

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年11月3日 (03.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/103288 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/48, A61K 31/7088, 38/00, 38/43, 38/45, 38/55, 39/395, 48/00, A61P 3/10, 11/00, 13/12, 25/02, 27/02, 29/00, 43/00 // (C12Q 1/02, 1/68)
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/008375
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2005年4月26日 (26.04.2005)
- (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:
特願2004-131731 2004年4月27日 (27.04.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 波佐間 正聡 (HAZAMA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 藤谷 靖志 (FUJITANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 一條 秀憲 (ICHIJO, Hidenori) [JP/JP]; 〒1120002 東京都文京区小石川3丁目14-8-302 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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。

(54) Title: SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: スクリーニング方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a preventive/remedy for apoptosis- or inflammation-related diseases, diabetes and complications thereof or chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Namely, a method of screening a preventive/remedy for apoptosis- or inflammation-related diseases, diabetes and complications thereof or COPD which comprises (1) comparing the activity of a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, its partial peptide or its salt in the presence of a test substance with the activity in the absence of the same, or (2) comparing the expression of a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, its partial peptide or its salt in a cell capable of producing the protein, its partial peptide or its salt in the presence of a test substance with the expression in the absence of the same.

(57) 要約: 本発明は、アポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病およびその合併症、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の予防・治療薬のスクリーニング方法、即ち、(1)被験物質の存在下および非存在下における、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を比較する、あるいは(2)配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを含む、アポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

WO 2005/103288 A1

明細書

スクリーニング方法

技術分野

- 5 本発明は、Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)、それをコードする核酸およびそれに対する抗体の新規用途、特に、アポトーシスまたは炎症関連疾患（例えば、糖尿病およびその合併症、または慢性閉塞性肺疾患）の予防・治療に有効な薬剤のスクリーニングのためのASK1またはそれをコードする核酸の使用などに関する。

10

背景技術

- Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼカスケードは物理化学的ストレスや腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン-1 (IL-1) などの炎症性サイトカインによって活性化されたMAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) が、
15 MAPキナーゼキナーゼ (MAPKK)、MAPキナーゼ (MAPK) を逐次活性化するシグナル伝達機構であり、細胞はこれらの刺激に応じて生存、増殖、分化、死（アポトーシス）などの表現型を示す。c-Jun N-terminal kinase (JNK) およびp38 MAP kinase (p38) は、アポトーシスを誘導するシグナル伝達経路の一部を担うMAPKとして知られている（例えば、非特許文献1参照）。

- 20 JNKおよびp38はMAPKKであるMKK4/MKK7およびMKK3/MKK6によってそれぞれ活性化される。これらのMAPKKはASK1と呼ばれるMAPKKKによって活性化される（特許文献1、非特許文献2）。MAPKKKはASK1以外にも多数報告されているが、ASK1は、JNKおよび/またはp38の活性化を介したシグナル伝達を通じて、細胞にアポトーシスを誘導する能力を有することにより特徴づけられる。最近、ASK1の活性化が
25 ケラチノサイトの分化やPC12細胞の神経突起伸長などの細胞分化にも関与することが示唆されており、ASK1はアポトーシスに限らず細胞の運命のコントロールに

重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

このように、ASK1は細胞の以後の運命を左右する重要な分子であるが故に、その活性化/不活性化には様々な因子が関与し、複雑な制御を受けていると考えられる。例えば、protein phosphatase 5 (PP5) はH₂O₂ 刺激下でASK1に直接結合し、スレオニンを脱リン酸化することで活性化されたASK1を不活性状態に戻すと考
5 えられる（非特許文献3）。また、レドックス制御因子であるチオレドキシンは、酸化ストレスのないときにはASK1のN末端側ドメインと恒常的に結合してASK1の活性化インヒビターとして働いており、酸化ストレスを与えるとASK1から
10 離れ、それによりASK1の活性化が起こることや（非特許文献4）、14-3-3蛋白質はASK1のC末端側ドメインに結合することによりその活性化を阻害すること（非特許文献5）なども報告されている。

上述のように、ASK1はJNK/p38経路を通じて細胞（特に不死化細胞）にアポトーシスを誘導し得ることから、該蛋白質が悪性腫瘍の形成/転移抑制に有効であることが示唆されている（特許文献1）。

15 一方、ASK1ノックアウト (KO) マウスの細胞を小胞体ストレス誘発剤で処理すると、野生型マウスの細胞に比べてアポトーシスが有意に抑制されること、また、該KOマウス細胞をLPSで刺激すると、野生型マウス細胞に比べてサイトカイン・ケモカインの産生が有意に抑制されることから、ASK1は小胞体ストレスによるア
20 ポトーシス誘導およびサイトカイン・ケモカイン産生と密接に関連しており、従って、上記のチオレドキシンや14-3-3蛋白質等のASK1阻害物質や、ASK1ドミナントネガティブ変異体、ASK1アンチセンスオリゴヌクレオチドなどは、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病等）などの小胞体ストレス関連疾患および免疫疾患の
予防・治療に有効であることが示唆されている（特許文献2、3）。

[特許文献1] 特開平10-93号公報

25 [特許文献2] 国際公開第02/38179号パンフレット

[特許文献3] 国際公開第03/00826号パンフレット

[非特許文献 1] *Science*, 270: 1326 (1995)

[非特許文献 2] *Science*, 275: 90-94 (1997)

[非特許文献 3] *EMBO Journal*, 20: 6028-6036 (2001)

[非特許文献 4] *EMBO Journal*, 17: 2596-2606 (1998)

5 [非特許文献 5] *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 96: 8511-8515 (1999)

発明の開示

上述のように、ASK1の生理的重要性や種々の疾患との関わりが次第に明らかにな
10 ってきており、それらの疾患の予防・治療薬としての利用が提唱されている。
しかしながら、ASK1を創薬ターゲットとした上記疾患の予防・治療薬の探索手段
については未だ報告がなされていない。従って、本発明の第一の目的は、ASK1を
用いた各種疾患の予防・治療薬のスクリーニング手段を提供することである。

また、上記した以外の疾患とASK1との関連については未だ不明の点が多い (例
15 えば、糖尿病やその合併症、あるいは慢性閉塞性肺疾患 (COPD) との関連性はこ
れまで報告されていない)。従って、本発明の第二の目的は、ASK1とある疾患と
の未知の関連性を新たに見出し、それに基づいた当該疾患の新規予防・治療手段
を提供することである。

糖尿病において高血糖の状態が長期間持続すると、糖尿病性神経障害、糖尿病
20 性網膜症、糖尿病性腎症等の合併症を発症する。例えば、糖尿病性腎症の治療に
は、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤などが用いられているが、本薬剤
は腎血行動態に影響を及ぼすために、高度の腎機能低下患者に用いることができ
ない。また、糖尿病性神経障害の治療薬としてはアルドース還元酵素阻害剤が知
25 られているが、発疹、下痢、肝・腎機能障害などの副作用を起こす場合があり、
我が国以外では使用されていない。そのため、より安全且つ有効な糖尿病の合併
症予防・治療薬の開発が望まれている。

従って、本発明の第三の目的は、糖尿病およびその合併症の新規予防・治療薬、並びにそのスクリーニング手段を提供することである。

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、世界保健機関（WHO）の統計では、現在の世界の死亡原因の第4位にランクされ（日本でも40歳以上で500万人を超える患者が
5 いると推定されている）、今後さらに患者数の増加が予測されている。しかし、COPDの治療薬としては、抗コリン薬、 β 2刺激薬、テオフィリン製剤などの気管支拡張薬や、去痰薬あるいは急性増悪時におけるステロイド薬などが対症療法的に使用されているのみであり、根本的な病態改善を目的とした治療薬の開発が望まれている。

10 従って、本発明の第四の目的は、COPDの新規予防・治療薬、並びにそのスクリーニング手段を提供することである。

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ASK1ノックアウトマウスにストレプトゾシンを投与して作製した糖尿病モデルでは、同様に処置した野生型マウスに比べて神経障害の進行が抑制されること、ASK1ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて高脂肪食下での血糖値上昇が有意に抑制されること、並びに糖尿病性腎症モデル（*db/db*）マウスでは、正常マウスに比べて腎臓でのASK1発現量が増大していることを見出した。これらの結果は、ASK1が糖尿病およびその合併症の発症・進行に深く関与しており、ASK1の発現もしくは活性を阻害することは、糖尿病およびその合併症の予防および治療に有効であることを示すものである。
20

また、本発明者らは、ASK1ノックアウトマウスをタバコ煙に曝露させて作製したCOPDモデルでは、同様に処置した野生型マウスに比べて肺における炎症性変化が抑制されることを見出した。さらに野生型マウスをタバコ煙に曝露することによって、肺における活性化ASK1の発現量が増大していることを見出した。

25 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：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法、

[2] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、糖尿病またはその合併症の予防・治療物質のスクリーニング方法、

[3] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法、

[4] 被験物質の存在下および非存在下における、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を比較することを特徴とする、上記[1]～

[3]のいずれかに記載のスクリーニング方法、

[5] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を比較することを特徴とする、上記[4]記載のスクリーニング方法、

[6] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記[1]～[3]のいずれかに記載のスクリーニング方法、

[7] 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である上記[2]記載のスクリーニング方法、

[8] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ

酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法、

5 [9] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを特徴とする、糖尿病またはその合併症の予防・治療物質のスクリーニング方法、

10 [10] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法、

15 [11] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸、あるいは配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする、上記[8]～[10]のいずれかに記載のスクリーニング方法、

[12] 細胞が配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有するものである、上記[8]～[10]のいずれかに記載のスクリーニング方法、

[13] 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である上記[9]記載のスクリーニング方法、

25 [14] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミ

ノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療剤、

5 [15] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるアポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療方法、

[16] アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

10 [17] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病またはその合併症の予防・治療剤、

[18] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体
15 の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における糖尿病またはその合併症の予防・治療方法、

[19] 糖尿病またはその合併症の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

20 [20] 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である上記 [17] 記載の予防・治療剤、

[21] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤、

25 [22] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の予防・治療方法、

[23] 慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質も

5 しくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

[24] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる2型糖尿病または糖尿病合併症の予防・治療剤、

10 [25] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における2型糖尿病または糖尿病合併症の予防・治療方法、

15 [26] 2型糖尿病または糖尿病合併症の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用、

[27] 糖尿病合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である上記[24]記載の予防・治療剤、

20 [28] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤、

[29] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の予防・治療方法、

[30] 慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用、

5 [31] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤、

[32] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを含む、哺乳動物におけるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断
10 方法、

[33] アポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

15 [34] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病またはその合併症の診断剤、

[35] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを含む、哺乳動物における糖尿病またはその合併症の診断方法、

20 [36] 糖尿病またはその合併症の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

[37] 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である上記 [34] 記載の診断剤、

25 [38] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の診断剤、

[39] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の診断方法、

- 5 [40] 慢性閉塞性肺疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

- [41] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸
10 を含有してなるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤、

[42] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断方法、

- 15 [43] アポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用、

- [44] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸
20 を含有してなる糖尿病またはその合併症の診断剤、

[45] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における糖尿病またはその合併症の診断方法、

- 25 [46] 糖尿病またはその合併症の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を

コードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用、

[47] 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である上記 [44] 記載の診断剤、

[48] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の診断剤、

[49] 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の診断方法、

[50] 慢性閉塞性肺疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用、

[51] ASK1阻害物質を含有してなる2型糖尿病または糖尿病合併症（糖尿病性神経障害を除く）の予防・治療剤、

[52] ASK1阻害物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における2型糖尿病または糖尿病合併症（糖尿病性神経障害を除く）の予防・治療方法、

[53] 2型糖尿病または糖尿病合併症（糖尿病性神経障害を除く）の予防・治療剤の製造のための、ASK1阻害物質の使用、

[54] ASK1阻害物質がASK1のドミナントネガティブ変異体、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ネフ、14-3-3、チオレドキシシンおよびHSP72からなる群より選択される1以上の化合物である上記 [51] 記載の予防・治療剤、

[55] 糖尿病合併症が糖尿病性腎症である上記 [51] 記載の予防・治療剤、

[56] ASK1阻害物質を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤、

[57] ASK1阻害物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物にお

ける慢性閉塞性肺疾患の予防・治療方法、および

[58] 慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤の製造のための、ASK1阻害物質の使用を提供する。

本発明のスクリーニング方法は、試験化合物のASK1発現または活性調節作用を測定することにより、迅速かつ簡便にアポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療に有効な化合物の候補を選択し得るという効果を奏する。

図面の簡単な説明

図1は、C57BL/KsJ *db/db*マウスおよびC57BL/KsJ *db/+m*マウスの腎組織におけるASK1の発現量（パネルA）および活性（自己リン酸化活性）（パネルB）を示す。レーン1~3：C57BL/KsJ *db/db*マウス腎組織；レーン4~6：C57BL/KsJ *db/+m*マウス腎組織；レーン7：HEK293細胞（H₂O₂添加）；レーン8：HEK293細胞（H₂O₂無添加）

図2は、タバコ煙曝露COPDモデルの肺組織におけるASK1の発現量および活性（自己リン酸化活性）を示す。図2Aはリン酸化ASK1とASK1のウェスタンブロッティングのイメージ（上パネル：リン酸化ASK1、下パネル：ASK1、各数値はタバコ煙曝露後の時間（hr）を示す）を、図2Bは、バンドを定量化（曝露前（pre）のバンド強度を1とした相対値）して、タバコ煙曝露後の時間（hr）に対してプロット（-◆-：リン酸化ASK1、-■-：ASK1）した結果をそれぞれ示している。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられるASK1は、配列番号：2に示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蛋白質である。

ASK1は、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵β細胞、

25

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、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など] もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織 [例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉（例、骨格筋、平滑筋）、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織] などに由来する蛋白質であってよく、また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で合成された蛋白質であつてもよい。あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する核酸を導入された形質転換体から産生された組換え蛋白質であつてもよい。

15 配列番号：2に示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、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合（%）を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸（Phe、Trp、Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala、Leu、Ile、Val）、極性アミノ酸（Gln、Asn）、塩基性アミノ酸（Lys、Arg、His）、酸性アミノ酸（Glu、Asp）、

水酸基を有するアミノ酸 (Ser、Thr)、側鎖の小さいアミノ酸 (Gly、Ala、Ser、Thr、Met) などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換は蛋白質の表現型に変化をもたらさない (即ち、保存的アミノ酸置換である) ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技
5 術分野で周知であり、種々の文献に記載されている (例えば、Bowieら, *Science*, 247: 1306-1310 (1990)を参照)。

本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10 ; ギャップを許す ; マ
10 トリクス=BLOSUM62 ; フィルタリング=OFF) にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム (version 2.0) に組み込まれている (Altschulら, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997))]、
15 Needlemanら, *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453 (1970)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている]、MyersおよびMiller, *CABIOS*, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム (version 2.0) に組み込まれている]、Pearsonら, *Proc. Natl.*
20 *Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている] 等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

より好ましくは、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、配列番号 : 2 に示されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約
25 90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

配列番号：2に示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、前記の配列番号：2に示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し、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を含有する蛋白質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、ASK1の自己リン酸化またはそのカスケードの下流に位置するキナーゼ群（例、MKK4/MKK7、MKK3/MKK6、JNK、p38など）のリン酸化（活性化）促進活性、細胞のアポトーシス誘導活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同様であることを示す。したがって、ASK1カスケード活性化促進等の活
10 性が同等であることが好ましいが、これらの活性の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい（例えば、活性については、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍の範囲内が挙げられる）。

- ASK1の自己リン酸化活性またはASK1カスケード活性化促進活性の測定は、公知の方法、例えば、標識したリン酸基供与体を用いてASK1の自己リン酸化またはその
15 カスケードの下流に位置するキナーゼ群（例、MKK4/MKK7、MKK3/MKK6、JNK、p38など）等のASK1の基質となり得る物質のリン酸化を検出することなどによって、また、アポトーシス誘導活性の測定は、細胞死誘導率の測定、細胞の形態学的観察、DNA断片化の検出等によって行うことができる。

- また、本発明で用いられるASK1には、例えば、(1) 配列番号：2に示されるア
20 ミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～100個程度、より好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、最も好ましくは数
(1～5) 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～100個程度、より好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、最も好ましくは数
25 (1～5) 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～100個程度、

より好ましくは1~50個程度、さらに好ましくは1~10個程度、最も好ましくは数
(1~5) 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4) 配列番号: 2 に示され
るアミノ酸配列中の1または2個以上 (例えば1~300個程度、好ましくは1~100個
程度、より好ましくは1~50個程度、さらに好ましくは1~10個程度、最も好まし
5 くは数 (1~5) 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(5) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質も含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、
欠失または置換の位置は、ASK1の活性 [例: ASK1の自己リン酸化またはその下流
に位置するキナーゼ群 (例、MKK4/MKK7、MKK3/MKK6、JNK、p38など) のリン酸化
10 (活性化) 促進活性、細胞のアポトーシス誘導活性など] が保持される限り特に
限定されない。

本発明で用いられるASK1は、好ましくは、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配
列を有するヒトASK1 (GenBank登録番号: BAA12684) もしくはそのアレル変異体
[例、GenBank登録番号: NP_005914 (配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列にお
15 いて1アミノ酸の欠失 (ΔA_{960}) と2アミノ酸の置換 ($Y_{763}S$ 、 $I_{1309}T$) を有す
る) 等]、または他の温血動物 (例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムス
ター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チ
ンパンジーなど) におけるそのオルソログ (ortholog) [例、マウスオルソログ
としては、GenBank登録番号: BAA23648 (配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列
20 と約92%同一性を有する) 等] である。

