

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-124574

(P2005-124574A)

(43) 公開日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 1/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 5/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 11/00	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 31 O L (全 173 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-307483 (P2004-307483)	(71) 出願人	504393460
(22) 出願日	平成16年10月21日 (2004.10.21)		アーチ ディベロプメント コーポレイション
(62) 分割の表示	特願平7-500850の分割		アメリカ合衆国 イリノイ 60637,
原出願日	平成6年5月20日 (1994.5.20)		シカゴ, イースト 58ティーエイチ
(31) 優先権主張番号	08/066,296		ストリート 1101
(32) 優先日	平成5年5月20日 (1993.5.20)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	08/100,694	(72) 発明者	グレイム アイ. ベル
(32) 優先日	平成5年7月30日 (1993.7.30)		アメリカ合衆国 イリノイ 60637,
(33) 優先権主張国	米国 (US)		シカゴ, エス. ドーチェスター アベニュー
(31) 優先権主張番号	08/147,592		5719
(32) 優先日	平成5年11月5日 (1993.11.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 オピオイドレセプター：組成物および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 種々のオピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸残基配列のうち少なくとも48の連続したアミノ酸に対応したポリヌクレオチドを用い、種々のオピオイドレセプターポリペプチドをコードする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組み換えポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドであって、配列番号 2 または配列番号 1 2、あるいは生物学的に等価な配列のうち少なくとも 4 8 の連続したアミノ酸を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドであって、ここで、前記ポリペプチドが、キメラである、ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドであって、ここで、前記ポリペプチドが、非 κ オピオイドレセプターポリペプチド由来のアミノ酸配列をさらに含む、ポリヌクレオチド。 10

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基 7 9 ~ 3 8 0、アミノ酸残基 1 6 7 ~ 2 2 8、またはアミノ酸残基 2 7 1 ~ 3 1 8 を含むか、あるいは配列番号 1 2 のアミノ酸残基 1 ~ 2 9 4、アミノ酸残基 8 1 ~ 1 4 1、またはアミノ酸残基 1 8 5 ~ 2 3 2 を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記ペプチドが、キメラであり、そして、配列番号 2 または配列番号 1 2 により規定される κ オピオイドレセプターのアミノ酸配列の少なくとも 6 2 アミノ酸を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 6】

前記コードされたポリペプチドが、(a) κ オピオイドレセプターの第二の細胞外ループ、または (b) κ オピオイドレセプターの第二の細胞外ループおよび哺乳動物 δ オピオイドレセプターの第三の細胞外ループを含む、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

配列番号 1 または配列番号 1 1 の少なくとも 2 5 の連続した塩基に同一であるかもしくはは相補的であるヌクレオチド塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記ヌクレオチド塩基配列が、配列番号 1 または配列番号 1 1 の配列を含む、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド。 30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれかによって規定されるポリヌクレオチドであって、前記コードされたポリペプチドが、 κ オピオイドレセプターである、ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

組換えポリペプチドであって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 1 2 により規定されるアミノ酸配列の少なくとも 4 8 アミノ酸を含む、ポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸配列または配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 2 または配列番号 1 2 により規定される組換えポリペプチドであって、3 つのアゴニスト、アンタゴニスト、および非特異的アゴニスト結合部位の 1 つまたは 2 つが欠失されている、組換えポリペプチド。 40

【請求項 13】

アミノ末端ドメインにおける前記アンタゴニスト結合部位が欠失されている、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

組換えポリペプチドであって、配列番号 2 または配列番号 1 2 の κ オピオイドレセプターの第二の細胞外ループの少なくとも κ レセプター特異的アゴニスト結合部分を含む、ポリペプチド。 50

【請求項 15】

前記κオピオイドレセプターの少なくとも前記第二の細胞外ループを含む、請求項14に記載のポリペプチドであって、該第二の細胞外ループが、アミノ酸GGTKVREDVDVIECS/CLQFPDD EYSWWを含む、ポリペプチド。

【請求項 16】

キメラポリペプチドであって、配列番号2または配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する哺乳動物κオピオイドレセプターの少なくとも1つのリガンド結合部位を含む、ポリペプチド。

【請求項 17】

前記ポリペプチドが、前記κオピオイドレセプターの第二の細胞外ループを含む、請求項16に記載のポリペプチド。 10

【請求項 18】

前記ポリペプチドが、δオピオイドレセプターの第三の細胞外ループをさらに含む、請求項17に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

κオピオイドレセプターポリペプチドである、請求項10～18のいずれか1項に規定されるポリペプチド。

【請求項 20】

請求項1～9のいずれかに記載のポリヌクレオチド、または、請求項10～19のいずれかにおいて規定されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター 20

【請求項 21】

請求項1～9のいずれかに記載のポリヌクレオチド、請求項10～19のいずれかに規定されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または請求項20に記載の発現ベクターでトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

【請求項 22】

請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドを調製する方法であって、該方法は、

a) 細胞に、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをトランスフェクトして形質転換宿主細胞を生成する工程；および 30

b) 該形質転換宿主細胞を、該ポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持する工程、
を包含する、方法。

【請求項 23】

請求項10～19のいずれかに規定されるオピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性である抗体。

【請求項 24】

オピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力について物質をスクリーニングする方法であって、該方法は、

a) 請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドを提供する工程；および 40

b) 該物質が該ポリペプチドと相互作用する能力を試験する工程、
を包含する、方法。

【請求項 25】

前記ポリペプチドを提供する工程が、宿主細胞に、該オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをトランスフェクトして形質転換細胞を形成し、該形質転換細胞を、該ポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持することにより行われる、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

κオピオイドレセプターポリペプチドの特異的アゴニストとして作用する能力を有する産物を作製する方法であって、該方法は、

- a) 請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドを提供する工程；
 - b) 候補特異的κオピオイドレセプターアゴニストを得る工程；
 - c) 該物質が該ポリペプチドと相互作用する能力を試験する工程；および
 - d) 該オピオイドレセプターと相互作用する能力を有する産物を提供する工程、
- を包含する、方法。

【請求項27】

κオピオイドレセプターポリペプチドの特異的アゴニストとして作用する能力を有する産物を作製するための、請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドの使用。

【請求項28】

請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA転写物を検出する方法であって、該方法は、

- a) 該メッセンジャーRNA転写物を、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして、二重鎖を形成する工程；および
- b) 該二重鎖を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項29】

生物学的試料中の請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドの存在を検出するための診断アッセイキットであって、該キットが、該ポリペプチドと免疫反応し得る一次抗体を含む第1のコンテナを備え、ここで該一次抗体が、少なくとも1つのアッセイを実施するに十分な量で存在する、アッセイキット。

20

【請求項30】

生物学的試料中の請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドと免疫反応性である抗体の存在を検出するための診断アッセイキットであって、該キットが、該抗体と免疫反応するポリペプチドを含む第1のコンテナを備え、ここで該ポリペプチドが、少なくとも1つのアッセイを実施するに十分な量で存在する、キット。

【請求項31】

薬学的組成物または診断組成物の開発および調製における、請求項10～19のいずれかに規定されるポリペプチドをコードする、請求項1～9のいずれかに規定されるポリヌクレオチドの使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、1993年11月5日に提出された米国特許出願第08/147,592号の一部継続出願であり、この出願自身は1993年7月30日に提出された米国特許出願第08/100,694号の一部継続出願であり、この出願は1993年5月20日に提出された米国特許出願第08/066,296号の一部継続出願であった。上記出願の開示のすべては、本明細書に参考として援用される。

【0002】

関連する所有権

本明細書に開示される情報についての研究は、Howard Hughes Medical Institute、American Diabetes Associationならびに米国公衆衛生局認可 DK-20595、DK-42086、MH-45533、およびMH-48518により援助された。これらの協会および米国政府は本明細書に開示される発明に対して特定の権利を所有し得る。

40

【0003】

発明の分野

本発明は、一般にオピオイドレセプターの組成物およびオピオイドレセプターを得るための方法に関する。本発明はまた、オピオイドレセプターをコードするDNA配列、これらの配列を有する組換えベクター、上記配列またはベクターのいずれかを含む組換え宿主細胞、および組換えオピオイドレセプターポリペプチドに関する。本発明はまた、オピオイドレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストのような候補物質を選択および改良する

50

ために設計されたアッセイにおいて、単離された組換えレセプターポリペプチドを使用するための方法、ならびに診断、薬剤設計、および治療用途に使用するポリペプチドを含む。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

オピオイド薬剤は、痛覚、意識、運動制御、気分、および自律神経機能に関して種々の影響を有し、そしてまた身体的依存を誘導し得る(Koobら 1992)。内因性オピオイド系は、内分泌、心臓血管、呼吸、胃腸管、および免疫機能の調整に重要な役割を演じている(Olsonら 1989)。オピオイド類は、中枢および末梢神経系を通じて位置する特異的膜関連レセプターに結合することによりそれらの作用を奏する(Pertら 1973)。これらのオピオイドレセプターの内因性リガンドは、3種の前駆体タンパク質、プロオピオメラノコルチン(proopiomelanocortin)、プロエンケファリン(proenkephalin)、およびプロダイノルフィン(prodynorphin)に由来する20種以上のオピオイドペプチドのファミリーとして同定されている(Hughesら、(1975); Akilら、(1984))。オピオイドペプチドは、オピオイドアルカロイドとは別のクラスの分子に属するけれども、それらは、レセプターとの相互作用に必要な、芳香族環と並置される陽電荷を含む共通の構造的特徴を有する(Bradburyら(1976))。

【0005】

薬理学的研究により、 δ 、 κ 、 μ 、および σ と呼ばれる、少なくとも4種の主要クラスのオピオイドレセプターが存在することが示唆されている(Simon 1991; Lutzら 1992)。これらのクラスは、種々のオピオイドリガンドに対するそれらの親和性において、およびそれらの細胞内分布において異なる。異なるクラスのオピオイドレセプターが、異なる生理学的機能を供すると考えられている(Olsonら 1989; Simon 1991; LutzおよびPfister 1992)。しかし、機能および分布について実質的な重複がある。多くのグループからのオピオイドレセプターの生化学的特徴付けは、3種のレセプターサブタイプのすべてについて約60,000 Daの分子量を報告し、それらが関連分子であり得ることを示唆している(Lohら(1990))。さらに、3種のレセプターサブタイプ間の類似性は、(I) μ および δ リガンドの両方と競合するが κ リガンドとは競合しない抗イディオタイプモノクローナル抗体(Gramschaら(1988); Cosciaら(1991))、および(I) μ および κ レセプターの両方と相互作用する精製 μ レセプターに対して惹起されたモノクローナル抗体の単離により支持される。

【0006】

オピオイドは、痛みの制御において臨床的に使用されるが、それらの使用は、呼吸低下、縮瞳、胃腸管運動性の減少、鎮静、吐気、および嘔吐を含む一群の望ましくない副作用により制限される(Jaffeら(1990))。慢性の痛みの処置においてオピオイドの使用に関する問題は、依存性と濫用の可能性である。研究は、オピオイドの臨床効果が種々のレセプターを介して仲介され、そしてオピオイドの治療効果および望ましくない副作用が異なるレセプター(サブ)タイプにより仲介されることを示唆する(Jaffeら(1990); Pasternack(1993))。従って、オピオイドの治療効果および副作用は、レセプターサブタイプに対するより選択的な因子の使用により分けられ得る。本発明は、クローン化 κ 、 δ 、および μ オピオイドレセプターの薬理学的特性、および広く使用されているオピオイドリガンドのレセプター選択性を開示する。

【0007】

δ レセプターは、エンケファリンに最も大きな親和性で結合し、そして μ または κ レセプターのいずれよりも、脳幹神経節および辺縁領域内で高濃度に、脳内でより分離性の分布を有する。モルヒネは、主として μ レセプターと相互作用するけれども、このオピオイドの末梢投与は、エンケファリンの放出を誘導する(Bertolucciら(1992))。従って、エンケファリンは、多分 δ レセプターと相互作用することにより、モルヒネに対する生理学的応答の一部を仲介し得る。薬理学的および生理学的不均一性にかかわらず、少なくと

もいくつかのタイプのオピオイドレセプターが、アデニル酸シクラーゼを阻害し、 K^+ コンダクタンスを増加させ、そして百日咳毒素感受性機構により Ca^{2+} チャンネルを不活性化する(Puttfarckenら 1988; Attal I ら 1989; Hs I a ら 1984)。これらの結果およびその他は、オピオイドレセプターが、Gタンパク質を通じてシグナルを与える細胞表面レセプターの大ファミリーに属することを示唆する(D I Ch I ara ら(1992); Loh ら(1990))。

【0008】

オピオイドレセプターをコードするcDNAをクローン化するいくつかの試みが報告されている。 μ 選択性を有するオピオイド結合タンパク質(OBCAM)をコードするcDNAが単離されたが(Schof I eld ら(1989))、推定タンパク質は、シグナル伝達に必要であると推定される貫膜(transmembrane)ドメインを欠失していた。さらに最近、発現クローニングにより得られた、別のcDNAの単離が報告された(X I e ら(1992))。推定タンパク質の配列は、7つの推定貫膜ドメインを示し、ヒトのニューロメジンK(neuromed I n K)レセプターに非常に類似している。しかし、COS細胞で発現されるこのレセプターに対するオピオイドリガンドの親和性は、予期される値より2桁小さく、そしてサブタイプ選択性は示され得ない。

10

【0009】

多くの細胞表面レセプター/貫膜系は、以下の少なくとも3種の膜結合ポリペプチド成分からなる：(a)細胞表面レセプター；(b)イオンチャンネルまたは酵素アデニル酸シクラーゼのようなエフェクター；および(c)レセプターおよびそのエフェクターの両方にカップリングする、グアニンヌクレオチド結合調節ポリペプチドまたはGタンパク質。

【0010】

Gタンパク質がカップリングしたレセプターは、光、臭気物質(odorant)、ペプチドホルモン、および神経伝達物質など種々の細胞外シグナルの作用を仲介する。そのようなレセプターは、酵母およびヒトのような進化論的に離れた生物において同定されている。ほぼすべてのGタンパク質カップリングレセプターは、互いに配列類似性を有し、そしてすべてが脂質二層にまたがる7つの疎水性(およびおそらく α らせん)セグメントからなる類似のトポロジーモチーフ(mot I f)主要素を担っている(Dohlman ら 1987; Dohlman ら 1991)。

20

【0011】

Gタンパク質は、3種の堅く会合したサブユニット、分子量の低くなる順に、 α 、 β 、および γ (1:1:1)、からなる。レセプターへのアゴニストの結合に次いで、コンホメーション変化がGタンパク質に伝達され、G α サブユニットを結合GDPをGTPに交換させ、そして $\beta\gamma$ サブユニットから解離させる。 α サブユニットのGTP結合形態は、代表的には、エフェクター調整部分である。シグナル増幅は、シグナルレセプターが多くのGタンパク質分子を活性化する能力、およびエフェクターの多くの触媒サイクルのG α GTPによる刺激から生じる。

30

【0012】

調節Gタンパク質のファミリーは、複数の異なる α サブユニット(ヒトでは20種を超える)を含み、 β および γ サブユニットのより小さなプール(それぞれ4種以上)と会合する(Strothman および S I mon 1991)。従って、種々の α サブユニットの標的または機能もまた、それらが会合する β および γ サブユニットに依存し得るが、 α サブユニットにおける違いが、おそらく種々のGタンパク質オリゴマーを区別することが理解される(Strothman および S I mon 1991)。

40

【0013】

細胞培養および薬理学的方法における改良、ならびにより最近の分子クローニングおよび遺伝子発現技術の使用が、新規なサブタイプおよび先に同定されたレセプターのサブのサブタイプを含む、多くの7種貫膜セグメントレセプターの同定および特徴付けに至った。 α_1 および α_2 アドレナリン性レセプターは、かつてそれぞれ単一のレセプター種からなると考えられていたが、現在ではそれぞれが少なくとも3種の別の遺伝子によりコードされることが知られている(Kob I lka ら 1987; Regan ら 1988; Cotecc h I a ら 1988; Lomas ney 1990)。桿細胞におけるロドプシン(薄暗い光中での視野を仲介する)に加えて、色覚

50

を仲介する 3 種の非常に良く似た円錐体色素がクローン化されている (Nathansら 1986A ; および Nathansら 1986B)。G タンパク質カップリングレセプターのすべてのファミリーは、G タンパク質カップリングレセプターファミリーの他のメンバー (例えば、ドーパミン性、ムスカリン性、セロトニン性、タキキニンなど) に類似であるようであり、そしてそれぞれが特徴的な 7 種の貫膜セグメント様相 (topography) を有しているようである。

【0014】

7 種の貫膜セグメントレセプターを互いに比較した場合、アミノ酸配列保存の識別し得るパターンが観察される。貫膜ドメインはしばしば最も類似し、その一方でアミノ末端領域およびカルボキシ末端領域、ならびに貫膜セグメント V および VI を接続する細胞質ループは極めて多様である (Dohlmanら 1987)。

10

【0015】

キナーゼおよび G タンパク質のような細胞質ポリペプチドとの相互作用は、レセプターの貫膜ドメインを接続する疎水性ループを含むことが推定された。しかし、機能の保存のために、7 種の貫膜セグメントレセプター間でどの特徴が保存されているか、そして新規機能に対してどの分枝した特徴が構造的適合を示すかを決定するために、挑戦がなされてきた。多くの戦略がこれらの考えを試験するために使用された。これらは、置換および欠失変異体、およびハイブリッドまたはキメラレセプターの構築のための組換え DNA および遺伝子発現技術の使用を包含する (Dohlmanら 1991)。

【0016】

レセプターサブタイプ、G タンパク質サブユニット、およびエフェクターの数が増えるにつれ、これらレセプターのリガンド結合および G タンパク質認識特性の特徴付けが調査の重要領域となる。複数のレセプターが単一の G タンパク質にカップリングすること、そして β_2 および α_2 アドレナリン性レセプターへのエピネフリン結合の場合のように、単一のリガンドが複数の機能的に別個のレセプターサブタイプに結合し得ることが長い間知られている。さらに、類似のレセプターを有する G タンパク質およびエフェクターカップリング特異性もまた同定されている。例えば、ヒト G_i の 3 つの種がクローン化され (It ohら 1988)、そして交互の mRNA スプライシングが G_s の複数の変異体を生じることが示されている (Kozasaら 1988)。ムスカリン性および α_2 アドレナリン性レセプターのクローニングおよび過剰生産は、単一のレセプターサブタイプが、細胞において高レベルで発現されるとき、G タンパク質の 1 つ以上のタイプにカップリングするという実証を導いた。

20

30

【0017】

オピオイドレセプターは、還元剤に感受性であることが知られている。そしてジスルフィド架橋の存在が、リガンド結合に必須であると仮定されている (G I oann I n I ら 1989)。ロドプシン、ムスカリン性、および β アドレナリン性レセプターについては、2 つの第 1 細胞外ループのそれぞれにおける 2 つの保存されたシステイン残基が、機能的タンパク質構造を安定化するために重要であることが示されており、そしてジスルフィド架橋を形成することにより安定化すると推定される。オピオイドリガンドの構造/機能研究は、レセプターに対する高親和性での結合のためのプロトン化されたアミン基の重要性を示した。従って、レセプターの結合部位は、決定的な負に荷電された相対物を有し得る。カテコールアミンレセプターは、それらの配列において、それらのリガンドの正に荷電されたアミン基を結合するために必要であることが示されている保存されたアスパラギン酸残基を呈示する。

40

【0018】

種々のオピオイドレセプターの機能の複雑さおよび見かけ上の同義性が与えられる場合、根本的に重要な疑問は、どのようにして、そしてどのような状況下で、特異的サブタイプおよびサブのサブタイプレセプターが、適切な刺激性リガンドの存在下で、それらの生理学的効果を奏するかということである。この疑問に答えるための従来のアプローチは、インビトロで精製レセプターおよび G タンパク質成分を再構築することであった。不運にも、精製スキームは、非常に限られた数のレセプターサブタイプおよびそれらの同族 G タンパク質のみについて成功しているに過ぎない。あるいは、異種発現系が、クローン化レ

50

セプターの特徴付けにおいて、およびレセプターGタンパク質カップリング特異性を解明することにおいて、より一般的に有用であり得る(Marulloら 1988; Payetteら 1990; Kingら 1990)。

【0019】

そのような系の1つが、最近酵母細胞で開発された。そこでは、哺乳類 β_2 アドレナリン性レセプターおよびG_s α サブユニットに対する遺伝子が同時発現された(Kingら 1990)。任意のヒト組織におけるより数百倍高いレベルの β_2 アドレナリン性レセプターの発現が達成され、そしてリガンド結合が適切な親和性、特異性、および立体選択性であることが示された。さらに、フェロモンシグナル伝達経路の β_2 アドレナリン性レセプター介在活性化が、成長停止の賦課、形態変化、および(β ガラクトシダーゼをコードする)Eshe 10
rI chI a colI lacZ遺伝子に融合されたフェロモン応答性プロモーター(FUS1)の誘導を含む種々の基準により示された(Kingら 1990)。

【0020】

最後に、他の関連サブタイプの非存在下における単一レセプターの発現は、しばしば、単離された非組換え哺乳類細胞においてさえ、達成することが不可能である。従って、オピオイドレセプター研究に対して、古典的遺伝学の標準アプローチまたは分子生物学の強力な技法でさえ、適用するのがかなり困難であると考えられている。特に、個々のオピオイドレセプターをコードするDNA配列の同定のための手段が必要である。このような単離 20
された組換え配列が与えられれば、イソ型特異的オピオイドレセプターアゴニストおよびアンタゴニストの設計および試験に関連する以前は扱いにくかった問題を取り扱うことが可能である。オピオイドレセプターをコードするcDNAの入手可能性は、単一形質導入機構の詳細な研究を可能にし、そしてこれらレセプターのmRNAの解剖学的分布を示し、神経系におけるそれらの発現パターンに関する情報を提供する。この情報は、結局、無痛覚(ana 30
lges I a)におけるオピオイド系のより良好な理解、そしてまたより特異的な治療剤の設計を可能にするはずである。

【0021】

オピオイドレセプターをコードするポリヌクレオチド配列、およびコードされたレセプターのポリペプチド配列の入手可能性は、無痛覚のような、薬学的組成物を、高められた特異性の機能を有して設計する能力を著しく増加させる。一般に、これらポリペプチド配列の入手可能性は、候補組成物の効率的なスクリーニングを可能にする。スクリーニング 30
プロセスを通じた操作原理は以下の通りである：天然アゴニストおよびアンタゴニストが細胞表面レセプターおよびチャンネルに結合して生理学的効果を生じる；特定の他の分子がレセプターおよびチャンネルに結合する；従って、特定の他の分子が生理学的効果を生じ得、そして治療的薬学的因子として作用する。従って、候補薬剤のオピオイドレセプターに結合する能力は、所望の機能的効力を有する薬学的組成物の選択のために特に有効なスクリーニング基準として機能し得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

細胞表面レセプターに優先的に結合する能力に基づいて候補薬剤をスクリーニングする 40
以前の方法は、組織ベースの技術に限られていた。これらの技術では、目的のレセプタータイプが豊富な動物組織を抽出および調製する；次いで候補薬剤を調製組織と相互作用させ、そしてレセプターに結合することが見いだされた薬剤がさらなる研究に選択される。しかし、これらの組織ベースのスクリーニング技術は、いくつかの顕著な欠点がある。第1に、レセプター細胞組織の供給源——実験動物——が高価であるので高価である。第2に、スクリーニングを実施するために広範な技術的インプットが必要である。そして、第3に、ただ1つのレセプターサブタイプのみを独占的に発現させる組織は存在しないので、スクリーニングは結果を混乱させ得る。従来 50
の先行技術スクリーニングでは、基本的には、間違った相互作用、または最良でも、種々の望まない相互作用の全体で混合された適切な相互作用を観察している。動物組織スクリーニングのさらなる基本的欠点は、それら

が動物レセプターを含む点にある—これは動物に対する薬剤を開発するには理想的であるがヒト治療剤においては価値が制限される。

【0023】

この問題に対する回答が本発明により提供される。本発明のポリヌクレオチドは、適切な宿主細胞中にトランスフェクトされて、オピオイドレセプターに相当するポリペプチド配列を、大量におよび比較的簡単な実験室手順による両方で発現し得る。この結果は、組織ベースのスクリーニング中で遭遇する競合的および望まない相互作用のない、非常に特異的なレセプター—薬剤相互作用を利用できることである。そのような内因性レセプターが存在しない微生物(例えば酵母細胞または変異哺乳類細胞株)におけるさらなる発現が、サブタイプ選択的薬剤のスクリーニングおよび評価のために有用であり得る (Marulloら 1988; Payetteら 1990; および Kingら 1990)。

【課題を解決するための手段】

【0024】

項目1. オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離されおよび精製されたポリヌクレオチドであって、ここで該オピオイドレセプターポリペプチドは、 κ オピオイドレセプターまたは先に規定されたオピオイドレセプターの薬理学的特性に比べ薬理学的に改変された特性を有するオピオイドレセプターであり、ここで該オピオイドレセプターが配列番号2、配列番号6、または配列番号12のいずれかのアミノ酸残基配列を含む、ポリヌクレオチド。

項目2. 前記ポリヌクレオチドがDNA分子である、項目1に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。 20

項目3. 短縮型オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを含む単離されおよび精製されたポリヌクレオチドであって、ここで、該短縮型オピオイドレセプターポリペプチドが、項目1に記載の短縮型オピオイドレセプターポリペプチドである、ポリヌクレオチド。

項目4. 前記短縮型オピオイドレセプターポリペプチドが、 κ オピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380、 κ オピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基167から228、または κ オピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基271から318を含む、項目3に記載のポリヌクレオチド。

項目5. 配列番号2、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸配列の部分を含むキメラオピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチド。 30

項目6. 前記ポリペプチドが、 κ オピオイドレセプターの第2細胞外ループを含み、特にここで該ポリペプチドがまた δ オピオイドレセプターの第3細胞外ループを含む、項目5に記載の単離されおよび精製されたポリヌクレオチド。

項目7. 前記キメラポリペプチドが、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ または $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ である、項目5または6に記載のポリヌクレオチド。

項目8. 配列番号1、配列番号5、または配列番号11の少なくとも25の連続する塩基のセグメントと同一または相補的である塩基配列を含む単離されおよび精製されたポリヌクレオチドであって、ここで該ポリヌクレオチドが項目1で規定されるオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。 40

項目9. 単離および精製された哺乳類オピオイドレセプターポリペプチドであって、ここで該ポリペプチドは組換えポリペプチドであり、そしてここで κ オピオイドレセプターが配列番号2のアミノ酸配列または配列番号12のアミノ酸配列または配列番号6のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

項目10. 配列番号2、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸配列を有する短縮型オピオイドレセプターポリペプチドとしてさらに規定される、単離および精製されたオピオイドレセプターポリペプチド。

項目11. 前記短縮型オピオイドレセプターポリペプチドが短縮型 κ オピオイドレセプターポリペプチドであり、より特定すればここで該短縮型オピオイドレセプターポリペプチ 50

ドが、配列番号2または配列番号12の配列を有するκオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380、または配列番号2または配列番号12のアミノ酸配列を有するκオピオイドレセプターポリペプチドの少なくともアミノ酸残基167から228、または配列番号2または配列番号12のアミノ酸配列を有するκオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基271から318を含む、項目10に記載の短縮型オピオイドレセプターポリペプチド。

項目12. キメラオピオイドレセプターポリペプチドを含む項目11に記載のオピオイドレセプターポリペプチドであって、特にここで該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号12のアミノ酸配列を有するκオピオイドレセプターの第2細胞外ループを含み、特にここで該ポリペプチドがまたδオピオイドレセプターの第3細胞外ループを含む、ポリペプチド。

10

項目13. 前記キメラポリペプチドがκ₁₋₇₈/δ₇₀₋₃₇₂またはδ₁₋₆₉/κ₇₉₋₃₈₀である、項目12に記載のオピオイドレセプターポリペプチド。

項目14. 項目1および項目9でそれぞれ規定されるオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターであって、特にここで該ポリヌクレオチドがエンハンサープロモーターに作動可能に連結される、発現ベクター。

項目15. 項目9で規定されるオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされた組換え宿主細胞であって、特にここで該細胞がPC12細胞またはCHO-D644細胞である、組換え宿主細胞。

項目16. 前記ポリヌクレオチドが、前記組換え宿主細胞において機能的な調節シグナルの転写制御下にあり、ここで該調節シグナルが、すべての必要な転写および転写後改変を可能にする様式で前記オピオイドレセプターポリペプチドの発現を適切に制御する、項目15に記載の組換え宿主細胞。

20

項目17. 項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドを調製する方法であって、

(a)該レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトして形質転換宿主細胞を生成する工程；および

(b)該形質転換宿主細胞を、該ポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持する工程、

を包含する方法。

30

項目18. 項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性である抗体。

項目19. 項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドを検出する方法であって、

(a)該ポリペプチドを項目18に記載の抗体と免疫反応させ、抗体-ポリペプチド結合体を形成する工程；および

(b)該結合体を検出する工程、
を包含する方法。

項目20. 項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA転写物を検出する方法であって、

40

(a)該メッセンジャーRNA転写物を該オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして二重鎖を形成する工程；および

(b)該二重鎖を検出する工程、
を包含する方法。

項目21. 生物学的試料中で、項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドの存在を検出するための診断アッセイキットであって、該キットが該オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応し得る一次抗体を含む第1コンテナを含み、ここで該一次抗体が少なくとも1つのアッセイを実施するに十分な量で存在する、アッセイキット。

項目22. 生物学的試料中で、項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性である抗体の存在を検出するための診断アッセイキットであって、該キットが

50

該抗体と免疫反応するオピオイドレセプターポリペプチドを含む第1コンテナを含み、そしてここで、該ポリペプチドが少なくとも1つのアッセイを実施するに十分な量で存在する、アッセイキット。

項目23. 項目9で規定されたオピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力について物質をスクリーニングする方法であって、

- (a)該オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程；および
 - (b)該物質が該オピオイドレセプターと相互作用する能力を試験する工程、
- を包含する方法。

項目24. 前記オピオイドレセプターポリペプチドがキメラオピオイドレセプターポリペプチドであり、特にここで該ポリペプチドが κ オピオイドレセプターの第2細胞外ループを含み、特にここで該ポリペプチドがまた δ オピオイドレセプターの第3細胞外ループを含む、項目23に記載の方法。

項目25. 前記キメラオピオイドレセプターポリペプチドが $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ または $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ である、項目24に記載の方法。

項目26. 前記オピオイドレセプターポリペプチドが短縮型オピオイドレセプターポリペプチドであり、特にここで該短縮型オピオイドレセプターポリペプチドが短縮型 κ オピオイドレセプターポリペプチドであり、さらに特にここで該短縮型オピオイドレセプターポリペプチドが κ オピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380を含む、項目23に記載の方法。

項目27. 前記オピオイドレセプターポリペプチドが変異オピオイドレセプターポリペプチドである、項目23に記載の方法。

項目28. 前記オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程が、該オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで宿主細胞をトランスフェクトして形質転換細胞を形成し、そして該形質転換細胞を、該オピオイドレセプターポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持することにより行われる、項目23に記載の方法。

項目29. κ オピオイドレセプターの特異的アゴニストとして作用する能力を有する産物を作成する方法であって、該方法は以下の工程を包含する：

- (a)オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程であって、特に該ポリペプチドが κ オピオイドレセプターポリペプチドの部分を含み、より特定すれば該部分が κ オピオイドレセプターポリペプチドの第2細胞外ループの部分を含み、さらにより特定すれば該部分が第2細胞外ループの負に荷電された領域である、工程；
- (b)候補特異的 κ オピオイドレセプターアゴニストを得る工程；
- (c)該物質が前記オピオイドレセプターと相互作用する能力を試験する工程；および
- (d)該オピオイドレセプターと相互作用する能力を有する産物を提供する工程。

項目30. 前記オピオイドレセプターポリペプチドがキメラオピオイドレセプターポリペプチドを含み、特にここで該ポリペプチドが κ オピオイドレセプターの第2細胞外ループを含み、より特定すれば該ポリペプチドがまた δ オピオイドレセプターの第3細胞外ループを含む、項目29に記載の方法。

項目31. 前記キメラポリペプチドが $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ または $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ である、項目30に記載の方法。

項目32. 前記オピオイドレセプターポリペプチドが、 κ オピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380を含み、または前記短縮型オピオイドレセプターポリペプチドが、 κ オピオイドレセプターポリペプチドの少なくともアミノ酸残基167から228を含む、項目29に記載の方法。

項目33. 前記候補特異的 κ オピオイドレセプターアゴニストが、該候補が正荷電を有するか否かを測定して予備スクリーニングされる、項目29に記載の方法。

項目34. 前記オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程が、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで宿主細胞をトランスフェクトして形質転換細胞を形成し、そして該形質転換細胞を、該オピオイドレセプターポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持することにより行われる、項目29に記載の方法。

10

20

30

40

50

項目35. 項目29に記載の方法により単離され得る、特異的κオピオイドレセプターアゴニスト。

【0025】

—発明の簡単な要旨

一般に、本発明はオピオイドレセプターに関する。本発明者らは、δおよびκレセプターを含む種々のオピオイドレセプターをコードする遺伝子を単離およびクローン化した。これらの遺伝子はオピオイドレセプターポリペプチドに発現される。これらのポリペプチドは種々の有用性を有し、そのうち最も重要な1つは、オピオイドレセプターアゴニストおよびアンタゴニストとして使用され得る物質の決定を可能にするスクリーニングアッセイの基礎として働く能力である。そのようなアゴニストおよびアンタゴニストは薬学的有用性を有する。新規オピオイドレセプターアゴニストおよびアンタゴニストの必要性が大いに存在する。何故なら現在使用されているものはどちらかと言えば重篤な副作用を有するからである。

10

【0026】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。好ましい実施態様では、本発明のポリヌクレオチドはDNA分子である。より好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、δ、κ、μ、またはσオピオイドレセプターであるポリペプチドをコードする。さらに好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、κオピオイドレセプター、例えばmORK1(配列番号2)またはヒトκオピオイドレセプター(配列番号12)またはδオピオイドレセプター、例えばmORD1(配列番号4)のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードする。最も好ましくは、本発明の単離および精製されたポリヌクレオチドは、κオピオイドレセプター、例えばmORK1(配列番号1)またはヒトκオピオイドレセプター(配列番号11)またはδオピオイドレセプター(配列番号3)のヌクレオチド塩基配列を含む。

20

【0027】

本発明は、先に規定されたオピオイドレセプターポリペプチド、例えば、MOP2(配列番号6)の薬理学的特性に比べて薬理学的に改変された特性を有するオピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。そのような本発明のオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの1つは、配列番号5のヌクレオチド塩基配列を含む。

30

【0028】

本発明はまた、変異オピオイドレセプターの生成を意図し可能にする。これらの変異レセプターは、それらに変異される元の天然に存在するオピオイドレセプターに比較して改変された結合活性および薬理学的活性を有する。例えば、mORD1配列の特定のアミノ酸残基でヒスチジンを挿入することによりオピオイドアゴニストがそのレセプターに結合することが妨げられ得ることが示されている。変異オピオイドレセプターポリペプチドの例は、残基128でアスパラギン酸の代わりにアスパラギンを有するmORD1ポリペプチドおよび残基278でヒスチジンの代わりにアスパラギンを有するmORD1ポリペプチドを包含する。これらの変異したレセプターはスクリーニングアッセイで有用性を有する。勿論、本発明はまた、これらの変異オピオイドレセプターをコードするヌクレオチド配列を意図する。

40

【0029】

本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50またはそれ以上の連続塩基のセグメントと同一または相補的である塩基配列を含む単離および精製されたポリヌクレオチドを意図し、ここでこのポリヌクレオチドは、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。好ましくは、この単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも15から100の連続塩基のセグメントと同一または相補的である塩基配列を含む。勿論、単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも25から75の連続塩基のセグメントと同一または相補的であるより短い塩基配列を含む。さ

50

らに、単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも35から60の連続塩基のセグメントと同一または相補的であるより短い塩基配列を含む。また、本発明のポリヌクレオチドは、開示されるヌクレオチド配列の40または55の連続塩基と同一または相補的な塩基のセグメントを含み得る。

【0030】

本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも10の連続塩基のセグメントと同一または相補的である塩基配列を含む単離および精製されたポリヌクレオチドを得ることを可能にする。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11、あるいは配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の相補物にハイブリダイズする。好ましくは、この単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも25から70の連続塩基のセグメントと同一または相補的である塩基配列を含む。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1(配列番号2をコードするコーディング部分)の40または55の連続塩基と同一または相補的な塩基のセグメントを含み得る。

10

【0031】

本発明は、さらに、単離および精製されたオピオイドレセプターポリペプチドを意図する。好ましくは、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは組換えポリペプチドである。より好ましくは、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは、 δ 、 κ 、 μ 、または σ オピオイドレセプターポリペプチドである。さらにより好ましくは、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含む。

20

【0032】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを意図する。好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。より好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のヌクレオチド塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む。さらに好ましくは、本発明の発現ベクターは、エンハンサープロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む。なおさらにより好ましくは、本発明の発現ベクターは、原核生物プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む。あるいは、本発明の発現ベクターは、真核生物プロモーターであるエンハンサープロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含み、そして発現ベクターはさらに、カルボキシ末端アミノ酸の3'側およびコードされたポリペプチドの転写単位内に位置するポリアデニル化シグナルを含む。

30

【0033】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされた組換え宿主細胞を包含する。好ましくは、本発明の組換え宿主細胞は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。1つの局面では、本発明の宿主細胞は真核生物宿主細胞である。適切な組換え宿主として当業者に知られている任意の真核生物細胞が事実上この観点から有用であることが意図される。例えば、本発明の組換え宿主細胞は、酵母細胞、COS-1細胞、PC12細胞、またはCHO-D644細胞などであり得る。

40

【0034】

本発明の組換え宿主細胞は原核生物宿主細胞であり得る。当業者は、原核生物細胞がクローニングおよび遺伝子操作の実施において非常に有用であることを理解する。従って、本発明の遺伝子配列を含む原核生物の使用について明確な利点が存在し得る。それによって原核生物から活性なポリペプチドが得られ得る方法、即ち、適切なポリペプチド折り畳みを可能にし、そして多くは変性されて不適切な折り畳みを取り除きそして活性形態に再生され得るポリペプチドの翻訳を可能にするいくつかの系がまた存在する。ペプチド発現における使用のために、組換え宿主細胞は、代表的には、組換え宿主細胞中で機能的な調

50

節シグナルの転写制御下にあるポリヌクレオチドを含み、ここで、調節シグナルは、すべての必要な転写および転写後改変を可能にする様式で、オピオイドレセプターポリペプチドの発現を適切に制御する。活性ポリペプチドを生成するための原核生物法は、本発明の範囲内に含まれる。本発明の例示の組換え宿主細胞は、Escherichia coli のDH5α株の細菌細胞である。

【0035】

本発明はまた、オピオイドレセプターポリペプチドを調製する方法を意図し、この方法は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトして、形質転換宿主細胞を生成する工程；およびこのポリペプチドを発現するに十分な生物学的条件下で形質転換宿主細胞を維持する工程を包含する。好ましくは、形質転換宿主細胞は真核生物細胞、例えば、COS-1細胞である。あるいは、宿主細胞は原核細胞、例えば、Escherichia coli のDH5α株である。好ましい実施態様では、形質転換細胞にトランスフェクトされるポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のヌクレオチド塩基配列を含む。

10

【0036】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性である抗体を提供する。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。より好ましくは、オピオイドレセプターポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含む。

【0037】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性の抗体を生成する方法を意図し、この方法は、(a)オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで組換え宿主細胞をトランスフェクトする工程；(b)宿主細胞を、このポリペプチドの発現に十分な条件下で培養する工程；(c)ポリペプチドを回収する工程；および(d)このポリペプチドに対する抗体を調製する工程を包含する。好ましくは、宿主細胞は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。さらにより好ましくは、本発明は、上記に記載の方法に従って調製される抗体を提供する。

20

【0038】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドを検出する方法を提供し、ここでこの方法は、ポリペプチドを、上記に記載される方法に従って調製される抗体と免疫反応させて、抗体-ポリペプチド結合体を形成する工程、およびこの結合体を検出する工程を包含する。

30

【0039】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA転写物を検出する方法を意図し、ここでこの方法は、(a)メッセンジャーRNA転写物を、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして二重鎖を形成させる工程；および(b)この二重鎖を検出する工程を包含する。あるいは、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするDNA分子を検出する方法を提供し、ここでこの方法は、(a)DNA分子を、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖を形成する工程；および(b)二重鎖を検出する工程を包含する。

40

【0040】

本発明は、生物学的試料中のオピオイドレセプターポリペプチドの存在を検出するための診断アッセイキットを提供し、ここでこのキットは、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応し得る一次抗体を含む第1コンテナを含み、この一次抗体は少なくとも1つのアッセイを実施するに十分な量で存在する。好ましくは、本発明のアッセイキットは、一次抗体と免疫反応する二次抗体を含む第2コンテナをさらに含む。より好ましくは、本発明のアッセイキットで使用される抗体はモノクローナル抗体である。さらにより好ましくは、一次抗体は固体支持体に付加される。なおより好ましくは、一次および二次抗体は

50

インジケータを含み、そして好ましくは、インジケータは放射性標識または酵素である。

【0041】

本発明は、生物学的試料中で、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出するための診断アッセイキットを提供し、このキットは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも10の連続ヌクレオチド塩基のセグメントと同一または相補的な第2ポリヌクレオチドを含む第1コンテナを含む。

【0042】

さらなる実施態様において、本発明は、生物学的試料中の、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性の抗体の存在を検出するための診断アッセイキットを意図し、このキットは、抗体と免疫反応するオピオイドレセプターポリペプチドを含む第1コンテナを含み、このポリペプチドは、少なくとも1つのアッセイを実施するに十分な量で存在する。

【0043】

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力について物質をスクリーニングする方法を意図し、この方法は、オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程、および選択された物質がオピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力を試験する工程を包含する。好ましい実施態様では、オピオイドレセプターポリペプチドはキメラオピオイドレセプターポリペプチドである。本発明は、事実上無限の多くの可能なキメラレセプターを意図し、これらレセプターのいくつかは、特異的アゴニスト、非特異的アゴニスト、または特定のオピオイドレセプターに対するアンタゴニストについてスクリーニングすることを望むかどうかによって依存して利点を有し得る。本発明者らは、各タイプのオピオイドレセプターリガンドについて特異的な結合領域があることを見いだした。1つの特定のリガンド結合部位、例えば、κ特異的アゴニスト結合部位を有し、そして非特異的結合部位を欠くキメラを使用することにより、非特異的リガンド由来の偽シグナルに悩ませられることなくκ特異的リガンドについてスクリーニングし得る。

【0044】

1つの実施態様において、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで宿主細胞をトランスフェクトして形質転換細胞を形成すること、およびオピオイドレセプターポリヌクレオチドの発現に十分な生物学的条件下で形質転換細胞を維持することを意図する。

【0045】

別の局面では、本発明は、短縮型オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。「短縮型」オピオイドレセプターポリペプチドは、完全長オピオイドレセプターのアミノ酸配列の部分を含む。短縮型レセプターは、代表的には、より長いアミノ酸配列をコードする遺伝物質の標準的遺伝子操作により作製される。短縮型レセプターは、スクリーニングアッセイにおいて大きな有用性を有する。そのようにレセプターを短縮型にすることが可能なので、1つまたはそれ以上のリガンド結合部位が欠失している。例えば、このオピオイドレセプターは、κまたはδオピオイドレセプターポリペプチドであり得る。特定の実施例では、オピオイドレセプターは、κオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380、またはδオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基70から372を含む。

【0046】

本発明は、キメラオピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。「キメラ」オピオイドレセプターポリペプチドは、2つまたはそれ以上の供給源由来のアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、ここで供給源の少なくとも1つはオピオイドレセプターポリペプチドである。例えば、δオピオイドレセプター、μオピオイドレセプター、κオピオイドレセプター、σオピオイドレセプター、MOP2、またはソマトスタチンレセプターの1つ、の1つまたはそれ以上のアミノ酸配列の部分からなりキメラが可能である。例示のキメラは、κ-δ(カルボキシーアミノ末端)、

$\delta - \kappa$ 、 $\kappa - \delta - \kappa$ などであり得る。本発明者らは、研究の過程で多くのキメラを作製し、そしてこれらのいくつかはスクリーニングアッセイで利点を有する。このような構築されているまたはされ得たキメラの例は、 $\kappa_1 - 78 / \delta_{70} - 372$ 、 $\delta_1 - 69 / \kappa_{79} - 380$ 、 $\kappa_1 - 74 / \delta_{65} - 372$ 、 $\delta_1 - 64 / \kappa_{75} - 380$ などである。

【0047】

本発明のキメラは、所望の目的を遂行するオピオイドリガンドの検出および解明を可能にするために設計されたスクリーニングアッセイにおいて非常に有用である。1つのクラスとして、オピオイドレセプターは、細胞外ループ、貫膜領域、細胞内ループ、および細胞外アミノ末端を含む。本発明者らは、レセプターの細胞外部分、細胞外ループ、およびアミノ末端が、オピオイドレセプターリガンドに対する結合部位として働くことを示した。例えば、 κ レセプターに関しては、 κ 特異的アゴニストが第2細胞外ループに結合し、その一方アンタゴニストがアミノ末端に結合することが示されている。本発明者らは、非特異的アゴニストが κ レセプターの第3細胞外ループに結合すると強く考え、そしてこのことを証明する研究が進行中である。この知識を用いて、特異的スクリーニングツールとして非常に有用なキメラを設計することが可能である。例えば、 κ 特異的アゴニストについてスクリーニングすることを望む場合、 κ レセプターの第2細胞外ループを有するキメラを使用すべきである。さらに、 κ レセプターの第2細胞外ループを有するが第3細胞外ループを欠くキメラが、非特異的アゴニストを検出する任意のおそれなく、 κ 特異的アゴニストを検出する利点を有し得た。勿論、第2細胞外ループを除く κ レセプターのすべての領域を有するキメラが、 κ 特異的アゴニストについてスクリーニングするように設計されたアッセイにおいてネガティブコントロールとして使用され得る。本発明者らは、多くのこのようなキメラを構築し、そしてより多くを構築する過程にある。標準の遺伝子操作およびオピオイドレセプターのリガンド結合部位に関して本発明者らが由来する知識を用いて、ほとんど無限の多くのキメラを作製することが可能である。そのようなキメラのすべて、それらをコードするポリヌクレオチド、およびアッセイ中でそれらを使用する方法が本発明の範囲内であると意図される。

【0048】

本発明はさらに、オピオイドレセプターと相互作用する能力について物質をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

a) キメラオピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程；および

b) この物質がキメラオピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力を試験する工程。

好適なキメラは、上記で呈示されたキメラと同じである。

【0049】

本発明はなお、オピオイドレセプターと相互作用する能力について物質をスクリーニングする方法をさらに提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

a) 短縮型オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程；および

b) この物質が短縮型オピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力を試験する工程。

好適な短縮型レセプターポリペプチドは上記で呈示されたポリペプチドと同じである。

【0050】

本発明の他の局面は、 κ オピオイドレセプターの特異的アゴニストとして作用する能力について、適切な候補をスクリーニングするために有用なアッセイを包含する。これらのアッセイは、 κ オピオイドレセプターの特異的アゴニストが、非特異的アゴニストが結合するよりレセプターの異なる領域に結合するという本発明者らの発見により可能になった。このようなスクリーニングアッセイは、オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程、候補の特異的 κ オピオイドレセプターアゴニストを得る工程、この候補物質がオピオイドレセプターと相互作用する能力をアッセイする工程を含む。当業者は、候補物質が κ レセプターと相互作用する能力は、本出願の発明の詳細な説明に詳細に記載された方法を含むが、しかしこれらに限定されない、任意の数の方法でアッセイされ得ることを認識

し得る。これらのスクリーニング方法は、現在の特異的のより少ないκアゴニストのネガティブな副作用を有しない特異的κレセプターアゴニストの解明を可能にする。

【0051】

好適な実施態様では、スクリーニングアッセイにおいて使用されるオピオイドレセプターポリペプチドは、κオピオイドレセプターポリペプチドの部分を含む。より好ましくは、このオピオイドレセプターポリペプチドは、κオピオイドレセプターポリペプチドの第2細胞外ループの部分を含み、それはκレセプター特異的アゴニストに対する結合部位を有することが示されている。κオピオイドレセプターの第2細胞外ループの負に荷電された領域を含むオピオイドレセプターポリペプチドは、これらのスクリーニング手順における使用に特に好適であることが予想される。何故なら、κレセプター特異的アゴニスト-κレセプター結合は、少なくとも部分的には、第2細胞外ループの負に荷電された部分とアゴニストの正に荷電された部分との間の荷電相互作用に基づくようであるからである。

10

【0052】

キメラオピオイドレセプターポリペプチドは、上記のアッセイで使用可能である。事実、これらアッセイの解明に至る研究は、キメラレセプターを用いて実施された。好適な実施態様では、キメラレセプターはκオピオイドレセプターの第2細胞外ループを含む。κの第2細胞外ループは、κオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基167-228間に位置する。他の好適なキメラは、κレセプターの第2細胞外ループを有するが、第3細胞外ループを欠く。第3細胞外ループは、推定の特異的アゴニスト結合領域を含むので、この領域を欠くキメラは、非特異的アゴニスト活性を検出することができないと予想される。従って、そのようなキメラに対して観察される任意のアゴニズムは、第2細胞外ループに対するκ特異的アゴニスト結合の結果でなければならない。第2細胞外ループを欠くキメラは、ネガティブコントロールとして有用である。本明細書の教示が提供されたとき、当業者は、オピオイドレセプターアゴニストおよびアンタゴニストのすべての形態のスクリーニングを可能にするキメラおよび制御スクリーニング戦略を得る。このようなアッセイのすべては本発明の範囲内にある。このようなスクリーニングアッセイにおいて有用であるキメラオピオイドレセプターの特定の例は以下である： $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ 、 $\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ 、 $\kappa_{1-74} / \delta_{65-372}$ 、または $\delta_{1-64} / \kappa_{75-380}$ など。

20

【0053】

短縮型オピオイドレセプターポリペプチドは、上記の候補スクリーニングアッセイにおいて有用である。κレセプター特異的アゴニスト結合を示すより短いポリペプチドが、より長いポリペプチドに比べ特定の利点を有することが記載される。好ましくは、短縮型オピオイドレセプターポリペプチドは、短縮型κオピオイドレセプターポリペプチドである。例えば、κオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380を含む短縮型オピオイドレセプターポリペプチドがこの観点から有用であると预期される。レセプターの第2細胞外ループを含む短縮型κオピオイドレセプターがこれらアッセイにおいて有用である。例えば、アミノ酸残基167から228を含む短縮型κレセプターが本発明において有用である。勿論、κレセプターの第2細胞外ループのκレセプター特異的アゴニスト結合領域に相当するこれらのアミノ酸残基を特異的に使用することが可能である。

30

40

【0054】

潜在的なκレセプター特異的アゴニストを、上記に記載されたアッセイで試験する前に、候補が正荷電を有するか否かを測定することにより予備スクリーニングされ得る。荷電相互関係は、負に荷電された結合領域が正に荷電されたアゴニストを結合して、κレセプター-特異的アゴニスト結合機構に影響する。勿論、有効なアゴニストが正に荷電していないことも可能である。しかし、荷電の評価は、試験されるべきアゴニストの範囲を狭める1つの機構を提供する。

【0055】

上記のアッセイ方法の1つの実施態様は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで宿主細胞をトランスフェクトして形質転換細胞を形成し、そして

50

形質転換細胞をオピオイドレセプターポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で維持することを伴う。このようにして得られたポリペプチドはスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。

【0056】

本発明の他の局面は、上記プロセスにより単離可能なおよび／または単離される特定のκオピオイドレセプターアゴニストを包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0057】

発明の詳細な説明

I. 本発明

本発明は、DNAセグメント、精製ポリペプチド、抗体を得るための方法、組換えオピオイドレセプターを得て用いるのに必要な組換え宿主細胞をクローニングし、そして用いる方法を提供する。従って、オピオイドレセプターに対する従来技術で明らかな、古典的遺伝学の標準手法または分子生物学における技術を適用する際に直面する困難性が、克服された。従って、本発明は、一般的にオピオイドレセプターの組成物およびその調製方法およびその使用に関する。

II. ポリヌクレオチド

A. オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチド。

【0058】

1つの局面においては、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。好ましい実施態様では、本発明のポリヌクレオチドはDNA分子である。より好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、δ、κ、μ、またはσオピオイドレセプターであるポリペプチドをコードする。さらにより好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、ヒト、マウス、またはマウス様オピオイドレセプターのアミノ酸残基配列（例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12の配列）を含むポリペプチドをコードする。最も好ましくは、本発明の単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、および配列番号11のヌクレオチド塩基配列を含む。

【0059】

本明細書中で用いられるように、用語「ポリヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合により接続されているヌクレオチドの配列を意味する。ポリヌクレオチドは、本明細書中では、5'から3'方向への方向で示される。本発明のポリヌクレオチドは、約680から約数十万塩基対までを含み得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは、約680～約150,000塩基対を含み得る。特定のポリヌクレオチドの好ましい長さは、以下に記載される。

【0060】

本発明のポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)分子またはリボ核酸(RNA)分子であり得る。ポリヌクレオチドがDNA分子である場合、その分子は遺伝子またはcDNA分子であり得る。本明細書中では、ヌクレオチド塩基を一文字表記により示す：アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)、イノシン(I)、およびウラシル(U)。

