

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508606

(P2005-508606A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 2 9
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 129 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-574306 (P2002-574306)	(71) 出願人	301005050 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 4・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) (22) 出願日	平成14年3月14日 (2002.3.14)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月10日 (2003.9.10)	(72) 発明者	ヒルマン、ジュニア・エル アメリカ合衆国カリフォルニア州94040 0・マウンテンビュー・#17・モンロー ドライブ 230
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007869		
(87) 国際公開番号	W02002/074913		
(87) 国際公開日	平成14年9月26日 (2002.9.26)		
(31) 優先権主張番号	60/276,857		
(32) 優先日	平成13年3月16日 (2001.3.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/285,489		
(32) 優先日	平成13年4月19日 (2001.4.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/285,556		
(32) 優先日	平成13年4月19日 (2001.4.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 核酸関連タンパク質

## (57) 【要約】

本発明は、ヒトの核酸関連タンパク質 (N A A P) および、N A A P を同定しコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明はまた、N A A P の異常発現に関連する疾患を、診断、治療または予防する方法をも提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の ( a ) 乃至 ( h ) からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

( a ) SEQ ID NO:1-26 ( 配列番号 1 乃至 26 ) からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド

( b ) SEQ ID NO:1-10、SEQ ID NO:13-15、SEQ ID NO:17-22、および SEQ ID NO:24-26 からなる群から選択した或るアミノ酸配列に対して少なくとも 90% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

( c ) SEQ ID NO:23 のアミノ酸配列に対して少なくとも 91% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

( d ) SEQ ID NO:16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 93% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

( e ) SEQ ID NO:11 のアミノ酸配列に対して少なくとも 94% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

( f ) SEQ ID NO:12 のアミノ酸配列に対して少なくとも 98% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

( g ) SEQ ID NO:1-26 からな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

( h ) SEQ ID NO:1-26 からな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原性断片

## 【請求項 2】

SEQ ID NO:1-26 からなる群から選択したアミノ酸配列を有する、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】

SEQ ID NO:27-52 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、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へ機能的に連結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。

## 【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有する遺伝形質転換体。

## 【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、

( a ) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項 1 のポリペプチドをコードする或るポリヌクレオチドへ機能的に連結されたプロモーター配列を持つ組換えポリヌクレオチドで形質転換される細胞を培養する過程と、

( b ) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程、とからなることを特徴とする方法。

## 【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-26 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

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 12】

10

20

30

40

50

以下の ( a ) 乃至 ( i ) からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

( a ) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

( b ) SEQ ID NO:27-36、SEQ ID NO:39-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも90%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

( c ) SEQ ID NO:37のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも94%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

( d ) SEQ ID NO:38のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも98%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

10

( e ) ( a ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

( f ) ( b ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

( g ) ( c ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

( h ) ( d ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

( i ) ( a ) 乃至 ( h ) のRNA等価物

【請求項13】

請求項12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持つ、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項14】

請求項12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、

20

( 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或る配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチド群を持つ或るプローブと前記サンプルとをハイブリダイズし、該プローブが、或るハイブリダイゼーション複合体が前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片群との間に形成される条件下で、前記標的ポリヌクレオチドへ特異的に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有無を検出し、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、とを含む方法。

【請求項15】

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14に記載の方法。

30

【請求項16】

請求項12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 ) 前記増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の有無を検出し、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、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項17】

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含むことを特徴とする組成物。

40

【請求項18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-26からな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17の組成物。

【請求項19】

機能的NAAPの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療を要する患者への請求項17の組成物の投与を含む治療方法。

【請求項20】

請求項1の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

50

ニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを有する或るサンプルを或る化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプルにおいて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スクリーニング方法。

【請求項21】

請求項20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組成物。

【請求項22】

機能的NAAPの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療を要する患者への請求項21の組成物の投与を含む治療方法。

10

【請求項23】

請求項1の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であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを有する或るサンプルを或る化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプルにおいて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スクリーニング方法。

【請求項24】

請求項23の方法で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有する組成物。

【請求項25】

機能的NAAPの過剰発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療を要する患者への請求項24の組成物の投与を含む治療方法。

20

【請求項26】

請求項1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) 請求項1に記載のポリペプチドを適切な諸条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、

(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27】

請求項1のポリペプチドの活性をモジュレート(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諸条件下で、請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、

(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。

30

【請求項28】

請求項5の配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変するのに効果的な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好適な諸条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを有する或るサンプルを或る化合物に曝露する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの、改変された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。

40

【請求項29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸群を有する或る生体サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

50

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸群と、請求項12のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続するヌクレオチド群を有する或るプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの或る標的ポリヌクレオチドとの間で或る特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される諸条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項12のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を有するポリヌクレオチドである、前記過程と、

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリダイゼーション複合体の量を、或る処理されていない生体サンプル中の前記ハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリダ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。

10

【請求項30】

生物学的サンプル中のNAAP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諸条件下で、前記生体サンプルを請求項11に記載の抗体と混合する過程と、

(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、前記生体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31】

請求項11の抗体であって、

(a) キメラ抗体

(b) 一本鎖抗体

(c) Fab断片

(d) F(ab')<sub>2</sub>断片

(e) ヒト化抗体、のいずれかであることを特徴とする抗体。

【請求項32】

請求項11に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを有する組成物。

【請求項33】

被検者におけるNAAPの発現に関連する症状又は疾患の診断方法であって、請求項32に記載の組成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。

20

30

【請求項34】

前記抗体が標識されることを特徴とする、請求項32に記載の組成物。

【請求項35】

被検者におけるNAAPの発現に関連する症状又は疾患の診断方法であって、請求項34に記載の組成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36】

請求項11の抗体の特異性を持つポリクローナル抗体を調製する方法であって、

(a) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列またはその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る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該ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する或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。

40

【請求項37】

請求項36の方法で産生したポリクローナル抗体。

【請求項38】

請求項37のポリクローナル抗体と好適なキャリアとを有する組成物。

【請求項39】

50

請求項11に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を作製する方法であって、

(a) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列またはその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から、抗体を産出する細胞を単離する過程と、

(c) 不死化した細胞と前記抗体産出細胞とを融合し、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) SEQ ID NO:1-26からな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モノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程、とを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項40】

請求項39に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項41】

請求項40に記載のモノクローナル抗体と適切なキャリアとを有する組成物。

【請求項42】

Fab発現ライブラリのスクリーニングによって前記抗体を産出することを特徴とする、請求項11に記載の抗体。

【請求項43】

組換え免疫グロブリンライブラリをスクリーニングすることにより産出されることを特徴とする、請求項11に記載の抗体。

20

【請求項44】

SEQ ID NO:1-26からな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サンプル中に検出する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、或るサンプルと共に請求項11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、SEQ ID NO:1-26からな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45】

30

SEQ ID NO:1-26 からな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との特異結合を許容する条件下で、或るサンプルと共に請求項11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、SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或る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とする方法。

【請求項46】

マイクロアレイの少なくとも1つのエレメントが請求項13に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項47】

40

ポリヌクレオチド群を有する或るサンプルの発現プロフィールを作製する方法であって、

(a) 該サンプルの該ポリヌクレオチド群を標識する過程と、

(b) ハイブリダイゼーション複合体の形成に適した諸条件下で請求項46のマイクロアレイのエレメント群をサンプルの標識されたポリヌクレオチド群と接触させる過程と、

(c) 該サンプル中の該ポリヌクレオチド群の発現を定量化する過程、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項48】

或る固体基板上の固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を有するアレイであって、少なくとも1つの前記ヌクレオチド分子が、或る標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチド群と特異的にハイブリダイズ可能な最初のオリゴヌクレ

50

オチドまたはポリヌクレオチド配列を含み、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項12に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

【請求項49】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項50】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的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に完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

10

【請求項51】

請求項48に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項52】

請求項48に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項53】

請求項48に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列を有するヌクレオチド分子にハイブリダイズした前記の標的ポリヌクレオチドを有することを特徴とするアレイ。

【請求項54】

請求項48に記載のアレイで、或るリンカーが少なくとも1つの前記のヌクレオチド分子と前記の固体基板とを連結していることを特徴とするアレイ。

20

【請求項55】

請求項48に記載のアレイで、該基板上的固有の物理的位置の各々が複数のヌクレオチド分子を含み、任意の単一の固有の物理的位置でのその複数のヌクレオチド分子は同一の配列を有し、該基板上的固有の物理的位置の各々は、該基板上的別の固有の物理的位置でのヌクレオチド分子群の配列とは異なる或る配列を有するヌクレオチド分子群を含むことを特徴とするアレイ。

【請求項56】

SEQ ID NO: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。

30

【請求項57】

SEQ ID NO: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58】

SEQ ID NO: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59】

SEQ ID NO: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60】

SEQ ID NO: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61】

SEQ ID NO: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。

40

【請求項62】

SEQ ID NO:7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63】

SEQ ID NO:8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64】

SEQ ID NO:9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65】

SEQ ID NO:10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66】

SEQ ID NO:11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。

50

- 【請求項 67】  
SEQ ID NO:12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 68】  
SEQ ID NO:13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 69】  
SEQ ID NO:14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 70】  
SEQ ID NO:15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 71】  
SEQ ID NO:16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。 10
- 【請求項 72】  
SEQ ID NO:17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 73】  
SEQ ID NO:18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 74】  
SEQ ID NO:19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 75】  
SEQ ID NO:20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 76】  
SEQ ID NO:21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。 20
- 【請求項 77】  
SEQ ID NO:22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 78】  
SEQ ID NO:23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 79】  
SEQ ID NO:24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 80】  
SEQ ID NO:25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 81】  
SEQ ID NO:26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。 30
- 【請求項 82】  
SEQ ID NO:27のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 83】  
SEQ ID NO:28のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 84】  
SEQ ID NO:29のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 85】  
SEQ ID NO:30のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 86】  
SEQ ID NO:31のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。 40
- 【請求項 87】  
SEQ ID NO:32のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 88】  
SEQ ID NO:33のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 89】  
SEQ ID NO:34のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 90】  
SEQ ID NO:35のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 91】  
SEQ ID NO:36のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。 50

## 【請求項 9 2】

SEQ ID NO:37のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 9 3】

SEQ ID NO:38のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 9 4】

SEQ ID NO:39のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 9 5】

SEQ ID NO:40のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 9 6】

SEQ ID NO:41のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 9 7】

SEQ ID NO:42のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 9 8】

SEQ ID NO:43のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 9 9】

SEQ ID NO:44のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 0 0】

SEQ ID NO:45のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 0 1】

SEQ ID NO:46のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

20

## 【請求項 1 0 2】

SEQ ID NO:47のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 0 3】

SEQ ID NO:48のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 0 4】

SEQ ID NO:49のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 0 5】

SEQ ID NO:50のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 0 6】

SEQ ID NO:51のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 1 0 7】

SEQ ID NO:52のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、核酸関連タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した、細胞増殖異常、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症性疾患の、診断・治療・予防に関する。本発明は更に、核酸関連タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列の発現における、外因性化合物の効果についての算定に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

多細胞生物は、構造及び機能が著しく異なる多様な細胞型を有する。細胞の個性は、特徴的な遺伝子発現パターンによって決定される。異なった細胞型は発生の間、重複するが異なる遺伝子群を発現する。遺伝子発現の空間的及び時間的な調節は、生物の発達に寄与する、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、及び他のプロセスの制御にとって極めて重要である。更に、遺伝子発現は、細胞外シグナルに応答して調節される。細胞外シグナルは、細胞間伝達を仲介し、様々な細胞型の作用を協調させる。適切な遺伝子調節はまた、細胞を効率よく機能させる。これを確実にするため、その機能が要求される遺伝子群のみが所定の時期に発現される。

50

## 【0003】

Znフィンガーは、システインリッチな、緻密に折りたたまれたタンパク質モチーフであり、この中で、特異的に位置するシステインが、また幾つの場合にはヒスチジンが、 $Zn^{+2}$ を配位する。数タイプのZnフィンガーモチーフが同定されている。Znフィンガーは、初めはDNAと直接相互作用する領域としてDNA結合タンパク質群において同定されたが、DNAと結合しない種々のタンパク質にも出現する (Lodish, H.他(1995) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York, NY, 447-451ページ)。例えばGalcheva-Gargova, Z. 他((1996) *Science* 272:1797-1802) は、種々のサイトカイン受容体と相互作用するZnフィンガー蛋白質群を同定している。

## 【0004】

RNAポリメラーゼ

転写というプロセスによって、DNA内にコードされる遺伝情報が、RNA内に書き写される。RNAポリメラーゼI、II、およびIIIは、転写のプロセスに関与する。RNAポリメラーゼIは、ヌクレオソームに局在する。また、28S、5.8S、および18S rRNAの前駆体の合成を担う。RNAポリメラーゼIIは、タンパク質をコードする遺伝子群を転写する。また、RNAスプライシングを担う小RNA群を産生する。RNAポリメラーゼIIIは核小体と連動して機能する。また、tRNA、5S rRNA、および一連の小さな安定性RNA群をコードする遺伝子群を転写する。

## 【0005】

タンパク質をコードする遺伝子群の、RNAポリメラーゼIIによる転写の開始は、mRNAの5'キャップに対応するDNA配列上でなされる。或る、高度に保存された、25~35塩基対DNA配列であるTATAボックスが、大抵の真核生物遺伝子においては転写開始点の上流の位置にある。TATAボックスの機能は、転写のプロモーターとして作用することである。RNAポリメラーゼIIと一連の転写因子(例えば転写因子TFIIAからTFIIH)とは、転写開始複合体を形成し、この複合体がTATAボックスプロモーター領域に結合する。この複合体の形成によって、RNAポリメラーゼIIが、転写の開始のために配置される。

## 【0006】

転写因子

転写調節タンパク質は、遺伝子発現の制御に必須である。これらのタンパク質の一部は転写因子として機能し、遺伝子の転写を開始、活性化、抑制し、または終了させる。転写因子は一般に遺伝子の、プロモーター、エンハンサー、および上流調節領域に、配列特異的に結合する(ただし、一部の因子は遺伝子のコード領域内またはその下流の調節エレメントに結合する)。転写因子はDNAの特定の領域に単独で結合するか、または他のアクセサリ因子との複合体として結合する(概説はLewin, B. (1990) *Genes IV*, Oxford University Press, New York, NY, およびCell Press, Cambridge, MA, 554-570ページを参照)。

## 【0007】

DNAの2重らせん構造とリピート配列群とがトポロジックおよび化学的な特徴を生み出し、これらの特徴は転写因子によって認識され得る。これらの特徴とは、水素結合の供与基と受容基、疎水性パッチ、主溝と副溝、および、配列の規則的な繰り返しストレッチ群(repeated stretches: ヘリックス内に明確な折れ曲がり群を誘導)である。通常、転写因子が特異的に認識するDNA配列モチーフ群は、約20ヌクレオチドの長さである。複数の、隣接した転写因子結合モチーフ群が遺伝子調節に必要な場合もある。

## 【0008】

多くの転写因子は、DNA結合の構造的モチーフ群を組み込んでいる。これらのモチーフはヘリックスまたはシートからなり、DNAの主溝に結合する。4種の良く特徴付けられた構造的モチーフが、ヘリックス・ターン・ヘリックス、Znフィンガー、ロイシン・ジッパー、およびヘリックス・ループ・ヘリックスである。これらのモチーフを持つタンパク質は、単独で単量体として作用して、または、ホモ2量体やヘテロ2量体を形成してDNAと相互作用する。

10

20

30

40

50

## 【0009】

NF- $\kappa$ B/Relシグネチャによって、或る真核生物転写因子ファミリーが定義される。これらの転写因子群は、発癌や、胚の発生、分化、および免疫応答に關与する。Rel 相同性ドメイン(RHD)を持つ殆どの転写因子は、2量体として、コンセンサスDNA配列モチーフである  $\kappa$ Bと結合する。Rel ファミリーのメンバーは、高度に保存された300アミノ酸ドメインである Rel 相同性ドメインを共有する。特徴的な Rel のC末端は、遺伝子活性化機能と細胞質固着機能とに關わる。RHDドメインを持つことが知られるタンパク質の例には、脊椎動物核因子NF- $\kappa$ B (或るDNA結合サブユニットと転写因子p65とのヘテロ2量体)、哺乳類転写因子RelB、および脊椎動物プロト癌遺伝子c-relがあり、c-relは、分化とリンパ球新生とに關わるタンパク質である (Kabrun, N., および Enrietto, P.J. (1994) *Semin. Cancer Biol.* 5:103-112)。

10

## 【0010】

CBFA1遺伝子は、1種の骨芽細胞特異的転写因子をコードする。これは骨芽細胞分化を調節する。或るアイソフォーム (マウスに觀察され呼称はCbfa1/Osf2アイソフォーム) は、或る上流エキソン (呼称はエキソン1) によってコードされる5'配列を含む。このエキソンはマウス、ラット、およびヒトにおいて高度に保存されている。マウスN末端Osf2配列は、CBFA1遺伝子産物の機能に必須でない (Xiao, Z.S. 他(1998) *Gene* 214:187-197)。

## 【0011】

イロコイ (Iroquois) ホメオボックス遺伝子ファミリーは、神経形成 (神経発生) に關わると思われている。マウス アフリカツメガエル イロコイホメオボックス (Irx) 遺伝子群であって異なる空間時間的パターン群を神経形成時に伴って発現される遺伝子としては、Irx1、Irx2、Irx3、Irx5およびIrx6を含む。Mash1は、Irxタンパク質の推定上の標的遺伝子である (Cohen, D. R. 他(2000) *Mech. Dev.* 91:317-321)。Irx4欠損マウスは、心筋症を発症する。この心筋症の特徴は、心肥大と、障害性の収縮機能とである (Bruneau, B. G. 他(2001) *Mol. Cell Biol.* 21(5):1730-1736)。

20

## 【0012】

ヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフは2つのヘリックスからなり、これらは、決まった角度で、アミノ酸群の或る短鎖によって接続されている。一方のヘリックスが、主溝に結合する。ヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフの1例はホメオボックス・モチーフであり、これはホメオドメイン蛋白質に在る。ホメオドメイン蛋白質は発生期に前後体軸 (anterior-posterior body axis) を決めるのに重要であり、動物界全体で保存されている。キイロショウジョウバエのアンテナペディアタンパク質とウルトラバイソラックスタンパク質とは、原型のホメオドメインタンパク質である (Pabo, C.O. および R. T. Sauer (1992) *Ann. Rev. Biochem.* 61:1053-1095)。

30

## 【0013】

Znフィンガーモチーフは亜鉛イオンに結合する。このモチーフは一般に、周期的に配置されたシステイン残基とヒスチジン残基からなる約30アミノ酸のタンデムリピート群を持つ。この配列パターンの例としては、C2H2タイプ、C4タイプおよびC3HC4タイプ (「RING」フィンガー) のZnフィンガー群、並びにPHDドメインが挙げられる (Lewin, 前出; Aasland, R., 他(1995) *Trends Biochem. Sci.* 20:56 - 59)。Znフィンガータンパク質の各々が1つの逆平行シート及び1つのヘリックスを持ち、それらの近接性とコンフォメーションとは、亜鉛イオンによって維持されている。DNAとの接触は、ヘリックスの前のアルギニン残基によって、並びに、ヘリックスの第2の残基、第3の残基、及び第6の残基によってなされる。タンパク質の各ZnフィンガーのヘリックスがDNA2重らせんの主溝と接触できるように、Znフィンガーモチーフはそのタンパク質内にタンデム型にリピートされ得る。この、タンパク質とDNAとの間の接触の繰り返しによって、強力且つ特異的なDNA-タンパク質相互作用が起こる。この相互作用の強度及び特異性は、タンパク質内のZnフィンガーモチーフの数によって調節され得る。

40

## 【0014】

マウスZic遺伝子群は、成体脳の小脳内でのみ発現されるZnフィンガー (Zf) タンパク質

50

群をコードする。Zic遺伝子群は、ショウジョウバエのペアルール遺伝子であるodd-paired (opa)の脊椎動物相同体である。Zic遺伝子としては、Zic1、Zic2、Zic3、およびZic4を含む。Zic4遺伝子は、他のZic遺伝子群と協同的に、小脳の発生時に働く (Aruga, J. 他 (1996) Gene 172:291-294)。

#### 【 0 0 1 5 】

細胞性プロトオンコジーンであるMYCがコードする或る核内転写因子は、重要な細胞機能の調節に関与する。この細胞機能としては、細胞周期進行、分化、およびアポトーシスを含む。調節不全なMYC発現は、種々のタイプの悪性腫瘍の発症に重大な意味を持つようなので、MYC発現の調節に関わる因子群も、幾つかの癌の発生機序において主要な役割を果たしうる。このようなMYC調節因子の1種であるCTCFは、高度に保存された11-Znフィンガー転写因子である。CTCFはヒトMYCオンコジーンの5'非翻訳配列内の多数の調節領域に結合する。また、その翻訳を調節できる (Filippova, G.N. 他 (1998) Genes Chromosomes Cancer 22:26-36)。

10

#### 【 0 0 1 6 】

ロイシンジッパーモチーフは、ロイシンに富むアミノ酸群の或るストレッチを有し、これは両親媒性のヘリックスを形成できる。この構造は、2つのロイシンジッパー蛋白質の2量体化のための基盤を提供する。ロイシンジッパーに隣接する領域は通常は塩基性であり、タンパク質二量体化すると、主溝に結合するのに最適であるように配置される。このようなモチーフを持つタンパク質を総称してbZIP転写因子と呼ぶ。ロイシンジッパーモチーフはプロトオンコジーンであるFosとJunとに見られる。FosとJunとはヘテロ2量体転写因子であるAP1を構成する。AP1は、細胞成長と、細胞系統の決定とに関わる (Papavassiliou, A.G. (1995) N. Engl. J. Med. 332:45-47)。

20

#### 【 0 0 1 7 】

ヘリックス・ループ・ヘリックス・モチーフ (HLH) は1つの短いヘリックスと、これが1つのループによって接続された長いヘリックスとからなる。このループは柔軟なので、2本のヘリックスは、互いに対して折れ曲がることができ、DNAに結合できる。オンコジーンであるMycは転写因子であり、細胞増殖に必要な遺伝子群を活性化する。Mycは原型的なHLHモチーフを持つ。

#### 【 0 0 1 8 】

殆どの転写因子には特徴的なDNA結合モチーフがあり、上記モチーフ群の種々の変異と新規のモチーフ群とが、これまでに、また現在も特徴付けられている (Faisst, S. および S. Meyer (1992) Nucl. Acids Res. 20:3-26)。これらモチーフの内には、フォークヘッドモチーフを含む。フォークヘッドが見られる転写因子群は、発生と発癌とに関わる (Hacker, U. 他 (1995) EMBO J. 14:5306-5317)。

30

#### 【 0 0 1 9 】

##### クロマチン関連タンパク質

核内で、DNAはクロマチンに詰められる。クロマチンはコンパクトな構成であり、DNAの、転写因子への到達可能性を制限し、遺伝子調節において主要な役割を果たす (前出Lewin, 409-410ページ)。クロマチンのコンパクトな構造は、クロマチン関連タンパク質によって決定され影響される。このようなタンパク質としては、ヒストン、高移動度群 (HMG) タンパク質、ヘリカーゼ、およびクロモドメインタンパク質がある。5種のクラスのヒストン、H1、H2A、H2B、H3およびH4があり、全ては高度に塩基性の低分子量タンパク質である。クロマチンの基盤ユニットであるヌクレオソームには、200塩基対のDNAと、H2A、H2B、H3およびH4それぞれ2つずつのコピーとがある。H1は、隣接ヌクレオソーム群を連結する。HMGタンパク質は、低分子量の非ヒストン蛋白質であり、DNAを巻き戻すことと、一本鎖DNAを安定させることにおいて役割を果たすと思われる。ヘリカーゼはDNA依存的ATPアーゼであり、DNAを巻き戻し、転写因子へのアクセスを可能にする。クロモドメイン蛋白質は、高度にコンパクト化されたヘテロクロマチンの形成において重要な役割を果たし、ヘテロクロマチンは転写的にはサイレント (不活動) である。

40

#### 【 0 0 2 0 】

50

C2H2タイプのZnフィンガーシグネチャモチーフには、或る28アミノ酸の配列があり、この配列には、2つの保存されたCys残基、および2つの保存されたHis残基が、或るC-2-C-12-H-3-Hタイプのモチーフ内に含まれる。C2H2型モチーフは一般に、多重タンデムリピートで出現する。或るシステインリッチドメインであってモチーフAsp-His-His-Cysを含むドメイン(DHHC-CRD)が、固有サブグループのZnフィンガープロテインとして同定されている。DHHC-CRD領域は、成長と発達とに關与すると思われる。或るDHHC-CRD突然変異体は、Rasの機能欠損を示す。Rasは小さな膜結合型GTP結合タンパク質であり、細胞の成長と分化とを調節する。一方、他のDHHC-CRDタンパク質類は、おそらくRasとは無関係の経路群で機能する(Bartels, D.J. 他(1999) Mol.Cell Biol. 19:6775-6787)。

#### 【0021】

SCANDメインは、高度に保存されたロイシンリッチモチーフであり、約60アミノ酸からなり、Znフィンガー転写因子のアミノ末端に見られる。SCANDメインは、最も多くはC2H2 Znフィンガーモチーフに連結しており、この連結は、それらのカルボキシル末端を通じてなされる。生化学的な結合研究は、SCANDメインを選択的なヘテロおよびホモタイプのオリゴマー化ドメインとして確定している。SCANDメインが媒介するタンパク質複合体は、転写因子の生物学的機能を変調させるよう機能するようである(Schumacher, C. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:17173-17179)。

#### 【0022】

KRAB (Kruppel-associated box)ドメインは、保存されたアミノ酸配列であって約75アミノ酸にまたがる。KRABドメインは、C2H2 Znフィンガーをコードする300~700種の遺伝子のほぼ3分の1に見られる。KRABドメインは、一般に2つのエキソンによってコードされる。KRAB-A領域またはボックスが1つのエキソンによってコードされ、KRAB-B領域またはボックスが第2エキソンによってコードされる。KRABドメインの機能は、転写の抑制である。転写抑制を達成するため、KRAB-associated protein-1(1種の転写コリプレッサー)またはKRAB-A相互作用タンパク質のどちらかが動員される。KRABドメインを持つタンパク質は、発生期に調節的な役割を果たすようである(Williams, A.J. 他(1999) Mol.Cell Biol. 19:8526-8535)。

#### 【0023】

C4モチーフは、ホルモン調節されるタンパク質に見られる。C4モチーフは一般に、唯2つのリピートのみを持つ。多数の真核生物タンパク質およびウイルス蛋白質には、或る保存されたシステインリッチドメインがあり、これは40~60残基からなり、C3HC4 ZnフィンガーまたはRINGフィンガーと呼ばれる。このドメインは亜鉛2原子と結合する。また、おそらくタンパク質間相互作用の仲介に關与する。亜鉛ライゲーション系の3次元の「十字(cross-brace)」構造は、RINGドメイン独自のものである。このようなドメイン内のシステイン群の間隔は、C-x(2)-C-x(9~39)-C-x(1~3)-H-x(2~3)-C-x(2)-C-x(4~48)-C-x(2)-Cである。

#### 【0024】

PHDフィンガーは、或るC4HC3 Znフィンガー様モチーフであって核タンパク質に見られ、これらの核タンパク質はクロマチンが媒介する転写調節に關与すると思われる。転写調節タンパク質は遺伝子発現の制御を、遺伝子転写を活性化または抑制して行う。転写因子は一般に遺伝子の調節領域に、配列特異的に結合する。通常は、プロモーターまたはエンハンサー領域(コード配列の上流)内に結合する。転写因子は、トポロジー的および化学的特徴を認識する。これら特徴とは、水素結合の供与基と受容基、疎水性パッチ、主溝と副溝、および、配列の規則的な反復ストレッチ群(repeated stretches: ヘリックス内に明確な折れ曲がり群を誘導)である。複数の、隣接した転写因子結合モチーフ群が遺伝子調節に必要な場合もある(概説は Lewin, B. (1990) Genes IV, Oxford University Press, New York, NY, 554-570ページを参照)。

#### 【0025】

GATAタイプの転写因子には1つまたは2つのZnフィンガードメインが含まれ、DNAの、連続したヌクレオチド配列であるGATAを有する領域に特異結合する。Znフィンガードメイ

10

20

30

40

50

ンコンセンサス配列はC-X(2)-C-X(4,8)-W-X(9,10)-C-X(2)-Cであり、ここでXは任意のアミノ酸であり、括弧内の数は、その領域内のアミノ酸の数の範囲を示す。NMR研究の示すところでは、このZnフィンガーには2枚の不規則な逆平行シートと1つのヘリックスとがあり、続いて、フィンガーのC末端までの長いループがある(Ominchinski, J.G. (1993) *Science* 261:438-446)。このヘリックスと、2枚のシートを接続するループとがDNAの主溝と接触し、一方、C末端部(結合の特性を決める部位)は、副溝内に巻き付きながら入り込む(wraps around into the minor groove)。

#### 【0026】

##### 遺伝子調節に関連する疾患および障害

ヒトにおける腫瘍疾患(neoplastic disorders)の多くは、不適切な遺伝子発現によって起こり得る。悪性の細胞成長は、腫瘍促進遺伝子の過剰な発現又は、腫瘍抑制遺伝子の不十分な発現によって起こり得る(Cleary, M. L. (1992) *Cancer Surv.* 15:89-104)。染色体転座によっても、或る遺伝子のコード配列を別の無関係遺伝子の調節領域と融合させる、キメラ座(chimeric loci)が生成され得る。このような編成は、おそらく不適切な遺伝子転写を引き起こし、悪性腫瘍を引き起こす可能性もある。臨床的に関連するZnフィンガー蛋白質の一つがWT1であるが、これはウィルムス腫瘍を持つ子供において不活性化されている腫瘍抑制タンパク質である。大細胞リンパ腫で重要な役割を果たすオンコジーンbcl-6もZnフィンガー蛋白質である(Papavassiliou, A.G. (1995) *N. Engl. J. Med.* 332:45-47)。染色体転座によっても、或る転写調節因子のコード配列を第2の無関係遺伝子の調節領域と融合させる、キメラ座(chimeric loci)が生成され得る。例えばバーキット型リンパ腫(Burkitt's lymphoma)では、転写因子Mycが免疫グロブリン重鎖遺伝子座に転座され、Myc発現を大きく増強し、急速な細胞成長を生じて白血病をもたらす(Latcman, D. S. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:28-33)。

#### 【0027】

更に、免疫系は、細胞防御機構の漸進的な選択、増幅、及び動員を調整するイベントのカスケードを活性化することにより、感染や外傷に応答する。遺伝子の活性化及び抑制の複雑かつバランスの取れたプログラムが、このプロセスに参与している。しかしながら、遺伝子発現の不適切或いは不十分な調節によって起こる免疫系の活動過多は、組織や器官に相当な損傷を与え得る。この損傷は、関節炎、アレルギー、心臓発作、卒中、及び感染に関連する免疫応答についての文献に詳しく記載されている(Isselbacher 他 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第13版, McGraw Hill, Inc. および Teton Data Systems Software, 1996)。自己免疫性多腺性内分泌不全症カンジダ症外胚葉性ジストロフィ(APECED)の原因遺伝子が最近単離され、2つのPHDタイプZnフィンガーモチーフを持つ或るタンパク質をコードすることが見出された(Bjorses, P. 他(1998) *Hum. Mol. Genet.* 7:2007-1553)。

#### 【0028】

更に、多細胞生物の産生は発生の適切な段階における細胞分化の誘導及び調整に基づいている。このプロセスの中心は、全身の細胞及び組織に固有性を与える差次的な遺伝子発現である。発生中に遺伝子発現の調節に失敗すると発達障害が起こり得る。Znフィンガー型転写調節因子の突然変異に起因するヒトの発達障害には以下が含まれる。泌尿生殖器の発生異常(WT1に関連); Greig頭蓋・多合指趾症候群(cephalopolysyndactyly)、Pallister-Hall症候群、および軸後性多指症(postaxial polydactyly)タイプA(GLI3に関連); 並びに、肛門、腎臓、手足および耳の異常を特徴とするTownes-Brocks症候群(SALL1に関連)である(Engelkamp, D. および van Heyningen, V. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:334-342; Kohlhase, J. 他(1999) *Am. J. Hum. Genet.* 64:435-445)。

#### 【0029】

##### 発現プロファイル作成

アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子または無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する、簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときには、アレイを用いて、或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファ

イルを試験するときは、アレイは次のような遺伝子を同定するプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、毒性アッセイにおいてテストされる物質に影響されるか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、ハウスキーピング機能を実行するか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの同定である。

#### 【0030】

新規の核酸関連タンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチド群の発見により、新規の組成物群を提供することで、当分野の要望に応えることができる。これら新規の組成物は、細胞増殖異常、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症疾患の、診断・治療・予防において有用であり、また、核酸関連タンパク質の核酸配列および

10

#### 【発明の開示】

#### 【発明の効果】

#### 【0031】

本発明は、総称して「NAAP」、個別には各々「NAAP-1」、「NAAP-2」、「NAAP-3」、「NAAP-4」、「NAAP-5」、「NAAP-6」、「NAAP-7」、「NAAP-8」、「NAAP-9」、「NAAP-10」、「NAAP-11」、「NAAP-12」、「NAAP-13」、「NAAP-14」、「NAAP-15」、「NAAP-16」、「NAAP-17」、「NAAP-18」、「NAAP-19」、「NAAP-20」、「NAAP-21」、「NAAP-22」、「NAAP-23」、「NAAP-24」、「NAAP-25」、および「NAAP-26」と呼ぶ、核酸関連タンパク質である、精製されたポリペプチドを提供する。或る態様において本発明は、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した、単離されたポリペプチドを提供する。1実施例で本発明は、SEQ ID NO:1-26のアミノ酸配列を持つ、単離されたポリペプチドを提供する。

20

#### 【0032】

また、本発明は(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ或る天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリヌクレオチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或る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を提供する。1実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或る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SEQ ID NO:27-52からなる群から選択される。

30

#### 【0033】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或る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、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を持つ組換えポリヌクレオチドを提供する。1実施態様で本発明は、この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。別の実施態様で本発明は、この組換えポリヌクレオチドを持つ遺伝形質転換体を提供する。

40

#### 【0034】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つ

50

ポリペプチドと、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%以上の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチドと、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片と、(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、とからなる群から選択したポリペプチドを製造する一方法を提供する。製造方法は、(a) 或る細胞を該ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、この細胞を組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換する過程と、(b) そのように発現したポリペプチドを回収する過程からなる。この組換えポリヌクレオチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対し機能的に連結したプロモーター配列を持つ。

**【0035】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドに特異結合する、単離された抗体を提供する。

**【0036】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド、(d) (b) に相補的なポリヌクレオチド、および(e) (a) ~ (d) のRNA等価物、からなる群から選択した、単離されたポリヌクレオチドを提供する。1実施態様で該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群からなる。

**【0037】**

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一方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(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、および(e) (a) ~ (d) のRNA等価物、からなる群から選択した、或るポリヌクレオチドの配列を持つ。検出方法は、(a) サンプル中の上記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなる或る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) 該ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、複合体が存在すればオプションでその量を検出する過程からなる。該プローブと該標的ポリヌクレオチドあるいはその断片と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、該標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする。1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群からなる。

**【0038】**

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) SEQ ID NO:27-52からな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、(b) SEQ ID NO:27-52からな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を含むポリヌクレオチド、(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、および(e) (a) ~ (d) のRNA等価物、からなる群から選択された配列のポリヌクレオチドを有する。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) 増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の有無を検出し、

10

20

30

40

50

該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在すればオプションでその量を検出する過程からなる。

【0039】

本発明は更に、或る有効量のポリペプチドと薬物として許容し得る或る賦形剤とからなる、或る組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択される。1実施態様では、この組成物はSEQ ID NO:1-26からなる一群から選択されたアミノ酸配列を持つ。更に、本発明は、機能的NAAPの発現の低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者への、この組成物の投与を含む方法を提供する。

10

【0040】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した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、或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) 該ポリペプチドを有するサンプルを或る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からなる。別法では、本発明は、この方法で同定したアゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤とを有する、或る組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的NAAPの発現の低下を伴う疾患や症状の治療を要する患者への、この組成物の投与方法を提供する。

20

【0041】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性につき、或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) 該ポリペプチドを含むサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。或いは本発明は、この方法で同定したアンタゴニスト化合物と薬物として許容し得る賦形剤とを有する組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的NAAPの過剰な発現に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者へのこの組成物の投与を含む方法を提供する。

30

【0042】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドに特異結合する或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) 該ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に混合させる過程と、(b) この試験化合物と該ポリペプチドとの結合を検出し、それにより該ポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程からなる。