本明細書に記載される蛋白質およびペプチドは、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: 2 に示されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとするASK1は、C末
端がカルボキシル基 ($-COOH$)、カルボキシレート ($-COO^-$)、アミド ($-CONH_2$) ま
25 たはエステル ($-COOR$) の何れであつてもよい。

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、*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； 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；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

ASK1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ASK1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。

10 さらに、ASK1には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残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-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基
15 など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} 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、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。

本発明で用いられるASK1の部分ペプチドは、上記したASK1の部分アミノ酸配列を含有し、且つASK1と実質的に同質の活性を有するペプチドである。ここで「実
20 質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。また、「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様にして行うことができる。本明細書においては、当該部分ペプチドを、以下「本発明の活性ペプチド」と称することとする。

本発明の活性ペプチドは、上記の性質を有する限り特に制限されないが、例えば、配列番号：2に示されるアミノ酸配列中約250アミノ酸以上、好ましくは約
25 500アミノ酸以上、より好ましくは約1000アミノ酸以上からなる部分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ペプチドなどが挙げら

れる。該部分アミノ酸配列はASK1のN末端側配列であっても、C末端側配列であってもよいし、内部配列であってもよい。あるいは、それらの部分配列の断続的な組み合わせであってもよい。好ましくは、本発明の活性ペプチドは、蛋白質リン酸化活性を有するセリン/スレオニン・プロテインキナーゼ触媒ドメイン（例
5 えばヒトASK1の場合、配列番号：2に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号678～936で示される部分アミノ酸配列）を少なくとも含有するASK1の部分ペプチドである。

一方、ASK1の部分ペプチドの中には、ASK1もしくは上記した本発明の活性ペプチドの（拮抗）阻害物質として機能し得るものが含まれる。かかる部分ペプチド
10 としては、例えば、ASK1の基質蛋白質であるMKK4/MKK7またはMKK3/MKK6に対する親和性を有するが、該MAPKKを活性化し得ないものなどが挙げられる。具体的には、例えば、上記セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ触媒ドメインの一部もしくは全部を欠失する部分ペプチドなどが挙げられる。ASK1のキナーゼ触媒ド
15 メインとしては、例えばヒトASK1の場合、上記した部分アミノ酸配列が挙げられ

る。
本明細書においては、当該部分ペプチドを以下「本発明の阻害ペプチド」と称
することとする。すなわち、本発明の阻害ペプチドは、配列番号：2に示される
アミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、且つ
ASK1シグナルカスケードの下流に位置するキナーゼ群を活性化しないペプチドで
20 ある。

ASK1の部分ペプチド（本発明の活性ペプチドおよび本発明の阻害ペプチドの両
者を包含する；以下、このような場合には「本発明の部分ペプチド」と称するこ
とがある）は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、
アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここでエス
25 テルにおけるRとしては、ASK1について前記したと同様のものが挙げられる。こ
れらのペプチドが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部分ペプチドに含まれる。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、本発明の部分ペプチドには、上記したASK1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。

ASK1またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、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。

ASK1またはその塩は、前述した温血動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって調製することができる。具体的には、温血動物の組織または細胞をホモジナイズし、可溶性画分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、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等で分離精製することによって、ASK1またはその塩を製造することができる。

ASK1またはその部分ペプチドは、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。ASK1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し、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とする蛋白質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の(1)～(5)に

記載された方法に従って行われる。

(1) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、*Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966年)

(2) Schroeder および Luebke、*The Peptide*, Academic Press, New York (1965年)

(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、蛋白質の化学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

10 このようにして得られたASK1またはその部分ペプチドは、公知の精製法により単離・精製することができる。ここで、精製法としては、例えば、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、これらの組み合わせなどが挙げられる。

15 上記方法で得られるASK1またはその部分ペプチドが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にASK1またはその部分ペプチドが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

20 ASK1またはその部分ペプチドの合成には、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、
25 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、目的とする蛋白質もしくはペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質（ペプチド）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（ペプチド）またはそ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ピル)カルボジイミドなどが用いられる。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。

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、ピリジンなどのアミン類、ジオキサン、テトラヒドロ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ができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および用いられる保護基、その保護基の脱離、並びに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
5 の手段から適宜選択しうる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペ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、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
10 チオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、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）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、
15 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
20 できる。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-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。
25

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。

5 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℃～
10 40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、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
15 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、
20 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、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。

25 蛋白質（ペプチド）のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、蛋白質（ペプチド）を構成する部分ペプチドの各C末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護し、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長（隣接する部分

ペプチドのC末端アミノ酸と連結されるべきアミノ酸)まで延ばした後、C末端側ペプチド鎖のN末端アミノ酸の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドと、N末端側ペプチド鎖のC末端アミノ酸のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチドとを製造し、これらのペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる方法が挙げられる。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(保護ペプチド)を精製した後、上記方法によって保護基を除去し、所望の粗蛋白質(粗ペプチド)を得ることができる。この粗蛋白質(粗ペプチド)は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質(ペプチド)のアミド体を得ることができる。

10 蛋白質(ペプチド)のエステル体は、例えば、C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てアミノ酸エステルとした後、上記のアミド体の場合と同様に処理して得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、ASK1またはその塩を適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

15 さらに、本発明のASK1またはその部分ペプチドは、それをコードする核酸を含有する形質転換体を培養し、得られる培養物からASK1またはその部分ペプチドを分離精製することによって製造することもできる。

ASK1またはその部分ペプチドをコードする核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNA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。

ASK1またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、温血動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)のあら

- ゆる細胞 [例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵 β 細胞、骨髄細胞、メサ
ンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細
胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B
細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、
- 5 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、幹細胞もしくは癌細胞などや
血球系の細胞]、あるい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、扁頭核、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、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、
- 10 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 (例、骨格筋、平滑筋)、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、卵巣、胎盤、子宮、骨、
関節、脂肪組織など] 由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。ASK1またはその
部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調
15 製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、
Polymerase Chain Reaction (以下、「PCR法」と略称する) およびReverse
Transcriptase-PCR (以下、「RT-PCR法」と略称する) によって直接増幅すること
もできる。あるいは、ASK1またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよ
びcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNA
20 の断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよび
cDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション法ま
たはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。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。
- 25 ASK1をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1に示される塩基配列を
含有するDNA、あるいは配列番号：1に示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含有し、前記した配列番号：2に示されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性（例、ASK1カスケード活性化促進活性、アポトーシス誘導活性など）を有する蛋白質をコードするDNAなどが挙げられる。

- 5 配列番号：1に示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できるDNAとしては、例えば、配列番号：1に示される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%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。

本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST
10 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

- 15 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、*Molecular Cloning*, 第2版（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、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに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。ハイブリダイゼーションは、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。

ハイストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム塩濃度が約19～約40mM、好ましくは約19～約20mMで、温度が約50～約70℃、好ましくは約60～約65℃の条件等が挙げられる。特に、ナトリウム塩濃度が約19mMで温度が約65℃の
25 場合が好ましい。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイ

ブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

ASK1をコードするDNAは、好ましくは配列番号：1に示される塩基配列を含有するヒトASK1 DNA (GenBank登録番号：D84476) もしくはそのアレル変異体 (例、
5 GenBank登録番号：NM_005923)、または他の温血動物 (例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) におけるそのオルソログ (ortholog) [例、マウスオルソログとしては、GenBank登録番号：AB006787 (配列番号：1に示される塩基配列と約86%同一性を有する) 等が挙げられる] である。

- 10 本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む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、上記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。

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、

- 15 (1) 配列番号：1に示される塩基配列を有するDNAの部分塩基配列、または
(2) 配列番号：1に示される塩基配列を有するDNA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、且つ
(a) 該DNAにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の活性 (例、ASK1カスケード活性化促進活性、アポトーシス誘導活性など)、または
20 (b) 該DNAにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質の活性を阻害する活性 (例、ASK1カスケード活性化阻害活性、アポトーシス抑制活性など)
を有するペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

- 配列番号：1に示される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、該塩基配列中の対応する部分
25 と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ASK1またはその部分ペプチドをコードするDNAは、該蛋白質またはペプチドをコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、*Molecular Cloning*, 第2版(前述)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

- 10 DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等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変換することができる。

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、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ができる。

上記のASK1またはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、該蛋白質またはペプチドを製造することができる。

ASK1またはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、ASK1をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、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。

25 発現ベクターとしては、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；pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

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、宿主が動物細胞である場合、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。

10 宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λP_L プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

15 宿主が酵母である場合、PH05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、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。

発現ベクターとしては、上記の他に、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^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイ
25 ニーズハムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、

目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、ASK1またはその部分ペプチドをコードするDNAの5'末端側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、
5 OmpA・シグナル配列などが；宿主がバチルス属菌である場合、 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、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合、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用いられる。

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。

エシェリヒア属菌としては、例えば、*Escherichia coli* K12・DH1 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60: 160 (1968)]、JM103 [*Nucleic Acids Research*, '9: 309' (1981)]、JA221 [*Journal of Molecular Biology*, 120: 517 (1978)]、HB101
15 [*Journal of Molecular Biology*, 41: 459 (1969)]、C600 [*Genetics*, 39: 440 (1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、*Bacillus subtilis* MI114 [*Gene*, 24: 255 (1983)]、207-21 [*Journal of Biochemistry*, 95: 87 (1984)]などが用いられる。

20 酵母としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* AH22、AH22R⁻、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、*Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913、NCYC2036、*Pichia pastoris* KM71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、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
25 MG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞、*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場

合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞 ; 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、*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、*Nature*, 5 315: 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。

10 形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)や*Gene*, 17: 107 (1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、*Molecular & General Genetics*, 168: 111 (1979) 15 などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、*Methods in Enzymology*, 194: 182-187 (1991)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929 (1978)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

20 昆虫細胞および昆虫は、例えば、*Bio/Technology*, 6: 47-55 (1988)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール、263-267 (1995) (秀潤社発行)、*Virology*, 52: 456 (1973)に記載の方法に従って形質転換することができる。

25 形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養

する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、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、シヨ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーン

5 スチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイシヨ抽出液などの無機または有機物質が；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それぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、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、好ましくは約5~8である。

- 10 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。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、 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添
- 15 加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15~43°Cで、約3~24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30~40°Cで、約6~24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

- 20 宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、Burkholder最小培地 [Bostian, K. L. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5~8である。培養は、通常約20°C~35°Cで、約24~72時間行なわれる。
- 25 必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

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場合の培地としては、

例えばGrace's Insect Medium (Grace, T. C. C., *Nature*, 195: 788 (1962)) に非働化した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、好ましくは約6.2~6.4である。培養は、通常約27°Cで、約3~5日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

- 5 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [*Science*, 122: 501 (1952)]、DMEM培地 [*Virology*, 8: 396 (1959)]、RPMI 1640培地 [*The Journal of the American Medical Association*, 199: 519 (1967)]、199培地 [*Proceeding of the Society for the Biological Medicine*, 73: 1 (1950)]などが用いられる。培地
- 10 地のpHは、好ましくは約6~8である。培養は、通常約30°C~40°Cで、約15~60時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外にASK1またはその部分ペプチドを生成させることができる。

- 前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ASK1またはその部分ペプチド
- 15 を自体公知の方法に従って分離精製することができる。

- 例えば、ASK1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場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞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後、遠心分離やろ過により可溶性蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜
- 20 用いられる。該緩衝液は、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-100™などの界面活性剤を含んでいてもよい。

- このようにして得られた可溶性画分中に含まれるASK1またはその部分ペプチドの単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、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
- 25 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。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

- 5 かくして得られるASK1またはその部分ペプチドが遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって該遊離体を塩に変換することができ、該蛋白質またはペプチドが塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

- 10 なお、形質転換体が産生するASK1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。該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。

- 15 かくして得られるASK1またはその部分ペプチドの存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロットティングなどにより確認することができる。

- 20 さらに、ASK1またはその部分ペプチドは、それをコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、ASK1またはその部分ペプチドをコードするDNAを鋳型としても合成することができる。無細胞蛋白質（転写／）翻訳系は市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液はPratt
25 J.M. et al., *Transcription and Translation*, 179-209, Hames B.D. & Higgins S.J. eds., IRL Press, Oxford (1984)に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販の細胞ライセートとしては、大腸菌由来のものは*E. coli* S30

extract system (Promega社製)やRTS 500 Rapid Translation System (Roche社製)等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製)等、さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS™ (TOYOBO社製)等が挙げられる。このうちコムギ胚芽ライセートを用いたものが好適である。

- 5 コムギ胚芽ライセートの作製法としては、例えばJohnston F.B. et al., *Nature*, 179: 160-161 (1957)あるいはErickson A.H. et al., *Meth. Enzymol.*, 96: 38-50 (1996)等に記載の方法を用いることができる。

- 蛋白質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法(Pratt, J.M. et al. (1984) 前述)や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式
10 無細胞蛋白質合成システム (Spirin A.S. et al., *Science*, 242: 1162-1164 (1988))、透析法 (木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは重層法 (PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein synthesis core kit取扱説明書: TOYOBO社製)等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法 (特
15 開2000-333673) 等を用いることができる。

- 「配列番号: 2 に示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蛋白質をコードする塩基配列またはその一部」、あるいは「該塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部」を含有する核酸とは、前述のASK1
20 またはその部分ペプチドをコードする核酸だけではなく、コドンの読み枠の合わない塩基配列をも含む意味で用いられる。

- 目的核酸の標的領域と相補的な塩基配列を含む核酸、即ち、目的核酸とハイブリダイズすることができる核酸は、該目的核酸に対して「アンチセンス」である
25 「相同性を有する」または「相補的である」とは、塩基配列間で約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

同一性または相補性を有することをいう。

ASK1をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸（以下、「本発明のアンチセンス核酸」ともいう）は、クローン化した、あるいは決定されたASK1をコードする核酸の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。

- 5 そうした核酸は、ASK1をコードする遺伝子の複製または発現を阻害することができる。即ち、本発明のアンチセンス核酸は、ASK1をコードする遺伝子から転写されるRNAとハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（蛋白質への翻訳）を阻害することができる。

- 本発明のアンチセンス核酸の標的領域は、アンチセンス核酸がハイブリダイズ
10 することにより、結果としてASK1蛋白質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、該蛋白質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性の問題を考慮すれば、約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいがそれに限定されない。具体的には、
15 例えば、ASK1をコードする核酸の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、翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンδροーム領域、および3' 端ヘアピンループが標的領域として選択しうるが、ASK1をコードする遺伝子内の如何なる領域も標的として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもまた好ましい。
20

さらに、本発明のアンチセンス核酸は、ASK1をコードするmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズして蛋白質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるASK1をコードする遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。

- 25 アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているリボヌクレオチド、プリンまたはピリミ

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、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）また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、

5 2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（また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の、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例

10 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、電荷を有する結合または硫黄含有結合（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

15 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-L-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）であつても

20 よい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよ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良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであつてよい。修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたヌクレ

25 オチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、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。

好ましくは、アンチセンス核酸は、修飾されていてもよいRNAまたはDNAである。修飾された核酸（RNA、DNA）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、標的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。こうした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 などに開示されている。

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もよく、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療において適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。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、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎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うる。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、それに限定されるものではない。

ASK1をコードするmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域の内部（初期転写
5 産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得るリボザイムもまた、
本発明のアンチセンス核酸に包含され得る。「リボザイム」とは核酸を切断する
酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列を有する
オリゴDNAも同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているので、本明
細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用
10 いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイド
やウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハン
マーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度
で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ず
つ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすること
15 により、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボ
ザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさ
らなる利点を有する。ASK1 mRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカ
ーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリ
ッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる
20 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザ
イムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、
転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結
したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res.,
29(13): 2780-2788 (2001)]。

25 ASK1をコードするmRNAもしくは初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期
転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な塩基配列を有する二本鎖オ

リゴRNA (siRNA) もまた、本発明のアンチセンス核酸に包含され得る。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAの一方の鎖に相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉 (RNAi) と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が哺乳動物細胞でも起こることが確認されて以来 [Nature, 5 411(6836): 494-498 (2001)], リボザイムの代替技術として広く利用されている。siRNAは標的となるmRNAの塩基配列情報に基づいて、市販のソフトウェア (例: RNAi Designer; Invitrogen) を用いて適宜設計することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、ASK1をコードするcDNA配列もしくはゲノムDNA配列情報に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の10 標的領域を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機 (アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等) を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。RNAi活性を有するsiRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中で、例えば、約90~約95°Cで約1分程度変性させた後、約30~約70°Cで約1~約8時間アニーリ15 ングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

本発明のアンチセンス核酸の遺伝子発現阻害活性は、ASK1をコードする核酸を20 含有する形質転換体、生体内や生体外のASK1をコードする遺伝子発現系またはASK1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。

本発明はまた、ASK1またはその部分ペプチドに対する抗体 (以下、「本発明の抗体」と略記する場合がある) を提供する。本発明の抗体は、該蛋白質またはペ25 プチドに対して特異的親和性を有するものであれば、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体は、ASK1またはその部分

ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 5 ASK1またはその部分ペプチドを、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する。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回程度行われる。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、
10 マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 例えば、抗原で免疫された哺乳動物、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同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、
15 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ASK1と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は、既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法 [*Nature*, 256: 495 (1975)] に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリ
20 コール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

