

(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2005-512531**(P2005-512531A)**

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 2 9
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 141 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-552915 (P2003-552915)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年5月2日 (2002.5.2)		インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月29日 (2003.10.29)		アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014276		
(87) 国際公開番号	W02003/052048	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開日	平成15年6月26日 (2003.6.26)		弁理士 大島 陽一
(31) 優先権主張番号	60/288,598	(72) 発明者	ユエ、ヘンリー
(32) 優先日	平成13年5月4日 (2001.5.4)		アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーバイル・ルイスアベニュー 826
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/291,776		
(32) 優先日	平成13年5月17日 (2001.5.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/292,172		
(32) 優先日	平成13年5月18日 (2001.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 核酸結合タンパク質

(57) 【要約】

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

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の(a)乃至(f)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:1-23 (配列番号 1 乃至 23) 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 - 12、SEQ ID NO: 14-18、およびSEQ ID NO: 23を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(c) SEQ ID NO:21の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有するポリペプチド

(d) SEQ ID NO:22のアミノ酸配列と少なくとも98%が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(e) SEQ ID NO: 1 - 23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

(f) SEQ ID NO:1 - 23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

【請求項 2】

SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項1のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチド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。

【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され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た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。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-23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(g)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:24-46を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:24-35、SEQ ID NO:37-41およびSEQ ID NO:43-46からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも90%が同一であるような天然ポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO:42のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも96%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(d) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(f) (c)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(g) (a) ~ (f)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。

10

【請求項14】

請求項12のポリヌクレオチドの配列を持つ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或る配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチド群を持つ或るプローブと前記サンプルとをハイブリダイズし、該プローブが、或るハイブリダイゼーション複合体が前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片群との間に形成される条件下で、前記標的ポリヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたは断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

20

【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のポリヌクレオチドの配列を持つ標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

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

30

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

【請求項17】

請求項1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】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列を持つことを特徴とする、請求項17の組成物。

【請求項19】

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

40

【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のポリペプチドを有する或るサンプルを或る化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項21】

請求項20に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形

50

剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 22】

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

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

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

10

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

【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) 適切な条件下で請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に混合させるステップと、

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

20

【請求項 27】

請求項 1 のポリペプチドの活性をモジュレート（調節）する化合物をスクリーニングする方法であって、

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

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

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

30

【請求項 28】

請求項 5 の配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変するのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記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、改変された発現を検出する過程と、

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

40

【請求項 29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸群を有する或る生体サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

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

50

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、或る処理されていない生体サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

【請求項30】

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

(a) 前記抗体を前記ポリペプチドと混合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成されるのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項11に記載の抗体と結合する過程と、 10

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

【請求項31】

請求項11の抗体であって、

(a) キメラ抗体

(b) 一本鎖抗体

(c) Fab断片

(d) F(ab')₂断片

(e) ヒト化抗体、のいずれかであることを特徴とする抗体。 20

【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】

被検者におけるNAAPの発現に関連する症状又は疾患の診断方法であって、請求項32に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項34】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項32に記載の組成物。

【請求項35】

被検者におけるNAAPの発現に関連する症状又は疾患の診断方法であって、請求項34に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。 30

【請求項36】

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) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列またはその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体を該ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する或るポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項37】 40

請求項36の方法で産生したポリクローナル抗体。

【請求項38】

請求項37のポリクローナル抗体と好適なキャリアとを有する組成物。

【請求項39】

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

(a) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列またはその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から、抗体を産出する細胞を単離する過程と、

(c) 不死化した細胞と前記抗体産出細胞とを融合し、モノクローナル抗体を産出する 50

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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項40】

請求項39に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項41】

請求項40に記載のモノクローナル抗体と適切なキャリアとを含む組成物。

【請求項42】

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11に記載の抗体。

【請求項43】

組換え免疫グロブリンライブラリ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11に記載の抗体。

【請求項44】

SEQ ID NO:1-23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、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、或るサンプルと共に請求項11に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO:1-23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がサンプル中に存在することを示唆することを特徴とする方法。

【請求項45】

SEQ ID NO:1-23 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、或るサンプルと共に請求項11に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項46】

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

【請求項47】

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成する方法であって、

(a) サンプルのポリヌクレオチドを標識するステップと、

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

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量するステップとを含むサンプルの転写イメージを作製する方法。

【請求項48】

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

10

20

30

40

50

【請求項 5 0】

請求項 4 8 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の少なくとも 60 の連続したヌクレオチド群に完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 1】

請求項 4 8 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 5 2】

請求項 4 8 に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 3】

請求項 4 8 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。

10

【請求項 5 4】

請求項 4 8 に記載のアレイで、或るリンカーが少なくとも 1 つの前記のヌクレオチド分子と前記の固体基板とを連結していることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 5】

請求項 4 8 に記載のアレイで、該基板上の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、該基板上の固有の物理的位置の各々は、該基板上の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。

20

【請求項 5 6】

SEQ ID NO:1 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

SEQ ID NO:2 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

SEQ ID NO:3 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

SEQ ID NO:4 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 6 0】

SEQ ID NO:5 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 1】

SEQ ID NO:6 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 2】

SEQ ID NO:7 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 3】

SEQ ID NO:8 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 4】

SEQ ID NO:9 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 6 5】

SEQ ID NO:10 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 6】

SEQ ID NO:11 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 7】

SEQ ID NO:12 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 8】

SEQ ID NO:13 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 9】

SEQ ID NO:14 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

50

【請求項 7 0】	
SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 1】	
SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 2】	
SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 3】	
SEQ ID NO:18のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 4】	
SEQ ID NO:19のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	10
【請求項 7 5】	
SEQ ID NO:20のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 6】	
SEQ ID NO:21のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 7】	
SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 8】	
SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。	
【請求項 7 9】	
SEQ ID NO:24のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	20
【請求項 8 0】	
SEQ ID NO:25のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 1】	
SEQ ID NO:26のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 2】	
SEQ ID NO:27のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 3】	
SEQ ID NO:28のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 4】	
SEQ ID NO:29のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	30
【請求項 8 5】	
SEQ ID NO:30のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 6】	
SEQ ID NO:31のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 7】	
SEQ ID NO:32のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 8】	
SEQ ID NO:33のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 8 9】	
SEQ ID NO:34のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	40
【請求項 9 0】	
SEQ ID NO:35のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 9 1】	
SEQ ID NO:36のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 9 2】	
SEQ ID NO:37のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 9 3】	
SEQ ID NO:38のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	
【請求項 9 4】	
SEQ ID NO:39のポリヌクレオチド配列を有する請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。	50

【請求項 9 5】

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

【請求項 9 6】

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

【請求項 9 7】

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

【請求項 9 8】

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

【請求項 9 9】

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

10

【請求項 1 0 0】

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

【請求項 1 0 1】

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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、核酸結合タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した、細胞増殖異常、神経疾患神経疾患、発達障害、自己免疫/炎症性疾患、および感染症の、診断・治療・予防に関する。本発明は更に、核酸結合タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列の発現における、外来化合物の効果についての算定に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

多細胞生物は、構造及び機能が著しく異なる多様な細胞型から構成されている。細胞型は遺伝子発現パターンの特徴によって決定され、また、異なった細胞型は発生中に、オーバーラップするが弁別的な一組の遺伝子群を発現する。遺伝子発現の空間的及び時間的な調節は、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、及び生物の発達に必要なその他のプロセスにとって極めて重要である。更に、遺伝子発現は、細胞外シグナルに応答して調節される。細胞外シグナルは、細胞間伝達を仲介し、様々な細胞型の作用を協調させる。適切な遺伝子調節はまた、細胞を効率よく機能させる。これを確実にするため、その機能が要求される遺伝子群のみが所定の時期に発現される。

30

【0 0 0 3】

転写因子

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

40

【0 0 0 4】

DNAの二重らせん構造とリピート配列群とがトポロジックおよび化学的な特徴を生み出し、これらの特徴は転写因子によって認識され得る。これらの特徴とは、水素結合の供与基と受容基、疎水性パッチ、主溝と副溝、および、配列の規則的な繰り返しストレッチ群（repeated stretches: ヘリックス内に明確な折れ曲がり群を誘導）である。通常、転写因子が特異的に認識するDNA配列モチーフ群は、約20ヌクレオチドの長さである。複数の、隣接した転写因子結合モチーフ群が遺伝子調節に必要な場合もある。

【0 0 0 5】

50

多くの転写因子は、DNA結合の構造的モチーフ群を組み込んでいる。これらのモチーフは α ヘリックスまたは β シートからなり、DNAの主溝に結合する。4種の良く特徴付けられたモチーフが、ヘリックス・ターン・ヘリックス、Znフィンガー、ロイシン・ジッパー、およびヘリックス・ループ・ヘリックスである。これらのモチーフを持つタンパク質は、単独で単量体として作用したり、または、ホモ二量体やヘテロ二量体を形成してDNAと相互作用する。

【0006】

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

10

【0007】

Znフィンガーモチーフは亜鉛イオンに結合する。このモチーフは一般に、周期的に配置されたシステイン残基とヒスチジン残基からなる約30アミノ酸のタンデムリピート群を持つ。この配列パターンの2例、C2H2とC3HC4 (「RING」フィンガー) については既に記載されている (Lewin, 前出)。Znフィンガータンパク質の各々が1つの逆平行 β シート及び1つの α ヘリックスを持ち、それらの近接性とコンフォメーションとは、亜鉛イオンによって維持されている。DNAとの接触は、 α ヘリックスの前のアルギニン残基によって、並びに、 α ヘリックスの第2の残基、第3の残基、及び第6の残基によってなされる。Znフィンガーモチーフの変異体の例には、あまり解明されていないシステインリッチモチーフ群があり、これらの変異体モチーフは、亜鉛または他の金属イオンと結合する。これらの変異体モチーフはヒスチジン残基を持たない場合があり、一般に非反復である。タンパク質の各Znフィンガーの α ヘリックスがDNA二重らせんの主溝と接触できるように、Znフィンガーモチーフはそのタンパク質内にタンデム型にリピートされ得る。この、タンパク質とDNAとの間の接触の繰り返しによって、強力且つ特異的なDNA-タンパク質相互作用が起こる。この相互作用の強度及び特異性は、タンパク質内のZnフィンガーモチーフの数によって調節され得る。Znフィンガーは、初めはDNAと直接相互作用する領域としてDNA結合タンパク質群において同定されたが、DNAと結合しない種々のタンパク質にも出現する (Lodish, H. 他 (1995) Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York NY, 447-451ページ)。例えば、Galcheva-Gargova, Z. 他 ((1996) Science 272:1797-1802) は、種々のサイトカイン受容体と相互作用するZnフィンガー蛋白質群を同定している。

20

30

【0008】

C2H2タイプのZnフィンガーシグネチャモチーフには、或る28アミノ酸の配列があり、この配列には、2つの保存されたCys残基、および2つの保存されたHis残基が、1つのC-2-C-12-H-3-Hタイプのモチーフ内に含まれる。C2H2型モチーフは一般に、多重タンデムリピートで出現する。或るシステインリッチドメインであってモチーフAsp-His-His-Cysを含むドメイン (DHHC-CRD) が、固有サブグループのZnフィンガープロテインとして同定されている。DHHC-CRD領域は、成長と発達に関与すると思われる。或るDHHC-CRD突然変異体は、Rasの機能欠損を示す。Rasは小さな膜結合型GTP結合タンパク質であり、細胞の成長と分化とを調節する。一方、他のDHHC-CRDタンパク質類は、おそらくRasとは無関係の経路群で機能する (Bartels, D.J. 他 (1999) Mol. Cell Biol. 19:6775-6787)。

40

【0009】

Znフィンガー転写因子は、しばしば、モジュラー配列モチーフ群を伴う。このモチーフの例は、Kruppel-associated box (KRAB) およびSCANDメインである。例えば、低 α リポ蛋白質血症 (hypoalphalipoproteinemia) 感受性遺伝子ZNF202は、或るSCANボックスと或るKRABドメイン (8つのC2H2 Znフィンガーモチーフ群が続く) とをコードする (Honer, C.

50

他 (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1517:441-448)。SCANドメインは、高度に保存されたロイシンリッチモチーフであり、約60アミノ酸からなり、Znフィンガー転写因子のアミノ末端に見られる。SCANドメインは、最も多くはC2H2 Znフィンガーモチーフに連結しており、この連結は、それらのカルボキシル末端を通じてなされる。生化学的な結合研究は、SCANドメインを選択的なヘテロおよびホモタイプのオリゴマー化ドメインとして確定している。SCANドメインが媒介するタンパク質複合体は、転写因子の生物学的機能を調節させるよう機能するようである (Schumacher, C. 他 (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17173-17179)。

【0010】

KRAB (Kruppel-associated box)ドメインは、保存されたアミノ酸配列であって約75アミノ酸にまたがる。KRABドメインは、C2H2 Znフィンガーをコードする300~700種の遺伝子のほぼ3分の1に見られる。KRABドメインは、フィンガーリピートに対してN末端側に見られる。KRABドメインは、一般に2つのエキソンによってコードされる。KRAB-A領域またはボックスが1つのエキソンによってコードされ、KRAB-B領域またはボックスが第2エキソンによってコードされる。KRABドメインの機能は、転写の抑制である。転写抑制を達成するため、KRAB-associated protein-1 (1種の転写コリプレッサー) またはKRAB-A相互作用タンパク質のどちらかが動員される。KRABドメインを持つタンパク質は、発生期に調節的な役割を果たすようである (Williams, A.J. 他 (1999) *Mol. Cell Biol.* 19:8526-8535)。全ヒト組織で検出し得る、高度に近縁のヒトKRAB Znフィンガー蛋白質群の或るサブグループは、ヒトTリンパ球に高度に発現される (Bellefroid, E.J. 他 (1993) *EMBO J.* 12:1363-1374)。ZNF85 KRAB Znフィンガー遺伝子はヒトZNF91ファミリーのメンバーであり、正常成人精巣や、精上皮腫 (seminoma) や、NT2/D1 奇形癌腫細胞株に高度に発現される (Poncelet, D.A. 他 (1998) *DNA Cell Biol.* 17:931-943)。

【0011】

C4モチーフは、ホルモン調節されるタンパク質に見られる。C4モチーフは一般に、2つのリピートのみを持つ。多数の真核生物タンパク質およびウイルス蛋白質には、或る保存されたシステインリッチドメインがあり、これは40~60残基からなり、C3HC4 ZnフィンガーまたはRINGフィンガーと呼ばれる。このドメインは亜鉛2原子と結合する。また、おそらくタンパク質間相互作用の仲介に関与する。亜鉛ライゲーション系の3次元の「十字 (cross-brace)」構造は、RINGドメイン独自のものである。このようなドメイン内のシステイン群の間隔は、C-x(2)-C-x(9~39)-C-x(1~3)-H-x(2~3)-C-x(2)-C-x(4~48)-C-x(2)-Cである。PHDフィンガーは、或るC4HC3 Znフィンガー様モチーフであって、クロマチンが媒介する転写調節に関与すると思われる核タンパク質に見られる。

【0012】

GATAタイプの転写因子には1つまたは2つのZnフィンガードメインが含まれ、DNAの、連続したヌクレオチド配列であるGATAを有する領域に特異結合する。NMR研究の示すところでは、このZnフィンガーには2枚の不規則な逆平行βシートと1つのαヘリックスとがあり、続いて、フィンガーのC末端までの長いループがある (Ominchinski, J.G. (1993) *Science* 261:438-446)。このヘリックスと、2枚のβシートを接続するループとがDNAの主溝と接触し、一方、C末端部 (結合の特性を決める部位) は、副溝内に巻き付きながら入り込む (wraps around into the minor groove)。

【0013】

LIMモチーフには約60アミノ酸残基があり、7つの保存されたシステイン残基と1つのヒスチジンとが、1つのコンセンサス配列内に含まれる (Schmeichel, K.L. および Beckert, M.C. (1994) *Cell* 79:211-219)。LIMファミリーには、発達、分化、および細胞成長に関与し得る、転写因子と細胞骨格タンパク質とを含む。一例のアクチン結合LIMタンパク質は、細胞骨格と細胞形態形成との調節において役割を果たし得る (Roof, D.J. 他 (1997) *J. Cell Biol.* 138:575-588)。アクチン結合LIMタンパク質のN末端ドメインには、LIMコンセンサス配列を有する二重Znフィンガーモチーフ群が4つのある。アクチン結合LIMタンパク質のC末端ドメインは、既知のアクチン結合タンパク質 (例えばデマチン: dematin) 50

inおよびビリン：villin)との配列類似性を示す。アクチン結合LIMタンパク質は、Fアクチンと結合する。この結合は、デマチン様C末端ドメインを通じて行う。LIMドメインは、他のLIM結合タンパク質とのタンパク質間相互作用を仲介するように思われる。

【0014】

骨髄性細胞の発達は、組織特異的な転写因子群によって制御される。骨髄性Znフィンガー蛋白質(MZF)としては、MZF-1とMZF-2とがある。MZF-1は好中性顆粒球の発生の調節において機能する。或るマウス相同体MZF-2は、骨髄性細胞群、特に好中球系にコミットされた細胞に発現される。MZF-2は、G-CSFによって下方調節される。また、好中球発生において独自の機能を持つようである(Murai, K. 他 (1997) Genes Cells 2:581-591)。

【0015】

ロイシンジッパーモチーフは、ロイシンに富むアミノ酸群の或るストレッチを有し、これは両親媒性の α ヘリックスを形成できる。この構造は、2つのロイシンジッパー蛋白質の二量体化のための基盤を提供する。ロイシンジッパーに隣接する領域は通常は塩基性であり、タンパク質二量体化すると、主溝に結合するのに最適であるように配置される。このようなモチーフを持つタンパク質を総称してbZIP転写因子と呼ぶ。ロイシンジッパーモチーフは癌原遺伝子であるFosとJunとに見られる。FosとJunとはヘテロ二量体転写因子であるAP1を構成する。AP1は、細胞成長と、細胞系統の決定とに関わる(Papavassiliou, A. G. (1995) N. Engl. J. Med. 332:45-47)。

【0016】

ヘリックス・ループ・ヘリックス・モチーフ(HLH)は1つの短い α ヘリックスと、これが1つのループによって接続された長い α ヘリックスとからなる。このループは柔軟なので、2本のヘリックスは、互いに対して折れ曲がることができ、DNAに結合できる。転写因子であるMycは、原型的なHLHモチーフを持つ。

【0017】

NF- κ -B/Relシグネチャは、或るファミリーの真核細胞転写因子を規定する。この転写因子は、発癌や、胚の発生、分化、および免疫応答に関与する。Rel 相同性ドメイン(RHD)を持つ殆どの転写因子は、二量体として、或るコンセンサスDNA配列モチーフである κ -Bと結合する。Rel ファミリのメンバーは、高度に保存された300アミノ酸ドメインであるRel 相同性ドメインを共有する。特徴的なRel C末端ドメインは、遺伝子活性化および細胞質固着の機能に関わる。RHDドメインを持つことが知られているタンパク質の例には、脊椎動物核因子NF- κ -B(或るDNA結合サブユニットと転写因子p65とのヘテロ二量体)、哺乳類転写因子RelB、および脊椎動物プロト癌遺伝子c-relがあり、c-relは、分化とリンパ球新生とに関わるタンパク質である(Kabrun, N., および Enrietto, P.J. (1994) Semin. Cancer Biol. 5:103-112)。

【0018】

ARID (ATリッチ相互作用ドメイン)と呼ばれるDNA結合モチーフは、或る進化的に保存されたファミリーのタンパク質を特徴づける。約100残基のARID配列は、細胞成長、分化、および組織特異的遺伝子発現の調節への関与が強く示唆される一連のタンパク質に存在する。ARIDタンパク質の例には、Bright (B細胞特異的遺伝子発現の調節因子)、dead ringer (発達に関与)、およびMRF-2 (サイトメガロウイルスエンハンサーからの発現を抑制)を含む(Dallas, P.B. 他 (2000) Mol. Cell Biol. 20:3137-3146)。

【0019】

ELM2 (Egl-27およびMTA1 相同性2)ドメインは、腫瘍転移関連タンパク質MTA1、およびタンパク質ER1に見られる。線虫(*Caenorhabditis elegans*)遺伝子egl 27は、胚パターン形成に必要である。MTA1は転移性癌で発現が上昇するヒト遺伝子であり、この遺伝子は、ヒストン脱アセチル酵素活性と、ヌクレオソームのリモデリング活性とを持つ或るタンパク質複合体の成分である(Solari, F. 他 (1999) Development 126:2483-2494)。ELM2ドメインは通常、myb様DNA結合ドメインのN末端に見られる。ELM2はまた、或るARID DNAに会合しているのが見られる。

【0020】

10

20

30

40

50

Iroquois (Irx)ファミリーの遺伝子は線虫、昆虫および脊椎動物に見られる。Irx遺伝子群は通常、三つの遺伝子からなる一つまたは二つのゲノムクラスターとなっており、特徴的なホメオドメインを持つ転写制御因子をコードする。Irx遺伝子群は発生早期において機能を果たして、身体の高様な領域の独自性を特定化する。ショウジョウバエおよび脊椎動物の両方で発生の後期においてIrx遺伝子群が再び機能して、これらの領域をより小さいドメインに分割する。(Iroquois 遺伝子の概説については、Cavodeassi, F. 他 (2001) Development 128:28472855を参照されたい。)例えば、マウスおよびヒトのIrx4 タンパク質は83%が保存的であり、その63-aaホメオドメインはショウジョウバエIroquois パターン化遺伝子の同ドメインと93%以上の同一性を有する。Irx4 転写物は主に心室で発現される。ホメオボックス遺伝子のIrx4は心臓の発生時の心室分化を仲介する(Brunneau, B. 他 (2000) Dev. Biol. 217:26677)。

10

【0021】

ヒスチジン三連構造(HIT)タンパク質は、2つの全く同じプリンヌクレオチド結合部位を形成している、異なった二量体の、10ストランドの半バレル構造(half-barrel structures)内に残基を共有する。Hint(ヒスチジン三連構造ヌクレオチド結合タンパク質)に関連するタンパク質は、生命のすべての形態に存在し、脆弱ヒスチジン三連構造(Fhit)に関連するタンパク質は動物や真菌類に存在するが、これらの2群のタンパク質はHITスーパーファミリーの2つの主要な分岐を表している。Fhit相同体はジアデノシンポリリン酸と結合し、また切断する。Fhit-Ap(n)A 複合体は上皮組織においてプロアポトーシス癌抑制経路において機能すると考えられる(Brenner C. 他 (1999) J. Cell Physiol.181:179187)。

20

【0022】

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ(PPARガンマ)は、核内受容体であり、これは脂肪細胞分化、脂質貯蔵およびインスリン感作に関する多数の遺伝子の発現を調節する。PPARガンマは脂肪酸誘導体およびプロスタグランジンJ2と結合し、活性化される。チアゾリジンジオン(Thiazolidinedione)は合成リガンドで、この受容体のアゴニストである(Rocchi, S. および Auwerx, J. (2000) Br. J. Nutr. 84:S223227)。チアゾリジンジオンまたはPPARガンマアゴニストは、II型糖尿病被験者のインスリン感作を改善し、血糖を減少し、血圧を下げる((Lebovitz, H.E. およびBanerji, M.A.(2001) Recent Prog. Horm. Res. 56:265294)。

【0023】

30

殆どの転写因子には特徴的なDNA結合モチーフがあり、上記モチーフ群の種々の変異体と新規のモチーフ群とが、これまでに特徴付けられており、また現在も特徴付けられている(Faisst, S. および S. Meyer (1992) Nucl. Acids Res. 20:3-26)。

【0024】

クロマチン関連タンパク質

遺伝子発現の調節は各々の遺伝子の転写開始部位に転写機構をもたらすことに依存する。DNAに結合するタンパク質群はこの調節に関与し得る。クロマチンタンパク質は調節性配列および開始部位のアクセス可能性に影響し得る。一方、転写因子は開始部位のRNAポリメラーゼ複合体の親和性を増加または減少し得る。真核生物の核DNAはクロマチンに組織化されるが、クロマチンのそのコンパクトな組織化は、DNAの転写因子へのアクセス可能性を制限すると同時に、DNAの物理的な組織化に寄与し、遺伝子調節において重要な役割を果たす(Lewin, 前出, 409-410ページ)。クロマチンの2つのタイプが観察される。すなわち、真正染色質(そのうちの幾分かが転写される)と異質染色質(ヘテロクロマチン)(密接に詰まっており、その大部分は転写のためのアクセスが不可能である)である。クロマチンのコンパクトな構造は、クロマチン結合タンパク質によって決定され影響される。このようなタンパク質としては、ヒストン、高移動度グループ(HMG)タンパク質、およびクロモドメイン蛋白質がある。5種のクラスのヒストン、H1、H2A、H2B、H3およびH4があり、全ては高度に塩基性の低分子量タンパク質である。クロマチンの基盤ユニットであるヌクレオソームには、200塩基対のDNAと、H2A、H2B、H3およびH4のそれぞれ2つずつのコピーとがある。H1は、隣接ヌクレオソーム群を連結する。HMGタンパク質は、低

40

50

分子量の非ヒストン蛋白質であり、DNAを巻き戻すことと、一本鎖DNAを安定させることにおいて役割を果たすと思われる。クロモドメイン蛋白質は、高度にコンパクト化されたヘテロクロマチンの形成において重要な役割を果たす。ヘテロクロマチンは転写的にはサイレント（不活動）である。ヘテロクロマチン様タンパク質複合体の形成もまた、遺伝子発現やゲノムの組織化の調節に関与している。遺伝子調節はまた、ヒストンのアセチル化やクロマチン構造に影響するDNAのメチル化のような修飾を介して生じる。

【0025】

クロモドメインタンパク質はポリコム（Polycomb）（Pc）群、ヘテロクロマチンタンパク質1（HP1）群、CHD群（クロモドメイン、ヘリカーゼ/ATP分解酵素およびDNA結合群）、SUV39群、並びに網膜芽細胞腫結合タンパク質1（RBP1）群などのいくつかのクラスに分かれる。Pcクロモドメインタンパク質は300個以上の長さのアミノ酸からなり、Pcボックスと呼ばれるC末端領域を共有する。Pcタンパク質は例えば、Hox遺伝子の抑制に機能するが、Hox遺伝子の活性は正常発達中に精密に制限されたパターンに制限される。Pcクロモドメインタンパク質と相互作用するタンパク質にはRing1A、Bmi-1、Rae-28/Mph1、Mel18およびRYBPがある。HP1様クロモドメインタンパク質は一般にアミノ酸の長さが200以下であり、クロモドメインのリピートであるC末端領域から「ヒンジ」領域によって区分されるN末端の近くの、負に荷電されたアミノ酸のストレッチを共有している。哺乳動物のPc1が欠失すると、重症なリンパ球の増殖性欠損を生じる。哺乳動物のHP1タンパク質にはHP1α、HP1β、およびHP1γがある。HP-1クロモドメインタンパク質と相互作用するタンパク質にはINCENP、TIF1α、BRG1/SNF2β、H1/H5-様タンパク質、hRAD54L、bLAP、KAP-1/Tif1β、ラミニンB受容体（LBR）、SP100、およびCAF-1が含まれる。CHDクロモドメインタンパク質と相互作用するタンパク質には、HDAC1/2、RbAp46/48、およびmtalが含まれる。哺乳動物CHDタンパク質は約200キロダルトンであり、高度なモジュラーとなっており、タンパク質の長さに沿って一貫した位置を示すいくつかの配列モチーフを有する。いくつかのメンバーはPHD Znフィンガーを含む。RBP1はADRドメインとクロモドメインを含む（クロモドメインタンパク質の概説については、Jones D.O. 他（2000）BioEssays 22:124-137を参照されたい）。

【0026】

遺伝子調節に関連する疾患および障害

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

【0027】

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

持つ或るタンパク質をコードすることが見出された(Bjorses, P. 他 (1998) Hum. Mol. Genet. 7:1547-1553)。

【0028】

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

10

【0029】

ペアードボックス(paired-box)遺伝子とも呼ばれるPax遺伝子は核転写因子をコードする発達調節遺伝子のファミリーである。これらはDNA結合活性を有する保存されたアミノ酸モチーフである対のドメインがあることが特徴である。脊椎動物において、Pax遺伝子はまた、胚形成にも関与する。9つの特徴付けされたPax遺伝子群のうちの4つでの突然変異は、ワールデンブルヒ症候群(PAX3)、無虹彩(PAX6)、Peter's奇形(PAX6)および腎欠損症候群(PAX2)のような先天性ヒト疾患に関連している。脊椎動物のpax遺伝子は腎臓、眼、耳、鼻、肢筋肉、脊椎および脳の器官形成を調節する。脊椎動物のPax遺伝子は胚形成時のパターン形成に関与する(Dahl, E. 他 (1997) Bioessays 19:755765)。

20

【0030】

ヒト急性白血病では、染色体相互転座が関与しており、そのような転座は、染色体領域11q23にあるALL1 遺伝子を、多様なヒト染色体に位置する一連のパートナー遺伝子に融合する。融合遺伝子はキメラタンパク質をコードする。AF17 遺伝子は1093アミノ酸のタンパク質をコードするが、これは融合点の3'にあるロイシンジッパー二量体化モチーフおよび、タンパク質Br140 (peregrin)内のドメインに相同性を示す、N末端のシステインリッチドメインを含む(Prasad R. 他(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91:81078111)。

トランスリン(translin)はDNA結合タンパク質であり、リンパ系悪性腫瘍の多くの症例において染色体転座のブレイクポイントジャンクションにあるコンセンサス配列に特異的に結合する(Aoki, K.他(1997) FEBS Lett. 401:109112)。

30

【0031】

核酸の合成

ポリメラーゼ

DNAとRNAとの複製は、細胞の複製と機能とにとって死活的なプロセスである。DNAとRNAとの複製を仲介する酵素がそれぞれDNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼであり、この仲介は「鋳型取り(templating)」プロセスで行う。このプロセスでは、DNAまたはRNAストランドのヌクレオチド配列が、相補的塩基対合によってDNAまたはRNAどちらかの相補的な核酸配列にコピーされる。しかし、この2つのプロセスには、根本的な相違がある。

【0032】

DNAポリメラーゼが触媒する反応は、或るポリヌクレオチド鎖(プライマー鎖)の3'-OH末端へのデオキシリボヌクレオチドの逐次付加であり、このプライマー鎖は第二の(鋳型)ストランドと対合される。新たなDNAストランドは、したがって5'から3'方向へ成長する(Alberts, B. 他 (1994) The Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc., New York, NY, 251-254ページ)。この重合反応の基質は対応するデオキシヌクレオチド三リン酸であり、ポリメラーゼに認識されるためには、鋳型ストランド上の正しいヌクレオチドと塩基対合する必要がある。DNAは二重らせんとして存在するので、二本鎖のそれぞれが、新たな相補的ストランドの形成のための鋳型となり得る。したがって、分裂中の細胞の2個の娘細胞のそれぞれが、1本は古く1本は新しいストランドを持つ新たなDNA二重らせんを受け継ぐ。したがって、DNAは、DNAポリメラーゼによって「半保存的に

40

50

」複製されると言われる。新たなDNAの合成に加え、DNAポリメラーゼはまた、損傷したDNAの修復にも関わる。これは、下記の「リガーゼ」で述べる。

【0033】

DNAポリメラーゼと対照的に、RNAポリメラーゼは1本のDNA鋳型ストランドを用いてDNAをRNAに「転写」し、これにはリボヌクレオチド三リン酸を基質として用いる。DNA重合と同様、RNA重合は、5'から3'方向に、リボヌクレオチド三リン酸の、成長するRNA鎖の3'-OH末端への付加によって進む。DNA転写はメッセンジャーRNA (mRNA)を産生し、mRNAはタンパク質合成のための情報を運ぶ。DNA転写はまた、転移RNA、リボソームRNAや、構造的または触媒的な機能を持つ他のRNAをも産生する。真核細胞では、3種の別々のRNAポリメラーゼが、3タイプのRNAを合成する(Alberts、前出 367-368ページ)。RNAポリメラーゼIは大きなリボソームRNAを作り、RNAポリメラーゼIIはタンパク質へと翻訳されるmRNAを作り、RNAポリメラーゼIIIは、種々の小さな安定したRNA(5SリボソームRNAや転移RNA(tRNA)等)を作る。どの場合も、RNA合成の開始は、RNAポリメラーゼの、DNA上のプロモーター領域への結合によってなされ、合成の開始は、プロモーター内の開始部位で起こる。合成の完了は、DNA内の停止(終了)シグナルでなされ、ここでポリメラーゼと完成したRNA鎖とが解放される。