40

50

## 【0043】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択したアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-26からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドの活性をモジュレートする或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) 該ポリペプチドの活性にとり許容し得る条件下で、該ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、(b) 該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の不存在下での該ポリペプチドの活性と比較する過程からなり、この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性の変化は、該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物を標示する。

10

## 【0044】

更に本発明は、SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変する効果につき、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a) この標的ポリヌクレオチドを有するサンプルを或る化合物に曝露する過程と、(b) この標的ポリヌクレオチドの発現の改変を検出する過程と、(c) 可変量のこの化合物の存在下でのこの標的ポリヌクレオチドの発現と、この化合物の不在下での発現とを比較する過程とからなる。

20

## 【0045】

本発明は更に、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。この方法には、以下の過程がある。(a) 核酸群を有する生体サンプルを試験化合物で処理する過程。(b) 処理済み生体サンプルの核酸群をハイブリダイズする過程。この過程には、次のようなプローブを用いる。(i) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii) (i) に相補的な配列を持つポリヌクレオチド、(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、からなる群から選択した或る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群からなるプローブである。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生体サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間に特異的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生じる。上記標的ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:27-52からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii) (i) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(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、からなる群から選択する。あるいは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i) ~ (v) からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片を持つ。毒性の算定方法には更に、以下の過程がある。(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) 処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程である。処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量の差異が、試験化合物の毒性を示す。

30

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0046】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列およ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、材料および方法に本発明が限定されるものではなく、修正され得るこ

50

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態様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。

【0047】

請求の範囲および明細書中で用いている単数形の「或る」および「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を指す場合もあることに注意されたい。したがって、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、および、当業者に公知の抗体の等価物などについても言及している。

【0048】

本明細書中で用いる全ての技術用語および科学用語は、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、材料およ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して用い得る、細胞株、プロトコル、試薬およびベクターについて説明およ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。

【0049】

(定義)

用語「NAAP」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など任意の供給源からの、全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、ネズミ、ウマ及びヒトを含む哺乳動物)から得られる実質的に精製されたNAAPのアミノ酸配列を指す。

【0050】

用語「アゴニスト」は、NAAPの生物学的活性を強化または模倣する分子を指す。アゴニストの例としては、NAAPと直接相互作用することによって、或いはNAAPが関与する生物学的経路の構成成分に作用することによってNAAPの活性を調節する、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や組成物を含みうる。

【0051】

用語「対立遺伝子変異体」は、NAAPをコードする別の形の遺伝子を指す。対立遺伝子変異体群は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から生じ得る他、変容したmRNA群を生じ得る。また、生じ得るポリペプチドの構造または機能は、変容することもしないこともある。或る遺伝子は、その天然型の対立遺伝子変異体を全く持たない場合もあり、1個以上持つこともある。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一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加または置換による。これら各種の変化は、単独であるいは他の変化と共に、或る配列内で1回以上、生じ得る。

【0052】

NAAPをコードする「変容した/改変された」核酸配列としては、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換を持つ結果、NAAPと同一のポリペプチドを、或いは、NAAPの機能的特徴の少なくとも1つを備えるポリペプチドを生じる配列を含む。この定義には、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列にとり正常な染色体の遺伝子座ではない位置での、対立遺伝子変異体群への不適當あるいは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、NAAPをコードするポリヌクレオチドの或る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なあるいは検出困難な多型性を含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じた結果、機能的に等価なNAAPとなるような、アミノ酸残基の欠失、挿入または置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的あるいは免疫学的にNAAPの活性が保持される範囲で、残基群の、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性についての、類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸およ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およびアルギニンがある。親水性値が近似した非荷電極性

10

20

30

40

50

側鎖を持つアミノ酸としては、アスパラギンとグルタミン、およびセリンとトレオニンを含みうる。親水性値が近似した非荷電側鎖を持つアミノ酸としては、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、およびフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

【0053】

用語「アミノ酸」および「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、あるいはそれらのいずれかの断片を指し、天然分子または合成分子を指す。「アミノ酸配列」が或る天然タンパク質分子の配列を指す場合、「アミノ酸配列」および類似の用語は、記載したそのタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0054】

用語「増幅」は、或る核酸配列の付加的複製物を作製する行為に関する。増幅には通常、当業者に公知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いる。

【0055】

用語「アンタゴニスト」は、NAAPの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子を指す。アンタゴニストとしては、NAAPと直接に相互作用するか或いはNAAPが関与する生物学的経路の諸成分に作用してNAAPの活性を調節する、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0056】

用語「抗体」は、エピトープの決定基と結合できる、無傷の免疫グロブリン分子やそれらの断片、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片を指す。NAAPポリペプチド群と結合する抗体類の作製には、免疫抗原として、無傷ポリペプチド群を用いることができ、または、当該の小ペプチド群を有する断片群を用い得る。マウス、ラット、ウサギなどの動物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の由来は、RNAの翻訳の場合や、または化学合成があり得る。また、それらは所望により、キャリアタンパク質に抱合し得る。通常用いられるキャリアであってペプチドと化学結合するキャリアの例は、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン、および、スカシガイのヘモシアニン(KLH)などがある。結合したこのペプチドは、前記動物を免疫化するために用いる。

【0057】

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する、分子の領域(すなわちエピトープ)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発し得る。或る抗原決定基は、或る抗体への結合について、無傷抗原(すなわち免疫応答を引き出すために用いられる免疫原)と競合し得る。

【0058】

用語「アプタマー(apptamer)」は、核酸またはオリゴヌクレオチド分子であって、特定の分子ターゲットに結合する分子を指す。アプタマーは*in vitro*での進化プロセスに由来する(例えば、SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの略、試験管内選択法)、米国特許第5,270,163号に記述)。これは、大規模な組合せライブラリ群から標的特異的アプタマー配列を選択するプロセスである。アプタマー組成は二本鎖または一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーの各ヌクレオチド成分は修飾された糖基を持つことがあり(例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基は2'-Fまたは2'-NH<sub>2</sub>によって置換され得る)、これは、ヌクレアーゼへの抵抗性または血中でのより長い寿命など、所望の特性を向上し得る。アプタマーを他の分子(例えば高分子量のキャリア)に抱合させることにより、循環系からのこのアプタマーのクリアランスを遅らせ得る。アプタマー類は、例えば或る架橋剤の光活性化によって、それらの同種リガンド群と特異的に架橋させ得る(例えば、Brody, E.N.およびL. Gold(2000) J. Biotechnol. 74:5-13を参照)。

【0059】

用語「イントラマー(intramer)」は、*in vivo*で発現されるアプタマーを指す。例え

10

20

30

40

50

ば、ワクシニアウイルスに基づく或るRNA発現系を用いて、白血球の細胞質内で特定のRNAアプタマー類が高レベルに発現されている (Blind, M.他(1999) Proc.Natl Acad. Sci. U SA 96:3606-3610)。

【0060】

用語「スピーゲルマー (spiegelmer)」は、アプタマーの内、L-DNA、L-RNAなどの左旋性ヌクレオチド誘導体または左旋性ヌクレオチド様分子などを指す。左旋性のヌクレオチド群を持つアプタマー類は、右旋性ヌクレオチド群を持つ基質に通常は作用する、天然酵素類による分解に対して耐性がある。

【0061】

用語「アンチセンス」は、或る特定の核酸配列の「センス」(コーディング)鎖との塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス組成物としては、DNAや、RNAや、ペプチド核酸 (PNA) や、修飾されたバックボーン連結たとえばホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸などを有するオリゴヌクレオチドや、修飾された糖基たとえば2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などを有するオリゴヌクレオチドや、あるいは修飾された塩基たとえば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などを有するオリゴヌクレオチドがあり得る。アンチセンス分子は、化学合成または転写など、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、細胞に導入されると、細胞が産生した天然核酸配列との塩基対を形成し、二重鎖を形成して転写または翻訳を妨害する。「負」または「マイナス」という表現は、或る参考DNA分子のアンチセンス鎖を指すことがあり、「正」または「プラス」という表現は、或る参考DNA分子のセンス鎖を意味し得る。

【0062】

用語「生物学的に活性」は、或る天然分子の構造的、調節的、あるいは生化学的な機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のNAAP、合成NAAP、またはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞内の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

【0063】

「相補」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、「5'-AGT-3'」は、その相補配列「3'-TCA-5'」との対を形成する。

【0064】

「~のポリヌクレオチド配列を含む(持つ)組成物」または「~のアミノ酸配列を含む(持つ)組成物」は、広い意味で、指定のポリヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を持つ、任意の組成物を指す。この組成物には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。NAAPをコード、若しくはNAAPの断片をコードするポリヌクレオチド配列を持つ組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。これらプローブは、凍結乾燥形態で貯蔵でき、また、糖質などの安定化剤と結合させ得る。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)および他の成分(例えばデンハート液、粉乳、サケ精子DNAなど)を有する水溶液中に、プローブを分散させ得る。

【0065】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を除くためにDNA配列解析を繰り返し行い、XL-PCRキット (Applied Biosystems, Foster City CA) を用いて5'および/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGELVIEW断片構築システム (GCG, Madison, WI) またはPhrap (University of Washington, Seattle WA) などの断片構築用コンピュータプログラムを用いて1つあるいはそれ以上のオーバーラップするcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長および構築の両方を行ってコンセンサス配列を産生した配列もある。

【0066】

「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えないと予測される置換を指す。すなわち、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存され、置換によって大き

くは変わらない。下表は、タンパク質内で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸であり、保存的アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示す。

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	10
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	20
Tyr	His, Phe, Trp	
Val	Ile, Leu, Thr	

#### 【0067】

保存的な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、および/または(c)側鎖の大部分、を保持する。

#### 【0068】

「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列内の变化、あるいは1個以上のヌクレオチドが欠如するヌクレオチド配列内の变化を指す。 30

#### 【0069】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。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、次のようなプロセスによって修飾されたポリペプチドである。すなわち、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、あるいは任意の同様なプロセスであって、誘導元のポリペプチドの少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持するプロセスである。 40

#### 【0070】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を発生し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合あるいは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

#### 【0071】

「差次的発現」は、少なくとも2例のサンプルを比較して判定する、増加(上方調節)、あるいは減少(下方調節)、または欠損した、遺伝子またはタンパク質の発現を指す。このような比較は例えば、処理済サンプルと不処理サンプル、または病態サンプルと健康サンプルとの間で行われ得る。

#### 【0072】

「エキソンシャッフリング」は、異なるコード領域(エキソン)群の組換えを意味する 50

。或るエキソンは、コードするタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャー群の新たな組合せによって新規のタンパク質群を構築することが可能であり、新たなタンパク質機能の進化を促進できる。

#### 【0073】

「断片」は、NAAPの又はNAAPをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列 (parent sequence) と配列は同一であるが親配列より長さが短いものを指す。或る断片は、定義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、あるいはその他の目的のために用いられる或る断片は、少なくとも長さ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あるいはアミノ酸残基であり得る。断片は、或る分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、或るポリペプチド断片は、定義された或る配列内に見られるような或るポリペプチドの最初の250または500アミノ酸 (または最初の25%または50%) から選択した、或る長さの連続したアミノ酸を持ち得る。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、本発明の実施態様では、配列表、表および図面を含む本明細書が支持する任意の長さであり得る。

10

#### 【0074】

SEQ ID NO:27-52の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:27-52を特異的に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を持つ。SEQ ID NO:27-52の或る断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:27-52を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:27-52の或る断片の正確な長さは、また、その断片が対応するSEQ ID NO:27-52の領域は、その断片に意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定し得る。

20

#### 【0075】

SEQ ID NO:1-26の或る断片は、SEQ ID NO:27-52の或る断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-26の或る断片は、SEQ ID NO:1-26を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を持つ。例えば、SEQ ID NO:1-26の或る断片は、SEQ ID NO:1-26を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-26の或る断片の正確な長さは、また、この断片が対応するSEQ ID NO:1-26の領域は、その断片に意図する目的に基づき、当業者が慣例的に判定し得る。

30

#### 【0076】

「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) と、それに続く1オープンリーディングフレームおよび翻訳終止コドンを有する配列である。或る「完全長」ポリヌクレオチド配列は、或る「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

#### 【0077】

「相同性」は、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、配列類似性、互換性、または配列同一性を意味する。

#### 【0078】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「~%同一」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、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。標準化アルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するため、標準化された再現性のある方法で比較対象の2配列内にギャップ群を挿入し得るので、2つの配列をより有意に比較できる。

40

#### 【0079】

ポリヌクレオチド配列間の一致率を判定するには、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムなどに組み込まれているCLUSTAL Vアルゴリズムの、デフォルトのパラメータ群を用い得る。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ (一組の分子生物学的分析プログラム) (DNASTAR, Madison WI) の一部である。このCLUSTAL Vは

50

、Higgins, D.G.およびP.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定される。「weighted」残基重み付け表がデフォルトで選択される。CLUSTAL Vによる一致率の報告は、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「percent similarity (類似性パーセント)」としてなされる。

#### 【0080】

あるいは、米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) が、一般的に用いられ、且つ、無料で利用可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。BLASTアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBIおよびインターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) から入手可能である。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と、様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールも入手可能であり、これは2つのヌクレオチド配列を直接のペアワイズで比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして、対話形式で利用できる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn および blastp (以下に記載) の両方に用い得る。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ (gap) などのパラメータをデフォルト設定にセットして用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.12 (2000年4月21日) を用いてblastnを実行し得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

#### 【0081】

```
Matrix: BLOSUM62
Reward for match: 1
Penalty for mismatch: -2
Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 11
Filter: on
```

#### 【0082】

一致率は、ある定義された配列の全長 (例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列) について測定し得る。あるいは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得た断片 (例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または少なくとも200の連続したヌクレオチドの断片) の長さの一致率も測定し得る。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

#### 【0083】

高度の同一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。

#### 【0084】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」または「~%同一」とは、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る2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。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

10

20

30

40

50

は通常、置換部位の電荷および疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を(したがって機能も)保存する。

【0085】

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群を用いて判定できる(参照先と共に上述)。ポリペプチド配列をCLUSTAL Vを用いてペアワイズ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と設定される。PAM250マトリクスがデフォルト残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドのアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の一致率は、CLUSTAL Vによって「percent similarity(類似性パーセント)」として報告される。

10

【0086】

あるいは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用い得る。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較する場合、「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.12(2000年4月21日)のblastpをデフォルトパラメータに設定して用い得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0087】

```
Matrix: BLOSUM62
Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 3
Filter: on
```

20

【0088】

一致率は、ある定義されたポリペプチド配列(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)の全長について測定し得る。あるいは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きなポリペプチド配列から得た断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、または少なくとも150の連続した残基の断片)の長さの一致率も測定し得る。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

30

【0089】

「ヒト人工染色体(HAC)」は直鎖状の微小染色体であり、約6kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を持ち得る。また、染色体の複製、分離および維持に必要な、全てのエレメントを持つ。

【0090】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつ、よりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列を改変した抗体分子を指す。

【0091】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、或る一本鎖ポリヌクレオチドが或る相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。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補性を共有することの指標である。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容的アニーリング条件下で形成され、1回以上の「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、よりストリンジェントな条件では、非特異結合(すなわち完全には一致しない核酸鎖対間の結合)が減少する。核酸配列のアニーリングに関する許容的条件は、当業者が慣例的に決定できる。アニール条件はどのハイブリダイゼーション実験でも一定であり得るが、洗浄条件は、所望のストリンジェンシー、したがってハイブリダイゼーション特異性を得るように、実験ごとに変更し得る。許容的アニーリング条件は、例えば、温度が68で

40

50

、約6×SSC、約1% (w/v) のSDS、並びに約100 μg/mlの、せん断して変性したサケ精子DNAの存在下である。

【0092】

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、所定のイオン強度およびpHにおける特定配列の融点(T<sub>m</sub>)より約5~20 低くなるように選択する。このT<sub>m</sub>は、所定のイオン強度およびpHの条件下で、完全一致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<sub>m</sub>を計算する式およ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, J. 他(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 10

【0093】

本発明のポリヌクレオチド間の高ストリンジェンシー条件のハイブリダイゼーションには、約0.2×SSCおよび約0.1%のSDSの存在下、68 度で1時間の洗浄条件を含む。あるいは、温度は約65 、60 、55 、または42 度を用い得る。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約0.1~2×SSCの範囲で変更し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約100~200 μg/mlの、せん断した変性サケ精子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では、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 20

【0094】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合の形成によって形成された、2つの核酸配列の複合体を指す。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<sub>0</sub>tまたはR<sub>0</sub>t解析など)。あるいは、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、フィルター、チップ、ピンまたはガラススライド、あるいは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板)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。 30

【0095】

用語「挿入」あるいは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基あるいはヌクレオチドがそれぞれ追加される、アミノ酸配列あるいは核酸配列における変化を指す。

【0096】

「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などに関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞およ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得る。

【0097】

「免疫原性断片」は、生物(例えば哺乳類)に導入すると免疫応答を引き起こし得る、NAAPのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片である。用語「免疫原性断片」にはまた、本明細書で開示するまたは当分野で既知のあらゆる抗体生産方法に有用な、NAAPの任意のポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片をも含む。 40

【0098】

用語「マイクロアレイ」は、或る基板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。

【0099】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の定義された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0100】

用語「モジュレート」または「活性を調節」は、NAAPの活性を変化させることを指す。例えば、モジュレートによって、NAAPのタンパク質活性の、或いは結合特性の、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起き得る。

【0101】

「核酸」および「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」および「核酸配列」の語はまた、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ある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。

【0102】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、或るプロモーターが或る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連結している。機能的に連結したDNA配列群は非常に近接するか連続的に隣接することがあり、また、2つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合は同一リーディングフレーム内にあり得る。

【0103】

「ペプチド核酸（PNA）」は、末端がリジンで終わるアミノ酸残基のペプチドの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を持つ、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。末端のリジンは、この組成に溶解性を与える。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伸長を停止させる。ポリエチレングリコール化することにより、細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0104】

NAAPの「翻訳後修飾」としては、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク質分解切断、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、合成的或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、NAAPの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

【0105】

「プローブ」とは、核酸配列の内、NAAPやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードし、同一配列や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る配列を指す。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接着した配列である。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬および酵素がある。「プライマー」とは、相補的な塩基対を形成して標的ポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素により、標的DNA鎖に沿って伸長され得る。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（および同定）に用い得る。

【0106】

本発明に用いるプローブおよ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群からなる。特異性を高めるため、長めのプローブおよびプライマー、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または少なくとも150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブおよびプライマーも用い得る。これよりもかなり長いプローブおよびプライマーもある。表、図面および配列リストを含む本明細書が支持する、任意の長さのヌクレオチドを用い得るものと理解されたい。

【0107】

プローブおよびプライマーの調製および使用方法については、Sambrook, J. 他(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. 他(1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innis, M. 他(1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CAなどを

10

20

30

40

50

参照されたい。PCRプライマー対を既知の配列から得るには、例えば、そ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) を用い得る。

**【0108】**

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既知の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および、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配列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、したが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(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手可能)を用いれば、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。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、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように修正し得る)。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いず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。したがって、このプログラムは、独自のものであれ保存されたものであれ、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド断片と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およびポリヌクレオチド断片は、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、ある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。

10

20

30

**【0109】**

「組換え核酸」は、天然の配列ではなく、配列の、2つ以上の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。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群の人為的操作によって、例えばSambrook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って達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部が付加、置換または欠失により改変された核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に連結した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、例えばある細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部と成し得る。

**【0110】**

あるいはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部と成すことができ、ベクターは例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなベクターは哺乳類に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳類内で防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

40

**【0111】**

「調節エレメント」は、或る遺伝子の非翻訳領域に通常は由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロンおよび5'および3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはRNA安定性を制御する宿主タンパク質またはウイルスタンパク質と相互作用する。

**【0112】**

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いる、化学的または生化

50

学的な成分である。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、磁気粒子およびその他の当分野で既知の成分がある。

【0113】

或るDNA配列に対する「RNA等価物」は、基準となるDNA配列と同じ直鎖のヌクレオチド配列からなるが、生じる全ての窒素性塩基のチミンがウラシルで置換され、糖鎖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なる。

【0114】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。NAAP、NAAPをコードする核酸群、またはその断片群を含むと推定されるサンプルとしては、体液と、細胞や細胞から単離した染色体や細胞内小器官（オルガネラ）や膜からの抽出物と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリントなどがあり得る。

10

【0115】

用語「特異結合」および「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドの、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物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（例えば抗原決定基すなわちエピトープ）であって結合分子が認識する構造の有無に依存する。例えば、或る抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」と抗体とを含む或る反応の中に、エピトープAを持つポリペプチドが、あるいは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

20

【0116】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離あるいは分離された核酸配列あるいはアミノ酸配列であって、自然に会合している他の成分が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

【0117】

「置換」とは、1つ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドを、それぞれ別のアミノ酸残基またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0118】

用語「基板」は、任意の好適な固体あるいは半固体の支持物を指し、膜およびフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビーズ、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。基板は、ウェル、溝、ピン、チャンネル、孔など、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

30

【0119】

「転写イメージ(transcript image)」または「発現プロファイル」は、所定条件下での所定時間における、或る特定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。

【0120】

「形質転換(transformation)」とは、外因性DNAが、或る受容細胞に導入されるプロセスを言う。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宿主細胞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、バクテリオファージあるいはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクションおよび微粒子銃を用いる方法がある。用語「形質転換（された）細胞」には、導入されたDNAが、自律的に複製するプラスミドとしてあるいは宿主染色体の一部として複製可能である、安定的に形質転換された細胞が含まれる。更に、限られた期間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

40

【0121】

50

ここで用いる「遺伝形質転換体(transgenic organism)」とは任意の生物体であり、限定するものではないが動植物を含み、生物体の1個以上の細胞が、ヒトの介入によって、例えば本技術分野で公知のトランスジェニック技術によって導入された異種核酸を有するものである。細胞への核酸の導入は、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行う。これは、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あるいは組換えウイルスでの感染によって行う。或いは核酸の導入は、組換えウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターを感染させて成し得る(Lois, C. 他(2002) Science 295:868-872)。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種あるいは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。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、真菌および動植物がある。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をこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrook 他(1989)などの参考文献に記載されている。

10

## 【0122】

特定の核酸配列の「変異体/変異配列」とは、核酸配列1本の或る長さ全体について、該特定核酸配列に対し少なくとも40%の配列同一性を有する核酸配列として定義された配列である。定義づけには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.9(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%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。変異体は、例えば、「対立遺伝子」変異体(上述)または「スプライス」変異体、「種」変異体、「多型」変異体と記述され得る。スプライス変異体は参照分子との有意な同一性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって通常、より多数またはより少数の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、追加機能ドメイン群を有するか、あるいは参照分子には存在するドメイン群が欠落していることがある。種変異体は、種によって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、相互に有意のアミノ酸同一性を持つ。多型性変異体は、所与の種の個体間における、或る特定遺伝子のポリヌクレオチド配列内での変異である。多型変異体にはまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチド塩基が異なる「1塩基多型性」(SNP)も含み得る。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。

20

30

## 【0123】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、ポリペプチド配列1本の或る長さ全体について、該特定ポリペプチド配列に対し少なくとも40%の配列同一性を有するポリペプチド配列として定義された配列である。定義づけには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.9(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、一方のポリペプチドの或る所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

## 【0124】

(発明)

本発明は、新規のヒト核酸関連タンパク質群(NAAP)および、NAAPをコードするポリヌクレオチド群の発見に基づく。また、これらの組成物を利用した、細胞増殖異常、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症疾患の、診断、治療、および予防法の発見に基づく。

40

## 【0125】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列およ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およびその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)と相関する。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

50

プチドID)によって表示した。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)によって表示した。列6は、本発明のポリペプチド配列とポリヌクレオチド配列とに対応する物理的完全長クローン群のIncyte ID番号を示す。完全長クローンは、列3に示すポリペプチド配列に対して少なくとも95%の配列同一性を持つポリペプチドをコードする。

#### 【0126】

表2は、GenBankタンパク質(genpept)データベースに対するBLAST分析で同定した、本発明のポリペプチド群に相同な配列群を示す。列1および列2はそれぞれ、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(ポリペプチドSEQ ID NO:)と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を示す。列3は、最も近いGenBank相同体のGenBank識別番号(GenBank ID NO:)を示す。列4は、各ポリペプチドとその相同体1つ以上との間の一致に関する確率スコアを示す。列5は、該当箇所には適当な引用を示すとともにGenBank相同体1つ以上の注釈(annotation)を示し、これら全ては特に引用を以て本明細書の一部とする。

10

#### 【0127】

表3は、本発明のポリペプチドの多様な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、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:)と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4は、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム(Genetics Computer Group, Madison WI)によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示し、また、シグネチャ配列群、ドメイン群、モチーフ群を有するアミノ酸残基を示す。列5は、タンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所には更に、分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

20

#### 【0128】

表2および3は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それら特性が、請求の範囲に記載されたポリペプチドが核酸関連タンパク質であることを確立している。

#### 【0129】

例えばSEQ ID NO:1は、残基M1から残基R1720までが、ラットRNAポリメラーゼ1の194 kDaサブユニット(GenBank ID g2739050)に対して87%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは0.0であり、これは観測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。SEQ ID NO:1はまた、1つのRNAポリメラーゼサブユニットドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、BLAST\_PRODOME、BLAST\_DOMO、及びMOTIFS解析からのデータは、SEQ ID NO:1がRNAポリメラーゼであるという、更に確証的な証拠を提供する。

30

#### 【0130】

別の例でSEQ ID NO:6は、残基M49から残基G432までが、ヒトSry関連HMGボックスタンパク質(GenBank ID g12082687)との100%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは1.6e-213であり、これは観察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。SEQ ID NO:6はまた、1つのHMG(高移動度グループ)ボックスを有し、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリドメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS解析および付加的BLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:6がDNA結合核内転写因子プロテインであることを更に確証する証拠を提供する。別の例でSEQ ID NO:7は、残基L14から残基E77までが、マウスのKRAB含有Znフィンガータンパク質であるKRAZ2(GenBank ID g4514561)

40

50

との71%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.3e-20$ であり、これは観察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。SEQ ID NO:7はまた、1つのKRABボックスドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS解析および付加的BLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:7がZnフィンガー-DNA結合タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。

#### 【0131】

別の例においてSEQ ID NO:16は、残基M1から残基M2435までが89%、残基P1984から残基V3572までが92%、ネズミのZnフィンガー-ホメオドメインタンパク質4 (GenBank ID g9663936)に対して同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは共に0.0であり、これは観測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。SEQ ID NO:16はまた、ホメオボックスドメイン群とZnフィンガー、C2H2タイプのドメイン群とを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析からのデータは、SEQ ID NO:16がZnフィンガー-ホメオドメインタンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する(注:「Znフィンガー」と「ホメオドメインタンパク質」とは、転写因子に見られる配列モチーフである)。

#### 【0132】

別の例でSEQ ID NO:18は、残基K131から残基V787までが、ヒトZnフィンガータンパク質(GenBank ID g186774)との52%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは $5.7e-207$ であり、これは観測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。SEQ ID NO:18はまた、Znフィンガーモチーフ群(C2H2タイプ)と1つのZnフィンガーKRABボックスドメインとを持つと、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して判定された(表3参照)。BLIMPS解析およびMOTIFS解析、並びにPRODOM、DOMO両データベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:18がZnフィンガータンパク質である、さらに実証的な

#### 【0133】

別の例でSEQ ID NO:19は、残基R400から残基Q549までが52%、残基L5からL119までが50%、また残基A196からP256までが30%、マウスZnフィンガータンパク質SKAT2 (GenBank ID g11527849)との同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは $2.6e-74$ であり、これは観察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。SEQ ID NO:19はまた、Znフィンガーモチーフ群(C2H2タイプ)、1つのKRABボックスドメイン、および1つのSCANDドメインを持つと、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して判定された(表3参照)。MOTIFS解析、並びにPRODOM、DOMO両データベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:19がZnフィンガータンパク質である、さらに実証的な

#### 【0134】

別の例でSEQ ID NO:23は、残基M1から残基A480までが、マウスのイロコイ・クラスのホメオボックスタンパク質であるIrx1 (GenBank ID g7576704)との90%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは $3.9e-239$ であり、これは観測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。SEQ ID NO:23はまた、1つのホメオボックスドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(

表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:23がホメオボックス蛋白質である、さらに実証的な証拠を提供する。

【0135】

別の例においてSEQ ID NO:24は、残基Q292から残基G599までが40%、残基N277から残基G628までが34%、ヒトのZnフィンガータンパク質ZNF226 (GenBank ID g6984172)に対して同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.7e-69$ であり、これは観測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。SEQ ID NO:24はまた、Znフィンガーモチーフ群(C2H2タイプ)を有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。MOTIFS解析、並びにPRODOMデータベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:24がZnフィンガータンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。更に、SPSCAN解析が示すところでは、SEQ ID NO:24はシグナルペプチドを有する。

10

【0136】

別の例でSEQ ID NO:25は、残基Y672から残基H797までが、分裂酵母の仮説的Znフィンガータンパク質 (GenBank ID g6912223)との42%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは $3.8e-28$ である。SEQ ID NO:25はまた、Znフィンガーモチーフ群(C-X8-C-X5-C-X3-Hタイプ)を持ち、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした、保存されたタンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。PRODOMデータベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:25がZnフィンガータンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。

20

【0137】

SEQ ID NO:2-5、SEQ ID NO:8-15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-22およびSEQ ID NO:26については、同様の方法で分析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-26の解析用のアルゴリズム及びパラメータを表7に記載した。

【0138】

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、あるいはこれら2種類の配列を任意に組み合わせ構築した。列1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)、対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、および塩基対での各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を構築するのに用いたcDNA配列および/またはゲノム配列の、また、例えばSEQ ID NO:27-52を同定するため、或いはSEQ ID NO:27-52と、関連するポリヌクレオチド配列群とを区別するためのハイブリダイゼーション技術または増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片の、開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示す。

30

【0139】

表4の列2に記載したポリヌクレオチド断片は、特に例えば組織特異的cDNAライブラリ群やプールしたcDNAライブラリ群に由来するIncyte cDNA群を指す場合もある。或いは列2に記載したポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチド配列の構築(アセンブリ)に寄与したGenBank cDNAまたはESTを指す場合もある。更に、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL(The Sanger Centre、英国ケンブリッジ)データベースに由来する配列を同定する場合もある(すなわち「ENST」の命名を含む配列)。あるいは、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records データベースに由来する場合もあり(すなわち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsに由来する場合もある(すなわち「NP」の命名を含む配列)。または列2に記したポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティッチング(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNAおよびGenscan予測エキソン群の両方からなる構築物を指す場合がある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FL\_XXXXXX\_N1\_N

40

50

${}_2\_YYYYY\_N_3\_N_4$  として同定される配列は「スティッチされた」配列であり、その内、XXXXXXは該アルゴリズムが適用された配列のクラスターの識別番号であり、YYYYYは該アルゴリズムが作成する予測の数であり、 $N_{1,2,3,\dots}$ がある場合には、解析中に手動で編集された特定のエキソン群を表す（実施例 5参照）。または、列2のポリヌクレオチド断片は「エキソストレッチング（exon-stretching）」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンの構築物を指す場合もある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FLXXXXXX\_gAAAAA\_gBBBBB\_1\_Nとして同定される配列は「ストレッチされた」配列である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号、またはNCBI RefSeq識別番号、Nは特定のエキソンを指す（実施例 5を参照）。或るRefSeq配列が「エキソストレッチング」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合では、「NM」、「NP」、または「NT」によって表されるRefSeq識別子が、GenBank識別子（すなわち、gBBBBB）の代わりに使用され得る。

10

## 【0140】

あるいは、接頭コードは、手動で編集された構成配列、ゲノムDNA配列から予測された構成配列、または組み合わされた配列解析方法に由来する構成配列を同定する。次の表は、構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する配列分析方法の例を列記する（実施例 4と5を参照）。

接頭コード	解析タイプおよび/またはプログラムの例
GNN, GFG, ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK) を用いた、ゲノム配列群からのエキソン予測
GBI	手動で編集された、ゲノム配列群の解析
FL	スティッチまたはストレッチゲノム配列（ <u>実施例 5</u> 参照）
INCY	ゲノムへの EST 配列群のマッピングからの、完全長転写物とエキソンとの予測。エキソン群と生じる転写物とを予測するために、ゲノム位置と EST 構成とのデータが組み合わされる。

20

30

## 【0141】

場合によっては、最終コンセンサポリヌクレオチド配列を確認するために、表4に示すような配列カバレッジと重複するIncyte cDNAカバレッジが得られたが、該当するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

40

## 【0142】

表5は、Incyte cDNA配列を用いて構築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ライブラリとはIncyte cDNAライブラリであり、これは、最も頻繁にはIncyte cDNA配列群によって代表されるが、これら配列は、上記のポリヌクレオチド配列を構築および確認するために用いられた。cDNAライブラリを作製するために用いた組織およびベクターを表5に示し、表6で説明している。

## 【0143】

本発明には、NAAPの変異体も含まれる。好適なNAAP変異体は、NAAPの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有し、かつ該NAAPアミノ酸配列に対して少なくとも約80%の

50

アミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する配列である。

【0144】

本発明はまた、NAAPをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施態様において、本発明は、NAAPをコードする、SEQ ID NO:27-52からなる一群から選択された1配列を持つポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO:27-52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配列をも含むが、そこでは窒素塩基チミンの出現はウラシルで置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくてリボースから構成されている。

【0145】

本発明にはまた、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の変異体を含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチド配列は、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列との、少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、あるいは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の或る態様では、SEQ ID NO:27-52からなる群から選択された核酸配列との少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するようなSEQ ID NO:27-52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体を含む。上記の任意のポリヌクレオチド変異体は、NAAP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うる。

【0146】

更に或いは別法では、本発明の或るポリヌクレオチド変異体は、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列のspray変異体である。或るspray変異体はNAAPをコードするポリヌクレオチド配列との顕著な配列同一性を持つ部分複数を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的sprayingによって生ずる、配列の数ブロックの付加または欠失により、通常、より多数またはより少数のヌクレオチドを有することになる。或るspray変異体には、約70%未満、または約60%未満、あるいは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列との間で全長に渡って見られるが、このspray変異体のいくつかの部分には、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の各部との、少なくとも約70%、あるいは少なくとも約85%、または少なくとも約95%、なおまたは100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。例えば、SEQ ID NO:34の配列を持つ或るポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:52の配列を持つポリヌクレオチドのspray変異体である。上記のspray変異体は何れも、NAAPの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードすることができる。

【0147】

遺伝暗号の縮重により、NAAPをコードする種々のポリヌクレオチド配列が作り出され、中には、既知のいかなる天然遺伝子のポリヌクレオチド配列群とも最小の類似性しか有しない配列もあることは、当業者には理解されよう。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あらゆる可能なポリヌクレオチド配列のバリエーションを網羅し得る。これらの組合せは、天然NAAPのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られる。また、こうした全ての変異が明確に開示されていると考慮されたい。

【0148】

NAAPとその変異体とをコードするヌクレオチド配列は一般に、好適に選択されたストリレンジンシー条件下で天然NAAPのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有するNAAP或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定コドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核宿主また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し得る。コードされるアミノ酸配列を改変せずに、NAAP及びその誘

10

20

30

40

50

導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に改変する別の理由には、天然配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることもある。

#### 【0149】

本発明には、また、NAAPとその誘導体群とをコードする、DNA配列群またはその断片群を、完全に合成化学によって作り出す過程をも含む。作製後、当分野で公知の試薬類を用いて、この合成配列を任意の多くの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、NAAPをコードする配列、またはその任意の断片中に突然変異を誘発し得る。

#### 【0150】

更に本発明には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:27-52及びそれらの断片群にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列群が含まれる（例えば、Wahl, G.M.およびS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511を参照）。アニーリングおよび洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載した。

#### 【0151】

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得る。DNAシーケンシング方法には酵素を用い得る。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) を用い得る。あるいは、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とを併用し得る。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) およびABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 あるいは 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) または当分野で既知の他のシステムを用いてシーケンシングを行う。結果として得た配列を、当分野で周知の種々のアルゴリズムを用いて分析する（例えば、Ausubel, F.M. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, 7.7 ユニット、Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, 856-853ページを参照）。

#### 【0152】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、NAAPをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。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およ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からの未知の配列を増幅する方法である（例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.* 2:318-322を参照）。別の方法に逆PCR法があり、これは多岐の方向に伸長するプライマー群を用いて、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、或る既知のゲノム遺伝子座およびその周辺の配列群からなる制限酵素断片群から得る（例えばTriglia, T. 他(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186を参照）。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これにはヒトおよび酵母人工染色体DNAの既知の配列群に隣接するDNA断片群をPCR増幅する方法を含む（例えばLagerstrom, M. 他(1991) *PCR Methods Applic.* 1:111-119を参照）。この方法では、PCRを行う前に、複数の制限酵素の消化およびライゲーション反応を用い、未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入し得る。未知の配列群を検索するために用い得る、他の複数の方法も当分野で既知である（例えばParker, J.D. 他(1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060を参照）。更に、PCR、ネステッドプライマー類、およびPROMOTERFINDERライブラリ類 (Clontech, Palo Alto CA) を用いて、ゲノムDN