- 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの哺乳動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、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
25 (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融

合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、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
5 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ASK1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；などによりスクリーニングすることができる。
10

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。モノクローナル抗体の選別は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）¹を添加した動物細胞用培地で行うことができる。モノクローナル抗体の選別および育種用培地は、ハイブリドーマが生育できるもの
15 ならばどのような培地を用いてもよい。このような培地としては、例えば、1～20%、好ましくは10～20%のウシ胎仔血清を含むRPMI 1640培地、1～10%のウシ胎仔血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（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。
20

このようにして得られたモノクローナル抗体は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤
25

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]に従って分離精製することができる。

[ポリクローナル抗体の作製]

ASK1またはその部分ペプチドに対するポリクローナル抗体は、自体公知の方法
5 に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ASK1またはその部分ペプチド）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体を作製し、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明の抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

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
10 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よう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やウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1
15 ~20、好ましくは約1~5の割合でカップリング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ップリングには、種々の縮合剤、例えば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
20 ビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、哺乳動物に対して、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
25 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回程度行われる。

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、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができ
25

る。

本発明の部分ペプチドを抗原として用いる場合、そのASK1上の位置は特に限定されないが、例えば、各種温血動物間でよく保存された領域の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドが挙げられる。具体的には、ヒトおよびマウス間で高度に保存されているキナーゼ触媒ドメイン（約99%アミノ酸同一性を有する；全体では約92%アミノ酸同一性）内の任意の部分ペプチドなどが好ましく例示される。

上記した(1) ASK1または本発明の活性ペプチド、(2) ASK1をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸、(3) 本発明の抗体、(4) 本発明のアンチセンス核酸、(5) 本発明の阻害ペプチドは、例えば以下の用途を有する。

10 (1) アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療物質のスクリーニング

上述のように、ASK1はアポトーシス誘導および炎症性サイトカインの産生を促進する。これらの事実は、ASK1の発現または活性を調節（促進または阻害）し得る物質がアポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療に有効であることを示すものである。ここで「アポトーシスまたは炎症関連疾患」とは、アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の不全または異常亢進に起因するか、あるいは結果としてそのような状態を生じる疾患または病態をいう。アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患としては、例えば、ウイルス感染症（例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等）、内分泌疾患（例、ホルモン欠乏症、サイトカイン欠乏症等）、血液疾患（例、血球減少症、腎性貧血等）、臓器形成不全（例、甲状腺萎縮、口蓋裂等）、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等）、虚血性心疾患（例、狭心症、心筋梗塞等）、放射線障害、紫外線障害（例、日焼け等）、中毒性疾患（例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等）、栄養障害（例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺の萎縮等）、炎症性疾患（例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等）、虚血性神経障害、血管系疾患（例、動

脈硬化等)、呼吸器系疾患(例、間質性肺炎、肺線維症等)、軟骨疾患(例、変形性関節炎等)などが挙げられる。一方、アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の不全に関連する疾患としては、癌(例、白血病、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、メラ
5 ノーマ、骨髄腫、骨肉腫、脳腫瘍等)、自己免疫疾患(例、全身性エリテマトーデス、強皮症、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、乾癬、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、糸球体腎炎等)、ウイルス感染症(例、出血熱、T細胞白血病、カポジ肉腫、伝染性単核症、リンパ腫、上咽頭癌、子宮頸癌、皮膚癌、肝炎、肝癌等)、内分
10 泌疾患(例、ホルモン過剰症、サイトカイン過剰症等)、血液疾患(例、血球増加症、B細胞リンパ腫、多血症等)、臓器過形成(例、半陰陽、停留睾丸、奇形腫、腎芽細胞癌、多発性嚢胞腎、心・大動脈奇形、合指症等)、血管形成術後再狭窄、癌切除術後の再発などが挙げられる。

後述の実施例において示される通り、ASK1遺伝子の不活性化は高脂肪食に対する
15 血糖上昇の感受性を低下させ、また、糖尿病モデルにおける神経障害の進行を抑制する。さらに、糖尿病性腎症モデルでは腎臓でのASK1発現が増大している。従って、ASK1の発現または活性を阻害し得る物質(以下、包括的に「ASK1阻害物質」という場合がある)は、糖尿病およびその合併症(例：糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等)の予防・治療に特に有効である。また、ASK1遺伝子の不活性化
20 はタバコ煙曝露による肺での炎症性変化を抑制するので、ASK1阻害物質は、COPDの予防・治療にも特に有効である。

従って、本発明は、ASK1もしくは本発明の活性ペプチドまたはその塩(以下、これらを包括して「ASK1類」(ASK1s)という場合がある)を用いることによるア
25 ポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、本発明は、

(a) 被験物質の存在下および非存在下における、ASK1類の活性を比較することを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法は、さらに

5 (a-1) 単離されたASK1類の活性を、被験物質の存在下と非存在下とで比較する方法と、

(a-2) ASK1類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下におけるASK1類の活性を比較する方法とに大別される。

10 上記(a-1)のスクリーニング方法において用いられるASK1もしくは本発明の活性ペプチドまたはその塩は、上記した方法を用いて単離・精製することができる。

15 上記(a-2)のスクリーニング方法において用いられるASK1またはその塩を産生する能力を有する細胞としては、それを生来発現しているヒトもしくは他の温血動物細胞またはそれを含む生体試料(例:血液、組織、臓器等)であれば特に制限はないが、酸化ストレスなどの物理的または化学的刺激に応じてASK1の発現が誘導されるものが好ましく、例えば、HeLa細胞、HEK293細胞等が挙げられる。非ヒト動物由来の血液、組織、臓器等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。

20 また、ASK1もしくは本発明の活性ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞としては、上記の遺伝子工学的手法により作製された各種の形質転換体が例示される。

25 被験物質としては、例えば蛋白質、ペプチド、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挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

上記(a-1)のスクリーニング方法におけるASK1類の活性の測定は、基質蛋白質

もしくはペプチドのリン酸化を検出することにより行うことができる。ASK1は自己リン酸化活性を有するので、ASK1類自体のリン酸化を検出すれば他の基質を反応系に添加することは必須ではないが、所望により、例えば、ASK1の生理的な基質蛋白質であるMKK4/MKK7やMKK3/MKK6等のMAPKK、ASK1もしくは前記基質蛋白質の標的リン酸化部位を含むフラグメント（例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号83で示されるセリン残基を含むASK1フラグメント等）、あるいはセリン/スレオニンキナーゼのアッセイ用基質として公知の各種合成ペプチドなどを用いることもできる。

リン酸化反応は、例えば、上述の方法により単離・精製されたASK1類標品を、
10 適当な緩衝液 [例：リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液（pH約4～約10、望ましくはpH約6～約8）等（必要に応じてTriton X-100、CHAPS、Tween-80TM、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤や、PMSF、ロイペプチン、バシトラシン、アプロチニン、E-64（蛋白質研究所製）、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）] に溶解し、被験物質を添加し（あるいは添加せず）、さらにリン酸基供与体（例えば、ATP等）および必要に応じて基質蛋白質（ペプチド）を添加して、通常約20～約40℃、好ましくは約30～約37℃で30分～数時間程度インキュベートすることにより行われる。

リン酸化の測定は、例えば、標識したリン酸基供与体（例えば、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP等）を用いて反応を行わせ、ASK1類および/または他の基質蛋白質（ペプチド）
20 における標識量を検出する（例えば、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを用いた場合、反応液を電気泳動（例：SDS-PAGE）に付した後、ゲル上の蛋白質（ペプチド）の ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィで測定する）ことにより行うことができる。あるいは、反応液を蛋白質（ペプチド）を吸着し得る素材（例：DE81膜、セルロース膜、PVDF膜等）と接触させ、該素材に結合した標識量を測定することもできる。また、
25 基質のリン酸化は総電荷の変化や分子量の変化を指標として検出することもできる。前者の例としては、基質として正味電荷が+1となるような合成ペプチドを用

いてリン酸化反応を行った後、反応液を電気泳動して陽極側に移動したペプチド（リン酸化した基質の正味電荷は-1であるため陽極側に移動する）における標識量を検出する方法などが挙げられる。一方、後者の例としては、質量分析を用いる方法や表面プラズモン共鳴を用いる方法等が挙げられる。

- 5 さらに、リン酸化基質に特異的な抗体が入手できる場合には、抗原抗体反応を用いて基質蛋白質（ペプチド）のリン酸化を検出することもできる。ASK1、MKK4、MKK3等のリン酸化物に対する抗体は市販されている（例えば、Cell Signaling Technology社、New England Biolabs. 社等より入手可能）。抗リン酸化蛋白質（ペプチド）抗体を用いたリン酸化の検出には、後記（c）のスクリーニング法
10 と同様の種々の免疫学的測定法を用いることができる。

上記(a-2)のスクリーニング方法におけるASK1類の活性の測定は、上記(a-1)のスクリーニング方法と同様に基質蛋白質（ペプチド）のリン酸化を検出することにより行うことができる他、アポトーシスまたは細胞死の誘導割合を測定することによっても行うことができる。

- 15 基質蛋白質（ペプチド）のリン酸化を指標とする場合、MKK4、MKK3のさらに下流にあるJNK、p38等のMAPKも基質蛋白質として利用することができる。リン酸化反応は、例えば、ASK1類を産生する能力を有する細胞を適当な培地（例えば、上述の各種動物細胞用培地）または緩衝液〔例：リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液（pH約4～約10、望ましくはpH約6～約8）等（必要に応じてTriton X-100、
20 CHAPS、Tween-80TM、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤や、PMSF、ロイペプチン、バシトラシン、アプロチニン、E-64（蛋白質研究所製）、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）〕に懸濁し、被験物質を添加し（あるいは添加せずに）、さらにリン酸基供与体（例えば、ATP等）および必要に応じて基質蛋白質（ペプチド）を添加して、通常約20～約40℃、好ま
25 しくは約30～約37℃で30分～数時間程度インキュベートすることにより行われる。

リン酸化の測定は、ASK1類が細胞内に局在する場合は、細胞を適当な緩衝液に

懸濁した後、超音波処理または凍結融解などによって細胞を破壊して得られる細胞破砕液を、ASK1類が細胞外に分泌される場合には細胞培養上清を、それぞれ上記(a-1)のスクリーニング方法において記載したと同様の方法で処理することにより行うことができる。必要に応じて、破砕液や培養上清から、例えば本発明の

5 抗体などを用いてASK1類を分離・精製した後測定を行ってもよい。

アポトーシス（細胞死）誘導を指標とする場合には、ASK1類を産生する能力を有する細胞を適当な培地または緩衝液に懸濁し、被験物質を添加し（あるいは添加せずに）、さらに酸化ストレス（例：H₂O₂添加）等の刺激を加えて、通常約20～約40℃、好ましくは約30～約37℃で約6～約72時間インキュベートした後で、

10 アポトーシス（細胞死）誘導率を測定する。

アポトーシス（細胞死）は、例えば、光学顕微鏡、位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡などを用いた形態学的観察により膜のブレッピング（blebbing）、細胞サイズの縮小化、クロマチン凝縮、DNA断片化等を検出することにより調べることができる。例えば、マルチウェルプレート中で細胞を培養し、プレートから剥離した細胞あるいは膜のブレッピングを生じた細胞を顕微鏡下で計数し、視野中の全細胞

15 細胞に占める死細胞の割合（%）を計算する。数視野で観察を行ってそれらの平均値を細胞死誘導率とする。また、トリパンブルー、エリスロシンB、ネグロシン、エオシンY、フルオレッセンジアセテート、アクリジンオレンジ、エチジウムブロマイド等の色素を用いて死細胞を染色、顕微鏡下で計数することによっても細胞死誘導率を導出することができる。さらに、DAPIやヘキスト33342等の蛍光色素を用いてDNAを染色し、蛍光顕微鏡下でクロマチン凝縮の起こっている細胞を計数することもできる。あるいは、断片化されたDNAの3'末端にターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ（TdT）を用いてビオチンや蛍光色素などで標識したdUTPを付加させ（TUNEL法）、強く染色された細胞数を光学顕微鏡、

20 蛍光顕微鏡などを用いて計数することにより、アポトーシス誘導率を算出することもできる。

また、粒子サイズ測定装置（例：Coulter multisizer等）を用いて細胞サイズ分布を測定することにより縮小化・断片化した細胞数を計数し、アポトーシス誘導率を計算することができる。あるいは、フローサイトメトリー（FACS）を用いて細胞サイズの縮小・アポトーシス小体への断片化を検出することにより、生死細胞を分離、細胞死誘導率を算出することもできる。

さらには、常法を用いて細胞から染色体DNAを抽出し、ゲル電気泳動してDNAの断片化の度合をデンストメーターなどを用いて測定することにより、生化学的にアポトーシスを検出することもできる。あるいは、3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) が生細胞によりホルマザンに還元されることを利用して、マイクロプレートリーダーを用いて570-630nmにおける吸光度の減少を測定することにより細胞死誘導率を算出することもできる。

上記（a）のスクリーニング法において、ASK1類の活性を増大させた物質を「ASK1活性促進物質」、活性を低下させた物質を「ASK1活性阻害物質」としてそれぞれ選択することができる。ASK1活性促進物質は、アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の不全に関連する疾患〔例えば、癌（例、白血病、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、骨髄腫、骨肉腫、脳腫瘍等）、自己免疫疾患（例、全身性エリテマトーデス、強皮症、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、乾癬、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、糸球体腎炎等）、ウイルス感染症（例、出血熱、T細胞白血病、カポジ肉腫、伝染性単核症、リンパ腫、上咽頭癌、子宮頸癌、皮膚癌、肝炎、肝癌等）、内分泌疾患（例、ホルモン過剰症、サイトカイン過剰症等）、血液疾患（例、血球増加症、B細胞リンパ腫、多血症等）、臓器過形成（例、半陰陽、停留睾丸、奇形腫、腎芽細胞癌、多発性嚢胞腎、心・大動脈奇形、合指症等）、血管形成術後再狭窄、癌切除術後の再発など〕の予防・治療剤として用いることができる。

一方、ASK1活性阻害物質は、アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患〔例えば、ウイルス感染症（例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等）、内分泌疾患（例、ホルモン欠乏症、サイトカイン欠乏症等）、血液疾患（例、血球減少症、腎性貧血等）、臓器形成不全（例、甲状腺萎縮、口蓋裂等）、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等）、虚血性心疾患（例、狭心症、心筋梗塞等）、放射線障害、紫外線障害（例、日焼け等）、中毒性疾患（例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等）、栄養障害（例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺の萎縮等）、炎症性疾患（例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等）、虚血性神経障害、血管系疾患（例、動脈硬化等）、呼吸器系疾患（例、間質性肺炎、肺線維症等）、軟骨疾患（例、変形性関節炎等）など〕の予防・治療剤として用いることができる。

また、ASK1活性阻害物質は、糖尿病またはその合併症（例：糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等）、あるいはCOPDの予防・治療剤として好ましく用いることができる。

ASK1活性促進もしくは阻害物質を上記予防・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。

例えば、ASK1活性促進もしくは阻害物質は、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、ASK1活性促進もしくは阻害物質を、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、上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、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80TM、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、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

ASK1活性促進物質の投与量は、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（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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
5 例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

ASK1活性阻害物質の投与量も、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、糖尿病（もしくはその合併
10 症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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、糖尿病（もしくはその合併症）
15 またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

ASK1活性調節（促進または阻害）物質のスクリーニング方法の一例として、ASK1類を産生する能力を有する細胞と抗リン酸化ASK1抗体とを用いて、ASK1類の自己リン酸化を測定する方法について、以下に具体的に説明する。本スクリー
20 ング系は、抗ASK1抗体を用いることによりASK1の発現調節（促進または阻害）物質のスクリーニングにも使用することができる。

[スクリーニング用試薬]

1) 培地

4.5mg/mLグルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を孔径0.45 μ m
25 のフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存したもの。

2) ヒトASK1標品

HeLa細胞またはHEK293細胞を上記1)の培地(10% ウシ胎仔血清(FBS) および100単位/mLペニシリンを添加)で 4×10^4 個/mLとなるように懸濁し、96ウェル培養プレートに100 μ L/ウェル播種し、5% CO₂/95% 大気雰囲気下、37°Cで1日間培養したもの。

5 3) 20×ATP

300 μ M水溶液を-20°Cで保存したもの。

4) 細胞溶解用緩衝液

20mM Tris-HCl (pH7.5) [150mM NaCl、10mM EDTA、1% Triton X-100、1% デオキシコレート、1.5% アプロチニンおよび1mM PMSF含有]を4°Cで保存したもの。

