

(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 - 522528

(P2003 - 522528A)

(43)公表日 平成15年7月29日 (2003.7.29)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 2 4
45/00		1/16	4 B 0 5 0
A 6 1 P 1/00		3/00	4 B 0 6 3
1/16		5/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全207数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 558463(P2001 - 558463)

(86)(22)出願日 平成13年2月8日(2001.2.8)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月5日(2002.8.5)

(86)国際出願番号 PCT/US01/04423

(87)国際公開番号 W001/059127

(87)国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)

(31)優先権主張番号 60/181,856

(32)優先日 平成12年2月11日(2000.2.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/183,684

(32)優先日 平成12年2月17日(2000.2.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミクス・インコーポレイテッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160

(72)発明者 タング、ワイ・トム

アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・ランウィックコート 4230

(72)発明者 ユエ、ヘンリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サンニール・ルイスアベニュー 826

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 薬剤代謝酵素

(57)【要約】

本発明は、ヒト薬剤代謝酵素 (DME) と、DMEを同定及びコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、発現ベクター及び宿主細胞、抗体、アゴニスト、アンタゴニストを提供する。更に、本発明は、DMEの異常な発現に関連する疾患の診断・治療・予防方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、

(a) SEQ ID NO:1乃至SEQ ID NO:12 (SEQ ID NO:1 - 12) からなる群から選択されたアミノ酸配列と、

(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、

(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、

(d) SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする単離されたポリペプチド。

【請求項2】 SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択された請求項1の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 請求項1のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 SEQ ID NO:13 - 24からなる群から選択された請求項4の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3のポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項6の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項8】 請求項6の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、

(b) そのように発現したポリペプチドを回収するステップとを含むことを特徴とする請求項1のポリペプチドの生産方法。

【請求項10】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項11】 単離されたポリヌクレオチドであって、

(a) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と、

(b) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、

(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等価物とで構成される群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項11のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 サンプルにおいて、請求項11に記載のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 前記サンプルをプローブでハイブリダイズするステップであって、前記プローブが、前記サンプル内の前記標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含み、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該ステップと、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 サンプルにおいて、請求項11のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて、前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップと、

(b) 増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチド及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-12からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16の組成物。

【請求項18】 機能的なDME（新規の薬剤代謝酵素）の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項16の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項19】 請求項1のポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項20】 請求項19のスクリーニング方法によって同定されたアゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項21】 機能的なDMEの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項20の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項22】 請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項23】 請求項22のスクリーニング方法によって同定されたアントゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項24】 機能的なDMEの過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項23の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項25】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 請求項1のポリペプチドと前記試験化合物との結合を検出して、請求項1のポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項26】 請求項1のポリペプチドの活性を変化させる化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性を評価するステップと、

(c) 前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性と、前記試験化合物の不在下での請求項1のポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、

前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性の変化が、請求項1のポリペプチドの活性を変化させる化合物の存在を示唆すること特徴とするスクリーニング方法。

【請求項27】 請求項5の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップと、

(c) 様々な量の前記化合物の存在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現と、前記化合物の不在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現とを比較するステップを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項28】 試験化合物の毒性を評価する方法であって、

(a) 核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸と、請求項11のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項11のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、

(d) 前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処理の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量と比較するステップとを含み、

前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差が試験化合物の毒性を示唆することを特徴とする試験化合物の毒性評価方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、薬剤代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患の診断・治療・予防に利用することに関する。本発明はさらに、薬剤代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価に関する。

【0002】**(発明の背景)**

薬剤の代謝および薬剤の体内での移動(薬物動体学)は、その効果、毒性、およびその他の薬剤との相互作用を決定する上で重要である。薬剤の吸収、様々な組織への薬剤の分布、および薬剤代謝産物の排除の3つのプロセスが薬物動体学を司っている。これらのプロセスは、様々な代謝調節によって、溶解性、受容体との結合性、および排泄の速度を含む薬剤の物理化学的特性および薬学的特性のほとんどを変えるため、薬剤代謝に密接に関係する。薬剤を変える代謝経路はまた、ステロイド、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、およびビタミン等の様々な天然の基質を受容する。従って、これらの経路における酵素は、天然の化合物、薬剤、発癌物質、変異誘発物質、および生体異物の間の生化学的および薬理的相互作用の重要な部位となる。

【0003】

薬剤代謝における遺伝的な差異が、個人間において薬剤効果および毒性のレベルの著しい違いを引き起こすことが以前から知られている。治療指数が狭い薬剤、またはコデイン等の生理活性を必要とする薬剤の場合、このような遺伝子多型は極めて重要である。更に、有望な新規の薬剤が、一部の患者のグループのみに副作用を引き起こすという毒性から臨床試験で排除されることがよくある。薬剤代謝酵素が重要な部分を占める薬理ゲノミクス研究が進歩すれば、薬剤の効果および毒性の疑問に耐え得るツールが発展し、そのような情報が拡大されるであろう(Evans, W. E.およびR. V. Relling (1999) Science 286 : 487-491を参照

)。

【0004】

薬剤代謝反応は、薬剤分子を機能させて更なる代謝のために準備するフェーズI、およびフェーズIIに分類され、それらは連続している。一般に、フェーズIの反応生成物は部分的或いは完全に不活性であり、フェーズIIの反応生成物は主に排泄種である。しかしながら、フェーズI反応生成物は、投与された元の薬剤よりも活性が高い場合があり、この代謝活性の原理がプロドラッグとして利用される(例えば、レボドパ)。加えて、或る種の毒性化合物(例えば、アフラトキシン、ベンゾ-a-ピレン)は、これらの経路を経て毒性中間体に代謝される。フェーズI反応は通常、薬剤代謝における律速段階である。化合物或いは複数の化合物への事前の暴露によって、フェーズI酵素の発現させることができるが、それによってこの代謝経路を介する基質の流入が増大する(Klaassen, C. D., Amdur, M. O.およびJ. Doull (1996) Casarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, New York, NY, pp. 113-186 ; B. G. Katzung (1995) Basic and Clinical Pharmacology, Appleton および Lange, Norwalk, CT, pp. 48-59 ; G. G. Gibson および P. Skett (1994) Introduction to Drug Metabolism, Blackie Academic and Professional, Londonを参照)。

【0005】

薬剤代謝酵素(DME)は幅広い基質特性を有する。これは、多種多様な抗体がそれらの抗原に対して高い特異性を有する免疫系とは対照的である。多様な分子を代謝するDMEの能力によって、ある代謝レベルにおいて薬剤の相互作用の可能性が生まれる。例えば、或る化合物のDMEの誘導により、その酵素によって別の化合物が代謝され得る。

【0006】

DMEは、それらが触媒する反応の種類および関係する補助因子に従って分類することができる。フェーズI酵素の主なクラスには、限定するものではないがチトクロームP450およびフラビン含有モノオキシゲナーゼが含まれる。フェーズI型触媒サイクルおよび反応に関与するその他の酵素のクラスには、限定するものではないが、NADPHチトクロームP450還元酵素(CPR)、ミクロソームチトクロ-

Δb5/NADHチトクロームb5レダクターゼ系、フェレドキシン/フェレドキシンレダクターゼレドックス対、アルド/ケト還元酵素、およびアルコールデヒドロゲナーゼが含まれる。フェーズII酵素の主なクラスには、限定するものではないが、UDPグルクロニルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Nアシルトランスフェラーゼ、およびNアセチルトランスフェラーゼが含まれる。

【0007】

チトクロームP450およびP450触媒サイクル関連酵素

酵素チトクロームP450のスーパーファミリーのメンバーは、様々な基質の酸化代謝を触媒する。そのような基質には、ステロイド、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、およびビタミン等の天然の化合物や、薬剤、発癌物質、変異誘発物質、および生体異物が含まれる。P450ヘム - チオレートタンパク質としても知られるチトクロームP450は通常、P450含有モノオキシゲナーゼ系と呼ばれる多成分電子伝達鎖における末端酸化酵素として作用する。触媒される特定の反応には、ヒドロキシル化、エポキシ化、N-酸化、スルホキシド化、N-脱アルキル、S-脱アルキル、およびO-脱アルキル、脱硫酸化、脱アミノ化、並びにアゾ、ニトロ、およびN-オキシド基の還元が含まれる。これらの反応は、動物における糖質コルチコイド、コルチゾール、エストロゲン、およびアンドロゲンのステロイド産生や、昆虫における殺虫剤耐性や、植物における除草剤耐性および花の発色や、微生物による環境浄化バイオレメディエーションに関係する。薬剤、発癌物質、変異誘発物質、および生体異物にチトクロームP450が作用して、物質の解毒或いはより毒性の強い生成物への変換を引き起こし得る。チトクロームP450は肝臓に豊富に存在するが、その他の組織にも存在し、その酵素はミクロソームに存在する (ExPASy ENZYME EC 1. 14. 14. 1 ; Prosite PDOC00081 Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature ; PRINTS EP450I E-Class P450 Group I signature ; Graham-Lorence, S.およびPeterson, J. A. (1996) FASEB J. 10 : 206-214.を参照)。

【0008】

400種類のチトクロームP450が、細菌、真菌、植物、および動物を含む様々

な生物において同定された (Graham-Lorence、前出)。Bクラスは原核生物および真菌に見られ、Eクラスは細菌、植物、昆虫、脊椎動物、および哺乳動物に見られる。5つのサブクラス即ちグループが、EクラスチトクロームP450の大きなファミリーの中に含まれる (PRINTS EP450I E-Class P450 Group I signature)。

【0009】

全てのチトクロームP450はヘム補助因子を用いており、構造的特性を共有する。ほとんどのチトクロームP450は、400～530のアミノ酸の長さである。酵素の二次構造は、約70%のヘリックスと約22%のシートである。タンパク質のC末端部におけるヘム結合部位の周りの領域は、全てのチトクロームP450に保存されている。このヘム-鉄結合領域におけるアミノ酸10個のシグネチャ配列が同定され、この配列には第5の配位部位にあるヘム-鉄の結合に關与する保存されたシステインが含まれる。真核生物チトクロームP450では、通常は膜貫通領域がタンパク質の初めの15～20のアミノ酸において見られ、通常は約15の疎水性残基およびそれに続く正に帯電した残基からなる (Prosite PDOC00081前出 ; Graham-Lorence前出を参照)。

【0010】

チトクロームP450酵素は、細胞増殖および発達に關係する。この酵素は、DNAと付加物を形成する反応性中間体に化学物質を代謝することで起こる化学的な変異誘発および発癌において或る役割を果たす (Nebert, D. W.およびGonzalez, F. J. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56 : 945-993)。これらの付加物が、発癌を引き起こすヌクレオチドの改変およびDNAの再編成を引き起こし得る。肝臓およびその他の組織におけるチトクロームP450の発現は、多環式芳香族炭化水素、ペルオキシソーム増殖因子、フェノバルビタール、および糖質コルチコイドデキサメタゾン等の生体異物によって引き起こされる (Dogra, S. C.他 (1998) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25 : 1-9)。チトクロームP450タンパク質は、P450遺伝子CYP1B 1における突然変異が原発性先天性緑内障を引き起こすように、目の発達に關与し得る (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) *601771 Cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 ; CYP1B 1

)。

【0011】

チトクロームP450は炎症および感染に関係する。肝チトクロームP450活性は、様々な感染および炎症性の刺激によって著しく増減される (Morgan, E. T. (1997) Drug Metab. Rev. 29 : 1129-1188)。in vivoで観察される効果は、炎症誘発性のサイトカインおよびインターフェロンによって模倣され得る。2つのチトクロームP450タンパク質に対する自己抗体は、自己免疫性多腺性内分泌不全症 I 型 (APECED) 即ち多腺性自己免疫症候群の患者に見られた (OMIM *240300 Auto immune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy)。

【0012】

チトクロームP450における突然変異は、乳児期および幼児期の副腎機能不全において最も一般的である副腎皮質過形成、プソイドビタミンD - 欠損くる病、脳腱黄色腫症、進行性の神経障害によって特徴付けられる脂質貯蔵病、早期アテローム性動脈硬化症、白内障、抗凝血薬であるクマリンおよびワルファリンに対する遺伝性の耐性を含む代謝障害に関係する (Isselbacher, K. J.他 (1994) Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, Inc. New York, NY, pp. 1968-1970 ; Takeyama, K.他 (1997) Science 277 : 1827-1830 ; Kitanaka, S.他 (1998) N. Engl. J. Med. 338 : 653-661 ; OMIM *213700 Cerebrotendinous xanthomatosis ; および OMIM #122700 Coumarin resistance)。チトクロームP450タンパク質アロマトラーゼの極端に高い発現レベルが、重度の女性化乳房 (女性化) を有する少年の繊維層肝細胞癌 (fibrolamellar hepatocellular carcinoma) に見られた (Agarwal, V. R. (1998) J. Clin. Endocrinol. Metab. 83 : 1797-1800)。

【0013】

チトクロームP450触媒サイクルは、NADPHチトクロームP450レダクターゼ (CPR) によるチトクロームP450の還元によって完了する。チトクロームb5およびNADPHチトクロームb5レダクターゼからなる別のミクロソーム電子伝達系は、チトクロームP450触媒サイクルへの電子の小供与体として広く見られる。しかしながら、Lamb, D. C.他 (1999 ; FEBS Lett. 462 : 283-8) による近年の研究報告から

、ミクロソームチトクロームb5/NADPHチトクロームb5レダクターゼ系によって効果的に還元され、支持され得るCandida albicansチトクロームP450 (CYP51) が確認された。従って、この別の電子供与系によって支持される多くのチトクロームP450が存在すると思われる。

【0014】

チトクロームb5レダクターゼはまた、赤血球細胞における酸化型ヘモグロビン（酸素を保持することができないメトヘモグロビン）の活性型ヘモグロビン（ferrohemoglobin）へ還元する。酸化剤即ち十分に還元されていない異常なヘモグロビン（ヘモグロビンM）が高いレベルで存在すると、メトヘモグロビン血症を引き起こされる。メトヘモグロビン血症はまた、赤血球チトクロームb5レダクターゼの先天的な欠損症からも起こり得る（Mansour, A.およびLurie, A. A. (1993) Am. J. Hematol. 42 : 7-12を参照）。

【0015】

チトクロームP450ファミリーのメンバーもまた、ビタミンDの合成および異化に密接に関係している。ビタミンDは、植物組織で生成されるエルゴカルシフェロール（ビタミンD2）および動物組織で生成されるコレカルシフェロール（ビタミンD3）の2つに生物学的に等価なプロホルモンとして存在する。後者のコレカルシフェロールは、7 - デヒドロコレステロールが近紫外線（例えば、290~310 nm）に曝露されると形成される。通常は、皮膚が短時間日光に曝されると生成される（Miller, W. L.およびPortale, A. A. (2000) Trends in Endocrinology and Metabolism 11 : 315-319を参照）。

【0016】

両方のホルモン型は更に、肝臓において酵素25 - ヒドロキシラーゼによって25 - ヒドロキシビタミンD (25(OH)D) に代謝される。25 (OH) Dは最も豊富に存在するビタミンDの前駆体であって、更に酵素25 - ヒドロキシビタミンD 1 - ヒドロキシラーゼ (1 - ヒドロキシラーゼ) によって、活性型である1,25 - ジヒドロキシビタミンD (1,25(OH)₂D) に腎臓において代謝される。1,25(OH)₂D生成の調節は主に合成経路の最終ステップで行われる。1 - ヒドロキシラーゼ活性は、酵素産物 (1,25(OH)₂D) の循環レベル、並びに副甲状腺ホルモン (PT

H)、カルシトニン、インスリン、カルシウム、リン、成長因子、およびプロラクチンのレベルを含む幾つかの生理学的因子に左右される。更に、腎臓外の1- α -ヒドロキシラーゼ活性が報告され、組織特異的かつ局所的な $1,25(OH)_2D$ 生成の調節が生物学的に重要であると考えられる。 $1,25(OH)_2D$ の24,25-ジヒドロキシビタミンD ($24,25(OH)_2D$) への触媒作用は、酵素25-ヒドロキシビタミンD24-ヒドロキシラーゼ (24-ヒドロキシラーゼ) を伴い腎臓でも起こる。24-ヒドロキシラーゼはまた、基質として25(OH)Dを利用することができる (Shinki, T.他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 : 12920-12925 ; Miller, W. L.およびPortale, A. A.、前出、を参照)。

【0017】

ビタミンD25-ヒドロキシラーゼ、 $1-\alpha$ -ヒドロキシラーゼ、および24-ヒドロキシラーゼは全て、NADPH依存性I型(ミトコンドリア)チトクロームP450酵素であって、そのファミリーの他のメンバーと高い相同性を有する。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼはまた、幅広い基質特異性を有し、胆汁酸中間体の26-ヒドロキシル化およびコレステロールの25-ヒドロキシル化、26-ヒドロキシル化、および27-ヒドロキシル化を行う (Dilworth, F. J.他 (1995) J. Biol. Chem. 270 : 16766-16774 ; Miller, W. L.およびPortale, A. A. 前出、を参照)。

【0018】

ビタミンDの活性型 ($1,25(OH)_2D$) は、カルシウムおよびリン酸の恒常性に関与し、骨髄細胞および皮膚細胞の分化を促進する。ビタミンDの代謝に関与する酵素 (例えば、 $1-\alpha$ -ヒドロキシラーゼ) の欠損によって生じるビタミンDの欠損は、低カルシウム血症、低リン酸血症、ビタミンD依存性 (感受性) くる病、骨密度の低下並びにあひる歩行を伴う内反膝およびO脚という症状を示す疾患を引き起こす。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼの欠損は、脳腱黄色腫症や、アキレス腱、脳、肺、およびその他の多くの組織におけるコレステロールおよびコレステロールの蓄積という特徴をもつ脂質貯蔵病を引き起こす。この疾患は、思春期後の小脳性運動失調症、アテローム性動脈硬化症、および白内障を含む進行性の神経障害を示す。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼの欠損がしてもくる病が起きないことから、 $25(OH)D$ 合成の別の経路が存在することが推定される (Griffin,

J. E.およびZerwekh, J. E. (1983) J. Clin. Invest. 72 : 1190-1199 ; Gambin, G. T.他 (1985) J. Clin. Invest. 75 : 954-960 ; およびW. L.およびPortale, A. A. 前出)。

【0019】

フェレドキシンおよびフェレドキシンレダクターゼは電子伝達アクセサリータンパク質であって、少なくとも1つのヒトチトクロームP450種、CYP27遺伝子によってコードされるチトクロームP450c27を支持する(Dilworth, F. J.他 (1996) Biochem. J. 320 : 267-71)。ストレプトマイセス グリセウスチトクロームP450であるCYP104D1は、大腸菌において異種と共に発現され、内在性フェレドキシンおよびフェレドキシンレダクターゼ酵素によって還元されている(Taylor, M.他 (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 263 : 838-42)。このことから、多くのチトクロームP450種が、フェレドキシン/フェレドキシンレダクターゼ対によって支持されていることが推定される。フェレドキシンレダクターゼはまた、モデル薬剤代謝系に見られ、抗腫瘍性抗生物質であるアクチノマイシンDを反応性フリーラジカル種に還元することが知られている(Flitter, W. D.およびMason, R. P. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 267 : 632-9)。

【0020】

フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)

フラビン含有モノオキシゲナーゼは、基質の通常範囲外の求核性の窒素、硫黄、およびリンのヘテロ原子を酸化する。チトクロームP450と同様に、FMOはミクロソーム酵素であってNADPHおよびO₂を用い、その基質がチトクロームP450の基質と広範に重なる。FMOは、肝臓、腎臓、および肺などの組織に分布している。

【0021】

組織特異的に発現される5つの異なった既知のFMOのアイソフォーム (FMO1、FMO2、FMO3、FMO4、およびFMO5) が哺乳動物に見られる。これらのアイソフォームは組織特異性が異なり、更に様々な化合物による阻害および反応の立体特異性等のその他の特性も異なる。FMOは、アミノ酸13個のシグネチャ配列を有し、その成分は配列のN末端の3分の2にまたがり、多くのNヒドロキシル化酵素に見られるFATGYモチーフおよびFAD結合領域を含む (Stehr, M.他 (1998) Trends Bi

ochem. Sci. 23 : 56-57 ; PRINTS FMOXYGENASE Flavin-containing monooxygenase signature)。

【0022】

特異的な反応には、求核性三級アミンのNオキシドへの酸化、二級アミンのヒドロキシルアミンおよびニトロンへの酸化、一級アミンのヒドロキシルアミンおよびオキシムへの酸化、および硫黄含有化合物およびホスフィンのS - オキシドおよびP - オキシドへの酸化が含まれる。ヒドラジン、ヨウ化物、セレン化物、および硼素含有化合物も基質である。FMOは化学的にチトクロームP450に類似しているが、FMOはその熱不安定性およびチトクロームP450の非イオン界面活性剤感受性に基づいて *in vitro* のチトクロームP450から通常は区別することができる。しかしながら、FMOのアイソフォームによって熱安定性および界面活性剤感受性が異なるため、これらの特性を区別に用いることは複雑である。

【0023】

FMOは、幾つかの薬剤および生体異物の代謝に重要な役割を果たしている。FMO (肺FMO3) は、尿中に排出される (S) ニコチンの (S) ニコチンN - 1' - オキシドへの代謝において主要な役割を果たす。FMOはまた、胃潰瘍の治療に広く用いられているH₂ - アンタゴニストであるシメチジンのS - 酸素化に関係する。FMOの肺発現型は、チトクロームP450と同じ調節制御下でない。例えば、ラットにおいて、フェノバルビタール治療によりチトクロームP450が生成されるが、FMO1は抑制される。

【0024】

FMOの内因性基質には、ジスルフィドに酸化されるシステアミンおよびトリメチルアミンN - オキシドに代謝されるトリメチルアミン (TMA) が含まれる。TMAは腐った魚のような臭いがし、FMO3アイソフォームの突然変異によって、悪臭がする遊離アミンが大量に汗、尿、および呼気から排出されるようになる。このような現象は、魚臭症候群引き起こす (OMIM 602079 Trimethylaminuria)。

【0025】

リシルオキシダーゼ

リシルオキシダーゼ (リシン6 - オキシダーゼL0) は、コラーゲンとエラスチ

ンの架橋結合による結合組織マトリクスの形成に關与する銅依存性アミノオキシダーゼである。LOは、約50 kDaのNグリコシル化前駆体タンパク質として分泌され、この前駆体も活性ではあるが、メタロプロテアーゼによって酵素の成熟型に切断される。LOの銅原子は、酸素へ電子を伝達したりその反対に酸素から電子を取り除いたりすることに関係し、これらの細胞外マトリクスタンパク質におけるリシン残基の酸化的脱アミノ反応を促進する。銅の配位がLO活性に必須であるが、食事によって銅が摂取されなくてもアポ酵素の発現はその影響を受けない。しかしながら、機能的なLOの不在は、食事による銅の欠損に關係する骨格組織および血管組織の疾患に關係する。LOはまた、様々なセミカルバジド、ヒドラジン、および亜硝酸アミノ、並びにヘパリンによって阻害される。 - アミノプロピオノニトリルは一般にインヒビターとして用いられる。LOの活性は、オゾン、カドミウム、および局所組織外傷に應答して放出されるホルモンのレベルの上昇に應答して増大する。このようなホルモンには、トランスフォーミング成長因子 - 、血小板由来成長因子、アンギオテンシンII、および線維芽成長因子等が含まれる。LO活性における異常は、メンケス症候群および後角症候群 (occipital horn syndrome) に關係する。サイトゾル型の酵素は異常な細胞増殖に關係する (Rucker, R. B.他. (1998) Am. J. Clin. Nutr. 67 : 996S-1002SおよびSmith-Mungo . L. I.およびKagan, H. M. (1998) Matrix Biol. 16 : 387-398を参照)。

【 0 0 2 6 】

ジヒドロ葉酸レダクターゼ

ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) は遍在性の酵素であって、ジヒドロ葉酸のテトラヒド葉酸へのNADPH依存性の還元を触媒する。この反応は、グリシンおよびプリンの新規の合成、並びにデオキシウリジン-リン酸 (dUMP) のデオキシチミジン-リン酸 (dTMP) への変換における重要な過程である。この基本的な反応は、7,8 - ジヒドロ葉酸 + NADPH → 5,6,7,8 - テトラヒド葉酸 + NADP⁺である。この酵素は、trimethoprimおよびメトトレキサートを含む様々なジヒドロ葉酸類似体によって阻害され得る。豊富なTMPがDNAの合成に必要であるため、迅速な細胞の分裂にはDHFR活性が必要である。DNAウイルス (例えば、ヘルペスウイルス) の複製はまた、高いレベルのDHFR活性を必要とする。そのため、DHFRを標的と

する薬剤が、DNAウイルスの複製を抑制するために癌の化学療法に用いられている（同様の理由で、チミジル酸シンターゼが標的酵素である）。DHFRを抑制する薬剤は、急激に分裂する細胞（またはDNAウイルス感染細胞）に対して細胞毒であるのが好ましいが、特異性を持たず、分裂する細胞を無差別に破壊する。更に、癌細胞は、獲得性の輸送障害または1或いは複数のDHFR遺伝子の複製の結果として、メトトレキセート等の薬剤に対して耐性を有するようになり得る（Stryer, L (1988) Biochemistry. W. H Freeman and Co., Inc. New York. pp. 511-5619）。

【0027】

アルド/ケト還元酵素

アルド/ケト還元酵素は、単量体NADPH依存性オキシドレダクターゼであって幅広い基質特異性を有する（Bohren, K. M.等 (1989) J. Biol. Chem. 264 : 9547-51）。これらの酵素は、カルボニル含有糖および芳香族化合物を含むカルボニル含有化合物の対応するアルコールへの還元を触媒する。従って、様々なカルボニル含有薬剤および生体異物はこのクラスの酵素によって代謝されると思われる。

【0028】

ファミリーメンバーであるアルドースレダクターゼによって触媒される既知の或る反応は、グルコースがソルビトールへ還元され、更にソルビトールデヒドロゲナーゼによってフルクトースに代謝される。通常の条件下で、グルコースのソルビトールへの還元は主な経路ではない。しかしながら、高血糖状態では、ソルビトールの蓄積は糖尿病合併症の発症に関係する（OMIM *103880 Aldo-keto reductase family 1, member B1）。この酵素のファミリーのメンバーはまた、或る種の肝癌で高発現される（Cao, D.他 (1998) J. Biol. Chem. 273 : 11429-35）。

【0029】

アルコールデヒドロゲナーゼ

アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）は、単純アルコールを対応するアルデヒドに酸化する。ADHはサイトゾル酵素であって、補助因子NAD⁺を好み亜鉛イオン

を結合させる。ADHのレベルは肝臓において最も高く、腎臓、肺、および胃粘膜においては低い。

【0030】

既知のADHアイソフォームは、40 kDaのサブユニットからなる二量体タンパク質である。これらのサブユニット(a、b、g、p、c)をコードする5つの既知の遺伝子座が存在し、その内の幾つかは特徴的な対立遺伝子変異体(b1、b2、b3、g1、g2)を有する。サブユニットはホモ二量体およびヘテロ二量体を形成することができ、サブユニットの構成によって活性化酵素の特異的特性が決定される。従って、ホロ酵素がクラスI(サブユニット構成、aa、ab、ag、bg、gg)、クラスII(pp)、およびクラスIII(cc)として分類される。クラスI ADHイソ酵素はエタノールおよびその他の小さい脂肪族アルコールを酸化し、ピラゾールによって阻害される。クラスIIイソ酵素は長鎖の脂肪族アルコールおよび芳香族アルコールを好み、メタノールを酸化できない。また、ピラゾールによって阻害されない。クラスIIIイソ酵素は、更に長い長鎖脂肪族アルコール(5炭素およびそれ以上)および芳香族アルコールを好み、ピラゾールによって阻害されない。

【0031】

短鎖アルコールデヒドロゲナーゼには、様々な基質特異性を有する幾つかの関連酵素が含まれる。このグループに含まれるものは哺乳動物酵素であるD - -ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、(R) - 3 - ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、15 - ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ、NADPH - 依存性カルボニルレダクターゼ、コルチコステロイド11 - -デヒドロゲナーゼ、エストラジオール - 17 - -デヒドロゲナーゼ、細菌酵素であるアセトアセチル - CoAレダクターゼ、グルコース1 - デヒドロゲナーゼ、3 - -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、20 - -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、リビトールデヒドロゲナーゼ、3 - オキソアシルレダクターゼ、2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase、ソルビトール - 6 - リン酸2 - デヒドロゲナーゼ、7 - -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、cis-1,2-dihydroxy-3,4cyclohexadiene-1-carboxylate dehydrogenase、シス - トルエンジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ、シス - ベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、ピフェニル - 2,3 - ジ

ヒドロ - 2,3 - ジオールデヒドロゲナーゼ、N-acylmannosamine 1dehydrogenase、および2 - デオキシ - D - グルコン酸3 - デヒドロゲナーゼがある (Krozowski, Z. (1994) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 51 : 125-130 ; Krozowski, Z. (1992) Mol. Cell Endocrinol. 84 : C25-31 ; およびMarks, A. R.他 (1992) J. Biol. Chem. 267 : 15459-15463)。

【0032】

UDPグルクロニルトランスフェラーゼ

UDPグルクロニルトランスフェラーゼファミリー (UGT) のメンバーは、補助因子ウリジン二リン酸 - グルクロン酸 (UDP - グルクロン酸) から基質へのグルクロン酸基の転送を触媒する。この転送は、通常は嗅覚性ヘテロ原子 (O、N、またはS) に対して行われる。基質には、フェーズI反応によって機能するようになる生体異物、並びにビリルビン、ステロイドホルモン、および甲状腺ホルモン等の内因性化合物が含まれる。グルクロン酸抱合の生成物は、基質の分子量が約250 g/mol未満であれば尿中に排泄されるが、グルクロン酸抱合された基質がそれより大きい場合は胆汁に排泄される。

【0033】

UGTは肝臓、腎臓、小腸、皮膚、脳、脾臓、および鼻粘膜のミクロソームに局在する。これらの局在化位置が、チトクロームP450酵素およびフラビン含有モノオキシゲナーゼと同じ小胞体膜の側であるため、フェーズI薬剤代謝の生成物への到達に理想的な位置である。UGTは、そのUGTを小胞体膜に固着するC末端膜貫通ドメイン、並びにそのC末端部分における約50のアミノ酸残基の保存されたシグネチャドメインを有する (Prosite PDOC00359 UDP-glycosyltransferase signature)。

【0034】

薬剤代謝に関係するUGTは、UGT1およびUGT2の2つの遺伝子ファミリーによってコードされる。UGT1ファミリーのメンバーは、補助因子結合および膜挿入に関係する定常領域および可変基質結合ドメインを有する単一の遺伝子座の選択的スプライシングによって得られる。UGT2ファミリーのメンバーは異なる遺伝子座によってコードされ、UGT2AおよびUGT2Bの2つのファミリーに分類される。2Aサブ

ファミリーは嗅上皮で発現し、2Bサブファミリーは肝臓ミクロソームで発現する。UGT遺伝子における突然変異は、高ビリルビン血症 (OMIM#143500 Hyperbilirubinemia 1)、出生児からの重度の高ビリルビン血症によって特徴付けられるクリグラー - ナジャー症候群 (OMIM#218800 Crigler-Najjar syndrome)、ギルベール病と呼ばれる軽度の高ビリルビン血症 (OMIM *191740 UGT1) に関係する。

【0035】

スルホトランスフェラーゼ

硫酸抱合は多くの同じ基質において起こり、0-グルクロン酸抱合により高水溶性の硫酸エステルが生成される。スルホトランスフェラーゼ (ST) は、補助因子3' ホスホアデノシン - 5' ホスホ硫酸 (PAPS) から基質へSO₃を転移してこの反応を触媒する。STの基質は主にフェノールおよび脂肪族アルコールであるが、抱合して対応するスルファミン酸を生成する芳香族アミンおよび脂肪族アミンも含まれる。これらの反応による生成物は主に尿中に排泄される。

【0036】

STは、肝臓、腎臓、腸管、肺、血小板、および脳を含む様々な組織に見られる。これらの酵素は、一般にサイトゾル酵素であって、多数の型が同時に発現される場合が多い。例えば、12種類を越えるSTの型がラットの肝サイトゾルに存在する。これらの生化学的に特徴付けられるSTは、それらの基質選択性に基づいて、アリアルスルホトランスフェラーゼ、アルコールスルホトランスフェラーゼ、エストロゲンスルホトランスフェラーゼ、チロシンエステルスルホトランスフェラーゼ、および胆汁酸塩スルホトランスフェラーゼの5つのクラスに分類される。

【0037】

ST酵素活性は、ラットの性別および年齢によって著しく異なる。発生の合図および性関連ホルモンとを組み合わせた効果が、ST発現プロファイルの差異並びにチトクロームP450等の他のDMEのプロファイルの差異を生じさせると考えられている。注目すべきは、ネコにおけるSTの高発現が、UDPグルクロナルトランスフェラーゼ活性のレベルの低下を部分的に補償する。

【0038】

STの幾つかの型は、ヒト肝サイトゾルから精製されクローニングされた。熱安定性および基質選択性が異なった2つのフェノールスルホトランスフェラーゼが存在する。熱安定酵素は、パラニトロフェノール、ミノキシジル、およびアセトアミノフェン等のフェノールの硫酸化を触媒し、熱不安定酵素は、ドーパミン、エピネフリン、およびlevadopa等のモノアミン基質を好む。その他のクローニングされたSTには、エストロゲンスルホトランスフェラーゼおよびN - アセチルグルコサミン - 6 - 0 - スルホトランスフェラーゼが含まれる。この最後の酵素は、細胞生化学におけるSTのその他の重要な役割を示す。即ち、細胞分化およびプロテオグリカンの成熟に重要となり得る炭化水素基質の修飾である。実際に、スルホトランスフェラーゼの先天性の異常は、成熟した硫酸ケラタンプロテオグリカンの合成不良という特徴をもつ障害である斑状角膜変性症に関係する (Nakazawa, K.他 (1984) J. Biol. Chem. 259 : 13751-7 ; OMIM *217800 Macular dystrophy, corneal)。

【0039】

ガラクトシルトランスフェラーゼ

ガラクトシルトランスフェラーゼは、溶液に遊離している糖脂質または糖タンパク質の一部であるN末端アセチルグルコサミン (GlcNAc) オリゴ糖鎖にガラクトース (Gal) を転移するグリコシルトランスフェラーゼのサブセットである (Kolbinger, F.他 (1998) J. Biol. Chem. 273 : 433-440 ; Amado, M.他 (1999) Biochim. Biophys. Acta 1473 : 35-53)。ガラクトシルトランスフェラーゼは細胞表面で見出された可溶性細胞外タンパク質であり、ゴルジ体にも存在する。

1,3 - ガラクトシルトランスフェラーゼは、Gal (1-3)GlcNAc結合を有するI型炭化水素鎖を形成する。既知のヒトおよびマウス 1,3 - ガラクトシルトランスフェラーゼは、短いサイトゾルドメイン、1つの膜貫通ドメイン、および8つの保存された領域を有する触媒ドメインを有すると考えられる (Kolbinger, F., 前出および Hennes, T.他 (1998) J. Biol. Chem. 273 : 58-65)。マウスUDP - ガラクトースである - N - アセチルグルコサミン 1,3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ - Iの領域1がアミノ酸残基の78 - 83、領域2がアミノ酸残基の93 - 102、領域3がアミノ酸残基116 - 119、領域4がアミノ酸残基1

47-158、領域5がアミノ酸残基の172-183、領域6がアミノ酸残基の203-206、領域7がアミノ酸残基の236-246、領域8がアミノ酸残基の264-275に位置する。マウスUDP-ガラクトース内に見られる配列の変異体である β -N-アセチルグルコサミン 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ-1の領域8が、細菌ガラクトシルトランスフェラーゼにも見られることから、この配列がガラクトシルトランスフェラーゼ配列モチーフを決定すると考えられる (Hennet, T. 前出)。近年の研究により、brainiacタンパク質が 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼであると報告された (Yuan, Y.他(1997) Cell 118:9-11; およびHennet, T. 前出)。

【0040】

UDP-GalであるGlcNAc-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (β -1,4-GalT) (Sato, T.他 (1997) EMBO J. 16: 1850-1857) が、Gal(1-4)GlcNAc結合を有するII型炭化水素鎖の形成を触媒する。1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの場合と同様に、可溶型の酵素が、膜結合型の切断によって形成される。1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼに保存されているアミノ酸には、ジスルフィド結合によって連結された2つのシステイン残基および触媒ドメインにおける推定上のUDP-ガラクトース結合部位が含まれる (Yadav, S.およびBrew, K. (1990) J. Biol. Chem. 265:14163-14169; Yadav, S. P.およびBrew, K. (1991) J. Biol. Chem. 266:698-703; およびShaper, N. L.他(1997) J. Biol. Chem. 272:31389-31399)。1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、糖タンパク質または糖脂質上に炭化水素鎖を合成するのに加えて、いくつかの特定の役割を有する。哺乳動物において、 α -ラクトアルブミンを有するヘテロ二量体の一部として1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼが、乳汁分泌哺乳動物の乳汁の生成に作用する。精子の表面上の1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、卵を特異的に認識する受容体として働く。細胞表面1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼはまた、細胞接着、細胞/基底板相互作用、正常な細胞遊走、および転移性細胞遊走に作用する (Shur, B. (1993) Curr. Opin. Cell Biol. 5:854-863; およびShaper, J. (1995) Adv. Exp. Med. Biol. 376:95-104)。

【0041】

グルタチオンSトランスフェラーゼ

グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)によって触媒される基本的な反応は、還元型グルタチオン(GSH)と求電子体の抱合である。GSTはホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質であって、主にサイトゾルに局在化するが、ある程度の活性がミクロソームにも見られる。主なイソ酵素は、共通の構造および触媒特性を有し、ヒトにおいてそれらは、主に、 μ 、およびの4つのクラスに分類される。2つの最も大きなクラスである μ および μ は、それぞれのタンパク質等電点 (μ はpIが7.5 - 9.0まで、 μ はpIが6.6まで) によって同定される。それぞれのGSTは、GSHに対する共通の結合部位および可変性疎水性結合部位を有する。それぞれのイソ酵素における疎水性結合部位は、特定の求電子性基質に対して特異的である。GST内の特定のアミノ酸残基が、これらの結合部位および触媒活性に重要であるとして同定された。残基Q67、T68、D101、E104、およびR131は、GSHの結合に重要である (Lee, H-C他 (1995) J. Biol. Chem. 270:99-109)。残基R13、R20、およびR69はGSTの触媒活性に重要である (Stenberg G他(1991) Biochem. J. 274:549-55)。

【0042】

殆どの場合、GSTは、潜在的な変異誘発性および発癌性の化学物質を不活性化し解毒するなど好都合に作用する。しかしながら、場合によってはそれらの作用が有害なもので、化学物質を活性化させて変異誘発性および発癌性にし得る。ラットおよびヒトGSTの或る型は、発癌の検出を助ける信頼性の高い新生物発生前マーカーとなる。変異誘発性を調べるための良く知られたエイムス試験に用いられるサルモネラチフィウムなどの細菌株におけるヒトGSTの発現は、変異誘発におけるこれらの酵素の役割を決定するのに役立つ。マウスにおいて肝腫瘍を引き起こすdihalomethanesは、GSTによって活性化されると考えられている。この考えは、dihalomethanesが非感染細胞よりもヒトGSTを発現する細菌細胞において突然変異誘発性が高いということから支持される(Thier, R.他 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8567-80)。二臭化エチレンおよび二塩化エチレンの変異誘発性が、ヒト GST, A1 - 1を発現する細菌細胞において上昇し、アフラトキシンB1の変異誘発がGSTの発現が促進されることで実質的に減少する (Simula,

T. P.他(1993) Carcinogenesis 14:1371-6)。従って、GST活性の制御が、変異誘発および発癌の制御において有用であろう。

【0043】

GSTは、多剤耐性(MDR)として知られる多くの癌の薬剤治療に対する耐性獲得に関係する。MDRは、シクロホスファミドなどの細胞毒で治療を受けた癌患者に起こり、その薬剤に対する耐性を有するようになった後、更にその他の様々な細胞毒に対しても耐性を有するようになる。GSTレベルの上昇は、これらの薬剤耐性癌に関係し、薬剤に反応してGSTレベルが上昇した後、GSTによって触媒されたGSH抱合反応によりその薬剤が不活化されると考えられる。次に上昇したGSTレベルにより癌細胞がその他のGSTに結合する細胞毒から保護される。腫瘍におけるA1-1のレベルの上昇は、シクロホスファミド治療によって生じた薬剤耐性に関する(Dirven H. A.他(1994) Cancer Res. 54:6215-20)。従って、癌組織におけるGST活性の調節は、癌患者のMDR治療に有用であろう。

【0044】

- グルタミルトランスぺプチダーゼ

- グルタミルトランスぺプチダーゼは広範に発現する酵素であって、 - グルタミルアミド結合を切断して細胞外のグルタチオン(GSH)の分解を開始させる。GSHの分解は、生合成経路のためにシステインが集まった領域を細胞に提供する。 - グルタミルトランスぺプチダーゼはまた、細胞の酸化防止に寄与し、その発現は酸化ストレスによって引き起こされる。細胞表面局在糖タンパク質は、癌細胞において高いレベルで発現される。研究により、癌細胞の表面における - グルタミルトランスぺプチダーゼの高レベルの活性が、プロドラッグの活性化に利用され、抗癌治療薬が局所的に高いレベルで蓄積され得る(Hanigan, M. H. (1998) Chem. Biol. Interact. 111-112:333-42; Taniguchi, N.およびIkeda, Y. (1998) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 72:239-78; Chikhi, N. 他(1999) Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 122:367-80)。