【0061】

本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知の標準技術を用いて調製され得る。本発明のオピオイドレセプターポリペプチドをコードするcDNA分子の調製は、以下に実施例1および2において記載される。ポリヌクレオチドはまた、ラムダファージ技術を用いてゲノムDNAライブラリーから調製され得る。

【0062】

別の局面においては、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを提供する。ここでこのポリヌクレオチドは、このポリペプチドを発現する細胞からcDNAクローンのライブラリーを構築する工程；このポリペ

10

20

30

40

50

プチドをコードするRNAから調製される標識cDNAプローブでライブラリーをスクリーニングする工程；およびプローブとハイブリダイズするクローンを選択する工程を包含するプロセスにより調製可能である。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、上記プロセスにより調製される。より好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を有するポリペプチドをコードする。よりさらに好ましくは、このポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のヌクレオチド配列を含む。

【0063】

B. プローブおよびプライマー。

10

【0064】

別の局面においては、本発明により提供されるDNA配列情報により、本明細書中で開示された選択されたポリヌクレオチドの遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする能力を有する比較的短いDNA（またはRNA）配列の調製が可能になる。これらの局面では、適切な長さの核酸プローブが、選択されたヌクレオチド配列（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示されるような配列）を考慮することに基づいて調製される。このような核酸プローブは、それらがオピオイドレセプターをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする能力により、種々の実施態様において特定の有用性が与えられる。最も重要なことには、プローブは、所定のサンプル中の相補的配列の存在を検出するための種々のアッセイにおいて用いられ得る。

20

【0065】

特定の実施態様では、オリゴヌクレオチドプライマーを用いることが有利である。このようなプライマーの配列は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて哺乳類細胞由来のオピオイドレセプターポリペプチドをコードする遺伝子またはポリヌクレオチドの規定のセグメントを検出する、増幅する、または変異させるのに用いるために、本発明のポリヌクレオチドを用いて設計される。

【0066】

本発明に従って特定の利点を提供するために、ハイブリダイゼーション研究またはアッセイのために用いられる好ましい核酸配列は、少なくとも10から70またはさらに長いヌクレオチド長のポリヌクレオチドに相補的なプローブ分子を包含する。このポリヌクレオチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12に示されるようなオピオイドレセプターポリペプチドをコードする。少なくとも10ヌクレオチド長のサイズが、フラグメントが、安定かつ選択的である二重鎖分子を形成するに十分な長さであることを確実にするに有効である。もっとも、10塩基長を超える長さによって相補的配列を有する分子が、ハイブリッドの安定性および選択的を増大させ、そしてそれにより、得られる特異的ハイブリッド分子の質および程度を向上させるためには、一般的に好ましい。一般的には、25～40ヌクレオチド、55～70ヌクレオチド、または所望とされるさらなる長さの遺伝子相補長を有する核酸分子を設計することが好ましい。このようなフラグメントは、例えば、化学的手段によるフラグメントの直接合成、核酸再生技術（例えば、本明細書中に参考として援用されている米国特許第4,603,102号に記載のPCR技術）の適用、または適切な挿入片および適切な制限酵素部位を含む組換えプラスミドからの選択DNAフラグメントの切り出しにより、容易に調製され得る。

30

40

【0067】

別の局面においては、本発明は、配列番号5の少なくとも10の連続塩基のセグメントに同一または相補的である塩基配列を含む単離および精製されたポリヌクレオチドを意図する。ここで、このポリヌクレオチドは、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。好ましくは、単離および精製されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11の少なくとも25～70の連続塩基のセグメントに同一または相補的である塩基配列を含む。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、開示ヌクレオチド配列の40または55の連続塩基に同一または相補的

50

である塩基のセグメントを含み得る。

【0068】

従って、本発明のポリヌクレオチドプローブ分子は、それが遺伝子の相補長と二重鎖分子を選択的に形成する能力のために用いられ得る。想定される適用に依存して、標的配列に対するプローブの多様な選択度を得るためには、多様なハイブリダイゼーション条件を用いることが望ましい。高い選択度を必要とする適用については、代表的には、ハイブリッドを形成するに比較的ストリンジェントな条件を用いることが望ましい。例えば、50℃～70℃の温度で0.02M～0.15M NaClにより提供されるような、比較的低塩および／または高温の条件を選択する。これらの条件は、特に選択的であり、そしてプローブと鋳型または標的鎖との間のミスマッチを（もしあったとしても）ほとんど許容しない。

10

【0069】

もちろん、いくつかの適用については、例えば、基礎的な鋳型に標準的にハイブリダイズした変異プライマー鎖を用いる変異体を調製することが望ましい場合、または他の細胞、機能的等価物などからオピオイドレセプターポリペプチドコーディング配列を単離しようとする場合、あまりストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件が、ヘテロ二重鎖を形成させるために典型的に必要とされる。これらの環境では、20℃～55℃の範囲の温度で0.15M～0.9M塩のような条件を用いることが望まれ得る。それにより、クロスハイブリダイズ種は、コントロールハイブリダイゼーションに関してポジティブにハイブリダイズするシグナルとして容易に同定され得る。いずれの場合においても、ホルムアミドの量を増加させて添加することにより、条件は、よりストリンジェントにされ得ることが一般に理解され得る。ホルムアミドは、温度上昇と同様に、ハイブリッド二重鎖を脱安定化するように作用する。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、そしてこのため一般的に、所望の結果に依存して選択される方法である。

20

【0070】

特定の実施態様では、ハイブリッド形成を検出するために、本発明のポリヌクレオチドを適切な標識と組み合わせて用いることが有利である。広範な種の適切な標識が当該分野において公知であり、これらは放射性リガンド、酵素リガンド、または他のリガンド（例えばアビジン／ビオチン）を包含する。これらの標識は、検出可能なシグナルを与え得る。

【0071】

一般的に、本明細書中に記載されたハイブリダイゼーションプローブは、溶液ハイブリダイゼーションならびに固相を用いる実施態様における試薬として有用であることが想定される。固相に関わる実施態様では、試験DNA（またはRNA）が、選択されたマトリックスまたは表面に吸着されるか、またはそうでなければ付加される。この固定された核酸は、次いで所望の条件下で選択されたプローブとの特異的ハイブリダイゼーションにかけられる。選択条件は、当該分野で周知のように、特定の環境および必要とされる基準（例えば、G+C含有量、標的核酸の型、核酸源、ハイブリダイゼーションプローブのサイズ）に依存する。マトリックスを洗浄して非特異的に結合したプローブ分子を除去した後、特異的ハイブリダイゼーションが、標識によって検出されるか、または定量もされ得る。

30

【0072】

40

III. オピオイドレセプターポリペプチド

1つの実施態様では、本発明は、単離および精製されたオピオイドレセプターポリペプチドを意図する。好ましくは、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは組換えポリペプチドである。より好ましくは、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは、 δ 、 κ 、 μ 、または σ オピオイドレセプターポリペプチドである。さらにより好ましくは、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含む。オピオイドレセプターポリペプチドは、好ましくは、約500未満のアミノ酸残基を含み、そしてより好ましくは約400未満のアミノ酸残基を含む。

50

【0073】

ポリペプチドは、アミノ酸残基配列として本明細書中に開示されている。これらの配列は、アミノ末端からカルボキシ末端への方角で左から右へ記載されている。標準的な命名法に従って、アミノ酸残基配列を以下に示すような一文字表記または三文字表記のいずれかで称する。

アミノ酸残基	三文字表記	一文字表記
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

10

20

改変および変更が本発明のポリペプチドの構造において行われ得、そしてさらにオピオイドレセプター様特性を有する分子も得ることができる。例えば、配列において、特定のアミノ酸が、レセプター活性を認められるほどに損失することなく別のアミノ酸と置換され得る。ポリペプチドの生物学的機能活性を決定するのはポリペプチドの相互に作用する能力および性質であるので、特定のアミノ酸配列置換がポリペプチド配列（または、もちろんその基礎となるDNAコーティング配列）において行われ得、そしてそれにも関わらず同様の特性を有するポリペプチド得ることができる。

30

【0074】

このような変更を行う際に、アミノ酸のハイドロパシー指数が考慮され得る。ポリペプチドに相互作用性生物学的機能を付与することにおけるハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で理解されている（KyteおよびDoolittle, J. Mol. Biol., 157:105-132, 1982）。特定のアミノ酸が類似のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸と置換されて、そして類似の生物学的活性を有するポリペプチドをさらに生じ得ることは公知である。各アミノ酸には、その疎水性および荷電特性に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられている。それらの指数は、以下の通りである：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；トレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

40

【0075】

アミノ酸の相対的ハイドロパシー特性は、得られるポリペプチドの二次構造を決定し、

50

続いてこのポリペプチドと他の分子（例えば酵素、基質、レセプター、抗体、抗原など）との相互作用を定義すると考えられている。アミノ酸が類似のハイドロパシー指数を有する別のアミノ酸により置換され得、そして機能的に等価のポリペプチドをさらに得ることができることは、当該分野において公知である。このような変更においては、そのハイドロパシー指数が ± 2 以内のアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、そして ± 0.5 以内のアミノ酸の置換がさらにより特に好ましい。

【0076】

同様のアミノ酸の置換はまた、親水性に基づいて行われ得、特に、それにより創製される生物学的機能的等価ポリペプチドまたはペプチドが免疫学的実施態様における使用が意図される場合に行われ得る。本明細書中に参考として援用されている米国特許第4,554,101号には、その近接のアミノ酸の親水性により決定されるような、ポリペプチドの最大局所的平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわちそのポリペプチドの生物学的特性と相関関係を有することが述べられている。

【0077】

米国特許第4,554,101号に詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（ $+3.0$ ）；リジン（ $+3.0$ ）；アスパラギン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；グルタミン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；セリン（ $+0.3$ ）；アスパラギン（ $+0.2$ ）；グルタミン（ $+0.2$ ）；グリシン（ 0 ）；プロリン（ -0.5 ± 1 ）；トレオニン（ -0.4 ）；アラニン（ -0.5 ）；ヒスチジン（ -0.5 ）；システイン（ -1.0 ）；メチオニン（ -1.3 ）；バリリン（ -1.5 ）；ロイシン（ -1.8 ）；イソロイシン（ -1.8 ）；チロシン（ -2.3 ）；フェニルアラニン（ -2.5 ）；トリプトファン（ -3.4 ）。アミノ酸が、類似の親水性値を有する別のアミノ酸により置換され得、そして生物学的等価物、特に免疫学的に等価なポリペプチドをさらに得ることができることは、理解され得る。このような変更においては、その親水性値が ± 2 以内のアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、そして ± 0.5 以内のアミノ酸の置換がさらにより特に好ましい。

【0078】

従って、上記で概説したように、アミノ酸置換は、一般的にアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性（例えば、それらの疎水性、親水性、荷電、サイズなど）に基づく。上記の種々の特徴を考慮する代表的な置換は、当業者に周知であり、そして以下を包含する：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリリン、ロイシン、およびイソロイシン（以下の表1を参照のこと）。従って、本発明は、上記のオピオイドレセプターポリペプチドの機能的または生物学的等価物を意図する。

【0079】

表 1

元の残基	例示的な置換
A l a	G l y ; S e r
A r g	L y s
A s n	G l n ; H i s
A s p	G l u
C y s	S e r
G l n	A s n
G l u	A s p
G l y	A l a
H i s	A s n ; G l n
I l e	L e u ; V a l
L e u	I l e ; V a l
L y s	A r g
M e t	M e t ; L e u ; T y r
S e r	T h r

T h r	S e r
T r p	T y r
T y r	T r p ; P h e
V a l	I l e ; L e u

生物学的または機能的に等価のポリペプチドはまた、部位特異的変異誘発を用いて調製され得る。部位特異的変異誘発は、基礎とするDNAの特異的な変異誘発を介して、その配列に由来する第二世代のポリペプチド、もしくは生物学的機能的に等価のポリペプチドまたはペプチドの調製に有用な技術である。上記のように、このような変化は、アミノ酸置換が所望される場所において所望され得る。この技術は、さらに、DNAに1またはそれ以上のヌクレオチド配列の変化を導入することにより、配列変異型(例えば、1またはそれ以上の上記の考慮を含む)を調製し、そして試験する迅速な能力を提供する。部位特異的変異誘発は、特定のオリゴヌクレオチド配列の使用を介して変異体の産生を可能にする。このオリゴヌクレオチド配列は、所望の変異のDNA配列、ならびに十分な数の近接したヌクレオチドをコードして、横断される欠失結合部の両側で安定な二本鎖を形成するのに十分なサイズと配列の複雑さとを有するプライマー配列を提供する。代表的には、約17~25ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましく、変化する配列の結合部の両側で約5~10残基をとまなう。

10

【0080】

一般に、部位特異的変異誘の技術は、Adelmanら(1983)により例示されるように当該分野で周知である。理解されるように、この技術は、一本鎖および二本鎖形態の両方で存在し得るファージベクターを使用する。部位特異的変異誘発に有用な代表的なベクターは、M13ファージ(Messingら、1981)のようなベクターを含む。これらのファージは市販されており、そしてそれらの使用は、一般に当業者に公知である。

20

【0081】

一般に、本発明による部位特異的変異誘発は、一本鎖ベクターを最初に得ることにより行われ、この一本鎖ベクターは、その配列内に、選択したオピオイドレセプターポリペプチド配列の全部または一部分をコードするDNA配列を含む。所望の変異配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般的に合成的に、例えば、Creaら(1987)の方法により調製される。次いで、このプライマーは、変異を有する鎖の合成を完了するために、一本鎖ベクターにアニールされ、そしてE. coliポリメラーゼIクレノウフラグメントのような酵素の使用により伸長される。こうして、ヘテロ二本鎖は形成され、ここで、一本の鎖が、元の非変異配列をコードし、そして2本目の鎖が、所望の変異を有する。次いで、このヘテロ二本鎖ベクターは、E. coli細胞のような適切な細胞を形質転換するために用いられ、そして変異を有する組換えベクターを含むクローンが選択される。市販されるキットは、オリゴヌクレオチドプライマーを除いて、必要な全ての試薬を有する。

30

【0082】

本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは、その任意の形態のオピオイドまたはオピオイドのアナログに結合し得るオピオイドレセプターポリペプチドであり得ると理解される。さらに、本発明のオピオイドレセプターポリペプチドは、特定の供給源には限定されない。本明細書中に開示されるように、本発明の技術および組成物は、例えば、マウス供給源からのmsls1-3の同定および単離を提供する。従って、本発明は、種々の供給源由来のオピオイドレセプターポリペプチドの属の一般的な検出および単離を提供する一方、この属の特に3つの種を同定する。オピオイドレセプターポリペプチドのファミリーの多くの種は、本発明の組成物および方法を用いて検出および単離することができる。例えば、本発明はまた開示している。

40

【0083】

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の標準的技術により調製される。このような技術は、このポリペプチドを含むことが公知な組織からの単離および精製、ならびに形質転換細胞を用いてこのようなポリペプチドをコードするクローニングされたDNAからの発現を包含するが、この限りではない(以降の本明細書中の実施例1および2を参照のこと)。

50

【0084】

他の実施態様では、本発明は、オピオイド様レセプターポリペプチドを意図する。このようなポリペプチドは、例えば、配列番号6のアミノ酸残基配列を含む。オピオイド様レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、配列番号5のヌクレオチド塩基配列を含む。

【0085】

オピオイドレセプターポリペプチドは、実質的にはヒトを含む全ての動物に見出される。マウスδオピオイドレセプターの配列は、以前に記載されている(Kiefferら、1992、およびEvansら、1992)。他のレセプターの場合と同様、異なる種のオピオイドレセプターの構造および機能の間にはわずかな変化しかないようである。種間の違いがある場合、これらの違いの同定は、当業者の技術の範囲内で十分である。従って、本発明は、いかなる哺乳類由来のオピオイドレセプターポリペプチドも意図する。好ましい哺乳類は齧歯類またはヒトである。

10

I V. 発現ベクター

別の実施態様では、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含する。さらに好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のヌクレオチド塩基配列を含むポリヌクレオチドを包含する。さらになお好ましくは、本発明の発現ベクターは、エンハンサープロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含む。さらに一層好ましくは、本発明の発現ベクターは、原核生物のプロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含む。あるいは、本発明の発現ベクターは、真核生物のプロモーターであるエンハンサープロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含み、そして発現ベクターは、さらに、カルボキシ末端のアミノ酸の3'、およびコードされたポリペプチドの転写単位内に位置するポリアデニル化シグナルを含む。

20

【0086】

プロモーターは、DNA分子の領域であり、代表的には、転写が開始する点(すなわち、転写開始部位)の前(上流)の約100ヌクレオチド対以内にある。この領域は、代表的には、異なる遺伝子における類似の相対的な位置に位置するいくつかのタイプのDNA配列エレメントを含む。本明細書に用いられるところの、用語「プロモーター」は、当該分野で、上流プロモーター領域、プロモーター領域、または一般的な真核生物RNAポリメラーゼI I 転写単位のプロモーターと呼ばれるものを含む。

30

【0087】

他のタイプの明確に区別される転写調節配列エレメントは、エンハンサーである。エンハンサーは、特定のコーディング領域(例えば、遺伝子)の時間、位置、および発現レベルの特異性を提供する。エンハンサーの主要な機能は、このエンハンサーに結合する1またはそれ以上の転写因子を含む細胞内での、コーディング配列の転写レベルの増加である。プロモーターと異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在する限り、転写開始部位から可変性の距離に位置する場合に、機能し得る。

40

【0088】

本明細書中で用いられるところの、用語「エンハンサープロモーター」は、エンハンサーおよびプロモーターエレメントの両方を含む混成単位を意味する。エンハンサープロモーターは、少なくとも1つの遺伝子産物をコードするコーディング配列に作動可能に連結される。本明細書中に用いられるところの、用語「作動可能に連結」は、コーディング配列の転写がエンハンサープロモーターにより制御および調節されるように、そのエンハンサープロモーターが、そのコーディング配列に接続されることを意味する。エンハンサープロモーターをコーディング配列に作動可能に連結する手段は、当該分野で周知である。やはり当該分野で周知なように、転写が制御されるコーディング配列に対する正確な配向および位置は、とりわけ、そのエンハンサープロモーターの特定の性質に依

50

存する。従って、TATAボックスの最小プロモーターは、代表的には、転写開始部位の約25～約30塩基対上流に位置し、そして上流プロモーターエレメントは、代表的には、転写開始部位の約100～約200塩基対上流に位置する。対照的に、エンハンサーは、開始部位から下流に位置され得、そしてこの部位からかなり離れて存在し得る。

【0089】

本発明のベクター構築物に用いられるエンハンサープロモーターは、トランスフェクトされるべき細胞で発現を駆動する任意のエンハンサープロモーターであり得る。周知の特性を有するエンハンサープロモーターを使用することにより、遺伝子産物の発現のレベルおよびパターンが最適化され得る。

【0090】

発現ベクターのコーディング配列は、転写終止領域に作動可能に連結される。RNAポリメラーゼは、ポリアデニル化が起こる部位を超えてコードされたDNA配列を転写する。代表的には、ポリアデニル化部位の数百(a few hundred)塩基対下流に位置するDNA配列が、転写の終止に役立つ。これらのDNA配列は、本明細書中で転写終止領域と呼ばれる。これらの領域は、転写されるメッセンジャーRNA(mRNA)の効率の良いポリアデニル化に必要である。転写終止領域は、当該分野で周知である。本発明のアデノウイルスベクター構築物中に用いられる好ましい転写終止領域は、SV40のポリアデニル化シグナルまたはプロタミン遺伝子を含む。

【0091】

発現ベクターは、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。このようなポリペプチドは、非オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドセグメントからそのセグメントを識別するために十分な長さのオピオイドレセプターポリペプチドをコードする、ヌクレオチド塩基の配列を含まなければならない。本発明のポリペプチドはまた、交換するアミノ酸の相対的なハイドロパシー値のような考察に基づき選択した変化を有するような、変異型のアミノ酸配列を有する、生物学的に機能的なポリペプチドまたはペプチドをコードし得る。これらの変異型配列は、天然供給源から単離される変異型配列か、または部位指向変異誘発のような変異誘発手順を用いて、本明細書で開示する配列中で誘起される変異型配列である。

【0092】

好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。発現ベクターは、上記の任意のオピオイドレセプターポリペプチドのオピオイドレセプターポリペプチドコーディング領域自身を含み得、またはそのようなオピオイドレセプターポリペプチドの塩基性(bas I c)コーディング領域において選択した変化または改変を有するコーディング領域を含み得る。あるいは、このようなベクターまたはフラグメントは、より大きなポリペプチドまたは塩基性(bas I c)コーディング領域をやはり含むポリペプチドをコードし得る。いずれにせよ、コドンの重複性および生物学的機能等価性のために、本発明のこの局面は、上記のポリペプチド配列に対応する特定のDNA分子に限定されないことは理解されるべきである。

【0093】

例示的なベクターは、pCMV6bおよびpCMV6c(Ch Iron Corp., Emeryville CA)を含む、哺乳類の発現ベクターのpCMVファミリーを含む。ある場合、および特にこれらの個々の哺乳類発現ベクターの場合には、生じる構築物は、pSV2neoのような選択マーカーを含むベクターでの同時トランスフェクションを必要とし得る。DG44のような、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠失チャイニーズハムスター卵巢細胞株への同時トランスフェクションを介して、このような発現ベクターに組み込まれたDNAによってオピオイドポリペプチドを発現するクローンは、検出され得る。

【0094】

本発明のDNA分子は、当該分野で周知な多くの技術によりベクターに組み込まれ得る。例えば、ベクターpUC18は、特に価値があることが示されている。同様に、関連するベク

10

20

30

40

50

ターM13mp18およびM13mp19は、本発明のある実施態様で、特に、ジデオキシ配列決定の実施に用いられ得る。

【0095】

本発明の発現ベクターは、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするDNA自身の大量の調製手段、およびコードされたポリペプチドおよびペプチドの調製手段の両方として有用である。本発明のオピオイドレセプターポリペプチドが、組換え手段により作製される場合、原核生物または真核生物の発現ベクターのいずれをもシャトル系として使用し得ることが意図される。しかし、原核生物系では、通常、前駆体ポリペプチドの正確なプロセッシングが不可能であり、特に、このような系は、膜に関連する真核生物のポリペプチドの正確なプロセッシングが不可能であるという点で、また、真核生物のオピオイドレセプターポリペプチドが、開示した本発明の教示を用いて期待されるので、真核生物宿主でこのような配列が発現されがちであろう。しかし、DNAセグメントが、真核生物オピオイドレセプターポリペプチドをコードする場合でさえ、原核生物発現が、さらに適応性を有し得ることは意図される。従って、本発明は、真核生物細胞および原核生物細胞の間で往復し得るベクターとの組合せで用いられ得る。細菌宿主細胞および真核生物宿主細胞の使用が可能なこのような系は、本明細書に記載される。

10

【0096】

組換えオピオイドレセプターポリペプチドの発現が所望され、そして真核生物宿主が意図される場合、真核生物の複製起点を組み込む、プラスミドのようなベクターを使用することは、最も好ましい。さらに、真核生物系での発現の目的のために、オピオイドレセプターをコードする配列を、チャイニーズハムスター卵巣細胞と組合せて用いられるプロモーターのような、効果的な真核生物プロモーターと近接して、そしてその制御下に位置させることが望ましい。真核生物または原核生物のいずれであっても、コーディング配列をプロモーターの制御下におくために、真核生物か原核生物かにかかわらず、一般に必要なものは、選択したプロモーターに関して3'または下流の約1から約50ヌクレオチドの間に、ポリペプチドの適切な翻訳読み取り枠の翻訳開始部位の5'末端を位置させることである。さらに、真核生物での発現が期待される場合、代表的には、オピオイドレセプターポリペプチドを含む転写単位に、適切なポリアデニル化部位を組み込むことが所望される。

20

【0097】

pCMVプラスミドは、本発明で特に有用な一連の哺乳類発現ベクターである。ベクターは、基本的に全ての培養細胞で使用するために設計されており、そしてSV40-形質転換シミアンCOS細胞株で非常によく作動する。pCMV1、2、3、および5ベクターは、各プラスミドのポリリンカー領域の、あるユニーク制限部位で互いに異なる。pCMV4ベクターは、ポリリンカーの前の配列に翻訳エンハンサーを含む点で、これら4つのプラスミドと異なる。直接的なpCMV1~5のシリーズのベクター由来ではないが、機能的に類似するpCMV6bおよびcベクターは、Emeryville, CAのChiron Corp.から入手され、そしてポリリンカー領域の配向が互いに逆であることを除いて、同一である。

30

【0098】

pCMVプラスミドの一般的な構成成分は、以下のとおりである。ベクターのバックボーンは、pTZ18R(Pharmacia)であり、そして一本鎖DNAの生産のためのバクテリオファージf1の複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子を含む。CMV領域は、ヒトサイトメガロウイルス(Towne株)主要極初期遺伝子の強力なプロモーター-調節領域のヌクレオチド-760~+3からなる(Thomsenら、1984; Boshartら、1985)。ヒト成長ホルモンフラグメント(hGH)は、この遺伝子の配列1533~2157を示す転写終止およびポリアデニル化シグナルを含む(Seeburg, 1982)。このフラグメントには、Alu中頻度反復DNA配列がある。最後に、SV40の複製起点および、(Okayamaら、1983)に記載されるpcD-Xプラスミド(HindIII~PstIフラグメント)由来の初期領域プロモーター-エンハンサーがある。このフラグメントのプロモーターは、転写がCMV/hGH発現カセットから離れて進行するように配向される。

40

【0099】

50

pCMVプラスミドは、ポリリンカー領域の違い、および翻訳エンハンサーの存在または非存在により互いに区別され得る。最初のpCMV1プラスミドは進歩的に改変され、ポリリンカー領域で、数が増加しているユニーク制限部位が与えられている。pCMV2を作製するために、pCMV1の2つのEcoRI部位の1つが破壊された。pCMV3を作製するために、pCMV1は、SV40領域(StuI～EcoRI)由来の短いセグメントを欠失させることにより改変され、そしてそうすることで、ポリリンカーにユニークなPstI、SalI、およびBamHI部位を作製した。pCMV4を作製するために、CMVプロモーターから転写されるmRNAの5'非翻訳領域に相当するDNAの合成フラグメントが、C付加された。この配列は、ポリペプチド合成での開始因子の必要性を減少することにより、翻訳エンハンサーとして働く(Joblingら、1987); Brownら、1988)。pCMV5を作製するために、DNAのセグメント(HpaI～EcoRI)がpCMV1のSV40起点領域から欠失され、最初のポリリンカーの全ての部位をユニークとした。

【0100】

pCMVベクターは、シミアンCOS細胞、マウスL細胞、CHO細胞、およびHeLa細胞でうまく発現した。いくつかの並行した比較では、それらは、SV40を元にしたベクターに比べ、COS細胞で5～10倍の高発現レベルを生じた。pCMVベクターは、LDLレセプター、核因子1、G_s αポリペプチド、ポリペプチドホスファターゼ、シナプトフィシン(synaptophysin)、シナプシン(synapsin)、インスリンレセプター、インフルエンザ血球凝集素、アンドロゲンレセプター、ステロイド26ヒドキシラーゼ、ステロイド17および21ヒドキシラーゼ、チトクロームP-450オキシドレダクターゼ、βアドレナリン性レセプター、葉酸(folate)レセプター、コレステロール側鎖開裂酵素、およびその他のcDNAの宿主を発現するために用いられた。これらのプラスミド中のSV40プロモーターが、優性選択マーカーのような他の遺伝子を発現するために用いられ得ることは注記される。最後に、pCMUのHindIIIおよびPstI部位の間のポリリンカーに、疑翻訳開始を起こし得るATG配列がある。このコドン、可能ならば、発現プラスミドで除去されるべきである。非経口(parenteral)pCMV1およびpCMV4ベクターの構築および使用を記載する論文は、公開されている(Andersonら、1989b)。

【0101】

V. トランスフェクト細胞

さらに他の実施態様では、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換したまたはトランスフェクトした組換え宿主細胞、および形質転換またはトランスフェクトしたこれらの細胞由来のトランスジェニック細胞を提供する。好ましくは、本発明の組換え宿主細胞は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。DNA分子のような外因性ポリヌクレオチドでの形質転換またはトランスフェクトの手法は、当該分野で周知であり、そしてリン酸カルシウムまたはDEAEデキストラン仲介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム仲介トランスフェクション、直接マイクロインジェクション、およびアデノウイルス感染(Sambrook、FruttschおよびManiatis、1989)のような技術を含む。

【0102】

最も広範囲に用いられる方法は、リン酸カルシウムまたはDEAEデキストランのいずれかにより仲介されたトランスフェクションである。そのメカニズムは依然として不明瞭であるが、トランスフェクトしたDNAは、エンドサイトーシスにより細胞の細胞質に侵入し、そして核へ輸送されると考えられる。細胞のタイプに依存するが、培養細胞の集団の90%までが、任意の一回でトランスフェクトされ得る。その高い効率のために、リン酸カルシウムまたはDEAEデキストランにより仲介されたトランスフェクションは、多数の細胞での外来DNAの一時的な発現を必要とする実験のために選択される方法である。リン酸カルシウムに仲介されたトランスフェクションはまた、外来DNAのコピーを組み込む細胞株を確立するために使用され、かかる外来DNAは、通常、頭から尾(head-to-tail)の縦列配置で宿主細胞ゲノムに配置される。

【0103】

プロトプラスト融合方法では、目的のプラスミドの多数のコピーを有する細菌由来のプロトプラストは、培養した動物細胞と直接混合される。細胞膜の融合の後(通常、ポリエチレングリコールを用いる)、細菌の含有物は、哺乳類細胞の細胞質に送達され、そしてプラスミドDNAは、核に輸送される。プロトプラスト融合は、一時的な発現アッセイのために一般に用いる多くの細胞株についてトランスフェクションほど効率的でないが、DNAのエンドサイトーシスが非効率的に起こる細胞株については有用である。プロトプラスト融合は、宿主染色体に縦列に組み込まれたプラスミドDNAの多くのコピーをしばしば生じる。

【0104】

種々の哺乳類および植物細胞への短い、高電圧電気パルスの適用は、細胞膜にナノメートルサイズの孔の形成を導く。DNAは、これらの孔を通るか、またはこの孔の閉鎖をとともなう膜構成成分の再分布の結果として、細胞の細胞質に直接的に取り込まれる。エレクトロポレーションは、非常に効率的であり得、そしてクローニングされた遺伝子の一時的な発現および目的の遺伝子の組み込まれたコピーを有する細胞株の確立の両方のために用いられ得る。エレクトロポレーションは、リン酸カルシウム仲介トランスフェクションおよびプロトプラスト融合と対照的に、しばしば、1つ、または多くて2、3の外来DNAの組み込まれたコピーを有する細胞株を生じさせる。

【0105】

リボソームトランスフェクションは、リボソーム内でのDNAおよびRNAのカプセル化に、続いて、細胞膜とリボソームとの融合を含む。どのようにDNAが細胞に送達されるのかというメカニズムは、不明確であるが、トランスフェクション効率は、高く90%であり得る。

【0106】

DNA分子の核への直接的なマイクロインジェクションは、低pHのエンドソームのような細胞の分画にDNAを曝さないという利点を有する。従って、マイクロインジェクションは、目的のDNAの組み込まれたコピーを有する細胞の株を確立する方法として主に用いられる。

【0107】

細胞トランスフェクションのためのベクターとしてのアデノウイルスの使用は、当該分野で周知である。アデノウイルスベクター仲介の細胞のトランスフェクションは、種々の細胞について報告されている(Stratford-Perricaudetら、1992)。

【0108】

トランスフェクトされる細胞は、原核性または真核性であり得る。好ましくは、本発明の宿主細胞は、真核性細胞である。さらに好ましくは、本発明の組換え宿主細胞はCOS-1細胞である。ヒトのオピオイドレセプターポリペプチドの生産に興味がある場合、培養哺乳類またはヒト細胞は、特に興味がある。

【0109】

他の局面では、本発明の組換え宿主細胞は、原核生物宿主細胞である。好ましくは、本発明の組換え宿主細胞は、Escherichia coliのDH5α株の細菌細胞である。一般に、原核生物は、DNA配列の最初のクローニング、および本発明で有用なベクターの構築に好ましい。例えば、E. coli K12株は、特に有用であり得る。用いられ得る他の微生物の株は、E. coli B、およびE. coli X1776(ATCC第31537号)を含む。これらの例は、もちろん、限定ではなく例示を意図している。

【0110】

原核生物はまた、発現にも用いられ得る。前記の株、およびE. coli W3110(F、λ、プロトトロフ、ATCC第273325号)、Bacillus subtilisのようなバチルス、またはSalmonella typhimuriumまたはSerratia marcescensのような他の腸内細菌科、および種々のPseudomonas種は、用いられ得る。

【0111】

一般に、宿主細胞と適合性の種由来のレプリコンおよび制御配列を含むプラスミドベク

10

20

30

40

50

ターは、これらの宿主と関連して用いられる。ベクターは、通常、複製部位、および形質転換細胞で表現型での選択を提供し得るマーカー配列を有する。例えば、E. coli は、E. coli 種由来のプラスミド pBR322 を用いて、形質転換され得る (Bol I var ら、1977)。pBR322 は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性に関する遺伝子を含み、従って、形質転換細胞を同定する容易な手段を提供する。pBR プラスミド、もしくは他の微生物プラスミドまたはファージはまた、それ自身のポリペプチドの発現のために微生物により用いられ得るプロモーターを含まなければならないか、または含むために改変されなければならない。

【0112】

組換え DNA 構築で最も一般的に用いるプロモーターは、 β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトースプロモーター系 (Chang ら、1978; Itakura ら、1977; Goeddel ら、1979; Goeddel ら、1980) およびトリプトファン (TRP) プロモーター系 (ヨーロッパ出願公開第 0036776 号; Siebwenlist ら、1980) を含む。これらは、最も一般的に用いられるが、他の微生物プロモーターが発見され、そして利用され、そしてそれらのヌクレオチド配列に関する詳細が公開されているので、当業者はプラスミドベクターに機能的なプロモーターを導入し得る (Siebwenlist ら、1980)。

【0113】

原核生物に加えて、酵母のような真核微生物は使用され得る。Saccharomyces cerevisiae または一般のパン酵母は、真核微生物の中で最も一般的に用いられるが、多くの他の株が一般に利用可能である。例えば、Saccharomyces での発現では、プラスミド YRp7 は、一般的に用いられる (Stinchcomb ら、1979; Kingsman ら、1979; Tschemper ら、1980)。このプラスミドは、トリプトファン中で成長する能力を欠損する酵母の変異株 (例えば、ATCC 第 44076 号または PEP4-1) の選択マーカーを提供する trp1 遺伝子をすでに含む (Jones, 1977)。従って、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての trp1 損傷の存在は、トリプトファンの非存在下での成長による形質転換の検出に効率的な環境を提供する。

【0114】

酵母ベクターの適切なプロモーター配列は、3-ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター (Hitzeman ら、1980) または他の糖分解酵素のプロモーター (Hess ら、1968; Holland ら、1978) を含み、他の糖分解酵素は、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼである。適切な発現プラスミドの構築では、これらの遺伝子に関連する終止配列はまた、発現ベクターの発現されるべき配列から下流に導入され、mRNA のポリアデニル化およびターミネーションを提供する。他のプロモーターは、転写が成長条件により制御されるというさらなる利点を有し、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチクローム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、および前記グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトースの利用の原因となる酵素のプロモーター領域である。酵母適合性プロモーター、起点または複製および終止配列を含む任意のプラスミドベクターは適切である。

【0115】

微生物に加えて、多細胞生物由来の細胞の培養物はまた、宿主として使用され得る。原則として、任意のこのような細胞培養は、脊椎動物または無脊椎動物いずれの由来でも、作動し得る。しかし、興味は、脊椎動物細胞で最も大きく、そして脊椎動物細胞の培養物 (組織培養) の増殖は、近年ルーチンな手順となった (Kruse および Peterson、1973)。このような有用な宿主細胞株の例は、AtT-20、VERO および HeLa 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、ならびに W138、BHK、COSM6、COS-7、293 および MDCK 細胞株である。このような細胞のための発現ベクターは、通常、(必要な場合) 複製起点、発現されるべき遺伝子上流に位置するプロモーターを、任意の必要なリボソーム結合部位、RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終止配列に加えて含む。

【0116】

哺乳類細胞における使用について、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス性物質由来である。例えば、一般に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、および最も頻繁にはシミアンウイルス40(SV40)由来である。SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、両方ともSV40ウイルスの複製起点も含むフラグメントとしてウイルスから容易に得られるために、有用である(FIersら、1978)。より小さなまたはより大きなSV40フラグメントはまた、ウイルスの複製起点に位置するH I n d I I I 部位からBgl I 部位に向かって伸長する約250bpの配列を含むものであれば、用いられ得る。さらに、所望の遺伝子配列に通常に関連するプロモーターまたは制御配列の利用は、このような制御配列が宿主細胞系と適合性であれば、やはり可能であり、そしてしばしば所望される。

10

【0117】

複製起点は、SV40または他のウイルス(例えば、ポリオーマ、アデノ、VSV、BPV、CMV)供給源由来であり得るような、もしくは宿主細胞染色体の複製メカニズムにより提供され得るような外因性起点を含むようにベクターを構築することで、提供され得る。ベクターが、宿主細胞の染色体に組み込まれる場合、しばしば後者で十分である。

【0118】

VI. 組換えオピオイドレセプターポリペプチドの調製。

【0119】

さらに他の実施態様では、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトして、形質転換宿主細胞を生産すること；およびポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下で形質転換宿主細胞を維持することを含む、オピオイドレセプターポリペプチドを調製するプロセスを意図する。好ましくは、形質転換宿主細胞は、真核生物細胞である。さらになお好ましくは、真核生物細胞は、COS-1細胞である。あるいは、宿主細胞は、原核生物細胞である。さらに好ましくは、原核生物細胞は、Escherichia coli のDH5 α 株の細菌細胞である。さらになお好ましくは、形質転換細胞にトランスフェクトされるポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のヌクレオチド塩基配列を含む。最も好ましいトランスフェクションは、本明細書中で以前に開示した発現ベクターを用いて達成される。

20

30

【0120】

このプロセスで用いる宿主細胞は、機能的な組換えオピオイドレセプターポリペプチドを発現し得る。好ましい宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞である。しかし、種々の細胞が、本発明のプロセスに適用できる。例えば、酵母細胞、ヒト細胞株、および当業者に周知の他の真核生物細胞株である。

【0121】

トランスフェクションに続いて、細胞は、オピオイドレセプターポリペプチドの発現に十分な時間の間、培養条件下で維持される。培養条件は、当該分野で周知であり、そしてイオン組成および濃度、温度、pHなどを含む。代表的には、トランスフェクト細胞は、培地中で培養条件下で維持される。種々の細胞タイプに適切な培地は、当該分野で周知である。好ましい実施態様では、温度は、約20℃から約50℃、さらに好ましくは約30℃から約40℃、さらになお好ましくは約37℃である。

40

【0122】

pHは、好ましくは約6.0の値から約8.0の値、さらに好ましくは約6.8の値から約7.8の値、および最も好ましくは約7.4である。オスモル濃度は、好ましくは約200ミリオスモル/リットル(mosm/L)から約400mosm/L、およびさらに好ましくは約290mosm/Lから約310mosm/Lである。コードされたタンパク質のトランスフェクションおよび発現に必要な他の生物学的条件は、当該分野で周知である。

【0123】

トランスフェクト細胞は、オピオイドレセプターポリペプチドの発現に十分な時間の間

50

維持される。適切な時間は、とりわけ、用いる細胞タイプに基づき、そして熟達した技術者により容易に決定され得る。代表的には、持続時間は、約2日から約14日である。

【0124】

組換えオピオイドレセプターポリペプチドは、トランスフェクト細胞またはそれらの細胞が培養されている培地のいずれかから回収または採取される。回収は、オピオイドレセプターポリペプチドの単離および精製を含む。ポリペプチドの単離および精製技術は、当該分野で周知であり、そして沈澱、濾過、クロマトグラフィー、電気泳動などのような手順を含む。

VI I. 抗体。

【0125】

さらに他の実施態様では、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性の抗体を提供する。好ましくは、本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。さらに好ましくは、オピオイドレセプターポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を含む。抗体の調製および特徴付けのための手段は、当該分野で周知である(例えば、Antibodies "A Laboratory Manual, E. HowellおよびD. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照)。

【0126】

簡単に言うと、ポリクローナル抗体は、動物を本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む免疫原で免疫化して、そして免疫化動物由来の抗血清を採取することにより調製される。広範囲な動物種が、抗血清の生産に用いられ得る。代表的には、抗-抗血清の生産に用いる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、またはモルモットである。ウサギのかなり大量の血液のために、ウサギは、ポリクローナル抗体の生産について好ましい選択である。

【0127】

当該分野で周知のように、特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの免疫原性は変化し得る。従って、本発明の免疫原(例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド)をキャリアと結合することは、しばしば必要である。例示的かつ好ましいキャリアは、スカシガイヘモシアニン(KLH)およびウシ血清アルブミン(BSA)である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンのような他のアルブミンはまた、キャリアとして用いられ得る。

【0128】

ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをキャリアタンパク質に結合する手段は、当該分野で周知であり、そしてグルタルアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、およびビス-ビアゾ化ベンジジンを含む。

【0129】

当該分野で周知のように、特定の免疫原に対する免疫原性は、免疫応答の非特異的刺激剤(アジュバントとして公知)の使用により促進され得る。例示的かつ好ましいアジュバントは、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントを含む。

【0130】

ポリクローナル抗体の生産で用いる免疫原の量は、とりわけ、免疫原の性質および免疫化に用いる動物で変化する。種々の経路は、免疫原を投与するために用いられ得る(皮下、筋肉内、皮内、静脈内、および腹腔内)。ポリクローナル抗体の生産は、免疫化後の種々の時点での免疫化動物の血液のサンプリングによりモニターされる。所望のレベルの免疫原性が得られると、免疫化動物は採血され、そして血清は単離および保存され得る。

【0131】

他の局面では、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性の抗体を生産する、以下の工程を含むプロセスを意図する：(a)組換え宿主細胞をオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトする工程；(b)ポリペプチドの発現に十分な条件下で宿主細胞を培養する工程；(c)ポリペプチドを回収する

10

20

30

40

50

工程；および(d)ポリペプチドに対する抗体を調製する工程。好ましくは、宿主細胞は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。さらになお好ましくは、本発明は、上記のプロセスにより調製される抗体を提供する。

【0132】

本発明のモノクローナル抗体は、本明細書中で参考として援用される米国特許第4,196,265号で例示される技術のような周知な技術の使用により容易に調製され得る。代表的には、技術は、免疫応答を提供するのに十分な様式で、選択した抗原(例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド)で適切な動物を最初に免疫化することを含む。マウスおよびラットのような齧歯動物は好ましい動物である。次いで、免疫化動物由来の脾臓細胞は、不死化ミエローマ細胞の細胞と融合される。免疫化動物がマウスである場合、好ましいミエローマ細胞は、ネズミNS-1ミエローマ細胞である。

【0133】

融合脾臓／ミエローマ細胞は選択培地で培養されて融合脾臓／ミエローマ細胞を親細胞から選択される。融合細胞は非融合親細胞の混合物から、例えば、組織培養培地中でのヌクレオチドのデノボ合成をブロックする物質の添加によって、分離される。例示的でそして好ましい物質は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートは、プリンおよびピリミジンのデノボ合成をブロックするのに対し、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキセートが用いられる場合、培地にはヌクレオチド源としてヒポキサンチンおよびチミジンを添加する。アザセリンが用いられる場合には、培地にヒポキサンチンを添加する。

【0134】

この培養は、特異的なハイブリドーマが選択されるハイブリドーマ集団を提供する。代表的には、ハイブリドーマの選択は、単一のクローン希釈物をマイクロタイタープレート中で培養し、その後抗原-ポリペプチドとの反応性に関して個々のクローン上清を試験することにより行われる。次いで、選択されたクローンは、無制限に増殖し得、モノクローナル抗体を提供する。

【0135】

特別な例として、本発明の抗体を産生するために、マウスは本発明のポリペプチドを含む約1~200 μ gの間の抗原を腹腔腔内注射される。Bリンパ球細胞は、完全フロイントアジュバント(死滅させたMycobacterium tuberculosisを含む免疫応答のための非特異的刺激物質)のようなアジュバントと共に抗原を注射することにより刺激されて成長する。第1回目の注射後のある時期(例えば少なくとも2週間後)に、マウスは不完全フロイントアジュバントと混合された抗原の第2回目の投与量を用いる注射によって追加免疫される。

【0136】

第2回目の注射から2、3週間後、マウスは尾部放血され、そして血清は、放射標識された抗原に対する免疫沈降によって力価を測定する。好ましくは、適切な力価が達成されるまで追加免疫と力価測定のプロセスが繰り返される。最も高い力価を有するマウスの脾臓を取り出し、そしてその脾臓のリンパ球はシリンジを用いて脾臓をホモジナイズすることにより得られる。代表的には、免疫されたマウス由来の脾臓は、約 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ リンパ球を含む。

【0137】

ミエローマ細胞として知られる変異リンパ球細胞は、そのような細胞が誘導されている実験動物から得られ、種々の周知の方法によって増殖させられる。ミエローマ細胞は、ヌクレオチド生合成のサルベージ経路が欠落している。ミエローマ細胞は腫瘍細胞なので、それらは組織培養において無制限に増殖し、従って、不滅といわれる。マウスおよびラット由来の多くのミエローマ細胞の培養細胞系(例えばネズミNS-1ミエローマ細胞)が、確立されてきた。

【0138】

ミエローマ細胞は、本発明の抗原／ポリペプチドを注射されたマウスまたはラットの脾臓由来の正常抗体産生細胞との融合を助長するのに適切な条件下で混合される。融合条件としては、例えば、ポリエチレングリコールの存在を包含する。得られた融合細胞はハイブリドーマ細胞である。ミエローマ細胞のように、ハイブリドーマ細胞は培養物中で無制限に増殖する。

【0139】

ハイブリドーマ細胞は、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）のような選択培地中で培養することにより融合しなかったミエローマ細胞と分別される。融合しなかったミエローマ細胞は、サルベージ経路からのヌクレオチド合成に必要な酵素を欠いている。なぜなら、それら細胞は、アミノプテリン、メトトレキセートまたはアザセリンの存在下で死滅するからである。融合しなかったリンパ球もまた組織培養中では生育し続けない。従って、首尾良く融合した細胞（ハイブリドーマ細胞）のみが選択培地内で増殖し得る。

【0140】

生き残ったハイブリドーマ細胞のそれぞれは、単一の抗体を産生する。これらの細胞は、次いで、本発明の抗原／ポリペプチドと免疫反応性の特異的抗体の産生に関してスクリーニングされる。単一の細胞のハイブリドーマは、ハイブリドーマの限界希釈によって単離される。このハイブリドーマは、連続的に何度も希釈され、希釈後に増殖させてその上清がモノクローナル抗体の存在に関してテストされた。次いで、その抗体を産生するクローンは、大量に培養され、本発明の抗体を適量産生する。

【0141】

本発明のモノクローナル抗体の使用により、本発明の特定のポリペプチドおよびポリヌクレオチドが抗原として認識され得、従って、同定され得る。一旦同定されると、それらのポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、抗体－アフィニティークロマトグラフィーのような技術によって単離され得、そして精製され得る。抗体－アフィニティークロマトグラフィーにおいては、モノクローナル抗体が固体の支持体に結合されそして所望の抗原を含む溶液に曝される。その抗原は、上記結合した抗体との免疫特異的結合を介して溶液から除かれる。次いで、このポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、支持体から容易に外されて、そして精製される。

【0142】

V I I I . 薬学的組成物

好ましい実施態様においては、本発明はオピオイドレセプターポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。より好ましくは、この薬学的組成物は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を有するオピオイドレセプターポリペプチドを包含する。より好ましくは、本発明の薬学的組成物は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。さらにより好ましくは、本発明の薬学的組成物は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12のアミノ酸残基配列を有するオピオイドレセプターポリペプチドを包含する。あるいは、この薬学的組成物は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを包含する。

【0143】

本発明の組成物は、代表的には、標準的な、周知の非毒性の生理学的に受容可能なキャリア、アジュバント、および所望の賦形剤を含む用量単位処方物で非経口的に投与される。本明細書中で用いられる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、動脈内、注射または注入技術を含む。

【0144】

注射可能な調製物は、例えば、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液であり、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて公知の技術に従って処方される。滅菌した

10

20

30

40

50

注射可能な調製物はまた、非毒性の非経口的に受容可能な希釈物または溶媒中の滅菌した注射可能な溶液または懸濁液（例えば1,3-ブタンジオール溶液のような）であり得る。

【0145】

受容可能な賦形剤および用いられ得る溶媒は、水、リンガー液、および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、滅菌された不揮発性の油は、溶媒または懸濁培地として従来から用いられている。この目的のために、合成モノーまたはジグリセリドを含む任意の会社の不揮発性油が用いられ得る。さらに、オレイン酸のような脂肪酸が注射可能な調製物に用いられることが知られている。

【0146】

好ましいキャリアは、中性の生理食塩水溶液で、ホスフェート、ラクテート、トリス等によって緩衝されている。もちろん、実施する者が実質的に所望しない混入物（例えば、不完全な干渉アデノウイルス粒子またはエンドトキシン）および他のパイロジェンを持たないほど十分にベクターを精製すれば、そのベクター構築物を受容する個体中にいかなる厄介な反応も引き起こさない。ベクターの精製に好ましい手段は、塩化セシウム勾配遠心分離のような浮遊密度勾配の使用を包含する。

【0147】

キャリアはまたリポソームであり得る。送達ビヒクルとしてのリポソームの使用手段は当該分野で周知である（例えば、Gabizonら、1990；Ferrutiら、1986；およびRanade, V.V., 1989を参照）。

【0148】

トランスフェクトされた細胞をキャリアとして用い得る。1例としては、肝臓細胞を生体から摘出し、前述の方法を用いて本発明のポリヌクレオチドによってトランスフェクトし得、そしてそのトランスフェクトされた細胞を当該生体へ戻し得る（例えば、血管内の注射によって）。

【0149】

I X. ポリヌクレオチドおよびコードされるポリペプチドの検出

あるいは、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドの検出のプロセスを提供し、ここで、このプロセスは、ポリペプチドが上記のプロセスによって調製された抗体と免疫反応して抗体-ポリペプチド結合体を形成する工程、およびその結合体を検出する工程を包含する。

【0150】

さらに別の実施態様においては、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA転写物を検出するプロセスを意図し、ここで、このプロセスは、(a)メッセンジャーRNA転写物をオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズさせて二重鎖を形成する工程；および(b)その二重鎖を検出する工程、を包含する。あるいは、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするDNA分子を検出するプロセスを提供し、ここで、このプロセスは、(a)DNA分子をオピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズさせて二重鎖を形成する工程；および(b)その二重鎖を検出する工程を包含する。

【0151】

X. スクリーニングアッセイ

さらに別の局面においては、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力に関して物質をスクリーニングするプロセスを意図し、オピオイドレセプターポリペプチドを提供する工程、および選択された物質がオピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する能力を試験する工程を包含する。

【0152】

本発明の方法および組成物を使用して、オピオイドレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストのような候補物質を試験するためのスクリーニングアッセイが得られ得る。候補物質は、結合または他の分子間相互作用によってオピオイドレセプターポリヌクレオチドと潜在的に相互作用し得るかまたは調節し得る物質である。いくつかの例では、このよ

10

20

30

40

50

うな候補物質は、上記レセプターのアゴニストであり得、そして別の例では、上記レセプターポリペプチドと相互作用する場合にアンタゴニスト様の特性を示し得る。その他の例では、そのような物質は、雑多なアゴニスト様およびアンタゴニスト様の性質を有し得、あるいは、別の方法でオピオイドレセプターを調節し得る。

【0153】

本発明の組換えレセプター発現システムは、組織ベースのシステムに関して明確な利点を有する。本発明の方法は、スクリーニングアッセイに用いるための大量のオピオイドレセプターを生産することを可能にする。しかし、より重要なことは、本発明によって提供されるレセプターポリペプチドの相対的な精製度である。タンパク質-タンパク質相互作用をアッセイするための相対的に純度の高いポリペプチド調製物により、競合して望ましくない副作用のない溶出方法を用いることが可能となる。 10

【0154】

ある特定のレセプターを十分に発現している組織を入手するのが困難である場合にも、本発明のようなクローン発現システムは有用である。コストは、少なくとも本発明の微生物発現システムに関しては、もう一つの実際的な利点である。一次スクリーニングにおけるアンタゴニストに関しては、本発明の微生物発現システムは、先行技術の組織スクリーニング方法と比較して安価である。

【0155】

従来、スクリーニングアッセイは、クルードなレセプター調製物の使用に頼った。代表的には、目的のレセプターが豊富であると考えられる動物組織切片がレセプターの供給源であった。あるいは、研究者は組織をホモジナイズし、そしてそのクルードなホモジネートをレセプター供給源として用いた。このアプローチの主な難点は、単一のレセプタータイプのみが発現される組織タイプがないということである。従って、得られるデータは、特定のレセプターと明確に相関し得ない。レセプターサブタイプおよびサブサブタイプの最近のクローニングによって、この困難に光が当てられた。従来のアプローチの2番目の基本的な難点は、潜在的な薬剤のスクリーニングのためのヒト組織を入手し得ないことである。従来のアプローチは、ほとんど動物レセプターを常用していた。ヒトレセプターのクローニングには、ヒトレセプターを用いるスクリーニングアッセイが必要である。 20