10 5) ウサギ抗ヒトASK1ポリクローナル抗体

2mg/mLとなるようPBS (0.02%アジ化ナトリウム含有)に溶解し、4°Cで保存したもの。

6) ウサギ抗ヒトリン酸化ASK1ポリクローナル抗体

2mg/mLとなるようPBS (0.02%アジ化ナトリウム含有)に溶解し、4°Cで保存し

15 たもの。

7) 西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体

2mg/mLとなるようPBS (0.02%アジ化ナトリウム含有)に溶解し、4°Cで保存したもの。

8) パーオキシダーゼ活性測定用化学発光基質

20 SuperSignal (登録商標) West Femto Maximum Sensitivity Substrate (PIERCE社)。4°Cで保存。

[測定法]

i) 96ウェル培養プレートにて培養したHeLa (またはHEK293) 細胞を、上記1)の培地で2回洗浄した後、新鮮培地90 μ lを各ウェルに加える。

25 ii) 10^{-3} ~ 10^{-10} Mの被験物質溶液を5 μ l加えた後、20×ATPを5 μ l加え、5% CO₂/95% 大気雰囲気下、37°Cで24時間培養する。

iii) 培養液をチューブに回収し、遠心分離にて培養上清を除去、新鮮な培地で洗浄後、上記4)の細胞溶解緩衝液を加えて細胞を溶解、遠心分離にて上清を回収し、細胞ライセートとする。

iv) 抗ASK1抗体1 μ L (2 μ g) を添加して4°Cで1時間インキュベートした後、プロ
5 テインGを固定化したセファロースビーズを加えて、4°Cで30分間免疫沈降させ、遠心分離にて沈殿を回収する。

v) 沈殿を洗浄後、電気泳動用バッファー [4% SDS、100mM トリス-塩酸 (pH8.8)、0.01% ブロモフェノールブルー、36% グリセロール] 30 μ Lを添加して100°Cで5分間煮沸し、SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードして150Vで60分間泳動する。

vi) PVD F膜に転写し、4°Cで一晩ブロッキングした後、抗ASK1抗体もしくは抗リン酸化ASK1抗体 (1000倍希釈液) と4°Cで一晩反応させ、さらにHRP標識抗ウサギIgG抗体 (1000倍希釈液) と室温で60分間反応させる。

vii) 化学発光基質を加え、発光量を画像解析装置を用いて測定する。

上記のスクリーニング方法において、ASK1産生細胞に被験物質を添加した際に
15 抗リン酸化ASK1抗体と反応するバンドのシグナル強度が増加した場合、該物質をASK1活性促進物質として選択することができる。同様に、被験物質を添加した際に該シグナル強度が減少した場合、該物質をASK1活性阻害物質として選択することができる。一方、ASK1産生細胞に被験物質を添加した際に抗ASK1抗体と反応するバンドのシグナル強度が増加した場合、該物質をASK1発現促進物質として選
20 択することができる。同様に、被験物質を添加した際に該シグナル強度が減少した場合、該物質をASK1発現阻害物質として選択することができる。

上述のように、ASK1の発現を調節 (促進または阻害) する物質は、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療に有効である。また、ASK1発現阻害物質は、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療に特に有効である。

25 従って、本発明はまた、ASK1類を産生する能力を有する細胞におけるASK1類の発現を、被験物質の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、アポトーシ

スまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

ASK1の発現量は、ASK1をコードする核酸とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸（即ち、前記したASK1をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸または本発明のアンチセンス核酸；以下、包括的に「本発明の核酸」という場合がある）を用いてそのmRNAを検出することにより、転写レベルで測定することもできる。あるいは、該発現量は、前記した本発明の抗体を用いて蛋白質（ペプチド）を検出することにより、翻訳レベルで測定することもできる。

10 従って、より具体的には、本発明は、

（b）ASK1類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下におけるASK1類をコードするmRNAの量を、本発明の核酸を用いて測定、比較することを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療物質のスクリーニング方法、および

15 び

（c）ASK1類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下におけるASK1類の蛋白質（ペプチド）量を、本発明の抗体を用いて測定、比較することを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

20

上記（b）および（c）のスクリーニング方法において、ASK1類を産生する能力を有する細胞としては、上記(a-2)のスクリーニング方法において用いられるのと同様のものが好ましく用いられる。

例えば、ASK1類のmRNA量または蛋白質（ペプチド）量の測定は、具体的には以下のようにして行うことができる。

25

（i）正常あるいは疾患モデル非ヒト温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサ

ギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、トリなど) に対して、薬剤 (例えば、TNF- α 、IL-1、Fas、抗癌剤など) あるいは物理化学的ストレス (例えば、UV、活性酸素、虚血など) などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器 (例えば、脳、肝臓、腎臓など)、あるいは臓器から単離した組織
5 または細胞を得る。

得られた細胞に含まれるASK1のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等から mRNAを抽出し、例えば、RT-PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、あるいは自体公知のノーザンブロット解析により定量することもできる。一方、ASK1蛋白質量は、ウェスタンブロット解析や以下に詳述する各種免疫アッセイ法を用いて定量することができる。
10

(ii) ASK1または本発明の活性ペプチドをコードする核酸を導入した形質転換体を上記の方法に従って作製し、該形質転換体に含まれるASK1類またはそれをコードするmRNAを、上記 (i)と同様にして定量、解析することができる。

ASK1類の発現量を変化させる物質のスクリーニングは、

15 (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト温血動物に対して、薬剤あるいは物理化学的ストレスなどを与える一定時間前 (30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前) もしくは一定時間後 (30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理化学的ストレスと同時に被験物質を投与し、投与から一定時間が経過した後 (30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、該動物から単離した細胞に含まれるASK1類をコードするmRNA量、
20 または蛋白質 (ペプチド) 量を定量、解析することにより、あるいは

(ii) 形質転換体を常法に従って培養する際に被験物質を培地中に添加し、一定時間培養後 (1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは2日後~3日後)、該形質転換体に含まれるASK1類のmRNA量または蛋白質 (ペプチド) 量を
25 定量、解析することにより行うことができる。

被験物質としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。

上記(c)のスクリーニング方法におけるASK1類の量の測定は、具体的には、

5 例えば、

(i) 本発明の抗体と、試料液および標識化されたASK1類とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたASK1類を検出することにより試料液中のASK1類を定量する方法や、

10 (ii) 試料液と、担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された別の本発明の抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の量(活性)を測定することにより、試料液中のASK1類を定量する方法等が挙げられる。

上記(ii)の定量法においては、2種の抗体はASK1類の異なる部分を認識するものであることが望ましい。例えば、一方の抗体がASK1類のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体としてASK1類のC端部と反応するものを用いることができる。

20 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、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 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、
25 抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン- (ストレプト) アビジン系を用いることもできる。

試料液としては、ASK1類が細胞内に局在する場合は、細胞を適当な緩衝液に懸濁した後、超音波処理または凍結融解などによって細胞を破壊して得られる細胞破砕液が、ASK1類が細胞外に分泌される場合には、細胞培養上清がそれぞれ用いられる。必要に応じて、破砕液や培養上清からASK1類を分離・精製した後に定量を行ってもよい。また、標識剤の検出が可能である限り、無傷細胞を試料として用いてもよい。

本発明の抗体を用いるASK1類の定量法は、特に制限されるべきものではなく、試料液中の抗原量に対応した、抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。感度、特異性の点で、例えば、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、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てもよい。担体としては、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あげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明の抗体に試料液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明の抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の量もしくは活性を測定することにより、試料液中のASK1類を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序で行っても、また、同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。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、固相化抗体あるいは標識化抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を

用いてもよい。

本発明の抗体は、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も用いることができる。

競合法では、試料液中のASK1類と標識したASK1類とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原(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することにより、試料液中のASK1類を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、ポリエチレングリコールや前記抗体(1次抗体)に対する2次抗体などを用いてB/F分離を行う液相法、および、1次抗体として固相化抗体を用いるか(直接法)、あるいは1次抗体は可溶性のものを用い、2次抗体として固相化抗体を用いる(間接法)固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、試料液中のASK1類と固相化したASK1類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、あるいは試料液中のASK1類と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化したASK1類を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、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試料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。試料液中のASK1類の量がわずかであり、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定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えてASK1類の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江

寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、*Methods in ENZYMOLOGY* Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、細胞におけるASK1類の生産量を感度よく定量することができる。

上記(b)および(c)のスクリーニング法において、ASK1類の発現量(mRNA量または蛋白質(ペプチド)量)を増加させた物質をASK1発現促進物質、発現量を減少させた物質をASK1発現阻害物質としてそれぞれ選択することができる。ASK1発現促進物質は、アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の不全に関連する疾患〔例えば、癌(例、白血病、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、骨髄腫、骨肉腫、脳腫瘍等)、自己免疫疾患(例、全身性エリテマトーデス、強皮症、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、乾癬、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、糸球体腎炎等)、ウイルス感染症(例、出血熱、T細胞白血病、カポジ肉腫、伝染性単核症、リンパ腫、上咽頭癌、子宮頸癌、皮膚癌、肝炎、肝癌等)、内分泌疾患(例、ホルモン過剰症、サイトカイン過剰症等)、血液疾患(例、血球増加症、B細胞リンパ腫、多血症等)、臓器過形成(例、半陰陽、停留睾丸、奇形腫、腎芽細胞癌、多

発性嚢胞腎、心・大動脈奇形、合指症等)、血管形成術後再狭窄、癌切除術後の再発など]の予防・治療剤として用いることができる。

一方、ASK1発現阻害物質は、アポトーシス誘導もしくは炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患 [例えば、ウイルス感染症 (例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等)、内分泌疾患 (例、ホルモン欠乏症、サイトカイン欠乏症等)、
5 血液疾患 (例、血球減少症、腎性貧血等)、臓器形成不全 (例、甲状腺萎縮、口蓋裂等)、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患 (例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等)、虚血性心疾患 (例、狭心症、心筋梗塞等)、放射線障害、
10 紫外線障害 (例、日焼け等)、中毒性疾患 (例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等)、栄養障害 (例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺の萎縮等)、炎症性疾患 (例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等)、虚血性神経障害、血管系疾患 (例、動脈硬化等)、呼吸器系疾患 (例、間質性肺炎、肺線維症等)、軟骨疾患 (例、変形性関節炎等) など] の予防・治療剤として用
15 いることができる。

また、ASK1発現阻害物質は、糖尿病またはその合併症 (例：糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等)、あるいはCOPDの予防・治療剤として好ましく用いることができる。

ASK1発現促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前
20 記したASK1活性促進もしくは阻害物質の場合と同様にして製剤化することができる。

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、ヒトや他の温血動物 (例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど) に対して投与するこ
25 とができる。

ASK1発現促進物質の投与量は、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（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

ASK1発現阻害物質の投与量も、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、糖尿病（もしくはその合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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、糖尿病（もしくはその合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

（2）アポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患の予防・治療剤

上記のように、ASK1は細胞にアポトーシスを誘導したり、炎症性サイトカインの産生を増大させるので、生体内においてASK1またはそれをコードする核酸（例、遺伝子、mRNA等）に異常がある（高活性変異体の出現）場合、あるいはその発現量が異常に増加している場合、さらには、他の何らかの要因で細胞のアポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生が異常亢進している場合、例えば、ウイルス感染症、内分泌疾患、血液疾患、臓器形成不全、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患、虚血性心疾患、放射線障害、紫外線障害、中毒性疾患、栄養障害、炎症、虚血性神経障害、血管系疾患、呼吸器系疾患、軟骨疾患

などの種々の疾病を発症する。

したがって、ASK1の増加等により生体にとって必要な細胞までがアポトーシスによって失われている、あるいは炎症性疾患を発病している患者がいる場合に、

- 5 a) 本発明の抗体を該患者に投与してASK1を不活性化したり、b) (イ) 本発明の
アンチセンス核酸を該患者に投与して標的細胞内に導入する（および発現させ
る）ことによって、あるいは（ロ）単離した標的細胞に本発明のアンチセンス核
酸を導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ASK1の量を減少させ、本来必要な細胞のアポトーシス死や炎症反
応を抑制することができる。

- 10 また、ASK1遺伝子の不活性化は高脂肪食に対する血糖上昇の感受性を低下させ、
また、糖尿病モデルにおける神経障害の進行を抑制するので、糖尿病およびその
合併症を発病している患者に、上記a)またはb)の処置を施すことにより、患者の
体内におけるASK1の活性もしくは量を低減させ、当該疾患を治療し、進行を抑制
することができる。

- 15 さらに、ASK1遺伝子の不活性化はタバコ煙曝露による肺での炎症性変化を抑制
するので、COPDを発病している患者に、上記a)またはb)の処置を施すことにより、
患者の体内におけるASK1の活性もしくは量を低減させ、当該疾患を治療し、進行
を抑制することができる。

- したがって、a) 本発明の抗体またはb) 本発明のアンチセンス核酸を、(i) ア
20 ポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生を抑制することが予防・治療上有
効な疾患、例えばASK1の過剰発現などに起因する疾患、具体的には、ウイルス感
染症（例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等）、内分泌疾患（例、ホルモン欠乏
症、サイトカイン欠乏症等）、血液疾患（例、血球減少症、腎性貧血等）、臓器形
成不全（例、甲状腺萎縮、口蓋裂等）、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不
25 全、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、
筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等）、虚血性心疾患（例、狭心症、

心筋梗塞等)、放射線障害、紫外線障害(例、日焼け等)中毒性疾患(例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等)、栄養障害(例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺の萎縮等)、炎症(例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等)、虚血性神経障害、血管系疾患(例、動脈硬化等)、呼吸器系疾患(例、間質性肺炎、肺線維症等)、軟骨疾患(例、変形性関節炎等)などの疾患、(ii)糖尿病(特に2型糖尿病)または糖尿病合併症(例、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等)、あるいは(iii)COPDの予防・治療剤として用いることができる。

本発明の抗体を上記予防・治療剤として使用する場合、前記したASK1活性阻害物質の場合と同様にして製剤化することができる。

また、本発明のアンチセンス核酸を上記予防・治療剤として使用する場合、該核酸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ト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、常套手段に従って製剤化することができる。該核酸は、そのまま、あるいは撮取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やヒドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。

例えば、本発明のアンチセンス核酸は、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、本発明のアンチセンス核酸を、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。

上記の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、結合剤などの添加剤としては、前記したASK1活性阻害物質の場合と同様

のものが例示される。

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、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

5

本発明の抗体の投与量は、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、糖尿病（もしくはその合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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、糖尿病（もしくはその合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

10

本発明のアンチセンス核酸の投与量は、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、2型糖尿病（もしくは糖尿病合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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、2型糖尿病（もしくは糖尿病合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

15

20

前記したように、本発明の阻害ペプチドはASK1の（拮抗）阻害物質として機能し得る。すなわち、該ペプチドはASK1の基質蛋白質であるMAPKKに対して親和性

25

を有するがそれを活性化しないので、細胞に内在するASK1とMAPKKの接近およびそれによるMAPKKの活性化（リン酸化）を競合的に阻害し得る。したがって、該部分ペプチドは、本発明の抗体や本発明のアンチセンス核酸と同様に、アポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患、糖尿病またはその合併症、あるいはCOPDの予防・治療剤として用いることができる。

本発明の阻害ペプチドを上記予防・治療剤として使用する場合、前記したASK1活性阻害物質の場合と同様にして製剤化することができる。

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、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

本発明の阻害ペプチドの投与量は、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、糖尿病（もしくはその合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg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、糖尿病（もしくはその合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(3) 遺伝子診断剤

前記した本発明の核酸は、プローブ等として使用することにより、ヒトまたは他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）におけるASK1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の損傷もしくは突然変異やmRNAのスプライシング異常あるいは発現低下、あるいは該DNAの増幅やmRNAの発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。ASK1をコードする塩基配列の一部を含有する核酸は、プローブとして必要な長さ（例えば、約15塩基以上）を有する限り特に制限されず、また、ASK1の
5 部分ペプチドをコードしている（即ち、in frameである）必要もない。

本発明の核酸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、定量的RT-PCR、PCR-SSCP法、アレル特異的PCR、PCR-SSOP法、DGGE法、RNaseプロテクション法、PCR-RFLP法などにより実施することができる。

10 例えば、被験温血動物の細胞から抽出したRNA画分についてのノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRの結果、ASK1の発現低下が検出された場合や、RNA画分もしくはゲノミックDNA画分についてPCR-SSCP法を実施した結果、ASK1遺
11 伝子の突然変異が検出された場合は、アポトーシス誘導または炎症性サイトカイン
12 産生の不全に関連する疾患、例えば、癌（例、白血病、食道癌、胃癌、大腸癌、
13 直腸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、
14 骨髄腫、骨肉腫、脳腫瘍等）、自己免疫疾患（例、全身性エリテマトーデス、強
15 皮症、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存
16 性糖尿病、乾癬、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、糸球
17 体腎炎等）、ウイルス感染症（例、出血熱、T細胞白血病、カポジ肉腫、伝染性
18 単核症、リンパ腫、上咽頭癌、子宮頸癌、皮膚癌、肝炎、肝癌等）、内分泌疾患
19 （例、ホルモン過剰症、サイトカイン過剰症等）、血液疾患（例、血球増加症、
20 B細胞リンパ腫、多血症等）、臓器過形成（例、半陰陽、停留睾丸、奇形腫、腎
21 芽細胞癌、多発性嚢胞腎、心・大動脈奇形、合指症等）、血管拡張術後再狭窄、
22 癌切除術後の再発などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が
23 高いと診断することができる。
24 25

