

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/050269

発行日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(43) 国際公開日 平成14年6月27日(2002.6.27)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09  
 A O 1 K 67/027  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 45/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A O 1 K 67/027  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 K 39/395 N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-552146 (P2002-552146)	(71) 出願人	597177471 株式会社ジェノックス創薬研究所
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/011286		茨城県つくば市東光台5-1-3
(22) 国際出願日	平成13年12月21日(2001.12.21)	(71) 出願人	502196050
(31) 優先権主張番号	特願2000-389476 (P2000-389476)		国立成育医療センター総長
(32) 優先日	平成12年12月21日(2000.12.21)		東京都世田谷区大蔵2丁目10-1
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, JP, US	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	松本 佳子 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大 学生物工学研究センター内 株式会社ジェ ノックス創薬研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー性疾患の検査方法

## (57) 【要約】

複数の健常者とアレルギー性疾患の患者の血液を採取し、ディファレンシャルディスプレイ法により発現に差の見られる遺伝子を探索した結果、患者群で発現レベルが有意に高い遺伝子B 1 1 5 3を単離することに成功した。本発明者らは、この遺伝子をアレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法。

a) 被検者の T 細胞における、配列番号：1 に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現レベルを測定する工程

b) 健常者の T 細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

## 【請求項 2】

アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 に記載の検査方法。

## 【請求項 3】

遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する請求項 1 に記載の検査方法。 10

## 【請求項 4】

遺伝子の発現レベルを、前記遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する請求項 1 に記載の検査方法。

## 【請求項 5】

配列番号：1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

## 【請求項 6】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬。 20

## 【請求項 7】

次の工程を含む、候補化合物が下記 (a) - (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(1) 下記 (a) - (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。 30

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなる DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(2) 前記 (a) - (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

## 【請求項 8】

細胞が株化 T 細胞である請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

次の工程を含む、候補化合物が下記 (a) - (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。 40

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなる DNA とストリン 50

ジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者のT細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、および

(2) 被験動物のT細胞における前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程。

【請求項10】

請求項7、または請求項9に記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法。

10

【請求項11】

次の工程を含む、候補化合物が配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域の活性に与える影響を検出する方法。

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、および

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、

【請求項12】

請求項11に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を低下させる化合物を選択する工程を含む、配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域の活性を低下させる化合物のスクリーニング方法。

20

【請求項13】

次の工程を含む、被検化合物が(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の活性に与える影響を検出する方法。

(1) 下記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質に候補化合物を接触させる工程、および

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者のT細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド

30

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者のT細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド

(2) 前記蛋白質の活性を測定する工程

【請求項14】

蛋白質の活性が、ミオシン結合サブユニット85、または骨格筋2アクチニンとの結合活性である請求項13に記載の方法。

【請求項15】

請求項13に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を低下させる化合物を選択する工程を含む、(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の活性を低下させる化合物のスクリーニング方法。

40

【請求項16】

配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクター。

【請求項17】

請求項16に記載のベクターを導入した細胞。

【請求項18】

50

請求項 10、請求項 12、および請求項 15 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項 19】

配列番号：1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその一部のアンチセンス DNA を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項 20】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に結合する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項 21】

下記の (a) - (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

10

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列から選択された塩基配列を有する DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項 22】

請求項 21 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

【請求項 23】

請求項 21 に記載のポリヌクレオチドを発現可能に保持するベクター。

【請求項 24】

請求項 21 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 23 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の形質転換細胞を培養し、その発現産物を回収する工程を含む、請求項 22 に記載の蛋白質の製造方法。

30

【請求項 26】

請求項 22 に記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の抗体と、請求項 22 に記載の蛋白質の免疫学的な反応を観察する工程を含む、請求項 22 に記載の蛋白質の免疫学的測定方法。

【請求項 28】

配列番号：1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも 15 塩基の長さを持つオリゴヌクレオチド。

【請求項 29】

請求項 28 に記載のオリゴヌクレオチドと、請求項 21 に記載のポリヌクレオチドとのハイブリダイズを観察する工程を含む、請求項 21 に記載のポリヌクレオチドの測定方法。

40

【請求項 30】

下記の (a) - (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの T 細胞における発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物。

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者の

50

T細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者のT細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項31】

配列番号：1に記載の塩基配列、またはその相補配列にハイブリダイズする少なくとも15塩基の長さを有するポリヌクレオチドと、配列番号：1に記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

10

【請求項32】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を有するペプチドを認識する抗体と、配列番号：1に記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

【請求項33】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列の蛋白質、およびこの蛋白質に対して相互作用する蛋白質を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

【請求項34】

相互作用する蛋白質が、ミオシン結合サブユニット85、骨格筋 2アクチニン、およびそれらの相互作用ドメインを含む断片からなる群から選択されるいずれかの蛋白質である

20

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、アレルギー性疾患に関連する遺伝子、並びに該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

30

またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、リアンおよびパディー(Liang and Pardue)によって1992年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

40

さて、現在アレルギー疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的IgE測定、白血球

50

ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的 I g E の存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的な I g E を検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を *in vitro* で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法（後者）も公知である。ブリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言えることができる。

この他、アレルゲンに関わらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。たとえば、血清 I g E 値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清 I g E 値は、アレルゲン特異 I g E の総量に相当する情報である。アレルゲンの種類に関わらず I g E の総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、I g E が低値となる場合がある。好酸球数と E C P 値は、I 型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれる蛋白質である E C P ( e o s i n o p h i l c a t i o n i c p r o t e i n ) も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし、実際に診断の指標とできる範囲は限られている。

したがって、アレルゲンに関わらず、アレルギー患者の病態の把握や治療方針の決定に役立てることができる診断指標が求められていた。加えて、患者に対する危険が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることができる、アレルギー疾患のマーカーが提供されれば有用である。

#### 発明の開示

本発明は、アレルギー性疾患に関連する遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は該遺伝子の発現を指標とした、アレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、既に確立された「蛍光 D D ( F l u o r e s c e n t D D ) 法」( T . I t o ら , 1 9 9 4 , F E B S L e t t . 3 5 1 : 2 3 1 - 2 3 6 ) の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した T 細胞 R N A サンプルを解析できる D D システムを開発した ( W O 0 0 / 6 5 0 4 6 ) 。そして該システムを、アレルギー性疾患特異的に発現量が異なる遺伝子の単離に応用した。

すなわち、まず本発明者らは、健常者およびアレルギー性疾患（気管支喘息およびアトピー性皮膚炎）の患者を含む複数の被検者について、ダニに対する I g E 値を測定した。その結果、アレルギー性疾患の患者群（以下、単に「患者群」と呼ぶ場合あり）においてスコアが有意に高いことを示し、患者群はダニ抗原に対してアレルギーを有することを確認した。

次に、複数の被検者を健常群、およびアレルギー性疾患の患者群とに分け、被検者の血液から T 細胞を採取して、前記システムを利用し、健常者群と患者群で発現量が変化する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、患者群において有意に高い発現量を示す遺伝子「B 1 1 5 3」の単離に成功した。この遺伝子は、公知の遺伝子データベースに同一の塩基配列を見出すことができず、新規な遺伝子であると考えられた。さらに本発明者らは、この遺伝子の発現量を指標として、アレルギー性疾患の検査、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、アレルギー素因を有する者に高い発現を示す遺伝子、該遺伝子によ

10

20

30

40

50

ってコードされる蛋白質、並びにそれらの応用に関する。より具体的には、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、および候補化合物の該遺伝子の発現に与える影響を検出する方法、更にこの検出方法に基づくアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。

〔 1 〕 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法。

a) 被検者の T 細胞における、配列番号： 1 に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現レベルを測定する工程

b) 健常者の T 細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔 2 〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔 1 〕 に記載の検査方法。

〔 3 〕 遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する〔 1 〕 に記載の検査方法。 10

〔 4 〕 遺伝子の発現レベルを、前記遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する〔 1 〕 に記載の検査方法。

〔 5 〕 配列番号： 1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

〔 6 〕 配列番号： 2 に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

〔 7 〕 次の工程を含む、候補化合物が下記 ( a ) - ( d ) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。 20

( 1 ) 下記 ( a ) - ( d ) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

( a ) 配列番号： 1 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

( b ) 配列番号： 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

( c ) 配列番号： 2 に記載のアミノ酸配列において、 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

( d ) 配列番号： 1 に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者の T 細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。 30

( 2 ) 前記 ( a ) - ( d ) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

〔 8 〕 細胞が株化 T 細胞である〔 7 〕 に記載の方法。

〔 9 〕 次の工程を含む、候補化合物が上記 ( a ) - ( d ) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

( 1 ) 被験動物に候補化合物を投与する工程、および

( 2 ) 被験動物の T 細胞における前記 ( a ) - ( d ) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程。 40

〔 10 〕 〔 7 〕、または〔 9 〕 に記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、前記 ( a ) - ( d ) のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法。

〔 11 〕 次の工程を含む、候補化合物が配列番号： 1 に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域の活性に与える影響を検出する方法。

( 1 ) 配列番号： 1 に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、および

( 2 ) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、 50

〔12〕〔11〕に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を低下させる化合物を選択する工程を含む、配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域の活性を低下させる化合物のスクリーニング方法。

〔13〕次の工程を含む、被検化合物が上記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の活性に与える影響を検出する方法。

(1) 上記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質に候補化合物を接触させる工程、および

(2) 前記蛋白質の活性を測定する工程

〔14〕蛋白質の活性が、ミオシン結合サブユニット85、または骨格筋 2 アクチニンとの結合活性である〔13〕に記載の方法。 10

〔15〕〔13〕に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を低下させる化合物を選択する工程を含む、上記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の活性を低下させる化合物のスクリーニング方法。

〔16〕配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクター。

〔17〕〔16〕に記載のベクターを導入した細胞。

〔18〕〔10〕、〔12〕、および〔15〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。 20

〔19〕配列番号：1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその一部のアンチセンスDNAを主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

〔20〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に結合する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

〔21〕上記の(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔22〕〔21〕に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

〔23〕〔21〕に記載のポリヌクレオチドを発現可能に保持するベクター。

〔24〕〔21〕に記載のポリヌクレオチド、または〔23〕に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

〔25〕〔24〕に記載の形質転換細胞を培養し、その発現産物を回収する工程を含む、 30  
〔22〕に記載の蛋白質の製造方法。

〔26〕〔22〕に記載の蛋白質に対する抗体。

〔27〕〔26〕に記載の抗体と、〔22〕に記載の蛋白質の免疫学的な反応を観察する工程を含む、〔22〕に記載の蛋白質の免疫学的測定方法。

〔28〕配列番号：1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも15塩基の長さを持つオリゴヌクレオチド。

〔29〕〔28〕に記載のオリゴヌクレオチドと、〔21〕に記載のポリヌクレオチドとのハイブリダイズを観察する工程を含む、〔21〕に記載のポリヌクレオチドの測定方法。 40

〔30〕上記の(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドのT細胞における発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物。

〔31〕配列番号：1に記載の塩基配列、またはその相補配列にハイブリダイズする少なくとも15塩基の長さを有するポリヌクレオチドと、配列番号：1に記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

〔32〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を有するペプチドを認識する抗体と、配列番号：1に記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。 50

〔 3 3 〕 配列番号： 2 に記載のアミノ酸配列の蛋白質、およびこの蛋白質に対して相互作用する蛋白質を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

〔 3 4 〕 相互作用する蛋白質が、ミオシン結合サブユニット 8 5、骨格筋 2 アクチニン、およびそれらの相互作用ドメインを含む断片からなる群から選択されるいずれかの蛋白質である〔 3 3 〕に記載のキット。

あるいは本発明は、〔 1 0 〕、〔 1 2 〕、および〔 1 5 〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を投与する工程を含む、アレルギー性疾患の治療方法に関する。さらに本発明は、〔 1 0 〕、〔 1 2 〕、および〔 1 5 〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、アレルギー性疾患の治療のための医薬組成物の製造における使用に関する。加えて本発明は、「 B 1 1 5 3 」遺伝子に対するアンチセンス DNA、または「 B 1 1 5 3 」蛋白質に結合する抗体を投与する工程を含むアレルギー性疾患の治療方法に関する。また本発明は、「 B 1 1 5 3 」遺伝子に対するアンチセンス DNA、または「 B 1 1 5 3 」蛋白質に結合する抗体の、アレルギー性疾患の治療のための医薬組成物の製造における使用に関する。

本発明は、新規な遺伝子「 B 1 1 5 3 」、並びに T 細胞における「 B 1 1 5 3 」の発現レベルを指標とする、アレルギー疾患の検査方法に関する。「 B 1 1 5 3 」は、配列番号： 1 に示す塩基配列を有する。また「 B 1 1 5 3 」は、健常者群とアレルギー性疾患の患者群とで発現量が変化する遺伝子である。本発明の遺伝子「 B 1 1 5 3 」は、公共データベースからは、特に構造的に同一性の高い既知遺伝子を見出すことができなかつた。

「 B 1 1 5 3 」は、その配列の 5 ' 側約 1 9 3 b p において、既に報告されている、ヒト分泌蛋白質の 5 ' E S T (ヨーロッパ特許第 1, 0 3 3, 4 0 1 号の S E Q I D 2 0 8 1 1) と 9 6 % の相同性を示したが、完全には一致しなかつた。したがって、「 B 1 1 5 3 」は新規な遺伝子であると考えられた。また言うまでも無く、この E S T がアレルギー性疾患に関与することを示す報告もない。配列番号： 1 に示す塩基配列を有する「 B 1 1 5 3 」がアレルギー性疾患に関与していることは、本発明者らによって今回初めて見出された知見である。

「 B 1 1 5 3 」は、 O R F を含む 3 5 9 6 b p の完全長 c D N A クローンとして単離された。決定された「 B 1 1 5 3 」 c D N A の塩基配列を配列番号： 1 に、またこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号： 2 に示した。

これらの配列情報についてホモロジー検索したところ、配列番号： 1 に示した「 B 1 1 5 3 」遺伝子塩基配列中の 5 0 5 b p から 2 1 4 8 b p までの塩基配列は、 K I A A 1 8 6 1 ( A c c e s s i o n N o . A B 0 5 8 7 6 4 ) と、また 1 4 2 0 b p から 3 5 9 6 b p までの配列は F L J 2 3 5 8 1 ( A c c e s s i o n N o . A K 0 2 7 2 3 4 ) と相同性が高かつた。しかし、 1 b p から 5 0 4 b p までの配列は新規配列であつた。これらの塩基配列の関係を、図 5 にまとめた。これらの塩基配列の他には、このアミノ酸配列と相同性を示す既知アミノ酸配列は見出されず、「 B 1 1 5 3 」は新規な蛋白質をコードしていると考えられた。

