

明 細 書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、そのDNAおよびそのリガンド

5 技術分野

本発明は、ラット脳幹周辺部およびヒト脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNA、ならびに該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド活性を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などに関する。

10

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7 TMR)と総称される。

15

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

20

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未だ未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質にいてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、い

わゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（即ち、リガンド）の探索、また該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニスト）
5 の探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

10 さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配
15 列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

加えて、該レセプターに対する内因性リガンドまたは該リガンド活性のある物質を見つけることができれば、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストのスクリーニング系
20 の構築が可能となる。

発明の開示

本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。即ち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該
25 G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよ

びそれらの誘導体)、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

さらに、本発明は該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガント活性を有するペプチドなどを提供する。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、degenerated PCR 法によって作成したEST情報に基づいて、ラット脳幹周辺部およびヒト脳由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。

さらに本発明者らは、いくつかの既知ペプチドあるいは遺伝子データベース上に発見された新規ペプチドを用いて、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性を有するペプチドを探索した。その結果、ガン転移抑制遺伝子KiSS-1(Genomics, 54巻, 145頁-148頁, 1998年)にコードされる蛋白質のC端ペプチドが本レセプターを活性化する作用を有することが明らかになった。KiSS-1は蛋白質をコードする遺伝子であるが、今回、発明者らはKiSS-1中のアミノ酸54残基からなるペプチドの配列に

着目した。さらにそのC端の部分ペプチドを合成し、レセプターとの反応性試験に供し、リガンド活性を有することを確認した。

KiSS-1 遺伝子産物から切り出されて生成するペプチドには、その遺伝子がガン転移抑制遺伝子であることから、ガン転移抑制活性を有することが期待される。それ以外にも、本遺伝子が胎盤に多量に発現されていることや該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のヒト型受容体である hOT7T175 が胎盤に多量に発現されていることを鑑み、該ペプチドが胎盤で重要な機能を担っていることも予想される。また、ヒトでは脾臓にも受容体の発現が比較的高く、脾臓においても本ペプチドは何らかの生理機能を現しているものと期待される。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、

(2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：5で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載の蛋白質またはその塩、

(3) 上記(1)記載の蛋白質の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩、

(4) 上記(1)記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、

(6) 配列番号：2または配列番号：6で表される塩基配列を有する上記(4)記載のポリヌクレオチド、

(7) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(8) 上記(7)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

(9) 上記(8)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩の製造法、

(10) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩に対する抗体、

(11) 上記(1)記載の蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(10)記載の抗体、

5 (12) 上記(10)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(13) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩を用いることにより得られうる上記(1)記載の蛋白質またはその塩に対するリガンド、

(14) 上記(13)記載のリガンドを含有してなる医薬、

10 (15) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(16) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15 (17) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(18) 上記(16)記載のスクリーニング方法または上記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

20 (19) 上記(16)記載のスクリーニング方法または上記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(20) 上記(10)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質の定量方法、

(21) 配列番号：10で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなる上記(21)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(22) 配列番号：10で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(23) 配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14で表わされるアミノ酸配列からなる上記(21)記載のペプチドのアミドまたはその塩、

(24) リガンドが上記(21)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である上記(16)記載のスクリーニング方法、および

(25) リガンドが上記(21)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である上記(16)記載のスクリーニング用キットなどに関する。

さらには、

(26) 蛋白質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載の蛋白質またはその塩、

(27) (i) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩、または上記(3)記載の部分ペプ

チドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記(16)記載のスクリーニング方法

5 、

(28) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10

(29) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15

(30) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20

(31) (i) 標識したリガンドを上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に

25

発現した蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３２）（ｉ）上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（１）記載
5 の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 （３３）上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガ
15 ドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３４）上記（１）記載の蛋白質を活性化する化合物が、上記（２１）記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である上記（３２）または上記（３３）記載のスクリーニング方法、

20 （３５）上記（２７）～（３４）記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（３６）上記（２７）～上記（３４）記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

25 （３７）上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（１７）記載のスクリーニング用キット、

(38) 上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(17)記載のスクリーニング用キット、

(39) 上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質を含有することを特徴とする上記(17)記載のスクリーニング用キット、

5 (40) 上記(37)～上記(39)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(41) 上記(37)～上記(39)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(42) 上記(10)記載の抗体と、上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記(1)の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法、

15 (43) 上記(10)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエ
20 ステルまたはその塩の定量法、および

(44) 被検液と担体上に不溶化した上記(10)記載の抗体および標識化された上記(10)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載の蛋白質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法な
25 どを提供する。

