

(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2003 - 116560

(P2003 - 116560A)

(43)公開日 平成15年4月22日(2003.4.22)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		A 6 1 P 1/02	4 B 0 2 4
38/00		19/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/02		C 0 7 H 21/04	B 4 B 0 6 4
19/00		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 32数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 313754(P2001 - 313754)

(22)出願日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(71)出願人 000003001

帝人株式会社

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

(72)発明者 中山 保典

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター内

(72)発明者 山名 慶

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター内

(74)代理人 100077263

弁理士 前田 純博

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 骨疾患や歯周疾患の治療に応用できるDMP 1に類似したヒト由来の新たなポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【解決手段】 ヒトcDNAライブラリーより新たにDMP 1に類似した遺伝子を単離し、そのポリペプチドのアミノ酸組成およびこれをコードするポリヌクレオチド配列を明らかにした。骨疾患や歯周疾患用の医薬、抗体、および関連化合物のスクリーニングキット、診断用キット等を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドの部分ペプチド。

【請求項3】 請求項1に記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号2で表される塩基配列またはそれとハイストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する請求項3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項2に記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項7】 請求項6に記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】 請求項7に記載の形質転換体を培養し、請求項1に記載のポリペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項9】 請求項1に記載のポリペプチドまたは請求項2に記載の部分ペプチドを含有してなる医薬。

【請求項10】 請求項3に記載のポリヌクレオチドまたは請求項5に記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項11】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドに対するモノクローナル抗体。

【請求項12】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドに対するポリクローナル抗体。

【請求項13】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドで免疫された抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより得られる、請求項11記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項14】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドを用いることを特徴とする請求項1に記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項15】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドを含有してなる請求項1に記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項16】 請求項14に記載のスクリーニング方

\*法または請求項15に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1に記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩。

【請求項17】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドを用いることを特徴とする請求項1に記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドを含有してなる請求項1に記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項19】 請求項17に記載のスクリーニング方法または請求項18に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1に記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩。

【請求項20】 請求項3もしくは請求項4に記載の塩基配列の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項21】 請求項20に記載のオリゴヌクレオチドプローブを含む塩基配列の検出試薬。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチド、並びに請求項11に記載のモノクローナル抗体および/または請求項12に記載のポリクローナル抗体を含む診断用キット、もしくは請求項1に記載のポリペプチド、または請求項2に記載の部分ペプチドの測定キット。

【請求項23】 請求項11に記載のモノクローナル抗体または請求項12に記載のポリクローナル抗体からなる医薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト由来の新規なポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチドに関する。更に詳細には、象牙細胞由来のDMP1に類似した新たなポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチドに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】細胞外マトリックスは、組織の細胞を取り巻く環境物質であり、主な成分はコラーゲンのような繊維性タンパク質、プロテオグリカンなどの複合糖質、細胞接着などに関係のあるフィブロネクチンなどの糖タンパク質である。細胞外マトリックスは、古くは細胞、組織、臓器を支持する機械的役割のみが考えられていたが、現在では、それは細胞の環境そのものであり、細胞の形態、代謝、移動、増殖、分化など細胞の活動に重大な影響を与え、生体の発生、加齢、炎症、創傷治癒、免

疫、腫瘍など多くの生体現象に極めて大きな関連を有することが認識されている。

【0003】骨は身体の運動器、支持組織としてばかりではなく、カルシウム貯蔵場所としてカルシウム代謝、ホメオスタシスに重要な役割を担っている臓器であり、3種類の細胞（骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞）と細胞外マトリックスより構成されている。通常、骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を絶えず繰り返しており、両者の微妙なバランスによって全体として骨量はほぼ一定に保たれている。

【0004】破骨細胞にはビトロネクチン、フィブロネクチン、オステオポンチンといった細胞外マトリックスタンパク質と結合しうるインテグリンが高発現しており、このインテグリンを介した結合は細胞外マトリックスタンパク質内に保存されたRGD(Arg-Gly-Asp)というアミノ酸モチーフを介していることが知られている(Rodan, S. B, and Rodan, G. A, J. Endocrinol. 154, S47, 1997)。また、最近、破骨細胞上のインテグリンとRGDアミノ酸モチーフを介した結合が破骨細胞の機能発現に重要な働きを持つことが示された(Duong, L. T, et al, Matrix Biol. 19, 97, 2000)。

【0005】骨と歯の象牙質(dentin)における細胞外マトリックスは類似しており、両組織の細胞外マトリックスは、主にタイプIコラーゲン、酸性タンパク質、プロテオグリカンにより構成されている。両組織における細胞外マトリックスの産生細胞としては、骨では骨芽細胞、歯の象牙質では象牙芽細胞が知られている。

【0006】Dentin Matrix Protein 1(DMP1)はラットの象牙芽細胞由来cDNAライブラリーより単離された酸性タンパク質で、RGDアミノ酸モチーフを持つ。DMP1は、骨芽細胞と象牙芽細胞において発現し、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化・成熟の制御に重要な働きをしていることが知られている(Narayanan, K, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4516, 2001)。また、DMP1内に存在するRGDアミノ酸モチーフがインテグリンとの結合に対して機能的に働くことも示されている(Kulkarni, G. V, et al, Arch. Oral. Biol. 45, 475, 2000)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】DMP1を制御することは骨疾患や歯周疾患の治療に応用できると期待されている。しかしながら、DMP1の機能については、未だ詳細に調べられていない点が多く、上記した以外の機能を持っている可能性がある。従って、DMP1に類似した新たなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供できれば、その各種細胞または組織での発現レベルや構造及び機能を解析でき、またその発現物の解析等によりこれらの関与する疾患の病態解明や診断、治療等が可能となると考えられる。

【0008】従って、本発明は、DMP1に類似した新たなポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチ

ドを提供することを目的としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的より鋭意研究を重ねた結果、ヒトcDNAライブラリーより新たに、上記目的に合致する遺伝子を単離することに成功し、ここに本発明を完成するに至った。本発明は、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化・成熟を調節し、インテグリン結合作用を有することが知られているDMP1とアミノ酸配列に相同性が認められる新規なヒトポリペプチド、並びにそれをコードするヒトポリヌクレオチドに関するものである。

【0010】即ち、本発明は配列番号1で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。上記ポリヌクレオチドとしては、例えば配列番号2で表される塩基配列が挙げられる。

【0011】また本発明は、(1): 配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(2): (1)記載のポリペプチドの部分ペプチド、(3): (1)記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、(4): 配列番号2で表される塩基配列またはそれとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する(3)記載のポリヌクレオチド、(5): (2)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、(6): (3)記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター、(7): (6)記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(8): (7)記載の形質転換体を培養し、(1)記載のポリペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする(1)記載のポリペプチドの製造方法、(9): (1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを含有してなる医薬、(10): (3)記載のポリヌクレオチドまたは(5)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、(11): (1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドに対するモノクローナル抗体、(12): (1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドに対するポリクローナル抗体、(13): (1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドで免疫された抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより得られる(11)記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、(14): (1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを用いることを特徴とする(1)記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(15): (1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを含有してなる(1)記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(16): (14)記載のスクリーニング方法または(15)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる(1)記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはそ

の塩、(17)：(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを用いることを特徴とする(1)記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(18)：(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを含有してなる(1)記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(19)：(17)記載のスクリーニング方法または(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる(1)記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩、(20)：(3)または(4)記載の塩基配列の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、(21)：(20)記載のオリゴヌクレオチドプローブを含む塩基配列の検出試薬、(22)：(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチド、並びに(11)記載のモノクローナル抗体および/または(12)記載のポリクローナル抗体を含む診断用キット、もしくは(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの測定キット、(23)：(11)記載のモノクローナル抗体または(12)記載のポリクローナル抗体からなる医薬を提供する。

【0012】また本発明は、(24)：(14)記載のスクリーニング方法または(15)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる(1)記載のポリペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(25)：(17)記載のスクリーニング方法または(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる(1)記載のポリペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(26)：(11)または(12)記載の抗体と被検液および標識化された(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの定量法、および(27)：被検液と担体上に不溶化した(11)または(12)記載の抗体および標識化された(11)または(12)記載の抗体とを同時にあるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの定量法を提供する。

【0013】また本発明は、(28)：外来性の(3)記載のポリヌクレオチドまたはその変異ポリヌクレオチドを有する非ヒト哺乳動物、(29)：非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である(28)記載の非ヒト哺乳動物、(30)：げっ歯動物がマウスである(29)記載の非ヒト哺乳動物、(31)：外来性の(3)記載のポリヌクレオチドまたはその変異ポリヌクレオチドを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクター、(32)：(3)記載のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、(33)：該ポリヌク

レオチドがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された(32)記載の胚幹細胞、(34)：ネオマイシン耐性である(32)記載の胚幹細胞、(35)：非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である(32)記載の胚幹細胞、(36)：げっ歯動物がマウスである(35)記載の胚幹細胞、(37)：(3)記載のポリヌクレオチドが不活性化された該ポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物、(38)：該ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が(3)記載のポリヌクレオチドに対するプロモーターの制御下で発現しうる(37)記載の非ヒト哺乳動物、(39)：非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である(37)記載の非ヒト哺乳動物、(40)：げっ歯動物がマウスである(39)記載の非ヒト哺乳動物を提供する。

【0014】さらに本発明は、(41)：(38)記載の非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする(3)記載のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(42)：(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを用いることによる(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドと相互作用するレセプターをスクリーニングする方法、(43)：(42)記載のスクリーニング方法を用いて得られる(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドと相互作用するレセプター、(44)：(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを用いることによる(43)記載のレセプターと(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(45)：(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドを用いることによる(43)記載のレセプターと(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、および(46)：(44)記載のスクリーニング方法または(45)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる(43)記載のレセプターと(1)記載のポリペプチドまたは(2)記載の部分ペプチドの相互作用を阻害する化合物またはその塩を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】本明細書で汎用する「ポリペプチド」とは、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有してなるペプチドまたはタンパク質、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有してなるペプチドまたはタンパク質、すなわち、ペプチドアイソスターをいう。「ポリペプチド」は、通常、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短鎖、およびタンパク質と称される長鎖の両方をいう。ポリペプチドは遺伝子によりコードされた20種のアミノ酸と