配列番号： 1 に示す塩基配列は、全長 c D N A である。この c D N A は、 T 細胞の c D N A ライブラリーを、配列番号： 1 に示した塩基配列から選択された塩基配列からなるプローブでスクリーニングすることによって取得することができる。

本発明は、配列番号： 1 に示す塩基配列を有するポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、このポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、このポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明において、ポリヌクレオチドとは、 DNA や RNA のような天然の核酸分子の他、標識を付した分子や、各種のヌクレオチド誘導体によって構成された人工的な分子をも含む。人工的なポリヌクレオチドには、ホスホリボチオエート結合やペプチド結合をバックボーンとするポリヌクレオチドが含まれる。

これら本発明のポリヌクレオチドは、化学的に合成することもできるし、 m R N A、 c D N A ライブラリー、あるいはゲノムライブラリー等の天然の核酸から単離することもでき

10

20

30

40

50

る。本発明のポリヌクレオチド分子は、それによってコードされる蛋白質の生産、「B 1 1 5 3」の発現を阻害するためのアンチセンス核酸、あるいはその存在をハイブリダイゼーションによって検出するためのプローブ等として有用である。

また本発明において、ある蛋白質がアレルギー性疾患患者、あるいはアレルギー疾患動物のT細胞において発現が増加するとき、本発明の蛋白質と機能的に同等と言う。ある蛋白質が、T細胞において発現が増加することは、採取されたT細胞における当該蛋白質をコードする遺伝子の発現レベルを比較することによって確認することができる。

このポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいて、ハイブリダイズやPCRなどの公知の手法によって取得することができる。たとえば、配列番号：1に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ストリンジェントな条件下で、T細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、配列番号：1に記載の塩基配列と同一性の高い塩基配列からなるcDNAを取得することができる。

あるポリヌクレオチドがストリンジェントな条件下で配列番号：1に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドとハイブリダイズするとき、このポリヌクレオチドがコードする蛋白質は本発明の蛋白質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、 $4 \times SSC$ 、 $65$  でハイブリダイゼーションさせ、 $0.1 \times SSC$ を用いて $65$  で1時間洗浄する。

ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度( $T_m$ )に応じて調整することができる。 $T_m$ はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成(塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度)によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

同一性の高い塩基配列からなるcDNAによってコードされる蛋白質は、本発明における機能的に同等な蛋白質である可能性が高い。本発明において、同一性の高い塩基配列とは、一般的に70%以上、通常は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を示す塩基配列を言う。塩基配列の同一性は、BLASTN等の公知のアルゴリズムによって計算することができる。

あるいは、配列番号：1に記載の塩基配列から選択された塩基配列なるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、やはりT細胞のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行うことにより、同一性の高いcDNAを取得することもできる。cDNAのソースとしてヒトの細胞を用いれば、ヒトのcDNAを取得することができる。またヒト以外の、脊椎動物細胞を利用すれば、異種動物におけるカウンターパートを取得することができる。このような非ヒト脊椎動物としては、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギなどの多くの実験動物を例示することができる。実験動物における「B 1 1 5 3」のカウンターパートは、各動物種におけるアレルギーモデル動物の作成や、アレルギーの治療薬の開発におけるマーカーとして有用である。

あるいは「B 1 1 5 3」タンパク質のアミノ酸配列に対して、たとえば90%以上、望ましくは95%以上、更に望ましくは99%以上の相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、「B 1 1 5 3」遺伝子と機能的な遺伝子として示すことができる。また、実施例において用いた配列番号：1に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして増幅することができる遺伝子であって、アレルギー素因を有する者に高い発現を示す蛋白質をコードする遺伝子も、機能的に同等な遺伝子である。本発明において、配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子、あるいはこの遺伝子と機能的に同等な遺伝子を指標遺伝子という。そして指標遺伝子によってコードされる蛋白質を指標蛋白質という。

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2で表されるアミノ酸配列に対して1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からな

10

20

30

40

50

り、本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。たとえば真核生物の遺伝子には、しばしば多型が見出される。多型によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあるが、通常蛋白質の活性は維持される。また、一般に、1個または数個のアミノ酸配列の改変によって、蛋白質の活性が維持される場合が多いことが知られている。したがって、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの人為的な改変によってアミノ酸配列に変異を与えた蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、該蛋白質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。このようなアミノ酸配列は、好ましくは配列番号：2で表されるアミノ酸配列に対して90%以上のホモロジーを持つ配列を含む。アミノ酸配列のホモロジーは、FASTAによって決定することができる。

10

なお、アミノ酸に対するコドンは公知であり、その選択も任意でよい。例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる[Grantham, R. et al. *Nucleic Acids Res.* 9, r43 (1981)]。したがって、コドンの縮重を考慮して、DNAを適宜改変したのもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法(site specific mutagenesis)[Mark, D. F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5662 (1984)]等にしたがって、これら塩基配列のコドンの一部改変することができる。

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも15塩基の長さを持つオリゴヌクレオチドに関する。ここで「相補鎖」とは、A:T(RNAにおいてはTをUに読みかえる)、G:Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、本明細書に記載したアルゴリズムにより決定することができる。

20

本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの検出や合成に有用である。オリゴヌクレオチドをプローブやプライマーとして、標的ポリヌクレオチドを検出、あるいは合成する手法は公知である。たとえば、mRNAを標的ポリヌクレオチドとするノーザンブロット法は、RNAの代表的な検出方法である。mRNAを鋳型としてRT-PCRを行えば、本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。また、その合成産物の有無や量を指標としてmRNAの有無やその発現レベルを知ることができる。あるいは、T細胞中に発現している本発明のポリヌクレオチドを、*in situ*ハイブリダイゼーションによって検出することもできる。

30

更に本発明のポリヌクレオチドを利用して、それがコードする蛋白質を組み換え体として製造することができる。より具体的には、配列番号：1の塩基配列を有するポリヌクレオチドのコード領域を公知の発現ベクターに組み込み、適切な宿主に形質転換することによって形質転換体を得る。あるいは、前記コード領域を含むポリヌクレオチドを適切な宿主のゲノムにインテグレートすることにより、形質転換体とすることもできる。

40

得られた形質転換体を、導入された本発明のポリヌクレオチドが発現可能な条件下で培養し、発現生成物を回収することにより、本発明の蛋白質を得ることができる。発現生成物は、公知の方法によって精製蛋白質とすることができる。

加えて本発明は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質に関する。本発明の蛋白質は、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患の診断のための指標として有用である。

あるいは本発明の蛋白質やその断片は、本発明の蛋白質に対する抗体を作成するための免疫原として有用である。与えられた免疫原を利用して抗体を得る手法は、公知である。すなわち、蛋白質、あるいはその断片を、適切なアジュバントと混合して免疫原とし、免疫

50

動物に接種する。免疫動物は限定されない。代表的な免疫動物としては、マウス、ラット、ウサギ、あるいはヤギ等の動物が挙げられる。抗体価の上昇を確認した後に採血し、血清を分取すれば抗血清とすることができる。あるいは、更にIgG分画を精製することにより、精製抗体を取得することもできる。抗体の精製には、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA結合セファロースや本発明の蛋白質をリガンドとするイムノアフィニティークロマトグラフィー等の手法を利用することができる。

更に、抗体産生細胞を細胞融合などの手法によって形質転換し、クローン化することによって、モノクローナル抗体を得ることもできる。あるいは、抗体産生細胞の遺伝子を取得し、ヒト化抗体やキメラ抗体を構築する方法も公知である。このようにして得ることができる抗体は、本発明の蛋白質を免疫学的に測定するためのツールとして有用である。本発明の蛋白質をその抗体と接触させ、両者の免疫学的な反応を観察することにより、本発明の蛋白質を免疫学的に測定することができる。本発明の免疫学的な測定には、公知の多くのアッセイフォーマットを応用することができる。たとえば、血清等に含まれる蛋白質であれば、ELISA等の手法によって測定することができる。あるいはT細胞に発現する蛋白質を抗体によって検出するには、免疫組織学的な手法や、あるいは蛍光標識抗体を用いたFACS等を利用することができる。

本発明において、アレルギー性疾患 (allergic disease) とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によってT細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因 (allergic diathesis) とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

本発明における遺伝子「B1153」は、健常者群とアレルギー性疾患の患者群との比較において、患者群で統計学的に有意に高い発現を示した。従って、「B1153」の遺伝子の発現レベルを指標として、アレルギー性疾患の検査を行うことができる。

本発明におけるアレルギー疾患の検査とは、たとえば以下のような検査が含まれる。まず、アレルギー疾患様の症状がアレルギー反応に起因するものであるかどうかを判断するための検査が挙げられる。アレルギー疾患様の症状としては、具体的には、皮膚炎(かゆみ、発赤)、鼻炎(はなづまり、鼻水、くしゃみ)、喘息(喘鳴、呼吸困難)等を示すことができる。これらの症状は、それぞれ皮膚乾燥症、かぜ症候群(鼻風邪)、気管支炎などでも認められるが、本発明の検査方法により、その症状がアレルギー反応に起因しているかどうかを判別可能である。また本発明のアレルギーの検査方法には、アレルギー素因を有するか否かを判断するための検査が含まれる。

本発明において、「B1153」の遺伝子の発現レベルとは、これらの遺伝子のmRNAへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。したがって本発明によるアレルギー疾患の検査方法は、前記遺伝子に対応するmRNAの発現レベル、あるいは前記遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

本発明におけるアレルギー性疾患の検査における「B1153」遺伝子の発現レベルの測定は、公知の遺伝子解析方法にしたがって実施することができる。具体的には、たとえばこの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号：1に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な

10

20

30

40

50

少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A:T(RNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLASTN等のアルゴリズムにより決定することができる。

このようなポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15 bp ~ 100 bp、好ましくは15 bp ~ 35 bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15 bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・クレーンフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg PA, Rebagkati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)
- ・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用することができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象(DNAもしくはRNAの逆転写産物)にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ(exonuclease)活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する(Holland,

10

20

30

40

50

P. M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276 - 7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6): 357 - 362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6: 986 - 994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6: 995 - 1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM 7700 (PEバイオシステムズ社)を用いることができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、前記遺伝子「B1153」によりコードされる蛋白質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、この遺伝子でコードされる蛋白質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。

この検出に用いる「B1153」蛋白質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537 - 40)であることができる。例えば、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髄腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

「B1153」蛋白質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

抗原に用いる蛋白質もしくはその部分ペプチドは、例えば該遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換え蛋白質を発現させ、発現させた組み換え蛋白質を培養液または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、この遺伝子によってコードされるアミノ酸配列、あるいは配列番号: 1に記載の全長cDNAによってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

本発明においては、被検者のT細胞を試料とする。T細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、たとえばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、リンパ球を分離する。分離されたリンパ球は、そのまま本発明によるアレルギー性疾患の検査のための試料として用いることもできる。純粋なT細胞集団ではなく、リンパ球分画を試料として直接分析することにより、ベッドサイドにおける簡便な検査が可能となる。あるいは分離したリンパ球から、CD3マイクロビーズ標識によってCD3陽性細胞を分取し、更にセルソーターなどによってT細胞を分離することができる。分離されたT細胞を破壊してライセートとすれば、前記蛋白質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートからmRNAを抽出すれば、前記遺伝子に対応するmRNAの測定のための試料とすることができる。T細胞のライセートやmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

あるいは、T細胞の分離を行わず、全血や、末梢血リンパ球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。たとえばT細胞に特異的に発現し、かつ細胞の状態に関わらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子(ハウスキーピング遺伝子)の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

10

20

30

40

50

また検出すべき蛋白質が分泌型の蛋白質である場合には、被検者の血液や血清などの体液試料に含まれる目的とする蛋白質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

本発明によるアレルギー性疾患の検査の結果、本発明の遺伝子の発現レベルが健常者に比べて高ければ、アレルギー性疾患を罹患していると判定することができる。あるいはアレルギー素因の検査においては、その被検者はアレルギー素因を有するものと判定することができる。

また本発明は、下記の(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドのT細胞における発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー疾患モデル動物に関する。

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなり、アレルギー性疾患患者のT細胞において発現が増加する蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アレルギー性疾患患者のT細胞において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

本発明によって、アレルギー疾患患者においては、前記遺伝子「B1153」のT細胞における発現レベルが高いことが明らかとなった。したがって、T細胞においてこの遺伝子、またはこの遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に増強した動物は、アレルギー疾患のモデル動物として利用することができる。なおT細胞における発現レベルの上昇とは、血液細胞における標的遺伝子の発現レベルの上昇を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを上昇させるのはT細胞のみである場合のみならず、血液細胞全体において、あるいは全身性に前記遺伝子の発現レベルが上昇している場合を含む。本発明において機能的に同等な遺伝子とは、前記(a) - (d)に記載したポリヌクレオチドのいずれかを意味する。

たとえば本発明によるアレルギー疾患モデル動物がアレルギー性の皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

本発明において、発現レベルの上昇とは、目的とする遺伝子が外来遺伝子として導入され強制発現している状態、あるいは宿主が備える遺伝子の転写と蛋白質への翻訳が増強されている状態、並びに翻訳産物である蛋白質の分解が抑制された状態のいずれかを意味する。遺伝子の発現レベルは、たとえば実施例に示すような定量的なPCRにより確認することができる。また翻訳産物であるタンパク質の活性は、正常な状態と比較することにより確認することができる。

代表的なトランスジェニック動物は、目的とする遺伝子を導入し強制発現させた動物である。この他のトランスジェニック動物には、たとえば遺伝子のコード領域に変異を導入し、その活性を増強したり、あるいは分解されにくいアミノ酸配列に改変した動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域に変異を導入することにより、本発明の遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法(マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号)、胚性幹細胞(ES細胞)を使用する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も

10

20

30

40

50

開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M. Lavitrano et al. Cell, 57, 717, 1989)。

本発明のトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

本発明によるトランスジェニック動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さら

10

にはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。  
更に本発明は、候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に関する。本発明において、「B1153」遺伝子は、アレルギー疾患を持つヒトにおいて有意に発現レベルが高い。したがって、この遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、対照と比較してその発現レベルを低下させることができる化合物を選択することによって、アレルギー疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを低下させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、蛋白質の活性発現のいずれかのステップに対して阻害的に作用する作用を持つ化合物である。

候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響の検出方法は、*in vivo*で行なうことも*in vitro*で行うこともできる。*in vivo*での影響を検出するには、適当な被験動物を利用する。被験動物には、たとえばアレルギー疾患モデル動物や、前記(a)-(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドのT細胞における発現が増強されたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物を利用することができる。本発明に基づく*in vivo*での発現レベルに与える影響の検出は、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

20

(1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、

(2) 被験動物のT細胞における前記(a)-(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

また、*in vitro*においては、例えば、前記(a)-(d)のいずれかに記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させ、これらポリヌクレオチドの発現レベルを検出する方法を利用することができる。具体的には、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