10

20

30

40

50

Aをウォーキングし得る。この手順は、ライブラリ類をスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部の発見に有用である。全てのPCRベースの方法では、市販ソフトウェア、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%以上で、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするように、プライマー群を設計し得る。

#### 【0153】

完全長cDNA群をスクリーニングする際は、より大きなcDNA群を含むようにサイズ選択されたライブラリ群を用いるのが好ましい。更に、ランダムプライマーのライブラリ群は、しばしば遺伝子群の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。ゲノムライブラリ群は、5'非転写調節領域への、配列の伸長に有用であろう。

10

#### 【0154】

市販のキャピラリー電気泳動システム群を用いて、シークエンシングまたは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し得る。具体的には、キャピラリーシークエンシングは、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、レーザーで活性化される蛍光色素と、発光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GENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATORなど) 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およ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小断片のシークエンシングに特に適している。

20

#### 【0155】

本発明の別の実施例では、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を組換えDNA分子内でクローニングして、適切な宿主細胞内にNAAP、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列群を産生し、これらの配列をNAAPの発現に利用し得る。

#### 【0156】

種々の目的で、NAAPをコードする配列群を改変するために、当分野で一般的に既知の複数の方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列群を組換えることができる。この組換えの多様な目的には、遺伝子産物のクローニングの、あるいはプロセッシングおよび/または発現のモディフィケーションが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドとの、ランダムなフラグメンテーションおよび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得る。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異誘導を利用して、新規な制限部位の作製、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などを起こす突然変異を導入し得る。

30

#### 【0157】

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. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャッフリング技術の対象となり得る。これにより、生物活性または酵素活性、あるいは他の分子や化合物と結合する能力など、NAAPの生物学的特性を改変あるいは改良し得る。DNAシャッフリングは、PCRを介する遺伝子断片組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、所望の特性を持つ遺伝子変異体群を同定する、選択またはスクリーニングの手順を経る。続いて、これら好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリングおよび選択/スクリーニングを行い得る。かくして、「人工的な」育種および急速な分子の進化によって、遺伝的多様性が生み出される。例えば、ランダムポイント突然変異を持つ単一の遺伝子の断片を

40

50

組換えて、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し得る。あるいは、所与の遺伝子の断片群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の断片と組換え、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、定方向の、制御可能な方法で最大化させることができる。

#### 【0158】

別の実施態様によれば、NAAPをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体あるいは一部が合成可能である（例えば、Caruthers, M.H.他(1980) *Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223*; および Horn, T.他(1980) *Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232*を参照)。別法として、化学的方法を用いてNAAP自体またはその断片を合成することが可能である。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い得る（例えばCreighton, T. (1984) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ; および Roberge, J.Y.他(1995) *Science* 269:202-204を参照)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ（Applied Biosystems）を用いて達成し得る。更に、NAAPのアミノ酸配列または任意のその一部を、直接合成の際に改変することにより、及び/または他のタンパク質からの配列群または任意のその一部と組み合わせることにより、或る天然ポリペプチドの配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドが作製され得る。

10

#### 【0159】

このペプチドは、分取用高速液体クロマトグラフィを用いて実質的に精製し得る（例えばChiez, R.M.およびF.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421を参照）。この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できる（例えば前出のCreighton, 28-53ページを参照）。

20

#### 【0160】

生物学的に活性なNAAPを発現させるために、NAAP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し得る。好適な発現ベクターとは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写および翻訳の制御に必要なエレメント群を持つベクターである。必要なエレメントとしては、該ベクターと、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列群とにおける調節配列群（エンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域など）が含まれる。必要なエレメント群は、強度および特異性が様々である。特定の開始シグナル類を用いて、NAAPをコードする配列群の、より効果的な翻訳を達成できる。開始シグナルの例には、ATG開始コドンと、コザック配列など近傍の配列とが含まれる。NAAPをコードする配列群、その開始コドン、および上流の調節配列群が、好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写制御シグナルや翻訳制御シグナルは必要ないこともある。しかしながら、コード配列あるいはその断片のみが挿入された場合は、インフレームATG開始コドンなど外因性の翻訳制御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。外因性の翻訳エレメント群および開始コドン群は、様々な天然物および合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である（例えばScharf, D. 他(1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162を参照）。

30

#### 【0161】

当業者に周知の方法を用いて、NAAPをコードする配列と、好適な転写および翻訳制御エレメントとを持つ発現ベクターを作製し得る。これらの方法としては、*in vitro*組換えDN A技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換え技術がある（例えばSambrook, J.他(1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4, 8, および 16-17章; Ausubel, F.M.他(1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, 9, 13, および 16章を参照）。

40

#### 【0162】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、NAAPをコードする配列群の保持及び発現ができる。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

50

発現ベクターで形質転換させた酵母菌など微生物や、ウイルス発現ベクター（例えばバキキュロウイルス）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プラスミドまたはpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある（例えば前出 Sambrook; 前出 Ausubel; Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509; Engelhard, E.K. 他(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V.他(1996) Hum.Gene Ther.7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311; 『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,191-196ページ; Logan, J. および T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659; および Harrington, J.J. 他(1997) Nat. Genet. 15:345-355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、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる（例えば Di Nicola, M.他(1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356; Yu, M.他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344; Buller, R.M.他(1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P.他(1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226; 並びに Verma, I.M. および N. Somia (1997) Nature 389:239-242を参照）。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

#### 【0163】

細菌系では、多数のクローニングベクターおよび発現ベクターが、NAAP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選択可能である。例えば、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT1プラスミド (Life Technologies) などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターのマルチクローニング部位にNAAPをコードする配列をライゲーションすると 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の同定の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レスキュー、入れ子欠失の生成にも有用であろう（例えば、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照）。例えば、抗体の産生のためなどに多量のNAAPが必要な場合は、NAAP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SP6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持つベクターが使用できる。

#### 【0164】

酵母の発現系を使用してNAAPを産出することもできる。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーターなど、構成型あるいは誘導型のプロモーターを持つ多数のベクターが、出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) またはピキア酵母 (*Pichia pastoris*) 内で使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の、分泌か細胞内での保持かのどちらかを指示するものであり、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列群を組み込むことを可能にする（例えば前出の Ausubel, 1995; Bitter, G.A. 他(1987) Methods Enzymol.153:516-544; および Scorer, C.A.他(1994) Bio/Technology 12:181-184を参照）。

#### 【0165】

植物系もNAAPの発現に使用可能である。NAAP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 (Takamatsu, 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。あるいは、RuBisCOの小サブユニットなど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得る（例えばCoruzzi, G.他(1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R.他(1984) Science 224:838-843; および Winter, J.他(1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105を参照）。これらの作製物は、直接DNA形質転換により、または病原体を媒介とする形質移入により、植物細胞内に導入し得る（例えば『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,191-196ページを参照)。

【0166】

哺乳類細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後期プロモーターと3連リーダー配列とからなるアデノウイルス転写/翻訳複合体に、NAAPをコードする配列群をライゲーションし得る。アデノウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域へ挿入することにより、宿主細胞内でNAAPを発現する感染ウイルスを得ることが出来る(例えばLogan, J.およびT. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659を参照)。更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなど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出来る。

10

【0167】

また、ヒト人工染色体(HAC)類を用いて、或るプラスミドに含まれ得る断片やプラスミドから発現し得る断片より大きなDNAの断片群を送達し得る。治療のために約6kb~10 MbのHACsが作製され、従来の送達方法(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)で送達されている(例えばHarrington, J.J.他(1997) *Nat. Genet.* 15:345-355を参照)。

【0168】

哺乳動物系内の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、細胞株におけるNAAPの安定した発現が望ましい。例えば、NAAPをコードする配列を細胞株に形質転換するために、発現ベクター類と、同じベクター上の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得る。用いる発現ベクターは、ウイルス起源の複製要素、および/または内因性の発現要素を持ち得る。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、細胞を増殖させ得る。選択可能マーカーの目的は選択剤への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーの存在により、導入した配列をうまく発現するような細胞の成長およ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。

20

【0169】

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<sup>-</sup>細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子と、apr<sup>-</sup>細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスの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(例えばWigler, M.他(1977) *Cell* 11:223-232; Lowy, I. 他(1980) *Cell* 22:817-823を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質ある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および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(例えばWigler, M.他(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F.他(1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14を参照)。この他の選択可能な遺伝子(例えばtrpBおよびhisD、これらは代謝物のための、細胞の必要条件を改変)も、文献に記載がある(例えばHartman, S.C.およびR.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051を参照)。可視マーカー類、例えばアントシアニンや、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼおよびその基質であるグルクロニド、またはルシフェラーゼおよびその基質であるルシフェリンを用い得る。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを同定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性あるいは安定したタンパク質発現を定量し得る(例えばRhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131を参照)。

30

40

【0170】

マーカー遺伝子発現の有無によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在および発現の確認が必要な場合もある。例えば、NAAPをコードする配列がマーカー遺

50

伝子配列の中に挿入された場合、NAAPをコードする配列を持つ形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定可能である。または、単一プロモーターの制御下で、或るマーカー遺伝子を、NAAPをコードする1配列とタンデムに配置することもできる。誘導または選択に应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。

#### 【0171】

一般に、NAAPをコードする核酸配列を含み且つNAAP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と、PCR増幅とがあり、また、核酸配列或いはタンパク質配列の検出、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、タンパク質の生物学的検定法または免疫学的検定法もある。

10

#### 【0172】

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NAAPの発現の検出と計測とを行うための免疫学的方法は、当分野で既知である。このような技術の例としては、酵素結合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。NAAP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群を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合結合試験を用いることもできる。これらのアッセイおよび他のアッセイは、当分野で周知である(例えばHampton, R.他(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APSPress, St. Paul MN, Sect.IV; Coligan, J.E.他(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience, New York NY; および Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJを参照)。

20

#### 【0173】

多岐にわたる標識方法および抱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。NAAP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プローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、エンドラベリング(末端標識化)、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、NAAPをコードする配列、またはその任意の断片を、mRNAプローブを生成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などの好適なRNAポリメラーゼおよ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Amersham Pharmacia Biotech、Promega(Madison WI)、U.S. Biochemicalなど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あるいは標識には、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、発色剤などがある。

30

#### 【0174】

NAAPをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現および回収に好適な条件下で培養される。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、あるいはその両者に依存する。NAAPをコードするポリヌクレオチド群を持つ発現ベクター類は、原核細胞膜または真核細胞膜を透過してのNAAPの分泌を指示するシグナル配列群を持つように設計できることは、当業者には理解されよう。

40

#### 【0175】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現をモジュレートする能力、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、脂質化およびアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断す

50

る翻訳後のプロセッシングを利用して、タンパク質の標的への誘導、折りたたみ、および/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための、特異的な細胞装置および特徴的な機序を持つ、種々の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、WI38など）は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択し得る。

#### 【0176】

本発明の別の実施態様では、NAAPをコードする、天然核酸配列、修飾された核酸配列、または組換え核酸配列を、或る異種配列にライゲーションすることにより、上記した任意の宿主系内で、或る融合タンパク質の翻訳を生じ得る。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラNAAPタンパク質は、NAAP活性のインヒビター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および異種ペプチド部分も、市販されている親和性マトリックス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および赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質が、NAAPをコードする配列と異種タンパク質配列との間にタンパク質分解切断部位を持つように遺伝子操作すると、精製後にNAAPが異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現および精製方法は、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および精製を促進することもできる。

10

20

#### 【0177】

本発明の更なる実施態様では、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 *in vitro* で、放射能標識したNAAPの合成が可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターに機能的に連結したタンパク質コード配列群の、転写と翻訳とを共役させる。翻訳は、例えば<sup>35</sup>S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。

30

#### 【0178】

本発明のNAAPまたはその断片を用いて、NAAPに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも1つ、または複数の試験化合物を用いて、NAAPへの特異的な結合をスクリーニングし得る。試験化合物としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質（例えば受容体）または小分子が挙げられる。

#### 【0179】

或る実施態様では、このように同定された化合物は、NAAPの天然リガンドに密接に関連し、例えばリガンドやその断片であり、または天然基質や、構造的または機能的な擬態物質 (mimetic)、あるいは自然結合パートナーである（例えばColigan, J.E.他(1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2):5章を参照）。同様に、この化合物は、NAAPが結合する天然受容体に、或いは例えばリガンド結合部位など少なくともこの受容体の或る断片に、密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。或る実施例では、これら化合物のためのスクリーニングには、分泌タンパク質として、あるいは細胞膜上でNAAPを発現する、好適な細胞群の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳類、酵母、ショウジョウバエ、または大腸菌からの細胞が含まれる。NAAPを発現する細胞またはNAAPを含有する細胞膜分画を次に試験化合物と接触させて、NAAPまたはこの化合物のどちらかの結合、刺激、または活性の阻害を分析する。

40

#### 【0180】

或るアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、フルオロフォア (蛍光標識試薬)、放射性同位体、酵素抱合体、または他の検出可能な標識により、その結

50

合を検出できる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の、あるいは固体支持物に固定されたNAAPと混合するステップと、NAAPとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法でこのアッセイでは、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出および測定を行うことができる。更にこのアッセイは、無細胞再構成標本、化学ライブラリ、または、天然産物の混合物を用いて実施でき、試験化合物(群)は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定する。

#### 【0181】

本発明のNAAPまたはその断片を用いて、NAAPの活性をモジュレートする化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物としては、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニストまたは逆アゴニストなどが含まれ得る。或る実施例では、NAAPを少なくとも1つの試験化合物と混合する、NAAPの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのNAAPの活性と、試験化合物不在下でのNAAPの活性とを比較する。試験化合物の存在下でのNAAPの活性の変化は、NAAPの活性をモジュレートする化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物を、NAAPの活性に適した条件下で、NAAPを含む *in vitro* 系すなわち無細胞系と混合してアッセイを実施する。これらアッセイの何れにおいても、NAAPの活性を調節する試験化合物は間接的に調節する場合があり、その際は試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つ、または複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

#### 【0182】

別の実施態様では、胚性幹細胞(ES細胞)における相同組換えを用いて動物モデル系内で、NAAPまたはその哺乳類相同体をコードするポリヌクレオチドを「ロックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である(米国特許第5,175,383号および第5,767,337号などを参照)。例えば129/SvJ細胞系などのマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292)などのマーカー遺伝子で破壊した、目的の遺伝子を持つベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより、宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。或いは、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をロックアウトする(Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U.他(1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス株などから採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。これらの胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を特定し、これらを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬物で検査されうる。

#### 【0183】

NAAPをコードするポリヌクレオチドを *in vitro* でヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉および外胚葉の細胞タイプを含む、少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統および心筋細胞に分化する(Thomson, J.A.他(1998) Science 282:1145-1147)。

#### 【0184】

NAAPをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ロックイン」ヒト化動物(ブタ)または遺伝子組換え動物(マウスまたはラット)を作製することもできる。ロックイン技術を用いて、NAAPをコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について試験し、潜在的医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばNAAPを乳汁内に分泌するなどNAAPを過剰発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る(Janne, J. 他(1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

#### 【0185】

10

20

30

40

50

## (治療)

NAAPの領域と核酸関連タンパク質の領域との間には、例えば配列及びモチーフの文脈における、化学的及び構造的類似性が存在する。また、NAAPの発現は、平滑筋、心房粘液腫、脳腫瘍、乳癌、心臓腫瘍、結腸腫瘍、消化系、後根神経節、血液系、免疫系、腎臓、肝臓腫瘍、肺腫瘍、男性生殖器、神経系、骨肉腫、卵巣腫瘍、呼吸系、線状体、精巣組織、淡蒼球組織、被殻組織、および非活性化(non-activated)Th1細胞に、密に関連する。また、NAAPを発現する組織の数例は、表6を見られたい。このように、NAAPは、細胞増殖異常、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症の疾患において、或る役割を果たすと考えられる。NAAP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、NAAPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、NAAP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、NAAPの発現または活性を増大させることが望ましい。

10

## 【0186】

従って、1実施態様では、NAAP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、被験者にNAAPまたはその断片や誘導体が投与され得る。限定するものではないが、このような疾患には細胞増殖異常、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症疾患が含まれ、細胞増殖異常の中には日光角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病(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、並びに、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、および奇形癌など癌、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、および子宮の癌が含まれる。発達障害には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症や、シャルコーマリーツース病および神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症や、Syndenham舞蹈病(Syndenham's chorea)および脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴が含まれる。心血管障害には、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎および静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術(vascular replacement)、冠動脈バイパス移植術が含まれ、神経疾患には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病およびその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化およびその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症(色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症および他の脱髄疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、プリオン病(クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、およびGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳三叉神経血管症候群、ダウン症を含む中枢神経系性精神遅滞および他の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経疾患、脊髄疾患、筋ジストロフィー他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎および多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、および中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神障害(気分性、不安性の障害、統合失調症/分裂病)、季節性感情障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性(corticobasal degeneration)、および家族性前頭側頭型痴呆とが含まれる。自己免疫/炎症疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病(慢性原発性副腎機能不全)、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、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺

20

30

40

50

性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィー（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、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患（胎児赤芽球症）、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、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、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、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、造血性癌（リンパ腫、白血病、骨髄腫を含む）、および外傷が含まれる。

10

## 【0187】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、NAAP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、NAAPまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを被験者に投与し得る。

## 【0188】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、NAAP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、実質的に精製されたNAAPを有する組成物を、好適な医薬用キャリアと共に被験者に投与し得る。

## 【0189】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、NAAP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、NAAPの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

20

## 【0190】

更なる実施例では、NAAPの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にNAAPのアンタゴニストを投与し得る。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、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症疾患を含む。1態様では、NAAPと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはNAAPを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング機構或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

## 【0191】

別の実施態様では、NAAPをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを被験者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む、NAAPの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防を成し得る。

30

## 【0192】

別の実施態様では、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。この方法により、少量の各薬物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。

40

## 【0193】

NAAP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NAAP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、NAAPと特異結合するものを同定することが可能である。NAAPへの抗体も、本技術分野で公知の方法を用いて産生され得る。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、および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（すなわ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。一本鎖抗体（例えば由来はラクダまたはラマ）は強力な酵素阻害剤である可能性があり、ペプチド擬態物質の設計において利点を持つようであり、免疫吸着剤とバイオセンサーとの開発においても利点を持つよう

50

ある(Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

【0194】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒトなどを含む種々の宿主が、NAAP、若しくは免疫原性の特性を備えるその任意の断片またはオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。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など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、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ジニトロフェノールなど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-ゲラン桿菌)およびコリネバクテリウム-パルバム(*Corynebacterium parvum*)が特に好ましい。

【0195】

NAAP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個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を持つものが好ましく、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものとなる。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。NAAPアミノ酸類の短いストレッチ群は、KLHなど他のタンパク質の配列と融合され、このキメラ分子に対する抗体群が産生され得る。

【0196】

NAAPに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製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、およびEBV-ハイブリドーマ技術がある(例えばKohler, G.他(1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D.他(1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J.他(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; および Cole, S.P.他(1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120を参照)。

【0197】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達した、ヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性および生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えばMorrison, S.L.他(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M.S. 他(1984) Nature 312:604-608; および Takeda, S.他(1985) Nature 314:452-454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用い、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、NAAP特異的一本鎖抗体を生成する。関連した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類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(例えばBurton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137を参照)。

【0198】

抗体類の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは文献に開示されているように非常に特異的な結合試薬の免疫グロブリンのライブラリ類またはパネル類のスクリーニングによっても行い得る(例えばOrlandi, R.他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G.他(1991) Nature 349:293-299を参照)。

【0199】

NAAPに対する特異的な結合部位を含む抗体断片も産生され得る。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')<sub>2</sub>断片と、F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFab断片とがある。あるいは、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片を迅速且つ容易に同定することが可能となる(例えばHuse, W.D. 他(1989) Science 246:1275-1281を参照)。

【0200】

種々の免疫学的検定(イムノアッセイ)を用いてスクリーニングすることにより、所望の特異性を有する抗体を同定し得る。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定量測定法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、NAAPとその特異抗体との間の複合体形成の計測を含む。2つの非干渉性NAAPエピトープに対して反応性を持つモノクローナル抗体群を用いる、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、競合結合試験も利用できる(Pound、前出)。

#### 【0201】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、NAAPに対する抗体の親和性を評価し得る。親和性を結合定数Kaで表すが、このKaは、平衡状態下の、NAAP抗体複合体のモル濃度を、遊離抗体と遊離抗原とのモル濃度で除して得られる値である。ポリクローナル抗体類は多様なNAAPエピトープに対して親和性が不均一であり、或るポリクローナル抗体製剤に関して判定したKaは、NAAPに対する抗体群の平均の親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は或る特定のNAAP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の或る製剤について判定したKaは、親和性の真の測定値を表す。Ka値が $10^9 \sim 10^{12}$  liter/molの高親和性抗体製剤は、NAAP-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。Ka値が $10^6 \sim 10^7$  liter/molの低親和性抗体製剤は、NAAPが抗体から最終的に(好ましくは活性化状態で)解離する必要がある免疫精製(immunopurification)およ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. および Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

10

20

#### 【0202】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価および結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような試薬の品質およ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の特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$  mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体製剤は一般に、NAAP抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。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(例えば前出のCatty、同Coligan 他を参照)。

#### 【0203】

本発明の別の実施例では、NAAPをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列を、治療目的で使用することができる。或る実施例では、NAAPをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子(DNA、RNA、PNA、または修飾したオリゴヌクレオチド)を設計して遺伝子発現をモディフィケーションし得る。このような技術は当分野では周知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはより大きな断片を、NAAPをコードする配列の制御領域、またはコード領域に沿った、さまざまな位置から設計可能である(例えばAgrawal, S., 編集(1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJを参照)。

30

#### 【0204】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を適切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作製する発現プラスミドの形で、細胞内に送達し得る(例えばSlater, J.E. 他(1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3):469-475; およびScanlon, K.J. 他(1995) 9(13):1288-1296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随伴ウイルスベクターなど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(例えばMiller, A.D. (1990) Blood 76:271、前出のAubel, Uckert, W. およびW. Walther (1994) Pharmacol. Ther. 63(3):323-347を参照)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープおよび当分野で公知のその他のシステムが含まれる(例えばRossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51(1):217-225; Boado, R.J. 他(1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315、Morris, M.C. 他(1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736を参照)。

40

50

## 【0205】

本発明の別の実施態様では、NAAP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の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療により、(i) 遺伝子欠損症を治療し(例えばX染色体連鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M.他(2000) Science 288:669-672)により特徴付けられる重症複合型免疫不全(SCID)-X1病の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に関連する重症複合型免疫不全症候群(Blaese, R.M. 他(1995) Science 270:475-480; Bordignon, C.他(1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J.他(1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G.他(1995) Hum.Gene Therapy 6:643-666; Crystal, R.G.他(1995) Hum.Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア(thalassaemia)、家族性高コレステロール血症や、第VIII因子若しくは第IX因子欠損に起因する血友病(Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I.M. および N. Somia (1997) Nature 389:239-242)、(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) 細胞内の寄生生物、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschla, E.他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)などヒトレトロウイルス、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、Candida albicansおよびParacoccidioides brasiliensis等の寄生真菌、並びに熱帯熱マラリア原虫およびクルーズトリパノソーマ等の寄生原虫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。NAAPの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からNAAPを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

10

20

## 【0206】

本発明の更なる実施例では、NAAPの欠損による疾患や異常症を、NAAPをコードする哺乳類発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってNAAP欠損細胞に導入することによって治療する。in vivoあるいは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) 遺伝子銃、(iii) リポソームを介した形質移入、(iv) 受容体を介した遺伝子導入、および(v) DNAトランスポゾンの使用がある(Morgan, R.A. および W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. および H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)。

## 【0207】

NAAPの発現に有効でありうる発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCM V-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。NAAPを発現させるために、(i) 構成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)、若しくは - アクチンの遺伝子など)、(ii) 誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. および H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他 (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. および H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456))、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVG RXRおよびPINDに含まれている: Invitrogen)、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(Rossi, F.M.V. および H.M. Blau, 前出)、または(iii) 正常な個体に由来する、NAAPをコードする内因性遺伝子の天然プロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用い得る。

30

40

## 【0208】

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、当業者は実験の各パラメータを最適化する努力をさほど要さず、ポリヌクレオチド群を、培養中の標的細胞群に送達し得る。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. および A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neum

50

ann, B. 他(1982) EMBO J. 1:841-845)によって、形質転換が実施される。初代培養細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳類の形質移入プロトコルの修正が必要である。

#### 【0209】

本発明の別の実施態様では、NAAPの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や障害は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーター若しくは独立したプロモーターの調節の下でNAAP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)追加のレトロウイルス・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およびPFBNE0)はStratagene社から市販されており、刊行データ(Riviere, I. 他(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737)に基づく。上記データを引用することを以て本明細書の一部とする。このベクターは、好適なベクター産生細胞株(VPCL)において増殖される。VPCLは、各標的細胞上の受容体への親和性を持つエンベロープ遺伝子を、またはVSVgなど汎親和性エンベロープタンパク質を発現する(Armentano, D. 他(1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. 他(1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. および A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. 他(1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. 他(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」)において、レトロウイルスパッケージング細胞株群を得る方法が開示されており、引用を以て本明細書の一部とする。レトロウイルスベクター類の繁殖や、細胞集団(例えばCD4<sup>+</sup>T細胞群)の形質導入、および形質導入した細胞群の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に周知の手法であり、多数の文献に記載がある(Ranga, U. 他(1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. 他(1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. 他(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

10

20

#### 【0210】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の或る送達系を用いて、NAAPの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する細胞群に、NAAPをコードするポリヌクレオチド群を送達する。アデノウイルス系ベクター類の作製およびパッケージングについては、当業者に周知である。複製欠損型アデノウイルスベクター類は、種々の免疫調節タンパク質をコードする遺伝子群を、無損傷の隣島内に導入する目的で多様に利用し得ることが証明された(Csete, M.E. 他(1995) Transplantation 27:263-268)。潜在的に有用なアデノウイルスベクター類は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、引用することを以て本明細書の一部とする。アデノウイルスベクター類については、Antinozzi, P.A. 他(1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544 並びに、Verma, I.M. および N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用を以て本明細書の一部とする。

30

#### 【0211】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、NAAPの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する標的細胞に、NAAPをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純ヘルペスウイルス(HSV)系ベクター類は、HSVが向性を持つ中枢神経細胞にNAAPを導入する際に、特に有益たりうる。ヘルペス系ベクター類の作製およびパッケージングは、当業者に公知である。或る複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV) I型系のベクターが、或るレポーター遺伝子の、霊長類の眼への送達に用いられている(Liu, X. 他(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 strains for gene transfer」)に詳細に開示されており、該特許の引用を以て本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号は、ヒト遺伝子治療などの目的で、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

40

50

少なくとも1つの外因性遺伝子を有するゲノムを持つ、組換えHSV d92の利用について記載する。上記特許はまた、ICP4、ICP27、およびICP22を欠失した組換えHSV系統の、作製および使用について開示している。HSVベクター類については、Goins, W.F. 他(1999) J. Virol. 73:519-532 および Xu, H.他(1994) Dev. Biol. 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用を以て本明細書の一部とする。クローン化したヘルペスウイルス配列群の操作、大ヘルペスウイルスゲノム(large herpesvirus genomes)の様々なセグメントを持つ複数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長および増殖、並びに細胞群へのヘルペスウイルスの感染は、当業者に公知の技術である。

#### 【0212】

別法では、或るウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いて、NAAPをコードするポリヌクレオチド群を標的細胞群に送達する。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(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類は、SFVゲノムに基づく(Garoff, H. および K.-J. Li (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、ウイルスのカプシドタンパク質群を通常はコードする、サブゲノムRNAが産生される。このサブゲノムRNAは、完全長ゲノムRNAよりも高レベルに複製するので、酵素活性(例えばプロテアーゼおよびポリメラーゼ)を持つウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質群が過剰産生される。同様に、NAAPをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のNAAPをコードするRNAが産生され、高いレベルでNAAPが合成される。通常、ウイルスの感染は、数日以内の細胞溶解を伴う。一方、シンドビスウイルス(SIN)の或る変異体を有するハムスター正常腎臓細胞(BHK-21)群が持続的な感染を確立する能力は、ウイルス類の溶解複製を、遺伝子治療に応用し得るように好適に改変可能であることを示唆する(Dryga, S.A.他(1997) Virology 228:74-83)。ウイルスの宿主域は広いので、様々なタイプの細胞にNAAPを導入できることとなる。或る集団における或るサブセットの細胞群の特異的形質導入は、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およびRNAの形質移入方法およびウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

#### 【0213】

転写開始部位(transcription initiation site)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。この位置は、例えばスタート部位(start site)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充分に開く、2重らせんの能力を阻害するので有用である。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(例えばGee, J.E.他(1994) in Huber, B.E. および B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, 163-177ページを参照)。また、相補配列またはアンチセンス分子を設計し、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の翻訳をブロックし得る。

#### 【0214】

リボザイム類は、酵素的RNA分子である。RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用い得る。リボザイム作用のメカニズムは、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、遺伝子操作で作ったハンマーヘッド型リボザイム分子が、NAAPをコードする配列の、内ヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

#### 【0215】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位を先ず同定するため、GUA、GUU、GUC配列などリボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンする。一度同定されると、切断部位を持つ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配列が、そのオリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴をもっていないかを評

10

20

30

40

50

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群とのハイブリダイゼーションへのアクセス可能性をテストすることによって行い得る。

【0216】

本発明の相補リボ核酸分子およびリボザイムは、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。作製方法には、固相ホスホラミダイト化学合成など、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。あるいは、NAAPをコードするDNA配列の *in vitro* および *in vivo* 転写によってRNA分子を産生し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6などの好適な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。あるいは、相補的RNAを構成的あるいは誘導的に合成するこれら

10

【0217】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするために、RNA分子を修飾し得る。限定するものではないが可能な修飾としては、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方において隣接配列群を追加することや、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リチオエートまたは2' O-メチルを使用することが含まれる。この概念は、本来はPNA群の産出におけるものであるが、これら全ての分子に拡大することができる。そのためには、内因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、およびウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - および同様の修飾をしたものや、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) を含める。

20

【0218】

本発明の更なる実施例は、NAAPをコードするポリヌクレオチドの発現の改変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発現改変を起こすのに有効であり得る化合物には、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や、転写因子などのポリペプチド転写制御因子、および、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改変し得る。従って、NAAPの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、NAAP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用であり、NAAP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、NAAP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用であり得る。

30

【0219】

或る特定ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性について、少なくとも1個、または複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物を得るには、当分野で公知の任意の方法を用い得る。取得方法としては、以下の場合に有効な既知化合物の化学修飾がある。ポリヌクレオチドの発現を改変する場合と、既存の、市販のまたは私的な、天然または非天然の化合物の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および/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とである。NAAPをコードするポリヌクレオチドを持つサンプルを、このようにして得た試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルは例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、あるいは *in vitro* 無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。NAAPをコードするポリヌクレオチドの発現における改変は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常は、NAAP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、特定の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することにより、1つ以上の試験化合物に曝露される、または曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較のための基礎を形成し得る。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改変する際に試験化合物が

40

50

有効であることを示す。或る特定ポリヌクレオチドの発現改変に有効な化合物のためのスクリーニングを実行でき、例えば分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clarke, M.L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いる。本発明の或る特定の実施態様は、或る特定ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性について、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、修飾したオリゴヌクレオチド) の組合せブラリをスクリーニングする過程に関する (Bruce, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

#### 【0220】

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* および *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、患者から採取した幹細胞内に導入し、クローニング増殖して同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による、またはリポソーム注入やポリカチオンアミノポリマーによる送達は、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 (例えば Goldman, C.K. 他 (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466 を参照)。

#### 【0221】

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、サルなどの哺乳類を含めて治療が必要な全ての被験体に適用できる。

#### 【0222】

本発明の或る更なる実施態様は、薬物として許容できる或る賦形剤と共に製剤される或る活性成分を一般に有する、或る組成物の投与に関する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴムおよびタンパク質がある。様々な剤型が広く知られており、詳細は *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような組成物は、NAAP、NAAPの抗体、擬態物質、アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターなどからなる。

#### 【0223】

本発明に用いる組成物は、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。

#### 【0224】

肺から投与する組成物は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、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量有機薬) の場合には、速効製剤のエアロゾル送達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およびタンパク質) 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送達が最近向上したことにより、インスリンなどの薬物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. 他, 米国特許第5,997,848号などを参照)。肺送達は、針注射なしに投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

#### 【0225】

本発明での使用に適した組成物には、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組成物が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

#### 【0226】

NAAPを有する、またはその断片群を有する高分子群を直接、細胞内に送達すべく、特殊な種々の形状の組成物群が調製され得る。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、NAAPまたはその断片を、HIV Tat-1タンパク質から得た短い陽イオン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類は、或るマウスモデル系の、脳を含む全ての組織の細胞群に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. 他 (1999) *Science* 285:

10

20

30

40

50

1569-1572)。

【0227】

任意の化合物に対して、先ず細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、あるいは、動物モデル、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルまたはブタなどにおいて、治療有効量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲およ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および投与経路を決定することができる。

【0228】

治療有効投与量とは、症状や容態を回復させる、たとえばNAAPまたはその断片、NAAPの抗体、NAAPのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなど活性処方成分の量を指す。治療有効性および毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬学手法によって、例えばED<sub>50</sub>（集団の50%の治療有効量）またはLD<sub>50</sub>（集団の50%の致死量）統計を計算するなどして判定できる。毒性効果の、治療効果に対する用量比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。細胞培養アッセイと動物実験とから得られたデータは、ヒトに用いる投与量の範囲の策定に用いられる。このような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆どあるいは全く持たず、ED<sub>50</sub>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、患者の感受性およ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。

【0229】

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。十分なレベルの活性成分を与え、あるいは所望の効果を維持すべく、用法および用量を調整する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、被験者の一般的な健康状態、被験者の年齢、体重および性別（ジェンダー）、投与の時間および頻度、薬物の併用、反応感受性および治療に対する応答などを考慮し得る。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期およ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、あるいは2週間に1度の間隔で投与し得る。

【0230】

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。特定の投与量および送達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、ヌクレオチドの処方では、タンパク質またはそれらのインヒビター類とは異な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送達は、特定の細胞、症状、部位などに特異的なものとなる。

【0231】

（診断）

別の実施例では、NAAPに特異的に結合する抗体を、NAAPの発現によって特徴付けられる障害の診断に、または、NAAPやNAAPのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビター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用い得る。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。NAAPの診断アッセイには、ヒトの体液から、あるいは細胞や組織の抽出物から、抗体および標識を用いてNAAPを検出する方法が含まれる。この抗体は、修飾して、または修飾せずに使用される。また、レポーター分子との共有結合または非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広くさまざまな種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

【0232】

NAAPを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が当分野では周知であり、変容した、あるいは異常なレベルのNAAPの発現を診断するための基盤を提供する。正常あるいは標準的なNAAPの発現の値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験体から採取した体液または細胞抽出物と、NAAPに対する抗体とを混合させることによって確定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法

10

20

30

40

50

で定量できる。被験体、対照、および、生検組織からの疾患サンプルでの、NAAP発現の量を標準値と比較する。標準値と被験体との偏差が、疾患を診断するパラメータを確定する。

#### 【0233】

本発明の別の実施態様によれば、NAAPをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用い得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およびDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用いて、NAAPの発現が疾患と相関し得る生検組織における遺伝子発現を検出し定量し得る。この診断アッセイを用いて、NAAPの存在の有無、更には過剰な発現を判定し、治療時のNAAPレベルの調節を監視しうる。

#### 【0234】

或る実施形態では、NAAPまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列などポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを、NAAPをコードする核酸配列を同定するために用いることができる。プローブが高度に特異的な領域（例えば5'調節領域）から作られている、或いはやや特異性の低い領域（例えば保存されたモチーフ）から作られているという、プローブの特異性と、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とによって、そのプローブがNAAPをコードする天然配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子変異体や関連配列を同定するかどうかが決まることとなる。

#### 【0235】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用でき、また、NAAPをコードする任意の配列との少なくとも50%の配列同一性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:27-52の配列、或いはNAAP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。

#### 【0236】

NAAPをコードするDNAに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、NAAPをコードまたはNAAP誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。mRNAプローブ作製用ベクター類は、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼと好適な標識されたヌクレオチドと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得る。ハイブリダイゼーションプローブ類は、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、<sup>32</sup>Pまたは<sup>35</sup>Sなどの放射性核種が、あるいはアビジン/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など酵素標識が挙げられる。

