

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 541802

(P2002 - 541802A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 1/04	4 B 0 2 4
A 6 1 P 1/04		9/10	4 B 0 6 3
9/10		11/02	4 B 0 6 4
11/02		11/06	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全145数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 611673(P2000 - 611673)

(86)(22)出願日 平成12年4月6日(2000.4.6)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月9日(2001.10.9)

(86)国際出願番号 PCT/US00/09277

(87)国際公開番号 W000/61750

(87)国際公開日 平成12年10月19日(2000.10.19)

(31)優先権主張番号 60/128,492

(32)優先日 平成11年4月9日(1999.4.9)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 スージェン・インコーポレーテッド
SUGEN, INC.

アメリカ合衆国カリフォルニア州94080,サ
ウス・サンフランシスコ,イースト・グラン
ド・アベニュー230

(72)発明者 ファン, ファン

アメリカ合衆国 94002 カリフォルニア州
ベルモント, チュラ ビスタ ドライブ
1512

(74)代理人 弁理士 田中 玲子 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 チロシンキナーゼ基質 (T k s) 蛋白質

(57)【要約】

本発明は、新規な T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 ポリペプチド、新規ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ならびに種々の関連疾病および状態の診断および治療に有用な種々の産物および方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択されるポリペプチドをコードする, 単離され, 濃縮され, または精製された核酸分子。

【請求項2】 前記核酸分子が,

(a) 配列番号 5 , 配列番号 6 , 配列番号 7 または配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする ;

(b) (a) のヌクレオチド配列の相補体である ;

(c) 高いストリンジェント条件下で (a) または (b) のヌクレオチド分子にハイブリダイズし, かつ天然に生ずるポリペプチドをコードする ;

(d) アミノ酸残基の以下のセグメントの全部ではないが 1 またはそれ以上を欠失している点において, 配列番号 5 , 配列番号 6 , 配列番号 7 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと異なる : 配列番号 5 の 1 - 1 0 8 2 , 1 0 8 3 - 1 2 5 7 , 1 2 5 8 - 1 2 6 4 , 1 2 6 5 - 1 3 7 2 または 1 3 7 3 - 1 5 1 9 ; 配列番号 6 の 1 - 3 8 3 または 3 8 4 - 4 7 6 ; 配列番号 7 の 1 - 2 2 7 , 2 2 8 - 3 7 1 または 3 7 2 - 4 3 1 ; または配列番号 8 の 1 - 6 2 9 または 6 3 0 - 8 3 2 ;

(e) (d) のヌクレオチド配列の相補体である ;

(f) 以下のアミノ酸残基の少なくとも 1 つに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする : 配列番号 5 の 1 - 1 0 8 2 , 1 0 8 3 - 1 2 5 7 , 1 2 5 8 - 1 2 6 4 , 1 2 6 5 - 1 3 7 2 または 1 3 7 3 - 1 5 1 9 ; 配列番号 6 の 1 - 3 8 3 または 3 8 4 - 4 7 6 ; 配列番号 7 の 1 - 2 2 7 , 2 2 8 - 3 7 1 または 3 7 2 - 4 3 1 または配列番号 8 の 1 - 6 2 9 または 6 3 0 - 8 3 2 ;

(g) (f) のヌクレオチド配列の相補体である ;

(h) C 末端ドメイン , N 末端ドメイン , スペーサー領域 , プロリンリッチ領域 , DH ドメイン , PH ドメイン , SH3 ドメインおよび G T P a s e ドメインからなる群より選択されるドメインの全部ではないが 1 またはそれ以上を欠失している点において, 配列番号 5 , 配列番号 6 , 配列番号 7 または配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと異なる ; または

(i)(h)のヌクレオチド配列の相補体である，
ヌクレオチド配列を含む，請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】 宿主細胞において転写を開始するのに有効なベクターまたはプロモーターをさらに含む，請求項1記載の核酸分子。

【請求項4】 前記核酸分子が，哺乳動物から単離され，濃縮され，または精製されたものである，請求項1記載の核酸分子。

【請求項5】 前記哺乳動物がヒトである，請求項4記載の核酸分子。

【請求項6】 試料中においてポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を検出する核酸配列を含む核酸プローブであって，前記ポリペプチドが，Tks107，Tks113，Tks118およびTks202からなる群より選択されることを特徴とする核酸プローブ。

【請求項7】 前記ポリペプチドが，配列番号5，配列番号6，配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである，請求項6記載のプローブ。

【請求項8】 Tks107，Tks113，Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドをコードする核酸分子を含む組換え細胞。

【請求項9】 前記ポリペプチドが，配列番号5，配列番号6，配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである，請求項8記載の細胞。

【請求項10】 全長または部分長Tks107，Tks113，Tks118およびTks202からなる群より選択される，単離され，濃縮され，または精製されたポリペプチド。

【請求項11】 前記ポリペプチドが，配列番号5，配列番号6，配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである，請求項10記載のポリペプチド。

【請求項12】 前記ポリペプチドが，
(a)配列番号5，配列番号6，配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号5, 配列番号6, 配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列, ただし, 以下のアミノ酸残基のセグメントの全部ではないが1またはそれ以上を欠失する点において異なる: 配列番号5の1-1082, 1083-1257, 1258-1264, 1265-1372または1373-1519; 配列番号6の1-383または384-476; 配列番号7の1-227, 228-371または372-431または配列番号8の1-629または630-832;

(c) 配列番号5, 配列番号6, 配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列の, 以下のアミノ酸残基の少なくとも1つを含むアミノ酸配列: 配列番号5の1-1082, 1083-1257, 1258-1264, 1265-1372または1373-1519; 配列番号6の1-383または384-476; 配列番号7の1-227, 228-371または372-431; または配列番号8の1-629または630-832; または

(d) 配列番号5, 配列番号6, 配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列であって, ただし, C末端ドメイン, N-末端ドメイン, スペーサー領域, プロリンリッチ領域, DHドメイン, PHドメイン, SH3ドメインおよびGTPaseドメインからなる群より選択されるドメインの, 全部ではないが1またはそれ以上を欠失する点において異なるアミノ酸配列, を含む, 請求項10記載のポリペプチド。

【請求項13】 前記ポリペプチドが, 哺乳動物から単離され, 精製され, または濃縮されたものである, 請求項10記載のポリペプチド。

【請求項14】 前記哺乳動物がヒトである, 請求項13記載のポリペプチド。

【請求項15】 前記ポリペプチドが, Tks107, Tks113, Tks118またはTks202ポリペプチドである, 請求項10記載のポリペプチド。

【請求項16】 Tks107, Tks113, Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメント。

【請求項17】 T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択されるポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項18】 ポリペプチド活性を調節する物質を同定する方法であって、

(a) T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択されるポリペプチドを試験物質と接触させ；

(b) ポリペプチドの活性を測定し；および

(c) 物質が前記ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する、
の各工程を含む方法。

【請求項19】 ポリペプチドの活性がポリペプチドと S r c との間の相互作用を含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】 細胞において活性を調節する物質を同定する方法であって、

(a) ポリペプチドまたはポリペプチドドメインを細胞中で発現させ、ここで、前記ポリペプチドまたはポリペプチドドメインは、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択され；

(b) 試験物質を前記細胞に加え；そして

(c) 細胞表現型または前記ポリペプチドまたはポリペプチドドメインと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化をモニターする、
の各工程を含む方法。

【請求項21】 天然の結合パートナーが S r c である、請求項20記載の方法。

【請求項22】 治療を必要とする患者に、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択されるポリペプチドの活性を調節する物質を投与することにより、疾病または疾患を治療する方法。

【請求項23】 前記疾病または疾患が、慢性関節リウマチ、動脈硬化、自己免疫疾患、臓器移植、心筋梗塞、心筋症、発作、腎不全、酸化ストレス関連神経変性性疾患、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病および癌からな

る群より選択される，請求項22記載の方法。

【請求項24】 前記免疫関連疾病および疾患が，慢性関節リウマチ，慢性炎症性大腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，喘息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫および臓器移植からなる群より選択される，請求項23記載の方法。

【請求項25】 疾病または疾患の診断道具として試料中においてポリペプチドを検出する方法であって，

(a) 試料を，Tks107，Tks113，Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドの核酸標的領域にハイブリダイゼーションアッセイ条件下でハイブリダイズする核酸プローブと接触させ，前記プローブは，前記ポリペプチド，そのフラグメント，および前記配列およびフラグメントの相補体をコードする核酸配列を含み；そして

(b) プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を前記疾病の指標として検出する

の各工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、新規なポリペプチド、新規ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ならびに種々の疾病および状態の診断および治療に有用な種々の産物および方法に関する。

【0002】**発明の背景**

本発明の背景の以下の記載は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明に対する先行技術であるかまたはそれを記載すると認めるものではない。

【0003】

細胞シグナル伝達は、各種の細胞プロセスを制御する外部刺激を細胞内部にリレーするための基本的メカニズムである。シグナル伝達の重要な生物化学機序の一つに、その構造と機能を変化させることで成熟蛋白質の活性を制御できる蛋白質の可逆的リン酸化がある。

【0004】

真核生物で最も良く特性決定されている蛋白質キナーゼはセリン、スレオニンおよびチロシン残基のヒドロキシ置換基で蛋白質をリン酸化する。これらのキナーゼは、セリンおよびトレオニンのリン酸化に特異的なものと、チロシンのリン酸化に特異的なものの2グループに大別される。“二重特異性”キナーゼと称されるキナーゼはチロシンおよびセリン/トレオニン残基をリン酸化することができる。

【0005】

多くのキナーゼは、その基質がリン酸化状態により活性が制御される他のキナーゼを含む制御カスケードに関与する。最終的に、そのような経路の活性化により生ずるリン酸化によって、下流のエフェクターの活性が調節される。

【0006】

非レセプターチロシンキナーゼは、原形質膜にリクルートされ、ここで固有の蛋白質チロシンキナーゼ活性を有しない細胞表面レセプターによる細胞シグナリ

ングを媒介する。例えば，蛋白質チロシンキナーゼのSrcファミリーのメンバーは，成長因子レセプターおよびG-蛋白質共役レセプターの刺激，ならびに多くの他の細胞外刺激に应答して活性化される(Thomas, et al., 1997. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 13:513-609)。

【0007】

Srcファミリーのキナーゼは，血小板の被覆膜領域と会合していることが見いだされている(Stenberg, et al., 1997. Blood 89:2384-93)。PC12細胞においてSrcはシナプス小胞とともに精製される(Linstedt, et al., 1992. J. Cell Biol. 117:1077-84)。Srcは膜輸送に関与するいくつかの蛋白質，例えばニューロンシナプス小胞付随蛋白質であるシナプシンI，シナプトフィシンおよびシナプトグリンと会合しこれをリン酸化する(Barnekow, et al., 1990. Oncogene 5:1019-24; Poster-Barber, et al., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4673-7; Janz, et al., 1998. J. Biol. Chem. 273:2851-7)。

【0008】

小GTPaseは，細胞増殖および分化，細胞骨格編成，蛋白質輸送，細胞サイクルおよびフリーラジカル生成等の多様な生物学的機能を制御する分子スイッチとして作用する蛋白質の大きなファミリーである(Bourne, H. R. et al., Nature, 348(6297):125-32, 1990. Bourne, H. R. et al., Nature, 349(6305):117-27, 1991)。このGTPaseは，これらの中心的細胞経路を調節し，GTPaseおよびそのレギュレーターの両方が非常に重要であることを示唆する。

【0009】

dblホモロジー領域(DHドメイン)は，約250アミノ酸の領域であり，DblおよびCdc24蛋白質において最初に見いだされた。多くの蛋白質がD

Hドメインを含むことが見いだされている。多くのDH含有蛋白質は、N末端の切断により細胞トランスフォーメーション活性を示す(Quilliam, L A . , et . al . BioEssays , 17 : 395 - 404 , 1995 . Whitehead , I . P . , et . al . , Biochimica et Biophysica Acta , 1332 : F1 - F23 , 1997 . Cerione , R . A . and Zheng , Y . Curr . Opin . Cell Biol . 8 : 216 - 222 , 1996に概説されている)。

【0010】

多くのDblファミリー蛋白質のDH/PHモジュールは、グアニン交換因子(GEP)として作用することにより、種々のRhoサブファミリー小GTPaseの活性を制御することが示されている(Whitehead, I. P., et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1332 : F1 - F23, 1997. Cerione, R. A. and Zheng, Y. Curr. Opin. Cell Biol. 8 : 216 - 222, 1996)。多くのRhoファミリーGTPaseは、アクチン構造の組立を制御することが示されており、種々のキナーゼ経路を介して遺伝子転写を制御することができる(Hall, A. Science, 279 : 509 - 514, 1998)。

【0011】

発明の概要

本発明は、細胞質チロシンキナーゼSrcの新規な基質である、Tks107, Tks113, Tks118およびTks202に関する。

【0012】

本発明の第1の観点は、Tks107, Tks113, Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドをコードする、単離され、濃縮され、または精製された核酸分子を特徴とする。

【0013】

核酸に関連して"単離された"とは、天然の起源から単離されたかまたは合成された、互いに結合したヌクレオチドのポリマーを意味し、DNAおよびRNAを含む。本発明の単離された核酸は、これが自然には純粋なまたは分離された状態

で見いだされないという点において独特である。"単離された"との用語の使用は、天然に生ずる配列がその通常の細胞環境(すなわち染色体)から除かれていることを表す。すなわち、配列は、無細胞溶液中にあってもよく、または異なる細胞環境に置かれていてもよい。この用語は、この配列が存在する唯一のヌクレオチド鎖であることを意味するものではなく、天然にこれに付随する非ヌクレオチド物質を本質的に含まず(少なくとも約90-95%純粋)、したがって、単離された染色体とは区別されることを意味する。

【0014】

核酸に関連して、"濃縮された"との用語の使用は、特定のDNAまたはRNA配列が、目的とする細胞または溶液中に存在する総DNAまたはRNA中で、正常または疾病細胞、またはこの配列が由来する細胞におけるより有意に高い割合(2-5倍)を占めることを意味する。これは、存在する他のDNAまたはRNAの量の優先的減少、または特定のDNAまたはRNA配列の量の優先的増加、またはこれらの2つの組み合わせにより、人が生じさせることができる。しかし、濃縮されたとは、他のDNAまたはRNA配列が存在しないことを意味するものではなく、単に、目的とする配列の相対的な量が有意に増加されていることを意味することに注意すべきである。"有意に"との用語は、増加のレベルがそのような増加を作成した人にとって有用であることを示すために用いられ、一般に、他の核酸に比べて少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも5-10倍、またはそれ以上増加していることを意味する。またこの用語は、他の起源からのDNAまたはRNAが存在しないことを意味するものではない。他の起源のDNAは、例えば、酵母または細菌ゲノム、またはクローニングベクター、例えばpUC19からのDNAでありうる。この用語は、1つのmRNAのレベルが他の種のmRNAと比較して自然に増加している天然に生ずる事象、例えばウイルス感染または腫瘍タイプの成長から区別される。すなわち、この用語は、人が所望の核酸の比率を上昇させることを意図する状況のみをカバーする。

【0015】

ある目的のためには、ヌクレオチド配列が精製された形であることも有利である。核酸に関して、"精製された"との用語は、絶対的純度(例えば均一な調製物

)を要求するものではない。むしろ、これは配列が天然の環境におけるより比較的純粋であることを示す(天然のレベルと比較して、このレベルは、例えばmg/mLで少なくとも2-5倍高い)。cDNAライブラリから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一にまで精製することができる。これらのクローンから得られた本発明のDNA分子は、総DNAからまたは総RNAから直接得ることができる。cDNAクローンは天然に生じず、好ましくは部分的に精製した天然に生ずる物質(メッセンジャーRNA)の操作により得る。mRNAからのcDNAライブラリの構築は、合成物質(cDNA)の作成を含み、純粋な個々のcDNAクローンは、cDNAライブラリを有する細胞のクローン選択により合成ライブラリから単離することができる。すなわち、mRNAからcDNAライブラリを構築し、個々のcDNAクローンを単離することを含む工程により、天然のメッセンジャーのおよそ 10^6 倍の精製が得られる。すなわち、少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁の精製が明示的に企図される。

【0016】

ポリペプチドとは、それぞれ配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列、または対応する全長アミノ酸配列の少なくとも108、93、60または203個またはそれ以上の連続するアミノ酸、または本明細書に記載されるその機能的誘導体を意味する。全長配列が与えられていない配列については、残りの配列は当業者によく知られる方法を用いて決定することができる。これらも本発明に含まれる。ポリペプチドは、全長核酸配列、またはポリペプチドの機能的活性が保持される限り全長核酸配列の任意の部分によりコードされることができる。

【0017】

アミノ酸配列は、配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に示される配列、または対応する全長アミノ酸配列、またはそのフラグメントと実質的に類似するであろう。配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8の配列と実質的に類似する配列は、好ましくはそれぞれの配列と、少なくとも90%(より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは99-100%)の同

一性を有するであろう。

【0018】

"同一性"とは、その類似性または関係の尺度である配列の性質を意味する。一般に、同一性は、同一の残基の数を残基とギャップの合計数で割り、100を乗ずることにより測定する。"ギャップ"とは、アミノ酸の付加または欠失により生ずる、アラインメント中の空間である。すなわち、完全に同一の配列の2つのコピーは100%の同一性を有するが、より低い程度に保存され、欠失、付加または置換を含む配列はより低い程度の同一性を有するであろう。当業者は、標準的なパラメータをデフォルト設定として用いる、配列の同一性を決定するためのいくつかのコンピュータプログラムが利用可能であることを認識するであろう。そのようなプログラムの例は、Gapped BLASTまたはPSI-BLAST (Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402), BLAST (Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410), およびSmith-Waterman (Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147:195-197) である。好ましくは、これらのプログラムのデフォルト設定を用いるが、当業者はこれらの設定を変更する必要があるか否かを認識し、どのようにして変更するかを理解している。

【0019】

好ましい態様においては、本発明は、(a) 配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；(b) (a)のヌクレオチド配列の相補体である；(c)より高いストリンジェント条件下で(a)または(b)のヌクレオチド分子にハイブリダイズし、かつ天然に生ずるポリペプチドをコードする；(d)以下のアミノ酸残基のセグメントの全部ではないが1またはそれ以上を欠失することにより、配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8のアミノ酸配列を有するポリペプチドとは異なる：配列番号5の1-1082、1083-1257、1258-1264、1265-1372または1373-1519；配列番号6の1-383または384-476；配列番号7の1-227、228-371または37

2 - 4 3 1 ; または配列番号 8 の 1 - 6 2 9 または 6 3 0 - 8 3 2 ; (e) (d) のヌクレオチド配列の相補体である ; (f) 以下のアミノ酸残基に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする : 配列番号 5 の 1 - 1 0 8 2 , 1 0 8 3 - 1 2 5 7 , 1 2 5 8 - 1 2 6 4 , 1 2 6 5 - 1 3 7 2 または 1 3 7 3 - 1 5 1 9 ; 配列番号 6 の 1 - 3 8 3 または 3 8 4 - 4 7 6 ; 配列番号 7 の 1 - 2 2 7 , 2 2 8 - 3 7 1 または 3 7 2 - 4 3 1 ; または配列番号 8 の 1 - 6 2 9 または 6 3 0 - 8 3 2 ; (g) (f) のヌクレオチド配列の相補体である ; (h) N末端ドメイン , DHドメイン , C末端ドメイン , PHドメイン , スペーサー領域 , SH3ドメイン , GTPaseドメインおよびプロリンリッチ領域からなる群より選択される 1 またはそれ以上のドメインを欠失することにより , 配列番号 5 , 配列番号 6 , 配列番号 7 または配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドとは異なる ; または (i) (h) のヌクレオチド配列の相補体である , ヌクレオチド配列を含むポリペプチドをコードする , 単離され , 濃縮され , または精製された核酸分子を特徴とする。

【0020】

"相補体"との用語は、互いに多くの望ましい相互作用を形成しうる2つのヌクレオチドを表す。例えば、アデニンはチミンと2つの水素結合を形成することができるため、チミンに相補的である。同様に、グアニンとシトシンは3つの水素結合を形成することができるため、相補的である。あるヌクレオチド配列は、第1の配列のすべてのヌクレオチドが第2の配列のすべてのヌクレオチドと相補的である場合、他のヌクレオチド配列の相補体である。

【0021】

"ドメイン"との用語は、特定の機能を含むポリペプチドの領域を表す。例えば、シグナル伝達蛋白質のN末端またはC末端ドメインは、例えば、限定されないが、シグナル伝達分子を細胞の異なる領域に局在させる分子に結合し、特定の細胞シグナルを伝播するのに直接関与する他のシグナリング分子に結合する、等の機能を提供することができる。あるドメインは蛋白質の残りとは別々に発現させてそれ自身で機能することができるが、他のドメインはその機能を保持するためには無傷の蛋白質の一部のままでなければならない。後者は蛋白質の機能的領域と

も称され、これもまたドメインと関連する。

【0022】

"N末端ドメイン"との用語は、蛋白質キナーゼの開始メチオニンと触媒的ドメインとの間に位置する触媒外領域を表す。N末端ドメインは、蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してスミス・ウォーターマンアラインメントを行い、触媒的ドメインのN末端境界を規定することにより同定することができる。N末端ドメインは、その長さに応じて、キナーゼ機能において制御的役割を果たすかまたは果たさない。N末端ドメインが制御的役割を果たすことが知られている蛋白質キナーゼの例はPAK65であり、これはCdc42およびrac結合に用いられるCRIBモチーフを含む(Burbelo, P.D. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 29071-29074)。

【0023】

N末端ドメインは、配列番号5のアミノ酸残基1-2082、配列番号6の1-383、配列番号7の1-227および配列番号81-629にわたる。

【0024】

本明細書において用いる場合、"基質"との用語は、本発明の蛋白質によりリン酸化される分子を表す。

【0025】

"C末端ドメイン"との用語は、一般に、最後の(C末端に最も近い位置にある)機能ドメインと前のドメインのカルボキシ末端アミノ酸残基との間に位置する領域を表す。"機能"ドメインとは、他の蛋白質とのアミノ酸配列ホモロジーから推定して、または特定の構造的コンフォメーションを生じさせることができるアミノ酸配列が存在することにより、制御的または触媒的役割を果たしうるポリペプチドの任意の領域を意味する。C末端ドメインは、非重複蛋白質データベースに対して蛋白質配列のスミス・ウォーターマンアラインメントを用いて、触媒ドメインまたは任意の機能的末端触媒ドメインのC末端境界を規定することにより同定することができる。

【0026】

C末端ドメインは、配列番号5のアミノ酸残基1373-1519にわたる。

【0027】

"dblホモロジードメイン(DHドメイン)"との用語は、本質的に -らせんからなるドメインを表し、このいくつかは、隠れマルコフモデルにより同定して、先に定義されている保存領域(Soission, S.M., et al, Cell, 95:259-268)に対応する(<http://hmmer.wustl.edu>)。

【0028】

DHドメインは、配列番号5のアミノ酸残基1083-1257にわたる。

【0029】

"PHドメイン"とは、プレクストリンの約100アミノ酸の領域に対してホモロジーを有するポリペプチドを意味する。現在提唱されているPHドメインの総数は70を超える。最近の構造的研究は、PHドメインが独特の構造的モジュールであることを示した。折り畳みは、C-末端らせんにより1つの角で閉じている2つの垂直なシートの7連鎖サンドイッチとして最もよく記述される。ドメインの分極は明白であり、サンドイッチのらせんにより閉じた角と反対側の角で3つの最も可変のループが正に荷電した表面を構成している(Ferguson, K.M. et al.. Cell. 79, 199-209, 1994 (図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。種々のPHドメインの例は、Musacchio, A., et al., TIBS, 18:343-348, 1993およびGibson, T.J., et al, TIBS, 19:349-353, 1994, (図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。他のPHドメインは、これらの刊行物に記載される配列アラインメント手法および三次元構造比較を用いて同定することができる。PHドメインには、セリン/トレオニンキナーゼならびにチロシンキナーゼ;小GTP-結合蛋白質のレギュレータ;細胞骨格蛋白質;および推定シグナリングアダプター分子中のものが含まれる。PHドメインはまたダイナミン(細胞膜輸送に関与する蛋白質)およびホスホリパーゼCアイソフォームからも得られる。多くの形態のホスホリパーゼCのクローニングおよび配列は、Suh, et al.. Cell, 54:161-169, 1988 (図面を含めその全体を

本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

【0030】

PHドメインは、配列番号5のアミノ酸1265 - 1372にわたる。

【0031】

"SH3"ドメイン"およびGTPaseドメインとの用語は、よく知られる用語であり、その意味は当業者に知られているように定義される。

【0032】

SH3ドメインは配列番号9のアミノ酸372 - 431にわたる。GTPaseドメインは、配列番号8のアミノ酸630 - 832にわたる。

【0033】

"シグナル伝達経路"との用語は、細胞外シグナルを細胞膜を通して伝播し、細胞内シグナルとなる分子を表す。このシグナルは、次に細胞性応答を刺激することができる。シグナル伝達プロセスに関与するポリペプチド分子は、典型的にはレセプターおよび非レセプター蛋白質チロシンキナーゼ、レセプターおよび非レセプター蛋白質ホスファターゼ、SRCホモロジー2および3ドメイン、ホスホチロシン結合蛋白質(SRCホモロジー2(SH2)およびホスホチロシン結合(PTBおよびPH)ドメイン含有蛋白質)、プロリンリッチ結合蛋白質(SH3ドメイン含有蛋白質)、ヌクレオチド交換因子および転写因子である。

【0034】

本明細書において用いる場合、"プロリンリッチ領域"との用語は、蛋白質キナーゼの、所定のアミノ酸長さにわたるプロリン含量が蛋白質において見いだされるこのアミノ酸の平均含量より高い(すなわち、>10%)領域を表す。プロリンリッチ領域は、アミノ酸配列を目で調べることにより容易に識別され、標準的なコンピュータ配列分析プログラム、例えばDNASTARプログラムEditSeqにより定量することができる。プロリンリッチ領域は、制御蛋白質と蛋白質との相互作用に関与することが示されている(例えば、Galisteo, M. L. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:20997 - 21000, およびSudol, M. (1996) Prog. Biochys. Mol. Bio. 65:113 - 132を参照)。

【0035】

プロリンリッチ領域は配列番号5のアミノ酸残基384 - 476にわたる。

【0036】

本明細書において用いる場合，"スペーサー領域"との用語は，予測される機能的ドメインの間に位置する蛋白質の領域を表す。

【0037】

スペーサー領域は，データベース中の任意のアミノ酸配列に対する検出可能なホモロジーを有しない。これは，非重複蛋白質データベースに対して蛋白質配列のスミスウォーターマンアラインメントを用いてフランキングしている機能的ドメインのCおよびN末端境界を規定することにより同定することができる。スペーサー領域は，蛋白質キナーゼ機能において基本的な機能を果たすかもしれず果たさないかもしれない。スペーサー領域のキナーゼ機能における制御的役割の先例は，srcキナーゼスペーサーのドメイン間相互作用における役割により提供される(Xu, W. et al (1997) Nature 385:595-602)。

【0038】

スペーサー領域は，配列番号5のアミノ酸残基1258 - 1264にわたる。

【0039】

所望の特異性および選択性に応じて，種々の低いまたは高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を用いることができる。これらの条件は，当業者にはよく知られている。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では，高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは，そのような条件は，20個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止し，より好ましくは，そのような条件は，50個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止し，最も好ましくは，そのような条件は，100個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。場合によっては，この条件は，全長配列中に5個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。

【0040】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件とは、少なくとも以下の程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件を意味する：50%ホルムアミド，5XSSC，50mM NaH_2PO_4 ，pH6.8，0.5%SDS，0.1mg/mL超音波処理サケ精子DNA，および5Xデンハルト溶液中で42℃で一夜のハイブリダイゼーション；2XSSC，0.1%SDSで45℃での洗浄；および0.2XSSC，0.1%SDSで45℃での洗浄。よりストリンジェントな条件は，2回目の洗浄について，0.1XSSC，0.05%SDSおよび55℃を含む。いくつかの最もストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件においては，2回目の洗浄は，0.1XSSCで70℃までの温度で行うことができる（Berger et al (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques pg 421，（図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する）。しかし，他の用途は，これらの条件の組の間に入る条件の使用を必要とするかもしれない。所望のハイブリダイゼーションを達成するのに必要な条件を決定する方法は当業者にはよく知られており，いくつかの因子，例えば，限定されないが，ハイブリダイズすべき配列および試験すべき試料に基づく。より低いストリンジェンシーの洗浄条件は，洗浄工程においてより低い温度，例えば65℃，60℃，55℃，50℃または42℃を用いる。

【0041】

別の好ましい態様においては，本発明は，ポリペプチドをコードし，かつ宿主細胞において転写を開始するのに有効なベクターまたはプロモーターをさらに含む，単離された，濃縮された，または精製された核酸分子を特徴とする。本発明はまた，組換え核酸，好ましくは細胞または生物中の組換え核酸を特徴とする。組換え核酸は，配列番号1，配列番号2，配列番号3または配列番号4に記載される配列，配列番号5，配列番号6，配列番号7，または配列番号8に記載されるポリペプチドをコードする核酸，またはそれらの機能的誘導體，および宿主細胞において転写を開始するのに有効なベクターまたはプロモーターを含むことができる。あるいは，組換え核酸は，細胞中で機能的な転写開始領域，ポリペプチ

ドをコードするRNA配列に相補的な配列，および細胞中で機能的な転写終止領域を含むことができる。

【0042】

"ベクター"との用語は，細胞にトランスフェクトすることができ，細胞ゲノム中でまたはそれとは独立に複製しうる一本鎖または二本鎖の環状核酸分子を表す。環状二本鎖核酸分子は，制限酵素で処理することにより切断し，したがって直鎖状にすることができる。核酸ベクターの分類，制限酵素，および制限酵素により切断されるヌクレオチド配列の知識は，当業者には容易に入手可能である。キナーゼをコードする核酸分子は，ベクターを制限酵素で切断し，2つの断片を一緒にライゲーションすることにより，ベクター中に挿入することができる。

【0043】

"トランスフェクトする"との用語は，核酸ベクターまたは他の核酸分子を細胞性生物中に挿入する多数の方法を規定する。これらの方法には，種々の手法が含まれ，例えば，細胞を高濃度の塩，電界，界面活性剤，またはDMSOで処理することにより，細胞の外膜または壁を目的の核酸分子に対して透過性にする，または種々のウイルス伝達戦略を用いることが含まれる。

【0044】

本明細書において用いる場合，"プロモーター"との用語は，遺伝子配列の発現に必要な核酸配列を表す。プロモーター領域は生物によって様々であるが，種々の生物について当業者によく知られている。例えば，原核生物においては，プロモーター領域は，プロモーター（RNA転写の開始を指示する）ならびに，RNAに転写されたときに合成の開始を合図するDNA配列の両方を含む。そのような領域は，通常は転写および翻訳の開始に関与する5'非コーディング配列，例えばTATAボックス，キャッピング配列，CAAT配列等を含む。

【0045】

好ましい態様においては，単離された核酸は，配列番号1，配列番号2，配列番号3または配列番号4に記載される核酸配列，または対応する全長配列を含むか，本質的にそれからなるか，またはそれからなるか，配列番号5，配列番号6，配列番号7または配列番号8のアミノ酸配列，または対応する全長アミノ酸配

列, それらの機能的誘導体, またはそれぞれ配列番号5, 配列番号6, または配列番号7または配列番号8または対応する全長アミノ酸配列の少なくとも108, 93, 60または203個の連続するアミノ酸をコードする。核酸は, cDNAクローニングまたはサブトラクティブハイブリダイゼーションにより天然の起源から単離することができる。天然の起源は哺乳動物であることができ, 好ましくはヒト, 血液, 精液, または組織であり, 核酸はトリエステル法によりまたは自動化DNA合成機を用いて合成してもよい。

【0046】

"哺乳動物"とは, 好ましくはマウス, ラット, ウサギ, モルモット, ヒツジ, およびヤギ等の生物を表し, より好ましくはネコ, イヌ, 有尾サル, および無尾サルを表し, 最も好ましくはヒトを表す。

【0047】

さらに別の好ましい態様においては, 核酸は, 例えば, 追加のポリペプチドの同定およびクローニングを容易にするためのハイブリダイゼーションプローブを設計するのに, 追加のポリペプチドのクローニングを容易にするためのPCRプローブを設計するのに, ポリペプチド領域に対する抗体を得るために, およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するのに有用な, 保存されたまたは独特の領域である。

【0048】

"保存された核酸領域"とは, ポリペプチドをコードする2つまたはそれ以上の核酸上に存在する領域を意味し, 特定の核酸配列がこの領域に低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができる。キナーゼポリペプチドをコードする核酸のスクリーニングに適した低ストリンジェンシー条件の例は, Berger et al. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques pg421 (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) に提供される。好ましくは, 保存領域は, 20ヌクレオチド中7個以下で異なる。

【0049】

"独特の核酸領域"とは, ポリペプチドをコードする核酸中に存在し, 天然に生

ずる任意の他のポリペプチドをコードする配列中には存在しない配列を意味する。そのような領域は、好ましくは、それぞれ配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列、または対応する全長アミノ酸配列またはそれらの機能的誘導体の、108、93、60または203個またはそれ以上の連続するアミノ酸をコードする。特に、独特の核酸領域は、好ましくは哺乳動物起源のものである。

【0050】

本発明の別の観点は、試料中でポリペプチドをコードする核酸を検出するための核酸プローブを特徴とする。ここで、前記ポリペプチドは、Tks107、Tks113、Tks118およびTks202からなる群より選択される。核酸プローブは、配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列、または対応する全長アミノ酸配列、またはそれらの相補体によりコードされる蛋白質のフラグメントであるポリペプチドをコードしてもよい。核酸プローブは、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載される配列、または対応する全長配列、またはそれらの機能的誘導体にハイブリダイズするであろうヌクレオチド塩基配列を含む。

【0051】

プローブを使用する方法には、ハイブリダイゼーションが生ずるような条件下で試料を核酸プローブと接触させ、RNAに結合したプローブの存在または量を検出することにより、試料中のRNAの存在または量を検出することが含まれる。プローブとポリペプチドをコードする核酸配列との間に形成される核酸デュプレックスを、検出された核酸の配列の同定において用いることができる(Nelson et al., Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, Kricka, ed., p. 275, 1992 (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。そのような方法を実施するためのキットは、その中に核酸プローブが置かれている容器手段を含むように構築することができる。

【0052】

別の観点においては、本発明は、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 およびT k s 2 0 2 からなる群より選択されるポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む組換えDNA分子、または細胞または組織を記載する。そのような細胞においては、核酸は遺伝的制御要素の制御下にあってもよく、または外来性プロモーターを含む外来性制御要素の制御下にあってもよい。"外来性"とは、通常はポリペプチドのコーディング配列とインビボで転写的にカップリングしていないプロモーターを意味する。

