

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 300880

(P2002 - 300880A)

(43)公開日 平成14年10月15日(2002.10.15)

| (51) Int. Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード (参考) |
|----------------------------------------|------|----------------|---------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | A 6 1 K 31/711 | 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 31/711 | | 39/395 | D 4 B 0 2 4 |
| 38/00 | | | N 4 B 0 5 0 |
| 39/395 | | 45/00 | 4 B 0 6 3 |
| | | 48/00 | 4 B 0 6 5 |
| 審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 40数) 最終頁に続く | | | |

(21)出願番号 特願2001 - 105813(P2001 - 105813)

(22)出願日 平成13年4月4日(2001.4.4)

(71)出願人 000002831
 第一製薬株式会社
 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(71)出願人 596175810
 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
 千葉県木更津市かずさ鎌足2 - 6 - 7

(72)発明者 小原 收
 千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人か
 ずさディー・エヌ・エー研究所内

(74)代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ユビキチン特異プロテアーゼ

(57)【要約】 (修正有)

【課題】新規の脱ユビキチン化活性を有するプロテアーゼ (U S P) およびこれに由来するペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドを提供し、遺伝子工学手法による、新規 U S P 由来のペプチドまたはポリペプチドの製造法を提供すること。

【解決手段】ヒト由来特定のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、前記ポリペプチドを含有するポリペプチド、前記ポリペプチドと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列上の相同性を有しかつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、および前記アミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、から選択されるポリペプチド、および該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群より選ばれるポリペプチド；
配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

前記のポリペプチドを含有するポリペプチド、

前記のポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有しかつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、および

前記アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド。

【請求項2】 配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項4】 配列表の配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項5】 配列表の配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の少なくとも約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項8】 請求項7に記載の組換えベクターを形質導入された形質転換体。

【請求項9】 請求項8に記載の形質転換体を培養する工程または請求項7に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、請求項1または2に記載のポリペプチドまたはペプチドの製造方法。

【請求項10】 請求項1または2に記載のポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項11】 脱ユビキチン化活性を抑制する、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】 請求項1に記載のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害もしくは活性化する化合物、および/または請求項3もしくは4に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、請求項1もしくは2に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項7に記載のベクター、請求項8に記載の形質転換体、請求項10もしくは11に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とするスク

リーニング方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法で同定される化合物。

【請求項14】 請求項1に記載のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求項3もしくは4に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物。

【請求項15】 請求項1または2に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項7に記載のベクター、請求項8に記載の形質転換体、請求項10もしくは11に記載の抗体、または請求項13もしくは14に記載の化合物のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項16】 請求項1に記載のポリペプチドの発現または脱ユビキチン化活性に関連した疾病の診断のための測定方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしている核酸および/または(b)試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項17】 請求項1もしくは2に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、または請求項10もしくは11に記載の抗体のうちの少なくとも1つを含んでなる、(a)該ポリペプチドまたは蛋白質をコードしている核酸および/または(b)試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法に使用する試薬キット。

【請求項18】 請求項1に記載のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害もしくは活性化する化合物、および/または請求項3もしくは4に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、請求項1もしくは2に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項7に記載のベクター、請求項8に記載の形質転換体、請求項10もしくは11に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法で得られる化合物を含有する神経変性疾患の予防・治療剤。

【請求項19】 請求項1または2に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項7に記載のベクター、請求項8に記載の形質転換体、請求項10もしくは11に記載の抗体、または請求項13もしくは14に記載の化合物のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする神経変性疾患の予防・治療剤。

【請求項20】 請求項18または請求項19に記載の神経変性疾患がアルツハイマー病および/またはパーキンソン病である神経変性疾患の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規な脱ユビキチン化活性を有するプロテアーゼ（以下USPと呼ぶこともある）に関するものである。さらに詳しくは、新規USPのアミノ酸配列の全部または一部を有するペプチドまたはポリペプチド、該ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ポリペプチドもしくは該ポリヌクレオチドに作用する脱ユビキチン化活性阻害化合物または脱ユビキチン化活性賦活化合物、これらの1種以上を含む医薬組成物、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドを検定することからなる診断手段、該形質転換体または該組換えベクターを使ったペプチドまたはポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法に関係する。

【0002】

【従来の技術】ユビキチン（以下Ubと略称することもある）は76個のアミノ酸からなるペプチド鎖であり、そのアミノ酸配列は酵母からヒトまで高度に保存されている。Ubの生体内での役割は様々であり、発癌（引用文献1-4）、細胞周期（引用文献5-7）、ウイルス感染（引用文献8）および神経変性疾患（引用文献9-11）等多くの生体反応に関与している。

【0003】Ubの最も重要な機能は、26Sプロテアソームでの蛋白分解におけるシグナルとしての働きである。ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）およびユビキチンリガーゼ（E3）といった一連のユビキチン化酵素によって、Ubは標的蛋白質にイソペプチド結合し、ポリユビキチン鎖を形成する。そのポリユビキチン鎖が分解シグナルとなりプロテアソームに認識され、ユビキチン化された蛋白質は分解される。

【0004】一方、生体は蛋白質からUbを遊離させ、蛋白質の分解を抑制する機能も備えている。その脱ユビキチン化反応を担うのが脱ユビキチン化酵素（DUB）である。DUBは、その構造から大きく2つのファミリーに分類されている（引用文献12-14）。一つはユビキチンC末端ヒドラーゼ（Ubiquitin C-terminal hydase）（UCH）と呼ばれるもので、分子量20kDaから30kDaのものが多く、異種間で一次構造が保存されている。UCHは主にUbのC末端に低分子が結合している場合にUbを遊離させる。もう一つはユビキチン特異プロテアーゼ（Ubiquitin specific protease）（USP）と呼ばれるもので、その分子量は40kDaから150kDaと様々であり、アミノ酸配列の共通性が少ない。USPはその活性ドメインとしてシステイン（Cys）ドメイン（Cys bo

x）、ヒスチジン（His）ドメイン（His box）およびアスパラギン酸（Asp）ドメインを持ち、Cysドメイン内に存在するシステイン残基を活性部位とするシステインプロテアーゼである。USPはUbのC末端に高分子が結合している場合にUbを遊離させる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題の一つは、新規なUSPを見だし、生体内における該USPの制御を可能にすることである。より具体的には、本発明の課題は新規な特性をもつUSPを提供することであり、それに伴い有用性がある新規USP由来のペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドを提供することである。また本発明の別の課題は、新規USP由来のペプチドまたはポリペプチドに対する抗体を提供することである。さらに本発明の別の課題は、新規USPの脱ユビキチン化活性の阻害剤・拮抗剤・賦活剤等の同定を行うことであり、同定された化合物を提供することである。またこれらを利用した医薬組成物および診断のための測定方法を提供することである。さらにまた、上記ポリヌクレオチドを用いて遺伝子工学手法による新規USP由来のペプチドまたはポリペプチドの製造法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、

1. 下記の群より選ばれるポリペプチド；

配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

前記のポリペプチドを含有するポリペプチド、

前記のポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有しかつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、および

前記アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、

2. 配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド、

3. 前項1または2のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

4. 配列表の配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

5. 配列表の配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の少なくとも約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド、

6. 前項3から5のいずれかのポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

7. 前項3から6のいずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

8. 前項7の組換えベクターを形質導入された形質転換体、

9. 前項8の形質転換体を培養する工程または前項7の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む、前項1または2のポリペプチドまたはペプチドの製造方法、

10. 前項1または2のポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、

11. 脱ユビキチン化活性を抑制する、前項10の抗体、

12. 前項1のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害もしくは活性化する化合物、および/または前項3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、前項1もしくは2のポリペプチドもしくはペプチド、前項3から6のいずれかのポリヌクレオチド、前項7のベクター、前項8の形質転換体、前項10もしくは11の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法、

13. 前項12の方法で同定される化合物、

14. 前項1のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前項3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物、

15. 前項1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前項3から6のいずれかのポリヌクレオチド、前項7のベクター、前項8の形質転換体、前項10もしくは11の抗体、または前項13もしくは14の化合物のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする医薬組成物、

16. 前項1のポリペプチドの発現または脱ユビキチン化活性に関連した疾病の診断のための測定方法であって、(a) 該ポリペプチドをコードしている核酸および/または(b) 試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法、

17. 前項1もしくは2のポリペプチドもしくはペプチド、前項3から6のいずれかのポリヌクレオチド、または前項10もしくは11の抗体のうちの少なくとも1つを含んでなる、(a) 該ポリペプチドまたは蛋白質をコードしている核酸および/または(b) 試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法に使用する試薬キット、

18. 前項1のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害もしくは活性化する化合物、および/または前項3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、前項1もしくは2のポリペプチドもしくはペプチド、前項3から6のいずれかのポリヌクレオチド、前項7のベクター、前項8の形質転換体、前項10もしくは11の抗体のうちの少なくともいずれか1

つを用いることを特徴とするスクリーニング方法で得られる化合物を含有する神経変性疾患の予防・治療剤、

19. 前項1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前項3から6のいずれかのポリヌクレオチド、前項7のベクター、前項8の形質転換体、前項10もしくは11の抗体、または前項13もしくは14の化合物のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする神経変性疾患の予防・治療剤、

20. 前項18または前項19に記載の神経変性疾患がアルツハイマー病および/またはパーキンソン病である神経変性疾患の予防・治療剤、からなる。

【0007】

【発明の実施の形態】(新規USP)本発明において提供される新規USPは、ヒトcDNAライブラリーから、新規なアミノ酸配列を有する物質としてそのcDNAが取得されたものである。当該新規USPは、ヒトの腎臓、卵巣、胎盤、小脳での発現が比較的高いことがノザンプロット法で確認された。当該新規USPは脱ユビキチン化活性を持ち、その配列中に少なくともCysドメインおよびHisドメインを保有する。このドメイン部位における相同性を除き、当該新規USPは既知USPとそのアミノ酸配列において殆ど相同性を有さない。

【0008】(ポリペプチドまたはペプチド)本発明に係る新規USPは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。さらに本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの少なくとも一部分を含有するポリペプチドまたはペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、アミノ酸配列上で約40%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%、特に好ましくは約95%以上の相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドまたはペプチドの選択は、脱ユビキチン化活性の有無の確認により行うことができる。脱ユビキチン化活性は、例えば後述する実施例に示したように、ヒトユビキチンのC末端にグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)を付加したものを基質として、該基質からユビキチンを遊離させるか否かを、ユビキチン遊離後のGSTを抗GST抗体によりイムノプロット法等の公知の方法で検出することにより測定できる。

【0009】アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAのヌクレオチド配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が可能である。

【0010】本発明に係るポリペプチドまたはペプチド

は、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドを包含し、これらは例えば試薬・標準物質・免疫原として利用できる。その最小単位としては5個以上のアミノ酸、好ましくは8個以上のアミノ酸、より好ましくは10個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に同定しうるポリペプチドまたはペプチドも本発明の対象とする。これらのペプチドは、試薬もしくは標準物質、または後述するように

10 新規USPに特異的な抗体を作製するための抗原として単独またはキャリアと結合して使用できる。
【0011】本発明の範囲には、上記のようにキャリア等の別種の蛋白質または物質を結合したものも包含される。例えば、本発明に係るポリペプチド等の検出もしくは精製を容易にするために、または別の機能を付加するために、そのN末端側やC末端側に別の蛋白質、例えばアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片またはFLAG-tag等のペプチドを直接またはリンカーペプチド等を介して

20 間接的に遺伝子工学的手法等の公知の方法を用いて付加することもできる。
【0012】さらに、上記ポリペプチドまたはペプチドを基にして脱コピキチン化活性の存在を指標とすることにより、1以上、例えば1~100個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個で特に好ましくは1ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはペプチドも提供される。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独または適宜組み合わせ、例えば

30 サンプルック等編[モレキュラークロニング, アラボラトリーマニュアル 第2版]コールドスプリングハーバーラボラトリー, 1989、村松正實編[ラボマニュアル遺伝子工学]丸善株式会社, 1988、エールリッヒ, HE. 編[PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用]ストックトンプレス, 1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実

40 施することができ、例えばUlmerの技術(Science, 219, 666, 1983)を利用することができる。
【0013】上記のような変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質(物性、活性、または免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等)の間での相互置換は容易に想定される。

【0014】本発明においては、配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドが有する生理活性と同様の活性を有するポリペプチドまたはその最小活性単位(領域もしくはドメイン)も提供されるが、それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したポリペプチドも提供される。これらは、例えば配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド様物質もしくは該ポリペプチドの拮抗物質として、または該ポリペプチドの生理活性を調節する物質のスクリーニング等に使用する試薬として有用である。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

【0015】本明細書において、ペプチド、オリゴペプチドもしくはオリゴマーとも称する短鎖をポリペプチド、また、長鎖のものを蛋白質ということもある。ペプチドは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を意味する。

【0016】(ポリヌクレオチド)本発明の1つの態様は、上記ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖である。好ましくは、配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖である。これらは例えば上記新規USPの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。

【0017】別の態様において本発明は、上記ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号3または配列番号4の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサンプルック等編[モレキュラークロニング, アラボラトリーマニュアル 第2版]コールドスプリングハーバーラボラトリー, (1989)等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号3または配列番号4に記載の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ハイブリダイゼーションするものであれば必ずしも相補的配列でなくとも良い。例えば、配列表の配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるポリペプチドまたはその相補鎖に対する相同性において、少なくとも約40%、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上であればよい。また本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドの指定された塩基