【0045】

アシルトランスフェラーゼ

N - アシルトランスフェラーゼ酵素は、アミノ酸抱合体の活性化カルボキシル

基への転移を触媒する。内因性化合物および生体異物は、サイトゾル、ミクロソーム、およびミトコンドリアにおけるアシル-CoAシンセターゼによって活性化される。次に、アシル-CoA中間体は、サイトゾルまたはミトコンドリアにおけるN-アシルトランスフェラーゼによってアミノ酸（通常はグリシン、グルタミン、またはタウリンであるが、オルニチン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、アスパラギン酸、およびいくつかのジペプチドを含む）と抱合し、アミド結合を有する代謝産物を形成する。この反応は、O-グルクロン酸抱合に相補的であるが、アミノ酸抱合では、グルクロン酸抱合によって生じる場合が多い反応性および毒性の代謝産物を生成されない。

【0046】

胆汁酸-CoAであるアミノ酸N-アシルトランスフェラーゼ（BAT）は、このクラスの良く特徴づけられた酵素の1つである。BATは、腸管において界面活性剤として作用する胆汁酸抱合体の生成に関係する(Falany, C. N.他 (1994) J. Biol. Chem. 269:19375-9; Johnson, M. R.他 (1991) J. Biol. Chem. 266:10227-33)。BATはまた、部分肝切除の後の肝臓癌患者の予後の予測マーカーとして有用である(Furutani, M.他(1996) Hepatology 24:1441-5)。

【0047】

アセチルトランスフェラーゼ

アセチルトランスフェラーゼは、ヒストンのアセチル化におけるその役割について徹底的に研究された。ヒストンのアセチル化により、真核細胞におけるクロマチン構造が弛緩し、それによって転写因子が、ゲノムの影響を受けた領域（またはゲノム全体）におけるDNAの鋳型のプロモータエレメントに到達できるようになる。これとは対照的に、ヒストンの脱アセチル化により、クロマチン構造が閉じ転写因子への到達が制限されて転写物が減少する。この最後に、ヒストンの脱アセチル化を阻害する化学薬品（例えば、酪酸ナトリウム）を細胞転写の刺激の一般的な手段として用いると、人為的結果であるが遺伝子発現が全体的に上昇する。アセチル化による遺伝子発現の調節はまた、限定するものではないが、p53、GATA-1、MyoD、ACTR、TFII E、TFII F、および高移動タンパク質を含むその他のタンパク質のアセチル化によっても行うことができる。p53の場合、アセチル

化によりDNAへの結合が増大し、p53によって調節される遺伝子の転写が刺激される。プロトタイプヒストンアセチラーゼ(HAT)は、サッカロミセス セレビジエに由来するGcn5である。Gcn5は、テトラヒメナp55、ヒトGcn5、およびヒトp300/CBPを含むアセチラーゼのファミリーメンバーである。ヒストンのアセチル化については文献(Cheung, W. L.他(2000) Current Opinion in Cell Biology 12:326-333およびBerger, S. L(1999) Current Opinion in Cell Biology 11:336-341)を参照されたい。ある種のアセチルトランスフェラーゼ酵素は、限定するものではないが、アセチルコリンエステラーゼおよびカルボキシルエステラーゼを含む幾つかの他の酵素の主なクラスに一般的である / ヒドロラーゼフォールド(/ hydrolase fold)(Center of Applied Molecular Engineering Inst. of Chemistry and Biochemistry University of Salzburg, <http://predict.sanger.ac.uk/irbm-course97/Docs/ms/>)を有する(Structural Classification of Proteins, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>)。

【0048】

N - アセチルトランスフェラーゼ

芳香族アミンおよびヒドラジン含有化合物は、肝臓およびその他の組織のN - アセチルトランスフェラーゼ酵素によってNアセチル化される。ある種の生体異物は、同じ酵素によってある程度0アセチル化される。N - アセチルトランスフェラーゼは、補助因子アセチル - 補酵素A(アセチル - CoA)を用いて2つのステップでアセチル基を転移するサイトゾル酵素である。第1のステップでは、アセチル基がアセチル - CoAから活性部位システイン残基に転移され、第2のステップでアセチル基が基質アミノ基に転移され酵素が再生される。

【0049】

他のほとんどのDMEクラスとは対照的に、既知のN - アセチルトランスフェラーゼの数が少ない。ヒトの場合、2つの高度に類似した酵素であるNAT1およびNAT2が存在し、マウスには第3型酵素であるNAT3が存在する。N - アセチルトランスフェラーゼのヒト型は、独立した調節(NAT1は広範に発現されるが、NAT2は肝臓および臓器のみに発現される)および重複した基質特異性を有する。両方の酵素はある程度までほとんどの基質を受容するが、NAT1はある種の基質(パラアミノ

安息香酸、パラアミノサリチル酸、スルファメトキサゾール、およびスルファニルアミド)を好み、一方NAT2は他の基質(イソニアジド、ヒドララジン、プロカインアミド、ダブソン、アミノグルテチミド、およびスルファメチアジン)を好む。

【0050】

1950年代に、抗結核薬であるイソニアジドを投与された患者の臨床試験から、化合物のアセチル化が速い人(rapid acetylator)および遅い人(slow acetylator)が報告された。これらの表現型は後に、酵素の活性または安定性に影響を与えるNET2遺伝子における突然変異によることが示された。イソニアジドのアセチル化が遅い表現型が、中東の集団に優性(約70%)であり、白人ではやや劣り(約50%)、アジアの集団では25%未満である。近年になって、NET1における機能的な多型が検出され、検査を受けた集団の約8%が、アセチル化が遅い表現型を有する(Butcher, N. J.他(1998) Pharmacogenetics 8:67-72)。NAT1がある種の既知の芳香族アミン発癌物質を活性化することができるため、広範に発現されるNAT1酵素における多型が癌のリスクの決定に重要であると考えられる(OMIM *108345 N-acetyltransferase1)。

【0051】

アミノトランスフェラーゼ

アミノトランスフェラーゼは、ピリドキサル5'-リン酸(PLP)依存性酵素のファミリーを含み、アミノ酸のトランスフォーメーションを触媒する。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AspAT)は最も研究されたPLP含有酵素である。AspATは、ジカルボキシルL-アミノ酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸、および対応する2-オキソ酸、オキサロ酢酸、および2-オキソグルタル酸の可逆的なアミノ基転移反応を触媒する。このファミリーの他のメンバーには、推定アミノトランスフェラーゼ、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、チロシンアミノトランスフェラーゼ、芳香族アミノトランスフェラーゼ、アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(AGT)およびキヌレニンアミノトランスフェラーゼが含まれる(Vacca, R. A.他(1997) J. Biol. Chem. 272:21932-21937)。

【0052】

原発性高シュウ酸尿症I型は、常染色体性劣性疾患であって、肝特異的ペルオキシソーム酵素であるアラニン - グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ - 1の欠損が起こる。この疾患の表現型は、グリオキシル酸代謝の欠損である。AGTが存在しない場合、グリオキシル酸はグリシンに転移されるのではなく、シュウ酸に酸化される。その結果、腎臓および尿管に不溶性カルシウムシュウ酸が蓄積し、最終的に腎不全が起こる(Lumb, M. J. 他 (1999) J. Biol. Chem. 274 : 20587-20596)。

【0053】

ヌレニンアミノトランスフェラーゼは、L - トリプトファン代謝産物L - キヌレニンの不可逆的なアミノ転移を触媒してキヌレニン酸を形成する。この酵素はまた、L - 2 - アミノアジピン酸から2 - オキソグルタル酸およびその逆への可逆的なアミノ基転移反応を触媒して2 - oxoadipateおよびL - グルタミン酸を生成し得る。キヌレニン酸は、グルタミン酸作動性神経伝達の推定上のモジュレーターであるため、キヌレニンアミノトランスフェラーゼの欠損がpleiotropic効果に関係すると思われる(Buchli, R. 他 (1995) J. Biol. Chem. 270:29330-29335)。

【0054】

カテコール - O - メチルトランスフェラーゼ

カテコール - O - メチルトランスフェラーゼ (COMT) は、カテコール基質における1つのヒドロキシル基 (例えば、レボドパ、ドーパミン、またはDBA) へのS - アデノシル - L - メチオニン (AdoMet; SAM) 供与体のメチル基の転移を触媒する。3' - ヒドロキシル基のメチル化は4' - ヒドロキシル基のメチル化より優先され、COMTの膜結合アイソフォームが可溶性よりも位置特異的である。この酵素の可溶性の翻訳は、完全長mRNA (1.5kb) の内部の開始コドンの利用によるか、或いは内部のプロモータから転写された短いmRNA (1.3kb) の翻訳による。提案されたS_N2様メチル化反応には、Mg²⁺が必要であり、Ca²⁺によって抑制される。供与体および基質のCOMTへの結合が連続的に起こる。まず、AdoMetがMg²⁺非依存的にCOMTに結合し、Mg²⁺の結合およびカテコール基質の結合がそれに続く。

【0055】

組織におけるCOMTの量は活性のために通常必要とされる量より多く存在するため阻害が困難である。しかしながら、インヒビターがin vitroでの使用(例えば、没食子酸、トロポロン、U-0521、および3', 4'-dihydroxy-2-methyl-propionetropolone)および臨床での使用(例えば、nitrocatechol系化合物およびtolcapone)のために開発された。これらのインヒビターを投与すると、レボドパの半減期が長くなり、続いてドーパミンの生成が起こる。COMTの阻害により、エピネフリン/ノルエピネフリン、イソプレナリン、リミテロール、ドブタミン、fenoldopam、アポモルフィン、およびメチルドパを含む他の様々なカテコール構造化合物の半減期が長くなると思われる。ノルエピネフリンの欠損は臨床的抑鬱症に繋がるため、COMTインヒビターの使用は抑鬱性の治療に有用であると思われる。COMTインヒビターは通常、副作用が最小限であり、最終的に肝臓で代謝され、体内にはわずかな代謝物が残るのみである(Mannisto, P. T.およびKaakkola, S. (1999) Pharmacological Reviews 51:593-628)。

【0056】

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼはコンパクトな二量体金属酵素であって、酸化的な傷害に対する細胞防御に関係する。この酵素は1つの亜鉛原子および1つの銅原子を各サブユニットに含み、スーパーオキシドアニオンの O_2^- および H_2O_2 への不均化反応を触媒する。この不均化反応の速度は、拡散を制限し、後に基質と酵素活性部位との間の好ましい静電的相互作用によって促進される。この酵素のクラスの例が、全ての真核細胞の細胞質において同定され、或る細菌種の周辺質でも同定された。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼは元気のいい酵素であって、蛋白分解に高い耐性を有し、尿素およびSDSによって変性される。この酵素のコンパクトな構造に加えて、金属イオンおよび内部サブユニットのジスルフィド結合が酵素の安定性に寄与していると考えられている。酵素は70もの高温でも可逆的に変性される(Battistoni, A.他(1998) J. Biol. Chem. 273:5655-5661)。

【0057】

スーパーオキシドジスムターゼの過剰な発現は、遺伝子組み換えアルファルフ

アの耐凍性を高めるのに関係しており、ジフェニルエーテル除草剤である acifluorfen などの環境毒に対する耐性を与える (McKersie, B. D. 他 (1993) Plant Physiol. 103:1155-1163)。加えて、酵母細胞が過酸化水素への暴露の後に解凍融解損傷に対する耐性が高まる。これは、曝露によるスーパーオキシドジスムターゼの発現のアップレギュレートにより、酵母細胞が更なる過酸化ストレスに適応するようになるためである。この研究により、酵母スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の突然変異は、冷凍保存過程を経て生物が存在するか否かを決定するのに重要であると長い間考えられていたグルタチオン代謝の調節に影響を及ぼす突然変異よりも、冷凍融解耐性に悪影響を与える (Jong-In Park, J-I. 他 (1998) J. Biol. Chem. 273:22921-22928)。

【0058】

スーパーオキシドジスムターゼの発現はまた、結核を引き起こす生物である結核菌に関連する。スーパーオキシドジスムターゼは、結核菌によって排泄される10の主なタンパク質の内の1つであり、酸化ストレスに応じてその発現が約5倍アップレギュレートされる。結核菌は、非病原性ミコバクテリア *M. smegmatis* よりスーパーオキシドジスムターゼをほぼ2桁多く発現し、極めて高い割合で発現酵素を分泌する。この結果、結核菌によって *M. smegmatis* よりも最大350倍多い酵素を分泌し、酸化ストレスに対する実質的な耐性を与える (Harth, G. および Horwitz, M. A. (1999) J. Biol. Chem. 274:4281-4292)。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼの発現の低下、並びに抗酸化能力を有するその他の酵素の発現の低下は初期の癌に関係する。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼの発現レベルは、正常な前立腺組織と比べ前立腺の上皮新生物および前立腺癌において低い (Bostwick, D. G. (2000) Cancer 89:123-134)。

【0059】

ホスホジエステラーゼ

ホスホジエステラーゼは、ホスホジエステル化合物の2つのエステル結合の一方の加水分解を触媒する酵素のクラスを構成する。従って、ホスホジエステラーゼは様々な細胞プロセスにとって重要である。ホスホジエステラーゼには、細胞増殖および複製に必須であるDNAおよびRNAのエンドヌクレアーゼおよびエクソヌ

クラーゼや、DNAのトポロジ再編成中の核酸鎖の分解および再形成をするトポイソメラーゼが含まれる。Tyr - DNAホスホジエステラーゼは、トポイソメラーゼI型およびDNAとの間に形成された行き止まり共有結合中間体を加水分解することでDNAの修復に作用する (Pouliot, J. J.他(1999) Science 286:552-555; Yang, S.-W. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11534-11539)。

【0060】

酸性スフィンゴミエリナーゼは、膜リン脂質スフィンゴミエリンを加水分解してセラミドおよびホスホリルコリンを生成するホスホジエステラーゼである。ホスホリルコリンは、様々な細胞内シグナル伝達経路に關与するホスファチジルコリンの合成に用いられ、一方のセラミドは神経組織に高濃度で見られる膜脂質であるガングリオシドの生成のための必須前駆体である。酸性スフィンゴミエリナーゼが欠損すると、イソソームにおいてスフィンゴミイリ分子が蓄積され、それによってニーマン - ピック病が引き起こされる (Schuchman, E. H.およびS. R. Miranda (1997) Genet. Test. 1:13-19)。

【0061】

グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼ (glycerophosphoryl diester phosphodiesterase) (グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼとも呼ばれる) は、ジアセチル化リン脂質グリセロホスホジエステル (deacetylated phospholipid glycerophosphodiester) を加水分解してsn - グリセロール - 3 - リン酸およびアルコールを生成するホスホジエステラーゼである。グリセロホスホコリン、グリセルホスホエタノールアミン (glycerophosphoethanolamine)、グリセロホスホグリセロール (glycerophosphoglycerol)、およびグリセロホスホイノシトール (glycerophosphoinositol) は、グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼのための基質の例である。大腸菌由来のグリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼは、グリセロホスホジエステル (glycerophosphodiester) 基質に対して広範な特異性を有する (Larson, T. J.他(1983) J. Biol. Chem. 248:5428-5432)。

【0062】

サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) は、サイクリックヌ

クレオチドcAMPおよびcGMPの調節に極めて重要な酵素である。cAMPおよびcGMPは、ホルモン、光、および神経伝達物質を含む様々な細胞外シグナルを伝達する細胞内セカンドメッセンジャーとして機能する。PDEはサイクリックヌクレオチドをそれらの対応する一リン酸に分解し、それによってサイクリックヌクレオチドの細胞内濃度およびシグナル伝達におけるそれらの効果を調節する。それらの役割がシグナル伝達の制御因子であることから、PDEは化学療法の標的として大規模に研究された (Perry, M. J.およびG. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481 ; Torphy, J. T. (1998) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 157:351-370)。

【0063】

哺乳動物PDEのファミリーは、それらの基質特異性および親和性、補助因子に対する感受性、および抑制剤に対する感受性に基づいて分類される (Beavo, J. A. (1995) *Physiol. Rev.* 75:725-748; Conti, M.他(1995) *Endocrine Rev.* 16:370-389)。これらのファミリーのいくつかは、固有の遺伝子を含み、その多くは様々な組織でスプライスバリエーションとして発現される。PDEファミリーの中には、多数のイソ酵素およびこれらのイソ酵素の多数のスプライスバリエーションが存在する (Conti, M.およびS.-L. C. Jin (1999) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63:1-38)。多数のPDEファミリー、イソ酵素、およびスプライスバリエーションの存在は、サイクリックヌクレオチドを伴う調節経路の多様性および複雑性を示すものである (Houslay, M. D.およびG. Milligan (1997) *Trends Biochem. Sci.* 22:217-224)。

【0064】

PDE1型 (PDE1) はCa²⁺ / カルモジュリン依存性であって、それぞれが少なくとも2つの異なるスプライスバリエーションを有する少なくとも3つの異なる遺伝子によってコードされると思われる (Kakkar, R. 他. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* 55:1164-1186)。PDE1は、肺、心臓、および脳で見出された。ある種のPDE1イソ酵素は、*in vitro*でリン酸化 / 脱リン酸化によって調節される。これらのPDE1イソ酵素のリン酸化すると、カルモジュリンに対するこの酵素の親和性が低下し、PDE活性が低下し、cAMPのレベルが安定する (Kakkar, 前出)。PDE1は、PDE

1がサイクリックヌクレオチドおよびカルシウムのシグナル伝達の両方に関与することによる中枢神経系および心血管、免疫系の疾患のための有用な治療標的を提供し得る (Perry, M. J.およびG. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481)。

【0065】

PDE2は、小脳、新皮質、心臓、腎臓、肺、肺動脈、および骨格筋に見られるcGMP刺激PDE (cGMP-stimulated PDE) である (Sadhu, K.他(1999) *J. Histochem. Cytochem.* 47:895-906)。PDE2は、カテコールアミン分泌におけるcAMPの効果を仲介し、アルドステロンの調節に関与し (Beavo, 前出)、更に嗅覚シグナル伝達においても役割を果たしていると思われる (Juilfs, D. M.他(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3388-3395)。

【0066】

PDE3はcGMPおよびcAMPの両方に対して高い親和性を有するため、これらのサイクリックヌクレオチドがPDE3の競合的基質 (competitive substrate) として作用する。PDE3は、心筋の収縮の刺激、血小板凝集の抑制、血管および気道の平滑筋の弛緩、Tリンパ球および血管平滑筋培養細胞の増殖抑制、脂肪組織からのカテコールアミン誘導性遊離脂肪酸放出の調節に作用する。ホスホジエステラーゼのPDE3ファミリーは、cilostamide、enoximone、およびlixazinoneなどの特定のインヒビターに対する感受性を有する。PDE3のイソ酵素は、cAMP依存性プロテインキナーゼまたはインスリン依存性キナーゼによって抑制され得る (Degerman, E.他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:6823-6826)。

【0067】

PDE4はcAMPに特異的であって、気道平滑筋、血管上皮、および全ての炎症細胞に局在化し、cAMP依存性リン酸化によって活性化され得る。cAMPのレベルの上昇によって、炎症細胞の活性が抑制され気管平滑筋が弛緩し得るため、PDE4は、喘息治療の発見に重点をおいて新規の抗炎症剤の可能性のある標的として広範に研究された。PDEインヒビターは、喘息、慢性塞栓性肺疾患、およびアトピー性湿疹の治療薬として臨床試験が行われている。PDE4の既知の4つ全てのイソ酵素は、マウスの行動記憶を改善することが分かっている化合物であるインヒビ

ターロリブラムに対して感受性が高い (Barad, M.他(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15020-15025)。PDE4インヒビターもまた、急性肺傷害、内毒素血症、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、および様々な神経や胃腸の疾患に対する可能性のある治療薬として研究された (Doherty, A. M. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3:466-473)。

【0068】

PDE5は、基質としてのcGMPに対して高い選択性を有し (Turko, I. V.他(1998) Biochemistry 37:4200-4205)、2つのアロステリックcGMP特異的結合部位を有する (McAllister-Lucas, L. M. 他. (1995) J. Biol. Chem. 270:30671-30679)。cGMPのこれらのアロステリック結合部位への結合は、触媒活性の直接的な調節よりもcGMP依存性プロテインキナーゼによるPDE5のリン酸化にとって重要であると思われる。PDE5が高いレベルで、血管平滑筋、血小板、肺、および腎臓に見られる。インヒビターザプリナストはPDE5およびPDE1に対して効果がある。PDE5に対する特異性を得るためにザプリナストを改良してsildenafilを生成した (VIAGRA; Pfizer, Inc., New York NY)。このsildenafilは男性勃起不全の治療薬である (Terrett, N. 他. (1996) Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:1819-1824)。PDE5のインヒビターは、心血管治療薬として現在研究されている (Perry, M. J. およびG. A. Higgs (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2:472-481)。

【0069】

光受容体サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼであるPDE6は、光伝達カスケードの重要な要素である。PDE6はGタンパク質トランスデュースンと結合して、cGMPを加水分解して光受容体膜におけるcGMP作動性陽イオンチャンネルを調節する。cGMP結合活性部位に加えて、PDE6はまた、PDE6の機能における調節的な役割を果たすと考えられる2つの高親和性cGMP結合部位を有する (Artemyev, N. O.他(1998) Methods 14:93-104)。PDE6の欠損は網膜の疾患に関係する。rdマウスの網膜変性症 (Yan, W.他(1998) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:2529-2536)、ヒトの常染色体性劣性色素性網膜炎 (Danciger, M.他(1995) Genomics 30:1-7)、およびアイリッシュセッター犬の杆状体/錐状体異形成1型 (Suber, M. L.他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3968-3972) は、PDE6B遺伝子に

おける突然変異が原因である。

【0070】

PDEのPDE7ファミリーは、複数のスプライスバリエーションを有する唯一つの既知のメンバーから成る (Bloom, T. J.およびJ. A. Beavo (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14188-14192)。PDE7はcAMP特異的であるが、その他の生理的機能については殆ど知られていない。PDE7をコードするmRNAが骨格筋、心臓、脳、肺、腎臓、および膵臓で見られるが、PDE7タンパク質の発現は特定の組織型に限定される (Han, P.他(1997) J. Biol. Chem. 272:16152-16157; Perry, M. J.およびG. A. Higgs (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2:472-481)。PDE7はPDE4ファミリーに密接に関連するが、PDE4の特異的なインヒビターであるロリプラムによって阻害されない (Beavo, 前出)。

【0071】

PDE8はcAMP特異的であり、PDE4ファミリーに密接に関連する。PDE8は、甲状腺、精巣、眼、肺、骨格筋、心臓、腎臓、卵巣、および脳において発現される。PDE8のcAMP加水分解活性は、PDEのインヒビターであるロリプラム、ビンボセチン、ミルリノン、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン)、またはザプリナストによって抑制されないが、PDE8はジピリダモールによって抑制される (Fisher, D. A.他(1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 246:570-577; Hayashi, M.他(1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 250:751-756; Soderling, S. H.他(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8991-8996)。

【0072】

PDE9はcAMP特異的であって、PDEのPDE8ファミリーに最も類似している。PDE9は腎臓、肺、肝臓、脳、脾臓、および小腸で発現される。PDE9はsildenafil (VIA GRA; Pfizer, Inc., New York NY)、ロリプラム、ビンボセチン、ジピリダモール、またはIBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン) によって抑制されないが、PDE5インヒビターであるザプリナストに対して感受性を有する (Fisher, D. A.他(1998) J. Biol. Chem. 273:15559-15564; Soderling, S. H.他(1998) J. Biol. Chem. 273:15553-15558)。

【0073】

PDE10は二重基質 (dual-substrate) PDEであって、cAMPおよびcGMPの両方を加水分解する。PDE10は、脳、甲状腺、および精巣で発現される (Soderling, S. H.他(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:7071-7076; Fujishige, K.他(1999) J. Biol. Chem. 274:18438-18445; Loughney, K.他(1999) Gene 234:109-117)。

【0074】

PDEは、約270 - 300のアミノ酸の触媒ドメイン、および補助因子の結合に必要なN末端調節ドメインを含み、場合によっては機能が未知の親水性C末端ドメインを含む (Conti, M. およびS.-L. C. Jin (1999) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 63:1-38)。保存された推定上の亜鉛結合モチーフであるHDXXHXGX_nが、全てのPDEの触媒ドメインにおいて同定された。N末端調節ドメインは、PDE2、PDE5、およびPDE6における非触媒cGMP結合ドメイン、PDE1におけるカルモジュリン結合ドメイン、およびPDE3およびPDE4におけるリン酸化部位を含むドメインを有する。PDE5では、N末端cGMP結合ドメインが約380のアミノ酸残基にまたがり、保存された配列モチーフN(R/K)_nFX₃DEのタンデムリピートを含む (McAllister-Lucas, L. M.他(1993) J. Biol. Chem. 268:22863-22873)。NKX_nDモチーフは変異誘発によって見られ、cGMP結合に重要である (Turko, I. V.他(1996) J. Biol. Chem. 271:22240-22244)。PDEファミリーは、触媒ドメイン内において約30%のアミノ酸同一性を有するが、同じファミリー内のイソ酵素は通常約85から95%のこの領域における同一性を示す (例えばPDE4AとPDE4B)。更に、あるファミリー内の触媒ドメイン外の類似性は高いが (60%を超える)、ファミリー間のこのドメイン外の配列類似性は殆ど存在しない。

【0075】

免疫反応および炎症反応を構成する作用の多くは、細胞内のcAMPのレベルを上昇させる薬剤によって阻害される (Verghese, M. W.他(1995) Mol. Pharmacol. 47:1164-1171)。様々な疾患がPDE活性の上昇が原因で起こり、サイクリックヌクレオチドのレベルの低下に関係する。例えば、マウスにおける尿崩症の或る型はPDE4活性の上昇に関係し、低K_mcAMP PDE活性の上昇がアトピー患者の白血球に見られ、PDE3が心疾患に関連する。

【0076】

PDEの多くのインヒビターが同定され、臨床試験が行われている (Perry, M. J. および G. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481; Torphy, T. J. (1998) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:351-370)。PDE3インヒビターは、血小板凝集阻止薬、血圧降下薬、および鬱血性心不全の治療に有用な強心薬として開発された。PDE4インヒビターであるロリプラムは、抑鬱症の治療に用いられ、PDE4のその他のインヒビターは抗炎症薬として評価が行われている。ロリプラムはまた、*in vitro*でHIV-1の複製を促すことが認められたリポ多糖(LPS)誘導性TNF-aを阻害することが分かった。従って、ロリプラムはHIV-1の複製を阻害すると考えられる (Angel, J. B.他(1995) *AIDS* 9:1137-1144)。更に、ロリプラムが、TNF-a、TNF-b、およびインターフェロン γ などのサイトカインの生成を抑制する能力に基づいて脳髄膜炎の治療に有効であることが示された。ロリプラムはまた、遅発性ジスキネジアに有効であると考えられ、実験動物モデルにおける多発性硬化症の治療に効果があった (Sommer, N.他(1995) *Nat. Med.* 1:244-248 ; Sasaki, H.他(1995) *Eur. J. Pharmacol.* 282:71-76)。

【0077】

テオフィリンは、気管支喘息およびその他の呼吸器疾患の治療に用いられる非特異的PDEインヒビターである。テオフィリンは、気道平滑筋の機能に作用し、呼吸器疾患の治療における抗炎症能力即ち免疫調節能力があると考えられる (Banner, K. H.およびC. P. Page (1995) *Eur. Respir. J.* 8:996-1000)。ペントキシフィリンは、間欠性跛行および糖尿病性末梢血管疾患の治療に用いられる別の非特異的PDEインヒビターである。ペントキシフィリンはまた、TNF-aの生成を阻止し、HIV-1の複製を阻害し得る (Angel他, 前出)。

【0078】

PDEは、様々な細胞型の細胞増殖に影響を与え (Conti他(1995) *Endocrine Rev.* 16:370-389)、様々な癌に関係すると報告された。前立腺癌細胞株DU145およびLNCaPの成長は、cAMP誘導体およびPDEインヒビターの送達によって抑制された (Bang, Y. J.他(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5330-5334)。これらの細胞はまた、上皮からニューロン形態への表現型における永久的な変換を示し

た。また、PDEインヒビターがメサングウム細胞の増殖を調節する可能性があり (Matousovic, K.他(1995) J. Clin. Invest. 96:401-410)、またリンパ球の増殖を調節する可能性もある (Joulain, C.他(1995) J. Lipid Mediat. Cell Signal. 11:63-79) ことが提案された。癌治療は、PDEを腫瘍の特定の細胞区画に送達し、細胞死を導くことであると記載されている (Deonarain, M. P.およびA. A. Epenetos (1994) Br. J. Cancer 70:786-794)。

【0079】

ホスホトリエステラーゼ

ホスホトリエステラーゼ(PTE, paraoxonases)は、毒性有機リン化合物を加水分解する酵素であって、様々な組織から単離された。この酵素は、哺乳動物には豊富に存在するが鳥や昆虫では不足していると思われ、鳥や昆虫の有機リン化合物に対する耐性の低さの説明となる (Vilanova, E.およびSogorb, M. A. (1999) Crit. Rev. Toxicol. 29:21-57)。ホスホトリエステラーゼは、哺乳動物による殺虫剤の解毒において中心的な役割を果たす。ホスホトリエステラーゼ活性は個人によって差があり、大人より幼児の方が低い。ノックアウトマウスは、有機リン系の毒素であるdiazoxonおよびchlorpyrifos oxonに対して顕著な感受性を有する (Furlong, C. E.,他(2000) Neurotoxicology 21:91-100)。PTEは、有機リン含有化学廃棄物および化学兵器 (例えば、パラチオン)、並びに農薬や殺虫剤の解毒能力を有する酵素として注目されている。ある研究により、ホスホトリエステラーゼがアテローム性動脈硬化症およびリポタンパク代謝に関係する疾患に関与することが示された。

【0080】

チオエステラーゼ

脂肪酸生合成に関係する2つの可溶性チオエステラーゼが、哺乳動物組織から単離された。その内の一方は、長鎖脂肪酸アシルチオエステルに対してのみ活性であり、他方は様々な長さの脂肪酸アシル鎖を有するチオエステルに対して活性である。これらのチオエステラーゼは、脂肪酸の新規合成における読み終わりステップを触媒する。読み終わり (chain-terminating) ステップは、脂肪酸アシル鎖を脂肪酸シンターゼのアシルキャリアタンパク質 (ACP) のサブユニットの4

' - ホスホパンテテイン補欠分子族と結合させるチオエステル結合の加水分解を伴う (Smith, S. (1981a) *Methods Enzymol.* 71:181-188; Smith, S. (1981b) *Methods Enzymol.* 71:188-200)。

【0081】

大腸菌は、長鎖アシルチオエステルに対してのみ活性なチオエステラーゼI型および様々な長さの鎖に対して特異性を有するチオエステラーゼII型 (TEII) の2つの可溶性チオエステラーゼを含む (Naggert, J.他(1991) *J. Biol. Chem.* 266:11044-11050)。大腸菌TEIIは、新規の脂肪酸生合成における読み終わり酵素 (chain-terminating enzyme) として機能する哺乳動物チオエステラーゼの2つの型のいずれとも配列類似性を有していない。哺乳動物チオエステラーゼとは異なり、大腸菌TEIIは、特徴的なセリン活性部位 gly - X - ser - X - gly配列モチーフを含まず、セリン変性剤であるジイソプロピルフルオロリン酸によって不活化されない。しかしながら、ヨードアセトアミドおよびジエチルピロカルボネートによるヒスチジン58の修飾によってPEII活性が失われる。TEIIの過剰な発現は大腸菌に含まれる脂肪酸を変化させない。これは、脂肪酸生合成において読み終わり酵素として機能していないことを示すものである (Naggert他, 前出)。このような理由から、Naggert他(前出)が、大腸菌TEIIの生理学的基質がACP - ホスホパンテテイン脂肪酸エステルではなく補酵素A(CoA)脂肪酸エステルであると考えられる。

【0082】

カルボキシルエステラーゼ

哺乳動物カルボキシルエステラーゼは、様々な組織および細胞型で発現される多重遺伝子ファミリーを構成する。イソ酵素は有意な配列相同性を有し、主にアミノ酸配列に基づいて分類される。アセチルコリンエステラーゼ、ブチリルコリンエステラーゼ、およびカルボキシルエステラーゼは、エステラーゼのセリンスーパーファミリー (Bエステラーゼ) に分類される。その他のカルボキシルエステラーゼには、チログロブリン、トロンビン、IX因子、glitactin、およびプラスミノゲンがある。カルボキシルエステラーゼは、分子のエステル基およびアミド基の加水分解を触媒し、薬剤、環境毒、および発癌物質の解毒に関与する。

カルボキシルエステラーゼの基質には短鎖および長鎖アシルグリセロール、アシルカルニチン、炭酸塩、ジピペフリン塩酸塩 (dipivefrin hydrochloride)、コカイン、サリチル酸塩、カプサイシン、パルミトイル-CoA、イミダプリル、ハロペリドール、ピロリジジンアルカロイド、ステロイド、p-ニトロフェニル酢酸、マラチオン、butanilicaine、およびイソカルボキサジドが含まれる。この酵素は低い基質特異性を示すことがよくある。カルボキシルエステラーゼはまた、プロドラッグを対応する遊離酸に変換するために重要である。対応する遊離酸は、例えば、血中コレステロールを低下させるために用いられるロバスタチンなどのそのプロドラッグの活性型であり得る (Sato, T. および Hosokawa, M. (1998) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38:257-288を参照)。

【0083】

neuroliginsは、(i)N末端シグナル配列を有し、(ii)細胞表面受容体に類似し、(iii)カルボキシルエステラーゼドメインを含み、(iv)脳で高発現され、(v)カルシウム依存的にニューレキシンと結合する分子のクラスである。カルボキシルエステラーゼと相同性を有するにもかかわらず、neuroliginsは活性部位セリン残基を含まず、触媒としてではなく基質結合において役割を果たすと考えられる (Ichtchenko, K. 他(1996) J. Biol. Chem. 271:2676-2682)。

【0084】

スクアレンエポキシダーゼ

スクアレンエポキシダーゼ (スクアレンモノオキシゲナーゼ、SE) は、ミクロソーム膜結合FAD依存性オキシドレドクターゼであって、真核細胞のステロール生合成経路における初めの酸素負荷ステップを触媒する。コレステロールは、LDL受容体仲介経路若しくは生合成経路によって獲得される細胞質膜の必須の構成成分である。後者の場合、コレステロール分子における27全ての炭素原子がアセチル-CoAに由来する (Stryer, L., 前出)。SEはスクアレンをまず2,3(S)-オキシドスクアレンに変換し、次にラノステロールに変換し、更にコレステロールに変換する。コレステロール生合成に関するステップを以下に要約する (Stryer, L (1988) Biochemistry. W. H FreemanおよびCo., Inc. New York. pp.554-560およびSakakibara, J. 他(1995) 270:17-20)。

【0085】

アセテート (アセチル - CoA由来) 3ヒドロキシ - 3 - メチル - グルタリルCoA
 メバロン酸 5 - ホスホメバロン酸 5 - ピロホスホメバロン酸 イソペンテニ
 ルピロリン酸 ジメチルアリルピロリン酸 ゲラニルピロリン酸 ファルネシル
 ピロリン酸 スクアレン スクアレンエポキシド ラノステロール コレステロ
 ール

コレステロールは真核細胞の生存に必須であるが、血清コレステロールのレベ
 ルが過度に上昇すると高等生物の動脈においてアテローム斑が形成されるよう
 になる。例えば冠状動脈などの必須の血管壁部に不溶性の脂質が蓄積されると、血
 流が減少して十分な血液が組織に流れなくなり組織壊死が起こる可能性が
 ある。HMG - CoAレダクターゼは、3 - ヒドロキシ - 3 - メチル - グルタリルCoA (H
 MG - CoA) のメバロン酸への変換に必要であり、この変換がコレステロール生合
 成の第1のステップである。HMG - CoAは、血漿コレステロールレベルを低下させ
 るようにデザインされた様々な医薬化合物の標的である。しかしながら、MHG - C
 oAの阻害はまた、その他の生合成経路に必要な非ステロール中間体 (例えば、メ
 バロン酸) の合成が減少する。SEは、ステロール合成経路の後の方で起こる律速
 反応を触媒し、コレステロールはSEによる触媒ステップの後の経路の最終産物で
 ある。従って、SEは、その他の必要な中間体を減少させない抗高脂血症薬をデザ
 インするための理想的な標的である (Nakamura, Y.他(1996) 271:8053-8056)。

【0086】

エポキシドヒドロラーゼ

エポキシドヒドロラーゼは、エポキシド含有化合物の水の添加を触媒し、それ
 によってエポキシドがその対応する1,2 - ジオールに加水分解される。これらは
 、細菌ハロアルカンデハロゲナーゼ (haloalkane dehalogenase) に関連し、酵
 素の / ヒドロラーゼフォールド (/ hydrolase fold) ファミリーのその
 他のメンバーと配列類似性を有する (例えば、*Streptomyces aureofaciens*由来
 ブロモペルオキシダーゼA2 (bromoperoxidase A2)、シュードモナス プチダ由
 来のhydroxyomuconic semialdehyde hydrolases、および *Xanthobacter autotrop
 hicus*由来ハロアルカンデハロゲナーゼ)。エポキシドヒドロラーゼは遍在性で

あって、哺乳動物、脊椎動物、植物、真菌、細菌に見られる。この酵素のファミリーは、生物内に導入されると求電子性が高く破壊性である場合が多い生体異物エポキシド化合物の解毒にとって重要である。エポキシドヒドロラーゼ反応の例には、cis-9,10-epoxyoctadec-9 (Z)-enoic acid (ロイコトキシン)からその対応するジオールへの加水分解、threo-9,10-dihydroxyoctadec-12 (Z)-enoic acid (leukotoxin diol)、およびcis-12,13-epoxyoctadec-9 (Z)-enoic acid (iso leukotoxin)からその対応するdiol threo-12,13-dihydroxyoctadec-9 (Z)-enoic acid (イソロイコトキシンジオール)への加水分解が含まれる。ロイコトキシンは膜の透過性を変えてイオンを輸送し炎症反応を引き起こす。加えて、エポキシド発癌物質は、薬剤および環境毒素の解毒における中間体としてチトクロームP450によって生成されることが知られている。

【0087】

この酵素は、Asp (求核性)、Asp (ヒスチジンを支持する酸)、およびHis (水活性化ヒスチジン)の3つの触媒部分を有する。エポキシドヒドロラーゼの反応のメカニズムは、標的分子のエポキシド環の第1の炭素原子に対するAsp残基の1つへの求核攻撃によって開始される共有結合エステル中間体によって始まり、共有結合エステル中間体が形成される (Michael Arand, M.他(1996) J. Biol. Chem. 271:4223-4229 ; Rink, R.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14650-14657; Argiriadi, M. A.他(2000) J. Biol. Chem. 275:15265-15270)。

【0088】

チロシン触媒作用に関与する酵素

コハク酸とピルビン酸か、或いはフマル酸とアセト酢酸へのアミノ酸チロシンの分解には多数の酵素が必要であり、多数の中間化合物が生成される。加えて、多くの生体異物化合物は、チロシン分解経路の一部である1或いは複数の反応が用いられて代謝され得る。この経路は初め細菌で研究されたが、チロシン分解は様々な生物において起こることが知られ、多数の同様の生物学的反応が関係すると思われる。

【0089】

コハク酸とピルビン酸へのチロシンの分解に関係する酵素には、4-ヒドロキ

シフェニルピルビン酸オキシダーゼ、4 - ヒドロキシフェニル酢酸3 - ヒドロキシラーゼ (4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase)、3,4 - ジヒドロキシフェニル酢酸 (3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase)、5 - カルボキシメチル - 2 - ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase)、トランス,シス - 5 - カルボキシメチル - 2 - ヒドロキシムコン酸イソメラーゼ (trans,cis-5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase)、ホモプロトカテチュ酸イソメラーゼ/デカルボキシラーゼ (homoprotocatechuate isomerase/decarboxylase)、cis-2-oxohept-3-ene-1,7-dioate hydratase、2,4-dihydroxyhept-trans-2-ene-1,7-dioate aldolase、およびコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (succinic semialdehyde dehydrogenase) が含まれる。

【0090】

チロシンのフマル酸塩とアセト酢酸塩への分解に関係する酵素には、4 - ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ、ホモゲンチシン酸 - 1, 2 - ジオキシゲナーゼ、マレイルアセト酢酸イソメラーゼ、およびフマリルアセトアセターゼが含まれる。コハク酸/ピルビン酸経路からの中間体が受け入れられた場合は、4 - ヒドロキシフェニル酢酸1 - ヒドロキシラーゼ (4-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase) が関係し得る。

【0091】

異なった生物においてチロシン代謝に関係する更なる酵素には、4 - クロロフェニル酢酸 - 3,4 - ジオキシゲナーゼ (4-chlorophenylacetate-3,4-dioxygenase)、芳香族アミノトランスフェラーゼ、5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase、2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate hydratase、および5 - カルボキシメチル - 2 - ヒドロキシムコン酸イソメラーゼ (5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase) が含まれる (Ellis, L. B. M.他(1999) Nucleic Acids Res. 27:373-376; Wackett, L. P. および Ellis, L. B. M. (1996) J. Microbiol. Meth. 25:91-93; および Schmidt, M. (1996) Amer. Soc. Microbiol. News 62:102)。

【0092】

ヒトにおいて、チロシン分解経路の酵素における後天性或いは先天性の遺伝的欠陥が、遺伝性チロシン血症I型を引き起こし得る。この疾患の1つの型である遺伝性チロシン血症I型 (HT1) は、チロシンをフマル酸とアセテート酢酸に代謝する生物における経路の最後の酵素である酵素フルマリルアセトアセターゼヒドロラーゼの欠損によって引き起こされ得る。HT1は幼児期に始まる進行性の肝傷害によって特徴づけられ、肝癌のリスクが高い (Endo, F.他(1997) J. Biol. Chem. 272:24426-24432)。

【0093】

複数の新規の薬剤代謝酵素、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患の診断・治療・予防において有用であり、また、薬剤代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価にも有用である。

【0094】

(発明の要約)