#### 【0237】

NAAPをコードするポリヌクレオチド配列を、NAAPの発現に関係する疾患の診断に用い得る。限定するものではないが、このような疾患には細胞増殖異常、発達障害、心血管障害、神経疾患、および自己免疫/炎症疾患が含まれ、細胞増殖異常の中には日光角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病（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、並びに、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、および奇形癌など癌、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、および子宮の癌が含まれる。発達障害には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞）、スミス マジェニス症候群（Smith-Magenis syndrome）、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症や、シャルコーマリーツス病および神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症や、Sydenham舞踏病（Sydenham's chorea）および脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音

10

20

30

40

50

難聴が含まれる。心血管障害には、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎および静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術 (vascular replacement)、冠動脈バイパス移植術が含まれ、神経疾患には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病およびその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化およびその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症 (色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症および他の脱髄疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、プリオン病 (クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、および Gerstmann-Straussler-Scheinker 症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管腫症 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳三叉神経血管症候群、ダウン症を含む中枢神経系性精神遅滞および他の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経疾患、脊髄疾患、筋ジストロフィー他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎および多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、および中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神障害 (気分性、不安性の障害、統合失調症 / 分裂病)、季節性感情障害 (SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性 (corticobasal degeneration)、および家族性前頭側頭型痴呆が含まれる。自己免疫 / 炎症疾患には、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、アジソン病 (慢性原発性副腎機能不全)、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、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィー (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、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患 (胎児赤芽球症)、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、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、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、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、造血性癌 (リンパ腫、白血病、骨髄腫を含む)、および外傷が含まれる。NAAPをコードするポリヌクレオチド配列は、変容したNAAP発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用する、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法や、ディップスティック (dipstick)、ピン (pin)、およびマルチフォーマットのELISA式アッセイ、およびマイクロアレイに使用可能である。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。

#### 【0238】

或る特定の態様では、NAAPをコードするヌクレオチド配列群は、関連する障害、特に上記した障害を検出するアッセイ類において有用であり得る。NAAPをコードするヌクレオチド配列を、標準的な方法で標識化し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができる。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。患者サンプル中のシグナルの量が、対照サンプルと較べて著しく変化している場合は、該サンプル内の、NAAPをコードするヌクレオチド配列群のレベル変化の存在が、関連する障害の存在を標示する。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評価するため、ある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。

#### 【0239】

NAAPの発現に関連する疾患の診断の基盤を提供するために、発現の正常すなわち標準的

なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーションあるいは増幅に好適な条件の下、動物あるいはヒトのいずれかの正常な被験体から採取された体液或いは細胞抽出物と、NAAPをコードする配列あるいはその断片とを混合す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で用いて行った実験から得た値を正常な被験者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。

#### 【0240】

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験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定期的に繰り返し得る。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。

10

#### 【0241】

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又は、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。

#### 【0242】

NAAPをコードする配列群から設計したオリゴヌクレオチド群の更なる診断的利用には、PCRの利用を含み得る。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、あるいは*in vitro*で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはNAAPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはNAAPをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適化した条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェンシー条件下で、近縁のDNAあるいはRNA配列の検出、定量、あるいはその両方のため用いることが可能である。

20

#### 【0243】

或る実施態様においては、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列群に由来するオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて、1塩基多型（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、挿入および欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP（single-stranded conformation polymorphism）および蛍光SSCP（fSSCP）がある。SSCPでは、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類とポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）とを用いた、DNAの増幅を行う。このDNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液などに由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形のPCR生成物の2次および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高処理機器でアンプリマー（amplimer）の検出が可能になる。更に、インシリコSNP（*in silico* SNP, *is*SNP）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オーバーラップするDNA断片群の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調製に、または統計モデルとDNA配列クロマトグラムの自動分析とを用いたシーケンシングのエラーに起因する配列変異を、フィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理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。

30

40

#### 【0244】

SNPを利用して、ヒト疾患の遺伝的基礎を研究しうる。例えば少なくとも16種の一般的SNPが、インスリン非依存型糖尿病と関連している。SNPはまた、単一遺伝子病における疾病転帰における相違を試験するにも有用である。単一遺伝子病としては、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、または慢性肉芽腫症がある。例えばマンノース結合レクチンにおける変

50

異体群であるMBL2は、嚢胞性線維症における有害な肺の転帰との相関が示されている。SNPはまた、薬理ゲノム学においても有用性を持つ。薬理ゲノム学は、患者の薬物への応答（例えば命を脅かす毒性）に影響する遺伝的変異体の同定を行う。例えばNアセチル転移酵素における或る変異は、抗結核薬であるイソニアジドに反応しての末梢ニューロパシーの高い発症率と関連する。一方、ALOX5遺伝子のコアプロモータにおける或る変異の結果、5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする或る抗喘息薬での治療に対する臨床応答が低下する。異なる集団群におけるSNPの分布の分析は、遺伝的浮動、突然変異、遺伝子組換え、遺伝子選択の調査に有用であり、集団の起源とその移動との追跡にも有用である(Taylor, J.G. 他(2001) Trends Mol. Med. 7:507-512; Kwok, P.-Y. および Z. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543; Nowotny, P. 他 (2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641)。 10

#### 【0245】

NAAP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、対照核酸の共増幅(coamplification)、および標準曲線から得た結果の補間もある(例えばMelby, P.C.他(1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplax, C.他(1993) Anal. Biochem. 212:229-236を参照)。複数サンプルの定量速度を加速するには、目的のオリゴマーまたはポリヌクレオチドを種々の希釈液中に置き、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットでのアッセイを行い得る。

#### 【0246】

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に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、或るマイクロアレイにおけるエレメント群として用いることができる。多数の遺伝子の相対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、突然変異および多型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物の活性を開発およ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効果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。 20

#### 【0247】

別の実施例では、NAAP、NAAPの断片、NAAPに特異的な抗体を、マイクロアレイ上のエレメント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、薬物-標的相互作用およ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。 30

#### 【0248】

或る実施態様は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを作製する、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る、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および相対存在量を定量することにより分析し得る(Seilhammer 他(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て明細書の一部となす)。したがって、特定の組織または細胞タイプの転写物または逆転写物全体に、本発明のポリヌクレオチドまたはそれらの相補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを作製し得る。或る実施態様では、本発明のポリヌクレオチドまたはそれらの相補体が1マイクロアレイ上に複数エレメントの1サブセットを持つ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。 40

#### 【0249】

転写イメージは、組織、細胞株、生検またはその生体サンプルから単離した転写物を用いて作製し得る。転写イメージはしたがって、組織または生検サンプルの場合には *in vivo*、細胞株の場合には *in vitro* での遺伝子発現を反映する。 50

## 【0250】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、in vitroモデル系および薬物の前臨床評価に、あるいは工業的または天然の環境化合物の毒性試験に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用および毒性のメカニズムを標示し、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性シグネチャ (toxicant signatures) と称される、特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. および N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、該文献は特に引用を以て明細書の一部となす)。試験化合物が、既知毒性を有する化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子およ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、最も有用且つ正確である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が、最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データをノーマライズすることに使用できるため、それらの遺伝子は重要である。ノーマライズ手順は、種々の化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。或る毒性シグネチャのエLEMENT群に遺伝子機能を割り当てることは毒性機序の解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要でない (例えば2000年2月29日に米国国立環境健康科学研究所 (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)。したがって、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、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。

10

20

## 【0251】

或る実施例では、核酸を有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより、この試験化合物の毒性を算定する。処理した生体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つ以上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。処理した生体サンプル中の転写物レベルを、未処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写物レベルの差は、処理済サンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を標示する。

## 【0252】

別の実施態様は、本発明のポリペプチド配列群を用いて或る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、個々に更なる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すなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数および相対存在量を定量することにより分析し得る。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離およ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 および Anderson)。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、あるいは銀染色液または蛍光染色液などの物質を用いてゲルを染色することにより、分散した、独自の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未処理のいずれかの生体サンプルからの、同等に位置した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。或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個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データが得られる

30

40

50

。

## 【0253】

プロテオームのプロファイルは、NAAPに特異的な抗体を用いてNAAP発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施態様では、マイクロアレイ上のエレメントとしてこれら抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイエレメント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. 他 (1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Mendozze, L.G.他 (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、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物とサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

10

## 【0254】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャ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シグネチャと並行に分析するべきである。いくつかの組織のいくつかのタンパク質については、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関が乏しいので (Anderson, N.L. および J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージには有意に影響しないがプロテオームのプロファイルを改変するような化合物の分析において、プロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中の転写物の分析はmRNAの急速な分解のために困難なので、プロテオームのプロファイル作成はこのような場合により信頼し得、情報価値があり得る。

## 【0255】

別の実施例では、タンパク質を含有する生体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。処理された生体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、未処理生体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の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。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。

20

## 【0256】

別の実施例では、タンパク質を含有する生体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。生体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。処理された生体サンプル中のタンパク質の量を、未処理生体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の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。

30

## 【0257】

マイクロアレイは、本技術分野で既知の方法で調製し、使用し、分析する (例えば Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D.他 (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号を参照)。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, 編集 (1999) Oxford University Press, Londonに記載がある。該文献は、特に引用を以て明細書の一部となす。

40

## 【0258】

本発明の別の実施態様ではまた、NAAPをコードする核酸配列群を用いて、天然ゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブ群を産生し得る。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、いくつかの例では、コード配列より非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子族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。配列は、或る特定の染色体に、または或る染色体の或る特定領域に、または人

50

為形成の染色体、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、あるいは単一染色体cDNAライブラリ群に対してマッピングされる (例えばHarrington, J.J.他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列群を用いて、例えば或る病状の遺伝を特定染色体領域の遺伝とまたは制限酵素断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を開発し得る (例えば、Lander, E.S.およびD. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

#### 【0259】

蛍光原位置ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的および遺伝的地図データと関連し得る (例えばHeinz-Ulrich,他 (1995) in Meyers, 前出、965-968ページを参照)。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られる。物理的染色体地図上の、NAAPをコードする遺伝子の位置と、特定の疾患との関連性、あるいは特定の疾患に対する素因との関連性は、この疾患と関連するDNAの領域の決定に役立ち得るため、位置を決定するクローニングの作業を促進し得る。

#### 【0260】

確定した染色体マーカー類を用いた連鎖分析などの物理的マッピング技術、および染色体標本の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類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、位置クローニングなどの遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探る研究者にとって価値がある。いったん疾患または症候群に關与する遺伝子 (群) が、血管拡張性失調症の11q22-23領域など、特定のゲノム領域への遺伝的連鎖によって、大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子あるいは調節遺伝子を提示している可能性がある (例えばGatti, R.A. 他 (1988) Nature 336:577-580を参照)。転座、反転などに起因する、健常者、保有者、罹病者の三者間における染色体位置の相違を検出する場合にも、本発明のヌクレオチド配列を用い得る。

#### 【0261】

本発明の別の実施態様では、NAAP、その触媒作用断片あるいは免疫原性断片またはそのオリゴペプチド群を、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における、化合物のライブラリ群のスクリーニングに用い得る。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ができる。NAAPと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定することもできる。

#### 【0262】

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 (例えばGeysen, 他 (1984) PCT出願第W084/03564号を参照)。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、NAAP、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、結合したNAAPを本技術分野で周知の方法で検出する。精製したNAAPはまた、上記した薬剤スクリーニング技術に用いるプレート上に直接コーティングできる。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。

#### 【0263】

別の実施例では、NAAPと特異結合可能な中和抗体がNAAPとの結合について試験化合物と競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体を用いて、1つ以上の抗原決定基をNAAPと共有するどのペプチドの存在をも検出できる。

#### 【0264】

別の実施例では、NAAPをコードするヌクレオチド配列を、将来に開発される分子生物学

10

20

30

40

50

技術であり、現在知られているヌクレオチド配列の特性（限定はされないが、トリプレット遺伝コード、特異的な塩基対相互作用等を含む）に依存する新技術に用い得る。

#### 【0265】

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て発明を最大限に利用できるであろう。したがって、これ以下に記載する好適な特定実施態様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。

#### 【0266】

上述および後述の全ての特許、特許出願および刊行物の開示は、米国特許出願第60/276,857号、第60/285,489号、第60/285,556号、第60/288,700号、第60/288,646号、第60/290,369号、第60/290,510号、および第60/332,426号を含め、言及することを以て特に本明細書の一部となす。

#### 【実施例】

#### 【0267】

##### 1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFESEQ GOLDデータベース（Incyte Genomics, Palo Alto CA）に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織は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、他の組織はホモジナイズしてフェノールにまたは変性剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL（Life Technologies）は、フェノールとグアニジンイソチオシアネートとの単相溶液である。結果として得た溶解物は、塩化セシウムのクッション液の上に重層して遠心分離するか、クロロフォルムで抽出した。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、あるいは別の慣例的方法で、溶解物からRNAを沈殿させた。

#### 【0268】

RNAの純度を高めるため、フェノールによるRNAの抽出および沈殿を、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, Chatsworth 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。

#### 【0269】

場合によってはStratagene社にRNAを提供し、同社が、対応するcDNAライブラリ群を作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム（Stratagene）またはSUPERScriptプラスミドシステム（Life Technologies）を用いて本技術分野で既知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した（前出のAusubel, 1997, 5.1-6.6ユニットなどを参照）。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、好適な制限酵素または酵素群でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ選択（300～1000 bp）は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ（Amersham Pharmacia Biotech）、あるいは分取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、適合する制限酵素部位にライゲーションされた。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）PCDNA2.1プラスミド（Invitrogen, Carlsbad CA）、PBK-CMVプラスミド（Stratagene）、PCR2-TOPOTAプラスミド（Invitrogen）、PCMV-ICISプラスミド（Stratagene）、pIGEN（Incyte Genomics, Palo Alto CA）、pRA RE（Incyte Genomics）、またはpINCY（Incyte Genomics）、またはこれらの誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、あるいはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはElectroMAX DH10Bなど適格な大腸菌細胞に形質転換した。

#### 【0270】

##### 2 cDNAクローンの単離

10

20

30

40

50

実施例1のようにして得たプラスミドの、宿主細胞からの回収は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、あるいは細胞溶解によって行った。プラスミドを精製する方法は、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およびQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットの中から少なくとも1つを用いた。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4で保管した。

#### 【0271】

別法では、高処理フォーマットで直接結合PCR法を用い、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)。宿主細胞の溶解および熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを加工し、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) および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。

#### 【0272】

##### 3 シークエンシングおよび分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法あるいは高処理装置、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) の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には、また、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) が、標準ABIプロトコルと塩基呼び出し (base calling) ソフトウェアとを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム (Applied Biosystems) が、あるいはその他の本技術分野で既知の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, 7.7ユニットに概説) を用いて同定した。いくつかのcDNA配列を選択し、実施例8に開示する技術で配列を伸長させた。

#### 【0273】

Incyte cDNAに由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカーおよびポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLASTと、動的プログラミングと、隣接ジヌクレオチド頻度分析とに基づく、アルゴリズムとプログラムとを用いた。次に、Incyte cDNA配列またはそれらの翻訳の問合せを、以下のデータベース群に対して行った。すなわち、選抜した公共のデータベース群 (例えばGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) と、ヒト、ラット、マウス、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) および *Candida albicans* からの配列群を持つPROTEOMEデータベース群 (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、および、隠れマルコフモデル (HMM) ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、例えばPFAM、INCY、およびTIGRFAM (Haft, D.H. 他(2001) Nucleic Acids Res. 29: 41-43); 並びにHMMベースのタンパク質ドメインデータベースたとえばSMART (Schultz他(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857-5864; Letunic, I. 他(2002) Nucleic Acids Res. 30:242-244) である (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。例えばEddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照)。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列を構築し、完全長のポリヌクレオチド配列を産出した。

あるいは、GenBank cDNA群、GenBank EST群、スティッチされた配列群、ストレッチされた配列群、またはGenscan予測コード配列群（実施例 4 および 5を参照）を用い、Incyte cDNAの集団を完全長まで伸長させた。PhredとPhrapとConsedとに基づくプログラムを用いて構築し、GenMarkとBLASTとFASTAと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ついてスクリーニングした。完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、対応する完全長ポリペプチド配列を誘導した。あるいは、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。完全長ポリペプチド配列群の続いたの分析としての問合せを、GenBankタンパク質データベース群（genpept）、SwissProt、PROTEOMEデータベース群、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびProsites等のデータベースや、PFAM、INCY、およびTIGRFAM等の隠れマルコフモデル（HMM）ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、並びにSMART等のHMMベースのタンパク質ドメインデータベース群に対し行った。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）およびLASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて分析する。ポリヌクレオチドとポリペプチドとの配列アラインメントは、MEGALIGNマルチシークエンスアラインメントプログラム（DNASTAR）に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムが指定する、デフォルトパラメータを用いて作製する。これは、アラインメントした配列間の一致率も計算する。

10

#### 【0274】

表7は、Incyte cDNAと完全長配列との分析と構築とに利用したツールとプログラムとアルゴリズムとの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを示す。用いたツール、プログラムおよびアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な参照文献であり、全ての文献は引用を以て文を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、確率値などのパラメータを示す（スコアが高いほど、または確率値が低いほど、2配列間の同一性が高い）。

20

#### 【0275】

完全長ポリヌクレオチド配列群とポリペプチド配列群との構築と分析とに用いた上記プログラム群は、SEQ ID NO:27-52のポリヌクレオチド配列断片群の同定にも利用した。ハイブリダイゼーション技術と増幅技術とに有用な約20～約4000ヌクレオチドの断片群を、表4の列2に示した。

30

#### 【0276】

#### 4 ゲノムDNAからのコード配列の同定および編集

推定上の核酸関連タンパク質は、先ず公共のゲノム配列データベース（例えばgbpriやgbhg）に対しGenscan遺伝子同定プログラムを実行して同定した。Genscanは汎用遺伝子同定プログラムであり、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する（Burge, C. および S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94、Burge, C. および S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照）。このプログラムは予測されたエキソン群を連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶ、構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチドおよ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。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が核酸関連タンパク質をコードするかを判定するために、コードされるポリペプチドを、PFAMモデル群に対し核酸関連分子について問合せて分析した。潜在的な核酸関連タンパク質はまた、既に核酸関連タンパク質としてアノテーションが付けられたIncyte cDNA配列に対する相同性を基に同定された。これら選択したGenscan予測配列を、次にBLAST分析により、公共データベースgenpeptおよびgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは省略されたエキソンなど、Genscanが予測した配列におけるエラーを補正した。BLAST分析はまた、Genscan予測配列の、いかなるIncyte cDNAまたは公共cDNAカバレッジ（coverage）の発見にも用いられ、したがって転写の証拠を提供した。Incyte cDNAカバレッジが利用できた場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を補正または確認した。完全長

40

50

ポリヌクレオチド配列は、実施例 3に記載した構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列および/または公共cDNA配列でGenscan予測コード配列を構築して得た。あるいは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集後または非編集のGenscan予測コード配列に、完全に由来する。

【0277】

#### 5 ゲノム配列データのcDNA配列データとの統合(assembly)

##### スティッチ配列(Stitched Sequence)

部分cDNA配列群を伸長させるため、実施例 4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムが予測したエキソン群を用いた。実施例 3に記載したように構築した部分cDNA群を、ゲノムDNAにマッピングし、また、関連するcDNA群と、1つ以上のゲノム配列からGenscan予測されたエキソン群とを有するクラスター群に分解した。cDNAとゲノムとの情報を統合すべく、グラフ理論および動的プログラミングに基づく或るアルゴリズムを用いて各クラスターを分析し、潜在的スプライス変異体群を生成した。配列群を続いて確認、編集または伸長し、完全長配列を創出した。区間の全長が、2つ以上の配列に在るような配列区間群をクラスター内で同定し、そのように同定された区間群は、推移性により、等しいと考えた。例えば、或る区間が、1つのcDNAと2つのゲノム配列とに在る場合、3つの区間は全て等しいと考えた。このプロセスにより、無関係だが連続したゲノム配列群を、cDNA配列で結び合わせて架橋し得る。このようにして同定した区間を、それらの親配列(parent sequences)に沿って現われる順にスティッチアルゴリズムで「縫い合わせ」、可能な限り最長の配列と配列変異体群とを生成した。1種類の親配列に沿って続く区間間の連鎖(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)より優先した。結果として得たスティッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベースgenpeptおよびgbpriと比較した。Genscanが予測した不正確なエキソン群は、genpeptからのトップBLASTヒットとの比較により補正した。必要な場合、追加cDNA配列群を用いるかゲノムDNAの検査により、配列群を更に伸長させた。

【0278】

##### ストレッチ配列(Stretched Sequence)

部分DNA配列群を、BLAST分析に基づく1アルゴリズムにより完全長まで伸長した。先ず、BLASTプログラムを用いて、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物および真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例 3に記載されたように構築された部分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エキ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対し、キメラタンパク質内では挿入または欠失が起こり得る。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、公共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、部分的なDNA配列を、相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を含んでいるか否かを判定した。

【0279】

#### 6 NAAPをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:27-52を構築するために用いた配列群を、BLAST他のSmith-Watermanアルゴリズムの実装群を用いて、Incyte LIFESEQデータベースおよび公共ドメインデータベース群の配列と比較した。SEQ ID NO:27-52と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどの構築アルゴリズム(表7)を使用して、連続しオーバーラップする配列のクラスター群に組み入れた。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などの公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッドおよび遺伝地図データを用いて、いずれかのクラスター化された配列が既にマッピングされているかを判定した。マッピングされた配列が或るクラスターに含まれている場合、そのクラスターの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

10

20

30

40

50

## 【0280】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に対して測定する（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、1cMは、ヒト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およ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、各クラスター内に配列が含まれる放射線ハイブリッドマーカー類に対して境界を提供するGenethonによってマッピングされた遺伝マーカー群に基づく。NCBI「GeneMap'99」（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>）など一般個人が入手可能なヒトゲノム地図などの資源を用いて、既に同定された疾患遺伝子類が、上記の区間内若しくは近傍にマップされているかを判定できる。

10

## 【0281】

この方法で、SEQ ID NO:27は、14番染色体の103.7~112.6センチモルガンの区間内にマッピングされた。

## 【0282】

## 7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験技術であり、特定の細胞種または組織からのRNAが結合している膜への、標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションに関与する（例えば前出のSambrook, 7章、同Ausubel (1995) 4章および16章を参照）。

20

## 【0283】

BLASTを応用した類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLIFESEQ (Incyte Genomics) などのcDNAデータベースにおいて、同一または関連分子を検索した。ノーザン分析は、いくつかの膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、任意の特定の一致を厳密なあるいは相同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修正することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

## 【0284】

## 【数1】

## (BLASTスコア×配列一致率)

 $5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)}) \text{の最小値}$ 

30

積スコアは、2つの配列間の類似度と、配列が一致する長さとの両方を考慮している。積スコアは0~100のノーマライズされた値であり、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。BLASTスコアを計算するには、或る高スコアリングセグメント対（HSP）内の一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不一致塩基に-4を割り当てる。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る（ギャップにより隔離される）。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアのセグメント対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的オーバーラップとBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア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。積スコア70は、一端が100%一致し、70%オーバーラップしているか、他端が88%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%オーバーラップしているか、79%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

40

## 【0285】

或いは、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列を、由来する組織に対して分析する。例えば幾つかの完全長配列は、少なくとも一部は、オーバーラップするIncyte cDNA配列群を用いて構築される（実施例3を参照）。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、以下の臓器/組織カテゴリーの1つへ分類される。

50

すなわち心血管系、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、血液および免疫系、肝、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性/混合性または尿路である。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/条件カテゴリー、すなわち癌、細胞株、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、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。得られるパーセンテージは、NAAPをコードするcDNAの、組織特異的発現および疾患特異的発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) から得ることができる。

10

## 【0286】

8 NAAPをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列はまた、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群を用いて該断片を伸長させて産生した。或る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、別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。開始プライマー群の設計には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、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となり、約68~約72の温度で標的配列にアニーリングするようにした。ヘアピン構造およびプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチド群の伸長は、全て回避した。

20

## 【0287】

選択したヒトcDNAライブラリ群を用い、配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマーあるいはプライマーのネステッドセットを設計した。

## 【0288】

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。反応混液は、鋳型DNAを有し、また、200 nmolの各プライマーを有する。また、 $Mg^{2+}$  と  $(NH_4)_2SO_4$  と2-メルカプトエタノールとを含有する反応バッファと、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) とを含有する。プライマー対であるPCI AとPCI Bとに対し、以下のパラメータで増幅した。ステップ1: 94 で3分間。ステップ2: 94 で15秒間。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および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。

30

## 【0289】

各ウェルのDNA濃度は、 $1 \times TE$  及び  $0.5 \mu l$  の希釈していないPCR産物に溶解した  $100 \mu l$  のPICOGREEN定量試薬 (0.25(v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) を不透明な蛍光光度計プレート (Corning Costar, Acton MA) の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定した。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量すべく、プレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) でスキャンした。反応混合物のアリコット  $5 \sim 10 \mu l$  を1%アガロース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判定した。

40

## 【0290】

伸長したヌクレオチドは、脱塩および濃縮して384穴プレートに移し、CviJI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、音波処理またはせん断し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) への再連結を行った。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

50

メラゼ (Stratagene) で処理して制限部位のオーバーハングを満たし、適格な大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を有する培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2xカルベニシリン培養液の384穴プレートに37で一晚培養した。

#### 【0291】

細胞を溶解し、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) およびPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いて以下のパラメータでDNAをPCR増幅した。ステップ1: 94で3分間。ステップ2: 94で15秒間。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および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の定量化には、上記したようにPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) を用いた。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エネルギー移動シークエンシングプライマー、およびDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) またはABI PRISM BIGDYEターミネーターサイクルシークエンシングレディ反応キット (Terminator cycle sequencing ready reaction kit) (Applied Biosystems) を用いてシークエンシングした。

10

#### 【0292】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリヌクレオチド配列を検証した。あるいは、完全長ポリヌクレオチドを用い、上記手順で、そのような伸長のために設計したオリゴヌクレオチド類と、或る適切なゲノムライブラリとを用いて5'調節配列を得た。

20

#### 【0293】

##### 9 NAAPをコードするポリヌクレオチドにおける1塩基多型の同定

1塩基多型 (SNP) として知られる一般的なDNA配列変異体が、SEQ ID NO:27-52において、LIFESEQデータベース (Incyte Genomics) を用いて同定された。同じ遺伝子からの配列群は共にクラスター化され、実施例3に述べたように構築されて、その遺伝子における全ての配列変異体の同定を可能にした。一連のフィルタ群を有する或るアルゴリズムを用いて、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルタ群 (preliminary filters) が過半の塩基呼び出し (basecall) エラーの除去を、最少Phred質スコア15を要求することによって行い、また、配列アラインメントエラーと、ベクター配列、キメラ、およびブライズ変異体の不適切なトリミングの結果であるエラーとをも除去した。先進の染色体分析の自動化された手順によって、推定上のSNPの近傍にある、オリジナルのクロマトグラムファイル群を分析した。クローンエラーフィルタ群は、統計的に発生させたアルゴリズムを用いて、実験室でのプロセス中に生じたエラーを同定した。エラーとしては、逆転写酵素、ポリメラーゼ、または常染色体突然変異によって起きたエラーがある。クラスター化エラーフィルタ群は、統計的に発生させたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体群または偽遺伝子群のクラスター化の結果であるエラーや、非ヒト配列による汚染が原因のエラーを同定した。最終セットのフィルタ群は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体において見られる重複 (duplicates) とSNPとを除去した。

30

#### 【0294】

幾つかのSNPは、更なる特徴付けの為に選択された。選択は高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc.) を用いた質量分析によって行い、4群の異なるヒト集団におけるSNP部位での対立遺伝子頻度を分析した。白人集団は92個体 (46名の男子、46名の女子) からなり、83名はユタ出身、4名はフランス人、3名はベネズエラ人、2名はアーミッシュの人々である。アフリカ集団は194個体 (97名の男子、97名の女子) からなり、全員がアフリカ系アメリカ人である。ヒスパニック集団は324個体 (162名の男子、162名の女子) からなり、全員がメキシコのヒスパニックである。アジア集団は126個体 (64名の男子、62名の女子) からなり、報告された親の内訳は43%が中国人、31%が日本人、13%がコリアン、5%がベトナム人、8%が他のアジア人である。対立遺伝子頻度の分析は先ず白人集団においてなされ、幾つかの場合、SNPの内、対立遺伝子変異をこの集団において示さなかったSNPは、更に他の3集団においてテストされることは無かった。

40

50

## 【0295】

10 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化および使用

SEQ ID NO:27-52由来のハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNA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本質的に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、[ $^{-32}$ P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250  $\mu$ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを混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、S EPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビーズカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。AseI、BglIII、EcoRI、PstI、XbaIまたはPvuII (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。

## 【0296】

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°Cで16時間行う。非特異的シグナル群を除去するため、最大で例えば $0.1 \times$ クエン酸ナトリウム食塩水および0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件下で、プロット群を室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィ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。

## 【0297】

11 マイクロアレイ

或るマイクロアレイ上でのアレイエレメント群の連接または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾ式印刷 (インクジェット印刷、前出のBaldeschweilerなどを参照)、機械的マイクロスポッティング技術およびこれらから派生した技術を用いて達成し得る。上記各技術において基板は、均一な、無孔の表面を持つ固体とすべきである (Schena (1999) 前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップおよびシリコンウエハがある。あるいは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似した手順を利用し、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置および結合させてもよい。通常のアレイは、利用可能な、当業者に公知の方法と機械とを用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る (例えばSchena, M. 他 (1995) Science 270:467-470; Shalon, D.他 (1996) Genome Res.6:639-645; Marshall, A. および J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31を参照)。

## 【0298】

完全長cDNA、発現配列タグ (EST)、またはそれらの断片またはオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントと成り得る。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、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) など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。アレイエレメント群を、生体サンプル中のポリヌクレオチド群とハイブリダイズする。生体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などの分子タグに抱合させる。ハイブリダイゼーション後、生体サンプルからの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でのハイブリダイゼーションを検出する。あるいは、レーザー脱離およ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或る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、相補性の度合と相対存在度とを算定し得る。一実施態様におけるマイクロアレイの調製および使用について、以下に詳述する。

## 【0299】

組織または細胞サンプルの調製

全RNAを組織サンプル群から単離するためグアニジニウム チオシアネート法を用い、ポ

リ(A)<sup>+</sup>RNAを精製するためオリゴ(dT)セルロース法を用いる。各ポリ(A)<sup>+</sup>RNAサンプルを、MMLV逆転写酵素、0.05pg/μlのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1×第一鎖バッファー、0.03unit/μlのRNアーゼ阻害因子、500μMのdATP、500μMのdGTP、500μMのdTTP、40μMのdCTP、40μM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、200ngのポリ(A)<sup>+</sup>RNAを含有する体積25mlで行う。特異的対照ポリ(A)<sup>+</sup>RNA群は、非コード酵母ゲノムDNAから*in vitro*転写により合成する。37で2時間インキュベートした後、各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5mlの0.5M水酸化ナトリウムで処理し、85で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプル群の精製には、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピナラム(CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いる。混合後、2つの反応サンプルのエタノール沈殿を、1mlのグリコーゲン(1mg/ml)、60mlの酢酸ナトリウム、および300mlの100%エタノールで行う。サンプルは次に、SpeedVAC(Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いて完全に乾燥させ、14μlの5×SSC/0.2%SDS中で再懸濁する。

10

#### 【0300】

##### マイクロアレイの調製

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローン化したcDNAインサート群と、ベクター群とを含有する細菌細胞群から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートの側面に位置するベクター配列群に相補的なプライマー類を用いる。30サイクルのPCRによって、1~2ngの初期量から5μgを超える最終量まで、アレイエレメントを増幅する。増幅したアレイエレメントは、SEPHACRYL-400(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて精製する。

20

#### 【0301】

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、0.1%のSDSおよびアセトン中で超音波洗浄し、処理の間および処理後に十分に蒸留水で洗浄する。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、十分に蒸留水中で洗浄し、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は、110のオーブンで硬化させる。

30

#### 【0302】

米国特許第5,807,522号に記載されている手順を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメント群を付加する。この特許は、引用を以て明細書の一部とする。平均濃度100ng/μlのアレイエレメントDNA1μlを、高速ロボット装置(robotic apparatus)により、開放型キャピラリープリンティングエレメント(open capillary printing element)に充填する。装置はここで、スライド毎に約5nlのアレイエレメントサンプルを置く。

#### 【0303】

マイクロアレイをUV架橋するため、STRATALINKER UV架橋剤(Stratagene)を用いる。マイクロアレイの洗浄を、室温において、0.2%SDSで1回、蒸留水で3回行う。非特異結合部位をブロックするため、マイクロアレイのインキュベーションを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で30分間行った後、前に行ったように0.2%SDSおよび蒸留水で洗浄する。

40

#### 【0304】

##### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応に用いる9μlのサンプル混合体には、Cy3またはCy5で標識したcDNA合成産物群の各0.2μgを、5×SSC、0.2%SDSハイブリダイゼーション緩衝液中に含む。サンプル混合体は、65まで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上へ等分して1.8cm<sup>2</sup>のカバーガラスで覆う。アレイを、顕微鏡用スライドよりわずかに大きい空

50

洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバー内を湿度100に保つため、140  $\mu$ lの5  $\times$  SSCをチェンバーの1コーナーに加える。アレイを入れたチェンバーは、60 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  $\times$  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  $\times$  SSC)において45 で10分間ずつ3回洗浄し、乾燥させる。

#### 【0305】

##### 検出

レポーター標識したハイブリダイゼーション複合体を検出するには、Cy3の励起のために488 nm、Cy5の励起のために632 nmでスペクトル線を発生し得るInnova70混合ガス10Wレーザ(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡を用いる。励起レーザ光の焦点をアレイ上に置くため、20  $\times$  顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いる。アレイを含むスライドを、顕微鏡の、コンピュータ制御のX-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタースキャンする。本実施例で用いる1.8 cm  $\times$  1.8 cmのアレイは、解像度20  $\mu$ mでスキャンする。

10

#### 【0306】

異なる2回のスキャンで、混合ガスマルチラインレーザは2つのフルオロフォアを連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、2つのフルオロフォアに対応する2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に送られる。好適なフィルター群をアレイと光電子増倍管との間に設置して、シグナルをフィルターする。用いるフルオロフォアの最大発光の波長は、Cy3では565 nm、Cy5では650 nmである。装置は両方のフルオロフォア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を用いて、フルオロフォア1つにつき1度スキャンし、各アレイを通常2度スキャンする。

20

#### 【0307】

通常、各スキャンの感度を校正するため、cDNA対照種を或る既知濃度でサンプル混合物に添加し、対照種が発生するシグナル強度を用いる。アレイ上の或る特定の位置には或る相補的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ゼーション種の重量比1:100,000で相関させる。異なる源泉(例えば代表的な試験細胞および対照細胞など)からの2つのサンプルを、各々異なるフルオロフォアで標識し、異なる発現をする遺伝子群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、校正するcDNAのサンプルを2種のフルオロフォアで標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって校正を行う。

30

#### 【0308】

光電子増倍管の出力をデジタル化するため、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールした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)を用いる。デジタル化したデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラースケールへのリニア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つの異なるフルオロフォアを同時に励起および測定する場合には、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いて、データは先ずフルオロフォア間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重なりに起因する)を補正される。

40

#### 【0309】

グリッドが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。

#### 【0310】

例えば、総RNAの単離を、前立腺DU-145癌細胞と前立腺PrEC上皮細胞とから行う。DU-145は前立腺癌細胞株であり、その細胞株の単離は或る69才男性(広範な転移性前立腺癌を有する)から行った。前立腺DU-145癌細胞の遺伝子発現プロファイルを、非腫瘍形成性の前

50

立腺PrEC上皮細胞のプロファイルと比較する。SEQ ID NO:45は、前立腺PrEC上皮細胞と比較して前立腺DU-145癌細胞で差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。前立腺PrEC上皮細胞と比較して、前立腺DU-145癌細胞においてSEQ ID NO:45の発現の低下が見られた。したがって、SEQ ID NO:45は、細胞増殖性障害の診断アッセイに有用である。

