

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 514574

(P2003 - 514574A)

(43)公表日 平成15年4月22日(2003.4.22)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/705	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/705		16/28	4 B 0 2 4
16/28		19/00	4 B 0 6 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 50数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 540111(P2001 - 540111)

(86)(22)出願日 平成12年11月14日(2000.11.14)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月27日(2002.5.27)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/11209

(87)国際公開番号 W001/038348

(87)国際公開日 平成13年5月31日(2001.5.31)

(31)優先権主張番号 99123567.2

(32)優先日 平成11年11月26日(1999.11.26)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト
ベシュレンクテル ハフトング
MERCK PATENT GESEL
LSCHAFT MIT BESCHR
AENKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシ
ユタット フランクフルター シュトラ
ーセ 250

(72)発明者 クルクセン、 フランツ - ヴェルナー
ドイツ連邦共和国 64367 ミュールタル
バーンホフシュトラーセ 39

(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Gタンパク質共役型受容体HTOGH35

(57)【要約】

HTOGH35ポリペプチドおよびそのポリヌクレオチド、ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。診断アッセイにおいて、HTOGH35ポリペプチドおよびそのポリヌクレオチドを用いるための方法もまた開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(b) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列；および

(e) (a)～(d)のポリペプチドの断片および変異体からなる群の1つから選択されるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号：2のポリペプチド配列である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：1の配列、あるいは少なくとも15塩基長を有するその断片を有する、標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも100

塩基長のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(f)(a)～(e)のポリヌクレオチドのRNA等価体であるポリヌクレオチド；

または前記単離されたポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド配列、ならびに上述するポリヌクレオチドの変異体および断片である、あるいは、上述のポリヌクレオチドに対して、その全長にわたって相補的であるかのポリヌクレオチド

からなる群の1つから選択されるポリヌクレオチド。

【請求項5】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、および

(d) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

からなる群から選択される、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 かかる発現ベクターが、適合した宿主細胞に存在する際に、請求項1に記載のポリペプチドの産生が可能なポリヌクレオチドを含んでなる発現システム。

【請求項7】 請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現している、請求項6に記載の発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドを製造する方法であって、
該ポリペプチドの産生に十分な条件下で請求項7に記載の宿主細胞を培養し、該ポリペプチドを培養培地から回収するステップを含む方法。

【請求項9】 免疫グロブリンのFc領域と、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドの一つとからなる融合タンパク質。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか一項に記載されるポリペプチドに対する、免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1～3のいずれか一項に記載されるポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞もしくは膜)またはその融合タンパク質に対する候補化合物の結合を、該候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識によって、定量的または定性的に、測定または検出すること;

(b) 該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞もしくは膜)またはその融合タンパク質に対する候補化合物の結合の競合を、標識された競合剤の存在下で測定すること;

(c) 該ポリペプチドの活性化または阻害によって発生されるシグナルを、かかる候補化合物が生じさせるか否かを、該ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適合する検出システムを使用して試験すること;

(d) 候補化合物を、請求項1～3のいずれか一項に記載されるポリペプチドを含有する溶液と混合して混合物を作製し、該混合物中での該ポリペプチドの活性を測定し、そして、なんらの候補化合物を含んでいないコントロール混合物と、該混合物の活性を比較すること;または

(e) 細胞内における、前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの産生に対する候補化合物の作用を、例えばELISAアッセイを使用して検出すること、

からなる群から選択される方法および

(f) 生物工学的または化学的な標準的な技術に従って、前記化合物を製造すること

を含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、以降、時に、HTOGH35と称する、新たに同定されたポリペプチド、およびかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断ならびに、治療において潜在的に有用なアゴニスト、アンタゴニストとなりえる化合物の同定におけるそれらの使用、ならびに、かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドの製造に関する。HTOGH35は、Gタンパク質共役型受容体の部類の一員である。

【0002】**(発明の背景)**

医薬探索プロセスは、現在、「機能的ゲノミクス」、すなわち、ハイ・スループットな、ゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を取り込むことで、根本的な革新を経験しつつある。治療の標的として、遺伝子および遺伝子産物を同定する手段として、この方法は、迅速に、「ポジショナル・クローニング」に基づく従前の方法に取って代わりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝子的疾患を同定し、その後、その遺伝子地図の位置に基づいて、その原因となる遺伝子の探知がなされる。

【0003】

機能的ゲノミクスは、ハイ・スループットなDNA配列決定技術、および現に入手可能な多くの分子生物学データベースから、潜在的な重要性を有する遺伝子配列を同定するためのバイオ・インフォマティクスの様々なツールに、大きく頼っている。医薬探索の標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を同定し、その特定を行うことが引き続き求められている。

【0004】

多くの医学的に重要な生物学的プロセスは、G-タンパク質および/または二次メッセンジャー、例えば、cAMPが関与しているシグナル伝達経路に関係をもっているタンパク質によって媒介されていることは、十分に確立されている(Lefkowitz, Nature, 1991, 351:353~354

)。本明細書中では、これらのタンパク質は、G - タンパク質とともに経路に係しているタンパク質、またはPPG - タンパク質と呼ばれる。これらのタンパク質の例には、アドレナリン作動剤およびドーパミンに対するもの等 (Kobilka, B.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:46~50; Kobilka, B.K. et al., Science, 1987, 238:650~656; Bunzow, J.R. et al., Nature, 1988, 336:783~787) のGPC受容体、G - タンパク質自体、エフェクター・タンパク質、例えば、ホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼおよびホスホジエステラーゼ、ならびにアクチュエーター・タンパク質、例えば、プロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼC (Simon, M.I. et al., Science, 1991, 252:802~8) が含まれる。

【0005】

例えば、シグナル伝達の1つの形態において、ホルモン結合の作用は、細胞内における、酵素、アデニレート・シクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素の活性化は、ヌクレオチドGTPの存在に依存している。GTPもまた、ホルモン結合に影響を及ぼしている。G - タンパク質は、ホルモン受容体をアデニレート・シクラーゼと連結する。G - タンパク質は、ホルモン受容体によって活性化された際、GTPを結合型GDPへと変換することが示されている。その際、GTP担持体は、活性化されたアデニレート・シクラーゼと結合する。G - タンパク質自体によって触媒されるGTPのGDPへの加水分解は、G - タンパク質をその基底型の不活性体へと戻す。従って、G - タンパク質は、受容体からエフェクターへのシグナルを中継する介在物として、そして、シグナルの持続時間を制御する時計としての、二重の役割を果たす。

【0006】

G - タンパク質共役型受容体の膜タンパク質遺伝子スーパーファミリーは、7個の推定的な膜貫通ドメインを有していることで特徴付けられている。該ドメインは、細胞外ならびに細胞質内ループによって連結された膜貫通 - ヘリックスを表していると考えられる。G - タンパク質共役型受容体には、ホルモン、ウイ

ルス、増殖因子ならびに神経の受容体などの、幅広い生物学的に活性な受容体が含まれる。

【0007】

G - タンパク質共役型受容体（一方では、7 TM受容体として知られている）は、少なくとも8個の分散された親水性ループを連結している、約20～30アミノ酸からなるこれらの7個の保存された疎水性領域を含んでいることで特徴付けられている。G - タンパク質に対する共役型受容体ファミリーには、精神病的ならびに神経学的な不調を治療するために使用されている神経遮断薬と結合する、ドーパミン受容体が含まれる。このファミリーのメンバーの他の例には、それらに限られないものの、カルシトニン、アドレナリン作動性、エンドセリン、cAMP、アデノシン、ムスカリン作動性、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンピン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オプシン類、内皮細胞分化遺伝子-1、ロドプシン類、オドラントならびにサイトメガロウイルスの受容体が含まれる。

【0008】

ほとんどのG - タンパク質共役型受容体は、機能的なタンパク質構造を安定化させると考えられる、ジスルフィド結合を形成する、各1個の保存されたシステイン残基を最初の2つの細胞外ループそれぞれに有している。7個の膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と名付けられている。TM3は、シグナル伝達と関係があるとされている。

【0009】

システイン残基のリン酸化および脂質化（パルミチル化またはファルネシル化）は、幾つかのG - タンパク質共役型受容体のシグナル伝達に影響を及ぼす可能性がある。ほとんどのG - タンパク質共役型受容体は、潜在的なリン酸化部位を第3の細胞質内ループおよび/またはカルボキシ端部の内に含んでいる。 - アドレナリン受容体などの、いくつかのG - タンパク質共役型受容体においては、プロテインキナーゼAおよび/または特異的な受容体キナーゼによるリン酸化は、受容体の不感化を引き起こす。

