

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3455782号
(P3455782)

(45)発行日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(24)登録日 平成15年8月1日(2003.8.1)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	N
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	N
	39/395	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00		C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40			16/42

請求項の数 6 (全 37数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 397811(P2001 - 397811)

(22)出願日 平成13年12月27日(2001.12.27)

(65)公開番号 特開2003 - 194814(P2003 - 194814A)

(43)公開日 平成15年7月9日(2003.7.9)

審査請求日 平成14年10月23日(2002.10.23)

早期審査対象出願

(73)特許権者 899000079
学校法人慶應義塾
東京都港区三田2丁目15番45号

(72)発明者 桑名 正隆
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学
医学部内

(74)代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀 (外2名)

審査官 新見 浩一

(56)参考文献 ARTHRITIS&RHEUMATISM, VOL.42, NO.2, P.2
75 - 284(1999)
GENOME RESEARCH, VOL.7, NO.10, P.1006 -
1017(1997)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 強皮症の診断薬

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のペプチドを用いることを特徴とする抗RNAポリメラーゼ抗体の検出方法。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号6の732番目~1080番目に示されるアミノ酸配列、配列番号6の891番目~1161番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるペプチド

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号6の732番目~1080番目に示されるアミノ酸配列、配列番号6の891番目~1161番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプ

2

チド

【請求項2】 以下のペプチドを含有することを特徴とする強皮症の診断薬。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号6の732番目~1080番目に示されるアミノ酸配列、配列番号6の891番目~1161番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるペプチド

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号6の732番目~1080番目に示されるアミノ酸配列、配列番号6の891番目~1161番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプ

チド

【請求項 3】 以下のペプチドからなることを特徴とする強皮症の診断用又は治療用ペプチド。

(a)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 7 3 2 番目 ~ 1 0 8 0 番目に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 8 9 1 番目 ~ 1 1 6 1 番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド
(b)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 7 3 2 番目 ~ 1 0 8 0 番目に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 8 9 1 番目 ~ 1 1 6 1 番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプチド

【請求項 4】 以下のペプチドを認識することを特徴とするモノクローナル抗体。

(a)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 7 3 2 番目 ~ 1 0 8 0 番目に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 8 9 1 番目 ~ 1 1 6 1 番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド
(b)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 7 3 2 番目 ~ 1 0 8 0 番目に示されるアミノ酸配列、配列番号 6 の 8 9 1 番目 ~ 1 1 6 1 番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプチド

【請求項 5】 請求項 4 記載のモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体。

【請求項 6】 強皮症の診断用又は治療用である請求項 5 記載の抗イディオタイプ抗体。

【発明の詳細な説明】

抗核抗体	陽性頻度	皮膚硬化範囲	内臓病変
抗トポイソメラーゼ I 抗体 (抗 Scl-70 抗体)	25%	びまん型	肺線維症、皮膚潰瘍
抗セントロメア抗体	20%	限局型	心、腎、肺の障害まれ、原発性胆汁性肝硬変
抗 U1RNP 抗体	20%	限局型	筋炎、肺高血圧症
抗 RNA ポリメラーゼ抗体	5%	びまん型	強皮症腎、心筋障害
抗 U3RNP 抗体	3%	びまん型	内臓障害が少ない
抗 Th/To 抗体	2%	限局型	内臓障害が少ない
抗 PM-Scl 抗体	<1%	限局型	筋炎
抗 Ku 抗体	2%	限局型	筋炎

【0005】抗 RNA P 抗体は、1993 年に複数の RNA ポリメラーゼ (RNA P) を同時に認識する抗核抗体として、本発明者らにより強皮症患者血清中に初めて

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗 RNA ポリメラーゼ抗体 (抗 RNA P 抗体) の検出方法、強皮症の診断薬、強皮症の診断用又は治療用ペプチド等に関する。

【0002】

【従来の技術】強皮症 (全身性硬化症) は膠原病の一種で、皮膚や肺、腸管など内臓諸臓器の線維化及び末梢循環障害を主徴とする病気である。我が国では約 1 万人程度の患者がいると推測されており、毎年 500 ~ 1000 人程度の新患が発生している。医療の進歩に伴い、各種膠原病の予後の改善が報告されているが、強皮症に対する根本的な治療法はいまだ確立されておらず、10 年生存率が 70% に満たない予後の悪い疾患である。強皮症患者における症状は多彩で、きわめて軽い循環障害のみで全く治療を要さない患者から、短期間のうちに呼吸不全、腎不全、心不全などにより死亡する患者まで幅広い。従って、強皮症と診断された患者では将来どのような臓器障害が進行するかの予測がきわめて重要である。

【0003】強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼ I やセントロメアなど重要な生物活性をもつ核蛋白に対する自己抗体 (抗核抗体) が高頻度に検出される。これら自己抗体は強皮症に特異的であることから、その診断に用いられている。また、抗トポイソメラーゼ I 抗体は肺線維症を伴い皮膚硬化範囲の広い (びまん型) 強皮症、抗セントロメア抗体は内臓病変が少なく皮膚硬化が手指に限局する (限局型) 強皮症と関連することから、これら抗核抗体の検出は病型分類や将来の臓器障害の予測にも有用である (Arthritis Rheum, 37:75-83, 1994)。強皮症に特異的で、診断及び病型分類に有用な抗核抗体が表 1 に示されているが、これらのうち、測定キットが発売され、一般診療で測定可能なものは抗トポイソメラーゼ I、抗セントロメア、抗 U1RNP 抗体の 3 種類のみである。

【0004】

【表 1】

見い出された抗体である (J Clin Invest 91:1399-404, 1993)。RNA P は RNA の転写を触媒する酵素で、RNA P I はリボゾーム RNA、RNA P II はメッセン

ジャーRNA、RNAPIIIはトランスファーRNAをそれぞれ転写する。強皮症患者血清中にはRNAPIとRNAPIIIを同時に認識する抗体が検出され、そのうち一部はRNAPIIとも反応する。抗RNA P抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、これまで強皮症患者以外での報告はない。抗RNA P抗体は急速に皮膚硬化が進行するびまん型強皮症に高頻度に検出され、強皮症腎を高率に併発し、きわめて予後の悪い病型と関連する。強皮症腎に対する治療法のなかった1980年代以前は5年生存率はわずか30%であった。死亡例の多くは強皮症腎とよばれる急激に血圧が上昇し、腎不全を伴う合併症により死亡する。1990年代に入ってから強皮症腎に対する特效薬(ACE阻害剤)が見い出され、強皮症腎の発症早期に投与すると後遺症を残さずに救命できることが示された。ただし、強皮症腎の症状が進行して腎機能が悪化してからACE阻害剤を投与しても効果は少なく、死亡する例もあり、たとえ回復したとしても多くの患者では人工透析が必要である。そこで、強皮症腎と関連する抗RNA P抗体が検出された強皮症患者では、強皮症腎を早期に発見するための血圧自己測定を徹底させることが勧められている。したがって、抗RNA P抗体は強皮症の診断、病型分類、臓器障害、特に強皮症腎の予測にきわめて有用な抗核抗体である。さらに、診断時に抗RNA P抗体の有無を調べることは、強皮症腎の早期発見、早期治療により死亡例を減らし、強皮症の生命予後の改善をももたらすと考えられている。

【0006】日本人強皮症患者における抗RNA P抗体の陽性頻度は約5%と少ないが、欧米白人強皮症での頻度は20~30%と高率であり、この頻度は抗トポイソメラーゼI、抗セントロメア、抗U1RNP抗体に比べて高く、欧米白人においては抗RNA P抗体が強皮症で最も高頻度に検出される抗核抗体であることが本発明者らにより報告(Arthritis Rheum 37, 902-6, 1994)されており、これらの成績は、その後欧米の複数の施設での追試で確認されている(Ann Intern Med, 119, 1005-13, 1993, Clin Exp Immunol, 105, 468-74, 1996)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】抗RNA P抗体は臨床的に非常に有用な抗核抗体であるが、現時点では大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であり、そのため、一般臨床検査室での抗RNA P抗体の検出は不可能とされ、世界でも限られた研究室でしかその検出ができないのが現状である。したがって、抗RNA P抗体の簡便な検出法の開発が急務と考

えられている。しかし、抗RNA P抗体は、抗核抗体を検出するために通常行われる二重免疫拡散法や粗精製の抗原を用いた免疫プロット法では検出できない。その原因として、RNAPI及びRNAPIIIはいずれも10個以上のサブユニットから構成される巨大複合体であり、細胞あたりの個々のサブユニットの分子数がきわめて少ないことを挙げることができる。この点を解決するためには、強皮症患者血清中の抗RNA P抗体により共通して認識される抗原部位(エピトープ)の同定が必須である。RNAPI及びRNAPIII分子上のエピトープ領域が明らかとなれば、その部位をリコンビナント蛋白として大量に発現させることで、酵素免疫測定法(ELISA)を含めた検出法の開発が可能と思われる。本発明の課題は、急速に皮膚硬化が進行するびまん型強皮症患者に高頻度に検出され、強皮症腎を高率に併発し、きわめて予後の悪い病型と関連することから、強皮症の診断、病型分類、臓器障害、特に強皮症腎の予測にきわめて有用で、強皮症に特異性がきわめて高い抗RNA P抗体の簡便な検出法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らによる基礎的検討により、強皮症患者血清中の抗RNA P抗体はRNAPIIIの155kDaと62kDaの2つのサブユニット(RPC155、RPC62)を高頻度に認識することが明らかにされている(Arthritis Rheum1999;42:275-84)。また、ヒトのRPC155のcDNA配列は1997年にSetarehとHernandezにより報告され(Genome Res 1997;7:1006-19)、NCBIのデータベースに登録されている(accession no. AF021351)。そこで、さらに詳細にRPC155、RPC62上に存在するエピトープを同定するために、RPC62の全長蛋白及びRPC155の部分断片をリコンビナント蛋白として大腸菌で発現させ、抗RNA P抗体陽性及び陰性の強皮症患者血清との反応性を免疫プロット法で調べてみた。まず図1に示すRPC155-A(配列番号8)、RPC155-B2(配列番号10)、RPC155-C(配列番号12)、RPC155-D(配列番号14)及びRPC62(全長)のリコンビナント蛋白を用いて検討したところ、表2に示す結果が得られた。いずれのリコンビナント蛋白も抗RNA P抗体陽性血清により認識されたが、抗RNA P抗体陽性11血清はすべてRPC155-Cと反応した。

【0009】

【表2】

リコンビナント RNAP III断片	強皮症		健常人 (n = 6)
	抗RNAP抗体(+) (n = 11)	抗RNAP抗体(-) (n = 10)	
RPC155-A	2(18%)	1 (10%)	0
RPC155-B2	1 (9%)	0	0
RPC155-C	11 (100%)	0	0
RPC155-D	3 (27%)	0	0
RPC62	6 (55%)	0	0