は異なるアミノ酸を含有してもよい。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセッシングなどの自然の工程により、または当業者に周知の化学修飾技法により修飾されたアミノ酸配列を含有する。このような修飾は基本テキストにて、およびさらに詳細な研究論文にて、ならびに膨大な研究文献において詳しく記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含め、ポリペプチドのどこでも起こり得る。また、所定のポリペプチドは多くの型の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチネーションの結果として分岐していてもよく、分岐した環状、または分岐していない環状であってもよい。環状、分岐および分岐した環状ペプチドは翻訳後の天然プロセスにより生じたものであってもよく、または合成法により製造されたものであってもよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、交差架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、交差架橋共有結合形成、システイン形成、ピログタメート形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、糖鎖形成、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解的プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのトランスファーRNA媒介のタンパク質へのアミノ酸付加、ならびにユビキチネーションを包含する。例えば、Proteins-Structure And Molecular Properties、第2版、T.E.Creighton、W.H.Freeman and Company、New York(1993)およびPosttranslational Covalent Modification Of Proteins、B.C.Johnson編、Academic Press、New York(1983)のWold、F.、Posttranslational Protein Modifications: Perspectives And Prospects、1~12頁; Seifterら、"Analysis For Protein Modifications And Nonprotein cofactors"、Meth.Enzymol. 182:626-646(1990)およびRattanら、"Protein Synthesis: Posttranslational Modifications And Aging"、Ann.N.Y.Acad.Sci. 663:48-62(1992)。

【0016】本発明の配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド(以下、「本発明のポリペプチド」と略記することがある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨

細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織(例、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など)または血球系の細胞もしくはその培養細胞株などに由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

【0017】本発明の配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列にアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなども含まれる。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の作用を有するポリペプチドであることが挙げられる。実質的に同質とは、それらの作用、活性、または生物学的活性が性質的に同質であることを示す。本発明のポリペプチドが有する作用、活性、生物学的活性とは、類似の作用、活性、または改良された作用、活性、あるいは望ましくない副作用の減じた作用、活性を含め、該ポリペプチドの代謝的または生理学的機能をいう。また、該ポリペプチドの抗原的および免疫原的活性も含まれる。したがって、これらの作用、活性、または生物学的活性が同等であることが望ましいが、活性の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。さらに好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一の配列を含有するポリペプチドが挙げられる。

【0018】本発明のポリペプチドは「成熟」タンパク質の形態であってもよく、あるいは融合タンパク質などの大型タンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基のごとき精製を促進する配列、または組換え操作の間の安定性のための付加的な配列を含む付加的なアミノ酸配列を含んでいることが有利なことがよくある。

【0019】本発明のポリペプチドの部分ペプチド(以下、「本発明の部分ポリペプチド」と略記することがある)としては、前記した本発明のポリペプチドの部分ペプチドであって、本発明のポリペプチドが有する作用、活性、生物学的活性を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、部分ペプチドのアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、アミノ酸が付加したアミノ酸配列、アミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または

それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するものも含まれる。本発明のポリペプチドが有する作用、活性、または生物学的活性とは、類似の作用、活性、または改良された作用、活性、あるいは望ましくない副作用の減じた作用、活性を含め、該ポリペプチドの代謝的または生理学的機能をいう。該ポリペプチドの抗原的および免疫原的活性も含まれる。本発明の部分ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列のすべてではなく一部に対して全く同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。該部分ポリペプチドは独立していてもよく、また本発明の部分ポリペプチドの一部もしくは一領域を形成する大型のポリペプチド内に含まれていてもよく、最も好ましくは単一の連続した領域として含まれるものがよい。好ましい本発明の部分ポリペプチドは、アルファヘリックスおよびアルファヘリックス形成領域、ベータシートおよびベータシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水領域、疎水領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可変領域、表面形成領域、基質結合領域および高抗原性指標領域を有する構造的または機能的属性により特徴付けられるものである。他の好ましい部分ペプチドは生物学的に活性な部分ペプチドである。生物学的に活性な部分ペプチドは、類似活性または改良された活性を有する、あるいは望ましくない活性を減じたものを含め、本発明のポリペプチドの活性を媒介する、部分ペプチドである。動物、とりわけヒトにおいて抗原的または免疫原的な部分ペプチドもまた含まれる。好ましくは、該部分ペプチドはすべて、抗原的活性を含め、本発明のポリペプチドの生物学的活性を保持している。

【0020】本明細書で汎用する「ポリヌクレオチド」とは、一般に、修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであってよい。すなわち、いずれかのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいう。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNAをいう。さらに「ポリヌクレオチド」は、一本鎖もしくはより典型的には二本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNAとDNAのハイブリッド分子を含むが、これに限られたものではない。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域の分子を含む。「ポリヌクレオチド」なる用語はまた、一つまたはそれ以上の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、ならびに安定性またはその他の理由で修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを包含する。「修飾された塩基」は、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンなどの通常でない塩基を包含する。すなわち、「ポリヌクレオチ

ド」は、天然において見いだされるような化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態のポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的な化学的形態のRNAもしくはDNAを包含する。また、「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと称される比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

【0021】本発明のDMPLポリヌクレオチドは、前述した本発明のDMPLポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、前記した細胞・組織由来のcDNA、また、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、化学的に合成されたDNA、PCRによって単離されたDNA、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー及びそれらの組み合わせのいずれでもよい。該ゲノムDNAは標準的な技法を用いて、本明細書中に開示された本発明のDMPLポリヌクレオチドに対するハイブリッド形成によっても単離することができる。さらにDMPLのDNAから転写されたRNAもまた、本発明によって包含される。配列番号2で示される本発明のポリヌクレオチドの配列は、これによりコードされる各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組み合わせ例であり、本発明ポリヌクレオチドはこれに限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンの組み合わせを選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮することができる(Nucleic Acids Research 9,43,1981)。

【0022】本発明のDMPLポリヌクレオチドの塩基配列は、後述する実施例で詳細に述べるように、RACE(RACE:Rapid amplification of cDNA ends;Frohman, M.A,et al,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.85,8998,1988)法により取得することができるが、その概要を述べれば次のとおりである。

【0023】一般的に、RACE法とは、cDNAの一部の配列のみが既知である場合、これをもとに完全長cDNA配列を取得する方法である。既知の配列領域から3'末端あるいは5'末端それぞれの方向に伸長できるようにプライマーを作製し、PCR(PCR:Polymerase chain reaction, Science 230,1350,1985)法によりcDNAを増幅する。PCR法を実施する際は、既知領域では特異的にアニールするプライマー、3'末端及び5'末端ではライゲーション反応等により付加した配列にアニールするプライマーを用いる。従って、PCR法により増幅させた領域は配列が未知の領域を含んでいる。次に、増幅させたDNAの塩基配列を決定することにより、完全長cDNAの配列を取得することができる。尚、増幅させたDNA断片の単離精製は後述の実施例でも述べる通り、常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動等によればよい。このようにして得られたDNA断片の塩基配列の決定も、常法に従うことができ、例えばジデオキシ法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.74,5463,197

7) やマキサム-ギルバート法 (Methods in Enzymology 65,499,1980) 等により行うことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いても容易に行い得る。

【0024】より具体的には、本発明における後述の実施例で詳細に述べるが、概略は以下の通りである。ヒトDMP1のアミノ酸配列を用いて、日本DNAデータバンク (DDBJ:DNA data bank of Japan) において、ESTデータベース (dbEST, EST: Expressed sequence tag) 上でTBLASTNサーチを実施し、ESTファイル、Genbank accession number U89012を検出した。U89012は、dbESTに登録された塩基配列断片であるが、前記TBLASTNサーチにより初めてDMP1に類似したアミノ酸配列を有する新規の遺伝子断片であることが明らかとなった。そこで、このdbESTより得たcDNAの一部の配列よりプライマーを合成し、RACE法を用いてヒトDMP1ポリヌクレオチドの塩基配列を決定するに至った。

【0025】さらに本発明のポリヌクレオチドには、配列番号1で表されるアミノ酸配列の一部が置換、欠失、付加した変異体をコードする塩基配列もまた包含される。これらポリペプチドの製造、改変(変異)等は、天然に生じることもあり、また翻訳後の修飾により、或いは遺伝子工学的的手法により、例えばサイトスペシフィック・ミュタジェネシス (Methods in Enzymology 154, 350, 367-382, 1987; 同100,468,1983; Nucleic Acids Research 12,9441,1984; 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」, 日本生化学会編,105,1986) 等の方法により取得することができる。

【0026】本発明のポリヌクレオチドの製造は、本発明によって開示された本発明のポリヌクレオチドについての配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的的手法により容易に実施できる (Molecular Cloning 2nd ED, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I, II, III」, 日本生化学会編, 1986 等参照)。

【0027】これは例えばヒトcDNAライブラリー(本発明のDMP1ポリヌクレオチドの発現される適当な起源細胞より常法に従い調製されたもの)から、本発明のポリヌクレオチドに特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 6613, 1981; Science 222, 778, 1983等)。

【0028】上記方法において、起源細胞としては、本発明のDMP1ポリヌクレオチドを発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示され、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAへの変換(合成)とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。また、cDNAライブラリー

は市販されてもおり、本発明ではそれらcDNAライブラリー、例えばクロンテック社 (CLONTECH Lab. Inc.) より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