【0010】

一部の受容体について、G - タンパク質共役型受容体のリガンド結合部位は、数個のG - タンパク質共役型受容体の膜貫通ドメインによって形成された親水性のソケットで構成されていると考えられており、前記ソケットはG - タンパク質共役型受容体の疎水性残基で取り囲まれている。G - タンパク質共役型受容体の各膜貫通ヘリックスの親水性側は、内部に向いており、極性なリガンドの結合部位を形成していると考えられている。T M 3は、T M 3のアスパラギン酸残基などの、リガンド結合部位を有しており、多くのG - タンパク質共役型受容体に関わっている。T M 5の数個のセリン、T M 6の1個のアスパラギン、ならびにT M 6またはT M 7の数個のフェニルアラニンまたはチロシンもまた、リガンド結合に関係があるとされている。

【0011】

G - タンパク質共役型受容体は、細胞内において、様々な細胞内酵素、イオンチャンネルおよび輸送因子に対して、ヘテロ三量体となるG - タンパク質によって連結されることもある(Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10:317~331を参照のこと)。種々のG - タンパク質の - サブユニットは、細胞内の様々な生物学的機能を調節する、特定のエフェクターを選択的に刺激する。G - タンパク質共役型受容体の細胞質残基のリン酸化は、幾つかのG - タンパク質共役型受容体のG - タンパク質共役を調節する上での重要な機構として同定されている。G - タンパク質共役型受容体は、哺乳動物宿主内において、多数の部位で見出されている。

【0012】

この15年間にわたって、7回膜貫通型(7TM)受容体を標的としている、350近くの治療剤の市場導入が、成功している。

(発明の概要)

本発明はHTOGH35に関し、特に、HTOGH35ポリペプチドおよびHTOGH35ポリヌクレオチド、組換え体およびその製造方法に関する。かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それらに限定はされないものの、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2によって引き起こされる感染症などの感染症；痛み；ガン；糖尿病、肥満；食欲不

振；過食症；喘息；パーキンソン病；急性心不全；低血圧；高血圧；尿閉；骨粗鬆症；狭心症；心筋梗塞；発作；潰瘍；喘息；アレルギー；良性の前立腺肥大；片頭痛；嘔吐；不安、精神分裂症、躁鬱病、鬱病、譫妄、痴呆および重症な精神遅延を含む、精神病的ならびに神経学的な不調；ハンチントン病、ジル・ド・ラ・ツレット症候群などのジスキネジーを含む、特定の疾患（以降、「本発明の疾患」と称する）を治療する方法に関連して、注目されている。さらなる形態において、本発明は、本発明により提供される材料を使用して、アゴニストおよびアンタゴニスト（例えば、阻害剤）を同定するための方法、ならびにその同定された化合物を用いて、HTOGH35の不均衡に関連する症状を治療するための方法に関する。さらに他の形態において、本発明は、不適当なHTOGH35の活性および濃度に付随する疾患を検出するための診断アッセイにも関する。

（発明の説明）

第1の形態において、本発明はHTOGH35ポリペプチドに関する。かかるポリペプチドには、

（a）配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

（b）配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

（c）配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；

（d）配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド；

（e）配列番号：2のポリペプチド配列；ならびに

（f）配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列を有するか、または含んでなるポリペプチド；

（g）（a）～（f）に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体

が含まれる。

【0013】

本発明のポリペプチドは、Gタンパク質共役型受容体ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。

【0014】

該HTOGH35の生物学的性質を、以降、「HTOGH35の生物学的活性、またはHTOGH35活性」と称する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのHTOGH35の生物学的活性を示す。

【0015】

本発明のポリペプチドには、全ての対立遺伝子形およびスプライス変異体を含む、上記ポリペプチドの変異体もまた含まれる。かかるポリペプチドは、挿入、欠失、ならびに保存的または非保存的であってもよい置換、あるいはそれらの任意の組み合わせによって、基準のポリペプチドから変異している。特に好ましい変異体は、幾つかの、例えば、50~30、30~20、20~10、10~5、5~3、3~2、2~1、または1個のアミノ酸が、任意の組み合わせで、挿入、置換または欠失されているものである。

【0016】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号：2のアミノ酸配列に由来する、少なくとも30、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド、あるいは配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも30、50または100の連続したアミノ酸が末端から除去または欠失しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、HTOGH35の生物学的活性を媒介する生物学的に活性なフラグメントであり、類似する活性または改善された活性を有するか、あるいは望ましくない活性の低下したものも含まれる。また、動物、特に、ヒトにおいて抗原性または免疫原性である、それらのフラグメントも好ましい。

【0017】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する完全長型ポリペプチドをペ

プチド合成によって製造するために用いることができ；従って、これらの変異体は、本発明の完全長型ポリペプチドを製造するための中間体として用いることができる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」タンパク質の形態であってもよく、あるいは、前駆体または融合タンパク質などの、より大きなタンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製に役立つ配列、例えば、反復するヒスチジン残基、あるいは組換え生産の間の安定性に利する配列が含まれる、付加的なアミノ酸配列を含むことは、しばしば、有益である。

【0018】

本発明のポリペプチドは、何れかの好適な方法、例えば、天然に存在する提供源や、発現システム（下記参照）を含んでなる遺伝子操作された宿主細胞からの単離、または、例えば、自動化されたペプチド合成機を使用した化学合成によって、あるいは、かかる方法の組み合わせによって、調製することができる。かかるポリペプチドを調製するための手段は、当該分野では十分に理解されている。

【0019】

さらなる形態において、本発明はHTOGH35ポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドには、

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：1のポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(f) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(g) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%

、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；

(j) 配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；
ならびに

上記のポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体である、またはその全長にわたって、上記のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドが含まれる。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントには、配列番号：1の配列に由来する、少なくとも15、30、50または100の連続した塩基を有する塩基配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1の配列から、少なくとも30、50または100個の連続した塩基が末端から削除または欠失している配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。

【0021】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体には、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、および1つまたは複数の単一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型体が含まれる。

【0022】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなり、かつ幾つかの、例えば、50~30、30~20、20~10、10~5、5~3、3~2、2~1、または1個のアミノ酸残基が、任意の組み合わせで置換、欠失または付加されているポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドもまた含まれる。

【0023】

さらなる形態において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。従って、

(a) 配列番号：2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含んでなる；

(b) 配列番号：2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物である；

(c) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写物を含んでなる；あるいは

(d) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；

ならびにそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチドが提供される。

【0024】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、K I A A 0 0 0 1 (N o m u r a , N , D i r e c t S u b m i s s i o n , 1 1 - N O V - 1 9 9 2) と同一性を示す。配列番号：2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号：1の配列をコードするポリペプチドと同一であってもよく、あるいは遺伝子暗号の縮退（縮重性）の結果によって、同じく配列番号：2のポリペプチドをコードする、配列番号：1以外の配列であってもよい。配列番号：2のポリペプチドは、K I 0 1 _ _ H U M A N (N O M U R A N . e t a l . , D N A R e s . 1 : 2 7 ~ 3 5 (1 9 9 4)) との同一性および/または構造的類似性を有している、Gタンパク質共役型受容体ファミリーの他のタンパク質と類縁している。

【0025】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相同的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌ

クレオチドは、少なくとも1つのHTOGH35活性を有する。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト・ケラチノサイトのmRNAに由来する、cDNAライブラリーから標準的なクローニング技術およびスクリーニング技術を使用して取得することができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照のこと)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の供給源から取得することもでき、あるいは、周知の、市販の手法を使用して合成することもできる。

【0027】

本発明のポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの組換え製造に使用する際には、該ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチドのコード配列、それ自体、あるいはリーダーまたは分泌配列、プレ-、もしくはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列、あるいは、他の融合ペプチド部分をコードするコード配列などの、他のコード配列と読み枠を合わせた成熟型ポリペプチドのコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にする、マーカ配列がコードしていてもよい。本発明のこの形態の幾つかの好ましい実施形態において、該マーカ配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)中に提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86:821~824に記載されている、ヘキサ・ヒスチジン・ペプチド、あるいはHAタグである。該ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳の配列、スプライシングならびにポリアデニレーション・シグナル、リボソーム結合部位、ならびにmRNAを安定化させる配列などの、非コードの5'ならびに3'配列を含んでもよい。

【0028】

配列番号: 1のポリヌクレオチド配列に対して、同一であるか、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイ

ブリダイゼーション・プローブとして、あるいは核酸増幅反応（例えば、PCR）用のプライマーとして、利用することができる。かかるプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする完全長型cDNAおよびゲノム・クローンを単離するために、ならびに、配列番号：1に対して、高い配列類似性、典型的には、少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子（ヒトの供給源に由来するパラログ、ならびにヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む）のcDNAおよびゲノム・クローンを単離するために使用してもよい。好ましいプローブおよびプライマーは、一般に、少なくとも15塩基、好ましくは少なくとも30塩基を含み、そして少なくとも100塩基ではなくとも、少なくとも50塩基を有してもよい。特に好ましいプローブは、30～50塩基を有するであろう。特に好ましいプライマーは、20～25塩基を有するであろう。

【0029】

ヒト以外の種に由来するホモログをも含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングする過程；および前記ポリヌクレオチド配列を含有する完全長型cDNAクローンおよびゲノム・クローンを単離する過程を含んでなる工程によって取得してもよい。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好ましい厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた切断サケ精子DNAを含んでなる溶液中で、42℃、一晚インキュベーションし、その後、0.1×SSC中で、約65℃にてフィルターを洗浄することが含まれる。従って、本発明にはまた、配列番号：1の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングすることによって取得される、単離されたポリヌクレオチド、好ましく

は少なくとも100塩基の塩基配列を有する単離されたポリヌクレオチドも含まれる。

【0030】

当業者は、多くの場合において、該ポリペプチドをコードする領域は、5'末端に至るまで完全には伸長していない点で、単離されたcDNA配列は不完全であることもあることを理解している。これは、第1鎖のcDNA合成の際に、mRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない、逆転写酵素、すなわち、本来、低い「プロセシング能」（ポリメリゼーション反応の間、テンプレートに結合した状態を維持する酵素の能力の指標）を有する酵素の結果である。

【0031】

完全長型cDNAを取得する、あるいは短いcDNAを伸長させるために利用でき、かつ当業者に周知の方法がいくつかあり、例えば、cDNA端の迅速な増幅(RACE)方法に基づく方法がある(例えば、Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998~9002, 1988を参照のこと)。例えば、Marathon(商標)法(Clontech Laboratories Inc.)で例示される、この技術の最近の改良は、より長いcDNAの探索を著しく簡単としている。Marathon(商標)法では、選択された組織から抽出されたmRNAと、その両端に連結された「アダプター」配列とから、cDNAが調製される。その後、遺伝子特異的なならびにアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを使用して、cDNAの「失われている」5'端を増幅するために、核酸増幅(PCR)を実施する。その後、「ネスティッド(入れこ型)」プライマー、すなわち、増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列においてさらに3'側にアニーリングするアダプター特異的なプライマー、および既知の遺伝子配列においてさらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的なプライマー)を使用して、PCR反応を繰り返す。そして、この反応の生成物をDNA配列決定によって分析することができ、また、完全な配列を与えるように、既存のcDNAに該生成物を直接結合させ

る、あるいは、5'プライマーの設計のために新しい配列情報を利用して、別途に完全長のPCRを実施することのいずれかによって、完全長型のcDNAを構築することができる。

【0032】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを含んでなる遺伝子操作された宿主細胞から、当該分野で周知の製法によって調製することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドの1つまたは複数を含んでなる発現システム、かかる発現システムで遺伝子操作されている宿主細胞、ならびに、組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳システムもまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、かかるタンパク質を製造するために使用することができる。

【0033】

組換え製造のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現システムまたはその一部を取り込むように、遺伝子操作することができる。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)およびSambrook et al. (前述)などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている方法によって宿主細胞中に導入することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入する好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレイプ負荷、バリスティック導入または感染が含まれる。

【0034】

適当な宿主の代表的な例には、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、大腸菌、ストレプトミセス属ならびに枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞やアスペルギルス属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2細胞や *Spodoptera Sf9* 細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293ならびにBowes

メラノーマ細胞などの動物細胞；および植物細胞が含まれる。

【0035】

非常に多様な発現システムを使用することができ、例えば、染色体、エピソームおよびウイルスに由来するシステム、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、バキュロウイルス、パポバウイルス(SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスやレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクター、ならびに、コスミドやファージミドなどの、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝子エレメントから誘導されたものなどの、それらの組み合わせに由来するベクターを使用することができる。該発現システムは、発現を生じさせるとともに、調節をする制御領域を含有してもよい。一般に、宿主内において、ポリペプチドを生産するためのポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現させることが可能である、システムまたはベクターはいずれも使用することができる。適切なポリヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al. (前述)中に示されているものなどの、周知で慣用の手法種々のいずれかによって発現システムに挿入することができる。適当な分泌シグナルを、小胞体の内腔、ペリプラズム腔または細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌を可能にするために、所望するポリヌクレオチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、該ポリペプチドに対して内因性であってもよく、あるいは異種のシグナルであってもよい。

【0036】

スクリーニング・アッセイにおいて使用するために、本発明のポリペプチドを発現させる際には、該ポリペプチドは細胞の表面で産生されることが、一般に好ましい。この場合、スクリーニング・アッセイにおいて使用するに先立ち、細胞を集菌してもよい。該ポリペプチドが培地内に分泌される場合には、該ポリペプチドの回収および精製を行うため、培地を回収することができる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に、細胞を予め溶解しなければならない。

【0037】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティー・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィおよびレクチン・クロマトグラフィを含む、周知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、ハイ・パフォーマンス・液体クロマトグラフィが精製のために使用される。該ポリペプチドが、細胞内合成、単離および/または精製の間に変性する際には、周知のタンパク質のリフォールディング方法を、活性な立体配座を再生させるために使用することができる。

【0038】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子における変異の検出を通して、診断試薬として使用することができる。cDNA配列またはゲノム配列において、配列番号：1のポリヌクレオチドによって特定され、また、機能不全に関連している、変異体型遺伝子の検出は、その遺伝子の過少な発現、過剰発現、あるいは変更された空間的または時間的な発現に起因する、疾患または疾患に対する感受性の診断に付加、あるいは、確定させることができる診断ツールを提供する。遺伝子に変異を有する個体は、当該分野で周知な様々な手法によって、DNAレベルで検出することができる。

【0039】

診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検試料などから得ることできる。ゲノムDNAを、直接、検出のために使用してもよく、あるいは、分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAもまた、同様な手順で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAを、標識されたHTOGH35の塩基配列に対して、ハイブリダイゼーションさせることによって同定することができる。完全に一致する配列は、ミスマッチした二重鎖と、RNase消化、あるいは融解温度における差によって、弁別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤の存在

下または非存在下での、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、あるいは、直接的なDNA配列決定によって検出してもよい(例えば、Myers et al., Science, (1985) 230: 1242を参照のこと)。特定の位置における配列の変化もまた、RNaseならびにS1保護などの、ヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいは化学的な切断方法によって、明らかにすることもできる(Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 85: 4397~4401を参照のこと)。

【0040】

HTOGH35のポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチド・プローブのアレイを、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。かかるアレイは、好ましくは、高密度のアレイまたは格子状である。アレイ化技術の方法は、周知であり、一般的な適用性を有しており、また、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変動性を含む、分子遺伝学における様々な問題を解明するために使用することができ、例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610~613 (1996)およびそれに引用されている他の参考文献を参照する。

【0041】

異常に、低下または増大しているポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの検出もまた、本発明の疾患に対する、被験体の感受性を診断または検出するために使用することができる。低下、または増大した発現は、例えば、核酸増幅、例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザン・プロットおよび他のハイブリダイゼーション法などの、当該分野で周知の、ポリヌクレオチドの定量方法のいずれかを使用して、RNAレベルで測定することができる。宿主に由来するサンプルにおける、本発明のポリペプチドなどのタンパク質レベルを決定するために使用することができるアッセイ手法は、当業者には周知である。かかるアッセイ方法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・プロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0042】

したがって、別の形態において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそのフラグメントもしくはそのRNA転写物；

(b) (a)の配列に対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号：2のポリペプチドまたはそのフラグメント；あるいは

(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2のポリペプチドに対する抗体

を含んでなる診断キットに関する。

【0043】

かかるキットの何れにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な成分を構成することができることは理解される。かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性、中でも、特に本発明の疾患を診断する際に有用である。

