

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年11月8日 (08.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/83705 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/15, 1/19, 5/00, 7/00, 15/00,
C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18

田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 本
社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03700

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) 国際出願日: 2001年4月27日 (27.04.2001)

(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2000-126741 2000年4月27日 (27.04.2000) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番
1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田陽史
(YAMADA, Yoji) [JP/JP]. 関根 進 (SEKINE, Susumu)
[JP/JP]. 桜田一洋 (SAKURADA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒
194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵
工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 菊池泰弘
(KIKUCHI, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代

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: MYOCARDIAL CELL PROLIFERATION-ASSOCIATED GENES

(54) 発明の名称: 心筋細胞増殖関連遺伝子

(57) Abstract: Genes showing different expression doses in fetal heart from adult heart are acquired. Thus proteins useful in searching for remedies for repairing tissues injured by myocardial necrosis, DNAs encoding these proteins, antibodies recognizing these proteins and methods of using the same are provided.

(57) 要約:

胎児心臓と成体心臓とで発現量が変化する遺伝子群を取得し、心筋壊死によ
って障害を受けた組織を修復するための治療薬の探索に有用な蛋白質、該蛋白
質をコードするDNAおよび該蛋白質を認識する抗体、ならびにこれらの利用法を
提供する。

WO 01/83705 A1

明 細 書

心筋細胞増殖関連遺伝子

技術分野

本発明は、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動するmRNAを基にして、サブトラクション法およびディファレンシャルハイブリダイゼーション法を用いて取得した該mRNAに相補するDNA (cDNA) 、および該DNAがコードする蛋白質に関する。また、該蛋白質に対する抗体、該蛋白質および該DNAの検出方法、ならびに該DNA、蛋白質、抗体などを含む、心筋壊死を原因とする種々の心疾患、例えば心肥大、心不全などの疾患の診断薬および治療薬に関する。

背景技術

心臓は個体発生の極めて早期に、臓器としては最も早く分化し、分化後すぐに自律拍動を開始する。心筋細胞は分化後も分裂能を維持し、胎生期の間は活発に分裂増殖を続ける。つまり、この時期の心筋細胞の特徴は、細胞質に多数の収縮フィラメントの束を含んでいるにもかかわらず、有糸分裂を有することである。

他の多くの体細胞は、それぞれ分化を遂げて特殊な細胞質構造ができあがると、分裂能が失われるが、心筋細胞の場合、この一般法則から逸脱している。

出生後、心筋細胞の増殖能は急速に低下する。このため、心臓の成長は個々の心筋細胞の大きさが増すという生理的肥大によっておこなわれ、出生後の心筋細胞には再生能力がないと考えられている。

心筋梗塞、心筋炎、老化等により心筋細胞が壊死すると、残存心筋細胞は細胞分裂ではなく、細胞肥大により適応する。出生直後の心肥大は生理的適応であるが、この場合は、共存する心線維芽細胞の増生、間質の線維化と相まって心臓自体の拡張機能の低下、さらには収縮機能の低下へと結びつき、心不全を呈してくる。心筋梗塞等による心不全のこれまでの治療では、心収縮力の増強薬や血管拡張薬による圧負荷や容量負荷の軽減、利尿薬による体積量の減少等の対処療法が主に行われてきた。重篤な心不全は予後が不良であり、抜本的治療法としては心臓移植しかないが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒

絶反応、医療費の高騰等の問題から心臓移植が一般的な治療法となっていない。

もし、成体心筋細胞に増殖能が付与されれば、心不全を治療、予防できると考えられる。現在、心筋細胞が出生後増殖能を喪失する分子機構については不明である。しかし、胎児および成体における心筋細胞の性質の違いから、胎児心臓で高発現している分子、または成体心臓で高発現している分子が心筋細胞の増殖抑制に関与している、ことが考えられる。

現在までに、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する蛋白質として、以下のようなものが知られている。

成体心臓に比べて胎児心臓で高発現している蛋白質として、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)、Rb(retinoblastoma)、Cyc(cyclin)D1、CycD3、Cdk(Cyclin D-dependent kinase)4等、DNA複製や細胞周期に関与するものが知られている〔Am. J. Physiol., 271, H2183-H2189 (1996)〕。一方、胎児心臓に比べて成体心臓で高発現している蛋白質として、Gax(Growth arrest-specific homeobox)が知られている〔Am. J. Physiol., 271, H2183-H2189 (1996)〕。

しかし、例えば、心筋細胞特異的にCyclinD1を強制発現させたトランスジェニックマウスにおいて、成体心筋細胞での多核は観察されたものの、成体型収縮蛋白質が発現するのみで細胞数の顕著な増加は観察されていない〔J. Clinical Investigation, 99, 2644-2654 (1997)〕等、これらの蛋白質のみで成体心筋細胞に増殖能を与えることには成功していない。

従って、心筋細胞の増殖に関与すると考えられる、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する新たな因子の同定が求められている。

発明の開示

胎児期には増殖能を有していた心筋細胞が、出生後、増殖能を喪失する分子メカニズムを解明できれば、心筋壊死を原因とする種々の心疾患の発症機構ならびに治療のターゲットを知ることができ、心筋細胞の再生方法を開発することができる。本発明の目的は、胎児心臓と成体臓とで発現量が変化する遺伝子を取得し、心筋壊死によって障害を受けた組織を修復するような治療薬の探索

に有用な蛋白質、該蛋白質をコードするDNAおよび該蛋白質を認識する抗体、並びにこれらの利用法を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究し以下の結果を得た。すなわち、胎生16日目のラット心臓由来のmRNAを鋳型として作製したcDNAライブラリーを、生後8週齢のラット心臓より抽出したmRNAで差し引くことにより、胎児心臓で発現が高い遺伝子が濃縮されたサブトラクションライブラリーを構築した。該サブトラクションライブラリーでは、発現量の低い遺伝子が均一化する現象ならびに挿入断片のない空のベクターが増加することから、サブトラクションライブラリーの各cDNAクローンについてディファレンシャルハイブリダイゼーションを行うことにより、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動するような遺伝子のクローンを多数取得した。該クローンの中には既に胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動することが知られている遺伝子に加えて、その変動が今まで知られていなかった遺伝子、および新規遺伝子が含まれていた。また、ノーザンハイブリダイゼーションを行って、それら遺伝子の発現変動を確認した。さらに該遺伝子がコードするペプチドを見出すことにより、本発明を完成させるに至った。

以下、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子を心筋細胞増殖関連遺伝子とも言う。

本願は、以下の(1)～(59)に記載の発明を提供する。

- (1) 配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNA。
- (2) 配列番号21または27で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のDNA。
- (3) 配列番号23、25または30で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしかつ該DNAと90%以上の相同性を有し、かつ胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のDNA。
- (4) 配列番号21、23、25、27および30で表わされる塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有する

DNA。

(5) 上記(4)記載のDNAと相補的な配列を有するDNA。

(6) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のmRNAを検出する方法。

(7) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。

(8) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の原因遺伝子を検出する方法。

(9) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

(10) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを用いて心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(11) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(12) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAを含む組換えウイルスベクター。

(13) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター。

(14) 配列番号19、32および37で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNA。

(15) 上記(14)記載のDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズする、胎児心臓と成体心臓とで発現が変動する遺伝子のDNA。

(16) 配列番号19、32および37で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA。

(17) 上記(16)記載のDNAと相補的な配列を有するDNA。

(18) 上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。

(19) 上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のDNAを用いる、心筋壊

死を原因とする心疾患の原因遺伝子を検出する方法。

(20) 上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

(21) 上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のDNAを用いて心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(22) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のmRNAを検出する方法。

(23) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。

(24) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

(25) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(26) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(27) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを含む組換えウイルスベクター。

(28) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター。

(29) 配列番号22、24、26、28および31で表されるアミノ酸配列

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質。

(30) 配列番号22、24、26および28で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列とは1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ心筋壊死を原因とする心疾患の修復に関与する活性を有する蛋白質。

(31) 上記(29)または(30)記載の蛋白質をコードするDNA。

(32) 上記(1)～(4)および(31)のいずれか1項記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(33) 上記(32)記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(34) 上記(33)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(29)または(30)記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

(35) 上記(29)または(30)記載の蛋白質を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(36) 上記(33)記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物を用いて心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(37) 上記(29)または(30)記載の蛋白質を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(38) 上記(29)または(30)記載の蛋白質の生産に関与する組換えウイルスベクター。

(39) 上記(38)記載の組換えウイルスベクターを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(40) 上記(29)または(30)記載の蛋白質を認識する抗体。

(41) 上記(40)記載の抗体を用いる上記(29)または(30)記載の蛋白質の免疫学的検出方法。

(42) 上記(40)記載の抗体を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(43) 上記(40)記載の抗体を用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が

変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

(44) 上記(40)記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。

(45) 上記(40)記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(46) 上記(40)記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質および低分子化合物から選ばれる薬剤とを結合させた融合抗体を心臓病巣へ誘導するドラッグデリバリー方法。

(47) 配列番号20または38で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体。

(48) 上記(47)記載の抗体を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(49) 上記(47)記載の抗体を用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変わる遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制する物質をスクリーニングする方法。

(50) 上記(47)記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。

(51) 上記(47)記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(52) 上記(47)記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質および低分子化合物から選ばれる薬剤とを結合させた融合抗体を心臓病巣へ誘導するドラッグデリバリー方法。

(53) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、34および36で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質の生産に関与する組換えウイルスベクター。

(54) 上記(53)記載の組換えウイルスベクターを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(55) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、34および36で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する

蛋白質を認識する抗体を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

(56) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、34および36で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

(57) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、34および36で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。

(58) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、34および36で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。

(59) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、34および36で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体と放射性同位元素、蛋白質および低分子化合物より選ばれる薬剤とを結合させた融合抗体を心臓病巣へ誘導するドラッグデリバリー方法。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のDNAは胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のDNAであり、例えば、配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNA、および該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動するDNAをあげることができる。

上記の配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列から選ばれる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列から選ばれる塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、細菌の

コロニーあるいはファージのプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃で標識したDNAプローブとのハイブリダイゼーションを行った後、0.1倍~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略記する）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略記する）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列から選ばれる塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは90%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

さらに、本発明のDNAとして、本発明のDNAの一部の配列を有するオリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドも含まれる。該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列から選ばれる塩基配列中の連続した5~60残基、好ましくは10~40残基の塩基配列と同じ配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができ、アンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、該オリゴヌクレオチドのアンチセンス・オリゴヌクレオチドをあげることができる。

本発明の蛋白質として、心筋壊死を原因とする心疾患に関連する活性を有する蛋白質をあげることができ、具体的には、配列番号22、24、26、28および31で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号22、24、26および28で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列とは1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ心筋壊死を原因とする心疾患の修復に関与する活

性を有する蛋白質をあげることができる。

配列番号 22、24、26 および 28 で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質のアミノ酸配列とは 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ心筋壊死を原因とする心疾患の修復に関与する活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング 第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

1 心筋細胞増殖関連遺伝子の調製

(1) ラット心臓分化cDNAライブラリーの調製とディファレンシャルハイブリダイゼーションによるライブラリーからのcDNAの選択

心筋細胞増殖関連遺伝子DNAを以下のようにして調製する。

まず、生後8週齢ラット心臓mRNAを用いて分化を行った胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーを作製し、その分化cDNAライブラリー中のcDNAクローンについて、さらに胎生16日ラット心臓RNAと生後8週齢ラット心臓RNAをそれぞれプローブとしたディファレンシャルハイブリダイゼーションを行って胎生16日心臓と生後8週齢心臓とで発現量が異なるcDNAクローンを選択することによって心筋細胞増殖関連遺伝子を得ることができる。

分化とは、ある条件の組織や細胞から抽出したmRNAから1本鎖cDNAを作製して対照群の細胞のmRNAとハイブリダイズさせ、mRNAとハイブリダイズしたcDNAだけを除くことによって、対照群と比較して発現量が異なる遺伝子のcDNAを選択する方法である。

(1) - 1 分化cDNAライブラリーの作製

分化cDNAライブラリーの作製法にはいくつかの方法があるが、本発明では、まず通常の方法で胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーを作製し、ヘルパーファージを用いて1本鎖DNAに転換した後、分化を行う方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 825 (1991)〕をとる。分化は、ビオチン化した8週齢ラット心

臓mRNAとハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしたビオチン化mRNA-cDNA複合体にさらにストレプトアビジンを結合させた後、フェノール抽出により分離する方法を用いる。

(1) -1-A 胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーの作製

ラット心臓からの全RNAの調製方法としては、チオシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)] 等をあげることができる。

mRNAは一般に3'末端にポリ(A)が付加しているので、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング 第2版) 等により、全RNAからポリ(A)+RNAを調製することができる。

さらに、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット (Fast Track mRNA Isolation Kit: Invitrogen社製)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット (Quick Prep mRNA Purification Kit: Amersham Pharmacia Biotech社製) 等のキットを用いてmRNAを調製することもできる。

mRNAからcDNAライブラリーの作製法としては、モレキュラー・クローニング 第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング (SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; Life Technologies社製) やザップ-cDNA・シンセシス・キット (ZAP-cDNA Synthesis Kit; Stratagene社製) を用いる方法等があげられる。

クローニングベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) 中で高いコピー数で複製可能で、アンピシリン耐性遺伝子やカナマイシン耐性遺伝子等の形質転換用のマーカー遺伝子、cDNAを挿入できるマルチクローニングサイト等を有しており、かつ一本鎖DNAへの変換が簡単にできるクローニングベクターがあげられる。クローニングベクターとしては、M13ファージの複製シグナルIG (intergenic space) を含みヘルパーファージの感染により一本鎖DNAファージに変換可能な

プラスミドであるファージミドベクターがあげられる。具体的には、pBluescriptSK(-)、pBluescriptII KS(+)、pBS(-)、pBC(+)[以上いずれもストラタジーン(Stratagene)社製]、pUC118(宝酒造社製)等があげられる。ヘルパーファージを利用したイン・ビボ・エクシジョン(in vivo excision)により、ファージミドに変換が可能な入ファージベクターがあげられる。具体的には、 λ ZAPII、ZAPExpress(両者ともストラタジーン社製)等があげられる。上述したイン・ビボ・エクシジョン、一本鎖DNAファージへの変換方法、および培養上清中のファージからの一本鎖DNAの精製方法はそれぞれ市販のベクターに添付されたマニュアルに従って行うことができる。

cDNAを組み込んだベクターを導入する大腸菌としては、導入した遺伝子を発現できるものならいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [Stratagene社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]等を用いることができる。

差別化にはcDNAと生後8週齢ラット心臓のmRNAとのハイブリダイゼーションを用いることと、ファージミドからできる一本鎖DNAは、ファージミドの種類により二本鎖のうちのどちらの鎖ができるか決まっていることから、cDNAライブラリー作製に際しては、どのcDNAクローンからも一本鎖DNAとしてアンチセンス鎖(実際のmRNAとは相補的な塩基配列をもつ鎖)ができるようにcDNAの作製とベクターへの挿入方向を工夫する。

例えば、ストラタジーン社のZAPcDNA合成キットのマニュアルに記載のように、逆転写酵素によるcDNA合成には5'末端にXhoIサイトをもつオリゴdTプライマーと、基質としてdCTPの代わりに5-メチルdCTP(合成後のcDNAの内部でXhoI切断できないようになる。)を含むdNTPとを用いて行う。合成されたcDNAの両端にEcoRIアダプターを付加した後に、XhoIで切断する。切断されたcDNAをベクター λ ZAPIIのEcoRI/XhoIサイト間に挿入すると、常にcDNAのEcoRIサイト側が

5'末端でXhoIサイト側が3'末端になり、ベクターへの挿入方向が一定になる。

上述の方法で得られたcDNAライブラリーは、インビボエクシジョンによりファージミドベクターpBluescript SK(-)に変換した後、ヘルパーファージを感染させることにより、cDNA部分がアンチセンス鎖の1本鎖DNAを取得することができる。

(1) - 1 - B 生後8週齢ラット心臓mRNAを用いた差分化

(1) - 1 - Aで調製したファージミドベクターのcDNAライブラリーについて、ヘルパーファージを感染させることにより、培養液中に一本鎖DNAファージを放出させる。該培養液から一本鎖cDNAを精製回収する。λファージベクターを用いる場合には、インビボエクシジョンを行ってベクターをファージミドに変換した後に上記と同様の操作を行う（モレキュラー・クローニング第2版）。一本鎖DNAの精製方法はモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に基づいて行うことができる。

差分化の具体的操作および試薬の組成や反応条件はGenes to Cells, 3, 459 (1998)に記載された方法で行うことができる。(1) - 1 - Aで示した方法で調製した生後8週齢ラット心臓mRNAを、フォトプローブビオチン〔ベクター・ラボラトリーズ (Vector Laboratories) 社製〕等を用いてビオチン化を行った後、上記の一本鎖胎生16日ラット心臓cDNAとハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後の溶液にビオチンと強固に結合するストレプトアビジンを反応させることにより、ビオチン化mRNAとハイブリダイズしたcDNAに、さらにストレプトアビジンを結合させ、疎水性を上昇させた後、フェノールを加えて抽出操作を行う。ハイブリダイズしないcDNAを水層から分取することができる。

なおフェノール層にはビオチン化mRNAとハイブリダイズしたcDNAが抽出される。

(1) - 1 - C 差分化後のcDNAライブラリー化

(1) - 1 - Bの差分化cDNAについて、ベクター部分の塩基配列と相補的な塩基配列をもつ適当なプライマーおよびBcaBEST（宝酒造社製）、Klenow断片等のDNAポリメラーゼを利用して二本鎖にした後、大腸菌に導入することにより、再度cDNAライブラリーとすることができる。大腸菌への導入方法は形質転換効

率が高いエレクトロポレーション法が好ましい。

(1) - 2 ディファレンシャルハイブリダイゼーション

(1) - 1 で作製した差分化cDNAライブラリーには、胎生16日ラット心臓で発現量が増加する遺伝子のcDNAが濃縮されているが、該ライブラリーの中の全てのcDNAクローンが心筋細胞増殖関連遺伝子であるとは限らない。これらの中から心筋細胞増殖関連遺伝子のcDNAを選択するには、それぞれのcDNAクローンをプローブにしたノーザン・ハイブリダイゼーション（モレキュラー・クローニング第2版）やcDNAクローンの塩基配列に基づいたプライマーを用いたRT（reverse-transcribed）-PCR法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕により胎生16日ラット心臓または生後8週齢ラット心臓のmRNAの発現量を比較することにより、どちらかでmRNAの発現量の高い心筋細胞増殖関連遺伝子のcDNAを選択する。また、以下に示すディファレンシャルハイブリダイゼーションを行うことにより、発現量の増加しているcDNAクローンを包括的かつ効率的に選択することもできる。

まず、(1) - 1 の方法で得られた差分化cDNAライブラリーを、個々のコロニーが分離できる程度の濃度に希釈して寒天培地上に広げて培養し、分離したコロニーをそれぞれ同一条件で液体培地中で培養する。該培養液中の大腸菌に含まれるcDNAを鋳型として、クローニングベクター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR法によりcDNAを増幅させる。その後、反応溶液を同一量2枚のナイロンメンブレンにスポットさせる。モレキュラー・クローニング第2版に記載の方法でナイロンメンブレン上のDNAの変性と中和を行った後、紫外線照射によりナイロンメンブレンにDNAを固定する。該メンブレンについて1枚は胎生16日ラット心臓の全mRNA、もう1枚は生後8週齢ラット心臓の全mRNAをそれぞれプローブにしてハイブリダイゼーションを行い、そのハイブリダイズシグナルの強弱を比較することにより、生後8週齢ラット心臓と胎生16日ラット心臓とで発現量が異なるクローンを選択する。選んだクローンの各コロニーを96穴プレートに分離して培養し、Hydra96 (Robbins Scientific社製) 等の96穴プレートに対応した自動微量分注装置を使用して反応溶液を分注した後PCR反応を行う。この操作により多数のクローンについて同じ量のDNAがプロットされ

た2枚の同一のメンブレンを容易に素早く調製でき、しかも元のクローンとの対応も明瞭である。

プローブとしては、通常のDNAプローブと同様にmRNA全体に対し逆転写酵素とランダムプライマーを用いて作製した標識cDNAを用いることも可能だが、RNAプローブの方が、メンブレン上のDNAに対しDNAプローブより強固にハイブリダイズして強いシグナルを与えるため、望ましい。プローブの標識には、³²P、³⁵Sなどの放射性同位体またはジゴキシゲニン (digoxigenin ; DIG)、ビオチン等の非放射性物質が用いられるが、安全性から非放射性物質がより好ましい。

胎生16日ラット心臓、および生後8週齢ラット心臓それぞれのRNAプローブと上記で作製したメンブレンをハイブリダイズさせた後、各コロニーDNAとハイブリダイズしたプローブを検出する。ハイブリダイズしたプローブの検出には標識物質によりそれぞれ適した方法が用いられる。例えば、放射性同位元素の場合は直接X線フィルムあるいはイメージングプレートを感光させるオートラジオグラフィにより、DIGの場合はDIGシステムユーザーガイド（ロシュ社製）に従いアルカリフォスファターゼ標識した抗DIG抗体を結合させた後、アルカリフォスファターゼにより発光するCSPD等の基質を反応させてX線フィルムを感光させる方法などが感度よくまた定量的に検出する方法として用いられる。

例えば、胎生16日ラットの心臓と生後8週齢ラットの心臓と比較して、どちらかで多く発現している遺伝子は、プローブ中に存在するその遺伝子のmRNA分子数の割合も高くなる。したがって、メンブレン上に等量のDNAがブロットイングされていれば、その遺伝子に対応するcDNAのスポットにはより多くのプローブが結合することになる。すなわち、同じcDNAクローンのDNAがブロットされている2枚のメンブレン上のハイブリダイズシグナルの強度を比較することにより、胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とで発現量が異なる遺伝子のcDNAを選択することができる。

このようにして得られたラットcDNAとして、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、32、33、35および37に示す塩基配列を有するラットcDNAをあげることができる。

(2) DNA塩基配列の解析

上記の方法で選択された、胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とで発現量が異なる遺伝子のcDNAについて、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシーケンサー(Perkin Elmer社製)等の塩基配列分離装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

上記方法で決定された塩基配列の新規性は、Blast等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより確認できる。

(3) 全長cDNAの調製

上述の方法で得られたDNAが、cDNAの部分DNAである場合には、例えば、cDNAクローンの塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 8998(1988)〕により、元のcDNAよりも5'末端側のcDNA断片を得ることができ、このcDNA断片と元のcDNAを繋ぎあわせることにより、全長のcDNAを取得することができる。

このようにして得られる、心筋細胞増殖関連遺伝子の全長cDNAとして、例えば、配列番号21、23、25、27および30で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

また、以上のようにして全長cDNAの塩基配列が明らかになった後は、塩基配列に基づいたプライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法により目的とするDNAを取得することができる。また、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、フォスフォアミダイト法を利用したPerkin Elmer社製のDNA合成機モデル392等をあげることができる。

(4) ヒトにおける相当遺伝子の取得

以上のようにして得られた、ラット胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子に対応する遺伝子は、ヒトにも存在すると考えられる。一般に同じ機能を有する蛋白質は動物種が異なってもアミノ酸配列に高い相同性があり、該蛋白質をコードしている遺伝子の塩基配列にも高い相同性がある傾向がある。

したがって、ラットのcDNAをプローブにして、ヒトの心臓のcDNAライブラリーからややストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションを行うことによってヒトcDNAを取得することが可能である。ややストリンジェントな条件は、以下の方法で決定する。