【0029】cDNAライブラリーからの本発明のポリヌクレオチドのスクリーニングは前記した通常の方法に従い実施することが出来る。該スクリーニング方法としては、例えばcDNAの産生するポリペプチドに対して、本発明のDMP1ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドに対する特異的抗体を使用した免疫的スクリーニングにより、対応するcDNAクローンを選択する方法、目的の塩基配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組み合わせを例示できる。ここで用いられるプローブとしては、本発明のポリヌクレオチドのDNA配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNA配列、既に取得された本発明のポリヌクレオチドやその断片がかかるプローブとして利用できる。

【0030】また、本発明のポリヌクレオチドの取得に際しては、PCR法によるDNA/RNA増幅法が好適に利用できる。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明のポリヌクレオチドの配列情報に基づいて適宜設定することができ、これは常法に従い合成することができる。

【0031】本発明によって明らかにされた本発明のポリヌクレオチドの配列情報を基にすれば、例えば該ポリヌクレオチドの一部又は全部の塩基配列を利用することにより、各種ヒト組織における本発明のポリヌクレオチドの発現の検出を行うことができる。これは常法に従って行うことができ、例えばRT-PCR (Reverse transcribed-polymerase chain reaction) (Kawasaki, E.S, et al, Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc, San Diego, 21-27, 1989) 法、ノーザンブロットング解析 (Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)、リアルタイムPCR法、等により、いずれも良好に実施しうる。RT-PCR法、リアルタイムPCR法のプライマー及びノーザンブロットング解析、リアルタイムPCR法のプローブは、本発明のDMP1ポリヌクレオチドを特異的に検出し得る配列である限り何ら制限はなく、かかる配列は本発明によって明らかにされた本発明のポリヌクレオチドの塩基配列より適宜設定することができる。従って、本発明は、本発明のDMP1ポリヌクレオチドの検出に有用なプライマー及び/又はプローブを提供するものであり、該ポリヌクレオチドの検出試薬として利用することが可能である。尚、該プローブは、サザンブロットング解析によるゲノムDNAの検出にも利用可能である。

【0032】配列番号2で表される塩基配列またはそれとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとしては、配列番号2で表される塩基配列と高い相同性を有する塩基配列、すなわち好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドが用いられる。該ヌクレオチドとしては、DNA、RNAが好ましい。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えばモレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)2nd(ColdSpring Harbor Lab.Press,1989)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。ハイストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号1のアミノ酸を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号1のアミノ酸を含有するポリペプチドの部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号2で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドが用いられる。より好ましくは、上記のポリヌクレオチドとしてDNAを用いることができる。

【0033】本発明のDMP Lポリヌクレオチドの配列を使用すれば、遺伝子工学的手法により該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを製造することが可能である。本発明のポリヌクレオチドを本発明のDMP Lポリペプチドの組換え生産に用いる場合、ポリヌクレオチドはそれ自体、成熟ポリペプチドまたはそのフラグメントのコーディング配列を含むものであってもよく、読み枠中に、リーダーまたは分泌配列、プレ、プロ、もしくはプレプロタンパク質配列をコードするコーディング配列、または他の融合ポリペプチド部分などの、他のコーディング配列を伴った、成熟ポリペプチドまたはそのフラグメントのコーディング配列を含むものであってもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を促進するマーカー配列を用いることもできる。本発明のこの態様の特に好ましい具体例において、マーカー配列は、pQEベクター(QIAGEN社)で得られ、Gentzらにより記載されるような(Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.86,821,1989)、ヘキサ-ヒスチジンペプチドであるか、またはHAタグである。ポリヌクレオチドはまた、非コーディング5'および3'配列、例えば、転写された非翻訳配列、スプライスおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定化する配列などを含有していてもよい。

【0034】本発明のDMP Lの部分ペプチドをコード

するポリヌクレオチドは、前述した本発明のDMP Lポリペプチドの部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また前記した細胞・組織由来のcDNA、cDNAライブラリー、化学的に合成されたDNA、PCRによって単離されたDNA、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー及びそれらの組み合わせのいずれでもよい。

【0035】本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号2で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドの部分塩基配列、または、配列番号2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと同質的作用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部分塩基配列を有するポリヌクレオチドなどが用いられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0036】本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド(複数でも可)を含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作する宿主細胞および組換え技法による本発明のポリペプチドの製造にも関する。該ポリペプチドの製造は、本発明のポリヌクレオチドが宿主細胞中で発現できる組換え体を作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養することにより行われる。

【0037】ここで宿主細胞としては、真核性宿主細胞及び原核性宿主細胞のいずれを用いることもできる。該真核性宿主細胞には、脊椎動物、酵母及び昆虫等の細胞が含まれる。脊椎動物細胞としては例えばCHO細胞、COS細胞等が挙げられる。

【0038】脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の upstream に位置するプロモーター、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用できる。該発現ベクターとしては例えば、SV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr(Mol.Cell.Biol.1,854,1981)等を例示できる。

【0039】真核性細胞中で目的ポリペプチドを発現させる手段は、それ自体当該分野では多くの系が周知である。例えば酵母中で発現させる系としては特開昭57-159489号公報に記載された「酵母中でのポリペプチドの発現」が挙げられ、昆虫細胞中で発現させる系としては特開昭60-37988号公報に記載された「組換えバキュロウイルス発現ベクターの製法」が挙げられ、哺乳類動物細胞中で発現させる系としては特開平2-171198号公報に記載された「真核性発現の改良」が挙げられるが、もちろんこれら以外にも多数存在する。

【0040】本発明のDMP Lポリヌクレオチドは、例えば、大腸菌、枯草菌およびストレプトマイセス等の原核性宿主細胞内でも発現し得る。例えば、上記宿主とし

ての大腸菌はEcherichia coli K12株等がよく用いられ、ベクターとしてはpBR322及びその改良ベクターがよく用いられるが、これらに限定されず知の各種菌株及びベクターも利用できる。プロモーターとしては、例えば、大腸菌ラクトース(Lac)、大腸菌trp等のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。また、上記のプロモーターは、いずれも、既に特性化されており、当業者が熟知しているものであって、合成的に、あるいは既知のプラスミドから組み立てることができるものである。

【0041】本発明の例示塩基配列、プラスミドおよびウイルスには多くの修飾や変更が可能である。例えば、遺伝暗号の同義性により、ポリペプチドの暗号領域全体を通して、ヌクレオチドの置換を行うことができる。そのような配列は、本発明のDMP Lポリヌクレオチドの塩基配列又はそれがコードするポリペプチドのアミノ酸配列から推定することができ、下記の従来からの合成法により、組み立てることができる。そのような合成法は、実質上、イタクラらの方法(Itakura, et al, Science 198, 1059, 1977)ならびにクレアらの方法(Crea, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 5765, 1978)に従って行うことができる。従って、本発明は特に例示した塩基配列、プラスミドおよびウイルスに限定されるものではない。

【0042】かくして得られる所望の本発明の組換え体ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また、得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により本発明本発明のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

【0043】上記により、形質転換体の細胞内、細胞外あるいは細胞膜上に該ポリペプチドが生産される。該ポリペプチドは、所望によりその物理学的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作[「生化学データブックI」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行; Biochemistry 25(25), 8274, 1986; Eur. J. Biochem. 63, 313, 1987等参照]により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、ポリペプチド沈澱剤による処理(塩析法)、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破砕、限外ろ過、ゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換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、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組み合わせ等を例示できる。

【0044】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体(以下、「本発明の抗体」と略記することがある)は、本発明のポリペプチドまたはその部分

ペプチドを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよい。本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って作製することができる。また、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを認識し得る抗体であれば、キメラ抗体、Fabフラグメント、一本鎖抗体であってもよく、トランスジェニックマウスまたは他の非ヒト哺乳類動物を用いて製造されたヒト化抗体であってもよい。該一本鎖抗体は、該一本鎖抗体を産生するのに記述された技術(米国特許第4946778)を適用して、製造することができる。

【0045】〔モノクローナル抗体の作製〕

(a)モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2回~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウス、ラットおよびハムスターが好ましく用いられる。

【0046】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法(Nature 256, 495, 1975)に従い実施できる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髄腫細胞としては、例えばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、P3U1、SP2/0が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞またはリンパ節細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、20~40、好ましくは30~37で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0047】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの

スクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。該ハイブリドーマの選別は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものであればどのような培地を用いてもよい。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業社）あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬社）などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### 【0048】(b)モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相あるいはプロテインA、プロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を分離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行うことができる。

【0049】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明のポリペプチドあるいはその部分ペプチド）とキャリアタンパク質との複合体を作製し、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のポリペプチドあるいはその部分ペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテン1に対して抗体が効率よくで

きれば、いずれのものをいずれの方法で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテンに対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカップルさせる方法が用いられる。

【0050】また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計3回~10回程度行われる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水などから採取することができるが、好ましくは血液中から採取できる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0051】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの塩基配列またはその一部の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現を抑制し得る作用を有するオリゴヌクレオチドまたはその誘導体であれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよい。好ましくは、該アンチセンスポリヌクレオチドとしては、アンチセンスDNAが用いられる。特に、本発明のDNAまたはmRNAの相補鎖の全塩基配列のうち、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のポリヌクレオチド合成装置などを用いて製造することができる。以下に、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体、もしくはアンチセンスポリヌクレオチドの用途を説明する。

【0052】(1)本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに異常が生じたり、欠損している場合あるいは発現量が減少している場合、生体内において正常な機能が発揮できないた

めに、疾患などの原因になることも考えられる。したがって、本発明のポリペプチド、その部分ペプチドまたはポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの欠損、損傷、発現減少などに起因する種々の疾病の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損しているために、本発明のポリペプチドの機能が十分に、あるいは正常に行われない患者がいる場合に、(イ)本発明のポリヌクレオチドを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のポリヌクレオチドを挿入し、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現させた後に、該細胞を該患者に移植することによって、または(ハ)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを該患者に注入することなどによって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。本発明のポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該ポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクター挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは、摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