本発明は、総称して「DME」、個別にはそれぞれ「DME-1」、「DME-2」、「DME-3」、「DME-4」、「DME-5」、「DME-6」、「DME-7」、「DME-8」、「DME-9」、「DME-10」、「DME-11」、および「DME-12」と呼ぶ薬剤代謝酵素である精製されたポリペプチドを提供する。本発明の一実施態様では、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1-12のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0095】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸

配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたポリペプチドをコードする。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:13 - 24からなる一群から選択される。

【0096】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を提供する。

【0097】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの生産方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドの発現に好適な条件下で、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、

(b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【0098】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0099】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:13 - 24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:13 - 24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0100】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:13 - 24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:13 - 24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(a) 前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を構成する少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルをハイブリダイズさせるステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレ

オチドまたはその断片とでハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする、該ステップと、(b)前記ハイブリダイゼーション複合体の存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0101】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b)SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c)前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d)前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e)前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて、前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップと、(b)増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。

【0102】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b)SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c)SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d)SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む効果的な量のポリペプチド及び好適な医薬用賦形剤を含む組成物を提供する。一実施例では、SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的DMEの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0103】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) このサンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的DMEの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0104】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) このサンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアンタゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的DMEの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0105】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と9

0%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)このポリペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

【0106】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a)このポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性を評価するステップと、(c)この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性と、この試験化合物の不在下でのこのポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性の変化が、このポリペプチドの活性を調節する化合物の存在を示唆するという特徴を有する。

【0107】

更に本発明は、SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、(a)この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0108】

本発明はさらに、試験化合物の毒性を評価する方法を提供する。この方法は、(a)核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、(b)処理した前記生体サンプルの核酸をプローブとハイブリダイズするステップと、(c)ハイブリダイゼーション複合体の収量を測定するステップと、(d)前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処理の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量とを比較するステップとを含み、前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差異が試験化合物の毒性を示唆する。この方法における前記プローブは、(1)SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2)SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3)前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4)前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5)前記(1)乃至(4)のRNA等価物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの連続する少なくとも20個のヌクレオチドを含む。また、前記ハイブリダイゼーションは、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われる。また、前記標的ポリヌクレオチドが、(1)SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2)SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3)前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4)前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5)前記(1)乃至(5)のRNA等価物とを含む。代替的に前記標的ポリヌクレオチドは前記ポリヌクレオチド配列の断片である。

【0109】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質及び核酸配列、方法について説明する前に、本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更でき

ることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いられたものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理解されたい。

【0110】

本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その（この等）」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」は複数の宿主細胞を含み、その「抗体」は複数の抗体は含まれ、当業者には周知の等価物なども含まれる。

【0111】

本明細書で用いた全ての科学技術用語は、別の方法で定義されていない限り、本発明の属する技術分野の一般的な技術者が普通に解釈する意味と同じである。本明細書で記述したものと類似、或いは同等の全ての装置及び材料、方法は本発明の実施及びテストに使用できるが、好適な装置及び材料、方法をここに記す。本明細書に記載の全ての文献は、本発明に関連して使用する可能性のある文献に記載された細胞系、プロトコル、試薬、ベクターを記述し開示するために引用した。従来の発明を引用したからと言って、本発明の新規性が損なわれると解釈されるものではない。

【0112】

（定義）

用語「DME」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種（特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物）から得られる実質的に精製されたDMEのアミノ酸配列を指す。

【0113】

用語「アゴニスト」は、DMEの生物学的活性を強める、或いは模倣する分子を指す。このアゴニストは、DMEに直接相互作用するか、或いはDMEが関与する生物学的経路の成分と作用して、DMEの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0114】

用語「アレル変異配列」は、DMEをコードする遺伝子の別の形を指す。アレル変異配列は、核酸配列における少なくとも1つの変異によって生じ、変異mRNA若しくは変異ポリペプチドになり、これらの構造や機能は変わる場合もあれば変わらない場合もある。ある遺伝子は、天然型のアレル変異配列が存在しないもの、1つ或いは多数存在するものがある。一般にアレル変異配列を生じる変異は、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、或いは置換による。これらの各変異は、単独或いは他の変異と同時に起こり、所定の配列内で一回或いはそれ以上生じる。

【0115】

DMEをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、DMEと同じポリペプチド或いはDMEの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、DMEをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置でのアレル変異配列との不相当或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにDMEをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じDMEと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にDMEの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち極性非荷電側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びチロシンが含まれ得る。

【0116】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子の配列を指す場合、

「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0117】

用語「増幅」は、核酸配列の複製物を作製することに関連する。一般に増幅は、この技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術によって行われる。

【0118】

用語「アンタゴニスト」は、DMEの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、DMEに直接相互作用するか、或いはDMEが関与する生物学的経路の成分と作用して、DMEの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0119】

用語「抗体」は、抗原決定基と結合可能なFab及びF(ab')₂、及びそれらの断片、Fv断片などの無傷の分子を指す。DMEポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて作製可能である。動物（例えば、マウス、ラット、若しくはウサギ）を免疫化するのに使用されるポリペプチド或いはオリゴペプチドは、RNAの翻訳から、或いは化学的に合成可能であり、必要に応じて担体タンパク質と結合させることも可能である。ペプチドと化学的に結合した一般に用いられる担体は、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、及びキーホールリンペットヘモニアン（KLH）を含む。次ぎに、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

【0120】

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質或いはタンパク質の断片が、宿主動物を免疫化するのに用いられるとき、このタンパク質の種々の領域は、抗原決定基（タンパク質上の特定の領域或いは三次元構造体）に特異的に結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、抗体と結合するために無傷の抗原（即ち、免疫応答を引き出すために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0121】

本明細書において「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス（コーディン

グ)鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス成分には、DNAと、RNAと、ペプチド核酸(PNA)と、ホスホロチオネートやメチルホスホネート、ベンジルホスホネート(benzylphosphonate)などの修飾された骨格(backbone linkage)を有するオリゴヌクレオチドと、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などの修飾された糖を有するオリゴヌクレオチドと、5-メチルシトシンまたは2'-deoxyuracil、7-deaza-2'-deoxyguanosineなどの修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アンチセンス分子は、化学合成や転写を含む任意の方法で作出することができる。相補的アンチセンス分子は、一度細胞に導入されると、細胞によって作られた天然の核酸配列と塩基対となって二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「負」または「マイナス」という表現はアンチセンス鎖であり、「正」または「プラス」という表現はセンス鎖である。

【0122】

用語「生物学的に活性」は、天然分子の構造的、調節的、或いは生化学的な機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のDME、合成のDMEまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

【0123】

用語「相補的」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、配列「5'AGT3'」が相補的な配列「3'TCA5'」と対をなす。

【0124】

「所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物」または「所定のアミノ酸配列を含む組成物」は広い意味で、所定のヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この組成物は、乾燥した製剤或いは水溶液を含み得る。DME若しくはDMEの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。ハイ

ブリダイゼーションにおいて、プローブは、塩（例えば、NaCl）及び界面活性剤（例えば、SDS：ドデシル硫酸ナトリウム）、その他の物質（例えば、デンハート液、乾燥ミルク、サケ精子DNAなど）を含む水溶液に展開され得る。

【0125】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット（PE Biosystems, Foster City CA）を用いて5'及び/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGEL VIEW 断片構築システム（GCG, Madison, WI）またはPhrap（University of Washington, Seattle WA）等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び重複の両方によって構築されるコンセンサス配列もある。

【0126】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えない置換を指す。即ち、置換によってそのタンパク質の構造や機能が大きくは変わらず、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存される。以下に、あるタンパク質の元のアミノ酸が別のアミノ酸に置換される保存的なアミノ酸置換を示す。

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Set
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu

Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

一般に、保存されたアミノ酸置換の場合は、a) 置換された領域のポリペプチドの骨格構造、例えば、シートやヘリックス高次構造、b) 置換された部位の分子の電荷または疎水性、及び/または、c) 側鎖の大半が維持される。

【0127】

用語「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列の変化、或いは1個以上のヌクレオチドが欠如する核酸配列の変化を指す。

【0128】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。ポリヌクレオチド配列の化学修飾には、例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基、或いはアミノ基による水素の置換がある。誘導体ポリヌクレオチドは、自然分子（未修飾の分子）の生物学的或いは免疫学的機能の少なくとも1つを維持するポリペプチドをコードする。誘導体ポリペプチドとは、もとのポリペプチドの生物学的機能、或いは免疫学的機能の少なくとも1つを維持する、グリコシル化、ポリエチレングリコール化、或いは任意の同様のプロセスによって修飾されたポリペプチドのことである。

【0129】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合或いは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

【0130】

用語「断片」は、DMEまたはDMEをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。「断片」の最大の長さは、親配列から1つのヌクレオチド/アミ

ノ酸残基を差し引いた長さである。例えば、ある断片は、5～1000個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基を含む。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子、またはその他の目的に用いる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さである。断片は、優先的に分子の特定の領域から選択される場合もある。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示された最初の250若しくは500のアミノ酸（或いは、ポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された連続するアミノ酸の所定の長さを含み得る。これらの長さは一例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の任意の長さが、本発明の実施例に含まれ得る。

【0131】

SEQ ID NO:13 - 24の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:13 - 24を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO:13 - 24のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:13 - 24を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:13 - 24の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0132】

SEQ ID NO:1 - 12のある断片は、SEQ ID NO:13 - 24のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1 - 12のある断片は、SEQ ID NO:1 - 12を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1 - 12のある断片は、SEQ ID NO:1 - 12を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:1 - 12の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

【0133】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、少なくとも1つの翻訳開始コドン（例えばメチオニン）、それに続くオープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。「完全長」ポリヌクレオチド配列は、「完全長」ポリペ

ブチド配列をコードする。

【0134】

「相同性」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列間または2つ以上のポリペプチド配列間の配列類似性である。この配列類似性は配列同一性と言い換えることができる。

【0135】

ポリヌクレオチド配列についての用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の一致する残基の百分率のことである。このようなアルゴリズムは、標準化され再現できる方法で、2つの配列間のアラインメントを最適化するべく、配列にギャップを挿入して、より意味をもつ2つの配列間の比較を行うことができる。

【0136】

ポリヌクレオチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、分子生物学分析プログラム一式 (DNASTAR, Madison WI) である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D.G. 及び P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対のアライメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。同一性のパーセントは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0137】

別法では、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)が提供する、広く用いられている無料の配列比較アルゴリズム一式が、NCBI (Bethesda, MD) を含む幾つかのソース及びインターネット (<http>

://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) で入手可能である。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html> にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (以下に記載) の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメータと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)でblastnを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

【 0 1 3 8 】

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定の配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、例えば、ある大きな所定の配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも、20または30、40、50、70、100、200のヌクレオチドの断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

【0139】

高い同一性を示さない核酸配列でも、遺伝子コードの縮重によって類似のアミノ酸配列をコードし得る。縮重を利用して核酸配列を変え、それぞれが実質的に同じタンパク質をコードする様々な核酸配列を作製できることを理解されたい。

【0140】

ポリペプチド配列に用いられる用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は周知である。アラインメント方法の中には、保存的なアミノ酸置換を考慮したものもある。詳細に上述したこのような保存的な置換は、一般に、置換部位の電荷や疎水性が保存され、ポリペプチドの構造（従って機能も）が保存される。

【0141】

ポリペプチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN バージョン3.12e配列アラインメントプログラム（上記）に組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。CLUSTAL Vを用いる対方式のポリペプチド配列のアライメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の同一性のパーセントは、「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0142】

別法では、NCBI BLASTソフトウェア一式が用いられる。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (Apr-21-2000)でblastpを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

【0143】

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定のポリペプチド配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、例えば、ある大きな所定のポリペプチド配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも15、20または30、40、50、70、150の残基の断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

【0144】

「ヒト人工染色体 (HAC)」は、約6 kb (キロベース) ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全てのエレメントを含む直鎖状の小染色体である。

【0145】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつよりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列が変えられた抗体分子を指す。

【0146】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高い相同性を有することを意味する。アニーリングが許容される条件下で、特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成され、洗浄過程の後もハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスの厳密性即ちストリンジェンシー (stringency) の決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合、即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合が減少する。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によ

って日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの間は一定であるが、洗浄過程は、目的のストリンジェンシーにするためにその最中に条件の変更が可能であり、ハイブリダイゼーション特異性が得られる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68℃で、約6×SSC、約1% (w/v) のSDS、並びに約100 μg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0147】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、洗浄過程を行う際の温度によっても左右される。この洗浄温度は通常、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の熱融点(T_m)より約5~20℃低く選択される。このT_mは、(所定のイオン強度とpHの下)標的の配列の50%が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。T_mを計算する式及び核酸のハイブリダイゼーションの条件は、周知であり、Sambrook, J. 他による, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainville NY; 特に2巻の9章に記載されている。

【0148】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約1%のSDSの存在の下、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65℃、60℃、55℃、42℃の温度で行う。SSCの濃度は、約0.1%のSDSが存在の下、約0.1~2×SSCの範囲である。通常は、ブロッキング試薬を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング試薬には、例えば、約100~200 μg/mlの切断され変性したサケ精子DNAが含まれる。約35~50%v/vの濃度のホルムアミドなどの有機溶剤が、例えば、RNAとDNAのハイブリダイゼーションなどの特定の場合に用いることができる。これらの洗浄条件の有用な改変は、当業者には周知である。特に高いストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド間の進化における類似性を示唆し得る。このような類似性は、それらのヌクレオチド及びコードされたポリペプチドが類似の役割を果たしていることを強く示唆する。

【0149】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合によって、形成された2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中（例えば、 C_0t または R_0t 分析）で形成されるか、或いは溶液中の1つの核酸配列と固体の支持物（例えば、紙、膜、フィルタ、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板）に固定されたもう一つの核酸配列とで形成され得る。

【0150】

用語「挿入」或いは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ追加されるアミノ酸配列或いは核酸配列の変化を指す。

【0151】

「免疫応答」は、炎症性疾患及び外傷、免疫異常、感染症、遺伝病などに関連する症状を指す。これらの症状は、細胞系及び全身防衛系に影響を及ぼすサイトカイン及びケモカイン、別の情報伝達分子などの様々な因子の発現という特徴をもつ。

【0152】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生きている動物に導入すると、免疫反応を引き起こすDMEのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用なDMEのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【0153】

用語「マイクロアレイ」は、基質上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物の構成を指す。

【0154】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0155】

用語「調節」は、DMEの活性の変化を指す。例えば、調節によって、DMEのタン

パク質活性、或いは結合特性、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

【0156】

用語「核酸」及び「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、或いはそれらの断片を指し、一本鎖若しくは二本鎖であって、センス鎖或いはアンチセンス鎖であるゲノム起源若しくは合成起源のDNA或いはRNA、ペプチド核酸(PNA)、任意のDNA様物質、及びRNA様物質である。

【0157】

「機能的に結合した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。一般に、機能的に結合したDNA配列は、同じ読み枠内で2つのタンパク質をコードする領域が結合する必要がある場合は、非常に近接或いは連続する。

【0158】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチド骨格に結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。この末端のリシンにより、この組成物が溶解性となる。PNAは、相補的な一本鎖DNAやRNAに優先的に結合して転写物の伸長を止め、ポリエチレングリコール化して細胞における寿命を延ばし得る。

【0159】

DMEの「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及びその他の当分野で既知の修飾を含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、DMEの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0160】

「プローブ」とは、同一配列或いはアレル核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、DMEやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸配列のことである。プローブは、検出可能な標識またはレポーター分子が結合され単

離されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドである。典型的な標識には、放射線アイソトープ及びリガンド、化学発光試薬、酵素がある。「プライマー」とは、相補的な塩基対を形成して標的のポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーがポリヌクレオチドにアニーリングした後、あるDNAポリメラーゼ酵素によって、標的のDNA一本鎖に沿って伸長される。プライマーの組は、例えば、PCR法における核酸配列の増幅（及び同定）に用いることができる。

【0161】

本発明に用いられるプローブ及びプライマーは、既知の配列の少なくとも15の連続するヌクレオチドを含む。特異性を高めるために、より長いプローブ及びプライマーが用いられることも可能である。例えば、開示した核酸配列の連続する少なくとも20または25、30、40、50、60、70、80、90、100、150のヌクレオチドを含む。プローブ及びプライマーは、上記した例より相当長いものも用いることができ、本明細書の表及び図面、配列表に示された任意の長さのヌクレオチドも用いることができることを理解されたい。

【0162】

プローブ及びプライマーの準備及び使用方法については、例えば、Sambrook, J.他による、1989年、名称「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版の1-3巻(Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)、またはAusubel, F.M.他による、1987年、名称「Current Protocols in Molecular Biology」(Greene Pubi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY)、並びに Innis他による、1990年、名称「PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications」(Academic Press, San Diego CA.)を参照されたい。PCR用のプライマーの組は、例えば、Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)などのそのような目的のためのコンピュータプログラムを用いて、ある既知の配列から引き出すことができる。

【0163】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のプライマー選択用のコンピュータプログラムで選択される。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェア

は、それぞれが最大100ヌクレオチドまでのPCR用のプライマーの対の選択、及び32,000塩基までの入力ポリヌクレオチド配列から最大5,000ヌクレオチドまでの大きなポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドの分析に有用である。類似のプライマー選択用プログラムには、能力を拡大する追加の機能が含まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム (Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TXより入手可能) は、メガベース配列から特定のプライマーを選択できるため、ゲノムワイドスコープ (genome-wide scope) におけるプライマーの設計に有用である。Primer3プライマー選択プログラム (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MAより入手可能) によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ (mispriming library)」を入力できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である (後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーのニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム (UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK より入手可能) は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域或いは最も保存されていない領域のどちらかとハイブリダイズするプライマーを選択することができる。従って、このプログラムは、固有及び保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記した任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法やシーケンシングプライマー、マイクロアレイエレメント、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

【0164】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人工の組み合わせは、化学合成によって作られる場合も多いが、前出のSambrook に記載されたような遺

伝子工学の技術を用いて核酸の離れたセグメントを人工的に操作する方がより一般的である。この「組換え核酸」には、単に核酸の一部の追加または置換、欠失によって変更された核酸も含む。組換え核酸は、あるプロモーター配列に機能的に結合した核酸配列を含む場合もある。このような組換え核酸は、例えば、ある細胞を形質転換するのに用いられるベクターの一部であり得る。

【0165】

別法では、このような組換え核酸は、この組換え核酸を発現する哺乳動物のワクチン接種に用いると、その哺乳動物の防衛的な免疫応答を誘発する、ワクチンウイルスに基づいたウイルスベクターの一部であり得る。

【0166】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写や翻訳、またはRNAの安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0167】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的な部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分が含まれる。

【0168】

本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0169】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。DME、DMEをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0170】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、結合する分子によって認識される、例えば、抗原決定基つまりエピトープなどのタンパク質の特定の構造の存在によって左右される。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」及び抗体を含む反応液に、エピトープAを含むポリペプチド或いは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

【0171】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましいは90%以上除去されたものを指す。

【0172】

「置換」とは、一つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドをそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0173】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルタ、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。この基板には、壁または塹壕、ピン、チャンネル、細孔などの様々な表面形態があり、そこにポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0174】

「転写イメージ」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

【0175】

「形質転換」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。形質転換は、当分野で周知の種々の方法により、自然或いは人工の条件下で起こ

り、原核宿主細胞若しくは真核宿主細胞の中に外来核酸配列を挿入する任意の周知の方法によって行うことができる。この形質転換の方法は、形質転換される宿主細胞のタイプによって選択される。この方法には、バクテリオファージまたはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、リポフェクション、及び微粒子照射が含まれるが、これらに限定されるものではない。「形質転換された」細胞には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一時的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

【0176】

本明細書における「遺伝子組換え生物」とは、当分野で周知の遺伝子組換え技術などを用いて、人間が生物の1つ以上の細胞に異種の核酸を導入した任意の生物であり、動物及び植物を含むが、それらに限定されるものではない。微量注入や組換えウイルスに感染させるなどの慎重な遺伝子操作によって、細胞の前駆体に直接或いは間接的に異種核酸を細胞に導入する。「遺伝子操作」とは、典型的な交雑育種や*in vitro*での受精ではなく、組換えDNA分子を導入することである。本発明に従った遺伝子組換え生物には、細菌及びラン藻類、菌類、植物、動物が含まれる。本発明の単離されたDNAは、当分野で周知の、例えば、感染、形質移入、形質転換、トランス接合（transconjugation）などの方法によって、宿主に導入することができる。本発明のDNAをそのような生物に導入する技術は周知であり、前出のSambrook他（1989）に記載されている。

【0177】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastnによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定の核酸配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。このような核酸の対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。ある変異配列は、例えば、「アレル」変異配列（上述）または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、

「多型」変異配列と表すことができる。スプライス変異配列は基準分子と同一性が極めて高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの択一的スプライシングによってポリヌクレオチドの数が多くなったり、少なくなったりする。対応するポリペプチドは、基準分子に存在する追加の機能ドメインを有したり、基準分子に存在するドメインが欠落したりし得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。得られるポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多型変異配列は、所定の種と種における特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1ヌクレオチド多型」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団、病態、病態の性向を示唆し得る。

【0178】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastpによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも40%と決定されたポリペプチド配列のことである。このようなポリペプチドの対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。

【0179】

(発明)

本発明は、新規のヒト薬剤代謝酵素(DME)及びDMEをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患の診断、治療、及び予防に関する。

【0180】

表1は、本発明のポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の識別番号を示す。各ポリヌクレオチドおよびそれに対応するポリペプチドは、1つのインサイトプロジェクト識別番号(Incyte Project ID)に相関する。各ポリペプチド配列は、記載されているようにポリペプチド配列識別番号(Polypeptide SEQ ID N

0 :) およびインサイトポリペプチド配列番号 (Incyte Polypeptide ID) の両方によって示されている。各ポリヌクレオチド配列は、記載されているようにポリヌクレオチド配列識別番号 (Polypeptide SEQ ID NO :) およびインサイトポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (Incyte Polypeptide ID) の両方によって示されている。

【 0 1 8 1 】

表 2 は、GenBankタンパク質 (genept) データベースにおいてBLAST解析により同定された本発明のポリペプチドに相同性を有する配列を示す。列 1 および列 2 はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (Polypeptide SEQ ID NO :) およびそれに対応するインサイトポリペプチド配列番号 (Incyte Polypeptide ID) を示す。列 3 は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号 (Genbank ID NO :) を示す。列 4 は、各ポリペプチドとそのGenBank相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列 5 は、GwnBank相同体のアノテーションを示し、更に該当箇所には適当な引用文も示す。これらを引用することを以って本明細書の一部とする。

【 0 1 8 2 】

表 3 は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列 1 および列 2 はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドのポリペプチド配列識別番号 (SEQ ID NO :) およびそれに対応するインサイトポリペプチド配列番号 (Incyte Polypeptide ID) を示す。列 3 は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列 4 および列 5 はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム (Genetics Computer Group, Madison WI) によって決定された、潜在的なリン酸化部位および潜在的なグリコシル化部位を示す。列 6 は、シグネチャ (signature) 配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列 7 は、タンパク質の構造 / 機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

【 0 1 8 3 】

表 2 および表 3 は共に、本発明のポリペプチドの特性を要約したものであって、これらの特性は請求するポリヌクレオチドが薬剤代謝酵素であることを立証す

るものである。例えば、SEQ ID NO:9は、M1残基からV512残基においてヒトチトクロームP450レチノイド代謝タンパク質P450RAI-2 (GenBank ID g8515441)と99%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2を参照)。BLASTの確率スコアは0であり、探しているポリペプチド配列アラインメントが偶然の一致により得られる確率を示す。SEQ ID NO:9はまた、チトクロームP450ドメインを有する。これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3を参照)。BLIMPS、MOTIFS、およびPROFILESCAN解析から得られたデータによって、SEQ ID NO:9がチトクロームP450であることが裏付けられた。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、およびSEQ ID NO:12も同様の方法で解析してアノテーションを付けた。SEQ ID NO:1-12の解析のためのアルゴリズムおよびパラメータを表7に記載する。

【0184】

表4に示されているように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列、またはゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列、或いはこれらの2種類の配列のあらゆる組み合わせを用いて組み立てた。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列識別番号(Polynucleotide SEQ ID NO:)およびそれに対応するインサイトポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte Polynucleotide ID)を示す。列3は、塩基対における各ポリヌクレオチド配列の長さを示す。列4は、例えば、SEQ ID NO:13-24を同定するため、或いはSEQ ID NO:13-24と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片を示す。列5は、cDNA配列、ゲノムDNAから推定されるコード配列(エキソン)、および/またはcDNAおよびゲノムDNAの両方からなる群に対応する識別番号を示す。これらの配列を用いて本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を組み立てた。表4の列6および列7はそれぞれ、列5の配列に対応するcDNA配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示

す。

【0185】

表4の列5に示されている識別番号は、具体的には、例えばインサイトcDNAおよびそれらに対応するcDNAライブラリの識別番号を示す。例えば、456001R1はインサイトcDNA配列の識別番号であり、KERANOT01はそれが由来するcDNAライブラリの識別番号である。cDNAライブラリが示されていないインサイトcDNAは、プールされているcDNAライブラリ（例えば、70683296V1）に由来する。または、列5の識別番号は、ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたGenBankのcDNAすなわちEST（例えば、g3250572）の識別番号の場合もある。または、列5の識別番号は、Genscan分析によって推定されるゲノムDNAのコード領域の場合もある。例えば、GNN.g5091644.editは、Genscan推定コード配列の識別番号であって、g5091644がGenscan分析によって得られたGenBankの配列の識別番号である。このGenscan推定コード配列は、配列を組み立てる前に編集する場合がある（実施例4を参照）。または、列5の識別番号は、“exon-stitching”アルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある。例えば、FL7256116_00002はステッチ配列（“stitched” sequence）であって、この7256116はアルゴリズムに用いた配列のクラスター識別番号を表し、00002はアルゴリズムによって推定された数を表す（実施例5を参照）。または、列5の識別番号は、“exon-stretching”アルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある（実施例5を参照）。場合によっては、列5に示されている配列の範囲と重複するインサイトcDNAの範囲が得られ、最終的なコンセンサス配列が決定されるが、それに相当するインサイトcDNAの識別番号は示されていない。

【0186】

表5は、インサイトcDNA配列を用いて組み立てられたこれらの完全長ポリヌクレオチド配列が由来する代表的なcDNAライブラリを示す。代表的なcDNAライブラリとは、上記ポリヌクレオチド配列の組み立ておよび決定に用いられたインサイトcDNA配列を最も多く含むインサイトcDNAライブラリのことである。表5に示されているcDNAライブラリを作製するために用いた組織およびベクターが表6に示

されている。

【0187】

本発明はまた、DMEの変異体も含む。好適なDMEの変異体は、DMEの機能的或いは構造的特徴の少なくともどちらか一方を有し、かつDMEアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0188】

本発明はまた、DMEをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、DMEをコードするSEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO:13-24のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

【0189】

本発明はまた、DMEをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、DMEをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列の変異配列を提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、DMEの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードする。

【0190】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るDMEをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能なコドン選択に基づいた組み合わせの選択によって作り出

され得る可能なポリヌクレオチド配列の変異の全てが含まれ得る。これらの組み合わせは、天然のDMEのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全ての変異が明確に開示されていると考慮する。

【0191】

DMEをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然のDMEのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを含むDME或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作ることには有利となり得る。特定のコードが宿主によって利用される頻度に基づいてコドンを選択して、ペプチドの発現が特定の真核細胞または原核宿主に発生する割合を高めることが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、DME及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、天然の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

【0192】

本発明はまた、DME及びその誘導体をコードするDNA配列またはそれらの断片を完全に合成化学によって作り出すことも含む。作製後にこの合成配列を、当分野で良く知られた試薬を用いて、種々の入手可能な発現ベクター及び細胞系の何れの中にも挿入可能である。更に、合成化学を用いて、DMEまたはその任意の断片をコードする配列の中に突然変異を導入することも可能である。

【0193】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:13-24及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; and Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

【0194】

当分野で周知のDNAのシーケンシング方法を用いて、本発明の何れの実施例

も実行可能である。この方法には、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech Piscataway NJ)、或いはELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD)にみられるような校正エキソヌクレアーゼとポリメラーゼとの組み合わせなどの酵素が用いられる。好ましくは、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200 Thermal Cycler200 (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800 (PE Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373或いは377 DNAシーケンシングシステム (PE Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。得られた配列を当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて分析する (例えば、Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley CH, New York NY, pp. 856-853. を参照)。

【0195】

当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、DMEをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば制限部位PCR法を利用する1つの方法では、一般的なプライマー及び入れ子プライマー (nested primer) を用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する (例えば、Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322を参照)。逆PCR法を用いる別法では、広範な方向に伸長して環状化した鋳型から未知の配列を増幅するプライマーを用いる。この鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限断片に由来する (例えば、Triglia, T.ら (1988) Nucleic Acids Res 16:8186を参照)。キャプチャPCR法を用いる第3の方法は、ヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む (例えば、Lagerstrom, M.他 (1991) PCR Methods Applic 1:111-119を参照)。この方法では、多数の制限酵素による消化及びライゲーションを用いて、PCRを行う前に未知の配列の領域の中

に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、当分野で周知の別の方法を用いて未知の配列を得ることも可能である。(例えば、Parker, J.D. 他 (1991)Nucleic Acids Res. 19:3055-3060を参照)。更に、PCR、ネスト化プライマー、PROMOTERFINDERライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いれば、ゲノムDNA内の歩行が可能である。この方法ではライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を探すのに有用である。全てのPCR法をベースにした方法では、プライマーは、市販のOLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムなどを用いて、長さが22~30ヌクレオチド、GC含量が50%以上、約68~72の温度で鋳型に対してアニーリングするよう設計される。

【0196】

完全長のcDNAをスクリーニングする場合は、大きなcDNAを含むようにサイズが選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、オリゴd(T)ライブラリが完全な長さのcDNAを産生できない場合は、遺伝子の5'領域を有する配列を含むものが多いランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリが有用である。ゲノムライブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0197】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のヌクレオチド配列のサイズの分析、または確認が可能である。詳しくは、キャピラリーシーケンシングには、電気泳動による分離のための流動性ポリマー、及び4つの異なったヌクレオチドに特異的なレーザーで活性化される蛍光色素、放出された波長の検出に利用するCCDカメラを使用することが可能である。出力/光強度は、適切なソフトウェア(例えば、GENOTYPER及びSEQUENCE NAVIGATOR、PE Biosystems)を用いて電気信号に変換され、サンプルのローディングからコンピュータ分析までのプロセス及び電子データ表示がコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しない場合もあるDNAの小片のシーケンシングに特に適している。

【0198】

本発明の別の実施例では、DMEをコードするポリヌクレオチド配列またはその

断片を組換えDNA分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にDME、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列が作られ得り、これらの配列をDMEのクローン化及び発現に利用可能である。

【0199】

種々の目的でDMEをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。ランダムな断片によるDNAの混合や遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドのPCR再組み立てを用いて、ヌクレオチド配列の組換えが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド媒介性定方向突然変異誘発を利用して、新しい制限部位を生成する突然変異の導入、グリコシル化パターンの変更、コドン選択の変更、スプライスバリエーションの作製等が可能である。

【0200】

本発明のヌクレオチドを、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; 米国特許第5,837,458号; Chang, C.-C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他 (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャフリング技術を用いてシャフリングして、DMEの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのDMEの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャフリングは、PCR法による遺伝子断片の組換えで遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。次に、このライブラリを、目的の特性を有する遺伝子変異体を同定するために選択或いはスクリーニングする。これらの好ましい変異体をプールし、DNAシャフリング及び選択/スクリーニングを繰り返す。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムな位置に変異がある1つの遺伝子の断片を、目的の特性が最適化するまで、組換え及びスクリーニング、シャフリングを実施することもできる。別法では、所定の遺伝子の断片を、同じ或いは異なった種の同じ遺伝子ファ

ミリーの相同な遺伝子の断片で組換え、それによってプロトコルに従った調節可能な方法で、多数の天然遺伝子の遺伝子多様性を最大にすることができる。

【0201】

別の実施例によれば、DMEをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である（例えば、Caruthers, M.H.ら（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:215-223; 及びHorn, T.他（1980）Nucl. Acid s Res. Symp. Ser.225-232を参照）。別法として、化学的方法を用いてDME自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、ペプチド合成は種々の固相技術を用いて実行可能である（例えば、Creighton, T. (1984) *Proteins. Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60; Roberge, J.Y.ら(1995) *Science* 269:202-204を参照）。また、合成の自動化は例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー（PE Biosystems）を用いて達成し得る。更にDMEのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【0202】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィー(例えば、Chiez, R.M. 及び F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421を参照)を用いて実質的に精製可能である。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸分析或いはシークエンシングにより確認することができる(例えば、Creighton、前出、pp28-53を参照)。

【0203】

生物学的に活性なDMEを発現させるために、DMEをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要なエレメントを含む。これらのエレメントには、ベクター及びDMEをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このようなエレメントは、その

長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、DMEをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、A T G開始コドン及びコザック配列などの近傍の配列が含まれる。DMEをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのA T G開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれなければならない。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、自然及び合成の様々なものから得ることが可能である。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。(例えば、Scharf, D. 他 (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 201 - 18-162.を参照)。

【0204】

当業者に周知の方法を用いて、DMEをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(例えば、Sambrook, J. 他. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及び Ausubel, F.M. 他. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章及び13章1 - 4章を参照)。

【0205】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、DMEをコードする配列の保持及び発現が可能である。これらには、限定するものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌や、ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で形質転換された植物細胞系や、動物細胞系などが含まれる(例えば、前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem*

. 264:5503-5509、Engelhard、E.K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196、Logan, J. and T. S henk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる (Di Nicola, M. 他 (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356、Yu, M. 他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他(1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. 他(1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0206】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、DMEをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて選択可能である。例えば、DMEをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT 1 プラスミド(GIBCO BRL)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にDMEをコードする配列をライゲーションするとlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクターを用いて、クローニングされた配列のin vitroでの転写、ジデオキシンスクリーニング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失を作り出すことが可能である(例えば、Van Heeke, G.及びS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のDMEが必要な場合は、DMEの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力に発現を誘発するT5またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターを使用できる。

【0207】

DMEの発現に酵母の発現系の使用が可能である。因子やアルコールオキシダーゼやPGHプロモーターなどの構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多種のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, G.A. ら (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544、及びScorer, C. A. ら (1994) *Bio/Technology* 121 - 181 -184. を参照)。

【0208】

植物系もDMEの発現に使用可能である。DMEをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV (例えば、Coruzzi, G. ら. (1984) *EMBO J.* 3 : 1671-1680 ; Broglie, R. ら (1984) *Science* 224 : 838-843 ; および Winter, J. ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17 : 85-105を参照) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせさせて促進される。これらの作製物は、直接のDNA形質転換或いは病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞の中に導入可能である。(例えば、*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill NY, pp.191-196を参照)。

【0209】

哺乳動物細胞では、多種のウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物 / 翻訳複合体にDMEをコードする配列を結合し得る。ウイルスのゲノムの非必須のE 1またはE 3領域への挿入により、感染した宿主細胞にDMEを発現する生ウイルスを得ることが可能である (Logan, J. 及びShenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659を参照)。さらに、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させることが可能である。タンパク質を高レベルで発現させるために、SV40またはEBVを基にしたベクターを用いることが

可能である。

【0210】

ヒト人工染色体 (HAC) を用いて、プラスミドで発現しそれに含まれているものより大きなDNAの断片を供給可能である。治療のために約6 kb ~ 10 MbのHACsを作製し、従来の輸送方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル) で供給する。(例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat Genet.15:345-355.を参照)。

【0211】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞におけるDMEの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、DMEをコードする配列を株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。ベクターの導入の後、細胞を選択培地に移す前に、強化培地で約1 ~ 2日の間増殖させる。選択マーカーの目的は選択的な媒介物に対する抵抗性を与えるとともに、その存在により導入された配列を確実に発現する細胞の増殖及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に好適な組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0212】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収することが可能である。選択系には、以下のものに限定はしないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれtk^rまたはapr^r細胞において使用される。(例えば、Wigler, M. 他 (1977) Cell 11:223-232; 及びLowy, I. 他(1980) Cell 22:817-823を参照)。また代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を選択のベースとして用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、als或いはpatはクロルスルフロン (chlorsulfuron)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (phosphinotricin acetyltransferase) に対する耐性を与える(例えば、Wigler, M. 他. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-3570; Colbere-Garapin

, F. 他(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14を参照)。さらに選択に利用できる遺伝子、例えば、代謝のために細胞が必要なものを変える *trpB* 及び *hisD* が文献に記載されている(例えば、Hartman, S.C. 及び R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51を参照)。アミノシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質GUS、ルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリンなどの可視マーカーが用いられる。緑色蛍光タンパク質(GFP) (Clontech, Palo Alto, CA)も使用できる。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(例えば、Rhodes, C.A. 他(1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131を参照)。

【0213】

マーカー遺伝子の発現の存在/不在によって目的の遺伝子の存在が示されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、DMEをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、DMEをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定可能である。または、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がDMEをコードする配列と一列に配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は、通常タンデム遺伝子の発現も示す。

【0214】

一般に、DMEをコードする核酸配列を含み、DMEを発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて特定することが可能である。これらの方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出及び/または数量化のための膜系、溶液ベース、或いはチップベースの技術を含むタンパク質生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0215】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるDMEの発現の検出及び計測のための免疫学的方法は、当分野で周知である。このような技法には、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ(ELISA)、ラジオ

イムノアッセイ (RIA)、蛍光標示式細胞分取器 (FACS) などがある。DME上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びその他のアッセイは、当分野では十分に知られている。(例えば、Hampton, R. 他.(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual. APS Press, St Paul, MN, Sect. IV; Coligan, J. E. 他 Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及び Pound, J.D. (1990) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

【0216】

種々の標識技術及び結合技術が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイに用いられ得る。DMEをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、DMEをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングすることも可能である。当分野では周知であり市販されているこのようなベクターを、T7, T3, またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドの追加によって、*in vitro*でのRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えば、Amersham Pharmacia Biotech及びPromega (Madison WI)、U.S. Biochemical Corp (Cleveland OH) が市販する種々のキットを用いて行うことができる。容易な検出のために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、コファクター、インヒビター、磁気粒子、及び放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤などが含まれる。

【0217】

DMEをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件下で培養される。形質転換された細胞から産生されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される

その配列及び/またはそのベクターによる。DMEをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過するDMEの分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

【0218】

更に、挿入した配列の発現調節能力または発現したタンパク質を所望の形にプロセシングする能力によって宿主細胞株が選択される。このようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化 (lipidation)、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断する翻訳後のプロセシングを利用して、標的タンパク質、折りたたみ及び/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための特定の細胞装置及び特徴のある機構をもつ種類の宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38) が American Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, MD) より入手可能であり、外来のタンパク質の正しい修飾及びプロセシングを確実にするために選択される。

【0219】

本発明の別の実施例では、DMEをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラDMEタンパク質が、DME活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分が、市販の親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。このような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-mc、赤血球凝集素 (HA) が含まれるが、これらに限定されるものではない。GST及びMBP、Trx、CBP、6-Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物 (phenylarsine oxide)、カルモジュリン、金属キレート樹脂のそれぞれで同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c-mc、及び赤血球凝集素 (HA) によって、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた融合タンパク

質の免疫親和性の精製ができる。また、DMEをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、DMEが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現と精製の方法は、Ausubel. (1995、前出 ch 10). に記載されている。市販されている様々なキットを用いて、融合タンパク質の発現及び精製を促進できる。

【0220】

本発明の別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系(Promega)を用いてin vitroで放射能標識したDMEの合成が可能である。これらの系は、T7またはT3、SP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質をコードする配列の転写と翻訳をつなげる。翻訳は、例えば、³⁵Sメチオニンである放射能標識されたアミノ酸前駆体の存在の下で起こる。

【0221】

本発明のDMEまたはその断片を用いて、DMEに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも1つまたは複数の試験化合物を用いて、DMEへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。試験化合物の例には、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば受容体)または小分子が挙げられる。

【0222】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのDMEの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的な擬態性または自然結合パートナーに密接に関連している(Coligan, J.E. 他(1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、DMEが結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてDMEを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、大腸菌からの細胞が含まれる。DMEを発現する細胞またはDMEを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、DMEまたは化合物の何れかの結合、刺激また

は阻害を分析する。

【0223】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、フルオロフォア、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたDMEと結合させるステップと、DMEとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、細胞遊離剤、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

【0224】

本発明のDMEまたはその断片を用いて、DMEの活性を調整する化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、或るいは部分的または逆アゴニスト等が含まれる。一実施例では、DMEが少なくとも1つの試験化合物と結合する、DMEの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのDMEの活性が試験化合物不在下でのDMEの活性と比較する。試験化合物の存在下でのDMEの活性の変化は、DMEの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をDMEの活性に適した条件下でDMEを含む *in vitro* または細胞遊離系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、DMEの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【0225】

別の実施例では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、DMEまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ノックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照）。例えば129/SvJ細胞株等のマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培

地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292) 等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をロックアウトする (Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

【0226】

DMEをコードするポリヌクレオチドをin vitroでヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞の種類を含む少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する (Thomson, J.A. 他 (1998) Science 282:1145-1147)。

【0227】

DMEをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物 (ブタ) または遺伝子組換え動物 (マウスまたはラット) を作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、DMEをコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、潜在的な医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばDMEを乳汁内に分泌するなどDMEを過剰に発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る (Janne, J. 他 (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

【0228】

(治療)

DMEのある領域と薬剤代謝酵素のある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、DMEの発現は、肋骨、脳、海馬、気管支、精巣、乳房、リンパ節、肺、および卵巣などの正常な組織、並びに脳腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、喘息の肺、および病変した乳房組織などの病変組織密接に関連する。従って、DMEは、自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患においてある役割を果たすと考えられる。DMEの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、DMEの発現または活性を低下させることが望ましい。また、DMEの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、DMEの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0229】

従って、一実施例において、DMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にDMEまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常の異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患が含まれ、自己免疫/炎症の疾患の中には、炎症及び日光性角化症、後天性免疫不全症候群(AIDS)及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌

感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、発生または発達障害の中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham舞蹈病(Sydenham's chorea)及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、内分泌障害の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラー クリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン(ADH)分泌症候群(SIADH)及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレース病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病(chronic hypercalcemia)を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordo

n症候群、褐色細胞腫瘍、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全 (isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 α -還元酵素症候群、女性乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれ、眼の疾患の中には、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、色素性網膜炎、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、交叉腫瘍 (chiasmal tumor) が含まれ、代謝障害の中には、副腎機能不全、脳腱黄色腫症、副腎皮質過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、アドレナリン過剰症、腎臓不全症、上皮小体亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂血症、脂質ミオパシー (lipid myopathies)、脂肪異栄養症、リソソーム蓄積症、メンケス症候群、後角症候群 (occipital horn syndrome)、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損症、低カルシウム血症、低リン酸血症、思春期後小脳性運動失調症、チロシン血症が含まれ、胃腸疾患の中には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、遺伝性高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、及び後天性免疫不全症候群 (AIDS) 腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、

肝炎、肝脂肪症、血色素症、ウィルソン病、 α -1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌とが含まれる。

【0230】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むDMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、DMEまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

【0231】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むDMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたDMEを含む組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

【0232】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むDMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、DMEの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0233】

更なる実施例では、DMEの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にDMEのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患が含まれる。一実施態様では、DMEと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはDMEを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング或いは運搬機構として間接的に用いられ得る。

【0234】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むDMEの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、DMEをコードする

ポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【0235】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補的な配列、ベクターを別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。当業者は、従来の医薬原理にしたがって併用療法で用いる好適な治療薬を選択可能である。治療薬との組み合わせにより、上に列記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらす得る。この方法を用いて少ない量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能であり、広範囲な副作用の可能性を低減し得る。

【0236】

DMEのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたDMEを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてDMEと特異的に結合するものを同定が可能である。DMEの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Fabフラグメント、及びFab発現ライブラリによって作られたフラグメントが含まれる。但し、これらに限定されるものではない。治療用には、中和抗体（即ち、二量体の形成を阻害するもの）が特に好ましい。

【0237】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、DMEまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。このようなアジュバントにはフロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバント、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、及びジニトロフェノールなどの界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG (bacilli Calmette-Guerin) 及びCorynebacterium parvum が特に好ましい。

【0238】

DMEに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド或いはペプチド、またはそれらの断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。DMEアミノ酸の短いストレッチは、KLHなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0239】

DMEに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されるものではない(例えば、Kohler, G. ら. (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, D. ら. (1985) *J. Immunol. Methods* 81-8-42; Cote, R.J. ら. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; Cole, S.P. ら. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120を参照)。

【0240】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えば、Morrison, S.L.他. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81-4851-4855; Neuberger, M.S.他. (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda, S.ら. (1985) *Nature* 314:452,454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、DME特異性一本鎖抗体を生成する。関連する特異性を備えるが別のイディオタイプの組成の抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから鎖混合によって生成することもできる(例えば、Burton D.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11120-3を参照)。

【0241】

抗体は、リンパ球集団の中の *in vivo* 産生を誘発することによって、または免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に示されているような、高

度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、得ることもできる（例えば、Orlandi, R. 他. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837; Winter, G. 他. (1991) Nature 349:293-299を参照）。

【0242】

DMEに対する特異的な結合部位を含む抗体も得ることができる。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(ab')に断片と、F(ab')に断片のジスルフィド架橋を減じることによって生成されるFab断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。別法では、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性とモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な同定が可能となる（例えば、Huse, W.D. ら. (1989) Science 254:1275-1281を参照）。

【0243】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定する。隔離された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、DMEとその特異性抗体との間の複合体調整の計測が含まれる。二つの非干渉性DMEエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0244】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、DMEに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下でDME抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除して得られる値である。多数のDMEエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体医薬の K_a は、DMEに対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のDMEエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体医薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ の高親和性抗体医薬は、DME抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用

いるのが好ましい。Ka値が $10^6 \sim 10^7$ L / mol の低親和性抗体医薬は、DMEが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製 (immunopurification) 及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0245】

ある下流での適用におけるこのような医薬品の品質及び適性を調べるために、ポリクローナル抗体医薬の抗体価及び結合活性を更に評価する。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg / ml の特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$ mg / ml の特異的な抗体を含むポリクローナル抗体医薬は一般に、DME抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。様々な適用例における抗体の特異性及び抗体価、結合活性、抗体の品質や使用法の指針は一般に入手可能である。(例えば、Catty, 前出, 及びColigan 他、前出を参照)。

【0246】

本発明の別の実施例では、DMEをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、DMEをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子 (DNA及びRNA、修飾ヌクレオチド) を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、DMEをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である。

【0247】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に送達することができる (例えば、Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. 他 (1995) 9(13):1288-1296. を参照)。また、アンチセンス配列は、例えばレトロウ

イルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(例えば、Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, 前出; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347を参照)。その他の遺伝送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ、及び当分野で周知のその他の系が含まれる(Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.を参照)。

【0248】

本発明の別の実施例では、DMEをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療は、(i) 遺伝子欠損症(例えば、X染色体連鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) *Science* 288:669-672)によって特徴づけられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1)、遺伝性アデノシン-デアミナーゼ(ADA)欠損症(Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. 他 (1995) *Science* 270:470-475)に関連する重度の複合型免疫欠損、嚢胞性繊維症(Zabner, J. 他 (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. 他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. 他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703)、サラセミア(thalassamia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損による血友病(Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and Somia, N. (1997) *Nature* 389:239-242)を治療したり、(ii) 条件的致死性遺伝子産物(例えば、細胞増殖の制御不能による癌の場合)を発現させたり、及び(iii) 細胞内の寄生虫(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396; Poeschla, E. 他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399)や、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、*Candida albicans* 及び *Paracoccidioides brasiliensis*等の真菌寄生虫、*Plasmodium falciparum* 及び *Trypanosoma cruzi*等の原虫寄生体)に対する防御機能を有するタンパク質を発現させて行うことができる。DMEの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からDMEを発現させて、遺伝

子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【0249】

本発明の更なる実施例では、DMEの欠損による疾患や異常症は、DMEをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってDME欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的な導入技術には、(i) 個々の細胞内へのDNAのマイクロインジェクション、(ii) 金粒子の打ち込み、(iii) リポソーム仲介性トランスフェクション、(iv) 受容体仲介性遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポゾン(Morgan, R. A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217; Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)の使用が含まれる。

【0250】

DMEの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。DMEを発現させるために、(i) 恒常的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、若しくは - アクチン遺伝子等)、(ii) 誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他 (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている: Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター(Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 前出)、または(iii) 正常な個体に由来するDMEをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

【0251】

市販のリポソーム形質転換キット（例えば、Invitrogenが販売しているPERFECT LIPID及びTRANSFECTION KIT）を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能である。別法では、リン酸カルシウム法（Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467）若しくは電気穿孔法（Neumann, B. 他 (1982) *EMBO J.* 1:841-845）を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、これらの標準的な哺乳動物トランスフェクションプロトコルを変更する必要がある。

【0252】

本発明の別の実施例では、DMEの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i) レトロウイルス末端反復配列（LTR）プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でDMEをコードするポリヌクレオチドと、(ii) 好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii) 追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント（RRE）とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター（例えば、PFB及びPFBNE0）はStratagene社から入手可能であり、公表データ（Riviere, I. 他. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:6733-6737）に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。このベクターは、VSVg（Armentano, D. 他 (1987) *J. Virol.* 61:1647-1650; Bender, M.A. 他 (1987) *J. Virol.* 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) *J. Virol.* 62:3802-3806; Dull, T. 他 (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zufferey, R. 他 (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880）等の乱交雑エンベロープタンパク質若しくは標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロープ遺伝子を発現する好適なベクター産生細胞系（VPCL）において増殖される。RIGGに付与された米国特許第5,910,434号（「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」）において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、ある細胞集団（例えば、CD

4⁺T細胞)の形質導入、並びに形質導入した細胞を患者に戻す方法は、遺伝子治療の分野では周知であり、多数の文献に記載されている(Ranga, U. 他. (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0253】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、DMEの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にDMEをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島の中に導入するために可変性であることが証明された(Csete, M.E. 他. (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターが、米国特許第5,707,618号(「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについてはまた、Antinozzi, P.A. 他 (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544; and Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0254】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、DMEの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にDMEをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にDMEを導入する際に特に重要である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製適格性の単純疱疹ウイルス(HSV)I型系のベクターは、霊長類の眼にレポーター遺伝子を送達するために用いられてきた(Liu, X. 他 (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製は、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(Herpes simplex virus strains for gene transfer)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために、

好適なプロモーターのコントロールの下で、細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を含むゲノムからなる組換えHSV d92についての記載がある。また上記特許には、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV株の作製及び使用方法が開示されている。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. 他 (1994) Dev. Biol. 163:152-161を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。クローニングされたヘルペスウイルス配列の操作や、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドをトランスフェクトした後の組換えウイルスの継代、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は当分野で周知の技術である。

【0255】

別法では、ウイルス（正の一本鎖RNAウイルス）ベクターを用いてDMEをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（Semliki Forest Virus, SFV）の生物学的な研究が広範に行われ、遺伝子伝達ベクター（gene transfer vector）がSFVゲノムに基づいていることが分かった（Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469）。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAが完全長のゲノムRNAより高いレベルで複製されるため、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を有するウイルスタンパク質に対してカプシドタンパク質が過剰に産生される。同様に、DMEをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のDMEをコードするRNAが産生され、高いレベルでDMEが合成される。通常はウイルス感染は2～3日以内の細胞溶解に関係するが、シンドビスウイルス（SIN）の変異体を有するハムスターの正常な腎細胞（BHK-21）の持続的な感染を確立する能力は、ウイルスの溶解性の複製が遺伝子治療に適用できるように好適に変更することが可能であることを示唆している（Dryga, S.A. 他. (1997) *Virology* 228 :74-83）。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にDMEを導入することができる。ある集団における細胞のサブセットの特定

の形質導入には、形質導入する前に細胞のソーティングを必要とする場合がある。ウイルスの感染性cDNAクローンの操作、ウイルスcDNA及びRNAのトランスフェクション、並びにウイルスの感染方法は当分野で周知である。

【0256】

例えば開始部位から約 - 10 から約 + 10 までの転写開始部位に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子の発現を阻害することが可能である。同様に、三重らせん塩基対合法を用いて阻害することができる。三重らせん構造は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がるのを阻止するため有用である。三重式DNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている（例えば、Gee, J.E. ら. (1994) In: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NYを参照）。相補的な配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するように設計できる。

【0257】

酵素性RNA分子であるリボザイムは、RNAの特異的切断を触媒するために用いることができる。リボザイム作用の機構には、相補的な標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションが含まれ、ヌクレオチド鎖切断が続く。例えば、DMEをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。

【0258】

任意の潜在的RNA標的内の特異的なリボザイム切断部位が、後続の配列GUA、GUU、及びGUCを含むリボザイム切断部位に対して、標的分子をスキャンニングすることによって初めに同定される。一度同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15個から20個のリボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドの機能を不全にする二次的な構造の特徴について評価することが可能である。候補標的の適合性も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの容易性をテストすることによって評価することが可能である。

【0259】

本発明の相補的なリボ核酸分子及びリボザイムは、当分野で周知の方法を用いて、核酸分子の合成のために作製することができる。これらの方法には、固相ホスホラミダイト化合物などのオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法が含まれる。別法では、RNA分子がin vitro及びin vivoでDMEをコードするDNA配列の転写によって生成され得る、このようなDNA配列はT7またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモータを用いて、種々のベクターの中に組み入れることが可能である。別法では、相補的なRNAを構成的または誘導的に合成するこれらのcDNA作製物は、細胞株、細胞、または組織の中に導入することができる。

【0260】

RNA分子を修飾することによって、細胞内の安定性を高め、半減期を長くすることができる。可能な修飾には、分子の5'及び/または3'端部でのフランキング配列の追加、または分子のバックボーン内のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオネートまたは2' Oメチルを用いる修飾が含まれるが、これらに限定されるものではない。PNAの生成に固有のこの概念は、内在性のエンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンのアセチル-、メチル-、チオ-、及び同様の修飾形態だけでなく、イノシン、キューエオシン (queosine)、及びワイプトシン (wybutosine) などの従来のものでない塩基を含めることによって、これらの分子の全体に拡大することができる。

【0261】

本発明の更なる実施例は、DMEをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物には、限定するものではないが、特定のポリヌクレオチド配列と相互作用可能な非高分子化学物質、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子やその他のポリペプチド転写調節因子が含まれる。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター或いはエンハンサーとして作用し、ポリヌクレオチドの発現を変化させ得る。従って、DMEの発現または活性の増加に関連する疾患の治療において

は、DMEをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、DMEの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、DMEをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有用であり得る。

【0262】

特定のポリヌクレオチドの発現の変化の有効性を調べるために、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングすることができる。試験化合物は、有効な化合物の化学修飾を含む当分野で周知の任意の方法で得ることができる。このような方法は、ポリヌクレオチドの発現を変化させる場合、一般に市販されている或いは専売の天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づいて化合物を合理的にデザインする場合、更に組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効である。DMEをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝露して得る。サンプルには、例えば無傷細胞、透過化処理した細胞、*in vitro*細胞遊離系または再構成生化学系が含まれ得る。DMEをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、DMEをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーションの収量を定量し、その値が1 或いは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較における基準となり得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現の変化が検出される場合は、ポリヌクレオチドの発現の変化に試験化合物が有効であることを示している。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物を調べるために、例えばSchizosaccharomyces pombe 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clark e, M.L. 他 (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13) を用いてスクリーニングする。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性を調べるための、各オリゴヌクレオチド (デオキシリボヌク

レオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、及び修飾オリゴヌクレオチド)の組み合わせライブラリのスクリーニングを含む (Bruice, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0263】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用でき、in vivo、in vitro、及びex vivoでの使用に等しく適している。ex vivoでの治療の場合、患者から採取された肝細胞の中にベクターを導入して、自家移植で同じ患者に戻すためにクローニング増殖される。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる運搬は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる (例えば、Goldman, C.K. 他. (1997) Nature Biotechnology 15:462-66:を参照)。

【0264】

上記したいかなる治療方法も、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ及びサルなどの哺乳動物を含む、治療が必要な全ての被験者に適用できる。

【0265】

本発明の別の実施例は、上記した全ての治療効果のために、医学上認められる担体と共に医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような組成物は、DME、DMEの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはDMEのインヒビターなどからなる。この組成物は、単体で、或いは安定剤などの1種類以上の別の薬剤と共に、無菌の生体適合性医薬品担体に投与することができる。このような医薬品担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、及び水などが含まれるがこれらに限定されるものではない。この組成物は、単独或いは薬物またはホルモンなどの別の薬剤と共に投与することができる。

【0266】

本発明に用いられる組成物は、様々な経路を用いて投与するが可能である。この経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下、または直腸が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0267】

肺投与用の組成物は、液状または乾燥粉末状に調製することができる。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば、従来の低分子量有機薬剤）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送が当分野で周知である。高分子（例えばより大きなペプチドやタンパク質）の場合には、肺の肺胞領域を介する肺輸送の技術が近年向上したため、インスリン等の薬剤を実際に血中に輸送することが可能となった（Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射を用いないで投与できるという点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーが必要でなくなる。

【0268】

本発明に用いる好適な組成物には、目的を達成するため、効果的な量の活性処方成分を含む組成物が含まれる。当業者は、十分に自身の能力で効果的な服用量を定めることができる。

【0269】

DMEまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく、特殊な形態に組成物が調製されるのが好ましい。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内輸送を促進し得る。別法では、DMEまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして作製された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入されることが確認されている（Schwarze, S.R. 他（1999）*Science* 285:1569-1572）。

【0270】

どのような組成物であっても、治療に効果的な薬用量は、初めは、例えば腫瘍細胞の腫瘍細胞アッセイで、或いは動物モデルのどちらかで推定することができる。通常、動物モデルには、マウス、ウサギ、イヌ、サル、またはブタなどが用いられる。動物モデルはまた、好適な濃縮範囲及び投与の経路を決めるのに用いることができる。このような治療をもとに、ヒトへの有益な薬用量及び投与経路を決定することができる。

【0271】

医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえばDMEまたはそ

の断片、DMEの抗体、DMEのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。薬用有効度及び毒性は、たとえば、ED₅₀（服用に対して集団の50%に医薬的效果がある用量）またはLD₅₀（服用に対して集団の50%に致命的である用量）統計を計算するなど、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって決定することができる。毒性効果と治療効果との薬用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀と示すことができる。高い治療指数を示す組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータが、ヒトへの適用のために、薬用量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる薬用量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含む血中濃度の範囲であることが望ましい。薬用量は、用いられる投与形態及び患者の感受性、投与の経路によって、この範囲内で様々である。

【0272】

正確な薬用量は、治療が必要な患者に関する要素を考慮して、実務者によって決められるであろう。薬用量及び投与は、効果的なレベルの活性成分を与えるため或いは所望の効果を維持するために調節される。薬用量の要素として考慮されるものには、疾患の重症度、患者の一般的な健康状態、年齢、体重、及び患者の性別、投与の時間及び頻度、併用する薬剤、反応感受性、及び治療に対する応答が含まれる。作用期間が長い組成物は、三日か四日に一度、一週間に一度、二週間に一度、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって左右され、投与され得る。

【0273】

通常の薬用量は投与の経路によって異なるが、約0.1~100,000 µgまでの最大約1グラムまでである。特定の薬用量及び運搬の方法に関するガイダンスは文献に記載されており、一般に当分野の実務者はそれを利用することができる。当業者は、タンパク質またはインヒビターとは異なったヌクレオチドの製剤を利用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの運搬は、特定の細胞、状態、位置などに対して特異的であろう。

【0274】

（診断）

別の実施例では、DMEに特異的に結合する抗体が、DMEの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはDMEやDMEのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイに用いられる。診断に有用な抗体は、治療のところで記載した方法と同じ方法で製剤される。DMEの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからDMEを検出する方法が含まれる。これらの抗体は、修飾をして或いはしないで使用され、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化され得る。当分野で周知の種々のレポーター分子が用いられるが、その内の幾つかは上記した。

【0275】

DMEを測定するためのELISA, RIA, 及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのDMEの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なDMEの発現の値は、複合体の形成に適した条件の下、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞とDMEに対する抗体とを結合させることによって決定する。標準的な複合体形成の量は、測光法 (photometric) などの種々の方法で定量され得る。被験者のDMEの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。基準値と被験者との間の偏差が、診断の指標となる。

【0276】

本発明の別の実施例によれば、DMEをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用いられるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的なRNA及びDNA分子、及びPNAが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るDMEを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、DMEの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のDME値の調節を監視する。

【0277】

一実施形態では、DMEまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、DMEをコードする核酸配列を同定することが可能である。例えば5'調節領

域である高度に特異的な領域か、例えば保存されたモチーフであるやや特異性の低い領域から作られているかのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントは、プローブがDMEをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いはアレルや関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

【0278】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、DMEをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:13-24の配列、或いはDME遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0279】

DMEをコードするDNAに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、DME及びDME誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。このようなベクターは市販されており、当業者には周知であり、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられる。ハイブリダイゼーションプローブは、例えば³²P或いは³⁵Sなどの放射性核種、或いはアビジン/ビオチン (biotin) 結合系によってプローブに結合されたアルカリホスファターゼなどの酵素標識等の種々のレポーターの集団によって標識され得る。

【0280】

DMEをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、DMEの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常の異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝臓の疾患を含む胃腸疾患が含まれ、自己免疫/炎症の疾患の中には、炎症及び日光性角化症、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状

腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー (APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膝炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病 (MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、発生または発達障害の中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィー、癩癧、性腺形成異常、WAGR症候群 (ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群 (Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham 舞蹈病 (Sydenham's chorea) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、内分泌障害の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラー クリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンプティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害

と、良性線種によって発生しやすい不適當抗利尿ホルモン（ADH）分泌症候群（SIADH）及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病（chronic hypercalcemia）を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全（isolated gonadotropin deficiency）、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 α -還元酵素症候群、女性乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれ、眼の疾患の中には、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、色素性網膜炎、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、交叉腫瘍（chiasmal tumor）が含まれ、代謝障害の中には、副腎機能不全、脳腱黄色腫症、副腎皮質過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、アドレナリン過剰症、腎臓不全症、上皮小体亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂血症、脂質ミオパシー（lipid myopathies）、脂肪異栄養症、リソソーム蓄積症、メンケス症候群、後角症候群（occipital horn syndrome）、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損症、低カル

シウム血症、低リン酸血症、思春期後小脳性運動失調症、チロシン血症が含まれ、胃腸疾患の中には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、遺伝性高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、及び後天性免疫不全症候群（AIDS）腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、肝脂肪症、血色素症、ウィルソン病、 α -1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌とが含まれる。MADをコードするポリヌクレオチド配列は、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック（dipstick）、ピン（pin）、ELISA式アッセイ、及び変異DMEの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。このような質的或いは量的方法は、当分野では周知である。

【0281】

ある実施態様では、DMEをコードするヌクレオチド配列は、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて有用であろう。DMEをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適な培養期間の後、サンプルを洗浄し、シグナルを定量して基準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと比べて著しく変わっている場合は、サンプル内のDMEをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイを用いて、動物実験、臨床試験、或いは個人の患者の治療を監視における、特

定の治療効果を推定することが可能である。

【0282】

DMEの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、DMEをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。基準値と被験者の値との偏差を用いて罹患しているかどうかを決定する。

【0283】

疾患の存在が確定され、治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返して、被験者における発現のレベルが正常な患者に示される値に近づき始めたかどうかを推定することが可能である。繰り返し行ったアッセイの結果を、数日から数ヶ月の期間の治療の効果を見るのに用いることができる。

【0284】

癌では、個体からの生体組織における異常な量の転写物が、疾患の発生の素因を示し、また実際に臨床的症状が出る前に疾患を検出する方法を提供することが可能である。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法或いは積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または進行を防ぐことが可能となる。

【0285】

DMEをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。このようなオリゴマーは、化学的な合成、酵素を用いた生成、或いは*in vitro*で生成され得る。オリゴマーは、好ましくはDMEをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはDMEをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件の下、特定の遺伝子

や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジエントな条件の下、近縁のDNA或いはRNA配列の検出及び/または定量のため用いることが可能である。

【0286】

或る実施態様において、DMEをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、一塩基多型 (SNP) を検出し得る。SNPは、ヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となる場合が多いヌクレオチドの置換、挿入及び欠失である。限定するものではないが、SNPの検出方法には、一本鎖立体構造多型 (SSCP) 及び蛍光SSCP (fSSCP) 法が含まれる。SSCPでは、DMEをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) でDNAを増幅する。このDNAは、例えば病変或いは正常な組織、生検サンプル、体液等に由来し得る。このDNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR産物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。この差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光標識することによって、DNAシーケンシング装置などのハイスループット機器でアンプリマー (amplimer) の検出をすることが可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP : isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、共通のコンセンサス配列の構築に用いられる個々の重複するDNA断片の配列を比較することによって、多型を同定することができる。これらのコンピュータベースの方法は、DNA配列クロマトグラムの自動分析及び統計モデルを用いたシーケンシングエラーや研究室でのDNAの調整に起因する配列のばらつきを排除する。別法では、例えばハイスループットのMASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0287】

DMEの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification)、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる (例えば、Melby, P.C.ら(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44 ; Duplaa, C.ら(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照)。多数のサンプルの定量速度は、ハイスループット型のアッセイを用いるこ

とで速くなるであろう。このアッセイでは、目的のオリゴマーやポリヌクレオチドが様々な希釈液中に含まれ、分光光度法或いは非色応答によって定量が迅速である。

【0288】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いることができる。マイクロアレイを、上記したように多数の遺伝子の相対的な発現レベルを同時にモニタリングする転写イメージング技術に用いることができる。マイクロアレイはまた、遺伝子変異、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いて、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を解明し、疾患を診断し、遺伝子発現に関連する疾病の進行/後退をモニタリングし、疾患の治療における治療薬の開発や活性のモニタリングを行うことができる。特に、患者にとって最適かつ有効な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを作成することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づいて、患者に対して極めて効果的でありながら副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0289】

別の実施例では、DME、DMEの断片、DMEに特異的な抗体をマイクロアレイ上のエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようにタンパク質間相互作用、薬剤 - 標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニタリング及び測定することが可能である。

【0290】

特定の実施例は、或る組織または細胞型の転写イメージを生成する本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞型により遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所定の条件下で所定の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析される (Seilliamer 他、米国特許第5,840,484号の "Comparative Gene Transcript Analysis" を参照。この特許に言及することを以って本明細書の一部とする)。従って、特定の組織または細胞型の転写物または逆転写物の全てに本発

明のポリヌクレオチドまたはその相補配列をハイブリダイズすることにより、転写イメージが生成され得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列がマイクロアレイ上に複数のエレメントのサブセットを構成するハイスループット型でハイブリダイゼーションさせる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルとなり得る。

【0291】

転写イメージは、組織、細胞株、生検サンプル、またはその他の生体サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。従って、転写イメージは、組織または生検サンプルの場合には in vivo、または細胞株の場合には in vitro における遺伝子発現を反映する。

【0292】

本発明のポリヌクレオチドの発現プロファイルを示す転写イメージはまた、合成化合物または天然化合物の毒性試験のみならず、in vitroモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用され得る。全ての化合物は、作用及び毒性の機構を示唆する、頻繁に分子フィンガープリント若しくは毒性シグネチャ (signature) と称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを引き起こす (Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:15 3-159、Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、また言及することを以って本明細書の一部とする)。試験化合物が、毒性を有する既知の化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性が高い。フィンガープリンまたはシグネチャが、より多くの遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいれば、より有用かつ正確になる。理想としては、発現のゲノム全域にわたって測定し、最高品質のシグネチャを提供することである。任意の試験化合物によっても発現が変化しない遺伝子も同様に重要である。それは、これらの遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを標準化することができるためである。標準化処理は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャのエレメントへの遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない (例えば2000年2月29日にNational Institute

of Environmental Health Sciencesより発行されたPress Release 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、毒性シグネチャを用いる毒性スクリーニングにおいて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要でありまた望ましいことである。

【0293】

一実施例では、試験化合物の毒性は、核酸を含有する生体サンプルをその試験化合物で処理して評価する。処理した生体サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1若しくは複数のプローブでハイブリダイズさせ、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量することができる。処理した生体サンプル中の転写レベルを、非処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差が、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示唆する。

【0294】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞型のプロテオームを分析することに関連する。「プロテオーム」という用語は、或る特定の組織または細胞型におけるタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームを構成する各タンパク質は、個々に更なる分析をすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロファイルは、所定の条件下で所定の時間に発現したタンパク質の数及びそれらの相対的な存在量を定量することにより分析する。従って、ある細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞型のポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、このような分離は2次元ゲル電気泳動によって行う。この2次元ゲル電気泳動法では、まず、1次元の等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、次に、2次元のドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に従って分離する(前出のSteiner and Anderson)。これらのタンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの染色剤を用いてゲルを染色して、分散した個別の位置にあるスポットとしてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサン

ブル、例えば試験化合物または治療薬で処理済みまたは未処理のいずれかの生体サンプルから得られる等位置にあるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を調べる。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的に切断した後、質量分析する標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基であるその部分的な配列を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

【0295】

プロテオームのプロファイルは、DMEに特異的な抗体を用いてDME発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上のエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝露して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する (Lueking, A. ら. (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111、Mendoze, L.G. ら. (1999) *Biotechniques* 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

【0296】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行して分析するべきである。或る組織における或るタンパク質では、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関性が低いことがあるため (Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18:533-537)、プロテオーム毒性シグネチャは、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロファイルを変化させる化合物の分析において有用たり得る。更に、体液中での転写の分析は、mRNAが急速に分解するため困難である。しがたがって、このような場合にはプロテオームのプロファイル作成はより信頼でき、情報価値がある。

【0297】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処理して評価する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質を分離して、各タンパク質の量が定量できるようにする。各タンパク質の量を、未処理生体サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプル中のタンパク質の量の差は、処理されたサンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。個々のタンパク質は、それらのアミノ酸残基をシーケンシングし、これらの部分配列を本発明のポリペプチドと比較することで同定する。

【0298】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処理することにより評価する。生体サンプルから得たタンパク質を、本発明のポリペプチドに特異的な抗体と共にインキュベートする。その抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生体サンプル中のタンパク質の量を、未処理生体サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差が、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。

【0299】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して使用し、分析する。(例えば、Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号;Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweiler 他(1995) PCT出願番号W095/251116; Shalon, D.他 (1995) PCT出願番号W095/35505; Heller, R.A. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; 及び Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。また、この文献を引用することを以って本明細書の一部とする。

【0300】

本発明の別の実施例ではまた、DMEをコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コーディング配列または非コーディング配列の何れかを用

いることができるが、或る例では、コーディング配列より非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー間にコーディング配列が保存されていることにより、染色体マッピング時に望ましくない交差ハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。この配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である (Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

【0301】

in situ蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) は、他の物理的及び遺伝子地図データと相関し得る (例えば、Heinz-Ulrich, 他による(1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968を参照)。遺伝子地図データの例は、種々の科学誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のワールドワイドウェブのサイトで見つけることができる。物理的な染色体地図上のDMEをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関連するDNA領域の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

【0302】

染色体標本のin situハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子地図を拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置させることにより、たとえ正確なヒト染色体の位置が分かっていなくても、関連するマーカーが明らかになる場合が多い。この情報は、位置クローニング或いは別の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患の研究をしている研究者にとって価値がある。疾患や症候群に關与する1つ或いは複数の遺伝子の位置が、例えば血管拡張性失調症の

11q22-23などの特定の遺伝子領域に遺伝子結合によって大まかに決定されると、その領域に対するどの配列マッピングも、さらなる調査のための関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表す（例えば、Gatti, R.A.他による（1988）Nature 336:577-580を参照）。また、目的の本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、即ち感染者の間の、転位置、反転などによる染色体位置の違いを検出することもある。

【0303】

本発明の別の実施例では、DME、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。このようなスクリーニングに用いる断片は、溶液に遊離、固体支持物に固定、細胞の表面上に保持、或いは細胞内に存在する。DMEと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【0304】

薬剤スクリーニングに用いる別の方法は、目的のタンパク質に対して、好適な結合親和性を有する化合物のスクリーニング処理能力を高めるために用いられる（例えば、Geysen,他による（1984）PCT出願番号 W084/03564を参照）。この方法では、相当な数の異なる小さな試験用化合物が、プラスチックピン或いは他の基板の上に合成される。試験用化合物は、DME、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、結合されたDMEが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたDMEはまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いて、ペプチドを捕らえ、固体支持物に固定することもできる。

【0305】

別の実施例では、DMEと結合可能な中和抗体がDMEと結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体が、DMEと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【0306】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にDMEをコードするヌクレオチド配列を用いて、限定はされないが、現在知られているトリプレット暗号及び特異的な塩基対相互作用などのヌクレオチド配列の特性に依存する新しい技術を提供することができる。

【0307】

当分野の技術者であれば、更なる説明がなくても前述の説明だけで最大限に本発明を利用できるであろう。したがって、以下に記載する特定の好適な実施例は、例示目的であって本発明を限定するものではない。

【0308】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60/181,856号、同第60/183,684号、同第60/185,141号、同第60/186,818号、同第60/188,345号、および同第60/189,997号に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0309】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

インサイトcDNAはLIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA)に含まれているcDNAライブラリに由来し、表4の列5に示されている。組織の一部をホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解する一方、この組織の別の一部をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIZOL (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの単相溶液などの好適な変性剤の混合液に溶解した。この溶解物を塩化セシウムにおいて遠心分離によって、或いはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムのどちらかとエタノール、或いは別の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

【0310】

RNAの純度を高めるためにRNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNA分解酵素でRNAを処理する。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子(Promega)またはOLIGOTEXラテックス粒子(QIAGEN

. Valencia CA)、OLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いてポリ(A+) RNAを単離した。別法では、POLY(A)PURE mRNA精製キット(Ambion, Austin TX)などの別のRNA単離キットを用いて組織溶解物から直接単離した。

【0311】

ある場合には、Stratagene社にRNAを提供し、Stratagene社が対応するcDNAライブラリを作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERSCRIP^T プラスミドシステム(Life Technologies)を用いて当分野で周知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, ユニット5.1-6.6を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに結合させてから、好適な1つの制限酵素或いは複数の制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S 1000または SEPHAROSE CL2B、SEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、アガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。PBLUESCRIP^Tプラスミド(Stratagene)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)、pcDNA2.1プラスミド(Invitrogen Carlsbad CA)、PBK-CMVプラスミド(Stratagene)、pINCYプラスミド(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)、またはそれらの誘導體などの好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位にcDNAを結合させた。この組換えプラスミドを、Stratagene社のXL1-Blue, XL1-BlueMRF、SOLR、またはLife Technologies社のDH5 またはDH 10B、ELECTROMAX DH 10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に導入し組み込んだ。

【0312】

2 cDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように得たプラスミドを、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)或いは細胞溶解を利用したin vivo切除によって宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、及びAGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、REAL Prep 96プラスミドキットの内の少なくとも1つを用いてプラスミドを精製した

。沈殿させた後、0.1 mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4 で保管した。

【0313】

別法では、ハイスループットの直接結合PCR法によって宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した。(Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程を単一反応混合液で行った。サンプルを処理してから384-ウェルプレートに移して保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光定量的に測定した。

【0314】

3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したインサイトcDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンシング反応は標準的な方法で行うか、またはHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)或いはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体移送装置と共にABI CATALYST 800 (PE Biosystems) サーマルサイクラー或いはPTC-200 thermal cycler (MJ Research)などのハイスループット装置を用いて行った。cDNAのシークエンシング反応は、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(PE Biosystems)などのABIシークエンシングキットに含まれる試薬を用いて行った。cDNAシークエンシングの反応物の電気泳動的による分離及び標識したポリヌクレオチドの検出は、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Molecular Dynamics)、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(PE Biosystems)、または当分野で周知のその他の配列解析システムを用いて行った。cDNA配列内の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長した。

【0315】

インサイトcDNAに由来する本ポリヌクレオチド配列の確認は、BLAST、動的プ

ログラミング、およびジヌクレオチドの分布による解析 (dinucleotide nearest neighbor analysis) に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター、リンカー、およびポリ A 配列を取り除き、更にあいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、インサイトcDNA配列およびそれらの翻訳を、公共のデータベースであるGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、および真核生物のデータベース、およびBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、およびPFAMなどの隠れマルコフモデル (HMM) を基にしたタンパク質ファミリーのデータベースから選択した配列に対して問合せた (HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス主構造を分析する確率的手法である。例えば、Eddy, S. R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 : 361-365を参照)。このような問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMRに基づいたプログラムを用いて行った。インサイトcDNA配列を組み立てて、完全長ポリヌクレオチド配列を作製した。或いは、GenBank cDNAs、GenBank EST、ステッチ配列 (stitched sequence)、ストレッチ配列 (stretched sequences)、またはGenscan-推定コード配列 (実施例4および5を参照) を用いて、インサイトcDNA群を完全長の配列に伸長した。配列の組み立ては、Phred、Phep、およびConsedに基づいたプログラムを用いて行い、GeneMark、BLAST、およびFASTAに基づいたプログラムを用いて、オープンリーディングフレームを決定するべくcDNA群をスクリーニングした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長ポリペプチド配列を得た。別法では、本発明のポリヌクレオチドは、完全長翻訳ポリヌクレオチドの任意のメチオニン残基から始まり得る。次に、完全長ポリペプチド配列をGenBankタンパク質データベース (genpept)、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、Prosite、およびPFAMなどの隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたタンパク質ファミリーデータベースに対して問合せて分析した。これらの完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) およびLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて分析した。ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列のアラインメントを、アラインメントした配列間のパーセント同一性も計算するMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム (DNASTAR) に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムによって指定されたデフォルトパ

ラメータを用いて作成した。

【0316】

表7は、インサイトcDNAおよび完全長配列の組み立て、および組み立てた配列の分析に利用したツール、プログラム、およびアルゴリズム、並びにそれらの説明、引用文献、閾値パラメータを簡単に示す。表7の列1は用いたツール、プログラム、およびアルゴリズム、列2はそれらの簡単な説明、列3は引用することで本明細書の一部とした引用文献、列4の記載されている部分は2つの配列の一致の程度を評価するために用いたスコア、確率値、およびその他のパラメータを示す（スコアが高くなれば高くなるほど即ち確率値が低ければ低いほど、配列間の相同性が高くなる）。

【0317】

完全長のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:13-24のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20～約4000ヌクレオチドの断片を表4の列4に示した。

【0318】

4 ゲノムDNAからコード配列の同定および編集

推定薬剤代謝酵素は、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物に由来するゲノムDNA配列を分析するための汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. および S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268 : 78-94、Burge, C. および S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 346-354を参照）。このプログラムは推定エキソンを連結して、メチオニンから停止コドンまで伸長した組み立てcDNA配列を構築する。Genscanにより得られる配列は、FASTAデータベースのポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列になる。Genscanによって一回で解析できる配列の最大長さは30kbに設定されている。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列が薬剤代謝酵素をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをPFAMモデルにおいて薬剤代謝酵素について問合せて分析した（7tm_1、7tm_2、7tm_3、および7tm_4）。潜在的な薬剤

代謝酵素が、薬剤代謝酵素としてアノテーションが付けられたインサイトcDNA配列に対する相同性を基に同定された。次に、これらの選択されたGenscan推定配列を、BLAST解析を用いてgeneptおよびgbpri公共データベースの配列と比較した。必要に応じて、Genscan推定cDNA配列を、geneptにおいてBLASTで最もヒットした配列と比較して、Genscan推定配列における余分なエクソンや省いてしまったエクソンなどのエラーを修正し、編集した。BLAST解析を用いてGenscan推定cDNA配列を含むインサイトcDNAまたは公共のcDNAを見つけ出すことにより、転写の証拠が得られる。インサイトcDNAがGenscan推定cDNA配列を含む場合、この情報を用いてGenscan推定配列を修正或いは確認できる。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に説明した組み立て方法でGenscan推定コード配列とインサイトcDNAおよび/または公共のcDNA配列を組み立てて作製した。別法では、完全長ポリヌクレオチド配列は、その全てが編集した或いは未編集のGenscan推定コード配列から作製した。

【0319】

5 ゲノム配列データとcDNA配列データとの組み立て

ステッチ配列 (Stitched Sequence)

部分的なcDNA配列を、実施例4に記載したGenscan遺伝子同定プログラムによって推定されたエクソンで伸長した。実施例3に記載されたように組み立てられた部分的なcDNAをゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNAおよび1或いは複数のゲノム配列に由来する関連する推定Genscanエクソンを含む複数のクラスターに入れた。各クラスターを、グラフ理論および動的計画法に基づいたアルゴリズムを用いて、cDNAおよびゲノム情報を統合して分析し、後に確認される潜在的なスプライスバリエントを生成し、編集或いは伸長して完全長の配列を作製した。或るクラスターの2つ以上の配列に或る区間の全長が存在する配列区間を同定し、推移 (transitivity) により同定した区間を同等と考える。例えば、或る区間がcDNAおよび2つのゲノム配列のそれぞれに存在する場合、これら3つ全ての区間を同等と考える。この方法によって、関連しないが連続するゲノム配列をcDNA配列によって繋ぎ1つにする。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可

能な最も長い配列および変異配列を作製する。或るタイプ(cDNAとcDNA、またはゲノム配列とゲノム配列)の親配列に沿って連結される区間と区間との繋ぎ合わせは、親配列のタイプが異なる(cDNAとゲノム配列)連結より好ましい。得られたステッチ配列を翻訳し、BLAST解析でgenpeptおよびgbpri公共データベースにおける配列と比較した。Genscanによって推定された不適当なエキソンを、genep tにおいてBLASTで最もヒットした配列と比較して修正する。このような配列を更なるcDNA配列で伸長し、必要に応じてゲノムDNAで検査した。

【0320】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分的なDNA配列をBLAST解析に基づいたアルゴリズムで完全長に伸長した。まず、実施例3に記載したように組み立てた部分的なcDNAを、BLASTプログラムを用いてGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、および真核生物のデータベースなどの公共のデータベースに対して問い合わせた。次に、GenBankの相同性の最も高いタンパク質を、実施例4に記載したインサイトcDNA或いはGenScanエキソン推定配列の何れかと比較した。得られた複数の高スコアのセグメント対(HSP)を用いてキメラタンパク質を作製し、GenBankの相同タンパク質上に翻訳した配列をマッピングした。元のGenBankの相同タンパク質に対して、キメラタンパク質に挿入や欠失が起こり得る。公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を探し出すために、GenBankの相同タンパク質およびキメラタンパク質の両方をプローブとして用いた。このようにして、部分的なDNA配列を相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。完全な遺伝子を含んでいるか得られたストレッチ配列を検査した。

【0321】

6 DMEをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:13 - 24を組み立てるために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、インサイトLIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:13 - 24と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap(表7)などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。Stanford Human Genomese Center (SHGC)、

Whitehead Institute for Genome Research (WIGR)及びGenethonなどの公共の情報源から入手できる放射線ハイブリッド (radiation hybrid) 及び遺伝子マッピングのデータを用いて、クラスター化した配列がすでにマッピングされているかを調べる。クラスターにマッピングされた配列が含まれている場合は、そのクラスターの全ての配列 (特定のSEQ ID NOを含む) をそのマッピング位置に割り当てた。

【0322】

遺伝子地図の位置は、範囲、区間、またはヒト染色体によって表される。センチモルガンで示したマッピング位置の範囲は、染色体の短腕 (p) の末端から測定した (センチモルガン (cM) は、同一染色体上の遺伝子間の乗換え率に基づいた距離を表す単位である。平均すると、1 cMはヒトの染色体の1メガベースに概ね等しいが、組換え率の高い部分と低い部分があるため、大きく変化し得る)。距離cMは、配列がそれぞれのクラスターに含まれている放射線ハイブリッドマーカーの境界を検出できるGenethonによってマッピングされた遺伝子マーカーに基づいている。NCBI「GeneMap99」 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>) などの公衆が入手可能なヒト遺伝子マップおよびその他の情報源を用いて、上記した区間が既に同定されている疾患遺伝子マップ内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