【0010】そこで、さらに詳細にRPC155-Cに含まれるエピトープを調べるため、RPC155-CのN末端及びC末端から短くしたC1~C5の5つのリコンビナント断片を新たに作製した。抗RNAP抗体陽性11血清との反応性を免疫ブロット法により検討すると、全ての血清はC3とC4を認識したが、C1、C2、C5とは反応しなかった。さらにC3とC4の共通部分をコードするC-aからC-gまでの7つのリコンビナント断片を作製し、同様に抗RNAP抗体陽性血清との反応性を調べた。すべての血清はC-c及びC-gと反応したが、他のリコンビナント断片は認識しなかった。したがって、C-cのコードするRPC155のアミノ酸残基891-1020番に強皮症患者血清中の抗RNAP抗体により共通して認識されるエピトープが存在することが明らかとなった。ただし、一部の血清でC-cに対する反応性がC-gに対する反応性に比べて弱かったため、患者血清中の抗体との強い結合にはC-gに余分に含まれるアミノ酸部分も必要であることが推測された。そのため、抗RNAP抗体の検出にはC-cよりもC-gの方が適していることがわかった。

【0011】C-gに対する反応性が強皮症患者血清中の抗RNAP抗体に特異的であることを確認するため、より多数例を用いた免疫ブロットによる検討を行った。その結果、C-gに対する反応性は抗RNAP抗体陽性強皮症16例の全例で検出されたが、抗RNAP抗体陰性強皮症55例、健常人26例では検出されなかった。したがって、C-gは強皮症患者血清中の抗RNAP抗体により共通して認識されるエピトープを含み、同部位を発現するリコンビナント蛋白が抗RNAP抗体検出法の抗原として有用であると考えられた。そこで、C-gを大腸菌で発現させた後にアフィニティーカラムにより精製し、ELISAの抗原として用いた。図2に示すとおり、従来の免疫沈降法により抗RNAP抗体陰性の強皮症血清、コントロールとして用いた全身性エリトマトーデス患者血清、健常人血清ではC-gに対する反応性はいずれも低値だった。健常人の平均+5×標準偏差である4.15ユニットをカットオフとすると、抗C-g抗体の陽性頻度は抗RNAP抗体陽性例で100%、他では0%となり、C-gを用いたELISAは感度、特異性とも100%のきわめて優れた抗RNAP抗体の検

出法であることが明らかとなった。本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0012】すなわち本発明は、次の(a)~(b)のペプチド(以下「本件ペプチド」という)を用いる抗RNAP抗体の検出方法、本件ペプチドを含有する強皮症の診断薬、本件ペプチドからなる強皮症の診断用又は治療用ペプチド、本件ペプチドを認識するモノクローナル抗体、本件ペプチドを認識するモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体、強皮症の診断用又は治療用である上記の抗イディオタイプ抗体に関する。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号6の732番目~1080番目に示されるアミノ酸配列、配列番号6の891番目~1161番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるペプチド
(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号6の732番目~1080番目に示されるアミノ酸配列、配列番号6の891番目~1161番目に示されるアミノ酸配列、または、配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプチド

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の抗RNAP抗体の検出方法や、本発明の強皮症の診断薬、強皮症の診断用又は治療用ペプチド、モノクローナル抗体、強皮症の診断用又は治療用である抗イディオタイプ抗体の作製に用いられる本件ペプチドとしては、ヒト10番染色体(10q22-q23)に存在しているDNA依存性RNAPIIIのサブユニット(accession No. NM-007055)遺伝子の翻訳産物であり、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなる155kDaのサブユニットRPC155の部分アミノ酸配列であるアミノ酸残基[AA]891-1020番目(配列番号2)で表されるペプチド、好ましくはAA891-1080番目(配列番号4)で表されるペプチドを好適に例示することができる。

【0014】また、本件ペプチドとしては、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列の全部を含むペプチド、例えばRPC155のAA732-1166番目(配列

番号12)、RPC155のAA732-1080番目及びRPC155のAA891-1166番目で表されるペプチドや、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列の一部を含むアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプチドを挙げることができ、ここで抗核抗体結合能を有するペプチドとは、抗RNA P抗体により認識されるエピトープを有するペプチド等の抗RNA P抗体と結合することができるペプチドをいう。

【0015】その他、本件ペプチドとしては、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の全部若しくは一部を含むアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ抗核抗体結合能を有するペプチドを挙げることができ、具体的には、配列番号4に示されるアミノ酸配列におけるAA1056番目のグリシンがアラニンに置換されたペプチドを挙げることができる。

【0016】本件ペプチドの調製方法は特に制限されないが、本件ペプチドをコードするDNAの塩基配列情報に基づき常法により組換えペプチド(リコンビナント断片)として調製する方法を好適に例示することができ、原核細胞等を宿主細胞とする場合は融合タンパク質として発現させてもよい。また、培養細胞や組織から精製することにより本件ペプチドを調製することもできる。なお、ヒトRPC155のエピトープ領域は他の有核生物のRPC155とも相同性が高く、RPC155の由来はヒトに限定されるものではない。

【0017】本発明の抗RNA P抗体の検出方法としては、本件ペプチドを用いる抗RNA P抗体の検出方法であれば特に制限されるものではなく、酵素免疫分析法(ELISA)、蛍光免疫分析法、免疫プロット分析法、ドットプロット分析法、免疫拡散分析法等を具体的に例示することができるが、中でもヘテロジニアスELISA法が好ましい。かかるELISA法としては、固相化した本件ペプチドを認識する抗RNA P抗体に対する酵素標識抗体を用いる二抗体サンドイッチ法、固相に結合した標識した本件ペプチドと試料中の抗RNA P抗体と接触させる直接抗体法、間接抗体法、競合法等を挙げることができ、固相としてはマイクロタイターウェル、アガロース、ラテックス粒子、磁性微粒子等を挙げることができ、標識酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ等を挙げることができる。なお、本発明の抗RNA P抗体の検出方法には、抗RNA P抗体の測定方法や分析方法も含まれる。

【0018】本発明の抗RNA P抗体の検出方法の対象となる試料としては特に制限されないが、通常、血清、血漿、唾液、脳脊髄液、尿等の体液を挙げることができ、抗RNA P抗体陽性のびまん型強皮症等の強皮症患者血清を好適に例示することができる。組換えペプチド

を用いる場合は、大腸菌成分等の宿主細胞成分と、あらかじめ血清等の試料を反応させ、大腸菌成分等の宿主細胞成分と反応する抗体を除去しておくことが好ましい。また、組換え融合ペプチドを用いる場合は、宿主細胞成分及び融合成分と、あらかじめ血清等の試料を反応させ、宿主細胞成分及び融合成分と反応する抗体を除去しておくことが好ましい。

【0019】本発明の強皮症の診断薬としては、本件ペプチドを含有する強皮症の診断薬であり、上記本発明の抗RNA P抗体の検出方法を実施しうる診断薬であれば特に制限されるものではなく、例えば、固相化した本件ペプチド、血清希釈用ELISA緩衝液、酵素標識化二次抗体、酵素基質、宿主細胞成分等を含む強皮症の診断キットを好適に例示することができる。本発明の強皮症の診断薬は、強皮症の診断、病型分類、臓器障害の予測に有用である。

【0020】本発明の強皮症の診断用又は治療用ペプチドとしては、本件ペプチドからなるものであれば特に制限されるものではなく、強皮症の診断用ペプチドとしては、固相化した本件ペプチドの他、本件ペプチドとマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチドを挙げることができる。上記マーカートンパク質としては、例えば、アルカリリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどの従来知られているマーカートンパク質を具体的に挙げることができ、またペプチドタグとしては、Hisタグ、FLAGタグ、Sタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質や融合ペプチドは常法により作製することができ、抗RNA P抗体の定量、強皮症の診断用マーカーなどとして、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0021】本発明の強皮症の治療用ペプチドは、本件ペプチドをコードするDNAが導入された組換えベクターとして投与することもでき、かかる組換えベクターとしては、本件ペプチドを宿主細胞内で発現させることができる発現系を含むものが好ましく、例えば、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、より具体的には、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。また、上記本発明の強皮症の治療用ペプチドの投与方法としては、経口投与、静脈注射等の非経口投与のいずれでもよく、投与量は、投与方法、患者の症状・年

齢、抗炎症性物質の物性等を考慮して適宜設定することができる。また、剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等を具体的に例示することができ、これらの製剤は製剤用担体と混合して調製した製剤の形で通常投与される。

【0022】本発明のモノクローナル抗体としては、本件ペプチドを認識するモノクローナル抗体であれば特に制限されるものではなく、かかるモノクローナル抗体は上記本件ペプチドを用いて常法により作製することができる。すなわち、動物（好ましくはヒト以外）に本件ペプチド若しくはエピトープを含むその断片を投与することにより産生され、例えば連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。かかるモノクローナル抗体は、例えば、ELISAをはじめとする本発明の抗RNA P抗体の検出方法や本発明の強皮症の診断薬におけるスタンダードとして、また、本件ペプチドをアフィニティー精製する上で、その他、強皮症の発症機構を明らかにする上で有用である。

【0023】本発明の抗イディオタイプ抗体としては、本件ペプチドを認識するモノクローナル抗体に対する抗体であれば特に制限されるものではなく、かかる抗イディオタイプ抗体は上記本発明のモノクローナル抗体やその可変領域からなる断片を用いて、ハイブリドーマ法等を利用して常法により作製することができる。そして、本発明の抗イディオタイプ抗体は、強皮症の診断用又は治療用として用いることができる。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 [方法]

実施例1 A (抗RNA P抗体陽性の血清の調製)

免疫沈降法により血清中の抗RNAポリメラーゼ(RNA P)抗体を検出した。³⁵Sメチオニン(TRAN³⁵S-LABEL; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA)で標識したHeLa細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とし、プロテインAセファロースと結合させた被検血清中のIgGと反応させ、RNA P Iの高分子サブユニット(190 kDa蛋白と126 kDa蛋白)とRNA P IIIの高分子サブユニット(155 kDa蛋白と138 kDa蛋白)をすべて沈降した血清を抗RNA P抗体陽性とした。被検血清としては、強皮症患者105例の血清を対象とし、このうち16例の血清が免疫沈降法で抗RNA P抗体陽性であった。コントロールとして全身性エリテ

マトーデス(SLE)61例の血清、健康人61例の血清を用いた。強皮症及びSLE患者は、全例がアメリカリウマチ学会による分類予備基準を満たしていた。

【0025】実施例1 B (RPC62、RPC155をコードするcDNAの増幅)

RNA P IIIの62 kDaのサブユニット(RPC62)をコードするcDNAと、RNA P IIIの155 kDaのサブユニット(RPC155)の図1に示される4つの断片(RPC155-A、RPC155-B2、RPC155-C、RPC155-D)をコードするcDNAをRT-PCR法により増幅し、各塩基配列を決定した(RPC155-A(配列番号7)、RPC155-B2(配列番号9)、RPC155-C(配列番号11)、RPC155-D(配列番号12))。まず、Genbankに登録されているRPC62とRPC155のcDNAの塩基配列(アクセッション番号:U93867及びNM-007055)をもとに合成した特異的なプライマーを用い、反応酵素にはExTaq(宝酒造, 東京)を用いた。反応条件は、サーマルサイクラー(Perkin-Elmer)を用いて最初のみ94で5分間変性させ、その後94で1分間熱変性させ、55で1分間アニーリングし、72で2分間伸張反応させるといふサイクルを35回繰り返すを行い、最後に72で7分間伸張させた。得られたPCR産物を、Big Dye DNA Sequencing Kit (ABI) とABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) とを用いてDNAシーケンスを行い、各塩基配列を決定した。