【0156】

クローン化レセプターの利用可能性により、組換えレセプタースクリーニングシステムには、組織ベースシステムよりもいくつかの利点がある。主な利点は、研究者は今やスクリーニングアッセイに用いられるレセプターのタイプを制御できるということである。特異的なレセプターサブタイプおよびサブサブタイプが優先的に発現され得、そしてリガンドとそれとの相互作用が同定され得る。他の利点には、大量のレセプターの入手可能性、以前には入手不能だった組織サンプル中の希少なレセプターの入手可能性、および生きた動物の維持にかかる費用の低減が含まれる。 30

【0157】

本発明のスクリーニングアッセイには、一般に、候補物質がレセプターに結合し、そしてレセプターの活性に影響を及ぼす能力（例えば、レセプターの機能を阻害するかまたはそうでなければ調節する物質を同定するための候補物質のスクリーニング）の決定が含まれる。代表的には、この方法は、組換えレセプターポリペプチドを調製する工程、次いで、その組換えポリペプチドまたはそのポリペプチドを発現している細胞を候補物質でテストし、その候補物質がその生理学的機能に影響を及ぼす能力を決定する工程を包含する。好ましい実施態様においては、本発明は、ヒトレセプターの酵素学的活性に影響を及ぼす候補物質を同定するための候補物質のスクリーニングに関し、従って、ヒトにおける使用に適切であり得る。 40

【0158】

当該分野で周知のように、スクリーニングアッセイは、物質がレセプターに結合するのに適した条件下でレセプターを提供する。これらの条件は、pH、温度、体調、関連したコファクターの存在、およびグリコシル化またはプレニレーションのようなポリペプチドに 50

対する改変を含むがそれらに限定されない。レセプターが原核細胞または真核細胞で発現され得、そして利用され得るということが意図される。レセプターを発現している宿主細胞が丸ごと用いられ得るか、またはレセプターが宿主細胞から単離され得る。このレセプターは、宿主細胞の膜中で膜結合し得るかまたは、宿主細胞の細胞質ゾル中で遊離し得る。宿主細胞はまた、レセプターが見出され得る細胞下画分に分画され得る。例えば、レセプターを発現している細胞は、核、小胞体、小胞、または細胞の膜表面に分画され得る。

【0159】

pHは、好ましくは約6.0～約8.0の値であり、より好ましくは約6.8～約7.8の値であり、そして最も好ましくは、約7.4である。好ましい実施態様においては、温度は、約20℃～約50℃、より好ましくは約30℃～約40℃、さらに好ましくは、約37℃である。容量オスモル濃度は、好ましくは1リットル当たり約5ミリオスモル(mosm/L)～約400mosm/Lであり、より好ましくは、1リットル当たり約200ミリオスモル～約400mosm/Lであり、そしてさらに好ましくは、約290mosm/L～約310mosm/Lである。コファクターの存在は、レセプターの適切な機能に必要とされ得る。代表的なコファクターには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、および塩化物が包含される。さらに、置換基として知られている小さい非ペプチド分子が必要とされ得る。レセプター機能に必要とされる他の生物学的条件は、当該分野で周知である。

10

【0160】

タンパク質が人工的な膜、小胞またはリポソームに再構築され得ることは当該分野で周知である。(Danboldtら、1990)。本発明は、レセプターが人工的な膜、小胞またはリポソームに組み込まれ得ることを意図する。再構築されたレセプターは、スクリーニングアッセイに用いられ得る。

20

【0161】

本発明のレセプターは、固体支持体にカップリングされ得るということがさらに意図される。この固体支持体は、アガロースビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ポリアクリルビーズ、またはタンパク質とカップリングし得る他の固体マトリックスであり得る。周知のカップリング剤はシアノゲンプロマイド、カルボニルジイミダゾール、トシルクロライド、およびグルタルアルデヒドを含む。

【0162】

本発明のレセプターと連動して機能し得る第2のポリペプチドが提供され得ることが、さらに意図される。例えば、本発明のレセプターは、その生理学的効力を、Gタンパク質およびエフェクターポリペプチドと連動して発揮する。

30

【0163】

候補物質を同定する代表的なスクリーニングアッセイにおいて、レセプターポリペプチドを得るための開始物質（一般的には、クルードなホモジネートの形態に調製されている）として同一の組換え発現宿主が用いられ得る。レセプターを発現している組換え細胞は、洗浄され、ホモジナイズされて本明細書中で開示された所望の緩衝液でクルードなポリペプチドホモジネートに調製される。代表的なアッセイでは、その細胞ホモジネート由来のポリペプチドのある量が、小容量の適切なpHの適切なアッセイ緩衝液中に入れられる。アゴニストおよびアンタゴニストのような候補物質が、適切な濃度の混合物に添加され、そして候補物質とレセプターポリペプチドとの間の相互作用がモニターされる。

40

【0164】

レセプターについての適切な周知の基質が用いられる場合、前述の方法で、組み換えられて産生されたレセプターに関するベースライン活性が得られる。次いで、レセプター機能の阻害剤または改変剤をテストするために、レセプターに及ぼす効果が公知である候補物質を混合物に組み込み得る。候補物質の存在下または非存在下で行われる反応を比較することにより、候補物質がレセプターの正常な機能に及ぼす影響に関する情報を得られ得る。

。

【0165】

従って、本発明のこの局面は、1つまたはそれより多い方法でオピオイドレセプターポ

50

リペプチドの作用を改変する能力を有する候補物質の同定を可能にする方法を、当業者に提供する。

【0166】

1つの実施態様において、このようなアッセイは、オピオイドの所望の性質を有するがオピオイドの所望でない性質は持たない候補物質を分別し得るように設計される。別の実施態様においては、オピオイドレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストのような候補物質をテストするスクリーニングアッセイは、1つまたはそれより多くのオピオイドレセプターポリペプチドと相互作用する選択能を有するそのような候補物質を同定するために用いられる。このポリペプチドは、本明細書中で同定される別のオピオイドレセプターポリペプチドの活性とは実質的にオーバーラップしない。

10

【0167】

さらに、候補物質のテストのためのスクリーニングアッセイは、オピオイドとレセプターとの構造と活性の関係の研究、例えば、レセプターと相互作用するかまたはそうでなければレセプターを改変する天然に生じるホルモンおよび他の物質の結合の研究とそのような分子がレセプターに結合することによって引き起こされる活性の研究との対比、を可能にするように設計される。ある実施態様においては、候補物質または他の分子とオピオイドレセプターポリペプチドとの相互作用を評価する手段としてX線結晶研究を行うために、本発明のポリペプチドは結晶化される。例えば、本発明の精製組換えポリペプチドは、適切な形態に結晶化されると、X線結晶学により分子間相互作用の検出に敏感に反応する。

20

【0168】

本発明の重要な局面は、レセプターの機能を阻害またはそうでなければ改変あるいは変化させ得る物質の同定のためのスクリーニングアッセイにおいて、組換えで産生されたオピオイドレセプターポリペプチドの使用である。天然に生じるレセプターが少量しか存在せず、そして精製の困難さが証明されたので、組換えで産生されたレセプターの使用は特に有益である。さらに、このことは、これまで入手不能だったレセプターの得やすい供給源を提供する。

【0169】

上記のように、アゴニスト存在下でのレセプターは、第2の分子を介してその生理学的効力を発揮する。本発明のスクリーニングアッセイでは、好ましい実施態様において、オピオイドレセプターポリペプチドが内部で産生される組換え宿主細胞から直接得たオピオイドレセプターポリペプチドを都合よく用いる。このことは、組換え宿主内で、代表的には真核宿主内で、選択されたポリペプチドを単純に発現させ、次いで、酵素を含むクルードなホモジネートを調製することによって、最も好ましく達成される。次いで、このクルードなホモジネートの一部は、レセプターの適切なエフェクターと、テストされるべき候補物質と一緒に混合される。候補物質の存在または非存在下でのレセプターに対する選択されたエフェクターの結合を比較することにより、当該候補物質の生理学的性質に関する情報が得られる。

30

【0170】

レセプターは、原核細胞または真核細胞内で発現され得る。レセプターは、E.coli内(Bertinら、1992)、酵母内(Kingら、(1990))、および哺乳類細胞内(Bouvierら、1988)で発現された。

40

【0171】

レセプターを発現している細胞は、物質をスクリーニングするために丸ごと用いられ得る。例えば、本発明のレセプターを発現している細胞は、放射標識した物質に曝され得、そして細胞に結合した放射標識した物質の量が決定され得る。

【0172】

レセプターを発現している細胞は、本発明のレセプターを含む細胞下成分に分画され得る。細胞下画分を精製する方法は当該分野で周知である。細胞下画分は細胞質、細胞膜、小胞体、ゴルジ体、小胞、および核のような膜性の画分を含むがそれらに限定されない。

50

細胞下画分として単離されたレセプターは、細胞膜と関連させ得る。例えば、細胞膜小胞がレセプターを発現している細胞から単離される場合、そのレセプター分子は、膜結合性であり得る。本発明のレセプターが該レセプターを発現する細胞から精製され得るということがさらに意図される。精製方法は、当該分野で周知である。精製レセプターは、スクリーニングアッセイに用いられ得る。

【0173】

本発明に従うそのようなスクリーニングアッセイのほとんどが、オピオイドの所望の局面を模倣し、その反面、このホルモンの所望でない局面を排除するのに有用な物質を単離するように設計されている場合、好ましいアッセイは、オピオイドを正常なアゴニストとして用いる。

10

【0174】

候補物質が本発明のレセプターポリペプチドに及ぼす影響を決定するために用いられ得る実施態様には広範な種類があり、そして本発明はそれらの方法の任意の1つに限定されることを意図していない。しかし、上記レセプターポリペプチドが結合するかまたは特定の物質の存在下で用いられるエフェクターによって改変される能力を測定し得るシステムを用いることが一般に所望される。

【0175】

物質とレセプターとの間の相互作用の検出は、当該分野で周知の技術を介して達成され得る。これらの技術には、遠心分離、クロマトグラフィー、電気泳動、および分光法が含まれるがそれらに限定されない。これらの技術と連動させてまたは単独でアイソトープで標識した試薬の使用もまた意図される。一般に用いられる放射性アイソトープには、³H、¹⁴C、²²Na、³²P、³⁵S、⁴⁵Ca、⁶⁰Co、¹²⁵I、および¹³¹Iが含まれる。一般に用いられる安定なアイソトープには、²H、¹³C、¹⁵N、¹⁸Oが含まれる。

20

【0176】

例えば、ある物質が本発明のレセプターに結合し得る場合、その結合は放射標識物質または放射標識レセプターの使用により検出され得る。簡単にいうと、放射標識物質または放射標識レセプターが用いられる場合、その物質-レセプター複合体は、液体シンチレーションまたはX線フィルムへの感光によって検出され得る。

【0177】

ある物質がレセプターを改変する場合、改変されたレセプターは、クロマトグラフィー、電気泳動、または遠心分離の使用を介して改変されたレセプターと改変されないレセプターとの移動度の違いにより検出され得る。用いられる技術が遠心分離の場合、移動度の違いは沈降係数として公知である。改変はまた、改変されたレセプターと改変されないレセプターとの間の分光学的性質の違いにより検出され得る。明確な例として、ある物質が共有結合によってレセプターを改変する場合、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)カラム上での改変されたレセプターと改変されないレセプターとの間の保持時間の違いは、容易に検出され得る。

30

【0178】

明確な例として、ある物質を共有結合によってレセプターを改変する場合、改変されたレセプターと改変されないレセプターとの間の核磁気共鳴(NMR)スペクトルにおける分光学的差異が検出され得る。あるいは、ある物質に注目して、遊離の物質とレセプター改変後の物質との間の分光学的性質の違いまたは移動度の違いを検出し得る。

40

【0179】

第2のポリペプチドが提供される場合、物質-レセプター-第2のポリペプチドの複合体あるいはレセプター-第2のポリペプチドの複合体が検出され得る。上記のような移動度の違い、または分光学的性質の違いが検出され得る。

【0180】

第2のポリペプチドが提供される場合、エフェクターポリペプチドの酵素活性が検出され得るということがさらに意図される。例えば、多くのレセプターがアデニリルシクラーゼの刺激または阻害を介して生理学的効力を発揮する。物質の存在下でのアデニリルシク

50

ラーゼの酵素学的活性が検出され得る。

【0181】

物質とレセプターとの相互作用は、レセプター遺伝子を提供することにより検出され得る。周知のレポーター遺伝子には、 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ(CAT)、およびルシフェラーゼが包含される。これらレポーター遺伝子は、宿主によって発現され、そしてレポーター遺伝子産物の酵素学的反応が検出され得る。

【0182】

好ましいアッセイにおいては、ポリペプチド、エフェクター、および候補物質を含む混合物が、所定の量の時間インキュベートされ、そして得られたインキュベートされた混合物は、そのようにして産生されたエフェクター／レセプター複合体から混合物中に残った非結合エフェクターを分離するための分離手段にかけられる。次いで、それぞれの量を単純に測定する（例えば、候補物質を添加しなかったコントロールに対して）。この測定は、速度データが所望される種々の時点で行われ得る。このことから、候補物質がレセプターの機能を変化させるかまたは改変させる能力を決定し得る。 10

【0183】

エフェクターをエフェクター／レセプター複合体から分離する多くの技術が公知であり、そしてそのような方法の全ては、本発明の範囲に入ることが意図される。薄層クロマトグラフィー法(TLC)、HPLC、分光測光法、ガスクロマトグラフィー／質量分光測光法、またはNMR分析の使用。任意のそのような技術は、エフェクターと複合体との間の区別が可能 20
な限り用いられ得、そして（例えば、基質および産物の同定または定量をすることにより）酵素学的機能を決定するために用いられ得る。

【0184】

エフェクター／レセプター複合体それ自身もまた、X線結晶学のような技術の対象となり得る。候補物質が薬剤の作用機作としてオピオイド分子に置き換わる場合、その置換およびそれがレセプターに与える影響をモニターするように設計された研究は、特に有益である。

【0185】

A. オピオイドレセプターポリペプチドのスクリーニングアッセイ

本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドの存在に関して生物学的サンプルをスクリーニングするプロセスを提供する。スクリーニングされる生物学的サンプルは、細胞外流体または細胞内流体のような生物学的流体、あるいは細胞抽出物または組織抽出物、あるいはホモジネートであり得る。生物学的サンプルはまた、単離された細胞（例えば、培養物中の）あるいは組織サンプルまたは組織学的サンプル中の細胞の採集物であり得る。組織サンプルは、液体培地に懸濁され得るか、または顕微鏡スライドのような固体支持体に固定され得る。 30

【0186】

スクリーニングアッセイプロセスに従って、生物学的サンプルはその存在がアッセイされるオピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性である抗体に曝される。代表的には、抗体および候補となるオピオイドレセプターポリペプチドの両方を含む液体培地中で混合物を形成することにより被曝が達成される。抗体あるいはオピオイドレセプターポリペプチドを有するサンプルのいずれも固体支持体（例えば、カラム、または、マイクロタイタープレート）に固定され得る。 40

【0187】

生物学的サンプルは、生物学的反応条件下で、抗体-ポリペプチド結合体の十分な形成をなし得る時間、抗体に曝される。生物学的反応条件には、イオン性組成物および濃度、温度、pH等が包含される。

【0188】

イオン性組成物および濃度は、蒸留水のそれからNaClの2重量モル濃度溶液のその範囲であり得る。好ましくは、容量オスモル濃度は約100mosmols/l～約400mosmols/lであり 50

、より好ましくは約200mosmols/l～約300mosmols/lである。好ましい温度は、約4℃～約100℃であり、より好ましくは約15℃～約50℃であり、さらに好ましくは、約25℃～約40℃である。pHは好ましくは、4.0～約9.0の値であり、より好ましくは、約6.5～約8.5の値であり、そしてさらに好ましくは、約7.0～約7.5の値である。生物学的反応条件の唯一の規定は、選択された条件が抗体-ポリペプチド結合体を形成させ、そしてその条件が抗体およびオピオイドレセプターポリペプチドのいずれにも有害な影響を及ぼさないということである。

【0189】

曝される時間は、用いられる生物学的条件、抗体およびポリペプチドの濃度、およびサンプル（例えば、流体または組織サンプル）の性質によって特に変化する。曝される時間を決定する手段は、当業者には周知である。代表的には、サンプルが流体でそのサンプル中のポリペプチド濃度が約 10^{-10} Mの場合、曝される時間は約10分～約200分である。 10

【0190】

サンプル中のオピオイドレセプターポリペプチドの存在は、抗体-オピオイドレセプターポリペプチド結合体の形成および存在を検出することにより検出される。そのような抗体-抗原（例えばレセプターポリペプチド）結合体または複合体を検出する手段は当該分野で周知であり、遠心分離、アフィニティークロマトグラフィー等、二次抗体の抗体-候補レセプター複合体への結合のような手順を含む。

【0191】

1つの実施態様においては、抗体に固定されたインジケータの検出により検出が達成される。例示的で周知のそのようなインジケータには、放射性標識（例えば、 32 P、 125 I、 14 C）、二次抗体、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼのような酵素が含まれる。インジケータを抗体に固定する手段は、当該分野で周知である。商業的なキットが入手可能である。 20

【0192】

B. 抗オピオイドレセプター抗体のスクリーニングアッセイ

別の局面において、本発明は、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応性の抗体（すなわち、抗オピオイドレセプター抗体）の存在に関して生物学的サンプルをスクリーニングするプロセスを提供する。そのようなプロセスに従って、生物学的サンプルは、生物学的条件下で、抗体-ポリペプチド結合体の形成が十分に行われる時間オピオイドレセプターポリペプチドに曝され、そして形成された結合体を検出される。 30

【0193】

C. オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのスクリーニングアッセイ

DNA分子（特にプローブ分子）は、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは遺伝子を有すると推測されるDNA供給源にハイブリダイズさせるために、オリゴヌクレオチドプローブとして用いられ得る。プローブ操作は、通常、オリゴヌクレオチドをそのようなレセプター遺伝子を有することが推測されるDNA供給源にハイブリダイズさせることにより達成される。ある場合には、上記プローブは唯一つのプローブのみを構築し、そしてその他の場合にはプローブは、特定のアミノ酸配列またはオピオイドレセプターポリペプチドの配列に基づいたプローブのコレクションを構築し、そしてそれらの多様性においては遺伝的コードに固有の重複性を考慮する。 40

【0194】

この方法でプローブする適切なDNA供給源は、オピオイドレセプターポリペプチドを発現し得、そして目的の細胞系のゲノムライブラリーとなり得る。あるいは、DNAの供給源は、目的の細胞系由来の全てのDNAを含む。一旦本発明のハイブリダイゼーションプロセスが候補DNAセグメントを同定すると、さらなるハイブリダイゼーション、制限酵素マッピング、配列決定および／または発現、および分析によってポジティブクローンが得られ 50

ることが確認される。

【0195】

あるいは、そのようなDNA分子は、それらの以下のような使用を含む多くの技術において用いられ得る：（１）患者の細胞由来のDNA中の正常および異常なDNA配列を検出するための診断用手段；（２）オピオイドレセプターファミリーの他のメンバーおよび関連ペプチドを、そのような配列を潜在的に含んでいるDNAライブラリーから検出および単離する手段；（３）そのような配列を増幅させる目的で関連した配列にハイブリダイズさせるプライマー；（４）天然のオピオイドレセプターDNA配列を変化させるためのプライマー；ならびに、本明細書中で開示されるオピオイドレセプターDNAセグメントのDNA配列と類似のDNA配列に依存したその他の技術。

10

【0196】

上記で述べたように、ある局面では、本発明によって提供されるDNA配列情報により、所定のオピオイドレセプター遺伝子をコードしている配列と特異的にハイブリダイズしているかなり短いDNA（またはRNA）配列（例えばプローブ）の調製が可能になる。これらの局面において、適切な長さの核酸プローブは、所定のオピオイドレセプター配列（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11、に示されるような配列）の考慮に基づいて調製される。そのような核酸プローブがオピオイドレセプターをコードする配列に特異的にハイブリダイズする能力は、種々の実施態様における特別な使用にそれらを提供せしめる。最も重要なことは、このプローブが与えられたサンプル中の相補的な配列の存在を検出するための種々のアッセイに用いられ得るということである。さらに、変異種のプライマー調製物に関する配列情報の使用、または他の遺伝的構築物の調製における使用のためのプライマーの使用を包含する用途が構想される。

20

【0197】

本発明に伴う確実な利点を提供するために、ハイブリダイゼーション研究またはアッセイに用いられる好ましい核酸配列には、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示されるような、少なくとも14～40またはそれより長いヌクレオチド長のオピオイドレセプターをコードする配列と相補的なプローブ配列が包含される。少なくとも14ヌクレオチド長のサイズは、そのフラグメントが安定で選択的な二重鎖分子を形成するのに十分な長さであることを確実にさせる。ハイブリッドの安定性および選択性を増大させるには、14塩基長より長い相補的な配列を有する分子が一般に好ましく、それにより、得られる特異的なハイブリッド分子の質および程度が改善される。14～20ヌクレオチド長、あるいは所望ならばさらに長い遺伝子相補性を有するように核酸分子を設計することが一般に好ましい。そのようなフラグメントは、例えば、化学的手段による直接合成により、核酸再生産技術（例えば、米国特許第4,603,102号のPCR技術、本明細書中で参考として援用する）の応用により、あるいは、選択された配列を組み換え再生産のために組み換えベクターに導入することにより容易に調製され得る。

30

【0198】

従って、本発明のヌクレオチド配列はそれが相補的な長さの遺伝子を有する二重鎖分子を選択的に形成する能力の故に用いられ得る。想定される適用に応じて、標的配列に対するプローブの種々の選択性の程度を達成するように種々の条件のハイブリダイゼーションが用いられ得る。高い選択性を必要とする適用には、ハイブリッドを形成するために、典型的に比較的厳しい条件を用いる。例えば、比較的低い塩濃度、および／または高い温度条件（例えば、0.02M～0.15MのNaClを50℃～70℃の温度で）が選択される。そのような条件は、特に選択的で、プローブと鋳型または標的鎖との僅かのミスマッチ（もしあるならば）も許容しない。

40

【0199】

もちろん、ある適用においては、例えば、基礎となる鋳型とハイブリダイズされた変異体プライマー鎖を用いて変異体の調製を所望する場合、あるいは、関連種、機能的等価物等からオピオイドレセプターコーディング配列を単離しようとする場合、ヘテロ二重鎖を形成させるために、あまり厳しくないハイブリダイゼーション条件が必要とされる。その

50

ような状況の下では、0.15M~0.9Mの塩で、温度範囲は20℃~55℃のような条件が用いられる。それにより、クロスハイブリダイズした種は、コントロールハイブリダイゼーションに関してポジティブにハイブリダイズしたシグナルとして容易に同定され得る。いかなる場合でも、条件は、ホルムアミドの添加量の増加により厳しくなるということが一般に理解されている。ホルムアミドは、温度上昇と同じ様式でハイブリッド二重鎖を不安定化するために与えられる。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作し得、従って、一般に所望の結果に応じて選択される方法である。

【0200】

特定の実施態様においては、ハイブリダイゼーションを決定するために、本発明の核酸配列を適切な手段（例えば、標識）と組み合わせて用いることが利点である。放射性、ア
10
ビジン／ピオチンのような酵素的または他のリガンド（これらは検出し得るシグナルを提供し得る）を含む幅広い種々の適切なインジケータ手段が当業者に公知である。好ましい実施態様においては、放射性または他の環境的に望ましくない試薬の代わりにウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、またはペルオキシダーゼのような酵素標識が用いられやすい。酵素標識の場合、比色インジケータ基質が公知である。これはヒトの目または分光測光で見える手段を提供するために用いられ、相補的な核酸を含有するサンプルとの特異的なハイブリダイゼーションを同定する。

【0201】

一般に、本明細書に記載されるハイブリダイゼーションプローブは溶液ハイブリダイゼーション中の試薬としておよび固体相を用いる実施態様の両方で有用である。固体相を含
20
む実施態様では、テストDNA（またはRNA）を含むサンプルは、選択されたマトリックスまたは表面に吸収されるかそうでなければ固定される。この固定された1本鎖の核酸は、次いで、所望の条件下で選択されたプローブとの特異的なハイブリダイゼーションの対象とされる。選択された条件は特に、必要とされる特定の基準（例えば、G+C含量、標的核酸のタイプ、核酸の供給源、ハイブリダイゼーションプローブのサイズなどに依存する）に基づいた特定の条件に依存する。非特異的に結合したプローブ分子を除去するようにハイブリダイズした表面を洗浄した後、標識によって特異的なハイブリダイゼーションが検出されるかまたは定量される。

【0202】

30

D. アゴニストおよびアンタゴニストのためのスクリーニング

δレセプターは、オピオイドレセプターの3つの主要なサブタイプの1つである。このレセプターと相互作用する内因性ペプチドは、メチオニンエンケファリンおよびロイシンエンケファリンである。これらのレセプターは、アデニリルシクラーゼ、百日咳毒素(per
tussin-toxin)感受性Gタンパク質を介するCa⁺⁺およびK⁺チャンネルを含む多数の細胞性エフェクター系(multiple cellular effector system)と結合する。δオピオイドレセ
プターは、オピオイドの鎮痛効果を仲介する。δオピオイドレセプターアゴニストは無痛
覚を引き起こし得る一方で、濫用の可能性を制限している。従って、高選択性δオピオ
イドレセプターアゴニストは、常習という有害な副作用がなく、慢性の痛みの治療に臨床上
有用であり得る。

40

【0203】

高選択性の、臨床的に有用なδオピオイドレセプターアゴニストの開発は、アゴニストの結合に必要なδレセプター内の特異的部位を理解することによって促進される。マウスδオピオイドレセプターcDNAのクローニングは、その機能に
関与しているこのレセプターサブタイプの構造ドメインを検討する可能性を開いた。以下に示すように、δレセプターの第2貫膜に及ぶ領域(transmembrane spanning region)における1個の(single)アミノ酸が、δ選択的オピオイドアゴニストの結合にとって重大である。

【0204】

リガンド結合に関係しているマウスδオピオイドレセプターの構造成分を調べるために、残基95のアスパラギン酸を、部位特異的変異によってアスパラギンに変換した。このア
50

スパラギン酸は、Gタンパク質結合レセプター間で保存され、そしてアゴニスト結合のNa⁺調節を仲介すると考えられている。δレセプターのリガンド結合特性を試験するために、変異型および野生型レセプターは、COS-7細胞で発現された。両レセプターは、δ選択的アゴニスト [³H]-DPDPEおよびアンタゴニスト [³H]-ナルトリンドールで標識され得た。Na⁺(90mM)は、野生型δレセプターへの [³H]-DPDPE結合を減少させたが、変異型レセプターへの結合は減少させなかった。Na⁺は、 [³H]-ナルトリンドール結合に影響を及ぼさなかったが、変異型レセプターではなく野生型レセプターへの放射性標識アンタゴニスト結合を阻害するアゴニストの能力を減少させた。これは、Na⁺が、アゴニストに対する野生型レセプターの親和性を選択的に減少させることを示している。

【0205】

10

[³H]-DPDPEの変異型レセプターへの結合は、野生型と比較して減少した。減少した結合は、Gタンパク質からのレセプターの脱離、変異型レセプターの低発現、またはレセプターのリガンド結合特性における変化に起因するものであり得る。変異型レセプターは、Gタンパク質にカップリングしたままであったが、これはGTPγSがレセプターへの [³H]-DPDPEの結合を減少させ得たからである。さらに、この変異型レセプターは、Gタンパク質結合に要求される反応であるアゴニストのcAMP形成阻害を仲介し得る。変異型レセプターは、野生型レセプターよりも高レベルで発現された。従って、変異型レセプターは、アゴニストに対する親和性を選択的に減少させた。

【0206】

このことは、δ選択的アゴニストDPDPE、DSLET、デルトルフィン、およびmet-エンケファリンが、野生型レセプターと比較して、変異型レセプターへの [³H]-ナルトリンドールの結合を阻害する能力が減少したことによって、さらに示された。変異型レセプターの親和性は、これらのペプチドに対して100倍以上低い。対照的に、δ選択的アンタゴニスト、ナルトリンドール、NTB、およびBNTXに対する変異型および野生型レセプターの親和性は類似しており、変異型レセプターはアゴニストに対する親和性が特異的に減少したことを示している。

20

【0207】

ブレマゾシン(bremazocine)のような非選択的オピオイドアゴニストの変異型および野生型δレセプターへの結合能力は、類似していた。この化合物は、全てのオピオイドレセプターサブタイプでのアゴニストである。アルカロイドであるブプレノルフィン(buprenorphine)は、オピオイド常習を処置するために用いられる化合物であり、部分的なμオピオイドアゴニストでありそしてδレセプターで完全レセプターであることが報告されている。なぜなら、野生型または変異型δレセプターのいずれかを発現しているCOS細胞中でのフォルスコリン刺激によるcAMPの形成を阻害するからである。この非ペプチド性アゴニストは、変異型および野生型δオピオイドレセプターの両方に同様の親和性で有効に結合する。変異型レセプターは、非選択的、非ペプチド性オピオイドアゴニストに対して、野生型レセプターと同様の親和性を示すが、δ選択的ペプチドアゴニストに対する親和性が減少したので、変異型および野生型レセプターのリガンド結合特性における相違は、アゴニストのペプチドの性質またはこれらのδレセプター選択特性に関して調べられた。

30

【0208】

40

BW373U86およびSIOMは、非ペプチドの、有力なδオピオイドレセプター選択的アゴニストである。両方の化合物は、野生型および変異型のδレセプターを刺激してcAMP形成を阻害する。BW373U86およびSIOMは、 [³H]-ナルトリンドールの野生型δレセプターへの結合を効果的に阻害する。それに対して、変異型レセプターへの結合ではBW373U86は100倍以上、そしてSIOMは、50倍以上低い能力である。これらの発見は、変異型δレセプターは異なる構造のδオピオイドレセプター選択的アゴニストに対して減少した親和性を有することを示す。

【0209】

このデータは、マウスδオピオイドレセプターの残基95のアスパラギン酸がδレセプター選択的アゴニストの高親和性結合のために必要であることを示す。この残基は、アンタ

50

ゴニスト結合には必要ではなく、非選択的オピオイドアゴニストの結合にも必要でない。非選択的アゴニストが変異型および野生型 δ レセプターに等しくよく結合しそして刺激する能力は、1つの残基変異がリガンド結合ドメインを非選択的に変えるか、あるいはレセプターとGタンパク質との相互作用を阻害するような、レセプターの大きなコンフォメーションの変化を引き起こさないことを示唆している。このことは、レセプターにとって高い親和性でアゴニストに結合するために不可欠である。非選択的アゴニストおよび δ 選択的アンタゴニストの δ レセプターへの結合は、点突然変異により影響されなかったもので、このようなアゴニストおよびアンタゴニストは、 δ オピオイドレセプター選択的アゴニスト結合に関係している部位とは別のこのオピオイドレセプターのリガンド結合ドメインに類似する領域と相互作用し得る。アスパラギン酸95は、非選択的アゴニストまたは δ オピオイドアンタゴニストの結合に必要でないレセプターとリガンドとの相互作用を安定化させるために負電荷を与えることによって、容易に δ レセプターに対して選択的にアゴニストを結合させ得る。同様に、 β -アドレナリンレセプターにおけるアスパラギン酸は、 β -アドレナリン選択的アゴニストの結合の安定化のために電荷を供給すると考えられている。最近の研究はまた、タキキニン(tachykinin)およびコレシストキニン(cholecystokinin)レセプターにおける1個のアミノ酸がサブタイプ選択的アンタゴニスト結合に関与していることを示し、さらに1個の残基が特異的なリガンド-レセプター相互作用によって重大であり得ることを示している。

【0210】

このデータは、選択的アゴニストおよびアンタゴニストが異なって δ オピオイドレセプターに結合することを示す。このことは、これらはこのレセプターの異なる領域で相互作用し得ることを示唆している。アスパラギン酸95を含む δ オピオイドレセプターの第2貫膜に及ぶ領域のドメインは、アゴニストの選択的結合に関与している。

【0211】

E. キメラオピオイドレセプターポリペプチド

κ および δ オピオイドレセプターは、異なる薬学的な特性を示す。貫膜に及ぶ領域における κ および δ オピオイドレセプターの間でアミノ酸配列が高い類似性を有することは、細胞外ドメインが、リガンドが各々のレセプターと選択的に結合することに関係しているらしいことを示唆する。2つのレセプターの細胞外領域のアミノ末端は、アミノ酸配列においてお互いに異なる。

【0212】

当業者に周知の標準的な変異誘発技術を用いて、異なったレセプターサブタイプからの部分を含むキメラオピオイドレセプターポリペプチドが生成される。好ましい実施態様において、特定のレセプターサブタイプ(例えば、 κ 、 δ)のアミノ末端領域は、異なったレセプターサブタイプの部分(非アミノ末端)に結合している。このようにして、特定のレセプターサブタイプのアミノ末端は交換され得る。このようなキメラレセプターポリペプチドをコードする変異ポリヌクレオチド(例えば、cDNA)は、次いで宿主細胞にトランスフェクトされ、キメラレセプターが発現される。好ましい宿主細胞は、COS細胞である。次いで、組換えキメラレセプターレセプターポリペプチドは、サブタイプ選択的アゴニストおよびアンタゴニストと結合する能力について試験される。

【0213】

第1貫膜に及ぶ領域におけるSpe I 制限部位を、オリゴヌクレオチド特異的な変異誘発を用いてマウス κ レセプターおよび δ レセプターcDNAに設計した。この部位は、両方のcDNAにおける同じ位置に設計され、これによって、配列のフレームシフトおよび／または欠失または付加を回避する。 κ または δ オピオイドレセプターcDNAのいずれのコーディング領域にも、天然のSpe I 制限部位はない。各々のレセプターのアミノ末端に対応するフラグメントは、両方のcDNAに新たに設計したSpe I 部位を切断することによって単離される。次いでこれらのフラグメントを他方のレセプターのカルボキシ末端に対応する精製されたcDNAに結合して、キメラ $\kappa_{1-74} / \delta_{65-372}$ および $\delta_{1-64} / \kappa_{75-380}$ レセプターを生成する。

【0214】

変異DNAフラグメントは、適切な発現ベクター(例えば、哺乳類発現ベクターpCMV6₀)にサブクロニングされ、そしてCOS-7細胞またはCHO細胞のような適切な宿主細胞に一時的にトランスフェクトされるかまたは安定に発現される。次いでこのキメラ体は、アゴニスト、アンタゴニストの研究に用いられる。例としては、 $\kappa_{1-74} / \delta_{65-372}$ キメラ体は、 δ レセプター選択的アゴニスト [3 H]-DPDPEおよびアンタゴニスト [3 H]-ナルトリンドール(野生型 δ レセプターに有効に結合する)、および κ 選択的アゴニスト [3 H]-U69,593ならびにアンタゴニスト [3 H]-ナロキソン(クロニングされた κ オピオイドレセプターに結合するがクロニングされた δ オピオイドレセプターには結合しない)で標識される能力について試験される。 δ オピオイドレセプター放射性リガンドがこのキメラレセプターに結合しないが、[3 H]-U69,593および[3 H]-ナロキソンが高い効力で結合する場合、両方のレセプターのリガンド結合領域は、アミノ末端に含まれるようである。

【0215】

マウス κ および δ オピオイドレセプターcDNAを、Altered Site^{T M} インビトロMutagenesis System (Promega Corp. Madison WI) を用いて変異した。 κ レセプターcDNAの第1貫膜に及ぶ領域の残基78~80部位でのSpe I 制限部位に設計するために、マウス κ レセプターcDNAを、ファージミドpALTER^{T M} にサブクロニングし、そしてヘルパーファージR408を用いて、一本鎖鋳型を作製した。所望の変異(TCTGGTからACTAGT)をコードする24マーのオリゴヌクレオチド(GTGGGCAATTCAGTATCATGTTT; 配列番号7)を、一本鎖鋳型にアニーリングし、そしてT4 DNAポリメラーゼで伸長した。次いで、ヘテロ二本鎖DNAを用いて、修復マイナス(repair minus)E. coli 株BMH 71-18 mut Sを形質転換した。

【0216】

形質転換細胞を、125 μ g/mlアンピシリンを含有するLBプレートで成長させて選択した。二本鎖プラスミドDNAの配列を、サンガーのジデオキシチエンターミネーション法によって決定し、そしてSpe I で切断して変異の存在を確認した。 δ レセプターcDNAについては、所望の変異(GCTCGTからACTAGT)をコードする24マーのオリゴヌクレオチド(CTGGGCAACGTACTAGTATCATGTTT; 配列番号8)を使用し、そして上記の κ レセプターcDNAの場合と同様の手順を用いた。各変異されたcDNAを、pALTERから、 δ レセプターcDNAの場合にはEcoRI およびSal I で、そして κ レセプターcDNAの場合にはSal I およびBamHI で切り出し、そして哺乳類発現ベクターpCMV6cの対応する部位にサブクロニングした。各レセプターのN末端領域に対応する各cDNAの5'領域(κ レセプターでは残基1~75および δ レセプターでは残基1~65)を、EcoRI / Spe I (δ レセプター)およびSal I / Spe I (κ レセプター)で切除し、そしてゲル精製した。 κ レセプターのN末端フラグメントを、 δ レセプターのC末端フラグメントに結合した。挿入物をベクターから切除し、そしてそのサイズをアガロースゲル電気泳動で測定して、適切な連結反応が起こったかどうかを確認した。次いで、キメラ κ - δ レセプターcDNAをカルシウム-ホスフェートを用いる手順によってCOS-7細胞に一時的にトランスフェクトした。

【0217】

選択的 κ アゴニスト [3 H]-U69593は、 $\kappa_{1-74} / \delta_{65-372}$ キメラに結合しなかった。アンタゴニスト [3 H]-ナロキソン(高親和性で野生型 κ に結合するが、 δ レセプターには結合しない)は、このキメラに結合した。[3 H]-ナロキシソンの結合は、 κ 選択的アンタゴニスト nor-BNI によって効果的に阻害されたが、選択的 κ アゴニスト U50,488、またはダイノルフィン(dynorphin)によっては阻害されなかった。これらの発見は、 κ レセプターのアミノ末端がアンタゴニスト結合部位を有しているが、アゴニスト結合部位は有していないようであることを示した。従って、アゴニスト結合部位は、このレセプターの他の領域に、例えば δ レセプターとは異なるアミノ酸配列を有する第3および第4細胞外ドメインに存在するようである。これらのデータはさらに、アゴニストおよびアンタゴニストが κ レセプターの明らかに離れた領域に結合することを示す。

【0218】

ナロキソン結合部位が κ レセプターのアミノ末端領域にあるという発見は、 κ レセプターの限定された領域が μ レセプターに類似し得ることを示唆する。ナロキソンは、効果的に μ オピオイドレセプター、および κ レセプターに結合する。これらのデータは、 κ レセプターのアミノ末端に対するプローブでcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより μ レセプターのクローニングが容易になることを示す。

【0219】

選択的 δ アゴニスト $[^3\text{H}]\text{-DPDPE}$ および選択的 δ アンタゴニスト $[^3\text{H}]\text{-ナルトリンドール}$ の両方は、有効にキメラ $\kappa_{1-74}/\delta_{65-372}$ に結合した。これらのデータは、これらの結合部位が δ レセプターのN末端にないことを示す。なぜならば、このキメラは δ レセプターのアミノ末端を有しないからである。これらの結合部位は、 δ レセプターの他の部分にあるようである。

10

【0220】

XI. κ および δ オピオイドレセプターのリガンド結合および Gタンパク質カップリングドメイン

A. リガンド結合ドメイン

κ および δ オピオイドレセプターは、異なった薬学的特性を示す。2つのレセプターのN末端細胞外領域は、アミノ酸配列においてお互いに異なる。変異誘発技術を用いて、各レセプターのN末端を交換する。変異cDNAは、適切な宿主細胞(例えば、COS細胞)にトランスフェクトされ、そしてキメラレセプターは、 κ および δ サブタイプ選択的アゴニストおよびアンタゴニストと結合する能力について試験される。この変異誘発のために、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発を用いて第1貫膜に及ぶ領域におけるSpe I制限部位を、マウス κ レセプターおよび δ レセプターcDNAに設計する。この部位は、両方のcDNAの同一位置に設計され、それによって配列のフレームシフトおよび/または欠失または付加を回避する。 κ または δ オピオイドレセプターcDNAのいずれのコーディング領域にも天然のSpe I制限部位はない。従って、両方のcDNAに新たに設計された部位で切断した後、各レセプターのN末端に対応するフラグメントを単離し、そしてこれらと、他方のレセプターのC末端に対応する精製されたcDNAとを結合することにより、キメラ $\kappa_{1-74}/\delta_{65-372}$ および $\delta_{1-64}/\kappa_{75-380}$ レセプターが生成され得る。各変異DNAフラグメントは、適切な哺乳類発現ベクター(例えば、pCMV6c)にサブクローニングされ、そしてCOS-7細胞に一時的にトランスフェクトされるかまたはCHO細胞にて安定に発現される。

20

30

【0221】

$\kappa_{1-74}/\delta_{65-372}$ キメラは、 δ レセプター選択的アゴニスト $[^3\text{H}]\text{-DPDPE}$ およびアンタゴニスト $[^3\text{H}]\text{-ナルトリンドール}$ (野生型 δ レセプターに有効に結合する)、および κ 選択的アゴニスト $[^3\text{H}]\text{-U69,593}$ ならびにアンタゴニスト $[^3\text{H}]\text{-ナロキソン}$ (クローニングされた κ オピオイドレセプターに結合するが、クローニングされた δ オピオイドレセプターには結合しない)で標識化される能力について試験される。 δ オピオイドレセプター放射性リガンドがこのキメラレセプターには結合しないが、 $[^3\text{H}]\text{-U69,593}$ および $[^3\text{H}]\text{-ナロキソン}$ が高い効力で結合する場合、両レセプターのリガンド結合領域は、N末端に含まれるようである。 $\delta_{1-64}/\kappa_{75-380}$ キメラの同様な薬学的分析は、さらに両レセプターのリガンド結合ドメインがそれらのN末端に存在するかどうか確認するのに役に立つ。

40

【0222】

アゴニストおよびアンタゴニストがキメラレセプターに結合する能力にもまた相違があるようである。この相違はまた、変異誘発を用いて調べられる。例としては、 δ 選択的アゴニスト $[^3\text{H}]\text{-DPDPE}$ が $\kappa_{1-74}/\delta_{65-372}$ キメラに結合しないで $[^3\text{H}]\text{-U69593}$ に結合する場合、 $[^3\text{H}]\text{-DPDPE}$ は、 $\delta_{1-64}/\kappa_{75-380}$ キメラに有効に結合するが、 $[^3\text{H}]\text{-U69593}$ には結合しないようである。反対に、 $[^3\text{H}]\text{-ナルトリンドール}$ および $[^3\text{H}]\text{-ナロキソン}$ が、キメラおよび野生型レセプターに同様に結合すれば、この結果は、アンタゴニストはアゴニストと比べてオピオイドレセプターの異なる領域に結合するという仮説を支持

50

する。

【0223】

N末端領域における2つのレセプターのリガンド結合ドメインをさらに同定および単離するために、N末端のより小さな領域が交換され、そして変異型レセプターは、 κ または δ アゴニストまたはアンタゴニストに対する親和性について試験される。

【0224】

最初の研究によりN末端がリガンド結合ドメインを含まないということが明らかであるとすれば、第3および第4細胞外ドメイン（アミノ酸配列において明らかに異なる、オピオイドレセプター中の唯一2つの異なっている細胞外領域）のどちらかが、リガンド結合ドメインとしての役割を果たしているであろう。これらの領域は、 κ レセプターの残基197~220および300~311、ならびに δ オピオイドレセプターの残基187~208および287~298に対応する。レセプターの第3および第4細胞外ドメインは、2つのレセプターの間で交換され、そして変異型レセプターは、 κ および δ レセプターアゴニストおよびアンタゴニストと結合する能力について試験される。

【0225】

マウス κ および δ オピオイドレセプターcDNAを、Altered SiteTMインビトロMutagenesis System (Promega Corp. Madison WI)を用いて変異する。 κ レセプターcDNAの第1貫膜に及ぶ領域における残基78~80にSpe I 制限部位を設計するために、マウス κ レセプターcDNAを、ファージミドpALTERTMにサブクローニングし、そしてヘルパーファージR408を用いて、一本鎖鋳型を作製する。所望の変異(TCTGGTからACTAGT)をコードする24マーのオリゴヌクレオチド(GTGGGCAATTCAGTTCATGTTT; 配列番号7)は、一本鎖鋳型にアニーリングし、そしてT4 DNAポリメラーゼで伸長する。次いで、ヘテロ二本鎖DNAを用いて、修復マイナスE. coli 株BMH 71-18 mut Sを形質転換する。形質転換細胞は、125 μ g/mlアンピシリンを含有するLBプレートで成長させて選択される。二本鎖プラスミドDNAの配列を、サンガーのジデオキシチエンターミネーション法によって決定し、そしてSpe I で切断して変異の存在を確認する。 δ レセプターcDNAについては、所望の変異(GCTCGTからACTAGT)をコードする24マーのオリゴヌクレオチド(CTGGGCAACGTACTAGTTCATGTTT; 配列番号8)を使用し、そして上記の κ レセプターcDNAの場合と同様の手順を用い得る。

【0226】

各変異されたcDNAは、pALTERから、 δ レセプターcDNAの場合にはEcoRI およびSal I で、そして κ レセプターcDNAの場合にはSal I およびBamHI で切り出され、そして適切な哺乳類発現ベクター（例えば、pCMV6c）の対応する部位にサブクローニングされる。各レセプターのN末端領域に対応する各cDNAの5'領域（ κ レセプターでは残基1~75および δ レセプターでは残基1~65）は、EcoRI / Spe I（ δ レセプター）およびSal I / Spe I（ κ レセプター）で切除され、そしてゲル精製される。 δ レセプターのN末端フラグメントは、 κ レセプターのC末端フラグメントに結合され、そして κ レセプターのN末端フラグメントは、 δ レセプターのC末端領域に結合される。挿入物はベクターから切除され、そしてそれらサイズをアガロースゲル電気泳動で測定し、適切な連結反応が起こったかどうかを確認する。

【0227】

次いで、キメラレセプターcDNAは、カルシウム-ホスフェートを用いる手順によってC0S-7細胞に一時的にトランスフェクトされる。第3または第4細胞外ループが κ と δ オピオイドレセプターとの間で交換されているキメラレセプターは、上記の同様の手順を用いてPCRによって生成される。

【0228】

レセプター結合の研究のために、キメラレセプターは、放射性リガンド [³H]-U69593、[³H]-ナロキソン、[³H]-DPDPE、および[³H]-ナルトリンドールで標識される。特異的結合は、ナロキソン感受性組織結合として定義される。多くの κ リガンド、例えば、U50488、U69593、nor-BNI、およびダイノルフィンを用いて競合阻害研究が行われる。結合の立体特異性は、ナロキシソンの異性体を用いて、そして結合の阻害でレボルファノ

ールとデキシトルファン(dextorphan)との能力を比較することによって、試験される。DPDPE、DSLET、エンケファリン、デルトルフィン(deltorphin)、およびBW373U86のようなδレセプターリガンド、ならびにナルトリンドール、NTBおよびBNTXなどのアンタゴニストもまた試験される。IC₅₀値の解析は、コンピューター曲線適合(curve fitting)プログラムPROPHETを用いて行われる。

【0229】

放射性標識アゴニストの結合または放射性標識アンタゴニストの結合のアゴニストによる阻害のいずれかにおけるGTPγSの効果を検討して、変異型レセプターがGタンパク質に結合するかどうか決定し得る。変異型レセプターの機能活性を調べるために、レセプターがフォルスコリン刺激によるcAMPの形成のアゴニストによる阻害を仲介する能力が、標準技術を用いて記載されているように決定される。 10

【0230】

B. Gタンパク質カップリングドメイン

Gタンパク質は、種々のエフェクター系に対してオピオイドレセプターを結合し、そして従ってこのオピオイドの細胞活動を仲介することにおいて重大である。Gタンパク質との会合に関係しているレセプターの領域は、以前は同定されてなかった。アドレナリンおよびムスカリンレセプターに関しては、Gタンパク質会合に関係するいくつかの異なる細胞内ドメインが、同定されている(Dohlmanら、1991)。これらのレセプターの第3細胞内ループが、Gタンパク質との相互作用することがまず考えられた。κおよびδオピオイドレセプターの第3細胞内ループのアミノ酸配列は、非常に類似している（下記参照）。それゆえ、κおよびδオピオイドレセプターの第3細胞内ループを交換しても、これらの領域がGタンパク質カップリングドメインであるかどうかの有用な情報を提供しそうにはない。しかし、κおよびδオピオイドレセプターは、ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1と高いアミノ酸配列類似性を有し、全体として40%のアミノ酸同一性を有する。さらに、オピオイドレセプターの第3細胞内ループおよびSSTR1は、サイズが同一（各々28アミノ酸）であるが、配列は異なる（下記参照）。 20

【0231】

SSTR1は、Gタンパク質と結合せず、またアデニリルシクラーゼ活性のアゴニストによる阻害も仲介しないことが示されている(Rens-Domianoら、1992; Yasudaら、1992)。その結果、SSTR1の第3細胞内ループは、Gタンパク質カップリングのために必要な配列を含んでいないようである。κおよびδレセプターの第3細胞内ループを、部位特異的変異誘発によってSSTR1の対応する領域と交換することにより、これらがGタンパク質カップリングドメインかどうか決定される。オピオイドレセプターの第3細胞内ループがGタンパク質カップリングドメインである場合、キメラオピオイドレセプターは、Gタンパク質と会合する能力をなくすようである。他方、キメラSSTR1は、Gタンパク質と会合する能力を得るはずである。Gタンパク質とキメラレセプターとの会合は、アゴニストとレセプターとの結合に対するGTPγSの影響、アゴニストの結合に対する百日咳毒素処理の影響およびキメラレセプターのcAMP形成のアゴニスト阻害を仲介する能力について試験される。キメラオピオイドレセプターの発現は、放射性標識化アンタゴニストおよびアゴニスト結合の両方を用いて測定される。キメラSSTR1発現は、前述(RaynorおよびReisine、1989)のように、[¹²⁵I]-Tyr¹¹ソマトスタチン結合を用いて検出される。 30 40

【0232】

【化 1】

第 3 細胞内ループ

SSTR1 Leu Ile Ile Ala Lys Met Arg Met Val Ala Leu Lys
Ala Gly Trp Gln Gln Arg Lys Arg Ser Glu Arg Lys
Ile Thr Leu Met (配列番号 13).

κ Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Leu Leu
Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg
Ile Thr Lys Leu (配列番号 14).

δ Leu Met Leu Leu Arg Leu Arg Ser Val Arg Leu Leu
Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu Arg Arg
Ile Thr Arg Met (配列番号 15).

10

第 2 細胞内ループ

SSTR1 Asp Arg Tyr Val Ala Val Val His Pro Ile Lys Ala
Ala Arg Tyr Arg Arg Pro (配列番号 16).

κ Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu
Asp Phe Arg Thr Pro (配列番号 17).

20

δ Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu
Asp Phe Arg Thr Pro (配列番号 17).