ヒトcDNAとラットcDNAの相同性の程度によって異なるが、制限酵素で切断したヒト染色体DNAに、ラットcDNAをプローブとして、度合いが異なるいくつかのハイブリダイズ条件でサザンブロットを行い、明確なバンドが見える条件のうち最もストリンジェントな条件をややストリンジェントな条件として決定する。具体的には、ホルムアミドを含まないハイブリダイズ液の場合、ハイブリダイズ液の組成は塩濃度を1 Mに固定し、ハイブリダイズ温度を68℃～42℃の間で段階的に変えてハイブリダイズを行う。メンブレンの洗浄は、ハイブリダイズ時と同じ温度で、0.5%SDSを含む2×SSCを用いて行う。ホルムアミドを含むハイブリダイズ液の場合、温度(42℃)と塩濃度(6×SSC)を固定して、ホルムアミド濃度を50%～0%で段階的に変えてハイブリダイズを行う。メンブレンの洗浄は、50℃で0.5%SDSを含む6×SSCを用いて行う。

また、(1)または(3)で得られたラットcDNAの塩基配列に対して、(2)と同様にして塩基配列の新規性と相同性の検索を行い、ラットcDNAの中の塩基配列のうち、蛋白質をコードしている領域全体において60%、好ましくは80%以上の相同性を示すヒトのcDNAの塩基配列を検索する。高い相同性を示すヒトcDNAは、(1)または(3)で得られたラット遺伝子に相当するヒト遺伝子のcDNAと推定される。したがって、このヒトcDNAの5'末端および3'末端の塩基配列に対応するプライマーを用いて、ヒトの細胞や組織、好ましくは心臓組織あるいは心臓由来の細胞から抽出したRNAを鋳型にしてRT-PCRを行うことにより、このヒトcDNAを増幅することができる。なお、ここでデータベース中で見出されるヒトcDNAが全長のものでなかったりESTの塩基配列だけの場合もあるが、このような場合も、ラットcDNAについて(3)に記載したのと同様な方法により全長のヒトcDNAを得ることができる。

また、このようにして得られたヒトcDNAは(2)と同様にして塩基配列を解析し、そのcDNAがコードするヒト蛋白質のアミノ酸配列を明らかにすることが

できる。

(5) ゲノム遺伝子の取得

モレキュラー・クローニング第2版に記載の方法により、ラットあるいはヒトの細胞や組織から単離した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブラリーに対して、(1)あるいは(4)で得られたラットあるいはヒトcDNAをプローブにして、プラークハイブリダイゼーション等の方法でスクリーニングすることにより、本発明の遺伝子のラットあるいはヒトのゲノムDNAを得ることができる。ゲノムDNAの塩基配列とcDNAの塩基配列を比較することにより該遺伝子のエキソン/イントロン構造を明らかにすることができる。また、特にcDNAの5'末端の部分をプローブにすることにより、本発明の遺伝子のプロモーターなど転写を制御するゲノム遺伝子領域の塩基配列を明らかにすることができる。この配列は本発明の遺伝子の転写の制御機構を解析するのに役立つ。また、相同性組換えの手法〔例えば、Nature, 324, 34-38 (1987)、Cell, 51, 503-512 (1987)等〕により、染色体上の本発明の遺伝子を不活化または任意の配列と置換したクローンを作製することもできる。

(6) オリゴヌクレオチドの調製

本発明のDNAの塩基配列情報を用いて、常法あるいはDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するオリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、5'末端側の塩基配列に相当するセンスプライマー、3'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマー等をあげることができる。ただし、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはチミジンとなる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることはないオリゴヌクレオチドで、5~60塩基数のものが好ましい。

さらに、これらオリゴヌクレオチドの誘導體（以下、オリゴヌクレオチド誘導體という）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' スフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

2 心筋細胞増殖関連蛋白質の生産

完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、あるいは完全長cDNAを発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換え発現ベクターを造成する。

該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

宿主細胞としては、目的とするDNAを発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア (Escherichia) 属、セラチア (Serratia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、バチルス (Bacillus) 属、マイクロバクテリウム (Microbacterium) 属等に属する細菌、クルイベロミセス (Kluyveromyces) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Shizosaccharomyces) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、シワニオミセス (Schwanniomyces) 属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用

いることができる。

発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、心筋細胞増殖関連遺伝子DNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、心筋細胞増殖関連遺伝子DNA組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、心筋細胞増殖関連遺伝子DNAおよび転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。ベクターにはプロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Amersham Pharmacia Biotech社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pKYP10〔特開昭58-110600〕、pKYP200〔Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（Stratagene社製）、pGEX（Amersham Pharmacia Biotech社製）、pET-3（Novagen社製）、pTerm2（USP4686191、USP4939094、USP5160735）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)〕等を例示することができる。

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したものをを用いることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（P_{trp}）、lacプロモーター（P_{lac}）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター（P_{trp} x 2）、tacプロモーター、letIプロモーター〔Gene, 44, 29 (1986)〕、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いる

ことができる。

本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子DNAの蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主細胞での発現に最適なコドンとなるように置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No. 49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換え発現ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法〔特開昭63-248394〕、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO 5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター

ター、ADHプロモーター、*gal 1*プロモーター、*gal 10*プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*)等をあげることができる。

組換え発現ベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1 (Invitrogen社製)、pcDM8 (Invitrogen社製)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 [特開昭63-299]等をあげることができる。

組換え発現ベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)〕等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスペクション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル（Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual）、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1-3 8 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

遺伝子導入用ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス（*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*）等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York, (1992)〕、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるHigh 5（Invitrogen社製）等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法〔特開平2-227075〕、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA,

84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に心筋細胞増殖関連蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、心筋細胞増殖関連蛋白質を製造することができる。

本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を製造するための形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母等の真核生物を宿主細胞とする場合、これら形質転換体を培養する培地は、該宿主細胞が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの宿主細胞が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを有する発現ベクターを用いた形質転換体を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを有する発現ベクターを用いた形質転換体を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを有する発現ベクターを用いた形質転換体を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T. C. C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

形質転換体の培養物から、心筋細胞増殖関連蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、蛋白質が、細胞内に溶解状態で産生した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、蛋白質の精製標品を得ることができる。

また、蛋白質が細胞内に不溶体を形成して産生した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。

回収した蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

可溶化液を希釈あるいは透析して、可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により蛋白質の精製標品を得る。

蛋白質あるいはその糖修飾体等が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質あるいはその糖修飾体等を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 22、24、26、28 および 31 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質等をあげることができる。

また、本発明の蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、

tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、米国Advanced ChemTech社製、Perkin-Elmer社製、Amersham Pharmacia Biotech社製、米国Protein Technology Instrument社製、米国Synthecell-Vega社製、米国PerSeptive社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

3 心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体の調製

本発明蛋白質の全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを抗原として50~100 μ g/匹程、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスターなどの非ヒトほ乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロイントの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。ペプチドを抗原とする場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫測定法[酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。

免疫に用いた抗原に対し、血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、抗体産生細胞と非ヒトほ乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、培養液または腹水から分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞としては、脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾臓の抗体産生細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株であるP3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等、マウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。

抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT培地 (正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地) に懸濁したのち、7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、抗原に反応し、抗原を含まない蛋白質には反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて用いる方法があげられる。

4 心筋細胞増殖関連蛋白質を生産する組換えウイルスベクターの調製

以下に、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を特定のヒト組織内で生産するための組換えウイルスベクターの調製法について述べる。

心筋細胞増殖関連遺伝子の完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、あるいは完全長cDNAをウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。

RNAウイルスベクターの場合には、心筋増殖関連遺伝子の完全長cDNAに相同なRNA断片を調製し、それらをウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスを造成する。RNA断片は、2本鎖のほか、ウィル

スベクターの種類に応じて、センス鎖もしくはアンチセンス鎖のどちらか一方の鎖を選択する。例えば、レトロウィルスベクターの場合は、センス鎖に相同なRNAを、センスウィルスベクターの場合には、アンチセンス鎖に相同なRNAを選択する。

該組換えウィルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、ウィルスのパッケージングに必要な蛋白質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウィルスベクターの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものでもよい。例えば、ヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウィルスベクターの場合はマウスレトロウィルス由来のgag、pol、env、レンチウィルスベクターの場合はH I Vウィルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef、アデノウィルスベクターの場合はアデノウィルス由来のE1A、E1Bが、アデノ随伴ウィルスの場合はRep (p5, p19, p40) , Vp (Cap) などの蛋白質があげられる。

ウィルスベクターとしては、上記パッケージング細胞において組換えウィルスが生産でき、標的細胞で心筋細胞増殖関連遺伝子DNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、pBabePuro[Nucleic Acids Res., 18, 3587-3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG[Journal of Virology, 72, 8150-8157(1998)]、pAdex1[Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821(1995)]等が用いられる。プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウィルス（ヒトCMV）のI E (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウィルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

パッケージング細胞への組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法〔特開平2-227075号公報〕、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

5 心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの検出

以下に本発明の心筋増殖関連遺伝子のDNAを用いて、心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAを検出する方法について述べる。

当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37で表される塩基配列を有するDNAもしくはそれらから得られるDNA断片等があげられる。

心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現量や構造変化を検出する方法としては、例えば(1)ノーザンブロット法(2) *in situ*ハイブリダイゼーション法、(3)定量的PCR法、(4)デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、(5)DNAチップ法、(6)RNAse保護アッセイ法などの方法等があげられる。

上記方法による分析に供する検体としては、心疾患患者ならびに健常者より取得した心臓組織、血清、唾液等の生体試料、あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料から取得したmRNAあるいは全RNAが用いられる(以後、該mRNAおよび全RNAを検体由来RNAと称する)。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

ノーザンブロット法では、検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写し、本発明のDNAより調製した標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAに特異的に結合したバンドを検出することにより、心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの発現量ならびに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼーションを行う際には、プローブと検体由来RNA中の心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAが安定なハイブリッドを形成する条件でインキュベーションする。偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、

プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えば、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている。

ノーザンブロット法に用いる標識プローブは、例えば、公知の方法(ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたはキナーゼ)により放射性同位体、ビオチン、蛍光基、化学発光基等を、本発明のDNAあるいは該DNAの配列から設計したオリゴヌクレオチドに取り込ませることで調製することができる。標識プローブの結合量は心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの発現量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することで心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの発現量を定量することができる。また、標識プローブ結合部位を分析することで、心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの構造変化を知ることができる。

in situハイブリダイゼーション法は、上記標識プローブと、生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いてハイブリダイゼーションおよび洗浄の工程を行うことにより、心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現量を検出する方法である。in situハイブリダイゼーション法で、偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載されている。

定量的PCR法、デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法またはDNAチップ法等の心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの検出法は、検体由来RNAに、オリゴdTプライマーあるいはランダムプライマーおよび逆転写酵素を用いてcDNAを合成することに基づいた方法で行うことができる(以後、該cDNAを検体由来cDNAと称する)。検体由来RNAがmRNAの場合は、上記いずれのプライマーも用いることができるが、該検体由来RNAが全RNAである場合は、オリゴdTプライマーを用いる。

定量的PCR法では、検体由来cDNAをテンプレートとし、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことで、心筋細胞増殖

関連遺伝子のmRNA由来のDNA断片が増幅する方法である。増幅DNA断片の量は心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現量を反映することから、アクチンやG3PDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)等をコードするDNAを内部コントロールとして置くことで心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの量を定量することが可能である。また、増幅DNA断片をゲル電気泳動により分離することで、心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの構造の変化を知ることができる。本検出法では、標的配列を特異的にかつ効率的に増幅する適当なプライマーを用いることが望ましい。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的cDNAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAからはずれる等の条件に基づき設計することができる。増幅DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加しているPCR反応の内に行うことが必要である。このようなPCR反応は、各反応ごとに生産される該増幅DNA断片を回収してゲル電気泳動で定量分析することで知ることができる。

デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法 [Trends in Genetics, 7, 314-317 (1991)] やDNAチップ法 [Genome Research, 6, 639-645 (1996)] は、検体由来cDNAをプローブとして、本発明のDNAを固定化させたフィルターまたはスライドガラスあるいはシリコンなどの基盤に対して、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことにより、心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの発現量の変動を検出する方法である。いずれの方法もフィルターまたは基盤上に、アクチンやG3PDHなどの内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体間での心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現の違いを正確に検出することができる。また対照検体と標的検体由来のRNAを基にそれぞれ異なる標識dNTPを用いて標識cDNA合成を行い、フィルターまたは基盤に二つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることにより正確な心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現量の定量を行うことができる。

RNase保護アッセイ法は、以下の方法により行う。まず、本発明のDNAの3'末端にT7プロモーター、SP6プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、RNAポリメラーゼを用いた *in vitro* の転写系により標識した r N T P を用いて、標識したアンチセンスRNAを合成する。該標識アンチセンスRNAを検体由来RNAと結

合させて、RNA-RNAハイブリッドを形成させた後、RNaseで消化し、消化から保護されたRNA断片をゲル電気泳動によりバンドを形成させ検出する。得られたバンドを定量することで、心筋細胞増殖関連遺伝子mRNAの発現量を定量することができる。

6 心疾患原因遺伝子の検出

以下に本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを用いて心筋壊死を原因とする心疾患の原因遺伝子を検出する方法について述べる。

当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37で表される塩基配列を有するDNAもしくはそれらから得られるDNA断片等があげられる。

心筋細胞増殖関連遺伝子座中に存在する心疾患の原因となる変異の存在の有無を評価するための最も明確な試験は、対照集団からの遺伝子と心疾患患者からの遺伝子とを直接比較することである。

具体的には心疾患患者ならびに健常人から、心臓組織、血清、唾液等のヒト生体試料あるいは、該生体試料から樹立した初代培養細胞由来の試料を集め、該生体試料ならびに該初代培養細胞由来試料中からDNAを抽出する（以後、該DNAを検体由来DNAと称する）。該検体由来DNAは直接あるいは、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いて増殖した心筋細胞増殖関連遺伝子DNAを試料DNAとして用いることができる。別法として、該検体由来cDNAをテンプレートとして、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーによりPCRを行うことで増殖した心筋細胞増殖関連遺伝子のDNA配列を含むDNA断片を試料DNAとして用いることができる。

心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAに心疾患の原因となる変異があるかどうかを検出する方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA鎖と変異対立遺伝子を有するDNA鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。

ヘテロ二本鎖を検出する方法には、（1）ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法〔Trends Genet., 7, 5 (1991)〕、（2）一本鎖コ

ンフォメーション多型解析法 [Genomics, 16, 325-332 (1993)]、(3) ミスマッチの化学的切断法 (CCM, chemical cleavage of mismatches) [Human Genetics (1996), Tom Strachan and Andrew P. Read, BIOS Scientific Publishers Limited]、(4) ミスマッチの酵素的切断法 [Nature Genetics, 9, 103-104 (1996)]、(5) 変性ゲル電気泳動法 [Mutat. Res., 288, 103-112 (1993)] 等の方法があげられる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法は、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35 および 37 に記載の塩基配列に基づき設計したプライマーにより、200bp よりも小さい断片として増幅する。該DNA断片を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAの変異によりヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりもゲルの移動度が遅く、それらは余分なバンドとして検出することができる。特製のゲル (Hydro-link, MDE など) を用いた方が分離度はよい。200bp よりも小さいDNA断片の検索ならば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基置換を検出可能である。ヘテロ二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション多型解析と組み合わせた1枚のゲルで行うことが望ましい。

一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP解析; single strand conformation polymorphism analysis) は、検体由来DNAまたは検体由来cDNAをテンプレートに、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーにより、200bp よりも小さい断片として増幅した心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを変性後、未変性ポリアクリルアミドゲル中で泳動する。DNA増幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色素で標識するか、または未標識の増幅産物を銀染色することにより、増幅した心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAをバンドとして検出することができる。野生型の泳動パターンとの相違を明らかにするために、コントロールの検体も同時に電気泳動すると、塩基配列に変異を持った断片を移動度の違いから検出することができる。

ミスマッチの化学的切断法 (CCM法) は、検体由来DNAあるいは検体由来cDNA

をテンプレートに、心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37に記載の塩基配列に基づき設計したプライマーでDNA断片を増幅する。本発明のDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり込ませた標識DNAと増幅DNA断片とをハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することでミスマッチしている場所のDNAの一方の鎖を切断させ塩基配列の変異を検出することができる。CCM法は最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

上記、四酸化オスミウムの代わりにT4ファージリゾルベースとエンドヌクレアーゼVIIのような細胞内でミスマッチの修復に関与する酵素とRNAse Aと組み合わせることで、酵素的にミスマッチを切断することもできる。

変性ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis : DGGE法) は、検体由来DNAまたは検体由来cDNAをテンプレートとして、心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37に記載の塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。増幅したDNA断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAに変異がある場合とない場合では増幅したDNAのゲル内での移動度が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ(G:C)末端を付けるとよい。

心疾患の原因遺伝子を検出する別の方法として、蛋白質短縮試験 (protein truncation test : PTT法) [Genomics, 20, 1-4 (1994)] がある。該試験により蛋白質の欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。PTT法は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、33および35に記載の塩基配列を有するDNAの5'末端にT7プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来RNAより逆転写PCR (RT-PCR) 法でcDNAを作製する。該cDNA

を用い、in vitro転写、翻訳を行うと蛋白質が生産される。該蛋白質をゲルに泳動して、該蛋白質の泳動位置が完全長蛋白質に相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、該蛋白質に欠損がある場合は、完全長蛋白質より短い位置に該蛋白質は泳動され、該位置より欠損の程度を知ることができる。

検体由来DNAおよび検体由来cDNAの塩基配列を決定するために本発明のDNAが有する塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いることが可能である。決定された塩基配列を解析することにより、検体由来DNAまたは検体由来cDNAに心疾患の原因となる変異があるか否かを判別することができる。

心筋細胞増殖関連遺伝子のコード領域以外の変異は、該遺伝子の付近またはその中のイントロンおよび調節配列などの、非コード領域を検査することによって検出し得る。非コード領域中の変異に起因する心疾患は、上記に記載した方法と同様の方法により検出することができる。

このようにして非コード領域における変異の存在が示唆された該遺伝子については、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37に記載の塩基配列を有するDNAをハイブリダイゼーションのプローブとして用いることにより、クローン化することができる。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。

見出された変異は、Handbook of Human Genetics Linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore(1994)に記載された方法に従い統計処理を行うことで、心疾患との連鎖があるSNPs(シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム)として同定することができる。また、心疾患の病歴を持つ家族から、先に示した方法に従いDNAを取得し、変異を検出することで、心疾患の原因遺伝子を同定することができる。

7 心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを用いて心疾患の発生の可能性および予後を診断する方法

当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37で表される塩基配列を有するDNAもしくはそれらから得られる

DNA断片等があげられる。

心疾患の原因は、ヒトのいずれかの組織における遺伝子の変異を検出することによって確認することができる。例えば、生殖細胞系に変異がある場合、当該変異を遺伝した個人は、心疾患を発症し易い傾向である可能性がある。当該変異は、該個人の体のいずれかの組織からのDNAを試験することによって検出し得る。例えば、ヒトから採血した血液の細胞からDNAを抽出し、該DNAを用いて、遺伝子の変異を検出することにより、心疾患を診断することができる。また、胎児細胞、胎盤細胞または羊膜細胞を採取してDNAを抽出し、該DNAを用いて、遺伝子の変異を検出することにより、出生前の心疾患診断を行うことができる。

また心疾患を発症した患者の、病巣部位の生体組織からDNAを取得し、遺伝子の変化を検出することにより、心疾患の種類を診断し、投与する薬物の選択などに利用することができる。生体組織からのDNAは、周囲の正常組織から遊離した病巣部位の組織を単離してトリプシンなどで処理し、得られた細胞を適当な培地で培養し、培養した細胞から染色体DNAならびにmRNAを抽出することにより取得することができる。

以後、診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したDNAを診断検体由来DNAと称する。また、診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したRNAより合成したcDNAを診断検体由来cDNAと称する。

心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAおよび診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを用い、上記心疾患の原因遺伝子を検出する方法に準じた方法により、心疾患の診断を行うことができる。

また、心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAおよび診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを利用した心疾患の診断方法としては、(1)制限酵素部位の検出、(2)対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブを利用する方法 (ASO: allele specific oligonucleotide hybridization)、(3)対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いたPCR (ARMS: amplification refractory mutation system)、(4)オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (OLA: oligonucleotide ligation assay)、(5)PCR-PHFA法 (PCR-preferential homoduplex formation assay)、(6)オリゴDNAアレイを用い

る方法〔蛋白質核酸酵素、43, 2004-2011 (1998)〕等の方法があげられる。

制限酵素部位の検出は、以下の方法に従う。すなわち、単一塩基の変化により制限酵素部位が消失または発生する場合は、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを、本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRで増幅したのち、制限酵素で消化し、得られた制限酵素切断DNA断片を正常人の場合と比較することで簡便に変異を検出することができる。しかし単一塩基変化が起こることはまれであり、診断目的には、本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAが有する配列情報ならびに別途同定された変異の情報を組合せることでオリゴヌクレオチドプローブを設計し、該オリゴヌクレオチドプローブをフィルターに結合させてハイブリダイズを行うリバースドットプロット法で変異を検出する。

対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブ (ASO) を利用する方法は、短い合成DNAプローブが、完全に対合する塩基配列とのみハイブリダイズする特徴を利用した方法で、1塩基の変異を容易に検出することができる。具体的には、本発明のDNAが有する塩基配列と同定された塩基の変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドをフィルターに結合させ、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAから本発明のDNAが有する配列を用いて設計したプライマーと標識したdNTPを用いたPCRで作成したプローブを用いてハイブリダイズを行うリバースドットプロットが用いられることが多い。

リバースドットプロットとは、スライドガラスまたはシリコンなどの基盤に直接、本発明のDNAが有する塩基配列と該変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドを合成して、高密度のアレイであるDNAチップを用いて、少量の診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを反応させて多様な変異をより簡便に検出する方法である。本方法は、大規模な診断目的に適した変異検出法である。

塩基の変異は、以下のオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (OLA) 法によっても検出できる。OLA法を、以下に具体的に述べる。

変異部位を挟んで5'末端側および3'末端側でそれぞれハイブリダイズする本発明のDNAが有する塩基配列をもとに設計した20塩基配列程度のオリゴヌクレオチドを作成する。診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAをテンプレート

として用いて、本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAが有する塩基配列から設計したプライマーを用い、PCRにより心筋細胞増殖関連遺伝子のDNA断片を増幅する。該DNA増幅断片と上記2本のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後、DNAリガーゼで2本のオリゴヌクレオチドを連結させる。例えば、2本のうちの一方のオリゴヌクレオチドにはビオチンを、他方のオリゴヌクレオチドにはジゴケシゲニンなどの異なる標識体を付加し、連結反応が起こったかどうかを速やかに検出することが可能である。OLAは電気泳動や遠心分離操作が不要なために、多数のサンプルを効果的に短期間で診断するのに適した変異検出法である。

また、以下のPCR-PHFA法により微量な変異遺伝子を定量的かつ容易に検出することができる。

PCR-PHFA法は、遺伝子増幅法（PCR）、非常に高い特異性を示す液相でのハイブリダイゼーション、およびELISAと同様の操作でPCR産物を検出するED-PCR (enzymatic detection of PCR product) の3つを組み合わせた方法である。

dinitrophenyl (DNP) 標識およびビオチン標識したプライマーセットを用いて、本発明のDNAをテンプレートにPCR増幅を行い、両末端標識増幅物を調製する。これに対して、未標識で標識プライマーと同じ塩基配列を有するプライマーセットを用いて、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAをテンプレートに増幅して得た非標識増幅物を20~100倍の大過剰量混合する。そして混合物を熱変性処理後、1℃/5分~10分間程度の緩やかな温度勾配で冷却し、完全な相補鎖を優先的に形成させる。こうして再形成された標識DNAはビオチンを介してストレプトアビジン固定化ウエルに捕獲吸着し、DNPを介して酵素標識抗DNP抗体を結合させて酵素による発色反応により検出する。検体中に標識DNAと同じ配列の遺伝子が存在しない場合は、元の2本鎖の標識DNAが優先的に再形成されて発色を示す。これに対し、同じ塩基配列の遺伝子が存在する場合は、相補鎖の置換がランダムに生じるため再形成される標識DNAは減少するので、発色は著しく低下する。これにより、既知の変異・多型遺伝子の検出・定量が可能となる。

