

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 508026

(P2003 - 508026A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(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 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		45/00	4 B 0 6 3
38/00		48/00	4 B 0 6 4
45/00		A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 (全 88数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 513990(P2001 - 513990)

(86)(22)出願日 平成12年7月17日(2000.7.17)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月9日(2002.1.9)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/06878

(87)国際公開番号 W001/009184

(87)国際公開日 平成13年2月8日(2001.2.8)

(31)優先権主張番号 99202326.7

(32)優先日 平成11年7月15日(1999.7.15)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 1012611

(32)優先日 平成11年7月15日(1999.7.15)

(33)優先権主張国 オランダ(NL)

(71)出願人 ソルベイ・ファーマシューチカルズ・ベー
・ブイ

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースブ・シージェイバンハウテンラ-ン36

(72)発明者 デレールスニーダー, ウイリ

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースブ・シージェイバンハウテンラ-ン36

(72)発明者 ニス, ガイ

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースブ・シージェイバンハウテンラ-ン36

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトG - タンパク質共役型受容体

(57)【要約】

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド、これらによりコードされるポリペプチドおよびこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、およびこれらの製造に関する。さらに具体的には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、I G S 1 - ファミリーと呼ばれるGタンパク質共役型受容体ファミリーに関する。本発明は、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用の阻害または活性化、該ポリヌクレオチドを含むベクター、これらのベクターを含む宿主細胞およびトランスジェニック動物にも関し、ここでI G S 1 遺伝子は過剰発現、非発現、過少発現または抑制(ノックアウト動物)のいずれかである。本発明は、さらに該Gタンパク質共役型受容体ファミリーI G S 1 のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる化合物をスクリーニングするための方法およびI G S 1 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドおよびI G S 1 受容体ファミリーに対するアゴニストまたはアンタゴニストの神経医学およびC N S 障害の治療における使用に関する。

。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 配列番号2記載のIGS1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

b) Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特には配列番号1に相当するヌクレオチド配列；

c) (a)または(b)のヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80% (好ましくは少なくとも90%)の配列の同一性を有するヌクレオチド配列；

d) (a)または(b)または(c)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列

からなる群より選ばれたヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 該ポリヌクレオチドが配列番号2のIGS1ポリペプチドをコードする配列番号1内に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 該ポリヌクレオチドが配列番号1に対してその全長にわたって少なくとも80%が同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号1のポリヌクレオチドである、請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 DNAまたRNAである、請求項1-4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項1のポリヌクレオチドまたは少なくとも5個のヌクレオチドそして好ましくは30個と50個との間のヌクレオチドのその断片を含んでなるハイブリダイゼーションプローブ。

【請求項7】 発現系が適合性宿主細胞内に存在する場合に、該発現系が配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸

配列を含んでなる I G S 1 ポリペプチドを産生することができる、該発現系を含んでなる D N A または R N A 分子。

【請求項 8】 請求項 7 の発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 9】 酵母細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 10】 動物細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 11】 請求項 8 から 10 までに記載の細胞に由来する I G S 1 受容体膜調製物。

【請求項 12】 ポリペプチドの産生のために十分な条件下で請求項 8 の宿主を培養しそして培養物からポリペプチドを回収することを含んでなる I G S 1 ポリペプチドを産生するための方法。

【請求項 13】 適当な培養条件下で、細胞が I G S 1 ポリペプチドを産生することができるように、請求項 7 の発現系を用いて細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、細胞の I G S 1 ポリペプチドを産生する細胞を産生するための方法。

【請求項 14】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 80% が同一であるアミノ酸配列を含んでなる、I G S 1 ポリペプチド。

【請求項 15】 配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 14 記載のポリペプチド。

【請求項 16】 請求項 14 記載の I G S 1 ポリペプチドに対して免疫特異性の抗体。

【請求項 17】 請求項 14 記載の I G S 1 ポリペプチド受容体の活性または発現を増強することを要する患者の治療のための方法において、

(a) 該受容体に対するアゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および / または、

(b) 配列番号 2 の I G S 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも 80% の同一性を有するヌクレオチド配列、またはインビボで該受容体活性の産生を行うような形で該ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドを患者

に提供する

ことを含んでなる方法。

【請求項18】 請求項14記載のIGS1ポリペプチド受容体の活性または発現を阻害することを要する患者の治療のための方法において

(a) 該受容体に対するアンタゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または

(b) 該受容体をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチドを患者に投与し、および/または

(c) リガンドに対して該受容体と競合するポリペプチドの治療的な有効量を患者に投与する

ことを含んでなる方法。

【請求項19】 患者内の請求項14記載のIGS1ポリペプチドの発現または活性に関して患者内の疾患または疾患に対する罹患性の診断のための方法において

(a) 該患者のゲノム内の該IGS1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内の突然変異の存在または不存在を決定し、および/または

(b) 該患者に由来する試料内のIGS1ポリペプチド発現の存在または量を分析する

ことを含んでなる方法。

【請求項20】 請求項14記載のIGS1ポリペプチドに対するアゴニストを同定するための方法において、

(a) IGS1ポリペプチドを産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物がIGS1ポリペプチドの活性化により発生するシグナルに影響するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項21】 請求項20記載の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項22】 請求項14記載のIGS1ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための方法において、

(a) IGS1ポリペプチドを産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生されたシグナルが候補化合物の存在下で減衰するかどうかを決定することを含んでなる方法。

【請求項23】 請求項22記載の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項24】 IGS1ポリペプチドを発現する請求項13記載の方法により産生された組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項25】 遺伝的に改変された非 - ヒト動物を創成する方法において

、
a) アミノ酸配列の配列番号2を有するタンパク質をコードする核酸配列またはその生物学的に活性な断片から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を、高レベル遺伝子発現または遺伝子が該動物内で通常は発現されない細胞タイプ内での発現を駆動することができる調節配列と連結させ、または

b) アミノ酸配列の配列番号2を有するタンパク質をコードする核酸配列またはその生物学的に活性な断片から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を操作し、そして、アミノ酸配列の配列番号2を有するタンパク質または生物学的に活性な断片をコードする内在性遺伝子対立遺伝子を完全にまたは部分的に不活性化するような方法で動物のゲノム内に該配列を再導入する

段階を含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の技術分野】**

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド、これらによりコードされるポリペプチドおよびこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用およびこれらの製造に関する。さらに具体的には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に関し、これを以後IGS1と呼ぶ。本発明は、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用の阻害または活性化、該ポリヌクレオチドを含むベクター、これらのベクターを含む宿主細胞およびトランスジェニック動物にも関し、ここでIGS1遺伝子は過剰発現、非発現、過少発現および/または抑制(ノックアウト動物)のいずれかである。本発明は、さらに、該Gタンパク質共役型受容体IGS1のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用できる化合物をスクリーニングするための方法にも関する。

【0002】**【発明の背景】**

多数の医療的に重要な生物学的過程が、Gタンパク質および/またはセカンドメッセンジャー、例えばcAMPを含むシグナル伝達経路に関与するタンパク質により媒介されることは良く証明されている(Lefkowitz, Nature 1991, 351:353-354)。本明細書中でこれらのタンパク質は、Gタンパク質と一緒に経路に関与するタンパク質と呼ばれる。これらのタンパク質の一部の例は、GPC受容体、例えばアドレナリン作動剤およびドーパミン(Kobilka, B.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K. et al., Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R., et al., Nature, 1988, 336:783-787)、Gタンパク質自体、エフェクタータンパク質、例えばホスホリパーゼC、アデニル酸シクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ、およびアクチュエータータンパク質、例えばタンパク質キナーゼAおよびタンパク質キナーゼC(Simon, M.I., et al., Science, 1991, 252:802-8)である。

【0003】

例えば、シグナル伝達の一つの形においてGPCRへのホルモン結合の際に、受容体は、ヘテロ三量体状Gタンパク質と相互作用してそしてグアニンヌクレオチド-結合部位からGDPの分離を誘導する。グアニンヌクレオチドの正常の細胞濃度において、GTPは部位を直ちに満たす。Gタンパク質の α -サブユニットへのGTPの結合は、受容体からGタンパク質の分離およびGタンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットへの分離を起こす。次いで、GTPを有する形は、アデニル酸シクラーゼに結合して活性化する。Gタンパク質自体により触媒されるGTPのGDPへの加水分解($\beta\gamma$ サブユニットは固有のGTPアーゼ活性を有する)は、Gタンパク質をその基底の不活性形に返還させる。 $\beta\gamma$ サブユニットのGTPアーゼ活性は、本質的には、オン/オフスイッチを制御する内部時計である。 $\beta\gamma$ サブユニットのGDP結合形は α に対する高い親和性を有しそしてGDPの α との引き続く再結合は、系を基底状態に返還させる。このように、Gタンパク質は二重の役割、すなわち受容体からエフェクター(この例ではアデニル酸シクラーゼ)へのシグナルを中継する中間体としておよびシグナルの存続期間を制御する時計としての役割を有する。

【0004】

Gタンパク質共役型受容体の膜結合スーパーファミリーは、7個の推定膜貫通ドメインを有するとして特性化されている。ドメインは、細胞外または細胞質ループにより連結された膜貫通らせんを示すと考えられている。Gタンパク質共役型受容体は、広範囲の生物学的活性受容体、例えばホルモン、ウイルス、成長因子および神経受容体を含む。

【0005】

Gタンパク質共役型受容体ファミリーは、CNS障害の治療に使用される神経弛緩性薬剤に結合するドーパミン受容体を含む。このファミリーの成員の他の例は、カルシトニン、アドレナリン作動薬、神経ペプチドY、ソマスタチン、ニューロテンシン、ニューロキニン、カプサイシン、VIP、CGRP、CRF、CCK、ブラジキニン、ガラニン、モチリン、ノシセプチン、エンドテリン、cAMP、アデノシン、ムスカリニン作用薬、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンビン、キニン、濾胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子-

1、ロドプシン、オドラント、およびサイトメガロウイルス受容体を含むが、これらに限定はされない。

【0006】

大部分のGタンパク質共役型受容体は、機能的タンパク質構造を安定化すると考えられているジスルフィド結合を形成する最初の2個の細胞外ループのそれぞれの中に単独保存システイン残基を有する。7個の膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と呼ばれる。TM5とTM6とを結合する細胞質ループは、Gタンパク質結合ドメインの主要な成分であろう。

【0007】

大部分のGタンパク質共役型受容体は、第三細胞質ループおよび/またはカルボキシ末端内に潜在的リン酸化部位を含む。数種のGタンパク質共役型受容体、例えば - アドレナリン受容体に対して、タンパク質キナーゼAおよび/または特定の受容体キナーゼによるリン酸化は、受容体脱感作を媒介する。

【0008】

最近、ある種のGPCRは、カルシトニン受容体様受容体と同様に、受容体活性調節タンパク質(RAMP)と呼ばれる小さい一回通過膜タンパク質と相互作用するらしいことが発見された。GPCRとある種のRAMPとのこの相互作用は、天然のリガンドがGPCR-RAMP組合せに対する関連親和性を有しそして複合体の機能的シグナル伝達活性を調節することに決定的である(McLathie, L.M. et al., Nature (1998) 393:333-339)。

【0009】

ある種の受容体に対して、Gタンパク質共役型受容体のリガンド結合部位は、数種のGタンパク質共役型受容体膜貫通ドメインにより形成された親水性ソケットを含んでなり、そのソケットはGタンパク質共役型受容体の疎水性残基により囲まれていると考えられる。それぞれのGタンパク質共役型受容体膜貫通らせんの親水性側は、内側に向き、そして極性リガンド-結合部位を形成すると考えられる。TM3は、数種のGタンパク質共役型受容体においてリガンド-結合部位、例えばTM3アスパラギン酸残基を有すると考えられている。TM5セリン、

TM6 アスパラギンおよびTM6 およびTM7 フェニルアラニンまたはチロシン
もリガンド結合に関係する。

【0010】

Gタンパク質共役型受容体は、ヘテロ三量体Gタンパク質により種々の細胞内
酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターに細胞内結合できる (Johnson
et al., Endoc. Rev., 1989, 10:317-331 参照)。種々のGタンパク質 サブユ
ニットは、特定のエフェクターを優先的に刺激して種々の生物学的機能を細胞内
で調節する。Gタンパク質共役型受容体の細胞質内残基のリン酸化は、ある種の
Gタンパク質共役型受容体のGタンパク質結合の調節のための重要な機構として
同定された。Gタンパク質共役型受容体は哺乳類宿主内の多数の部位に見いださ
れている。

【0011】

主としてGPCRクラスの受容体は、現在既知の薬剤の半分以上を誘導した(D
rews, Nature Biotechnology, 1996, 14:1516)。これは、これらの受容体が、治
療標的として確立され、証明された経歴を有することを示す。本発明中に記載す
る新規のIGS1 GPCRは、機能不全、障害、または疾患(以後全体的に「
疾患」と呼ぶ)の診断、防止、改善または矯正において役立つことができる別の
受容体の同定および特性決定のために当該技術分野での要求を明らかに満足する
。「疾患」は、精神分裂症、間欠性発作不安(EPA)障害、例えば強迫症(OC
D)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑
うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発
性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞
、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、
痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、
偏頭痛、注意散漫/活動過多障害(ADHD)を含む精神医学およびCNS障害
、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性
高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜
下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾
患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群(IBS)、炎症性

腸疾患（IBD）、胃食道反射疾患（GERD）、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2による感染、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害を含み、これらに限定はされない。

【0012】

特に、本発明に記載の新規のIGS1 GPCRは、精神医学およびCNS不全、障害および疾患、特に運動障害、障害または疾患、例えばチック、振せん、ツレット症候群、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニーおよび痙攣の診断、防止、改善または矯正に重要な役割を演じることができるといふ別の受容体の同定および特性決定のための当該技術分野の要求を満足する。

【0013】

【発明の要旨】

一つの態様では、本発明は、IGS1ポリペプチドおよび組換え物質およびこれらの製造のための方法に関する。本発明の別の態様は、このようなIGS1ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用のための方法に関する。このような使用は、上記のような「疾患」の一つの治療を含み、これに限定はされない。特に使用は、精神医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット症候群、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニーおよび痙攣の治療を含む。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は、本発明により提供される物質を用いるアゴニストおよびアンタゴニストの同定のため、および同定された化合物を用いるIGS1平衡失調に関連する状態を治療する方法に関する。本発明のさらに別の態様は、不適当なIGS1活性またはレベルに関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。本発明のさらに別の態様は、IGS1の異常な発現または活性から起きる障害に対するモデルとして挙動する動物に基づく系に関する。

【0015】

【表1】

表1: 配列番号:1のIGS1-DNA

```

5' -
GCCTGCAACCTGTCTCACGCCCTCTGGCTGTTGCCATGACGTCCACCTGCACCAACAGCA
CGCGCGAGAGTAACAGCAGCCACACGTGCATGCCCCCTCTCCAAAATGCCCATCAGCCTGG
CCCACGGCATCATCCGCTCAACCGTGTGGTTATCTTCCTCGCCGCCTCTTTCGTCGGCA
ACATAGTGCTGGCGCTAGTGTTGACGCGCAAGCCGACGTGCTGCAGGTGACCAACCGTT
TTATCTTTAACCTCCTCGTCAACGACCTGCTGCAGATTTTCGCTCGTGGCCCCCTGGGTGG
TGGCCACCTCTGTGCCTCTCTTCTGGCCCCCAACAGCCACTTCTGCACGGCCCTGGTTA
GCCTCACCCACCTGTTTCGCTTCGCCAGCGTCAACACCATTGTCTTGGTGTGAGTGGATC
GCTACTTGTCCATCATCCACCCTCTCTCCTACCCGTCCAAGATGACCCAGCGCCGCGGTT
ACCTGCTCCTCTATGGCACCTGGATTGTGGCCATCCTGCAGAGCACTCCTCCACTCTACG
GCTGGGGCCAGGCTGCCTTTGATGAGCGCAATGCTCTCTGCTCCATGATCTGGGGGCCA
GCCCCAGCTACACTATTCTCAGCGTGGTGTCTTCATCGTCATTCCACTGATTGTCATGA
TTGCCTGCTACTCCGTGGTGTCTCTGTGCAGCCCCGAGGCAGCATGCTCTGCTGTACAATG
TCAAGAGACACAGCTTGAAGTGCAGTCAAGGACTGTGTGGAGAATGAGGATGAAGAGG
GAGCAGAGAAGAAGGAGGAGTTCCAGGATGAGAGTGAGTTTCGCCGCCAGCATGAAGGTG
AGGTCAAGGCCAAGGAGGGCAGAATGAAGCCAAGGACGGCAGCCTGAAGGCCAAGGAAG
GAAGCACGGGGACCAGTGAGAGTAGTGTAGAGGCCAGGGGCAGGAGGAGTGCAGAGAGA
GCAGCACGGTGGCCAGCGACGGCAGCATGGAGGGTAAGGAAGGCAGCACCAAAGTTGAGG
AGAACAGCATGAAGGCAGACAAGGTCGCACAGAGGTCAACCAGTGCAGCATTGACTTGG
GTGAAGATGGCATGGAGTTTGGTGAAGACGACATCAATTTTCAGTGAGGATGACGTCGAGG
CAGTGAACATCCCGGAGAGCCTCCACCCAGTCGTCGTAACAGCAACAGCAACCCTCCTC
TGCCCAGGTGCTACCAAGTCAAAGCTGCTAAAGTGATCTTCATCATCATTTTCTCCTATG
TGCTATCCCTGGGGCCCTACTGCTTTTTAGCAGTCCTGGCCGTGGGTGGATGTCGAAA
CCCAGGTACCCAGTGGGTGATCACCATAATCATCTGGCTTTTCTTCCTGCAGTGCTGCA
TCCACCCCTATGCTATGGCTACATGCACAAGACCATTAAGAAGGAAATCCAGGACATGC
TGAAGAAGTTCTTCTGCAAGGAAAAGCCCCGAAAGAAGATAGCCACCCAGACCTGCCCC
GAACAGAGGGTGGGACTGAAGGCAAGATTGTCCCTTCCTACGATTCTGCTACTTTTCCTT
GAAGTTAGTTCTAAGGCAAACCTTGAATAATCAGTCCTTCAGCCACAGCTATTTAGAGCTT
TAAACTACCAGTTCAATCACTGGTTATGCTTTCTGTG-3'