【0026】ヒト白血病細胞株K562からポリA⁺のmRNAをマグネティックビーズ結合オリゴ(dt)₂₅(宝酒造, 東京)を用いて分離した。AMVの逆転写酵素により、オリゴ(dt)を用いて一本鎖cDNAへと変換し、さらにこれをテンプレートとし、RPC62用プライマー(センスプライマー: 配列番号15、アンチセンスプライマー: 配列番号16)を用いたPCRにより、RPC62の全オープンリーディングフレーム(ORF)をコードするcDNAを増幅した。また、RPC155については、K562のmRNAからrandom hexamer (GIBCO, Grand Island, NY, USA)を用いた逆転写反応により得られた一本鎖cDNAをテンプレートとし、それぞれRPC155-A用プライマー(センスプライマー: 配列番号17、アンチセンスプライマー: 配列番号18)、RPC155-B用プライマー(センスプライマー: 配列番号19、アンチセンスプライマー: 配列番号20)、RPC155-C用プライマー(センスプライマー: 配列番号21、アンチセンスプライマー: 配列番号22)、RPC155-D用プライマー(センスプライマー: 配列番号23、アンチセンスプライマー: 配列番号24)を用いたPCRにより、全ORFを重複してコードする4つの断片(RPC155-A、アミノ酸残基[AA]1-374番目(配列番号8); RPC

155-B、AA365-751;RPC155-C、AA732-1166(配列番号12);RPC155-D、AA1092-1391(配列番号14))を増幅した。得られたPCR産物はpGEM-Tベクター(Promega, Madison, WI, USA)にサブクローニングした。インサートの塩基配列はT7及びSP6プライマーを用いて、ABI Prism 310 genetic analyzerにより決定した。

【0027】また、上記RPC155-CをコードするpGEM-TをテンプレートとしたPCRにより、図1 10に示す12種類のRPC155-Cの部分断片C-1~C-5、C-a~C-gを増幅した。使用プライマーとしては、C-1(センスプライマー:配列番号25、アンチセンスプライマー:配列番号26)、C-2(センスプライマー:配列番号27、アンチセンスプライマー:配列番号28)、C-3(センスプライマー:配列番号29、アンチセンスプライマー:配列番号30)、C-4(センスプライマー:配列番号31、アンチセンスプライマー:配列番号32)、C-5(センスプライマー:配列番号33、アンチセンスプライマー:配列番号34)、C-a(センスプライマー:配列番号35、アンチセンスプライマー:配列番号36)、C-b(センスプライマー:配列番号37、アンチセンスプライマー:配列番号38)、C-c(センスプライマー:配列番号39、アンチセンスプライマー:配列番号40)、C-d(センスプライマー:配列番号41、アンチセンスプライマー:配列番号42)、C-e(センスプライマー:配列番号43、アンチセンスプライマー:配列番号44)、C-f(センスプライマー:配列番号45、アンチセンスプライマー:配列番号46)、C-g(センスプライマー:配列番号47、アンチセンスプライマー:配列番号48)をそれぞれ用いた。これら12種類のRPC155-Cの各部分断片のPCRに使用したすべてのプライマーには、サブクローニングのことを考慮してすべて制限酵素部位(上流EcoRI、下流はXbaIサイト)が付加されている。

【0028】実施例1C(RPC62、RPC155のリコンビナント蛋白の発現)

実施例1Bで調製したRPC62の全長、及びRPC155の一部をコードするcDNAを蛋白発現ベクターpMAL-c2(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)のMalE遺伝子の下流にフレームを合わせてサブクローニングした。0.3mMのIPTGの添加により、RNAPサブユニットのリコンビナント蛋白をmaltose-binding protein(MBP)との融合蛋白として発現させた。一部の試験では、大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白をアミロースレジンを用いて精製した。

【0029】実施例1D(免疫プロット法)

RPC62全長及びRPC155のリコンビナント断片を発現した大腸菌を10%ポリアクリルアミド-SDS 50

ゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。血清は250倍に希釈し、MBPの発現を誘導した大腸菌成分と反応させて、あらかじめ大腸菌成分とMBPと反応する抗体を除去した。ニトロセルロース膜は血清、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(ICN/Cappel, Aurora, OH, USA)と順次反応させた。リコンビナント蛋白に結合した抗体はNBT/BCIPを基質とした発色反応により検出した。

【0030】実施例1E(ELISA)

2-メルカプトエタノール(0.05%)添加リン酸緩衝液(PBS)で希釈した精製リコンビナント蛋白(0.5µg/ml)を96ウェルポリビニールプレート(スミロンHプレート;住友ベークライト、東京)の各ウェルに加え、4で12時間静置して固相化した。PBSで1回洗浄後に各ウェルに3%ウシ血清アルブミン(BSA)を加え、ブロッキングした。患者血清はELISAバッファー(0.1%BSA、0.1%Tween20添加PBS)で250倍に希釈し、MBPの発現を誘導した大腸菌成分と反応させて大腸菌成分とMBPと反応する抗体を除去した上で各ウェルに加えた。室温で2時間反応させた後、ELISAバッファーで3回洗浄した。さらに、5,000倍に希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体と室温で1時間反応させ、ELISAバッファーで3回洗浄した。DMSOで1mg/mlの濃度に溶解したテトラメチルベンジジンをリン酸・クエン酸緩衝液に対して1:9の割合で混合し、基質として各ウェルに加えた。10分間の反応後に1規定の硫酸を加えて、反応を停止させた。各ウェルの405nmでの吸光度はプレートリーダー(Bio-rad Laboratories, Hercules, CA)により測定した。全ての検体は2ウェルで測定し、その平均を求めた。抗RNAP抗体高力価陽性のMY血清の希釈系列から標準曲線を作成し、4,000倍希釈血清中の抗RNAP抗体量を1ユニットとして各検体の吸光度をユニットに換算した。健康人血清の平均+3×標準偏差である4.15ユニットをカットオフとした。

【0031】実施例2[結果]

実施例2A(RPC62、RPC155をコードするcDNAの増幅)

RPC62の全ORFをコードするcDNAは、通常のRT-PCR法により得られたが、RPC155のORFに相当するcDNA(配列番号5)は4.2kbと大きく、そのため全長の増幅は困難であった。そこで、RPC155の全ORFを30bp以上オーバーラップする4つのcDNA断片として増幅した。すなわち、1391個のアミノ酸で構成されるRPC155を、AA1-374(RPC155-A)、AA365-751(RPC155-B)、AA732-1166(RPC155-C)、AA1092-1391(RPC155-D)をそれぞれコードする4つのcDNA断片として

増幅した。得られた cDNA 断片は pGEM-T にサブクローニング後に塩基配列を決定し、既知の RPC155 の塩基配列 (GenBank アクセション番号: NM-007055) と比較した。いずれの断片も高度の相同性を有していたが、RPC155-A、C にはそれぞれ 4 箇所の塩基置換を認め、そのうち 4 箇所はアミノ酸置換を伴っていた (15 番スレオニンがイソロイシン、262 番フェニルアラニンがイソロイシン、283 番ロイシンがプロリン、1056 番グリシンがアラニンにそれぞれ置換)。また、RPC155-D に含まれる 1276 番目のバリンは欠失していた。これらの配列は複数のコロニー由来の DNA から検出され、さらに一致する配列が、Genbank に登録されている遺伝子配列中に見い出されることから、多くは RPC155 遺伝子に存在する一塩基遺伝子多型性 (SNPs) と考えられた。

【0032】実施例 2B (RPC62、RPC155 リコンビナント蛋白の発現)

次に RPC62、RPC155-A、RPC155-B、RPC155-C、RPC155-D をそれぞれ pMAL-c2 にサブクローニングし、MBP との融合蛋白として発現させた。RPC155-A、RPC155-C、RPC155-D ではインサートの塩基配列及び融合蛋白の分子量から、それぞれの部分をコードする融合蛋白の発現が確認された。しかし、RPC155-B の cDNA を導入した大腸菌のコロニーからは異なる塩基配列を有するクローンが数多く検出された。いずれの塩基配列中にも塩基の欠失、挿入、変異を認め、フレームシフトや終止コドンへの変異により RPC155-B の全長を発現するクローンはなかった。そのため、最も長くオリジナルのアミノ酸配列を発現するクローンを RPC155-B2 (AA365-451) (配列番号 10) と名付け、その後の解析に用いた (図 1)。RPC155 の AA509-519 は大腸菌からヒトのまで種を越えて広く保存されており、転写活性中心部分と考えられている。そのため、この活性中心部分を含みリコンビナント蛋白の発現が大腸菌に対して毒性に働き、これらの遺伝子に変異をもったクローンが選択された可能性が高い。

【0033】実施例 2C (RPC62、RPC155 リコンビナント蛋白に対する反応性)

RPC62、RPC155 をコードする 5 つのリコンビナント蛋白 (RPC62、RPC155-A、RPC155-B2、RPC155-C、RPC155-D) に対する抗 RNA P 抗体陽性強皮症 11 例、抗 RNA P 抗体陰性強皮症 10 例、健常人 6 例の血清の反応性を免疫プロット法により調べた。前記表 2 に示すように、RPC62、RPC155-A、RPC155-B2、RPC155-C、RPC155-D はそれぞれ 6 例 (55%)、2 例 (18%)、1 例 (9%)、11 例 (100%)、3 例 (27%) の抗 RNA P 抗体陽性血清により認識され、RPC62、RPC155 分子上には自己抗体と反応する複数のエピトープが存在することが示された。特に、RPC155-C は抗 RNA P 抗体が陽性の全例により認識されたが、抗 RNA P 抗体陰性強皮症及び健常人の血清には認識されなかった。したがって、抗 RNA P 抗体陽性血清により共通して認識されるエピトープは、RPC155-C に存在する可能性が考えられた。

【0034】実施例 2D (RPC155 上の主要なエピトープ領域の同定)

さらに詳細に RPC155-C に含まれるエピトープ領域を調べるため、RPC155-C の N 及び C 末端から短くした C1-C5 の 5 つのリコンビナント断片を PCR 法により新たに作製した (図 1 参照)。

抗 RNA P 抗体陽性 11 血清との反応性を免疫プロット法により検討すると、全ての血清は C3 と C4 を認識したが、C1、C2、C5 とは反応しなかった。さらに C3 と C4 の共通部分をコードする C-a から C-g までの 7 つのリコンビナント断片を、配列番号 1 に示される塩基配列からなる C-c や配列番号 3 に示される塩基配列からなる C-g 等の配列情報に基づいて作製し (図 1 参照)、同様に抗 RNA P 抗体陽性 11 血清との反応性を調べた。抗 RNA P 抗体陽性のすべての血清は C-c 及び C-g と反応したが、他のリコンビナント断片は認識しなかった。したがって、C-c のコードする RPC155 の AA891-1020 に強皮症患者血清中の抗 RNA P 抗体により共通して認識されるエピトープが存在することが明らかとなった。ただし、一部の血清で C-c に対する反応性が C-g に対する反応性に比べて非常に弱かったため、患者血清中の抗体との強い結合には C-g に余分に含まれるアミノ酸部分も必要であることが推測された。C-g に対する反応性が強皮症患者血清中の抗 RNA P 抗体に特異的であることを確認するため、多数例を用いた免疫プロット法による検討を行った。その結果、C-g に対する反応性は抗 RNA P 抗体陽性強皮症 16 例全例で検出されたが、抗 RNA P 抗体陰性強皮症 5 例、健常人 26 例では検出されなかった。