30

(1) 前記(a)-(d)のいずれかに記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(2) 前記(a)-(d)のいずれかに記載したポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

本発明において、工程(1)に用いるための細胞は、株化T細胞、あるいはこれらポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドを発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

40

ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法(HVJ(センダイウイルス)、ポリエチレングリコール(PEG)、電気的細胞融合法、微少核融合法(染色体移入))が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン(gene gun)を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

50

本発明の検出方法においては、前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを発現する細胞として、株化T細胞を用いることもできる。株化T細胞としてMolt 4細胞、Jurkat細胞を例示できる。スクリーニングの方法は、まず前記株化T細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化T細胞における前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、対照と比較して該ポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物を選択する。

なお本発明の方法において、前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルは、これらのポリヌクレオチドがコードする蛋白質の発現レベルのみならず、対応するmRNAを検出することにより比較することもできる。mRNAによって発現レベルの比較を行うには、蛋白質試料の調製工程に代えて、先に述べたようなmRNA試料の調製工程を実施する。mRNAや蛋白質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

10

さらに本発明の開示に基づいて本発明の遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

すなわち本発明は、次の工程を含む、候補化合物が配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域の活性に与える影響を検出する方法に関する。

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、および

20

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、TATAボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子としては、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

本発明の遺伝子の転写調節領域は、次のようにして取得することができる。すなわち、まず本発明で開示したcDNAの塩基配列に基づいて、BACライブラリー、YACライブラリー等のヒトゲノムDNAライブラリーから、PCRまたはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該cDNAの配列を含むゲノムDNAクローンを得る。得られたゲノムDNAの配列を基に、本発明で開示したcDNAの転写調節領域を推定し、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子の上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

30

本発明の前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、前記ポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

40

すなわち本発明は、in vivoおよび/またはin vitroにおいて、候補化合物による前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、前記(a) - (d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法に関する。

あるいは本発明は、配列番号：1に示す塩基配列を有する遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対照と比較してレポーター遺伝子の発現を低下させる化合物を選択することにより、配列番号：1に示す塩基配列を有

50

する遺伝子の発現を誘導する化合物を取得することができる。

また本発明の蛋白質「B1153」の活性を指標として、被検化合物の本発明の蛋白質「B1153」の活性に与える影響を評価することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、被検化合物が、「B1153」蛋白質の活性に与える影響を測定する方法に関する。

- (1) 指標遺伝子によってコードされる蛋白質と被検化合物を接触させる工程、
- (2) 前記蛋白質の活性を測定する工程、

本発明における指標蛋白質である「B1153」は、実施例に記載したようにミオシン結合サブユニット85、および骨格筋 2 アクチニンとの相互作用が観察された。したがって、「B1153」蛋白質と、これらの分子との相互作用を指標として、被検化合物が「B1153」蛋白質の活性に与える影響を評価することができる。分子間の相互作用の測定には、公知の方法を利用することができる。このような解析手法の一つとして、プルダウンアッセイを示すことができる。

プルダウンアッセイは、たとえば次のようにして行われる。まず、指標蛋白質である「B1153」蛋白質と、結合パートナーであるミオシン結合サブユニット85（または骨格筋 2 アクチニン）のいずれかを標識する。標識には、<sup>35</sup>S - メチオニンなどが利用される。プルダウンアッセイに用いる指標蛋白質および結合パートナーは、完全な分子構造を維持していなくてもよい。たとえば、相互の結合に必要なドメインを含む部分ペプチドを用いることもできる。実施例において確認されたように、ミオシン結合サブユニット85はそのC末端領域において、B1153蛋白質との結合活性を示す。また、骨格筋 2 アクチニンは、その中央部分である309aa - 528aaに相当する領域において、B1153蛋白質との結合活性が確認された。

次いで指標蛋白質と結合パートナーとを、被検化合物とともにインキュベートし、結合分画を回収する。結合分画を容易に分離するために、指標蛋白質に予めタグを結合させておくことである。タグには、ヒスチジンタグやHAタグなどが用いられる。結合分画に含まれる標識の量を対照と比較することにより、被検化合物の影響が評価される。

本発明による、被検化合物が、「B1153」蛋白質の活性に与える影響を測定する方法を利用して、「B1153」蛋白質の活性を調節する機能を有する化合物をスクリーニングすることができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む、「B1153」蛋白質の活性を抑制する機能を有する化合物のスクリーニング方法に関する。

- (1) 被検化合物が、「B1153」蛋白質の活性に与える影響を測定する工程、および
- (2) 対照と比較して「B1153」蛋白質の活性を抑制する化合物を選択する工程

このようにして得ることができる化合物は、「B1153」の働きを抑制する。したがって当該化合物の投与によって、T細胞において発現が誘導された指標蛋白質の阻害を通じて、アレルギー性疾患を制御することができる。

本発明による各種のスクリーニング方法に必要な、ポリヌクレオチド、抗体、細胞株、モデル動物、「B1153」蛋白質、あるいは「B1153」蛋白質の結合パートナー等は、予め組み合わせてキットとすることができる。「B1153」蛋白質の結合パートナーとは、B1153蛋白質と相互作用する成分を言う。たとえばミオシン結合サブユニット85、および骨格筋 2 アクチニンは、B1153蛋白質と相互作用することが確認された。これらの成分、並びにB1153との相互作用に必要なこれらの成分の部分構造を有する化合物は、本発明における「B1153」蛋白質の結合パートナーとして用いることができる。

より具体的には、たとえば指標遺伝子を発現する細胞と、これらの指標遺伝子の発現レベルを測定するための試薬とで構成される。指標遺伝子の発現レベルを測定するための試薬としては、たとえば少なくとも1つの指標遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、若しくはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドが用いられる。あるいは、少なくとも1つの指標蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を試薬として用いることができる。

あるいは、「B1153」蛋白質および、結合パートナーであるミオシン結合サブユニッ

10

20

30

40

50

ト 8 5 ( または骨格筋 2 アクチニン ) を組み合わせたキットとすることもできる。キットを構成する、結合パートナーであるミオシン結合サブユニット 8 5 または骨格筋 2 アクチニンは、先に述べたような、B 1 1 5 3 蛋白質との相互作用に必要な領域を含む断片であってもよい。同様に B 1 1 5 3 蛋白質は、キットを構成する結合パートナーとの相互作用に必要な領域を含む断片を用いることもできる。このようなキットは、被検化合物 B 1 1 5 3 蛋白質の活性に与える影響を評価するためのキットとして用いることができる。更に、B 1 1 5 3 蛋白質、またはその結合パートナーをビーズや反応容器に固定した状態で、供給することもできる。反応に必要な成分を固相化したキットは、ハイスループットスクリーニングに有用である。

これらのキットには、標識の検出に用いられる基質化合物、細胞の培養のための培地や容器、陽性や陰性の標準試料、更にはキットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。本発明に基づく候補化合物の「B 1 1 5 3」遺伝子の発現レベルに与える影響を検出するためのキットは、「B 1 1 5 3」遺伝子の発現レベルを修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。

これらの方法に用いる被験候補化合物としては、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。あるいは、指標遺伝子の発現を抑制することができる、アンチセンス DNA も、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。更に、指標遺伝子によってコードされる蛋白質を認識する抗体が、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。本発明のアレルギー性疾患の治療薬は、前記スクリーニング方法によって選択された化合物を有効成分として含み、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

また、投与すべき化合物がタンパク質からなる場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらすタンパク質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である。

あるいはアンチセンス DNA は、適当なプロモーター配列の下流に組み込み、アンチセンス RNA 発現ベクターとして投与することができる。この発現ベクターをアレルギー疾患患者の T 細胞へ導入すれば、これらの遺伝子のアンチセンスを発現し、当該遺伝子の発現レベルの低下によってアレルギーの治療効果を達成することができる。T 細胞への発現ベクターの導入としては、*in vivo*、あるいは *ex vivo* で行う方法が公知である。

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき 0 . 1 m g から 5 0 0 m g の範囲で、好ましくは 0 . 5 m g から 2 0 m g の範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕患者および健常者からの血液採取

アレルギー性疾患特異的に発現が異なる遺伝子を単離する目的で、症例を解析し、選出さ

れた患者および健常者から血液を採取した。健常者および極軽症者群として12名、気管支喘息患者群として23名、アトピー性皮膚炎患者群として24名から血液を採取した。これらの血液試料の一部を用いて、ダニ抗原特異的IgEの量を測定した。

特異的IgEの測定はペーパーディスクを固相とするRAST法を改良したCAP RAST法により行った。Pharmacia社製の標準の抗体価を含む血清を基準とし、それぞれの検体のIgE抗体価を決定した。得られた値をスコアで示した。

被検者のダニ特異的IgE抗体価のスコアを表1の「IgEスコア」のカラムに示す。表1に示されるように、健常者および極軽症者群では、極軽症者の一人を除いてスコアが0であった。一方、患者群では高いスコアが示され、ダニ抗原に対するアレルギーを持つことが示された。

表1

被験者 番号	疾患	IgE スコア	被験者 番号	疾患	IgE スコア
01	極軽症	0	37	皮膚炎	3
02	極軽症	0	38	皮膚炎	4
03	極軽症	5	39	皮膚炎	5
04	極軽症	0	40	皮膚炎	4
05	極軽症	0	41	皮膚炎	6
06	極軽症	0	42	皮膚炎	6
07	健常	0	43	皮膚炎	6
08	健常	0	44	皮膚炎	5
09	健常	0	45	皮膚炎	6
10	健常	0	46	皮膚炎	6
11	健常	0	47	皮膚炎	5
12	健常	0	48	皮膚炎	3
13	喘息	5	49	皮膚炎	6
14	喘息	5	50	皮膚炎	6
15	喘息	4	51	皮膚炎	6
16	喘息	5	52	皮膚炎	6
17	喘息	5	53	皮膚炎	5
18	喘息	5	54	皮膚炎	6
19	喘息	6	55	皮膚炎	4
20	喘息	6	56	皮膚炎	6
21	喘息	4	57	皮膚炎	5
22	喘息	5	58	皮膚炎	5
23	喘息	5	59	皮膚炎	5
24	喘息	6	60	皮膚炎	6
25	喘息	5			
26	喘息	6			
27	喘息	5			
28	喘息	6			
29	喘息	6			
30	喘息	6			
31	喘息	4			
32	喘息	4			
34	喘息	4			
35	喘息	6			
36	喘息	5			

10

20

30

40

50

## 〔実施例2〕血液試料からのリンパ球画分の調製

血液10mlから、以下のようにしてT細胞を調製した。まずノボ社製等のヘパリン1mlで注射筒壁を万遍なく処理し、最終濃度50unit/mlのヘパリンを含む10ml注射筒に採血した。このとき一人の採血に22G針を2本準備した。注射針をはずし、50mlの遠心チューブ(ポリプロピレン製)に移した。1500rpm、室温で5分間遠心し、できるだけ表面近くから1.1mlを採取し、15000rpmで5分間、4で遠心して上清1mlを血漿(plasma)として回収した。血漿を回収した残りに3%のデキストラン(ナカライ社製)を含む0.9% NaClを等量(9ml)加え、静かに数回転倒させて混和した。その後30分間室温で静置した。PRP(Platelet rich plasma, 血小板に富む血漿)を別の15ml遠心チューブに移し、1200rpm(トミー社製の遠心機で150×gに相当する)で5分間、室温で遠心した。遠心後、血小板は上清にあった。沈殿した細胞をギブコ社等から入手したCa、Mg不含のHBSS 5mlに懸濁した。これを、パストールピペットを用いてFicol Paque(ファルマシア社製)が5mlが入ったチューブ(ファルコンチューブ:2006または2059;ポリプロピレン製)1本に上層した。1200rpmで5分間遠心後、1500rpm(トミー社製の遠心機で400×gに相当する)で30分間室温で遠心した。その結果、顆粒細胞(granulocyte)、赤血球(erythrocyte)が沈殿し、フィコール層を挟んで中間層にリンパ球(lymphocyte)、単球(monocyte)、血小板(platelet)が含まれた。パストールピペットで中間層を回収し、2~3倍の容量のBSA/PBS(0.5% BSA, 2mM EDTA in PBS, pH7.2;使用直前に脱気した)を添加し、1200rpm、4で5分間遠心した。沈殿を回収し、BSA/PBSで2回洗浄した。2回目の洗浄後、細胞を5mlに懸濁し、その一部をトリパンプルで2倍に希釈して細胞数を測定した。全細胞数は約 $1 \times 10^7$ であった。これをリンパ球画分とした。

## 〔実施例3〕リンパ球画分からのT細胞の分離

実施例2で得たリンパ球画分を1200rpmで4、5分間遠心し、100 $\mu$ lあたり $10^8$ になるようにBSA/PBSに懸濁した。容量は約20 $\mu$ lになった。これをエッペンドルフチューブ(1.5ml)に移し、CD3マイクロビーズ液を添加した。その後、30分間4~10に放置した(このとき氷上には置かなかつた)。この試料をマグネチックセルソーター(MACS)(Miltenyi Biotech Inc.製)で以下のように処理した。

MS<sup>+</sup>/RS<sup>+</sup>カラムをMini MACSまたはVari o MACSセパレーションユニットに装着した(針は付けなかつた)。500 $\mu$ lのBSA/PBSをカラムに静かにアプライし、バッファは流し出した。次にCD3マイクロビーズ標識した細胞をカラムにアプライした。カラムを500 $\mu$ lで3回洗浄した(B細胞画分)。カラムをセパレーションユニットからはずし、溶出液を集めるチューブ上に置いた。1mlのBSA/PBSをカラムにアプライし、カラム添付のプランジャーを用いポジティブ細胞を急速に流し出した。これをT細胞画分とした。

得られたT細胞画分について、1200rpm、5分間4で遠心した。沈殿をBSA/PBSで2回洗浄した。2回目の洗浄後、細胞を1mlに懸濁し、その一部をトリパンプルで2倍に希釈して細胞数を測定した。全細胞数は約 $4 \times 10^6$ であった。

## 〔実施例4〕T細胞からの全RNAの調製

T細胞からの全RNAの調製はRNeasy Mini(Qiagen製)を用い、原則として添付のマニュアルに従い行った。操作はすべて手袋を着用して、室温で行った。またウォッシュバッファRPEに4倍量のエタノールを加えた。リシスバッファRLTには10 $\mu$ l/mlの2-メルカプトエタノールを加えた。

細胞浮遊液を1000~1200rpmで5分間遠心し、上清をアスピレーションで除いた。沈殿に350 $\mu$ lのリシスバッファRLT(2-メルカプトエタノールを含む)溶液を加えた。この段階で、RLTバッファ中の細胞のライセートは、-70で保存可能であった。細胞のライセートを冷凍保存していた場合は、37で10~15分間イン