#### 【0311】

別の例として、総RNAの単離を、ホスホリパーゼA2で処理したヒトのジャーカット(Jurkat)細胞から、また無処理ジャーカット細胞から行う。ジャーカットは、急性T細胞白血病細胞株である。ホスホリパーゼA2は、脂質代謝、炎症、シグナル伝達、および遺伝子発現制御において役割を果たす。ホスホリパーゼA2処理したジャーカット細胞の遺伝子発現プロファイルを、無処理ジャーカット細胞のプロファイルと比較する。遺伝子発現プロファイルの比較はまた、ラパマイシンで処理したヒトPBMC細胞と、無処理PBMC細胞とで行う。ラパマイシンは、細胞増殖の阻害剤である。ラパマイシンは、リンホカイン類(例えばインターロイキン2およびインターロイキン4)に対するT細胞の応答を障害して、T細胞の活性化の抑制を行う。また、ラパマイシンは、種々の造血成長因子(例えばインターロイキン3、インターロイキン6、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、およびkitリガンドを含む)に対する細胞株の増殖性の応答をブロックする。SEQ ID NO:51は、低下した発現を、ヒトT細胞白血病ジャーカット細胞のホスホリパーゼA2処理細胞で、無処理ジャーカット細胞との比較において示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。無処理PBMC細胞と比較して、ラパマイシンで処理したヒトPBMC細胞において、SEQ ID NO:51の発現の増加が見られた。したがって、SEQ ID NO:51は、細胞増殖性障害、発達障害、および免疫障害の診断アッセイに有用である。

10

20

#### 【0312】

##### 1.2 相補的ポリヌクレオチド

NAAPをコードする配列あるいはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然NAAPの発現を検出、低減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、これより小さなあるいは大きな配列の断片の場合でも、本質的に同じ手順を用いる。適切なオリゴヌクレオチド群を設計するため、Oligo 4.06ソフトウェア(National Biosciences)および、NAAPのコーディング配列を用いる。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防止する。翻訳を阻害するには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、NAAPをコードする転写物にリボソームが結合するのを防ぐ。

30

#### 【0313】

##### 1.3 NAAPの発現

NAAPの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌内でATRSを発現させるには、抗生物質耐性遺伝子と、cDNA転写レベルを高める誘導性プロモーターとを有する好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターとしては、lacオペレーター調節エレメントと併用するT5またはT7バクテリオファージプロモーター、および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)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌にNAAPを発現させるには、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発する。真核細胞でのNAAPの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に、一般にバキュロウイルスとして知られるAutographica californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の組換え型を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子をNAAPをコードするcDNAと置換するには、相同組換えを行うか、或いは、トランスファープラスミドの媒介を伴う、細菌の媒介による遺伝子転移を行う。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモーターによって高レベルのcDNA転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は夜蛾の1種Spodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞への感染に用いるが、ヒト肝細胞への感染に用いることもある。後者の感染

40

50

の場合は、バキュロウイルスへの更なる遺伝的修飾が必要になる (Engelhard, E.K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V.他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945を参照)。

#### 【0314】

殆どの発現系では、NAAPが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)と、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識と合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの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ステップで行い得る。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性および抗原性を維持した状態で、固定化したグルタチオン上での融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GST要素を、特異的に操作した部位においてNAAPからタンパク質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およびポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いた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、金属キレート樹脂上での精製を可能にする (QIAGEN)。タンパク質の発現および精製の方法は、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NAAPを直接用いて、以下の実施例17および18の、適用可能なアッセイを行える。

10

#### 【0315】

##### 1.4 機能的アッセイ

NAAPの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理的に高められたレベルでの、NAAPをコードする配列の発現によって算定する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを持つ哺乳動物発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選択されるベクターとしては、PCMV SPORT (Life Technologies) およびPCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA) があり、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを持つ。リポソーム製剤あるいは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10  $\mu$ 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、一過的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2  $\mu$ 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、組換えベクターからのcDNA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、それら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ある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、ヨウ化プロピジウムによるDNA染色によって計測される核DNA含量の変化、前方散乱光と90°側方散乱光によって計測される細胞サイズと顆粒性の変化、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および細胞内におけるタンパク質の発現の変容、および、フルオレセイン抱合したアネキシン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容がある。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。

20

30

40

#### 【0316】

遺伝子発現に与えるNAAPの影響は、NAAPをコードする配列と、CD64またはCD64-GFPのどちら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、形質移入された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存された複数の領域に結合する。形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビーズを用いて効率的に分離できる (DYNAL, Lake Success NY)。mRNAは、当業者に周知の方法で細胞から精製できる。NAAPと、目的とする他の遺伝子とをコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析できる。

#### 【0317】

50

### 1.5 NAAP特異的抗体の産生

実質的に精製されたNAAPをポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE; 例えばHarrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182:488-495を参照) または他の精製技術で作製し、これを用いて標準的なプロトコルで動物 (例えばウサギ、マウスなど) を免疫化して抗体を作り出す。

#### 【0318】

別法では、NAAPアミノ酸配列を、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C末端付近の、或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で周知である (例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

#### 【0319】

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、免疫原性を高める (例えば前出のAusubel, 1995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-KLH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NAAP活性を試験するには、ペプチドまたはNAAPを基板に結合し、1% BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

#### 【0320】

### 1.6 特異的抗体を用いる天然NAAPの精製

天然NAAPあるいは組換えNAAPを実質的に精製するため、NAAPに特異的な抗体群を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーを行う。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化したSEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗NAAP抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従ってこのレジンをブロックし、洗浄する。

#### 【0321】

NAAPを有する培養液をイムノアフィニティークラムに通し、NAAPを優先的に吸着できる条件で (例えば、界面活性剤の存在下で高イオン強度のバッファーで) そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とNAAPとの結合を切るような条件で (例えば、或るpH2~3のバッファー、あるいは高濃度の、例えば尿素またはチオシアン酸イオンなどのカオトロップで) 溶出させ、NAAPを収集する。

#### 【0322】

### 1.7 NAAPと相互作用する分子の同定

NAAP、または生物学的に活性なその断片を、<sup>125</sup>Iボルトンハンター試薬で標識する (例えば Bolton, A.E. および W.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529-539を参照)。マルチウェルプレートの各ウェルに予め配列しておいた候補の分子群を、標識したNAAPと共にインキュベートし、洗浄して、標識されたNAAP複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なNAAP濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したNAAPの数量、親和性、および会合についての値を計算する。

#### 【0323】

別法では、NAAPと相互作用する分子を、Fields, S. および O. Song (1989, *Nature* 340: 245-246) に記載の酵母2-ハイブリッドシステム (yeast two-hybrid system) を、または、MATCHMAKERシステム (Clontech) など2-ハイブリッドシステムに基づく市販キットを用いて分析する。

#### 【0324】

NAAPはまた、ハイスループット型の酵母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大ライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を判定できる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国

特許第6,057,101号)。

【0325】

18 NAAP活性の実証

NAAP活性の測定を、レポーター遺伝子の転写を刺激するNAAPの能力によって行う(Liu, H. Y. 他(1997) EMBO J. 16:5289-5298)。このアッセイは、十分に特徴付けられたレポーター遺伝子作成物であるLexA<sub>op</sub>-LacZを用いる。このLexA<sub>op</sub>-LacZは、大腸菌LacZ酵素をコードする配列に融合されたLexA DNA転写調節エレメント(LexA<sub>op</sub>)からなる。融合遺伝子の作成及び発現、細胞への融合遺伝子の導入、及び、LacZ酵素活性の測定方法は、当分野で周知である。NAAPをコードする配列を、LexA転写因子に由来するDNA結合ドメインとNAAPとからなる融合タンパク質、LexA-NAAPの合成を誘導するプラスミドにクローニングする。LexA-NAAP融合タンパク質をコードする得られたプラスミドを、LexA<sub>op</sub>-LacZレポーター遺伝子を持つプラスミドと共に酵母細胞内に導入する。対照細胞と比較したLexA-NAAP形質移入細胞に関連するLacZ酵素活性の量が、NAAPによって刺激された転写の量に比例する。

10

【0326】

別のレポーター遺伝子アッセイであるDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いてNAAP活性を測定できる(Agata, Y. 他(1999) J. Biol. Chem. 274:16412-16422)。略述すると、NIH 3T3細胞への形質移入を、250 ngの或る発現プラスミド(或るNAAP融合タンパク質をコードする配列群を含有)と100 ngの或るルシフェラーゼレポータープラスミドで行う。細胞の培養をダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)内で、10%ウシ胎児血清(FCS)で行う。細胞を収集して溶解し、細胞溶解物のアッセイを、相対的ルシフェラーゼ活性について、アッセイシステムが提供する方法に従い行う。

20

【0327】

NAAPの走化活性の測定を、変法Boydenチャンバーを用い、フィルター群(5 μmの孔径、Corning)をコラーゲンI(100 μg/mlを0.5 Mの酢酸中)およびフィブロネクチン(10 μg/ml)で処理して行う。20,000~40,000個の細胞(平滑筋細胞であり、培養を、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)内で行い、収集し、洗浄し、再懸濁を無血清DMEM内で行った細胞)を、Boydenチャンバの上部ウェルに加える。NAAPの希釈を無血清DMEM内で行い、下部ウェルに加える。遊走を37 °Cで一晩行わせる。フィルターの上部表面に残る細胞を擦り落とし、フィルターをメタノールで固定し、10% (wt/vol)クリスタルバイオレットを20% (vol/vol)メタノール中に含む溶液中で染色を行う。試験は少なくとも2回、三つ組(triplicate)で行う。細胞のカウントを、各フィルターについて10倍率の視野で行う。結果は平均±標準偏差であり、対照の何倍として表される。無作為細胞遊走(すなわち、NAAP不在中の遊走)は、恣意的な値(arbitrary value)である100%を与えられる(Resnati, M. 他(1996) EMBO Journal 15:1572-1582)。

30

【0328】

あるいはNAAPの活性は、亜鉛に結合する能力により測定される。5~10 μMのサンプル溶液(2.5 mMの酢酸アンモニウム溶液中、pH 7.4)と0.05 Mの硫酸亜鉛溶液(Aldrich, Milwaukee WI)との混合を、100 μMのジチオスレイトール(10%メタノールを添加)の存在下で行う。サンプルと硫酸亜鉛溶液とを、20分間インキュベートする。反応溶液をVydacカラムに通す(約300オングストロームのポアサイズ(bore size)、5 μMの粒径)。これにより、亜鉛-サンプル複合体を溶液から単離し、次に質量分析計(PE Sciex, Ontario, Canada)にかける。サンプルに結合した亜鉛の定量には、機能的原子量である63.5 Daを用いる。この原子量を観測したのはWhittal, R. M. 他((2000) Biochemistry 39:8406-8417)である。

40

【0329】

当業者には、本発明の要旨および精神から逸脱しない範囲での、記載した本発明の方法およびシステムの、種々の修正および変更の手段は自明であろう。本発明について説明するにあたり幾つかの実施例に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、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。分子生物学または

50

関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載する本発明の実施方法の様々な修正は、明確に特許請求の範囲内にあるものとする。

【0330】

(表の簡単な説明)

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

【0331】

表2は、GenBank識別番号と、本発明のポリペプチドに最も近いGenBank相同体の注釈とを示す。また、各ポリペプチドとその相同体(1つ以上)が一致する確率スコアも併せて示す。

10

【0332】

表3は、予測されるモチーフおよびドメインなど、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方法、アルゴリズムおよび検索可能なデータベースと共に示す。

【0333】

表4は、本発明のポリヌクレオチド配列を構築するために用いたcDNA断片やゲノム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。

【0334】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0335】

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

20

【0336】

表7は、本発明のポリヌクレオチドとポリペプチド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、参照文献および閾値パラメータと共に示す。

【0337】

表1-1

Incyte プロジ エクト 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	CA2 試験
2277388	1	2277388CD1	27	2277388CB1	
7487561	2	7487561CD1	28	7487561CB1	
3504861	3	3504861CD1	29	3504861CB1	
2686104	4	2686104CD1	30	2686104CB1	
1380119	5	1380119CD1	31	1380119CB1	
2277388	1	2277388CD1	27	2277388CB1	
7487561	2	7487561CD1	28	7487561CB1	
3504861	3	3504861CD1	29	3504861CB1	
2686104	4	2686104CD1	30	2686104CB1	
1380119	5	1380119CD1	31	1380119CB1	
2294975	6	2294975CD1	32	2294975CB1	90072482CA2
6178145	7	6178145CD1	33	6178145CB1	6178145CA2, 6399778CA2, 9011540CA2
7493913	8	7493913CD1	34	7493913CB1	2646019CA2
778511	9	778511CD1	35	778511CB1	90093121CA2
5609988	10	5609988CD1	36	5609988CB1	
7487559	11	7487559CD1	37	7487559CB1	
3112390	12	3112390CD1	38	3112390CB1	90067452CA2
269219	13	269219CD1	39	269219CB1	
2503465	14	2503465CD1	40	2503465CB1	1863842CA2, 2503465CA2, 3430213CA2, 7151169CA2
6806534	15	6806534CD1	41	6806534CB1	
3206847	16	3206847CD1	42	3206847CB1	
4003220	17	4003220CD1	43	4003220CB1	1953853CA2
4792756	18	4792756CD1	44	4792756CB1	
1867021	19	1867021CD1	45	1867021CB1	
6335220	20	6335220CD1	46	6335220CB1	
2314637	21	2314637CD1	47	2314637CB1	
5543910	22	5543910CD1	48	5543910CB1	

10

20

30

【表 1 - 2】

表1-2

Incyte プロシ エクト 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	CA2 試験
3620140	23	3620140CD1	49	3620140CB1	
4083592	24	4083592CD1	50	4083592CB1	
1522155	25	1522155CD1	51	1522155CB1	
7503717	26	7503717CD1	52	7503717CB1	

10

20

30

【 0 3 3 9 】

【表 2 - 1】

表2-1

ポリペプチド SEQ ID NO.	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO.または PROTEOME ID NO.	確率スコア	注釈
1	2277388CD1	95596656	0	[線虫 (Caenorhabditis elegans)] Pfam ドメインとの類似性を持つ PF00623, RNA ポリメラーゼ $\alpha$ サブユニット
1	2277388CD1	92739050	0	[ラット] RNA ポリメラーゼ 1 194 kDa サブユニット Hannan, R.D. 他 (1998) Affinity purification of RNA polymerase I: Identification of an associated kinase. J. Biol. Chem. 273: 1257-1267
2	7487561CD1	96939732	0	[ヒト] 転写因子 Elongin A2 Aso, T. 他 (2000) Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. J. Biol. Chem. 275: 6546-6552
3	3504861CD1	955471	1.6E-72	[マウス] Zfp-29 Denny, P. および Ashworth, A. (1991) A zinc finger protein-encoding gene expressed in the post-meiotic phase of spermatogenesis. Gene 106 (2), 221-227
4	2686104CD1	99968290	3.6E-177	[ヒト] Zn フィンガー-蛋白質 304
5	1380119CD1	9200407	1.4E-216	[マウス] pMLZ4 (Brady, J.P. および Ptzigorsky, J. (1993) Cloning and characterization of a novel zinc-finger protein-encoding cDNA from the mouse eye lens. Gene 124, 207-214.)
6	2294975CD1	97658011	1.6E-213	[ヒト] 新規 HMG ボックス転写因子 Dunn, T.L. 他 (1995) Gene 161:223-225
7	6178145CD1	94514561	1.3E-20	[マウス] KRAB 含有 Zn フィンガー-蛋白質 KRAZ2 Agata, Y. 他 (1999) J. Biol. Chem. 274:16412-16422
8	7493913CD1	912329939	9.3E-211	[ヒト] OMADS1 タンパク質
9	778511CD1	91769491	2.9E-53	[ヒト] kruppel 関連 Zn フィンガー-蛋白質 Goldwurm, S. 他 (1997) Genomics 40:486-489

10

20

30

40

【 0 3 4 0 】

【表 2 - 2】

表2-2

ホリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
10	5609988CD1	g3298472	1.2E-276	[マウス] Znフィンガー蛋白質 Lee, J.Y. 他 (1998) DNA Cell Biol. 17:849-58
11	7487559CD1	g3492787	1.5E-109	[ヒト] 甲狀腺転写因子 2 Maechia, P.E. 他 (1999) Biochimie 81:433-440
12	3112390CD1	g1549245	7E-233	[ヒト] SWI/SNF 複合体 60 KDa サブユニット Wang, W. 他. Genes Dev. 10:2117-2130
13	269219CD1	g55471	0	[マウス] Zfp-29 Denny, P. および Ashworth, A. (1991) Gene 106:221-227
14	2503465CD1	g12001970	1.9E-47	[ヒト] My015 タンパク質
15	6806534CD1	g9229934	4.6E-227	[マウス] midnolin Tsukahara, M. 他 (2000) Gene 254:45-55
16	3206847CD1	g9663936	0	[マウス] Znフィンガー-ホメオドメイン蛋白質 4 Sakata, N., 他 (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 273:686-693
17	4003220CD1	g12483904	3.6E-268	[ラット] Znフィンガー蛋白質 III-39
18	4792756CD1	g186774	5.7E-207	[ヒト] Znフィンガー蛋白質 Bellefroid, E.J. 他 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 3608-3612; Amemiya, C.T. 他 (1993) EMBO J. 12, 1363-1374
19	1867021CD1	g11527849	2.6E-74	[マウス] Znフィンガー蛋白質 SKAT2 Blanchard, A.D. 他 (2000) Eur. J. Immunol. 30, 3100-3110
20	6335220CD1	g1480005	1E-151	[マウス] Zic4 タンパク質 Aruga, J. 他 (1996) Gene 172:291-294 Identification and characterization of Zic4, a new member of the mouse Zic gene family

10

20

30

【 0 3 4 1 】

【表 2 - 3】

表2-3

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO:または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
21	2314637CD1	53901262	1.2E-45	[ラット] Cbfa1/Osf2 転写因子 Xiao, Z.S. 他 (1998) Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor Gene 214:187-197
22	5543910CD1	96910966	1.7E-148	[ヒト] 転写抑制因子 CTCF Filippova, G.N. (1998) Genes Chromosomes Cancer 22:26-36 A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF... within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers
23	3620140CD1	97576704	3.9E-239	[マウス] イロコイ-クラスのホメオボックス蛋白質 Irx1 Cohen, D.R. (2000) Mech. Dev. 91:317-321 Expression of two novel mouse Iroquois homeobox genes during neurogenesis
24	4083592CD1	92618752	1E-166	[トラフグ (Takifugu rubripes)] Znフィンガー蛋白質 Venkatesh, B.他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12462-12466 Transgenic rats reveal functional conservation of regulatory controls between the Fugu isotocin and rat oxytocin genes.
25	1522155CD1	96912223	3.8E-28	[分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe)] 仮説的 Zn フィンガー蛋白質
26	7503717CD1	912329939	2E-97	[ヒト] OMADS1 タンパク質

10

20

30

40

【 0 3 4 2 】

表3-1

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	2277386CD1	1720	RNA ポリメララーゼ $\alpha$ サブユニット: S295-G1023 RNA ポリメララーゼ A/ $\beta$ /VA サブユニット: L1187-L1719 膜貫通ドメイン: P113-P141, L1533-R1561 真核生物 RNA ポリメララーゼ 2 ヘプタペプチドリピート蛋白質, BL00115: S404-G434, K435-F462, A463-S495, T535-F589, G591-Q616, Q617-Y658, S731-T773, G775-G823, E82-P113, L863-I912, S913-T952, G953-T982, S983-D1009, S1010-Q1051, P1207-N1240, V1241-M1263, E1566-Y1601, N1603-M1648, G43-I81 DNA 依存性 (DNA DIRECTED) RNA ポリメララーゼ 1 最大サブユニット 転移酵素 転写 亜鉛	HMMER_PFAM HMMER_PFAM TMAP BLIMPS_BLOCKS
			PD038667: V126-K386; PD000656: L421-N832, S731-G1023, D412-P530, L299-N327, PD022171: L1024-E1179; PD150347: E1250-S1362 DNA 依存性 RNA ポリメララーゼ 2: DM00252 P10964 227-771: A346-K718, T234-K350, L98-T111; DM00252 P15398 222-786: Q237-W716; DM00261 P15398 788-1067: E741-L1024; DM00261 P10964 773-1054: E741-L1024 チトクロム C フォアミリンヘム結合部位シグネチャ: C104-M109 潜在的リン酸化部位: S21 S29 S153 S260 S281 S382 S404 S508 S706 S731 S774 S838 S931 S1042 S1058 S1093 S1131 S1158 S1203 S1218 S1280 S1353 S1386 S1429 S1689 T210 T359 T360 T513 T642 T662 T683 T712 T720 T944 T952 T982 T1006 T1165 T1178 T1271 T1369 T1373 T1470 T1487 T1528 Y872 Y1427	BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM BLAST_DOMO
			潜在的グリコシル化部位: N73 N704 N1240 N1565 ロイシンジックパターンの位置: L78-L99	MOTIFS MOTIFS
2	7487561CD1	753	ELONGIN A; PD042849: T83-A521; PD035203: M641-R753 タンパク質染色体 2 ELONGIN A 膜貫通 遺伝子間; PD013328: T528-K640 伸長; 転写; ELONGIN; DM05381 A57244 329-773: S313-R752 潜在的リン酸化部位: S147 S165 S229 S230 S270 S313 S319 S333 S363 S426 S436 S438 S478 S494 S628 S655 S661 S716 S751 T7 T20 T52 T83 T131 T142 T262 T281 T399 T528 T603 T650 T654 T727 潜在的グリコシル化部位: N327 N415 N601	MOTIFS MOTIFS BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM BLAST_DOMO MOTIFS

【表 3 - 2】

表3-2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
3	3504861CD1	568	Znフィンガー、C2H2 タイプ: Y450-H472, H506-H528, Y394-H416, Y422-H444, Y478-H500, Y534-H556 C2H2 タイプ Znフィンガーシグネチャ: PR00048: P393-S406, L409-G418 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 父性的に発現される; PD017719: G363-E559, N392-L561, L351-K551, Q358-H556 Znフィンガー DNA 結合 金属結合 核内転写調節リピーター; PD000072: K476-C542, K420-C483, K448-C511, P393-C455 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 転写調節; PD033163: C452-K560 Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン DM00002 Q05481 831-885; C399-E454, C427-E482, C455-P505; DM00002 P08042 314-358: C455-H500, C427-H472, C399-H444, C511-H556; DM00002 Q05481 789-829: R441-E482, R413-E454, Q469-D510, H388-C424; DM00002 P08042 272-312: R441-E482, R413-E454 Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン: C396-H416, C424-H444, C452-H472, C480-H500, C508-H528, C536-H556 Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン: BL00028: C396-H412 タンパク質 Znフィンガー: PD00066: H468-C480	HMMER_PFAM BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_DOMO
4	2686104CD1	676	潜在的リン酸化部位: S71 S97 S187 S211 S234 S253 S277 S291 S309 S329 S350 S406 S430 T8 T20 T107 T249 T336 T345 T439 潜在的グリコシル化部位: N323 N460 N488 N489 Signal_cleaveage: MI-S50 Znフィンガー、C2H2 タイプ: H82-H104, C230-H252, Y258-H280, Y286-H308, Y314-H336, Y342-H364, Y370-H392, Y398-H420, Y426-H448, Y454-H476, Y482-H504, F510-H532, Y538-H560, Y566-H585, Y591-H613, Y619-H641, Y647-H669 KRAB ボックス: V5-S60 Znフィンガー 金属結合 父性的に発現される; PD017719: W198-F435, C232-H476, G422-R672; G254-S495, G478-K676	MOTIFS BLIMPS_BLOCKS BLIMPS_PRODOM MOTIFS MOTIFS SPSCAN HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLAST_PRODOM

【表 3 - 3】

表3-3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
4			Znフィンガー DNA 結合 金属結合 核内転写調節リポーター; PD000072: R368-C431, R394-C459, K508-C571; R256-C319, R284-C347, R312-C375; R340-C403, R408-C543, K617-H669; R536-C596, R589-C652, R424-C487, R452-C515 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合タンパク質 転写調節; PD009300: M86-S188, C459-Y566 仮説的 Znフィンガー 蛋白質 染色体 3 DNA 結合 金属結合 核内; PD149420: R394-H665, Q325-G506, Q492-H669, C232-H420, C316-H504, V219-C291 Znフィンガー, C2H2 タイプ, ドメイン; DM00002 Q0548 789-829; Q305-E346, Q501-E542, R529-E570, Q277-E318, Q417-E458, Q473-E514, Q361-E402; Q610-E651, Q249-E290, Q333-E374; DM00002 P08042 272-312; Q473-E514, Q305-E346, Q277-E318, Q417-E458; Q445-E486, Q333-E374, Q249-E290; R529-E570, Q501-E542; DM00002 P52743 31-93; L273-H336, L578-H641, Y245-H308, L329-H392; L469-H532, L441-H504; DM00002 Q0548 831-883; C291-E346, C319-E374, C515-E570, C624-K676 Znフィンガー, C2H2 タイプ, ドメイン; C84-H104, C230-H252, C232-H252, C260-H280; C288-H308, C316-H336, C344-H364, C372-H392, C400-H420, C428-H448, C456-H476, C484-H504, C512-H532, C540-H560, C593-H613, C621-H641, C649-H669 潜在的リン酸化部位: S15 S50 S57 S77 S123 S139 S140 S164 S188 S204 S213 S226 S240 S268 S296 S366 S380 S408 S436 S490 S577 S627 S633 T253 T281 T352 T384 T601 T670 Y675 潜在的グリコシル化部位: N13 N326	BLAST_PROD BLAST_PROD BLAST_PROD BLAST_DOMO
5	1380119CD1	452	Znフィンガー, C2H2 タイプ; Y176-H198, H204-H226, Y372-H394, Y316-H338, Y232-H254, Y288-H310, Y400-H422, Y148-H170, Y344-H366, Y428-H450, H120-H142, Y260-H282 KRAB ホックス; A2-E53 C2H2 タイプ Znフィンガー シグネチャ; PR00048: P231-S244, L387-G396 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 父性的に発現される; PD017719: G172-K426, G228-H450, K140-F381; G200-D452, G116-F353, V104-F325 Znフィンガー 蛋白質 DNA 結合 金属結合; PD053061: S61-Y119 Znフィンガー DNA 結合タンパク質 金属結合 核内転写調節リポーター; PD000072: K202-C265, K230-C293, K314-C377; K258-C321, R286-C349, R146-C209; R174-C237, C122-C181, K370-C433; K342-C405	MOTIFS MOTIFS MOTIFS HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLIMPS_PRINTS BLAST_PROD BLAST_PROD

【表 3 - 4】

表3-4

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
			Znフィンガー-金属結合 DNA 結合 転写調節; PD009300; I328-Y428, H218-Y316, H162-Y260	BLAST_PRODOME BLAST_DOMO
			Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン; DM00002 Q03309 48-82; L107-H142; DM00002 Q03309 104-134; L163-H194; L331-H362, L219-H250; DM00002 P08042 272-312; Q335-E376; Q391-E432, Q167-E208; Q363-C402, Q223-E264; Q251-E292, Q195-E236; R280-E320; DM00002 Q0548 1789-829; Q223-E264; Q167-E208, R280-E320; Q335-E376, Q251-E292; Q391-E432, Q139-E180; I197-E236, R307-C346	
			Znフィンガー、C2H2 タイプ; BL00028; C234-H250	BLIMPS_BLOCKS
			タンパク質 Znフィンガー、亜鉛; PD01066; M1-D34	BLIMPS_PRODOMO M
			タンパク質 Znフィンガー、メタ; PD00066; H250-C262	BLIMPS_PRODOMO M
			Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン; C122-H142, C150-H170, C178-H198, C206-H226, C234-H254, C262-H282, C290-H310, C318-H338, C346-H366, C374-H394, C402-H422, C430-H450	MOTIFS
			潜在的リン酸化部位: S41 S61 S84 S270 S380 T6 T59 T92 T431	MOTIFS
			潜在的グリコシル化部位: N296 N324	MOTIFS
6	2294975CD1	432	HMG (高移動度グループ)ボックス; I133-K201	HMMER_PFAM
			HMG1/2タンパク質 BL00353; G116-K165, M166-K212	BLIMPS_BLOCKS
			転写タンパク質 DN PD02448; N138-A176, A177-G224, V395-A420	BLIMPS_PRODOMO M
			タンパク質 XS0X7 転写因子 SOX18 調節活性化因子 DNA 結合 核内 PD089778; F235-S431, Y202-P353	BLAST_PRODOME
			転写因子 SOX18 調節活性化因子 DNA 結合 核タンパク質 PD059614; M49-I133	BLIMPS_PRODOMO M
			タンパク質 DNA 結合 核内転写因子 調節移動度グループ 高リピート PD000156; R134-Y202	BLIMPS_PRODOMO M
6			HMG ボックス DM00056; P43680 68-141; R122-D196; P48434 93-167; D129-D196; P48433 35-107; A128-R195; P53783 40-112; A128-R195	BLAST_DOMO

10

20

30

【 0 3 4 6 】

【表 3 - 5】

表3-5

SEQ ID NO:	inocyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
7	6178145CD1	107	潜在的リン酸化部位: S28 S241 S266 S406 T373 T384 Y115 潜在的グリコシル化部位: N380 KRAB ボックス: V15-E77 タンパク質 Znフィンガー PD01066: F17-G55	MOTIFS MOTIFS HMMER_PFAM BLIMPS_PRODOM BLAST_PRODOM
8	7493913CD1	429	Znフィンガー-金属結合 DNA 結合タンパク質フィンガー亜鉛核内リピート転写調節 PD001562: V15-E77 KRAB ボックスドメイン DM00605: I48689I1-85: Q12-L80; I51786I24-86: V15-W74; I51523I5-79: Q12-I75; I17097I1-76: E13-E77 潜在的リン酸化部位: S10 S16 S88 S100 T25 T59 シグナルペプチド: M1-Q24 膜貫通ドメイン: G366-S390; N-末端はサイトゾル内でない	MOTIFS HMMER TMAP
9	778511CD1	670	潜在的リン酸化部位: S22 S31 S41 S142 S211 S260 S390 T151 T236 T322 T355 Y167 潜在的グリコシル化部位: N189 N209 N259 転写因子 S-2 (TFIIS): L442-K482 Znフィンガー、C2H2 タイプ: Y140-H163, F57-H79, H388-H409, F108-H130, Q273-H296, Y528-H550, F500-H522, H332-H354, L442-H465, H472-H494, F305-H327, Y360-H382, Y197-H219, Y573-H595 エクステンション; VSP-3; 雄ずい(PISTIL): 豊富; DM00698 S499I549-645: K412-P445, A166-P209, P605-P619; Q032I1I130-231: K412-K449, P171-P196, Q604-P619 細線維コラーゲン(fibrillar collagen)カルボキシル末端 DM00042: A41I32I43-I33: P171-P196, P171-P189, G411-P439, P611-P619, P606-P617; S21930I37-137: A169-P189, P171-P196, A169-P200, G414-P439, P606-I623, P611-E627 潜在的リン酸化部位: S74 S84 S119 T41 T68 T167 T208 T218 T538 潜在的グリコシル化部位: N398 N514 Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン C59-H79 C110-H130 C142-H163 C199-H219 C307-H327 C334-H354 C362-H382 C444-H465 C474-H494 C502-H522 C530-H550 C575-H595	MOTIFS MOTIFS HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLAST_DOMO BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS MOTIFS

表3-6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
10	5609988CD1	582	タンパク質 A キナーゼアンカー AKAP 核内 Zn フィンガー DNA 結合 PDI46760: P181-D486, R70-F322, Y26-Y74 Zn フィンガー蛋白質 PDI184744: M1-S69 潜在的リン酸化部位: S114 S130 S301 S335 S369 S445 T198 T272 T321 T347 T394 T566 潜在的グリコシル化部位: N54 N61 N153 N224 N228 N377	BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM MOTIFS MOTIFS HMIMER HMIMER_PFAM
11	7487559CD1	509	シグナルペプチド: M1-A27 フォークヘッドドメイン: K199-A291 膜貫通ドメイン: T298-R326 N 末端はサイトソール内 フォークヘッドドメインシグネチャ PR00053: K199-I212, L217-P234, W240-I257 フォークヘッドドメインシグネチャ PD106996: M1-R198; PD023124: L296-M509 PD000425: K199-K290	BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODUM BLAST_DOMO
			フォークヘッド DNA 結合ドメイン DM00381 S344721-222: G187-S383; P55315 58-332: G187-S354, Q44-P82, P145-P162, P133-G158, P192-P201, P133-P154; P35583 66-342: S95-R359; P55318 56-259: V144-K338	MOTIFS MOTIFS MOTIFS
			潜在的リン酸化部位: S74 S107 S214 S243 S292 S465 T54 T87 T88 T128 T249 T425 潜在的グリコシル化部位: N247	MOTIFS MOTIFS MOTIFS
			フォークヘッドドメインシグネチャ 2 W240-H246	MOTIFS
12	3112390CD1	531	BAF60b ドメイン、SWIB (DNA トポイソメラーゼ) 複合体のもの: Q307-P386 SWI/SNF 複合体 A サブユニット蛋白質; PD008527: K136-Q310, PD114337: M36-L135; PD006316: Y311-L377	HMIMER_PFAM BLAST_PRODUM
			細線維コラーゲン (fibrillar collagen) カルボキシル末端 DM00019 P17656 108-273: G5-T110	BLAST_DOMO
13	269219CD1	614	潜在的リン酸化部位: S2 S205 S250 S474 T110 T189 T279 T452 Zn フィンガー、C2H2 タイプ: Y278-H300 Y586-H608, Y446-H468, Y558-H580, Y474-H496, Y334-H356, Y530-H552, Y418-H440, Y222-H244, Y362-H384, F306-H328, Y502-H524, Y390-H412, Y250-H272 SCAN (C2H2Zn フィンガー) ドメイン: P51-I139	BLAST_DOMO HMIMER_PFAM HMIMER_PFAM

表3-7

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
13			潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ タンパク質 Znフィンガー-金属結合: PD017719: G246-F483, G358-F595, G330-H580, G302-H552, G218-H468, V206-H440, G414-Y614, PD111748: T129-K220, PD000072: K500-C563, K388-C451, K248-C311, K416-C479, K360-C423, K220-C283, K304-C367, K276-C339, K332-C395, K444-C507 Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン DM00002 P08042:314-358: C395-H440, C507-H552, C311-H356, C479-H524, C367-H412, C451-H496, C563-H608, C535-H580, C283-H328, Q05481789-829: Q493-C532, Q381-E422, E241-D282, Q325-E366, I355-D394, H272-E310, Q297-E338, M467-E506, R409-C448, Q549-E590, Q521-E562, Q05481831-885: C235-E310, C395-K447, C479-K531, C367-E422, C339-K391, C451-E506, C563-K612, C311-E366, C283-E338, P08042:272-312: Q493-C532, Q353-D394, Q297-E338, Q269-E310, Q325-E366 潜在的リン酸化部位: S117 S135 S156 S172 S176 S232 S258 S335 S512 T131 T191 T407 T435 T478 Y373	BLAST_PRODOM BLAST_DOMO
14	2503465CD1	112	潜在的グリコシル化部位: N154 N264 N345 N597 Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン C224-H244 C252-H272 C280-H300 C308-H328 C336-H356 C364-H384 C392-H412 C420-H440 C448-H468 C476-H496 C504-H524 C532-H552 C560-H580 C588-H608 Signal cleavage: M1-C33 潜在的リン酸化部位: S34 S45 S76 T16 T42 潜在的グリコシル化部位: N20 N26 N43	MOTIFS MOTIFS MOTIFS SPSCAN MOTIFS
15	6806534CD1	468	チトクロムCファミリー-ヘム結合部位シグネチャ C61-H66 ユビキチンプロアミリン: M31-G105 潜在的リン酸化部位: S10 S61 S82 S111 S123 S134 S220 S262 S296 S421 S437 T41 T229 T350 細胞接着配列 R179-D181	MOTIFS HMMER_PFAM MOTIFS
16	3206847CD1	3572	ホメオボックスドメイン: R2183-K2239, K2562-K2618, K2886-K2942, K2086-N2135	HMMER_PFAM
15			Znフィンガー、C2H2タイプ: Y1567-H1591, F699-H723, L644-H667, Y2268-C2291, T1399-H1422, Y1191-HU214, K2631-H2654, Y1515-H1539, Y1021-H1045, W767-H791, F3359-C3382, I613-H636, Y917-H941, L1920-H1943, L973-H995, Y3403-H3427, I1220-H1243, L278-H301, P2963-H2987, Y1371-H1393 Y2449-H2471	HMMER_PFAM