【0035】実施例 2E (抗 RNA P 抗体検出のための ELISA 法の確立)

C-c、C-g とともに抗 RNA P 抗体により共通して認識されるエピトープを含んでいたが、一部の血清で C-c に対する反応性が C-g に対する反応性に比べて非常に弱かったため、抗 RNA P 抗体の検出には C-c よりも C-g の方が適していると判断した。そこで、C-g を大腸菌で発現させた後にアフィニティーカラムにより精製し、ELISA の抗原として用いた。図 2 に示す通り、従来の免疫沈降法により抗 RNA P 抗体が陽性の血清は全て抗 C-g 抗体高値を示したが、抗 RNA P 抗体陰性の強皮症血清、コントロールとして用いた SLE 患

17

者血清、健常人血清ではC - g に対する反応性はいずれも低値であった。健常人の平均 + 5 x 標準偏差である 4 . 1 5 ユニットをカットオフとすると、抗C - g 抗体の陽性頻度は、抗RNA P 抗体陽性例で100%、他では0%となり、C - g を用いたELISAは感度、特異性とも100%のきわめて優れた抗RNA P 抗体の検出法であることがわかった。

【0036】

【発明の効果】本発明により強皮症患者血清中の抗RN

18

AP 抗体により共通して認識されるRNA P サブユニットのエピトープ部位が同定され、その領域を含むリコンビナント蛋白を用いることでELISAなどによる抗RNA P 抗体の簡便な検出法の開発が可能となった。本検出法をキット化して一般臨床検査室でも抗RNA P 抗体の測定が可能となれば、強皮症患者の生命予後の改善にも貢献すると考えられる。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> KEIO UNIVERSITY
<120> Diagnostic drugs for scleroderma
<130> 000000251
<140>
<141>
<160> 48
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 390
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(390)
<400> 1
cga agc tct act ggc gat att atc cag ttc
att tat gga gga gat ggc 48
Arg Ser Ser Thr Gly Asp Ile Ile Gln Phe
Ile Tyr Gly Gly Asp Gly
1 5 10 15
tta gat cct gca gct atg gag gga aaa gat
gaa cct ttg gag ttt aaa 96
Leu Asp Pro Ala Ala Met Glu Gly Lys Asp
Glu Pro Leu Glu Phe Lys
20 25 30
agg gtt ctg gac aac atc aaa gca gtc ttc
ccg tgt ccc agt gag cct 144
Arg Val Leu Asp Asn Ile Lys Ala Val Phe
Pro Cys Pro Ser Glu Pro
35 40 45
gct ctc agc aaa aac gag ctg atc ctg acc
aca gag tcc atc atg aag 192
Ala Leu Ser Lys Asn Glu Leu Ile Leu Thr
Thr Glu Ser Ile Met Lys
50 55 60
aag agt gag ttc ctc tgc tgc cag gac agc
ttc ctg cag gaa ata aaa 240
Lys Ser Glu Phe Leu Cys Cys Gln Asp Ser
Phe Leu Gln Glu Ile Lys
65 70 75 80

```

Arg Asp
 130 19

<210> 2
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

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

Lys Phe Ile Lys Gly Val Ser Glu Lys Ile
 Lys Lys Thr Arg Asp Lys
 85 90 95
~~210~~ Ile Asn Asp Asn Gly Thr Thr Glu
~~211~~ Val Leu Tyr Gln
~~212~~ DNA 100 105 110
~~213~~ Homo sapiens
~~400~~ Lys Phe Ile Lys Gly Val Ser Glu Lys Ile
~~130~~ Lys Lys Thr Arg Asp Lys
 <221> CD 15 120 125
 A221(1)..(570)
 <400> 30

cga agc tct act ggc gat att atc cag ttc
 att tat gga gga gat ggc 48
 Arg Ser Ser Thr Gly Asp Ile Ile Gln Phe
 Ile Tyr Gly Gly Asp Gly
 1 5 10 15
 tta gat cct gca gct atg gag gga aaa gat
 gaa cct ttg gag ttt aaa 96
 Leu Asp Pro Ala Ala Met Glu Gly Lys Asp
 Glu Pro Leu Glu Phe Lys
 20 25 30
 agg gtt ctg gac aac atc aaa gca gtc ttc
 ccg tgt ccc agt gag cct 144
 Arg Val Leu Asp Asn Ile Lys Ala Val Phe
 Pro Cys Pro Ser Glu Pro
 35 40 45
 gct ctc agc aaa aac gag ctg atc ctg acc
 aca gag tcc atc atg aag 192
 Ala Leu Ser Lys Asn Glu Leu Ile Leu Thr

aaa ttc att aag ggg gtc tct gag aag atc
 aag aaa acc aga gat aaa 288
 Lys Phe Ile Lys Gly Val Ser Glu Lys Ile
 Lys Lys Thr Arg Asp Lys
 85 90 95
 tat ggc atc aat gat aac ggc aca aca gag
 ccc cgt gtg ctg tac cag 336
 Tyr Gly Ile Asn Asp Asn Gly Thr Thr Glu
 Pro Arg Val Leu Tyr Gln
 100 105 110
 ctg gac cgc atc acc ccc acc caa gta gaa
 aag ttt ctg gag acc tgt 384
 Leu Asp Arg Ile Thr Pro Thr Gln Val Glu
 Lys Phe Leu Glu Thr Cys
 115 120 125
 agg gac aag tac atg agg gca cag atg gag
 cct ggt tct gca gtg ggt 432
 Arg Asp Lys Tyr Met Arg Ala Gln Met Glu
 Pro Gly Ser Ala Val Gly
 130 135 140
 gct ctg ~~gct~~ gcc cag agc att ggt gag cca
 ggc acc cag atg acc ctg 480
~~A210Leu~~ Cys Ala Gln Ser Ile Gly Glu Pro
~~G211Thr~~ Gln Met Thr Leu
~~4252>~~ PRT 150 155 1
~~6013>~~ Homo sapiens
~~ad00ac4~~ ttc cac ttt gca ggt gtg gcc tcc
~~Atg Sac Sec Tbc Gty Gsp~~ Ile Gln Phe
~~Lys Tyr Bly Bly Rbp Gly~~ Gly Val Ala Ser
 Met Asn Ile Thr Leu Gly 10 15
 Leu Asp Pro Ala ~~A65~~ Met Glu Gly Lys ~~A30~~ 175
~~Gtg Eco Cgg Gtu Bhe Ggg~~ atc atc aac gct
 tcc aag gcc ~~a20~~ 570 25 30
~~Wag Pab Aeg Asp Lys Glu Lys Ala Wam Rha~~
~~Boo Cys Rfa See~~ Glu Pro
 35 180 40 185 45 190
 Ala Leu Ser Lys Asn Glu Leu Ile Leu Thr
 Thr Glu Ser Ile Met Lys
 50 55 60
 Lys Ser Glu Phe Leu Cys Cys Gln Asp Ser
 Phe Leu Gln Glu Ile Lys
 65 70 75 80

 Lys Phe Ile Lys Gly Val Ser Glu Lys Ile
 Lys Lys Thr Arg Asp Lys
 85 90 95
 Tyr Gly Ile Asn Asp Asn Gly Thr Thr Glu
 Pro Arg Val Leu Tyr Gln
 100 105 110
 Leu Asp Arg Ile Thr Pro Thr Gln Val Glu
 Lys Phe Leu Glu Thr Cys
 115 120 125
 Arg Asp Lys Tyr Met Arg Ala Gln Met Glu

21 180 185 190
 <210> 5
 <211> 4176
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(4176)
 <400> 5
 atg gtg aag gag cag ttc cgg gag acg gat
 gtg gcc aag aaa aca agc 48
 Met Val Lys Glu Gln Phe Arg Glu Thr Asp
 Val Ala Lys Lys Thr Ser
 1 5 10 15
 cac atc tgt ttt gga atg aag tca cct gag
 gag atg cgc cag cag gcg 96
 His Ile Cys Phe Gly Met Lys Ser Pro Glu
 Glu Met Arg Gln Gln Ala
 20 25 30
 cac atc caa gtt gtg agt aag aac ctg tac
 agc cag gac aac caa cat 144
 His Ile Gln Val Val Ser Lys Asn Leu Tyr
 Ser Gln Asp Asn Gln His
 35 40 45
 gcc ccc ttg cta tat ggg gtg ctc gac cat
 agg atg ggt acg agt gag 192
 Ala Pro Leu Leu Tyr Gly Val Leu Asp His
 Arg Met Gly Thr Ser Glu
 50 55 60
 aag gat cgt cca tgt gaa acc tgt ggg aaa
 aac ttg gct gac tgt cta 240
 Lys Asp Arg Pro Cys Glu Thr Cys Gly Lys
 Asn Leu Ala Asp Cys Leu
 65 70 75 80
 ggc cac tat ggg tat atc gac ctg gag ttg
 ccg tgt ttt cat gta ggg 288
 Gly His Tyr Gly Tyr Ile Asp Leu Glu Leu
 Pro Cys Phe His Val Gly
 85 90 95
 tac ttc aga gca gtc ata ggc atc tta cag
 atg atc tgc aaa acc tgc 336
 Tyr Phe Arg Ala Val Ile Gly Ile Leu Gln
 Met Ile Cys Lys Thr Cys
 100 105 110
 tgc cac atc atg ctg tcc caa gag gag aag
 aag cag ttt ctg gac tat 384
 Cys His Ile Met Leu Ser Gln Glu Glu Lys
 Lys Gln Phe Leu Asp Tyr
 115 120 125
 cta aag agg ccc ggc ctg acc tac ctt cag
 aag cga gga ctg aaa aag 432

Pro Leu Leu Gly Arg Ala Gln Glu Asn Leu
 Asn Pro Leu Val Val Leu
 210 215 220
 aat tta ttt aaa cga atc cca gct gaa gat
 gtt cct cta ctt ctg atg 720
 Asn Leu Phe Lys Arg Ile Pro Ala Glu Asp
 Val Pro Leu Leu Leu Met
 225 230 235 2
 40
 aac cca gaa gcc gga aag ccg tct gat ttg
 att ctc aca cga ctt ttg 768
 Asn Pro Glu Ala Gly Lys Pro Ser Asp Leu
 Ile Leu Thr Arg Leu Leu
 245 250 255
 gtg cct cct ttg tgt ttc aga ccc tcc gtt
 gtg agt gat ttg aag tct 816
 Val Pro Pro Leu Cys Phe Arg Pro Ser Val
 Val Ser Asp Leu Lys Ser
 260 265 270
 ggc acc aat gaa gat gat ctg aca atg aaa
 ctg aca gaa atc att ttc 864
 Gly Thr Asn Glu Asp Asp Leu Thr Met Lys
 Leu Thr Glu Ile Ile Phe
 275 280 285
 cta aac gat gtt att aaa aag cat cgg atc
 tca gga gcc aag acc cag 912
 Leu Asn Asp Val Ile Lys Lys His Arg Ile
 Ser Gly Ala Lys Thr Gln
 290 295 300
 atg atc atg gag gac tgg gat ttc ctg cag
 ctg cag tgt gcc ctc tac 960
 Met Ile Met Glu Asp Trp Asp Phe Leu Gln
 Leu Gln Cys Ala Leu Tyr
 305 310 315 3
 20
 att aac agt gag ctc tcg ggc att ccc ctc
 aac atg gca ccc aag aag 1008