キュベートして、不溶物が見えるようなら最大速度で3分間遠心し、上清のみを回収した。このライセートを20Gのカテラン針を付けた注射筒でホモゲナイズ後、キアシュレッダー(QIA shredder)で処理した。すなわち、ピペットマンを用いて350 $\mu$ lの細胞のライセートをキアシュレッダーユニットにアプライした。これを1500rpmで2分間遠心し、流出液を回収した。350 $\mu$ lの70%エタノールを加え、ピペティングしてよく混ぜた。

RNeasyスピンカラムを添付の2mlチューブに装着し、細胞のライセート混合物をアプライし、8000 $\times$ g(11500rpm)で1分間遠心し、流出液は捨てた。ウォッシュバッファ-RW1 700 $\mu$ lをカラムにアプライし、5分間フタをした形で立てた。11500rpmで15秒間遠心し、流出液は捨てた。カラムを新しい2mlチューブに装着し、ウォッシュバッファ-RPE(エタノールを含む)500 $\mu$ lをカラムにアプライした後、11500rpmで15秒間遠心し、流出液は捨てた。ウォッシュバッファ-RPE 500 $\mu$ lをカラムにアプライし、最大速度で2分間遠心した。カラムを新しい1.5mlチューブに装着し、DEPC処理した水30 $\mu$ lをアプライし、フタをして10分間立てた。11500rpmで10分間遠心し、全RNAを得た。濃度を測定し、量が少ないようなら、再度カラムを新しい1.5mlチューブに装着し、DEPC処理した水30 $\mu$ lをアプライし、フタをして10分間立て、11500rpmで10分間遠心した。

10

#### 〔実施例5〕全RNAのDNase処理

T細胞から調製した全RNAからDNAを除くため、DNase処理を行った。反応は20ユニットのDNase(ニッポンジーン社)および50ユニットのRNaseインヒビター(ファルマシア社)を含む100 $\mu$ lの1 $\times$ DNaseバッファ(ニッポンジーン社)中で行った。これを37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした後、等量のPCI(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を加え、ボルテックスした。12000rpmで室温、10分間遠心し、上層(水層)を新しい1.5mlチューブに移した。1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、2.5倍量の100%エタノールおよびエタ沈メイト1 $\mu$ lを加えて、転倒混和させた。-20 $^{\circ}$ Cで15分間静置させた後、12000rpmで4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心し、上清を除去し、70%エタノールを加えた。沈殿がはがれる程度にタッピングした後、上清をきれいに除去した。3分間乾燥させ、10~20 $\mu$ lのDDW(DNaseおよびRNase不含)に溶解させた。濃度を測定し、使用まで-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

20

30

#### 〔実施例6〕T細胞から調製した全RNAを用いたディファレンシャルディスプレイ(DD)解析

T細胞から調製した全RNAを用いた蛍光ディファレンシャルディスプレイ(Fluorescent Differential Display,「DD」と略記する)解析は文献(T. Itoら, 1994, FEBS Lett. 351:231-236)に記載の方法に準じて行った。T細胞から調製した全RNAを逆転写し、cDNAを得た。第一次DD-PCR反応用には3種のアンカープライマーの各々について全RNAの各0.2 $\mu$ gを用いてcDNAを調製した。第二次DD-PCR反応用には、3種のアンカープライマーの各々についてRNA 0.4 $\mu$ gを用いてcDNAを調製した。いずれのcDNAも、0.4ng/ $\mu$ l RNA相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1反応あたり1ng RNA相当のcDNAを用いてDD-PCR反応を行った。反応液の組成は表2の通りである。

40

表 2

cDNA(0.4ng/ $\mu$ l RNA 相当)	2.5 $\mu$ l
任意プライマー (2 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
10 $\times$ AmpliTaq PCR バッファー	1.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP	0.8 $\mu$ l
50 $\mu$ M アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	0.1 $\mu$ l
Gene Taq (5U/ $\mu$ l)	0.05 $\mu$ l
AmpliTaq (5U/ $\mu$ l)	0.05 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ l
総量	10.0 $\mu$ l

10

PCRの反応条件は、「95 3分、40 5分、72 5分」を1サイクル、続いて、「94 15秒、40 2分、72 1分」を30サイクルの後、72 5分、その後連続的に4 にした。

使用したプライマー対はアンカープライマーであるGT15A(配列番号:3)、GT15C(配列番号:4)、およびGT15G(配列番号:5)に対して任意プライマーをそれぞれAG 1~110、AG 111~199、およびAG 200~287を組み合わせ、計287組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしてはGC含量50%の10ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

ゲル電気泳動は、6%変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、2.5 $\mu$ lの試料をアプライし、40Wで210分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザーFM BIO O IIを用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

2回のDD解析を行い、患者群と健常群間で再現性よく発現に差を示すバンドをゲルから切り出し、配列決定を行った。その結果、健常群と患者群の間で発現レベルに差が見られた遺伝子(DD解析のバンドID B1153-03;以後、この遺伝子を「B1153」と称する)を同定した。バンドID B1153-03の増幅に用いたプライマーセットを以下に示す。また、B1153-03のDDバンドの塩基配列を配列番号:6に示す。

バンドID : B1153-03

断片の長さ : 184 bp (プライマーの塩基配列を除く)

アンカープライマー : GT15A

任意プライマーの名前 : AG00103

任意プライマーの配列 : TGACCTGAGT (配列番号 : 7)

30

〔実施例7〕塩基配列の伸長

(1) 5' RACE法による塩基配列解析

実施例6で決定した塩基配列に基づいて、5' RACE法により本発明の遺伝子の塩基配列解析を進めた。Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)のプロトコルに従いHuman Leukocyte Marathon Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としてキット付属のAP1プライマーと「B1153」特異的なプライマー1153-2RでPCRを行った。さらに、この増幅断片を鋳型にアダプター内の配列[AP2]とプライマー1153-2Rを用いてPCRを行った。増幅した断片をサブクロニングし配列決定をしたところ「B1153」の配列を含む約2.0kbの配列(配列番号:8)が得られた。

プライマー配列

1153-2R: AACCTCTACTCAACAACCTCACCCATAA (配列番号:9)

(2) ゲノム配列解析

(1)で得られた2.0kb配列に対し、複数のゲノム配列がホモロジーを示した。その

50

うち、最も高いホモロジーを示したゲノム配列 ( A C 0 0 2 4 5 3 ) に対して、エキソン検索ソフト ( G E N S C A N , G R A I L , G e n e F i n d e r または E R ) を用いてエキソン予測を行った。その結果、予測遺伝子を見出した。2.0 kb 配列はその予測遺伝子のイントロン領域であった。2.0 kb 配列近傍の仮想エキソン配列を基に、複数の P C R プライマーを設計した。G E N S C A N および G e n e F i n d e r によって予測されたエキソンと、これらの予測に基づいて設定したプライマーの位置関係を図 1 に示した。

ヒト末梢血由来 T 細胞および P B M C ( p e r i p h e r a l b l o o d m o n o n u c l e a r c e l l 、末梢血単核球細胞) から調製した全 R N A ならびにヒト末梢血白血球由来 p o l y A R N A から c D N A を合成し、P C R の鋳型とした。この鋳型に対して、2 組以上の上記 P C R プライマーを用いて、P C R を行った。P C R 増幅断片は、クローニングした後、配列決定を行い、仮想エキソン配列か否かを確認した。その結果、フォワードプライマーとして 1 1 5 3 - 1 4 3 U 1 7 、リバースプライマーとして 1 1 5 3 - 3 5 9 L 2 1 を用いた P C R により、予測された遺伝子配列 1 9 9 b p ( 配列 A 、配列番号 : 1 0 ) が実際に存在することを確認できた。

プライマー配列

1153-143U17: GAAAAGCCCTCAAGAAA (配列番号 : 1 1)

1153-359L21: TTGTCTCTATACGCCTCTAAT (配列番号 : 1 2)

( 3 ) E S T クラスティングによる塩基配列解析

公共データベースから、配列 A と一致する E S T 配列 ( G e n B a n k a c c e s s i o n # : A I 7 9 3 0 6 2 、 5 2 4 b p ) や、配列 A と相同性が認められた E S T 配列を見出した。これらの E S T をクラスティングし、6 8 1 b p の塩基配列を得た。この配列中にプライマー 1 1 5 3 E S T - F ( 5 ' - G G G T C A T T T G T G T A G T G G C T C G G - 3 ' ; 配列番号 : 1 3 ) および 1 1 5 3 E S T - R ( 5 ' - C C T C C T C C A G C A T T T C A C T T A A C C G - 3 ' ; 配列番号 : 1 4 ) を設計し、( 2 ) と同じライブラリーを鋳型として P C R したところ、6 4 9 b p の P C R 増幅断片が得られた。この P C R 増幅断片の配列を決定した結果、E S T クラスティング配列と一致していた。

( 4 ) クラスティングによる塩基配列解析

このようにして決定された 6 4 9 b p の塩基配列のうち、プライマーに由来する塩基配列を除く 6 0 1 b p の塩基配列をもとに、ゲノム配列 ( A C 0 0 2 4 5 3 ) 上のエキソン解析をさらに進めた。3 ' 下流に予測された仮想エキソン配列を基にして以下の P C R プライマーを設計し、( 2 ) と同様の操作によって、クローニングと P C R 産物の配列決定を行った。

プライマー

1153-3'-207U18: 5' GAGAACAGCCAAGTGACC 3' (配列番号 : 1 5)

1153-3'-896L21: 5' TTTTCCAAAGAAGTCGATAAG 3' (配列番号 : 1 6)

P C R 増幅の結果、6 3 6 b p の遺伝子断片が増幅され、その配列には予測されたエキソン配列が含まれていた。前記プライマーによって増幅された 6 3 6 b p の塩基配列を配列番号 : 1 7 に示す。ここで得られた 6 3 6 b p と先に得られた 6 0 1 b p の配列をあわせて、全体で 8 2 4 b p ( 配列番号 : 2 5 ) の塩基配列を得ることができた。配列番号 : 2 5 は、3 ' 側に O R F の一部と見られる領域 ( 5 0 - 8 2 0 ) を含み、2 5 7 アミノ酸 ( 配列番号 : 2 6 ) をコードしていた。このアミノ酸配列と相同性を示す既知アミノ酸配列は見出されず、「 B 1 1 5 3 」は新規な蛋白質をコードしていると考えられた。

[ 実施例 8 ] A B I 7 7 0 0 による発現量の定量

実施例 1 とは異なる健常者、アトピー性皮膚炎軽症患者、アトピー性皮膚炎中等症患者およびアトピー性皮膚炎重症患者各 1 0 名の T 細胞より調製した全 R N A 試料の一部を、A B I - P R I S M 7 7 0 0 を用いる T a q H a n 法による遺伝子発現定量に使用した。この T a q M a n 法は、P C R 増幅された D N A 鎖を蛍光色素を用いてリアルタイムに定量

10

20

30

40

50

検出するシステムである。

DDバンドの塩基配列を基に実施例7において決定した「B1153」の塩基配列を基にして作製したプライマーセットを使用した。また、TaqManプローブは5'端をFAM(6-carboxy-fluorescein)で、3'端をTAMRA(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)で蛍光標識して用いた。使用したプライマーセット、およびTaqManプローブの塩基配列を以下に示す。

1153-F2 : AAAGCCCTCAAGAAAGCCTCA (配列番号 : 18)

1153-R2 : GGTCACCTGGCTGTTCTCGAA (配列番号 : 19)

TaqMan プローブ : TGATCTTGGTGCCATAGAGAGTCTCCGG (配列番号 : 20)

鋳型には全RNAからポリT(12~18mer)をプライマーとして逆転写したcDNAを用いた。コピー数を算出する標準曲線のために両プライマーで増幅される塩基配列領域を含むプラスミドクローンを準備し、その段階希釈を鋳型として反応を行った。PCR増幅のモニタリングのための反応液の組成は表3に示した。

表3

ABI-PRISM 7700の反応組成 (1ウェルあたりの反応量)

滅菌蒸留水	25.66 ( $\mu$ L)
10x TaqMan バッファ-A	5
25mM MgCl <sub>2</sub>	7
dATP(10mM)	1.2
dCTP(10mM)	1.2
dGTP(10mM)	1.2
dUTP(10mM)	1.2
Forward Primer (100 $\mu$ M)	0.15
Reverse Primer (100 $\mu$ M)	0.15
TaqMan プローブ (6.7 $\mu$ M)	1.49
AmpliTag Gold (5U/ $\mu$ L)	0.25
AmpErase UNG (1U/ $\mu$ L)	0.5
テンプレート溶液	5
総量	50

また、試料中のcDNA濃度の差を補正するため、補正用内部標準として  $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子のコピー数を算出した。 $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)遺伝子の定量には、ヒトcDNAを鋳型として用いた。

アクチン測定用のプライマーとプローブは、TaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents (PEバイオシステムズ)に添付のものを用いて行った。塩基配列は以下の通りである。 $\beta$ -アクチンにより補正した「B1153」遺伝子発現量(copy/ng RNA)を表4および図2に示す。

10

20

30

40

$\beta$ アクチンフォワードプライマー (配列番号: 21)

TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A

$\beta$ アクチンリバースプライマー (配列番号: 22)

CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G

$\beta$ アクチン TaqMan プローブ (配列番号: 23)

5'-(FAM)ATGCCC-T(TAMRA)-CCCCCATGCCATCCTGCGTp-3'

FAM:6-carboxy-fluorescein

TAMRA:6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine

10

表4の値を用いて各群間で遺伝子発現に有意な差があるかをパラメトリックな手法で統計解析した。健常群と患者群(アトピー性皮膚炎の軽症患者、中等症患者および重症患者を含む)の2群間の検定としてはt検定を行った。健常群ならびにアトピー性皮膚炎の軽症患者群、中等症患者群および重症患者群の4群に分け、その中の2群間での検定にTukey型多重比較検定を行った。検定は、The SAS SYSTEMのSAS前臨床パッケージVersion 4.0(SAS Institute Inc.)を用いて行

20

表4

症状		copy/ng
健常		
1	NM	1816.47
2	NM	1368.00

3	NM	2726.58	
4	NM	949.69	
5	NM	1282.75	
6	NM	1670.67	
7	NM	1397.46	
8	NM	1985.45	
9	NM	1505.48	
10	NM	2538.33	
<hr/>			
アトピー性皮膚炎軽症			
11	DL	584.77	10
12	DL	1620.12	
13	DL	1095.80	
14	DL	1552.95	
15	DL	1724.20	
16	DL	1395.51	
17	DL	1824.83	
18	DL	2435.67	
19	DL	2257.11	
20	DL	1919.66	20
<hr/>			
アトピー性皮膚炎皮膚炎中等症			
21	DM	3385.60	
22	DM	4507.43	
23	DM	1296.35	
24	DM	5346.69	
25	DM	4490.46	
26	DM	1808.76	
27	DM	1703.40	
28	DM	4977.20	30
29	DM	4815.31	
30	DM	4723.18	
<hr/>			
アトピー性皮膚炎重症			
31	DS	2050.58	
32	DS	2391.61	
33	DS	5799.96	
34	DS	7142.03	
35	DS	1754.79	
36	DS	5032.68	40
37	DS	5208.56	
38	DS	5662.86	
39	DS	2495.72	
40	DS	984.57	