【0044】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体局在化の研究に有益である。該配列は、個々のヒト染色体上の特定位置に対して、特異的に標的化されており、そして、ハイブリダイゼーションすることができる。本発明に従って、関連する配列を染色体にマッピングすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患と関連させる上での、重要な最初の過程である。一度、配列を正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上における該配列の物理的な位置を、遺伝地図データと関連させることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick、ヒトにおけるメンデル遺伝(Johns Hopkins大学 Welch Medical Libraryを通してオンラインで利用可能である)中で、見出される。同じ染色体領域にマッピングされている、遺伝子と疾患と間の関係は、その後、連鎖分析(物理的に隣り合う遺伝子の同時遺伝)を通して、同定される。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)に関する、正確なヒト染色体上の局在化は、放射ハイブリッド(RH)マッピングを使用して決定することができる(Walter, M., Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J. および Goodfellow, P., (1994),

ゲノム全体の放射ハイブリッド・マップを構築するための方法、Nature Genetics, 7, 22~28)。多数のRHパネルを、Research Genetics (Huntsville, AL, 米国)から、例えば、GeneBridge4 RHパネル(Hum. Mol. Genet., 1996, Mar; 5(3):339~46、ヒトゲノムの放射ハイブリッドマップ。Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillet D., Muselet D., Prud'Homme J.F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach, J.およびGoodfellow, P.N.)を入手可能である。このパネルを使用して遺伝子の染色体上の位置を決定するためには、RH DNA上の関心のある遺伝子から設計されたプライマーを使用して、93回のPCRが行われる。これらのDNAのそれぞれは、ハムスターのバックグラウンド(ヒト/ハムスターのハイブリッド細胞株)中に維持された、ランダムなヒト・ゲノム・フラグメントを含んでいる。このようなPCRは、目的とする遺伝子のPCR産物の存在または非存在を示す、93のスコアをもたらす。これらのスコアは、既知の位置のゲノム配列に由来するPCR産物を使用して作製されたスコアと比較される。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu/>において行われる。

【0045】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織発現の研究に対する有益なツールである。かかる研究は、それらをコードするmRNAを検出することによって、コードされたポリペプチドの組織内の発現パターンに関する指標を与える、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの決定を可能とする。使用される技術は、当該分野では周知であり、また、cDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schene et al., Science, 270, 467~470, 1995およびShalon et al., Genome Res., 6, 639~645, 1996)などの、格子上に配列されたクローンに対する系内・ハイブリダイゼーション技術、ならびにPCRなどの塩基増

幅技術を含む。好ましい方法は、Perkin Elmerから入手可能なTAQMAN（商標）法を使用する。これらの研究による結果は、生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供する。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の形態（例えば、潜在的または調節的な変異をコードするポリペプチドにおける変化を有するもの）によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割、または疾患におけるその不適切な発現の役割に対する有益な見識を提供することができる。かかる不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的な性質のものであってもよい。

【0046】

本発明のポリペプチドは、ヒトのケラチノサイト、扁桃腺、ホジキンリンパ腫、胎児の心臓において発現している。

【0047】

本発明のさらなる形態は、抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、あるいはそれらを発現している細胞は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的である抗体を作製するための免疫原として、使用することができる。「免疫特異的」の用語は、抗体が、先行技術における他の関連するポリペプチドに対するそれらの親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して、実質的により大きな親和性を有することを意味する。

【0048】

本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は、慣用的なプロトコルを使用して、該ポリペプチドまたはエピトープ保持したフラグメント、あるいは細胞を、動物、好ましくは、非ヒト動物に、投与することによって取得することができる。モノクローナル抗体の調製には、継代的な細胞株培養物によって産生される抗体を提供する技術のいずれをも、使用することができる。例には、ハイブリドーマ技術（Kohler, G. および Milstein, C., Nature (1975), 256: 495~497）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunology Today (1983), 4: 73）、およびEBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., Monoclonal Antibodies

and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。

【0049】

米国特許第4,946,778号に記載されているものなどの、一本鎖抗体を製造するための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造する上で応用することができる。また、トランスジェニック・マウス、あるいは、他の哺乳動物を含む他の生物を、ヒト化抗体を発現させるための使用してもよい。

【0050】

上に記載された抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するために、あるいはアフィニティー・クロマトグラフィによって該ポリペプチドを精製するために使用してもよい。本発明のポリペプチドに対する抗体は、また、中でも、本発明にかかる疾患を治療するために使用することができる。

【0051】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとして使用することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、その疾患が個体において既に慢性化しているか否かに関わらず、前記動物を疾患から保護するために、抗体および/またはT細胞免疫応答(例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む)を生じさせるに適する、本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる、哺乳動物における免疫学的応答を誘導するための方法に関する。哺乳動物における免疫学的応答はまた、本発明にかかる疾患から前記動物を保護するための抗体を産生するような、かかる免疫学的応答を誘導するために、*in vivo*で、該ポリヌクレオチドの発現を支配し、かつ該ポリペプチドをコードしているベクターによって、本発明のポリペプチドを送達することを含んでなる方法によって誘導してもよい。該ベクターを投与する1つの方法は、粒子またはそれ以外のものの上へのコーティング物として、所望する細胞中へのそれを促進することによる。かかる核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾型核酸またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。用途によって、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン配合物

(組成物)として提供される。該配合物はさらに、適合するキャリアを含むことができる。ポリペプチドは胃において分解されることもあるため、それは、好ましくは非経口的に投与される(例えば、皮下、筋肉内、静脈内、あるいは皮内注射)。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、ならびに配合物を接種者の血液と等張性にする溶質を含んでもよい、水性および非水性の無菌注射液;ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでもよい、水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。該配合物は、単位用量または多回用量容器、例えば、密封されたアンプルならびにバイアルに入れて提供することができ、また、使用直前に無菌の液体キャリアを添加するだけでよい、凍結乾燥状態で保存することができる。該ワクチン配合物はまた、水中油型システムや当該分野で既知のその他のシステムなどの、配合物の免疫原性を増強するためのアジュバント・システムを含むことができる。投与量は、該ワクチンの比活性に依存し、型どおりの実験によって容易に決定することができる。

【0052】

本発明のポリペプチドは、1つまたはそれ以上の疾患状態、特に、既に記載した本発明の疾患に関連している、1つまたはそれ以上の生物学的機能を有する。従って、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。従って、さらなる形態において、本発明は、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するために、化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、上に記載したような本発明の疾患に対する治療および予防目的のために使用することができる、アゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な供給源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、化学化合物のコレクション、および天然産物混合物から同定することができる。このように同定される、かかるアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、ポリペプチド自体の、天然または修飾された基質、リガンド、受容体、酵素など;その構造的または機能的な模倣体(Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1(2):5章(1991)を参照のこと)あるいは小分子であってもよい。

【0053】

該スクリーニング方法は、候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識を利用して、該ポリペプチド、あるいは該ポリペプチドまたはその融合タンパク質を表出している細胞または膜に対する候補化合物の結合を単に測定することでもよい。代わりに、該スクリーニング方法は、標識された競合剤（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）に対して、候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合の（定性的または定量的に）測定または検出を含んでもよい。さらに、これらのスクリーニング方法では、該ポリペプチドを表出している細胞に適する検出システムを使用して、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって誘起されるシグナルをもたらすか否かを調べることもよい。活性化の阻害剤は、一般には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして、候補化合物の存在による、アゴニストによる活性化に対する作用を観測する。さらに、該スクリーニング方法は、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液と混合して、混合体を形成させる工程、混合物におけるHTOGH35活性を測定する工程、および混合物のHTOGH35活性を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較する工程を単に含んでなることでもよい。

【0054】

本発明のポリペプチドは、従来の低い容量のスクリーニング方法、そして、また、ハイ・スループットなスクリーニング（HTS）形態においても、使用することができる。かかるHTS形態には、十分に確立された、96 -、また、最近では、384 - ウェル・マイクロ・タイター・プレートの使用のみでなく、Schullek et al., Anal. Biochem., 246, 20~29 (1997) に記載されている、ナノウェル法などの開発途上の方法もまた含まれる。

【0055】

既に記載したような、Fc部分およびHTOGH35ポリペプチドから作製されるものなどの、融合タンパク質もまた、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための、ハイ・スループットなスクリーニング・アッセイのために使用することができる（D. Bennett et al., J. M

ol. Recognition, 8:52~58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270(16):9459~9471 (1995)を参照のこと)。

【0056】

1つのスクリーニング技術は、受容体の活性化によって引き起こされる細胞外pHの変化または細胞内カルシウムの変化を測定するシステムにおける、本発明の受容体を発現している細胞(例えば、トランスフェクションされたCHO細胞)の利用を含んでいる。この技術では、化合物を、本発明の受容体ポリペプチドを発現している細胞と接触させることができる。そして、可能性を有する化合物が受容体を活性化するか、あるいは阻害するかを決定するために、二次メッセンジャーの応答、例えば、シグナル伝達、pH変化またはカルシウム濃度の変化を測定する。