8 心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体を用いて心筋細胞増殖関連蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法

本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体（ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体）を用いて、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織を、免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック）（1987）、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法（東京化学同人）（1986）〕などがあげられる。

蛍光抗体法とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質でラベルした抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

酵素免疫測定法（ELISA法）とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法などの免疫組織化学染色法とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは

その断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

ウェスタンブロッティング法とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕で分画した後、該ゲルをPVDF膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、確認する方法である。

ドットブロッティング法とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法である。

免疫沈降法とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を本発明の抗体と反応させた後、プロテインG-セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

サンドイッチELISA法とは、心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体で、抗原認識部位の異なる2種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体をプレートに吸着させ、もう一方の抗体をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、標識した抗体を反応させ、結合した標識物質により検出を行う方法である。

9 心筋増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体を用いる心疾患の診断

ヒト生体試料ならびヒト初代培養細胞での、心筋細胞増殖関連蛋白質の発現量の変化ならびに発現している蛋白質の構造変化を同定することは、将来心疾患を発症する危険性や既に発症した心疾患の原因を知る上で有用である。

心筋細胞増殖関連蛋白質の発現量や構造変化を検出して診断する方法としては、上記した、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法などがあげられる。

上記方法による診断に供する検体としては、患者より取得した心臓病巣部位の組織、血液、血清、尿、便、唾液などの生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞ならびに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

10 心筋細胞増殖関連蛋白質、該蛋白質をコードするDNAまたは該蛋白質を認識する抗体を用いる心疾患治療薬のスクリーニング

当該スクリーニング方法において用いられるDNAとしては、例えば配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、30、32、33、35および37で表される塩基配列を有するDNAがあげられ、蛋白質としては、例えば配列番号22、24、26、28および31で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは、配列番号22、24、26および28で表されるアミノ酸とは1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ心筋壊死を原因とする心疾患の修復に関与する活性を有する蛋白質があげられ、抗体としては、該蛋白質を認識する抗体があげられる。

本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを導入して本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質あるいは心筋細胞増殖関連蛋白質の一部を構成するポリペプチドを生産するように形質転換した微生物、動物細胞、または昆虫細胞ならびに、精製した心筋細胞増殖関連蛋白質あるいは心筋細胞増殖関連ポリペプチドは、心筋細胞増殖関連蛋白質に特異的に作用する薬剤をスクリーニングするために有用である。

スクリーニングにより得られた薬剤は、心疾患の治療に有用である。

上記スクリーニングの1つの方法は、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質ある

いは心筋細胞増殖関連蛋白質の一部を構成するポリペプチドを生産するように形質転換した微生物、動物細胞、または昆虫細胞（以後、探索用形質転換体と称する）に特異的に結合する標的化合物を選択することである。形質転換していない微生物、動物細胞、または昆虫細胞との結合状態を対照として比較することで、特異的な標的化合物を検出することができる。また、探索用形質転換体に特異的に結合する化合物あるいは蛋白質の探索用形質転換体に対する結合を阻害することを指標に、標的化合物を競合スクリーニングすることができる。

精製した本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質または心筋細胞増殖関連蛋白質の一部を構成するポリペプチドは、心筋細胞増殖関連蛋白質に特異的に結合する標的化合物を選択するのに用いることができる。標的化合物を定量するには、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体を用いて上記の免疫学的方法により行うことができる。また、心筋細胞増殖関連蛋白質あるいは心筋細胞増殖関連ポリペプチドに結合する標的化合物の該蛋白質あるいは心筋細胞増殖関連ポリペプチドに対する結合を阻害することを指標に、標的化合物を競合スクリーニングすることができる。

上記スクリーニングのもう1つの方法としては、心筋細胞増殖関連蛋白質の一部を構成するペプチドを多数、プラスチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合成し、該ペプチドに選択的に結合する化合物あるいは蛋白質を効率的にスクリーニングする方法がある（W084/03564）。

心臓由来の細胞株で、心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAあるいは心筋細胞増殖関連蛋白質の発現を促進あるいは抑制する発現調節用薬剤も、心疾患の治療に有効である。

心臓由来の細胞株に種々の被検化合物を添加し、本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを用いて、心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現の増減を測定することで心筋細胞増殖関連遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングすることができる。心筋細胞増殖関連遺伝子のmRNAの発現の増減は、上記したPCR法、ノーザンブロット法、RNase保護アッセイ法により検出できる。

心臓由来の細胞株に種々の被検化合物を添加し、本発明の心筋細胞増殖関連

蛋白質を特異的に認識する抗体を用いて、心筋細胞増殖関連蛋白質の発現の増減を測定することで心筋細胞増殖関連遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングすることができる。心筋細胞増殖関連蛋白質の発現の増減は、上記した蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法により検出できる。

上述の方法により取得した化合物は、心筋梗塞モデルラットなどの心疾患モデル動物に薬剤として投与し、該動物の心臓活動電位ならびに心拍数の測定等を行うことにより、該化合物のその心疾患への治療効果を評価することが可能である。

1.1 心筋増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体を用いて心臓に特異的に薬物を輸送する方法（ドラッグデリバリー方法）

当該ドラッグデリバリー方法に用いられる抗体は、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体であればいずれでも良いが、特にヒト化抗体を用いることが望ましい。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR（Complementary Determining Region; 相補性決定領域; 以下、CDRと記す）移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、定常領域はC領域としてCHとも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体は、心筋細胞増殖関連蛋白質に結合し、本発明の蛋白質の作用を中和するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコード

する遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型CDR移植抗体は、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質に反応し、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質に結合し、本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質の作用を中和する、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒトの体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

ヒトの体内に存在する抗体は、例えば、以下の方法により取得することができる。

ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化させた後、クローニングする。得られた目的とする抗体を産生するリンパ球を培養し、培養物中より該抗体を取得することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより、Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、完全型ヒト抗体へ変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法としては、通常ヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させる方法があげられる。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFabは、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パインで処理して得ることができる。また、該抗体のFabをコードするDNAを宿主細胞発現ベクターに挿入後、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該DNAを発現させることによりFabを取得することができる。

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される)、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性

を有する抗体断片である。

本発明の $F(ab')_2$ は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。また、該抗体の $F(ab')_2$ をコードするDNAを宿主細胞用発現ベクターに挿入後、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該DNAを発現させることにより、 $F(ab')_2$ を取得することができる。

Fab' は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab' は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。また、該抗体のFab'断片をコードするDNAを宿主細胞用発現ベクターに挿入後、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該DNAを発現させることにより、Fab'を取得することができる。

一本鎖抗体（以下、scFvとも称す）は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体から由来したものをを用いることができる。

本発明の一本鎖抗体は、以下の方法により取得できる。

本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得後、一本鎖抗体をコードするDNAを構築する。該DNAを宿主細胞用ベクターに挿入後、該発現ベクターを宿主細胞へ導入し、該DNAを発現させることにより、一本鎖抗体を取得することができる。

ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvとも称す）は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明で使用されるdsFvに含まれるVHおよびVLは本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体から由来したものをを用いる

ことができる。

本発明のジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)は、以下の方法により取得することができる。

本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得後、dsFvをコードするDNAを構築する。該DNAを宿主細胞用発現ベクターに挿入後、該発現ベクターを宿主細胞へ導入し、該DNAを発現させることにより、dsFvを取得することができる。

CDRを含むペプチドは、Fmoc法、tBoc法等の化学合成法によって製造することができる。

本発明の抗体により調製された以下に述べる融合抗体は、心臓の病巣へ特異的に薬剤や蛋白質を運ぶ、ドラッグデリバリーに用いることができる。

融合抗体は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質、低分子化合物等の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体をいう。

本発明の融合抗体は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体および抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体および抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体および抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質、低分子化合物等の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させることにより製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体または抗体断片に結合させることができる。

低分子化合物としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルピシン、ドキソルピシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤〔臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社）〕、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、

ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社〕などがあげられる。

常法により上記抗体に低分子の薬剤を結合させることができるが、例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインや血管内皮、血管平滑筋等の増殖制御因子が好適であり、例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、ヒトマクロファージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン12、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)、血小板由来増殖因子 (PDGF) 等があげられる。

蛋白質との融合抗体は、以下の方法により取得できる。

抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させて、融合抗体をコードするDNAを構築する。該DNAを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入後、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物などの宿主細胞へ導入し、該DNAを発現させることにより、融合抗体を取得することができる。

1.2 心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを含有する遺伝子治療剤

本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを含有するウイルスベクターを用いた遺伝子治療剤は4項で作製した組換えウイルスベクターと遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる〔Nature Genet., 8, 42(1994)〕。

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液

とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治療に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、患者の冠動脈より心臓に吸収されるように、局所的に投与方法をあげることができる。

ウイルスベクターを用いる遺伝子移入は、リポソームデリバリーを用いる直接的イン・ビボ(*in vivo*)遺伝子移入と組み合わせることにより、心臓病巣にウイルスベクターを指向させることができる。

適当なサイズの本発明の心筋細胞増殖関連遺伝子のDNAを、アデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン-コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的に遺伝子を発現させることができる。

心筋細胞増殖関連遺伝子DNAは、非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送することができる。

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法 [Virology, 52, 456-467 (1973) ; Science, 209, 1414-1422 (1980)]、マイクロインジェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399-5403 (1980) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980) ; Cell, 27, 223-231 (1981) ; Nature, 294, 92-94 (1981)]、リポソームを介した膜融合-介在移入法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987) ; Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989) ; J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989) ; Hum. Gene Ther., 3, 267-275, (1992) ; Science, 249, 1285-1288 (1990) ; Circulation, 83, 2007-2011 (1992)]あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移入法 [Science, 247, 1465-

1468 (1990) ; J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991) ; J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989) ; BioTechniques, 11, 474-485 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991) ; Hum. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)]等をあげることができる。

リポソームを介した膜融合-介在移入法ではリポソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告されている [Hum. Gene Ther., 3, 399-410 (1992)]。したがって同様の効果が心臓病巣でも期待される。DNAを心臓病巣に直接標的化するには、直接DNA取り込み技術が好ましい。受容体-媒介DNA移入は、例えば、ポリリジンを介して、蛋白質リガンドにDNA(通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる)をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞または組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。受容体とリガンドの組み合わせとしては、例えばエンドセリン(ET)-1受容体とET-1の組み合わせが含まれる。当該リガンド-DNAコンジュゲートは、所望により、血管に直接注射することができ、受容体結合およびDNA-蛋白質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNAの細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

1.3 心筋細胞増殖関連蛋白質を含有する心疾患治療薬

本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質は心筋壊死を原因とする種々の心疾患において、心臓の構造ならびに機能を再構築するのに用いることができる。

本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を含有する心疾患治療薬は、有効成分として該蛋白質のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口

投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば、乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、本発明の蛋白質を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は本発明の蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明の蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。本発明の蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、対象疾病の種類、投与方法、治療期間、年齢、体

重等により異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg \sim 8mg/kgである。

1.4 心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体を含有する心疾患治療薬

本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体は、心疾患などの治療に直接利用することができる。

本発明の心筋細胞増殖関連蛋白質を特異的に認識する抗体を含有する治療薬は、有効成分として該抗体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。該治療薬の調製、投与は前記1.3の心筋細胞増殖関連蛋白質を含有する治療薬に準じて行うことができる。

以下に実施例をあげて、本発明を具体的に示す。

図面の簡単な説明

第1図は、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のノーザン解析の結果である。パネル1 \sim 19はそれぞれ、RHDH-009、-063、-068、-098、-099、-231、-249、-274、-286、-057、-185、-226、-235、-239、-279-1、-309、-100、-140、-093についての胎児心臓と成体心臓とにおける発現量の変動を示す。それぞれのプロットにおいて、左側のレーンにはラット胎生16日心臓由来の全RNA 12 μ g、右側のレーンにはラット生後8週齢心臓由来の全RNA 12 μ gを泳動した。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーの作製

Wistar系妊娠16日ラット（日本SLC社）から胎児心臓を摘出し、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)〕により、全RNAを調製した。この全RNAをオリゴdTセルロースカラム（Collaborative Research社製）に通過させることにより、ポリ(A)+RNAとしてmRNAを取得した後、ZAP-cDNA合成キット（ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社）を用いて、独立プラーク総数 1.0×10^6 のcDNAライブラリーを作製した。cDNAライブラリーの作製方法の詳細は、キットのマニュアルに従った。このcDNAラ

イブラリーは、λファージベクターλ ZAPII（ストラタジーン社製）をベクターとして、ベクターのXhoI/EcoRIサイト間にcDNAの5'末端がEcoRIサイト側になるように挿入されている。

実施例2 差分化ライブラリーの作製

(1) 一本鎖DNAの調製

実施例1で調製した胎生16日ラット心臓cDNAライブラリー（λファージの状態）を、ヘルパーファージExAssist（ストラタジーン社製）とともに宿主細胞、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF'（ストラタジーン社製）に感染させ、イン・ビボ・エクシジョン（*in vivo excision*）を行うことにより、ベクターからcDNAを含むファージミド、pBluescript SK(-)部分を一本鎖DNAファージとして切り出し、培養上清中に放出させた。イン・ビボ・エクシジョンの方法は、ストラタジーン社のマニュアルに従った。この培養上清（タイター： 1.8×10^5 cfu/ μ l） 700μ lを、ExAssistが感染しない宿主細胞である*Escherichia coli* SORL（ストラタジーン社） 1.8×10^{10} 個を含む10mM MgSO₄ 7mlに添加し37°Cで15分間保温した後、全量を2×YT培地（1.6%バクトトリプトン、1%イーストエキス）200mlに添加して37°Cで45分間振とう培養し、cDNAを含む一本鎖DNAファージを感染させた。これに、アンピシリンを50 μ g/ml濃度になるよう添加し、さらに37°Cで1時間振とう培養し、ファージ感染大腸菌のみを増殖させた。600nmの吸光度で細胞数を測定したところ 8.0×10^{10} だったので、ヘルパーファージR408（ストラタジーン社）を感染多重度（moi）=10（ 7.7×10^{11} pfu）で添加して37°Cで7時間振とう培養し、再度一本鎖DNAを上清に放出させた。培養液を滅菌チューブに移し、4°Cで10000rpm、10分間遠心分離し、ファージを含む上清のみを新しい滅菌チューブに移して回収した。この上清を同条件で再度遠心分離した後、孔径0.22mmの滅菌フィルター（ミリポア社製）に通し、菌体を完全に除いた。10×緩衝液[100mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl₂] 20ml、デオキシリボヌクレアーゼI（ニッポンジーン社）140単位を添加し、37°Cで30分間反応させた。これに1/4容の20%ポリエチレングリコール（分子量6000）-2.5M NaClを加えてよく混合して室温に20分間静置した後、4°Cで10000rpm、10分間遠心分離し、ファージを沈殿させた。上清を完全に除き、得られたファージの沈殿を、400 μ lの

TE [10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)] に溶解し、10%SDS を $4\mu\text{l}$ 、プロテイナーゼK $625\mu\text{g}$ ($25\mu\text{l}$) を添加して、 42°C で1時間反応させた。フェノール抽出、フェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出の後、水層をエタノール沈殿し、胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーの一本鎖DNA (ベクター pBluescript SK(-)) $75.0\mu\text{g}$ を得た。

(2) RNAのビオチン化

実施例1と同様の方法により、生後8週齢ラット心臓からポリ(A)+RNAを調製した。このRNA $10\mu\text{g}$ と蒸留水を試験管に加えて $20\mu\text{l}$ とし、これに $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の PHOTOPROBE biotin (Vector Laboratories社製) $30\mu\text{l}$ を暗所で加えた。試験管の蓋を開けて氷上に置き、約10cmの高さから水銀ランプを20分間照射してビオチン化した。

反応液に $50\mu\text{l}$ の100mM Tris-HCl (pH9.5) と1mM EDTA (pH8.0) の溶液を加えた。これに $100\mu\text{l}$ の水飽和ブタノールを加え、激しく攪拌した。 4°C で14,000rpm、5分間遠心分離後、上層のブタノール層を除いた。この操作をあと2回繰り返した。水層に $100\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えて激しく攪拌し、 4°C で14,000rpm、5分間遠心分離後、水層を新しい試験管に移した。この操作を再度繰り返した後、エタノール沈殿を行った。回収されたRNAの沈殿を $20\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解させ、ビオチン化の操作を繰り返した。ビオチン化したRNAは、ハイブリダイゼーションまでエタノール沈殿の状態で -80°C に保存した。

(3) 差分化

(1) で調製した胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーの一本鎖DNA $0.5\mu\text{g}$ ($1\mu\text{l}$) に、 $2\times$ 反応用緩衝液 [80%ホルムアミド、100mM HEPES (pH7.5)、2mM EDTA (pH8.0)、0.2%SDS] $12.5\mu\text{l}$ 、2.5M NaCl $2.5\mu\text{l}$ およびポリ(A) (アマシヤム・ファルマシア・バイオテック社製) $0.5\mu\text{g}$ ($1\mu\text{l}$) を添加し、さらに(2) で調製したビオチン化RNA (RNA $10\mu\text{g}$ 分) を $5\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解して添加した。混合液を 65°C で10分間加熱した後、2晩、 42°C 保温して、ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション反応後の液に緩衝液 [500mM NaCl、50mM HEPES (pH7.5)、2mM EDTA (pH8.0)] $400\mu\text{l}$ を加え、これにストレプトアビジン (ライフ・テック

ノロジーズ社製) 10 μ g (5 μ l) を添加し、室温で5分間反応させた。フェノール-クロロホルム抽出を行い、ストレプトアビジン-ビオチン化RNA-ハイブリダイズしたcDNAからなる複合体を水層から除去した。水層に再度ストレプトアビジン 10 μ g を添加し室温で5分間反応させ、フェノール-クロロホルム抽出を2回行った後、クロロホルム抽出を行い水層を回収した。水層をユニットフィルター-ウルトラフリーC3プラスTK (ミリポア社製) に通してフィルターにcDNAを吸着・洗浄後、1/10TE [1mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA (pH8.0)] 30 μ l に回収することによりcDNAの濃縮と脱塩を行った。このフィルターを用いた操作はミリポア社のマニュアルに従った。

(4) 2本鎖DNAの合成、大腸菌への導入

上記のように差分化を行って得られた1本鎖DNA 30 μ lのうち15 μ lに、蒸留水 14 μ l、2 μ g/ μ lの配列番号42記載の塩基配列を有するプライマー伸長用プライマー 1 μ lを加え、65°Cで10分間加熱した。室温に5分間置いてプライマーを1本鎖DNAにアニーリングさせた後、10×反応緩衝液 (BcaBEST Dideoxy Sequencing Kitに添付のもの、宝酒造社製) 5 μ l、1mM dNTP混合液10 μ l、3 μ g/ μ lの1本鎖DNA結合タンパク質 (USB社製) 0.5 μ l、2単位/ μ lのBcaBEST DNA polymerase (宝酒造社製) 2 μ l、蒸留水2.5 μ lを加えた。65°Cで1時間反応させ、2本鎖DNAを合成した。該反応液に60 μ lの蒸留水を加え、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理を行った。(3)と同様にユニットフィルター-ウルトラフリーC3プラスTKを用いて溶液を濃縮し、最終的に20 μ lのTEで2本鎖DNAを溶解した。このうち1/5量を用い、大腸菌XL1-Blue MRF' にエレクトロポレーション法により該2本鎖DNAを導入し、cDNAライブラリー (差分化cDNAライブラリー) を作製した。

実施例3 ディファレンシャルハイブリダイゼーション

(1) アレイフィルターの作製

実施例2の(4)で作製した差分化cDNAライブラリーを用いて、LB-Ap寒天培地上にコロニーを形成させ、その内の9600コロニーをLB-Ap培地100 μ lを入れた96穴プレート103枚に1コロニー/1穴になるよう植菌した。各コロニーは96穴プレート中で37°Cで培養後、50%グリセロール75 μ lを添加して-80°Cにて保存

した（この保存培養液をグリセロールストックとよぶ）。

LB-Ap培地100 μ lを分注した96穴プレートに、再度グリセロールストックから96ピンレプリケーターを使用して植菌し、37°Cで一晩静置培養した。予め、96穴PCRプレートに、以下のような反応液を自動分注装置Hydra96を用いて20 μ l分注しておき、そこへ大腸菌を含んだ一晩培養液を痕跡量付けた。PCR反応溶液は、10×反应用緩衝液（ExTaqに添付）2 μ l、2.5mM dNTP 2 μ l、10 μ M T3 HT プライマー（配列番号39） 1 μ l、10 μ M T7 プライマー（配列番号40） 1 μ l、蒸留水13.8 μ l、Taq DNAポリメラーゼExTaq（宝酒造社製）0.2 μ lで行った。また反応条件は、PCR用装置を用いて、94°Cで5分間加熱後、94°C1分間（変性）／64°C1分間（アニール）／72°C1分間（伸長反応）からなる反応サイクルを30回行い、4°Cで保存した。なお、T3 HT プライマー、T7 プライマーはcDNA部分が増幅されるよう、ベクターのcDNA挿入部の両側にあたる特異的な配列をもとに設計してある。

この反応液を0.5 μ lずつNYLON TRANSFER MEMBRANE Hybond N⁺（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）上に96穴プレートと同じ格子状（縦8×横12）にスポットした。1枚のナイロンメンブレンには96穴プレート4枚分に相当する384コロニー分を格子状（縦16×横24）にスポットし、また1つのコロニー由来のPCR反応液について2枚のメンブレンの同じ位置にスポットし、同じメンブレンが2枚ずつできるようにした。反応液をスポットしたメンブレンを室温で風乾させた後、変性溶液（0.5M NaOH, 1.5M NaCl）を染み込ませたろ紙上へのせ、室温で10分間放置し、DNAを変性させた後、中和溶液（1.0M Tris-HCl pH7.5, 1.5M NaCl）を染み込ませたろ紙上にメンブレンを移し、室温で10分間放置した。バットに十分量用意した0.5%SDSを含む2×SSC（0.3M塩化ナトリウム、30mMクエン酸ナトリウム）中で、メンブレン（アレイフィルター）を洗浄した。

（2）プローブのラベル化

実施例1および実施例2（2）で調製した胎生16日ラット心臓および生後8週齢ラット心臓のポリ(A)RNAからLabel IT Digoxin Nucleic Acid Labeling Kit（以下「Label IT Kit」と呼ぶ）（Mirus社製）を用いて、ジゴキシゲニン（DIG）標識プローブを作製した。方法はキットに添付のマニュアルに従った。

(3) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイズしたスポットの検出の方法と試薬は全てロシュ社のDIGシステムユーザーズガイドに従った。

(1) で作製したメンブレンをハイブリバッグに入れ、50℃に加温したハイブリダイゼーション緩衝液 [5×SSC、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%SDS、2%ブロッキング試薬(ロシュ社製)、50%ホルムアミド] 20mlを加え、50℃で4時間プレハイブリダイゼーションを行った。(2) で調製したプローブ量の10分の1容量のDenaturation緩衝液 (Label IT kitに添付; Mirus社製) を加え室温で5分間反応させた後、同じくプローブの10分の1容量のNeutralization緩衝液 (Label IT kitに添付; Mirus社製) を加え、変性させた。これをハイブリダイゼーション緩衝液と混合し、プレハイブリダイゼーションの終了したメンブレンに加えた。50℃で1晩保温し、バッグ内でフィルターが動く程度 (約12rpm) に振とうさせながらハイブリダイゼーションを行った。なお、(1) で同一のDNAをスポットした2枚のメンブレンを作製しているため、1枚は胎生16日ラット心臓のプローブ、1枚は生後8週齢ラット心臓のプローブとハイブリダイゼーションさせた。

