

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年5月1日 (01.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/035872 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, (71) 出願人 および  
C07K 14/47, 16/18, C12N 5/10, C12P 21/08, C12Q 1/68, (72) 発明者: 本庶 佑 (HONJO, Tasuku) [JP/JP]; 〒606-0001  
A61K 38/17, 39/395, 48/00, A61P 25/00, 35/00, G01N 京都府 京都市 左京区岩倉大鷲町 1 9-4 Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/10936 (72) 発明者; および
- (22) 国際出願日: 2002年10月22日 (22.10.2002) (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田代 啓  
(TASHIRO, Kei) [JP/JP]; 〒603-8162 京都府 京都市  
北区小山東大野町 9 3 Kyoto (JP). 高橋 淳 (TAKA-  
HASHI, Jun) [JP/JP]; 〒606-8336 京都府 京都市 左京  
区岡崎北御所町 2 5 ベルシャトゥ岡崎北御所町  
5 0 1 Kyoto (JP). 戸田 弘紀 (TODA, Hiroki) [JP/US];  
94301-1518 カリフォルニア州 パロアルト エベレッ  
ト通#3 1 3 5 3 5号 CA (US).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: (74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE, Kunihisa); 〒103-0013 東京  
特願 2001-325189 都 中央区 日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ  
2001年10月23日 (23.10.2001) JP ル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-8526 大阪府 大阪市 中央区道修 DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
町 2 丁目 1 番 5 号 Osaka (JP). ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: HUMAN AND MAMMALIAN STEM CELL-DERIVED NEURONAL SURVIVAL POLYPEPTIDES

(54) 発明の名称: ヒトおよび哺乳動物の幹細胞由来神経生存因子

(57) Abstract: Human, rat and mouse stem cell derived neuronal survival polypeptides (SDNSF); a process for producing the same; cDNA encoding SDNSF; a vector comprising this cDNA; host cells transformed by the vector; an SDNSF antibody; medicinal compositions containing SDNSF or the antibody; a method of assaying SDNSF; a reagent for assaying SDNSF; and a screening method using SDNSF. The above polypeptides are effective in the survival of nerve cells and, therefore, efficacious in treating injury in the central nerve system by brain infarction, brain hemorrhage, spinal injury, etc.

(57) 要約:

本発明は、ヒト、ラット、マウスの幹細胞由来神経生存因子ポリペプチド (SDNSF)、その製造方法、SDNSFをコードするcDNA、そのcDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、SDNSFの抗体、SDNSFまたは抗体を含有する薬学的組成物、SDNSFを測定する方法、SDNSFを測定する試薬およびSDNSFを用いたスクリーニング方法に関する。

本発明のポリペプチドは、神経細胞の生存に有効であり、脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷の治療に有効である。



WO 03/035872 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

ヒトおよび哺乳動物の幹細胞由来神経生存因子

## 5 技術分野

本発明はヒト、ラット、マウスの幹細胞由来神経生存因子（Stem cell Derived-Neuron Survival Factor、以下、SDNSFと省略する。）に関する。

- さらに詳しく言えば、ヒト、ラット、マウスのSDNSF、それらの製造方法、SDNSFをコードするcDNA、そのcDNAからなるベクター、  
10 そのベクターで形質転換された宿主細胞、SDNSFの抗体、SDNSFまたは抗体を含有する薬学的組成物、SDNSFを測定する方法、SDNSFを測定する試薬およびSDNSFを用いたスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

- 15 成体脳では新しいニューロンは生まれにくいというのが長い間の定説であり、脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患などでは、神経細胞の細胞死により運動機能が失われ、いったん失われた機能の回復は難しいとされていた。しかし近年、ヒトやサルなどの高等哺乳動物の成体脳（海馬、大脳皮  
20 質連合野、側脳室）でもニューロンが新生することが見出され、これらの領域で新しく生まれるニューロンが神経幹細胞から発生することも示された。また、神経幹細胞が高齢者の脳内にも存在し、神経細胞に分化しうることも証明された。これらのことは、脳の再生治療が細胞を移植する細胞治療に限定されず、タンパク質医薬、薬物あるいは遺伝子治療などの方法により直接  
25 内在性の幹細胞を活性化する治療が可能であることを示唆している。

従来、ある特定のポリペプチドまたはそれをコードするcDNAを得よう

とする場合、組織や細胞培養液中に目的とする生物活性を確認し、次いでポリペプチドの単離精製を経て、遺伝子をクローニングするという方法、あるいはその生物活性を指標として遺伝子を発現クローニングする方法が一般的に用いられてきた。しかし、生体内生理活性ポリペプチドは、多様な生物活性を有している場合が多いので、あるひとつの活性を指標にして遺伝子をクローニングした結果、それが既知のポリペプチドと同一であることが後になって判明するという事例が増えている。また、微量しか産生されなかったり、特別な生理条件でのみ発現する因子も多く、そのことが単離、精製および生物活性の確認を困難なものとしている。

10

#### 発明の開示

本発明者らは、中枢神経の損傷または神経変性に係わる疾患の治療、診断、脳腫瘍の診断あるいは研究上有益な新規な因子（ポリペプチド）、特に分泌シグナルを有する分泌蛋白質および膜蛋白質に着目してそれを見出すべく、鋭意検討を行った。その結果、神経幹細胞に係わる新規なペプチド分子を単離し、上記のような再生治療に使用すること、および神経細胞の特異的マーカーとなることを見出した。

本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のクローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子（例えば、各種サイトカイン等）のような分泌蛋白質やそのレセプターのような膜蛋白質（以下、これらをまとめて分泌蛋白質等と呼ぶ。）の大部分がそのN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を有していることに着目して、シグナルペプチドをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニングする方法を鋭意検討した。その結果、動物細胞を用いて、シグナルペプチドの有無を簡単に検索できる方法（シグナルシーケンストラップ（SST）法）を見出した（日本国特許第 2,879,303 号参照）。さらに同じ概念のもとに、酵母を用いてさらに大量

かつ簡便にシグナルペプチドをコードする遺伝子を単離する方法（酵母 S S T法）も開発された（米国特許第 5,536,637 号）。

本方法を用いて、成体ラット海馬由来神経幹細胞が産生している新規な分泌蛋白質、およびそれをコードする cDNA を同定することに成功し、その  
5 情報を基に全長 cDNA を成体ラット海馬由来神経幹細胞より見出した。

本ポリペプチドが、後に詳述するように、脳の一部のニューロン（海馬神経初代培養細胞および海馬由来幹細胞）に対し、生存支持活性を持つことを確認し、本発明を完成した。本ポリペプチドは、機能が特定された有用な因子である。

10 本発明が提供する cDNA 配列は、配列番号 1 または 2 で示されるラット SDNSF クローンとして同定され、成体ラット海馬由来神経幹細胞から作製した cDNA ライブラリーより、酵母 S S T 法を使用して得た情報をもとに単離された。配列番号 1 で示されるラット SDNSF クローンは分泌蛋白質（ここではラット SDNSF 蛋白として表される。）をコードする完全な  
15 cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

本発明が提供する cDNA 配列は、配列番号 5 または 6 で示されるヒト SDNSF クローンとして同定され、成体ラット海馬由来神経幹細胞から作製した cDNA ライブラリーより、酵母 S S T 法を使用して得た情報をもとに単離された。配列番号 5 で示されるヒト SDNSF クローンは分泌蛋白質（こ  
20 こではヒト SDNSF 蛋白として表される。）をコードする完全な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

本発明が提供する配列番号 9 または 10 で示される cDNA 配列は、マウス SDNSF クローンとして同定され、成体ラット海馬由来神経幹細胞から作製した cDNA ライブラリーより、酵母 S S T 法を使用して得た情報をも  
25 とに単離された。配列番号 9 で示されるマウス SDNSF クローンは分泌蛋白質（ここではマウス SDNSF 蛋白として表される。）をコードする完全

な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して GenBank  
および NCBI を用いた BLASTN、FASTA および UNIGENE などにより、また  
アミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸  
5 配列に対して BLASTP、Fly Database、SwissProt などにより検索をした結果、  
本発明ポリペプチドであるラット SDNSF およびそれらをコードする核酸  
配列と一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドは、  
新規の分泌蛋白質であることが判明した。

また、本発明者らは脳の一部のニューロンの生存支持活性を持つこと、分  
10 泌蛋白質でありながら EF ハンドモチーフを持ち、細胞外または分泌経路のオ  
ルガネラのカルシウムで調節を受けるサイトカインである可能性があること、  
および既知のいずれのニューロトロフィンとも相同性を有さないことから、  
既知のニューロトロフィン遺伝子欠損マウス解析からそれらへの依存性が知  
られている交感神経、知覚神経、脊髄運動神経核の神経、基底核コリン作動  
15 性神経以外のニューロンの形成や生存を支持するサイトカインである可能性  
と同時に、これまで原因不明であった神経変性疾患の病因解明および治療に  
つながるものと考えられる。

本発明は、

1. 実質的に純粋な形である配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸  
20 配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはその  
フラグメントのホモログ、
2. 配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなる前記第 1 項  
記載のポリペプチド、
3. 前記第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドをコードする cDNA、
- 25 4. 配列番号 1、2、5、6、9 または 10 で示される塩基配列を有する前  
記第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフ

- ラグメント、
- 5 5. 前記第3項または第4項記載のcDNAからなる複製または発現ベクター、
6. 前記第5項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞、
- 5 7. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドを発現させるための条件下で前記第6項記載の宿主細胞を培養することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法、
8. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体、
- 10 9. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドまたは前記第8項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物、
- 10 10. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドまたは前記第8項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする神経変性が係わる疾患の治療に有効な薬学的組成物、
11. 神経変性が係わる疾患が、脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷である前記第10項記載の薬学的組成物、
12. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドの測定方法、
13. 前記第8項記載の抗体を用いることを特徴とする前記第1項または第20 2項記載のポリペプチドの免疫化学的測定方法、
14. 前記第12項または第13項記載の方法を用いることを特徴とする前記第1項または第2項記載のポリペプチドを検出する試薬、
15. 前記第12項または第13項記載の方法を用いることを特徴とする腫瘍を検査する試薬、
- 25 16. 腫瘍が脳腫瘍である前記第14項記載の試薬、
17. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドを用いることを特徴とする該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を