【0057】

別の方法は、受容体により媒介されるcAMPおよび/またはアデニレート・シクラーゼの蓄積に対する阻害または刺激を測定することによって、受容体阻害剤についてスクリーニングすることを含んでいる。かかる方法は、受容体を細胞表面で発現させるために、真核生物細胞を本発明の受容体でトランスフェクションすることを含んでいる。その後、細胞は、本発明の受容体の存在下で、可能性のあるアンタゴニストに曝される。そして、cAMPの蓄積量が測定される。可能性のあるアンタゴニストが受容体に結合し、従って、受容体への結合を阻害する場合には、受容体により媒介されるcAMP、またはアデニレート・シクラーゼ、活性のレベルは、低下または増大される。

【0058】

本発明の受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを検出するための別の方法は、米国特許第5,482,835号に記載されているような、酵母に基づく技術である。

スクリーニング技術

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、細胞内におけるmRNAおよびポリペプチドの産生に対する、

添加された化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を形成するために使用することができる。例えば、当該分野で公知の標準的な方法によって、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して、ポリペプチドの分泌または細胞結合している濃度を測定するために、ELISAアッセイを構築することができる。これは、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害または増強することができる薬剤（また、それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる）を発見するために使用することができる。

【0059】

本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の標準的な受容体結合手法を通して、存在する場合には、膜結合型または可溶性の受容体を同定するために使用することができる。これらには、それに限定されないものの、ポリペプチドを、放射性同位体（例えば、 ^{125}I ）で標識、化学修飾（例えば、ビオチン化され）、あるいは検出または精製に好適なペプチド配列と融合して、そして推定される受容体の供給源（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液）とインキュベーションする、リガンド結合ならびにクロスリンク・アッセイが含まれる。他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光測定法などの、生物物理学的技術が含まれる。これらのスクリーニング方法はまた、存在する場合には、ポリペプチドのその受容体に対する結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために使用することができる。かかるアッセイを行うための標準的な方法は、当該分野では十分に理解されている。

【0060】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいは、ある場合には、該ポリペプチド自体のリガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、場合により、例えば、該リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント；あるいは本発明のポリペプチドに結合するものの、応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性が妨げられる、小分子が含まれる。

【0061】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびHTOGH35遺

伝子の使用を含んでもよい。トランスジェニック動物を構築する手法は、十分に確立されている。例えば、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロインジェクション、移植前または移植後の胚へのレトロウイルス移入、エレクトロポレーションなどによって、遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を通して、HTOGH35遺伝子を導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物のゲノム内において、動物の遺伝子がヒトの等価体によって置き換えられている、所謂「ノック・イン」動物である。ノック・イン・トランスジェニック動物は、医薬探索のプロセスにおいて、化合物はヒトの標的に対して特異的であるという、標的の妥当性検証用に有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、内因性DNA配列によってコードされている、本発明のポリペプチドに対する動物オルソログの発現が細胞内で部分的または完全に無効とされている、所謂「ノック・アウト」動物である。遺伝子のノック・アウトは、技術の限界の結果として、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細胞または組織においてのみ起きていてもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じてもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現 - クローニング・システムを提供する。

【0062】

上に記載された方法において使用されるスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態をなす。かかるスクリーニング・キットは、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；

を含んでなり、好ましくは、前記のポリペプチドは、配列番号：2のものである。

【0063】

かかるキット何れの中においても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な構成要素を構成することは理解される。

(用語集)

下記の定義は、本明細書中で既に頻繁に使用されているいくつかの用語の理解を容易にするために提供される。

【0064】

本明細書中に用いられる「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、ならびにヒト化抗体、同様に、Fabフラグメントをも包含し、Fabまたは他の免疫グロブリンの発現ライブラリー生成物をも包含する。

【0065】

「単離(された)」は、その天然の状態から、「ヒトの手によって」変化していること、すなわち、自然界に存在する場合、その本来の環境から変化、または移動されているか、あるいは、その両方であることを意味する。例えば、生きた生物に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離」されてはいないが、その天然状態の共存物質から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語の本明細書中での用法に従うと、「単離」されている。さらに、形質転換、遺伝子操作、または何らかの他の組換え方法によって、生物中に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生物が生存または非生存かのいずれでも、前記生物中に未だ存在している場合でさえ、「単離」されている。

【0066】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、非改変型または改変型のRNAあるいはDNAであってもよい、任意のポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)を指す。「ポリヌクレオチド」には、限定ではないものの、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖、または、より典型的には、二本鎖の、あるいは、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAとの両方を含んでなる三重鎖領域をもいう。用語

「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、ならびに、イノシンなどの非通常型の塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができ、従って、「ポリヌクレオチド」は、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態と同様に、自然界に典型的に見出されるような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態をも包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される、比較的短いポリヌクレオチドをも包含する。

【0067】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合(すなわち、ペプチド等配電子体)によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含んでなるポリペプチドのいずれをも指す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれる短い鎖、ならびに、一般にはタンパク質と呼ばれる、より長い鎖の双方ともをいう。ポリペプチドは、遺伝子によってコードされる20種のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、あるいは当該分野で周知の化学的な修飾方法のいずれかによって、修飾がなされたアミノ酸配列が含まれる。かかる修飾は、基本的な教本、およびより詳細な専門書、ならびに数多くの研究文献中に、広く記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチド内のいずれの位置に生じさせることもできる。同じタイプの修飾が、所与ポリペプチド内のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在してもよいことが理解される。また、所与のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝がなされてもよく、また、分枝を有する、または有していない、環状であってもよい。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、翻訳に続く天然のプロセスに起因しても、あるいは合成的方法によって作製されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ビオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌ

クレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンク形成、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPI・アンカー形成、ヒドロキシ化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファー・RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins - Structures and Molecular Properties、第2版、T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., 翻訳後のタンパク質修飾: 全体像および展望、1~12、Post-translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., 「タンパク質修飾および非タンパク質補助因子の分析」、Meth. Enzymol., 182, 626~646, 1990; Rattan et al., 「タンパク質合成: 翻訳後修飾およびエイジング」、Ann. NY Acad. Sci., 663, 48~62, 1992を参照のこと)。

【0068】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、基準の配列よりも短いものの、基準となるポリペプチドと同一の生物学的な機能または活性を本質的に保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号: 1の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0069】

「変異体」は、基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるものの、その本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、基準となるポリヌクレオチドに対して、塩基配列に相違がある。変異体の塩基配列における変異は、基準となるポ

リヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させても、させなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、下記に説明するように、基準の配列によってコードされるポリペプチド中における、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端の短縮化を引き起こしてもよい。ポリペプチドの典型的な変異体は、基準となるポリペプチドに対して、アミノ酸配列に相違がある。一般に、改変は、基準となるポリペプチドおよび変異体の配列が全体的には非常に類似し、そして多くの領域において同一となるように制限される。変異体ならびに基準となるポリペプチドは、アミノ酸配列において、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組み合わせによって相違してもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であっても、なくともよい。典型的な、保存的置換には、Gly、Ala； Val、Ile、Leu； Asp、Glu； Asn、Gln； Ser、Thr； Lys、Arg； ならびにPheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に存在するものであってもよく、あるいは天然では存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然には存在しない変異体は、変異誘発方法によって、あるいは直接合成によって作製することもできる。また、1つまたは複数の翻訳後の修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADP-リボシル化などを有するポリペプチドも、また変異体には含まれる。実施態様には、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化、ならびにC末端グリシンの修飾が含まれる。

【0070】

「対立遺伝子」は、ゲノム中の所与の遺伝子座に存在する遺伝子の、2つまたはそれ以上の選択的な形態の1つをいう。

【0071】

「多型」は、集団内における、ゲノムにおける所与の位置における塩基配列（仮に関連する場合には、コードされるポリペプチド配列）の変動をいう。

【0072】

「単一塩基多型」（SNP）は、集団内においてゲノム内の1つの塩基位置に

おける、塩基変動の発生をいう。SNPは、遺伝子内で、あるいはゲノムの遺伝子間領域内で起こってもよい。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASA)を使用してアッセイすることができる。該プロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーが、アッセイされる多型に対して、逆方向に相補となるように使用される。この共通プライマーは、多型な塩基から50bpから1500bpの間で隔たったものとできる。それ以外の2つ(またはそれ以上)のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ(またはそれ以上)の対立遺伝子の1つと一致するように変化している点を除いて、互いに同一である。そして、それぞれ、共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、2回(またはそれ以上)のPCR反応を、サンプルDNAについて行う。