【0053】

ポリペプチドは、好ましくは配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列またはその全長配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである。"フラグメント"とはポリペプチド中に存在するアミノ酸配列を意味する。好ましくは、そのような配列は、それぞれ配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載される配列の少なくとも108、93、60または203個の連続するアミノ酸を含む。

【0054】

別の観点においては、本発明は、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 およびT k s 2 0 2 からなる群より選択される、単離され、濃縮され、または精製されたポリペプチドを特徴とする。

【0055】

ポリペプチドに関して"単離された"とは、互いに結合した2個以上のアミノ酸のポリマーを意味し、天然の起源から単離されたまたは合成されたポリペプチドを含む。本発明の単離されたポリペプチドは、天然には純粋なまたは分離された形で見いだされない点において独特である。"単離された"との用語の使用は、天然に生ずる配列がその正常な細胞性環境から除かれていることを示す。すなわち、配列は、無細胞溶液中にあってもよく、異なる細胞性環境に置かれていてもよい。この用語は、その配列が存在する唯一のアミノ酸鎖であることを意味するものではなく、配列が天然にこれに付随する非アミノ酸物質を本質的に含まない(少なくとも約90-95%純粋)ことを意味する。

【0056】

ポリペプチドに関して使用する場合，“濃縮された”との用語は，特定のアミノ酸配列が，正常または疾病細胞におけるより，または配列が由来する細胞におけるより，目的とする細胞または溶液中に存在する総アミノ酸配列の有意に高い割合（2 - 5倍）を占めることを意味する。これは，存在する他のアミノ酸配列の量の優先的減少により，または目的とする特定のアミノ酸配列の量の優先的増加により，またはこれら2つの組み合わせにより，人が生じさせることができる。しかし，濃縮されたとは，他のアミノ酸配列が存在しないことを意味するものではなく，単に目的とする配列の相対的な量が有意に増加していることを意味することに注意すべきである。本明細書において有意にとの用語は，増加のレベルがそのような増加を作成した人にとって有用であることを示し，一般に，他のアミノ酸配列と比較して少なくとも約2倍，より好ましくは少なくとも5 - 10倍，またはそれより多い増加を意味する。この用語はまた，他の起源からのアミノ酸配列が存在しないことを意味するものではない。アミノ酸配列の他の起源は，例えば，酵母または細菌のゲノム，またはクローニングベクター，例えばpUC19によりコードされるアミノ酸配列を含みうる。この用語は，人が介在して所望のアミノ酸配列の比率を増加させる状況のみをカバーすることを意味する。

【0057】

ある目的のためには，アミノ酸配列が精製された形であることも有利である。ポリペプチドに関して“精製された”との用語は絶対的純度（例えば均一調製物）を要求するものではなく，この用語は配列が天然の環境におけるより比較的純粋であることを示す。天然のレベルと比較して，このレベルは少なくとも2 - 5倍高くあるべきである（例えばmg/mLで）。少なくとも1桁の精製，好ましくは2または3桁，より好ましくは4または5桁の精製が明示的に意図される。物質は，好ましくは機能的に有意なレベルで夾雑物を含まず，例えば，90%，95%，または99%純粋である。

【0058】

好ましい態様においては，ポリペプチドは，配列番号5，配列番号6，配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列，または対応する全長アミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである。好ましくは，ポリペプチ

ドは、それぞれ配列番号5、配列番号6、または配列番号7または配列番号8の、少なくとも108、93、60または203個の連続するアミノ酸を含む。

【0059】

好ましい態様においては、ポリペプチドは、

(a) 配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列と、以下のアミノ酸残基のセグメントの全部ではないが1またはそれ以上を欠失する点において異なるアミノ酸配列：配列番号5の1-1082、1083-1257、1258-1264、1265-1372または配列番号6の1373-1519；1-383または配列番号7の384-476；1-227、228-371または372-431または配列番号8の1-629または630-832；

(c) 配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列の、配列番号5の1-1082、1083-1257、1258-1264、1265-1372または1373-1519；配列番号6の1-383または384-476；配列番号7の1-227、228-371または372-431、または配列番号8の1-629または630-832のアミノ酸残基；または

(d) 配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8に記載されるアミノ酸配列と、C末端ドメイン、PHドメイン、DHドメイン、N末端ドメイン、SH3ドメイン、スペーサー領域、プロリンリッチ領域およびGTPaseドメインからなる群より選択されるドメインの、全部ではないが1またはそれ以上を欠失する点において異なるアミノ酸配列、を有するアミノ酸配列を含む。

【0060】

ポリペプチドは、当該技術分野においてよく知られる方法により、天然の起源から単離することができる。天然の起源は哺乳動物であることができ、好ましくはヒト、血液、精液、または組織であり、またはポリペプチドは自動化ポリペプ

チド合成機を用いて合成してもよい。単離され、濃縮され、または精製されたポリペプチドは、好ましくは、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 または T k s 2 0 2 ポリペプチドである。

【0061】

ある態様においては、本発明は、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択される組換えポリペプチドを含む。"組換えポリペプチド"とは、その存在位置（例えば、天然に見いだされる物とは異なる細胞または組織に存在）、純度または構造において天然に生ずるポリペプチドと区別されるように、組換えDNA技術により製造されるポリペプチドを意味する。一般に、そのような組換えポリペプチドは、天然に通常観察される量とは異なる量で細胞中に存在するであろう。

【0062】

別の観点においては、本発明は、ポリペプチドまたはポリペプチドドメインまたはフラグメントに対して特異的結合親和性を有する抗体（例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体）を特徴とし、ここで、ポリペプチドは、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択される。"特異的結合親和性"とは、抗体が、特定の条件下において、他のポリペプチドに結合するより高い親和性をもって標的ポリペプチドに結合することを意味する。抗体または抗体フラグメントは、他のポリペプチドに結合しうる領域を含むポリペプチドである。"特異的結合親和性"との用語は、特定の条件下で、他のポリペプチドに結合するより高い親和性をもってポリペプチドに結合する抗体を記述する。

【0063】

"ポリクローナル"との用語は、抗原またはその抗原性機能的誘導体で免疫した動物の血清から誘導される抗体分子の異成分集団である抗体を表す。ポリクローナル抗体の製造のためには、種々の宿主動物に抗原を注射することにより免疫することができる。宿主の種により、種々のアジュバントを用いて免疫学的応答を増加させることができる。

【0064】

"モノクローナル抗体"は、特定の抗原に対する抗体の実質的に均一な集団である。モノクローナル抗体は、培養連続細胞株による抗体分子の生成を与える任意の技術により得ることができる。モノクローナル抗体は、当業者に知られる方法により得ることができる(Kohler et al. Nature 256: 495 - 497, 1975, および米国特許4,376,110(これらの両方は、図面または表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。

【0065】

"抗体フラグメント"との用語は、特定の分子に対して特異的結合親和性を表示する抗体の一部、しばしば超可変領域および周囲の重鎖および軽鎖の一部を表す。超可変領域は、抗体のポリペプチド標的に物理的に結合する部分である。

【0066】

本発明のポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントは、試料をポリペプチド-抗体免疫複合体の形成に適した条件下で抗体で探索し、ポリペプチドに結合した抗体の存在および/または量を検出することにより、試料中のポリペプチドの存在および/または量を検出する方法において用いることができる。そのような方法を実施するための診断キットは、ポリペプチドに特異的な抗体または抗体フラグメント、ならびに抗体の結合パートナーまたは抗体それ自体のコンジュゲートを含むように構築することができる。

【0067】

本発明のポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントは、原核生物または真核生物から単離、濃縮、または精製することができる。当業者に知られる日常的な方法により、原核生物および真核生物の両方において、抗体または抗体フラグメントを製造することができる。ポリペプチド分子である抗体の精製、濃縮および単離は、上に記載される。

【0068】

本発明のポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体は、免疫複合体が形成するような条件下で試料を抗体と接触させ、ポリペプチドに結合した抗体の存在および/または量を検出することにより、試料中のポリペプチドの存在および/または量を検出するための方法において用いることができる。そのような

方法を実施するための診断キットは、抗体を含む第1の容器および抗体の結合パートナーおよび標識（例えば放射性同位体）を含む第2の容器を含むように構築することができる。診断キットはまた、FDAに認可された使用の通知およびその指針を含んでいてもよい。

【0069】

本発明のさらに別の観点では、ポリペプチドまたはポリペプチドドメインに対して特異的結合親和性を有する抗体を産生するハイブリドーマを特徴とし、ここで、ポリペプチドは、Tks107、Tks113、Tks118およびTks202からなる群より選択される。"ハイブリドーマ"とは、抗体（例えば本発明のポリペプチドに対する抗体）を分泌しうる不死化細胞株を意味する。好ましい態様においては、ポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドに特異的に結合することができるアミノ酸の配列を含む。

【0070】

別の観点においては、本発明は、Tks107、Tks113、Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドに結合することができるポリペプチド結合剤を特徴とする。結合薬剤は、好ましくは、本発明のポリペプチド上に存在するエピトープを認識する精製された抗体である。他の結合薬剤には、そのようなポリペプチドに結合する分子およびポリペプチドに結合する類似の分子が含まれる。そのような結合薬剤は、キナーゼ結合パートナー活性を測定するアッセイを用いて同定することができる。

【0071】

本発明はまた、本発明のポリペプチドまたは同等の配列を含むヒト細胞をスクリーニングする方法を特徴とする。該方法は、当該技術分野において日常的かつ標準的な技術、例えば本発明のポリペプチドの同定のために本明細書において記載される技術（例えば、クローニング、サザンまたはノザンブロット分析、インシトゥーハイブリダイゼーション、PCR増幅等）を用いて、ヒト細胞において新規ポリペプチドを同定することを含む。

【0072】

さらに別の観点においては、本発明は、ポリペプチド活性を調節する物質を同

定する方法を特徴とする。該方法は、(a) Tks107, Tks113, Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドを試験物質と接触させ；(b)前記ポリペプチドの活性を測定し；そして(c)前記物質が前記ポリペプチドの活性を調節するか否かを決定する，ことを含む。

【0073】

"調節する"との用語は、化合物が本発明のポリペプチドの機能を変化させる能力を表す。調節剤は、好ましくは、ポリペプチドに暴露される化合物の濃度に依存して、本発明のポリペプチドの活性を活性化しまたは阻害する。

【0074】

"活性化する"との用語は、ポリペプチドの細胞活性を増加させることを表す。"阻害する"との用語は、ポリペプチドの細胞活性を減少させることを表す。活性は、好ましくは、天然の結合パートナー、例えばsrcとの相互作用に影響を与える。

【0075】

"調節する"との用語はまた、ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される可能性を増加または減少させることにより、本発明のポリペプチドの機能を変更することを表す。調節剤は、好ましくは、ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間にそのような複合体が形成される可能性を増加させ、より好ましくは、暴露される化合物の濃度に依存して複合体が形成される確率を増加または減少させ、最も好ましくは、ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される可能性を減少させる。

【0076】

"複合体"との用語は、互いに結合した少なくとも2つの分子の集合を表す。シグナル伝達複合体は、しばしば、互いに結合した少なくとも2つの蛋白質分子を含む。

【0077】

"天然の結合パートナー"との用語は、細胞中でポリペプチドに結合するポリペプチド、脂質、小分子、または核酸を表す。ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化は、相互作用が形成される確率の増加または減少、ま

たはポリペプチド/天然の結合パートナー複合体の濃度の増加または減少として現れることができる。

【0078】

本明細書において用いる場合，"接触する"との用語は，試験化合物を含む溶液を，本発明の方法の細胞を浸している液体培地と混合することを表す。化合物を含む溶液はまた，該方法の細胞内への試験化合物の取り込みを容易にする他の成分，例えばジメチルスルホキシド(DMSO)を含んでいてもよい。試験化合物を含む溶液は，輸送装置，例えば，ピペットに基づく装置またはシリンジに基づく装置を用いて，細胞を浸している培地に加えることができる。

【0079】

別の観点においては，本発明は，細胞においてポリペプチド活性を調節する物質を同定する方法を特徴とする。該方法は，(a)細胞中でポリペプチドを発現させ，ここで，前記ポリペプチドは，Tks107，Tks113，Tks118およびTks202からなる群より選択され；(b)前記細胞を試験物質と接触させ；そして(c)細胞表現型または前記ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化をモニターする，ことを含む。

【0080】

本明細書において用いる場合，"発現"との用語は，細胞中で核酸ベクターから本発明のポリペプチドが産生されることを表す。本明細書に記載されるように，核酸ベクターを，当該技術分野においてよく知られる手法を用いて細胞中にトランスフェクトする。

【0081】

別の観点においては，本発明は，治療を必要とする患者に，Tks107，Tks113，Tks118およびTks202からなる群より選択されるポリペプチドの活性を調節する物質を投与することにより，疾病を治療する方法を提供する。好ましくは，疾病は，慢性関節リウマチ，動脈硬化，自己免疫疾患，臓器移植，心筋梗塞，心筋症，発作，腎不全，酸化ストレス関連神経変性性疾患および癌からなる群より選択される。

【0082】

疾患または疾病の治療に有用な物質は、好ましくは、問題とする疾患または疾患の治療に対応する活性についての1またはそれ以上のインビトロアッセイにおいて陽性の結果を示す。ポリペプチドの活性を調節する物質は、好ましくは、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび蛋白質キナーゼの阻害剤を含む。

【0083】

"予防する"との用語は、生物が異常な状態に罹患するかこれを発達させる可能性を減少させることを表す。

【0084】

"治療する"との用語は、生物において治療効果を有し、異常な状態を少なくとも部分的に緩和するかまたは排除することを表す。

【0085】

"治療効果"との用語は、異常な状態を引き起こすかまたはこれに寄与する阻害または活性化率を表す。治療効果は、異常な状態の1またはそれ以上の症状をある程度緩和する。異常な状態の治療に関して、治療効果は、以下の1またはそれ以上を表すことができる：(a)細胞の増殖、成長、および/または分化の増加；(b)細胞死の阻害(すなわち、遅延または停止)；(c)変性の阻害；(d)異常な状態に伴う1またはそれ以上の症状のある程度の緩和；および(e)影響を受けた細胞の集団の機能の増強。異常な状態に対して有効性を示す化合物は、本明細書に記載されるようにして同定することができる。

【0086】

"異常な状態"との用語は、生物の細胞または組織における、その生物における正常な機能からはずれた機能を表す。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、または細胞生存に関連する。

【0087】

異常な細胞増殖状態には、癌、例えば繊維性およびメサンギウム疾患、異常な新脈管形成および脈管形成、創傷治癒、乾癬、真性糖尿病、および炎症、ならびに本発明の癌が含まれる。

【0088】

異常な分化状態には、限定されないが、神経変性疾患、遅い創傷治癒速度、および遅い組織移植治癒速度が含まれる。

【0089】

異常な細胞生存状態は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）経路が活性化されているかまたは排除されている状態に関連する。多くの蛋白質キナーゼがアポトーシス経路に関連している。蛋白質キナーゼのいずれかの機能の異常は、細胞の不死または未成熟細胞死につながりうる。

【0090】

シグナル伝達プロセスにおけるキナーゼポリペプチドの機能に関連して、"異常な"との用語は、生物において過剰発現または過小発現されているか、その触媒活性が野生型蛋白質キナーゼ活性より低いかまたは高いように変異しているか、天然の結合パートナーともはや相互作用できないように変異しているか、別の蛋白質キナーゼまたは蛋白質ホスファターゼによりもはや修飾されないか、または天然の結合パートナーともはや相互作用しない、キナーゼを表す。

【0091】

"投与する"との用語は、化合物を生物の細胞または組織内に取り込ませる方法に関連する。異常な状態は、生物の細胞または組織が生物中または生物外に存在する場合、予防または治療することができる。生物の外に存在する細胞は、細胞培養皿中で維持または成長させることができる。生物中に含まれる細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多くの手法が存在し、例えば、限定されないが、経口、非経口、経皮、注入およびエアロゾル外用が含まれる。生物外の細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多数の手法が存在し、例えば、限定されないが、細胞マイクロインジェクション手法、トランスフォーメーション手法、および担体手法が含まれる。

【0092】

異常な状態はまた、シグナル伝達経路に異常を有する一群の細胞を有する生物に化合物を投与することにより、予防または治療することができる。次に、化合物の投与が生物機能に及ぼす影響をモニターすることができる。生物は、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはヤギであり、より好ましくは

有尾サルまたは無尾サルであり、最も好ましくはヒトである。

【0093】

本発明の別の観点は、疾病または疾患の診断道具として、試料中においてポリペプチド（またはポリペプチドをコードする核酸）を検出する方法を特徴とする。該方法は、(a) 試料を、ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、T k s 1 0 7 , T k s 1 1 3 , T k s 1 1 8 および T k s 2 0 2 からなる群より選択されるポリペプチドの核酸標的領域とハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、該プローブは、ポリペプチドをコードする核酸配列、そのフラグメント、およびその配列およびフラグメントの相補体を含み；そして(b) プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を疾病または疾患の指標として検出する、の工程を含む。

【0094】

本発明の好ましい態様においては、疾病または疾患は、慢性関節リウマチ、動脈硬化、自己免疫疾患、臓器移植、心筋梗塞、心筋症、発作、腎不全、酸化ストレス関連神経変性性疾患および癌からなる群より選択される。

【0095】

ハイブリダイゼーション条件は、他の核酸分子が存在したとしても、遺伝子とのみハイブリダイゼーションが生ずるような条件であるべきである。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下では、高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは、そのような条件は、20個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。そのような条件は上で定義される。

【0096】

試料中の遺伝子の検出により診断することができる疾病には、核酸(DNAおよび/またはRNA)が正常細胞と比較して増幅されている疾病が含まれる。"増幅"とは、正常細胞と比較して、細胞中でDNAまたはRNAの数が増加していることを意味する。

【0097】

RNAに関する場合、"増幅"は、細胞においてRNAが検出可能なように存在

することでありうる。ある正常細胞においては、RNAの基底発現がないためである。他の正常細胞においては、そのような発現の基底レベルが存在し、したがってこれらの場合には増幅は基底レベルと比較して少なくとも1 - 2倍、好ましくはそれより多い、検出可能な存在の増加を示す核酸の増加である。

【0098】

試料中の核酸の検出により診断することができる疾病には、好ましくは、癌が含まれる。本発明の核酸探索方法に適した試験試料には、例えば、細胞または細胞の核酸抽出物、または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は、アッセイフォーマット、検出方法、およびアッセイする組織、細胞または抽出物の性質により様々でありうる。細胞の核酸抽出物を調製する方法は、当該技術分野においてよく知られており、用いる方法に適合した試料を得るために容易に適合させることができる。

【0099】

最後に、本発明はTks107、Tks113、Tks118およびTks202を用いる、トランスジェニック動物および遺伝子治療に関する。

【0100】

本明細書においては、発明を広くかつ一般的に記載している。一般的開示に含まれるより狭い種および亜属のそれぞれのグループもまた本発明の一部を形成する。これには、除かれたものが具体的に記載されているか否かにかかわらず、属から任意の主題を除く「ただし・・・」またはネガティブ限定を含む発明の一般的記載が含まれる。

【0101】

上述の本発明の概要は、限定的なものではなく、本発明の他の特徴および利点は、以下の発明の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0102】

図面の簡単な説明

図1は、Tks107のヌクレオチド配列（配列番号1）を示す。

【0103】

図2は、Tks113のヌクレオチド配列（配列番号2）を示す。

【0104】

図3は、Tks118のヌクレオチド配列（配列番号3）を示す。

【0105】

図4は、Tks202のヌクレオチド配列（配列番号4）を示す。

【0106】

図5は、Tks107の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号5）を示す。

【0107】

図6は、Tks113の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

【0108】

図7は、Tks118の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号7）を示す。

【0109】

図8は、Tks202の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

【0110】

図9は、dbl, cdc24, vav, tiam, fgdlおよびGrubのdblホモロジー（DH）ドメインの隠れマルコフモデル（HMM）アラインメントを示す。配列の上のバーは、h-sos（H1-H8）または保存領域（CR1-CR3）のDH/PHドメインの結晶構造から予測される重要な残基を示す。いくつかのよく保存されているアミノ酸は影で示す（Soisson, S., et al. (1988) Cell 95:259-268）。

【0111】

図10は、Grubプレクストリンホモロジー（PH）ドメインと、dbl, tiam, およびfgdlのPHドメインの隠れマルコフモデル（HMM）アラインメントを示す。影で示したアミノ酸は、PHドメイン中に見いだされるいくつかのよく保存されているアミノ酸である（Shaw, G. (1996) Bio Essays 18:35-46）。

【0112】

図11は、種々の組織におけるGrubの発現を示す。元のTks107クローンをを用いて、Multiple Tissue Northern Blotsを探索した。

【0113】

図12は、正常組織およびNCI腫瘍細胞におけるGrubの発現を示す。元のTks107クローンを用いて、種々の起源からの総RNAを探索した。上の2つのパネルは正常組織からのRNAを含み、残りのパネルは種々の腫瘍細胞株からのRNAを含む。

【0114】

図13は、293細胞におけるGrubとSrcの共発現を示す。mycでタグづけした、Grubの全長(wt)、N末端(N)、またはC末端(C)を発現する構築物を、293細胞中で活性化Src(k+)キナーゼ、不活性Src(k-)とともに、またはSrcなしで共発現させた。溶解物を抗myc抗体(9E10)で免疫沈澱させ、9E10または抗ホスホチロシン抗体(pTyr)でウエスタンブロットを行った。全長またはN末端Grubのみが活性化Srcによりリン酸化され、C末端Grubを活性化Srcと共発現させたとき、またはいずれかのGrub構築物をキナーゼ不活性Srcと共発現させたとき、リン酸化は観察されなかった。

【0115】

図14は、種々の組織におけるTks113の発現を示す。Tks113からの1.5kbEcoRIフラグメントを用いて、Multiple Tissue Northern (Clontech)を探索した。

【0116】

図15は、Tks113特異的抗体を示す。レーン1および3は、NIH3T3細胞からの細胞溶解物を含み、レーン2および4は、NCIH460細胞からの細胞溶解物を含む。パネルAはウサギ前免疫血清で免疫プロットした。パネルBは、Gst-Tks113で免疫したウサギからの血清で免疫プロットした。

【0117】

図16は、Tks118とmSH3P7、ドレブリンEおよびSrcのSH3ドメインのアミノ酸配列アラインメント(J. Heinの方法を用いるMegAlign)を示す。

【0118】

図17は、種々の組織におけるTks118の発現を示す。Tks118からの1.6kbEcoRI/XhoIフラグメントを用いてMultiple Tissue Northern (Clontech)を探索した。

【0119】

図18は、正常組織およびNCI腫瘍細胞におけるTks118の発現を示す。元のTks118クローンを用いて、種々の組織からの総RNAを探索した。上の2つのパネルは正常組織からのRNAを含み、残りのパネルは種々の腫瘍細胞株からのRNAを含む。

【0120】

図19は、293細胞におけるTks118とSrcの共発現を示す。293細胞において、mycでタグ付けしたTks119を発現する構築物を、活性化Src(k+)、キナーゼ不活性Src(k-)または空ベクター対照(-)とともに共発現させた。溶解物を抗myc抗体(9E10)で免疫沈澱させ、9E10または抗ホスホチロシン抗体でウエスタンブロットを行った。Tks118は、活性化Srcと共発現した場合にのみリン酸化され、キナーゼ不活性Srcではリン酸化されなかったことに注意すべきである。

【0121】

図20は、NIH3T3-Y527F細胞の抗Tks118(5033)および抗ピンクリン(Upstate Biotechnology)の共染色を示す。染色は、Tks118の染色がピンクリンと共局在化していることを示し、これらの細胞に見られる細胞突起部の末端の丸いポドソーム構造が染色された。

【0122】

図21は、Tks202のC末端と、c-melおよびrab8のアラインメント(Clustal法を用いるMegAlign)を示す。

【0123】

図22は、種々の組織におけるTks202の発現を示す。元のTks202クローンの5'の500b.p.を用いて、Multiple Tissue Northern (Clontech)を探索した。

【0124】

図23は、Grubの5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【0125】

図24は、Tks113の5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【0126】

図25は、Tks118の5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【0127】

図26は、Tks202の5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【0128】

発明の詳細な説明

本発明は、部分的には、本発明の新規な基質であるTks107、Tks113、Tks118およびTks202に関連するポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのような核酸を含む細胞、そのようなポリペプチドに対する抗体、そのようなポリペプチドを用いるアッセイ、および上述のすべてに関連する方法に関する。ポリペプチドおよび核酸は、本明細書に記載される配列が与えられれば、よく知られた標準的な合成法を用いて製造することができる。以下の例は、蛋白質Tks107/Grub、Tks113、Tks118/DreshおよびTks202(チロシンキナーゼ基質)の単離および特性決定を示す。

【0129】

蛋白質チロシンキナーゼは、細胞外環境から細胞の内部にシグナルを伝達するよう機能する、関連する蛋白質の大きなスーパーファミリーを構成する。これらのシグナルは、細胞機能のあらゆる観点、例えば、成長、分化および死を指示する。任意の特定のキナーゼについて、関連の深い基質の同定はその機能を解明するための重要な工程である。

【0130】

我々は、細胞質チロシンキナーゼSrcの新規な基質の同定を記述する。我々は、ニトロセルロースフィルターに固定化したラムダ発現ライブラリのSrc含有Sf9溶解物(Lock, P. et al. EMBO J. 17(15):43

46-4357, 1998)によるインビトロリン酸化に基づくスクリーニング戦略を用いた。このようにして, 4つのSrc基質をコードするラムダクロンTks107, 113, 118およびTks202が同定された。

【0131】

本発明の核酸

本明細書に記載される単離された核酸分子の機能的等価物も本発明の範囲に含まれる。遺伝コードの縮重のため, あるコドンと同じアミノ酸を規定する他のコドンで置き換え, 同じ蛋白質を生じさせることができる。既知のアミノ酸は, メチオニンおよびトリプトファンを除き, 2以上のコドンによりコードすることができるため, 核酸配列は実質的に様々でありうる。すなわち, 本発明の遺伝子の一部または全部を合成して, 配列番号1, 配列番号2, 配列番号3および配列番号4に示される核酸配列と有意に異なる核酸配列を得ることができる。しかし, これによりコードされるアミノ酸配列は保存される。

【0132】

さらに, 核酸配列は, 配列番号1, 配列番号2, 配列番号3または配列番号4に示される核酸の式またはその誘導体の5'-末端および/または3'-末端で少なくとも1つのヌクレオチドを付加, 欠失または置換することにより得られるヌクレオチド配列を含んでいてもよい。その付加, 欠失または置換が, ヌクレオチド配列によりコードされる配列番号5, 配列番号6, 配列番号7または配列番号8のアミノ酸配列を変更しない限り, 任意のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをこのように用いることができる。例えば, 本発明は, 本発明の核酸配列またはその誘導体の5'-末端に開始コドンとしてATGを付加することにより, または本発明のヌクレオチド配列またはその誘導体の3'-末端に終止コドンとしてTTA, TAGまたはTGAを付加することにより得られる任意の核酸配列を含むことを意図する。さらに, 本発明の核酸分子は, 必要に応じて, これらの5'-末端および/または3'-末端に付加された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有することができる。

【0133】

所定の核酸配列のそのような機能的変更により, これに融合した外来核酸配列

によりコードされる異種蛋白質の分泌および/またはプロセッシングが促進される機会が与えられる。したがって、遺伝コードにより許容される本発明の遺伝子およびそのフラグメントのヌクレオチド配列のすべての変種は本発明に含まれる。

【0134】

さらに、コドンを削除するかまたは1またはそれ以上のコドンを縮重コドン以外のコドンと置換して、構造的に改変されているが、未改変核酸分子により産生されるポリペプチドと実質的に同じ有用性または活性を有するポリペプチドを製造することが可能である。当該技術分野において認識されているように、2つのポリペプチドは機能的に同等であり、これらの核酸分子の間の相違が遺伝コードの縮重に関連しない場合であっても、これらの製造を生じさせる2つの核酸分子も機能的に同等である。

【0135】

本発明のSrc基質を単離するために、Lock, P. et al. EMBO J. 17(15): 4346-4357, 1998 (図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるように、ニトロセルロースフィルター上に固定化されたラムダ発現ライブラリのSrc含有Sf9溶解物によるインビトロリン酸化に基づくスクリーニング戦略を用いて、Src基質を単離した。このようにして、4つのSrc基質をコードするラムダクローンTks107, 113, 118およびTks202が同定された。

【0136】

Tks107 (Grub)

ラムダクローンtks107は、ヒト肺腫瘍細胞株NCI-H460からのcDNAを用いて構築したZapcDNAライブラリから単離された。Tks107をコードするDNAフラグメントを用いて、同じライブラリからTks107の種々の重複クローンを単離した。これらのクローンの1つ(Tks107-4)は、推定開始メチオニンの上流にインフレームで終止コドンを有する、大きいオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。このORFは、1511アミノ酸の蛋白質をコードすると予測され、Grubと名付けられた。この配列をクエリーとして公共配列データベースをコンピュータ検索すると、このORFが

dblホモロジードメイン(DH), 続いてそのC末端にプレクストリンホモロジードメイン(PH)を有することが明らかになった。

【0137】

dblホモロジードメイン(DHドメイン)は, 最初にDb1およびCdc24蛋白質において見いだされた約250アミノ酸の領域である。その後, 増加する蛋白質のリスト(>20)がDHドメインを含有することが示された。異なる蛋白質のDHドメインは, 互いに約30%のアミノ酸同一性を有する。DHドメインを含む蛋白質は, 小GTPaseのRhoメンバーのグアニン交換因子(GEF)として作用することが示されている。多くのDH含有蛋白質は, N末端切断により細胞トランスフォーメーション活性を示す(ここで, DHドメインは変異されない)(Quilliam, L.A., et al. *Bio Essays*, 17:395-404, 1995. Whitehead, I.P., et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1332:F1-F23, 1997. Cerione, R.A. and Zheng, Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:216-222, 1996に概説されている)。最近, ヒトSosのDHドメインの三次元構造が解明された(Soisson, S.M., et al., *Cell*, 95:259-268)。これは -らせんから構成されていることが示され, このいくつかは先に定義されたDHドメインの保存領域(CR)とよく対応する(Whitehead, I.P., et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1332:F1-P23, 1997, およびGrub GEPアラインメントの図)。HMMER(<http://hmmer.wustl.edu>)を用いてDHドメインについて隠れマルコフモデル(HMM)を作成した。HMMERへの入力は, CLUSTALW(Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson, T.J., *Nucleic Acid Research*, 1994)により評価された多配列アラインメント遺伝子である。(Soisson, S.M., et al., *Cell*, 95:259-268)からの二次構造情報をCLUSTALWアラインメントに導入した。配列番号5(Tks107/Grub)の1083-1257のアミノ酸領域は, この隠れマルコフモデ

ルとよく整合し、保存 - らせんモチーフならびに保存アミノ酸残基の両方を示した (GrubGEFアラインメント図)。

【0138】

さらに、2つのEST (AA778210およびAA829341) がTks107-4の3'配列と重複し、3'非翻訳配列がポリアデニル化まで延びていることが見いだされた。Tks107、tks107-4および2つのESTから編集された配列が配列番号1に示されており、これはGrubと名付けられた。この配列の提唱される関連性のある特徴は以下のものを含む：

【表1】

ヌクレオチド	コメント
155-1778	元のTks107の配列
1-5107	Tks107-4の配列
208-4764	Grubの推定コーディング領域
3454-3978	Dblホモロジードメイン
4000-4323	プレクストリンホモロジードメイン
4164-5335	ESTAA778210
?-5332	ESTAA829341 (5'末端は未知)
5305-5315	AA829341には存在せず
4897	ESTにおいてはGの代わりにT
5005	ESTにおいてはGの代わりにT
5010	ESTにおいてはGの代わりにT
5072	ESTにおいてはGの代わりにT
5103	ESTにおいてはGの代わりにT

【0139】

GrubのC末端におけるDH/PHドメインのタンデムアレイは、Dblファミリーの蛋白質の顕著な特徴である。このファミリーの多くのメンバーは、N末端切断により細胞トランスフォーメーション活性を示す。細胞トランスフォーメーションには、DH/PHモジュールが無傷であることが必要である。多くのDblファミリー蛋白質のDH/PHモジュールは、グアニン交換因子 (GEF

)として作用することにより種々のR h oサブファミリー小G T P a s eの活性を制御することが示されている。多くのR h oファミリーG T P a s eは、アクチン構造の組立を制御し、種々のキナーゼ経路、例えばJ n kの活性化を通して遺伝子転写を制御するかもしれないことが示されている (H a l l , A . S c i e n c e , 2 7 9 : 5 0 9 - 5 1 4 , 1 9 9 8)。

【0140】

G r u b mRNAは、調べたすべてのヒト組織において発現されており、特に膵臓および脾臓で高い発現が見られる。60種類の腫瘍細胞株についてG r u bの発現レベルを測定し、13 (~21%)種類の細胞株で有意に上昇していることが見いだされ、10またはそれ以上の細胞株でわずかに上昇しているかもしれない。欠失分析は、293細胞中で両方を共発現させたときにG r u bがN末端でS r cによりリン酸化されることを示す。293細胞において発現させた組換えG r u bは、見かけMr約190,000で移動する。これは予測されたMrである164,701 (一次アミノ酸配列に基づく)より大きい。この範囲のサイズの蛋白質のMrを正確に決定することはしばしば困難であり、G r u bがそのMrを変化させるかもしれない翻訳後修飾を有するか否かは明らかではない。

【0141】

G r u bの全長、N末端またはC末端を安定に発現するN I H 3 T 3クローンを作成した。これらのクローンは、増強された成長速度、軟寒天中での成長、あるいは変化したモルホロジーを示さない(データ示さず)。しかし、293細胞でG r u bのNまたはC末端をH A - J N Kと共発現させると、J n k活性をベクター単独の4 - 6倍活性化した。野生型G r u bをH A - J n kと共発現させると、野生型G r u bをG r u bのNまたはC末端よりはるかに低いレベル(約1/10)で発現させたにもかかわらず、J n k活性が2.5倍促進された。これに対し、他の異種蛋白質(S H 3 P 7 S H 3)の過剰発現はJ n k発現を弱く活性化させたのみであった。これらのデータは、G r u bのC末端が、おそらくは未知のR h oファミリーG T P a s eのグアニン交換因子として作用することによりJ n k活性を活性化しうることを示唆する。G r u bのD H / P Hまた

はDHドメインはそれ自体Jnk活性を強く活性化しないことに注意することは興味深い。このことは、ある種のdb1ファミリーメンバーのDHドメインは完全な活性を示すためにフランキング領域を必要とする（おそらくは、フランキング配列により付与される追加の構造的安定性のため）という挿話的証拠と一致する。N末端はまた、Jnkを活性化することができる。N末端がJnkを活性化するメカニズムは現在不明であるが、N末端がJnkを活性化することができる蛋白質に対する酵素的（すなわち、隠れたGEF活性）または結合活性を有するドメインを含む可能性がある。