【表 3 - 8】

表3-8

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
			膜貫通ドメイン: A3211-S3228; N末端はサイトソル内	TMAP
			ホメオボックスドメイン蛋白質: L2197-K2239	BLIMPS_BLOCKS
			Znフィンガー、C2H2タイプ: C1569-H1585	BLIMPS_BLOCKS
			「ホメオボックス」ドメインシグネチャおよびプロファイル: L2197-E2258, L2900-E2964, L2576-G2676	PROFILESKAN
			タンパク質ホメオボックス DNA 結合核内ホメオドメイン Znフィンガー-金属結合 αプロテインエンハンサー結合; PD023200: M1-D440; PD014283: S563-N732; PD014284: P868-E1081; PD152468: L1425-E1601	BLAST_PRODUM
			エンハンサー; α; プロテロチン; DM08369[A41948]1-156: L863-Y1004	BLAST_DOMO
			ホメオボックス DM00609 [A41948]1723-1786: D2557-F2621, D2881-I2945; DM00009 [A41948]2027-2091: D2881-I2945	BLAST_DOMO
			エンハンサー; α; プロテロチン; DM08569[P28167]843-1035: L875-L1007	BLAST_DOMO
			潜在的リン酸化部位: S10 S45 S46 S76 S117 S122 S172 S226 S246 S263 S314 S334 S390 S428 S432 S555 S611 S624 S640 S720 S788 S900 S903 S1042 S1103 S1130 S1140 S1230 S1275 S1278 S1291 S1298 S1338 S1362 S1364 S1407 S1426 S1451 S1482 S1560 S1580 S1747 S1828 S1836 S1848 S1937 S1972 S2109 S2125 S2181 S2184 S2185 S2303 S2350 S2359 S2533 S2547 S2554 S2629 S2644 S2672 S2700 S2719 S2728 S2785 S2794 S2859 S2973 S2977 S3027 S3145 S3306 S3332 S3413 S3478 S3490 S3528 S3533 S3538 S3556 S3564 T18 T25 T304 T342 T359 T528 T533 T539 T643 T709 T766 T938 T1029 T1091 T1104 T1174 T1347 T1525 T1637 T1649 T1859 T1917 T2157 T2169 T2390 T2587 T2694 T2754 T2770 T2771 T2777 T2911 T2961 T3010 T3150 T3166 T3192 T3305 T3322 T3328 T3333 T3369 T3431 Y240 Y1191 Y1967 Y2149 Y2493	MOTIFS
			潜在的グリコシル化部位: N44 N112 N126 N213 N504 N705 N713 N747 N1067 N1337 N1502 N2150 N2545 N2752 N3456 N3468	MOTIFS
16			「ホメオボックス」ドメインシグネチャ M2118-R2141 I2594-R2617	MOTIFS
			Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン C280-H301 C615-H636 C646-H667 C1221-H1243 C1222-H1243 C1373-H1393 C1401-H1422 C1517-H1539 C1569-H1591 C1922-H1943 C2451-H2471 C2633-H2654 C2965-H2987 C3405-H3427	MOTIFS
17	4003220CD1	500	KRAB ボックス: L29-A91	HMMER_PFAM

10

20

30

40

表3-9

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
			Zn フィンガー、C2H2 タイプ: Y345-H367, F457-C484, P149-C169, Y373-H395, Y177-H199, Y205-H227, H261-H283, Y317-H339, Y289-H311, Y233-H255 H401-H423 Y429-H451	HMMER_PFAM
			C2H2 タイプ Zn フィンガーシグネチャ PR00048: P204-R217, L276-G285	BLIMPS PRINTS
			タンパク質 Zn フィンガー PD01066: F31-G69	BLIMPS_PRODOM M
			Zn フィンガー 金属結合 DNA 結合 女性的に発現される PW1 PD017719: G201-H451	BLAST PRODOM
			Zn フィンガー DNA 結合タンパク質 金属結合核内転写調節リピート PD000072: P204-C266	BLAST_PRODOM
			KRAB ボックスドメイン DM00605 Q0548  : L29-W88, I226-C263	BLAST_DOMO
			KRAB ボックスドメイン DM00605 P527383-77: A28-W88	BLAST_DOMO
			Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン DM00002 P08042 B14-358: C266-H311,  Q0548  789-829: I226-263	BLAST_DOMO
			Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン: C179-H199, C207-H227, C235-H255, C263-H283, C291-H311, C319-H339, C347-H367, C375-H395, C403-H423, C431-H451	MOTIFS
			潜在的リン酸化部位: S19 S39 S79 S136 S166 S187 S194 S215 S327 S329 S334 S355 S418 S435 S478 S485 S494 T110 T157 T290 T394 Y37	MOTIFS
			潜在的グリコシル化部位: N219	MOTIFS
			C2H2 タイプ Zn フィンガーシグネチャ: 207-223: C207-H223	BLIMPS_BLOCKS
			TFIIS 配列リボンドメイン蛋白質: 263-299: C263-R299	BLIMPS_BLOCKS
			RNA ポリメラーゼ M/15 Kd サブユニット蛋白質 263-300: C263-q300	BLIMPS_BLOCKS
18	4792756CD1	791	Zn フィンガー、C2H2 タイプ: Y455-H477, Y679-H701, Y623-H645, Y287-H309, Y567-H589, Y427-H449, H315-H337, Y735-H757, Y595-H617, Y539-H561, Y259-H281, Y511-H533, F231-H253, Y343-H365, Y371-H393, Y707-H729, Y651-H673, Y763-H785, Y483-H505, Y399-H421; Zn フィンガー、KRAB ボックス: L24-K72	HMMER_PFAM
			C2H2 タイプ Zn フィンガーシグネチャ BL00028: C709-H725	BLIMPS_BLOCKS
18			C2H2 タイプ Zn フィンガーシグネチャ PR00048: P286-V299, L358-G367	BLIMPS_PRINTS
			タンパク質 Zn フィンガー: PD01066: F26-D64; PD00066: H361-C373	BLIMPS_PRODOM M

【表 3 - 10】

表3-10

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
			タンパク質 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 父性的に発現される PW1 PD017719: G367-F604, G479-K733, G283-H533; Znフィンガー DNA 結合タンパク質 金属結合 核内転写調節リポーター PD000072: K621-C684; 骨髄芽球 KIAA0211 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 PD149061: K568-H753; 仮説的 Znフィンガー-蛋白質 B03B8.4 (染色体3内) DNA 結合 金属結合 核内 PD149420: Q326-E592	BLAST_PRODROM
			Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン DM00002: Q05481 789-829; R362-K402; DM00002: Q05481 831-885; C320-E375; DM00002: p52743 31-93; L666-H729; DM00002: p08042 314-358; C320-H365	BLAST_DOMO
			潜在的リン酸化部位: S34 S44 S66 S67 S183 S193 S197 S236 S314 S381 S384 S388 S437 S454 S524 S584 S605 S633 S650 S717 T25 T136 T385 T426 T528 T575 T654	MOTIFS
			潜在的グリコシル化部位: N214 N234 N241	MOTIFS
			Znフィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン; C261-H281 C289-H309 C317-H337 C345-H365 C373-H393 C401-H421 C429-H449 C457-H477 C485-H505 C541-H561 C569-H589 C597-H617 C625-H645 C653-H673 C681-H701 C709-H729 C737-H757 C765-H785	MOTIFS
19	1867021CD1	549	Signal cleavage: MI-A18	SPSCAN
			KRAB ボックス: Q222-Y274; SCAN ドメイン: S35-I130; Znフィンガー、C2H2 タイプ; Y492-H514, Y520-H542, F436-H458, C464-H486, P408-H430	HMMER_PFAM
			C2H2 タイプ Znフィンガー-シグネチャ BL00028: C522-H538	BLIMPS_BLOCKS
			タンパク質 Znフィンガー-Z; PD000066: H510-C522; PD01066: G213-A251	BLIMPS_PRODROM
			Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 核内転写調節リポーター PD004640: G10-M144; PD000072: K490-K546; タンパク質 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 父性的に発現される PW1 PD017719: C410-H542	BLAST_PRODROM
19			P18; フィンガー; 垂胎: DM03735 139152 42-87: P37-I83; DM03974 S37648 57-189: L84-E223; DM03735 P49910 45-90: E38-I83; DM03974 P49910 92-271: L84-H255	BLAST_DOMO

表3-11

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
			Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン C410-H430 C438-H458 C464-H486 C494-H514 CS22-H542	MOTIFS
			潜在的リン酸化部位: S24 S35 S108 S118 S141 S186 S324 S360 S366 S394 S533 T39 T58 T114 T188 T231 T330 T393 T409	MOTIFS
			潜在的グリコシル化部位: N169	MOTIFS
20	6335220CD1	334	Znフィンガー、C2H2タイプ: F204-H228, Y264-H288, F234-H258, H171-H198, S142-H162 C2H2タイプ Znフィンガーシグネチャ: PR00048: P205-S218, L191-G200	HMMER_PFAM BLIMPS_PRINTS
			Znフィンガー、C2H2タイプドメインシグネチャ BL00028: F208-H224	BLIMPS_BLOCKS
			金属結合 DNA 結合タンパク質 小脳の Znフィンガーリピート PD002513: P113-N170 PD006679: G28-G99	BLAST_PRODOM
			Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン DM00002 P46684I212-272: A115-W175; P46684I274-321: E176-H224; P29768I263-310: C178-H224; P39768I342-374: S255-H288	BLAST_DOMO
			潜在的リン酸化部位: S249 S255 S260 S280 S296 T19 T150 T265 Y275	MOTIFS
			潜在的グリコシル化部位: N102 N247	MOTIFS
			Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン C206-H228, C236-H258, C266-H288	MOTIFS
21	2314637CD1	126	膜貫通ドメイン:S63-R85; N末端はサイトソール内にはない	TMAP
			OSF2 PEBP2 アルブミン A 主要 THL1 アイソフォーム PD062417: L19-W116	BLAST_PRODOM
			潜在的リン酸化部位: S40	MOTIFS
22	5543910CD1	445	Znフィンガー、C2H2タイプ: H77-H99, F278-H300, L250-H272, F49-H71, Y105-H128, Y338-C360, Y220-H243, Y190-H213, F134-H156, F162-H184, F306-H329	HMMER_PFAM
			タンパク質 Znフィンガー 金属結合 DNA 結合 父的に発現される PW1 ; PD017719: G101-S370	BLAST_PRODOM
			Znフィンガー、C2H2タイプ、ドメイン DM00002 Q08705I398-425: M181-I209; Q08705I341-368: R124-H152	BLAST_DOMO
			潜在的リン酸化部位: S35 S58 S73 S246 S357 S370 S427 S436 T85 T116 T174 T204 T271 T376 T382 T414 T415	MOTIFS

【表 3 - 1 2】

表3-12

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	解析方法及びデータベース
22			Znフィンガン、C2H2タイプ、ドメイン；C79-H99、C107-H128、C192-H213、C222-H243、C252-H272、C280-H300、C308-H329	MOTIFS
23	3620140CD1	480	Signal cleavage: M1-A38 ホメオボックスドメイン；R150-K187 膜貫通ドメイン；A45-Y64；N末端はサイトソル内 「ホメオボックス」ドメインシグネチャおよびプロファイル homeobox.prf；T139-A204 「ホメオボックス」ドメイン蛋白質 BL00027 W145-K187 ホメオボックス蛋白質 DNA 結合 核内 イロコイ クラスのホメオドメイン IRX3 転写因子 PD027004；F79-P131 ホメオボックス DM00009P54269J222-288；Y125-K190 潜在的リン酸化部位；S40 S94 S208 S241 S293 S318 S429 T141 T156 T210 T324 T435 T470 潜在的グリコシル化部位；N75 N133 N373 「ホメオボックス」ドメインシグネチャ L163-K186 Signal cleavage: M1-G26	SPSCAN HMMER_PFAM TMAP PROFILESCAN BLIMPS_BLOCKS BLAST_PRODOR BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS MOTIFS SPSCAN HMMER_PFAM
24	4083592CD1	679	Znフィンガン、C2H2タイプ；H351-H373 Y435-H457 Y379-H401 F575-H598 H407-H429、W295-H317、F463-H485、F491-H513、Y519-H541、F547-H569、H323-H345 Znフィンガン-蛋白質金属結合 DNA 結合 PD053589-S572-Q608； Znフィンガン-DNA 結合タンパク質 金属結合 転写調節リピーター PD000072；R349-C412； MVELOBLAST KIAA0211 ZINC FINGER METAL BINDING DNA BINDING PDI49061； C325-M510 潜在的リン酸化部位；S29 S165 S227 S252 S261 S403 S515 S581 S618 S671 T9 T95 T99 T170 T177 T305 T484 T533 Y304 潜在的グリコシル化部位；N589 N620 N623	MOTIFS MOTIFS MOTIFS BLAST_PRODOR MOTIFS
25	1522155CD1	948	Znフィンガン、C2H2タイプ、ドメイン C297-H317 C325-H345 C353-H373 C381-H401 C409-H429 C437-H457 C465-H485 C493-H513 C521-H541 C549-H569 C577-H598 Znフィンガン-C-x8-C-x5-C-x3-Hタイプ；K668-P694、R751-L776、E724-Y748、L777-T799、E695-V721	MOTIFS MOTIFS HMMER_PFAM

10

20

30

【表 3 - 1 3】

表3-13

SBQ ID NO:	Incvte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位、潜在的グリコシル化部位、シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
25			潜在的リン酸化部位 : S46 S51 S58 S69 S75 S145 S184 S207 S211 S317 S320 S329 S367 S391 S399 S453 S475 S562 S569 S750 S804 S834 S836 S869 S892 S903 S938 T218 T300 T303 T469 T503 T532 T634 T707 T775 T799 T819 Y675 タンパク質 Zn フィンガー 切断 ポリアザニル化特異性因子 A サブユニット NO ARCHES	MOTIFS
26	7503717CD1	328	PD013575: E671-H797 Signal cleavage: M1-A21 潜在的リン酸化部位 : S22 S31 S41 S142 S289 T151 T221 T254 Y167 シグナルペプチド : M1-S15, M1-A19, M1-A21, M1-G23, M1-S22, M1-W16	BLAST_PRODROM SPSCAN MOTIFS HMMER

【 0 3 5 5】

10

20

30

40

表4-1

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 平配列断片	ボリスクレオチド ID/ 配列長
27/2277388CBI/5582	1-447, 1-482, 21-468, 27-356, 78-348, 78-580, 86-5343, 168-670, 181-602, 181-722, 283-535, 308-788, 329-890, 334-535, 388-910, 394-788, 457-880, 473-985, 600-644, 608-941, 608-1110, 674-1139, 675-1139, 681-897, 730-1150, 730-1235, 793-1196, 810-1360, 833-921, 864-1433, 865-1433, 884-1395, 971-1519, 1012-1548, 1065-1653, 1066-1306, 1070-1611, 1071-1556, 1078-1603, 1127-1375, 1170-1658, 1190-1577, 1209-1238, 1216-1725, 1283-1431, 1300-1674, 1312-1754, 1335-1872, 1403-1845, 1411-1947, 1425-1850, 1455-2001, 1561-1592, 1649-2023, 1984-2275, 2057-2502, 2069-2473, 2086-2597, 2197-2503, 2446-2684, 2446-3000, 2457-2722, 2524-2987, 2539-2813, 2539-3075, 2543-2976, 2543-3079, 2549-3060, 2577-2823, 2642-2754, 2665-2879, 2665-3135, 2682-3141, 2683-2965, 2763-3199, 2906-3273, 2924-3202, 2926-3445, 2993-3525, 3021-3498, 3023-3273, 3027-3498, 3080-3246, 3080-3525, 3169-3517, 3186-3525, 3522-3950, 3978-4137, 4264-4358, 4328-4592, 4357-4652, 4423-4701, 4423-4911, 4444-4945, 4444-4984, 4447-4884, 4447-4969, 4449-4685, 4449-4932, 4450-4843, 4465-4695, 4467-4991, 4592-5122, 4592-5126, 4618-4870, 4950-5459, 4976-5166, 4999-5236, 5019-5530, 5053-5308, 5053-5442, 5092-5513, 5096-5339, 5096-5582, 5125-5515
28/7487561CBI/2813	1-565, 1-586, 1-599, 1-604, 1-636, 1-650, 1-737, 2-420, 125-2813, 280-496, 647-772, 647-929, 1597-1604, 2416-2797, 2418-2625
29/3504861CBI/1973	1-652, 1-653, 280-331, 280-349, 280-350, 280-385, 280-566, 280-575, 280-778, 280-800, 280-890, 362-820, 507-911, 519-1099, 519-1336, 524-810, 574-717, 574-746, 574-748, 574-750, 575-643, 591-1041, 591-1149, 591-1368, 591-1377, 591-1395, 591-1444, 642-1280, 689-1329, 703-874, 704-874, 724-1219, 767-874, 769-874, 814-1453, 833-1594, 843-1437, 858-1405, 893-1640, 1041-1298, 1081-1613, 1132-1786, 1141-1461, 1146-1786, 1243-1964, 1273-1973, 1274-1954, 1292-1964, 1324-1702, 1324-1915, 1326-1897, 1327-1964, 1344-1508, 1344-1592, 1347-1973, 1349-1964, 1384-1491, 1384-1497, 1384-1556, 1384-1582, 1384-1583, 1384-1584, 1384-1656, 1384-1677, 1384-1762, 1390-1964, 1437-1592, 1442-1487, 1442-1762, 1468-1554, 1468-1668, 1468-1676, 1468-1846, 1497-1973, 1526-1846, 1528-1592, 1552-1806, 1552-1845, 1558-1845, 1559-1845, 1596-1834, 1596-1844, 1611-1668, 1612-1677, 1627-1844, 1632-1964, 1685-1762, 1689-1844, 1690-1845, 1786-1844

【表 4 - 2】

表4-2

ボリヌクレオチド リヌクレオチド	SEQ ID NO/ ID/ 配列長	Incyte ボ 配列断片
30/2686104CB1/3006		1-390, 1-461, 1-598, 124-537, 124-546, 262-930, 271-930, 341-945, 341-956, 341-1008, 374-930, 461-714, 502-1085, 502-1196, 691-1487, 711-1035, 797-1055, 908-1559, 922-1200, 922-1517, 923-1196, 1067-1301, 1067-1688, 1128-1344, 1128-1420, 1187-1988, 1240-1514, 1240-1660, 1240-1760, 1240-1761, 1240-1763, 1240-1879, 1262-1776, 1264-1843, 1361-1867, 1372-2017, 1373-1867, 1414-1988, 1462-1960, 1505-2166, 1524-1929, 1613-2296, 1706-2257, 1750-1903, 1750-2379, 1801-2414, 1867-2467, 1897-2506, 1942-2553, 1958-2406, 1977-2452, 1984-2560, 2048-2569, 2064-2621, 2076-2338, 2076-2621, 2076-2637, 2088-2563, 2096-2802, 2097-2722, 2097-2786, 2099-2598, 2181-2540, 2181-2551, 2189-2637, 2284-2637, 2320-2931, 2321-2595, 2321-2967, 2325-2637, 2337-2637, 2404-2637, 2433-2637, 2501-2637, 2550-3006, 2562-3002, 2617-2637, 2637-2669, 2637-2693, 2637-2717, 2637-2727, 2637-2750, 2637-2827, 2637-2835, 2637-2863, 2637-2882, 2637-2931, 2637-2996, 2637-2998, 2637-3006, 2704-3006, 2709-2803
31/1380119CB1/4456		1-709, 4-41, 7-38, 453-866, 453-1095, 486-1014, 504-1091, 588-1091, 946-1232, 946-1237, 1000-1611, 1056-1628, 1173-1481, 1173-2016, 1209-1456, 1246-1802, 1451-1725, 1461-1959, 1665-1963, 1749-1990, 1791-2066, 1791-2163, 1884-2352, 1888-2128, 1950-2491, 1951-2240, 2042-2238, 2046-2318, 2048-2312, 2064-2555, 2083-2578, 2143-2366, 2148-2405, 2168-2421, 2195-2405, 2195-2778, 2332-2742, 2407-2535, 2462-2690, 2462-2936, 2468-2595, 2485-2828, 2485-3017, 2520-3047, 2521-2845, 2707-2945, 2758-3225, 2790-3034, 2818-3093, 2818-3108, 2854-3101, 2854-3323, 2854-3487, 2886-3463, 2889-3131, 2888-3275, 2994-3251, 3061-3241, 3063-3245, 3068-3310, 3068-3577, 3068-3649, 3093-3368, 3121-3373, 3170-3412, 3231-3483, 3274-3917, 3277-3500, 3299-3535, 3312-3911, 3327-3907, 3343-3590, 3374-3628, 3397-3662, 3408-3914, 3413-3673, 3438-3883, 3451-3728, 3485-3672, 3537-3795, 3540-3800, 3573-3821, 3573-4048, 3671-3921, 3674-3931, 3676-3921, 3715-3923, 3738-3949, 3745-4013, 3745-4287, 3750-4340, 3773-4441, 3795-4443, 3799-4442, 3815-4381, 3817-4377, 3819-4098, 3842-4414, 3881-4407, 3893-4128, 3893-4154, 3893-4448, 3926-4439, 4171-4424, 4191-4430, 4260-4456

【表 4 - 3】

表4-3

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
32/2294975CBI/1755	1-1339, 36-131, 41-134, 338-845, 339-844, 339-845, 368-547, 429-635, 503-647, 506-1000, 972-1374, 996-1179, 1005-1268, 1053-1432, 1057-1277, 1057-1508, 1070-1355, 1094-1300, 1094-1714, 1119-1365, 1119-1637, 1127-1412, 1147-1700, 1154-1489, 1184-1436, 1189-1424, 1189-1708, 1192-1428, 1201-1473, 1203-1717, 1211-1755, 1219-1445, 1233-1384, 1233-1694, 1236-1477, 1236-1682, 1247-1732, 1283-1413, 1293-1733, 1295-1546, 1295-1720, 1296-1501, 1297-1692, 1300-1529, 1300-1560, 1316-1733, 1322-1733, 1337-1738, 1344-1743, 1347-1626, 1348-1468, 1353-1572, 1353-1603, 1353-1723, 1353-1738, 1353-1753, 1355-1715, 1360-1618, 1379-1716, 1383-1664, 1383-1715, 1383-1755, 1389-1753, 1404-1715, 1407-1719, 1407-1720, 1407-1721, 1407-1749, 1408-1738, 1409-1733, 1414-1733, 1433-1674, 1447-1738, 1467-1755, 1468-1692, 1479-1740, 1527-1733, 1538-1701, 1546-1749, 1549-1731, 1563-1734, 1566-1755, 1567-1700, 1568-1734, 1569-1740, 1625-1719, 1625-1721, 1645-1753
33/6178145CBI/1777	1-600, 336-468, 346-468, 347-468, 368-468, 371-637, 371-937, 393-699, 393-1080, 442-468, 465-597, 472-626, 472-649, 472-692, 472-695, 476-692, 494-692, 500-597, 522-597, 571-693, 572-693, 682-1287, 706-1362, 753-924, 753-979, 823-1433, 866-1054, 868-1397, 880-1107, 920-1122, 920-1191, 944-1417, 947-1405, 953-1411, 974-1410, 1007-1339, 1009-1236, 1058-1410, 1079-1410, 1084-1389, 1088-1414, 1183-1399, 1183-1410, 1183-1777, 1191-1446
34/7493913CBI/2434	1-309, 165-521, 165-779, 169-560, 171-543, 173-393, 173-753, 174-325, 178-541, 326-687, 470-1020, 492-1111, 500-896, 522-876, 584-883, 592-1115, 619-974, 638-1275, 662-907, 681-1150, 690-1010, 727-975, 732-1299, 740-1313, 758-1302, 776-1187, 825-1313, 852-1313, 863-1570, 884-1316, 889-1034, 966-1313, 982-1318, 989-1213, 1010-1314, 1199-1359, 1218-1407, 1218-1445, 1220-1314, 1312-1532, 1319-1845, 1346-1954, 1370-1661, 1438-1649, 1438-1830, 1442-1713, 1637-1904, 1683-2004, 1684-2198, 1694-1973, 1757-2197, 1771-1955, 1779-2026, 1779-2189, 1845-2159, 1847-2080, 1903-2103, 1939-2174, 2004-2423, 2007-2186, 2016-2204, 2042-2247, 2273-2434

【 0 3 5 8 】

【表 4 - 4】

表 4-4

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 示 リヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
35/778511CBL/2994	1-640, 16-663, 23-286, 27-144, 27-180, 27-481, 27-486, 36-206, 36-486, 46-345, 46-351, 46-548, 53-404, 73-885, 91-369, 91-595, 91-605, 91-665, 104-175, 158-683, 161-200, 188-715, 208-467, 258-930, 329-898, 329-929, 350-597, 356-855, 414-895, 438-746, 481-1122, 499-1141, 547-1078, 606-1041, 670-1084, 682-1199, 694-1088, 733-1243, 776-1303, 777-1211, 779-1060, 900-1395, 901-1044, 901-1364, 901-1502, 907-1416, 916-1489, 919-1367, 920-1479, 937-1496, 944-1499, 976-1576, 1002-1517, 1021-1618, 1047-1479, 1114-1496, 1114-1521, 1124-1824, 1163-1371, 1172-1621, 1199-1401, 1211-1825, 1278-1702, 1290-1579, 1314-1989, 1354-1497, 1448-1737, 1471-2066, 1474-2098, 1557-2201, 1562-2086, 1569-2146, 1569-2195, 1571-1887, 1571-2001, 1613-2152, 1614-1908, 1629-2166, 1635-2013, 1675-2231, 1708-1999, 1716-2170, 1721-1982, 1730-2091, 1748-1965, 1748-1992, 1751-1994, 1751-2045, 1768-2325, 1781-2376, 1801-2048, 1811-2242, 1813-2189, 1850-2159, 1862-2452, 1902-2576, 1915-2184, 1924-2483, 1937-2629, 1938-2578, 1951-2460, 1954-2535, 1982-2309, 1982-2437, 1982-2524, 1992-2209, 1992-2636, 2015-2597, 2029-2290, 2051-2413, 2087-2597, 2091-2357, 2103-2696, 2111-2368, 2111-2416, 2123-2814, 2160-2774, 2165-2752, 2183-2838, 2203-2445, 2228-2846, 2252-2855, 2265-2512, 2265-2538, 2265-2780, 2265-2855, 2288-2811, 2326-2855, 2327-2836, 2339-2605, 2361-2558, 2370-2673, 2380-2854, 2395-2829, 2399-2612, 2413-2855, 2414-2849, 2417-2736, 2420-2544, 2423-2854, 2426-2855, 2468-2855, 2494-2834, 2497-2854, 2552-2817, 2560-2801, 2560-2813, 2560-2814, 2565-2748, 2618-2855, 2678-2855, 2681-2855, 2724-2994, 2739-2926

10

20

30

【表 4 - 5】

表4-5

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポ リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
36/5609988CBI/2449	1-715, 18-212, 19-212, 28-616, 185-714, 211-1731, 296-323, 321-681, 321-713, 321-773, 359-658, 448-924, 448-955, 494-768, 594-937, 611-828, 632-1004, 645-987, 645-1013, 648-893, 684-1263, 701-1327, 704-963, 730-841, 730-879, 730-960, 730-1030, 730-1198, 730-1414, 733-901, 769-1050, 901-1127, 901-1422, 901-1445, 910-1149, 954-1542, 955-1233, 983-1579, 1070-1754, 1091-1571, 1095-1419, 1154-1417, 1154-1735, 1179-1330, 1212-1858, 1276-1805, 1284-1576, 1289-1530, 1306-1858, 1311-1779, 1323-1522, 1323-1559, 1356-1602, 1418-1488, 1418-1591, 1421-1689, 1467-2043, 1472-2043, 1485-2042, 1609-1726, 1632-1887, 1632-2019, 1635-1684, 1651-2286, 1653-1936, 1692-1960, 1692-1970, 1738-1988, 1739-1991, 1740-1998, 1744-1870, 1758-1807, 1762-2077, 1765-2008, 1765-2012, 1765-2013, 1765-2023, 1765-2045, 1767-1857, 1767-2260, 1769-2379, 1771-1999, 1771-2010, 1771-2016, 1771-2030, 1771-2149, 1773-1977, 1773-2005, 1773-2015, 1773-2022, 1773-2052, 1773-2140, 1773-2164, 1773-2280, 1773-2305, 1773-2310, 1774-1999, 1774-2021, 1774-2023, 1774-2035, 1774-2042, 1774-2052, 1774-2054, 1774-2260, 1774-2261, 1774-2271, 1774-2288, 1774-2298, 1774-2332, 1774-2337, 1774-2393, 1774-2395, 1775-1965, 1775-2034, 1775-2339, 1776-2037, 1777-2293, 1778-2312, 1779-1972, 1779-1996, 1779-1998, 1779-2038, 1781-2043, 1782-1977, 1782-2074, 1783-2053, 1794-2058, 1799-2179, 1802-2372, 1803-2081, 1804-2210, 1807-2043, 1807-2154, 1807-2162, 1813-2070, 1836-2161, 1838-2265, 1842-2265, 1845-2106, 1871-2398, 1876-2000, 1879-2000, 1881-2140, 1888-2203, 1893-2398, 1913-2120, 1936-2393, 1945-2388, 1973-2384, 1974-2385, 1978-2243, 1980-2384, 1987-2388, 1995-2319, 1997-2384, 1997-2388, 2011-2388, 2012-2354, 2013-2391, 2018-2259, 2023-2301, 2023-2383, 2025-2356, 2048-2383, 2066-2398, 2078-2393, 2089-2338, 2092-2390, 2104-2388, 2125-2360, 2135-2354, 2135-2382, 2139-2403, 2149-2390, 2171-2384, 2196-2388, 2196-2410, 2199-2388, 2202-2388, 2208-2449, 2251-2388, 2253-2388, 2266-2433, 2276-2388, 2283-2388, 2286-2388, 2287-2388, 2299-2388, 2325-2388, 2326-2388, 2338-2388, 2350-2388, 2358-2388

表4-6

ボリスクレオチド リヌクレオチド ID/ 配列長	SEQ ID NO/ Incyte ボ 配列断片
37/7487559CB1/4381	1-3575, 1893-2009, 1897-2069, 3463-3889, 3463-3681, 3463-3690, 3463-3883, 3463-3946, 3463-3964, 3463-4044, 3463-4048, 3463-4057, 3463-4064, 3463-4086, 3463-4097, 3463-4112, 3463-4119, 3463-4131, 3467-4139, 3476-4153, 3511-4233, 3522-4155, 3591-4333, 3674-4043, 3694-4167, 3758-4219, 3762-4381, 3782-4143, 3815-4381, 3832-4381, 3842-4154, 3846-4050, 3853-4254, 3857-4381, 3872-4236, 3881-4339, 3903-4381, 3904-4381, 3921-4381, 3947-4381, 3978-4381, 3992-4250, 3992-4381, 4014-4381, 4021-4381, 4047-4338
38/3112390CB1/2511	1-675, 78-286, 79-541, 82-651, 84-281, 91-606, 95-745, 207-479, 234-507, 276-512, 363-472, 376-1001, 493-774, 498-695, 589-829, 589-1087, 591-836, 591-847, 620-1061, 631-797, 631-837, 684-1324, 693-896, 693-1143, 696-984, 696-1061, 696-1245, 697-942, 697-992, 698-922, 705-1349, 715-1173, 724-1004, 726-1284, 768-1058, 806-1180, 830-1269, 847-1123, 856-1127, 865-1101, 865-1135, 871-1181, 883-1040, 883-1162, 890-1112, 890-1522, 905-1569, 959-1236, 959-1239, 1008-1275, 1015-1268, 1039-1263, 1041-1284, 1053-1308, 1059-1334, 1111-1377, 1156-1432, 1156-1708, 1281-1550, 1281-1593, 1339-1536, 1372-1624, 1378-1591, 1391-1661, 1409-1669, 1409-1967, 1414-1697, 1417-1624, 1417-1637, 1426-1679, 1440-1670, 1464-1719, 1481-1767, 1598-1867, 1609-2338, 1610-1803, 1610-1832, 1620-1862, 1630-1837, 1685-1961, 1704-1965, 1707-1860, 1709-2511, 1712-1936, 1763-2004, 1763-2254, 1768-2038, 1800-2044, 1824-2038, 1840-2071, 1874-2511, 1879-2130, 1898-2511, 1941-2222, 1943-2130, 1956-2511, 1966-2216, 1978-2109, 1982-2243, 2033-2244, 2123-2332, 2123-2380, 2130-2371, 2152-2373, 2159-2414, 2170-2381, 2170-2433, 2189-2416, 2193-2420, 2193-2455

【表 4 - 7】

表4-7

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ボリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
39/269219CBI/2066	1-291, 5-60, 33-298, 33-370, 110-436, 111-279, 111-301, 111-329, 111-622, 153-279, 153-281, 190-300, 192-349, 192-475, 253-515, 262-628, 286-733, 286-879, 321-628, 332-559, 360-628, 362-599, 362-828, 379-522, 390-628, 403-599, 426-470, 440-536, 478-621, 500-748, 507-748, 545-627, 576-605, 627-1090, 627-2066, 638-1177, 672-2066, 710-798, 811-1090, 854-1057, 855-1397, 858-1650, 872-976, 872-1137, 872-1240, 872-1280, 872-1458, 872-1544, 873-917, 873-921, 873-965, 873-1137, 873-1757, 873-1841, 876-920, 876-976, 933-1597, 934-1312, 950-977, 999-1308, 1035-1061, 1035-1169, 1035-1230, 1035-1249, 1035-1368, 1035-1507, 1035-1925, 1041-1123, 1041-1391, 1041-2009, 1047-1170, 1068-1312, 1107-1604, 1117-1249, 1119-1307, 1119-2009, 1125-1217, 1125-1250, 1125-1501, 1125-2009, 1152-1312, 1194-1732, 1194-1986, 1202-1475, 1202-1700, 1233-1868, 1278-1506, 1353-1397, 1353-1408, 1353-1511, 1353-1732, 1353-2017, 1358-1590, 1359-1513, 1359-1785, 1369-1666, 1376-1501, 1376-1816, 1376-2048, 1443-1896, 1448-1475, 1454-1727, 1455-1507, 1455-1727, 1460-1837, 1460-2046, 1526-2009, 1547-1595, 1547-1744, 1570-1842, 1610-2009, 1623-1856, 1628-1732, 1628-1753, 1628-2036, 1695-1986, 1705-1979, 1707-1758, 1707-1846, 1707-2040, 1707-2046, 1740-2009, 1791-2036, 1800-1844, 1822-2009, 1887-2010, 1947-1979, 1959-1985, 1965-2009
40/2503465CBI/554	1-249, 9-267, 31-313, 32-228, 57-297, 61-357, 66-352, 66-396, 68-552, 71-552, 72-525, 73-250, 73-342, 73-442, 73-503, 73-528, 75-528, 79-321, 83-517, 83-552, 84-264, 84-308, 84-322, 84-370, 84-386, 84-451, 84-513, 84-540, 85-331, 85-379, 86-299, 86-315, 86-350, 86-391, 86-403, 86-527, 90-286, 90-326, 90-536, 91-367, 92-347, 92-472, 93-328, 93-342, 94-359, 94-365, 95-284, 95-405, 96-339, 96-523, 96-552, 100-367, 103-357, 104-290, 104-393, 106-347, 108-384, 109-315, 110-554, 119-343, 119-438, 127-469, 168-443, 189-423, 218-436, 246-510, 275-545, 278-521, 334-540

【 0 3 6 2 】

【表 4 - 8】

表4-8

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
41/6806534CB1/3505	1-760, 94-767, 156-213, 156-887, 293-747, 335-767, 327-756, 328-886, 329-1025, 330-765, 350-765, 351-756, 356-765, 361-596, 361-628, 361-765, 400-765, 407-765, 410-767, 414-720, 415-767, 419-756, 437-749, 439-591, 447-735, 468-628, 472-757, 524-1094, 536-1073, 542-767, 571-762, 571-765, 572-762, 626-716, 626-764, 629-735, 745-956, 745-1364, 757-940, 758-883, 758-940, 758-1009, 758-1072, 763-940, 811-1121, 829-1101, 836-1114, 847-1115, 849-1292, 939-994, 939-1005, 945-1410, 993-1257, 1005-1505, 1050-1370, 1123-1374, 1134-1374, 1135-1604, 1135-1621, 1135-1623, 1150-1534, 1150-1577, 1150-1579, 1151-1430, 1153-1555, 1153-1613, 1164-1462, 1178-1460, 1185-1771, 1326-1904, 1347-1989, 1373-1677, 1373-1823, 1394-1959, 1396-2050, 1410-2001, 1410-2033, 1443-1681, 1471-2018, 1478-2048, 1491-1995, 1498-1994, 1502-1904, 1517-1719, 1558-1780, 1559-1861, 1567-1850, 1578-1879, 1582-1821, 1598-1760, 1598-1905, 1611-1855, 1613-1687, 1614-1889, 1621-1874, 1631-1904, 1646-1900, 1676-2402, 1681-2359, 1690-2327, 1702-1970, 1717-2282, 1728-1893, 1734-1893, 1750-2049, 1768-2048, 1790-2054, 1814-2248, 1818-2487, 1833-2446, 1840-2401, 1842-2401, 1888-2499, 1907-2139, 1930-2191, 1941-2187, 1941-2417, 1951-2215, 1966-2227, 1966-2254, 1966-2258, 1972-2361, 1973-2361, 1988-2428, 2002-2308, 2004-2338, 2004-2634, 2029-2468, 2039-2287, 2041-2266, 2075-2488, 2077-2488, 2077-2592, 2079-2245, 2093-2430, 2093-2455, 2122-2422, 2123-2472, 2125-2417, 2129-2406, 2130-2371, 2131-2342, 2131-2348, 2144-2571, 2153-2423, 2160-2601, 2178-2628, 2183-2479, 2193-2804, 2213-2509, 2218-2889, 2227-2785, 2291-2907, 2319-2557, 2319-2579, 2323-2936, 2332-2607, 2333-2947, 2333-2499, 2271-2548, 2273-2425, 2274-2574, 2275-2544, 2286-2534, 2338-2472, 2348-2957, 2349-2554, 2353-2649, 2353-2964, 2355-2610, 2355-2930, 2359-3025, 2385-2520, 2398-2614, 2402-2673, 2433-3010, 2441-2644, 2449-2716, 2488-2664, 2561-3847, 2563-2755, 2563-2760, 2563-2847, 2590-2621, 2660-2880, 2692-2718, 2695-2718, 2824-3059, 2844-3143, 2844-3151, 2906-3124, 2949-3172, 2950-3175, 2962-3505, 2964-3175, 3005-3285, 3006-3454, 3113-3149, 3157-3378, 3157-3439, 3178-3427, 3191-3404, 3339-3464

