

(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2005-511022

(P2005-511022A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(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 6 3
<b>A 6 1 K 49/00</b>	A 6 1 K 49/00	A 4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 139 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-529903 (P2003-529903)	(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9月12日 (2002. 9. 12)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月12日 (2004. 3. 12)	(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94070 0・サンカルロス・ローレルストリート 158
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029219		
(87) 国際公開番号	W02003/025129		
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003. 3. 27)		
(31) 優先権主張番号	60/322, 180		
(32) 優先日	平成13年9月14日 (2001. 9. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/326, 096		
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001. 9. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/327, 446		
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経伝達関連タンパク質

## (57) 【要約】

本発明の種々の実施例は、ヒトの神経伝達関連タンパク質(NTRAN)および、NTRANを同定しコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明の実施例はまた、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。別の幾つかの実施態様は、NTRAN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提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の ( a ) 乃至 ( j ) 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:1-10 ( 配列番号 1 乃至 10 ) および SEQ ID NO:14-25 ( 配列番号 14 乃至 25 ) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

( b ) SEQ ID NO: 11 - 13 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

( c ) SEQ ID NO:2-3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22 および SEQ ID NO:25 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

( d ) SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15 および SEQ ID NO:24 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 96% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド 10

( e ) SEQ ID NO:20 のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

( f ) SEQ ID NO:9 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持つポリペプチド

( g ) SEQ ID NO:11 および SEQ ID NO:18-19 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 99% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

( h ) SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO:16-17、SEQ ID NO:21 および SEQ ID NO:23 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド 20

( i ) SEQ ID NO: 1-25 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、および

( j ) SEQ ID NO:1-25 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】

以下の ( a ) 乃至 ( b ) からなる群から選択した請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

( a ) SEQ ID NO:1-10 および SEQ ID NO:14-25 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド 30

( b ) SEQ ID NO: 11 - 13 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載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 に記載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:26-50 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含む、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。 40

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

## 【請求項 9】

請求項 1 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ポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む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を含む方法。

【請求項10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-25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的に結合する単離された抗体。

【請求項12】

以下の(a)乃至(o)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:26-50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:26-32、SEQ ID NO:34-37、SEQ ID NO:39-40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45-48、SEQ ID NO:50からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO:33のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも91%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(d) SEQ ID NO:44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含むポリヌクレオチド

(e) SEQ ID NO:49のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも95%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(f) SEQ ID NO:38のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも97%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(g) SEQ ID NO:41およびSEQ ID NO:43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99%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(h) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(i) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(j) (c)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(k) (d)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(l) (e)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(m) (f)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(n) (g)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

(o) (a)~(n)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含む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、

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

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、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。

【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

10

20

30

40

50

増幅する過程と、

(b) 前記の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 に記載のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の組成物であって、以下の (a) 乃至 (b) からなる群から選択されたポリペプチド

(a) SEQ ID NO:1-10 (配列番号 1 乃至 10) および SEQ ID NO:14-25 (配列番号 14 乃至 25) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド 10

(b) SEQ ID NO:11-13 (配列番号 11 乃至 13) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

【請求項 19】

機能的な NTRAN 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、そのような治療が必要な患者に請求項 17 の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【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ニングする方法であって、

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、 20

(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】

機能的な NTRAN 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、そのような治療が必要な患者に請求項 21 の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、 30

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(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方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項 25】

機能的 NTRAN の過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 24 に記載の組成物の投与することを含む治療方法。 40

【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 のポリペプチドを適切な条件下で少なくとも 1 つの試験化合物と混合する過程と、

(b) 請求項 1 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 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方法。

【請求項 27】

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

(a) 請求項 1 のポリペプチドの活性が許容される条件下で、請求項 1 のポリペプチド 50

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

【請求項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条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現改変を検出する過程と、

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

【請求項29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生物学的サンプルの核酸と、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を持つ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ゼーションが、前記プローブと前記生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、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またはその断片のポリヌクレオチド配列を含む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) 前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、

前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示するような方法。

【請求項30】

生体サンプル中のNTRANの発現に関連する症状または疾患の診断試験法であって、

(a) 前記生物学的サンプルと請求項11の抗体との混合を、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を形成するのに適した条件下で行う過程と、

(b) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

【請求項31】

請求項11に記載の抗体であって、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(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含む組成物。

【請求項33】

被検者のNTRANの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項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。

【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。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 5】

被検者のNTRANの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項 3 4 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 3 6】

請求項 11 に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、  
 ( a ) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-25 からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、  
 ( b ) 前記動物から抗体を単離する過程と、  
 ( c ) 前記単離された抗体を前記ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-25 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するポリクローナル抗体を同定する過程とを含むような方法。 10

## 【請求項 3 7】

請求項 3 6 の方法で産生したポリクローナル抗体。

## 【請求項 3 8】

請求項 3 7 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 3 9】

請求項 1 1 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 ) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-25 からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、 20  
 ( b ) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、  
 ( c ) 前記抗体産出細胞と不死化した細胞とを融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、  
 ( d ) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、  
 ( e ) SEQ ID NO:1-25 からなる群から選択したアミノ酸配列を含む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。

## 【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

## 【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載のモノクローナル抗体と適切なキャリアとを含む組成物。 30

## 【請求項 4 2】

Fab発現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 1 1 に記載の抗体。

## 【請求項 4 3】

組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 1 1 に記載の抗体。

## 【請求項 4 4】

サンプル中のSEQ ID NO:1-25 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する方法であって、 40

( a ) 請求項 1 1 に記載の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、前記抗体と 1 サンプルと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:1-25 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 4 5】

SEQ ID NO:1-25 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 ) 請求項 1 1 に記載の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、前記抗体と 1 サンプルとをインキュベートする過程と、 50

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列を含む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】

ポリヌクレオチドを含むサンプルの発現プロファイルを作製する方法であって、

(a) サンプル中のポリヌクレオチドを標識化する過程と、

(b) ハイブリダイゼーション複合体が形成されるのに適した条件下で請求項46のマイクロアレイのエレメントとサンプル中の標識化ポリヌクレオチドとを接触させる過程と、

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量する過程とを含む方法。

10

【請求項48】

或る固体基板上的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オチドまたはポリヌクレオチド配列を有し、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。

20

【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。

【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。

30

【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或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更に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、或るリンカーが前記のヌクレオチド分子の少なくとも1つ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。

【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。

40

【請求項56】

SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項57】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項58】

SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項59】

50

- SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項60】
- SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項61】
- SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項62】
- SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項63】
- SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項64】 10
- SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項65】
- SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項66】
- SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項67】
- SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項68】
- SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項69】 20
- SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項70】
- SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項71】
- SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項72】
- SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項73】
- SEQ ID NO:18のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項74】 30
- SEQ ID NO:19のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項75】
- SEQ ID NO:20のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項76】
- SEQ ID NO:21のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項77】
- SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項78】
- SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項79】 40
- SEQ ID NO:24のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項80】
- SEQ ID NO:25のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。  
【請求項81】
- SEQ ID NO:26のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項82】
- SEQ ID NO:27のポリヌクレオチド配列を含む請求項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含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項84】 50

SEQ ID NO:29のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 8 5】  
 SEQ ID NO:30のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 8 6】  
 SEQ ID NO:31のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 8 7】  
 SEQ ID NO:32のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 8 8】  
 SEQ ID NO:33のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 8 9】  
 SEQ ID NO:34のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 9 0】  
 SEQ ID NO:35のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 9 1】  
 SEQ ID NO:36のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 9 2】  
 SEQ ID NO:37のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 9 7】  
 SEQ ID NO:42のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
 【請求項 1 0 2】  
 SEQ ID NO:47のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 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含む請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

10

20

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規の核酸群、それら核酸がコードする神経伝達関連タンパク質群、ならびに、これらの核酸及びタンパク質とを利用した自己免疫/炎症疾患、心臓血管疾患、神経疾患、発生・発達障害、細胞増殖異常、輸送障害、精神疾患、代謝疾患及び内分泌疾患の

50

診断、治療、及び予防に関する。本発明はまた、核酸及び神経伝達関連タンパク質の発現に対する外因性化合物の作用の評価に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトの神経系は全ての身体機能を調節しているが、このヒトの神経系は脳と脊髄からなる中枢神経系（CNS）及び神経インパルスを感じ覚器官からCNSに伝導する求心性神経経路と運動インパルスをCNSから効果器官に伝導する遠心性神経経路からなる末梢神経系（PNS）からなっている。PNAはさらに骨格筋のような随意運動を調節する体性神経系と、心臓、肺及び内臓の不随意運動を調節する自律神経系に分けることができる。CNS関連のタンパク質は、ニューロンシグナルの伝達、細胞接着、神経再生、軸索誘導、神経発生その他のプロセスにおいて機能を果たす。

10

【0003】

大脳皮質、すなわち上位脳は最大の構造であり、脳梁で連結された左右の半球からなっている。大脳皮質は知覚、随意筋骨格運動、及び意識、言語、感情及び記憶に関連する広範囲の活動に関係する統合機能、感覚及び運動機能にかかわっている。大脳は神経系の下位センターと共同して機能する。延髄、脳橋、中脳、小脳、基底核、黒質、視床下部及び視床等の脳の下位領域は動脈圧及び呼吸、平衡及び唾液分泌等の摂食反射を含む無意識の活動を制御する。

【0004】

中枢神経系（CNS）は、脊髄レベル、下位脳レベル及び上位脳レベルすなわち皮質レベルにある1兆以上のニューロンからなっている。ニューロンは細胞間で電氣的または化学的なシグナルを送る。脊髄（骨質の脊柱管の中の細い管として存在する中枢神経系の延長部分）は上行感覚経路と下行運動経路を含み、脳幹及び大脳半球の膜につながった膜で覆われている。脊髄は胴体及び手足の運動出力及び感覚入力系の殆ど全てを含み、脊髄内のニューロン回路は歩行等の律動的な動き及びさまざまな反射も制御している。延髄、脳橋、中脳、小脳、基底核、黒質、視床下部及び視床等の脳の下位領域は動脈圧及び呼吸、平衡及び唾液分泌等の摂食反射を含む無意識の活動を制御する。怒り、興奮、性的反応及び痛みまたは快感への反応は下位脳に由来する。大脳皮質、すなわち上位脳は最大の構造であり、脳梁で連結された左右の半球からなっている。大脳皮質は知覚、随意筋骨格運動、及び意識、言語、感情及び記憶に関連する広範囲の活動に関係する統合機能、感覚及び運動機能にかかわっている。大脳は神経系の下位センターと共同して機能する。

20

30

【0005】

神経系の組織及び発達

神経細胞（ニューロン）は細胞体、軸索、樹状突起及び軸索終末という4つの領域を含んでいる。細胞体は、核その他の細胞小器官を含んでいる。樹状突起は細胞体から外方向に伸びる突起であり、感覚器官または他のニューロンの軸索からのシグナルを受け取る。これらのシグナルは電気インパルスに変換され、細胞体に伝送される。軸索（そのサイズは1ミリから1メートル以上まで広範囲に及ぶ）は細胞体からの神経インパルスを外へ伝導する単一の突起である。微小管及び神経フィラメントを含む細胞骨格繊維は軸索の全長にわたって走り、タンパク質、膜小胞その他の高分子を細胞体から軸索に沿って軸索終末まで輸送する機能を持っている。一部の軸索は、希突起膠細胞（CNS）またはシュワン細胞（PNS）の膜でできた髄鞘によって覆われている。有髄軸索は同じ直径の無髄軸索に比べて電気インパルスを速く伝導する。軸索終末は軸索の細胞体と離れた側の先端にある。（Lodish, H.他（1986）Molecular Cell Biology, Scientific American Books Inc., New York, NY, 715-719ページなど参照）。

40

【0006】

CNS関連のタンパク質は、ニューロンシグナルの伝達、細胞接着、神経再生、軸索誘導、神経発生その他の機能において役割を持っている。CNS関連タンパク質の中には膜に埋め込まれた部分を形成していたり、膜に付着しているものがある。例えば、神経膜タンパク質35（NMP35）は神経膜に緊密に関連しており、ラット成体の神経系で高度に発現して

50

いることが知られている (Schweitzer, B. 他 (1998) *Mol. Cell. Neurosci.* 11:260273)。シナプトフィジン (SY) は小型シナプス小胞の主要な膜内在性タンパク質である。ヒトとマウスにおけるSYの染色体位置はX染色体のサブバンドXp11.22-p11.23である。この領域はWiskottAldrich症候群、3種類のX遺伝子連関の高カルシウム尿腎結石症、そして色素性網膜炎2、先天的停止性夜盲症及びAland Island眼病等の眼疾患を含むいくつかの遺伝病に關与しているとされている (Fisher, S.E. 他 (1997) *Genomics* 45:340-347)。ペリフェリン、すなわち網膜緩慢変性タンパク質 (rds) は光受容体の外側セグメントディスクの周縁に存在する膜内在性の糖タンパク質である。哺乳動物においては、rdsは関係する非糖タンパク質との異好性相互作用を通じてディスク周縁を安定化すると考えられている。rdsは杵体及び錐体光受容体の異常な発達とその後のゆっくりとした変性を特徴とするマウスの神経性突然変異である (Kedzierski, W.J. et al. (1999) *Neurochem.* 72:430438)。

10

## 【0007】

ヒト成人の1兆を超えるニューロンの各々が千個以上の標的細胞と接続している (Tessier-Lavigne, M. 他 (1996) *Science* 274:1123-1133)。これらの神経接続は胚の発生中に形成される。分化する各ニューロンが先端に成長円錐を持った軸索を送り出す。分子的なガイダンスに導かれて、成長円錐は胚の環境の中でシナプス標的まで移動する。神経の発生時には前進する軸索の伸展成長が生じるが成熟哺乳動物のCNSにおいては生じない。CNSが損傷を受けた後には、増殖阻害分子の発現が亢進されるが、その増殖促進の対応物の利用性は減少する。発生中の軸索ガイダンスを支配するタンパク質は損傷中枢神経の再生不能に寄与する。これらのタンパク質にはセマフォリン3A及びセマフォリン3A受容体タンパク質のニューロピリン (neuropilin) 1 とプレキシン (plexin) A1が含まれる (Pasterkamp, R.J. 及び J. Verhaagen (2001) *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35:3654)。

20

## 【0008】

セマフォリン類は、成長する軸索がアクセスできない領域を指定する局所シグナルを提供することにより胚発生時に機能する (Puschel, A.W. 他 (1995) *Neuron* 14:941-948)。これらは少なくとも30の異なるメンバーで構成されており、脊椎動物、無脊椎動物及び、特定のウイルスにさえも存在する。すべてのセマフォリンは長さが約500アミノ酸のセマ (sema) ドメインを有する。セマフォリン受容体であるニューロピリンは、*in vitro*で神経突起の伸展成長を促進することが示されている。ニューロピリンの細胞外領域はCUB、ジスコイジン (discoidin)、及びMAMドメインの3種のドメインからなる。ニューロピリンのCUBモチーフ及びMAMモチーフはタンパク質間相互作用において幾つかの役割を果たすことが示唆されており、またセマドメイン及びC末端ドメインを介してセマフォリン類の結合に關与すると考えられる (Raper, J.A. (2000) *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:88-94の概説を参照)。

30

## 【0009】

発生中の軸索のガイダンスには正と負の効果 (すなわち化学誘引と化学反発) の両方が関わっている。スリット・ファミリーのタンパク質は軸索の枝分かれ、延長及び反発の推進に關与しているとされてきた。スリット・ファミリーのメンバーは昆虫、両生類、鳥類、齧歯類及びヒトを含むさまざまな生物で同定されている (Guthrie, S. (1999) *Current Biology* 9:R432-R435)。スリットタンパク質類は反発誘導受容体Roundabout (Robo)のリガンドであるが、スリットタンパク質は一部のアッセイでは伸長を起こす原因ともなる。スリットの翻訳後処理された形が、このタンパク質の活性型であると思われる (Guthrie, S. 前出, Brose, K. 他 (1999) *Cell* 96:795-806)。

40

## 【0010】

軸索の成長は、細胞表面分子及び細胞外マトリクス (ECM) 分子がらみの接触仲介性機構によっても部分的に誘導されている。フィブロネクチン、ピトロネクチン、ラミニンのメンバー、テネイシン、コラーゲン及びトロンボスポンジンの各ファミリー、及び様々のプロテオグリカンを含んだ多くのECM分子は神経突起の成長及び伸長のプロモーターとして、あるいはインヒビターとして作用し得る (Tessier-Lavigne 他, 前出)。ECM分子の受

50

容体としては、インテグリン、免疫グロブリン・スーパーファミリーのメンバー及びプロテオグリカン等が挙げられる。ECM分子及びその受容体はニューロンの接着、保守及び分化にも関与している(Reichardt, L.F. 他 (1991) *Ann. Rev. Neurosci.* 14:531-571)。プロテオグリカンのテストカン(testican)は海馬の錐体細胞のシナプス後領域に局在していて、受容体の活動、神経修飾、シナプス可塑性及び神経伝達において役割を果たしている可能性がある(Bonnet, F. 他 (1996) *J. Biol. Chem.* 271:4373-4380)。

#### 【0011】

ニューロトロフィン、脊椎動物の神経系の発達、保守及び機能を調節する。ニューロトロフィンは二つの異なるクラスの受容体、すなわち、Trkファミリーの受容体チロシンキナーゼとTNF受容体スーパーファミリーのメンバーであるp75NTRを活性化する。これらの受容体によって、ニューロトロフィンは多くのシグナル伝達経路を活性化するが、このシグナル伝達経路には、ras及びcdc-42/ras/rho Gタンパク質ファミリーのメンバーによって媒介される経路、並びにMAPキナーゼ、PI3キナーゼ及びJunキナーゼカスケードによって媒介される経路が含まれる。発生の際には、限られた量のニューロトロフィンが生存因子として働いて、適切な標的の神経支配のための必要条件と生存ニューロンの数とを一致させる。これらは、また細胞の運命決定、軸索成長、神経樹状突起の剪定(pruning)、神経支配のパターン化、及び神経伝達物質及びイオンチャネルのような正常な神経細胞機能に決定的なタンパク質の発現を制御する。これらのタンパク質はまた、神経機能の多くの面を調節する。成熟した神経系において、これらは、シナプス機能及びシナプスの可塑性を調節し、他方、神経生存を変調し続ける(Huang, E.J. 及び L.F. Reichardt (2001) *Ann. Rev. Neurosci.* 24:677-736)。ニューリチン(neuritin)は神経の活性、及び神経突起生成を促進するニューロトロフィンによって誘発されるタンパク質である。

10

20

#### 【0012】

ニューレキソフィリン(neurexophilin)は、合成後にタンパク質分解で処理される神経ペプチド様タンパク質である。これらのタンパク質はニューロン特異的な細胞表面タンパク質、ニューレキシン(-neurexin)のリガンドである。ニューレキソフィリンとニューレキシンは、ニューロンシグナル伝達経路に参加している可能性がある(Missler, M. 及び T.C. Sudhof (1998) *J. Neurosci.* 18:3630-3638; Missler, M. 他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:34716-34723)。ニンジュリン(ninjurin)は、細胞接着と損傷後の神経再生で役割を果たすニューロン細胞表面タンパク質である。ニンジュリンは後根神経節組織及びシュワン細胞内の神経損傷後に上方制御される(Araki, T. 及び Milbrandt, J. (1996) *Neuron* 17:353-361)。ニンジュリン2は、成熟感覚神経や腸管神経で発現され、神経突起の成長を促進する。ニンジュリン2は、損傷神経の遠位部分を囲むシュワン細胞においてニンジュリン1、神経CAM及びL1の時間経過と同様の時間経過で上方制御される。

30

#### 【0013】

ニューレキシンIVは、胚芽及び幼生におけるPNSでの軸索の絶縁(axonal insulation)に必須である。軸索の絶縁は、活動電位の適切な進行にとって極めて重要である。ニューレキシンIVの脊椎動物ホモログであるCaspr(パラノジン(paranodin)とも呼ばれる)は、軸索とシュワン細胞の間のランヴィエ絞輪のparanodal領域に局在する中隔様接合部構造に存在する。Caspr/パラノジンは、血液脳関門の形成、及び軸索の細胞骨格網と神経細胞膜成分との連結に関与していると考えられている(Bellen, H.J. 他(1998) *Trends Neurosci.* 21:444-449)。

40

#### 【0014】

哺乳動物のNumbは、ホスホチロシン結合(PTB)ドメイン含有タンパク質であり、哺乳動物の神経系の細胞運命決定と皮質の神経発生に関わっている可能性がある。Numbの結合パートナーであるLNXTタンパク質は4つのPDZドメインと1つのリングフィンガードメインを含み、Numbに関わるシグナル経路に参加している可能性がある。PDZドメインは、細胞膜表面におけるシグナル伝達イベントに関わっている多機能タンパク質複合体のアセンブリのアダプタの役割をするタンパク質の中で見つかっている(Ponting, C.P. (1997) *Bioessays* 19:469-479)。LNXTタンパク質は、SHC(チロシンリン酸化成長因子受容体及び下流

50

エフェクターと関連するアダプタ・タンパク質)等の他のPTB含有タンパク質の結合に重要であり得るチロシンリン酸化部位を含んでいる(Dho, S.E. 他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:9179-9187)。

【0015】

Nogoは、中枢神経系(CNS)ミエリンの成分として同定されている。ミエリンは、成体脊椎動物における軸索再生を妨げる。Nogo-66 受容体その他のグリコホスファチジルイノシトール結合タンパク質(glycophosphatidylinositol-linked proteins)を軸索表面から切断すると、ニューロンをNogo-66に対して非感受性にし、CNS損傷からの潜在的回復を促進する(Fournier, A.E. 他(2001) *Nature* 409:341-346)。

【0016】

ホメオボックス転写因子は、神経細胞関連組織のパターン化及び分化を誘導する。これらのタンパク質の存在と機能は線虫、節足動物及び脊椎動物に遍在すると思われる。これらのタンパク質の一例は、哺乳動物感覚ニューロンに発現され、また神経冠発生に関与すると考えられるホメオボックス転写因子、DRG11である(Saito, T. 他(1995) *Mol. Cell Neurosci.* 6:280-292)。侵害刺激を検知する皮膚の感覚神経は脊椎の後角に投射し、一方、これらの神経支配の筋肉伸長受容器は前角に投射する。DRG11は侵害受容性感覚神経から脊椎後角のその中心的標的までの空間時間的に適切な投射を形成するのに必要とされる(Chen, Z.F. 他 (2001) *Neuron* 31:5973)。

【0017】

シナプス

1つのニューロンともう1つのニューロンとの間の接触はシナプスと呼ばれる特殊化された部位で起こる。多くの神経系機能は、シナプトフィジン、シナプシン類、成長関連タンパク質43 (growth associated protein 43: GAP43), SV2及び p65などの多様なシナプスタンパク質によって制御されている。これらはシナプスの細胞内区画に分布している。シナプス末端は、また、カルシウム輸送、神経伝達、シグナル伝達、増殖及び可塑性に関与する多くの他のタンパク質を含む。この部位において、1つのニューロン(シナプス前細胞)からの軸索終末がもう1つのニューロン(シナプス後細胞)にシグナルを送る。シナプスは電氣的または化学的に接続しうる。電氣的シナプスは2つのニューロンを接続するギャップ接合部からなり、シナプス前細胞からシナプス後細胞に電気インパルスを直接通す。化学的シナプスにおいては、シナプス前細胞の軸索終末が特定の神経伝達物質分子を含む膜小胞を含んでいる。神経終末における電位の変化の結果、電圧依存性チャンネルを通じてカルシウムイオンが流れ込み、これにトリガされてシナプス小胞からエキソサイトーシスによって神経伝達物質が放出される。神経伝達物質はシナプス前神経細胞とシナプス後細胞を分離しているシナプス間隙を急速な拡散によって横断する。神経伝達物質は受容体に結合し、シナプス後細胞の原形質膜にある伝達物質依存性イオンチャンネルを開き、細胞内の電位の変化を誘発する。このシナプス後細胞の膜電位の変化により、神経インパルスのその後の伝達が興奮または抑制されうる。

【0018】

シナプス前カルシウムチャンネルの活動は、システイン・ストリングタンパク質(CSP)によって調節される。CSPは神経伝達だけでなくその他の細胞種のエキソサイトーシスにおいても機能する分泌性小胞タンパク質である。CSPはDnaJ/hsp40〔熱ショックタンパク質〕シャペロンファミリーに属する。カルシウムレベルに対するCSPの作用はカルシウム放出に後続すると思われるっており、またエキソサイトーシスが関わっていると思われる、おそらくGタンパク質とも関連していると考えられる(Braun, J.E. 他 (1995) *Neuropharmacology* 34:1361-9136; Magga, J.M. 他 (2000) *Neuron* 28:195-204; Dawson-Scully, K. 他 (2000) *J. Neurosci.* 20:6039-6047; Chamberlain, L.H. 他 (2001) *J. Cell Sci.* 114:445-455)。ニューレグリン(NRG)は電気神経活性と分子成分との間を、シナプスにおけるイオンチャンネル受容体または伝達物質放出の発現を制御することによって媒介する。NRGはまた、興奮ニューロンと抑制ニューロンを調整することによって歩行運動またはその他のより高度な機能の同調に関与するシグナル伝達因子であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0019】

Nタイプ及び P/Qタイプの  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルはシナプス前神経末端に高密度に局在しており、また、ニューロン興奮と分泌の連結の重要な要素である。 $\text{Ca}^{2+}$ 流入を媒介して伝達物質放出を開始することに加えて、これらはシナプス小胞のドッキング/融合機構のタンパク質と直接相互作用すると考えられている。Nタイプ及び P/Qタイプ  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは神経末端において高密度のクラスターとなってシタキシンと共存している。Nタイプ及び P/Qタイプの  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの 1Bと 1Aサブユニットの両方の細胞内ループII-III(LII-III)におけるシナプスタンパク質の相互作用 (synprint) 部位はシタキシン、SNAP-25及びシナプトタグミンに結合する。シナプス前 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは開口分泌機構に必要な $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを提供するだけでなく、小胞のドッキング、プライミング及び融合プロセスに不可欠な構造的要素をも含む。シナプトタグミンは調節性及び恒常的な小胞の輸送に關与するタンパク質の大きなファミリーである。これらにはニューロンタイプ (シナプトタグミンI-V、X及びXI) と偏在タイプ (シナプトタグミンVIIX) が含まれる。 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性シナプトタグミン活性は神経突起の伸展成長に關与している(Mikoshiba, K. 他 (1999) Chem. Phys. Lipids 98:5967)。

10

## 【0020】

シナプス小胞の膜に結合するタンパク質にはvamp(シナプトブレビン)、rab3A、シナプトフィジン、シナプトタグミン (p65) 及びSV2がある。これらの膜タンパク質は神経伝達物質の取り込み、小胞ターゲティング及びシナプス前原形質膜との融合を制御することによって調節されたエキソサイトーシスにおいて機能を果たす(Elferink, L.A. 及び R

20

## 【0021】

V-ATP分解酵素のAc39サブユニットとしても知られているフィゾフィリン (physophilin) は、オリゴマータンパク質であり、これはシナプス小胞膜シナプトフィジンと結合し、エキソサイトーシス性融合細孔 (exocytotic fusion pore) を形成する複合体を構成する。Ac39はシナプトソーム複体内に存在し、この複合体には、シナプトフィジンに加えて大量のシナプトブレビンII及び、V-ATP分解酵素のV0セクターのサブユニットcとAc115が含まれている。ラット脳での *in situ*ハイブリッド形成によってAc39/フィゾフィリンmRNAのほとんどのニューロンの分布が明らかになる。この分布はサブユニットc及びシナプトフィジンのものと空間時間的に相関する。免疫組織化学的な分析によって、Ac39/フィゾ

30

## 【0022】

原形質膜のドーパミン・トランスポータ (DAT) は、シナプスから放出されたドーパミンの再取り込みに必須である。ドーパミンの取り込みは温度及び時間に依存し、コカイン等のさまざまな化学物質によって阻害される。DATノックアウト・マウスは極端に過度な活発性とコカイン及びアンフェタミンの両方への耐性を示している、DATに対するコカインの主要な作用と一致している(Giros, B. 他 (1996) Nature 379:606-612)。DATの厳密な調節に動揺があると、ニューロンがさまざまな傷害によって損傷しやすくなる。もっとも顕著なのは、パーキンソン氏病の元になると考えられている線条体のDAT発現ドーパミン神経終末の選択的な変性である。DATの発現により神経集団の選択的脆弱性を予見できるが、このことはDAT機能を変異させることをめざした治療戦略がさまざまな疾患において大きな恩恵をもたらす可能性を示唆している(Gary, W.M. 他 (1999) Trends Pharmacol. Sci. 20:424429)。

40

## 【0023】

43 KD 後シナプスタンパク質、すなわちアセチルコリン受容体会合43 KDタンパク質 (RAPSIN) はシナプス部位においてニコチン性アセチルコリン受容体のつなぎ留めあるいは安定化に或る役割を果たしていると考えられている。RAPSINは膜結合にかかわっており、

50

ニコチン性アセチルコリン受容体を、裏打ちする後シナプス細胞骨格にリンクしている可能性がある(Buckel, A. 他(1996) Genomics 35:613-616)。Neuritinはタンパク質であり、その遺伝子は神経活動によって、及び神経発生を促進する神経栄養因子(neurotrophin)によって誘導されることが知られている。ニューラキシン(neuraxin)は、ラット中枢神経系の構造タンパク質であり、免疫学的に微小管関連タンパク質5(MAP5)と関係していると考えられている。ニューラキシンは新しいタイプのニューロン特異的タンパク質であり、12個のセントラル・ヘプタデカリピート(heptadecarepeats)と推定上のタンパク質及び膜相互作用部位という異例のアミノ酸組成を特徴とする。ニューラキシンをコードする遺伝子は半数体ラット・ゲノム内で唯一独自であり、高等脊椎動物で保存されている。ニューラキシンは、神経膜と微小管の相互作用に関与していると考えられ、げっ歯類のCNS中で発現されている(Rienitz, A 他(1989) EMBO J. 8:2879-2888)。

10

## 【0024】

神経伝達物質及び神経伝達物質輸送タンパク質

神経伝達物質は、30の小分子の多種多様なグループからなっており、これにはアセチルコリン、モノアミン(セロトニン、ドパミン及びヒスタミン等)、及びアミノ酸(アミノ酪酸(GABA)、グルタミン酸及びアスパラギン酸等)並びに神経ペプチド(エンドルフィンやエンケファリン等)が含まれる(McCance, K.L. 及び S.E. Huether (1994) PATHOPHYSIOLOGY, The Biologic Basis for Disease in Adults and Children, 第2版, Mosby, St. Louis, MO, 403-404ページ)。これらの分子の多くは2つ以上の機能を持ち、その効果は興奮性(例えばシナプス後細胞の原形質膜を脱分極化して神経インパルスの伝達を刺激)あるいは抑制性(例えば原形質膜を過分極化して神経インパルスの伝達を抑制)である。

20

## 【0025】

神経伝達物質及びその受容体は神経機能の制御を目的とする薬物の標的である。例えば、GABAはCNSにおける主要な抑制性神経伝達物質であり、GABA受容体はGABA仲介性効果を強化することにより作用するベンゾジアゼピン及びバルビツール酸塩等の鎮静剤の主要な標的である(Katzung, B.G. (1995) Basic and Clinical Pharmacology, 第六版, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 338-339ページ)。

## 【0026】

2つの主要なクラスの神経伝達物質トランスポーターが神経系の機能に必須である。第一のクラスはニューロンとグリア細胞の原形質膜内の取り込みキャリアであり、細胞外の空間から細胞に神経伝達物質を輸送する。この過程は原形質膜の両側の $\text{Na}^+$ 勾配に依存し、 $\text{Na}^+$ の共役輸送では特にそうである。2つのタンパク質ファミリーが特定されている。第一のファミリーはグリシン、プロリン等のアミノ酸、ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニン等のモノアミン及びGABAのトランスポーターを含む。共通の構造部分としては12個の推定膜貫通型ヘリックドメイン、細胞質内のN末端及びC末端、及び膜貫通型ドメインを3~4つに分けている大きなグリコシル化細胞外ループが挙げられる。この相同タンパク質のファミリーは $\text{Na}^+$ 及び $\text{Cl}^-$ イオンと神経伝達物質の細胞内への共役輸送からエネルギーを引き出している( $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ 神経伝達物質トランスポーター)。第2のファミリーはグルタミン酸塩等の興奮性アミノ酸のトランスポーターを含んでいる。共通の構造部分としては、推定6~10個の膜貫通型ドメイン、細胞質内のN末端及びC末端、及び細胞外ループのグリコシル化が含まれる。興奮性アミノ酸トランスポーターは $\text{Cl}^-$ に依存せず、細胞内 $\text{K}^+$ イオン( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 神経伝達物質トランスポーター)を必要とする可能性がある(Liu, Y. 他(1999) Trends Cell Biol. 9:356-363)。

30

40

## 【0027】

神経伝達物質トランスポーターの第2のクラスは小胞体膜内に存在し、シナプス伝達中の小胞体内容物のエキソサイトーシスの前に神経伝達物質を細胞質から小胞体に濃縮する。小胞体輸送においては、 $\text{H}^+$ ATPaseによって生成される小胞体膜両側の電気化学的勾配を使用する。神経伝達物質の小胞体への輸送には、2つのタンパク質ファミリーが関わっている。1つのファミリーは主にプロトン交換を使って分泌性小胞体内への輸送を駆動するが、こ

50

れにはモノアミンとアセチルコリンのトランスポータが含まれる。例えば、モノアミン・トランスポータは細胞質伝達物質の各分子につき2つの小胞体内のプロトンを交換する。第2のファミリーにはGABAトランスポータが含まれるが、これはシナプス小胞体の正電荷に依存する。これら2つのクラスの小胞体トランスポータは互いに配列類似性がなく、その構造は原形質膜キャリアの構造と異なる構造である(Schloss, P. 他 (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:595599; Liu, Y. 他、前出)。

#### 【0028】

GABAは支配的な抑制性神経伝達物質であり、哺乳動物の神経系に広範に分布している。GABAは特異的な高親和性の $\text{Na}^+$ 及び $\text{Cl}^-$ 依存性のトランスポータによってシナプス間隙から除去されるが、これらのトランスポータはシナプス前及びシナプス後ニューロンと周囲のグリア細胞に局在していると考えられている。少なくとも4つのGABAトランスポータ(GAT1~GAT4)がクローン化されている(Liu, Q.R. 他 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:21062112)。培養細胞及びさまざまな組織から単離された原形質膜小胞体への $[^3\text{H}]$ GABAの取り込みの研究によると、GABAトランスポータの異質性にはかなりの違いがある。基質親和性及び特異性、特有のプロッカー薬理剤、及びさまざまな組織局在性の点でGABAトランスポータはさまざまな違いを示す。例えば、発現したGAT1からGAT4までのGABA取り込みの $K_m$ 値はそれぞれ6、79、18及び0.8 mMである。GAT2はGABAを輸送するだけでなく、ベタインも輸送する。GAT3とGAT4はアラニンとタウリンも輸送する。薬理的な研究によると、GAT1とGAT4によるGABA輸送はGAT2とGAT3によるものと比べて2,4ジアミノ酪酸とguavicineへの感受性が高い。*in situ*ハイブリッド形成の示すところによると、GAT1とGAT4の発現は脳に特異的である。GAT2とGAT3のmRNAは肝臓、腎臓等の組織で検出されている(Schloss, P. 他、前出; Borden, L.A. (1996) *Neurochem. Int.* 29:335356; Nelson, N. (1998) *J. Neurochem.* 71:1785-1803)。

#### 【0029】

ヒトの研究によると、GABAトランスポータの機能は癲癇性の海馬において減少している。GABA感受性の神経伝達の減少は分裂症の病理生理学にも関与しているとされている(Simpson, M.D. 他 (1992) *Psychiatry Res.* 42:273-282)。

#### 【0030】

ジアゼパム結合インヒビター(DBI)は、エンドゼピン(endozepine)及びアシル・コエンチム(CoA)結合タンパク質としても知られているが、このインヒビターは、GABAの効果を下方向調節すると考えられている、内因性GABA受容体リガンドである。DBIは中鎖及び長鎖アシルCoAエステルに非常に高い親和性で結合し、アシルCoAエステルの細胞内キャリアとして機能している可能性がある(\*125950 Diazepam Binding Inhibitor; DBI, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM); PROSITE PDOC00686 Acyl-CoA-binding protein signature)。

#### 【0031】

グリシンは、塩素イオンチャネル受容体(リガンド依存性イオンチャネル・スーパーファミリーのメンバー)を活性化することによって哺乳動物の神経系における主要な抑制性神経伝達物質として機能する(Betz, H. (1990) *Neuron* 5:383-392)。グリシンはまた、NメチルDアスパラギン酸(NMDA)受容体のアロステリック活性化を通じて興奮性伝達を助長する(Johnson, J.W. and P. Ascher (1987) *Nature* 325:529-531)。グリシントランスポータの形態にはGLYT1とGLYT2がある。GLYT1(GLYT1 a/b)の変異体は選択的スプライシングによって生成される(Liu, Q.R. 他(1993) *J. Biol. Chem.* 268:22802-22808)。GLYT1aの転写物が神経組織と非神経組織の両方で検出されるのに対して、GLYT1bは神経組織でのみ検出された(Borowsky, B. 他 (1993) *Neuron* 10:851-863)。高レベルのGLYT1a/b mRNAが海馬や皮質に存在しており、これは、GLYT1a/b mRNAが興奮性シナプス伝達の調節に関与していることを示唆する。GLYT1aがニューロン、グリアあるいはその両方で発現されているかどうかは明らかでない。反対に、GLYT1bはそのほとんどが線維路(fiber tract)に見つかっており、グリア細胞における局在化を示唆する(Schloss 他、前出)。GLYT2は主に脳幹と脊髄に発現される(Schloss 他、前出)。

10

20

30

40

50

## 【0032】

2番目に同定されたグリシン・トランスポータ (GLYT2) は、細胞内アミノ端が長い点が GLYT1a/b と異なっている。この mRNA が主に局在しているのは脳幹と脊髄であり、Nメチル・アミノ酢酸への感受性が低いことから、GLYT2 がストリキニーネ感受性の抑制性グリシン受容体にてシグナル伝達を終結させていることが示唆される。GLYT1b を含む細胞が脱分極化するとトランスポータが逆に働き、グリシンを放出して NMDA 受容体において神経調節アミノ酸の役割を果たさせるのではないかと提案されている (Attwell, D. 及び M. B. Ouvier (1992) *Curr. Biol.* 2:541-543)。こうした逆輸送による神経伝達物質の  $Ca^{2+}$  非依存性非小胞体放出はグルタミン酸及びセロトニンについて実証されている。このことにより、伝達物質トランスポータは神経伝達物質作用の開始及び終結の両方にとって重要であることが示唆される (Schloss 他、前出)。

10

## 【0033】

クレアチン・トランスポータは、GABA のトランスポータと強く関係している。クレアチン・トランスポータ種の相同体同士の一次配列同一性は極めて高い (98~99%)。薬理学的研究によって高親和性クレアチン取り込み (27~43mM) が実証されているが、この取り込みは高親和性のクレアチン類似物質によってブロックされる。クレアチン・トランスポータは、脳、副腎、小腸、直腸、前立腺、胸腺、卵巣、脾臓、膵臓、胎盤、臍帯、甲状腺、舌、咽頭、椎間円板、顎及び鼻の上皮組織を含むさまざまな哺乳動物組織において広範に発現している。マウスの遺伝子地図によれば、クレアチン・トランスポータは X 染色体の 1 つの領域に局在していて、その領域はヒトの Xq28 領域と連結保存になっているが、ここはいくつかの神経筋病の遺伝子のあるところである (Nash, S.R. 他 (1994) *Receptors Channels* 2:165174)。