【0053】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、精製されたものを使用するのが好ましい。本発明のポリペプチド、その部分ペプチドまたはポリヌクレオチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、またはマイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。

【0054】例えば、本発明のポリペプチド、その部分ペプチドまたはポリヌクレオチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などと共に一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これらの製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのようない賦形剤、ゼラチン、コーンスターチ、アルギン酸のようない膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甜味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場

合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0055】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(例、エタノールなど)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば胡麻油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また緩衝剤(例、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射剤は、通常、適当なアンプルに充填される。

【0056】このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。該ポリペプチド、その部分ペプチドまたはポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は、対象疾患、投与対象などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0057】(2)各種疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現減少などに起因する疾病の予防・治療剤などの医薬として使用できる。一方、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの過剰発現などに起因する疾

病の予防・治療剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩、および本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

【0058】すなわち本発明は、(A)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩(以下、活性化剤と略記する場合がある)または該作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供する。

【0059】例えば、(B)(i)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞を培養した場合と、(ii)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞を試験化合物の存在下で培養した場合における、細胞の分化または活性化などを観察し、比較することを特徴とする該活性化剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。具体的には、上記スクリーニング方法(B)において、例えば、(i)と(ii)の場合における、該細胞の分化または活性化過程などを観察して、比較することを特徴とするものである。

【0060】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドとしては、前記したものと同様のものが用いられる。本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞としては、骨芽細胞、骨芽細胞株、好ましくはMG-63の他、本発明のポリヌクレオチドを導入せしめた株化細胞などが用いられる。本発明のポリヌクレオチドを導入せしめた株化細胞は、自体公知の方法を用いて製造することができる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これらの化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0061】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用とは、本発明のポリペプチドが有する作用、活性、生物学的活性であり、類似の作用、活性、または改良された作用、活性、あるいは望ましくない副作用の減じた作用、活性を含め、該ポリペプチドの代謝的または生理学的機能をいい、これをスクリーニングの指標とすることができる。また、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現量、あるいは本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現量などを指標とすることができる。本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするmRNAの発

現量は、例えば、ノザンハイブリダイゼーションなどにより測定することができる。本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現量は、後述する本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量法に従って測定することができる。試験化合物を添加することにより本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現量、あるいは本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現量が増加した場合、該試験化合物は本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩として選択することができる。一方、試験化合物を添加することにより本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現量、あるいは本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現量が減少した場合、該試験化合物は本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩として選択することができる。

【0062】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有するものであってもよく、あるいは本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞、または本発明のポリヌクレオチドを導入せしめた細胞を含有するものであってもよい。

【0063】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩、あるいは該作用または該発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩である。該化合物は、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用を直接に活性化もしくは増強、または阻害もしくは減弱するものであってもよいし、あるいは本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの転写レベルでの発現を活性化もしくは増強、あるいは阻害もしくは減弱するものであってもよい。

【0064】該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)または塩(例、アルカリ金属)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0065】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物

またはその塩は、例えば、本発明のポリペプチドの発現減少などに起因する疾病の予防・治療剤などの医薬として有用である。一方、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩は、例えば、本発明のポリペプチドの過剰発現などに起因する疾病の予防・治療剤などの医薬として有用である。

【0066】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチド、その部分ペプチドまたはポリヌクレオチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとして行うことができる。得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は、対象疾患、投与対象などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0067】(3)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i)本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量法、および(ii)被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量法を提供す

る。上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドのN末端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドのC末端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0068】また、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体、好ましくはモノクローナル抗体であるが、これを用いて本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量を行えるほか、組織染色、フローサイトメトリー等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、サンドイッチ法を用いるのが好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼなどが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0069】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明の抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した本発明の抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることがで

きる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明の抗体は本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドのC末端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC末端部以外、例えばN末端部を認識する抗体が用いられる。

【0070】以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを感度よく定量することができる。さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの濃度を定量することによって、例えば、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドが関与する疾病の診断を行うことができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

【0071】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol.70(Immunochemical Techniques<Part A>)、同書Vol.73(Immunochemical Techniques<Part B>)、同書Vol.74(Immunochemical Techniques<Part C>)、同書Vol.84(Immunochemical Techniques<Part D: Selected Immunoassays>)、同書Vol.92(Immunochemical Techniques<Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods>)、同書Vol.121(Immunochemical T

chniques<Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies>)(以上、アガミック社発行)など参照〕。以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを感度良く定量することができる。

#### 【0072】(4) 遺伝子診断剤

本発明のポリヌクレオチド、好ましくはDNAであるが、これらは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジーなど)における本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のポリヌクレオチドを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自己公知のノザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法などにより実施することができる。

#### 【0073】(5) アンチセンスポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えばDNAまたはmRNAであるが、これらに相補的に結合し、該ポリヌクレオチドや本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現を抑制することができるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらをコードするポリヌクレオチドの異常発現を抑制することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドとしては、アンチセンスDNAが好ましい。したがって、該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらをコードするポリヌクレオチドの異常発現に起因する疾病の予防・治療剤として使用することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のポリヌクレオチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクター挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のポリヌクレオチドの存在、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列、またはその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプ

ローブあるいは塩基配列の検出試薬として使用することもできる。

【0074】(6)ポリヌクレオチド転移動物の作製  
本発明は、外来性の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(以下、本発明の外来性ポリヌクレオチドと略記する場合がある)またはその変異ポリヌクレオチド(本発明の外来性変異ポリヌクレオチドと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。該ポリヌクレオチドは、好ましくはDNAであり、該変異ポリヌクレオチドは、好ましくは変異DNAである。すなわち、本発明は、(i)本発明の外来性ポリヌクレオチドまたはその変異ポリヌクレオチドを有する非ヒト哺乳動物、(ii)非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第(i)記載の非ヒト哺乳動物、(iii)げっ歯動物がマウスである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、および(iv)本発明の外来性ポリヌクレオチドまたはその変異ポリヌクレオチドを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

【0075】本発明の外来性ポリヌクレオチドまたはその変異ポリヌクレオチドを有する非ヒト哺乳動物(以下、本発明のポリヌクレオチド転移動物と略記することがある)は、未受精卵、受精卵、精子、およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするポリヌクレオチドを転移することによって作出することができる。また、該ポリヌクレオチド転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性ポリヌクレオチドを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のポリヌクレオチド転移動物を作成することもできる。非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、動物モデル系の作製の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なげっ歯動物、とりわけマウスまたはラットなどが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

【0076】本発明の外来性ポリヌクレオチドとは、哺乳動物が本来有している本発明のポリヌクレオチドではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のポリヌクレオチドをいう。本発明の変異ポリヌクレオチドとしては、元の本発明のポリヌクレオチドの塩基配列

に変異(例えば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたポリヌクレオチドなどが用いられ、また、異常ポリヌクレオチドも含まれる。該異常ポリヌクレオチドとしては、異常な本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現させるポリヌクレオチドを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるポリヌクレオチドなどが用いられる。本発明の外来性ポリヌクレオチドは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のポリヌクレオチドを対象動物に転移させるにあたっては、該ポリヌクレオチドを動物細胞で発現せしめるプロモーターの下流に結合したポリヌクレオチドコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトポリヌクレオチドを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のポリヌクレオチドを有する各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のポリヌクレオチドを発現せしめる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトポリヌクレオチドを結合したポリヌクレオチドコンストラクト(例、ベクターなど)を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のポリヌクレオチドを高発現するポリヌクレオチド転移哺乳動物を作成することができる。

【0077】上記の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、または酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のポリヌクレオチド発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、ウイルス(例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど)に由来するポリヌクレオチドのプロモーター、各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のものとしては、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニュー

ロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびII、A、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン 水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ポリペプチド鎖延長因子1(EF-1)、アクチン、およびミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられるが、好ましくは全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1(EF-1)のプロモーター、ヒトおよびニワトリアクチンプロモーターなどを用いることができる。

【0078】上記ベクターは、ポリヌクレオチド転移哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列(一般にターミネーターと呼ばれる)を有していることが好ましい。さらに、目的ポリヌクレオチドをさらに高発現させる目的で各ポリヌクレオチドのスパライシングシグナル、エンハンサー領域、真核ポリヌクレオチドのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、ヒトなど)由来の前立腺、気管、肺、骨髄、精巣、骨芽細胞株(例、MG-63など)由来ポリヌクレオチドおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または前立腺、気管、肺、骨髄、精巣、骨芽細胞株(例、MG-63など)由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することができる。また、本発明の外來性異常ポリヌクレオチドは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異させた翻訳領域を作製することができる。該翻訳領域は転移動物において発現しうるポリヌクレオチドコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外來性ポリヌクレオチドの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。ポリヌクレオチド転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性ポリヌクレオチドが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性ポリヌクレオチドを保持することを意味する。本発明の外來性ポリヌクレオチドを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明のポリヌクレオチドを有する。

【0079】本発明の外來性正常ポリヌクレオチドを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により該ポリヌクレオチドを安定に保持することを確認して、該ポリヌクレオチド保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。受精卵細胞段階における本発明の外來性ポリヌクレオチドの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。ポリヌクレオチド転移後の作出動物の胚芽細胞および体細胞において本発明の外來性ポリヌクレオチドが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性ポリヌクレオチドを過剰に有することを意味する。本発明の外來性ポリヌクレオチドを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性ポリヌクレオチドを過剰に有する。導入ポリヌクレオチドを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することにより全ての子孫が該ポリヌクレオチドを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の正常ポリヌクレオチドを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常ポリヌクレオチドが高発現させられており、内在性の正常ポリヌクレオチドの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常ポリヌクレオチド転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態機序の解明、およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。また、本発明の外來性正常ポリヌクレオチドを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0080】一方、本発明の外來性異常ポリヌクレオチドを有する非ヒト哺乳動物は、交配により該ポリヌクレオチドを安定に保持することを確認して、該ポリヌクレオチド保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。さらに、目的とする外來性異常ポリヌクレオチドを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのポリヌクレオチドコンストラクトは、通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外來性異常ポリヌクレオチドの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。ポリヌクレオチド転移後の作出動物の胚芽細胞および体細胞において、本発明の外來性異常ポリヌクレオチドが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性異常ポリヌクレオチドを保持することを意味する。本発明の外來性異常ポリヌクレオチドを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外