【表 4 - 9】

表4-9

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 株式会社 ID/ 配列番号	配列断片
42/3206847CBI/11367	1-548, 189-792, 222-792, 424-11142, 1182-1821, 1185-1504, 1555-2143, 1556-1645, 1556-1755, 1869-2548, 3014-3438, 3014-3670, 3439-3670, 3439-3739, 3671-3856, 3740-3990, 3857-3990, 3988-4181, 3991-4191, 3991-4309, 4031-4181, 4192-6487, 4310-6487, 4310-9670, 4835-5408, 4910-5086, 4910-5268, 4993-5277, 5005-5268, 5302-5993, 6488-9670, 6488-11142, 6702-7315, 6702-7335, 6702-7370, 6865-7462, 8363-8925, 8530-8905, 8614-8893, 8614-9158, 8634-8945, 8704-9302, 8718-9381, 8760-9416, 8761-9043, 8779-9299, 8878-9514, 8900-9357, 8928-9256, 8928-9600, 9037-9511, 9053-9308, 9053-9447, 9353-9564, 9532-10147, 9546-10174, 9671-11142, 9929-10551, 10023-10652, 10045-10589, 10186-10406, 10392-10901, 10486-10800, 10486-11037, 10492-11137, 10521-10726, 10521-10869, 10521-10984, 10775-11196, 10778-11367, 10801-11109, 10940-11192, 10940-11294
43/4003220CBI/3281	1-612, 95-684, 539-1140, 549-780, 564-765, 564-850, 564-1000, 565-854, 565-1177, 572-1225, 580-1322, 586-892, 729-1418, 749-1003, 752-1389, 822-1517, 822-1586, 904-1744, 923-1494, 935-1437, 935-1460, 939-1168, 939-1533, 939-1590, 952-1697, 955-1739, 966-1730, 976-1807, 1008-1847, 1049-1716, 1122-1647, 1130-1839, 1143-1633, 1222-1995, 1222-2016, 1223-1899, 1226-2037, 1229-1831, 1313-2157, 1366-2041, 1403-1431, 1403-1470, 1403-1496, 1403-1596, 1403-1613, 1403-1614, 1403-1649, 1403-1712, 1403-1722, 1454-1649, 1454-1722, 1520-1722, 1543-1722, 1553-2119, 1574-2401, 1575-2303, 1595-1901, 1611-2243, 1613-2297, 1629-2385, 1675-1722, 1708-2433, 1711-1747, 1711-1754, 1711-1774, 1715-2016, 1715-2199, 1757-2538, 1757-2540, 1765-2034, 1795-1838, 1795-1858, 1799-1845, 1799-1858, 1800-1858, 1811-1845, 1815-2665, 1817-2475, 1823-1914, 1823-1916, 1823-1998, 1823-2016, 1823-2029, 1823-2035, 1823-2046, 1823-2068, 1823-2069, 1823-2142, 1829-2142, 1838-2566, 1854-2610, 1874-1923, 1874-1925, 1874-2016, 1879-1923, 1879-2016, 1883-1923,

【 0 3 6 4 】

【表 4 - 1 0】

表4-10

ボリヌクレオチド リヌクレオチド SEQ ID NO/ ID/ 配列長	Incyte 水 配列断片
44/4792756CB1/4048	1883-2006, 1929-2604, 1936-2429, 1940-2413, 1946-2459, 1952-2653, 1953-2699, 1963-2002, 1963-2003, 1963-2016, 1963-2019, 1963-2019, 1967-2012, 1967-2013, 1967-2016, 1991-2016, 1991-2019, 1995-2019, 2000-2660, 2012-2565, 2012-2610, 2015-2653, 2023-2653, 2026-2565, 2045-2928, 2052-2329, 2096-2557, 2105-2268, 2106-2341, 2106-2564, 2125-2377, 2126-2175, 2126-2268, 2126-2280, 2126-2281, 2128-2632, 2200-2420, 2215-2255, 2215-2257, 2215-2268, 2215-2269, 2238-2899, 2306-2723, 2306-2728, 2308-2482, 2308-2923, 2329-2551, 2394-3278, 2423-2635, 2435-3174, 2461-2712, 2482-2724, 2489-2610, 2541-2778, 2558-3083, 2562-3083, 2564-3202, 2579-3033, 2614-3281, 2633-3249, 2710-3281, 2731-2966, 2731-3027, 2731-3230, 2733-3281, 2772-3269, 2794-3270, 2806-3281, 2826-3269, 2837-3269, 2854-3281, 2862-3266, 2875-3281, 2878-3275, 2881-3030, 2885-3266, 2910-3055, 2929-3266, 2932-3266, 2934-3269, 2962-3235, 2962-3251, 2962-3281, 2987-3275, 2996-3266, 3002-3281, 3008-3269, 3018-3258, 3057-3263, 3079-3281, 3087-3269, 3097-3281, 3147-3267 1-185, 14-246, 47-634, 239-1027, 460-1096, 466-759, 663-738, 726- 1357, 944-1510, 944-1595, 945-1176, 945-1245, 962-1408, 1009-1630, 1072-1376, 1072-1737, 1124-1401, 1215-1768, 1215-1832, 1300-1596, 1314-2030, 1321-1366, 1323-1345, 1343-1925, 1465-1870, 1468-2125, 1485-1999, 1505-1545, 1505-1546, 1514-1545, 1522-1545, 1522-1546, 1527-2126, 1528-2127, 1530-1925, 1554-1838, 1588-1685, 1588-1692, 1588-1693, 1588-1694, 1588-1700, 1588-1701, 1588-1702, 1588-1703, 1588-1717, 1588-1751, 1588-1786, 1588-1789, 1588-1790, 1588-1847, 1588-1861, 1588-1870, 1588-1880, 1588-1886, 1588-1893, 1588-1940, 1588-1954, 1588-1958, 1588-1964, 1588-2012, 1588-2024, 1588-2028, 1588-2029, 1588-2030, 1588-2032, 1588-2041, 1588-2057, 1588-2114, 1590-1692, 1604-1694, 1606-1692, 1606-1702, 1606-1717, 1606-1968, 1606-2030, 1606-2154, 1610-1702, 1614-1692, 1614-1900, 1614-2197, 1615-1694, 1615-1791, 1615-1810, 1615-1823, 1615-1825, 1615-1871, 1615-1880, 1615-1938, 1615-1944, 1615-1958, 1615-1966, 1615-2029, 1615-2030, 1617-1983, 1619-1717, 1619-1790,

10

20

30

【表 4 - 1 1】

表4-11

ポリスクレオチド リヌクレオチド ID/ 配列長	SEQ ID NO/ Incyte 本 配列断片
	1618-1880, 1619-2139, 1619-2216, 1621-1632, 1627-1692, 1632-1694, 1632-2291, 1641-1718, 1641-1719, 1641-1751, 1641-1777, 1641-1789, 1641-1977, 1641-2028, 1641-2042, 1641-2113, 1641-2126, 1641-2198, 1643-1692, 1643-1731, 1643-1983, 1643-2023, 1643-2030, 1644-1693, 1644-1707, 1644-1777, 1644-1786, 1644-1790, 1644-1791, 1644-1876, 1644-1944, 1644-2030, 1649-1687, 1650-1694, 1650-1703, 1650-1718, 1650-1751, 1650-1789, 1650-1790, 1650-1977, 1651-1713, 1651-1777, 1651-1886, 1651-1899, 1651-1959, 1651-1963, 1651-1977, 1651-2029, 1651-2031, 1651-2041, 1651-2123, 1651-2198, 1653-1958, 1654-1632, 1654-1702, 1654-1712, 1654-2041, 1659-1716, 1660-1877, 1661-2215, 1664-1694, 1665-1690, 1665-1694, 1665-1696, 1665-1697, 1665-1700, 1665-1701, 1665-1702, 1665-1703, 1665-1705, 1665-1707, 1665-1712, 1665-1716, 1665-1717, 1665-1718, 1665-1719, 1665-1728, 1665-1739, 1665-1751, 1665-1756, 1665-1777, 1665-1785, 1665-1786, 1665-1790, 1665-1791, 1665-1792, 1665-1861, 1665-1862, 1665-1869, 1665-1870, 1665-1874, 1665-1928, 1665-1944,
44	1665-1954, 1665-1960, 1665-1969, 1665-2012, 1665-2015, 1665-2017, 1665-2022, 1665-2028, 1665-2030, 1665-2038, 1665-2041, 1665-2045, 1665-2048, 1665-2050, 1665-2077, 1665-2108, 1665-2113, 1665-2125, 1665-2126, 1665-2127, 1665-2136, 1665-2137, 1665-2145, 1665-2180, 1665-2194, 1665-2197, 1665-2211, 1668-1718, 1668-1728, 1668-2120, 1669-1697, 1669-1702, 1669-1716, 1669-1855, 1669-1880, 1669-1958, 1669-1960, 1669-2029, 1669-2041, 1669-2130, 1670-1717, 1670-1728, 1670-1790, 1670-1906, 1671-1700, 1671-1703, 1671-1707, 1671-1712, 1671-1717, 1671-1751, 1671-1756, 1671-1763, 1671-1784, 1671-1796, 1671-1870, 1671-1874, 1671-1944, 1671-2030, 1671-2112, 1671-2215, 1671-2291, 1671-2292, 1671-2374, 1672-1716, 1672-2145, 1674-2051, 1674-2298, 1675-1703, 1675-1958, 1675-2132, 1675-2198, 1675-2317, 1678-1744, 1678-2126, 1681-1703, 1682-1944, 1685-2246, 1724-1791, 1724-2281, 1725-1778, 1728-1791, 1728-1874, 1728-2030, 1728-2049, 1728-2114, 1728-2145, 1728-2316, 1728-2348, 1735-2129, 1735-2197, 1737-2050, 1737-2198, 1738-1967, 1738-2114,

10

20

30

40

【表 4 - 1 2】

表4-12

ボリスク レオチド ID/ 配列長	ボリスク レオチド SEQ ID NO/ Incyte 配列断片 ボ
	1738-2159, 1738-2291, 1743-1790, 1743-1818, 1743-1827, 1743-1865, 1743-1881, 1743-1954, 1743-1958, 1743-2028, 1743-2041, 1743-2049, 1743-2116, 1743-2117, 1743-2127, 1743-2196, 1743-2198, 1743-2210, 1743-2244, 1743-2281, 1743-2282, 1744-1780, 1744-1796, 1744-1861, 1744-1873, 1744-1876, 1744-1879, 1744-1880, 1744-1881, 1744-1944, 1744-1954, 1744-1958, 1744-2030, 1744-2334, 1745-1786, 1745-1788, 1745-1789, 1745-1790, 1745-1791, 1745-1874, 1745-1876, 1745-1967, 1745-2212, 1746-1790, 1747-2212, 1748-1789, 1748-1958, 1748-2127, 1749-1790, 1749-1844, 1749-1860, 1749-1865, 1749-1870, 1749-1874, 1749-1876, 1749-1880, 1749-1881, 1749-1882, 1749-1960, 1749-1969, 1749-1971, 1749-1977, 1749-1984, 1749-2004, 1749-2114, 1758-1787, 1761-1881, 1761-1944, 1761-2030, 1761-2151, 1761-2183, 1761-2188, 1761-2196, 1761-2198, 1762-1790, 1762-1958, 1762-1967, 1762-1984, 1762-2026, 1762-2114, 1762-2129, 1762-2210, 1764-1858, 1764-1870, 1764-1874, 1764-1960, 1764-1964, 1769-1865, 1769-1967, 1769-2009, 1769-2024, 1769-2030, 1769-2092, 1769-2121, 1769-2125, 44
	1769-2217, 1770-2028, 1770-2313, 1771-1861, 1774-2012, 1775-2217, 1778-2136, 1780-1877, 1780-1924, 1787-2126, 1787-2136, 1789-2030, 1794-2029, 1801-2198, 1804-1946, 1811-2477, 1812-2029, 1821-2026, 1822-1944, 1822-1967, 1822-2028, 1822-2132, 1822-2197, 1828-1875, 1830-1856, 1830-1861, 1830-1865, 1830-1873, 1830-1874, 1830-1881, 1830-1882, 1830-1932, 1830-1938, 1830-1939, 1830-1940, 1830-1944, 1830-1954, 1830-1957, 1830-1958, 1830-1960, 1830-1965, 1830-1966, 1830-1968, 1830-1969, 1830-1984, 1830-2013, 1830-2017, 1830-2018, 1830-2024, 1830-2030, 1830-2038, 1830-2041, 1830-2125, 1830-2126, 1830-2127, 1830-2137, 1830-2153, 1830-2154, 1830-2198, 1830-2216, 1830-2245, 1830-2290, 1830-2291, 1832-1862, 1832-1874, 1832-1880, 1832-1881, 1832-1882, 1832-1894, 1832-1894, 1832-1960, 1832-1968, 1832-2028, 1832-2029, 1832-2030, 1832-2050, 1832-2114, 1832-2126, 1832-2127, 1832-2129, 1832-2198, 1833-1869, 1833-2301, 1832-2537, 1833-1863, 1833-1865, 1833-1869, 1833-1870, 1833-1874, 1833-1882, 1833-1939, 1833-1944, 1833-1954, 1833-1958, 1833-1960,

10

20

30

【表 4 - 1 3】

表4-13

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	1833-1864, 1833-1968, 1833-2028, 1833-2030, 1833-2045, 1833-2114, 1833-2122, 1833-2136, 1833-2152, 1833-2243, 1833-2257, 1833-2295, 1833-2300, 1833-2362, 1833-2390, 1833-2409, 1835-1877, 1838-2048, 1839-1870, 1839-1881, 1839-1894, 1839-2039, 1839-2184, 1839-2191, 1839-2198, 1839-2300, 1839-2449, 1840-1944, 1840-1983, 1840-2263, 1840-2491, 1842-2231, 1842-2313, 1845-1874, 1846-1968, 1846-2127, 1846-2198, 1846-2285, 1846-2300, 1846-2301, 1846-2384, 1846-2437, 1847-2198, 1849-1968, 1850-1873, 1850-1944, 1850-1958, 1850-1969, 1850-2039, 1850-2137, 1853-2048, 1853-2384, 1855-1959, 1855-2137, 1857-2198, 1858-2114, 1859-2198, 1862-2126, 1863-2215, 1864-2116, 1866-1958, 1866-2030, 1873-2300, 1874-2282, 1876-2126, 1876-2198, 1877-2126, 1877-2462, 1879-2114, 1881-1973, 1882-2198, 1884-2471, 1888-2477, 1889-2116, 1890-2300, 1891-1944, 1891-1960, 1891-2029, 1891-2442, 1892-2216, 1892-2329, 1895-2127, 1896-1958, 1897-2028, 1898-1940, 1898-2034, 1898-2137, 1898-2289, 1899-2134, 1899-2137, 1904-2114, 1904-2127, 1904-2134, 1905-1967, 1905-2124,
44	1906-1936, 1906-1958, 1906-2301, 1906-2303, 1906-2362, 1911-1944, 1911-1954, 1911-1959, 1911-1983, 1911-1984, 1911-2029, 1911-2030, 1911-2048, 1911-2212, 1911-2290, 1911-2300, 1911-2471, 1912-1939, 1912-1944, 1912-1946, 1912-1955, 1912-2004, 1912-2024, 1912-2029, 1912-2038, 1912-2114, 1912-2126, 1912-2129, 1912-2145, 1912-2198, 1912-2217, 1912-2300, 1912-2359, 1913-1944, 1913-1969, 1913-2137, 1914-1958, 1914-2008, 1914-2093, 1914-2114, 1914-2133, 1914-2135, 1914-2137, 1914-2282, 1914-2295, 1914-2444, 1914-2469, 1915-1973, 1915-2532, 1916-1954, 1916-1959, 1916-1960, 1916-2015, 1917-1944, 1917-1958, 1917-1983, 1917-2030, 1917-2114, 1917-2145, 1917-2198, 1917-2291, 1917-2384, 1919-2300, 1920-2469, 1921-2048, 1922-1983, 1922-2145, 1922-2303, 1924-2114, 1924-2303, 1926-2030, 1927-2114, 1927-2129, 1927-2303, 1929-2137, 1931-2532, 1942-2015, 1950-2126, 1967-2300, 1973-2030, 1974-2198, 1977-2450, 1980-2532, 1983-2300, 1988-2041, 1988-2017, 1989-2028, 1989-2029, 1989-2030, 1989-2126, 1989-2134, 1989-2138, 1989-2151, 1989-2211, 1989-2301,

10

20

30

【表 4 - 1 4】

表4-14

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ボ リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
1989-2303, 1989-2471, 1989-2574, 1990-2026, 1990-2028, 1990-2127,	
1990-2301, 1990-2384, 1990-2597, 1994-2198, 1995-2114, 1995-2136,	
1996-2024, 1996-2028, 1996-2029, 1996-2030, 1996-2048, 1996-2114,	
1996-2132, 1996-2216, 1996-2282, 1996-2290, 1996-2301, 1996-2303,	
1997-2024, 1997-2028, 1997-2038, 1997-2041, 1997-2126, 1997-2471,	
1998-2030, 1998-2198, 1998-2301, 2000-2026, 2000-2028, 2000-2030,	
2000-2043, 2001-2028, 2001-2030, 2001-2048, 2001-2301, 2001-2557,	
2006-2282, 2007-2216, 2007-2360, 2008-2282, 2011-2300, 2013-2198,	
2013-2469, 2014-2469, 2020-2126, 2020-2132, 2020-2468, 2020-2471,	
2026-2127, 2044-2540, 2049-2300, 2053-2132, 2053-2216, 2057-2125,	
2058-2126, 2063-2216, 2065-2198, 2065-2316, 2065-2282, 2065-2300,	
2065-2468, 2065-2532, 2065-2574, 2068-2126, 2068-2127, 2068-2301,	
2068-2303, 2071-2137, 2073-2107, 2073-2126, 2073-2127, 2073-2134,	
2073-2301, 2073-2374, 2074-2127, 2074-2388, 2074-2681, 2075-2327,	
2078-2290, 2079-2359, 2080-2112, 2080-2113, 2080-2120, 2080-2122,	
2080-2136, 2080-2139, 2080-2154, 2080-2172, 2080-2192,	
2080-2196, 2080-2198, 2080-2206, 2080-2210, 2080-2216, 2080-2217,	
2080-2218, 2080-2255, 2080-2282, 2080-2290, 2080-2295, 2080-2300,	
2080-2301, 2080-2375, 2080-2383, 2080-2384, 2080-2388, 2080-2394,	
2080-2461, 2080-2463, 2080-2467, 2080-2540, 2080-2594, 2080-2636,	
2080-2642, 2080-2713, 2080-2785, 2081-2116, 2081-2121, 2081-2127,	
2081-2136, 2081-2138, 2081-2295, 2081-2360, 2082-2122, 2082-2126,	
2082-2133, 2082-2172, 2082-2196, 2082-2207, 2082-2255, 2082-2282,	
2082-2300, 2082-2359, 2082-2360, 2082-2469, 2082-2498, 2082-2533,	
2082-2552, 2083-2196, 2083-2461, 2084-2133, 2084-2198, 2084-2471,	
2085-2117, 2085-2138, 2085-2169, 2085-2211, 2085-2282, 2085-2289,	
2085-2290, 2085-2413, 2085-2450, 2085-2509, 2085-2547, 2085-2557,	
2085-2617, 2085-2618, 2085-2636, 2088-2138, 2088-2218, 2090-2137,	
2090-2138, 2090-2290, 2091-2701, 2092-2126, 2092-2282, 2094-2468,	
2094-2618, 2095-2126, 2095-2183, 2095-2303, 2095-2540, 2095-2552,	
2095-2720, 2097-2540, 2102-2126, 2102-2362, 2105-2126, 2105-2618,	
2111-2547, 2114-2217, 2119-2211, 2119-2336, 2119-2342,	

44

10

20

30

40

【表 4 - 15】

表 4-15

ボリスクレオチド リヌクレオチド ID/ 配列長	SEQ ID NO/ Incyte ボ 配列断片
	2119-2374, 2119-2469, 2123-2311, 2127-2540, 2133-2540, 2137-2552,
	2144-2721, 2145-2625, 2145-2771, 2148-2469, 2148-2552, 2148-2741,
	2153-2658, 2154-2468, 2155-2211, 2155-2617, 2156-2768, 2158-2196,
	2158-2212, 2158-2218, 2158-2282, 2158-2301, 2158-2384, 2158-2388,
	2158-2468, 2163-2196, 2163-2197, 2163-2198, 2163-2217, 2163-2285,
	2163-2300, 2163-2534, 2163-2537, 2164-2211, 2164-2217, 2164-2282,
	2164-2284, 2164-2301, 2164-2384, 2165-2216, 2165-2217, 2165-2218,
	2168-2198, 2168-2384, 2169-2212, 2169-2450, 2173-2660, 2173-2710,
	2173-2721, 2174-2459, 2175-2206, 2175-2211, 2175-2212, 2175-2282,
	2175-2291, 2175-2301, 2175-2302, 2175-2303, 2175-2360, 2175-2374,
	2175-2540, 2175-2624, 2176-2212, 2176-2222, 2176-2281, 2176-2300,
	2176-2303, 2176-2360, 2176-2540, 2177-2222, 2178-2290, 2179-2636,
	2181-2231, 2181-2300, 2181-2879, 2186-2303, 2188-2300, 2189-2301,
	2194-2301, 2196-2303, 2198-2642, 2202-2540, 2203-2301, 2206-2392,
	2206-2806, 2210-2540, 2210-2687, 2210-3009, 2213-2360, 2213-2604,
	2213-2692, 2213-2803, 2213-2889, 2219-2642, 2220-2831,
44	2221-2282, 2224-2540, 2225-2291, 2225-2301, 2225-2303, 2225-2618,
	2226-2301, 2227-2285, 2227-2300, 2227-2301, 2228-2449, 2232-2295,
	2238-2540, 2241-2302, 2246-2785, 2247-2285, 2247-2290, 2247-2291,
	2247-2299, 2247-2300, 2247-2313, 2247-2359, 2247-2375, 2247-2384,
	2247-2448, 2247-2462, 2247-2469, 2247-2636, 2247-2642, 2247-2655,
	2247-2656, 2247-2701, 2247-2702, 2247-2715, 2247-2745, 2247-2901,
	2248-2285, 2248-2290, 2248-2360, 2248-2384, 2248-2388, 2248-2471,
	2248-2540, 2249-2290, 2249-2295, 2249-2353, 2249-2356, 2249-2359,
	2250-2295, 2250-2426, 2250-2450, 2250-2540, 2250-2631, 2250-2720,
	2252-2300, 2253-2359, 2253-2450, 2253-2720, 2253-2786, 2259-2295,
	2259-2300, 2260-2618, 2261-2303, 2265-2715, 2266-2295, 2266-2300,
	2266-2540, 2266-2547, 2266-2618, 2266-2720, 2269-2303, 2269-2462,
	2269-2534, 2269-2715, 2270-2534, 2279-2540, 2279-2864, 2282-2384,
	2283-2540, 2291-2561, 2296-2374, 2298-2553, 2305-2897, 2324-2362,
	2324-2388, 2324-2574, 2325-2462, 2326-2359, 2326-2360, 2326-2636,
	2334-2360, 2334-2375, 2334-2384, 2334-2423, 2334-2448,

10

20

30



【表 4 - 17】

表4-17

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	2500-2565, 2500-2571, 2500-2574, 2500-2576, 2500-2581, 2500-2616,
	2500-2624, 2500-2640, 2500-2642, 2500-2649, 2500-2700, 2500-2701,
	2500-2714, 2500-2715, 2500-2720, 2500-2785, 2500-2947, 2501-2528,
	2501-2530, 2501-2537, 2501-2538, 2501-2540, 2501-2547, 2501-2557,
	2501-2621, 2501-2622, 2501-2631, 2501-2715, 2501-2725, 2501-2785,
	2502-2528, 2502-2537, 2502-2540, 2502-2547, 2502-2556, 2502-2616,
	2502-2618, 2502-2702, 2502-2723, 2502-2878, 2502-2894, 2502-2952,
	2502-3032, 2503-2540, 2504-2555, 2505-2532, 2505-2537, 2505-2621,
	2505-2688, 2505-2702, 2505-2708, 2505-2725, 2505-2739, 2505-2740,
	2505-2771, 2505-2776, 2505-2779, 2505-2784, 2505-2785, 2505-3037,
	2509-2617, 2511-2537, 2511-2557, 2511-2586, 2511-2636, 2511-2702,
	2511-2710, 2511-2714, 2511-2785, 2511-2879, 2512-2848, 2512-2888,
	2512-2952, 2514-2870, 2514-3131, 2515-2537, 2515-2540, 2515-2702,
	2515-2863, 2515-2870, 2515-2889, 2515-3049, 2515-3141, 2518-3059,
	2522-2785, 2525-3075, 2534-2631, 2555-2701, 2562-2702, 2563-2616,
	2563-2618, 2563-2621, 2563-2640, 2563-2641, 2563-2702,
44	2563-2877, 2563-2890, 2564-2618, 2564-2833, 2564-3121, 2565-2643,
	2565-2673, 2565-2741, 2565-2785, 2565-2804, 2565-2877, 2565-2890,
	2565-2976, 2565-3037, 2565-3053, 2567-2617, 2567-2702, 2567-2809,
	2567-2890, 2568-2618, 2569-3134, 2570-2621, 2570-2714, 2570-2715,
	2571-2611, 2572-2890, 2573-2620, 2573-2621, 2573-2700, 2573-2889,
	2576-2616, 2576-2618, 2576-2701, 2576-2870, 2577-2617, 2578-2616,
	2584-2616, 2584-2617, 2584-2618, 2584-2620, 2584-2624, 2584-2631,
	2584-2636, 2584-2637, 2584-2640, 2584-2645, 2584-2702, 2584-2715,
	2584-2726, 2584-2739, 2584-2780, 2584-2785, 2584-2873, 2584-2878,
	2584-3153, 2588-2621, 2588-2624, 2588-2631, 2588-2636, 2588-2714,
	2588-2785, 2588-2804, 2588-2883, 2588-2890, 2588-2972, 2588-3050,
	2589-2614, 2589-2621, 2589-2624, 2589-2642, 2589-2711, 2589-2714,
	2589-2784, 2590-2649, 2593-2701, 2594-2795, 2594-2873, 2594-2947,
	2594-2952, 2594-3121, 2595-2640, 2595-2642, 2595-2798, 2595-2804,
	2595-2848, 2595-2878, 2597-2701, 2598-3053, 2599-2624, 2599-2640,
	2599-2878, 2599-2888, 2599-2889, 2599-3038, 2599-3053,

10

20

30

【表 4 - 1 8】

表4-18

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Inocyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
2601-2824, 2601-2952, 2606-2870, 2609-3053, 2627-2888, 2637-3276, 2641-3283, 2649-2726, 2649-2764, 2649-2785, 2649-2878, 2649-2952, 2649-3049, 2649-3134, 2649-3217, 2651-2952, 2658-3280, 2659-2700, 2659-2702, 2659-2715, 2659-2991, 2659-3053, 2662-2872, 2662-3038, 2661-3007, 2662-2696, 2662-2771, 2662-2872, 2662-2952, 2662-3038, 2662-3059, 2662-3101, 2667-2708, 2667-2714, 2667-2720, 2667-2721, 2667-2724, 2667-2725, 2667-2749, 2667-2772, 2667-2779, 2667-2785, 2667-2877, 2667-2879, 2667-2889, 2667-3011, 2667-3038, 2667-3057, 2667-3120, 2667-3131, 2667-3134, 2667-3136, 2668-2710, 2668-2727, 2668-2784, 2668-2785, 2668-2803, 2668-2804, 2668-2834, 2668-2863, 2668-2873, 2668-2883, 2668-2888, 2668-2889, 2668-2907, 2668-2941, 2668-2950, 2668-2952, 2668-3011, 2668-3030, 2668-3051, 2668-3058, 2668-3134, 2669-2711, 2669-2712, 2669-2713, 2669-2714, 2669-2715, 2669-2720, 2669-2749, 2670-2749, 2671-2749, 2672-2713, 2672-2715, 2672-2724, 2672-2749, 2672-2784, 2672-2948, 2672-3051, 2672-3121, 2672-3136, 2672-3141, 2672-3238, 2673-2698, 2673-2705, 2673-2709, 2673-2715, 2673-2724, 2673-2726, 2673-2741, 2673-2779, 2673-2784, 2673-2785, 2673-2804, 2673-2883, 2673-2884, 2673-3141, 2678-2718, 2678-2720, 2678-2870, 2678-2889, 2678-3134, 2679-2715, 2679-2724, 2679-2725, 2679-2726, 2679-2749, 2679-2878, 2679-2911, 2679-2990, 2679-3134, 2679-3135, 2681-3265, 2682-3134, 2683-2704, 2683-2714, 2683-2715, 2683-2726, 2683-2749, 2683-2784, 2683-2870, 2683-2889, 2683-3038, 2683-3049, 2683-3131, 2683-3134, 2683-3206, 2684-2725, 2684-3128, 2685-2749, 2685-3038, 2685-3128, 2689-2714, 2689-3141, 2690-2749, 2690-2907, 2693-3206, 2699-3134, 2702-2804, 2707-2883, 2707-2952, 2721-3288, 2732-2888, 2732-3128, 2733-3128, 2736-2785, 2743-2780, 2745-2785, 2745-3038, 2745-3128, 2745-3205, 2746-2781, 2746-2785, 2746-2870, 2746-2877, 2746-2879, 2746-3037, 2746-3056, 2746-3128, 2746-3141, 2747-3038, 2751-2784, 2751-2785, 2751-2809, 2751-2873, 2751-3049, 2751-3051, 2751-3100, 2751-3131, 2751-3142, 2751-3469, 2752-2780, 2752-2784, 2752-2785, 2752-2797, 2752-2804, 2752-2848, 2752-2870,	

10

20

30

40

【表 4 - 1 9】

表4-19

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 水 リヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	2752-2872, 2752-2878, 2752-2879, 2752-2888, 2752-2889, 2752-2890, 2752-2952, 2752-3058, 2752-3213, 2753-2778, 2753-2785, 2753-2804, 2755-2785, 2756-2782, 2756-2785, 2756-2804, 2756-2869, 2756-2873, 2756-2889, 2756-2991, 2756-3122, 2756-3142, 2757-2780, 2757-2782, 2757-2784, 2757-2785, 2757-2786, 2757-2799, 2757-2800, 2757-2870, 2757-2873, 2757-2878, 2757-2879, 2757-2888, 2757-2889, 2757-2890, 2757-2948, 2757-2952, 2757-2968, 2757-2991, 2757-3038, 2757-3121, 2758-2784, 2759-2784, 2759-2879, 2759-2889, 2760-2872, 2761-2784, 2762-3236, 2763-3047, 2763-3128, 2764-3469, 2764-3473, 2765-2804, 2767-3053, 2769-2873, 2769-2879, 2774-2879, 2774-2889, 2776-2873, 2777-2890, 2782-2888, 2787-2889, 2788-3398, 2789-2889, 2789-2876, 2791-3423, 2794-2976, 2794-3128, 2798-2952, 2798-3128, 2798-3136, 2798-3257, 2798-3271, 2801-3128, 2801-3298, 2812-2952, 2813-2879, 2813-2890, 2813-2952, 2813-3121, 2814-2889, 2815-2878, 2815-2889, 2816-3122, 2819-3056, 2821-3128, 2824-3288, 2826-2870, 2829-2890, 2829-3141, 2830-3398, 2836-2873, 2836-2878, 2836-2880, 2836-2950, 2836-2952, 2836-2977, 2836-2991, 2836-3036, 2836-3038, 2836-3050, 2836-3051, 2836-3053, 2836-3056, 2836-3059, 2836-3134, 2836-3218, 2836-3316, 2836-3416, 2836-3469, 2837-2866, 2837-2873, 2837-2877, 2837-2878, 2837-2879, 2837-2883, 2837-2884, 2837-2890, 2837-3129, 2838-2888, 2838-2889, 2838-2932, 2838-3011, 2838-3038, 2838-3133, 2838-3140, 2838-3141, 2838-3206, 2838-3236, 2838-3443, 2838-3445, 2839-2952, 2840-2890, 2841-2873, 2841-2883, 2841-2884, 2841-2889, 2841-3051, 2841-3122, 2841-3133, 2841-3134, 2841-3136, 2841-3398, 2841-3445, 2841-3447, 2844-2878, 2844-3218, 2844-3283, 2845-2873, 2845-2878, 2846-2883, 2846-2884, 2850-3136, 2850-3218, 2851-2878, 2851-2879, 2851-2889, 2851-3057, 2851-3136, 2851-3206, 2851-3289, 2853-3122, 2854-2879, 2855-3057, 2858-3122, 2867-3286, 2867-3289, 2870-3443, 2871-3312, 2872-3331, 2873-3387, 2877-3218, 2879-3442, 2881-2952, 2881-3290, 2885-3308, 2885-3312, 2885-3417, 2885-3538, 2885-3556, 2890-3293, 2892-3488, 2895-3122, 2898-3218, 2905-2977, 2905-3036, 2905-3206, 2905-3470, 2912-2952,

44

10

20

30

40

【表 4 - 2 0】

表4-20

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 本 リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	2912-2977, 2913-3050, 2913-3122, 2913-3134, 2913-3381, 2914-2949, 2914-2952, 2914-2966, 2914-2973, 2914-2986, 2914-3012, 2914-3059, 2914-3122, 2914-3136, 2915-3122, 2919-3513, 2920-3036, 2920-3038, 2920-3049, 2920-3050, 2920-3141, 2920-3142, 2920-3302, 2920-3323, 2920-3451, 2920-3464, 2921-3050, 2922-3036, 2922-3050, 2922-3128, 2922-3131, 2925-3026, 2930-3136, 2933-3128, 2935-3050, 2935-3136, 2935-3050, 2937-3050, 2939-3128, 2947-3218, 2957-3268, 2959-3136, 2965-3128, 2972-3725, 2980-3423, 2981-3050, 2982-3036, 2983-3056, 2983-3059, 2984-3122, 2994-3136, 2994-3542, 2997-3061, 2997-3128, 2997-3423, 2998-3036, 2998-3051, 2998-3053, 3003-3236, 3003-3652, 3003-3672, 3004-3049, 3004-3050, 3004-3128, 3004-3131, 3004-3141, 3004-3142, 3005-3560, 3005-3574, 3006-3051, 3006-3058, 3006-3134, 3006-3136, 3007-3038, 3008-3051, 3009-3128, 3013-3142, 3014-3418, 3015-3141, 3016-3142, 3021-3128, 3022-3128, 3028-3407, 3028-3499, 3028-3560, 3029-3609, 3032-3700, 3034-3597, 3036-3565, 3041-3261, 3043-3142, 3046-3141, 3053-3122, 3056-3542, 3062-3141, 3062-3539, 3062-3688, 3062-3815, 3065-3142, 3065-3218, 3066-3141, 3066-3494, 3067-3738, 3078-3265, 3080-3128, 3080-3141, 3081-3142, 3089-3115, 3089-3120, 3089-3121, 3089-3126, 3089-3130, 3089-3131, 3089-3133, 3089-3134, 3089-3136, 3089-3142, 3089-3143, 3089-3169, 3089-3556, 3089-3557, 3089-3565, 3090-3134, 3091-3134, 3091-3136, 3092-3121, 3092-3122, 3092-3128, 3092-3130, 3092-3134, 3092-3136, 3092-3137, 3092-3140, 3092-3141, 3092-3142, 3092-3143, 3092-3206, 3092-3228, 3092-3470, 3092-3540, 3093-3118, 3093-3125, 3093-3129, 3093-3130, 3093-3131, 3093-3133, 3093-3134, 3093-3137, 3093-3141, 3093-3148, 3093-3446, 3093-3477, 3093-3565, 3094-3142, 3096-3125, 3096-3142, 3096-3148, 3097-3133, 3097-3134, 3097-3140, 3097-3142, 3097-3228, 3097-3441, 3098-3131, 3098-3132, 3098-3134, 3099-3129, 3100-3137, 3100-3140, 3100-3141, 3100-3228, 3101-3142, 3102-3446, 3102-3565, 3103-3142, 3103-3169, 3103-3565, 3103-3673, 3106-3134, 3109-3659, 3109-3690, 3110-3134, 3110-3736, 3131-3368, 3134-3472, 3137-3566, 3137-3623, 3137-3652,
44	