【0073】

本明細書中で使用されている「スプライス変異体」は、同じゲノムDNA配列から一旦転写され、ただし、択一的なRNAスプライシングを受けている、RNA分子から作製されたcDNA分子をいう。択一的なRNAスプライシングは、一般には、イントロンを除くために、一次RNA転写物がスプライシングを受ける際に生じ、それぞれ、異なるアミノ酸配列をコードしてもよい、1つ以上のmRNA分子の産生を引き起こす。スプライス変異体の用語はまた、上記のcDNA分子によってコードされるタンパク質をもいう。

【0074】

「同一性」は、その配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の間における相互関係を反映している。一般に、同一性は、対比がなされている配列の長さによつて、2つのポリヌクレオチド配列、あるいは2つのポリペプチド配列の、それぞれ塩基毎またはアミノ酸毎の厳密な一致をいう。

【0075】

「%同一性」 - 正確な一致が存在しない配列については、「%同一性」を決定することができる。一般に、対比すべき2つの配列を、配列間で最大の相関を与えるようにアラインメントされる。これには、アラインメントの程度を高めるた

めに、「ギャップ」をいずれか一方の配列または両方の配列に挿入することを含んでもよい。%同一性は、比較されている配列のそれぞれの全長にわたって、決定してもよく（所謂、全体的なアラインメント）、同じ長さまたは非常に類似する長さの配列に対してに特に適している；あるいは、より短い、限定された長さにわたって、決定してもよく（所謂、局所的なアラインメント）、不ぞろいな長さの配列において、より好適である。

【0076】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係に対する、より精巧な、さらなる尺度である。一般に、「類似性」は、残基毎に基づき、（同一性に関してと、同様に）比較されている配列それぞれからの、相互に対をなす残基間における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合にも、進化的な基準に基づいて、1つの残基は、他方に対する適当な置換であるかどうかをも考慮する、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間での比較を意味する。この蓋然性は、付随した「スコア」を有し、2つの配列の「%類似性」は、それに基づき決定することができる。

【0077】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該分野では周知となっている。従って、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージバージョン 9.1 (Devereux J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 387~395, 1984; Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin, 米国) 中の利用可能なプログラム、例えば、BESTFIT およびGAP プログラムを、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、ならびに2つのポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定するために使用してもよい。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム(*J. Mol. Biol.*, 147, 195~197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482~489, 1981)を使用して、2つの配列間における、類似性の最も良い1つの領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2

つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の比較に対してより適しており、該プログラムは、より短い配列は、より長いものの一部を表すことを仮定している。一方、GAPは、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム(J. Mol. Biol., 48, 443~453, 1970)に従って、「最大の類似性」を見出しつつ、2つの配列をアラインメントする。GAPは、ほぼ同じの長さであり、また、アラインメントが長さ全体にわたって期待される配列の比較に対してより適している。好ましくは、比較されるものを、最適にアラインメントするための、各プログラムにおいて使用される「ギャップ加重」および「長さ加重」のパラメーターは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に対しては、50および3であり、ポリペプチド配列に対しては、12および4である。好ましくは、比較されている2つの配列を最適にアラインメントした上で、%同一性および類似性を決定する。

【0078】

配列間の同一性および/または類似性を決定するための他のプログラムもまた、当該分野では知られており、例えば、BLASTファミリーのプログラム(Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403~410, 1990; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res., 25:389~3402, 1997; National Center for Biotechnology Information(NCBI)(Bethesda, Maryland, 米国)から入手することができ、またwww.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページからアクセス可能である)、およびFASTA(Pearson WR, Methods in Enzymology, 183, 63~99, 1990; Pearson W.R.およびLipman D.J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85, 2444~2448, 1988; ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能である)。

【0079】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列(Henikoff S

and Henikoff JG, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 10915~10919, 1992)を、比較の前に、ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に予め翻訳する場合をも含み、ポリペプチド配列の比較において使用する。

【0080】

好ましくは、プログラム BESTFITが、基準とするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、検討するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用され、前に記載したように、検討と基準とする配列とは、最適にアラインメントされ、また、プログラムのパラメーターは、暫定の値に設定されている。

【0081】

「同一性指標」は、候補配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）と基準の配列とを比較するために使用することができる、配列関連性の尺度である。すなわち、例えば、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、該候補ポリヌクレオチド配列は、基準の配列の各100塩基あたり平均して5個までの相違を含んでもよい点を除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つの塩基欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリヌクレオチド配列の5'または3'末端部位に、あるいはこれら末端部位の間の任意な位置で、基準配列内の塩基間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中で点在して、起こってもよい。換言すると、基準となるポリヌクレオチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内の塩基100個毎に、平均して5個までが、任意の組み合わせで、欠失、置換または挿入されていてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0082】

同様に、ポリペプチドの場合には、基準のポリペプチド配列と比較したときに

、例えば、0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、基準の配列の各100アミノ酸あたり、平均して5個までの違いを該ポリペプチド配列が含んでもよいことを除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、保存的ならびに非保存的な置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端部位に、あるいはこれら末端部位間の任意の位置に、基準配列内のアミノ酸間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中に点在して、起こってもよい。換言すると、基準のポリペプチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内のアミノ酸の100個毎に、平均して5個まで、任意の組み合わせで、欠失、置換または挿入がなされてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0083】

塩基またはアミノ酸の相違数と同一性指標との関係は、下記の式で表記でき、

$$n_a - x_a - (x_a \cdot I)$$

式中、

n_a は、塩基またはアミノ酸の相違数であり、

x_a は、配列番号：1あるいは配列番号：2における塩基またはアミノ酸のそれぞれの総数であり、

I は、同一性指標であり、

\cdot は、乗算演算子に対する記号であり、

その際、 x_a と I との非整数の積は、 x_a から減ずるに先立ち、最も近い整数に切り捨てられる。

【0084】

「ホモログ」は、基準の配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すために、当該分野で使用されている一般的な用語である。かかる関連性は、既に定義されているように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって、定量化すること

もできる。この総称的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種中における、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している、同じ種内にあるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0085】

「融合タンパク質」は、2つの、関連しない、融合された遺伝子またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質をいう。その例が、米国特許第5541087号、同第5726044号に開示されている。Fc-HTOGH35の場合、融合タンパク質の一部として、免疫グロブリンのFc領域の使用は、治療に使用する際のかかる融合タンパク質の薬物動態学的性質を改善するため、ならびに、二量体型のFc-HTOGH35を形成させるために、Fc-HTOGH35またはHTOGH35断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-HTOGH35のDNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの細胞外への輸送を誘起するシグナル配列、融合パートナーとして、免疫グロブリンのFc領域フラグメントをコードするDNA、およびFc-HTOGH35をコードするDNAまたはその断片を含んでなる。ある用途では、融合タンパク質の残部には手を触れることなく、機能的なFc側を変異させ、その固有的な機能的性質（補体結合、Fc受容体結合）を変える、あるいは発現後にFc部分を完全に除くことを可能とすることが望ましい。

【0086】

特許および特許出願に限らず、これらを含む、本明細書中で引用されている刊行物および参考文献の全ては、十分に述べているように、個々の刊行物または参考文献を、参照して組み込むために、明示的かつ個別的に示唆されているように、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。本出願が優先権を主張する特許出願はいずれも、先に刊行物および参考文献に関して記載したと同様に、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。

(実施例)

実施例1

哺乳動物細胞での発現

本発明の受容体は、ヒト胚性腎臓293 (HEK293)細胞または接着性dhfr CHO細胞のいずれかで発現される。受容体の発現を最大にするために、典型的には、pCDNまたはpCDNA3ベクターへの挿入に先立って、5'および3'の非翻訳領域(UTR)の全てが、該受容体cDNAから除かれる。細胞は、リポフェクチンによって個々の受容体cDNAでトランスフェクションされ、そして、400mg/mlのG418の存在下で選抜される。3週間の選抜の後、個々のクローンは、採集され、また、さらなる分析のために展開される。ベクターのみでトランスフェクションされたHEK293またはCHO細胞は陰性コントロールとして役立つ。個々の受容体を安定的に発現している細胞系統を単離するために、約24のクローンを、典型的には選択し、そして、ノーザン・ブロット分析によって分析される。受容体のmRNAは、一般には、分析されたG418耐性クローンの約50%において、検出が可能である。