10

【0034】

リガーゼ

DNA修復のプロセスによって、偶発的な塩基変化(原因は例えば酸化損傷、加水分解的攻撃、DNAの無秩序なメチル化など)が、DNAの複製または転写が起きる前に修正される。DNA修復プロセスの効率が良いので、偶発的な塩基変化の1000分の1未満のみが突然変異を起こす(Alberts、前出 245-249ページ)。殆どのタイプのDNA修復に共通の3つのステップは、(1)損傷または変容した塩基またはヌクレオチドの、DNAヌクレアーゼによる切除。(2)切除されたヌクレオチドが残したギャップへの、正しいヌクレオチドの挿入。これはDNAポリメラーゼが、相補的ストランドを鋳型として用いて行う。(3)挿入されたヌクレオチド(群)と既存DNAストランドとの間に残った切れ目の、DNAリガーゼによる埋め合わせ(sealing)、である。最後の反応において、DNAリガーゼはATP加水分解からのエネルギーを用い、切れ目の入ったホスホジエステル結合の5'末端を活性化した後、DNAストランドの3'-OHとの新たな結合を形成する。ブルーム症候群は遺伝性のヒト疾患であるが、この患者はこのDNAライゲーションが部分的に欠損しているため、癌の発症の増加を示す(Alberts、前出 247ページ)。

20

30

【0035】

ヌクレアーゼ

ヌクレアーゼ酵素には、DNAを加水分解するDNアーゼと、RNAを加水分解するRNアーゼとがある。2種のヌクレアーゼは、核酸代謝において別々の目的で働く。ヌクレアーゼは、隣接するヌクレオチド間のホスホジエステル結合を加水分解する。エンドヌクレアーゼは内部の位置で加水分解し、エキソヌクレアーゼは3'または5'末端のヌクレオチド位置で加水分解する。例えばDNAポリメラーゼにおける或るDNAエキソヌクレアーゼ活性は、ポリメラーゼによって成長するDNAストランドの3'-OH末端に付着されたヌクレオチドの内、不適切に対合したヌクレオチドを除去するよう働くので、「校正」機能を提供する。上記したように、DNAエンドヌクレアーゼ活性は、DNA修復プロセスの切除ステップに関わる。

40

【0036】

RNアーゼ(RNase)もまた、種々の機能を提供する。例えばRNase Pはリボ核タンパク質酵素であり、tRNA前駆体群の5'末端の切断を、それらの成熟プロセスの一部として行う。RNase Hは、或るRNA/DNAハイブリッドのRNAストランドを消化する。このようなハイブリッドはレトロウイルスが侵入した細胞に生じ、RNase Hは、レトロウイルス複製サイクルにおける重要な酵素である。膵臓RNアーゼは膵臓によって腸内に分泌され、摂取した食物の中のRNAを加水分解する。血清と細胞抽出物とにおけるRNアーゼ活性の上昇は、種々の癌や感染疾患で見られる(Schein, C.H. (1997) Nat. Biotechnol. 15:529-536)。RNアーゼ活性の調節が、腫瘍血管新生、アレルギー反応、ウイルスの感染および複製、並びに真

50

菌感染を制御する手段として研究されている。

【 0 0 3 7 】

核酸の修飾

メチラーゼ

特定ヌクレオチドのメチル化はDNA、RNA双方で起こり、この2種の高分子において別々の機能を提供する。DNAでシトシン残基のメチル化は5-メチルシトシンを形成し、これは、DNA二重らせん内で互いに塩基対合したCG配列群内で特異的に起こる。メチル化のこのパターンは、DNA複製時に世代間で受け渡される。これを行う酵素は「維持メチラーゼ」と呼ばれ、既にメチル化されたCG配列と塩基対合したCG配列上で優先的に作用する。このようなメチル化は、活性遺伝子と非活性遺伝子との区別を、遺伝子を「オンにする (turn on)」調節タンパク質の結合を防ぐ一方、遺伝子を不活化するタンパク質の結合を許すことによって行うようである (Alberts 他、前出 448-451ページ)。RNA代謝では、「tRNAメチラーゼ」がtRNAにおける幾つかのヌクレオチド修飾の1つを起こす。この修飾は、この分子のコンフォメーションと塩基対合とに影響し、適切なmRNAコドンの、特異的tRNA群による認識を促進する。主なメチル化パターンとしてはグアニン残基のジメチル化があり、これはN,N-ジメチルグアニンを形成する。

【 0 0 3 8 】

ヘリカーゼおよび一本鎖結合タンパク質

ヘリカーゼ酵素は、DNA、RNA双方の二重らせん構造を不安定化し、巻き戻す。DNA複製は2本のストランドでほぼ同時に起こるので、2本のストランドは先ず分離して複製「フォーク」を産生し、DNAポリメラーゼが作用できるようにする必要がある。2種の複製タンパク質がこのプロセスに寄与する。DNAヘリカーゼと、一本鎖結合タンパク質とである。DNAヘリカーゼは、ATPを加水分解し、そのエネルギーを用いてDNAストランドを分離させる。一本鎖結合タンパク質(SSB)が次に、露出したDNAストランドに結合するが、塩基を覆いはず、DNAポリメラーゼによる鋳型取りのためにそれらを一時的に安定化する (Alberts、前出 255-256ページ)。

【 0 0 3 9 】

RNAヘリカーゼは、RNAのコンフォメーションと2次構造とを変容させ調節する。DNAヘリカーゼと同様、RNAヘリカーゼは、ATP加水分解に由来するエネルギーを利用し、RNA二重鎖を不安定化し巻き戻す。RNAヘリカーゼの最も良く特徴付けられ偏在するファミリーはDEADボックスファミリーであり、その名は、保存されたBタイプATP結合モチーフに由来する。このモチーフは、このファミリーのタンパク質にとって特徴的である。40種を超すDEADボックスヘリカーゼが、細菌、昆虫、酵母、両生類、哺乳類、および植物に及ぶ多様な生物において同定されている。DEADボックスヘリカーゼは、多様なプロセスにおいて機能する。そのプロセスとしては例えば翻訳開始、スプライシング、リボソームのアセンブリ、および、RNAの編集、輸送、安定性がある。これらのRNAヘリカーゼの例としては、酵母Drs1タンパク質 (リボソームRNAプロセシングに関与)、酵母TIF1およびTIF2並びに哺乳類eIF-4A (これらはRNA翻訳の開始に必須である)、およびヒトp68抗原 (細胞の成長および分化を調節) がある (Ripmaster, T.L. 他 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11131-11135; Chang, T.-H. 他 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1571-1575)。これらのRNAヘリカーゼは、強い配列相同性を、約420アミノ酸のストレッチにわたり示す。これらの保存された配列としては、或るATP結合タンパク質のAモチーフのコンセンサス配列、「DEADボックス」配列 (ATPアーゼ活性に関与)、配列SAT (実際のヘリカーゼ巻き戻し領域に関与)、および、RNA結合とATP加水分解とに必要なオクタペプチドコンセンサス配列がある (Pause, A. 他 (1993) Mol. Cell Biol. 13:6789-6798)。これらの保存された領域以外の差異は、個々のタンパク質の機能上の役割における差異を反映すると思われる (Chang, T.H. 他 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1571-1575)。

【 0 0 4 0 】

数種のDEADボックスヘリカーゼは、精子形成と胚形成とにおいて、組織特異的およびステージ特異的な役割を果たす。DEADボックス1タンパク質(DDX1)の過剰発現は、神経芽腫 (

Nb)と網膜芽腫(Rb)との進行において役割を果たすと思われる(Godbout, R. 他 (1998) J. Biol. Chem. 273:21161-21168)。これらの観察の示唆するところでは、DDX1は、腫瘍進行の促進または増強を、癌細胞内のRNAの正常な二次構造と発現レベルとを改変することによって行う。別のDEADボックスヘリカーゼ群は、腫瘍形成に直接または間接的に関与すると思われる(前出Godbout で考察されている)。例えばネズミp68は紫外線で誘発した腫瘍において突然変異し、ヒトDDX6は、B細胞リンパ腫に関連する或る染色体ブレイクポイントに位置する。同様に、DDX10とNUP98(1種の核膜孔タンパク質:nucleoporin)とかなるキメラ蛋白質は、特定の骨髄性悪性腫瘍の病原に関与している可能性がある。

【0041】

RuvA、RuvBおよびRuvCタンパク質は損傷を受けたDNAの相同性遺伝子組替えおよび組換え修復の後期に関与している。RuvA およびRuvBは複合体を形成し、この複合体はヘテロ二本鎖DNAの形成のためのHolliday ジャンクションのATP依存性交叉点移動(branch migration)を促進する。RuvA はジャンクションへの交叉点移動モーターであるRuvBを標的とする特異性因子として作用する。2つのRuvA 4量体はジャンクションを間にはさみ、それを広げられた四角平面構成で保持する。RuvBの六量体リングはジャンクションを挟んで互いに向きあっており、ATP加水分解によって生じる遊離エネルギーを用いて、RuvAB 複合体を介してDNAを「注ぎ込む(pump)」新規な二重のヘリカーゼ作用を促進する。第三のタンパク質であるRuvC エンドヌクレアーゼは2つのDNA鎖に切れ目を入れることによってHollidayジャンクションを分離する。遺伝的研究と生化学的研究により、この三つのタンパク質間の直接の相互作用によって、おそらくはRuvABC 複合体の形成によって交叉点移動と分解は関連していることが示されている(West, S.C.(1997) Annu. Rev. Genet. 31:213244)。

【0042】

トポイソメラーゼ

DNAストランドを複製前に分離する他に、2本のストランドは、DNAヘリカーゼによる分離の前に、互いから「巻き戻す」必要がある。この機能を行うタンパク質は、DNAトポイソメラーゼとして知られる。DNAトポイソメラーゼは、可逆的ヌクレアーゼとして効果的に作用してDNAストランド内のホスホジエステラーゼ結合を加水分解し、二本鎖を互いに対して自由に回転できるようにしてヘリックスを巻き戻した後、二本鎖の間の元のホスホジエステル結合を再結合させる。トポイソメラーゼは、転写、複製、クロマチン形成、組換え、および染色体分離、によって生じたDNAのトポロジ的再編成を担う必須酵素である。DNAへの高次らせんコイルの導入は、前進する酵素(processive enzyme)(例えばRNAポリメラーゼ)の通過によって、または、ヘリカーゼによるDNAストランドの複製前の分離によってなされる。DNAの合成、貯蔵、修復のプロセス中に、結び目(knotting)と連環(concatenation)とが生じ得る。全てのトポイソメラーゼの働きは、DNAのリボース-リン酸主鎖内のホスホジエステル結合を壊して行う。この酵素にある或る触媒チロシン残基が、切れやすいホスホジエステル結合に求核攻撃することによって反応中間体を生じる。この中間体では、共有結合が、この酵素と、壊れたストランドの1端との間に形成される。或るチロシンDNAホスホジエステラーゼは、偶発するデッドエンドトポイソメラーゼI-DNA中間体の中のこの結合を加水分解することでDNAの修復に機能する(Pouliot, J. J.他(1999) Science 286:552-555)。

【0043】

2タイプのDNAトポイソメラーゼ、タイプIとタイプIIとがある。タイプIトポイソメラーゼは単量体として働いてDNAの一本鎖に切れ目を作る。一方、タイプIIトポイソメラーゼはホモ二量体として働き、二本鎖の双方を切断する。DNAトポイソメラーゼIは、DNAヘリックス内に一本鎖の切れ目を生じることによって、ヘリックスの二本鎖が、反対のストランドの中の、残るホスホジエステル結合を軸に回転できるようにする。DNAトポイソメラーゼIはDNAヘリックスの二本鎖の双方に一時的な切れ目を作り、ここで二本の二重らせんが互いに交差する。このトポイソメラーゼIIは、2つの連環した環状DNAを、効果的に分離できる(Alberts、前出 260-262ページ)。タイプIIトポイソメラーゼは、真核生物で

は増殖する細胞（癌細胞など）にほとんど限られている。このためトポイソメラーゼIIは、抗癌剤の標的である。トポイソメラーゼIIは、多剤耐性（MDR）に関係すると思われる。その理由は、この酵素がDNA結合剤（ドキソルビシン：doxorubicinやビンクリスチン：vincristineなど）によるDNA損傷の修復を助けると思われるからである。

【0044】

トポイソメラーゼIファミリーには、トポイソメラーゼI（TopoI）とトポイソメラーゼIII（TopoIII）とを含む。ヒトのトポイソメラーゼIの結晶構造が示唆するところでは、無傷DNAストランドを軸とした回転を、この酵素が部分的に制御する。この「制御された回転（controlled rotation）」モデルでは、タンパク質-DNA相互作用がこの回転を制限する。これはDNA内のねじれひずみ（torsional strain）が駆動する（Stewart, L. 他（1998）*Science* 379:1534-1541）。構造的にはTopoIは、その活性部位領域内の触媒チロシン残基と、多数の他の保存された残基で認識できる。TopoIは、転写時に機能すると思われる。2種のTopoIIIがヒトでは既知であり、これらは原核生物トポイソメラーゼに相同で、保存されたチロシンと、このファミリーに特異的な活性部位シグネチャを持つ。TopoIIIは、減数分裂組換え（meiotic recombination）において役割を果たすことが示唆されている。マウスのある種のTopoIIIは精巣組織で高度に発現され、その発現の増加は、太糸期（pachytene）における細胞数の増加に伴う（Seki, T. 他（1998）*J. Biol. Chem.* 273:28553-28556）。

10

【0045】

トポイソメラーゼIIファミリーには、2種のイソ酵素（II α およびII β ）を含み、2種は別々の遺伝子がコードする。TopoIIは二本鎖DNAの切断を、再現性のある非無作為の方法で優先的に、或るATリッチ領域で行うが、切断部位選択性の原理は未知である。構造上はTopoIIには4つのドメインがある。その最初の2つは構造的に類似し、おそらく真核生物TopoIの類似ドメインに遠い相同性を持つ。第二ドメインには触媒チロシンと、高度に保存されたペントペプチドを持つ。II α イソフォームは、染色体分離時にDNAを解くこと（unlinking）に関係するようである。II α を発現するがII β を発現しない細胞株は、II β が細胞プロセスに非必須であることを示唆するが、II β ノックアウトマウスは、神経発生における不全のため周産期に死亡した。主な異常が主に後期発生イベント（神経形成）時に起きたことは、II β が有糸分裂ではなくDNA修復時に必要であることを示唆する（Yang, X. 他（2000）*Science* 287:131-134）。

20

30

【0046】

トポイソメラーゼは多数の病態に関わるとされており、トポイソメラーゼ毒は、数種のヒト悪性腫瘍癌に有効な抗腫瘍薬であることが示されている。TopoIはファンコニ貧血（Fanconi's anemia）では誤った場所に局在する。また、この疾患に見られる染色体切断に関わるとされる（Wunder, E.（1984）*Hum. Genet.* 68:276281）。毛細血管拡張性運動失調（A-T）細胞での短縮されたTopoIIIの過剰発現は、部分的にA-T表現型を抑制するが、これはおそらく優性阻害機序（dominant negative mechanism）による。これが示唆するところでは、TopoIIIはA-Tでは調節解除される（Fritz, E. 他（1997）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4538-4542）。TopoIIIはまた、ブルーム症候群（Bloom's Syndrome）遺伝子産物と相互作用する。また、腫瘍抑制因子としての役割を持つことを示唆されている（Wu, L. 他（2000）*J. Biol. Chem.* 275:9636-9644）。異常なTopoII活性は、しばしば癌や、増加した癌リスクを伴う。大きく低下したTopoII活性が、全てではないが数種のA-T細胞株に見られている（Mohamed, R. 他（1987）*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:233-238）。一方、TopoIIIは、DNAの分断を、A-T遺伝子（ATM）の領域で行い得る。ATMは、全てのDNA損傷応答性細胞周期チェックポイントを制御する（Kaufmann, W.K.（1998）*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:327-334）。トポイソメラーゼがDNAを分断する能力は、抗腫瘍薬の基礎として用いられている。トポイソメラーゼ毒は、デッドエンド共有結合DNA-酵素複合体の細胞内の数を増すことによって作用し、最終的には細胞死経路の引き金となる（Fortune, J.M. および N. Osheroff（2000）*Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64:221-253；Guichard, S.M. および M.K. Danks（1999）*Curr. Opin. Oncol.* 11:482-489）。TopoI

40

50

に対する抗体は全身性強皮症 (systemic sclerosis) 患者の血清中に見られ、この抗体のレベルは、この疾患に關与する肺のマーカーとして利用できそうである (Diot, E. 他 (1999) Chest 116:715-720)。最後に、ヒトのTopoIのDNA結合領域は、遺伝子治療用のDNA送達伝播体として用いられている (Chen, T.Y. 他 (2000) Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:558-567)。

【 0 0 4 7 】

リコンビナーゼ

遺伝子組換えは、或る生物のゲノム内でのDNA配列の再編成プロセスであり、環境の変化に応じたその生物の遺伝子変異を提供する。DNA組換えによって、或る個体のゲノム内にある遺伝子の特定の組み合わせにおける変異が可能になり、これらの遺伝子の発現の時期とレベルとにおける変異も可能である (前出Alberts、263-273ページを参照)。2種の広範なクラスの遺伝子組換え (普遍的組換えと部位特異的組換え) が広く認識されている。普遍的組換えでは、任意の相同的な1対のDNA配列間の遺伝子交換を伴う。これらの配列の位置は通常、同じ染色体の2つのコピー上にある。このプロセスを補助する酵素であるリコンビナーゼは、DNA二重鎖の一方のストランドに幾分無作為的に「ニック (切れ目) を入れ」、他の二重鎖にある相補的ストランドとの交換を可能にする。このプロセスは、通常は染色体内の遺伝子の編成を変えない。部位特異的組換えでは、リコンビナーゼは組み換える分子の一方または双方にある特定のヌクレオチド配列を認識する。塩基対合はこの形の組み換えには関与しないので、組み換える分子の間のDNA相同性は不要である。普遍的組換えとは異なり、部位特異的組み換えは、染色体内のヌクレオチド配列群の相対位置を改変できる。

【 0 0 4 8 】

R N A 代謝

リボ核酸 (RNA) は直鎖の一本鎖重合体である (4種のヌクレオチドであるATP、CTP、UTP、およびGTPからなる)。殆どの生物では、RNAは、その生物の遺伝子材料であるデオキシリボ核酸 (DNA) のコピーとして転写される。レトロウイルスでは、DNAでなくRNAが遺伝子材料として働く。遺伝子材料のRNAコピーは、タンパク質をコードするか、もしくは生物内で種々の構造的、触媒的、または調節的な役割を果たす。RNAの分類は、その細胞内局在と機能とに基づく。メッセンジャーRNA (mRNA) は、ポリペプチドをコードする。リボソームRNA (rRNA) は、リボソーム蛋白質と組み合わされてリボソームとなる。リボソームは細胞質粒子であり、mRNAをポリペプチドへ翻訳する。転移RNA (tRNA) はサイトゾルのアダプター分子であり、mRNA翻訳における機能はmRNAコドンと、そのコドンに適合するアミノ酸との双方の認識である。ヘテロ核RNA (hnRNA) としては、mRNA前駆体と、他の種々のサイズの核内RNAとを含む。核内低分子RNA (snRNA) は核内スプライセオソーム複合体の一部である。この複合体は、mRNA前駆体内に介在する非コード配列 (イントロン) 群を除去し、エキソン群を再結合する。

【 0 0 4 9 】

タンパク質は、DNAからのRNAの転写や、RNAプロセシング、および、タンパク質へのmRNAの翻訳の際に、RNAと会合する。タンパク質はまた、RNAが構造的、触媒的、または調節的な目的で利用される際に、RNAと会合する。

【 0 0 5 0 】

R N A プロセシング

リボソームRNA (rRNA) は、リボソーム蛋白質と組み合わされてリボソームとなる。リボソームは細胞質粒子であり、メッセンジャーRNA (mRNA) をポリペプチドへ翻訳する。真核生物リボソームは60S (大) サブユニットと40S (小) サブユニットとからなり、両ユニットが共になって80Sリボソームを形成する。18S、28S、5S、および5.8SのrRNAに加え、リボソームには生物の種類によって50から80種を超す別々のリボソーム蛋白質が含まれる。リボソーム蛋白質の分類は、それらが属するサブユニットによる (すなわち、大きな60Sサブユニットに関連するならL、小さい40SサブユニットならS)。大腸菌リボソームはもっとも詳しく研究されており、50種の蛋白質を持ち、その多くは全ての生物で保存されている

。9種のリボソーム蛋白質の構造の解明が3.0D未満の分解能でなされており(すなわちS5、S6、S17、L1、L6、L9、L12、L14、L30)、共通のモチーフ群(例えばb-a-b蛋白質フォールド群)と、b-ストランドの間に位置する酸性および塩基性のRNA結合モチーフ群とを明らかにした。殆どのリボソーム蛋白質はrRNAと直接に接触すると思われる(概説はLiljas, A. および Garber, M. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:721-727; また、Woodson, S.A. および Leontis, N.B. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:294-300; Ramakrishnan, V. および White, S.W. (1998) *Trends Biochem. Sci.* 23:208-212を参照)。

【0051】

リボソーム蛋白質は、翻訳を調節するために、翻訳後修飾を受けたり、他のリボソーム関連タンパク質と相互作用することがある。例えば高度に相同な40Sリボソーム蛋白質S6キナーゼであるS6K1とS6K2とは細胞成長の調節において主要な役割を果たすが、これはタンパク質合成装置(例えばリボソーム蛋白質)を作り上げる翻訳成分の生合成を制御することにより行う。S6K1の場合、少なくとも8つのリン酸化部位が、キナーゼ活性化を階層的な手法で仲介すると思われる(Dufner および Thomas (1999) *Exp. Cell. Res.* 253:100-109)。数種のリボソーム蛋白質(L1を含む)はまた翻訳抑制因子として機能し、これはリボソーム蛋白質をコードするポリシストロニック性mRNAと結合して行う(概説は前出Liljasおよび前出Garber)。

10

【0052】

最近の証拠が示唆するところでは、多数のリボソーム蛋白質が、蛋白質生合成へのこれらの関与とは独立した二次機能を持つ。これらの蛋白質は、細胞増殖の調節因子として、また数例では細胞死の誘発因子として機能する。例えばヒトのリボソーム蛋白質L13aの発現は、アポトーシスを誘発することが示されている。これは、細胞周期のG2/M期に細胞成長を停止させて行う。L13aの発現の抑制は標的細胞内にアポトーシスを誘発し、これが示唆するところでは、この蛋白質は、適量では、細胞生存に必要である。同様の結果が酵母でも得られている。ここでは、L13aの酵母相同体である、rp22とrp23との不活化によって、重度の成長遅滞と死とを招いた。非常に近縁のリボソーム蛋白質であるL7は、G1期の細胞を停止させ、アポトーシスをも誘発する。したがって、或るサブセットのリボソーム蛋白質は、細胞周期チェックポイントとして機能すると思われ、新規ファミリーの細胞増殖調節因子を構成するようである。

20

【0053】

個々のリボソーム蛋白質の、無傷リボソームの表面へのマッピングがなされた。これには3D免疫低温電子顕微鏡(immunocryoelectronmicroscopy)を用い、これによって特定のリボソーム蛋白質群に対して産生された抗体群が可視化された。L1、L7、およびL12のマッピングに向けて進歩がなされているが、無傷リボソームの構造の解明は、わずかに20~25Dの分解能であり、別々の粗構造(crude structures)の間には矛盾がある(Frank, J. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:266-272)。

30

【0054】

3種の別々の部位が、リボソーム上で同定されている。アミノアシルtRNA受容部位(A部位)は、アミノ酸を負わせた(charged) tRNAを受け取る(例外は開始tRNAである)。ペプチジルtRNA部位(P部位)は新生ポリペプチドと結合し、A部位からのアミノ酸が、この伸長する鎖に付加される。脱アシル化したtRNA群は、脱出部位(E部位)内に結合した後、リボソームから解放される。リボソームの構造の概説は、Stryer, L. (1995) *Biochemistry* W. H. Freeman and Company, New York NY 888-9081ページ; Lodish, H. 他 (1995) *Molecular Cell Biology* Scientific American Books, New York NY 119-138ページ; および Lewin, B (1997) *Genes* VI Oxford University Press, Inc. New York, NYを見られたい。

40

【0055】

種々の蛋白質が、核内で転写されたRNAのプロセッシングに必要である。mRNAプロセッシングの前段階としては、5'末端へのメチルグアノシンでのキャッピング、3'末端のポリアデニル化、および、イントロンを除去するためのスプライシングを含む。DNAからの一次RNA転写物は、エキソン、イントロン双方の配列を有する遺伝子の忠実なコピーであり、イン

50

トロン配列がRNA転写物から切り出されることが、蛋白質をコードするmRNAを産出するために必要である。mRNAの「スプライシング」は、核内で、大きな多成分リボ核タンパク質複合体(スプライセオソームとして知られる)の補助を受けてなされる。スプライセオソーム複合体は、5種の低分子核内リボ核タンパク質粒子(snRNP)である、U1、U2、U4、U5、およびU6からなる。それぞれのsnRNP内には、1つの種のsnRNAと、約10種のタンパク質とを含む。数種のsnRNPのRNA成分は、イントロンのコンセンサス配列を認識し塩基対合する。タンパク質成分は、スプライセオソームアセンブリと、スプライシング反応とを仲介する。snRNPタンパク質に対する自己抗体は、全身性紅斑性狼瘡患者の血中に見られる(Stryer, L. (1995) Biochemistry W.H. Freeman and Company, New York NY, 863ページ)。

【0056】

10

不均質核内リボ核タンパク質(hnRNP)の役割は、スプライシングや、成熟RNAの細胞質への移出、および、mRNA翻訳にあることが同定されている(Biamonti, G. 他 (1998) Clin. Exp. Rheumatol. 16:317-326)。hnRNPの例としては、酵母タンパク質群である、Hrp1p(RNAの切断と3'末端でのポリアデニル化に関与)、Cbp80p(RNAの5'末端のキャッピングに関与)、および、Npl3p(核からのmRNAの移出に関与する哺乳類hnRNP A1の相同体)がある(Shen, E.C. 他 (1998) Genes Dev. 12:679-691)。hnRNPは、リウマチ性疾患における自己免疫応答の重要な標的であることが示されている(前出Biamonti)。

【0057】

多くのsnRNPタンパク質およびhnRNPタンパク質は、或るRNA認識モチーフ(RRM)によって特徴付けられる(概説はBirney, E. 他 (1993) Nucleic Acids Res. 21:5803-5816)。RRMは、約80アミノ酸の長さであり、 α/β サンドイッチの形に編成された4本の β ストランドと2本の α ヘリックスとを形成する。RRM内には、コアのRNP-1オクタペプチドモチーフと、周囲の保存された配列群とを含む。snRNPタンパク質に加え、上記モチーフ群を持つRNA結合タンパク質の例には、新生RNAを安定させるヘテロ核リボ核タンパク質と、選択的スプライシングを調節する因子群とを含む。選択的スプライシング因子には発生的に調節されるタンパク質が含まれ、その特異的な例は下等真核生物(例えばキイロショウジョウバエや線虫*Caenorhabditis elegans*)において同定されている。これらのタンパク質は、それぞれ発生プロセス(例えばパターン形成や性決定)において重要な役割を果たす(例えばHodgkin, J. 他 (1994) Development 120:3681-3689を参照)。

20

【0058】

30

殆どの真核生物mRNAの3'末端は、また、ポリアデニル化による転写後修飾を受ける。ポリアデニル化は、2種の、酵素的に別々のステップを経て進む。(i)新生mRNAの内ヌクレオチド鎖分解性切断が、3'非翻訳(非コード)領域内のシス作用ポリアデニル化シグナル群でなされ、(ii)ポリ(A)トラクト(poly(A) tract)が、5' mRNA断片へ付加される。シス作用RNA配列群の存在が、両方のステップに必要である。これらの配列としては、5'-AAUAAA-3'(切断部位の10~30ヌクレオチド上流に位置)と、あまり保存されていないGU-リッチ配列エレメントまたはU-リッチ配列エレメント(切断部位の10~30ヌクレオチド下流に位置)とを含む。切断刺激因子(CstF)、切断因子I(CF I)、および切断因子II(CF II)は切断反応に関わり、一方、切断ポリアデニル化因子(CPSF)とポリ(A)ポリメラーゼ(PAP)とは、切断とポリアデニル化との双方に必要である。付加的酵素であるポリ(A)結合タンパク質II(PAB II)は、ポリ(A)トラクト伸長を促進する(Ruegsegger, U. 他 (1996) J. Biol. Chem. 271:6107-6113; およびその参考文献)。

40

【0059】

翻訳

遺伝子コードの正しい翻訳は、適切な転移RNA(tRNA)との連結を形成する各アミノ酸に依存する。アミノアシル-tRNA合成酵素(aaRS)は、全ての生物に在る本質的なタンパク質である。aaRSは、タンパク質の生合成の最初の段階として、アミノ酸の活性化と、その同族tRNAとの正しい付着とを担う。原核生物は少なくとも20種の異なるタイプのaaRSを持ちアミノ酸ごとに1種類のaaRSを持つが、真核生物は通常、異なるアミノ酸の各々のために細胞質ゾル型とミトコンドリア型の2つのaaRSを有する。20種のaaRS酵素は2つの構造的

50

クラスに分け得る。クラスI酵素はtRNAの3'末端で2'ヒドロキシルにアミノ酸を加え、クラスII酵素はtRNAの3'末端で3'ヒドロキシルにアミノ酸を加える。各クラスは触媒的ドメインの特有のトポロジーによって特徴づけられる。クラスI酵素には、ヌクレオチド結合した「ロスマンフォールド」に基づく触媒的ドメインがある。特に、或るコンセンサステトラペプチドのモチーフは、高度に保存的である(Prositate Document PDOC00161, Aminoacyl-transfer RNA synthetases class-I signature)。クラスI酵素は、アルギニン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、チロシン、トリプトファンおよびバリンに特異的である。クラスII酵素は、中心的触媒ドメイン(7本鎖の逆平行β-シートドメインからなる)と、N末端およびC末端調節ドメインを持つ。クラスII酵素は酵素のヘテロ二量体構造あるいはホモ二量体構造に基づく2つのグループに分けられ、後者はさらにN末端およびC末端調節ドメインの構造によって分けられる(Hartlein, M. および Cusack, S. (1995) J. Mol. Evol. 40:519-530)。クラスII酵素は、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、フェニルアラニン、プロリン、セリンおよびトレオニンに特異的である。

10

【0060】

数種のaaRSには編集(エディティング)機能もある。例えばIleRSはバリンを誤って活性化しVal-tRNA^{Ile}を形成する場合があるが、この生成物は、誤ってチャージした生成物を破壊する、或る加水分解作用によって取り除かれる。この編集活性は、クラスI酵素のRossmann foldドメイン内の長い挿入配列である接続ポリペプチド1領域(connective polypeptide 1 region)(CP1)で見つかる2番目の触媒サイト内に位置する(Schimmel, P. 他(1998) FASEB J. 12:1599-1609)。AaRSはまたtRNAプロセッシングでも役割を果たす。成熟したtRNAは細胞質に移出される前に、核の中でそれぞれのアミノ酸でチャージされることが示されている。またこのアミノ酸との結合は品質管理機構として機能し、確実にtRNAを機能的に保っている可能性がある(Martinis, S.A. 他(1999) EMBO J. 18:4591-4596)。

20

【0061】

最適条件下でのポリペプチド合成の進行速度は、約40アミノ酸残基/秒である。翻訳時の誤った取り込みの比率は 10^{-4} の位であり、主な原因はアミノアシル-tRNAに間違ったアミノ酸でチャージされたことである。不正にチャージしたtRNAは細胞毒性を持つ。その理由は、それらが不正アミノ酸残基を、伸長するポリペプチドに組み込むためである。翻訳の速度は、最適な伸長速度と、翻訳忠実度の必要性との折衷で決まると推測される。数学的計算による予測では、 10^{-4} が、生物系におけるタンパク質合成の最大許容エラー率である(概説は前出 Stryer および Watson, J. 他(1987) The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Menlo Park, CA)。特にエラーの多いアミノアシル-tRNAチャージングイベントは、tRNA^{Gln}のグルタミン(Gln)との結合である。このミスチャージングを補正する機序があり、これはその起源を進化の中に持つようである。Glnはポリペプチド合成に利用され自然界に現れる20種の天然アミノ酸の最後の集団にあった。グラム陽性真正細菌、シアノバクテリア、始原菌(Archeae)、および真核生物のオルガネラは、Gln-tRNA^{Gln}の合成のための非典型的経路(noncanonical pathway)を持ち、この経路はGlu-tRNA^{Gln}(Glu-tRNAシンテターゼであるGluRSが合成)のトランスフォーメーションに基づくものであり、酵素であるGlu-tRNA^{Gln}アミドトランスフェラーゼ(Glu-AdT)を用いる。アミド基転移経路に関わる反応は次のとおりである(Curnow, A.W. 他(1997) Nucleic Acids Symposium 36:2-4)。