10

20

30

【表 4 - 2 1】

表4-21

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	3143-3379, 3143-3690, 3148-3460, 3148-3691, 3148-3795, 3151-3417, 3155-3401, 3163-3490, 3166-3557, 3166-3777, 3166-3796, 3170-3609, 3177-3228, 3177-3503, 3182-3776, 3186-3751, 3188-3303, 3188-3777, 3189-3248, 3189-3265, 3189-3302, 3189-3303, 3189-3397, 3200-3302, 3207-3555, 3222-3659, 3229-3771, 3232-3256, 3255-3311, 3274-3446, 3276-3382, 3276-3386, 3276-3470, 3276-3472, 3281-3372, 3281-3389, 3281-3397, 3281-3398, 3281-3431, 3281-3446, 3281-3466, 3281-3470, 3281-3540, 3281-3553, 3281-3554, 3281-3564, 3281-3565, 3281-3580, 3282-3397, 3285-3796, 3286-3470, 3287-3564, 3300-3796, 3324-3469, 3324-3470, 3345-3368, 3345-3370, 3345-3372, 3345-3373, 3345-3374, 3345-3376, 3345-3377, 3345-3381, 3345-3382, 3345-3384, 3345-3385, 3345-3386, 3345-3387, 3345-3388, 3345-3389, 3345-3396, 3345-3397, 3345-3447, 3345-3451, 3345-3456, 3345-3460, 3345-3461, 3345-3462, 3345-3465, 3345-3466, 3345-3467, 3345-3469, 3345-3470, 3345-3472, 3345-3476, 3345-3477, 3345-3478, 3345-3494, 3345-3540, 3345-3541, 3345-3553, 3345-3555, 3345-3556, 3345-3557, 3345-3564, 3345-3565, 3345-3573, 3345-3580, 3345-3600, 3346-3397, 3347-3372, 3347-3375, 3347-3392, 3347-3393, 3347-3396, 3347-3397, 3347-3400, 3347-3432, 3347-3477, 3348-3372, 3348-3397, 3348-3472, 3350-3432, 3350-3470, 3351-3387, 3351-3388, 3351-3467, 3351-3477, 3354-3470, 3355-3386, 3355-3388, 3355-3398, 3355-3470, 3355-3472, 3357-3428, 3357-3456, 3357-3471, 3357-3555, 3357-3564, 3357-3565, 3357-3659, 3358-3446, 3359-3397, 3368-3565, 3412-3470, 3412-3477, 3412-3478, 3412-3556, 3412-3573, 3413-3540, 3417-3446, 3417-3451, 3417-3469, 3417-3555, 3418-3470, 3421-3451, 3423-3446, 3423-3544, 3424-3478, 3424-3480, 3424-3540, 3424-3556, 3425-3467, 3425-3470, 3426-3540, 3428-3477, 3428-3478, 3439-3477, 3445-3477, 3487-3540, 3488-3744, 3502-3565, 3503-3565, 3507-3544, 3508-3582, 3516-3540, 3516-3542, 3516-3556, 3516-3559, 3516-3565, 3516-3580, 3517-3555, 3517-3565, 3518-3565, 3518-3566, 3525-3565, 3583-3796, 3596-3777, 3618-3751, 3625-3796, 3630-4048, 3631-3680, 3642-3882, 3642-3896, 3846-3882
44	

【表 4 - 2 2】

表4-22

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ボリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
45/1867021CB1/3134	1-479, 271-775, 478-716, 478-939, 478-952, 478-1034, 478-1038, 478-1074, 478-1092, 480-712, 498-869, 505-718, 507-1115, 508-998, 571-1175, 571-1250, 717-1010, 747-1315, 822-1215, 822-1530, 1149-1447, 1209-1515, 1274-1468, 1360-1601, 1360-1630, 1360-1868, 1360-1888, 1360-1922, 1360-1985, 1360-1986, 1374-1837, 1411-2017, 1433-1719, 1433-2081, 1451-2118, 1510-1649, 1520-1832, 1539-2003, 1561-2250, 1568-2148, 1586-2211, 1652-2017, 1653-1882, 1653-1899, 1718-1988, 1749-2436, 1750-2038, 1750-2291, 1832-2486, 1846-2483, 1847-2525, 1849-2140, 1854-2033, 1862-2575, 1900-2339, 1913-2646, 1921-1959, 1938-2169, 1939-2634, 1963-2646, 1969-2199, 1969-2237, 1969-2245, 1970-2392, 1972-2297, 1991-2458, 2033-2676, 2035-2286, 2053-2674, 2057-2680, 2059-2612, 2065-2266, 2072-2671, 2077-2720, 2100-2684, 2116-2439, 2144-2267, 2175-2729, 2183-2709, 2218-2729, 2236-2491, 2244-2511, 2244-2587, 2244-2603, 2244-2687, 2244-2704, 2244-2716, 2244-2717, 2247-2670, 2297-2728, 2306-2729, 2307-2729, 2310-2685, 2341-2600, 2346-2629, 2351-2717, 2425-2448, 2458-2717, 2495-2716, 2501-2718, 2528-3134
46/6335220CB1/1861	1-764, 1-796, 229-1050, 392-844, 392-1043, 478-1411, 822-1243, 825-1082, 1001-1267, 1001-1737, 1093-1652, 1094-1224, 1096-1370, 1096-1564, 1096-1579, 1096-1575, 1100-1762, 1245-1861, 1411-1805
47/2314637CB1/702	1-28, 1-32, 1-35, 1-43, 1-44, 1-53, 1-56, 1-62, 1-66, 1-67, 1-68, 1-73, 1-81, 1-88, 1-90, 1-96, 1-110, 1-111, 1-123, 1-126, 1-129, 1-135, 1-140, 1-155, 1-156, 1-158, 1-160, 1-161, 1-171, 1-172, 1-175, 1-179, 1-181, 1-183, 1-185, 1-189, 1-190, 1-191, 1-213, 1-225, 1-226, 1-227, 1-238, 1-239, 2-110, 2-191, 4-30, 4-88, 4-169, 4-191, 4-193, 5-191, 7-160, 8-191, 12-191, 17-191, 21-191, 34-191, 40-191, 43-191, 48-191, 53-191, 54-191, 56-191, 58-191, 61-191, 64-191, 66-191, 156, 71-191, 72-191, 81-188, 81-191, 86-238, 94-191, 96-191, 99-191, 102-191, 104-191, 105-191, 107-191, 111-185, 113-191, 120-191, 122-191, 138-191, 180-239, 188-238, 190-239, 191-232, 191-236, 191-239, 192-216, 192-232, 192-234, 192-236, 192-238, 192-239, 192-240, 192-241, 192-245, 192-375, 192-553, 192-684, 193-239, 193-240, 195-227, 195-239, 195-240, 195-241, 195-243, 198-239, 202-239, 203-241, 240-350, 240-387, 240-411, 256-518, 293-375, 307-375, 311-692, 327-374, 328-375, 333-375, 411-535, 411-695, 411-698, 411-702, 412-435, 412-698, 535-696, 556-589

10

20

30

40

表4-23

ボリスクレオチド リスケレオチド ID/ 配列長	SEQ ID NO/ Incyte ポ 配列断片
48/5543910CBL/1586	1-59, 1-69, 1-176, 1-217, 1-331, 1-344, 1-466, 1-468, 1-471, 1-556, 58-556, 72-556, 109-556, 113-556, 122-556, 168-556, 181-556, 209-556, 211-556, 233-556, 243-556, 250-310, 256-1170, 444-556, 757-962, 901-1098, 901-1537, 901-1586, 1221-1489
49/3620140CBL/1804	1-588, 503-658, 593-655, 593-1214, 991-1265, 1183-1416, 1186-1441, 1186-1804
50/4083592CBL/2329	1-551, 1-553, 1-1690, 201-389, 204-455, 204-685, 263-663, 434-1091, 561-761, 597-917, 636-1364, 747-1389, 787-1389, 853-1553, 902-1388, 919-1186, 919-1389, 941-1389, 946-1357, 988-1388, 994-1386, 1095-1345, 1242-1933, 1293-1770, 1381-1790, 1381-1845, 1381-1964, 1382-1672, 1382-1776, 1382-1819, 1382-1836, 1382-1873, 1382-1909, 1382-1996, 1385-1772, 1387-2088, 1387-2052, 1387-2054, 1400-1871, 1425-1562, 1425-1761, 1425-1792, 1425-1881, 1428-1599, 1428-1817, 1428-2003, 1431-1823, 1440-1687, 1472-2056, 1521-1950, 1646-2250, 1699-2004, 1722-2279, 1758-1998, 1803-2312, 1844-2329, 1866-2056, 1876-2315, 1902-2298, 1987-2294, 2020-2298, 2021-2298, 2085-2329, 2171-2321
51/1522155CBL/3006	1-605, 1-3005, 14-101, 14-110, 15-829, 27-281, 40-602, 40-605, 43-605, 44-605, 49-605, 69-605, 395-601, 421-736, 439-1009, 443-700, 556-745, 556-992, 561-1009, 640-1271, 709-1262, 744-832, 768-1364, 1137-1590, 1138-1430, 1311-1603, 1369-1803, 1375-1945, 1486-2018, 1549-2080, 1638-2160, 1661-2021, 1720-1854, 1720-1998, 1720-2057, 1720-2071, 1720-2122, 1720-2201, 1749-2118, 1750-2009, 1750-2235, 1750-2258, 1751-2291, 1826-2375, 1835-2091, 1842-2257, 1856-2116, 1856-2439, 1867-2444, 1879-2133, 1879-2490, 1905-2258, 1925-2270, 1926-2532, 2021-2212, 2043-2212, 2054-2590, 2142-2655, 2148-2803, 2175-2653, 2175-2668, 2210-2374, 2213-2344, 2245-2737, 2281-2376, 2294-2516, 2343-2895, 2343-2372, 2388-2614, 2436-2714, 2438-2853, 2456-3006, 2531-2697, 2541-2853, 2546-2770, 2559-2773, 2727-2853, 2786-2836, 2819-2853, 2821-2853

【表 4 - 2 4】

表4-24

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
52/7503717CB1/1967	1-356, 1-1967, 6-378, 9-160, 9-228, 13-376, 131-215, 161-850, 531-745, 537-1055, 651-1480, 731-891, 750-1056, 750-1068, 847-1362, 873-1297, 878-1486, 902-1193, 970-1181, 970-1221, 970-1362, 970-1406, 970-1407, 970-1425, 970-1489, 970-1629, 974-1245, 990-1359, 1022-1584, 1090-1732, 1109-1432, 1109-1730, 1169-1436, 1192-1755, 1192-1766, 1198-1767, 1214-1534, 1216-1721, 1216-1730, 1226-1505, 1229-1963, 1284-1747, 1303-1487, 1311-1558, 1311-1721, 1344-1698, 1378-1691, 1404-1864, 1424-1686, 1428-1779, 1428-1780, 1436-1635, 1466-1791, 1471-1706, 1479-1843, 1483-1775, 1493-1824, 1537-1764, 1539-1718, 1548-1736, 1580-1779, 1581-1779, 1638-1782, 1684-1963, 1803-1967

【 0 3 7 9】

10

20

30

【表 5】

表 5

ボリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID	代表的ライブラリ
27	2277388CB1	LUNGTUT07
28	7487561CB1	BRAUNOR01
29	3504861CB1	NERDTH03
30	2686104CB1	BRSTNOT04
31	1380119CB1	BRAITUT08
32	2294975CB1	LUNLTUE01
33	6178145CB1	BRAHTDR03
34	7493913CB1	SMCANOT01
35	778511CB1	SPLNDIC01
36	5609988CB1	BRAVXT03
37	7487559CB1	THYRNOT10
38	3112390CB1	BLADTUT07
39	289219CB1	PROSNOT05
40	2503465CB1	PROSNOT19
41	6806534CB1	ADRETTUE02
42	3206847CB1	OVARDIR01
43	4003220CB1	HEAANOT01
44	4792756CB1	SCORNOT01
45	1867021CB1	SMCCNON03
46	6335220CB1	BRANDIN01
47	2314637CB1	PANCNOT04
48	5543910CB1	TESTNOC01
49	3620140CB1	BRSTNOT23
50	4083592CB1	SINTFER02
51	1522155CB1	TESTTUE02
52	7503717CB1	KIDNNOC01

10

20

30

【 0 3 8 0 】

【表 6 - 1】

表6-1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ADRETUE02	PCDNA2.1	この5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは、49才白人男性の一例副腎摘出時に除去された右副腎腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製された。病理は、副腎皮質細胞癌を示し、これは、ほぼ標本全体を構成した。腫瘍は副腎へ接着していた。副腎は軽度の皮質萎縮を示し、周囲に薄い(1~3mm)結合組織の縁があった。患者は副腎癌、腹痛、発熱(不明な起源による)、および欠乏性貧血を示した。患者の病歴には良性高血圧がある。以前の手術としてはアデノイド口蓋扁桃摘出術があった。患者の服用薬には、アスピリン、カルシウム、および鉄を含む。家族歴は、母親にアテローム性冠動脈疾患、父親に脳血管発作およびアテローム性冠動脈疾患、祖父母に良性高血圧がある。
BLADTUT07	P1NCY	ライブラリは、根治的膀胱切除、根治的前立腺摘除、及び胃腸造設時に58才白人男性の前部膀胱壁から取り除かれた膀胱腫瘍組織から単離されたRNAを用いて作製された。病理は、左側膀胱にグレード3の移行上皮癌を示した。患者の病歴には狭心症、肺気腫および喫煙がある。家族歴には急性心筋梗塞、アテローム硬化型冠動脈疾患および2型糖尿病がある。
BRAHTR03	PCDNA2.1	このランダムプライムしたライブラリは、胆管癌で死亡した55才白人女性から切除した旧皮質、前海馬組織から単離したRNAを用いて作製された。病理は円蓋部全体に優勢な軽度の髄膜線維症があり、帯状皮質白質および視床に軸索球状体が散在しており、内嗅野および中脳水道灰白質領域にいくぶん神経原線維変化の散在があった。随伴腫瘍組織の病理は、残存腫瘍または再発性腫瘍を伴う高分化型の肝臓胆管癌を示した。患者の病歴には、胆管癌、術後パッド・キアリー症候群、胆汁性腹水、水腫症、脱水症、栄養不良、乏尿および急性腎不全を含む。過去の手術には、胆管切除、および肝臓の85%の摘除がある。
BRAITUT08	P1NCY	ライブラリは、47才の白人男性の脳腫瘍組織の切除時に左前頭葉から採取した脳腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は焦点性腫瘍性放射線壊死(focal tumoral radionecrosis)を伴うグレード4の原線維性星細胞腫を示した。患者の病歴には、脳血管障害、欠乏性貧血、高脂血症、癲癇および喫煙がある。家族の病歴には、脳血管障害、悪性前立腺腫瘍がある。
BRANDINC1	P1NCY	このノーマライズ(均質化)された松果体組織ライブラリは、2人の異なる提供者からの或る松果体組織ライブラリの400万の独立クローンから作製された。開始RNAは2名の白人女性から除去したプーラーした松果体組織から作製された。うつ血性心不全で死亡した68才(提供者A)と肺炎で死亡した79才(提供者B)である。提供者Aの神経病理は、軽度から中等度のアルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症および多発性梗塞を示した。提供者Bの神経病理は、重度のアルツハイマー病、綿動脈硬化症、脳アミロイド血管症および多発性梗塞を示した。両方の提供者において調べた脳切片全体に渡って、びまん性神経突起アミロイド斑と神経原線維変化があった。患者歴は提供者Aにおいて真性糖尿病、関節リウマチ、甲状腺機能亢進、アミロイド心疾患お

【表 6 - 2】

表6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRAUNOR01	PINCY	このランダムアライメントされたライブラリは、アテローム性動脈硬化による出血および脳部大動脈破裂で死亡の81才白人女性から得た、線条体、淡蒼球、および後部被殻組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は、中等度のアテローム性動脈硬化(両側の内頸動脈に併発)、微視的梗塞(前頭皮質および海馬)、並びに年齢に一致した散在性びまん性のアミロイド症および神経原線維変化を示した。肉眼的には、軟膜は上矢状静脈洞に沿った軽度の肥厚と硝子質化とを示すのみであった。残りの軟膜は薄かった。また、充血した血管がいくらか見られた。主に前頭極および前頭葉、及び側頭葉(両側)に軽度の萎縮が見られた。微視的には、アルツハイマー2型星状細胞のペーア複数が新皮質の深層に増大していた。扁桃体には微量のびまん性斑と神経原線維変化とがあった。後リトリーシス (satellitosis) が増大していた。扁桃体には微量のびまん性斑と神経原線維変化とがあった。後部海馬には、反応性グリオシスに囲まれたヘモジデリン含有マクロファージを伴う、微視的な囊胞性の空洞化領域を含んでいた。患者の病歴は、敗血症、胆管炎、術後無気肺、肺炎冠動脈疾患(CAD)、左室肥大に起因する心肥大、巨脾症、細動脈性腎硬化、結節性コロイド甲状腺腫、鬱血性心不全(CHF)、甲状腺機能低下症および末梢血管疾患を含んでいた。
BRAVXT03	PINCY	ライブラリは、妊娠22週で死亡の女子胎児の脳から採取した処理済み星状細胞から単離したRNAを用いて作製された。細胞の処理は、腫瘍壊死因子(TNF)αおよびインターロイキン1(IL-1)各10 ng/mlで24時間おこなった。
BRSTN0T04	PSPORT1	ライブラリは、62才の東インド人女性の片側性巨大単純乳房切除時に採取した乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。随伴腫瘍組織の病理は、浸潤性、グレード3の乳管癌を示した。患者の病歴には、良性高血圧、高脂血症および血尿がある。家族歴には、脳血管疾患、心臓血管疾患、高脂血症、および肝癌がある。
BRSTN0T23	PINCY	ライブラリは、35才の白人女性の両側乳房縮小時に採取した罹患乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は非増殖性纖維囊性病変(乳腺症)を示した。家族歴には、2型糖尿病、アテローム性冠動脈疾患、急性心筋梗塞、高脂血症、および冠動脈バイパスがある。
HEAAN0T01	PINCY	ライブラリは、46才白人男性の心移植時に外植心臓から採取した右冠動脈および右回旋冠動脈組織から単離したRNAを用いて作製した。患者の病歴には、心筋梗塞(原因は左前下行枝冠動脈の完全閉塞)、アテローム性

【表 6 - 3】

表6-3

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
KIDNCC01	pINCY	冠動脈疾患、高脂血症、心筋虚血、拡張性心筋症、左心室機能障害、およびタバコ濫用が含まれる。前に心臓カテーテル法の手術を受けている。家族の病歴には、アテローム性冠動脈疾患を含む。
LUNGTT07	pINCY	この大型分画のライブラリは妊娠20週にパト一症候群(13-トリソミー)で死亡した白人男子胎児から採取してプールのした左右腎臓組織から単離したRNAを用いて作製した。
LUNLTUE01	PCDNA2.1	ライブラリは、50才の白人男性の肺部分切除時に上葉から採取した肺腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学の示すところでは、浸潤性、グレード4の扁平上皮細胞癌である。患者の病歴には喫煙がある。家族歴には皮膚癌が含まれていた。
NERDITN03	pINCY	このノーマライズされた後根神経節組織のライブラリは、56才の白人男性から、肺全摘除、心臓切除、および所属リンパ節切除時に摘出した左上葉肺腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は、グレード3の扁平上皮細胞癌(左上葉に中心的に腫瘤を形成)を示した。腫瘍は、胸膜を通過して隣接する心臓に伸展していた。患者の病歴には、喀血、およびタバコ濫用がある。家族歴は、母親に良性高血圧、脳血管発作、アテローム性冠動脈疾患、父親に前立腺癌、同胞に2型糖尿病がある。
OVARDIT01	PCDNA2.1	このノーマライズされた後根神経節組織のライブラリは、或る後根神経節組織ライブラリの105万の独立クロームから作製した。開始RNAは、急性肺水腫、急性気管支肺炎、両側性胸膜滲出、心嚢液貯留、及び悪性リンパ腫(ナチキラルキラー細胞タイプ)で死亡した32才の白人男性の頸椎から除去した後根神経節組織から作製された。当患者には、原因不明の発熱、倦怠感、疲労、及び胃腸出血があった。患者の病歴には、推定サイトメガロウイルス感染、肝臓腫瘍、脂肪肝、脾腫、出血性膀胱炎、甲狀腺出血、呼吸不全、左肺の肺炎、咽頭のナチキラルキラー細胞リンパ腫、ペル麻疹、及びタバコとアルコールの濫用等がある。過去の手術には、結腸内視鏡、閉鎖型結腸生検、アブノイド口蓋扁桃摘出、鼻咽腔内視鏡検査および生検等がある。患者の薬物療法には、Diflucan (fluconazole)、Deltasone (prednisone)、hydrocodone、Lortab、アルプラゾラム (Alprazolam)、Reazodone、ProMace-Cytabom、Etoposide、シスプラチン (Cisplatin)、シタラビン (Cytarabine)、及びデキサメタゾン (dexamethasone) 等がある。当患者は放射線療法及び複数の輸血を受けた。このライブラリは、極めて長時間(48時間/一回)の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Soares 他、PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他、Genome Research (1996) 6:791 を適用した条件を用いて2回にわたりノーマライズした。
		このランダムプライムライブラリは、45才の白人女性の膣式子宮全摘出、阿爾卵管卵巣摘出、嚢嚢垂と固定化、および付随的虫垂切除時に除去された右卵巣組織から単離されたRNAを用いて作製された。病理は、左右卵巣の間質性卵巣黄体化嚢腫を示した。一致する腫瘍組織の病理検査では、左の卵巣に類皮嚢胞(良性嚢胞性

表6-4

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
PANCN04	PSPORT1	ライブラリは、自動車事故で死亡した5才の白人男子の膵臓組織から単離したRNAを用いて作製した。
PROSN05	PSPORT1	ライブラリは、67才白人男子の前立腺全摘出およびリンパ節生検時に切除した罹患前立腺組織から単離したRNAを用いて作製された。このライブラリは本来、罹患前立腺から無影響の切片として作製されたが、幾つかの腫瘍細胞を有すると判定されている。病理は、腺癌 (Gleason グレード 3+3) を示した。患者の病歴には、冠状動脈疾患、胃潰瘍、および骨関節炎を含む。家族歴には、うつ病、心不全がある。
PROSN019	pINCY	ライブラリは、59才白人男子の前立腺全摘出および所属リンパ節切除時に除去した罹患前立腺組織から単離したRNAを用いて作製された。病理は、腺癌 (Gleason グレード 3+3) が見られた。患者は前立腺特異抗原 (PSA) の上昇も示した。患者の病歴には、結腸癌、アスタト肺、血栓性静脈炎がある。過去に、部分結腸切除を含む手術を受けている。家族歴には、良性高血圧、多発性骨髄腫、高脂血症、および慢性閉鎖性肺病が含まれる。
SCORNO1	PSPORT1	ライブラリ作製に用いたRNAを単離した腎臓組織は、呼吸停止で死亡した71才の白人男性から採取した。患者の病歴には、心筋梗塞、癆瘵、および末期腎臓病がある。
SINIFER02	pINCY	このランダムプライムしたライブラリは、死亡した白人女子胎児から採取した小腸組織から単離したRNAを用いて作製された。死因は胎児性死亡である。
SMCAN01	pINCY	ライブラリは、心移植時の、或る男性の外植体に由来の大動脈平滑筋細胞株から単離したRNAを用いて作製された。
SMCCN03	pINCY	このノーマライズした平滑筋細胞ライブラリは、或る平滑筋細胞ライブラリの7.56×10 <sup>6</sup> の独立クローンから作製した。開始RNAは、3才の白人男子の冠状動脈から除去した平滑筋細胞組織から作製した。ノーマライズ条件およびハイブリダイゼーション条件は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228-9232; Swarcop 他, NAR (1991) 19:1954; および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791-806 から適応し、有意に長い(48時間)の再アニーリングハイブリダイゼーション期間を用いた。
SPLNDIC01	pINCY	この大型分画ライブラリは、2名の提供者からのプールしたcDNAを用いて作製した。cDNAは、無酸素症で死

表6-5

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
TESTNOC01	PBLUESCRIPT	ライブラリは、11例の、10才から61才の白人男性のプールからの精巣組織から単離した RNA を使用して作製された。
TESTTUE02	PCDNA2.1	この5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは、31才白人男性の片側性精巣摘出術時に摘出された精巣組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査では、精巣全体に及ぶ、大部分が壊死性の塊を形成する胚性嚢腫が見られた。残留精巣の微量の病巣 (rare foci) は小葉内生殖細胞異常増殖を示し、腫瘍が精索縁に同定された。患者は腰痛をもっていた。患者の病歴には喫煙がある。以前受けた手術には、精巣の針生検がある。患者の使用薬剤には Colace と制酸薬がある。
THYRN0T10	pINCY	ライブラリは、30才の白人女性の片側甲状腺切除および副甲状腺再移植時に採取した、罹患左甲状腺組織から単離した RNA を用いて作製された。病理は、リンパ球性甲状腺炎を示した。

【表 7 - 1】

表7-1

プログラム	説明	参照文献	パラメータ閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除き、まぎらわしい塩基をマスクするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸配列または核酸配列の比較と注釈とに有用な、ファーストデーターアインダ(Fast Data Finder)。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列の構築を行うプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	アミノ酸配列および核酸配列の配列類似性検索に有用な、ベシクローカルアライメント検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool)。BLASTには5つの機能がある: blastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastx。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	EST: 確率値=1.0E-8以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と、問合せ配列との間の類似性について検索する、Pearson および Lipman アルゴリズム。FASTAは最少5つの機能からなる: fasta、tfasta、fastx、tfastx および ssearch。	Pearson, W.R. および Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; および Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	EST: fasta E 値=1.06E-6 構築された ESTs : fasta 同一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fasta E 値=1.0E-8以下 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM およびPFAMデータベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相同性、および構造的フィンガープリント領域を検索するBLOCKS IMPROVED Searcher。	Henikoff, S. および J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J. G. および S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105, Attwood, T.K. 他. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下
HMMER	問合せ配列を、PFAMなど、タンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づくデータベース群に対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1998) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350 ページ	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

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表7-2

【配列表】  
2005508606000001.app

プログラム	説明	参考文献	パラメータ関連
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内の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	ノーマライズされた質スコア≧特定のPrositeモチーフに対する GCG指定「HIGH」値 通常、スコア=1.4~2.1.
Phred	高い感度と確率で自動シーケンサートレースを調べるペーサーコンソーシアムアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. および P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Watermanアルゴリズムの効率的実装に基づくプログラムである、SWATとCrossMatchを含むPhils Revised Assembly(改訂構築) プログラム。配列相同性検査やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrapアセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンし、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み行列分析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. および S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み行列を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkovモデル(HMM)を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他, 編集, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ	
Motifs	Prositeで定義されたものと一致するパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual,バージョン9, M51-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16		4 B 0 6 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10		4 B 0 6 5
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 5/14		4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06		4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00		
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	1 0 1	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12		
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12		
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/04		
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/06		
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04		
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02		
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08		
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14		
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02		
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00		
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 33/00		
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02		
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00		
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
C 0 7 K 1/22	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 1/22		
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47		
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/18		
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/40		
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/46		
C 1 2 M 1/00	C 0 7 K 19/00		
C 1 2 N 1/15	C 1 2 M 1/00	A	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19		
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 9/12	C 1 2 N 9/12		
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08		
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D	

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/53

M

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

F

C 1 2 N 5/00

A

A 6 1 K 37/02

- (31)優先権主張番号 60/288,700  
 (32)優先日 平成13年5月4日(2001.5.4)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/288,646  
 (32)優先日 平成13年5月4日(2001.5.4)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/290,510  
 (32)優先日 平成13年5月10日(2001.5.10)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/290,369  
 (32)優先日 平成13年5月11日(2001.5.11)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/332,426  
 (32)優先日 平成13年11月16日(2001.11.16)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ボーグン、マライア・アール  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 7 7・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4  
 (72)発明者 スウォーナカール、アニータ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 2 2・サンフランシスコ・# 5ディー・ロックスリーアベ  
 ニュー 8  
 (72)発明者 ユエ、ヘンリー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 7・サニーベイル・ルイスアベニュー 8 2 6  
 (72)発明者 エリオット、ビッキー・エス  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 1・サンノゼ・ポルテンプレイスウェイ 3 7 7 0  
 (72)発明者 パーフォード、ニール  
 アメリカ合衆国コネチカット州0 6 4 2 2・ダラム・ワイルドウッドサークル 1 0 5  
 (72)発明者 ディング、リー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 6・パロアルト・# 1 4 6・アルマストリート 3 3 5  
 3  
 (72)発明者 タング、ワイ・トム  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 1 8・サンノゼ・ランウィックコート 4 2 3 0  
 (72)発明者 リー、ソー・ユーン  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 1 5・デイリーシティ・ウエストデールアベニュー 4 0  
 (72)発明者 アジムザイ、ヤルダ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 2・カストロバレー・ボールダーキャニオンドライブ  
 5 5 1 8  
 (72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ

- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ・ユニオンシティ ・ # 7 1 2 ・ユニオンスクエア 3  
3
- (72)発明者 ギーツェン、キンバリー・ジェイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 3 ・サンノゼ・ロスウエコストドライブ 6 9 1
- (72)発明者 グリフィン、ジェニファー・エイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 5 ・フレモント ・ # 1 1 ・メローウェイ 3 3 6 9 1
- (72)発明者 ラル、ブリーティ・ジー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 6 ・サンタクララ・ピーオーボックス 5 1 4 2
- (72)発明者 ヤング、ジュンミン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 9 ・サンノゼ・バンクレーン 7 1 2 5
- (72)発明者 ポロースキー、マーク・エル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 1 ・レッドウッドシティー・オーチャードアベニュー  
1 2 2
- (72)発明者 リチャードソン、トマス・ダブリュ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 2 ・レッドウッドシティー ・ # 1 0 7 ・キャニオンロード  
6 1 6
- (72)発明者 ユエ、ヒュイピン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 1 4 ・クーペルティノー・サウスステリングロード 1 1  
7 0
- (72)発明者 ベチャ、シャニア  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 4 6 ・カストロバレー ・ # 1 1 7 ・ゲイリードライブ 2  
1 0 6 2
- (72)発明者 フォーサイス、イアン・ジェイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 1 ・レッドウッドシティー・ローブルアベニュー 3 0 8
- (72)発明者 ジョーンズ、カレン・アン  
イギリス国エセックス州 ・シービー 1 0 1 ビーエイチ・サフロンウォールデン・キャッスルコー  
ト 2
- (72)発明者 ワレン、ブリジット・エイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 1 4 ・クーペルティノー ・ # 2 ・パークウッドドライブ  
1 0 1 3 0
- (72)発明者 サンガベル、カピサ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 ・マウンテンビュー ・ # 2 3 ・モンテシトアベニュー  
1 9 5 0
- (72)発明者 ホンチェル、シンシア・ディー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 7 0 ・サンカルロス ・ # 2 0 3 ・ローレルストリート 4  
0 0
- (72)発明者 ジョリー、ヘレン・イー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 7 7 ・サンレアンドロ・ブリッジロード 7 8 2
- (72)発明者 ハファリア、エープリル、ジェイ・エイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 4 ・サンタクララ・コーレデプリマベラ 2 2 2 7
- (72)発明者 リング、ヒュイジュン、ジュー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 2 2 ・ロスアルトス・オレンジアベニュー 6 2 5
- F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02  
FB03  
4B024 AA01 AA11 BA10 BA21 BA43 CA04 CA09 FA02 HA14 HA17  
4B029 AA07 BB20 FA15  
4B050 CC03 DD11 FF14 LL01  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ43 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34  
4B064 AG02 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13  
4B065 AB01 BA02 CA24 CA25 CA29 CA44 CA46

4C084 AA01 AA17 DC50 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66  
NA14 ZA022 ZA062 ZA152 ZA162 ZA202 ZA362 ZA422 ZA452 ZA512  
ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972  
ZB072 ZB132 ZB152 ZB212 ZB262 ZB272 ZB322 ZB372 ZC062 ZC352  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 BB43 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA76 DA89  
EA21 EA22 EA23 EA24 EA25 EA26 EA27 EA28 EA29 EA50  
FA74 GA26

專利名稱(譯)	核酸相關蛋白		
公開(公告)號	<a href="#">JP2005508606A</a>	公開(公告)日	2005-04-07
申請號	JP2002574306	申請日	2002-03-14
[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	ヒルマンジェニファーエル ボーグンマライアアール スウォーナカールアニータ ユエヘンリー エリオットビッキーエス バーフォードニール デイングリー タングワイトム リーソーユーン アジムザイヤルダ チョーラナリンダーケイ ギーツエンキンバリージェイ グリフィンジェニファーエイ ラルプリーティジー ヤングジュンミング ポロースキーマークエル リチャードソントマスダブリュ ユエヒュイビン ベチャシャニア フォーサイスイアンジェイ ジョーンズカレンアン ワレンブリジットエイ サンガベルカピサ ホンチエルシンシアディー ジョリーヘレンイー ハファリアエープリルジェイエイ リングヒュイジュンジイー		
發明人	ヒルマン、ジェニファー・エル ボーグン、マライア・アール スウォーナカール、アニータ ユエ、ヘンリー エリオット、ビッキー・エス バーフォード、ニール デイング、リー タング、ワイトム リー、ソー・ユーン アジムザイ、ヤルダ チョーラ、ナリンダー・ケイ ギーツエン、キンバリー・ジェイ グリフィン、ジェニファー・エイ ラル、プリーティ・ジー ヤング、ジュンミング ポロースキー、マーク・エル リチャードソン、トマス・ダブリュ		

ユエ、ヒュイビン  
ベチャ、シャニア  
フォーサイス、イアン・ジェイ  
ジョーンズ、カレン・アン  
ワレン、ブリジット・エイ  
サンガベル、カピサ  
ホンチエル、シンシア・ディー  
ジョリー、ヘレン・イー  
ハファリア、エープリル、ジェイ・エイ  
リング、ヒュイジュン、ジー

IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/04 A61P19/06 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/04 A61P19/06 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/04 A61P19/06 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.F 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/BA10 4B024/BA21 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/FA02 4B024/HA14 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/FA15 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/FF14 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA202 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB322 4C084/ZB372 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA24 4H045/EA25 4H045/EA26 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26
優先権	60/276857 2001-03-16 US 60/285489 2001-04-19 US 60/285556 2001-04-19 US 60/288700 2001-05-04 US 60/288646 2001-05-04 US 60/290510 2001-05-10 US 60/290369 2001-05-11 US 60/332426 2001-11-16 US

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码NAAP的人核酸相关蛋白 ( NAAP ) 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。 本发明还提供了用于诊断，治疗或预防与NAAP异常表达有关的疾病的方法。

(P2005-508606A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テームコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 2 9
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B 0 5 0
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 129 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-574306 (P2002-574306)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		インサイト・ゲノミックス・インコーポレ イテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月10日 (2003.9.10)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9430 4・パロアルト・ボータードドライブ 31 60
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007869		
(87) 国際公開番号	W02002/074913		
(87) 国際公開日	平成14年9月26日 (2002.9.26)	(74) 代理人	100089286
(31) 優先権主張番号	60/276,857		弁理士 大島 陽一
(32) 優先日	平成13年3月16日 (2001.3.16)		ヒルマン、ジュニア・エル
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アメリカ合衆国カリフォルニア州9404 0・マウンテンビュー・街17・モンロー ドライブ 230
(31) 優先権主張番号	60/285,489		
(32) 優先日	平成13年4月19日 (2001.4.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/285,556		
(32) 優先日	平成13年4月19日 (2001.4.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く