50

の領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよび該相補鎖を包含する。

【0018】これらのポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチド等の製造においても、新規USPをコードする核酸、例えばその遺伝子もしくはmRNAの検出のためのプローブもしくはプライマーとしても、または遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等としても有用である。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。ここで、新規USPまたは該USPと同様の活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの選別は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性特に脱ユビキチン化活性を指標にして行うことができる。蛋白質発現に無細胞蛋白質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる(Nature, 179, 160~161, 1957)。

【0019】(形質転換体)また本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によっても、本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドは提供可能である。本発明の具体例においては、大腸菌を利用したが、無論これに限定されるものではない。

【0020】形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。

【0021】ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せ利用できる。

【0022】形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現産生される新規USPおよびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの酵素活性特に脱ユビキチン化活性をマーカーにして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチによって、生産してもよい。

【0023】(新規USPおよびその由来物回収)培地からの新規USPおよびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの回収は、脱ユビキチン化活性を指標

にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差にもとづく硫酸、アルコール等の分画手段により精製回収できる。好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作成し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【0024】(抗体)抗体は、本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの抗原決定基を選別し、作製する。抗原は新規USPまたはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。新規USPに特異的な抗体を作製するためには、USPファミリーの保存領域以外の新規USPに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1または配列番号2に記載のものと相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は免疫学的に新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

【0025】抗体を産生するためには、本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で、単独または担体に結合して、動物に対して体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことによって行われる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティークロマトグラフィー法である。

【0026】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞(例えば、脾臓またはリンパ節由来)を回収し、自体公知の永久増殖性細胞(例えば、P3X63Ag8株等のミエローマ株)への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、該抗体産生細胞と永久増殖性細胞とのハイブリドーマをクローン化し、本発明に係るUSPを特異的に認識する抗体を選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

【0027】USPの活性を抑制し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明に係る新規USPに結合し、脱ユビキチン化活性を制御可能であ

る。そのため、USPが関連する各種疾患の治療・予防のために有用である。さらにこれらの抗体は、上記USPおよびその由来物であるポリペプチドまたはペプチドの精製用抗体、試薬、または標識マーカー等として利用できる。

【0028】(同定・スクリーニング)かくして調製された新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを用いる蛋白質合成系ならびに新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数手段を組合せることによって、新規USPおよびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドに対する活性阻害剤または活性賦活剤の同定・スクリーニングに有効な手段を提供する。例えば、ペプチドまたはポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて、利用可能である。

【0029】また、本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを用いて、スクリーニングされる化合物とこれらペプチドまたはポリペプチドとの間の相互作用を可能にする条件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナル(マーカー)を使用する系を導入し、このシグナル(マーカー)の存在・不存在を検出することにより、本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの活性、例えば脱ユビキチン化活性、を賦活または阻害する化合物を同定可能である。

【0030】(化合物、医薬組成物)上記手段により同定された化合物は、新規USPおよびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの活性、例えば脱ユビキチン化活性、の活性阻害剤、活性拮抗剤、または活性賦活剤の候補化合物として、利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規USPおよびその由来物の系に対する発現阻害剤、発現拮抗剤、発現賦活剤の候補化合物としても利用可能である。その効果は、USPの発現や活性の増加、減少または欠失等が関連する各種病的症状の予防・治療を期待できる。後述するように、神経変性疾患との係わりが重要であることから、同疾患の予防・治療剤となる。かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。

【0031】また本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター、ならびに新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学

的に認識する抗体は、それ自体が、診断マーカーや試薬等の疾病診断手段として、または新規USPの活性の阻害、拮抗、もしくは賦活等の機能を利用して治療薬等の医薬手段として使用し得る。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチドまたはポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0032】本発明に係る新規USPの発現およびその活性の減少や欠失等に関連する異常な症状の治療には、1つの方法として当該USP自体あるいはUSPをコードする遺伝子を活性化する治療上有効量の化合物(促進剤)を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な症状を改善することを特徴とする方法が挙げられる。あるいは、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞内で当該USPを生成なさしめてもよい。上記ポリヌクレオチドを利用した遺伝子治療は、公知の方法が利用できるが、例えば、上記のごとく本発明に係るポリヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作製して遺伝子治療に利用すればよい。また、遺伝子治療において、治療に使用する蛋白質を対象中において生成させることもできる。例えば、蛋白質をコードしているDNAまたはRNAを用いて、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエクスピボ(ex vivo)において対象由来の細胞を処理し、次いで、細胞を対象に導入することもできる。

【0033】本発明に係る新規USPの発現およびその活性が過剰な場合、有効量の上記阻害剤化合物を医薬上許容される担体とともに対象に投与して、当該USPの活性を阻害し、そのことにより異常な症状を改善することもできる。さらに、発現ブロック法を用いて内在性の上記USPをコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成させた、あるいは別個に投与された当該遺伝子のアンチセンス配列を使用して当該遺伝子の発現を阻害できる。これらのオリゴヌクレオチドは、上記本発明に係るポリヌクレオチドを基にして設計し合成できる。当該オリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインビボで発現させることもできる。

【0034】USPの発現や活性の増加、減少もしくは欠失等の機能障害はUSPに係るユビキチンシステムの異常をきたす。ユビキチンシステムの機能の一つは、生体内で生じた異常蛋白の除去や転写因子、シグナル伝達因子の分解による量的調節等である(引用文献21)。そのため、USPの異常と発癌や神経変性疾患との関わりが示唆されている(引用文献21-23)。例えば、アルツハイマー病やパーキンソン病で観察される蛋白凝集体の多くが抗ユビキチン抗体に反応することから(引用文献21)、神経変性疾患とUSPの機能異常との関係が示唆される。上記本発明に係るUSPは、腎臓、卵巣および胎盤と同様に小脳での発現が比較的高いことから、当該

USPがこれらの神経変性疾患と関わりがある可能性が高い。また、当該USPを細胞内蛋白局在予測プログラムPSORTにより解析したところ、核内に局在することが予測された。USPは染色体構造の維持にも関与しており、ユビキチン化されたヒストンの脱ユビキチン化が染色体凝集に重要であることが知られている（引用文献24）。最近、USPファミリーの1つであるUSP16がH2Aを脱ユビキチン化することが報告されたが（引用文献25）、本発明に係るUSPもヒストンの脱ユビキチン化に関与している可能性がある。生体内には多くのUSPが存在しており、それぞれ異なる基質特異性や生理機能を有していると思われる。従って、本発明は、USPの関与する生体機能の解明、とりわけ、発癌プロセスの解明や、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の解明、ならびにそれらの予防・治療剤および診断を可能とする上で非常に有用なものである。

【0035】（診断のための測定方法および試薬）本発明に係る新規なUSPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、ならびに当該USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用可能である。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチドまたはポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0036】本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの発現または活性に関連した疾患の診断手段は、例えば当該USPをコードしている核酸との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在量を決定すること、および/または当該USPについて個体中の生体内分布を決定すること、および/または当該USPの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。詳しくは、新規USPを診断マーカーとして検定するのである。試料中の当該USPの検出またはその存在量の決定に用いることができる測定法は当業者に周知である。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等がある。また、本発明に係る新規USPをコードするポリヌクレオチドの検出法および定量法としては、例えば増幅、PCR、RTPCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロットングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いてRNAレベルで測定することができる。

【0037】測定される試料として、個体由来の細胞、例えば血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等を挙げることができる。また、測定される核酸は、上

記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRもしくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを標識した上記USPをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定することができる。

【0038】上記測定により本発明に係るUSPおよび当該USPをコードするDNAの変異、減少、増加を検出することにより、当該USPに関連する疾患、例えば、癌あるいは神経変性疾患等、特にアルツハイマー病やパーキンソン病等の診断が可能となる。

【0039】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。本発明に係るUSPは、かずさDNA研究所のヒト長鎖cDNA解析情報データベースから、バイオインフォマティクス(bioinformatics)により、新規プロテアーゼ候補遺伝子として抽出されたクローンpg01082を基に、その全長cDNA配列が決定された。当該クローンは、1145個のアミノ酸をコードするCDSを含む6642bpのクローンであり（配列表の配列番号1）、プロテアーゼモチーフ検索から、USPのCysドメイン(Cys box) (G-[LIVMFY]-x(1,3)-[AGC]-[NASM]-x-C-[FYW]-[LIVMFC]-[NST]-[SACV]-x-[LIVMS]-Q)とHisドメイン(His-box) (Y-x-L-x-[SAG]-[LIVMFT]-x(2)-H-x-G-x(4,5)-G-H-Y)およびアスパラギン酸(Asp)ドメインを有する。なお、本発明に係る遺伝子は、Cys box内において既知の当該ドメイン配列と一致していないアミノ酸残基が一つ存在する。

【0040】A. 大腸菌を用いた組換えpg01082の発現
1. 組換えpg01082発現プラスミドの構築

組換えpg01082発現プラスミドをGATEWAY™ Cloning Technology (Life Technologies社)を用いて作製した。まず、ヒト脳cDNAライブラリー（引用文献26）より得たpg01082クローン(pBluescript II SK₊のSalI-NotI部位に挿入)を鋳型として、Advantage-HF2 PCR Kit (Clontech社)を用いて推定ORF領域(ヌクレオチド番号10-3438)を増幅した後、BP clonase enzymeを用いた組換え反応によりエンターベクター(pDONR201)に挿入し、pDONR-01082を作成した。なお、プライマーはattB-01082(+) (5'-GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA ATG CTT CTT CCT ACA TGT CCT AAT ATG-3')とattB-01082(-) (5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA ACA ACT TAA AGA AAG GAT TGG CTG-3')を使用した。次に、pDONR-01082とN-terminal His-tagged Protein発現用ベクターであるpDEST17を用いて、LR clonase enzymeによる組換え反応によりHis-tagged pg01082

発現プラスミド (pHis-01082) を作成した。発現プラスミドは、NaClにより発現誘導が可能な大腸菌 (*E. coli*) BL21-SI (Life Technologies社) に導入した。なお、増幅したORF領域にPCRエラー等の変異が起きていないことはシーケンシングにより確認した。シーケンス反応はThermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kitを、泳動および解析はGene Rapid (いずれもAmersham pharmacia biotech社) を用い、添付の説明書に従い実施した。

【0041】2. pg01082の大腸菌での発現誘導 LBON/Amp培地 [NaClを含まず、100 μg/mlのアmpicillin (ampicillin) を含むLB培地] に1/10量の前培養液を接種し、25 ℃にてOD₆₀₀が約1.0になるまで培養後、NaClを終濃度0.3 Mになるように添加し、さらに約6時間培養後、菌体を回収した。菌体をリン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁後、超音波処理、遠心により上清を回収し、抽出液とした。抽出液を7.5% SDS-PAGEにより分離後、抗His-tag抗体 (Penta-His™ Antibody, QIAGEN社) を用いたイムノプロットングにより蛋白質を検出した。なお、検出にはECL western blotting detection kit (Amersham pharmacia biotech社) を使用した。

【0042】3. インビトロ (in vitro) での脱ユビキチン化活性の検出 His-tagged USP15発現プラスミドpHis-USP15を、ヒト脳cDNAライブラリー (引用文献26) から得たUSP15 cDNA (KIAA0529クローン) を鋳型として、上記と同様にGATEWAY™ Cloning Technologyを用いて作成した。なお、KIAA0529はUSP15のN末端3アミノ酸残基 (Met-Ala-Glu) が欠失していたため、Bakerらの方法に従い (引用文献15)、この3残基に対応するコドンプライマー内に設計し、完全なORFとした。pHis-USP15はpg01082と同様に大腸菌BL21-SIに導入した。

【0043】大腸菌抽出液の調製は、pHis-01082またはpHis-USP15を保持する大腸菌BL21-SIを上記と同様に誘導培養した後、菌体を回収した。菌体を培養液の1/10量の50mM His-HCl, pH7.6/ 5mM EDTA/ 1mM DTTに懸濁後、超音波処理により菌体を破壊し、遠心分離により上清を回収した。これを活性測定用の大腸菌抽出液とした。

【0044】基質 (Ub-M-GST) の調製は、ヒトユビキチンのC末端にグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を結合させたUb-M-GSTの発現プラスミド、pTV118N/Ub-GSTを保持する大腸菌 (*E. coli*) DH5 を37 ℃にてOD₆₀₀が約1.0になるまで培養後、IPTGを終濃度10 mMになるように添加し、さらに約4時間培養後、菌体を回収した。菌体を50 mM Tris-HCl, pH7.6/ 5 mM EDTA/ 1 mM DTT/10% glycerol に懸濁し、リゾチーム、超音波処理により破壊後、遠心分離により上清を回収し、グルタチオン・セファロース4B (Amersham pharmacia biotech社) を用いてUb-M-GSTを精製した。精製

物は50 mM Tris-HCl, pH7.6/ 5 mM EDTA/ 1 mM DTT/ 10 % glycerolに対して透析を行った後、使用時まで-80 ℃にて保存した。

【0045】インビトロでの脱ユビキチン化反応は上記の調製した各大腸菌抽出液10 μlとUb-M-GST 5 μl (2.5 μg) を50 mM Tris-HCl, pH7.6/ 5 mM EDTA/ 1 mM DTT中にて混合後 (計20 μl)、37 ℃にて16時間インキュベートした。反応液を15%または5-20% SDS-PAGEにより分離した後、1次抗体として抗GST抗体 (Amersham pharmacia biotech社)、2次抗体としてHRP (ホースラディッシュペロキシダーゼ) 標識抗ヤギ抗体 (Alpha diagnostic international社) を用いたイムノプロットングによりUb-M-GSTおよび遊離したGSTを検出した。なお、検出はECL western blotting detection kitを使用した。