【0142】

可能性のあるGrub機能をさらに理解するため、Grub相互作用蛋白質を単離するために、酵母2-ハイブリッドスクリーニングにおいてGrubのN末端をおとりとして用いた。HeLa cDNAライブラリの約 1.8×10^6 個のトランスフォーマントを単離した。このアッセイにおいては、蛋白質スナピンをコードする6個の独立したcDNAおよびラットRACK1のヒト相同体をコードする2個の独立したcDNAが単離された。

【0143】

スナピンは小さいニューロン特異的蛋白質であり、シナプス小胞に局在し、SNARE複合体とシナプトタグミンとの間の架橋として働く（Dardi, J., et al., Nature Neuro. 1999, 2: 119-124）。シナプトタグミンは、シナプス小胞と原形質膜との最終的な融合を誘発するカルシウムセンサーである。GTPaseのRabサブファミリーの小GTPaseはまた、効率的なシナプス輸送においても役割を果たす（Sudhof, T.C., Nature 1996, 375: 645-653）。Grubがこれらの小GTPaseのGEFとして作用するという仮説は魅力的である。あるいは、GrubはRhoファミリーGTPaseのGEFとしてより伝統的な様式で作用するかもしれないが、スナピンに結合することにより、Rhoファミリーメンバーを制御することによりアクチンサイクルへの小胞輸送とつながるかもしれない。

【0144】

RACK1は最初、活性化蛋白質キナーゼCの細胞内レセプターとしてクローニングされた(Ron, D., et al., P.N.A.S. 1994, 91: 839-843)。それ以来、RACK1は、種々のシグナリング分子、例えばSrcと結合すること、およびシグナリング複合体が組み立てられる分子足場として作用するかもしれないことが示されている(Rodriguez MM, et al. Biochemistry. 1999 38:13787-94. Liliental, J. and Chang, D.D. JBC 1998 273:2379-2383. Chang, B., et al., MCB 1998 18:3245-3256.)。

【0145】

Tks113

ラムダクローンTks113は、ヒト肺腫瘍細胞株NCI-H460からcDNAを用いて構築した ZapcDNAライブラリから単離された。Tksは、1430ヌクレオチドのEcoRI/XhoIフラグメントを含む。このフラグメントは、476アミノ酸のORFをコードし、公共に入手可能な配列のいずれとも有意な相同性を有しない。しかし、Tks113は、C末端プロリンリッチドメイン(26%プロリン)中にいくつかのPXXPモチーフを含み、このことは、これがSH3ドメインを有するシグナリング分子の結合パートナーかもしれないことを示唆する。シグナリング複合体の足場、アンカーまたはアダプターとして働く蛋白質は、しばしば蛋白質/蛋白質相互作用の多数のモチーフ(例えばPXXP)を示す(Pawson, T. and Scott, J.D., Science 278:2075-2080, 1997)。

【0146】

Tks113の配列は配列番号2に示される。この配列の関連性のある特徴は以下のとおりである。Tks113 mRNAは調べたすべてのヒト組織において発現されており、精巣、心臓および骨格筋において最も高く発現されている。これらの実験でのTks113のmRNAの見かけのサイズは約2.4 kbである。さらに、Tks113のN末端に対して生成した抗体は、NIH3T3細胞において約77 kDaの蛋白質を同定する。したがって、これらのデータに基づく

と、T k s 1 1 3は全長クローンではなさそうである。T k s 1 1 3の機能を説明するためには、全長クローンを単離して、発現構築物等の試薬を生成することが必要である。

【0147】

T k s 1 1 8

T k s 1 1 8は、ヒト肺腫瘍細胞株N C I - H 4 6 0からのc D N Aを用いて構築した Z a p c D N Aライブラリから単離された。T k s 1 1 8は、430アミノ酸の大きいO R F（推定開始メチオニンから開始して）を有する1532ヌクレオチドのクローンである。T k s 1 1 8の最初の1115ヌクレオチドと同一の独立したクローン（T k s 1 0 9）もまた同じスクリーニングから単離された。これらの配列を用いて公共のデータベースを検索すると、t k s 1 1 8が先にクローニングされたネズミ配列S H 3 P 7と86%同一であることが示され、このことは、t k s 1 1 8がおそらくm S H 3 P 7のヒトオルトログであることを示唆する（S p a r k s , e t a l . , N a t u r e B i o t e c h . 1 4 : 7 4 1 - 7 4 4 , 1 9 9 6）。さらに、T k s 1 1 8のN末端240アミノ酸は、トリ蛋白質であるドレブリン（D r e b r i n）と44%同一である。ドレブリンは、アクチン構造に結合しこれを変化させることが報告されている（S h i r a o , T . , J . B i o c h e m . , 1 1 7 : 2 3 1 - 2 3 6 , 1 9 9 5）。さらに、h S H 3 P 7もC末端62アミノ酸にS H 3ドメインを含む。T k s 1 1 8の配列は配列番号3に示される。この配列の関連性のある特徴は以下のとおりである。

【表2】

ヌクレオチド	コメント
1 - 1 5 3 5	T k s 1 1 8 配列
1 - 1 1 1 5	T k s 1 0 9 配列
2 6 - 1 3 1 9	T k s 1 1 8 コーディング配列
1 - 7 2 0	ドレブリンホモロジードメイン
1 1 3 0 - 1 3 1 9	S H 3 ドメイン
9 6 6	T k s 1 0 9 においてはCの代わりにT

969 T k s 1 0 9 においてはCの代わりにT

1023 T k s 1 0 9 においてはCの代わりにT

【0148】

T k s 1 1 8 の mRNA は、調べたすべての組織において発現されており、脾臓、胸腺、前立腺および末梢血リンパ球において最も高い発現が見られる。T k s 1 1 8 mRNA は、試験した腫瘍細胞株の40%以上で過剰発現されている。293細胞中で共発現させたときT k s 1 1 8 はS r cによりリン酸化される。N I H 3 T 3 およびS r c でトランスフォームしたN I H 3 T 3 細胞中でT k s 1 1 8 を過剰発現させると、アクチン様構造に局在化する。注目すべきことに、S r c でトランスフォームした細胞においてT k s 1 1 8 はポドソームに局在する。この局在化は、ドレブリンホモロジドメインに依存しており、ドレブリンがアクチン構造に結合してこれを変化させるという先の報告と一致する。最近m - S H 3 P 7 が抗原レセプター刺激リンパ球においてチロシンリン酸化され、N I H 3 T 3 細胞中でアクチン構造と共局在することが示されている(L a r b o l e t t e , O . , M C B . 1 9 : 1 5 3 9 - 1 5 4 6 , 1 9 9 9)。現在、我々は、T k s 1 1 8 がインビトロおよびインビボでアクチン構造に結合し、および/または影響を及ぼすか否かを決定している。種々のT k s 1 1 8 構築物を細胞株中で過剰発現させて、T k s 1 1 8 が、細胞成長、トランスフォーメーション、および運動性に及ぼす影響を決定することができる。

【0149】

T k s 2 0 2

ラムダクローンT k s 2 0 2 は、ヒト結腸腫瘍細胞株C o l o 2 0 5 (S t r a t a g e n e) からのcDNAを用いて構築したZ a p cDNAライブラリから単離された。t k s 2 0 2 をコードするDNA配列を用いて公共のデータベースを調べて、有益な相同性を明らかにした。この検索により、T k s 2 0 2 の3'末端が小G T P a s e ファミリーの蛋白質と相同のアミノ酸配列をコードすることが明らかになった。さらに、2つのE S T (A A 4 7 0 5 1 9 およびr 7 8 6 5 5) がt k s 2 0 2 の3'配列と重複することも見いだされた。これらのE S T からの配列を用いてT k s 2 0 2 配列をポリアデニル化部位まで延長した

。T k s 2 0 2からの5'の約500ヌクレオチドのR I / X b a lフラグメントを用いてT r i p ; E x前立腺ライブラリ(C l o n t e c h)を探索し,追加のT k s 2 0 2クローンを得た。これらのクローンの1つであるT k s 2 0 2 - 1 7は,5'配列を933ヌクレオチド延長した。5'配列の追加の370ヌクレオチドは,以下に記載する5'R A C Eの改変により得た。この5'R A C E産物は,ヌクレオチド170に終止コドンを示し,これはヌクレオチド647の推定開始メチオニンの5'側である。T k s 2 0 2, T k s 2 0 2 - 1 7, 2つのE S T, および5'R A C E産物から編集された配列が配列番号4に示される。この配列の関連性のある特徴は以下のとおりである:

【表3】

ヌクレオチド	コメント
1305 - 3155	T k s 2 0 2
371 - 1798	T k s 2 0 2 - 1 7
647 - 2866	推定T k s 2 0 2コーディング領域
2258 - 2866	G T P a s eドメイン
1 - 532	5'R A C E産物
1788 - 3155	E S T AA470519
2544 - 3155	E S T r78655

【0150】

t k s 2 0 2のDNAフラグメントを用いて, M u l t i p l e T i s s u e N o r t h e r n B l o t s (C l o n t e c h)を探索した。このことにより,内因性t k s 2 0 2 mRNAが約5 kbであり,前立腺および膵臓を除き,試験したほとんどの組織で非常に低いかまたは検出されないレベルで発現されていることが示された。

【0151】

小G T P a s eは,多様な生物学的機能,例えば,細胞増殖および分化,細胞骨格構成,蛋白質輸送,細胞サイクルおよびフリーラジカル生成を制御する分子スイッチとして作用する蛋白質の大きなファミリーである(B o u r n e, H. R. e t. a l. . N a t u r e, 348(6297):125-32, 199

O. Bourne, H. R. et al. . Nature, 349 (6305) : 117 - 27, 1991)。このGTPaseはこれらの中心的細胞経路を調節し、GTPaseおよびそのレギュレータの両方とも非常に重要であることを示唆する。

【0152】

小GTPaseは、典型的には約200アミノ酸であり、そのほぼすべてが単一のGTPaseドメインに折り畳まれている。そのように、tk202は顕著な延長N末端をそのGTPaseドメインに含む点において珍しい。この延長の存在は、tk202（および類似の構造のまだ発見されていないGTPase）の、GTPaseについてこれまでに知られていない細胞での役割を示唆するかもしれないと推測することができる。

【0153】

II. 本発明の蛋白質を検出するための核酸プローブ、方法およびキット

本発明の核酸プローブを用いて、通常ハイブリダイゼーション方法により適当な染色体またはcDNAライブラリを探索して、本発明の他の核酸分子を得ることができる。染色体DNAまたはcDNAライブラリは、当該技術分野において認識されている方法にしたがって、適当な細胞から調製することができる（"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第2版. Cold Spring Harbor Laboratory, Sambrook, Fritsch, & Maniatis, eds., 1989を参照）。

【0154】

別の方法においては、目的とするポリペプチドのアミノ酸配列のN末端およびC末端部分に対応するヌクレオチド配列を有する核酸プローブを得るために化学合成を行うことができる。合成された核酸プローブは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）においてプライマーとして使用して、認識されているPCR手法にしたがって、本質的にPCR Protocols, "A Guide to Methods and Applications", Academic Pre

ss, Michael, et al., eds., 1990にしたがって, 適当な染色体またはcDNAライブラリを用いて, 本発明のフラグメントを得ることができる。

【0155】

当業者は, 本明細書に開示される配列に基づいて, 当該技術分野において知られるコンピュータアラインメントおよび配列分析の方法を用いてそのようなプローブを用意に設計することができる("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 上掲)。本発明のハイブリダイゼーションプローブは, 標準的標識技術, 例えば放射性標識, 酵素標識, 蛍光標識, ビオチン-アビジン標識, 化学発光等を用いる技術により, 標識することができる。ハイブリダイゼーション後, プローブは既知の方法を用いて可視化することができる。

【0156】

本発明の核酸プローブはRNAならびにDNAプローブを含み, そのようなプローブは, 例えば当該技術分野において知られる技術を用いて生成される。核酸プローブは, 固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例としては, 限定されないが, プラスチック, 例えばポリカーボネート, 複合炭水化物, 例えばアガロースおよびセファロース, およびアクリル樹脂, 例えばポリアクリルアミドおよびラテックスビーズが含まれる。核酸プローブをそのような固体支持体に結合させる技術は当該技術分野においてよく知られている。

【0157】

本発明の核酸探索方法に適した試験試料には, 例えば, 細胞または細胞の核酸抽出物, または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は, アッセイフォーマット, 検出方法, およびアッセイすべき組織, 細胞, または抽出物の性質により様々であろう。細胞の核酸抽出物を調製する方法は当該技術分野においてよく知られており, 用いる方法に適合する試料を得るために容易に適合させることができる。

【0158】

試料中で本発明の核酸の存在を検出する1つの方法は, (a) 前記試料をハイ

ブリダイゼーションが生ずるような条件下で上述の核酸プローブと接触させ、そして(b)前記核酸分子に結合した前記プローブの存在を検出する、ことを含む。当業者は、当該技術分野において知られる技術にしたがって、上述のように核酸プローブを選択するであろう。試験すべき試料には、限定されないが、ヒト組織のRNA試料が含まれる。

【0159】

試料中で本発明の核酸の存在を検出するためのキットは、その中に上述の核酸プローブが置かれている少なくとも1つの容器手段を含む。キットはさらに、以下の1またはそれ以上を含む他の容器を含んでいてもよい：洗浄試薬および結合した核酸プローブの存在を検出することができる試薬。検出試薬の例としては、限定されないが、放射性標識プローブ、酵素標識プローブ（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、および親和性標識プローブ（ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジン）が挙げられる。

【0160】

詳細には、コンパートメント化されたキットには、試薬が別々の容器に入れている任意のキットが含まれる。そのような容器には、小ガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックまたは紙のストリップが含まれる。そのような容器は、試料および試薬が互いに夾雑しないように、かつ各容器の薬剤または溶液を定量的様式で1つのコンパートメントから別のコンパートメントに加えることができるように、1つのコンパートメントから別のコンパートメントに試薬を有効に移すことができるものである。そのような容器には、試験試料を入れる容器、アッセイにおいて用いるプローブまたはプライマーを含有する容器、洗浄試薬（例えばリン酸緩衝化食塩水、Tris緩衝液等）を含有する容器、およびハイブリダイズしたプローブ、結合した抗体、増幅産物等を検出するために用いられる試薬を含有する容器が含まれる。当業者は、本発明において記載される核酸プローブを、当該技術分野においてよく知られる確立されたキットフォーマットの1つに容易に組み込むことができることを容易に認識するであろう。

【0161】

III. Tks 107, Tks 113, Tks 118およびTks 202関連核

酸分子を含むDNA構築物およびこれらの構築物を含む細胞

本発明はまた、宿主細胞において転写を開始するのに有効なプロモーターおよび上述の核酸分子を5'から3'方向に含む組換えDNA分子に関する。さらに、本発明は、ベクターおよび上述の核酸分子を含む組換えDNA分子に関する。本発明はまた、細胞において機能的な転写領域、上述のポリペプチドに対応するアミノ酸配列をコードするRNA配列に相補的な配列、および前記細胞において機能的な転写終止領域を含む核酸分子に関する。上述の分子は、単離されたおよび/または精製されたDNA分子でありうる。

【0162】

本発明はまた、上述の核酸分子を含み、したがってポリペプチドを発現しうる細胞または生物に関する。ポリペプチドは、そのポリペプチドを発現するよう変更されている細胞から精製することができる。細胞が、細胞が通常は産生しないかまたは細胞が通常はより低いレベルで産生する蛋白質を産生するように遺伝子操作により作成されている場合、細胞は"所望のポリペプチドを発現するよう変更されている"と言われる。当業者は、ゲノム、cDNA、または合成配列のいずれかを真核生物または原核生物細胞のいずれかに導入して発現させるための方法を容易に適用することができる。

【0163】

核酸分子、例えばDNAは、これが転写および翻訳制御情報を含むヌクレオチド配列を含み、かつそのような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に"動作可能なように連結されている"場合、ポリペプチドを"発現しうる"と言われる。動作可能な連結とは、制御DNA配列および発現が求められているDNA配列が、遺伝子配列の発現を可能とするような様式で接続されているような連結である。遺伝子配列の発現に必要な制御領域の詳細な性質は生物によって異なるであろうが、これは一般にプロモーター領域を含む。原核生物においては、プロモーター領域は、プロモーター(RNA転写の開始を指示する)ならびにRNAに転写されたときに合成の開始を合図するであろうDNA配列の両方を含む。そのような領域は、通常は転写および翻訳の開始に関与する5'-非コーディング配列、例えばTATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等を含むで

あろう。

【0164】

所望の場合には、本発明のポリペプチドをコードする配列の3'側の非コーディング領域を上述の方法により得ることができる。この領域は、その転写終止制御配列、例えば終止およびポリアダニル化のために保持することができる。すなわち、本発明のポリペプチドをコードするDNA配列に天然に隣接している3'領域を保持することにより、転写終止シグナルを提供することができる。発現宿主細胞において転写終止シグナルが十分に機能性でない場合には、宿主細胞において機能的な3'領域で置き換えることができる。

【0165】

2つのDNA配列（例えば、プロモーター領域配列および本発明のポリペプチドをコードする配列）は、2つのDNA配列の連結の性質が、（1）フレームシフト変異を導入しない、（2）プロモーター領域配列が本発明のポリペプチドをコードする遺伝子配列の転写を指示する能力を妨害しない、または（3）本発明のポリペプチドの遺伝子配列がプロモーター領域配列により転写されることを妨害しない場合、動作可能なように連結されていると言われる。すなわち、プロモーター領域は、プロモーターがそのDNA配列の転写を行うことができる場合、DNA配列に動作可能なように連結されているであろう。すなわち、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を発現させるためには、適当な宿主により認識される転写および翻訳シグナルが必要である。

【0166】

本発明は、本発明のポリペプチド（またはその機能的誘導体）をコードする遺伝子を原核生物または真核生物細胞のいずれかにおいて発現させることを包含する。原核生物宿主は、一般に、組換え蛋白質の製造において非常に有効でありかつ便利であり、したがって、本発明のポリペプチドのための1つの好ましい発現システムである。原核生物は、しばしば*E. coli*の種々の株により代表される。しかし、他の細菌株等の他の微生物株もまた用いることができる。

【0167】

原核生物系においては、宿主と適合性のある種に由来する複製部位および制御

配列を含むプラスミドベクターを用いることができる。適当なプラスミドベクターの例には、pBR322、pUC118、pUC119等が含まれ、適当なファージまたはバクテリオファージベクターの例には、gt10、gt11等が含まれ、適当なウイルスベクターの例には、pMAM-neo、pKRC等が含まれる。好ましくは、本発明の選択されたベクターは、選択された宿主細胞において複製する能力を有する。

【0168】

認められている原核生物宿主には、細菌、例えば*E. coli*、*Bacillus*、*Streptomyces*、*Pseudomonas*、*Salmonella*、*Serratia*等が含まれる。しかし、そのような条件下においては、ポリペプチドはグリコシル化されない。原核生物宿主は発現プラスミド中のレプリコンおよび制御配列と適合性でなければならない。

【0169】

本発明のポリペプチド（またはその機能的誘導体）を原核生物細胞において発現させるためには、本発明のポリペプチドをコードする配列が、機能的原核生物プロモーターと動作可能なように連結されていることが必要である。そのようなプロモーターは、構成的であってもよく、より好ましくは制御可能（すなわち、誘導可能または抑制解除可能）である。構成的プロモーターの例には、バクテリオファージの*int*プロモーター、pBR322の β -ラクタマーゼ遺伝子配列の*bla*プロモーター、およびpPR325のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列の*cat*プロモーター等が含まれる。誘導可能な原核生物プロモーターの例には、バクテリオファージの主要右および左プロモーター（ P_L および P_R ）、*E. coli*の*trp*、*recA*、*lacZ*、*lacI*、および*gal*プロモーター、 α -アミラーゼ（Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162:176-182, 1985）および*B. subtilis*の σ^{28} -特異的プロモーター（Oilman et al., *Gene Sequence* 32:11-20, 1984）、*Bacillus*のバクテリオファージのプロモーター（Gryczan, *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academ

ic Press, Inc., NY, 1982), および *Streptomyces* プロモーター (Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478, 1986) が含まれる。原核生物プロモーターは, Glick (*Ind. Microbiol.* 1:277-282, 1987), Cenatiempo (*Biochimie* 68:505-516, 1986), および Gottesman (*Ann. Rev. Genet.* 18:415-442, 1984) により概説されている。

【0170】

原核生物細胞における適切な発現には, 遺伝子コーディング配列の上流にリボソーム結合部位の存在が必要である。そのようなリボソーム結合部位は, 例えば, Gold et al. (*Ann. Rev. Microbiol.* 35:365-404, 1981) に記載されている。制御配列, 発現ベクター, トランスフォーメーション方法等の選択は, 遺伝子を発現させるために用いられる宿主細胞のタイプに依存する。本明細書において用いる場合, "細胞", "細胞株" および "細胞培養" は互換的に用いることができ, そのような名称はすべて子孫を含む。すなわち, "トランスフォーマント" または "トランスフォームした細胞" との語句は, 継代の数にかかわらず, 初代対象細胞およびここから誘導された培養物を含む。また, 意図的なまたは偶然の変異のために, すべての子孫が DNA 含有物において精密に同一ではないかもしれないことが理解される。しかし, 定義されるように, 変異体子孫は元々のトランスフォームした細胞と同じ機能性を有する。

【0171】

本発明の発現システムにおいて用いることができる宿主細胞は, 目的とするポリペプチドの発現において用いるのに適当である限り, 特に限定されない。適当な宿主はしばしば真核生物細胞を含むことができる。好ましい真核生物宿主には, 例えば, 酵母, 真菌, 昆虫細胞, 哺乳動物細胞 (インビボまたは組織培養のいずれか) が含まれる。宿主として有用でありうる哺乳動物細胞には, HeLa 細胞, 繊維芽細胞由来の細胞, 例えば VERO または CHO-K1, またはリンパ球由来の細胞, およびこれらの誘导体が含まれる。好ましい哺乳動物宿主細胞には, SP2/0 および J558L, ならびに神経芽細胞腫細胞株, 例えば IMR

332が含まれ、これらは正しい翻訳後プロセシングのよりすぐれた能力を提供することができる。

【0172】

さらに、植物細胞もまた宿主として利用可能であり、植物細胞と適合しうる制御配列、例えばカリフラワーモザイクウイルス35Sおよび19S、およびノパリンシンターゼプロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列が利用可能である。他の好ましい宿主は昆虫細胞、例えば、*Drosophila larva*である。昆虫細胞を宿主として用いる場合、*Drosophila*アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターを用いることができる(Rubin, *Science* 240:1453-1459, 1988)。あるいは、バキュロウイルスベクターを、昆虫細胞において本発明のキナーゼを大量に発現するよう遺伝子工学処理することができる(Jasny, *Science* 238:1653, 1987; Miller et al., *Genetic Engineering, Vol. 8, Plenum, Setlow et al., eds., pp. 277-297, 1986*)。

【0173】

酵母がグルコースの豊富な培地中で成長するとき大量に産生される解糖系酵素をコードする活発に発現されている配列からのプロモーターおよび終止要素を組み込んだ一連の酵母発現システムの任意のものを用いることができる。既知の解糖系遺伝子配列はまた、非常に効率的な転写制御シグナルを提供することができる。酵母は、翻訳後修飾を行うこともできる点において、実質的な利点を与える。強いプロモーター配列および高コピー数プラスミドを用いる多くの組換えDNA戦略が存在し、これを酵母において所望の蛋白質を製造するために用いることができる。酵母はクローン化された哺乳動物遺伝子のリーダー配列を認識して、リーダー配列を有するペプチド(すなわちプレペプチド)を分泌する。哺乳動物宿主における本発明のポリペプチドの発現にはいくつかの可能なベクター系が利用可能である。

【0174】

宿主の性質に応じて、広範な種類の転写および翻訳制御配列を用いることがで

きる。転写および翻訳制御シグナルは、制御シグナルが高レベルの発現を有する特定の遺伝子配列に関連しているウイルス起源、例えばアデノウイルス、ウシバピローマウイルス、サイトメガロウイルス、サルウイルス等から誘導することができる。あるいは、哺乳動物発現産物、例えばアクチン、コラーゲン、ミオシンなどからのプロモーターを用いることができる。転写開始制御シグナルは、遺伝子配列の発現を調節することができるように、抑制または活性化を可能とするものを選択することができる。興味深いものは、温度を変化させることにより発現を抑制または開始することができるように温度感受性であるか、化学物質（例えば代謝産物）制御を行うことができる制御シグナルである。

【0175】

本発明のポリペプチドの真核生物宿主における発現には、真核生物制御領域を使用することが必要である。そのような領域は、一般に、RNA合成の開始を指示するのに十分なプロモーター領域を含む。好ましい真核生物プロモーターには、例えば、マウスメタロチオネインI遺伝子配列のプロモーター（Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288, 1982）；ヘルペスウイルスのTKプロモーター（McKnight, Cell 31:355-365, 1982）；SV40初期プロモーター（Benoit et al., Nature (London) 290:304-31, 1981）；および酵母gal4遺伝子配列プロモーター（Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975, 1982；Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955, 1984）が含まれる。

【0176】

真核生物mRNAの翻訳は、最初のメチオニンをコードするコドンから開始される。この理由のため、真核生物プロモーターと、本発明のポリペプチド（またはその機能的誘導体）をコードするDNA配列との間の連結には、メチオニンをコードする介在コドン（すなわちAUG）が含まれないことを確実にすることが好ましい。そのようなコドンの存在は、融合蛋白質（AUGコドンが本発明のポリペプチドのコーディング配列と同じリーディングフレームにある場合）また

はフレームシフト変異（AUGコドンが本発明のポリペプチドのコーディング配列と同じリーディングフレームにない場合）の形成のいずれかをもたらす。

【0177】

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子および動作可能なように連結されたプロモーターは、レシピエントである原核生物または真核生物細胞中に、非複製DNAまたはRNA分子のいずれかとして導入することができ、これは、直線状分子またはより好ましくは閉環状分子のいずれでもよい。そのような分子は自己複製することができず、遺伝子の発現は導入された配列の過渡的発現により生ずる。あるいは、導入されたDNA配列が宿主染色体中にインテグレートされることにより永久発現が得られる。

【0178】

所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体中にインテグレートしうるベクターを用いることができる。導入されたDNAをその染色体中に安定にインテグレートしている細胞は、発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を可能とする1またはそれ以上のマーカーを導入することにより選択することができる。マーカーは、栄養要求性宿主に対する栄養、殺生物剤耐性（例えば抗生物質、または重金属、例えば銅）等を提供することができる。選択マーカー遺伝子配列は、発現させるべきDNA遺伝子配列に直接連結してもよく、または同じ細胞にコトランスフェクションにより導入してもよい。mRNAの最適な合成には追加の要素も必要であろう。これらの要素には、スプライシングシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終止シグナルが含まれる。そのような要素を組み込んだcDNA発現ベクターには、Okayama (Mol. Cell. Biol. 3: 280-289, 1983) により記載されるものが含まれる。

【0179】

導入された核酸分子は、レシピエント宿主中で自己複製可能なプラスミドまたはウイルスベクター中に取り込ませることができる。この目的のために広範な種類のベクターの任意のものを用いることができる。特定のプラスミドまたはウイルスベクターの選択において重要な因子には、ベクターを含むレシピエント細胞を認識しベクターを含まないレシピエント細胞から選択することの容易性；特定

の宿主において所望されるベクターのコピー数；およびベクターを異なる種の宿主細胞間で"シャトル"しうることが望ましいか否かが含まれる。

【0180】

好ましい原核生物ベクターには，E. coli 中で複製しうるプラスミド（例えば，，pBR322，ColE1，pSC101，pACYC184，VX；"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"，1989，上掲）などのプラスミドが含まれる。Bacillus プラスミドには，pC194，pC221，pT127等が含まれる（Gryczan，The Molecular Biology of the Bacilli，Academic Press，NY，pp. 307-329，1982）。適当なStreptomyces プラスミドには，p1J101（Kendall et al.，J. Bacteriol. 169: 4177-4183，1987），およびStreptomyces バクテリオファージ，例えばIC31（Chater et al.，Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology，Akademiai Kiado，Budapest，Hungary，pp. 45-54，1986）が含まれる。Pseudomonas プラスミドはJohn et al.（Rev. Infect. Dis. 8: 693-704，1986），およびIzaki（Jpn. J. Bacteriol. 33: 729-742，1978）により概説されている。

【0181】

好ましい真核生物プラスミドには，例えば，BPV，ワクチニア，SV40，2-ミクロンサークル等，またはそれらの誘導体が含まれる。そのようなプラスミドは当該技術分野においてよく知られている（Botstein et al.，Miami Wntr. Symp. 19: 265-274，1982；Broach，"The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance"，Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor，NY，p. 445-470

, 1981; Broach, Cell 28:203-204, 1982; Bollon et al., J. Clin. Hematol. Oncol. 10:39-48, 1980; Maniatis, Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563-608, 1980)。

【0182】

構築物を含有するベクターまたは核酸分子を発現用に用意した後、DNA構築物は、種々の適当な手段、すなわち、トランスフォーメーション、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈澱、直接マイクロインジェクション等により、適当な宿主細胞中に導入することができる。ベクターを導入した後、レシピエント細胞を、ベクター含有細胞の成長を選択する選択培地中で成長させる。クローニングされた遺伝子の発現により、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントが産生される。これは、トランスフォームした細胞中でそのまま起こるか、またはこれらの細胞を分化させるよう誘導した後に起こる（例えば、プロモデオキシウラシルを神経芽細胞腫等に投与することにより）。本発明のペプチドを形成するために、種々のインキュベーション条件を用いることができる。最も好ましい条件は、生理学的条件を模倣した条件である。

【0183】

IV. 本発明の蛋白質およびその発現パターン

当該技術分野において知られる種々の方法論を用いて、本発明のポリペプチドを得ることができる。ポリペプチドは、天然にポリペプチドを産生する組織または細胞から精製することができる。あるいは、上述の単離された核酸フラグメントを用いて本発明のポリペプチドを生物中で発現させることができる。本発明の試料には、細胞、蛋白質抽出物または細胞の膜抽出物、または生物学的液体が含まれる。試料は、アッセイフォーマット、検出方法、および試料として用いられる組織、細胞または抽出物の性質に基づいて様々であろう。

【0184】

起源生物が天然にそのようなポリペプチドを含む限り、任意の真核生物を本発明のポリペプチドの起源として用いることができる。本明細書において用いる場合、"起源生物"とは、その生物においてサブユニットが発現されているか、および最終的にそれから単離されたかにかかわらず、サブユニットのアミノ酸配列が由来する元の生物を意味する。

【0185】

当業者は、天然の夾雑物を含まないポリペプチドを得るために、蛋白質を単離する既知の方法に容易にしたがうことができる。これらには、限定されないが、サイズ排除クロマトグラフィー、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、および免疫アフィニティークロマトグラフィーが含まれる。

【0186】

Tks107 (Grub)

GrubのC末端におけるDH/PHドメインのタンデムアレイは、蛋白質のDb1ファミリーの顕著な特徴である。このファミリーの多くのメンバーは、N末端切断により細胞トランスフォーメーション活性を示す。細胞トランスフォーメーションには、DH/PHモジュールが無傷であることが必要である。

【0187】

Grub mRNAは、調べた全てのヒト組織で発現しており、特に脾臓および脾臓で高い発現が見られる(図11)。60種類の腫瘍細胞株についてGrubの発現レベルを測定し、13(-21%)種類の細胞株で有意に上昇していることが見いだされ、10またはそれ以上の細胞株でわずかに上昇しているかもしれない(図12)。欠失分析は、293細胞において両方を共発現させたときGrubがN末端においてSrcによりリン酸化されることを示す(図13)。293細胞中で発現させた組換えGrubは、見かけのMr約190,000で移動する(図13)。これは予測されるMrである164,701(一次アミノ酸配列に基づく)より大きい。この範囲のサイズの蛋白質のMrを正確に決定することはしばしば困難であり、GrubがそのMrを変更するかもしれない翻訳後修飾を有するか否かは明らかではない。

【0188】

Grubの正常および切断型変異体の過剰発現の結果の特性決定、特にこれらが細胞トランスフォーメーションを誘導するか逆転するかに着目したものが進行中である。組換え的に発現させた全長および切断型Grubを、小GTPaseの種々のメンバーに対するGEF活性の可能性について試験する。これらの組換え蛋白質を発現する安定なクローンが単離されるであろう。これらは成長速度、DNA合成、細胞接触阻害（フォーカス形成）、アンカー非依存性成長（軟寒天アッセイ）、およびヌードマウスにおける腫瘍原性について特性決定されるであろう。

【0189】

Tks113

Tks113 mRNAは調べたすべてのヒト組織で発現されており、精巣、心臓および骨格筋において最も高く発現される（図14）。これらの実験におけるTks113のmRNAの見かけのサイズは約2.4 kbである。さらに、Tks113のN末端に対して生成させた抗体は、NIH3T3細胞において約77 kDaの蛋白質を同定する。これらのデータに基づくと、Tks113は全長クローンではなさそうである（図15）。

【0190】

Tks118

Tks mRNAは、調べたすべての組織において発現しており、脾臓、胸腺、前立腺および末梢血リンパ球において最も発現が高い（図17）。Tks118 mRNAは試験した腫瘍細胞株の40%以上で過剰発現されている（図18）。293細胞において共発現させるとTks118はSrcによりリン酸化される（図19）。NIH3T3およびSrcでトランスフォームしたNIH3T3細胞においてTks118を過剰発現させると、アクチン様構造に局在化する（図20）。注目すべきことに、Tks118はSrcでトランスフォームした細胞においてはポドソームに局在化する（図20）。この局在化は、ドレブリンホモロジドメインに依存性であり、ドレブリンがアクチン構造に結合してこれを変化させるという先の報告と一致する。最近、m-SH3P7が抗原レセプター刺激リンパ球においてチロシンリン酸化され、NIH3T3細胞中のアクチン構造

に共局在することが示されている(Larbolette, O., MCB. 19: 1539-1546, 1999)。

【0191】

現在、我々は、Tks118がインビトロおよびインビボでアクチン構造に結合し、および/またはそれに影響を与えるか否かを決定している。種々のTks118構築物を細胞株で過剰発現させて、細胞成長、トランスフォーメーションおよび運動性に及ぼすTks118の影響を決定する。

【0192】

Tks202

tks202のDNAフラグメントを用いてMultiple Tissue Northern Blots(Clontech)を探索した。このことにより、内因性tks202 mRNAが約5 kbであり、前立腺および膵臓を除き、試験したほとんどの組織において非常に低いかまたは検出されないレベルで発現されていることが示された(図22)。

【0193】

小GTPaseは、典型的には約200アミノ酸であり、そのほとんどすべては単一のGTPaseドメイン中に折り畳まれている。そのように、Tks202は、そのGTPaseドメインへの顕著なN末端の延長を含む点において珍しい。この延長の存在は、Tks202(および類似の構造のまだ発見されていないGTPase)の、GTPaseについてこれまでに知られていない細胞での役割を示唆するかもしれず、またはGTPase活性を制御する新規なメカニズムであるかもしれないと推測することができる。