30

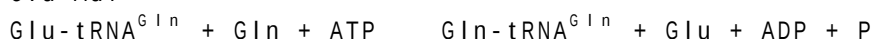
40

【0062】

GluRS



Glu-AdT



【0063】

50

類似の酵素である Asp-tRNA^{Asn} アミドトランスフェラーゼは始原菌に存在し、Asp-tRNA^{Asn} を Asn-tRNA^{Asn} へ転換する。ホルミラーゼ(formylase)酵素は真正細菌において Met-tRNA^{fMet} を fMet-tRNA^{fMet} へ転換し、これは近縁の酵素のようである。或る加水分解活性もまた、ミスチャージした Val-tRNA^{Ile} を破壊することが同定されている (Schimmel, P. 他 (1998) FASEB J. 12:1599-1609)。原始的な生物形態における Glu-AdT の進化の、或る可能性のあるシナリオは、特異的グルタミンル-tRNA シンターゼ (GlnRS) の不在が、Gln-tRNA^{Gln} の合成のための代替経路を必要としたというものである。事実、グラム陽性細菌における Glu-AdT オペロンの欠失は致命的である (Curnow, A.W. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:11819-11826)。他の生物における GluRS 活性の存在が自然界の翻訳機構における高度の保存によって推測されているが、GluRS は、ヒトを含む全ての生物において同定されていない。このような酵素は、翻訳忠実度を確保し、欠陥ポリペプチドの合成を減らすよう働くと思われる。

10

【0064】

タンパク質合成における機能に加えて、特定のアミノアシル tRNA 合成酵素群は、細胞忠実度、RNA スプライシング、RNA 輸送、アポトーシス、および転写と翻訳の調節で役割を果たす。例えばヒトのチロシル tRNA 合成酵素はたんぱく質分解により、別々のサイトカイン活性を持つ 2 つの部分に裂け得る。C 末端ドメインは単球と白血球の走化性を示し、また、ミエロペルオキシダーゼ、腫瘍壊死因子- α および組織因子の生成を促す。N 末端ドメインはインターロイキン-8 タイプ A 受容体に結合し、インターロイキン 8 様サイトカインとして機能する。ヒトのチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) はアポトーシス段階の腫瘍細胞から分泌される。また、アポトーシスを加速する可能性がある (Wakasugi, K および Schimmel, P (1999) Science 284:147-151)。ミトコンドリア型のアカパンカビ (*Neurospora crassa*) TyrRS および 出芽酵母 (*S. cerevisiae*) LeuRS はグループリントロンの数種のスプライシング活性に必須であり、ヒトのミトコンドリア LeuRS は酵母のヌル種 (null strain) において酵母 LeuRS として代用できる。数種のバクテリア aaRS は、それ自身の転写または翻訳の調節に関与している (前出 Martinis)。数種の aaRS は、細胞増殖、分化、およびアポトーシスにおいて役割を持つシグナル伝達分子の 1 クラスである、ジアドノシン オリゴホスフェートを合成できる (Kisselev, L.L 他 (1998) FEBS Lett. 427:157-163; Vartanian, A. 他 (1999) FEBS Lett. 456:175-180)。

20

アミノアシル-tRNA に対する自己抗体は、リウマチ関節炎、皮膚筋炎、及び多発性筋炎など、自己免疫疾患の患者によって産生される。また、複雑な間質性肺疾患 (ILD) と強度に相関する (Freist, W. 他 (1999) Biol. Chem. 380:623-646; Freist, W. 他 (1996) Biol. Chem. Hoppe Seyler 377:343-356)。これらの自己抗体はウイルス感染に応じて産生されるとみられ、コクサッキー ウイルスは動物に実験的ウイルス性筋炎を誘発するために用いられている。

30

【0065】

aaRS 構造の、人体と病原体とでの比較は、新規の抗生物質の設計に有用となっている (Schimmel, 前出)。遺伝子操作した aaRS 群を用いて *in vivo* で、非天然アミノ酸群のタンパク質類への部位特異的取り込みが可能となっている (Liu, D.R. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10092-10097)。

40

【0066】

tRNA の修飾

修飾されたりボヌクレオシドであるプソイドウリジン (Ψ) は、転移 RNA (tRNA)、大小のリボソーム RNA (rRNA)、および核内低分子 RNA (snRNA) のアンチコドン領域に偏在する。 Ψ は、tRNA に存在する最も一般的な修飾ヌクレオシド (すなわち G、A、U、および C 以外) である。タンパク合成に無関係のわずかな酵母 tRNA のみが、 Ψ を持たない (Cortese, R. 他 (1974) J. Biol. Chem. 249:1103-1108)。ウリジンから Ψ への転換を担う酵素であるプソイドウリジン合成酵素 (プソイドウリジル酸シンターゼ) は初め、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) から単離された (Arena, F. 他 (1978) Nucleic Acids Res. 5:4523-4536)。この酵素はそれ以後、多数の哺乳類 (例えば去勢ウシやマウス) から単離されて

50

いる (Green, C.J. 他 (1982) J. Biol. Chem. 257:3045-52並びに Chen, J. および Patton, J.R. (1999) RNA 5:409-419)。tRNA プソイドウリジン合成酵素は、このファミリーの、最も広く研究されているメンバーである。これらの酵素の最適活性には、チオール供与体 (システインなど) と、一価カチオン (アンモニアやカリウムなど) とが必要である。付加的補因子や高エネルギー分子 (ATP や GTP) は不要である (Green、前出)。別の真核生物プソイドウリジン合成酵素群が同定されており、rRNA に特異的なようである (概説は Smith, C.M. および Steitz, J.A. (1997) Cell 89:669-672)。また、或る二重特異性酵素は、tRNA 基質と rRNA 基質との双方を利用することが同定されている (Wrzesinski, J. 他 (1995) RNA 1:437-448)。ψ が tRNA のアンチコドンループ内に不在の場合、細菌 (Singer, C.E. 他 (1972) Nature New Biol. 238:72-74) と酵母 (Lecointe, F. (1998) 273:1316-1323) との双方において成長が低下するが、この遺伝子欠損は致死的ではない。

10

【 0 0 6 7 】

別のリボヌクレオシド修飾が主に真核細胞で起こる。これはグアノシンから N^2, N^2 -ジメチルグアノシン (m^2_2G) への転換であり、サイトゾルおよびミトコンドリアの tRNA の D ステムの塩基位置 26 または 10 で起こる。この転写後修飾は、tRNA 構造の安定化を、別の tRNA 二次構造および三次構造の形成を防ぐことで行うと思われる。酵母 tRNA^{Asp} は、この修飾を持たない点の特異である。この修飾は真正細菌には起こらず、理由はおそらく、これらの細胞とオルガネラにおける tRNA の構造が配列によって制約され、転写後修飾によって別の構造の形成を防ぐ必要がないためである (Steinberg, S. および Cedergren, R. (1995) RNA 1:886-891、およびその参考文献)。グアノシンから m^2_2G への転換を担う酵素は、63 kDa の S-アデノシルメチオニン (SAM)-依存性 tRNA N^2, N^2 -ジメチルグアノシンメチルトランスフェラーゼである (TRM1 遺伝子産物とも呼ばれ、本明細書では TRM と呼ぶ) (Edqvist, J. (1995) Biochimie 77:54-61)。この酵素は、核とミトコンドリアとの双方に局在する (Li, J.-M. 他. (1989) J. Cell Biol. 109:1411-1419)。アフリカツメガエル由来の TRM での研究に基づく、修飾される G26 の直前の C11 ~ G24 と G10 ~ C25 との位置での塩基対合には或る要件があると思われ、tRNA の別の構造的特徴も、G26 基質の適切な提示に必要に思われる (Edqvist, J. 他 (1992) Nucleic Acids Res. 20:6575-6581)。酵母での研究が示唆するところでは、或る弱いオーカー tRNA サプレッサ (sup3-i) を有する細胞群は、TRM 活性が無ければ翻訳終了を抑制できないことから、TRM が真核細胞において tRNA の正しい三次元構造の確保という、より一般的な機能にくわえて、抑制の頻度を調整する役割をも持つことを示唆する (Niederberger, C. 他 (1999) FEBS Lett. 464:67-70)。

20

30

【 0 0 6 8 】

翻訳開始

翻訳の開始は、3つのステージに分けることができる。第一ステージは、或る開始転移 RNA (Met-tRNA_f) と 40S リボソームサブユニットとから 43S 開始前複合体を形成する。第二ステージは、43S 開始前複合体を mRNA と結合させた後、複合体を正しい AUG 開始コドンに移動させる。第三ステージは、60S リボソームサブユニットを 40S サブユニットに導き、開始コドンにおいて 80S リボソームを産生する。翻訳の調節には主に、開始プロセスにおける第一および第二のステージが関わる (V.M. Pain (1996) Eur. J. Biochem. 236:747-771)。

40

【 0 0 6 9 】

数種の開始因子 (その多くは複数のサブユニットを持つが)、開始 tRNA と 40S リボソームサブユニットとの複合に関わる。eIF2 は 1 種のグアニンヌクレオチド結合タンパク質であり、開始 tRNA を 40S リボソームサブユニットまで動員する。eIF2 は GTP と結合した時にのみ開始 tRNA と会合する。eIF2B は 1 種のグアニンヌクレオチド交換タンパク質であり、eIF2 の、GDP 結合不活性型から GTP 結合活性型への転換を担う。2 種の別の因子である eIF1A と eIF3 とは、40S サブユニットと結合し安定化させ、これは 18S リボソーム RNA および特定のリボソーム構造タンパク質群と相互作用して行う。eIF3 はまた、40S リボソームサブユニットと mRNA との会合にも関わる。Met-tRNA_f、eIF1A、eIF3 および 40S リボソームサブユニットは共に、43S 開始前複合体を形成する (Pain、前出)。

50

【0070】

43S開始前複合体がmRNA分子と結合するには、複数の付加的因子が必要であり、このプロセスは、いくつかのレベルで調節される。eIF4Fという複合体は、3種のタンパク質、eIF4E、eIF4A、およびeIF4Gからなる複合体である。eIF4EはmRNAの5'-末端^{m7}GTPキャップを認識して結合し、eIF4Aは二方向性のRNA依存型ヘリカーゼであり、eIF4Gは一種の足場ポリペプチドである。eIF4Gは三つの結合ドメインを持つ。eIF4GのN末端側の三分の一はeIF4Eと相互作用し、中央の三分の一はeIF4Aと相互作用し、C末端の三分の一は43S開始前複合体に結合したeIF3と相互作用する。したがって、eIF4Gは、40SリボソームサブユニットとmRNAとの橋渡しをする(M.W. Hentze (1997) Science 275:500-501)。

【0071】

eIF4Fが43S開始前複合体の結合を開始する能力は、mRNAの構造的特徴によって調節される。mRNA分子は、5'キャップとAUG開始コドンとの間に非翻訳領域(UTR)を持つ。数種のmRNAでは、この領域は43S開始前複合体の結合を妨害する二次構造を形成する。eIF4Aのヘリカーゼ活性は、この二次構造を除去して43S開始前複合体の結合を促進するよう機能すると思われる(Pain、前出)。

【0072】

翻訳伸長

伸長プロセスでは、付加的アミノ酸群が開始メチオニンに結合し、完全ポリペプチド鎖を形成する。伸長因子であるEF1 α 、EF1 β γ 、およびEF2が、開始後のポリペプチド鎖の伸長に関わる。EF1 α はGTP結合タンパク質である。EF1 α のGTP結合型では、EF1 α がアミノアシルtRNAをリボソームのA部位に導く。新規に到着したアミノアシルtRNAに付着していたアミノ酸は、ペプチド結合を開始メチオニンとの間に形成する。EF1 α 上のGTPはGDPへ加水分解され、EF1 α -GDPはリボソームから解離する。EF1 β γ がEF1 α -GDPと結合し、GDPをEF1 α から解離させることにより、EF1 α はGTPと結合できるようになり新規サイクルが始まる。

【0073】

次々にアミノアシルtRNAがリボソームに導かれ、EF-G(別のGTP結合タンパク質)が、リボソームのA部位からP部位へ、そして最後にはE部位へのtRNAの移動を触媒する。これにより、リボソームとmRNAは翻訳中に結合したままでいられる。

【0074】

翻訳終了

放出因子(release factor)であるeRFが翻訳を終了させる。eRFはmRNA内の停止コドン認識し、ポリペプチド鎖をリボソームから遊離させる。

【0075】

発現プロファイル作成

アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子または無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する、簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときは、アレイを用いて、或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを試験するときは、アレイは次のような遺伝子を同定するプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、毒性アッセイにおいてテストされる物質に影響されるか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、ハウスキーピング機能を実行するか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの同定である。

【0076】

新規の核酸結合タンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチド群の発見により、新規の組成物群を提供することで、当分野の要望に応えることができる。これら新規の組成物は、細胞増殖異常、神経疾患、発達障害、自己免疫/炎症疾患、および感染症の、診断・治療・予防において有用であり、また、核酸結合タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列の発現における外来化合物群の効果についての算定にも有用である。

【発明の開示】

【発明の効果】

【0077】

本発明は、総称して「NAAP」、個別には各々「NAAP-1」、「NAAP-2」、「NAAP-3」、「NAAP-4」、「NAAP-5」、「NAAP-6」、「NAAP-7」、「NAAP-8」、「NAAP-9」、「NAAP-10」、「NAAP-11」、「NAAP-12」、「NAAP-13」、「NAAP-14」、「NAAP-15」、「NAAP-16」、「NAAP-17」、「NAAP-18」、「NAAP-19」、「NAAP-20」、「NAAP-21」、「NAAP-22」および「NAAP-23」と呼ぶ、核酸結合タンパク質である、精製されたポリペプチドを提供する。或る態様において本発明は、(a) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23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(d) SEQ ID NO:1-23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単離されたポリペプチドを提供する。一態様では、SEQ ID NO:1-23のアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチドを提供する。

【0078】

また、本発明は(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23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(d) SEQ ID NO:1-23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より選択されたポリペプチドをコードするような単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:1-23からなる群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:24-46を有する群から選択される。

【0079】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を持つ組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様で本発明は、この組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様で本発明は、この組換えポリヌクレオチドを持つ遺伝形質転換生物体を提供する。

【0080】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(b) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の同一性を有する天然のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(c) SEQ ID NO:1-23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に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-23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回収する過程とを有し、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連結したプロモーター配列を有する。

【0081】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23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 (d) SEQ ID NO:1-23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】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド配列、および(e) (a) ~ (d)のRNA等価物からなる群から選択された単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様で該ポリヌクレオチドは、少なくとも60の連続したヌクレオチド群からなる。

10

【0083】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド、(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド、および(e) (a) ~ (d)のRNA等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチドの配列を有する。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し、複合体が存在すればオプションでその量を検出する過程からなる。該プローブと該標的ポリヌクレオチドあるいはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは、該標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチド群からなる。

20

【0084】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a) SEQ ID NO:24-46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:24-46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%が同一の天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および(e) (a) ~ (d)のRNA等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチドの配列を有する。検出方法は、(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b) 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存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

30

【0085】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23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(d) SEQ ID NO:1-23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される。一実施態様では、この組成物はSEQ ID NO:1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列を持つ。更に、本発明は、機能的NAAPの発現の低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者にこの組成物を投与することを含む方法を提供する。

40

50

【 0 0 8 6 】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを有するサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程からなる。別法では、本発明は、この方法で同定したアゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤とを有する、或る組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的NAAPの発現の低下を伴う疾患や症状の治療を要する患者への、この組成物の投与方法を提供する。

10

【 0 0 8 7 】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性につき、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを含むサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的NAAPの過剰な発現に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者へのこの組成物の投与を含む方法を提供する。

20

【 0 0 8 8 】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドに特異結合する或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に混合する過程と、(b) この試験化合物と該ポリペプチドとの結合を検出し、それにより該ポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とからなる。

30

【 0 0 8 9 】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23を有す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:1-23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:1-23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:1-23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からなる群から選択された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】

更に本発明は、SEQ ID NO:24-46からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変する効果につき、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)この標的ポリヌクレオチドを有するサンプルを或る化合物に曝露する過程と、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の改変を検出する過程と、(c)可変量のこの化合物の存在下でのこの標的ポリヌクレオチドの発現と、この化合物の不在下での発現とを比較する過程とからなる。

【0091】

本発明は更に、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。この方法には、以下の過程がある。(a)核酸群を有する生体サンプルを試験化合物で処理する過程。(b)処理済み生体サンプルの核酸群をハイブリダイズする過程。この過程には、次のようなプローブを用いる。(i)SEQ ID NO:24-46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:24-46からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)に相補的な配列を持つポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択した或るポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなるプローブである。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生体サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間に特異的ハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で生じる。上記標的ポリヌクレオチドは、(i)SEQ ID NO:24-46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:24-46からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i)~(v)からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片を持つ。毒性の算定方法には更に、(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0092】

(本発明の記載について)

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

【0093】

請求の範囲および明細書中で用いている単数形の「或る」および「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のも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、および、当業者に公知の抗体の等価物などについても言及している。

【0094】

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

10

20

30

40

50

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

【0095】

(定義)

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

【0096】

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

10

【0097】

用語「対立遺伝子変異配列」は、NAAPをコードする別の形の遺伝子を指す。対立遺伝子変異体は、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、単独

20

【0098】

NAAPをコードする「変容した/改変された」核酸配列に含む配列には、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換を有し、その結果、NAAPと同一のポリペプチドを、或いは、NAAPの機能的特徴の少なくとも1つを備えるポリペプチドを生じる配列がある。この定義には、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列にとり正常な染色体の遺伝子座ではない位置での、対立遺伝子変異体群への不適当あるいは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、NAAPをコードするポリヌクレオチドの或る特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能なあるいは検出困難な多型性を含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じた結果、機能的に等価なNAAPとなるような、アミノ酸残基の欠失、挿入または置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的あるいは免疫学的にNAAPの活性が保持される範囲で、残基群の、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性についての、類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジンおよびアルギニンがある。親水性値が近似した非荷電極性側鎖を持つアミノ酸としては、アスパラギンとグルタミン、およびセリンとトレオニンを含みうる。親水性値が近似した非荷電側鎖を持つアミノ酸としては、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、およびフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

30

【0099】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に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、核酸配列の追加複製に関連する。増幅には通常、当業者に公知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いる。

【0101】

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

50

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

【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、F(ab')₂ 及びFv断片を指す。NAAPポリペプチド群と結合する抗体類の作製には、免疫抗原として、無傷ポリペプチド群を用いることができ、または、当該の小ペプチド群を有する断片群を用い得る。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。

【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、大規模な組み合わせライブラリ群から標的的特異的アプタマー配列を選択するプロセスである。アプタマー組成は、2本鎖または1本鎖であってもよく、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーの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'-NH₂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。アプタマー類は、例えば或る架橋剤の光活性化によって、それらの同種リガンド群と特異的に架橋させ得る（Brody, E.N. および L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13等を参照）。

20

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

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」（コーディング）鎖と塩基対を形成することが可能な任意の組成物を指す。アンチセンス組成物としては、DNAや、RNAや、ペプチド核酸（PNA）や、修飾されたバックボーン連結たとえばホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸などを有するオリゴヌクレオチドや、修飾された糖基たとえば2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などを有するオリゴヌクレオチドや、あるいは修飾された塩基たとえば5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルま

50

たは7-デアザ-2'-デオキシグアノシンなどを有するオリゴヌクレオチドがあり得る。アンチセンス分子は、化学合成または転写など、任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、細胞に導入されると、細胞が産生した天然核酸配列との塩基対を形成し、二重鎖を形成して転写または翻訳を妨害する。「負」または「マイナス」という表現は、或る参考DNA分子のアンチセンス鎖を指すことがあり、「正」または「プラス」という表現は、或る参考DNA分子のセンス鎖を意味し得る。

【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、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然または組換え体のNAAP、合成NAAP、またはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物または細胞内の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

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'-AGT-3'」は、相補配列「3'-TCA-5'」と対合する。

【0110】

「～のポリヌクレオチド配列を含む(有する)組成物」及び「～のアミノ酸配列を有する組成物」は、所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含む広範囲の任意の成分を指す。この組成物には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。NAAPをコード、若しくはNAAPの断片をコードするポリヌクレオチド配列を持つ組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。これらプローブは、凍結乾燥形態で貯蔵でき、また、糖質などの安定化剤と結合させ得る。ハイブリダイゼーションにおいては、塩(例えばNaCl)、界面活性剤(例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS)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	10
His	Asn, Arg, Gln, Glu	
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	20
Tyr	His, Phe, Trp	
Val	Ile, Leu, Thr	

【 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βシートやαヘリックス構造、(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) 側鎖の大部分が保持される。

【 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 50

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るため、安定したサブストラクチャー群の新たな組み合わせによって、新しいタンパク質をアセンブリす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】

用語「断片」は、NAAPの又はNAAPをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列 (parent sequence) と配列は同一であるが親配列より長さが短いものを指す。断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5 ~ 1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、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、表および図面を含む本明細書が支持する任意の長さであり得る。

【0120】

SEQ ID NO:24-46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:24-46を明確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:24-46のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:24-46に関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:24-46の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO:24-46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。

【0121】

SEQ ID NO:1-23のある断片は、SEQ ID NO:24-46のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-23の断片には、SEQ ID NO:1-23を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、SEQ ID NO:1-23の断片は、SEQ ID NO:1-23を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-23の断片、及び断片に対応するSEQ ID NO:1-23の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0122】

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

【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、互換性、または配列同一性を意味する。

【0124】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。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。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ (一組の分子生物学的分析プログラム) (DNASTAR, Madison WI) の一部である。このCLUSTAL Vは、Higgin

s, D.G. 及び P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「weighted (重み付けされた)」残基重み付け表が、デフォルトとして選択される。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「percent similarity (類似率)」として一致率を報告する。

【0126】

或いは、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、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、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することが可能である。「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ために、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツール Version 2.0.12 (2000年4月21日) を用いて blastn を実行してもよい。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、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

【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「一致性%」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一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換

10

20

30

40

50

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

【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でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスが選択される。ポリヌクレオチドのアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の一致率は、CLUSTAL Vによって「percent similarity（類似性パーセント）」として報告される。 10

【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、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12（2000年4月21日）でblastpを使用するであろう。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

【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、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。 30

【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的アニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、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性も得るように実験によって変更することができる。許容的アニーリング条件は、例えば、温度が68で 40 50

、約 $6 \times \text{SSC}$ 、約 1% (w/v) の SDS、並びに約 $100 \mu\text{g/ml}$ の、せん断して変性したサケ精子 DNA の存在下である。

【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_m) より約 $5 \sim 20$ 低くなるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及び pH の下で、完全に一致するプローブに標的配列の 50% がハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook 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高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び約 1% の SDS の存在の下、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 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$ 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 $100 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子 DNA がある。特定条件下で、例えば RNA と DNA のハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約 $35 \sim 50\%$ 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、およ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_0t または R_0t 解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体 (例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板) に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。 30

【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核酸配列の変化を指す。

【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】

用語「免疫原性断片」は、生物 (例えば哺乳類) に導入すると免疫応答を引き起こし得る、NAAP のポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。「免疫抗原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法において有用な NAAP の任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。 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、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0146】

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

【0147】

「核酸」および「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」および「核酸配列」の語はまた、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるかあるいはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド核酸（PNA）や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

【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。

【0150】

NAAPの「翻訳後修飾」としては、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解的切断、及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、NAAPの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

【0151】

「プローブ」とは、核酸配列の内、NAAPやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードし、同一配列や対立遺伝子核酸配列、または関連する核酸配列の検出に用いる配列を指す。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に接着した配列である。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬および酵素がある。「プライマー」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、核酸配列の増幅（および同定）に用い得る。

【0152】

本発明に用いるプローブおよびプライマーは通常、既知の配列の、少なくとも15の連続したヌクレオチド群からなる。特異性を高めるため、長めのプローブおよびプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または少なくとも150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブおよびプライマーも用い得る。これよりもかなり長いプローブおよびプライマーもある。表、図面および配列リストを含む本明細書が支持する、任意の長さのヌクレオチドを用い得るものと理解されたい。

【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, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innis他 (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照された

10

20

30

40

50

い。PCRプライマー対を既知の配列から得るには、例えば、そのためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用い得る。

【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および、最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得た配列を分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、Primer 10
OUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、したがってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手可能)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(mispriming library)」を入力できる。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように修正し得る)。Primer 20
Gen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およびポリヌクレオチド断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、あるいは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない 30

【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配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばSambrookの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、核酸の一部が単に付加、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。

【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。

【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な部分である。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、磁気粒子およびその他の当分野で既知の成分がある。

【0159】

本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性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。

【0160】

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

10

【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】

「実質的に精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合する他の構成要素の少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が無いものを指す。

【0163】

「置換」とは、一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、リポフェクションおよ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】

50

ここで用いる「遺伝形質転換体(transgenic organism)」とは任意の生物であり、限定するものではないが動植物を含み、生物の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り、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスの感染によって行う。或る実施例において、核酸はレンチウイルスベクターのような組換えウイルスベクターを用いた感染によって導入することができる(Lois, C. 他(2002) Science 295:868-872)。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種あるいはin vitro受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指す。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌および動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrook 他 (1989)等の参考文献に記載されている。

10

【0168】

特定の核酸配列の「変異体/変異配列」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%の配列同一性を有する核酸配列であると定義する。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blastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多型性」変異体として記載し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって通常、より多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメイン群を有するか、あるいは参照分子には存在するドメイン群が欠落していることがある。種変異体は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多型性変異体は、所与の種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1塩基多型性」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

20

30

【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%の配列同一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%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

(発明)

本発明は、新規のヒト核酸結合タンパク質群(NAAP)および、NAAPをコードするポリヌクレオチド群の発見に基づく。また、これらの組成物を利用した、細胞増殖異常、神経疾患、発達障害、自己免疫/炎症性障害、および感染症の、診断、治療、および予防の開発に基づく。

40

【0170】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の命名の概略である。各ポリヌクレオチドおよびその対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識別番号(IncyteプロジェクトID)に相關する。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(In

50

cyteポリヌクレオチドID)によって表示した。

【0171】

表2は、GenBankタンパク質 (genpept) データベースに対するBLAST分析によって同定されたような、本発明のポリペプチドとの相性を有する配列を示している。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (ポリペプチド SEQ ID NO:) と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID) を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号 (Genbank ID NO:) を示す。列4は、各ポリペプチドとその相同体1つ以上との間の一致に関する確率スコアを示す。列5は、該当箇所には適当な引用を示すとともにGenBank相同体1つ以上の注釈 (annotation) を示し、これらはすべて本明細書では参考文献に含まれる。

10

【0172】

表3は、本発明のポリペプチドの多様な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (SEQ ID NO:) と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID) を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4および列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、リン酸化およ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、およ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

【0173】

表2および3は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それら特性が、請求の範囲に記載されたポリペプチドが核酸結合タンパク質であることを確立している。例えば、SEQ ID NO:2はシロイヌナズナの推定ATP依存RNAヘリカーゼA (GenBank ID g4510377) とQ784残基からF1175まで42%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された (表2参照)。BLAST確率スコアは $1.9e-168$ 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:2はまた、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ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

30

【0174】

別の実施例において、SEQ ID NO:4はマウスERG結合タンパク質ESET (GenBank ID g3644042)にL128残基からP513残基まで37%、F624残基からL707残基まで58%およびK9残基からY49残基まで26%の同一性を有することが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 $1.5e-88$ 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:4はまた、SET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からのデータと、PRODOM およびDOMO データベースのBLAST解析はSEQ ID NO:4がSETドメインを含み、転写因子である、更に確証的証拠を提供する。

40

【0175】

また他の例として、SEQ ID NO:8はヒトの推定ヘリカーゼRUVBL (GenBank ID g8886769) とM22残基からC665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 $8e-239$ であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:8もまた、ATP分解酵素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

50

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:8がヘリカーゼであることをさらに確証する証拠を提供する。

【0176】

別の例において、SEQ ID NO:14 はヒトペアードボックス（PAX）タンパク質（GenBank ID g409139）にF13残基からK312残基まで98%の同一性を有することが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 $1.4e-15$ 6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:14もまた、ペアードボックスドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル（HMM）を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された（表3参照）。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:14がPAX蛋白質である、さらに実証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5-7、SEQ ID NO:9-13 およびSEQ ID NO:15-23 は同様にして解析し、注釈付けをされた。SEQ ID NO:1-23の解析用のアルゴリズム及びパラメータを表7に記載した。

【0177】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列またはゲノムDNA由来のコード（エキソン）配列を用いて、或いはこれら2種類の配列を任意に組み合わせてアセンブリした。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）および対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号（Incyte ID）、およ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、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列のアセンブリに使われたcDNA配列および/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'）、およびSEQ ID NO:24-46を同定するか、またはSEQ ID NO:24-46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配列の断片のヌクレオチド開始位置（5'）と終了位置（3'）を示す。

【0178】

表4の列2で記述されたポリヌクレオチド断片は特に、例えば組織特異的cDNAライブラリあるいはプールしたcDNAライブラリに由来するIncyte cDNAを指す場合もある。或いは列2に記載したポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチド配列の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、「エキソンスティッチング（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ある。例えば、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ 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_{1,2,3,4} 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「エキソンストレッチング（exon-stretching）」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンの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「エキソンストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号またはNCBI RefSeq 識別番号であり、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「エキソンストレッチング」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合では、RefSeq識別番号（「NM」、「NP」、または「NT」によって表される）が、GenBank識別子（即ち、gBB

BBB) の代わりに使用される場合もある。

【 0 1 7 9 】

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	ゲノムへのEST配列のマッピングからの完全長転写物とエキソンとの予測。エキソン群と生じる転写物とを予測するために、ゲノム位置とEST構成とのデータが組み合わされる。

10

20

【 0 1 8 0 】

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。

30

【 0 1 8 1 】

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

【 0 1 8 2 】

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

40

【 0 1 8 3 】

本発明はまた、NAAPをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施態様において、本発明は、NAAPをコードする、SEQ ID NO:24-46からなる一群から選択された 1 配列を持つポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO:24-46のポリヌクレオチド配列には、配列表に示したように等価 RNA配列をも含むが、そこでは窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくリボースで構成される。

【 0 1 8 4 】

本発明にはまた、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の変異体を含む。詳細には、

50

このような変異体ポリヌクレオチド配列は、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列との、少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、あるいは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の或る態様では、SEQ ID NO:24-46からなる群から選択された核酸配列との少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するようなSEQ ID NO:24-46からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異体を含む。上記の任意のポリヌクレオチド変異体は、NAAPの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードしうる。

【0185】

更に或いは別法では、本発明の或るポリヌクレオチド変異体は、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列のスプライス変異体である。或るスプライス変異体はNAAPをコードするポリヌクレオチド配列との顕著な配列同一性を持つ部分複数を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的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、約70%未満、または約60%未満、あるいは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列との間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異体のいくつかの部分には、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の各部との、少なくとも約70%、あるいは少なくとも約85%、または少なくとも約95%、なおまたは100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。上記したスプライス変異配列は何れも、NAAPの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るアミノ酸配列をコードし得る。

【0186】

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

【0187】

NAAPとその変異体とをコードするヌクレオチド配列は一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然NAAPのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有するNAAP或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定コドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核宿主または原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択し得る。コードされるアミノ酸配列を改変せずに、NAAP及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に改変する別の理由には、天然配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることもある。

【0188】

本発明には、また、NAAPとその誘導体群とをコードする、DNA配列群またはその断片群を、完全に合成化学によって作り出す過程をも含む。作製後、当分野で公知の試薬類を用いて、この合成配列を任意の多くの入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いて、NAAPまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘発し得る。

【0189】

更に本発明には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:24-46 及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) Methods Enzymol.