 Ile Asn Ser Glu Leu Ser Gly Ile Pro Leu
 Asn Met Ala Pro Lys Lys
 325 330 335
 tgg acc aga ggc ttc gtc caa cgc ctg aag
 gga aaa cag ggt cga ttt 1056
 Trp Thr Arg Gly Phe Val Gln Arg Leu Lys
 Gly Lys Gln Gly Arg Phe
 340 345 350
 aga gga aat ctc tca gga aag aga gtg gat
 ttt tct ggc aga aca gtc 1104
 Arg Gly Asn Leu Ser Gly Lys Arg Val Asp
 Phe Ser Gly Arg Thr Val
 355 360 365
 atc tcg ccc gac ccc aac ctc cgg att gat
 gag gta gct gtg cca gtt 1152
 Ile Ser Pro Asp Pro Asn Leu Arg Ile Asp

aag ccc cac cgg acc ttc aga ttt aat gag
tgt gtc tgt aca ccc tat 1488
Lys Pro His Arg Thr Phe Arg Phe Asn Glu
Cys Val Cys Thr Pro Tyr
485 490 495
aat gct gac ttt gat ggt gat gaa atg aac
ctt cat ctt cct caa aca 1536
Asn Ala Asp Phe Asp Gly Asp Glu Met Asn
Leu His Leu Pro Gln Thr
500 505 510
gaa gaa gct aaa gca gag gcc ctt gtt ctg
atg ggg act aaa gca aat 1584
Glu Glu Ala Lys Ala Glu Ala Leu Val Leu
Met Gly Thr Lys Ala Asn
515 520 525
ctt gta acc ccg agg aat ggg gaa ccg ctg
att gct gct att cag gat 1632
Leu Val Thr Pro Arg Asn Gly Glu Pro Leu
Ile Ala Ala Ile Gln Asp
530 535 540
ttt cta aca ggt gcc tat ctc ctc act ctc
aag gac act ttc ttt gat 1680
Phe Leu Thr Gly Ala Tyr Leu Leu Thr Leu
Lys Asp Thr Phe Phe Asp
545 550 555 5
60
cga gcc aag gct tgc caa atc att gct tca
ata ctg gtt ggc aag gat 1728
Arg Ala Lys Ala Cys Gln Ile Ile Ala Ser
Ile Leu Val Gly Lys Asp
565 570 575
gag aaa att aaa gtt cgc ctc cca ccg cct
aca atc cta aag cct gtc 1776
Glu Lys Ile Lys Val Arg Leu Pro Pro Pro
Thr Ile Leu Lys Pro Val
580 585 590
acc ctg tgg acg gga aag cag atc ttc agt
gtc atc ctc agg cct agc 1824
Thr Leu Trp Thr Gly Lys Gln Ile Phe Ser
Val Ile Leu Arg Pro Ser
595 600 605
gat gac aat cca gtg agg gcc aac ctg cga
acc aag ggc aag cag tac 1872
Asp Asp Asn Pro Val Arg Ala Asn Leu Arg
Thr Lys Gly Lys Gln Tyr
610 615 620
tgt ggc aaa ggg gaa gat ctc tgt gcc aat
gat tcc tat gtt aca atc 1920
Cys Gly Lys Gly Glu Asp Leu Cys Ala Asn
Asp Ser Tyr Val Thr Ile
625 630 635 6
40
cag aac agt gag ttg atg agt ggc agc atg

740 745 750
 ctg aag gag ctg tct gtg atc cgt gac cac
 gct ggc agt gcc tgc ctc 2304
 Leu Lys Glu Leu Ser Val Ile Arg Asp His
 Ala Gly Ser Ala Cys Leu
 755 760 765
 cgg gag ctg gac aag agc aac agc ccc ctc
 acc atg gct ctg tgc ggc 2352
 Arg Glu Leu Asp Lys Ser Asn Ser Pro Leu
 Thr Met Ala Leu Cys Gly
 770 775 780
 tcc aaa ggt tcc ttc att aac ata tca cag
 atg att gcc tgt gtg gga 2400
 Ser Lys Gly Ser Phe Ile Asn Ile Ser Gln
 Met Ile Ala Cys Val Gly
 785 790 795 8
 00
 cag cag gcc atc agt ggc tct cga gtg cca
 gac ggc ttt gaa aac agg 2448
 Gln Gln Ala Ile Ser Gly Ser Arg Val Pro
 Asp Gly Phe Glu Asn Arg
 805 810 815
 tcc ttg cct cat ttt gaa aaa cac tca aag
 ctc cca gct gcc aaa ggc 2496
 Ser Leu Pro His Phe Glu Lys His Ser Lys
 Leu Pro Ala Ala Lys Gly
 820 825 830
 ttt gtg gct aat agc ttt tat tcc ggt ttg
 aca cca act gag ttt ttc 2544
 Phe Val Ala Asn Ser Phe Tyr Ser Gly Leu
 Thr Pro Thr Glu Phe Phe
 835 840 845
 ttc cac aca atg gcc ggc cgg gaa ggt cta
 gtc gac acg gct gta aag 2592
 Phe His Thr Met Ala Gly Arg Glu Gly Leu
 Val Asp Thr Ala Val Lys
 850 855 860
 aca gct gaa acg gga tac atg cag cga agg
 ctt gtc aaa tct ctt gaa 2640
 Thr Ala Glu Thr Gly Tyr Met Gln Arg Arg
 Leu Val Lys Ser Leu Glu
 865 870 875 8
 80
 gat ctt tgc tcc cag tat gat ctg aca gtc
 cga agc tct act ggc gat 2688
 Asp Leu Cys Ser Gln Tyr Asp Leu Thr Val
 Arg Ser Ser Thr Gly Asp
 885 890 895
 att atc cag ttc att tat gga gga gat ggc
 tta gat cct gca gct atg 2736
 Ile Ile Gln Phe Ile Tyr Gly Gly Asp Gly
 Leu Asp Pro Ala Ala Met
 900 905 910

Thr Gln Val Glu Lys Phe Leu Glu Thr Cys
 Arg Asp Lys Tyr Met Arg
 1010 1015 1020
 gca cag atg gag cca ggt tct gca gtg ggt
 gct ctg tgt gcc cag agc 3120
 Ala Gln Met Glu Pro Gly Ser Ala Val Gly
 Ala Leu Cys Ala Gln Ser
 1025 1030 1035
 1040
 att ggt gag cca ggc acc cag atg acc ctg
 aag act ttc cac ttt gga 3168
 Ile Gly Glu Pro Gly Thr Gln Met Thr Leu
 Lys Thr Phe His Phe Gly
 1045 1050 1055

 ggt gtg gcc tcc atg aac atc acc ctg ggc
 gtg ccc cgg att aaa gag 3216
 Gly Val Ala Ser Met Asn Ile Thr Leu Gly
 Val Pro Arg Ile Lys Glu
 1060 1065 1070
 atc atc aac gct tcc aag gcc atc agc act
 cca att atc aca gca cag 3264
 Ile Ile Asn Ala Ser Lys Ala Ile Ser Thr
 Pro Ile Ile Thr Ala Gln
 1075 1080 1085
 cta gac aag gat gac gac gcg gat tat gct
 cgc ctc gtg aaa ggg aga 3312
 Leu Asp Lys Asp Asp Asp Ala Asp Tyr Ala
 Arg Leu Val Lys Gly Arg
 1090 1095 1100
 att gag aaa acc ctc ttg gga gag att tcc
 gag tat att gaa gaa gtg 3360
 Ile Glu Lys Thr Leu Leu Gly Glu Ile Ser
 Glu Tyr Ile Glu Glu Val
 1105 1110 1115
 1120
 ttt ctt cct gat gac tgc ttt att ctc gtc
 aag ctc tcc ctg gaa cgg 3408
 Phe Leu Pro Asp Asp Cys Phe Ile Leu Val
 Lys Leu Ser Leu Glu Arg
 1125 1130 1135

 att agg ctt ctg aga ctg gaa gtg aac gct
 gag aca gtg aga tat tcc 3456
 Ile Arg Leu Leu Arg Leu Glu Val Asn Ala
 Glu Thr Val Arg Tyr Ser
 1140 1145 1150
 atc tgc aca tcc aag ctc cgt gtg aag ccc
 ggt gat gtg gct gtt cat 3504
 Ile Cys Thr Ser Lys Leu Arg Val Lys Pro
 Gly Asp Val Ala Val His
 1155 1160 1165
 ggt gag gct gtg gtg tgt gtc acc ccc aga

atg agc atc gac agg agg cac gtg atg ctg
 ctc tcc gac ctc atg acc 3888
 Met Ser Ile Asp Arg Arg His Val Met Leu
 Leu Ser Asp Leu Met Thr
 1285 1290 1295

tac aag ggt gaa gtc ctg ggc atc act agg
 ttt ggc ctg gcc aag atg 3936
 Tyr Lys Gly Glu Val Leu Gly Ile Thr Arg
 Phe Gly Leu Ala Lys Met
 1300 1305 1310

aag gag agt gtg ctg atg ctg gcc tcc ttt
 gag aag acg gct gac cat 3984
 Lys Glu Ser Val Leu Met Leu Ala Ser Phe
 Glu Lys Thr Ala Asp His
 1315 1320 1325

ctc ttt gac gct gcc tac ttc ggg cag aag
 gac tct gtg tgt ggg gtg 4032
 Leu Phe Asp Ala Ala Tyr Phe Gly Gln Lys
 Asp Ser Val Cys Gly Val
 1330 22 1335 1340

tct gag tgc atc atc atg gga atc cca atg
 aat cat gga acc ggg ctc 4080
 Ser Ile Ile Met Gly Ile Pro Met
 Asp Thr Gly Leu
 <245> Homo sapiens 1350 1355
 <4000 6

Met Val Cys Glu Glu Arg Gln Glu Arg Asp
 Val Ala Cys Cys Arg Ser
 Phe Lys Leu Leu His Lys Ala Asp Arg Asp 15
 Phe Ala Cys Phe Gly Met Lys Ser Pro Glu
 Glu Met Arg Gln Ala 1370 1375
 20 25 30

His ctg Gln Val Val Ser Arg Gln Leu Cys
 Ser Gln Asp Gln Gln Arg 4176
 Pro Leu Ile Phe Asp Thr Asn Gln Phe His 45
 Ala Pro Leu Val Tyr Gly Val Leu Asp His
 Arg Met Gly Ser Glu 1385 1390
 50 55 60

Lys Asp Arg Pro Cys Glu Thr Cys Gly Lys
 Asn Leu Ala Asp Cys Leu
 65 70 75 80

Gly His Tyr Gly Tyr Ile Asp Leu Glu Leu
 Pro Cys Phe His Val Gly
 85 90 95

Tyr Phe Arg Ala Val Ile Gly Ile Leu Gln
 Met Ile Cys Lys Thr Cys
 100 105 110

Cys His Ile Met Leu Ser Gln Glu Glu Lys
 Lys Gln Phe Leu Asp Tyr
 115 120 125

Leu Lys Arg Pro Gly Leu Thr Tyr Leu Gln

	180		185		190	
Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Glu	Thr
His	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	
	195		200		205	
Pro	Leu	Leu	Gly	Arg	Ala	Gln