【0194】

V. Tks107, Tks113, Tks118またはTks202を検出するための抗体、ハイブリドーマ、使用方法およびキット

本発明はまた、本発明の全長または部分ポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体に関連する。そのような抗体は、本発明のポリペプチドに対するその結合親和性を他のポリペプチドに対する結合親和性と比較することにより単離することができる。本発明のポリペプチドに選択的に結合する抗体を、本発明

のポリペプチドと他のポリペプチドとを区別することを必要とする方法において用いるために選択することができる。そのような方法には、限定されないが、他のポリペプチドを含む組織における発現の変化の分析が含まれる。

【0195】

本発明のポリペプチドは、種々の手順および方法、例えば抗体の生成、医薬組成物の同定、およびDNA/蛋白質相互作用の研究において用いることができる。

【0196】

本発明のポリペプチドは、抗体またはハイブリドーマを生成するために用いることができる。当業者は、抗体が望まれる場合、そのようなペプチドを本明細書に記載されるように生成し、免疫原として用いることができることを認識するであろう。本発明の抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体のフラグメント、およびヒト化型が含まれる。本発明の抗体のヒト化型は、キメラ化またはCDRグラフティング等の当該技術分野において知られる手法の1つを用いて生成することができる。

【0197】

本発明はまた、上述のモノクローナル抗体、またはその結合フラグメントを産生するハイブリドーマに関する。ハイブリドーマは、特定のモノクローナル抗体を分泌することができる不死化細胞株である。

【0198】

一般に、モノクローナル抗体およびハイブリドーマを製造する手法は当該技術分野においてよく知られている(Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984; St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35:1-21, 1980)。抗体を生成することが知られている任意の動物(マウス、ウサギ等)を、選択されたポリペプチドで免疫することができる。免疫の方法は当該技

術分野においてよく知られている。そのような方法には、ポリペプチドの皮下または腹膜内注射が含まれる。当業者は、免疫に用いるポリペプチドの量は、免疫する動物、ポリペプチドの抗原性、および注入部位により様々であることを認識するであろう。

【0199】

ポリペプチドは、ペプチドの抗原性を増加させるために、修飾するかまたはアジュバント中で投与することができる。ポリペプチドの抗原性を増加させる方法は当該技術分野においてよく知られている。そのような方法には、抗原を異種蛋白質（例えばグロブリンまたは - ガラクトシダーゼ）とカップリングさせるか、または免疫の間にアジュバントを含めることが含まれる。

【0200】

モノクローナル抗体のためには、免疫した動物から脾臓細胞を切除し、ミエロマ細胞、例えばSP2/0-Ag14ミエロマ細胞と融合させ、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞とさせる。当該技術分野においてよく知られる多数の方法の任意のものを用いて、所望の特性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定することができる。これらには、ハイブリドーマをELISAアッセイ、ウエスタンブロット分析、またはラジオイムノアッセイを用いてスクリーニングすることが含まれる(Lutz et al., Exp. Cell Res. 175:109-124, 1988)。所望の抗体を分泌するハイブリドーマをクローニングし、当該技術分野において知られる方法を用いてクラスおよびサブクラスを決定する(Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", 上掲, 1984)。

【0201】

ポリクローナル抗体については、免疫した動物から抗体を含有する抗血清を単離し、上述の方法の1つを用いて所望の特異性を有する抗体の存在についてスクリーニングする。上述の抗体は、検出可能なように標識することができる。抗体は、放射性同位体、アフィニティー標識（例えばビオチン、アビジン等）、酵素

標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ，アルカリホスファターゼ等），蛍光標識（例えばFITCまたはローダミン等），常磁性原子等を用いて，検出可能なように標識することができる。そのような標識を行う方法は当該技術分野においてよく知られている。例えば，Stemberger et al. , J. Histochem. Cytochem. 18:315, 1970; Bayer et al. Meth. Enzym. 62:308-319, 1979; Engval et al. , Immunol. 109:129-135, 1972; Goding, J. Immunol. Meth. 13:215-226, 1976を参照。本発明の標識された抗体は，インビトロ，インビボ，およびインシトゥーアッセイに用いて，特定のペプチドを発現する細胞または組織を同定することができる。

【0202】

上述の抗体は，固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例には，プラスチック，例えばポリカーボネート，複合炭水化物，例えばアガロースおよびセファロース，アクリル樹脂，例えばポリアクリルアミドおよびラテックスビーズが含まれる。抗体をそのような固体支持体にカップリングさせる技術は当該技術分野においてよく知られている（Weir et al. , "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed. , Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10, 1986; Jacoby et al. , Meth. Enzym. 34, Academic Press, N. Y. , 1974）。本発明の固定化された抗体は，インビトロ，インビボ，およびインシトゥーアッセイに，ならびに免疫クロマトグラフィーに用いることができる。

【0203】

さらに，当業者は，合理的に設計された抗ペプチドペプチドを生成するために，現在利用可能な方法，並びに抗体に関して本明細書に記載される技術，方法およびキットを容易に適合させて，特定のペプチド配列に結合しうるペプチドを容易に生成することができる（Hurby et al. , "Applicati

on of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", In Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, NY, pp. 289-307, 1992; Kaspczak et al., Biochemistry 28: 9230-9238, 1989)。

【0204】

抗ペプチドペプチドは、本発明のポリペプチドのペプチド配列中に見いだされる塩基性アミノ酸残基を、疎水性および非荷電極性基を維持しながら酸性残基で置き換えることにより生成することができる。例えば、リジン、アルギニン、および/またはヒスチジン残基をアスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換え、およびグルタミン酸残基をリジン、アルギニンまたはヒスチジンで置き換える。

【0205】

本発明はまた、試料中においてTks107, Tks113, Tks118またはTks202ポリペプチドを検出する方法を包含する。該方法は、(a) 試料を、免疫複合体が形成するような条件下で上述の抗体と接触させ、そして(b) ポリペプチドに結合した前記抗体の存在を検出する、ことを含む。詳細には、該方法は、試験試料を1またはそれ以上の本発明の抗体とインキュベートし、抗体が試験試料に結合するか否かをアッセイすることを含む。試料中で本発明のポリペプチドのレベルが正常なレベルと比較して変化していることは疾病を示すかもしれない。

【0206】

抗体を試験試料とインキュベートする条件は様々である。インキュベーション条件は、アッセイにおいて用いられるフォーマット、用いられる検出方法、およびアッセイにおいて用いられる抗体のタイプおよび性質によって異なる。当業者は、慣用的に入手可能な免疫学的アッセイフォーマット(例えばラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ、拡散に基づくオクタロニー、またはロケット免疫蛍光アッセイ)の任意のものを、本発明の抗体を用いるために容易に適合させることができることを認識するであろう。そのようなアッセイの例は、Chard("An Introduction to Radioimm

unoassy and Related Techniques", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1986), Bullock et al. ("Techniques in Immunocytochemistry", Academic Press, Orlando, FL Vol. 1, 1982; Vol. 2, 1983; Vol. 3, 1985), Tijssen ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1985)に見いだすことができる。

【0207】

本発明の免疫学的アッセイ試験試料には、細胞、蛋白質または細胞の膜抽出物、または体液、例えば血液、血清、血漿または尿が含まれる。上述の方法において用いられる試験試料は、アッセイフォーマット、検出方法の性質およびアッセイすべき試料として用いられる組織、細胞または抽出物により様々であろう。蛋白質抽出物または細胞の膜抽出物を製造する方法は当該技術分野においてよく知られており、用いるシステムにより試験しうる試料を得るために容易に適合させることができる。

【0208】

キットは、先に記載した検出方法を実施するために必要な全ての試薬を含む。キットは、(i) 上述の抗体を含む第1の容器手段、および(ii) 抗体の結合パートナーと標識を含むコンジュゲートを含む第2の容器手段を含むことができる。好ましくは、キットは使用の指針も含む。別の好ましい態様においては、キットは以下の1またはそれ以上を含む1またはそれ以上の他の容器をさらに含む：洗浄試薬および結合した抗体の存在を検出しうる試薬。

【0209】

検出試薬の例には、限定されないが、標識第2抗体が含まれ、あるいは、一次抗体が標識されている場合には、標識された抗体と反応しうる発色団、酵素、ま

たは抗体結合試薬が含まれる。コンパートメント化キットは核酸プローブキットについて上述したようなものでもよい。当業者は、本発明に記載される抗体を、当該技術分野においてよく知られる確立されたキットフォーマットの1つに容易に取り込ませることができることを容易に認識するであろう。

【0210】

VI. 本発明のポリペプチドと相互作用する化合物の単離

本発明はまた、本発明のTks107, Tks113, Tks118またはTks202に結合しうる化合物を検出する方法に関する。該方法は、化合物を本発明のTks107, Tks113, Tks118またはTks202とともにインキュベートし、Tks107, Tks113, Tks118またはTks202に結合した化合物の存在を検出することを含む。化合物は、複雑な混合物、例えば、血清、体液、または細胞抽出物中に存在していてもよい。

【0211】

本発明はまた、Tks107, Tks113, Tks118またはTks202の活性または結合パートナー（例えばsrc）の活性のアゴニストまたはアンタゴニストを検出する方法に関する。該方法は、本発明のポリペプチドを産生する細胞を化合物の存在下でインキュベートし、ポリペプチド活性またはポリペプチド結合パートナーの活性のレベルの変化を検出することを含む。このようにして同定される化合物は、化合物の存在を示す活性の変化を生ずるであろう。化合物は、複雑な混合物、例えば、血清、体液、または細胞抽出物中に存在していてもよい。いったん化合物が同定されれば、当該技術分野においてよく知られる技術を用いてこれを単離することができる。

【0212】

本発明はまた、哺乳動物においてsrc-結合パートナー関連活性をアゴナイズ（促進）するかまたはアンタゴナイズする方法を包含する。該方法は、前記哺乳動物に、Tks107, Tks113, Tks118およびTks202ポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストを前記アゴニズムまたはアンタゴニズムを生ずるのに十分な量で投与することを含む。Tks107, Tks113, Tks118またはTks202関連機能をアゴナイズまたはアンタゴ

ナイズするのに十分な量のアゴニストまたはアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において、Tks107, Tks113, Tks118 またはTks202 活性のアゴニストまたはアンタゴニストを用いて、疾病を治療する方法もまた本発明に含まれる。

【0213】

疾病の新規な治療を発見することをめざして、生物医学研究者および化学者は、蛋白質ポリペプチドの機能を阻害する分子を設計し、合成し、試験してきた。いくつかの小さい有機分子は蛋白質ポリペプチドの機能を調節する化合物の一群を形成する。蛋白質キナーゼの機能を阻害することが報告されている分子の例としては、限定されないが、ビス単環式、二環式または複素環式アリール化合物 (PCT WO92/20642, 1992年11月26日公開, Maguire et al.), ビニレン-アザインドール誘導体 (PCT WO94/14808, 1994年7月7日公開, Ballinari et al.), 1-シクロプロピル-4-ピリジル-キノロン類 (米国特許5,330,992), スチリル化合物 (米国特許5,217,999), スチリル置換ピリジル化合物 (米国特許5,302,606), ある種のキナゾリン誘導体 (欧州特許出願0566266A1), セレオインドール類およびセレニド類 (PCT WO94/03427, 1994年2月17日公開, Denny et al.), 三環式ポリヒドロキシ化合物 (PCT WO92/21660, 1992年12月10日公開, Dow), およびベンジルホスホン酸化合物 (PCT WO91/15495, 1991年10月17日公開, Dow et al.) が挙げられる (これらのすべてを図面を含め本明細書の一部としてここに引用する)。

【0214】

細胞膜を横切ることができ、酸加水分解に耐性の化合物は、患者に経口投与された後に高度に生物利用性となることができるため、治療剤として利点を有する可能性がある。しかし、これらの蛋白質阻害剤の多くは、機能を弱くしか阻害しない。さらに、多くは種々の蛋白質キナーゼを阻害し、したがって、疾病の治療剤として多くの副作用を引き起こすであろう。

【0215】

しかし、ある種のインドリノン化合物は、酸耐性であり膜透過性である有機分子の一群を形成する。WO96/22976(1996年8月1日公開, Ballinari et al.)は、オキシインドール環に融合したテトラリン、ナフタレン、キノリン、およびインドール置換基を有する水溶性インドリノン化合物を記載する。これらの二環式置換基は、さらに、ヒドロキシル化アルキル、リン酸、およびエーテル成分等の極性成分で置換されている。"Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の米国特許出願08/702,232(1996年8月23日出願; Lyon&Lyon Docket No.221/187)および"Benzylidene-Z-Indoline Compounds for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の米国特許出願08/485,323(1995年6月7日出願; Lyon&Lyon Docket No.223/298)および国際特許出願WO96/40116(1996年12月19日公開, Tang, et al.)およびWO96/22976(1996年8月1日公開, Ballinari et al)(これらはすべて、図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)は、オキシインドール環に融合した他の二環式成分ならびに単環式成分を有するインドリノン化合物のインドリノン化学ライブラリを記載する。"Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の出願08/702,232(1996年8月23日出願; Lyon&Lyon Docket No.221/187), "Benzylidene-Z-Indoline Compounds for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の08/485,323(1995年6月7日出願; Lyon&Lyon Docket No.223/298), およびWO96/22976(1996年8月1日公開, Ba

llinari et al.) は、インドリノンの合成方法、細胞におけるインドリノン化合物の生物学的活性を試験する方法およびインドリノン誘導体の阻害パターンを教示する(いずれも、図面含め本明細書の一部としてここに引用する)。

【0216】

キナーゼ活性を調節することができる物質の他の例には、限定されないが、チロホスチン、キナゾリン、キノキソリン、およびキノリンが含まれる。上述のキナゾリン、チロホスチン、キノリン、およびキノキソリンには、よく知られる化合物、例えば文献に記載される化合物が含まれる。例えば、キナゾリン類を記載する代表的刊行物には、Barker et al., 欧州特許公開0520722A1; Jones et al., 米国特許. 4,447,608; Kabbe et al., 米国特許. 4,757,072; Kaul and Vougioukas, 米国特許. 5,316,553; Kreighbaum and Comer, 米国特許. 4,343,940; Pegg and Wardleworth, 欧州特許公開0562734A1; Barker et al., (1991) Proc. of Am. Assoc. for Cancer Research 32, 327; Bertino, J.R., (1979) Cancer Research 3, 293-304; Bertino, J.R., (1979) Cancer Research 9(2 part 1), 293-304; Curtin et al., (1986) Br. J. Cancer 53, 361-368; Fernandes et al., (1983) Cancer Research 43, 1117-1123; Ferris et al. J. Org. Chem. 44(2), 173-178; Fry et al., (1994) Science 265, 1093-1095; Jackman et al., (1981) Cancer Research 51, 5579-5586; Jones et al. J. Med. Chem. 29(6), 1114-1118; Lee and Skibo, (1987) Biochemistry 26(23), 7355-7362; Lemus et al., (1989) J. Org. Chem. 54, 3511-3518; L

ey and Seng, (1975) Synthesis 1975, 415 - 522; Maxwell et al., (1991) Magnetic Resonance in Medicine 17, 189 - 196; Mini et al., (1985) Cancer Research 45, 325 - 330; Phillips and Castle, J. (1980) Heterocyclic Chem. 17(19), 1489 - 1596; Reece et al., (1977) Cancer Research 47(11) - 2996 - 2999; Sculler et al., (1986) Cancer Immunol. and Immunother. 23, ASS; Sikora et al., (1984) Cancer Letters 23, 289 - 295; Sikora et al., (1988) Analytical Biochem. 172, 344 - 355 (これらすべては、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)が含まれる。

【0217】

キノキサリン類は, Kaul and Vougioukas, 米国特許5, 316, 553, (図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。

【0218】

キノリン類は, Dolle et al., (1994) J. Med. Chem. 37, 2627 - 2629; McGuire, J. (1994) Med. Chem. 37, 2129 - 2131; Burke et al., (1993) J. Med. Chem. 36, 425 - 432, - および Burke et al. (1992) Bio Organic Med. Chem. Letters 2, 1771 - 1774 (これらすべては、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。

【0219】

チロホスチン類は, Alien et al., (1993) Clin. Exp. Immunol. 91, 141 - 156; Anafi et al., (1993) Blood 82:12, 3524 - 3529; Baker et a

l., (1992) J. Cell. Sci. 102, 543-555; Bild
er et al., (1991) Amer. Physiol. Soc. pp.
6363-6143-.C721-C730; Brunton et al., (1
992) Proceedings of Amer. Assoc. Canc
er Rsch. 33, 558; Bryckaert et al., (1992
) Exp. Cell Research 199, 255-261; Dong
et al., (1993) J. Leukocyte Biology 53,
53-60; Dong et al., (1993) J. Immunol. 15
1(5), 2717-2724; Gazit et al., (1989) J.
Med. Chem. 32, 2344-2352; Gazit et al., (1
993) J. Med. Chem. 36, 3556-3564; Kaur et
al., (1994) Anti-Cancer Drugs 5, 213-2
22; King et al., (1991) Biochem. J. 275, 4
13-418; Kuo et al., (1993) Cancer Lette
rs 74, 197-202; Levitzki, A., (1992) The
FASEB J. 6, 3275-3282; Lyall et al., (19
89) J. Biol. Chem. 264, 14503-14509; Peter
son et al., (1993) The Prostate 22, 335
-345; Pillemer et al., (1992) Int. J. Canc
er 50, 80-85; Posner et al., (1993) Mole
cular Pharmacology 45, 673-683; Rendu
et al., (1992) Biol. Pharmacology 44(5)
, 881-888; Sauro and Thomas, (1993) Life
Sciences 53, 371-376; Sauro and Thoma
s, (1993) J. Pharm. and Experimental The
rapeutics 267(3), 119-1125; Wolbring e
t al., (1994) J. Biol. Chem. 269(36), 2247
0-22472; および Yoneda et al., (1991) Canc
er Research 51, 4430-4435; (これらはすべて、図面を含

めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。

【0220】

調節剤として用いることができる他の化合物には、オキシンドリノン、例えば、米国特許出願08/702,232(1996年8月23日出願、図面を含め本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるものが含まれる。

【0221】

VIIII. トランスジェニック動物

本発明に関連するトランスジェニック動物の製造には、種々の方法が利用可能である。DNAを雄前核と雌前核の融合前に受精可能卵の前核に注入するか、またはDNAを胚性細胞(例えば、2細胞胚の核)の核に注入した後、細胞分裂を開始させることができる(Brinster et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985)。本発明の無機イオンレセプターヌクレオチド配列を有するよう改変したウイルス、特にレトロウイルスを胚に感染させることができる。

【0222】

胚の内部細胞塊から誘導され培養中で安定化させた多能性幹細胞を、培養中で操作して本発明のヌクレオチド配列を取り込ませることができる。トランスジェニック動物は、そのような細胞を胚盤胞中に移植し、これを仮母に移植し、分娩させることにより製造することができる。トランスジェニック実験に適当な動物は、標準的な商業的供給源、例えばCharles River(Wilmington, MA), Taconic(Germantown, NY), Harlan Sprague Dawley(Indianapolis, IN)等から入手することができる。

【0223】

齧歯類胚を操作する方法およびDNAを接合子の前核に注入する方法は、当業者によく知られている(Hogan et al., 上掲)。魚、両生類卵および鳥類のためのマイクロインジェクション法は、Houdebine and Chourrout(Experientia 47:897-905, 1991)に詳述されている。DNAを動物の組織中に導入する他の方法は、米国特許

, 4, 945, 050 (Sandford et al., 1990年7月30日)に記載されている。

【0224】

一例にすぎないが、トランスジェニックマウスを製造するためには、雌マウスを過剰排卵誘発する。雌を雄といっしょに置き、交配した雌をCO₂窒息または頸部脱臼により殺し、切除した卵管から胚を回収する。まわりの丘細胞を除去する。次に、前核胚を洗浄し、注入時まで保存する。ランダムな周期の成人雌を精管切除雄と対にする。レシピエント雌はドナー雌と同じ時に交配させる。次に胚を外科的に移す。トランスジェニックラットを製造する方法はマウスの場合と類似する方法である (Hammer et al., Cell 63:1099-1112, 1990)。

【0225】

胚性幹 (ES) 細胞を培養し、次にエレクトロポレーション、リン酸カルシウム/DNA沈澱および直接注入等の方法を用いてDNAをES細胞中に導入することによりトランスジェニック動物を製造する方法もまた当業者によく知られている (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell, A Practical Approach, E. J. Robertson, ed., IRL Press, 1987)。

【0226】

ランダム遺伝子インテグレーションを含む場合には、本発明の配列を含むクローンを耐性をコードする遺伝子とともにコトランスフェクトすることができる。あるいは、ネオマイシン耐性をコードする遺伝子を、本発明の配列に物理的に連結させることができる。所望のクローンのトランスフェクションおよび単離は、当業者によく知られるいくつかの方法のいずれかを用いて実施することができる (E. J. Robertson, 上掲)。

【0227】

ES細胞中に導入されたDNA分子はまた、相同組換えのプロセスにより染色体中にインテグレートされることができる (Capecchi, Science 244:1288-1292, 1989)。組換え事象のポジティブ選択 (す

なわち, neo耐性) および二重ポジティブ - ネガティブ選択 (すなわち, neo耐性およびガンシクロビル耐性) の方法, および続くPCRによる所望のクローンの同定は, Capecchi, 上掲および Joyner et al. (Nature 338: 153 - 156, 1989) に記載されており, これらの教示は, 図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。この方法の最後の段階は, 標的とするES細胞を胚盤胞中に注入し, 胚盤胞を擬妊娠雌に移すことである。得られるキメラ動物を繁殖させ, 子孫をサザンブロッティングにより分析して, トランスジンを有する個体を同定する。非齧歯類哺乳動物および他の動物の製造方法は別の者により議論されている (Houdebine and Chourrout, 上掲; Pursel et al., Science 244: 1281 - 1288, 1989; and Simms et al., Bio/Technology 6: 179 - 183, 1988)。

【0228】

本発明は, 本発明のポリペプチドをコードするトランスジンはまたはポリペプチドの発現に影響する遺伝子を含むトランスジェニックの非ヒト哺乳動物を提供する。そのようなトランスジェニックの非ヒト哺乳動物は, ポリペプチドの導入の効果を研究するため, またはポリペプチドの発現を制御 (すなわち, 追加の遺伝子, アンチセンス核酸, またはリボザイムの導入により) するためのインビボ試験系として特に有用である。

【0229】

上述の参考文献はすべて, 図面を含め本明細書の一部としてここに引用する。

【0230】

"トランスジェニック動物"とは, 細胞中に人工的に挿入されたDNAを含む細胞を有する動物である。該DNAは, その細胞から発生した動物のゲノムの一部となる。好ましいトランスジェニック動物は, 霊長類, マウス, ラット, ウシ, ブタ, ウマ, ヤギ, ヒツジ, イヌおよびネコである。トランスジェニックDNAは, ヒトTks107, Tks113, Tks118またはTks202をコードすることができる。動物における自然の発現は, レセプターの発現を減少させるのに有効な量のアンチセンスRNAまたはDNAを与えることにより減少させ

ることができる。

【0231】

IX. 遺伝子治療

Tks107, Tks113, Tks118またはTks202遺伝子またはその遺伝子配列は、遺伝子治療においても有用である(総説としてMiller, Nature 357:455-460, 1992)。Millerは、進歩により、ポジティブな初期の結果を示したヒト遺伝子治療に対する実用的なアプローチが得られたと述べている。遺伝子治療の基本的な科学はMulligan (Science 260:926-931, 1993)に記載されている。

【0232】

1つの好ましい態様においては、Tks107, Tks113, Tks118またはTks202のコーディング配列を含む発現ベクターを細胞に挿入し、細胞をインビトロで成長させ、次にこれを大量に患者に注入する。別の好ましい態様においては、選択されたプロモーター(例えば、強いプロモーター)を含むDNAセグメントを、本発明の内因性遺伝子を含む細胞中に、プロモーターセグメントが内因性ポリペプチド遺伝子の発現を増強する様式で移送する(例えば、プロモーターセグメントをこれが内因性遺伝子に直接連結するように細胞内に移送する)。

【0233】

遺伝子治療は、腫瘍を標的とするポリペプチドcDNAを含むアデノウイルスの使用を含むことができる。全身ポリペプチドは、遺伝子工学処理した細胞の移植、そのようなポリペプチドをコードするウイルスの注入、または裸のDNAの適当な組織への注入により増加する。

【0234】

そのような複合体の活性を調節するために、標的細胞集団を、蛋白質複合体の1またはそれ以上の変更された形の成分を導入することにより改変することができる。例えば、標的細胞中における複合体成分の活性を減少させるか阻害することにより、そのような状態につながる異常なシグナル伝達事象を減少させ、阻害し、または逆転させることができる。蛋白質複合体の他の成分と相互作用する能

力を保持しているが、シグナル伝達において機能することができない成分の欠失またはミスセンス変異体を用いて、異常な、有害なシグナル伝達事象を阻害することができる。

【0235】

ウイルス、例えばレトロウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、いくつかのRNAウイルス、またはウシパピローマウイルスに由来する発現ベクターを用いて、本発明の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばcDNA）を標的細胞集団（例えば腫瘍細胞）に輸送することができる。当業者によく知られる方法を用いて、コーディング配列を含む組換えウイルスベクターを構築することができる（Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989）。あるいは、蛋白質配列をコードする組換え核酸分子を裸のDNAとしてまたは再構築系、例えば標的細胞への輸送のためのリポソームまたは他の脂質系において用いることができる（例えば、Felgner et al., *Nature* 337:387-8, 1989）。ヒト遺伝子治療において用いるための、プラスミドDNAを細胞内に直接輸送するいくつかの他の方法が存在し、これはプラスミドDNAを蛋白質に複合体化させることによりDNAを細胞上のレセプターにターゲティングすることを含む（Miller, 上掲）。

【0236】

最も簡単な形においては、遺伝子輸送は、単にマイクロインジェクション工程により細胞の核内に最小量のDNAを注入することにより行うことができる（Capecci, *Cell* 22:479-88, 1980）。組換え遺伝子は、いったん細胞内に導入されると、転写および翻訳に関する細胞の正常なメカニズムにより認識されることができ、遺伝子産物が発現される。より多数の細胞に

DNAを導入するための他の方法も試みられている。これらの方法には、DNAをCaPO₄で沈澱させピノサイトーシスにより細胞中に取り込ませるトランスフェクション(Chen et al., Mol. Cell Biol. 7:2745-52, 1987);細胞を高圧パルスに暴露して膜に穴をあけるエレクトロポレーション(Chu et al., Nucleic Acids Res. 15:1311-26, 1987);DNAを親油性ベヒクル中に封入し、これを標的細胞と融合させるリポフェクチン/リポソーム融合(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7417, 1987);および小さい発射体に結合させたDNAを用いる粒子衝撃(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-9572, 1990)が含まれる。DNAを細胞内に導入する他の方法は、DNAを化学的に修飾した蛋白質にカップリングさせることである。

【0237】

また、アデノウイルス蛋白質がエンドソームを不安定化させ、DNAの細胞への取り込みを促進しうることが示されている。アデノウイルスをDNA複合体を含む溶液と混合するか、または組換え遺伝子の取り込みおよび発現を実質的に改良する蛋白質架橋試薬を用いてアデノウイルスに共有結合したポリリジンにDNAを結合させる(Curiel et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6:247-52, 1992)。

【0238】

本明細書において用いる場合、"遺伝子輸送"とは、外来核酸分子を細胞中に導入する工程を意味する。遺伝子輸送は、一般に、遺伝子によりコードされる特定の産物の発現を可能とするために行われる。産物には、蛋白質、ポリペプチド、アンチセンスDNAまたはRNA、または酵素的に活性なRNAが含まれる。遺伝子輸送は、培養細胞中で、または動物への直接投与により行うことができる。一般に、遺伝子輸送には、核酸を非特異的レセプター媒介性相互作用により標的細胞と接触させ、核酸を膜を通してまたはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込ませ、核酸を原形質膜またはエンドソームから細胞質内に放出させる工程が

含まれる。さらに、発現には、核酸が細胞の核に移動し、転写のための適当な核因子に結合することが必要である。

【0239】

本明細書において用いる場合、"遺伝子治療"とは、遺伝子輸送の1つの形であり、本明細書において用いられる遺伝子輸送の定義の中に含まれ、特にインビボでまたはインビトロで細胞から治療用産物を発現させるための遺伝子治療を表す。遺伝子輸送は、細胞でエクスピボで行い、次に患者に移植することにより、または、核酸または核酸蛋白質複合体を患者に直接投与することにより、行うことができる。

【0240】

別の好ましい態様においては、Tks107、Tks113、Tks118またはTks202ポリペプチドをコードする核酸配列を有するベクターが提供され、ここで、核酸配列は特定の組織においてのみ発現される。組織特異的遺伝子発現を行う方法は、国際公開WO93/09236(1992年11月3日出願、1993年5月13日公開)に記載される。

【0241】

上述の参考文献はすべて、図面を含め本明細書の一部としてここに引用する。

【0242】

上述したすべてのベクターにおいて、本発明のさらに別の観点は、ベクターに含まれる核酸配列が、核酸の配列の一部または全てについて、上で定義したような付加、欠失または修飾を含んでいてもよいことである。

【0243】

別の好ましい態様においては、遺伝子置換の方法が記載される。本明細書において用いる場合、"遺伝子置換"とは、インビボで発現しうる核酸配列を動物に供給し、このことによりその動物に欠失しているかまたは不完全な内因性遺伝子の機能を提供することを意味する。

【0244】

X. 物質の投与

患者に投与すべき化合物の量を決定する方法、および化合物を生物に投与する

モードは、米国特許08/702,282(1996年8月23日出願)および国際公開WO96/22976(1996年8月1日公開)に記載されており、これらの両方とも、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。当業者は、そのような記載が本発明に適用可能であり、これに容易に適合しうることを理解するであろう。

【0245】

適切な投与量は、種々の因子、例えば、治療している疾病のタイプ、用いられる特定の組成物、および患者のサイズおよび生理学的状態等に依存する。本明細書に記載される化合物の治療的に有効な用量は、最初に細胞培養および動物モデルから見積もることができる。例えば、動物モデルにおいて、最初は細胞培養アッセイにおいて決定された IC_{50} を考慮して循環濃度範囲を達成するような用量を処方することができる。動物モデルのデータを用いて、ヒトにおいて有用な用量をさらに正確に決定することができる。

【0246】

薬剤および代謝産物の血漿半減期および血漿、腫瘍、および主要な臓器における生物学的分布を決定して、疾患を阻害するのに最も適当な薬剤の選択を容易にすることができる。そのような測定を実施することができる。例えば、薬剤で処置した動物の血漿についてHPLC分析を行い、X線、CATスキャン、およびMRI等の検出方法を用いて放射性標識した化合物の位置を決定することができる。スクリーニングアッセイにおいて強力な阻害活性を示すが、不十分な薬物動力的特性を有する化合物は、化学構造の変更および再試験により最適化することができる。この点に関しては、優れた薬物動力的特性を示す化合物をモデルとして用いることができる。

【0247】

毒性研究は、血液細胞組成物を測定することにより実施することもできる。例えば、以下のようにして、適当な動物モデルにおいて毒性研究を行うことができる1)化合物をマウスに投与し(未処置対照マウスも用いなければならない); 2)各処置群の1匹のマウスの尾部静脈から定期的に血液試料を採取し;そして 3)試料を、赤血球および白血球数、血液細胞組成物、およびリンパ球対多形核

細胞のパーセントについて分析する。各用量計画および対照からの結果の比較は、毒性が存在するか否かを示す。

【0248】

各毒性研究の終わりに動物を犠牲にすることにより（好ましくは、the American Veterinary Medical Association guidelines Report of the American Veterinary Medical Assoc. Panel on Euthanasia, Journal of American Veterinary Medical Assoc. / 202:229-249, 1993 にしたがって）、さらなる研究を実施することができる。次に、各処置群の代表的動物を、肉眼剖検により転移の直接証拠、異常な不健康、または毒性について調べることができる。組織の肉眼異常を記録し、組織を組織学的に調べる。体重または血液成分の減少を引き起こす化合物、および主要な臓器に有害な影響を有する化合物はあまり好ましくない。一般に、有害な影響が大きければ大きいほど、化合物はより好ましくない。

【0249】

癌の治療においては、疎水性薬剤の予測される1日用量は1 - 500 mg / day, 好ましくは、1 - 250 mg / day, 最も好ましくは、1 - 50 mg / day の範囲である。薬剤は、活性成分の血漿レベルが治療の有効性を維持するのに十分であるかぎり、より少ない頻度で投与することができる。

【0250】

血漿レベルは薬剤の有効性を反映するはずである。一般に、化合物が強力であればあるほど、有効性を達成するのに必要な血漿レベルは低い。

【0251】

実施例

以下の実施例は限定的なものではなく、単に本発明の種々の観点および特徴の代表例にすぎない。

【0252】

リン酸化スクリーニング

Src基質を同定するために用いたリン酸化スクリーニング法は、先に報告されている(Lock, P., et al. EMBO J. 17(15):4346-4357, 1998)。NCIH460 ZAPライブラリからの約 1.2×10^6 個のプラークおよびColo205 ZAPIIライブラリ(Stratagene)からの 4.9×10^5 個のプラークを150mmペトリ皿に播種した。プレートに10mMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)に浸漬したニトロセルロースフィルターで覆い、37°Cで16時間インキュベートして、組換えlacZ融合蛋白質の発現を誘導した。レプリカフィルターをTEST(10mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100)中でよく洗浄し、次にキナーゼ緩衝液(10mM MgCl₂および2mM MnCl₂を含むTBST)中で1時間平衡化した。フィルターを3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むキナーゼ緩衝液中で室温で1時間ブロッキングした。組換え蛋白質は、フィルターを1/10または1/20容量のバキュロウイルス由来ヒトSrc, 250μMATPおよび100μMオルトバナジン酸ナトリウムを含むSf9抽出物を補充したキナーゼ緩衝液中で、30°Cで60分間インキュベートすることによりリン酸化した。フィルターをキナーゼ緩衝液のみで簡単に洗浄し、次にストリッピング緩衝液(62.5mM Tris-HCl pH7.0, 2% SDS, 100mM 2-メルカプトエタノール)中で50°Cで30分間インキュベートして、スクリーニングを妨害するかもしれない付随している可能性のあるリン蛋白質、例えばSrcそれ自体またはSf9細胞由来蛋白質を除去した。チロシンリン酸化蛋白質は、抗ホスチロシンモノクローナル抗体、4G10で、標準的な免疫プロットング法を用いて検出した。陽性の第一次クローンを単離し、SM緩衝液(0.1M NaCl, 8mM MgSO₄·7H₂O, 50mM Tris 7.5, 0.01%ゼラチン)中に抽出し、追加の2ラウンドのリン酸化スクリーニングにより精製した。精製したクローンのpBluescriptファージミドをZAPクローンから切り出し、ExAssistヘルパーファージを用いて、製造元の指針にしたがって(Stratagene)SOLR細胞に導入した。