来性異常ポリヌクレオチドを有する。導入該ポリヌクレオチドを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することにより全ての子孫が該ポリヌクレオチドを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の異常ポリヌクレオチドを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常ポリヌクレオチドが高発現させられており、内在性の正常ポリヌクレオチドの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常ポリヌクレオチド転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。また、本発明の異常ポリヌクレオチド高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（ドミナントネガティブ作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外来性異常ポリヌクレオチドを転移させた哺乳動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0081】また、上記2種類の本発明のポリヌクレオチド転移動物のその他の利用可能性として、例えば、組織培養のための細胞源としての使用、本発明のポリヌクレオチド転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはポリヌクレオチドにより発現した組織中のポリペプチドを分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、ポリヌクレオチドを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、上記記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および本発明の変異ポリペプチドの単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

【0082】さらに、本発明のポリヌクレオチド転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的な所見が得られ、新しい治療法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。また、本発明のポリヌクレオチド転移動物から各臓器を取り出し、細断後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したポリヌクレオチド転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行うことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常などを調べることなどができ、本発明のポリペプチドお

よびその作用解明のための有用な研究材料となる。さらに、本発明のポリヌクレオチド転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行うために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のポリヌクレオチド転移動物または本発明の外来性ポリヌクレオチド発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドに関連する疾患の遺伝子治療法を検討、開発することが可能である。

#### 【0083】(7) ノックアウト動物の作製

本発明は、本発明のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(i) 本発明のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、(ii) 該ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(i)項に記載の胚幹細胞、(iii) ネオマイシン耐性である第(i)項に記載の胚幹細胞、(iv) 非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第(i)項に記載の胚幹細胞、(v) げっ歯動物がマウスである第(iv)項に記載の胚幹細胞、(vi) 本発明のポリヌクレオチドが不活性化された該ポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物、(vii) 該ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(vi)項に記載の非ヒト哺乳動物、(viii) 非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第(vi)項に記載の非ヒト哺乳動物、(ix) げっ歯動物がマウスである第(viii)項に記載の非ヒト哺乳動物、および、(x) 第(vii)項に記載の非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0084】本発明のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のポリヌクレオチドに人為的に変異を加えることにより、ポリヌクレオチドの発現能を抑制するか、もしくは該ポリヌクレオチドがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、ポリヌクレオチドが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトポリヌクレオチドと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記することがある）をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様とのもので用いられる。本発明のポリヌクレオチドに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的的手法により該ポリ

ヌクレオチド配列の一部または全部の削除、他のポリヌクレオチドを挿入または置換させることによって行うことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトポリヌクレオチドを作製すればよい。本発明のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のポリヌクレオチド不活性化 E S 細胞または本発明のノックアウト E S 細胞と略記することがある）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のポリヌクレオチドを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは *lacZ*（

ガラクトシダーゼ遺伝子）、*cat*（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロンの部分に遺伝子の転写を終結させるポリヌクレオチド配列（例えば、poly A 付加シグナルなど）を挿入し、完全な mRNA を合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド鎖（以下、ターゲティングベクターと略記することがある）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られた E S 細胞について本発明のポリヌクレオチド上あるいはその近傍のポリヌクレオチド配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のポリヌクレオチド配列とターゲティングベクター作製に使用した本発明のポリヌクレオチド以外の近傍領域のポリヌクレオチド配列をプライマーとした PCR 法による解析で、本発明のノックアウト E S 細胞を選別することにより得ることができる。

【0085】また、相同組換え法等により本発明のポリヌクレオチドを不活性化させるために用いられる元の E S 細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufman の方法に準じて新しく樹立したものでよい。例えば、マウスの E S 細胞の場合、現在、一般的には 129 系の E S 細胞が使用されているが、免疫的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかかな E S 細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6 マウスや C57BL/6 の採卵数の少なさを DBA/2 との交雑により改善した BDF1 マウス（C57BL/6 と DBA/2 との F1）を用いて樹立したものなども良好に用いうる。BDF1 マウスは、採卵数が多く、かつ卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6 マウスを背景に持つので、これを用いて得られた E S 細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6 マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景を C57BL/6 マウスに代えることが可能である点で

有利に用いられる。また、E S 細胞を樹立する場合、一般には受精後 3.5 日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に 8 細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれの E S 細胞を用いてもよいが、通常雄の E S 細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合がよい。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行うことが望ましい。E S 細胞の雌雄の判定方法として、例えば、PCR 法により Y 染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その 1 例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約  $10^6$  個の細胞数を要していたのに対して、1 コロニー程度の E S 細胞数（約 50 個）で済むので、培養初期における E S 細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行うことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0086】また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られる E S 細胞の染色体数は正常数の 100% が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、E S 細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が  $2n = 40$  である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で LIF（ $1 \sim 10000 \text{ U/ml}$ ）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5% 炭酸ガス、95% 空気、または 5% 酸素、5% 炭酸ガス、90% 空気）で約 37 で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA 溶液（通常  $0.001 \sim 0.5\%$  トリプシン/ $0.1 \sim 5 \text{ mM}$  EDTA、好ましくは約  $0.1\%$  トリプシン/ $1 \text{ mM}$  EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。

【0087】このような継代は、通常 1～3 日毎に行うが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。E S 細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり（Evans, M.J, and Kaufman, M.H, Nature 292, 154, 1981; Martin, G. R, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 7634, 1981; Doetschman, T.C, et al, J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27, 1985）、本発明の E S 細胞を分化させて得られる本発明のポリヌクレオチド発現不全細胞は、in vitro における本発明のポリペプチドの細胞生物学的検討において有用である。本発

明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知の方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0088】本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入することによりノックアウトさせることができる。すなわち、該ターゲッティングベクターを導入することにより、ターゲッティングベクター内の不活性化された本発明のポリヌクレオチド配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のポリヌクレオチドと入れ換わり、ノックアウトさせることができる。本発明のポリヌクレオチドがノックアウトされた細胞は、本発明のポリヌクレオチド上またはその近傍のポリヌクレオチド配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析、またはターゲッティングベクター上のポリヌクレオチド配列とターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のポリヌクレオチド以外の近傍領域のポリヌクレオチド配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のポリヌクレオチドが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明の遺伝子座をもつ細胞と人為的に変異した本発明の遺伝子座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明の遺伝子座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群から、すべての組織が人為的に変異を加えた本発明の遺伝子座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することができる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体どうしを交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でポリヌクレオチド溶液を注入することによりターゲッティングベクターが染色体内に導入されたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、遺伝子相同組換えにより本発明の遺伝子座に変異のあるものを選択することで得られる。

【0089】このようにして本発明のポリヌクレオチドがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該ポリヌクレオチドがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行うこと

ができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性化ポリヌクレオチドの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性化ポリヌクレオチドを相同染色体の両方にもつホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活性化ポリヌクレオチドを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のポリペプチド発現不全マウスは、本発明のポリペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明および治療法の検討に有用である。

【0090】(8a)本発明のポリヌクレオチドの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物は、前記した本発明のポリヌクレオチドの欠損や損傷などに起因する疾病に対する治療・予防効果などを有する化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該非ヒト哺乳動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のポリヌクレオチドの欠損や損傷などに起因する疾病に対する治療・予防効果などを有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これらの化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物を試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

【0091】本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から得られた化合物またはその塩であり、本発明のポリペプチ

ドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対する治療・予防効果などを有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物またはその塩から誘導される化合物またはその塩も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）または塩（例、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する治療・予防剤は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様に製造することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は、対象疾患、投与対象などによっても異なるが、例えば、該化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0092】(8b)本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、レポーター遺伝子を導入することにより不活性化された本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、*-*ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)が好適である。本発明のポリヌクレオチドをレポーター遺伝子で不活性化された本発明のポリヌクレオチド発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーターの支配下に存在するの

で、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

【0093】例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド領域の一部が大腸菌由来の*-*ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)で不活性化されている場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに*-*ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-*-*ガラクトピラノシド(*X-gal*)のような*-*ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、*X-gal*を含む染色液で、室温または7℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mMEDTA/PBS溶液で洗浄することによって、*-*ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、*lacZ*をコードするmRNAを検出してもよい。

【0094】上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）または塩（例、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を活性化または増強し、該ポリペプチドの作用または発現を活性化または増強することができるので、例えば、本発明のポリペプチドの発現減少などに起因する疾病に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。一方、本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、該ポリペプチドの作用を減少させることができるので、例えば、本発明のポリペプチドの過剰発現に起因する疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物またはその塩から誘導され

る化合物またはその塩も同様に用いることができる。

【0095】該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する医薬と同様にして製造し、ヒトまたは哺乳動物に投与することができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。一方、例えば、本発明のポリペプチドの過剰発現に起因する疾病の治療目的で本発明のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0096】(9)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体を用いた各種疾病の予防・治療剤  
本発明の抗体は、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに特異性を示すことより、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの生物学的活性を阻害もしくは減弱、あるいは本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドそのものを除去できると考えられる。したがっ

て、本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの過剰発現などに起因する疾病の予防・治療剤などの医薬として使用できる。すなわち、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの望ましくない効果により発症したヒトもしくは温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