図面の簡単な説明

図1は実施例1で得られた本発明のラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 1 7 5 をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ
5 酸配列を示す（図2に続く）。

図2は実施例1で得られた本発明のラット脳幹周辺部由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 1 7 5 をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図1の続き、図3に続く）。

図3は実施例1で得られた本発明のラット脳幹周辺部由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 1 7 5 をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図2の続き）。

図4は図1～図3に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のラット脳幹周辺部由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 1 7 5 の疎水性プロットを示す。

図5は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 h O T 7 T 1 7 5 をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図6に続く）。

図6は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 h O T 7 T 1 7 5 をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図5の続き、図7に続く）。

図7は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 h O T 7 T 1 7 5 をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図6の続き）。

図8は図5～図7に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト脳由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 h O T 7 T 1 7 5 の疎水性プロットを示す。

図9は実施例3（1－2）で行われた細胞内C a イオン濃度上昇活性の測定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の蛋白質（レセプター蛋白質、G蛋白質共役型レセプター蛋白質、以下「本発明のレセプター蛋白質」と略記する。）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列〔図1～図3中のアミノ酸配列〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質である

5 。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マ

10 クロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後

15 頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であつてもよく、また合成蛋白質であつてもよい。

20 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

具体的には、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列〔図5～図7中のアミノ酸配列〕を

25 含有する蛋白質などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有す

る蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

5 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

10 リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1
15 で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたア
20 ミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：5で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：5で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ま
25 ししくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：5で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは

、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。

5 本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

10 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

15 本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン
20 残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} ア
25 シル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のレセプター蛋白質または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）

- 5 としては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

- 具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、〔図4〕で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。さらに、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、〔図8〕で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。
- 10
- 15

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

- 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。
- 20

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

- また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～
- 25

10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のレセプター蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基もしくは酸との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じた方法により製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリ
5 アクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる
10 。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミド
15 などが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOOBt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

20 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロ
25 フランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温

度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約
-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～
4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には
保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができ
5 る。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダ
ゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えない
ようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボ
ニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z
10 、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニ
トロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、
ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロ
オクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、ア
15 ラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メト
キシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェ
ナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボ
ニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる
20 。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベ
ンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの
炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、
ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベ
25 ンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチ

ルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、
5 N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフル
10 オロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、ア
15 ニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の
20 酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -
25 -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質と

C末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分

5 を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のレセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のレセプター蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、

10 以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

① M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

20 ③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④ 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第 14 巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離

25

体に変換することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997 記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでよい。

配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列と約70以上、好

ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

15 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のレセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定された蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはレセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してレセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及びレセプター蛋白質関連RNAと
25 特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外でレセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に

有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。

- 5 レセプター蛋白質遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF 翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域、及び3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。
- 10 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸
- 15 及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非
- 20 修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（
- 25 例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリール

ーリジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 α アノマー型の核酸など)
5)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてもよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例え
10 ば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス
15 核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

20 こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有して
いて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療
25 により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカ

チオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のレセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または（2）配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター

蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：6で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性

5 性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部

10 あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことが

15 できる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-G（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex 法やKunkel 法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、

20 または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

25 本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発

現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなど
5 その他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は
10 、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌
15 である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして
25 使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Pho A・シグナル配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SU C 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

10 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)] , JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)] , JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ (Journal of Molecular Biology)] , 120巻, 517(1978)] , HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ, 41巻, 459(1969)] , C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

20 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High FiveTM 細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology

), 6, 47-55 (1988)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

- 5 このようにして、本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、
10 コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- 15 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬
20 剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・

アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], D MEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し

、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）または本発明のリガンドペプチド（後述）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

10 (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドは、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。

15 用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化された本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、
25 、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明のレセプター蛋白質等抗原または本発明のリガンドペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グ

ロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

5 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体

10 含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペ
15 ット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリ
20 ジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

20 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは
25 血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測

定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩、およびそれをコードするDNAは、（１）本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）の決定、（２）本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、（３）遺伝子診断剤、（４）本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの定量、（５）本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング、（６）本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（７）本発明のレセプター蛋白質等の定量、（８）本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体による中和、（９）本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いた後述の本発明のリガンドとのレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを後述の各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（１）本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

本発明のレセプター蛋白質等は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質等と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する