(4) スポットの検出

メンブレンをハイブリバッグから取り出し、2×SSC-0.1%SDSで68℃で10分間洗浄した後、洗浄液を新しくして、再度同じ条件で洗浄した。さらに0.1×SSC-0.1%SDSで68℃で15分間洗浄する操作を2回繰り返した。その後、アルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体、化学発光基質CSPDからなるDIG発光検出キット (ロシュ社製) で処理し、X線フィルム ハイパーフィルムECL (アマシヤム・ファルマシア・バイオテック社製) を感光させ、現像した。感光時間は、胎生16日ラット心臓のプローブ、生後8週齢ラット心臓のプローブとハイブリダイズしたものでバックグラウンドが同程度の濃度になるように調整した。生後8週齢ラット心臓のプローブと比較して胎生16日ラット心臓のプローブと強くハイブリダイズしたクローン、および、胎生16日ラット心臓のプローブと比較して生後8週齢ラット心臓のプローブと強くハイブリダイズしたクローン、合計316クローンを選択した。アレイの位置からクローンを特定し、各クローンをそ

れぞれ実施例3の(1)で調製したグリセロールストックから培養して、プラスミドDNAを調製した。

実施例4 各クローンの解析

(1) 塩基配列の決定

実施例3のディファレンシャルハイブリダイゼーションによって選択された316クローンのcDNAの塩基配列を、DNAシーケンサーを用いて解析した。この塩基配列について、解析プログラムBlastNを用いて、塩基配列データベースGenBank、EMBLおよびGeneSeq〔ダーウエント(Derwent)社製〕中の配列に対する相同性を調べた。この解析の結果、成体心臓に比べ胎児心臓で強く発現していることが公知の遺伝子、slow-fiber troponin I、non-muscle myosin alkali light chain、vimentin、elongation 1 α をコードする遺伝子が含まれていた。

その後、(2)に示すノーザンハイブリダイゼーション法によっても、生後8週齢ラットの心臓と比較して胎生16日ラットの心臓で発現量が上昇していることが確認された遺伝子、および、胎生16日ラットの心臓と比較して生後8週齢ラットの心臓で発現量が上昇している遺伝子については、cDNA全体の塩基配列を決定し、得られたcDNAの塩基配列から、遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を推定した。さらに、このアミノ酸配列についても、解析プログラムBlastを用いて、アミノ酸配列データベースSwissProt、PIR、GenPept、TREMBL、GeneSeq中の配列に対する相同性を調べた。

(2) ノーザンハイブリダイゼーションによる発現変動解析

(1)で選択した316クローンから、新規な塩基配列のものを中心に興味深いクローンを選択し、それぞれの遺伝子の胎生16日心臓と生後8週齢心臓での発現量を比較して調べるため、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。

(2) -1 RNAのメンブレンへの転写

胎生16日ラット心臓、あるいは生後8週齢ラット心臓から実施例1と同様の方法により得られた全RNA12 μ gに、それぞれ蒸留水を加え3.5 μ lとした。ここに10 \times MOPS緩衝液〔80mM 酢酸ナトリウム、197mM MOPS、10mM EDTA (pH8.0)〕1.5 μ l、35%ホルムアルデヒド溶液(ナカライテスク社製)2 μ l、脱イオン化ホルムアミド5 μ lを加えた。65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、氷上に置いて急冷し、全

量を1×MOPS/2%ホルムアルデヒド/1%アガロースゲルで電気泳動した。泳動終了後、ゲルを20×SSC[3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム]を用いたキャピラリートランスファー法により、ゲル中のRNAをNYLON TRANSFER MEMBRANE Hybond N⁺ (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) に転写した。転写終了後、クロスリンカーオプティマルリンク (フナコシ社製) を用いて紫外線照射により、RNAをメンブレンに固定した。

(2) - 2 プローブのラベル化

選択したクローンについて、プラスミドをApaIとPstIで切断し、挿入DNA断片を切り出した。断片の精製にはQIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用い、方法はキットに添付のマニュアルに従った。精製したDNA断片を鋳型とし、DIG-High Prime (ロシュ社製) を用いて該DNA断片をラベルし、プローブとして用いた。方法はキットに添付のマニュアルに従った。

(2) - 3 ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィー

ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイズしたスポットの検出の方法と試薬は全てロシュ社のDIGシステムユーザーズガイドに従った。

(1) で作製したメンブレンをハイブリバッグに入れ、50℃に加温した高SDSハイブリダイゼーション緩衝液 [5×SSC、0.1%ラウロイルサルコシル、7%SDS、50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)、50%フォルマミド、2%ブロッキング試薬 (ロシュ社)] を加えた。50℃で数時間以上保温し、プレハイブリダイゼーションを行った。(2) で調製したプローブを95℃で5分間加熱後、急冷し、変性させた。これをハイブリダイゼーション緩衝液と混合し、プレハイブリダイゼーションの終了したメンブレンに加えた。50℃で一晩保温し、ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンをハイブリバッグから取り出し、2×SSC-0.1%SDSで68℃で10分間洗浄した後、洗浄液を新しくして、再度同じ条件で洗浄した。さらに0.1×SSC-0.1%SDSで68℃で15分間洗浄する操作を2回繰り返した。その後、アルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体、化学発光基質CSPDからなるDIG発光検出キット (ロシュ社製) で処理し、X線フィルム ハイパーフィルムECL (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) を感光させ、オートラジオグラフィーを行った。

その結果、生後8週齢ラット心臓と比べて胎生16日ラット心臓で発現量が高いクローン16個 [RHDH-009、RHDH-063、RHDH-068、RHDH-098、RHDH-099、RHDH-231、RHDH-249、RHDH-274、RHDH-286、RHDH-057、RHDH-185、RHDH-226、RHDH-235、RHDH-239、RHDH-279、RHDH-309] および胎生16日ラット心臓と比べて生後8週齢ラット心臓で発現量が高いクローン3個 [RHDH-100、RHDH-140、RHDH-093] を得た。以下、これらのクローンについて記載する。

(3) 生後8週齢ラット心臓と比較して胎生16日ラット心臓で発現量が高い既知遺伝子

RHDH-009の塩基配列はrat insulin-like growth factor II (IGF-II) の配列 [Accession: X13101] (配列番号1) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号2に示した。IGF-IIは、細胞増殖因子の一つとして知られているが、生理的な意義は不明な点が多い。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル1に示した。

RHDH-063の塩基配列 (配列番号3) は推定ヒト分泌蛋白質の遺伝子 [PCT出願: W099/3126] と76%と高い相同性を示した。従って、この遺伝子はラットにおけるオーソログであると推定された。配列番号3に示した塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号4に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さず、機能も未知である。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル2に示した。

RHDH-068の塩基配列はrat melanocyte-specific expression gene 1 (msg1) の配列 [Accession: AF104399] (配列番号5) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号6に示した。msg1遺伝子は細胞の色素沈着と関連があると考えられている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 12298-12303 (1996)] が、心臓での機能は全くわかっていない。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル3に示した。

RHDH-098の塩基配列はmouse c-ablの配列 [Accession: L10656] (配列番号7) と高い相同性を示した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号8に示した。c-abl遺伝子産物はチロシンキナーゼ活性を有している。胎生16日ラ

ット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル4に示した。

RHDH-099の塩基配列はrat non-neuronal enolaseの配列 [Accession: X02610] (配列番号9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号10に示した。non-neuronal enolase遺伝子は解糖系の酵素であるが、胎児心臓と成体心臓での発現量の変動は知られていない。心臓胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル5に示した。

RHDH-231の塩基配列はrat receptor-linked tyrosine phosphatase (PTP-P1) の配列 [Accession: L19180] (配列番号11) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号12に示した。この遺伝子産物はチロシンフォスファターゼ活性を有する。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル6に示した。

RHDH-249の塩基配列はrat TSC-22の配列 [Accession: L25785] (配列番号13) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号14に示した。rat TSC-22遺伝子はTGF- β により発現が誘導される遺伝子として報告されている [J. Biol. Chem., 267, 10219 (1992)] が、その機能は明らかになっていない。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル7に示した。

RHDH-274の塩基配列はrat SH3p8の配列 [Accession: AB008161] (配列番号15) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号16に示した。SH3p8の遺伝子産物はSrc homology 3 (SH3) ドメインを有しsynaptojaninあるいはdynamin Iと結合する活性を持つ [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 8569-8574 (1997)]。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル8に示した。

RHDH-286の塩基配列 (配列番号17) はmouse retinoic acid-response protein (MK) の配列 [Accession: M35833] と91%と高い相同性を示した。従って、この遺伝子はラットにおけるオーソログであると推定された。配列番号17で示された塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号18に示した。

MK遺伝子産物は、レチノイン酸による胚性腫瘍細胞の分化過程で早期に発現が誘導される遺伝子産物として知られている〔Biochem. Biophys. Res. Commun., 151, 1312-1318 (1988)〕。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル9に示した。

(4) 生後8週齢ラット心臓と比較して胎生16日ラット心臓で発現量が高い新規遺伝子

RHDH-057の塩基配列を配列番号19に示した。相同性解析の結果、既知遺伝子中の配列で一致するものはなく新規な塩基配列であった。UniGene Rn. 7790に含まれるEST群と一致したが、RHDH-057の塩基配列と全て重複するものは存在しなかった。RHDH-057がコードするアミノ酸配列を配列番号20に示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル10に示した。

RHDH-185の塩基配列を配列番号21に示した。相同性解析の結果、既知遺伝子中の配列で一致するものはなく新規な塩基配列であった。UniGene Rn. 12591に含まれるEST群と一致したが、RHDH-185の塩基配列と全て重複するものは存在しなかった。RHDH-185のcDNAを含有するプラスミドpRHDH-185を保有する大腸菌XL1-Blue MRF'/pRHDH185株はブダペスト条件に基づいて独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成12年3月10日付けで受託番号FERM BP-7081として国際寄託されている。RHDH-185の塩基配列中には109アミノ酸からなるORFが観察され、配列番号22にそのアミノ酸配列をに示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル11に示した。

RHDH-226の塩基配列を配列番号23に示した。相同性解析の結果、既知遺伝子中の配列で一致するものはなく新規な塩基配列であった。UniGene Rn. 7270に含まれるEST群と一致したが、RHDH-226の塩基配列と全て重複するものは存在しなかった。RHDH-226のcDNAを含有するプラスミドpRHDH-226を保有する大腸菌XL1-Blue MRF'/pRHDH226はブダペスト条件に基づいて独立行政法人 産業技術

総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成12年3月10日付けで受託番号FERM BP-7082として国際寄託されている。

RHDH-226の塩基配列中には376アミノ酸からなるORFが観察され、配列番号24にそのアミノ酸配列を示した。このアミノ酸配列とデータベース中の配列との相同性を調べたところ、W099/06423公報で推定ヒト分泌蛋白質として公開されているアミノ酸配列と、配列番号24の1~273番目のアミノ酸配列の部分で88%の高い相同性を示したが、配列番号24の274~376番目のアミノ酸と対応する、W099/06423公報に示される蛋白質のアミノ酸配列は存在しなかった。従って、W099/06423公報で示される蛋白質は、配列番号24で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質のヒトオースログではないと推定できる。なお、W099/06423公報に示される蛋白質の機能は分泌因子であること以外は明らかになっていない。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル12に示した。

RHDH-235の塩基配列を配列番号25に示した。相同性解析の結果、human metastasis-associated gene 1 (mtal) の配列 [Accession: U35113] と65%の相同性を、また、そのラットオースログであるrat mta1の配列 [Accession: U02522] とは64%の相同性を示した。RHDH-235の塩基配列中には513アミノ酸からなるORFが観察され、配列番号26にそのアミノ酸配列を示した。配列番号26で示されるアミノ酸配列は、human mta1遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列とは74%、rat mta1遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列とは73%の相同性を示した。human mta1およびrat mta1のアミノ酸配列とは一致しないことから、RHDH-235は、新規遺伝子と考えられる。RHDH-235のcDNAを含有するプラスミドpRHDH-235を保有する大腸菌XL1-Blue MRF' /pRHDH235はブダペスト条件に基づいて独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成12年3月10

日付けで受託番号FERM BP-7083として国際寄託されている。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンプロットを、第1図のパネル13に示した。

RHDH-239の塩基配列を配列番号27に示した。相同性解析の結果、既知遺伝子中の配列で一致するものはなく新規な塩基配列であった。UniGene Rn. 23890に含まれるEST群と一致したが、RHDH-239の塩基配列と全て重複するものは存在しなかった。RHDH-239のcDNAを含有するプラスミドpRHDH-239を保有する大腸菌XL1-Blue MRF' /pRHDH239はブダペスト条件に基づいて独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成12年3月10日付けで受託番号FERM BP-7084として国際寄託されている。RHDH-239の塩基配列中には158アミノ酸からなるORFが観察され、配列番号28にそのアミノ酸配列を示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンプロットを、第1図のパネル14に示した。

RHDH-279の塩基配列を配列番号29に示した。相同性解析の結果、マウス interferon regulatory factor 3 (mirf3) の配列 [Accession: U75840] と92%と高い相同性を示した。配列番号29で示した塩基配列とmirf3遺伝子の塩基配列を比較すると、このクローンは全長cDNAの5'末端が欠けているものと考えられた。そこで実施例1でλZAPIIをベクターにして作製した胎生16日ラット心臓cDNAライブラリーを鋳型にして、ベクター特異的配列を基にした配列番号39に示すプライマーとRHDH-279特異的な配列を基にした配列番号41に示すプライマーを用いてPCRをおこなうことにより、クローンのcDNAよりもさらに5'側のcDNA断片を増幅し単離した。

このcDNA断片とRHDH-279のcDNAとをつなぎあわせることによりRHDH-279-1クローンを得た。RHDH-279-1の塩基配列を配列番号30に示した。RHDH-279-1のcDNAを含有するプラスミドpRHDH-279-1を保有する大腸菌XL1-Blue MRF' /pRHDH279-1はブダペスト条件に基づいて独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成

12年3月10日付けで受託番号FERM BP-7085として国際寄託されている。配列番号30で示される塩基配列の30番目以降は、mirf3の配列と92%と高い相同性を示す一方、配列番号30で示される塩基配列の1~29番目は、mirf3の配列とは大きく異なっている。

従って配列番号30で示される塩基配列は単なるmirf3のラットオーソログではないと推定される。配列番号30で示される塩基配列中には94アミノ酸からなるORFが観察され、配列番号31にそのアミノ酸配列を示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル15に示した。

RHDH-309の塩基配列を配列番号32に示した。相同性解析の結果、既知遺伝子中の配列で一致するものはなく新規な塩基配列であった。UniGene Rn. 1779に含まれるEST群と一致したが、RHDH-309の塩基配列と全て重複するものは存在しなかった。この配列中には100アミノ酸以上から成るORFが存在せず、非翻訳領域と考えられる。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル16に示した。

(5) 胎生16日ラット心臓と比較して生後8週齢ラット心臓で発現量が高い既知遺伝子

RHDH-100の塩基配列はrat protein kinase C receptorの配列〔Accession: U03390〕（配列番号33）と一致した。

この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号34に示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル17に示した。

RHDH-140の塩基配列（配列番号35）はmouse pigment epithelium-derived factor (PEDF)の配列〔Accession: AF017057〕と92%と高い相同性を示した。従って、この遺伝子はラットにおけるオーソログであると推定された。配列番号35に示した塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号36に示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル18に示した。

(6) 胎生16日ラット心臓と比較して生後8週齢ラット心臓で発現量が高い新

規遺伝子

RHDH-093の塩基配列を配列番号37に示した。相同性解析の結果、既知遺伝子中の配列で一致するものはなく新規な塩基配列であった。UniGene Rn.16542に含まれるEST群と一致したが、RHDH-093の塩基配列と全て重複するものは存在しなかった。RHDH-093の塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号38に示した。胎生16日ラット心臓と生後8週齢ラット心臓とに対するノーザンブロットを、第1図のパネル19に示した。

産業上の利用可能性

心筋壊死を原因とする種々の心疾患、例えば心肥大、心不全などの疾患の診断薬および治療薬を提供することができる。

「配列表フリーテキスト」

配列番号39－人工配列の説明：合成DNA

配列番号40－人工配列の説明：合成DNA

配列番号41－人工配列の説明：合成DNA

配列番号42－人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

1. 配列番号 21、23、25、27 および 30 で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNA。
2. 配列番号 21 または 27 で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のDNA。
3. 配列番号 23、25 または 30 で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしかつ該DNAと90%以上の相同性を有し、かつ胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のDNA。
4. 配列番号 21、23、25、27 および 30 で表わされる塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA。
5. 請求項4記載のDNAと相補的な配列を有するDNA。
6. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のmRNAを検出する方法。
7. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。
8. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の原因遺伝子を検出する方法。
9. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。
10. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを用いて心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
11. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
12. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAを含む組換えウイルスベクター。
13. 請求項1～5のいずれか1項に記載のDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター。
14. 配列番号 19、32 および 37 で表される塩基配列からなる群より選ば

れる塩基配列を有するDNA。

15. 請求項14記載のDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする、胎児心臓と成体心臓とで発現が変動する遺伝子のDNA。
16. 配列番号19、32および37で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA。
17. 請求項16記載のDNAと相補的な配列を有するDNA。
18. 請求項14～16のいずれか1項に記載のDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。
19. 請求項14～16のいずれか1項に記載のDNAを用いる、心筋壊死を原因とする心疾患の原因遺伝子を検出する方法。
20. 請求項14～16のいずれか1項に記載のDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。
21. 請求項14～16のいずれか1項に記載のDNAを用いて心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
22. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子のmRNAを検出する方法。
23. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。
24. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。
25. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
26. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35

- 5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
27. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAを含む組換えウイルスベクター。
28. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、33および35で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター。
29. 配列番号22、24、26、28および31で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質。
30. 配列番号22、24、26および28で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列とは1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ心筋壊死を原因とする心疾患の修復に関与する活性を有する蛋白質。
31. 請求項29または30記載の蛋白質をコードするDNA。
32. 請求項1～4および31のいずれか1項記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。
33. 請求項32記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。
34. 請求項33記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項29または30記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。
35. 請求項29または30記載の蛋白質を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
36. 請求項33記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物を用いて心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
37. 請求項29または30記載の蛋白質を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
38. 請求項29または30記載の蛋白質の生産に関与する組換えウイルスベ

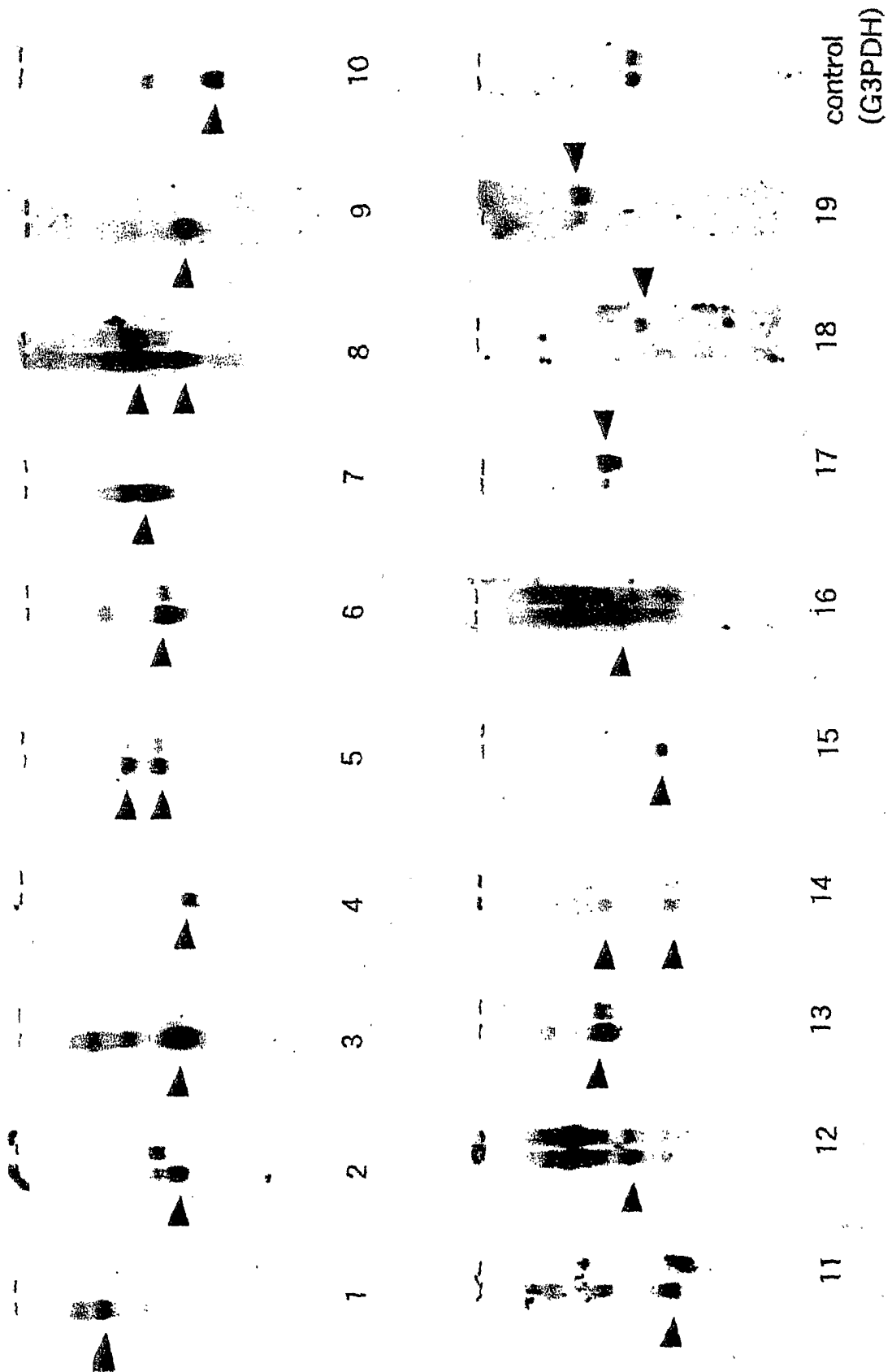
クター。

39. 請求項 3 8 記載の組換えウイルスベクターを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
40. 請求項 2 9 または 3 0 記載の蛋白質を認識する抗体。
41. 請求項 4 0 記載の抗体を用いる請求項 2 9 または 3 0 記載の蛋白質の免疫学的検出方法。
42. 請求項 4 0 記載の抗体を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
43. 請求項 4 0 記載の抗体を用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。
44. 請求項 4 0 記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。
45. 請求項 4 0 記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
46. 請求項 4 0 記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質および低分子化合物から選ばれる薬剤とを結合させた融合抗体を心臓病巣へ誘導するドラッグデリバリー方法。
47. 配列番号 2 0 または 3 8 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体。
48. 請求項 4 7 記載の抗体を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
49. 請求項 4 7 記載の抗体を用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制する物質をスクリーニングする方法。
50. 請求項 4 7 記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。
51. 請求項 4 7 記載の抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
52. 請求項 4 7 記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質および低分子化合物か

ら選ばれる薬剤とを結合させた融合抗体を心臓病巣へ誘導するドラッグデリバリー方法。

53. 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 および 36 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質の生産に関与する組換えウイルスベクター。
54. 請求項 53 記載の組換えウイルスベクターを含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
55. 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 および 36 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬をスクリーニングする方法。
56. 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 および 36 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。
57. 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 および 36 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の診断薬。
58. 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 および 36 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、心筋壊死を原因とする心疾患の治療薬。
59. 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 および 36 で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体と放射性同位元素、蛋白質および低分子化合物より選ばれる薬剤とを結合させた融合抗体を心臓病巣へ誘導するドラッグデリバリー方法。

第 1 図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> novel DNAs related to cardiomyocyte proliferation

<130> 11301W01

<140>

<141>

<150> P2000-126741

<151> 2000-04-27

<160> 42

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3532

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (101)..(640)

<400> 1

gcaaactgga catttgettc tctgtgaga accttcagc cttttctgt cttcaccctc 60
ttccagcccc agcggcctcc ttatccaact tcaggtacca atg ggg atc cca gtg 115