Asn	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Asn
	210		215		220	
Asn	Leu	Phe	Lys	Arg	Ile	Pro
Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Met	Glu
225			230		235	2
40						
Asn	Pro	Glu	Ala	Gly	Lys	Pro
Ile	Leu	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser
			245		250	
Val	Pro	Pro	Leu	Cys	Phe	Arg
Val	Ser	Asp	Leu	Lys	Ser	Pro
			260		265	
Gly	Thr	Asn	Glu	Asp	Asp	Leu
Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Phe	Thr
			275		280	
Leu	Asn	Asp	Val	Ile	Lys	Lys
Ser	Gly	Ala	Lys	Thr	Gln	His
			290		295	
Met	Ile	Met	Glu	Asp	Trp	Asp
Leu	Gln	Cys	Ala	Leu	Tyr	Phe
305				310		315
20						3
Ile	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly
Asn	Met	Ala	Pro	Lys	Lys	Ile
						330
			325			335
Trp	Thr	Arg	Gly	Phe	Val	Gln
Gly	Lys	Gln	Gly	Arg	Phe	Arg
			340			345
Arg	Gly	Asn	Leu	Ser	Gly	Lys
Phe	Ser	Gly	Arg	Thr	Val	Arg
			355			360
Ile	Ser	Pro	Asp	Pro	Asn	Leu
Glu	Val	Ala	Val	Pro	Val	Arg
			370			375
His	Val	Ala	Lys	Ile	Leu	Thr
Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Asn	Phe
385				390		395
00						4
Ile	Asn	Phe	Leu	Arg	Lys	Leu
Gly	Pro	Glu	Val	His	Pro	Val
			405			410
Gly	Ala	Asn	Phe	Ile	Gln	Gln
Gln	Met	Lys	Arg	Phe	Leu	Arg
			420			425
Lys	Tyr	Gly	Asn	Arg	Glu	Lys
Glu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Asp	Met
			435			440
Ile	Val	Glu	Arg	His	Leu	Ile
						445

	580		585		590				
Thr	Leu	Trp	Thr	Gly	Lys	Gln	Ile	Phe	Ser
Val	Ile	Leu	Arg	Pro	Ser				
	595		600		605				
Asp	Asp	Asn	Pro	Val	Arg	Ala	Asn	Leu	Arg
Thr	Lys	Gly	Lys	Gln	Tyr				
	610		615		620				
Cys	Gly	Lys	Gly	Glu	Asp	Leu	Cys	Ala	Asn
Asp	Ser	Tyr	Val	Thr	Ile				
625			630		635				6
40									
Gln	Asn	Ser	Glu	Leu	Met	Ser	Gly	Ser	Met
Asp	Lys	Gly	Thr	Leu	Gly				
			645		650				655
Ser	Gly	Ser	Lys	Asn	Asn	Ile	Phe	Tyr	Ile
Leu	Leu	Arg	Asp	Trp	Gly				
			660		665				670
Gln	Asn	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Arg
Leu	Ala	Arg	Leu	Ala	Pro				
			675		680				685
Val	Tyr	Leu	Ser	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Ile
Gly	Ile	Gly	Asp	Val	Thr				
	690				695				700
Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr
Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Gly				
705			710		715				7
20									
Tyr	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Ile	Glu	Ala
Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu				
			725		730				735
Gln	Gln	Gln	Pro	Gly	Cys	Thr	Ala	Glu	Glu
Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Ile				
			740		745				750
Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asp	His
Ala	Gly	Ser	Ala	Cys	Leu				
			755		760				765
Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Ser	Pro	Leu
Thr	Met	Ala	Leu	Cys	Gly				
			770		775				780
Ser	Lys	Gly	Ser	Phe	Ile	Asn	Ile	Ser	Gln
Met	Ile	Ala	Cys	Val	Gly				
785			790		795				8
00									
Gln	Gln	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Arg	Val	Pro
Asp	Gly	Phe	Glu	Asn	Arg				
			805		810				815
Ser	Leu	Pro	His	Phe	Glu	Lys	His	Ser	Lys
Leu	Pro	Ala	Ala	Lys	Gly				
			820		825				830
Phe	Val	Ala	Asn	Ser	Phe	Tyr	Ser	Gly	Leu
Thr	Pro	Thr	Glu	Phe	Phe				
			835		840				845
Phe	His	Thr	Met	Ala	Gly	Arg	Glu	Gly	Leu

	980	985	990
Gly Thr Thr Glu Pro Arg Val Leu Tyr Gln			
Leu Asp Arg Ile Thr Pro			
	995	1000	1005
Thr Gln Val Glu Lys Phe Leu Glu Thr Cys			
Arg Asp Lys Tyr Met Arg			
	1010	1015	1020
Ala Gln Met Glu Pro Gly Ser Ala Val Gly			
Ala Leu Cys Ala Gln Ser			
	1025	1030	1035
1040			
Ile Gly Glu Pro Gly Thr Gln Met Thr Leu			
Lys Thr Phe His Phe Gly			
	1045	1050	1055
Gly Val Ala Ser Met Asn Ile Thr Leu Gly			
Val Pro Arg Ile Lys Glu			
	1060	1065	1070
Ile Ile Asn Ala Ser Lys Ala Ile Ser Thr			
Pro Ile Ile Thr Ala Gln			
	1075	1080	1085
Leu Asp Lys Asp Asp Ala Asp Tyr Ala			
Arg Leu Val Lys Gly Arg			
	1090	1095	1100
Ile Glu Lys Thr Leu Leu Gly Glu Ile Ser			
Glu Tyr Ile Glu Glu Val			
	1105	1110	1115
1120			
Phe Leu Pro Asp Asp Cys Phe Ile Leu Val			
Lys Leu Ser Leu Glu Arg			
	1125	1130	1135
Ile Arg Leu Leu Arg Leu Glu Val Asn Ala			
Glu Thr Val Arg Tyr Ser			
	1140	1145	1150
Ile Cys Thr Ser Lys Leu Arg Val Lys Pro			
Gly Asp Val Ala Val His			
	1155	1160	1165
Gly Glu Ala Val Val Cys Val Thr Pro Arg			
Glu Asn Ser Lys Ser Ser			
	1170	1175	1180
Met Tyr Tyr Val Leu Gln Phe Leu Lys Glu			
Asp Leu Pro Lys Val Val			
	1185	1190	1195
1200			
Val Gln Gly Ile Pro Glu Val Ser Arg Ala			
Val Ile His Ile Asp Glu			
	1205	1210	1215
Gln Ser Gly Lys Glu Lys Tyr Lys Leu Leu			
Val Glu Gly Asp Asn Leu			
	1220	1225	1230
Arg Ala Val Met Ala Thr His Gly Val Lys			

1380 1385 1390
 <210> 7
 <211> 1122
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1122)
 <400> 7
 atg gtg aag gag cag ttc cgg gag acg gat
 gtg gcc aag aaa ata agc 48
 Met Val Lys Glu Gln Phe Arg Glu Thr Asp
 Val Ala Lys Lys Ile Ser
 1 5 10 15
 cac atc tgt ttt gga atg aag tca cct gag
 gag atg cgc cag cag gcg 96
 His Ile Cys Phe Gly Met Lys Ser Pro Glu
 Glu Met Arg Gln Gln Ala
 20 25 30
 cac atc caa gtt gtg agt aag aac ctg tac
 agc cag gac aac caa cat 144
 His Ile Gln Val Val Ser Lys Asn Leu Tyr
 Ser Gln Asp Asn Gln His
 35 40 45
 gcc ccc ttg cta tat ggg gtg ctc gac cat
 agg atg ggt acg agt gag 192
 Ala Pro Leu Leu Tyr Gly Val Leu Asp His
 Arg Met Gly Thr Ser Glu
 50 55 60
 aag gat cgt cca tgt gaa acc tgt ggg aaa
 aac ttg gct gac tgt cta 240
 Lys Asp Arg Pro Cys Glu Thr Cys Gly Lys
 Asn Leu Ala Asp Cys Leu
 65 70 75 80
 ggc cac tat ggg tat atc gac ctg gag ttg
 ccg tgt ttt cat gta ggg 288
 Gly His Tyr Gly Tyr Ile Asp Leu Glu Leu
 Pro Cys Phe His Val Gly
 85 90 95
 tac ttc aga gca gtc ata ggc atc tta cag
 atg atc tgc aaa acc tgc 336
 Tyr Phe Arg Ala Val Ile Gly Ile Leu Gln
 Met Ile Cys Lys Thr Cys
 100 105 110
 tgc cac atc atg ctg tcc caa gag gag aag
 aag cag ttt ctg gac tat 384
 Cys His Ile Met Leu Ser Gln Glu Glu Lys
 Lys Gln Phe Leu Asp Tyr
 115 120 125
 cta aag agg ccc ggc ctg acc tac ctt cag
 aag cga gga ctg aaa aag 432
 Leu Lys Arg Pro Gly Leu Thr Tyr Leu Gln

Cys His Ile Met Leu Ser Gln Glu Glu Lys
 Lys Gln Phe Leu Asp Tyr
 115 120 125
 Leu Lys Arg Pro Gly Leu Thr Tyr Leu Gln
 Lys Arg Gly Leu Lys Lys
 130 135 140
 Lys Ile Ser Asp Lys Cys Arg Lys Lys Asn
 Ile Cys His His Cys Gly
 145 150 155 1
 60
 Ala Phe Asn Gly Thr Val Lys Lys Cys Gly
 Leu Leu Lys Ile Ile His
 165 170 175
 Glu Lys Tyr Lys Thr Asn Lys Lys Val Val
 Asp Pro Ile Val Ser Asn
 180 185 190
 Phe Leu Gln Ser Phe Glu Thr Ala Ile Glu
 His Asn Lys Glu Val Glu
 195 200 205
 Pro Leu Leu Gly Arg Ala Gln Glu Asn Leu
 Asn Pro Leu Val Val Leu
 210 215 220
 Asn Leu Phe Lys Arg Ile Pro Ala Glu Asp
 Val Pro Leu Leu Leu Met
 225 230 235 2
 40
 Asn Pro Glu Ala Gly Lys Pro Ser Asp Leu
 Ile Leu Thr Arg Leu Leu
 245 250 255
 Val Pro Pro Leu Cys Ile Arg Pro Ser Val
 Val Ser Asp Leu Lys Ser
 260 265 270
 Gly Thr Asn Glu Asp Asp Leu Thr Met Lys
 Pro Thr Gln Ile Ile Phe