。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビ
ノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、
オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴ
5 ン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、
GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタ
チン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリ
レーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、ト
ロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば
10 、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP1
0、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP-1 α 、MIP
-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロ
テンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなど）の他に、例えば、
ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽
15 出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清など（具体的
には、KiSS-1 (Welch DR, J. Natl. Cancer Inst. 88, 1731, 1996)の特定の断片ペプチ
ド（例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番
目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはそのア
ミドもしくはそのエステルまたはその塩など））を本発明のレセプター蛋白質等に添加し、
20 細胞刺激活性等を測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、ま
たは組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッ
セイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質等に結合して細胞刺激活性（例え
ば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細
25 胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、
c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（

例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質等と試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質等に対する試験化合物の結合量や、細胞刺激
5 活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質等に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜面に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
10

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
15

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および
20

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、
25

細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質等に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、前記した本発明のレセプター蛋白質等であれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた本発明のレセプター蛋白質等が適している。

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質等をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は

それ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

- 5 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法
- 10 などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 15 該レセプター蛋白質等を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質等の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

- 20 本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の①~③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 25 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニ

- ン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジ
- 5 キニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エン
- 10 テロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンまたはKiSS-1（Welch DR, J. Natl. Cancer Inst. 88, 1731, 1996）の特定の断片ペプチド（例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩など）などが好適である。
- 15 具体的には、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質等との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特
- 20 異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該
- 25 レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）

を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0 cpmを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質等に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても

5 良い。

②レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個／穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

- 10 市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などと標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

- 15 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。
- 20 ②標識試験化合物を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μ l加えておく。
- ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。
- 25 ④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質等に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下

垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、

5 CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-

10 78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、KiSS-1 (Welch DR, J. Natl. Cancer Inst. 88, 1731, 1996)の特定の断片ペプチド（例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のア

15 ミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩など）などが用いられる。

特に、後述の実施例3で示されているとおり、KiSS-1 (Welch DR, J. Natl. Cancer Inst. 88, 1731, 1996)の特定の断片ペプチド（例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミ

20 ノ酸残基からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩など）が本発明のレセプター蛋白質等に結合することができるリガンドとしてあげられる。

「配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド」（以下、「本発明のリガンドペプチド」と略記する場合がある）としては、配列番号：10で表されるアミノ酸配

25 列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドであればいかなるものであってもよいが、ペプチドの活性（例

例えば、リガンドと受容体の結合活性、リガンドによって引き起こされる受容体発現細胞の細胞刺激活性など）などが、実質的に同じであることを意味する。

本発明のリガンドペプチドとして好ましくは、例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15
5 個のアミノ酸残基からなるペプチドなどがあげられる。

さらに好ましくは、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（特にこれらのアミド体）などがあげられる。
。

また、本発明のリガンドペプチドはC末端アミノ酸のカルボキシル基がアミド化されたアミド体であるものが特に好ましい。
10

これらのペプチドのアミド体もしくはエステル体および塩については、上記の本発明のレセプター蛋白質の塩、その断片ペプチドのアミド体、エステル体と同様である。

本発明のリガンドペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のリガンドペプチドをコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のリガンドペ
15 チドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

20 本発明のリガンドペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse
25 Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のリガンドペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

- 5 本発明のリガンドペプチドをコードするDNAとしてより具体的には、例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなるペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、さらに具体的には、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有し、8乃至15
10 個のアミノ酸残基からなるペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

- また、本発明のリガンドペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列において、5'末端から139番目乃至162番目の塩基配列を有するDNAを含有し、24乃至162個の塩基からなるDNAなどがあげられ、さらに具体的には、配列番号：15で表される塩基配列において、5'末端から139番目乃至162番目の塩基配列を
15 有するDNAを3'末端に有し、24乃至45個の塩基からなるDNAなどがあげられる。

さらに、本発明のリガンドペプチドをコードするDNAとして具体的には、例えば、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

- 20 ここで、①配列番号：10で表されるアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、②配列番号：11で表されるアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号：16で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、③配列番号：12で表されるアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号：17で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、④配列番号
25 :13で表されるアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号：18で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、⑤配列番号：14で表されるアミノ酸配列をコー

ドするDNAとしては、配列番号：19で表される塩基配列を有するDNAを含有するポリヌクレオチドなどが具体例としてあげられる。

本発明のリガンドペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩、および該リガンドペプチドをコードするポリヌクレオチドの製造方法は、上記の本発明のレセプター蛋白質等および該蛋白質等をコードするポリヌクレオチドの製造方法と同様の方法などが用いられる。