【0046】大腸菌を用いた組換えpg01082の発現は、pg01082でのCDSの5'末端が翻訳開始コドンのATGではないため、最初 (1st) のATGがさらに上流に存在する可能性が考えられたが、pg01082のCDSにおける最初のATGからの領域をORFとし、アミノ酸番号4から1145までの1142個のアミノ酸を発現させた (配列表の配列番号1)。pg01082のこの領域をN-terminal His-tagged proteinとして大腸菌BL21-SI株を用いて誘導発現させたところ、予想される分子量 (135 kDa) の蛋白の発現が抗His抗体を用いたイムノプロットングにおいても検出されなかった。検出されない原因として発現系が上手く動いていない可能性も考えられたが、発現量が極めて微量である可能性 (検出限界以下) も考え、以下の活性の有無を検討した。

【0047】大腸菌にはUSPが存在しないことから、上記で誘導発現させた大腸菌の抽出液を用いてpg01082の脱ユビキチン化活性について検討した。しかしながら、UbのC末端にGSTを結合させた人工基質、Ub-M-GSTに対する検討を行った結果、活性は検出されなかった (図1)。ただし、脱ユビキチン化活性を有することが報告されているUSP15 (引用文献15) では活性が検出されたことから (図1)、試験系には問題が無いことを確認した。

【0048】B. 共発現系での脱ユビキチン化活性の検出

1. 共発現用各種基質 (Ub-X-GST) 発現プラスミドの構築

pTV118N/Ub-GSTを鋳型としてUb-GSTコード領域をPCRにより増幅させた後、GATEWAY™ Cloning Technologyを用いて大腸菌発現用ベクター、pDEST14に挿入し、pDEST14Ub-GSTを作成した。次に、pDEST14Ub-GSTからT7プロモーターおよびUb-GSTコード領域を含む領域をSphIおよびHindIII処理により切り出し、p15A由来の開始点 (ori) を持つpACYC184 (ニッポンジーン社) のSphI-HindIII間に組み込み、pACUb-M-GSTを作成した。これを共発

現用Ub-M-GST発現プラスミドとした。次に、pACUb-M-GSTをSalIおよびHindIIIで処理し、T7プロモーターおよびUb-GSTコード領域を含む領域をpBluescriptII SK (+) (Stratagene社)のSalI-HindIII間に組み込み、pBSUbGSTを作成した。さらに、pBSUbGSTを鋳型に、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を用いてGSTのN末端のアミノ酸に対応するコドン(ATG [メチオニン (Met)] からCCG [プロリン (Pro)]、ATC [イソロイシン (Ile)] およびCGT [アルギニン (Arg)] に変換させたpBSub-P-GST、pBSub-I-GST およびpBSub-R-GSTを作成した。コドンの変換は、シーケンシングにより確認した。次に、各pBSub-X-GSTをHindIIIおよびSphIで処理し、T7プロモーターおよびUb-X-GSTコード領域を含む領域をpACYC184のHindIII-SphI間に組み込み、各共発現用Ub-X-GST発現プラスミド、pACUb-X-GSTを作成した。作成した4種類のpACUb-X-GSTは大腸菌BL21-SIに導入し、塩化カルシウム法によりコンピテントセル化した。

【0049】2. His-tagged pg01082^{C508A}発現プラスミドの構築

pg01082の推定活性残基である508番目のシステイン(508-Cys)のアラニン(Ala)への置換は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kitを用いて行った。使用したプライマーは、508-CysのコドンであるTGTがAlaのコドンであるGCGに置換するように設計した(5'-CTT ACT AAC CTT GGA GCT ACT GCG TAC TTA GCTTCT ACT ATT C AG-3')。変異の導入をシーケンシングにて確認し、His-taggedpg01082^{C508A}発現プラスミド、pHis-01082^{C508A}を得た。

【0050】3. 共発現株の作成

各pACUb-X-GSTをそれぞれ保持する大腸菌BL21-SIコンピテントセルにpHis-01082、pHis-01082C508A、pHis-USP15またはpHis-Lucを加え、形質転換した。形質転換体は、100μg/mlアンピシリンおよび34μg/mlクロラムフェニコールを含むLBON (NaClを含まないLB培地)プレート上にて選択し、各種共発現株を得た。なお、ヒスチジン付加ルシフェラーゼ(His-tagged luciferase)発現プラスミドであるpHis-Lucは、pGL3-Lucベクター(Promega社)を鋳型として、上記と同様にGATEWAY™ Cloning Technologyを用いて作成した。

【0051】4. 共発現試験

各種共発現株を100μg/mlアンピシリンおよび34μg/mlクロラムフェニコールを含むLBON培地中でOD₆₀₀が約0.7から1.0になるまで25にて培養後、NaClを終濃度0.3Mになるように添加し、さらに約9時間培養後、菌体を回収した。上記大腸菌抽出液の調製に従い抽出液を調製した後、抽出液をSDS-PAGEにより分離し、上記と同様に抗GST抗体を用いたイムノブロットングによりUb-X-GSTおよび遊離のGSTを検出した。

【0052】既知のUSPの中にはインビトロの系では活性が認められないものの、基質との共発現系では活性が認められるものもある(引用文献18)。そこで、pg01082についてもこの可能性を考え、共発現系での活性の検出を試み、酵素発現用プラスミドが有するpBR322系のoriとcompatibility(互換性)を示すp15Aのoriを有する基質(Ub-GST)発現用プラスミドを使用することにより、酵素と基質を同一菌体内で共発現させた(引用文献16)。その結果、Ub-M-GSTに対するpg01082の脱ユビキチン化活性が、この共発現系で遊離のGSTが検出されたことから、認められ、pg01082がUSPの一つであることが確認された(図2)。また、陽性コントロールとしてUSP15、陰性コントロールとしてルシフェラーゼ(図中ではLucと表示)をそれぞれ同様に共発現させた結果、USP15では活性が認められ、ルシフェラーゼでは活性が認められなかったことから(図2)、試験系の妥当性も確認された。

【0053】pg01082の脱ユビキチン化活性における基質特異性を検討するために、Ub-M-GSTにおいてUbのC末端直後のアミノ酸であるMetをPro、IleおよびArgに置換させたUb-P-GST、Ub-I-GSTおよびUb-R-GSTを発現させる各共発現用プラスミドを作成し、これら基質に対する活性を共発現系で調べた。その結果、Ub-R-GSTに対しては活性が認められたが、Ub-I-GSTおよびUb-P-GSTに対しては活性は認められなかった(図2)。Ub-P-GSTに対して活性を示すことが報告されているUSP15は(引用文献17)、Ub-P-GSTを含め全ての基質に対して活性が認められた(図2)。

【0054】USPはシステインプロテアーゼの一つであり、Cys box内に存在するCys残基が活性部位であることが知られている。そこで、pg01082における推定活性部位である508-CysをAlaに置換した変異体(pg01082^{C508A})を上記のように作成し、Ub-M-GSTおよびUb-R-GSTを基質とした共発現系での脱ユビキチン化活性への影響を検討した結果、pg01082^{C508A}において両基質に対する活性の消失が認められた(図3)。本発明に係るUSPは、既知のUSPと同様に、508-Cysが活性に重要であることが確認された。また、pg01082はUb-M-GSTおよびUb-R-GSTに対しては活性が認められたが、Ub-I-GSTおよびUb-P-GSTに対しては活性を示さず、基質選択性があることが明らかとなった。一般にUb-P-GSTは切れにくい基質であることが知られており、酵母に存在するUSPは全てUb-P-GSTに対する活性が低い(引用文献17,19)。Ub-P-GSTに活性を示すヒトのUSPとしてUSP4(引用文献17)とUSP15(引用文献15)が報告されており、pg01082はこれらのUSPとは生体内で異なる基質選択性を持つものと考えられた。

【0055】C. 全長USP(hk03615x2)の調製 pg01082を基礎として、これのC末、N末を伸張させたhk03615x2の調製を行った。まず、pg01082のC末端を更

に伸長させたクローンであるhk03615x1 (図4A) が取得された。pg01082の1138番目のアミノ酸でグルタミン(1138-Gln)以下のC末端8アミノ酸はフレームシフトにより生じた配列であり、実際は1137番目のアルギニン(1137-Arg)からC末端側に更に1014個のアミノ酸が付加されることが明らかとなった。また、N末端側をさらに1261個のアミノ酸伸長させたクローンであるhh02365mrp1(図4A)も取得し、これら3つのクローンをin silico上で連結させると、3395個のアミノ酸をコードするORFを有するcDNA(hk03615x2)となることが明らかとなった(ORFは18番目のMetを1st Metとして規定した。ちなみに、CDSでは3412個のアミノ酸をコードする。図4A中、CDSにおける1st Met含むN末端側18個のアミノ酸を一文記しているが、三文字表記では、Leu Arg Arg Asn Leu Gln ArgVal Leu Ile Leu Leu Val Tyr Gly Val Gln Met)(図4B)。よって、生体内では3381アミノ酸からなるhk03615x2が存在しており、上記脱ユビキチン化活性の確認は、hk03615x2内の触媒ドメイン(catalytic domain)に対応する領域について行ったこととなる。

【0056】

【発明の効果】本発明は、USPの関与する生体機能の解明、とりわけ、発癌プロセスの解明や、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の解明、ならびにそれらの予防、治療および診断を可能とする上で非常に有用なものである。

【0057】

【引用文献】1. Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitinligase E3 for tumor suppressor p53. FEBS Letter. 420, 25 (1997)
 2. Gupta, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Gray, D. A. Unp, a mouse gene related to the oncogene. Oncogene 8, 2307 (1993)
 3. Gray, D. A., Inazawa, J., Gupta, K., Wong, A., Ueda, R. and Takahashi, T. Elevated expression of Unph, a proto-oncogene at 3p21.3, in human lung tumors. Oncogene 10, 2179 (1995)
 4. Papa, F. R. and Hochrasser, M. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. Nature 366, 313 (1993)
 5. Hershko, A. and Ciechanover, A. The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem. 67, 425 (1998)
 6. Zhu, Y., Carroll, M., Papa, F. R., Hochrasser, M. and D'andrea, A.D. DUB-1, a deubiquitinating enzyme with growth-suppressing activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 3275 (1996)
 7. Zhu, Y., Lambert, K., Corless, C., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and D'Andrea, 50

A. D. DUB-2 is a member of a novel family of cytokine-inducible deubiquitinating enzymes. J. Biol. Chem. 272, 51 (1997)
 8. Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M. and Parkinson, J. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. EMBO J. 16, 1519 (1997)
 9. Alves-Rodrigues, A., Gregori, L. and Figueiredo-Pereira, ME. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. Trends Neurosci. 21, 516 (1998)
 10. Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D. and Polymeropoulos, M. H. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 395, (1998)
 11. Saigoh, K., Wang, Y., Suh, J. G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T. and Wada, K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. Nature Genet. 23, 47 (1999)
 12. Chung, C. H., and Beak, S. H., Deubiquitinating enzymes: Their diversity and emerging roles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 266, 633 (1999)
 13. Wilkinson, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent process by deubiquitinating enzymes. FASEB J. 11, 1245 (1997)
 14. D'Andrea, A. and Pellman, D. Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulator. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 33, 337 (1998)
 15. Baker, R. T., Wang, Xiao-Wen, Woollatt, E., White, J. and Sutherland G. R. Identification, functional characterization, and chromosomal localization of USP15, a novel human ubiquitin-specific protease related to the UNP oncoprotein, and a systematic nomenclature for human ubiquitin-specific protease. Genomics 59, 264 (1999)
 16. Rao-Naik, C., Chandler, J. S, McArdle, B. and Callis, J. Ubiquitin-specific proteases from Arabidopsis thaliana: Cloning of AtUBP5 and analysis of substrate specificity of AtUBP3, AtUBP4 and AtUBP5 using Escherichia coli in vivo and in vitro assays. Arch Biochem Biophys. 379, 198 (2000)
 17. Gilchrist, C. A., Gray, D. A. and Baker, R. T. A ubiquitin-specific protease that efficiently cleaves the ubiquitin-proline bond. J. Biol. Chem. 272, 32280 (1997)

18. Chandler, J. S., McArdle, B. and Callis, J. At UBP3 and AtUBP4 are two closely related Arabidopsis thaliana ubiquitin-specific proteases present in the nucleus. Mol Gen Genet. 255, 302 (1997)
19. Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science 234, 179 (1986)
20. Wilkinson, K. D., Tashayev, V. L., O'Connor, L. B., Larsen, C. N., Kasperk, E. and Pickart, C. M. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. Biochemistry 34, 14535 (1995)
21. 鈴木俊顕、志村秀樹、服部信孝、ユビキチンと神経変性疾患、実験医学18,1478 (2000)
22. 鈴木俊顕、脱ユビキチン化酵素の多彩な作用、実験医学 19, 193 (2001)
23. 阿南正、中尾光善、ユビキチン病の分子機構、蛋白質 核酸 酵素44, 776 (1999)
24. Bradbury, E. M. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. BioEssays 14, 9 (1992)
25. Cai, S. Y., Babbitt, R. W. and Marchesi, V. T. A mutant deubiquitinating enzyme (Ubp-M) associates with mitotic chromosomes and blocks cell division. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 2828 (1999)
26. 小原收、長瀬隆弘、野村信夫、蛋白質 核酸 酵素42, 2851 (1997)