【0 2 3 3】

いくつかのレセプターの第 2 細胞内ループもまた、G タンパク質カップリングに寄与すると考えられている (Dohlman ら、1991)。κ および δ オピオイドレセプターのこの領域は、同一である (上記参照)。しかし、この配列は、SSTR1 の配列とは異なる。第 2 細胞内ループは、オピオイドレセプターの G タンパク質カップリングドメインを含み得る。これらの領域は、SSTR1 と交換され、そしてキメラオピオイドレセプターは G タンパク質カップリングの喪失について試験され、そしてキメラ SSTR1 は G タンパク質会合の能力の獲得について試験される。

30

【0 2 3 4】

G タンパク質カップリングに関係し得るオピオイドレセプターの第 3 の潜在的領域は、細胞質テール (cytoplasmic tail) であろう。これは、2 つのオピオイドレセプター間でアミノ酸配列が異なる唯一の細胞内ドメインである。両方のオピオイドレセプターが百日咳毒素感受性 G タンパク質にカップリングするが、それが会合する G タンパク質のサブタイプは異なるようである。これらのレセプターが異なる G タンパク質と相互作用し得れば、オピオイドレセプターの C 末端の独特の配列は、異なる G タンパク質と相互作用するこれらの能力の構造的な根拠を提供するようである。これらの領域は、SSTR1 の対応する領域と交換され、そしてキメラレセプターは、放射性リガンド結合技術を用いて G タンパク質会合について、およびアデニルシクラーゼ活性のアゴニスト阻害を仲介する能力について試験される。

40

【0 2 3 5】

κ および δ オピオイドレセプターの C 末端は、C 末端が κ および δ レセプターが G タンパク質のサブタイプと会合する能力の微妙な差に関係しているかどうか決定するために交換される。次いで、このキメラ型および野生型レセプターは、適切な宿主細胞 (例えば、CHO 細胞または PC12 細胞) において安定に発現される。次いで、キメラレセプターは、免疫沈降アプローチを用いて、どの G タンパク質とそれらが会合しているかについて試験され

50

る。さらに、キメラレセプターの異なるエフェクター系（例えば、アデニリルシクラーゼ、Ca⁺⁺およびK⁺チャンネル）へのカップリングもまた、特定のエフェクター系を調節するためにC末端がレセプターに選択的にGタンパク質とカップリングするように指示(direct)しているがどうか決定するために分析される。

【0236】

ハイブリッドκレセプター／SSTR1またはδレセプター／SSTR1変異体（SSTR1の第3細胞内ループが、κおよびδレセプターの同様の領域と交換される）を構築するために、PCRが用いられる。3つのフラグメント、N末端、C末端、およびSSTR1の第3細胞内ループ、κおよびδレセプターは、以下の条件下で10～50ngのプラスミドDNAから増幅される：95℃で1分間、55℃で1分間、そして72℃で1分間からなるサイクルを25～30サイクル。 10

【0237】

N末端フラグメント：N末端フラグメントは、SSTR1のcDNAにおける独特のSal I 部位、δレセプターのEcoR I 部位、およびκレセプターのSal I 部位におよぶ順方向プライマーを用いて生成される。逆方向プライマーは、SSTR1の第5膜に及ぶ領域の3'末端、δおよびκレセプターについて行われる。SSTR1、δおよびκレセプターN末端生成物を、それぞれ、Sal I、EcoR I およびSal I で切断することにより、5'オーバーハングおよび3'平滑末端を有するDNAフラグメントを生じる。N末端フラグメント(N-)のPCR増幅に用いられる順方向(F)および逆方向(R)プライマーは、以下を含む：

【0238】

【化2】

SSTR1 **N-F=TATCTAGGTC GACGG;**
 (配列番号 18),

SSTR1 **N-R=CATCTTAGCA ATGAT;**
 (配列番号 19),

δレセプター **N-F=GTCGAGAATT CCCCg;**
 (配列番号 20),

δレセプター **N-R=CAGGCGCAGT AGCAT;**
 (配列番号 21),

κレセプター **N-F=TAGGTCGACG GTATC**
 (配列番号 22), 及び

κレセプター **N-R=CAGGCGCAGG ATCAT**
 (配列番号 23)。

【0239】

第3細胞内ループ：第3細胞内ループ(3-I-ループ)は、SSTR1、δおよびκレセプターの3-I-ループの5'末端をコードする順方向プライマー、ならびに3-I-ループとC末端フラグメントとの間の接合点(juncture)にまたがる逆方向プライマーを用いて増幅される。このプライマーは、SSTR1、δおよびκレセプターcDNA内の同一位置で制限部位Mbo Iを有している。SSTR1、δおよびκレセプター第3細胞内ループPCRフラグメントをMbo Iで切断すると、5'平滑末端および3'Mbo Iオーバーハングを有するDNAが生成する。3-I-ループのPCR増幅に用いられるプライマーは、以下を含む： 40

【0240】

【化 3】

SSTR1 3-i-ループ-F=CGCATGGTGGCCCTC;
(配列番号 24),

SSTR1 3-i-ループ-R=GGTGATCTTGCGCTC;
(配列番号 25),

δレセプター 3-i-ループ-F=CGCAGCGTGCGTCTG;
(配列番号 26),

δレセプター 3-i-ループ-R=CGTGATCCGCCGCAG;
(配列番号 27),

κレセプター 3-i-ループ-F=AAGAGTGTCCGGCTC; および
(配列番号 28),

κレセプター 3-i-ループ-R=GGTGATCCGGCGGAG;
(配列番号 29)。

10

【0241】

C末端フラグメント：C末端フラグメントは、3-I-ループとC末端フラグメントとの間の接合点にわたる順方向プライマー、およびSSTR1の唯一のEcoRI部位、δレセプターのSalI部位、ならびにκレセプターのためのXbaI部位をコードする逆方向プライマーで生成される。順方向プライマーは、3-I-ループフラグメントの逆方向プライマーと全く同じで、MboI部位をコードする。これは、3-I-ループフラグメントとC末端フラグメントとを指向性をもって結合させる。SSTR1、δおよびκレセプターのC末端生成物を、それぞれ、EcoRI、SalIおよびXbaI、ならびにMboIで切断すると、5'MboIオーバーハングおよびそれらのそれぞれの3'オーバーハングを有するDNAフラグメントを生じる。以下のプライマーは、C末端フラグメント(C-)のPCR増幅に用いられる：

20

【0242】

【化 4】

SSTR1 C-F=GAGCGCAAGATCACC;
(配列番号 30),

SSTR1 C-R=TCGAGAATTCCTCGG;
(配列番号 31),

δレセプター C-F=CTGCGGCGCGATCAC;
(配列番号 32),

δレセプター C-R=TAGGTCGACGGTGTGG;
(配列番号 33),

κレセプター C-F=CTCCGGCGGATCACC;
(配列番号 34), および

κレセプター C-R=GGGTCGAGAACTAGT;
(配列番号 35)。

30

40

【0243】

PCR増幅および切断の後、SSTR1のN-およびC-末端フラグメントは、δまたはκレセプターの第3細胞内ループに接合され、そしてT4 DNAリガーゼの存在下16℃で24時間、pCMV-6b（これは、SalIおよびEcoRIで切断されている）に結合される。一旦ハイブリッドが適切に発現ベクターに結合されると、全体の挿入物の配列を、サンガーのジデオキシチエンターミネーション法(Sequenase vers I on 2.0、USB)を用いて製造業者の記載に従って決定する。この手順は、SSTR1の第3細胞内ループを含むδおよびκレセプターにつ

50

いて繰り返される。δおよびκレセプターのC末端フラグメントは、それぞれ、1および2個の内因性Mbo I 部位を有することを留意すべきである。δおよびκレセプターの挿入物は、以前にファージミドpALTERにサブクロニングされている。オリゴヌクレオチド特異的変異誘発(Altered S I tes、Promega)によって、これらの内因性Mbo I 部位は、1個の(s I ngle)ヌクレオチド変化(この変化はアミノ酸配列を変化しない)によって壊れる。これは、PCR増幅の前に行われる。

【0244】

第2細胞内ループの交換は、第3細胞内ループ交換に類似した方法で行われる。C末端交換は、N末端交換のような類似した様式で行われる。この交換では、共通の制限部位が、SSTR1、δおよびκレセプターの対応する同一の部位にて設計される。適切な制限酵素を用いて、各レセプターからC末端フラグメントを切断し、次いでSSTR1のC末端フラグメントはκまたはδレセプターの残りのいずれかに結合されるか、あるいはオピオイドレセプターのC末端フラグメントはSSTR1の残りに結合される。

10

【0245】

キメラレセプターは、適切な宿主細胞(例えば、CHOおよびPC12細胞)で安定に発現され、そして各々のレセプターとアゴニストとの高い親和性による結合をGTPアナログが減少させる能力を用いてGタンパク質カップリングについて試験される。κレセプターは[³H]-U69,593で標識され、δレセプターは[³H]-DPDPEで標識され、そしてキメラSSTR1は、前述(Rens-Dom I anoら、1992、Yasudaら、1992)のように、[¹²⁵I]-Tyr¹¹SRIFで標識される。キメラレセプターはまた、フォルスコリンによるcAMP形成刺激のアゴニスト阻害を仲介するそれらの能力について試験される。

20

【0246】

C. δレセプターのリガンド結合

リガンド結合に必要なδオピオイドレセプターの構造的必要条件を調べるために、クローニングされたマウスδオピオイドレセプターの残基128のアスパラギン酸および残基278のヒスチジンを、それぞれ独立に、部位特異的変異誘発によってアスパラギンに変換した(後述の実施例8参照)。野生型および変異型レセプターをCOS-7細胞で発現し、そしてオピオイドアゴニストおよびアンタゴニストに対する親和性について試験した。レセプターは、δレセプター選択的アンタゴニスト、3H-ナルトリンドールで特異的に標識し得た。野生型および変異型レセプターは、アンタゴニスト、ナルトリンドール、NTB、およびジプレノルフィンを同様な高親和性で結合する。対照的に、δレセプター選択的ペプチド性アゴニスト、例えば、D-Ala²デルトルフィン(deltorph I n) I I、DSLET、DPDPE、および非ペプチド性アゴニストS I OM、ならびに非選択的オピオイドアゴニスト、例えば、β-エンドルフィン、エトルフィン、ブレマゾシン、およびレボルファノールのアスパラギン128変異体(D128N変異体)との結合能力は、野生型レセプターへの結合と比較して非常に減少した。アゴニストに対するD128N変異体の親和性の減少は、Gタンパク質からのレセプターの解離に起因するのではなかった。なぜならば、D128N変異体は、オピオイドアゴニストにより誘発されるフォルスコリン刺激によるcAMPの形成の阻害を効果的に仲介する。しかし、結合の結果と一致して、D128N変異体を発現する細胞においてDSLETおよびブレマゾシンがフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を阻害する能力は、野生型δレセプターと比較して減少した。これらの研究の結果は、マウスδレセプターにおける残基128のアスパラギン酸はアゴニストがδオピオイドレセプターと結合するには必要であるが、アンタゴニストがδオピオイドレセプターと結合するには必要ではないことを示す。この負に荷電された残基は、オピオイドアゴニストの正に荷電された窒素残基に対しイオンとしての役目を果たし得る。対照的に、ヒスチジン278をアスパラギンに変換した(H278N)変異型レセプターは、野生型レセプターよりもアゴニストに対してより高い親和性を有した。この発見は、このヒスチジンの芳香族構造は、δレセプターとのリガンド結合に不可欠ではなく、実際はアゴニスト結合の障害になり得ることを示唆する。これら2つの変異型レセプターにおけるアゴニストの能力(アンタゴニストの能力ではなく)の変化は、アゴニストおよびアンタゴニストがδレセプターに異なる方法で、そしておそらくは異なるリガンド結

30

40

50

合ドメインと相互作用することによって、結合するという仮説を支持する。

【0247】

XI I. κ および δ オピオイドレセプターにカップリングしたGタンパク質および細胞性エフェクター系の同定

A. オピオイドレセプターにカップリングしたGタンパク質

κ および δ オピオイドレセプターの両方は多細胞性エフェクター系にカップリングする。Gタンパク質は多くのレセプターを細胞性エフェクター系に関連させるのに必要とされる。オピオイドレセプターと物理学的に関連するGタンパク質を直接測定する生物化学的なアプローチが本研究所により開発された。このアプローチは、SRIFレセプターおよび $\alpha 2a$ アドレナリンレセプターに関連するGIおよびGoサブタイプを同定するために使用されている (Lawら、1991、1993; LawおよびReisine、1992; OkumaおよびReisine、1992)。簡潔にいうと、このアプローチは、(1)レセプター/Gタンパク質の関係を維持するために、マイルドな清浄剤CHAPSを用いてレセプターを発現する組織供給源由来のこのレセプターを可溶化させること、(2)可溶化されない物質を除去するために高速度で遠心分離し、そしてGI $\alpha 1$ (3646)、GI $\alpha 2$ (1521)、GI $\alpha 3$ (1518)、Go $\alpha 1$ またはGo $\alpha 2$ のいずれかに対するペプチド特異的抗血清を用いてレセプター/Gタンパク質複合体を免疫沈降させること、を包含する。この抗血清は、D. Manning博士 (Dept. Pharmacology, Univ. PA) により生成されて提供され、そして α サブタイプの内部配列に特異的である。この抗血清は、 α サブユニットの組み換え形態によって決定されたそれらの特異性に基づいて各 α サブユニットに対し選択的であり、そしてこの抗血清は、 $[^3\text{H}]\text{-メチオニン}$ で代謝的に標識された α サブユニットを免疫沈降させる能力により測定されるように、 α サブユニットを免疫沈降させることに同様に効果的である。免疫沈降の後、免疫沈降物を上清から分離し、そして免疫沈降されたレセプターまたは上清中に残存する可溶化されたレセプターのいずれかに対して高親和性アゴニスト結合が行われ得る。免疫沈降の特異性は、免疫沈降をブロックするために生成された抗血清に対するペプチドを用いて測定される。 δ オピオイドレセプターは、 $[^{125}\text{I}]\text{-}\beta\text{-エンドルフィン}$ を用いて標識される。なぜなら、それは δ レセプターとの結合に使用できる最も強力なアゴニストの1つであり、かつその高い比放射能によりこのレセプターの検出が容易になるからである。さらに、Gタンパク質にカップリングしていないレセプターのアゴニストに対する親和性が低いので、レセプターをアゴニストで標識することは、検出されたレセプターがGタンパク質にカップリングしたものであることを保証する。可溶化され、そして免疫沈降された δ レセプターもまた、アンタゴニスト $[^3\text{H}]\text{-ナルトリンドール}$ で標識される。 κ レセプターを標識するためには、高親和性のアゴニスト $[^3\text{H}]\text{-U69,593}$ およびアンタゴニスト $[^3\text{H}]\text{-ナロキソン}$ が利用される。組織供給源に関しては、 δ および κ オピオイドレセプターの両方が共にCHO細胞およびPC12細胞に安定に発現されている。これらの研究により、どのGタンパク質がクローン化された δ および κ オピオイドレセプターと物理学的に関連するかを決定し得る。

【0248】

これらの研究のために、SRIFおよび $\alpha 2$ アドレナリンレセプターにカップリングするGタンパク質を研究するために用いた方法と同様の方法を利用した (Lawら、1991、1993; OkumaおよびReisine、1992を参照)。クローン化された δ または κ レセプターのいずれかを安定に発現するCHO (DG44) またはPC12細胞は、非イオン性清浄剤CHAPS (20mM CHAPS、20%グリセロール、250mM PMSF、ならびに50mM Tris-HCl (pH7.8)、1mM EGTA、5mM MgCl₂、10 μ gロイペプチン、2 μ gペプスタチンおよび200 μ gバシトラシンからなる緩衝液A) を含有する緩衝液で可溶化する。可溶化後、溶液を100,000 $\times$ gで60分間4 $^{\circ}$ Cで遠心分離して上清を除去し、そして緩衝液A中の7.5%グリセロール、0.5 μ g/mlアプロチニンで1:5に希釈する。続いて、サンプルをAmicon8050限外濾過装置を用いて濃縮する。オピオイドレセプター/Gタンパク質複合体を免疫沈降させるため、可溶化されたレセプターをGタンパク質に特異的な抗血清のアリコートと共にインキュベートし、サンプルを回転

装置内に4℃で4～6時間放置する。続いて、50% (w/v) タンパク質Aセファロースビーズ100 μ lを、このサンプルに加え、そして一晩インキュベートする。抗血清の別のアリコートを連続して添加し、全抗血清の希釈度を1:20 (これは、ソマトスタチンおよび α 2レセプター/Gタンパク質複合体を免疫沈降させる抗血清の最適濃度である) にする。サンプルを3時間インキュベートし、続いて、Eppendorp microcentrifugeにて10,000rpmで2分間遠心分離する。上清を除去し、そして下記の結合アッセイを用いてオピオイドレセプターの存在についてテストする。免疫沈降物を緩衝液Aに再懸濁し、そして再び遠心分離する。上清を除去して免疫沈降物を緩衝液Aに再懸濁し、そして下記の結合アッセイによりオピオイドレセプターの存在を検出する。

【0249】

可溶化されたオピオイドレセプターを放射性リガンド結合アッセイにより検出する。 δ レセプターについては、代表的には、 $[^{125}\text{I}]-\beta$ -エンドルフィンを用いてレセプターを標識する。特異的な結合をDSLET (1 μ M) またはナルトリンドール (1 μ M) の置換可能な結合により測定する。結合反応は25℃で行い、そして反応混合物に9mlの冷Tris-HCl緩衝液(pH7.8)を加え、そしてサンプルを真空下で濾過することにより停止する。結合した放射性をガンマカウンターを用いて分析する。同様の研究を $[^3\text{H}]-$ ナルトリンドールを用いて行う。 $[^3\text{H}]-$ ナルトリンドールは、その結合がGタンパク質カップリングに依存しないため、存在する可溶化された δ レセプターの全量を測定するために使用される。反対に、 $[^{125}\text{I}]-\beta$ -エンドルフィンはGタンパク質にカップリングしたレセプターの存在のみを検出する。免疫沈降された δ オピオイドレセプターを検出するために、免疫沈降されたレセプターをTris-HCl (pH7.8) 緩衝液に再懸濁し、そして上記と同様の結合アッセイを行う。可溶化され、そして免疫沈降された κ オピオイドレセプターを検出するために、アゴニスト $[^3\text{H}]-$ U69,593を用いて、 κ レセプター/Gタンパク質複合体を検出し、そして $[^3\text{H}]-$ ナロキソンを用いて存在する全 κ レセプターを検出する。

【0250】

使用されるGタンパク質特異的抗血清は、SRIFおよび α 2アドレナリンレセプター/Gタンパク質カップリングを研究するために使用された先の血清と同じである。抗血清8730はGI α のC-末端に特異的であり、そして全ての形態のGI α を認識する。使用されるGI α サブタイプ選択性抗血清は、3646 (GI α 1)、1521 (GI α 2) および1518 (GI α 3) である。これらの抗血清はGI α の内部領域に特異的である。それらの選択性はGI α サブタイプの組み換え形態に対するその特異性に基づいて確立されている。抗血清9072および2353は、それぞれ、Go α のC-末端および内部領域に特異的である。これらは、Go α と選択的に相互作用する。オピオイドレセプターと相互作用するGo α のスプライシング変種を区別するために使用するGo α 1およびGo α 2抗血清は、Go α サブタイプの290～299残基に対応するペプチドGlu Tyr Pro Gly Ser Asn Thr Tyr Glu Asp (配列番号: 36) およびGlu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr Glu (配列番号: 37) に対して生成される (Lawら、1993)。

XI I I . オピオイドレセプターおよびそれらのmRNAのアゴニスト調節の分子基礎

オピオイドレセプターの急激な刺激は痛覚消失を誘導し得るが、レセプターのアゴニストへの慢性被曝は耐性を誘導し得る (KoobおよびBloom、1992)。これらの行動現象に含まれる特異的な神経化学メカニズムは知られていない。しかしながら、多くの研究は、耐性の発生をオピオイドレセプターの脱感作と関連させている (Nestler、1993、LohおよびSmith、1990; Childers、1988)。オピオイドアゴニストへの慢性被曝の後、細胞株および動物中の δ オピオイドレセプターが脱感作されると報告されている (Lawら、1983～1985)。同様に、COSまたはCHO細胞に発現されるクローン化された δ オピオイドレセプターは、アゴニストによる前処理の後で、脱感作する (未公開の結果)。齧歯類における研究もまた、 κ レセプターが慢性オピオイド処理により変調され得ることを示唆している。予測されるように、COS細胞に発現されるクローン化された κ レセプターは、アゴニストによる前処理の後、脱感作される。

【0251】

短期間のオピオイド処理はオピオイドレセプターの脱感作を誘導し得るが、培養中の細

10

20

30

40

50

胞のオピオイドへの長期間被曝または動物のオピオイドによる長期間処理はオピオイドレセプターのダウンレギュレーションを引き起こす。ダウンレギュレーションは、このレセプターの内在化 (Internalization) または退化 (degradation) による不活性化を包含する。これは、NG-108細胞に発現されるδオピオイドレセプターについて、最も明らかに確立されている (Lawら、1984、1985)。多くのホルモンレセプターおよび神経伝達物質のレセプターに関しては、レセプターの脱感作およびダウンレギュレーションが、時間的様式および分子形態の両方に関連している (Hausdorffら、1992)。

【0252】

多くの神経伝達物質およびホルモンに関しては、レセプターのダウンレギュレーションが多くの長期間の適応細胞応答を引き起こし得る。最も明確な変化の1つは、ダウンレギュレートされたレセプターをコードする遺伝子の発現における改変である。慢性オピオイド処理がオピオイドレセプターのダウンレギュレーションを引き起こすと報告されているが、慢性オピオイドの使用後の、適応細胞応答に関しては殆ど知られていない。

10

【0253】

A. オピオイドレセプターの脱感作の分子基礎

アゴニストに対するクローン化されたκレセプターを発現するCOS細胞の前処理はκレセプターを脱感作する。酵素BARKはκレセプターの脱感作に関与する。なぜなら、κレセプターおよび優性のネガティブBARK変異体を同時発現する細胞では、アゴニスト前処理がκレセプターの脱感作を引き起こさないからである。リン酸化はレセプターをGタンパク質およびエフェクター系から解離することが示されているので、BARKは多くのアゴニストの占めるレセプターのリン酸化を触媒し、そしてこのリン酸化はこれらのレセプターのアゴニスト誘発脱感作に連動する (Hausdorffら、1992; Benovicら、1989)。κレセプターに対するペプチド特異的抗血清を生成し、そしてそれを用いてκレセプターが脱感作の間にリン酸化されるかどうか、およびBARKがリン酸化の触媒に関与するかどうかをテストする。本発明は、κレセプターのC-末端 (Thr Val Gln Asp Pro Ala Ser Met Arg Asp Val Gly; 配列番号: 38、残基367~378) およびN-末端 (Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Asp Pro Gly Pro Thr Cys Ser; 配列番号: 39、残基3~17) に対応する2つの合成ペプチドを開示する。これらの配列は、κレセプターのユニークな領域であり、そしてGenbankデータベースから入手可能な他のいずれの配列にも対応しない。このペプチドを用いて、SRIFレセプターに対するペプチド特異的抗血清を生成するために利用されたのと同じアプローチを用い、抗血清を生成する。この抗血清は、可溶化されたκレセプターを免疫沈降させるそれらの能力 (これは、放射性リガンド結合技術を用いて検出される)、および、 $[^3\text{H}]$ -メチオニンで代謝的に標識された、トランスフェクトされたCOS細胞中のκレセプターを免疫沈降させるそれらの能力についてテストされる。抗血清の特異性は、レセプターを免疫沈降させる抗血清の能力をブロックするために生成されるペプチドの能力により測定される。この抗血清はまた、κレセプターを一過的または安定的に発現するそれぞれのCOS細胞またはCHO細胞を用いる免疫ブロット法によりクローン化されたκレセプターを選択的に検出する能力についてテストされる。

20

30

【0254】

一旦抗血清の特異性が特徴付けられると、これらは、κオピオイドレセプターが脱感作の間にリン酸化されるかどうかを測定するために使用される。これらの研究のために、κレセプターを発現するCOS細胞またはCHO細胞のいずれかを $[^3\text{H}]$ -オルトホスフェートでプレロードする。これらの細胞を、U50,488で種々の時間 (1、5、10、15、30、45分間、および1、2および4時間) 処理し、処理を停止し、そして細胞を可溶化させてκレセプターを免疫沈降させる。続いて、免疫沈降されたレセプターをSDS-PAGEにかけ、そしてオートラジオグラフして、それらがリン酸化されるかどうかを測定する。N-末端特異的抗血清はリン酸化されたレセプターおよびリン酸化されていないレセプターの両方を同様に良く認識し得るはずである。なぜなら、そのエピトープは細胞内キナーゼに接近できない細胞外ドメインにあり、従って、リン酸基により妨害されるはずがないからである。C-末端特異的抗血清もまた、レセプターを免疫沈降させるために用いられる。リン酸

40

50

化された残基が抗血清のエピトープに近い場合、これはリン酸化により影響され得る。N-末端特異的な抗血清が免疫沈降し得るのに対し、それがリン酸化されたレセプターを免疫沈降させることができないならば、このとき、結果はC-末端の領域がリン酸化されることを示唆する。レセプターがリン酸化される場合、反応の特異性は、nor-BN I がアゴニスト誘導リン酸化をブロックし得るかどう（ちょうど、それがアゴニスト誘導脱感作をブロックし得るように）を測定することによりテストされる。リン酸化におけるBARKの役割は、BARK優性ネガティブ変異体がレセプターのリン酸化を防止するかどう（ちょうど、それがκレセプターの脱感作を防止するように）を測定することによりテストされる。

【0255】

BARK優性ネガティブ変異体がアゴニスト誘導κレセプターのリン酸化をブロックする場合、リン酸化され、かつκレセプターの脱感作に関与するκレセプター中の領域は、標準的な技術を用いて同定される。リン酸化はレセプターの細胞内ドメインで起き易い。なぜなら、これらはBARKから影響を受ける領域であるためである。交換変異は、リン酸化され得、かつ脱感作に関与し得るκレセプター中の局在領域に使用される。本研究所での先の研究は、SRI Fレセプター-SSTR1が慢性的なアゴニスト処理の後に脱感作せず、従って、アゴニスト依存性様式でリン酸化されると予測できないことを示している（Rens-Domianoら、1992）。このレセプターはκレセプターとアミノ酸配列において40%の同一性を有する。先に生成された一連のκレセプター/SSTR1交換変異体の、第2および第3の細胞内ループならびに細胞質尾部は、この2つのレセプターの主な細胞内ドメインであり、リン酸化され易いκレセプターの領域である。なぜなら、これらは、BARKにより触媒されるリン酸化のアセプターである多数のセリンおよびトレオニン残基を含有するからである。キメラκレセプター/SSTR1を発現するCHO細胞をκアゴニスト（U50,488）で処理することを用いてこのレセプターのリン酸化をテストする。これらの研究では、変異体レセプターを安定に発現するCHO細胞を、 $[^3\text{H}]$ -オルトホスフェートでプレロードし、そしてアゴニスト処理の後に、細胞を可溶化させ、キメラレセプターをκレセプターのN-末端領域（これは、レセプター変異により妨害されないエピトープである）特異的な抗血清で免疫沈降させる。アゴニスト前処理の後にリン酸化されていないキメラが一旦同定されると、野生型のκレセプター中のセリンおよびトレオニンの一点突然変異が、キメラレセプターで交換されたそれらの領域に誘発される。変異レセプターは、慢性的なアゴニスト処理の後に、それらの脱感作能力、およびそれらがアゴニスト刺激に応答してリン酸化されるかどうかについてテストされる。

【0256】

κレセプターのN-末端およびC-末端中のユニークな配列に対応するペプチドSer Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Asp Pro Gly Pro Thr Cys Ser (配列番号：39)およびThr Val Gln Asp Pro Ala Ser Met Arg Asp Val Gly (配列番号：38)は、ペプチド合成装置（the Wistar Inst. Philadelphia, PA）を用いてS. Khan博士により合成された。このペプチドは、二官能性カップリング試薬であるグルタルアルデヒドを用い、キャリアとしてのスカシガイヘモシアニン（KLH）タンパク質に共有結合する。ペプチド-KLH結合体は、第1の注射のためのフロイント完全アジュバントの存在下で、続いて、次の注射のための不完全アジュバントの存在下で乳化される。ニュージーランドウサギは、4週間毎に皮下注射を受け、そして各免疫化の10日後に採血される。

【0257】

クローン化されたκレセプターを発現するCHO細胞またはCOS細胞のいずれかおよびコントロール細胞由来の膜を8%のSDS-PAGEにかけ、タンパク質をニトロスクリーンメンブレンに移し、そしてこのメンブレンを、5%の脱脂ミルク、0.02%アジドおよびPBSで37℃で2時間飽和させる。種々の希釈度（1:10~1:10,000）の5%ミルク/PBS中の抗血清を、このメンブレンと共に4℃で連続的に振動しながら、一晚インキュベートし、続いて、このニトロセルロースメンブレンを洗浄し、結合した抗体を、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ抗体キットで検出する。非特異的な反応を、特異的なペプチドブロックに

10

20

30

40

50

より測定する。前免疫血清もまた、特異性のコントロールとして使用される。

【0258】

COSまたはCHO細胞中のκレセプターを可溶化させ、そして抗血清でプレロードしたタンパク質A-セファロースビーズ（20μl血清あたり、20μlの50%タンパク質A-セファロースビーズ/50%PBS溶液）の存在下で一晩4℃でインキュベートする。上清および免疫沈降物を、高親和性の $[^3\text{H}]$ -U69593結合および $[^3\text{H}]$ -ナロキソン結合の存在について分析する。さらに、レセプターを、Theveniauら（1992）に記載のように、 $[^3\text{S}]$ -メチオニンで代謝的に標識し、そして抗血清で免疫沈降させる。これらの研究のため、クローン化されたκレセプターを発現するCOSまたはCHO細胞を、0.5mCiの $[^3\text{S}]$ -メチオニンを含むメチオニンフリーの培地中で一晩インキュベートする。細胞をPBSで洗浄し、そしてタンパク質をRIPA緩衝液に可溶化させる。レセプターを、抗体でコートされたタンパク質Aビーズとともに一晩インキュベーションすることにより免疫沈降させる。免疫沈降物をサンプル緩衝液中に沸騰させ、10%のSDS-PAGEおよびオートラジオグラフにかける。

10

【0259】

κレセプター、またはキメラκレセプター/SSTR1を発現するCOSまたはCHO細胞のいずれかを、0.3mCiの $[^3\text{P}]$ -オルトホスフェートと共に24時間インキュベートして、レセプターが脱感作の間にリン酸化されることを測定する。続いて、細胞をU50488で種々の時間（0、5、15、30、45、60、90、120または240分間）刺激する。反応を停止し、細胞を冷PBSで洗浄し、上記のように膜を可溶化させ、そしてレセプターをペプチド特異的抗血清で免疫沈降させる。免疫沈降物をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフにかけ、このレセプターがリン酸化されるかどうかを測定する。免疫沈降の特異性は、ペプチド（これに対して抗血清が生成されるかどうか）でブロックすること、およびコントロールの、非処理の細胞中のκレセプターのリン酸化の欠如により示される。

20

【0260】

B. δオピオイドレセプターの脱感作の分子基礎

κレセプターと同様に、δオピオイドレセプターは慢性的なアゴニスト前処理の後に脱感作する。CHO細胞に安定に発現されるクローン化されたδレセプターは、慢性的なアゴニスト前処理の後に、脱感作する。脱感作は、アゴニストに対するレセプターの親和性の低下、Gタンパク質由来のレセプターの不結合およびcAMP形成のアゴニスト阻害を介するδレセプターの能力の減少として特徴付けられる。上記のκレセプターと同様の研究は、COS細胞中で発現されるδレセプターがアゴニスト処理の後に脱感作されるかどうかをテストするために行われる。

30

【0261】

これらの研究のため、クローン化されたδレセプターに対するペプチド特異的抗血清は、N-およびC-末端の残基20~32および367~379にそれぞれ対応するペプチド（Ser Asp Ala Phe Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala; 配列番号：40）、および（Ala Thr Thr Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser; 配列番号：41）を用いることにより、生成される。抗血清は、続いて、δレセプターが脱感作の間にリン酸化されるかどうかを測定するために使用される。これらの研究のため、クローン化されたδレセプターをCOSおよびCHO細胞内で発現させ、その細胞を32P-オルトホスフェートでプレロードし、そしてDSLET（1μM）で種々の時間（1、5、10、15、30、および60分間）刺激する。続いて、細胞を可溶化し、そしてδレセプターを抗血清で免疫沈降させる。免疫沈降物をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフにかけ、レセプターがリン酸化されるかどうかを測定する。同様の研究は、δレセプターでコトランスフェクトされたCOS細胞およびBARK優性ネガティブ変異体において行われ、BARKがδレセプターのリン酸化に関与するかどうかを測定する。

40

【0262】

脱感作の間にリン酸化されるδオピオイドレセプターの領域を決定するために、上記の

50

κ レセプターと同様のアプローチを、δ オピオイドレセプター／SSTR1キメラレセプターに用いる。キメラがリン酸化されない場合、点突然変異が野生型レセプターに誘発され、SSTR1で交換された対応する領域中のセリンおよびトレオニンを変換する。続いて、この変異したδ レセプターは、アゴニスト前処理後の脱感作されるその能力、およびそれがリン酸化されるかどうかについてテストされる。

【0263】

XIV. オピオイドレセプター遺伝子の発現

慢性的なオピオイド処理は多くの適応細胞応答を誘導する。いくつかの神経伝達物質およびホルモンに関しては、標的細胞または組織のアゴニストへの慢性被曝は、このレセプター遺伝子の発現に長期間の変化を誘発し得る。現在までのところ、δ およびκ オピオイドレセプター遺伝子の発現に対するオピオイド処理の長期間的影響に関する情報は入手し得ない。

10

【0264】

δ オピオイドレセプターを内在的に発現するNG-108細胞 (Lawら、1983) を、δ アゴニストで処理してこのレセプターを脱感作およびダウンレギュレートし、そして随伴変化がこのδ オピオイドレセプター遺伝子の発現に存在するかどうかを測定する。δ レセプター遺伝子発現の変化を、δ レセプター特異的プローブを用いるノーザン分析により測定する。NG-108細胞を、δ 選択的アゴニストDPDPE (1~100nm) で種々の時間 (5、15、45、60分間、2、4、6、8、16および24時間) 処理する。DPDPEがδ レセプターmRNAレベルを変化させる場合、他のアゴニスト (DSLET、デルトルフィン (deltorphin) およびブレマゾシン (bremazocine)) がこの影響を誘導する能力を研究する。これらの研究は、長期的なδ レセプターアゴニスト処理に対する細胞応答がδ レセプター遺伝子発現の変化であるかどうかをテストする。

20

【0265】

δ オピオイド選択的アゴニストを用いた慢性処理がインビボでのδ レセプター遺伝子発現を改変するかどうかを調べるために、DPDPEで慢性的に処理してアゴニストに対する耐性 (抗侵害受容性) を作ったラットおよびマウスの死後冷凍した脳を得る。使用される手順および薬物投与のスケジュールは、先に記載されたもの (CowanおよびMurray、1990; Heymanら、1988) と同様である。選択された脳の領域 (大脳皮質、線条、海馬および小脳)、生理食塩水で処理されたコントロールの脊髄およびDPDPEで処理された動物では、δ オピオイドレセプターmRNAの変化はノーザン分析により定量される。いくつかの同じプロットに関しては、κ レセプターmRNAを再プローブ化して、オピオイドレセプター遺伝子発現の変化の選択性を測定する。さらに、コントロールおよび処理動物の他のグループでは、δ オピオイドレセプターmRNAの相対レベルを、インサイチュハイブリダイゼーション組織化学法によるセミ定量により測定する。慢性δ アゴニスト処理の結果としてδ レセプターmRNAの変化を検出するためにインサイチュハイブリダイゼーション組織化学法を使用する利点は、局所的 (フィルムオートラジオグラフ) および細胞的レベル (エマルジョンオートラジオグラフ) での優れた解剖学的な解析である。これは、その内部でδ レセプターが重要な役割を有し、そしてδ アゴニストに対する耐性が示された青斑 (locus coeruleus) および他の脳幹核 (brainstem nuclei) のような小核 (small nuclei) 中のδ レセプターmRNAにおける変化を分析するのに特に重要である (Nestler、1993)。インサイチュハイブリダイゼーションのために、セクションを加工し、フィルムにアプライし、そして青斑、黒質、線条、中隔側座核、海馬、扁桃、視床下部および中心灰白物質のような選択された領域におけるオートラジオグラムの吸光度を分析する。これらの領域は、マウスの脳中のδ オピオイドレセプターmRNAを発現し、そしてオートラジオグラフの研究では、ラットの脳中でδ レセプターを発現することが示されている (Herz、1993)。フィルムへ曝した後、これらのセクションを写真乳剤に含浸させ、そして単一細胞レベルでオートラジオグラフシグナルを測定し、標識の解剖学的な特異性を確認する。単一細胞レベルでの定量は、標識された細胞が散乱するために、フィルム上での標識が最適ではない脳領域で行われる。顕微鏡分析が、所定の領域中のニューロンのサブ集団に対して異なる効果を示

30

40

50

唆する場合、単一細胞分析もまた、吸光度測定を補足する。同様の研究は、DPPDEに対する耐性を作った動物の脳で κ レセプターmRNAが改変されるかどうかを測定するために行われ、 δ レセプター遺伝子発現に与える影響の特異性を測定する。これらの処理のために使用される δ レセプターアゴニストDPDPEは、 κ レセプターにも、その他のいずれのオピオイドレセプターにも結合しない。

【0266】

A. κ レセプター遺伝子発現における選択的な変化

κ レセプターを内在的に発現する細胞株はない。さらに、クローン化された κ レセプターを安定に発現するCOSおよびCHO細胞を、CMVプロモータの存在下でマウスcDNAによりトランスフェクトする。従って、このcDNAは、調節領域、および κ レセプター遺伝子発現を調整する因子の正常な制御下に置かれていない。従って、 κ アゴニストによる齧歯類動物の慢性的な処理は、このアゴニストが κ レセプター遺伝子発現の変化を誘導し得るかどうかを測定する。これらの研究のため、U50,488で処理されたラットおよびマウスから冷凍した死後の脳を入手し、先の手順（CowanおよびMurray, 1990）を用いて κ アゴニストの抗侵害受容作用に対する行動耐性を誘導する。選択的脳領域中の改変された κ レセプター遺伝子発現は、ノーザン分析を用いることにより、および κ レセプター選択的RNAプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーション組織化学法により行われる。処理された動物の脳セクションの結果を、コントロールである生理食塩水で処理された動物の脳セクションで検出された κ レセプターのmRNAレベルと比較する。隣接したセクションでは、この処理が κ レセプター遺伝子発現を選択的に影響するかどうかを測定するために、 δ オピオイドレセプターmRNAレベルが検出される。U50,488は、 δ オピオイドレセプターにも、 κ レセプター以外のその他のいずれのレセプターにも結合しない。従って、U50,488処理が、 δ レセプターmRNAレベルには変化を与えずに、 κ レセプターmRNAレベルの選択的な変化を誘導する場合、 κ レセプター遺伝子発現の変化は、 κ レセプターの活性化および変調に直接に関連するようである。

【0267】

B. オピオイドレセプター遺伝子発現に対するモルヒネの影響

モルヒネはnM IC_{50} 値を有する μ レセプターに強力に結合する。しかし、これは、クローン化された κ レセプター（ $IC_{50} = 1\mu M$ ）には強力でないが、 $10\mu M$ ではクローン化された δ レセプターとの結合を阻害しない。 μ レセプターに対するその選択的高親和性は、遺伝子発現の変化が単に κ または δ レセプターの活性化のみによるのであれば、その親和性は κ または δ オピオイドレセプター遺伝子発現に影響し得ないことを示唆する。

【0268】

κ および δ オピオイドレセプターmRNAレベルに対するモルヒネの影響は、脳セクションではインサイチュハイブリダイゼーション組織化学法を用いることにより、そして脳領域ではノーザン分析により研究される。モルヒネの抗傷害受容行動に対する耐性を作ったラットおよびマウスからの、凍結した死後の脳は、先の手順を用いて得られる（Tortellaら、1981；CowanおよびMurray, 1990）。

【0269】

NG-108細胞を、DPDPE（ $1\mu M$ ）に種々の時間（0、5、15、45分間、1、2、4、8、16および24時間）曝す。細胞をPBSで洗浄し、フラスコから分離し、RNAをグアニジンイソチオシアネート塩化セシウム法で抽出し、グリオキサールで変性させ、1%アガロースゲルにて分画し、そしてナイロンメンブレンへ転移した。ブロットを、cDNAのコーディング領域の開始350bpに対応するクローン化されたマウス δ オピオイドレセプターcDNAの [^{32}P]—標識フラグメントでプローブする。ハイブリダイゼーションの後、ブロットを2×SSCにて室温で、0.05% SDSにて室温で、続いて、0.1×SSCにて48℃で、そして0.1% SDSで30分間洗浄する。続いて、このブロットを、補力スクリーンの存在下にて-75℃でX線フィルムに曝す。各レーンの全RNAの差を考慮するための内部コントロールとして、このブロットを β -アクチンmRNA用のプローブで再プローブする。 δ レセプターmRNAの相

10

20

30

40

50

対レベルは、デンシトメトリー、mRNAを含有するゲル上のバンドを切り出し、そしてシンチレーション分光法により放射活性量を測定することにより定量される。NG-108細胞中の δ レセプターのレベルがノーザン分析により検出されるには低すぎる場合は、逆転写酵素PCRを用いてmRNAのレベルを測定する。異なるラットおよびマウスの脳領域における δ オピオイドレセプターmRNAについてのノーザン分析は、上記と同様の手順を用いて行われる。Yasudaらにより記載されるように、cDNAの開始375bpに対応するマウス κ レセプターcDNAのPstI/EcoRIフラグメントを用いて κ レセプターmRNAを検出するために、同様の手順が使用される。

【0270】

インサイチュハイブリダイゼーション組織化学法は、上記の、35S-放射標識のRNAプローブを用いて行われる (Chesseletら、1987)。これらの研究のために、脳セクションを-70℃で保存し、室温に戻し、アセチル化して、0.1MのTris/グリシン (pH7.0) 中でインキュベートし、そして勾配エタノールで脱水する。ハイブリダイゼーションを、湿潤チャンバー内で50℃で3.5時間行う。ハイブリダイゼーション緩衝液は、40%のホルムアミド、4×SSC (クエン酸ナトリウム15mMおよびNaCl 150mM中の1×SSC、pH7.2)、10%の硫酸デキストラン、10mMのDTT、tRNA、ニシン精子DNA、Denhardt溶液および標識プローブを含有する。mRNAにおける量的な差は、このような条件下で確実に検出され得る (Weiss-WunderおよびChesselet、1991)。これらの実験のために、生理食塩水で処理したコントロール動物の脳セクション、および処理した動物の対応する脳セクションと一緒に加工する。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、50%ホルムアミド/2×SSCにより52℃で5、20、および25分間行う。2回目と3回目の洗浄の間に、セクションを2×SSCでリンスし、2×SSC中のRNase(100mg/ml)にて37℃で30分間処理する。このセクションを、2×SSC/Tris-Tone X-100(0.0%)中で一晩リンスし、300mMの酢酸アンモニウムを含む勾配エタノールで脱水し、オートラジオグラフィ用に加工作る。オートラジオグラムを先に記載されたように定量する (Soghomonianら、1992)。コントロールは、センスプローブとのハイブリダイゼーション、および非オーバーラップアンチセンスプローブとのハイブリダイゼーションの解剖学的パターン変化を含む。

【0271】

Morphon Image分析システムによる単一細胞分析に関しては、細胞を明視野照度 (brightfield illumination) 下で、100倍または40倍の対物レンズによって観察し、そしてイメージを拡大してビデオスクリーン上に転写する。規定領域内のオートラジオグラフィグレイを先に記載されたように分析する (Weiss-WunderおよびChesselet、1991)。

【0272】

動物を処理するために使用される正確な手順は、動物モデルに依存して変化する。例えば、オスICRマウス (20~25g、Hilltop Inc., PA) をケージあたり8匹収容し、食物および水を自由に与える。12時間の明期/12時間の暗期のサイクルを毎日維持する。8匹のマウスのグループは、U50,488、モルヒネまたは蒸留水のs.c.注射を受ける。DPDPEを左外側大脳室内に注射する。動物をエーテルで軽く麻酔し、続いて、各マウスはその頭皮に小切開を受ける。27-ゲージ針付きの10 μ lのマイクロシリンジを用いることにより、5 μ lのDPDPEまたは蒸留水を、ブレグマの2mm外側、および2mm尾部側で深さ3mmのところに投与する。傷口を、ステンレススチールクリップで閉じ、次のIcv注射を頭蓋上の同じ孔を通して行う。代表的な注射スケジュールは先に記載されている (CowanおよびMurray、1990; Mattiaら、1991)。マウスのグループに、U50,488(s.c.)、モルヒネ(s.c.)、DPDPE(Icv)および蒸留水(n=46、s.c.またはn=32、Icv)のいずれかを1日目の午後1時に適切な用量で注射する。侵害受容刺激として、50℃の温水によってテールフリック (tail flick) する潜伏時間を用い、そして100× (テスト潜伏時間-コントロール潜伏時間) / (15または30-コントロール潜伏時間) のように計算して、0、10、20、および30分における抗傷害受容を評価する。15または30秒の遮断点は、代表的には、初頭の潜伏時間に応じて選択される。蒸留水を与えられるコントロールマウスもまた、テールフリック潜

伏時間について測定される。回帰線、A50値および95%信頼限界は、TallaridaおよびMurrayのコンピュータプログラム中の手順8（1987）を用い、個々のデータ点から測定される。マウスに、注射スケジュールに基づいてアゴニストまたは蒸留水を注射し、続いて、抗侵害受容アッセイを再実行する。薬理的な耐性は、最初の投与量－反応曲線の右方向（そしておそらく下向き）の変化により反映される。最後の注射の4時間後、各動物を断頭し、全脳を碎氷上で切開し、そして直ちに－80℃で保存する。いくつかの動物については、断頭の後に、脳を切開し、大脳皮質、海馬、小脳、髄質、中脳、視床下部および線条を収集し、直ちに－80℃で凍結し、そしてノーザン分析に用いる。

【0273】

ラットに関する研究のために、オスS.D.アルビノラットを、（毎日12時間の明期／12時間の暗期のサイクル）ケージあたり5匹収容する。これらのラットはU50,488、モルヒネまたは蒸留水のs.c.注射を受ける。左外側大脳室にPE10を予め移植したラットにDPDPE（5 μ l）を注射する（Tortellaら、1981）。ラットには先に記載のように注射する（Heymanら、1988；CowanおよびMurray、1990）。ラットのグループに、U50,488(s.c.)、モルヒネ(s.c.)、DPDPE（Icv）または蒸留水（n=46、s.c.またはn=32 I CV）を1日目の午後1時に注射する。侵害受容刺激として、50℃ホットプレート上での後足なめ（hind-paw lick）の潜伏時間を用い、そして100×（テスト潜伏時間－コントロール潜伏時間）／（30、45または60－コントロール潜伏時間）のように計算して、0、10、20、および30分における抗傷害受容を評価する。30、45、または60秒の遮断点は、通常、初頭の潜伏時間に応じて選択される。計算、注射スケジュールおよびデータ分析は、マウスに関する記載と同じである。

【0274】

XV. アッセイキット

他の局面では、本発明は、生物学的なサンプル中のオピオイドレセプターポリペプチドを検出するための診断アッセイキットを意図し、ここで、このキットは、オピオイドレセプターポリペプチドと免疫反応し得る一次抗体を含有する第1のコンテナを有し、そして一次抗体は少なくとも1回のアッセイを行うのに充分の量で存在する。好ましくは、本発明のアッセイキットは、さらに、一次抗体と免疫反応する二次抗体を含有する第2のコンテナを有する。さらに好ましくは、本発明のアッセイキットに使用される抗体は、モノクローナル抗体である。さらにより好ましくは、一次抗体が固体支持体に固定されている。さらに、より好ましくは、一次および二次抗体はインジケーターを含有し、そして好ましくは、このインジケーターは放射活性標識または酵素である。

【0275】

本発明はまた、作用物質をスクリーニングするための診断キットを意図する。このようなキットは、本発明のオピオイドレセプターを含有し得る。このキットは、作用物質と本発明のレセプターとの間の相互作用を検出するための試薬を含有し得る。提供される試薬は、放射標識され得る。このキットは、本発明のレセプターと結合または相互作用し得る周知の放射標識作用物質を含有し得る。

【0276】

このキットは第2のポリペプチドを含有し得ることがさらに意図される。第2のポリペプチドはGタンパク質であり得る。この第2のポリペプチドはまた、エフェクタータンパク質であり得る。キットに第2のポリペプチドが含有されるとき、レセプターとこの第2ポリペプチドとの間の相互作用を検出するための試薬が提供され得る。特定の例として、レセプター／Gタンパク質複合体を検出し得る抗体が提供され得る。別の特定の例として、Gタンパク質／エフェクター複合体を検出し得る抗体が提供され得る。エフェクターの検出用試薬が提供され得る。例えば、提供されるエフェクターがアデニルシクラーゼである場合、アデニルシクラーゼの活性を検出するための試薬が提供され得る。このような作用物質の同定は、関連分野の業者の知識範囲内である。

【0277】

10

20

30

40

50

他の局面では、本発明は、生物的なサンプル中の、レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出するための診断アッセイキットを提供し、このキットは、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：11の少なくとも10個の連続したヌクレオチド塩基のセグメントと同じまたは相補的な第2のポリヌクレオチドを含有する第1のコンテナを包含する。

【0278】

他の実施態様では、本発明は、生物的なサンプル中の、オピオイドレセプターポリペプチドに免疫反応性の抗体を検出するための診断アッセイキットを提供し、このキットは、その抗体と免疫反応するオピオイドレセプターポリペプチドを含有する第1のコンテナを有し、そしてこのポリペプチドは、少なくとも1回のアッセイを行うのに十分な量で存在する。このキットの試薬は、液状溶液、固体支持体に付着された形態として、または乾燥粉末として提供され得る。試薬が液状溶液で提供される場合、この液状溶液は、好ましくは水溶液である。好ましくは、試薬が固体支持体に付着されている場合、この固体支持体はクロマトグラフィー媒体または顕微鏡スライドであり得る。提供される試薬が乾燥粉末である場合、この粉末は、適切な溶媒を添加することにより再構成され得る。この溶媒は提供され得る。

10

【実施例】

【0279】

実施例は、本発明の好ましい態様を含む。以下の実施例の特定の局面は、本発明の実施において十分に役立つように本発明者らにより見出されまたは意図された技術および手順に関して記載される。これらの実施例は、本発明者らの標準的な研究所での実施の使用により例示される。本開示および当業者の一般的な技術レベルに照らして、当業者は、以下の実施例が単に例示的であることを意図することおよび多くの変化、改変、ならびに変更が本発明の精神および範囲から逸脱することなく行われ得ることを認識する。

20

【0280】

—実施例1：cDNAクローンの単離

2つの変性オリゴヌクレオチド、SSTR-D1、
5'-ACCAA(T/C)(G/A)TCTA(T/C)AT(T/C)AT(T/C)CT I AACCTGGC-3'

配列番号：9；および

SSTR-D2、

30

5'-AC I GTCAG(G/A)CAG(A/T)A(G/T)AT(G/A)CTGGTGAA-3'

配列番号：10

を、ソマトスタチン(SRIF)レセプターサブタイプ、SSTR1、SSTR2およびSSTR3の第2および第3貫膜ドメイン中に存在する保存配列を使用して選択した(Yasudaら、1992；Yamadaら、1992)。マウス脳cDNAライブラリー(Clontech、Palo Alto、CA；カタログ番号ML1036a)のアリコート(約 1×10^6 pfu)を鋳型として使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する増幅を行った。

【0281】

サイクル条件は：94°Cで1分間の変性、37°Cで1分間のアニーリングおよび72°Cで2分間の伸長を10サイクル、次いで、94°Cで1分間の変性、55°Cで1分間のアニーリングおよび72°Cで2分間の伸長を35サイクルであった。PCR産物を、3%低融点アガロースゲル上で分離し、そして150bpと200bpとの間のDNAフラグメントを単離し、M13 mp18中へクローニングして配列決定した。

40

【0282】

新規SRIFレセプター様配列をコードする2種のPCR産物を同定し、msl-1(SD3)およびmsl-2(SD15)と名付けた。これらを、ニックトランスレーションにより³²P-標識し、そしてそれを用いてX-線フィルムへ曝する前に50°Cの0.1×SSCおよび0.1%SDS中で最後のハイブリダイゼーション後洗浄を行う標準条件を用いるハイブリダイゼーションによりマウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。

【0283】

50

SRIFレセプター関連配列をコードするマウス脳cDNAを、PCRおよび変性オリゴヌクレオチドプライマーを使用して上述のように増幅した。150～200bpのPCR産物をクローニングし、そして配列決定した。特徴付けられた33クローンのうち、2個がmSSTR1を、2個がSSTR2を、9個がmSSTR3をコードし、4個が同一で、msl-1と呼ばれるGタンパク質カップリングレセプタースーパーファミリーの新たなメンバーをコードし、そして1個がmsl-2と名付けられた第2の新レセプター様配列をコードしていた。残る15クローンの配列は、Gタンパク質カップリングレセプターの配列またはGenBankデータベース内の他のどの配列とも関連していなかった。クローンmsl-1およびmsl-2をプローブとして使用し、マウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、そして3.1kbおよび2.3kbの挿入断片をそれぞれ有するλmsl-1およびλmsl-2を単離した。msl-1をマウスκオピオイドレセプターと新たに命名し、そしてmsl-2をマウスδオピオイドレセプターと新たに命名した。 10

【0284】

λmsl-1およびλmsl-2内の挿入断片の配列(それぞれ受託番号L11065およびL1104でGenBankデータベースに寄託した)を決定し、それぞれ380アミノ酸および372アミノ酸のポリペプチドをコードすることを示した(図1)。msl-1およびmsl-2の配列は、mSSTR1の配列と約35%の同一性を有する最近記述されたSRIFレセプターファミリーのメンバーの配列に最も密接に関連した。

【0285】

msl-1およびmsl-2の配列は、第2細胞内ループのNH₂-末端内の配列Asp-Arg-Tyr(DRY)ならびにジスルフィド結合を形成し得る第1および第2の細胞外ループ内のシステイン残基を含むGポリペプチドレセプタースーパーファミリーのメンバーの間で保存される多くの特徴を共有する。推定のNH₂末端ドメインにおけるN-結合(連結)(N-linked)グリコシル化のための可能な部位ならびに細胞内ループおよびCOOH-末端ドメインにおけるcAMP依存性プロテインキナーゼおよびプロテインキナーゼCに対するいくつかの可能なリン酸化部位(KennellyおよびKrebs, 1991)もまた存在する(図1参照)。 20

【0286】

msl-1およびmsl-2のアミノ酸配列のアラインメントは、それらが61%のアミノ酸同一性および71%の類似性を有することを示した。密接に関連するGタンパク質カップリングレセプターの他の比較において以前に示されたように(Probstら、1992)、推定膜に及ぶセグメント配列は、NH₂-およびCOOH-末端ドメインの配列よりさらに高度に保存される。Gタンパク質のカップリングに決定的に重要であると考えられている短い第3の細胞内ループ(Kobalikaら、1988)を含む細胞内ループの配列は、msl-1とmsl-2との間で高度に保存される。このことは、それらが、同一のGタンパク質にカップリングし得ることを示唆する。msl-1およびmsl-2の両方は、第2貫膜ドメイン内に保存性のAsp残基を有する。このAspは、アドレナリンレセプター(Horstmanら、1990)およびソマトスタチンレセプターにおけるアゴニスト結合のナトリウム阻害を媒介すると提案された。 30