有する化合物をスクリーニングする方法、

18. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドを有効成分とする中枢神経損傷治療剤、

5 19. 中枢神経損傷が脳梗塞による中枢神経損傷である前記第19項記載の試薬、

20. 中枢神経損傷が脳出血による中枢神経損傷である前記第19項記載の試薬、および

21. 中枢神経損傷が脊髄損傷による中枢神経損傷である前記第19項記載の試薬に関する。

10

#### 詳細な説明

実質的に純粋な形である配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを意味する。

15 配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60、80または100個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%  
20 以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後本発明のポリペプチドとして記載される。

さらに、配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、  
25 25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味する。

配列番号1、2、5、6、9または10で示される塩基配列からなるcD



NAに選択的にハイブリダイズするcDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60、80または100個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのよ  
5 うなcDNAは、以後本発明のcDNAとして記載される。

配列番号1、2、5、6、9または12で示される塩基配列からなるcDNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、25、30または40塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明のcDNAに含まれる。

10 本発明のSDNSF蛋白は、脳腫瘍のうち未分化なニューロblastomaとグリオblastoma細胞株から大量に分泌されるが、分化したグリオblastomaからは分泌されないことと、血中や髄液中に分泌されるニューロblastomaとグリオblastoma脳腫瘍マーカーは無いので、SDNSF蛋白が、血中で検出可能な初の未分化脳腫瘍マーカーとすることができる。

15 さらに、本発明には、本発明のcDNAからなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori領域と、必要により上記cDNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウィルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺  
20 子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ (in vitro) において、例えばcDNAに対応するRNAの製造、宿主細胞の形質転換に用いることができる。

さらに、本発明には、配列番号1、2、5、6、9また10で示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームからなるcDNAを  
25 含む本発明のcDNAを複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞また

は哺乳動物細胞が挙げられる。

さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行われることが好ましい。

本発明の cDNA は、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンス RNA を製造することもできる。このようなアンチセンス RNA は、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

10 本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体をも含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法をも含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチドまたは、その断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例  
15 えば、ラットやウサギ等）に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

(A) 前記 1 の本発明のポリペプチドとしては、配列番号 4、8 または 1  
20 2 で示されたアミノ酸配列からなるもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号 4 中、生物活性の発現に必須な部分だけからなる成熟ポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、および上記本発明のポリペプチドに他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

25 よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは 1～6 種類（例えば、Met は 1 種類、Leu は 6 種類）知られている。従って、

ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく cDNA の塩基配列を変えることができる。

(B) 前記 3 で特定される本発明の cDNA には、(A) の配列番号 4、8 または 12 で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上する  
5 ことがある。

(C) 配列番号 2、6 または 10 で特定される cDNA は、(B) で示される cDNA の一態様であり、天然型配列を表わす。

(D) 配列番号 1、5 または 9 で示される cDNA は、(C) で特定される cDNA に天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。  
10

配列番号 1、5 または 9 で示される塩基配列からなる cDNA の作製は、以下の方法に従って行われる。

はじめに酵母 SST 法 (米国特許第 5,536,637 号に記載) の概要について説明する。

15 サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母がシヨ糖またはラフィノースをエネルギー源や炭素源として利用するためにはインベルターゼを培地中に分泌しなければならない (インベルターゼはラフィノースをシヨ糖とメリビオースに、シヨ糖をフルクトースとグルコースに分解する酵素である。)。また数多くの既知の哺乳類のシグナルペプチドは酵母のインベルターゼを分泌させうることが知られている。  
20

これらの知見から、酵母のインベルターゼの分泌を可能にする新規のシグナルペプチドを哺乳類の cDNA ライブラリーからラフィノース培地上での酵母の生育を指標にスクリーニングする方法として本方法は開発された。

翻訳開始点 ATG を削除した非分泌型のインベルターゼ遺伝子 SUC2  
25 (GENBANK accession No.V01311) を酵母の発現ベクターに組み込んで酵母 SST 用ベクター pSUC2 を作製した。発現ベクターには、AAH5 プラスミド

(Gammerer, Methods in Enzymol. 101,192-201,1983)由来の発現用プロモーター (ADH プロモーター) およびターミネーター (ADH ターミネーター) が組み込まれ、酵母複製起点としては  $2 \mu$  ori、酵母選択マーカには TRP1、大腸菌複製起点としては ColE1 ori、大腸菌薬剤耐性マーカにはアンピシリン耐性遺伝子がそれぞれ組み込まれている。その SUC2 遺伝子の上流に哺乳類の cDNA を組み込んで、酵母 S S T cDNA ライブラリーを調製した。このライブラリーを分泌型インベルターゼを欠損している酵母に形質転換した。

組み込まれた哺乳類 cDNA がシグナルペプチドをコードしている場合、酵母で発現されたインベルターゼに対しても分泌作用をもつと考えられ、その結果ラフィノース培地上での生育が可能となる。そこで出現したコロニーから酵母を培養してプラスミドを調製し、インサート cDNA の塩基配列を決定することによって、新規シグナルペプチドの検索を迅速かつ容易にした。

酵母 S S T cDNA ライブラリーの作製は、  
工程 (1) : 対象となる細胞より mRNA を単離し、特定の制限酵素 (酵素 I) サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖 cDNA を合成し、  
工程 (2) : 酵素 I とは異なる特定の制限酵素 (酵素 II) サイトを含むアダプターを連結して、酵素 I で消化した後、適当なサイズで分画し、  
工程 (3) : 酵母発現ベクター内のシグナルペプチドを削除したインベルターゼ遺伝子の上流に得られた cDNA 断片を連結し、形質転換する工程よりなる。

各工程を詳しく説明すると、工程 (1) では、対象となる哺乳類の臓器や細胞株などより、必要により適当な刺激剤で刺激した後、公知の方法 (以下、公知の方法は特に記載がなければ Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) または Current Protocol in Molecular Biology (E.M.Ausubel ら編、John Wiley & Sons, Inc. より発刊) に記載の方法に従って行われる。) に従って mRNA の単

離が行われる。

対象となる組織としては、マウス胎児心臓が挙げられる。ランダムプライマーを用いる二本鎖 cDNA の合成は公知の方法により行われる。

アダプターに連結される制限酵素（酵素 I）サイトと次の工程（2）で用  
5 いられる制限酵素（酵素 II）サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素 I として XhoI、酵素 II としては EcoRI が用いられる。

工程（2）では T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素 II アダプ  
ターを連結した後、酵素 I で消化し、アガロース電気泳動（AGE）により  
10 300～800 bp の cDNA を分画する。酵素 I は、前記したように酵  
素 I と異なるものなら何でもよい。

工程（3）は、酵母発現用プラスミドベクターに連結されたシグナルペプ  
チドを削除したインベルターゼの遺伝子上流に（2）で得られた cDNA  
断片を組み込んで大腸菌に形質転換する工程である。ここで酵母発現用プラ  
15 スミドベクターとしては、種々のものが知られているが、例えば、大腸菌内  
でも機能する YEp24 などが用いられるが、好適には前述したプラスミド  
pSUC2 が用いられる。

形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、好ま  
しくは DH10B のコンピテントセルである。また形質転換方法は公知の方  
20 法のいずれを用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法により  
行われる。形質転換体は公知の方法により培養され、酵母 SST 用の cDNA  
ライブラリーが得られる。

この cDNA ライブラリーでは、すべてのクローン cDNA 断片が導入さ  
れているわけではないし、またすべてが未知の（新規の）シグナルペプチド  
25 をコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未  
知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要が

ある。

5 遺伝子をもたない酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (例えば YT455 株など) またはインペルターゼ遺伝子を人為的に欠損させた株 (公知の方法に従い作製可能) に、該 cDNA ライブラリーを導入し、シグナルペプチドをコードする配列を有する断片のスクリーニングを行なう。酵母の形質転換は公知の方法、例えば酢酸リチウム法によって行われる。形質転換体を選択培地で生育後、ラフィノースを炭素源とする培地に移し、生育可能なコロニーを選択し、プラスミドを回収する。ラフィノースを炭素源として酵母が生育したということは、ライブラリー中に何らかの分泌蛋白質のシグナルペプチドが組み込まれていたことを示している。

次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、未知の蛋白質をコードすることが明らかになった cDNA については、それをプローブとして全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。これらの操作は、当業者にとってすべて公知の方法で行われる。

15 配列番号 1、5 または 9 で示される塩基配列が、一部、好ましくは全てが確定されると哺乳類に存在する本発明の蛋白質をコードする cDNA もしくは本発明蛋白質のホモログおよびサブセットをコードする cDNA を得ることができる。適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳類由来の cDNA ライブラリーあるいは mRNA から PCR  
20 法により、あるいは適当な塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、他の哺乳類 cDNA ライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、他の哺乳類型の当該蛋白質をコードする cDNA を得ることができる。

このようにして得られた cDNA が、SST で得られた cDNA 断片の塩  
25 基配列 (またはその相同配列) を含んでいるならばシグナルペプチドをコードしていることになるので、該 cDNA が全長、またはほぼ全長であること

は明らかである。

(シグナルペプチドは例外なく蛋白質のN末端に存在することから、cDNAのオープンリーディングフレームの5'末端にコードされている。)

さらに公知の方法に従い、該cDNAをプローブとしてノザン(Northern)解析によって全長の確認をしてもよい。ハイブリダイズしたバンドから得られるmRNAのサイズと該cDNAのサイズを比較し、ほぼ同じであれば該cDNAはほぼ全長であると考えられる。

本発明は、開示されたタンパクの全長型並びに成熟型の両方を提供する。それらのタンパクの全長型は、配列番号4、8または12で示される塩基配列の翻訳されるアミノ酸配列で同定される。それらの成熟タンパクは、適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で開示された配列番号1、5または9で示される全長DNAを適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で発現させることによって得られる。成熟型のタンパクの配列は、全長型のアミノ酸配列より予測可能である。

配列番号1、2、5、6、9または10で示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、これをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のcDNAを得ることができる。さらに、本cDNAを含有するベクターcDNAを適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とするcDNAを必要量得ることができる。

本発明のポリペプチドを取得する方法としては、

- (1) 生体または培養細胞から精製単離する方法、
- (2) ペプチド合成する方法、または
- (3) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的には(3)に記載した方法が好ましい。

遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系(宿主

ーベクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟蛋白部分をコードするcDNAの5'末端に開始コドン(ATG)を付加し、得られたcDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λPLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド(例えば、pelBのシグナルペプチド)を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号1、2、5、6、9または10で示される塩基配列を適当なベクター(例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞(例えば、サルCOS-1細胞、COS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、分泌蛋白である本発明の蛋白は、その細胞上清中に目的とするポリペプチドとして発現される。さらに、その他のポリペプチド、例えば抗体の定常領域(Fc portion)をコードするcDNA断片と連結することによって、フュージョン・プロテイン(fusion protein)を生