【0087】

実施例2

結合アッセイおよび機能的アッセイ用のリガンド・バンク

600を超える推定的な受容体リガンドのバンクを、スクリーニングのために集めた。このバンクは、ヒトの7回膜貫通型(7TM)受容体を介して作用することが知られている、伝達物質、ホルモンおよびケモカイン；ヒトの7TM受容体、哺乳動物の対応体が未だ同定されていない非哺乳動物の生物学的に活性なペプチドに対する、推定的なアゴニストとなるかもしれない天然に存在する化合物；ならびに、天然では見出されていないが、知られていない天然のリガンドとともに7TM受容体を活性化する化合物で構成されている。このバンクは、機能的な(すなわち、カルシウム、cAMP、微量生理機能測定計、卵母細胞電気生理学など、下記参照)ならびに結合アッセイの両方を使用して、既知のリガンドに対する受容体を最初にスクリーニングするために使用される。

【0088】

実施例3

リガンド結合アッセイ

リガンド結合アッセイは、受容体の薬理を確認するための直接的な方法を提供し、また、ハイ・スループットな形態に応用可能である。受容体に対する精製されたリガンドは、結合性研究のために、高比活性(50~2000 Ci/mmol)に放射化標識される。その後、放射化標識のプロセスが、その受容体に対するリガンドの活性を低下させていないことの評定がなされる。緩衝液、イオン、pH、および塩基などの他の調節因子に関するアッセイ条件は、膜ならびに全細胞の受容体源双方ともに、使用可能なシグナル対ノイズ比を設定するために最適化される。これらのアッセイでは、特異的な受容体結合は、結合されている総放射能 - 過剰な未標識の競合リガンドの存在下で測定された放射能として、定義される。可能な場合には、1つより多くの競合リガンドが、残存する非特異的な結合を明らかにするために利用される。

【0089】

実施例4

アフリカツメガエル(Xenopus)卵母細胞における機能的アッセイ

本発明の受容体cDNAをコードしている線状化プラスミドテンプレートに由来するキャップ化RNA転写物を、標準的な手法に従って、RNAポリメラーゼを用いてインビトロで合成する。インビトロ転写物を、0.2mg/mlの最終濃度で、水中に懸濁する。卵巣葉を、メスの成体カエルから取り出す。第V期の濾胞除去卵母細胞を取得し、そして、RNA転写物(10ng/卵母細胞)を、顕微注入装置を使用して、50nlボラス中に注入する。アゴニスト曝露にตอบสนองする個々のアフリカツメガエル卵母細胞からの電流を測定するために、2つの電極電圧クランプを使用する。記録は、Ca²⁺を含まないBartth培地において室温で行われる。該アフリカツメガエルの系は、活性化するリガンドについて、既知のリガンドならびに組織/細胞抽出物をスクリーニングするために使用することができる。

【0090】

実施例5

微量生理機能測定アッセイ

広範な二次メッセンジャー系の活性化は、細胞からの少量の酸の放出を引き起

こす。生成された酸は、主として、細胞内のシグナル伝達過程にエネルギーを供給するために必要となる、増大した代謝活性の結果である。細胞周囲の培地におけるpH変化は、非常に小さいものの、CYTOSENSOR微量生理機能測定計(Molecular Devices Ltd., Menlo Park, CA)によって検出可能である。従って、CYTOSENSORは、本発明のG-タンパク質共役型受容体などの、エネルギーを利用している細胞内シグナル伝達経路と結びついている、受容体の活性化を検出することができる。

【0091】

実施例6

抽出物/細胞上清のスクリーニング

今のところ、依然として、それに対する内因性の活性化リガンド(アゴニスト)が判っていない、非常に多くの哺乳動物受容体が存在している。すなわち、これらの受容体に対する活性化リガンドは、これまでに同定されている、リガンド・バンク内には含まれていないかもしれない。従って、本発明の7TM受容体はまた、天然のリガンドを同定するために、組織抽出物に対して、(カルシウム、cAMP、微量生理機能測定計、卵母細胞電気生理学など、機能的スクリーンを利用して)機能的スクリーニングがなされる。陽性の機能的な応答を示す抽出物は、活性化リガンドが単離、同定されるまで、順次分画化することができる。

【0092】

実施例7

カルシウムおよびcAMPの機能的アッセイ

HEK293細胞において発現された7TM受容体は、PLCの活性化、ならびにカルシウムの動員および/またはcAMPの刺激もしくは阻害と、機能的に結びついていることが示されている。受容体でトランスフェクションされた、あるいは、ベクターのみのコントロールの細胞における、HEK293細胞内のカルシウムの基底レベルは、100nM~200nMの正常な範囲内にあることが実測された。組換え受容体を発現しているHEK293細胞は、fura2を負荷して、そして、同日中に、アゴニストにより誘導されるカルシウムの動員について、150を超える選択されたリガンドまたは組織/細胞抽出物を評価する。

同様に、組換え受容体を発現しているHEK293細胞を、標準的なcAMP定量アッセイを使用して、cAMP産生の刺激または阻害について評価する。カルシウムの変化またはcAMPの変動を示すアゴニストは、その応答が、受容体を発現しているトランスフェクションされた細胞に、独特であるか否かが決定するため、ベクターのみのコントロール細胞において、試験される。

実施例8

ヒト組織におけるポリペプチドmRNAの発現

HTOGH35の組織分布の分析を、HTOGH35ポリペプチドに由来する標識されたcDNAを使用して行った。このcDNAは、調査した約50の異なるヒト組織に由来するmRNAを含むドット・プロット(Clontech多組織発現アレイ)をプローブするために使用した。データは、該受容体は、食道、胎盤、膀胱、前立腺、精巣、および気管の各組織で発現していることを示している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Novel G-protein coupled receptor HTOGH35

<130> HTOGH35FWKWS

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1155

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

25 <400> 1

atg	ctg	aac	cca	cgc	ctc	aat	cgt	ccc	caa	gtg	ttt	cct	gac	acg	cat	48
Met	Leu	Asn	Pro	Arg	Leu	Asn	Arg	Pro	Gln	Val	Phe	Pro	Asp	Thr	His	
1				5					10					15		

30	ctt	tgc	tta	cag	tgc	atc	aca	act	gga	aga	atg	ggg	ttc	aac	ttg	acg	96
	Leu	Cys	Leu	Gln	Cys	Ile	Thr	Thr	Gly	Arg	Met	Gly	Phe	Asn	Leu	Thr	
				20					25					30			

35	stt	gca	aaa	tta	cca	awt	aac	gag	ctg	cac	ggc	caa	gag	agt	cac	aat	144
	Xaa	Ala	Lys	Leu	Pro	Xaa	Asn	Glu	Leu	His	Gly	Gln	Glu	Ser	His	Asn	
			35					40					45				

40	tca	ggc	aac	agg	agc	gac	ggg	cca	gga	aag	aac	acc	acc	ctt	cac	aat	192
	Ser	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Gly	Pro	Gly	Lys	Asn	Thr	Thr	Leu	His	Asn	
		50				55						60					

45	gaa	ttt	gac	aca	att	gtc	ttg	ccg	gtg	ctt	tat	ctc	att	ata	ttt	gtg	240
	Glu	Phe	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Pro	Val	Leu	Tyr	Leu	Ile	Ile	Phe	Val	
	65				70					75					80		

50	gca	agc	atc	ttg	ctg	aat	ggc	tta	gca	gtg	tgg	atc	ttc	ttc	cac	att	288
	Ala	Ser	Ile	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Ala	Val	Trp	Ile	Phe	Phe	His	Ile	
					85					90					95		

55	agg	aat	aaa	acc	agc	ttc	ata	ttc	tat	ctc	aaa	aac	ata	gtg	ggt	gca	336
	Arg	Asn	Lys	Thr	Ser	Phe	Ile	Phe	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ile	Val	Val	Ala	
				100					105					110			

60	gac	ctc	ata	atg	acg	ctg	aca	ttt	cca	ttt	cga	ata	gtc	cat	gat	gca	384
	Asp	Leu	Ile	Met	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Phe	Arg	Ile	Val	His	Asp	Ala	
			115					120					125				