```

【0016】

【表2】

表2: 配列番号: 2のIGS1-タンパク質

```

MTSTCTNSTRESNSSHTCMPLSKMPISLAHGIIRSTVLVIFLAASFVGNIVLALVLQRKP
QLLQVTNRFIENLLVTDLLQISLVAPWVWVATSVPLFWPLNSHFCTALVSLTHLFAFASVN
TIVLVSVDRLYSIIHPLSYPSKMTQRRGYLLLYGTWIVAILQSTPPLYGHWGQAAFDERNA
LCSMINGASPSYTIILSVVSFIVIPLIVMIACYSVVFCARRQHALLYNVKRHSLEVRVKD
CVENEDEEGAEEKKEEFQDESEFRRQHEGEVKAKEGRMEAKDGSLLKAKEGSTGTSESSVEA
RGSEEVRESSTVASDGSMEGKEGSTKVEENSMKADKGRTEVNQCSIDLGEDGMEFGEDDI
NFSEDDVEAVNIPESLPPSRNSNSNPPLPRCYQCKAAKVIFIIIFSIVLSLGPYCFILAV
LAVWVDVETQVPQWVITIIIWLFQCCIHPIVYGYMHKTIKKEIQDMLKKFFCKEKPKK
EDSHPDLPGTEGGTEGKI VPSYDSATFP

```

【0017】

[発明の詳細な説明]

配列およびモチーフの範囲内での構造類似性は、本発明のIGS1 GPCRとその他のヒトGPCRとの間で存在する。さらにIGS1は、脳組織、特に尾状核および被殻内に発現される。従って、IGS1はなかでも上記の「疾患」に関与すると考えられる。特にIGS1は、精神医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット症候群、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニーおよび痙攣に関与すると考えられる。

【0018】

別途に断らない限り、本明細書中に使用される技術的および科学的用語は、本発明が属する当該分野の通常熟練者により共通して理解されると同様の意味を有する。本明細書中に記載のものに類似または等価なあらゆる方法および物質が本発明の実施または試験に使用できるけれども、好ましい方法、装置および物質をここに記載する。本明細書中に引用したすべての公開文献は、すべての公開文献を特定して個別に完全に記載すると同様に本明細書中に引用して組み込むと同様に、引用することにより本明細書中に編入される。

【0019】

【定義】

以下の定義は、本明細書中にしばしば使用される一部の用語の理解を助けるために記載される。

【0020】

「IGS1」は、なかでも、配列番号2中に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変種を含んでなるポリペプチドを呼ぶ。

【0021】

「受容体活性」または「受容体の生物学的活性」は、該IGS1の代謝または生理的機能と呼び、同様の活性または改善された活性または低下した望ましくない副作用を有するこれらの活性を含む。該IGS1の抗原性および免疫原性活性も含まれる。

【0022】

「IGS1遺伝子」は、配列番号1中に記載のヌクレオチド配列またはこれらの対立遺伝子変種および/またはこれらの相補物を含んでなるポリヌクレオチドを呼ぶ。

【0023】

本明細書中に使用される「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、および人体適応化された抗体、ならびにFab断片を含み、これにはFabまたはその他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産生物も含まれる。

【0024】

「単離された」は、「人手により」本来(天然)の状態から改変および/または本来の環境から分離されたことを意味する。従って、本来的に存在する「単離された」組成物または物質が「単離」されると、その当初の環境から変化または移動または両方を受ける。例えば、本来的に生きた動物内に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、しかしその本来の状態と一緒に存在する物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離され」ており、このように本明細書中で用語が使用される。

【0025】

「ポリヌクレオチド」は、一般に、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであってもよいあらゆる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呼ぶ。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖

状DNA、一本鎖および二本鎖の領域の混合であるDNA、一本鎖および二本鎖状RNA、および一本鎖および二本鎖の領域の混合であるRNA、一本鎖またはさらに典型的には二本鎖または一本鎖および二本鎖の領域の混合であってもよいDNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子を含むが、これに限定はされない。さらに「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含んでなる三本鎖領域も含んでもよい。用語ポリヌクレオチドは、1個またはそれ以上の修飾塩基を含むDNAまたはRNAおよび安定性またはその他の理由により修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。「修飾された」塩基は、例えばトリチル化された塩基および通常ではない塩基例えばイノシンを含む。種々の修飾がDNAおよびRNAに対して行われ、従って、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的または代謝的に修飾された、典型的に天然に見いだされるポリヌクレオチドの形、ならびにウイルスおよび細胞のDNAおよびRNA特性の化学的形のポリヌクレオチドの形を包含する。「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

【0026】

「ポリペプチド」は、たがいにペプチド結合または変形ペプチド結合、すなわちペプチドアイソスターで結合された2個またはそれ以上のアミノ酸を含んでなるあらゆるペプチドまたはタンパク質を呼ぶ。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般にタンパク質と呼ばれるさらに長い鎖、および/またはこれらの組み合わせを呼ぶ。ポリペプチドは、20個の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、天然の過程、例えば翻訳後プロセッシングにより、または当該技術分野では周知の化学的修飾技術のいずれかにより修飾されたアミノ酸配列を含む。このような修飾は基本的教科書中およびさらなる長大な論文中ならびに大量の研究文献中に十分に記載されている。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むポリペプチドのあらゆる場所で起きることができる。同じ形式の修飾が、与えられたポリペプチド中の種々の部位において同一または異なる程度で存在してもよいことが認められる。また、与えられた

ポリペプチドは多数の形式の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝してもよく、そしてこれらは分枝を有するかまたは有していない環状であってもよい。環状、分枝状および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセッシングからもたらされてもよくまたは合成法により作製されてもよい。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付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質または脂質誘導体の共有結合付加、ホスホチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加例えばアルギニル化、およびユビキチン化を含む。例えば、「タンパク質 - 構造および分子的性質」(PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993)および「翻訳後タンパク質修飾- 前途および予想」(Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed. Academic Press, New York, 1983)、「タンパク質修飾および非タンパク質補因子の分析」(Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182:626-646)および「タンパク質合成：翻訳後修飾および熟成」(Ratten et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663:48-62)を参照。

【 0 0 2 7 】

本明細書中の用語としての「変種」は、比較するポリヌクレオチドまたはポリペプチドとはそれぞれ異なるが、本質的な性質、例えば本質的な生物学的、構造的、調節的または生化学的性質は保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変種は、他の比較ポリヌクレオチドとは又

クレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列中の変化は、比較ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化してもしなくてもよい。ヌクレオチド変化は、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断を比較配列によりコードされるポリペプチド中にもたらしてもよく、これは以下に考察する。ポリペプチドの典型的な変種は、アミノ酸配列が他の比較ポリペプチドと異なる。一般に、相違は、比較ポリペプチドおよび変種の配列が全体的には密接に類似しそして多くの領域で一致している程度に限定される。変種および比較ポリペプチドは、アミノ酸配列内で1個またはそれ以上の置換、付加、および欠失のあらゆる組み合わせにより異なってもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子暗号によりコードされるものであってもなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、天然に存在する例えば対立遺伝子変種であってもよく、またはこれは天然に存在するとは知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非-天然存在変種は、突然変異技術または直接合成により作製されてもよい。

【0028】

「同一性」は、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、配列は最高度の一致が得られるように整列される。「同一性」それ自体は、当該技術分野で認められた意味を有しそして公開された技術を用いて算出できる。例えば下記参照：「コンピューターによる分子生物学」(COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988); 「バイオコンピューティング: 情報学およびゲノムプロジェクト」(BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993); 「配列データのコンピューター分析、第一部」(COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994); 「分子生物学における配列解析」(SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G. Academic Press, 1987); および「配列解析プライマー」(SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991)。2個のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の間の同一性を測定する多数の方法が存在するけれ

ども、用語「同一性」は、当該技術分野の熟練者には周知である(Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math, (1988) 48:1073)。2個の配列の間の同一性または類似性を決定するために一般的に使用される方法は、「大型コンピュータへのガイド(Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994) およびCarillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math, (1988) 48:1073 中に開示されたものを含むが、これに限定はされない。同一性および類似性を決定するための方法は、コンピュータプログラム中にコード化されている。配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法は、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403)を含むが、これに限定はされない。用語「相同」は、「同一性」に置換してもよい。

【0029】

説明として、配列番号1の比較ヌクレオチド配列に対して少なくとも例えば95%「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列が配列番号1の比較ヌクレオチド配列のヌクレオチド100個それぞれに対して5個以下のヌクレオチド相違を含んでもよいことを除いて、比較配列と同一であることを意味する。換言すると、比較ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有すポリヌクレオチドを得るためには、比較配列中のヌクレオチドの5%以下が欠失または他のヌクレオチドにより置換されてもよいか、または比較配列中の全ヌクレオチドの5%以下の数のヌクレオチドが比較配列内に挿入されてもよいか、または比較配列内の全ヌクレオチドのいずれかの5%以下のヌクレオチドの数において欠失、挿入および置換の組み合わせがあってもよい。比較配列のこれらの変異は、比較ヌクレオチド配列の5または3末端位置においてまたはこれらの末端位置の間のいかなる位置でも、比較配列中のヌクレオチドの間で個別に、または比較配列内の1個またはそれ以上の連続基内のヌクレオチドのいずれかに散在して起きてもよい。

【0030】

同様に、例えば、配列番号2の比較アミノ酸配列に対して少なくとも95%「同一性」を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、ポリペプチド配列が配列番号2の比較配列のアミノ酸100個のそれぞれに対して5個以下のアミノ酸変化を含んでもよいことを除いてポリペプチドのアミノ酸配列が比較配列と同一であること意味する。換言すると、比較アミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、比較配列内のアミノ酸残基の5%以下が欠失または他のアミノ酸で置換されていてもよい、または比較配列内の全アミノ酸残基の5%以下の数のアミノ酸が比較配列中に挿入されてもよい。比較配列のこれらの変更は、比較アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置においてまたはこれらの末端位置の間のあらゆる位置で、比較配列内の残基間に個別にまたは比較配列内の1個またはそれ以上の隣接基内のいずれかに散在して存在してもよい。

本発明のポリペプチド

一つの態様では、本発明は、IGS1ポリペプチド(IGS1タンパク質も含む)に関する。IGS1ポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)に1999年7月15日付けで寄託された寄託番号CBS102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ならびに配列番号2のアミノ酸配列およびCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、および配列番号2のものと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列および/またはその全長にわたってCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列、そしてさらに好ましくは、該アミノ酸配列に少なくとも90%同一、そしてその上にさらに好ましくは少なくとも95%一致を有するポリペプチドを含むポリペプチドを含む。さらに、少なくとも97%同一、特に少なくとも99%が最も好ましい。IGS1ポリペプチド中には、配列番号2のアミノ酸配列

を有するポリペプチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS 102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドに対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれ、そしてさらに好ましくは配列番号2に少なくとも90%同一、そしてその上にさらに好ましくは少なくとも95%同一である。さらに、少なくとも97%、特に少なくとも99%が最も好ましい。好ましくは、IGS1ポリペプチドは受容体の少なくとも一つの生物学的活性を示す。

【0031】

IGS1ポリペプチドは、「成熟」タンパク質の形であってもよくまたはさらに大きいタンパク質、例えば融合タンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製において支援する配列、例えば重複ヒスチジン残基を含む追加のアミノ酸配列、または組換え物産生のための追加の配列を含むとしばしば有利である。

【0032】

IGS1ポリペプチドの断片も本発明中に含まれる。断片とは、上記のIGS1ポリペプチドのアミノ酸配列の一部ではあるが全体ではないものと同様のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。IGS1ポリペプチドと同様に、断片は「自立」、すなわちこれらが部分または領域を形成するさらに大きいポリペプチド内で、最も好ましくは単独の連続領域を含んでなってもよい。本発明のポリペプチド断片の代表的な例は、例えば、IGS1ポリペプチドのアミノ酸番号約1-20、21-40、41-60、61-80、81-100、および101から末端の断片を含む。この範囲内で、「約」は一方または両端のいずれかにおける数個、5、4、3、2または1個のアミノ酸ほど大きいかまたは小さい特定の列挙の範囲を含む。

【0033】

好ましい断片は、例えば、アミノ末端を含む残基の一連の連続物もしくはカルボキシ末端を含む残基の一連の連続物の欠失、またはアミノ末端を含むものおよびカルボキシ末端を含むものの残基の2個の連続物の欠失を除き、IGS1ポリ

ペプチドのアミノ酸配列を有する切断ポリペプチドを含む。構造的または機能的属性、例えばアルファらせんおよびアルファらせん形成性領域、ベータシートおよびベータシート形成性領域、ターンおよびターン形成性領域、コイルおよびコイル形成性領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両性領域、ベータ両性領域、フレキシブル領域、表面形成性領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含んでなる断片により特徴付けられる断片も好ましい。その他の好ましい断片は、生物学的活性の断片である。生物学的活性の断片は、受容体活性を媒介するものであり、類似した活性もしくは改善された活性を有するか、または低下した望ましくない活性を有するものを含む。動物中特にはヒト中で抗原または免疫原性であるものも好ましい。

【0034】

従って、本発明のポリペプチドは、配列番号2のものと少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび/またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS 102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは相当する断片に対して少なくとも80%の同一性を有するこれらの断片を含む。好ましくは、これら全てのポリペプチド断片は、抗原活性を含む受容体の生物学的活性を保持する。定義された配列および断片の変種も、本発明の一部を形成する。好ましい変種は、保存性アミノ酸置換により比較物とは異なるものである。すなわち、残基を類似した別の特性のものと置換したものである。このような置換基の典型は、特にAla、Val、LeuおよびLie、特にSerおよびThr、特に酸残基AspおよびGlu、特にAsnおよびGln、および特に塩基残基LysおよびArg、または芳香族残基PheおよびTyrである。特に好ましいものは、その中で数個、5-10個、1-5個、または1-2個のアミノ酸があらゆる組み合わせで置換、欠失、または付加された変種である。

【0035】

本発明のIGS1ポリペプチドは、あらゆる適当な方法で作製できる。このようなポリペプチドは、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え作製され

たポリペプチド、合成して作製されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせで作製されたポリペプチドを含む。このようなポリペプチドの作製方法は、当該技術分野では周知である。

本発明のポリヌクレオチド

本発明の別の態様は I G S 1 ポリヌクレオチドに関する。I G S 1 ポリヌクレオチドは、I G S 1 ポリペプチドおよび断片をコードする単離されたポリヌクレオチド、およびこれに密接に関連したポリヌクレオチドを含む。さらに具体的には、本発明の I G S 1 ポリヌクレオチドは、配列番号 1 中に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、例えば配列番号 2 の I G S 1 ポリペプチドをコードできるもの、配列番号 1 の特定の配列を有するポリヌクレオチドおよび Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号 C B S 1 0 2 0 4 9 号内に含まれる D N A 挿入物に本質的に相当するポリヌクレオチドを含む。

【0036】

I G S 1 ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の I G S 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全体にわたって少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、配列番号 1 のものにその全長にわたって少なくとも 8 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドおよび Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号 C B S 1 0 2 0 4 9 号内に含まれる D N A 挿入物に本質的に相当するポリヌクレオチドをさらに含む。

【0037】

これに関して、少なくとも 9 0 % 同一のポリヌクレオチドが特に好ましく、そして少なくとも 9 5 % 同一のポリヌクレオチドがさらに好ましい。さらに、少なくとも 9 7 % のものが高度に好ましく、少なくとも 9 8 - 9 9 % のものが最も高度に好ましく、少なくとも 9 9 % のものが最も好ましい。I G S 1 ポリヌクレオチドとして、配列番号 1 内に含まれるヌクレオチド配列に対しまして Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号 C B S 1 0 2 0 4 9 号内に含まれる D N A 挿入物に対して十分な一致性を有するヌクレオ

チド配列も、増幅のためまたはプローブまたはマーカーとしての使用のために使用可能な条件下でハイブリダイズするために含まれる。本発明は、これらのIGS1ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも提供する。

【0038】

本発明のIGS1は、Gタンパク質共役型受容体ファミリーの他のタンパク質に構造的に関連し、これは公開データベース中のBLASTサーチの結果により示される。表2のアミノ酸配列(配列番号2)は、約30%の同一性(BLAST使用、Altschul S.F. et al., [1997], Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)を主要部分(アミノ酸残基7-222および396-470)においてラビットアルファ-1cアドレナリン受容体(アクセッション番号#O02824, Miyasato et al. RL Life Sci. (1997) 60:2069-2074)と、そして約33%の同一性をアミノ酸残基31-220において、ヒトGタンパク質共役型受容体RE2(ジーンバンクアクセッション#AF091890)と有する。表1のヌクレオチド配列(配列番号1)は、57%の同一性をヒト-1a/dアドレナリン受容体(アクセッション番号#L31722, Bruno J.F., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991) 179:1485-1490)と266ヌクレオチド残基で有し、そして44%の同一性をヒトGタンパク質共役型受容体RE2と最初の1426ヌクレオチド残基(ジーンバンクアクセッション#AF091890)において有する。さらに、IGS1タンパク質配列のヒドロパシー分析(Hoffmann, K., Stoffel, W(1993) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347:166)は、膜貫通領域7個の存在を示した。従って、本発明のIGS1ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、なかでもこれらの相通的ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに類似した生物学的機能/性質を有すると予想され、そしてこれらの有用性は当該技術分野のすべての熟練者に明白である。

【0039】

本発明のポリヌクレオチドは、天然起源、例えばゲノムDNAから得ることができる。特に、縮重(degenerated)PCRプライマーは、特定のGPCR遺伝子サブファミリー内の保存された領域をコードするように設計できる。縮重プライマーを用いるゲノムDNAまたはcDNA上のPCR増幅反応は、考慮している