20

## 【0034】

$Na^+$  / Cl 依存性トランスポータファミリーのタンパク質をコードしている数々の cDNA クローンの基質はまだ同定されていない。これらはオルファントランスポータである。オルファントランスポータの基質の同定は困難であったが、その理由は *in situ* ハイブリダイゼーション及び免疫組織化学の示すところによればこれらのトランスポータは表現型の異なるニューロン集団、例えばグルタミン感受性、GABA 感受性またはセロトニン感受性ニューロンによって合成されているためである。これらのトランスポータの 1 つである NTT4 はクレアチン・トランスポータと最も高い相同性を示す。これは膜貫通領域の 7 と 8 の間に異例な長さのループを持っているという点で、このファミリーの他のメンバーと構造的に異なっている (Liu, Q.R. 他 (1993) *FEBS Lett.* 315:114-118; Schloss, P. 他、前出)。

30

## 【0035】

グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。起電性 ( $Na^+$  /  $K^+$ ) 共役グルタミン酸トランスポータは神経終末及びグリア細胞の原形質膜に存在し、興奮性シナプスで放出されたグルタミン酸の除去を仲介して細胞外濃度を神経毒性レベルより低く保つ。グルタミン酸トランスポータは 3 つのナトリウムイオン及び 1 つのプロトンとの共輸送の後でカリウムイオンを反対の方向に移行することにより、この過程を実現する (Zerangue, N. and M.P. Kavanaugh (1996) *Nature* 383:634637)。

## 【0036】

グルタミン酸トランスポータの膜トポロジーによれば、タンパク質の N 末端部分に 6 つの膜貫通ヘリックスの存在が明らかになっている (Slotboom, D.J. 他 (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:293307)。グルタミン酸塩トランスポータの C 末端側半分はよく保存されており、移行経路の主要部分を構成していて、基質及び共輸送イオンの結合部位を含んでいる (Zhang, Y. and B.I. Kanner (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:17101715)。

40

## 【0037】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者の運動皮質において、シナプスのグルタミン酸の再取り込みの障害とグルタミン酸トランスポータの発現の減少が見出されている。*in vitro* 及び *in vivo* で長期的にアンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与することによりグルタ

50

ミン酸トランスポータの各サブタイプの合成を阻害したところ、このタンパク質の発現とグルタミン酸トランスポータの機能が選択的かつ特異的に減少した。グリアのグルタミン酸トランスポータが失われると、細胞外グルタミン酸レベルの上昇、興奮性毒性に特徴的な神経変性及び漸進的な麻痺が見られた。神経グルタミン酸トランスポータが失われても、線条体の細胞外グルタミン酸塩は上昇しなかったが、軽い神経毒性を生じ、癲癇をもたらした(Rothstein, J.D. 他 (1996) *Neuron* 16:675686)。

【0038】

神経伝達物質トランスポータの欠陥に起因するヒトの病気としては、分裂症、トゥーレット症候群、パーキンソン氏病、脳虚血、筋萎縮性側索硬化症、鬱病及び癲癇等が挙げられる。例えば、癲癇及び分裂症等のCNS疾患の病理生理学において、GABA感作性神経伝達の減少が関与しているとされている。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者の運動皮質において、シナプスのグルタミン酸塩の再取り込みの障害とグルタミン酸塩トランスポータの発現の減少が見出されている。グリアのグルタミン酸トランスポータが失われると、細胞外グルタミン酸レベルの上昇、興奮性毒性に特徴的な神経変性及び漸進的な麻痺が見られた。神経細胞グルタミン酸トランスポータが失われると軽い神経毒性が生じ、結果として癲癇を招く(Rothstein, J.D. 他、前出)。

10

【0039】

小胞体モノアミン・トランスポータ(VMAT)は細胞質モノアミン神経伝達物質を、調節性のエキソサイトーシスで放出用に分泌性小胞体に蓄積させる。VMATはプロトン電気化学的勾配を使ってプロトンとモノアミンの起電性交換体として機能する。VMATトランスポータにはVMAT1とVMAT2が含まれる。VMATタンパク質は12の膜貫通セグメントを持ち、その両端は細胞質側にある。VMATタンパク質はニューロン及び神経内分泌細胞の異なった小胞集団と会合している(Henry, J.P. 他 (1994) *J. Exp. Biol.* 196:251262)。

20

【0040】

小胞体輸送は降圧剤レセルピン及びこれと関係するがより中枢で作用するテトラベナジンによって阻害される。VMATの輸送機構と生化学はこれらの薬を使い、トランスポータのソースとしてウシ副腎から得たクロム親和性顆粒を主に使って解析されてきた(Peter, D. 他 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:72317237)。

【0041】

ヒトの研究によると、レセルピンは鬱病に似た症候を引き起こすことがあり、このことは気分と行動の制御に小胞体トランスポータの活動が重要であることを示唆している。精神刺激薬のアンフェタミンは分泌性小胞体内のアミンの貯蔵も乱すが、このことは小胞体モノアミン輸送の変化が行動に影響しうることを示唆している(Sulzer, D. and S. Rayport (1990) *Neuron* 5:797808)。

30

【0042】

神経伝達に重要と考えられるもう1つの分子ファミリーは、コリン・トランスポータ様CTL1タンパク質である。プロトタイプのCTL1はコリン輸送突然変異の抑制因子として酵母の中で同定されたが、哺乳動物の相同体も特定されている。このタンパク質は約10個の推定膜貫通ドメインとトランスポータ様モチーフを含むが、正当なコリン・トランスポータではないようである。コリン輸送は神経伝達に重要であるが、その理由はコリンがコリン感作性ニューロンに大量に必要とされるアセチルコリンの前駆体であるためである(O'Regan, S. 他 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1835-1840)。

40

【0043】

ニューロンのシグナルは神経筋接合部(NMJ)を超えて伝達される。運動軸索は分子アグリンを放出して筋線維のシナプス後装置の形成を誘発する。ジストログリカン、MuSK、及びrapsynのようなタンパク質はアグリンシグナルの伝達に関与する。アグリンはまた、筋核(myonuclei)における遺伝子転写の上方制御及びシナプス前分化の制御において作用する(Ruegg, M.A. 及び J.L. Bixby (1998) *Trends Neurosci.* 21:2227)。

【0044】

神経タンパク質ドメイン

50

CNS関連タンパク質はホスホプロテインでもありうる。例えば、ARPP21(サイクリックAMP調節性ホスホプロテイン)は線条体その他脳のドーパミンを受容する(dopaminergic)領域に非常に豊富に存在する細胞質性神経ホスホプロテインである。ARPP21 mRNAの定常状態は発達に関連して調節されている。しかし、新生及び成熟した動物においては、ARPP21 mRNAは黒質の6ヒドロキシドーパミン病変の後でも、あるいはD1またはD2ドーパミン受容体を上方制御する薬理的治療によっても変異しない。

#### 【0045】

CNS関連シグナル伝達タンパク質は、PDZドメインを含むことがある。PDZドメインは、細胞膜表面におけるシグナル伝達イベントに関わっている多機能タンパク質複合体のアセンブリのアダプタの役割をするタンパク質の中で見つかっている。PDZドメインは、いくつかのジストロフィン関連タンパク質及び神経一酸化窒素シンターゼ(NOS)を含む膜関連タンパク質中に一般に存在する(Ponting, C.P. 他(1997) Bioessays 19:469-479)。PSD-95/SAP90はシナプス後密度(PSD)で神経細胞中に存在する膜結合グアニル酸キナーゼである(Takeuchi, M. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:11943-11951)。PSD-95/SAP90は、PDZドメインを3個、SH3ドメインを1個、またグアニル酸キナーゼを1個含む。PDZドメインはNMDA受容体、Shaker型カリウムチャネル及び脳一酸化窒素シンターゼとの相互作用を媒介する。SAPAP(SAP90/PSD-95-Associated Proteins: SAP90/PSD-95-結合タンパク質)は、原形質膜でのPSD-95/SAP90の局在化を促進する。

10

#### 【0046】

CNS関連タンパク質は、上皮成長因子(EGF)ドメインを含むことがある。ノッチ(notch)タンパク質は反復EGFドメインの細胞外領域を含む膜貫通タンパク質である。ノッチタンパク質(例えばショウジョバエ(*Drosophila melanogaster*)の神経原性タンパク質Notch)は一般に発達過程の阻止に関わっている。ノッチファミリーのその他のメンバーは、線虫(*Caenorhabditis elegans*)のlin12及びglp1遺伝子である。遺伝学的研究の示すところによると、lin12及びglp1タンパク質、特定の発生上の細胞相互作用において受容体として機能する。その細胞相互作用は、ある種の胚性欠陥に関わっている可能性がある(Tax, F. E. 他(1994) Nature 368:150154)。Pecanex(*D. melanogaster*の母性効果神経原性遺伝子座)は大きな膜貫通タンパク質をコードしていると考えられている。pecanex遺伝子の母性発現がない場合、胚はNotch突然変異胚の特徴である過剰神経化に似た重度の過剰神経化を発症する(LaBonne, S. G. 他(1989) Dev. Biol. 136:1116)。

20

30

#### 【0047】

他のCNS関連シグナル伝達タンパク質はWWドメインを含んでいる。WWドメインは2つの高度に保存されたトリプトファンを持ったタンパク質モチーフである。このドメインはHuntingtin相互作用タンパク質を含む数々のシグナル伝達及び調節タンパク質に存在している。

#### 【0048】

いくつかの線維芽細胞成長因子(FGF)相同因子(例えば、FHFポリペプチド)も、マウス及びヒト組織におけるmRNA発現パターンからみて、神経系発達に関与しているとされている。

#### 【0049】

FHFファミリーのポリペプチドのメンバーは構造的にプロトタイプのFGFと区別可能であるが、このことはFGF関係タンパク質の異例な役割と整合している(Smallwood, P.M. 他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:9850-9857 及び Hartung, H. 他(1997) Mech. Dev. 64:31-39)。

40

#### 【0050】

##### 神経的プロセスに関連する疾患

アルツハイマー病(AD)はCNSの変性疾患であり、成人の中期から後期において漸進的な記憶の喪失と認知の衰退をもたらす。ADはアミロイド沈着及び神経内の神経原線維変化を含む広範囲の神経病理学的特徴を持っている。神経変性やアルツハイマー病を生じる病原経路はよく理解されていないが、この疾患に遺伝的感受性を与える遺伝子座が少なくと

50

も三つ同定されている (Schellenberg, G.D. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:8552-8559; Sherrington, R. 他 (1995) Nature 375:754-760)。

【 0 0 5 1 】

家族性英国痴呆症 (Familial British dementia) (FBD) は、常染色体優性疾患で、星状膠細胞及びミクログリアによって囲まれたアミロイド斑、神経原線維変化、神経細胞欠損及び進行性痴呆を特徴とする。第13番染色体上のBRI遺伝子は、4 kDのペプチドのA-Briをコードする。この膜固着タンパク質は、アミロイド沈着物の主要構成成分であり、FBD患者の中樞神経系からの病変部にこれが存在することがこの疾患に寄与する要因である可能性がある (El-Agnaf, O.M.A. 他 (2001) Biochemistry 40:3449-3457)。

【 0 0 5 2 】

星状細胞腫及びさらに悪性のグリア芽細胞腫は、脳における最も一般的な原発腫瘍であり、原発脳腫瘍の65%以上を占めている。これらの腫瘍は星状細胞系統のグリア細胞で生じる。病原体の感染の後、星状細胞は抗原提示細胞として機能し、リンパ球及びマクロファージの活動を調節する。星状細胞は、通常なら病原体の感染の後でのみ生成されるサイトカイン及びインターロイキンを構成的に発現する (de Micco, C. (1989) J. Neuroimmunol. 25:93-108)。星状細胞の分化に関連する遺伝子を同定する過程で、植物病原関連 (PR) タンパク質に構造的に関連しているタンパク質をコードする1つのcDNAが星状細胞cDNAライブラリから単離された (Murphy, E.V. 他 (1995) Gene 159:131-135)。神経膠腫病原関係タンパク質 (GliPR) はグリア芽細胞腫において高度に発現しているが、胎児や成人の脳あるいはその他の神経系腫瘍においてはそうではない。PRタンパク質はタバコモザイクウイルス等の植物のウイルス感染によって誘導される小さな (10~20 kDa) のプロテアーゼ耐性タンパク質のファミリーである。PRタンパク質の合成は植物における原始的な免疫反応の一部であると考えられている (van Loon, L.C. (1985) Plant Mol. Biol. 4:111-116)。GliPRは、タンパク質の殆ど3分の2を構成する領域にわたってPR-1タンパク質ファミリーと最大50%の相同性を示し、その中には金属結合ドメインを形成するように適切な間隔で配置されたアミノ酸の三つ組His-Glu-Hisが含まれている (Murphy 他、前出)。

【 0 0 5 3 】

Trkファミリー受容体によって惹起されるシグナル伝達は神経原性腫瘍において動的役割を果たす。プロトオンコジンのTrkは、神経成長因子 (NGF) ニュートロフィンの高親和性受容体チロシンキナーゼをコードする。再配列されたTrk発癌遺伝子が結腸癌や乳頭状甲状腺癌のような非ニューロン性腫瘍においてよく観察される。プロトオンコジンTrkは神経芽細胞腫及び髄芽腫のようなニューロン起源の腫瘍の増殖、分化及びアポトーシスを制御する。

【 0 0 5 4 】

Neuronal Thread Protein (NTP) は、脳及び神経管外胚葉腫瘍細胞株に見られる免疫学的に関係のある分子のグループである。神経細胞におけるNTPの発現は、増殖、分化、脳の発達、アルツハイマー病 (AD) の脳、及び再生神経発芽に関連する病理学的状態において増加する (de la Monte, S.M. 他 (1996) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55:1038-1050)。末期AD脳ライブラリから単離された組換えNTP (AD7c-NTP) に対して生成されたモノクローナル抗体は、AD脳組織の白質、神経網繊維及び周核体において高レベルのNTP免疫活性を示した。*in vitro*の研究はまた、誘導された神経突起発芽及び神経分化中に、NTPの上方制御、リン酸化及び核周囲部から細胞突起と成長円錐への移行を実証した。さらに、NTPの免疫反応性の増加がダウン症候群の脳で10~20歳の年齢において、広範囲のAD神経変性が確立する前に、そして対照の脳でNTP発現が低レベルまたは不在である年齢において始まることを見出された。これらの知見は、脳内のNTPの異常な発現と蓄積がダウン症候群のAD神経変性の早期マーカーでありえることを示している (de la Monte, S.M. 他 (1996) J. Neurol. Sci. 135:118-125)。さらに、AD脳組織におけるNTPの発現及び蓄積の増加と対応して脳脊髄液 (CSF) におけるNTPの増加が平行して起こり、CSF内のNTPの増加はこの病気の早期に検出可能である。

【 0 0 5 5 】

Fe65タンパク質ファミリーの新しいメンバーであるFe65様タンパク質 (Fe65L2) は、アルツハイマー・ベータアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の細胞質ドメインと相互作用するリガンドの1つである。APPを発現している遺伝子組換えマウスはアルツハイマー病の顕著な行動及び病理学的な特徴の一部を模倣するが、その中には年齢に関係した学習及び記憶機能障害、神経喪失、グリオシス、神経突起の変化、アミロイド沈着及び異常なタウリン酸化が含まれる (Dutilio, A. 他 (1998) *Biochem. J.* 330:513-519)。

【0056】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンの死、突然変異SOD1のペルオキシダーゼ活性の変異、細胞内銅ホメオスタシスの変化、タンパク質凝集及び興奮毒性を生じるグルタミン酸トランスポータの機能変化を特徴とする。神経フィラメント及びペリフェリン (peripherin) は運動ニューロン変性においていくらかの役割を果たすと考えられる。ALSは時折神経フィラメント重鎖遺伝子の突然変異と関連している (AlChalabi, A. 及び P.N. Leigh (2000) *Curr. Opin. Neurol.* 13:397405)。細胞骨格異常、例えば、神経フィラメント (NF) 及び/またはペリフェリンを含む異常封入体、NF軽鎖 (NF-L) タンパク質のmRNAレベルの低下及びNF重鎖 (NF-H) 遺伝子の突然変異がALSでは観察されている。ペリフェリンを含む中間フィラメント封入体はALSにおいて誘因となる役割を果たし得る (Julien, J.P. 及び J.M. Beaulieu (2000) *J. Neurol. Sci.* 180:714)。

10

【0057】

MillerDieker症候群 (MDS) あるいはisolated lissencephaly syndrome (ILS) は、脳の表面が滑らかで、皮質が厚くて4つの異常な層があり、ニューロンの場所が間違っているという特徴を持っている。どちらの病状もLIS1遺伝子における欠損または突然変異から生じ得る。脳回欠損遺伝子産物Lis1は、神経細胞遊走にとって必須の進化的に保存された細胞内多タンパク質複合体の成分であり、また、細胞増殖機構及び細胞内輸送の構成成分であり得る (Leventer, R.J. 他 (2001) *Trends Neurosci.* 24:489492)。核運動タンパク質であるNudCはLis1と相互作用する (Morris, S.M. 他 (1998) *Curr. Biol.* 8:603606)。

20

【0058】

NudCは核運動タンパク質であり、神経移動にかかわる脳回欠損遺伝子産物Lis1と相互作用する。MillerDieker症候群 (MDS) またはisolated lissencephaly sequence (ILS) を持つ人々はLIS1遺伝子の中に半接合体の欠失または突然変異が起こっている。いずれの状態も脳の表面が滑らかで、皮質が厚くて4つの異常な層があり、ニューロンの場所が間違っているという特徴を持っている。LIS1は脳室帯及び大脳皮質で高度に発現している。Lis1とNudCの相互作用とMDS及びILSの表現型を考え合わせると、脳室帯内の核運動が神経の運命と皮質の構造に密接に関係しているという可能性が出てくる (Morris, S. M. 他 (1998) *Curr. Biol.* 8:603606)。

30

【0059】

網膜色素変性症は、思春期に夜の視覚及び周辺部での視野喪失を生じる、緩慢進行性の網膜の先天性障害グループである。ショウジョウバエのオプシン遺伝子の劣性ノンセンスの突然変異は光受容体の変性を生じる。或ファミリーにおいて、ロドプシンやペリフェリン/RDSをコードする遺伝子群はこの疾患の遺伝子座に極めて近接にマップされる。常染色体優性のすべての症例のほぼ30%に、ロドプシン及びペリフェリン/RDSの突然変異が見つか

40

【0060】

シナプスタンパク質は、アルツハイマー病 (AD) 及び虚血 (シナプス関連タンパク質は神経終末に異常に蓄積されるか、あるいはシナプスタンパク質が脱神経後に変異されるような種々の疾患) 及び腫瘍性疾患などの他の疾患に関与する (Masliah, E. 及び R. Terry (1993) *Brain Pathol.* 3:7785)。小型シナプス小胞の主要な膜内在性タンパク質であるシナプトフィジン (SY) の染色体位置はX染色体のサブバンドXp11.22-p11.23である。この領域はWiskottAldrich症候群、3種類のX遺伝子連関の高カルシウム尿腎結石症、そして色素性網膜炎2 (先天的停止性夜盲症) 及びAland Island眼病等の眼疾患を含むいくつかの遺伝病に関与しているとされている (Fisher, S.E. 他 (1997) *Genomics* 45:340-347)。

50

## 【0061】

BRI 遺伝子ファミリーのBRI2アイソフォームでの突然変異はヒトの痴呆症に関連する (Vidal, R. 他 (2001) *Gene* 266:95102)。

## 【0062】

ニューロンシグナル伝達系の分子及び細胞成分での変化は、抗うつ薬による長期治療後に観察される気分及び認識における効果と相関する。抗うつ薬治療後、脳内では、二つのセリン/トレオニンキナーゼ、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII及びサイクリックAMP依存性タンパク質キナーゼが活性化される。シナプス前終末及び微小管を含む細胞内区画の選択したタンパク質基質のリン酸化における関連する変化が抗うつ薬で観察されるシナプス伝達の変調に寄与し得る (Popoli, M. 他 (2001) *Pharmacol. Ther.* 89: 149170)。レセルピンは鬱病に似た症候を引き起こすことがあり、このことは気分と行動の制御に小胞体輸送活動が重要であることを示している。精神刺激薬のアンフェタミンは分泌性小胞体内のアミンの貯蔵も乱すが、このことは小胞体モノアミン輸送の変化が行動に影響しうることを示唆している (Sulzer, D. and S. Rayport (1990) *Neuron* 5:797808)。

## 【0063】

癲癇及び分裂症等のCNS疾患の病理生理学において、GABA感作性神経伝達の減少が関与しているとされている。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者の運動皮質において、シナプスのグルタミン酸の再取り込みの障害とグルタミン酸トランスポータの発現の減少が見られる。グリアのグルタミン酸トランスポータが失われると、細胞外グルタミン酸レベルの上昇、興奮性毒性に特徴的な神経変性及び漸進的な麻痺が見られた。神経グルタミン酸トランスポータが失われると軽い神経毒が生じ、結果として癲癇を招く (Rothstein, J.D. 他 (1996) *Neuron* 16:675686)。GABAトランスポータ機能はてんかん性海馬において減少される。ドーパミン、ノルエピネフリン及びセロトニンのトランスポータはコカイン、抗鬱剤及びアンフェタミンを含む臨床関係の精神刺激剤の標的として特に重要である。コカイン及び抗鬱剤は、さまざまなレベルの特異性で除去を制限することにより、アミンのシナプス濃度を上げる働きをするトランスポータ拮抗物質である。アンフェタミンは小胞体のアミン貯蔵の枯渇に呼応して、トランスポータ仲介性の流出を増強する (Barker, E.L. 及び R.D. Blakely (1995) *Psychopharmacology* 28:321333; Sulzer, D. 及び S. Rayport (1990) *Neuron* 5:797808; Wall, S.C. 他 (1995) *Mol. Pharmacol.* 47:544550)。

## 【0064】

μオピオイド受容体 (MOR) は、モルフィン、コデイン、メサドン、及びフェンタニルやヘロインなどの鎮痛解熱剤の作用を媒介する。MORは、Gタンパク質で活性化したカリウムチャンネルに機能的に共役する (Mestek A. 他 (1995) *J. Neurosci.* 15:2396-2406)。種々のMORサブタイプが在る。選択的スプライシングは、MOR-1で観察されており、多数のGタンパク質共役受容体でも観察されている。この共役受容体としては、ソマトスタチン2、ドーパミンD2、プロスタグランジンEP3、並びにセロトニン受容体サブタイプ (5-ヒドロキシトリプタミン4 及び5-ヒドロキシトリプタミン7) を含む (Pan, Y.X. 他 (1999) *Mol. Pharm.* 56:396-403)。

## 【0065】

中枢神経系は細菌産物や免疫介在物質に応答して抗炎症性ホルモンのカスケードを作ることによって生得的な免疫系を制御する。中枢神経系はまた、迷走神経によって搬送されるアセチルコリン媒介の遠心性シグナルを介して応答する。マクロファージに発現されるニコチン性コリン受容体はこれらのシグナルを検出し、弱まったサイトカイン応答で反応する (Tracey K.J. 他 (2001) *FASEB J.* 15:15751576)。

## 【0066】

Dysferlinは、常染色体劣性肢帯筋ジストロフィータイプ2B(LGMD2B)患者と遠位型筋ジストロフィー (三好型筋ジストロフィー) 患者での変異された遺伝子のタンパク質産物である。Dysferlinは線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の精子形成因子のFER1に相同性である。別のヒトFER1様タンパク質 (ferlin) であるOtoferlinは常染色体劣性非症候性難聴 (DF

NB9)に關与している。Ferlinのすべては、ラットシナプトタグミンIIIのC2Aドメインと最高レベルの相同を共有する複数のC2ドメインに相当する配列を特徴とする(Britton S. 他(2000) Genomics 68:313321)。

【0067】

発現プロファイル作成

マイクロアレイは、生体分析で用いられる分析ツールである。マイクロアレイは複数の分子を有し、それらは或る固体支持体の表面で空間的に分布し、その表面と安定して結合している。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及び/または抗体のマイクロアレイが開発されており、その種々の用途には遺伝子シーケンシング、遺伝子発現のモニタリング、遺伝子マッピング、細菌同定、薬剤発見、コンビナトリアルケミストリがある。

10

【0068】

特にマイクロアレイの使用として見出された1つの分野は、遺伝子発現分析である。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には、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。

20

【0069】

アテローム性動脈硬化症

アテローム性動脈硬化症、それに関連する冠状動脈疾患、脳卒中は、先進国におけるもっとも一般的な死の原因を代表する。特定の主な危険因子は同定されているが、この複雑な疾患の原因を解明し、看護する完全な分子的性質決定は、まだ達成されていない。アテローム性血管硬化病変部の成長と退化の分子的性質決定には、成長、安定、溶解、破裂、そして最も致命的な閉塞性血管血栓の誘発を含む病変部の特徴に寄与する遺伝子の同定を必要とする。

【0070】

アテローム性動脈硬化症発生の初期段階は、「脂肪線条」の形成である。コレステロールに富んだ低密度リポタンパク質(LDL)等のリポタンパク質は、血管内膜の細胞外空間に蓄積して、修飾を受ける。LDLの酸化は、循環抗酸化体防御の効果が少ない内皮下空間で最も激しい。LDL酸化の程度は、LDLと標的細胞との相互作用に影響する。「最小限に酸化した」LDL(MM-LDL)は、同定された酸化LDL(Ox-LDL)またはスカベンジャー受容体タイプAとB、CD36、CD68/macrosialin、LOX-1等の「スカベンジャー」受容体にはではなく、LDL受容体に結合することができる(Navab 他(1994) Arterioscler Thromb Vasc Biol 16:831-842; Kodama 他(1990) Nature 343:531-535; Acton 他(1994) J Biol Chem 269:21003-21009; Endemann他(1993) J Biol Chem 268:11811-11816; Ramprasad 他(1996) Proc Natl Acad Sci 92:14833-14838; Kataoka 他(1999) Circulation 99:3110-3117)。MM-LDLは単球の接着と貫通を増加し、内皮細胞により単球走化タンパク質1(MCP-1)の放出を刺激する、またスカベンジャー受容体A(SRA)とマクロファージにおけるCD36発現を誘発することができる(Cushing 他(1990) Proc Natl Acad Sci 87:5134-5138、Yoshida 他(1998) Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:794-802、Steinberg(1997) J Biol Chem 272:20963-20966)。SRA及び他のスカベンジャー受容体は、Ox-LDLに結合し、リポタンパク質粒子の取込みを強化することができる。

30

40

【0071】

単核食細胞は、脈管内膜に入り、マクロファージに分化して、Ox-LDL等の修飾した脂質を取り込む。大抵のタイプの細胞では、コレステロール含有はLDL受容体と生合成酵素のフィードバック調節により厳密に制御されている(Brown 及び Goldstein(1986) Science 232:34-47)。しかしマクロファージでは、スカベンジャー受容体の追加によってコレス

50

テロールの制御不能な取込み (Brown及びGoldstein (1983) Annu Rev Biochem 52:223-261)、及び「泡沫細胞」表現型を作製する多数の細胞内脂質飛沫の蓄積へとつながる。コレステロール充満の死んだマクロファージは、初期「脂肪線条」プラークの塊及び典型的な罹患した動脈の「進行した」損傷のはとんどの原因となる。多数の研究において、アテローム硬化性血管壁プラークの成長と破裂に寄与する多様な泡沫細胞応答について記載されている。これらの反応には、増殖と隣接細胞の接着を促す多様な成長因子とサイトカイン、循環する単球を成長しているプラークにさらに引き寄せるケモカイン類、細胞外マトリックスの再構築を引き起こすタンパク質類、血栓症誘発の可能性のある組織因子の作製を含む (Ross (1993) Nature 362:801-809; Quin 他. (1987) Proc Natl Acad Sci 84:2995-2998)。 (1987) Proc Natl Acad Sci 84:2995-2998)。よってアテローム斑形成のほとんどの段階において大量に発生するコレステロールを蓄積したマクロファージは、アテローム動脈硬化性 (atherosclerotic) 過程の開始、最終的なプラーク破裂と閉塞性血栓に寄与する。

10

#### 【0072】

Ox-LDL取り込み中、マクロファージはサイトカインと成長因子を生成する。それらは、さらに平滑筋細胞増殖と細胞外マトリックスの生成等の、アテローム発生を調節する細胞事象を誘発する。さらに、これらのマクロファージは、発現誘導型一酸化窒素シンターゼを含む炎症に関与する遺伝子を活性化する可能性がある。従って、泡沫細胞形成中に差次的に発現される遺伝子群がアテローム硬化性過程のマーカーであると期待することは道理的に可能である。

20

#### 【0073】

##### 肺癌

肺癌は、米国男性の癌死の主因であり、女性の癌死の第2の原因である。肺癌は、4つの組織病理的に異なる群に分けられる。3群 (扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌) は、非小細胞肺癌 (NSCLC) に分類される。第4群の癌は、小細胞肺癌 (SCLC) という。肺ガンでは一般的に染色体第11の欠損が見られる。K-rasの活性化突然変異は肺癌で一般的に見られ、この疾患の1つのマウスモデルの基礎である。肺癌の発生と進行に伴う遺伝子発現パターンの解析はこの病気の生物学的基盤に対するすばらしい洞察を生み出すだろうし、また診断と治療の改善にもつながるだろう。

30

#### 【0074】

##### 卵巣癌

卵巣癌は、婦人科癌の死亡の主な原因となっている。卵巣癌の主なものは上皮細胞から由来しており、上皮卵巣癌の患者の70%は疾患の後期段階にある。その結果、この疾患に対する長期的生存率は極めて低い。卵巣癌の早期マーカーを同定できれば、生存率を大きく増加できるであろう。卵巣癌の発症に関与する遺伝的変異にはp53の突然変異及びミクロサテライトの不安定性が含まれる。正常な卵巣を卵巣腫瘍と比較するとおそらく、遺伝子発現パターンが異なっている。

#### 【0075】

当分野には、自己免疫/炎症疾患、心血管疾患、神経疾患、発生・発達障害、細胞増殖異常、輸送障害、精神疾患、代謝疾患及び内分泌疾患の診断、予防、及び治療のための、核酸とタンパク質とを含む新規組成の要望がある。

40

#### 【発明の開示】

#### 【発明の効果】

#### 【0076】

本発明の種々の実施態様は、総称して「NTRAN」、個別にはそれぞれ「NTRAN-1」、「NTRAN-2」、「NTRAN-3」、「NTRAN-4」、「NTRAN-5」、「NTRAN-6」、「NTRAN-7」、「NTRAN-8」、「NTRAN-9」、「NTRAN-10」、「NTRAN-11」、「NTRAN-12」、「NTRAN-13」、「NTRAN-14」、「NTRAN-15」、「NTRAN-16」、「NTRAN-17」、「NTRAN-18」、「NTRAN-19」、「NTRAN-20」、「NTRAN-21」、「NTRAN-22」、「NTRAN-23」、「NTRAN-24」及び「NTRAN-25」と呼ぶ、神経伝達関連タンパク質である、精製ポリペプチドを提供し、また、これら

50

のタンパク質とそれらをコードするポリヌクレオチドとを利用した疾患と病状との検出、診断、及び治療の方法を提供する。実施態様は精製された神経伝達関連タンパク質や、それをコードするポリヌクレオチドを、効果、投与量、毒性及び薬物学的特徴の決定を含む薬物発見プロセスに利用する方法も提供する。関連する実施態様は精製された神経伝達関連タンパク質やそれをコードするポリヌクレオチドを疾患及び病状の病原性の研究に利用する方法を提供する。

【0077】

或る実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと、(b)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、(c)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択され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と、(d)SEQ ID NO:1-25とからなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片とで構成される群から選択された単離したポリペプチドを提供する。別の実施態様は、SEQ ID NO:1-25のアミノ酸配列を含む単離したポリペプチドを提供する。

10

【0078】

また別の実施態様は(a)SEQ ID NO:1-25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:1-25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:1-25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:1-25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。一実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-25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:26-50からなる群から選択される。

20

【0079】

更に、他の実施例は、(a)SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一である、または少なくともほぼ90%同一である天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群からな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結合したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、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。しかし別の実施態様は、組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換生物体を提供する。

30

【0080】

別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-25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、または(d)SEQ ID NO:1-25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、からなる群から選択したポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a)組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b)そのように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

40

【0081】

更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90

50

%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-25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、または(d)SEQ ID NO:1-25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、から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような単離された抗体を提供する。

**【0082】**

また更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:26-50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:26-50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、及び(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。別の実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも20、30、40、60、80、あるいは100の連続したヌクレオチドを含むことができる。

10

**【0083】**

また別の実施態様は、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:26-50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:26-50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%同一であるあるいは少なくとも約90%同一であ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、及び(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される。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する過程を含む。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。関連する或る実施態様では、方法にはハイブリダイゼーション複合体の量を検出することが含まれ得る。別の実施態様では、プローブは少なくとも約20、30、40、60、80、あるいは100の連続したヌクレオチドを含むことができる。

20

**【0084】**

更にまた別の実施態様は、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:26-50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:26-50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%同一であるあるいは少なくとも約90%同一であ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、及び(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される。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存在・不存在を検出する過程を含む。関連する或る実施態様では、検出方法には増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の量を検出することが含まれ得る。

30

40

**【0085】**

別の実施態様は、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-25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、または(d)SEQ ID NO:1-25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、からなる群れから選択される。一実施例では、組成物はSEQ ID NO:1-25からなる群から選択されたアミノ酸配列を含み得る。他の

50

実施例は、機能的NTRANの発現の低下または異常発現に関連する疾患や症状の治療方法を提供し、そのような治療に必要な患者にこの組成物を投与することを含む。

【0086】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO:1-25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、(b) SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるか、または少なくともほぼ90%同一である天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群から選択され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化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別の実施様態は、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を含む、或る組成物を提供する。また別の実施様態は、機能的NTRAN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。

10

【0087】

なお、他の実施例は更に、(a) SEQ ID NO:1-25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、(b) SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるか、または少なくともほぼ90%同一である天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群から選択されたポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。別の実施様態は、この方法で同定したアンタゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤を含む、或る組成物を提供する。また別の実施様態は、機能的NTRANの過剰発現を伴う疾患や症状の治療を要する患者への、該組成物の投与方法を提供する。

20

【0088】

もう1つの実施例は、(a) SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-25からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性あるいは少なくとも約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:1-25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、または(d) SEQ ID NO:1-25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を含む群から選択されたポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

30

【0089】

さらにもう1つの実施例は、(a) SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性あるいは少なくとも約90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-25を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片を含むポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) 試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物であることを意味する。

40

50

## 【0090】

更になお、他の実施例は、SEQ ID NO:26 - 50からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供し、その方法には、(a)この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを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変化を検出する過程と、(c)可変量の化合物の存在下と化合物の非存在下で標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程が含まれる。

## 【0091】

別の実施様態は、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。10  
(i)SEQ ID NO:20-50からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:26-50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%の同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii)(i)に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv)(i)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26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:26-50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:26-50からなる群から20  
選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%または少なくとも約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場合がある。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

## 【0092】

(本発明の記載について)

タンパク質、核酸及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、機器、材料及び方法に本発明の実施様態が限定されるものではなく、変更され得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施様態を説明する目的で用いたものであり、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。

## 【0093】

補足請求及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、40  
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もの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1個以上の抗体、及び、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。

## 【0094】

本明細書中で用いる全ての技術用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明の実施様態に関係して用い得る、細胞株 50

、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

【0095】

(定義)

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

【0096】

用語「アゴニスト」は、NTRANの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、NTRANに直接相互作用するか、或いはNTRANが関与する生物学的経路の成分と作用して、NTRANの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

10

【0097】

用語「対立遺伝子変異配列」は、NTRANをコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から作製し得る。また、変容したmRNAまたはポリペプチドを作製し得る。そ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、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単

20

【0098】

NTRANをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、NTRANと同じポリペプチド或いはNTRANの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、NTRANをコードするポリヌクレオチド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或いは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、NTRANをコードするポリヌクレオチドの或る特定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或いは検出困難な多型を含む。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なNTRANとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る

。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にNTRANの活性が保持される範囲で、残基の、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性、についての1つ以上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及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似した非荷電極性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、及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、及びフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

30

【0099】

用語「アミノ酸」及び「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し得る。ここで「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に関連する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

40

【0100】

「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。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)技術または当分野でよく知られている他の核酸増幅技術を用いて実行される。

【0101】

用語「アンタゴニスト」は、NTRANの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子を指す。

50

アンタゴニストとしては、NTRANと直接相互作用すること、あるいはNTRANが関与する生物学的経路の各成分に作用することによってNTRANの活性をモジュレートする、抗体などのタンパク質、anticalin、核酸、糖質、小分子、または任意の他の化合物や組成物があり得る。

【0102】

「抗体」の語は、抗原決定基と結合することができる、無傷の免疫グロブリン分子やその断片、例えばFab<sub>1</sub>、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片を指す。NTRAN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。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、所望によりキャリアタンパク質に抱合することも可能である。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ものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカシガイのヘモシアニン(KLH)等がある。結合その結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

10

【0103】

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

20

【0104】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸またはオリゴヌクレオチドを指す。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的特異のアプタマー配列を選択するプロセスである。アプタマーの構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、ヌクレオチド誘導體または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーのヌクレオチド構成要素は修飾された糖基(例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基が2'-Fまたは2'-NH<sub>2</sub>で置換されている)を有することが可能で、これらの糖基は、例えば、ヌクレアーゼに対する耐性あるいは血中でのより長い寿命など、望む性質を改善しうる。循環系からアプタマーが除去される速度を遅くするために、アプタマーを高分子量キャリア等の分子に抱合させることができる。アプタマーは、たとえば架橋剤の光活性化によって各々のリガンドと特異的に架橋させることができる(Brody, E.N. 及び L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13)。

30

【0105】

「イントラマー(intramer)」の用語は*in vivo*で発現されるアプタマーを意味する例え、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. USA 96:3606-3610)。

【0106】

「スピーゲルマー(spiegelmer)」の語はL-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導體またはヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性ヌクレオチドを含むアプタマーは、右旋性のヌクレオチドを含む基質に通常作用する天然の酵素による分解に耐性がある。

40

【0107】

用語「アンチセンス」は、或る特定の核酸配列を有するポリヌクレオチドの「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

50

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、ある参考DNA分子のアンチセンス鎖を意味し、「正」または「プラス」という表現は、ある参考DNA分子のセンス鎖を意味する。

【0108】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に、「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然、組換え体、または合成のNTRAN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。

10

【0109】

「相補(的)」または「相補性」の語は、塩基対形成によってアニーリングする2つの一本鎖核酸の間の関係を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」と対を形成する。

【0110】

「所与のポリヌクレオチドを含む(持つ)組成物」または「所与のポリペプチドを含む(持つ)組成物」は、所定のポリヌクレオチド配列若しくはポリペプチドを持つ、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。NTRANまたはNTRANの断片をコードするポリヌクレオチドを含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして用いられ得る。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)及びその他の構成要素(例えばデンハート液、粉乳、サケの精子のDNA等)を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

20

【0111】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット(Applied Biosystems, Foster City CA)を用いて5'及び/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断片アセンブリシステム(GCG, Madison, WI)か、あるいはPhrap(University of Washington, Seattle WA)等の断片アセンブリ用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片からアセンブリされた核酸配列を指す。伸長及びアセンブリの両方を行ってコンセンサス配列を作製する配列もある。