【0287】

実施例2：発現および結合結果

マウスκオピオイドレセプターcDNAクローンλmsl-1の1.2kbのPst Iフラグメント、およびδオピオイドレセプターcDNAクローンλmsl-2の1.3kbのEcoRI-SacIフラグメントを、それぞれCMVプロモーターベースの発現ベクターpCMV-6bおよびpCMV-6c(Chiron Corp., Emeryville, CAのDr. Barbara Chapmanより入手)中へクローニングした。得られた構築物pCMV-msl-1およびpCMV-msl-2を用いて、前述(Yasudaら、1992)のようにCOS-1細胞にトランスフェクトした。 40

【0288】

msl-1およびmsl-2を一時的に発現するCOS-1細胞から調製した膜を使用する結合研究を、トランスフェクション72時間後に行った。簡潔に言えば、細胞を、Polytron(Brinkmann, 2.5にセット、30秒)を使用して、50mMのTris-HCl(pH7.8)、1mMのエチレンジアミン、10μg/mlのロイペプチン、10μg/mlのペプスタチン、200μg/mlのバシトラシン、および0.5μg/mlのアプロ 50

チニン(緩衝液1)中に採取した。次いで、このホモジネートを、 $48,000\times g$ で20分間 4°C で遠心分離した。このペレットを、緩衝液1中に再懸濁し、そしてこの膜調製物を放射性リガンド結合研究に使用した。

【0289】

細胞膜(総タンパク質 $20\sim 30\mu\text{g}$)を、競合剤の存在下または非存在下で、 $[^3\text{H}]\text{U69,593}$ (1nM 、比放射能 $37.2\text{Ci}/\text{mmol}$)または $[^3\text{H}]\text{デキストロメトルファン}$ (1nM 、比放射能 $82.7\text{Ci}/\text{mmol}$)、 $[^3\text{H}]\text{DTG}$ (1mM 、比放射能 $37.2\text{Ci}/\text{mmol}$)または $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ (1nM 、比放射能 $55\text{Ci}/\text{mmol}$)(Dupont NEN、Boston、MA)と一緒に最終容量 $200\mu\text{l}$ で40分間 25°C でインキュベートした。非特異的結合を、 $[^3\text{H}]\text{デキストロメトルファン}$ および $[^3\text{H}]\text{DTG}$ を除く(代わりに $10\mu\text{M}$ のハロペリドールまたはクエン酸カルベタペンタンを使用した)全ての放射性リガンドについて、 $10\mu\text{M}$ のナロキソンの存在下で残存結合している放射活性として定義した。

10

【0290】

結合反応を、 50mM の氷冷 Tris-HCl ($\text{pH}7.8$)の添加、ならびに 0.5% ポリエチルイミンおよび 0.1% ウシ血清アルブミンで少なくとも1時間前処理したWhatman GF/Bガラスファイバーフィルターによる急速濾過により停止させた。次いで、このフィルターを 12ml の氷冷 50mM Tris-HCl ($\text{pH}7.8$)を用いて洗浄し、そして結合した放射性を液体シンチレーションカウンターを使用して測定した。放射性リガンド結合研究からのデータを用いて、阻害曲線を作成した。NIHが後援するPROPHET system上で利用可能な数学的モデリングプログラムFITCOMPにより実行された曲線適合から IC_{50} 値を得た。

【0291】

20

msl-1 と msl-2 とSRIFレセプターとの間の相同性により、それらがSRIFレセプターファミリーの新メンバーであり得ることが示唆された。しかし、 msl-1 および msl-2 を一時的に発現するCOS-1細胞由来の膜は、特異的な $[^{125}\text{I}]\text{-Try}^{11}$ SRIF結合を示さなかった。このことは、 msl-1 および msl-2 がSRIFレセプターではなかったことを示す。SRIFアゴニストSMS 201-995は、SRIFレセプターおよび μ オピオイドレセプターに結合すると報告されているので、 msl-1 および msl-2 はオピオイドレセプターであり得る可能性があった。この仮説を試験するために研究を継続している間に、2つのグループがNG 108-15細胞由来のマウス δ オピオイドレセプターのクローニングを報告した。これらのレセプターの配列は、 msl-2 と同一であった。

【0292】

30

δ 、 κ 、 μ および σ オピオイドレセプターに選択的なアゴニストを使用する結合研究により、 msl-2 が δ オピオイドレセプター(mORD1 、配列番号：4)であることが確定し、そして msl-1 が κ レセプター(mORK1 、配列番号：2)であることが示された。 msl-1 および msl-2 を発現するCOS-1細胞から調製された膜の結合特性を、表2に要約した。

【0293】

【表 2】

表 2
COS-1 細胞内に発現されたクローン化マウスオピオイド"
レセプターに対するオピオイドリガンドの結合能

		IC ₅₀ (nM)	
		[³ H]U-69,693 msl-1 (mORK1)	[³ H] ナルトリンドール msl-2 (mORD1)
内因性オピオイドリガンド			
ダイノルフィン A (1-17)	0.4	>100	
ダイノルフィン A (1-8)	0.2	>100	
ダイノルフィン B	0.1	>100	
α-ネオエンドルフィン	0.1	10	
β-エンドルフィン (ヒト)	42	15.3	
Leu-エンケファリン	>1000	79	
Met-エンケファリン	>1000	41	
κ-選択的リガンド			
ダイノルフィン (1-17)NH ₂	0.2	>100	
[D-Ala ² , F ₃ Phe ⁴] ダイノルフィン (1-17)NH ₂	0.2	>100	
ブレマゾシン	0.3	19	
[Met ⁵] ダイノルフィン (1-17)	0.6	>100	
U-62,066	1.0	>1000	
エタルサチンクラザシン	1.1	511	
U-50,488	1.1	>1000	
nor-BNI	1.2	197	
U-69,593	2.6	>1000	
ICI 204,448	6.6	>1000	
[D-Ala ² , F ₃ Phe ⁴] ダイノルフィン (1-13)NH ₂	19	>100	
ナルブフィン	36	>1000	
ダイノルフィン (7-17)	>1000	>1000	
δ-選択的リガンド			
ナルトリドール	37	1.9	
DADL	>1000	20	
DSLET	>1000	21	
DPDPE	>1000	122	
その他			
ナルトレキソン	0.66	368	
(-)-ナロキソン	4.9	565	
(+)-ナロキソン	>1000	>1000	
レボルファンール	5.3	103	
デキストロルファン	>1000	>1000	
DAMGO	>1000	>1000	
ハロペリドール	>1000	>1000	
DTG	>1000	>1000	
臭化水素酸デキストロメトルファン	>1000	>1000	
クエン酸カルベタペンテン	>1000	>1000	
SRIF	>1000	>1000	
SMS 201-995	>1000	>1000	

【0294】

msl-1はκ型レセプターであって、κ₁レセプターに強力かつ特異的に結合するが、他のいずれのレセプターとも結合しないU-50,488およびU-69,593に対する、このレセプターの高い親和性によって指定される(Zukinら、1988; Clarkら、1989)。また、msl-1がκレセプターであることは、ダイノルフィンAに対して高い親和性を示し、βエンドルフ

10

20

30

40

50

インおよびエンケファリンに対してより低い親和性を示すこととも一致している。さらに、msl-1は、 μ 、 δ 、または σ 特異的リガンドに対してかなり低い親和性を示した。msl-1に結合するアゴニストおよびアンタゴニストは、オピオイドレセプターに予測されるとおり、立体特異的であった。

【0295】

GppNHp(100 μ M)によって、msl-1に結合するアゴニストが44%減少し、そしてmsl-2に結合するアゴニストが20%減少したことから、msl-1およびmsl-2はともにGタンパク質と結合する。さらに、90mM NaClによって、msl-1およびmsl-2に結合するアゴニストがそれぞれ95%および60%減少したことから、脳より調製した膜を用いて示されるオピオイドアゴニスト結合のナトリウム依存性が確認された(PertおよびSnyder, 1974; Ottら、1988)。

【0296】

フォルスコリン刺激によるサイクリックAMP蓄積の障害が、72時間一時的にmsl-1およびmsl-2を発現するCOS-1細胞内で観察された。簡単に説明すると、12ウェルのコスター組織培養プレートで培養された細胞を、10%牛胎児血清および500nM 3-イソブチル-1-メチルキサンチンを含む1mlのDMEM培地とともに30分間インキュベートした。培地を除去し、細胞を洗浄して、そして培地を10 μ Mフォルスコリンのみを含む同様の培地、または1 μ Mオピオイドアゴニストおよび/またはアンタゴニストと取り替えた。30分後、培地を除去し、そして0.5mlの1N HClを細胞に加え、次に10秒間超音波処理した。HClをSpeedVacでエバポレーション除去し、試料のcAMP含有量を、ラジオイムノアッセイキット(NEN/Dupont)を用いて測定した。

【0297】

この2つのオピオイドレセプターは、アデニルシクラーゼ活性のオピオイド障害を仲介する。 κ 特異的アゴニストのU-50,448およびエチルケトシクラゾシンは、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を、一時的にmsl-1を発現するCOS-1細胞内で50%障害し、そしてこの効果は、ナロキソンでは完全に復帰した(図2aおよび2b参照)。 δ 特異的アゴニストのDPDPEおよびDSLETは、フォルスコリン刺激によるcAMPの形成を、msl-2を発現するCOS-1細胞で70%障害し、そしてこの効果はまた、ナロキソンによりブロックされ得た。これらの結果は、msl-1およびmsl-2がともに、COS-1細胞でのアデニルシクラーゼ活性に対して、サブタイプ特異的アゴニスト誘導性の障害を仲介し得ることを示す。

【0298】

実施例3： κ オピオイドレセプター(msl-1)mRNAの組織内分布

ノーザンブロット分析については、マウスマルチプル組織ノーザンブロット(Clontech)を、製造会社の奨励する手法に従い、ヌクレオチド172-548に対応する λ msl-1の³²P標識376bp Pst I-EcoR Iフラグメントでハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、ブロットを室温で、2 $\times$ SSCおよび0.05%SDSにて洗浄し、そして次に48°Cで、0.1 $\times$ SSCおよび0.1%SDSにて30分間洗浄した。ブロットを増強スクリーンの存在下、-75°Cで7日間、X線に暴露した。サザンブロット分析については、10 μ gのマウスおよびヒトDNAをEcoR Iで切断し、1%アガロースゲル上で分離し、ニトロセルロースフィルター上に移した。ブロットを、標準的な条件を用いて、ヌクレオチド172-1408に対応する λ msl-1の³²P標識1.2kb Pst Iフラグメントでハイブリダイゼーションした。6日間のX線フィルムへの暴露前に、ブロットを、48°Cで、0.1 $\times$ SSCおよび0.1%SDSにて30分間洗浄した。

【0299】

成熟雄BALB/cマウスより調製した脳切片を用いるインサイチュハイブリダイゼーションを、既に報告されている(Brederら、1992)とおりに、上記の λ msl-1の376bpのPst I-EcoR Iフラグメントを含むプラスミドより転写された³⁵S標識アンチセンスリボプローブおよびセンスリボプローブを用いて行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、切片をNTB2写真用感光乳剤に浸し、そして4週間暴した。スライドをD-19現像液で現像し、次に、暗視野顕微鏡を用いて観察する前に、チオニン中で3分間対比染色した。

【0300】

RNAブロッティングにより、成熟マウス脳内に κ オピオイドレセプターmsl-1 mRNAをコードする5 kbの単一の転写物が認められた。ハイブリダイゼーションのシグナルは、心臓、脾臓、肝臓、肺、骨格筋、腎臓、または精巣内には認められなかった。成熟マウスの中枢神経系内の κ オピオイドレセプターmRNAの分布を、インサイチュハイブリダイゼーションにより試験した。新皮質、梨状皮質、海馬、扁桃、内側手綱、視床下部(弓状核および室傍核)、青斑、および傍小脳脚核では、大量の発現が認められた。

【0301】

³ ² P標識msl-1 cDNAのEcoRI切断マウスDNAおよびヒトDNAへのハイブリダイゼーションでは、18kbおよび3.4kbの2つのマウスDNAフラグメントの強い標識が認められたのに対し、このプローブは、ヒトDNAの多数のフラグメントとハイブリダイゼーションし、8.0kb、6.0kb、および2.5kbのフラグメントとは強く、そして9.5kb、5.1kb、4.8kb、および3.1kbのフラグメントとは弱くハイブリダイゼーションした。これらのプロットに見られる多数のバンドに関する分子基本を確立する必要がある。msl-1 cDNA配列の内在性EcoRI部位の存在は、2つのマウスフラグメントに対するハイブリダイゼーションを説明し得る。さらに、この結果から、マウスゲノム内には、単一の κ レセプター遺伝子しか存在し得ないことが示唆される。

10

【0302】

ヒトプロットでの多数のDNAフラグメントへのハイブリダイゼーションは、さらに解釈し難い。ヒト κ オピオイドレセプター遺伝子の部分配列から、マウスの配列のアミノ酸Arg⁸ ⁶ およびAsp¹ ⁸ ⁴ に対応するコドン内に位置するこの遺伝子内に、少なくとも2つのイントロンが存在することが示されており、そしてこの結果は、少なくとも部分的に、ヒトDNAのサザンプロットで見られる多数のバンドを説明し得る。

20

【0303】

最近の報告(XIeら、1992)は、 κ レセプターの豊富な供給源であるヒト胎盤由来の推定オピオイドレセプターcDNAの発現クローニングを開示する。このクローン化レセプターを発現する細胞は、オピオイドリガンドと中程度の親和性のみで結合したが、立体特異的方法では、予測される κ レセプター選択性は認められなかった。このクロンの配列はまた、ヒトニューロメジンKレセプターに対する配列との方が、クローン化マウス δ または κ オピオイドレセプターに対するよりも大きな配列同一性があることが認められ、さらに、このことがこの配列のこれら後者のレセプターとの関係を複雑にしているが、このレセプターは、真正のオピオイドレセプターについて推測される親和性および選択性を示す。

30

【0304】

δ オピオイドレセプターの最近のクローニング、および κ 型オピオイドレセプターのクローニングについて本明細書中に記載したデータは、種々のオピオイドレセプタークラスが、異なる遺伝子産物を表現することを強く示唆している。しかし、数クラス、例えば、 κ_1 、 κ_2 、および κ_3 での種々のサブクラスについては、分子基本が未だ明らかにされていない。COS-1細胞で発現したmsl-1の薬理学的特徴付けにより、msl-1は κ_1 レセプターであることが示唆されている。他の κ サブタイプは、他の遺伝子の産物であり得るか、もしくは共通のポリペプチドから異なるグリコシル化または他の転写後修飾を受けて生じたものか、もしくはGタンパク質のカップリングおよび非カップリング状態を、同一の分子として表現すると思われる(FrIelleら、1988)。あるいは、ヒト遺伝子の予備分析に示されるとおり、 κ オピオイドレセプター遺伝子内にイントロンが存在する場合、おそらく、別のスプライシングにより、僅かに異なる薬理学的特性を有する κ サブタイプが生じるものと思われる。

40

【0305】

マウスの δ オピオイドレセプターおよび κ オピオイドレセプターのアミノ酸配列を比較することにより、推定膜に及ぶセグメントおよび接続ループの配列は、NH₂末端およびCOOH末端よりも良く保存されていることが明らかにされた。この配列の保存には、第3細胞内ループが含まれていた。これは、他のGタンパク質カップリングレセプターが、Gタン

50

パク質に結合する領域であり、このことから、おそらくこれら2つのレセプターは、類似したGタンパク質と相互作用することが示唆される。大きく異なる薬理学的特性を有するこれら2つのクローン化レセプターを利用することができれば、アドレナリン性レセプター(Fr I elleら、1988)およびタキキニンレセプター(Yokotaら、1992)に対して行われたのと同様に、キメラポリペプチドの結合特性を比較することにより、リガンド結合部位の位置決定が可能となる。

【0306】

オピオイドレセプターの種々のクラスは、様々な薬理機能をもたらすと考えられている(Olsonら、1989; S I mon 1991; LutzおよびPf I ster 1992)。マウス脳内の κ オピオイドレセプターmRNAの分布より、 κ レセプターは、覚醒機能、神経内分泌機能、および自律神経機能の調節に関与し、ならびに感覚情報の処理にも関与している可能性があることが示唆された。予備RNAプロッティング研究により、 κ オピオイドレセプターmRNAの分布には、種間で差がある可能性が示唆されている。例えば、インサイチュハイブリダイゼーションにより、皮質内に高レベルのmRNAが認められ、そして線条体内では非常に低レベルのmRNAしか認められないが、ラット脳の種々の領域から調製したRNAを用いたノーザンブロッティング研究では、大脳皮質内よりも線条体内の方がmRNAレベルが多いことが示唆され、この結果は、ラット脳内のリガンド結合研究と一致する(Mansourら、1987; Nockら、1988; Unterwaldら、1991)。このような差の機能的意義については不明であるが、ある種について、 κ 選択的アゴニストを用いる研究の結果を、他の種での結果から予測することは不可能であるといえる。実際、この3つのオピオイドレセプタークラスの内、 κ 型は、種間で最も分岐する分布を示す。予備インサイチュハイブリダイゼーション研究により、 δ オピオイドレセプターmRNAは、大脳皮質、海馬、扁桃、および視床下部内での発現を含む、マウス脳内の κ レセプターの分布と比較して、類似してはいるが異なる分布を有することが明らかにされている。

【0307】

クローン化オピオイドレセプターを利用することができれば、インビボでのこれらの機能を直接試験することが可能である。これらのレセプターはまた、さらに選択性の高いアゴニストおよびアンタゴニストを臨床に適用するための開発を大いに促進し得る。オピオイドレセプターのこのクラスに対するアゴニストは、無痛覚を誘導するが、濫用性を制限し(Unterwaldら、1987)、呼吸機能に対する副作用はより少ない(Shookら、1990)ことから、 κ レセプターは今後、特に重要である。同様に、 κ オピオイドレセプターファミリーの他のメンバーを同定することにより、無痛覚を誘導するが、 κ アゴニストの鎮静剤または向精神薬の副作用を殆ど有さない(Pfe I fferら、1986)か、もしくは、その代わりにこれらの好ましくない副作用を選択的に拮抗する、選択的リガンドの開発を導き得る。

【0308】

実施例4：診断/治療への適用

異なるオピオイドレセプターポリペプチドを単離および精製すると、診断および治療への適用での使用に好ましい特性を有すると思われる候補アゴニストおよびアンタゴニストなどの候補物質をスクリーニングするために設計した方法において、これらのペプチドを利用することができる。

【0309】

例えば、最近(Dohlmanら、1991)が、その数が増加し続けているレセプターのサブタイプ、Gタンパク質、およびエフェクターについて述べているように、レセプターのリガンド結合およびGタンパク質認識の特性を特徴付けることは、診断および治療産業にとって重要な課題である。ここで述べているとおり、再構築実験は、レセプターが、種々の程度の特異性で、多数の(および場合によっては機能的に異なる)Gタンパク質とカップリングし得ることを示す最初のものであった(Kanahoら、1984)。

【0310】

例えば、ムスカリン性レセプターおよび α_2 -アドレナリン性レセプターのクローニングおよび過剰生産により、細胞内に高レベルに発現された場合の、単一レセプターサブタ

10

20

30

40

50

イプが、1タイプより多くのGタンパク質とカップリングすることが明らかにされた。これらレセプターのそれぞれに対し、アゴニスト処理によってアデニリルシクラーゼの阻害およびホスホイノシチド代謝の刺激の両方が得られる。最終的に、個々のGタンパク質種は、1つを越えるエフェクターを刺激することが明らかにされており、例えばG_sはカルシウムチャンネル、さらにはアデニリルシクラーゼを調節することが報告されている。これらの著者らは、このように機能が複雑でかつ見かけ上同義性であるものであるならば、根本的に重要な問題として、どのようにして、そしてどのような環境下で、Gタンパク質は多数のレセプターからシグナルを発生させ、そして適切なエフェクターに運ぶのであろうか、という疑問が生ずると記している。

【0311】

従来のアプローチでは、精製したレセプターおよびGタンパク質成分をインビトロで再構築していた。あいにく、これらの著者らが記すように、精製スキームは、非常に限られた数のレセプターのサブタイプおよびその同族Gタンパク質にしか成功していない。あるいは、これまでに同定されているオピオイドレセプターのクローニングおよび配列決定によってここで可能になったように、異種発現系は、クローン化レセプターの特徴付け、およびレセプター-Gタンパク質カップリング特異性を解明するのにさらに全般的に有用であり得る。

【0312】

このような系の一つが、最近酵母細胞で開発されており、哺乳類の β_2 -アドレナリン、およびG_s α サブユニットの遺伝子が同時発現された(KIngら、1990)。 β_2 -アドレナリンの発現は、どのヒト組織よりも数百倍高いレベルに達し、そしてリガンド結合は適切な親和性、特異性、および立体選択性があることが明らかにされた。さらに、フェロモンシグナル伝達経路の β_2 -アドレナリン介在活性化が、成長速度変化、形態変化、およびEscherichia coli lacZ遺伝子(β -ガラクトシダーゼをコードする)と融合するフェロモン応答性プロモーター(FUS1)の誘導を含むいくつかの基準により示された。

【0313】

β_2 -アドレナリン、およびG_s α サブユニットの発現によって酵母のフェロモン応答経路を制御する能力には、このようなレセプターの構造的および機能的特徴付けを非常に容易にする能力を有する。成長速度または β -ガラクトシダーゼ誘導を測ることによって、変異レセプターの特性を迅速に試験することができる。さらに、本明細書中で実現可能となった単離された組換えオピオイドレセプターは、オピオイドの所望の特性をともなうが、オピオイドの所望しない特性を欠く候補物質を識別することができるはずである。さらに、本出願により実現したオピオイドレセプターポリペプチドの1またはそれ以上が、オピオイドレセプターの同ファミリー内のポリペプチドよりも相互作用する、選択的能力を有する候補物質を同定するために、上記のような系を用いることが可能なはずである。

【0314】

従って、例えば、特に共通の細胞株内でクローン化および発現された一連のオピオイドレセプターを利用して、この一連のレセプターポリペプチドを種々の候補物質に暴することができる。このようなスクリーニングアッセイの結果から、例えば δ 、 κ 、 μ 、または σ オピオイドレセプターと相互作用する能力を有する候補物質を同定することができるはずである。

【0315】

さらに、本出願により実現した単離された組換えオピオイドレセプターを比較する場合、オピオイドの構造-活性関係を、続いて調べることができる。このような研究には、それぞれ個々のオピオイドレセプターと結合するアゴニストおよびアンタゴニストのような候補物質を同定するための結合研究が含まれるだけでなく、レセプターへの結合の他、オピオイドレセプターの活性を刺激する候補物質を同定するための研究も含まれる。

【0316】

さらに、Dohlmanら、1991が記しているように、本出願により実現可能となったレセプターのようなレセプターとカップリングした、推定Gタンパク質に対する別の遺伝子が単

10

20

30

40

50

離されると、非同定遺伝子産物に対する活性を有するリガンドを同定するために一連のリガンドを都合良くスクリーニングすることができる。これらの著者も記しているように、他の関連サブタイプ非存在下での単一レセプターの発現を、天然の哺乳類細胞内で達成することは、しばしば不可能である。従って、このような内因性レセプターを有さない微生物内または単離した真核細胞内での発現は、サブタイプ選択的薬剤をスクリーニングし、かつ評価するのに有用であり得る (Marulloら、1988; Payetteら、1990; および Kingら、1990)。 実施例 5：ヒトオピオイドレセプター

ヒトオピオイドレセプターポリペプチドを、このようなレセプターポリペプチドをコードするヒト遺伝子配列より単離および同定する。ヒトκオピオイドレセプターのイントロンおよびエキソンの両方を含む部分ゲノム配列を図3に示す。図4aおよび4bでは、ヒトκオピオイドレセプターの部分アミノ酸配列とマウスκオピオイドレセプターの部分アミノ酸配列とを比較している。マウスの配列はアミノ酸残基1から開始し、そしてヒトの配列はアミノ酸残基87から開始する。

10

【0317】

ヒト脳の海馬よりcDNAライブラリーを構築し、そしてマウスκオピオイドレセプターより、ポリヌクレオチドプローブでスクリーニングした。簡単に説明すると、cDNA分子をEcoRIリンカーと連結した。ベクターλgt10をEcoRIで切断して直鎖状のベクターを作製した。EcoRIリンカーを有するcDNA分子をこの直鎖ベクターに連結した。ライブラリー構築に関する宿主細胞はE.coliのLE 392株であった。

【0318】

20

ヒトおよびマウスのκオピオイドレセプターのアミノ酸配列には高い相同性が認められる。図3に見られるように、293個のアミノ酸のうち、292個は同一か、または類似のアミノ酸である。281残基は同一であり、そして6残基は保存的置換に関連している。残基232、284、285、328、および348はロイシン、イソロイシン、またはバリンに關与する置換である。当業者によって高く評価されているとおり、ロイシン、イソロイシン、およびバリンに關与している置換は、保存的置換である。残基218は、グルタミン酸からアスパラギン酸への変化であり、そして残基274は、リジンからアルギニンへの変化である。当該分野で周知のとおり、グルタミン酸およびアスパラギン酸のハイドロパシー指数は-3.5で一致している。さらに、リジンおよびアルギニンは、指数がそれぞれ-3.9および-4.5の、ハイドロパシーが最も小さい2個のアミノ酸である。従って、218位および274位でのアミノ酸の変化は、保存的置換である。加えて、完全なヌクレオチド配列がまだ確定されていないため、ヒトκオピオイドレセプター内には、255位、267位、351位、および355位に、未だ同定されていない4つのアミノ酸がある。しかし、残基351および355をコードする配列から、一つだけヌクレオチドが欠けていることが認められている。この2つのヌクレオチドを同定すると、アミノ酸残基351および355は相同性であり得るものと思われる。残基255および267は、この残基をコードする2つのヌクレオチドが、ヌクレオチド配列から欠けているため、現在同定されていない。ヒトおよびマウスκオピオイドレセプター間の唯一の有意差は、セリンがアスパラギンに置き換わった残基358に認められる。

30

【0319】

図4aおよび4bに示すヒトκオピオイドレセプターは、ヒトκオピオイドレセプターのアミノ末端が存在しない部分配列である。このヒトκオピオイドレセプターのアミノ末端をコードする遺伝子配列は、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーをヒトまたはマウスκオピオイドレセプターのポリヌクレオチドでスクリーニングすることによって同定し得る。好ましくは、図3のヒトκオピオイドレセプターのポリヌクレオチドがプローブである。ヒトオピオイドレセプターサブタイプは、ヒトオピオイドレセプタープローブでスクリーニングすることにより同定される。

40

【0320】

さらに、オピオイドレセプターポリペプチドをコードするヒトcDNAは、本明細書中前記の技術を用いて、適切な宿主細胞にトランスフェクトされ、そしてオピオイドレセプターポリペプチドが発現される。発現したヒトポリペプチドは、オピオイドレセプターサブタ

50

イプを同定するために、アゴニストおよびアンタゴニストを用いてスクリーニングされる。

【0321】

—実施例6：哺乳類細胞の安定なトランスフェクション

A. 安定な形質転換細胞の単離

PC-12細胞を10%ウマ血清および5%ウシ血清を含むRPMI培地中で、5%CO₂下、37℃で50%集密度まで生育させた。細胞をリポフェクション法(Mullerら、1990)により、既に報告されているとおり(Yasudaら、1993)、CMVプロモーターを基礎とする発現ベクターpCMV-6cにクローニングしたマウスκレセプターcDNAの1.2キロベースPst Iフラグメントの7μgでトランスフェクトした。200μg/ml G418を含む同様の培地中で細胞を選択し、そして維持した。既に記載されているとおり(Rens-Domianoら、1992)、マウスδレセプターを安定に発現するCHO-DC44細胞株の継代を確立した。簡単に説明すると、マウスδオピオイドレセプターcDNAの1.3キロベースEcoRI-SacIフラグメントを発現ベクターpCMV-6cに挿入し、そしてpSV2neoとともにCHO細胞に同時トランスフェクトし、そして既に記載されているとおり(Yasudaら、1993、およびRens-Domianoら、1992)、安定なトランスフェクタントを選択および生育させた。既に記載されているとおり(Chenら、1993、およびKongら、1993)、ラットμレセプターをCOS-7細胞内で一時的に発現させた。

10

【0322】

B. 薬理学的特性

既に記載されているとおり(4、10)、クローン化マウスκレセプターを安定に発現するPC12細胞、マウスδレセプターを安定に発現するCHO-DG44細胞、またはトランスフェクション後、48-72時間でラットμレセプターを一時的に発現するCOS-7細胞のいずれかに由来する膜を用いて、レセプター結合アッセイを行った。放射性リガンド結合アッセイについては、1mM エチレングリコールビス(β-アミノエチルエーテル)-N,N'-四酢酸、5mM MgCl₂、10μg/mlロイペプチン、10μg/mlペプスタチン、200μg/mlバシトラシン、および0.5μg/mlアプロチニンを含有する50mM Tris-HCl (pH 7.8)(緩衝液1)内に細胞を回収し、そして24,000×gで7分間、4℃で遠心分離した。ペレットを、Polytron(Brinkmann、設定2.5 30秒)を用いて緩衝液1中でホモジナイズした。次いでホモジネートを48,000×gで20分間、4℃で遠心分離した。ペレットを緩衝液1中でホモジナイズし、そしてこの膜調製物を放射性リガンド結合研究に使用した。阻害研究については、細胞膜(10-20μgタンパク質量)を、[³H]U-69,593(2nM、比放射能 47.4Ci/mmol)、[³H]ナルトリンドール(1nM、比放射能 31.2Ci/mmol)、または[³H]DAMGO(1nM、比放射能 55Ci/mmol)とともに、最終容量200μLで、40分間、25℃にて、競合剤存在下または非存在下でインキュベートした。飽和実験については、細胞膜を上昇系列濃度の放射性リガンドとともにインキュベートした。非特異的結合を、全放射性リガンドに対する、10μMナロキソン存在下で残存結合している放射活性と定義した。氷冷50mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.8)を添加し、そして0.5%ポリエチレンイミン/0.1% BSAで少なくとも1時間前処理したWhatman GF/Bグラスファイバーフィルターにて急速濾過することにより、結合反応を停止した。次に、フィルターを12mLの氷冷Tris-HCl緩衝液で洗浄し、そして結合放射活性をシンチレーションカウンターで計数した。放射性リガンド結合研究からのデータを用いて、阻害曲線を作成した。数学的モデリングプログラムFITCOMP(PerryおよびMcGonigle、1988)により行った曲線適合からIC₅₀値を得、そして飽和データを、米国国立衛生研究所後援によるPROPHETシステム上で入手可能なFITSAT(McGonigleら、1988)を用いて分析した。Chong-Prusoff式(ChengおよびPrusoff、1973)を用いて、IC₅₀値より阻害結合定数(K_I)を算出した。

20

30

40

【0323】

κ、δ、およびμレセプターをコードするクローン化cDNAはPC12(κ)またはCHO-D644細胞(δ)細胞内で安定に、もしくはCOS-7細胞(μ)内で一時的に発現した。κ、δ、およびμオピオイドレセプターを、それぞれ選択的オピオイド放射性リガンドである[³H]U-69,593、[³H]ナルトリンドール、または[³H]DAMGOで標識した。これらの放射性リガン

50

ドの結合は、飽和性で、および高親和性である(図5Aおよび5B)。飽和実験により、 $[^3\text{H}]$ U-69,593は、2.8nMの K_D および3346fmol/mgタンパク質の B_{max} を有するクローン化 κ レセプターと結合することが実証された。同様に、クローン化 δ レセプターに結合する $[^3\text{H}]$ ナルトリンドールは、高い親和性を有し、そして0.18nMの K_D および633 fmol/mgタンパク質の B_{max} を有する。クローン化 μ レセプターに結合する $[^3\text{H}]$ DAMGOに対する K_D は0.57nMであり、そして B_{max} は444 fmol/mgタンパク質である。全データを単一部位分析(single-site analysis)により最適化した。適切な非トランスフェクションコントロール細胞中には、特異的放射性リガンド結合は検出されなかった。

【0324】

一連のオピオイドリガンドを用いて、クローン化 κ 、 δ 、および μ オピオイドレセプターの薬理学的特異性を同定した(表3)。これらのリガンドには、オピオイドレセプターに対する選択的および非選択的因子として、予め特性付けられたペプチド性および非ペプチド性化合物の両方が包含される(LutzおよびPfister, 1992; GoldsteinおよびNaidu, 1989; Schiller, 1993; Portoghese, 1993; およびCorbettら, 1993)。内因性オピオイドペプチドのダイノルフィンAは、 κ レセプターに対して選択的であるのに対し、 β -エンドルフィン、Leu-およびMet-エンケファリンは、 μ および δ レセプターに対して選択的であって、これらは、Leu-およびMet-エンケファリンについては κ レセプターと結合せず、かつ β -エンドルフィンについては低効力でしか結合しなかった。Des-Tyr¹- β -エンドルフィンはどのオピオイドレセプターにも結合しなかった。各レセプターへの結合は立体選択的で、(-)ナロキソンおよびレボルファノールによっては阻害されるが、それぞれの異性体、(+)ナロキソンまたはデキストロルファンによっては阻害されない。試験したその他の比較的非選択的な化合物は、(±)ブレマゾシン、エチルケトシクラゾシン、エトルフィン、ペンタゾシン、およびジプレノルフィンであった。これらの化合物はそれぞれ、 κ より μ に対して比較的非選択的であって、そしてこれらのレセプターに対して、 δ レセプターに対するよりも高い親和性を示した。同様の結果が、 β -FNAおよび β -CNAについて認められたが、これらのリガンドの共有結合性により、得られた数値は真の K_I 値ではない。さらに、ナルトレキソン、ナルブフィン、およびナロルフィンはまた、 κ 、 μ レセプターに対しては比較的选择的で、 δ レセプターに対しては、極めてより高い濃度でのみ結合した。

【0325】

10

20

30

【表 3 - 1】

表 3

クロン化、 δ および μ オロイドレポターに對する
リガンドの結合能 (Ki-nM)

非選択的化合物	μ レポター [³ H]U-69,593	δ レポター [³ H]ナルトリンドール	μ レポター [³ H]DAMGO
ダイノルゲンA	0.5	>1000	32
Leu-エンケファリン	>1000	>1000	3.4
Met-エンケファリン	>1000	4.0	3.4
β -エンドルフィン	52	1.0	1.0
des-Tyr ¹ - β -エンドルフィン	>1000	>1000	>1000
(-)プロキソン	2.3	17	0.93
(+)プロキソン	>1000	>1000	>1000
レボルナール	6.5	5.0	0.086
デキストロルフィン	>1000	>1000	>1000
(±)ブレモジシン	0.089	2.3	0.75
エチルグテグテグテグ	0.40	101	3.1
エトルフィン	0.13	1.4	0.23
ペンタジシン	7.2	31	5.7

【0326】

10

20

30

40

【表 3 - 2】

クロニンヒル、 δ および μ オヒオイドレセプターに対する
リガンドの結合能 (K_i-nM)

	κ レセプター [³ H]U-69,593	δ レセプター [³ H]ナルトリンドール	μ レセプター [³ H]DAMGO
シブレンホルフィン	0.017	0.23	0.072
β -CNA	0.083	115	0.90
非選択的化合物			
β -FNA	2.8	48	0.33
ナルトレキソン	3.9	149	1.0
ナルブフィン	39	>1000	11
ナロルフィン	1.1	148	0.97
μ -選択的化合物			
CTOP	>1000	>1000	0.18
デルモルフィン	>1000	>1000	0.33
メサドン	>1000	>1000	0.72
DAMGO	>1000	>1000	2.0
PLO17	>1000	>1000	30
モルフィセブタン	>1000	>1000	56
コデイン	>1000	>1000	79
フェンタール	255	>1000	0.39
スフェンタール	75	50	0.15

【0327】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

クロール化 δ , δ オブジェクトレセプターに対する
リガンドの結合能 (KJ-mM)

	ϵ レセプター [³ H]U-69,593	δ レセプター [³ H]ナルトリンドール	μ レセプター [³ H]DAMGO
ロゼンタニル	5.9	5.5	0.68
ナロキリナジン	11	8.6	0.054
モルセネ	538	>1000	14
κ -選択的化合物			
norBNI	0.027	65	2.2
スピラリドン	0.036	>1000	21
U-50,488	0.12	>1000	>1000
U-69,593	0.59	>1000	>1000
ICI 204,488	0.71	>1000	>1000
δ -選択的化合物			
DPDPE	>1000	14	>1000
D-Ala ² -テイルナレン II	>1000	3.3	>1000
DSLET	>1000	4.8	39
BW 3734	17	0.013	26
DADL	>1000	0.74	16
SIOM	>1000	1.7	33

10

20

30

40

【0328】

【表 3 - 4】

クロン化 μ , δ および κ オピオイドレセプターに対する リガンド結合能 (Ki-nM)			
	μ レセプター [³ H]U-69,593	δ レセプター [³ H]ナルトリンドール	μ レセプター [³ H]DAMGO
ナルトリンドール	66	0.02	64
NTB	13	0.013	12
BNTX	55	0.66	18

10

20

30

40

【0329】

ペプチド性および非ペプチド性のアゴニストおよびアンタゴニストを含む μ 選択性として既に特徴付けられた化合物もまた、利用した。予想どおり、これらの化合物の殆どは、低い nM 範囲の K_i 値でクロン化 μ レセプターと結合した(表 3)。例外物にはモルヒネ、

50

コデイン、モルフィセプチン(morphine)、およびPL017が含まれ、10–100nMの範囲の親和性で結合する。試験した主なりガンドは、 μ レセプターに対して選択的であり、そして κ または δ レセプターとは結合しない。交差反応性を示したリガンドのうち、フェンタニルは高選択性で μ レセプターと結合するが、その誘導体であるロフェンタニルおよびスフェンタニルはより低選択性であり、 δ および κ 両レセプターと相互作用するが、 μ レセプターに対するより低い親和性で相互作用する。同様の交差反応性は化合物のナロキソナジンで認められたが、この化合物は μ レセプターのサブタイプ間を識別することが示唆されており、 μ_1 レセプターに対して高い親和性を有する(PasternackおよびWood、1986)。クローン化 μ レセプターの、サブタイプ選択性を有する化合物であるナロキソナジンに対する高い親和性は、クローン化 μ レセプターが、内在的に発現された μ_1 レセプターのサブタイプに相当することを示唆する。 10

【0330】

κ -選択的リガンドであるU-50,488、U-69,593、ICI 204488、およびスピラドリンの結果(表3)から、 κ 選択性を示す既存の結果が確認された(LutzおよびPfister、1992; GoldsteinおよびNaidu、1989; Schiller、1993; Portoghese、1993;およびCorbettら、1993)。 κ アンタゴニストnorBNIもまた、 κ レセプターに対して選択的であったが、試験したアゴニストほどではなかった。これらの結果から、クローン化 κ レセプターは、異種組織で既に特徴付けられた κ_1 レセプターに薬理学的に対応することが示される(Clarkら、1989)。

【0331】

δ レセプターにおける種々のペプチド性および非ペプチド性アゴニストおよびアンタゴニスト(LutzおよびPfister、1992; GoldsteinおよびNaidu、1989; Schiller、1993; Portoghese、1993; およびCorbettら、1993)を試験し、そして結果より、これらの化合物の δ -選択性が確認された(表3)。従って、ペプチド性アゴニストであるDPDPEおよびD-Ala²-デルトルフィンII(deltorphin II)は δ レセプターに対して高選択性であるが、DSLETおよびDADLはそれほど選択的ではない。最近開発された非ペプチド性アゴニストのBW3734(Leeら、1992)およびSIOM(Portogheseら、1993)についても試験した。BW3734は高 δ -選択性である。 δ_1 および δ_2 レセプターサブタイプ間を識別するとされている化合物を試験した。これらの因子は、種々の親和性でクローン化 δ レセプターと結合した。アゴニストであるDSLETおよびD-Ala²-デルトルフィンIIは δ_2 リガンドとされているが、 δ_1 選択性であるDPDPEより強力であることが認められた。さらに、アンタゴニストであるナルトリンドールおよびNTBは、クローン化 δ レセプターへの結合においてBNTXより強力であった。クローン化 δ オピオイドレセプターの薬理学的プロファイルは、多様な組織で既に特徴付けられている δ オピオイドレセプターとは異なる。DPDPEおよびBNTXのような δ_1 レセプターと相互作用する化合物、ならびにDSLET、D-Ala²-デルトルフィンII、およびNTBのような δ_2 レセプターと相互作用する化合物を用いた反応データに基づき、 δ レセプターのサブタイプの存在が示唆されている(Sofugluら、1991; Portogheseら、1992; およびSofugluら、1991)。おそらく十分な選択性を有する放射性リガンドが欠けているために、放射性リガンド結合研究の結果に基づいた、 δ レセプターサブタイプの存在の実証は、さらに不明瞭なものになっている。これらの結果は、クローン化 δ オピオイドレセプターの薬理学的プロファイルが、 δ_2 レセプターサブタイプのものと一致することを示唆する。 30 40

【0332】

本研究所にて得られたK₁値を、文献(GoldsteinおよびNaidu、1989; Schiller、1993; Portoghese、1993;ならびにCorbettら、1993)中に報告された値と比較する相関分析を行った。クローン化されたオピオイドレセプターの薬理学的プロファイルが、複数のオピオイドレセプターサブタイプを含有する生物学的組織中にインビボで発現されたレセプターに関して以前に報告されているものと同様であったかどうかの決定のためである。文献値が得られなかった化合物または所定のレセプターに結合しなかった化合物は、分析に含まれていない。 μ (図6A)および κ (図6B)レセプターの両方について得られた相関 50

係数は、非常に高く、 r 値はそれぞれ0.954($n=25$)および0.879($n=16$)である。対照的に、 δ レセプターの相関は低く（データを示していない）、 r 値は0.185($n=17$)であり、クローン化された δ レセプターは、多様な組織において特徴的づけられたレセプターとは薬理学的に異なることを示している。

【0333】

興味深いことに、内因性オピオイドペプチドである β -エンドルフィン、Leu-およびMet-エンケファリンは、 μ および δ レセプター対 κ レセプターについて選択的であった。実際、これらペプチドについての K_I 値は、 μ および δ レセプターにおいては同等であった。エンケファリンの μ および δ レセプターに対する結合力は生理学的濃度の範囲内であるため、これらペプチドは、これら両レセプターサブタイプの内因性リガンドであり得る。

10

【0334】

本発明者らの結果は、濫用性(abuse liability)を有するオピオイド因子が、 μ レセプターと高い親和性を有することを示している。故に、中毒性化合物であるモルヒネ、フェンタニル、およびメサドン、クローン化された μ レセプターと高い親和性を有しているが、 δ レセプターまたは κ レセプターに対する親和性は全くないかほとんどない。さらに、濫用性を有することが示されている(JaffeおよびMartin, 1990) エトルフィン、スフェンタニル、レボルファノール、ナルブフィン、およびコデインは、共に μ レセプターに対して比較的高い親和性を有している。 κ -または δ -選択的鎮痛薬の開発により、この μ -選択的鎮痛薬の制約は除去され得る。

20

【0335】

クローン化されたオピオイドレセプターサブタイプの薬理学的特性を個別に研究する能力により、選択的相互作用を可能にするリガンドの構造的特徴の同定が可能になる。個々のオピオイドレセプターが治療剤の同定を導き得る薬剤の薬理学的相互作用を同定することにより、望ましくない副作用を生じる可能性の重荷を少なくした。

【0336】

実施例7：キメラオピオイドレセプター

モルヒネなどのオピオイドは、慢性的疼痛の処置(management)のために用いられる(JaffeおよびMartin, 1990)。しかし、オピオイドの使用は、呼吸抑制、胃腸運動性の減少、鎮静作用、吐き気、および気分の変化(mood change)を含む望ましくない副作用を有する。他の主要な制約は、濫用性、耐性、および依存性である。モルヒネならびに内因性オピオイドペプチドである、エンケファリン、エンドルフィン、およびダイノルフィン、中枢および末梢神経系ならびに標的組織中で発現した膜結合レセプターを介してそれらの生理学的効果を現す。

30

【0337】

クローン化されそして機能的に特徴づけられたオピオイドレセプターの3つの主要型である δ 、 κ 、および μ (Evansら、1993; Kiefferら、1992; Yasudaら、1993; およびChenら、1993)は、7つの貫膜に及ぶレセプターのDRY含有サブファミリーに属する。約60%のアミノ酸同一性が、 δ 、 κ 、および μ オピオイドレセプターの配列間にある。推定膜に及ぶセグメント(TM I-VI)およびこれらのセグメントを接続する3つの細胞内ループの配列は、高度に保存されているが、細胞外 NH_2 -末端セグメント、第2および第3細胞外ループ、および細胞内COOH-末端の配列は、多様である。これらの多様な細胞外領域は、 δ 、 κ 、および μ レセプターの異なるリガンド結合プロフィルの要因となっているようである。本発明は、キメラオピオイドレセプターの調製および特徴付けを説明する。キメラレセプターは、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ 、 $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ 、 $\kappa_{1-74}/\delta_{65-372}$ 、および $\delta_{1-64}/\kappa_{75-380}$ を含む。このキメラレセプターの表記において、アミノ末端を最初に示し、カルボキシ末端を2番目に示している。このように、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ については、キメラのアミノ末端は、 κ レセプターのアミノ酸残基1~78からなり、そしてカルボキシ末端は δ レセプターのアミノ酸残基70~372からなっている。図7(C)および7(D)は、それぞれ $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ 、および

40

50

$\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ を図示している。これらのキメラのアゴニストおよびアンタゴニスト結合特性、ならびにそのキメラのアデニルシクラーゼ活性の阻害を仲介する能力も記載する。

【0338】

キメラの生成：

マウスの δ および κ オピオイドレセプター間の NH_2 - 末端を通常の制限部位で交換する。Spe I を、第 1 貫膜ドメインをコードしている領域中の cDNA の同等の位置に、どちらのレセプターもその他のアミノ酸配列を変更せずに生成した。Altered Sites^{T M} インビトロ Mutagenesis System (Promega, Madison, WI)、ならびに、Spe I 部位である δ レセプターオリゴヌクレオチド-CTGGGCAACGTACTAGTCATGTTTGGC (配列番号：42) および κ レセプターオリゴヌクレオチド-GTGGGCAATTCACTAGTCATGTTTGTC (配列番号：43) を含有する 27 マーのオリゴヌクレオチドを用いて、部位特異的変異誘発を行った。Spe I および適切な 5' および / または 3' 酵素を用いて消化した後、 δ および κ の NH_2 - および COOH - 末端をコードする cDNA フラグメントを、1.2% の低融点アガロースゲルから単離した。 δ レセプターの NH_2 - 末端および κ レセプターの COOH - 末端をコードするフラグメント、ならびにその逆を互いに連結し、そして哺乳類発現ベクター pCMV-6c 中にクローン化した。短縮型 δ および κ レセプターを、 COOH - 末端をコードするフラグメントを直接発現ベクター中に連結することによって生成した；これらの構築物中のレセプター配列の翻訳は、Spe I 部位のすぐ末端側の保存された ATG において開始すると予測された。

【0339】

前述のように (Evans ら、1993；Kieffer ら、1992；Yasuda ら、1993；および Chen ら、1993)、野生型 κ レセプターは、 κ - 選択的アゴニスト [^3H]U-69,593 およびアンタゴニスト [^3H]ナロキソンで標識され得、そして野生型 δ レセプターは、 δ - 選択的アゴニストである [^3H][D-Pen², D-Pen⁵]-エンケファリン (DPDPE) およびアンタゴニストである [^3H]ナルトリンドールで標識され得る。 κ - 選択的および δ - 選択的リガンドは、最小の交差反応性を有する。 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ および $\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ キメラオピオイドレセプターは、独自のアゴニストおよびアンタゴニスト結合特性を示す。 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ レセプターは、アンタゴニストである [^3H]ナロキソン (これは野生型 δ レセプターをあまり標識しない)、ならびにそれぞれ δ - 選択的アゴニスト およびアンタゴニストである [^3H]DPDPE および [^3H]ナルトリンドール (図*) を結合する。対照的に、 $\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ レセプターは、 κ - 選択的アゴニストである [^3H]U-69,593 のみを結合するが、46 fmol/mg タンパク質で結合する野生型 κ - レセプターに比較すると低レベルである。これらの結果は、 κ レセプターのアゴニストおよびアンタゴニスト結合ドメインが分離可能であり、タンパク質の異なる領域中に位置していることを示している。 κ のアンタゴニスト結合ドメインは、 NH_2 末端細胞外ドメインを含むアミノ酸 1~78 の領域中に局在している。対照的に、 δ レセプターのアンタゴニスト結合ドメインはこのレセプターの対応領域中に位置していない。

【0340】

放射性リガンド結合アッセイ：

レセプター結合研究のために、レセプターを発現する COS-7 細胞を、1mM の EGTA、5mM の MgCl_2 、10 $\mu\text{g/ml}$ のロイペプチン、10 $\mu\text{g/ml}$ のペプスタチン、200 $\mu\text{g/ml}$ のバシトラシン、および 0.5 $\mu\text{g/ml}$ のアプロチニンを含有する 50nM Tris-HCl (pH 7.8) (緩衝液 1) 中のトランスフェクションの 72 時間後に採取し、24,000 $\times g$ で 7 分間 4 $^{\circ}\text{C}$ にて遠心分離し、そしてペレットをポリトロンを用いて緩衝液 1 で再懸濁した。ホモジネートを 48,000 $\times g$ で 20 分間 4 $^{\circ}\text{C}$ にて遠心分離し、ペレットを緩衝液 1 で再懸濁し、放射性リガンド結合アッセイに使用した。細胞膜 (10~20 μg のタンパク質) を、[^3H]U69,593 (2 nM、比放射能 47.4 Ci/mmol)、[^3H]ナロキソン (6 nM、比放射能 72.1 Ci/mmol)、[^3H]DPDPE (2 nM、比放射能 34.3 Ci/mmol)、または [^3H]ナルトリンドール (1 nM、比放射能 31.2 Ci/mmol) とともに、最終容量 200 μl で 25 $^{\circ}\text{C}$ にて 40 分間、競合因子の存在下または非存在

下でインキュベートした。全ての放射性リガンドは、NEN/Dupont (Boston, MA) から得た。非特異的結合は、 δ -および κ -選択的リガンドに対してそれぞれ1 μ Mのナルトリンドールまたはナロキソンの存在下で結合したときの残存放射活性として定義される。氷冷の50mMのTris-HCl (pH 7.8) を添加すること、そして0.5%のポリエチレンイミンおよび0.1%のウシ血清アルブミンで前処理したWhatman GF/B グラスファイバーフィルターで素早く濾過することによって、結合反応を終了する。このフィルターを、氷冷した緩衝液12mlで洗浄し、シンチレーション液体中に一晩浸した。結合放射活性を、シンチレーションカウンターを用いて決定した。IC₅₀ 値を、NIH型Prophetシステム(NIH-based Prophet system) (PHOPHET Public Procedure Notebook(Bolt, Berabek, and Newman, Inc., Cambridge, MA, 1988)中のH. PerryおよびP. McGonigle, pp.187~197) の曲線適合プログラムFITCOMPを用いて得た。

10

【0341】

$\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ キメラの結合特性を、阻害研究によりさらに検討した。図9に示すように、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ キメラに結合する [³H]ナロキソンは、 κ -選択的アゴニストU-50,488によって阻害されなかった。 κ レセプターの内因性リガンドであるダイノルフィンは、[³H]ナロキシソンの $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ キメラへの結合を、IC₅₀ 値40nMで阻害した。これは、野生型 κ レセプター(2)について観察される結合よりも約500倍少ない効力である。[³H]ナロキソン結合は用量依存性であり、IC₅₀ 値14nM (図*) でアンタゴニストであるナロキソンによって強力に阻害され、そしてIC₅₀ 値0.14nMで κ -選択的アンタゴニストであるノルビナルトルフィミン(norbinaltorphimide; nor-BNI)によっても阻害された。[³H]ナルトリンドールのこのキメラへの結合は、用量依存的に、強力な δ -選択的アゴニストである[D-Ser²]-Leu-エンケファリン-Thr(DSLET)およびDPDPE、ならびに δ -選択的アンタゴニストであるナルトリンドールによって阻害された。この結果は、 δ レセプター中のアゴニストおよびアンタゴニスト結合部位が残基70~372中に含まれていることを示している。

20

【0342】

サイクリックAMP蓄積アッセイ：

野生型レセプターまたは変異レセプターを発現するCOS-7細胞中のcAMP蓄積を、前述のように測定する(Yasudaら、1992)。簡潔に言えば、COS-7細胞を12ウェルの培養プレート中で継代培養した。cAMP実験の72時間前に細胞をトランスフェクトした。培養培地をウェルから除去し、0.5mMのイソブチルメチルキサンチン(IBMx)を含有する新鮮な培地500 μ lと交換した。細胞を37℃にて20分間インキュベートした。培地を除去し、0.5mMのIBMxを含有し、そして10 μ Mフォルスコリンならびに様々なオピオイドアゴニストおよびアンタゴニストを含有するあるいは含有していない、新鮮な培地と交換した。細胞を37℃にて30分間インキュベートした。培地を除去し、細胞を500 μ lの1N HCl中のウェルの中で超音波処理した。HClを真空下で除去し、DuPont-New England Nuclearのラジオイムノアッセイキットを用いてcAMPを定量した。

30

【0343】

図10Aおよび10Bに示すように、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ および $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ キメラは機能的に活性であり、そしてフォルスコリン刺激したサイクリックAMP(cAMP)蓄積の、選択的アゴニストによる阻害を仲介し得る(Yasudaら、1992)。cAMP蓄積のU-50,488による $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ キメラを介した阻害は、ナロキソンによってブロックされなかった。U-50,488のcAMP形成阻害能力は、約1nMであり、これはその野生型 κ レセプターとの相互作用能力と同様である。さらに、ダイノルフィン、 $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ キメラを介してcAMP形成を阻害し得、その効果はナロキソンによってブロックされなかった。従って、ナロキソン結合部位は、 κ レセプターのNH₂-末端に存在している可能性が高い。 κ レセプターの短縮型であり、細胞外NH₂-末端ドメインが欠落している κ_{79-380} の発現もまた、ナロキソン結合部位がアミノ末端に存在していることを示している。この短縮型 κ レセプターをコードする構築物でトランスフェクトされた細胞は、特異的な[³H]-U69,593結合をほとんど示さなかったが、フォルスコリン刺激