遺伝子ファミリーの数種のメンバー（公知および新規の両方）の増幅をもたらす（ゲノム鋳型を用いる場合には、縮重プライマーは同じエキソン内に位置しなければならない）（Libert et al., Science, 1989, 244:569-572）。本発明のポリヌクレオチドは、周知で商業的に利用できる技術を用いて合成もできる。

【0040】

配列番号2のIGS1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1中に含まれる配列をコードするポリペプチドと同一であってもよい（ヌクレオチド番号36から1559）か、またはこれは、遺伝子コードの重複（縮重）の結果として、配列番号1内に含まれる配列をコードするポリペプチドと比較して変化を示すが、しかし配列番号2のポリペプチドもコードする異なるヌクレオチド配列であってもよい。

【0041】

本発明のポリヌクレオチドがIGS1ポリペプチドの組換え産生に使用される場合には、ポリペプチドは成熟ポリペプチドに対するコーディング配列またはその断片をそれ自体に成熟ポリペプチドに対するコーディング配列または他のコーディング配列を有する読み取り枠内の断片、例えばリーダーまたは分泌配列、ブレ-、またはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列またはその他の融合ペプチド部分をコードするものを含んでもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易とするマーカー配列がコードされることができる。本発明のこの実施におけるある好ましい態様では、マーカー配列はヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、これはpQEベクター(Qiagen, Inc.)として提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されており、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、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、スプライシング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を安定化する配列も含んでもよい。

【0042】

さらに好ましい態様は、数個、5-10、1-5、1-3、1-2または1個のアミノ酸残基があらゆる組み合わせで置換、欠失または付加された配列番号2のIGS1ポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるIGS1変種をコードする

ポリヌクレオチドである。

【0043】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現の変性を含むが、これに限定はされない種々の目的のためにIGS1コード化配列を改変するために当該技術分野では一般に公知の方法を用いて操作することができる。ランダムフラグメンテーションによるDNAシャフリングおよび遺伝子断片ならびに合成オリゴヌクレオチドのPCR再構築を、ヌクレオチド配列を操作するために使用してもよい。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位指定突然変異誘発は、アミノ酸置換の創成、新規の制限部位の創成、修飾（例えばグリコシル化またはリン酸化）パターンの改変、コドン優先の変化、スプライス変種の産生などの変異を導入するために使用してもよい。

【0044】

本発明は、さらに、本明細書中に以上に記載した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は、ストリンジентな条件下で本明細書中に以上に記載したポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに特に関する。本明細書中に使用される用語「ストリンジент条件」は、少なくとも80%、そして好ましくは少なくとも90%、そしてさらに好ましくは少なくとも95%、それ以上に好ましくは少なくとも97%、特には少なくとも99%の同一性が配列間で存在する場合にのみハイブリダイゼーションが起きることを意味する。

【0045】

配列番号1またはその断片中に含まれるヌクレオチド配列に同一または十分に同一である本発明のポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして、全長cDNAとIGS1をコードするゲノムクローンとを単離しそしてcDNAとIGS1遺伝子に高度の配列類似性を有する他の遺伝子（ヒト以外の種からの相同体またはオルソログ体をコードする遺伝子を含む）のゲノムクローンとを単離するために使用してもよい。当該技術分野の熟練者は、このようなハイブリダイゼーション技術を熟知している。典型的にはこれらのヌクレオチド配列は、比較物のものと80%同一、好ましくは

90%同一、さらに好ましくは95%同一である。プローブは、一般に、少なくとも5個のヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも8個のヌクレオチド、そしてさらに好ましくは少なくとも10個のヌクレオチド、もっと好ましくは少なくとも12個のヌクレオチド、特には少なくとも15個のヌクレオチドを含んでなる。最も好ましくは、このようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチドそして少なくとも50個のヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは、30から50個の範囲内のヌクレオチドである。

【0046】

ヒト以外の種からの相同体またはオルソログ体を含むIGS1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得るための一つの態様は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1またはその断片を有する標識プローブを用いる適当なライブラリーのスクリーニング、および全長DNAならびに該ポリヌクレオチド配列を含むゲノムクローンを単離する段階を含んでなる。このようなハイブリダイゼーション技術は当該技術分野の熟練者には周知である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、上記に定義されたもの、または42℃で、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート溶液、10%硫酸デキストラン、および20μg/ml変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中で一晩インキュベーションし、次いで0.1xSSC中、約65℃でフィルターを洗浄する条件と定義される。

【0047】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、動物およびヒト疾患に対する治療および診断の発見のための研究用試薬および材料として使用してもよい。

ベクター、宿主細胞、発現

本発明は、ポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含んでなるベクター、および本発明のベクターを用いて遺伝子的に操作された宿主細胞および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生にも関する。細胞を含まない翻訳系も、本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いるこのようなタンパク質の産生に使用できる。

【0048】

組換え産生のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現系またはこれらの部分を組み込むために遺伝子的に操作できる。宿主細胞内へのポリヌクレオチドの導入は、多数の標準的実験マニュアル、例えば「分子生物学における基本的方法」(Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY(1986))および「分子クローニング：実験マニュアル」(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))に記載された方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスヴェクション(transvection)、マイクロ注入、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、スクレイプ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(Ballistic introduction)または感染により行うことができる。

【0049】

適当な宿主の代表的な例は、細菌細胞、例えば連鎖球菌属、ブドウ状球菌、大腸菌、ストレプトミセス属および枯草菌細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属細胞、昆虫細胞、例えばショウジョウバエS2およびスポドプテラ(Spodoptera) Sf9細胞、動物細胞、例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293およびボウズ・メラノーマ(Bowes melanoma)細胞、および植物細胞を含む。

【0050】

広範な各種の発現系が使用できる。このような系は、なかでも、染色体、エピソームおよびウイルス誘導系、例えば細菌プラスミドから、バクテリオファージから、トランスポゾンから、酵母エピソームから、挿入要素から、酵母染色体要素から、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスに由来するベクター、およびこれらの組み合わせに由来するベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝要素、例えばコスミドおよびファジェミドに由来するものを含む。発現系は、発現を調節ならびに

発生する制御領域を含んでもよい。一般に、宿主中にポリペプチドを産生するためのポリヌクレオチドを維持、増殖または発現するために適するあらゆる系またはベクターを使用してもよい。適当なヌクレオチド配列は、各種の周知で慣用の技術、例えば「分子クローニング：実験マニュアル」(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、上記)に記載のものいずれを用いても発現系内に挿入してもよい。

【0051】

小胞体の内腔内へ、細胞周辺腔内へまたは細胞外環境内への翻訳されたタンパク質の分泌のために、適当な分泌シグナルを所望のポリペプチド内に組み込んでよい。これらのシグナルは、ポリペプチドに内在性であってもよくまたは非相同性シグナルであってもよい。

【0052】

スクリーニングアッセイで使用するためにIGS1ポリペプチドが発現される場合に、一般にポリペプチドが細胞の表面で産生されることが好ましい。このイベントにおいて、細胞をスクリーニングアッセイに使用する前に採取してもよい。IGS1ポリペプチドの親和性または機能的活性が受容体活性調節タンパク質(RAMP)により変性される場合に、細胞表面におけると考えられる関係するRAMPの同時発現が好ましく、しばしば要求される。このイベントの場合にも、IGS1ポリペプチドおよび関係するRAMPを発現する細胞のスクリーニングアッセイ使用前での採取も要求される。IGS1ポリペプチドが培地内で分泌される場合には、培地は、ポリペプチドを回収および精製するために回収できる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に細胞を先ず溶解しなければならない。

【0053】

IGS1ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用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、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により組換え細胞培養物から回収および精製できる。最

も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが精製に用いられる。タンパク質をリフォールディングするための周知の技術は、ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性される場合に活性配座を再生するために使用してもよい。

診断アッセイ

本発明は、診断試薬としての使用のためのIGS1ポリヌクレオチドの使用にも関する。機能不全と関連するIGS1遺伝子の変異形の検出は、IGS1の過少発現、過剰発現または改変された発現からもたらされる疾患または疾患への罹病性の診断に追加またはこれを決定することができる診断手段を提供する。このイベントにおいても、関連する受容体活性調節タンパク質の同時発現は、所望の品質の診断アッセイを得るために要求できる。IGS1遺伝子内に変異を有する個体は、種々の技術によりDNAレベルで検出してもよい。

【0054】

診断のための核酸は、患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検物質から得てもよい。ゲノムDNAは検出のために直接使用してもよくまたは分析の前にPCRまたはその他の増幅技術を使用して酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様の方法で使用してもよい。欠失および挿入は、正常の遺伝子型と比較して増幅の大きさの変化により検出できる。点変異は、増幅したDNAを標識IGS1ヌクレオチド配列にハイブリダイズして同定できる。完全にマッチした配列は、RNAアーゼ消化によりまたは溶融温度の相違によりミスマッチ二本鎖から区別できる。DNA配列の相違は、変性剤を加えまたは加えないゲル内のDNA断片の電気泳動の移動性の改変により、または直接のDNA配列決定により検出してもよい。例えばMyers et al., Science (1985) 230:1242 参照。特定の位置における配列変化は、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNAアーゼおよびS1保護または化学開裂法により解明してもよい。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401参照。別の態様では、IGS1ヌクレオチド配列またはその断片を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを例えば遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。アレイ技術の方法は周知であり、そして一般的な用途を有しそして遺伝子発現、遺伝子連結、および遺伝子変化を含む分子遺伝学における各種の問

題を解明するために使用できる（例えばM. Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613(1996) 参照）。

【0055】

診断アッセイは、記載の方法によるIGS1遺伝子内の変異の検出を通じて、なかでも上記の「疾患」への罹病性を診断または決定するための方法を提供する。診断アッセイは、特に、神経医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣に対する罹病性を、上記の方法によるIGS1遺伝子内の変異の検出を通じて診断または検出するための方法を提供する。

【0056】

さらに、なかでも上記の「疾患」は、患者に由来する試料からIGS1ポリペプチドまたはIGS1 mRNAの異常な低下または増加したレベルから決定することを含んでなる方法により診断できる。特に神経医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣を患者から誘導した試料からIGS1ポリペプチドまたはIGS1 mRNAの異常な低下または増加したレベルから決定することを含んでなる方法により診断できる。

【0057】

低下または増加した発現は、ポリヌクレオチドの定量のために当該技術分野では周知の方法、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブローディングおよびその他のハイブリダイゼーション法のいずれかを用いてRNAレベルで測定できる。宿主に由来する試料中のタンパク質、例えばIGS1のレベルを決定するために使用できるアッセイ技術は、当該技術分野の熟練者には周知である。このようなアッセイ方法は、放射免疫検定、競合的結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイを含む。

【0058】

別の態様では、本発明はなかでも「疾患」または上記の「疾患」のひとつに対する罹病性に対する診断キットに関する、具体的には、本発明は、神経医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキン

ソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣に対する診断キットに関する。

【0059】

このキットは、

(a) IGS1ポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列、またはその断片、および/または

(b) (a)のものに対して相補的なヌクレオチド配列、および/または

(c) IGS1ポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチド、またはその断片、および/または

(d) IGS1ポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号2のポリペプチドに対する抗体、および/または

(e) IGS1のポリペプチドの関連する生物学的または抗原的性質に対して必要なRAMPポリペプチドを含んでなってもよい。

【0060】

このようないずれもキットでも、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は本質的な成分を含んでなってもよいことが認められる。

染色体アッセイ

本発明のヌクレオチド配列は、染色体同定に対しても価値がある。配列は、個別のヒト染色体上の特定の位置に特異的に標的設定されそしてこれとハイブリダイズできる。本発明に従う染色体の関連配列の地図作製は、これらの配列を遺伝子関連疾患と関連させるために重要な第一段階である。配列が正確に染色体位置に場所決定された場合に、染色体上の配列の物理的位置は、遺伝子地図データと相関できる。このようなデータは、例えばV. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能)内に見いだされる。次いで、同じ染色体領域に場所決定された遺伝子と疾患との関係は、連鎖分析により同定される(物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝)。

【0061】

影響および非影響個体間のcDNAまたはゲノム配列の相違も決定できる。変異が影響を受けた個体の一部またはすべてに観察されるがしかし正常個体内には観察されない場合には、変異は疾患の原因薬剤であろう。

抗体

本発明のポリペプチドもしくはこれらの断片もしくはこれらの類似体、または関連RAMPと一緒に要求される場合にこれらを発現する細胞は、IGS1ポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を産生する免疫原として使用してもよい。用語「免疫特異性」は、抗体が、従来技術の他の関連ポリペプチドに対するこれらの親和性よりも本質的に大きい本発明のポリペプチドへの親和性を有することを意味する。

【0062】

IGS1ポリペプチドに対して生成した抗体は、ポリペプチドまたはエピトープ-保持断片、類似体または細胞を動物、好ましくはヒト以外に慣用のプロトコールを通じて投与して得てもよい。モノクローナル抗体の作製のために、連続細胞様培養により産生される抗体を供給するあらゆる技術を使用してもよい。その例は、ハイブリドーマ技術(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ技術、ヒトB-細胞技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) を含む。

【0063】

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定するためまたはアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するために使用してもよい。

【0064】

IGS1ポリペプチド自体に対する抗体、またはIGS1ポリペプチド-RAMP複合体に対する抗体は、なかでも上記の「疾患」を治療するために使用してもよい。特に、IGS1ポリペプチド自体に対する抗体、またはIGS1ポリペプチド-RAMP複合体に対する抗体は、神経医学およびCNS障害、特に

運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣を治療するために使用してもよい。

動物

本発明の別の態様は、IGS1の異常な発現または活性から起きる障害に対するモデルとして挙動するヒト以外の動物に基づく系に関する。ヒト以外の動物に基づくモデル系は、IGS1遺伝子の活性をさらに特徴付けるために使用してもよい。このような系は、IGS1に基づく疾患、例えばなかでも上記の「疾患」を治療できる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として使用してもよい。特に、この系はIGS1に基づく神経医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣を治療するために使用できる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として使用してもよい。

【0065】

この方法で、動物に基づくモデルは、IGS1の異常な発現または活性の障害の治療において有効であるような薬剤化合物、治療および介入を同定するために使用してもよい。さらにこのような動物モデルは、動物患者内のLD₅₀およびED₅₀を測定するために使用してもよい。これらのデータは、潜在的IGS1障害治療の生体内効力を決定するために使用してもよい。

【0066】

異常なIGS1発現または活性に基づくIGS1に基づく障害の動物に基づくモデル系は、非-組換え動物ならびに組換え操作トランスジェニック動物の両方を含んでもよい。

【0067】

IGS1障害に対する動物モデルは、例えば遺伝子モデルを含んでもよい。IGS1に基づく障害様症候群を示す動物モデルは、例えばIGS1配列、例えば上記のもののような配列を、当該技術分野の熟練者に周知のトランスジェニック動物作製のための技術と組み合わせて使用して操作してもよい。例えば、IGS1配列は、関係する動物のゲノム内に導入、そして過剰発現および/または発現

欠失しても、または内在性 I G S 1 配列が存在する場合には、これらを過剰発現、発現欠失のいずれでもよく、または、その代わりに、I G S 1 遺伝子発現を過少発現または不活性化するために破壊してもよい。

【0068】

I G S 1 遺伝子配列を過剰発現または発現欠失するために、I G S 1 遺伝子配列のコーディング部分は、高レベル遺伝子発現または関係する動物種で遺伝子が正常では発現されない細胞種内での発現を駆動することが可能な調節配列に連結されてもよい。このような調節領域は、当該技術分野の熟練者には周知であり、そして不当に多くの実験を行わないで使用してもよい。

【0069】

内在性 I G S 1 遺伝子配列の過少発現のために、このような配列を単離および操作して、関係する動物のゲノム内に再導入された場合に、内在性 I G S 1 遺伝子対立遺伝子が不活性化、すなわち「ロックアウト」されてもよい。好ましくは、操作された I G S 1 遺伝子配列は、遺伝子標的法を介して、例えば動物ゲノム内へ操作された I G S 1 遺伝子配列の組込みの際に内在性 I G S 1 配列が破壊されるように導入される。

【0070】

マウス、ラット、ラビット、リス、モルモット、ブタ、小型ブタ、ヤギ、および非 - ヒト霊長類、例えばヒヒ、サル、および類人猿を含むが、これに限定はされないあらゆる種の動物を、I G S 1 関連障害の動物モデルを作製するために使用してもよい。

【0071】

当該技術分野で公知のあらゆる技術は、I G S 1 導入遺伝子を動物内に導入してトランスジェニック動物の創始株を作製するために使用してもよい。このような技術は、前核ミクロ注入(Hoppe, P.C. and Wagner, T.E. 1989, 米国特許(US)第4,873,191号);レトロウイルス媒介の生殖細胞系内への遺伝子導入(van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152, 1985);胚幹細胞内での遺伝子標的法(Thompson et al., Cell 56:313-321, 1989);胚の電気穿孔(Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814, 1983);および精子媒介遺伝子導入(Lavitra

no et al., Cell 57:717-723, 1989) 等を含むが、これらに限定はされない。このような技術の概説は、Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229, 1989参照。

【0072】

本発明は、すべてのこれらの細胞内に I G S 1 導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、ならびに一部であるがすべてではない細胞内に導入遺伝子を有する動物、すなわちモザイク動物を提供する（例えばJakobovitz, Curr. Biol. 4:761-763, 1994に記載の技術参照）。導入遺伝子は、単独の導入遺伝子として、またはコンカテマー、例えば頭 - 頭タンデムまたは頭 - 尾タンデム内に組み込まれてもよい。導入遺伝子は、例えばラスコラの教示(Lasko, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236, 1992) に従って、特定の細胞種内に選択的に導入しそして活性化してもよい。