30

【0112】

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

元の残基	保存的な置換	
Ala	Gly, Ser	
Arg	His, Lys	
Asn	Asp, Gln, His	
Asp	Asn, Glu	
Cys	Ala, Ser	
Gln	Asn, Glu, His	
Glu	Asp, Gln, His	
Gly	Ala	
His	Asn, Arg, Gln, Glu	10
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	
Tyr	His, Phe, Trp	20
Val	Ile, Leu, Thr	

## 【 0 1 1 3 】

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

## 【 0 1 1 4 】

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

30

## 【 0 1 1 5 】

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

## 【 0 1 1 6 】

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

40

## 【 0 1 1 7 】

「差次的発現」は、少なくとも2つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加(上方調節)、あるいは減少(下方調節)、または遺伝子発現またはタンパク発現の欠損を指す。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常サンプルとの間で行われ得る。

## 【 0 1 1 8 】

「エキソンシャフリング」は、異なるコード領域(エキソン)の組換えを意味する。1つのエキソンはコードされるタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得

50

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、新しいタンパク質がアセンブリされることが可能であり、新しいタンパク質機能の進化を促進できる。

【0119】

「断片」は、NTRANの又はNTRANをコードする或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) と配列は同一でありう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、約5~約1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、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、表及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

【0120】

SEQ ID NO:26 - 50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:26 - 50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含む。SEQ ID NO:26-50のある断片は、本発明の例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術の1つ以上の実施様態、またはSEQ ID NO:26-50を関連ポリヌクレオチドから区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:26-50の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO:26-50の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

20

【0121】

SEQ ID NO:1 - 25のある断片は、SEQ ID NO:26 - 50のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1 - 25のある断片は、SEQ ID NO:1 - 25を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1 - 25のある断片は、SEQ ID NO:1 - 25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用いられ得る。SEQ ID NO:1 - 25のある断片の正確な長さ及びその断片に相当するSEQ ID NO:1 - 25の領域は、本明細書に記載する複数の解析的方法、あるいは、当業者の公知の方法を用いて、その断片に対する意図した目的に基づき決定することが可能である。

30

【0122】

「完全長」ポリヌクレオチドとは、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及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。

【0123】

「相同性」の語は、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、交互選択性、または配列同一性を意味する。

40

【0124】

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少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。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。

【0125】

ポリヌクレオチド配列間の一一致率は、当分野で知られているあるいは本明細書に記載されている1つ以上のコンピュータアルゴリズムまたはプログラムを用いて決定し得る。例えば、一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれてい

50

るようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。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。CLUSTAL Vは、Higgins, D.G.及びP.M. Sharp (1989; CABIOS 5:151-153)、並びにHiggins, D.G. 他(1992; CABIOS 8:189-191)に記載がある。ポリヌクレオチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Kt uple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。

#### 【0126】

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、無料で利用可能な用い得る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及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列をペアワイズで直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp(以下に記載)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及び他のパラメータをデフォルト設定に設定して用いる。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 2.0.12(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。

#### 【0127】

```
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
```

#### 【0128】

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。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得られた断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片)の長さについて一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列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。

#### 【0129】

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。

#### 【0130】

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同じ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。保守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守的

10

20

30

40

50

置換は通常、置換部位の電荷及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。ポリペプチド配列に用いられる用語「類似率」または「~%類似性」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同じ残基の一致及び保存的置換を含む残基の一致率を意味する。反対に、保存的置換はポリペプチド配列間の一致率の計算には含まれないものとする。

#### 【0131】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる(既に説明したのでそれを参照されたい)。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列を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、デフォルトの残基重み付け表として選択される。

10

#### 【0132】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。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 2.0.12(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。

#### 【0133】

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

20

#### 【0134】

一致率は、ある定義されたポリペプチド配列の全長(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。或いは、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られた断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、または150の連続した残基の断片)の長さについて一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列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

#### 【0135】

「ヒト人工染色体(HAC)」は、約6 kb(キロベース)~10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、染色体の複製、分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の微小染色体である。

#### 【0136】

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が変えられた抗体分子を指す。

#### 【0137】

「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、ある一本鎖ポリヌクレオチドがあ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される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対する許容条件は、当業者が慣例的に決定できる。許容条件は、どのハイブリダイゼーション実験でも一定でありうるが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異

40

50

性も得るように実験によって変更することができる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68で、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が含まれる。

【0138】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特定の配列の融点(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、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。T<sub>m</sub>を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook, 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巻の9章を参照されたい。

10

【0139】

本発明のポリヌクレオチド間のストリンジェンシーの高いハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約0.1%のSDSの存在中で、約68で1時間の洗浄過程を含む。或いは、約65、60、55または42の温度で行ってもよい。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約0.1~2×SSCの範囲で変化し得る。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、せん断して変性サケ精子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、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。進化的類似性は、ヌクレオチド群、及びヌクレオチドがコードするポリペプチド群について、或る同様の役割を強く示唆する。

20

【0140】

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、一方の核酸が溶解状態で存在し、もう一方の核酸が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、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つの核酸間に形成され得る。

30

【0141】

用語「挿入」或いは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ追加されるアミノ酸配列或いはポリヌクレオチド配列の変化を指す。

【0142】

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

【0143】

「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物など生物に導入すると免疫応答を引き起こす、NTRANのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」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、NTRANのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

40

【0144】

用語「マイクロアレイ」は、基板上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体またはその他の化合物の構成を指す。

【0145】

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指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体またはその他の化合物を指す

50

。

【0146】

用語「モジュレート」または「活性を調節」は、NTRAN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、NTRANのタンパク質活性の増減、或いは結合特性またはその他の、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こる。

【0147】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語はまた、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。

10

【0148】

「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。

【0149】

「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含む、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するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

20

【0150】

NTRAN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、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、NTRANの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0151】

「プローブ」とは、同一核酸、対立遺伝子核酸、または関連核酸の検出に用いる、NTRANやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸を指す。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、化学発光試薬及び酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、核酸の増幅(及び同定)に用い得る。

30

【0152】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の、少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるため、長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または少なくとも150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及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及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書が支持する、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。

40

【0153】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. 他(1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)、Ausubel, F.M. 他(1999; Short Protocols in Molecular Biology, 第4版,

50

John Wiley & Sons, New York NY)、及び Innis, M. 他 (1990; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA) などの参照文献に記載がある。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

#### 【0154】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び、最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロボースまでのイン  
10  
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 Geno  
me Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手可能)によって、ユーザーは  
、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(mi  
spriming 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  
20  
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。従って、この  
プログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片  
の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及び  
ポリヌクレオチド断片は、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  
クエ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  
30  
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。

#### 【0155】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグ  
メントを人工的に組み合わせた核酸である。この人為的組合せはしばしば化学合成によ  
って達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばSamb  
rook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。  
40

#### 【0156】

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。

#### 【0157】

「調節因子」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー  
、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域(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。  
50

## 【0158】

「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られる化学的または生化学的部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

## 【0159】

DNA分子に対する「RNA等価物」は、基準となるDNA分子と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、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。

## 【0160】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。NTRAN、NTRANをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、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、組織プリント等を含み得る。 10

## 【0161】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、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（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、遊離した標識A及びその抗体を含む反応において、エピトープA（つまり遊離した、標識されていないA）を含むポリペプチドの存在が、抗体に結合する標識されたAの量を低減させる。 20

## 【0162】

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、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは約90%以上除去されたものを指す。

## 【0163】

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

## 【0164】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、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

## 【0165】

「転写イメージ(transcript image)」または「発現プロファイル(プロフィール)」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

## 【0166】

「形質転換(transformation)」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。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、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「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或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。さらに、限られた時間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。 40

## 【0167】

ここで用いる「遺伝形質転換生物体 (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、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られているトランスジェニック (transgenic) 技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスでの感染によって行う。別の実施態様で核酸の導入は、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

10

## 【0168】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (1999年5月7日) を用いて blastn を実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%

20

30

## 【0169】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の配列相同性または配列類似性を有するポリペプチド配列として定義される。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 2.0.9 (1999年5月7日) を用いて blastp を実行する。このようなポリペプチド対は、そのポリペプチドの一方の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、あるいは、配

40

## 【0170】

(発明)

本発明の様々な実施態様は、新規のヒト神経伝達関連タンパク質 (NTRAN) 及び、NTRAN をコードするポリヌクレオチドを含む。また、これらの組成物を利用した、自己免疫/炎症性疾患、心血管疾患、神経系疾患、発達障害、細胞増殖異常、輸送障害、精神疾患、代謝疾患及び内分泌疾患の診断、治療、または予防を含む。

## 【0171】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド及びポリペプチド実施態様の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及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

50

別番号 (IncyteプロジェクトID)に 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。

【0172】

表2は、GenBankタンパク質 (genpept)データベースとPROTEOMEデータベースとに対する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及び列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、GenBankの最も近い相同体のGenBank識別番号 (Genbank ID NO:)と最も近いPROTEOMEデータベース相同体のPROTEOMEデータベース識別番号 (PROTEOME 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、GenBankとPROTEOMEデータベースの相同体の注釈を示し、更に該当箇所には関連する引用文献も示す。これらを引用することを以って本明細書の一部とする。

10

【0173】

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及び列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及び列5はそれぞれ、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、リン酸化及びグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ配列、ドメイン、及びモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7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

【0174】

表2及び表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、それらの特性が請求の範囲に記載されたポリペプチドが神経伝達結合タンパク質であることを確立している。

【0175】

例えば、SEQ ID NO:1はヒトアミロイドA4タンパク質 (GenBank ID g28721) とM1残基からL686残基まで90%同一であることが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0.0であるが、これは観測されたポリペプチド配列が偶然に得られる確率を示す。SEQ ID NO:1はまた、1つのアミロイドA4細胞外ドメインと1つのKunitz/ウシ膵臓トリプシンインヒビター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、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:1がアミロイド形成的糖タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。

30

【0176】

他の例でSEQ ID NO:4は、ヒトBRI3 (GenBank ID g9588046)とM1残基からQ162残基まで92%、また、R150残基からV230残基まで98%同一であることが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 $5.8e-119$ 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。さらなるBLAST解析及びMOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:4が神経伝達関連タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。

40

【0177】

他の例でSEQ ID NO:7は、ヒトセマホリンB (GenBank ID g12248382)とM1残基からV348残基まで90%、また、G349残基からA631残基まで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0であ

50

るが、これは観測されたポリペプチド配列が偶然に得られる確率を示す。SEQ ID NO:7はまた、1つのSema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及びMOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:7がセマホリン(semaphorin)であることをさらに確証する証拠を提供する。

#### 【0178】

また他の例として、SEQ ID NO:8は脳アセチルコリンエステラーゼ推定膜アンカーであるヒト二価カチオン耐性タンパク質CUTA(GenBank ID g6624588)とM1残基からM98残基まで100%同一であることが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 $2e-46$ 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:8はまた、1つのCutA1二価イオン耐性タンパク質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)。さらなるBLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:8が二価カチオン耐性タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。

10

#### 【0179】

また他の例として、SEQ ID NO:9はm-tomosyn(GenBank ID g3790389)とM1残基からF115残基まで97%同一であることが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0.0であるが、これは観測されたポリペプチド配列が偶然に得られる確率を示す。SEQ ID NO:9は細胞内領域に局在し、シンタキシン-1及びWD遺伝子機能を有しており、トモシン(tomosyn)タンパク質であることが、PROTEOMEデータベースを用いてBLAST解析によって確認された。SEQ ID NO:9はまた、1つのWD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、BLAST-PRODOM、BLAST-DOMO及びMOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:9がシンタキシン結合タンパク質分子であるという、さらに確証的な証拠を提供する。

20

#### 【0180】

他の例でSEQ ID NO:10は、FEZ1 (GenBank ID g1927202)とE137残基からT363残基までと99%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 $1.2e-114$ 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:10は細胞内領域に局在し、軸索の伸展成長遺伝子機能を有しており、FEZタンパク質であることが、PROTEOMEデータベースを用いたBLAST解析によって確認された。BLAST-PRODOM解析よりのデータは、SEQ ID NO:10がFEZ分子である、さらに実証的な証拠を提供する。

30

#### 【0181】

他の例として、SEQ ID NO:12はラット(*Rattus norvegicus*)のPSD-95/SAP90-関連タンパク質-4 (GenBank ID g1864093)とQ183残基からL505残基まで98%、またS12残基からU132残基まで93%同一であることがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定された(表2参照)。BLAST確率スコアは $5.4e-229$ 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:12はまた、シナプス後密度に局在するタンパク質に相同性を有し、シグナル伝達機能を持ち、そしてPSD-95/SAP90のグアニル酸キナーゼ様ドメインに結合するシナプスタンパク質であることがPROTEOMEデータベースを用いたBLAST解析によって確認された。PRODOMデータベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:12が神経伝達関連タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。

40

#### 【0182】

例えば、SEQ ID NO:18はヒトのジョセフィン(josephin) MJD1 タンパク質 (GenBank ID g2262199)とK8残基からK321残基まで98%同一であることが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 $2.3e-162$ であり、こ

50

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:18はまた、MJD遺伝子産物のカルボキシル末端に局在しているタンパク質に相同性であり、ヌクレオチド除去修復及びアポトーシス機能を有し、また、ジョセフィンMJDタンパク質であることがPROTEOMEデータベースを用いたBLAST解析によって確認された。SEQ ID NO:18はまた、1つのジョセフィンドメインとユビキチン相互作用モチーフ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)。BLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:18がジョセフィンタンパク質であることを示す更に確証的な証拠を提供する。

#### 【0183】

他の例でSEQ ID NO:23は、マウス(*Mus musculus*) Ac39/physophilin (GenBank ID g1226235)とM1残基からE43残基まで100%、また、A31残基からF234残基まで95%同一であることがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって確認された(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.6e-124$ 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:23はまた、ヒトATP6DVの推定オーソログであるタンパク質に相同性である。ヒトATP6DVは、アクセサリサブユニット(ATP結合と、A及びBサブユニットによる加水分解を制御する)である、液胞H(+)ATP分解酵素プロトンポンプのサブユニットDであることがPROTEOMEデータベースを用いたBLAST解析によって確認された。SEQ ID NO:23はまた、1つのATPシンターゼ(C/AC39)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決定された(表3参照)。PRODOMとDOMOのデータベースに対するさらなるBLAST解析は、SEQ ID NO:23がシナプス輸送タンパク質であることをさらに確証する証拠を提供する。

#### 【0184】

SEQ ID NO: 2-3、SEQ ID NO: 5-6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13-17、SEQ ID NO:19-18及びSEQ ID NO:24-25は同様にして解析し、注釈付けをされた。SEQ ID NO: 12-5の解析のためのアルゴリズム及びパラメータは表7に記述する。

#### 【0185】

表4に示すように、完全長ポリヌクレオチドの具体例は、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アセンブリした。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)及び対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、及び塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、完全長ポリヌクレオチド実施態様のアセンブリに使われたcDNA配列及び/またはゲノム配列のヌクレオチド開始位置(5')と停止位置(3')、及びSEQ ID NO:26-50を同定するか、またはSEQ ID NO:26-50と、関連するポリヌクレオチド配列とを区別する技術(例えば、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の断片のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示す。

#### 【0186】

表4の列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、具体的にはたとえば組織特異的なcDNAライブラリまたはプールされたcDNAライブラリに由来するIncyte cDNAを指す場合がある。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のアセンブリに寄与したGenBank cDNAまたはESTを指す場合もある。さらに、列2のポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL(The Sanger Centre、英国ケンブリッジ)データベースから由来した配列(即ち「ENST」命名を含む配列)を同定し得る。或いは、列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Recordsデータベースから由来する場合もあり(即ち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsから由来する場合もある(即ち「NP」の命名を含む配列)。または列2のポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティック(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方のアセンブリ体を意味する場合が

10

20

30

40

50

ある。例えば、FL\_XXXXXX\_N<sub>1</sub>\_N<sub>2</sub>\_YYYYY\_N<sub>3</sub>\_N<sub>4</sub> と同定されるポリヌクレオチドは、アルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号がXXXXXXであり、アルゴリズムにより生成される予測の番号がYYYYYであり、(もし存在すれば) N<sub>1,2,3...</sub> が解析中に手動で編集された可能性のある特定のエキソンであるような「縫合された(stitched)」配列である(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(exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンのアセンブリ体を指す場合もある。例えば、FLXXXXXX\_gAAAAA\_gBBBBB\_1\_Nとして同定されるポリヌクレオチド配列は、「ストレッチされた」配列である。XXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソストレッチ」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 識別番号であり、Nは特定のエキソンを指す(実施例5を参照)。あるRefSeq配列が「エキソストレッチ」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には、RefSeq識別子(「NM」、「NP」、または「NT」によって表される)が、GenBank識別子(即ち、gBBBBB)の代わりに使用される場合もある。

10

あるいは、接頭コードは手作業で編集されたか、ゲノムDNA配列から予測されたか、または配列解析方法の組み合わせから由来してい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同じ配列の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	解析タイプやプログラムの例
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(実施例5参照)
INCY	EST配列群の、ゲノムへのマッピングからの、完全長転写物とエキソンとの予想。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せられる。

20

30

#### 【0187】

場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するために、表4に示すような配列の適用範囲と重複するIncyte cDNA適用範囲が得られたが、該当するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

#### 【0188】

表5は、Incyte cDNA配列を用いてアセンブリされた完全長ポリヌクレオチドのための代表的な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をアセンブリ及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及びベクターを表5に示し、表6で説明している。

40

#### 【0189】

表8は、本発明のポリヌクレオチド配列に見られる一塩基多型(SNP)を、種々のヒト集団での対立遺伝子(アレル)頻度と共に示す。列1及び列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列識別番号(SEQ ID NO:)及びそれに対応するIncyteプロジェクト識別番号(PID)を示す。列3はSNPが検出されたESTのIncyte識別番号(EST

50

ID)を示し、列4はSNPの識別番号(SNP ID)を示す。列5はSNPが存在するEST配列内の位置(EST SNP)を示し、列6は完全長ポリヌクレオチド配列内のSNPの位置(CB1 SNP)を示す。列7はEST配列内に存在する対立遺伝子を示す。列8及び列9はSNP部位に存在する2つの対立遺伝子を示す。列10はESTに存在する対立遺伝子に基づいてSNP部位に含まれるコドンによってコードされるアミノ酸を示す。列11~14は四つの異なったヒト母集団における対立遺伝子1の発生頻度を示す。n/d(検出されない)の項目は母集団における対立遺伝子1の発生頻度が低すぎて検出されなかったことを示し、また、n/a(利用不可)はその母集団において対立遺伝子の発生頻度が決定されなかったことを示す。

**【0190】**

本発明はまた、NTRANの変異体も含む。好適なNTRAN変異体は、NTRAN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NTRANアミノ酸配列に対して少なくとも約80%の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。

10

**【0191】**

種々の実施態様はまた、NTRANをコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施例において、本発明は、NTRANをコードするSEQ ID NO:26-50からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO:26-50のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、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等価RNA配列を含む。

**【0192】**

本発明はまた、NTRANをコードするポリヌクレオチドの変異体群を含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチドは、NTRANをコードするポリヌクレオチドとの、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。本発明の或る実施態様では、SEQ ID NO:26-50からなる群から選択された核酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するようなSEQ ID NO:26-50からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、NTRANの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドをコードし得る。

20

**【0193】**

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、NTRANをコードするポリヌクレオチドのスプライス変異体である。或るスプライス変異体はNTRANをコードするポリヌクレオチドとの有意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スプライシングによって生ずる、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ポリヌクレオチドを有することになる。或るスプライス変異体には、NTRANをコードするポリヌクレオチドに対して全長の約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見られるが、このスプライス変異体の幾つかの部分には、NTRANをコードするポリヌクレオチドの各部との、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、配列SEQ ID NO:43を含むポリヌクレオチドと配列SEQ ID NO:44を含むポリヌクレオチドとは互いにスプライス変異体であり、配列SEQ ID NO:29を含むポリヌクレオチド、配列SEQ ID NO:31を含むポリヌクレオチド及び配列SEQ ID NO:46を含むポリヌクレオチドとは互いにスプライス変異体であり、配列SEQ ID NO:32を含むポリヌクレオチド、配列SEQ ID NO:49を含むポリヌクレオチド、及び配列SEQ ID NO:50を含むポリヌクレオチドとは互いにスプライス変異体であり、並びにSEQ ID NO:36を含むポリヌクレオチド、配列SEQ ID NO:37を含むポリヌクレオチド及びSEQ ID NO:45を含むポリヌクレオチドは互いにスプライス変異体である。上記のスプライス変異体は何れも、NTRANの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るポリペプチドをコードし得る。

30

40

**【0194】**

50

NTRANをコードする種々のポリヌクレオチド配列が遺伝暗号の縮重によって作り出され、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NTRAN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。このような全ての変異が明確に開示されていると考慮されたい。

**【0195】**

NTRANとその変異体とをコードするポリヌクレオチドは一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然NTRANをコードするポリヌクレオチド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NTRAN或いはその誘導体をコードするポリヌクレオチドを作り出すことは、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。コードされたアミノ酸配列を変えないで、NTRAN及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、天然の配列から作られる転写物より長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

**【0196】**

本発明にはまた、NTRANとその誘導体とをコードする、ポリヌクレオチド群またはそれらの断片の、完全に合成化学による作製も含む。作製後にこの合成ポリヌクレオチドを、当分野で公知の試薬を用いて、多くの入手可能な発現ベクター及び細胞系の何れにも挿入可能である。更に、合成化学を用いて、NAAPまたはその任意の断片をコードするポリヌクレオチドの中に突然変異を導入することも可能である。

**【0197】**

本発明の実施態様には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド、特に、SEQ ID NO:26-50に示す配列を持つポリヌクレオチド、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群が含まれる(Wahl, G.M及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel, A.R.(1987)*Methods Enzymol.* 152:507-511)。アニーリング及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。

**【0198】**

DNAシーケンシングの方法は当分野では公知であり、本発明のいずれの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用い得る。例えばDNAポリメラーゼ1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 Biosciences, Piscataway NJ)を用い得る。あるいは、例えばELONGASE増幅システム (Invitrogen, Carlsbad CA)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)及び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 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Amersham Biosciences)または当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する (Ausubel 他、前出、第7章; Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY、856-853ページ)。

**【0199】**

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、NTRANをコードする核酸を伸長し、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

10

20

30

40

50

ーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322)。別の方法にインバースPCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、或る既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列群からなる制限酵素断片群から得る (Triglia, T. 他 (1988) Nucleic Acids Res.16:8186)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に参与している (Lagerstrom, M. 他 (1991) PCR Methods Applic.1:111119)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及びライゲーション反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。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 (Parker, J.D 他 (1991) Nucleic Acids Res.19:30553060)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinderライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリ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。

10

#### 【0200】

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は、遺伝子群の5'領域を有する配列をしばしば含んでおり、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。

20

#### 【0201】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで刺激される蛍光色素と、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等) を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

30

#### 【0202】

本発明の他の実施態様では、NTRANをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を、NTRAN、その断片または機能的等価物を適切な宿主細胞内に発現させる組換えDNA分子にクローニングし得る。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ポリペプチドをコードする別のポリヌクレオチドを産生し、これらの配列をNTRANの発現に利用し得る。

40

#### 【0203】

種々の目的で、NTRAN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、本発明のポリヌクレオチド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ン化の、あるいはプロセッシング及び/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。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド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等を起こす突然変異を導入し得る。

50

## 【0204】

本発明のヌクレオチドを、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を用いてシャッフリングして、NTRANの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのNTRANの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する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シャッフリング及び選択/スクリーニングを行い得る。従って、「人工的な」育種及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。或いは、所与の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と組み換え、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝的多様性を、管理され制御可能な方法で、最大化させることができる。

10

## 【0205】

別の実施態様では、NTRAN をコードするポリヌクレオチドは、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部を合成可能である(例えば、Caruthers, M.H.他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; Horn, T.他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232)。あるいは、NTRAN 自体またはその断片を当分野で既知の化学的方法を用いて合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる(Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY55-60ページ; Roberge, J.Y.他(1995) Science 269:202-204)。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。NTRANのアミノ酸配列、または任意のその一部は更に、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合せることにより、変異体ポリペプチドを作製、または、或る天然ポリペプチドの1配列を有するポリペプチドを作製し得る。

20

## 【0206】

このペプチドは分取用高速液体クロマトグラフィーで実質的に精製し得る(Chiez, R.M. 及びF.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421)。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で確認できる(前出Creighton, 28-53ページ)。

30

## 【0207】

生物学的に活性なNTRANを発現させるために、NTRANをコードするポリヌクレオチド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及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、ベクター内及びNTRANをコードするポリヌクレオチドにおける調節配列(例えばエンハンサー、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、強度及び特異性が様々である。特異的な開始シグナル類を用いて、NTRANをコードするポリヌクレオチド群の、より効率的な翻訳を達成することもできる。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。NTRANをコードするポリヌクレオチド配列、及びその開始コドンや、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写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開始コドンなど外来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。外来性の翻訳エレメント及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。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(Scharf, D.他(1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125162)。

40

50

## 【0208】

当業者に周知の方法を用いて、NTRANをコードするポリヌクレオチドと、好適な転写及び翻訳制御エレメントとを持つ発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法としては、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、及び*in vivo*遺伝子組換え技術がある(Sambrook, J.他(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4, 8, 及び 16-17章; Ausubel他、前出、1, 3及び15章)。

## 【0209】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、NTRANをコードするポリヌクレオチドの保持及び発現が可能である。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌などの微生物や、ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルス:CaMVまたはタバコモザイクウイルス:TMV)または細菌発現ベクター(例えばTiまたはpBR322プラスミド)で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系等がある(Sambrook、前出、Ausubel 他、前出、Van Heeke, G. 及び 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.及びT. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659、Harrington, J.J. 他(1997) *Nat. Genet.* 15:157-355)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチドを標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる(Di Nicola, M.他(1998) *Cancer Gen. Ther.* 5:350-356; Yu, M.他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6340-6344; Buller, R.M.他(1985) *Nature* 317:813-815; McGregor, D.P.他(1994) *Mol. Immunol.* 31:219-226; Verma, I.M.及びN. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)。本発明は使用する宿主細胞によって限定されない。

## 【0210】

細菌系では、NTRANをコードするポリヌクレオチドの使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、NTRANをコードするポリヌクレオチドの日常的なクローニング、サブクローニング及び増殖は、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはPSPORT1プラスミド(Invitrogen)などの多機能の大腸菌ベクターを用いて達成することができる。NTRANをコードするポリヌクレオチドをベクターのマルチクローニング部位に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、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう(Van Heeke, G. 及び S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509)。例えば抗体の産生などに多量のNTRANが必要な場合は、NTRANの発現をハイレベルで指示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含むベクターが使用できる。

## 【0211】

酵母の発現系を使用してNTRAN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プロモーター等の構造型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) またはピキア酵母(*Pichia pastoris*) に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の、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ポリヌクレオチド配列群を組み込むことを可能にする(Ausubel 他、前出; Bitter, G.A. 他、(1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C.A.他(1994) *Bio/Technology* 12:181-184)。

10

20

30

40

50

## 【0212】

植物系を使用してNTRANを発現することも可能である。NTRANをコードするポリヌクレオチドの転写は、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 (Coruzzi, G. 他 (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. 他 (1984) Science 224:838-843; 及び Winter, J. 他 (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85105)。これらの作成物を、植物細胞に、直接DNA形質転換または病原体を媒介した形質移入で導入できる (『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)。

## 【0213】

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、NTRANをコードするポリヌクレオチド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のE1またはE3領域へ挿入することにより、宿主細胞にNTRANを発現する感染した生ウイルスを得ることが可能である (Logan, J. 及び Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659)。更に、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

## 【0214】

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6 kb ~ 10 MbのHACsが作製され、従来送達方法 (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 (Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:157-355)。

## 【0215】

長期にわたり哺乳動物系内で組換えタンパク質を産生するためには、細胞株内の、NTRANの安定発現が望ましい。例えば、NTRANをコードするポリヌクレオチド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、及び/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及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖できる。

## 【0216】

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 (Wigler, M. 他 (1977) Cell 11:223-232; Lowy, I. 他 (1980) Cell 22:817-823)。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はアミノグリコシドであるネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える (Wigler, M. 他 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:35673570; Colbere-Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14)。この他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変えるtrpB及びhisDは、文献に記載されている (Hartman, S.C. 及び R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-

8051)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系に起因しうる一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することも可能である (Rhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131)。

#### 【0217】

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、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、NTRANをコードする配列を或るマーカー遺伝子配列の中に挿入すると、NTRANをコードするポリヌクレオチド群を含む形質転換細胞群を、マーカー遺伝子機能の欠落により特定できる。または、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子をNTRANをコードする配列とタンデムに配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

10

#### 【0218】

一般に、NTRANをコードするポリヌクレオチドを持ち、NTRANを発現する宿主細胞を、当業者に周知の種々の方法を用いて特定することができる。これらの方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク質配列の検出及び/または数量化のための膜系、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生物学的試験法または免疫学的アッセイがあるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0219】

特定のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いてNTRANの発現を検出及び計測する免疫学的な方法は、当分野で既知である。このような技法の例には、酵素に結合した免疫吸着剤検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) 及び蛍光活性化細胞選別 (FACS、フローサイトメトリー) などがある。NTRAN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。これらのアッセイ及び他のアッセイは、当分野で周知である (Hampton, R.他 (1990) *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St. Paul MN, Sect. IV, Coligan, J.E.他 (1997) *Current Protocols in Immunology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY; Pound, J.D. (1998) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa NJ)。

20

30

#### 【0220】

多岐にわたる標識方法及び抱合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイ及びアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。NTRAN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、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、NTRANをコードするポリヌクレオチド群、またはその任意の断片群を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングできる。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ポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、*in vitro*でRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えばAmersham Biosciences、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemicalなどの種々の市販キットを用いて実行できる。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。

40

#### 【0221】

NTRANをコードするポリヌクレオチドで形質転換した宿主細胞を、細胞培地での該タンパク質の発現と回収とに好適な条件下で培養しうる。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。NTRANをコードするポリヌクレオチドを持つ発現ベクターは、原核細胞膜ま

50

たは真核細胞膜を通してのNTRANの分泌を誘導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。

#### 【0222】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入したポリヌクレオチド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、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断する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、折りたたみ及び/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、特定の細胞装置及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及びプロセッシングを確実にするように選択し得る。

10

#### 【0223】

本発明の別の実施例では、NTRAN をコードする天然のポリヌクレオチド、修飾されたポリヌクレオチド、または組換えのポリヌクレオチドを上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に連結させ得る。例えば、市販の抗体によって認識され得る異種部分を含むキメラNTRANタンパク質は、NTRAN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容易にし得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性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)、チオレドキシニン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及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、精製後に異種部分からNTRANが切断されるように、NTRAN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融合タンパク質を遺伝子操作することもできる。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel他(前出、10及び16章)に記載がある。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

20

30

#### 【0224】

別の実施態様では、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、放射標識NTRAN を合成し得る。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターと機能的に連結したタンパク質コード配列の転写及び翻訳をカップルさせる。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。

#### 【0225】

NTRAN或いはその断片または変異体を用いて、NTRAN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。1つ以上の試験化合物を用いて、NTRANへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。種々の実施態様で、1、2、3、4、5、10、20、50、100、または200個の試験化合物について、NTRANへの特異結合のスクリーニングを行える。試験化合物の例として、抗体、アンティカリン (anticalins)、オリゴヌクレオチド、タンパク質 (例えばリガンドや受容体)、または小分子が挙げられる。

40

#### 【0226】

関連する実施例において、NTRAN変異体を用いて、抗体等の試験化合物の、NTRAN、NTRANの変異体、あるいはNTRAN及び/または1つ以上のNTRAN変異体との組み合わせへの結合をスクリーニングすることができる。ある実施例においては、SEQ ID NO:1-25の配列の正確な配列を有するNTRANではなく、NTRANの変異体に結合する化合物のスクリーニングにNTRANの変異体を用いることができる。このようなスクリーニングを行うために使うNTRAN変異体はNTRANに約50%から約99%の範囲で配列同一性を有し得る。また、種々の実施例で6

50

0%、70%、75%、80%、85%、90%及び95%の配列同一性を有することができる。

【0227】

ある実施態様では、NTRANへの特異的結合のスクリーニングで同定された化合物は、NTRANの天然のリガンド、例えばリガンドやその断片、または天然の基質、構造的または機能的な擬態あるいは自然結合パートナーに密接に関連している (Coligan, J.E. 他 (1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2)の5章)。別の実施例においては、こうして同定された化合物は受容体NTRANの天然のリガンドである (Howard, A.D. 他 (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 22:132-140; Wise, A. 他 (2002) *Drug Discovery Today* 7:235-246)。

【0228】

別の実施態様でNTRANへの特異結合スクリーニングで同定した化合物は、NTRANが結合する天然受容体に、或いは少なくとも該受容体の或る断片に、または例えばリガンド結合部位や結合ポケットの全体または一部を含む該受容体の或る断片に、密接に関連し得る。例えば該化合物は、シグナルを伝播可能なNTRAN受容体の場合や、シグナルを伝播できないNTRANおとり受容体の場合がある (Ashkenazi, A.及びV.M. Divit (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:255-260; Mantovani, A. 他 (2001) *Trends Immunol.* 22:328-336)、該化合物は既知の技術を用いて合理的に設計できる。こうした技術の例としては、化合物エタネルセプト (etanercept) (ENBREL; Immunex Corp., Seattle WA) 作製に用いた技術を含む。エタネルセプトは、ヒトリウマチ様関節炎の治療に有効である。エタネルセプトは遺伝子操作されたp75腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ダイマーであり、ヒトIgG<sub>1</sub> のFc部分に連結されている (Taylor, P.C. 他 (2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13:611-616)。

10

20

【0229】

1つの実施態様で、2種以上の、同様のまたは異なる特異性を持つ抗体を、NTRANまたはその断片あるいは変異体への特異結合についてスクリーニングできる。したがって、このようにしてスクリーニングされた抗体の結合特異性は、NTRANの特定の断片または変異体を同定するために選択することができる。ある実施態様においては、その抗体の結合特異性によって、NTRANの特定の断片または変異体を優先的に同定できるように抗体を選ぶことができる。他の実施態様においては、その抗体の結合特異性によって、NTRAN産生の増加、減少あるいはその他の異常産生を伴う特定疾患または状態を優先的に診断できるように抗体を選ぶことができる。

【0230】

ある実施態様においては、anticalinをNTRAN、NTRANの断片またはNTRANの変異体への結合についてスクリーニングすることができる。anticalinはリポカリン足場に基づいて作成されたりガンド結合タンパク質である (Weiss, G.A. 及び H.B. Lowman (2000) *Chem. Biol.* 7:R177-R184; Skerra, A. (2001) *J. Biotechnol.* 74:257-275)。リポカリンのタンパク質構造には、8つの逆平行ベータストランドを持つバレルが含まれ得り、それらのストランドはバレルの開放末端に4つのループを支持する。これらのループはリポカリンの天然リガンド結合部位を形成し、この部位は *in vitro* でアミノ酸置換によって再度人工操作して、新規な結合特異性を与えることができる。このアミノ酸置換は当分野で既知の方法または本明細書に記載の方法を用いて行うことができる。また、保存的置換 (例えば結合特異性を変えないような置換)、あるいは、結合特異性を少し、中等度、または大きく変えるような置換を行うこともできる。

30

40

【0231】

一実施例では、NTRANへの特異的な結合、刺激または阻害を行う化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてNTRANを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、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。NTRANを発現する細胞、またはNTRANを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、結合や、NTRANまたは該化合物の何れかの、刺激または活性の阻害を分析する。

【0232】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、蛍光色

50

素、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。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NTRANと混合するステップと、NTRAN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及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。

#### 【0233】

アッセイを用いて、或る化合物が、その天然リガンドに結合する能力及び/またはその天然リガンドの、その天然受容体への結合を阻害する能力を評価しうる。こうしたアッセイの例としては、米国特許第5,914,236号及び第6,372,724号に記載されたような放射ラベルアッセイを含む。関連した実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換が或るポリペプチド化合物(受容体など)に導入され、その天然リガンドに結合する能力を向上または改変しうる(Matthews, D.J. 及び J.A. Wells. (1994) Chem. Biol. 1:25-30)。もう1つの関連する実施態様においては、ポリペプチド化合物(たとえばリガンド)に1つ以上のアミノ酸置換を行うことにより、天然受容体への結合能力を改善または改変することができる(Cunningham, B.C. 及び J.A. Wells (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3407-3411; Lowman, H.B. 他 (1991) J. Biol. Chem. 266:10982-10988)。

10

#### 【0234】

NTRAN或いはその断片または変異体を用いて、NTRANの活性をモジュレートする化合物をスクリーニングしうる。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。一実施態様では、NTRANを少なくとも1つの試験化合物と混合する、NTRAN活性が許容される諸条件下で或るアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのNTRANの活性を試験化合物不在下でのNTRANの活性と比較する。試験化合物の存在下でのNTRANの活性の変化は、NTRAN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、NTRANの活性に適した条件下で、NTRANを有する *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、NTRANの活性を調節する試験化合物は、間接的に調節し得るし、そ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。

20

30

#### 【0235】

別の実施態様では、NTRANまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドは、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、「ノックアウト」し得る。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号及び第5,767,337号等を参照)。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される。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ノックアウトする(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。

40

#### 【0236】

また、NTRAN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、中胚葉及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

50

は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する(Thomson, J.A.他(1998) Science 282:1145-1147)。

【0237】

また、NTRAN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「ノックイン」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)を作製することも可能である。ノックイン技術を用いて、NTRANをコードするポリヌクレオチドのある領域を動物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NTRANを乳汁内に分泌するなどNTRAN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)。

10

【0238】

(治療)

NTRANの領域と神経伝達関連タンパク質の領域との間に、例えば配列及びモチーフの内容における化学的類似性及び構造的類似性が存在する。さらに、NAPの発現は副腎、脳、脳腫瘍、頸部、後根神経節組織、胎児脳、精巣、腫瘍を随伴する胃及び子宮組織、また、気管支上皮細胞、胎児前立腺線維芽細胞、多小脳回、神経膠症及び子宮頸癌、精巣癌に関連している。さらに、NTRANを発現する組織の例が、表6及び実施例11にも見られる。従って、NTRANは、自己免疫/炎症性疾患、心血管障害、神経障害、及び発達障害、細胞増殖異常、輸送障害、精神疾患、代謝疾患及び内分泌疾患において、或る役割を果たすと考

20

【0239】

従って、一実施例において、NTRANの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にNTRANまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。そのような疾患の例には、限定するものではないが、自己免疫/炎症性の疾患では、後天性免疫不全症候群(AIDS)及びアジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫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、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、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、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、外傷が含まれ、心血管疾患の中には、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、及び心臓移植の合併症、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、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術、冠状動脈バイパス手術が含まれ、神経疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎(網膜色素変性症)、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性