40

50

cAMP形成のU-50,488による阻害を仲介し得た(図10A)。この効果は、 κ -選択的アンタゴニストであるナロキソンによってブロックされなかった。このことは、残基1~78がアゴニスト認識に関与していないがナロキソンによるアンタゴニズムに必要であることと一致している。さらに、 δ -選択的アゴニストであるDSLETは、 $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ キメラと同様に、短縮型 κ レセプターを発現している細胞中でのcAMP形成に影響を及ぼさなかった。

【0344】

キメラ $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ または短縮型 δ レセプターである δ_{70-372} のCOS-7細胞における発現は、野生型 δ レセプターと区別のつかない機能的特性を与えた(図9B)。図10は、 δ -選択的アゴニストであるDSLETが、ナルトリンドールによってブロックされるフォルスコリン刺激cAMP形成を阻害したことを示している。この結果は、 δ レセプターのアゴニストおよびアンタゴニスト結合ドメインが、残基70~372に局在していることを示している。 κ -選択的アゴニストであるU-50,488は、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ レセプターまたは短縮型 δ レセプターである δ_{70-372} の機能的特性になんら影響を及ぼさなかった。

10

【0345】

本発明は、アゴニストおよびアンタゴニスト結合ドメインの局在に関する κ および δ レセプター間の予期せぬ差異を示し、そして、 κ レセプターのNH₂-末端の78残基がアンタゴニスト結合において果たす重要な役割を示している。アゴニストおよびアンタゴニストが κ レセプターの異なる領域に結合するという証明は、より選択性の高い κ リガンドの開発を容易にするはずである。これは、非常に興味深い領域である。 κ レセプター-選択的因子は限られた濫用性および呼吸抑制効果を有しているため、 κ 選択的リガンドの開発は非常に興味深い。オピオイドレセプターのリガンド結合ドメインの構造分析により、限られた副作用を有する新世代の治療上有用な鎮痛剤を合理的に設計するための基礎が提供される。

20

【0346】

実施例8： 変異 δ オピオイドレセプターポリペプチド

近年、オピオイドレセプターのクローニング(Evans, 1992; Kiefferら, 1992; Yasudaら, 1993; Chenら, 1993)により、リガンド結合に含有されるレセプターのアミノ酸残基およびドメインの分析が可能になった。 β -アドレナリン性レセプターに対する以前の研究により、第2および第3貫膜に及ぶ領域におけるアスパラギン酸がリガンド結合に対して決定的であることが示唆されている(Straderら, 1987)。 β_2 -アドレナリン性レセプターの第3貫膜に及ぶ領域におけるアスパラギン酸113がアスパラギンに変異することにより、アンタゴニスト結合のレセプターに対する効力が大幅に低下する一方で、アデニルシクラーゼの活性を刺激するアゴニストのKactが増大する(Straderら, 1987)。アスパラギン酸113のカルボキシル基は、 β -アドレナリンアゴニストおよびアンタゴニストのカチオン基の対イオンとして機能する可能性が高い(Straderら, 1987)。第2貫膜に及ぶ領域におけるアスパラギン酸79がアスパラギンに変異することにより、レセプターのアゴニストに対する親和性は低下するが、アンタゴニストに対する親和性は低下しない。したがって、おそらくこのアスパラギン酸は、 β -アドレナリン性レセプターとのアゴニスト結合に選択的に含有され、また、このレセプターのアゴニストおよびアンタゴニスト結合ドメインは別個のものではあるが重複している部分もある。

30

40

【0347】

最近の研究によれば、マウス δ オピオイドレセプターの第2貫膜に及ぶドメインにおけるアスパラギン酸95がアスパラギンに変異することにより、このレセプターの δ 選択的アゴニストに対する親和性は低下するが、アンタゴニストに対する親和性は低下しないことが示されている(Kongら, 1993)。この変異レセプターは、野生型 δ レセプターとして非選択的オピオイドアゴニストに対して同様の親和性を発現した。このことは選択的 δ オピオイドアゴニストは、非選択的アゴニストあるいはアンタゴニストとは異なる形態で δ レセプターに結合されることを示している。

50

【0348】

すべてのオピオイドは、正に荷電された窒素を有しているのみならず、高親和性リガンド結合には必須の芳香族環構造を有している (G I lmanら, 1990; S I mon, 1991)。ニューロキニン-1レセプターに対する最近の研究により、残基197におけるヒスチジンの芳香族環構造はアンタゴニストと相互作用し、またヒスチジンはタキキニンアンタゴニスト結合に必要なレセプターにおいて決定的な残基であることが示されている (Fongら, 1993; Getherら, 1993)。 δ レセプターの第6の貫膜に及ぶドメインにおける残基278のヒスチジンはアスパラギンに変異しており、また、オピオイドとのその相互作用も試験されている。

【0349】

この結果により、アスパラギン酸128はオピオイドアゴニストが δ レセプターと高い親和性で結合するのには必要であるが、アンタゴニスト結合には含まれていないこと、およびヒスチジン278がリガンド結合には必須でないことが示される。D128N変異体およびH278N変異体による結果と併せて考えると、アゴニストおよびアンタゴニストは、おそらく別個のリガンド結合ドメインと相互作用することにより、クローン化 δ レセプターと異なる形態で結合されることが証明される。

【0350】

[D-Pen², D-Pen⁵]エンケファリン(DPDPE)、[D-Ser², Leu⁵]エンケファリン-Thr⁶(DSLET)、D-Ala²デルトルフィンI Iおよび β -エンドルフィンPeninsula Labs. (Belmont, CA)から入手した。また、アゴニストであるレボルファノールおよびブレマゾシン、ならびにアンタゴニストであるジプレノルフィンおよびナルトリンドールは、Research Biochemicals Inc. (Natick, MA)から入手した。7-ス피ロインジノーオキシモルフォン(SIOM)、7-ベニリデンナルトレキソン(BNTX)、ナルトリンドールのベンゾフランアナログ(NTB)はP. Portoghesi博士(Univ. Minn.)により提供された。³H-ナルトリンドール(比放射能 28.8 Ci/mmol)はDupont/NEN (Boston, MA)から入手した。

【0351】

クローン化マウス δ オピオイドレセプターの変異誘発

マウス δ オピオイドレセプターcDNAをAltered SiteTMインビトロMutagenesis Systems (Promega Corp. Madison WI)を用いて変異させた。アスパラギン酸128とヒスチジン278とをアスパラギンに変異させるために、 δ レセプターcDNAをファージミドpALTERTMへとサブクローニングし、ヘルパーファージR408を用いて一本鎖の鋳型を生成した。アスパラギン酸128を変異させるために、所望の変異(GACからAACへ)を含んでいる21マーのオリゴヌクレオチド(GCTCTCCATTAAGTACTACAA)(配列番号:44)を一本鎖の鋳型にアニールし、そしてT4 DNAポリメラーゼを用いて伸長させた。ヒスチジン278の変異のために、所望の変異(CACからAACへ)を含んでいる21マーのオリゴヌクレオチド(GGCGGCCCCATCAACATCTTCGT)(配列番号:45)を一本鎖の鋳型にアニールし、そして伸長させた。それぞれについて、修復マイナス E. coli BMH 71-18 mut Sを形質転換するためにヘテロ二重鎖DNAを用いた。形質転換体は、125 μ g/mlのアンピシリンを含んでいるLBプレート上で成長させて選択した。この変異をDNA配列決定により確認した。cDNAをEcoRIおよびSal Iを用いてpALTERから切り出し、哺乳類発現ベクターpCMV6c(Yasudaら, 1929)における対応部位へとサブクローニングした。

【0352】

COS-7細胞におけるマウス δ オピオイドレセプターcDNAの発現:

変異された野生型のcDNAを、リン酸カルシウム仲介法によりCOS-7細胞へとトランスフェクトした。レセプター結合を研究するために、この δ レセプターを発現するCOS-7細胞を、1mMのEGTA、5mMのMgCl₂、10 μ g/mlのロイペプチン、10 μ g/mlのペプスタチン、200 μ g/mlのバシトラシン、および0.5 μ g/mlのアプロチニン(緩衝液1)を含有する50mMのTris-HCl (pH 7.8)においてトランスフェクションを行った48時間後に採取し、24,000 $\times$ gで7分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離した。このペレットをポリトロンを用いて緩衝液1中でホモジナイズした。このホモジネートを48,000 $\times$ gで20分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し、そしてこの

10

20

30

40

50

ペレットを緩衝液 1 中に再懸濁し、放射性リガンド結合アッセイに用いた。細胞膜 (20~30 μ g のタンパク質) を、競合因子の存在あるいは非存在下に最終容量 200 μ l となるように 40 分間、25°C で δ 選択的アンタゴニストである 3 H-ナルトリンドール (Simon, 1991; Sofugluら, 1991; Portogheseら, 1992) (1nM) とともにインキュベートした。非特異的結合を 10 μ M のナロキソンの存在下で結合している放射活性として規定した。50 mM の氷冷 Tris-HCl (pH 7.8) を加え、かつ 0.5% ポリエチレンイミンおよび 0.1% ウシ血清アルブミンにより前処理した Whatman GF/B グラスファイバーフィルターにより急速に濾過することによって結合反応を終了させた。このフィルタを 12 ml の氷冷緩衝液で洗浄し、液体シンチレーションカウンタを用いて結合放射活性を測定した。放射性リガンド結合の研究により得られたデータを用いて阻害曲線を作成した。FITCOMP プログラム (Kongら, 1993; Yasudaら, 1992) により行われた曲線適合から IC_{50} 値を得、式 $K^2 = IC_{50} / (1 + L/K_d)$ を用いて K_1 値に変換した。

【0353】

cAMP 蓄積

簡単に言えば、COS-7 細胞を 12 ウェルの培養プレートにおいて継代培養した。これらの細胞を cAMP 実験の 48 時間前にトランスフェクトした。これらのウェルから培地を除去し、代わりに 0.5 mM のイソブチルメチルキサンチン (IBMX) を含有する新鮮な培地 500 μ l で満たした。細胞を 20 分間、37°C でインキュベートした。培地を除去した後、10 μ M のフォルスコリンおよび様々なオピオイドアゴニストを含めるかまたは含めずに、0.5 mM の IBMX を含有する新鮮な培地を満たした。これらの細胞を 30 分間、37°C でインキュベートした。培地を除去し、細胞を 500 μ l の 1N HCl でウェルにおいて超音波処理した。HCl を Speed-Vac において揮発させ、NEN/Dupont (Wilmington, DE) のラジオイムノアッセイキットを用いて cAMP を分析した。

【0354】

野生型 δ オピオイドレセプター、ならびに D128N および H278N 変異レセプターが COS-7 細胞において一時的に発現した。 δ レセプター選択的アンタゴニストである 3 H-ナルトリンドールはこれら 3 つのレセプターのすべてと特異的に結合した。 3 H-ナルトリンドールの COS-7 細胞膜におけるこれら 3 つのレセプターのすべてとの結合は飽和性で高い親和性を有するものであった。 3 H-ナルトリンドールの飽和性結合を図 11a、図 11b、および図 11c のグラフに示す。図 11a は、 3 H-ナルトリンドールの野生型レセプターに対する結合を示している (白四角)。図 11b は、 3 H-ナルトリンドールの D128N 変異体に対する結合を示しており (黒丸)、また図 11c は、 3 H-ナルトリンドールの H278N 変異体に対する結合を示している (白丸)。 K_d および B_{max} の値を以下の表 4 に示す。

【0355】

表 4：野生型レセプター、ならびに D128N および H278N 変異 δ オピオイドレセプターに対する 3 H-ナルトリンドール結合の K_d 値および B_{max} 値

【0356】

【表 4】

レセプター	K_d (nM)	B_{max} (pmol/mg タンパク質)
野生型	0.6 ± 0.2	45.4 ± 9
D128 変異体	1.3 ± 0.6	12.2 ± 4
H278N 変異体	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.4

【0357】

これらの値は 3 回の別々の実験により得られた結果の平均値 $\pm$ SEM である。

【0358】

野生型レセプター、D128N変異体、およびH278N変異体への³H-ナルトリンドール結合を阻害する、 δ レセプター選択的アンタゴニストであるナルトリンドールおよびNTB、ならびに非選択的オピオイドアンタゴニストであるジブレノルフィンの効力を図12a、図12b、および図12cに示す。図12aは、 δ 選択的アンタゴニストNTBの存在下における、野生型レセプター（白四角）、D128N（黒丸）、およびH278N（白丸）を発現するCOS-7細胞由来の膜への³H-ナルトリンドール結合を示す。これら3つのレセプター、すなわち野生型、D128N、およびH278Nのすべてが δ 選択的アンタゴニストであるNTBにより阻害された。図12bは、 δ 選択的アンタゴニストDPDPEの存在下における、野生型レセプター（白四角）、D128N（黒丸）、およびH278N（白丸）を発現するCOS-7細胞由来の膜への³H-ナルトリンドール結合を示す。これら3つのレセプター、すなわち野生型、D128N、およびH278Nのすべてが δ 選択的アンタゴニストであるDPDPEにより阻害された。図12cは、非選択的アゴニストであるレボルファノールの存在下における、野生型レセプター（白四角）、D128N（黒丸）、およびH278N（白丸）を発現するCOS-7細胞由来の膜への³H-ナルトリンドール結合を示す。これら3つのレセプター、すなわち野生型、D128N、およびH278Nのすべてが非選択的アゴニストであるレボルファノールにより阻害された。これらの実験により得られた K_i 値を表5および表6に示す。

表5：野生型レセプターおよび変異 δ オピオイドレセプターに対するアンタゴニスト結合の効力

【0359】

【表5】

薬剤	野生型	D128N 変異体 (K_i 値 nM)	H278N 変異体
ナルトリンドール	1.4	5.6	0.5
NTB	0.04	0.07	0.03
ジブレノルフィン	5.0	16	1.4

【0360】

これらの値は、各薬剤に対して少なくとも3回別々に測定を行って得られた値の平均値である。各薬剤に対するSEMは、平均値の15%未満である。

【0361】

これに対して、D128N変異レセプターへの³H-ナルトリンドール結合を阻害する、ペプチド（DPDPE、DSLET、およびD-Ala² デルトルフィン I I）および非ペプチド（SIOM）の δ レセプター選択的アゴニストおよび非選択的オピオイドアゴニストである、エトルフィン、レボルファノール、 β -エンドルフィン、およびブレマゾシンの効力は、野生型レセプターへの結合の場合に比べて低かった（表6）。DPDPE、DSLET、および β -エンドルフィンの効力は、野生型レセプターに比べてD128N変異体への結合において100倍以上低かった。

表6：野生型レセプターおよび変異 δ オピオイドレセプターに対して結合するアゴニストの効力

【0362】

【表 6】

薬 剤	野生型	D128N 変異体 (K_1 値 nM)	H278N 変異体
<u>δ 選択的</u>			
DPDPE	116	39181	15
DSLET	49	15000	0.5
デレトルフィン	32	1938	4.0
II— SIOM	46	1216	1.8
<u>非選択的</u>			
エタルフィン	73	2323	0.3
レボルファンール	187	4378	2.8
ブレマゾシン	58	2694	1.7
β— エンドルフィン	26	15806	8.1

10

20

【0363】

K_1 値は、少なくとも3回別々に行われた測定により得られた値の平均値である。各薬剤について、SEMは平均値の10%未満である。

【0364】

D128N変異レセプターのアゴニストに対する親和性の低下は、このレセプターのGタンパク質からの脱カップリングによるものではなかった。なぜなら、このD128N変異レセプターは、フォルスコリン刺激によるcAMPの形成のアゴニストによる阻害、すなわちこのレセプターをGタンパク質にカップリングすることを必要とする応答を仲介したからである。D128N変異体を発現するCOS-7細胞においては、δアゴニストであるDSLETは、野生型レセプターあるいはH278Nレセプターを発現する細胞における場合と同じくらいフォルスコリン刺激によるcAMPの形成を最大限に阻害した。しかしながら、D128N変異体を発現するCOS-7細胞においてフォルスコリン刺激によるcAMPの形成を阻害するDSLETおよびブレマゾシンの効力は、野生型レセプターを発現する細胞における効力を下回った（表7）。図13は、野生型レセプターおよび変異δオピオイドレセプターを発現するCOS-7細胞において、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積がδアゴニストDSLETにより阻害されることを示す。cAMP蓄積を野生型（白棒）、D128N変異体（黒棒）、およびH278N変異体（斜線棒）を発現するCOS-7細胞において測定した。基底レベルおよび1μMのDSLET (DSLET)または1μMのナルトリンドールを含む1μMのDSLET (DSLET+ナルトリンドール)が存在する場合またはしない場合（フォルスコリン）の10μMのフォルスコリンにより刺激されたレベルを評価した。

30

40

表7：野生型レセプターあるいは変異δオピオイドレセプターを発現するCOS-7細胞においてフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を阻害するアゴニストの効力

【0365】

【表 7】

薬 剤	野生型	D-128N 変異体 (EC ₅₀ 値 nM)	H278N 変異体
ブレマゾシン	7.4	80	1.5
DSLET	1.5	30	3.8

【0366】

これらの値は、3つの別々の実験により得られた値の平均値であり、ここでSEMは平均値の20%未満であった。

10

【0367】

これらの結果は、アゴニストに対するD128N変異体の親和性の低下を示すリガンド結合研究の結果と一致する。したがって、アゴニストに対してD128N変異体レセプターの親和性が低下したのは、Gタンパク質の脱カップリングに帰結するコンホメーションの大幅な変化によるものであったのではなく、アゴニストが δ オピオイドレセプターに対して結合される際にアスパラギン酸128が果たす必須の役割によるものである。

【0368】

H278N変異レセプターのアゴニストに対する親和性は、野生型 δ オピオイドレセプターの場合よりも大きかった（表6）。これに対して、H278N変異体および野生型レセプターに対して結合するアンタゴニストの効力は比較的近似したものであった（表5）。野生型 δ レセプターと同様にH278N変異体もまた機能的に活性であった。なぜなら、このレセプターを発現する細胞においては、 δ アゴニストがフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を阻害したからである（表7）。

20

【0369】

薬理学的研究により、効力を有するすべてのオピオイドアゴニストが疎水性芳香族基に近接した位置にカチオン窒素を含有することが示されている（Gillmanら, 1990; Simon, 1991）。正に荷電されたアミノ基をオピオイドレセプターにおいて負に荷電された残基と会合させることが提案されており、この静電的相互作用がオピオイドのレセプターへの結合の特異性および高親和性にとって必須であると考えられている。マウス δ オピオイドレセプターにおける2つのアスパラギン酸はアゴニスト結合に影響を及ぼし、かつオピオイドアゴニストのカチオン窒素に対して対イオンを供給し得るものである。前述したように、 δ レセプターの第2貫膜に及ぶ領域におけるアスパラギン酸95は、選択的アゴニストを δ レセプターに対して高い親和性で結合するのに必要であった。本願明細書に示しているように、アスパラギン酸128は、すべてのオピオイドアゴニストを δ レセプターに対して高い親和性で結合するのに必須である。

30

【0370】

リガンド結合においてアスパラギン酸95およびアスパラギン酸128が別々に果たす役割により、選択的アゴニストと非選択的アゴニストとは、 δ オピオイドレセプターに対して異なる形態で結合されることが示唆される。アデニルシクラーゼおよびGタンパク質に対する機能的カップリングを維持しながら、D128N変異体がアゴニストに対する親和性を低下させる機構は、レセプターからアゴニストが解離する速度が、アゴニストが会合する速度を低下させることなしに、選択的に増大することによるものと考えられる。これにより、結合の研究において検出されたように、変異レセプターと相互作用するアゴニストの効力が低下する一方で、このレセプターを介してcAMPの蓄積を阻害するアゴニストの能力が維持される理由が説明され得る。なぜなら機能的応答は、結合アッセイの場合に比べて、アゴニストが解離する速度に依存する割合が低いからである。さらに、 δ オピオイドレセプターにおけるアスパラギン酸128がアゴニスト結合を安定化させる対イオンとして機能するのならば、このアスパラギン酸への変異に引き続いて発生するように、この残基の電

40

50

荷を除去することによって、アゴニスト結合の脱安定化とアゴニストの解離速度の増大が予想され得る。D95N変異 δ レセプターの選択的アゴニストに対する親和性の低下を説明するために同様の提案がなされている（Kong, 1993）。 ^3H -DPDPEおよび ^{125}I - β -エンドルフィンはいずれも、このD128N変異体に対して特異的に結合し得なかったが、これらは野生型 δ レセプターに対しては有効かつ特異的に結合する（データは特に示さない）。このことは、D128N変異体に対する ^3H -ナルトリンドール結合を阻害する効力が大幅に低下する結果と符合する。

【0371】

δ レセプターにおける残基95または128におけるアスパラギン酸の変異は、アンタゴニスト結合に対して明らかな影響を及ぼしたわけではない。このことにより、オピオイドアンタゴニストのカチオン窒素がリガンド結合にとって必須ではないか、あるいは、静電的相互作用に対して負の電荷を供給するレセプターにおけるアミノ酸残基がレセプターの他の場所に存在しているかが暗示される。 δ レセプターにおいてアスパラギン酸128がアンタゴニスト結合に対して果たす必須ではない役割は、 β -アドレナリン性レセプターについて得られた結果とは対照的である。Straderらは、 β_2 -アドレナリン性レセプターの第3貫膜に及ぶ領域におけるアスパラギン酸113のアスパラギンへの変異が発生した結果、アンタゴニストおよびアゴニストに対するレセプターの親和性が低下したことを報告した（Straderら, 1987）。Straderらは、この残基がカテコールアミンアゴニストおよびアンタゴニストに対して β -アドレナリン性レセプターのリガンド結合ドメインの必須の認識部位であることを提案している。 δ および β -アドレナリン性レセプターにおいて保持されていたアスパラギン酸の同様の変異に対して根本的に異なる結果が得られたということは、リガンドがこれらのレセプターに対して異なる形態で結合していることを示している。

【0372】

ニューロキニンレセプターについての最近の部位特異的変異誘発の研究により、親和性の高いアンタゴニストの結合を得るためには第5貫膜に及ぶ領域内のヒスチジン残基が必要であることが示されている（Fongら, 1993）。これらの研究の結果によれば、ヒスチジン残基の芳香族環構造がニューロキニンアンタゴニストの芳香族環構造と相互作用する。芳香族環はすべてのオピオイドリガンド内に存在し、また、オピオイドがそれらのレセプターに高い親和性で結合するためには必要であると提起されているため（Gilmanら, 1990; Simon, 1991）、278位のヒスチジン残基をアスパラギンに変異させた。なぜなら、これが、ニューロキニンレセプターに比較される δ レセプターの類似の領域内における唯一のヒスチジンであるからである。この変異体レセプターの発現レベルは、野生型またはD128N変異体のいずれかより低かった。しかし、レセプターのアゴニストに対する親和性は、野生型の δ レセプターのこれら化合物に対する親和性より高かった。アンタゴニストは同様の効能で両方のレセプターに結合した。一方、H278N変異体は、野生型のレセプターより僅かに高い親和性で、 ^3H -ナルトリンドールおよび他のオピオイドアンタゴニストと結合した。ヒスチジンをアスパラギンに置換してもアゴニストおよびアンタゴニストに対するレセプターの親和性が減少しなかったという知見は、この残基がリガンドの δ オピオイドレセプターへの結合にとって必須ではないことを示している。アゴニストに対する変異体レセプターの親和性が向上したことは、その変異によって誘発されるレセプター内の微妙な配座上の変化によるものであり得るか、またはヒスチジンが通常はアゴニストの結合を妨げていることを示し得る。

【0373】

H278N変異体のアゴニストに対する親和性が選択的に大きく増加すると、D128N変異体のアゴニストに対する親和性が選択的に失われるということは、アゴニストおよびアンタゴニストが、おそらくは別々のリガンド結合ドメインと相互作用することによって、 δ レセプターに別々に結合するという、D95N変異体 δ レセプターにおける我々（Kongら, 1993）の以前得られた知見と一致する。さらに、アスパラギン酸95および128ならびにヒスチジン278のアスパラギンへの変異によって、 δ オピオイドレセプターへのアンタゴニストの

結合が減少しなかったという知見は、 β -アドレナリン性レセプターの (Straderら、1987) およびタキキニンレセプター (Fongら、1993) の同様の変異により得られる結果とは異なり、オピオイドアンタゴニストはこれらの他の神経伝達物質レセプターへのアンタゴニストの結合とは異なる方法で δ レセプターと相互作用することを示唆している。

【0374】

実施例9： MOP2の分析

MOP2は、古典的オピオイドレセプターの薬理学的特性とは異なる薬理学的特性を有するマウスレセプターである。MOP2は、例外的なリガンド結合特性を有するオピオイドレセプターであると考えられる。アンタゴニストである3H-ナロキソン、³H-ナルトリンドール、および³H-ジプレノルフィンはこのレセプター (MOP2) に特異的に結合せず、また、アゴニストである³H-U-69,593、³H-DPDE、³H-DAGO、³H-EKC、^{1,2,5}I- β -エンドルフィン、および σ リガンド³H-ペンタゾシンもまたこのレセプターに特異的に結合しなかった。MOP2 (配列番号6) の分析については、cDNA (配列番号5) をCOS-7細胞内で発現させ、まず、発現したタンパク質をオピオイド放射性リガンドの結合について試験した。

10

【0375】

潜在的な機能活性を試験するために、多数のオピオイドリガンドについて、MOP2を発現するCOS-7細胞内にフォルスコリンの刺激によりcAMPが蓄積されるのを阻害する能力を試験した。2つのオピオイド、エトルフィンおよびロフェンタニルは、1 μ Mの濃度で、フォルスコリン刺激によるcAMPの形成を、各々、63 $\pm$ 11%および52 $\pm$ 7% (N=5) だけ阻害した。これらの化合物は、ベクターのみでトランスフェクトされた細胞内において刺激によるcAMPの蓄積を阻害しなかった。これら2つのオピオイドの効果は、最大効果の半分が100 nMで生じる濃度依存型であった。100 nMの濃度では、これら2つのオピオイドの効果は、オピオイドアンタゴニストナロキソナジン (1 μ M) により完全にブロックされ、アンタゴニストナロキソンおよびB-FNAによって一部ブロックされた。

20

【0376】

さらに、MOP2を発現するCOS-7を、阻害Gタンパク質形態のアデニリルシクラーゼをカップリングしていない百日咳毒素で前処理すると、エトルフィンおよびロフェンタニルによるcAMP形成の阻害が完全にブロックされた。1つの実験では、ロフェンタニルに加えて、アナログのフェンタニルがフォルスコリン刺激によるcAMP形成を40%だけ減少させた。これに対して、1 μ Mの濃度のモルフィン、メサドン、コデイン、EKC、レボルファノール、ブレマゾシン、および β -エンドルフィンは、MOP2を発現するCOS-7細胞内でのフォルスコリン刺激によるcAMP形成に何の影響も与えなかった。

30

【0377】

MOP2がクローン化されたオピオイドレセプターとアミノ酸配列が非常に類似していること、およびこの異常なレセプターがナロキソナジンおよびナロキシンの感受性を有するような方法でエトルフィンおよびロフェンタニルのcAMP形成の阻害を仲介する能力を有することは、このレセプターが新規のオピオイドレセプターであり得ることを示唆している。このレセプターの新規性は、多くのオピオイドアゴニストがこのレセプターと相互作用することができないことによってさらに示唆される。

40

【0378】

エトルフィンは最も効能のある利用可能な鎮痛薬の1つである。事実、その呼吸低下を誘発する能力およびその高い濫用性が、エトルフィンがスケジュール1の薬剤であり、臨床において用いられない理由である。ロフェンタニルのようなフェンタニル誘導体は濫用性が極めて高い。作製されたフェンタニルの誘導体の中では、ロフェンタニルが最も効能があり効果的な鎮痛薬である。濫用性ならびに鎮痛の効能および効力が極めて高い薬剤がMOP2と選択的に相互作用するという知見は、このレセプターが麻薬常習癖の治療に用いられ得る薬剤の開発にとって重要な位置にあり得ることを示唆している。

【0379】

実施例10： κ レセプターの物理的に離れた細胞外ドメインがアゴニストおよびアンタ

50

ゴニストの結合にとって必要であるという知見により、レセプター特異的アゴニストのアッセイが可能となる

クローン化された κ および δ レセプターは独特の薬理学的プロフィールを示す。しかし、 κ および δ レセプターのアミノ酸配列は約60%が同一である。最も多様性のレセプターの領域は NH_2 および COOH 末端ならびに細胞外ループである。発明者らは、これらの細胞外ドメインはリガンドの識別および／または結合に1つの役割を有するという仮説をたてた。この仮説を試験するために、発明者らは、 NH_2 末端および第2細胞外ループが交換された κ および δ のキメラレセプターを構築した。これらの結果についてはスクリーニングアッセイについてのセクションで詳細に説明している。 κ レセプターの NH_2 末端および δ レセプターの残りを含むキメラ (κ/δ) の研究により、 κ レセプターへのアゴニストおよびアンタゴニストの結合は異なるドメインで行われることが明らかとなった。このキメラは κ 選択的アンタゴニストには結合したが κ 選択的アゴニストには結合しなかった。

10

【0380】

これらの薬理学的および機能的な結果により、 κ レセプターの NH_2 末端のためにアンタゴニストの識別および結合が起こり、一方、選択的アゴニストが第2細胞外ループに結合することが示唆される。U50,488、およびU69,593およびスピラドリンのようなその誘導体、ならびに κ レセプターでの内因性伝達物質、ダイノルフィンおよびそのアナログ、ダイノルフィン(1-8)、ダイノルフィン(1-17)のような選択的アゴニストは、キメラに結合しなかった。これらの κ 選択的アゴニストは δ レセプターの第2細胞外ループには結合し得なかった。 κ/δ 2eループキメラの κ 選択的アゴニストがフォルスコリン刺激によるcAMP蓄積を阻害する能力は失われた。

20

【0381】

これに対して、エチルケトシクラゾシン(EKC)、ブレマゾシン、およびレボルファノールのようなより低い選択性のアゴニストは同様の親和性で κ/δ 2eループキメラおよび野生型のレセプターに結合した。さらに、これらの非選択的アゴニストは、キメラレセプターを発現するCOS-7細胞内のcAMP形成を同様の程度で阻害した。

【0382】

κ/δ 2eループキメラに結合するアンタゴニストと野生型の κ レセプターとは類似しており、これにより、キメラは野生型と同様のレベルで発現されること、および第2細胞外ループはアンタゴニスト結合にとっては必要とされないことが示された。

30

【0383】

これらの結果により、 κ 選択的アゴニストおよびアンタゴニストは κ レセプターの物理的に離れた領域に結合することが明瞭に示される。 κ レセプターの第2細胞外ループは κ 選択的アゴニストのための結合ドメインを含む。EKCのような非選択的アゴニストは κ レセプターの他の領域に結合する。このような知見は、オピオイドレセプターのアゴニスト結合ドメインの最初の同定であり、また、選択的および非選択的アゴニストが同じレセプターの異なる領域に結合し得、アゴニズムを引き起こすことの最初の実証である。

【0384】

このような知見は重要な薬理学的な示唆を有する。EKCのような非選択的アゴニストは不快および精神病を誘発するが、ダイノルフィンおよび κ レセプターでの内因性伝達物質のような選択的アゴニストは誘導しないことが知られている。従って、これらの知見により、特異的であるダイノルフィンレセプターのアゴニストの開発およびスクリーニングを可能する、治療に有用であって、かつ利用可能な非特異的 κ アゴニストの副作用を回避し得る方法の基礎が提供される。

40

【0385】

候補アゴニスト物質をスクリーニングする方法および条件については、上記のスクリーニングアッセイについてのセクションで詳細に述べている。 κ 特異的および非特異的オピオイドレセプターアゴニストの異なる結合部位に関する本出願の教示が与えられれば、当業者であれば、これらの方法が κ レセプター特異的アゴニストのためのスクリーニングに用いられ得ることは理解され得る。

50

【0386】

スクリーニングアッセイは、オピオイドレセプターポリペプチドを得る工程、候補特異的κオピオイドレセプターアゴニストを得る工程、および候補物質がオピオイドレセプターと相互作用する能力をアッセイする工程を包含する。候補物質がκレセプターと相互作用する能力を、本出願の発明の詳細な説明のセクションで詳細に述べた方法を含むがこれらに限定されない多くの方法でアッセイし得ることは、当業者であれば認識し得る。

【0387】

スクリーニングアッセイで用いられるオピオイドレセプターポリペプチドは、κオピオイドレセプターポリペプチドの少なくとも一部を含むべきである。より詳細には、スクリーニングポリペプチドは、κレセプター特異的アゴニストのための結合部位を有することが示されているκオピオイドレセプターポリペプチドの第2細胞外ループの一部を含むべきである。κオピオイドレセプターの第2細胞外ループの負に荷電された領域を含むオピオイドレセプターポリペプチドが、これらのスクリーニング方法で用いるのに特に好適であると予想される。なぜなら、κレセプター特異的アゴニスト-κレセプター結合は、少なくとも部分的には、第2細胞外ループの負に荷電された部分とアゴニストの正に荷電された部分との間の電荷相互作用に基づくと考えられるからである。

【0388】

キメラオピオイドレセプターポリペプチドは、上記のアッセイに使用可能である。実際、これらのアッセイの解明に関する研究は、キメラレセプターを用いて行われた。ひとつのクラスとしては、オピオイドレセプターは、細胞外ループ、貫膜領域、細胞内ループ、および細胞外アミノ末端を包含している。本発明の発明者は、レセプターの細胞外部分、すなわち、第2および第3細胞外ループおよびアミノ末端が、オピオイドレセプターリガンドの結合部位となることを示している。例えば、κレセプタについては、κ特異的アゴニストは第2細胞外ループに結合し、アンタゴニストはアミノ末端に結合することが示されている。本発明の発明者は、非特異的アゴニストはκレセプターの第3細胞外ループに結合すると強く考えており、このことを証明すべく研究が進められている。この知見があれば、特異的スクリーニング手段として非常に有効なキメラを設計することが可能である。

【0389】

好ましい実施態様においては、キメラレセプターはκオピオイドレセプターの第2細胞外ループを含んでいる。κ第2細胞外ループは、κオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基167-228の間に位置している。本発明の発明者の研究の結果、κレセプターの残基1-78はアンタゴニストと特異的に結合することが示された。κレセプターの残基167-228は、選択的アゴニストと結合する。エチルケチンシクラゾシン(etylketIn cyclazocIne)などの非選択的アゴニストは、これらの領域のいずれとも結合しない。独特のアミノ酸配列を有するκレセプターの唯一の細胞外ドメインは、第3細胞外ループ(残基271-318)である。これは、非選択的アゴニストと結合し易い領域である。δレセプターの第3細胞外ループでなるキメラκレセプターは、選択的κアゴニストのみに結合し、非選択的アゴニストには結合しないと考えられる(キメラはκ1-270/δ258-300/K319-380である)。このキメラは、選択的κアゴニストをスクリーニングするために用いられ得た。さらに、キメラδ1-69/κ79-270/δ258-306/K319-380は、選択的アゴニストのみと結合すると考えられる。κ特異的アゴニストをスクリーニングしたい場合は、κレセプターの第2細胞外ループを有するキメラを用いるべきである。さらに、κレセプターの第2細胞外ループを有するが第3細胞外ループを有していないキメラは、非特異的アゴニストを検出することなくκ特異的アゴニストを検出するという利点を有し得た。もちろん、第2細胞外ループ以外のκレセプターのすべての領域を有するキメラは、κ特異的アゴニストについてのスクリーニングを行うように設計されたアッセイにおけるネガティブコントロールとして用いられ得る。他の好ましいキメラは、κレセプターの第2細胞外ループを有するが、第3細胞外ループを有さない。第3細胞外ループは推定非特異的アゴニスト結合領域を含有するので、この領域を有さないキメラは非特異的アゴニスト活

10

20

30

40

50

性を検出できないと考えられる。したがって、このようなキメラについて見られるいかなるアゴニズムも、第2細胞外ループに結合するκ特異的アゴニストの結果として生じるものでなければならない。第2細胞外ループを有さないキメラは、ネガティブコントロールとして有効である。

【0390】

本明細書の教示が与えられれば、当業者は、すべての形態のオピオイドレセプターアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニングを可能にするキメラおよび制御されたスクリーニング戦略を考案することができる。本発明の発明者はそのようなキメラを多数構築しており、より多くのキメラの構築過程にある。標準の遺伝子操作およびオピオイドレセプターのリガンド結合領域に関して本発明の発明者が得た知見を用いて、ほとんど無限の多くのキメラを作製することが可能である。そのようなキメラすべて、それらをコードするポリヌクレオチド、およびそれらをアッセイにおいて用いる方法が、本発明の範囲内と考えられる。スクリーニングアッセイにおいて有用なキメラオピオイドレセプターの特定の実施例は、 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ 、 $\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ 、 $\kappa_{1-74} / \delta_{65-372}$ あるいは $\delta_{1-64} / \kappa_{75-380}$ である。

【0391】

短縮型オピオイドレセプターポリペプチドは、上記の候補スクリーニングアッセイにおいて有用である。κレセプター特異的アゴニスト結合を示す短いポリペプチドは、長いポリペプチドに対してある利点を有する。好ましくは、短縮型オピオイドレセプターポリペプチドは、第2細胞外ループの少なくともアゴニスト結合部を含む短縮型κオピオイドレセプターポリペプチドである。例えば、κオピオイドレセプターポリペプチドのアミノ酸残基79から380を含む短縮型オピオイドレセプターポリペプチドは、この点において有効であると考えられる。レセプターの第2細胞外ループを含む短縮型κオピオイドレセプターは、これらのアッセイにおいて有用である。例えば、アミノ酸残基167から228を含む短縮型κレセプターは、本発明において有用である。

【0392】

潜在的なκレセプター特異的アゴニストは、上記候補が正の電荷を有しているかを決定することによって上記のアッセイでテストされる前に、前もってスクリーニングされ得る。電荷の関係は、κレセプター特異的アゴニスト結合機構に影響を与え、負に荷電された結合領域は、正に荷電されたアゴニストに結合する。もちろん、有効なアゴニストを正に荷電させないことも可能であるが、電荷を評価することによって、テストされるアゴニストの範囲を狭くするためのある機構が与えられる。

【0393】

本発明の教示が与えられれば、当業者は本発明を実施することが可能になるであろう。

【0394】

特定のκアゴニストの開発は、κレセプターの第2細胞外ループの独特な性質の知見によって補助される。κレセプターの第2細胞外ループは、7つのアスパラギン酸およびグルタミン酸で強く負に荷電されている。反対に、δおよびμレセプターは、対応するループ中に負に荷電された残基を1つだけ有している。ダイノルフィンが正に荷電され、κレセプターの第2細胞外ループが多数の負電荷を有しているので、本発明の発明者は、負に荷電された残基を中性の保存された残基へ変異させ、このレセプターへのダイノルフィンアナログの選択的結合に荷電がどの程度重要であるかを決定している。この作業は進行過程にあり、この結果は、κ特異的アゴニストを解明しようとしているものにさらに指針を与えることになるだろう。

実施例11： クローニングされたκおよびμオピオイドレセプターは、マウスAtT-20細胞で発現されると、内向き整流カリウム電流 (Inward rectifier potassium current) とカップリングする

κ、δ、およびμオピオイドレセプターのクローニングによって、これらのレセプターの活性の細胞機構の研究に新しい技術を用いることが可能になる。内因性オピオイドレセプターに焦点を当てた実験によって、イオンコンダクタンスの調節は重要な機構であり、

この機構によってこれらのレセプターは細胞における事象を仲介していることが示された。本発明者は、PC-12細胞において安定に発現されたクローニングされたκオピオイドレセプターがN型カルシウム電流を調整することができることを観察した。オピオイドレセプターイオンチャンネルカップリングをさらに検討するために、本発明者はκおよびμレセプターを安定に発現するAtT-20細胞株を生じさせた。全細胞パッチクランプ記録は、κおよびμレセプターは両方とも、この細胞株において以前記載された内向き整流カリウム電流の活性化を調整することができることを示している。κおよびμによって仲介される活性の両者が選択的アンタゴニストによってブロックされるので、これらの効果は選択的である。同一細胞株において別々に発現されたレセプターを両方有することによって、本発明者が、Gタンパク質のカップリングおよび脱感作を含む、これら2つのレセプターの機能的特性を比較することが可能になる。 10

【0395】

実施例12： δオピオイドレセプターの第3細胞内ループはアデニルシクラーゼへのカップリングに関連する

アデニルシクラーゼへの結合における第3細胞内ループの役割を調査するために、δオピオイドレセプターとソマトスタチンレセプターSSTR1の間のキメラレセプターを生成した。SSTR1は、アデニルシクラーゼに結合しないソマトスタチンレセプターである。キメラレセプターが生成し、ここではSSTR1の第3細胞内ループがδレセプターの第3細胞内ループと置き換えられ、δレセプターの第3細胞内ループがSSTR1の第3細胞内ループと置き換えられている。野生型SSTR1は、cAMP蓄積アッセイにおいてアデニルシクラーゼへの結合を示さなかったが、SSTR1δキメラレセプターは、アゴニストに応答し、フォルスコリン刺激によるcAMPの増加の阻害を仲介することが可能であった。アゴニストによるcAMP阻害は投与量に依存していた。逆に、野生型δレセプターはアデニルシクラーゼ活性の阻害を仲介したが、δSSTR1キメラは、アゴニストによるcAMPの蓄積を阻害する能力が減少することを証明した。これらの結果は、δレセプターの第3細胞内ループは、Gタンパク質へのレセプターのカップリングに関係があることを示している。 20

【0396】

実施例13： δオピオイドレセプターに対するペプチド特異的抗血清の開発

ペプチド特異的ポリクローナル抗血清を、クローニングしたδオピオイドレセプターのC末端に対して開発した。この抗血清を生じさせるために、クローニングされたδオピオイドレセプターのC末端におけるアミノ酸の13個の長さの残基に対応する独特のペプチドAla-Thr-Thr-Arg-Glu-Arg-Val-Thr-Ala-Cys-Thr-Pro-Ser（配列番号：46）をウサギに注射した。次いで、抗血清を部分的に精製し、δレセプターを特異的に認識する能力についてテストした。抗血清は、δレセプターを安定に発現するCHO細胞中でおおよそ70kDaのタンパク質を認識する。この70kDaのタンパク質を³⁵S-メチオニンで標識し、ペプチド特異的抗血清によって免疫沈降させることが可能である。70kDaのタンパク質の免疫沈降は、それに対して抗血清が生じる過剰のペプチドによって特異的にブロックされ得る。このタンパク質のサイズは、クローニングされたδレセプターについて、¹²⁵I-β-エンドルフィンを用いて行われた架橋試験の結果と一致している。ペプチド特異的抗血清は、特異的¹²⁵I-β-エンドルフィン結合活性を、δレセプターを安定に発現するCHO細胞から免疫沈降させることが可能であった。¹²⁵I-β-エンドルフィンの免疫沈降物への結合は、δ選択的アゴニストDPDPEによって阻害された。免疫前の血清は結合活性を免疫沈降させることができず、抗血清による結合活性の免疫沈降を過剰のペプチドによってブロックした。抗血清は、免疫ブロット法によりδレセプターを認識することができず、このことは、この抗血清が認識するエピトープが変性されたか、あるいは、抗体に対して認識不可能にされていることを示唆している。この抗血清は、δレセプターの物理的特性およびδレセプターが受け得る翻訳後改変の調査に有効である。 30 40

【0397】

実施例14： δ、κ、およびμオピオイドレセプターにおける保存残基の変異誘発

オピオイドリガンドのこれらのレセプターへの結合における、推定第2および第3貫膜 50

に及ぶドメイン (TM2およびTM3) 中のアスパラギン酸 (D) 残基の役割を調査するために、本発明者は、TM2中のアスパラギン酸95、105および114ならびにTM3中のアスパラギン酸128、138および147を、 δ 、 κ 、および μ のそれぞれについてアスパラギン (N) に変異させた。本発明者が δ TM2変異体については既に示しているように (Kong, 1993, J. Biol. Chem.)、各レセプターのTM2におけるDの変異は、選択的アゴニストの結合に著しい効果をもたらし、それぞれのレセプターについてこれらの化合物の親和性が一般的に100分の1未満に低減される。さらに、この変異によって、アゴニスト結合の Na^+ 調節が終了した。これらのレセプターのTM3におけるDの変異によって、これらのレセプターに結合する選択的アゴニストも著しく減少し、非選択的薬剤の親和性も低下した。興味深いことには、TM6に保存されているヒスチジン残基278、291、および297の変異によって、レセプターに分岐効果が与えられた。 δ TM6変異体について効果が観察されないのに対して、変異 μ レセプターについて幾つかのペプチドアゴニストの親和性が低下していることが観察された。CTOPおよびSMS201-995のような、 μ 変異体に対して低下した親和性を示す、 μ レセプターに対するペプチドアンタゴニストという顕著な例外はあるが、これらの変異はいずれもアンタゴニストの結合に対して際だった効果を有さない。それと共に、これらの研究によって、クローニングされたオピオイドレセプターの各々へのオピオイドアンタゴニストの結合において重要な残基が同定され、アゴニストおよびアンタゴニストがこれらのレセプターに識別可能に結合することが示される。

実施例15: クローン化ヒト μ オピオイドレセプターの特徴付け

オピオイドをヒトにおいて臨床に用いると、呼吸低下、縮腫、胃腸運動の低下、鎮静、吐気、および嘔吐を含む望ましくない副作用が種々存在することによってその効果が弱められる (JaffeおよびMartin, 1990)。オピオイド投与に関して生じる他の不利な点は、耐性、依存性および濫用の可能性である。オピオイドの効果は、種々のレセプターを介して仲介されるので、あるレセプター (サブ) タイプは治療上の効果を仲介し得るが、異なるレセプター (サブ) タイプは望ましくない副作用を促進させ得る (Pasternack, 1993)。従って、治療に関係のあるレセプターについてより多くの選択的因子を用いると、望ましくない副作用は最小化あるいは除去され得る。モルヒネ、メサドン、コデイン、およびフェンタニルを含む、治療上用いられるオピオイドの大半が、 μ レセプターと選択的に相互作用する。このことは、最近クローニングされたラット μ レセプターについての研究において直接示された (Raynorら, 1994)。ヒトにおけるこれらの化合物の活動の機構をより深く洞察するために、本発明者は、クローニングされたヒト μ オピオイドレセプターの薬理学的特性およびヒトの脳における μ レセプターをコードするメッセージの分配を調査した。

【0398】

材料および方法

略称:

β -FNA β -フナルトレキシアミン

CTOP

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂

DAMGO [D-Ala², MePhe⁴, Gly^{-o15}]エンケファリン

GTPγS グアノシン-5'-0-(3-チオトリホスフェート)

IBMX イソブチルメチルキサンチン

PTX 百日咳毒素

クローニング: ヒト μ オピオイドレセプターをクローニングするために、cDNAライブラリーをヒト尾状核mRNAから構築し、ラット μ オピオイドレセプターcDNA (Chenら, 1993) を用いて、緊縮性を減少させた状態でスクリーニングした。1個のcDNAの完全な配列分析は、1200 bpのオープンリーディングフレームを呈示し、400個のアミノ酸のタンパク質が想定された。レセプター発現のために、レセプターのオープンリーディングフレームを含むcDNAを、哺乳類発現ベクターpcDNA3 (Invitrogen) 中のヒトサイトメガロウイルスプロモーターの下流にクローニングした。ヒト μ オピオイドレセプターcDNAの単離に関する

詳細は、他で報告する（Mestekら、提出済）。cDNA配列はGenBank（受託番号第L29301号）に提出済みである。

【0399】

放射性リガンド結合の研究：先に記載したように（Raynorら、1994）トランスフェクションから48時間後に、ヒト μ レセプターを一時的に発現するCOS-7細胞からの膜を用いて、レセプター結合アッセイを行った。放射性リガンド結合アッセイのために、1 mMエチレンジグリコールビス（ γ -アミノエチルエーテル）-N,N'-四酢酸、5 mM $MgCl_2$ 、10 mg/mlロイペプチン、10 mg/mlペプスタチン、200 mg/mlバシトラシン、および0.5 mg/mlアプロチニンを含む50 mMトリス-HCl(pH 7.8)（緩衝液1）中で細胞を採集し、4℃で7分間、24,000 $\times$ gで遠心分離した。Polytron (Brinkmann、設定2.5、30秒)を用いて緩衝液1 10
中でペレットをホモジナイズした。その後、ホモジェネートを、次いで、4℃で20分間、48,000 $\times$ gで遠心分離した。緩衝液1中でペレットをホモジナイズし、この膜調製物を用いて、放射性リガンド結合の研究を行った。細胞膜（10-20 mgタンパク質）を、競合する因子の存在下または不在下において25℃で40分間、最終容量200 mL中で、 μ アゴニスト [3H]DAMGO(2 nM、比放射能55 Ci/mmol)またはアンタゴニスト[3H]ナロキソン（4 nM、比放射能55 Ci/mmol）（NEN/Dupont、Wilmington、DE）とインキュベートした。飽和実験においては、細胞膜を、[3H]DAMGOの濃度を増加させながら(0.25-15 nM)インキュベートした。非特異的結合を、1 mMナロキシンの存在下において残存結合している放射活性として定義した。氷冷した50 mMトリス-HCl緩衝液（pH 7.8）を添加し、0.5%ポリエチレンイミン/0.1% BSAで少なくとも1時間予備処理したWhatman GF/Bガラスファイバーフィルタ 20
ーで急速濾過を行うことにより、結合反応を終了させた。その後、12 mLの氷冷したトリス-HCl緩衝液でフィルターを洗浄し、結合した放射活性をシンチレーションカウンタにおいて計数した。放射性リガンド結合研究からのデータを用いて、阻止曲線を生成した。数学的モデリングプログラムFITCOMP(PerryおよびMcGonigle、1988)により行った曲線適合からIC50値を得、National Institutes of Health後援のPROPHETシステムにより入手可能なFITSAT(McGonigleら、1988)を用いて飽和データを分析した。Cheng-Prusoff式(ChengおよびPrusoff、1973年)を用いてIC50値より、阻害結合定数(K_I)を計算した。

【0400】

膜へのアゴニストの次の結合に対する、ヒト μ レセプターを発現する細胞をモルヒネまたは百日咳毒素で予備処理することの影響もまた調べた。放射性リガンド結合研究に先だ 30
って、1 mMモルヒネまたは100 ng/ml百日咳毒素のいずれかのコントロール媒体を用いて、各々4時間または18時間、細胞を処理した。

【0401】

cAMP蓄積の研究：フォルスコリン刺激によるアデニル酸シクラーゼ活性を阻止する化合物の能力を調べる研究を、先に記載のように（Kongら、1993、J. Biol. Chem.）行った。簡潔に言うと、cAMP蓄積の研究に用いた細胞を、12ウェルの培養プレート中で継代培養した。翌日、細胞をトランスフェクトし、続いて48時間にわたってcAMP実験を行った。培養培地をウェルから除去し、0.5 mMイソブチルメチルキサンチン（IBMX）を含む500 mLの新鮮な培地と交換した。37℃で20分間、細胞をインキュベートした。その後、培地を除去し 40
、10 mMフォルスコリンおよび様々な濃度の薬剤の存在下または不在下において、0.5 mM IBMXを含む新鮮な培地と交換した。37℃で30分間、細胞をインキュベートした。その後、培地を除去し、250 mL 1M HCl中でウェル中で細胞を超音波処理し、続いてRIAによるcAMP含有量の測定のために冷凍した。NEN/Dupont(Wilmington、DE)より市場入手可能なアッセイキットを用いてcAMP含有量の分析を行う前に、サンプルを解凍し、cAMP RIA緩衝液中で希釈した。

【0402】

RNAプロット分析：先に記載のように（Kongら、1994、Neuroscience; Delfsら、印刷中）、RNAプロット分析を行った。CLONTECH laboratories (Palo Alto, CA) からヒト脳RNAプロットを得た。各レーンは2 mgのポリA選択mRNAを含んでいた。EcoR V 50

およびXba Iによる消化後に単離された1.6キロベース (kB)フラグメントに対応する、ランダムにプライムされた³²P標識DNA(Pr I me- I t、Stratagene)と、プロットを42℃で24時間ハイブリダイズした。このフラグメントは、ヒトμオピオイドレセプターの全コーディング領域を含む。プロットを、65℃で、2 × SSC/0.5% SDS (0.3 M塩化ナトリウム/0.03 Mクエン酸ナトリウム) 中で20分間、および0.2 × SSC/0.2% SDS中で20分間洗浄した後、シグナルを検出するために5～7日間X線フィルムに露出した。

【0403】

考察

クローン化ヒトμレセプターを薬理的に特徴づけるために、発明者らは、先に記載のように (Yasudaら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6736; Kongら、1993、J. Biol. Chem.; Raynorら、1994)、COS-7細胞中でこのレセプターをコードするcDNAを一時的に発現させた。比較のために、平行実験でラットμレセプターをも発現させた。ヒトμレセプターへの[³H]DAMGOの結合は飽和性であり、親和性が高かった (図14)。飽和実験のスキッチャード分析は、[³H]DAMGOは、1.0 nMのKDおよび232 fmol/mgのB_{max}で、クローン化ヒトμレセプターに結合することを示した。全データは、単一部位分析により最良に適合した。発明者らは以前に、[³H]DAMGOは、0.57 nMのKDおよび444 fmol/mgタンパク質のB_{max} (Raynorら、1994)で、クローン化ラットμレセプターに結合すると報告した。トランスフェクトされていない、またはベクターでトランスフェクトされたCOS-7細胞においては、特異的放射性リガンド結合は検出不能であった。