表5

t-test	Normal:Patient			0.028
Tukey 型 多重比較	4 群 Nm:健常 L:皮膚炎軽症 M:皮膚炎中症 S:皮膚炎重症	Nm	L	0.9991
		Nm	M	0.0135
		Nm	S	0.0072
		L	M	0.0095
		L	S	0.005
		M	S	0.9951

統計解析の結果、t検定により、健常群に比べアトピー性皮膚炎患者群で、有意に発現が高いことが確認された ( $p = 0.028$ )。Tukey型多重比較検定からは、健常群または軽症患者群に比べ、中等症患者群または重症患者群では、有意に発現が高いことが確認された。p値は、健常群・中等症患者群間では  $p = 0.0135$ 、健常群・重症患者群間では  $p = 0.0072$ 、軽症患者群・中等症患者群間では  $p = 0.0095$ 、軽症患者群・重症患者群間では  $p = 0.005$  である。以上の知見は、「B1153」遺伝子の発現がアトピー性皮膚炎患者において高いことを示している。これらの結果は、この遺伝子の発現を測定することが、アトピー性皮膚炎において診断的価値をもつことを示している。このT細胞由来遺伝子は、アトピー性皮膚炎の治療標的あるいは診断マーカーとして医療上有用である。

10

〔実施例9〕様々な組織や細胞における「B1153」の発現レベルの測定  
ヒト各種組織および癌細胞株から調製したmRNAを転写したフィルターを用いて「B1153」の発現を調べた。用いたフィルターは次の6種(いずれもCLONTECH社製)である。

20

Human MTN Blot、

Human MTN Blot II、

Human Brain II、

Human Brain IV、

Human Immune System MTN Blot IIおよび

30

Human Cancer Cell Line MTN Blot

実施例〔7〕-(3)で用いた「B1153」プライマー1153EST-Fと1153EST-Rを用いてPCR増幅した649bpのDNA断片を、Random Primer Labeling Kit (TAKARA)を用いて<sup>32</sup>Pにより標識してプローブとした。Express Hybridization Solution (CLONTECH)を用いて、添付使用書通りにノーザンハイブリダイゼーションおよび膜洗浄を行った。洗浄後の膜をイメージングプレートに曝露し、Molecular Imager System (BIO-RAD)によって画像を取得した。

結果は図3に示した。免疫組織を含むほとんどの組織および癌細胞株で、約4kbのmRNAを検出した。本発明による遺伝子「B1153」は、特に脳で強い発現が認められた。

40

〔実施例10〕各種免疫細胞での「B1153」遺伝子の発現

5人の健常人の末梢血から分離した細胞での「B1153」遺伝子の発現を調べた。T細胞(T)の分離は下記の通り行った。採取した全血に3%デキストラン溶液を加えて30分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液(Ficoll-Plus; アマシャムファルマシアバイオテック)の上に乗せて1500rpm、30分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分をCD16抗体磁気ビーズと4で30分反応させ、MACSを用いた分離でトラップされずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。好中球(N)は好酸球を溶出させた後、CD16抗体磁気

50

ビーズでトラップされた細胞を磁界から外して溶出、回収して調製した。一方、フィコール遠心分離で中間層に回収される単球画分を、MACS CD3抗体磁気ビーズにより溶出画分(M: monocyteとB cellの混合物)とトラップされる画分(T cell画分)に分離した。次に、溶出画分をMACS CD14抗体磁気ビーズにより、溶出画分(B cell画分)とトラップされる画分(monocyte画分)に分け、それぞれを精製T細胞、精製B細胞、そして精製単球とした。

好酸球はIsogen、好中球、T細胞、B細胞、そして単球はRNeasy (Qiagen)を用いて可溶化し、全RNA抽出、DNase処理後(方法は前述の通り)遺伝子発現解析に供した。用いたプライマー、プローブ等は上記と同一である。これらの血球細胞での平均発現量(AVERAGE: copy/ng(補正值))をSDとともに以下に示した。また測定結果を図4にまとめた。この結果から、T細胞での発現がもっとも高いことが確認された。

好酸球(E) : 394.15±358.37

T細胞(T) : 2004.11±803.91

好中球(N) : 85.75± 73.90

単球(M) : 537.70±166.95

B細胞(B) : 1231.60±892.66

#### 〔実施例11〕cDNAクローンの単離

GENE TRAPPER IIシステム(INVITROGEN社製)を用いて、B1153遺伝子のcDNAクローンを単離した。配列番号: 25における64bp~347bpに相当する284bp(配列番号: 24)のB1153プローブを用いてGT II Full-length Testis cDNA Library(INVITROGEN社製)に対してスクリーニングしたところ、ORFを含む3596bpの完全長cDNAクローンが得られた。決定されたcDNAの塩基配列を配列番号: 1に、またこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号: 2に示した。

これらの配列情報についてホモロジー検索したところ、配列番号: 1に示したB1153遺伝子塩基配列中の505bpから2148bpまでの塩基配列は、KIAA1861(Accession No. AB058764)と、また1420bpから3596bpまでの配列はFLJ23581(Accession No. AK027234)と同一性が高かった。しかし、1bpから504bpまでの配列は新規配列であった。これらの塩基配列の関係を、図5にまとめた。

#### 〔実施例12〕Yeast Two Hybridシステムによる相互作用タンパク質のスクリーニング

GAL4系酵母のin vivo遺伝子発現型を利用した、Invitrogen社のPROQUEST<sup>TM</sup> TWO-Hybridシステムによって、本発明の蛋白質と相互作用する蛋白質を探索した。B1153のORF領域全長(86bp~2977bp)をbaitとして、Human Brain cDNAライブラリに対して、B1153と相互作用するタンパク質をスクリーニングした。プロトコルは、システムの指示書にしたがった。

その結果、B1153タンパク質と相互作用する5個のポジティブクローンが得られた。5個のうち、4個は、ミオシン結合サブユニット85(myosin binding subunit 85; Accession No. AF312028)(図6)の部分配列であり、1個は、骨格筋2アクチニン(skeletal muscle alpha 2 actinin; Accession No. M86406)の部分配列であった。得られたpreyクローンが保持している配列範囲を以下に示す。なお( )内の情報はGenBankのAccession No.である。この結果に基づいて、ミオシン結合サブユニット85、または骨格筋2アクチニンを構成するアミノ酸配列中、B1153との相互作用に必要な領域を特定することができる。

たとえばミオシン結合サブユニット85は、以下に示す4つのpreyベクターのうちの3つまでは590aa以降のC末端領域を含んでいるので、ミオシン結合サブユニット8

10

20

30

40

50

5のC末端領域はB1153と相互作用すると考えられる。同様にして、骨格筋2アクチニンは、中央領域である309aa-528aaに相当する領域を含むpreyベクターがポジティブだったので、309aa-528aaに相当する骨格筋2アクチニンの中央部分がB1153と相互作用すると考えられた。

ミオシン結合サブユニット85全長782アミノ酸 (No.AF312028)

prey-No.3 : 1784bp-2541bp (590aa-782aa と 3' UTR)

prey-No.4 : 1784bp-2463bp (590aa-782aa と 3' UTR)

prey-No.7 : 1298bp-1991bp (428aa-657aa)

prey-No.11 : 1983bp-2618bp (656aa-782aa と 3' UTR)

骨格筋 $\alpha$ 2アクチニン全長894アミノ酸残基 (Accession No.M86406)

prey-No.10 : 1096bp-1755bp (309aa-528aa)

ミオシン結合サブユニット85は、protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12Cの別名を持ち、2001年6月のThe Journal of Biological Chemistry (vol. 276, No. 24, 21209-21216)に、新規遺伝子として掲載された。N末端の100アミノ酸残基-287アミノ酸残基のアンキリンリピート(ankyrin repeat)は、protein phosphatase 1 (PP1)と結合し、アクチン脱重合に必須な領域である。中央部分にはMERC-キナーゼによってリン酸化を受ける領域(MERC-alpha kinase phosphorylated domain)が見出された。ミオシン結合サブユニット85は、この領域のリン酸化によって構造変化をひき起こすことが知られている。ミオシン結合サブユニット85は、この他のモチーフとして、C末端にヘリカルロイシンリピート(alpha-helical leucine repeat)、およびリン酸化阻害モチーフ(Phosphorylation inhibitory motif)が見出されている。リン酸化阻害モチーフは、アンキリンリピートに対する拮抗作用を有する領域である。

骨格筋2アクチニンは、アクチン結合調節タンパク質として既によく知られている分子である。これら2つの遺伝子は、いずれもアクチン脱重合に関与していることから、B1153遺伝子のアクチン脱重合への関与が示唆された。T細胞において、B1153遺伝子は細胞骨格の再構築に作用し、T細胞の活性化、分裂、遊走に関与する可能性が示唆された。

したがって、B1153蛋白質と、ミオシン結合サブユニット85あるいは骨格筋2アクチニンとの相互作用を妨げる化合物は、B1153蛋白質の活性の阻害に基づくアレルギー性疾患の治療効果が期待される。被検化合物の相互作用に与える活性は、蛋白質間の結合反応を指標として容易に評価することができる。たとえば、固定化したB1153蛋白質と、標識したミオシン結合サブユニット85あるいは骨格筋2アクチニンを用いて、被検化合物の干渉を評価するためのハイスループットスクリーニングを行うことも可能である。すなわち本発明のB1153蛋白質は、アレルギー性疾患の治療に有用な化合物をスクリーニングするための、ハイスループットスクリーニングを可能とする。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、健常者とアレルギー性疾患の患者とで発現に差の見られる遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標にすることにより、アレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。特に、本発明において明らかにされたB1153蛋白質の活性を指標にすれば、ハイスループットスクリーニングを容易に構築することができる。

10

20

30

40

50

本発明によって提供されたアレルギー疾患関連遺伝子は、アレルゲンの種類に関わらず、簡便にその発現レベルを知ることができる。したがって、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。

また本発明によるアレルギーの検査方法は、末梢血白血球を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。しかも遺伝子発現解析に関しては、たとえばECPなどの蛋白質測定と異なって、微量サンプルによる高感度な測定が可能である。遺伝子解析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。したがって本発明によるアレルギーの検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味でこれらの病態関連遺伝子の診断的価値は高い。

更に、本発明のスクリーニング方法は、アレルギー患者に共通して発現が見られた遺伝子を指標として実施される。したがって、このスクリーニング方法によって見出すことができる化合物は、幅広いアレルギーの病態制御に有用であると期待できる。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Genox Research, Inc.

Japan as Represented by General Director of National Children's  
Hospital

10

<120> Method for examination for allergosis

<130> G1-A0007P

<140>

<141>

20

<150> JP 2000-389476

<151> 2000-12-21

<160> 26

30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3596

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<220>

<221> CDS

<222> (86)..(2980)

<400> 1

cttcctagtg tcagggccag ctgtgtagtg gctcgggtgtg atttgttagc tctttgagcc 60

agggtaccct cctcaggatt tcgat atg caa aaa atc aaa tct ctc atg acc 112

10

Met Gln Lys Ile Lys Ser Leu Met Thr

1

5

cga cag ggt ctg aaa agc cct caa gaa agc ctc agt gat ctt ggt gcc 160

Arg Gln Gly Leu Lys Ser Pro Gln Glu Ser Leu Ser Asp Leu Gly Ala

10

15

20

25

20

ata gag agt ctc cgg gtc cct gga aag gaa gaa ttc agg gaa ctt cga 208

Ile Glu Ser Leu Arg Val Pro Gly Lys Glu Glu Phe Arg Glu Leu Arg

30

35

40

gaa cag cca agt gac cct caa gct gaa caa gag ctt att aat agt att 256

30

Glu Gln Pro Ser Asp Pro Gln Ala Glu Gln Glu Leu Ile Asn Ser Ile

45

50

55

gaa caa gta tat ttt tct gtg gat tca ttt gat att gtt aaa tat gag 304

Glu Gln Val Tyr Phe Ser Val Asp Ser Phe Asp Ile Val Lys Tyr Glu

60

65

70

40

ctg gag aag ctt cca cct gtt ctc aat ttg caa gaa tta gag gcg tat 352

Leu Glu Lys Leu Pro Pro Val Leu Asn Leu Gln Glu Leu Glu Ala Tyr

75

80

85

aga gac aaa ttg aaa caa cag caa gct gca gta tct aaa aaa gtg gca 400

Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln Gln Ala Ala Val Ser Lys Lys Val Ala

90

95

100

105

10

gat tta atc ctt gaa aaa cag cct gct tat gta aag gaa ctt gaa aga 448

Asp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Pro Ala Tyr Val Lys Glu Leu Glu Arg