産することもできる。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

#### 産業上の利用可能性

- 5 本発明のポリペプチドおよびそれをコードする cDNA は、一つあるいはそれ以上の効果あるいは生物活性（以下に列挙するアッセイに関連するものを含む。）を示すことが考えられる。

本発明の蛋白に関して記述される効果あるいは生物活性は、その蛋白の投与あるいは使用により、あるいは、その蛋白をコードする cDNA の投与あるいは使用（例えば、遺伝子療法（再生医療を含む。）や cDNA 導入に適したベクター）により提供される。

- 10 本発明のポリペプチドが、脳の一部のニューロン（海馬神経初代培養細胞および海馬由来幹細胞）の生存維持活性を有していることから、神経変性に関わる疾患（脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷）の治療
- 15 に有用である。

- また、該ポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行え、これによって該ポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。
- 20 ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は該ポリペプチドあるいはその断片を抗原として用いて公知の方法により作製することができる。

また、該ポリペプチドを用いることにより、例えば、アフィニティーカラムを作製して、本ポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白（リガンド）の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行うことができる。

- また、該ポリペプチドを用いて、例えば、ウエスト-ウエスタン法により、
- 25 または該 cDNA（好ましくは該ポリペプチドをコードする cDNA）を用いて、例えば、酵母 Two-Hybrid 法により該ポリペプチドと相互作用する分子

の同定、遺伝子クローニングを行うこともできる。

さらに、本ポリペプチドを用いることによって、本ポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体—シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行うこともできる。

5     スクリーニングは、例えば、以下の方法により行なうことが出来る。すなわち、

(a) 本発明のポリペプチド、スクリーニングすべき化合物、及び細胞を含む反応混合物を、細胞が該ペプチドにより正常に刺激される条件下と一緒にし（該反応混合物は細胞が増殖するに従い細胞中に導入される標識および該  
10     ペプチドの機能を効果的に観察させるための該ペプチド以外のペプチドを含む）；ついで、

(b) 細胞の増殖の程度を測定して、該化合物が有効なアンタゴニストまたはアゴニストであるかどうかを決定する。

本発明の cDNA は、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを  
15     生産する際の重要かつ必須の鑄型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療（遺伝子欠損症の治療またはアンチセンス DNA（RNA）によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等）に利用できる。

また、本発明の cDNA をプローブとしてジェノミック（genomic）DNA を分離できる。

20     前記の疾患に適応するために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体は通常、全身的または局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異  
25     なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、100  $\mu$ g から 100 mg の範囲で、一日一回から数回経口投与されるかまたは、成人一人あたり、一回

につき、10  $\mu$ gから100 mgの範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

もちろん前記したように、投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合も

5 ある。

本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒  
10 剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤（例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）と混合される。  
15 組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、安定化剤（ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（アルギニン、アスパラギン酸等）を含有していてもよい。

錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセル  
20 ロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸  
25 濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤（例えば、精製水、エタノール等）を含んでいてもよい。この様な組成物

は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。

- 5 この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第 2,868,691 号および同第 3,095,355 号明細書に詳しく記載されている。
- 10 本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（登録商標）等が挙げられる。

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（例えば、アルギニン、アスパラギン酸等）のような補助剤を含んでいてもよい。

20

#### 図面の簡単な説明

第1図（A）はヒト、マウスおよびラット SDNSF のアミノ酸配列の相同性アライメントを示し、（B）はシグナルペプチドの下流に2つの EF ハンドモチーフ（カルシウム結合モチーフ）を有することを示す。

- 25 第2図は、SDNSF の EF ハンドモチーフがカルシウム分泌蛋白であるカルモデュリン（calmodulin）の EF ハンドモチーフと共通の配列を有してい

ることを示す。

第3図は、培養上清中にSDNSF合成蛋白が分泌されていることを抗SDNSF抗体および抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロット (Western Blot) 法により確認した様子を示す。

- 5 第4図は、ゲル精製を行った、 $^{32}\text{P}$ ラベルcDNAフラグメントをプローブとして、検出を行った様子を示す。

第5図は、神経初代培養細胞 (Primary neuron)、神経膠星状細胞 (astrocyte)、神経幹細胞 (胎児神経幹細胞 (embryo NSC)、未分化成人神経幹細胞 (adult NSC undiff)、分化成人神経幹細胞 (adult NSC diff))、ラットグリオーマ細胞 C6、マウス神経芽細胞 N18、ヒト神経膠芽種細胞 UG251 でのSDNSF mRNAの発現を示す。

第6図は、初代神経膠星状細胞 (primary astrocyte)、神経初代培養細胞 (Primary neuron)、成人神経幹細胞 (adult NSC)、マウス神経芽細胞 N18、ヒト神経膠芽種細胞 UG251 でのSDNSFタンパク質の発現を示す。

- 15 第7図 (A) (B) は、神経初代細胞 (hippocampal neuron) および神経幹細胞 (neuron stem cells) におけるSDNSF添加による細胞生存活性に対する効果を示す。

第8図は、SDNSFの添加が、濃度依存的に神経初代細胞の生存活性に有効であることを示す (\*は、SDNSF非添加群に対する統計的有意差 ( $P < 0.01$ ) を示す。 ) 。

第9図は、FGF-2非存在下で培養した神経幹細胞の生存活性に対するSDNSFの効果を示す (\*は、無添加群 (Ctrl) に対する統計的有意差 ( $P < 0.01$ ) を示す。 ) 。

- 25 第10図は、FGF-2非存在下で培養した神経幹細胞のニューロスフェア (神経細胞塊) を計数することによる神経幹細胞の自己再生能に対するSDNSFの効果を示す (\*は、無添加群 (Ctrl) に対する統計的有意差 ( $P < 0.01$ ) を示す。 ) 。

第11図は、FGF-2非存在下で培養した神経幹細胞のニューロスフェア（神経細胞塊）の神経細胞への分化能に対するSDNSFの効果を示す（\*は、SDNSF添加群、FGF-2添加群および無添加群（Ctrl）間それぞれの統計的有意差（ $P < 0.01$ ）を示す。）。

5

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明のSDNSFに関する実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

10 実施例1：poly(A)<sup>+</sup>RNAの調製

成体ラット海馬由来神経幹細胞をクローン化したPZ5細胞より TRIzol reagent（商品名、Life Technologies, Incより購入）を用いて全RNAを抽出し、OligotexdT30<Super>（商品名、Rocheより購入）を用いてpoly(A)<sup>+</sup>RNAを精製した。

15

実施例2：酵母SST cDNAライブラリーの作製

上記poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型にXhoI部位を連結した9mer  
5'-TCC CGA TTG AAT TCT AGA CCT GCC TCG AGN NNN NNN NN-3'

（配列番号13）

20 をプライマーとして、Super Script Choice System（商品名、Life Technologies, Incより購入）を用いて2本鎖cDNAの合成を行った。EcoRIアダプター（GIBCOERLより購入）をDNA ligation kit Ver.2（商品名、宝酒造（株）より購入。以後、cDNAの連結はすべて本キットを使用した。）を用いて連結した後、XhoIで消化し、アガロース電気泳動で400～800bpのcDNA  
25 Aを切り出して分画し、pSuc2t7lori（米国特許5,536,637号参照）のEcoRI/XhoI部位に連結し、大腸菌DH10株にエレクトロポレーション法で形質転換して酵

母 S S T 用の c D N A ライブラリーを得た。

実施例 3 : S S T によるスクリーニングおよび S S T 陽性クローンの塩基配列の決定

- 5 この c D N A ライブラリーのプラスミドを調製し、酢酸リチウム法 (Current Protocols In Molecular Biology 13.7.1 を参照) により酵母 YTK12 株を形質転換し、トリプトファン (Trp) 不含の酵母形質転換体の選択培地 (CMO-Trp 培地) のプレート上にまいた。30°C で 48 時間インキュベートした後、Accutran Replica Plater (商品名、Schleicher & Schuell より購入) を用いて得られたコロニー (形質転換体) のレプリカををラフィノースを炭素源とする Y R P プレートにとり、30°C で 14 日間インキュベートした。

- 3 日目以降、出現してきた各々のコロニーを一つずつ再度 Y P R プレートにストリークして、30°C で 48 時間インキュベーション後、シングルコロニーを Y P D 培地に植菌し、さらに、30°C で 48 時間インキュベーション
- 15 した後、プラスミドを調製した。続いて、pSUC2 のクローニングサイトの両端の配列の 2 種類のプライマー (センス鎖はビオチン化プライマー) を用いて公知の方法に従って P C R を行い、インサート c D N A を増幅した後、Dynabeads (商品名、DYNAL より購入) を用いてビオチン化 1 本鎖 c D N A を精製し、塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は DNA Sequencing kit
- 20 (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) (商品名、Applied Biosystems Inc. より購入) を用いた蛍光ダイターミネーターサイクルシーケンス法で反応を行い、自動 D N A シークエンサー 373 (Applied Biosystems Inc.) で読み取りを行った (以下の塩基配列決定もすべて本方法で行った)。

- 得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列についてデータベースと
- 25 の相同性検索を行い、S D N S F と名付けられたクローンがデータベースに登録されていない新規の c D N A であることが明らかとなった。そこで、こ

のSDNSFクローンの断片cDNA（以後、SDNSF SST断片cDNAと呼ぶ）について全長cDNAのクローニングを試みた。また、推定されるアミノ酸配列を既知のシグナルペプチドと比較することによりSDNSF SST断片cDNAが機能的かつ構造的にもシグナルペプチドを有することを確認した。

5

#### 実施例4：全長cDNAのクローニングおよび塩基配列の決定

PZ5 cDNAライブラリーより得られた100万プラークをナイロンメンブレンにトランスファーした。<sup>32</sup>P標識したラットSDNSF SST断片cDNAをプローブとして、公知の方法に従いハイブリダイゼーションを行い、多数の陽性クローンを得た。その中の1クローンを単離して、大腸菌DH5αに形質転換してプラスミドを調製した。初めに5'側の塩基配列を決定してラットSDNSF SST断片cDNAの塩基配列が存在することを確認した後、全塩基配列を決定し、配列番号1に示す配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号2に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号15 4に示す推定アミノ酸配列を得た。