【0097】本発明の抗体を上記の予防・治療剤として使用する場合は、精製されたものを使用するのが好ましい。本発明の抗体は、製薬上許容し得る担体、希釈剤または医薬添加物と組み合わされた本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの生物活性を阻害し得る製薬処方物として提供される。好ましくは、本発明の抗体は非経口投与に適した処方物、例えば注射剤もしくは静脈内投与に適した処方物、あるいは有効形態で血流への送達を確実にするようなその他の方法による非経口投与に適した処方物として調製される。このような処方物は、好ましくは単位投与量形態であり、各投与量は例えば所望の免疫グロブリン約0.001~1000mgを含有している。好ましくは、処方物は本発明の抗体約0.01~200mgを含有していることが挙げられる。本発明の抗体を処方する手段は、当業者に周知である。特に、本発明の抗体は、製薬上許容し得る担体、希釈剤またはキャリアーと温和して組合せることができる。適当な担体、希釈剤あるいは医薬添加物および他のヒト蛋白質、例えばヒト血清アルブミンを包含する処方物は、例えばレミントン・ファーマシューティカル・サイエンシズ(Remington's Pharmaceutical Sciences)、16版、1980年、マックパブリッシング・カンパニー(Mack Publishing Co.)、オソル(Osoli)等編に記載されている。典型的な製薬上許容し得る医薬添加物、希釈剤および担体、殊に好ましい投与経路である非経口投与のためのこれらのものには、例えば、等張性食塩水、希デキストロース水溶液(例、5%)、多価脂肪族アルコールもしくはその混合物、例えばグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等が包含される。非経口溶液はまた防腐剤、例えばフェネチルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベン、チメロサル等を含み得る。必要に応じて、約0.05~0.20重量%の抗酸化剤、例えばメタ重亜硫酸ナトリウムまたは重亜硫酸ナトリウムもまた使用し得る。

【0098】(10)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプターおよびの該相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング  
本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプターを探索し、または決定するための試薬として有用である。さらに、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプターを探索し、または

決定するためのスクリーニング方法に利用できる。該レセプターとしては、公知のレセプターの他に、例えば温血動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞抽出物などの構成物などが考えられる。該レセプターの同定法としては、技術分野において知られる標準的なレセプター結合方法、例えば、該組織抽出物、細胞抽出物などを本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドとインキュベートするリガンド結合および架橋アッセイなどが挙げられる。他の方法には、表面プラスモン共鳴および分光学などの生物学方法が含まれる。さらに、該レセプターは可溶性レセプターもありえる。したがって、該レセプターの同定法に、細胞上清、体液なども使用することができる。

【0099】具体的には、本発明のレセプター決定方法は、該組織抽出物、細胞抽出物、細胞上清、体液などを用いるか、または考えられうる組換え型レセプタータンパク質（例えば、公知のレセプターなど）の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドが該レセプターに結合して細胞刺激活性（例えば、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有するレセプターを決定する方法である。本発明のレセプター決定方法においては、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとを接触させた場合の、例えば該レセプターに対する本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0100】より具体的には、本発明は、(A) 標識した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターに接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する結合量を測定することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプター決定方法、(B) 標識した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターを含有する細胞または該細胞の膜画分もしくは培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する結合量を測定することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプターの決定方法、(C) 標識した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該レセプターもしくは培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドのレセプターに対する結合量を測定することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと

相互作用するレセプターの決定方法、(D) 本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターを含有する細胞に接触させた場合における、該レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプターの決定方法、および(E) 本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該レセプターに接触させた場合における、該レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するの決定方法を提供する。

【0101】さらに、本発明は、本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと相互作用するレセプターの相互作用を阻害する化合物またはその塩は、該レセプターの発現系を構築し、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを添加する該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとの結合を阻害する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、該レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、pHの低下などを抑制する活性など）を有しない化合物（いわゆるレセプターアンタゴニスト）などが含まれる。

【0102】すなわち、本発明は、(i) 本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターを接触させた場合と(ii) 本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物と該レセプターを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする該レセプターと本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドとの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、(i) 本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターを接触させた場合と(ii) 本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物と該レセプターを接触させた場合における、例えばレセプターに対する本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0103】より具体的には、本発明は、(a) 標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチ

ドを、該レセプターに接触させた場合と、標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物を該レセプターに接触させた場合における、標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの該レセプターに対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(b) 標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターを含有する細胞または該細胞の膜画分もしくは培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに接触させた場合と、標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物を該レセプターを含有する該細胞または該細胞の膜画分もしくは該培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに接触させた場合における、標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの該細胞または該膜画分もしくは該培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(c) 標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを、該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該レセプターもしくは該培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに接触させた場合と、標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物を該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該レセプターもしくは該培養細胞上清中に産生された可溶性レセプターに接触させた場合における、標識した本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドの該レセプターに対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(d) 本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを該レセプターを含有する細胞に接触させた場合と、本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物を該レセプターを含有する細胞に接触させた場合における、該レセプターを介した細胞刺激性(例えば、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、pHの低下などを抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とする、本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および(e) 本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体

を培養することによって細胞膜上に発現した該レセプターに接触させた場合と、本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドおよび試験化合物を該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該レセプターに接触させた場合における、該レセプターを介する細胞刺激性(例えば、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、pHの低下などを抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とする本発明の本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドと該レセプターとの相互作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0104】本発明のDMP Lポリヌクレオチドがコードするポリペプチドはアミノ酸配列上、DMP 1と同一性を有する(図1)。DMP 1は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリンが豊富に存在し(図1)、親水度が非常に高く、RGDアミノ酸モチーフを持つタンパク質である(図2)。本発明のDMP Lポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、DMP 1と同様にグルタミン酸、アスパラギン酸、セリンが豊富に存在し、上述したRGDアミノ酸モチーフを持つ(図1)。さらに、図2に示すように、DMP Lポリペプチドも親水度が非常に高い。さらに、DMP 1は骨芽細胞においてmRNAの発現が観察されることが報告されているが、これと同様に本発明のDMP L mRNAも骨芽細胞株(MG-63)において発現が見られる(図3)。従って、DMP 1と本発明のDMP Lポリヌクレオチドがコードするポリペプチドはその構造・機能に関して密接に関連しているものと推測される。

【0105】上述したようにDMP 1は、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化・成熟を制御する能力などを有するため、その機能から医薬品への応用が期待されている。従って、DMP 1と構造・機能に関して密接に関連していると推測される。このことから、本発明のDMP Lポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化・成熟、破骨細胞の機能発現誘導作用などに関与していると考えられる。すなわち、該ポリヌクレオチドの異常は、骨粗鬆症や大理石病などの骨代謝の異常や歯周疾患を惹起する可能性がある。従って、本発明のポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドまたはその部分ペプチド、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに結合する抗体、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩、もしくは該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩は、医薬組成物として臨床的に応用することが可能である。例えば、本発明のポリヌクレオチドを利用することにより、上記疾患に対する遺伝子治療またはアンチセンス療法が可能になる。また、該ポリヌクレオチドがコードするポリペ

プチドまたはその部分ペプチドは、不完全又は不十分な量の該ポリペプチドによって引き起こされた疾患に対して投与することができる。該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに結合する抗体は、過剰な量の該ポリペプチドによって引き起こされた疾患に対する治療薬として臨床的に応用できると考えられる。

【0106】さらに、上述したようにDMP Lポリペプチドは、DMP 1と同様にRGDアミノ酸モチーフを持つことから、RGDアミノ酸モチーフを持つタンパク質が結合するレセプターであるインテグリン（例えば、 $\alpha$  v  $\beta$  3など）に結合することが予想される。従って、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを用いることによって、新たなインテグリンを同定することができ、さらには、インテグリンと本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドとの相互作用を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

【0107】また、実施例4で示したように、ヒトの組織において、DMP L mRNAは気管、精巣、肺、骨髄において強い発現が観察されることから、DMP Lは前立腺、気管、精巣、肺、骨髄において重要な働きをしていると思われる。すなわち、上記組織におけるDMP Lの発現異常によって、様々な疾患が引き起こされるものと考えられる。したがって、従って、本発明のポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドまたはその部分ペプチド、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに結合する抗体、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩、もしくは該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩は、前立腺、気管、精巣、肺、骨髄などにおける疾患の治療剤として有効である。

【0108】

【実施例】以下、本発明を実施例をあげ、更に詳細に説明する。

【0109】[試薬および実験操作に関する説明]他に断らない限りは、タカラ (Takara)、ファルマシア (Pharmacia)、ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim)、キアゲン (QIAGEN) およびクロンテック (CLONTECH) から得たDNA修飾酵素（例えば、ExTaq DNAポリメラーゼ；タカラ）およびキット類を製造業者による指示の通りに使用する。

【0110】PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) は、前述のExTaq DNAポリメラーゼを用いてパーキンエルマー (Perkin-Elmer) 社製DNAサーマルサイクラー (DNA Thermal Cycler) で実施し、DNAを特異的に増幅することができる。

【0111】大腸菌 (E. coli) 細胞は、マニアチス (Maniatis) ら [モレキュラー・クローニング: アーボラトリー・マニュアル (Molecular cloning: A laboratory manual), コールド・スプリング・ハーバ-

によって記載されている如くに形質転換することができる。

【0112】プラスミドは、アンピシリン  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  を含有しているLプロス寒天培地 (1%ペプトン、1% NaCl、0.5%酵母エキス、および1.5%寒天) 上の約  $25 \text{ cm}^2$  においてプラスミドを保持する大腸菌 (E. coli) を37 °Cで一晩培養し、キアゲン (QIAGEN) 社製キアゲン・プラスミド・キット (QIAGEN Plasmid Kit) で調製することができる。

【0113】[実施例1] 本発明のDMP Lポリヌクレオチドは以下の手順に従って単離した。

【0114】<ヒトDMP Lポリヌクレオチドの単離> 日本DNAデータバンク (DDBJ: DNA data bank of Japan) から、ヒトDMP 1のアミノ酸配列 (Genbank accession number U89012) を用いて、dbESTデータベース上でTB L A S T Nサーチを実施した。その結果、Expressed sequence tag (EST) ファイル、Genbank accession number AL537798が検出された。