10

20

30

40

50

152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511等を参照)。アニーリングおよび洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載した。

【0190】

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

【0191】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、NAAPをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマーおよびネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAからの未知の配列を増幅する方法である (例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.* 2:318--322を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは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およびその周辺の配列群からなる制限酵素断片群から得る (例えば、Triglia, T. 他 (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これ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増幅する方法に関与している。 (Lagerstrom, M. 他 (1991) *PCR Methods Applic.* 1:111-119等を参照)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化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 (例えば Parker, J.D. 他 (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:30553060を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー類、およびPROMOTERFINDERライブラリ類 (Clontech, Palo Alto CA) を用いて、ゲノムDNAをウォーキングし得る。この手順は、ライブラリ類をスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部の発見に有用である。全てのPCRベースの方法では、市販ソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Bio sciences, 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。

【0192】

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、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリ群は、5'非転写調節領域への、配列の伸長に有用であろう。

【0193】

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

10

20

30

40

50

イズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザで活性化されるフルオロフォア（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。出力ノ光の強度は、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。

【0194】

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

【0195】

種々の目的で、NAAPをコードする配列群を改変するために、当分野で一般的に既知の複数の方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列群を組換えることができる。この組換えの多様な目的には、遺伝子産物のクローン化の、あるいはプロセッシングおよび/または発現のモディフィケーションが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片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。

【0196】

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シャッフリングシャッフリング技術を用いてシャッフリングして、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NAAP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シャッフリングおよび選択/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、定方向の、制御可能な方法で最大化させることができる。

【0197】

別の実施例によれば、NAAPをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である（例えば、Caruthers, M.H. 他 (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 7:215-223; 及びHorn, T. 他 (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232を参照）。別法として、化学的方法を用いてNAAP自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行い得る（例えばCreighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, 55-60、Roberge, J.Y. 他 (1995) Science 269:202204を参照）。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ（Applied Biosystems）を用いて達成し得る。更に、NAAPのアミノ酸配列または任意のその一部を、直接合成の際に改変することにより、及び

／または他のタンパク質からの配列群または任意のその一部と組み合わせることにより、或る天然ポリペプチドの配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドが作製され得る。

【0198】

このペプチドは、分取用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質的に精製し得る（例えばChiez, R.M.およびF.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421を参照）。この合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認できる（前出のCreighton, 28-53ページ等を参照）。

【0199】

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

【0200】

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

【0201】

種々の発現ベクター／宿主系を利用して、NAAPをコードする配列群の保持及び発現ができる。限定するものではないがこのような発現ベクター／宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌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プラスミドまたはpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある。（前出のSambrook、前出のAusubel、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) *EMBOJ.* 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. 他T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659、Harrington, J.J. 他 (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355等を参照）レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる（Di Nicola, M. 他 (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356、Yu

、M. 他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他(1985) Nature 317(6040):813-815、McGregor, D.P. 他(1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226、Verma, I.M.およびN. Somia (1997) Nature 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0202】

細菌系では、多数のクローニングベクターおよび発現ベクターが、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて選択可能である。例えば、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列の慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT1 プラスミド (Life Technologies) などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターのマルチクローニング部位にNAAPをコードする配列をライゲーションするとlacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖のレスキュー、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう(例えば、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のNAAPが必要な場合は、NAAPの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

10

【0203】

酵母の発現系を使用してNAAPを産出することもできる。 α 因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、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配列群を組み込むことを可能にする(例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, G.A. 他 (1987) Methods Enzymol. 153:516-544、及びScorer, C. A. 他 (1994) Bio/Technology 12:181-184を参照)。

20

【0204】

植物系もNAAPの発現に使用可能である。NAAPをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV (Takamatsu, N. (1987) EMBO J 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせる用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモーターによって促進される。あるいは、RuBisCOの小サブユニットなどの植物プロモーター、または熱ショックプロモーターを用い得る(例えば、Coruzzi, G. 他 (1984) EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie, R. 他 (1984) Science 224: 838-843; および Winter, J. 他 (1991) Results Probl. Cell Differ. 17 : 85-105を参照)。これらの作製物は、直接DNA形質転換にまたは病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196ページ等を参照)。

30

【0205】

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

40

【0206】

50

ヒト人工染色体 (HAC) を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を送達することもできる。治療のために約 6 kb ~ 10 MbのHACを作製し、従来の送達方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル) で送達されている (例えばHarrington, J.J.他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355を参照)。

【0207】

哺乳動物系内の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、細胞株におけるNAAPの安定した発現が望ましい。例えば、NAAPをコードする配列を細胞株に形質転換するために、発現ベクター類と、同じベクター上の或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用い得る。用いる発現ベクターは、ウイルス起源の複製要素、および/または内因性の発現要素を持ち得る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約 1 ~ 2 日間、細胞を増殖させ得る。選択可能マーカーの目的は選択剤への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーの存在により、導入した配列をうまく発現するような細胞の成長および回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

10

【0208】

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^{-} 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^{-} 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等を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質あるいは除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M. 他 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14等を参照)。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 $hisD$ が、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等を参照)。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)、 β グルクロニダーゼ及びその基質 β グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを同定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性あるいは安定したタンパク質発現を定量し得る(Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131等を参照)。

20

30

【0209】

マーカー遺伝子発現の有無によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在および発現の確認が必要な場合もある。例えば、NAAPをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、NAAPをコードする配列を持つ形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定可能である。または、単一プロモーターの制御下で、或るマーカー遺伝子を、NAAPをコードする1配列とタンデムに配置することもできる。誘導または選択に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。

40

【0210】

一般に、NAAPをコードする核酸配列を含み且つNAAPを発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションと、PCR増幅とがあり、また、核酸配列或いはタンパク質配列の検出、定量、或いはその両方を行うための、膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含む、タンパク質の生物学的検定法または免疫学的検定法もある。

【0211】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてNAAPの発現の検出と計測とを行うための免疫学的方法は、当分野で既知である。このような技術の例として

50

は、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光活性化細胞選別 (FACS) などが挙げられる。NAAP上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体群を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好ましいが、競合結合試験を用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である (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等を参照)。

【0212】

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およびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。NAAPをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、エンドラベリング (末端標識化)、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、NAAPをコードする配列、またはその任意の断片を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemicalなどから市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子あるいは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤などがある。

【0213】

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

【0214】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現をモジュレートする能力、または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断す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、特定の細胞装置および特徴的な機序を持つ、種々の宿主細胞 (例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、WI38など) は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択し得る。

【0215】

本発明の別の実施態様では、NAAPをコードする、天然核酸配列、修飾された核酸配列、または組換え核酸配列を、或る異種配列にライゲーションすることにより、上記した任意の宿主系内で、或る融合タンパク質の翻訳を生じ得る。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラNAAPタンパク質は、NAAP活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分および異種ペプチド部分も、市販されている親和性マトリックスを用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリ

10

20

30

40

50

ン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-mycおよび赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質が、NAAPをコードする配列と異種タンパク質配列との間にタンパク質分解切断部位を持つように遺伝子操作すると、精製後にNAAPが異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現および精製方法は、前出のAusubel (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現および精製を促進することもできる。

10

【0216】

本発明の更なる実施態様では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて *in vitro* で、放射能標識したNAAPの合成が可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーター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³⁵Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【0217】

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

20

【0218】

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

30

【0219】

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NAAPと混合するステップと、NAAPとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出および測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、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することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

40

【0220】

本発明のNAAPまたはその断片を用いて、NAAPの活性をモジュレートする化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物としては、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニストまたは逆アゴニストなどが含まれ得る。或る実施例では、NAAPを少なくとも1つの試験化合物と混合する、NAAPの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのNAAPの活性と、試験化合物不在下でのNAAPの活性とを比較する。試験化合物の存在下でのNAAPの活性の変化は、NAAPの活性をモジュレートする化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物を、NAAPの活性に適した条件下で、NAAPを含

50

む *in vitro* すなわち無細胞系と混合してアッセイを実施する。これらアッセイの何れにおいても、NAAPの活性を調節する試験化合物は間接的に調節する場合があり、その際は試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つ、または複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【0221】

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

10

20

【0222】

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

【0223】

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

30

【0224】

（治療）

NAAPの領域と核酸結合タンパク質の領域との間には、例えば配列及びモチーフの内容における、化学的及び構造的類似性が存在する。また、NAAPを発現する組織の数例は、表6を見られたい。また、実施例11をも見られたい。このように、NAAPは、細胞増殖異常、神経疾患、発達障害、および自己免疫/炎症疾患および感染症において或る役割を果たすと考えられる。NAAPの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、NAAPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、NAAPの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、NAAPの発現または活性を増大させることが望ましい。

40

【0225】

従って、一実施態様では、NAAPの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にNAAPまたはその断片や誘導体が投与され得る。限定するものではないが、そのような疾患のうち、細胞増殖異常の中に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、混合型結合組織病（MCTD）、骨髓線維症、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

50

、黒色腫、骨髓腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髓、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、脾臓、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、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病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、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、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病、ゲルストマン症候群、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 10 及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫（cerebelloretinal hemangioblastomatosis）、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、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、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病（気分性、不安性の障害、分裂病性疾患）、季節性障害（SAD）、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病が含まれる。また発達障害も含まれ、その中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ-ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR 症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿 20 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-トゥ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（Syndenham'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、また自己免疫/炎症性疾患には、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、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性外胚葉ジストロフィ（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性 30 胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、脾炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、慢性関節リウマチ炎、強皮症、シェ-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、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、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、また、アデノウイルス、アレナウイルス、プニャウイルス、カルチウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、パラミキソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラウド 40 ウイルス、またはトガウイルスと分類されるウイルス性媒介物による感染症、肺炎球菌感染症、ブドウ球菌、連鎖球菌、パシラス菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、髄膜炎菌、淋菌、リステリア、モラクセラ、キングラ、ヘモフィルス、レジオネラ、ボルデテラ属、グラム陰性菌腸内細菌（シゲラ、サルモネラ、カンピロバクターを含む）、シェードモナス、ビブリオ、ブルセラ、野兔病菌、エルシニア、バルトネラ、nocardium、放線菌、ミコバクテリウム、スピロヘータ（spirochaetale）、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマに分類される細菌性媒介物による感染症、アスペルギルス、プラストミセス、皮膚糸状菌、クリプトコッカス、コクシジオイデス、malassezia、ヒストプラズマ、または他の真菌症起因菌として分類される真菌による感染症、また、プラスモディム（マラリアを起こす寄生虫）、寄生アメーバ、リーシュマニア属、トリパノソーマ属、トキソプ 50

ラスマ属、ニューモシスティスカリニ属、ジアルジアのような腸内原生動物類、トリコモナス属、旋毛虫のような組織内線虫類、回虫のような腸内線虫類、リンパ性フィラリア線虫類、住血吸虫のような吸虫類および条虫類(サナダムシ)として分類される寄生虫による感染症が含まれる。

【0226】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、NAAPの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、NAAPまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを被験者に投与し得る。

【0227】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、NAAPの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたNAAPを有する組成物を、好適な医薬用キャリアと共に被験者に投与し得る。

【0228】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、NAAPの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、NAAPの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

【0229】

更なる実施例では、NAAPの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にNAAPのアнтаゴニストを投与し得る。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した細胞増殖異常、神経障害、発達障害、自己免疫/炎症性疾患、および、感染症が含まれる。一態様では、NAAPと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはNAAPを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング機構或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【0230】

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

【0231】

別の実施態様では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組合せて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従って選択し得る。治療薬と組合せることにより、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。

【0232】

NAAPのアнтаゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたNAAPを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、NAAPと特異結合するものを同定することが可能である。NAAPへの抗体も、本技術分野で公知の方法を用いて産生され得る。限定するものではないがこのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、およびFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体(すなわち二量体の形成を阻害する抗体)は通常、治療用に好適である。一本鎖抗体(例えば、ラクダまたはラマ)は有力な酵素阻害剤であり、またペプチド擬態物質の設計および免疫吸着剤やバイオセンサーの開発に利点があるであろう(Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

【0233】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒトなどを含む種々の宿主が、NAAP、若しくは免疫原性の特性を備えるその任意の断片またはオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアダプタ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

10

20

30

40

50

ジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ジニトロフェノールなどの界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG (カルメット - ゲラン杆菌) およびコリネバクテリウム - パルバム (*Corynebacterium parvum*) が特に好ましい。

【0234】

NAAPに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を持つものが好ましく、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものとなる。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片はまた、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。NAAPアミノ酸類の短いストレッチ群は、KLHなど他のタンパク質の配列と融合され、このキメラ分子に対する抗体群が産生され得る。

10

【0235】

NAAPに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術がある (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等を参照)。

【0236】

更に、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「キメラ抗体」作製のために開発された技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる (例えば、Morrison, S.L. 他 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855; Neuberger, M.S. 他 (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda, S. 他 (1985) *Nature* 314:452-454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用い、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、NAAP特異的一本鎖抗体を生成する。関連した特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリ類からチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10134-10137等を参照)。

20

【0237】

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等を参照)。

30

【0238】

NAAPに対する特異的な結合部位を含む抗体断片も産生され得る。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される $F(ab')_2$ 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。或いは、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等を参照)。

40

【0239】

種々の免疫学的検定 (イムノアッセイ) を用いてスクリーニングすることにより、所望の特異性を有する抗体を同定し得る。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる免疫放射定量測定法または競合結合アッセイに対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、NAAPとその特異抗体との間の複合体形成の計測を含む。2つの非干渉性 NAAP エピトープに対して反応性を持つモノクローナル抗体群を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合試験も利用できる (Pound、前出)。

【0240】

50

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、NAAPに対する抗体の親和性を評価し得る。親和性を結合定数Kaで表すが、このKaは、平衡状態下の、NAAP抗体複合体のモル濃度を、遊離抗体と遊離抗原とのモル濃度で除して得られる値である。ポリクローナル抗体類は多様なNAAPエピトープに対する親和性が不均一であり、或るポリクローナル抗体試薬に関して判定したKaは、NAAP抗体群の平均の親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は或る特定のNAAPエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体の或る試薬について判定したKaは、親和性の真の測定値を表す。Ka値が $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの高親和性抗体試薬は、NAAP-抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。Ka値が $10^6 \sim 10^7$ liter/molの低親和性抗体製剤は、NAAPが抗体から最終的に（好ましくは活性化状態で）解離する必要がある免疫精製（immunopurification）および類似の処理に用いるのが好ましい（Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. および Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY）。

10

20

30

40

50

【0241】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価および結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような試薬の品質および適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/mlの特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体製剤は一般に、NAAP-抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である（前出のCattyの文献、同Coligan 他の文献等を参照）。

【0242】

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

【0243】

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することが可能である（Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475 及び Scanlon, K.J. 他 (1995)9(13):1288-1296等を参照）。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる（Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Uckert, W.及びW. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347等を参照）。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープおよび当分野で公知のその他のシステムが含まれる（Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225、Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.等を参照）。

【0244】

本発明の別の実施態様では、NAAPをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、（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欠損（SCID）-X1の場合）、先天性アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症に関連する重症複合型免疫欠損（Blaese, R.M. 他 (1995) *Sci*

ence 270:475-480、Bordignon, C. 他 (1995) Science 270:470-475)、囊胞性繊維症 (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. 及び N. Somia. (1997) Nature 389:239-242) を補正し、(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) 細胞内の寄生体 (例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)などヒトのレトロウイルス (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschla, E. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11395-11399)、B型若しくはC型肝炎ウイルス (HBV、HCV)、Candida albicans及びParacoccidioides brasiliensis等の真菌寄生体、並びにPlasmodium falciparum及びTrypanosoma cruzi等の原虫寄生体) に対する防御機能をもたらすタンパク質を発現させることができる。NAAPの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からNAAPを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

10

【0245】

本発明の更なる実施例では、NAAPの欠損による疾患や異常症を、NAAPをコードする哺乳類発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってNAAP欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii) 遺伝子銃、(iii) リボ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トランスポソンの使用 (Morgan, R.A. および W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. および H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450) がある。

20

【0246】

NAAPの発現に有効でありうる発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCM V-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH / PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) が含まれる。NAAPを発現させるために、(i) 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 β -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PINDに含まれている: Invitrogen)、FK506 / ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486 / ミフェプリストーン誘導性プロモーター (Rossi, F.M.V. 及び H.M. Blau, 前出)、または(iii) 正常な個体に由来するNAAPをコードする内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。

30

【0247】

市販のリボ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、当業者はポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に送達することが可能になる。また、実験パラメータ群を最適化するのに必要な努力が最小限になる。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, B. 他 (1982) EMBO J. 1:841-845) を用いて形質転換を行う。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。

40

【0248】

本発明の別の実施例では、NAAPの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や障害を、(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或る独立プロモータ

50

ーのコントロール下でNAAPをコードするポリヌクレオチドと、(ii) 好適なRNAパッケージングシグナル群と、(iii) 追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列と、効率的なベクター増殖に必要なコーディング配列とを伴う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. U.S.A. 92:6733-6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞株(VPCL)において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVg等の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 10、Adam, M.A. および A.D. Miller(1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. 他(1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. 他(1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号(「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」)において、レトロウイルスパッケージング細胞株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の増殖、細胞集団(例えばCD4⁺ T細胞)の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている(Ranga, U. 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. U.S.A. 95 20:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0249】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の或る送達系を用いて、NAAPの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する細胞群に、NAAPをコードするポリヌクレオチド群を送達する。アデノウイルス系ベクター類の作製およびパッケージングについては、当業者に周知である。複製欠損型アデノウイルスベクター類は、種々の免疫調節タンパク質をコードする遺伝子群を、無損傷の臍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(Cs ete, M.E.他(1995) Transplantation 27:263268)。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 30。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. 他(1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544 及び Verma, I.M. 及び N. Somia(1997) Nature 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0250】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、NAAPの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する標的細胞に、NAAPをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純ヘルペスウイルス(HSV)系ベクター類は、HSVが向性を持つ中枢神経細胞にNAAPを導入する際に、特に有益たりうる。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた(Liu, X. 他(1999) Exp. Eye Res. 1 40 69:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(「Herpes simplex virus swains for gene transfer」)に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外因性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22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ベクターについては、Goins, W.F. 他(1999) J. Virol. 73:519-53 2 及び Xu, H. 他(1994) Dev. Biol. 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった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 50

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。

【0251】

別法では、或る α ウイルス（正の一本鎖RNAウイルス）ベクターを用いて、NAAPをコードするポリヌクレオチド群を標的細胞群に送達する。プロトタイプの α 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）。 α 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、NAAPをコードする配列を α ウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のNAAPをコードするRNAが産生され、高いレベルでNAAPが合成される。通常、 α 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、 α 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）。 α ウイルスの宿主域は広いので、様々なタイプの細胞にNAAPを導入できることとなる。或る集団における或るサブセットの細胞群の特異的形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。 α ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、 α ウイルスのcDNAおよびRNAの形質移入方法および α ウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

10

20

【0252】

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

30

【0253】

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関与している。例えば、遺伝子操作で作ったハンマーヘッド型リボザイム分子が、NAAPをコードする配列の、内ヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

【0254】

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。

40

【0255】

本発明の相補リボ核酸分子およびリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。作製方法には、固相ホスホラミダイト化学合成など、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。あるいは、NAAPをコードす

50

るDNA配列の *in vitro* および *in vivo* 転写によってRNA分子を産生し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6などの好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。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。

【0256】

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ロチオエートまたは2'-O-メチルを使用することが含まれる。この概念は、本来はPNA群の産出におけるものであるが、これら全ての分子に拡大することができる。そのためには、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - および同様の修飾をしたものや、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイブトシン (wybutosine) を加える。

10

【0257】

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

20

【0258】

或る特定ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性について、少なくとも1個、または複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、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えるのに有効であるとされている化合物の化学的修飾、天然または非天然の化合物の既存の、市販または私的なライブラリからの選択、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こと、および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の選択がある。NAAPをコードするポリヌクレオチドを持つサンプルを、このようにして得た試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルは例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、あるいは *in vitro* 無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。NAAPをコードするポリヌクレオチドの発現における改変は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常は、NAAPをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、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。特異ポリヌクレオチドの発現改変に有効な化合物に対して、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、Arnold, G.M. 他 (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. 他 (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性を調べるためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニ

30

40

50

ングすることに関与している (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)。

【0259】

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、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる (例えば Goldman, C.K. 他 (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466 を参照)。

【0260】

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。

【0261】

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

【0262】

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、骨髓内、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。

【0263】

肺から投与する組成物は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子 (例えば伝統的な低分子量有機薬) の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。高分子 (例えばより大きなペプチドおよびタンパク質) の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺送達が最近向上したことにより、インスリンなどの薬物を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした (Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号などを参照)。肺送達は、針注射なしに投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【0264】

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。

【0265】

NAAPを有する、またはその断片群を有する高分子群を直接、細胞内に送達すべく、特殊な種々の形状の組成物群が調製され得る。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、NAAPまたはその断片を、HIV Tat-1タンパク質から得た短い陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質類は、或るマウスモデル系の、脳を含む全ての組織の細胞群に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. 他 (1999) Science 285:1569-1572)。

【0266】

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

10

20

30

40

50

【0267】

治療有効投与量とは、症状や容態を回復させる、たとえばNAAPまたはその断片、NAAPの抗体、NAAPのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなど活性成分の量を指す。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ED₅₀（集団の50%の治療有効量）またはLD₅₀（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比が治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。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、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性および投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

10

【0268】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。十分なレベルの活性成分を与え、あるいは所望の効果を維持すべく、用法および用量を調整する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の全身健康状態、被験者の年齢、体重及び性別（ジェンダー）、投与の時間及び頻度、薬剤の併用、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い組成物は、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。

【0269】

20

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量および送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、ヌクレオチドの処方では、タンパク質またはそれらのインヒビター類とは異なる処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、症状、部位などに特異的なものとなる。

【0270】

（診断）

別の実施例では、NAAPに特異的に結合する抗体を、NAAPの発現によって特徴付けられる障害の診断に、または、NAAPやNAAPのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイに用い得る。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で作成される。NAAPの診断アッセイには、ヒトの体液から、あるいは細胞や組織の抽出物から、抗体および標識を用いてNAAPを検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものも、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。

30

【0271】

NAAPを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が当分野では周知であり、変化した、あるいは異常なレベルのNAAPの発現を診断するための基盤を提供する。正常あるいは標準的なNAAPの発現の値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験体から採取した体液または細胞抽出物と、NAAPに対する抗体とを混合させることによって確定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験体、対照、および、生検組織からの疾患サンプルでの、NAAP発現の量を標準値と比較する。標準値と被験体との偏差が、疾患を診断するパラメータを確定する。

40

【0272】

本発明の別の実施態様によれば、NAAPをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用い

50

て、NAAPの発現が疾患と相関し得る生検組織における遺伝子発現を検出し定量し得る。この診断アッセイを用いて、NAAPの存在の有無、更には過剰な発現を判定し、治療時のNAAPレベルの調節を監視しうる。

【0273】

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

10

【0274】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用でき、また、NAAPをコードする任意の配列との少なくとも50%の配列同一性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:24-46の配列、或いはNAAP遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0275】

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

20

【0276】

NAAPをコードするポリヌクレオチド配列を、NAAPの発現に関係する疾患の診断に用い得る。限定するものではないが、そのような疾患のうち、細胞増殖異常の中に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、混合型結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、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、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、脾臓、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、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病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、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、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病、ゲルストマン症候群、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（cerebelloretinal hemangioblastomatosis）、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、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、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病（気分性、不安性の障害、分裂病性疾患）、季節性障害（SAD）、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥーレット病が含まれ、また発達障害も含まれ、

30

40

50

その中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ - ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱）、スミス - マジェニス症候群 (Smith- Mageris 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、自己免疫 / 炎症性疾患には、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、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性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、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、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、過敏性大腸症候群、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、膝炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、慢性関節リウマチ炎、強皮症、シェ - 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、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、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、また、アデノウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、カルチウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、パラミキソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラブドウイルス、またはトガウイルスと分類されるウイルス性媒介物による感染症、肺炎球菌感染症、ブドウ球菌、連鎖球菌、バシラス菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、髄膜炎菌、淋菌、リステリア、モラクセラ、キングセラ、ヘモフィルス、レジオネラ、ボルデテラ属、グラム陰性菌腸内細菌（シゲラ、サルモネラ、カンピロバクターを含む）、シュドモナス、ビブリオ、ブルセラ、野兔病菌、エルシニア、バルトネラ、nocardium、放線菌、ミコバクテリウム、スピロヘータ (spirochaetale)、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマに分類される細菌性媒介物による感染症、アスペルギルス、プラストミセス、皮膚糸状菌、クリプトコッカス、コクシジオイデス、malassezia、ヒストプラズマ、または他の真菌症起因菌として分類される真菌による感染症、また、プラズモディム（マラリアを起こす寄生虫）、寄生アメーバ、リーシュマニア属、トリパノソーマ属、トキソプラズマ属、ニューモシスティスカリニ属、ジアルジアのような腸内原生動物類、トリコモナス属、旋毛虫のような組織内線虫類、回虫のような腸内線虫類、リンパ性フィラリア線虫類、住血吸虫のような吸虫類および条虫類（サナダムシ）として分類される寄生虫による感染症が含まれる。NAAPをコードするポリヌクレオチド配列は、変容したNAAP発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用する、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術や、PCR法や、ディップスティック（dipstick）、ピン（pin）、およびマルチフォーマットのELISA式アッセイ、およびマイクロアレイに使用可能である。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【0277】

或る特定の態様では、NAAPをコードするヌクレオチド配列群は、関連する障害、特に上記した障害を検出するアッセイ類において有用であり得る。NAAPをコードするヌクレオチド配列を、標準的な方法で標識化し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプル中のシグナルの量が、対照サンプルと較べて著しく変化している場合は、該サンプル中の、NAAPをコードするヌクレオチド配列群のレベルが変化している場合、関連する障害が存在することを示す。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。

【0278】

NAAPの発現に関連する疾患の診断の基準を提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロフィールが確立される。これは、ハイブリダイゼーションあるいは増幅に好適な条件の下、動物あるいはヒトのいずれかの正常な被験体から採取された体液或いは細胞抽出物と、NAAPをコードする配列あるいはその断片とを混合することにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量で用いて行った実験から得た値を正常な被験者から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

10

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを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。

【0279】

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、実際に臨床的症狀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。

20

【0280】

NAAPをコードする配列群から設計したオリゴヌクレオチド群の更なる診断的利用には、PCRの利用を含み得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、あるいは*in vitro*で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはNAAPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはNAAPをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適化した条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェンシー条件下で、近縁のDNA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。

【0281】

或る実施態様においては、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列群に由来するオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて、一塩基多型（SNP）を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入および欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP（single-stranded conformation polymorphism）及び蛍光SSCP（fSSCP）がある。SSCPでは、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類とポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）とを用いた、DNAの増幅を行う。このDNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液などに由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの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

【0282】

ヒト疾患の遺伝的根拠を研究するためにSNPを用いることができる。例えば、少なく

50

とも16の一般的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関連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。例えば、N-アセチルトランスフェラーゼにおける或る変異は抗結核剤、イソニアジドに反応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反応を減少する。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、組み換えおよ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)。

【0283】

NAAPの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、対照核酸の共増幅(coamplification)、および標準曲線から得た結果の補間もある(例えば、Melby, P.C. 他 (1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplax, C. 他 (1993) Anal. Biochem. 212:229-236を参照)。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。

【0284】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、或るマイクロアレイにおけるエレメント群として用いることができる。多数の遺伝子の相対発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異および多型性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾患の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬物の活性を開発およびモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に効果的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0285】

別の実施例では、NAAP、NAAPの断片、NAAPに特異的な抗体を、マイクロアレイ上のエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質-タンパク質相互作用、薬物-標的相互作用および遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

【0286】

或る実施態様は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを作製する、本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプによる遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数および相対存在量を定量することにより分析し得る(Seilhame 他 米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」を参照。該特許は特に引用することを以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。

【0287】

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。

【0288】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、in vitroモデル系および薬物の前臨床評価に、あるいは工業的または天然の環境化合物の毒性試験に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを示す、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、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物の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、多数の遺伝子および遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合に、最も有用且つ正確である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が、最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データをノーマライズする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に遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要とされない(例えば、2000年2月29日に米国国立環境衛生科学研究所 (National Institute of Environmental Health Sciences) より発行されたPress Release 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。したがって、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、全ての発現した遺伝子配列を含めることは、重要且つ望ましい。

10

20

【0289】

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。

30

【0290】

別の実施態様は、本発明のポリペプチド配列群を用いて或る組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更なる分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターンすなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数および相対存在量を定量することにより分析し得る。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離および分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により、分離が達成される(前出のSteiner および Anderson)。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、あるいは銀染色液または蛍光染色液などの物質を用いてゲルを染色することにより、分散した、独自の位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常、サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または未処理のいずれかの生体サンプルからの、同等に位置したタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。或るスポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも

40

50

も5個の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列データが得られる。

【0291】

プロテオームのプロファイルは、NAAPに特異的な抗体を用いてNAAP発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上でエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する(Lueking, A. 他 (1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendoza, 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

10

【0292】

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

20

【0293】

別の実施例では、タンパク質を含有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、未処理生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。

【0294】

別の実施例では、タンパク質を含有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生体サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生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

【0295】

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

40

【0296】

本発明の別の実施態様ではまた、NAAPをコードする核酸配列群を用いて、天然ゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブ群を産生し得る。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、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

50

より、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。配列は、或る特定の染色体に、または或る染色体の或る特定領域に、または人為形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、細菌P1産物、あるいは単一染色体cDNAライブラリ群に対してマッピングされる（例えばHarrington, J.J. 他（1997）Nat. Genet. 15:345-355、Price, C.M.（1993）Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J.（1991）Trends Genet. 7:149-154を参照）。一度マッピングすると、本発明の核酸配列群を用いて、例えば或る病状の遺伝を特定染色体領域の遺伝とまたは制限酵素断片長多型（RFLP）と関連させるような遺伝子連鎖地図を開発し得る（例えば、Lander, E.S. 及び D. Botstein（1986）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照）。

10

【0297】

蛍光 *in situ* ハイブリッド形成法（FISH）は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る（前出のHeinz-Ulrich, 他（1995）in Meyers, 965-968頁等を参照）。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man（OMIM）のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上の、NAAP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。

【0298】

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、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、位置クローニング、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。いったん疾患または症候群に關与する遺伝子（群）が、血管拡張性失調症の11q22-23領域など、特定のゲノム領域への遺伝的連鎖によって、大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子あるいは調節遺伝子を提示している可能性がある（例えばGatti, R.A. 他（1988）Nature 336:577580を参照）。転座、反転などに起因する、健常者、保有者、罹病者の三者間における染色体位置の相違を検出する場合にも、本発明のヌクレオチド配列を用い得る。

20

30

【0299】

本発明の別の実施態様では、NAAP、その触媒作用断片あるいは免疫原性断片またはそのオリゴペプチド群を、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における、化合物のライブラリ群のスクリーニングに用い得る。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置しうる。NAAPと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定することもできる。

【0300】

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（Geysen, 他（1984）PCT application W084/03564等を参照）。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、NAAP、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、結合したNAAPを本技術分野で周知の方法で検出する。精製したNAAPはまた、上記した薬剤スクリーニング技術に用いるプレート上に直接コーティングできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

40

【0301】

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

50

【0302】

別の実施例では、NAAPをコードするヌクレオチド配列を、将来に開発される分子生物学技術であり、現在知られているヌクレオチド配列の特性（限定はされないが、トリプレット遺伝コード、特異的な塩基対相互作用等を含む）に依存する新技術に用い得る。

【0303】

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。したがって、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。

【0304】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60/288.598号、同第60/291.776号、同第60/292.172号、および同第60/293.564号に言及することをもって本明細書の一部とする。

【実施例】

【0305】

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群は、LIFESEQ GOLDデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA)に記載されたcDNAライブラリ群に由来する。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールにまたは変性剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL (Life Technologies) は、フェノールとグアニジニウム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、クロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0306】

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。

【0307】

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SUPERScriptプラスミドシステム (Life Technologies) を用いて本技術分野で既知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出のAusubel, 1997, 5.1-6.6ユニット等を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素群でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズの選択 (300 ~ 1000 bp) は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは分取用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの適合する制限酵素部位に結合させた。好適なプラスミドは例えば、PBLUESCRIPT プラスミド (Stratagene)、PSPORT1 プラスミド (Life Technologies)、PCDNA2.1 プラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMV プラスミド (Stratagene)、PCR2-TOPOTAプラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド (Stratagene)、pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics) または pINCY (Incyte Genomics)、あるいはその誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5α、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0308】

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のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。プラスミドの精製には、下記の少なくとも1つを用いた。すなわちMagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus PlasmidおよびQIAWELL 8 Ultra Plasmid精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットのいずれかである。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4 で保管した。

【0309】

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)。宿主細胞の溶解および熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、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。

【0310】

3 シークエンシングおよび分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収した *Incyte* cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬、またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Molecular Dynamics) か、標準ABIプロトコル及び塩基呼び出し (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, 1997, 7.7ユニットに概説) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長させた。