 275 280 285
 Lys Asn Asp Val Ile Lys Lys His Arg Ile
 Ser Ile Ala Lys Thr Gln
 <21229DNA 295 300
 Met Ile Met Asp Trp Asp Phe Leu Gln
 Lys In Cys Ala Leu Tyr
 300 > CDS 310 315 3
 2022> (1)..(87)
 Lys Ser Glu Leu Ser Gly Ile Pro Leu
 Arg Met Ala Gln Lys Lys ccc gac ccc aac
 ctc cgg att gat GAG gta 48 330 335
 GTP Arg Arg Gln Phe Ser Gln Asp Phe Asp
 Gln Arg Gln Asp Arg Phe
 1 340 5 345 10 350 15
 GCG GTC ACA GCG GAT GTG GGC AAG GAT ASP
 GCG GAT GCG Arg Thr Val 87
 Ala Val 355 Val His Val Ala 360 Ile Leu 365
 The Gln Pro Asp Pro Asn
 370 20 25

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Gly Arg Thr Val Ile Ser Pro Asp Pro Asn
 Leu Arg Ile Asp Glu Val
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val His Val Ala Lys Ile Leu
 Thr Phe Pro
 <210> 11 20 25
 <211> 1305
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1305)
 <400> 11
 aac acg ggc aag ctg cag cag cag cct ggc
 tgc act gct gag gag acc 48
 Asn Thr Gly Lys Leu Gln Gln Gln Pro Gly
 Cys Thr Ala Glu Glu Thr
 1 5 10 15
 ctg gag gca ctg atc ctg aag gag ctg tct
 gtg atc cgt gac cat gct 96
 Leu Glu Ala Leu Ile Leu Lys Glu Leu Ser
 Val Ile Arg Asp His Ala
 20 25 30
 ggc agt gcc tgc ctc cgg gag ctg gac aag
 agc aac agc ccc ctc acc 144
 Gly Ser Ala Cys Leu Arg Glu Leu Asp Lys
 Ser Asn Ser Pro Leu Thr
 35 40 45
 atg gct ctg tgc ggc tcc aaa ggt tcc ttc
 att aac ata tca cag atg 192
 Met Ala Leu Cys Gly Ser Lys Gly Ser Phe
 Ile Asn Ile Ser Gln Met
 50 55 60
 att gcc tgc gtg gga cag cag gcc atc agt
 ggc tct cga gtg cca gac 240
 Ile Ala Cys Val Gly Gln Gln Ala Ile Ser
 Gly Ser Arg Val Pro Asp
 65 70 75 80

 ggc ttt gaa aac agg tcc ttg cct cat ttt
 gaa aaa cac tca aag ctc 288
 Gly Phe Glu Asn Arg Ser Leu Pro His Phe
 Glu Lys His Ser Lys Leu
 85 90 95
 cca gct gcc aaa ggc ttt gtg gct aat agc
 ttt tat tcc ggt ttg aca 336
 Pro Ala Ala Lys Gly Phe Val Ala Asn Ser
 Phe Tyr Ser Gly Leu Thr
 100 105 110

gat cct gca gct atg gag gga aaa gat gaa
cct ttg gag ttt aaa agg 576
Asp Pro Ala Ala Met Glu Gly Lys Asp Glu
Pro Leu Glu Phe Lys Arg
180 185 190
gtt ctg gac aac atc aaa gca gtc ttc ccg
tgt ccc agt gag cct gct 624
Val Leu Asp Asn Ile Lys Ala Val Phe Pro
Cys Pro Ser Glu Pro Ala
195 200 205
ctc agc aaa aac gag ctg atc ctg acc aca
gag tcc atc atg aag aag 672
Leu Ser Lys Asn Glu Leu Ile Leu Thr Thr
Glu Ser Ile Met Lys Lys
210 215 220
agt gag ttc ctc tgc tgc cag gac agc ttc
ctg cag gaa ata aaa aaa 720
Ser Glu Phe Leu Cys Cys Gln Asp Ser Phe
Leu Gln Glu Ile Lys Lys
225 230 235 2
40
ttc att aag ggg gtc tct gag aag atc aag
aaa acc aga gat aaa tat 768
Phe Ile Lys Gly Val Ser Glu Lys Ile Lys
Lys Thr Arg Asp Lys Tyr
245 250 255
ggc atc aat gat aac ggc aca aca gag ccc
cgt gtg ctg tac cag ctg 816
Gly Ile Asn Asp Asn Gly Thr Thr Glu Pro
Arg Val Leu Tyr Gln Leu
260 265 270
gac cgc atc acc ccc acc caa gta gaa aag
ttt ctg gag acc tgt agg 864
Asp Arg Ile Thr Pro Thr Gln Val Glu Lys
Phe Leu Glu Thr Cys Arg
275 280 285
gac aag tac atg agg gca cag atg gag cct
ggg tct gca gtg ggt gct 912
Asp Lys Tyr Met Arg Ala Gln Met Glu Pro
Gly Ser Ala Val Gly Ala
290 295 300
ctg tgt gcc cag agc att ggt gag cca ggc
acc cag atg acc ctg aag 960
Leu Cys Ala Gln Ser Ile Gly Glu Pro Gly
Thr Gln Met Thr Leu Lys
305 310 315 3
20
act ttc cac ttt gca ggt gtg gcc tcc atg
aac atc acc ctg ggc gtg 1008
Thr Phe His Phe Ala Gly Val Ala Ser Met
Asn Ile Thr Leu Gly Val
325 330 335
ccc cgg att aaa gag atc atc aac gct tcc

435
 <210> 12
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Asn Thr Gly Lys Leu Gln Gln Gln Pro Gly
 Cys Thr Ala Glu Glu Thr
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Leu Ile Leu Lys Glu Leu Ser
 Val Ile Arg Asp His Ala
 20 25 30
 Gly Ser Ala Cys Leu Arg Glu Leu Asp Lys
 Ser Asn Ser Pro Leu Thr
 35 40 45
 Met Ala Leu Cys Gly Ser Lys Gly Ser Phe
 Ile Asn Ile Ser Gln Met
 50 55 60
 Ile Ala Cys Val Gly Gln Gln Ala Ile Ser
 Gly Ser Arg Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Phe Glu Asn Arg Ser Leu Pro His Phe
 Glu Lys His Ser Lys Leu
 85 90 95
 Pro Ala Ala Lys Gly Phe Val Ala Asn Ser
 Phe Tyr Ser Gly Leu Thr
 100 105 110
 Pro Thr Glu Phe Phe Phe His Thr Met Ala
 Gly Arg Glu Gly Leu Val
 115 120 125
 Asp Thr Ala Val Lys Thr Ala Glu Thr Gly
 Tyr Met Gln Arg Arg Leu
 130 135 140
 Val Lys Ser Leu Glu Asp Leu Cys Ser Gln
 Tyr Asp Leu Thr Val Arg
 145 150 155 1
 60
 Ser Ser Thr Gly Asp Ile Ile Gln Phe Ile
 Tyr Gly Gly Asp Gly Leu
 165 170 175
 Asp Pro Ala Ala Met Glu Gly Lys Asp Glu
 Pro Leu Glu Phe Lys Arg
 180 185 190
 Val Leu Asp Asn Ile Lys Ala Val Phe Pro
 Cys Pro Ser Glu Pro Ala
 195 200 205
 Leu Ser Lys Asn Glu Leu Ile Leu Thr Thr
 Glu Ser Ile Met Lys Lys
 210 215 220
 Ser Glu Phe Leu Cys Cys Gln Asp Ser Phe
 Leu Gln Glu Ile Lys Lys
 225 230 235 2

Ile Ile Thr Ala Gln Leu Asp Lys Asp Asp
 Asp Ala Asp Tyr Ala Arg
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Arg Ile Glu Lys Thr Leu
 Leu Gly Glu Ile Ser Glu
 370 375 380
 Tyr Ile Glu Glu Val Phe Leu Pro Asp Asp
 Cys Phe Ile Leu Val Lys
 385 390 395 4
 00
 Leu Ser Leu Glu Arg Ile Arg Leu Leu Arg
 Leu Glu Val Asn Ala Glu
 405 410 415
 Thr Val Arg Tyr Ser Ile Cys Thr Ser Lys
 Leu Arg Val Lys Pro Gly
 420 425 430
 Asp Val Ala
 435
 <210> 13
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)
 <400> 13
 gat gac gac gcg gat tat gct cgc ctc gtg
 aaa ggg aga att gag aaa 48
 Asp Asp Asp Ala Asp Tyr Ala Arg Leu Val
 Lys Gly Arg Ile Glu Lys
 1 5 10 15
 acc ctc ttg gga gag att tcc gag tat att
 gaa gaa gtg ttt ctt cct 96
 Thr Leu Leu Gly Glu Ile Ser Glu Tyr Ile
 Glu Glu Val Phe Leu Pro
 20 25 30
 gat gac tgc ttt att ctc gtc aag ctc tcc
 ctg gaa cgg att agg ctt 144
 Asp Asp Cys Phe Ile Leu Val Lys Leu Ser
 Leu Glu Arg Ile Arg Leu
 35 40 45
 ctg aga ctg gaa gtg aac gct gag aca gtg
 aga tat tcc atc tgc aca 192
 Leu Arg Leu Glu Val Asn Ala Glu Thr Val
 Arg Tyr Ser Ile Cys Thr
 50 55 60
 tcc aag ctc cgt gtg aag ccc ggt gat gtg
 gct gtt cat ggt gag gct 240
 Ser Lys Leu Arg Val Lys Pro Gly Asp Val
 Ala Val His Gly Glu Ala
 65 70 75 80
 gtg gtg tgt gtc acc ccc aga gag aac agc

tat gag gtg gag aaa act ctg ggc atc gag
 gcc gcc cgg aca acg atc 528
 Tyr Glu Val Glu Lys Thr Leu Gly Ile Glu
 Ala Ala Arg Thr Thr Ile
 165 170 175
 atc aat gaa atc cag tac acc atg gtg aac
 cac ggc atg agc atc gac 576
 Ile Asn Glu Ile Gln Tyr Thr Met Val Asn
 His Gly Met Ser Ile Asp
 180 185 190
 agg agg cac gtg atg ctg ctc tcc gac ctc
 atg acc tac aag ggt gaa 624
 Arg Arg His Val Met Leu Leu Ser Asp Leu
 Met Thr Tyr Lys Gly Glu
 195 200 205
 gtc ctg ggc atc act agg ttt ggc ctg gcc
 aag atg aag gag agt gtg 672
 Val Leu Gly Ile Thr Arg Phe Gly Leu Ala
 Lys Met Lys Glu Ser Val
 210 215 220
 ctg atg ctg gcc tcc ttt gag aag acg gct
 gac cat ctc ttt gac gct 720
 Leu Met Leu Ala Ser Phe Glu Lys Thr Ala
 Asp His Leu Phe Asp Ala
 225 230 235 2
 40