NCBIデータベース検索の結果、本発明のポリペプチド（ラットSDNSFポリペプチドと呼ぶ）およびコードする核酸配列と一致する配列はなかった。さらに、ラットSDNSFポリペプチドは膜貫通領域を持たないことも明らかとなり、本発明のラットSDNSFポリペプチドは新規の分泌蛋白質であることが判明した。20

モチーフ検索の結果から、SDNSFはシグナルペプチドと下流に2つのEFハンドモチーフ（カルシウム結合モチーフ）を有することが判明した（第1図）。EFハンドモチーフはカルシウム分泌蛋白質であるcalmodulinのEFハンドモチーフと共通の配列を有している（第2図）。EFハンドモチーフは分泌蛋白質ではあまりみられない構造ではあるが、同様の構造を有する蛋白質としてはBM-40とその関連蛋白質が報告されている。BM-40においてはEFハ25



ンドモチーフが分泌小胞内のカルシウム濃度に応じて蛋白質高次構造の変化に寄与し、分泌効率に関与しているのではないかとされている（文献1：Busch E et.al., Calcium affinity cooperativity and domain interaction of extracellular EF-hands present in BM-40., J. Biol. Chem. , 275(33), 25508-15(2000)）。

5

#### 実施例5：ヒトおよびマウスSDNSF遺伝子の塩基配列の決定

他の哺乳類のESTsおよびUNIGENE DNAデータベースの相同性検索の結果、本発明者らはラットSDNSFと相同するヒトおよびマウス EST 配列を見出した。

- 10     そこで、本発明者らは、その配列情報を用いて、常法によりヒトおよびマウスSDNSFの全長遺伝子を単離し、全塩基配列を決定した。その結果、配列番号5および9に示す塩基配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号8および12に示す推定アミノ酸配列を得た。以上のことから、該ヒトクローンおよびマウスクローンは全長であること、お
- 15     よびラットSDNSFに対してアミノ酸レベルで、それぞれ87%、90%一致していることが判明した。

- このヒトSDNSFおよびマウスSDNSFについても核酸配列データベースおよびアミノ酸配列データベースを検索したが、ラットSDNSFと同様に一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドも、新
- 20     規の分泌蛋白質であることが判明した。

#### 実施例6：哺乳類以外の動物との相同性検索

- 線虫、およびショウジョウバエの遺伝子データベース検索の結果から線虫の仮想的な蛋白質として報告されているF55A11.1あるいはショウジョウバエ
- 25     の遺伝子産物として報告されているCG12817と20-30%のアミノ酸が一致する相同性を有することが確認された。このことから、種間の保存が保た

れていると考えられた。

#### 実施例 7 : 抗SDNSF 蛋白ポリクローナル抗体の作製

固相法により合成し、キーホール リムペット ヘモシアニン (Keyhole limpet  
5 hemocyanin ; KLH) コンジュゲートした 3 種類のラットSDNSFポリペプチ  
ドの部分ペプチド

Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Cys-KLH

(配列番号 4 の 15 ~ 30)

His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Val Pro Pro Met Ser Glu Asp Glu Cys-KLH

10

(配列番号 4 の 74 ~ 89)

KLH-Cys Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser Leu Gln

(配列番号 4 の 106 ~ 119)

を免疫原としてウサギに免疫して、抗体価の測定後血清を採取した。得られ  
た血清を各々免疫原としたペプチド断片を結合させたアフィニティーカラム  
15 により抗SDNSF 蛋白ポリクローナル抗体を精製した。

#### 実施例 8 : SDNSF の分泌経路の検討

ラットSDNSF のアミノ基末端に FLAG 構造を付加したSDNSF 合成  
蛋白 (FLAG-SDNSF) およびカルボキシル基末端に FLAG-6His 構造を付加し  
20 たSDNSF 合成蛋白 (SDNSF-C'FLAG-6His) を 293T 細胞に強制発現させた。  
それぞれの培養上清中にSDNSF 合成蛋白が分泌されていることを抗SD  
NSF 抗体および抗FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット (Western Blot)  
法により確認した (第3図)。

#### 25 実施例 9 : ラットSDNSF の発現部位の同定

成体ラット脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、骨格筋、胸腺の組織

より TRIzol reagent (商品名、Life Technologies, Inc より購入) を用いて全 RNA を抽出し、OligotexdT30<Super> (商品名、Roche より購入) を用いて poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製した。

それぞれの poly(A)<sup>+</sup> RNA をホルムアルデヒドゲル電気泳動し、(Sambrook, et.al., 1989[Molecular Cloning]) の方法に従い、ブロットニングを行った。ゲル精製を行った、<sup>32</sup>P ラベル cDNA フラグメントをプローブとして、検出を行ったところ、第 4 図に示すように全ての臓器で発現が認められた。

ラット胎児の全身および脳、出生後 7 日までの脳の組織および神経系の初代培養細胞および細胞株より TRIzol reagent (商品名、Life Technologies, Inc より購入) を用いて全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA の発現量を調べた。第 5 図に示すように、培養幹細胞、神経初代培養細胞、神経幹細胞に SDNSF の発現が認められた。また、ヒト神経膠芽種細胞 UG251 およびマウス神経芽細胞 N18 では SDNSF の発現を認めたが、グリア初代培養細胞およびラットグリオーマ細胞 C6 では発現を認めなかった。また、ウェスタンブロット (Western Blot) 法によって、ヒト神経膠芽種細胞 UG251 およびマウス神経芽細胞 N18 で SDNSF タンパク質の発現が確認された (第 6 図)。

#### 実施例 10 : SDNSF の神経細胞および幹細胞生存支持活性の測定

SDNSF の発現部位より、神経細胞および幹細胞に対する機能を調べた。His 構造を利用し Ni-NTA 法により精製した合成 SDNSF 蛋白 (SDNSF-FLAG-6His) をラット海馬神経初代培養細胞およびラット海馬由来幹細胞の培養上清に加えて、それぞれの培養条件下における培養 4 日目の生存細胞数を WST reduction 法を用いて検討したところ、第 7 図に示すように神経初代細胞においては SDNSF 100 ng/ml の濃度において無添加群と比較して細胞生存に有効であった。また、神経幹細胞においても SDNSF 添加群に

において無添加群と比較して生存細胞数が多い傾向が認められた。また、FGF-2（線維芽細胞増殖因子2）を除いた培地でのラット海馬由来幹細胞の5日目での生存活性は、SDNSF添加濃度に依存して増強した（第8図および第9図）。

5

実施例11：SDNSFの神経幹細胞の自己再生および分化に対する効果の測定

ラット海馬由来幹細胞をSDNSF存在/FGF-2欠如培地で5日間培養後、さらに、非コート培養ディッシュ中にてFGF-2（20ng/ml）  
10 添加培地で6日間培養した後の神経幹細胞のニューロスフェア（神経細胞塊）を計数した。また、神経細胞の分化マーカーであるTuj-1陽性細胞を計測した。第10図および第11図に示すように、SDNSF添加神経幹細胞は、無添加群（Ctrl）と比較して有意なニューロスフェアの増加を呈した。さらに、そのうちの分化した神経細胞の割合は、無添加群（Ctrl）と比較して有意な増加  
15 を示した。これらの結果から、SDNSFは、FGF-2と同様に神経幹細胞の自己再生能を維持し、神経細胞やグリア細胞への分化を促進する活性を有すると考えられる。

## 請求の範囲

1. 実質的に純粋な形である配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはその  
5 フラグメントのホモログ。
2. 配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなる請求の範囲第 1 項記載のポリペプチド。
- 10 3. 請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドをコードする cDNA。  
A。
4. 配列番号 1、2、5、6、9 または 10 で示される塩基配列を有する請求の範囲第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズ  
15 するフラグメント。
5. 請求の範囲第 3 項または第 4 項記載の cDNA からなる複製または発現ベクター。
- 20 6. 請求の範囲第 5 項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。
7. 請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドを発現させるための条件下で請求の範囲第 6 項記載の宿主細胞を培養することを特徴とする該ポリ  
25 リペプチドの製造方法。
8. 請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドに対するポリクロー

ナルまたはモノクローナル抗体。

9. 請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドまたは請求の範囲第8項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有  
5 することを特徴とする薬学的組成物。

10. 請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドまたは請求の範囲第8項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有  
10 することを特徴とする神経変性が係わる疾患の治療に有効な薬学的組成物。

11. 神経変性が係わる疾患が中枢神経の損傷である請求の範囲第10項記載の薬学的組成物。

12. 請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドの測定方法。

15

13. 請求の範囲第8項記載の抗体を用いることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドの免疫化学的測定方法。

14. 請求の範囲第12項または第13項記載の方法を用いることを特徴と  
20 する請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドを検出する試薬。

15. 請求の範囲第12項または第13項記載の方法を用いることを特徴とする腫瘍を検査する試薬。

25 16. 腫瘍が脳腫瘍である請求の範囲第14項記載の試薬。

17. 請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドを用いることを特

徴とする該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

- 1 8. 請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドを有効成分とする  
5 中枢神経損傷治療剤。
- 1 9. 中枢神経損傷が脳梗塞による中枢神経損傷である請求の範囲第 1 9 項  
記載の試薬。
- 10 2 0. 中枢神経損傷が脳出血による中枢神経損傷である請求の範囲第 1 9 項  
記載の試薬。
- 2 1. 中枢神経損傷が脊髄損傷による中枢神経損傷である請求の範囲第 1 9  
項記載の試薬。