【0058】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO
., LTD
      Kazusa DNA Research Institute
<120> Novel Ubiquitin specific
protease
<130> NP01-1027
<140>
<141>
<160> 4
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1137
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Glu Leu Leu Met Leu Leu Pro Thr Cys Pro
Asn Met Leu Met Ala Phe
      1          5          10          15
Gln Asn Ile Ser Asp Glu Gln Ser Asn Asp
Gly Phe Asn Trp Lys Glu
      20          25          30
Leu Leu Lys Ile Lys Ser Ala His Lys Leu
Leu Tyr Ala Leu Glu Ile
      35          40          45
Ile Glu Ala Leu Gly Lys Pro Asn Arg Arg
Ile Arg Arg Glu Ser Thr
      50          55          60
Gly Ser Tyr Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Ser
Asp Asp Ser Ser Glu Asp
      65          70          75          80
Gln Val Glu Asn Ser Lys Asn Ser Trp Ser
Cys Lys Phe Val Ala Ala
      85          90          95
Gly Gly Leu Gln Gln Leu Leu Glu Ile Phe

```

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| His Arg Lys Arg Thr Trp Pro Gly Lys Ser Arg Lys Ala Ala Gly Asp 165 170 175 |
| His Ala Lys Gly Leu His Ile Pro Arg Leu Thr Glu Val Phe Leu Val 180 185 190 |
| Leu Val Gln Gly Thr Ser Leu Ile Gln Arg Leu Met Ser Val Ala Tyr 195 200 205 |
| Thr Tyr Asp Asn Leu Ala Pro Arg Val Leu Lys Ala Gln Ser Asp His 210 215 220 |
| Arg Ser Arg His Glu Val Ser His Tyr Ser Met Trp Leu Leu Val Ser 225 230 235 2 |
| 40 Trp Ala His Cys Cys Ser Leu Val Lys Ser Ser Leu Ala Asp Ser Asp 245 250 255 |
| His Leu Gln Asp Trp Leu Lys Lys Leu Thr Leu Leu Ile Pro Glu Thr 260 265 270 |
| Ala Val Arg His Glu Ser Cys Ser Gly Leu Tyr Lys Leu Ser Leu Ser 275 280 285 |
| Gly Leu Asp Gly Gly Asp Ser Ile Asn Arg Ser Phe Leu Leu Leu Ala 290 295 300 |
| Ala Ser Thr Leu Leu Lys Phe Leu Pro Asp Ala Gln Ala Leu Lys Pro 305 310 315 3 |
| 20 Ile Arg Ile Asp Asp Tyr Glu Glu Glu Pro Ile Leu Lys Pro Gly Cys 325 330 335 |
| Lys Glu Tyr Phe Trp Leu Leu Cys Lys Leu Val Asp Asn Ile His Ile 340 345 350 |
| Lys Asp Ala Ser Gln Thr Thr Leu Leu Asp Leu Asp Ala Leu Ala Arg 355 360 365 |

| | | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|
| 545 | 550 | 555 | 5 |
| 60 | | | |
| Asn Pro Arg Pro Phe Cys Lys Thr Tyr Thr | | | |
| Met Asp Lys Gln Pro Leu | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| Asn Thr Gly Glu Gln Lys Asp Met Thr Glu | | | |
| Phe Phe Thr Asp Leu Ile | | | |
| | 580 | 585 | 590 |
| Thr Lys Ile Glu Glu Met Ser Pro Glu Leu | | | |
| Lys Asn Thr Val Lys Ser | | | |
| | 595 | 600 | 605 |
| Leu Phe Gly Gly Val Ile Thr Asn Asn Val | | | |
| Val Ser Leu Asp Cys Glu | | | |
| | 610 | 615 | 620 |
| His Val Ser Gln Thr Ala Glu Glu Phe Tyr | | | |
| Thr Val Arg Cys Gln Val | | | |
| 625 | 630 | 635 | 6 |
| 40 | | | |
| Ala Asp Met Lys Asn Ile Tyr Glu Ser Leu | | | |
| Asp Glu Val Thr Ile Lys | | | |
| | 645 | 650 | 655 |
| Asp Thr Leu Glu Gly Asp Asn Met Tyr Thr | | | |
| Cys Ser His Cys Gly Lys | | | |
| | 660 | 665 | 670 |
| Lys Val Arg Ala Glu Lys Arg Ala Cys Phe | | | |
| Lys Lys Leu Pro Arg Ile | | | |
| | 675 | 680 | 685 |
| Leu Ser Phe Asn Thr Met Arg Tyr Thr Phe | | | |
| Asn Met Val Thr Met Met | | | |
| | 690 | 695 | 700 |
| Lys Glu Lys Val Asn Thr His Phe Ser Phe | | | |
| Pro Leu Arg Leu Asp Met | | | |
| 705 | 710 | 715 | 7 |
| 20 | | | |
| Thr Pro Tyr Thr Glu Asp Phe Leu Met Gly | | | |
| Lys Ser Glu Arg Lys Glu | | | |
| | 725 | 730 | 735 |
| Gly Phe Lys Glu Val Ser Asp His Ser Lys | | | |
| Asp Ser Glu Ser Tyr Glu | | | |
| | 740 | 745 | 750 |
| Tyr Asp Leu Ile Gly Val Thr Val His Thr | | | |
| Gly Thr Ala Asp Gly Gly | | | |

| | | | |
|-----------------------------------------|------|------|------|
| 930 | 935 | 940 | |
| Gln Ala Ala Cys Glu Trp Phe Leu Asp Arg | | | |
| Met Ala Asp Asp Asp Trp | | | |
| 945 | 950 | 955 | 9 |
| 60 | | | |
| Trp Pro Met Gln Ile Leu Ile Lys Cys Pro | | | |
| Asn Gln Ile Val Arg Gln | | | |
| | 965 | 970 | 975 |
| Met Phe Gln Arg Leu Cys Ile His Val Ile | | | |
| Gln Arg Leu Arg Pro Val | | | |
| | 980 | 985 | 990 |
| His Ala His Leu Tyr Leu Gln Pro Gly Met | | | |
| Glu Asp Gly Ser Asp Asp | | | |
| | 995 | 1000 | 1005 |
| Met Asp Thr Ser Val Glu Asp Ile Gly Gly | | | |
| Arg Ser Cys Val Thr Arg | | | |
| 1010 | 1015 | 1020 | |
| Phe Val Arg Thr Leu Leu Leu Ile Met Glu | | | |
| His Gly Val Lys Pro His | | | |
| 1025 | 1030 | 1035 | |
| 1040 | | | |
| Ser Lys His Leu Thr Glu Tyr Phe Ala Phe | | | |
| Leu Tyr Glu Phe Ala Lys | | | |
| | 1045 | 1050 | 1055 |
| Met Gly Glu Glu Glu Ser Gln Phe Leu Leu | | | |
| Ser Leu Gln Ala Ile Ser | | | |
| | 1060 | 1065 | 1070 |
| Thr Met Val His Phe Tyr Met Gly Thr Lys | | | |
| Gly Pro Glu Asn Pro Gln | | | |
| | 1075 | 1080 | 1085 |
| Val Glu Val Leu Ser Glu Glu Glu Gly Glu | | | |
| Glu Glu Glu Glu Glu Glu | | | |
| 1090 | 1095 | 1100 | |
| Asp Ile Leu Ser Leu Ala Glu Glu Lys Tyr | | | |
| Arg Pro Ala Ala Leu Glu | | | |
| 1105 | 1110 | 1115 | |
| 1120 | | | |
| Lys Met Ile Ala Leu Val Ala Leu Leu Val | | | |
| Glu Gln Ser Arg Ser Glu | | | |
| | 1125 | 1130 | 1135 |

Arg

| | | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 | |
| Leu Ser Asp Gln Glu Leu Arg Gln Ser Ala | | | |
| Ala Arg Asn Met Ala Asp | | | |
| 145 | 150 | 155 | 1 |
| 60 | | | |
| Leu Met Trp Ser Thr Val Lys Glu Pro Leu | | | |
| Asp Thr Thr Leu Cys Phe | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Asp Lys Glu Ser Leu Asp Leu Ala Phe Lys | | | |
| Tyr Phe Met Ser Pro Thr | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Leu Thr Met Arg Leu Ala Gly Leu Ser Gln | | | |
| Ile Thr Asn Gln Leu His | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Thr Phe Asn Asp Val Cys Asn Asn Glu Ser | | | |
| Leu Val Ser Asp Thr Glu | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Thr Ser Ile Ala Lys Glu Leu Ala Asp Trp | | | |
| Leu Ile Ser Asn Asn Val | | | |
| 225 | 230 | 235 | 2 |
| 40 | | | |
| Val Glu His Ile Phe Gly Pro Asn Leu His | | | |
| Ile Glu Ile Ile Lys Gln | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Cys Gln Val Ile Leu Asn Phe Leu Ala Ala | | | |
| Glu Gly Arg Leu Ser Thr | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Gln His Ile Asp Cys Ile Trp Ala Ala Ala | | | |
| Gln Leu Lys His Cys Ser | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Arg Tyr Ile His Asp Leu Phe Pro Ser Leu | | | |
| Ile Lys Asn Leu Asp Pro | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Val Pro Leu Arg His Leu Leu Asn Leu Val | | | |
| Ser Ala Leu Glu Pro Ser | | | |
| 305 | 310 | 315 | 3 |
| 20 | | | |
| Val His Thr Glu Gln Thr Leu Tyr Leu Ala | | | |
| Ser Met Leu Ile Lys Ala | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Leu Trp Asn Asn Ala Leu Ala Ala Lys Ala | | | |
| Gln Leu Ser Lys Gln Ser | | | |
| | 340 | 345 | 350 |

| | | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|
| 530 | 535 | 540 | |
| Thr Glu Ser Leu Pro Ser Val Asp Asn Arg | | | |
| Met Arg Met Leu Asp Ala | | | |
| 545 | 550 | 555 | 5 |
| 60 | | | |
| Cys Ser His Ser Glu Asp Pro Glu His Asp | | | |
| Ile Ser Gly Glu Met Asn | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| Ala Thr His Ile Ala Gln Gly Ser Gln Glu | | | |
| Ser Cys Ile Thr Arg Thr | | | |
| | 580 | 585 | 590 |
| Gly Asp Phe Leu Gly Glu Thr Ile Gly Asn | | | |
| Glu Leu Phe Asn Cys Arg | | | |
| | 595 | 600 | 605 |
| Gln Phe Ile Gly Pro Gln His His His His | | | |
| His His His His His His | | | |
| | 610 | 615 | 620 |
| His His Asp Gly His Met Val Asp Asp Met | | | |
| Leu Ser Ala Asp Asp Val | | | |
| 625 | 630 | 635 | 6 |
| 40 | | | |
| Ser Cys Ser Ser Ser Gln Val Ser Ala Lys | | | |
| Ser Glu Lys Asn Met Ala | | | |
| | 645 | 650 | 655 |
| Asp Phe Asp Gly Glu Glu Ser Gly Cys Glu | | | |
| Glu Glu Leu Val Gln Ile | | | |
| | 660 | 665 | 670 |
| Asn Ser His Ala Glu Leu Thr Ser His Leu | | | |
| Gln Gln His Leu Pro Asn | | | |
| | 675 | 680 | 685 |
| Leu Ala Ser Ile Tyr His Glu His Leu Ser | | | |
| Gln Gly Pro Val Val His | | | |
| | 690 | 695 | 700 |
| Lys His Gln Phe Asn Ser Asn Ala Val Thr | | | |
| Asp Ile Asn Leu Asp Asn | | | |
| 705 | 710 | 715 | 7 |
| 20 | | | |
| Val Cys Lys Lys Gly Asn Thr Leu Leu Trp | | | |
| Asp Ile Val Gln Asp Glu | | | |
| | 725 | 730 | 735 |
| Asp Ala Val Asn Leu Ser Glu Gly Leu Ile | | | |
| Asn Glu Ala Glu Lys Leu | | | |
| | 740 | 745 | 750 |

| | | | |
|-----------------------------------------|------|------|------|
| 930 | 935 | 940 | |
| Leu Ala Arg Leu Ala Thr Ser Ala Tyr Asp | | | |
| Gly Cys Ser Asn Ser Glu | | | |
| 945 | 950 | 955 | 9 |
| 60 | | | |
| Leu Cys Gly Met Asp Gln Phe Trp Gly Ile | | | |
| Ala Leu Arg Ala Gln Ser | | | |
| | 965 | 970 | 975 |
| Gly Asp Val Ser Arg Ala Ala Ile Gln Tyr | | | |
| Ile Asn Ser Tyr Tyr Ile | | | |