【0323】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されている膜への標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを伴う (例えば、Sambrook, 前出, 7章; 及び Ausubel, F.M. 他, 前出, 4章及び16章を参照)。

【0324】

BLASTに用いる類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals) のようなcDNAデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この分析は多くの膜系ハイブリダイゼーションより非常に速度が速い。さらにコンピュータ検索の感度を変更して、任意の特定の一致が、厳密な一

致或いは相同的一致の何れかとして分類されるかを確定することができる。検索の基準は、

【0325】

【数1】

$$\frac{(\text{BLAST スコア} \times \text{配列一致率})}{5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)}) \text{の最小値}}$$

として定義される積スコアである。積スコアは、0～100の標準化された値であり、以下のように求める。BLASTスコアにヌクレオチド配列の一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアのセグメントの対(HSP)において一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不適性塩基対に-4を割り当てることにより、BLASTスコアを計算する。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより離隔される)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアの塩基対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、BLASTアラインメントの断片的重複と質とのバランスを表す。例えば積スコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合にのみ得られる。積スコア70は、100%の同一性で重畳が70%であるか、或いは88%の同一性で重畳が100%であるかの何れかの場合である。積スコア50は、100%の同一性で重畳が50%重畳であるか、或いは79%の同一性で重畳が100%であるかの何れかの場合である。

【0326】

或いは、DMEをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば、ある完全長の配列は、少なくとも部分的にインサイトcDNA配列をオーバーラップさせて組み立てられる(実施例3を参照)。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、心血管系、結合組織、消化系、胚構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肺、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、または尿管などの1つの生物/組織のカテゴリーに分類される。各カテゴリーにおけるライブラリの数をカウントし、その合

計数を全カテゴリーのライブラリ数で除す。同様に、各ヒト組織は、癌、細胞系、発生、炎症、神経、外傷、心血管、プール (pooled) などの1つの疾患/症状のカテゴリーに分類され、各カテゴリーにおけるライブラリ数をカウントし、その合計数を全カテゴリーのライブラリ数で除す。得られるパーセンテージは、DMEをコードするcDNAの疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) から得ることができる。

【0327】

8 DMEをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列は、完全長分子の好適な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてその完全長分子の好適な断片を伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68~72の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを伸長した。

【0328】

選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要な場合、若しくは望ましい場合は、追加或いはネスト化プライマーの組を設計する。

【0329】

当分野で既知の方法を利用したPCR法で高い忠実度で増幅した。PCRはPTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.)を用いて96ウェルブロックプレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ とメルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素 (Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメータで

増幅を行った。

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 60 で1分間
- ステップ4 68 で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を20回繰り返す
- ステップ6 68 で5分間
- ステップ7 4 で保管

別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った

。

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 57 で1分間
- ステップ4 68 で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を20回繰り返す
- ステップ6 68 で5分間
- ステップ7 4 で保管。

【0330】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 μ lの希釈していないPCR産物に溶解した100 μ lのPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート(Coming Costar, Acton MA)の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンして、サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量化する。反応混合物の5~10 μ lのアリコットを1%のアガロースミニゲル上での電気泳動によって解析し、何れの反応物が配列を伸長することに成功したかを決定する。

【0331】

伸長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison W

1)で消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結する前に音波処理またはせん断を行った。ショットガンシーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上に分離して断片を切断し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。T4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて伸長したクローンをpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の延び出しを処理してコンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37℃で一晩培養した。

【0332】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。

- ステップ1 94℃で3分間
- ステップ2 94℃で15秒
- ステップ3 60℃で1分間
- ステップ4 72℃で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す
- ステップ6 72℃で5分間
- ステップ7 4℃で保管。

上記したようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量化した。DNA回収率の悪いサンプルは、上記した条件で再び増幅した。サンプルを20%のジメチルサルホサイド(dimethylsulphoxide)(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC DIRECTキット(Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Applied Biosystems)を用いてシーケンシングした。

【0333】

同様に上述の手順で、完全長のポリヌクレオチド配列を検査したり、或いは完全長のポリヌクレオチド配列を利用して、この伸長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適なゲノムライブラリを用いて5'調節配列を得た。

【0334】

9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用法

SEQ ID NO:13 - 24から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記すが、より大きなcDNAフラグメントの場合でも基本的に同じ手順を用いる。オリゴヌクレオチドを、OLIGO4.06ソフトウェア (National Bioscience) のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、50pmolの各オリゴマーと、250 μ Ciの[³²P]アデノシン三リン酸 (Amersham, Chicago, IL) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを組み合わせるにより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、SEPHADEX G-25超精細排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。毎分10⁷カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、次のエンドヌクレアーゼ、Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、XbaI或いはPvu II (DuPont NEN) の1つを用いて切断したヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において用いる。

【0335】

各切断物からのDNAを、0.7%アガロースゲル上で分画して、ナイロン製メンブラン (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に転写する。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くため、例えば、最大0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件の下、プロットを順次室温にて洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー或いは別のイメージ化手段で視覚化して比較する。

【0336】

1.0 マイクロアレイ

マイクロアレイ上のアレイエレメントの連結または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾプリント (インクジェットプリンター、前出のBaldeschweiler等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一な非多孔性の固体

とすべきである (Schena (1999). 前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。別法では、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱や紫外線、または化学的或いは機械的な結合手段で基板の表面にエレメントを配置して結合させることができる。通常のアレイは利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正な数のエレメントを含めることができる (Schena, M. 他 (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. 他 (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31. を参照)。

【0337】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、或いはそれらの断片やオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントとなり得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片やオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) などの当分野で周知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。このアレイエレメントを、生体サンプル中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。生体サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに結合する。ハイブリダイゼーションの後、生体サンプルからハイブリダイズしなかったヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおけるハイブリダイゼーションを検出する。別法では、レーザー脱離及び質量スペクトロメトリーを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の程度及び相対的存在量は、算定することができる。一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

【0338】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルは、MMLV逆転写酵素、0.05 pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー (21mer)、1 \times 第1鎖緩衝液、0.03単位/ μ lのRNアーゼインヒビター、500 μ M dATP、500 μ M dGTP、500 μ M dTTP、40 μ M dCTP、40 μ M dCTP-Cy3 (BDS) また

はdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。この逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用いて、200 ngのポリ(A)⁺RNAを含む25 ml容量で行う。特異的なコントロールポリ(A)⁺RNAは、in vitro転写により非コーディング酵母ゲノムDNAから合成する。370 で2時間インキュベートした後、各反応サンプル (一方はCy3標識、他方はCy5標識) は、2.5 mlの0.5 M 水酸化ナトリウムで処理し、850 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを変性する。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピナカラム (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルを、1 mlのグリコーゲン (1 mg/ml)、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールを用いてエタノール沈殿させる。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて乾燥して仕上げ、14 µl 5 × SSC / 0.2% SDS中で再懸濁する。

【0339】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローン化cDNA挿入断片を含むベクターを含有する細菌性細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNA挿入断片に隣接するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRによって、1 ~ 2 ngの初期量から5 µgを超える最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製する。

【0340】

精製したアレイエレメントを、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、処理中及び処理後に大量の蒸留水での洗浄と、0.1%のSDS及びアセトン中で超音波による洗浄を行う。スライドガラスは、4%フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、蒸留水中で広範囲にわたって洗浄し、95%エタノール中の0.05%アミノプロピルシラン (Sigma) でコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 の天火で硬化させる。

【0341】

米国特許第5,807,522号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が100 ng/ μ lのアレイエレメントDNA 1 μ lを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。次にこの装置が、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルを分注する。

【0342】

マイクロアレイには、STRATALINKER UVクロスリンカー (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2% SDSで1回洗浄し、蒸留水で3回洗浄する。非特異的な結合部位は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) における0.2% カゼイン中で60 で30分間マイクロアレイをインキュベートし、その後上述したように0.2% SDS及び蒸留水で洗浄することによってブロックする。

【0343】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 \times SSC、0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液にCy3及びCy5標識したcDNA合成産物を各0.2 μ g含む9 μ lのサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合液を、65 で5分間加熱し、マイクロアレイ表面上に一定量分注してから1.8 cm^2 のカバーガラスで覆う。このアレイを、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水チェンバーに移す。チャンバーの角に140 μ lの5 \times SSCを加えて、チャンバー内を湿度100%に保持する。このアレイを含むチャンバーを、60 で約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中 (1 \times SSC, 0.1% SDS) において45 で10分間、第2洗浄緩衝液中 (0.1 \times SSC) において45 で10分間それぞれ3回洗浄し、その後乾燥させる。

【0344】

検出

レポーター標識されたハイブリダイゼーション複合体は、Cy3を励起するための488 nm、及びCy3を励起するための632 nmのスペクトル線を生成し得る Inn

ova 70混合ガス10 Wレーザー (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20倍の顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、アレイ上に励起レーザー光を集中させる。このアレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御X-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタスキャンする。本実施例で用いた1.8 cm × 1.8 cmのアレイは、20 μmの解像度でスキャンする。

【0345】

2つの異なるスキャンにおいて、混合ガスマルチラインレーザーは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、波長に基づいて2つの蛍光体に対応する2つの光電子増倍管検出器 (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) に分割される。アレイと光電子増倍管との間に配設された好適なフィルタを用いて信号をフィルタリングする。用いる蛍光体の最大発光は、Cy3では565 nm、Cy5では650 nmである。装置は両方の蛍光体からのスペクトルを同時に記録できるが、レーザー源に好適なフィルタを用いて、蛍光体1つにつき1回スキャンし、各アレイを通常2回スキャンする。

【0346】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNAコントロール種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列を含め、その位置におけるシグナルの強度がハイブリダイズする種の重量比1:100,000に相関するようにする。異なる試料 (例えば検査細胞及びコントロール細胞を代表する) からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光体で標識し、他と異なって発現する遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズさせる場合には、較正は2つの蛍光体を有する較正するcDNAのサンプルを標識して、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えて行う。

【0347】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル (A/D) 変換ボード (Analog Devices, Inc., Norwood MA) を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、リニア20色変換を用いてシグナル強度が青色 (低シグナル) から赤色 (

高シグナル)までの擬似カラー範囲にマッピングされるイメージとして表示される。データはまた、定量的に分析される。2つの異なる蛍光体を同時に励起して測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、先ずデータは蛍光体間の光学的漏話(重複発光スペクトルに起因する)に対して補正される。

【0348】

グリッドを蛍光シグナルイメージ上に重畳して、各スポットからのシグナルがグリッドの各エレメントに中央に位置するようにする。各エレメント内の蛍光シグナルを統合し、シグナルの平均強度に対応する数値を得る。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

【0349】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

DMEをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のDMEの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15~約30個の塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、より小さな或いはより大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びDMEのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5

配列から相補的なオリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがDMEをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0350】

1.2 DMEの発現

DMEの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でDMEが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えベクター

を、BL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル - Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとDMEを発現する。真核細胞でのDMEの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多面性ウイルス(AcMNPV)を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、DMEをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモータによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda (Sf9)昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(例えば、Engelhard, E. K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.を参照)。

【0351】

殆どの発現系では、DMEが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く1回で行うことができる。Schistosoma japonicumからの26キログルトンの酵素GSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で固定されたグルタチオンで融合タンパク質の精製が可能となる(Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でDMEからタンパク質的に切断できる。アミノ酸8個のペプチドであるFLAGで、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)で精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したDMEを直接用いて以下の実施例16、17、及び18のアッセイを行うことができる。

【0352】

1.3 機能のアッセイ

DMEの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのDMEをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを、cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。このようなベクターには、pCMV SPORT™ (Life Technologies.)及びpCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを含んでいる。5 ~ 10 µgの組換えベクターを、例えば内皮由来か造血由来のヒト細胞株にリポソーム製剤或いは電気穿孔法によって一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 µgのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とを区別できる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。このような標識タンパク質には、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、及びCD64またはCD64-GFP融合タンパク質が含まれる。レーザー光学に基づいた技術を利用した自動流動細胞計測法(FCM)を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。また、FCMで、先行した或いは同時の細胞死の現象を診断する蛍光分子の取り込みを検出して計量する。これらの現象には、プロピジウムヨウ化物でのDNAの染色によって計測される核DNA内容物の変化と、プロモデオキシウリジンの取り込み量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節と、特異的な抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内のタンパク質の発現の変化と、蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とが含まれる。流動細胞計測法は、Ormerod, M. G.による(1994) Flow Cytometry Oxford, New York, N.Y.に記載されている。

【0353】

遺伝子発現におけるDMEの影響は、DMEをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存された領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換され

ない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。DME及び目的の他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0354】

1.4 DMEに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば、Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 1816 - 3088-495を参照)または他の精製技術で実質的に精製されたDMEを用いて、標準的なプロトコルでウサギを免疫化して抗体を作り出す。

【0355】

別法では、DMEアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C末端付近の、或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で周知である(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

【0356】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのABI 431Aペプチドシンセサイザー(PE Biosystems)を用いてfmoc法のケミストリにより合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によりKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel, 1995を参照)。フロイントの完全アジュバントにおいてオリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗DME活性を検査するには、ペプチドまたはDMEを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0357】

1.5 特異的抗体を用いる天然DMEの精製

天然DME或いは組換えDMEを、DMEに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) のような活性化クロマトグラフィ用レジンと抗DME抗体とを共有結合させることにより形成する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従ってブロッキング処理し洗浄する。

【0358】

DMEを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、DMEを優先的に吸着できる条件で(例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで)そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とDMEとの結合を切るような条件で(例えば、pH 2~3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピックイオンで)溶出させ、DMEを回収する。

【0359】

1.6 DMEと相互作用する分子の同定

DMEまたは生物学的に活性なその断片を、¹²⁵I ボルトンハンター試薬(例えば、Bolton A.E.及びW.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529を参照)で標識する。マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識したDMEと共にインキュベートし、洗浄して、標識したDME複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なDME濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したDMEの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0360】

別法では、DMEと相互作用する分子を、Fields, S.及びO. Song(1989, Nature 340:245-246)に記載の酵母2-ハイブリッドシステム(yeast two-hybrid system)やMATCHMAKERシステム(Clontech)などの2-ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて分析する。

【0361】

DMEはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT)に用いて、遺伝子の2つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定す

ることができる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0362】

1.7 DME活性の実証

DMEのチトクロームP450活性を、アニリンの4-ヒドロキシル化を利用して測定する。アニリンは酵素によって4-アミノフェノールに変換され、630nmにおいて光吸収率が最大である (GibsonおよびSkett、前出)。このアッセイは便利な方法であるが、ヒドロキシル化が2位および3位でも起こるため全体のヒドロキシル化が過少評価される。アッセイは37℃で行い、反応バッファには酵素のアリコットおよび好適な量のアニリン (最大2mM) が含まれている。バッファは、反応のためにNADPHまたはNADPH生成補助因子系を含まなければならない。この反応バッファのある調整では、85mM Tris pH 7.4、15mM MgCl₂、50mMニコチンアミド、40mg trisodium isocitrate、および2単位のイソクエン酸デヒドロゲナーゼを含め、アッセイの前に8mg NADP⁺を10mLの反応バッファストックに加える。反応は蛍光キュベットで行い、630nmで吸光度を測定する。吸光度の上昇の割合が、アッセイにおける酵素活性に比例する。既知の濃度の4-アミノフェノールを用いて標準的な曲線を作成することができる。

【0363】

ABBRの1,25-ジヒドロキシビタミンD₂₄-ヒドロキシラーゼ活性を、ABBRを発現する遺伝子組換えラットにおける³H標識された1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25(OH)₂D)の24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)₂D)への変換をモニタリングして決定する。エタノール (或いはコントロールとしてエタノールのみ) に溶解した1μgの1,25(OH)₂Dを、ABBRの破壊変異体を発現する若しくはABBRを発現していないという点を除けばコントロールラットと同一のABBRを発現する約6週目のオス遺伝子組換えラットに静脈内投与する。ラットを8時間後に断頭により屠殺し、腎臓を手早く取り除き、洗浄し、9倍量の氷冷バッファ(15mM Tris-acetate(pH7.4)、0.19Mスクロース、2mM酢酸マグネシウム、および5mMコハク酸ナトリウム)においてホモジナイズする。次に、各ホモジネートの所定量 (例えば3ml) を、約3.5GBq/mmolの特定の活性を有する0.25nM 1,25(OH)₂[1-³H]Dにおいて、常に振盪しながら酸素存在下、37℃で、15分間インキュベート

する (Bligh, E. G. および Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917)。次にクロロホルム相を、1ml/minの流速でn-ヘキサン/クロロホルム/メタノール (10:2.5:1.5) の溶液を含むFINEPAK SILカラム (JASCO, Tokyo, Japan) を用いてHPLCで分析する。別法では、クロロホルム相は、1ml/minの流速でアセトニトリルバッファ系 (40~100%, 水中で30分間) でJ SPHERE ODS-AMカラム (YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて逆相HPLCで分析する。溶出液を30秒 (或いは30秒未満) 毎に集め、その容量における³Hの存在量をシンチレーションカウンタで測定する。コントロールサンプル (すなわち、1,25-ジヒドロキシビタミンDまたは24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)₂D)を含むサンプル) のクロマトグラムと反応生成物のクロマトグラムとを比較し、基質 (24,25(OH)₂D) および生成物 (24,25(OH)₂[1-³H]D) の相対的な移動度を決定し、その値が収集した容量における存在量と相関性を有する。コントロールラットにおいて生成された24,25(OH)₂[1-³H]Dの量を、ABBRを発現する遺伝子組換えラットの24,25(OH)₂[1-³H]Dの量から差し引く。遺伝子組換えラットとコントロールラットとの24,25(OH)₂[1-³H]Dの生成物の差が、そのサンプルに存在するABBRの25-ヒドラーゼ活性のレベルに比例する。基質および生成物の同定は、質量分光法によって行う (Miyamoto, Y. 他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:14115-14119)。

【0364】

DMEのフラビン含有モノオキシゲナーゼ活性を代謝産物のクロマトグラフ分析によって測定する。例えば、Ring, B. J. 他(1999 ; *Drug Metab. Dis.* 27:1099-1103) は、0.1Mリン酸ナトリウムバッファ (pH7.4または8.3) および1mM NADPHにおいてFM0を37℃でインキュベートし、有機溶剤で反応を停止させ、HPLCにより生成物の形成を決定する。別法では、活性はクラーク型電極を用いて炭素の取り込み量をモニタリングして測定する。例えば、Ziegler, D. M. および Poulsen, L. L. (1978 ; *Methods Enzymol.* 52:142-151) は、基質メチマゾールを含むNADPH生成補助因子系 (上記したものに類似) において37℃でこの酵素をインキュベートした。酸素の取り込み割合が酵素活性に比例する。

【0365】

DMEのUDPグルコニルトランスフェラーゼ活性を、遊離アミノ基の比色測定を用

いて測定する (GibsonおよびSkett、前出)。2 - アミノフェノールなどのアミン含有基質は、必要な補助因子を含む反応バッファ (40mM Tris pH8.0, 7.5mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100, 1mMアスコルビン酸, 0.75 mM UDP - グルクロン酸) において酵素のアリコットと共に37℃でインキュベートする。十分な時間が経過した後、0.1Mリン酸バッファpH2.7に氷冷した20%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、氷上でインキュベートし、遠心分離器にかけて上澄みを除去する。反応しなかった全ての2 - アミノフェノールをこのステップで破壊する。次に、新しく準備した亜硝酸ナトリウムを加え、グルクロン酸抱合体であるジアゾニウム塩が形成されるようにする。過剰な亜硝酸は、十分なスルファミン酸アンモニウムを加えて除去し、ジアゾニウム塩を芳香族アミン (例えば、N - ナフチルエチレンジアミン) と反応させて、分光光度計でアッセイ可能な (例えば540nmにおいて) 着色アゾ化合物を生成する。2 - アミノフェノールグルクロニドと特性が類似した発色団を形成するアニリンの既知の濃度を用いて標準的な曲線を作成することができる。

【0366】

DMEのグルタチオンS - トランスフェラーゼ活性を、340nmにおける最大吸光率を有するモデル基質を用いて測定する。このモデル基質は、グルタチオンと反応して2,4 - ジニトロフェニルグルタチオンを生成する2,4 - ジニトロ - 1 - クロロベンゼンなどである。GSTが様々な基質特異性を有することは重要であり、モデル基質は目的のGSTの基質選択制に基づいて選択しなければならない。アッセイは室温で行われ、酵素のアリコットを好適な反応バッファ (例えば1mM グルタチオン, 1mM ジニトロクロロベンゼン, 90mMリン酸カリウムバッファ、pH6.5) に含める。反応は蛍光キュベットで行い、340nmにおける吸光度を測定する。吸光度の上昇の割合がアッセイにおける酵素活性に比例する。

【0367】

DMEのN - アシルトランスフェラーゼ活性を、放射標識したアミノ酸基質を用い、抱合体の中に取り込まれた放射標識を測定して決定する。酵素を、無標識のアシル - CoA化合物および放射線標識したアミノ酸を含む反応バッファにおいてインキュベートし、放射線標識アシル抱合体をn - ブタノールまたはその他の好適

な有機溶剤の中に抽出して反応しなかったアミノ酸から分離する。例えば、Johnson, M. R.他(1990; J. Biol. Chem. 266:10227-10233)が、この酵素をコリルCoA (cholyI-CoA) および³Hグリシンまたは³Hタウリンと共にインキュベートしてトリチウム化コール酸抱合体をn-ブタノールの中に抽出し、抽出した生成物の中の放射活性をシンチレーションカウンタで測定して、胆汁酸CoA:アミノ酸N-アシルトランスフェラーゼ活性を決定した。別法では、N-アシルトランスフェラーゼ活性を、分光光度計で後述する還元型CoA (CoASH)を測定して決定する。

【0368】

DMEのN-アセチルトランスフェラーゼ活性を、[¹⁴C]アセチルCoAから基質分子への放射標識の転移を利用して測定する(例えば、Deguchi, T. (1975) J. Neurochem. 24:1083-5を参照)。別法では、CoASHとDTNB (5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸); エルマン試薬)の反応に基づいた分光光度アッセイが用いられ得る。N-アセチルトランスフェラーゼの触媒によるアセチル基の基質への転移の間に、遊離チオール含有CoASHが生成される。CoASHは、412nmにおけるDTNB複合体の吸光度を用いて決定される(De Angelis, J.他(1997) J. Biol. Chem. 273:3045-3050)。酵素活性は基質の中に取り込まれた放射活性の割合、または分光光度アッセイにおける吸収率の上昇の割合に比例する。

【0369】

DMEのカテコール-0-メチルトランスフェラーゼ活性を、50mM Tris-HCl (pH7.4)、1.2mM MgCl₂、200 μM SAM (S-アデノシル-L-メチオニン) ヨウ化物(0.5 μCiのメチル-[³H]SAMを含む)、1mMジチオスレイトール、および様々な濃度のカテコール基質(例えば、レボドパ、ドーパミン、またはDBA)から成る最終容量が1.0mlの反応液において測定する。この反応は、精製したDMEまたは未精製のDMEを含むサンプル250~500 μgを加えて開始し、37℃で30分間行った。この反応は、氷上で素早く冷却して停止させ、直後に氷冷n-ヘプタンで抽出する。次に10分間1000×gで遠心分離した後、液体シンチレーションカウンタで有機抽出物の3 mlのアリコットをその中に含まれている放射活性について分析した。有機相におけるカテコール関連放射活性のレベルがDMEのカテコール-0-メチルトランスフェラーゼ活性に比例する(Zhu, B. T. Liehr, J. G. (1996) 271:1357-

1363)。

【0370】

DMEのDHFR活性を、340nm ($\epsilon_{340} = 11,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)においてNADPHの消滅の後に15で分光光度法で測定する。標準的なアッセイ混合液は、100 μM NADPH、14mM 2-メルカプトエタノール、MTEN バッファ (50mM 2-morpholinoethanesulfonic acid、25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane、25mMエタノールアミン、および100mM NaCl、pH7.0) を含み最終容量を2.0mlとする。反応は50 μM のジヒドロ葉酸 (基質として) を追加して開始させる。反応液におけるNADPHのNADP⁺への酸化がジヒドロ葉酸の還元と一致し、サンプルにおけるDHFR活性の量に比例する (Nakamura, T.およびIwakura, M. (1999) J. Biol. Chem. 274:19041-19047)。

【0371】

DMEのアルド/ケト還元酵素活性を、NADPHが消費される時の340nmにおける吸光率の低下を測定する。標準的な反応混合液は、135mMのリン酸ナトリウムバッファ (酵素によりpH6.2~7.2の範囲)、0.2mM NADPH、0.3M硫酸リチウム、0.5~2.5 μg 酵素、および好適なレベルの基質を含む。この混合液を30でインキュベートし、反応を分光光度計で連続的に測定する。酵素活性は、酵素1 μg 当たり消費されるNADPHのモル数として計算される。

【0372】

DMEのアルコールデヒドロゲナーゼ活性を、NAD⁺がNADHに還元される時の340nmにおける吸光率の増大を利用して測定する。標準的な反応混合液は、50mMのリン酸ナトリウム、pH7.5、および0.25mM EDTAである。反応液を25でインキュベートし、分光光度計でモニタリングする。酵素活性は、酵素1 μg 当たり生成されたNADHのモル数として計算する。

【0373】

DMEのカルボキシルエステラーゼ活性を、基質として4-酢酸メチルウンベルフェリル (4-methylumbelliferyl acetate) を用いて測定する。酵素反応は、約10 μl のDME含有サンプルを、0.5mM 4-酢酸メチルウンベルフェリルを含む1mlの反応バッファ (90mM KH_2PO_4 、40mM KCl、pH7.3) に加えて開始させる。4-メチル

ウンベルフェロンの生成を分光光度計 ($\epsilon_{350} = 12.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) で1分30秒モニタリングする。酵素活性は、1分間に1mgのタンパク質で生成され生成物の μ モルとして表すことができ、サンプルにおけるDME活性に非例する (Evgenia, V.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14769-14775)。

【0374】

別法では、DMEのコカインベンゾイルエステルヒドロラーゼ (cocaine benzoyl ester hydrolase) 活性を、約0.1mlの酵素および3.3 mM コカインを、1mM benz amidineおよび1mM EDTAを含む反応バッファ (50mM NaH_2PO_4 , pH7.4) で37°Cでインキュベートして測定する。全量で0.4mlの反応液を1時間インキュベートし、等量の5%トリクロロ酢酸で終了させる。0.1mlの内部標準3,4-ジメチル安息香酸 (10 $\mu\text{g/ml}$) を加える。沈降したタンパク質を10分間12,000 $\times g$ で遠心分離して分離する。上澄みを新しいチューブに移して、0.4mlの塩化メチレンで2回抽出する。2つの抽出物を混ぜ、窒素を流して乾燥させる。この残滓を、100 ml 当たり8 μl のジエチルアミンを含む14%アセトニトリル、250mM KH_2PO_4 , pH4.0に再懸濁してから、C18逆相HPLCカラム上に注入して分離する。このカラム溶出液を235nmでモニタリングする。DME活性は、内部標準に対する分析物のピーク面積の割合を比較して定量する。標準曲線は、トリクロロ酢酸処理タンパク質基質内に準備した安息香酸標準で作成する (Evgenia, V.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14769-14775)。

【0375】

別法では、水溶性基質であるパラニトロフェニル酪酸に対するDMEカルボキシルエステラーゼ活性を、当分野で周知の分光光度法によって測定する。この方法では、DME含有サンプルを、6 mM タウロコール酸塩の存在下で0.5M Tris-HCl (pH 7.4または8.0) または酢酸ナトリウム (pH5.0) で希釈する。このアッセイは、新たに準備したパラニトロフェニル酪酸溶液 (酢酸ナトリウムに100 $\mu\text{g/ml}$, pH5.0) を加えて開始する。次にカルボキシルエステラーゼ活性をモニタリングし、405nmにセットした分光光度計で基質のコントロール自己加水分解と比較する (Wan, L.他(2000) J. Biol. Chem. 275:10041-10046)。

【0376】

DMEのスルホトランスフェラーゼ活性を、 $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ からフェノールなどのモデル基質内への ^{35}S の取り込みを用いて測定する (Folds, A. および Meek, J. L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 327:365-374)。酵素のアリコットを1mLの10mMリン酸バッファ、pH6.4、50 μM フェノール、および0.4~4.0 μM $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ で37でインキュベートする。放射標識の5~20%が基質に転移するのに十分な時間が経過した後、0.2mLの0.1M酢酸バリウムを加えタンパク質およびリン酸バッファを沈降させる。次に0.2mLの0.1M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ を加え、その後に0.2mLの ZnSO_4 を加える。円心分離して上澄みをはっきりさせ、タンパク質および未反応の $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ を除去する。上澄みの放射活性をシンチレーションカウンタで測定する。酵素活性は、反応生成物における放射活性のモル数から決定する。

【0377】

DMEのヘパラン硫酸6 - スルホトランスフェラーゼ活性を、DMEを含むサンプルを、2.5 μmol イミダゾールHCl (pH6.8)、3.75 μg の塩化プロタミン (protamine chloride)、25nmolの完全に脱硫酸化されN - 再硫酸化されたヘパリン(ヘキサミンとして)、および50pmol (約 5×10^5 cpm)の $[^{35}\text{S}]$ アデノシン3' - リン酸5' - ホスホ硫酸(PAPS)と共に最終反応容量50 μl で37で20分間インキュベートし、*in vitro*で測定する。この反応は、熱湯に反応チューブを1分間浸漬して停止させる。0.1 μmol のコンドロイチン硫酸A (グルクロン酸として)を、キャリアとして反応混合液に加える。 ^{35}S 標識ポリ多糖を、1.3%酢酸カリウムを含む冷却した三倍量のエタノールで沈殿させ、脱塩カラムを用いてゲルクロマトグラフィによって取り込まれなかった $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ およびその分解生成物から完全に分離する。一単位の酵素活性を1分間に1pmolの硫酸を移送するのに必要な量と定義し、沈殿した多糖の中に取り込まれた $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ の量によって測定する (Habuchi, H.他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:4172-4179)。

【0378】

別法では、DMEのヘパラン硫酸6 - スルホトランスフェラーゼ活性を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)によって分離した後、ゲルから酵素を抽出して再生し測定する。分離した後、ゲルをバッファ(0.05M Tris-HCl, pH8.0)で洗浄し、3~5mmのセグメントに切断し、0.15M NaClを含

む同じバッファを100 μ lで4 で48時間攪拌する。溶出した酵素を遠心分離して収集し、上記したように、スルホトランスフェラーゼ活性についてアッセイする (Habuchi, H.他(1995) J. Biol. Chem. 270:4172-4179)。

【0379】

別法では、DMEのスルホトランスフェラーゼ活性を、 $[^{35}\text{S}]$ PAPSから固定されたペプチドへの $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の転移を測定して決定する。この固定されたペプチドは、C末端システイン残基が付加された成熟P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1ポリペプチドのN末端の15残基である。このペプチドは3つの潜在的なチロシン硫酸化部位に渡っている。このペプチドは、システイン残基によってヨードアセトアミド活性化樹脂に結合される (1mlの樹脂あたり1.5~3.0 μ molペプチドの密度)。この酵素アッセイは、140mM Pipes (pH6.8)、0.3M NaCl、20mM MnCl_2 、50mM NaF、1% Triton X-100、および1mM 5'-AMPを含む最終容量130 μ lにおいて10 μ lのペプチド誘導体ビーズと2~20 μ lのDME含有サンプルを結合させて行った。このアッセイは、0.5 μ Ciの $[^{35}\text{S}]$ PAPS (1.7 μ M; 1Ci = 37GBq)を加えて開始させた。37 で30分経過した後に、反応ビーズを65 で6Mグアニジンで洗浄し、ビーズに取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定する。ビーズ結合ペプチドに移送された $[^{35}\text{S}]$ 硫酸を測定し、サンプルにおけるDME活性を決定する。1単位の活性は1分間に1pmolの生成物が生成されると定義する (Ouyang, Y-B.他 (1998) Biochemistry 95:2896-2901)。

【0380】

別法では、DMEスルホトランスフェラーゼのアッセイを、50mM HEPES-NaOH (pH 7.0)、250mM スクロース、1mMジチオスレイトール、14 μ M $[^{35}\text{S}]$ PAPS (15Ci/mmol)、およびドーパミン(25 μ M)、-ニトロフェノール(5 μ M)またはその他の候補基質を含む最終容量30 μ lにおいて硫酸供与体として $[^{35}\text{S}]$ PAPSを用いて行った。アッセイの反応は、精製されたDME酵素試薬或いはDME活性を含むサンプルを加えて開始させ、その反応を37 で15分間続け、100 で3分間加熱して停止させる。生成された沈降物を遠心分離によって除去する。次に ^{35}S 硫酸化物を調べるために、上澄みを薄膜クロマトグラフィ或いは二次元薄膜分離方法のいずれかによって分析する。 ^{35}S 硫酸化物の同定ができるように好適な標準を上澄みと

平行に流し、反応性生物の移動の相対速度に基づいてDME含有サンプルの酵素特異性を決定する (Sakakibara, Y.他 (1998) J. Biol. Chem. 273:6242-6247)。

【0381】

DMEのスクアレンエポキシラーゼ活性を、精製したDME (またはDMEを含む未精製の混合液)、20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.01mM FAD、0.2単位のNADPH - チトクロームC (P-450)レダクターゼ、0.01 mM [¹⁴C]スクアレン(20 μ lのTween 80を用いて拡散された)、および0.2% Triton X-100を含む混合液においてアッセイする。1mM NADPHを加えて反応を開始させ、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。非けん化脂質を、酢酸エチル/ベンゼン(0.5:99.5, v/v)で作製したシリカゲルTLCによって分析する。反応生成物を、DMEを含まない反応混合液による反応生成物と比較する。2,3(S) - オキシドスクアレンの存在を、好適な脂質標準を用いて確認する (Sakakibara, J.他(1995) 270:17-20)。

【0382】

DMEのエポキシドヒドロラーゼ活性を、エーテル抽出物のガスクロマトグラフィ(GC)分析を用いて基質を除去した後、或いはアセトンで失活させた反応混合液をGC分析により基質を除去してジオールを生成した後に測定する。DMEを含むサンプルまたはエポキシドヒドロラーゼコントロールサンプルを、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、および5mM エポキシド基質 (例えば、エチレンオキシド、スチレンオキシド、プロピレンオキシド、isoprene monoxide、エピクロロヒドリン、epibromohydrin、epifluorohydrin、グリシドール、1,2-epoxybutane、1,2-epoxyhexane、または1,2-epoxyoctane) でインキュベートする。様々な時点でサンプルの一部を反応混合液から取り出して、内部標準を含む1mlの氷冷アセトンに加えてGC分析を行う (例えば、1-ノナノール)。タンパク質および塩を遠心分離 (15分、4000 \times g) によって除去し、抽出物を0.2mm \times 25m CP-Wax57-CBカラム(CHROMPACK, Middelburg, The Netherlands) および水素炎イオン化検出器を用いてGCにより分析する。GC産物の同定は、当分野で周知の好適な標準およびコントロールを用いて行う。1単位のDME活性は、1分間に1 μ molのジオール生成を触媒する酵素の量と定義する (Rink, R.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14650-14657)。

【0383】

DMEのアミノトランスフェラーゼ活性は、DMEを含むサンプルを、1mM L-キヌレニンおよび1mM 2-オキソグルタル酸の存在下で、最終容量200 μ lの70 μ M PLPを含む150mM Tris 酢酸バッファ(pH8.0)で37℃で1時間インキュベートしてアッセイする。キヌレニン酸の生成は、当分野で周知の好適な標準およびコントロールを用いて330nmで分光光度検出によりHPLCで定量する。別法では、L-3-ヒドロキシキヌレニンを基質として用い、キサンツレン酸の生成を340nmでのUV検出で生成物のHPLC分析により測定する。キヌレニン酸およびキサンツレン酸の生成はそれぞれ、アミノトランスフェラーゼ活性を示す (Buchli, R.他(1995) J. Biol. Chem. 270:29330-29335)。

【0384】

別法では、DMEのアミノトランスフェラーゼ活性の測定は、酵素結合補助因子であるピリドキサル5'-リン酸(PLP)のUV/VIS吸収スペクトルにおける変化をモニタリングして、一回のターンオーバーの条件下で精製したDMEのサンプル或いはDMEを含む未精製のサンプルの様々なアミノ酸およびオキソ酸基質に対する活性をして決定して行う。この反応は、9 μ M 精製DME またはサンプル含有DMEおよび検査する基質 (アミノ酸およびオキソ酸基質) を含む50mM4-メチルモルフォリン(pH7.5)において25℃で行う。アミノ酸からオキソ酸への半反応の後に、酵素結合PLPのピリドキサミン5'リン酸 (PMP) への変換により生じる360nmにおける吸収率の低下および330nmにおける吸収率の増加を測定する。DMEの特異性および相対的な活性を、特定の基質に対する酵素活性によって測定する (Vacca, R. A.他 (1997) J. Biol. Chem. 272:21932-21937)

DMEのスーパーオキシドジスムターゼ活性を、細胞ペレット、培養した上澄み、または精製したタンパク質試薬からアッセイする。サンプルすなわち溶解物を15%非変性ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動法によって分離する。このゲルを、2.5mMニトロブルーテトラゾリウムにおいて30分間インキュベートし、その後30mMリン酸カリウム、30mM TEMED、および30 μ Mリボフラビン(pH7.8)において20分間インキュベートする。スーパーオキシドジスムターゼ活性は、背景のブルーに対して白いバンドとして見ることができ、ライトボックスでゲルに

照明を当てる。スーパーオキシドジスムターゼ活性の定量は、好適なスーパーオキシドジスムターゼのポジティブおよびネガティブコントロール（例えば、様々な量の市販されている大腸菌スーパーオキシドジスムターゼなど）を用いて活性ゲルの比重走査により行う(Harth, G.およびHorwitz, M. A. (1999) J. Biol. Chem. 274:4281-4292)。

【0385】

1.8 DMEインヒビターの同定

検査する化合物を、実施例17のアッセイで記載したように、好適なバッファおよび基質と共に様々な濃度でマルチウェルプレートのウェルに入れる。DME活性をそれぞれのウェルについて測定し、それぞれの化合物のDME活性を阻害する能力を決定して用量反応曲線を作成する。このアッセイを用いてDME活性を促進する分子を同定することが可能であろう。

【0386】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行うことができるであろう。特定の好適な実施例に基づいて本発明を説明したが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学或いは関連する分野の専門家には明らかな、本明細書に記載の本発明の実施例の様々な改変は、特許請求の範囲に含まれる。

【0387】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列に対する系統的な名称を示す。

【0388】

表2は、本発明のポリペプチドに最も近いGenBankの相同体のGenBankの識別番号およびアノテーションを示す。ポリペプチドとそのGenBankの相同体との間の一致を表す確率値スコアも示す。

【0389】

表3は、推定上のモチーフおよびドメインを含む本発明のポリペプチド配列の

構造的な特徴、並びに本発明のポリペプチドの分析に用いた方法、アルゴリズム、および検索可能なデータベースを示す。

【0390】

表4は、本発明のポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたcDNA断片およびゲノムDNA断片のリスト、並びに本発明のポリヌクレオチド配列の選択された断片のリストを示す。

【0391】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0392】

表6は、表5に示すcDNAライブラリの作製に用いた組織およびベクターを示す付録である。

【0393】

表7は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、及びアルゴリズム、並びにその説明、引用文献、閾値パラメータを示す。

【表1】

表 1

インサイト プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト ポリヌクレオチド ID
1642862	1	1642862CD1	13	1642862CB1
3861612	2	3861612CD1	14	3861612CB1
7472055	3	7472055CD1	15	7472055CB1
1923521	4	1923521CD1	16	1923521CB1
1558210	5	1558210CD1	17	1558210CB1
5629033	6	5629033CD1	18	5629033CB1
2750679	7	2750679CD1	19	2750679CB1
1570911	8	1570911CD1	20	1570911CB1
1959720	9	1959720CD1	21	1959720CB1
6825202	10	6825202CD1	22	6825202CB1
7256116	11	7256116CD1	23	7256116CB1
4210675	12	4210675CD1	24	4210675CB1

【表 2】

表2-1

ポリペプチド SEQ ID NO	インサイト ポリペプチドID	GenBank ID NO	確率スコア	相同体
1	1642862CD1	g8886005	6.00E-70	リゾスファアジン酸アシルトランスフェラーゼδ (ヒト)
2	3861612CD1	g2828262	2.30E-62	アラキリルアシルCoA: アミノ酸Nアシルトランスフェラーゼ (ウシ) (Vessey, D. A. 及び Lau, E. (1996) J. Biochem. Toxicol., 11: 211-215)
3	7472055CD1	g510905	2.20E-57	グルタチオントランスフェラーゼT1 (ヒト) (Pemble, S. ら (1994) Biochem. J. 300 (Pt 1): 271-276)
4	1923521CD1	g2651302	3.30E-72	仮定上のタンパク質 (シロイヌナズナ) (Lin, X., ら (1999) Nature 402: 761-768)
5	1558210CD1	g31867	1.2E-96	N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ (ヒト) (Robertson, D. A., ら (1992) Biochem. J. 288 (Pt 2): 539-544)
6	5629033CD1	g6522854	2.6E-12	推定上のレダクターゼ (Streptomyces coelicolor A3(2)) (Redenbach, M., ら (1996) Mol. Microbiol., 21: 77-96)
		g6469247	1.8E-10	推定上の酸化還元酵素 (Streptomyces coelicolor A3(2)) (Redenbach, M., ら (1996) Mol. Microbiol., 21: 77-96)
7	2750679CD1	g2443331	9.50E-121	Nfr1 (アフリカツメガエル) (新種のフェレドキシン様) (Hatada, S., ら (1997) Gene 194: 297-299)
8	1570911CD1	g6166390	1.00E-162	チトクロームb5レダクターゼb5R.2 (ヒト) (Zhu, H., ら (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 14742-14747)
9	1959720CD1	g8515441	0	チトクロームP450レチノイド代謝タンパク質P450RAI-2 (ヒト) (White, J. A., ら (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 6403-6408)
10	6825202CD1	g4519535	1.00E-256	ロイコトリエンB4ω-ヒドロキシラーゼ (ヒト) (Kikuta, Y., ら (1994) FEBS Lett., 348: 70-74; Kikuta, Y., ら (1999) DNA Cell Biol., 18: 723-730)