110

115

120

gtt acc tca ttg cag aca ggt ctt caa tta gct gct gtt atc tgt aca 496

20

Val Thr Ser Leu Gln Thr Gly Leu Gln Leu Ala Ala Val Ile Cys Thr

125

130

135

aat ggg aga aga cac ttg aat att gca aag gaa ggt ttt act caa gct 544

Asn Gly Arg Arg His Leu Asn Ile Ala Lys Glu Gly Phe Thr Gln Ala

140

145

150

30

agt tta ggc ctt ctt gca aat caa agg aaa cgt cag ttg ctg att gga 592

Ser Leu Gly Leu Leu Ala Asn Gln Arg Lys Arg Gln Leu Leu Ile Gly

155

160

165

40

ctt ctg aaa tct ctg aga act ata aaa aca ttg caa aga aca gat gta 640

Leu Leu Lys Ser Leu Arg Thr Ile Lys Thr Leu Gln Arg Thr Asp Val

170

175

180

185

cgg tta agt gaa atg ctg gag gag gaa gat tat cca gga gct att cag 688

Arg Leu Ser Glu Met Leu Glu Glu Glu Asp Tyr Pro Gly Ala Ile Gln

190

195

200

ttg tgc ctt gaa tgt caa aaa gct gcc agc act ttt aaa cat tac agt 736

Leu Cys Leu Glu Cys Gln Lys Ala Ala Ser Thr Phe Lys His Tyr Ser

205

210

215

10

tgt ata agt gaa ctg aat tca aag ctg caa gat act ttg gaa cag att 784

Cys Ile Ser Glu Leu Asn Ser Lys Leu Gln Asp Thr Leu Glu Gln Ile

220

225

230

20

gag gaa cag ctg gac gta gct ctt tcc aaa atc tgc aag aat ttt gac 832

Glu Glu Gln Leu Asp Val Ala Leu Ser Lys Ile Cys Lys Asn Phe Asp

235

240

245

att aac cat tat acc aag gtt caa caa gct tat cga ctt ctt gga aaa 880

Ile Asn His Tyr Thr Lys Val Gln Gln Ala Tyr Arg Leu Leu Gly Lys

250

255

260

265

30

aca cag aca gca atg gat caa ctt cat atg cac ttc acc caa gcc att 928

Thr Gln Thr Ala Met Asp Gln Leu His Met His Phe Thr Gln Ala Ile

270

275

280

40

cac aac acc gtg ttt caa gtt gtt ctt ggt tat gtg gaa cta tgt gca 976

His Asn Thr Val Phe Gln Val Val Leu Gly Tyr Val Glu Leu Cys Ala

285

290

295

gga aac aca gac aca aaa ttc caa aag ctg caa tat aag gat ctc tgt 1024

Gly Asn Thr Asp Thr Lys Phe Gln Lys Leu Gln Tyr Lys Asp Leu Cys

300

305

310

10

aca cat gtt aca cca gac agc tat att cca tgc ctt gca gac ctg tgc 1072

Thr His Val Thr Pro Asp Ser Tyr Ile Pro Cys Leu Ala Asp Leu Cys

315

320

325

aaa gca cta tgg gaa gtt atg ctc agc tat tat agg act atg gaa tgg 1120

Lys Ala Leu Trp Glu Val Met Leu Ser Tyr Tyr Arg Thr Met Glu Trp

330

335

340

345

20

cat gaa aag cat gac aat gag gat act gct tca gct tct gaa ggg agt 1168

His Glu Lys His Asp Asn Glu Asp Thr Ala Ser Ala Ser Glu Gly Ser

350

355

360

30

aat atg ata ggt act gaa gaa act aat ttt gat cgt ggc tac ata aaa 1216

Asn Met Ile Gly Thr Glu Glu Thr Asn Phe Asp Arg Gly Tyr Ile Lys

365

370

375

40

aag aaa tta gaa cat gga ctt aca cga ata tgg cag gat gtt cag cta 1264

Lys Lys Leu Glu His Gly Leu Thr Arg Ile Trp Gln Asp Val Gln Leu

380

385

390

aaa gta aaa acc tac ttg ctt gga act gat ttg tct ata ttc aaa tat 1312  
 Lys Val Lys Thr Tyr Leu Leu Gly Thr Asp Leu Ser Ile Phe Lys Tyr  
 395 400 405

gat gat ttc atc ttt gtt ttg gat ata atc agc agg ttg atg caa gtt 1360  
 Asp Asp Phe Ile Phe Val Leu Asp Ile Ile Ser Arg Leu Met Gln Val 10  
 410 415 420 425

gga gaa gaa ttt tgt ggt agc aag tct gaa gtt tta cag gaa tct att 1408  
 Gly Glu Glu Phe Cys Gly Ser Lys Ser Glu Val Leu Gln Glu Ser Ile  
 430 435 440 20

aga aaa caa agt gtc aat tat ttc aag aat tac cat aga aca cgg ctc 1456  
 Arg Lys Gln Ser Val Asn Tyr Phe Lys Asn Tyr His Arg Thr Arg Leu  
 445 450 455

gat gaa ctg aga atg ttc tta gag aat gag act tgg gaa ctt tgt cct 1504  
 Asp Glu Leu Arg Met Phe Leu Glu Asn Glu Thr Trp Glu Leu Cys Pro 30  
 460 465 470

gtt aag tca aat ttc agc atc ttg caa ctt cat gaa ttt aaa ttc atg 1552  
 Val Lys Ser Asn Phe Ser Ile Leu Gln Leu His Glu Phe Lys Phe Met  
 475 480 485 40

gaa cag tct cgc tcc cca tca gtt tca cct agt aaa cag cca gtc tca 1600

Glu Gln Ser Arg Ser Pro Ser Val Ser Pro Ser Lys Gln Pro Val Ser  
 490 495 500 505

act tct tca aaa aca gtg acc ttg ttt gag cag tac tgt agt ggt ggg 1648

Thr Ser Ser Lys Thr Val Thr Leu Phe Glu Gln Tyr Cys Ser Gly Gly  
 510 515 520

10

aat cca ttt gaa att cag gcc aac cac aaa gat gaa gaa aca gaa gat 1696

Asn Pro Phe Glu Ile Gln Ala Asn His Lys Asp Glu Glu Thr Glu Asp  
 525 530 535

gtc tta gct tct aat ggg tat gaa tct gat gaa caa gaa aag agt gcc 1744

Val Leu Ala Ser Asn Gly Tyr Glu Ser Asp Glu Gln Glu Lys Ser Ala  
 540 545 550

20

tat caa gag tat gac agt gac agt gat gtt cct gag gaa ctc aaa cga 1792

Tyr Gln Glu Tyr Asp Ser Asp Ser Asp Val Pro Glu Glu Leu Lys Arg  
 555 560 565

30

gac tat gtg gat gag cag aca gga gat ggt cct gtg aaa agt gtt tct 1840

Asp Tyr Val Asp Glu Gln Thr Gly Asp Gly Pro Val Lys Ser Val Ser  
 570 575 580 585

40

cgg gaa act cta aaa agc agg aag aaa tca gat tac agt cta aat aaa 1888

Arg Glu Thr Leu Lys Ser Arg Lys Lys Ser Asp Tyr Ser Leu Asn Lys  
 590 595 600

gtg aat gca cct atc tta aca aat aca aca ttg aac gtc ata aga ctt 1936  
Val Asn Ala Pro Ile Leu Thr Asn Thr Thr Leu Asn Val Ile Arg Leu  
605 610 615

gtt gga aaa tat atg cag atg atg aac att ctt aag cca att gcc ttt 1984  
Val Gly Lys Tyr Met Gln Met Met Asn Ile Leu Lys Pro Ile Ala Phe 10  
620 625 630

gat gtt att cat ttc atg tct caa cta ttt gat tat tac ttg tat gca 2032  
Asp Val Ile His Phe Met Ser Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Leu Tyr Ala  
635 640 645 20

ata tat acc ttt ttt ggt cgg aat gat tca ttg gaa tca act gga ctc 2080  
Ile Tyr Thr Phe Phe Gly Arg Asn Asp Ser Leu Glu Ser Thr Gly Leu  
650 655 660 665

ggc ctt agt agt agt aga cta aga aca act cta aac aga ata caa gaa 2128  
Gly Leu Ser Ser Ser Arg Leu Arg Thr Thr Leu Asn Arg Ile Gln Glu 30  
670 675 680

agc ctt att gat cta gaa gtt tca gct gat cct act gcc aca ctc aca 2176  
Ser Leu Ile Asp Leu Glu Val Ser Ala Asp Pro Thr Ala Thr Leu Thr  
685 690 695 40

gca gca gaa gaa aga aag gag aag gtg cca agt cca cac ctc agt cac 2224

Ala Ala Glu Glu Arg Lys Glu Lys Val Pro Ser Pro His Leu Ser His

700

705

710

cta gtg gtt ttg aca tct ggg gat acg ttg tat ggg ttg gca gaa aga 2272

Leu Val Val Leu Thr Ser Gly Asp Thr Leu Tyr Gly Leu Ala Glu Arg

715

720

725

10

gtg gta gcc acg gaa tcc ttg gta ttc ttg gct gaa cag ttt gag ttc 2320

Val Val Ala Thr Glu Ser Leu Val Phe Leu Ala Glu Gln Phe Glu Phe

730

735

740

745

ctt cag cca cat ctg gat gct gtg atg cct gca gtc aaa aag ccc ttt 2368

Leu Gln Pro His Leu Asp Ala Val Met Pro Ala Val Lys Lys Pro Phe

750

755

760

20

ctt cag cag ttc tat tct cag aca gtc tca acc gcc agt gaa cta cgg 2416

Leu Gln Gln Phe Tyr Ser Gln Thr Val Ser Thr Ala Ser Glu Leu Arg

765

770

775

30

aaa cca att tac tgg att gta gct ggt aaa gcc ctt gat tat gaa cag 2464

Lys Pro Ile Tyr Trp Ile Val Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Glu Gln

780

785

790

40

atg ctg ctt ctc atg gct aat gtg aaa tgg gat gta aaa gaa att atg 2512

Met Leu Leu Leu Met Ala Asn Val Lys Trp Asp Val Lys Glu Ile Met

795

800

805

tca cag cac aac ata tat gta gat gca cta tta aag gaa ttt gag cag 2560

Ser Gln His Asn Ile Tyr Val Asp Ala Leu Leu Lys Glu Phe Glu Gln

810 815 820 825

ttt aac agg agg cta aat gaa gtt tct aag aga gtt cgc ata ccc ttg 2608

Phe Asn Arg Arg Leu Asn Glu Val Ser Lys Arg Val Arg Ile Pro Leu

830 835 840

10

cct gtg tct aat ata ctt tgg gaa cat tgt ata cga ttg gct aat cga 2656

Pro Val Ser Asn Ile Leu Trp Glu His Cys Ile Arg Leu Ala Asn Arg

845 850 855

20

act att gta gaa gga tat gcc aat gtc aag aaa tgc agt aat gag ggt 2704

Thr Ile Val Glu Gly Tyr Ala Asn Val Lys Lys Cys Ser Asn Glu Gly

860 865 870

cgt gcc ctg atg caa ttg gat ttt caa cag ttt tta atg aaa ctt gaa 2752

Arg Ala Leu Met Gln Leu Asp Phe Gln Gln Phe Leu Met Lys Leu Glu

875 880 885

30

aaa cta aca gat att aga ccc att cct gat aaa gaa ttt gta gaa act 2800

Lys Leu Thr Asp Ile Arg Pro Ile Pro Asp Lys Glu Phe Val Glu Thr

890 895 900 905

40

tat att aaa gct tat tac cta act gag aat gac atg gaa cgg tgg atc 2848

Tyr Ile Lys Ala Tyr Tyr Leu Thr Glu Asn Asp Met Glu Arg Trp Ile

910

915

920

aaa gag cac agg gaa tat tca acg aag cag ctg acc aat ctg gtg aat 2896

Lys Glu His Arg Glu Tyr Ser Thr Lys Gln Leu Thr Asn Leu Val Asn

925

930

935

10

gtt tgc ctg gga tcc cat atc aat aag aaa gca aga caa aaa ctt cta 2944

Val Cys Leu Gly Ser His Ile Asn Lys Lys Ala Arg Gln Lys Leu Leu

940

945

950

gca gct ata gat gat ata gac aga cct aaa aga taa tgaacacage 2990

20

Ala Ala Ile Asp Asp Ile Asp Arg Pro Lys Arg

955

960

965

tctcttttct caacggcatt gatctcact caatatatat gacctgaaag ccagtttttt 3050

tatgcacttc tgacaactat ctgetaagaa aactttgtgc atgttttttt gactggaaag 3110

30

tggaaaatat tgaatgtgt gtggtgttct catgactttt atatgctgtg gtctcttcaa 3170

cttttggctc cttttgttgt aatctgaaat gatgttgccg ctttgcata acaatggtta 3230

tgtgactaca gttatacatt ttacagaaga atgtaccata agtatataat tagaagaaca 3290

40

gtggcttaat atatgtatgg gaagtttatg gaaaatgaag ttggcacttt tctaccctct 3350

gagcttggtt ctttaataage ataatgtgag ggtgaatag tagtatctcc taattatgag 3410

cactgcatga gaattaaaaa acacatgtaa gtaaaatagt tgaaaaatca gtatgttctc 3470

tgtttttaaa atgtcaaagt ttatgtcagg gtttaatttag ttataacaaa gtgatcataa 3530

tggtgaaatt taataaatat actctagtat gatcagccta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3590

aaaaaa 3596

10

<210> 2

20

<211> 964

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Lys Ile Lys Ser Leu Met Thr Arg Gln Gly Leu Lys Ser Pro

30

1 5 10 15

Gln Glu Ser Leu Ser Asp Leu Gly Ala Ile Glu Ser Leu Arg Val Pro

20 25 30

Gly Lys Glu Glu Phe Arg Glu Leu Arg Glu Gln Pro Ser Asp Pro Gln

35 40 45

Ala Glu Gln Glu Leu Ile Asn Ser Ile Glu Gln Val Tyr Phe Ser Val

40

50 55 60

Asp Ser Phe Asp Ile Val Lys Tyr Glu Leu Glu Lys Leu Pro Pro Val			
65	70	75	80
Leu Asn Leu Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln			
	85	90	95
Gln Ala Ala Val Ser Lys Lys Val Ala Asp Leu Ile Leu Glu Lys Gln			
	100	105	110
Pro Ala Tyr Val Lys Glu Leu Glu Arg Val Thr Ser Leu Gln Thr Gly			10
	115	120	125
Leu Gln Leu Ala Ala Val Ile Cys Thr Asn Gly Arg Arg His Leu Asn			
	130	135	140
Ile Ala Lys Glu Gly Phe Thr Gln Ala Ser Leu Gly Leu Leu Ala Asn			
145	150	155	160
Gln Arg Lys Arg Gln Leu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Ser Leu Arg Thr			
	165	170	175
Ile Lys Thr Leu Gln Arg Thr Asp Val Arg Leu Ser Glu Met Leu Glu			
	180	185	190
Glu Glu Asp Tyr Pro Gly Ala Ile Gln Leu Cys Leu Glu Cys Gln Lys			
	195	200	205
Ala Ala Ser Thr Phe Lys His Tyr Ser Cys Ile Ser Glu Leu Asn Ser			
	210	215	220
Lys Leu Gln Asp Thr Leu Glu Gln Ile Glu Glu Gln Leu Asp Val Ala			
225	230	235	240
Leu Ser Lys Ile Cys Lys Asn Phe Asp Ile Asn His Tyr Thr Lys Val			
	245	250	255
Gln Gln Ala Tyr Arg Leu Leu Gly Lys Thr Gln Thr Ala Met Asp Gln			
	260	265	270
			30
			40