Met Gly Ile Pro Val

	1	5	
ggg aag tcg atg ttg gtg ctt ctc atc tct ttg gcc ttc gcc ttg tgc			163
Gly Lys Ser Met Leu Val Leu Leu Ile Ser Leu Ala Phe Ala Leu Cys			
	10	15	20
tgc atc gct gct tac cgc ccc agc gag act ctg tgc gga ggg gag ctt			211
Cys Ile Ala Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu			
	25	30	35
gtt gac acg ctt cag ttt gtc tgt tcg gac cgc ggc ttc tac ttc agc			259
Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Ser Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser			
	40	45	50
agg cct tca agc cgt gcc aac cgt cgc agc cgt ggc atc gtg gaa gag			307
Arg Pro Ser Ser Arg Ala Asn Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu			
	55	60	65
tgc tgc ttc cgc agc tgc gac ttg gcc ctc ctg gag aca tac tgt gcc			355
Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala			
	70	75	80
acc ccc gcc aag tcc gag agg gac gtg tct acc tct cag gcc gta ctt			403
Thr Pro Ala Lys Ser Glu Arg Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu			
	90	95	100
ccg gac gac ttc ccc aga tac ccc gtg ggc aag ttc ttc aaa ttc gac			451
Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Lys Phe Asp			
	105	110	115
acc tgg aga cag tcc gcg gga cgc ctg cgc aga ggc ctg cct gcc ctc			499
Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu Arg Arg Gly Leu Pro Ala Leu			
	120	125	130
ctg cgt gcc cgc cgg ggt cgc atg ctt gcc aaa gag ctc gaa gcg ttc			547
Leu Arg Ala Arg Arg Gly Arg Met Leu Ala Lys Glu Leu Glu Ala Phe			
	135	140	145
aga gag gcc aag cgc cac cgt ccc ctg atc gtg tta cca ccc aaa gac			595

Arg Glu Ala Lys Arg His Arg Pro Leu Ile Val Leu Pro Pro Lys Asp
 150 155 160 165
 ccc gcc cac ggg gga gcc tct teg gag atg tcc agc aac cat cag tgaacc 646
 Pro Ala His Gly Gly Ala Ser Ser Glu Met Ser Ser Asn His Gln
 170 175 180
 aaattatgtg gtaattctgc aatgtagtac catcagtctg tgacctctc ttgagcaggg 706
 acagctccat catgtcccac actaaggtct ctctgctcca cttecttcc caggtttctc 766
 cccaccacc cccatgccc gctccccac atcaggctgc tccccttgcc ccacaccatc 826
 gggcaagggg atcccagcaa ctctcaaaa ccaaatgtga ttggctctaa acaaccaat 886
 tggcaccctc caaattatat atgaacatta aaaaaaact ttaaagcata tagtcccttt 946
 acaacaaatt ggcttaagaa actccataac tgataatcta aaaattaat aaccaaagaa 1006
 attaattggc taaaaacata ctaaaaatta attggcttaa aaacaattgg caaaaatcaa 1066
 ataatttggc cegcececcc ccccttcac ttctttccat ttagatcttt agtcaaatg 1126
 gctcagactt ggatctcaga acccaagaag aaaggaagg gaccacaaat tttgcagta 1186
 gcatgtcatt gcttcagtgc tctctccttg tccactagtc cttttagcat aatctggctg 1246
 tgaacaacaa tagccgccca aactctttct tccactgtca ttccatcaca aatgtcacc 1306
 atgtcaccaa ggggctgggt gaaggaacc aaggagagga acagaacatg aaaactgaaa 1366
 atagaaccta attgaccaa gccccagtc caaaaaatct cacttttcat acctacteta 1426
 aaaagcacat gattatacc acacgtacat gcacacacac atgcacacag gcacacacac 1486
 acacacacac acacacacac aactatttag atgagaacat tgaatggct gagcaactc 1546
 gattggaacc acattgcca atccaaggcc catcttaaat tcctgagca gtttgcagtg 1606
 tttgagctc tctctgaatc catctagttt ctgctgccag tctagagtc gtttggccag 1666
 ataaggagat ggcaactgca agtgatacat gctaccgag tagcctgacc cctaggtgtg 1726
 ctctgggag gaaagatctg ggggacaacc cctaccccaa gcacacctat gggccatctc 1786
 tgtcaatctc ctggggagcc ccaacttttt aggggctccc caggagactc aactgatgt 1846
 ggggagtgtg ggaagtctgg cggttgagg ggtgggtggg gggcagtggg ggctgggtgg 1906
 ggggaaacta tgggtaggaa gtgtcccag agaggcttta ggtggaacag tcaggaggag 1966
 gcacaggtca acttcagaa ttactgaaga atcaggacc caaatctct gtcaattgat 2026
 ctatccctt cttttatgt ctggggcagg tttttcctt ttttttttt aatccctct 2086
 tagcttttaa tgcgtcata atccattcc ctatgtaac ggggcagca tcaagtaag 2146

aatgcatcaa gceatcaata ccagcgagag ccagtaacac cggctagagc catcaacacc 2206
ggcttccacc atgtcctgct cccaaccatt tateaacctt tttttttttt ttatctgtct 2266
ctatcgcttg gcctgagttg ggagtggagt ctctgtgggg tgctggccac gcacccacag 2326
agaaataaaa ggaattgaga aggccgctac ctggcctgac ttctggggac agtggctggt 2386
ccccagaagt tctgaggagt ggagggggcg tggggcagtg tcccctcagg tgtaggaag 2446
gtgctcggag gccacaaaga tggggcccca gctggccctg ccagttgggg gggaagggga 2506
tgtagatgta agactagaga gttccatca ggcgggagca agtggctgcc ttctgagcac 2566
ttgggggagg tcctcccgt gccctcagt gtcatttgc cactcctca gcacccatc 2626
ttaccctcag gaggtctgga gctctacaga cctcctgggg gcaaggtggg gtgaggcctg 2686
gagctgggga agcgaggagg ctttaaagcc ttcagagcca ggagaactgt gtacatgggg 2746
ttgtctgggc cctggggccc gaggtctggt tgagccgtag cagccactcc acggtgecta 2806
ggactcgggc gggaacagg gcggctggag gtttacctca ccccacttc tgcttccagt 2866
gcagtcccc tgcccaacag tectactagt aatctagagg cctgaggctt ctgggcccag 2926
gtgacaggac tggcaccacc ctggggggcg tgtgtgtcag ccagccatgg cacagagggt 2986
tctcagcaag tgcctaaaga atgggccatt tggaaacttg gacagaaact caaagagtaa 3046
attgttataa ttggagaata tgaattggcc tggtaaccaa aatatctcga ggcaccctaa 3106
attacctgcc catttgactg gacatccacc cagtgttaat atgcctcgtg ggatgggtgt 3166
tttcaggggc atttctgac cactctctgt gtcccagat ttgcagttct cccatcata 3226
ggtcaccctg atgcaggcac ctccctggcc tccatgcct agtgtggccc tccatcttgt 3286
tttgtctctt cctactgtc ttgggtggga tcccctcttg ggtcccccaa tttgtcatcc 3346
tgtgaagact tcccacgct cgaatgcat atgtcacctg tgccactgcc catgtcatcc 3406
agcagtggcc cgggtattt gcccacactc agtcccttta acatgcattt tctggcaaaa 3466
tccaaagctt gggttttgtt tttaacctgt taacgcttgc aaacctata aagcattcaa 3526
aatact 3532

<210> 2

<211> 180

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Gly Ile Pro Val Gly Lys Ser Met Leu Val Leu Leu Ile Ser Leu

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

<210> 3

<211> 876

<212> DNA

<1> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<1> (113)..(454)

<400>3

cggtcctga cctctgttcc tgtgctcccg cegtcgtcct ccagcgcagg cctccgggct 60
 ccagctccgg tgttggtgc aggctggtg tggctccaa agtgactgaa ca atg cag 118

Met Gln

1

aag gac agt ggc cca ctg gtt cct tta cat tat tat ggt ttc ggc tat 166
 Lys Asp Ser Gly Pro Leu Val Pro Leu His Tyr Tyr Gly Phe Gly Tyr

5

10

15

gcg gcc ctg gtg gct act ggt ggg att att ggc tat gca aaa gca ggt 214
 Ala Ala Leu Val Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Lys Ala Gly

20

25

30

agt gtg ccg tcc ctg gct get gga ctc ttc ttt ggg ggc ctg gca ggc 262
 Ser Val Pro Ser Leu Ala Ala Gly Leu Phe Phe Gly Gly Leu Ala Gly

35

40

45

50

ctg ggt gcc tac cag ctg tct cag gac ccc agg aac gtg tgg gtt ttc 310
 Leu Gly Ala Tyr Gln Leu Ser Gln Asp Pro Arg Asn Val Trp Val Phe

55

60

65

cta gct acg tct ggg act ttg gct ggc att atg ggg atg aga ttc tac 358
 Leu Ala Thr Ser Gly Thr Leu Ala Gly Ile Met Gly Met Arg Phe Tyr

70

75

80

aac tct ggg aaa ttt atg cct gca ggt ttg atc gcg gga gcc agt ttg 406
 Asn Ser Gly Lys Phe Met Pro Ala Gly Leu Ile Ala Gly Ala Ser Leu

85

90

95

ctg atg gtt gcc aaa ctt gga ctt agt atg ttg agt tca ccc cat ccg 454
 Leu Met Val Ala Lys Leu Gly Leu Ser Met Leu Ser Ser Pro His Pro

100

105

110

tagtagccat agccctgcgt gggctcatga tgagttgaca ctctccagtc ctctacatta 514
 ccacgctgaa gagataagaa cagcaaagac ctacactgag cacatggagg cgaagacgtg 574

gttactatag tgaccgttca gagacggcga gtgtctgacc tcagagctca cactgccttc 634
 atgcggttg ttcttgtgtc atgatgtctc gactctctgt actactacat aaaggggtaa 694

aatgttgggt gtcaacactg ggggccaga gctacacgtc ctgccgggaa gttgtgaaat 754
 ctcttggatga catttggat gtgggatctt ttgcacaggt ctgctatgaa attatgttac 814
 ggcaacatta tcggtgaaaa taaagtttcc tattaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 874
 aa 876

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

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

His Pro

<210> 5

<211> 631

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(628)

<400> 5

actagtgatt taggatcca atg cca act atg tcg agg cct gca ctg gat gtc 52
Met Pro Thr Met Ser Arg Pro Ala Leu Asp Val
1 5 10

aag ggt ggt acc acc tct gga aag gaa gat gcc aac cag gag atg aac 100
Lys Gly Gly Thr Thr Ser Gly Lys Glu Asp Ala Asn Gln Glu Met Asn
15 20 25

tct ctg gcc tac tct aac ctc ggg gta aaa gat cgc agg gca gtg acc 148
Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Arg Arg Ala Val Thr
30 35 40

gtc ctg cac tac ccc ggg gtc acc gca aat gga gcc aaa gcc aat gga 196
Val Leu His Tyr Pro Gly Val Thr Ala Asn Gly Ala Lys Ala Asn Gly
45 50 55

gtg ccc act agc ccc tct gga tca tca tct cca aca ggc tct cct act 244
Val Pro Thr Ser Pro Ser Gly Ser Ser Ser Pro Thr Gly Ser Pro Thr
60 65 70 75

gcc acc cct tct acc aaa ccc cca tcc ttc aac ctg cac ccc acc cct 292
Ala Thr Pro Ser Thr Lys Pro Pro Ser Phe Asn Leu His Pro Thr Pro
80 85 90

cac ctg ctg gcc agt atg cag ctt cag aag ctt aat agc cag tac caa 340
His Leu Leu Ala Ser Met Gln Leu Gln Lys Leu Asn Ser Gln Tyr Gln
95 100 105

ggg gct gca gcg act gct gct gct gcc ctg gct gca cca agc caa cca 388
Gly Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ala Ala Pro Ser Gln Pro
110 115 120

gga gag gat gag ccc ctg cta aac tgg ggc act ggg atc cag gca gga 436
Gly Glu Asp Glu Pro Leu Leu Asn Trp Gly Thr Gly Ile Gln Ala Gly
125 130 135

gca ggg gga tca ccc gga tca gtc tct cct gct ggt gcc cag agc cct 484

Ala Gly Gly Ser Pro Gly Ser Val Ser Pro Ala Gly Ala Gln Ser Pro
 140 145 150 155
 gct atc att gat tct gac cca gtg gat gag gag gtg ctg atg tct ctg 532
 Ala Ile Ile Asp Ser Asp Pro Val Asp Glu Glu Val Leu Met Ser Leu
 160 165 170
 gtg gta gaa ttg ggg cta gac cga gcc aat gag ctt ccc gag ctg tgg 580
 Val Val Glu Leu Gly Leu Asp Arg Ala Asn Glu Leu Pro Glu Leu Trp
 175 180 185
 cta ggg cag aat gag ttt gat ttc act gca gat ttt ccc tct ggc tgc 628
 Leu Gly Gln Asn Glu Phe Asp Phe Thr Ala Asp Phe Pro Ser Gly Cys
 190 195 200
 tga 631

<210> 6

<211> 203

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

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

	100		105		110										
Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Pro	Gly	Glu	Asp	Glu	Pro
		115					120						125		
Leu	Leu	Asn	Trp	Gly	Thr	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Pro
		130					135						140		
Gly	Ser	Val	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Ile	Asp	Ser
145					150					155					160
Asp	Pro	Val	Asp	Glu	Glu	Val	Leu	MET	Ser	Leu	Val	Val	Glu	Leu	Gly
				165					170						175
Leu	Asp	Arg	Ala	Asn	Glu	Leu	Pro	Glu	Leu	Trp	Leu	Gly	Gln	Asn	Glu
			180						185						190
Phe	Asp	Phe	Thr	Ala	Asp	Phe	Pro	Ser	Gly	Cys					
		195							200						

<210> 7

<211> 3653

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (361)..(3021)

<400> 7

```

acccccgtca acagcctgga gaaacattcc tggatcatg gccctgtatc tcggaatgct 60
gctgagtatc tgctgagcag cggaatcaac ggcagcttct tagtgcgga gagtgagagt 120
agccctggcc agagatccat ctcgctgagg tatgaaggga ggggtgtacca ctacaggatc 180
aacactgect ctgatggcaa gctgtacgtg tcctccgaga gccgcttcaa cactctgget 240
gagttagtte accatcactc cacggtggct gatggcctca tcaccacact cactacca 300
gctcccaage gcaacaagec cactatctac ggtgtgtccc ccaactacga caagtggaa 360
atg gag cgc acc gac atc acc atg aag cac aag ttg ggt gga ggc cag 408
Met Glu Arg Thr Asp Ile Thr Met Lys His Lys Leu Gly Gly Gly Gln

```

1

5

10

15

tac ggg gag gtg tac gag ggc gtt tgg aag aag tac agc ctc act gtg	456
Tyr Gly Glu Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys Tyr Ser Leu Thr Val	
20 25 30	
gcc gtg aag acc ttg aag gag gac acc atg gag gtg gag gag ttc ctg	504
Ala Val Lys Thr Leu Lys Glu Asp Thr Met Glu Val Glu Glu Phe Leu	
35 40 45	
aag gaa gcg gcg gtg atg aag gag atc aaa cac cct aac ctg gtg cag	552
Lys Glu Ala Ala Val Met Lys Glu Ile Lys His Pro Asn Leu Val Gln	
50 55 60	
ctg cta ggg gtg tgt acc cgg gaa cca cca ttc tac ata atc act gag	600
Leu Leu Gly Val Cys Thr Arg Glu Pro Pro Phe Tyr Ile Ile Thr Glu	
65 70 75 80	
ttc atg acc tat ggg aac ctg ctg gac tac ctg agg gag tgt aac cgg	648
Phe Met Thr Tyr Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu Arg Glu Cys Asn Arg	
85 90 95	
cag gag gtg agc gcc gtg gta ctg ctc tac atg gcc aca cag atc tca	696
Gln Glu Val Ser Ala Val Val Leu Leu Tyr Met Ala Thr Gln Ile Ser	
100 105 110	
tca gcc atg gag tac ttg gag aag aag aac ttc atc cac aga gac ctt	744
Ser Ala Met Glu Tyr Leu Glu Lys Lys Asn Phe Ile His Arg Asp Leu	
115 120 125	
gct gcc cgg aac tgc ctg gta ggg gaa aac cac ttg gtg aag gtg gct	792
Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn His Leu Val Lys Val Ala	
130 135 140	
gat ttt ggc ctg agc agg ttg atg aca ggg gac acc tac acg gcc cat	840
Asp Phe Gly Leu Ser Arg Leu Met Thr Gly Asp Thr Tyr Thr Ala His	
145 150 155 160	
gct gga gcc aaa ttc ccc atc aaa tgg acc gca cct gag agc ctg gcc	888
Ala Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ser Leu Ala	
165 170 175	

tac aac aag ttc tcc atc aag tgc gac gtg tgg gca ttt gga gta ttg	936
Tyr Asn Lys Phe Ser Ile Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu	
180 185 190	
ctc tgg gag att gct acc tat ggc atg tca cct tac ccg gga att gac	984
Leu Trp Glu Ile Ala Thr Tyr Gly Met Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Asp	
195 200 205	
ctg tct cag gtt tat gag ctg ctg gaa aaa gac tac cgc atg gag cgc	1032
Leu Ser Gln Val Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Asp Tyr Arg Met Glu Arg	
210 215 220	
cct gaa ggc tgc ccg gag aag gtc tac gag ctc atg cga gca tgt tgg	1080
Pro Glu Gly Cys Pro Glu Lys Val Tyr Glu Leu Met Arg Ala Cys Trp	
225 230 235 240	
cag tgg aac ccc tct gac cgg ccc tcc ttt gct gaa atc cac caa gcc	1128
Gln Trp Asn Pro Ser Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Ile His Gln Ala	
245 250 255	
ttt gaa acc atg ttc cag gaa tcc agt atc tca gat gag gtg gag aag	1176
Phe Glu Thr Met Phe Gln Glu Ser Ser Ile Ser Asp Glu Val Glu Lys	
260 265 270	
gag ctg ggg aaa cga ggc acg aga gga ggt gct ggg agt atg ctg cag	1224
Glu Leu Gly Lys Arg Gly Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ser Met Leu Gln	
275 280 285	
gcc cca gag ctg ccc acc aag acc aga acc tgc agg aga gca gct gag	1272
Ala Pro Glu Leu Pro Thr Lys Thr Arg Thr Cys Arg Arg Ala Ala Glu	
290 295 300	
cag aaa gat gcg cct gac acc cct gag ctg ctc cac acg aag ggc ctg	1320
Gln Lys Asp Ala Pro Asp Thr Pro Glu Leu Leu His Thr Lys Gly Leu	
305 310 315 320	
gga gaa agc gat gca ctg gac agt gag cct gct gta tgc cca ctg ctt	1368
Gly Glu Ser Asp Ala Leu Asp Ser Glu Pro Ala Val Ser Pro Leu Leu	
325 330 335	

cct cgg aaa gag cgc ggg ccc cca gac ggc agc cta aat gaa gat gag	1416
Pro Arg Lys Glu Arg Gly Pro Pro Asp Gly Ser Leu Asn Glu Asp Glu	
340 345 350	
cgc ctt ctc ccc aga gac aga aag acc aac ctg ttc agc gct ttg atc	1464
Arg Leu Leu Pro Arg Asp Arg Lys Thr Asn Leu Phe Ser Ala Leu Ile	
355 360 365	
aag aag aag aag aaa atg gcg ccg acg ccc cct aag cgc agc agt tcc	1512
Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro Thr Pro Pro Lys Arg Ser Ser Ser	
370 375 380	
ttc cga gag atg gat ggc cag cca gac cgc aga ggg gct agt gag gat	1560
Phe Arg Glu Met Asp Gly Gln Pro Asp Arg Arg Gly Ala Ser Glu Asp	
385 390 395 400	
gac agc agg gaa ctc tgc aat gga cca cca gct ctc acc tca gac gca	1608
Asp Ser Arg Glu Leu Cys Asn Gly Pro Pro Ala Leu Thr Ser Asp Ala	
405 410 415	
gca gag cct acc aag tcc cca aag gcc agc aat ggg gct ggc gtc cct	1656
Ala Glu Pro Thr Lys Ser Pro Lys Ala Ser Asn Gly Ala Gly Val Pro	
420 425 430	
aat gga gcc ttc cgg gag ccg ggc aac tca ggc ttc cgt tct ccc cac	1704
Asn Gly Ala Phe Arg Glu Pro Gly Asn Ser Gly Phe Arg Ser Pro His	
435 440 445	
atg tgg aaa aag tcc agc aca ctg acc ggg agc cgc ctg gct gct gcc	1752
Met Trp Lys Lys Ser Ser Thr Leu Thr Gly Ser Arg Leu Ala Ala Ala	
450 455 460	
gaa gag gag agc ggc atg agc tcc agt aag cgc ttc ctg cgt tct tgt	1800
Glu Glu Glu Ser Gly Met Ser Ser Ser Lys Arg Phe Leu Arg Ser Cys	
465 470 475 480	
tcg gcc tcc tgc atg ccc cat ggg gca agg gac aca gag tgg cgg tcg	1848
Ser Ala Ser Cys Met Pro His Gly Ala Arg Asp Thr Glu Trp Arg Ser	
485 490 495	

gtc acg ctg cct cga gac ctg ccg tct gct ggc aag cag ttt gac tca 1896
 Val Thr Leu Pro Arg Asp Leu Pro Ser Ala Gly Lys Gln Phe Asp Ser
 500 505 510

tcc acc ttt gga ggg cac aaa agc gaa aag cca gct ctg cct cgg aaa 1944
 Ser Thr Phe Gly Gly His Lys Ser Glu Lys Pro Ala Leu Pro Arg Lys
 515 520 525

cgc acc agt gag agc agg tct gag cag gtg gcc aaa agc acg gcg atg 1992
 Arg Thr Ser Glu Ser Arg Ser Glu Gln Val Ala Lys Ser Thr Ala Met
 530 535 540

ccc cct ccc cgg ctg gtg aag aag aac gag gag gct gct gaa gaa ggc 2040
 Pro Pro Pro Arg Leu Val Lys Lys Asn Glu Glu Ala Ala Glu Glu Gly
 545 550 555 560

ttc aaa gac aca gaa tcc agc cct ggc tcc agc cct ccc agc ttg act 2088
 Phe Lys Asp Thr Glu Ser Ser Pro Gly Ser Ser Pro Pro Ser Leu Thr
 565 570 575

ccc aaa ctc ctc cgc agg cag gtc act gcc tct cct tcc tct ggc ctc 2136
 Pro Lys Leu Leu Arg Arg Gln Val Thr Ala Ser Pro Ser Ser Gly Leu
 580 585 590

tct cac aag gaa gag gcc acc aag ggc agt gcc tca ggc atg ggg act 2184
 Ser His Lys Glu Glu Ala Thr Lys Gly Ser Ala Ser Gly Met Gly Thr
 595 600 605

ccg gcc act gca gag cca gca ccc ccc agc aac aaa gtg ggc ctc agc 2232
 Pro Ala Thr Ala Glu Pro Ala Pro Pro Ser Asn Lys Val Gly Leu Ser
 610 615 620

aag gcc tcc tct gag gag atg cgc gta agg agg cac aag cac agc tcg 2280
 Lys Ala Ser Ser Glu Glu Met Arg Val Arg Arg His Lys His Ser Ser
 625 630 635 640

gag tcc cca ggg aga gac aag ggg cga ctg gct aag ctc aag cct gcc 2328
 Glu Ser Pro Gly Arg Asp Lys Gly Arg Leu Ala Lys Leu Lys Pro Ala
 645 650 655