【表3】

表2-2

ポリペプチド SEQ ID NO	インサイト ポリペプチドID	GenBank ID NO	確率スコア	相同体
11	7256116CD1	G9313018	1.00E-116	チトクロームP450 4F2 (ヒト) (Chen, L. 及び Hardwick, J.P. (1993) Arch. Biochem. Biophys. 300:18-23)
12	4210675CD1	G4416524	1.30E-36	クラスα-グルタチオンS-トランスフェラーゼ (ニワトリ) (Liu, L.F. 等 (1993) Biochim. Biophys. Acta 1216:332-334)

【表4】

表3-1

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチドID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及びデータベース
1	1642862CD1	208	T191		アシルトランスフェラーゼドメイン DM08356 S52645 8-320; W2-L151 膜貫通ドメイン: L159-G178	BLAST-DOMO HMMER
2	3861612CD1	294	S7 S24 T119 S188 S250 T289 S20 S144 Y91	N162	アラキルアシルCoA:グリシン-N- アセチルトランスフェラーゼドメイン: PD022048: M1-K140	BLAST-PRODOM
3	7472055CD1	241	S79 S56 T124 S164 S223 S21 S188	N187 N232	グルタチオンSトランスフェラーゼドメイン: L3-R195 グルタチオンSトランスフェラーゼドメイン: PF00043, K53-S82	HMMER-PFAM BLIMPS-PFAM
4	1923521CD1	640	S51 T122 S167 S223 T290 T377 T399 T459 S562 T587 S118 S415 S623 Y492	N121 N220 N390 N397 N451 N473	テハログナーゼ; ジクロロメタンドメイン: DM02033 Q01579 70-200; L71-E199 チトクロームCオキシダーゼサブユニットII、 銅A結合領域: DM00023 I84424 1-52; S337-R378 (p=0.32)	BLAST-DOMO BLAST-DOMO

【表5】

表3-2

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
5	1558210CD1	870	S857 T108 S289 T368 T453 T762 T67 T97 T206 S207 T392 T469 S536 T563 T600 S815 S857	N65 N112 N132 N149 N171 N198 N241 N561 N608 N717 N754 N764	アリスルファターゼ: PD001700:P44-E393 アリスルファターゼ: DM08669 Q10723 23-520:R43-W260 シグナルペプチド: M1-A24 シグナル切断: M1-S17 スルファターゼタンパク質: BL00523A:P44-S60 BL00523B:C88-K99 BL00523C:G135-L145 BL00523D:P215-H226 BL00523E:Y290-G319 BL00523F:D364-G374 BL00523G:Y781-Q790 スルファターゼ_1: P85-G98 DDC/GAD/HDC/TyrDCペリドキサルリン酸 結合部位: S514-R535 膜貫通ドメイン: M357-L374, P429-P452	BLAST-PRODOM BLAST-DOMO HMMER SPScan BLIMPS-BLOCKS Motifs Motifs HMMER
6	5629033CD1	488	T286 T75 S82 S101 T118 S128 S197 T64 S455 T470 Y424	N256 N344		

【表6】

表3-3

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
7	2750679CD1	402	S338 S81 S156 T262 S343 S50 S54 T63 T230 S237 T295 Y182 Y335	N61 N154	Rieske [2Fe-2S]ドメイン: E105-G165 ポリジンヌクレオチド-ジスルフィド オキシドレタクターゼ クラス I: DM00071 Q07946 1-243:S212-Q318	HMMER-PFAM BLAST-DOMO

【表7】

表3-4

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及びデータベース
8	157091ICD1	276	T10 S73 S74 T145 T187 T203 S3 T32 S174	N185	FAD/NAD結合チトクロームレダクターゼ: N2-P120 酸化還元酵素FAD/NAD結合ドメイン: A147-P261 チトクロームΔb5ファミリ- ヘム結合ドメインタンパク質: BL00191I:K59-S73 BL00191J:G99-P120 BL00191K:G155-E198 チトクロームΔB5レダクターゼシグネチャ: PR00406A:L46-L57 PR00406B:R67-S74 PR00406C:G112-Y126 PR00406D:G151-T170 PR00406E:E189-I200 PR00406F:L245-P253 フラボプロテインピリジンヌクレオチド チトクロームレダクターゼシグネチャ: PR00371B:R67-S74 PR00371C:G99-N108 PR00371D:G151-T170 PR00371E:T177-Q186 PR00371F:E189-I200 PR00371G:W221-L237 PR00371H:L245-P253 フラボタンパク質: PD149632:P8-P120	HMMER-PFAM HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM

【表8】

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及びデータベース
9	1959720CD1	512	S75 T97 S133 S174 S201 S273 T282 T317 S395 S462 S44 S74 S120 T168 T189 T342 T461 S487		シグナルペプチド: M1-S29 チトクロームP450: F434-G443 チトクロームP450: P50-L106, E177-L449 チトクロームP450システイン ヘム-鉄 リカンドドメイン: D413-L458 EクラスP450 II 群シグネチャ: PR00464A:G135-E155 PR00464C:E285-L313 PR00464D:K314-I331 PR00464E:G350-G370 PR00464G:V405-A420 PR00464H:R428-C441 PR00464I:C441-F464 P450スーパーファミリーシグネチャ: PR00385A:A296-L313 PR00385B:K314-R327 PR00385C:C356-P367 PR00385D:L432-C441 PR00385E:C441-K452 チトクロームP450: DM00022 P08684 58-487:Q238-P482	SPScan MOTIFS HMMER-PFAM ProfileScan BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-DOMO

【表9】

表 3 - 6

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
10	6825202CD1	524	T277 T40 T68 S139 S305 S314 T494 S186 S388	N168	シグナルペプチド: M1-A36 シグナルペプチド: M1-A16 チトクロームP450: F461-G470 チトクロームP450: P52-L519 チトクロームP450システインヘム-鉄 リガンドシグネチャ: N430-H488 エクラスP450 II群シグネチャ: PR00464A:G141-K161 PR00464B:L197-Q215 PR00464C:D317-A345 PR00464D:K346-K363 PR00464E:Q377-V397 PR00464F:G417-T432 PR00464G:V433-E448 PR00464H:P455-C468 PR00464I:C468-I491 エクラスP450 IV群シグネチャ: PR00465D:L378-P394 PR00465F:H428-D446 PR00465G:E452-C468 PR00465H:C468-L486 チトクロームP450: DM00022 Q08477 I08-511:R108-L512 チトクロームP450 (PD000021): L90-L226, I271-S399, P348-F458, H428-L519	HMMER SPScan MOTIFS HMMER-PFAM ProfileScan BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-DOMO BLAST-PRODOM

【表 10】

表 3-7

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
11	7256116CD1	369	S147 S321 T5 T52 T358 S240 S354 T358	潜在的 グリコシル化部位	シグナルペプチド: M1-R41 膜貫通ドメイン: F19-L43 チトクローム P450: P60-T340 エクラスP450 II 群シグネチャ: PR00464A:G149-K169 PR00464B:L205-Q223 PR00464C:D324-W352 チトクローム P450 (PD008467): V98-Q342 チトクローム P450: DM00022 Q08477 108-511;K116-L345 グルタチオンS-トランスフェラーゼ: M1-P98	SPScan HMMER HMMER-PFAM BLOCKS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
12	4210675CD1	144	S19 S60 T140 T35 S108 T121		グルタチオンS-トランスフェラーゼ: M1-P98	HMMER-PFAM BLAST-DOMO

【表 11】

表4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
13	1642862CB1	3878	3498-3878, 1-527, 1973-2806, 1176-1330	70683296V1 6132155H1 (BMARTXT02) 1509788F6 (LUNGNOT14) 1580621F6 (DUODNOT01) 7222783H1 (PLAFEC01) 6808134J1 (SKIRNOR01) 1642862F6 (HEARFET01) 2689031F6 (LUNGNOT23) 70680681V1 6800757J1 (COLENOR03) 7090202H1 (BRAUTDR03) 5316004T6 (EPIPNO05) 6315967H1 (LUNGDI02) 6630490U1 2764838F6 (BRSTNOT12) 4935754H1 (BRSTTUT20) 3861612F6 (LNODNOT03) 4185388T6 (BRSTNOT31) GNN.g5420326_008.edit g3250572 3114779H1 (BRSTNOT17) 874731R1 (LUNGAST01) 1905421F6 (OVARNOT07) 881602R1 (THYRNOT02) 1879816F6 (LEURNOT03) 024598R6 (ADENINE01) 1923521R6 (BRSTTUT01)	3321 475 2133 2526 1 1011 1534 1763 3254 2257 2732 784 564 398 145 1 1240 1065 1 472 2156 643 404 1853 1223 1 1371	3878 775 2622 3117 525 1613 1961 2237 3867 2686 3292 1369 843 1125 681 262 1645 1636 722 798 2478 1350 943 2321 1820 536 2001
14	3861612CB1	1645	1-353, 795-868			
15	7472055CB1	798				
16	1923521CB1	2478	1-1252			

【表12】

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
17	1558210CB1	3348	1591-1798, 2546-2613, 2447-2482, 1-985	456001R1 (KERANOT01) 2265713H1 (UTRSNOT02) 1399359F6 (BRAITUT08) 1922528R6 (BRSTTUT01) 874691R1 (LJNGAST01) 1437376F1 (PANCNOT08) 4922315F6 (TESTNOT11) 876198R1 (LJNGAST01) 3616819H1 (EPIPNOT01) 2080530F6 (UTRSNOT08) 168977T6 (LIVRNOT01) 827274R1 (PROSNOT06) 3078024H1 (BONEUNT01) 5634459F8 (PLACFER01) 2183562F6 (SININOT01) 5762163H1 (PROSBPT02) 6898367H1 (LIVRTMR01) 2744518F6 (BRSTTUT14) 6905932H1 (MUSLIDR02) 593737H1 (BRAVUNT02) 1509719F6 (LUNGNOT14) 6432858H1 (LUNGNON07) 5634459R8 (PLACFER01) 2509876T6 (CONUTUT01) 7066389H1 (BRATNOR01) 7179765H1 (BRAXDIC01) 4695285F6 (BRAENOT02) 6120495H1 (BRAHNON05) 6559956H1 (BRAFNON02) 6789457H1 (COLNDIY01)	2099 1874 329 2357 2833 1141 1 908 801 1631 3241 2684 1 355 3416 2033 1015 193 746 1754 1861 2481 1518 3225 1308 558 1 1657 404 1165	2851 2230 1009 2998 3348 1678 513 1601 1142 2309 3823 3256 263 850 3844 2628 1553 724 1375 2023 2392 2986 1987 3815 1886 1203 420 2278 1025 1768
18	5629033CB1	3844	2994-3243, 1-1739, 2382-2473			
19	2750679CB1	2278	1-863, 1029-1156			

【表13】

表 4-3

ポリヌクレオチド SEQ. ID NO:	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
20	1570911CB1	1288	1-448	70513126V1 6744209H1 (BRAFN0T02) 6739435H1 (BRAFDIT02) 967260H1 (BRSTN0T05)	138 359 828 1	654 961 1288 266
21	1959720CB1	4660	3931-4023, 1-69, 4619-4660, 903-2498, 2867-3511	7254687H1 (FIBRXC01) 6728782H1 (COLITUT02) 6314941H1 (NERFDN03) 70572127V1 70571246V1 GNN.95091644.edit	1907 3652 1534 2981 3072 1	2318 4314 2164 3622 3634 512
22	6825202CB1	1669	1-20	7255474H1 (FIBRXC01) 6754650J1 (SINTFER02) 3292871F6 (BONRFET01) 2914908F6 (THYMFET03) 70572179V1 70569822V1 6819509H1 (OVARDIR01) 5882656H1 (LIVRN0N08) 9680724	2161 359 1154 4279 3577 2405 708 1422 1274	2741 1001 1593 4660 4180 3039 1316 1666 1669
23	7256116CB1	1882	1-298, 1737-1882, 1649-1668	3244023H1 (BRAIN0T19) 2252906T6 (OVARTUT01) 6550131H1 (BRAFN0N02) 5866845F6 (COLTDIT04)	440 1087 547 1	672 1645 1207 457
24	4210675CB1	880	1-60, 697- 880, 194- 366	7256116H2 (SKIRPDC01) FL7256116_00002 4210675T6 (BRONDIT01) 4210675F6 (BRONDIT01)	1 152 299 1	635 1882 880 837

【表 14】

表5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト プロジェクトID	代表的ライブラリ
13	1642862CB1	LUNGN0T23
14	3861612CB1	BRSTTUT20
16	1923521CB1	OVARN0T07
17	1558210CB1	BRAITUT01
18	5629033CB1	LUNGN0T14
19	2750679CB1	BRAHNON05
20	1570911CB1	LNODN0T03
21	1959720CB1	BONRFET01
22	6825202CB1	OVRTUT01
23	7256116CB1	BRSTN0T02
24	4210675CB1	BRONDIT01

【表15】

表 6-1

【表 16】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BONRFET01	pINCY	このライブラリは、妊娠20週目でパト一症候群（トリソミー13）により死亡した白人男胎児から採取した肋骨組織から単離したRNAを用いて作製した。
BRAHNON05	pINCY	このライブラリは、心不全で死亡した35歳の白人男性から採取された海馬組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、大脳新皮質の中等度の軟膜線維症及び多発性微小梗塞を示していた。顕微鏡検査によれば、大脳半球は限局性石灰化を伴なう中等度の軟膜の線維症であった。大脳半球全域にやや好酸性の髄体ニューロンおよび収縮が見られた。更に、グリオースに取囲まれた空洞化した多数の極微小領域が、大脳半球全域に亘って存在していた。患者の病歴には、心筋症、CHF、うっ血性心不全、心臓肥大、脾臓及び肝臓の肥大が含まれていた。患者の投薬履歴には、シメチコン、Lasix、Digoxin、Colace、Zantac、カプトプリル、及びVasotecが含まれていた。このライブラリは、アールハイブリダイゼーションを著しく長く（48時間/回）したことを除けば、SoaresらPNAS（1994）91:9228 and Bonaidoら、Genome Research 6（1996）:791の条件に従って標準化を2回実施した。
BRAITUT01	PSPORT1	このライブラリは、50歳の白人女性から前頭葉切除の際に採取した脳腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、巣状壊死及び汎性石灰化を伴う再発性のグレード3オリゴ星状細胞腫を示していた。患者の病歴には、言語障害及び痲痺が含まれる。患者の脳は、放射線照射もされており、総照射量は5,082cvg（フラクション8）であった。家族歴には、脳腫瘍が含まれていた。
BRONDIT01	pINCY	年齢22歳から51歳の喘息に罹患している3人の白人男女のピンチ気管支バイオプシー時に得たプールから除去した右下葉気管支組織から単離したRNAを用いて作製した。

表 6-2

【表 17】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRSTN0T02	PSPORT1	このライブラリは、55歳白人女性の片側拡大単純乳房切除の際に採取した病変乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、異型を伴わない管過形成(ductal hyperplasia)及びアポクリン化生、硬化性腺症、嚢胞形成によって特徴付けられる増殖性線維嚢胞変化(fibrocytic changes)であった。病理学的には、関連腫瘍組織は浸潤性グレード4の乳房腺癌であった。既往症には、心房性頻脈及び良性腫瘍があった。家族歴には、心血管疾患及び脳血管疾患があった。
BRSTTUT20	pINCY	このライブラリは、66歳の黒人女性の片側拡大単純乳房切除および微小ニードルによる生検の際に採取された左乳房腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、左乳房を置換するように拡散した、浸潤性グレード4で核グレード3の管型腺癌を示していた。この皮膚、乳頭、および筋膜は全て腫瘍に侵されており、サージカルマージンが深いことも含まれていた。広範な血管リンパ管侵入が見られ、皮膚表面のリンパ管にも及んでいた。結節外を含む6つのリンパ節が転移性グレード4の腺癌に完全に置換され、複数の下側軸リンパ節組織が、転移性乳房腺癌であった。左胸壁の生検により、転移性グレード4の腺癌と判明した。左胸壁の生検によって転移性グレード4の腺癌と判る前に、核グレード3の転移性乳房腺癌と診断されていた。患者には、倦怠感および疲労感があった。患者の既往症には、肝臓の二次性悪性腫瘍、脳/脊髄の二次性悪性腫瘍、欠乏性貧血、II型糖尿病、慢性腎不全、および正常出産が含まれていた。患者の投薬履歴には、1995年11月におけるシクロホスファミド/エピドール/サイクルの2サイクルが含まれていた。家族歴には、母親の良性高血圧症、II型糖尿病、高脂血症、および抑うつ症があった。
LNODN0T03	pINCY	このライブラリは、67歳の白人男性の部分的肺切除及び気管支鏡検査の際に採取したリンパ節組織より単離したRNAを用いて作製した。鏡検では、この組織は10%生存可能な腫瘍を含み、広範囲に亘って壊死性であることがわかった。関連腫瘍組織は、病理学的には侵襲性グレード3-4扁平上皮癌を示していた。患者の病歴には、血管腫があった。家族歴には、アテローム性冠動脈疾患、良性高血圧、及びうつ病性心不全があった。

【表18】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
LUNGN0T14	pINCY	このライブラリは、年齢47歳の白人男性の左下肺葉から肺区域切除術の際に採取された肺組織から単離されたRNAを用いて作製した。病理学的には、関連する腫瘍組織の病変はグレード4腺癌を示しており、肺実質は石灰化肉芽腫性肺炎を示している。患者の既往症には、良性高血圧症及び慢性閉塞性肺疾患があった。家族歴には、II型糖尿病及び急性心筋梗塞があった。
LUNGN0T23	pINCY	このライブラリは、年齢58歳の白人男性から採取された左肺葉組織から単離されたRNAを用いて作製した。病理学的には、関連腫瘍組織は転移性のグレード3（4段階中）の骨肉腫を示していた。患者の既往症には、軟組織癌、結核性肺病、前立腺癌、出血を伴った急性十二指腸潰瘍があった。家族歴には、前立腺癌、乳癌、及び急性白血病があった。
OVARN0T07	pINCY	このライブラリは、28歳の白人女性の子宮摘出、並びに卵巣及び卵巣の切除術の際に採取された左卵巣組織から単離したRNAを用いて作製した。その組織は、多発性脂肪腺嚢腫症、弱い増殖期の子宮内膜、及び扁平上皮化生を伴う慢性子宮頸管炎に関係していた。家族歴には、良性の高血圧症、高脂血症、及びアテローム硬化性冠状動脈疾患があった。
OVARTUT01	PSPORT1	このライブラリは、年齢43歳の白人女性から両側の卵管及び卵巣摘出術の際に採取された卵巣腫瘍組織から単離されたRNAを用いて作製した。病理学的には、病変は左側卵巣全体に亘るグレード2粘液性嚢胞腺癌を示していた。患者の既往症には、僧帽弁疾患、肺炎、及びウイルス性肝炎があった。家族歴には、アテローム硬化性冠状動脈疾患、脾臓癌、脳血管障害、乳癌、及び子宮癌があった。

表7-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター関値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder は、アミノ酸または核酸配列の比較及び注釈付け (annotation) に有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool は、アミノ酸及び核酸配列の配列類似性検索に有用であり、blastp 及び blastn、blastx、tblastn、tblastx の5つのファンクションがある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10 以下
FASTA	Pearson 及び Lipman アルゴリズムは、両合わせの配列と同種の配列群との類似性を検索する。FASTA は、fasta 及び tfasta、fastx、tfastx、ssearch の少なくとも5つのファンクションを含む。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.0E-6 構築された ESTs: fasta 同一性=95%以上、一致長さ=200 塩基以上、fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100 以上
BLIMPS	Blocks Improved Searcher は、BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列に対して、ある配列の一致性を調べ、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィンガープリンティング領域を探索する。	Henikoff, S and J.G. Henikoff, Nucleic Acid Res., 19:6565-72, 1991. J.C.; Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM などのタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して両合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322. Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM ヒット: 確率値=1.0E-3 以下 シングルレベルプロトタイプ: スコア=0 以上

【表19】

表7-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター関連値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造及び配列のモチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された質のスコア≧特定 の Prositeモチーフに対する GCG 指定"HIGH"値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び確率で自動配列決定機のトレースを調べる塩基読み出しアルゴリズムである。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプレメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phrap Revised Assembly プログラムであって、配列相同性の検索及び DNA 配列の構築に有用である。	Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致長さ=56以上
Consed	Phrap で構築したものの表示及び編集をするためのグラフィックツールである。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリクス解析プログラムである。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10: 1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み付けマトリックスを用いたタンパク質配列上の膜貫通セグメントの明確化および向きを決定するためのプログラム	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れマルコフモデル (HMM) を用いたタンパク質配列上の膜貫通セグメントの明確化および向きを決定するためのプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他 eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prosite で定義された配列と一致したパターンについてアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他、 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【配列表】

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
TANG, Y. Tom
BAUGHN, Mariah R.
YAO, Monique G.
BANDMAN, Olga
AZIMZAI, Yalda
LAL, Preeti
GANDHI, Ameena R.
RING, Huijun Z.
SHIH, Leo L.
YANG, Junming
POLICKY, Jennifer L.

<120> DRUG METABOLIZING ENZYMES

<130> PI-0033 PCT

<140> To Be Assigned
<141> Herewith

<150> 60/181,856; 10/183,684; 60/185,141; 60/186,818; 60/188,345; 60/189,997
<151> 2000-02-11; 2000-02-17; 2000-02-25; 2000-03-03; 2000-03-09; 2000-03-17

<160> 24
<170> PERL Program

<210> 1
<211> 208
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1642862CD1

<400> 1
Met Trp Phe Leu Leu Tyr Cys Glu Gly Thr Arg Phe Thr Glu Thr
1 5 10 15
Lys His Arg Val Ser Met Glu Val Ala Ala Lys Gly Leu Pro
20 25 30
Val Leu Lys Tyr His Leu Leu Pro Arg Thr Lys Gly Phe Thr Thr
35 40 45
Ala Val Lys Cys Leu Arg Gly Thr Val Ala Val Tyr Asp Val
50 55 60
Thr Leu Asn Phe Arg Gly Asn Lys Asn Pro Ser Leu Leu Gly Ile
65 70 75
Leu Tyr Gly Lys Lys Tyr Glu Ala Asp Met Cys Val Arg Arg Phe
80 85 90
Pro Leu Glu Asp Ile Pro Leu Asp Glu Lys Glu Ala Ala Gln Trp
95 100 105
Leu His Lys Leu Tyr Gln Glu Lys Asp Ala Leu Gln Glu Ile Tyr
110 115 120
Asn Gln Lys Gly Met Phe Pro Gly Glu Gln Phe Lys Pro Ala Arg
125 130 135
Arg Pro Trp Thr Leu Leu Asn Phe Leu Ser Trp Ala Thr Ile Leu
140 145 150
Leu Ser Pro Leu Phe Ser Phe Val Leu Gly Val Phe Ala Ser Gly
155 160 165
Ser Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Leu Gly Phe Val Gly Ala Ala
170 175 180
Ser Phe Gly Val Arg Arg Leu Ile Gly Val Thr Glu Ile Glu Lys
185 190 195
Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Gln Glu Phe Lys Lys Lys Glu
200 205

<210> 2
<211> 294

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 3861612CD1
 <400> 2
 Met Leu Val Leu His Asn Ser Gln Lys Leu Gln Ile Leu Tyr Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Lys Ser Ile Pro Glu Ser Ile Lys Val Tyr Gly Ala
 20 25 30
 Ile Phe Asn Ile Lys Asp Lys Asn Pro Phe Asn Met Glu Val Leu
 35 40 45
 Val Asp Ala Trp Pro Asp Tyr Gln Ile Val Ile Thr Arg Pro Gln
 50 55 60
 Lys Gln Glu Met Lys Asp Asp Gln Asp His Tyr Thr Asn Thr Tyr
 65 70 75
 His Ile Phe Thr Lys Ala Pro Asp Lys Leu Glu Glu Val Leu Ser
 80 85 90
 Tyr Ser Asn Val Ile Ser Trp Glu Gln Thr Leu Gln Ile Gln Gly
 95 100 105
 Cys Gln Glu Gly Leu Asp Glu Ala Ile Arg Lys Val Ala Thr Ser
 110 115 120
 Lys Ser Val Gln Val Asp Tyr Met Lys Thr Ile Leu Phe Ile Pro
 125 130 135
 Glu Leu Pro Lys Lys His Lys Thr Ser Ser Asn Asp Lys Met Glu
 140 145 150
 Leu Phe Glu Val Asp Asp Asp Asn Lys Glu Gly Asn Phe Ser Asn
 155 160 165
 Met Phe Leu Asp Ala Ser His Ala Gly Leu Val Asn Glu His Trp
 170 175 180
 Ala Phe Gly Lys Asn Glu Arg Ser Leu Lys Tyr Ile Glu Arg Cys
 185 190 195
 Leu Gln Asp Phe Leu Gly Phe Gly Val Leu Gly Pro Glu Gly Gln
 200 205 210
 Leu Val Ser Trp Ile Val Met Glu Gln Ser Cys Glu Leu Arg Met
 215 220 225
 Gly Tyr Thr Val Pro Lys Tyr Arg His Gln Gly Asn Met Leu Gln
 230 235 240
 Ile Gly Tyr His Leu Glu Lys Tyr Leu Ser Gln Lys Glu Ile Pro
 245 250 255
 Phe Tyr Phe His Val Ala Asp Asn Asn Glu Lys Ser Leu Gln Ala
 260 265 270
 Leu Asn Asn Leu Gly Phe Lys Ile Cys Pro Cys Gly Trp His Gln
 275 280 285
 Trp Lys Cys Thr Pro Lys Lys Tyr Cys
 290

<210> 3
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7472055CD1

<400> 3
 Met Ala Leu Glu Leu Tyr Met Asp Leu Leu Ser Ala Pro Cys Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Tyr Ile Phe Ser Lys Lys His Asp Ile Gln Phe Asn Phe
 20 25 30
 Gln Phe Val Asp Leu Leu Lys Gly His His His Ser Lys Glu Tyr
 35 40 45
 Ile Asp Ile Asn Pro Leu Arg Lys Leu Pro Ser Leu Lys Asp Gly
 50 55 60

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

<210> 4
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1923521CD1

<400> 4
 Met Pro Cys Gly Glu Asp Trp Leu Ser His Pro Leu Gly Ile Val
 1 5 10 15
 Gln Gly Phe Phe Ala Gln Asn Gly Val Asn Pro Asp Trp Glu Lys
 20 25 30
 Lys Val Ile Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Leu Lys Glu Asn Asn Ala
 35 40 45
 Pro Lys Trp Val Pro Ser Leu Asn Glu Val Pro Leu His Tyr Leu
 50 55 60
 Lys Pro Asn Ser Phe Val Lys Phe Arg Cys Met Ile Gln Asp Met
 65 70 75
 Phe Asp Pro Glu Phe Tyr Met Gly Val Tyr Glu Thr Val Asn Gln
 80 85 90
 Asn Thr Lys Ala His Val Leu His Phe Gly Lys Tyr Arg Asp Val
 95 100 105
 Ala Glu Cys Gly Pro Gln Gln Glu Leu Asp Leu Asn Ser Pro Arg
 110 115 120
 Asn Thr Thr Leu Glu Arg Gln Thr Phe Tyr Cys Val Pro Val Pro
 125 130 135
 Gly Glu Ser Thr Trp Val Lys Glu Ala Tyr Val Asn Ala Asn Gln
 140 145 150
 Ala Arg Val Ser Pro Ser Thr Ser Tyr Thr Pro Ser Arg His Lys
 155 160 165
 Arg Ser Tyr Glu Asp Asp Asp Asp Met Asp Leu Gln Pro Asn Lys
 170 175 180
 Gln Lys Asp Gln His Ala Gly Ala Arg Gln Ala Gly Ser Val Gly
 185 190 195
 Gly Leu Gln Trp Cys Gly Glu Pro Lys Arg Leu Glu Thr Glu Ala
 200 205 210
 Ser Thr Gly Gln Gln Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Ser Pro Phe
 215 220 225

Asp Leu Asn Phe Pro Leu Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Cys Leu
 230 235 240
 Val Lys Val Tyr Glu Asp Trp Asp Cys Phe Lys Val Asn Asp Ile
 245 250 255
 Leu Glu Leu Tyr Gly Ile Leu Ser Val Asp Pro Val Leu Ser Ile
 260 265 270
 Leu Asn Asn Asp Glu Arg Asp Ala Ser Ala Leu Leu Asp Pro Met
 275 280 285
 Glu Cys Thr Asp Thr Ala Glu Glu Gln Arg Val His Ser Pro Pro
 290 295 300
 Ala Ser Leu Val Pro Arg Ile His Val Ile Leu Ala Gln Lys Leu
 305 310 315
 Gln His Ile Asn Pro Leu Leu Pro Ala Cys Leu Asn Lys Glu Glu
 320 325 330
 Ser Lys Thr Phe Val Ser Ser Phe Met Ser Glu Leu Ser Pro Val
 335 340 345
 Arg Ala Glu Leu Leu Gly Phe Leu Thr His Ala Leu Leu Gly Asp
 350 355 360
 Ser Leu Ala Ala Glu Tyr Leu Ile Leu His Leu Ile Ser Thr Val
 365 370 375
 Tyr Thr Arg Arg Asp Val Leu Pro Leu Gly Lys Phe Thr Val Asn
 380 385 390
 Leu Ser Gly Cys Pro Arg Asn Ser Thr Phe Thr Glu His Leu Tyr
 395 400 405
 Arg Ile Ile Gln His Leu Val Pro Ala Ser Phe Arg Leu Gln Met
 410 415 420
 Thr Ile Glu Asn Met Asn His Leu Lys Phe Ile Pro His Lys Asp
 425 430 435
 Tyr Thr Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Leu Leu Gln Leu Pro Ser
 440 445 450
 Asn Thr Ser Leu Val Ile Asp Glu Thr Leu Leu Glu Gln Gly Gln
 455 460 465
 Leu Asp Thr Pro Gly Val His Asn Val Thr Ala Leu Ser Asn Leu
 470 475 480
 Ile Thr Trp Gln Lys Val Asp Tyr Asp Phe Ser Tyr His Gln Met
 485 490 495
 Glu Phe Pro Cys Asn Ile Asn Val Phe Ile Thr Ser Glu Gly Arg
 500 505 510
 Ser Leu Leu Pro Ala Asp Cys Gln Ile His Leu Gln Pro Gln Leu
 515 520 525
 Ile Pro Pro Asn Met Glu Glu Tyr Met Asn Ser Leu Leu Ser Ala
 530 535 540
 Val Leu Pro Ser Val Leu Asn Lys Phe Arg Ile Tyr Leu Thr Leu
 545 550 555
 Leu Arg Phe Leu Glu Tyr Ser Ile Ser Asp Glu Ile Thr Lys Ala
 560 565 570
 Val Glu Asp Asp Phe Val Glu Met Arg Lys Asn Asp Pro Gln Ser
 575 580 585
 Ile Thr Ala Asp Asp Leu His Gln Leu Leu Val Val Ala Arg Cys
 590 595 600
 Leu Ser Leu Ser Ala Gly Gln Thr Thr Leu Ser Arg Glu Arg Trp
 605 610 615
 Leu Arg Ala Lys Gln Leu Glu Ser Leu Arg Arg Thr Arg Leu Gln
 620 625 630
 Gln Gln Lys Cys Val Asn Gly Asn Glu Leu
 635 640

<210> 5
 <211> 870
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1558210CD1

 <400> 5

Met	Gly	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Thr	Val
1				5					10					15
Phe	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Ala	Phe	Leu	Ser	His	His	Arg
				20					25					30
Leu	Lys	Gly	Arg	Phe	Gln	Arg	Asp	Arg	Arg	Asn	Ile	Arg	Pro	Asn
				35					40					45
Ile	Ile	Leu	Val	Leu	Thr	Asp	Asp	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	Ser
				50					55					60
Met	Gln	Val	Met	Asn	Lys	Thr	Arg	Arg	Ile	Met	Glu	Gln	Gly	Gly
				65					70					75
Ala	His	Phe	Ile	Asn	Ala	Phe	Val	Thr	Thr	Pro	Met	Cys	Cys	Pro
				80					85					90
Ser	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Thr	Gly	Lys	Tyr	Val	His	Asn	His	Asn
				95					100					105
Thr	Tyr	Thr	Asn	Asn	Glu	Asn	Cys	Ser	Ser	Pro	Ser	Trp	Gln	Ala
				110					115					120
Gln	His	Glu	Ser	Arg	Thr	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	Asn	Ser	Thr	Gly
				125					130					135
Tyr	Arg	Thr	Ala	Phe	Phe	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn	Glu	Tyr	Asn	Gly
				140					145					150
Ser	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Trp	Lys	Glu	Trp	Val	Gly	Leu	Leu	Lys
				155					160					165
Asn	Ser	Arg	Phe	Tyr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Cys	Arg	Asn	Gly	Val	Lys
				170					175					180
Glu	Lys	His	Gly	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Asp	Tyr	Leu	Thr	Asp	Leu
				185					190					195
Ile	Thr	Asn	Asp	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Arg	Thr	Ser	Lys	Lys	Met
				200					205					210
Tyr	Pro	His	Arg	Pro	Val	Leu	Met	Val	Ile	Ser	His	Ala	Ala	Pro
				215					220					225
His	Gly	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Pro	Gln	Tyr	Ser	Arg	Leu	Phe	Pro
				230					235					240
Asn	Ala	Ser	Gln	His	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Pro	Asn
				245					250					255
Pro	Asp	Lys	His	Trp	Ile	Met	Arg	Tyr	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Pro
				260					265					270
Ile	His	Met	Glu	Phe	Thr	Asn	Met	Leu	Gln	Arg	Lys	Arg	Leu	Gln
				275					280					285
Thr	Leu	Met	Ser	Val	Asp	Asp	Ser	Met	Glu	Thr	Ile	Tyr	Asn	Met
				290					295					300
Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Glu	Leu	Asp	Asn	Thr	Tyr	Ile	Val	Tyr	Thr
				305					310					315
Ala	Asp	His	Gly	Tyr	His	Ile	Gly	Gln	Phe	Gly	Leu	Val	Lys	Gly
				320					325					330
Lys	Ser	Met	Pro	Tyr	Glu	Phe	Asp	Ile	Arg	Val	Pro	Phe	Tyr	Val
				335					340					345
Arg	Gly	Pro	Asn	Val	Glu	Ala	Gly	Cys	Leu	Asn	Pro	His	Ile	Val
				350					355					360
Leu	Asn	Ile	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Ile	Leu	Asp	Ile	Ala	Gly	Leu
				365					370					375
Asp	Ile	Pro	Ala	Asp	Met	Asp	Gly	Lys	Ser	Ile	Leu	Lys	Leu	Leu
				380					385					390
Asp	Thr	Glu	Arg	Pro	Val	Asn	Arg	Phe	His	Leu	Lys	Lys	Lys	Met
				395					400					405
Arg	Val	Trp	Arg	Asp	Ser	Phe	Leu	Val	Glu	Arg	Gly	Lys	Leu	Leu
				410					415					420
His	Lys	Arg	Asp	Asn	Asp	Lys	Val	Asp	Ala	Gln	Glu	Glu	Asn	Phe
				425					430					435
Leu	Pro	Lys	Tyr	Gln	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Cys	Gln	Arg	Ala	Glu
				440					445					450
Tyr	Gln	Thr	Ala	Cys	Glu	Gln	Leu	Gly	Gln	Lys	Trp	Gln	Cys	Val
				455					460					465
Glu	Asp	Ala	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	His	Lys	Cys	Lys	Gly	Pro
				470					475					480
Met	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Arg	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Lys
				485					490					495
Tyr	Tyr	Gly	Gln	Gly	Ser	Glu	Ala	Cys	Thr	Cys	Asp	Ser	Gly	Asp

Tyr Lys Leu Ser 500
 Leu Ala Gly Arg Arg Lys Lys Leu Phe Lys Lys 510
 515
 Lys Tyr Lys Ala Ser Tyr Val Arg Ser Arg Ser Ile Arg Ser Val 525
 530
 Ala Ile Glu Val Asp Gly Arg Val Tyr His Val Gly Leu Gly Asp 540
 545
 Ala Ala Gln Pro Arg Asn Leu Thr Lys Arg His Trp Pro Gly Ala 555
 560
 Pro Glu Asp Gln Asp Asp Lys Asp Gly Gly Asp Phe Ser Gly Thr 570
 575
 Gly Gly Leu Pro Asp Tyr Ser Ala Ala Asn Pro Ile Lys Val Thr 585
 590
 His Arg Cys Tyr Ile Leu Glu Asn Asp Thr Val Gln Cys Asp Leu 600
 605
 Asp Leu Tyr Lys Ser Leu Gln Ala Trp Lys Asp His Lys Leu His 615
 620
 Ile Asp His Glu Ile Glu Thr Leu Gln Asn Lys Ile Lys Asn Leu 630
 635
 Arg Glu Val Arg Gly His Leu Lys Lys Lys Arg Pro Glu Glu Cys 645
 650
 Asp Cys His Lys Ile Ser Tyr His Thr Gln His Lys Gly Arg Leu 660
 665
 Lys His Arg Gly Ser Ser Leu His Pro Phe Arg Lys Gly Leu Gln 675
 680
 Glu Lys Asp Lys Val Trp Leu Leu Arg Glu Gln Lys Arg Lys Lys 690
 695
 Lys Leu Arg Lys Leu Leu Lys Arg Leu Gln Asn Asn Asp Thr Cys 705
 710
 Ser Met Pro Gly Leu Thr Cys Phe Thr His Asp Asn Gln His Trp 720
 725
 Gln Thr Ala Pro Phe Trp Thr Leu Gly Pro Phe Cys Ala Cys Thr 735
 740
 Ser Ala Asn Asn Asn Thr Tyr Trp Cys Met Arg Thr Ile Asn Glu 750
 755
 Thr His Asn Phe Leu Phe Cys Glu Phe Ala Thr Gly Phe Leu Glu 765
 770
 Tyr Phe Asp Leu Asn Thr Asp Pro Tyr Gln Leu Met Asn Ala Val 780
 785
 Asn Thr Leu Asp Arg Asp Val Leu Asn Gln Leu His Val Gln Leu 795
 800
 Met Glu Leu Arg Ser Cys Lys Gly Tyr Lys Gln Cys Asn Pro Arg 810
 815
 Thr Arg Asn Met Asp Leu Gly Leu Lys Asp Gly Gly Ser Tyr Glu 825
 830
 Gln Tyr Arg Gln Phe Gln Arg Arg Lys Trp Pro Glu Met Lys Arg 840
 845
 Pro Ser Ser Lys Ser Leu Gly Gln Leu Trp Glu Gly Trp Glu Gly 855
 860
 865
 870

<210> 6
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5629033CD1

<400> 6
 Met Pro Glu Glu Met Asp Lys Pro Leu Ile Ser Leu His Leu Val
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Ser Ser Leu Ala Lys Val Pro Asp Glu Ala Pro Lys
 20 25 30
 Val Gly Ile Leu Gly Ser Gly Asp Phe Ala Arg Ser Leu Ala Thr
 35 40 45

Arg	Leu	Val	Gly	Ser	Gly	Phe	Lys	Val	Val	Val	Gly	Ser	Arg	Asn
				50					55					60
Pro	Lys	Arg	Thr	Ala	Arg	Leu	Phe	Pro	Ser	Ala	Ala	Gln	Val	Thr
				65					70					75
Phe	Gln	Glu	Glu	Ala	Val	Ser	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Phe	Val	Ala
				80					85					90
Val	Phe	Arg	Glu	His	Tyr	Ser	Ser	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Asp	Gln
				95					100					105
Leu	Ala	Gly	Lys	Ile	Leu	Val	Asp	Val	Ser	Asn	Pro	Thr	Glu	Gln
				110					115					120
Glu	His	Leu	Gln	His	Arg	Glu	Ser	Asn	Ala	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser
				125					130					135
Leu	Phe	Pro	Thr	Cys	Thr	Val	Val	Lys	Ala	Phe	Asn	Val	Ile	Ser
				140					145					150
Ala	Trp	Thr	Leu	Gln	Ala	Gly	Pro	Arg	Asp	Gly	Asn	Arg	Gln	Val
				155					160					165
Pro	Ile	Cys	Gly	Asp	Gln	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Ala	Val	Ser	Glu
				170					175					180
Met	Ala	Leu	Ala	Met	Gly	Phe	Met	Pro	Val	Asp	Met	Gly	Ser	Leu
				185					190					195
Ala	Ser	Ala	Trp	Glu	Val	Glu	Ala	Met	Pro	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro
				200					205					210
Ala	Trp	Lys	Val	Pro	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Val	Cys
				215					220					225
Phe	Tyr	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Arg	Asp	Val	Leu	Gln	Pro	Tyr	Val
				230					235					240
Gln	Glu	Ser	Gln	Asn	Lys	Phe	Phe	Lys	Leu	Pro	Val	Ser	Val	Val
				245					250					255
Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Cys	Val	Ala	Tyr	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
				260					265					270
Tyr	Leu	Pro	Gly	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Arg	Arg	Gly
				275					280					285
Thr	Lys	Tyr	Gln	Arg	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Asp	His	Trp	Leu	Gln
				290					295					300
His	Arg	Lys	Gln	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Cys	Ala	Ala	Leu
				305					310					315
His	Ala	Leu	Tyr	Ser	Phe	Cys	Leu	Pro	Leu	Arg	Arg	Ala	His	Arg
				320					325					330
Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Leu	Ala	Val	Lys	Gln	Val	Leu	Ala	Asn	Lys
				335					340					345
Ser	His	Leu	Trp	Val	Glu	Glu	Glu	Val	Trp	Arg	Met	Glu	Ile	Tyr
				350					355					360
Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala
				365					370					375
Val	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala	Asn	Ser	Leu	Asn	Trp	Arg	Glu
				380					385					390
Phe	Ser	Phe	Val	Gln	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Val	Ala	Leu	Val	Leu
				395					400					405
Ser	Thr	Leu	His	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Trp	Thr	Arg	Ala	Phe	Glu
				410					415					420
Glu	Ser	Arg	Tyr	Lys	Phe	Tyr	Leu	Pro	Pro	Thr	Phe	Thr	Leu	Thr
				425					430					435
Leu	Leu	Val	Pro	Cys	Val	Val	Ile	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Phe	Leu
				440					445					450
Leu	Pro	Cys	Ile	Ser	Arg	Arg	Leu	Ala	Arg	Ile	Arg	Arg	Gly	Trp
				455					460					465
Glu	Arg	Glu	Ser	Thr	Ile	Lys	Phe	Thr	Leu	Pro	Thr	Asp	His	Ala
				470					475					480
Leu	Ala	Glu	Lys	Thr	Ser	His	Val							
				485										