60	gga	ttt	gga	cct	tgg	tac	ttc	aag	ttt	att	ctc	tgc	aga	tac	act	tca	432
	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	Tyr	Phe	Lys	Phe	Ile	Leu	Cys	Arg	Tyr	Thr	Ser	
		130					135						140				

	gtr ttg ktt tat gca aac atg tat act tcc atc gtg ttc ctt ggg ctg	480
	Val Leu Xaa Tyr Ala Asn Met Tyr Thr Ser Ile Val Phe Leu Gly Leu	
	145 150 155 160	
5	ata agc att gat cgc tat ctg aag gtg gtc aag cca ttt ggg gac tct	528
	Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Lys Val Val Lys Pro Phe Gly Asp Ser	
	165 170 175	
10	cgg atg tac agc ata acc ttc acg aag gtt tta tct gtt tgt gtt tgg	576
	Arg Met Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Lys Val Leu Ser Val Cys Val Trp	
	180 185 190	
15	gtg atc atg gct gtt ttg tct ttg cca aac atc atc ctg aca aat ggt	624
	Val Ile Met Ala Val Leu Ser Leu Pro Asn Ile Ile Leu Thr Asn Gly	
	195 200 205	
20	cag cca aca gag gac aat atc cat gac tgc tca aaa ctt aaa agt cct	672
	Gln Pro Thr Glu Asp Asn Ile His Asp Cys Ser Lys Leu Lys Ser Pro	
	210 215 220	
25	ttg ggg gtc aaa tgg cat acg gca gtc acc tat gtg aac agc tgc ttg	720
	Leu Gly Val Lys Trp His Thr Ala Val Thr Tyr Val Asn Ser Cys Leu	
	225 230 235 240	
30	agg tac atc cac aaa tcc agc agg caa ttc ata agt cag tca agc cga	816
	Arg Tyr Ile His Lys Ser Ser Arg Gln Phe Ile Ser Gln Ser Ser Arg	
	260 265 270	
35	aag cga aaa cat aac cag agc atc agg gtt gtt gtg gct gtg ttt ttt	864
	Lys Arg Lys His Asn Gln Ser Ile Arg Val Val Val Ala Val Phe Phe	
	275 280 285	
40	acc tgc ttt cta cca tat cac ttg tgc aga att cct ttt act ttt agt	912
	Thr Cys Phe Leu Pro Tyr His Leu Cys Arg Ile Pro Phe Thr Phe Ser	
	290 295 300	
45	cac tta gac agg ctt tta gat gaa tot gca caa aaa atc cta tat tac	960
	His Leu Asp Arg Leu Leu Asp Glu Ser Ala Gln Lys Ile Leu Tyr Tyr	
	305 310 315 320	
50	tgc aaa gaa att aca ctt ttc ttg tct gcg tgt aat gtt tgc ctg gat	1008
	Cys Lys Glu Ile Thr Leu Phe Leu Ser Ala Cys Asn Val Cys Leu Asp	
	325 330 335	
55	cca ata att tac ttt ttc atg tgt agg tca ttt tca aga agg ctg ttc	1056
	Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Met Cys Arg Ser Phe Ser Arg Arg Leu Phe	
	340 345 350	
60	aaa aaa tca aat atc aga acc agg agt gaa agc atc aga tca ctg caa	1104
	Lys Lys Ser Asn Ile Arg Thr Arg Ser Glu Ser Ile Arg Ser Leu Gln	
	355 360 365	
65	agt gtg aga aga tcg gaa gtt cgc ata tat tat gat tay act gat gtg	1152
	Ser Val Arg Arg Ser Glu Val Arg Ile Tyr Tyr Asp Tyr Thr Asp Val	
	370 375 380	
70	tag	1155

385

5 <210> 2
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2
 Met Leu Asn Pro Arg Leu Asn Arg Pro Gln Val Phe Pro Asp Thr His
 1 5 10 15
 Leu Cys Leu Gln Cys Ile Thr Thr Gly Arg Met Gly Phe Asn Leu Thr
 20 25 30
 15 Xaa Ala Lys Leu Pro Xaa Asn Glu Leu His Gly Gln Glu Ser His Asn
 35 40 45
 Ser Gly Asn Arg Ser Asp Gly Pro Gly Lys Asn Thr Thr Leu His Asn
 50 55 60
 Glu Phe Asp Thr Ile Val Leu Pro Val Leu Tyr Leu Ile Ile Phe Val
 65 70 75 80
 20 Ala Ser Ile Leu Leu Asn Gly Leu Ala Val Trp Ile Phe Phe His Ile
 85 90 95
 Arg Asn Lys Thr Ser Phe Ile Phe Tyr Leu Lys Asn Ile Val Val Ala
 100 105 110
 25 Asp Leu Ile Met Thr Leu Thr Phe Pro Phe Arg Ile Val His Asp Ala
 115 120 125
 Gly Phe Gly Pro Trp Tyr Phe Lys Phe Ile Leu Cys Arg Tyr Thr Ser
 130 135 140
 Val Leu Xaa Tyr Ala Asn Met Tyr Thr Ser Ile Val Phe Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 30 Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Lys Val Val Lys Pro Phe Gly Asp Ser
 165 170 175
 Arg Met Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Lys Val Leu Ser Val Cys Val Trp
 180 185 190
 35 Val Ile Met Ala Val Leu Ser Leu Pro Asn Ile Ile Leu Thr Asn Gly
 195 200 205
 Gln Pro Thr Glu Asp Asn Ile His Asp Cys Ser Lys Leu Lys Ser Pro
 210 215 220
 Leu Gly Val Lys Trp His Thr Ala Val Thr Tyr Val Asn Ser Cys Leu
 225 230 235 240
 40 Phe Val Ala Val Leu Val Ile Leu Ile Gly Cys Tyr Ile Ala Ile Ser
 245 250 255
 Arg Tyr Ile His Lys Ser Ser Arg Gln Phe Ile Ser Gln Ser Ser Arg
 260 265 270
 45 Lys Arg Lys His Asn Gln Ser Ile Arg Val Val Val Ala Val Phe Phe
 275 280 285
 Thr Cys Phe Leu Pro Tyr His Leu Cys Arg Ile Pro Phe Thr Phe Ser
 290 295 300
 His Leu Asp Arg Leu Leu Asp Glu Ser Ala Gln Lys Ile Leu Tyr Tyr
 305 310 315 320
 50 Cys Lys Glu Ile Thr Leu Phe Leu Ser Ala Cys Asn Val Cys Leu Asp
 325 330 335
 Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Met Cys Arg Ser Phe Ser Arg Arg Leu Phe
 340 345 350
 55 Lys Lys Ser Asn Ile Arg Thr Arg Ser Glu Ser Ile Arg Ser Leu Gln
 355 360 365
 Ser Val Arg Arg Ser Glu Val Arg Ile Tyr Tyr Asp Tyr Thr Asp Val
 370 375 380

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 00/11209
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N5/10 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/50 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 29849 A (INCYTE PHARMA INC ;YUE HENRY (US); BANDMAN OLGA (US); LAL PREETI ()) 17 June 1999 (1999-06-17) SEQ ID NO.3 figure 3 page 53, line 8 -page 54, line 27	1-8,10, 11
X	DATABASE EMBL 'Online! 11 May 1999 (1999-05-11) STRAUSBERG, R. ET AL.: "tu25b10.x1 NCI_cgap_Pr28 Homo sapiens cDNA clone" Database accession no. AI659657 XP002168878 nts 61-678	1,4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 June 2001		Date of mailing of the international search report 22/06/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-9016		Authorized officer Blanco Urgoiti, B

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No PCT/EP 00/11209
--

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 3 September 1998 (1998-09-03) WOESSNER J., ET AL.: "Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD79H11" Database accession no. AF086432 XP002168879 nts. 1-513 ---	1,4
X	DATABASE EMBL 'Online! 28 June 1999 (1999-06-28) STRAUSBERG R., ET AL.: "wf72h05.x2 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone" Database accession no. AI743546 XP002168880 nts. 1-467 ---	1,4
P,X	WO 00 08133 A (MCDONALD TERRENCE P ;LIU QINGYUN (US); MERCK & CO INC (US); WANG R) 17 February 2000 (2000-02-17) the whole document ---	1-8,10, 11
P,X	WO 99 63087 A (HODG MARTIN R ;GLUCKSMANN MARIA ALEXANDRA (US); MILLENNIUM PHARM I) 9 December 1999 (1999-12-09) the whole document -----	1-8,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/11209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9929849 A	17-06-1999	US 6063596 A AU 1620199 A EP 1037980 A	16-05-2000 28-06-1999 27-09-2000
WO 0008133 A	17-02-2000	NONE	
WO 9963087 A	09-12-1999	AU 4544999 A EP 1084241 A	20-12-1999 21-03-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁸ (参考)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50			M
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	クルクセン、 フランツ - ヴェルナー ドイツ連邦共和国 64367 ミュールタル バーンホフシュトラッセ 39			
Fターム(参考)	2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03 FB07 4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 CA07 GA11 HA15 4B064 AG20 CA19 CC24 DA01 DA13 4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46 4H045 AA10 AA11 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA50 FA74			