【0253】

ラムダブラークスクリーニングおよびノザンハイブリダイゼーション

約360,000個のNCIH460 ZAPライブラリブラークをNCZY Mプレートに播種し, ニトロセルロースフィルター上に持ち上げた。フィルターを変性し(0.5M NaOH, 1.5M NaCl), 中和し(0.5M Tris 7.4, 1.5M NaCl), 80 で焼き, ハイブリダイゼーション緩衝液(5X SSPE, 10X デンハルト, 2% SDS, 50%ホルムアミド, 0.1mg/mL サケ精子DNA) 中で3-6時間プレハイブリダイズさせた。元の1.6kb RI/XhoI tks107フラグメント(切り出したファージミドより)を精製し, Boehringer MannheimのRandom Primed DNA Labelling Kitを用いて標識し, QiagenのQiaQuick PCR精製キットを用いて精製した。新鮮なハイブリダイゼーション緩衝液中で42 で一夜ハイブリダイゼーションする間, フィルターをこの標識フラグメントで探索した。次に室温, 2X SSC, 0.05% SDS, 10分間で3回, および0.1X SSC, 0.1% SDS, 50 で20分間で2回洗浄した。フィルターを風乾し, 増感スクリーン1枚を用いて-80 で一夜X-OMAT-ARフィルム(Kodak)を感光させた。陽性ブラークを単離し, 続くハイブリダイゼーションスクリーニングのラウンドにより均一になるまで精製した。精製クローンのpBluescriptファージミドを ZAPクローンから切り出して, 上述したようにSOLR細胞に導入した。

【0254】

約270,000個のTriplex-前立腺ライブラリブラーク(Clontech)を, 元のTks202クローンから得られた約500bpのEcoRI/XbaIフラグメントで同様に探索した。このフラグメントをReady to Go DNA Labelling Beadsを用いてランダムプライム標識し, Probe Quant G-50マイクロカラム(Pharmacia)で精製した。

【0255】

Human Multiple Tissue Northern Blots IおよびII(Clontech)を, tks107クローンからの1.6

k b E c o R I / X h o I フラグメント, T k s 1 1 3 クローンからの 1 . 5 k b E c o R I フラグメント, T k s 1 1 8 クローンからの 1 . 6 k b E c o R I / X h o I フラグメント, および T k s 2 0 2 クローンからの約 5 0 0 b . p . E c o R I / X b a 1 フラグメントを用いて, 上述したものと同一標識, ハイブリダイゼーションおよび洗浄プロトコルでハイブリダイズさせた。各プローブの間では, 0 . 5 % S D S 中で 1 0 分間煮沸し, 2 X S S C で洗浄することによりプロットをはがした。

【0256】

構築物

すべての分子生物学的手法および緩衝液は S a m b r o o k , e t . a l . 1 9 8 9 に記載されるように実施し調製した。

【0257】

4 . 6 5 k b N a r I / P v u I フラグメント (T k s 1 0 7 の全オープンリーディングフレーム [O R F] および約 9 0 n . t . の 3 ' 非翻訳領域 [U T R] を含む) を p C M V n e o M y c 2 の E c o R V 部位にクローニングすることにより, p C n M - 1 0 7 を構築した。このことにより, C M V プロモーターの転写制御下にある N 末端 M y c タグ付き全長 T k s 1 0 7 が作成された。p C n M - 1 0 7 の C 末端にインフレームの 4 6 6 アミノ酸欠失を含む p C n M - 1 0 7 N は, p C n M - 1 0 7 を B s t E I I / X h o I で消化し, d N T P および T 4 ポリメラーゼでフィルインし, T 4 D N A リガーゼで再閉鎖することにより作成した。p C n M 2 の M y c タグに融合された t k s 1 0 7 の C 末端の 4 7 7 a . a . からなる p C n M - 1 0 7 C は, p C n M - 1 0 7 の B a m H I / B s t E I I フラグメントのインフレーム欠失により作成した。p C A N M y c - G r u b D H / P H は, G r u b の D H / P H ドメインのみをコードする B a m H I / X h o I P C R フラグメントを p C A N - M y c A の B a m H I / X h o I 部位にクローニングすることにより生成した。P C A N - M y c A は, ポリリンカー中に挿入された M y c タグを有する p C D N A 3 (I n v i t r o g e n) 誘導体である。P C R に用いたプライマーは, C C C C G G A T C C G A G C G C A A G C G A A G C A T および A A C T C C T C G A G C T A G G C T G C C

TGTCTCCAC (イタリックのヌクレオチドはBamHIまたはXhoI部位を表す; 下線のCTAは遺伝子工学に作成された終止コドンである)であった。PCAN-Myc-GrubDHは, GrubのDHドメインのみをコードするBamHI/XhoI PCRフラグメントをpCANMycAにクローニングすることにより作成した。PCRに用いたプライマーは, 以下のとおりであった: CCGGATCCGAGCGCAAGCGAAGCATおよびCACCTCGAGCTACGCTTCCACGGCCAGCAGGTC (イタリックのヌクレオチドはBamHIまたはXhoI部位を表す; 下線のCTAは遺伝子工学的に作成された終止コドンである)。

【0258】

tk s 1 1 8の約330 n . t .のBamHI/NcoI PCRフラグメントは, T k s 1 1 8の5'コーディング領域にBamHI部位を融合させることにより生成した。NcoI部位はT k s 1 1 8に天然に見いだされる。用いたプライマーは以下のとおりであった: 5'プライマー, GCTGGGATCCGATCTATGCGCGCGAACCTG (配列番号9) (イタリックのヌクレオチドはBamHI部位を表す; 下線のATGはT k s 1 1 8の開始メチオニンである); 3'プライマー, TGAAAGCTGTAGTTGGCACCTGA (配列番号10)。このPCR産物を用いて, t k s 1 1 8中のBamHI/NcoIフラグメントを置き換えた。このことにより, すべての5'UTRが効率よく削除された。得られた構築物(全長t k s 1 1 8をコードする)からのBamHI/HindIIIフラグメントをpCnM2のBamHI/EcoRV部位にクローニングしてpCnM-118を得た。D r e s hのSH3ドメインを欠失する発現構築物pCnM-118 SH3は, pCnM-118のBamHI/XcmIフラグメントをpCnM2のBamHI/EcoRV部位にクローニングすることにより作成した。T k s 1 1 8のSH3ドメインのみを発現する構築物pCnM-118 SH3は, pCnM-118のXcmI/Asp718フラグメントをpCnM2のStuI/Asp718部位にクローニングすることにより作成した。

【0259】

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)に融合したTks118のSH3ドメインを発現する構築物は、プライマー5'CGCGAATTCCGGGCTCAGTGGGCAAGGG(配列番号11)およびGGGCTCGAGTCACTCAATGAGCTCCAC(配列番号12)3'を用いてSH3ドメインをPCR増幅し、EcoRI/XhoIで消化し、pGEX-4T-3(Pharmacia)の同じ部位にクローニングすることにより作成し、プラスミドpGEX-118SH3を得た。

【0260】

GSTに融合したtks113のN末端を発現する構築物は、EcoRI/tks113フラグメントをpGEX-4T-3中にクローニングすることにより作成して、pGEX-113aを得た。Tks113のC末端をコードするAsp718/XhoIフラグメントをpGEX-113aから欠失させて、pGEX-113cを得た。

【0261】

5' RACE - PCR

Tks202の5'末端を伸長させるために5'RACE PCRを改変した。第1鎖cDNAは、オリゴDTプライミング逆転写によりヒト膵臓mRNAから作成した。第2鎖は、オリゴ(ML2G)AAGTGGCAACAGAGATAACGCGTACCGGGでプライミングした。ML2Gの3'末端の3個のGはリバーストランスクリプターゼにより転写産物の末端に付加された非特異的なCの列と塩基対形成する。Tks202の5'RACE PCR反応は、配列GGCTGGTTCGGCCACTTGAGGGのtks202特異的プライマーおよびML2Gを用いて、GC-RichPCRキット(Roche Molecular Biochemicals)を用いて行った。PCR反応産物をアガロースゲルで分離し、ニトロセルロースに移し、ランダムプライム(Ready to Go Beads, Pharmacia)標識したTks202-17の5'末端からの550ntDNAフラグメントとハイブリダイズさせた(上述のように)。約500bpの標識されたバンドを切り出し、TopoTAクローニングキット(Invitrogen)を用いてpCR2.1Topo中に

クローニングした。所望の挿入物を有するコロニーを、同じ t k s 2 0 2 - 1 7 プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションにより同定した。これらのコロニーからのDNAを調製し配列決定した。

【0262】

細胞培養およびDNAトランスフェクション

活性化トリSrcアレルY527F (NIH3T3 - Y527F) を安定に発現する293, NIH3T3, およびNIH3T3細胞株を、10% FCSおよび抗生物質を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で成長させた。DNAトランスフェクションの前日に、コンフルエントの293細胞を1:10に、またはNIH3T3を1:5に分割した。リポフェクタミン (Gibco) またはエフェクテン (Qiagen) を用いて、製造元の指針にしたがって、細胞を0.1 - 5 µgのDNAで4 - 20時間トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をDMEM, 10% FCS, および抗生物質中で一夜回復させた。

【0263】

抗体

GST-DreshSH3およびGST-113c融合蛋白質の産生を細菌中で誘導し、グルタチオン-アガロースビーズ (Pharmacia) で精製した。400 mLの誘導物からの細胞ペレットを、100 mg/mL リゾチウム, 10 µg/mL アプロチニン, 20 µM ロイペプチンおよび100 µM (PMSF) を含む30 mLの10 mM Tris 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (STE) に再懸濁し、超音波処理して細胞を溶解させた。溶解物を17 Kgで15分間遠心分離した。10 mLのPBSを上清に加え、Tween 20を加えて最終濃度0.1%とした。これをグルタチオン-アガロースカラムに負荷し、0.1% Tween 20を含むPBSでよく洗浄した。融合蛋白質は、75 mM Heps 7.5, 150 mM NaCl, 200 mM グルタチオン, 5 mM DTT および0.1% オクチルグルコシドを用いて溶出した。溶出物をPBSに対して透析した。

【0264】

ポリクローナル抗体は、ウサギを2つの融合蛋白質 (Animal Pharm

)で免疫することにより生成した。抗体は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で沈澱させ、PBS中に再懸濁し、GSTとカップリングさせたカラムを通してGST特異的抗体を除去した。得られた溶出物をCN-Br活性化セファロース4B(Pharmacia)にカップリングさせたGST融合蛋白質を含むカラムを通すことにより、アフィニティー精製した。

【0265】

細胞溶解，免疫沈澱，免疫ブロッティング

溶解用の細胞は、(PBS + Na_3VO_4)中で洗浄し、 $100\mu\text{MNa}_3\text{VO}_4$ 、 10mMNaF 、 $0.5 - 2.0\text{mMDTT}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ アプロチニン、 $20\mu\text{M}$ ロイペプチンおよび $100\mu\text{M}$ フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)を含む、RIPA溶解緩衝液($20\text{mMTris}7.5$ 、 150mMNaCl 、 $1\%\text{TX}100$ 、 1% デオキシコール酸、 $0.1\%\text{SDS}$)またはHNTG(1.5mMMgCl_2 、 150mMNaCl 、 $50\text{mMHepes}7.5$ 、 $10\%\text{グリセロール}$ 、 $1\%\text{TX}100$ 、 1mMEGTA)中で溶解した。抽出物は $16,000\text{g}$ で10分間の遠心分離により透明にした。

【0266】

$2 - 20\mu\text{g}$ の9E10抗体または12CA5および $20\mu\text{L}$ のプロテインA/G(Santa Cruz Biotechnology)とともに4で4時間インキュベートすることにより、約 $0.2 - 5.0\text{mg}$ の総蛋白質を免疫沈澱した。免疫複合体を溶解緩衝液で4回洗浄し、 $45\mu\text{l}$ のSDS試料緩衝液($80\text{mMTris}6.8$ 、 $2\%\text{SDS}$ 、 $10\%\text{グリセロール}$ 、 1.25% プロモフェノールブルーおよび 280mM -メルカプトエタノール)に再懸濁し、95で3-5分間加熱した。試料をSDS-PAGEに供し、Millipore半乾燥ブロッティング装置を用いて、ニトロセルロース膜(MSI)上に免疫プロットした。

【0267】

フィルターを $3\%\text{BSA}$ または 2% 無脂乾燥乳を含むTBST($25\text{mMTris}7.5$ 、 150mMNaCl および $0.1\%\text{Tween}20$)中で、室温で1時間ブロッキングした。フィルターをブロッキング緩衝液中で一次抗体ととも

に、以下の希釈率を用いて1時間インキュベートした：12CA5，9E10，および4G101：5000；抗cst1，1：200；抗118SH3（5033）および抗tk118（5029），1：1000。フィルターをTBSTで3×10分間洗浄し、ブロッキング緩衝液中1：10000のロバ抗ウサギHRP（Amersham）またはヤギ抗マウスHRP（Amersham）中で1時間インキュベートした。フィルターを上述したように洗浄し、増強化学発光（SuperSignal，Pierce）をFujifilmフィルムと組み合わせて蛋白質バンドを検出した。

【0268】

細胞染色

NIH3T3またはNIH3T3-Y527F細胞を1：5でコンフルエントの皿からカバースリップに分けた。細胞を上述および明細書本文に記載の種々のプラスミドでトランスフェクトした。カバースリップ上の細胞をPBS中3%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS中0.2%TX100で透過性にした。細胞をPBST中0.2%TX100，0.2%BSAで希釈した種々の組み合わせの抗体で染色した。用いた一次抗体は1/50に希釈した。第2抗体も1：50に希釈し、これは、Rabbit-TexRed（ImmunoResearch）およびMouse-Oregon-Green（MolecularProbe）であった。細胞はまた、ビス-ベンジミドで染色して、核を染色した。

【0269】

JNKキナーゼアッセイ

293細胞をpCAN-HA-JNKおよび種々の発現プラスミドでトランスフェクトした。細胞をHNTG中で溶解し、0.2mgを12CA5を用いて4時間免疫沈澱させた。免疫沈澱物を溶解緩衝液で3回、キナーゼ緩衝液（25mM HEPES 7.6，20mM MgCl₂，2mM DTT，100μM Na₃VO₄，1mM PMSF）で2回洗浄した。各免疫沈澱物の1/2をアクリルアミドゲルに流し、HA-JNK発現レベルについてウエスタンブロットを行った。残りを、20μM ATP，5μCi P³²ATP，および5μgのGST-Jun1-223を含む30μlのキナーゼ緩衝液に再懸濁し、30℃で30分間イン

キュベートした。7 μ lの5 x Laemmli 試料緩衝液で反応を停止し、沸騰させ、10% SDS - PAGEゲルで分離し、乾燥し、フィルムに露光した。GST - Junバンドを切り出し、シンチレーションカウンターで計数した。

【0270】

2 - ハイブリッドスクリーニング

pCnM - 107NからのGrubのN末端ドメインをコードするBamHIフラグメントを、pEG202のBamHI部位にクローニングして、pEG - 107Nを作成した。このプラスミドは、DNA結合ドメインLexAに融合されたGrubのN末端をコードする。このおとり構築物を*S. cerevisiae* EGY48株に導入して、得られる株を製造した。EGY48は、LEU2およびLexA結合部位を有する合成プロモーターの制御下にある - ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。酵母発現ベクターpJG45中のHelacDNA発現ライブラリを、得られた株にトランスフォームした(Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) Cell 75, 791 - 803)。約 1.8×10^6 個のトランスフォーマントを相互作用クローンについてスクリーニングした。6個の独立したcDNAは、先に単離された遺伝子スナピン(Dardi, et al. Nature Neuro. (1999) 2, 119 - 124)と同一であることが見いだされた。2個の独立した重複クローンは、ラットRACK1のヒトのオルトログであることが見いだされた(Ron, D., et al. P.N.A.S. (1994) 91, 839 - 843)。

【0271】

結論

当業者は、本発明が、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るのによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される分子複合体および方法、手順、処理、分子、特定の化合物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して

種々の置換および変更をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。

【0272】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。すべての特許および刊行物は、それぞれの刊行物が特定の個々に本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

【0273】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定的に開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、"・・・を含む"、"・・・から本質的になる"および"・・・からなる"との用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いた用語および表現は、説明の用語として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではない。特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。

【0274】

すなわち、好ましい態様および任意の特徴により本発明を特定的に開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および変種が可能であり、そのような変更および変種も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【0275】

さらに、発明の特徴および観点がマーカッシュグループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、マーカッシュグループのメンバーの個々のメンバーまたはサブグループに関してもまた記載されていることを認識するであろう。例えば、Xが、臭素、塩素およびヨウ素からなる群より選択されるとして記載されている場合、Xが臭素である特許請求の範囲およびXが臭素および塩素である特許請求の範囲も完全に記載されている。

【0276】

遺伝コードの縮重の観点から、核酸の他の組み合わせもまた本明細書のペプチドおよび蛋白質をコードする。例えば、GCT, GCC, GCA, GCGの4つの核酸配列はすべてアミノ酸アラニンをコードする。したがって、あるアミノ酸について平均で3つのコドンが存在し、100アミノ酸の長さのポリペプチドは平均で3100、もしくは 5×10^{47} 種類の核酸配列によりコードされるであろう。すなわち、日常的な方法を用いて過度の実験なしに、核酸配列を改変して第1の核酸配列によりコードされるものと同じポリペプチドをコードする第2の核酸配列を形成することができる。すなわち、特許請求の範囲に記載されるペプチドおよび蛋白質をコードするすべての可能な核酸もまた、コドン使用、特にヒトにおいて好ましいものを完全に考慮してこれらがすべて書き出されているように、本明細書に完全に記載されている。さらに、ポリペプチドの有意な活性が変更しない配列の領域内において、ポリペプチドのアミノ酸配列、またはそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列の変更が生ずるよう設計または選択することができる。例えば、ポリペプチドの活性部位と離れたターン中で、アミノ酸変化を生じさせることができる。また、欠失（例えば活性部位に影響を与えないポリペプチドのセグメントまたはそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列を除去する）および付加（例えば、活性部位の機能に影響を与えずに、ポリペプチド配列により多くのアミノ酸を付加する、例えばGST融合蛋白質を形成する、または活性部位の機能に影響を与えずにそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列に付加する）もまた本発明の範囲内である。ポリペプチドに対するそのような変更は、当業者が日常的な方法を用いて過度の実験なしに行うことができる。すなわち、本発明のペプチドまたは蛋白質の有意な活性に影響を与えないと容易に決定することができるすべての可能な核酸および/またはアミノ酸配列もまた本明細書に完全に記載されている。

【0277】

本明細書においては、発明を広くかつ一般的に記載している。一般的開示に含まれるより狭い種および亜属のそれぞれのグループもまた本発明の一部を形成する。これには、除かれたものが具体的に記載されているか否かにかかわらず、属から任意の主題を除く「ただし・・・」またはネガティブ限定を含む発明の一般

的記載が含まれる。

【0278】

他の態様も特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、Tks107のヌクレオチド配列（配列番号1）を示す

。

【図2】 図2は、Tks113のヌクレオチド配列（配列番号2）を示す

。

【図3】 図3は、Tks118のヌクレオチド配列（配列番号3）を示す

。

【図4】 図4は、Tks202のヌクレオチド配列（配列番号4）を示す

。

【図5】 図5は、Tks107の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号5）を示す。

【図6】 図6は、Tks113の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

【図7】 図7は、Tks118の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号7）を示す。

【図8】 図8は、Tks202の翻訳されるアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

【図9】 図9は、dbl,cdc24,vav,tiam,fgdlおよびGrubのdblホモロジー（DH）ドメインの隠れマルコフモデル（HMM）アラインメントを示す。

【図10】 図10は、Grubプレクストリンホモロジー（PH）ドメインと、dbl,tiam,およびfgdlのPHドメインの隠れマルコフモデル（HMM）アラインメントを示す。

【図11】 図11は、種々の組織におけるGrubの発現を示す。

【図12】 図12は、正常組織およびNCI腫瘍細胞におけるGrubの発現を示す。

【図13】 図13は、293細胞におけるGrubとSrcの共発現を示す。

【図14】 図14は、種々の組織におけるTks113の発現を示す。

【図15】 図15は、Tks113特異的抗体を示す。

【図16】 図16は、Tks118とmSH3P7、ドレブリンEおよびSrcのSH3ドメインのアミノ酸配列アラインメント(J. Heinの方法を用いるMegAlign)を示す。

【図17】 図17は、種々の組織におけるTks118の発現を示す。

【図18】 図18は、正常組織およびNCI腫瘍細胞におけるTks118の発現を示す。

【図19】 図19は、293細胞におけるTks118とSrcの共発現を示す。

【図20】 図20は、NIH3T3-Y527F細胞の抗Tks118(5033)および抗ピンクリン(Upstate Biotechnology)の共染色を示す。

【図21】 図21は、Tks202のC末端と、c-melおよびrab8のアラインメント(Clustal法を用いるMegAlign)を示す。

【図22】 図22は、種々の組織におけるTks202の発現を示す。

【図23】 図23は、Grubの5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【図24】 図24は、Tks113の5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【図25】 図25は、Tks118の5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【図26】 図26は、Tks202の5つの他のリーディングフレームの翻訳を示す。

【図 1 A】

CGCTGAAGGGCGGGCGGGAGGGGGCGGCGCTCTCGGCCCTCCCTGGCGGGGCCCGCGGCCCTTGAAGCCGGAGCGGGCC
 GAGCCGCCACCCGGCCGGAGCTGTCCCTTAGCCAGACCAGGCGAGACACGAGCGGGGGAGGGAGGGTGGCGGCC
 GGCCCGCCCGCCCGACCAAGCGTCGGACSCGGCCCGGCGCGGACATGGAGCCTGAGCCAGTGGAGGACTGTGTGCAG
 AGCACTCTCGCCGCCCTGTATCCACCCCTTTGAGGCAACAGCCCCACCCCTGTTGGGCCAGGTGTTCCAGGTGGTGGAGAG
 GACTTATCGGGAGACGCACCTGAGGTACACGCTGGACTTCTGGTACCAGCCAAGCACCTGCTTCCAAAGTCCAGCAGG
 AAGCCTGTGCCAATACAGTGGATTCCCTCTTCCATGAGGGTGGCCGCTCTGCCGTGCATGAACAGGTGGTGGTGCAG
 CTAGCAGCCCTACCTGGCAACTGCTGCGCCAGGAGACTTCTATCTGCAGGTGGTGGCCCTCAGCTGCCCAAGCACCCCG
 ACTAGCACTCAAGTGTCTGGCCCTGGGGTGGGCGGGTGCAGGAGGTTCTGTGCCAATGAGGCTTGTGCCTACCTAT
 TCACACCTGAGTGGCTACAAGGCATCAACAAGGACCGGCAACAGGTGCGCTCAGTACCTGCCTACTGTCTGCGCCCTCT
 GGGATTACAGCGCTGCCCTGGGCTGAGCTCATCTGTCCACGATTTGTGCACAAAGAGGGCCCTCATGGTTGGACATCAGCC
 AAGTACACTGCCCCAGAACTGCCCTCTGGACCTCCAGGGCTTCCAGCCCTCCACTTCTGAGGAGGGCTGGGTACCC
 GGATTCCTGGGATGGGCAATGCCCTGTGGAAGGACCTGAGGGCGAGTATGTGGAGCTGTTAGAGGTGACGCTGCC
 GTGAGGGGAGCCCAACAGATGCTGAAGGCCTCCAGGCTCTCCAGAGTCCGGACGGTACCCACCCGAAGGGCGCTGG
 AGGGAAGGGCCGCCACCGGAGACACCGGGCTGGATGCACCGAAGGGCCCTGGGGCTCGGGCCAGGATGGAGCACGGC
 CACCCGGCGAGGGGAGCAGCACCGGAGCCTCCCTGAGTCTCCCGAGGAGCTGAGGCTGTCCAGAGGCAGCAGTCTTG
 GAGGTGTTGAGCCCGCAGCAGAGGCTGTGGGAGAAGCCTCCGGATCTTGCCCTGAGGCCAGGGAGCTTAGAGGAGG
 AGGAGGAGGAGCCAGGGGCTGAAGGACCCTGGTACCCCTCGGAGAACAGGCAAGGAACAGAAGAAAGAGCGAG
 CTGCAAGTCCAGGGGCTCTTAGCCGAGGAGGGACAGTCCCCACTGAGCCCTGGGGACAAGGAAGATGCCAGCCACCAA
 GAAGCCCTTGGCAATCTGCCCTCACCAGTGAAGCACAGCTTCCAGAATGCCACCTGGTTAAGGAGGAATATGAAGGCTC
 AGGGAAGCCAGAATCTGAGCCAAAAGAGCTCAAAACAGCAGGCGAGAAAGAGCCTCAGCTCTCTGAAGCTGTGGGCTA
 CAGAAGAGGGGGCCGGAGAGAGAGAGCTGGAGGGGCCAGGCTGCTGTGTATGGCAGGACACACAGGCCCAGAAGGCC
 CTGTCTGCACTCCAACACCTCCGCTGGAGACTGTGCAGGAAGGAAAAGGGGACAACATTCAGAAGAGGCCCTTGCAGT
 CTCCTCTCTGTATCACCCTGATGTAGCTTGGGACTTGTGGCATCTGGATTCTCATCTGACGGGAGGGTGGACAGAG
 GTGGGCGAGCTCTGCTGACCAATTACCCACCGTGCCTCTGAGGAGCCCCACCTCCCGAGACACGCTGAACACA
 CTTTCACTTACTCCACTCACTGCTCAGGCTGATCTACAGACTGGGCTGTCCGCTCTGCTGAGCTTCTGTCAGGCACC
 TCCACTGCTCCAGCACTCATCTGCTGAGCCAACTCAGGACTCAGGAGATCCTCCCTTGTTCAGCGCTGCTGA
 TTCTCATTATGATGACCTTCCAACCTGAACCTCTGTGGATTTAGGGTGGCTGAGGTGCTGTGAGAGATGATCTGAAAAGA
 GTGGCCAGCCAGAGGAGCTGCACTGGGAGTTAGGAGGTCACAGGGACCCCTCTCCAGTCACTGGGTAGAGATACCCA
 GGAAGTGGTAAGGCTATGTCGCTGTGCCAAGGTGTGTGGGCTCGGTACGGCAGGCCATTGAGGAGCTGGAGGGAGCAG
 CAGAGCCAGAGGAAGAGGAGGAGTGGGAATGCCAAGCCACTGCAGAAGTGTGTCAGATCCCGGCTGACGGCACTG
 CAGAGGATGGGGGGCCATCCTCATGAGGCTGCGCTCCACTCCAGCAGCAAGCTGGAGGGCCAAGGCCAGCTACACT
 GTATCAGGAAGTGGACAGGCCATTCACCAGCTTGTGGCCCTCCAACCTGCAAGTGCAGCAGCAAGAGCAGCGGAGT
 GCCTCGGGGACTCCAGCAGGTGTGTCAGTGGCTCTCGGGCCAGGGGAGGAGCAGCTGGCAAGCTTGTATGCTGGG
 GACACCTTGTCTGCCCTGCAGGAGACAGAGCTGGATTCCGCTTTTCAGCGCTGAGGTCCAGGAGCGCTGGCCAGGC
 ACGGGAGGCCCTGGCTCTGGAGGAGAATGCCACCTCCAGAAGTGTGGATATCTTTGAACAGCGGCTGGAGCAGGTTG
 AGAGTGGCCCTCCATCGGGCCCTGGGCTACAGCGCTTCTTCCAGCAGGCACATGAATGGGTGGATGAGGCTTTGCTCGG
 CTGGCAGGAGCTGGGCGGGTGGGAGGCTGTGCTGGCTGCACTGGCCCTCGGGCGGGCCCGAGGCCATGGCCGGCAC
 CTTCCAGGAGATGCGGGCCCTGGCCCTGGACCTGGGAGGAGGAGGCGGCCACGGGCTACCGACGACGGCGGGCAGAC
 GGTGCCAGCAGTGGAGGGCCCAAGTGGGGCCCGCAGCCCTCGCCAGCCTCAGCTCCTTGTGCTGCCAGCAGCC
 TGGGCCACGGCCAGCCCATCCATTGCTCCCTGGCCCATGTGGAGAGGACTATGAGGAAGAGGGCCCTGAGCTGGGCTC
 CAGAAGCAGAGGGCAGGCCCCCAAGAGCTGTGCTGATCCGAGGCTGGAGGTCACAGCACTGAGGTGGTAGACAGGAG
 TGCTCACCACGGGAACAGTGTGCTGGCCGGGCTAGGGGGCCAGACGGACCTGGGGAGTAGGCGCCCCCGATGGA
 GCGCAAGCGAAGCATCAGTGCCAGCAGCGGCTGGTGTCTGAGCTGATTGCTGTGAACAAGATTACGTGGCCACCTTGA
 GTGAGCCAGTGCACCCCTGGGCTGAGCTGACCGCTGAACCTCGGGCACCTGGGCTGCTGCCCTGAGTGGCCGGGAA
 AGGCTTCGCACTTCCACCGACACACTTCTGCGGGAGCTTCAAGGCTGCGCCACCCACCCCTACGCATGGGGCTG
 CTTCTTCCGCCAGGGACCAAGTTAGCCTTTATGCACAGTACGTGAAGCACCGACACAACCTGGAGAATGGTCTGGCTG
 CGCTCAGTCCCTAAGCAAGGGCTCCATGGAGGCTGGCCCTTACCTGCCCGAGCCCTGCAGCAGCTCTGGAACAGCTG
 ACTCGGATGGGGCGCTCCCTGGAGGAGCTCCCTGAGGGAAGCTGGGCTGAGCTCAGTCTGAGTGGCGGGCCCTTGGGGC

Fig. 1A

【図1B】

TGCTGTACAGCTGCTCCGGGAACAAGAGGCCCGTGGCAGAGACCTGCTGGCCGTGGAGGCGGTGCGTGCTGTGAGATAG
ATCTGAAGGAGCAGGGACAGCTCTTGCATCGAGACCCCTTCACTGTCATCTGTGGCCGAAAGAAAGTGCCTTCGCCATGTC
TTTCTCTTCCGAGCATCTCCTCCTGTTCCAGCAAGCTCAAGGGCCCTGAAGGGGGTCCAGAGATGTTTGTACAAAGCAGGC
CTTTAAGACTGCTGATATGGGGCTGACAGAAAACATCGGGACAGCGGACTCTGCTTTGAGTTGTGGTTTCGGCGGGGGC
GTGCACGAGAGGCATACACTCTGCAGGCAACCTCACCAGAGATCAAACCTCAAGTGGACAAGTTCTATTGCCAGCTGCTG
TGGAGACAGGCAGCCACAACAAGGAGCTCCGAGTGCAGCAGATGGTGTCCATGGGCATTGGGAATAAACCTTCCTGGA
CATCAAAGCCCTTGGGGAGCGGACGCTGAGTGCCCTGCTCACTGGAAGAGCCGCCGCCACCCGGGCTCCGTGGCCGTGT
CATCTTTGAGCATGCCGGCCCTCCCTCCCGGCCTTTCGCCGGGAGCCTGCTCCCTGCCTGCCCGGTCGAGGAGGAG
GCCTGGGATCTGGACTTCAAGCAAATTTCCCTGGCCCCAGAAACACTTGACTCTTCTGGAGATGTGTCCCAGGACCAAG
AAACAGCCCCAGCCTGCAACCCCCACCCTGGGAGCAGCACTCCACCCTGGCCAGTCGAGGGATCTTAGGGCTATCCC
GACAGAGTCATGCTCGAGCCCTGAGTGACCCACCACGCCTCTGTGACCTGGAGAAGATCCAGAACTTGGTGCAGCTTC
TCCTCTCAGCACACTTTGGGCTGGGATGGCAGTGGGGCATAATGGAGCCCTGGGGATCGCTGAATTTCTCCCTCTGCT
TCCTGGACACAGAGGAgGCTAACGACCAGAGTATTGCCCTGCCACCCTATCTCTAGTCTCCCTAGCTTGGTGCCTTCT
CCTGCAGGAGTCAGAGCAGCCACATTGCTTGCCTTCATACCCTGgAGGTgGGGAAGTTATCCCTCTCCGGTGCCTTCCC
ATCCTGGGCCACTGTATCCAGGACATCACTCCATGCCAGCCCTCCCTGGCAGCCCATGTTCCCTCTTTCTCACCCCC
TGACTTTCCCTGAGAAGAATCATCTCTGCCAGGCAACTGGAGTCCCTGGTACCCATTCTGAGGTGCACAAGCAATG
AAGCTATGCAACAATAGGAGGGTGTGACAGGGGAACCGTAGACTTTATATATGTAATTAAGTATTATAATACTATTG
TTATATTAATGTATTTACTCACACTTTCCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 1B

【図2】

GAATTCGGCAGGCAACTACGGCGGCGGCGGCGAGAACCAGCAGTGTATGT
GGAGGTGGAGACCCACAGGAGCCCGGAC
TTGACCTGAGCTACCTCAGTGGTCACCAAGAGTGGCAAGATAAAGAAAACCC
TGAGTTGGGCGGGACCAGGATGCCTGAC
CGGGACAGCTATGCCAACGGTACCGGGAGCAGCGGTGGAGGCCCTGGAGGT
GGTGGCAGCAAGGAGGCCAGTGGGGCAGG
GGTAGGCAGTGGCGGGCCAGCTCAGATGCCATCTGTAGAGACTTCTTGAGG
AATGTGTGCAAGCGAGGCAAGCGTTGCC
GATATCGCCACCCAGACATGAGCGAGGTGTCCAACCTGGGGGTGAGCAAAA
CGAGTTCATCTTCTGCCATGACTTCCAG
AACAAGGAGTGTAGCCGCCAAATTGCCGTTTCATCCATGGCTCCAAGGAGG
ATGAGGATGGCTATAAGAAGACAGGAGA
GCTTCCCCACGGCTGAGGCAGAAAGTAGCAGCTGGCCTTGGCCTTTCACCG
GCTGACCTACCAAAATGGCAAGGAGGAGG
TCCCTATCTGCCGTGACTTTCTCAAGGGTGACTGTGAGAGGAGGCCAAGTG
CAAGTTCGCTCACCTGCAACGGGATTTT
GAGTTTGATGCTCGGGGTGGAGGAGGCACCTGGTGGGGCTCAACAGGCTCAG
TCCTCCAGGACGACGTCATGATCTCTA
TGATATCTATGACCTTCTGACAGGGGCTTTGAGGACCATGAGCCAGGCCCA
AAACGCCGSGCAGGTGGATGCTGCCCC
CTGATGGCCCTCATTTTGAGTCATATGAATATAGTTTGGCTCCACCGGAGGG
GTGGAGTGCAGACTGCTAGAGGAGGAG
AATGCCATGCTCAGGAAGCGGGTAGAGGAGTTAAAGAAGCAGGTCAGCAAC
CTGCTGGCCACCAATGAGGTACTACTGGA
ACAAAATGCTCAGTCCGCAATCAGGCCAAGGTCATAACCCTGAGCTCCACT
GCACCAGCGACTGAGCAGACTCTGGCCC
CCACTGTGGGCACTGTTGCCACTTTTAACCATGGCATTGCCAGACTCACACT
ACTCTCAGCAGCCAGGCTCTACAGCCT
CGTCCAGTGTCCAGCAAGAAGTGGTGGCCCCGCTGGAGCTCCAGCTGCTC
CCCCAACTAATGCTGCACCTCCTGCTGC
TCCACCACCCACCCACACTTGACCCAGAGATCACGCCACTGTCAGCT
GCCCTGGCTCAAACAATTGCCAGGGAA
TGGCACCTCCACCTGTCTCCATGGCTCCTGTGGCTGTATCTGTGGCTCCTGTG
GCCCTGTGGCTGTATCGATGGCCCA
CCCTTGGCAGGAATCACAATGAGCCACACCACCTCCCATGGTGACTTACC
CTATCGCTCCCCCTCGAG