30

40

50

頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、及びGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む）、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫症（cerebelloretinal hemangioblastomatosis）、脳三叉神経血管腫症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系性の精神遅滞及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経疾患、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性のミオパシー、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、分裂病性疾患）、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、遅発性ジスキネジー、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、及び家族性前頭側頭型痴呆が含まれ、発達障害として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、精神薄弱）、スミス マジェニス症候群（Smith-Magenis syndrome）、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及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、Sydenham舞蹈病（Sydenham's chorea）及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、また、細胞増殖異常では日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、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、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌など癌、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、子宮の癌が含まれ、輸送障害として、運動不能症、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、嚢胞性線維症、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面神経麻痺、シャルコー・マリー・ツース病、糖尿病、尿崩症、糖尿病性ニューロパシー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、高カリウム血性周期性四肢麻痺、正常カリウム血性周期性四肢麻痺、パーキンソン病、悪性高体温症、多剤耐性、重症筋無力症、筋緊張性異常栄養症（筋強直性ジストロフィー）、緊張病、遅発性ジスキネジー、ジストニー、末梢神経障害、脳腫瘍、前立腺癌、輸送に関連する心臓疾患（例えばアンギナ、徐脈性不整脈、頻脈性不整脈、高血圧、QT延長症候群、心筋炎、心筋症、ネマリンミオパシー、中心核ミオパシー、脂質ミオパシー、ミトコンドリアミオパシー、甲状腺中毒性ミオパシー、エタノールミオパシー、皮膚筋炎、封入体筋炎、感染性筋炎、多発性筋炎）、輸送に関連する神経疾患（例えばアルツハイマー病、記憶喪失、双極性障害、痴呆、鬱病、癲癇、トゥレット病、パラノイド精神病、及び精神分裂病（統合失調症））、輸送に関する他の疾患（例えば神経線維腫症、帯状疱疹後神経痛、三叉神経障害、サルコイドーシス、鎌状赤血球貧血、ウィルソン病、白内障、不妊症、肺動脈狭窄、感音常染色体難聴、高血糖症、低血糖症、グレーブズ病、甲状腺腫、クッシング病、アジソン病、グルコース・ガラクトース吸収不良症候群、高コレステロール血症、副腎脳白質ジストロフィー、ツェルヴェーガー症候群、Menkes病、後頭角症候群（occipital horn syndrome）、von Gierke病、シスチン尿症、イミノグリシン尿症、Hartup病、及びファンコーニ病）が含まれ、精神疾患として、急性ストレス疾患、アルコール依存症、アンフェタミン依存症、拒食症、非社会性人格障害、注意欠陥多動性障害、自閉症、不安症、回避的人格障害、双極性障害、境界性人格障害、短期的な精神異常、神経性大食症、大麻依存症、コカイン依存症、行為障害、気分循環性障害、精神錯乱、妄想性障害、痴呆、依存性人格障害、鬱病、気分変調性障害、幻覚剤依存症、演技性人格障害、吸入物依存症、躁鬱病、多発脳梗塞性痴呆、自己愛性人格障害、ニコチン依存症、強迫神経症、オピオイド依存症、反抗性障害、パニック障害、妄想性人格障害、フェンシクリジン依存症、恐怖症、心的外傷後ストレス障害、分裂病性感情障害、分裂性人格障害、精神分裂症、鎮静剤依存症、分離不安障害、及び睡眠障害等の精神疾患が含まれ、代謝系の疾患の中には、アジソン病、脳腱黄色腫症

10

20

30

40

50

、先天性副腎過形成、クマリン耐性 (coumarin resistance)、嚢胞性繊維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、フルクトース-1、6 - ジホスファターゼ欠乏症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、副腎皮質機能亢進症 (Hyperadrenalism)、副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、高コレステロール血症、甲状腺機能亢進症、低血糖症、甲状腺機能低下症、脂肪過剰血症、脂質ミオパシー、脂肪ジストロフィー症、リソソーム蓄積症、モノシドーシス、ノイラミニナーゼ欠損症、肥満、骨粗しょう症、フェニルケトン尿症、ブソイドビタミンD欠損くる病、炭水化物代謝障害(例えば、先天性II型異常赤血球産生症性貧血、糖尿病、インスリン依存型真性糖尿病、非インスリン依存型真性糖尿病、ガラクトースエピメラーゼ欠乏症、糖原病、リソソーム蓄積症、果糖尿、五炭糖尿症)、及びピルビン酸代謝の先天性異常、脂肪肝のような脂質代謝異常、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症、高トリグリセリド血症、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマン ピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、GM<sub>2</sub> ガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無 リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、最小変化症、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低 リポ蛋白血症、甲状腺機能低下症、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳髄黄色腫症、シトステロール血症、低コレステロール血症、テイ サックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、及びMenke病のような銅代謝疾患、ウイルソン病、及びエーレルス ダンロー症候群IX型糖尿病が含まれ、内分泌疾患の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラークリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン (ADH) 分泌症候群 (SIADH) 及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎 (橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病 (chronic hypercalcemia) を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全 (isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 - 還元酵素症候群、女性化乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれる。

#### 【0240】

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、NTRAN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、NTRAN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。

#### 【0241】

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、NTRAN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NTRAN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。

## 【0242】

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NTRAN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、NTRANの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

## 【0243】

更なる実施態様では、NTRANの発現または活性の亢進に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にNTRAN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、上記の自己免疫/炎症性疾患、心血管疾患、神経疾患、発達障害、細胞増殖異常、輸送障害、精神疾患、代謝疾患及び、内分泌疾患が含まれる。一実施態様では、NTRAN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NTRAN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或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

10

## 【0244】

別の実施態様では、NTRAN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、NTRANの発現または活性の亢進に関連した疾患の治療または予防も可能である。

## 【0245】

他の実施態様において、タンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、相補的配列、またはベクターは他の適切な治療剤と併用して投与し得る。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。

20

## 【0246】

NTRANのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたNTRANを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてNTRANと特異的に結合するものの同定が可能である。NTRANへの抗体も、当分野で周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、及びFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（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（例えばラクダまたはラマ由来）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である (Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

30

## 【0247】

抗体の産生の場合には、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、NTRAN または任意の断片、または免疫原性の特性を備えるその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 グラン細菌) 及びコリネバクテリウム パルバム (*Corynebacterium parvum*) が特に好ましい。

40

## 【0248】

NTRANに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、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り、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片はまた、天然の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。NTRAN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

50

産生され得る。

【0249】

NTRAN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、及びEBV-ハイブリドーマ技術がある (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; Cole, S.P.他(1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120)。

【0250】

更に、「キメラ抗体」作製のために開発された技術、例えば、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、好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るために用いられる (Morrison, S.L. 他(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M.S. 他(1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.他(1985) Nature 314:452-454)。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、NTRAN特異的一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイデオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137)。

【0251】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは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またはパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R. 他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G.他(1991) Nature 349:293-299)。

【0252】

NTRANに対する特異的な結合部位を持つ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  $F(ab')_2$  断片と、 $F(ab')_2$  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 (Huse, W.D. 他(1989) Science 246:1275-1281)。

【0253】

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競合的結合アッセイ、または免疫放射定量測定法のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このような免疫測定法には、NTRANとその特異性抗体との間の複合体の計測が含まれる。二つの非干渉性NTRANエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、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、競合的結合アッセイも利用することができる (Pound, 前出)。

【0254】

NTRANに対する抗体の親和性を、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算定する。親和性を結合定数  $K_a$  で表すが、この  $K_a$  は、平衡状態の下で NTRAN 抗体複合体のモル濃度を遊離抗原と遊離抗体のモル濃度で除して得られる値である。NTRAN エピトープ多数に対してポリクローナル抗体類は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  $K_a$  は、NTRAN に対する抗体群の平均の親和性または結合活性を表す。特定の NTRAN エピトープに単一特異的なモノクローナル抗体試薬の  $K_a$  は、親和性の真の測定値を表す。  $K_a$  値が  $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$  の高親和性抗体試薬は、NTRAN-抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。  $K_a$  値が  $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$  の低親和性抗体製剤は、NTRAN 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

）及び類似の処理に用いるのが好ましい（Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. 及び Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY）。

#### 【0255】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価及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及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも1~2 mg/mlの特異的な抗体、好ましくは5~10 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、NTRAN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（Catty、前出、Coligan 他、前出）。 10

#### 【0256】

本発明の別の実施態様では、NTRAN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に使用できる。ある態様では、NTRAN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変更することができる。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大きな断片が、NTRANをコードする配列のコード領域、または制御領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である（Agrawal, S., 編集 (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press., Total 20  
wa NJ）。

#### 【0257】

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（Slater, J.E.他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:469-475; Scanlon, K.J. et al. (1995) 9:1288-1296）。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる（Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Uckert, W. 及び W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63:323-347）。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及び当分野で公知のその他のシステムが含まれる（Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51:217-225; Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C.他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2730-2736）。 30

#### 【0258】

本発明の別の実施態様では、NTRAN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。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症（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、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. and Somia, N. (1997) *Nature* 389:239-242）を治療し、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ（例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合）、(iii) 細胞内の寄生生物（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及びParacoccidioides brasiliensis等の真菌寄生菌、並びにPlasmodium falciparum及びTrypanosoma cruzi等の原生動物寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。NT 40 50

RAN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NTRAN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。

【0259】

本発明の更なる実施例では、NTRANの欠損による疾患や異常症は、NTRANをコードする哺乳動物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NTRAN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、及び(v)DNAトランスポゾンの使用がある(Morgan, R.A. 及び W.F. Anderson(1993)Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z.(1997)Cell 91:501-510; Boulay, J-L. 及びH. Recipon(1998)Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)。

10

【0260】

限定するものではないがNTRANの発現に有効でありうる発現ベクターには、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV(Stratagene, La Jolla CA)及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG(Clontech, Palo Alto, CA)がある。NTRANを発現させるために、(i)恒常的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、若しくは -アクチン遺伝子等)、(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. 及び 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. 及び 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PVGRXR及びPINDI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. 及び H.M. Blau, 前出)、または(iii)正常な個体に由来するNTRANをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

20

【0261】

市販のリポソーム形質転換キット(例えばInvitrogen社のPERFECT LIPID TRANSFECTION KIT)を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. 及び A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neumann, E. 他(1982) EMBO J. 1:841-845)。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。

30

【0262】

本発明の別の実施態様では、NTRAN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NTRAN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及び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. 及び 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

40

50

,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を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。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、及び形質導入した細胞群の患者への戻しは、遺伝子治療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)。

#### 【0263】

或る実施態様では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、NTRANの発現に関連する1つ或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にNTRANをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクター類の作製及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)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号 (「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクター類については、Antinozzi, P.A. 他 (1999; Annu. Rev. Nutr. 19:511-544) 並びに、Verma, I.M. 及び N. Somia (1997; Nature 18:389:239-242)。

#### 【0264】

別の実施態様では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、NTRAN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、NTRANをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス (HSV) が向性を持つ中枢神経細胞にNTRANを導入するには、HSV系ベクターの利用が特に有用たり得る。ヘルペス系ベクター類の作製及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) 1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. 169:385395)。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」)に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92の使用についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22を欠失した組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクター類については、Goins, W.F. 他 (1999; J. Virol. 73:519532)、Xu, H. 他 (1994; Dev. Biol. 163:152161)。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なったセグメント群を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

#### 【0265】

別の実施態様では、ウイルス (正の一本鎖RNAウイルス) ベクターを用いてNTRANをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。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 (Semliki Forest Virus, SFV) の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターはSFVゲノムに基づいている (Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) Cun. Opin. Biotech. 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスのカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、酵素活性 (例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ) を有するウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、ウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に、NTRANのコード配列を導入すると、ベクター導入細胞において多数のNTRANをコードするRNAが産生され、高いレベル

10

20

30

40

50

でNTRAN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)。ウイルスの宿主域が広いため、NTRANの様々なタイプの細胞への導入が可能になる。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及びRNAの形質移入方法及びウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

#### 【0266】

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と結合できるように十分に開こうとする、二重らせんの能力を阻害するため有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある(Gee, J.E.他(1994) in Huber, B.E. 及び B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, 163-177ページ)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するように設計することができる。

#### 【0267】

リボザイムは酵素的RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、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に起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、人為操作されたハンマーヘッド型リボザイム分子は、NTRANをコードするRNA分子のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒し得る。

#### 【0268】

任意のRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、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。

#### 【0269】

相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子の合成のために当分野で既知の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。或いは、NTRANをコードするDNA分子の*in vitro*及び*in vivo*転写によってRNA分子を作成し得る。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。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA産物を、細胞株、細胞または組織内に導入することができる。

#### 【0270】

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オチオエートまたは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RNA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、及びウリジンにアセチル-、メチル-、チオ-及び同様の修飾をしたものや、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(wybu

10

20

30

40

50

tosine)を加える。

【0271】

NTRAN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が、本発明の更なる実施態様に含まれる。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの発現の改変に効果的な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を改変し得る。従って、NTRAN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、NTRAN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、NTRAN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、NTRAN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。

10

【0272】

特異ポリヌクレオチドの発現改変における有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは私的な、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。NTRANをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルを、このようにして得られ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。NTRANをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、NTRANをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1つ以上の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を改変する際に試験化合物が有効であることを示している。或る特定ポリヌクレオチドの改変発現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)。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) の組合せライブラリをスクリーニングする過程に関する (Bruice, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

20

30

【0273】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro*及び*ex vivo*の使用に対して同程度に適している。*ex vivo*治療の場合、ベクターを、患者から採取した幹細胞内に導入し、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、当分野で周知の方法を用いて実行することができる (Goldman, C.K. 他 (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466)。

40

【0274】

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。

【0275】

50

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、ゴム及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、NTRAN、NTRAN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。

【0276】

本発明に用いられる組成物は、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。

10

【0277】

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及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺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。

【0278】

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。

20

【0279】

NTRAN、またはその断片群を有する高分子群を直接、細胞内に送達するために、特殊な種々の形状の組成物群を調製し得る。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、NTRANまたはその断片を HIV Tat-1タンパク質の短い陽イオン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 285:1569-1572）。

30

【0280】

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

【0281】

治療有効投与量は、症状や容態を回復させる、たとえばNTRANまたはその断片、NTRANの抗体、NTRANのアゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターなど、活性成分の量を指す。治療有効性及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えば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）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比が治療指数であり、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。投与量は、用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によってこの範囲内で変わる。

40

【0282】

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

50

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、用法及び用量を調整する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の全身の健康状態、患者の年齢、体重及び性別(ジェンダー)、投与の時間及び頻度、併用薬、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮しうる。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3~4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

#### 【0283】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1~100.000 $\mu$ gであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及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、現場の医師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。

10

#### 【0284】

(診断)

別の実施態様では、NTRANに特異結合する抗体類が、NTRANの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはNTRANやNTRAN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類に用いられる。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作成される。NTRANの診断アッセイには、抗体及び標識を用いて、ヒトの体液において、或いは細胞や組織の抽出物において、NTRANを検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものも、されていないものも可能であり、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。

20

#### 【0285】

NTRANを測定するための、ELISA、RIA、及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのNTRANの発現を診断する元となるものを提供する。NTRANの発現の正常値或いは標準値は、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者から採取した体液または細胞とNTRANの抗体とを結合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。NTRANの、被験体、対照及び、生検組織からの疾患サンプルでの発現量を、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。

30

#### 【0286】

本発明の別の実施態様では、NTRANをコードするポリヌクレオチドを、診断目的で用い得る。用いることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用いて、NTRANの発現が疾患と相関し得る生検組織での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、NTRANの存在の有無、更には過剰発現を調べ、治療時のNTRAN値の調節を監視する。

#### 【0287】

一実施形態では、例えばNTRANをコードまたは近縁の分子群をコードするゲノム配列群など、ポリヌクレオチド群を検出できるPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを用いて、NTRANをコードする核酸配列群を同定できる。NTRANをコードする天然配列のみをプローブが同定するか、または対立遺伝子変異体や関連配列を同定するかは、プローブが高度に特異的な領域(例えば5'調節領域)から作られているか、またはやや特異性の低い領域(例えば保存されたモチーフ)から作られているかという、そのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーションのまたは増幅のストリンジェンシーとによって決まることになる。

40

#### 【0288】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、NTRANをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプロー

50

ブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:26 - 50の配列か、或いはNTRAN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。

【0289】

NTRANをコードするポリヌクレオチド群に対して特異的なハイブリダイゼーションプローブ群の作製手段としては、NTRANまたはNTRAN誘導体群をコードするポリヌクレオチド群を、mRNAプローブ群の作製のためのベクター類にクローニングする方法を含む。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーター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、 $^{32}\text{P}$ または $^{35}\text{S}$ 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

10

【0290】

NTRANをコードするポリヌクレオチドを用いて、NTRANの発現に関連する疾患を診断することが可能である。そのような疾患の例には、限定するものではないが、自己免疫/炎症性の疾患では、後天性免疫不全症候群（AIDS）及びアジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫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、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、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、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、外傷が含まれ、心血管疾患の中には、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、及び心臓移植の合併症、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、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術、冠状動脈バイパス手術が含まれ、神経疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎（網膜色素変性症）、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、及びGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む）、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫症（cerebelloretinal hemangioblastomatosis）、脳三叉神経血管腫症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系の精神遅滞及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経疾患、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性のミオパシー、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、分裂病性疾患）、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、遅発性ジスキネジー、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、及び家族性前頭側頭型痴呆が含まれ、発達障害としては尿細管性アシドーシス、貧血、クッシ

20

30

40

50

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、癩癩、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、精神薄弱）、スミス マジェニス症候群（Smith-Magenis syndrome）、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及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、Sydenham舞蹈病（Sydenham's chorea）及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、細胞増殖異常では日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、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、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌など癌、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、子宮の癌が含まれ、また輸送障害として、運動不能症、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、嚢胞性線維症、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面神経麻痺、シャルコー・マリー・ツース病、糖尿病、尿崩症、糖尿病性ニューロパシー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、高カリウム血性周期性四肢麻痺、正常カリウム血性周期性四肢麻痺、パーキンソン病、悪性高体温症、多剤耐性、重症筋無力症、筋緊張性異栄養症（筋強直性ジストロフィー）、緊張病、遅発性ジスキネジー、ジストニー、末梢神経障害、脳腫瘍、前立腺癌、輸送に関連する心臓疾患（例えばアンギナ、徐脈性不整脈、頻脈性不整脈、高血圧、QT延長症候群、心筋炎、心筋症、ネマリンミオパシー、中心核ミオパシー、脂質ミオパシー、ミトコンドリアミオパシー、甲状腺中毒性ミオパシー、エタノールミオパシー、皮膚筋炎、封入体筋炎、感染性筋炎、多発性筋炎）、輸送に関連する神経疾患（例えばアルツハイマー病、記憶喪失、双極性障害、痴呆、鬱病、癩癩、トゥーレット病、パラノイド精神病、及び精神分裂病（統合失調症））、輸送に関する他の疾患（例えば神経線維腫症、帯状疱疹後神経痛、三叉神経障害、サルコイドーシス、鎌状赤血球貧血、ウィルソン病、白内障、不妊症、肺動脈狭窄、感音常染色体難聴、高血糖症、低血糖症、グレーブズ病、甲状腺腫、クッシング病、アジソン病、グルコース・ガラクトース吸収不良症候群、高コレステロール血症、副腎脳白質ジストロフィー、ツェルヴェーガー症候群、Menkes病、後頭角症候群（occipital horn syndrome）、von Gierke病、シスチン尿症、イミノグリシン尿症、Hartup病、及びファンコーニ病）が含まれ、精神疾患として、急性ストレス疾患、アルコール依存症、アンフェタミン依存症、拒食症、非社会性人格障害、注意欠陥多動性障害、自閉症、不安症、回避的人格障害、双極性障害、境界性人格障害、短期的な精神異常、神経性大食症、大麻依存症、コカイン依存症、行為障害、気分循環性障害、精神錯乱、妄想性障害、痴呆、依存性人格障害、鬱病、気分変調性障害、幻覚剤依存症、演技性人格障害、吸入物依存症、躁鬱病、多発脳梗塞性痴呆、自己愛性人格障害、ニコチン依存症、強迫神経症、オピオイド依存症、反抗性障害、パニック障害、妄想性人格障害、フェンシクリジン依存症、恐怖症、心的外傷後ストレス障害、分裂病性感情障害、分裂性人格障害、精神分裂症、鎮静剤依存症、分離不安障害、及び睡眠障害等の精神疾患が含まれ、代謝系の疾患の中には、アジソン病、脳髄黄色腫症、先天性副腎過形成、クマリン耐性（coumarin resistance）、嚢胞性繊維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、フルクトース-1、6-ジホスファターゼ欠乏症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、副腎皮質機能亢進症（Hyperadrenalism）、副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、高コレステロール血症、甲状腺機能亢進症、低血糖症、甲状腺機能低下症、脂肪過剰血症、脂質ミオパシー、脂肪ジストロフィー症、リソソーム蓄積症、モノドーシス、ノイラミニナーゼ欠損症、肥満、骨粗しょう症、フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損くる病、炭水化物代謝障害（例えば、先天性II型異常赤血球産生症性貧血、糖尿病、インスリン依存型真性糖尿病、非インスリン依存型真性糖尿病、ガラクトースエピメラーゼ欠乏症、糖原病、リソソーム蓄積症、果糖尿、五炭糖尿症）、及びピルビン酸代謝の先天性異常、脂肪肝のような脂質代謝異常、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンバルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症

10

20

30

40

50

、高トリグリセリド血症、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマン ピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、GM<sub>2</sub> ガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、最小変化症、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症、甲状腺症機能低下症、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳腱黄色腫症、シトステロール血症、低コレステロール血症、テイ サック病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、及びMenke病のような銅代謝疾患、ウイルソン病、及びエーレルス ダンロー症候群IX型糖尿病が含まれ、内分泌疾患の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラークリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン（ADH）分泌症候群（SIADH）及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、ブランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病（chronic hypercalcemia）を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血症、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全（isolated gonadotropin deficiency）、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5-還元酵素症候群、女性化乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれる。NTRANをコードするポリヌクレオチドは、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、ディップスティック（dipstick）、ピン（pin）、及びマルチフォーマットのELISA式アッセイ、及び、変容したNTRAN 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。

#### 【0291】

或る特定の態様では、NTRANをコードするヌクレオチド群を、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用い得る。NTRANをコードする配列に相補的なポリヌクレオチドは、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下、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。患者のサンプルのシグナルの量が対照サンプルと比較して著しく変化している場合は、そのサンプル内のNTRANをコードするポリヌクレオチド群のレベル変化の存在により、関連する疾患の存在が明らかになる。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。

#### 【0292】

NTRANの発現に関連する疾患の診断基準を得るために、発現の正常あるいは標準プロフィールを確立する。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下で、動物あるいはヒトのいずれかの正常な被験体からの体液あるいは細胞抽出物とNTRAN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。

#### 【0293】

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

#### 【0294】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供し得る。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。

#### 【0295】

NTRAN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NTRANをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはNTRAN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或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

20

#### 【0296】

或る特定態様で、NTRANをコードするポリヌクレオチド群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて塩基多型（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、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP（single-stranded conformation polymorphism）及び蛍光SSCP（fSSCP）がある。SSCPでは、NTRANをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でDNAを増幅する。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によって、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異が生じる。この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, isSNP）と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列へアセンブリされるような個々のオーバーラップするDNA断片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、また統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理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

#### 【0297】

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の一般的なSNPが非インスリン依存型真性糖尿病と関連がある。SNPはまた、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、慢性肉芽腫性疾患等の単一遺伝子病の転帰の違いを研究するために有用である。例えば、マンノース結合レクチンでの変異体（MBL2）は、嚢胞性線維症の肺での有害な転帰と相関することがわかっている。SNPはまた、生命を脅かす毒性等の薬剤への患者の反応に影響する遺伝変異体の同定という薬理ゲノミクスにおいても有用性がある。

50

例えば、N-アセチルトランスフェラーゼにおける変異は抗結核剤、イソニアジドにตอบสนองした末梢神経障害の発生率が高くなるが、ALOX5 遺伝子のコアプロモータの変異は5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする抗喘息薬での治療に対する臨床的応答を減少する。異なった集団でのSNPの分布についての分析は遺伝的浮動、突然変異、組み換え及び選択の研究に有用であると共に、集団の起源と移動の調査にも有用である (Taylor, J.G. 他 (2001) Trends Mol. Med. 7:507-512、Kwok, P.-Y.及びZ. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543、Nowotny, P. 他 (2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641)。

#### 【0298】

NTRANの発現を定量するためにも用い得る別の方法の例としては、ヌクレオチド群の放射標識またはビオチン標識、対照核酸の共増幅 (coamplification) 及び、標準曲線から得た結果の補間もある (Melby, P.C 他 (1993) J. Immunol. Methods 159:235-244、Duplaa, C. 他 (1993) Anal. Biochem. 212:229-236)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または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のアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

10

#### 【0299】

更に別の実施態様では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド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。大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、突然変異及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及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効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の最も少ない治療薬を選択することができる。

20

#### 【0300】

別の実施例では、NTRAN、NTRANの断片、NTRAN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-標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

30

#### 【0301】

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及び相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilhamer 他 米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。従って、特定の組織または細胞タイプの転写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、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補体がマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルを提供し得る。

40

#### 【0302】

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。

#### 【0303】

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、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、*in vitro* モデル系及び薬剤の前臨床評

50

価と併せて使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを標示し、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. 及び N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のシグネチャと同様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、多数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合に、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ために使用できるため、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。毒性シグネチャの要素への遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない (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2000年2月29日に発行された 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/toxic\\_hip.htm](http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxic_hip.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

**【0304】**

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。処理した生物学的サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1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物レベルを定量し得る。処理した生体サンプル中の転写レベルを、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、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

20

**【0305】**

別の実施態様は、本明細書に開示する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、個々に更なる分析にかけることができる。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及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及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により、分離が達成される (前出のSteiner及び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、目的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

**【0306】**

プロテオームのプロファイルは、NTRANに特異的な抗体類を用いてNTRAN発現レベルを定量することによっても作成できる。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

50

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。

#### 【0307】

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. 及び J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロファイルを変更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でき、情報価値があり得る。

10

#### 【0308】

別の実施様態では、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、未処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示す。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシーケンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

20

#### 【0309】

別の実施様態では、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。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示す。

30

#### 【0310】

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、Shalton, 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)。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、Schena, M 編集 DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, Londonに記載されている)。

#### 【0311】

本発明の別の実施態様では、NTRAN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作製できる。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列より非コード配列の方が好ましい。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。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる(Harrington, J.J.他(1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127134; Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149154)。一度マッピングすると、核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限酵素断片長多型(RFLP)の遺伝とが関連するような遺伝子連鎖地図を作成可能である(Lander, E.S. 及び D. Botstein (1986) Proc. Nat

40

50

l. Acad. Sci. USA 83:7353-7357)。

【0312】

蛍光原位ハイブリッド形成法(FISH)は、他の物理的及び遺伝的地図データと相関し得る(Heinz-Ulrich他(1995) in Meyers, 前出、965-968ページ)。遺伝的地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM)のウェブサイトに見ることができる。物理的な染色体地図上のNTRANをコードする遺伝子の位置と、特定の疾患との相関性、あるいは特定の疾患に対する素因との相関性は、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。

【0313】

確定した染色体マーカーを用いた連鎖分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝的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、ポジショナルクローニング、またはその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群に關与する遺伝子が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に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(Gatti, R.A.他(1988) Nature 336:577-580)。転座、反転などに起因する、健康者、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。

10

20

【0314】

本発明の別の実施態様では、NTRAN、その触媒作用断片群、或いは免疫原断片群、またはそのオリゴペプチド群を、種々の任意の薬物スクリーニング技術における、化合物群のライブラリ類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、細胞内に位置しうる。NTRANと、テストする薬剤との、結合複合体の形成を測定し得る。

【0315】

別の薬物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(Geyssen他(1984) PCT出願W084/03564)。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、NTRAN、或いはその断片と反応させてから洗浄する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したNTRANを検出する。精製したNTRANはまた、前記の薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

30

【0316】

別の実施例では、NTRANと特異結合し得る中和抗体がNTRANとの結合を試験用化合物と競合する、競合的薬物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NTRANと共有するどのペプチドの存在をも検出できる。

40

【0317】

別の実施例では、将来に開発される分子生物学技術が、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、及び特定の塩基対相互作用のような特性)に依存しているならば、NTRANをコードするヌクレオチド配列をその新技術に用い得る。

【0318】

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

【0319】

50

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/322,180号、第60/326,096号、第60/327,446号、第60/345,837号、第60/343,903号、第60/334,020号、第60/340,226号、第60/345,008号、第60/365,645号及び第60/379,887号は言及することをもって本明細書の一部となす。

#### 【実施例】

#### 【0320】

##### 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 (Invitrogen) 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、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

10

#### 【0321】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNA分解酵素で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。

20

#### 【0322】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSCRIPトラスミドシステム (Invitrogen) を用いて本技術分野で公知の推奨される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、他、5章)。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cDNAのサイズ選択 (300~1000bp) は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ (Amersham Biosciences)、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は好適なト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。好適なトラスミドは、例えばPBLUESCRIPTトラスミド (Stratagene)、PSPORT1トラスミド (Invitrogen) PCDNA2.1トラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMVトラスミド (Stratagene)、PCR2-TOPOTAトラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICISトラスミド (Stratagene)、pGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics)、またはpLNCY (Incyte Genomics)、またはこれらの誘導体である。組換えトラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはInvitrogen社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテントな大腸菌細胞に形質転換した。

30

40

#### 【0323】

##### 2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例1のようにして得たトラスミドを宿主細胞から回収した。ト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及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96トラスミド精製キットの中から少なくとも1つを用いた。トラスミドは、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せずに4℃で保管した。

#### 【0324】

50

別法では、高処理フォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した(Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFLUOROSKAN 2 蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

#### 【0325】

##### 3 シークエンシング及び分析

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 Biosciences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及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Applied Biosystems)か、標準ABIプロトコル及び塩基呼び出し(base calling)ソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(Applied Biosystems)か、或いはその他の本技術分野で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, 7章)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長させた。

#### 【0326】

IncyteのcDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列を除去し、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、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、Incyte cDNA配列またはそれらの翻訳の問い合わせを、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)及びCandida albicansからの配列群を持つPROTEOMEデータベース群(Incyte Genomics, Palo Alto CA)、及び、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、及び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, J. 他(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857-5864; Letunic, I. 他(2002) Nucleic Acids Res. 30:242-244)。(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。Eddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照)。問い合わせは、BLAST、FASTA、BLIMPS、及びHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するようにアセンブリした。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及び5を参照)を用い、Incyte cDNAのアセンブリ体群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アセンブリし、GenMarkとBLASTとFASTAとに基づくプログラムを用いて、cDNAのアセンブリ体を、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得た。あるいは、或るポリペプチドは、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い合わせを、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及びProsite等のデータベースや、PFAM、INCY、及びTIGRFAM等の隠れマルコフモデル(HMM

10

20

30

40

50

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(MiraiBio, Alameda CA)及び LASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて分析する。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列間の一致率も計算するMEGALIGNマルチシークエンスアラインメントプログラム(DNASTAR)に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって指定されるデフォルトパラメータを用いて作製する。

#### 【0327】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを表7に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表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、全ての文献は全体を引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す(スコアが高いほど、または確率値が低いほど、2配列間の相同性が高くなる)。

10

#### 【0328】

完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列のアセンブリ及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:26-50のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20~約4000ヌクレオチドの断片を表4の列2に示した。

20

#### 【0329】

##### 4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の神経伝達関連タンパク質は、公共のゲノム配列データベース(例えば、gbpriやgbhtg)においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して最初に同定された。Genscanは、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである(Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94、Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354)。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから停止コドンに及ぶアセンブリされたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30kbに設定した。これらのGenscan推定cDNA配列の中のどの配列が神経伝達関連タンパク質をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドを、神経伝達関連タンパク質のPFAMモデルについて問合せて分析した。潜在的な神経伝達関連タンパク質はまた、神経伝達関連タンパク質として注釈が付けられていたIncyte cDNA配列への相同性を基に同定された。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgenpept及び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。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載したアセンブリプロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/または公共cDNA配列でGenscan予測コード配列をアセンブリして得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集した、または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

30

40

#### 【0330】

##### 5 cDNA配列データを使ったゲノム配列データのアセンブリ

##### スティッチ配列(Stitched Sequence)

部分cDNA配列は、実施例4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムにより予測されたエキソンを用いて伸長させた。実施例3に記載されたようにアセンブリされた部分cDNAは、ゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNA及び1つ以上のゲノム配列から予測されたGensc

50

anエキソンを含むクラスタに分解した。cDNA及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスタを分析し、引き続いて確認、編集または伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライス変異体を生成した。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、1つのcDNAと2つのゲノム配列上に或る区間が存在する場合、この3つの区間は全て等しいと考えられた。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われる順にステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列及び変異配列を作製する。1種類の親配列に沿って発生した区間間の連鎖 (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) に優先した。結果として得たステッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベース genpept 及び gbpr i 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。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

10

### 【0331】

#### ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分DNA配列は、BLAST分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。まず、BLASTプログラムを用いて、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例3に記載したようにアセンブリされた部分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。

20

### 【0332】

#### 6 NTRAN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:26-50をアセンブリするために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、Incyte LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:26-50 と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどのアセンブリアルゴリズム (表7) を使用して、連続及びオーバーラップした配列のクラスタにアセンブリした。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon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及び遺伝地図データを用いて、いずれかのクラスタ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に含まれている場合、そのクラスタの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

30

40

### 【0333】

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、染色体の短腕 (p-arm) 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、1 cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。もっとも、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットによって広範囲に変化する)。cM距離は、各クラスタ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/>) などの一般個人が入手可能なヒト遺伝子マップ及びその他の情報源を用いて、既に同定されている疾患遺伝子群が、上記した区間内若しくは近傍に位

50

置するかを決定できる。

【0334】

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用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合され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を伴う(Sambrook 他, 前出, 7章; Ausubel 他, 前出, 4章)。

【0335】

類似の、BLASTを応用したコンピュータ技術を用いて、GenBankやLIFESEQ (Incyte Genomics) などの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、多数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。

10

【0336】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

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

【0337】

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。

20

30

【0338】

或いは、NTRANをコードするポリヌクレオチドを由来する組織源に対して分析する。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配列群を用いてアセンブリされる(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つに分類される。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、血液及び免疫系、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/条件カテゴリー即ち癌、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、NTRANをコードするcDNAの、組織特異的発現及び疾患特異的発現を反映する。cDNA配列及び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) から取得できる。

40

【0339】

8 NTRAN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もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。或るプライマーは既知の断片の

50

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含量が約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。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチド群の伸長は、全て回避した。

#### 【0340】

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。

10

#### 【0341】

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ウェルプレート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200nmol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を含む反応バッファー、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)、ELONGASE酵素(Invitrogen)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94, 3分、ステップ2: 94, 15秒、ステップ3: 60, 1分、ステップ4: 68, 2分、ステップ5: ステップ2、3及び4を20回反復する。ステップ6: 68、5分、ステップ7: 4で保存する。別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94, 3分、ステップ2: 94, 15秒、ステップ3: 57, 1分、ステップ4: 68, 2分、ステップ5: ステップ2、3及び4を20回反復する。ステップ6: 68、5分、ステップ7: 4で保存する。

20

#### 【0342】

各ウェルのDNA濃度は、1×TE及び0.5µlの希釈していないPCR産物に溶解した100µl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5~10µl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。

30

#### 【0343】

伸長したヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、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 Biosciences)への再連結を行った。ショットガン・シークエンシングのために、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。伸長したクローンをT4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクター(Amersham Biosciences)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で処理して制限部位のオーバーハング部分を満たし、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。

40

#### 【0344】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。ステップ1: 94、3分、ステップ2: 94、15秒、ステップ3: 60、1分、ステップ4: 72、2分、ステップ5: ステップ2、3及び4を29回反復する。ステップ6: 72、5分、ステップ7: 4で保存する。上記のようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC エネルギートランスファー シークエン

50

シングプライマー、及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Biosciences) 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。

#### 【0345】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリヌクレオチドを検証した。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。

#### 【0346】

##### 9 NTRANをコードするポリヌクレオチドにおける一塩基多型の同定

一塩基多型 (SNP) として知られる一般的なDNA配列変異体は、LIFESEQデータベース (Incyte Genomics) を用いてSEQ ID NO:26-50において同定された。実施例3に記述されているように、同じ遺伝子からの配列を共にクラスターにしてアセンブリし、これによって遺伝子内のすべての配列変異体の同定ができた。一連のフィルターからなるアルゴリズムを使って、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルターは、最小限Phredクオリティスコア15を要求することにより大多数のベースコールのエラーを除去し、また、配列アライメントエラーや、ベクター配列、キメラ及びスプライス変異体の不適当なトリミングにより生じるエラーを取り除いた。染色体の高度解析の自動化手順により、推定SNPの近傍におけるオリジナルのクロマトグラムファイルが解析された。クローンエラーフィルタは統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、逆転写酵素、ポリメラーゼ、または体細胞突然変異によって引き起こされるエラーのような、実験処理時に導入されるエラーを識別した。クラスターエラーフィルターは、統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体または偽遺伝子のクラスター化に起因するエラー、または非ヒト配列によるコンタミネーションにより生じたエラーを同定した。最後のフィルター群によって、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に存在する重複 (duplicates) とSNPが除去された。

#### 【0347】

異なる4つのヒト集団のSNP部位における対立遺伝子頻度を分析するために、高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc.) を用いる質量分析によって、更なる特徴付けのためにいくつかのSNPが選択された。白人母集団は、ユタ州の83人、フランス人4人、ベネズエラ3人及びアーミッシュ派2人を含む92人 (男性46人、女性46人) で構成された。アフリカ人母集団はすべてアフリカ系アメリカ人である194人 (男性97人、女性97人) からなる。ヒスパニック母集団はすべてメキシコ系ヒスパニックの324人 (男性162人、女性162人) からなる。アジア人母集団は126人 (男性64人、女性62人) からなり、親の内訳は中国人43%、日本人31%、コリアン13%、ベトナム人5%及びその他のアジア人8%と報告されている。対立形質の発生頻度は最初に白人母集団において分析し、いくつかの例において、この母集団で対立形質分散を示さなかったSNPは他の三つの母集団においてさらに検査しなかった。

#### 【0348】

##### 10 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用

SEQ ID NO:26-50から導き出された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 Biosciences) 250  $\mu$ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NE N, 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、SEPHADEX 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 Biosciences) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba1またはPvu II (DuPont NE N) 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。

## 【0349】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40℃で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1×クエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィ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。

## 【0350】

## 1.1 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの結合または合成は、フォトリソグラフィ、10  
 ピエゾ式印刷 (インクジェット印刷、前出のBaldeschweiler他等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一且つ無孔の固体とするべきである (Schena, M., ed. (1999) DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, Londonに記載されている)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウェハがある。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及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 (Schena, M. 他 20  
 (1995) *Science* 270:467-470; Shalon, D. 他 (1996) *Genome Res.* 6:639-645; Marshall, A. 及び J. Hodgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31を参照)。

## 【0351】

完全長cDNA、発現配列タグ (EST)、またはそ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、レーザー脱離及び質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上の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及び使用について、以下に詳述する。 30

## 【0352】

組織または細胞サンプルの調製

全RNAを組織サンプル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精製にオリゴ(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×第一鎖合成バッファー、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 Biosciences) を用いて逆転写する 40  
 。逆転写は、200 ng poly(A)<sup>+</sup> RNAを含む25 mlの量でGEMBRIGHTキット (Incyte Genomics) を用いて実施される。特異的対照ポリ(A)<sup>+</sup> RNA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、2.5 mlの0.5 M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。サンプル精製には、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピカラム (Clontech, Palo Alto CA) を用いる。混合後、2つの反応サンプルをエタノール沈殿させるため、1 mlのグリコーゲン (1 mg/ml)、60 mlの酢酸ナトリウム、及び300 mlの100% エタノールを用いる。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて完全に乾燥させ、14 μlの5× SSC / 0.2% SDS中で再懸濁する。 50

## 【0353】

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 cDNA インサートを持つベクター含有細菌細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNA インサートに隣接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 で 1 ~ 2 ng の初期量から 5 µg より大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅したアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Biosciences) を用いて精製する。

## 【0354】

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 及びアセトン中で超音波洗浄し、処理の間及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。