| | 980 | 985 | 990 |
| Asn Gly Lys Thr Gly Leu Glu Lys Glu Gln | | | |
| Glu Phe Ile Ser Lys Cys | | | |
| | 995 | 1000 | 1005 |
| Met Glu Ser Leu Met Ile Ala Ser Ser Ser | | | |
| Leu Glu Gln Glu Ser His | | | |
| 1010 | 1015 | 1020 | |
| Ser Ser Leu Met Val Ile Glu Arg Gly Leu | | | |
| Leu Met Leu Lys Thr His | | | |
| 1025 | 1030 | 1035 | |
| 1040 | | | |
| Leu Glu Ala Phe Arg Arg Arg Phe Ala Tyr | | | |
| His Leu Arg Gln Trp Gln | | | |
| | 1045 | 1050 | 1055 |
| Ile Glu Gly Thr Gly Ile Ser Ser His Leu | | | |
| Lys Ala Leu Ser Asp Lys | | | |
| | 1060 | 1065 | 1070 |
| Gln Ser Leu Pro Leu Arg Val Val Cys Gln | | | |
| Pro Ala Gly Leu Pro Asp | | | |
| | 1075 | 1080 | 1085 |
| Lys Met Thr Ile Glu Met Tyr Pro Ser Asp | | | |
| Gln Val Ala Asp Leu Arg | | | |
| 1090 | 1095 | 1100 | |
| Ala Glu Val Thr His Trp Tyr Glu Asn Leu | | | |
| Gln Lys Glu Gln Ile Asn | | | |
| 1105 | 1110 | 1115 | |
| 1120 | | | |
| Gln Gln Ala Gln Leu Gln Glu Phe Gly Gln | | | |
| Ser Asn Arg Lys Gly Glu | | | |
| | 1125 | 1130 | 1135 |
| Phe Pro Gly Gly Leu Met Gly Pro Val Arg | | | |
| Met Ile Ser Ser Gly His | | | |
| | 1140 | 1145 | 1150 |

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 1330 | 1335 | 1340 |
| Asn Ser Lys Asn Ser Trp Ser Cys Lys Phe | | |
| Val Ala Ala Gly Gly Leu | | |
| 1345 | 1350 | 1355 |
| 1360 | | |
| Gln Gln Leu Leu Glu Ile Phe Asn Ser Gly | | |
| Ile Leu Glu Pro Lys Glu | | |
| | 1365 | 1370 |
| | | 1375 |
| Gln Glu Ser Trp Thr Val Trp Gln Leu Asp | | |
| Cys Leu Ala Cys Leu Leu | | |
| | 1380 | 1385 |
| | | 1390 |
| Lys Leu Ile Cys Gln Phe Ala Val Asp Pro | | |
| Ser Asp Leu Asp Leu Ala | | |
| | 1395 | 1400 |
| | | 1405 |
| Tyr His Asp Val Phe Ala Trp Ser Gly Ile | | |
| Ala Glu Ser His Arg Lys | | |
| | 1410 | 1415 |
| | | 1420 |
| Arg Thr Trp Pro Gly Lys Ser Arg Lys Ala | | |
| Ala Gly Asp His Ala Lys | | |
| 1425 | 1430 | 1435 |
| 1440 | | |
| Gly Leu His Ile Pro Arg Leu Thr Glu Val | | |
| Phe Leu Val Leu Val Gln | | |
| | 1445 | 1450 |
| | | 1455 |
| Gly Thr Ser Leu Ile Gln Arg Leu Met Ser | | |
| Val Ala Tyr Thr Tyr Asp | | |
| | 1460 | 1465 |
| | | 1470 |
| Asn Leu Ala Pro Arg Val Leu Lys Ala Gln | | |
| Ser Asp His Arg Ser Arg | | |
| | 1475 | 1480 |
| | | 1485 |
| His Glu Val Ser His Tyr Ser Met Trp Leu | | |
| Leu Val Ser Trp Ala His | | |
| | 1490 | 1495 |
| | | 1500 |
| Cys Cys Ser Leu Val Lys Ser Ser Leu Ala | | |
| Asp Ser Asp His Leu Gln | | |
| 1505 | 1510 | 1515 |
| 1520 | | |
| Asp Trp Leu Lys Lys Leu Thr Leu Leu Ile | | |
| Pro Glu Thr Ala Val Arg | | |
| | 1525 | 1530 |
| | | 1535 |
| His Glu Ser Cys Ser Gly Leu Tyr Lys Leu | | |
| Ser Leu Ser Gly Leu Asp | | |
| | 1540 | 1545 |
| | | 1550 |

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 1730 | 1735 | 1740 |
| Trp Asp Tyr Trp Pro His Glu Asp Val Arg | | |
| Ala Glu Cys Arg Phe Val | | |
| 1745 | 1750 | 1755 |
| 1760 | | |
| Gly Leu Thr Asn Leu Gly Ala Thr Cys Tyr | | |
| Leu Ala Ser Thr Ile Gln | | |
| | 1765 | 1770 |
| | | 1775 |
| Gln Leu Tyr Met Ile Pro Glu Ala Arg Gln | | |
| Ala Val Phe Thr Ala Lys | | |
| | 1780 | 1785 |
| | | 1790 |
| Tyr Ser Glu Asp Met Lys His Lys Thr Thr | | |
| Leu Leu Glu Leu Gln Lys | | |
| | 1795 | 1800 |
| | | 1805 |
| Met Phe Thr Tyr Leu Met Glu Ser Glu Cys | | |
| Lys Ala Tyr Asn Pro Arg | | |
| | 1810 | 1815 |
| | | 1820 |
| Pro Phe Cys Lys Thr Tyr Thr Met Asp Lys | | |
| Gln Pro Leu Asn Thr Gly | | |
| 1825 | 1830 | 1835 |
| 1840 | | |
| Glu Gln Lys Asp Met Thr Glu Phe Phe Thr | | |
| Asp Leu Ile Thr Lys Ile | | |
| | 1845 | 1850 |
| | | 1855 |
| Glu Glu Met Ser Pro Glu Leu Lys Asn Thr | | |
| Val Lys Ser Leu Phe Gly | | |
| | 1860 | 1865 |
| | | 1870 |
| Gly Val Ile Thr Asn Asn Val Val Ser Leu | | |
| Asp Cys Glu His Val Ser | | |
| | 1875 | 1880 |
| | | 1885 |
| Gln Thr Ala Glu Glu Phe Tyr Thr Val Arg | | |
| Cys Gln Val Ala Asp Met | | |
| | 1890 | 1895 |
| | | 1900 |
| Lys Asn Ile Tyr Glu Ser Leu Asp Glu Val | | |
| Thr Ile Lys Asp Thr Leu | | |
| 1905 | 1910 | 1915 |
| 1920 | | |
| Glu Gly Asp Asn Met Tyr Thr Cys Ser His | | |
| Cys Gly Lys Lys Val Arg | | |
| | 1925 | 1930 |
| | | 1935 |
| Ala Glu Lys Arg Ala Cys Phe Lys Lys Leu | | |
| Pro Arg Ile Leu Ser Phe | | |
| | 1940 | 1945 |
| | | 1950 |

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 2130 | 2135 | 2140 |
| Tyr Phe Gly Phe Met Trp Gln Leu Cys Ser | | |
| Cys Ile Pro Ser Thr Leu | | |
| 2145 | 2150 | 2155 |
| 2160 | | |
| Pro Asp Pro Lys Ala Val Ser Leu Met Thr | | |
| Ala Lys Leu Ser Thr Ser | | |
| | 2165 | 2170 |
| | | 2175 |
| Phe Val Leu Glu Thr Phe Ile His Ser Lys | | |
| Glu Lys Pro Thr Met Leu | | |
| | 2180 | 2185 |
| | | 2190 |
| Gln Trp Ile Glu Leu Leu Thr Lys Gln Phe | | |
| Asn Asn Ser Gln Ala Ala | | |
| | 2195 | 2200 |
| | | 2205 |
| Cys Glu Trp Phe Leu Asp Arg Met Ala Asp | | |
| Asp Asp Trp Trp Pro Met | | |
| 2210 | 2215 | 2220 |
| Gln Ile Leu Ile Lys Cys Pro Asn Gln Ile | | |
| Val Arg Gln Met Phe Gln | | |
| 2225 | 2230 | 2235 |
| 2240 | | |
| Arg Leu Cys Ile His Val Ile Gln Arg Leu | | |
| Arg Pro Val His Ala His | | |
| | 2245 | 2250 |
| | | 2255 |
| Leu Tyr Leu Gln Pro Gly Met Glu Asp Gly | | |
| Ser Asp Asp Met Asp Thr | | |
| | 2260 | 2265 |
| | | 2270 |
| Ser Val Glu Asp Ile Gly Gly Arg Ser Cys | | |
| Val Thr Arg Phe Val Arg | | |
| | 2275 | 2280 |
| | | 2285 |
| Thr Leu Leu Leu Ile Met Glu His Gly Val | | |
| Lys Pro His Ser Lys His | | |
| 2290 | 2295 | 2300 |
| Leu Thr Glu Tyr Phe Ala Phe Leu Tyr Glu | | |
| Phe Ala Lys Met Gly Glu | | |
| 2305 | 2310 | 2315 |
| 2320 | | |
| Glu Glu Ser Gln Phe Leu Leu Ser Leu Gln | | |
| Ala Ile Ser Thr Met Val | | |
| | 2325 | 2330 |
| | | 2335 |
| His Phe Tyr Met Gly Thr Lys Gly Pro Glu | | |
| Asn Pro Gln Val Glu Val | | |
| | 2340 | 2345 |
| | | 2350 |

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 2530 | 2535 | 2540 |
| Arg Val Arg Thr Ser Ala Ala Tyr Leu Leu | | |
| Val Ser Leu Ile Pro Ser | | |
| 2545 | 2550 | 2555 |
| 2560 | | |
| Asn Ser Phe Arg Gln Met Phe Arg Ser Thr | | |
| Arg Ser Leu His Ile Pro | | |
| | 2565 | 2570 |
| | | 2575 |
| Thr Arg Asp Leu Pro Leu Ser Pro Asp Thr | | |
| Thr Val Val Leu His Gln | | |
| | 2580 | 2585 |
| | | 2590 |
| Val Tyr Asn Val Leu Leu Gly Leu Leu Ser | | |
| Arg Ala Lys Leu Tyr Val | | |
| | 2595 | 2600 |
| | | 2605 |
| Asp Ala Ala Val His Gly Thr Thr Lys Leu | | |
| Val Pro Tyr Phe Ser Phe | | |
| | 2610 | 2615 |
| | | 2620 |
| Met Thr Tyr Cys Leu Ile Ser Lys Thr Glu | | |
| Lys Leu Met Phe Ser Thr | | |
| 2625 | 2630 | 2635 |
| 2640 | | |
| Tyr Phe Met Asp Leu Trp Asn Leu Phe Gln | | |
| Pro Lys Leu Ser Glu Pro | | |
| | 2645 | 2650 |
| | | 2655 |
| Ala Ile Ala Thr Asn His Asn Lys Gln Ala | | |
| Leu Leu Ser Phe Trp Tyr | | |
| | 2660 | 2665 |
| | | 2670 |
| Asn Val Cys Ala Asp Cys Pro Glu Asn Ile | | |
| Arg Leu Ile Val Gln Asn | | |
| | 2675 | 2680 |
| | | 2685 |
| Pro Val Val Thr Lys Asn Ile Ala Phe Asn | | |
| Tyr Ile Leu Ala Asp His | | |
| | 2690 | 2695 |
| | | 2700 |
| Asp Asp Gln Asp Val Val Leu Phe Asn Arg | | |
| Gly Met Leu Pro Ala Tyr | | |
| 2705 | 2710 | 2715 |
| 2720 | | |
| Tyr Gly Ile Leu Arg Leu Cys Cys Glu Gln | | |
| Ser Pro Ala Phe Thr Arg | | |
| | 2725 | 2730 |
| | | 2735 |
| Gln Leu Ala Ser His Gln Asn Ile Gln Trp | | |
| Ala Phe Lys Asn Leu Thr | | |
| | 2740 | 2745 |
| | | 2750 |

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 2930 | 2935 | 2940 |
| Thr Tyr His His Ser Asn Ile Pro Met Ser | | |
| Leu Gly Pro Tyr Phe Pro | | |
| 2945 | 2950 | 2955 |
| 2960 | | |
| Cys Arg Glu Asn Ile Lys Leu Ile Gly Gly | | |
| Lys Ser Asn Ile Arg Pro | | |
| | 2965 | 2970 |
| | | 2975 |
| Pro Arg Pro Glu Leu Asn Met Cys Leu Leu | | |
| Pro Thr Met Val Glu Thr | | |
| | 2980 | 2985 |
| | | 2990 |
| Ser Lys Gly Lys Asp Asp Val Tyr Asp Arg | | |
| Met Leu Leu Asp Tyr Phe | | |
| | 2995 | 3000 |
| | | 3005 |
| Phe Ser Tyr His Gln Phe Ile His Leu Leu | | |
| Cys Arg Val Ala Ile Asn | | |
| | 3010 | 3015 |
| | | 3020 |
| Cys Glu Lys Phe Thr Glu Thr Leu Val Lys | | |
| Leu Ser Val Leu Val Ala | | |
| 3025 | 3030 | 3035 |
| 3040 | | |
| Tyr Glu Gly Leu Pro Leu His Leu Ala Leu | | |
| Phe Pro Lys Leu Trp Thr | | |
| | 3045 | 3050 |
| | | 3055 |
| Glu Leu Cys Gln Thr Gln Ser Ala Met Ser | | |
| Lys Asn Cys Ile Lys Leu | | |
| | 3060 | 3065 |
| | | 3070 |
| Leu Cys Glu Asp Pro Val Phe Ala Glu Tyr | | |
| Ile Lys Cys Ile Leu Met | | |
| | 3075 | 3080 |
| | | 3085 |
| Asp Glu Arg Thr Phe Leu Asn Asn Asn Ile | | |
| Val Tyr Thr Phe Met Thr | | |
| | 3090 | 3095 |
| | | 3100 |
| His Phe Leu Leu Lys Val Gln Ser Gln Val | | |
| Phe Ser Glu Ala Asn Cys | | |
| 3105 | 3110 | 3115 |
| 3120 | | |
| Ala Asn Leu Ile Ser Thr Leu Ile Thr Asn | | |
| Leu Ile Ser Gln Tyr Gln | | |
| | 3125 | 3130 |