【0073】

このような細胞種特異性活性化のために必要な調節配列は、関係する特定の細胞種に依存し、そして当該技術分野の熟練者には明らかである。

【0074】

I G S 1 導入遺伝子を内在性 I G S 1 遺伝子の染色体部位内に組み込むことを望む場合には、遺伝子標的法が好ましい。要約すると、この技術を用いる場合には、関係する内在性 I G S 1 遺伝子に相同なあるヌクレオチド配列（例えばマウス I G S 1 遺伝子のヌクレオチド配列）を含むベクターを、染色体配列との相同組換えを介して、内在性 I G S 1 遺伝子または遺伝子対立遺伝子のヌクレオチド配列内に組み込み、そしてその機能を破壊する目的で設計される。導入遺伝子は、特定の細胞種内に選択的に導入されてもよく、これによりその細胞種内でのみ関係する内在性遺伝子を不活性化し、これは例えばグラの教示に従う(Gu, H. et al., Science 265:103-106, 1996)。このような細胞種特異性不活性化のために必要な調節配列は、関係する特定の細胞種に依存し、そして当該技術分野の熟練者には明らかであろう。

【0075】

トランスジェニック動物が作製されると、組換え I G S 1 遺伝子およびタンパ

ク質の発現を標準技術を用いてアッセイしてもよい。最初のスクリーニングは、導入遺伝子の組込みが起きたかどうかをアッセイするために動物組織を分析するために、サザンブロット分析またはPCR技術により行ってもよい。トランスジェニック動物の組織内のIGS1導入遺伝子のmRNA発現のレベルは、動物から得た組織試料のノーザンブロット分析、in situ ハイブリダイゼーション技術、およびRT-PCRを含むがこれに限定はされない技術を用いて評価してもよい。標的遺伝子-発現組織の試料を、関係する標的遺伝子導入遺伝子産物に対する抗体特異性を用いて免疫細胞化学的に評価してもよい。容易に検出できるレベルでIGS1遺伝子mRNAまたはIGS1導入遺伝子ペプチドを発現するIGS1トランスジェニック動物(標的遺伝子産物エピトープに対する抗体を用いて免疫細胞化学的に検出)を、次いでさらに、特徴的なIGS1に基づく障害候群を示すこれらの動物を同定するために続いて評価してもよい。

【0076】

IGS1トランスジェニック創始動物(すなわち、関係する細胞または組織内にIGS1タンパク質を発現し、そしてこれは好ましくは、IGS1に基づく障害の症候群を示す動物)が作製されると、特定の動物のコロニーを作製するためにこれらを育種、同系交配、異系交配、または交雑交配してもよい。このような育種戦略の例は、分離した株を確立するために1種を越える組込み部位を有する創始動物の異系交配、それぞれのIGS1導入遺伝子の付加発現の効果のために高いレベルで関係するIGS1導入遺伝子が発現する複合IGS1トランスジェニックを産生するための分離した株の同系交配、増加した発現およびDNA分析による動物のスクリーニングの考えられる必要性を除くために、与えられた組込み部位に対して異型接合の動物を作製するための異型接合トランスジェニック動物の交雑、複合異型接合または同型接合株を作製するための分離した同型接合株の交雑、IGS1導入遺伝子の発現およびIGS1様症候群の発生に対する対立遺伝子変性の効果を検討するための種々の同系交配遺伝子背景への動物の育種を含むがこれらの限定はされない。このような方法の一つは、IGS1関連障害様症候群、例えば上記のものを示すF1世代を作製するために、IGS1トランスジェニック創始動物と野生型株との交雑である。次いで、異型接合標的遺伝子ト

ランスジェニック動物が生育可能である場合に、異型接合株を発生させるために、F1世代を同型交配してもよい。

ワクチン

本発明の別の態様は、哺乳類内に免疫学的反応を誘導するための方法に関し、これは、哺乳類にIGS1ポリペプチドまたはその断片を、所要の場合には抗体および/またはT細胞免疫反応を発生するために適するRAMPポリペプチドと一緒に投与（例えば接種）して、なかでも上記の「疾患」の一つから該動物を保護することを含んでなる。

【0077】

本発明のさらに別の態様は、哺乳類内に免疫学的反応を誘導するための方法に関し、これは動物を疾患から保護するための抗体を産生する免疫学的反応を誘導するために、IGS1ポリペプチドを生体内でのIGS1ポリヌクレオチドの発現を指令するベクターを介して供給することを含んでなる。

【0078】

本発明の別の態様は、哺乳類宿主内に導入された場合に、IGS1ポリペプチドに対する哺乳類内の免疫学的反応を誘導する免疫学的/ワクチン調剤（組成物）に関し、ここでその組成物はIGS1ポリペプチドまたはIGS1遺伝子を含んでなる。このような免疫学的/ワクチン調剤（組成物）は、治療用の免疫学的/ワクチン調剤または予防用の免疫学的/ワクチン調剤のいずれかであってもよい。ワクチン調剤は、さらに適当なキャリアーを含んでなってもよい。IGS1ポリペプチドは胃内で分解されるので、これは好ましくは非経口的に投与される（皮下、筋肉内、静脈内、皮内などの注射を含む）。非経口投与のために適する調剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および調剤をレシピエントの血液と等張性とするための溶質を含んでもよい水性および非水性滅菌注射液剤、および懸濁剤または増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌注射液剤を含む。調剤は、単位投与または複数投与容器、例えば封をしたアンプルおよびバイアル内に存在してもよく、そして使用の直前に滅菌液体キャリアーを加えるだけでよい凍結乾燥状態で貯蔵してもよい。ワクチン調剤は、調剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系、例えば水中油系およびその他の当該技術分野では公知の系を含んでもよ

い。用量はワクチンの活性に依存しそして日常的な試験により容易に決定できる。

スクリーニングアッセイ

本発明のIGS1ポリペプチドは、受容体を結合しそして本発明の受容体ポリペプチドの活性化（アゴニスト）または活性化の阻害（アンタゴニスト）をする化合物に対するスクリーニングプロセスに使用してもよい。従って、本発明のポリペプチドは、小分子基質および例えば細胞、細胞を含まない調製物、化学ライブラリー、および天然産物混合物内のリガンドの結合を評価するために使用してもよい。これらの基質およびリガンドは、天然の基質およびリガンドであってもまたは構造的または機能的疑似体であってもよい。

【0079】

IGS1ポリペプチドは、病理学を含む生物学的機能の原因である。従って、一方ではIGS1を刺激し、そして他方ではIGS1の機能を阻害できる化合物または薬剤を発見することが望ましい。一般に、アゴニストはなかでも上記の「疾患」の病状に対する治療および予防の目的で使用される。特に、アゴニストは、神経医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣に対する治療および予防の目的で使用される。

【0080】

アンタゴニストは、なかでも上記の「疾患」の病状に対する種々の治療および予防の目的で使用してもよい。特に、アンタゴニストは、神経医学およびCNS障害、特に運動障害、例えばチック、振せん、ツレット病、パーキンソン病、ハンチントン病、運動異常、ジストニアおよび痙攣に対する種々の治療および予防の目的で使用してもよい。

【0081】

一般に、このようなスクリーニング手順は、本発明の受容体ポリペプチドをその表面に発現しそして、必須の場合にはその表面にRAMPの同時発現をする産生に適する細胞を含む。このような細胞は、哺乳類、酵母、ショウジョウバエまたは大腸菌からの細胞を含む。次いで、受容体を発現する細胞（または発現され

た受容体を含む細胞膜)を試験化合物と接触させ、結合、または機能性反応の刺激もしくは阻害を観察する。

【0082】

一つのスクリーニング技術は、受容体活性化により起きる細胞外pH、細胞内pH、または細胞内カルシウム変化を測定する、系内に本発明の受容体を発現する細胞(例えばトランスフェクションされたCHO細胞)の使用を含む。この技術において、化合物を本発明の受容体ポリペプチドを発現する細胞と接触させてもよい。セカンドメッセンジャー反応、例えばシグナル伝達、pH変化、またはカルシウムレベルの変化を次いで測定して、潜在的化合物が受容体を活性化または阻害するかどうかを決定する。

【0083】

別の方法は、受容体-媒介シグナル、例えばcAMP蓄積および/またはアデニル酸シクラーゼ活性の調節を決定することによる受容体阻害剤に関するスクリーニングを含む。このような方法は、真核細胞を本発明の受容体を用いてトランスフェクションして細胞表面上に受容体を発現させることを含む。次いで、細胞を、潜在的アンタゴニストの存在下で本発明の受容体に対するアゴニストに暴露する。潜在的アンタゴニストが受容体を結合しこれにより受容体結合を阻害する場合には、アゴニスト媒介シグナルは調節されるであろう。

【0084】

本発明の受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを検出する別の方法は、米国特許(US)第5,482,835号に記載の酵母に基づいた技術である。

【0085】

アッセイは、単なる候補化合物の試験結合でもよく、ここで受容体を有する細胞への接着は、候補化合物と直接または間接に会合した標識を用いるか、または標識競合物との競合を含むアッセイにより検出される。さらに、これらのアッセイは、候補化合物が受容体の活性化により発生するシグナルをもたらすかどうかを試験してもよく、これには表面において受容体を有する細胞に適する検出系を用いる。活性化の阻害剤は、一般に、既知のアゴニストの存在下で、そして候補

化合物の存在によるアゴニストによる活性化に対する効果を観察してアッセイされる。

【0086】

さらに、アッセイは、混合物を形成するためのIGS1ポリペプチドを含む溶液と候補化合物とを混合し、混合物中のIGS1活性を測定し、そして混合物のIGS1活性を標準と比較する段階を単に含んでなってもよい。

【0087】

IGS1 cDNA、タンパク質およびタンパク質に対する抗体は、細胞内のIGS1 mRNAおよびタンパク質の産生に対する添加した化合物による効果を検出するためのアッセイを形成するために使用してもよい。例えば、ELISAは、当該技術分野に公知の標準方法によりモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてIGS1タンパク質の分泌または細胞関連レベルを測定するために構築されてもよく、そしてこれは適当に操作された細胞または組織からのIGS1の産生を阻害または促進するであろう薬剤（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる）を発見するために使用できる。スクリーニングアッセイを行うための標準方法は、当該技術分野では周知である。

【0088】

潜在的IGS1アンタゴニストの例は、抗体または、ある場合にはIGS1のリガンド、例えばリガンドの断片に密接に関係したオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、または受容体に結合するが反応は行わない小分子を含み、受容体の活性を阻止する。

【0089】

従って、別の態様では、本発明は、IGS1ポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素などを同定するためのスクリーニングキット、または

(a) IGS1ポリペプチド、好ましくは配列番号2のもの、

(b) IGS1ポリペプチドを発現する組換え細胞、好ましくは配列番号2のもの、

(c) IGS1ポリペプチドを発現する細胞膜、好ましくは配列番号2のもの、

または

(d) IGS1ポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号2のものを含んでなるIGS1ポリペプチドの産生を低下または促進する化合物に関する。

【0090】

あらゆるこのようなキット内で、(a)、(b)、(c)または(d)は本質的な成分を含んでなってもよいことが認められる。

予防および治療方法

本発明は、IGS1活性の過剰および/または不十分な量の両方に関連する異常な状態を治療するための方法を提供する。

【0091】

IGS1の活性が過剰な場合には、数種の方法が利用できる。一つの方法は、以上に記載した阻害化合物(アンタゴニスト)を、薬剂的に許容できるキャリアーと一緒に、IGS1に対するリガンドの結合を遮断することにより、またはRAMPポリペプチドまたはセカンドシグナルとの相互作用を阻害することにより活性化を阻害し、これにより異状状態を緩和するために有効な量を患者の投与することを含んでなる。

【0092】

他の方法では、内在性IGS1と競合してリガンドをまだ結合できるIGS1ポリペプチドの可溶性の形を投与してもよい。このような競合物の典型的な態様は、IGS1ポリペプチドの断片を含んでなる。

【0093】

さらに別の方法では、内在性IGS1をコードする遺伝子の発現は、発現遮断技術を用いて阻害できる。既知のこのような技術は、内部産生または別途に投与したアンチセンス配列の使用を含む。例えばO'Conner, J. Neurochem. (1991) 56:560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Florida USA (1988)参照。あるいは、遺伝子と三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給できる。例えばLee et al., Nucleic Acids Res. (1979) 6:3073; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Derva

n et al., Science (1991) 251: 1360参照。これらのオリゴマーは、それ自体を投与できるかまたは関連するオリゴマーを生体内で発現できる。合成したアンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチドは、修飾された塩基または修飾された骨格を有してもよい。後者の例は、メチルホスホナート、ホスホロチオアートまたはペプチド核酸骨格を含む。このような骨格は、ヌクレアーゼによる分解からの保護を与えるためにアンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチド内に組み込まれ、これは当該技術分野には周知である。これらまたはその他の修飾された骨格を有する合成されたアンチセンスおよび三重らせん分子は、本発明の一部を形成する。

【0094】

さらに、IGS1ポリペプチドの発現は、IGS1 mRNA配列に特異性のリボザイムを用いて回避してもよい。リボザイムは、天然または合成であることができる触媒活性RNAである(例えばUsman et al., Curr. Opin. Struct. Biol. (1996) 6(4), 527-33 参照)。合成リボザイムは、選択された位置で特異的にIGS1 mRNAを開裂し、これによりIGS1 mRNAの機能性ポリペプチド内への翻訳を避けるように設計できる。リボザイムは天然リン酸リボース骨格および天然塩基、例えばRNA分子中に通常見いだされるものを用いて合成してもよい。あるいは、リボザイムは非天然骨格を用いて、リボヌクレアーゼ分解からの保護を与えるように、例えば2'-O-メチルRNAに合成してもよくそして修飾塩基を含んでもよい。

【0095】

IGS1およびその活性の低い発現に関連する異常な状態を治療するために、種々の方法も利用できる。一つの方法は、IGS1を活性化する化合物、すなわち上記のようなアゴニストの治療的に有効な量を薬剂的に許容できるキャリアーと一緒に患者に投与して、これにより異常な状態を緩和することを含んでなる。あるいは、患者内の関連細胞によるIGS1の内在的産生を行うために遺伝子治療を利用してもよい。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上記に考察した複製欠失レトロウイルスベクター内の発現に関して操作してもよい。次いでレトロウイルス発現構築物を単離して、そして本発明のポリペプチドをコードするRN

Aを含むレトロウイルスプラスミドベクターを用いて形質導入したパッケージング細胞内に導入してもよく、これによりパッケージング細胞は関係する遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する。これらの産生体細胞は、生体内における細胞の操作のためおよび生体内におけるポリペプチドの発現のために患者に投与してもよい。遺伝子治療の概説については、Human Molecular Genetics, Strachan T. and Read A.P., BIOS Scientific Publishers, Ltd(1986) 中の「遺伝子治療およびその他の分子遺伝子に基づく治療方法」の第20章(Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches) およびその中の引用文献を参照のこと。

【0096】

上記のあらゆる治療方法は、例えば哺乳類、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラビット、サル、および最も好ましくはヒトを含む治療が必要なあらゆる患者に適用してもよい。

調剤および投与

ペプチド、例えばIGS1ポリペプチドの可溶性形、およびアゴニストおよびアンタゴニストペプチドまたは小分子は、適当な薬剤キャリアーと組み合わせて調剤してもよい。このような調剤は、治療的に有効な量のポリペプチドまたは化合物、および薬剂的に許容できるキャリアーまたは賦形剤を含んでなる。調剤は投与の形態に適合しなければならず、そして当該技術分野の熟練者の範囲内に十分に入る。本発明は、さらに、本発明の上記の組成物の1種またはそれ以上の成分を充填した1個またはそれ以上の容器を含んでなる薬剤包装物およびキットにも関する。

【0097】

本発明のポリペプチドおよびその他の化合物は、単独または他の化合物、例えば治療用化合物と一緒に使用してもよい。

【0098】

薬剤組成物の全身投与の好ましい形は、注射、典型的には静脈内注射を含む。他の注射経路、例えば皮下、筋肉内、または腹腔内が使用できる。全身投与の別の手段は、浸透剤、例えば胆汁酸塩またはフシジン酸またはその他の界面活性剤

を用いる粘膜経由または経皮投与を含む。さらに、経口およびカプセル化調剤に
適当に調剤された場合には、経口投与も可能であろう。

【0099】

所要の投与範囲はペプチドまたは化合物の選択、投与の経路、調剤の性質、患者の病状の性質、および担当医師の判断に依存する。適当な用量は、 $1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{kg}$ (患者体重) の範囲内である。しかし、種々の使用化合物および投与の種々の経路の異なる効率を考慮して、所要用量の広範な変化も予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与よりも高い用量を必要とすると予想される。これらの用量レベルの変化は、最適化のための標準的な経験慣行を用いて調整でき、これは当該技術分野では良く理解されている。

【0100】

治療に使用されるペプチドは、上記のようにしばしば「遺伝子治療」と呼ばれる治療モダリティーにおいて、患者内に内在的に発生されることもできる。従って、例えば、患者からの細胞は、ポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAを用いて生体外で、そして例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いてポリペプチドをコードするように操作してもよい。次いで細胞を患者内に導入する。

【0101】

以下の実施例は、本発明をさらに詳細に説明することのみを意図するものであり、従ってこれらの実施例は本発明をいかなる意味でも制限するとはみなされない。

【0102】

【実施例】

実施例1 . 新規のGタンパク質共役型受容体をコードするCDNAのクローニング

実施例1a . 新規のGタンパク質共役型受容体(GPCR)をコードするゲノム断片の相同性PCRクローニング

PCRに基づく相同性クローニング戦略を、新規のGタンパク質共役型受容体をコードする部分ゲノムDNA配列を単離するために使用した。下記の前進(F

11) および後退 (R13) 縮重PCRプライマーをニューロテンシン受容体遺伝子の保存領域内で膜貫通ドメイン1 (MT1) 内および膜貫通ドメイン3の境界においてそれぞれ細胞内ループ第2 (TM3/12) をそれぞれ用いて設計した。

F11 (TM1) :

5' - CATCTTCGTCGTCGGCAC (A, C, GまたはT) G (CまたはT) (A, C, GまたはT) GG (A, C, GまたはT) AA - 3'

(配列番号3)

R13 (TM3/12) :

5' - GGGTGGCAGATGGCCA (AまたはG) (AまたはG) (CまたはT) A (A, C, GまたはT) C (CまたはT) (CまたはT) TC - 3'

(配列番号4)