第1図

(A)

rSDNSF	1	MASLQLLRGPFLLCVLLWAFGV-----PGARAQE-----HGA	31
mSDNSF	1	MATLQLLRAPLLCVLLWVPCA-----PGARAH-----HGA	31
hSDNSF	1	MTMRSLLRTPFLCGLLWAFCA-----PGARAE-----PAA	31
NP_505967	1	MAANTLVVS---CLILGSAHQPPQFFGSNQQQPQQGGQAEQA	40
CG12817	1	MCNLSNLLNFIIICIASFSQNF-----DATLAVK-----RGP	31
rSDNSF	32	GVHH-GSVGLDKSTVHDDQEHIMEHLEGVINQ-PEAEMSPQELQ	72
mSDNSF	32	DVHH-GSVGLDKSTVHDDQEHIMEHLEGVLDQ-PEAEMSPQELQ	72
hSDNSF	32	SFSQPGSMGLDKNTVHDDQEHIMEHLEGVINK-PEAEMSPQELQ	73
NP_505967	41	QHAQPQQQFGGGEQARDEHHIKEHLDGKVD-PTANMTPEQLQ	81
CG12817	32	HHPRGETRRVDDHLTHHEHRIDDDLKDMGVQANLDDLSEEEKI	74
EF hand 1			
rSDNSF	73	LHYFKMHDYDGNLSLLDGLLELSTAITHVHKEE-G-----	104
mSDNSF	73	LHYFKMHDYDGNLSLLDGLLELSTAITHVHKEE-G-----	104
hSDNSF	74	LHYFKMHDYDGNLNLDDGLLELSTAITHVHKEE-G-----	105
NP_505967	82	FHYFNMHDLKNGKLDGVELIKAITHFHAENPGFQHTQNNANA	124
CG12817	75	FYMEKAHNDNNNALDGLEMIQSAMHNYDYFK-----N	108
EF hand 2			
rSDNSF	103	SEQ-----VPPMSEDE-LTSLIDGVLRDDDKNNDGYIDYAEFA	141
mSDNSF	103	SEQ-----APVMSEDE-LVSLIDGVLRDDDKNNDGYIDYAEFA	141
hSDNSF	104	SEQ-----APLMSEDE-LINLIDGVLRDDDKNNDGYIDYAEFA	142
NP_505967	125	NHQ-----PPPLPSEVE-LETMIDSLKDDDFNADGFIDYGEFL	162
CG12817	109	NERDAYL-QNATDELEHFLEALDKFLLIADDNNDGLLHYPERV	150
rSDNSF	142	KSLQ	145
mSDNSF	142	KSLQ	145
hSDNSF	143	KSLQ	146
NP_505967	163	KAQKLREDQARSHQEQMQKAGGTQ	186
CG12817	151	KAITGGKEQPNVDRNLLR	168

(B)

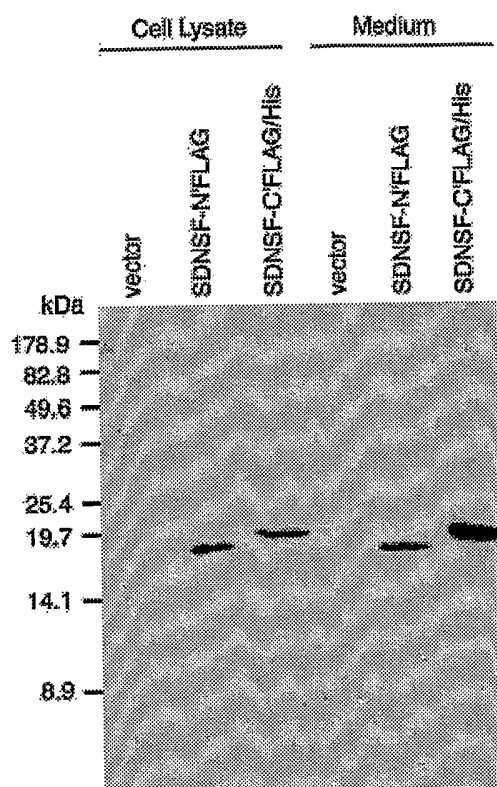


第2図

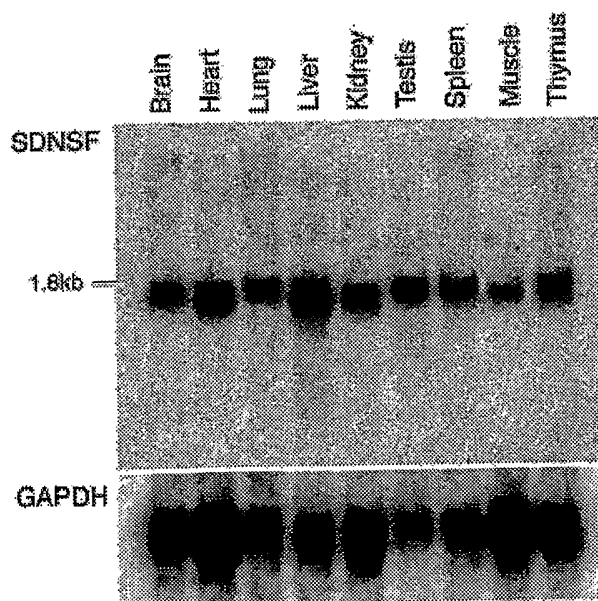
		HELIX      LOOP      HELIX
rSDNSF	1	LQLHYFKMHDYDGNLSLLDGLLELSTAITHV
rSDNSF	2	IIDGVLRDDDKNNDGYIDYAEFAKSLQ*
calmodulin 1		EFKEAFALFDKDGDTITTKELGTVMRSL
calmodulin 2		ELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLSLMARK
calmodulin 3		ELIEAFKVFDRDGNLISAAELRHVMTNL
calmodulin 4		EVDENIREADIDGDGHINYEYFVRMIVAK
consensus EF		DXDGGXIDXXE