20

【0404】

クローン化ヒトμオピオイドレセプターの薬理的プロファイルを同定するために、多くのオピオイドリガンドの、このレセプターへの[³H]DAMGOの結合を阻害する能力についてテストした (表8)。

【0405】

【表 8】

表 8

クローン化ヒト μ オピオイドレセプターに対する
リガンドの結合能力 (K_i -nM)

μ レセプター [3 H]DAMGO		
Leu-エンケファリン	6.6(1.2)	10
β -エンドルフィン	0.94(0.06)	
des-Tyr ¹ - β -エンドルフィン	>1000	
(-)ナロキソン	1.4(0.4)	20
(+)ナロキソン	>1000	
(-)ブプレノルフィン	0.51(0.09)	
(+)ブプレノルフィン	>1000	
レボルファノール	1.9(0.6)	
デキストロールファン	>1000	
DAMGO	1.4(0.04)	
モルヒネ	2.0(0.6)	
メサドン	5.6(0.4)	
コデイン	65(13)	
フェンタニル	1.9(0.4)	30
スフェンタニル	0.3(0.08)	
CTOP	3.9(0.4)	
SMS 201-995	12(3)	
エトルフィン	0.18(0.04)	
β -FNA	0.29(0.02)	
ナロルフィン	6.6(1.2)	
($\pm$)ブレマゾシン	1.4(0.3)	
ナルトレキソン	1.5(0.05)	
ジプレノルフィン	0.18(0.04)	

【0406】

これらのリガンドは、ペプチドおよび非ペプチドの両方のアゴニストそしてアンタゴニスト (LutzおよびPfister, 1992; GoldsteinおよびNaidu, 1989; Raynorら, 1994) を含む、先に μ -選択的であると特徴づけられている様々な化合物を含んでいた。予想されたように、これらの化合物のほとんどは、低いnM範囲 (表 8) における K_i 値で、クローン化 μ レセプターに結合した。内因性のオピオイドペプチド Leu-エンケファリンおよび β -エンドルフィンは μ レセプターに強力に結合し、他方、des-Tyr¹- β -エンドルフィンは結合しなかった。結合は、立体選択的であり、(-) ナロキソン、(-) ブプレノルフィン、およびレボルファノールにより阻害されたが、各々の異性体である (+) ナロキソン、(+) ブプレノルフィン、およびデキストロールファンによっては阻害されなかった。 μ -選択的化合物である DAMGO、モルヒネ、メサドン、フェンタニル、およびスフェンタニルは、低いナノモル範囲において親和性を有して結合し、他方、コデインの親和性は多少低かった。 μ -選択的ペプチドアンタゴニスト CTOP および SMS201-995 もまた高い親和性で結合した。テストした他の比較的非選択的な化合物は、エトルフィン、 β -FNA、ナロルフィン、(+) ブレマゾシン、ナルトレキソン、およびジプレノルフィンであり、全て高い親和性で結合した。 δ -選択的アゴニスト DPDPE および D-Ala² デルトルフィン I I そして κ -選択的化合物 U-50,488 および U-69,593 は 1 mM 程度の濃度においてもヒト δ レセプターに結合しなかった。これらの全リガンドの、ヒトおよびラット μ レセプター

に対する親和性の比較は、これらの薬剤の全てではないが大部分が類似の親和性でこれらのレセプターに結合することを示した。モルヒネ、メサドン、およびコデインの親和性は、ラット μ レセプターに対してよりもヒト μ レセプターに対して有意に高かった（表 9）。テストした他の全ての薬剤は、表 9 に例示するように、ヒトおよびラット μ レセプターに対して識別不可能なほどよく似た親和性を示した。

【0407】

【表 9】

表 9

クローン化ヒトおよびラット μ オピオイド
レセプターに対するリガンドの結合能力 (K_i -nM)

10

	[^3H]DAMGO	
	ヒト	ラット
モルヒネ	2.0(0.6)	22(6.8)
メサドン	5.6(0.4)	19(1.4)
コデイン	65(13)	168(4)
フェンタニル	1.9(0.4)	1.3(0.5)
エトルフィン	0.18(0.04)	0.27(0.6)
β -エンドルフィン	0.94(0.06)	1.7(0.4)
(-)ブプレノルフィン	0.51(0.09)	0.42(0.03)

20

【0408】

ヒト μ レセプターとグアニン-ヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質) との会合を調べるために、発明者らは、GTPの加水分解不能なアナログおよび一時的にレセプターを発現する COS-7 細胞の百日咳毒素処理の、レセプターに対する放射標識アゴニストの結合に対する影響を調べた。図 15 に示すように、[^3H]DAMGO 結合アッセイ中における 100 mM GTP γ S の含有が、ヒトおよびラット μ レセプターの特異的標識化を、各々 65 $\pm$ 1.5% および 55 $\pm$ 7% 減少させた。加えて、レセプターを発現する細胞の PTX-予備処理は、ヒトおよびラット μ レセプターの [^3H]DAMGO 標識化を、各々 79 $\pm$ 8% および 42 $\pm$ 5% 実質的に減少させた。これらの結果は、Gタンパク質に対するヒトおよびラット μ レセプターの両方のカップリングと一致する。

30

【0409】

クローン化ラット μ レセプターは、機能的にアデニル酸シクラーゼの阻害とカップリングする (Chen ら、1993)。ヒト μ レセプターもまたアデニル酸シクラーゼとカップリングするか否かを決定するために、レセプターを発現する細胞中の cAMP 蓄積を減少するアゴニストの効果を調べた (図 16)。フォルスコリン刺激による cAMP の蓄積は、Leu-エンケファリンにより有意に減少し、そしてその効果は (-) ナロキソンにより抑制された。効果は、レボルファノールもまた cAMP 蓄積を減少させるがデキストロルファンは効果を持たないという点で、立体選択的である。

40

【0410】

オピオイドに対する耐性の潜在的な細胞性許容機構は、これらの薬剤に対する特異的レセプターの感度低下/調節低下に関係があり得る。アゴニストが μ レセプターの調節を引き起こすか否かを決定するために、ヒトおよびラット μ レセプターを発現する細胞を 4 時間、1 μ M モルヒネに曝した。発明者らは以前に、クローン化マウス δ および κ レセプターが、高濃度の選択的アゴニストに 4 時間曝された後、有意な感度低下および/または調節低下を起こすことを示した (Raynor ら、提出済; K. R. および T. R.、未発表の考察)。図 17 に示すように、放射標識されたアゴニストまたはアンタゴニストの結合のいずれにおいても有意な変化は検出不能であった。これらの結果は、 μ レセプターが、アゴニスト露

50

出によって、 δ および κ レセプターのようには容易に調節されないことを示唆している。

【0411】

ヒト μ オピオイドレセプターの完全長コーディング領域に対してプローブを用いてRNAブロッティングを行ったところ、約13.5 kBの優勢なmRNAを含む複数の転写物(図18)が検出された。これは、発明者らおよびその他の研究者がラット μ レセプターmRNA(Fukudaら、1993; Delfsら、1994)について報告した μ オピオイドレセプターmRNAと類似のサイズである。11、4.3、および2.8の、より小さいサイズのバンドもまた検出された。ヒト脳中の μ オピオイドレセプターmRNAの最高のレベルは、視床下部、視床、および視床下核(図18、レーン5、7、8)で検出された。高レベルはまた扁桃および尾状核(図18、レーン1、2)においても検出された。はるかに低いレベルは、海馬、脳梁、および黒質(図18、レーン3、4、6)で検出された。11 kB RNAは扁桃および視床下核において最も豊富であり、他方、4.3 kB RNAは脳梁でも豊富に見つかった。

10

【0412】

本実施例において、クローン化ヒト μ レセプターの薬理学的プロフィール、調節、および細胞のエフェクタカップリングを調べる。レセプターの特徴は、クローン化ラット μ レセプターのそれに酷似しており、これらの種のレセプター間に見られる高レベルの構造的相同性と一致する。ヒト μ レセプターの薬理学的プロフィールは、発明者らが以前にラット μ レセプターについて報告したもの(Chenら、1993)と類似であるが、モルヒネ、メサドン、およびコデインのような、いくつかの臨床的に使用されるオピオイドの親和性が顕著に異なる。これらの化合物は、ラット μ レセプターよりもヒト μ レセプターに対して高い親和性で結合する。ヒトおよびラットレセプターは、N末端において最も多様であり、これらのアミノ酸置換は、ラットおよびヒト μ レセプターの異なる薬理学的特性に貢献し得る。興味深いことに、内因性オピオイドペプチド β -エンドルフィンおよびLeu-エンケファリンは、 μ レセプターに高い親和性で結合し、これらのペプチドがこのレセプターにおいて生理学的条件で作用し得ることを示唆している。同様に、発明者らがラット μ レセプターに関して見いだしたように、本願の研究結果は、モルヒネ、フェンタニル、およびメサドンのような、悪用される傾向のあるオピオイド因子は、ヒト μ レセプターに対して高い親和性を有し、他方、マウス δ レセプターおよび κ レセプター(Raynorら、1994)に対してはほとんどまたは全く親和性を示さないことを示している。 κ -または δ -選択的である鎮痛剤の開発は、 μ 選択的鎮痛剤に関するこうした懸念、および呼吸器圧迫を含む他の深刻な副作用を回避し得る。

20

30

【0413】

オピオイドの長期にわたる使用に関する他の問題点は、これらの因子に対する耐性の発展である。この現象を引き起こす可能性のある機構としてオピオイドレセプターの感度低下/調節低下が示唆されているが、多くの証拠が、長期にわたるインビボ露出における μ オピオイドレセプターの場合はそうではないことを示唆している(Zukinら、1993において検討)。培養された細胞内で発現したヒト μ オピオイドレセプターに関する、これらの現在の研究結果は、レセプターレベルで調節低下はまた、クローン化 κ および δ レセプターにおけるようには容易に起こらないということ(Raynorら、提出済; K. R.およびT. R.、未発表の考察)、そして μ -選択的オピオイドに対する耐性の発展には他の機構も関わっているに違いないということをも示唆している。

40

【0414】

一般に、 μ オピオイドレセプターmRNAの分布は、ラットおよびヒト脳において類似であり、最も高度なレベルが視床領域で検出され、より低いレベルが線条で検出された。視床下部領域における高レベルのmRNA発現は珍しく、神経構造制御に関わるこの重要なリレー核が高い μ オピオイドレセプター発現を有し得ることを示唆している。

【0415】

RNAブロッティングは、ヒト脳で発現する複数の μ レセプター転写物を示した。最大転写物サイズ(~13.5 kB)は、ラット μ オピオイドレセプターmRNAに関して報告された(Fukudaら、1993; Delfsら、1994)ものと類似である。しかし、ヒト脳で検出された、より

50

小さい分離したRNA種は、ラット組織で検出されたものとは異なる。RNAブロットにより検出された複数のRNA種の同一性は明確でない。これらは、異なるポリA⁺尾部、またはプロセシング中間部を有する同一のRNAを表し得る。薬理学的証拠は、 μ レセプターのサブタイプが、神経系で発現することを示唆している。1つの興味深い可能性は、異なる転写物のいくつかは μ レセプターのサブタイプをコードすることである。

【0416】

クローン化オピオイドレセプターのサブタイプの薬理学的特性を個々に研究する能力があれば、選択的相互作用を許容する、リガンドの構造的特徴の同定が可能になる。薬剤の薬理学的相互作用を、個々のオピオイドレセプターで同定することは、望ましくない副作用を生成する可能性がより少ない治療剤の同定につながる。

10

【0417】

本発明の好適な実施態様を説明するために実施例を挙げた。以下の実施例のいくつかの局面は、本発明の実施に際して、発明者らがうまくいくことを発見した、またはうまくいくと考えた技術および手順で説明されている。これらの実施例は、発明者の標準的な実験室での実施を用いることにより説明されている。本明細書の開示内容および当該分野の一般的な水準に照らして、当業者は、以下の実施例が例を示すためだけのものであり、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの改変、修正、および変更が可能であることを理解する。

【0418】

20

参照文献

以下の文献および明細書中で引用した全ての文献は、本明細書で用いた方法、技術、および／または組成物の根拠を補足、説明、および提供する、あるいは教示する範囲において、参考として本明細書中に援用される。

【0419】

【数 1 - 1】

- Adelman ♪ (1983) *DNA* 2:183.
- Akil ♪ (1984) *Annu. Rev. Neurosci.* 7:223.
- Attali ♪ (1989) *J. Neurochem.* 52:360.
- Benovic ♪ (1989) *Science* 246:235.
- Bertin ♪ (1992) *J. Biol. Chem.* 267(12):8200.
- Bero ♪ (1988) *Mol. Pharmacol.* 34:614. 10
- Bertolucci ♪ *Neurosci, Abstr.* 18L1368.
- Bihoreau ♪ (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5133.
- Bolivar ♪ (1977) *Gene*, 2:95.
- Boshart ♪ (1985) *Cell* 41:521.
- Bouvier ♪ (1988) *Mol. Pharmacol.* 33:133.
- Bradbury ♪ (1976) *Nature* 260:165. 20
- Breder ♪ (1992). *J. Neurosci* 12:3920.
- Chang ♪ (1978) *Nature*, 375:615.
- Chen ♪ (1993) *Mol. Pharmacol.* 44:8.
- Cheng ♪ Prusoff (1973) *Biochem. Pharmacol.* 22:3099.
- Chesselet ♪ (1987) *J. Comp. Neurol.* 262:125.
- Childers (1991) *Life Sci.* 48:991. 30
- Clark ♪ (1989) *J. Pharmacol. Expt. Therapeut.* 251:461.
- Corbett ♪ (1993) *Opioids I, Handbook of Exp. Ther.* 104:645 (Springer-Verlag, Berlin).
- Cotecchia ♪ (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7159.
- Cowan ♪ Murray (1990) *Prog. Clin. Biol. Res.* 328:303. 40

【 0 4 2 0 】

【数 1 - 2】

- Crea り (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:5765.
- Danboldt り (1990) *Biochemistry* 29(28):6734.
- Delfs り (1994) *J. Comp. Neurol.* 343:2.
- Di Chiara り (1992) *Trends Pharmacol. Sci.* 13:185.
- Dohlman (1987) *Biochemistry* 26:2657.
- Dohlman (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60:166-170; 174-176; 653-688. 10
- Dooley り (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10811.
- Evans り (1992) *Science* 258:1952.
- Ferruti おび Tanzi (1986) *Cris. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2:117-136.
- Fiers り (1978) *Nature* 273:113.
- Fong り (1993) *Nature* 362:350-343. 20
- Frielle り (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9484.
- Fukuda り (1993) *FEBS* 3:311.
- Gabizon り (1990) *Cancer Res.* 50:6371-6378.
- Garin り (1988) *Brit. J. Pharmacol.* 95:1023.
- Gether り (1993) *Nature* 362:345-348.
- Gilman り (1990) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第8版 (Pergamon Press, New York). 30
- Gioannini り (1989) *J. Mol. Recogn.* 2:44.
- Goeddel り (1979) *Nature*, 281:544.
- Goeddel り (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8:4057.
- Goldstein おび Naidu (1989) *Mol. Pharmacol.* 36:265.
- Gransch り (1988) *J. Biol. Chem.* 263:5853.
- Hausdorff り (1990) *FASEB J* 4:2881. 40
- Herz (1993) *Opioids I, Handbook of Exp. Ther.* 104 (Springer-Verlag, Berlin).
- Hess り (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149.
- Heyman り (1988) *TIPS* 9:134.
- Hitzeman り (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073.

【 0 4 2 1】

【数 1 - 3】

Holland ら (1978) *Biochemistry* 17:4900.Horstman ら (1990) *J. Biol. Chem.* 265:21590.Hsia ら (1984) *J. Biol. Chem.* 259:1086.Hughes ら (1975) *Nature* 258:577.Itakura ら (1977) *Science*, 198:1056.Jaffe および Martin (1990) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第8版, A. Gilman, J. Rall, A. Nies, P. Taylor, 編 104:485-573 (Pergamon Press, New York).Jones (1977) *Genetics* 85:12.Kanaho ら (1984) *J. Biol. Chem.* 259:7378.Kennelly ら (1991) *J. Biol. Chem.* 266:15555.Kieffer ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:12048.King ら (1990) *Science* 250:121.Kingsman ら (1979) *Gene* 7:141.Kobilka ら (1987) *J. Biol. Chem.* 262:7321.Kobilka ら (1988) *Science* 240:1310.Kong ら (1993) *Mol. Pharmacol.* 44:380.Kong ら (1993) *J. Biol. Chem.* 268:23055-23058.Kong ら (1994) *Neuroscience* 59:175.Kong ら (1994) *Soc. Neurosci. Abst.* submitted.Koob ら (1992) *Trends Neurosci.* 15:186.Koob および Bloom (1992) *Science* 242:715.Kozasa ら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:2081.Kruse および Patterson, 編 (1973) *Tissue Culture*, Academic Press.Kyte および Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105.Law ら (1983) *Mol. Pharmacol.* 23:26.Law ら (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17885.Law および Reisine (1992) *Mol. Pharmacol.* 42:398.Law ら (1993) *J. Biol. Chem.* 268:10721.

【 0 4 2 2 】

【数 1 - 4】

Lee ら (1992) *Int'l Narcotic Research Conference, Abstract 34.*

Loh ら (1990) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:123.

Loh および Smith (1990) *Annu. Rev. Pharmacol.* 30:123.

Lomasney ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5094.

Lovett および Portoghese (1987) *J. Med. Chem.* 30:1668. 10

Lutz および Pfister (1992) *J. Receptor Res.* 12:267.

Mansour ら (1987) *J. Neurosci.* 7:2445.

Marullo ら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7551.

McFarland ら (1989) *Science* 245:494.

McGonigle ら (1988) *PROPHET Public Procedures Notebook 215* (Bolt, Berabek, and Newman, Inc., Cambridge, MA). 20

Messing ら (1981) *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, Walton, 編 (Elsevier, Amsterdam).

Mestek ら (1994) 模出済 .

Muller ら (1990) *DNA and Cell Biol.* 9:221.

Nathans ら (1986 A) *Science* 232:193.

Nathans ら (1986 B) *Science* 232:203 30

Nestler (1993) *Crit. Rev. in Neurobiol.* 7:23.

Nock ら (1988) *Eur. J. Pharmacol.* 154:27.

Okayama ら (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:280.

Okuma および Reisine (1992) *J. Biol. Chem.* 267:14826.

Olson ら (1989) *Peptides* 10:1253.

Ott ら (1988) *J. Biol. Chem.* 263:10524. 40

Page ら (1993) *Life Sci.* 52:560.

Pasternack (1993) *Clin. Neuropharmacology* 16:1.

Pasternack および Wood (1986) *Life Sci.* 38:1889.

Payette ら (1990) *FEBS Lett.* 266:21.

【0 4 2 3】

【数 1 - 5】

Perry *et al.* McGonigle (1988) *PHOPHET Public Procedure Notebook* 187-197 (Bolt, Berabek, and Newman, Inc., Cambridge, MA).

Pert *et al.* (1973) *Science* 179:1011.

Pert *et al.* (1974) *Mol. Pharmacol.* 10:868.

Pfeiffer *et al.* (1986) *Science* 223:774.

Portoghese *et al.* (1992) *Eur J. Pharmacol.* 218:195. 10

Portoghese (1993) *Opioids I* 104:276.

Portoghese *et al.* (1993) *J. Med. Chem.* 36:2572.

Puttfarcken *et al.* (1988) *Mol. Pharmacol.* 33:520.

Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685-694.

Raynor *et al.* (1994) *Mol. Pharmacol.* 45:330.

Raynor *et al.* Reisine (1989) *J. Pharmacol. Expt. Therap.* 251:510. 20

Raynor *et al.* (1994) *J. Pharmacol. Expt. Therap.* in press.

Regan *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6301.

Reisine *et al.* Bell (1993) *Trends in Neurosci.* 16:506.

Rens-Domiano *et al.* (1992) *Mol. Pharmacol.* 42:28.

Richardson *et al.* (1992) *Biochem. Pharmacol.* 43:1415. 30

Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Schiller (1993) *Opioids I* 104:681.

Seeburg (1982) *DNA* 1:239.

Shook *et al.* (1990) *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:895.

Siebwienlist *et al.* (1980) *Cell* 20:269. 40

Simon (1991) *Medicinal Res. Rev.* 11:357.

Sofuglu *et al.* (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257:676.

Sofuglu *et al.* (1991) *Life Sci.* 49:153.

Soghomonian *et al.* (1992) *Brain Res.* 576:68.

Spalding *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:4092.

【 0 4 2 4 】

【数 1 - 6】

- Sprengel ら (1990) *Mol. Endocrinol.* 4:525.
- Stinchcomb ら , (1979) *Nature*, 282:39.
- Strader ら (1988) *J. Biol. Chem.* 263:10267.
- Strader ら (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4384-4388.
- Stratford-Perricaudet ら (1992).
- Strotchman および Simon (1991).
- Tallarida および Murray (1987) *Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs*, 第2版
- Thomsen ら (1984) *PNAS* 81:659.
- Tortella ら (1981) *Life Sci.* 10:1039.
- Tschemper ら , (1980) *Gene* 10:157.
- Unterwald ら (1991) *Brain Res.* 562:57.
- Unterwald ら (1987) *Eur. J. Pharmacol.* 133:275.
- Wang ら (1994) *FEBS Lett.* 338:217.
- Weiss-Wunder および Chesselet (1991) *J. Comp. Neurol.* 303:478.
- Xie ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4124.
- Yamada ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:251.
- Yasuda ら (1992) *J. Biol. Chem.* 267:20422.
- Yasuda ら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4384.
- Yasuda ら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6736.
- Yokota ら (1992) *EMBO J.* 11:3585.
- Zoffman ら (1993) *FEBS Lett.* 336:506.
- Zukin ら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4061.
- Zukin ら (1993) *Opioids I, Handbook of Experimental Ther.* 104:107 (Springer-Verlag, New York).

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0 4 2 5】

本明細書の一部を構成する図において：

【図 1】図 1 は、マウス κ オピオイドレセプター (mORK1) およびマウス δ オピオイドレセプター (mORD1) のアミノ酸配列の比較を示す。星印は同一アミノ酸を示し、バーは類似残基を示す。この並列を生じるように導入されたギャップをコロンによって表す。7 つの推

定貫膜ドメイン(TM1~TM7)を示す。NH₂末端細胞外ドメインにおけるN-連結グリコシル化の潜在部位を下線を引いて示す。mORK1およびmORD1において、それぞれ残基274および260に、cAMP依存性タンパク質キナーゼの潜在リン酸化部位が存在する。潜在タンパク質キナーゼCリン酸化部位は、mORK1に残基242、255、344、および352で、そしてmORD1に残基255、357、および369で存在する。

【図2A】図2aおよび2bは、マウスκ(a)およびδ(b)オピオイドレセプターが、cAMP形成のオピオイド阻害を仲介することを示す。マウスκおよびδオピオイドレセプターを一時的に発現するCOS-1細胞を、フォルスコリン(forskolin)(10μM)±1μMオピオイドアゴニストまたは1μMアゴニストおよび10μMナロキソンで処理した。これらの研究のために、等数の細胞(5×10⁵個)をプレートした。κおよびδオピオイドレセプターを発現する細胞において、基底cAMPレベルは40±3p/mol/ウェルであり、そしてフォルスコリン刺激cAMP形成は5倍量であった(203±10p/mol/ウェル)であった。その値は、フォルスコリン刺激cAMP形成のパーセントとして表され、3回の異なる実験の平均値±SEMである。星印は、フォルスコリン処理細胞とオピオイドアゴニスト/アンタゴニスト処理細胞との間のcAMPレベルの有意(p<0.05)差を示す。NaI、ナロキソン; EKC、エチルケトシクラゾシン。

【図2B】図2aおよび2bは、マウスκ(a)およびδ(b)オピオイドレセプターが、cAMP形成のオピオイド阻害を仲介することを示す。マウスκおよびδオピオイドレセプターを一時的に発現するCOS-1細胞を、フォルスコリン(forskolin)(10μM)±1μMオピオイドアゴニストまたは1μMアゴニストおよび10μMナロキソンで処理した。これらの研究のために、等数の細胞(5×10⁵個)をプレートした。κおよびδオピオイドレセプターを発現する細胞において、基底cAMPレベルは40±3p/mol/ウェルであり、そしてフォルスコリン刺激cAMP形成は5倍量であった(203±10p/mol/ウェル)であった。その値は、フォルスコリン刺激cAMP形成のパーセントとして表され、3回の異なる実験の平均値±SEMである。星印は、フォルスコリン処理細胞とオピオイドアゴニスト/アンタゴニスト処理細胞との間のcAMPレベルの有意(p<0.05)差を示す。NaI、ナロキソン; EKC、エチルケトシクラゾシン。

【図3】図3は、ヒトκオピオイドレセプターの部分ゲノム配列を示す。イントロン1は、残基1で始まり、残基101で終わる。イントロン2は、残基454で始まる。イントロン2の長さは現在のところまだ決定されていない。残基455の後の13個のコロンは13個の未知のヌクレオチドを表すのではない。これらのコロンは、イントロン2が図4aおよび4bに示されるより多くのヌクレオチドを含むことを表し、残基503で始まり残基435で終わる。終止コドンは、残基436で始まる。エキソン2では、未決定のヌクレオチド残基がいくつか存在する。これらの残基は656、657、691、692、945、および955に存在する。

【図4A】図4aおよび4bは、ヒトκおよびマウスκ(mORK1)オピオイドレセプターのアミノ酸配列の比較を示す。この並列を生じるように導入されたギャップをコロンにより示す。アミノ酸残基255、267、351、および355を下線を引いて示す。なぜなら、これらの残基は、対応するヌクレオチド配列が未だ同定されていないからである。マウス配列はアミノ酸残基1で始まり、そしてヒト配列はアミノ酸残基87で始まる。

【図4B】図4aおよび4bは、ヒトκおよびマウスκ(mORK1)オピオイドレセプターのアミノ酸配列の比較を示す。この並列を生じるように導入されたギャップをコロンにより示す。アミノ酸残基255、267、351、および355を下線を引いて示す。なぜなら、これらの残基は、対応するヌクレオチド配列が未だ同定されていないからである。マウス配列はアミノ酸残基1で始まり、そしてヒト配列はアミノ酸残基87で始まる。

【図5-1】図5a~5fは、[³H]U-69,593、[³H]ナルトリンドール(naltrindole)、または[³H]DAMGOのクローン化κ、δ、およびμオピオイドレセプターへの飽和性結合を示す。安定にクローン化κレセプターを発現するPC12細胞由来の膜(図5aおよび5b)、安定にクローン化δレセプターを発現するCHO-DG44細胞(図5cおよび5d)、または一時的にクローン化μレセプターを発現するCOS-7細胞(図5eおよび5f)をそれぞれ、特異的結合(黒丸)を測定するために、10μMナロキシソンの存在下(白三角)また

10

20

30

40

50

は非存在下（白四角）で、 $[^3\text{H}]\text{U}-69,593$ 、 $[^3\text{H}]\text{ナルトリンドール}$ 、または $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ の濃度を上昇させながら、 25°C で40分間インキュベートした。上方、代表実験の飽和等温；下方、飽和等温データの線形化。 κ レセプターへの飽和性結合の分析は、 $[^3\text{H}]\text{U}-69,593$ が、 2.8nM の K_D および 3346fmol/mg タンパク質の B_{max} で一つの部位に結合したことを明らかにした。 δ レセプターへの飽和性結合の分析は、 $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ が、 0.18nM の K_D および 663fmol/mg タンパク質の B_{max} で一つの部位に結合したことを明らかにした。 μ レセプターへの飽和性結合の分析は、 $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ が、 0.57nM の K_D および 444fmol/mg タンパク質の B_{max} で一つの部位に結合したことを明らかにした。実験は3回行い、そして3回の独立実験のうち2回の結果は類似していた。

【図5-2】図5-1のつづき。

10

【図5-3】図5-2のつづき。

【図6A】図6aおよび6bは、クローン化 κ 、 δ 、および μ オピオイドレセプターへの放射性リガンド結合を阻害するオピオイドリガンドの効力と異種組織において特徴づけられるオピオイドレセプターとの相関関係を示す。相関分析は、クローン化 κ （a）およびクローン化 μ （b）レセプターに対するオピオイドリガンドの親和性の対数と、異種組織におけるこれらのオピオイドレセプタータイプへのサブタイプ選択放射性リガンドの結合を阻害するこれらの化合物の効力の対数とを対プロットすることにより行った。 κ および μ レセプターに対するリガンドの親和性は、文献値と高い相関関係を有しており、それぞれ r 値は 0.954 および 0.879 であった。 δ レセプターでの効力の相関関係は非常に劣るものであった（ $r=0.185$ ）（プロットなし）。

20

【図6B】図6aおよび6bは、クローン化 κ 、 δ 、および μ オピオイドレセプターへの放射性リガンド結合を阻害するオピオイドリガンドの効力と異種組織において特徴づけられるオピオイドレセプターとの相関関係を示す。相関分析は、クローン化 κ （a）およびクローン化 μ （b）レセプターに対するオピオイドリガンドの親和性の対数と、異種組織におけるこれらのオピオイドレセプタータイプへのサブタイプ選択放射性リガンドの結合を阻害するこれらの化合物の効力の対数とを対プロットすることにより行った。 κ および μ レセプターに対するリガンドの親和性は、文献値と高い相関関係を有しており、それぞれ r 値は 0.954 および 0.879 であった。 δ レセプターでの効力の相関関係は非常に劣るものであった（ $r=0.185$ ）（プロットなし）。

【図7】図7aは、野生型 δ レセプターの模式図を示す。図7bは、野生型 κ レセプターの模式図を示す。図7cは、 $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ キメラレセプターの模式図を示す。図7dは、 $\delta_{1-69}/\kappa_{79-380}$ キメラレセプターの模式図を示す。

30

【図8】図8は、キメラ $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ レセプターの結合特性を示す。 δ および κ -選択的アゴニストおよびアンタゴニストのキメラ $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ レセプターへの結合。 $\text{COS}-7$ 細胞を、リン酸カルシウム沈降法により、野生型 δ または κ または $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ レセプターcDNAでトランスフェクトした。 δ および κ -選択的アゴニスト（それぞれ $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ および $[^3\text{H}]\text{U}-69,593$ ）およびアンタゴニスト（それぞれ $[^3\text{H}]\text{ナルトリンドール}$ および $[^3\text{H}]\text{ナロキソン}$ ）を、それらが $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ レセプターに結合する能力について試験した。値は、野生型 δ レセプターへの $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ および $[^3\text{H}]\text{ナルトリンドール}$ 結合パーセント、および野生型 κ レセプターへの $[^3\text{H}]\text{U}-69,593$ および $[^3\text{H}]\text{ナロキソン}$ 結合パーセントとして表される。 $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ および $[^3\text{H}]\text{ナルトリンドール}$ の野生型 δ レセプターへの平均結合は、それぞれ 1987fmol/mg タンパク質および 2404fmol/mg タンパク質であり； $[^3\text{H}]\text{U}-69,593$ および $[^3\text{H}]\text{ナロキソン}$ の野生型 κ レセプターへの平均結合は、それぞれ 998fmol/mg タンパク質および 2085fmol/mg タンパク質であった。これらは、3～4回の別個の実験の平均結果である。

40

【図9A】図9aおよび9bは、 κ -および δ -選択的因子による $\kappa_{1-78}/\delta_{70-372}$ キメラレセプターへの $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ （a）および $[^3\text{H}]\text{ナロキソン}$ （b）結合の阻害を示す。 δ -選択的アゴニストである DSLET （黒四角）および DPDPE （黒丸）ならびに δ -選択的アンタゴニストである ナルトリンドール （黒三角）を、それらがこのキメラへの $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ の結合を阻害する能力について試験した（上部）。 $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ の結合の阻害のIC

50

IC_{50} 値は、DPDPE、DSLET、およびナルトリンドールについて、それぞれ5.8、2.0、および0.25mMであった。 $[^3H]$ ナロキソンの結合の阻害の IC_{50} 値は、ナロキソン（黒ひし形）については14nMであったが、 κ -選択的アゴニストU-50,488（黒星）は、 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ キメラへの $[^3H]$ ナロキソンの結合を阻害しなかった（下部）。

【図9B】図9aおよび9bは、 κ -および δ -選択的因子による $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ キメラレセプターへの $[^3H]$ DPDPE（a）および $[^3H]$ ナロキソン（b）結合の阻害を示す。 δ -選択的アゴニストであるDSLET（黒四角）およびDPDPE（黒丸）ならびに δ -選択的アンタゴニストであるナルトリンドール（黒三角）を、それらがこのキメラへの $[^3H]$ DPDPEの結合を阻害する能力について試験した（上部）。 $[^3H]$ DPDPEの結合の阻害の IC_{50} 値は、DPDPE、DSLET、およびナルトリンドールについて、それぞれ5.8、2.0、および0.25mMであった。 $[^3H]$ ナロキソンの結合の阻害の IC_{50} 値は、ナロキソン（黒ひし形）については14nMであったが、 κ -選択的アゴニストU-50,488（黒星）は、 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ キメラへの $[^3H]$ ナロキソンの結合を阻害しなかった（下部）。

【図10A】図10aおよび10bは、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積の阻害を示す。COS-7細胞を、リン酸カルシウム沈降法により、野生型（黒棒）、キメラ（白棒）、または短縮型（斜線棒）のレセプターcDNAでトランスフェクトした。 κ -および δ -選択的アゴニスト（それぞれ1 μ MのU-50,488およびDSLET）を、それらが10 μ Mフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を阻害する能力について試験した。 κ -および δ -選択的アンタゴニスト（それぞれ1 μ Mナロキソンおよびナルトリンドール）がアゴニストの効果をブロックする能力もまた試験した。結果を、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積（野生型 δ レセプターについて173pmol/ウェル、野生型 κ レセプターについて244pmol/ウェル、 $\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ レセプターについて172pmol/ウェル、 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ レセプターについて205pmol/ウェル、 δ_{70-372} レセプターについて100pmol/ウェル、および κ_{79-380} レセプターについて51pmol/ウェル）のパーセントとして算定した。基底cAMPレベル（これはフォルスコリン刺激cAMPレベルの5%未満であった）を全ての値から引いた。結果は、3回の別個の実験の平均値 $\pm$ S.E.M.である。

【図10B】図10aおよび10bは、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積の阻害を示す。COS-7細胞を、リン酸カルシウム沈降法により、野生型（黒棒）、キメラ（白棒）、または短縮型（斜線棒）のレセプターcDNAでトランスフェクトした。 κ -および δ -選択的アゴニスト（それぞれ1 μ MのU-50,488およびDSLET）を、それらが10 μ Mフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を阻害する能力について試験した。 κ -および δ -選択的アンタゴニスト（それぞれ1 μ Mナロキソンおよびナルトリンドール）がアゴニストの効果をブロックする能力もまた試験した。結果を、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積（野生型 δ レセプターについて173pmol/ウェル、野生型 κ レセプターについて244pmol/ウェル、 $\delta_{1-69} / \kappa_{79-380}$ レセプターについて172pmol/ウェル、 $\kappa_{1-78} / \delta_{70-372}$ レセプターについて205pmol/ウェル、 δ_{70-372} レセプターについて100pmol/ウェル、および κ_{79-380} レセプターについて51pmol/ウェル）のパーセントとして算定した。基底cAMPレベル（これはフォルスコリン刺激cAMPレベルの5%未満であった）を全ての値から引いた。結果は、3回の別個の実験の平均値 $\pm$ S.E.M.である。

【図11】図11a、11b、および11cは、野生型ならびにD128NおよびH278N変異 δ レセプターへの 3H -ナルトリンドールの飽和性結合を示す。野生型（A、白四角）、D128N変異体（B、黒丸）、およびH278N変異体（C、白丸）への 3H -ナルトリンドールの飽和性結合を、COS-7細胞で発現された各レセプターの親和性（ K_d ）および密度（ B_{max} ）を評価するために測定した。

【図12】図12a、12b、および12cは、アンタゴニスト（NTB）、 δ -選択的アゴニスト（DPDPE）、および非選択的アゴニスト（レボルファノール）による野生型および変異 δ レセプターへの 3H -ナルトリンドール結合の阻害を示す。野生型（白四角）、D128N変異体（黒丸）、およびH278N変異体（白丸）を発現するCOS-7細胞の膜への 3H -ナルトリンドール結合は、 δ -選択的アンタゴニストNTB（A）、 δ -選択的アゴニストDPDPE（B）、および非選択的オピオイドアゴニストレボルファノール（C）により阻害され

10

20

30

40

50

た。これらは3回の別個の測定の実験の代表例である。

【図13】図13は、野生型および変異 δ オピオイドレセプターを発現するCOS-7細胞における δ アゴニストDSLETによるフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積の阻害を示す。cAMP蓄積を、野生型（白棒）、D128N変異体（黒棒）、およびH278N変異体（斜線棒）を発現するCOS-7細胞において、方法の欄に記載のようにして測定した。基底レベル、および1 μ MのDSLET（DSLET）または1 μ Mナルトリンドールを含む1 μ M DSLET（DSLET+ナルトリンドール）が存在する場合またはしない場合（フォルスコリン）の10 μ Mフォルスコリンにより刺激されたレベルを評価した。結果は、3回の別個の測定の実験の平均値 $\pm$ SEMである。

【図14】図14aおよび14bは、[3H]DAMGOのクローン化ヒト μ オピオイドレセプターへの飽和性結合を示す。クローン化ヒト μ レセプターを一時的に発現するCOS-7細胞の膜を、特異的結合を測定するために1mMナロキソンの存在下または非存在下で、[3H]DAMGOの濃度を上昇させながら、25°Cで40分間インキュベートした。代表実験の飽和等温（A）および飽和等温データの線形化（B）を示す。ヒト μ レセプターへの飽和性結合の分析は、[3H]DAMGOが、1.0nMのKDおよび232fmol/mgタンパク質の B_{max} で一つの部位に結合したことを明らかにした。実験は3回で行い、そして3回の独立実験の結果は類似していた。

【図15】図15は、安定なGTPアナログであるGTP γ Sによる、そして百日咳毒素での細胞の前処理による、クローン化ヒトおよびラット μ レセプターへのアゴニスト結合調節を示す。ヒト（斜線）またはラット（無地） μ レセプターを一時的に発現するCOS-7細胞の膜中の μ レセプターを、100mM GTP γ Sの存在下または非存在下で[3H]DAMGOで標識した（GTP γ S）。別のフラスコ内の細胞を、100ng/mlの百日咳毒素で18時間処理した（PTX）。これらは、3回の別個の実験の実験の平均値 $\pm$ SEMである。

【図16】図16は、ヒト μ レセプターを発現する細胞におけるフォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積にオピオイドが及ぼす効果を示す。ヒト μ レセプターを一時的に発現するCOS-7細胞におけるフォルスコリン刺激（10mM）によるcAMPの蓄積を、レボルファノール、デキストロルファン、またはナロキソン（10mM）を用いるまたは用いないLeu-エンケファリンの存在下または非存在下で、試験した。Leu-エンケファリンおよびレボルファノールは、同様の最大程度まで（それぞれ41%および31%）、フォルスコリン刺激によるcAMPの蓄積を阻害した。これらは、3回の独立実験の結果である。

【図17】図17は、モルヒネによるクローン化ヒトおよびラット μ レセプターへのアゴニスト結合調節の欠如を示す。ヒト（斜線）またはラット（無地） μ レセプターを一時的に発現するCOS-7細胞を1mMのモルヒネを用いてまたは用いずに4時間処理した。細胞を2回洗浄し、回収し、そして方法の欄に記載のようにして[3H]ナロキソンおよび[3H]DAMGO結合アッセイのために膜を調製した。アゴニストに前もって曝した後の残留放射性リガンド結合をコントロールのパーセントとしてプロットする。これらは3回の別個の実験についての平均値 $\pm$ SEMである。

【図18】図18は、ヒト脳におけるヒト μ レセプター分布のノーザンブロット分析を示す。ヒト脳RNAブロットをCLONTECH laborator I esから入手した。各レーンは、32P-標識ヒト μ オピオイドレセプターcDNAプローブとハイブリダイズした2mgのポリA-選択的mRNAを含んでいた。レーンは、1-扁桃、2-尾状核、3-脳梁、4-海馬、5-視床下部、6-黒質、7-視床下核、および8-視床である。このブロットを-80°Cで5~7日間フィルムに曝した。

【0426】

（配列の簡単な説明）

以下のリストにより、本明細書および請求の範囲において議論される配列を簡単に説明する：

配列番号1 マウス κ オピオイドレセプターcDNA

配列番号2 マウス κ オピオイドレセプターアミノ酸配列（mORK1）

配列番号3 マウス δ オピオイドレセプターcDNA

配列番号4 マウス δ オピオイドレセプターアミノ酸配列（mORD1）

- 配列番号 5 マウス由来のオピオイドレセプター様レセプターのcDNA
- 配列番号 6 マウス由来のオピオイドレセプター様レセプターのアミノ酸配列 (MOP2)
- 配列番号 7 マウス κ レセプターにおいてSpe I 制限部位を生成するのに用いられるオリゴヌクレオチド
- 配列番号 8 マウス δ レセプターにおいてSpe I 制限部位を生成するのに用いられるオリゴヌクレオチド
- 配列番号 9 マウスライブラリーをスクリーニングするのに用いられるオリゴヌクレオチド
- 配列番号 10 マウスライブラリーをスクリーニングするのに用いられるオリゴヌクレオチド 10
- 配列番号 11 ヒトオピオイドレセプターの部分ゲノム配列
- 配列番号 12 ヒトオピオイドレセプターの部分アミノ酸配列
- 配列番号 13 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1の第3細胞内ループのアミノ酸配列。
- 配列番号 14 マウス κ レセプターの第3細胞内ループのアミノ酸配列。
- 配列番号 15 マウス δ レセプターの第3細胞内ループのアミノ酸配列。
- 配列番号 16 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1の第2細胞内ループのアミノ酸配列。
- 配列番号 17 マウス κ および δ レセプターの第2細胞内ループのアミノ酸配列。
- 配列番号 18 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1のアミノ末端由来の順方向PCRプライマー。 20
- 配列番号 19 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1のアミノ末端由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 20 マウス δ レセプターのアミノ末端由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 21 マウス δ レセプターのアミノ末端由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 22 マウス κ レセプターのアミノ末端由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 23 マウス κ レセプターのアミノ末端由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 24 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1の第3細胞内ループ由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 25 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1の第3細胞内ループ由来の逆方向PCRプライマー。 30
- 配列番号 26 マウス δ レセプターの第3細胞内ループ由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 27 マウス δ レセプターの第3細胞内ループ由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 28 マウス κ レセプターの第3細胞内ループ由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 29 マウス κ レセプターの第3細胞内ループ由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 30 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1のカルボキシ末端由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 31 ソマトスタチンレセプターサブタイプSSTR1のカルボキシ末端由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 32 マウス δ レセプターのカルボキシ末端由来の順方向PCRプライマー。 40
- 配列番号 33 マウス δ レセプターのカルボキシ末端由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 34 マウス κ レセプターのカルボキシ末端由来の順方向PCRプライマー。
- 配列番号 35 マウス κ レセプターのカルボキシ末端由来の逆方向PCRプライマー。
- 配列番号 36 Gタンパク質のGo α サブユニットに対する抗血清を生成するのに用いられる抗原のアミノ酸配列。
- 配列番号 37 Gタンパク質のGo α サブユニットに対する抗血清を生成するのに用いられる抗原のアミノ酸配列。
- 配列番号 38 マウス κ レセプターのカルボキシ末端に対する抗血清を生成するのに用いられる抗原のアミノ酸配列。
- 配列番号 39 マウス κ レセプターのアミノ末端に対する抗血清を生成するのに用いられ 50

る抗原のアミノ酸配列。

配列番号 40 マウス δ レセプターのアミノ末端に対する抗血清を生成するのに用いられる抗原のアミノ酸配列。

配列番号 41 マウス δ レセプターのカルボキシ末端に対する抗血清を生成するのに用いられる抗原のアミノ酸配列。

配列番号 42 キメラオピトイドレセプターを生成するのに用いられるマウス δ レセプター由来のオリゴヌクレオチド配列。

配列番号 43 キメラオピトイドレセプターを生成するのに用いられるマウス κ レセプター由来のオリゴヌクレオチド配列。

配列番号 44 アスパラギン酸128をアスパラギンに変異誘発するのに用いられるマウス δ レセプター由来のオリゴヌクレオチド配列。

10

配列番号 45 ヒスチジン128をアスパラギンに変異誘発するのに用いられるマウス δ レセプター由来のオリゴヌクレオチド配列。

配列番号 46 δ オピトイドレセプターのC末端に対するポリクローナル抗血清を得るのに用いられるペプチド。

【0427】

(配列表)

【0428】

【数 1 - 1】

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：

(A) 住所人：アーチ ディベロプメント コーポレイション

(B) 番地：58 ティーエイチ ストリート 1101

(C) 市：シカゴ

(D) 州：イリノイ

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：60637

10

(ii) 発明の名称：変異オピオイドレセプター：組成物および方法

(iii) 配列数：46

20

(iv) 連絡住所：

(A) 住所人：アーノルド、ホワイト アンド ダーキー

(B) 番地：ビー. オー. ボックス 4433

(C) 市：ヒューストン

(D) 州：テキサス

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：77210

30

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS, ASCII

(vi) 先願データ：

(A) 出願番号：66,296

(B) 出願日：1993年5月20日

40

(A) 出願番号：100,649

(B) 出願日：1993年7月30日

【0 4 2 9】

【数 1 - 2】

(A)出願番号：147,952

(B)出願日：1993年11月5日

(vii)代理人／事務所情報：

(A)氏名：マーク ビー. ウィルソン

(B)登録番号：37,259

(C)照会／記録番号：ARCD115PCT

10

(ix)電話回線情報：

(A)電話：(512)320-7200

(B)テレファックス：(512)474-7577

(2)配列番号1の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：1410塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：genomic DNA

30

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表わす記号：CDS

(B)存在位置：186..1325

【0 4 3 0】

(xi)配列：配列番号 1：

GCGCACCTTG CTGATCCCAA ACAGGCAGAG CTTCTTCCAG TCTTGGAAGG CACAAATTGA 60
GCATCAGGAA CGTGGACCCA TCAGGGGCTGA ACAGCTACTC AGGATCTAAA GTGGTGACTT 120
GGAAGGCTGA CGGTGACTTG GGAAGGGAGG TCGCCAATCA GCGATCTGGA GCTGCAGCGC 180
TCACC ATG GAG TCC CCC ATT CAG ATC TTC CGA GGA GAT CCA GGC CCT 227
Met Glu Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Asp Pro Gly Pro
1 5 10
ACC TGC TCT CCC AGT GCT TGC CTT CTC CCC AAC AGC AGC TCT TGG TTC 275
Thr Cys Ser Pro Ser Ala Cys Leu Leu Pro Asn Ser Ser Ser Trp Phe
15 20 25 30
CCC AAC TGG GCA GAA TCC GAC AGT AAT GGC AGT GTG GGC TCA GAG GAT 323
Pro Asn Trp Ala Glu Ser Asp Ser Asn Gly Ser Val Gly Ser Glu Asp
35 40 45
CAG CAG CTG GAG TCC GCG CAC ATC TCT CCG GCC ATC CCT GTT ATC ATC 371
Gln Gln Leu Glu Ser Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile
50 55 60

【数 1 - 4】

ACC GCT GTC TAC TCT GTG GTA TTT GTG GTG GGC TTA GTG GGC AAT TCT 419
 Thr Ala Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser
 65 70 75

CTG GTC ATG TTT GTC ATC ATC CGA TAC ACG AAG ATG AAG ACC GCA ACC 467
 Leu Val Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr
 80 85 90

AAC ATC TAC ATA TTT AAC CTG GCT TTG GCA GAT GCT TTG GTT ACT ACC 515
 Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr
 95 100 105 110

ACT ATG CCC TTT CAG AGT GCT GTC TAC TTG ATG AAT TCT TGG CCT TTT 563
 Thr Met Pro Phe Gln Ser Ala Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe
 115 120 125

GGA GAT GTG CTA TGC AAG ATT GTC ATT TCC ATT GAC TAC TAC AAC ATG 611
 Gly Asp Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met
 130 135 140

TTT ACC AGC ATA TTC ACC TTG ACC ATG ATG AGT GTG GAC CGC TAC ATT 659
 Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile
 145 150 155

GCT GTG TGC CAC CCT GTG AAA GCT TTG GAC TTC CGA ACA CCT TTG AAA 707

【 0 4 3 2 】

10

20

30

40

【数 1 - 5】

【 0 4 3 3 】

Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys	
160	165
	170
GCA AAG ATC ATC AAC ATC TGC ATT TGG CTC CTG GCA TCA TCT GTT GGT	755
Ala Lys Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Ala Ser Ser Val Gly	
175	180
	185
	190
ATA TCA GCG ATA GTC CTT GGA GGC ACC AAA GTC AGG GAA GAT GTG GAT	803
Ile Ser Ala Ile Val Leu Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp	
195	200
	205
GTC ATT GAA TGC TCC TTG CAG TTT CCT GAT GAT GAA TAT TCC TGG TGG	851
Val Ile Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Glu Tyr Ser Trp Trp	
210	215
	220
GAT CTC TTC ATG AAG ATC TGT GTC TTC GTC TTT GCC TTT GTG ATC CCA	899
Asp Leu Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Val Phe Ala Phe Val Ile Pro	
225	230
	235
GTC CTC ATC ATC ATT GTC TGC TAC ACC CTG ATG ATC CTG CGC CTG AAG	947
Val Leu Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys	
240	245
	250
AGT GTC CGG CTC CTG TCT GGC TCC CGA GAG AAG GAC CGA AAT CTC CGC	995
Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg	

10

20

30

40

【 0 4 3 4 】

10
20
30
40

【数 1 - 7】

【 0 4 3 5】

CCT GCT TCC ATG AGA GAT GTG GGA GGG ATG AAT AAG CCA GTA
Pro Ala Ser Met Met Arg Asp Val Gly Gly Met Asn Lys Pro Val

370375380

1325

TGACTAGTCG TGGAAATGTC TTCTTTATTGT TCTCCAGGTA GAGAAGAGTT CAATGATCPT

1385

GGTTTAACCC AGATTACAAC TGCAG

1410

- (2)配列番号 2 の情報：
- (i)配列の特色：
- (A)長さ：380アミノ酸
 - (B)型：アミノ酸
 - (D)トポロジー：直鎖状
- (ii)配列の種類：タンパク質

10

20

30

40

【数 1 - 8】

(xi)配列：配列番号 2：

Met	Glu	Ser	Pro	Ile	Gln	Ile	Phe	Arg	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Thr	Cys	
1				5					10						15	
Ser	Pro	Ser	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Asn	Ser	Ser	Ser	Trp	Phe	Pro	Asn	
			20					25							30	
Trp	Ala	Glu	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Ser	Val	Gly	Ser	Glu	Asp	Gln	Gln	
			35				40					45				
Leu	Glu	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Pro	Ala	Ile	Pro	Val	Ile	Ile	Thr	Ala	
			50			55					60					
Val	Tyr	Ser	Val	Val	Phe	Val	Val	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	
			65			70				75					80	

10

20

30

【0 4 3 6】

【数 1 - 9】

Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
85 90 95

Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
100 105 110

Pro Phe Gln Ser Ala Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
115 120 125

Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
130 135 140

Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145 150 155 160

Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
165 170 175

Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ala Ser Ser Val Gly Ile Ser
180 185 190

Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
195 200 205

Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Glu Tyr Ser Trp Trp Asp Leu

【 0 4 3 7】

10

20

30

【数 1 - 1 0】

210 215 220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Val Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225 230 235 240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
 245 250 255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
 260 265 270
Thr Lys Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Ile Ile Cys Trp Thr
 275 280 285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
 290 295 300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305 310 315 320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
 325 330 335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Ile Lys Met Arg Met
 340 345 350

10

20

30

【 0 4 3 8】

【数 1 - 1 1】

Glu Arg Gln Ser Thr Asn Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
355 360 365

Ser Met Arg Asp Val Gly Gly Met Asn Lys Pro Val
370 375 380

(2)配列番号 3 の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：2272塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：CDS
- (B)存在位置：12..1127

(xi)配列：配列番号 8：

CACGCGCGCC C ATG GAG CTG GTG CCC TCT GCC CGT GCG GAG CTG CAG TCC 50

Met Glu Leu Val Pro Ser Ala Arg Ala Glu Leu Gln Ser 10

1 5

【0 4 3 9】

【数 1 - 1 2】

【 0 4 4 0】

TCG CCC CTC GTC AAC CTC TCG GAC GCC TTT CCC AGC GCC TTC CCC AGC 98
 Ser Pro Leu Val Asn Leu Ser Asp Ala Phe Pro Ser Ala Phe Pro Ser
 15 20 25
 GCG GGC GCC AAT GCG TCG GGG TCG CCG GGA GCC CGT AGT GCC TCG TCC 146
 Ala Gly Ala Asn Ala Ser Gly Ser Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser
 30 35 40 45
 CTC GCC CTA GCC ATC GCC ATC ACC GCG CTC TAC TCG GCT GTG TGC GCA 194
 Leu Ala Leu Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala
 50 55 60
 GTG GGG CTT CTG GGC AAC GTG CTC GTC ATG TTT GGC ATC GTC CGG TAC 242
 Val Gly Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr
 65 70 75
 ACC AAA TTG AAG ACC GCC ACC AAC ATC TAC ATC TTC AAT CTG GCT TTG 290
 Thr Lys Leu Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu
 80 85 90
 GCT GAT GCG CTG GCC ACC AGC ACG CTG CCC TTC CAG AGC GCC AAG TAC 338
 Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr
 95 100 105
 TTG ATG GAA ACG TGG CCG TTT GGC GAG CTG CTG TGC AAG GCT GTG CTC 386