Fig. 2

【図3】

TTGACACGAGCTGCGGGCGGGCCATGGCGGCGAACCTGAGCCGGAACGGGCCAGCGCTGCAAGAGGCCTACGTGCGGG
TGGTCAACCGAGAAGTCCCGACCGACTGGGCTCTCTTTACCTATGAAGGCAACAGCAATGACATCCGCGTGGCTGGCACA
GGGGAGGGTGCCCTGGAGGAGATGGTGGAGGAGCTCAACAGCGGGAAGGTGATGTACGCCCTTCTGCAGAGTGAAGGACCC
CAACTCTGACTGCCAAATTTGTCTCATCAACTGGACAGGCGAGGGCGTGAACGATGTGCGGAAGGGAGCCTGTGCCA
GCCACGTGAGCACCATGGCCAGCTTCTGAAGGGGGCCCATGTGACCATCAACGCACGGGCCGAGGAGGATGTGGAGCCT
GAGTGCATCATGGAGAAGGTGGCCAAGGCTTCAGGTGCCAACTACAGCTTTCACAAGGAGAGTGGCCGCTTCCAGGACGT
GGGACCCAGGCCCCAGTGGGCTCTGTGTACCAGAAGACCAATGCCGTGTCTGAGATTAAGGGTTGGTAAAGACAGCT
TCTGGGCCAAGCAGAGAAGGAGGAGGAGAACCCTGGGCTGGAGGAAAAGCGCGGGCCGAGGAGGCACAGCGGCAGCTG
GAGCAGGAGCGCCGGGAGCGTGAGCTGCGTGAGGCTGCACGCCGGGAGCAGCGCTATCAGGAGCAGGGTGGCGAGGCCAG
CCCCAGACGAGGACGTGGGAGCAGCAGCAAGAAGTGGTTTCAAGGAACCGAAATGAGCAGGAGTCTGCCGTGCACCCGA
GGGAGATTTCAAGCAGAAGGAGAGGGCCATGTCCACCACCTCCATCTCCAGTCTCAGCCTGGCAAGCTGAGGAGCCCC
TTCTGCAGAAGCAGCTCACCCAACCCAGAGACCCACTTTGGCAGAGAGCCAGCTGCTGCCATCTCAAGGCCCAGGGCAGA
TCTCCCTGcTGAGGAGCCGGCGCCAGCACTCCTCCATGTCTGGTGCAGGCAGAAGAGGAGGcTG6TATGAGGAACCTC
CAGAGCAGGAGACCTTCTACGAGCAGCCCCACTGGTGCAGCAGCAAGGTGCTGGCTCTGAGCACATTGACCACCACATT
CAGGGCCAGGGGCTCAGTGGCAAGGGCTCTGTGCCGTGCCCTGTACGACTACCAGGCAGCCGACGACACAGAGATCTC
CTTTGACCCCGAGAACCTCATCACGGGCATCGAGGTGATCGACGAAGGCTG6TGGCGTG6CTATGGGCCGGATGGCCATT
TTGGCATGTTCCCTGCCAACTACGTGGAGCTCATTGAGTGAGGCTGAGGGCACATCTTGCCCTTCCCCTCTCAGACATGG
CTTCCTTATTGCTGGAAGAGGAGGCTGGGAGTTGACATTGAGCACTCTTCCAGGAATAGGACCCCCAGTGAGGATGAGG
CCTCAGGGCTCCCTCCGGCTTGGCAGACTCAGCCTGTACCCCAATGCAGCAATGGCCTGGTGATTCCACACATCCTT
CCTGCATCCCCGAC

Fig. 3

【 図 4 】

CAGTCGCAGGAGGCGCTCCTTG6CGGTGCC TGGAGCCCGGGCGCACCCACCGCTCCCGGGACCTGTTGGGGGCTGGCCC
 GAACCGTCTGTCGAAGGGAGCCGCTCGGCCACCCCGGACGTTCTCGCCCGCCGACGTTCCCTCAAGTGGCCGAACCAG
 CCGGACGAGCCAAACTCGCCGGGCCCTCCGGGGCAGCAGGTGGCCCGCTTCCAGGGAGGGCCCTGCGCCCGCGGC
 GCTCCGGAGCCCTCTCGGCCGCCCGCCAGGCGGGATGGAGCGGATGGGGACGGAGAGGAGCTGGCCCGCTGCGCTC
 AGTCTTCGCCGCTGCGAGCGGAACCGCTCGGGGGCCCTGGAGCGCGAGGAGTTCGGGGCAcTGTCACGGAGCTGCGGG
 TGGCGCCGGCCGACCGCGAGGCGAGTATTCAGCGGCTGGACCGCGACCGTGACGGCGCCATCACCTTCCAGGAGTTGCGG
 CGTGGCTTCTCGGGTCCCTCCGGGGGGCGGCGCGGACTGGGGTCTCTGGATCCCGCGCCCGCTGTCTGAGGC
 GGGGCGGAgACACACGACAGCGAGGAGGACGAAGGCGAGgAGGACgCGGCGGGCGCTGGCCACCTGTCGGGCCCGG
 CGAGTCCCGGCCGGGCTTGGCAGGATTTCCAGGCGGACTTGGGGACGAAGCCAAGTTCATTCAGAGAAAGAGCAAGTT
 AGTACCTTGTACCAAAACATCAACCTTGTGGAGCCAAGATTAATTCAGCCATATGAACATGTTATAAAGAAGCTTCATCCG
 TGAGATCAGACTTCAAAGCACAGAAATGGAAAATTTGGCCATTGCGGTGAAGAGAGCCAGGACAAGGAGCTATGCACT
 TGAGTGAGTTGGAAGAGGAAATGGATCAGAGGATTGAGGCTGCGAAGCATAAAGACCGAAAAGACGAAAAACGCAAAGT
 GAGGAAGCCCTCAGTGACCTCAGACGTGATGAACTGAAGTAGGAGATCTGCAGGTGACCATTAAGAAAGCTAAGAAA
 GCTCGAAGAACAAATCAAAAAGCGTAAAGTCAAAGGAAGATGGGCTGCATTGAAAAAACAAATTTATGATTTATCAATGG
 AAAACAGAAAGTTAAGAAAGACCTTTTAGAAGCACAGACAAACATAGCCTTTCTTCAGAGTGAGTTAGATGCTTTGAAA
 AGTGATTTAGCTGATCAGAGTCTGAATACTGAAAGGGATCTGGAAATAATCCGAGCATACACAGAAGATCGAAATAGTCT
 TGAGAGGCAAATGAAATACTCAAACAGCTAACCGGAAGCTACATGACAGTAATGATGGCCTTAGAAGTGCCTTGAAA
 ACAGTTATAGCAAGTTCAACAGATCTTGCATATAAATAATCTCACCAGGGAATACAATTTCTAGAAGCAGTCCCAAA
 TTCATTGGTCATTCCTCAACCTCTAGGCTATGACAGGTCATCCCGCTCTTCTTATGTTGATGAGGACTGTGACTCCCT
 GGCCCTCTGTGATCCTGTGCAGAGGACAAATGTGAAAGTTGACAGCCTGCCTGAAAGCTGCTTCGACAGCGGCTTGTCTA
 CCTTGAGAGATCCCAATGAGTATGACTCAGAAGTGGAAACAAGCACCAGAGGGGATTCAGAGGTCACACGGGGTGACG
 GAGAGCTTTGGAGGTGATGCTTCAGACACAGATGTTCTGACATAAGGGATGAAGAGACATTTGGTTTGAAGATGTGGC
 TTCCGCTTTAGACTGGAAGCCCAAGGGTCTGTTAGTGAAGGCAGCATTTGTTAGTTTCATCAAGAAAAGCCATCTCAGCAC
 TCTCGCCCGACAGACCTGGTAGATGACAACGCTAAATCTTTAGCTCACAGAAGGCTTACAAGATTGTACTTGGTGGG
 GACCGTGACGTGGGGAAGTCTAGTTTCTCATGAGACTTTGCAAGAATGAATTCGAGAAAAATAAGCGCCACCCTGGG
 AGTTGATTTCAAATGAAAACCTCAATTTGTGGATGGAGAACGAACAGTTCGACGCTCTGGGATACAGCTGGTCAGGAGA
 GATTCAGAAGTATGCAAGTCTTACTTCAGAAAGGCAGATGGTGTGTTTGTCTGCTGATGATGTTACATGTGAGAAAAGC
 TTTCTTAACATACGAGAATGGGTAGATATGATTGAGGATGCAGCCCATGAGACTGTTCCCATTATGCTGGTAGGAAACAA
 GGCTGACATTCGTGACACTGCTGCTACAGAGGGACAAAAATGTGTCCAGGGCACTTTGGAGAGAACTGGCCATGACGT
 ATGGGGCATTATCTGTGAAACAAGTGCCAAAGATGGTTCTAACATAGTGGAGGCTGTTCTGCACCTTGTGAGAAAGTG
 AAAAAGABAAGTACAAAGGATGACAGCAGATCCATTACCAATCTAACCGGGACCAATTCAAAAAGTCAACACAGATGAA
 GAATTTGCAATGGCTAAATCCCAACATCCTTGGCCTGTGAAGTCTTCATTTCCAGAATACTGAATTTGTGTGACTTA
 TTTGGCTCTTAACAGAGTGGCADCCTACTGACACTGTCTATGGAGAGTTTACAGTGCAGGGAAACCTGAACCCAGCT
 CTCAGGTCCTCTGGAACCTTGGCTCTTCTTTGTTTTGTCTCAGTGAGTATTTGGGCCCTCTGGCTAAATAGACTAGTC
 ATGTCCTTACAGGTCTTAAAAGATAACATGTAATGTTTTTAAATGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 4

【図 5】

MEPEPVEDCVQSTLAAL YPPFEATAPTL LGQVFQVVERTYREDALRYTLDFLVP
 AKHLLAKVQEQEACAQYSGFLFFHEGW
 PLCLHEQVVVQLAALPWQLLRPGDFYLQVPSAACAPRLALKCLAPGGGRVQE
 VPVPNEACAYLFTPEWLQGINKDRPTG
 RLSTCLLSAPSGIQRLPWAELICPRFVHKEGLMVGHPSTLPPPELPSGPPGLPSPPL
 PEEALGTRSPGDGHNAPVEGPEG
 EYVELLEVTLPVRGSPTDAEGSPGLSRVRTVPTRKGAGGKGRHRRHRAWMHQK
 GLGPRGQD GARPPGEGSSTGASPEPSP
 GAEAVPEAAVLEVFEPPEAEAVGEASGSCPLRPGELRGGGGGQGAEGPPGTPRR
 TGKGNRRKKRAAGRGALSRGDSAPL
 SPGDKEDASHQEALGNL PPSSEHKLPECHLVKEEYEGSGKPESEPKELKTAGEKE
 PQLSEACGPTTEGAGERELEGPGL
 CMAGHTGPEGPLSDTPTPPL ETVQEGKGDNIPEEALAVSVSDHPDVANDLMASG
 FLILTGGVDQSGRALITTTTPCPPEE
 PPSRDTLNTTLHYLHSLLRPDLQTLGLSVLLDLRQAPPLPPALIPALSQLQDSGD
 PPLVQRLLILIHDDLPTELCGFQG
 AEVLENDLKRVAKPEELQWELGGHRDPSPSHWVEIHQEVVRLCRLCQGVLSV
 RQAI EEL EGAAEPEEEEEAVGMPKPLQ
 KVLADPRLTALQRDGGAILMRLRSTPSSKLEGQGPATLYQEVDEAIIHQLVRLSNL
 HVQQEQEQRQCLRRLQQVLQWLSGPG
 EEQLA\$FAMPGDLSALQETELRFRAFSAEVQERLAQAREALALEENATSQKVL
 DIFEQRLEQVESGLHRALRLQRFQ
 AHEWVDEGFARLAGAGPGREAVLAALALRRAPEPSAGTFQEMRALALDLGSPA
 ALREWGRCOARCOELERRIQHLGEEA
 SPRGYRRRRADGASSGGAQWGRSPSPSLSSLLL PSSPGPRPAPSHCSLAPCGEDY
 EEEGPPELAPAEGRPPRAVLIRGL
 EVTSTEVDRTCSPREHVLLGRARGPDGPWVGAPRMERKRSISAQQRLVSELI
 ACEQDYVATLSEVPPPGPELTPELR
 GTWAAALSARERLRSFHRTHFLRELQGCATHPLRIGACFLRHGDQFSLYAQYVK
 HRHKL ENGLAALSPLSKGSMEAGPYL
 PRALQQPLEQLTRYGRLL EELLREAGPELSSECRALGAAVQLLREQEARGRDLLA
 VEAVRGCEIDLKEQGQLLRDPFTV
 ICGRKKCLRHVFLFEHLLLF SKLKGPEGGSEM FVYKQAFKTADMGLTENIGDSG
 LCFELWFRRRRAREAYTLQATSPEIK
 LKWTSSIAQLLWRQAAHNKELRVQQMYSMGI GNKPFLDIKALGERTLSALLTGR
 AARTRASVAVSSFEHAGPSLPGLSPG
 ACSL PARVEEEAWDL DVKQISLAPETLDSSGDVSPGPRNSPSLQPPHGSSTPTLA
 SRGILGLSRQSHARALSDPTTL

Fig. 5

【図6】

```
NSARATTA AAAEPSSDVEVETHRSPGLHLSYLSGHQEWQDKENPELGGTRMPDR
DSYANGTGSSGGGPGGGGSKEASGAG
VGSGGASSDAICRDFLRNVCKRGRKRCRYRHPDMSEVSNLGVSKNEFIFCHDFQN
KECSRPNCRFIHGSKEDGDKYKKTGE
LPPRLRQKVAAGLGLSPADL PNGKEEVPICRDFLKGDCQRGAKCKFRHLQRDFE
FDARGGGGTGGGSGSVLPGRRHDLY
DIYDL PDRGFEDHEPGPKRRRGCCPPDGPHFESYEYSLAPPRGVECRLL EEENA
MLRKRVEELKKQVSNLLATNEVLE
QNAQFRNQAKVITLSSTAPATEQTLAPT VGT VATFNHGIAQTHTLSSQALQPRP
VSQQL VAPAGAPAAPPTNAAPPAA
PPPPPHLTPEITPLSAALAQTI AQGMAPPVSMAPVAVSVAPVAVVAVSMAQPL
AGITMSHTTTPMVTYPIAPPR
```

Fig. 6

【 図 7 】

MAANLSRNGPALQEAYVRVTEKSPTDVALFTYEGNSNDIRVAGTGEGGLEEM
VEELNSGKVMYAFRCRVKDPNSGLPKFV
LINWTGEGVNDVRKGACASHVSTMASFLKGAHVTTINARAEEDVEPECIMEKVA
KASGANYSFHKESGRFQDVGPAQVGS
VYQKTNAVSEIKRVGKDSFWAKAEKEEENRRLEEKRRAEAAQRQLEQERREREL
REAAARREQRYQEQGGEASQSRWEQ
QOEYVSRNRNEQESAVHPREIFKQKERAMSTTSISSPQPGKLRSPFLQQLTQPET
HFGREPAAAISRPRADLPAEEPAP
STPPCLVQAEEEEAVYEEPPEQETFYEQPPLVQQGAGSEHIDHHIQGQLSGQGL
CARALYDYQAADDTEISFDPENLIT
GIEVIDEGWWRGYGPDGHFGMFPANYVELIE

Fig. 7

【図8】

QSQEALLGGAWSPGAPHRSRDLLGAGPNRRRREPLGHPRRSSRPTFPQVAEPAG
RAKLAGPPGGSRWPRPSREGPAPRG
APEPSRPPPPGMEADGDGEELARLRVFAACDANRSGRLEREFRALCTELRVR
PADAEAVFQRLDADRDGAI TFQFA
RGFLGSLRGRRRDWGPLDAPAVSEAGPETHDSEDEGEDAAAAALATSCGPA
SPGRAWQDFQARLGDEAKFI PREEQV
STLYQNINLVEPRLIQPYEHVIKNFIREIRLQSTEMENLAIKRAQDKAAMQLSE
LEEEMDQRIQAAEHKTRKDEKRKA
EEALSDLRROYETEVDLQVTIKKLRKLEEQSKRVSQKEDVAALKKQIYDLSME
NQKYKDLLAQTNIAFLQSELDALK
SDYADQSLNTERDLEIRAYTEDRNSLERQIEILQTANRKLHDSNDGLR SALENSY
SKFNRLHINNISPNTISRSSPK
FIGSPQLGYDRSSRSYVDEDCDSLALCDPLQRTNCEVDSLPE SCFDSGLSTLR
DPNEYDSEVEYKHQRGFORSHGVO
ESFGGDASDTPDIRDEETFGLVDVASVLDWKPQGSVSEGSIVSSSRKPI SALSP
QTDLVDDNAKSFSSQKAYKIVLAG
DAAVGKSSFLMRLCKNEFRENISATLGVD FQMKTLIVDGERTVLQLWDTAGQER
FRSIAKSYFRKADGVLLLYDVTCEKS
FLNIREWVDMIEDAAHETVPIMLVGNKADIRDTAATEGQKCVPGHFGEK LAMTY
GALFCETSAKDGSNIVEAVLHLAREV
KKRTDKDDRS.ITNL TGTNSKKSPOKNCNG

Fig. 8

【図 9】

		CR1	
		H1a	
dbl	493	DVLKNHVLNELIQTEPVYVRELYTVLLGYRAEMD-NPEMFDMPPLLRNK	
cdc24	276	HNEYVKIIEFVATERKYVHDLLELDKYRQQLLD-----SNLITSEELY	
vav	192	YDKRCCCLREIQQTEKEYDTLLGSIQQHFMKPLQ-----RFLKPDME	
tiam	1038	ADNVRKVICELLETERTYVKDLNCLMERYLKPLQ-----KETFLTQDEL	
fgd1	370	QQKVFHIANELLQTEKAYVSRLLHLLDQVFCARLL-EEARNRSSFPADVH	
Grub	1083	ISAOQRLVSELIACELDYVATLSEPVPPPPELT--PELRGTWAAALSAR	
		CR2	
		H2a	H2b
dbl	542	KdILFGNMAEIEYEFINDIFLSSLEN---CAHAPE.....--RVGP	
cdc24	320	M.-LFPNLGDAIDFORRFLISLEIN-ALVEPSKQ.....--RIGA	
vav	235	T.-IFVNIPELLSVHTHFLKELKDA--LSGGAT.....--MLYQ	
tiam	1083	V.-LFGNLTMEVEFQVEFLKTELDGVRVLPDLEK1ekvdqfkvLFSLGG	
fgd1	419	G.-IFSNICSIYCFHQOFLLEPELEKRMEEWDRYP.....--RIGD	
Grub	1131	E.-----RLRSFHRTHFLRELOG---CATHPL.....--RIGA	
		H3	H2b
dbl	577	CFLEKDDF--QMYAKYCQNKPRSETI-WRKYSECA-FFQEQQRKLRH-	
cdc24	355	LFMHSKHFF--KLYEPWSIGQNAIEFLSSTLHKM--RVDESQRFIINN-	
vav	269	VFIKYKERF--LVYGRYCSQVESAIKHLDQVATAR-EDVQMKLEECSORA	
tiam	1131	SFLYYADRF--KLYSAFCAIHTKVPKVLKAKTDT--AFKAFDAQNPK-	
fgd1	455	ILQKLAPFL--KMYGEYVKNFDRAVELVNTWTERST-QFKVIIHEVQKE-	
Grub	1158	CELRHGQDF--SLYAQYVVKHRHKL ENGLAALSPLS-----KGSMEAGPY-	
		CR3	
		H7b	H8
dbl	622	---LR.---LDSYLLKPVQRIKYLILKELLKYS--KDCEGSALLK--	
cdc24	400	-----KLELQSFLYKPVQRLCRYPLLVKELLAESSDDN-NTKELEA--	
vav	316	N-NGR.-FTLRDLLMVPMPQVVKYHLLLOELVKHTQ-DTTEKENLRL--	
tiam	1176	---QQ.hSSTLESYLKPIQRIKYPPLLLREL FAL TDAES-EEHYHLD--	
fgd1	501	---EAcnLTLQHHMLEPVQRIIPRYELLKDYLLKLPHGSPDSKDAQK--	
Grub	1200	-----LPRALQPLEQLTRYGRLLLELLREAG---PELSSECR--	
dbl	660	KALDAML DLL-KSVND-SMHQIAIN 682	
cdc24	440	-ALDISKNIA-RSINE-KQRRTENH 461	
vav	359	-ALDAMRDLA-QCVNEVKRDNETLR 381	
tiam	1219	VAIKTMNKVA-SHINE--MQKIHEE 1240	
fgd1	546	-SLELIATAA-EHSNA-AIRKMERM 567	
Grub	1235	-ALGAAVQLL-REQEARGROLLAVE 1257	

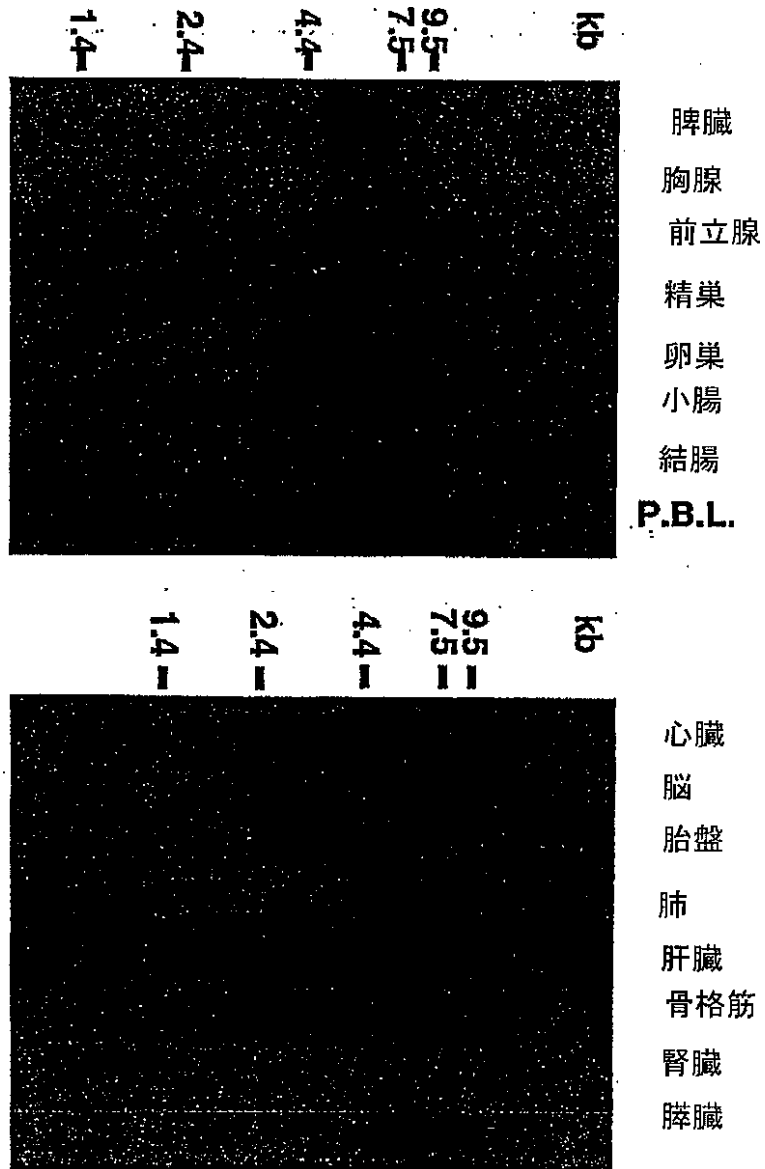
Fig. 9

【図 10】

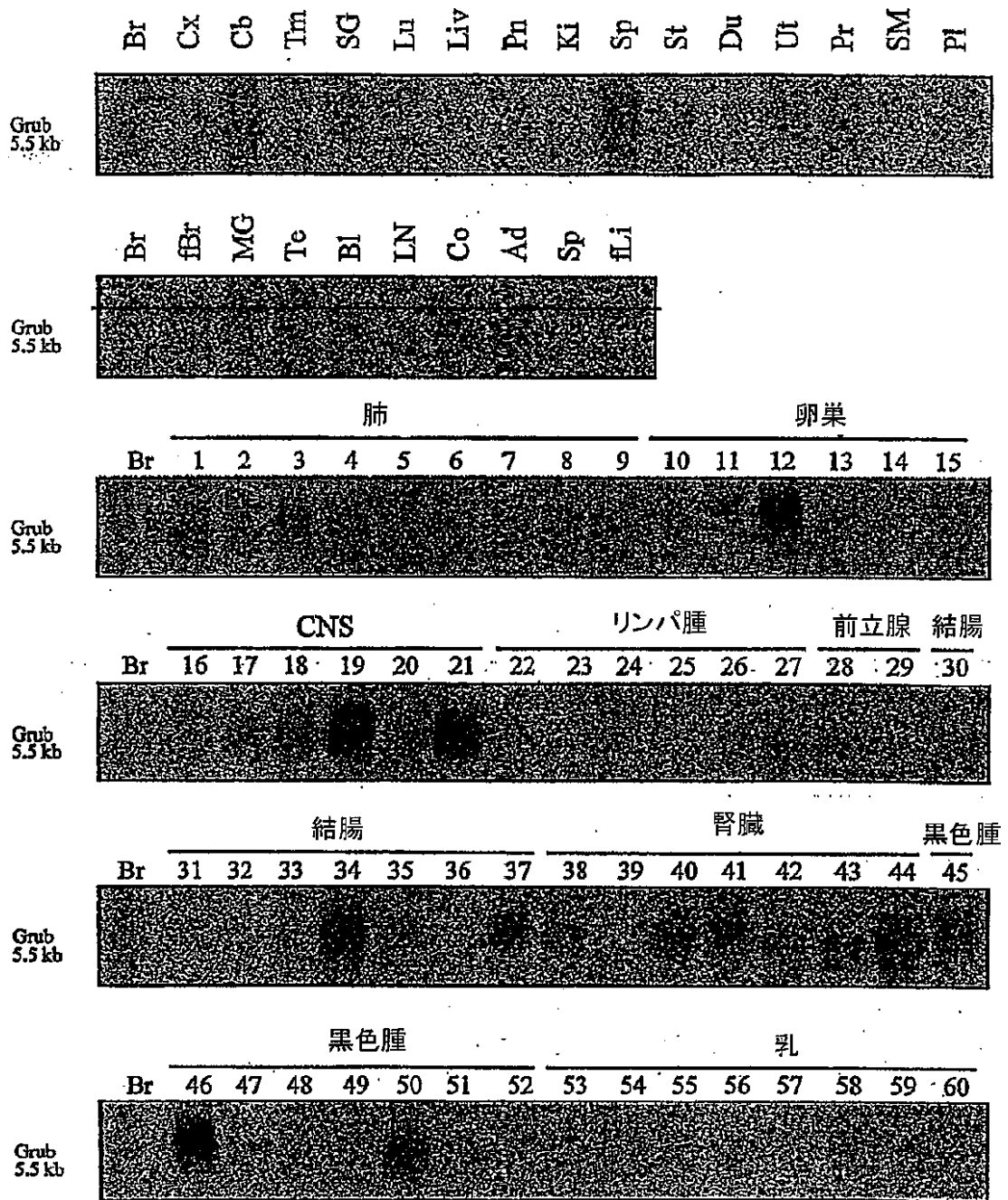
Db1	687	NLNELGKMIMQGgfsvwighkkgatkKDL-ARFKPMQRHLFLYEKA-IV	
tiam	433	TVRKAGALAVKNF1vhk.....knkkvESA-TRRKWKHYWVSLKGCT-LF	
fgd1	820	NSVICSFLHYME.....KGG-KG--WHKAWFVVPENEPLY	
Grub	1265	DLKEQGQLHRDp.....fTVICGR-KKCLRHVFLFEHL-LL	
Db1	735	FCRRrVESGEG..SDRYPSYSFKHCWKMDVEVGITEYVKG..DNRKFEIWy	
tiam	476	FYESD.GRSG-..-IDHNSIPKHAVVWENSIVQAV-PEHpkKDFVFLS-	
fgd1	852	LYIYGaPQDV-..-KAQRSLPLIGFEVGPPE--AG-ERP.dRRHVFKIT-	
Grub	1300	FSKLGpEGGSemFVYKQAFKTADMGLTENIGDSG-LC-..---FELW-	
Db1	781	GEKEEV...YIVQASNVQKMTLKEIRNILL	809
tiam	519	NSLGDA...FLFQTTSTELNWTATHSACA	547
fgd1	893	-QSHLS...WYFSPETEELQRRWMAVLGRAGR	901
Grub	1341	-FRRRRareaYTLQATSPETIKLWTSSIAQLLW	1372

Fig. 10

【圖 1 1】



【図12】



【图13】

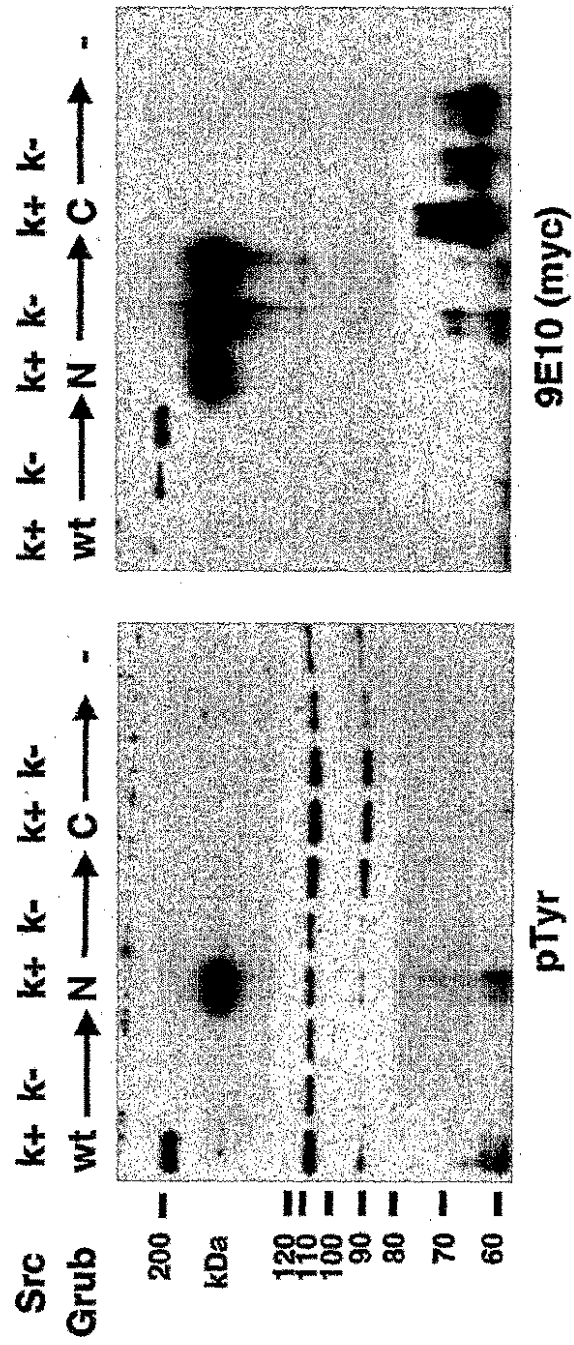
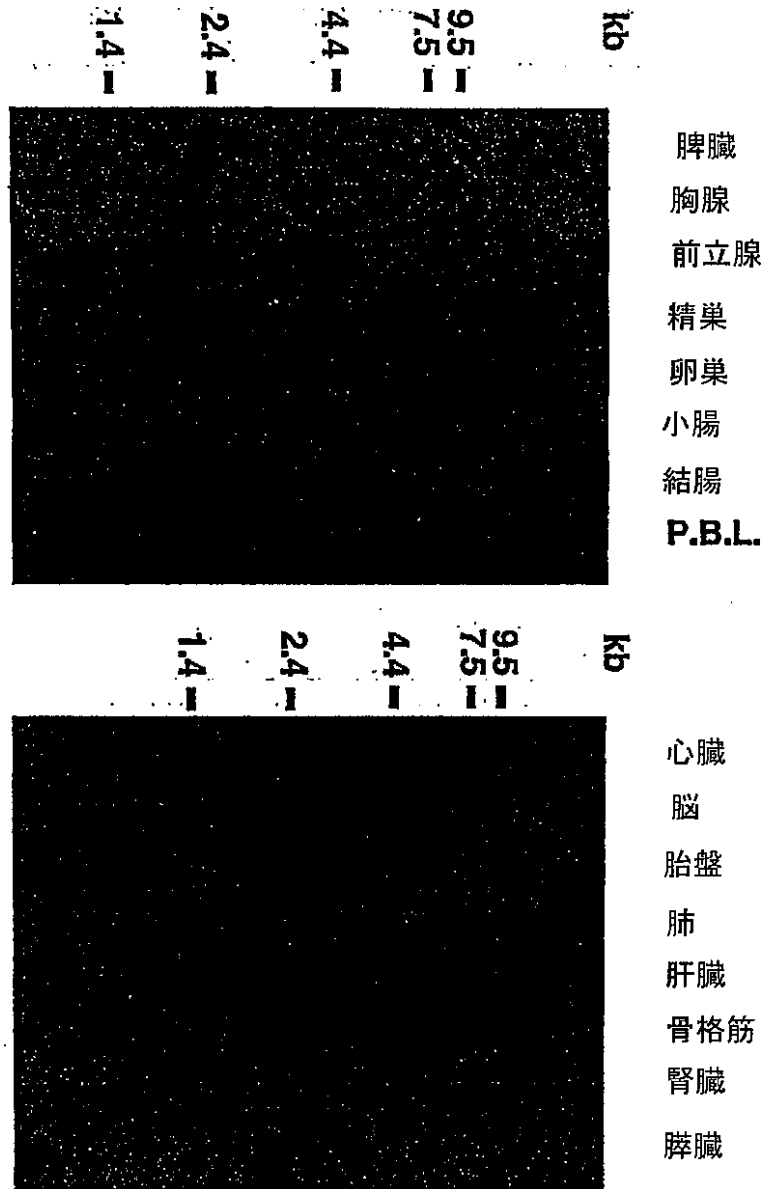