<210> 7
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2750679CD1

<400> 7

```

Met Thr Ala Pro His Leu Cys Ser Cys Leu Pro Ala Ile Leu Arg
 1      5      10
Pro Leu Ala Met Gly Gly Cys Phe Ser Lys Pro Lys Pro Val Glu
 20     25     30
Leu Lys Ile Glu Val Val Leu Pro Glu Lys Glu Arg Gly Lys Glu
 35     40     45
Glu Leu Ser Ala Ser Gly Lys Gly Ser Pro Arg Ala Tyr Gln Gly
 50     55     60
Asn Gly Thr Ala Arg His Phe His Thr Glu Glu Arg Leu Ser Thr
 65     70     75
Pro His Pro Tyr Pro Ser Pro Gln Asp Cys Val Glu Ala Ala Val
 80     85     90
Cys His Val Lys Asp Leu Glu Asn Gly Gln Met Arg Glu Val Glu
 95    100    105
Leu Gly Trp Gly Lys Val Leu Leu Val Lys Asp Asn Gly Glu Phe
110    115    120
His Ala Leu Gly His Lys Cys Pro His Tyr Gly Ala Pro Leu Val
125    130    135
Lys Gly Val Leu Ser Arg Gly Arg Val Arg Cys Pro Trp His Gly
140    145    150
Ala Cys Phe Asn Ile Ser Thr Gly Asp Leu Glu Asp Phe Pro Gly
155    160    165
Leu Asp Ser Leu His Lys Phe Gln Val Lys Ile Glu Lys Glu Lys
170    175    180
Val Tyr Val Arg Ala Ser Lys Gln Ala Leu Gln Leu Gln Arg Arg
185    190    195
Thr Lys Val Met Ala Lys Cys Ile Ser Pro Ser Ala Gly Tyr Ser
200    205    210
Ser Ser Thr Asn Val Leu Ile Val Gly Ala Gly Ala Ala Gly Leu
215    220    225
Val Cys Ala Glu Thr Leu Arg Gln Glu Gly Phe Ser Asp Arg Ile
230    235    240
Val Leu Cys Thr Leu Asp Arg His Leu Pro Tyr Asp Arg Pro Lys
245    250    255
Leu Ser Lys Ser Leu Asp Thr Gln Pro Glu Gln Leu Ala Leu Arg
260    265    270
Pro Lys Glu Phe Phe Arg Ala Tyr Gly Ile Glu Val Leu Thr Glu
275    280    285
Ala Gln Val Val Thr Val Asp Val Arg Thr Lys Lys Val Val Phe
290    295    300
Lys Asp Gly Phe Lys Leu Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Leu Ala Pro
305    310    315
Gly Glu Gln Pro Gln Asp Ser Glu Leu Gln Arg Gln Arg Ser Gly
320    325    330
Glu Arg Val His Tyr Pro Asp Ala Arg Gly Cys Gln Ser Arg Gly
335    340    345
Glu Ala Gly Pro Arg Pro Gln Arg Gly Arg Arg Gly Ser Arg Leu
350    355    360
Pro Gly Asp Gly Gly Gly Arg Leu Pro Asp Gly Glu Gly Pro Leu
365    370    375
Cys Val Cys Gly Gly Ala Gly Gly Asp Ala Leu Gln Glu Val Pro
380    385    390
Gly Gly Ala Arg Gly Ser Cys Pro His Glu Asp Val
395    400

```

<210> 8

<211> 276

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1570911CD1

```

<400> 8
Met Asn Ser Arg Arg Arg Glu Pro Ile Thr Leu Gln Asp Pro Glu
 1      5      10      15
Ala Lys Tyr Pro Leu Pro Leu Ile Glu Lys Glu Lys Ile Ser His
 20      25      30
Asn Thr Arg Arg Phe Arg Phe Gly Leu Pro Ser Pro Asp His Val
 35      40      45
Leu Gly Leu Pro Val Gly Asn Tyr Val Gln Leu Leu Ala Lys Ile
 50      55      60
Asp Asn Glu Leu Val Val Arg Ala Tyr Thr Pro Val Ser Ser Asp
 65      70      75
Asp Asp Arg Gly Phe Val Asp Leu Ile Ile Lys Ile Tyr Phe Lys
 80      85      90
Asn Val His Pro Gln Tyr Pro Glu Gly Gly Lys Met Thr Gln Tyr
 95      100      105
Leu Glu Asn Met Lys Ile Gly Glu Thr Ile Phe Phe Arg Gly Pro
 110      115      120
Arg Gly Arg Leu Phe Tyr His Gly Pro Gly Asn Leu Gly Ile Arg
 125      130      135
Pro Asp Gln Thr Ser Glu Pro Lys Lys Thr Leu Ala Asp His Leu
 140      145      150
Gly Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly Ile Thr Pro Met Leu Gln Leu
 155      160      165
Ile Arg His Ile Thr Lys Asp Pro Ser Asp Arg Thr Arg Met Ser
 170      175      180
Leu Ile Phe Ala Asn Gln Thr Glu Glu Asp Ile Leu Val Arg Lys
 185      190      195
Glu Leu Glu Glu Ile Ala Arg Thr His Pro Asp Gln Phe Asp Leu
 200      205      210
Trp Tyr Thr Leu Asp Arg Pro Pro Ile Gly Trp Lys Tyr Ser Ser
 215      220      225
Gly Phe Val Thr Ala Asp Met Ile Lys Glu His Leu Pro Pro Pro
 230      235      240
Ala Lys Ser Thr Leu Ile Leu Val Cys Gly Pro Pro Pro Leu Ile
 245      250      255
Gln Thr Ala Ala His Pro Asn Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Thr Gln
 260      265      270
Asp Met Ile Phe Thr Tyr
 275

```

```

<210> 9
<211> 512
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1959720CD1

```

```

<400> 9
Met Leu Phe Glu Gly Leu Asp Leu Val Ser Ala Leu Ala Thr Leu
 1      5      10      15
Ala Ala Cys Leu Val Ser Val Thr Leu Leu Leu Ala Val Ser Gln
 20      25      30
Gln Leu Trp Gln Leu Arg Trp Ala Ala Thr Arg Asp Lys Ser Cys
 35      40      45
Lys Leu Pro Ile Pro Lys Gly Ser Met Gly Phe Pro Leu Ile Gly
 50      55      60
Glu Thr Gly His Trp Leu Leu Gln Val Ser Gly Phe Gln Ser Ser
 65      70      75
Arg Arg Glu Lys Tyr Gly Asn Val Phe Lys Thr His Leu Leu Gly
 80      85      90
Arg Pro Leu Ile Arg Val Thr Gly Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile
 95      100      105
Leu Met Gly Glu His His Leu Val Ser Thr Glu Trp Pro Arg Ser
 110      115      120
Thr Arg Met Leu Leu Gly Pro Asn Thr Val Ser Asn Ser Ile Gly

```

```

125                               130                               135
Asp Ile His Arg Asn Lys Arg Lys Val Phe Ser Lys Ile Phe Ser
140                               145                               150
His Glu Ala Leu Glu Ser Tyr Leu Pro Lys Ile Gln Leu Val Ile
155                               160                               165
Gln Asp Thr Leu Arg Ala Trp Ser Ser His Pro Glu Ala Ile Asn
170                               175                               180
Val Tyr Gln Glu Ala Gln Lys Leu Thr Phe Arg Met Ala Ile Arg
185                               190                               195
Val Leu Leu Gly Phe Ser Ile Pro Glu Glu Asp Leu Gly His Leu
200                               205                               210
Phe Glu Val Tyr Gln Gln Phe Val Asp Asn Val Phe Ser Leu Pro
215                               220                               225
Val Asp Leu Pro Phe Ser Gly Tyr Arg Arg Gly Ile Gln Ala Arg
230                               235                               240
Gln Ile Leu Gln Lys Gly Leu Glu Lys Ala Ile Arg Glu Lys Leu
245                               250                               255
Gln Cys Thr Gln Gly Lys Asp Tyr Leu Asp Val Leu Asp Leu Leu
260                               265                               270
Ile Glu Ser Ser Lys Glu His Gly Lys Glu Met Thr Met Gln Glu
275                               280                               285
Leu Lys Asp Gly Thr Leu Glu Leu Ile Phe Ala Ala Tyr Ala Thr
290                               295                               300
Thr Ala Ser Ala Ser Thr Ser Leu Ile Met Gln Leu Leu Lys His
305                               310                               315
Pro Thr Val Leu Glu Lys Leu Arg Asp Glu Leu Arg Ala His Gly
320                               325                               330
Ile Leu His Ser Gly Gly Cys Pro Cys Glu Gly Thr Leu Arg Leu
335                               340                               345
Asp Thr Leu Ser Gly Leu Arg Tyr Leu Asp Cys Val Ile Lys Glu
350                               355                               360
Val Met Arg Leu Phe Thr Pro Ile Ser Gly Gly Tyr Arg Thr Val
365                               370                               375
Leu Gln Thr Phe Glu Leu Asp Gly Phe Gln Ile Pro Lys Gly Trp
380                               385                               390
Ser Val Met Tyr Ser Ile Arg Asp Thr His Asp Thr Ala Pro Val
395                               400                               405
Phe Lys Asp Val Asn Val Phe Asp Pro Asp Arg Phe Ser Gln Ala
410                               415                               420
Arg Ser Glu Asp Lys Asp Gly Arg Phe His Tyr Leu Pro Phe Gly
425                               430                               435
Gly Gly Val Arg Thr Cys Leu Gly Lys His Leu Ala Lys Leu Phe
440                               445                               450
Leu Lys Val Leu Ala Val Glu Leu Ala Ser Thr Ser Arg Phe Glu
455                               460                               465
Leu Ala Thr Arg Thr Phe Pro Arg Ile Thr Leu Val Pro Val Leu
470                               475                               480
His Pro Val Asp Gly Leu Ser Val Lys Phe Phe Gly Leu Asp Ser
485                               490                               495
Asn Gln Asn Glu Ile Leu Pro Glu Thr Glu Ala Met Leu Ser Ala
500                               505                               510
Thr Val

```

```

<210> 10
<211> 524
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 6825202CD1

```

```

<400> 10
Met Pro Gln Leu Ser Leu Ser Trp Leu Gly Leu Gly Pro Val Ala
1 5 10 15
Ala Ser Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Gly Gly Ser Trp Leu

```

				20						25				30
Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Trp	Thr	Tyr	Thr	Phe	Tyr	Asp	Asn	Cys
				35						40				45
Arg	Arg	Leu	Gln	Cys	Phe	Pro	Gln	Pro	Pro	Lys	Gln	Asn	Trp	Phe
				50						55				60
Trp	Gly	His	Gln	Gly	Leu	Val	Thr	Pro	Thr	Glu	Glu	Gly	Met	Lys
				65						70				75
Thr	Leu	Thr	Gln	Leu	Val	Thr	Thr	Tyr	Pro	Gln	Gly	Phe	Lys	Leu
				80						85				90
Trp	Leu	Gly	Pro	Thr	Phe	Pro	Leu	Leu	Ile	Leu	Cys	His	Pro	Asp
				95						100				105
Ile	Ile	Arg	Pro	Ile	Thr	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Lys
				110						115				120
Asp	Met	Ile	Phe	Tyr	Gly	Phe	Leu	Lys	Pro	Trp	Leu	Gly	Asp	Gly
				125						130				135
Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys	Trp	Ser	Arg	His	Arg	Arg	Met
				140						145				150
Leu	Thr	Pro	Ala	Phe	His	Phe	Asn	Ile	Leu	Lys	Pro	Tyr	Met	Lys
				155						160				165
Ile	Phe	Asn	Lys	Ser	Val	Asn	Ile	Met	His	Asp	Lys	Trp	Gln	Arg
				170						175				180
Leu	Ala	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Arg	Leu	Asp	Met	Phe	Glu	His	Ile
				185						190				195
Ser	Leu	Met	Thr	Leu	Asp	Ser	Leu	Gln	Lys	Cys	Val	Phe	Ser	Phe
				200						205				210
Glu	Ser	Asn	Cys	Gln	Glu	Lys	Pro	Ser	Glu	Tyr	Ile	Ala	Ala	Ile
				215						220				225
Leu	Glu	Leu	Ser	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Arg	Asn	Gln	Gln	Ile	Leu
				230						235				240
Leu	His	Thr	Asp	Phe	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Gly	Gln	Arg
				245						250				255
Phe	Arg	Arg	Ala	Cys	His	Leu	Val	His	Asp	Phe	Thr	Asp	Ala	Val
				260						265				270
Ile	Gln	Glu	Arg	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Gln	Gly	Ile	Asp	Asp
				275						280				285
Phe	Leu	Lys	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Asp	Phe	Ile	Asp
				290						295				300
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Lys	Asp	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Asp
				305						310				315
Glu	Asp	Ile	Arg	Ala	Glu	Ala	Asp	Thr	Phe	Met	Phe	Glu	Gly	His
				320						325				330
Asp	Thr	Thr	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Leu	Tyr	His	Leu	Ala
				335						340				345
Lys	His	Pro	Glu	Tyr	Gln	Glu	Gln	Cys	Arg	Gln	Glu	Val	Gln	Glu
				350						355				360
Leu	Leu	Lys	Asp	Arg	Glu	Pro	Ile	Glu	Ile	Glu	Trp	Asp	Asp	Leu
				365						370				375
Ala	Gln	Leu	Pro	Phe	Leu	Thr	Met	Cys	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg
				380						385				390
Leu	His	Pro	Pro	Val	Pro	Val	Ile	Ser	Arg	Cys	Cys	Thr	Gln	Asp
				395						400				405
Phe	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Pro	Lys	Gly	Ile	Val	Cys
				410						415				420
Leu	Ile	Asn	Ile	Ile	Gly	Ile	His	Tyr	Asn	Pro	Thr	Val	Trp	Pro
				425						430				435
Asp	Pro	Glu	Val	Tyr	Asp	Pro	Phe	Arg	Phe	Asp	Gln	Glu	Asn	Ile
				440						445				450
Lys	Glu	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser	Ala	Gly	Pro
				455						460				465
Arg	Asn	Cys	Ile	Gly	Gln	Ala	Phe	Ala	Met	Ala	Glu	Met	Lys	Val
				470						475				480
Val	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Leu	His	Phe	Arg	Ile	Leu	Pro	Thr	His
				485						490				495
Thr	Glu	Pro	Arg	Arg	Lys	Pro	Glu	Leu	Ile	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly
				500						505				510
Gly	Leu	Trp	Leu	Arg	Val	Glu	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Gln	
				515						520				

<210> 11
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7256116CD1

<400> 11
 Met Leu Pro Ile Thr Asp Arg Leu Leu His Leu Leu Gly Leu Glu
 1 5 10 15
 Lys Thr Ala Phe Arg Ile Tyr Ala Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe
 20 25 30
 Leu Leu Phe Phe Leu Phe Arg Leu Leu Leu Arg Phe Leu Arg Leu
 35 40 45
 Cys Arg Ser Phe Tyr Ile Thr Cys Arg Arg Leu Arg Cys Phe Pro
 50 55 60
 Gln Pro Pro Arg Arg Asn Trp Leu Leu Gly His Leu Gly Met Tyr
 65 70 75
 Leu Pro Asn Glu Ala Gly Leu Gln Asp Glu Lys Lys Val Leu Asp
 80 85 90
 Asn Met His His Val Leu Leu Val Trp Met Gly Pro Val Leu Pro
 95 100 105
 Leu Leu Val Leu Val His Pro Asp Tyr Ile Lys Pro Leu Leu Gly
 110 115 120
 Ala Ser Ala Ala Ile Ala Pro Lys Asp Asp Leu Phe Tyr Gly Phe
 125 130 135
 Leu Lys Pro Trp Leu Gly Asp Gly Leu Leu Leu Ser Lys Gly Asp
 140 145 150
 Lys Trp Ser Arg His Arg Arg Leu Leu Thr Pro Ala Phe His Phe
 155 160 165
 Asp Ile Leu Lys Pro Tyr Met Lys Ile Phe Asn Gln Ser Ala Asp
 170 175 180
 Ile Met His Ala Lys Trp Arg His Leu Ala Glu Gly Ser Ala Val
 185 190 195
 Ser Leu Asp Met Phe Glu His Ile Ser Leu Met Thr Leu Asp Ser
 200 205 210
 Leu Gln Lys Cys Val Phe Ser Tyr Asn Ser Asn Cys Gln Glu Lys
 215 220 225
 Met Ser Asp Tyr Ile Ser Ala Ile Ile Glu Leu Ser Ala Leu Ser
 230 235 240
 Val Arg Arg Gln Tyr Arg Leu His His Tyr Leu Asp Phe Ile Tyr
 245 250 255
 Tyr Arg Ser Ala Asp Gly Arg Arg Phe Arg Gln Ala Cys Asp Met
 260 265 270
 Val His His Phe Thr Thr Glu Val Ile Gln Glu Arg Arg Arg Ala
 275 280 285
 Leu Arg Gln Gln Gly Ala Glu Ala Trp Leu Lys Ala Lys Gln Gly
 290 295 300
 Lys Thr Leu Asp Phe Ile Asp Val Leu Leu Leu Ala Arg Asp Glu
 305 310 315
 Asp Gly Lys Glu Leu Ser Asp Glu Asp Ile Arg Ala Glu Ala Asp
 320 325 330
 Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ile Gln Trp Asp Leu
 335 340 345
 Leu Gly Cys Cys Ser Ile Trp Gln Ser Ile Arg Asn Thr Arg Arg
 350 355 360
 Asn Ala Glu Lys Arg Phe Arg Lys Ser
 365

<210> 12
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4210675CD1

<400> 12
Met Tyr Val Glu Gly Leu Lys Asp Leu Ser Asp Met Ile Met Phe
1 5 10 15
Gln Pro Leu Ser Leu Pro Glu Glu Lys Met Asn Leu Ala Tyr Ile
20 25 30
Leu Glu Arg Ala Thr Thr Arg Leu Phe Pro Val Cys Glu Lys Ala
35 40 45
Leu Arg Asp His Arg Gln Asp Phe Leu Val Gly Asn Arg Leu Ser
50 55 60
Trp Ala Asp Thr Gln Gln Pro Glu Val Ile Leu Met Thr Glu Glu
65 70 75
Cys Lys Pro Ser Val Leu Leu Gly Phe Pro Leu Leu Gln Lys Phe
80 85 90
Lys Ala Arg Ile Ile His Ile Pro Thr Ile Asn Lys Cys Leu Gln
95 100 105
Pro Gly Ser Gln Arg Lys Pro Pro Leu Asp Glu Glu Ser Ile Glu
110 115 120
Thr Val Lys Asn Ile Phe Lys Phe Glu His Gly Leu Phe Leu Lys
125 130 135
Asn Met Ile Thr Thr Leu Ala Glu Tyr
140

<210> 13
<211> 3878
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1642862CB1

<400> 13
ctttctcacc atggccttgc ctttgagatg accccacctg cgtccctgca gaaccacttc 60
cgtttagctaa gctgcctcag atgaaacctt aactactccc cgatgctggc agaagaat 120
cattgcagtc aaagccctcg tgtgagggcag caccccccagg ccaccccccg gaagcctggc 180
agcctctgca tccggctcat ccaccttccc tgagggcctt ccagagccaag cctgagcctc 240
agtttctca tttctggggc gaccactca cctcagaag ccgggtcctg cttcacagca 300
gacccccga gccacaaagc cgtgactcct agagcgacac cacacaggag ctgggtgcag 360
cgggagcctg gccaaagccc tggcctctgt ccgacgtga atgcccagg gcccctcct 420
ctctccctc cagagctcca aggtcctcgc taagaaggag ctgctctacg tgcctccat 480
cggctggacg tggacttctc tggagattgt gttctgcaag cggagtggtg aggaggaccg 540
ggacaccgtg gtcgaagggc tgaggcgcct gtcggactac cccgagtaca tgtggtttct 600
cctgtactgc gaggggacgc gcttcaogga gaccaagcac cgcgttagca tggaggtggc 660
ggctgctaag gggcttctg tctcaagta ccactgctg ccgaggacca agggcttcc 720
caccgcagtc aagtgcctcc gggggacagt cgcagctgtc tatgatgtaa cctgaactt 780
cagaggaaac aagaaccgt cctgctggg gatcctctac gggagaagt acgagggcga 840
catgtgcgtg aggagattc ctctggaaga catcccctg gatgaaaagg aagcagctca 900
gtggcttcat aaactgtacc aggagaagga cgcgctccag gagatatata atcagaaggg 960
catgtttcca ggggagcagt ttaagcctgc ccggaggccg tggacctcc tgaacttct 1020
gtcctgggcc accattctc tgtctcccct cttcagttt gtcttggcg tctttgccag 1080
cggatcacct ctctgatcc tgactttctt ggggtttgtg ggagcagctt cctttggagt 1140
tcgcagactg ataggagtaa ctgagataga aaaaggctcc agctacggaa accaagagt 1200
taagaaaaag gaataattaa tggctgtgac tgaacacacg cggccctgac ggtggtatcc 1260
agttaactca aaaccaacac acagagtgca ggaaaagaca attagaaact attttctta 1320
ttaactggtg actaatatta acaaaacttg agccaagagt aaagaattca gaaggcctgt 1380
cagggtgaagt cttcagcctc ccacagcgca gggtcocagc atctccacgc gcgcccgtgg 1440
gaggtgggtc cggccggaga ggcctcccgc ggacgcctg tctccagaac tccgcttcca 1500
agagggagcc tttggctgct ttctctcctt aaacttagat caaatttttt ggtttttaat 1560
cagttabctt gggaaactta cctggcccct cactcttct gcacccccg cccccgaac 1620
tgtctcgtaa tgaatttctg ctgtcctcct gggagtggaac ggccgggtcc cgtcccccg 1680
gagcatcgtc cggctcagca ccttggctcc cagtgggggc cccgtggagg gcgcccgtag 1740
tgataagcac accggcacga acgtcaggtc cactctcga agtcggagcc ctactctgc 1800
cctgtcctgg gctggctga gggcgaacgc cccacctcac tttctagagc cctgtctgtc 1860
ctagctccta tctgacctg tgtgtaataa cgtacatctg tttttaagt ggatggcccc 1920

```

ctgagaactc agtgaaatgc agagtctctc atgcacctaa agctcctttg tgcgtctcat 1980
ggctgtcaga tcttgggtccc tccacactgg gtgctgggga gggaggaccc tgggggctac 2040
cgcgcgcccc cccatcccac agatcaggag ccaaggaggg agaacagggc agcctgtggg 2100
actctaggat gcttcagaag aagcgacggc accgtcaacc ctctgttttt taagggtggt 2160
tggagactgt taacactgag ctcatgact tctagagatt ttatTTTTtac tggttgatct 2220
cttgggtggtt ttcaacttcc tgctggaaac tagaggtggg gcacccccca cccccagcc 2280
tcgactgtg tcttgggga aggcccgccc ccactctggc cgggtgctact gtggccggc 2340
caccctgag cggccagctc cctacctctt ggacgtctct gagagtccag gcagagcaga 2400
gggcagcgct cggccgggtca tgctggctcc cttggccttg cagcgagccc ctggccccag 2460
ccgagcgagg gatgcttctc cctacagcat gtccactccc ccggcatggc cagggtggggc 2520
ccctggggca atggcagtg tagaacgctc aacttggttg cggtaaccatc agcccacctg 2580
catttggctt tcgacttgct tgttctaagt cacagcgccc tcatcttttt agcaaggtaa 2640
aaaaaccaaa atgggtgtta tctctgatat cttgaaacca gcgttctgaa tagaggtagg 2700
ttgagttttc taggggaaaa caaatggaga aaagaggcat gaagaaaagt aaaccgagaa 2760
cataattagg catcgggccc aagtgtcctg gggagattgg aggggacggc agcgttctgc 2820
atgatggagg cgctgcccgg ccccggtctc gtggggggcg tgctctcagg gcgtgtgagg 2880
gagcccaect tggcacacct gctcagagca cggctctcgc caggggtgaa ggggcagacc 2940
aacgaaacca gatgagacca acgacacccat gogagacacg cttgcagaca ctgttgtttt 3000
ggaaatgtgc ttccctccat ctgaaatctc atccctccac ccgcccactc gggcagctgt 3060
gctgtgggca gggcagtcgc tccctggctc gagcacccca gagattctcc tgcaccttcc 3120
tcatgcccga cgtgctcat ccgtctccat gtgtgttttag atccatgcc a tctactgact 3180
cactaacacc tgcaaaatct ttaaggaaaa aagctgaagg gtaccgacct gcacatatgt 3240
gacctggaaa atgcaaatTT agatctttta tgatttaatt attattgttt cccatagaag 3300
ttccctccct ttgaaattaa tataaatgt ataaattctg cactgagcca tggcggagct 3360
gggcagcccc taggttagag tggagacgga ggcccaggcg caggggtcac acctcatctg 3420
gtttccttcc catctcacag cttagcttgt gcttctcaac accaagtctt taagagcaat 3480
aaaaactaca ccatgaatgt ttgaatTTTT ggttttgggg ggggggaggg tggattttgc 3540
ttttcatcca gaaggaaaag gggagagag ctcctttaca ttttttaaat taaattcata 3600
aatcccagaa cagtcttttt ttttcccttt tccctttaca ccttatttct gagcttaate 3660
cagttgatgt ttgtccaat ttcaggctga gtgcccaggc tgaagcaatt ctgtagcccc 3720
cagtcctgctc tggccactgt cggggtgagg cacttcttag gcctggaate gttgatgccc 3780
tctgtcccc a gtctttgagc caggccgagg acaggaaggg cattgctggc ctgtagcccc 3840
tgttaccac ccagagccag gggccacacg tgaaggct 3878

```

```

<210> 14
<211> 1645
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3861612CB1

```

```

<400> 14
attgacttaa tattgttcta gaatagcctt tcagctacaa gaggttata ataaatcaaa 60
agcttcttga gtagaacttc ttagaattgt agaagctgct caatacggaa catattctca 120
gtcctctctc ggtctacaaa gcctgtgatt tcttgtctat ggacagaacg tctggtttaa 180
tctacaggaa cccataactt cctgaagctt tatgtctaac agtgacaacg tgagtcagtt 240
gaattttatt gtgtttcagt ccgtagagta tttagctacag aaacctttcc attgccatac 300
tgagaaactg cagcaggcag tgtgctaca ggtctacaaa gaaacttcag atcatcttct 360
tgagggaaag aagctgaagt gctacataag atgcttgtgc ttcataactc tcagaagctg 420
cagattctgt ataaatcctt agaaaagagc atccctgaat ccataaagg atatggcgcc 480
atthtcaaca taaaagataa aaaccttttc aacatggagg tgcctggtaga tgcctggcca 540
gattaccaga tcgtcattac ccggcctcag aaacaggaga tgaaagatga ccaggatcat 600
tataccaaca cttaccacat cttaccaaa gctctgaca aattagagga agtctgtca 660
tactccaatg taatcagctg ggagcaaaact ttgcagatcc aaggttgcca agagggtctg 720
gatgaagcaa taagaaagg tgcacttca aaatcagctc aggtagatta catgaaacc 780
atcctcttta taccggaatt accaaagaaa cacaagacct caagtaatga caagatggag 840
ttatttgaag tggatgatga taacaaggaa ggaaactttt caaacatgtt cttagatgct 900
tcacatgcag gtcttgtgaa tgaacactgg gcctttggga aaaatgagag gagcttga aa 960
tatattgaac gctgcctcca ggattttcta ggatttgggt tgctgggtcc agagggccag 1020
cttctctctt ggattgtgat ggaacagctc tgtgagtga gaatgggtta tactgtcccc 1080
aaatacagac accaaggcaa catgttgcaa attggttacc atcttga aaa gtatctttct 1140
cagaaagaaa tccattttta tttccatgtg gcagataata atgagaaaag cctacaggca 1200
ctgaacaatt tggggtttaa gatttgcctc tgtggctggc atcagtgaa atgcacccc 1260
aagaaatatt gttgattgat tccactgtcc atttcaaatc tttcttaca gtaaaaaaac 1320
attaattcaa acacaagcat tgtgatctac attagcacia aatgcaactg attatctagg 1380

```

```

atctgtgtat tacttaagct cacccttaac agttttacct tcctttctct ctgtattctt 1440
acagaaaatt agaagctcaa ttttatggtc tcataatctc ctttatgaca gacatctcag 1500
aattaaaatc acccaaagcc aatcattagt gccaaagataa cccctttaaag gcaacacttt 1560
cttaaatgaa gactattctt ttcatgaaaa aattcacttt tatgactttc ttgttaaaa 1620
aaaaagtctg cttttaaaaa aaaaaa

```

```

<210> 15
<211> 798
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472055CB1

```

```

<400> 15
atggccctgg agctctacat ggacctgctg tcagcaacct gccgtgccgt ctacatcttc 60
tcgaagaagc atgacatcca gttcaacttt cagtttgtag atctgctgaa aggtcaccac 120
cacagcaaag aatacattga catcaacccc ctcaggaagc tgcccagcct caaagatggg 180
aaatttatct taagtgaag cccccaactc ctttactacc tgtgccgcaa gtacagcgca 240
ccatgcact ggtgcccgcc agaccgcgac gcaogtgccc gtgtggatga gttcgtggct 300
tggcaacaca cggcctttca gctgcccatg aagaagatag tctggctcaa gttgctgatc 360
ccaaagataa caggggagga agtttcagct gagaagatgg agcatgcagt ggaagaggtg 420
aagaacagcc tgcagctctt tgaggagtat tttctgcagg ataagatgtt catcaccggg 480
aaccaaatct cactggctga cctggtggcc gtggtggaga tgatgcagcc catggcagcc 540
aactataatg tcttctcaa cagctccaag ctagctgagt ggcgtatgca ggtggagctg 600
aatattggct ctggcctctt tagggaggcc catgatcgac taatgcagtt gcccgactgg 660
gacttttcaa cattggatct aatggtaag gagaatattt ctgagttgct gaagaagagc 720
aggtgacctt aggcgcagcc tgtcccgcag gccctggctg gcttagcaat ttgagccacc 780
ttccttaaag gaaatggt

```

```

<210> 16
<211> 2478
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1923521CB1

```

```

<400> 16
ccggtcttcg ccggccccgg cccctggcga gatgccgtgt ggggaggatt ggctcagcca 60
cccgtgggga atcgtgcagg gattcttcgc ccaaaatgga gttaatcctg actgggagaa 120
gaaagtaatt gagtatttta aggagaagct gaaggaaaat aatgctcta agtgggtacc 180
atcactgaac gaagtcccc ttcattatct gaaacctaat agttttgtga aatttcgttg 240
catgattcag gatatgtttg accctgagtt ttacatggga gtttatgaaa cggttaacca 300
aaacacaaaa gcacatgttc ttcattttgg aaaatataga gatgtagcag agtgtgggcc 360
tcaacaagaa cttgatttaa actctccacg aaataccact ttggaaagac agactttcta 420
ttgtgttcgg tgccctgggg aatctacgtg ggtaaaagaa gcctatgta atgcaaacca 480
agctcagctc agtccctcaa catcctacac tccctagtcg cacaagagga gttatgaga 540
tgatgacgat atggacctac agcccaataa gcagaaagac caacatgcag gtgccagaca 600
agcagggagt gttggtggtc ttcaatggtg tggagagcca aaacgttag aaactgaagc 660
ttctactggg caacagctga actctctgaa ctgtctctct ccttttgatt tgaattttcc 720
attgccagga gagaagggcc ctgcatgcct tgtgaagggt batgaagatt gggattggtt 780
caaagtaaat gacattcttg agctatatgg catactgtct gtggatctg tgctgagtat 840
actgaataat gatgaaagg atgcctctgc actgctggat ccgatggagt gcacagacac 900
agcagaggag cagagagtac acagtcctcc tgcttcatta gtgccgagaa ttcattgtgat 960
cttagccagc aagttgcaac acatcaaccc attattgcct gcctgcctta acaaagagga 1020
gagcaaaaac ttgttttcaa gtttcatgtc cgaattgtct ccagtcagag cagaacttct 1080
tgggttctct actcatgccc ttctggggga tagtttggct gctgaatacc ttatattaca 1140
tctcatctcc acagtatata caagaagaga tgtccttcca ctaggaaaat ttacagttaa 1200
cttgagtggg tgcccacgga atagtacctt cacagaacac ttgtatcgaa ttatcaaca 1260
tcttgttcca gcatctttc gtctgcagat gactatagag aacatgaacc atttgaaatt 1320
cattccccac aaagactaca cagccaatcg cttggtcagt gggctcctcc agctgccagc 1380
caatacttcc cttgtaatcg atgagactct cctggaacag gggcagctgg ataccccagg 1440
tgttcataat gtgacagccc tgagcaacct cataacgtgg cagaaggtgg attatgactt 1500
cagctaccat cagatggaat tcccctgcaa tattaacggt ttcattactt cggaggggag 1560

```

```

gtcactcctc ccggcagact gccagattca cttacagccc cagctaattc caccaaacat 1620
ggaggagtac atgaacagcc ttctctcagc ggtgctgcct tccgtgctga acaaattccg 1680
catttatcota actcttttga gattctttgga atatagcata tctgatgaaa taaccaaggc 1740
agttgaagat gactttgtgg aaatgcgga gaacgaccct cagagcatca ctgctgatga 1800
tcttcaccag ctgctcgtgg tggctcggtg tctgtctctc agtgctggtc agacaacct 1860
gtcaagagaaa cgatggctga gagcaaaagca gctagagtct ttaagaagaa cgaggcttca 1920
gcagcaaaaa tgtgtgaatg gaaatgaact ttaaagatgt aatacctatg aagagtaatg 1980
ggcaaaactgt agccacataa ttgtaaaatt cagatattca ttataccac attgttttat 2040
aggtaatttc tatcacaaac cagtgcatt tcctgaaate aagcctggta acacctgatg 2100
tttatatgat attcagtaag gacttttacc ttactgattt catggagctt ttgaagtttg 2160
ttttataata attatataaa ttagtaatga tgtaaaaaaa gtatttgata ttaaaagttt 2220
aatattgata atgttgctga ttgtaccatt tccttagctt cagctgagtc ataggccaga 2280
ctgttgaaat gctgaaatga agaaggttgt tgcagtttca aagtcagagg aatcgtgctt 2340
cggatttctt atgttttcta gttctctgtt tttccagttc acagtgggtt ggggtgcatt 2400
cagtagtcca tctttgggga acggaggcgt acttgccatt gattcacatg actacatgaa 2460
attctgtact gtcatttc                                     2478

```

```

<210> 17
<211> 3348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1558210CB1

```

```

<400> 17
cccaaaagaa gcaccagatc agcaaaaaaa gaagatgggc cccccgagcc tcgtgctgtg 60
cttgctgtcc gcaactgtgt tctccctgct ggggtggaagc tcggccttcc tgtcgcacca 120
ccgcctgaaa ggcaggtttc agagggaccg caggaacatc cgccccaa caatcctggg 180
gctgaaggac gaccaggatg tggagctggg ttccatgcag gtgatgaaca agaccggcg 240
cattatggag cagggcgggg cycaacttcat caacgccttc gtgaccacac ccatgtgctg 300
cccccaagc tcctccatcc tcaactggca gtaactccac aaccacaaca cctacacca 360
caatgagAAC tgcctctgca cctcctggca ggcacagcac gagagcgcga cctttgccc 420
gtacctcaat agcactggct accggacagc tttcttcggg aagtatctta atgaatacaa 480
cggctcctac gtgccaccgc gctggaagga gtgggtcgga ctccctaaaa actcccgett 540
ttataactac acgctgtgtc ggaacggggt gaaagagaag cacggctccg actactccaa 600
ggattacctc acagacctca tcaccaatga cagcgtgagc tctctccgca cgtccaagaa 660
gatgtaccgc cacaggccag tctcatggt catcagccat gcagccccc acggccctga 720
ggattcagcc ccacaatatt cagcctctt cccaaacgca tctcagcaca tcacgccag 780
ctacaactac gcgcccacc cggacaaa ca ctggatcatg cgctacacgg ggcccatgaa 840
gccccaccac atggaaatca ccaacatgct ccagcggaa gctctgcaga cctcatgtc 900
ggttgagcag tccatggaga cgtatttaca catgctggtt gagacggcg agctggaca 960
cacgtacatc gtatacccg ccgaccaggg ttaccacatc ggccagttt gctggtgtaa 1020
agggaaatcc atgccatag agtttgacat cagggctccc ttctactgta ggggcccaca 1080
cgtggaagcc ggctgtctga atccccac cgtcctcaac attgacctgg ccccccat 1140
cctggacatt gcaggcctgg acatacctgc ggatattggac gggaaatcca tctcaagct 1200
gctggacacg gagcggccgg tgaatcgggt tcaactgaaa aagaagatga ggtctggcg 1260
ggactccttc ttggtggaga gaggaagct gctacacaag agagacaatg acaaggtgga 1320
cgccaggag gagaacttcc tgcccagta ccagcgtgtg aaggacctgt gtcagcgtc 1380
tgagtaccag acggcgtgtg agcagctggg acagaagtgg cagtgtgtgg aggacgccac 1440
ggggaagctg aagctgcata agtgcaaggg cccatgctgg ctgggctggca gcagagcct 1500
ctccaacctc gtgcccaggt actacgggca gggcagcag gctgcaact gtgacagcg 1560
ggactacaag ctcagcctgg ccggacgccc gaaaaaactc ttcaagaaga agtacaaggc 1620
cagctatgtc cgcagctgct ccatccgctc agtggccatc gaggtggacg gcagggtgta 1680
ccacgtaggc ctgggtgatg ccgccagcc ccgaaacctc accaagcggc actggccagg 1740
ggcccctgag gaccaagatg acaaggatgg tggggacttc agtggcactg gaggccttcc 1800
cgactactca gccgccacc ccattaaagt gacacatcgg tgctacatcc tagagaacga 1860
cacagtccag tgtgacctgg acctgtacaa gtcccctgcag gctggaag accacaagct 1920
gcacatcgac cagagatg aaacctgca gaacaaaatt aagaacctga ggaagtcctg 1980
aggtcacctg aagaaaaagc gccagaaga atgtgactgt cacaaaatca gctaccacac 2040
ccagcaca aa ggccgctca agcacagagg ctccagctct catccttcca ggaagggcct 2100
gcaagagaag gacaaggtgt gctgtttgcg ggagcagaag cgcaagaaga aactccgcaa 2160
gctgtcCaag cgcctgcaga acaacgacac gtgcagcatg ccaggcctca cgtgcttcc 2220
ccacgacaac cagcactggc agacggcgcc tttctggaca ctggggcctt tctgtgctc 2280
caccagcgcc aacaataaca cgtactggtg catgaggacc atcaatgaga ctcaaat 2340
cctctctgtg gaatttgcaa ctggcttcc agagtacttt gatctcaaca cagaccctca 2400

```

ccagctgatg	aatgcagtg	acacactgga	cagggatgtc	ctcaaccagc	tacacgtaca	2460
gctcatggag	ctgaggagct	gcaaggggta	caagcagtgt	aacccccgga	ctcgaaacat	2520
ggacctggga	cttaaagatg	gaggaageta	tgagcaatac	aggcagtttc	agcgtcgaaa	2580
gtggccagaa	atgaagagac	cttcttccaa	atcactggga	caactgtggg	aaggctggga	2640
aggttaagaa	acaacagagg	tggaacctca	aaaacataga	ggcatcacct	gactgcacag	2700
gcaatgaaaa	accatgtggg	tgatttccag	cagacctgtg	ctattggcca	ggaggcctga	2760
gaaagcaagc	acgcactctc	agtcaacatg	acagattctg	gaggataacc	agcaggagca	2820
gagataactt	caggaagtcc	atttttgccc	ctgcttttgc	tttggattat	acctcaccag	2880
ctgcacaaaa	tgcatTTTT	cgatcaaaaa	agtcaccact	aacctcccc	cagaagctca	2940
caaaggaaaa	cgagagagc	gagcgagaga	gatttccctg	gaaatttctc	ccaagggcga	3000
aagtcaattg	aatTTTTaa	tcabagggga	aaagcagtc	tgttctaaat	ccctttatc	3060
ttttggtttg	tcacaaagaa	ggaactaaga	agcaggacag	aggcaacgtg	gagaggctga	3120
aaacagtgca	gagacgtttg	acaatgagtc	agtagcacia	aagagatgac	atttacctag	3180
cactataaac	cctggttgcc	tctgaagaaa	ctgccttcat	tgtataatg	tgactattta	3240
catgtaatca	acatgggaac	ttttagggga	acctaatag	aaatcccaat	tttcaggagt	3300
ggtggtgtca	ataaacgctc	tgtggccagt	gtaaaagaaa	aaaaaaaa		3348