【0311】

Incyte 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、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、*Incyte*のcDNA配列、またはその翻訳を公共のデータベース (例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) と、ヒト、ラット、マウス、線虫、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、および鵝口瘡カンジダ (*Candida albicans*) からの配列を含むPROTEOMEデータベース (*Incyte Genomics*, Palo Alto CA)、及びPFAM等隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたタンパク質ファミリーデータベース並びに、SMART (Schultz 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857-5864, Letunic, I. 他 (2002) Nucleic Acids Res. 30:242-244) のようなHMMに基づいたタンパク質ドメインデータベースから選択したデータベースに対して問い合わせた。(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。例えばEddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照)。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMERに基づくプログラムを用いて行った。*Incyte* cDNA配列は、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、GenBan

10

20

30

40

50

k cDNA群、GenBank EST群、ステッチされた配列群、ストレッチされた配列群、またはGenscan予測コード配列群（実施例 4 および 5を参照）を用い、Incyte cDNAのアセンブリ体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誘導した。あるいは、本発明のポリペプチドは、完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。完全長ポリペプチド配列群の続いて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およびProsites等のデータベースや、PFAM、INCY、およびTIGRFAM等の隠れマルコフモデル（HMM）ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、並びにSMART等のHMMベースのタンパク質ドメインデータベース群に対し行った。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア（日立ソフトウェアエンジニアリング、South San Francisco CA）およびLASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて分析する。ポリヌクレオチド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。

【0312】

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分となす。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）。

【0313】

完全長ポリヌクレオチド配列群とポリペプチド配列群とのアセンブリと分析とに用いた上記プログラム群は、SEQ ID NO:24-46のポリヌクレオチド配列断片群の同定にも利用した。ハイブリダイゼーション技術と増幅技術とに有用な約20～約4000ヌクレオチドの断片群を、表4の列2に示した。

【0314】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定および編集

推定上の核酸結合タンパク質は、先ず公共のゲノム配列データベース（例えばgbpriやgbhtg）に対しGenscan遺伝子同定プログラムを実行して同定した。Genscanは、様々な生物からゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C及びS. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94、Burge, C及びS. Karlin (1998) Cuff. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから停止コー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、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30 kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が核酸結合タンパク質をコードするかを判定するために、コードされるポリペプチドを、PFAMモデル群に対し核酸結合分子について問合せて分析した。潜在的な核酸結合タンパク質はまた、既に核酸結合タンパク質としてアノテーションが付けられたIncyte cDNA配列に対する相同性を基に同定された。こうして選択された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 に記載した構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列および/または公共cDNA配列でGenscan予測コード配列を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。

【0315】

5 cDNA配列データとの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Genscan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ー内で同定し、そのように同定された区間群は、推移性により、等しいと考えた。例えば、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およ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ィッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベースgenpeptおよびgbpriと比較した。Genscanが予測した不正確なエキソン群は、genpeptからのトップBLASTヒットとの比較により補正した。必要な場合には、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

20

【0316】

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。

30

【0317】

6 NAAPをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:24-46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:24-46 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ーにアセンブリした (表7)。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethonなどの公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッドおよび遺伝地図データを用いて、いずれかのクラスター化された配列が既にマッピングされているかを判定した。マッピングされた配列が或るクラスターに含まれている場合、そのクラスターの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

40

50

【0318】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に対して測定する（センチモルガン（cM）は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、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/>）など一般個人が入手可能なヒトゲノム地図などの資源を用いて、既に同定された疾患遺伝子類が、上記の区間内若しくは近傍にマップされているかを判定できる。

10

7 ポリヌクレオチド発現の分析

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

【0319】

BLASTを適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Genomics) 等のcDNAデータベースにおいて同一または関連分子を検索した。ノーザン分析は、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。

20

【0320】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

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

【0321】

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。

30

40

【0322】

或いは、NAAPをコードするポリヌクレオチド配列を、由来する組織に対して分析する。例えば幾つかの完全長配列は、少なくとも一部は、オーバーラップするIncyte cDNA配列群を用いてアセンブリされる（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つへ分類される。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、血液および免疫系、肝、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性／混合性または尿路である。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以

50

下の疾患 / 条件カテゴリーすなわち癌、細胞系、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、NAAPをコードするcDNAの、組織特異的発現および疾患特異的発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ / 組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) から得ることができる。

【0323】

8 NAAPをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、該断片から設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて完全長分子の適切な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。開始プライマーは、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0324】

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。

【0325】

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200 nmolの各プライマーを有する。また、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と2-メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素 (Life Technologies)、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および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および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。

【0326】

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

【0327】

伸長したヌクレオチドは、脱塩および濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、音波処理またはせん断し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech)への再連結を行った。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度 (0.6~0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene)で処理して制限部位のオーバーハングを満たし、適格な大腸菌細

10

20

30

40

50

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。

【0328】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順で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および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 シークエンシングプライマー、及びDYENAMIC DIRECT kit(Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット(Terminator cycle sequencing ready reaction kit)(Applied Biosystems)を用いてシークエンシングした。

10

【0329】

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

【0330】

20

9 NAAPをコードするポリヌクレオチドにおける1塩基多型の同定

一塩基多型性(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:24-46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、キメラおよ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。

30

【0331】

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人およびアーミッシュ派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%およ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。

40

【0332】

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

50

SEQ ID NO:24-46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、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 μCi と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) 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 Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、XbaIまたはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

10

【0333】

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

【0334】

20

1.1 マイクロアレイ

或るマイクロアレイ上でのアレイエレメント群の連接または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾ式印刷 (インクジェット印刷、前出のBaldeschweilerなどを参照)、機械的マイクロスポッティング技術およびこれらから派生した技術を用いて達成し得る。上記各技術において基板は、均一且つ、無孔の表面を持つ固体とするべきである (Schena (1999) 前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップおよびシリコンウェハがある。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および結合させてもよい。通常のアレイは、利用可能な、当業者に公知の方法と機械とを用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る (例えばSchena, M. 他. (1995) Science 270:467-470、Shalon, D.他. (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A.及びJ. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31等を参照)。

30

【0335】

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は、マイクロアレイのエレメントと成り得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) など本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメント群を、生体サンプル中のポリヌクレオチド群とハイブリダイズする。生体サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識などの分子タグに抱合させる。ハイブリダイゼーション後、生体サンプルからのハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントでのハイブリダイゼーションを検出する。あるいは、レーザー脱離および質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上の或るエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの、相補性の度合と相対存在度とを算定し得る。一実施態様におけるマイクロアレイの調製および使用について、以下に詳述する。

40

【0336】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジニウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルを、MLLV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、0.03u

50

nit/ μ lのRNアーゼ阻害因子、500 μ MのdATP、500 μ MのdGTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ MのdCTP-Cy3 (BDS) またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用い、200 ngのポリ(A)⁺RNAを含有する体積25 mlで行う。特異的対照ポリ(A)⁺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。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) を用いて精製する。混合した後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン (1 mg/ml) を用いて析出させたエタノール、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールである。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて完全に乾燥させ、14 μ lの5 $\times$ SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

10

【0337】

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インサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRで1~2 ngの初期量から5 μ g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 Pharmacia Biotech) を用いて精製する。

20

【0338】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、0.1%のSDSおよびアセトン中で超音波洗浄し、処理の間および処理後に十分に蒸留水で洗浄する。スライドガラスは、4%フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、十分に蒸留水中で洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドは、110 のオーブンで硬化させる。

30

【0339】

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アレイエレメントを付加する。この特許に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/ μ lのアレイエレメントDNA 1 μ l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加える。

【0340】

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。

40

【0341】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 $\times$ SSC、0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液にCy3及びCy5標識したcDNA合成産物を各0.2 μ g含む9 μ lのサンプル混合体を含めたものである。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 cm² 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。チェンバー内を湿度100に保つため、140 μ lの5 $\times$ SSCをチェンバーの1コーナーに加える。アレイを入れたチェンバーは、60 で約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中 (1 $\times$ SSC, 0.1% SDS) において

50

45 で10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中(0.1×SSC)において45 で10分間ずつ3回洗浄し、乾燥させる。

【0342】

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488nm、Cy5の励起のために632nm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1.8cm×1.8cmのアレイは、解像度20μmでスキャンする。

【0343】

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する。用いるフルオロフォアの最大発光の波長は、Cy3では565nm、Cy5では650nmである。装置は両方のフルオロフォアからのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザー源において好適なフィルタを用いて、フルオロフォア1つにつき1度スキャンし、各アレイを通常2度スキャンする。

【0344】

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。

【0345】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化したデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラースケールへのリニア20色変換を用いて、シグナル強度がマッピングされたイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なるフルオロフォアを同時に励起および測定する場合には、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いて、データは先ずフルオロフォア間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重なりに起因する)を補正される。

【0346】

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 MT00LS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

【0347】

発現

例えば、ステロイドで治療された肝臓細胞株では、非治療肝臓細胞株の対照に対してSEQ ID NO:35の発現が下方制御されることがわかった。肝芽腫細胞は肝臓癌患者(15才、男)から得て、インスリン受容体およびインスリン様成長因子II受容体を発現する細胞系を得るのに用いた。サンプルはプロゲステロン、ベタメサゾン、デキサメサゾン、プレドニゾン、ブデソニド、メドロキシプロゲステロン、およびベクロメタゾン等のステロイドで

治療した。したがって、SEQ ID NO:35 は自己免疫/炎症性疾患の診断および治療に有用であり得る。

【0348】

更なる実施例において、SEQ ID NO:41 は未治療の組織に対してPPAR-ガンマアゴニストと分化用培養液で処理した前脂肪細胞組織において示差発現を示したが、これはマイクロアレイ分析によって確認した。したがって、SEQ ID NO:41 は糖尿病のような代謝疾患の治療において有益である。体重指数(BMI)が32.47の女性(40才)の脂肪組織から初代皮下前脂肪細胞を単離した。前脂肪細胞を活性成分のPPAR-ガンマとヒトインスリンを含む分化用培養液中で培養して、脂肪細胞への分化を誘発し、その後、インスリンだけを含む培養液に切り替えた。分化した脂肪細胞は誘発剤の入っていない培養液中にある未処理の前脂肪細胞と比較した。

10

【0349】

1.2 相補的ポリヌクレオチド

NAAPをコードする配列あるいはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然NAAPの発現を検出、低減または阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さなあるいは大きな配列の断片の場合でも、本質的に同じ手順を用いる。適切なオリゴヌクレオチド群を設計するため、Oligo 4.06ソフトウェア(National Biosciences)および、NAAPのコーディング配列を用いる。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いて、プロモーターがコーディング配列に結合するのを防止する。翻訳を阻害するには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、NAAPをコードする転写物にリボソームが結合するのを防ぐ。

20

【0350】

1.3 NAAPの発現

NAAPの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌内でATRSを発現させるには、抗生物質耐性遺伝子と、cDNA転写レベルを高める誘導性プロモーターとを有する好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターとしては、lacオペレーター調節エレメントと併用するT5またはT7バクテリオファージプロモーター、およびtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌にNAAPを発現させるには、イソプロピルβ-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発する。真核細胞でのNAAPの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に、一般にバキュロウイルスとして知られるAutographica californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の組換え型を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子をNAAPをコードするcDNAと置換するには、相同組換えを行うか、或いは、トランスファープラスミドの媒介を伴う、細菌の媒介による遺伝子転移を行う。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモーターによって高レベルのcDNA転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は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。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K.ら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら(1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

30

40

【0351】

殆どの発現系では、NAAPが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)と、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識と合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を、迅速に1ステップで行い得る。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性および抗原性を維持した状態で、固定化したグルタチオン上での融合タンパク質の精製を可能とする(Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GST部分を、特異的に操作した部位においてNAAPからタンパク質分解的に切断することが可能である。FLAGは8アミノ酸のペプチド

50

であり、市販されているモノクローナルおよびポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いた免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂上での精製を可能にする (QIAGEN)。タンパク質の発現および精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したNAAPを直接用いて以下の実施例 17、18、および19の、適用可能なアッセイを行うことができる。

【0352】

14 機能的アッセイ

NAAPの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理的に高められたレベルでの、NAAPをコードする配列の発現によって算定する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを持つ哺乳動物発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選択されるベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR 3.1プラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA) が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤あるいは電気穿孔法を用いて、5~10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に、一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 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザ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、ヨウ化プロビジウムによる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。

【0353】

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

【0354】

15 NAAP 特異的抗体の作製

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実質的に精製されたNAAPを用いて、標準的なプロトコルで動物 (ウサギ、マウス等) を免疫化して抗体を作り出す。

【0355】

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

【0356】

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

【0357】

10

16 特異的抗体を用いる天然NAAPの精製

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

【0358】

NAAPを有する培養液をイムノアフィニティークラムに通し、NAAPを優先的に吸着できる条件で (例えば、界面活性剤の存在下で高イオン強度のバッファーで) そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とNAAPとの結合を切るような条件で (例えば、或る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、NAAPを収集する。

20

【0359】

17 NAAPと相互作用する分子の同定

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

30

【0360】

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

【0361】

NAAPはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2つの大きな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決定することができる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

40

【0362】

18 NAAP活性の実証

NAAP活性を、その、レポーター遺伝子の転写を刺激する能力によって測定する (Liu, H. Y. 他 (1997) EMBO J. 16: 5289-5298)。このアッセイは、十分に特徴付けられたレポーター遺伝子作成物であるLexA_{0p}-LacZを用いる。このLexA_{0p}-LacZは、大腸菌LacZ酵素をコードする配列に融合されたLexA DNA転写調節エレメント (LexA_{0p}) からなる。融合遺伝子の作成及び発現、細胞への融合遺伝子の導入、及び、LacZ酵素活性の測定方法は、当業者に周知である。NAAPをコードする配列を、LexA転写因子に由来するDNA結合ドメインとNAAPとからなる融合タンパク質、LexA-NAAPの合成を指示するプラスミドにクローニングする。LexA-NAAP融合タンパク質をコードする得られたプラスミドを、LexA_{0p}-LacZレポ

50

ーター遺伝子を持つプラスミドと共に酵母細胞内に導入する。対照細胞と比較したLexA-NAAP形質移入細胞に関連するLacZ酵素活性の量が、NAAPによって刺激された転写の量に比例する。

【0363】

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

10

【0364】

或いは、NAAPの核酸結合活性を判定する或る方法は、ポリアクリルアミドゲル泳動移動度シフトアッセイを伴う。このアッセイの調製では、NAAPは、NAAP cDNAを有する真核生物発現ベクターを用い、COS7、HeLa、若しくはCHOなど、哺乳類細胞株を形質転換することで発現される。形質転換の後、この細胞株がNAAP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。可溶化した蛋白質を有する抽出物の調製は、NAAPを発現する細胞から行い、この方法は当分野で周知である。NAAPを有する抽出物の各部分を、 $[^{32}\text{P}]$ 標識したRNAまたはDNAに添加する。当分野で公知の技術により放射性核酸をin vitroで合成することが可能である。混合物を5～10分間バッファした条件下でRNA分解酵素とDNA分解酵素のインヒビターの存在下で25℃でインキュベートする。インキュベートした後に、サンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析する。その後オートラジオグラフ法により分析する。バンドがオートラジオグラム上に存在すれば、NAAPと放射性転写物との複合体の形成を示す。同様の移動度のバンドは、非形質転換細胞から調製した対照抽出物を用いて準備したサンプル中には見られないであろう。

20

【0365】

或いはNAAPのメチラーゼ活性を判定する或る方法では、供与体基質と受容体基質との間の放射標識メチル基の転移を測定する。反応混合液(50 μlの最終容量)には、15 mMのHEPES(pH 7.9)、1.5 mMのMgCl₂、10 mMジチオスレイトール、3%ポリビニルアルコール、1.5 μCi [メチル- ^3H]AdoMet (0.375 μMのAdoMet) (DuPont-NEN)、0.6 μgのNAAP、および受容体基質(例えば0.4 μgの $[^{35}\text{S}]$ RNAまたは6-メルカプトプリン(6-MP)、最大1 mMの最終濃度)を含む。反応混合液は30℃で30分間、次に65℃で5分間インキュベートする。

30

【0366】

[メチル- ^3H]RNAの分析法は次のとおりである。(1) 50 μlの2×ローディングバッファ(20 mMのTris-HCl(pH 7.6)、1 MのLiCl、1 mMのEDTA、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))および50 μlオリゴd(T)-セルロース(1×ローディングバッファ中に10 mg/ml)を反応混合液に添加し、インキュベーションを室温で振盪しながら30分間おこなう。(2)反応混合液を96ウェルろ過プレート(真空装置に接続)に移す。(3)各サンプルを逐次洗浄する。これには3つの2.4 mlアリコットの1×オリゴd(T)ローディングバッファ(0.5% SDSまたは0.1% SDSを有するものと、SDSを有しないもの)を用いる。(4) RNAの溶出を、300 μlの水で96ウェル収集プレートへ行い、シンチレーションバイアル(液体シンチラントを含有)に移し、放射能を判定する。

40

【0367】

[メチル- ^3H]6-MPの分析法は次のとおりである。(1) 500 μlの0.5 M ホウ酸バッファ(pH 10.0)、次に20% (v/v)でトルエンに希釈したイソアミルアルコールの2.5 mlを、反応混合液に添加する。(2) サンプルの混合を、10秒間、ボルテックスで良く攪拌しておこなう。(3) 遠心分離を700gで10分間おこなった後、1.5 mlの有機相をシンチレーションバイ

50

アル(0.5 ml 無水エタノールと液体シンチラントとを含有)に移し、放射能を判定する。
(4) 結果の補正を、6-MPの、有機相(約41%)への抽出について行う。

【0368】

或いは、NAAPのタイプIIトポイソメラーゼ活性のアッセイを、或るスーパーコイルDNA基質の弛緩(relaxation)に基づき行う。NAAPのインキュベートをその基質と共に、 Mg^{2+} とATPとを欠くバッファ中で行い、反応を終了させ、生成物をアガロースゲルにロードする。変容したトポアイソマーの、スーパーコイル基質からの弁別は、電気泳動でできる。このアッセイはタイプIIトポイソメラーゼ活性に特異的である。その理由は、 Mg^{2+} とATPとが、タイプIIトポイソメラーゼに必要な補因子だからである。

【0369】

NAAPのタイプIIトポイソメラーゼ活性のアッセイを、或るキネトプラストDNA(KDNA)基質の脱連環(decatenation)に基づいて行い得る。NAAPのインキュベートをKDNAと共にを行い、反応を終了させ、生成物をアガロースゲルにロードする。単量体環状KDNAの、連環したKDNAとの弁別は、電気泳動でできる。タイプIIトポイソメラーゼ活性とタイプIIトポイソメラーゼ活性とを測定する市販キットはTopogen (Columbus OH)で得られる。

【0370】

NAAPのATP依存性RNAヘリカーゼ巻き戻し活性は、ZhangおよびGrosse (1994; Biochemistry 33:3906-3912)に記載された方法で測定できる。RNA巻き戻し用の基質には ^{32}P -標識RNAが含まれており、このRNAは二本のRNAストランド(194および130ヌクレオチドの長さ)からなり、17塩基対のduplex領域を持つ。RNA基質を、37℃で30分間、ATP、 Mg^{2+} 、Tris-HClバッファ(pH 7.5)で可変量のNAAPと共にインキュベートする。次に、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルを通す電気泳動法によって一本鎖RNA生成物を二本鎖RNA基質から分離し、オートラジオグラフ法により定量する。回収した一本鎖RNAの量は、調製物中のNAAP量に比例する。

【0371】

あるいはNAAP機能のアッセイは、哺乳動物細胞培養系において生理的に高められたレベルでの、NAAPをコードする配列の発現によって算定する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを持つ哺乳動物発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選択されるベクターとしては、pCMV SPORT (Life Technologies) およびpCR3.1 (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA) があり、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを持つ。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μg の組換えベクターをヒト細胞株、好ましくは内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 μg のプラスミドを同時に形質移入する。

【0372】

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、それらの細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。

【0373】

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。

10

20

30

40

50

【0374】

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

【0375】

10

NAAPのプソイドウリジン合成酵素活性のアッセイには、トリチウム(^3H) 放出アッセイを、Nurse 他((1995) RNA 1:102112)を改作して行い、RNA中の ^3H -放射標識Uが異性化されてプソイドウリジン(Ψ)になるときに、ウリジル酸(U)のピリミジン成分のC₅ 位置からの ^3H の放出を測定する。典型的な500 μl アッセイ混液の内容は、50 mMのHEPESバッファ(pH 7.5)、100 mM酢酸アンモニウム、5 mMジチオスレイトール、1 mMのEDTA、30 単位のRNase阻害剤、および0.1~4.2 μM の [^3H]tRNA (約1 $\mu\text{Ci/nmol}$ のtRNA)である。反応を開始するには、5 μl より少量のNAAPの濃縮溶液(またはNAAP含有サンプル)を添加し、インキュベートを5分間37 $^{\circ}\text{C}$ で行う。NAAPを加えた後、反応混液の一部を様々な経過時間(最長30分まで)に採取し、NoritSA3 (12% w/v)を含有する1 mlの0.1 MのHClに希釈して反応を停止する。停止した反応混液の遠心分離を5分間、最大速度のマイクロ遠心機で行い、上澄みのろ過を、グラスウールの詰め物を通して行う。ペレットを、1 mlの0.1 M HCl中で2回、再懸濁して洗浄した後、遠心分離する。洗浄後の上澄みの各々を、別々にグラスウールの詰め物に通し、元のろ過物と混合する。混合したろ過物の一部を、シンチレーション液(最大10 ml)と混合し、シンチレーションカウンタでカウントする。RNAから放出された ^3H の量、また可溶性ろ液に存在する ^3H の量が、サンプルにおけるプソイドウリジン合成酵素活性の量に比例する(Ramamurthy, V. (1999) J. Biol. Chem. 274:22225-22230)。

20

【0376】

あるいはNAAPのプソイドウリジン合成酵素活性のアッセイは、30 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ で、次の混液で行う。すなわち100 mMのTrisHCl (pH 8.0)、100 mM 酢酸アンモニウム、5 mMの MgCl_2 、2 mMジチオスレイトール、0.1 mMのEDTA、および1~2 fmolの [^{32}P]放射標識ランオフ(run off)転写物(産生はin vitro で、適切なRNAポリメラーゼすなわちT7またはSP6で行う)を基質として含む混液である。NAAPを加えて反応を開始させるか、反応液に加えずに対照サンプルとする。インキュベート後、RNAをフェノール-クロロホルムで抽出し、エタノール中に沈殿させる。また、完全に加水分解して3-ヌクレオチドリン酸にするためRNase T₂を用いる。水解物の分析には2次元薄層クロマトグラフィを用い、 ^{32}P 放射ラベルの量(Ψ MPおよびUMPスポット中に存在する量)の評価を、薄層クロマトグラフィプレートフィルムまたはPhosphorImager スクリーンに曝した後に行う。基質RNA中のウリジル酸残基の相対数を考慮してyMPとUMPとの相対量を判定し、この量を用いてtRNA分子の量に対する Ψ の相対量を計算する(モル Ψ /tRNAモル、またはモル Ψ /tRNAモル/分で表す)。この量が、NAAPサンプル中のプソイドウリジン合成酵素活性の量に一致する(Lecointe, F. 他. (1998) J. Biol. Chem. 273:1316-1323)。

30

40

【0377】

NAAPの N^2 , N^2 ジメチルグアノシン転移酵素((m^2_2G) メチルトランスフェラーゼ)活性の測定は、160 μl 反応混液に以下を含有して行う。すなわち100 mMのTris-HCl (pH 7.5)、0.1 mMのEDTA、10 mMの MgCl_2 、20 mMの NH_4Cl 、1mMジチオスレイトール、6.2 μM のS-アデノシル-L-[メチル- ^3H]メチオニン(30~70 Ci/mM)、8 μg の m^2_2G -欠損tRNAまたは野生型tRNA(酵母由来)および約100 μg の精製NAAPまたはNAAP含有サンプルを含む。反応液を30で90分間インキュベートし、氷上で冷却する。各反応液の一部を、100 μg BSAを含む1 mlの水に希釈する。1 mlの2 M HClを各サンプルに加え、酸性不溶性産物を氷上で20分間沈殿させた後、収集のためのろ過をガラス繊維フィルターで行う。収集した物質の洗浄を数

50

回、塩酸で行い、液体シンチレーションカウンターを用いて定量する。 ^3H が、 m^2_2G を欠損した酸性不溶性tRNAに取り込まれる量が、NAAPサンプル中の N^2, N^2 -ジメチルグアノシン転移酵素活性の量に比例する。基質tRNAを含まない反応、または既に修飾された野生型tRNAを含む反応は対照反応として役だち、この反応では酸性不溶性 ^3H -標識産物は得られないはずである。

【0378】

NAAPのポリアデニル化活性の測定には、in vitro のポリアデニル化反応を用いる。反応混合液の作製は氷上で行い、以下を含む。10 μl の 5 mM ジチオスレイトール、0.025% (v/v) NONIDET P-40、50 mMクレアチンリン酸、6.5% (w/v)ポリビニルアルコール、0.5 ユニット/ μl のRNAGUARD (Pharmacia)、0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ クレアチン・キナーゼ、1.25 mM コルジセピン5'-三リン酸、および3.75 mMの MgCl_2 で、総容量25 μl とする。60 fmolのCst F、50 fmolのCPSF、240 fmolのPAP、4 μl の未精製CF II、又は部分的に精製したCF IIと、可変量CF Iを次に反応混液に加える。容量を調整して23.5 μl にするため、以下を有するバッファを加える。50 mMのTrisHCl (pH 7.9)、10% (v/v)グリセロール、および0.1 mMのNaEDTAである。最終的な硫酸アンモニウム濃度は20 mM未満とする。反応を開始するため(氷上で)、15 fmol の ^{32}P 標識mRNA前駆体テンプレートと、2.5 μg の無標識tRNAを含む1.5 μl の水を加える。反応液を次にインキュベートする。これは30 で75~90分間行い、停止するには75 μl (約2倍量)のプロテイナーゼKミックス(0.2 MのTris-HCl (pH 7.9)、300 mMのNaCl、25 mMのNaEDTA、2% (w/v) SDS)、1 μl の10 mg/mlプロテイナーゼK、0.25 μl の20 mg/mlグリコーゲンおよび23.75 μl の水を加える。インキュベート後、RNAをエタノールで沈殿させ、分析を6% (w/v)ポリアクリルアミド、8.3 M尿素シーケンシングゲル上で行う。乾燥したゲルの感光を、オートラジオグラフィで、またはホスホイメージャー(phosphoimager)で行う。切断活性を判定するには、切断産物の量を、mRNA前駆体テンプレートの量と比較する。いずれかのポリペプチド成分を反応から除くことと、NAAPを代替することとは、mRNA前駆体ポリアデニル化におけるNAAPの特定の生物機能を同定する上で有用である(Ruegsegger, U. 他 (1996) J. Biol. Chem. 271:6107-6113およびその中の参考文献)。

【0379】

tRNA合成酵素活性は、 ^{14}C -標識されたアミノ酸の存在下で基質tRNAのアミノアシル化として測定される。NAAPは緩衝液中で、 ^{14}C -標識されたアミノ酸と好適な同族tRNA (例えば、 ^{14}C アラニンおよび tRNA^{Ala}) と共にインキュベートされる。 ^{14}C -標識の産物は遊離 ^{14}C アミノ酸からクロマトグラフィーによって分離され、取り込まれた ^{14}C はシンチレーションカウンタで測定される。このアッセイでは、 ^{14}C -標識産物の量がNAAPの活性に比例する。

【0380】

あるいはNAAP活性を測定するため、NAAP含有サンプルのインキュベートを、以下を含む溶液で行う。1 mMのATP、5 mMのHepes-KOH (pH 7.0)、2.5 mMのKCl、1.5 mM塩化マグネシウム、および0.5 mMのDTTであり、また誤ってアシル化した ^{14}C -Glu-tRNAGln (例えば1 μM)および同様の濃度の無標識Lグルタミンをも含む。反応を停止させるため3 M酢酸ナトリウム(pH 5.0)を加えた後、混液の抽出を同量の水-飽和フェノールで行い、水相と有機相とを分離する遠心分離を15,000 $\times g$ 、室温で1分間おこなう。水相の沈殿を3倍量のエタノール、-70 で15分間おこなう。沈殿したアミノアシルtRNAを回収する遠心分離を15,000 $\times g$ 、4 で15分間おこなう。ペレットの再懸濁を25 mMのKOHで行い、脱アシル化を65 で10分間おこない、中和を0.1 MのHClで行い(最終pH 6~7)、真空乾燥する。乾燥ペレットの再懸濁を水中で行い、セルロースTLCプレート上にスポットする。プレートの展開を、イソプロパノール/蟻酸/水またはアンモニア/水/クロロホルム/メタノール中で行う。イメージを濃度計分析し、GluとGlnとの相対量の計算を、スポットのRf値と相対強度とに基づき行う。NAAP活性の計算を、GluがGlu-tRNA $^{\text{Gln}}$ としてアシル化され転換した結果のGlnの量に基づき行う(Curnow, A.W. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11819-26)。

【0381】

あるいは、NAAP活性をクロマチン〔染色質〕活性の増加によって実証される。クロマチン活性はDNA分解酵素Iへの感受性に比例する(Dawson, B.A. 他(1989) J. Biol. Chem. 264:12830-12837)。NAAP含有サンプル(NAAP+)と対照のサンプル(NAAP-)をDNA分解酵素Iで処理し、続いて、分解可能なビオチン標識ヌクレオチド類似体である5-[(N-ビオチンアミド)ヘキサノアミド-エチル-1,3-チオプロピオニル-3-アミノアリル]-2'-デオキシウリジン 5'-三リン酸(5-[(N-biotinamido)hexanoamido-ethyl-1,3-thiopropionyl-3-aminoallyl]-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate)を、当業界で周知のニック修復技術を用いて挿入した。精製し、EcoRI制限エンドヌクレアーゼで消化した後、ビオチン標識された配列をストレプトアビジンおよびビオチンセルロースに順次結合させることでアフィニティ単離する。NAAPが存在する場合と存在しない場合でのビオチン化の相違はNAAP活性に比例する。

10

【0382】

19 NAAPアゴニスト及びアンタゴニストの同定

NAAPの活性化若しくは抑制のアゴニスト若しくはアンタゴニストを、実施例18で記述したアッセイを用いてテストし得る。アゴニストはNAAP活性を増加し、アンタゴニストはNAAP活性の減少させる。

【0383】

当業者には、本発明の要旨および精神から逸脱しない範囲での、記載した本発明の方法およびシステムの、種々の修正および変更の手段は自明であろう。本発明について説明するにあたり幾つかの実施例に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な修正は、特許請求の範囲内にあるものとする。

20

(表の簡単な説明)

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

【0384】

表2は、GenBank識別番号と、本発明のポリペプチドに最も近いGenBank相同体の注釈とを示す。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。

30

【0385】

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

【0386】

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

【0387】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0388】

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。

40

【0389】

表7は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、参考文献及び閾値パラメータと共に示す。

【0390】

【表 1】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポリバブチド SEQ ID NO:	Incyte ポリバブ チド ID	ポリバブチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ヌクレオチド ID
4936875	1	4936875CD1	24	4936875CB1
264408	2	264408CD1	25	264408CB1
2181434	3	2181434CD1	26	2181434CB1
1367252	4	1367252CD1	27	1367252CB1
5633694	5	5633694CD1	28	5633694CB1
7985981	6	7985981CD1	29	7985981CB1
4706628	7	4706628CD1	30	4706628CB1
5790110	8	5790110CD1	31	5790110CB1
2948827	9	2948827CD1	32	2948827CB1
1398040	10	1398040CD1	33	1398040CB1
7716061	11	7716061CD1	34	7716061CB1
6113748	12	6113748CD1	35	6113748CB1
7474037	13	7474037CD1	36	7474037CB1
2955646	14	2955646CD1	37	2955646CB1
1573006	15	1573006CD1	38	1573006CB1
1336756	16	1336756CD1	39	1336756CB1
71259816	17	71259816CD1	40	71259816CB1
3354130	18	3354130CD1	41	3354130CB1
1797985	19	1797985CD1	42	1797985CB1
2870383	20	2870383CD1	43	2870383CB1
1285088	21	1285088CD1	44	1285088CB1
1532441	22	1532441CD1	45	1532441CB1
3056408	23	3056408CD1	46	3056408CB1