Fig. 13

【图14】



【图15】

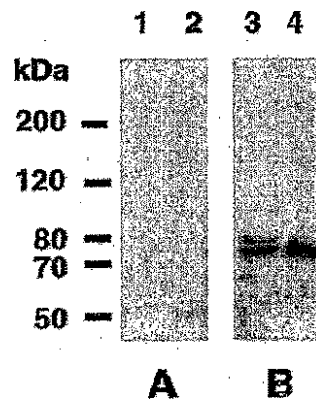


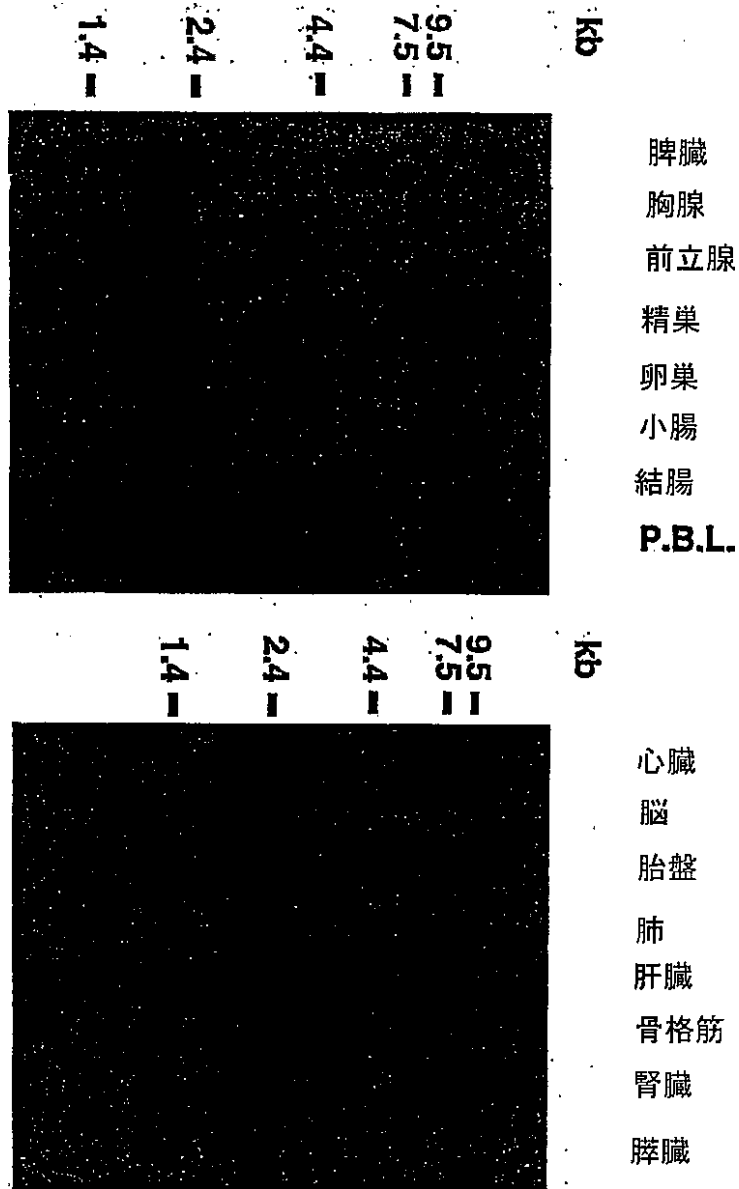
Fig. 15

【図16A】

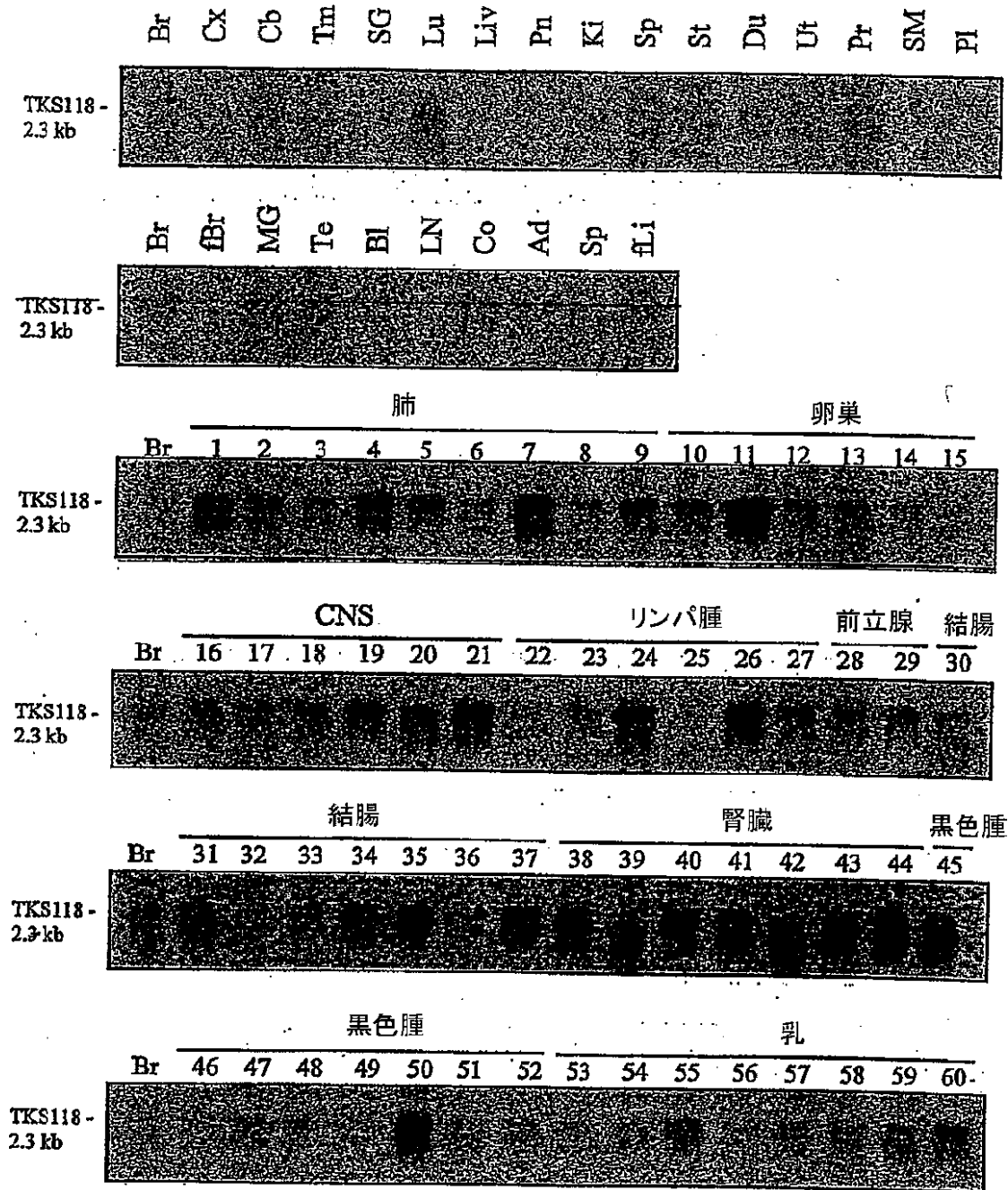
1	M	A	G	V	S	F	S	G	H	R	L	L	A	A	Y	E	E	V	I	R	E	E	S	A	A	D	W	A	L	Y	T	Y	E	D	G	S	D	D	Drebrin E		
11	M	A	A	-	N	L	S	R	N	G	P	A	L	Q	E	A	Y	V	R	V	T	E	K	S	P	T	D	W	A	L	F	T	Y	E	G	N	S	N	D	Tks118	
11	M	A	V	-	N	L	S	R	N	G	P	A	L	Q	E	A	Y	V	R	V	T	E	K	S	P	T	D	W	A	L	F	T	Y	E	G	N	S	N	D	mSH3P7	
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SRC -human		
41	L	K	L	A	S	G	E	G	G	L	Q	E	L	S	G	H	F	E	N	Q	K	V	M	Y	G	F	C	S	V	K	D	S	Q	A	A	L	P	K	Y	Drebrin E	
40	I	R	V	A	G	T	G	E	G	L	E	E	M	V	E	E	L	N	S	G	K	V	M	Y	A	F	C	R	V	K	D	P	N	S	G	L	P	K	F	Tks118	
40	I	R	V	A	G	T	G	E	G	L	E	E	L	V	E	E	L	N	S	G	K	V	M	Y	A	F	C	R	V	K	D	P	N	S	G	L	P	K	F	mSH3P7	
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SRC -human		
81	V	L	I	N	W	V	G	E	D	V	P	I	A	R	K	C	A	C	A	S	H	V	A	K	V	A	E	F	F	Q	G	Y	D	V	I	V	N	A	S	Drebrin E	
80	V	L	I	N	W	T	G	E	G	V	N	D	V	R	K	G	A	C	A	S	H	V	S	T	M	A	S	F	L	K	G	A	H	V	T	I	N	A	R	A	Tks118
80	V	L	I	N	W	T	G	E	G	V	N	D	V	R	K	G	A	C	A	S	H	V	S	T	M	A	N	F	L	K	G	A	H	V	T	I	N	A	R	A	mSH3P7
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SRC -human	
121	V	E	D	I	D	A	G	A	T	I	G	Q	R	L	S	N	G	L	A	R	L	S	P	V	L	H	R	L	R	L	R	E	D	E	N	A	E	P	V	G	Drebrin E
120	E	E	D	V	E	P	E	C	I	M	E	K	V	A	K	A	S	G	A	N	Y	S	F	H	K	E	S	G	R	F	Q	D	V	G	P	Q	A	P	V	G	Tks118
120	E	E	D	V	E	P	E	C	I	M	E	K	V	A	K	A	S	G	A	N	Y	S	F	H	K	E	S	T	S	F	Q	D	V	G	P	Q	A	P	V	G	mSH3P7
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SRC -human	
161	T	T	Y	Q	K	T	D	A	A	V	E	M	K	R	I	N	R	E	Q	F	W	E	Q	A	K	K	E	E	E	L	R	K	E	E	R	K	K	A	L	Drebrin E	
160	S	V	Y	Q	K	T	N	A	V	S	E	I	K	R	V	G	K	D	S	F	W	A	K	A	E	K	E	E	E	N	R	R	L	E	E	K	R	R	A	E	Tks118
160	S	V	Y	Q	K	T	N	A	I	S	E	I	K	R	V	G	K	D	N	F	W	A	K	A	E	K	E	E	E	N	R	R	L	E	E	K	R	R	A	E	mSH3P7
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SRC -human	
201	D	E	R	L	R	F	E	Q	E	R	M	E	Q	E	R	Q	E	Q	E	E	R	E	R	R	Y	R	E	R	A	S	P	Q	S	R	T	W	E	E	-	Drebrin E	
200	E	A	Q	R	Q	L	E	Q	E	R	R	E	R	E	L	R	E	A	A	R	R	E	Q	R	Y	Q	E	Q	G	G	E	A	S	P	Q	S	R	T	W	E	Tks118
200	E	E	R	Q	R	L	E	E	R	R	E	R	E	L	Q	E	A	A	R	R	E	Q	R	Y	Q	E	Q	H	R	S	A	G	A	P	S	R	T	G	E	E	mSH3P7
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SRC -human	

Fig. 16A

【圖17】



【図18】



【図19】

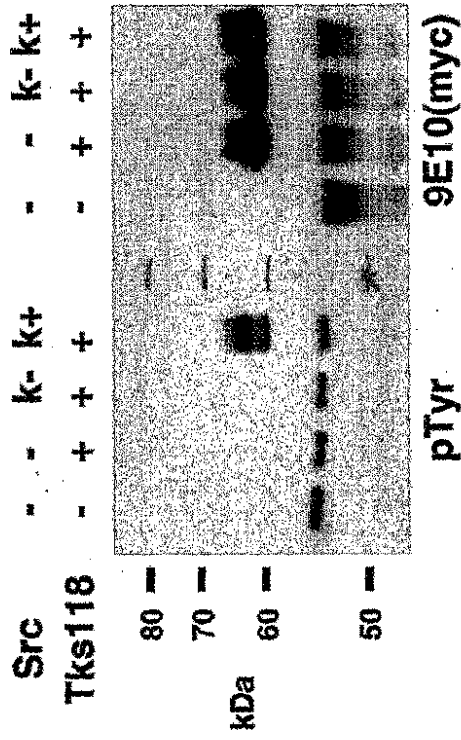
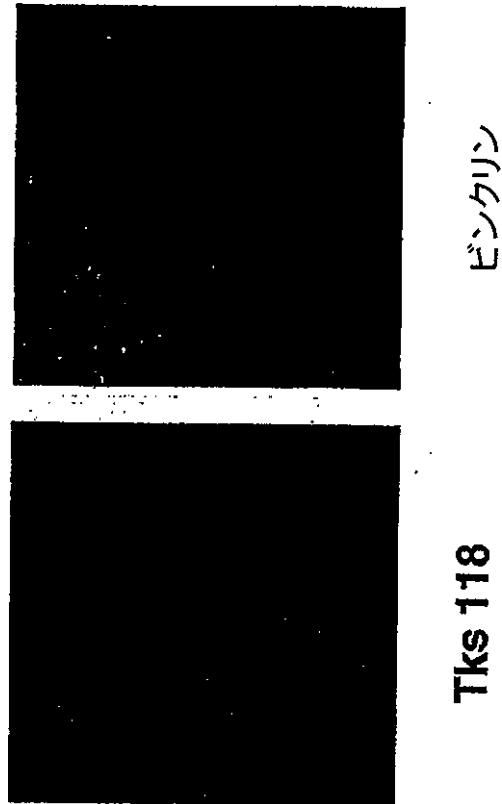


Fig. 19

【図20】

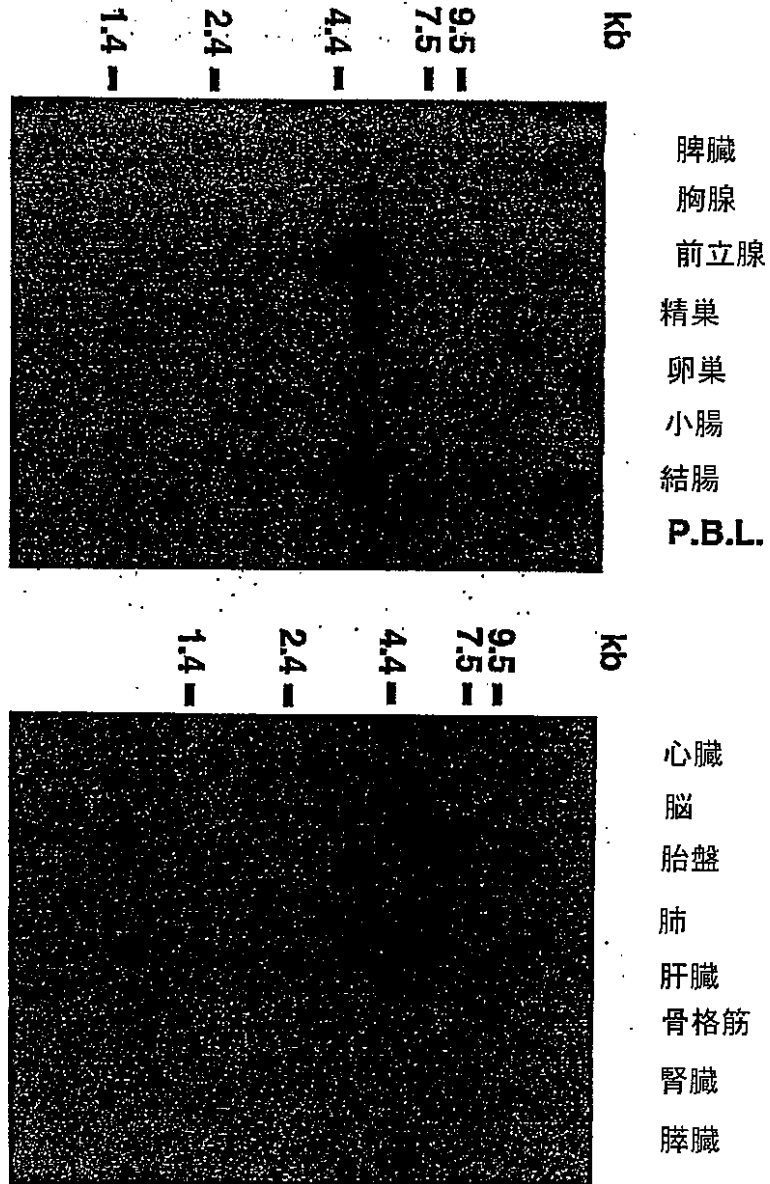


【 2 1 】

1	M	A	K	T	Y	D	Y	L	F	K	L	L	I	G	D	S	G	V	G	K	T	C	V	L	F	R	F	S	E	D	A	F	N	S	T	F	I	S	T	C-me1	
1	M	A	K	T	Y	D	Y	L	F	K	L	L	I	G	D	S	G	V	G	K	T	C	V	L	F	R	F	S	E	D	A	F	N	S	T	F	I	S	T	rab8	
630	S	Q	K	A	Y	-	-	-	K	I	V	L	A	G	D	A	A	V	G	K	S	S	F	L	M	R	L	C	K	N	E	F	R	E	N	I	S	A	T	Tks202	
41	I	G	I	D	F	K	I	R	T	I	E	L	D	G	K	R	I	K	L	Q	I	W	D	T	A	G	Q	E	R	F	R	T	I	T	T	A	Y	Y	R	G	C-me1
41	I	G	I	D	F	K	I	R	T	I	E	L	D	G	K	R	I	K	L	Q	I	W	D	T	A	G	Q	E	R	F	R	T	I	T	T	A	Y	Y	R	G	rab8
666	L	G	V	D	F	Q	M	K	T	L	I	V	D	G	E	R	T	V	L	Q	L	W	D	T	A	G	Q	E	R	F	R	S	I	A	K	S	Y	F	R	K	Tks202
81	A	M	G	I	M	L	V	Y	D	I	T	N	E	K	S	F	D	N	I	R	N	W	I	R	N	I	E	E	H	A	S	A	C	V	E	K	M	I	L	G	C-me1
81	A	M	G	I	M	L	V	Y	D	I	T	N	E	K	S	F	D	N	I	R	N	W	I	R	N	I	E	E	H	A	S	A	C	V	E	K	M	I	L	G	rab8
706	A	D	G	V	L	L	L	Y	D	V	T	C	E	K	S	F	L	N	I	R	E	W	V	D	M	I	E	D	A	A	H	E	T	V	P	I	M	L	V	G	Tks202
121	N	K	C	D	V	N	D	K	R	Q	V	S	K	E	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C-me1
121	N	K	C	D	V	N	D	K	R	Q	V	S	K	E	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	rab8
746	N	K	A	D	I	R	D	T	A	A	T	E	G	Q	K	C	V	P	G	H	F	G	E	K	L	A	M	T	Y	G	A	L	F	C	E	T	S	A	K	D	Tks202
155	N	I	N	V	E	N	A	F	F	T	L	A	R	D	I	K	A	K	M	D	K	N	W	K	A	T	A	-	G	S	H	G	V	K	I	T	V	E	C-me1		
155	N	I	N	V	E	N	A	F	F	T	L	A	R	D	I	K	A	K	M	D	K	K	L	E	G	N	S	P	Q	G	S	N	Q	G	V	K	I	T	P	D	rab8
786	G	S	N	I	V	E	A	V	L	H	L	A	R	E	V	K	R	T	D	K	D	D	S	R	S	I	T	N	L	T	G	T	N	S	K	K	S	P	Q	Tks202	
194	Q	Q	K	R	T	S	F	F	R	C	S	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C-me1
195	Q	Q	K	R	T	S	F	F	R	C	S	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	rab8
826	M	K	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tks202

Fig. 21

【圖22】



【図 23A】

AEGRGGEGRPSRPSLAGPRGLEAGAGRAATAAGAVP.PDPARHERREGGGGAPG
 PARPTKRRTRPGAEPWLSQWRTVCR
 ALSPPCIHPLRQQPPPCWARCSRWWRGLIGRTH.GTRWTSWYQPSTCLPRSSRKP
 VPNTVDSSSSMRGGRSACMNRWCS
 .QPYPGNCCAQETSICRWCPQLPKHPD.HSSVWPLGVGGCRRFLCPMRLVPTYSH
 LSGYKASTRTGQQVASVPAYCLRPL
 GFSGCPGLSSSVHDLCTKRASWLDISQVHCPQNCPLDLQGFALHFLRRRWVPG
 VLGMGTMPLWKDLRASMWSC.R.RCP
 .GGAQMLKAPQASPESGRYPPARALEGRAATGDTGRGCTRRAWGLGARMEHA
 HPARGAAPEPPLSLPQELRLSQRQSW
 RCLSPQORLWEKPPDLAP.GQGSLEEEEEEARGLKDHLVPLGEQAKETEERSELQ
 VEGLLAEEGTVPH.ALGTRKMPATK
 KPLAICPHQVSTSFQATWLRNMKAQGSQNLQKSSKQARKSLSSLKPVGLQ
 KRGPERSWRGQACCVWQDQOAKAP
 CLTLQHLRWRLCRKEKGTTFQKRPLQSPSLITLM.LTG.WHLDSSS.REGWTRVGE
 LC.PLPHRALLRSPHPETR.TQL
 FITSTHCGLIYRHWGCPSCWTFVRHLHCLQHSFLP.ANFRTQEILPLFSGC.FFSM
 MTFQLNSVDFRVLRCQMI.KE
 WPSQRSCSGS.EVTGTPLPVTG.RYTRKW.GYVACAKVCWARYGRPLRSWREQQ
 SQRKRRQWECPSHCRRCWQIPG.RHC
 RGMGGPS.GCAPLPAASWRAKAQLHCIRKWTRPFTSLCASPTCTCSSKSSGSAGC
 DSSRCCSGSRAQGRSSWQALLCLG
 TPCLPCRQSCDSVLSALRSRSAPRHGRPWLRMPPPRRCWISLNSGWSRLR
 VASIGPCGYSASSSRHMNGWMRALLG
 WQELGRVGRCLCWLHWPCGGPQSPVPAPSRRCGPWPWTWAAQQPCENGAAARP
 AAKS.RGGSSNTWERRRAHGATDDGGQT
 VPAVEGSPGGPAAPRPASAPCCSPAALGHGQPHPIAPWPHVERTMRKRALSWLQ
 KQRAGPQELC.SEAWRSPALRW.TGR
 AHHGNTCCWAGLGGQTDPE.APPGWSASEASVPSSGWCLS.LPVNKITWPP.VS
 QCHPLGLS.RLNFGAPGLLP.VPGK
 GFAASTGHTFCGSFRAAPPTPYALGPASFATGTSSAFMHST.STDTNWRMVWLR
 VP.ARAPWRLALTCPEPCSSLWNS.
 LGMGGSWRSS.GKLGLSSVLSAGPLGLLYSCSGNKRPAETCWPRRCVAVR.I.
 RSRDSSCIETPSLSSVAERSAFAMS
 FSSSISSCSASSRALKGGQRCLFTRPLRLLIWG.QKTSGTADALSALSCFGGGVHER
 HTLCRQPHQRSNSSGQVLLPSCC
 GDRQPTRTSSECSRWCPWALGINPSWTSKPLGSGR.VPCSLPEPPAPGPPWPCHPL
 SMPAPPFAFRREPAPCLPASRRR
 PGIWTSKFPWPQKHLTLEMCQQQETAPACNPPTLGAALPPWPVEGS.GYPDR
 VMLEP.VTPPRLCDLEKIQLRAAS
 PLSTLWAGMAVGHNGALGDR.ISSLCFLDTEEV.RPEYCPATTISSLSLVPSPAGV
 RAATLLAFIPWRWGSYPSSGAFP
 SWATVSRTSLPCQPSLAHVPLFSHPLTFPEKNHLCQVNWSPW.LHSEVSQAMKL
 CKQ.EGVTGEP.TLYM.LLLL.YYC
 YIKCIYSHFASKKKKKKK

Fig. 23A

【 23B 】

LKGGAGRGGRLGPPWRGPAAWKPERAEPPRPELSLSQTRRDTSGGREAVARPA
 PPARPSVGRGPAPSHGA . ASGGLCAE
 HSRRPVSTL . GNSPHPVGPVPGGGEDL SGGRTVEVHAGLPGTSQAPACQGPAGSL
 CPIQWIPLL . GVAALPA . TGGGAA
 SSPTLATAAPRLLSAGGALSCPSTPTSTQVSGPWGWAGAGGSCAQ . GLCLPIHT .
 VATRHQQGPANRSPQYLPTVCALW
 DSAAALG . AHLSTICAQRGPHGWTS AKYTAPRTALWTSRASQPSTS . GGAGYPES
 WGAQCPCGRT . GRVCGAVRGDAAR
 EGEPNRC . RLPRPLQSPDGTHPQGRWREGPPPETPGVDAPEGPGASGPGWSTPTR
 RGEQHRSLP . VSPRS . GCPRGSSLG
 GV . APSRRGGRSLRILPPEARGA . RRRRRRPGG . RTTWYPSENRQRKQKEASCRS
 RGS . PRRGQCPTEPWGQGRCP
 SPWQSALTK . AQASRMPPG . GGI . RLREARI . AKRAQNSRRERASAL . SLWAYRRGG
 RRERAGGARPAVYGRTHRPRPP
 V . HSNTSAGDCAGRKRQHSRRGPCSLRL . SP . CSLGLDGIWIPHPDGRGGPEWAS
 SADHYPTVPS . GAPTLPRAEHNS
 SLPLTAQA . STDTGAVRPAGPSSGTSTASSTHSCLEPTSGLRRSSPCSAAADSHS . .
 PSN . TLWISGC . GAVRE . SEKS
 GQARGAAVGVRRSQGPLSQSLGRDTPGSGKAMSPVPRCAGLGTAGH . GAGGSSR
 ARGRGGSGNAQATAEGAGRSPADGTA
 EGWGGHPDEAALHSQQAGGPRPSYTVSGSGRGHSPACAPLQPARAAAAAAV
 PAATPAGVAVALGPRGGAAGKLCYAWG
 HLVCAPAGDRAATPCFQR . GPGAPGPGTGGPGSGGECHLPEGAGYL . TAAGAG . EW
 PPSGPAATALLPAGT . MGG . GLCSA
 GRSWAGSGGCAGCTGPAAGPRAQCRHLPGDAGPGPGQPPSSPARMGPLPGPLP
 RAREDPATPGRGGEPTGLPTTAGRR
 CQWRGVPVGAQPLAQPQLLAAPQWPATASPIPLLPGPMWRGL . GRGP . AGSRS
 RGQAPKSCADPRPGGHQH . GGRQDV
 LTTGTRAAGPG . GARRTLGSRPPDGAQAKHQCPAAAGV . ADCL . TRLRGHLE . AS
 ATPWA . ADA . TSGHLGCCPECPGK
 ASQLPPDTL SAGASGLRHPPPTHWGLLPSRGPVQPLCTVREAPTQTGEWSGCAQ
 SLKQQLHGGWPLPAPSPAAASGTAD
 SVWAAPGGAPEGSA . AQF . VPGPWGCCTAAPGTRGPWQRPAGRGGAWL . DR
 SEGAGTALASRPLHCHLWPKEVPSPCL
 SLRASPPVQQAQGP . RGV RDVCLQAGL . DC . YGADRKHRGQRTLL . VVVSAACT
 RGIHSAGNLTRDQTQVDKFCYCPAAV
 ETGSPQQGAPSAADGVHGHWE . TLPGHQSPWGADAECPAHWKSRPHGLRGRVI
 L . ACRPLPSRPFAGSLLPACPRRGGG
 LGSGRQANFPGPRNT . LFWRCVPRTKQPPATPPPWEQHSHPGQSRDLRAIPTES
 CSSPE . PHHASVTWRRSRTCQQLL
 LSAHFLGWQWIMEPWAIAEFLPSASWTQRRSNDQSIALLPPLSLVSLAWCLLL
 QESEQPHCLPSYPGGGEV IPLPVLSH
 PGPLYPGHSHASPPWQPMFSPFLTP . LSLRRIISARSTGVPGDSILRCHKQ . SYANN
 RRV . QGNRRLYICNYCYNTIV
 ILNVFHTLPLKKKKK

Fig. 23B

【図 23C】

FFFFFFFRGKV.VNTFNITIVL..Q.LHI.SLRFPCHTLLLF.A.LHCL.HLRMESPGTPVD
 LAEMILLRESQGVKKEGNM
 GCQGLLAW.E.CPGYSGPGWESTGRGITSPPPGYEGKQCGCSDSCRRRHQARETR
 DSGGRAILWSLDLLCVQEAEGRNSAI
 AQGSIMPHCHPSFKCAERRSCTQVLDLLQVTEAWWGHSGLEHDSVGIALRSLD
 WPGWECCSQGGGVAGWGCFLVLGTHLQ
 KSQVFLGPGKFA.RPDPRPPRRGQAGSRLPAKGREGRRHAQRMTRPRRPGCG
 RLFQ.AGHSASAPQGL.CPGRVYSQC
 PWTSAALGAPCCGLPVSTAAGQ.NLST.V.SLVRLPAECMPLVHAAAETTTQSRV
 RCPRCFLSAPYQQS.RPACKQTSL
 TPLQGP.AC.TGGDARRERHGEGETSFGHR.Q.RGLDARAVPAPSDLSHSHAPPPRPA
 GLCHGPLVPGAAVQQPGPGTON
 .AQAQLPSGAPPGAHTESAVPEAAAGLGAGKGQPPWSPCLRD.AQPDHSPVCV
 GASRTVHKG.TGPRGEGSRPQCQVGGG
 WRSPPEAPAESVSGGCEAFPGHSGQQPRCPEVQASQAQGVLAHSRWPRNLV
 HRQSAQTPAAAGH.CFACAPSGGRLLP
 RVRLAP.PGPAARVPVVSTSLPPQW.PPGLGSAQLLQACPLLEPAQGPLPHSPL
 HMGPGSNGMGLAVAQGCWGAARS
 .GWARGCGAPTGPLHCWHRLPAVVGSPVGPPLPGVAGSSSLALGSGPGSGPILA
 GLLGCPGPGPGPASPGRCRHWALGP
 AAGVQPAQPDPDPAQLLPAEQSPHPP.IHVPAGRSAVAAGPDGGHSOPAPAAVQR
 YPAPSGRWHSPPPEGPPVPGPGAGP
 QR.KHGIAALSPAGQTRCPQA.QSLPAAPPLGPRATATPAGVAAGTAAALAAARA
 GWRGAQAGEWPRPLPDTV.LGLGPP
 ACCWEWSAASGWPHPHSAVPSAGDLPASAVAWAFPLPPLPLALLLPPAPQWP
 AVPSPAHLGTGDIALPLPGVSLPSDW
 ERGPCDLLTPTAAPLAWPLFSDHSLTAPQHPEIHRVQLEGHHE.ESAAAEQGEDLL
 SPEVGSRQE.VLEAVEVPDEGPAG
 RTAPVSDQA.AVSGGNEELCSACLGRVGAPEQETVG.WSSAELAHSGPPLPSG.GI
 QMPSSPKLHQGDQRRRLQGPLEC
 CPLFLPAQSPAEVLECQTGGLLGLCVLPYTAGLAPPALSLRPPLL.AHRLQRAEAL
 SRLLF.ALLAQILASLSLHIPP.P
 GGILEACAHLVRADCQGLLGGWHLPCPQGSVGHCPLLG.EPLDLQLASFFCFLCL
 FSEGYQVVLQPPGLLLLLL.APLAS
 GGKIRRLLPQPLLGAQTTPRLLPLGQPQLGETQGRRLRCCSPRRVGLHPGPEAP
 GPSGASTPGVSGGGPSLQRPCGWV
 SGLWRGLGSLQHLGSPSRAASPLTAPHTRPQVLPQGHCAHPQDSGYPAPPQEV
 EGWEALEVQRAVLGAVYLADVQP.GP
 LCAQIVDR.AQPRAAAESQRAQTVGRY.GDLLAGPC.CLVATQV.IGRHKPHWAGE
 PPAPAHPPQPDV.VLVGVLGQLRA
 PPADRSLLGAAVARVGLLAAPPVHAGRAATPHGRRG.IHCIGHRLPAGPWQAGA
 WLVPGSPACTSVRPPDKSSPPPGTPG
 PTGWGLLPQRVDTGRRECSAHSPLAQAPWLGAQPRPTLGRAGGAGRATASLPP
 LVSRRVWLRDSSGRGGGSARSGFQAA
 GPRQGGPRRPLPAPPFS