さらに、3' ブロックされたオリゴプライマー (HNTR1F1STOP) を設計した。

HNTR1F1STOP :

5' - ACGGTGGGCAACACGGTGACGGCGTT - 3' - 3' -
dA

(配列番号5)

3' ブロックされたプライマーは、TM1コード化領域内のヒトニューロテンシン受容体 (NTR1) cDNAに対して特異性でありそして縮重前進プライマーと部分的に重複 (および競合) している。この3' 末端は、3' - デオキシアデノシン基によりブロックされており、ポリメラーゼ - 触媒延伸を避ける (Eurogentec、ベルギー国、カタログ番号OL-0401-0302)。

【0103】

PCR反応は、体積60 μ lで行いそして100 ngヒトゲノムDNA (Clontech)、6 μ l 10x PCR緩衝液II (100 mM トリス - HCl pH 8.3; 500 mM KCl, Perkin Elmer)、3.6 μ l 25 mM MgCl₂、0.36 μ l dNTP類 (それぞれのdNTPの25 mM)、1.5単位 Amp1 iTaq™ポリメラーゼ (Perkin Elmer)、縮重前進および後退プライマーそれぞれの30ピコモルおよび3' ブロックされたプライマーの100ピコ

モルを含んでいた。反応管を94℃で2分間加熱し、次いで変性(94℃、30秒間)、アニーリング(55℃、1分間、タッチダウン-0.25℃/サイクル)および延伸(72℃、1分間)の20サイクル、次いでさらに変性(94℃、30秒間、アニーリング(50℃、1分間)および延伸(72℃、1分間)の20サイクルを行った。最後に反応管を5分間、72℃で加熱した。PCR反応産物を2%アガロースゲル上でサイズ分級しそして臭化エチジウムを用いて染色した。期待した大きさの断片(±300bp)をQiagen Inc.のQiagex-III™精製キット(Qiagen Inc.)を用いてゲルから精製し、そして供給者(pGEM-Tキット、Promega)により推奨された手順に従ってpGEM-Tプラスミド内に連結した。このようにして作製した組換えプラスミドを適応性(competent)大腸菌SURE™2細菌(Stratagene)を形質転換するために使用した。

【0104】

形質転換した細胞を、アンピシリン(100µg/ml)、IPTG(0.5mM)およびX-gal(50µg/ml)を含むLBアガープレート上にプレーティングした。コロニーをHybond-N+膜(Amersham)上にリフトしそしてDNAを変性しそしてBuluwela et al. のマイクロ波オープン法(Nucleic acids Research 17, p452; 1989)に従って固定した。コロニーリフトを変性Church緩衝液(0.5Mリン酸塩、7%SDS、10mMEDTA)中、65℃で2時間でプレハイブリダイズし、次いで³²P標識ヒトニューロテンシン受容体1および2cDNAプローブ(NTR1/2)の等モル量の2×10⁶cpm/mlを含む同じ緩衝液中、65℃で一晩ハイブリダイズした。ヒトNTR1およびNTR2の全コーディング配列を含むcDNAプローブを、[γ-³²P]dCTPのランダム開始組換えを介して、比放射能>10⁹cpm/µgまで、Prime-It IIキット™(Stratagene)を用い、供給者が提供した指針に従って放射標識した。ハイブリダイズしたフィルターを高ストリンジェンシー(2×30分間、室温、2×SSC/0.1%SDS中、次いで40分間、65℃での0.1×SSC、0.1%SDS中での洗浄2回)で洗浄しそして一晩オートラジオグラフィーを行った。高ストリンジェンシー洗浄の後にハイブリダイゼーションシグナルを示さない多数のランダム白色コロニーをDNA配列分析のため

に選択した。

【0105】

DNA配列決定反応は、ABI Prism™ BigDyeターミネーターサイクル配列決定反応キット(PE-ABI)を用いて行った。サイクル配列決定反応産物をEtOH/NaOAc沈降を介して精製しそしてABI373自動化配列決定装置に負荷した。2個のほとんど同一であるクローン(HNT642およびHNT768)を同定し、これはGPCRファミリーの新規のメンバーの一部をコードすると考えられた。我々はこの新規のGPCRをIGS1と名付けた。

【0106】

【表3】

表3: 使用したオリゴプライマーの一覧

配列番号 : 3	F11: 5'-CATCTTCGTCGTCGGCAC(A,C,GまたはT)G(CまたはT)(A,C,GまたはT)GG(A,C,GまたはT)AA-3'
配列番号 : 4	R13: 5'-GGGTGGCAGATGGCCA(AまたはG)(AまたはG)(CまたはT)A(A,C,GまたはT)C(GまたはT)(CまたはT)TC-3'
配列番号 : 5	HNTR1F1STOP: 5'-ACGGTGGGCAACACGGTGACGGCGTT-3'-3'-dA
配列番号 : 6	AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
配列番号 : 7	AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'
配列番号 : 8	IP11260: 5'-TTTATCTTTAACCTCCTCGTCACCGACC-3'
配列番号 : 9	IP11261: 5'-TAGTGTTGCAGCGCAAGCCG-3'
配列番号 : 10	IP11262: 5'-GGCAGCGTTCCACTGACACCAAGACAATGG-3'
配列番号 : 11	IP11263: 5'-CAGCGTTCCACTGACACCAAGACAATGG-3'
配列番号 : 12	IP11264: 5'-AAGGCGAACAGGTGGGTGAGGCTAACC-3'
配列番号 : 13	IP11515: 5'-TGCGGAAGGCGAACAGGTGG-3'
配列番号 : 14	IP11516: 5'-GCGAAGGCGAACAGGTGGGTGAGG-3'
配列番号 : 15	IP11684: 5'-CTAGTGTTGCAGCGCAAGCCGCAG-3'
配列番号 : 16	IP12261: 5'-CACAGAAAGCATAACCAGTGATTGAACC-3'
配列番号 : 17	IP12262: 5'-GCTTTAGGTTCTGGAATCCCATTTGG-3'
配列番号 : 18	IP12264: 5'-TTGTCACCAGCATAGGCACTGAGTG-3'

【0107】

実施例1b. 完全なIGS1コーディング配列を含むcDNA断片のクローニング

IGS1 cDNAの完全なコーディング配列は、cDNA末端の迅速増幅を

介して得られた(RACE分析)。5' - および3' - RACE PCRを、Marathon-Ready™ヒト脳cDNA(Clontech, no.7400-1)上で、Marathon™cDNA増幅キット(Clontech, K1802-1)と一緒に提供されたアダプタープライマー(AP1、配列番号6)およびIGS1特異性プライマーIP11261(3'RACE、配列番号9)およびIP11262ならびにIP11263(5'RACE、それぞれ配列番号10および11)を用い、クローンHNT642およびHNT768のDNA配列に基づいて行った(図1)。次いで、ネスト(nest)したRACE PCRをアダプタープライマー2(AP2;配列番号7)およびIGS1特異性ネストしたプライマーIP11260(3'RACE、配列番号8)およびIP11515およびIP11516(5'RACE、それぞれ配列番号13および14)を用いて行った。一次およびネストしたPCR RACE反応を、Clontechから提供されたMarathon-Ready™cDNAユーザーマニュアルの指示に従って行った。ネストしたPCR RACE産物を1%アガロースゲル上で分離しそしてEtBrを用いて染色した。ゲルをHybond N+膜上にブロットしそしてChurchハイブリダイゼーション緩衝液中、65℃でクローンHNT642の³²P標識挿入物を用いて一晩ハイブリダイズした。

【0108】

AP2/IP11515およびAP2/IP11516 5'RACEネストPCR反応物の両方のサザンブロット分析は、数個の陽性バンドを示した(±200bp、±250bp、±330bp、±360bp、±400bpおよび±700bp)。これらのバンドそれぞれをゲルから精製し、そしてpGEM-Tプラスミドベクター内にクローンした(IP11515およびIP11516ネスト5'RACE反応物からのそれぞれのPCR断片をクローニングの前にプールした)。それぞれの断片からの3~4個のランダムコロニーを配列決定した(=クローンHNT1393-1412)(図1)。

【0109】

ネストしたAP-2/IP11260 3'-RACE PCR反応物は、数本のバンドを示した。IGS1プローブとハイブリダイズした最大の3'ネストRACE PCR断片(±1,550bp)をゲルから精製し、pGEM-T(P

omega) 内に連結しそして適応性大腸菌 SURE II 細胞を形質転換するために使用した。この連結反応からの IGS 1 特異性形質転換体を、クローン HNT 642 の ^{32}P -標識挿入物を用いるコロニーハイブリダイゼーションの後に同定した。コロニープロットを以前に指定されたプローブにハイブリダイズしそして高ストリンジェンシー (0.1 x SSC 0.1% SDS、65 で30分間) で洗浄した。3' RACE ネスト PCR ライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングは、3個の陽性クローンを生成した。これらの2個 (HNT 1413 - 1414) を配列決定した。

【0110】

追加の2回の実験で、3個の別の3' RACE cDNA クローン (HB 4686、HB 4687 および HB 4688) が Marathon-Ready™ ヒト脳 cDNA (Clontech) から、供給者から提供されたマニュアル (Clontech PT1156-1) に記載された手順に従って得られた。一つの実験において、一次3' RACE 反応 (IGS 1 特異性プライマー IP 11261 およびアダプタープライマー AP 1 を用いて得られた) からの産物をヘミ (hemi) - ネストしたプライマー対 IP 11260 / IP 11261 (それぞれ配列番号 8 および 16) を用いて再増幅した。これは、予想された ± 1400 bp 断片を生成しこれをゲルから精製しそして pGEM-T プラスミドベクター内にクローンすると、クローン HB 4686 および HB 4687 が生成した。別の実験において、一次3' RACE PCR 産物 (IGS 1 特異性プライマー IP 11264 (配列番号 15) およびアダプタープライマー AP 1 を用いて得られた) をネストしたプライマー対 IP 11260 / IP 11261 を用いて再増幅した。この反応から得られた ± 1400 bp 断片を精製しそして pGEM-T プラスミドベクター内にクローニングすると、クローン HB 4688 が得られた。

【0111】

単離されたすべての IGS 1 cDNA クローンを完全に配列決定しそして単一コンティグ内に構築できた (図 1)。少なくとも4回の独立した cDNA クローンから決定されたこの連続 cDNA の一部分を IGS 1 DNA として本明細書に記載する (配列番号 1)。このコンティグの翻訳は、長いオープン読み取り枠

を明らかにし、508アミノ酸のタンパク質が予想されこれはGPCRタンパク質に良い相同性を示した(I G S 1 P R O T ; 配列番号2)。発現された配列タグデータベース(d b a s e)に対するI G S 1 コンティグのDNA配列のコンピュータ支援相同性サーチ(Blastn; Altschul S.F. et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)は、E S T 2 0 8 8 9 (アクセション番号A A 3 1 8 7 1 7)およびE S T アクセション番号A I 6 7 2 1 4 1の存在を示し、これらは両方共にI G S 1 コンティグの3'末端と重複するがしかしI G S 1 オープン読み取り枠の外側である(図1)。

実施例1c. 完全I G S 1 コーディング配列を含む連続c D N A 断片の単離

連続I G S 1 c D N A クローンをクローンH N T 1 3 9 8 およびH N T 1 4 1 3 鋳型上で重複-PCRを介して作製した。H N T 1 3 9 8 プラスミドDNAの100ngおよびH N T 1 4 1 3 プラスミドの100ngを、それぞれプライマー対I P 1 2 2 6 4 / I P 1 1 2 6 4 (それぞれ配列番号18および12)およびI P 1 1 2 6 0 / I P 1 2 2 6 2 (それぞれ配列番号8および11)を用いて別々の反応(50 μ l)でPCR増幅した(変性[94、30秒間]、アニーリング[60、30秒間]および延伸[72、1分間]の30PCRサイクル、Expand™ High Fidelity PCRシステム[Boehringer]使用)。それぞれのPCR反応物の1 μ lの量を一緒にしそしてプライマー対I P 1 2 2 6 4 / I P 1 2 2 6 1を用い、同じ条件下で再増幅した。この重複-PCR反応物は、 \pm 1730bpのバンドを生成し、これをゲルから精製しそしてpGEM-Tプラスミドベクター中に連結した。適応性大腸菌D H 5 F'菌を形質転換するために組換えプラスミドを使用した。形質転換した細胞をアンピシリン(100 μ g/ml)を含むLBアガプレート上にプレーティングした。プラスミドDNAを多数のランダムコロニーから作製しそして挿入物の大きさを制限消化を介して決定した。 \pm 1730bp挿入物を含むクローン3個を配列決定した。クローンH B 4 6 9 3の配列は、共通I G S 1 c D N A 配列と完全に一致した(図1参照)。プラスミドH B 4 6 9 3を内包する細胞株を、アンピシリン100 μ g/mlを含むLBアガプレート上に再プレーティングした後に再クローンし、そしてInnogenetics strain list (I C C G # 4 2 9 7) およびCentraalbureau voo

r Schimmelculturen(CBS) (Baarn、オランダ国) (寄託番号CBS102049)の両方に寄託した。再クローンした単離物から作製したプラスミドDNAを再度配列決定しそして以前に決定した共通配列と同一であることを見いだした。

【0112】

注：我々は、その後、プライマーIP12262配列がクローンHNT1413の挿入配列中に含まれていないことおよびその結果、HNT1413鋳型からアンプリコンが産生できなかったことを見いだした。従って、我々は、重複断片の成功した増幅は、HNT1413プラスミドDNA(重複PCR反応管内に持ち込まれた)とHNT1398鋳型から生成したアンプリコンとの間の直接重複を介して発生したと推定する。

実施例2. IGS1のノーザンおよび「MTEアレイ」分析

実施例2a. pcDNA3.1(+) huIGS1発現ベクターの構築

5 µgのpcDNA3.1(+) (Invitrogen)をHindIIIを用いて切断し(3時間、37 °C)、dNTP(0.25 mM f.c.)の存在下でT4ポリメラーゼを用いて平滑化し、そしてゲル上で分析した。線状化したDNAをゲルから溶出し(Qiaex II抽出キット(Qiagen)使用)そして40 µl H₂O中に溶かした。このDNAをNotIを用いて消化し、そして再度ゲル上で分析した。得られた5364 bpベクター断片をQiaex IIゲル抽出キットを用いてゲルから溶出しそして40 µl H₂O中に溶かした。5 µlをゲル上で分析して大きさ、量および純度を検査した。

【0113】

ヒトIGS1コーディング配列を、5 µg pGEM-Thu1GS1プラスミド(ICCG#4297)のNaeI/NotI消化(3時間、37 °C)の後に入手した。消化は、アガロースゲル電気泳動により400 bp、1629 bpおよび2702 bpの断片3個をもたらした。1629 bp断片をゲル(QiaexII)から溶出しそして40 µl H₂O中に再び溶かした。5 µlをゲル上で分析した。

【0114】

HindIII消化したpcDNA3.1(+)ベクターの1 µl、挿入物3

μl および $16 \mu\text{l}$ H_2O を Ready-To-Go リガーゼ管 (T4 DNA リガーゼ、Amersham Pharmacia Biotech) に加えそして 1 時間、室温でインキュベーションした。連結混合物の $2 \mu\text{l}$ を化学的適応性 DH5 α 菌を形質転換するために使用した。形質転換した細菌 $200 \mu\text{l}$ を LB プレート上にプレーティングし ($100 \mu\text{g}$ アンピシリン / ml) そして一晩 37°C で培養した。16 個のランダムコロニーを採取しそしてアンピシリンを含む LB 培地 3ml 中で培養した。プラスミド DNA を BioRobotTM9600 核酸精製システム (Qiagen) を用いて作製しそして Not I、Pst I および Sph I 制限酵素を用いる制限分析を介して分析した。正しい制限パターンを有する 1 個のコロニーからの DNA を部分的に配列決定して挿入点を確認しそして期待の配列を有していることを見いだした。部分的に配列決定したコロニーを Innogenetics strainlist (ICCG # 4350) に寄託しそして大量の DNA (MegaPrep、Qiagen 500 キット) を寄託した株から調製した。この大規模 DNA プレプ ($3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の $500 \mu\text{l}$) の配列分析が期待の配列を確認した。

実施例 2 b . MTE (多組織発現) アレイ分析

25ng ヒト IGS1 DNA (pcDNA3.1 hu IGS1 (ICCG # 4350) からの 1093bp Aat II 挿入物) を (^{-32}P) - dCTP を用いて標識した。標識したプローブを Micro Bio-Spin P-30 カラム (BioRad) を用いて精製した。 16×10^6 cpm の標識した hu IGS1 cDNA プローブを、Cot-1 DNA の $30 \mu\text{g}$ 、せん断ニシン精子 DNA の $150 \mu\text{g}$ および $50 \mu\text{l}$ $20 \times \text{SSC}$ を用いて、全量 $200 \mu\text{l}$ になるように混合し、5 分間、 95°C で加熱し次いで 30 分間、 68°C でインキュベーションした。この混合物を 5ml の Express Hyb 溶液に加えそしてヒト多組織発現 (MTE) アレイ (Clontech #7775-1) 上に均等に分布させた。アレイを一晩、 68°C でハイブリダイズした。プロットを 20 分間、 65°C 、 $2 \times \text{SSC} / 1\% \text{SDS}$ 中で 4 回、そして 20 分間、 55°C 、 $0.1 \times \text{SSC} / 0.5\% \text{SDS}$ 中で 2 回リンスした。プロットを X 線フィルムを用いてオートラジオグラフィーした。

【0115】

IGS1 プローブの MTE アレイ上のハイブリダイゼーションは、尾状核およ

び被殻上にのみ強いシグナルを示した(図2)。

実施例2c. ノーザンブロット分析

25 ng ヒト IGS1 DNA (pcDNA3.1 huIGS1 (ICCG# 4350) からの 1093 bp AatII 挿入物) を ($-^{32}\text{P}$)-dCTP を用いて標識した。標識したプローブを Micro Bio-Spin P-30 カラム (BioRad) を用いて精製した。 8×10^6 cpm の標識した huIGS1 cDNA プローブを、5 分間、95 で変性しそして 5 ml の Express Hyb 溶液を加えそしてヒト脳 MTN ブロット II または IV (それぞれ Clotech #7775-1 および #7769-1) 上に均等に分布させた。ブロットを一晩、68 でハイブリダイズした。ブロットを 10 分間、室温、2XSSC/0.05% SDS 中で 4 回、そして 40 分間、50、0.1XSSC/0.1% SDS 中で 2 回リンスした。ブロットを X 線フィルムを用いてオートラジオグラフィーした。