Leu His Met His Phe Thr Gln Ala Ile His Asn Thr Val Phe Gln Val	
275	280 285
Val Leu Gly Tyr Val Glu Leu Cys Ala Gly Asn Thr Asp Thr Lys Phe	
290	295 300
Gln Lys Leu Gln Tyr Lys Asp Leu Cys Thr His Val Thr Pro Asp Ser	
305	310 315 320
Tyr Ile Pro Cys Leu Ala Asp Leu Cys Lys Ala Leu Trp Glu Val Met	
	325 330 335
Leu Ser Tyr Tyr Arg Thr Met Glu Trp His Glu Lys His Asp Asn Glu	
	340 345 350
Asp Thr Ala Ser Ala Ser Glu Gly Ser Asn Met Ile Gly Thr Glu Glu	
	355 360 365
Thr Asn Phe Asp Arg Gly Tyr Ile Lys Lys Lys Leu Glu His Gly Leu	
	370 375 380
Thr Arg Ile Trp Gln Asp Val Gln Leu Lys Val Lys Thr Tyr Leu Leu	
385	390 395 400
Gly Thr Asp Leu Ser Ile Phe Lys Tyr Asp Asp Phe Ile Phe Val Leu	
	405 410 415
Asp Ile Ile Ser Arg Leu Met Gln Val Gly Glu Glu Phe Cys Gly Ser	
	420 425 430
Lys Ser Glu Val Leu Gln Glu Ser Ile Arg Lys Gln Ser Val Asn Tyr	
	435 440 445
Phe Lys Asn Tyr His Arg Thr Arg Leu Asp Glu Leu Arg Met Phe Leu	
	450 455 460
Glu Asn Glu Thr Trp Glu Leu Cys Pro Val Lys Ser Asn Phe Ser Ile	
465	470 475 480

Leu	Gln	Leu	His	Glu	Phe	Lys	Phe	Met	Glu	Gln	Ser	Arg	Ser	Pro	Ser	
				485					490					495		
Val	Ser	Pro	Ser	Lys	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Ser	Lys	Thr	Val	Thr	
				500				505					510			
Leu	Phe	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Gly	Gly	Asn	Pro	Phe	Glu	Ile	Gln	Ala	
				515				520						525		10
Asn	His	Lys	Asp	Glu	Glu	Thr	Glu	Asp	Val	Leu	Ala	Ser	Asn	Gly	Tyr	
				530			535					540				
Glu	Ser	Asp	Glu	Gln	Glu	Lys	Ser	Ala	Tyr	Gln	Glu	Tyr	Asp	Ser	Asp	
545					550					555					560	
Ser	Asp	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Asp	Tyr	Val	Asp	Glu	Gln	Thr	
				565					570					575		20
Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Lys	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Thr	Leu	Lys	Ser	Arg	
				580					585					590		
Lys	Lys	Ser	Asp	Tyr	Ser	Leu	Asn	Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Thr	
				595				600						605		
Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Val	Ile	Arg	Leu	Val	Gly	Lys	Tyr	Met	Gln	Met	
				610				615						620		30
Met	Asn	Ile	Leu	Lys	Pro	Ile	Ala	Phe	Asp	Val	Ile	His	Phe	Met	Ser	
625					630					635					640	
Gln	Leu	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Thr	Phe	Phe	Gly	Arg	
				645						650					655	
Asn	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Arg	Leu	
				660					665					670		40
Arg	Thr	Thr	Leu	Asn	Arg	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	Glu	Val	
				675					680						685	

Ser Ala Asp Pro Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ala Glu Glu Arg Lys Glu			
690	695	700	
Lys Val Pro Ser Pro His Leu Ser His Leu Val Val Leu Thr Ser Gly			
705	710	715	720
Asp Thr Leu Tyr Gly Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Thr Glu Ser Leu			
	725	730	735
Val Phe Leu Ala Glu Gln Phe Glu Phe Leu Gln Pro His Leu Asp Ala			
	740	745	750
Val Met Pro Ala Val Lys Lys Pro Phe Leu Gln Gln Phe Tyr Ser Gln			
	755	760	765
Thr Val Ser Thr Ala Ser Glu Leu Arg Lys Pro Ile Tyr Trp Ile Val			
	770	775	780
Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Glu Gln Met Leu Leu Leu Met Ala Asn			
785	790	795	800
Val Lys Trp Asp Val Lys Glu Ile Met Ser Gln His Asn Ile Tyr Val			
	805	810	815
Asp Ala Leu Leu Lys Glu Phe Glu Gln Phe Asn Arg Arg Leu Asn Glu			
	820	825	830
Val Ser Lys Arg Val Arg Ile Pro Leu Pro Val Ser Asn Ile Leu Trp			
	835	840	845
Glu His Cys Ile Arg Leu Ala Asn Arg Thr Ile Val Glu Gly Tyr Ala			
	850	855	860
Asn Val Lys Lys Cys Ser Asn Glu Gly Arg Ala Leu Met Gln Leu Asp			
865	870	875	880
Phe Gln Gln Phe Leu Met Lys Leu Glu Lys Leu Thr Asp Ile Arg Pro			
	885	890	895

Ile Pro Asp Lys Glu Phe Val Glu Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Tyr Leu

900

905

910

Thr Glu Asn Asp Met Glu Arg Trp Ile Lys Glu His Arg Glu Tyr Ser

915

920

925

Thr Lys Gln Leu Thr Asn Leu Val Asn Val Cys Leu Gly Ser His Ile

930

935

940

10

Asn Lys Lys Ala Arg Gln Lys Leu Leu Ala Ala Ile Asp Asp Ile Asp

945

950

955

960

Arg Pro Lys Arg

<210> 3

20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:"GT15A", an  
artificially synthesized primer sequence

30

<400> 3

gttttttttt ttttta

17

40

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:"GT15C", an  
artificially synthesized primer sequence

10

<400> 4

gttttttttt ttttttc

17

<210> 5

20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:"GT15G", an  
artificially synthesized primer sequence

30

<400> 5

gttttttttt ttttttg

17

40

<210> 6

<211> 184

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gggggagaca agcaaataga taattgcaga ggagtagagg cacaacagag ttcagctagg 60  
 agaggatgtg gagtaggtag aaatgtatc aggatctttt agagttggcg attaattttt 120  
 ttaagaaaga ttacagtttt atggggtgag ttgttgagta gaggttgggg acaaggatac 180  
 tgat 184

10

<210> 7

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "AG00103", an  
 artificially synthesized primer sequence

30

<400> 7

tgacctgagt 10

40

<210> 8

<211> 1921

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

gecatggcca attccaatta aatcaceggt tttgggtgga ggcaagtgtc agtaatattt 60
agagattccc tggtaattcc agtgtagage caggtttggg aaccaatggc caagatgaga 120
atattatctc aagaatggag caacaggaaa tagaggaact gttctaaaaa attgtttgga 180
agttttactg agaatTTTTg tagaataaga tagaatgacc taaaatttca ttcttcgaaa 240
tggattctgt tatgtttcaa attagtggga ttttcatgca gagttaaaga tataagaaat 300
taggtagtat tttctaagtt tgtaaatcca tttaaacatg aaaggtattt tacttaattg 360
gttacaagaa ttaagaatac aactagtatt tgttataata tatgatagta gagccacaac 420
gttattagtt atagaactta ttggactgt gtttgagagt atttgttgaa ccttgattaa 480
aaagtaaaaa taccagtatt cagaacetta taaaatctac atccagcett tattaatata 540
cactttccat agtacttcca cagtggcaca atgtgaacct gaaaaagagt attgatacta 600
atattgtttt acgagttttt agtgaagcat tgcctcctca tagtattctt taatgataag 660
ggggtttttt tgccctcaat ttaattaact cataaatagt aatgggatte agctgtcttt 720
acttttcat gattggttta cttttgattt tttttcgtga aagaaaaata taggatgagg 780
tgacaaaata aatgtctggt gcagtcaaca ttgataata taattgttta aggataagaa 840
ataatttttt tatacttcat ccattcaaca aatatttatt gagtacctgc ctactctgaa 900
gcattttctac ttatataaat tctaggaatt tgagcagaat gttttctaga gtttctagta 960
cttctgtgaa atcagataaa ccgatttgac ttgacttctt aaaatccatt aaaagaatec 1020
taaaaccacc tgctaactgc agagcttggg ttacagtttt accaaaattt gtggagagtg 1080
tgcttgaate acagtcaaga gacatagggt gaagtattga cttaaacata cagcttgttg 1140
aaaggaagtc attttaatgc ttigtgcctc agtttcttca tttgtgaaaa gatgctattg 1200
aactagaact ttttggate ctttttgcct gaatgtttta tactttctat attgtaattt 1260
ttgtaggaga aatatgacac aagaaatata cattctaat aatTTTTTga gcagttttt 1320
ttagaagatt tgcatttgg tgtctgtatt agagaggatt agtattgagg tttatgacta 1380

```

ggtgaattta tttagtgate atgataaaga ctttcaattt aggattatgt atcatttagg 1440  
 acaggtgtct tctgcaggtg gtactaaggg agactctaac tatggatctg caaaatcatt 1500  
 taagagtttt tcttaggtgc tcatggctaa cagtatttag ttgtgttctt ttttaaccatt 1560  
 aatgaaatta tgcttctcat agcttcagat gctttgagat tettaaccct tctttcatag 1620  
 caaatcatat aagttcattc atacagtcca ttggcacaac acttatggaa ccaggcagtt 1680  
 actaatcatt gaagatgcag agaggtacaa gactgttctt aactcaacct gagtggggga 1740  
 gacaagcaaa aatagataat tgcagaggag tagaggcaca acagagttca gctaggagag 1800  
 gatgtggagt aggtagaaat gtattcagga tcttttagag ttggcgatta atttttttaa 1860  
 gaaagattac agttttatgg ggtgagttgt tgagtagagg ttggggacaa ggatactgat 1920  
 t 1921

10

20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

30

<223> Description of Artificial Sequence: "1153-2R", an  
 artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

aactctact caacaactca cccataa

28

40

&lt;210&gt; 10

<211> 199

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

```
gcctcagtga tcttgggtgcc atagagagtc tccgggtccc tggaaaggaa gaattcaggg 60
aacttcgaga acagccaagt gaccctcaag ctgaacaaga gcttattaat agtattgaac 120
aagtatattt ttctgtggat tcatttgata ttgttaaata tgagctggag aagcttccac 180
ctgtttctcaa tttgcaaga 199
```

<210> 11

20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "1153-143U17",  
an artificially synthesized primer sequence

30

<400> 11