Fig. 23C

【図 23D】

FFFFFFFLEAKCE.IHLL.Q.YNNSNYIYKVYGSPVTPSYCLHSFIACDTSEWSHQGL
 QLTWQR.FFSGKVRG.EKRGTW
 AAREGWHGSDVLDTVAQDGKAPPEG.LPHLQGMKASNVAALTPAGEGTLKRL
 EIVVAGQYSGR.TSSVSRKQREIQR
 PRAPLCPTAIPAQSVLRGEAARKFWIFSRQRGGVTQGSMTLSG.P.DPSTGQG
 GSAAPRVGGLQAGAVSWSWGHISR
 RVKCFWGGNLLDVQIPGLLLDAGRQAGSRRKAGKGGAGMLKG.HGHGGPG
 AGGSSSEQGTQRPLPKGFDVQEGFIPNA
 HGHLLHSELLVVGCLSPQQLGNRTCPLFDLW.GCLQSVCLSTPPPKQLKAE
 SAVPDVFCQPHISSLKGLLVNKHLL.
 PPFRALEAEQEEMLEEKMAKALLSATDDSEGVSQMELSLLLQIYLTATHRLH
 GQVYATGLLFPEQLYSSPKGPALRT
 ELRPSFPQELLQEPPIPSQLFORLLQSGGQVRASLHGALA.GTERSQTIQFVSVLH
 VLCIKAEVVPVAKAEPNA.GVG
 GAALKLPKVCVPEAAKPFPGTQSSPGAPKFRRLRPRGWHWLTQGGHVILFT
 GNQLRHQPLLGTDASLALHPGGAYSP
 GSVWPPSPAQQHVFPW.ARPYHLSAGDLQASDQHSWGPALCFWSQLRALFLI
 VLSTWGGQAMGWGPWPRAAGEQQGA
 EAGRGAAGPPLGPSTAGTVCPSSVAPWARLLSQVLLDPPL.LLAAGLAAAPFSQ
 GCWAAQVQGGQPHLLLEGAGTGLWGP
 PQGQCSQHSLPTRPSSCQPSKALIHPPMCLLEEAL.PQGMEATLNLQPLFKDIOH
 LLGGGILLQSQGLPCLGQALLDL
 SAESTESQLCLLQGRQGVPRHSKACQLLLPWAREPLQHLLQSPQALPLLLLVHQ
 VGEAHKLVNGLVHFLIQCSWALALQ
 LAAGSGAQPHQDGPPIPLQCROPGICQHLLQWLGHSHCLLFLWLCCSLQLLNLGP
 YRAQHTLAQAT.PYHFLVYLYPVTG
 RGVPTS.LPLQLLWLGHSFQIIL.QHLSTLKSTEFMSKVMNENQQLNKGRIS.VL
 KLAQGRNECWQRCLTKVQD
 GQPQCL.IRPEQ.VEVMKSCVQVSGGWGLLRARWNGGQSSPTLVHPSRDE
 ESRCHQVPSYIRVIRDGDCGLFWNV
 VPFSLHSLQRRCSVRQAFWACVSCHTQAWPLQLSLSGPLFCRPTGFREL
 LFLACCFELFWLRFWLP.AFIFLLNQ
 VAFWKLVLTW.GQIAKGFLVAGIFLVPRAQWGTVPSSAKSPSTCSSLLSSVSFACS
 PRGTRWSFSPLASSSSSKLPWPQ
 GARGGFSSHLCWGLKHLQDCCLWDSLSSWGRLRGGGAAPLAGWACSIAPR
 PQALLVHPRVSPVAALPSSALAGGYR
 PDSGEAWGAFSICWAPPHGQRHL.QLHILALRSFHRGIVPIPRTPGTQRLLRKWR
 GKPNRSRQFQGWQCTWLMNSHEAL
 FVHKSWTDELSPGQPLNPRRRQ.AGTEATCWPVLVDAL.PLRCE.VGTSLIGHRN
 LLHPPTPRGQTEC.SGCLGS.GH
 HLQIEVSWAQQLP.GC.LHHHLMQAERPPLMEEEEESTVLGTGFLLDLGKQVLG
 WYQEVQRVPQCVLPISPLHLEHLA
 QGGGCLKGIQGGESALHTVLHWLRLHGSAPGRVRRLVGRAGPGAPPPPSR
 RSCLAGSG.GTAPAAVAARPAASRPR
 GPAREGRDGRPSPPRPSA

Fig. 23D

【図 23E】

FFFFFFF, RQSVSKYI, YNNSIITVITYIKSTVPLSHPPIVCIASLLVTPQNGVTRDSS, P
 GRDSSSQKSGGKRGEGH
 LPGRAGMGVMSSWIQWRPRMGKHKRDNFPTSRV, RQAMWLL, LLQEKAPS, GD, R
 WWQGNLTVVRPPLCPGSRGKKFSDR
 PGLHYAPLPSQPKVC, EEKLHASSGSSPGHRGVVGSRLARA, LCRDSPKIPRLARV
 GVLLPGWGGCRLGLFLGPGDTSPE
 ESSVSGAREICLTSRSQASSSTRAGREQAPGERPGREGPACSKDDTATEARVRAA
 LPVSRALSVRSRALMSRKGLFPMP
 MDTICCTRSLLWAACLHSSWAIELVHLSLISGEVACRVYASRARRRRNHNSKQS
 PLSPMFVSVPIAVLKAEL, TNISD
 PPSGPLSLLNRRRCRKTWRRHFFRPQMTVKGSRCKSCPCSFRSISQPRSTASTAS
 RSLPRASCSRSSCTAAPPRIISEL
 SSGPASLRSSSRSPYRVSCSRGCCRARGR, CPASMEPLLKGLSAARPFSSLCRCFT
 YCA, RLNWSPWRRKQAPMRRGW
 AQP, SSRKCVRWKLRSLRALRAAAQVPRSSGVSSGPGGGTGLKVAT, SCSQAI
 SSDTSRCWALMLRLRSIRGAPTPQ
 GPSGPLARPSSTCSRGEHVLSTTVLTSRPRISTALGGLPSASGASSGPPSS, SSPH
 GAREQWDGAGRGPGLLGSSEL
 RLGEGLRGPWAPPLLAPSARRRR, PRGLASSPRCCWILLSSWQRAWORPHSRR
 AAGLPRSSRARARISWKVPALGSGAR
 RRASAASTASRPGPAPASRAKPSSTHSCACWKKRCSRRARWRPLSTCSSRCSKIS
 STFNEVAFSSRARASRAWARRSWTS
 ALKARNRSSVSCRADKVSPIAKLASCSSPGPESHONTCWSRRRHCRCSCCCTCR
 LERRTSW, MASSTS, YSVAGPWPS
 LLLGVERSLIRMAPPSCSAVSSRGSASTFCSGLGIPTASSSSGSAAPSSSSMACRTE
 PSTPWHRHSLTTSWCISTQ, LG
 EGSL, PPNSHCSSGLATLFRSFDSTAP, NPQSSVGRSS, MRISSR, TRGGSPES, SW
 LKAGMSAGGSGGA, RRSRT
 DSPSVCRSGLSSEWR, RVVSVSREGGGSSGGHGGVMVSRARPLWSTPPVVRMRN
 PDAIKSQATSG, SETETARASSGML
 SPFPSCVSSGGVGVSDRGPSPVCPAHSRPGPSSSLSPAPSSVGPQASES, GSFSP
 AVLSSFGSDSGFPEPSYSSLTR
 WHSGSLCSLGEGRLPRASWWLASSLSPGLSGALSPPRLRAPRPAARFFLLFPLPVL
 RGVPGGPSAPWPPPPPLSSPGLR
 GODPEASPTASAGGSNTSKTAASGTASAPGGDSGEAPVLLPSPGGRAPSWPRGPR
 PFWCIHARCLRWRPFPPAPLRVGTV
 RTLERPGEPSASVGLPLTGSVTSNSSTYSPSGPSTGALCPSPLRVPSASSGSGGLG
 SPGGPEGSSGGSVLG, CPTMRPS
 LCTNRGQMSSAQGSR, IPEGADSRQVLRPVGRLMPCSHSGVNR, AQASLGTG
 TSCTRPPGARHLSASRGAWAAEGT
 TCR, KSPGRSSCQGRAASCTTTCSCRQSGHPSWKKRNPLYWAQASCWTLASRCL
 AGTRKSSVYLSASSR, VLSTTWNTWP
 NRVGAVASKGGYRAARVLCTQSSSTGSGSMARRRAASDAWSSGGRGRARHRLPP
 AARVSPGLAKGQLRPRWRLGPLRLPGRG
 APPGRAETAAPPRPALQ

Fig. 23E

【図 24A】


EFGTSNYGGGRTQQ.CGGGDPQEPRTSPELPQWSRVAR.RKP.VGRDODA.PGQ
LCORYREQRWRPWRWWQGGQWGR
GROWRGQLRCHL.RLLEECVQARQALPISPPRHERGVQLGGEQKRVHLLP.LPEQ
GV.PPKLPFHPWLQGG.GWL.EDRR
ASPTAEAESSWPWPFTG.PTKWQGGPYLP.LSQG.LSERSQVQVPSPATGF.V.CS
GWRRHWGLNRLSPRTTS.SL
.YL.PS.QGL.GP.ARPKTPARWMLPP.WPSF.VI.I.FGSTARGGVQTARGGECHAQEA
GRGVKEAGQQPAGHQ.GTTG
TKCSVPQSGQGHNPELHCTSD.ADSGPHDCGHCH.F.WHCPDSSHYSQQPGSTASS
SVPARTGGPCWSSSCSPN.CCTSCC
STTPTPLDPRDHATVSCPGSNCPGNGTSTCLHGSCGCTCGSCGPGCIDGPTLG
RNHNPHHHSHGDLPYRSPS

Fig. 24A

【図 24B】


IRHEQLRRRRQNPAVMWRWRPTGAPDFT.ATSVVTKSGKIKKTLWAGPGCLTG
TAMPTVPGAAVEALEVVAARRPVGQG
.AVAGPAQMPSVETS.GMCASEASVADIATQT.ARCPTWG.AKTSSSSAMTSRTRS
VAAQIAYSSMAPRRMRMAIRQES
FPHG.GRK.QLALAFHRLTYQMARRRLSAVTFSRVTVREEPSASSVTCNGILSLM
LGVEEALVGAQQAQSSQDDVMISM
ISMFTLTGALRTMSQAQNAQGEVDAAPLMALILSHMNIWVWLHREGWSADC.RRR
MPCSGSG.RS.RSRSATCWPPMRYWVW
KMLSSAIRPRS.P.APLHQRLSRLWPPLWALLPLLTMALPRLTLLSAARLYSLVQC
PSKNWVPLLELQLLPQLMLHLLL
HHPHPHT.PQRSRHCQLPWLKQLPREWHLHLSPWLLWLYLWLLWPLWLYRWPN
PWQESQ.ATPPLPW.LTLSLPLE

Fig. 24B

【 24C】

LEGER.GKSPWEWCGSL.FLPRVGPSIQPGPQEPQIQPQEPWRQVEVPFPGQLF
EPGQLTVA.SLGSSVGVGVVEQQE
VOH.LGEQLELQQGPPVLAGTLDEAVEPGC.E.CESGQCHG.KWQCPQWGPESA
QSLVQWSSGL.PWPDCGTEHFVPVV
PHWWPAGC.PASLTPLPAS.AWHSPPLAVCTPPLAVEPNYIHMTQNEGHQGGSIH
LAGVGLGLAHGPQSPCCQEGHRYHRDH
DVVLGGLSLLSPHQCLLHPEHOTQNPVAGDGTCTWLLSDSHP.ESHGR.GPPPCHL
VGQPVKGGQQLLSASAVGALLS
SYSHPPHPWSHG.NGNLGGYTPCSGSHGRR.TRFCSPPSWTPRSCLGGDIGNACLA
CTHSSRSLYRWHLSWPRHCLPLPH
WPPCCHLQGLHRCRYSRYRWHSCPGQASWSRPTQGFLYLATLGDH.GSSGEVRGS
GCSPPIIIICWVLP PPP.LLVPN

Fig. 24C

【 24D】

SRGSDRVSHHGS GGVAHCDSCQGLGHRYSHRGHRSHRYSHRSHGDRWRCHSLG
NCLSQGS.QWRDLWGQVWGQWSSRR
CSISWGSSWSSSRGHQFLLGHWTRL.SLAAESSVSLGNAMVKS GNSAHSGGQSL
SRWCSGAQGYDLGLIAELSILFQ.Y
LIGGQQVADLLLL.LLYPLPEHGILLL.QSALHPSRWSQTIFI.LKMRAIGAASTSPAF
WAWLMVLKAPVRKVIDIIEIM
TSSWED.AC.APTSASSTPSIKLKIPLQVTEALGSSLTVTLEKVTADRLLLLAIW.V
SR.KAKASCYFLPOPWGKLSCL
LIAILILLGAMDETAIWAATLLVLEVMAEDELVFAHPQVGH LAHVWVAISATLAS
LAHIPQEVSTDGI.AGPATAYPCPT
GLLAATTSRASTAAPGTVGIAPVVRHPGPAQLRVFFILPLLVTTEVAQVKSGAPV
GLIILIIITAGFCRRRRSCSRI

Fig. 24D

【 24E 】


RGGGIG .VTMGVVVWLIVIPAKGWAIDTATGATGATDTATGAMETGGGAIPIWAI
V .ARAADSGVISGVKCGGGGGGAAGG
AALVGGGAGAPAGATSSCWDTGRCRAWLLRVV .VWAMPWLKVATVPTVGA
RVCSVAGAVELRVMTLA .LRN .AFCSSST
SLVASRLLTCFFNSSTRFLSMAFSSSSSLHSTPRGGAKLYSYDSK .GPSGGQHPPRR
RFGPGSWSSKPLSGRS .IS .RS .
RRPGRTEPVEPPPVPVPPPPRASNSKSRCR .RNLHLAPL .QSPLRKSQIGTSSLPFGRSGRS
AGERPRPAATFCLSRGGSSPVF
L .PSSSSLEPWMKRFGRHSLFWKSWQKMNSFLLTPKLDTSLMSGWRYRQRLP
RLHTFLKKSLOMASELAPPLPTPAPL
ASLLPPPPGPPPLLPVPLA .LSRSGILVPPNSGFSLSCHSW .PLR .LR .SPGLLWVSTST
SLLGSAAAAVVARAEF

Fig. 24E

【図 25A】


FDTSCGAGHGGEPEPERASAARGLRAGGHREVPDRLSGSLYL . RQQQ . HPRGWHR
GGWPGDGGGAQQREGDVRLQLQSEGP
QLWTAQICPHQLDRRGRERCAEGSLCQPRQHHGQL PEGGPCDHQRTGRGGCGA .
VHHGEGGQGFRCQLQLSQGEWPLPGR
GTPGSGLCVPEDQCRV . D . KGW . RQLLGQSREGGGEPSAGGKAAGRGGTAAAG
AGAPGA . AA . GCTPGAALSGAGWRGQ
PPEQDVGAAARSGFKEPK . AGVCRAPEGDFQAEGEGHVHHLHLQSSAWQAEEL
PAEAAHPTRDPLWQRASCCHLKAQGR
SPC . GAGAQHSSMSGAGRRGGCV . GTSRAGDLLRAAPTGAAARCWL . AH . PPHSG
PGAQWARALCPCPVRLPGSRRHRDL
L . PREPHHGHRGDRRRLVAVLWAGWPFVHVPCLRGAAH . VRLRAHLALPLSDM
ASLLLEEWELTFSTLPGIGPPVVRM
PQGLRLGRLSLSPQMQQWPGDSHTSFLHPP

Fig. 25A

【 25B】


RHEL RGGPWRRT . AGTGQRCKRPTCGWSPRSPRPTGLSLPMKATAMTSAWLAQ
GRVAWRRWRSSTAGR . CTPSAE . RTP
TLDCPNLSSSTGQARA . TMCGREVPATSAPWPAS . RGPM . PSTHGPRRMWLSAS
WRRWPRLQVPTTAFTRRVAASRTW
DPRPQWALCTRRPMPCLRLKGLVKTASGPKQRRRRRTVGWRKSGGPRRHSGSW
SRSAGSVSCVRLHAGSSAIRSRVARPA
PRAGRGSSSKKWFQGTMSRSLPCTRGRFSSRRRGPCPPPPSPVLSLAS . GAPSCRS
SSPNQRPTLAESQLLPSQGPGQI
SLLRSRRPALLHVWCQRKRRLCMRNLQSRPSTSSPHWCSSKVLALSTLTTTFRA
RGSVKGGSVPVPCITTRQPTTQRSP
LTPRTSSRASR . STKAGGVAMGRMAILACSLPTTWSSLSEAEGTSCPSPLRHGFLI
AGRGGLGVDIQHSSRNRTPEDEA
SGLPPAWQTQVTPNAAMAW . FPHILPASPD

Fig. 25B

【 25C】


VGGCRKDVWESPGHCCIWGDRLSLPSRREP . GLILTGGPI PGRVLNVNSQASSSSN
KEAMSERGRARCALS LTQ . APRSW
QGTCONGHPAHSHATSLRRSPRCP . . GSRGQRRSLCRRLPGSRTGHGHRALAH . AP
GPECGGQCAQSQHLAAAPVGAARR
RSPALEVPHTQPPLL PADPMEECWAPAPQGGDL PWALRWQQLALCQSGSLVG . A
ASAGRGSSACQAEDWRWRWWTWPSPS
A . KSPSGARQTPAHFGSLKPLLAAAPTSCSGGWPRHPAPDSAAPGVQPHAAHAPG
APAPAAAVPPRPAAFPPADGSPPPS
LLWPRSCLYQPF . SQTRHWSSGTQSPLGPGVPRPGSGHSPCESCSWHLKPWPPSP .
CTQAPHPRPVR . WSHGPPSGSWP
WC . RGWHRLPSAHRSRPRLSS . . GQIWAVQSWGPSLCRRRTSPSRC . APPPSPPGHP
PLCQPRGCHCCCLHR . REPSRSG
TSR . PPARRPLAALARSGSGSPPWPAPQLVS

Fig. 25C

【 25D】

SGDAGRMCGNHQAI AAFGVTG . VCOAGGSPEASSSLGVL FLEEC . MSTPRPPLPAI
RKPCLRGEGQDVPSASLNELHVVG
REHAKMAIRPIATPPAFVDHL DARDEVLGVKGDL CVVGCLVVVQGTGTEPLPTE
PLALNVVYVNLRASTLLLHQWGLLVE
GLLLWRFLTSHLLFCLHQTWRSAGRRLSREICPGP . DGSSWLSAKVGLWL GELL
LQEGAPQLARLRTGDGGGGHG PLLL
LENLPRVHGRLLLISVP . NHFLLLLPRPALGAGLATLLLIALLPACSLTQLTLPALL
LQLPLCLLGPPLFLQPTYLLLLL
CFGPEAVFTNPFNLRHGIGLLVHRAHWGLGSHVLEAATLLVKAVVGT . SLGHLL
HDALRLHILLGPCVDGHMGPLQEAGH
GADVAGTGS LPHIVHALACPVDEDKFGQSRVGLHSAEGVHHLPAVELLHLLQ
ATLPCASHADVI AVAFIGKESPVGRG
LLGDHPHVGLLQRWPVPAQVRRHGPPRSSCR

Fig. 25D

【 25E】

RGMQEGCVGITRPLLHLG.QAESAKPEGALRPHPHWGSYSWKSAEQQLPGLLFQ
Q.GSHV.EGKGMCPQPHSMSST.LA
GNMPKWPSGP.PRHQPSSITSMVPMRFSGSKEISVSSAAW.SYRARAQSPCLSPW
P.MWWSMCSEPAFCCCTSGGCS.K
VSCSGGSSYTASSACTRHGGVLGAGSSAGRSALGLEMAAAGSLPKWVSGWVS
CFCRKGLLSLPG.GLEMEVDMALSFC
LKISLGCTADSCSFRFLETTSCCCSHVLLWGLASPPCS..RCSRRAASRSSRSRRSCS
SCRCASSARFSSRRFSSFS
ALAQKLSLPTLLISDTALVFWYTEPTGAWGPTSWKRPLSL.KL.LAPEALATFSMM
HSGSTSSSARALMVTWAPFRKLAM
VLTWLAQAPFRSFTSPVQLMRTNLGSPELGSFTLQKAYITFLLSSSTISSRPPSP
VPATRMSLLLPS.VKRAQSVGD
FSVTTRT.ASCSAGPFRLRFAAMARPAARVE

Fig. 25E

【図 26A】


SRRRRSLAVPGARAHPTAPGTCWGLARTVVEGSRSATPDVPRPARRSLKWPNQ
 DEPNSPGLPAAAGGPVLPGRALRPAA
 LRSPLGRPROAGWRRMGTERS WPGCAQSSPPATRTARGAWSARSSGHCARSCG
 CGRPTPRQYSSGWTPVTAPSPSRSSR
 VASSGSPAGGGAGTGVLWIPRPPCLRGRRRHTTARRTKATRTRRRRWPRAARR
 VPAGLGRISRDLGTPSSFEKSKL
 VPCTKTSTLWSQD.FSHMML.RTSSVRSDFKAQKWKIWPLR.REPRTRQLCS.VS
 WKRKWIRGFRLQNIHKGTKNAKL
 RKPSVTSQVSMKLL.EICR.PLKS.ESSKNNQNA.VKRKMWLH.KNKFMIYQWKTR
 KLRKTF.KHRQT.PFFRVS.ML.K
 VI MLIRV.IKGIWK.SEHTQKIEIVLRGKLYSKQLTGSYMTVMMALEVPLKTVI
 ASSTDLCI.IISIIQGIQFLEAVPN
 SLVIPLNL.AMTGHPALPMWRTVTPWPSVILCRGQIVKLTACLKAASTAACLP.E
 IPMSMTQKWNTSTRGDFRGHTGCR
 RALEVMLQTMFLT.GMKRHLV.KMWLPS.TGSPKGLLVKAALLVHQESPSQHSR
 PRQTW.MTTLNLLAHRRLTRL YLLG
 TLQWGLVSS.DFARMNFEKI.APPWELISK.KPSLWMENEQFCSSGIQLVRRDSEV
 LPSLTSEERQMVFCMMMLHVRKA
 FLTYENG.I.LRMQPMRLFPLCW.ETRLTFVTL LLQRDKNVSQGT LERNWP.RMGH
 YSVKQVPMVLT.WRLFCTLLEK.
 KRELTRMTADPLP.PGPIPKSHHR.RIVAMAKSQTSLACEVFISRILNLCDFGS.QS
 GTSY.HCPMESLQCRET.TQL.
 SGPSGTLALLCFVSVSDLGPLAK.TSHVLTGLKR.HVNVFKMVKKKKK

Fig. 26A

【図26B】

VAGGAPWRCLEPGRTPPLPGPVGGWPEPSSKGAARPPPTFLAPPDVPSSGRTSRT
 SQTRRASRRQVAPSFQGGPCAPRR
 SGALSAAPARRDGGWGRRGAGPAALSLRRLRREPLGAPGARGVPGTVHGAAG
 AAGRRRGSIPAAGRRP,RRHHLPGVRA
 WLPRVPPRGAAPGLGSSGSRARRV,GGAGDTRQGGRRRRRGRGGGAGHLVPRG
 ESRPGLAGFPGATWGRSQVHSQRRAS.
 YLVPKHQPCGAKINSAL,TCYKELHP,DQTSKHRNGKFGHCGEESPGQGSYAVE,V
 GRNGSEDSGCRT,DTERRKTQS.
 GSPQ,PQTSV,N,SRRSAGDH,KAKKARRTIKTRKSKGRCGCIEKTNL,FINGKPES,E
 RPFIRSTDKHLSSE,VRCFEK
 ,LC,SESEY,KGSGNNPSIHRRSK,S,EAN,NTPNS,PEAT,Q,.WP,KCP,KQL,QVQQIFA
 YK,YTLTREYNF,KQSQI
 HWSFPSTSR,L,QVIPLFLCG,GL,LPGPL,SSAEDKL,S,QPA,KLLRQRLVYERSQ,V
 LRSGIQAPEGISEVTRGAG
 ELWR,CFRHRCS,HKG,RDIWFRRCGFRLRLEAPRVC,.RQHC,FIKKAHLSTLAPDR
 PGR,QR,IF,LTEGLQDCTCWG
 RCSGEV,FPHETLQE,ISRKYKRHPGS,FPNENPHCGWRTNSSAALGYSWSGEIQKY
 CQVLLQKGRWCFAAV,CYM,EKL
 S,HTRMGRYD,GCSP,DCSHYAGRKQG,HS,HCCYRGTKMCPRALWRETGHVWVG
 IIL,NKCQRWF,HSGGCSAPCSRSE
 KEN,QG,QQIHYQSNRDQFQKVTTDEELLQWLNPKHPWPVKSSFPEY,ICVTYLAL
 NRVAHPTDVTVLRVYSAGKPEPSS
 QVPLELWLFVLSQ,VIWALWLNRLVMSLQVLKDNM,MFLKW,KKKKK

Fig. 26B

【 26C】

FFFFFFILKTFTCYLLRPVRT.LVYLARGPKSLTETKQRRRAKVPEGPESWVQVSL
HCKLSIGQCQ.DVPLC.EPNKSHK
FSILEMKT SQAKDVNDLAIATILHLW.LFGIGPG.IGNGSAVILVSSLFHFSSKVQNS
LHYVRTIFGTCFTE.CPIRHGQ
FLSKVPWDTFLSLC SSSVTNVS LVS YQHNGNSLMGCILNHIYPFSYVKKAF LTCNI
IQQNTICLSEVRLGNTSESLLTS
CIPELQNCFSFIHNEGFHLEINSQGGAYIFSKFILAKSHEETRLPHCSVP SKYNLVSL
L.AKRFSVVIYQVCLGREC.DG
LS.TNNAFTNRPLGLPV.DGSHIF.TKCLFIPYVRNICV.SITSKALLHPV.PLKSPLV
LVFHF.VILIGISQGRQAA
VEAAFRAVNFTICPLQRITGQGVTVLIHIGRAG.PVIA.RLRGMTNEFGTASRNC
SKAWVM.LPVSCLEYFNLPLKTISIFCVCSDFYQIPFSIQTLISHTFQSI.LTLKKOY
IPW.DIIYMORSVELAITVFKGT
SKAIITVM.LPVSCLEYFNLPLKTISIFCVCSDFYQIPFSIQTLISHTFQSI.LTLKKGY
VCLCF.KVFLNFLVFH.I
INLFFQC SHIFLLTYAF.LFFELS.LFNHGLQISYFSFILTSEVTEGFLSFAFFVFPCLM
FCSLNPLIHFLFQLTQLHSC
LVLGSLHRNGQIFHFCALKSDLTDEVLYNMF IWLN.SWLHKVDVLVQGTNLLFS
GNELGFVPKSRLEILPSPAGTRRAAR
GGQRRRRVLVAFVLLAVVCLRPRLRHGGRGIQRTVPVAPPPAEGPEEATRELLEG
DGAVTVGVQPLEYCLGVGRPHQLR
AQPELLALQAPRAVRVAGGED.AQPGQLLSVPIRLHPAWRGRPRGLRSAAGR
ALPGRTGPPAAAGRPGEFSSGWFGH
LRERRAGRGTSGVAERLPSTTVRAS PQVPGAVGCARAPGTAKERLLRL

Fig. 26C

【図 26D】

FFFFLPF.KHLHVIF.DL.GHD.SI.PEGPNHSLRQNKKEPKFORDLRAGFRFPCTVNS
 P.DSVSRMCHSVKSQISHTN
 SVFWK.RLHRPRMFGI.PLQOFFICGDFLELVPVRLVMDLLSSLSVLFFTSRARCRT
 ASTMLEPSLALVSQNNAPYVMAS
 FSPKCPGTHFCPSVAAVSRMSALFPTSIMGTVSWAASSIISTHSRMLRKLFSHVTS
 YSSKTPSAFLK.DLAITLNL.S.PA
 VSQSCRTVRSPSTMRF.IWKSTPRVALIFSRNSFLQSLMRKLDFTAASPASTIL.A
 FCELKDLALSSTRSVWGESAEEMG
 FDELTMLPSLTOPWGFQSKTEATSSKPNVSSLSMSGTSVSEASPPLSCTPCDL.
 NPLWCLYSTSESYSLGSLKVDKPL
 SKQLSGRLSTSQFVLCRGSQRARESQQSSST.EERDDL.S.PRG.GE.PMNLGLLEIVFP
 GEILFICKDLLNL.LFSRAL
 LRPSLLSCSFR LAVWSISICLSRLFRSSVYARIISRSLSVFRL.SA.SLFKASNSL.RKA
 MFVCASKRSFLTFWFSDKS
 .ICFFNAATSSF.LTRFDCSSSFLSFLMVTCSRPTSVSY.RLRSLRASSALRFSSFRVL
 CSAA.IL.SISSNSLNCIAA
 LSWALFTAMAKFSISVL.SLISRMKFFITCSYG.INLGSTRLMFWYKVLTCSSLGMM
 LASSPSRAWKSCQARPGLAGPHE
 VASAAAASSSPSSSLSCVSGPASDTAGAGSRGPQSRRRPPRRDPRKPRANSWKV
 MAPSRASRRWNTASASAGRTRSSV
 HSARNSSRRRPERFASQAAKTERSASSPSPSASIPGGGGREGSGAPRGAGPS
 LEGRGHLLPPGGPASLARPAGSAT
 .GNVGRGEEERGWPSGSLRRRFGPAPNRSRERWGAPGLQAPPRASCD

Fig. 26D

【図 26 E】

FFFFYHFKNIYMLSFKTKDMTSLFSQRAQITH.DKTKKSQSSRGT.ELGSGFPAL.
 TLHRTVSVGCATLLRAK.VTQI
 QYSGNEDFTGQGCLGFSHCNSSSVVTFWNWSRLDW.WICCHPCQFSFSLLEQG
 AEQPPLC.NHLWHLFHRIMPHTSWPY
 SLQSAIGHIFVPL.QQCHECQPCFLPA.WEQSHGLHPQSYLPILVC.EFSHM.HHTA
 AKHHLPF.SKTWQYF.ISPDQL
 YPRAAELFVLHPQ.GFSFGNQLPGWRLYFLEIHSCKVS.GN.TSPLQRQQVQSCKP
 SVS.KI.RCHLPGLSGARVLRWA
 FLMN.QCCLH.OTLGASSLRKPHLLNQMSLHPLCQEHLCLKHHLQSSPAPRVTSE
 IPSGACIPLLSHTHWDLR.TSRC
 RSSFQAGCQLHNLSSAEDHRGPGSHSPHHRKSGMTCHSLEVEGNDQ.IWDCF.K
 LYSLVRYLYAKIC.TCYNCFQGIIF
 .GHHYCHVASG.LFGVFQFASQDYFDLLCMLGLFPDPFQYSDSDQHNHFSKHLTH
 SEERLCLSVLLKGLS.LSGFPLINH
 KVFVSMQPHLPFDLRVLI VLR AFLAF.WSPADLLLQFHTDV.GH.GLPQLCVFRLSV
 SYVLQPESSDPFPLPTHSTA.LP
 CPGLSSPQWPNFPFLCFEV.SHG.SSL.HVHMAELILAPQG.CFGTRY.LALLWE.TW
 LRPQVAPGNPAKPGRDSRGRTR
 WPAPPPRRRRLRPPRCRVSPAPPQTRRARDPEDPSPGAAPRGGTRGSHARTPGR.
 WRRHGRRPAAGILPRRRPAAPAAPC
 TVPGTTPRAGAPSGSRRRRRRLSAAGPAPLRPHPPPSRLAGAAERAPERGAQGP
 PWKDGATCCRREARRWLVRLVRPL
 EGTSGGARNVGGGRAAPFDDGSGQPPTGPGSGGVPRGSRHRQGAPPAT

Fig. 26E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/09277

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession number R18386, 22 April 1995 (1995-04-22) HILLIER ET AL.: "The WashU-Merck EST project." XP002146969 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,6,7
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession number W65329, 12 June 1996 (1996-06-12) HILLIER ET AL.: "The WashU-Merck EST project." XP002146970 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,6,7
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession number AA402736, 1 May 1997 (1997-05-01) HILLIER ET AL.: "WashU-NCI human EST project." XP002146971 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,6,7
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession number W68106, 16 June 1996 (1996-06-16) HILLIER ET AL.: "The WashU-Merck EST project." XP002156940 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,6,7
X	<p>WO 96 31625 A (UNIV NORTH CAROLINA ;CYTOGEN CORP (US)) 10 October 1996 (1996-10-10) figures 56,57</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15,25
X	<p>SPARKS A. B. ET AL.: "CLONING OF LIGAND TARGETS: SYSTEMATIC ISOLATION OF SH3 DOMAIN- CONTAINING PROTEINS" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 14, no. 6, June 1996 (1996-06), pages 741-744, XP000876847 ISSN: 1087-0156 the whole document & DATABASE EMBL 'Online! Accession number Q62418, 1 June 1998 (1998-06-01) SPARKS ET AL.: "Drebrin-like SH3 domain-containing protein SH3P7." abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-15,25

5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/09277

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>ENSENAT D. ET AL.: "A novel Src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 48, 26 November 1999 (1999-11-26), pages 33945-33950, XP002156939 ISSN: 0021-9258 the whole document</p> <p>---</p>	1-17,25
P, X	<p>WO 99 55858 A (SCHMITT ARMIN ;SPECHT THOMAS (DE); DAHL EDGAR (DE); HINZMANN BERND) 4 November 1999 (1999-11-04) SEQ.IDs. 43, 285 and 287 page 185</p> <p>---</p>	1-15,25
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession number C75612, 6 September 1997 (1997-09-06) TAKEDA J.: "Large scale collection of expressed sequence tags (ESTs) from human pancreatic islet cDNA library." XP002156941 abstract</p> <p>---</p>	2,6,7
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession number AA470519, 21 June 1997 (1997-06-21) STRAUSBERG R.: "National Institute, Cancer Genome Anatomy Project." XP002156942 abstract</p> <p>-----</p>	2,6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/09277

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 22-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 22-24
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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.:

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 22-24

Claims 22-24 refer to a substance that modulates the activity of a Src substrate (Tks 107, Tks 113, Tks 118, Tks 202) without giving a true technical characterization. Moreover, no such specific compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT).

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/09277

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9631625 A	10-10-1996	AU 711141 B	07-10-1999
		AU 5382196 A	23-10-1996
		CA 2217641 A	10-10-1996
		EP 0833941 A	08-04-1998
		JP 11509172 T	17-08-1999
		ZA 9602813 A	09-10-1996
WO 9955858 A	04-11-1999	DE 19820190 A	04-11-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P	11/06	A 6 1 P	4 C 0 8 4
	13/12		4 H 0 4 5
	17/06		
	19/02		
	25/00		
	29/00		
	35/00		
	37/06		
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K	
	16/18		
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	
	1/19		
	1/21		
	5/10		A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	Z
	1/68		Z
G 0 1 N	33/15		D
	33/50		M
	33/53		
	33/566		
// C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	C
		C 1 2 N	Z N A A
			A
			B

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ファン, フアン
 アメリカ合衆国 94002 カリフォルニア
 州 ベルモント, チュラ ビスタ ドラ
 イブ 1512

(72)発明者 コートニッジ, サラ・エー
アメリカ合衆国 94010 カリフォルニア
州 バーリングゲーム, アルバラード スト
リート 1408

F ターム(参考) 2G045 BB24 CA25 CB01 CB14 DA12
DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
FB07
4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA04
DA02 EA02 GA11 HA01 HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ20 QQ42
QQ52 QR55 QR59 QR62 QR77
QR80 QS24 QS25 QS28 QS34
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA17 ZA01 ZA34 ZA36 ZA45
ZA59 ZA68 ZA81 ZA89 ZA96
ZB02 ZB11 ZB15 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41
CA40 DA76 DA86 EA21 EA22
EA23 EA27 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2002541802A5	公开(公告)日	2007-06-07
申请号	JP2000611673	申请日	2000-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	苏根公司		
申请(专利权)人(译)	Sujen公司		
当前申请(专利权)人(译)	Sujen公司		
[标]发明人	ファンファン コートニッジサラエー		
发明人	ファン,ファン コートニッジ,サラエー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K45/00 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 C12P21/02		
CPC分类号	C07K14/47 A61P1/04 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29 /00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/02.C		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB14 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063 /QA18 4B063/QA19 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064 /CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/ZA01 4C084 /ZA34 4C084/ZA36 4C084/ZA45 4C084/ZA59 4C084/ZA68 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/128492 1999-04-09 US		
其他公开文献	JP2002541802A		

摘要(译)

本发明涉及新颖的Tks107, Tks113, Tks118和Tks202多肽, 编码该新颖多肽的核苷酸序列, 以及可用于诊断和治疗各种相关疾病和病症的各种产品和方法。