ccg ccg cct cct cct gcc tgc aca gga aaa gca ggc aag ccc gca cag	2376
Pro Pro Pro Pro Pro Ala Cys Thr Gly Lys Ala Gly Lys Pro Ala Gln	
660 665 670	
agc ccc agc caa gag gcc ggg gag gca ggg ggg ccc aca aag aca aaa	2424
Ser Pro Ser Gln Glu Ala Gly Glu Ala Gly Gly Pro Thr Lys Thr Lys	
675 680 685	
tgc acg agt ctg gct atg gat gct gtg aac act gac ccc acc aag gcc	2472
Cys Thr Ser Leu Ala Met Asp Ala Val Asn Thr Asp Pro Thr Lys Ala	
690 695 700	
ggc cca cct gga gaa gga ctg aga aag cct gtg ccc cca tct gtg cca	2520
Gly Pro Pro Gly Glu Gly Leu Arg Lys Pro Val Pro Pro Ser Val Pro	
705 710 715 720	
aag ccc cag tcg acg gct aag cct cca ggg act ccc acc agc ccg gtc	2568
Lys Pro Gln Ser Thr Ala Lys Pro Pro Gly Thr Pro Thr Ser Pro Val	
725 730 735	
tcc acc ccc tcc aca gca cca gct cct tca ccc ctg gct ggg gac cag	2616
Ser Thr Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ala Gly Asp Gln	
740 745 750	
cag cca tct tct gcc gcc ttc atc ccc ctc ata tca acc cgt gtg tct	2664
Gln Pro Ser Ser Ala Ala Phe Ile Pro Leu Ile Ser Thr Arg Val Ser	
755 760 765	
ctt agg aag acc cgc cag ccg cca gag cgc att gcc agt ggc acc atc	2712
Leu Arg Lys Thr Arg Gln Pro Pro Glu Arg Ile Ala Ser Gly Thr Ile	
770 775 780	
acc aag ggt gtg gtt ctg gac agt act gag gcc ctg tgc ctt gcc atc	2760
Thr Lys Gly Val Val Leu Asp Ser Thr Glu Ala Leu Cys Leu Ala Ile	
785 790 795 800	
tcc cgg aac tca gag cag atg gcc agc cac agt gct gta ctg gag gct	2808
Ser Arg Asn Ser Glu Gln Met Ala Ser His Ser Ala Val Leu Glu Ala	
805 810 815	

ggc aag aac ctg tac act ttc tgt gtg agc tat gtg gac tct atc cag 2856
 Gly Lys Asn Leu Tyr Thr Phe Cys Val Ser Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 820 825 830
 cag atg agg aac aag ttt gcc ttc cgt gag gct atc aac aag ctg gag 2904
 Gln Met Arg Asn Lys Phe Ala Phe Arg Glu Ala Ile Asn Lys Leu Glu
 835 840 845
 agc aac ctc cga gag ctg cag atc tgc cct gcc aca gcc tcc agt ggg 2952
 Ser Asn Leu Arg Glu Leu Gln Ile Cys Pro Ala Thr Ala Ser Ser Gly
 850 855 860
 cca gct gcc acc caa gac ttc agc aag ctg ctc agc tct gtg aag gag 3000
 Pro Ala Ala Thr Gln Asp Phe Ser Lys Leu Leu Ser Ser Val Lys Glu
 865 870 875 880
 atc agc gac att gtc cgg agg tagcagcaac cagtgtatgt cagcaagaga 3051
 Ile Ser Asp Ile Val Arg Arg
 885
 tgttgagctt cacagggtc ttgtgctat aaagatgggg acaggggact ggggagctgg 3111
 cgtctttccc caggagcttt aaagagagac aagcagagcc tgaggagagac ctggatggag 3171
 cctggtggag ttggctcttc ctctgtgtt gtgcaccagc tgccctgcac ctttctgtc 3231
 cageccagge gtcagccacc tctcctcact gcctgtggat gggctctctg ctctgaagac 3291
 tacatctgge ctgcctggee accagcttc tcaactcccc gtgcctcaga cccagctccc 3351
 aggtcagcct ggagtgtctt tcctgtcct tgcagaacga cctcctctga tggaccttct 3411
 tgtcaccaag gcatgggagc cctgtgctt actgtacctg cacctttgat gcttacaaac 3471
 tgtccccgag agcctgtgct cactgtgttt tcattggaag ggctgtcgtt ttaaggtca 3531
 tgaggtgcta aagccagggg cccagatggg tgggcactgg aaacaggagc tgggcagtgt 3591
 ggtctgtcac ctgctctcag tatcttcage agtgtgcccc gcagatcttg gacagcaage 3651
 tt 3653
 <210> 8
 <211> 887
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 8

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

225 230 235 240
 Gln Trp Asn Pro Ser Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Ile His Gln Ala
 245 250 255
 Phe Glu Thr Met Phe Gln Glu Ser Ser Ile Ser Asp Glu Val Glu Lys
 260 265 270
 Glu Leu Gly Lys Arg Gly Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ser Met Leu Gln
 275 280 285
 Ala Pro Glu Leu Pro Thr Lys Thr Arg Thr Cys Arg Arg Ala Ala Glu
 290 295 300
 Gln Lys Asp Ala Pro Asp Thr Pro Glu Leu Leu His Thr Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Gly Glu Ser Asp Ala Leu Asp Ser Glu Pro Ala Val Ser Pro Leu Leu
 325 330 335
 Pro Arg Lys Glu Arg Gly Pro Pro Asp Gly Ser Leu Asn Glu Asp Glu
 340 345 350
 Arg Leu Leu Pro Arg Asp Arg Lys Thr Asn Leu Phe Ser Ala Leu Ile
 355 360 365
 Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro Thr Pro Pro Lys Arg Ser Ser Ser
 370 375 380
 Phe Arg Glu Met Asp Gly Gln Pro Asp Arg Arg Gly Ala Ser Glu Asp
 385 390 395 400
 Asp Ser Arg Glu Leu Cys Asn Gly Pro Pro Ala Leu Thr Ser Asp Ala
 405 410 415
 Ala Glu Pro Thr Lys Ser Pro Lys Ala Ser Asn Gly Ala Gly Val Pro
 420 425 430
 Asn Gly Ala Phe Arg Glu Pro Gly Asn Ser Gly Phe Arg Ser Pro His
 435 440 445
 Met Trp Lys Lys Ser Ser Thr Leu Thr Gly Ser Arg Leu Ala Ala Ala
 450 455 460
 Glu Glu Glu Ser Gly Met Ser Ser Ser Lys Arg Phe Leu Arg Ser Cys

465 470 475 480
 Ser Ala Ser Cys Met Pro His Gly Ala Arg Asp Thr Glu Trp Arg Ser
 485 490 495
 Val Thr Leu Pro Arg Asp Leu Pro Ser Ala Gly Lys Gln Phe Asp Ser
 500 505 510
 Ser Thr Phe Gly Gly His Lys Ser Glu Lys Pro Ala Leu Pro Arg Lys
 515 520 525
 Arg Thr Ser Glu Ser Arg Ser Glu Gln Val Ala Lys Ser Thr Ala Met
 530 535 540
 Pro Pro Pro Arg Leu Val Lys Lys Asn Glu Glu Ala Ala Glu Glu Gly
 545 550 555 560
 Phe Lys Asp Thr Glu Ser Ser Pro Gly Ser Ser Pro Pro Ser Leu Thr
 565 570 575
 Pro Lys Leu Leu Arg Arg Gln Val Thr Ala Ser Pro Ser Ser Gly Leu
 580 585 590
 Ser His Lys Glu Glu Ala Thr Lys Gly Ser Ala Ser Gly Met Gly Thr
 595 600 605
 Pro Ala Thr Ala Glu Pro Ala Pro Pro Ser Asn Lys Val Gly Leu Ser
 610 615 620
 Lys Ala Ser Ser Glu Glu Met Arg Val Arg Arg His Lys His Ser Ser
 625 630 635 640
 Glu Ser Pro Gly Arg Asp Lys Gly Arg Leu Ala Lys Leu Lys Pro Ala
 645 650 655
 Pro Pro Pro Pro Pro Ala Cys Thr Gly Lys Ala Gly Lys Pro Ala Gln
 660 665 670
 Ser Pro Ser Gln Glu Ala Gly Glu Ala Gly Gly Pro Thr Lys Thr Lys
 675 680 685
 Cys Thr Ser Leu Ala Met Asp Ala Val Asn Thr Asp Pro Thr Lys Ala
 690 695 700
 Gly Pro Pro Gly Glu Gly Leu Arg Lys Pro Val Pro Pro Ser Val Pro

705 710 715 720
 Lys Pro Gln Ser Thr Ala Lys Pro Pro Gly Thr Pro Thr Ser Pro Val
 725 730 735
 Ser Thr Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ala Gly Asp Gln
 740 745 750
 Gln Pro Ser Ser Ala Ala Phe Ile Pro Leu Ile Ser Thr Arg Val Ser
 755 760 765
 Leu Arg Lys Thr Arg Gln Pro Pro Glu Arg Ile Ala Ser Gly Thr Ile
 770 775 780
 Thr Lys Gly Val Val Leu Asp Ser Thr Glu Ala Leu Cys Leu Ala Ile
 785 790 795 800
 Ser Arg Asn Ser Glu Gln Met Ala Ser His Ser Ala Val Leu Glu Ala
 805 810 815
 Gly Lys Asn Leu Tyr Thr Phe Cys Val Ser Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 820 825 830
 Gln Met Arg Asn Lys Phe Ala Phe Arg Glu Ala Ile Asn Lys Leu Glu
 835 840 845
 Ser Asn Leu Arg Glu Leu Gln Ile Cys Pro Ala Thr Ala Ser Ser Gly
 850 855 860
 Pro Ala Ala Thr Gln Asp Phe Ser Lys Leu Leu Ser Ser Val Lys Glu
 865 870 875 880
 Ile Ser Asp Ile Val Arg Arg
 885

<210> 9

<211> 1725

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (111)..(1412)

<400> 9

```

agtgctgctc cggtagcgag tcgcgctcac gtttgctcctt aagactccct tcggtgtctc 60
caggaccctc tttccttctt ccgcagcgat cctactgcca gaacttcacc atg tcc 116
                                                    Met Ser
                                                    1
att ctc aag atc cat gcc aga gag atc ttt gac tcc cgc ggg aat ccc 164
Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly Asn Pro
           5                10                15
acc gtt gag gtg gat ctc tac acc gca aaa ggt ctc ttc cgt gct gcg 212
Thr Val Glu Val Asp Leu Tyr Thr Ala Lys Gly Leu Phe Arg Ala Ala
           20                25                30
gtg ccc agc ggt gcg tcc act ggc atc tac gag gcc cta gaa ctc cga 260
Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu Leu Arg
           35                40                45                50
gac aat gat aag acc cgc ttc atg ggg aag ggt gtc tca aag gct gtt 308
Asp Asn Asp Lys Thr Arg Phe Met Gly Lys Gly Val Ser Lys Ala Val
           55                60                65
gag cac atc aat aaa act att gca cct gct ctg gtt agc aag aaa ctg 356
Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys Lys Leu
           70                75                80
aat gtt gtg gag cag gag aag att gac cag ctg atg atc gag atg gac 404
Asn Val Val Glu Gln Glu Lys Ile Asp Gln Leu Met Ile Glu Met Asp
           85                90                95
ggc aca gag aat aaa tct aag ttt ggt gca aat gcc atc ctg gga gtg 452
Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu Gly Val
           100                105                110
tcc ctg gct gtc tgc aag gct ggt gcc gtg ggg aag ggg gtg ccc ctt 500
Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Gly Lys Gly Val Pro Leu
           115                120                125                130
tac cgt cac att gcc gac ttg gcc ggc aac cct gaa gtc act ctg ccg 548

```

Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Pro Glu Val Thr Leu Pro
 135 140 145
 gtc cca gct ttc aat gtg atc aac ggc ggt tct cat gct ggc aac aag 596
 Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly Asn Lys
 150 155 160
 ttg gcc atg caa gag ttc atg atc ctg cct gtg ggg gca tcc tct ttc 644
 Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ser Ser Phe
 165 170 175
 cgg gaa gcc atg cgc att gga gca gag gtt tac cac aac ctg aag aac 692
 Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu Lys Asn
 180 185 190
 gtc atc aaa gag aag tac ggg aaa gac gcc acc aat gtg ggt gat gag 740
 Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly Asp Glu
 195 200 205 210
 ggt gga ttc gca cct aac atc ctg gag aac aaa gaa gca ctg gag ctg 788
 Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Ala Leu Glu Leu
 215 220 225
 ctc aag tct gcc att gca aag gcc ggc tac act gac cag gtt gtc atc 836
 Leu Lys Ser Ala Ile Ala Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Gln Val Val Ile
 230 235 240
 ggc atg gat gtg gct gcc tcc gag ttc tac agg gct ggc aag tat gac 884
 Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Arg Ala Gly Lys Tyr Asp
 245 250 255
 ctg gac ttc aag tct cca gat gat gcc agc cgg tac atc aca ccc gac 932
 Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Ala Ser Arg Tyr Ile Thr Pro Asp
 260 265 270
 cag ctg gcc gac ctg tac aag tcc ttc atc aag gac tac cca gtg gtg 980
 Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro Val Val
 275 280 285 290
 tcc att gaa gat ccc ttt gac cag gac gac tgg gat gct tgg cag aag 1028

Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Asp Ala Trp Gln Lys
295 300 305
ttc aca gct act gca ggc atc cag gtg gtg ggg gat gac ctc aca gtg 1076
Phe Thr Ala Thr Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu Thr Val
310 315 320
acc aac cct aag cgg atc gcc aag gct gca ggc gaa aag tcc tgc aac 1124
Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Ala Gly Glu Lys Ser Cys Asn
325 330 335
tgc ctc ctg ctc aaa gtg aac cag att ggc tct gtg acc gag tct ctg 1172
Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu Ser Leu
340 345 350
cag gcg tgt aag ctg gcc cag tcc aat ggc tgg ggt gtc atg gtg tcc 1220
Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ser Asn Gly Trp Gly Val Met Val Ser
355 360 365 370
cat cga tct gag gag act gag gac act ttc att gcc gac ctg gtg gtg 1268
His Arg Ser Glu Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu Val Val
375 380 385
ggg ctc tgc act ggg cag atc aag act ggt gcc ccc tgc cga tct gag 1316
Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg Ser Glu
390 395 400
cgc ctg gcc aag tac aat cag atc ctt aga atc gag gag gaa ctg ggc 1364
Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Ile Leu Arg Ile Glu Glu Glu Leu Gly
405 410 415
agc aaa gcc aag ttt gcc ggc agg tcc ttc agg aac ccc ctg gcc aag 1412
Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Ser Phe Arg Asn Pro Leu Ala Lys
420 425 430
taaggcatgg accggagate cctggagcta ccagatcctc tgtctccgtc atccaggcgg 1472
ctcaaggctg gcccagtgt tgcctctccc atgtcactgc ttccttagat gtccacccg 1532
accacctgga gccctgctgg agccccacg tttgtaatca tgtgatcagt ctgaatcatt 1592
gtttctgtca cctgacttte cagctagtgt ctggagcct ctgaactcca gcgtaatctc 1652

tagagtgcc acaccatcaa gactcccccc agtggtttac ttgcaaaaat aaaagctgca 1712
 gaagctcaaa aaa 1725

<210> 10

<211> 434

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 10

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

180 185 190
 Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Ala Leu
 210 215 220
 Glu Leu Leu Lys Ser Ala Ile Ala Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Gln Val
 225 230 235 240
 Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Arg Ala Gly Lys
 245 250 255
 Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Ala Ser Arg Tyr Ile Thr
 260 265 270
 Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro
 275 280 285
 Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Asp Ala Trp
 290 295 300
 Gln Lys Phe Thr Ala Thr Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Ala Gly Glu Lys Ser
 325 330 335
 Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu
 340 345 350
 Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ser Asn Gly Trp Gly Val Met
 355 360 365
 Val Ser His Arg Ser Glu Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu
 370 375 380
 Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg
 385 390 395 400
 Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Ile Leu Arg Ile Glu Glu Glu
 405 410 415

Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Ser Phe Arg Asn Pro Leu

420

425

430

Ala Lys

<210> 11

<211> 5412

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(4515)

<400> 11

cagggcggag gctggaggcc actgccaagc atg gcg ccc acc tgg aga ccc agc 54

Met Ala Pro Thr Trp Arg Pro Ser

1

5

gtg gtg tct gtg gtg ggt cct gtg ggg ctc ttc ctt gta ctg ctg gcc 102

Val Val Ser Val Val Gly Pro Val Gly Leu Phe Leu Val Leu Leu Ala

10

15

20

aga ggg tgc ttg gct gaa gag cca ccc aga ttt atc aga gag ccc aag 150

Arg Gly Cys Leu Ala Glu Glu Pro Pro Arg Phe Ile Arg Glu Pro Lys

25

30

35

40

gat cag att ggt gtg tca gga ggc gtg gcc tcc ttc gtg tgc cag gcc 198

Asp Gln Ile Gly Val Ser Gly Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Gln Ala

45

50

55

aca ggt gac cct aag cca cgg gtg acc tgg aac aag aag ggc aag aaa 246

Thr Gly Asp Pro Lys Pro Arg Val Thr Trp Asn Lys Lys Gly Lys Lys

60

65

70

gtg aac tca cag cgc ttt gag acc att gac ttt gac gag agc teg ggg 294

Val Asn Ser Gln Arg Phe Glu Thr Ile Asp Phe Asp Glu Ser Ser Gly

75

80

85

gcc gtg ctg agg atc cag cca ctt cgg aca ccc cgg gat gag aac gtg 342

Ala Val Leu Arg Ile Gln Pro Leu Arg Thr Pro Arg Asp Glu Asn Val	
90	95 100
tac gag tgt gtg gcc cag aac tgc gtg ggg gag atc aca gtt cat gcg	390
Tyr Glu Cys Val Ala Gln Asn Ser Val Gly Glu Ile Thr Val His Ala	
105	110 115 120
aag ctc acc gtc ctg cga gag gac cag ctg cct cct ggc ttc ccc aac	438
Lys Leu Thr Val Leu Arg Glu Asp Gln Leu Pro Pro Gly Phe Pro Asn	
125	130 135
att gac atg ggc ccc cag ttg aag gtt gta gag cgc aca cgc aca gcc	486
Ile Asp Met Gly Pro Gln Leu Lys Val Val Glu Arg Thr Arg Thr Ala	
140	145 150
acc atg ctc tgt gct gcc agc gga aac cct gac cct gag atc acc tgg	534
Thr Met Leu Cys Ala Ala Ser Gly Asn Pro Asp Pro Glu Ile Thr Trp	
155	160 165
ttc aag gac ttc ctg cct gtg gac ccc agt gcc agc aat ggg cgg atc	582
Phe Lys Asp Phe Leu Pro Val Asp Pro Ser Ala Ser Asn Gly Arg Ile	
170	175 180
aag cag ctt cgg tca ggt gcc ctg cag att gag agc agc gag gag aca	630
Lys Gln Leu Arg Ser Gly Ala Leu Gln Ile Glu Ser Ser Glu Glu Thr	
185	190 195 200
gac cag ggc aag tac gag tgt gtg gcc acc aaa cag gcg ggg gtg cgc	678
Asp Gln Gly Lys Tyr Glu Cys Val Ala Thr Lys Gln Ala Gly Val Arg	
205	210 215
tac tca tca cct gcc aac ctc tac gtg cga gtc cgc cgt gtg gcc ccc	726
Tyr Ser Ser Pro Ala Asn Leu Tyr Val Arg Val Arg Arg Val Ala Pro	
220	225 230
cgc ttc tcc atc ctg ccc atg agc cac gag atc atg ccc ggt ggg aat	774
Arg Phe Ser Ile Leu Pro Met Ser His Glu Ile Met Pro Gly Gly Asn	
235	240 245
gtg aat atc act tgt gtg gct gtg ggc tca ccc atg ccc tac gtg aag	822

Val Asn Ile Thr Cys Val Ala Val Gly Ser Pro Met Pro Tyr Val Lys
 250 255 260
 tgg atg cag ggg gca gag gac ctg acg cct gag gat gac atg ccc gtg 870
 Trp Met Gln Gly Ala Glu Asp Leu Thr Pro Glu Asp Asp Met Pro Val
 265 270 275 280
 ggt cgg aat gtc ctc gaa ctc acg gat gtc aaa gac tca gcc aac tat 918
 Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Thr Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn Tyr
 285 290 295
 cct tgt gtg gcc atg tcc agc ctg gga gtg atc gag gcc gtt gct gac 966
 Pro Cys Val Ala Met Ser Ser Leu Gly Val Ile Glu Ala Val Ala Asp
 300 305 310
 atc act gta aaa tct ctc ccc aaa gcc cct ggg act ccc gtg gtg acg 1014
 Ile Thr Val Lys Ser Leu Pro Lys Ala Pro Gly Thr Pro Val Val Thr
 315 320 325
 gag aac act gct acc agt atc act gtc aca tgg gac gca ggc aat cct 1062
 Glu Asn Thr Ala Thr Ser Ile Thr Val Thr Trp Asp Ala Gly Asn Pro
 330 335 340
 gac cct gtg tcc tac tac gta ttg agt ata atc aaa gcc agg atg ggc 1110
 Asp Pro Val Ser Tyr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Lys Ala Arg Met Gly
 345 350 355 360
 cgt atc aga tca aag aag aca tca acc acc acg cgc tac agc atc ggc 1158
 Arg Ile Arg Ser Lys Lys Thr Ser Thr Thr Thr Arg Tyr Ser Ile Gly
 365 370 375
 ggc ctg agc ccc aac tct gag tat gag atc tgg gtg tca gct gtc aac 1206
 Gly Leu Ser Pro Asn Ser Glu Tyr Glu Ile Trp Val Ser Ala Val Asn
 380 385 390
 tcc atc ggc cag gcc ccc agt gag tcc gtg gtg acc cgc aca ggc gag 1254
 Ser Ile Gly Gln Ala Pro Ser Glu Ser Val Val Thr Arg Thr Gly Glu
 395 400 405
 cag gca cca gcc agt get ccc agg aat gtt cag gcg cgc atg etc agt 1302

Gln Ala Pro Ala Ser Ala Pro Arg Asn Val Gln Ala Arg Met Leu Ser
 410 415 420
 gcc acc acc atg att gtg cag tgg gag gag ccc gtg gag ccc aat ggc 1350
 Ala Thr Thr Met Ile Val Gln Trp Glu Glu Pro Val Glu Pro Asn Gly
 425 430 435 440
 ctg atc cgt ggc tac cgc gtc tac tac acc atg gag ccc gag cat ccg 1398
 Leu Ile Arg Gly Tyr Arg Val Tyr Tyr Thr Met Glu Pro Glu His Pro
 445 450 455
 gtg ggc aac tgg cag aag cac aat gtg gac gac agt ctt ctg acc act 1446
 Val Gly Asn Trp Gln Lys His Asn Val Asp Asp Ser Leu Leu Thr Thr
 460 465 470
 gtg ggc agc ctg cta gag gat gag acc tac act gtg aga gtg ctc gcc 1494
 Val Gly Ser Leu Leu Glu Asp Glu Thr Tyr Thr Val Arg Val Leu Ala
 475 480 485
 ttc aca tcg gtg ggc gat ggg cca ctg tca gac ccc atc cag gtc aag 1542
 Phe Thr Ser Val Gly Asp Gly Pro Leu Ser Asp Pro Ile Gln Val Lys
 490 495 500
 acc cag cag gga gtg ccc ggc cag ccc atg aac ttg cgg gct gag gcc 1590
 Thr Gln Gln Gly Val Pro Gly Gln Pro Met Asn Leu Arg Ala Glu Ala
 505 510 515 520
 aag tca gag acc agc att ggg ctc tcg tgg agt gca cca cgg cag gag 1638
 Lys Ser Glu Thr Ser Ile Gly Leu Ser Trp Ser Ala Pro Arg Gln Glu
 525 530 535
 agt gtc att aag tat gaa ctg ctc ttc cgg gag ggc gac cga ggc cga 1686
 Ser Val Ile Lys Tyr Glu Leu Leu Phe Arg Glu Gly Asp Arg Gly Arg
 540 545 550
 gag gtg ggg cga acc ttc gac cca acc aca gcc ttt gtg gtg gag gac 1734
 Glu Val Gly Arg Thr Phe Asp Pro Thr Thr Ala Phe Val Val Glu Asp
 555 560 565
 ctc aag ccc aat acg gag tac gcg ttc cgg ctg gcg gct cgc tcg ccg 1782