10

## 【0355】

アレイエレメントは米国特許第 5,807,522 号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板に付加される。該特許を引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が 100 ng/µl のアレイエレメント DNA 1 µl を高速機械装置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 5 nl のアレイエレメントサンプルを置く。

20

## 【0356】

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

## 【0357】

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 9 µl 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 0.2 µg 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で等分して 1.8 cm<sup>2</sup> のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに 140 µl の 5 × SSC を加えることにより、チェンバー内部を湿度 100 に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 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 × 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 × SSC) において各々 45 で 10 分間、3 度洗浄して乾燥させる。

30

## 【0358】

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 レーザー (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡を用いる。励起レーザー光の焦点をアレイ上に置くため、20 × 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 × 1.8 cm のアレイは、解像度 20 µm でスキャンする。

40

## 【0359】

2 回の異なるスキャンで、混合ガスマルチラインレーザーは 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

50

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リングする。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。装置は両方の蛍光色素からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザー源において好適なフィルターを用いて、蛍光色素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。

#### 【0360】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNA対照種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度を、ハイブリダイズする種の重量比1:100,000に相 10  
関させる。異なる源泉 (例えば試験される細胞及び対照細胞など) からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光色素で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、その較正を、較正するcDNAのサンプルを2つの蛍光色素で標識し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加えることによって行う。

#### 【0361】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル (A/D) 変換ボード (Analog Devices, Inc., Norwood M 20  
A) を用いてデジタル化される。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及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起因する) を補正される。

#### 【0362】

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、GE 30  
MTTOOLS遺伝子発現分析プログラム (Incyte Genomics) である。少なくとも約2倍の発現変化、2.5以上のSB比、及び少なくとも40%のエレメントスポットサイズを示したアレイエレメントが、差次的発現を示したとして同定された。

#### 【0363】

##### 発現

乳癌の組織学及び分子的評価によると、乳癌の発生・発達は複数の段階を通じて進み、これらの段階を通じて悪性になる前の乳房表皮細胞が比較的順序の決まったイベントを経て腫瘍を形成することが明らかになった。早期の腫瘍発達イベントとして導管過形成がある。急速な新生物成長中の細胞は次第に浸潤性の癌に進行し、肺、骨、そして潜在的には他の臓器へ転移するようになる。腫瘍進行と悪性転換との過程に遺伝因子、環境因子、成長因子、及びホルモンなどのいくつかの因子が関与する。この過程の複雑さに基づいて、悪性転換の過程を生じるヒト乳腺上皮細胞集団を研究し、表現型変化及び分子変化を伴う 40  
進行の特定の段階と関連付けることが重要である。

#### 【0364】

SEQ ID NO:26は、純粋のヒト乳腺上皮細胞株 (HMEC) と比べて種々の乳癌細胞株において差次的に発現された。BT-474は60才の女性から得た乳房の実質性で浸潤性の管癌から単離された乳房腺管癌細胞株である。BT-474はデスモソーム、微絨毛、ギャップ結合及び密着結合のような典型的上皮細胞構造を示す。BT-483は23才の女性 (乳ガンの家族歴があり、月経のある、正常な経産婦) から得た乳頭の浸潤性乳管腫瘍から単離された乳房腺管癌細胞株である。BT-483はデスモソーム、微絨毛、密着結合及びギャップ結合のような上皮細胞構造の特徴を示す。MCF7は非悪性乳腺癌細胞株であり、或る69才の女性の胸水から単離された。MCF7は、乳腺上皮の特徴、例えば細胞質エストロゲン受容体を介してエスト 50

ラジオールをプロセスする能力、及び、培養でドームを形成する能力などを保持している。MCF10Aは乳腺(腔管の特徴:luminal ductal characteristics)細胞株であり、乳腺症(fibrocystic breast disease)の36才の女性から単離された。MCF-10Aは、細胞質ケラチン類、上皮性シアロムチン類、及び乳脂肪小球(milkfat globule)抗原類を発現する。この細胞株はまたコラーゲン中で3次元成長を示し、またコンフルエントな培養でドームを形成する。Hs578Tは74才の乳癌患者(女性)から単離された乳房腺管癌細胞株である。これらの細胞は検出可能なエストロゲン受容体を発現しないし、半流動性培地においてコロニーを形成しない。MDA-MB-468は乳房の転移性腺癌を有する51才の女性の胸水から単離された乳腺癌細胞株である。SK-BR-3は、43才の女性の悪性胸水から単離された乳腺癌細胞株である。これはヌードマウスに注入すると、低分化腺癌を形成する。SEQ ID NO:26の発現は、HMEC細胞に比べてこれらの乳癌(乳房腫瘍)細胞株のすべてにおいて少なくとも二分の一に減少していた。

10

## 【0365】

他の実験において、ヒト乳房腫瘍細胞株BT-474、BT-483、MCF7及びMCF-10AをHMEC細胞と比較する24時間前に成長因子や成長ホルモンの不在下で基本培地において増殖させた。SEQ ID NO:26の発現は、HMEC細胞に比べてこれらの乳房腫瘍細胞株のすべてにおいて少なくとも二分の一に減少していた。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:26は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)乳癌の治療のモニタリング、ii)乳癌の診断アッセイ、そしてiii)乳癌の治療法及び/または他の療法の開発である。

## 【0366】

前立腺癌は多段階の進行を通じて発達し、最終的に攻撃的な腫瘍表現型を生じる。腫瘍進行の初めの段階には、正常な内腔及び/または基底上皮細胞の過剰増殖が関係する。アンドロゲン応答性細胞は過形成し、初期段階の腫瘍に発展する。初期段階の腫瘍はしばしばアンドロゲンに対して感受性がありアンドロゲン除去療法に反応するが、アンドロゲン非依存性細胞の集団は過形成集団から発展する。これらの細胞は、浸襲性となり、また骨、脳、または肺に転移する可能性がある前立腺腫瘍のより進んだ形態を表す。これらの実験において、前立腺腫瘍細胞株を正常ドナーから単離された初代前立腺上皮細胞株(PrEC)と比較した。LNCaPは、転移性前立腺癌の50才男子のリンパ節生検から単離された前立腺癌細胞株である。LNCaP細胞は前立腺特異抗原を発現し、前立腺酸性フォスファターゼを産生し、そしてアンドロゲン受容体を発現する。PC-3はグレード4の前立腺癌を有する62才男性の骨の転移部位から単離された前立腺癌細胞株である。SEQ ID NO:26の発現は、制限された条件(飢餓状態、例えば、成長因子、成長ホルモンの不在の基本培地にて)下のLNCaP細胞とPC-3細胞で少なくとも二分の一に減少し、また、至適条件(成長因子及び成長ホルモンの存在等)下のLNCaP細胞で少なくとも二分の一に減少した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:26は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)前立腺癌の治療のモニタリング、ii)前立腺癌の診断アッセイ、そしてiii)前立腺癌の治療法及び/または他の療法の開発である。

20

30

## 【0367】

他の実施例として、5-aza-2-デオキシチジンで処理したHT29結腸直腸癌細胞において、未処理のHT29細胞に比べてSEQ ID NO:32は上方制御された。HT29細胞は44才の白人女性から得た結腸のグレード2の腺癌に由来する。HT29の腺癌細胞(American Type Culture Collection, Manassas VA)は10%胎性ウシ血清(Life Technologies)を補充したMcCoy培地にて培養する。完全培地で継代された後処理細胞を500 nMの5アザ2-デオキシチジン(Sigma-Aldrich)に暴露する。対照培地は平行して、リン酸緩衝食塩水媒体で処理する。24時間後に、培地を薬物を含まない培地で置き換える。最初の処理の後、対照細胞と5アザ2-デオキシチジンで処理された細胞を同じ密度で1日及び5日間継代培養し、そしてその後増殖をCoulter計数器(Beckman Coulter, Inc., Fullerton CA)を使って測定する。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:32は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)結腸直腸癌の治療のモニタリング、ii)結腸直腸癌の診断アッセイ、そしてiii)結腸直腸癌の治療法及び/または他の療法の開発である。

40

50

## 【0368】

他の実施例として、SEQ ID NO:32は、リポ多糖(LPS)で処理した末梢血単核細胞(PBMC)において、未処理のPBMC細胞に比べて上方制御されることがマイクロアレイ解析によって確認された。二人の健常ボランティアドナーからのPBMCをLPSで1、2、4、24及び72時間処理した。LPSで処理したPBMCを同じドナーからの未処理のPBMCと比較した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:32は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i) 免疫疾患、及び関連する疾患、症状の治療のモニタリング、ii) 免疫疾患、及び関連する疾患、症状の診断アッセイ、そしてiii) 免疫疾患、及び関連する疾患、症状の治療及び/または他の療法の開発である。

## 【0369】

他の例としてSEQ ID NO:35は、正常乳腺上皮細胞(HMEC)に比べて、この実験で調べたヒト乳房腫瘍細胞株のすべてにおいて差次的に発現した。

## 【0370】

以下のヒト乳房腫瘍細胞株をHMEC株と比較した。すなわち、BT-20(乳癌)、BT-474(乳房腺管癌(breast ductal carcinoma))、BT-483(乳房腺管癌)、Hs 578T(乳房腺管癌)、MCF7(非悪性乳腺癌(nonmalignant breast adenocarcinoma))、MCF-10A(乳房腺管腔特徴的)細胞株)及びMDA-MB-468(乳腺癌(breast adenocarcinoma))である。腫瘍進行の異なった段階で種々の乳癌株の発現プロファイルと比較した対照のHMEC細胞の遺伝子発現プロファイルにおいて、乳房腫瘍細胞株では発現が少なくとも二分の一に減った。同様の別の実験において、HMEC細胞を再び種々のヒト乳房腫瘍細胞株と比較した。腫瘍細胞株の6つ(MCF7、T47D、Sk-BR-3、BT-20及びMDA-mb-435S)の中5つにおいてSEQ ID NO:35はHMEC細胞に比べて少なくとも二分の一に下方制御された。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:35は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i) 乳癌の治療のモニタリング、ii) 乳癌の診断アッセイ、そしてiii) 乳癌の治療法及び/または他の療法の開発である。

## 【0371】

SEQ ID NO:35はまた、正常肺組織を同じドナーの腫瘍肺組織と比較するよう計画された対比較試験を用いた四つの肺腫瘍組織サンプルにおいて差次的に発現した。肺癌は、4つの組織病理的に異なる群に分けられる。3群(扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌)は、非小細胞肺癌(NSCLC)に分類される。第4群の癌は、小細胞肺癌(SCLC)という。NSCLCを全部合わせると全症例中の約70%になり、SCLCは約18%である。肺癌の発生と進行に関する分子生物学及び細胞生物学的理解は不完全である。3番染色体での欠失は肺癌に一般的であり、この領域に腫瘍抑制遺伝子の存在を示すと思われる。K-rasの活性化突然変異は肺癌で一般的に見られ、この疾患の1つのマウスモデルの基礎である。疾患の発症及び進行に関連する遺伝子発現パターンの解析は、この疾患の根底にある生物学に深大な洞察を与える。SEQ ID NO:35は、同じドナーの正常肺組織に比べて、肺腫瘍組織の全サンプルにおいて少なくとも二分の一まで発現が減少していたあった。これらの実験はSEQ ID NO:35がマイクロアレイ技術を用いると有意な差次的発現パターンを表すことを示し、さらに、SEQ ID NO:35を、癌等の神経伝達関連タンパク質に関連する多様な病状及び疾患に有用な診断マーカー、または治療薬として利用できることを確立する。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:35は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i) 肺癌の治療のモニタリング、ii) 肺癌の診断アッセイ、そしてiii) 肺癌の治療法及び/または他の療法の開発である。

## 【0372】

他の例として、SEQ ID NO:36及びSEQ ID NO:37は共に形態学的に「泡沫細胞」と同定された特殊なマクロファージ細胞において差次的に発現した。THP-1は、急性単球性白血病の1才の男児の末梢血に由来するヒト前単球株であるTHP-1細胞は、ホルボールエステルでの処理によってマクロファージ様表現型に分化することができる。マクロファージは、炎症免疫応答の開始と維持に或る重要な役割を果たす。アテローム性動脈硬化症では、マクロファージは血管病変に局在し、脂質を蓄積し、「泡沫細胞」として知られる形態とな

10

20

30

40

50

る。活性化されたマクロファージはまた、炎症誘発性サイトカインの主要な源であり、また慢性炎症はアテローム型動脈硬化発症の主な誘因であると思われる。SEQ ID NO:36 と SEQ ID NO:37は、未分化のTHP-1細胞と比べて分化したTHP-1細胞（「泡沫細胞」）で発現が少なくとも二分の一以下に減少した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:36とSEQ ID NO:37は以下の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)アテローム型動脈硬化症の治療のモニタリング、ii)アテローム型動脈硬化の診断アッセイ、そしてiii)アテローム型動脈硬化症の治療法及び/または他の療法の開発である。

#### 【0373】

他の例として、SEQ ID NO:45は形態学的に「泡沫細胞」と同定された特殊マクロファージにおいて差次的に発現された。SEQ ID NO:45は、未分化のTHP-1細胞と比べて、分化された「泡沫細胞」において少なくとも二分の一以下に下方制御された。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:45は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)アテローム型動脈硬化症の治療のモニタリング、ii)アテローム型動脈硬化症の診断アッセイ、そしてiii)アテローム型動脈硬化症の治療法及び/または他の療法の開発である。

10

#### 【0374】

別の例でSEQ ID NO:48は正常な肺組織に対して肺腫瘍組織での発現が減少したが、これはマイクロアレイ分析で判定した。68才の女性の正常肺組織(Roy Castle International Centre for Lung Cancer Research)を同じドナーの肺腫瘍組織と比較した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:48は以下の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)肺癌の治療のモニタリング、ii)肺癌の診断アッセイ、そしてiii)肺癌の治療法及び/または他の療法の開発である。

20

#### 【0375】

##### 1.2 相補的ポリヌクレオチド

NTRANをコードする配列、或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のNTRANの発現を検出、低下、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。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びNTRANのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いて、プロモーターがコーディング配列に結合するのを防止する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがNTRANをコードする転写物に結合するのを阻害する。

30

#### 【0376】

##### 1.3 NTRANの発現

NTRAN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NTRANを発現させるためには、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持つ、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、及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌がイソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとNTRANを発現する。真核細胞でのNTRAN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ている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の多角体遺伝子を、相同組換えか、或いは転移プラスミド中間体を伴う細菌の媒介による遺伝子転移かのどちらかによって、NTRANをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強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Spodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞への感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場

40

50

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. 7:19 37-1945)。

#### 【0377】

殆どの発現系では、NTRAN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、タンパク質の活性及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 Biosciences)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でNTRANからタンパク分解的に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用い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)。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel他(前出、10及び16章)に記載がある。これらの方法で精製したNTRANを直接用いて、以下の実施例17及び18の、適用可能なアッセイを行える。

10

#### 【0378】

##### 1.4 機能的アッセイ

NTRAN機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでNTRANをコードする配列を発現させることによって評価する。cDNAの高いレベルの発現を誘導する強力なプロモーターを含む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 (Invitrogen, Carlsbad CA) 及びPCR 3.1プラスミド (Invitrogen) 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、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー(FCM)を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、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粒度の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変容、及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とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M.G. (1994; *Flow Cytometry*, Oxford, New York NY)に記述がある。

20

30

40

#### 【0379】

遺伝子発現におけるNTRANの影響は、NTRAN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。形質転換された細胞は、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ドを用いて、形質転換されない細胞から効率的に分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。NTRAN及び目的の他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

#### 【0380】

50

### 1.5 NTRANに特異的な抗体の作製

実質的に精製されたNTRAN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行い、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。

#### 【0381】

あるいは、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてNTRANアミノ酸配列を解析し、免疫原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。C末端付近あるいは親水性領域などの、適切なエピトープの選択方法については、当分野に記述が多い (前出Ausubel他, 11章)。

#### 【0382】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、FMOC化学法を用いる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 (前出のAusubel 他)。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NTRAN活性を試験するには、ペプチドまたはNTRAN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。

#### 【0383】

### 1.6 特異的な抗体を用いた天然NTRAN質の精製

天然NTRAN或いは組換えNTRANを、NTRANに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE (Amersham Biosciences) のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗NTRAN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。

#### 【0384】

NTRANを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、NTRAN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において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NTRANとの結合を切るような条件で (例えば、或るpH 2~3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NTRANを収集する。

#### 【0385】

### 1.7 NTRANと相互作用する分子の同定

NTRAN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 (Bolton A.E. 及び W.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529)。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NTRANと共にインキュベートし、洗浄して、標識されたNTRAN複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なNTRAN濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したNTRANの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

#### 【0386】

別法では、NTRANと相互作用する分子を、Fields, S. 及び 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) や、MATCHMAKERシステム (Clontech) などの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。

#### 【0387】

NTRAN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)。

【0388】

18 NTRAN活性の実証

NTRAN活性の測定はトレーサーフラックスと電気生理学的アプローチによって行なわれる。トレーサーフラックスは、アフリカツメガエル卵母細胞への標識された基質の取り込みによって実証される。ステージ5及び6における卵母細胞は、NTRAN mRNA (卵母細胞あたり10 ng)で注入され、OR2培地(82.5mMのNaCl、2.5 mMのKCl、1mMのCaCl<sub>2</sub>、1mMのMgCl<sub>2</sub>、1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、5 mMのHepes、3.8 mMのNaOH、50 µg/ml ゲンタマイシン、pH 7.8)内で、摂氏18度で3日間インキュベートされ、NAPタンパク質NTRANの発現を可能とする。卵母細胞は、次に標準取り込み培地(100mMのNaCl、2 mMのKCl、1mMのCaCl<sub>2</sub>、1mMのMgCl<sub>2</sub>、10 mMのHepes/Tris、pH 7.5)へと移される。神経伝達物質の取り込みは卵母細胞に<sup>3</sup>H基質を加えることによって開始される。30分間のインキュベートの後、取り込みの終了を、卵母細胞をNa<sup>+</sup>の無い培地内で3回洗浄して行い、取り込まれた<sup>3</sup>Hの量を測定し、対照と比較する。NTRAN活性は内部移行された<sup>3</sup>H基質のレベルに比例する。

【0389】

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

【0390】

或いは、NTRAN活性のアッセイは、細胞増殖のリガンド/受容体が媒介する変調についての原型のアッセイに基づく。このアッセイは、Swissマウス3T3細胞におけるDNA合成速度を測定する。NTRANをコードするポリヌクレオチドを持つプラスミドを、当分野で周知のトランスフェクション法を用いて静止状態の3T3培養細胞に加える。次に、一過的に形質移入した細胞を[<sup>3</sup>H]チミジン(放射性DNA前駆体分子)の存在下でインキュベートする。次に、培養した細胞に種々の量のNTRAN リガンドを加える。[<sup>3</sup>H]チミジンの酸沈殿可能DNAへの取り込みは、ラジオアイソトープカウンターを用いて適切な時間間隔で測定する。取り込み量は、新たに合成されたDNAの量に正比例する。少なくとも100倍のNTRANリガンド濃度範囲に対する用量反応曲線がリニアであることは、受容体活性を示唆する。ミリリットルあたりの活性の1ユニットは、50%の応答レベルを産生するNTRANの濃度として定義される。ここで、100%の応答レベルとは、酸-沈殿可能DNAへの、[<sup>3</sup>H]チミジンの最大の取り込みを表す(McKay, I. 及び I. Leigh, eds.(1993) Growth Factor: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, NY, 73ページ)。

【0391】

あるいはNTRAN活性のアッセイは、NTRANファミリー蛋白質が、G蛋白質に活性化されるセカンドメッセンジャーシグナル伝達経路を変調させる能力に基づく(例えばcAMP; Gaudin, P. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:4990-4996)。完全長NTRANをコードする或るプラスミドを或る哺乳類細胞株に形質移入する。細胞株は例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)またはヒト胎児腎臓(HEK-293)細胞株であり、方法は当分野で周知のものを用いる。形質移入細胞を12穴トレイで培地において48時間、成長させ、次に培地を処分し、附着した細胞をPBSで穏やかに洗浄する。次に細胞のインキュベートを、培地内で、リガンドと共に又はリガンド無しで30分間行い、次に培地を除去し、細胞の溶解を、1 Mの過塩素酸で処理して行う。溶解産物中のcAMPレベルは、当分野で既知の方法を用いて放射免疫アッセイにより測定する。リガンドに曝された細胞から得た溶解産物中のcAMPレベルをリガンドなしのものと比較したときの変化は、形質移入された細胞に存在するNTRANの量に比例する。

【0392】

イノシトールリン酸レベルの変化を測定するためには、 $1 \times 10^5$  細胞/穴を含む24穴プレートで細胞を成長させ、イノシトールを含まない培地及び [ $^3\text{H}$ ]ミオイノシトールを用いて2  $\mu\text{Ci}$ /穴で48時間インキュベートする。培地を除去し、細胞の洗浄を10 mMのLiCl含有バッファで行った後、リガンドを加える。反応を、過塩素酸を加えて停止させる。イノシトールリン酸の抽出と分離とをDowex AG1-X8 (Bio-Rad)アニオン交換樹脂上で行い、標識された総イノシトールリン酸のカウントを液体シンチレーションによって行う。リガンドに曝した細胞からの標識されたイノシトールリン酸のレベルの変化(リガンド無しのものと比較)が、形質移入細胞内に在るNTRANの量に比例する。

#### 【0393】

或いはNTRANのイオンコンダクタンス能力が電気生理学的アッセイを用いて実証される。NTRANをコードする真核生物発現ベクターで哺乳動物細胞株(例えばCOS7、HeLa、若しくはCHOなど)を形質転換することによってNTRANは発現される。真核生物発現ベクターは市販されており、それらを細胞内に導入する技術は当業者には周知である。 - ガラクトシダーゼなど多数のマーカ-遺伝子のいずれか1つを発現させる少量の第二プラスミドをこれら細胞へと同時形質転換することにより、外来DNAを取り込んで発現させた細胞群の迅速な同定が可能となる。形質転換の後、この細胞株がNTRAN及び - ガラクトシダーゼを発現し蓄積するのに適した条件下でこれらの細胞を48~72時間、インキュベーションする。 - ガラクトシダーゼを発現する形質転換細胞は、好適な比色用基質が本技術分野で公知の条件下で培地へ添加されると、青く染色される。染色した細胞は、本技術分野で公知の電気生理技術を用いて膜コンダクタンスの違いを試験する。形質転換していない細胞、及び/または、形質転換に、ベクター配列群のみ、または - ガラクトシダーゼ配列群のみを用いた細胞を対照として用い、平行して試験する。カチオンまたはアニオンのコンダクタンスに対するNTRANの寄与は、NTRANに特異的な抗体類を用いて細胞をインキュベートすることで示され得る。それぞれの抗体は、NTRANの細胞外側に結合することにより、イオンチャンネル内のポアと、それに伴うコンダクタンスとをブロックすることとなる。NAPの外部イオンに対する依存性を調べるために、ナトリウムをコリンまたはNメチルDグルコサミンで置き換え、塩素イオンをグルコン酸、 $\text{NO}_3$ 、または  $\text{SO}_4$  で置き換えることができる (Kavanaugh, M.P. 他 (1992) J. Biol. Chem. 267:2200722009)。

#### 【0394】

更なる実施例において、NTRANの輸送活性は、アフリカツメガエル卵母細胞への標識された基質の取り込みを測定することによって検査される。ステージ5及び6の卵母細胞は、NTRAN mRNA(卵母細胞あたり10 ng)で注入され、OR2培地(82.5mMのNaCl、2.5mMのKCl、1mMの $\text{CaCl}_2$ 、1mMの $\text{MgCl}_2$ 、1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、5 mMのHepes、3.8 mMのNaOH、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ゲンタマイシン、pH 7.8)内で18で3日間インキュベートして、NTRANの発現を可能とする。卵母細胞は次に、標準取り込み培地(100mMのNaCl、2 mMのKCl、1mMの $\text{CaCl}_2$ 、1mMの $\text{MgCl}_2$ 、10 mMのHepes/Tris、pH 7.5)へと移される。種々の基質(例えばアミノ酸、糖、薬物、及び神経伝達物質)の取り込みは、卵母細胞に $^3\text{H}$ 基質を加えることによって開始される。30分間のインキュベートの後、取り込みの終了を、卵母細胞を $\text{Na}^+$ の無い培地内で3回洗浄して行い、取り込まれた $^3\text{H}$ の量を測定し、対照と比較する。NTRAN活性は内部移行された $^3\text{H}$ 基質のレベルに比例する。

#### 【0395】

別方法として、NTRANの活性を電気生理学的アッセイを使って、イオンコンダクタンスを測定して実証することもできる。T7ポリメラーゼで転写され、キャッピングされたNTRAN mRNAを上記方法に類似の卵胞をくずしたステージ5のアフリカツメガエル卵母細胞に注入する。2~7日後、2電極電位クランプ法により輸送を測定する。2電極電位クランプ法は保持電位50mVで行なわれる。データは10Hzでフィルタリングされ、MacLabデジタルアナログコンバータ及びデータ収集解析用のソフトウェア(AD Instruments, Castle Hill, Australia)により記録される。NTRANの外部イオンに対する依存性を調べるために、ナトリウムをコリンまたはNメチルDグルコサミンで置き換え、塩素イオンをグルコン酸、 $\text{NO}_3$ または $\text{SO}_4$ で置き換えることができる (Kavanaugh, M.P. 他 (1992) J. Biol. Chem. 267:2200

722009)。

【0396】

別方法として、NTRANのコリン輸送活性またはコリントランスポータ様CTL1タンパク質活性を、NTRANをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した酵母によるコリンの取り込みの測定によって求める。アッセイは25nM [<sup>3</sup>H]コリン存在下の無窒素培地において30 で10分または30分行なわれる。細胞はそれからフィルタリングされ、洗浄される。細胞内の [<sup>3</sup>H]コリンの量は細胞内のNTRAN活性に比例する(前出のO'Regan, S.)

【0397】

さらなる実施例において、NTRANプロテインキナーゼ(PK)活性は、 標識の [<sup>32</sup>P]ATP を用いたタンパク質基質のリン酸化と組み込まれた放射活性を定量することによって測定される。NTRANは、タンパク質基質、 [<sup>32</sup>P]-ATP、及び適切なキナーゼバッファと共にインキュベートされる。生成物に取り込まれた<sup>32</sup>Pを電気泳動で遊離 [<sup>32</sup>P]-ATPから分離し、取り込まれた<sup>32</sup>Pをカウントする。このアッセイでは、回収された<sup>32</sup>Pの量が、NTRANのPK活性に比例する。リン酸化した特異的アミノ酸残基の判定を、加水分解したタンパク質のホスホアミノ酸解析で行う。

10

【0398】

当業者には、本発明の要旨及び精神から逸脱しない範囲での、本発明の記載した組成物、方法及びシステムの種々の修正及び変更の手段は自明であろう。本発明が新規であり、有用なタンパク質及びそのコードするポリヌクレオチドを提供することは高く評価されるであろう。また、これらは薬物発見及び疾患及び症状の検出、診断及び治療にこれらの組成物を使用する方法に用いられ得る。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。また、本発明をこのような実施態様の説明によって、開示した形態だけに網羅されるか、あるいは、制限されるものと見なされるべきでもない。さらに、一実施態様の要素は他の実施態様の1つ以上の要素と容易に組み合わせられ得る。このような組合せによって本発明の範囲内で多数の実施態様が形成され得る。本発明の範囲は下記の請求項及びそれに相当するものによって定義することを意図するものである。

20

【0399】

(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及びポリペプチド実施態様の命名の概略である。

30

【0400】

表2は、本発明のポリペプチド実施例のGenBank識別番号と、最も近いGenBank相同体の注釈(annotation)と、PROTEOMEデータベース識別番号と、PROTEOMEデータベース相同体群の注釈とを示す。各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【0401】

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

40

【0402】

表4は、ポリヌクレオチド実施態様をアセンブリするために用いたcDNAやゲノムDNA断片を、ポリヌクレオチドの選択した断片と共に示す。

【0403】

表5は、ポリヌクレオチド実施態様の代表的なcDNAライブラリを示す。

【0404】

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

50

【 0 4 0 5 】

表 7 は、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、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

【 0 4 0 6 】

表 8 は、本発明のポリヌクレオチド配列に見られる一塩基多型を、種々のヒト集団での対立遺伝子(アレル)頻度と共に示す。

【 0 4 0 7 】

【 表 1 】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID No:	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID No:	Incyte ポリヌクレオチド ID	Incyte 完全長
7500354	1	7500354CD1	26	7500354CB1	
3871329	2	3871329CD1	27	3871329CB1	
1681386	3	1681386CD1	28	1681386CB1	
7500938	4	7500938CD1	29	7500938CB1	
90055441	5	90055441CD1	30	90055441CB1	
7500936	6	7500936CD1	31	7500936CB1	
7500950	7	7500950CD1	32	7500950CB1	
7500854	8	7500854CD1	33	7500854CB1	
2754176	9	2754176CD1	34	2754176CB1	
7503408	10	7503408CD1	35	7503408CB1	
71086982	11	71086982CD1	36	71086982CB1	
7506367	12	7506367CD1	37	7506367CB1	
1414020	13	1414020CD1	38	1414020CB1	
7621128	14	7621128CD1	39	7621128CB1	
7505822	15	7505822CD1	40	7505822CB1	
71607945	16	71607945CD1	41	71607945CB1	
7505777	17	7505777CD1	42	7505777CB1	
7505818	18	7505818CD1	43	7505818CB1	
7505821	19	7505821CD1	44	7505821CB1	
7506685	20	7506685CD1	45	7506685CB1	
7500933	21	7500933CD1	46	7500933CB1	
7389203	22	7389203CD1	47	7389203CB1	
7506268	23	7506268CD1	48	7506268CB1	
7509159	24	7509159CD1	49	7509159CB1	
7512347	25	7512347CD1	50	7512347CB1	

10

20

30

40

【 0 4 0 8 】

【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	7500354CD1	g28721	0.0	[ヒト]アミロイド A4(751)タンパク質 (AA 1-751) (Ponte, P. 他 (1988) Nature 331: 525-527)
2	3871329CD1	g6651019	8.7E-291	[マウス]セマフォリン細胞質ドメイン関連タンパク質 3A
3	1681386CD1	g17861384	0.0	[f1][ヒト] nesprin-2?
	1681386CD1	g10880799	0.0	[マウス] Syne-1B (Apel, E.D. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275: 31986-31995)
4	7500938CD1	g9588046	5.8E-119	[ヒト] BRI3 (Vidal, R. 他 (2001) Gene 266: 95-102)
5	90055441CD1	g3851518	5.2E-135	[マウス] semaF細胞質ドメイン関連タンパク質 2
6	7500936CD1	g9588046	2.6E-114	[ヒト] BRI3 (Vidal, R. 他 (前出))
7	7500950CD1	g12248382	0.0	[ヒト] SEMB
8	7500854CD1	g6624588	2.0E-46	[ヒト] dJ570F3.2 (LOC51596 (二価カチオン耐性タンパク質 CUTA))
9	2754176CD1	g3790389	0.0	[ラット] m-tomosyn Fujita, Y. 他 Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process Neuron 20, 905-15 (1998). [ラット] Tomosyn, SNARE 複合体形成を促進することによって神 経伝達物質放出において作用し得るシタキシン-1-結合タンパク 質
	2754176CD1	701814 LOC81 022	0.0	

10

20

30

40

表 2 - 2

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
2754176CD1	2754176CD1	424148 KIAA1 006	0.0	[ヒト]タンパク質間の相互作用を媒介し得る、1つのWDドメイン (WD-40 リピート)を含むタンパク質 Nagase 他 Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res. 6 (1), 63-70 (1999)
2754176CD1	2754176CD1	340838 LLGL2	4.6E-94	[ヒト] LLGL1 に高い類似性を有するタンパク質、LLGL1 は、非 筋肉のミオシン II の重鎖と会合している細胞骨格タンパク質であ り、Smith-Magenis 症候群と関連している可能性がある。
10	7503408CD1	g1927202	1.2E-114	[ヒト] FEZ1 Bloom, L. および Horvitz, H.R. The Caenorhabditis elegans gene unc-76 and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (7), 3414-3419 (1997)
	7503408CD1	657931 FEZ1	2.7E-53	[ヒト] Zyg1、線虫 UNC-76 に類似性を有し、軸索形成に関与し 得る。 Ishii, H. 他 The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine- zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 3928-33 (1999).
	7503408CD1	568588 FEZ2	9.8E-33	[ヒト] 線維束収縮 (fasciculation) および伸長タンパク質 (zyg1n)、軸索形成において機能する、軸索線維束形成および保持 における構造的またはシグナル伝達の役割を持つ線虫 UNC-76 に 関連するタンパク質ファミリーのメンバー。

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
11	71086982CD1	g1864093	4.6E-232	[ラット] PSD-95/SAP90-関連タンパク質-4 Takeuchi, M. 他 (1997) SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. <i>J. Biol. Chem.</i> 272:11943-11951.
	71086982CD1	331912 Rn.112 79	4.0E-233	[ラット] PSD-95/SAP90 のグアニル酸キナーゼ様ドメインに結合するシナプスタンパク質に高い類似性を有するタンパク質、 PSD-95/SAP90 は受容体およびイオンチャネルに会合しており、シグナル伝達において機能し得る。
	71086982CD1	348264 DLGA P2	9.8E-104	[ヒト]グアニル酸キナーゼ結合タンパク質 DLGAP1 に高い類似性を有するタンパク質。DLGAP1 は PSD-95 ファミリのグアニル酸キナーゼ様ドメインに結合し、シナプス組織化や神経細胞シグナル伝達において機能し得る。
				Ranta, S. 他 (2000) Positional cloning and characterization of the human DLGAP2 gene and its exclusion in progressive epilepsy with mental retardation. <i>Eur. J. Hum. Genet</i> 8: 381-384.
12	7506367CD1	g1864093	5.4E-229	[ラット] PSD-95/SAP90-結合タンパク質-4 Takeuchi, M. 他(前出)
	7506367CD1	331912 Rn.112 79	4.8E-230	[ラット] PSD-95/SAP90 のグアニル酸キナーゼ様ドメインに結合するシナプスタンパク質に高い類似性を有するタンパク質、 PSD-95/SAP90 は受容体およびイオンチャネルに会合しており、シグナル伝達において機能し得る。
	7506367CD1	348264 DLGA P2	2.0E-103	[ヒト]グアニル酸キナーゼ結合タンパク質 DLGAP1 に高い類似性を有するタンパク質。DLGAP1 は PSD-95 ファミリのグアニル酸キナーゼ様ドメインに結合し、シナプス組織化や神経細胞シグナル伝達において機能し得る。
13	1414020CD1	g1235591	8.0E-283	[ラット] dendrin Wisden, H.A. 他(1997) <i>Mol. Cell Neurosci.</i> 8:367-374.

10

20

30

40

【表 2 - 4】

表 2 - 4

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
	1414020CD1	423733 KIAA0 749	0.0	[ヒト]ラット Rn.5444 に高い類似性を有するタンパク質、 dendrin, dendrin は樹状突起に局在し、前脳にのみ発現され、その 発現は睡眠の欠乏した後は減少する。
	1414020CD1	328690 Rn.544 4	7.0E-284	[ラット][小胞体、細胞質、原形質膜、樹状突起]Dendrin、樹状突 起に局在し、前脳にのみ発現される、シナプスの柔軟性の変調に 関与し得る、発現は睡眠欠乏後に減少する。
14	7621128CD1	g17026376	0.0	[マウス]筋肉由来のタンパク質 MDP77 変異体 2
	7621128CD1	g7619884	6.8E-183	[ニワトリ]筋肉由来のタンパク質 Uyeda, A. 他 (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 269:564- 569.
	7621128CD1	335126 FEA1	2.0E-14	[ヒト][小分子結合タンパク質][エンドソーム/エンドソーム小 胞、核、細胞質、原形質膜]早期のエンドソーム抗原 1、エンドソ ームの低分子量 GTP 分解酵素 RAB5 のエフェクター、エンドソ ーム融合に必要とされ、原形質膜から早期エンドソームへの輸送方 向性を指定し得る、亜急性皮膚全身体性エリテマトーデスと関連す る自己抗原。 Mu, F. 他 (1995) J. Biol. Chem. 270:13503-13511.
15	7505822CD1	569920 KIAA0 063	1.6E-33	[ヒト]神経疾患に関わるトリプレットリピートを含むジョセフィ ンファミリーのメンパー、Machado-Joseph 疾患に関連し、過剰発現 されるとアポトーシスを誘発するヒト MID Alaxin 3 の領域に低 い類似性を有する。
16	71607945CD1	g193209	0.0	[マウス]リントタンパク質 Lafer, E. 他 (1992) J. Neurosci. 12:2144-2155.