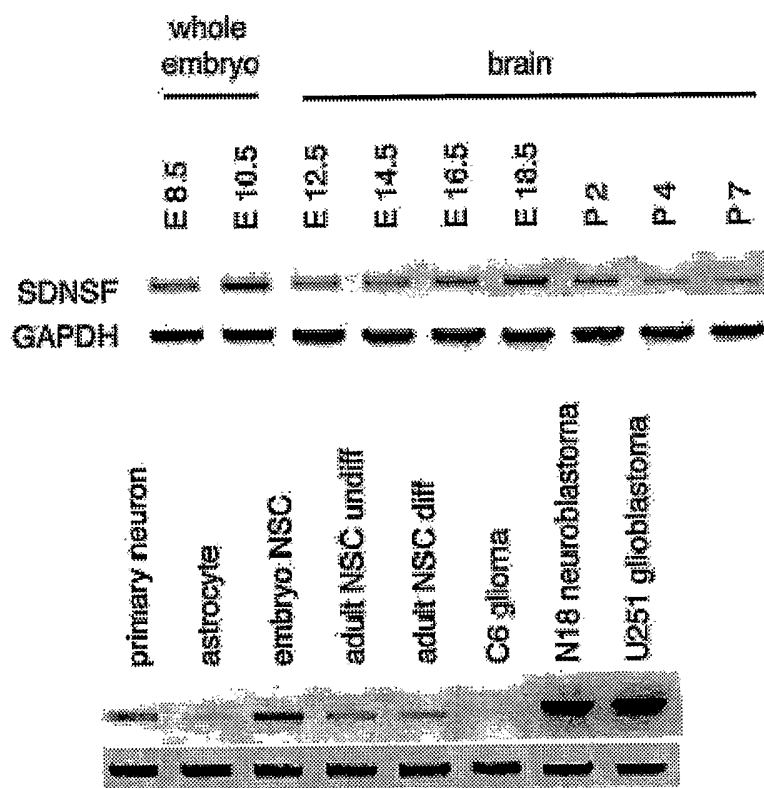
第3図



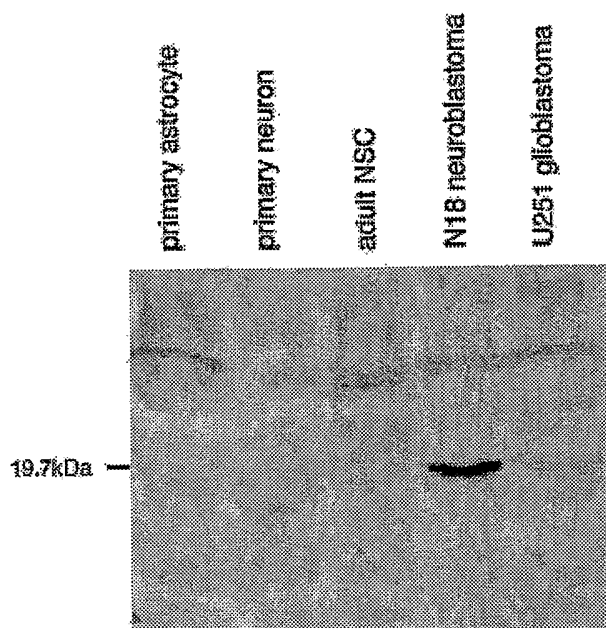
第4図



第5図

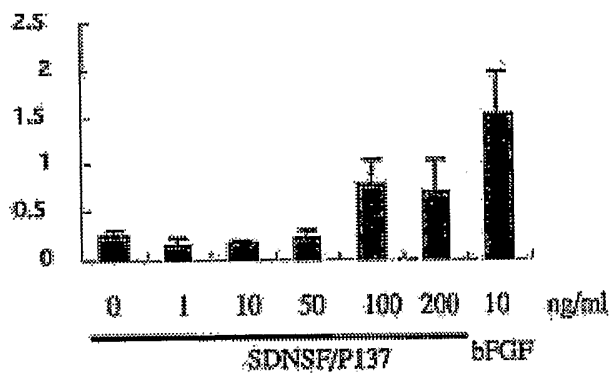


第6図

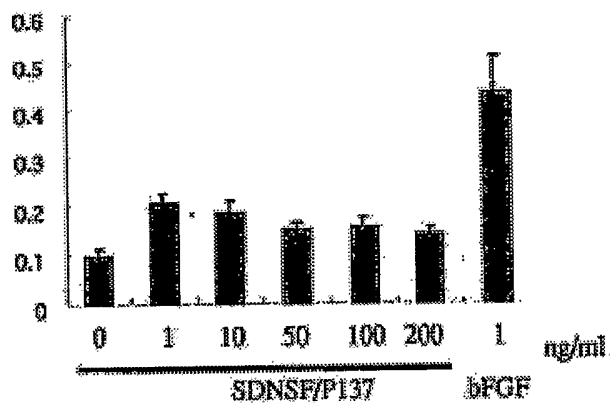


第7図

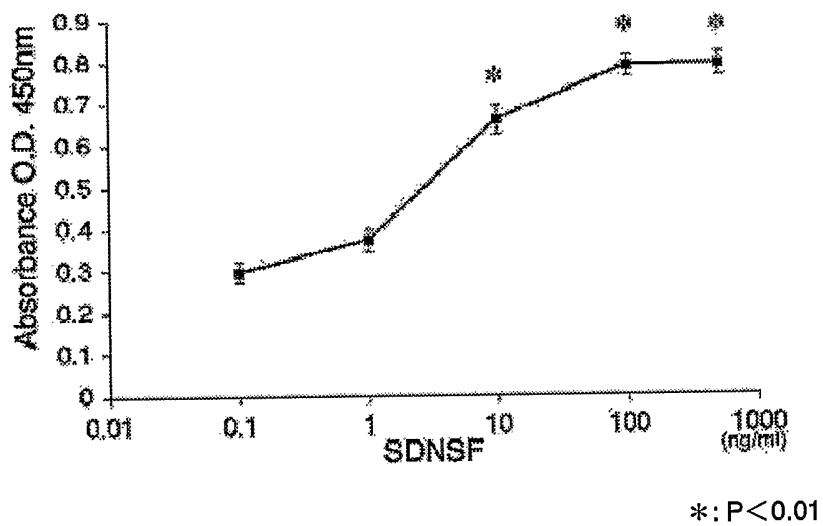
(A) 神経初代細胞



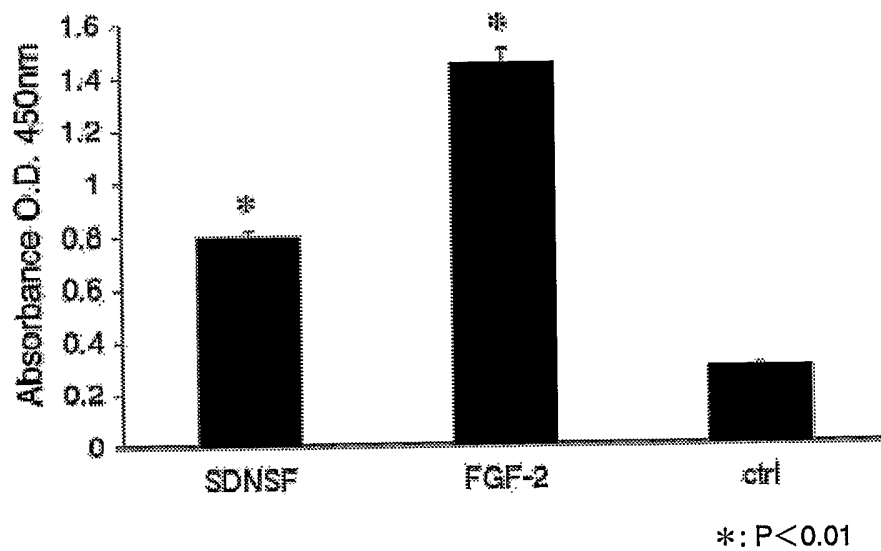
(B) 神経幹細胞



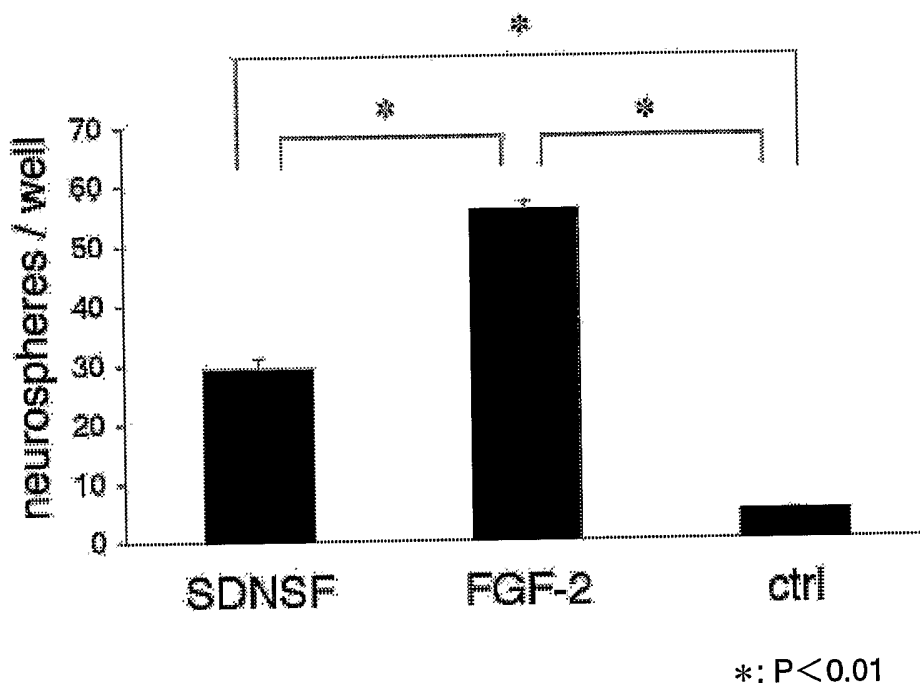
第8図



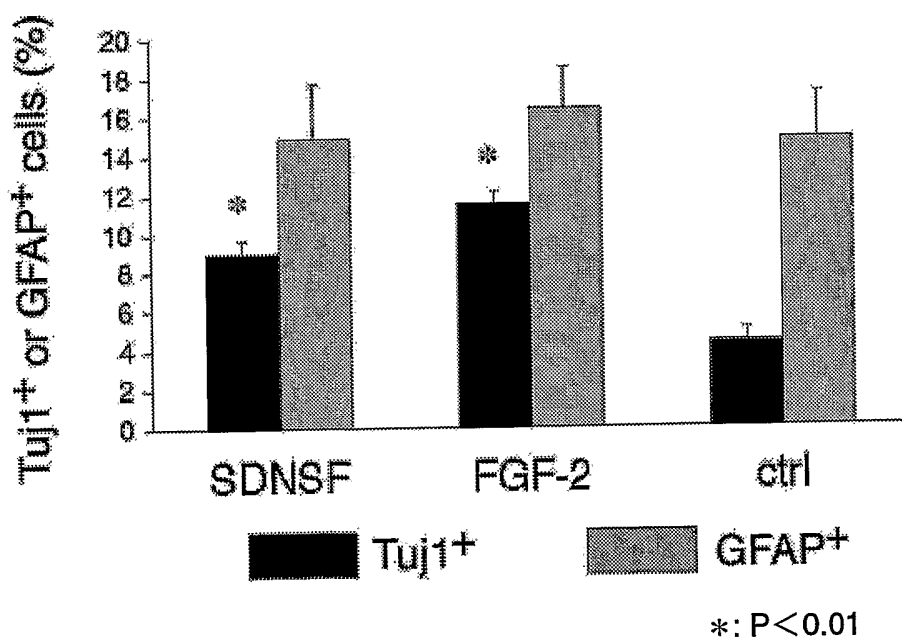
第9図



第 1 0 図



第 1 1 図



## SEQUENCE LISTING

<110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

HONJO Tasuku

<120> Stem cell Derived-Neuron Survival Factor of the Human and Mammal

<130> ONF-4356PCT

<150> JP2001-325189

<151> 2001-10-23

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 1

```

gcgtcagggg gacgcagctg gcaaggttca tccacaagtg cttegcgact gcgtcagggg 60
ttatcagggt actggaagca tggcatccct gcagctgctc agaggtccct tcctgtgtgt 120
tctgctctgg gccttttgtg ttcttggtgc cagggccag gagcatgggg ctgggttcca 180
ccatggcagc gtgggcctgg acaagagcac agtgcacgac caagagcaca ttatggaaca 240
tctggaaggt gtcataacc agccagaggc ggagatgtcc ccacaggaac tacagctcca 300
ttatttcaaa atgcatgatt acgatggcaa cagtttgctt gatggcttag agctctcgac 360
ggccatcact cacgtgcaca aggaggagg gagtgagcag gtcccacca tgagcgagga 420
cgagctcatc agcatcatag acggtgtcct gagagacgac gacaagaaca atgacggcta 480
catcgactat gcagagtttg ccaagtcgct gcagtaggcg gcaggccctt tcctgtatgc 540
acacgtgacc cttgctaata tgatggacat tctggtaata agaagcagct tatttctgtc 600
tactgctgca gcgctggtaa agcctgtggc agtctgttag actgggtag gaggaagcca 660
caaggaatac ggagagaagt ggggcagtgt caatgtgtgt ttaaacctgt tggacaagag 720
ctcgaacctt ccgaagggtg gtggggtatc tcaagctccc gggaacctga ctctagatgc 780
cactctaact tcttgatggt atttcatgct acctgaaaag taaagacagt ctgctttgcc 840
aagtggagac ttcagtgacg gtggaggag agccaaaagc cgcgtatctt ccagttggg 900
tcctgctctg ggcagatgtg gtcagtatgc tgttccccag gcatacagca tcacgtccta 960

```

aagccacagc aggagaagaa tgtcaccac ggagtccacc agacacagag tgaagactcc 1020  
ttaccactg gcattttgga agcgaagcac cactggcctg aatacttagc cttttcagat 1080  
cttcagtttc cttcacaact actgccacac cctgtgctct gtcatttcag cccgagagaa 1140  
accttgaatt ggggtgtgctc tccgctcacc accaccgtt tgagctccct gaccttgtgt 1200  
tttatccttg ctcccagggc tcccttcttg gcttatgaac tattaacttg gtatcgcagg 1260  
tttaactgt cagctgctct agcctaagtc agaccagaaa agatcagtca ttaagggtgg 1320  
tggetaacct tatccaagtt ttgaaggaat gtttttaaaa ttacctcttt gaccctgaat 1380  
atgataatte ttttaatttc agggaagaac agaaaaggaa gagcagtagt agctgaaaga 1440  
gaaacagcca taggtcgtac tttgcgttgt gaaacgtcat agacttactg taaacgaatc 1500  
cagaatgatg gtgggatcag aaaaagaaac tgaatcaaat ttgctttacg atgtatagag 1560  
acttattttc tttattaag tattcttgta agaaaactta cgtatttgta aaacagtttt 1620  
ctgtgtcaag tttttgtgca atcggagctg acttgtaaac tattcttgta agatctcatt 1680  
attttgaaag atttatataa tgaactctga ctatctgaca ataaaatgga tgaaaaagta 1740  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1771

<210> 2

<211> 435

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 2

atggcatccc tgcagctgct cagaggtccc ttctgtgtg ttctgctctg ggccttttgt 60  
gttcttggtg ccagggccca ggagcatggg gctggtgtcc accatggcag cgtgggcctg 120  
gacaagagca cagtgcacga ccaagagcac attatggaac atctggaagg tgtcatcaac 180  
cagccagagg cggagatgtc cccacaggaa ctacagctcc attatttcaa aatgcatgat 240  
tacgatggca acagtttget tgatggctta gagctctcga cggccatcac tcacgtgcac 300  
aaggaggagg ggagtgagca ggtcccacc atgagcgagg acgagctcat cagcatcata 360  
gacggtgtcc tgagagacga cgacaagaac aatgacggct acatcgacta tgcagagttt 420  
gccaagtgcg tgcag 435