10

20

30

40

【数 1 - 1 3】

Leu Met Glu Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu
 110 115 120 125
 TCC ATT GAC TAC TAC AAC ATG TTC ACT AGC ATC TTC ACC CTC ACC ATG 434
 Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met
 130 135 140
 ATG AGC GTG GAC CGC TAC ATT GCT GTC TGC CAT CCT GTC AAA GCC CTG 482
 Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu
 145 150 155
 GAC TTC CGG ACA CCA GCC AAG GCC AAG CTG ATC AAT ATA TGC ATC TGG 530
 Asp Phe Arg Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp
 160 165 170
 GTC TTG GCT TCA GGT GTC GGG GTC CCC ATC ATG GTC ATG GCA GTG ACC 578
 Val Leu Ala Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr
 175 180 185

【 0 4 4 1】

10

20

30

40

【数 1 - 1 4】

626
 CAA CCC CGG GAT GGT GCA GTG GTA TGC ATG CTC CAG TTC CCC AGT CCC
 Gln Pro Arg Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro
 190 195 200 205

674
 AGC TGG TAC TGG GAC ACT GTG ACC AAG ATC TGC GTG TTC CTC TTT GCC
 Ser Trp Tyr Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala
 210 215 220

722
 TTC GTG GTG CCG ATC CTC ATC ATC ACG GTG TGC TAT GGC CTC ATG CTA
 Phe Val Val Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu
 225 230 235

770
 CTG CGC CTG CGC AGC GTG CGT CTG CTG TCC GGT TCC AAG GAG AAG GAC
 Leu Arg Leu Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp
 240 245 250

818
 CGC AGC CTG CGG CGC ATC ACG CGC ATG ATG GTG GTG GTG GGC GCC
 Arg Ser Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Gly Ala
 255 260 265

866
 TTC GTG GTG TGC TGG GCG CCC ATC CAC ATC TTC GTC ATC GTC TGG ACG
 Phe Val Val Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr
 270 275 280 285

【0 4 4 2】

10

20

30

40

【数 1 - 1 5】

【 0 4 4 3】

CTG GTG GAC ATC AAT CGG CGC GAC CCA CTT GTG GTG GCC GCA CTG CAC 914
 Leu Val Asp Ile Asn Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His
 290 295 300
 CTG TGC ATT GCG CTG GGC TAC GCC AAC AGC AGC CTC AAC CCG GTT CTC 962
 Leu Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu
 305 310 315
 TAC GCC TTC CTG GAC GAG AAC TTC AAG CGC TGC TTC CGC CAG CTC TGT 1010
 Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys
 320 325 330
 CGC ACG CCC TGC GGC CGC CAA GAA CCC GGC AGT CTC CGT CGT CCC CGC 1058
 Arg Thr Pro Cys Gly Arg Gln Glu Pro Gly Ser Leu Arg Arg Pro Arg
 335 340 345
 CAG GCC ACC ACG CGT GAG CGT GTC ACT GCC TGC ACC CCC TCC GAC GGC 1106
 Gln Ala Thr Thr Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly
 350 355 360 365
 CCG GGC GGT GGC GCT GCC GCC TGACCTACCC GACCTTCCCC TTAAACGCC 1157
 Pro Gly Gly Ala Ala Ala
 370
 CTCCCAAGTG AAGTGATCCA GAGGCCACAC CGAGCTCCCT GGGAGGCTGT GGCCACCACC 1217

10

20

30

40

【数 1 - 1 6】

【 0 4 4 4】

AGGACAGCTA GAATTGGGCC TGCACAGAGG GGAGGCCCTCC TGTGGGGAGG GGGCCTGAGG 1277
GATCAAAGGC TCCAGGTTGG AACGGTGGGG GTGAGGAAGC AGAGCTGGTG ATTCTTAAAC 1337
TGTATCCAAT AGTAAGGCCT CTCCAATGGG ACAGAGCCTC CGCCTTGAGA TAACATCGGG 1397
TTCTGGCCAA AAAGAACACC AGCTCCAGTC CAAGACCCAA GGATTCAGG TCCAGGAACC 1457
AGGAGGGGTC GATGATTGGG TTTGGCTGAG AGTCCAGCA TTTGTGTAT GGGGAGGATC 1517
TCTCATCTTA GAGAAGATAA GGGGACAGGG CATTACAGCA AGCAGCTTG GGGTTTGGTC 1577
AGGAGATAAG CGCCCCCTTC CCTTGGGGGG AGGATAAGTG GGGGATGGTC AACGTTGGAG 1637
AAGAGTCAA GTTCTCACCA CCTTTCTAAC TACTCAGCTA AACTCGTTGA GGCTAGGGCA 1697
ACGTGACTTC TCTGTAGAGA GGATACAAGC CGGGCCTGAT GGGGCAGGCT GTGTAATCCC 1757
AGTCATAGTG GAGGCTGAGG CTGGAATAAT AAGACCAAC AGCCTGGGCA ATTAGTGTC 1817
TCAAAATAAA ATGPAAGAG GGTGGGAAT GTAGCTCAGT GGTAGGGTGT TTGTGTGAGG 1877
CTCTGGGATC AATAAGACAA AACAAACCAAC CAACCAAAA CCTTCCAAC AACAAAACCA 1937
ACCTCAAC CAAAAACTA TGTGGGTGTC TCTGAGTCTG GTTTGAAGAG AACCCGCAGC 1997

10

20

30

40

【数 1 - 1 7】

2057 CCTGTATCCC TGTGGGGCTG TGGACAGTGG GCAGAAGCAG AGGCTCCCTG GATCCTGAAC
 2117 AAGGGCCCCA AAAGCAAGTT CTAAGGGAC CCCTGAAACC GAGTAAGCCT TTGTGTCAAG
 2177 AAGTGGGAGT AGAACCCAGAA AGGTGGCTGA GTGATTAAAG GCACGTGACT CTCTTGCAGA
 2237 GGACATAGGT TCGATTCCCA GCACCCACAT AGTGGCTCAC AGCCATCTGT AACCCGAGTC
 2272 GCAGTCAATC TAATGCTTTC CAACAACGTG GGGCA

(2)配列番号 4 の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：372アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号 4：

Met Glu Leu Val Pro Ser Ala Arg Ala Glu Leu Gln Ser Ser Pro Leu

【 0 4 4 5】

10

20

30

40

【数 1 - 1 8】

1 5 10 15
 Val Asn Leu Ser Asp Ala Phe Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala
 20 25 30
 Asn Ala Ser Gly Ser Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
 35 40 45
 Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
 50 55 60
 Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Leu
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
 85 90 95
 Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
 100 105 110
 Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
 115 120 125
 Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
 130 135 140

10

20

30

【 0 4 4 6】

【数 1 - 1 9】

Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
 145 150 155 160
 Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
 165 170 175
 Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Gln Pro Arg
 180 185 190
 Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
 195 200 205
 Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
 210 215 220
 Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
 245 250 255
 Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Gly Ala Phe Val Val
 260 265 270
 Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp

10

20

30

【 0 4 4 7】

【 0 4 4 8 】

[illegible]

(2)配列番号5の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ：1330塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：CDS
- (B)存在位置：161..1261

(xi)配列：配列番号5：

AGCCGGAGCA GACCCCAAGC TAGAGTGAGA AGCATTACTC AGTTCATTGT GCTCCCTGCCT 60

GCCCTTCTGC TAAGCATTAG GGTCTGTTTT GGGCCAGCTT CTGAAGAGGT TGTGTGTGCT 120

GTTGGAGGAA CTGTACTGAG TGGCTTTGCA GGGTGACAGC ATG GAG TCC CTC TTT 175

Met Glu Ser Leu Phe
1 5

CCT GCC CCA TTC TGG GAG GTC TTG TAT GGC AGC CAC TTT CAA GGG AAC 223

Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Leu Tyr Gly Ser His Phe Gln Gly Asn
10 15 20

【数 1 - 2 2】

【 0 4 5 0】

CTG TCT CFC CTA AAT GAG ACC GTA CCC CAT CAC CTG CTC CTC AAT GCT 271
 Leu Ser Leu Leu Asn Glu Thr Val Pro His His Leu Leu Leu Asn Ala
 25 30 35
 AGC CAC AGT GCC TTC CTG CCC CTT GGA CTC AAG GTC ACC ATC GTG GGG 319
 Ser His Ser Ala Phe Leu Pro Leu Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly
 40 45 50
 CTC TAC TTG GCT GTG TGC ATC GGG GGG CTC CTG GGG AAC TGC CTC CTC 367
 Leu Tyr Leu Ala Val Cys Ile Gly Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val
 55 60 65
 ATG TAT GTC ATC CTC AGG CAC ACC AAG ATG AAG ACT GCT ACC AAC ATT 415
 Met Tyr Val Ile Leu Arg His Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
 70 75 80 85
 TAC ATA TTT AAT CTG GCA CTG GCT GAT ACC CTG GTC TTG CTG ACA CTG 463
 Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu
 90 95 100
 CCC TTC CAG GGC ACA GAC ATC CTT CTG GGC TTC TGG CCA TTT GGG AAT 511
 Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu Leu Gly Phe Trp Pro Phe Gly Asn
 105 110 115
 GCA CTG TGC AAG ACG GTC ATT GCT ATC GAC TAC TAC AAC ATG TTT ACC 559

10

20

30

40

【数 1 - 2 3】

Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
 120 125 130

AGC ACT TTC ACT TTG ACT GCC ATG AGT GTA GAC CGT TAT GTA GCT ATC 607
 Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile
 135 140 145

TGC CAC CCT ATC CGT GCC CTT GAT GTT CGG ACA TCC AGT AAA GCC CAG 655
 Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp Val Arg Thr Ser Ser Lys Ala Gln
 150 155 160 165

GCC GTT AAT GTG GCC ATA TGG GCC CTG GCT TCG GTG GTT GGT GTT CCT 703
 Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ser Val Val Gly Val Pro
 170 175 180

GTT GCC ATC ATG GGC TCA GCA CAA GTG GAG GAT GAA GAG ATC GAG TGC 751
 Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln Val Glu Asp Glu Ile Glu Cys
 185 190 195

CTG GTG GAG ATC CCC GCC CCT CAG GAC TAT TGG GGC CCT GTA TTT GCC 799
 Leu Val Glu Ile Pro Ala Pro Gln Asp Tyr Trp Gly Pro Val Phe Ala
 200 205 210

ATC TGC ATC TTC CTT TTT TCC TTC ATC ATC CCG GGT CTG ATC ATC TCT 847
 Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe Ile Ile Pro Val Leu Ile Ile Ser

10

20

30

【0 4 5 1】

40

【数 1 - 2 4】

【0 4 5 2】

215	220	225			
GTC TGC TAC AGC CTC ATG ATT CGA CGA CTT CGT GGT GTC CGG CTG CTT					895
Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg Arg Leu Arg Gly Val Arg Leu Leu					
230	235	240	245		
TCA GGC TCC CGA GAG AAG GAC CGG AAC CTG CGA CGC ATC ACA CGG CTG					943
Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu					
250	255	260			
GTA CTG GTA GTT GTG GCT GTG TTT GTG GGC TGC TGG ACA CCT GTG CAG					991
Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Gly Cys Trp Thr Pro Val Gln					
265	270	275			
GTC TTT GTC CTG GTT CAA GGA CTG GGT GTT CAG CCA GGT AGT GAG ACT					1039
Val Phe Val Leu Val Gln Gly Leu Gly Val Gly Val Pro Gly Ser Glu Thr					
280	285	290			
GCA GTA GCC ATT CTG CGC TTC TGC ACA GCC CTG GGC TAT GTC AAC AGT					1087
Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys Thr Ala Leu Gly Tyr Val Asn Ser					
295	300	305			
TGT CTC AAT CCC ATT CTC TAT GCT TTC TTC TTT GAT GAG AAC TTC AAG GCC					1135
Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ala					

10

20

30

40

【数 1 - 2 5】

310 315 320 325 1183
TGC TTT AGA AAG TTC TGC TGT GCT TCT GCC CTG CAC CGG GAG ATG CAG
Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala Ser Ala Leu His Arg Glu Met Gln
330 335 340
GTT TCT GAT CGT GTG CGC AGC ATC GCC AAG GAT GTA GGC CTT GGT TGC
Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile Ala Lys Asp Val Gly Leu Gly Cys
345 350 355
AAG ACC TCT GAG ACA GTA CCA CGG CCG GCA TGACTAGGCG TGGACCTGCC 1281
Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg Pro Ala
360 365
CATGCTGCCT GTCAGTCCAC AGAGCCCATC TACACCCAAC ACGGAGCTC 1330

(2)配列番号 6 の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：367アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (D)トポロジー：直鎖状

【 0 4 5 3 】

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号 6：

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

【数 1 - 2 7】

Trp Pro Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Tyr
 115 120 125
 Tyr Asn Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp
 130 135 140
 Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp Val Arg Thr
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ser
 165 170 175
 Val Val Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln Val Glu Asp
 180 185 190
 Glu Glu Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Ala Pro Gln Asp Tyr Trp
 195 200 205
 Gly Pro Val Phe Ala Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe Ile Ile Pro
 210 215 220
 Val Leu Ile Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg Arg Leu Arg
 225 230 235 240
 Gly Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg

【 0 4 5 5】

10

20

30

【数 1 - 2 8】

Arg Ile Thr Arg Leu Val Arg Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Gly Cys	245	250	255
260	265	270	
Trp Thr Pro Val Gln Val Phe Val Leu Val Gln Gly Leu Gly Val Gln	275	280	285
Pro Gly Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys Thr Ala Leu	290	295	300
Gly Tyr Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp	305	310	315
320			
Glu Asn Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala Ser Ala Leu	325	330	335
His Arg Glu Met Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile Ala Lys Asp	340	345	350
Val Gly Leu Gly Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg Pro Ala	355	360	365

10

20

30

【 0 4 5 6】

【数 1 - 2 9】

(2)配列番号 7 の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：24塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

10

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号 7：

GTGGGCAATT CACTAGTCAT GTTT**24**

(2)配列番号 8 の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：24塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

30

(xi)配列：配列番号 8：

CTGGGCAACG TACTAGTCAT GTTT**24**

(2)配列番号 9 の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：29塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

(ii)配列の種類：DNA

(ix)配列の特徴：

【 0 4 5 7 】

50

【数 1 - 3 0】

- (A)特徴を表わす記号：Y
- (B)存在位置：6, 12, 15, および18
- (C)特徴を決定した方法：Y = T または C

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：R
- (B)存在位置：7
- (C)特徴を決定した方法：R = G または A

10

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：N
- (B)存在位置：21
- (C)特徴を決定した方法：N = イノシン

(xi)配列：配列番号 9：

20

ACCAAYRTCT AYATYATYCT NAACCTGGC**29**

(2)配列番号10の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：26塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

30

(ii)配列の種類：DNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：N
- (B)存在位置：3
- (C)特徴を決定した方法：N = イノシン

40

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：R
- (B)存在位置：9 および 18
- (C)特徴を決定した方法：R = G または A

(ix)配列の特徴：

【 0 4 5 8 】

50

【数 1 - 3 1】

- (A)特徴を表わす記号：W
- (B)存在位置：13
- (C)特徴を決定した方法：W = A または T

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：K
- (B)存在位置：15
- (C)特徴を決定した方法：K = G または T

10

(xi)配列：配列番号10：

ACNGTCAGRC AGWAKATRCT GGTGAA**26**

(2)配列番号11の情報：

20

(i)配列の特色：

- (A)長さ：1000塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

30

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：N
- (B)存在位置：607-608, 642-643, 896, 906
- (C)特徴を決定した方法：N = A, C, G または T

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表わす記号：CDS

40

【0 4 5 9】

(B)存在位置：102..986

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表わす記号：Xaa

(B)存在位置：169, 181, 265, 269

(C)特徴を決定した方法：Xaa = 不明

(xi)配列：配列番号11：

AAGAAGCAAA ATCAGTAATC CAAAGGCTAT CACAAACACA TTCACCTTAT GGGGTTTGAC 60

TTGAAAATGG AGGGAATGC TATTGTTTCT TTTCCTTTAG A TAC ACA AAG ATG AAG 116

Tyr Thr Lys Met Lys

5

ACA GCA ACC AAC ATT TAC ATA TTT AAC CTG GCT TTG GCA GAT GCT TTA 164

Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu

10

15

20

GTT ACT ACA ACC ATG CCC TTT CAG AGT ACG GTC TAC TTG ATG AAT TCC 212

Val Thr Thr Thr Met Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser

25

30

35

【数 1 - 3 3】

TGG CCT TTT GGG GAT GTG CTG TGC AAG ATA GTA ATT TCC ATT GAT TAC 260
 Trp Pro Phe Gly Asp Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr
 40 45 50
 TAC AAC ATG TTC ACC AGC ATC TTC ACC TTG ACC ATG ATG AGC GTG GAC 308
 Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp
 55 60 65
 CGC TAC ATT GCC GTG TGC CAC CCC GTG AAG GCT TTG GAC TTC CGC ACA 356
 Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr
 70 75 80 85
 CCC TTG AAG GCA AAG ATC ATC AAT ATC TGC ATC TGG CTG CTG TCG TCA 404
 Pro Leu Lys Ala Lys Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser
 90 95 100
 TCT GTT GGC ATC TCT GCA ATA GTC CTT GGA GGC ACC AAA GTC AGG GAA 452
 Ser Val Gly Ile Ser Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu
 105 110 115
 GGT GTC GAT GTC ATT GAG TGC TGC TTG CAG TTC CCA GAT GAT GAC TAC 500
 Asp Val Asp Val Ile Glu Cys Cys Leu Gln Phe Pro Asp Asp Tyr
 120 125 130

【 0 4 6 1 】

10

20

30

40

【数 1 - 3 4】

TCC TGG TGG GAC CTC TTC ATG AAG ATC TGC GTC TTC ATC TTC GCC TTC 548
 Ser Trp Trp Asp Leu Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe
 135 140 145

 GTG ATC CCT GTC CTC ATC ATC ATC GTC TGC TAC ACC CTG ATG ATC CTG 596
 Val Ile Pro Val Leu Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu
 150 155 160 165

 CGT CTC AAG ANN GTC CGG CTC CTT TCT GGC TCC CGA GAG AAA GAT NNC 644
 Arg Leu Lys Xaa Val Arg Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Xaa
 170 175 180

 AAC CTG CGT AGG ATC ACC AGA CTG CTC CTC GTG GTG GCA GTC TTC 692
 Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu Val Leu Val Val Ala Val Phe
 185 190 195

 GTC GTC TGC TGG ACT CCC ATT CAC ATA TTC ATC CTC GTG GAG GCT CTG 740
 Val Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu
 200 205 210

 GGG AGC ACC TCC CAC AGC ACA GCT GCT CTC TCC AGC TAT TAC TTC TGC 788
 Gly Ser Thr Ser His Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys
 215 220 225

【0 4 6 2】

10

20

30

【数 1 - 3 5】

【 0 4 6 3 】

ATC GCC TTA GGC TAT ACC AAC AGT AGC CTG AAT CCC ATT CTC TAC GCC	836
Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala	245
230	235
TTT CTT GAT GAA AAC TTC AAG CGG TGT TTC CGG GAC TTC TGC TTT CCA	884
Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro	260
250	255
CTG AAG ATG AGN ATG GAG CGC NAG AGC ACT AGC AGA GTC CGA AAT ACA	932
Leu Lys Met Xaa Met Glu Arg Xaa Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr	275
265	270
GTT CAG GAT CCT GCT TAC CTG AGG GAG ATC GAT GGG ATG ATG AAT AAA	980
Val Gln Asp Pro Ala Tyr Leu Arg Glu Ile Asp Gly Met Met Asn Lys	290
280	285
CCA GTA TGACTAGTCG TGGA	1000
Pro Val	295

(2)配列番号12の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：295アミノ酸

10

20

30

40

(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(ix)配列の特徴：
(A)特徴を表わす記号：Xaa
(B)存在位置：169, 181, 265, 269
(C)特徴を決定した方法：Xaa = 不明

(xi)配列：配列番号12：

Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala 15
5 10
Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Met Pro Phe Gln Ser Thr Val 30
20 25
Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp Val Leu Cys Lys Ile Val 45
35 40
Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr 60
50 55 60

【数 1 - 3 7】

Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala
65 70 75 80

Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys Ile Ile Asn Ile Cys Ile
85 90 95

Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser Ala Ile Val Leu Gly Gly
100 105 110

Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile Glu Cys Cys Leu Gln Phe
115 120 125

Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu Phe Met Lys Ile Cys Val
130 135 140

Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu Ile Ile Val Cys Tyr
145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Xaa Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser
165 170 175

Arg Glu Lys Asp Xaa Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu Val Leu Val
180 185 190

【 0 4 6 5】

10

20

30

【数 1 - 3 8】

Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Phe Ile
195 200 205

Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His Ser Thr Ala Ala Leu Ser
210 215 220

Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Ser Leu Asn
225 230 235 240

Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg
245 250 255

Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Xaa Met Glu Arg Xaa Ser Thr Ser
260 265 270

Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala Tyr Leu Arg Glu Ile Asp
275 280 285

Gly Met Met Asn Lys Pro Val
290 295

【0 4 6 6】

10

20

30

【数 1 - 3 9】

(2)配列番号13の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：28アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号13：

Leu Ile Ile Ala Lys Met Arg Met Val Ala Leu Lys Ala Gly Trp Gln
5 10 15
Gln Arg Lys Arg Ser Glu Arg Lys Ile Thr Leu Met
20 25

(2)配列番号14の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：28アミノ酸

【 0 4 6 7 】

10

20

30

【数 1 - 4 0】

- (B)型：アミノ酸
- (D)トポロジー：直鎖状
- (ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号14：

Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg15

510

Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Lys Leu2025

(2)配列番号15の情報：

- (i)配列の特色：
 - (A)長さ：28アミノ酸
 - (B)型：アミノ酸
 - (D)トポロジー：直鎖状
- (ii)配列の種類：タンパク質

【 0 4 6 8】

【数 1 - 4 1】

【 0 4 6 9】

(xi)配列：配列番号15：

Leu Met Leu Leu Arg Leu Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys
5 10 15

Glu Lys Asp Arg Ser Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met
20 25

(2)配列番号16の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：18アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号16：

Asp Arg Tyr Val Ala Val Val His Pro Ile Lys Ala Ala Arg Tyr Arg
5 10 15

10

20

30

【数 1 - 4 2】

Arg Pro

(2)配列番号17の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：18アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号17：

Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
5 10 15

Thr Pro

【0 4 7 0】

10

20

30

【数 1 - 4 3】

(2)配列番号18の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

10

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号18：

TATCTAGGTC GACGG**15**

(2)配列番号19の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

30

(xi)配列：配列番号19：

CATCTTAGCA ATGAT**15**

(2)配列番号20の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

【 0 4 7 1 】

【数 1 - 4 4】

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号20：

GTCGAGAATT CCCCCG

15

(2)配列番号21の情報：

10

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

20

(xi)配列：配列番号21：

CAGGCGCAGT AGCAT

15

(2)配列番号22の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

30

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号22：

40

TAGGTCGACG GTATC

15

【 0 4 7 2 】

【数 1 - 4 5】

(2)配列番号23の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

10

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号23：

CAGGCGCAGG ATCAT -**15**

(2)配列番号24の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

30

(xi)配列：配列番号24：

CGCATGGTGG CCCTC**15**

(2)配列番号25の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

【 0 4 7 3 】

【数 1 - 4 6】

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号25：

GGTGATCTTG CGCTC

15

(2)配列番号25の情報：

10

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

20

(xi)配列：配列番号26：

CGCAGCGTGC GTCTG

15

(2)配列番号27の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

30

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号27：

CGTGATCCGC CGCAG

15

40

【 0 4 7 4 】

【数 1 - 4 7】

(2)配列番号28の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

10

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号28：

AAGAGTGTCC GGCTC**15**

(2)配列番号29の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

30

(xi)配列：配列番号29：

GGTGATCCGG CGGAG**15**

【 0 4 7 5 】

【数 1 - 4 8】

(2)配列番号30の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

10

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号30：

GAGCGCAAGA TCACC**15**

(2)配列番号31の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

30

(xi)配列：配列番号31：

TCGAGAATTC CCCGG**15**

(2)配列番号32の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

【 0 4 7 6 】

【数 1 - 4 9】

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号32：

CTGCGGCGCG ATCAC**15**

(2)配列番号33の情報：

10

(i)配列の特色：

(A)長さ：16塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

20

(xi)配列：配列番号33：

TAGGTCGACG GTGTGG**16**

(2)配列番号34の情報：

(i)配列の特色：

30

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号34：

40

CTCCGGCGGA TCACC**15**

【 0 4 7 7 】

(2)配列番号35の情報:

10

(xi)配列：配列番号35：

15

20

(D) トポロジー：直鎖状

30

10

40

(B)型：アミノ酸

【 0 4 7 8 】

(D) トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号37：

10

(i)配列の特色：

20

(D) トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号98：

30

(i)配列の特色：

40

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

【 0 4 7 9 】

【数 1 - 5 2】

(xi)配列：配列番号39：

Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Asp Pro Gly Pro Thr Cys Ser
5 10 15

(2)配列番号40の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：13アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号40：

Ser Asp Ala Phe Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala
5 10

【 0 4 8 0 】

10

20

30

【数 1 - 5 3】

(2)配列番号41の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 13アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

10

(ii)配列の種類: タンパク質

(xi)配列: 配列番号41:

Ala Thr Thr Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser
 5 10

(2)配列番号42の情報:

20

(i)配列の特色:

(A)長さ: 27塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA

30

(xi)配列: 配列番号42:

CTGGGCAACG TACTAGTCAT GTTTGGC

27

(2)配列番号43の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 27塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

40

【 0 4 8 1 】

【数 1 - 5 4】

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号43：

GTGGGCAATT CACTAGTCAT GTTTGTC**27**

(2)配列番号44の情報：

10

(i)配列の特色：

(A)長さ：21塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA

20

(xi)配列：配列番号44：

GCTCTCCATT AACTACTACA A**21**

(2)配列番号45の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：21塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

30

(ii)配列の種類：DNA

(xi)配列：配列番号45：

40

GGCGGCCCAT CAACATCTTCG T**21**

【0 4 8 2】

【数 1 - 5 5】

(2)配列番号46の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：18アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号46：

Ala-Thr-Thr-Arg-Glu-Arg-Val-Thr-Ala-Cys-Thr-Pro-Ser

10

【図 1】

```

MORK1 MESPIGIFRGDPGFTCPFSACLENSSSW.....:FPNWAESDSNGSVGSEDDQLESANISPAIFVEITAVY
MORD1 ME.....:LVP SARAEIQSSPLVNLSDAFFSAFFSAGANASGSPGARSASSL:::ALALAITALY
MORK1 SVVTVUGLVGNSLVMEVILRYTKMTATNIYIFNLALADALVTTIMPFQSAVYLNNSWPFQGVLCRIVISID
MORD1 SAVCAVGLLGVLVMEGIVRYTKMTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSAKYLMETNPFQGLLCKAVLSID
MORK1 YNNMETSIFELTNMSVDRYLAVCHPVKALDFRTPAKAKLINICIMWLLASSVVGISAIVLGGTKVREDVDVIEC
MORD1 YNNMETSIFELTNMSVDRYLAVCHPVKALDFRTPAKAKLINICIMWLLASSVVGISAIVLGGTKVREDVDVIEC
MORK1 SLQFFPDDEYSWOLFNMKICITVFAFVIFVLLITFVCTLMILRLKSVLLSGSREKDRNLRRITKLVLVVAV
MORD1 MLQFFSPSW:YVDVTXKICVLFIAVVPILLITVCYGLMLRLASVLLSGSKEKDRSLRRITRMVLVVGA
MORK1 FTECHTFIHIFILVEALGSTSHSTAALSSYF:FCIALGYTNSSLNPFVLYAFLENTKRCFRDFCFPIKMRME
MORD1 FVVCWAFIRHIFIVWTLVDINRRDPLVVAALHICLALGYANSSLNPFVLYAFLENTKRCFRQLCRTECGRQE
MORK1 RQSTNVRNIVQDP:::ASHROVVGGMKPV - 380 (配列番号2)
MORD1 PGSLARPQATTREAVTACTFSDDGGGGGAAA - 372 (配列番号4)

```

FIG. 1

【図 2 A】

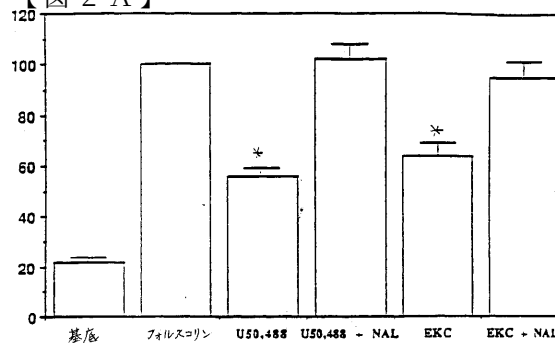


FIG. 2a

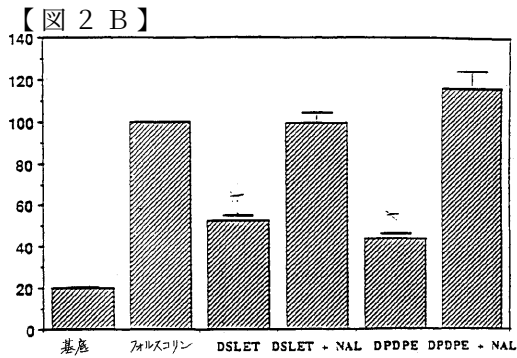


FIG. 2b

【図 3】

```

1  AAGAAGCAAAATCAGTAATCCAAAGGCTATCACAACACATTCACCTTATGGGTTTGAC
    TyrThrLysMetLysThrAla
61  TTGAAATGGAGGAAATGCTATGTTCTTCTTTTACATACACAAGATGACACAG
    ThrAsnIleTyrIlePheAsnLeuAlaLeuAlaAspAlaLeuValThrThrMetPro
121  CAACCAACATTACATATTTAAGCTGCTTGGCAGATGCTTTAGTTACTCAACCATGG
    PheGlnSerThrValTyrLeuMetAsnSerTrpProPheGlyAspValLeuCysLysIle
181  CCTTCAGAGTACGGTCTACTGATGAATTCCTGCGCTTTGGGGATGCTGCTGCAAGA
    ValIleSerIleAspTyrTyrAsnMetPheThrSerIlePheThrLeuThrMetSer
241  TAGTAATTCATTGATTACTACAACATGTTCCAGCAGCATCTTACCTTGACCATGATGA
    ValAspArgTyrIleAlaValCysHisProValLysAlaLeuAspPheArgThrProLeu
301  GCGTGACCGCTACATTCGCGTGGCCACCCCGTGAGGCTTTGAGCTTCCGACACCGCT
    LysAlaLysIleIleAsnIleCysIleTrpLeuLeuSerSerSerValGlyIleSerAla
361  TGAAGGCAAGATCATCAATATCTGCATCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    IleValLeuGlyGlyThrLysValArgGluA
421  CAATAGTCTCTGGAGGCCACCAAGTCAGGGAAGGT:TTTTCTGTTGTTCT
    spValAspValIleGluCysLysLeuGlnPheProAsp
481  GGTITTTATGGCTCTCTCCAGCTCGATGTCATTGAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    AspAspTyrSerTrpTrpAspLeuPheMetLysIleCysValPheIlePheAlaPheVal
541  GATGACTACTCTGCTGGAGCTCTCTCATGAAGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    IleProValLeuIleIleIleValCysTyrThrLeuMetIleLeuArgLeuLysNNNVal
601  ATCCCTGTCTCATCATCATCTGCTGCTACACCTGATGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    ArgLeuLeuSerGlySerArgGluLysAspNNNAsnLeuArgArgIleThrArgLeuVal
661  CGGCTCCTTTCTGGCTCCGAGAGAAAGATNNCAACCTGCTAGGATCACCAGACTGGTC
    LeuValValValAlaValPheValValCysTrpThrProIleHisIlePheIleLeuVal
721  CTGCTGCTGCTGGAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    GluAlaLeuGlySerThrSerHisSerThrAlaAlaLeuSerSerTyrThrPheCysIle
781  GAGGCTCTGGGGAGCAGCTCTCCACAGCAGCTGCTCTCTCCAGCTATTACTTCTGCTG
    AlaLeuGlyTyrThrAsnSerSerLeuAsnProIleLeuTyrAlaPheLeuAspGluAsn
841  GCGTTAGGCTATCCACAGCTAGCTGATTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    PheLysArgCysPheArgAspPheCysPheProLeuLysMetNNNMetGluArgNNNSer
901  TTCAGCGGCTGTTCCGGGACTCTGCTGCTTCCAGTGAAGATGAGNATGGAGCGNAGAGC
    ThrSerArgValArgAsnThrValGlnAspProAlaTyrLeuArgGluIleAspGlyMet
961  ACTAGCAGAGTCCGAAATACAGTTTCAGGATCTGCTGCTTACCTGAGGAGATCGATGGGATG
    MetAsnLysProValop
1021 ATGAATAAACAGTATGACTAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
    ( 配列番号 12 )
    ( 配列番号 11 )
  
```

FIG. 3

【図 4 A】

```

1  Met Glu Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Asp Pro Gly Pro Thr Cys
    1 5 10 15
2  Ser Pro Ser Ala Cys Leu Leu Pro Asn Ser Ser Ser Trp Phe Pro Asn
    20 25 30 35
3  Trp Ala Glu Ser Asp Ser Asn Gly Ser Val Gly Ser Glu Asp Gln Gln
    40 45 50
4  Leu Glu Ser Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Thr Ala
    55 60 65
5  Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
    70 75 80
6  Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
    85 90 95
7  Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
    100 105 110
8  Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Met
    115 120 125
9  Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Met
    130 135 140
10  Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
    145 150 155
11  Pro Phe Gln Ser Ala Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
    160 165 170
12  Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
    175 180 185
13  Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
    190 195 200
14  Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
    205 210 215
15  Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
    220 225 230
16  Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
    235 240 245
17  Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
    250 255 260
18  Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
    265 270 275
19  Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
    280 285 290
20  Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
    295 300 305
21  Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
    310 315 320
22  Glu Cys Cys Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
    325 330 335
23  Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Glu Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
    340 345 350
24  Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
    355 360 365
25  Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Val Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
    370 375 380
26  Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys NNN Val
    385 390 395
27  Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
    400 405 410
  
```

FIG. 4a

【図 4 B】

```

1  Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp NNN Asn Leu Arg Arg Ile
    マウス 260 265 270
2  Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
    ヒト 275 280 285
3  Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
    マウス 290 295 300
4  Thr Lys Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Ile Ile Cys Trp Thr
    ヒト 305 310 315
5  Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
    マウス 320 325 330
6  Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
    ヒト 335 340 345
7  Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
    マウス 350 355 360
8  Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
    ヒト 365 370 375
9  Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
    マウス 380 385 390
10  Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
    ヒト 395 400 405
11  Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met NNN Met
    マウス 410 415 420
12  Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Ile Lys Met Arg Met
    ヒト 425 430 435
13  Glu Arg NNN Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
    マウス 440 445 450
14  Glu Arg Gln Ser Thr Asn Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
    ヒト 455 460 465
15  Tyr Leu Arg Glu Ile Asp Gly Met Met Asn Lys Pro Val ( 配列番号 12 )
    マウス 470 475 480
16  Ser Met Arg Asp Val Gly Gly Met Asn Lys Pro Val ( 配列番号 2 )
    ヒト 485 490 495
  
```

FIG. 4b

【図 5-1】

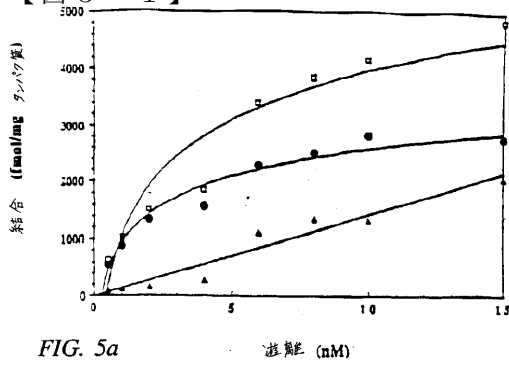


FIG. 5a

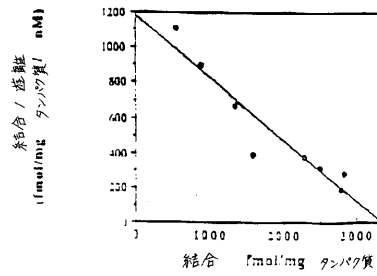


FIG. 5b

【図 5-2】

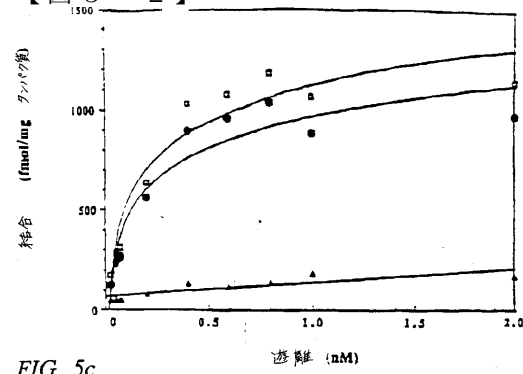


FIG. 5c

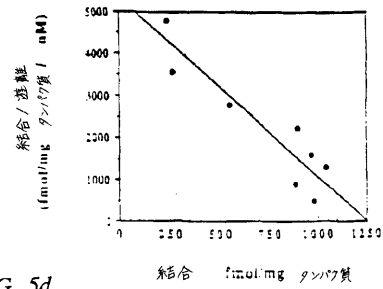


FIG. 5d

【図 5-3】

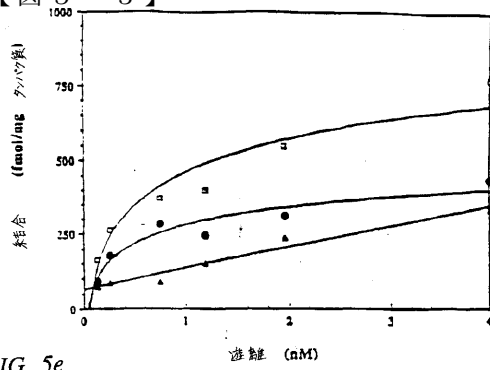


FIG. 5e

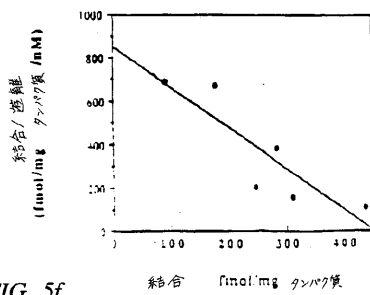


FIG. 5f

【図 6 A】

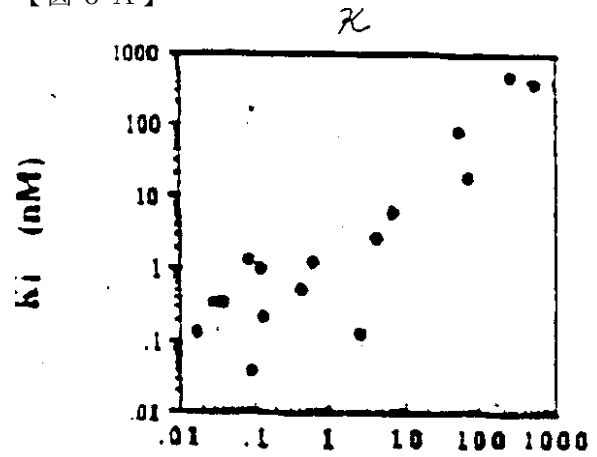


FIG. 6a

【図 6 B】

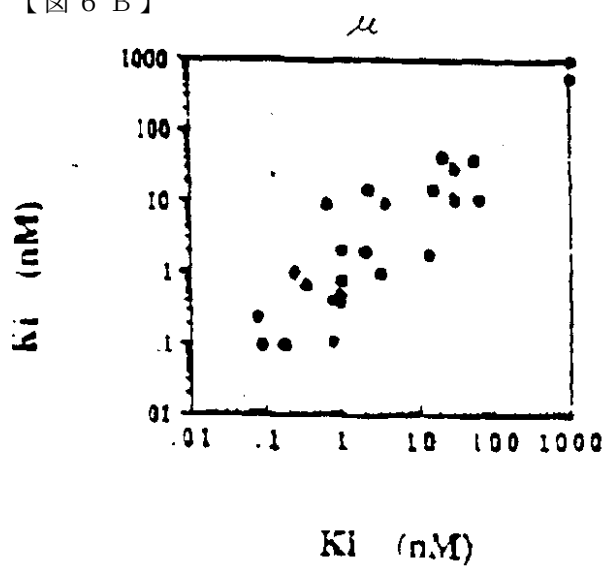
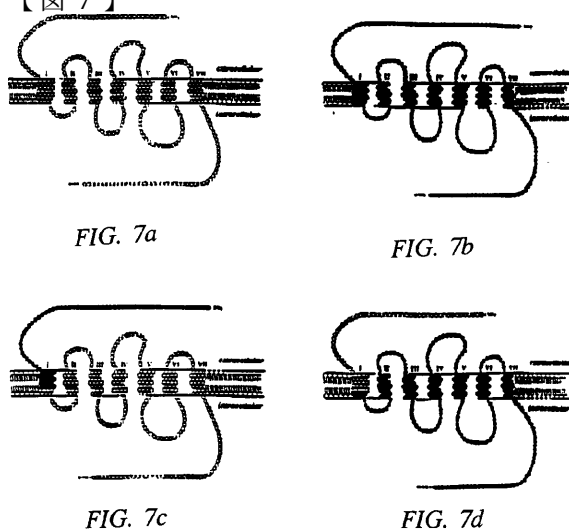


FIG. 6b

【図 7】



【図 8】

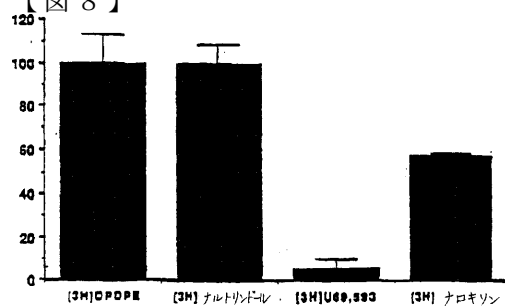


FIG. 8

【図 9 B】

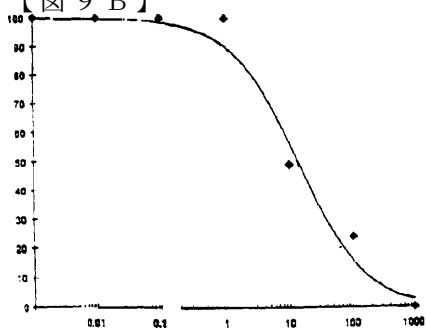


FIG. 9b

【図 9 A】

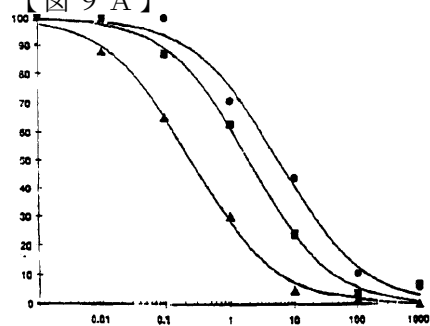


FIG. 9a

【図 10 A】

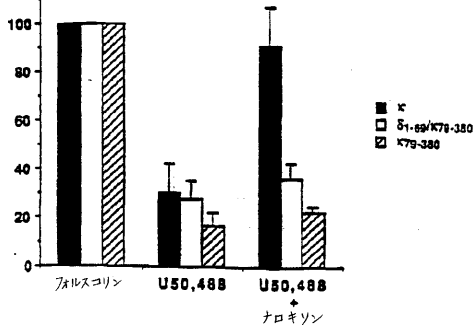


FIG. 10a

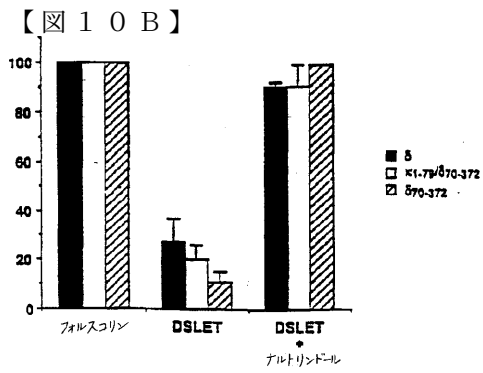


FIG. 10b

【図 11】
FIG. 11a

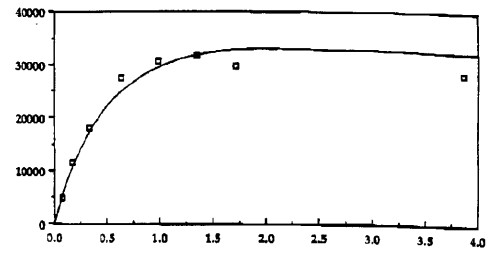


FIG. 11b

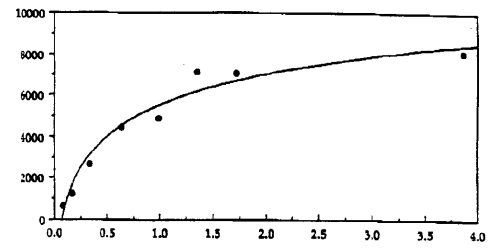
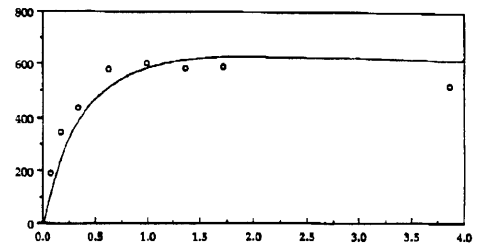


FIG. 11c



【図 12】
FIG. 12a

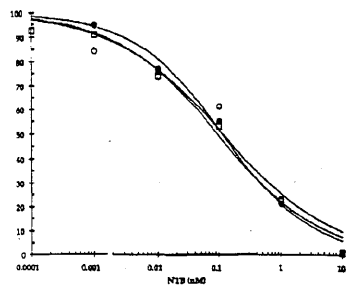


FIG. 12b

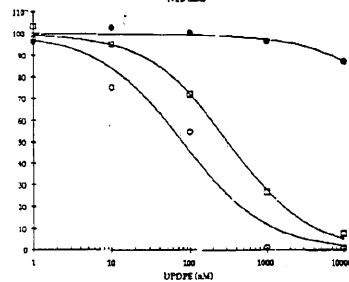
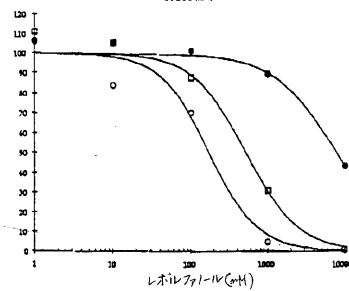


FIG. 12c



【図 13】

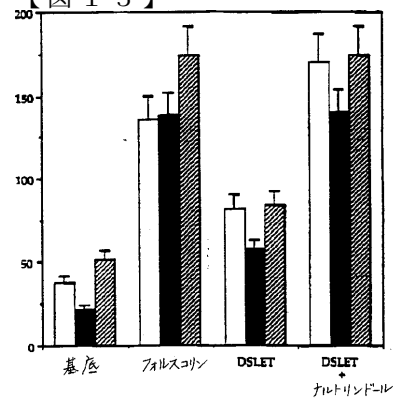
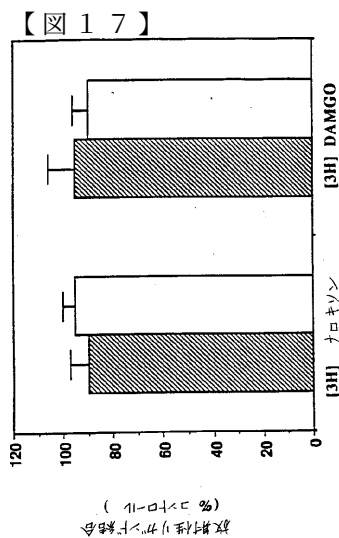
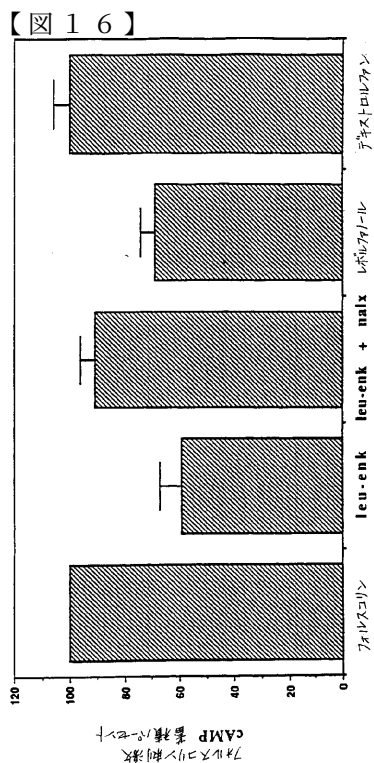
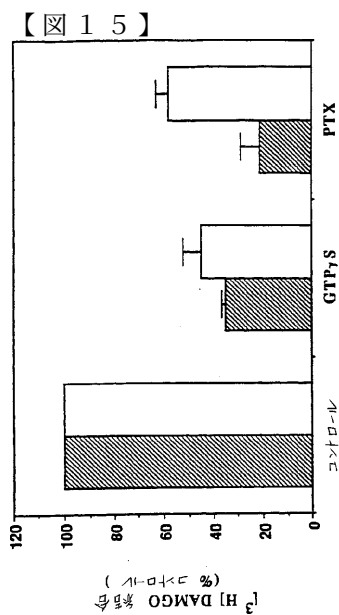
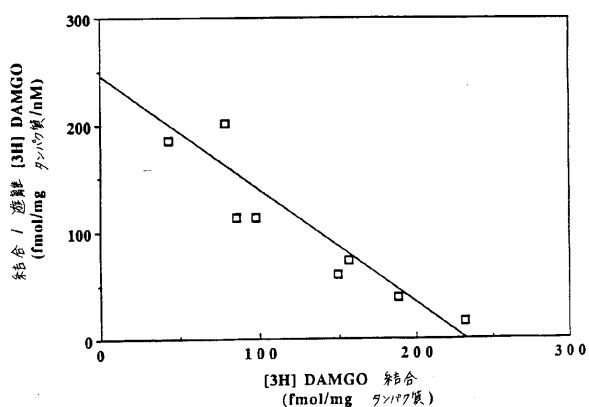
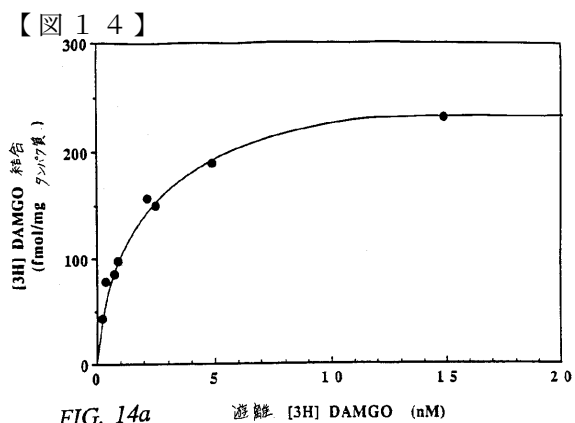


FIG. 13



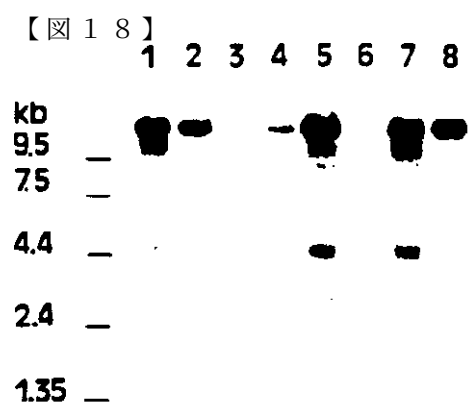


FIG. 18

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/72	
C 0 7 K 14/72	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 テリー レイジーン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 9 1 0 4, フィラデルフィア, サウス 4 4 ストリート
4 3 8

(72)発明者 安田 和基

東京都町田市金井町 2 1 3 4 - 6 5

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37
 DA77 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA20 DA02 EA04 GA13 HA14
 4B063 QA01 QQ53 QR32 QR56 QS34 QX07
 4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA26X AA90X AA91Y AB01 AC14 BA02 BA05 BC03 BC07 CA24
 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DB64 NA06 NA14
 ZA011 ZA081 ZA361 ZA591 ZA661 ZB021 ZB212 ZC211 ZC411 ZC412
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	阿片类受体：组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005124574A	公开(公告)日	2005-05-19
申请号	JP2004307483	申请日	2004-10-21
申请(专利权)人(译)	拱门开发公司		
[标]发明人	グレイムアイベル テリーレイジーン 安田和基		
发明人	グレイム アイ. ベル テリー レイジーン 安田 和基		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61P1/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P37/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K2319/00 C07K2319/033 C07K2319/32		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P1/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K14/72 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DB64 4C084/NA06 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA081 4C084/ZA361 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZB021 4C084/ZB212 4C084/ZC211 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	08/066296 1993-05-20 US 08/100694 1993-07-30 US 08/147592 1993-11-05 US		
其他公开文献	JP2005124574A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供分离和纯化的编码各种阿片受体多肽的多核苷酸。 解决方案：在特定氨基酸残基序列中，对应于至少48个连续氨基酸的多核苷酸用于编码各种阿片受体多肽。 [选择图]无

[illegible]