【0115】[RACE法によるヒトDMP LをコードするcDNA領域の増幅] クロンテック社製Human fetus Marathon-Ready™ cDNAを用いて製品説明書に従い、RACE法によりcDNAの増幅を行った。プライマーは上記のdbESTより得られた塩基配列より合成した。PCRは、PE Applied Biosystems社製、GeneAmp PCR System 9600を用い、反応サイクルは96 5秒、72 2分30秒を5回、96 5秒、70 2分30秒を5回、96 5秒、68 2分30秒を2.5回繰り返し、PCR反応液を得た。この反応液をテンプレートとして1/10量加え、同条件で2度目のPCRを行った。

【0116】[PCR増幅産物の精製] 得られたPCR産物をエチジウムブロマイド入りの1%アガロースゲルで電気泳動を行い、このゲルを紫外線下で観察することによりDNAバンドを調べた。増幅されたフラグメントをゲルから切り取り、製品説明書に従い、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて精製した。

【0117】[ヒトDMP LポリペプチドをコードするcDNA領域の塩基配列の決定] 精製フラグメントの塩基配列は製品説明書に従い、PE Applied Biosystems社製DNAシーケンサー (ABI PRISM310 Genetic Analyzer) 及びABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kitを用いて決定した。

【0118】ヒトDMP Lポリヌクレオチドの核酸塩基配列を配列番号2に、アミノ酸配列を配列番号1に示す。配列番号2で表されるヒトDMP Lポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列が、ヒトDMP 1と相同性を示すことから、この遺伝子をDMP Lポリヌクレオチド (DMP1 like polynucleotide) と呼ぶこととした。

【0119】[ヒトDMP Lポリヌクレオチドを含むベ

クターの構築] ヒト DMP L cDNA の coding sequence (CDS) を PCR により増幅して pcDNA3.1(+)ベクター (Invitrogen社) に組み込んだ。ベクターに組み込まれた DMP L ポリヌクレオチド配列は製品説明書に従い、PE Applied Biosystems社製 DNA シークエンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) 及び ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit を用いて決定した。

#### 【0120】[実施例2]

<DMP L アミノ酸配列の解析> 本発明の DMP L ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドはアミノ酸配列上、DMP 1 と相同性を有する (図1)。DMP 1 は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリンが豊富に存在し (図1)、親水度が非常に高く、RGD アミノ酸モチーフを持つタンパク質である (図1および図2)。本発明の DMP L ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、DMP 1 と同様にグルタミン酸、アスパラギン酸、セリンが豊富に存在し、上述した RGD アミノ酸モチーフを持つ (図1および配列番号1)。更に図2に示すように、DMP L ポリペプチドも親水度が非常に高い。したがって、本発明のポリペプチドと DMP 1 は、同じファミリーに属している可能性があり、機能的にも類似していることが予想される。

#### 【0121】[実施例3]

<骨芽細胞株 (MG-63) における DMP L mRNA の発現解析> 骨芽細胞株 (MG-63) (大日本製薬社) を 10% ウシ胎児血清 (GIBCO BRL社) を含むダルベッコ変法 MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM (以下「DMEM」と言うことがある) 培養液 (GIBCO BRL社) 中で数日間培養した。培養ディッシュの全面をほぼ被う程度に細胞が増殖したのを確認した後、細胞から総 RNA を ISOGEN (ニッポンジーン製) を用いて抽出し、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN製) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。PCR は、センスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μM、5 μL の HotStarTaq PCR Master Mix Kit (QIAGEN製)、2 μL の cDNA を含む総量 10 μL の反応液により行った。

【0122】用いたプライマーは、DMP L, 5'-ATGAGGAGAGGCCTCAGCTTTCC-3', 5'-ACAGGCTGTCCTGGAGTAGGTGG-3'; DMP 1, 5'-TAAACCCCGACCCACA ACTA-3', 5'-GGCTTTCTCGCTCTGACTC-3'; beta-actin (-actin), 5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAG-3', 5'-TCTTCATGGTGTCTAGGAGGCA-3' である。

【0123】条件としては、1) 変性 (94 で 20 秒間)、2) アニールリング (60 で 30 秒間)、3) 伸長反応 (72 で 30 秒間) のサイクルを DMP L 遺伝子の増幅のために 34 サイクル、DMP 1 遺伝子の増幅

のために 34 サイクル、GAPDH 遺伝子は 28 サイクル行った。PCR 産物の一部を 0.5 μg/mL のエチジウムブロミド (Sigma製) を含む 2% アガロースゲル (ニッポンジーン製) を用いて電気泳動し、Gel Doc 2000 (Bio-Rad製) により泳動像を検出した。

【0124】その結果、骨芽細胞株 (MG-63) において DMP L および DMP 1 mRNA の発現が観察された (図3)。DMP L と相同性の高い DMP 1 は骨芽細胞において重要な働きをしていると考えられていることから、DMP L は骨芽細胞において DMP 1 と同様の働き、もしくは重要な働きをしていると思われる。

#### 【0125】[実施例4]

<ヒト組織における DMP L mRNA の発現解析> ヒト組織における DMP L mRNA の発現量の経時的変化はリアルタイム PCR 法によって調べた。ヒト組織 (20 組織) 由来の総 RNA (クロンテック製) より、Omniscrypt RT Kit (Qiagen製) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。PCR は、各標的遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.1 μM、10 μL の 2x SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems製)、5 μL の cDNA を含む総量 20 μL の反応液により行った。

【0126】用いたプライマーは、DMP L, 5'-CAATGGCTGGTCGTGATCC-3', 5'-TGGAAAGCCCTCAAACGTTCT-3' である。また、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) プライマーは PE Applied Biosystems社から購入した (Pre-Developed Taqman Assay Reagents Endogenous Control)。

【0127】PCR 反応は、1) 変性 (95 で 15 秒間)、2) アニールリングおよび伸長反応 (60 で 1 分間) の条件で 40 サイクルまで行った。各標的遺伝子の発現量の定量は、GeneAmp 5700 SDS software (PE Applied Biosystems製) により行った。すなわち、増幅された PCR 産物 (二本鎖 DNA) に結合した SYBR Green の蛍光シグナル強度を PCR サイクル毎に経時的に測定し、サイクル数に対する PCR 産物の増幅曲線を作成後、この増幅曲線と任意の閾値 (通常、増幅曲線の指数増幅領域の中点付近を選択する) の交わる Threshold cycle (Ct) 値を算出することにより行った。内部標準である GAPDH に対する DMP L mRNA の相対的な発現量は、下記計算式により算出した。

#### 【0128】

$$\text{発現量} = 2^{-(\text{DMP L})_{Ct} \text{値} - (\text{GAPDH})_{Ct} \text{値}}$$

図4は、20種類のヒト組織における DMP L mRNA の発現量の経時的変化をリアルタイム PCR 法により調べた結果である。その結果、前立腺、気管、精巣、肺、骨髄において DMP L mRNA の強い発現が観察された (図4)。これらのことから DMP L は前立腺、気管、精巣、肺、骨髄において重要な働きをしていると思われる。すなわ

ち、上記組織におけるDMP Lの発現異常によって、様々な疾患が引き起こされるものと考えられる。

【0129】

【発明の効果】本発明により新たなヒトポリペプチド、並びにそれをコードするヒト遺伝子(DMP L遺伝子)が提供される。DMP L遺伝子は、それがコードするポリペプチドがDMP 1と相同性を有する新規の遺伝子である。

【0130】上述したようにDMP 1は、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化・成熟、破骨細胞の機能発現誘導作用などを有するため、その機能から医薬品への応用が期待されている。すなわち、DMP 1と相同性を有する本発明のポリペプチド及びそれがコードする遺伝子は、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化・成熟、破骨細胞の機能発現誘導

作用などに関与していると考えられることより、本発明により、これらの関与する疾患の病態解明や診断、治療等が可能となると考えられる。また、本発明のポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドまたはその部分ペプチド、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに結合する抗体、該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を活性化もしくは増強する化合物またはその塩、もしくは該ポリペプチドまたはその部分ペプチドの作用または発現を阻害もしくは減弱する化合物またはその塩は、医薬組成物として臨床的に応用することが可能である。

【0131】

【配列表】

<110>	帝人株式会社		
<120>	新規なポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド		
<130>	P35176		
<160>	2		
<210>	1		
<211>	666		
<212>	PRT		
<213>	Homo Sapiens		
<400>	1		
	Met Ala Asp Met Glu Asp Leu Phe Gly Ser		
	Asp Ala Asp Ser Glu		
	1 5 10		15
	Ala Glu Arg Lys Asp Ser Asp Ser Gly Ser		
	Asp Ser Asp Ser Asp		
	20 25		30
	Gln Glu Asn Ala Ala Ser Gly Ser Asn Ala		
	Ser Gly Ser Glu Ser		
	35 40		45
	Asp Gln Asp Glu Arg Gly Asp Ser Gly Gln		
	Pro Ser Asn Lys Glu		
	50 55		60
	Leu Phe Gly Asp Asp Ser Glu Asp Glu Gly		
	Ala Ser His His Ser		
	65 70		75
	Gly Ser Asp Asn His Ser Glu Arg Ser Asp		
	Asn Arg Ser Glu Ala		
	80 85		90
	Ser Glu Arg Ser Asp His Glu Asp Asn Asp		
	Pro Ser Asp Val Asp		
	95 100		105
	Gln His Ser Gly Ser Glu Ala Pro Asn Asp		
	Asp Glu Asp Glu Gly		
	110 115		120
	His Arg Ser Asp Gly Gly Ser His His Ser		
	Glu Ala Glu Gly Ser		
	125 130		135
	Glu Lys Ala His Ser Asp Asp Glu Lys Trp		
	Gly Arg Glu Asp Lys		