本発明のリガンドペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩（以下本発明のリガンドペプチド等と称する場合がある）、および該リガンドペプチドをコードするポリヌクレオチドはリガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

10 本発明のリガンドペプチド等およびリガンドペプチドをコードするDNAは、癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、脾癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）の予防または治療薬に有用である。

また、本発明のリガンドペプチド等およびリガンドペプチドをコードするDNAは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の发育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。

本発明のリガンドペプチド等を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のリガンドペプチドをコードするDNA（以下、本発明のリガンドDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のリガンドDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のリガンドDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のリガンドペプチド等または②該リガンドペプチドをコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、ま

たは懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のリガンドペプチド等または②該リガンドペプチドをコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤
5 における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油
10 またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液
15 （例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併
20 用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常
25 、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例え

ば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のリガンドペプチド質等の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明のリガンドDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

20 （2）本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質等または該レセプター蛋白質等をコードするDNAを、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質等を該患者に投与し該レセプター蛋白質等の量を補充したり、②（イ）本発明の

レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは
(ロ) 対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNAを挿入し発現させ
た後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における本発明のレセプ
ター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって
5 、本発明のレセプター蛋白質等および本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安
全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治
療剤などの医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等および本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNAは、癌
転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸
10 癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）の予防または治療薬に有用である。

また、本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドおよび本発明のレセ
プター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドをコードするDNAは、胎盤機能調節作用
を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代
謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。

15 本発明のレセプター蛋白質等を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従っ
て製剤化することができる。

一方、本発明のレセプター蛋白質等をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記す
る場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいは
レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイ
20 ルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。
本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃や
ハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプター蛋白質等または②該レセプター蛋白質等をコードするDN
Aは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤な
25 どとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、
または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター

蛋白質等または②該レセプター蛋白質等をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には
- 10 、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、
- 15 適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。
- 20 また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。
- 25 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与

することができる。

本発明のレセプター蛋白質等の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約

5 1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

10 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通

15 常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

（3）遺伝子診断剤

20 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAまたは本発明のリガンドペプチドをコードするDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然

25 変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAまたは本発明のリガンドペプチドをコードするDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー（Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

（4）本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

15 ①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

（5）本発明のレセプター蛋白質またはその塩とリガンド（本発明のリガンドペプチド）との結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質またはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c

ー f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニスト）、あるいは（ハ）リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明のレセプター蛋白質等と、リガンド（本発明のリガンドペプチド）とを接触させた場合と（ii）本発明のレセプター蛋白質等と、リガンド（本発明のリガンドペプチド）および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンド（本発明のリガンドペプチド）の結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）を、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）の該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）を、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンド（本発明の

リガンドペプチド)と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンド(本発明のリガンドペプチド)を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標

5 識したリガンド(本発明のリガンドペプチド)および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンド(本発明のリガンドペプチド)の該レセプター蛋白質等々に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンド(本発明のリガンドペプチド)と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物(例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど)を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンド(本発明のリガンドペプチド)と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物(例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンド(本発明のリガンドペプチド)など)を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生

成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

- 5 本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いてG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する方法が採られていた。しかし、細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質
10 に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

- しかしながら、例えば、本発明のレセプター蛋白質等を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。
15

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、前記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、
20 スクリーニングに用いる大量のレセプター蛋白質を得るには、組換え体を用いて大量発現させたレセプター蛋白質等などが適している。

- 本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるもの
25 ではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該

DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含むものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分と

する。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、
5 発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセ
10 プター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが
15 用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などと標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンド（本発明のリガンドペプチド）の分解を抑える目的でPMSF、
20 ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を
25

添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識したリガンド（本発明のリガンドペプチド）を添加し、同時に 10^{-4} M～ 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンド（本発明のリガンドペプチド）を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

できる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

15 ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

20 ②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個／穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したリガンド

25 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- 5 ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。
- ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5μl加えておく。
- 10 ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。
- ④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

15

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

20 B_0 : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性また

25

は抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、あるいは（ハ）リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

- 5 該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンド（本発明のリガンドペプチド）が有する生理活性と同様の作用を有しているので、
10 、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、
15 、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）の予防または治療薬に有用である。

また、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胎状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。
15

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンド（本発明のリガンドペプチド）が有する生理活性を抑制することができるので、
20 、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

- 20 リガンド（本発明のリガンドペプチド）と本発明のレセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンド（本発明のリガンドペプチド）が有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。
25 例えば、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩（アゴニストの場合）の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与5 方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好まし10 くは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