| | | 3135 |
| Asn Leu Gln Ser Asp Phe Ser Asn Arg Val | | |
| Glu Ile Ser Lys Ala Ser | | |
| | 3140 | 3145 |
| | | 3150 |

3330 3335 3340
 Asp Leu Ala Asp Leu Arg Ser Cys Asp Gly
 Gln Ala Leu Pro Ser Gln
 3345 3350 3355
 3360
 Asp Pro Glu Val Ala Leu Ser Leu Ser Cys
 Gly His Ser Arg Gly Leu
 3365 3370 3375

 Phe Ser His Met Gln Gln His Asp Ile Leu
 Asp Thr Leu Cys Arg Thr
 3380 3385 3390

 Ile Glu Ser Thr Ile His Val Val Thr Arg
 Ile Ser Gly Lys Gly Asn
 3395 3400 3405

 Gln Ala Ala Ser

3410

<210> 3

<211> 3411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gagctactga tgcttcttcc tacatgtcct aata
 tgttga tggcattcca gaatatctca 60
 gatgagcaga gtaatgatgg atttaattgg aaag
 aacttc tcaaaattaa gagcgccac 120
 aagctattgt atgctctgga aattattgaa gcac
 tgggaa aacctaatag aagaataagg 180
 agggagtcta cggaagtta cagtatctt tatc
 cagatt cagatgattc aagtaggat 240
 caagtggaaa atagtaaaaa ttctggagt tgca
 agtttg ttgctgctgg agggcttcaa 300
 cagttattag aaatttttaa ttctggaatt ctag
 agccta aagagcagga atcatggact 360
 gtgtggcagc tagactgtct tgcttgcttg ctga
 agttaa tatgccagt tgcagtagat 420
 ccatccgatt tggatttagc ttatcatgat gtct
 ttgcct ggtctggtat agcggaaagc 480
 cataggaaaa gaacctggcc tggcaaatca agga
 aggctg ctgggatca tgctaagggt 540
 ctatcatatac cacgattaac agaggatttt ctg
 ttcttg tccaaggaac cagtttgatt 600
 cagcgactta tgtctgttgc ttatacgtat gata
 atctgg ctcttagagt tttaaaagct 660
 cagtctgac acaggtctag acatgaagtt tcac
 attatt caatgtggct ctgggtgagt 720
 tgggctcatt gctgttcttt agtgaatct agcc
 ttgctg atagcagatca ttacaagat 780
 tggctaaaga aattgactct ccttattcct gaga

tgttttaaga aattgcctcg catTTTgagt ttca
atacta tgagatacac atttaatatg 2100
gtcacgatga tgaagagaa agtgaataca cact
tttctt tcccattacg tttggacatg 2160
acgccctata cagaagattt tcttatggga aaga
gtgaga ggaagaagg ttttaaagaa 2220
gtcagtgatc attcaaaaga ctcagagagc tatg
aatatg acttgatagg agtgactggt 2280
cacacaggaa cggcagatgg tggacactat tata
gcttta tcagagatat agtaaatccc 2340
catgcttata aaaacaataa atggtatctt tttt
atgatg ctgaggtaaa accttttgat 2400
tctgctcaac ttgcatctga atgttttggg ggag
agatga cgaccaagac ctatgattct 2460
gttacagata aatttatgga cttctctttt gaaa
agacac acagtgcata tatgctgttt 2520
tacaaacgca tggaccaga ggaagaaaat ggca
gagaat acaaatttga tgtttcgtca 2580
gagttactag agtggatttg gcatgataac atgc
agtttc ttcaagacaa aaacattttt 2640
gaacatacat attttggatt tatgtggcaa ttgt
gtagtt gtattcccag tacattacca 2700
gatcctaaag ctgtgtcctt aatgacagca aagt
taagca cttcctttgt cctagagaca 2760
tttattcatt ctaaagaaaa gccacgatg cttc
agtgga ttgaactgtt gacgaaacag 2820
tttaataata gtcaggcagc ttgtgagtgg tttt
tagatc gtatggctga tgacgactgg 2880
tggccaatgc agatactaat taagtgccct aatc
aaattg tgagacagat gtttcagcgt 2940
ttgtgtatcc atgtgattca gaggctgaga cctg
tgcatg ctcatctcta tttgcagcca 3000
ggaatggaag atgggtcaga tgatatgat acct
cagtag aagatattgg tggtcgttca 3060
tgtgtcactc gctttgtgag aaccctgtta ttaa
ttatgg aacatggtgt aaaacctcac 3120
agtaaacatc ttacagagta tttgccttc cttt
acgaat ttgcaaaaat gggtagaagaa 3180
gagagccaat ttttgctttc attgcaagct atat
ctacaa tggtagattt ttacatggga 3240
acaaaaggac ctgaaaatcc tcaagttgaa gtgt
tatcag aggaagaagg ggaagaagaa 3300
gaggaggaag aagatattct ctctctggca gaag
aaaaat acaggccagc tgcccttgaa 3360
aagatgatag ctttagttgc tcttttgggt gaac
agtctc gatcagaaag g 3411

<210> 4

<211> 11269

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (480)..(10718)

| | | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 | |
| gat atg aat gat gta gaa gta cca ttg cat | | | |
| ttg ctt cgt tat gta tgt 719 | | | |
| Asp Met Asn Asp Val Glu Val Pro Leu His | | | |
| Leu Leu Arg Tyr Val Cys | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| ttg ttt tgt ggg aaa aat ggc ctt tct ctc | | | |
| atg aag gat tgc ttt gaa 767 | | | |
| Leu Phe Cys Gly Lys Asn Gly Leu Ser Leu | | | |
| Met Lys Asp Cys Phe Glu | | | |
| 85 | 90 | | 95 |
| tat gga act cct gaa act ttg cca ttt ctt | | | |
| ata gca cat gcg ttt att 815 | | | |
| Tyr Gly Thr Pro Glu Thr Leu Pro Phe Leu | | | |
| Ile Ala His Ala Phe Ile | | | |
| 100 | 105 | | 110 |
| aca gtt gtg tct aat att aga ata tgg cta | | | |
| cat att ccc gct gtc atg 863 | | | |
| Thr Val Val Ser Asn Ile Arg Ile Trp Leu | | | |
| His Ile Pro Ala Val Met | | | |
| 115 | 120 | | 125 |
| cag cac att ata cct ttt agg acc tat gtt | | | |
| att agg tat tta tgc aag 911 | | | |
| Gln His Ile Ile Pro Phe Arg Thr Tyr Val | | | |
| Ile Arg Tyr Leu Cys Lys | | | |
| 130 | 135 | | 140 |
| ctc tcg gat cag gag tta cga cag agt gca | | | |
| gct cgt aac atg gct gac 959 | | | |
| Leu Ser Asp Gln Glu Leu Arg Gln Ser Ala | | | |
| Ala Arg Asn Met Ala Asp | | | |
| 145 | 150 | 155 | 1 |
| 60 | | | |
| tta atg tgg agc aca gtc aaa gaa cca ttg | | | |
| gat aca aca tta tgc ttt 1007 | | | |
| Leu Met Trp Ser Thr Val Lys Glu Pro Leu | | | |
| Asp Thr Thr Leu Cys Phe | | | |
| 165 | 170 | | 175 |
| gat aaa gaa agc cta gat ctt gca ttt aag | | | |
| tac ttt atg tca cct act 1055 | | | |
| Asp Lys Glu Ser Leu Asp Leu Ala Phe Lys | | | |
| Tyr Phe Met Ser Pro Thr | | | |
| 180 | 185 | | 190 |
| ttg act atg agg ttg gct gga ttg agt cag | | | |
| ata aca aat caa ctc cat 1103 | | | |
| Leu Thr Met Arg Leu Ala Gly Leu Ser Gln | | | |
| Ile Thr Asn Gln Leu His | | | |
| 195 | 200 | | 205 |

gtt cat act gaa cag aca ctg tac ttg gca
 tcc atg tta att aaa gca 1487
 Val His Thr Glu Gln Thr Leu Tyr Leu Ala
 Ser Met Leu Ile Lys Ala
 325 330 335

ctg tgg aat aac gca cta gca gct aag gct
 cag tta tct aaa cag agt 1535
 Leu Trp Asn Asn Ala Leu Ala Ala Lys Ala
 Gln Leu Ser Lys Gln Ser
 340 345 350

tct ttt gca tct tta tta aat act aat att
 ccc att gga aat aag aaa 1583
 Ser Phe Ala Ser Leu Leu Asn Thr Asn Ile
 Pro Ile Gly Asn Lys Lys
 355 360 365

gag gaa gaa gag ctt aga aga aca gct cca
 tca cct tgg tca cct gca 1631
 Glu Glu Glu Glu Leu Arg Arg Thr Ala Pro
 Ser Pro Trp Ser Pro Ala
 370 375 380

gct agt cct caa agc agt gat aat agc gat
 aca cat caa agt gga ggt 1679
 Ala Ser Pro Gln Ser Ser Asp Asn Ser Asp
 Thr His Gln Ser Gly Gly
 385 390 395 400

agt gac att gaa atg gat gag caa ctt att
 aat aga acc aaa cat gtg 1727
 Ser Asp Ile Glu Met Asp Glu Gln Leu Ile
 Asn Arg Thr Lys His Val
 405 410 415

caa caa cga ctt tca gac aca gag gaa tcc
 atg cag gga agt tct gac 1775
 Gln Gln Arg Leu Ser Asp Thr Glu Glu Ser
 Met Gln Gly Ser Ser Asp
 420 425 430

gaa act gcc aac agt ggt gaa gat gga agc
 agt ggt cct ggt agc agt 1823
 Glu Thr Ala Asn Ser Gly Glu Asp Gly Ser
 Ser Gly Pro Gly Ser Ser
 435 440 445

agt ggg cat agt gat gga tct agc aat gag
 gtt aat tct agc cac gca 1871
 Ser Gly His Ser Asp Gly Ser Ser Asn Glu
 Val Asn Ser Ser His Ala

Ala Thr His Ile Ala Gln Gly Ser Gln Glu
Ser Cys Ile Thr Arg Thr
580 585 590

ggg gac ttc ctt ggg gag act att ggg aat
gaa tta ttt aat tgt cga 2303
Gly Asp Phe Leu Gly Glu Thr Ile Gly Asn
Glu Leu Phe Asn Cys Arg
595 600 605

caa ttt att ggt cca cag cat cac cac cac
cac cac cac cat cac cac 2351
Gln Phe Ile Gly Pro Gln His His His His
His His His His His His
610 615 620

cac cac gat ggg cat atg gtt gat gat atg
cta agt gca gat gat gtc 2399
His His Asp Gly His Met Val Asp Asp Met
Leu Ser Ala Asp Asp Val
625 630 635 6
40

agt tgt agt agc tcc cag gtt agt gca aaa
tca gaa aaa aat atg gct 2447
Ser Cys Ser Ser Ser Gln Val Ser Ala Lys
Ser Glu Lys Asn Met Ala
645 650 655

gat ttt gat ggt gaa gaa tct gga tgt gaa
gag gag cta gtt cag att 2495
Asp Phe Asp Gly Glu Glu Ser Gly Cys Glu
Glu Glu Leu Val Gln Ile
660 665 670

aat tca cat gcg gaa ctg aca tct cac ctc
caa caa cat ctt ccc aat 2543
Asn Ser His Ala Glu Leu Thr Ser His Leu
Gln Gln His Leu Pro Asn
675 680 685

tta gct tcc att tac cat gaa cat ctt agt
caa gga cct gta gtt cat 2591
Leu Ala Ser Ile Tyr His Glu His Leu Ser
Gln Gly Pro Val Val His
690 695 700

aaa cat caa ttc aac agt aat gct gtt aca
gac att aat ttg gat aat 2639
Lys His Gln Phe Asn Ser Asn Ala Val Thr
Asp Ile Asn Leu Asp Asn
705 710 715 7
20

gtt tgc aag aaa gga aat act ttg ttg tgg

| | | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|---|
| 835 | 840 | 845 | |
| gaa gtt caa gtt cgt ctt caa ttc ttg act | | | |
| tgt gta ttt tca act ctg 3071 | | | |
| Glu Val Gln Val Arg Leu Gln Phe Leu Thr | | | |
| Cys Val Phe Ser Thr Leu | | | |
| 850 | 855 | 860 | |
| gga tca cct gat cat ttc agg tta agt tta | | | |
| gag caa gtt gac atc tta 3119 | | | |
| Gly Ser Pro Asp His Phe Arg Leu Ser Leu | | | |
| Glu Gln Val Asp Ile Leu | | | |
| 865 | 870 | 875 | 8 |
| 80 | | | |
| tgg cat tgt tta gta gaa gat tct gaa tgt | | | |
| tat gat gat gca ctc cat 3167 | | | |
| Trp His Cys Leu Val Glu Asp Ser Glu Cys | | | |
| Tyr Asp Asp Ala Leu His | | | |
| 885 | 890 | 895 | |
| tgg ttt tta aat caa gtt cga agt aaa gat | | | |
| caa cat gct atg ggt atg 3215 | | | |
| Trp Phe Leu Asn Gln Val Arg Ser Lys Asp | | | |
| Gln His Ala Met Gly Met | | | |
| 900 | 905 | 910 | |