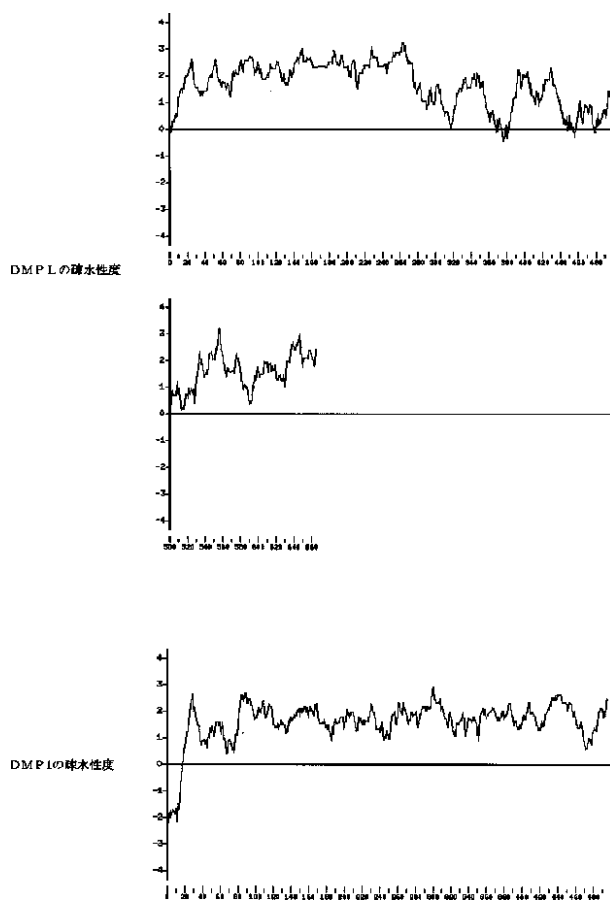
	200	205	210
Asn Ser Asp Asp Glu Arg Pro Val Ala Ser Asp Asn Asp Asp Glu			
	215	220	225
Lys Gln Asn Ser Asp Asp Glu Glu Gln Pro Gln Leu Ser Asp Glu			
	230	235	240
Glu Lys Met Gln Asn Ser Asp Asp Glu Arg Pro Gln Ala Ser Asp			
	245	250	255
Glu Glu His Arg His Ser Asp Asp Glu Glu Glu Gln Asp His Lys			
	260	265	270
Ser Glu Ser Ala Arg Gly Ser Asp Ser Glu Asp Glu Val Leu Arg			
	275	280	285
Met Lys Arg Lys Asn Ala Ile Ala Ser Asp Ser Glu Ala Asp Ser			
	290	295	300
Asp Thr Glu Val Pro Lys Asp Asn Ser Gly Thr Met Asp Leu Phe			
	305	310	315
Gly Gly Ala Asp Asp Ile Ser Ser Gly Ser Asp Gly Glu Asp Lys			
	320	325	330
Pro Pro Thr Pro Gly Gln Pro Val Asp Glu Asn Gly Leu Pro Gln			
	335	340	345
Asp Gln Gln Glu Glu Glu Pro Ile Pro Glu Thr Arg Ile Glu Val			
	350	355	360
Glu Ile Pro Lys Val Asn Thr Asp Leu Gly Asn Asp Leu Tyr Phe			
	365	370	375
Val Lys Leu Pro Asn Phe Leu Ser Val Glu Pro Arg Pro Phe Asp			
	380	385	390
Pro Gln Tyr Tyr Glu Asp Glu Phe Glu Asp Glu Glu Met Leu Asp			
	395	400	405
Glu Glu Gly Arg Thr Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Asn Thr Ile			
	410	415	420
Arg Trp Arg Ile Arg Arg Asp Glu Glu Gly Asn Glu Ile Lys Glu			
	425	430	435
Ser Asn Ala Arg Ile Val Lys Trp Ser Asp Gly Ser Met Ser Leu			
	440	445	450
His Leu Gly Asn Glu Val Phe Asp Val Tyr Lys Ala Pro Leu Gln			

560 565 570  
 Glu Pro Asp Arg Tyr Asp Glu Glu Glu Glu  
 Gly Glu Glu Ser Ile  
 575 580 585  
 Ser Leu Ala Ala Ile Lys Asn Arg Tyr Lys  
 Gly Gly Ile Arg Glu  
 590 595 600  
 Glu Arg Ala Arg Ile Tyr Ser Ser Asp Ser  
 Asp Glu Gly Ser Glu  
 605 610 615  
 Glu Asp Lys Ala Gln Arg Leu Leu Lys Ala  
 Lys Lys Leu Thr Ser  
 620 625 630  
 Asp Glu Glu Gly Glu Pro Ser Gly Lys Arg  
 Lys Ala Glu Asp Asp  
 635 640 645  
 Asp Lys Ala Asn Lys Lys His Lys Lys Tyr  
 Val Ile Ser Asp Glu  
 650 655 660  
 Glu Glu Glu Asp Asp Asp  
 665 666  
 <210> 2  
 <211> 2177  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 2  
 gccctaaccg aggcagcagc ggacgtgagc gata  
 34  
 atg gcg gat atg gag gat ctc ttc ggg agc  
 gac gcc gac agc gaa 79  
 Met Ala Asp Met Glu Asp Leu Phe Gly Ser  
 Asp Ala Asp Ser Glu  
 gct gag cgt aaa gat tct gat tct gga tct  
 gac tca gat tct gat 124  
 Ala Glu Arg Lys Asp Ser Asp Ser Gly Ser  
 Asp Ser Asp Ser Asp  
 caa gag aat gct gcc tct ggc agt aat gcc  
 tct gga agt gaa agt 169  
 Gln Glu Asn Ala Ala Ser Gly Ser Asn Ala  
 Ser Gly Ser Glu Ser  
 gat cag gat gaa aga ggt gat tca gga caa  
 cca agt aat aag gaa 214  
 Asp Gln Asp Glu Arg Gly Asp Ser Gly Gln  
 Pro Ser Asn Lys Glu  
 ctg ttt gga gat gac agt gag gac gag gga  
 gct tca cat cat agt 259  
 Leu Phe Gly Asp Asp Ser Glu Asp Glu Gly  
 Ala Ser His His Ser  
 ggt agt gat aat cac tct gaa aga tca gac  
 aat aga tca gaa gct 304  
 Gly Ser Asp Asn His Ser Glu Arg Ser Asp

Leu Ser Asp Asp Glu Arg Gln Gln Leu Ser  
Glu Glu Glu Lys Ala  
aat tct gat gat gaa cgg ccg gta gct tct  
gat aat gat gat gag 709  
Asn Ser Asp Asp Glu Arg Pro Val Ala Ser  
Asp Asn Asp Asp Glu  
  
aaa cag aat tct gat gat gaa gaa caa cca  
cag ctg tct gat gaa 754  
Lys Gln Asn Ser Asp Asp Glu Glu Gln Pro  
Gln Leu Ser Asp Glu  
gag aaa atg caa aat tct gat gat gaa agg  
cca cag gcc tca gat 799  
Glu Lys Met Gln Asn Ser Asp Asp Glu Arg  
Pro Gln Ala Ser Asp  
gaa gaa cac agg cat tca gat gat gaa gag  
gaa cag gat cat aaa 844  
Glu Glu His Arg His Ser Asp Asp Glu Glu  
Glu Gln Asp His Lys  
tca gaa tct gca aga ggc agt gat agt gaa  
gat gaa gtt tta cga 889  
Ser Glu Ser Ala Arg Gly Ser Asp Ser Glu  
Asp Glu Val Leu Arg  
atg aaa cgc aag aat gcg att gca tct gat  
tca gaa gcg gat agt 934  
Met Lys Arg Lys Asn Ala Ile Ala Ser Asp  
Ser Glu Ala Asp Ser  
gac act gag gtg cca aaa gat aat agt gga  
acc atg gat tta ttt 979  
Asp Thr Glu Val Pro Lys Asp Asn Ser Gly  
Thr Met Asp Leu Phe  
gga ggt gca gat gat atc tct tca ggg agt  
gat gga gaa gac aaa 1024  
Gly Gly Ala Asp Asp Ile Ser Ser Gly Ser  
Asp Gly Glu Asp Lys  
cca cct act cca gga cag cct gtt gat gaa  
aat gga ttg cct cag 1069  
Pro Pro Thr Pro Gly Gln Pro Val Asp Glu  
Asn Gly Leu Pro Gln  
gat caa cag gaa gag gag cca att cct gag  
acc aga ata gaa gta 1114  
Asp Gln Gln Glu Glu Glu Pro Ile Pro Glu  
Thr Arg Ile Glu Val  
gaa ata ccc aaa gta aac act gat tta gga  
aac gac tta tat ttt 1159  
Glu Ile Pro Lys Val Asn Thr Asp Leu Gly  
Asn Asp Leu Tyr Phe  
gtt aaa ctg ccc aac ttt ctc agt gta gag  
ccc aga cct ttt gat 1204  
Val Lys Leu Pro Asn Phe Leu Ser Val Glu  
Pro Arg Pro Phe Asp  
cct cag tat tat gaa gat gaa ttt gaa gat  
gaa gaa atg ctg gat 1249



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
C 0 7 H 21/04		C 0 7 K 16/18	4 C 0 5 7
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
	16/18		4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15			4 H 0 4 5
	1/19	C 1 2 P 21/02	C
	1/21	C 1 2 Q 1/68	A
	5/10	G 0 1 N 33/15	Z
	15/02		Z
C 1 2 P 21/02			D
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/15		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/50		B
	33/53		A
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 東 由明  
 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
 株式会社東京研究センター内

(72)発明者 上村 孝  
 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
 株式会社東京研究センター内

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03  
4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 GA05  
HA14 HA17  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ43 QR55  
QS34  
4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01  
DA13  
4B065 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C057 MM01 MM09  
4C084 AA02 BA23 NA14 ZA67 ZA96  
4C086 AA01 AA02 EA16 ZA67 ZA96  
ZA97  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09  
CA40 DA76 EA27 EA50 FA74