10

20

30

40

表 2 - 5

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
	71607945CD1	570248 SNAP9	0.0	[ヒト] シナプトソーム関連タンパク質 91。シナプスにおいてクラ スリン媒介性のシナプス小胞再利用の調節を助ける acathrin アセ ンブリタンパク質。
		1		Yao, P. J. 他 (1999) Neuroscience 94:389-394.
17	7505777CD1	g2589160	3.1E-88	[ヒト] DCRA. Nakamura, A. (1997) J. Biochem. 122:872-877. [ヒト] ダウン症決定領域遺伝子 3、遍在的に発現されるタンパク 質、対応する遺伝子はダウン症の決定領域の 21 番染色体に位置す る。 Nakamura, A. 他(1997)前出。
18	7505818CD1	g2262199	2.3E-162	[ヒト] Josephin MID1 Goto, J. (他 (1997) Neurosci. Res. 28:373-377. [ヒト] [核、細胞質、核基質] マチャド・ジヨセフ病(脊髄小脳失 調 3)、スクレオチド切除修復に関与し得る、拡大ポリグルタミン 領域を有する変異体はマチャド・ジヨセフ病に関連しており、過 剰発現されるとアポトーシスを生じる。 Paulson, H.L. 他 (1997) Ann. Neurol. 41:453-462.
19	7505821CD1	g2262199	7.8E-182	[ヒト] Josephin MID1 (Goto, J. 他 (1997) 前出) [ヒト] [核、細胞質、核基質] マチャド・ジヨセフ病(脊髄小脳失 調 3)、スクレオチド切除修復に関与し得る、拡大ポリグルタミン 領域を有する変異体はマチャド・ジヨセフ病に関連しており、過 剰発現されるとアポトーシスを生じる。 Gaspar, C. 他. (2000) Hum. Mol. Genet. 9:1957-1966
	7505821CD1	700748 MJD	2.6E-174	

表 2 - 6

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
20	7506685CD1  7506685CD1	g1864093  424074 KIAA0964	1.4E-134  3.2E-137	[ラット] PSD-95/SAP90-結合タンパク質-4 (Takeuchi, M. 他 (1997) J. Biol. Chem. 272 : 11943-11951) [ヒト] PSD-95/SAP90 のグアニル酸キナーゼ様ドメインに結合し、シグナル伝達において機能し得るシナプスタクソームタンパク質である Rn.37481 に高い類似性を有するタンパク質。
21	7500933CD1	g9588046  435996 TMM2B	2.7E-110  8.9E-33	[ヒト] BR13 (Vidal, R. 他(前出)) [ヒト] [不特定膜; 原形質膜] 膜内在性タンパク質、II 型膜内在性タンパク質ファミリーのメンバー、対応する遺伝子における突然変異によって家族性 British 痴呆症 (familial British dementia) の原因となる不溶性ペプチド断片の産生を生じる。Holton, J. L., 他 (2001) Am. J. Pathol. 158:515-26 Regional distribution of amyloid-Bri deposition and its association with neurofibrillary degeneration in familial British dementia.
22	7389203CD1	g10119916  710087 Otof	7.4E-107  1.0E-107	[マウス] [不特定膜] II 型膜内在性タンパク質ファミリーのメンバー [ヒト] 脳 otoferlin 長イソ型 Yasunaga, S. 他 (2000) Am. J. Hum. Genet. 67:591-600 OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9 [マウス] Otoferrin, シナプスまたは他の小胞膜融合に関与し得る、ヒト otoferlin 遺伝子の変異は非症候性 prelingual deafness に関連する。

【表 2 - 7】

表 2 - 7

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
		335100 DYSF	1.5E-47	[ヒト][原形質膜]dysferlin, 細胞のシグナル伝達に関与し得る正常筋肉機能に必要なタンパク質、対応遺伝子の変異によって、三好ミオパチーおよび肢帯筋ジストロフィー型 2B を生じる。 Piccolo, F.他 (2000) Ann. Neurol. 48:902-912 Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies.
23	7506268CD1	g1226235	1.6E-124	[マウス] Ac39/ フォイゾフィリン Carrion-Vazquez, M. (1998) Eur. J. Neurosci. 10:1153-1166 Brain Ac39/physophillin: cloning, coexpression and colocalization with synaptophysin. [マウス][調節サブユニット; 活性輸送体, primary; ヒドロラーゼ, 輸送体; ATP 分解酵素][不特定膜, 原形質膜]ヒト ATP6DV(液胞 H(+)-ATP 分解酵素プロトンポンプのサブユニット D)の推定オルソログ、アクセサリサブユニット(ATP 結合および A と B サブユニットによる加水分解を制御する) [ヒト][調節サブユニット, 活性輸送体, primary, 加水分解酵素, 輸送体, ATP 分解酵素][原形質膜]液胞型 H+-ATP 分解酵素プロトンポンプ(サブユニット D)、末梢性 (peripheral) 触媒的 V1 複合体におけるアクセサリサブユニット、ATP 加水分解(V1 複合体)とプロトン輸送(V0 複合体)の共役に関与し得る。 Forgac, M. (1998) FEBS Lett 440:258-263. Structure, function and regulation of the vacuolar (H+)-ATPases.
24	7509159CD1	g12248382	0.0	[ヒト] SEMB

10

20

30

40

【表 2 - 8】

表 2 - 8

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
		587311 Sema4a	0.0	[マウス]セマホリン 4a(セマホリン B)、神経発達中に神経軸索ガイダンスに関与するタンパク質のファミリーであるセマホリンの膜貫通型サブファミリーの中にある。 Puschel, A. W. 他(1996) Mol. Cell Neurosci. 7:419-431 The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins.
		323692 Sema4b	2.4E-111	[マウス][不特定膜]セマホリン 4b(セマホリン C)、神経細胞成長円錐ガイダンスに関与するタンパク質のファミリーのメンバーである。
25	7512347CD1	g12248382 587311 Sema4a	3.3E-28 5.7E-16	[ヒト] SEMB [マウス]セマホリン 4a(セマホリン B)、神経発達中に神経軸索ガイダンスに関与するタンパク質のファミリーであるセマホリンの膜貫通型サブファミリーの中にある。 Puschel, A. W. 他(前出)

10

20

30

40

表 3-1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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	7500354CD1 733		Signal_cleavage: M1-A17 シグナルペプチド: M1-A17; M1-E19; M1-T22 アミロイド A4 細胞外ドメイン G24-P188 Kunitz 型/ウシ膵臓トリプシン抑制物質: C291-C341 サイトゾル内ドメイン: 膜貫通ドメイン: L36-L686 非サイトゾル内ドメイン: M1-G663 膵臓トリプシン抑制物質 (Kunitz) ファミリータンパク質 BL00280 : G298-C341 アミロイド形成糖タンパク質細胞外ドメインタンパク質 BL00319; T59-T107, BLIMPS_BLOCKS T157-V182, D243-T276, T347-E396, V420-L461, Q462-A504, K687-Q732 アミロイド形成糖タンパク質シグネチャ: K161-V208; V698-N733 膵臓トリプシン抑制物質 (Kunitz) ファミリーシグネチャ: P299-D357 アミロイド A4 タンパク質前駆体シグネチャ PR00203; D177-N195, P363-R386, BLIMPS_PRINTS K662-K687, E708-Q730 βアミロイドペプチド (β-APP) シグネチャ PR00204; F638-L651, V652-A664, BLIMPS_PRINTS A664-A676 塩基性プロテアーゼ (Kunitz 型) 抑制因子ファミリーシグネチャ PR00759: BLIMPS_PRINTS R288-A302, C316-G326, G326-C341 タンパク質前駆体 アミロイド 膜貫通 プロテアーゼ シグナル セリン 抑制 BLAST_PRODOM 物質 A4 糖タンパク質; PD003339; G4-V196; PD0003344; I345-I518; PD0003449: E627-Q730; PD004634; E520-E617 アミロイド形成糖タンパク質細胞外ドメイン DM02422; [Q0648] [I81-761: L165-Q732; [P05067] [342-768; I345-L686; [P51693] [187-619; Y336- E550; [A49414] [167-679; P353-E637 アミロイド形成糖タンパク質細胞外ドメインシグネチャ: G181-P188 アミロイド形成糖タンパク質細胞内ドメインシグネチャ: G719-K726 膵臓トリプシン抑制物質 (Kunitz) ファミリーシグネチャ: F319-C337	SPSCAN HMIMER HMIMER_PFAM HMIMER_PFAM TMHMMER BLIMPS_BLOCKS BLIMPS_BLOCKS PROFILESCAN PROFILESCAN BLIMPS_PRINTS BLIMPS_PRINTS BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODOM BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS 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	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びビデー タベース
2	3871329CD11036		<p>潜在的リン酸化部位： S159 S282 S351 S577 S595 S642 S660 T14 T61 T157 T266 T278 T362 T489 T583 T614 T706 T724 Y336</p> <p>潜在的グリコシル化部位： D40N523 N552</p> <p>Signal_cleavage: M1-R48</p> <p>PDZ ドメイン (DHR または GLGF と呼ばれる)： T224-R313, E402-P486</p> <p>Zn フィンガー、 C3HC4 タイプ (RING フィンガー)： C18-C56</p> <p>Zn フィンガー、 C3HC4 タイプ BL00518: C33-C40</p> <p>PDZ ドメインタンパク質 PF00595： I447-N457</p> <p>GLGF ドメイン DM00224 P31016 302-390: D217-V308</p> <p>Zn フィンガー、 C3HC4 タイプ (RING フィンガー)、 シグネチャ： C33- L42</p> <p>潜在的リン酸化部位： S91 S409 S433 S472 S561 S568 S581 S584 S650 S731 S744 S786 S792 S837 S861 S879 S942 S966 S977 S991 T136 T188 T251 T291 T334 T422 T522 T701 T712 T767 T902 T926 T927 T931 T1009 Y400 Y646 Y829 Y900</p>	<p>MOTIFS</p> <p>MOTIFS</p> <p>SPSCAN</p> <p>HMMER_PFAM</p> <p>HMMER_PFAM</p> <p>BLIMPS_BLOCKS</p> <p>BLIMPS_PFAM</p> <p>BLAST_DOMO</p> <p>MOTIFS</p> <p>MOTIFS</p>
3	1681386CD11847		<p>潜在的グリコシル化部位： N231 N331 N578 N603 N711 N765</p> <p>スベクトリンリピート N879-E981, R1098-H1204, K140-S236, K814-D876, E29- Q129, Q278-S344, Q1670-G1731, Q1513-Q1620, A984-E1095, N1207-R1293, K528-G553;</p> <p>ロイシンジッパーパターン: L842-L863</p> <p>潜在的リン酸化部位： S23 S42 S88 S94 S133 S211 S222 S284 S312 S413 S470 S517 S585 S747 S752 S769 S909 S946 S1108 S1133 S1237 S1239 S1323 S1339 S1366 S1391 S1392 S1406 S1409 S1423 S1578 S1613 S1641 S1741 S1783 S1817 S1818 T41 T135 T255 T274 T324 T329 T543 T595 T608 T624 T640 T669 T718 T719 T832 T1063 T1071 T1096 T1153 T1196 T1224 T1231 T1259 T1310 T1327 T1532 T1567 T1770 Y248</p>	<p>MOTIFS</p> <p>MOTIFS</p> <p>MOTIFS</p> <p>MOTIFS</p> <p>HMMER_PFAM</p>

10

20

30

40

【表 3 - 3】

表 3-3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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	7500938CD1 230		潜在的グリコシル化部位: N81 N375 N411 N606 N947 N992 N1061 N1125 N1169 N1325 N1576 サイトゾル内ドメイン: M1-G57; 膜貫通ドメイン: V58-Y80; 非サイトゾル内ドメイン: R81-V230 タンパク質膜内在性膜貫通シグナルアンカー-2A E25 2B E316 E25B PD023945: D147-C227, M1-L155 潜在的リン酸化部位: S30 S49 S172 T110 T153 T190 T198 Y126 Signal_cleavage: M1-T54	MOTIFS TMHMMER BLAST_PRODOM MOTIFS SPSCAN
5	90055441CD 315 1		PDZ ドメイン (DHR または GLGF と呼ばれる): E117-P198; 類似の線虫 DNDA クローン CEMSH65R F44D12.4 タンパク質 PD041259 A39-R312 潜在的リン酸化部位: S62 S77 S152 S213 T54 T88 T130 T192 T224 T234 T268 T289	HMMER_PFAM BLAST_PRODOM MOTIFS MOTIFS
6	7500936CD1 220		タンパク質膜内在性膜貫通シグナルアンカー-2A E25 2B E316 E25B PD023945: M65-C217 潜在的リン酸化部位: S30 S162 T63 T143 T180 T188 Y79 潜在的グリコシル化部位: N122	BLAST_PRODOM MOTIFS MOTIFS
7	7500950CD1 631		Sema ドメイン: M1-V348 サイトゾル内ドメイン: A574-A631; 膜貫通ドメイン: W551-V573; 非サイトゾル内ドメイン: M1-Y550 セマフォリン B 前駆体 シグナル 免疫グロブリンフォルド 多重遺伝子ファミリー 神経発生 発生 タンパク質 PD116663: P413-A631 セマフォリン タンパク質 前駆体 受容体 キナーゼ シグナル チロシン 肝細胞 PD001844: V118-C280, I2-F146, G270-V348	HMMER_PFAM TMHMMER BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM

表 3-4

SEQ ID NO:	Incyte ポ リペプチド ID	アミノ酸 残基数	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
8	7500854CD1132		セマフォリン; ファシクリン (FASCICLIN); コラズシン (COLLAPSTIN); II; DM01606 I48745 I-619; M1-V348, L344-L491 A49069 I-646; I2-C280, P139-V348, V351-W461 I48747 I-646; I2-C280, P139-V348, V351-W461, P449-L482 I48744 I-639; I2-V348, V351-T474 細菌制御タンパク質、araC ファミリーシグネチャ; R537-R581 潜在的リン酸化部位: S7 S12 S20 S77 S153 S243 S286 S312 S368 S372 S403 S425 S444 S608 S615 S617 T53 T151 T163 T185 T262 T267 T591 潜在的グリコシル化部位: N21 N36 N366 N477 Signal_cleavage: M1-P30 シグナルペプチド: M1-P30 CutA1.2 価イオン耐性タンパク質; V45-G116 タンパク質 2 価カチオン耐性 ペリプラズム CUTA C 型手トクロム生命成 PD009206; F49-M98 潜在的リン酸化部位: S82 S105	MOTIFS MOTIFS MOTIFS SPSCAN HMME HMME_PFAM BLAST_PRODUM MOTIFS
9	2754176CD11115		Signal_cleavage: M1-S21 WDドメイン、G-βリビート: I187-D224, K431-D464, A230-N265, C91-N126, N493-R529, C49-G85, L621-Y657 Lethal (2) giant larvae タンパク質シグネチャ PR00962; T40-Y58, P308- M330, Q360-Q380, P448-Q471, P775-L793, S634-L658 幼生 (Larvae) タンパク質 巨大 (Giant) サプレッサ 致死性 (Lethal) 2 P127 抗発癌遺伝子リビート 類似性 数個 PD007842; V298-D500, R144- Y363, E34-W125, L600-Y657, D495-F530, L211-D224 マウス MCL1 のような幾つかの腫瘍サプレッサタンパク質に類似 PD145797; BLAST_PRODUM N737-E844, S531-P677, D533-P566 コードされたマウス MCL1 のような幾つかの腫瘍サプレッサタンパク質に類 BLAST_PRODUM 似 PD040184; S864-F1115	SPSCAN HMME_PFAM BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM

10

20

30

40

【表 3 - 5】

表 3-5

SEQ ID NO:	Incyte ポ リペプチド ID	アミノ酸 残基数	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	7503408CD1363		タンパク質 SNI1 SRO7 SNI2 SRO77 C1F3.03 1 番染色体 膜貫通 PD025667: I37-A239, D231-Y363, I451-K484, V880-Y982 HUGL; 幼生 (Larvae); 巨大 (Giant); DM03976 [S55474 I-1015: P30-E550, L600-D852, I758-S983 S54142 I-1017: G196-V554, E34-L127, S749-L997, G612-E844 P08111 I-1032: G31-D490, N902-L980, P628-S692, I758-P797 YPR032W; 膜; DM08120 S54506 G6-1033: I37-D237, I451-L593 Trp-Asp (WD) リピートシグネチャ: L113-L127, I451-A465 潜在的リン酸化部位: S137 S190 S227 S255 S343 S393 S429 S446 S459 S531 S588 S684 S715 S719 S723 S869 S883 S939 S973 S1034 S1091 T51 T161 T235 T302 T349 T400 T478 T748 T768 T999 Y234 Y948 Y1113 潜在的グリコシル化部位: N638 N902 UNC76 ZYGINI FEZIT PD011714: D102-T363 潜在的リン酸化部位: S7 S18 S42 S44 S55 S58 S116 S134 S169 S199 S272 S273 S287 S306 S324 S327 T99 T308 潜在的グリコシル化部位: N48 N132 N189 Signal_cleavage: M1-A46	BLAST_PRODOM BLAST_DOMO BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS MOTIFS MOTIFS MOTIFS BLAST_PRODOM MOTIFS MOTIFS MOTIFS SPSCAN
11	71086982CD453 1		タンパク質 PSD95/SAP90 関連 DAP1 グアニル酸キナーゼ 関連 $\beta$ $\alpha$ PSD95 BLAST_PRODOM 結合 PD006399: A235-N433 タンパク質 PSD95/SAP90 関連 DAP1 グアニル酸キナーゼ 関連 $\beta$ $\alpha$ PSD95 BLAST_PRODOM 結合 PD007821: S12-P195 PSD95/SAP90-関連タンパク質 4 PD142277: D196-E234 潜在的リン酸化部位: S41 S45 S76 S115 S126 S170 S171 S186 S190 S193 S224 MOTIFS S251 S315 S352 S357 S410 S429 S434 T30 T49 T111 T175 T276 T338 潜在的グリコシル化部位: N68 N183 N222 N294	BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM MOTIFS MOTIFS

10

20

30

40

【表 3 - 6】

表 3-6

SEQ ID NO:	Incyte ポ リペプチド ID	アミノ酸 残基数	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
12	7506367CD1 505		Signal_cleavage: M1-A46 タンパク質 PSD95/SAP90 関連 DAPI グアニル酸キナーゼ 関連 $\beta$ $\alpha$ PSD95 BLAST_PROD 結合 PD006399: A287-N485 タンパク質 PSD95/SAP90 関連 タンパク質 DAPI グアニル酸キナーゼ 関連 BLAST_PROD $\beta$ $\alpha$ PSD95 結合 PD007821: S12-I130, P180-P247 PSD95/SAP90-関連タンパク質 4 PD142277: D248-E286 潜在的リン酸化部位: S41 S45 S76 S126 S134 S146 S222 S223 S238 S242 S245 S276 S303 S367 S404 S409 S462 S481 S486 T30 T49 T111 T227 T328 T390 潜在的グリコシル化部位: N68 N235 N274 N346	SPSCAN BLAST_PROD MOTIFS
13	1414020CD1 711		Dendrin PD146601: M55-K709 潜在的リン酸化部位: S13 S46 S327 S389 S447 S515 S516 S539 S626 S644 S652 S665 S666 S679 S688 T125 T242 T269 T433 T469 T540 T545 T622 T658 Y278	BLAST_PROD MOTIFS
14	7621128CD1 684		潜在的グリコシル化部位: N68 タンパク質 コイルドコイル鎖 ミオシン リピート 重 ATP 結合 フィラメン ト 7 連子 PD000002: V122-E353 筋肉 T22C1.6 タンパク質 PD075375: I285-E465 トリコヒアリン DM03839  P37709 632-1103: E103-E492  P22793 921-1475: K129-E492 潜在的リン酸化部位: S82 S127 S212 S265 S284 S364 S464 S474 S529 S569 S603 T105 T121 T157 T227 T253 T383 T391 T392 T404 T523 T588 T678 Y334 潜在的グリコシル化部位: N4 N225 N481	MOTIFS BLAST_PROD BLAST_PROD BLAST_PROD
15	7505822CD1 146		ジョセフィン: G61-E137, T13-R49 タンパク質 T27A16.26 KIAA0063 HAI234 膜貫通 PD108404: V59-L129, V14- R49	MOTIFS HMMER_PFAM BLAST_PROD

10

20

30

40

【表 3 - 7】

表 3-7

SEQ ID NO:	Incyte ポ リペプチド ID	アミノ酸 残基数	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
16	71607945CD 902 1		潜在的リン酸化部位: Y94 ENTH ドメイン: G19-M141  クラスリン被膜 アセンブリ タンパク質 AP180 関連 被覆ピット 選択性ス プライミング PD037674: T284-A405 タンパク質 クラスリン アセンブリ 被膜 AP180 関連 被覆ピット 選択性ス プライミング PD009526: Q4-R139 クラスリン被膜 アセンブリ タンパク質 AP180 関連 被覆ピット 選択性ス プライミング PD028037: E436-S524 タンパク質 クラスリン アセンブリ 被膜 AP180 関連 被覆ピット 選択性ス プライミング PD014599: T549-W790 AP0 ポリシアロ糖タンパク質; シアロ糖タンパク質 DM05537  P12027 I-541: G214-A731  S08207 I-540: E249-D718 潜在的リン酸化部位: S128 S137 S273 S447 S475 S570 S649 S711 S750 S883 T5 T7 T30 T62 T342 T413 T769 T770 T785 潜在的グリコシル化部位: N50 N69 N105 ダウン症候群決定領域 タンパク質 A PD040389: K10-R171, M1-G19	MOTIFS HMMER_PFAM  BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_DOMO  MOTIFS MOTIFS
17	7505777CD1 172		潜在的リン酸化部位: S28 T3 潜在的グリコシル化部位: N58 ジヨセフィン: P10-Q143, M1-Q9 ユビキチン相互作用モチーフ: E188-S205, D168-I185, M294-V311 タンパク質 ジヨセフィン MJD1 マチャドジョセフ病 多型 トリプレット リ ピート 拡張 脊髄小脳 PD014018: K8-E235, M1-Q9	MOTIFS BLAST_PRODOM  MOTIFS MOTIFS HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLAST_PRODOM
18	7505818CD1 321			

10

20

30

40

【表 3 - 8】

表 3-8

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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
19	7505821CD1 362		シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ 脊髄小脳性失調症タイプ 3 PDI27646: Q258-K321 潜在的リン酸化部位: S181 S205 S295 T67 T83 T152 T222 T310 潜在的グリコシル化部位: N208 N220 Signal_cleavage: M46-G73 ジョセフィン: Q63-Q183, M1-L62 ユビキチン相互作用モチーフ: E228-S245, D208-I225, M335-V352 タンパク質 ジョセフィン MJD1 マチャドジョセフ病多型 トリプレット リ ビート 拡張 脊髄小脳 PD014018: M1-E275 脊髄小脳性失調症タイプ 3 PDI27646: Q299-K362 潜在的リン酸化部位: S29 S221 S245 S336 T54 T107 T123 T192 T262 T351	BLAST_PRODOM MOTIFS MOTIFS SPSCAN HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM MOTIFS
20	7506685CD1 332		潜在的グリコシル化部位: N248 N260 Signal_cleavage: M1-A46 タンパク質 PSD95/SAP90 関連 DAP1 グアニル酸キナーゼ 関連 $\beta$ $\alpha$ PSD95 結合 PD006399: A114-N312 PSD95/SAP90 関連 タンパク質 DAP1 グアニル酸キナーゼ 関連 $\beta$ $\alpha$ PSD95 結合 PD007821: S12-S75 PSD95/SAP90-関連タンパク質 4 PD142277: T77-E113 潜在的リン酸化部位: S41 S45 S76 S103 S130 S194 S231 S236 S289 S308 S313 T30 T49 T155 T217 潜在的グリコシル化部位: N68 NI01 NI73	MOTIFS SPSCAN BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM MOTIFS MOTIFS
21	7500933CD1 214		サイトゾル内ドメイン: M1-G57; 膜貫通ドメイン: V58-Y80; 非サイトゾル内 ドメイン: R81-V214 タンパク質 膜内在性 膜貫通 シグナルアンカー 2A E25 2B E316 E25B PD023945: I144-C211, M1-E 147, I144-C211	BLAST_PRODOM

10

20

30

40

【表 3 - 9】

表 3-9

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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
22	7389203CDI 716		潜在的リン酸化部位: S30 S49 S156 T110 T174 T182 Y126 C2 ドメイン: V28-I106, L191-V285 細胞接着配列: R154-D156 潜在的リン酸化部位: S150 S170 S254 S265 S292 S530 T31 T58 T60 T108 T371 T383 T437 T536	MOTIFS HMME PFAM MOTIFS MOTIFS
23	7506268CDI 234		ATP シンターゼ (CIAC39) サブユニット: Y15-P232 サブユニット V-ATP 分解酵素 AC39 液胞型 ATP シンターゼ 加水分解酵素 水素イオン輸送 PD008622: S52-F234, N35-G169 AC39; ATP; 液胞型; シンターゼ; DM03240 P12953 1-272: A31-F234 DM03240 P53659 1-363: N35-F234, L7-E43 DM03240 P5464 10-355: V11-F234 DM03240 P32366 32-344: V37-F234 潜在的リン酸化部位: S29 S52 S116 T86 T172 Y77	HMME PFAM BLAST_PRODUM BLAST_DOMO
24	7509159CDI 728		シグナルペプチド: M1-A31 Sema ドメイン (プレキシンおよびセマホリンに存在する): Y127-Q445, F64-E122 サイトゾル内ドメイン: A671-A728; 膜貫通ドメイン: W648-V670; 非サイトゾル内ドメイン: M1-Y647 セマフォリン B 前駆体 SEM B シグナル 免疫グロブリンファミリー 多重遺伝子ファミリー 神経発生 発生 タンパク質 PDI16663: P510-A728; PDI07003: M1-D63 セマホリン タンパク質前駆体 受容体 キナーゼ シグナル チロシン ファミリー 肝細胞 PD001844: V184-C346, G336-A442, K118-T229, L67-P147	MOTIFS HMME HMME PFAM TMHMMER BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM

10

20

30

40



【表 4 - 1】

表 4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
26/7500354CB1/34 95	1-256, 1-287, 1-581, 11-298, 13-254, 13-273, 13-281, 15-256, 16-328, 17-244, 17-260, 17-3469, 18-267, 18-280, 18-282, 18-677, 19-693, 19-782, 20-263, 20-266, 20-268, 20-569, 20-610, 20-780, 21-831, 22-782, 23-244, 23-263, 23-274, 23-276, 23-280, 23-298, 23-299, 23-311, 23-319, 23-324, 23-326, 23-375, 23-479, 23-520, 23-549, 23-554, 23-584, 23-587, 23-601, 23-656, 23-668, 23-680, 24-249, 24-265, 24-281, 24-307, 24-308, 24-316, 24-447, 24-551, 24-563, 24-566, 24-587, 24-601, 24-619, 24-638, 24-661, 24-781, 24-782, 24-809, 25-261, 25-297, 25-353, 25-440, 25-536, 25-701, 25-835, 26-250, 26-677, 28-340, 29-570, 29-762, 30-298, 30-308, 30-726, 31-663, 33-326, 33-346, 33-620, 33-671, 34-279, 35-293, 39-231, 42-288, 42-292, 43-596, 45-340, 45-609, 45-656, 46-611, 49-295, 50-563, 52-712, 57-364, 58-687, 59-500, 66-393, 67-340, 67-415, 67-446, 68-658, 75-331, 76-808, 77-350, 80-582, 81-640, 82-591, 83-770, 90-351, 98-351, 98-693, 98-709, 113-316, 113-642, 119-404, 123-332, 127-390, 135-765, 147-747, 148-694, 148-820, 172-789, 173-424, 178-423, 178-429, 178-434, 181-451, 186-426, 187-585, 194-467, 194-480, 194-800, 201-782, 205-980, 208-730, 216-413, 221-402, 226-864, 229-497, 235-902, 239-574, 255-909, 258-568, 262-505, 266-643, 267-503, 270-833, 271-852, 282-460, 284-549, 293-601, 300-551, 303-669, 303-767, 309-661, 309-730, 309-971, 318-840, 318-931, 320-559, 322-434, 322-719, 323-933, 326-586, 328-968, 332-825, 338-772, 338-914, 344-775, 350-888, 354-878, 354-944, 358-624, 361-945, 365-614, 368-794, 369-621, 371-593, 383-464, 383-611, 383-617, 383-620, 383-847, 383-981, 387-920, 390-818, 390-975, 391-902, 393-891, 412-657, 418-588, 418-649, 418-661, 418-662, 418-663, 418-665, 418-672, 431-685, 435-970, 451-712, 453-1131, 454-757, 455-1124, 470-1046, 470-1062, 471-797, 471-1067, 473-722, 480-817, 480-1267, 482-822, 510-993, 513-757, 513-761, 513-939, 521-749, 521-765, 522-689, 523-729, 523-1010, 534-768, 537-767, 541-659, 541-792, 541-829, 541-1096, 548-745, 548-843, 549-849, 550-872, 558-954, 569-854, 579-817, 581-763, 597-1146, 604-1181, 606-888, 615-1322, 632-870, 652-781, 659-902, 661-1133, 663-906, 668-1303, 683-907, 687-1095, 777-1564, 796-1227, 808-1506, 823-1372, 867-1608, 876-1560, 877-1050, 879-1567, 883-1092, 886-1384, 901-1558, 902-1501, 904-1344, 917-1259, 925-1593, 927-1481, 933-1481, 942-1556, 943-1224, 943-1234, 943-1258, 943-1268, 943-1546, 943-1558, 949-1197, 952-1623, 958-1259, 961-1536, 961-1611, 961-1646, 971-1556, 978-1621, 986-1560, 987-1241, 987-1295, 990-1155, 993-1596, 1009-1609, 1027-1295, 1030-1469, 1034-1238, 1034-1560, 1034-1706, 1040-1712, 1041-1497, 1041-1498, 1050-1760, 1054-1617, 1057-1181, 1057-1408, 1065-1671, 1081-1427, 1085-1348, 1090-1724, 1097-1693, 1114-1307, 1115-1369, 1124-1792, 1126-1684, 1127-1501, 1127-1646, 1169-1820, 1174-1641, 1183-1549, 1184-1713, 1184-1827, 1195-1438, 1195-1717, 1199-1664, 1210-1810, 1221-1494, 1226-1892, 1229-1801, 1230-1724, 1234-1679, 1237-1854, 1238-1538, 1238-1841, 1242-1477, 1243-2005, 1246-1534, 1248-1728, 1248-1775, 1248-1816, 1250-1926, 1251-1499, 1253-1514, 1258-1539, 1261-1539, 1265-1902, 1269-1850, 1269-1880, 1271-1587, 1275-1528, 1277-1916, 1279-1825, 1284-1517, 1286-1568, 1294-1865, 1296-1848, 1300-1613, 1302-1500, 1307-1790, 1310-1734, 1311-1566, 1311-1577, 1311-1985, 1316-1841, 1318-1581, 1323-1605, 1325-1558, 1329-1887, 1334-1918, 1338-1628, 1338-1729, 1341-1761, 1345-1900, 1346-1829, 1349-1964, 1351-1812, 1353-1620, 1353-1912, 1359-1801, 1368-1994, 1374-1930, 1374-1947, 1380-1543, 1380-1599, 1380-1630, 1380-1935, 1381-1619, 1381-1620, 1381-1645, 1383-1997, 1384-1990, 1390-1667, 1390-1924, 1391-1668, 1391-1783, 1401-1685, 1402-1495, 1403-1849, 1403-2002, 1404-1548, 1404-1667, 1404-1973, 1405-1687, 1410-1609, 1412-1641, 1412-1668,

10

20

30

40

【表 4 - 2】

表 4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
1412-1673, 1427-1695, 1428-1693, 1432-1717, 1442-1733, 1444-1674, 1455-1771, 1465-1897, 1467-2001, 1468-1942,	
1476-1703, 1485-2127, 1502-1792, 1506-1782, 1513-1753, 1513-1820, 1515-1759, 1515-1789, 1522-1889, 1527-1826,	
1528-1797, 1536-2089, 1540-1774, 1543-1792, 1546-1793, 1563-1859, 1568-1891, 1568-1755, 1573-1843, 1573-1868,	
1575-1810, 1575-1823, 1575-1826, 1578-2230, 1581-1830, 1584-1777, 1606-1911, 1607-1777, 1607-1891, 1618-1915,	
1622-1856, 1638-2268, 1653-2001, 1667-2278, 1681-1917, 1683-1916, 1708-1994, 1718-1987, 1721-1987, 1722-1995,	
1722-1998, 1746-2255, 1756-2001, 1788-2107, 1794-2408, 1840-2008, 1860-1931, 1863-1990, 1892-2002, 1992-2369,	
2000-2572, 2001-2588, 2001-2714, 2003-2246, 2004-2523, 2006-2145, 2015-2251, 2028-2666, 2031-2256, 2031-2630,	
2040-2507, 2040-2663, 2051-2355, 2062-2349, 2065-2359, 2076-2402, 2076-2532, 2080-2530, 2081-2347, 2081-2371,	
2081-2751, 2082-2670, 2083-2373, 2085-2355, 2086-2610, 2091-2436, 2094-2630, 2094-2686, 2094-2716, 2094-2721,	
2097-2729, 2106-2382, 2109-2367, 2109-2391, 2115-2374, 2117-2369, 2117-2656, 2119-2376, 2126-2350, 2131-2753,	
2133-2472, 2139-2402, 2140-2669, 2141-2421, 2145-2392, 2146-2388, 2146-2409, 2150-2971, 2152-2418,	
2153-2857, 2158-2400, 2158-2402, 2160-2480, 2162-2432, 2165-2443, 2166-2428, 2167-2736, 2170-2435, 2170-2483,	
2170-2568, 2171-2488, 2176-2412, 2176-2753, 2176-2765, 2191-2463, 2196-2432, 2200-2731, 2205-2406, 2205-2481,	
2206-2495, 2209-2729, 2210-2472, 2211-2467, 2215-2436, 2215-2490, 2221-2828, 2223-2505, 2223-2506, 2227-2505,	
2232-2524, 2237-2542, 2240-2578, 2242-2727, 2245-2633, 2247-2507, 2247-2535, 2249-2509, 2250-2514, 2250-2579,	
2250-2708, 2251-2533, 2253-2775, 2256-2440, 2256-2511, 2256-2704, 2256-2755, 2256-2864, 2259-2818, 2261-2931,	
2268-2584, 2269-2507, 2270-2501, 2270-2534, 2276-2811, 2279-2559, 2279-2788, 2279-2960, 2279-3083, 2286-2567,	
2288-2550, 2289-2539, 2290-2530, 2295-2569, 2295-2572, 2295-2909, 2297-2507, 2298-2845, 2300-2412, 2301-2565,	
2302-2534, 2304-2894, 2310-2574, 2310-2806, 2311-2581, 2312-2590, 2316-2943, 2317-2629, 2318-2671, 2319-2472,	
2324-2558, 2327-3018, 2329-2579, 2331-2522, 2331-2539, 2335-2882, 2337-2560, 2338-2605, 2338-2969, 2343-2608,	
2343-2618, 2343-2872, 2344-2612, 2345-2574, 2347-2597, 2348-2637, 2348-2640, 2349-2607, 2349-2609, 2349-2610,	
2350-2607, 2353-2709, 2365-2583, 2365-2612, 2366-2638, 2368-2614, 2372-2632, 2382-2845, 2384-2573, 2384-2637,	
2385-2679, 2387-2657, 2387-2948, 2400-2852, 2407-2663, 2409-2676, 2414-2624, 2417-2664, 2417-2665, 2421-2647,	
2427-2587, 2427-2735, 2432-2681, 2435-2664, 2436-2753, 2437-2697, 2437-2719, 2437-2757, 2437-2905,	
2438-2895, 2439-2671, 2440-2673, 2440-2691, 2440-2714, 2440-2715, 2440-2717, 2441-2723, 2443-2664, 2443-2682,	
2443-2713, 2444-2833, 2447-2746, 2458-2747, 2459-2687, 2460-3158, 2465-2855, 2466-2669, 2466-2674, 2472-2702,	
2472-2705, 2472-3030, 2474-2699, 2474-2715, 2474-2731, 2475-3016, 2477-2768, 2481-2723, 2484-2708, 2484-2712,	
2484-2718, 2484-2726, 2484-2781, 2485-2767, 2486-2568, 2486-2709, 2486-2739, 2486-2766, 2489-2790, 2494-2787,	
2499-2714, 2499-2773, 2500-3183, 2502-2751, 2502-2764, 2502-3016, 2508-2828, 2508-2892, 2511-2753, 2511-2780,	
2513-2721, 2513-2750, 2513-2752, 2515-2735, 2515-2741, 2519-3079, 2520-2786, 2525-2802, 2528-2781, 2530-2773,	
2532-2734, 2532-2766, 2532-3078, 2532-3219, 2538-2752, 2541-2791, 2543-3093, 2546-2800, 2546-3180,	
2549-2841, 2550-2844, 2553-2798, 2553-2805, 2554-2851, 2555-3201, 2561-3215, 2563-2813, 2563-2833, 2563-2836,	
2566-2852, 2567-2862, 2569-2857, 2573-2846, 2573-2855, 2575-3222, 2584-3430, 2587-3008, 2587-3173, 2588-2835,	
2592-3203, 2593-2825, 2593-2861, 2594-2842, 2594-2859, 2595-2848, 2595-2988, 2600-2808, 2602-2809, 2602-2813,	

10

20

30

40

【表 4 - 3】

表 4-3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
	2602-2831, 2602-2855, 2602-2888, 2602-3002, 2602-3207, 2605-2844, 2605-2851, 2605-3177, 2606-3146, 2607-2864,
	2608-2870, 2608-3116, 2609-3220, 2619-2859, 2619-2863, 2619-3219, 2621-2873, 2623-2883, 2624-2853, 2627-2876,
	2629-2920, 2633-2859, 2633-2877, 2637-2879, 2639-3178, 2643-2903, 2648-3429, 2652-2886, 2652-2899, 2654-2931,
	2655-3216, 2656-2884, 2656-3216, 2659-2944, 2659-2927, 2664-3219, 2665-3056, 2666-2926, 2667-3166, 2667-3213,
	2668-2931, 2672-2934, 2675-2951, 2676-2910, 2676-2920, 2677-2918, 2681-3142, 2683-2953, 2683-2962, 2685-2969,
	2687-3204, 2689-2951, 2689-2982, 2689-3211, 2692-2825, 2693-2988, 2694-2726, 2696-3416, 2697-3216, 2702-2949,
	2702-2951, 2703-2950, 2703-2951, 2703-2954, 2704-2986, 2705-2955, 2707-2945, 2707-2980, 2707-2989, 2710-3217,
	2712-3216, 2714-2887, 2714-2924, 2716-2882, 2716-3214, 2717-3216, 2718-3205, 2729-2999, 2729-3216, 2732-2961,
	2732-2975, 2733-3219, 2734-3216, 2736-3039, 2737-3005, 2737-3145, 2738-3200, 2739-3003, 2739-3176, 2739-3216,
	2741-3209, 2742-3000, 2743-3317, 2744-3216, 2745-2956, 2745-2988, 2745-3005, 2746-2983, 2746-2985, 2746-3214,
	2749-2983, 2750-3162, 2751-3008, 2751-3042, 2751-3054, 2751-3101, 2753-3203, 2753-3217, 2755-3016, 2756-3067,
	2757-2975, 2757-3009, 2757-3028, 2757-3216, 2760-3003, 2760-3216, 2761-3200, 2763-3142, 2763-3214, 2764-3066,
	2764-3217, 2765-3213, 2765-3346, 2767-3064, 2767-3214, 2768-3042, 2768-3214, 2770-2925, 2773-3204, 2773-3209,
	2774-2979, 2774-3015, 2774-3213, 2774-3422, 2776-3020, 2776-3210, 2778-3406, 2779-3129, 2779-3202,
	2780-3114, 2782-3214, 2782-3216, 2783-2967, 2783-2988, 2783-3055, 2783-3116, 2786-2947, 2786-3217, 2787-3214,
	2788-3023, 2789-3216, 2790-3217, 2792-3068, 2792-3214, 2794-3051, 2795-3023, 2796-3205, 2796-3217, 2797-3216,
	2798-3034, 2798-3213, 2799-3024, 2799-3396, 2801-3214, 2803-3205, 2804-3214, 2804-3430, 2805-3213, 2806-3322,
	2808-3214, 2812-3209, 2813-3085, 2814-3039, 2814-3069, 2814-3071, 2814-3076, 2814-3080, 2814-3205, 2814-3216,
	2815-3204, 2815-3216, 2816-3205, 2816-3216, 2819-3216, 2820-3204, 2820-3205, 2820-3214, 2821-3227, 2822-3204,
	2822-3214, 2823-3216, 2823-3217, 2824-3205, 2826-3205, 2826-3209, 2826-3213, 2826-3214, 2827-3212, 2828-3068,
	2828-3396, 2829-3211, 2829-3214, 2830-3090, 2830-3205, 2830-3216, 2832-3013, 2832-3078, 2832-3110, 2832-3210,
	2833-3143, 2833-3145, 2833-3173, 2834-3075, 2835-3485, 2839-3137, 2841-2917, 2841-3082, 2841-3090, 2841-3390,
	2842-3213, 2843-3082, 2845-3073, 2845-3131, 2846-3073, 2847-3081, 2847-3093, 2847-3135, 2848-3214, 2849-3205,
	2850-3097, 2850-3113, 2851-3071, 2852-3071, 2855-3205, 2856-3153, 2858-3086, 2858-3088, 2858-3205, 2859-3108,
	2860-3113, 2860-3176, 2861-3119, 2861-3146, 2861-3455, 2862-3116, 2862-3214, 2864-3205, 2864-3457, 2865-3214,
	2866-3233, 2870-3106, 2870-3214, 2870-3382, 2871-3214, 2874-3211, 2874-3464, 2876-3131, 2876-3132, 2877-3140,
	2877-3205, 2878-3125, 2878-3138, 2880-3436, 2883-3214, 2883-3365, 2888-3139, 2890-3183, 2891-3160, 2893-3175,
	2893-3201, 2893-3211, 2893-3217, 2895-3216, 2896-3131, 2897-2995, 2900-3149, 2901-3214, 2904-3158, 2904-3204,
	2906-3156, 2910-3211, 2911-3155, 2911-3205, 2911-3209, 2913-3209, 2914-3204, 2914-3214, 2915-3475, 2917-3214,
	2920-3163, 2920-3214, 2922-3170, 2922-3200, 2922-3210, 2923-3182, 2923-3210, 2923-3218, 2923-3292, 2923-3495,
	2924-3203, 2924-3216, 2925-3184, 2925-3209, 2925-3213, 2926-3185, 2926-3209, 2930-3169, 2931-3205, 2931-3215,
	2936-3205, 2939-3163, 2939-3203, 2940-3158, 2940-3399, 2941-3204, 2941-3214, 2943-3175, 2943-3191,
	2943-3214, 2943-3216, 2947-3205, 2952-3170, 2955-3202, 2955-3206, 2955-3213, 2955-3253, 2956-3172, 2957-3174,
	2961-3159, 2961-3216, 2961-3265, 2965-3031, 2965-3217, 2967-3216, 2967-3485, 2969-3204, 2969-3216, 2970-3191,