（6）本発明のレセプター蛋白質等とリガンド（本発明のリガンドペプチド）との結合性を15 変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質等は前述のとおり、例えば癌転移抑制作用など生体内で何らかの重要な役割を果たしている。従って、本発明のレセプター蛋白質等とリガンド（本発明のリガンドペプチド）との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、本発明のレセプター蛋白質等の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用20 いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質等の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液25 との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結

合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーン
- 5 スターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための
- 10 無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピ
- 15 レングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム
- 20 緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例え
- 25 ば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩（アゴニストの場合）の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

10 （7）本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの定量

本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの定量法、

20 （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体および標識化された本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの定量法を提供する。

25 上記（ii）においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等または本

発明のリガンドペプチドのC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量または本発明のリガンドペプチド）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量または本発明のリガンドペプチドを定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

10 本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対するモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用地第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

25 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗

体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗

体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

(8) 本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質等または本発明のリガンドペプチドに対する抗体が、それらレセプター蛋白質等または該リガンドペプチドに対する中和活性とは、即ち、該レセプター蛋白質等または該リガンドペプチドの関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質等または該リガンドペプチドの関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。従って、該レセプター蛋白質または該リガンドペプチドの過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

(9) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを有する動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）などが挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の

本発明のDNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作成できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可

能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
10	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
15	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
20	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
25	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン

	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
5	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
10	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
15	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
20	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	T o s	: p-トルエンスルフォニル
25	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル

	Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
5	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェノール
	Trt	: トリチル
	Bum	: t-ブトキシメチル
10	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
15	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	BHA	: ベンツヒドリルアミン
	MeBzl	: 4-メチルベンジル
	OcHex	: シクロヘキシルエステル
	NMP	: N-メチルピロリドン
20	TFA	: トリフルオロ酢酸

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T175 のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：2〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のラット脳幹周辺部由来新規G蛋

白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T175 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

本発明のラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T175 をコードする cDNA をクローニングするために使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：4〕

本発明のラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T175 をコードする cDNA をクローニングするために使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

10 本発明のヒト脳由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hOT7T175 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

配列番号：5 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hOT7T175 をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

15 本発明のヒト脳由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hOT7T175 をコードする cDNA をクローニングするために使用したプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

本発明のヒト脳由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hOT7T175 をコードする cDNA をクローニングするために使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：9〕

本発明のヒト脳由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hOT7T175 をコードする cDNA をクローニングするために使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

実施例 3 に記載の PEPTIDE (1-54) のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：11〕

実施例 3 に記載の PEPTIDE (40-54) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：12]

実施例3に記載の PEPTIDE (45-54) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：13]

実施例3に記載の PEPTIDE (46-54) のアミノ酸配列を示す。

5 [配列番号：14]

実施例3に記載の PEPTIDE (47-54) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：15]

配列番号：10で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：16]

10 配列番号：11で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：17]

配列番号：12で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：18]

配列番号：13で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

15 [配列番号：19]

配列番号：14で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：20]

実施例3に記載の Kiss-1 産物のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：21]

20 実施例3に記載の PEPTIDE (48-54) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：22]

配列番号：21で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH10B
／pAK-rOT175は、平成10年10月21日から通商産業省工業技術院生命工学工
業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6553 として、平成10年10月1
25 日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16209 として寄託されている

。

後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH10 B/pCMV-hOT175は、平成11年2月17日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-6648として、平成11年2月9

5 日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16258として寄託されている。

。

実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例1 ラット脳幹周辺部のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

15 ラット脳幹周辺部cDNAを鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号:3)およびプライマー2(配列番号:4)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社)1/50量、プライマー1(配列番号:3)およびプライマー2(配列番号:4)を各0.2μM、dNTPs 200μM

20 、および酵素に添付のバッファーを加え、50μlの液量とした。PCR反応は、①94℃・2分の後、②94℃・30秒、72℃・2分のサイクルを3回、③94℃・30秒、68℃・2分のサイクルを3回、④94℃・30秒、64℃・30秒、68℃2分のサイクルを30回繰り返し、⑤最後に68℃・8分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpC

25 R2.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のク

ローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列（配列番号：2）を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列（配列番号：1）を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をrOT7T175と命名した。

5 本発明のラット脳幹周辺部由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T175をコードするcDNA（配列番号：2）がサブクローニングされたプラスミドpAK-rOT7T175を、自体公知の方法に従い大腸菌（*Escherichia coli*）DH10Bに導入して、形質転換体：大腸菌（*Escherichia coli*）DH10B/pAK-rOT175を得た。