10

20

30

【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:またはプロテ オーム ID NO:	確率スコア	注釈
1	4936875CD1	g3255965	0	[ヒト]U5 snRNP-特異的 200kD タンパク質 Lauber, J. 他 (1996) EMBO J. 15:4001-4015
2	264408CD1	g4510377	1.90E-168	[シロイヌナズナ]推定 ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ A
3	2181434CD1	g6901197	3.50E-48	[分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe)]推定ヘリカーゼ
4	1367252CD1	g13699244	0	[ヒト]CLJL8 タンパク質 Mabuchi H, 他 (2001) Cancer Res. 61:2870-2877
5	5633694CD1	g4730929	1.40E-140	[ヒト]HCF 結合転写因子 Zhangfei Lu, R. 及び Misra, V. (2000) Nucleic Acids Res. 28, 2446-2454
6	7985981CD1	g2429354	2.50E-45	[マウス]EWS/FLI1 活性化転写物 2 Thompson, A.D. 他 (1996) Oncogene 13:2649-2658
7	4706628CD1	g4220590	6.90E-224	[マウス] 核タンパク質 np95 Fujimori, A. 他 (1998) Mamm. Genome 9:1032-1035
8	5790110CD1	g14349166	0	[ヒト]Werner ヘリカーゼ相互作用タンパク質 Kawabe, Y., 他 (2001) J. Biol. Chem. 276:20364-20369
9	2948827CD1	g1885356	1.80E-49	[ヒト]タイプ I RNA ヘリカーゼ pNORF1 Appelquist, S.E. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:814-821
10	1398040CD1	g10121865	6.90E-24	[ヒト]トポイソメラーゼ II アルファ-4 Petruti-Mot, A.S., Earnshaw, W.C. (2000) Gene 258:183-192
11	7716061CD1	g10121865	5.10E-23	[ヒト]トポイソメラーゼ II アルファ-4 Petruti-Mot, A.S., Earnshaw, W.C. (2000) Gene 258:183-192
12	6113748CD1	g1770528	6.30E-15	[ヒト]トランスリン(Translin) 結合 Zn フィンガー蛋白質 1 Aoki, K. 他 (1997) FEBS Lett. 401:109-112
13	7474037CD1	g12655063	7.00E-66	[ヒト] (BC001381) ポリメラーゼ (RNA) III (DNA 依存性) ポリペプ チド K (12.3 kDa)

【 0 3 9 2 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

表 2 - 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプ チド ID	GenBank ID NO.またはプロテ オーム ID NO:	確率スコア	注釈
14	2955646CD1	g409139	1.40E-156	[ヒト]ペアードボックス(paired-box)タンパク質 Eccles, M.R. 他 (1992) Cell Growth Differ. 3:279-289
15	1573006CD1	g487787	1.60E-63	[ヒト]亜鉛フィンガンタンパク質 ZNF140 Vissing, H. 他 (1995) FEBS Lett. 369:153-157
16	1336756CD1	g3638956	1.90E-294	[ヒト]亜鉛フィンガン様、P52742 (PID:g1731411)に類似
18	3354130CD1	g2306773	3.90E-90	[ヒト]亜鉛フィンガンタンパク質 Lee, P.L. 他 (1997) Genomics 43:191-201
19	1797985CD1	g14134120	0	[線虫]エンドサイトーシスタンパク質 RME-8 Zhang, Y., 他 (2001) Mol. Biol. Cell 12:2011-2021
20	2870383CD1	g7021370	8.90E-100	[キイロシヨウジョウバエ] c12.2 Batterham, P., 他 (2000) Molecular structure of the lozenge gene of Drosophila melanogaster, Accession: AAF35310
21	1285088CD1	g6016005	3.50E-256	[ヒト] CoREST タンパク質 Anderson, S.K. 他 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:9873-9878
22	1532441CD1	g11094232	9.40E-23	[マウス]神経活性関連リングフィンガンタンパク質 (Ohkawa, N., 他 (2001) J. Neurochem. 78:75-87
23	3056408CD1	g11527189	0	[ヒト] p250R Kato, H., 他 (2002) J. Biol. Chem. 277:5498-5505

【表 3 - 1】

表 3 - 1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	4936875CD1	2136	S26 S207 S225 S252 S253 S282 S339 S377 S385 S434 S679 S727 S872 S939 S1010 S1051 S1056 S1272 S1285 S1315 S1354 S1427 S1436 S1479 S1554 S1565 S1625 S1709 S1726 S1777 S1794 S1803 S1910 S1981 S2028 T31 S2078 S2133 T5 T180 T295 T366 T389 T565 T597 T642 T693 T731 T734 T764 T790 T795 T863 T1008 T1028 T1108 T1197 T1380 T1412 T1569 T1572 T1593 T1608 T1765 T1792 T1827 T1975 T2083 T2131 Y605	N995 N1026 N1531 N1825 N2103	DEAD/DEAH box ヘリカーゼ: A471-F676, E1318-Q1528	HMMER-PFAM

【 0 3 9 4 】

10

20

30

40

【表 3 - 2】

表 3 - 2

SEQ ID NO: 子ド ID	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシ化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1 (続.)					ヘリカーゼ保存 C-末端ドメイン: Q768-Q860	HMMER-PFAM
					ヘリカーゼ、ATP 結合、核タンパク質、mRNA 前駆体スプライシング、BRR2 PD007814: I1425-N1449, K1711-K2089, P859-L1190, P1694-L1904, H1965-Y2113	BLAST-PRODOM
					mRNA 前駆体スプライシング ヘリカーゼ BRR2 EC 3.6.1. PD184330: L1262-S1492	BLAST-PRODOM
					mRNA 前駆体スプライシング ヘリカーゼ BRR2 PD043126: R270-F475, Y11-D228, R25-F475, L1609-A1657	BLAST-PRODOM
					核小体ヘリカーゼ SKI2W, SKI2 DM01537: P32639 502-912: I484-V894, I1331-S1726 P53327 279-707: F478-Q892, L1369-S1726, F1325-T1569, R1133-F1150 P53327 1130-1542: E1318-L1728, F478-M893	BLAST-PRODOM
					ATP/GTP 結合部位モチーフ A(P-loop): A503-T510, A1350-T1357	MOTIFS

【表 3 - 3】

表 3 - 3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
2	264408CD1	1386	S4 S19 S54 S70 S74 S82 S127 S132 S240 S293 S337 S376 S475 S480 S504 S605 S608 S633 S689 S752 S788 S819 S878 S891 S931 S947 S1032 S1099 S1134 S1152 S1161 S1205 S1325 T196 T225 T282 T399 T413 T768 T921 T1047 T1199 T1256 T1289 Y365 Y939 Y1280	N80 N460 N493 N766	DEAD/DEAH box ヘリカーゼ: R612-E706	HMMER-PFAM
					Zn フィンガー-C-x8-C-x5-C-x3-H タイプ: N300-V325	HMMER-PFAM
					膜貫通ドメイン: G841-Y864, P1063-L1091, I1294-G1309 N 末端は細胞質ゾル内でない	TMAP
					DEAH-ボックスサブファミリー BL00690: T599-E616, I665-T674, G567-Q576	BLIMPS-BLOCKS
					DEAD 及び DEAH box ファミリー ATP 依存性ヘリカーゼシグネチャ: L642-P692	ProfileScan
					Zn フィンガー-C-x8-C-x5-C-x3-H PF00642: C313-H323	BLIMPS-PFAM

【 0 3 9 6 】

10

20

30

40

【表 3 - 4】

SEQ ID NO: 子ド ID	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
2 (続.)					ヘリカーゼ、核膜、ATP 結合 PD000440: L857-S979, P545-T702, P903-H980, T180-V210	BLAST-PRODOM
					RNA ヘリカーゼ、ATP 結合 PD001259: C973-Y1121	BLAST-PRODOM
					ヘリカーゼ PD091835: Q561-D728, H843-A897	BLAST-PRODOM
					DEAD-box サブファミリー ATP 依存性ヘリカーゼ DM00649: P24785 374-1061: T768-T1199, F534-K760, Q985-S1249, K1253-V1292 Q08211 378-1053: T817-D1197, Q535-S788, S1119-V1292 P34498 432-1038: G848-I1173, Q535-F730, I1264-F1293, S1205-A1250, V1333-I1364, K762-T817 S59384 595-1296: K825-F1175, R541-A737, Y1145-Y1261, F285-F359	BLAST-DOMO
					ATP / GTP 結合部位モチーフ A (P-loop) : G567-T574	MOTIFS
					DEAD-box サブファミリー ATP 依存性ヘリカーゼ シグネチャ: S663-E672	MOTIFS
3	2181434CD1	604	S62 S117 S205 S236 S259 S281 S460 S564 T25 T57 T63 T100 T171 T290 T445 T478 T534 T586	N386	膜貫通ドメイン: P227-M255 N-末端は細胞質内にはない。	TMAP

【表 3 - 5】

表 3 - 5

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプ チド ID	アミノ酸残 基数	潜在的リン酸化部 位	潜在的グリコシル 化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベ ース
3 (続)					3 番染色体内の仮定上ヘリカーゼ C28H8.3、 ATP 結合、核 PD135267: R211-M431, K510- E593	BLAST-PRODOM
4	1367252CD1	707	S34 S67 S94 S111 S178 S186 S230 S251 S310 S385 S415 S425 T45 T75 T89 T299 T394 T409 T442 T445 T463 T503 T566 T610 T667 T687 Y196 Y398	N63 N81 N127 N209 N269 N272 N467 N609 N639	核小体ヘリカーゼ SKI2W、SKI2 DM01537: A56003 60-514: D120-F244 S56752 289-744: D120-F244 P47047 131-583: L93-V219 P35207 309-803: E82-F244 SET ドメイン: V348-T687	BLAST-DOMO HMMER_PFAM
					SET ドメインタンパク質 PF00856: G366-E402, L626-L647	BLIMPS_PFAM
					タンパク質 転写調節 核 DNA 結合 相同体 ZESTE のエンハンサー SUVAR39 PD001211: F624-E684, R347-K396	BLAST_PRODOM
					タンパク質 SUVAR39 G9A 相同体 推定 G9A 様 CLR4P CLR4 ERG 関連 ESET PD036912: V232-N346	BLAST_PRODOM
					タンパク質 ERG 関連 ESET PDI30488: L128-K226	BLAST_PRODOM

【 0 3 9 8 】

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	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					PD130488: L128-K226	
4 (続)					SET ドメイン DM01286[S30385]716-969: D233-D406, E602-R703 DM01286[S44861]920-1138: V241-S390 DM01286[P45975]370-633: C281-R405, F624-K704 DM01286[S44861]1139-1275: V623-Y683 signal_cleavage: M1-S20	BLAST_DOMO
5	5633694CD1	358	S79 S103 S175 S189 S198 S209 S349 S351 T18	N273	signal_cleavage: M1-S20	SPSCAN
					bZIP 転写因子: A217-Y266	HMMER_PFAM
					ロイシンジッパーパターン L232-L253 L239-L260 L246-L267	MOTIFS
6	7985981CD1	132	S45 S71 S78 S84 S105 S107 S123 T11 T52 Y62		signal_cleavage: M1-T52	SPSCAN
					Src 相同性ドメイン 2: Y5-F86	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン: P37-T52 N 末端は細胞質ゾル内	TMAP
					SH2 ドメイン シグネチャ PR00401: Y5-L19, D25-S35, P37-N48, K59-E69, V75-P89	BLIMPS_PRINTS

【 0 3 9 9 】

10

20

30

40

【表 3 - 7】

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
7	4706628CD1	802	S20 S114 S170 S196 S301 S317 S346 S391 S409 S422 S567 S574 S628 S643 S654 S667 S760 T15 T24 T57 T85 T186 T270 T277 T293 T458 T661 T662 T789 Y56 Y386 Y487 Y507	N167	PHD フィンガー: S346-D395	HMMER_PFAM
					ユビキチンファミリー: M1-T83	HMMER_PFAM
					Zn フィンガー-タンパク質推定 T15F16.7 PD126626: V442-G509	BLAST_PRODOR
					細胞接着配列: R501-D503	MOTIFS
					Zn フィンガー、C3HC4 タイプ (RING フィンガー)、シグネチャ: C748-L757	MOTIFS
8	5790110CD1	665	S4 S34 S54 S75 S92 S139 S153 S156 S254 S285 S289 S336 S403 S416 S436 S456 S457 S509 T87 T230 T235 T323 T477 Y434 Y500 Y631	N334 N415 N516	様々な細胞活性と関連する ATP アーゼファミリー: S263-A433	HMMER_PFAM

【 0 4 0 0 】

10

20

30

40

【表 3 - 8】

表 3 - 8

SEQ ID NO: チド ID	Incyte ポリパブ アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
				膜貫通ドメイン: V376-I398; N-末端はサイトソル内	TMAP
8 (続)				タンパク質 ATP 結合 遺伝子間領域 ATP 依存性プロテアーゼ LA 相同体 加水分解酵素 セリン PD006874; I424-N598, Q337-A450	BLAST_PRODOM
				タンパク質 ATP 結合 遺伝子間領域 PDI50113; V614-K661	BLAST_PRODOM
				ヘリカーゼ Holliday ジャンクシオン DNA RUVB 修復 SOS 応答 ATP 結合 組換え PD003018; L264-N334, Pvalue 2.6e-06	BLAST_PRODOM
				HI1590; SER; SPOIIE; 49.9; DM03120 P40151 285-586; L435-L654 S43134 49-353; L410-F660, N359-P406 P39918 151-445; L410-F660, L368-P406 P45262 153-445; M422-F660, L368-I393	BLAST_DOMO
				ロイシンジッパーパター L604-L625	MOTIFS
				ATP/GTP 結合部位モチーフ A (P-loop): G268-T275	MOTIFS
9	2948827CD1 677	S42 S51 S80 S146 S151 S164 S208 S294 S311 S549 S564 S592 S666 T23 T117 T165 T175 T330 T332 T348 T431 T474 T514	N110 N162 N313 N349	ウイルス性(スーパファミリ 1)RNA ヘリカーゼ: T223-L237, I396-P414	HMMER_PFAM

【 0 4 0 1 】

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	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					膜貫通ドメイン: D63-S80 F220-F248 K263-R291 E510-T535 N 末端は細胞質ソル内にある	TMAP
9 (続)					UvrD/REP ヘリカーゼ PF00580: V561-L579, D591-G603, I224-V245, K375-T388, V407-S420	BLIMPS_PFAM
					タンパク質 ヘリカーゼ ATP 結合 DNA 結合 核 DNA RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ推定 PD002062: V358-S479	BLAST_PRODOM
					タンパク質 ヘリカーゼ ATP 結合 DNA 結合 核 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ DNA 染色体 PD001429: K516-N619	BLAST_PRODOM
					RETICULUM、ターゲティング DM01082 Q09820 551-842: T362-E630 S62476 551-842: T362-E630 P30771 585-840: P395-G635 Q00416 1474-1740: Q386-R632	BLAST_DOMO
					ATP/GTP 結合部位モチーフ A(P-loop) G227-S234	MOTIFS
10	1398040CD1	107	S16 S30 S91 T43 T80		Signal_cleavage: M1-L19	SPSCAN
					膜貫通ドメイン: A47-H70; N-末端は細胞質内にある。	TMAP
					タンパク質 プロトオンコジーン 核 偏在性 TPR モチーフ Y アイソフォーム MYB CMYB PD015557: F60-A101	BLAST_PRODOM

【表 3 - 1 0】

表 3 - 1 0

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
11	7716061CD1	96	T65		Signal_cleavage: M1-A34	SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-A18	HMMER
					膜貫通ドメイン: G39-L61, N-末端は細胞質内	TMAP
11 (続)					タンパク質 プロトコンジョーン核 偏在性 TPR モチーフ Y アイソフォーム MYB CMYB PD015557: F51-A92	BLAST_PRODOM
12	6113748CD1	469	S67 S95 S108 S159 S196 S229 S345 S397 T51 T80 T136 T192 T202 T208 T221 T228 T287		Signal_cleavage: M1-L53	SPSCAN
					BTB/POZ ドメイン: R8-V117	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン: I28-T51; N 末端は細胞質ゾル内	TMAP
					タンパク質 DNA 結合 Zn フィンガー-金属結合 PD000632:P4-V105 P 値 1.7e-08	BLAST_PRODOM
					POZ ドメイン DM00509 S59069 1-171: M1-E174 S44264 27-229: M1-G123 P24278 1-212: M1-P84	BLAST_DOMO
13	7474037CD1	132	S100 T25 T42 T62	N5 N89 N118 N360	ユビキチン DM00160 S55243 54-235: G102-R130	BLAST_DOMO

【 0 4 0 3 】

10

20

30

40

【表 3 - 1 1】

表 3 - 1 1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシ化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
14	2955646CD1	332	S81 S200 S223 S227 S253 S315 T96 T292 T310 Y254	N130 N299	Signal_cleavage: M1-G22	SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-G24	HMMER
					「ペアー-ドボックス」ドメイン: G20-R144	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン P4-G20; 末端は細胞質内にならない。	TMAP
14 (続)					「ペアー-ドボックス」ドメインタンパク質 BL00034:: S175-P185, G20-S70, G74-N110, F114-R144	BLIMPS_BLOCKS
					「ペアー-ドボックス」ドメインシグネチャ paired box.prf: G34-S90	PROFILES SCAN
					ペアー-ドボックスシグネチャ PR00027: V24-D39, R42-R60, L62-T79, G80-P97	BLIMPS_PRINTS
					ペアー-ドボックス 核 DNA 結合 PD000643: G20-R144 PD072729: P217-N293 PD004047: P217-N293 PD010666: T145-P176	BLAST_PRODOME
					ペアー-ドボックス DM00579 Q02962 13-126: G20-D131 S36156 12-125: H21-D131 Q02548 13-126: S17-D131 Q02650 13-126: G20-D131	BLAST_DOMO
					「ペアー-ドボックス」ドメインシグネチャ: R54-S97	MOTIFS

【表 3 - 1 2】

表 3 - 1 2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法データベース
15	1573006CD1	304	S16 S57 S82 S118 S167 S208 T86 T101 T110 T146 T180 T223 T279	N38 N270 N296	KRAB box: V6-D69	HMMER_PFAM
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ: Y256-H278, Y200-H222, F228-H250	HMMER_PFAM
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ BL00028: C258-H274	BLIMPS_BLOCKS
					C2H2 タイプ Zn フィンガー-PR00048: P255-G268, D243-G252	BLIMPS_PRINTS
					タンパク質 Zn フィンガー-亜鉛 PD01066: F8-A46	BLIMPS_PRODOM
15 (続)					Zn フィンガー-金属結合 DNA 結合タンパク質 フィンガー-亜鉛 核リポート転写調節 PD001562: V6-D69 PD053122: M106-S154, R245-K254, R273-K281, P212-K226 PD000072: K198-C261, K226-K281 PD017719: S185-C261, D113-T294	BLAST_PRODOM
					KRAB ボックスドメイン DM00605 I48208 18-93: S5-W77 S42077 18-93: S5-W77 P52738 3-77: Q3-R74 I48689 11-85: Q3-R74	BLAST_DOMO
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン: C202-H222 C230-H250 C258-H278	MOTIFS

【表 3 - 1 3】

表 3 - 1 3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
16	1336756CD1	595	S39 S40 S50 S209 S219 S226 S254 S497 S525 S553 T56 T174 T198 T275 T285 T310 T462		Signal_cleavage: M1-G16	SPSCAN
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ: F459-H481, Y160-H182, F431-H453, F543-H565, F216-H238, F272-H294, F487-H509, Y244-H266, C188-H210, Y300-H322, H515-H537, F355-H377	HMMER_PFAM
					C2H2 タイプ Zn フィンガー-シグネチャ PR00048: P243-K256, L287-G296	BLIMPS_PRINTS
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ BL00028: C545-H561	BLIMPS_BLOCKS
					タンパク質 Zn フィンガー-PD00066: H290-C302	BLIMPS_PRODOM
16 (続)					タンパク質 Zn フィンガー 金属結合 DNA 結合 PD170001:W111-G186 PD167819:A390-F432 PD017719:G184-G385 PD000072:R214-C277, R242-C305	BLAST_PRODOM
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン DM00002 P08042 272-312: Q263-Q304	BLAST_DOMO
					アルデヒド デヒドロゲナーゼ システイン活性部位 A68-K79	MOTIFS

【表 3 - 1 4】

表 3 - 1 4

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプ チド ID	アミノ酸残 基数	潜在的リン酸化部 位	潜在的グリコシル 化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデー タース
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン C162- H182 C188-H210 C190-H210 C218-H238 C246- H266 C274-H294 C302-H322 C357-H377 C433- H453 C461-H481 C489-H509 C517-H537 C545- H565	MOTIFS
17	71259816CD 1	281	S73 S101 S131 S212 T122 T130 T161 T221	N237		
18	3354130CD1	518	S103 S302 S317 S346 S402 S421 S471 S499 T24 T84 T236 T275 T294 T389 T400 T406 T456 Y246 Y407	N196	Signal_cleavage: M1-N14	SPSCAN
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ: H351-H373, Y379- H401	HMMER_PFAM
					SCAN ドメイン: T24-V119	HMMER_PFAM
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ: F463-H485, H323- H345, H435-H457, Y407-H429, Y491-H513	HMMER_PFAM
18 (続)					C2H2 タイプ Zn フィンガー-シグネチャ PR00048: P350-S363, L422-G431	BLIMPS_PRINTS
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ: C353-H369	BLIMPS_BLOCKS

【表 3 - 15】

SEQ ID NO: チド ID	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシ化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					金属結合 Zn フィンガー タンパク質 DNA 結合 PD004640: N14-E144 PD017719: K314-H513, G375-G516, G347-H485, G319-F500 PD000072: R377-C440, Y407-C468, K433-C496, K321-C384, E349-C412	BLAST_PRODOME
					P18; DM03974 Q07231 I65-306: L73-P153	BLAST_DOMO
					P18; フィンガー; 亜鉛; DM03735 P49910 45-90: E27-L72	BLAST_DOMO
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン DM000002 Q05481 789-829: Q342-C381 DM000002 P08042 314-358: C440-H485, C468-H513, C356-H401	BLAST_DOMO
					Zn フィンガー、C2H2 タイプ、ドメイン: C325-H345 C353-H373 C381-H401 C409-H429 C437-H457 C465-H485 C493-H513	MOTIFS
19	1797985CD1	1033	S88 S147 S253 S415 S425 S437 S448 S503 S556 S592 S618 S633 S867 T13 T54 T196 T347 T394 T438 T731 Y180 Y463	N221 N435 N436 N655	DnaJ ドメイン: D91-D155	HMMER_PFAM
19 (続)					膜貫通ドメイン S316-Y344 V549-H574 N598-L622 G766-W784; N-末端は細胞質内。	TMAP

【表 3 - 1 6】

表 3 - 1 6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシ化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
20	2870383CD1	486	S19 S50 S64 S418 S426 T127 T141 T220 T393 T402 Y466	N284	ロイシンジッパーパターン L817-L838 Signal_cleavage: M1-G15	MOTIFS SPSCAN
21	1285088CD1	485	S12 S86 S94 S95 S96 S181 S235 S244 S260 S283 S320 S347 S464 T196 T387	N70 N81 N143 N330 N414	シグナルペプチド: M1-P17 ATP/GTP 結合部位モチーフ A(P-loop): G447-T454 Signal_cleavage: M1-A39	HMMER MOTIFS SPSCAN
22	1532441CD1	751	S9 S72 S369 S394 S507 S535 S567 S736 T117 T143 T253 T402 T418 T426 T427 T434 T442 T695 T729 Y152		ELM2 ドメイン: G103-A167 Myb 様 DNA 結合ドメイン N383-R428, P192-K237 ATP/GTP 結合部位モチーフ A(P-loop): A206-T213 B-ボックス Zn フィンガー: R164-L205, A96-L149	HMMER_PFAM HMMER_PFAM MOTIFS HMMER_PFAM

10

20

30

40

【表 3 - 1 7】

表 3 - 1 7

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
22 (続)					膜貫通ドメイン:G542-L570; N 末端は細胞質内。	TMAP
					タンパク質 Zn フィンガー 核転写媒介因子 調節リプレッサー DNA 結合 フィンガー PD013917: R164-H355	BLAST_PRODOM
					W04H10.3 PROTEIN PD181144: L11-K87	BLAST_PRODOM
					真核生物 推定上 RNA 結合領域 RNP-1 シグネチャ: K689-L696	MOTIFS
					Zn フィンガー、 C3HC4 タイプ (RING フィンガー)、シグネチャ: C36-L45	MOTIFS

【表 3 - 1 8】

表 3 - 1 8

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
23	3056408CD1	1786	S168 S192 S255 S502 S581 S677 S705 S739 S772 S790 S802 S842 S949 S992 S1054 S1114 S1179 S1244 S1260 S1265 S1289 S1319 S1340 S1373 S1419 S1437 S1449 S1462 S1545 S1627 S1643 S1698 T174 T280 T589 T615 T709 T1164 T1292 T1303 T1369 T1413 Y917 Y929	N231 N319 N336 N396 N452 N468 N469 N489 N840 N1031 N1209 N1567 N1748	ARID DNA 結合ドメイン: L600-T709	HMMER_PFAM
23 (続)					膜貫通ドメイン: L1220-Y1238, E1756-I1776; N 末端はサイトソル内にはない	TMAP
					タンパク質結合 核 DNA 相同体 転写 DRIL1 網膜芽細胞腫 トランザクティング因子 PD004601: E605-P699	BLAST_PRODOM
					B120 PD067746: E939-P1026 PD123703: R875-Q937	BLAST_PRODOM

【 0 4 1 1 】

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
24/4936875CBI/ 6790	1-274, 1-279, 1-390, 1-798, 5-284, 5-532, 6-289, 13-377, 13-393, 17-593, 42-505, 60-688, 64-635, 134-663, 260-635, 296-677, 360-634, 423-982, 445-785, 552-1076, 561-690, 621-950, 738-1389, 843-1406, 893-1146, 1044-6576, 1114-1414, 1134-1402, 1155-1436, 1155-1459, 1224-1708, 1228-1636, 1232-1848, 1270-1885, 1286-1534, 1446-1705, 1446-1721, 1648-2447, 1674-2421, 1695-2485, 1796-2574, 1825-2548, 1840-1868, 1840-1937, 1906-2140, 1927-2482, 1947-2553, 1948-2648, 2013-2602, 2058-2681, 2066-2600, 2166-2818, 2222-2780, 2347-3274, 2456-3109, 2536-2657, 2597-3250, 2598-3181, 2624-3296, 2666-3217, 2717-3271, 2742-3389, 2874-3412, 2874-3484, 2886-3724, 2925-3735, 2996-3571, 3001-3727, 3023-3590, 3047-3698, 3243-3973, 3248-3959, 3391-3971, 3562-4137, 3629-4355, 3654-4369, 3675-4466, 3677-4533, 3722-4665, 3734-4314, 3749-4377, 3766-4343, 3766-4464, 3772-4652, 3789-4678, 3824-4492, 3829-4466, 3835-4396, 3858-4601, 3872-4485, 3941-3965, 3944-4570, 3956-4698, 3959-4518, 3968-4518, 3969-4619, 3993-4794, 4019-4597, 4022-4712, 4022-4727, 4059-4640, 4059-4787, 4066-4710, 4067-4685, 4082-4641, 4083-4865, 4103-4967, 4108-4631, 4113-4775, 4125-4687, 4134-4803, 4165-5002, 4186-4796, 4193-4942, 4197-5001, 4215-4838, 4219-5067, 4295-5036, 4296-4405, 4296-4540, 4298-4389, 4305-5129, 4308-5011, 4327-4980, 4331-5047, 4357-4385, 4367-5059, 4389-5237, 4393-4984, 4394-4928, 4394-5152, 4409-4950, 4438-5126, 4473-5085, 4474-5033, 4496-5048, 4553-5236, 4572-5128, 4578-5129, 4619-5390, 4636-5388, 4653-5213, 4657-5387, 4674-5408, 4686-5305, 4703-5387, 4708-5333, 4718-5399, 4743-5567, 4749-5460, 4784-5467, 4823-5502, 4845-5399, 4862-5541, 4864-5492, 4873-5469, 4896-5541, 4936-5560, 4939-5608, 4955-5642, 5002-5573, 5013-5667, 5047-5618, 5073-5608, 5081-5713, 5083-5698, 5097-5668, 5099-5743, 5113-5752, 5133-5896, 5142-5722, 5165-5698, 5189-5737, 5191-5774, 5199-5725, 5201-5756, 5203-5845, 5210-5746, 5223-5881, 5228-5892, 5246-5936, 5256-5896, 5272-5893, 5305-6012, 5307-5894, 5347-5949, 5362-6049, 5371-5986, 5384-6038, 5392-6061, 5408-5944, 5428-6209, 5455-6125, 5457-6003, 5470-6219, 5507-6151, 5554-6185, 5556-6098, 5571-6163, 5572-6105, 5572-6115, 5572-6128, 5572-6136, 5572-6158, 5572-6165, 5572-6176, 5578-6238, 5579-6247, 5583-6158, 5594-6248, 5599-6208, 5604-6204, 5610-6227, 5615-6239, 5623-6298, 5637-

10

20

30

【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
24 (続)	6220, 5655-6335, 5662-6271, 5670-6200, 5858-6710, 5907-6537, 5957-6577, 6010-6777, 6011-6726, 6014-6783, 6016-6720, 6030-6591, 6042-6788, 6056-6776, 6062-6612, 6071-6771, 6083-6717, 6090-6759, 6109-6762, 6125-6782, 6126-6778, 6135-6766, 6136-6708, 6136-6753, 6137-6755, 6140-6790, 6151-6790, 6157-6762, 6158-6765, 6159-6782, 6159-6787, 6162-6782, 6169-6751, 6177-6762, 6178-6695, 6188-6746, 6195-6773, 6199-6762, 6200-6733, 6206-6717, 6224-6773, 6227-6749, 6233-6748, 6235-6666, 6235-6765, 6239-6769, 6245-6776, 6255-6731, 6261-6755, 6261-6772, 6266-6716, 6273-6782, 6276-6790, 6289-6764, 6293-6776, 6296-6770, 6301-6777, 6303-6790, 6304-6773, 6307-6770, 6311-6790, 6315-6771, 6316-6773, 6316-6790, 6318-6551, 6321-6765, 6323-6769, 6323-6770, 6325-6770, 6329-6770, 6332-6687, 6341-6773, 6342-6770, 6344-6771, 6344-6773, 6346-6775, 6347-6739, 6351-6770, 6351-6772, 6352-6769, 6354-6773, 6356-6771, 6358-6770, 6360-6771, 6360-6773, 6361-6788, 6362-6774, 6363-6773, 6364-6773, 6365-6770, 6367-6757, 6367-6773, 6367-6790, 6370-6770, 6374-6773, 6379-6773, 6380-6790, 6381-6773, 6384-6770, 6388-6770, 6407-6768, 6411-6770, 6411-6772, 6411-6773, 6412-6770,
	6412-6773, 6416-6770, 6417-6685, 6418-6712, 6425-6679, 6426-6785, 6433-6740, 6434-6768, 6436-6716, 6437-6712, 6439-6789, 6451-6770, 6457-6773, 6459-6770, 6460-6732, 6464-6784, 6465-6714, 6465-6770, 6469-6696, 6480-6710, 6482-6698, 6484-6773, 6490-6767, 6494-6768, 6495-6734, 6495-6772, 6496-6778, 6497-6766, 6509-6776, 6510-6773, 6511-6781, 6513-6769, 6513-6773, 6516-6691, 6526-6772, 6534-6785, 6540-6773, 6561-6770, 6566-6694, 6572-6770, 6576-6717, 6593-6790, 6599-6698, 6611-6732, 6739-6773
25/264408CB1/ 4859	1-684, 80-785, 301-622, 336-602, 345-849, 367-1043, 405-1074, 904-1226, 904-1273, 905-1273, 906-1193, 1188-1774, 1266-1360, 1340-1844, 1340-1955, 1432-2181, 1520-1616, 1661-1888, 1672-1922, 1761-1919, 1761-2127, 1761-2147, 1761-2162, 1761-2166, 1761-2194, 1761-2200, 1761-2204, 1761-2207, 1761-2243, 1761-2247, 1761-2319, 1761-2412, 1790-2319, 1922-2688, 1961-2380, 1963-2161, 2024-2551, 2046-2521, 2142-2656, 2144-2423, 2150-2287, 2194-2454, 2201-2948, 2223-2719, 2226-2415, 2226-2688, 2251-2857, 2254-2562, 2296-2617, 2309-2932, 2310-2932, 2344-2932, 2364-2892, 2366-2932, 2367-2932, 2376-2932, 2380-2932, 2381-2932, 2386-2932, 2387-2932, 2393-2932, 2409-2932, 2412-3085, 2413-2932, 2419-2932, 2419-2998, 2426-2932, 2426-3106, 2427-2932, 2431-2932, 2432-2963, 2434-2932, 2442-2932, 2449-2932, 2475-2932, 2477-2932, 2484-2932, 2486-3028, 2486-3035, 2487-2932, 2492-2932, 2510-2932, 2516-2932, 2517-2932, 2524-2930, 2551-2932, 2583-2932, 2638-2932, 2639-3202, 2718-3276, 2720-2973, 2920-3177, 2920-3508, 2961-3214, 2961-3471, 3007-3528, 3009-3271, 3010-3274, 3029-3287, 3103-3458, 3119-3635, 3159-3406, 3159-3751, 3281-3998, 3327-3630, 3408-3656, 3409-