一方、ノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRによりASK1の発現過多

- が検出された場合は、(i)アポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患、例えば、ウイルス感染症（例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等）、内分泌疾患（例、ホルモン欠乏症、サイトカイン欠乏症等）、血液疾患（例、血球減少症、腎性貧血等）、臓器形成不全（例、甲状腺萎縮、口蓋裂等）、
- 5 移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等）、虚血性心疾患（例、狭心症、心筋梗塞等）、放射線障害、紫外線障害（例、日焼け等）、中毒性疾患（例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等）、栄養障害（例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺
- 10 の萎縮等）、炎症（例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等）、虚血性神経障害、血管系疾患（例、動脈硬化等）、呼吸器系疾患（例、間質性肺炎、肺線維症等）、軟骨疾患（例、変形性関節炎等）などの疾患、(ii)糖尿病またはその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等）、あるいは(iii)COPDに罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。
- 15 前記した本発明の抗体は、ヒトまたは他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）におけるASK1またはその塩の量を測定することができるので、例えば、該蛋白質の発現低下または発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。
- 20 本発明の核酸を用いる上記の遺伝子診断は、前記した本発明の抗体を用いるASK1発現調節（促進もしくは阻害）物質のスクリーニング方法（(c)のスクリーニング方法）において、ASK1類を産生する能力を有する細胞として、被験温血動物から採取した生体試料（例、血液、血漿、尿、生検など）を用いてイムノアッセイを実施することにより行うことができる。
- 25 イムノアッセイの結果、該試料中のASK1またはその塩の減少が検出された場合は、アポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生の不全に関連する疾患、例

えば、癌（例、白血病、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、骨髄腫、骨肉腫、脳腫瘍等）、自己免疫疾患（例、全身性エリテマトーデス、強皮症、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、乾癬、潰瘍性大腸炎、

5 特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、糸球体腎炎等）、ウイルス感染症（例、出血熱、T細胞白血病、カポジ肉腫、伝染性単核症、リンパ腫、上咽頭癌、子宮頸癌、皮膚癌、肝炎、肝癌等）、内分泌疾患（例、ホルモン過剰症、サイトカイン過剰症等）、血液疾患（例、血球増加症、B細胞リンパ腫、多血症等）、臓器過形成（例、半陰陽、停留睾丸、奇形腫、腎芽細胞癌、多発性嚢胞腎、心・大動脈

10 奇形、合指症等）、血管拡張術後再狭窄、癌切除術後の再発などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

一方、免疫アッセイの結果、該試料中のASK1またはその塩の増加が検出された場合は、(i)アポトーシス誘導または炎症性サイトカイン産生の異常亢進に関連する疾患、例えば、ウイルス感染症（例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等）、

15 内分泌疾患（例、ホルモン欠乏症、サイトカイン欠乏症等）、血液疾患（例、血球減少症、腎性貧血等）、臓器形成不全（例、甲状腺萎縮、口蓋裂等）、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等）、虚血性心疾患（例、狭心症、心筋梗塞等）、放射線障害、紫外線障害（例、

20 日焼け等）、中毒性疾患（例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等）、栄養障害（例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺の萎縮等）、炎症（例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等）、虚血性神経障害、血管系疾患（例、動脈硬化等）、呼吸器系疾患（例、間質性肺炎、肺線維症等）、軟骨疾患（例、変形性関節炎等）などの疾患、(ii)糖尿病またはその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等）、あるいは(iii)COPDに罹患しているか、あるいは

25 将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

(4) ASK1阻害物質の用途

本発明はまた、ASK1阻害物質（前記したことから明らかなように、該用語は上記ASK1発現阻害物質とASK1活性阻害物質とを包含する）を含有してなる(i) 2型糖尿病または糖尿病合併症（例、糖尿病性腎症等）、あるいは(ii) COPDの予防・

5 治療剤を提供する。

ASK1阻害物質としては、例えば、ASK1のドミナントネガティブ変異体（例えば、上記特許文献1～3参照）、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ネフ、14-3-3、チオレドキシシン、HSP72 (*Mol. Cell Biol.*, 22(22): 7721-7730, 2002)、あるいは前記した本発明の各種スクリーニング方法により得られるASK1発現もしくは活

10 性阻害物質等が挙げられるが、それらに限定されない。

ASK1阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合、前記したスクリーニング方法により得られるASK1活性阻害物質の場合と同様にして製剤化することができる。

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、ヒトや他の

15 温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

ASK1阻害物質の投与量は、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、2型糖尿病（もしくは糖尿病合併症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg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、2型糖尿病（もしくは糖尿病性腎症）またはCOPD患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程

25 度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することが

できる。

(5) ASK1をコードするDNAを導入した動物およびその用途

本発明は、ASK1をコードする外来性のDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物の新規用途を提供する。

本発明で使用される非ヒト哺乳動物は、

- [1] 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- [2] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]記載の動物、
- [3] ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第[2]記載の動物である。

10 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、
15 マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより
20 本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6
25 系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好

ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有しているASK1をコードするDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出されたASK1をコードするDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元のASK1をコードするDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

10 該異常DNAとしては、異常なASK1を発現させるDNAを意味し、例えば、正常なASK1の機能を抑制する異常ASK1を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明の外来性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うるプロモーターの下流に結合したDNA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、ヒトASK1をコードするDNAを転移させる場合、これと相同性が高いASK1のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、ヒトASK1をコードするDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってASK1をコードするDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

ASK1の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス (例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物 (ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキニンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ (一般にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素 (Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原 (H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列 (一般にターミネターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシ

ングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常なASK1の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、
5 ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞等由来のRNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常な
10 ASK1の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的的手法により作製することができる。

15 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞
20 胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNA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継代飼育することが出来る。

25 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の

子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNA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を過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の外来性正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的にASK1の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、ASK1の機能亢進症や、ASK1が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、ASK1の増加症状を有することから、ASK1の機能亢進に関連する疾患、例えば、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等）、呼吸器系疾患（例、COPD、間質性肺炎、肺線維症等）、ウイルス感染症（例、AIDS、インフルエンザ、不明熱等）、内分泌疾患（例、ホルモン欠乏症、サイトカイン欠乏症等）、血液疾患（例、血球減少症、腎性貧血等）、臓器形成不全（例、甲状腺萎縮、口蓋裂等）、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、免疫不全、神経変性疾患（例、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、小脳変性症等）、虚血性心疾患（例、狭心症、心筋梗塞等）、放射線障害、紫外線障害（例、日焼け等）中毒性疾患（例、重金属による腎尿細管細胞傷害、アルコールによる肝細胞傷害等）、栄養障害（例、ビタミン、微量元素欠乏による胸腺の萎縮等）、炎症（例、急性膵炎、関節炎、歯周病、大腸炎等）、虚血性神経障害、血管系疾患（例、動脈硬化等）、軟骨疾患（例、変形性関節炎等）などの疾患に対する予防・治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNA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継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、
5 通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに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異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性異常DNAを有することを意味する。導入DNAを相同染色体の両方
10 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。

本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現
15 させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的にASK1の機能不活性型不応症（例えば、癌（例、白血病、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、骨髄腫、骨肉腫、脳腫瘍等）、自己免疫疾患（例、全身性エリテマトーデス、強皮症、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、乾癬、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、糸球体腎炎等）、
20 ウイルス感染症（例、出血熱、T細胞白血病、カポジ肉腫、伝染性単核症、リンパ腫、上咽頭癌、子宮頸癌、皮膚癌、肝炎、肝癌等）、内分泌疾患（例、ホルモン過剰症、サイトカイン過剰症等）、血液疾患（例、血球増加症、B細胞リンパ腫、多血症等）、臓器過形成（例、半陰陽、停留睪丸、奇形腫、腎芽細胞癌、多発性嚢胞腎、心・大動脈奇形、合指症等）など）となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用
25 いて、ASK1の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、ASK1の機能不活性型不応症における異常ASK1による正常ASK1の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、ASK1の増加症状を有することから、ASK1の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、ASK1の機能不活性型不応症を含む、ASK1に関連する疾患の予防・治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患予防・治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、ASK1が関連する疾患の遺伝子治療法を検討、開発することが可能である。

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
20 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
25 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
	EDT	: エチレンジアミン四酢酸
5	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
	Leu	: ロイシン
10	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
15	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
20	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
25	Gln	: グルタミン
	pGlu	: ピログルタミン酸

* : 終止コドンに対応する

Me : メチル基

Et : エチル基

Bu : ブチル基

5 Ph : フェニル基

TC : 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。

Tos : p-トルエンスルフォニル

10 CHO : ホルミル

Bzl : ベンジル

Cl₂Bzl : 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

15 Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル

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

20 Bum : t-ブトキシメチル

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

25 DCC : N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

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]

ヒトASK1 cDNAのアミノ酸コード領域の塩基配列を示す。

[配列番号：2]

ヒトASK1のアミノ酸配列を示す。

- 5 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲はそれらによって何ら限定されるものではない。

実施例1 ストレプトゾシン誘発糖尿病モデルにおける糖尿病性神経障害に及ぼすASK1遺伝子ノックアウトの効果

- 10 7週齢の雄性ASK1ノックアウト (KO) マウス (上記特許文献2に記載の方法に準じて作製) および同週齢の雄性C57BL/6Jマウス (日本クレア) を用いた。24時間の絶食を行い、絶食前後の体重およびその変化量がほぼ均等になるよう各動物を2群に分け、'ストレプトゾシン (STZ) 125 mg/kgおよび135 mg/kg投与群とした。無処置の6週齢C57BL/6Jマウスを正常対照群とした。STZ (Sigma) は溶媒 (0.1 M
- 15 クエン酸と生理食塩液の1:2混合液) に12.5および13.5 mg/mlの濃度になるよう投与直前に溶解し、エーテル麻酔下に10 ml/kgの用量で腹腔内投与した。STZ投与8及び12週間後に眼底採血を行い、生化学自動分析装置 (Beckman Coulter, シンクロンCX5△) を用いて血漿中グルコース濃度を測定した。尾の運動神経伝導速度はSTZ投与後7、10および13週目にNeuropack2 (日本光電) により測定した。
- 20 尚、データは125 mg/kgおよび135 mg/kg投与群をあわせて解析した。

結果を表1及び表2に示す。C57BL/6Jマウス、ASK1 KOマウスともSTZの投与により血漿中グルコース濃度が上昇し、その程度は同等であった。STZ処置C57BL/6JマウスおよびSTZ処置ASK1 KOマウスでは、STZ処置7週間後において、正常対照マウスに比して尾運動神経伝導速度が有意に低下していた。STZ処置

25 C57BL/6Jマウスでは、10および13週間後に更に尾運動神経伝導速度は低下したが、STZ処置ASK1 KOマウスでは、7週間後と同程度の値で推移した。

[表 1] 各STZ処置マウスの血漿中グルコース濃度 (単位: mg/dL)

マウス	STZ処置後期間 (週)	
	8	12
5 正常対照マウス	178.2	209.3
STZ処置C57BL/6Jマウス	653.0	713.7
STZ処置ASK1 KOマウス	665.7	690.5

(n=7-9, 平均)

10 [表 2]

各STZ処置マウスの尾運動神経伝導速度 (単位: m/s)

マウス	STZ処置後期間 (週)		
	7	10	13
15 正常対照マウス	22.6	22.0	23.2
STZ処置C57BL/6Jマウス	19.8**	17.0**	17.0**
STZ処置ASK1 KOマウス	20.1*	20.1	21.7#

(n=6-9, 平均, *: p<0.05, **: p<0.01 vs. 正常マウス,
#: p<0.05 vs. STZ処置C57BL/6Jマウス, students t検定)

20

実施例 2 高脂肪食負荷時のマウスにおける血糖上昇に及ぼすASK1遺伝子ノックアウトの効果

5週齢の雄性ASK1 KOマウスおよび同齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いた。体重測定、眼底採血を行い、生化学自動分析装置 (Beckman, CX5△) を用いて血漿中グルコース濃度 (Glu) を測定した。体重およびGluがほぼ均等となるよう、各マウスを正常食群および高脂肪食群の2群ずつに組分けた。正常食としてCE-2 (日本

25

クレア)、高脂肪食として#D12451 (45 kcal% fat, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) を用いた。高脂肪食負荷後2、4、6、8および10週目に体重測定、採血を行い、Gluを測定した。

結果を表3及び表4に示す。C57BL/6Jマウスにおいて、高脂肪食負荷後6週目から8週目にかけて、体重の増加傾向、2週目から10週目にかけて、Gluの有意な上昇が認められた。一方、ASK1 KOマウスでは、高脂肪食負荷後6週目から10週目にかけて体重の有意な増加が認められた。また、高脂肪食負荷後2週および6週目にGluの有意な上昇が認められるものの、野生型 (C57BL/6J) マウスに比して軽度であり、8および10週目ではその差は消失した。

10

[表3] 各動物群の体重推移 (単位: g)

処理群	実験期間 (週)					
	0	2	4	6	8	10
15 C57BL/6J 正常食群	20.7	23.0	24.5	26.2	27.2	28.0
C57BL/6J 高脂肪食群	20.6	22.7	24.9	27.0	28.2	28.8
ASK1 KO 正常食群	17.9	20.9	23.0	24.5*	26.2**	26.6**
ASK1 KO 高脂肪食群	18.0	21.5	23.8	25.6	28.3	29.5

(n=10-13, 平均, *: p<0.05, **: p<0.01 vs 正常食群, students t検定)

20

[表 4] 各動物群の血漿中グルコース濃度の推移 (単位: mg/dL)

処理群	実験期間 (週)					
	0	2	4	6	8	10
5 C57BL/6J 正常食群	253.6	242.7	223.4	202.6	195.6	216.1
C57BL/6J 高脂肪食群	269.5	275.9*	303.5**	255.7**	241.7**	254.1**
ASK1 KO 正常食群	216.5	232.3	202.2	196.7	234.1	159.3
ASK1 KO 高脂肪食群	208.1	266.1**	221.1	227.5*	224.3	172.5

(n=10-13, 平均, *: p<0.05, **: p<0.01 vs 正常食群, students t検定)

10

実施例 3

糖尿病性腎症モデルマウス (*db/db*マウス) の腎臓組織におけるASK1の発現および活性の上昇

15 インスリン非依存性糖尿病を呈し糖尿病性腎症を自然発症する雄性C57BL/KsJ *db/db*マウス (32週齢、日本クレア) およびその正常対照動物である同週齢の雄性C57BL/KsJ *db/+m* (日本クレア) を用いた。マウスを放血致死させ、腎臓を摘出、液体窒素で凍結した後、組織を粉砕し、1 mlのホモジナイゼーションバッファ

20 ー [20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1% デオキシコレート、3 mM ジチオスレイトール、2 mM オルトバナジン酸ナトリウム、12 mM β -グリセリン酸、50 mM NaF、プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche)] を加えてポリロンホモジナイザーでホモジナイズした。超音波破碎機で5秒間処理した後、15000 rpmで15分間遠心し、上清を別のチューブに移した。脂質を除去する目的で0.45 μ mの遠心フィルターにかけ (15000 rpm、1分)、通過液を新しい

25 ホモジナイゼーションバッファで調整した。抗ASK1抗体 (sc-6368, Santa Cruz Biotechnology, US) を 2 μ g/チューブ加え、4°Cで1時間転倒混和後、20

μL のプロテイン-G-セファロース (ファルマシア) を加えて、 4°C で30分間転倒混和することにより免疫沈降を行った。15000 rpmで1分間遠心し、沈殿を洗浄 (3回) した後、チューブに30 μL のLDSサンプルバッファー (50 mM DTT含有、Invitrogen) を加え、 100°C で5分間煮沸した。NuPAGE 3-8% Tris-Acetate Gel (Invitrogen) を用い、レーンあたり20 μL のサンプルを泳動 (150V、60分) した。蛋白質をPVDF膜に転写 (セミドライ法) し、ブロックエース (大日本製薬) を用い、 4°C で一晩ブロッキングを行った。抗リン酸化ASK1抗体 (2000倍希釈) あるいは抗ASK1抗体 (DAV抗体、1000倍希釈) を 4°C で一晩反応させた後、HRP標識抗ウサギIgG抗体 (anti-rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment、1000倍希釈、アマシヤム) を室温で60分間反応させた。基質には Super Signal West Maximum Sensitivity (PIERCE) を用い、化学発光を画像解析装置 (アトー) で検出した。陽性対照としてASK1高発現HEK293細胞由来のサンプルを用いた。

結果を図1に示す。32週齢のC57BL/KsJ *db/db*マウスの腎組織において、'正常' 対照動物であるC57BL/KsJ *db/+m*マウスに比べてASK1蛋白質量の増加が認められた (図1 A ; レーン1~6)。また、C57BL/KsJ *db/db*マウスの腎組織では、リン酸化ASK1量も増加していた (図1 B ; レーン1~6)。

実施例4 タバコ煙曝露COPDモデルにおける気道炎症におよぼすASK1遺伝子ノックアウトの効果

6週齢の雄性ASK1ノックアウト (KO) マウス (上記特許文献2に記載の方法に準じて作製) および同週齢の野生型マウス (C57BL/6J、雄性、日本クレア) をタバコ煙曝露実験に供した。ASK1 KOおよび野生型マウスをアクリル製チャンバーに収納し、5分毎にタバコ1本分の主流煙 (タバコ銘柄: Kentucky Research Cigarette 1R1, タバコ主流煙濃度: 16%) をチャンバー内に注入することでタバコ煙曝露を行った。タバコ煙曝露は一日あたり30分間 (タバコ6本分) 行い、これを3日間継続した。また対照群としては通常飼育室で同期間飼育した同週齢の

雄性マウスを用いた。最終タバコ煙曝露24時間後に肺胞洗浄液を回収し気道炎症の観察を行った。マウスをペントバルビタール麻酔により致死させ、気道内にカニューレを挿入後、0.5ml 氷冷 PBSの注入(計3回)することで肺胞洗浄液の回収を行った。肺胞洗浄液は3000 rpm、4°Cで10分間遠心後、上清は回収し好中球遊走因子であるKCの測定(KC ELISA kit, Genzyme社)に用いた。また遠心後の沈査は0.1ml HBSSで再懸濁し総細胞数の計測と白血球の分別測定に用いた。