<210> 3

<211> 1771

<212> DNA  
 <213> Rattus rattus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (80)..(514)  
 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (158)..(514)  
 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (80)..(157)  
 <400> 3

```

gcgtcagggg gacgcagctg gcaaggttca tccacaagtg cttcgcgact gcgtcagggg 60
ttatcagggg actggaage atg gca tcc ctg cag ctg ctc aga ggt ccc ttc 112
                Met Ala Ser Leu Gln Leu Leu Arg Gly Pro Phe
                -25                -20

ctg tgt gtt ctg ctc tgg gcc ttt tgt gtt cct ggt gcc agg gcc cag 160
Leu Cys Val Leu Leu Trp Ala Phe Cys Val Pro Gly Ala Arg Ala Gln
-15                -10                -5                -1 1
gag cat ggg gct ggt gtc cac cat ggc agc gtg ggc ctg gac aag agc 208
Glu His Gly Ala Gly Val His His Gly Ser Val Gly Leu Asp Lys Ser
                5                10                15
aca gtg cac gac caa gag cac att atg gaa cat ctg gaa ggt gtc atc 256
Thr Val His Asp Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile
                20                25                30
aac cag cca gag gcg gag atg tcc cca cag gaa cta cag ctc cat tat 304
Asn Gln Pro Glu Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr
                35                40                45
ttc aaa atg cat gat tac gat ggc aac agt ttg ctt gat ggc tta gag 352
Phe Lys Met His Asp Tyr Asp Gly Asn Ser Leu Leu Asp Gly Leu Glu
                50                55                60                65
    
```



ctc tcg acg gcc atc act cac gtg cac aag gag gag ggg agt gag cag 400  
 Leu Ser Thr Ala Ile Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln  
                   70                                  75                                  80  
 gtc cca ccc atg agc gag gac gag ctc atc agc atc ata gac ggt gtc 448  
 Val Pro Pro Met Ser Glu Asp Glu Leu Ile Ser Ile Ile Asp Gly Val  
                   85                                  90                                  95  
 ctg aga gac gac gac aag aac aat gac ggc tac atc gac tat gca gag 496  
 Leu Arg Asp Asp Asp Lys Asn Asn Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu  
                   100                                  105                                  110  
 ttt gcc aag tcg ctg cag taggcggcag gccctttcct gtatgcacac 544  
 Phe Ala Lys Ser Leu Gln  
                   115  
 gtgacccttg ctaatgtgat ggacattctg gtaatgagaa gcagcttatt tctgtctact 604  
 gctgcagcgc tggtaaagcc tgtggcagtc tgttagactg gggtaggagg aagccacaag 664  
 gaatacggag agaagtgggg cagtgtcaat gtgtgtttaa acctgttga caagagctcg 724  
 aaccttccga aggggtgggg ggtatctcaa gctcccggga acctgactct agatgccact 784  
 ctaacttctt gatgttattt catgctacct gaaaagtaaa gacagtctgc tttgccaagt 844  
 ggagacttca gtgacgggtg agggagagcc aaaagccgcg tatcttccca gttgggtcct 904  
 gctctgggca gatgtggtca gtatgctgtt cccaggcat acagcatcac gtcctaaagc 964  
 cacagcagga gaagaatgac acccacggag tccaccagac acagagtga gactccttac 1024  
 ccactggcat tttggaagcg aagcaccact ggcctgaata cttagccttt tcagatcttc 1084  
 agtttcttc acaactactg ccacacctg tgctctgtca tttcagcccg agagaaacct 1144  
 tgaattgggt gtgctctccg ctcaccacc accgtttgag ctcctgacc ttgtgtttta 1204  
 tccttgetcc cagggetccc ttcttggett atgaactatt aacttggat cgcaggttta 1264  
 aactgtcagc tgctctagcc taagtcagac cagaaaagat cagtcattaa ggggtgtggc 1324  
 taaccttate caagttttga agaatgttt ttaaattac ctctttgagc ctgaatatga 1384  
 taattctttt aatttcaggg aagaacagaa aaggaagagc agtagtagct gaaagagaaa 1444  
 cagccatagg tcgtactttg cgttgtgaaa cgtcatagac ttactgtaaa cgaatccaga 1504  
 atgatggtgg gatcagaaaa agaaactgaa tcaaatttgc tttacgatgt atagagactt 1564  
 attttcttta ttaaagtatt cttgtaagaa aacttacgta tttgtaaaac agttttctgt 1624  
 gtcaagtatt tgtgcaatcg gagctgactt gtaaactatt cttgtaagat ctcattatth 1684

tgaaagattt atataatgaa ctctgactat ctgacaataa aatggatgaa aaagtaaaaa 1744  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1771

<210> 4

<211> 145

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 4

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

<210> 5

<211> 823

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

tggtgaggcc cgaggcgtg gagggcttc cgtctgcttc ggagaccgta aggatattga 60
tgaccatgag atccctgctc agaaccccct tcctgtgtgg cctgctctgg gccttttgtg 120
ccccaggcgc cagggtgag gagcctgcag ccagcttctc ccaaccggc agcatgggcc 180
tggataagaa cacagtgcac gaccaagagc atatcatgga gcatctagaa ggtgtcatca 240
acaaccaga ggcggagatg tcgccacaag aattgcagct ccattacttc aaaatgcatg 300
attatgatgg caataattg cttgatggct tagaactctc cacagccatc actcatgtcc 360
ataaggagga agggagtga caggcaccac taatgagtga agatgaactg attaacataa 420
tagatgggtg tttgagagat gatgacaaga acaatgatgg atacattgac tatgctgaat 480
ttgcaaaatc actgcagtag atgttatttg gccatctcct ggttatatac aaatgtgacc 540
cgtgataatg tgattgaaca ctttagtaat gcaaaataac tcatttccaa ctactgctgc 600
agcattttgg taaaaacctg tagcgattcg ttacactggg gtgagaagag ataagagaaa 660
tgaaagagaa gaaaaatggg acatctaata gtccctaagt gctattaat accttattgg 720
acaaggaaaa acaacaaaaa aaaatattag tctgtattaa tgetgctgat aaagacgtac 780
ccaagactgg gaagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 823

```

<210> 6

<211> 438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

atgaccatga gatccctgct cagaacccc ttctgtgtg gcctgctctg ggccttttgt 60
gccccaggcg ccagggtgga ggagcctgca gccagcttct cccaaccggg cagcatgggc 120
ctggataaga acacagtgca cgaccaagag catatcatgg agcatctaga aggtgtcatc 180
aacaaccag aggcggagat gtcgccaca gaattgcagc tccattactt caaatgcat 240
gattatgatg gcaataattt gcttgatggc ttagaactct ccacagccat cactcatgtc 300
cataaggagg aaggagtga acaggcacca ctaatgagtg aagatgaact gattaacata 360
atagatggtg ttttgagaga tgatgacaag acaatgatg gatacattga ctatgctgaa 420
tttgcaaaat cactgcag 438

```

```

<210> 7
<211> 823
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (60)..(497)
<220>
<221> sig_peptide
<222> (60)..(137)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (138)..(497)
<400> 7
tggtgaggcc cgaggcgttg gaggccttcg cgtctgcttc ggagaccgta aggatattg 59
atg acc atg aga tcc ctg ctc aga acc ccc ttc ctg tgt ggc ctg ctc 107
Met Thr Met Arg Ser Leu Leu Arg Thr Pro Phe Leu Cys Gly Leu Leu
      -25          -20          -15
tgg gcc ttt tgt gcc cca ggc gcc agg gct gag gag cct gca gcc agc 155
Trp Ala Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ser
-10          -5          -1  1          5
ttc tcc caa ccc ggc agc atg ggc ctg gat aag aac aca gtg cac gac 203
Phe Ser Gln Pro Gly Ser Met Gly Leu Asp Lys Asn Thr Val His Asp
          10          15          20
caa gag cat atc atg gag cat cta gaa ggt gtc atc aac aaa cca gag 251
Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile Asn Lys Pro Glu
          25          30          35
gcg gag atg tcg cca caa gaa ttg cag ctc cat tac ttc aaa atg cat 299
Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His
          40          45          50

```

gat tat gat ggc aat aat ttg ctt gat ggc tta gaa ctc tcc aca gcc 347  
 Asp Tyr Asp Gly Asn Asn Leu Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Thr Ala  
 55 60 65 70  
 atc act cat gtc cat aag gag gaa ggg agt gaa cag gca cca cta atg 395  
 Ile Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Leu Met  
 75 80 85  
 agt gaa gat gaa ctg att aac ata ata gat ggt gtt ttg aga gat gat 443  
 Ser Glu Asp Glu Leu Ile Asn Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp  
 90 95 100  
 gac aag aac aat gat gga tac att gac tat gct gaa ttt gca aaa tca 491  
 Asp Lys Asn Asn Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser  
 105 110 115  
 ctg cag tagatgttat ttggccatct cctggttata tacaaatgtg acccgtgata 547  
 Leu Gln  
 120  
 atgtgattga acaactttagt aatgcaaaat aactcatttc caactactgc tgcagcattt 607  
 tggtaaaaac ctgtagcgat tcgttacact ggggtgagaa gagataagag aatgaaaga 667  
 gaagagaaat gggacatcta atagtccecta agtgcetatta aataccttat tggacaagga 727  
 aaaacaacaa aaaaaaatat tagtctgtat taatgctgct gataaagacg tacccaagac 787  
 tgggaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 823

<210> 8

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Thr Met Arg Ser Leu Leu Arg Thr Pro Phe Leu Cys Gly Leu Leu  
 -25 -20 -15  
 Trp Ala Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ser  
 -10 -5 -1 1 5  
 Phe Ser Gln Pro Gly Ser Met Gly Leu Asp Lys Asn Thr Val His Asp