| gaa acc tac aaa cat ctt ttc ctg gag aag | | | |
| atg ccc cag cta aaa cct 3263 | | | |
| Glu Thr Tyr Lys His Leu Phe Leu Glu Lys | | | |
| Met Pro Gln Leu Lys Pro | | | |
| 915 | 920 | 925 | |
| gaa aca att agc atg act ggc tta aac ctg | | | |
| ttt cag cat ctc tgt aac 3311 | | | |
| Glu Thr Ile Ser Met Thr Gly Leu Asn Leu | | | |
| Phe Gln His Leu Cys Asn | | | |
| 930 | 935 | 940 | |
| ttg gct cga ttg gct acc agt gcc tat gat | | | |
| ggt tgt tca aat tct gag 3359 | | | |
| Leu Ala Arg Leu Ala Thr Ser Ala Tyr Asp | | | |
| Gly Cys Ser Asn Ser Glu | | | |
| 945 | 950 | 955 | 9 |
| 60 | | | |
| ctg tgt ggt atg gac caa ttt tgg ggc att | | | |
| gct tta aga gca caa tct 3407 | | | |
| Leu Cys Gly Met Asp Gln Phe Trp Gly Ile | | | |
| Ala Leu Arg Ala Gln Ser | | | |
| 965 | 970 | 975 | |
| ggg gat gtc agt cga gca gct atc cag tat | | | |
| att aac tcc tat tat att 3455 | | | |
| Gly Asp Val Ser Arg Ala Ala Ile Gln Tyr | | | |

Ala Glu Val Thr His Trp Tyr Glu Asn Leu
 Gln Lys Glu Gln Ile Asn
 1105 1110 1115
 1120
 caa caa gct cag ctt cag gag ttt ggt caa
 agc aac cga aaa gga gag 3887
 Gln Gln Ala Gln Leu Gln Glu Phe Gly Gln
 Ser Asn Arg Lys Gly Glu
 1125 1130 1135

 ttt cct gga ggc ctc atg gga cct gtc agg
 atg att tca tct gga cac 3935
 Phe Pro Gly Gly Leu Met Gly Pro Val Arg
 Met Ile Ser Ser Gly His
 1140 1145 1150

 gag tta aca aca gat tat gat gaa aaa gca
 ctt cat gag ctt ggt ttt 3983
 Glu Leu Thr Thr Asp Tyr Asp Glu Lys Ala
 Leu His Glu Leu Gly Phe
 1155 1160 1165

 aag gat atg cag atg gta ttt gta tct ttg
 ggt gca cca agg aga gag 4031
 Lys Asp Met Gln Met Val Phe Val Ser Leu
 Gly Ala Pro Arg Arg Glu
 1170 1175 1180

 cgg aaa ggg gaa ggt gtt cag ctg cca gca
 tct tgc ctc cca ccc cct 4079
 Arg Lys Gly Glu Gly Val Gln Leu Pro Ala
 Ser Cys Leu Pro Pro Pro
 1185 1190 1195
 1200
 cag aag gac aac att cca atg ctt ttg ctt
 tta caa gag cct cat tta 4127
 Gln Lys Asp Asn Ile Pro Met Leu Leu Leu
 Leu Gln Glu Pro His Leu
 1205 1210 1215

 act act ctt ttt gat tta tta gag atg ctt
 gca tca ttt aaa cca ccc 4175
 Thr Thr Leu Phe Asp Leu Leu Glu Met Leu
 Ala Ser Phe Lys Pro Pro
 1220 1225 1230

 tca gga aaa gtg gca gtg gat gat agt gag
 agc tta cga tgt gaa gaa 4223
 Ser Gly Lys Val Ala Val Asp Asp Ser Glu
 Ser Leu Arg Cys Glu Glu
 1235 1240 1245

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 1365 | 1370 | 1375 |
| cag gaa tca tgg act gtg tgg cag cta gac | | |
| tgt ctt gct tgc ttg ctg 4655 | | |
| Gln Glu Ser Trp Thr Val Trp Gln Leu Asp | | |
| Cys Leu Ala Cys Leu Leu | | |
| 1380 | 1385 | 1390 |
| aag tta ata tgc cag ttt gca gta gat cca | | |
| tcc gat ttg gat tta gct 4703 | | |
| Lys Leu Ile Cys Gln Phe Ala Val Asp Pro | | |
| Ser Asp Leu Asp Leu Ala | | |
| 1395 | 1400 | 1405 |
| tat cat gat gtc ttt gcc tgg tct ggt ata | | |
| gcg gaa agc cat agg aaa 4751 | | |
| Tyr His Asp Val Phe Ala Trp Ser Gly Ile | | |
| Ala Glu Ser His Arg Lys | | |
| 1410 | 1415 | 1420 |
| aga acc tgg cct ggc aaa tca agg aag gct | | |
| gct ggt gat cat gct aag 4799 | | |
| Arg Thr Trp Pro Gly Lys Ser Arg Lys Ala | | |
| Ala Gly Asp His Ala Lys | | |
| 1425 | 1430 | 1435 |
| 1440 | | |
| ggt ctt cat ata cca cga tta aca gag gta | | |
| ttt ctt gtt ctt gtc caa 4847 | | |
| Gly Leu His Ile Pro Arg Leu Thr Glu Val | | |
| Phe Leu Val Leu Val Gln | | |
| 1445 | 1450 | 1455 |
| gga acc agt ttg att cag cga ctt atg tct | | |
| ggt gct tat acg tat gat 4895 | | |
| Gly Thr Ser Leu Ile Gln Arg Leu Met Ser | | |
| Val Ala Tyr Thr Tyr Asp | | |
| 1460 | 1465 | 1470 |
| aat ctg gct cct aga gtt tta aaa gct cag | | |
| tct gat cac agg tct aga 4943 | | |
| Asn Leu Ala Pro Arg Val Leu Lys Ala Gln | | |
| Ser Asp His Arg Ser Arg | | |
| 1475 | 1480 | 1485 |
| cat gaa gtt tca cat tat tca atg tgg ctc | | |
| ttg gtg agt tgg gct cat 4991 | | |
| His Glu Val Ser His Tyr Ser Met Trp Leu | | |
| Leu Val Ser Trp Ala His | | |
| 1490 | 1495 | 1500 |
| tgc tgt tct tta gtg aaa tct agc ctt gct | | |
| gat agc gat cat tta caa 5039 | | |
| Cys Cys Ser Leu Val Lys Ser Ser Leu Ala | | |

Asp Cys Ile Arg Ser Arg Glu Ile Leu Asp
His Gln Asp Gly Asn Val

1635 1640 1645

gaa gat gat ggg ctt aca gga ctc cta agg
ctt gca aca agt gtt gtt 5471
Glu Asp Asp Gly Leu Thr Gly Leu Leu Arg
Leu Ala Thr Ser Val Val

1650 1655 1660

aaa cac aaa cca ccc ttt aaa ttt tca agg
gaa gga cag gaa ttt ttg 5519
Lys His Lys Pro Pro Phe Lys Phe Ser Arg
Glu Gly Gln Glu Phe Leu

1665 1670 1675
1680

aga gat atc ttc aat ctc ctg ttt ttg ttg
cca agt cta aag gac cga 5567
Arg Asp Ile Phe Asn Leu Leu Phe Leu Leu
Pro Ser Leu Lys Asp Arg

1685 1690 1695

caa cag cca aag tgc aaa tca cat tct tca
aga gct gcc gct tac gat 5615
Gln Gln Pro Lys Cys Lys Ser His Ser Ser
Arg Ala Ala Ala Tyr Asp

1700 1705 1710

ttg tta gta gag atg gta aag ggg tct gtt
gag aac tac agg cta ata 5663
Leu Leu Val Glu Met Val Lys Gly Ser Val
Glu Asn Tyr Arg Leu Ile

1715 1720 1725

cac aac tgg gtt atg gca caa cac atg cag
tcc cat gca cct tat aaa 5711
His Asn Trp Val Met Ala Gln His Met Gln
Ser His Ala Pro Tyr Lys

1730 1735 1740

tgg gat tac tgg cct cat gaa gat gtc cgt
gct gaa tgt aga ttt gtt 5759
Trp Asp Tyr Trp Pro His Glu Asp Val Arg
Ala Glu Cys Arg Phe Val

1745 1750 1755
1760

ggc ctt act aac ctt gga gct act tgt tac
tta gct tct act att cag 5807
Gly Leu Thr Asn Leu Gly Ala Thr Cys Tyr
Leu Ala Ser Thr Ile Gln

1765 1770 1775

| | | | |
|-----------------------------------------|------|------|------|
| 1890 | 1895 | 1900 | |
| aag aac att tat gaa tct ctt gat gaa gtt | | | |
| act ata aaa gac act ttg 6239 | | | |
| Lys Asn Ile Tyr Glu Ser Leu Asp Glu Val | | | |
| Thr Ile Lys Asp Thr Leu | | | |
| 1905 | 1910 | 1915 | |
| 1920 | | | |
| gaa ggt gat aac atg tat act tgt tct cat | | | |
| tgt ggg aag aaa gta cga 6287 | | | |
| Glu Gly Asp Asn Met Tyr Thr Cys Ser His | | | |
| Cys Gly Lys Lys Val Arg | | | |
| | 1925 | 1930 | 1935 |
| gct gaa aaa agg gca tgt ttt aag aaa ttg | | | |
| cct cgc att ttg agt ttc 6335 | | | |
| Ala Glu Lys Arg Ala Cys Phe Lys Lys Leu | | | |
| Pro Arg Ile Leu Ser Phe | | | |
| | 1940 | 1945 | 1950 |
| aat act atg aga tac aca ttt aat atg gtc | | | |
| acg atg atg aaa gag aaa 6383 | | | |
| Asn Thr Met Arg Tyr Thr Phe Asn Met Val | | | |
| Thr Met Met Lys Glu Lys | | | |
| 1955 | 1960 | 1965 | |
| gtg aat aca cac ttt tcc ttc cca tta cgt | | | |
| ttg gac atg acg ccc tat 6431 | | | |
| Val Asn Thr His Phe Ser Phe Pro Leu Arg | | | |
| Leu Asp Met Thr Pro Tyr | | | |
| 1970 | 1975 | 1980 | |
| aca gaa gat ttt ctt atg gga aag agt gag | | | |
| agg aaa gaa ggt ttt aaa 6479 | | | |
| Thr Glu Asp Phe Leu Met Gly Lys Ser Glu | | | |
| Arg Lys Glu Gly Phe Lys | | | |
| 1985 | 1990 | 1995 | |
| 2000 | | | |
| gaa gtc agt gat cat tca aaa gac tca gag | | | |
| agc tat gaa tat gac ttg 6527 | | | |
| Glu Val Ser Asp His Ser Lys Asp Ser Glu | | | |
| Ser Tyr Glu Tyr Asp Leu | | | |
| | 2005 | 2010 | 2015 |
| ata gga gtg act gtt cac aca gga acg gca | | | |
| gat ggt gga cac tat tat 6575 | | | |
| Ile Gly Val Thr Val His Thr Gly Thr Ala | | | |
| Asp Gly Gly His Tyr Tyr | | | |
| | 2020 | 2025 | 2030 |
| agc ttt atc aga gat ata gta aat ccc cat | | | |
| gct tat aaa aac aat aaa 6623 | | | |
| Ser Phe Ile Arg Asp Ile Val Asn Pro His | | | |

cca gat cct aaa gct gtg tcc tta atg aca
 gca aag tta agc act tcc 7007
 Pro Asp Pro Lys Ala Val Ser Leu Met Thr
 Ala Lys Leu Ser Thr Ser
 2165 2170 2175

ttt gtc cta gag aca ttt att cat tct aaa
 gaa aag ccc acg atg ctt 7055
 Phe Val Leu Glu Thr Phe Ile His Ser Lys
 Glu Lys Pro Thr Met Leu
 2180 2185 2190

cag tgg att gaa ctg ttg acg aaa cag ttt
 aat aat agt cag gca gct 7103
 Gln Trp Ile Glu Leu Leu Thr Lys Gln Phe
 Asn Asn Ser Gln Ala Ala
 2195 2200 2205

tgt gag tgg ttt tta gat cgt atg gct gat
 gac gac tgg tgg cca atg 7151
 Cys Glu Trp Phe Leu Asp Arg Met Ala Asp
 Asp Asp Trp Trp Pro Met
 2210 2215 2220

cag ata cta att aag tgc cct aat caa att
 gtg aga cag atg ttt cag 7199
 Gln Ile Leu Ile Lys Cys Pro Asn Gln Ile
 Val Arg Gln Met Phe Gln
 2225 2230 2235
 2240

cgt ttg tgt atc cat gtg att cag agg ctg
 aga cct gtg cat gct cat 7247
 Arg Leu Cys Ile His Val Ile Gln Arg Leu
 Arg Pro Val His Ala His
 2245 2250 2255

ctc tat ttg cag cca gga atg gaa gat ggg
 tca gat gat atg gat acc 7295
 Leu Tyr Leu Gln Pro Gly Met Glu Asp Gly
 Ser Asp Asp Met Asp Thr
 2260 2265 2270

tca gta gaa gat att ggt ggt cgt tca tgt
 gtc act cgc ttt gtg aga 7343
 Ser Val Glu Asp Ile Gly Gly Arg Ser Cys
 Val Thr Arg Phe Val Arg
 2275 2280 2285

acc ctg tta tta att atg gaa cat ggt gta
 aaa cct cac agt aaa cat 7391
 Thr Leu Leu Leu Ile Met Glu His Gly Val
 Lys Pro His Ser Lys His
 2290 2295 2300

| | | |
|-----------------------------------------|------|------|
| 2420 | 2425 | 2430 |
| tgt aat ctg att ttc agc ctg tgt cga tac | | |