実施例2 ヒト脳由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hOT7T175のcDNAの

10 クローニングと塩基配列の決定

cDNAのクローニングはGENE TRAPPER（Life Technologies社）の処方に従って行った。プローブ（配列番号：7）をビオチン化した後、一本鎖にしたヒト脳cDNAライブラリー（スーパースクリプトcDNAライブラリー、Life Technologies社）とハイブリダイゼーションし、得られた一本鎖遺伝子をプライマー1（配列番号：8）を用いて二本鎖とした。この遺伝子を電気穿孔法（エレクトロポレーション法）により大腸菌DH10Bに導入した後、アンピシリン含有選択プレート上で生育した形質転換体を得た。エレクトロポレーションはE. coli Pulser（BIORAD社）を用いて電圧1.8 kVで行った。得られた形質転換体をプローブ（配列番号：7）とプライマー2（配列番号：9）をもちいたコロニーPCRによって選択し、形質転換体：20 大腸菌（*Escherichia coli*）DH10B/pCMV-hOT175を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列（配列番号：5）を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhOT7T175と命名した。コロニーPCRは、Advantage cDNA Polymerase Mix（CLONTECH社）1/50量、プローブ（配列番号：7）およびプライマー2（配列番号：9）を各0.2 μM、dNTPs 200 μM、DMSO 1/25量および酵素に添付のバッファーを加え、10 μlの液量とした。PCR反応は25 、① 94℃・10分の後、② 94℃・10秒、60℃・10秒、68℃・1分のサイクル

を25回繰り返し行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH10Bに導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:6)を得た。
5 このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号:5を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhOT175と命名した。

実施例3 rOT7T175(オーファンレセプター)を活性化するペプチドのスクリーニング

10 (1-1) ペプチド合成

遺伝子データベース上に見出されたガン転移抑制遺伝子(KiSS-1)産物中(配列番号:20)中の第68番目(Gly)~第121番目(Phe)の54アミノ酸残基から成る配列(配列番号:10)からなるペプチド(以下、PEPTIDE(1-54)と称す)は以下の方法により合成できる。

15 さらに、以下に述べる方法により、PEPTIDE(1-54)(配列番号:10)のC端部分ペプチドPEPTIDE(40-54)(配列番号:11)、PEPTIDE(45-54)(配列番号:12)、PEPTIDE(46-54)(配列番号:13)、PEPTIDE(47-54)(配列番号:14)、PEPTIDE(48-54)(配列番号:21)を合成した。

① PEPTIDE(40-54)の製造

20 市販p-メチルBHA樹脂(0.77 mmole/g resin)をペプチド合成機ABI 430Aの反応槽に入れ、Boc-strategy(NMP-HOBt)ペプチド合成方法でBoc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asp(OcHex), Boc-Lys(Cl-Z)を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂0.12 gをp-クレゾール1 ml、1,4-ブタンジチオール1.2 mlと共に無水弗化水素10 ml中、0℃60分撹拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物へジエチルエーテルを加え沈殿を濾過した。この沈殿に50%酢酸水を加え抽出し、不溶部分を

25

除き、抽出液を十分に濃縮後、50%酢酸水で充填したセファデックス（商品名）G-25 カラム（2.0 x 80 cm）に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め凍結乾燥し、白色粉末40mgを得た。半量をLiChroprep（商品名）RP-18 を充填した逆相クロマトカラム（2.6 x 60 cm）に付け0.1%TFA水 200ml で洗浄、0.1%TFA水 300ml と0.1%TFA含有33%アセトニトリル水 300ml
5 を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め凍結乾燥し目的とするペプチド 4.1 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1869.9 (計算値 1969.9)

HPLC 溶出時間 18.6分

カラム条件

10 カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い A/B：95/5～45/55
へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

② PEPTIDE (45-54)の製造

15 市販p-メチルBHA樹脂 (0.77 mmole/g resin)をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn, Boc-Tyr(Br-Z), を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂 0.11 gを上記①と同様に脱保護精製し目的とするペプチド 2.2 mg を得た。

20 質量分析による(M+H)⁺ 1302.5 (計算値 1302.6)

HPLC 溶出時間 18.7分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い A/B：95/5～45/55
25 へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

③ PEPTIDE (46-54)の製造

市販p-メチルBHA樹脂 (0.77 m mole/g resin)をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn, を順に導入し目的の
5 保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂 0.11 gを上記①と同様に脱保護精製し目的とするペプチド 3.4 mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1139.6 (計算値 1139.6)