<210> 18
 <211> 3844
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5629033CB1

<400> 18						
gacctcagc	tgccgcggtc	gctccgagcg	gcgggccgca	gagccaccaa	aatgccagaa	60
gagatggaca	agccactgat	cagcctccac	ctggtggaca	gcgatagtag	ccttgccaag	120
gtcccagatg	aggcccccaa	agtgggcata	ctgggtagcg	gggactttgc	ccgctccctg	180
gccacaagcc	tggtgggctc	tggttcaaaa	gtggtgggtg	ggagccgcaa	ccccaaagc	240
acagccagggc	tgtttccctc	agcggcccaa	gtgactttcc	aagaggaggc	agttagctcc	300
ccggagggtca	tctttgtggc	tgtgttccgg	gagcactact	cttcaactgtg	cagtctcagt	360
gaccagctgg	cgggcaagat	cctgggtgat	gtgagcaacc	ctacagagca	agagcacctt	420
cagcatcgtg	agtccaatgc	tgagtacctg	gcctccctct	tccccacttg	cacagtggtc	480
aaggccttca	atgtcatctc	tgctggacc	ctgcaggctg	gcccagggga	tggtaacagg	540
caggtgcccc	tctgcggtga	ccagccagaa	gccaaagctg	ctgtctcgga	gatggcgctc	600
gccatgggct	tcattgccctg	ggacatggga	tccttggcgt	cagcctggga	ggtggaggcc	660
atgcccctgc	gcctccctcc	ggcctggaag	gtgcccaccc	tgctggccct	gggctcttc	720
gtctgcttct	atgcctacaa	cttcttccgg	gacgttctgc	agccctatgt	gcaggaagc	780
cagaacaagt	tcttcaagct	gcccgtgtcc	gtggtcaaca	ccacactgcc	gtgctgtggc	840
tacgtgtctg	tgtaactcgt	gtacttgccc	ggcgtgctgg	cggtctgcct	gcagctgccc	900
cgcgccaccca	agtaacagcg	cttccccgac	tggtctggacc	actggctaca	gcaccgcaag	960
cagatcgggc	tgctcagctt	cttctgcgcc	gccttgcacg	ccctctacag	cttctgcttg	1020
ccgctgctcc	gcgcccaccg	ctacgacctg	gtcaacctgg	cagtcaagca	ggtcttggcc	1080
aacaagagcc	acctctgggt	ggaggaggag	gtctggggga	tgagatcta	cctctccctg	1140
ggagtgtctg	ccctcgccac	gttgctccctg	ctggccgtga	cctcaactgcc	gtccatttga	1200
aactgctcca	actggaggga	gttcagcttc	gttcagctcc	cactgggctt	tggtggccctc	1260
gtgctgagca	cactgcacac	gtcacaactac	ggctggacc	gcgccttcga	ggagagccgc	1320
tacaagtctc	acctgcctcc	caccttcaag	ctcacgctgc	tggtgcctcg	cgctgctatc	1380
ctggccaaaag	ccctgtttct	cctgcccctgc	atcagccgca	gactcggcag	gatccggaga	1440
ggctgggaga	gggagagcac	catcaagttc	acgctgcccc	cagaccacgc	cctggccgag	1500
aagacgagcc	acgtatgagg	tgctgcccct	gggtctctgga	ccccgggcac	acgagggacg	1560
gtgcccctgag	cccggttaggt	ttctttttct	tggtgggtgca	aagtgggtata	actgtgtgca	1620
aataggaggt	ttgaggtoca	aattcctggg	actcaaatgt	atgcagtaact	attcagaatg	1680
atatacacac	atagtgtat	atgtatttac	atataattcca	catataaac	aggatttga	1740
attatacata	gctagctaaa	aagtgggtc	tctgagattt	caactttag	atttaaaaac	1800
aagtgcgcta	cgtaagaga	agagcagatc	atgctattgt	gacatttga	gagatataca	1860
cacacttttt	gtacagaaga	ggcttgtgct	gtggtgggtt	cgatttatcc	ctgcccacc	1920
catccccaca	acttcccctt	tgtaacttcc	ccaaggctct	tgagagcta	gggtctgaa	1980
ggggagggaa	ggcaacggct	ctgcccagag	ccatccctgg	agcatgtgag	cagcggctgg	2040
tctcttccct	ccacctgggg	cagcagcagg	aggctgggg	aggaggaaaa	tcaggcagtc	2100
ggcctggagt	ctgtgcctgg	tcctttgccc	gggtgtggga	ggatggagg	attgggctga	2160
agctgctcca	cctcatcctt	gctgagtggt	ggagacatct	tcctgaaag	tcagaagtca	2220
ccatagagcc	tgcaaatgga	tcctcctgtg	agagtgaagt	cacctccttt	ccagagccat	2280
tagtgagcct	ggcttgggaa	caagtgtaat	ttccttccct	cctttaacct	ggcagatgagc	2340
gtcctttaa	ccactgtgct	ttctcaccct	ttccatcttc	agtttgaacg	actcccagga	2400

```

aggcctagag cagacccttt agaaatcagc ccaaggggga gagcaagaga aaacactcta 2460
gggagtaaag ctccccgggc gtcagagttg agccctgcct gggctgaagg actgtcttca 2520
cgaagtcagt cctgagggaaa aatattgggg actccaaatg tcctctggca gaggaccag 2580
aaaaccacac tggctccaac ttctctctca tggggcatta cacttcaaaa cagtggggag 2640
caacttttcc accaaagcta caaacctaaa atgctgctgc cccaaagcac aagagggag 2700
agcaccgcgc gggccacagc acgtotgtcc tccagtcaca gccatcctt gctgtccct 2760
actgaactca gcttacttcc cctgtgaaga aacaggtgtt ctggctgag ccccaacc 2820
tctgcagaac caggttgatc tgccacagaa aaagcatctt tgaagacaaa gagggtgagg 2880
tcttcatgag tctcctgggc ccaaagccat ctctctgagg aaggaagaga gtagggccag 2940
tgaaggtgc ccagagagaa tgtcacagat gaggctgccc ctgccccccc tccgccagg 3000
aggtttcatg agtcatgtc tatgcagcac ataagggttc ttcagtgaag agcagagaa 3060
gagcccactg caaggatagc tcattaggca catgaccgat gcagggaagg ccatgccgg 3120
gaagctcttc ctgcaggtat tttccatctg ctgtgccaag gctgagcggc agaaacttg 3180
ctcataaatt gccactgatg gagcatcagc tgtggcccac agagagcctt gctgagaagg 3240
gggcaggtaa agcagagatt tttagcattgc ctggcataa caagggccca tcatctcc 3300
actaatgaga ggcagggaga gcatgggcaa tggagacca ccaatgatcc ccaaccocg 3360
tgggtactgg ctgctgccc tgggcccagg aatggctcct tataccaaa atgtggcac 3420
atagcagaac ccagtgcacg tctctccctt cccaccacc tctggctgaa ggtgctcaag 3480
aggaaagcaa ttataaggtg ggtggcagga gggaaacagg gccacctgct ggacaatca 3540
acgaaaggca ggcgggctgt gtaactgggc ctgactgtgc gtccactgct gcttcccta 3600
ctcaccagg ctactggcag cagcatcccg agagcacatc atctccacag cctggtaaat 3660
tccatgtgcc tctgggtaca aaagtgcctc aacgacatgc tctggaaatc ccaaatgcca 3720
cagtctgagg ttgatatcta aaatctatgc ctcaaaaaga gtctctgttt ttttttttta 3780
acctggtaga cggataaaaa gcagtgcaaa taaacacctt acctctgca aaaaaaaaaa 3840
aaaa

```

```

<210> 19
<211> 2278
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2750679CB1

```

```

<400> 19
ccaagggccc gcagcctcag tccactgctg ggctggaac acggagcagt ggctgcctg 60
cgaggaggtc ctagagcagc tccagcagga tgacagctcc ccactctgtc tccctgectg 120
cggccatctc caggccactc gccatggggc gctgcttctc caaacccaaa ccagtggagc 180
tcaagatcga gttggtgctg cctgagaagg agcagagcaa ggaggagctg tcggccagtg 240
ggaagggcag ccccccggcc taccagggca atggcacggc ccgccacttc cacacggagg 300
agcgcctgtc caccctcacc ccctacccca gccctcagga ttgctgtagg gctgctgtct 360
gccacgtcaa ggcctctcag aatggccaga tggcggaaag tggagctggc tgggggaagg 420
tgttgctggt gaaggacaat ggggagttec acgccctggg ccataagtg tccgactacg 480
gcgacccctt ggtgaaaggc gttctgtccc gtggctgggt gcgctgcccc tggcagggcg 540
cctgcttcaa catcagcact ggggacctgg aggaactccc tggcctggac agtctacaca 600
agtccagggt gaagattgag aaggagaagg tgtactgccc ggcagcaag caggccctac 660
agctgcagcg aaggaccaag gtgatggcca agtgatctc tccaagtgtc gggtaacagc 720
gtagcaccaa tgtgtcatt gttgggtcag gtgcagctgg cctgggtgtg gcagagacac 780
tgccggcagga gggcttctcc gaccggatcg tccctgtgac gctagaccgg caccttccct 840
acgaccgtcc caagctcagc aagtcctcgg acacacagcc tgagcagctg gccctgaggg 900
ccaaggagtt ttcccgagcc tatggcatcg aggtgctcac cgaggctcag gtggtcacag 960
tggacgtgag aactaagaag gtcgtgttca aggatggctt caagctggag tacagcaagc 1020
tgctgctggc accaggggag cagccccaag actctgagct gcaaaggcaa agaagtggag 1080
aacgtgttca ctatccggac gccagaggat gccaatcggc tggtagggct ggcccaggc 1140
cgcaacgtgg tctgtgtggg agccggettc ctggggatgg aggtggccgc ttacctgacg 1200
gagaaggccc actctgtgtc tgtggtggag ctggaggaga cgccttcag gaggttctg 1260
ggggagcgcg tgggtcgtgc cctcatgaag atgtttgaga acaaccgggt gaagttctac 1320
atgcagacgg aggtgtctga gctcggggc caggagggaa agctgaagga ggttgtgctg 1380
aagagcagca aggtcgtgcg ggtgacgtc tgctgtgtgg gcatgtgtgc agtgcgccgc 1440
acaggcttcc tgaggcaaag cggcatcgtt ttggattccc gaggttcat cctgtcaacc 1500
aagatgatgc agaccaatgt cccagggctg ttgacagctg gcgatgctg cacctccc 1560
cttgccctgga ggaacaaccg caaagtgaac atccacatt ggcagatggc tcatgctcag 1620
gggcgcgtgg cagcccagaa catgttggcg caggaggcgg agatgagcac tgtgcctac 1680
ctctggaccg ccatgtttgg caagagcctg cgctacgcgg gctacggaga aggtctcag 1740
gacgtcatca tccaggggga tctggaggag ctgaagttg tggcttttta cactaaaggc 1800
gacgaggtga tcccgctggc cagcatgaac tacgatccca ttgtgtccaa ggtcgtgag 1860

```

```

gtgctggcct caggccgtgc catccggaag cgggaggtgg agactggcga catgtcctgg 1920
cttacgggga aaggatcctg agctcacatg cagtagactt gggcaggcaa agggggcacc 1980
aagggcacag gccaaagcctt gggggcaggt gccaatctcc agtcccagga tccccagggy 2040
cagaacctga gccctcccag tgcttgcttt cagccacctg gctcccctcc tgggagcct 2100
ctgctggatc cagaagatgc tcaaccctca aggcctctgc tgccactgac agctggcact 2160
ggaggcagga caagccctgc ctctctctcc totattggga ctggctcccct gaagaaccct 2220
gcaacatggt agacattacc gtaaaattaa aacgcacaaa ttgacagaaa aaaaaaaa 2278

```

```

<210> 20
<211> 1288
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1570911CB1

```

```

<400> 20
tgaatatatt cgcgcgctct ttgcagctgc ctgaattctt ccttccccag catccccctc 60
cgcccggta cccagacggc cttctccagc cttgccgagc ttaagaccg tccctgctcc 120
tgaccatcac cgtcactggg gtcactgtgc tcgtgttggg cctgaagagc atgaactcca 180
ggaggagaga gccaatcacc ttacaggacc ctgaagccaa gtaccocgtg ccccttgattg 240
agaaagagaa aatcagccac aacaccggga ggttccgctt tggactgctt tcgcccggacc 300
atgtcttagg gcttctgtga ggtaactatg tccagctctt ggcaaaaatc gataatgaa 360
tgggtgtcag gcttacacc cctgtctcca gtgatgatga cagaggcttt gtggacctaa 420
ttataaagat ctacttcaaa aatgtacacc cccaatatcc tgaagggtgg aagatgactc 480
agtatttggg gaacatgaaa atcggggaga ccatcttttt tcgagggcca aggggacgt 540
tgttttacca tgggccaggy aatcttggaa tcagaccaga ccagacgagt gagcctaaaa 600
aaacactggc cgtcacctg ggaatgattg ctgggggac aggcatacaca ccatgtttgc 660
agctcattcg ccacatcacc aaggacccca gtgacaggac caggatgtcc ctcatctttg 720
ccaaccagac agaggaggat atcttggta gaaaagact tgaagaaatt gccaggactc 780
accagacca gttcgacctg tggtaacacc tggacaggcc tcccattggc tggaggtaca 840
gctcaggctt cgttactgcc gacatgatca aggagcact tctcctcca gcgaagtcca 900
cgtcctcct ggtgtgtggc ccgccaccac tgatccagac ggcggctcac cctaacctgg 960
agaagctggg ttataccag gacatgattt tcacctacta acaaacacct ccatgtgtct 1020
agcaaatgtt catgtccctt ttcatctgtt tcagagtaag ttcaatttca ccagggtcaa 1080
ctgggatggt ttcaaaagtg ccttgccatg taccttcgg cacacactgg ttctcctctt 1140
ttgggtgtgg gctaacaaa aagggtcaa ggggtggag actggctgct ggggcctcct 1200
tgcttgagg ctggcaagag ctccatttca gtatctttct ccgtggtttt gtgaaataaa 1260
ctcaagtaca aagcagaaaa aaaaaaaaa

```

```

<210> 21
<211> 4660
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1959720CB1

```

```

<400> 21
cgccgctcgg gtcccctccc gtcgggcect cccctcccc gccggggcgg gcacagccaa 60
tccccgagc gycgcgcaac atgtcttttg agggcttggg tctgggtgct gcgctggcca 120
ccctcgccgc gtgcctgggt tccgtgacgc tgctgtgggc cgtgtcgcag cagctgtggc 180
agctgocgtg ggcggccact cgcgacaaga gctgcaagct gcccatccc aagggatcca 240
tgggcttccc gctcatcgga gagaccggcc actggctgct gcaggtttct ggttccagt 300
cgtcgcggag ggagaagtat ggcaacgtgt tcaagacgca tttgttgggy cggccgctga 360
tacgctgac cggcgcggag aacgtgcgca agatcctcat gggcgagcac cacctcgtga 420
gcaccagatg gctcgcagc acccgcatgt tgctgggccc caacacggtg tccaattcca 480
ttggcgacat ccaccgcaac aagcgcaagg tcttctcca gatcttcag cacgaggccc 540
tggagagtta cctgcccagg atccagctgg tgatccagga cacactgccc gcctggagca 600
gccaccocga gccatcaac gtgtaccagg aggcgcagaa gctgaccttc cgcctggcca 660
tccgggtgct gctgggcttc agcatccctg aggaggacct tgggcacctc tttgaggtct 720
accagcagtt tgtggacaat gtcttctccc tgctgtcga cctgcccctc agtggctacc 780
ggcggggcat tcaggctcgg cagatcctgc agaaggggct ggagaaggcc atccgggaga 840
agctgcagtg cacacagggc aaggactact tggacgtcct ggaectctc attgagagca 900
gcaaggagca cgggaaggag atgaccatgc aggagctgaa ggacgggacc ctggagctga 960

```

tctttggggc	ctatgccacc	acggcdagcg	ecagcacctc	actcatcatg	cagdtgctga	1020
agcaccacc	tgtgctggag	aagctgcggg	atgagctgcg	ggetcatggc	atcctgcaca	1080
gtggcggctg	cccctgcgag	ggcacactgc	gcctggacac	gctcagtggg	ctgcgctacc	1140
tggactgcgt	catcaaggag	gtcatgcgcc	tgttcacgcc	catttcgggc	ggctaccgca	1200
ctgtgctgca	gaccttcgag	cttgatgggt	tccagatccc	caaaggctgg	agtgtcatgt	1260
atagcatccc	ggacacccat	gacacagcgc	ccgtgttcaa	agacgtgaac	gtgttcgacc	1320
ccgatcgctt	cagccaggcg	cggagcgagg	acaaggatgg	ccgcttccat	tacctcccg	1380
tcggtggcgg	tgtccggacc	tgccctggca	agcacctggc	caagctgttc	ctgaagggtg	1440
tggcgggtga	gctggctagc	accagccgct	ttgagctggc	cacacggacc	ttcccccgca	1500
tcaccttggt	ccccctcctg	caccccgtgg	atggcctcag	cgtaagttc	tttggcctgg	1560
actccaacca	gaacgagatc	ctgcccggag	cggaggccat	gctgagcgcc	acagtctaac	1620
ccaagaccca	cccgcctcag	cccagcccag	gcagcggggg	gggtgctgtg	ggaggtagaa	1680
acctgtgtgt	gggagggggc	cggaacgggg	aggcggagtg	gccccatac	ttggcctccc	1740
ttgcctcccc	ttcctggcaa	accctacca	aagccagtgg	gccccattcc	tagggctggg	1800
ctcccctctc	ggctccagct	tcctcccagc	cactcccctc	ttaccatcag	ctcagcccct	1860
gggaagggcg	tggcaggggc	tctgcatgcc	cgtgacagtg	ttaggtgtca	gcgcgtgcta	1920
cagtgttttt	gtgatgttct	gaactgctcc	cttcctccg	ttcctttcgg	acccttttag	1980
ctgggggttg	gggacgggaa	gagccgtgcc	cccttggggc	cactcttcag	cgctctccc	2040
tcctgcgccc	ccactgcgtc	tgcccaggaa	cagcatcctg	ggtagcagaa	caggagtcaa	2100
ccttggcggg	gcgggggctg	cgtccaacct	ggagattgcc	cttcccctatg	ccacggttcc	2160
cacctcccct	caccagtttg	gacaatttga	aattacat	tgctgtctact	tgttctgtcc	2220
tctgaccttg	gggcaaagga	gccccaggcc	ctgtctcccc	agcatcctcc	ctgggtggccc	2280
tgggcaggtg	cactgcacac	cccaccttcc	catcccctgc	tgaaccaggc	cctgttacac	2340
acagcccgct	aaggcccgcg	gctcatgtgc	tgcccggccc	catatttatt	cactgataag	2400
gaatcctggg	gatgctgggg	tctggagtga	acatctctct	cccttcctgc	cctagcctgt	2460
gttctagctg	tcctgycgag	acttctgtga	gtgaagagga	aggggtctct	ggtcaaaccc	2520
agcccccag	gcctagggtt	gaaagccttc	cccggctccg	ggcattattt	gggtttaact	2580
tcggagcctc	actcctggac	tgaagtcggg	tgctctgcc	ttatccctgg	tggagatgga	2640
atgtggccca	ttgcctcctc	ctctcctcgt	caaaaacct	gatcaggtag	atttggaggc	2700
ggccacgatt	tcctgtttgg	cccctgttca	cccagtgca	ctggccctga	ctccaggcgt	2760
gagtatgggg	aaggatcagg	gttcttctga	cggggagcaa	gggectccgt	cttcccctcc	2820
ttactctctc	ccccttggccc	tcgcacctga	aaaagggtgc	cttgaagtc	cttcccactc	2880
tatgccactg	tctgcttagc	ccagctcagg	ggtggggaag	agggcaaac	gtgggggagg	2940
tgagcgcagc	ggcagttctg	cctcggagct	gatttcaggg	ccctgtgtgg	tttccggaca	3000
gctgcgggaa	ggctgcgcga	gctgaagctg	aagagggcgc	tacgtgcggg	ttgtcagggg	3060
gattggggtg	aaaactggcc	agtccggatg	actgggtgaa	agaggagttag	ctcctgccac	3120
tggcgttttt	agtgttggca	atttgggatg	cctcctgggg	aagggttccg	ggcgtttggg	3180
gagtctctag	atttttcctt	gctttctgtg	tttattgggt	tttgatgttg	taaaagcaat	3240
gaatcccctt	tacaagaaaa	tcgaaaaac	agaagaatga	aggacatgcc	agtcctccgt	3300
cgctgtgtgt	agcacctcag	tggctcccct	agaccagatc	ccgtaggcag	ccccacagac	3360
cgaccctgac	cccactcaca	gccaccctga	agatagacta	taggaaacggg	cccataccac	3420
acagactgac	ctccaatccc	tgagtctcag	atgtttcatt	tatttccctac	ttttccacta	3480
ctaaaaaaca	gtgtggaata	gacattatgt	gcaaaaatgc	tcacccctaa	tctgaaaaaa	3540
caggccagaa	tgggtaaaaga	cttgtcaaag	cttgcacat	agctacatgg	tgaccctggg	3600
cctgtacccc	ctccccccaa	cacaaaacca	gtgtctggga	ggttcatttt	cttttaact	3660
gatccagctg	gcctgaacc	aattgttttt	gactgagtat	ctaggagagc	agtaagtgga	3720
acttcagaca	agcccactgg	gtctgggtcca	ggtgaggggc	agggggcatg	gggctgggag	3780
gtctcagggg	ccttccctgg	gggtggccag	cctggtaggg	ggcagagaag	gaaaagctga	3840
ggggggctcc	tgtgagggag	gaaagaagga	tcatttgcct	cgctgggtct	caaaggcagt	3900
gagaagagag	ctgaagaaag	ctctggctgg	ctgacaggat	ccctgtgttg	taattggtcc	3960
ctcctttcag	ctctctagtg	agatgccctg	gtctgtgcgt	gtgcgtgtgt	gtttcataca	4020
gctagcatta	gatgggtgat	gtttcttact	tatcatccct	aactattgca	acttgacctt	4080
aaaaagacaa	aaccccacaa	aactcttctc	gccacgggct	tcagatttga	agcactttcg	4140
atgttggggc	ctggcgtttg	tgttctgggc	accacogtga	ccctgccccag	atggctataa	4200
tattatttta	tacacaaacc	ttttttttcc	ataaaatgta	taattttgtg	tctgtcttta	4260
taaaactatta	taagtaactat	ttttgttata	attcaaaata	gatatttagt	ataaagtttt	4320
tgtgttataa	tatttgttat	ttagtaaaact	atgaattttg	ctctattgta	aacatggttc	4380
aaaatattaa	tatgttttta	tcacagtcgt	tttaatatgg	aaaaagcact	tgtgtgtttt	4440
gttttgatag	gaaactggta	ccgtgtgagt	gtttttgctg	tcgtggtttt	aatctgtata	4500
taatatccca	tgttgcatat	taaaaaacatg	aatgttgtgc	attttgtgat	tttggaataa	4560
ctcaatgtgg	ctcttctata	gcttcttaga	ataaacctgt	gggaccgcga	aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			4660

<210> 22
 <211> 1669
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 6825202CB1

<400> 22
ctagcagaagg gggagaggag ggatgcccga gctgagcctg tccctggctgg gcctcggggcc 60
cgtggcagca tcccctgggc tgcttctgct gctgggtggg ggctcctggc tcctggcccgc 120
cgtcctggcc tggacctaca ccttctatga caactgcctg cgctccagt gtttctctca 180
acccccgaaa cagaactggt tttggggaca ccagggcctg gtactccca cggagagggg 240
catgaagaca ttgacctcagc tgggtgaccac atatccccag ggctttaagt tgtggctggg 300
tctaccttc cccctcctca ttttatgcca ccctgacatt atccggecta tcaccagttg 360
ctcagctgct gtcgcaccca aggatgatgat tttctatggc ttctgaagc cctggctggg 420
ggatgggctc ctgctgagtg gtgggtgacaa gtggagcctg cacctgcgga tggtagcgc 480
tgcttccat ttcaacatct tgaagcctta tatgaagatt ttcaacaaga gtgtgaacat 540
catgcacgac aagtggcagc gcctggcctc agagggcagc gccagactgg acatgtttga 600
acacatcagc ctcatgacct tggacagctc gcagaaatgt gtcttcagct ttgaaagcaa 660
ttgtcaggag aagcccagtg aatataattgc cgccatcttg gagctcagtg cctttgtaga 720
aaagagaaac cagcagatc tcttgccacac ggacttctctg tattatctca ctctgatgg 780
gcagccttc cgaggggcct gccacctggg gcacgacttc acagatgccg tcatccagga 840
goggcgccgc accctccca ctcagggtat tgatgatttc ctcaagaaca aggcaagtc 900
caagacttta gaectcattg atgtgctct gctgagcaag gatgaagatg ggaaggaatt 960
gtctgatgag gacataagag cagaagctga caccttcctg tttgagggcc atgacactac 1020
agccagtggt ctctcctggg tccatatac ccttgcaaa caccagaat accaggaaca 1080
gtgccggcaa gaagtgcag agcttctgaa ggaccgtgaa cctatagaga ttgaaatggga 1140
cgacctggcc cagctgccct tcttgaccat gtgcattaa gagagcctgc ggttgcatcc 1200
cccagtcocg gtcactctcc gatgttgac gcaggacttt gtgctcccag acggcccgct 1260
cctcccaaaa ggcaattgtct gctcctcaaa tattatcggg atccattaca acccaactgt 1320
gtggccagac cctgaggtct acgaccctt ccgtttcgac caagagaaca tcaaggagag 1380
gtcacctctg gcttttatct ccttctcggc agggcccaga aactgcctgc ggcagggctt 1440
cgccatggct gagatgaagg tggctcctggc gctcacctg ctgcaacttc gcatctgcc 1500
gaccacact gaaccocga ggaaccocga gctgataatg cgcgcagagg gtggactttg 1560
gctgcccgtg gagcccctgg gtgcgaactc acagtgactg tctaccacac ccaccacct 1620
ctgtagagtc ccagaaacaa aactatgctg acaaaaaata taaaaaaaa 1669

<210> 23
<211> 1882
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7256116CB1

<400> 23
gcgcgggtgg atccggatcg agggcaggag gctgagacc gggggagctg gccctaaagc 60
aaggacctga gtgcaagtaa ttttttggg aagtaataac agaaaatacc agcaaggaag 120
aagacagtga acccaaaaaga attgaaaaca ggatgctgcc catcacagac cgcctgctgc 180
acctcctggg gctggagaag acggcgttcc gcatatacgc ggtgtccacc cttctcctct 240
tctgctctct ctctctgttc cgctgctgc tgcggttcct gaggetctgc aggagcttct 300
acatcacctg ccgcccgtg cgctgcttcc ccagcctcc ccggcgcaac tggctgctgg 360
gccacctggg catgtacct ccaaatgagg cgggccttca agatgagaag aaggtactgg 420
acaacatgca ccatgtactc ttggatgga tgggacctgt cctgcccctg ttggttctgg 480
tgcacctga ttacatcaaa ccccttttgg gaccctcagc tgccatcgcc cccaaggatg 540
acctctteta tggcttccca aaaccttggc taggggatgg gctgctgctc agcaaagggt 600
acaagtggag ccggcaccgt cgctgctga caccgcctt ccactttgac atctgaagc 660
cttacatgaa gatctcaac cagagcgtg acattatgca tgctaaatgg cggcatctgg 720
cagagggctc agcgtctcc cttgatatgt ttgagcatat cagcctcatg accctggaca 780
gtcttcagaa atgtgtcttc agctacaaca gcaactgcca agagaagatg agtgattata 840
tctccgatc cattgaactg agcgtctgt ctgtccggcg ccagtatcgc ttgcaccact 900
acctcgactt catttactac cgctcggcgg atggcgggag gttccggcag gcctgtgaca 960
tgggtgacca cttcaccact gaagtcatcc aggaacggcg gccggcactg cgtcagcagg 1020
gggcccaggc ctggcttaag gccaaagcagg ggaagacctt ggaactttatt gatgtgctgc 1080
tcctggcccag ggatgaagat ggaaaggaac tgtcagacga ggatatccga gccgaagcag 1140
acaccttcat gtttgagggt caccgacaaa ccatccagtg ggatcttctt ggatgctgtt 1200
caatttggca aagtatccgg aataccagga gaaatgcga gaagagatc aggaagtcat 1260
gaaagggcgg gagctggagg agctggagtg ggaacgatctg actcagctgc cctttacaac 1320
tatgtgcatt aaggagagcc tgcgccagta cccacctgtc aactcttctc tctcgcacat 1380

```

gcacggagga catcaagctc ccagatgggc gcatcatccc caaaggaatc atctgqtttg 1440
tcagcatcta tggaaaccac cacaacccca cagtgtggcc tgactccaag gtgtacaacc 1500
cctaccgctt tgacceggac aaccacacagc agcgtctccc actggcctat gtgcccttct 1560
ctgcaggacc caggaattgc atcggacaga gcttcgccat ggccgagtgt cgggtggttg 1620
tggcactaac actgctacgt ttccgcctga gcgtggaccg aacgcgcaag gtgcggcggg 1680
agccggagct catactgccc acggagaaag ggctctggct caagggtggag ccgctgcctc 1740
cgccggcctg agcgtggggc cgcctctggc gctcccaggg gtccaggccc cgcctccaaa 1800
ggaccaggac tcgccccaaa gatcccagg gcataggcac cccctcgaa gttcaggtta 1860
gctcctggat gacaggcacc gc 1882

```

<210> 24

<211> 880

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 4210675CB1

<400> 24

```

atgtggttct gtctcccagc tagaccctga aacaatggaa aggagaactg cctcaacttc 60
aggtggaacc ctgatgtatg gacaagtgcc catggtcgaa actcatggaa tgaattaggt 120
agaaaccaga gccttccctaa gatacatagc tgcaaaatat gacttgatgt gaaggaacat 180
gaaggaacaa gctgatgca tcttccctaa tatttcaaag gaacagcatg cctctgaaaa 240
cacttgctt cagtctctgg aacaatgttc catgaaaaca cctgataact aagcaggatt 300
cacatgtatg tagaaggctt gaaggacctg agtgacatga ttatgttcca gccactctct 360
ctgcctgaag agaagatgaa tcttgcatac atccttgaaa gagccactac aagattattc 420
cctgtctgtg agaaggcact gagagaccac agacaagatt ttcttgtggg caatcggctg 480
agctgggctg atacacagca acctgaagtc atcttaatga ctgaagagtg caaaccctgt 540
gtcctcttgg gcttctctct gctacagaaa ttcaaggcca gaatcatcca catccccaca 600
attaataaat gtctccaacc tggaaagccaa aggaagcctc cactggatga agaattcatt 660
gagactgtga agaatatatt taaatttgaa catggcctgt ttcttaaaaa catgatcact 720
acattagctg agtattaaca aatgaaacaa agtctaagaa acgtagtata tatttacta 780
ttcattgtta tcataccgga ggagaatatc ataatccac attaatgtaa taaagtaata 840
aggcatttgg tgtgtttttt ttacatgtaa tcgctggcca 880

```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

						International Application No PCT/US 01/04423
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C12N15/52	C12N9/00	C12N15/63	C12N5/10	A01K67/027	
	C12P21/00	C07K16/40	C12Q1/68	A61K38/43	C12Q1/00	
	G01N33/573					
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 C12N						
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)						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	MYERS ET AL.: "Homo sapiens clone P1 C12461" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 December 1997 (1997-12-04), XP002172010 HEIDELBERG DE Ac AC003656 the whole document ---					12
A						5,11
X	CARIM ET AL.: "Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 180147" EMBL SEQUENCE DATABASE, 9 August 1999 (1999-08-09), XP002172011 HEIDELBERG DE Ac AL109795 the whole document ---					12
-/-						
<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.						
^a Special categories of cited documents:						
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			"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			
"E" earlier document but published on or after the international filing date			"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			
"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)			"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.			
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"&" document member of the same patent family			
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
13 July 2001				12. 10. 01		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer CEDER O.		

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 01/04423

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OTTENWAEELDER ET AL.: "Homo sapiens mRNA; EST DKFZp761N142 s1" EMBL SEQUENCE DATABASE, 25 September 1999 (1999-09-25), XP002172012 HEIDELBERG DE Ac AL120093 the whole document	12
A	US 5 843 739 A (BROWN ADRIAN PAUL ET AL) 1 December 1998 (1998-12-01) Seq Id No 7 abstract	1
A	WO 98 54302 A (ICOS CORP) 3 December 1998 (1998-12-03) abstract	1-28
A	US 5 888 793 A (CORLEY NEIL C ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) abstract	1-28
A	EP 0 463 395 A (HOFFMANN LA ROCHE) 2 January 1992 (1992-01-02) page 2, line 1 -page 3, line 41	1-28
A	KIMURA S ET AL: "THE HUMAN DEBRISOQUINE 4-HYDROXYLASE (CYP2D) LOCUS: SEQUENCE AND IDENTIFICATION OF THE POLYMORPHIC CYP2D6 GENE, A RELATED GENE, AND A PSEUDOGENE" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS,US,UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO,, vol. 45, no. 6, 1 December 1989 (1989-12-01), pages 889-904, XP000570035 ISSN: 0002-9297	
P,X	WO 00 37655 A (CELL THERAPEUTICS INC ;LEUNG DAVID W (US); ADOUREL DANIEL (US); HO) 29 June 2000 (2000-06-29) abstract; claims column 1, line 1 -column 5, line 4	1-28
P,X	LEUNG, D.W.: "Homo sapiens lysophosphatidic acid acyltransferase-gamma2 (LPAAT-gamma2) mRNA, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE, 6 July 2000 (2000-07-06), XP002172013 HEIDELBERG DE Ac AF156775 the whole document	3,4,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/04423**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 20,21,23,24
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-28 all partially

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 18 is 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 compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20,21,23,24

Claims 20, 21, 23 and 24 refer to agonists/antagonists of the polypeptide of claim 1 without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are specifically defined in the description. It is only indicated that they "may include proteins" (such as antibodies), nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of DME either by directly interacting with DME or by acting on components of the biological pathway in which LBAP participates." (page 32 lines 1-3; page 33 lines 2-5). In consequence the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

Claim 8 has only been search as far as it concerns nonhuman transgenic organisms.

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 56.1(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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 1 and 13, respectively.

2. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 2 and 14, respectively.

3. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 3 and 15, respectively.

4. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 4 and 16, respectively.

5. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 5 and 17, respectively.

6. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 6 and 18, respectively.

7. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 7 and 19, respectively.

8. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 8 and 20, respectively.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 9 and 21, respectively.

10. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 10 and 22, respectively.

11. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 11 and 23, respectively.

12. Claims: 1-28 all partially

An isolated polypeptide, an isolated polynucleotide and their uses where the polypeptide and polynucleotide are Seq Id No 12 and 24, respectively.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/04423

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5843739 A	01-12-1998	AU 694098 B	16-07-1998
		AU 5656794 A	04-07-1994
		AU 8932398 A	03-12-1998
		CA 2151147 A	23-06-1994
		CZ 9501506 A	18-03-1998
		EP 0673424 A	27-09-1995
		WO 9413814 A	23-06-1994
		HU 71785 A	28-02-1996
		PL 309327 A	02-10-1995
		SK 76395 A	13-09-1995
		US 6194640 B	27-02-2001
		US 5945323 A	31-08-1999
-----	-----	-----	-----
WO 9854302 A	03-12-1998	AU 7600098 A	30-12-1998
-----	-----	-----	-----
US 5888793 A	30-03-1999	US 6001620 A	14-12-1999
-----	-----	-----	-----
EP 0463395 A	02-01-1992	AU 645091 B	06-01-1994
		AU 7848791 A	02-01-1992
		CA 2045012 A	23-12-1991
		JP 5211895 A	24-08-1993
		NZ 238610 A	25-11-1993
		US 5648482 A	15-07-1997
		US 5844108 A	01-12-1998
		DE 69126064 D	19-06-1997
		DE 69126064 T	28-08-1997
		ES 2103756 T	01-10-1997
-----	-----	-----	-----
WO 0037655 A	29-06-2000	US 6136964 A	24-10-2000
		US 6060263 A	09-05-2000
-----	-----	-----	-----

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 P 3/00		A 6 1 P 15/00	4 C 0 8 4
5/00		27/02	4 H 0 4 5
15/00		29/00	
27/02		35/00	
29/00		37/02	
35/00		43/00	1 1 1
37/02		C 0 7 K 16/40	
43/00	1 1 1	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/40		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		9/02	
1/21		9/10	
5/10		9/14	
9/02		C 1 2 Q 1/26	
9/10		1/34	
9/14		1/48	
C 1 2 Q 1/26		1/68	A
1/34		G 0 1 N 33/15	Z
1/48		33/50	Z
1/68		33/53	M
G 0 1 N 33/15		33/566	
33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/53		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 8 5 , 1 4 1
(32)優先日 平成12年2月25日(2000.2.25)
(33)優先権主張国 米国(U S)
(31)優先権主張番号 6 0 / 1 8 6 , 8 1 8
(32)優先日 平成12年3月3日(2000.3.3)
(33)優先権主張国 米国(U S)
(31)優先権主張番号 6 0 / 1 8 8 , 3 4 5
(32)優先日 平成12年3月9日(2000.3.9)
(33)優先権主張国 米国(U S)
(31)優先権主張番号 6 0 / 1 8 9 , 9 9 7
(32)優先日 平成12年3月17日(2000.3.17)
(33)優先権主張国 米国(U S)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), 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, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, MZ, 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 ボーゲン、マライア・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・
サンレアンドロ・サンティアゴロード
14244
- (72)発明者 ヤオ、モニック・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94043・
マウンテンビュー・フレデリックコート
111
- (72)発明者 バンドマン、オルガ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94043・
マウンテンビュー・アンナアベニュー
366
- (72)発明者 アジムザイ、ヤルダ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94552・
カストロバレー・ボールダーキャニオンド
ライブ 5518
- (72)発明者 ラル、フリーティ
アメリカ合衆国カリフォルニア州95054・
サンタクララ・ラスドライブ 2382
- (72)発明者 ガンディー、アミーナ・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州94025・
メンロパーク・#1・ローブルアベニュー
837
- (72)発明者 リング、ヒュイジュン・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94022・
ロスアルトス・オレンジアベニュー 625
- (72)発明者 シー、レオ・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州94303・
パロアルト・アパートメント ビー・タン
ランドドライブ 1081

- (72)発明者 ヤング、ジュンミング
アメリカ合衆国カリフォルニア州95129・
サンノゼ・パークレーン 7125
- (72)発明者 ポリッキー、ジェニファー・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州95124・
サンノゼ・ナショナルアベニュー 4864
- F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 FB02
4B024 AA01 BA08 BA10 BA11 CA04
CA09 DA02 DA06 EA02 EA04
GA11 GA18 GA19 HA03 HA14
4B050 CC01 CC03 DD07 LL01 LL10
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ20 QQ42
QR02 QR06 QR10 QR32 QR38
QR41 QR55 QR57 QR77 QR82
QS12 QS25 QS28 QS34 QS39
QX01 QX07
4B065 AA26X AA90X AA91X AA93X
AA93Y AB01 AC14 BA01
CA27 CA44
4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08
BA21 BA22 BA23 DC50 NA14
ZA332 ZA662 ZA752 ZA812
ZB072 ZB112 ZB262 ZC022
ZC032
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	药物代谢酶		
公开(公告)号	JP2003522528A	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2001558463	申请日	2001-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	タングワイトム ユエヘンリー ボーグンマライアアール ヤオモニークジー バンドマンオルガ アジムザイヤルダ ラルプリーティ ガンディーアミーナアール リングヒュイジュンジー シーレオエル ヤングジュンミン ポリッキージェニファーエル		
发明人	タング、ワイトム ユエ、ヘンリー ボーグン、マライア・アール ヤオ、モニーク・ジー バンドマン、オルガ アジムザイ、ヤルダ ラル、プリーティ ガンディー、アミーナ・アール リング、ヒュイジュン・ジー シー、レオ・エル ヤング、ジュンミン ポリッキー、ジェニファー・エル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P5/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/02 C12N9/10 C12N9/14 C12N15/09 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P29/00 C12N9/00		
FI分类号	A61K45/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P5/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12N9/10 C12N9 /14 C12Q1/26 C12Q1/34 C12Q1/48 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33 /566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/BA08 4B024 /BA10 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050 /DD07 4B050/LL01 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QR02 4B063/QR06 4B063/QR10 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR41 4B063/QR55 4B063 /QR57 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA27 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084		

/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/NA14
 4C084/ZA332 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB262
 4C084/ZC022 4C084/ZC032 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045
 /CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74

優先権
 60/181856 2000-02-11 US
 60/183684 2000-02-17 US
 60/185141 2000-02-25 US
 60/186818 2000-03-03 US
 60/188345 2000-03-09 US
 60/189997 2000-03-17 US

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码DME的人药物代谢酶 (DME) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体和宿主细胞， 抗体， 激动剂， 拮抗剂。 此外， 本发明提供了一种用于诊断/治疗/预防与DME异常表达有关的疾病的方法。

インサート シクエンスID	挿入位置 SEQ ID NO:	インサート シクエンスID	挿入位置 SEQ ID NO:	インサート シクエンスID	挿入位置 SEQ ID NO:
1642862	13	1642862	13	1642862	13
3861612	14	3861612	14	3861612	14
7477055	15	7477055	15	7477055	15
1923521	16	1923521	16	1923521	16
1558210	17	1558210	17	1558210	17
5629033	18	5629033	18	5629033	18
2750679	19	2750679	19	2750679	19
1570911	20	1570911	20	1570911	20
1959720	21	1959720	21	1959720	21
6025202	22	6025202	22	6025202	22
7266116	23	7266116	23	7266116	23
4210675	24	4210675	24	4210675	24