10

20

30

40

【表 4 - 4】

表 4-4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
	2972-3484, 2973-3214, 2983-3209, 2983-3214, 2986-3216, 2986-3414, 2987-3215, 2987-3216, 2987-3240, 2989-3258,
	2990-3215, 2991-3495, 2993-3214, 2994-3204, 2994-3214, 2994-3216, 2994-3226, 2996-3209, 2996-3214,
	3000-3216, 3000-3267, 3005-3216, 3005-3411, 3010-3205, 3012-3186, 3012-3204, 3013-3181, 3015-3216, 3015-3266,
	3015-3277, 3015-3347, 3020-3469, 3020-3489, 3020-3495, 3021-3216, 3022-3495, 3025-3216, 3028-3495, 3031-3226,
	3031-3309, 3031-3465, 3033-3214, 3034-3268, 3034-3469, 3035-3151, 3035-3216, 3035-3261, 3038-3216, 3039-3265,
	3039-3315, 3040-3217, 3040-3293, 3044-3315, 3045-3468, 3046-3247, 3047-3495, 3048-3326, 3050-3205, 3051-3214,
	3051-3317, 3051-3331, 3051-3456, 3052-3474, 3057-3472, 3059-3468, 3059-3492, 3061-3214, 3061-3216, 3061-3468,
	3061-3472, 3062-3324, 3063-3491, 3064-3491, 3070-3468, 3070-3470, 3075-3411, 3077-3214, 3077-3216, 3078-3312,
	3078-3468, 3079-3194, 3083-3216, 3083-3324, 3083-3345, 3086-3469, 3088-3214, 3088-3266, 3090-3472, 3093-3200,
	3093-3205, 3095-3398, 3095-3469, 3096-3471, 3097-3308, 3097-3329, 3098-3348, 3098-3383, 3098-3470, 3099-3216,
	3099-3318, 3100-3199, 3100-3204, 3100-3215, 3100-3216, 3100-3331, 3100-3332, 3100-3341, 3100-3354, 3101-3369,
	3102-3193, 3102-3211, 3102-3216, 3102-3217, 3102-3220, 3102-3232, 3102-3311, 3102-3325, 3102-3327, 3102-3328,
	3102-3338, 3102-3343, 3102-3350, 3102-3358, 3102-3360, 3102-3365, 3102-3368, 3102-3369, 3102-3370,
	3102-3376, 3102-3380, 3102-3384, 3102-3394, 3102-3396, 3103-3214, 3103-3216, 3103-3217, 3104-3216, 3104-3357,
	3105-3193, 3105-3216, 3105-3232, 3105-3335, 3105-3350, 3105-3354, 3105-3355, 3105-3362, 3105-3363, 3105-3368,
	3105-3377, 3105-3386, 3105-3392, 3106-3215, 3106-3216, 3106-3217, 3106-3287, 3106-3337, 3106-3345, 3106-3357,
	3106-3377, 3107-3210, 3107-3361, 3107-3363, 3107-3395, 3108-3468, 3108-3471, 3111-3366, 3112-3329, 3112-3338,
	3112-3341, 3112-3342, 3112-3349, 3112-3357, 3112-3379, 3112-3380, 3112-3390, 3113-3216, 3114-3214, 3115-3210,
	3115-3217, 3115-3370, 3115-3380, 3115-3388, 3115-3390, 3115-3471, 3116-3380, 3117-3354, 3118-3353, 3120-3319,
	3121-3284, 3121-3355, 3121-3363, 3122-3362, 3122-3468, 3128-3328, 3128-3331, 3128-3362, 3128-3381, 3128-3410,
	3130-3294, 3131-3216, 3135-3475, 3138-3476, 3138-3491, 3140-3384, 3140-3422, 3140-3470, 3143-3374, 3149-3480,
	3149-3495, 3152-3205, 3158-3495, 3171-3432, 3173-3373, 3173-3430, 3173-3482, 3174-3442, 3177-3449, 3178-3420,
	3179-3473, 3182-3469, 3183-3468, 3184-3463, 3184-3495, 3186-3468, 3187-3468, 3192-3469, 3195-3470, 3195-3471,
	3196-3469, 3197-3471, 3198-3468, 3198-3470, 3199-3471, 3210-3478, 3218-3477, 3219-3333, 3219-3465, 3219-3476,
	3220-3477, 3220-3480, 3227-3420, 3248-3482, 3248-3488, 3254-3487, 3255-3469, 3263-3489, 3265-3469, 3267-3471,
	3268-3465, 3292-3463, 3292-3485, 3314-3468, 3322-3488, 3354-3482
27/3871329CB1/37	1-782, 183-649, 245-649, 643-1067, 669-1052, 696-844, 767-1097, 816-1101, 816-1097, 999-1097, 1034-
20	1097, 1034-1098, 1034-1102, 1034-1103, 1034-1244, 1034-1544, 1034-1545, 1034-1647, 1034-1684,
	1039-1080, 1204-1896, 1265-1801, 1345-2065, 1561-2216, 1635-1926, 1661-2317, 1676-2365, 1700-2253, 1727-2415,
	1754-2375, 1765-2380, 1765-2409, 1791-2174, 1791-2473, 1919-2469, 1920-2720, 1974-2642, 2105-2701, 2123-2687,
	2209-2891, 2344-3162, 2350-2927, 2647-3294, 2714-3546, 2733-3446, 2748-3422, 2765-3048, 2770-3433, 2781-3125,
	2787-3407, 2817-3433, 2820-3365, 2820-3522, 2837-3522, 2851-3550, 2865-3515, 2873-3448, 2889-3590, 2904-3468,
	2918-3538, 2965-3528, 2986-3714, 3008-3663, 3008-3717, 3046-3720

10

20

30

40

【表 4 - 5】

表 4-5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
28/1681386CB1/61	1-550, 36-550, 105-548, 105-752, 338-569, 352-569, 416-781, 416-790, 470-951, 490-529, 557-625, 557-829, 557-847,
19	557-982, 557-987, 557-1132, 557-1133, 563-1199, 575-1013, 649-974, 704-1401, 719-990, 719-1183, 914-1380, 929- 1529, 1116-1403, 1138-1199, 1155-1723, 1276-1802, 1520-2076, 1563-1865, 1563-2117, 1572-1833, 1572-1837, 1615-2129, 1757-2161, 1763-1928, 1763-2298, 1775-2118, 1786-2272, 1808-2458, 1823-2082, 1823-2322, 1876-2576, 1887-2364, 1888-2364, 1909-2054, 1935-2551, 1979-2619, 2039-2619, 2088-2506, 2135-2867, 2135-2896, 2146-2709, 2150-2707, 2189-2591, 2193-2744, 2223-2952, 2231-2737, 2245-2494, 2258-2722, 2320-2572, 2320-2864, 2333-2927, 2342-2553, 2351-2888, 2379-2888, 2405-2915, 2426-3079, 2427-2938, 2579-2952, 2597-3052, 2669-2909, 2669-3073, 2669-3105, 2685-6060, 2693-2781, 2693-2982, 2835-3660, 2853-3660, 2906-3035, 2916-3182, 2945-3690, 3118-3697, 3132-3419, 3195-3749, 3221-3914, 3233-4042, 3255-3485, 3341-3322, 3342-4072, 3363-3807, 3404-4075, 3432-3978, 3432-4278, 3533-3703, 3534-3770, 3534-4124, 3613-4229, 3657-4100, 3714-4160, 3771-4399, 3776-4470, 3857-4462, 3885-4353, 3903-4549, 3937-4467, 3957-4576, 3987-4353, 3987-4603, 4028-4738, 4039-4589, 4075-4381, 4137-4695, 4146-4402, 4146-4630, 4146-4657, 4146-4658, 4146-4689, 4146-4694, 4146-4697, 4146-4702, 4146-4724, 4146-4743, 4159-4657, 4167-4574, 4235-4738, 4291-4955, 4318-4937, 4327-4787, 4341-4448, 4355-4926, 4432-4951, 4464-5228, 4521-5153, 4533-5098, 4570-5150, 4572-5150, 4639-5385, 4641-5194, 4684-5460, 4731-5133, 4731-5314, 4731-5372, 4743-5268, 4778-4994, 4800-5557, 4810-5332, 4810-5437, 4810-5440, 4814-5298, 4829-5075, 4834-5074, 4834-5124, 4835-5468, 4845-5385, 4849-5474, 4852-5160, 4884-5384, 4884-5419, 4884-5443, 4884-5523, 4898-5509, 4915-5454, 4916-5444, 4928-5145, 4929-5170, 4943-5563, 4946-5570, 4951-5572, 4958-5622, 4961-5674, 4963-5527, 4982-5609, 4987-5582, 4997-5254, 5002-5139, 5014-5664, 5016-5660, 5018-5600, 5020-5640, 5027-5324, 5041-5750, 5046-5553, 5049-5649, 5050-5675, 5060-5533, 5060-5558, 5066-5099, 5067-5317, 5067-5697, 5070-5560, 5070-5566, 5070-5629, 5076-5500, 5083-5322, 5083-5375, 5087-5540, 5098-5629, 5101-5660, 5102-5203, 5107-5680, 5110-5677, 5110-5700, 5113-5511, 5116-5393, 5117-5698, 5123-5512, 5128-5309, 5131-5620, 5131-5824, 5131-5838, 5148-5693, 5161-5419, 5165-5671, 5167-5497, 5168-5782, 5172-5569, 5174-5382, 5178-5662, 5201-5320, 5201-5447, 5201-5494, 5201-5787, 5207-5836, 5211-5771, 5215-5590, 5219-5706, 5234-5308, 5236-5756, 5242-5784, 5257-5836, 5265-5436, 5265-5647, 5282-5947, 5290-5569, 5290-5604, 5307-5424, 5307-5924, 5312-5749, 5316-5554, 5316-5572, 5316-5583, 5316-5600, 5316-5602, 5316-5611, 5326-5902, 5334-5589, 5336-5602, 5355-5648, 5357-5978, 5360-5649, 5364-5675, 5365-5746, 5376-5940, 5391-5674, 5392-5969, 5392-6035, 5393-6047, 5402-5639, 5410-5660, 5415-6039, 5417-6019, 5424-5715, 5425-5991, 5426-5905, 5434-6072, 5435-6040, 5445-5637, 5447-6050, 5447-6051, 5451-6066, 5859-6119

【表 4 - 6】

表 4-6

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
29/7500938CBI/11	1-237, 1-557, 1-1073, 2-332, 4-240, 4-252, 4-271, 4-305, 8-224, 9-486, 12-344, 16-281, 18-272, 21-287, 26-317, 27-291, 27-422, 27-510, 28-276, 28-297, 28-539, 29-248, 29-277, 29-488, 29-557, 30-585, 32-308, 32-557, 34-128, 34-286, 34-308, 34-316, 34-455, 37-346, 37-413, 37-424, 37-501, 37-511, 37-556, 37-557, 38-274, 38-282, 38-298, 38-337, 39-287, 39-313, 40-280, 40-282, 40-292, 40-313, 40-378, 41-285, 41-292, 42-271, 42-296, 42-355, 42-557, 43-301, 43-320, 43-321, 43-327, 43-350, 43-463, 43-554, 44-225, 44-255, 44-276, 44-280, 44-282, 44-288, 44-294, 44-300, 44-317, 44-331, 44-344, 44-357, 44-516, 45-291, 45-305, 47-311, 47-313, 48-286, 48-305, 48-321, 48-481, 49-263, 49-298, 49-299, 49-302, 49-324, 50-225, 50-244, 50-282, 50-284, 50-286, 50-293, 50-300, 50-306, 50-309, 50-315, 50-319, 50-331, 50-343, 50-357, 50-428, 50-518, 50-557, 52-314, 52-322, 52-339, 52-557, 54-283, 54-300, 54-325, 54-335, 54-338, 55-230, 55-311, 55-349, 55-479, 55-557, 56-302, 56-374, 57-292, 57-304, 57-305, 57-352, 57-382, 57-384, 57-557, 57-575, 58-294, 58-455, 61-278, 62-286, 63-300, 63-358, 63-373, 64-185, 64-297, 64-310, 65-557, 67-192, 67-197, 67-208, 67-281, 67-303, 67-326, 67-377, 68-324, 68-327, 70-317, 74-332, 75-316, 75-334, 75-345, 79-399, 81-391, 83-281, 83-515, 84-353, 90-329, 90-343, 90-557, 92-358, 96-329, 96-339, 96-346, 96-546, 97-557, 121-415, 122-353, 122-368, 123-358, 128-380, 152-327, 156-399, 169-390, 171-425, 179-515, 210-404, 211-514, 212-508, 224-484, 226-469, 246-494, 246-504, 259-484, 259-497, 259-506, 265-506, 265-536, 266-498, 269-540, 269-544, 270-538, 274-550, 274-559, 277-500, 281-486, 290-533, 297-519, 297-557, 301-518, 306-548, 309-517, 316-557, 337-554, 347-557, 356-546, 368-503, 376-546, 399-534, 556-781, 557-723, 557-767, 557-768, 557-776, 557-787, 557-795, 557-797, 557-808, 557-809, 557-810, 557-986, 557-1050, 557-1112, 560-1032, 562-800, 574-755, 578-835, 578-1095, 590-846, 594-840, 599-847, 600-822, 602-852, 603-850, 603-872, 606-849, 606-878, 606-888, 610-895, 611-835, 611-893, 618-804, 618-819, 618-885, 618-888, 618-898, 624-913, 627-883, 629-856, 629-901, 630-924, 634-890, 638-740, 638-841, 638-876, 656-924, 660-923, 661-907, 663-926, 665-811, 665-984, 666-884, 666-890, 666-904, 666-1084, 667-911, 670-859, 672-798, 672-1142, 674-907, 674-916, 675-910, 675-935, 679-935, 681-1061, 682-933, 687-1084, 696-1007, 696-1071, 700-860, 700-980, 713-1007, 716-979, 716-1147, 725-794, 729-791, 741-956, 742-1012, 744-814, 748-983, 750-1071, 755-993, 755-998, 755-1019, 764-1030, 771-1046, 775-993, 778-1004, 778-1013, 779-1055, 779-1073, 791-1072, 792-1017, 793-1078, 794-1036, 796-1016, 796-1090, 797-907, 797-1044, 797-1076, 799-1052, 803-1013, 803-1064, 811-1082, 814-985, 814-1088, 816-1044, 825-1074, 834-1006, 836-1082, 857-1076, 859-1085, 868-1127, 884-1086, 893-987, 899-1151, 901-1048, 901-1144, 921-1135, 944-1083
30/90055441CBI/1277	1-670, 93-700, 346-639, 407-819, 407-1016, 407-1089, 407-1141, 407-1192, 407-1277, 408-1097, 408-1199, 408-1273, 408-1276, 408-1277, 415-1277, 496-1277

10

20

30

40

【表 4 - 7】

表 4-7

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
31/7500936CBI/10 41	1-217, 1-1036, 19-255, 24-290, 26-310, 30-255, 30-296, 37-218, 43-218, 51-504, 51-505, 89-352, 132-385, 219-355, 224-815, 230-1013, 234-871, 236-555, 238-851, 241-553, 244-883, 249-883, 251-386, 253-529, 258-527, 261-545, 262-540, 262-859, 266-919, 267-724, 270-738, 288-544, 288-577, 288-905, 295-594, 296-557, 301-569, 302-552, 305-549, 305-608, 308-551, 311-820, 311-905, 311-923, 312-565, 313-538, 313-539, 314-986, 318-709, 333-632, 338-1038, 343-547, 349-575, 349-588, 349-607, 349-670, 350-605, 355-611, 363-810, 364-614, 366-932, 369-606, 370-947, 370-1004, 376-625, 376-981, 378-637, 380-668, 382-530, 382-626, 382-979, 384-615, 384-659, 385-644, 412-990, 413-626, 414-955, 416-978, 419-697, 419-709, 420-657, 425-664, 426-668, 426-688, 427-691, 427-1023, 435-634, 435-924, 436-643, 436-689, 436-760, 438-1032, 445-626, 445-670, 448-742, 450-716, 450-841, 451-993, 455-688, 455-766, 461-765, 464-763, 464-771, 468-575, 468-697, 468-712, 468-735, 469-776, 471-755, 472-717, 472-731, 476-717, 476-756, 476-757, 481-739, 481-1041, 483-978, 484-988, 488-703, 488-947, 488-950, 491-683, 492-756, 493-611, 493-613, 496-758, 496-771, 496-949, 496-1041, 497-772, 498-686, 498-730, 498-1013, 502-739, 506-773, 515-760, 518-731, 520-744, 520-750, 523-995, 525-763, 537-718, 541-798, 541-1041, 553-809, 557-803, 562-810, 563-785, 565-815, 566-813, 569-812, 569-841, 569-851, 573-858, 574-798, 574-856, 581-767, 581-848, 587-876, 590-846, 592-819, 593-887, 601-703, 601-804, 601-839, 619-887, 623-886, 624-870, 628-774, 628-947, 629-867, 629-1041, 630-874, 635-761, 638-873, 638-898, 642-898, 645-896, 650-1041, 659-970, 659-1034, 663-943, 679-1041, 688-757, 692-754, 704-919, 707-777, 711-946, 713-1034, 741-976, 756-1041
32/7500950CBI/27 45	1-337, 1-2589, 205-859, 233-376, 245-801, 290-1226, 291-1009, 299-1087, 301-464, 306-975, 329-768, 378-514, 401-1058, 414-1115, 446-963, 449-1061, 461-1149, 467-956, 484-943, 490-1081, 528-814, 541-1239, 574-1165, 582-1189, 585-973, 602-902, 606-1267, 608-1145, 619-1129, 622-1263, 625-802, 637-910, 653-1227, 657-1193, 663-1262, 673-1381, 681-1069, 695-1285, 697-1165, 708-1089, 710-945, 710-1207, 748-1293, 753-1360, 758-1336, 768-1089, 773-1407, 781-1521, 788-1336, 804-1301, 854-1495, 877-1356, 925-1605, 1004-1227, 1201-2087, 1377-2195, 1419-2098, 1441-2204, 1460-1991, 1487-2116, 1512-2118, 1521-2168, 1524-2069, 1531-2151, 1541-2195, 1544-2190, 1547-2212, 1548-2043, 1558-2049, 1562-2239, 1576-2157, 1579-2201, 1583-2199, 1608-2087, 1608-2117, 1615-2280, 1637-1912, 1649-2089, 1650-1939, 1651-1884, 1651-2302, 1662-2311, 1692-2001, 1716-1959, 1739-2040, 1783-1991, 1796-2206, 1816-2389, 1834-2405, 1855-2539, 1860-2222, 1877-2329, 1888-2220, 1903-2426, 1906-2204, 1936-2224, 1954-2387, 1976-2539, 1989-2511, 1991-2451, 1993-2266, 2006-2575, 2018-2589, 2048-2547, 2059-2538, 2075-2601, 2079-2294, 2090-2427, 2153-2397, 2159-2299, 2162-2425, 2162-2429, 2171-2454, 2176-2299, 2180-2741, 2184-2650, 2235-2461, 2327-2535, 2476-2745
33/7500854CBI/62 7	1-191, 1-224, 1-239, 1-242, 1-253, 1-264, 1-268, 1-270, 1-278, 1-290, 1-292, 1-295, 1-344, 1-574, 2-250, 2-265, 3-237, 3-242, 7-279, 8-244, 11-265, 13-277, 28-270, 45-330, 47-308, 56-318, 56-342, 57-276, 60-308, 67-268, 103-344, 105-340, 109-233, 120-571, 344-583, 349-591, 363-587, 363-593, 372-595, 376-582, 384-627, 421-571, 432-569, 440-619, 479-571, 495-618, 507-571

10

20

30

40

【表 4 - 8】

表 4-8

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
34/2754176CB1/58	1-641, 61-616, 129-674, 456-815, 628-1074, 778-1369, 858-1096, 858-1464, 1070-1367, 1102-1255, 1333-1445, 1333-1808, 1333-1920, 1333-1922, 1333-1939, 1333-1945, 1333-1960, 1336-1820, 1375-1910, 1402-1626, 1402-1834, 1415-1785, 1484-1935, 1507-2017, 1530-2002, 1639-1820, 1639-2125, 1673-2152, 1701-2292, 1757-1984, 1772-1993, 1801-2272, 1805-2372, 1810-1969, 1826-2042, 1844-2390, 1845-2092, 1894-2439, 1912-2135, 1928-2107, 1950-2366, 1957-2492, 1984-2626, 2012-2198, 2019-2477, 2034-2335, 2080-2254, 2118-2592, 2120-2720, 2205-2746, 2235-2328, 2263-2748, 2292-2507, 2331-2533, 2344-2742, 2347-2591, 2515-2719, 2523-2819, 2523-2967, 2523-3058, 2644-2991, 2647-3117, 2647-3138, 2663-2897, 2810-3302, 2830-3331, 2946-3312, 2981-3244, 2986-3189, 2989-3511, 3010-3163, 3023-3297, 3040-3314, 3074-3643, 3123-3393, 3146-3430, 3147-3419, 3202-3440, 3202-3759, 3234-3465, 3278-3485, 3318-3912, 3470-3679, 3476-4112, 3484-3741, 3485-4009, 3533-3767, 3571-3815, 3573-4021, 3584-4013, 3664-3934, 3669-3883, 3698-3960, 3755-4014, 3759-3992, 3773-4042, 3787-4129, 3824-4135, 3835-4238, 3850-4500, 3872-4144, 3924-4159, 3940-4129, 3980-4233, 4016-4508, 4027-4517, 4037-4508, 4040-4476, 4052-4327, 4086-4347, 4086-4570, 4089-4362, 4093-4476, 4094-4508, 4096-4508, 4105-4516, 4105-4517, 4138-4374, 4138-4509, 4143-4493, 4160-4511, 4218-4510, 4221-4533, 4270-4870, 4279-4478, 4279-4510, 4308-4651, 4312-4579, 4443-4988, 4462-5061, 4620-4894, 4731-4984, 4764-5017, 4764-5034, 4764-5341, 4770-5066, 4846-5111, 4887-5467, 5080-5693, 5169-5403, 5224-5422, 5233-5495, 5326-5580, 5326-5857, 5393-5658, 5393-5663, 5419-5696, 5444-5898, 5638-5899
35/7503408CB1/15	1-255, 1-284, 4-381, 6-1524, 20-275, 47-267, 47-331, 49-318, 67-236, 67-302, 91-281, 91-360, 116-471, 145-389, 160-410, 161-441, 172-388, 187-499, 204-477, 283-503, 455-706, 463-716, 463-927, 470-761, 504-1107, 509-878, 511-1043, 518-1202, 519-815, 519-1176, 520-943, 520-1112, 521-744, 521-744, 521-757, 529-992, 530-1022, 536-809, 536-1158, 538-919, 540-933, 545-1190, 567-1037, 569-822, 571-1055, 572-1478, 585-812, 586-867, 587-1154, 588-1328, 589-908, 595-836, 622-877, 629-1154, 630-837, 630-1084, 630-1154, 640-864, 651-955, 653-911, 659-1112, 660-1136, 661-924, 663-1314, 665-1277, 667-910, 669-924, 672-963, 673-939, 676-758, 676-1380, 677-949, 677-1247, 680-1309, 686-982, 686-1233, 693-1356, 697-962, 697-1070, 699-1398, 715-1415, 719-1018, 727-1535, 729-1044, 731-1010, 736-1271, 736-1291, 752-1522, 753-1024, 754-1179, 756-1291, 756-1354, 757-1242, 769-1514, 775-867, 791-1017, 791-1358, 796-1033, 803-1382, 809-1453, 820-1380, 821-1087, 822-1137, 829-1469, 831-1091, 834-1142, 839-1112, 859-1143, 842-1094, 844-1421, 844-1463, 845-1122, 845-1366, 847-1281, 853-1115, 857-1385, 859-1000, 859-1089, 861-1036, 865-1494, 874-1140, 874-1261, 874-1506, 877-1519, 886-1540, 887-1469, 888-1100, 892-1477, 892-1536, 894-1539, 896-1153, 897-1542, 902-1189, 902-1190, 913-1527, 917-1510, 923-1202, 924-1510, 930-1201, 930-1477, 935-1537, 939-1277, 944-1172, 950-1104, 961-1262, 962-1246, 965-1519, 967-1251, 967-1314, 974-1513, 987-1271, 992-1315, 1011-1259, 1012-1139, 1024-1539, 1029-1254, 1029-1366, 1029-1514, 1031-1540, 1032-1297, 1038-1530, 1055-1525, 1058-1525, 1067-1530, 1077-1527, 1078-1527, 1081-1528, 1097-1542, 1100-1540, 1102-1452, 1108-1158, 1180-1473, 1209-1539, 1209-1542, 1286-1527, 1326-1527, 1398-1542

10

20

30

40

【表 4 - 9】

表 4-9

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
36/71086982CBI/2 997	1-161, 1-301, 1-336, 10-803, 46-342, 46-840, 54-161, 63-324, 67-787, 69-258, 91-160, 159-270, 160-391, 190-840, 221-594, 265-431, 268-1076, 310-764, 310-1014, 311-795, 312-1053, 320-1089, 343-1095, 381-637, 381-946, 423-958, 425-1085, 470-1083, 535-618, 541-669, 541-813, 541-825, 541-989, 566-1194, 585-1141, 589-1229, 618-1370, 635-1225, 660-853, 690-1157, 707-1001, 713-929, 717-1249, 726-943, 726-1248, 737-1017, 743-904, 749-1013, 749-1020, 768-1047, 780-1025, 780-1193, 801-1338, 809-1363, 820-1064, 845-1093, 1095-1790, 1203-1775, 1231-1849, 1236-1693, 1273-1921, 1274-1543, 1281-1898, 1284-1944, 1292-1865, 1302-1844, 1302-1908, 1316-1965, 1319-1868, 1320-1665, 1321-1775, 1324-1952, 1328-1964, 1329-1912, 1340-1493, 1346-2005, 1347-1966, 1357-1577, 1359-1602, 1366-1948, 1372-1592, 1382-1638, 1408-1790, 1412-1898, 1416-1712, 1419-2016, 1430-1627, 1464-1804, 1506-2025, 1529-1927, 1555-2076, 1562-2119, 1566-2177, 1580-1868, 1591-2184, 1594-2089, 1596-2183, 1597-2131, 1597-2177, 1618-1806, 1619-2191, 1622-1887, 1626-1894, 1628-1906, 1630-1904, 1630-2138, 1630-2193, 1640-1874, 1640-2360, 1644-2224, 1645-1821, 1645-2153, 1645-2226, 1660-1940, 1671-1913, 1674-2217, 1676-1977, 1677-2310, 1687-1874, 1694-1889, 1715-2226, 1730-2270, 1739-2332, 1745-1908, 1748-2217, 1771-2094, 1772-2224, 1775-2203, 1776-2317, 1786-2195, 1791-2036, 1792-2095, 1792-2341, 1793-2309, 1796-2277, 1802-2203, 1802-2205, 1802-2213, 1805-2325, 1820-1894, 1827-2181, 1831-2219, 1837-2212, 1842-2221, 1843-2093, 1847-2180, 1853-2462, 1877-2102, 1904-2110, 1906-2198, 1927-2228, 1951-2188, 1957-2214, 2190-2778, 2552-2997, 2587-2837, 2616-2934, 2630-2909, 2720-2997
37/7506367CBI/33 83	1-3383, 69-258, 660-1427, 869-1785, 1197-1785, 1347-1437, 1347-1501, 1347-1696, 1347-1762, 1347-1767, 1347-1769, 1347-1874, 1350-1721, 1355-1598, 1359-1931, 1364-1656, 1365-1760, 1387-2005, 1429-2077, 1430-1699, 1437-2054, 1438-1476, 1440-2100, 1448-2021, 1454-1922, 1458-2000, 1458-2064, 1472-2121, 1475-2024, 1476-1821, 1477-1931, 1477-2004, 1480-2108, 1484-2120, 1485-2068, 1496-1649, 1502-2161, 1503-2122, 1513-1733, 1515-1758, 1522-2104, 1528-1748, 1538-1794, 1548-1957, 1564-1946, 1568-2054, 1571-2259, 1572-1868, 1575-2172, 1586-1783, 1620-1960, 1662-2181, 1685-2083, 1711-2232, 1718-2275, 1718-2275, 1722-2333, 1736-2024, 1747-2299, 1747-2340, 1750-2245, 1752-2339, 1753-2287, 1753-2333, 1774-1962, 1775-2347, 1778-2043, 1782-2050, 1784-2062, 1786-2060, 1786-2294, 1786-2349, 1793-2153, 1796-2030, 1796-2515, 1800-2380, 1801-1977, 1801-2309, 1801-2382, 1816-2096, 1827-2069, 1830-2373, 1832-2133, 1833-2466, 1843-2030, 1850-2045, 1871-2382, 1878-2460, 1886-2426, 1895-2487, 1904-2373, 1927-2250, 1928-2380, 1931-2359, 1932-2473, 1942-2351, 1947-2192, 1948-2251, 1948-2496, 1949-2465, 1952-2433, 1958-2361, 1961-2481, 1976-2050, 1983-2337, 2009-2616, 2062-2354, 2083-2384, 2107-2344, 2244-2751, 2346-2931, 2349-3031, 2367-3104, 2376-3123, 2387-3221, 2407-3282, 2419-3063, 2437-3012, 2472-3048, 2537-3107, 2537-3114, 2542-3219, 2547-3126, 2549-3205, 2554-3081, 2558-3066, 2565-3254, 2578-3142, 2580-3229, 2619-3271, 2630-3300, 2633-3102, 2633-3254, 2639-3248, 2643-3252, 2644-3200, 2645-3124, 2655-3185, 2655-3379, 2659-3255, 2663-3295, 2674-3338, 2679-3383, 2685-3327, 2699-3184, 2732-3189, 2740-2990, 2755-3262, 2761-3216, 2769-3087, 2783-3062, 2873-3150

10

20

30

40

【表 4 - 1 0】

表 4-10

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
38/1414020CB1/37	1-309, 16-225, 55-722, 71-663, 82-681, 152-737, 201-748, 225-530, 306-844, 627-1123, 852-1461, 942-1469, 976-1201, 1117-1717, 1365-1947, 1833-2310, 1984-2205, 1994-2336, 2026-2721, 2027-2377, 2132-2550, 2147-2894, 2267-2504, 2300-2570, 2300-2572, 2339-2786, 2358-2611, 2358-2865, 2411-2862, 2442-2950, 2455-2795, 2458-2743, 2483-2756, 2488-3004, 2494-3152, 2496-2759, 2499-3151, 2500-2792, 2502-3182, 2517-2777, 2522-2812, 2522-2815, 2522-2825, 2541-2784, 2541-3024, 2541-3152, 2548-2824, 2557-2622, 2567-3111, 2572-2854, 2572-2855, 2574-2994, 2599-3296, 2604-3242, 2612-3152, 2623-2861, 2624-2898, 2627-2769, 2646-3243, 2669-3287, 2683-3316, 2683-3317, 2724-3298, 2738-3072, 2749-2952, 2756-2971, 2756-3310, 2761-3388, 2770-3398, 2770-3431, 2791-3051, 2792-2990, 2793-3409, 2800-3277, 2800-3283, 2811-3255, 2821-3364, 2830-3391, 2835-3444, 2841-3051, 2844-3519, 2858-3153, 2869-3439, 2869-3555, 2871-3123, 2871-3286, 2871-3414, 2879-3557, 2892-3511, 2923-3473, 2925-3294, 2936-3225, 2941-3176, 2947-3466, 2948-3194, 2967-3241, 2992-3515, 2999-3649, 3006-3222, 3006-3550, 3015-3511, 3017-3728, 3034-3533, 3038-3503, 3047-3551, 3053-3537, 3069-3715, 3071-3731, 3086-3728, 3095-3728, 3098-3351, 3102-3739, 3105-3326, 3109-3724, 3110-3763, 3125-3739, 3141-3375, 3141-3567, 3141-3735, 3141-3743, 3142-3399, 3142-3626, 3142-3672, 3144-3711, 3144-3763, 3152-3756, 3155-3731, 3195-3513, 3196-3421, 3196-3764, 3209-3467, 3259-3606, 3264-3553, 3268-3761, 3279-3761, 3308-3789, 3320-3553, 3342-3581, 3348-3545, 3388-3757, 3474-3717
39/7621128CB1/41	1-294, 209-711, 215-462, 215-721, 215-727, 215-781, 215-800, 215-801, 215-817, 215-828, 215-863, 215-876, 215-883, 215-902, 215-941, 232-477, 232-768, 239-508, 239-514, 239-800, 239-816, 247-596, 295-508, 295-526, 295-548, 295-606, 314-1056, 321-1059, 334-870, 339-978, 385-909, 403-1047, 414-700, 417-1046, 426-1034, 524-1139, 535-993, 549-1256, 592-1023, 640-1188, 688-1265, 725-1464, 735-2360, 736-1470, 749-1642, 750-1300, 761-1639, 780-1642, 806-1642, 879-1642, 881-1451, 949-1642, 960-1405, 1018-1475, 1040-1274, 1040-1315, 1040-1317, 1042-1446, 1092-1475, 1108-1475, 1114-1475, 1165-1475, 1230-1475, 1240-1464, 1488-1768, 1555-2112, 1555-2217, 1692-1916, 1711-1907, 2112-2705, 2125-2781, 2179-2944, 2179-2973, 2308-2605, 2308-2851, 2308-2951, 2328-2622, 2361-2920, 2361-2972, 2445-3215, 2487-3025, 2517-2719, 2554-3215, 2724-3379, 2785-3401, 2785-3413, 2790-3329, 2993-3650, 3112-3212, 3384-3888, 3386-3648, 3403-3674, 3525-3748, 3546-4074, 3647-3946, 3672-3985, 3740-3978, 3740-4159, 3815-4174
40/7505822CB1/81	1-263, 3-222, 5-744, 12-248, 12-288, 12-611, 12-655, 12-659, 12-681, 13-312, 25-197, 29-137, 32-464, 35-218, 35-224, 37-238, 37-240, 38-210, 42-255, 44-267, 48-283, 57-262, 57-272, 57-285, 61-285, 64-285, 66-285, 66-316, 82-348, 104-284, 109-219, 149-688, 192-444, 200-416, 209-455, 209-575, 209-741, 225-658, 282-562, 282-750, 282-757, 286-750, 288-687, 288-771, 290-753, 294-766, 302-553, 305-750, 314-748, 334-441, 341-631, 356-751, 364-589, 382-748, 386-748, 390-811, 402-750, 424-757, 426-750, 443-756, 477-732, 477-747, 482-567, 482-756, 503-748, 503-753, 504-755, 512-669, 593-675, 593-686, 633-722

10

20

30

40

【表 4 - 1 1】

表 4-11

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
41/71607945CB1/4	1-518, 36-621, 90-772, 267-589, 284-941, 385-1059, 429-721, 721-981, 721-1219, 773-1105, 822-1387, 958-1335, 976-1508, 1032-1294, 1043-1571, 1069-1728, 1085-1550, 1090-1796, 1182-1210, 1183-1838, 1196-1746, 1215-1827, 1221-1854, 1260-1792, 1277-1847, 1283-1834, 1287-1938, 1309-1892, 1398-1811, 1412-2018, 1417-1844, 1429-1970, 1443-2064, 1453-2104, 1461-2098, 1469-1986, 1478-1989, 1478-1994, 1503-2117, 1557-1840, 1606-2051, 1624-2253, 1635-2349, 1771-2370, 1800-2303, 1826-2263, 1861-2356, 1875-2430, 1890-2108, 1939-2357, 1946-2555, 1954-2396, 1960-2500, 1968-2269, 2043-2629, 2046-2692, 2119-2722, 2194-2483, 2345-3051, 2386-2629, 2386-2891, 2464-2960, 2488-2765, 2491-2693, 2491-3211, 2497-3121, 2550-2858, 2550-3067, 2552-3121, 2558-3258, 2583-3119, 2590-2828, 2600-3327, 2606-3327, 2621-2871, 2644-3227, 2653-3367, 2655-2952, 2662-3335, 2666-3184, 2718-3212, 2810-3482, 2825-3380, 2827-3485, 2847-3444, 2884-3463, 2889-3452, 2930-3497, 2947-3450, 3017-3609, 3049-3641, 3056-3546, 3056-3716, 3060-3609, 3061-3719, 3064-3526, 3081-3125, 3082-3245, 3082-3246, 3083-3585, 3095-3325, 3110-3354, 3110-3579, 3116-3718, 3118-3388, 3118-3391, 3121-3337, 3127-3354, 3134-3381, 3135-3691, 3149-3702, 3154-3409, 3164-3897, 3180-3410, 3183-3917, 3210-3892, 3226-3383, 3250-3874, 3268-3930, 3300-3589, 3385-3897, 3386-4105, 3395-3984, 3458-4033, 3512-3775, 3517-3817, 3528-3794, 3559-4188, 3566-3828, 3572-3821, 3573-3828, 3581-3827, 3600-4077, 3608-3852, 3608-3858, 3608-4147, 3608-4183, 3615-3834, 3621-3890, 3646-3903, 3671-3917, 3693-4312, 3722-4214, 3726-4368, 3728-3979, 3730-4410, 3790-4340, 3793-4015, 3793-4037, 3856-4406, 3861-4115, 3865-4136, 3873-4116, 3890-4122, 3908-4373, 3921-4189, 3928-4171, 3928-4176, 3928-4188, 3928-4340, 3928-4387, 3972-4224, 3984-4250, 3997-4430, 4023-4255, 4072-4378, 4087-4330, 4098-4415, 4128-4430, 4132-4430, 4133-4429, 4136-4430, 4205-4368, 4207-4430, 4208-4429, 4217-4420, 4225-4412
42/7505777CB1/12	1-237, 1-238, 1-1216, 3-280, 142-669, 142-713, 368-914, 441-1138, 488-1144, 511-1138, 542-884, 551-1087, 552-884, 616-1001, 677-934, 677-982, 765-1059, 781-969, 781-1216, 800-1061, 822-1094, 822-1099, 822-1101, 865-1065, 905-1030
43/7505818CB1/12	1-234, 1-1266, 60-315, 66-300, 138-705, 155-399, 156-1134, 202-797, 217-1134, 227-501, 231-1134, 235-796, 236-1134, 250-803, 257-1133, 271-786, 291-476, 323-825, 325-1134, 374-705, 385-929, 475-741, 475-850, 482-741, 509-765, 509-1159, 521-1005, 561-1192, 756-1013, 841-1216, 841-1252, 853-1252, 856-1252, 861-1250, 863-1251, 868-1269, 873-1267, 903-1251, 931-1181, 931-1266, 1022-1240, 1025-1253, 1040-1253, 1065-1267, 1092-1225, 1140-1250
44/7505821CB1/14	1-705, 1-848, 1-1350, 74-518, 219-786, 236-480, 237-1218, 283-916, 308-582, 316-877, 331-884, 352-867, 404-906, 406-1218, 455-786, 466-1013, 556-822, 556-1097, 563-822, 590-846, 590-1243, 832-1143, 1015-1349, 1050-1324, 1109-1336, 1124-1336, 1149-1423, 1176-1309, 1217-1334
45/7506685CB1/28	1-2864, 46-258, 69-258, 831-1283, 1041-1130, 1041-1355, 1045-1427, 1067-1264, 1725-2231, 1901-2544, 2017-2588, 2029-2686, 2099-2752, 2113-2583, 2165-2437, 2264-2543, 2269-2619