結果を表5に示す。通常飼育室で飼育を行った対照群においては、肺胞洗浄液中の総細胞数、マクロファージ細胞数、好中球細胞数、KC量のいずれにおいても、野生型マウスとASK1 KOマウスの間で有意な差はみられなかった。次に野生型マウスとASK1 KOマウスのタバコ煙曝露後の気道炎症反応を比較したところ、総細胞数は野生型マウスで $12.0 \pm 0.9 \times 10^4$ 個であったが、ASK1 KOマウスでは $7.2 \pm 0.4 \times 10^4$ 個と有意に減少し、好中球数も野生型マウスで $6.5 \pm 0.7 \times 10^4$ 個、ASK1 KOマウスでは $2.2 \pm 0.4 \times 10^4$ 個と66%の有意な減少効果が観察された。一方、マクロファージ細胞数は野生型マウスとASK1 KOマウスの間で有意な差は見られなかった(5.3 ± 0.2 vs $4.8 \pm 0.4 \times 10^4$ 個、野生型vs ASK1 KOマウス)。また、肺胞洗浄液中のKC量を測定したところ、野生型マウスでは 57.0 ± 4.3 pg/ml、ASK1 KOマウスでは 41.6 ± 2.0 pg/mlとASK1 KOマウスで有意な減少がみられた。

[表 5] 各動物群の肺胞洗浄液中の細胞数ならびにKC産生量

マウス	例数	細胞数 (x10 ⁴ 個/肺胞洗浄液)			KC量 (pg/ml)
		総細胞	マクロファージ	好中球	
5 対照群					
C57BL/6Jマウス	4	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	0	16.2 ± 0.6
ASK1 KOマウス	6	2.8 ± 0.8	2.8 ± 0.8	0	16.4 ± 0.6
タバコ煙曝露群					
C57BL/6Jマウス	6	12.0 ± 0.9	5.3 ± 0.2	6.5 ± 0.7	57.0 ± 4.3
10 ASK1 KOマウス	8	7.2 ± 0.4**	4.8 ± 0.4	2.2 ± 0.4**	41.6 ± 2.0*

(平均 ± 標準誤差, *: P<0.05, **: P<0.01 vs 野生型 (C57BL/6J) マウス、students t検定)

実施例5' タバコ煙曝露 COPD モデルの肺組織における ASK1 の発現および活性の上昇

- 15 6 週齢の雄性マウス (C57BL/6J、日本クレア) を実験に供した。マウスをアクリル製チャンバーに収納し、自動タバコ煙発生装置(柴田科学)を用いタバコ(タバコ銘柄: Kentucky Research Cigarette 2R4F) 主流煙 (3%) をチャンバー内流入させ 30 分間のタバコ煙曝露を行った。タバコ煙曝露終了 3、6、9 時間後にマウスを屠殺し、肺を液体窒素中で急速冷凍させた。肺組織を 1 ml の氷冷ホモジネート バッファー (ホスファターゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤含) 中でホモジナイズし、遠心後の上清の蛋白定量を行った。肺ホモジネート (5mg 蛋白)
- 20 に抗 ASK1 抗体(N-19、Santa Cruz 社、4 μg/tube)を 2 μg/チューブ加え、4°Cで 1 時間転倒混和後、20 μL のプロテイン-G-セファロース (ファルマシア) を加えて、4°Cで 30 分間転倒混和することにより免疫沈降を行った。免疫沈降物を洗
- 25 浄後、SDS サンプルバッファーを加え 100°Cで 5 分間煮沸した。NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen 社) を用い、レーンあたり 10 μL のサンプルを電気

泳動 (150V、90 分) した。蛋白質を PVDF 膜に転写後、ブロッカー (大日本製薬社) を用い 4°C で一晩ブロッキングを行った。抗リン酸化 ASK1 抗体 (Cell signaling 社) あるいは抗 ASK1 抗体 (Santa Cruz 社) を 4°C で一晩反応させた後、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (anti-rabbit IgG, HRP-linked、アマシヤム社) を室温で 60 分間反応させた。基質には Super Signal West Maximum Sensitivity (PIERCE 社) を用い、化学発光を画像解析装置 (富士フィルム社) で検出した。

図 2 にリン酸化 ASK1 と ASK1 のウェスタンブロッティング (図 2 A) とバンドを定量化 (図 2 B) した結果を示す。ASK1 のリン酸化はタバコ煙暴露によって亢進し、3、6、9 時間後では pre 値と比較してそれぞれ 1.8、2.7、2.6 倍の増強が観察された。また、このときに ASK1 の発現量もリン酸化 ASK1 と同様のタイムコースで増加し、3、6、9 時間後では pre 値と比較してそれぞれ 1.8、2.3、2.6 倍の増強が観察された。以上の結果から、タバコ煙曝露刺激後の肺において ASK1 蛋白の発現量の増加に伴い ASK1 リン酸化 (活性化) も亢進していくことが判明した。

産業上の利用可能性

本発明のスクリーニング方法によれば、アポトーシスまたは炎症関連疾患、糖尿病またはその合併症、あるいは慢性閉塞性肺疾患に対して予防・治療効果を示す化合物を、迅速かつ簡便に選択することが可能であり、当該疾患の予防・治療薬の開発における薬効評価等のためのツールとして有用である。

本出願は、日本で出願された特願 2004-131731 (出願日: 2004 年 4 月 27 日) を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。
5
2. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、糖尿病またはその合併症の予防・治療物質のスクリーニング方法。
- 10 3. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。
4. 被験物質の存在下および非存在下における、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその
15 部分ペプチドまたはその塩の活性を比較することを特徴とする、請求の範囲1～3のいずれかに記載のスクリーニング方法。
5. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を比較することを特徴とする、
20 請求の範囲4記載のスクリーニング方法。
6. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求の範囲1～3のいずれかに記載のスクリーニング方法。
- 25 7. 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である請求の範囲2記載のスクリーニング方法。

8. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを特徴とする、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。
- 5
9. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを特徴とする、糖尿病またはその合併症の予防・治療物質のスクリーニング方法。
- 10
10. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有する細胞における該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を、被験物質の存在下と非存在下とで比較することを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。
- 15
11. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸、あるいは配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲8～10のいずれかに記載のスクリーニング方法。
- 20
12. 細胞が配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を産生する能力を有するものである、請求の範囲8～10のいずれかに記載のスクリーニング方法。
- 25
13. 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である請求の範囲9記載のスクリーニング方法。

1 4. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療剤。

5 1 5. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるアポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療方法。

10 1 6. アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

1 7. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病またはその合併症の予防・治療剤。

15 1 8. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における糖尿病またはその合併症の予防・治療方法。

20 1 9. 糖尿病またはその合併症の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

2 0. 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である請求の範囲17記載の予防・治療剤。

25 2 1. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤。

2 2. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ

酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の予防・治療方法。

23. 慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

24. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる2型糖尿病または糖尿病合併症の予防・治療剤。

25. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における2型糖尿病または糖尿病合併症の予防・治療方法。

26. 2型糖尿病または糖尿病合併症の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用。

27. 糖尿病合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である請求の範囲24記載の予防・治療剤。

28. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤。

29. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の予防・治療方法。

30. 慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用。

5 31. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤。

10 32. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを含む、哺乳動物におけるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断方法。

33. アポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

15 34. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病またはその合併症の診断剤。

35. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを含む、哺乳動物における糖尿病またはその合併症の診断方法。

20 36. 糖尿病またはその合併症の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

37. 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である請求の範囲34記載の診断剤。

25 38. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を

含有してなる慢性閉塞性肺疾患の診断剤。

39. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の診断方法。

5 40. 慢性閉塞性肺疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

41. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤。

42. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるアポトーシスまたは炎症関連疾患の診断方法。

15 43. アポトーシスまたは炎症関連疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用。

44. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる糖尿病またはその合併症の診断剤。

45. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における糖尿病またはその合併症の診断方法。

25 46. 糖尿病またはその合併症の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコ

ードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用。

47. 合併症が糖尿病性腎症または糖尿病性神経障害である請求の範囲44記載の診断剤。

48. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の診断剤。

49. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の診断方法。

50. 慢性閉塞性肺疾患の診断剤の製造のための、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸の使用。

51. ASK1阻害物質を含有してなる2型糖尿病または糖尿病合併症（糖尿病性神経障害を除く）の予防・治療剤。

52. ASK1阻害物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における2型糖尿病または糖尿病合併症（糖尿病性神経障害を除く）の予防・治療方法。

53. 2型糖尿病または糖尿病合併症（糖尿病性神経障害を除く）の予防・治療剤の製造のための、ASK1阻害物質の使用。

54. ASK1阻害物質がASK1のドミナントネガティブ変異体、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ネフ、14-3-3、チオレドキシシンおよびHSP72からなる群より選択される1以上の化合物である請求の範囲51記載の予防・治療剤。

55. 糖尿病合併症が糖尿病性腎症である請求の範囲51記載の予防・治療剤。

56. ASK1阻害物質を含有してなる慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤。

57. ASK1阻害物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患の予防・治療方法。

58. 慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤の製造のための、ASK1阻害物質の使用。

図 1

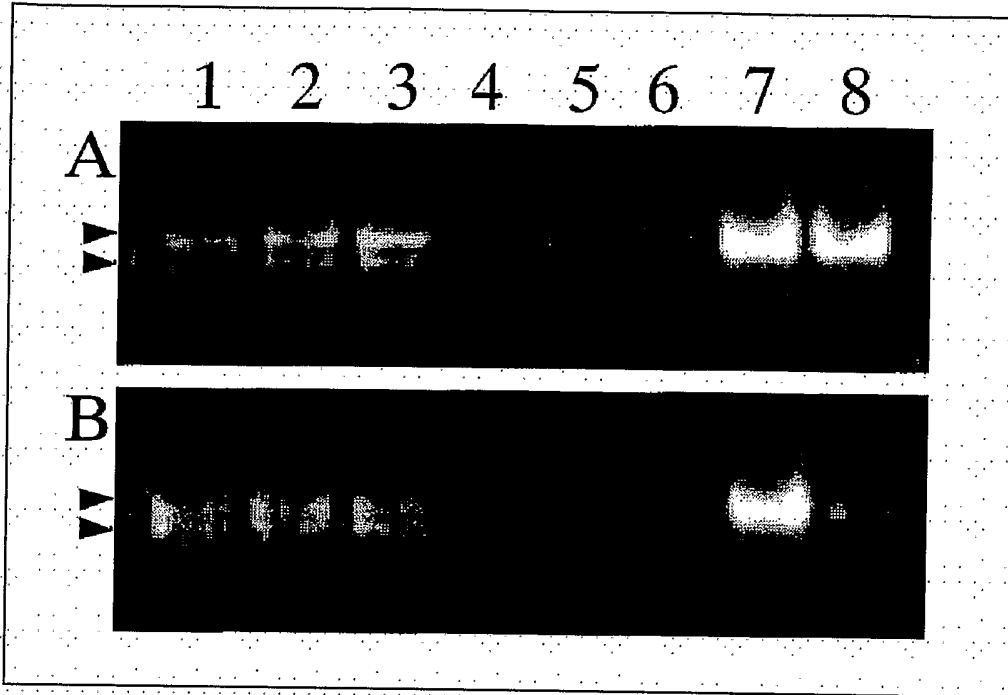


図 2 B

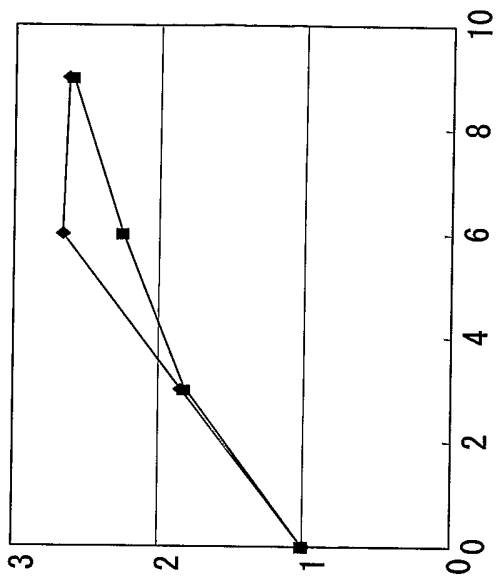
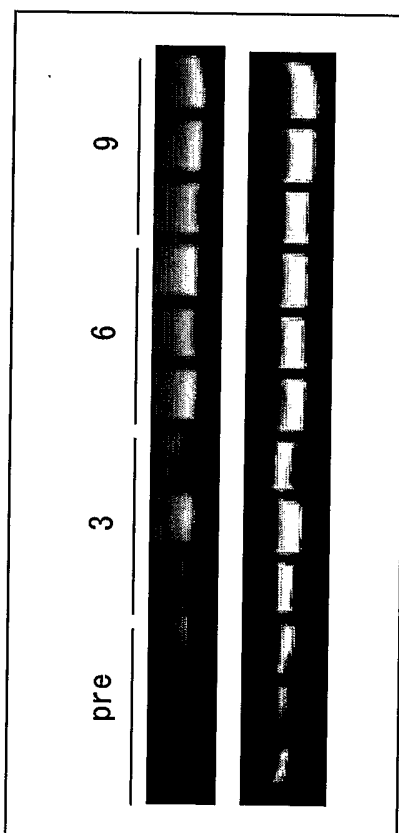


図 2 A



I/I4

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Screening Method

<130> 09762

<150> JP 2004-131731

<151> 2004-04-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 4125

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(4125)

<400> 1

atg agc acg gag gcg gac gag ggc atc act ttc tct gtg cca ccc ttc	48
Met Ser Thr Glu Ala Asp Glu Gly Ile Thr Phe Ser Val Pro Pro Phe	
1 5 10 15	

gcc ccc tcg ggc ttc tgc acc atc ccc gag ggc ggc atc tgc agg agg	96
Ala Pro Ser Gly Phe Cys Thr Ile Pro Glu Gly Gly Ile Cys Arg Arg	
20 25 30	

gga gga gcg gcg gcg gtg ggc gag ggc gag gag cac cag ctg cca ccg	144
Gly Gly Ala Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Glu His Gln Leu Pro Pro	
35 40 45	

ccg ccg ccg ggc agt ttc tgg aac gtg gag agc gcc gct gcc cct ggc	192
Pro Pro Pro Gly Ser Phe Trp Asn Val Glu Ser Ala Ala Ala Pro Gly	
50 55 60	

atc ggt tgt ccg gcg gcc acc tcc tcg agc agt gcc acc cga ggc cgg	240
Ile Gly Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Arg Gly Arg	
65 70 75 80	

ggc agc tct gtt ggc ggg ggc agc cga cgg acc acg gtg gca tat gtg	288
Gly Ser Ser Val Gly Gly Gly Ser Arg Arg Thr Thr Val Ala Tyr Val	
85 90 95	

atc aac gaa gcg agc caa ggg caa ctg gtg gtg gcc gag agc gag gcc	336
Ile Asn Glu Ala Ser Gln Gly Gln Leu Val Val Ala Glu Ser Glu Ala	
100 105 110	

2/14

ctg cag agc ttg cgg gag gcg tgc gag aca gtg ggc gcc acc ctg gaa Leu Gln Ser Leu Arg Glu Ala Cys Glu Thr Val Gly Ala Thr Leu Glu 115 120 125	384
acc ctg cat ttt ggg aaa ctc gac ttt gga gaa acc acc gtg ctg gac Thr Leu His Phe Gly Lys Leu Asp Phe Gly Glu Thr Thr Val Leu Asp 130 135 140	432
cgc ttt tac aat gca gat att gcg gtg gtg gag atg agc gat gcc ttc Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val Val Glu Met Ser Asp Ala Phe 145 150 155 160	480
cgg cag cgg tcc ttg ttt tac cac ctt ggg gtg aga gaa agt ttc agc Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser 165 170 175	528
atg gcc aac aac atc atc ctc tac tgc gat act aac tcg gac tct ctg Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu 180 185 190	576
cag tca ctg aag gaa atc att tgc cag aag aat act atg tgc act ggg Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly 195 200 205	624
aac tac acc ttt gtt cct tac atg ata act cca cat aac aaa gtc tac Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile Thr Pro His Asn Lys Val Tyr 210 215 220	672
tgc tgt gac agc agc ttc atg aag ggg ttg aca gag ctc atg caa cgg Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro 225 230 235 240	720
aac ttc gag ctg ctt ctt gga ccc atc tgc tta cct ctt gtg gat cgt Asn Phe Glu Leu Leu Leu Gly Pro Ile Cys Leu Pro Leu Val Asp Arg 245 250 255	768
ttt att caa ctt ttg aag gtg gca caa gca agt tct agc cag tac ttc Phe Ile Gln Leu Leu Lys Val Ala Gln Ala Ser Ser Ser Gln Tyr Phe 260 265 270	816
cgg gaa tct ata ctc aat gac atc agg aaa gct cgt aat tta tac act Arg Glu Ser Ile Leu Asn Asp Ile Arg Lys Ala Arg Asn Leu Tyr Thr 275 280 285	864
ggt aaa gaa ttg gca gct gag ttg gca aga att cgg cag cga gta gat Gly Lys Glu Leu Ala Ala Glu Leu Ala Arg Ile Arg Gln Arg Val Asp 290 295 300	912
aat atc gaa gtc ttg aca gca gat att gtc ata aat ctg tta ctt tcc Asn Ile Glu Val Leu Thr Ala Asp Ile Val Ile Asn Leu Leu Leu Ser 305 310 315 320	960
tac aga gat atc cag gac tat gat tct att gtg aag ctg gta gag act Tyr Arg Asp Ile Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Val Lys Leu Val Glu Thr	1008