【0116】

種々のヒト脳領域からの RNA のノーザンブロット上の IGS1 プローブのハイブリダイゼーションは、尾状核および被殻の両方で薬剂的に許容できる約 4.400 および 9.000 ヌクレオチド (nt) の 2 個の強いバンドを示した(図3)。この低い方のバンドは、尾状核の方が僅かに強く、被殻ではその逆であった。4.400 および 9.000 nt バンドは視床でも見られたが両方共に非常に弱かった。さらに非常にかすかな 9.000 nt 転写物が黒質中に検出されたが 4.400 バンドにはなかった。最後に、極端に弱い 9.000 nt バンドが小脳、骨髄および扁桃に観察された。4.400 nt バンドは視床および黒質中には観察できなかつた。これらの結果は、MTE 分析の結果と、IGS1 の最強の発現が尾状核および被殻で観察されたという意味で同一である。しかし、2 個の転写物の存在は予想されなかつた。4.400 nt バンドは IGS1 mRNA に相当すると最も考えられるが、9.000 nt バンドの起源は明らかでない。IGS1 遺伝子はイントロンを含まないので(少なくともコーディング領域内では含まない)、9.000 nt 転写物は多分非スプライスまたは交互にスプライスされた転写物によるのではない。これは交互のポリ-アデニル化部位を有する IGS1 転写物であるかまたはこれは交差ハイブリダイゼーション種そのもので

あろう。我々は、弱い9.000 nt 転写物のみが検出されそして4.400 nt 転写物は検出されない場合には、これは9.000 nt 転写物が4.400 nt 転写物よりも僅かに強く、従ってこの低い方のバンドがノーザンアッセイの検出限界の丁度下にあることによると想定する。

【0117】

これらの結果は、ラット脳内のIGS1の*in situ*ハイブリダイゼーション分析により確認され、この場合にはIGS1発現は上記と解剖学的に同じ領域中で検出された。

実施例3. IGS1に対する推定リガンドのスクリーニング

実施例3a. IGS-1トランスフェクションCHO G16-細胞の構築

IGS1に対するリガンドを同定するために、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞をIGS1を用いて安定してトランスフェクションした。IGS1のGタンパク質共役機構は未知なので、GPCRに対する「汎用アダプター」として知られる(Milligan G. et al., (1996) Trends Pharmacol. Sci. 17:235-7) G-タンパク質G16(CHO G16, Molecular Devices)を発現する特異性CHO-細胞を使用した。

【0118】

使用した材料は下記を含む: IGS1-pREP9ベクター; SuperFect トランスフェクション試薬(Qiagen); 増殖-培地(Growth medium): 10% FCS, 2 mM L-グルタミン、ハイグロマイシンB 400 µg/mlを補足したCHO-S-SFM II(Gibco BRL)、選択-培地; 10% FCS、2 mM L-グルタミン、ハイグロマイシンB 400 µg/mlおよびジェネティシン500 µg/mlを補足したCHO-S-SFM II(Gibco BRL); RNeasy Miniキット(Qiagen)、DNase I (Ambion、2 U/µl)、SuperScript II(Gibco BRL)、SuperScript II 200U(Gibco BRL)、AmpliTaq(Perkin Elmer)。

【0119】

IGS1コーディング配列をpcDNA3.1huIGS1(ICCG#4350)からpREP9(Invitrogen)中にXhoI/NheI部位を介してクローンした。CHO G16細胞をSuperFect(Qiagen)を用い、供給者の記載の通り

にしてトランスフェクションした。トランスフェクションはT25フラスコ内で行った。増殖 - 培地内で24時間経過した後、培地を除去しそして選択 - 培地に置換した。選択 - 培地内で集密に達するまで培養した後、ポリクローナル体をT75フラスコ内を2回通過させた。モノクローナル体を得るために、細胞をLimited Dilution内に接種した。

【0120】

モノクローナル体の選択は、RT-PCRにより行った。モノクローナル体14個を試験した。提供されたプロトコールに従ってRNeasy Mini キット(Qiagen)を用いてRNAをモノクローナル体から単離した(24ウエルプレートから1個の集密ウエル)。試料当たりDNase I (Ambion、2 U / μ l) 1 Uを用いてRNAを処理した。RNA試料の半分をSuperScript II(Gibco BRL) を用いるRT-PCRに使用した。プライマーアニーリングは、RNAおよびオリゴ-dT16(0.6 μ M)を用い、10分間、65 ~ 15 で行った。それぞれdNHPの0.43 mMを有するFirst Strand Buffer(Gibco BRL)、DTT 10 mM、20 U RNasin(Promega, 40 U / μ l) およびSuperScript II 200U(Gibco BRL, 200 U / μ l) を最終体積30 μ lまで加え、次いで42 で1時間インキュベーションした。

【0121】

PCRをAmpliTaq(Perkin Elmer)を用い、IGS1特異性内部プライマーを用いて25 μ l中で行った。最初に、35サイクルのPCRを行った。陽性モノクローナルを確認するためおよび最善のものを選択するために、サイクル数が少なくそしてより高いアニーリング温度を用いる別のPCRを行った。PCR反応あたりに、2 μ lのFirst Strand cDNA(30 μ lから)を使用した。

【0122】

6個の最善のモノクローナル体を集密となるまでT75フラスコ内で培養しそして10% DMSOを含む増殖培地内で冷凍した。

実施例3b . 細胞内カルシウム測定

CHOG 16 - IGS1細胞をFluorometric Imaging Plate Reader(FLIPR)上で機能的にスクリーニングして、推定リガンドに反応する細胞内カルシウムの

移動度を測定した。

【0123】

細胞調製のために、下記の材料を使用した。透明で平底の黒色ウエル96ウエルプレート(Costar)；増殖培地：10%牛胎児血清(Gibco)を補足したGlutamax(Gibco)を有するNut-Mix F-12(HAM)；インキュベーター：5%CO₂、37(Nuair)。

【0124】

実験の24時間または48時間前に黒色壁マイクロプレート内に細胞を接種した。細胞密度は、48時間培養に対しては 0.8×10^{-4} 細胞/ウエル、そして24時間培養に対しては 2.2×10^{-4} 細胞/ウエルであった。すべての段階を滅菌条件下で行った。

【0125】

染料負荷のために、下記の材料を使用した：2mM染料ストック：443 μ lの低水分DMSO(Sigma)中で可溶性化した1mg Fluo-4(Molecular Probes)(アリコートは-20で貯蔵)；20%プルロン酸(Pluronic acid)溶液：2mlの低水分DMSO(Sigma)中、37で可溶性化した400mgプルロン酸(Sigma)(室温で貯蔵)；染料/プルロン酸混合物：使用直前に等量の染料ストックおよび20%プルロン酸と混合した(染料およびプルロン酸は、最終濃度それぞれ1mMおよび10%であった)；プロベンシッド、250mMストック溶液：5ml 1N NaOH溶液中で可溶化しそして20mM HEPESを補足したフェノールレッド(Gibco)を欠いた5ml Hank's BSSと混合した710mgプロベンシッド(Gibco)；負荷-緩衝液：20mM HEPESを補足したフェノールレッド(Gibco)を欠いた10.5ml Hank BSS、105 μ lプロベンシッド、210 μ l 1M HEPES；洗浄-緩衝液：20mM HEPESおよび2.5mMプロベンシッドを補足したフェノールレッド(Gibco)を欠いたHank BSS。

【0126】

2mM染料ストックを負荷-緩衝液に加える直前に等量の20%(w/v)プルロン酸と混合した。集密化細胞層を攪乱しないようにして増殖-培地をウエル

から吸引除去した。100 μ l の負荷 - 緩衝液をMultidrop(Labsystems) を用いてそれぞれのウエル中に分配した。細胞を5% CO₂、37 °C のインキュベーター中で30分間インキュベーションした。背景蛍光を算出するために、一部のウエルには染料を負荷しなかった。染料負荷の後、洗浄 - 緩衝液を用いて細胞を3回洗浄して(自動化したDanley細胞洗浄装置)、基底蛍光を背景上20,000 ~ 25,000カウントに低下させた。100 μ l の洗浄 - 緩衝液を加えそして細胞を37 °C で実験の開始までインキュベーションした。

【0127】

スクリーニングする化合物を20 mM HEPESおよび0.1% BSA(Sigma) を補足したフェノールレッド(Gibco) を欠いたハंक BSS中で希釈した。FLIPRを用いる細胞内カルシウム検出は、製造者(Molecular Devices) による記載のようにして行った。FLIPRセットアップパラメーターは、暴露長さ0.4秒、フィルター1、50 μ l 液体添加、ピペッター(pipetter)高さ125 μ l、分配速度40 μ l / 秒、攪拌なしに設定した。

【表4】

PCT

SPW99.04

Original (for SUBMISSION) - printed on 17.07.2000 02:18:30 PM

0-1	Form - PCT/RO/134 (EASY) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)
0-2	International Application No.	PCT/EP00/06878
0-3	Applicant's or agent's file reference	SPW99.04
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	36
1-2	line	7>
1-3	Identification of Deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	Centraalbureau voor Schimmelcultures
1-3-2	Address of depositary institution	Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherlands
1-3-3	Date of deposit	15 July 1999 (15.07.1999)
1-3-4	Accession Number	CBS 102049
1-4	Additional Indications	NONE
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designated States
1-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	NONE

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	17 JUL 2000	(17.07.2000)
0-4-1	Authorized officer	MARIE LEGENDRE (070) 340 4134	EUROPEAN PATENT OFFICE PCT INTERNATIONAL APPLICATION

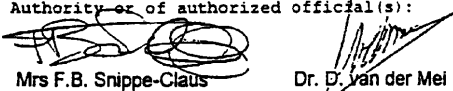
FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the International Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

【表5】

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Duphar International Research B.V. C.J. van Houtenlaan 36 1381 CP WEESP The Netherlands <i>name and address of depositor</i>		RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM		
Identification reference given by the DEPOSITOR: E. coli DH5alphaF' pGEMThiGS1 (ICCG 4297)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 102049	
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION		
The microorganism identified under I above was accompanied by:		
<input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation <i>(mark with a cross where applicable)</i>		
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE		
This International Depositary accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 15-07-99 (date dd-mm-yy of the original deposit)		
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION		
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on not applicable (date dd-mm-yy of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on not applicable (date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)		
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY		
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures Address: Oosterstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Snippe-Claus Dr. E. van der Mei Date (dd-mm-yy): 26-07-99	

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

【表6】

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Duphar International Research B.V. C.J. van Houtenlaan 36 1381 CP WEESP The Netherlands <i>name and address of the party to whom the viability statement is issued</i>
--

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

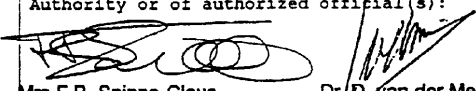
I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Duphar International Research B.V. Address: C.J. van Houtenlaan 36 1381 CP WEESP The Netherlands	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 102049 Date (dd-mm-yy) of the deposit or of the transfer: 1 15-07-99
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 22-07-99 2. On that date (dd-mm-yy), the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

【表7】

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED 4	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures Address: Oosterstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Snippe-Claus Dr. D. van der Mei Date (dd-mm-yy): 26-07-99

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V.

5 <120> Novel human G-protein coupled receptor

<130> SPW99.04

<140>

10 <141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1659

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (36)..(1559)

25

<400> 1

gcttgcaacc tgctcycacgc cctctggtgtg ttgcc atg acg tcc acc tgc acc 53
 Met Thr Ser Thr Cys Thr
 1 5

30

aac agc acg cgc gag agt aac agc agc cac acg tgc atg ccc ctc tcc 101
 Asn Ser Thr Arg Glu Ser Asn Ser Ser His Thr Cys Met Pro Leu Ser
 10 15 20

35

aaa atg ccc atc agc ctg gcc cac ggc atc atc cgc tca acc gtg ctg 149
 Lys Met Pro Ile Ser Leu Ala His Gly Ile Ile Arg Ser Thr Val Leu
 25 30 35

40

gtt atc ttc ctc gcc gcc tct ttc gtc ggc aac ata gtg ctg gcg cta 197
 Val Ile Phe Leu Ala Ala Ser Phe Val Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu
 40 45 50

45

gtg ttg cag cgc aag ccg cag ctg ctg cag gtg acc aac cgt ttt atc 245
 Val Leu Gln Arg Lys Pro Gln Leu Leu Gln Val Thr Asn Arg Phe Ile
 55 60 65 70

50

ttt aac ctc ctc gtc acc gac ctg ctg cag att tcg ctc gtg gcc ccc 293
 Phe Asn Leu Leu Val Thr Asp Leu Leu Gln Ile Ser Leu Val Ala Pro
 75 80 85

55

tgg gtg gtg gcc acc tct gtg cct ctc ttc tgg ccc ctc aac agc cac 341
 Trp Val Val Ala Thr Ser Val Pro Leu Phe Trp Pro Leu Asn Ser His
 90 95 100

55

	ttc tgc acg gcc ctg gtt agc ctc acc cac ctg ttc gcc ttc gcc agc	389
	Phe Cys Thr Ala Leu Val Ser Leu Thr His Leu Phe Ala Phe Ala Ser	
	105 110 115	
5	gtc aac acc att gtc ttg gtg tca gtg gat cgc tac ttg tcc atc atc	437
	Val Asn Thr Ile Val Leu Val Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ile	
	120 125 130	
10	cac cct ctc tcc tac ccg tcc aag atg acc cag cgc cgc ggt tac ctg	485
	His Pro Leu Ser Tyr Pro Ser Lys Met Thr Gln Arg Arg Gly Tyr Leu	
	135 140 145 150	
15	ctc ctc tat ggc acc tgg att gtg gcc atc ctg cag agc act cct cca	533
	Leu Leu Tyr Gly Thr Trp Ile Val Ala Ile Leu Gln Ser Thr Pro Pro	
	155 160 165	
20	ctc tac ggc tgg ggc cag gct gcc ttt gat gag cgc aat gct ctc tgc	581
	Leu Tyr Gly Trp Gly Gln Ala Ala Phe Asp Glu Arg Asn Ala Leu Cys	
	170 175 180	
25	tcc atg atc tgg ggg gcc agc ccc agc tac act att ctc agc gtg gtg	629
	Ser Met Ile Trp Gly Ala Ser Pro Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Val Val	
	185 190 195	
30	tcc ttc atc gtc att cca ctg att gtc atg att gcc tgc tac tcc gtg	677
	Ser Phe Ile Val Ile Pro Leu Ile Val Met Ile Ala Cys Tyr Ser Val	
	200 205 210	
35	gtg ttc tgt gca gcc cgg agg cag cat gct ctg ctg tac aat gtc aag	725
	Val Phe Cys Ala Ala Arg Arg Gln His Ala Leu Leu Tyr Asn Val Lys	
	215 220 225 230	
40	aga cac agc ttg gaa gtg cga gtc aag gac tgt gtg gag aat gag gat	773
	Arg His Ser Leu Glu Val Arg Val Lys Asp Cys Val Glu Asn Glu Asp	
	235 240 245	
45	gaa gag gga gca gag aag aag gag gag ttc cag gat gag agt gag ttt	821
	Glu Glu Gly Ala Glu Lys Lys Glu Glu Phe Gln Asp Glu Ser Glu Phe	
	250 255 260	
50	cgc cgc cag cat gaa ggt gag gtc aag gcc aag gag ggc aga atg gaa	869
	Arg Arg Gln His Glu Gly Glu Val Lys Ala Lys Glu Gly Arg Met Glu	
	265 270 275	
55	gcc aag gac ggc agc ctg aag gcc aag gaa gga agc acg ggg acc agt	917
	Ala Lys Asp Gly Ser Leu Lys Ala Lys Glu Gly Ser Thr Gly Thr Ser	
	280 285 290	
60	gag agt agt gta gag gcc agg ggc agc gag gag gtc aga gag agc agc	965
	Glu Ser Ser Val Glu Ala Arg Gly Ser Glu Glu Val Arg Glu Ser Ser	
	295 300 305 310	
65	acg gtg gcc agc gac ggc agc atg gag ggt aag gaa ggc agc acc aaa	1013
	Thr Val Ala Ser Asp Gly Ser Met Glu Gly Lys Glu Gly Ser Thr Lys	
	315 320 325	

	gtt gag gag aac agc atg aag gca gac aag ggt cgc aca gag gtc aac	1061
	Val Glu Glu Asn Ser Met Lys Ala Asp Lys Gly Arg Thr Glu Val Asn	
	330 335 340	
5	cag tgc agc att gac ttg ggt gaa gat ggc atg gag ttt ggt gaa gac	1109
	Gln Cys Ser Ile Asp Leu Gly Glu Asp Gly Met Glu Phe Gly Glu Asp	
	345 350 355	
10	gac atc aat ttc agt gag gat gac gtc gag gca gtg aac atc ccg gag	1157
	Asp Ile Asn Phe Ser Glu Asp Asp Val Glu Ala Val Asn Ile Pro Glu	
	360 365 370	
15	agc ctc cca ccc agt cgt cgt aac agc aac agc aac cct cct ctg ccc	1205
	Ser Leu Pro Pro Ser Arg Arg Asn Ser Asn Ser Asn Pro Pro Leu Pro	
	375 380 385 390	
20	agg tgc tac cag tgc aaa gct gct aaa gtg atc ttc atc atc att ttc	1253
	Arg Cys Tyr Gln Cys Lys Ala Ala Lys Val Ile Phe Ile Ile Ile Phe	
	395 400 405	
25	tcc tat gtg cta tcc ctg ggg ccc tac tgc ttt tta gca gtc ctg gcc	1301
	Ser Tyr Val Leu Ser Leu Gly Pro Tyr Cys Phe Leu Ala Val Leu Ala	
	410 415 420	
30	gtg tgg gtg gat gtc gaa acc cag gta ccc cag tgg gtg atc acc ata	1349
	Val Trp Val Asp Val Glu Thr Gln Val Pro Gln Trp Val Ile Thr Ile	
	425 430 435	
35	atc atc tgg ctt ttc ttc ctg cag tgc tgc atc cac ccc tat gtc tat	1397
	Ile Ile Trp Leu Phe Phe Leu Gln Cys Cys Ile His Pro Tyr Val Tyr	
	440 445 450	
40	ggc tac atg cac aag acc att aag aag gaa atc cag gac atg ctg aag	1445
	Gly Tyr Met His Lys Thr Ile Lys Lys Glu Ile Gln Asp Met Leu Lys	
	455 460 465 470	
45	aag ttc ttc tgc aag gaa aag ccc ccg aaa gaa gat agc cac cca gac	1493
	Lys Phe Phe Cys Lys Glu Lys Pro Pro Lys Glu Asp Ser His Pro Asp	
	475 480 485	
50	ctg ccc gga aca gag ggt ggg act gaa ggc aag att gtc cct tcc tac	1541
	Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Thr Glu Gly Lys Ile Val Pro Ser Tyr	
	490 495 500	
55	gat tct gct act ttt cct tgaagttagt tctaaggcaa accttgaaaa	1589
	Asp Ser Ala Thr Phe Pro	
	505	
60	tcagtccttc agccacagct atttagagct ttaaaactac caggttcaat cactggttat	1649
	gctttctgtg	1659