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

<210> 9

<211> 1815

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

```

gtgcggagaa aagcgtccca gggacggcag ctggcaaggt tcacgttgga gtgcttcgcg 60
actgcgtcgg ggattatcgg ggtaccacc cggaagcatg gcaaccctac agctgctcag 120
agctcccttg ctgtgtgtcc tgctttgggt cttttgtgct ccaggtgcca gagcccatga 180
ccatggggct gatgtccatc atggcagcgt gggcctggat aagagcacag tgcacgacca 240
agagcacatc atggaacatc tggaaggtgt catcgaccag ccagaggcgg agatgtcccc 300
acaggaactg cagctccatt acttcaaat gcatgattac gacggcaaca gtttgcttga 360
cggcctagag ctctccatag ccatcactca cgtgcacaag gaggagggga gtgagcaggc 420
gccagtcacg agcgaggatg agctcgtcag catcatagat ggtgtcctga gggacgatga 480
caagaacaat gacggctaca tcgactacgc tgagtttgca aagtcaactgc agtagaccgt 540
tggtcttttc ctttgtgcac atgtgaccct tgctaattgtg atggacgtgt ctggtaatgc 600

```

gaaacaactt atttccgtct actgctcagc actttggtaa gagcctgtgg cagtctgtaa 660  
 gagtggggtg aggaagaagc cacatgactg tggagagaag tgggacagge ctcagtcct 720  
 agaggtgtgt ttaagcttgt tgggcaagag ccgatgagg atcttcggaa gggcgggtgg 780  
 tatcccagat tctcaggaat ccgactgtag aatgccactc tgacttcttg atgttaatcc 840  
 atgtaccta aagtaaagac aggctgcttg gccaaagtga cacacttgag aaacagtgga 900  
 gggagagtgt gaaagccaca cgcttgcctt ggttggtcct gtcttttaggc agatgtggtc 960  
 agtattctgt tccccaggca tacagcatca tatattaaag ccacagcaga agaggaatgt 1020  
 cgccactga gccaccag atgcagagtc taggattcct tgcacttg ccttttgaa 1080  
 atgaagcacc actggcctga ataattagca ttttcagat cttcagtatc ttccacaact 1140  
 actgccatac cctgtgttgt atcatttgac caggaggaa acctgaatt ggggtgtgtt 1200  
 ctetaatcac tttccactgt ctgagcttc ctgaccctg tattgtatcc ttgctcccag 1260  
 ggctcccttc atggcttgtg aactgttaac ttggtatctc aggttaact gtcagctggt 1320  
 ctagcctgag cgaggcctga gaccatcagt cactaagagc agtggttaac ctcacgaag 1380  
 ttggaaggaa tgtttttaa attacctctt cgagcctgaa tacaagaat aaaagaataa 1440  
 aagaattctt ttaatttcag ggaagatcag aaaagaaagc ctaaagccct ttagcgttgt 1500  
 gaacctcagt agtagctgaa agagaagctg ccacaggtg taacttgctct gtgagatgtt 1560  
 gtagacattc cgtaagagaa tccagaatga tagcaggatc aggaaagaaa tggagccaaa 1620  
 tctgctctaa ggtgaataga gacttatttt tctttattaa agtattcttg taagacagtt 1680  
 ttctgtgtca agtatttgtg aaatcagagc tgacatgtaa gctattcttg taatatctca 1740  
 ttattttgaa agatttatat aatgaactct ggctatctga caataaatg gatgaaaaag 1800  
 caaaaaaaaa aaaaa 1815

<210> 10

<211> 435

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

atggcaacce tacagctgct cagagctccc ttgctgtgtg tcttctttg ggtcttttgt 60  
 gctccagggt ccagagccca tgaccatggg gctgatgtcc atcatggcag cgtgggcctg 120  
 gataagagca cagtgcacga ccaagagcac atcatggaac atctggaagg tgtcatcgac 180  
 cagccagagg cggagatgtc cccacaggaa ctgcagctcc attacttcaa aatgcatgat 240

tacgacggca acagtttget tgacggccta gagctctcca tagccatcac tcacgtgcac 300  
 aaggaggagg ggagtgagca ggcgccagtc atgagcgagg atgagctcgt cagcatcata 360  
 gatggtgtcc tgagggacga tgacaagaac aatgacggct acatcgacta cgctgagttt 420  
 gcaaagtcac tgcag 435

<210> 11  
 <211> 1815  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (98)..(532)  
 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (98)..(175)  
 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (176)..(532)  
 <400> 11

gtgcggagaa aagcgtccca gggacggcag ctggcaaggt tcacgttga gtgcttcgag 60  
 actgcgtcgg ggattatcgg ggtaccacc cggaagc atg gca acc cta cag ctg 115  
 Met Ala Thr Leu Gln Leu  
 -25

ctc aga gct ccc ttg ctg tgt gtc ctg ctt tgg gtc ttt tgt gct cca 163  
 Leu Arg Ala Pro Leu Leu Cys Val Leu Leu Trp Val Phe Cys Ala Pro  
 -20 -15 -10 -5

ggt gcc aga gcc cat gac cat ggg gct gat gtc cat cat ggc agc gtg 211  
 Gly Ala Arg Ala His Asp His Gly Ala Asp Val His His Gly Ser Val  
 -1 1 5 10

ggc ctg gat aag agc aca gtg cac gac caa gag cac atc atg gaa cat 259  
 Gly Leu Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln Glu His Ile Met Glu His



15	20	25	
ctg gaa ggt gtc atc gac cag cca gag gcg gag atg tcc cca cag gaa			307
Leu Glu Gly Val Ile Asp Gln Pro Glu Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu			
30	35	40	
ctg cag ctc cat tac ttc aaa atg cat gat tac gac ggc aac agt ttg			355
Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His Asp Tyr Asp Gly Asn Ser Leu			
45	50	55	60
ctt gac ggc cta gag ctc tcc ata gcc atc act cac gtg cac aag gag			403
Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Ile Ala Ile Thr His Val His Lys Glu			
	65	70	75
gag ggg agt gag cag gcg cca gtc atg agc gag gat gag ctc gtc agc			451
Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Val Met Ser Glu Asp Glu Leu Val Ser			
	80	85	90
atc ata gat ggt gtc ctg agg gac gat gac aag aac aat gac ggc tac			499
Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp Asp Lys Asn Asn Asp Gly Tyr			
	95	100	105
atc gac tac gct gag ttt gca aag tca ctg cag tagaccgttg gctctttcct			552
Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser Leu Gln			
110	115		
ttgtgcaat gtgacccttg ctaatgtgat ggacgtgtct ggtaatgca aacaacttat			612
ttccgtctac tgctcagcac tttggtaaga gcctgtggca gtctgtaaga gtggggtag			672
gaagaagcca catgactgtg gagagaagtg ggacaggcct cagtccctag aggtgtgttt			732
aagcttgttg ggcaagagcc ggatgaggat cttegggaagg gcggtgggta tcccgagttc			792
tcaggaatcc gactgtagaa tgccactctg acttcttgat gttaatccat gctacctaaa			852
gtaaagacag gctgcttggc caagtggaca cacttgagaa acagtggagg gagagtgtga			912
aagccacacg cttgccttg ttggtcctgt ctttaggcag atgtggtcag tattctgttc			972
cccaggcata cagcatcata tattaaagcc acagcagaag aggaatgtcg cccactgagg			1032
ccaccagat gcagagtota ggattccttg cccactggcc ttttgaaat gaagcaccac			1092
tggcctgaat aattagcatt ttccagatct tcagtatctt ccacaactac tgceataccc			1152
tgtgttgtat catttgacca ggagggaaac cttgaattgg ggtgtgttct ctaatcaact			1212
tccactgtct gagctttcct gaccctgta ttgtatcctt gctcccagg ctcccttcat			1272

ggcttgtgaa ctgttaactt ggtatctcag gttaaactgt cagctggtct agcctgagcg 1332  
 aggcctgaga ccatcagtca ctaagagcag tggctaacct catcgaagtt ggaaggaatg 1392  
 tttttaaaat tacctcttcg agcctgaata caaagaataa aagaataaaa gaattctttt 1452  
 aatttcaggg aagatcagaa aagaaagcct aaagcccttt agcgttgtga acctcagtag 1512  
 tagctgaaag agaagctgcc acaggttgta cttgctctgt gagatggtgt agacattccg 1572  
 taagagaatc cagaatgata gcaggatcag gaaagaaatg gagccaaatc tgccttaagg 1632  
 tgaatagaga cttatctttc tttattaaag tattcttgta agacagtttt ctgtgtcaag 1692  
 tatttgtgaa atcagagctg acatgtaagc tattcttgta atatctcatt attttgaaag 1752  
 atttatataa tgaactctgg ctatctgaca ataaaatgga tgaaaaagca aaaaaaaaaa 1812  
 aaa 1815

<210> 12

<211> 145

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Ala Thr Leu Gln Leu Leu Arg Ala Pro Leu Leu Cys Val Leu Leu  
 -25 -20 -15  
 Trp Val Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala His Asp His Gly Ala Asp  
 -10 -5 -1 1 5  
 Val His His Gly Ser Val Gly Leu Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln  
 10 15 20  
 Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile Asp Gln Pro Glu Ala  
 25 30 35  
 Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His Asp  
 40 45 50  
 Tyr Asp Gly Asn Ser Leu Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Ile Ala Ile  
 55 60 65 70  
 Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Val Met Ser  
 75 80 85  
 Glu Asp Glu Leu Val Ser Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp Asp

	90	95	100
Lys	Asn Asn Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser Leu		
	105	110	115
Gln			

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (30)..(30)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (31)..(31)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (32)..(32)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (33)..(33)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (34)..(34)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (35)..(35)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (36)..(36)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (37)..(37)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc\_feature

<222> (38)..(38)

<223> n=a, t, c or g

<400> 13

tcccgattga attctagacc tgcctcgagn nnnnnnnn

38

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/10936

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P35/00, G01N35/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P35/00, G01N35/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566 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 practicable, search terms used) SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/18204 A2 (Protegene Inc.), 15 April, 1999 (15.04.99), & EP 1040188 A2 & JP 2001-519155 A Sequence No. 3	1-21
X	WO 01/21658 A1 (Human Genome Sciences), 29 March, 2001 (29.03.01), & EP 1218408 A1 & US 2002/0068319 A1 Sequence No. 94	1-9, 12-14, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 03 December, 2002 (03.12.02)	Date of mailing of the international search report 17 December, 2002 (17.12.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq,  
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/18204 A2 (Protegene Inc) 1999.04.15 & EP 1040188 A2 & JP 2001-519155 A 配列番号 3	1-21
X	WO 01/21658 A1 (Human Genome Sciences) 2001.03.29 & EP 1218408 A1 & US 2002/0068319 A1 配列番号 9 4	1-9, 12-14, 17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー


- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03.12.02

国際調査報告の発送日 17.12.02

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
田村 明 照   
4 B 8 4 1 2  
電話番号 03-3581-1101 内線 3448