表 4-12

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
46/7500933CBI/10 25	1-237, 1-1025, 2-332, 4-240, 4-252, 4-271, 4-305, 8-224, 9-486, 12-344, 16-281, 18-272, 21-287, 26-317, 27-291, 27-422, 27-510, 28-276, 28-297, 28-539, 29-248, 29-277, 29-488, 32-308, 34-128, 34-286, 34-308, 34-316, 34-455, 37-346, 37-374, 37-377, 37-413, 37-424, 37-498, 37-501, 37-511, 37-544, 38-274, 38-282, 38-298, 38-337, 39-287, 39-313, 40-280, 40-282, 40-292, 40-313, 40-378, 41-285, 41-287, 42-271, 42-296, 42-355, 43-301, 43-320, 43-321, 43-327, 43-350, 43-463, 43-544, 44-225, 44-255, 44-276, 44-280, 44-282, 44-288, 44-294, 44-300, 44-317, 44-331, 44-344, 44-357, 44-516, 45-291, 45-305, 47-311, 47-313, 48-286, 48-305, 48-321, 48-481, 49-263, 49-298, 49-299, 49-302, 49-324, 50-225, 50-244, 50-264, 50-282, 50-284, 50-286, 50-293, 50-300, 50-306, 50-309, 50-315, 50-319, 50-331, 50-343, 50-357, 50-428, 50-518, 50-544, 52-314, 52-322, 52-339, 52-544, 54-283, 54-300, 54-325, 54-335, 54-338, 55-230, 55-311, 55-349, 55-479, 56-302, 56-374, 57-292, 57-304, 57-305, 57-352, 57-382, 57-384, 57-544, 58-294, 58-455, 61-278, 62-286, 63-300, 63-358, 63-373, 64-185, 64-297, 64-310, 65-544, 67-192, 67-197, 67-208, 67-281, 67-303, 67-326, 67-377, 68-324, 68-327, 70-317, 74-332, 75-316, 75-345, 79-399, 81-391, 83-281, 83-515, 84-353, 90-329, 90-343, 92-358, 96-329, 96-339, 96-544, 97-544, 121-415, 122-353, 122-368, 123-361, 128-380, 152-327, 156-399, 158-412, 159-415, 168-413, 169-390, 171-425, 179-515, 210-404, 211-514, 212-508, 224-484, 226-469, 233-393, 246-494, 246-504, 259-484, 259-497, 259-506, 265-506, 265-536, 266-498, 269-540, 269-544, 270-538, 274-544, 277-500, 281-486, 290-533, 297-519, 297-544, 301-518, 304-544, 306-544, 308-455, 309-517, 316-544, 337-544, 356-544, 368-503, 376-541, 399-534, 464-703, 535-707, 535-720, 535-733, 535-739, 535-749, 535-752, 535-787, 535-984, 535-1025, 542-798, 546-792, 551-799, 551-915, 552-774, 554-804, 555-802, 555-824, 558-801, 558-830, 558-840, 562-847, 563-787, 563-845, 570-756, 570-771, 570-837, 570-840, 570-850, 576-865, 579-835, 581-808, 581-853, 582-876, 586-842, 590-692, 590-793, 590-828, 608-876, 612-875, 613-859, 615-878, 617-763, 617-936, 618-836, 618-842, 618-856, 618-1020, 619-863, 622-811, 624-750, 624-1014, 626-859, 626-868, 627-862, 627-887, 631-887, 633-1013, 634-885, 639-1025, 648-959, 648-1023, 652-812, 652-932, 665-959, 668-931, 668-1023, 677-746, 681-743, 693-908, 694-964, 696-766, 700-935, 702-1023, 707-945, 707-950, 707-971, 716-982, 723-998, 727-945, 730-956, 730-965, 731-1007, 731-1025, 743-1024, 744-969, 745-1025, 746-988, 748-968, 748-1025, 749-859, 749-996, 749-1025, 751-1004, 755-965, 755-1016, 763-1013, 766-937, 766-1025, 768-996, 777-1025, 786-958, 788-1025, 809-1025, 811-1025, 820-1025, 836-1025, 845-939, 851-1025, 853-1000, 853-1025, 873-1025, 896-1025
47/7389203CBI/30 48	1-547, 1-551, 1-636, 1-828, 1-2531, 76-537, 106-758, 373-1008, 379-554, 421-758, 445-1008, 894-1580, 950-1580, 985-1091, 1209-1549, 1216-1588, 1217-1558, 1235-1584, 1273-1591, 1371-1677, 1461-1588, 1582-1823, 1582-2001, 1582-2071, 1588-1696, 1588-2014, 1592-2194, 1592-2313, 1627-2061, 1627-2479, 1631-1867, 1709-2539, 1777-2555, 1777-2577, 1856-2728, 1933-2800, 1933-2816, 2113-3048, 2154-2974, 2211-2789, 2305-2986, 2324-2905, 2391-2799, 2401-2820, 2404-2801, 2411-2905

10

20

30

40

【表 4 - 1 3】

表 4-13

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
48/7506268CBI/12 99	1-222, 10-221, 16-221, 17-278, 17-542, 17-713, 24-1289, 36-221, 38-222, 39-208, 39-222, 41-163, 53-222, 62-132, 74-222, 81-222, 88-217, 222-436, 222-457, 222-463, 222-471, 222-475, 222-486, 222-501, 222-531, 222-705, 222-720, 222-856, 226-488, 228-476, 228-721, 228-831, 228-890, 233-527, 236-496, 240-546, 241-458, 243-490, 248-546, 256-553, 257-495, 257-619, 262-525, 263-849, 268-502, 268-515, 273-466, 274-881, 277-569, 285-532, 286-540, 288-563, 293-570, 298-412, 298-578, 302-501, 302-546, 302-715, 302-800, 309-531, 309-566, 312-538, 315-607, 319-848, 322-562, 324-566, 330-966, 332-978, 347-621, 347-899, 348-967, 351-595, 352-567, 354-667, 355-983, 356-924, 357-626, 358-618, 360-583, 367-678, 368-839, 375-635, 378-581, 379-622, 379-623, 379-635, 382-567, 384-635, 386-586, 388-681, 391-890, 396-646, 396-887, 404-1028, 405-700, 411-685, 414-668, 418-517, 422-688, 426-1132, 430-645, 430-659, 430-771, 431-705, 432-652, 432-672, 432-725, 432-1017, 433-672, 433-890, 433-917, 433-919, 433-940, 435-887, 436-1033, 437-677, 437-711, 439-924, 443-683, 445-975, 448-731, 450-708, 450-740, 451-687, 459-697, 472-1143, 473-717, 475-713, 475-812, 475-902, 479-726, 486-779, 487-742, 489-787, 493-781, 498-642, 498-725, 498-1186, 502-891, 515-963, 520-835, 521-781, 525-821, 532-1126, 536-791, 536-792, 545-835, 545-978, 546-806, 546-812, 549-1249, 555-745, 571-846, 582-810, 582-870, 583-737, 584-1095, 586-804, 586-811, 586-849, 586-856, 586-869, 586-879, 588-861, 591-852, 594-841, 604-864, 604-1261, 604-1294, 607-805, 607-897, 619-874, 623-1255, 626-895, 632-1130, 636-885, 640-920, 641-891, 652-903, 654-783, 654-978, 658-941, 661-927, 663-825, 664-908, 668-889, 670-1021, 674-1287, 685-806, 704-1285, 709-1030, 725-1094, 735-1287, 744-1014, 746-1287, 761-1233, 766-1291, 769-1294, 775-852, 778-1029, 782-1047, 787-1287, 790-1226, 791-1235, 794-1068, 794-1294, 797-1006, 800-956, 804-1052, 805-1098, 812-1294, 813-1136, 814-1238, 817-1033, 819-1096, 820-967, 820-1063, 822-1076, 823-1083, 833-1064, 834-880, 836-1100, 838-1100, 840-1054, 841-1111, 853-1150, 858-1294, 859-1091, 859-1113, 859-1115, 861-1143, 866-1294, 867-1144, 870-1287, 872-1294, 873-1294, 874-1100, 874-1145, 874-1294, 875-1086, 875-1294, 877-1151, 877-1294, 880-1096, 880-1103, 882-1191, 883-1294, 884-1105, 884-1133, 885-1294, 886-1131, 899-1053, 901-1170, 901-1187, 902-1211, 904-1299, 905-1291, 909-1294, 910-1294, 912-1294, 915-1294, 918-1162, 920-1294, 922-1192, 925-1147, 941-1294, 942-1197, 947-1294, 966-1217, 970-1291, 971-1294, 973-1243, 977-1232, 978-1211, 978-1266, 981-1294, 982-1294, 983-1294, 984-1294, 991-1294, 992-1294, 993-1258, 993-1294, 994-1262, 994-1279, 994-1294, 995-1247, 995-1286, 995-1294, 996-1167, 996-1294, 997-1294, 1000-1283, 1000-1294, 1001-1294, 1002-1294, 1008-1294, 1009-1294, 1014-1294, 1016-1188, 1019-1275, 1028-1244, 1038-1294, 1040-1294, 1050-1294, 1054-1294, 1065-1233, 1069-1294, 1077-1235, 1078-1294, 1091-1294, 1099-1294, 1107-1294, 1108-1294, 1114-1294, 1116-1192, 1125-1294, 1128-1294, 1139-1294, 1142-1294, 1162-1294, 1167-1294, 1179-1203, 1186-1286

10  
20  
30  
40

【表 4 - 1 4】

表 4-14

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列 長	配列断片
49/7509159CBI/31 46	1-259, 1-367, 1-444, 1-534, 1-535, 1-536, 1-542, 2-3146, 3-275, 4-275, 161-824, 169-275, 170-275, 181-275, 189-460, 195-275, 198-418, 199-430, 206-507, 404-547, 563-1015, 563-1028, 563-1153, 600-886, 613-1311, 646-1237, 654-1261, 657-1045, 676-973, 678-1339, 680-1217, 691-1201, 694-1335, 709-982, 725-1299, 731-1265, 735-1334, 753-1141, 767-1357, 769-1237, 780-1161, 782-1017, 782-1279, 802-1384, 820-1365, 825-1432, 830-1408, 840-1161, 848-1409, 860-1408, 860-1518, 876-1373, 903-1557, 905-1449, 916-1505, 919-1456, 930-1496, 939-1535, 948-1653, 949-1428, 960-1377, 965-1518, 989-1507, 992-1536, 1026-1624, 1027-1621, 1043-1752, 1050-1595, 1063-1574, 1065-1226, 1065-1265, 1070-1226, 1076-1226, 1122-1801, 1169-1660, 1174-1793, 1176-1595, 1176-1736, 1178-1466, 1182-1684, 1196-1454, 1202-1664, 1245-1511, 1245-1869, 1302-1801, 1316-1602, 1322-1981, 1323-1509, 1337-1808, 1342-1631, 1343-1694, 1357-1829, 1367-1592, 1412-2007, 1424-1919, 1502-1625, 1522-2100, 1530-1917, 1536-2106, 1539-2396, 1542-2360, 1562-2401, 1563-2401, 1565-2063, 1567-2401, 1570-2074, 1573-2401, 1580-2104, 1580-2122, 1584-2263, 1585-2175, 1598-2401, 1606-2369, 1608-2401, 1612-2401, 1613-2172, 1625-2156, 1644-2142, 1652-2281, 1653-2133, 1669-2172, 1677-2283, 1684-2401, 1686-2333, 1689-2234, 1692-2348, 1696-2210, 1706-2360, 1709-2355, 1712-2377, 1713-2208, 1715-2401, 1720-2401, 1722-2545, 1723-2214, 1727-2404, 1731-2336, 1741-2322, 1744-2366, 1748-2364, 1759-2397, 1773-2252, 1773-2282, 1780-2445, 1797-2343, 1802-2077, 1813-2401, 1814-2098, 1814-2254, 1815-2104, 1815-2135, 1816-2049, 1816-2467, 1819-2305, 1824-2315, 1827-2476, 1829-2503, 1829-2543, 1830-2328, 1834-2299, 1855-2216, 1857-2166, 1864-2098, 1880-1999, 1880-2075, 1881-2124, 1890-2212, 1892-2127, 1892-2145, 1923-2625, 1925-2663, 1932-2606, 1936-2512, 1948-2156, 1961-2371, 1981-2554, 1992-2347, 1997-2145, 1999-2242, 1999-2570, 2005-2743, 2018-2373, 2020-2704, 2025-2387, 2042-2494, 2053-2385, 2068-2591, 2071-2369, 2081-2527, 2101-2389, 2102-2553, 2107-2763, 2110-2642, 2119-2552, 2141-2704, 2146-2789, 2154-2676, 2156-2616, 2158-2431, 2161-2765, 2171-2740, 2183-2754, 2193-2756, 2200-2791, 2205-2789, 2213-2712, 2215-3004, 2224-2703, 2224-2788, 2240-2634, 2244-2459, 2255-2592, 2288-2785, 2294-2782, 2302-2871, 2308-3013, 2318-2562, 2323-3013, 2324-2464, 2327-2594, 2327-2594, 2336-2619, 2339-2789, 2341-2464, 2345-2730, 2348-2490, 2348-2726, 2366-2834, 2377-2701, 2400-2626, 2425-3076, 2487-3130, 2492-2700, 2496-2759, 2500-3146, 2524-3142, 2544-2825, 2546-3136, 2548-2826, 2571-2976, 2571-3146, 2579-3143, 2601-2868, 2616-2860, 2620-3095, 2640-3094, 2641-2830, 2641-2908, 2641-2923, 2641-3132, 2645-2951, 2655-2936, 2658-2936, 2658-2937, 2658-2939, 2658-2941, 2658-2942, 2658-2943, 2658-2948, 2658-2950, 2663-2884, 2673-3133, 2677-3133, 2691-3123, 2699-2953, 2700-3094, 2704-3132, 2709-3133, 2718-3074, 2723-3133, 2725-3094, 2730-3084, 2736-3140, 2739-3146, 2752-3133, 2756-3133, 2757-2915, 2778-3133, 2784-2927, 2784-3132, 2792-3037, 2794-3133, 2809-3030, 2815-3133, 2824-3133, 2850-3130, 2856-3127, 2860-3125, 2861-3094, 2862-3102, 2884-3133, 2938-3132, 2940-3072, 2945-3132, 2966-3131, 3003-3132, 3013-3133, 3021-3146, 3025-3132, 50/7512347CBI/22 38

10

20

30

40

【表 4 - 1 5】

表 4 - 1 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO./ Incyte ID/ 配列長	配列断片
297500938CB1/1151	1-237, 1-557, 1-1073, 2-332, 4-240, 4-252, 4-271, 4-305, 8-224, 9-486, 12-344, 16-281, 18-272, 21-287, 26-317, 27-291, 27-422, 27-510, 28-276, 28-297, 28-539, 29-248, 29-277, 29-488, 29-557, 30-585, 32-308, 32-557, 34-128, 34-286, 34-308, 34-316, 34-455, 37-346, 37-413, 37-424, 37-501, 37-511, 37-556, 37-557, 38-274, 38-282, 38-298, 38-337, 39-287, 39-313, 40-280, 40-282, 40-292, 40-313, 40-378, 41-285, 41-292, 42-271, 42-296, 42-355, 42-557, 43-301, 43-320, 43-321, 43-327, 43-350, 43-463, 43-554, 44-225, 44-255, 44-276, 44-280, 44-282, 44-288, 44-294, 44-300, 44-317, 44-331, 44-344, 44-357, 44-516, 45-291, 45-305, 47-311, 47-313, 48-286, 48-305, 48-321, 48-481, 49-263, 49-298, 49-302, 49-324, 50-225, 50-244, 50-282, 50-284, 50-286, 50-293, 50-300, 50-306, 50-309, 50-315, 50-319, 50-331, 50-343, 50-357, 50-428, 50-518, 50-557, 52-314, 52-322, 52-339, 52-557, 54-283, 54-300, 54-325, 54-335, 54-338, 55-230, 55-311, 55-349, 55-479, 55-557, 56-302, 56-374, 57-292, 57-304, 57-305, 57-352, 57-382, 57-384, 57-65-557, 67-192, 67-197, 67-208, 67-281, 67-303, 67-326, 67-377, 68-324, 68-327, 70-317, 74-332, 75-316, 75-334, 75-345, 79-399, 81-391, 83-281, 83-515, 84-353, 90-329, 90-343, 90-557, 92-358, 96-329, 96-339, 96-346, 96-546, 97-557, 121-415, 122-353, 122-368, 123-358, 128-380, 152-327, 156-399, 169-390, 171-425, 179-515, 210-404, 211-514, 212-508, 224-484, 226-469, 246-494, 246-504, 259-484, 259-497, 259-506, 265-506, 266-498, 269-540, 269-544, 270-538, 274-550, 274-559, 277-500, 281-486, 290-533, 297-519, 297-557, 301-518, 306-548, 309-517, 316-557, 337-554, 347-557, 356-546, 368-503, 376-546, 399-534, 556-781, 557-723, 557-767, 557-768, 557-776, 557-787, 557-795, 557-797, 557-808, 557-809, 557-810, 557-986, 557-1050, 557-1112, 560-1032, 562-800, 574-755, 578-835, 578-1095, 590-846, 594-840, 599-847, 600-822, 602-852, 603-850, 603-872, 606-849, 606-878, 606-888, 610-895, 611-835, 611-893, 618-804, 618-819, 618-885, 618-888, 618-898, 624-913, 627-883, 629-856, 629-901, 630-924, 634-890, 638-740, 638-841, 638-876, 656-924, 660-923, 661-907, 663-926, 665-811, 665-984, 666-884, 666-890, 666-904, 666-1084, 667-911, 670-859, 672-798, 672-1142, 674-907, 674-916, 675-910, 675-935, 679-935, 681-1061, 682-933, 687-1084, 696-1007, 696-1071, 700-860, 700-980, 713-1007, 716-979, 716-1147, 725-794, 729-791, 741-956, 742-1012, 744-814, 748-983, 750-1071, 755-993, 755-998, 755-1019, 764-1030, 771-1046, 775-993, 778-1004, 778-1013, 779-1055, 779-1073, 791-1072, 792-1017, 793-1078, 794-1036, 796-1016, 796-1090, 797-907, 797-1044, 797-1076, 799-1052, 803-1013, 803-1064, 811-1082, 814-985, 814-1088, 816-1044, 825-1074, 834-1006, 836-1082, 857-1076, 859-1085, 868-1127, 884-1086, 893-987, 899-1151, 901-1048, 901-1144, 921-1135, 944-1083
309005544ICB1/ 1277	1-670, 93-700, 346-639, 407-819, 407-1016, 407-1089, 407-1141, 407-1192, 407-1277, 408-1097, 408-1199, 408-1273, 408-1276, 408-1277, 415-1277, 496-1277

10

20

30

40

【表 5】

表 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロセス エクト ID:	代表的ライブラリ
26	7500354CB1	BEPINOT01
27	3871329CB1	DRGCNOT02
28	1681386CB1	FIBPFEN06
29	7500938CB1	BRAITUT21
30	90055441CB1	STOMTDE01
31	7500936CB1	BRAITUT21
32	7500950CB1	EOSITXT01
33	7500854CB1	SCORNON02
34	2754176CB1	ADRENOT08
35	7503408CB1	BRAINOT09
36	71086982CB1	TESTTUT02
37	7506367CB1	CERVNOT01
38	1414020CB1	BRAINOT12
39	7621128CB1	KIDNFET01
40	7505822CB1	LUNGTUT03
41	71607945CB1	BRAINOT11
42	7505777CB1	BMARTXE01
43	7505818CB1	PROSNON01
44	7505821CB1	THP1TXT03
45	7506685CB1	BRAZDIT04
46	7500933CB1	BRAITUT21
47	7389203CB1	LIVRFEE02
48	7506268CB1	MUSCDIN06
49	7509159CB1	LIVRFEA01

10

20

30

40

表 6-1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ADRENOT08	pINCY	ライブラリは頭外傷で死亡した 20 才の白人男性から摘出した副腎組織から単離した RNA を用いて作製した。
BEPINOT01	PSPORT1	ライブラリは 54 才の白人男子に由来する気管支上皮初代細胞株から単離した RNA を用いて作製した。
BMARTXE01	pINCY	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 4 才の白人女子から除去した転移性骨髄神経芽腫由来の処理された SH-SY5Y 細胞から単離した RNA を用いて作製した (Schering AG)。培地は 10% ウシ胎仔血清を含む MEM/HAM'S F12 であった。約 80% コンフルエントに達した後、細胞を 100 マイクロモルの 6 ヒドロキシドパーバミン(6-OHDA) で 8 時間処理した。
BRAINOT09	pINCY	ライブラリは妊娠 23 週で死亡した白人男子胎児から採取した脳組織から単離した RNA を用いて作製された。
BRAINOT11	pINCY	ライブラリは、5 才の白人男子の脳半球切除術時に右側頭葉から摘出された脳組織から単離された RNA を用いて作製された。病理は、慢性癲癇発作に一致する広範囲の多小脳回症 (polymicrogyria) と軽度から中等度の神経膠症(主に、軟膜下、皮質下)を示した。家族歴には子宮頸癌が含まれる。
BRAINOT12	pINCY	ライブラリは 5 才の白人男性の脳半球切除時に右前頭葉から採取した脳組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学検査では、広範囲にわたる多小脳回症 (polymicrogyria) と軽度から中等度に至るグリオーシス(主に柔膜下と皮質膜下)が見られ、これらは慢性発作障害と一致する。家族歴には子宮頸癌が含まれる。
BRAITUT21	pINCY	ライブラリは、61 才の白人女性の脳腫瘍病変の切除時、正中線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。病理検査は、異型を伴わない前頭下髄膜皮髄膜腫 (subfrontal meningothelial meningioma) を示した。1 つの篩骨と粘膜炎組織サンプルは髄膜腫を示した。家族歴には、脳血管疾患、老人性痴呆症、高脂血症、良性の高血圧、アテローム硬化型冠状動脈疾患、鬱血性心不全および乳がんが含まれる。

表 6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRAZDJIT04	pINCY	<p>ライブラリは、転移性腺癌で死亡した 70 才女性から抽出した線糸体および淡蒼球組織から単離した RNA から作製した。病理学検査では、中等度のアルツハイマー病、及び軽い頸動脈と脳のアテローム性動脈硬化症を示した。大脳半球、前頭葉、側頭葉、白質、海馬には、左右に軽度の萎縮が見られた。おびただしい神経原繊維変化、神経突起アミロイド斑およびびまん性アミロイド斑の沈着が、大脳新皮質領域の大部分にあった。びまん性の斑の多くは表層にあり、コアおよび神経突起のアミロイド斑は深部皮質層の方に多かった。繊維濃縮体の多くは大きな錐体ニューロンではなく小さな介在ニューロンに見られた。斑や繊維濃縮体を最も多く含む部位は、内嗅野、側頭皮質および上頭頂葉であった。顕著な表層の空胞化が検査した新皮質領域全体に見られた。海馬には多数の神経原線維変化（主に CA-1 領域内）、びまん性の斑および神経突起斑があり、また、錐体細胞ニューロンに顆粒空胞変性があった。扁桃体内に散在性神経原線維変化を伴う神経突起斑があった。視床には散在性びまん性斑があった。軽度の色素失調症 (pigment incontinence) が黒質緻密部にあった。中脳水道周囲灰白質は軽度のグリオシスを示した。びまん性の斑が上丘内に見られた。神経原線維変化が橋内に見られた。青斑核のニューロンが膨張しており、ごくわずかのニューロメロニン色素を持つ好酸性の泡沫状物質を有していた。</p>
CERVNOT01	PSPORT1	<p>ライブラリは 35 才の白人女性の、掻爬を伴った腔式子宮摘出時の、子宮頸部の組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査は、軽度の慢性子宮頸管炎を示した。家族歴にはアテローム性冠動脈疾患、および II 型糖尿病がある。</p>
DRGCNOT02	pINCY	<p>ライブラリは、急性肺水腫、急性気管支肺炎、双方胸膜滲出、心膜滲出、及び悪性リンパ腫（ナチュラルキラー細胞タイプ）のため死亡した 32 才の白人男性の頸部脊椎から取り除かれた後根神経節組織から単離された RNA を使って作製された。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、肝臓鬱血、脂肪肝、脾臓腫、出血性膀胱炎、甲状腺出血、呼吸不全、左肺の肺炎、咽頭のナチュラルキラー細胞リンパ腫、ベル麻痺、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、アデノイド蓋扁桃摘出、鼻咽腔内視鏡検査および生検等がある。当患者の薬物療法には、Diflucan (fluconazole)、Deltasone (prednisone)、hydrocodone、Lorlab、アルブトララム (Alprazolam)、Reaxodone、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。</p>

表 6-3

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
-------	------	----------

EOSITX01	pINCY	ライブラリは、IL-5 で刺激した好酸球から単離した RNA を用いて作製した。ノーマライズされた前立腺間質線維芽細胞組織ライブラリは、或る前立腺線維芽細胞ライブラリからの 156 万個の独立クローンから作製した。開始 RNA は妊娠 26 週間後死亡の男子胎児から採取した前立腺間質の線維芽細胞から作製した。このライブラリは、極めて長時間(48 時間/1 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他は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 を適応した条件を用いて 2 回にわたりノーマライズした。このライブラリはクローンを含む挿入断片用を選択するために、下記のように直線化し、再度環状にした。プラスミド DNA は軟寒天形質転換後にノーマライズした前立腺間質線維芽細胞組織ライブラリからの約 100 万個のクローンから調製した。
FIBPFEN06	pINCY	
KIDNFET01	pINCY	ライブラリは、無脳体で妊娠 17 週目に死亡した白人女性胎児から取り除かれた腎臓組織から単離された RNA を用いて作製された。
LIVRFEA01	PSPORT1	このランダムプライムされたライブラリは胎児死亡の白人男子胎児から抽出した肝組織から単離された RNA を用いて作成した。
LIVRFEE02	pINCY	この 5' に偏向してランダムプライムしたライブラリは、死亡した白人男子胎児から採取した肝臓組織から単離した RNA を用いて作製された。死因は胎児性死亡である。血清検査は陰性だった。
LUNGTUT03	PSPORT1	ライブラリは 69 才の白人男性の肺の部分切除中に左下肺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グレード 3 の扁平上皮細胞の侵襲性のある後遺癌である。患者の病歴には急性心筋梗塞、前立腺肥大、悪性皮膚腫瘍および喫煙癖がある。
MUSCDIN06	pINCY	このノーマライズされた罹患大腿筋組織ライブラリは、罹患大腿筋組織ライブラリの 676 万個の独立クローンから作製した。開始 RNA は筋萎縮性側索硬化症(ALS)による呼吸停止で脂肪した 74 才白人女性から抽出された罹患大腿筋組織から単離された RNA から作成した。患者の病歴には筋萎縮性側索硬化症、高血圧および関節炎がある。このライブラリは、極めて長時間(48 時間/1 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他は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228-9232 及び 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。

10

20

30

40

表 6-4

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
PROSNON01	PSPORT1	標準化した前立腺ライブラリは、前立腺ライブラリの 440 万個の独立性クロノンから作製した。開始 RNA は自ら課した発砲の傷から死亡した 28 才の白人男子から採取した前立腺組織から作製した。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares, M.B. 他. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9228-9232 を適用し、長時間 (19 時間) の再アニーリングによるハイブリダイゼーション期間を用いた。
SCORNON02	PSPORT1	このノーマライズした背髄ライブラリは、或る背髄組織ライブラリの 324 万個の独立クロノンから作製した。RNA を単離した背髄組織は、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、壊疽、および末期腎臓病がある。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares 他 (PNAS (1994) 91:9228) を適用した。
STOMTDE01	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、61 才の白人男性の食道部分切除、近位胃切除、幽門筋層切開術、および限局的リンパ節切除時に取り除いた胃組織から単離した RNA を用いて作製した。随伴する腫瘍の病理検査は、食道での侵襲性グレード 3 の腺癌を示し、伸長して末端が胃食道境界部に至っていた。腫瘍は筋層を通過して食道周囲と胃周囲の軟組織に及んでいた。胃周囲の 1 つのリンパ節と食道周囲の 2 つのリンパ節が腫瘍に陽性であった。胃周囲と食道周囲に複数の腫瘍転移 (tumor implants) があった。患者は欠乏性貧血と脊髄形成異常を示した。患者の病歴は高脂質血症と、共に寛解期にあるタバコ濫用とアルコール濫用があった。以前の骨髄吸引では、そのは、アデノイド扁桃摘出術、造鼻術、精管切除、および痔切除がある。以前の骨髄吸引では、その年齢としては骨髄が細胞過多であり、実質/脂肪比 (cellularity-to-fat ratio) が 95:5 であった。骨髄は限局的かつ高密度に線維性であった。顆粒球前駆体は、正常な成熟と共にわずかに増加していた。芽細胞の推定は 5% 超であった。巨核球は増加しており、クラスター状に異型に見えた。貯蔵細胞と肉芽腫はなかった。患者の服用薬剤には Epoetin, Danocrine, Berocca Plus 錠剤, Selenium, ビタミン B6 リン酸, ビタミン E と ビタミン C, β カロチンが含まれる。家族歴としては、父親にアルコール濫用、アテローム性冠動脈疾患、タイプ II 糖尿病、慢性肝臓病、および特発性心筋症があり、母親に良性高血圧症と脳血管病がある。
TESTTUT02	pINCY	ライブラリは 31 才の白人男性の一個性辜丸摘出術時に取り除かれた精巣腫瘍から単離した RNA を用いて作製した。病理は胚性癌腫を示した。

10  
20  
30  
40

【表 6 - 5】

# 表 6-5

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
THP1TX103	pINCY	<p>ライブラリは、処理された THP-1 細胞から単離した RNA を使用して作製された。THP-1 は、急性単球性白血病の 1 才白人男児の末梢血に由来するヒト前球株である (参照: Int. J. Cancer (1980) 26:171)。THP-1 培養細胞は PMA(100ng/ml) で 48 時間分化させ、結核菌 (H37Rv 菌株) と共に、37°C で 4 時間インキュベートし、洗浄し、RNA 抽出した。</p>

10

20

30

40

50

【 0 4 4 7 】  
【 表 7 - 1 】

表7-1

プログラム	説明	参考文献	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去し、 て、あいまいな塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder. アミノ酸配列または核酸配列の比較および注釈付けに有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列をアセンブリするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool. アミノ酸配列および核酸配列の配列類似性検索に有用である。BLASTにはblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (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	問合せ配列と同種の配列群との類似性を検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最少5つの機能(fasta、fastx、tfastx およびssearch)がある。	Pearson, W. R. 及びD. J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448. Pearson, W. R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98. Smith, T. F. 及びM. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	EST: fasta E値1.06E-6; アセンブリされたEST: Fasta 一性=95%以上、一致する長さ (Match length)=200 塩基以上; 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BLOKS IMPROVED Searcher。	Henikoff, S. 及びJ. G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572, Henikoff, J. G. 及び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、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)に基づいたデータベース(PFAM、INCY、SMART、およびTIGRFAMなど)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. (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350.	率値=1.0E-3 以下; シグナア=0 以上

【 0 4 4 8 】

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表7-2

プログラム	説明	参照文献	パラメータ閾値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列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. Ewing, B. 他(1998) Genome Res. 8:175-185. Ewing, B及びXP. Green(1998) Genome Res. 8:186-194.	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GCC指定「HIGH」値。一般に、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度と確率で自動配列決定機トレースを調べるベースコーティングアルゴリズム。	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づくSWATや CrossMatchを含むPhis Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索やDNA配列のアセンブリに有用である。	
Phrap	Phrapアセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Smith, T.F. 及び M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. 及び M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; 及びGreen, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上; Match length=56以上
Consed		Gordon, D. 他(1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み行列解析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み行列を用いて蛋白配列で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. 及び P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371	
THRMER	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 (AAAI) Press, Menlo Park, CA, 及び MIT Press, Cambridge, MA, 175-182ページ	
74Motifs	Prositeで定義された配列と一致した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, 第9版, M51-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

10

20

30

40



2005511022000001.app

## 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 K 51/00	A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 5/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 37/00	A 6 1 K 49/02	A
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	C

- (31)優先権主張番号 60/345,837  
(32)優先日 平成13年10月26日(2001.10.26)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/343,903  
(32)優先日 平成13年11月2日(2001.11.2)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/334,020  
(32)優先日 平成13年11月27日(2001.11.27)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/340,226  
(32)優先日 平成13年12月7日(2001.12.7)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/345,008  
(32)優先日 平成14年1月4日(2002.1.4)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/365,645  
(32)優先日 平成14年3月18日(2002.3.18)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/379,887

(32)優先日 平成14年5月10日(2002.5.10)

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(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 2 0 2 4・エンシニタス・#ビー1 0 3・サウスエルカミーノ  
レアル 1 8 1 0

(72)発明者 ボロースキー、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・オーチャードアベニュー 1  
2 2

(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・メローウェイ 3 3 6 9 1

(72)発明者 リー、ジョアナ・エックス  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 1 2・サンフランシスコ・ジュネーブアベニュー 1 2 6  
4

(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・デリーシティ・ウエストデールアベニュー 4 0

(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 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・ローブルアベニュー 3 0 8

(72)発明者 マーキス、ジョセフ・ピー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 3 5・サンノゼ・レイジーレーン 4 4 2 8

(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 ボーゲン、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 トラン、ユエン・ケイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 3 3・サンノゼ・メイブリースクエア 2 6 3 8

(72)発明者 レーア・メイソン、パトリシア・エム  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0 3 7・モーガンヒル・クラークレーン 3 6 0

(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 ランクマール、ジャヤラクシミ  
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・メイバードサークル 3 4 3 5 9

(72)発明者 エマーリング、ブルック・エム  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 3・パロアルト・#7 1・ウッドランドアベニュー 1  
7 3 5

(72)発明者 リー、アーンステーション・エイ  
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・クロウクリークロード 2 0 5 2  
3

(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・ポルトンブレイスウェイ 3 7 7 0

(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 ダガン、ブレンダン・エム  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 8 6 ・ サニーベイル ・ # 3 0 6 ・ ブエナビスタアベニュー  
2 4 3
- (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 ケーブル、エイミー・イー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 0 9 ・ サンフランシスコ ・ # 4 ・ ポークストリート 2 3  
4 5
- (72)発明者 チャン、シン - ル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 0 2 ・ ベルモント ・ トレジャーアイランドドライブ 3 2  
6
- (72)発明者 カーレ、リーナ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 7 0 ・ サラトガ ・ オレラコート 1 2 6 5 0
- (72)発明者 ベチャ、シャニア・ディー  
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 ジン、ペイ  
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 ・ # ディー ・ カートナーアベニュー 3  
2 0
- (72)発明者 リー、サリー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 0 ・ サンフランシスコ ・ トゥエンティシックスストリ  
ート 3 6 4 3

F ターム(参考) 2G045 AA34 CB01 DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12  
EA04 GA05 GA11 HA12  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25  
QS33 QS34 QX02  
4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24  
DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 AB05 BA02 BA08 CA24  
CA25 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA62 DC50 NA13  
ZA012 ZA362 ZA812 ZB022 ZB072 ZB112 ZB262 ZC212  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB41 BB43 HH01 HH03 KA04 KA05 LL13  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA21 EA50  
FA72 FA74

專利名称(译)	神经传递相关蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005511022A</a>	公开(公告)日	2005-04-28
申請号	JP2003529903	申請日	2002-09-12
[标]申請(專利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申請(專利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]發明人	ホンチエルシンシアディー ワレンブリジットエイ ボロースキーマークエル グリフィンジェニファーエイ リージョアナエックス リーソーユーン ユエヘンリー フォーサイスイアンジェイ マーキスジョセフピー ギーツエンキンバリージェイ ボーグンマライアアール トランユエンケイ レーアメイソンパトリシアエム タングワイトム ランクマールジャヤラクシミ エマーリングブルックエム リーアーンステイーンエイ エリオットビッキーエス ハファリアエープリルジェイエイ ダガンブレンダンエム チョーラナリンダーケイ ケーブルエイミーイー チャンシシル カーレリーナ ベチャシャニアディー ジンペイ リーサリー		
發明人	ホンチエル、シンシア・ディー ワレン、ブリジット・エイ ボロースキー、マーク・エル グリフィン、ジェニファー・エイ リー、ジョアナ・エックス リー、ソー・ユーン ユエ、ヘンリー フォーサイス、イアン・ジェイ マーキス、ジョセフ・ピー ギーツエン、キンバリー・ジェイ ボーグン、マライア・アール トラン、ユエン・ケイ レーア・メイソン、パトリシア・エム タング、ワイトム ランクマール、ジャヤラクシミ エマーリング、ブルック・エム リー、アーンステイーン・エイ		

エリオット、ビッキー・エス  
ハファリア、エープリル・ジェイ・エイ  
ダガン、ブレンダン・エム  
チョーラ、ナリンダー・ケイ  
ケーブル、エイミー・イー  
チャン、シン・ル  
カーレ、リーナ  
ベチャ、シャニア・ディー  
ジン、ペイ  
リー、サリー

IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P3/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/705 C07K14/78 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P3/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/705 C07K14/78 C07K2319/00
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K49/00.A A61P3/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 A61K37/02 A61K49/02.A C12N15/00.F C12N5/00.A C12N15/00.C
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA62 4C084/DC50 4C084/NA13 4C084/ZA012 4C084/ZA362 4C084/ZA812 4C084/ZB022 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/HH01 4C085/HH03 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/LL13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74
優先権	60/322180 2001-09-14 US 60/326096 2001-09-28 US 60/327446 2001-10-04 US 60/345837 2001-10-26 US 60/343903 2001-11-02 US 60/334020 2001-11-27 US 60/340226 2001-12-07 US 60/345008 2002-01-04 US 60/365645 2002-03-18 US 60/379887 2002-05-10 US
外部リンク	<a href="#">Espacenet</a>

#### 摘要(译)

本発明の各種実施方案提供了鉴定和编码NTRAN的人神经传递相关蛋白 ( NTRAN ) 和多核苷酸。 本発明の実施方案还提供表达载体， 宿主细胞， 抗体， 激动剂和拮抗剂。 其他实施方案提供了用于诊断， 治疗或预防与NTRAN异常表达有关的疾病的方法。

(5) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I			テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/00</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A		2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</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 6 3
<b>A 6 1 K 49/00</b>	A 6 1 K 49/00	A		4 B 0 6 4
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求		(全 139 頁) 最終頁に於

(2) 出願番号	特願2003-529903 (P2003-529903)	(7) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		インサイト・ゲノミックス・インコーポ イテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月12日 (2004.3.12)		アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029219		4 ・ バロアルト ・ ポータードライブ 3
(87) 国際公開番号	W02003/025129		6 0
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003.3.27)	(7) 代理人	100089286
(3) 優先権主張番号	60/322,180		弁理士 大島 陽一
(32) 優先日	平成13年9月14日 (2001.9.14)	(7) 発明者	ホンチェル、シンシア・ディー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0
(31) 優先権主張番号	60/326,096		0 ・ サンカルロス ・ ローレルストリート
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001.9.28)		1 5 8
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/327,446		
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		