Leu Lys Pro Asn Thr Glu Tyr Ala Phe Arg Leu Ala Ala Arg Ser Pro
 570 575 580
 cag ggc ctg ggc gcc ttc acc gcg gtt gtg cgc cag cgc aca ctg cag 1830
 Gln Gly Leu Gly Ala Phe Thr Ala Val Val Arg Gln Arg Thr Leu Gln
 585 590 595 600
 gcc atc tcc ccc aag aac ttc aag gtg aag atg atc atg aaa act tca 1878
 Ala Ile Ser Pro Lys Asn Phe Lys Val Lys Met Ile Met Lys Thr Ser
 605 610 615
 gtg ctg cta agc tgg gag ttc cct gac aac tat aac tca ccc acg ccc 1926
 Val Leu Leu Ser Trp Glu Phe Pro Asp Asn Tyr Asn Ser Pro Thr Pro
 620 625 630
 tac aag atc cag tac aat gga ctc aca ctg gac gtg gat ggc cgc act 1974
 Tyr Lys Ile Gln Tyr Asn Gly Leu Thr Leu Asp Val Asp Gly Arg Thr
 635 640 645
 acc aag aag ctg atc acg cac ctc aag cca cac acc ttc tat aac ttc 2022
 Thr Lys Lys Leu Ile Thr His Leu Lys Pro His Thr Phe Tyr Asn Phe
 650 655 660
 gtg ctc acc aac cgt ggc agc agc ctg gga ggc ctg cag cag acg gtc 2070
 Val Leu Thr Asn Arg Gly Ser Ser Leu Gly Gly Leu Gln Gln Thr Val
 665 670 675 680
 acc gcc agg acc gcc ttc aac atg ctc agt ggc aag cct agt gtc gcc 2118
 Thr Ala Arg Thr Ala Phe Asn Met Leu Ser Gly Lys Pro Ser Val Ala
 685 690 695
 cca aag cct gac aac gat ggt tcc att gtg gtc tac ctg cct gat ggc 2166
 Pro Lys Pro Asp Asn Asp Gly Ser Ile Val Val Tyr Leu Pro Asp Gly
 700 705 710
 cag agt ccc gtg aca gtg cag aac tac ttc att gtg atg gtc cca ctt 2214
 Gln Ser Pro Val Thr Val Gln Asn Tyr Phe Ile Val Met Val Pro Leu
 715 720 725
 cgg aag tct cgt ggt ggc cag ttc cct atc cta cta cct agt cca gag 2262

Arg Lys Ser Arg Gly Gly Gln Phe Pro Ile Leu Leu Pro Ser Pro Glu
 730 735 740
 gac atg gat ctg gag gag ctc atc cag gac ctc tcc cgg ctg cag agc 2310
 Asp Met Asp Leu Glu Glu Leu Ile Gln Asp Leu Ser Arg Leu Gln Ser
 745 750 755 760
 agc ctg cgc cac tca aga cag ctg gag gtg cct cgg cct tac atc gcc 2358
 Ser Leu Arg His Ser Arg Gln Leu Glu Val Pro Arg Pro Tyr Ile Ala
 765 770 775
 gct cgg ttc tcc atc ctg cca gct gtc ttc cat cct ggg aac cag aag 2406
 Ala Arg Phe Ser Ile Leu Pro Ala Val Phe His Pro Gly Asn Gln Lys
 780 785 790
 caa tat ggt ggc ttt gac aac agg ggc ttg gag cca ggc cac cgt tat 2454
 Gln Tyr Gly Gly Phe Asp Asn Arg Gly Leu Glu Pro Gly His Arg Tyr
 795 800 805
 gtc ctc ttt gta ctt gct gtg ctg cag aag aat gag cct aca ttt gca 2502
 Val Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Gln Lys Asn Glu Pro Thr Phe Ala
 810 815 820
 gcc agt ccc ttc tca gac ccc ttc caa ctg gac aac cca gac ccg cag 2550
 Ala Ser Pro Phe Ser Asp Pro Phe Gln Leu Asp Asn Pro Asp Pro Gln
 825 830 835 840
 ccc att gtg gat ggc gag gag ggc ctc atc tgg gtg atc ggg ccc gtg 2598
 Pro Ile Val Asp Gly Glu Glu Gly Leu Ile Trp Val Ile Gly Pro Val
 845 850 855
 ctg gcc gtg gtc ttc atc atc tgc atc gta att gcc atc ctg ctg tac 2646
 Leu Ala Val Val Phe Ile Ile Cys Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Tyr
 860 865 870
 aag aac aag cct gac agc aaa cgc aag gac tca gag ccc cgc acc aaa 2694
 Lys Asn Lys Pro Asp Ser Lys Arg Lys Asp Ser Glu Pro Arg Thr Lys
 875 880 885
 tgc tta ttg aac aat gca gac ctc gcc ccc cat cac ccc aag gac cct 2742

Cys Leu Leu Asn Asn Ala Asp Leu Ala Pro His His Pro Lys Asp Pro
 890 895 900
 gtg gaa atg cga cgt atc aac ttc cag acg cca ggt atg ctc agc cac 2790
 Val Glu Met Arg Arg Ile Asn Phe Gln Thr Pro Gly Met Leu Ser His
 905 910 915 920
 ccg ccc att ccc atc aca gac atg gct gaa cac atg gag aga ctc aaa 2838
 Pro Pro Ile Pro Ile Thr Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys
 925 930 935
 gcc aac gac agc ctc aag ctc tcc cag gag tat gag tcc atc gac cct 2886
 Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro
 940 945 950
 ggc cag cag ttc act tgg gaa cat tcg aac ctg gag gcc aac aag cca 2934
 Gly Gln Gln Phe Thr Trp Glu His Ser Asn Leu Glu Ala Asn Lys Pro
 955 960 965
 aag aac cga tac gcc aat gtc atc gcc tat gac cat tca cga gtc atc 2982
 Lys Asn Arg Tyr Ala Asn Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile
 970 975 980
 ctg cag cct tta gaa ggc atc atg ggt agt gat tac atc aat gcc aac 3030
 Leu Gln Pro Leu Glu Gly Ile Met Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn
 985 990 995 1000
 tat gtt gac ggc tat cgg cgg cag aac gca tac atc gcc acg cag ggg 3078
 Tyr Val Asp Gly Tyr Arg Arg Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly
 1005 1010 1015
 ccc ctg cct gag acc ttt ggg gac ttc tgg cgg atg gtg tgg gag cag 3126
 Pro Leu Pro Glu Thr Phe Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln
 1020 1025 1030
 cgg tca gcc act gtg gtc atg atg aca cgg ctg gag gag aaa tca cgg 3174
 Arg Ser Ala Thr Val Val Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg
 1035 1040 1045
 gtc aaa tgt gac cag tac tgg cct aac cga ggc acc gag aca tac ggc 3222

Val Lys Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Asn Arg Gly Thr Glu Thr Tyr Gly
 1050 1055 1060
 ttc atc cag gtc acc cta cta gat act atg gag ctg gcc acc ttc tgt 3270
 Phe Ile Gln Val Thr Leu Leu Asp Thr Met Glu Leu Ala Thr Phe Cys
 1065 1070 1075 1080
 gtc agg acc ttt tct cta cac aag aat ggc tct agt gag aag cgt gag 3318
 Val Arg Thr Phe Ser Leu His Lys Asn Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu
 1085 1090 1095
 gta cga cat ttt cag ttc aca gca tgg cct gac cac ggg gta ccc gag 3366
 Val Arg His Phe Gln Phe Thr Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu
 1100 1105 1110
 tac ccc aca ccc ttc ctg gcg ttt ctg cgc aga gtc aag acc tgc aac 3414
 Tyr Pro Thr Pro Phe Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Thr Cys Asn
 1115 1120 1125
 ccg cct gac gct ggc cca gtt gtg gtc cac tgc agc gcg ggt gtg ggg 3462
 Pro Pro Asp Ala Gly Pro Val Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly
 1130 1135 1140
 cgt act ggc tgc ttc att gta att gat gcc atg ttg gag cgc atc aga 3510
 Arg Thr Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Ile Arg
 1145 1150 1155 1160
 aca gag aag acg gtg gat gtg tac gga cac gtg aca ctc atg cgg tca 3558
 Thr Glu Lys Thr Val Asp Val Tyr Gly His Val Thr Leu Met Arg Ser
 1165 1170 1175
 cag cgc aac tac atg gtg cag aca gag gat cag tat agc ttc atc cac 3606
 Gln Arg Asn Tyr Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Ser Phe Ile His
 1180 1185 1190
 gag gca ctg ctg gag gct gtg ggc tgt ggc aat acc gag gtc ccc gcg 3654
 Glu Ala Leu Leu Glu Ala Val Gly Cys Gly Asn Thr Glu Val Pro Ala
 1195 1200 1205
 cgc agc ctc tac acc tat atc cag aag ctg gcc cag gtg gag cct ggc 3702

Arg Ser Leu Tyr Thr Tyr Ile Gln Lys Leu Ala Gln Val Glu Pro Gly
 1210 1215 1220
 gag cat gtc aca gga atg gag ctt gag ttc aag agg ctt gca gct cca 3750
 Glu His Val Thr Gly Met Glu Leu Glu Phe Lys Arg Leu Ala Ala Pro
 1225 1230 1235 1240
 agg cac aca ctt cga gat tca ttc act gcc agc ctg cct tgc aac aag 3798
 Arg His Thr Leu Arg Asp Ser Phe Thr Ala Ser Leu Pro Cys Asn Lys
 1245 1250 1255
 ttt aag aac cgc ctg gtg aac atc ctg ccg tac gag agc tgc cgt gtc 3846
 Phe Lys Asn Arg Leu Val Asn Ile Leu Pro Tyr Glu Ser Ser Arg Val
 1260 1265 1270
 tgc ctg cag ccc att cgt ggt gtc gag ggc tct gac tac atc aat gcc 3894
 Cys Leu Gln Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala
 1275 1280 1285
 agc ttc atc gac ggc tac aga cag cag aaa gcc tac att gca acg cag 3942
 Ser Phe Ile Asp Gly Tyr Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln
 1290 1295 1300
 ggt cca ctg gca gag acc aca gag gac ttc tgg cgt gcc ctg tgg gag 3990
 Gly Pro Leu Ala Glu Thr Thr Glu Asp Phe Trp Arg Ala Leu Trp Glu
 1305 1310 1315 1320
 aac aac tcc act att gtg gta atg ctc acc aag ctc cgc gag atg ggc 4038
 Asn Asn Ser Thr Ile Val Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly
 1325 1330 1335
 cgg gag aag tgc cac cag tac tgg cca gct gag cgc tct gcc cgc tac 4086
 Arg Glu Lys Cys His Gln Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr
 1340 1345 1350
 cag tac ttt gtg gtt gac ccg atg gca gag tat aac atg cca gag tac 4134
 Gln Tyr Phe Val Val Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Glu Tyr
 1355 1360 1365
 att ctg cgt gag ttt aag gtc aca gat gcc cgg gat ggc cag tcc cgg 4182

Ile Leu Arg Glu Phe Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg
 1370 1375 1380
 acc gtc cga cag ttc acg gac tgg cca gag cag ggt gca ccc aag tca 4230
 Thr Val Arg Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Ala Pro Lys Ser
 1385 1390 1395 1400
 ggg gaa ggc ttc att gac ttc atc ggc caa gtg cat aag acc aag gag 4278
 Gly Glu Gly Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu
 1405 1410 1415
 cag ttt ggc cag gat ggc ccc atc tcg gtg cac tgt agt gct gga gtg 4326
 Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile Ser Val His Cys Ser Ala Gly Val
 1420 1425 1430
 ggc agg acc gga gta ttc atc act ctg agc atc gtg ctg gag cga atg 4374
 Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met
 1435 1440 1445
 cgc tac gag ggg gtg gtg gac att ttc cag aca gtg aag gtg ctt cgg 4422
 Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Ile Phe Gln Thr Val Lys Val Leu Arg
 1450 1455 1460
 acc cag cgg cct gcc atg gtg cag aca gag gat gag tac cag ttc tgc 4470
 Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Glu Tyr Gln Phe Cys
 1465 1470 1475 1480
 ttc cag gcg gcg ttg gaa ttg ggc agc ttt gat cat tat gca aca taagcc4521
 Phe Gln Ala Ala Leu Glu Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr
 1485 1490 1495
 atgggccccg caacgctcg acccagctcc aagtgccctg catgtgagcc cagccctcgg 4581
 tgctggtggg aggcgccca gggaggaaac ctctctctcc tggagacagc actgccttct 4641
 aaggccacat tcctcattcc ttctgactcc aaaacgaggt tccagggtgg gggtaggggt 4701
 ggagagtaga ggagccactg ctccatagc tggggtcaca agggacagaa ctctgctccc 4761
 aacttcct gctgcctgc ctgtcagca cattcttttt tttcattttt ttaactgtag 4821
 tgtatttttc ttcattttct tttttttttt aagaaaaaaa aaacaatgag cagtcaaatt 4881
 ttgaaaacaa cgagacagc tggtctgtt tgctgctctg tggaggcca acttttcata 4941

gtaagtgtgt cgtgtggcgg ctctgtgcaa caactttgat ggcttctgtg tgcattette 5001
 ccacatgtcc cegtgtgaat ggctcacgta ggttttcttt ttaccctttt tacttttttt 5061
 ttaaatacaat cttcagacat atcagatgtg aaggggtgat ggctggagca cctgggccag 5121
 gctgcaggac atggccacca ggacacagtg gctggcctca ctgcccagtc cctgcccgcac 5181
 cagagagggt ctttgtcttc tctgactca tgecccgcat ggaggacccc cgggactacg 5241
 gacacttggg gacacgcagc ccctagagc aagtgagtc tctctttgta ggagagtggg 5301
 tcagcactcg tccccgcttg ttttttgggc agaagcgggt gacagccctg tatgtagata 5361
 aaccaagttt gtattaataa agattcgtcc gacctaaaaa aaaaaaaaaa a 5412

<210> 12

<211> 1495

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 12

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

130		135		140
Val Val Glu Arg Thr Arg Thr Ala Thr Met Leu Cys Ala Ala Ser Gly				
145		150		160
Asn Pro Asp Pro Glu Ile Thr Trp Phe Lys Asp Phe Leu Pro Val Asp				
	165		170	175
Pro Ser Ala Ser Asn Gly Arg Ile Lys Gln Leu Arg Ser Gly Ala Leu				
	180		185	190
Gln Ile Glu Ser Ser Glu Glu Thr Asp Gln Gly Lys Tyr Glu Cys Val				
	195		200	205
Ala Thr Lys Gln Ala Gly Val Arg Tyr Ser Ser Pro Ala Asn Leu Tyr				
	210		215	220
Val Arg Val Arg Arg Val Ala Pro Arg Phe Ser Ile Leu Pro Met Ser				
225		230		240
His Glu Ile Met Pro Gly Gly Asn Val Asn Ile Thr Cys Val Ala Val				
	245		250	255
Gly Ser Pro Met Pro Tyr Val Lys Trp Met Gln Gly Ala Glu Asp Leu				
	260		265	270
Thr Pro Glu Asp Asp Met Pro Val Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Thr				
	275		280	285
Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn Tyr Pro Cys Val Ala Met Ser Ser Leu				
	290		295	300
Gly Val Ile Glu Ala Val Ala Asp Ile Thr Val Lys Ser Leu Pro Lys				
305		310		315
Ala Pro Gly Thr Pro Val Val Thr Glu Asn Thr Ala Thr Ser Ile Thr				
	325		330	335
Val Thr Trp Asp Ala Gly Asn Pro Asp Pro Val Ser Tyr Tyr Val Leu				
	340		345	350
Ser Ile Ile Lys Ala Arg Met Gly Arg Ile Arg Ser Lys Lys Thr Ser				
	355		360	365
Thr Thr Thr Arg Tyr Ser Ile Gly Gly Leu Ser Pro Asn Ser Glu Tyr				

370		375		380
Glu Ile Trp Val Ser Ala Val Asn Ser Ile Gly Gln Ala Pro Ser Glu				
385		390		400
Ser Val Val Thr Arg Thr Gly Glu Gln Ala Pro Ala Ser Ala Pro Arg				
	405		410	415
Asn Val Gln Ala Arg MET Leu Ser Ala Thr Thr Met Ile Val Gln Trp				
	420		425	430
Glu Glu Pro Val Glu Pro Asn Gly Leu Ile Arg Gly Tyr Arg Val Tyr				
	435		440	445
Tyr Thr Met Glu Pro Glu His Pro Val Gly Asn Trp Gln Lys His Asn				
	450		455	460
Val Asp Asp Ser Leu Leu Thr Thr Val Gly Ser Leu Leu Glu Asp Glu				
465		470		480
Thr Tyr Thr Val Arg Val Leu Ala Phe Thr Ser Val Gly Asp Gly Pro				
	485		490	495
Leu Ser Asp Pro Ile Gln Val Lys Thr Gln Gln Gly Val Pro Gly Gln				
	500		505	510
Pro Met Asn Leu Arg Ala Glu Ala Lys Ser Glu Thr Ser Ile Gly Leu				
	515		520	525
Ser Trp Ser Ala Pro Arg Gln Glu Ser Val Ile Lys Tyr Glu Leu Leu				
	530		535	540
Phe Arg Glu Gly Asp Arg Gly Arg Glu Val Gly Arg Thr Phe Asp Pro				
545		550		560
Thr Thr Ala Phe Val Val Glu Asp Leu Lys Pro Asn Thr Glu Tyr Ala				
	565		570	575
Phe Arg Leu Ala Ala Arg Ser Pro Gln Gly Leu Gly Ala Phe Thr Ala				
	580		585	590
Val Val Arg Gln Arg Thr Leu Gln Ala Ile Ser Pro Lys Asn Phe Lys				
	595		600	605
Val Lys MET Ile MET Lys Thr Ser Val Leu Leu Ser Trp Glu Phe Pro				

610 615 620
Asp Asn Tyr Asn Ser Pro Thr Pro Tyr Lys Ile Gln Tyr Asn Gly Leu
625 630 635 640
Thr Leu Asp Val Asp Gly Arg Thr Thr Lys Lys Leu Ile Thr His Leu
645 650 655
Lys Pro His Thr Phe Tyr Asn Phe Val Leu Thr Asn Arg Gly Ser Ser
660 665 670
Leu Gly Gly Leu Gln Gln Thr Val Thr Ala Arg Thr Ala Phe Asn Met
675 680 685
Leu Ser Gly Lys Pro Ser Val Ala Pro Lys Pro Asp Asn Asp Gly Ser
690 695 700
Ile Val Val Tyr Leu Pro Asp Gly Gln Ser Pro Val Thr Val Gln Asn
705 710 715 720
Tyr Phe Ile Val Met Val Pro Leu Arg Lys Ser Arg Gly Gly Gln Phe
725 730 735
Pro Ile Leu Leu Pro Ser Pro Glu Asp Met Asp Leu Glu Glu Leu Ile
740 745 750
Gln Asp Leu Ser Arg Leu Gln Ser Ser Leu Arg His Ser Arg Gln Leu
755 760 765
Glu Val Pro Arg Pro Tyr Ile Ala Ala Arg Phe Ser Ile Leu Pro Ala
770 775 780
Val Phe His Pro Gly Asn Gln Lys Gln Tyr Gly Gly Phe Asp Asn Arg
785 790 795 800
Gly Leu Glu Pro Gly His Arg Tyr Val Leu Phe Val Leu Ala Val Leu
805 810 815
Gln Lys Asn Glu Pro Thr Phe Ala Ala Ser Pro Phe Ser Asp Pro Phe
820 825 830
Gln Leu Asp Asn Pro Asp Pro Gln Pro Ile Val Asp Gly Glu Glu Gly
835 840 845
Leu Ile Trp Val Ile Gly Pro Val Leu Ala Val Val Phe Ile Ile Cys

850						855										860
Ile	Val	Ile	Ala	Ile	Leu	Leu	Tyr	Lys	Asn	Lys	Pro	Asp	Ser	Lys	Arg	
865						870										880
Lys	Asp	Ser	Glu	Pro	Arg	Thr	Lys	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Ala	Asp	Leu	
				885					890							895
Ala	Pro	His	His	Pro	Lys	Asp	Pro	Val	Glu	Met	Arg	Arg	Ile	Asn	Phe	
			900						905							910
Gln	Thr	Pro	Gly	Met	Leu	Ser	His	Pro	Pro	Ile	Pro	Ile	Thr	Asp	Met	
		915						920								925
Ala	Glu	His	Met	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala	Asn	Asp	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	
		930						935								940
Gln	Glu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asp	Pro	Gly	Gln	Gln	Phe	Thr	Trp	Glu	His	
945					950											960
Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Asn	Lys	Pro	Lys	Asn	Arg	Tyr	Ala	Asn	Val	Ile	
					965					970						975
Ala	Tyr	Asp	His	Ser	Arg	Val	Ile	Leu	Gln	Pro	Leu	Glu	Gly	Ile	Met	
			980							985						990
Gly	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asn	Tyr	Val	Asp	Gly	Tyr	Arg	Arg	Gln	
		995							1000							1005
Asn	Ala	Tyr	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	Pro	Glu	Thr	Phe	Gly	Asp	
		1010							1015							1020
Phe	Trp	Arg	Met	Val	Trp	Glu	Gln	Arg	Ser	Ala	Thr	Val	Val	Met	Met	
1025																1040
Thr	Arg	Leu	Glu	Glu	Lys	Ser	Arg	Val	Lys	Cys	Asp	Gln	Tyr	Trp	Pro	
					1045											1055
Asn	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Tyr	Gly	Phe	Ile	Gln	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	
			1060													1070
Thr	Met	Glu	Leu	Ala	Thr	Phe	Cys	Val	Arg	Thr	Phe	Ser	Leu	His	Lys	
		1075														1085
Asn	Gly	Ser	Ser	Glu	Lys	Arg	Glu	Val	Arg	His	Phe	Gln	Phe	Thr	Ala	

1090	1095	1100	
Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro Thr Pro Phe Leu Ala Phe			
1105	1110	1115	1120
Leu Arg Arg Val Lys Thr Cys Asn Pro Pro Asp Ala Gly Pro Val Val			
	1125	1130	1135
Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile Val Ile			
	1140	1145	1150
Asp Ala Met Leu Glu Arg Ile Arg Thr Glu Lys Thr Val Asp Val Tyr			
	1155	1160	1165
Gly His Val Thr Leu Met Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Met Val Gln Thr			
	1170	1175	1180
Glu Asp Gln Tyr Ser Phe Ile His Glu Ala Leu Leu Glu Ala Val Gly			
1185	1190	1195	1200
Cys Gly Asn Thr Glu Val Pro Ala Arg Ser Leu Tyr Thr Tyr Ile Gln			
	1205	1210	1215
Lys Leu Ala Gln Val Glu Pro Gly Glu His Val Thr Gly Met Glu Leu			
	1220	1225	1230
Glu Phe Lys Arg Leu Ala Ala Pro Arg His Thr Leu Arg Asp Ser Phe			
	1235	1240	1245
Thr Ala Ser Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn Arg Leu Val Asn Ile			
	1250	1255	1260
Leu Pro Tyr Glu Ser Ser Arg Val Cys Leu Gln Pro Ile Arg Gly Val			
1265	1270	1275	1280
Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Asp Gly Tyr Arg Gln			
	1285	1290	1295
Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Glu Thr Thr Glu			
	1300	1305	1310
Asp Phe Trp Arg Ala Leu Trp Glu Asn Asn Ser Thr Ile Val Val Met			
	1315	1320	1325
Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys Cys His Gln Tyr Trp			

1330 1335 1340
 Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe Val Val Asp Pro Met
 1345 1350 1355 1360
 Ala Glu Tyr Asn Met Pro Glu Tyr Ile Leu Arg Glu Phe Lys Val Thr
 1365 1370 1375
 Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Val Arg Gln Phe Thr Asp Trp
 1380 1385 1390
 Pro Glu Gln Gly Ala Pro Lys Ser Gly Glu Gly Phe Ile Asp Phe Ile
 1395 1400 1405
 Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile
 1410 1415 1420
 Ser Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr
 1425 1430 1435 1440
 Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Ile
 1445 1450 1455
 Phe Gln Thr Val Lys Val Leu Arg Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln
 1460 1465 1470
 Thr Glu Asp Glu Tyr Gln Phe Cys Phe Gln Ala Ala Leu Glu Leu Gly
 1475 1480 1485
 Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr
 1490 1495