<210> 2
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Thr Ser Thr Cys Thr Asn Ser Thr Arg Glu Ser Asn Ser Ser His
 1 5 10 15

10

Thr Cys Met Pro Leu Ser Lys Met Pro Ile Ser Leu Ala His Gly Ile
 20 25 30

Ile Arg Ser Thr Val Leu Val Ile Phe Leu Ala Ala Ser Phe Val Gly
 35 40 45

15

Asn Ile Val Leu Ala Leu Val Leu Gln Arg Lys Pro Gln Leu Leu Gln
 50 55 60

20

Val Thr Asn Arg Phe Ile Phe Asn Leu Leu Val Thr Asp Leu Leu Gln
 65 70 75 80

Ile Ser Leu Val Ala Pro Trp Val Val Ala Thr Ser Val Pro Leu Phe
 85 90 95

25

Trp Pro Leu Asn Ser His Phe Cys Thr Ala Leu Val Ser Leu Thr His
 100 105 110

Leu Phe Ala Phe Ala Ser Val Asn Thr Ile Val Leu Val Ser Val Asp
 115 120 125

30

Arg Tyr Leu Ser Ile Ile His Pro Leu Ser Tyr Pro Ser Lys Met Thr
 130 135 140

35

Gln Arg Arg Gly Tyr Leu Leu Leu Tyr Gly Thr Trp Ile Val Ala Ile
 145 150 155 160

Leu Gln Ser Thr Pro Pro Leu Tyr Gly Trp Gly Gln Ala Ala Phe Asp
 165 170 175

40

Glu Arg Asn Ala Leu Cys Ser Met Ile Trp Gly Ala Ser Pro Ser Tyr
 180 185 190

Thr Ile Leu Ser Val Val Ser Phe Ile Val Ile Pro Leu Ile Val Met
 195 200 205

45

Ile Ala Cys Tyr Ser Val Val Phe Cys Ala Ala Arg Arg Gln His Ala
 210 215 220

50

Leu Leu Tyr Asn Val Lys Arg His Ser Leu Glu Val Arg Val Lys Asp
 225 230 235 240

Cys Val Glu Asn Glu Asp Glu Glu Gly Ala Glu Lys Lys Glu Glu Phe
 245 250 255

55

	Gln Asp Glu Ser Glu Phe Arg Arg Gln His Glu Gly Glu Val Lys Ala	
	260	265 270
5	Lys Glu Gly Arg Met Glu Ala Lys Asp Gly Ser Leu Lys Ala Lys Glu	
	275	280 285
	Gly Ser Thr Gly Thr Ser Glu Ser Ser Val Glu Ala Arg Gly Ser Glu	
	290	295 300
10	Glu Val Arg Glu Ser Ser Thr Val Ala Ser Asp Gly Ser Met Glu Gly	
	305	310 315 320
	Lys Glu Gly Ser Thr Lys Val Glu Glu Asn Ser Met Lys Ala Asp Lys	
15		325 330 335
	Gly Arg Thr Glu Val Asn Gln Cys Ser Ile Asp Leu Gly Glu Asp Gly	
	340	345 350
20	Met Glu Phe Gly Glu Asp Asp Ile Asn Phe Ser Glu Asp Asp Val Glu	
	355	360 365
	Ala Val Asn Ile Pro Glu Ser Leu Pro Pro Ser Arg Arg Asn Ser Asn	
25		370 375 380
	Ser Asn Pro Pro Leu Pro Arg Cys Tyr Gln Cys Lys Ala Ala Lys Val	
	385	390 395 400
30	Ile Phe Ile Ile Ile Phe Ser Tyr Val Leu Ser Leu Gly Pro Tyr Cys	
	405	410 415
	Phe Leu Ala Val Leu Ala Val Trp Val Asp Val Glu Thr Gln Val Pro	
	420	425 430
35	Gln Trp Val Ile Thr Ile Ile Ile Trp Leu Phe Phe Leu Gln Cys Cys	
	435	440 445
	Ile His Pro Tyr Val Tyr Gly Tyr Met His Lys Thr Ile Lys Lys Glu	
40		450 455 460
	Ile Gln Asp Met Leu Lys Lys Phe Phe Cys Lys Glu Lys Pro Pro Lys	
	465	470 475 480
45	Glu Asp Ser His Pro Asp Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Thr Glu Gly	
	485	490 495
	Lys Ile Val Pro Ser Tyr Asp Ser Ala Thr Phe Pro	
	500	505
50		
	<210> 3	
	<211> 27	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

5 <220>
 <221> variation
 <222> (19)
 <223> Degenerated primers

10 <220>
 <221> variation
 <222> (22)
 <223> Degenerated primers

15 <220>
 <221> variation
 <222> (25)
 <223> Degenerated primers

20 <400> 3
 catcttcgtc gtcggcacng ynggnaa 27

<210> 4
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 30 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
 <221> variation
 <222> (21)
 35 <223> Degenerated primers

<400> 4
 gggtaggcaga tggccarrya nckytc 26

40 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (27)
 <223> Modified base : 3'-deoxyadenosine

<400> 5
 55 acggtaggcaca acacggtagc ggcgta 27

5 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 10 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

 <400> 6
 ccatacctaatacgcactcact atagggc 27

15 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

 <400> 7
 25 actcactata gggctcgagc ggc 23

30 <210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

35 <400> 8
 tttatcctta acctcctcgt caccgacc 28

40 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

 <400> 9
 tagtggtgca ggcgaagccg 20

50 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

55

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer
 <400> 10
 5 ggcagcgttc cactgacacc aagacaatgg 30

<210> 11
 <211> 28
 10 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer
 15 <400> 11
 cagcgttcca ctgacaccaa gacaatgg 28

20 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer
 <400> 12
 30 aaggcgaaca ggtgggtgag gctaacc 27

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer
 40 <400> 13
 tggcgaaggc gaacaggtgg 20

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 45 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer
 50 <400> 14
 gcgaaggcga acaggtgggt gagg 24

55

	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
	<400> 15	
10	ctagtgttgc agcgaagcc gcag	24
	<210> 16	
	<211> 28	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
20	<400> 16	
	cacagaaagc ataaccagtg attgaacc	28
	<210> 17	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
	<400> 17	
30	gctttaggtt cctggaatcc catttgg	27
35		
	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
45	<400> 18	
	ttgtcaccag cataggcact gagtg	25

【図面の簡単な説明】

【図1】

共通IGS1コンティグを生成するように単離された種々のクローンの相対位置の図示。クローニングのために使用したPCRプライマーは、(IP#)で指示する。クローンHB4693は、HNT1398とHNT1413との重複PCRを介して得た。IGS1コーディング配列(IGS1PROT)の位置は、星印「*」で指示した。EST20889およびEATアクセッション番号A1672141の位置は「=」で、IGS1DNAの位置は「++」で指示した。IGS1DNAはIGS1コンティグの一部であり、その配列はそれぞれのヌクレオチド位置における少なくとも4個の独立したcDNAクローンに対して

決定した。

【図2】

ヒトIGS1プローブを用いた多重組織発現アレイ分析。この膜上には痕跡的な多数のシグナルが存在する。矢印で指示したシグナルだけが、寄託したRNAの位置と一致しそして特異的である。

【図3】

種々の脳領域からのRNAに対するヒトIGS1のノーザンプロット分析。

【図1】

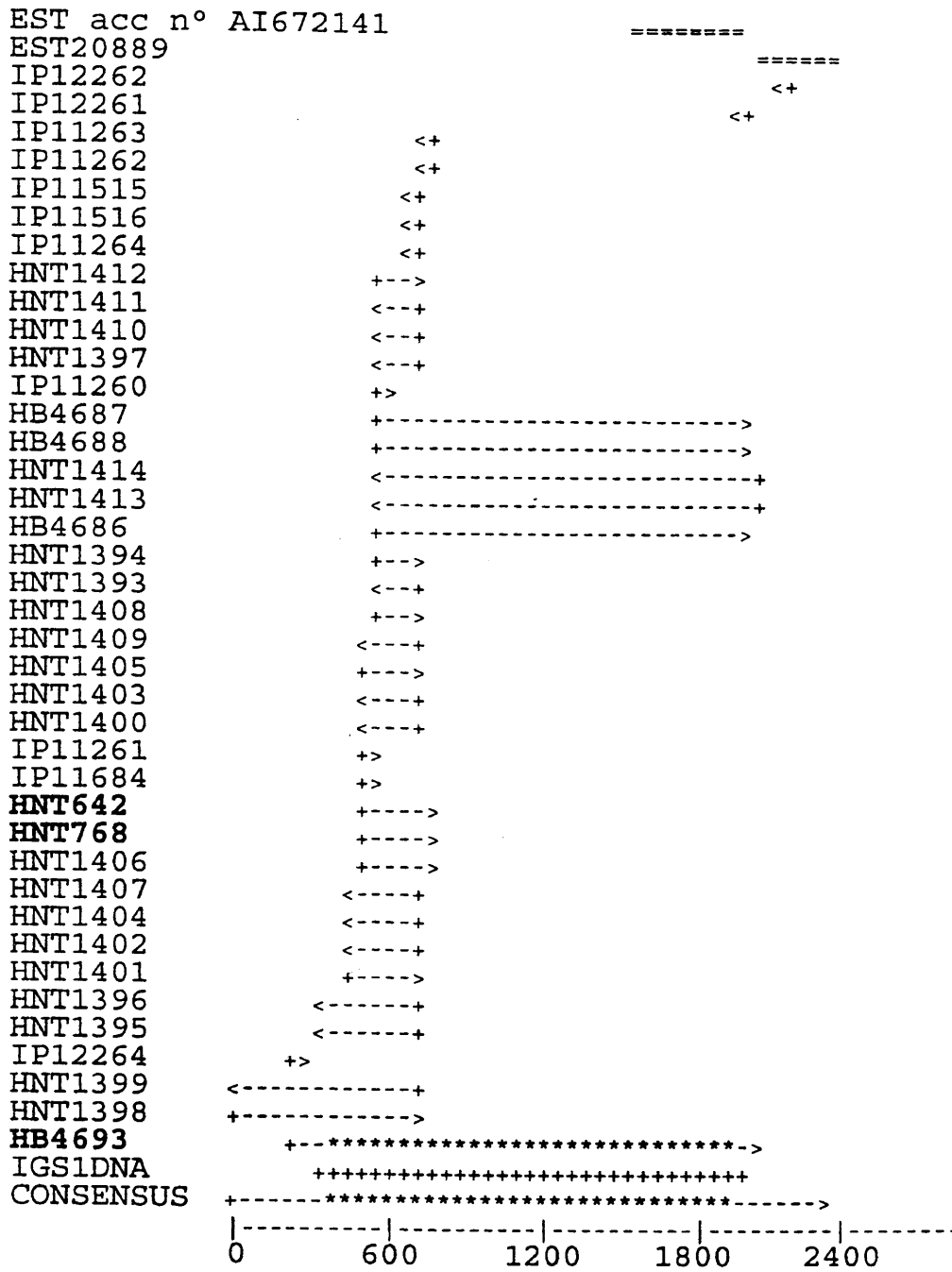
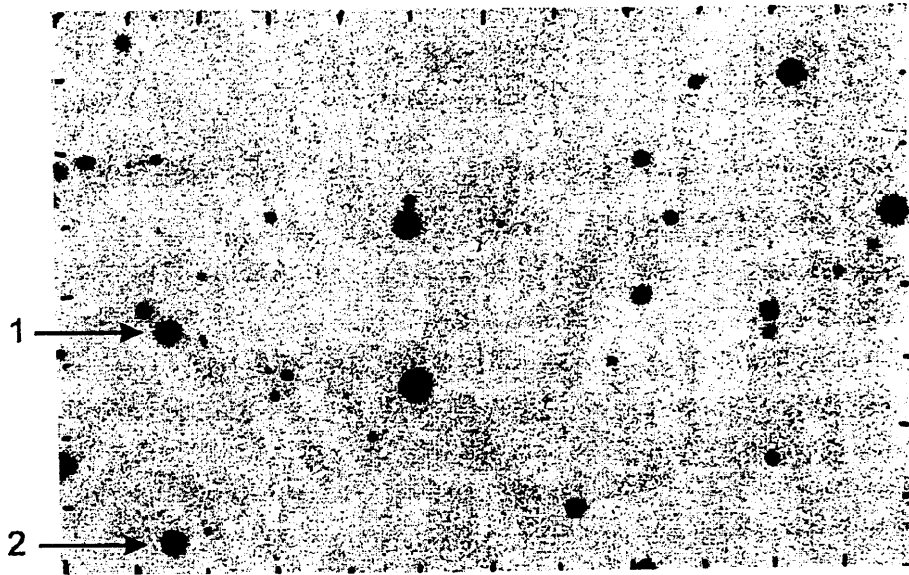


FIG.1

【図2】



1: ヒト尾状核ポリA⁺ RNA
 2: ヒト被殻ポリA⁺ RNA

FIG. 2

【図3】

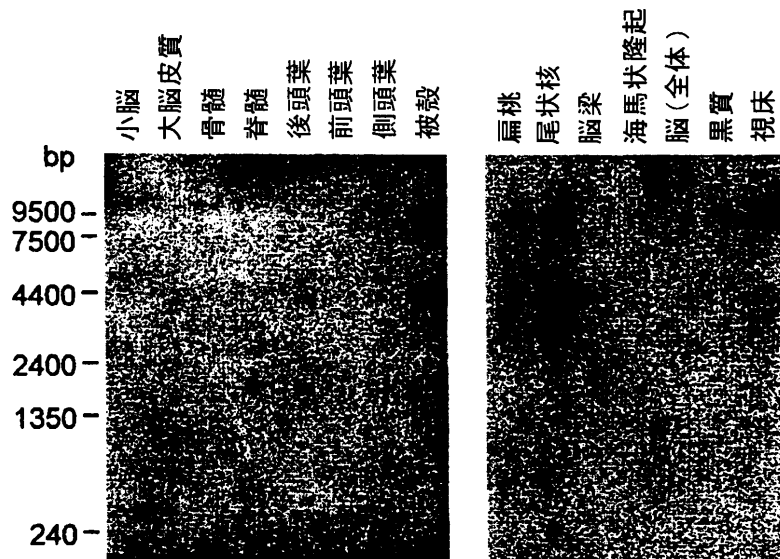


FIG. 3

【手続補正書】**【提出日】**平成14年11月1日(2002.11.1)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 a) 配列番号2記載のIGS1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

b) Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102049号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号1に相当するヌクレオチド配列；

c) (a)または(b)のヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80% (好ましくは少なくとも90%)の配列の同一性を有するヌクレオチド配列；

d) (a)または(b)または(c)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列

からなる群より選ばれたヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 該ポリヌクレオチドが配列番号2のIGS1ポリペプチドをコードする配列番号1内に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 該ポリヌクレオチドが配列番号1に対してその全長にわたって少なくとも80%が同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号1のポリヌクレオチドである、請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 DNAまたはRNAである、請求項1-4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 発現系が適合性宿主細胞内に存在する場合に、該発現系が配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるIGS1ポリペプチドを産生することができる、該発現系を含んでなるDNAまたはRNA分子。

【請求項7】 請求項6の発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項8】 酵母細胞である、請求項7記載の宿主細胞。

【請求項9】 動物細胞である、請求項7記載の宿主細胞。

【請求項10】 請求項7から9までに記載の細胞に由来するIGS1受容体膜調製物。

【請求項11】 ポリペプチドの産生のために十分な条件下で請求項7の宿主を培養しそして培養物からポリペプチドを回収することを含んでなるIGS1ポリペプチドを産生するための方法。

【請求項12】 適当な培養条件下で、細胞がIGS1ポリペプチドを産生することができるように、請求項6の発現系を用いて細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、細胞のIGS1ポリペプチドを産生する細胞を産生するための方法。

【請求項13】 配列番号2記載のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも80%が同一であるアミノ酸配列を含んでなる、IGS1ポリペプチド。

【請求項14】 配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる、請求項13記載のポリペプチド。

【請求項15】 請求項13記載のIGS1ポリペプチドに対して免疫特異性の抗体。

【請求項16】 請求項13記載のIGS1ポリペプチド受容体の活性または発現を増強することを要する患者の治療のための方法において、

(a) 該受容体に対するアゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または、

(b) 配列番号2のIGS1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列、またはインビボで該受容体活性の産生を行うような形で該ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドを患者に提供する