 gcc tac ttc ggg cag aag gac tct gtg tgt
 ggg gtg tct gag tgc atc 768
 Ala Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ser Val Cys
 Gly Val Ser Glu Cys Ile
 245 250 255
 atc atg gga atc cca atg aac att gga acc
 ggg ctc ttc aag ctg ctt 816
 Ile Met Gly Ile Pro Met Asn Ile Gly Thr
 Gly Leu Phe Lys Leu Leu
 260 265 270
 cac aag gct gac agg gac ccg aac cct ccc
 aag agg ccc ctg atc ttc 864
 His Lys Ala Asp Arg Asp Pro Asn Pro Pro
 Lys Arg Pro Leu Ile Phe
 275 280 285
 gac aca aat gaa ttc cac atc ccc ctt gtc
 aca tag 900
 Asp Thr Asn Glu Phe His Ile Pro Leu Val
 Thr
 290 295 300
 <210> 14
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Asp Asp Asp Ala Asp Tyr Ala Arg Leu Val
 Lys Gly Arg Ile Glu Lys

Met Ala Thr His Gly Val Lys Gly Thr Arg
 Thr Thr Ser Asn Asn Thr
 145 150 155 1

60
 Tyr Glu Val Glu Lys Thr Leu Gly Ile Glu
 Ala Ala Arg Thr Thr Ile
 165 170 175

Ile Asn Glu Ile Gln Tyr Thr Met Val Asn
 His Gly Met Ser Ile Asp
 180 185 190

Arg Arg His Val Met Leu Leu Ser Asp Leu
 Met Thr Tyr Lys Gly Glu
 195 200 205

Val Leu Gly Ile Thr Arg Phe Gly Leu Ala
 Lys Met Lys Glu Ser Val
 210 215 220

Leu Met Leu Ala Ser Phe Glu Lys Thr Ala
 Asp His Leu Phe Asp Ala
 225 230 235 2

40 25
 Ala Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ser Val Cys
 G210> Val15Ser Glu Cys Ile
 <211> 27 245 250 255

<212> DNA
 G213> Artificial Sequence
 <220> 260 265 270

H223> Description of Artificial
 Sequence:RPC62 sense
 primer
 275r 280 285

A400> Thr15Asn Glu Phe His Ile Pro Leu Val
 Ccagactcc ccagtacaat gactcaa
 290 295

<210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC62 antisense
 primer
 <400> 16
 ccaggcacct cctttatattt gctttcc
 27

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-A sense
 primer
 <400> 17
 atggtgaagg agcagttccg gg

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-A
 antisense primer
 <400> 18
 aggttggggt cgggcgagat ga
 22

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-B sense
 primer
 <400> 19
 tggcagaaca gtcattctgc cc
 22

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-B
 antisense primer
 <400> 20
 atcagtcct ccagggtctc ct
 22

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C sense
 primer
 <400> 21
 aacacgggca agctgcagca gca
 23

<210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C
 antisense primer
 <400> 22
 ccatgaacag ccacatcacc gg
 22

<400> 23
aggatgacga cgcgattat gctcgc
26

<210> 24
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-D
antisense primer

<400> 24
ctatgtgaca aggggatgt ggaattc
27

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C1 sense
primer

<400> 25
gggaattcaa cacgggcaag ct
22

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C1
antisense primer

<400> 26
gctctagatc acccatctcc tcca
24

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C2 sense
primer

<400> 27
gggaattcaa cacgggcaag ct
22

<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C3 sense
 primer
 <400> 29
 gggaattcaa cacgggcaag ct
 22
 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C3
 antisense primer
 <400> 30
 cgtctagatc agatggcctt gga
 23
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C4 sense
 primer
 <400> 31
 ccgaattccg aagctctact ggc
 23
 <210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C4
 antisense primer
 <400> 32
 ggtctagatc acagccacat cacc
 24
 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C5 sense
 primer
 <400> 33
 ttgaattcga ccgcatcacc ccc
 23
 <210> 34

ggtctagatc acagccacat cacc

24

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:RPC155-C-a

sense primer

<400> 35

ccgaattccg aagctctact ggc

23

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:RPC155-C-a

antisense primer

<400> 36

ggtctagatc agggcaggaa gctgt

25

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:RPC155-C-b

sense primer

<400> 37

ccgaattccg aagctctact ggc

23

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:RPC155-C-b

antisense primer

<400> 38

actctagatc aggtgatgcg gtc

23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:RPC155-C-c

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C-c
antisense primer
<400> 40
gctctagatc agtcctaca ggt
23
<210> 41
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C-d
sense primer
<400> 41
ggaattcga gtccatcatg aag
23
<210> 42
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C-d
antisense primer
<400> 42
cgtctagatc agatggcctt gga
23
<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC155-C-e
sense primer
<400> 43
gcaattcca ggacagcttc ct
22
<210> 44
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:RPC-C-e
antisense primer
<400> 44
cgtctagatc agatggcctt gga
23
<210> 45
<211> 23

<210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC-C-f
 antisense primer
 <400> 46 26
 cgtctagatc agatggcctt gga
 23

<210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC-C-g sense
 primer
 <400> 47
 ccgaattccg aagctctact ggc
 23

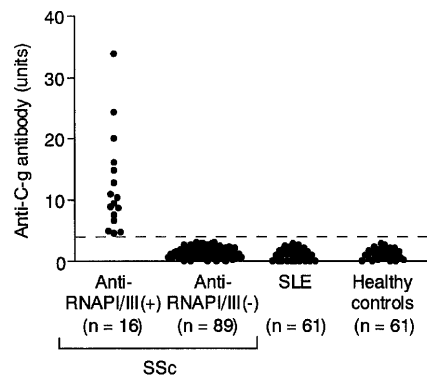
<210> 48
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:RPC155-C-C-g
 antisense primer

27

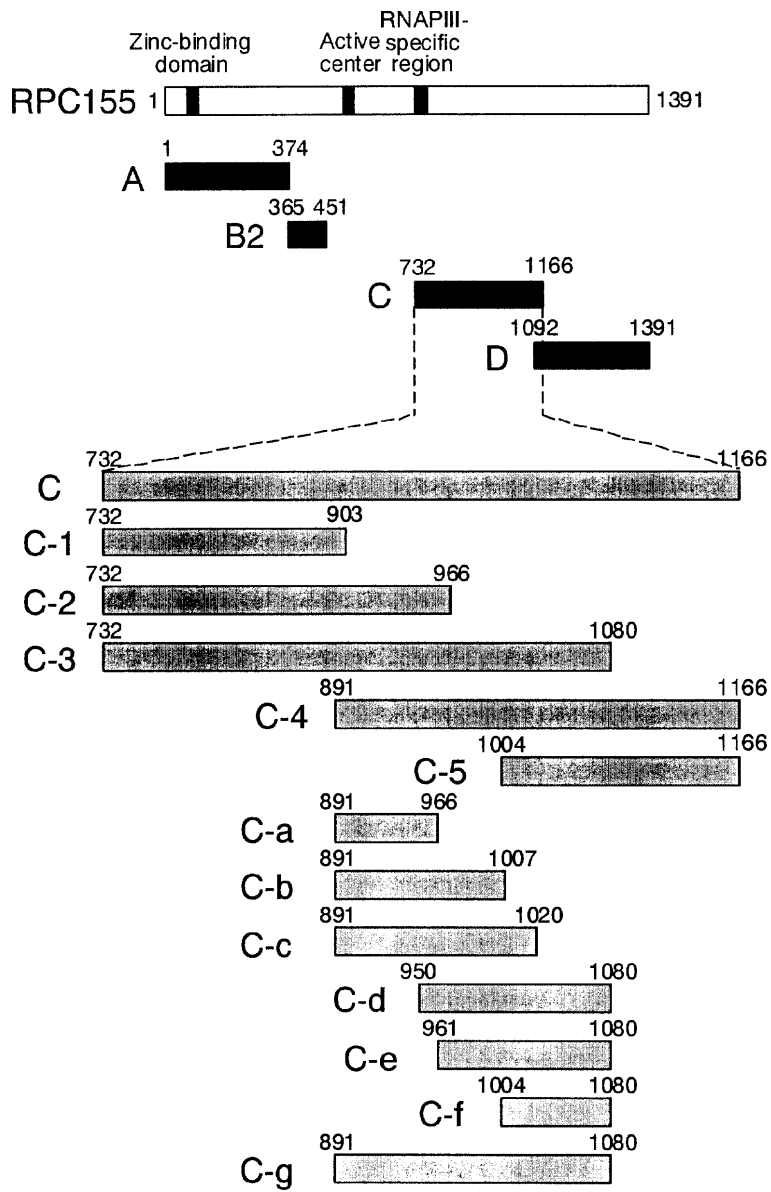
c 【図面の簡単な説明】
 【図 1】強皮症患者血清中の抗 RNA P 抗体により共通して認識される RNAP II の C-terminal の C-g 部位の解析に用いた RPC 155 のリコンビナント断片を示

す図である。
 【図 2】リコンビナント断片 C - g を用いた E L I S A による抗 RNA P 抗体の検出結果を示す図である。

【図 2】



【図 1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 0 7 K 16/42

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

C 0 7 K 14/47

// C 0 7 K 14/47

A 6 1 K 37/02

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/53

A61K 38/00

A61K 39/395

A61P 17/00

C07K 16/40

C07K 16/42

C12P 21/08

C07K 14/47

BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	硬皮病的诊断剂		
公开(公告)号	JP3455782B2	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001397811	申请日	2001-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
[标]发明人	桑名正隆		
发明人	桑名 正隆		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P17/00 C07K14/47 C07K16/40 C07K16/42 C12P21/08 G01N33/68		
CPC分类号	A61P17/00 C07K16/40 C07K2317/21 G01N33/686 G01N33/6881 G01N2333/9125		
FI分类号	G01N33/53.N A61K39/395.N A61P17/00 C07K16/40 C07K16/42 C12P21/08 C07K14/47 A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DC28 4C084/MA13 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA32 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/ZA892 4C085/AA15 4C085/BB11 4C085/BB22 4C085/CC02 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
其他公开文献	JP2003194814A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单的抗RNA聚合酶（RNAP）抗体检测方法，该抗体非常适用于诊断皮肤病，分类疾病类型和预测器官病，特别是抗RNAP抗体引起的皮肤病肾在弥漫性皮肤病患者中高度频繁地检测到在硬化症中迅速发展，并且以高比率超过皮肤病肾脏，并且与极度恶劣的善后疾病类型有关。ŽSOLUTION：为了鉴定抗RNAP抗体共同识别的表位，RPC62的总长度和RPC155的部分片段是大肠杆菌62kDa和155kDa的两个亚单位，大肠杆菌作为重组蛋白显示，并且与通过免疫印迹法研究抗RNAP抗体的阳性和阴性皮肤病患者血清，以确定在第891号皮肤病患者血清中存在抗RNAP抗体共同识别的表位。1015个RPC155的氨基酸残基。Ž

【图 2】