10

20

30

【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
25 (続)	3614, 3451-3596, 3499-3743, 3528-3817, 3567-3823, 3588-3727, 3611-4212, 3647-4142, 3648-3952, 3653-4301, 3710-3981, 3726-4209, 3743-3973, 3789-3900, 3798-4192, 3814-4008, 3814-4231, 3880-4030, 3880-4236, 3896-4142, 3907-4570, 3908-4510, 3931-4111, 3935-4229, 3948-4603, 3982-4143, 3982-4207, 3990-4300, 4004-4199, 4011-4694, 4026-4612, 4069-4309, 4107-4386, 4126-4418, 4130-4372, 4165-4831, 4170-4859, 4173-4611, 4175-4420, 4201-4646, 4227-4451, 4233-4610, 4237-4859
26/2181434CB1/ 3336	1-913, 283-1089, 497-739, 497-908, 497-1042, 497-1048, 497-1054, 497-1075, 595-916, 600-1374, 691-917, 710-1303, 715-915, 715-1020, 912-1284, 916-1162, 923-1539, 977-1601, 993-1284, 1001-1284, 1021-1162, 1021-1284, 1063-1284, 1132-1284, 1163-1432, 1191-1442, 1191-1747, 1191-1762, 1274-1756, 1281-1355, 1281-1390, 1281-1412, 1281-1545, 1284-1614, 1285-1432, 1285-1575, 1353-1728, 1368-1707, 1378-1887, 1400-1972, 1405-1653, 1428-1808, 1429-1988, 1433-1575, 1433-1727, 1450-2048, 1452-2016, 1465-1739, 1478-2052, 1491-1857, 1510-2090, 1511-2042, 1517-2052, 1521-2065, 1532-1804, 1538-2010, 1544-2194, 1552-1872, 1561-2225, 1565-2201, 1576-1727, 1576-1790, 1605-2187, 1609-2126, 1612-2182, 1618-2209, 1619-2334, 1624-2368, 1625-1791, 1684-2222, 1689-2175, 1691-2201, 1709-1956, 1718-1977, 1727-1920, 1727-2028, 1727-2044, 1728-1917, 1731-2001, 1731-2212, 1735-2005, 1762-2008, 1767-2392, 1770-2017, 1783-2074, 1788-1935, 1791-1917, 1871-2107, 1895-2153, 1913-2510, 1927-2191, 1928-2237, 1933-2564, 1952-2617, 1961-2621, 1972-2533, 1983-2593, 1996-2388, 1997-2558, 2015-2521, 2015-2530, 2021-2630, 2026-2627, 2070-2466, 2089-2361, 2100-2605, 2110-2564, 2121-2735, 2123-2564, 2124-2681, 2129-2380, 2129-2549, 2129-2641, 2154-2466, 2167-2453, 2178-2419, 2178-2431, 2182-2453, 2191-2462, 2191-2809, 2191-2878, 2211-2466, 2211-2467, 2235-2702, 2249-2410, 2250-2821, 2254-2517, 2279-2470, 2279-2844, 2317-2609, 2317-3070, 2319-2855, 2321-2711, 2335-2594, 2335-2911, 2337-2588, 2353-2902, 2366-2564, 2376-2863, 2394-2854, 2396-2915, 2405-2924, 2406-2678, 2417-2909, 2434-3279, 2452-2908, 2465-2724, 2487-2740, 2497-3053, 2534-2821, 2538-2799, 2549-2784, 2558-3285, 2581-3278, 2604-3014, 2604-3244, 2611-3260, 2626-2862, 2633-3128, 2644-3331, 2655-3288, 2659-3331, 2660-3259, 2677-3260, 2691-2943, 2704-2909, 2711-2977, 2711-3085, 2711-3234, 2711-3313, 2721-3319, 2721-3331, 2723-3315, 2731-2915, 2731-3015, 2733-2978, 2733-3319, 2741-3331, 2780-3047, 2784-3298, 2785-3014, 2785-3025, 2803-3323, 2812-3336, 2831-3289, 2842-3316, 2847-3108, 2876-3331, 2878-3320, 2880-3318, 2895-3331, 2915-3270, 2916-3114, 2936-3331, 2982-3290, 2993-3270, 2993-3287, 2993-3289, 3010-3176, 3010-3331, 3062-3331, 3065-3243, 3079-3314, 3079-3317, 3079-3331, 3094-3319

10

20

30

【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
27/1367252CB1/ 2918	1-514, 75-588, 112-587, 356-973, 489-1156, 525-1173, 625-916, 826-1023, 826-1067, 826-1397, 826-1426, 866-1512, 896-1315, 1126-1340, 1126-1697, 1212-1522, 1214-1663, 1246-1541, 1399-2033, 1400-1666, 1400-1832, 1442-1713, 1442-1948, 1458-1755, 1483-1778, 1484-1812, 1562-2121, 1600-2128, 1619-1910, 1626-1901, 1718-2251, 1738-1982, 1748-2071, 1761-1992, 1761-1994, 1761-2296, 1789-2312, 1850-2094, 1860-2099, 1868-2490, 1875-2131, 1899-2575, 1956-2253, 1956-2258, 1956-2361, 1972-2571, 2047-2181, 2057-2400, 2090-2508, 2097-2515, 2112-2501, 2123-2380, 2131-2581, 2131-2589, 2174-2586, 2178-2501, 2193-2668, 2228-2499, 2272-2510, 2279-2493, 2335-2550, 2336-2617, 2350-2804, 2414-2715, 2429-2589, 2527-2813, 2527-2814, 2527-2823, 2670-2918
28/5633694CB1/ 1610	1-260, 1-319, 1-643, 1-645, 1-1610, 7-172, 7-516, 13-575, 14-284, 14-520, 16-531, 17-680, 19-318, 24-280, 24-305, 24-306, 24-325, 24-438, 28-296, 33-213, 49-289, 70-381, 76-306, 86-358, 187-755, 191-674, 245-768, 251-538, 296-886, 297-717, 315-872, 315-881, 316-881, 326-883, 389-858, 392-858, 395-858, 397-858, 399-889, 402-871, 407-880, 408-858, 412-858, 412-871, 413-881, 415-858, 419-858, 420-858, 424-705, 450-882, 455-882, 457-882, 460-870, 464-845, 485-927, 492-858, 494-856, 499-758, 499-838, 499-858, 500-800, 501-801, 501-840, 501-851, 501-858, 501-871, 501-888, 506-881, 507-800, 509-858, 510-881, 538-858, 538-871, 548-868, 549-858, 552-881, 553-876, 553-881, 568-859, 568-871, 581-858, 586-1274, 600-858, 613-858, 616-889, 649-860, 667-858, 679-871, 690-858, 882-1226, 882-1260, 882-1283, 882-1313, 882-1323, 882-1359, 882-1383, 888-1441, 890-1411, 891-1447, 897-1126, 898-1394, 900-1357, 907-1181, 910-1121, 910-1175, 935-1174, 936-1242, 947-1247, 956-1276, 956-1349, 969-1299, 984-1350, 984-1396, 1003-1259, 1005-1604, 1031-1319, 1053-1527, 1058-1290, 1107-1292, 1119-1294, 1175-1481, 1201-1409, 1332-1610, 1335-1604, 1378-1574, 1459-1587
29/7985981CB1/9 35	1-615, 1-935, 7-676, 147-653, 147-796

10

20

30

【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
30/4706628CB1/ 3609	1-480, 87-588, 271-886, 425-1001, 557-1102, 814-1042, 814-1466, 868-1418, 868-1448, 1027-1447, 1093-1604, 1095-1415, 1097-1324, 1153-1418, 1172-1444, 1249-1808, 1342-1589, 1342-1594, 1342-1685, 1374-1944, 1474-1704, 1474-1705, 1488-1761, 1558-2025, 1564-1813, 1564-1837, 1564-2052, 1590-2203, 1749-2020, 1817-2060, 1817-2307, 1967-2243, 1981-2266, 2018-2233, 2018-2597, 2079-2323, 2079-2684, 2139-2744, 2161-2431, 2208-2512, 2228-2584, 2232-2513, 2257-2524, 2266-2441, 2266-2450, 2266-2810, 2290-2572, 2290-2767, 2318-2453, 2327-2645, 2368-2647, 2385-2695, 2409-2676, 2432-2663, 2454-2740, 2465-2812, 2484-2754, 2487-2755, 2545-2799, 2581-2819, 2581-2841, 2584-2828, 2585-2833, 2612-3210, 2613-2893, 2620-2901, 2623-3244, 2637-3115, 2649-2885, 2649-3195, 2663-2952, 2668-3227, 2668-3372, 2672-2818, 2675-2956, 2692-2956, 2750-2983, 2769-3370, 2777-2980, 2777-3000, 2781-2984, 2785-3042, 2805-3082, 2814-3341, 2815-3368, 2836-3214, 2850-3107, 2850-3124, 2850-3131, 2864-3108, 2866-3078, 2872-3205, 2877-3604, 2886-3084, 2886-3140, 2908-3589, 2913-3512, 2916-3354, 2940-3210, 2948-3609, 2951-3558, 2955-3198, 2956-3219, 2956-3466, 2957-3599,
	2994-3257, 2996-3232, 2996-3338, 2999-3022, 3003-3593, 3009-3590, 3010-3528, 3015-3464, 3021-3593, 3022-3304, 3024-3342, 3025-3600, 3026-3285, 3037-3303, 3039-3303, 3045-3609, 3048-3283, 3054-3591, 3057-3588, 3068-3593, 3070-3609, 3088-3279, 3095-3341, 3103-3565, 3113-3592, 3131-3600, 3139-3401, 3143-3433, 3145-3443, 3146-3407, 3147-3403, 3154-3608, 3156-3449, 3156-3605, 3162-3595, 3163-3432, 3163-3600, 3164-3600, 3173-3600, 3180-3600, 3194-3606, 3198-3600, 3201-3605, 3202-3600, 3202-3606, 3212-3473, 3215-3465, 3223-3606, 3225-3584, 3229-3504, 3235-3609, 3239-3600, 3244-3606, 3244-3607, 3284-3558, 3300-3600, 3336-3579, 3336-3609, 3347-3609, 3370-3609, 3387-3606, 3388-3609, 3406-3599, 3418-3606, 3426-3600
31/5790110CB1/ 4136	1-459, 280-433, 295-915, 301-1226, 316-616, 342-914, 360-913, 362-990, 422-1274, 540-907, 540-925, 735-925, 916-1310, 916-1458, 916-1588, 916-1627, 917-1466, 917-1548, 918-1383, 918-1414, 918-4136, 920-1593, 921-1400, 923-1598, 924-1482, 925-1229, 945-1337, 956-1398, 969-1422, 983-1126, 986-1366, 997-1118, 997-1130, 997-1207, 997-1231, 997-1243, 997-1247, 997-1268, 997-1271, 997-1274, 997-1303, 997-1310, 997-1313, 997-1314, 997-1348, 997-1349, 997-1353, 997-1363, 997-1383, 997-1385, 997-1386, 997-1387, 997-1388, 997-1389, 997-1391, 997-1392, 997-1393, 997-1395, 997-1397, 997-1398, 997-1399, 997-1400, 997-1401, 997-1402, 997-1404, 997-1406, 997-1407, 997-1409, 997-1411, 997-1412, 997-1413, 997-1414, 997-1416, 997-1421, 997-1422, 997-1425, 997-1426, 997-1427, 997-1428, 997-1433, 997-1434, 999-1400, 1007-1378, 1041-1158, 1110-1310, 1117-1515, 1132-1695, 1136-1695, 1188-1444, 1195-1512, 1201-1539, 1277-1512, 1290-1983, 1303-1972, 1317-1336, 1320-2137, 1322-1664, 1322-1694, 1331-1925, 1344-1745, 1346-1592, 1356-1873, 1357-2224, 1365-1826, 1365-1828, 1366-1836, 1370-1983, 1403-2079, 1410-2101, 1422-1706, 1422-2117, 1438-1684, 1461-1932, 1463-

10

20

30

【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
	1969, 1470-1896, 1470-1913, 1470-1974, 1472-1953, 1473-1834, 1482-1552, 1482-1955, 1483-1740, 1495-2015, 1497-2137, 1501-2030, 1508-1830, 1516-1816, 1520-2054, 1522-2056, 1558-1809, 1587-2111, 1600-2165, 1619-1930, 1637-2332, 1657-2137, 1663-1939, 1664-1913, 1664-2214, 1665-2214, 1674-1885, 1719-1770, 1722-1770, 1729-2248, 1729-2277, 1730-1967, 1745-1833, 1747-1772, 1755-2220, 1764-2353, 1772-2061, 1773-2056, 1773-2305, 1783-2250, 1783-2282, 1784-2269, 1784-2318, 1800-2314, 1824-2105, 1833-2338, 1834-2339, 1841-2312, 1854-2083, 1854-2113, 1854-2128, 1879-2379, 1883-2364, 1889-2143, 1889-2162, 1899-2537, 1912-2170, 1916-2267, 1919-2549, 1933-2211, 1944-2227, 1944-2439, 1949-2448, 1959-2522, 1967-2469, 1972-2586, 1977-2195, 1977-2213, 1977-2236, 1982-2241, 1982-2300, 1986-2254, 1992-2476, 2021-2577, 2023-2527, 2023-2826, 2044-2303, 2046-2721, 2052-2269, 2052-2650, 2054-2364, 2056-2222, 2056-2371, 2058-2316, 2073-2324, 2073-2342, 2082-2453, 2084-2934, 2091-2269, 2106-2373, 2106-2811, 2117-2366, 2118-2399, 2119-2617, 2129-2515, 2131-2405, 2135-2316, 2135-2716, 2135-2740, 2139-2642, 2140-2418, 2142-2508, 2143-2375, 2145-2403, 2150-2694,
31 (続)	2150-2745, 2157-2416, 2187-2925, 2187-2949, 2191-2426, 2191-2429, 2199-2913, 2200-2648, 2206-2441, 2208-2471, 2213-2285, 2213-2454, 2217-2441, 2224-2484, 2227-2481, 2229-2505, 2230-2949, 2235-2874, 2240-2419, 2243-2519, 2243-2524, 2245-2707, 2249-2663, 2250-2433, 2254-2512, 2254-2935, 2255-2790, 2259-2536, 2261-2729, 2263-2712, 2264-2675, 2269-2528, 2271-2501, 2279-2532, 2279-2770, 2291-2947, 2302-2757, 2303-2576, 2303-2933, 2306-2938, 2311-2547, 2319-2891, 2322-2650, 2326-2892, 2328-2459, 2342-2604, 2356-2846, 2357-2827, 2359-2809, 2366-2884, 2381-2917, 2382-2648, 2382-2683, 2382-2696, 2384-2441, 2387-2657, 2398-2896, 2403-2662, 2405-2949, 2413-2645, 2414-2943, 2445-2752, 2448-2852, 2456-2765, 2468-2948, 2469-2948, 2471-2949, 2472-2553, 2477-2919, 2480-2709, 2481-2847, 2481-2941, 2483-2955, 2485-2944, 2490-2950, 2494-2751, 2494-2948, 2494-2949, 2498-2943, 2502-2948, 2504-2949, 2508-2808, 2510-2943, 2513-2949, 2515-2948, 2515-2949, 2516-2949, 2517-2761, 2517-2949, 2518-2948, 2518-2949, 2520-2948, 2522-2948, 2531-2901, 2533-2949, 2541-2948, 2541-2949, 2543-2955, 2544-2949, 2547-2949, 2549-2948, 2550-2860, 2550-2949, 2551-2949,
	2557-2852, 2557-2948, 2558-2943, 2578-2949, 2588-2899, 2608-2845, 2609-2949, 2611-3302, 2614-2948, 2615-2949, 2617-2916, 2619-2950, 2619-2947, 2622-2901, 2632-2893, 2634-2868, 2639-2948, 2639-2949, 2649-2943, 2655-2906, 2655-2913, 2661-2928, 2662-2949, 2675-2923, 2713-2948, 2719-2916, 2719-2931, 2730-2949, 2734-2948, 2753-2949, 3047-3710, 3099-3726, 3210-3876, 3363-4027, 3566-4136, 3654-4116, 3655-4111

10

20

30

【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
32/2948827CB1/ 2850	1-1747, 14-760, 232-536, 456-536, 541-1060, 541-1200, 574-845, 683-1048, 684-968, 742-1449, 1185- 2750, 1185-2850, 1296-1814, 1306-1586, 1348-1602, 1358-1609, 1363-1593, 1383-2094, 1483-1752, 1577-2321, 1616-1877, 1649-1892, 1649-2222, 1729-2341, 1736-2009, 1753-2337, 1794-1986, 1824- 2265, 1883-2276, 1925-2366, 1929-2273, 1943-2355, 1952-2355, 1953-2355, 1968-2357, 1979-2358, 2007-2355, 2010-2267, 2043-2355, 2096-2325, 2096-2359, 2138-2356, 2141-2594
33/1398040CB1/4 99	1-499
34/7716061CB1/7 12	1-712, 398-484, 622-706
35/6113748CB1/ 1793	1-541, 3-530, 11-562, 16-310, 16-747, 450-1043, 471-769, 502-781, 567-870, 629-969, 997-1200, 997- 1570, 1049-1466, 1077-1260, 1077-1368, 1260-1793
36/7474037CB1/8 58	1-249, 1-297, 2-207, 2-285, 2-344, 3-559, 5-213, 5-244, 5-292, 5-485, 5-520, 5-561, 5-581, 9-664, 10- 261, 13-253, 19-194, 19-196, 19-261, 19-266, 19-271, 19-275, 19-290, 19-302, 20-231, 20-257, 20-290, 20-312, 20-337, 20-782, 21-288, 23-272, 23-287, 23-306, 23-308, 23-311, 23-717, 24-226, 24-265, 24- 272, 25-269, 25-309, 25-314, 25-533, 27-300, 27-787, 28-271, 28-282, 29-247, 29-331, 29-363, 30-242, 30-278, 30-289, 30-473, 30-794, 31-330, 32-288, 32-326, 34-282, 34-285, 34-293, 34-303, 34-319, 34- 326, 34-357, 34-714, 35-188, 35-235, 35-662, 36-284, 36-325, 39-651, 39-818, 43-294, 44-292, 44-313, 44-314, 49-325, 49-329, 50-379, 52-345, 55-362, 55-365, 66-210, 70-342, 73-400, 79-452, 81-306, 87- 322, 105-361, 108-773, 109-336, 122-514, 125-304, 150-450, 162-458, 177-403, 195-797, 197-821, 206- 416, 207-462, 208-450, 212-650, 246-494, 246-759, 246-825, 252-412, 253-484, 257-499, 266-853, 267- 395, 276-536, 286-775, 311-499, 313-674, 337-597, 360-858, 370-660, 379-786, 379-792, 381-838, 384- 838, 385-858, 387-857, 392-645, 392-669, 413-858, 445-716, 470-711, 483-640, 486-617, 489-727, 493- 858, 500-790, 516-699, 516-758, 554-827, 569-780, 573-830, 578-834, 613-857, 615-858
37/2955646CB1/ 2387	1-258, 1-509, 1-519, 1-584, 283-784, 283-793, 429-562, 441-661, 470-661, 505-720, 609-1156, 628- 1286, 656-880, 666-962, 716-1200, 732-1007, 740-1343, 741-799, 785-1450, 946-1232, 970-1559, 1011-1610, 1087-1420, 1088-1743, 1121-1686, 1162-1626, 1162-1628, 1244-1788, 1250-1899, 1256- 1958, 1337-1959, 1342-1699, 1360-1938, 1468-1932, 1480-2063, 1511-2210, 1592-2079, 1592-2082, 1647-2082, 1685-1901, 1688-2249, 1823-2387

10

20

30

表 4 - 8

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
38/1573006CB1/ 2091	1-537, 1-673, 150-405, 150-558, 150-734, 150-764, 161-568, 161-671, 161-677, 161-717, 161-752, 161-770, 161-779, 161-792, 163-416, 164-377, 164-633, 186-863, 197-389, 197-714, 226-812, 226-877, 244-951, 304-987, 331-712, 332-831, 341-1008, 384-928, 420-1071, 436-1108, 506-1107, 542-1045, 551-920, 569-1185, 646-1093, 652-1265, 658-1284, 690-1304, 729-1382, 760-872, 760-884, 763-1294, 777-884, 790-920, 806-1093, 823-1093, 823-960, 823-978, 823-1007, 830-1124, 843-884, 845-883, 845-1007, 853-1215, 855-1007, 864-1007, 887-1307, 907-967, 907-1062, 907-1091, 918-1278, 928-1040, 928-1052, 929-1091, 934-1521, 938-1359, 939-1091, 943-1052, 948-1429, 991-1091, 999-1052, 999-1091, 1002-1091, 1011-1052, 1018-1091, 1023-1091, 1032-1557, 1054-1612, 1070-1680, 1120-1624, 1124-1624, 1136-1398, 1137-1669, 1220-1488, 1220-1493, 1220-1803, 1229-1875, 1298-1858, 1317-1902, 1321-1902, 1358-1926, 1387-1910, 1405-1921, 1413-2071, 1437-2091, 1468-2079, 1522-2052, 1522-2074, 1559-2091, 1588-2091, 1662-1910
39/1336756CB1/ 2385	1-758, 110-637, 210-645, 211-621, 214-645, 263-645, 334-1845, 374-990, 561-1165, 625-1028, 626-1036, 638-1038, 646-862, 691-978, 693-808, 694-744, 694-818, 694-829, 695-829, 723-1392, 766-1073, 778-913, 810-913, 839-1090, 861-976, 881-1150, 897-1082, 912-1401, 912-1531, 912-1534, 933-1082, 1025-1599, 1029-1249, 1029-1358, 1159-1542, 1196-1524, 1534-1726, 1534-1830, 1534-1966, 1534-1977, 1534-1985, 1534-1986, 1534-1987, 1534-2009, 1534-2012, 1534-2017, 1534-2037, 1534-2038, 1534-2045, 1535-1595, 1535-1670, 1535-1711, 1535-1780, 1535-1782, 1535-1797, 1535-1805, 1535-1901, 1535-1918, 1535-1929, 1535-1930, 1535-1935, 1535-1951, 1535-1968, 1535-1971, 1535-1980, 1535-1982, 1535-2005, 1535-2010, 1535-2011, 1535-2015, 1535-2019, 1535-2020, 1535-2021, 1535-2022, 1535-2023, 1535-2024, 1535-2025, 1535-2026, 1535-2027, 1535-2028, 1535-2030, 1535-2032, 1535-2033, 1535-2034, 1536-1931, 1536-2024, 1537-1845, 1537-2041, 1537-2050, 1538-1885, 1539-1651, 1543-1986, 1543-2124, 1545-1982, 1546-1867, 1553-1679, 1553-1802, 1553-1884, 1553-1920, 1553-1963,
	1553-1972, 1553-1976, 1553-2006, 1553-2010, 1553-2013, 1553-2019, 1553-2020, 1553-2029, 1554-2013, 1571-1648, 1572-1966, 1578-1808, 1580-2038, 1583-1964, 1584-1735, 1585-1959, 1592-2012, 1619-1846, 1619-2175, 1628-2195, 1643-2131, 1661-1903, 1666-2193, 1699-2040, 1706-2197, 1741-2181, 1760-2191, 1771-2037, 1785-2196, 1789-2191, 1812-2197, 1839-2196, 1844-2189, 1846-2385, 1847-2025, 1847-2187, 1847-2197, 1892-2145, 1947-2197, 1979-2196, 1980-2197
40/71259816CB1/ 1289	1-501, 1-516, 1-1289, 2-596, 4-305, 4-386, 37-226, 142-713, 159-713, 206-713, 278-750, 365-713, 382-776, 415-713, 416-713, 484-711, 513-713, 527-713, 714-789, 714-846, 714-884, 714-904, 714-935, 714-1041, 714-1140, 773-928, 965-1289, 1025-1289

【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
41/3354130CB1/ 2628	1-561, 1-563, 6-289, 6-516, 6-672, 7-580, 11-555, 27-317, 27-327, 27-546, 27-700, 224-773, 284-872, 323-777, 364-774, 376-779, 491-1038, 566-1022, 744-1303, 852-1024, 866-1485, 867-1378, 867-1401, 873-1359, 910-1127, 928-1178, 953-1524, 992-1501, 1009-1524, 1065-1620, 1107-1575, 1108-1186, 1147-1722, 1174-1395, 1186-1900, 1251-1903, 1276-1354, 1298-1358, 1434-1866, 1449-1680, 1458-2135, 1466-1526, 1481-1774, 1493-1720, 1494-2089, 1530-1793, 1569-1793, 1619-2221, 1779-2327, 1979-2405, 1979-2628, 1980-2267, 2030-2281
42/1797985CB1/ 4077	1-1830, 201-1086, 201-4010, 413-1212, 450-1099, 588-1162, 622-902, 675-1216, 687-898, 745-1002, 889-1182, 998-1457, 1043-1570, 1101-1551, 1124-1350, 1261-1556, 1353-1629, 1370-1829, 1486-2142, 1514-1706, 1515-2048, 1530-1797, 1607-2284, 1614-2262, 1629-1995, 1649-2241, 1680-1928, 1803-2046, 1807-2067, 1846-2107, 1872-2498, 1887-2160, 1900-2143, 1919-4077, 1933-2561, 1939-2286, 1977-2205, 1988-2121, 2024-2369, 2027-2334, 2066-2575, 2087-2323, 2100-2323, 2196-2428, 2196-2639, 2196-2653, 2196-2678, 2196-2681, 2196-2691, 2196-2764, 2196-2807, 2245-2813, 2269-2539, 2275-2524, 2276-2775, 2277-2770, 2277-2775, 2347-2611, 2349-2579, 2379-2677, 2419-2809, 2449-2719, 2482-2742, 2482-3056, 2500-2792, 2506-2799, 2557-2685, 2597-2867, 2605-2855, 2605-3177, 2633-2848, 2636-2895, 2663-2967, 2685-3013, 2697-2834, 2705-2974, 2767-3030, 2767-3043, 2771-3037, 2788-3016, 2871-3155, 2889-3172, 2900-3190, 2916-3126, 2916-3189, 2951-3190, 2957-3248, 2968-3206, 3025-3265, 3035-3285, 3051-3312, 3053-3370, 3118-3377, 3158-3398, 3218-3506, 3239-3484, 3271-
	3551, 3295-3530, 3303-3597, 3312-3528, 3312-3903, 3323-3599, 3330-3993, 3332-3998, 3333-3570, 3333-3571, 3333-3820, 3335-4006, 3356-4007, 3400-3633, 3400-3829, 3480-3743, 3480-4009, 3480-4017, 3582-3845, 3582-3976, 3582-4017, 3614-3840
43/2870383CB1/ 1570	1-1348, 1-1458, 446-766, 446-767, 508-1004, 1184-1570
44/1285088CB1/ 2642	1-284, 11-301, 24-284, 45-284, 244-1692, 303-686, 343-770, 430-647, 430-741, 430-760, 430-780, 430-782, 430-783, 430-803, 430-881, 465-906, 707-1236, 730-1549, 791-1374, 869-1125, 1013-1282, 1043-1191, 1093-1649, 1181-1423, 1207-1367, 1231-1550, 1231-1576, 1373-1965, 1458-1877, 1568-1779, 1754-2426, 2014-2473, 2175-2466, 2237-2513, 2301-2582, 2330-2642
45/1532441CB1/ 2618	1-763, 80-320, 80-463, 100-148, 110-778, 146-463, 147-399, 256-324, 260-459, 464-834, 470-1054, 475-1116, 495-953, 547-899, 824-1029, 884-1624, 970-1542, 1020-1659, 1057-1660, 1065-1753, 1066-1720, 1240-1911, 1325-1912, 1465-1896, 1509-1870, 1624-1911, 1716-2514, 1734-2027, 1957-2201, 2102-2618

10

20

30

【表 4 - 1 0】

表 4 - 1 0

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
46/3056408CB1/ 6294	1-510, 1-517, 1-613, 1-678, 11-363, 138-678, 179-519, 237-640, 397-1242, 499-1384, 687-1199, 736-1221, 839-1124, 881-1374, 893-1403, 977-1601, 1015-1403, 1037-1403, 1159-1416, 1162-1702, 1403-1885, 1520-2031, 1764-2041, 1817-2333, 1901-2512, 1926-2219, 2049-2235, 2103-2715, 2106-2553, 2201-2771, 2222-2794, 2302-3025, 2304-2777, 2305-2712, 2305-3027, 2380-3020, 2385-2771, 2436-3130, 2461-2773, 2542-2688, 2561-3141, 2575-3103, 2617-3347, 2666-3287, 2698-2845, 2793-3291, 2918-3462, 2940-3441, 3082-3317, 3226-3793, 3285-3475, 3334-3931, 3347-3517, 3414-3625, 3416-3639, 3416-3678, 3583-3832, 3584-4227, 3662-3912, 3669-4447, 3682-4208, 3685-3944, 3711-3981, 3724-4214, 3743-4334, 3778-4414, 3840-4559, 3884-4088, 3907-4502, 3914-4463, 4031-4559, 4036-4398, 4049-4748, 4049-4783, 4057-4570, 4082-4404, 4082-4511, 4086-4317, 4107-4369, 4148-4767, 4170-4706, 4188-4437, 4189-4493, 4214-4497, 4235-4595, 4249-4462, 4253-4499, 4263-4650, 4300-4562, 4309-4630, 4315-4673, 4372-4655, 4372-4776, 4387-4626, 4405-4631, 4438-4680, 4444-5010, 4475-5007, 4479-4715, 4512-5134, 4518-5119, 4518-5143, 4518-5144, 4518-5153, 4518-5174, 4521-4949, 4521-5101, 4521-5105, 4521-5125, 4521-5133, 4521-5143, 4521-5165, 4524-5163, 4531-5039, 4547-5025, 4548-4816, 4558-5123, 4559-4851, 4579-4850, 4585-5162, 4600-5110, 4635-4895, 4635-5077, 4681-4930, 4716-5324, 4736-5091, 4753-4962, 4753-5213, 4757-5329, 4763-5123, 4797-4920, 4797-5058, 4797-5155, 4797-5178, 4869-5318, 4883-5451, 4896-5432, 4904-5137, 4904-5529, 4958-5290, 4966-5410, 4967-5754, 4968-5231, 4973-5611, 4973-5638, 4978-5215, 4978-5475, 4998-5266, 5006-5230, 5006-5233, 5006-5289, 5006-5550, 5007-5305, 5029-5557, 5039-5302, 5040-5759, 5047-5297, 5054-5765, 5066-5312, 5073-5763, 5082-5763, 5095-5759, 5096-5759, 5103-5763, 5104-5386, 5108-5763, 5109-5751, 5111-5658, 5124-5763, 5125-5407, 5135-5763, 5136-5596, 5140-5606, 5150-5399, 5165-5415, 5165-5418, 5165-5419, 5165-5421, 5165-5424, 5165-5432, 5165-5434, 5165-5472, 5165-5487, 5165-5489, 5165-5498, 5168-5606, 5182-5595, 5192-5820, 5227-5498, 5229-5597, 5240-5708, 5272-5602, 5279-5597, 5280-5850, 5311-5763, 5327-5756, 5343-5977, 5373-5763, 5450-5602, 5453-5718, 5460-5722, 5460-5915, 5461-5736, 5464-5875, 5502-5967, 5510-5953, 5529-5983, 5531-5798, 5532-6067, 5539-5826, 5577-6038, 5598-6022, 5626- 5864, 5626-6183, 5629-6244, 5635-5885, 5671-6068, 5689-5926, 5718-5747, 5721-6285, 5733-6294, 5741-5981, 5741-6294, 5755-5986, 5759-6294, 5767-6021, 5768-6285, 5769-6049, 5770-6294, 5776-6142, 5889-6149, 5961-6211, 6023-6261, 6066-6294