ことを含んでなる方法。

【請求項17】 請求項13記載のIGS1ポリペプチド受容体の活性または発現を阻害することを要する患者の治療のための方法において

(a) 該受容体に対するアンタゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または

(b) 該受容体をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチドを患者に投与し、および/または

(c) リガンドに対して該受容体と競合するポリペプチドの治療的な有効量を患者に投与する

ことを含んでなる方法。

【請求項18】 患者内の請求項13記載のIGS1ポリペプチドの発現または活性に関して患者内の疾患または疾患に対する罹患性の診断のための方法において

(a) 該患者のゲノム内の該IGS1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内の突然変異の存在または不存在を決定し、および/または

(b) 該患者に由来する試料内のIGS1ポリペプチド発現の存在または量を分析する

ことを含んでなる方法。

【請求項19】 請求項13記載のIGS1ポリペプチドに対するアゴニストを同定するための方法において、

(a) IGS1ポリペプチドを産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物がIGS1ポリペプチドの活性化により発生するシグナルに影響するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項 2 0】 請求項 1 9記載の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項 2 1】 請求項 1 3記載の I G S 1 ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための方法において、

(a) I G S 1 ポリペプチドを産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生されたシグナルが候補化合物の存在下で減衰するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項 2 2】 請求項 2 1記載の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項 2 3】 I G S 1 ポリペプチドを発現する請求項 1 2記載の方法により産生された組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項 2 4】 遺伝的に改変された非 - ヒト動物を創成する方法において

、

a) アミノ酸配列の配列番号 2 を有するタンパク質をコードする核酸配列またはその生物学的に活性な断片から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を、高レベル遺伝子発現または遺伝子が該動物内で通常は発現されない細胞タイプ内での発現を駆動することができる調節配列と連結させ、または

b) アミノ酸配列の配列番号 2 を有するタンパク質をコードする核酸配列またはその生物学的に活性な断片から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を操作し、そして、アミノ酸配列の配列番号 2 を有するタンパク質または生物学的に活性な断片をコードする内在性遺伝子対立遺伝子を完全にまたは部分的に不活性化するような方法で動物のゲノム内に該配列を再導入する

段階を含んでなる方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 2】

【実施例】

実施例1. 新規のGタンパク質共役型受容体をコードするcDNAのクローニング

実施例1a. 新規のGタンパク質共役型受容体(GPCR)をコードするゲノム断片の相同性PCRクローニング

PCRに基づく相同性クローニング戦略を、新規のGタンパク質共役型受容体をコードする部分ゲノムDNA配列を単離するために使用した。下記の前進(F11)および後退(R13)縮重PCRプライマーを、膜貫通ドメイン1(TM1)内および膜貫通ドメイン3と細胞内ループ2の境界(TM3/12)のそれぞれのニューロテンシン受容体遺伝子の保存領域内で設計した。

F11(TM1):

5' - CATCTTCGTCGTCGGCAC (A, C, GまたはT) G (CまたはT) (A, C, GまたはT) GG (A, C, GまたはT) AA - 3'

(配列番号3)

R13(TM3/12):

5' - GGGTGGCAGATGGCCA (AまたはG) (AまたはG) (CまたはT) A (A, C, GまたはT) C (CまたはT) (CまたはT) TC - 3'

(配列番号4)

さらに、3'ブロックされたオリゴプライマー(HNTR1F1STOP)を設計した。

HNTR1F1STOP:

5' - ACGGTGGGCAACACGGTGACGGCGTT - 3' - 3' -
dA

(配列番号5)

3'ブロックされたプライマーは、TM1コード化領域内のヒトニューロテンシン受容体(NTR1)cDNAに対して特異性でありそして縮重前進プライマーと部分的に重複(および競合)している。この3'末端は、3'-デオキシアデノシン基によりブロックされており、ポリメラーゼ-触媒伸張を避ける(Eurogentic、ベルギー国、カタログ番号OL-0401-0302)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

PCR反応は、体積60 μ lで行いそして100ngヒトゲノムDNA(Clontech)、6 μ l 10xPCR緩衝液II(100mM トリス-HCl pH8.3; 500mM KCl, Perkin Elmer)、3.6 μ l 25mM MgCl₂、0.36 μ l dNTP類(それぞれのdNTPの25mM)、1.5単位AmpliTaqTMポリメラーゼ(Perkin Elmer)、縮重前進および後退プライマーそれぞれの30ピコモルおよび3'ブロックされたプライマーの100ピコモルを含んでいた。反応管を94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱し、次いで変性(94 $^{\circ}$ C、30秒間)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、1分間、タッチダウン-0.25 $^{\circ}$ C/サイクル)および伸張(72 $^{\circ}$ C、1分間)の20サイクル、次いでさらに変性(94 $^{\circ}$ C、30秒間、アニーリング(50 $^{\circ}$ C、1分間)および伸張(72 $^{\circ}$ C、1分間)の20サイクルを行った。最後に反応管を5分間、72 $^{\circ}$ Cで加熱した。PCR反応産物を2%アガロースゲル上でサイズ分級しそして臭化エチジウムを用いて染色した。期待した大きさの断片(\pm 300bp)をQiaex-IIITM精製キット(Qiagen Inc.)を用いてゲルから精製し、そして供給者(pGEM-Tキット、Promega)により推奨された手順に従ってpGEM-Tプラスミド内に連結した。このようにして作製した組換えプラスミドをコンピテント大腸菌SURETM2細菌(Stratagene)を形質転換するために使用した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0109

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0109】

ネストしたAP-2/IP11260 3'-RACE PCR反応物は、数本のバンドを示した。IGS1プローブとハイブリダイズした最大の3'ネスト

RACE PCR断片(±1, 550 bp)をゲルから精製し、pGEM-T (Promega) 内に連結しそしてコンピテント大腸菌SURE II細胞を形質転換するために使用した。この連結反応からのIGS1特異性形質転換体を、クローンHNT642の32P-標識挿入物を用いるコロニーハイブリダイゼーションの後に同定した。コロニープロットを以前に指定されたプローブにハイブリダイズしそして高ストリンジェンシー(0.1×SSC 0.1%SDS、65℃で30分間)で洗浄した。3'RACEネストPCRライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングは、3個の陽性クローンを生成した。これらの2個(HNT1413-1414)を配列決定した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0111

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0111】

単離されたすべてのIGS1 cDNAクローンを完全に配列決定しそして単一コンティグ内に構築できた(図1)。少なくとも4回の独立したcDNAクローンから決定されたこの連続cDNAの一部をIGS1 DNAとして本明細書に記載する(配列番号1)。このコンティグの翻訳は、長いオープン読み取り枠を明らかにし、508アミノ酸のタンパク質が予想されこれはGPCRタンパク質に良い相同性を示した(IGS1 PROT; 配列番号2)。発現された配列タグデータベース(database)に対するIGS1コンティグのDNA配列のコンピューター支援相同性サーチ(Blastn; Altschul S.F. et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)は、EST20889(アクセション番号AA318717)およびESTアクセション番号AI672141の存在を示し、これらは両方共にIGS1コンティグの3'末端と重複するがしかしIGS1オープン読み取り枠の外側である(図1)。

実施例1c. 完全IGS1コーディング配列を含む連続cDNA断片の単離

連続IGS1 cDNAクローンをクローンHNT1398およびHNT14

13 鋳型上で重複 - PCR を介して作製した。HNT1398 プラスミド DNA の 100 ng および HNT1413 プラスミドの 100 ng を、それぞれプライマー対 IP12264 / IP11264 (それぞれ配列番号 18 および 12) および IP11260 / IP12262 (それぞれ配列番号 8 および 11) を用いて別々の反応 (50 μ l) で PCR 増幅した (変性 [94、30 秒間]、アニーリング [60、30 秒間] および伸張 [72、1 分間] の 30 PCR サイクル、ExpandTM High Fidelity PCR システム [Boehringer] 使用)。それぞれの PCR 反応物の 1 μ l の量を一緒にしそしてプライマー対 IP12264 / IP12261 を用い、同じ条件下で再増幅した。この重複 - PCR 反応物は、 ± 1730 bp のバンドを生成し、これをゲルから精製しそして pGEM-T プラスミドベクター中に連結した。コンピテント大腸菌 DH5 F' 菌を形質転換するために組換えプラスミドを使用した。形質転換した細胞をアンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB アガプレート上にプレーティングした。プラスミド DNA を多数のランダムコロニーから作製しそして挿入物の大きさを制限消化を介して決定した。 ± 1730 bp 挿入物を含むクローン 3 個を配列決定した。クローン HB4693 の配列は、共通 IGS1 cDNA 配列と完全に一致した (図 1 参照)。プラスミド HB4693 を内包する細胞株を、アンピシリン 100 μ g/ml を含む LB アガープレート上に再プレーティングした後に再クローンし、そして Innogenetics strain list (ICCG # 4297) および Centraal bureau voor Schimmelculturen (CBS) (Baarn、オランダ国) (寄託番号 CBS 102049) の両方に寄託した。再クローンした単離物から作製したプラスミド DNA を再度配列決定しそして以前に決定した共通配列と同一であることを見いだした。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

HindIII消化したpcDNA3.1(+)ベクターの1 μ l、挿入物3 μ lおよび16 μ l H₂OをReady-To-Go リガーゼ管(T4 DNAリガーゼ、Amersham Pharmacia Biotech)に加えそして1時間、室温でインキュベーションした。連結混合物の2 μ lを化学的コンピテントDH5 α F'菌を形質転換するために使用した。形質転換した細菌200 μ lをLBプレート上にプレーティングし(100 μ gアンピシリン/ml)そして一晩37 $^{\circ}$ Cで培養した。16個のランダムコロニーを採取しそしてアンピシリンを含むLB培地3ml中で培養した。プラスミドDNAをBioRobot TM9600核酸精製システム(Qiagen)を用いて作製しそしてNotI、PstIおよびSphI制限酵素を用いる制限分析を介して分析した。正しい制限パターンを有する1個のコロニーからのDNAを部分的に配列決定して挿入点を確認しそして期待の配列を有していることを見いだした。部分的に配列決定したコロニーをInnogenetics strainlist (ICCG#4350)に寄託しそして大量のDNA(MegaPrep、Qiagen 500キット)を寄託した株から調製した。この大規模DNAプレブ(3 μ g/ μ lの500 μ l)の配列分析により期待された配列が確認された。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 00/06878
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/72 C12N15/81 C12N15/85 C12P21/00 C07K16/28 A61K38/17 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BIRREN B ET AL: "Human clone RP11-14N15" EMBL SEQUENCE DATABASE, 1 December 1999 (1999-12-01), XP002156168 HEIDELBERG DE Accession Nr.: AC016468 99.8 % identity in 1587 bp overlap abstract ---	1-6
P, X	PAVITT R: "Human clone RP13-13L21" EMBL SEQUENCE DATABASE, 24 May 2000 (2000-05-24), XP002156169 HEIDELBERG DE Accession Nr.: AL356783 99,2 % overlap in 1594 bp abstract --- -/--	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 December 2000		Date of mailing of the international search report 15/01/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5016 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer De Kok, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06878

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MCKEE K K ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF TWO HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GENES (GPR38 AND GPR39) RELATED TO THE GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE AND NEUROTENSIN RECEPTORS" GENOMICS,US,ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, vol. 46, no. 3, 15 December 1997 (1997-12-15), pages 426-434, XP000889913 ISSN: 0888-7543 page 426, column 1 -page 427, column 1	1
Y	WILKIE T M ET AL: "CLONING MULTIGENE FAMILIES WITH DEGENERATE PCR PRIMERS" METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY,US,ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, vol. 2, no. 1, 1 February 1991 (1991-02-01), pages 32-41, XP000565446 ISSN: 1046-2023 page 32, column 1	1
A	WO 98 20040 A (INCYTE PHARMA INC) 14 May 1998 (1998-05-14)	1-9, 11-19, 21,23
X	page 51 -page 52 abstract	6
A	WO 96 05225 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 22 February 1996 (1996-02-22)	1-9, 11-19
X	page 1 -page 6; figure 1	6
A	EP 0 875 568 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 4 November 1998 (1998-11-04)	1-9, 11-19, 21,23
	the whole document	
T	MARTIN F ET AL.: "The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria bicolor: structural analysis and allelic polymorphism" MICROBIOLOGY, vol. 145, July 1999 (1999-07), pages 1605-1611, XP002156170 READING GB abstract	1

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 17b and 18b are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the claimed polynucleotide.

Although claim 19a encompasses a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out based on the assumption that the claimed methods are to be carried out on a sample obtained from the human/animal body.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 11, 21, 23, 25 completely and 17, 18 and 24 and partly

Claims 11, 25 and claim 24, second half sentence, have not been searched, as their subject-matter has not been carried out by the applicants and thus lacks disclosure in the sense of Article 5 PCT.

Claims 21 and 23 and claims 17a and 18a refer to agonists/antagonists of the IGS1 polypeptide, without giving a true technical characterization of those agonists/antagonists. Thus, the subject-matter of said claims is not sufficiently disclosed and supported in the sense of Articles 5 and 6 PCT and, therefore, has not been searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06878

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9820040 A	14-05-1998	US 5817480 A	06-10-1998
		AU 5169598 A	29-05-1998
		EP 0941249 A	15-09-1999
WO 9605225 A	22-02-1996	AU 7669394 A	07-03-1996
		EP 0773959 A	21-05-1997
		JP 10510701 T	20-10-1998
		US 5994506 A	30-11-1999
EP 0875568 A	04-11-1998	US 6008050 A	28-12-1999
		CA 2223021 A	02-10-1998
		JP 11018782 A	26-01-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 1/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04			4 C 0 8 6
1/08			4 H 0 4 5
1/12			
1/14			
3/04			
3/06			
3/10			
7/02			
9/04			
9/06			1 0 1
9/10			
	1 0 1		
9/12			
11/06			
13/10			
13/12			
19/02			
19/10			
25/00			
25/06			
25/08			
25/14			
25/16			
25/18			
25/20			
25/22			
25/24			
25/28			
25/30			
31/04			
31/10			
31/12			
31/18			
33/02			
35/00			
37/00			
37/08			
C 0 7 K 14/705		C 0 7 K 14/705	
16/28			
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	
1/19			
1/21			
5/10			
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
			A
			Z
			Z

1/68
G 0 1 N 33/15
33/50
33/53

33/566

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ツアング, フアン

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースプ・シージエイバンハウテンラーン36

33/53

D

M

33/566

C 1 2 N 15/00

Z N A A

5/00

B

A 6 1 K 37/02

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04
DA02 EA04 GA11 HA01 HA11
HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ42
QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48
QR51 QR55 QR77 QS34 QX07
4B064 AG20 CA05 CA10 CA19 DA01
DA13
4B065 AA26X AA91X AA93Y AB01
BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA16 NA14 ZA02 ZA05
ZA06 ZA08 ZA12 ZA16 ZA18
ZA22 ZA29 ZA36 ZA40 ZA42
ZA43 ZA45 ZA54 ZA59 ZA66
ZA68 ZA69 ZA70 ZA71 ZA73
ZA81 ZA96 ZA97 ZB07 ZB13
ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZB38
ZC33 ZC35 ZC39 ZC55
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 NA14
ZA02 ZA05 ZA06 ZA07 ZA08
ZA12 ZA16 ZA18 ZA22 ZA29
ZA36 ZA40 ZA42 ZA43 ZA45
ZA54 ZA59 ZA66 ZA68 ZA69
ZA70 ZA71 ZA72 ZA73 ZA75
ZA81 ZA84 ZA94 ZA96 ZA97
ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
ZB33 ZB35 ZB38 ZC33 ZC35
ZC55
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA50 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	人G蛋白偶联受体		
公开(公告)号	JP2003508026A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2001513990	申请日	2000-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏威杉机俞蒂卡尔的裴浮标		
[标]发明人	デレールスニーダーウイリ ニスガイ ツアングフアン		
发明人	デレールスニーダー,ウイリ ニス,ガイ ツアング,フアン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/12 A61P1/14 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/10 A61P13/12 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/02 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/09 C12N5/81 C12N15/85 C12P21/00 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/12 A61P1/14 A61P3/10 A61P11/06 A61P13/10 A61P13/12 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/02 A61P35/00 C07K14/723		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/12 A61P1/14 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/10 A61P13/12 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/02 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA05 4C084/ZA06 4C084/ZA08 4C084/ZA12 4C084/ZA16 4C084/ZA18 4C084/ZA22 4C084/ZA29 4C084/ZA36 4C084/ZA40 4C084/ZA42 4C084/ZA43 4C084/ZA45 4C084/ZA54 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA68 4C084/ZA69 4C084/ZA70 4C084/ZA71 4C084/ZA73 4C084/ZA81 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZB07 4C084/ZB13 4C084/ZB26 4C084/ZB32 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZB38 4C084/ZC33 4C084/ZC35 4C084/ZC39 4C084/ZC55 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA05 4C086/ZA06 4C086/ZA07 4C086/ZA08 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA22 4C086/ZA29 4C086/ZA36 4C086/ZA40 4C086/ZA42 4C086/ZA43 4C086/ZA45 4C086/ZA54 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA69 4C086/ZA70 4C086/ZA71 4C086/ZA72 4C086/ZA73 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA84 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26		

4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB38 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74

优先权 1999202326 1999-07-15 EP
1012611 1999-07-15 NL

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及新鉴定的多核苷酸，由其编码的多肽以及这些多核苷酸和多肽的用途及其生产。更具体地，本发明的多核苷酸和多肽涉及被称为IGS1家族的G蛋白偶联受体家族。本发明还涉及抑制或激活这些多核苷酸和多肽，含有所述多核苷酸的载体，含有这些载体的宿主细胞和转基因动物，其中IGS1基因是过表达的，未表达的。表达，表达不足或抑制（基因敲除动物）。本发明进一步提供了一种筛选能够充当所述G蛋白偶联受体家族IGS1的激动剂或拮抗剂和IGS1多肽的神经科学的化合物的方法，以及IGS1受体家族的多核苷酸和激动剂或拮抗剂。及其在中枢神经系统疾病治疗中的用途。