3/14

				325					330					335		
tta	gaa	aaa	ctg	cca	acc	ttt	gat	ttg	gcc	tcc	cat	cac	cat	gtg	aag	1056
Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe	Asp	Leu	Ala	Ser	His	His	His	Val	Lys	
				340					345					350		
ttt	cat	tat	gca	ttt	gca	ctg	aat	agg	aga	aat	ctc	cct	ggt	gac	aga	1104
Phe	His	Tyr	Ala	Phe	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg	Asn	Leu	Pro	Gly	Asp	Arg	
				355					360					365		
gca	aaa	gct	ctt	gat	att	atg	att	ccc	atg	gtg	caa	agc	gaa	gga	caa	1152
Ala	Lys	Ala	Leu	Asp	Ile	Met	Ile	Pro	Met	Val	Gln	Ser	Glu	Gly	Gln	
				370					375					380		
gtt	gct	tca	gat	atg	tat	tgc	cta	gtt	ggt	cga	atc	tac	aaa	gat	atg	1200
Val	Ala	Ser	Asp	Met	Tyr	Cys	Leu	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Lys	Asp	Met	
				385					390					395	400	
ttt	ttg	gac	tct	aat	ttc	acg	gac	act	gaa	agc	aga	gac	cat	gga	gct	1248
Phe	Leu	Asp	Ser	Asn	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu	Ser	Arg	Asp	His	Gly	Ala	
				405					410					415		
tct	tgg	ttc	aaa	aag	gca	ttt	gaa	tct	gag	cca	aca	cta	cag	tca	gga	1296
Ser	Trp	Phe	Lys	Lys	Ala	Phe	Glu	Ser	Glu	Pro	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	
				420					425					430		
att	aat	tat	gcg	gtc	ctc	ctc	ctg	gca	gct	gga	cac	cag	ttt	gaa	tct	1344
Ile	Asn	Tyr	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	His	Gln	Phe	Glu	Ser	
				435					440					445		
tcc	ttt	gag	ctc	cgg	aaa	gtt	ggg	gtg	aag	cta	agt	agt	ctt	ctt	ggt	1392
Ser	Phe	Glu	Leu	Arg	Lys	Val	Gly	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	
				450					455					460		
aaa	aag	gga	aac	ttg	gaa	aaa	ctc	cag	agc	tac	tgg	gaa	gtt	gga	ttt	1440
Lys	Lys	Gly	Asn	Leu	Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Tyr	Trp	Glu	Val	Gly	Phe	
				465					470					475	480	
ttt	ctg	ggg	gcc	agc	gtc	cta	gcc	aat	gac	cac	atg	aga	gtc	att	caa	1488
Phe	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Ala	Asn	Asp	His	Met	Arg	Val	Ile	Gln	
				485					490					495		
gca	tct	gaa	aag	ctt	ttt	aaa	ctg	aag	aca	cca	gca	tgg	tac	ctc	aag	1536
Ala	Ser	Glu	Lys	Leu	Phe	Lys	Leu	Lys	Thr	Pro	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	
				500					505					510		
tct	att	gta	gag	aca	att	ttg	ata	tat	aag	cat	ttt	gtg	aaa	ctg	acc	1584
Ser	Ile	Val	Glu	Thr	Ile	Leu	Ile	Tyr	Lys	His	Phe	Val	Lys	Leu	Thr	
				515					520					525		
aca	gaa	cag	cct	gtg	gcc	aag	caa	gaa	ctt	gtg	gac	ttt	tgg	atg	gat	1632
Thr	Glu	Gln	Pro	Val	Ala	Lys	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Phe	Trp	Met	Asp	
				530					535					540		

4/14

ttc ctg gtc gag gcc aca aag aca gat gtt act gtg gtt agg ttt cca	1680
Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Thr Asp Val Thr Val Val Arg Phe Pro	
545 550 555 560	
gta tta ata tta gaa cca acc aaa atc tat caa cct tct tat ttg tct	1728
Val Leu Ile Leu Glu Pro Thr Lys Ile Tyr Gln Pro Ser Tyr Leu Ser	
565 570 575	
atc aac aat gaa gtt gag gaa aag aca atc tct att tgg cac gtg ctt	1776
Ile Asn Asn Glu Val Glu Glu Lys Thr Ile Ser Ile Trp His Val Leu	
580 585 590	
cct gat gac aag aaa ggt ata cat gag tgg aat ttt agt gcc tct tct	1824
Pro Asp Asp Lys Lys Gly Ile His Glu Trp Asn Phe Ser Ala Ser Ser	
595 600 605	
gtc agg gga gtg agt att tct aaa ttt gaa gaa aga tgc tgc ttt ctt	1872
Val Arg Gly Val Ser Ile Ser Lys Phe Glu Glu Arg Cys Cys Phe Leu	
610 615 620	
tat gtg ctt cac aat tct gat gat ttc caa atc tat ttc tgt aca gaa	1920
Tyr Val Leu His Asn Ser Asp Asp Phe Gln Ile Tyr Phe Cys Thr Glu	
625 630 635 640	
ctt cat tgt aaa aag ttt ttt gag atg gtg aac acc att acc gaa gag	1968
Leu His Cys Lys Lys Phe Phe Glu Met Val Asn Thr Ile Thr Glu Glu	
645 650 655	
aag ggg aga agc aca gag gaa gga gac tgt gaa agt gac ttg ctg gag	2016
Lys Gly Arg Ser Thr Glu Glu Gly Asp Cys Glu Ser Asp Leu Leu Glu	
660 665 670	
tat gac tat gaa tat gat gaa aat ggt gac aga gtc gtt tta gga aaa	2064
Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Asp Arg Val Val Leu Gly Lys	
675 680 685	
ggc act tat ggg ata gtc tac gca ggt cgg gac ttg agc aac caa gtc	2112
Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala Gly Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val	
690 695 700	
aga att gct att aag gaa atc cca gag aga gac agc aga tac tct cag	2160
Arg Ile Ala Ile Lys Glu Ile Pro Glu Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln	
705 710 715 720	
ccc ctg cat gaa gaa ata gca ttg cat aaa cac ctg aag cac aaa aat	2208
Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu His Lys His Leu Lys His Lys Asn	
725 730 735	
att gtc cag tat ctg ggc tct ttc agt gag aat ggt ttc att aaa atc	2256
Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile	
740 745 750	
ttc atg gag cag gtc cct gga gga agt ctt tat gct ctc ctt cgt tcc	2304
Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly Ser Leu Tyr Ala Leu Leu Arg Ser	

755	760	765	
aaa tgg ggt cca tta aaa gac aat gag caa aca att ggc ttt tat aca Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn Glu Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr 770 775 780			2352
aag caa ata ctg gaa gga tta aaa tat ctc cat gac aat cag ata gtt Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys Tyr Leu His Asp Asn Gln Ile Val 785 790 795 800			2400
cac cgg gac ata aag ggt gac aat gtg ttg att aat acc tac agt ggt His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn Val Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly 805 810 815			2448
gtt ctc aag atc tct gac ttc gga aca tca aag agg ctt gct ggc ata Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile 820 825 830			2496
aac ccc tgt act gaa act ttt act ggt acc ctc cag tat atg gca cca Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr Gly Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro 835 840 845			2544
gaa ata ata gat aaa gga cca aga ggc tac gga aaa gca gca gac atc Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg Gly Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile 850 855 860			2592
tgg tct ctg ggc tgt aca atc att gaa atg gcc aca gga aaa ccc cca Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro 865 870 875 880			2640
ttt tat gaa ctg gga gaa cca caa gca gct atg ttc aag gtg gga atg Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln Ala Ala Met Phe Lys Val Gly Met 885 890 895			2688
ttt aaa gtc cac cct gag atc cca gag tcc atg tct gca gag gcc aag Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro Glu Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys 900 905 910			2736
gca ttc ata ctg aaa tgt ttt gaa cca gat cct gac aag aga gcc tgt Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu Pro Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys 915 920 925			2784
gct aac gac ttg ctt gtt gat gag ttt tta aaa gtt tca agc aaa aag Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu Phe Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys 930 935 940			2832
aaa aag aca caa cct aag ctt tca gct ctt tca gct gga tca aat gca Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser Ala Leu Ser Ala Gly Ser Asn Ala 945 950 955 960			2880
gaa tat ctc agg agt ata tcc ttg ccg gta cct gtg ctg gtg gag gac Glu Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro Val Pro Val Leu Val Glu Asp 965 970 975			2928

6/14

acc agc agc agc agt gag tac ggc tca gtt tca ccc gac acg gag ttg	2976
Thr Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu	
980 985 990	
aaa gtg gac ccc ttc tct ttc aaa aca aga gcc aag tcc tgc gga gaa	3024
Lys Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu	
995 1000 1005	
aga gat gtc aag gga att cgg aca ctc ttt ttg ggc att cca gat	3069
Arg Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu Phe Leu Gly Ile Pro Asp	
1010 1015 1020	
gag aat ttt gaa gat cac agt gct cct cct tcc cct gaa gaa aaa	3114
Glu Asn Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro Ser Pro Glu Glu Lys	
1025 1030 1035	
gat tct gga ttc ttc atg ctg agg aag gac agt gag agg cga gct	3159
Asp Ser Gly Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser Glu Arg Arg Ala	
1040 1045 1050	
acc ctt cac agg atc ctg acg gaa gac caa gac aaa att gtg aga	3204
Thr Leu His Arg Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys Ile Val Arg	
1055 1060 1065	
aac cta atg gaa tct tta gct cag ggg gct gaa gaa ccg aaa cta	3249
Asn Leu Met Glu Ser Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro Lys Leu	
1070 1075 1080	
aaa tgg gaa cac atc aca acc ctc att gca agc ctc aga gaa ttt	3294
Lys Trp Glu His Ile Thr Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu Phe	
1085 1090 1095	
gtg aga tcc act gac cga aaa atc ata gcc acc aca ctg tca aag	3339
Val Arg Ser Thr Asp Arg Lys Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys	
1100 1105 1110	
ctg aaa ctg gag ctg gac ttc gac agc cat ggc att agc caa gtc	3384
Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp Ser His Gly Ile Ser Gln Val	
1115 1120 1125	
cag gtg gta ctc ttt ggt ttt caa gat gct gtc aat aaa gtt ctt	3429
Gln Val Val Leu Phe Gly Phe Gln Asp Ala Val Asn Lys Val Leu	
1130 1135 1140	
cgg aat cat aac atc aag cgg cac tgg atg ttt gcc tta gac agt	3474
Arg Asn His Asn Ile Lys Pro His Trp Met Phe Ala Leu Asp Ser	
1145 1150 1155	
atc att cgg aag gcg gta cag aca gcc att acc atc ctg gtt cca	3519
Ile Ile Arg Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile Thr Ile Leu Val Pro	
1160 1165 1170	
gaa cta agg cca cat ttc agc ctt gca tct gag agt gat act gct	3564
Glu Leu Arg Pro His Phe Ser Leu Ala Ser Glu Ser Asp Thr Ala	

7/14

1175		1180		1185	
gat caa gaa gac ttg gat gta gaa gat gac cat gag gaa cag cct					3609
Asp Gln Glu Asp Leu Asp Val Glu Asp Asp His Glu Glu Gln Pro					
1190		1195		1200	
tca aat caa act gtc cga aga cct cag gct gtc att gaa gat gct					3654
Ser Asn Gln Thr Val Arg Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu Asp Ala					
1205		1210		1215	
gtg gct acc tca ggc gtg agc acg ctc agt tct act gtg tct cat					3699
Val Ala Thr Ser Gly Val Ser Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser His					
1220		1225		1230	
gat tcc cag agt gct cac cgg tca ctg aat gta cag ctt gga agg					3744
Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg					
1235		1240		1245	
atg aaa ata gaa acc aat aga tta ctg gaa gaa ttg gtt cgg aaa					3789
Met Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu Glu Glu Leu Val Arg Lys					
1250		1255		1260	
gag aaa gaa tta caa gca ctc ctt cat cga gct att gaa gaa aaa					3834
Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg Ala Ile Glu Glu Lys					
1265		1270		1275	
gac caa gaa att aaa cac ctg aag ctt aag tcc caa ccc ata gaa					3879
Asp Gln Glu Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Ile Glu					
1280		1285		1290	
att cct gaa ttg cct gta ttt cat cta aat tct tct ggc aca aat					3924
Ile Pro Glu Leu Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser Gly Thr Asn					
1295		1300		1305	
att gaa gat tct gaa ctt acc gac tgg ctg aga gtg aat gga gct					3969
Ile Glu Asp Ser Glu Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn Gly Ala					
1310		1315		1320	
gat gaa gac act ata agc cgg ttt ttg gct gaa gat tat aca cta					4014
Asp Glu Asp Thr Ile Ser Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr Leu					
1325		1330		1335	
ttg gat gtt ctc tac tat gtt aca cgt gat gac tta aaa tgc ttg					4059
Leu Asp Val Leu Tyr Tyr Val Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu					
1340		1345		1350	
aga cta agg gga ggg atg ctg tgc aca ctg tgg aag gct atc att					4104
Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu Cys Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile					
1355		1360		1365	
gac ttt cga aac aaa cag act					4125
Asp Phe Arg Asn Lys Gln Thr					
1370		1375			

8/14

<210> 2
 <211> 1375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Thr Glu Ala Asp Glu Gly Ile Thr Phe Ser Val Pro Pro Phe
 1 5 10 15

Ala Pro Ser Gly Phe Cys Thr Ile Pro Glu Gly Gly Ile Cys Arg Arg
 20 25 30

Gly Gly Ala Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Glu His Gln Leu Pro Pro
 35 40 45

Pro Pro Pro Gly Ser Phe Trp Asn Val Glu Ser Ala Ala Ala Pro Gly
 50 55 60

Ile Gly Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Arg Gly Arg
 65 70 75 80

Gly Ser Ser Val Gly Gly Gly Ser Arg Arg Thr Thr Val Ala Tyr Val
 85 90 95

Ile Asn Glu Ala Ser Gln Gly Gln Leu Val Val Ala Glu Ser Glu Ala
 100 105 110

Leu Gln Ser Leu Arg Glu Ala Cys Glu Thr Val Gly Ala Thr Leu Glu
 115 120 125

Thr Leu His Phe Gly Lys Leu Asp Phe Gly Glu Thr Thr Val Leu Asp
 130 135 140

Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val Val Glu Met Ser Asp Ala Phe
 145 150 155 160

Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser
 165 170 175

Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu
 180 185 190

9/14

Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly
 195 200 205

Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile Thr Pro His Asn Lys Val Tyr
 210 215 220

Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro
 225 230 235 240

Asn Phe Glu Leu Leu Leu Gly Pro Ile Cys Leu Pro Leu Val Asp Arg
 245 250 255

Phe Ile Gln Leu Leu Lys Val Ala Gln Ala Ser Ser Ser Gln Tyr Phe
 260 265 270

Arg Glu Ser Ile Leu Asn Asp Ile Arg Lys Ala Arg Asn Leu Tyr Thr
 275 280 285

Gly Lys Glu Leu Ala Ala Glu Leu Ala Arg Ile Arg Gln Arg Val Asp
 290 295 300

Asn Ile Glu Val Leu Thr Ala Asp Ile Val Ile Asn Leu Leu Leu Ser
 305 310 315 320

Tyr Arg Asp Ile Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Val Lys Leu Val Glu Thr
 325 330 335

Leu Glu Lys Leu Pro Thr Phe Asp Leu Ala Ser His His His Val Lys
 340 345 350

Phe His Tyr Ala Phe Ala Leu Asn Arg Arg Asn Leu Pro Gly Asp Arg
 355 360 365

Ala Lys Ala Leu Asp Ile Met Ile Pro Met Val Gln Ser Glu Gly Gln
 370 375 380

Val Ala Ser Asp Met Tyr Cys Leu Val Gly Arg Ile Tyr Lys Asp Met
 385 390 395 400

10/14

Phe Leu Asp Ser Asn Phe Thr Asp Thr Glu Ser Arg Asp His Gly Ala
 405 410 415

Ser Trp Phe Lys Lys Ala Phe Glu Ser Glu Pro Thr Leu Gln Ser Gly
 420 425 430

Ile Asn Tyr Ala Val Leu Leu Leu Ala Ala Gly His Gln Phe Glu Ser
 435 440 445

Ser Phe Glu Leu Arg Lys Val Gly Val Lys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 450 455 460

Lys Lys Gly Asn Leu Glu Lys Leu Gln Ser Tyr Trp Glu Val Gly Phe
 465 470 475 480

Phe Leu Gly Ala Ser Val Leu Ala Asn Asp His Met Arg Val Ile Gln
 485 490 495

Ala Ser Glu Lys Leu Phe Lys Leu Lys Thr Pro Ala Trp Tyr Leu Lys
 500 505 510

Ser Ile Val Glu Thr Ile Leu Ile Tyr Lys His Phe Val Lys Leu Thr
 515 520 525

Thr Glu Gln Pro Val Ala Lys Gln Glu Leu Val Asp Phe Trp Met Asp
 530 535 540

Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Thr Asp Val Thr Val Val Arg Phe Pro
 545 550 555 560