```
gaaaagccct caagaaa 17
```

40

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:"1153-359L21",  
an artificially synthesized primer sequence

10

<400> 12

ttgtctctat acgcctctaa t

21

<210> 13

20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:"1153EST-F", an  
artificially synthesized primer sequence

30

<400> 13

gggtcatttg tgtagtggt cgg

23

40

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:"1153EST-R", an  
artificially synthesized primer sequence

10

<400> 14

cctcctccag catttcaatt aaccg

25

<210> 15

20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:"1153-3'-207U18", an artificially  
synthesized primer sequence

30

<400> 15

gagaacagcc aagtgacc

18

40

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: "1153-3' -896L21", an artificially  
synthesized primer sequence

10

<400> 16

ttttccaag aagtcgataa g

21

20

<210> 17

<211> 636

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 17

ctcaagctga acaagagctt attaatagta ttgaacaagt atatTTTTtct gtggattcat 60  
ttgatattgt taaatatgag ctgagagagc ttccacctgt tctcaatttg caagaattag 120  
aggcgtatag agacaaattg aaacaacagc aagctgcagt atctaaaaaa gtggcagatt 180  
taatccttga aaaacagcct gttatgtaa aggaacttga aagagttacc tcattgcaga 240  
caggctctca attagctgct gttatctgta caaatgggag aagacacttg aatattgcaa 300  
aggaaggttt tactcaagct agtttaggcc ttcttgcaaa tcaaaggaaa cgtcagttgc 360  
tgattggact tctgaaatct ctgagaacta taaaaacatt gcaaagaaca gatgtacggc 420

40

taagtgaat gctggaggag gaagattatc caggagctat tcagttgtgc ettgaatgc 480  
 aaaaagctgc cagcactttt aaacattaca gttgtataag tgaactgaat tcaaagctgc 540  
 aagatacttt ggaacagatt gaggaacagc tggacgtagc tctttccaaa atctgcaaga 600  
 attttgacat taaccattat accaaggttc aacaag 636

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "1153-F2", an  
artificially synthesized primer sequence

20

<400> 18

aaagecctca agaaagcctc a

21

30

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "1153-R2", an

## artificially synthesized primer sequence

<400> 19

ggtcacttgg ctgttctega a

21

10

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

30

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (28)

40

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 20

tgatcttggt gccatagaga gtctccgg

28

<210> 21

<211> 25

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 21

tcacccacac tgtgccatc tacga

25

<210> 22

30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 22

cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 23

<211> 26

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized TaqMan probe sequence

20

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

30

<220>

<221> misc\_binding

<222> (7)

<223> Label TAMRA  
(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

40

<400> 23

atgcectccc ceatgccatc ctgcgt

26

<210> 24

<211> 284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<400> 24

atctctcatg acccgacagg gtctgaaaag ccctcaagaa agcctcagtg atcttggtgc 60  
catagagagt ctccgggtcc ctggaaagga agaattcagg gaacttcgag aacagccaag 120  
tgacctcaa gctgaacaag agcttattaa tagtattgaa caagtatatt tttctgtgga 180  
ttcatttgat attgttaaat atgagctgga gaagcttcca cctgttctca attgcaaga 240  
attagaggcg tatagagaca aattgaaaca acagcaagct gcag 284

20

<210> 25

30

<211> 824

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

40

<221> CDS

&lt;222&gt; (50)..(823)

&lt;400&gt; 25

tgtgatttgt tagctctttg aggcaggta cctcctcag gatttcgat atg caa aaa 58

Met Gln Lys

1

10

atc aaa tet ctc atg acc cga cag ggt ctg aaa agc cct caa gaa agc 106

Ile Lys Ser Leu Met Thr Arg Gln Gly Leu Lys Ser Pro Gln Glu Ser

5

10

15

ctc agt gat ctt ggt gcc ata gag agt ctc cgg gtc cct gga aag gaa 154

Leu Ser Asp Leu Gly Ala Ile Glu Ser Leu Arg Val Pro Gly Lys Glu

20

25

30

35

20

gaa ttc agg gaa ctt cga gaa cag cca agt gac cct caa gct gaa caa 202

Glu Phe Arg Glu Leu Arg Glu Gln Pro Ser Asp Pro Gln Ala Glu Gln

40

45

50

30

gag ctt att aat agt att gaa caa gta tat ttt tet gtg gat tca ttt 250

Glu Leu Ile Asn Ser Ile Glu Gln Val Tyr Phe Ser Val Asp Ser Phe

55

60

65

40

gat att gtt aaa tat gag ctg gag aag ctt cca cct gtt ctc aat ttg 298

Asp Ile Val Lys Tyr Glu Leu Glu Lys Leu Pro Pro Val Leu Asn Leu

70

75

80

caa gaa tta gag gcg tat aga gac aaa ttg aaa caa cag caa gct gca 346

Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Arg Asp Lys Leu Lys Gln Gln Gln Ala Ala

85

90

95

gta tct aaa aaa gtg gca gat tta atc ctt gaa aaa cag cct gct tat 394

Val Ser Lys Lys Val Ala Asp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Pro Ala Tyr

100

105

110

115

10

gta aag gaa ctt gaa aga gtt acc tca ttg cag aca ggt ctt caa tta 442

Val Lys Glu Leu Glu Arg Val Thr Ser Leu Gln Thr Gly Leu Gln Leu

120

125

130

20

gct gct gtt atc tgt aca aat ggg aga aga cac ttg aat att gca aag 490

Ala Ala Val Ile Cys Thr Asn Gly Arg Arg His Leu Asn Ile Ala Lys

135

140

145

gaa ggt ttt act caa gct agt tta ggc ctt ctt gca aat caa agg aaa 538

Glu Gly Phe Thr Gln Ala Ser Leu Gly Leu Leu Ala Asn Gln Arg Lys

150

155

160

30

cgt cag ttg ctg att gga ctt ctg aaa tct ctg aga act ata aaa aca 586

Arg Gln Leu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Ser Leu Arg Thr Ile Lys Thr

165

170

175

40

ttg caa aga aca gat gta egg tta agt gaa atg ctg gag gag gaa gat 634

Leu Gln Arg Thr Asp Val Arg Leu Ser Glu Met Leu Glu Glu Glu Asp

180 185 190 195

tat cca gga gct att cag ttg tgc ctt gaa tgt caa aaa gct gcc agc 682

Tyr Pro Gly Ala Ile Gln Leu Cys Leu Glu Cys Gln Lys Ala Ala Ser

200 205 210

10

act ttt aaa cat tac agt tgt ata agt gaa ctg aat tca aag ctg caa 730

Thr Phe Lys His Tyr Ser Cys Ile Ser Glu Leu Asn Ser Lys Leu Gln

215 220 225

gat act ttg gaa cag att gag gaa cag ctg gac gta gct ctt tcc aaa 778

Asp Thr Leu Glu Gln Ile Glu Glu Gln Leu Asp Val Ala Leu Ser Lys

230 235 240

20

atc tgc aag aat ttt gac att aac cat tat acc aag gtt caa caa g 824

Ile Cys Lys Asn Phe Asp Ile Asn His Tyr Thr Lys Val Gln Gln

245 250 255

30

<210> 26

<211> 258

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

10

20

30

40



図3は、様々な組織、または細胞における「B1153」の発現レベルを測定したノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。図中の番号と組織は、以下のように対応している。

I	: i	心臓	ii	脳
	iii	胎盤	iv	肺
	v	肝臓	vi	骨格筋
	vii	腎臓	viii	膵臓
II	: i	脾臓	ii	胸腺
	iii	前立腺	iv	精巣
	v	卵巣	vi	小腸
	vii	大腸	viii	末梢白血球
III	: i	小脳	ii	大脳皮質
	iii	髄質	iv	脊髄
	v	後頭極	vi	前頭葉
	vii	側頭葉	viii	被殻
IV	: i	扁桃	ii	尾状核
	iii	脳梁	iv	海馬
	v	全脳	vi	黒質
	vii	視床		
V	: i	脾臓	ii	リンパ節
	iii	胸腺	iv	末梢白血球
	v	骨髄	vi	胎児肝臓
VI	: i	前骨髄細胞白血病細胞 HL-60		
	ii	HeLa細胞 S3		
	iii	慢性骨髄性白血病細胞 K-562		
	iv	リンパ芽球性白血病細胞 MOLT-4		
	v	パーキットリンパ腫 Raji		
	vi	大腸腺癌 SW480		
	vii	肺癌 A549		
	viii	メラノーマ G361		

10

20

30

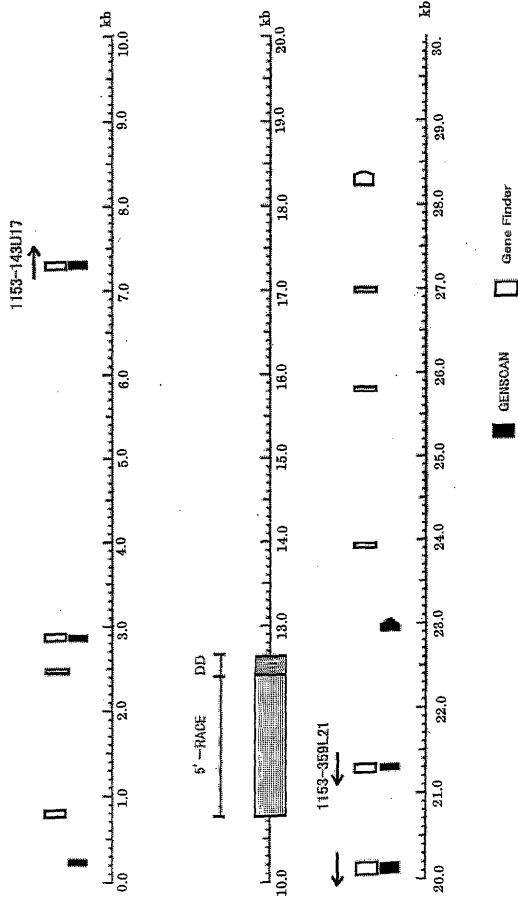
図4は、各種免疫細胞での「B1153」遺伝子の発現を測定した定量的PCRの結果を示すグラフである。縦軸がアクチン補正した「B1153」遺伝子の発現レベル(copy/ng)、横軸が細胞の種類を示す。

図5は、本発明の遺伝子「B1153」と、既知塩基配列KIAA1861(Accession No. AB058764)、FLJ23581(Accession No. AK027234)、およびFLJ20097との関係をまとめた図である。

図6は、実施例12において「B1153」蛋白質との相互作用が検出された、ミオシン結合サブユニット85(Accession No. AF312028)の構造を示す図である。

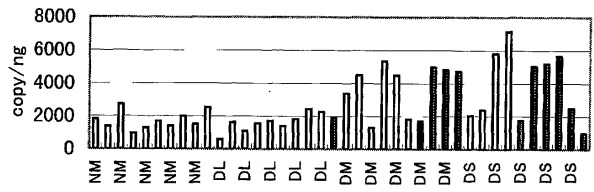
【 1 】

1



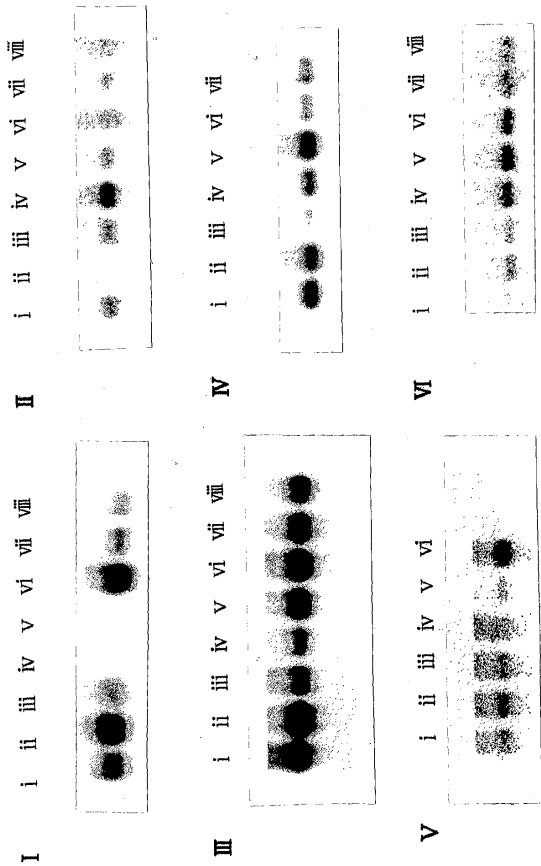
【 2 】

2



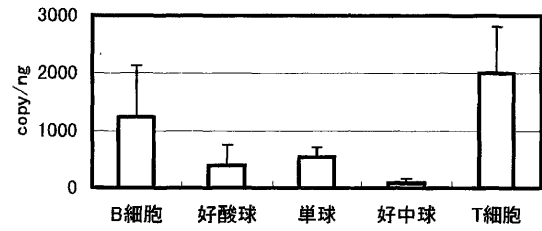
【 3 】

3



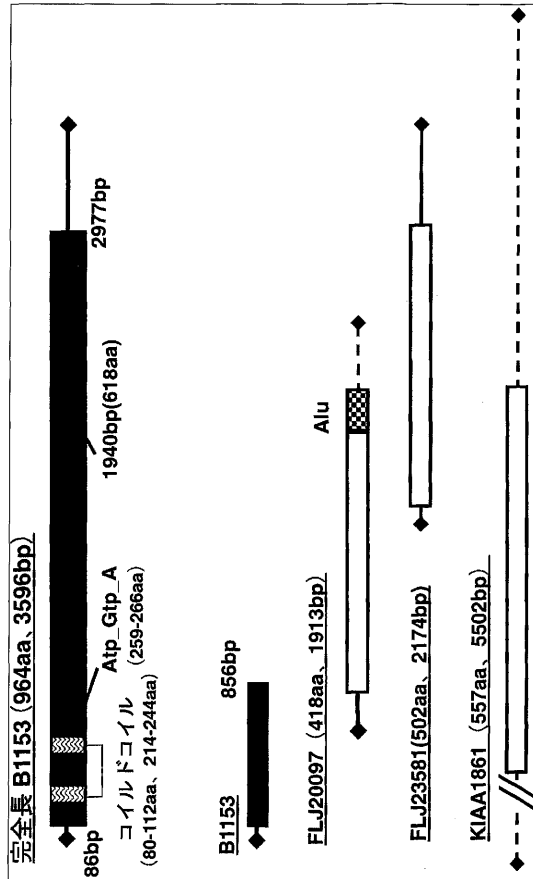
【 4 】

4



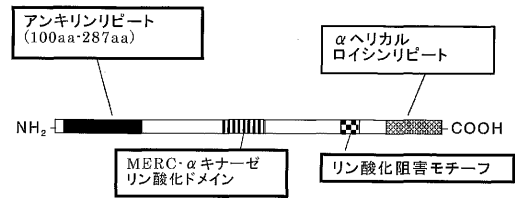
【 5 】

図 5



【 6 】

図 6



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/11286
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/11, C07K16/18, A61K67/027, A61K31/711, A61K45/00, A61K48/00, A61P37/08, C12Q1/68, G01N33/50 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/11, C07K16/18, A61K67/027, A61K31/711, A61K45/00, A61K48/00, A61P37/08, C12Q1/68, G01N33/50 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 practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/65046 A (Genox Research, Inc.), 02 November, 2000 (02.11.00), (Family: none)	1-34
P, A	Takahiro NAGASE et al. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. x x. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. DNA RESEARCH April 2001, Vol.8, No.2, pages 85 to 95	1-34
P, A	WO 01/53312 A1 (Hyseq, Inc.), 26 July, 2001 (26.07.01), (Family: none)	1-34
P, A	WO 01/02568 A2 (Chiron Corp.), 11 January, 2001 (11.01.01), & AU 6069300 A	1-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 12 April, 2002 (12.04.02)		Date of mailing of the international search report 23 April, 2002 (23.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/11286
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>1</sup> C12N15/11, C07K16/18, A61K67/027, A61K31/711, A61K45/00, A61K48/00, A61P37/08, C12Q1/68, G01N33/50		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>1</sup> C12N15/11, C07K16/18, A61K67/027, A61K31/711, A61K45/00, A61K48/00, A61P37/08, C12Q1/68, G01N33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/65046 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 2000.11.02 ファミリーなし	1-34
PA	Takahiro NAGASE et al. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XX. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins <i>in vitro</i> . DNA RESEARCH April 2001, Vol. 8, No. 2, p. 85-95	1-34
PA	WO 01/53312 A1 (HYSEQ, INC.) 2001.07.26 ファミリーなし	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に根拠を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	12.04.02	国際調査報告の発送日 23.04.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明	4B 9358 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/11286
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO 01/02568 A2 (CHIRON CORPORATION) 2001.01.11 & AU 6069300 A	1 - 34

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 11/02	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 27/16	
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Q
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

- (72)発明者 今井 雪穂  
神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬  
研究所内
- (72)発明者 押田 忠弘  
神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬  
研究所内
- (72)発明者 杉田 雄二  
神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬  
研究所内
- (72)発明者 長洲 毅  
茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内
- (72)発明者 辻本 豪三  
東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立成育医療センター研究所内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	测试过敏性疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2002050269A1</a>	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002552146	申请日	2001-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所 国家中心儿童健康和发展的—般		
申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所有限公司 国家中心儿童健康和发展的—般		
[标]发明人	松本佳子 今井雪穗 押田忠弘 杉田雄二 辻本豪三		
发明人	松本 佳子 今井 雪穗 押田 忠弘 杉田 雄二 長洲 毅 辻本 豪三		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/711 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/16 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K48/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/16 C07K14/47 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/505 G01N33/5091 G01N33/6854 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/16 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Q G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2000389476 2000-12-21 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明人收集了来自多个正常健康受试者和过敏性疾病患者的血液样品，并且进行了差异显示分析以寻找在它们之间显示出其表达差异的基因。结果，发明人成功地分离了在过敏性疾病患者组中表达水平显著高的B1153基因。发明人发现有可能利用该基因测试变应性疾病，并筛选变应性疾病的—治疗剂候选化合物。

被験者番号	疾患	IgEスコア	被験者番号	疾患	IgEスコア
01	極軽症	0	37	皮膚炎	3
02	極軽症	0	38	皮膚炎	4
03	極軽症	5	39	皮膚炎	5
04	極軽症	0	40	皮膚炎	4
05	極軽症	0	41	皮膚炎	6
06	極軽症	0	42	皮膚炎	6
07	健常	0	43	皮膚炎	5
08	健常	0	44	皮膚炎	6
09	健常	0	45	皮膚炎	6
10	健常	0	46	皮膚炎	6
11	健常	0	47	皮膚炎	5
12	健常	0	48	皮膚炎	3
13	喘息	5	49	皮膚炎	6
14	喘息	5	50	皮膚炎	6
15	喘息	4	51	皮膚炎	6
16	喘息	5	52	皮膚炎	6
17	喘息	5	53	皮膚炎	5
18	喘息	5	54	皮膚炎	6
19	喘息	5	55	皮膚炎	4
20	喘息	6	56	皮膚炎	6
21	喘息	4	57	皮膚炎	5
22	喘息	5	58	皮膚炎	5
23	喘息	5	59	皮膚炎	5
24	喘息	5	60	皮膚炎	6
25	喘息	5			
26	喘息	5			
27	喘息	5			
28	喘息	6			
29	喘息	6			
30	喘息	6			
31	喘息	4			
32	喘息	4			
34	喘息	4			
35	喘息	6			
36	喘息	5			