| aat aat cga ctt gca gaa 7823 | | |
| Cys Asn Leu Ile Phe Ser Leu Cys Arg Tyr | | |
| Asn Asn Arg Leu Ala Glu | | |
| 2435 | 2440 | 2445 |
| cat att gta tct atg ctt ttc aca tca ata | | |
| gca aag ttg act cct gag 7871 | | |
| His Ile Val Ser Met Leu Phe Thr Ser Ile | | |
| Ala Lys Leu Thr Pro Glu | | |
| 2450 | 2455 | 2460 |
| gca gcc aat cct ttc ttt aag ttg ttg act | | |
| atg cta atg gag ttt gct 7919 | | |
| Ala Ala Asn Pro Phe Phe Lys Leu Leu Thr | | |
| Met Leu Met Glu Phe Ala | | |
| 2465 | 2470 | 2475 |
| 2480 | | |
| ggt gga cct cca gga atg cct ccc ttt gca | | |
| tct tat att ctg cag agg 7967 | | |
| Gly Gly Pro Pro Gly Met Pro Pro Phe Ala | | |
| Ser Tyr Ile Leu Gln Arg | | |
| 2485 | 2490 | 2495 |
| ata tgg gag gtg att gaa tac aat cct tct | | |
| cag tgt cta gat tgg ttg 8015 | | |
| Ile Trp Glu Val Ile Glu Tyr Asn Pro Ser | | |
| Gln Cys Leu Asp Trp Leu | | |
| 2500 | 2505 | 2510 |
| gca gtg cag aca ccc cga aat aaa ctg gca | | |
| cac agc tgg gtc tta cag 8063 | | |
| Ala Val Gln Thr Pro Arg Asn Lys Leu Ala | | |
| His Ser Trp Val Leu Gln | | |
| 2515 | 2520 | 2525 |
| aat atg gaa aac tgg gtc gag cgg ttt ctt | | |
| ttg gct cac aat tat cct 8111 | | |
| Asn Met Glu Asn Trp Val Glu Arg Phe Leu | | |
| Leu Ala His Asn Tyr Pro | | |
| 2530 | 2535 | 2540 |
| aga gtg agg act tct gca gct tat ctt ctg | | |
| gtg tcc ctt ata cca agc 8159 | | |
| Arg Val Arg Thr Ser Ala Ala Tyr Leu Leu | | |
| Val Ser Leu Ile Pro Ser | | |
| 2545 | 2550 | 2555 |
| 2560 | | |
| aat tca ttc cgt cag atg ttc cgg tca aca | | |
| agg tct ttg cac atc cca 8207 | | |
| Asn Ser Phe Arg Gln Met Phe Arg Ser Thr | | |

cca gtg gta acc aag aac att gcc ttc aat
tac atc ctt gct gac cat 8591

Pro Val Val Thr Lys Asn Ile Ala Phe Asn

Tyr Ile Leu Ala Asp His

2690

2695

2700

gat gat cag gat gtg gtg ctt ttt aac cgt
ggg atg ctg cca gcg tac 8639

Asp Asp Gln Asp Val Val Leu Phe Asn Arg

Gly Met Leu Pro Ala Tyr

2705

2710

2715

2720

tat ggc att ctg agg ctc tgc tgt gag cag
tct cct gca ttc aca cga 8687

Tyr Gly Ile Leu Arg Leu Cys Cys Glu Gln

Ser Pro Ala Phe Thr Arg

2725

2730

2735

caa ctg gct tct cac cag aac atc cag tgg
gcc ttt aag aat ctt aca 8735

Gln Leu Ala Ser His Gln Asn Ile Gln Trp

Ala Phe Lys Asn Leu Thr

2740

2745

2750

cca cat gcc agc caa tac cct gga gca gta
gaa gaa ctg ttt aac ctg 8783

Pro His Ala Ser Gln Tyr Pro Gly Ala Val

Glu Glu Leu Phe Asn Leu

2755

2760

2765

atg cag ctg ttt ata gct cag agg cca gat
atg aga gaa gaa gaa tta 8831

Met Gln Leu Phe Ile Ala Gln Arg Pro Asp

Met Arg Glu Glu Glu Leu

2770

2775

2780

gaa gat att aaa cag ttc aag aaa aca acc
ata agt tgt tac tta cgt 8879

Glu Asp Ile Lys Gln Phe Lys Lys Thr Thr

Ile Ser Cys Tyr Leu Arg

2785

2790

2795

2800

tgc tta gat ggc cgc tcc tgc tgg act act
tta ata agt gcc ttc aga 8927

Cys Leu Asp Gly Arg Ser Cys Trp Thr Thr

Leu Ile Ser Ala Phe Arg

2805

2810

2815

ata cta tta gaa tct gat gaa gac aga ctt
ctt gtt gta ttt aat cga 8975

Ile Leu Leu Glu Ser Asp Glu Asp Arg Leu

Leu Val Val Phe Asn Arg

Thr Tyr His His Ser Asn Ile Pro Met Ser
 Leu Gly Pro Tyr Phe Pro
 2945 2950 2955
 2960
 tgt cga gaa aat atc aag cta ata gga ggg
 aaa agc aat att cgg cct 9407
 Cys Arg Glu Asn Ile Lys Leu Ile Gly Gly
 Lys Ser Asn Ile Arg Pro
 2965 2970 2975

 ccg cgc cct gaa ctc aat atg tgc ctc ttg
 ccc aca atg gtg gaa acc 9455
 Pro Arg Pro Glu Leu Asn Met Cys Leu Leu
 Pro Thr Met Val Glu Thr
 2980 2985 2990

 agt aag ggc aaa gat gac gtt tat gat cgt
 atg ctg cta gac tac ttc 9503
 Ser Lys Gly Lys Asp Asp Val Tyr Asp Arg
 Met Leu Leu Asp Tyr Phe
 2995 3000 3005

 ttt tct tat cat cag ttc atc cat cta tta
 tgc cga gtt gca atc aac 9551
 Phe Ser Tyr His Gln Phe Ile His Leu Leu
 Cys Arg Val Ala Ile Asn
 3010 3015 3020

 tgt gaa aaa ttt act gaa aca tta gtt aag
 ctg agt gtc cta gtt gcc 9599
 Cys Glu Lys Phe Thr Glu Thr Leu Val Lys
 Leu Ser Val Leu Val Ala
 3025 3030 3035
 3040
 tat gaa ggt ttg cca ctt cat ctt gca ctg
 ttc ccc aaa ctt tgg act 9647
 Tyr Glu Gly Leu Pro Leu His Leu Ala Leu
 Phe Pro Lys Leu Trp Thr
 3045 3050 3055

 gag cta tgc cag act cag tct gct atg tca
 aaa aac tgc atc aag ctt 9695
 Glu Leu Cys Gln Thr Gln Ser Ala Met Ser
 Lys Asn Cys Ile Lys Leu
 3060 3065 3070

 ttg tgt gaa gat cct gtt ttc gca gaa tat
 att aaa tgt atc cta atg 9743
 Leu Cys Glu Asp Pro Val Phe Ala Glu Tyr
 Ile Lys Cys Ile Leu Met
 3075 3080 3085

Glu Gln Glu Ala Lys Glu Arg Lys Thr Lys
Asp Asp Glu Gly Ala Thr

3205 3210 3215

ccc att aaa agg cgg cgt gtt agc agt gat
gag gag cac act gta gac 10175
Pro Ile Lys Arg Arg Arg Val Ser Ser Asp
Glu Glu His Thr Val Asp

3220 3225 3230

agc tgc atc agt gac atg aaa aca gaa acc
agg gag gtc ctg acc cca 10223
Ser Cys Ile Ser Asp Met Lys Thr Glu Thr
Arg Glu Val Leu Thr Pro

3235 3240 3245

acg agc act tct gac aat gag acc aga gac
tcc tca att att gat cca 10271
Thr Ser Thr Ser Asp Asn Glu Thr Arg Asp
Ser Ser Ile Ile Asp Pro

3250 3255 3260

gga act gag caa gat ctt cct tcc cct gaa
aat agt tct gtt aaa gaa 10319
Gly Thr Glu Gln Asp Leu Pro Ser Pro Glu
Asn Ser Ser Val Lys Glu

3265 3270 3275
3280

tac cga atg gaa gtt cca tct tcg ttt tca
gaa gac atg tca aat atc 10367
Tyr Arg Met Glu Val Pro Ser Ser Phe Ser
Glu Asp Met Ser Asn Ile

3285 3290 3295

agg tca cag cat gca gaa gaa cag tcc aac
aat ggt aga tat gac gat 10415
Arg Ser Gln His Ala Glu Glu Gln Ser Asn
Asn Gly Arg Tyr Asp Asp

3300 3305 3310

tgt aaa gaa ttt aaa gac ctc cac tgt tcc
aag gat tct acc cta gct 10463
Cys Lys Glu Phe Lys Asp Leu His Cys Ser
Lys Asp Ser Thr Leu Ala

3315 3320 3325

gag gaa gaa tct gag ttc cct tct act tct
atc tct gca gtt ctg tct 10511
Glu Glu Glu Ser Glu Phe Pro Ser Thr Ser
Ile Ser Ala Val Leu Ser

3330 3335 3340

gac tta gct gac ttg aga agc tgt gat ggc

| | | | | |
|---------|-----------------------|----------|--------------------------------|---------|
| | 9/64 | G 0 1 N | 33/15 | Z |
| C 1 2 Q | 1/37 | | 33/50 | Z |
| | 1/68 | | 33/53 | D |
| G 0 1 N | 33/15 | | | M |
| | 33/50 | | 33/566 | |
| | 33/53 | C 1 2 N | 15/00 | Z N A A |
| | | | 5/00 | A |
| | 33/566 | A 6 1 K | 37/02 | |
| (72)発明者 | 長瀬 隆弘 | Fターム(参考) | 2G045 AA40 DA12 DA13 DA36 FB02 | |
| | 千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人 | | FB03 | |
| | かずさディー・エヌ・エー研究所内 | | 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA09 | |
| (72)発明者 | 大石 道夫 | | CA20 DA06 EA04 GA11 HA14 | |
| | 千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人 | | 4B050 CC01 CC03 DD11 EE01 LL01 | |
| | かずさディー・エヌ・エー研究所内 | | LL03 LL05 | |
| (72)発明者 | 横田 博 | | 4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 | |
| | 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第 | | QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61 | |
| | 一製薬株式会社東京研究開発センター内 | | QQ89 QR08 QR32 QR35 QR40 | |
| (72)発明者 | 和田 直也 | | QR42 QR55 QR62 QS16 QS25 | |
| | 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第 | | QX02 | |
| | 一製薬株式会社東京研究開発センター内 | | 4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X | |
| (72)発明者 | 岡本 貴史 | | AA87X AA93Y AB01 AC14 | |
| | 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第 | | BA02 CA33 CA44 CA46 | |
| | 一製薬株式会社東京研究開発センター内 | | 4C084 AA02 AA06 AA13 BA01 BA08 | |
| | | | BA22 BA23 CA53 DC50 NA14 | |
| | | | ZA022 ZA152 ZA162 ZC022 | |
| | | | 4C085 AA13 AA14 BB11 CC04 CC05 | |
| | | | CC13 DD22 DD33 DD34 EE01 | |
| | | | 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 | |
| | | | MA03 MA04 MA07 NA14 ZA02 | |
| | | | ZA15 ZA16 ZC02 | |
| | | | 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20 | |
| | | | EA50 FA71 | |

| | | | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 新型泛素特异性蛋白酶 | | |
| 公开(公告)号 | JP2002300880A | 公开(公告)日 | 2002-10-15 |
| 申请号 | JP2001105813 | 申请日 | 2001-04-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上总DNA KENKYUSHO | | |
| 申请(专利权)人(译) | 第一制药有限公司 上总DNA研究所 | | |
| [标]发明人 | 小原收 長瀬隆弘 大石道夫 横田博 和田直也 岡本貴史 | | |
| 发明人 | 小原 收 長瀬 隆弘 大石 道夫 横田 博 和田 直也 岡本 貴史 | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| FI分类号 | A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050 /LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063 /QR40 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084 /BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC13 4C085/DD22 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA03 4C086/MA04 4C086/MA07 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZC02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045 /DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 | | |
| 代理人(译) | 庄司隆 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供具有新的去泛素化活性的蛋白酶（USP），衍生自蛋白酶的（多）肽和编码这些的核苷酸，并提供产生来自新USP的（多）肽的方法通过基因工程技术。溶液：选自由衍生自人的特定氨基酸序列显示的多肽，含有上述多肽的多肽，具有与上

述氨基酸序列同源的氨基酸序列的多肽的多肽。通过从上述氨基酸序列中，在其中或之中删除，取代，添加或插入一个或多个氨基酸并且具有去泛素化活性，以及编码多核苷酸而具有去泛素化活性的多肽或多肽具有去泛素化活性。提供了多肽或其互补链。