HPLC 溶出時間 18.1分

カラム条件

10 カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液: A液-0.1% TFA 水、B液-0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い A/B: 95/5~45/55
へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml / 分

④ PEPTIDE (47-54)の製造

15 市販p-メチルBHA樹脂 (0.77 m mole/g resin)をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO) を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂 0.12 gを上記①と同様に脱保護精製し目的とするペプチド 13.0 mgを得た。

20 質量分析による(M+H)⁺ 1025.5 (計算値 1025.5)

HPLC 溶出時間 17.6分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液: A液-0.1% TFA 水、B液-0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い A/B: 95/5~45/55

25 へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml / 分

⑤ PEPTIDE (48-54)の製造

市販p-メチルBHA樹脂 (0.77 m mole/g resin)をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。

- 5 この樹脂0.16 gをp-クレゾール1 ml と共に無水弗化水素10 ml 中、0℃ 60分撹拌した後、上記①と同様に処理、精製し目的とするペプチド29.0 mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 839.5 (計算値 839.5)

HPLC 溶出時間 15.6分

カラム条件

- 10 カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い A/B：95/5～45/55
へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速：1.0 ml / 分

⑥ PEPTIDE(1-54)の製造

- 15 PEPTIDE(1-54)は市販p-メチルBHA樹脂 (0.77 m mole/g resin)をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt)ペプチド合成方法で Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asp(OcHex), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Glu(OcHex), Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Val, Boc-Leu, Boc-Val, Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Gln, Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Pro, Boc-Ile, Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl), Boc-His(Bom), Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Pro, Boc-Gln, Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl), Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Glu(OcHex), Boc-Pro, Boc-Pro, Boc-Pro, Boc-Ser(Bzl), Boc-Leu, Boc-Ser(Bzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Gly
- 20 を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得、この樹脂を上記①の PEPTIDE (40-54) の製造法の記載と同様に脱保護精製して得ることができる。
- 25

(1-2) FLIPR を用いた細胞内 Ca イオン濃度上昇活性の測定

r0T7T175 安定発現細胞株は動物細胞発現用プラスミド pAK-r0T175 を CHO/dhfr⁻細胞に CellPfect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水 240 ml に溶解したプラスミド DNA 9.6 mg に対して Buffer A (CellPfect Transfection Kit に添付) 240 ml を添加し、攪拌し、10 分間静置後、Buffer B (CellPfect Transfection Kit に添付) 480 ml を添加し、激しく攪拌し該 DNA を含有するリポソームを形成させた。4 x 10⁵ 個の CHO/dhfr⁻ 細胞 (ATCC より入手) を 60 mm シャーレに播き、10%のウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 社) を含む Ham's F-12 培地 (日水製薬株式会社) 中で 37℃、5%炭酸ガス中で 2 日間培養した後、該リポソーム 480 ml をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37℃、5%炭酸ガス中にて 6 時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12 培地で 2 回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に 15%グリセロール 3 ml を添加し 2 分間処理した。これを、再度、血清を含まない Ham's F-12 培地で 2 回洗浄した後、10%のウシ胎児血清を含む Ham's F-12 培地中で 37℃、5%炭酸ガス中で 15 時間培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、1.25 x 10⁴ 個ずつ 6-well plate に播き、透析済み 10%ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (日水製薬株式会社) 中にて 37℃、5%炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換 CHO 細胞は該培地中で生育するが非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始 1 日目、および 2 日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始 8-10 日後に生育してきた形質転換 CHO 細胞のコロニーを約 20 個選んだ。それぞれ選択された細胞から RNA を市販の RNA 単離用キットを用いて回収し、以降公知の RT-PCR 法により r0T7T175 レセプター遺伝子を高発現する r0T7T175 発現 CHO 細胞 23 番クローン (以後 r0T7T175-23 と略称する) を選別した。

また、対照として ETA 発現 CHO 細胞 24 番クローン (以後 ETA24 と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279 巻、675-685 頁、1996 年参照) を用いた。