Val Leu Ile Leu Glu Pro Thr Lys Ile Tyr Gln Pro Ser Tyr Leu Ser
 565 570 575

Ile Asn Asn Glu Val Glu Glu Lys Thr Ile Ser Ile Trp His Val Leu
 580 585 590

Pro Asp Asp Lys Lys Gly Ile His Glu Trp Asn Phe Ser Ala Ser Ser
 595 600 605

Val Arg Gly Val Ser Ile Ser Lys Phe Glu Glu Arg Cys Cys Phe Leu
 610 615 620

11/14

Tyr Val Leu His Asn Ser Asp Asp Phe Gln Ile Tyr Phe Cys Thr Glu
625 630 635 640

Leu His Cys Lys Lys Phe Phe Glu Met Val Asn Thr Ile Thr Glu Glu
645 650 655

Lys Gly Arg Ser Thr Glu Glu Gly Asp Cys Glu Ser Asp Leu Leu Glu
660 665 670

Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Asp Arg Val Val Leu Gly Lys
675 680 685

Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala Gly Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val
690 695 700

Arg Ile Ala Ile Lys Glu Ile Pro Glu Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln
705 710 715 720

Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu His Lys His Leu Lys His Lys Asn
725 730 735

Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile
740 745 750

Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly Ser Leu Tyr Ala Leu Leu Arg Ser
755 760 765

Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn Glu Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr
770 775 780

Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys Tyr Leu His Asp Asn Gln Ile Val
785 790 795 800

His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn Val Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly
805 810 815

Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile
820 825 830

12/14

Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr Gly Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro
 835 840 845

Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg Gly Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile
 850 855 860

Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro
 865 870 875 880

Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln Ala Ala Met Phe Lys Val Gly Met
 885 890 895

Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro Glu Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys
 900 905 910

Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu Pro Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys
 915 920 925

Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu Phe Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys
 930 935 940

Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser Ala Leu Ser Ala Gly Ser Asn Ala
 945 950 955 960

Glu Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro Val Pro Val Leu Val Glu Asp
 965 970 975

Thr Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu
 980 985 990

Lys Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu
 995 1000 1005

Arg Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu Phe Leu Gly Ile Pro Asp
 1010 1015 1020

Glu Asn Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro Ser Pro Glu Glu Lys
 1025 1030 1035

Asp Ser Gly Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser Glu Arg Arg Ala
 1040 1045 1050

13/14

Thr Leu His Arg Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys Ile Val Arg
 1055 1060 1065

Asn Leu Met Glu Ser Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro Lys Leu
 1070 1075 1080

Lys Trp Glu His Ile Thr Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu Phe
 1085 1090 1095

Val Arg Ser Thr Asp Arg Lys Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys
 1100 1105 1110

Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp Ser His Gly Ile Ser Gln Val
 1115 1120 1125

Gln Val Val Leu Phe Gly Phe Gln Asp Ala Val Asn Lys Val Leu
 1130 1135 1140

Arg Asn His Asn Ile Lys Pro His Trp Met Phe Ala Leu Asp Ser
 1145 1150 1155

Ile Ile Arg Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile Thr Ile Leu Val Pro
 1160 1165 1170

Glu Leu Arg Pro His Phe Ser Leu Ala Ser Glu Ser Asp Thr Ala
 1175 1180 1185

Asp Gln Glu Asp Leu Asp Val Glu Asp Asp His Glu Glu Gln Pro
 1190 1195 1200

Ser Asn Gln Thr Val Arg Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu Asp Ala
 1205 1210 1215

Val Ala Thr Ser Gly Val Ser Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser His
 1220 1225 1230

Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg
 1235 1240 1245

14/14

Met Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu Glu Glu Leu Val Arg Lys
1250 1255 1260

Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg Ala Ile Glu Glu Lys
1265 1270 1275

Asp Gln Glu Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Ile Glu
1280 1285 1290

Ile Pro Glu Leu Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser Gly Thr Asn
1295 1300 1305

Ile Glu Asp Ser Glu Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn Gly Ala
1310 1315 1320

Asp Glu Asp Thr Ile Ser Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr Leu
1325 1330 1335

Leu Asp Val Leu Tyr Tyr Val Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu
1340 1345 1350

Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu Cys Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile
1355 1360 1365

Asp Phe Arg Asn Lys Gln Thr
1370 1375

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12Q1/48, A61K31/7088, 38/00, 38/43, 38/45, 38/55, 39/395, 48/00, A61P3/10, 11/00, 13/12, 25/02, 27/02, 29/00, 43/00, C12Q1/02, 1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12Q1/48, A61K31/7088, 38/00, 38/43, 38/45, 38/55, 39/395, 48/00, A61P3/10, 11/00, 13/12, 25/02, 27/02, 29/00, 43/00, C12Q1/02, 1/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-000093 A (Japanese Foundation For Cancer Research), 06 January, 1998 (06.01.98), All pages; (particularly, Par. Nos. [0008], [0048] to [0050], [0074] to [0092]; Sequence Nos. 1, 2 & WO 1997/040143 A1 & US 6194187 B1 & EP 0896055 A2	1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43
X	JP 2003-505063 A (Isis Pharmaceuticals Inc.), 12 February, 2003 (12.02.03), Par. Nos. [0004] to [0005]; Sequence No. 1 & WO 2001/007461 A1 & US 2000/6080546 A1	1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43
<input checked="" 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 application or patent 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 15 July, 2005 (15.07.05)		Date of mailing of the international search report 02 August, 2005 (02.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008375

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ERINN, et al., Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation, J.Biol.Chem., Vol.279, No.11, 12 March, 2004 (12.03.04), pages 10442 to 10449	1,4-6,11-12,31,33,41,43
A	WO 2002/038179 A1 (KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 16 May, 2002 (16.05.02), All pages & AU 2402202 A	1,4-6,8, 11-12,31,33, 41,43
A	TAKEDA, et al., Roles of MARKKK ASK1 in stress-induced cell death, Cell Struct.Funct., Vol.28, No.1, 2003, February, pages 23 to 29	1,4-6,8, 11-12,31,33, 41,43
A	WO 2003/008413 A1 (BAYER AG.), 30 January, 2003 (30.01.03), All pages (particularly, page 1, lines 1 to 28; page 13, lines 6 to 8) & US 0220208 A	1,4-6,8, 11-12,31,33, 41,43
A	JP 2003-512377 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 02 April, 2003 (02.04.03), All pages (particularly, Claims 19 to 21, 23; Par. Nos. [0001], [0003]) & WO 2001/029041 A1 & US 6642241 B1	1,4-6,8, 11-12,31,33, 41,43
P,A	JP 2005-60408 A (Redokkusu BioScience Kabushiki Kaisha), 10 March, 2005 (10.03.05), (Family: none)	1,4-6,8, 11-12,31,33, 41,43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008375

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 15, 32, 42
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15, 32, 42 are relevant to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: see extra sheet
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

The inventions as claimed in claims 1, 8, 14 to 16, 31 to 33 and 41 to 43 aim at controlling the activity of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, i.e., "ASK1" protein to thereby use it in preventing/treating apoptosis- or inflammation-related diseases or the like. The inventions as claimed in claims 2, 7, 9, 13, 17 to 20, 24 to 27, 34 to 37, 44 to 47 and 51 to 55 aim at controlling the activity of "ASK1" protein to thereby use it in preventing/treating diseases such as diabetes. The inventions as claimed in claims 3, 10, 21 to 23, 28 to 30, 38 to 40, 48 to 50 and 56 to 58 aim at controlling the activity of "ASK1" protein to thereby use it in preventing/treating chronic obstructive pulmonary (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts of claims 4 to 6 and 11 to 12 and claims 1, 8, 14 to 16, 31 to 33 and 41 to 43.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008375

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

Parts of claims 1, 4 to 6, 8, 11 to 12, 31, 33, 41 and 43 and claims 14 and 16 relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirement to such an extent that no meaningful international search can be carried out. Namely,

Parts of claims 1, 8, 4 to 6, 11 to 12, 31, 33, 41 and 43

Even though the statement in the description of the present case is taken into consideration, it is unknown what "a protein containing an amino acid sequence which is substantially the same" as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 as claimed in claims 1, 8, 4 to 6, 11 to 12, 31, 33, 41 and 43 specifically means. Thus, the parts of claims 1, 8, 4 to 6, 11 to 12, 31, 33, 41 and 43 are neither clearly nor briefly described.

Concerning "a protein containing an amino acid sequence which is substantially the same" in the above claims 1, 4 to 6, 8, 11 to 12, 31, 33, 41 and 43, for example, a protein having a homology of 70% with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 and a protein derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by deletion, addition, substitution, etc. of as many as 300 amino acids are cited in the description of the present case. However, there is seemingly a low possibility that a protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by so many mutations still sustains the same activity as the protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. Therefore, it is unknown whether or not "a protein containing an amino acid sequence which is substantially the same" relates to apoptosis- or inflammation-related diseases, even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration. Thus, "a protein containing an amino acid sequence which is substantially the same" relating to claims 1, 4 to 6, 8, 11 to 12, 31, 33, 41 and 43 is neither supported by the description nor described therein in such a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on inventions which are neither supported by the description nor described therein in such a manner sufficiently clear and complete.

Parts of claims 1, 4 to 6, 8 and 11 to 12

Concerning "a partial peptide" as claimed in claims 1, 4 to 6, 8 and 11 to 12, it is never indicated in EXAMPLES, etc. what partial amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 relates to the onset of apoptosis- or inflammation-related diseases in practice. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unknown what partial peptide in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 relates to apoptosis- or inflammation-related diseases. Thus, "a partial peptide" as claimed in claims 1, 4 to 6, 8 and 11 to 12 is neither supported by the description nor described therein in such a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on inventions which are neither supported by the description nor described therein in such a manner sufficiently clear and complete.

(continued to next page)

Claims 14 and 16

Concerning the inventions relating to a preventive/remedy as claimed in claims 14 and 16, the usability thereof as a preventive/remedy is not sufficiently supported in EXAMPLES, etc. by presenting pharmacological data or the like. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unknown whether or not an antibody against the amino acid sequence ASK1 represented by SEQ ID NO:2 is usable as a preventive/remedy for apoptosis- or inflammation-related diseases. Thus, it appears that the inventions according to claims 14 and 16 are neither supported by the description nor described therein in such a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on inventions which are neither supported by the description nor described therein in such a manner sufficiently clear and complete.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

disease. Namely, the matter common to there invention groups resides in relating to "ASK1" protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. However, this point has been publicly known as reported by, for example, JP 10-000093A (JAPAN Found Cancer Res.).

Such being the case, the inventions as claimed in claims 1, 8, 14 to 16, 31 to 33 and 41 to 43, the inventions as claimed in claims 2, 7, 9, 13, 17 to 20, 24 to 27, 34 to 37, 44 to 47 and 51 to 55 and the inventions as claimed in 3, 10, 21 to 23, 28 to 30, 38 to 40, 48 to 50 and 56 to 58 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but being divided into three invention groups comprising inventions differing from each other. It is recognized that claims 4 to 6 and 11 to 12 have three groups of inventions differing from each other.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ C12Q1/48, A61K31/7088, 38/00, 38/43, 38/45, 38/55, 39/395, 48/00, A61P3/10, 11/00, 13/12, 25/02, 27/02, 29/00, 43/00, C12Q1/02, 1/68

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.⁷ C12Q1/48, A61K31/7088, 38/00, 38/43, 38/45, 38/55, 39/395, 48/00, A61P3/10, 11/00, 13/12, 25/02, 27/02, 29/00, 43/00, C12Q1/02, 1/68

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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2005年
 日本国実用新案登録公報 1996-2005年
 日本国登録実用新案公報 1994-2005年

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)
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST ファイル (JOIS)

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	JP 10-000093 A (財団法人癌研究会) 1998.01.06, 全頁 (特に、段落番号【0008】、【0048】 - 【0050】、【0074】 - 【0092】、配列番号 1, 2 を参照) & WO 1997/040143 A1 & US 6194187 B1 & EP0896055 A2	1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43
X	JP 2003-505063 A (アイシス・ファーマシューティカルス・インコーポレーテッド) 2003.02.12, 段落番号【0004】 - 【0005】、配列番号 1 & WO 2001/007461 A1 & US 2000/6080546 A1	1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43

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 15. 07. 2005
 国際調査報告の発送日 02. 8. 2005

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 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) 4B 3538
 阪野 誠司
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 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
A	ERINN, et al., Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation, J. Biol. Chem., Vol.279, No.11, 2004.03.12, p.10442-10449	1, 4-6, 8, 11-12, 31,33, 41, 43
A	WO 2002/038179 A1 (KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2002.05.16, 全頁 & AU 2402202 A	1, 4-6, 8, 11-12, 31,33, 41, 43
A	TAKEDA, et al., Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death, Cell Struct. Funct., Vol.28, No.1, 2003.02, p.23-29	1, 4-6, 8, 11-12, 31,33, 41, 43
A	WO 2003/008413 A1 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2003.01.30, 全頁 (特に第1頁第1-28行、及び、第13頁第6-8行を参照) & US 0220208 A	1, 4-6, 8, 11-12, 31,33, 41, 43
A	JP 2003-512377 A (エフ. ホフマン ロシュ アーゲー) 2003.04.02, 全頁 (特に、【請求項 19】 - 【請求項 21】 , 【請求項 23】 , 段落番号 【0001】 - 【0003】 を参照) & WO 2001/029041 A1 & US 6642241 B1	1, 4-6, 8, 11-12, 31,33, 41, 43
P, A	JP 2005-60408 A (レドックス・バイオサイエンス株式会社) 2005.03.10 (ファミリーなし)	1, 4-6, 8, 11-12, 31,33, 41, 43

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 15, 32, 42 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲15, 32, 42は、人の身体の治療による処置方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 特別ページを参照 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、特別ページを参照。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1, 8, 14-16, 31-33, 41-43 に記載された発明は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、すなわち「ASK1」蛋白質の活性を制御することで、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療等に利用するものである。請求の範囲 2, 7, 9, 13, 17-20, 24-27, 34-37, 44-47, 51-55 に記載された発明は、「ASK1」蛋白質の活性を制御することで、糖尿病等の疾病の予防・治療等に利用するものである。請求の範囲 3, 10, 21-23, 28-30, 38-40, 48-50, 56-58 に記載された発明は、「ASK1」蛋白質の活性を制御することで、慢性閉塞性肺疾患の予防・治療等に利用するものである。すると、これらの発明群の共通事項は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる「ASK1」蛋白質に係ることであるが、この点は、例えば、JP 10-000093 A (財団法人癌研究会) 1998.01.06 に記載されているように公知である。(特別ページに続く)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 4-6, 11-12 の一部, 1, 8, 14-16, 31-33, 41-43

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<第II欄の続き>

請求の範囲 1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43 の一部, 14, 16 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

請求の範囲 1, 8, 4-6, 11-12, 31, 33, 41, 43 の一部

請求の範囲 1, 8, 4-6, 11-12, 31, 33, 41, 43 の配列番号：2 で表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」は、本願明細書の記載を参酌しても、具体的にどのようなものか不明である。よって、請求項の範囲 1, 8, 4-6, 11-12, 31, 33, 41, 43 の一部は、明確かつ簡潔に記載されていない。

上記請求の範囲 1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43 の「実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質」について、本願明細書には、例えば、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と 70% の同一性を有するもの、又は、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列に 300 個もの欠失・付加・置換等を有する蛋白質が挙げられているが、配列番号：2 の中にこのように多くの変異を有するアミノ酸配列を含有する蛋白質が、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と同じ活性を有する蓋然性は低いと認められる。すると、「実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質」がアポトーシスまたは炎症関連疾患に関与することは、出願時の技術常識を参酌しても不明である。したがって、請求の範囲 1, 4-6, 8, 11-12, 31, 33, 41, 43 に係る「実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質」について、明細書に裏付けられているとは言えないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に記載されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 1, 4-6, 8, 11-12 の一部

請求の範囲 1, 4-6, 8, 11-12 の「部分ペプチド」について、実施例等を見ても、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列中のどの部分アミノ酸配列が、アポトーシスまたは炎症関連疾患の発症に関与するのか実際に示されておらず、出願時の技術常識を参酌しても、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列中のどの部分ペプチドが、アポトーシスまたは炎症関連疾患に関与するのか不明である。したがって、請求の範囲 1, 4-6, 8, 11-12 に係る「部分ペプチド」について、明細書に裏付けられているとは言えないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に記載されていない発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 14, 16

請求の範囲 14, 16 の予防・治療剤に係る発明について、実施例等を見ても、薬理データ等により予防・治療剤として利用できることを示す十分な裏付けがされていないし、出願時の技術常識を参酌しても、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列 A S K 1 に対する抗体が、アポトーシスまたは炎症関連疾患の予防・治療剤として使用できるか不明である。したがって、請求の範囲 14, 16 に係る発明について、明細書に裏付けられているとは言えないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に記載されていない発明については、調査を行っていない。

<第Ⅲ欄の続き>

よって、請求の範囲 1, 8, 14-16, 31-33, 41-43 に記載された発明、請求の範囲 2, 7, 9, 13, 17-20, 24-27, 34-37, 44-47, 51-55 に記載された発明、及び、請求の範囲 3, 10, 21-23, 28-30, 38-40, 48-50, 56-58 に記載された発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは言えず、異なる 3 の発明からなる発明群であると認められる。また、請求の範囲 4-6, 11-12 は、異なる 3 の発明を含むと認められる。