10

20

30

40

【 表 5 】

表 5

ポリペプチドSEQ ID NO:	Incyte プロジェ クト ID:	代表的ライブラリ
24	4936875CB1	SINTNOR01
25	264408CB1	BRAINOT03
26	2181434CB1	PENITUT01
27	1367252CB1	TESTTUT02
28	5633694CB1	NERDTDN03
29	7985981CB1	UTRSTUC01
30	4706628CB1	THYMNOT11
31	5790110CB1	BRAYDIN03
32	2948827CB1	LIVRFEE04
35	6113748CB1	PANCTUT02
36	7474037CB1	FIBPFEN06
37	2955646CB1	KIDNFET01
38	1573006CB1	BRAHTDR04
39	1336756CB1	SPLNNOE01
40	71259816CB1	SINTNOR01
41	3354130CB1	PLACFER06
42	1797985CB1	SINTNOT13
44	1285088CB1	THYMNNOE01
45	1532441CB1	COLENOR03
46	3056408CB1	TNFRDNV01

【 0 4 2 2 】

10

20

30

【表 6 - 1】

表 6 - 1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRAHTDR04	PCDNA2.1	このランダムプライムされたライブラリは、胆管癌で死亡した 55 才白人女性から切除した旧皮質、前海馬組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は、円蓋部全体に優勢な軽度の髄膜線維形成があり、帯状皮質白質および視床に軸索球状体が散在し、内嗅皮質および中脳水道灰白質領域に、少数の神経原繊維変化の散在を示している。随伴する腫瘍組織の病理は、残存腫瘍または再発性腫瘍を持つ高分化型の肝臓胆管癌を示した。患者の病歴には、胆管癌、術後バッド・キアリー症候群、胆汁性腫瘍、脱水症、栄養不良、乏尿、および急性腎不全がある。過去の手術には、胆嚢切除術および、肝臓の 85% の摘除がある。
BRAINOT03	PSPORT1	ライブラリは、26 才の白人男性の頭蓋形成術および脳髄膜病変の切除時に、摘出された脳組織から単離した RNA を用いて作製した。随伴する腫瘍組織の病理は、脳の右前頭頭頂部におけるグレード 4 の少星細胞腫を示した。
BRAYDIN03	pINCY	この標準化されたライブラリは、脳組織ライブラリの 670 万個の独立性クローンから作製した。開始 RNA は脳血管事故から死亡した 57 才の白人男性から採取された罹患視床下部組織から単離した RNA から作製した。患者の病歴にはハンチントン病および肺気腫がある。このライブラリは、極めて長時間 (48 時間/一回) の再アミールリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 から採用した条件を用いて 2 回にわたり標準化した。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直線化し、再度環状にした。
COLENOR03	PCDNA2.1	ライブラリは自動車事故で死亡した 13 才の白人女子から採取した大腸上皮組織から単離した RNA を用いて作製した。

【 0 4 2 3 】

10

20

30

40

【表 6 - 2】

表 6 - 2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
FIBPFEN06	pINCY	標準化された前立腺間質性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 を適用した条件を用いて 2 回にわたり標準化した。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標準化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。
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。
LIVRFEE04	PCDNA2.1	この 5'偏向ランダムプライムライブラリは妊娠 20 週にてパター症候群(13-トリソミー)で死亡した白人男胎児から採取した肝臓組織から単離した RNA を用いて作製した。血清学は陰性であった。
NERDTDN03	pINCY	この標準化された後根神経節組織のライブラリは、後根神経節組織ライブラリの 105 万の独立性クローンから作製した。開始 RNA 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)で死亡した 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、咽頭のナチユ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、アデノイド口蓋扁桃摘出、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 (フルコナゾール)、Deltasone (プレドニゾン)、hydrocodone、Lortab、アルプラゾラム(Alprazolam)、Reazodone、ProMace-Cytobom、Etoposide、シスプラチン(Cisplatin)、シタラビン(Cytarabine)、及びデキサメタゾン(dexamethasone)等がある。
		当患者は放射線療法及び複数の輸血を受けた。このライブラリは、極めて長時間(48 時間/一回)の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 を適応した条件を用いて 2 回にわたり標準化した。

【 0 4 2 4 】

10

20

30

40

【表 6 - 3】

表 6 - 3

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
PANCTUT02	pINCY	ライブラリは、根治的脾十二指腸切除時に 45 歳の白人女性から採取した脾臓腫瘍組織から単離した RNA を使用して作製された。病理学検査では、グレード 4 の未分化癌が見られた。家族の病歴には、良性高血圧、高脂質血症およびアテローム硬化冠動脈疾病が見られた。
PENITUT01	pINCY	ライブラリは 64 才の白人男性の陰茎から陰茎切断時に切除した腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査では、菌状に発育する侵襲度 4 の扁平上皮細胞癌が包皮の内壁にあり亀頭に及んでいた。患者の病歴には良性の大腸腫瘍、アテローム性冠動脈疾患、狭心症、痛風および肥満が含まれる。家族の病歴には、悪性咽頭腫瘍、慢性リンパ球性白血病および慢性肝臓病がある。
PLACFER06	pINCY	このランダムプライムされたライブラリは、胎児性死亡および水頭症で妊娠 16 週目に死亡した白人胎児から採取した胎盤組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴としては、頭(3回)および肩(1回)に臍帯が巻きついていて、血清学は抗 CMV にて陽性であった。家族歴には、複数の妊娠と生児出産、および一回の妊娠中絶がある。
SINTNOR01	PCDNA2.1	このランダムプライムされたライブラリは、31 才白人女性の Roux-Y 胃吻合術時に小腸組織から単離された RNA を用いて作製された。患者の病歴には臨床的肥満がある。
SINTNOT13	pINCY	ライブラリは 25 オアジア人〔女性〕の部分結腸切除術および一次的回腸造瘻術時に得た回腸組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は遠位縁から上行結腸までの結腸粘膜に及ぶ中等度進行性慢性潰瘍性大腸炎を示した。家族歴には高脂血症、抑鬱性疾患、悪性子宮頸部腫瘍、ウイルス性 A 型肝炎および抑鬱性疾患が含まれる。
SPLNNOE01	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、脳無酸素症で死亡した 2 オヒスパニック系男子の脾臓組織から単離された RNA を用いて作製された。過去の病歴は無く、血清検査は陰性であった。
TESTTUT02	pINCY	ライブラリは 31 才の白人男性の一側性睾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 - 4】

表 6 - 4

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
THYMNOE01	PCDNA2.1	この 5' に偏ってランダムプライムされたライブラリは、2 才白人女子の胸腺摘出および左心房性フィステルのパッチ閉鎖時に摘出した胸腺組織から単離した RNA を用いて作製された。病理学検査では、胸腺に肉眼的異常は見られなかった。患者には先天性心異常が見られた。患者の病歴には、左室性単心室 (double inlet left ventricle)、痕跡右心室、肺高血圧症、チアノーゼ、大動脈弁下部狭窄、発作、頭蓋底の骨折がある。患者の服用薬剤はランシックスおよび Captopril がある。家族歴は、逆流性腎症が母親にある。
THYMNOT11	pINCY	ライブラリは、2 才白人女子の胸腺摘出および左心房性フィステルのパッチ閉鎖中に除去した胸腺組織から単離した RNA を用いて作製された。患者は先天性心異常を示した。患者の病歴には、左室性単心室 (double inlet left ventricle)、痕跡右心室、肺高血圧症、チアノーゼ、大動脈弁下部狭窄、発作、頭蓋底の骨折がある。家族歴には逆流性腎症がある。
TNFRDNOV01	PCR2-TOPO TA	ライブラリは異なったドナーからのプールされた cDNA を使って作製された。妊娠 23 週で早産のため死亡した白人男子胎児 (ドナー A) から摘出されたプールされた小腸組織、胎児死亡の白人男子胎児 (ドナー B) から摘出された肺組織、55 才白人女性 (ドナー C) の肺全摘出時に摘出された胸膜腫瘍組織、2 才白人女子 (ドナー D) の脳髄膜病変の切除時に摘出された前頭/頭頂部脳腫瘍組織、72 才白人男子 (ドナー E) の肝臓部分切除術時に摘出された肝腫瘍組織、妊娠 23 週目で左心室発育不全で死産となった白人男子胎児 (ドナー F) から摘出されたプールされた胎児脳組織、および妊娠 23 週目で早産死亡の白人男子胎児 (ドナー G) から摘出された脳組織、妊娠、20 ~ 33 週で自然流産で死亡した 59 人の男女胎児から摘出されたプールされた胎児腎臓組織から単離された mRNA を用いて cDNA を作製した。

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
TNFRDNDV01 (cont.)		また、18～32 オの突然死の9人の男女ドナーから摘出されたプールされた胸腺組織および妊娠 18～24 週の 32 人の男女胎児から摘出されたプールされた胎児肝組織から単離された mRNA を用いて cDNA を作製した。ドナー A の血清検査は陰性だった。家族歴は、糖尿病が母親にある。ドナー B の血清検査は陰性だった。ドナー C の場合、病理学的検査では平滑筋肉腫と最もよく一致するグレード 3 の肉腫があり、子宮が原発で、右下葉および中葉の一部を置き換える隆起塊を形成していた。腫瘍を構成する多数の小結節はほとんど完全な壊死を示していた。平滑筋アクチンは陽性だった。エストロゲン受容体は陰性で、プロゲステロン受容体は陽性だった。患者は息切れがあった。患者の病歴には消化性潰瘍疾患、正常分娩、貧血および寛解期にあるニコチン中毒がある。前に受けた手術には腹式子宮全摘、両側生卵管卵巣摘出、痔核切除、内視鏡による肺病巣の切除および虫垂切除が含まれる。患者の服用薬剤には Megace、タモキシフェンおよび Pepcid が含まれる。家族歴には多発性硬化症(母)、アテローム硬化型冠動脈疾患および II 型糖尿病(父)および乳癌(祖父母)がある。 ドナー D の場合、病理は神経外胚葉性腫瘍を呈し、進行型神経節分化が見られた。病変部は単に中等度に細胞性であるが、有糸分裂的に活性で MIB-1 標識指数が高い。神経細胞分化が広範囲にわたり、進行していた。多核と形成異常を示す形態が容易に見られた。グリア成分はそれほど著しくなかった。患者には運動発作があった。家族歴には、高血圧が祖父母(1人以上)にある。ドナー E の場合、病理は転移度 2(4 の中)の神経内分泌癌を示し、塊を形成していた。患者は転移性肝臓癌を示した。患者の病歴には良性高血圧、I 型糖尿病、前立腺肥大、前立腺癌、アルコールおよびタバコ濫用(共に寛解期)がある。前に行われた手術には膀胱病変部切除、非観血的な前立腺生検(closed prostatic biopsy)、経尿道的な前立腺切除、両側の精巣摘出および脾臓全摘が含まれる。患者の服用薬剤には、Eulexin、Hytrin、Proscar、エコトリン およびインスリンがある。家族歴には母親にアテローム性冠動脈疾患と急性心筋梗塞、父親にアテローム性冠動脈疾患と II 型糖尿病がある。
		ドナー F および G については、血清学的検査は両方のドナーで陰性であり、ドナー G の家族歴には母の糖尿病があった。

【表 6 - 6】

表 6 - 6

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
UTRSTUC01	PSPORT1	この大型分画のライブラリは2人のドナーからのプールされた cDNA を使って作製された。cDNA は 37 才黒人女性 [ドナーA]の筋腫切除、掻爬、右卵管採領域生検および付随的虫垂切除時に摘除された子宮内腹腫瘍組織と、49 才白人女性(ドナーB)の腔式子宮摘出および両側生卵管卵巣摘出術時に摘出された子宮内腹腫瘍組織から単離された mRNA を用いて作製した。ドナーA の病理は多重子宮平滑筋腫を示した。卵管採嚢胞が見られた。子宮内膜はホルモン作用による分泌期にあった。患者は欠乏性貧血、臍ヘルニアおよび月経閉止前の月経過多を示した。患者の病歴は月経閉止前の月経過多および肺のサルコイドーシスを含んでいた。以前の手術としては、ヒステロスコピー、掻爬および肺の内視鏡的生検があった。患者の服用薬剤は Chromagen および Claritin がある。ドナーB の病理はグレード 3 の子宮底内に塊を形成する腺扁平上皮癌を示しており、これは子宮前壁、および限局的に隣接する子宮内腹ポリープにも及んでいた。 腫瘍は最大の深さが 7mm にまでなっていた(腫瘍になっていない壁の厚さは 2.2cm)。隣接する子宮内膜は非活性であった。エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体に対するパラフィン切片免疫染色は陽性であった。患者の病歴には悪性乳癌が含まれる。前に受けた手術には片側性拡大単純乳房切除術および両側生卵管破壊がある。患者の服用薬剤には Megace および CAF (シクロホスファミド、アドリアマイシン、Fluorouracil)が含まれる。

表7-1

プログラム	説明	参考文献	パラメータ関連値
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. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値1.0E-10 以下
FASTA	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、tfasta、fastx、tfastxおよびsssearch)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.	ESTs: fasta E 値=1.06E-6 アセンブリされた ESTs:fasta 同一性= 95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLOCKS IMPROVED Searcher。	Henikoff, S. 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; 及びAtwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値 = 1.0E-3以下
HMMER	PFAMのような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に対して問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Somnhammer, E.L.L. 他 (1998) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350ページ。	PFAM ヒット: 確率値 = 1.0E-3 以下 シグナル ペプチド ヒット:スコア=0 以上

表7-2

【表 7 - 2】

プログラム	説明	参照文献	パラメータ関値
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.	ノーマライズされた質スコアとその特定のProsite モチーフに対する GCG指定「HIGH」値 通常、スコア=1.4-2.1.
Phred	高い感度と確率で自動配列決定機トレースを調べベースコールングアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. 及び P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	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プログラムであるSWATやCrossMatchを含むPhils 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。	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; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrapアセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、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. 及び P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM) を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他, eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ。	
Motifs	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	

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/14276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : C12P 21/06; C12N 15/00, 5/00, 15/63												
US CL : 435/69.1, 320.1 325 455												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 320.1 325 455												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	Database Geneseq on GenCore, AN:ABR2232, 13 October 2003, INCYTE GENOMICS INC. Human nucleic acid-associated protein (NAAP)-id 4936875CD1. see amino acid sequences which matches to SEQ ID NO:1.	1-2, 4-5, 17-18 and 56										
A	Database Geneseq on GenCore, AN:ACF35640, 13 October 2003, INCYTE GENOMICS INC. Human nucleic acid-associated protein (NAAP)-id 4936875CB1. see amino acid sequences which matches to SEQ ID NO:1.	1-2, 4-5, 17-18 and 56										
A	Database GenEmbl on GenCore, AN:AB018331, 05 July 2002, NAGASE et al, Homo sapiens mRNA for KIAA0788 protein, partial CD. see nucleic acid sequences that matches to SEQ ID NO:24.	1-2, 4-5, 17-18 and 56										
P,X	Database Geneseq on GenCore, AN: AAM78989, 06 November 2001, HYSEQ INC. Human protien SEQ ID NO:1651. see amino acid sequences which matches SEQ ID	1-2, 4-5, 17-18 and 56										
P,X	Database Geneseq on GenCore, AN: AAK52122, 06 November 2001, HYSEQ INC. Human polynucleotide SEQ ID NO:667. see amino acid sequences which matches SEQ ID NO:24.	1-2, 4-5, 17-18 and 56										
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 11 July 2004 (11.07.2004)		Date of mailing of the international search report 02 AUG 2004										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 372-9305		Authorized officer <i>Cherie Bell-Kamryn</i> Suresh Kaushal Ph.D. Telephone No. (571)272-1600										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/14276

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 2, 4-5 17-18 and 56

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14276

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

- Group 1, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 56, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:1.
- Group 2, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 57, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:2.
- Group 3, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 58, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:3.
- Group 4, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 59, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:4.
- Group 5, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 60, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:5.
- Group 6, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 61, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:6.
- Group 7, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 62, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:7.
- Group 8, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 63, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:8.
- Group 9, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 64, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:9.
- Group 10, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 65, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:10.
- Group 11, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 66, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:11.
- Group 12, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 67, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:12.
- Group 13, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 68, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:13.
- Group 14, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 69, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:14.
- Group 15, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 70, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:15.
- Group 14, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 71, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:16.
- Group 16, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 72, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:17.
- Group 17, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 73, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:18.
- Group 18, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 74, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:19.
- Group 19, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 74, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:14.
- Group 20, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 75, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:20.
- Group 21, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 76, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:21.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14276

Group 22, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 77, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:22.

Group 23, claim(s) 1, 2, 4-5, 17-18, 78, drawn to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:23.

Group 24, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:24.

Group 25, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:25.

Group 26, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:26.

Group 27, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:27.

Group 28, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:28.

Group 29, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:29.

Group 30, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:30.

Group 31, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:31.

Group 32, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:32.

Group 33, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:33.

Group 34, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:34.

Group 35, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:35.

Group 36, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:36.

Group 37, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:37.

Group 38, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:38.

Group 39, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:39.

Group 40, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:40.

Group 41, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:41.

Group 42, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:42.

Group 43, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:43.

Group 44, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:44.

Group 45, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:45.

Group 46, claim(s) 3, 6-7, 9-10, 12-13, 14-16, 29, 46-55, 79-101, drawn to an isolated polynucleotides selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:46.

Group 47, claim(s) 8, drawn to a transgenic organism comprising the recombinant peptide of SEQ ID NO:24.

Group 48, claim(s) 8, drawn to a transgenic organism comprising the recombinant peptide of SEQ ID NO:25.

Group 49, claim(s) 8, drawn to a transgenic organism comprising the recombinant peptide of SEQ ID NO:26.

Group 50, claim(s) 8, drawn to a transgenic organism comprising the recombinant peptide of SEQ ID NO:27.

Group 51, claim(s) 8, drawn to a transgenic organism comprising the recombinant peptide of SEQ ID NO:28.

Group 52, claim(s) 8, drawn to a transgenic organism comprising the recombinant peptide of SEQ ID NO:29.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

PCT/US02/14276

Group 70, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:1.
Group 71, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:2.
Group 72, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:3.
Group 73, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:4.
Group 74, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:5.
Group 75, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an Isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:6.
Group 76, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:7.
Group 77, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:8.
Group 78, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:9.
Group 79, claim(s) 11, 31-45 sdrawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:10.
Group 80, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:11.
Group 81, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:12.
Group 82, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:13.
Group 83, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:14.
Group 84, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:15.
Group 85, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an Isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:16.
Group 86, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that birnds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:17.
Group 87, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:18.
Group 88, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:19.
Group 89, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected form the amino acid sequences of SEQ ID NO:20.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14276

Group 90, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:21.
 Group 91, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:22.
 Group 92, claim(s) 11, 31-45 drawn to isolate an antibody that binds to an isolated polypeptide selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:23.

Group 93, claim(s) 19, drawn to a method of treating disease associated with decreased expression of MAAP.

Group 94, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:1.
 Group 95, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:2.
 Group 96, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:3.
 Group 97, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:4.
 Group 98, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:5.
 Group 99, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:6.
 Group 100, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:7.
 Group 101, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:8.
 Group 102, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:9.
 Group 103, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:10.
 Group 104, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:11.
 Group 105, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:12.
 Group 106, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:13.
 Group 107, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:14.
 Group 108, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:15.
 Group 109, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:16.
 Group 110, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:17.
 Group 111, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:18.
 Group 112, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:19.
 Group 113, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:20.
 Group 114, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:21.
 Group 115, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:22.
 Group 116, claim(s) 20-27, drawn to a method of screening compounds that modulates the activity of a polypeptide, selected from the amino acid sequences of SEQ ID NO:23.

Group 117, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:24.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14276

Group 118, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:25.
 Group 119, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:26.
 Group 120, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:27.
 Group 121, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:28.
 Group 123, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:29.
 Group 124, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:30.
 Group 125, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:31.
 Group 126, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:32.
 Group 127, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:33.
 Group 128, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:34.
 Group 129, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:35.
 Group 130, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:36.
 Group 131, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:37.
 Group 132, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:38.
 Group 133, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:39.
 Group 134, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:40.
 Group 135, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:41.
 Group 136, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:42.
 Group 137, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:43.
 Group 138, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:44.
 Group 139, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:45.
 Group 140, claim(s) 28, drawn to a method of screening compound that alter the expression of a polynucleotides selected from SEQ ID NO:46.

The inventions listed as Groups 1-140 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Groups 1-23 are polypeptide molecules, wherein each polypeptide molecule (SEQ ID NO:1-23) has different structure and function.

The special technical features of Groups 24-46 are nucleic acid molecule, wherein each nucleic acid molecule (SEQ ID NO:24-46) has different structure and function.

The special technical feature of Groups 47-69 is a transgenic organism characterized by an expression of a polypeptide, wherein each polypeptide (SEQ ID NO:24-46) has different structure and function.

The special technical features of Groups 70-92 is an antibody, wherein each antibody is characterized by its binding to a polypeptide that has different structure and function.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14276

The special technical feature of Group 93 is treatment of a disease that requires in-vivo administration of a therapeutic compound.
The special technical features of Group 94-116 are compounds that modulates the activity of a polypeptide (SEQ ID NO:1-23), wherein each polypeptide has different structure and function.
The special technical feature of Group 117-140 are compounds that modulates the expression of a polynucleotides (SEQ ID NO:23-46), wherein each polynucleotides has different structure and function. In addition the method of screening compounds that interacts with a polypeptide does not share any special technical feature with method of screening compounds that interacts with a nucleic acid sequence, since these methods do not share a common core structure.

This international searching authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2, and 13.3) for the reasons indicated below:
According to the guidelines in Section 9(i)(a) of Annex B of the PCT Administrative instruction, the special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 shall be considered to be met when all the alternatives of a Markush-group are of similar nature. For chemical alternatives, such as the claimed sequences) the Markush group shall be regarded as being of similar nature when

(A) all alternatives have a common property or activity and

(B)(1) a common structure is present, i.e, a significant structure is shared by all of the alternatives or

(B)(2) In cases where the common structure cannot be the unifying criteria, all alternatives belong to an art recognized class of compounds in the art to which the invention pertains.

The instant application claims multiple polynucleotide sequences, the proteins encoded by them, antibodies and transgenic animals. Each of these is considered to lack unity because:

These sequences do not meet the criteria of (A), common property or activity or (B)(2) art recognized class of compounds. Each sequence behave in a different way in the context of the claimed invention. Each member of the class cannot be substituted, one for the other, with the expectation that the same intended result would be achieved.

Further, the sequences do not meet the criteria of (B)(1), as they do not share, one with another, a common core structure. Accordingly, unity of invention between the nucleotide and protein sequences is lacking and each sequence claimed is considered to constitute a special technical feature.

Accordingly, the claims are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT rule 13.2 so as to form a single inventive concept.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

STIC Sequence search data bases in Gencore, Medline

Search Terms: amino acid sequences of Seq ID NO:1.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 3/12
 A 6 1 P 5/00
 A 6 1 P 5/10
 A 6 1 P 5/14
 A 6 1 P 5/38
 A 6 1 P 5/40
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 7/02
 A 6 1 P 7/04
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 7/08
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 13/02
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/04
 A 6 1 P 19/06
 A 6 1 P 19/10
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/02
 A 6 1 P 25/08
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/18
 A 6 1 P 25/20
 A 6 1 P 25/22
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 27/06
 A 6 1 P 27/12
 A 6 1 P 27/16
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/10

A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 3/12
 A 6 1 P 5/00
 A 6 1 P 5/10
 A 6 1 P 5/14
 A 6 1 P 5/38
 A 6 1 P 5/40
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 7/02
 A 6 1 P 7/04
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 7/08
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 13/02
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/04
 A 6 1 P 19/06
 A 6 1 P 19/10
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/02
 A 6 1 P 25/08
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/18
 A 6 1 P 25/20
 A 6 1 P 25/22
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 27/06
 A 6 1 P 27/12
 A 6 1 P 27/16
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 31/04

4 B 0 6 5
 4 C 0 8 4
 4 C 0 8 5
 4 H 0 4 5

A 6 1 P	31/12	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 P	31/18	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/22	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	33/00	A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	33/02	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	33/04	A 6 1 P	33/02	
A 6 1 P	33/10	A 6 1 P	33/04	
A 6 1 P	33/12	A 6 1 P	33/10	
A 6 1 P	35/00	A 6 1 P	33/12	
A 6 1 P	35/02	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/04	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/06	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	37/08	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	1/22	A 6 1 P	37/08	
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	16/18	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	16/46	C 0 7 K	16/18	
C 1 2 M	1/00	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 M	1/34	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	1/15	C 1 2 M	1/34	Z
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/02	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 P	21/08	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	37/00	G 0 1 N	37/00	1 0 2
		C 1 2 N	15/00	C
		C 1 2 N	15/00	F
		C 1 2 N	5/00	A
		A 6 1 K	37/02	

(31)優先権主張番号 60/293,564

(32)優先日 平成13年5月25日(2001.5.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ディング、リー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 ・ パロアルト ・ # 1 4 6 ・ アルマストリート 3 3 5

- (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 ラル、ブリーティ・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 6 ・ サンタクララ・ピーオーボックス 5 1 4 2
- (72)発明者 ユエ、ヒュイピン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 1 4 ・ クーペルティーノ・サウスステリングロード 1 1 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・コーレデブリマベータ 2 2 2 7
- (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 ・ カストロパレー・クロウクリークロード 2 0 5 2 3
- (72)発明者 アイソン、クレイグ・エイチ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ・ウェザーズフィールドウェイ 1 2 4 2
- (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 ・ カストロパレー・# 1 1 7 ・ ゲイリードライブ 2 1 0 6 2
- (72)発明者 ガルラジャン、ラジャゴバル
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ・デントアベニュー 5 5 9 1
- (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 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 タング、ワイ・トム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ・ランウィックコート 4 2 3 0
- (72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 3 ・ サンノゼ・コイドライブ 2 3 3
- (72)発明者 ヤオ、モニーク・ジー
アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 0 3 3 ・ カーメル・ウッドゲートドライブ 1 1 8 9
- (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 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 ガンディー、アミーナ・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 8 ・ サンフランシスコ・フィフスアベニュー 7 0 5
- (72)発明者 リー、ソー・ユーン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 1 5 ・ デイリーシティ・ウエストデールアベニュー 4 0
- (72)発明者 リチャードソン、トマス・ダブリュ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 2 ・ レッドウッドシティ・# 1 0 7 ・ キャニオンロード 6 1 6
- (72)発明者 ヤング、ジュンミン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 9 ・ サンノゼ・パークレーン 7 1 2 5
- (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 リュ、ヤン
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・コリーナウェイ 3 8 8 5
- (72)発明者 サンガベル、カピサ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 ・ マウンテンビュー・# 2 3 ・ モンテシトアベニュー

1 9 5 0

(72)発明者 ヒー、アン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 9 ・ サンノゼ ・ カタリナドライブ 4 6 0 1

(72)発明者 アジムザイ、ヤルダ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 2 ・ カストロバレー ・ ボールダーキャニオンドライブ
5 5 1 8

(72)発明者 ラーマン、ブリジット・イー

アメリカ合衆国イリノイ州 6 0 6 3 7 ・ シカゴ ・ # 3 ビー ・ サウスドーチェスターアベニュー 5
8 0 1

(72)発明者 スウォーナカール、アニータ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 2 2 ・ サンフランシスコ ・ # 5 ディー ・ ロックスリーアベ
ニュー 8

(72)発明者 バーフォード、ニール

アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 4 2 2 ・ ダラム ・ ワイルドウッドサークル 1 0 5

F ターム(参考) 2G045 AA25 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 DA77

FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 AA19 BA44 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09

CA10 CA11 DA02 EA02 EA04 FA02 FA10 GA05 GA11 GA18

HA03 HA08 HA12 HA14 HA19

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 FA12

4B063 QA01 QA18 QA20 QQ20 QQ48 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62

QR66 QR82 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QS39 QX02

4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 MA13

MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA012 ZA022

ZA052 ZA062 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA222 ZA332 ZA342 ZA362

ZA392 ZA452 ZA512 ZA522 ZA532 ZA542 ZA552 ZA592 ZA662 ZA682

ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972 ZB052 ZB082 ZB092 ZB112

ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZB372 ZB382 ZB392 ZC032

ZC042 ZC062 ZC082 ZC212 ZC312 ZC352 ZC552

4C085 AA13 AA14 AA19 BB11 BB41 BB43 CC22 CC23 EE01 GG01

GG08 GG10

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 AA40 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86

EA20 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	核酸结合蛋白		
公开(公告)号	JP2005512531A	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2003552915	申请日	2002-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ユエヘンリー デイングリー ボーグンマライアアール ラルプリーティジー ユエヒュイビン ハファリアエープリルジェイエイ リーアーンステイーンエイ アイソクレイグエイチ ベチャシャニアディー ガルラジャンラジャゴバル エマーリングブルックエム グリフィンジェニファーエイ タングワイトム リュデュングアイナエム ヤオモニークジー チョーラナリンダーケイ ランクマールジャヤラクシミ ガンディーアミーナアール リーソーユーン リチャードソントマスダブリュ ヤングジュンミング エリオットビッキーエス リュヤン サンガベルカピサ ヒーアン アジムザイヤルダ ラーマンブリジットイー スウォーナカールアニータ バーフォードニール		
发明人	ユエ、ヘンリー デイング、リー ボーグン、マライア・アール ラル、プリーティ・ジー ユエ、ヒュイビン ハファリア、エープリル・ジェイ・エイ リー、アーンステイーン・エイ アイソン、クレイグ・エイチ ベチャ、シャニア・ディー ガルラジャン、ラジャゴバル エマーリング、ブルック・エム グリフィン、ジェニファー・エイ タング、ワイトム リュ、デュング・アイナ・エム ヤオ、モニーク・ジー		

チョーラ、ナリンダー・ケイ
ランクマール、ジャヤラクシミ
ガンディー、アミーナ・アール
リー、ソー・ユーン
リチャードソン、トマス・ダブリュ
ヤング、ジュンミング
エリオット、ビッキー・エス
リュ、ヤン
サンガベル、カピサ
ヒー、アン
アジムザイ、ヤルダ
ラーマン、ブリジット・イー
スウォーナカール、アニータ
バーフォード、ニール

IPC分類号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P3/12 A61P5/00 A61P5/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P5/40 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/04 A61P33/10 A61P33/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12M1/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/02 C12N5/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00
CPC分類号	A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/04 A61P33/10 A61P33/12 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47
FI分類号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P3/12 A61P5/00 A61P5/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P5/40 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/04 A61P33/10 A61P33/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12M1/00.A C12M1/34.Z 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 C12N15/00.C C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02
F-TERM分類号	2G045/AA25 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ20 4B063/QQ48 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/MA13 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084

/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA222 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA522 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZB382 4C084/ZB392 4C084/ZC032 4C084/ZC042 4C084/ZC062 4C084/ZC082 4C084/ZC212 4C084/ZC312 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26

優先権
60/288598 2001-05-04 US
60/291776 2001-05-17 US
60/292172 2001-05-18 US
60/293564 2001-05-25 US

外部リンク [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码NAAP的人核酸相关蛋白（NAAP）和多核苷酸。本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。本发明还提供了用于诊断，治疗或预防与NAAP异常表达有关的疾病的方法。

Inoyte プロジェクト ID	ポバグチド SEQ ID NO:	Inoyte ポバ チド ID	ポバグチド SEQ ID NO:	Inoyte ポリ ヌクレオチド ID
4936875	1	4936875CD1	24	4936875CB1
264408	2	264408CD1	25	264408CB1
2181434	3	2181434CD1	26	2181434CB1
1367252	4	1367252CD1	27	1367252CB1
5633694	5	5633694CD1	28	5633694CB1
7985981	6	7985981CD1	29	7985981CB1
4706628	7	4706628CD1	30	4706628CB1
5790110	8	5790110CD1	31	5790110CB1
2948827	9	2948827CD1	32	2948827CB1
1398040	10	1398040CD1	33	1398040CB1
7716061	11	7716061CD1	34	7716061CB1
6113748	12	6113748CD1	35	6113748CB1
7474037	13	7474037CD1	36	7474037CB1
2955646	14	2955646CD1	37	2955646CB1
1573006	15	1573006CD1	38	1573006CB1
1336756	16	1336756CD1	39	1336756CB1
71259816	17	71259816CD1	40	71259816CB1
3354130	18	3354130CD1	41	3354130CB1
1797985	19	1797985CD1	42	1797985CB1
2870383	20	2870383CD1	43	2870383CB1
1285088	21	1285088CD1	44	1285088CB1
1532441	22	1532441CD1	45	1532441CB1
3056408	23	3056408CD1	46	3056408CB1