上記 (1-1) で得られた合成ペプチドについて、r0T7T175-23 及び ETA24 における細胞内 Ca イオン濃度上昇活性の測定を FLIPR (Molecular Devices 社) を用いて行った。

r0T7T175-23 細胞、ETA24 細胞共に 10% 透析処理済ウシ胎児血清(以後 d FBS と略称する)を加えた DMEM で継代培養しているものを用いた。r0T7T175-23 細胞、ETA24 細胞をそれぞれ 15×10^4 cells/ml となるように培地(10% dFBS-DMEM)に懸濁し、FLIPR 用 96 穴プレート(Black plate clear bottom, Coster 社)へ、分注器を用いて各ウェルに $200 \mu\text{l}$ ずつ蒔き(3.0×10^4 cells/ $200 \mu\text{l}$ /ウェル)、5% CO_2 インキュベーター中で 37°C で一晩培養した後、用いた(以後細胞プレートと略称する)。HANKS/HBSS (HANKS' 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、1M HEPES 20ml、1 N 水酸化ナトリウムで pH7.4 に合わせた後、フィルター滅菌処理) 21ml、250mM Probenecid $210 \mu\text{l}$ 、ウシ胎児血清(FBS) $210 \mu\text{l}$ (HANKS/HBSS-Probenecid-FBS)を混合した。また、Fluo3-AM 2 バイアル($50 \mu\text{g}$ /バイアル)をジメチルスルフォキシド $42 \mu\text{l}$ 、20% Pluronic acid $42 \mu\text{l}$ に溶解し、これを上記 HANKS/HBSS-Probenecid-FBS 20ml に加え、混和後、培養液を除いた細胞プレートに 8 連ピペットを用いて各ウェル $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中で 37°C で 1 時間インキュベートした(色素ローディング)。ペプチドを $1 \times 10^{-3} \text{M}$ となるようジメチルスルフォキシドに溶解した。ペプチドのジメチルスルフォキシド溶液 0.002ml ($1 \times 10^{-3} \text{M}$)に、2.5 mM Probenecid、0.2% BSA を含む HANKS'/HBSS 0.066ml を加えて希釈した(活性測定時、最終濃度 $1 \times 10^{-5} \text{M}$)。さらに、ペプチドのジメチルスルフォキシド溶液 0.001ml ($1 \times 10^{-3} \text{M}$)にジメチルスルフォキシド 0.009ml を加えて希釈し、これを 0.002ml 分取した後、2.5 mM Probenecid、0.2% BSA を含む HANKS'/HBSS 0.066ml を加えて希釈した(最終濃度 $1 \times 10^{-5} \text{M}$)。同様に最終濃度 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ まで希釈を行い、FLIPR 用 96 穴プレート(V-Bottom プレート、Coster 社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、HANKS'/HBSS に 2.5 mM Probenecid を加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャーを用いて細胞プレートを 4 回洗浄し、洗浄後 $100 \mu\text{l}$ の洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートを FLIPR にセットし、FLIPR 装置により自動的にサンプルプレートから 0.05ml のサンプルを細胞プレートへと移して、細胞の応答反応を促した。180 秒間の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を継続的に測定した。

その結果、上記(1-1)で合成したペプチドが r0T7T175 発現細胞特異的に細胞内カル

シウムイオン濃度の上昇をひき起こすことが明らかになった。そのドーズレスポンスカーブ（図9）を比較すると、PEPTIDE(40-54)、PEPTIDE(45-54)が最も高い活性を有していることが明らかである。

5 産業上の利用可能性

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体）は、①リガンド（本発明のリガンドペプチド）（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。
2. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：5で表されるアミノ酸配列である請求項1記載の蛋白質またはその塩。
3. 請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩。
4. 請求項1記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：2または配列番号：6で表される塩基配列を有する請求項4記載のポリヌクレオチド。
7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩の製造法。
10. 請求項1記載の蛋白質またはその塩、請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩に対する抗体。
11. 請求項1記載の蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項10記載の抗体。
12. 請求項10記載の抗体を含有してなる診断薬。
13. 請求項1記載の蛋白質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項1記載の蛋白質またはその塩に対するリガンド。
14. 請求項13記載のリガンドを含有してなる医薬。
15. 請求項1記載の蛋白質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくは

そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

16. 請求項1記載の蛋白質またはその塩、請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載
5 の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

17. 請求項1記載の蛋白質またはその塩、請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載
の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キッ
ト。

10 18. 請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キ
ットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化
させる化合物またはその塩。

19. 請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キ
ットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化
15 させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

20. 請求項10記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載の蛋白質の定量方法
。

21. 配列番号：10で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目
のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはそのアミ
20 ドもしくはそのエステルまたはその塩。

22. 配列番号：10で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47乃至54番目
のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなる請求項21記載のペ
プチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

23. 配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14で表わさ
25 れるアミノ酸配列からなる請求項21記載のペプチドのアミドまたはその塩。

24. リガンドが請求項21記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま

たはその塩である請求項 1 6 記載のスクリーニング方法。

2 5. リガンドが請求項 2 1 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である請求項 1 6 記載のスクリーニング用キット。