<210> 13

<211> 1666

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (180)..(608)

<400> 13

cggcagccga gtcggattga gctgctgcag acgccaggcc actccagcca gcaactgccgt 60

tttcacgccc cggctgcaga cagctaggag gctttateta gtttgaacca ggctgctgga 120
 gctegctect tccctctctt ttttccacg aggctgtttt tttatttgge tgcaattgc 179
 atg aaa tcc caa tgg tgt aga cca gtg gcg atg gat cta gga gtt tac 227
 Met Lys Ser Gln Trp Cys Arg Pro Val Ala Met Asp Leu Gly Val Tyr
 1 5 10 15
 caa ctg aga cat ttt tca att tet ttc ttg tcg tct ttg ctg gga act 275
 Gln Leu Arg His Phe Ser Ile Ser Phe Leu Ser Ser Leu Leu Gly Thr
 20 25 30
 gaa aac gct tcc gtg aga ctt gac aat agc tct ggt gca agt gtg gta 323
 Glu Asn Ala Ser Val Arg Leu Asp Asn Ser Ser Gly Ala Ser Val Val
 35 40 45
 gct atc gac aac aaa ata gag caa gct atg gat ctg gtg aaa agc cat 371
 Ala Ile Asp Asn Lys Ile Glu Gln Ala Met Asp Leu Val Lys Ser His
 50 55 60
 ttg atg tat gca gtt aga gag gaa gtg gag gtt ctg aag gag cag atc 419
 Leu Met Tyr Ala Val Arg Glu Glu Val Glu Val Leu Lys Glu Gln Ile
 65 70 75 80
 aaa gaa cta ata gag aaa aac tcc caa ctg gag cag gag aac aat ctg 467
 Lys Glu Leu Ile Glu Lys Asn Ser Gln Leu Glu Gln Glu Asn Asn Leu
 85 90 95
 ttg aag aca ctg gcc agt ccg gag cag etc gcc cag ttt cag gcc cag 515
 Leu Lys Thr Leu Ala Ser Pro Glu Gln Leu Ala Gln Phe Gln Ala Gln
 100 105 110
 ctg cag act ggc tcc cct ccg gct acc acg cag cca cag ggg acc aca 563
 Leu Gln Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Gln Pro Gln Gly Thr Thr
 115 120 125
 cag ccc cct gca cag cca gcg tcc cag ggc tca gga tca acc gca tagcct614
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ala Ser Gln Gly Ser Gly Ser Thr Ala
 130 135 140
 gctatgcccc aacagaactg gctgctgctg tctgaactga acagaccgaa gagatgtgct 674

agtgagaagc cgcctccagt cacccatttc attgctgtct gcgaaagaga cgtgagactc 734
 acacatgctg ttctcgcttt ctccccagta ttaagcactc atatgctttt ggcttgaaga 794
 aatatactag ttgagtgaat taaaggtaa acagagagtg agcatggatg taccctgtgc 854
 aacgtggcag atgtctgagg aatggtttga ttgacgctga ggaggagctc tgtgcctttt 914
 caaccctccc cagccgcccc ctctactccc aagctctggg gctcgcctgc atggggctca 974
 gaaggtgggc tgctcctgga ttttgtgttc tctctcctt cccttcaaag aatttgagag 1034
 gccagaaacg agactgcaaa gggggggatg cagtcctttt acaaaacega caactgtcac 1094
 caaagcttat aaaacaggac agtactgtcc ctcttttctg aaacatcaga agacacaaaa 1154
 ctgttagtga cacaacggtg acaggtagct gggacctagg ctatcttatt atgaaggttg 1214
 ttttgcttgt tgtatatttg tgtatgtagt gtaacgaatt tgtacaatag aggaccgtaa 1274
 ctactgttag gttgtacaga ttgaagtta gatgttccat tggctgtctg aaaagggtgtg 1334
 gattgtcctt cctagagaga tctacttaaa aactgcttcg tgacaaaaac cacacctgaa 1394
 gaaatthta gaatttgca cagttagtca ctttgtgtca cccggaatct agctgctgag 1454
 tcttgcaaag taaacccct gttgactgat gtcagttgag ctagtgaatg aatagatgga 1514
 gaaacgtcag tcagttgctg aggaagtgga tttcccagta ggggtttctg cagctcacct 1574
 gtatagtctt gcgcatgttc cccacacaga acccactgta tttacctgtt ctacttgta 1634
 cctttcaata aagcatatca aatggtgata cc 1666

<210> 14

<211> 143

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Met Lys Ser Gln Trp Cys Arg Pro Val Ala Met Asp Leu Gly Val Tyr

1 5 10 15

Gln Leu Arg His Phe Ser Ile Ser Phe Leu Ser Ser Leu Leu Gly Thr

20 25 30

Glu Asn Ala Ser Val Arg Leu Asp Asn Ser Ser Gly Ala Ser Val Val

35 40 45

Ala Ile Asp Asn Lys Ile Glu Gln Ala Met Asp Leu Val Lys Ser His

50 55 60

Leu Met Tyr Ala Val Arg Glu Glu Val Glu Val Leu Lys Glu Gln Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Ile Glu Lys Asn Ser Gln Leu Glu Gln Glu Asn Asn Leu
 85 90 95
 Leu Lys Thr Leu Ala Ser Pro Glu Gln Leu Ala Gln Phe Gln Ala Gln
 100 105 110
 Leu Gln Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Gln Pro Gln Gly Thr Thr
 115 120 125
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ala Ser Gln Gly Ser Gly Ser Thr Ala
 130 135 140

<210> 15

<211> 2010

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (139)..(1242)

<400> 15

tcgaccacg cgcccgca gagctggcaa gttgatttg cggggcggc gcctaccccc 60
 gcgcgaggga acgaaatcgg ttcggcgacg ccggcgaaa ccttagttcg agcggaagc 120
 ctgacagtgg caggcggc atg tcg gtg gcg ggg ctg aag aag cag ttc tac 171
 Met Ser Val Ala Gly Leu Lys Lys Gln Phe Tyr
 1 5 10
 aag gcg agc cag ctg gtc agc gag aaa gtt ggt ggg gcc gaa ggg acc 219
 Lys Ala Ser Gln Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gly Ala Glu Gly Thr
 15 20 25
 aaa ctg gat gat gac ttc aga gag atg gaa aag aaa gtg gat atc acc 267
 Lys Leu Asp Asp Asp Phe Arg Glu Met Glu Lys Lys Val Asp Ile Thr
 30 35 40
 agt aag gcc gtg gca gag gtg ctg gtc aga acc ata gaa tat ctg caa 315

Ser Lys Ala Val Ala Glu Val Leu Val Arg Thr Ile Glu Tyr Leu Gln
 45 50 55
 cct aac cca gcc tcg agg gcc aag ctg act atg ctg aat act gta tcc 363
 Pro Asn Pro Ala Ser Arg Ala Lys Leu Thr Met Leu Asn Thr Val Ser
 60 65 70 75
 aag atc cgg ggc caa gtg aag aat cct ggc tac cca cag tca gag ggt 411
 Lys Ile Arg Gly Gln Val Lys Asn Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Glu Gly
 80 85 90
 ctg ctg gga gag tgc atg gtc cgc cat ggc aag gaa cta ggc gga gag 459
 Leu Leu Gly Glu Cys Met Val Arg His Gly Lys Glu Leu Gly Gly Glu
 95 100 105
 tcc aac ttt ggc gat gct ctg cta gat gca ggt gag tct atg aag cgc 507
 Ser Asn Phe Gly Asp Ala Leu Leu Asp Ala Gly Glu Ser Met Lys Arg
 110 115 120
 ctg gct gag gtg aag gac tca ctg gac atc gag gtc aag cag aac ttc 555
 Leu Ala Glu Val Lys Asp Ser Leu Asp Ile Glu Val Lys Gln Asn Phe
 125 130 135
 atc gac cca ctg cag aac ctg tgt gac aag gat ctg aag gag atc cag 603
 Ile Asp Pro Leu Gln Asn Leu Cys Asp Lys Asp Leu Lys Glu Ile Gln
 140 145 150 155
 cac cac ctg aag aag ttg gag ggc cgc cgc ctt gac ttt gac tac aag 651
 His His Leu Lys Lys Leu Glu Gly Arg Arg Leu Asp Phe Asp Tyr Lys
 160 165 170
 aag aag cgc cag ggc aag atc cct gat gag gag ctg cgt cag gcc cta 699
 Lys Lys Arg Gln Gly Lys Ile Pro Asp Glu Glu Leu Arg Gln Ala Leu
 175 180 185
 gag aag ttt gag gag tcc aag gag gtg gcg gag acc agt atg cac aac 747
 Glu Lys Phe Glu Glu Ser Lys Glu Val Ala Glu Thr Ser Met His Asn
 190 195 200
 etc ctg gag act gat att gag cag gtg agc cag etc tca gcc cta gtg 795

Leu Leu Glu Thr Asp Ile Glu Gln Val Ser Gln Leu Ser Ala Leu Val
 205 210 215
 gat gcc cag ctg gac tac cac cgg cag gca gtg cag atc ctg gag gag 843
 Asp Ala Gln Leu Asp Tyr His Arg Gln Ala Val Gln Ile Leu Glu Glu
 220 225 230 235
 ctg gct gat aag ctg aag cgc agg gtg aga gaa gcc tcc tca cgc ccc 891
 Leu Ala Asp Lys Leu Lys Arg Arg Val Arg Glu Ala Ser Ser Arg Pro
 240 245 250
 agg agg gag ttc aag ccc agg ccc cag gag ccc ttt gag ctt gga gag 939
 Arg Arg Glu Phe Lys Pro Arg Pro Gln Glu Pro Phe Glu Leu Gly Glu
 255 260 265
 ctg gag cag ccc aat ggg gga ttc ccc tgt gcc tca gca ccc aag atc 987
 Leu Glu Gln Pro Asn Gly Gly Phe Pro Cys Ala Ser Ala Pro Lys Ile
 270 275 280
 aca gct tcg tca tca ttt aga tca ggg gac aag ccc acc agg acg ccc 1035
 Thr Ala Ser Ser Ser Phe Arg Ser Gly Asp Lys Pro Thr Arg Thr Pro
 285 290 295
 agc aag agt atg cca ccc ctg gac cag cca agc tgc aag gcg ctg tat 1083
 Ser Lys Ser Met Pro Pro Leu Asp Gln Pro Ser Cys Lys Ala Leu Tyr
 300 305 310 315
 gac ttt gag cca gag aac gat ggc gag ctg ggc ttc cga gag ggt gac 1131
 Asp Phe Glu Pro Glu Asn Asp Gly Glu Leu Gly Phe Arg Glu Gly Asp
 320 325 330
 ctc atc acg ctt acc aac cag atc gat gag aac tgg tat gag ggg atg 1179
 Leu Ile Thr Leu Thr Asn Gln Ile Asp Glu Asn Trp Tyr Glu Gly Met
 335 340 345
 ctg cat ggc cag tca ggc ttc ttc cca ctt agc tat gtg cag gtg ctg 1227
 Leu His Gly Gln Ser Gly Phe Phe Pro Leu Ser Tyr Val Gln Val Leu
 350 355 360
 gtg cct ctg cct cag tgactgcgct tgcacactga ctagegcctg cacacgctgc 1282

Val Pro Leu Pro Gln

365

cagtcacagt gtggcagtag tctaagcca aggtgctcta taaacactaa tgttctcca 1342
 ggggagacct ctteectct ccctcagecc tggggcccc ccatectaag actcagaaag 1402
 gcccaccctg aggttctatt acctttctgg tgggtggcagc tcccacctat ttcaaccctt 1462
 cccagcccgt tgctggcgat gggcccagc cctctccag gctccctagg ggaggcaggt 1522
 ccttgggate cccagcctgc aagcacagcc agtcagcat atggagacac ctggcacctg 1582
 ctgctcattc agaagtgcac aaggcatgaa cgtgtacact tcccatggga ccacagacce 1642
 agtcagccc tgttgaagac caagcaciaa ggcctgaag agtggacatt cccaggtccc 1702
 tggcaccttc cctgagcca gctccactgc tacctgctca tgtgactcta cagctggcca 1762
 caggcagttg gcaggtcct tttcaaccag catgcgagge tggccacagc cgcggctctg 1822
 catcatgagg gaggctttgg ctggactcag ttacactett ctctacagct gccccacaac 1882
 ccgtggcttg tccttgttac gtggggccc acccatgccc cctagatggg caaactgtc 1942
 ctccagcctg tgaagtggac ttactccta atttttttt tttaaaagta ttaaatact 2002
 ctttctat 2010

<210> 16

<211> 368

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

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

Val Lys Asn Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Glu Gly Leu Leu Gly Glu Cys
 85 90 95
 Met Val Arg His Gly Lys Glu Leu Gly Gly Glu Ser Asn Phe Gly Asp
 100 105 110
 Ala Leu Leu Asp Ala Gly Glu Ser Met Lys Arg Leu Ala Glu Val Lys
 115 120 125
 Asp Ser Leu Asp Ile Glu Val Lys Gln Asn Phe Ile Asp Pro Leu Gln
 130 135 140
 Asn Leu Cys Asp Lys Asp Leu Lys Glu Ile Gln His His Leu Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Glu Gly Arg Arg Leu Asp Phe Asp Tyr Lys Lys Lys Arg Gln Gly
 165 170 175
 Lys Ile Pro Asp Glu Glu Leu Arg Gln Ala Leu Glu Lys Phe Glu Glu
 180 185 190
 Ser Lys Glu Val Ala Glu Thr Ser Met His Asn Leu Leu Glu Thr Asp
 195 200 205
 Ile Glu Gln Val Ser Gln Leu Ser Ala Leu Val Asp Ala Gln Leu Asp
 210 215 220
 Tyr His Arg Gln Ala Val Gln Ile Leu Glu Glu Leu Ala Asp Lys Leu
 225 230 235 240
 Lys Arg Arg Val Arg Glu Ala Ser Ser Arg Pro Arg Arg Glu Phe Lys
 245 250 255
 Pro Arg Pro Gln Glu Pro Phe Glu Leu Gly Glu Leu Glu Gln Pro Asn
 260 265 270
 Gly Gly Phe Pro Cys Ala Ser Ala Pro Lys Ile Thr Ala Ser Ser Ser
 275 280 285
 Phe Arg Ser Gly Asp Lys Pro Thr Arg Thr Pro Ser Lys Ser Met Pro
 290 295 300
 Pro Leu Asp Gln Pro Ser Cys Lys Ala Leu Tyr Asp Phe Glu Pro Glu
 305 310 315 320

Asn Asp Gly Glu Leu Gly Phe Arg Glu Gly Asp Leu Ile Thr Leu Thr
 325 330 335
 Asn Gln Ile Asp Glu Asn Trp Tyr Glu Gly Met Leu His Gly Gln Ser
 340 345 350
 Gly Phe Phe Pro Leu Ser Tyr Val Gln Val Leu Val Pro Leu Pro Gln
 355 360 365

<210> 17

<211> 731

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(442)

<400> 17

atcgagccgg cccgtgagcg ag atg cag cac cga agt ttc ttc ctt cta gcc 52
 Met Gln His Arg Ser Phe Phe Leu Leu Ala
 1 5 10
 ctt gtt gcc ctc ttg get gtc acg acc gcg gtg gcc aaa aag aaa gac 100
 Leu Val Ala Leu Leu Ala Val Thr Thr Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp
 15 20 25
 aag gtg aag aag ggc agc gag tgt tgc gag tgg acc tgg ggg ccc tgc 148
 Lys Val Lys Lys Gly Ser Glu Cys Ser Glu Trp Thr Trp Gly Pro Cys
 30 35 40
 acc ccc agc agc aag gac tgc ggc atg ggt ttc cgc gag ggt acc tgt 196
 Thr Pro Ser Ser Lys Asp Cys Gly Met Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys
 45 50 55
 ggg gcc cag acc cag cgc atc cat tgc aag gtg ccc tgc aac tgg aag 244
 Gly Ala Gln Thr Gln Arg Ile His Cys Lys Val Pro Cys Asn Trp Lys
 60 65 70
 aag gag ttt gga gcc gac tgc aaa tac aag ttt gag agc tgg ggg gcg 292

Lys Glu Phe Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Ser Trp Gly Ala
 75 80 85 90
 tgt gat ggg agc act ggc acc aaa gcc cgc caa ggg acc ctg aag aag 340
 Cys Asp Gly Ser Thr Gly Thr Lys Ala Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys
 95 100 105
 gct cgg tac aat gcc cag tgc cag gag acc atc cgc gtg acc aag ccc 388
 Ala Arg Tyr Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro
 110 115 120
 tgc acc tcc aag acc aag tca aag gcc aaa gcc aag aaa gga aaa gga 436
 Cys Thr Ser Lys Thr Lys Ser Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly
 125 130 135
 aag gac tgagtcagga ggccagagag tttctggcct gggacctgaa cggagccctc 492
 Lys Asp
 140
 ctctcccaca ggccaagat gtaaccacc agtgcctttt gtcttctgt cagctttgtc 552
 aatcacacce ttttactcct gccctcttt gctacaccta gtacccaaag tggggaggga 612
 caagggattc tggaagtga gcctcccat aaccctttt gtttcccca cctgatacc 672
 tgttatcgag aatgaataa aatgaactca ctttttttcc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 731
 <210> 18
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 18
 Met Gln His Arg Ser Phe Phe Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Thr Thr Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Ser
 20 25 30
 Glu Cys Ser Glu Trp Thr Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser Ser Lys Asp
 35 40 45
 Cys Gly Met Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln Thr Gln Arg

50 55 60
 Ile His Cys Lys Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Ser Trp Gly Ala Cys Asp Gly Ser Thr Gly
 85 90 95
 Thr Lys Ala Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr Asn Ala Gln
 100 105 110
 Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Ser Lys Thr Lys
 115 120 125
 Ser Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp
 130 135

- <210> 19
- <211> 1158
- <212> DNA
- <213> *Rattus norvegicus*
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(369)
- <400> 19

```

ctt gga ttc acc gcc acg gac tcc aca ctg gag ggt gag act gcc aga 48
Leu Gly Phe Thr Ala Thr Asp Ser Thr Leu Glu Gly Glu Thr Ala Arg
  1                                  5                                  10                                  15
gcc tac atg ccc aga cac atg tgc aaa gga acg cag aga caa tct gaa 96
Ala Tyr Met Pro Arg His Met Cys Lys Gly Thr Gln Arg Gln Ser Glu
                                             20                                  25                                  30
gcc acg atg tcc ctc tgc agg gac tca ggc ccc aga gtt tgc tca ctg 144
Ala Thr Met Ser Leu Cys Arg Asp Ser Gly Pro Arg Val Cys Ser Leu
                                             35                                  40                                  45
cat gag agg gct cag gtc ccc egg gtt cac ctc agt agc ata gga gcc 192
His Glu Arg Ala Gln Val Pro Arg Val His Leu Ser Ser Ile Gly Ala
  
```

50	55	60	
cag aca agg gca ggg cac aag cga ctg aca ccg aaa gaa cag tca tgg			240
Gln Thr Arg Ala Gly His Lys Arg Leu Thr Pro Lys Glu Gln Ser Trp			
65	70	75	80
tgt cac ggg gac aga aag gca gct ggt ccc aga agg gaa aca ctg gtg			288
Cys His Gly Asp Arg Lys Ala Ala Gly Pro Arg Arg Glu Thr Leu Val			
	85	90	95
tct gca tgg gag aac act ctc gga agt ccc cag ctt ctg tca gac tgc			336
Ser Ala Trp Glu Asn Thr Leu Gly Ser Pro Gln Leu Leu Ser Asp Cys			
	100	105	110
ttt cac cca gca gca aag gac aac cta cga gtt taaggcaagt			379
Phe His Pro Ala Ala Lys Asp Asn Leu Arg Val			
	115	120	
cccctgaggg gagctgtgtg tgctgacata atactaagcc cacaccaagg gtccactgac			439
tgaagtgccca tgggtaaaga aatagtcaca tgtecccact cttgatagct caggcaccgg			499
gctgtctcag cctgcagcac ctctccaaag gggcccaagg cggcttctca tgctgagtc			559
cccacagecc ctgcccaca gtgetgggtc tcagcacagg gctaccactt tccttgttga			619
gagaatgttg cagtggctag tttggctgga acaacaaaac ctcagctcca tgccctcaa			679
cactaagttt tcagtgaaat aaaagcagga ggccgggccc atgcgcagge atgcctgttc			739
tttgatctg gacactggag gatacattca taggaggcca gcaaggcca gcagtgcgtc			799
ccacttcct gaaacactgg agtctgaaag cagcttgtct accacacgeg tgcttgaaca			859
acactgctga ttctgacaca tgctcagca cacacaccac acagacacac agatgagcac			919
acacagactt gctggaagg tcaaaggatg cccgttctgg gcagcatgga gtgtctgga			979
gccgcttga ctgttcagt ctaggtgtca gagectcaa gccagagtct ctgtgggaac			1039
ccttcagta ggagtgcgtt gggatgggca gcaggacca gcaggtgctg tgctggttct			1099
tcatgaccag agaacggact gtgtttggtg tcgagcacgg gcatctggtc agatgtcag			1158
<210>	20		
<211>	123		
<212>	PRT		
<213>	Rattus norvegicus		

<400> 20

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

<210> 21

<211> 762

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (255)..(581)

<400> 21

cgtgaccaat gctctgtgct gtgaatataa tagcaaacce ttcccctggt tcagcatagt 60
 tagtcgtagg ggtttgctat gcctttcagc tacctctagg ctcttaagtc cctactgttt 120
 cacaagcttt aatcagagca gtagtggtca caggagaagg gctggcttcc agaagtagcc 180
 caggtcagcc actgtcagtc tctggaaagg gcatagtgtc tctgctcatt tacctggagc 240
 agcagcacag tcgc atg cac cta cag gaa gca gtc acc aca gag agc aga 290

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

<210> 23

<211> 1312

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (164)..(1291)

<400> 23

ctgattgact ggccccgta ccaggctat agagtgaac ctgcggcggg gtgaacgcgc 60
 gcgaactttg tgtcgccgcg gtctaacttc gactcggcctt gctgcagctt caggcaggat 120
 cctggcttcc actatccccc ctccatccaa ccactcggga act atg gag gta gcc 175

Met Glu Val Ala

1

gag gcc aac agc ccc act gag gag gag gaa gag gaa gag gag gaa gaa 223
 Glu Ala Asn Ser Pro Thr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 5 10 15 20

gca tcc tgc tcc aca ttc aat ttg gaa ggc ctc ttc agc ctc atc cag	751
Ala Ser Cys Ser Thr Phe Asn Leu Glu Gly Leu Phe Ser Leu Ile Gln	
185 190 195	
cag aag act gag ctg cca gtc aca gag aat gtg caa acc atc cca ccc	799
Gln Lys Thr Glu Leu Pro Val Thr Glu Asn Val Gln Thr Ile Pro Pro	
200 205 210	
ccc tac gtc gtg cgc acc atc ctg gtc tac agc cgc cca ccc tgc cag	847
Pro Tyr Val Val Arg Thr Ile Leu Val Tyr Ser Arg Pro Pro Cys Gln	
215 220 225	
ccc cag ttc tcc ttg act gag ccc atg aag aag atg ttc caa tgt ccc	895
Pro Gln Phe Ser Leu Thr Glu Pro Met Lys Lys Met Phe Gln Cys Pro	
230 235 240	
tac ttc ttc ttc gac atc att tac atc cac agt ggc cct gag gaa aag	943
Tyr Phe Phe Phe Asp Ile Ile Tyr Ile His Ser Gly Pro Glu Glu Lys	
245 250 255 260	
gaa gac gat atg agc tgg aag gac atg ttc gcc ttc atg ggc agt ctg	991
Glu Asp Asp Met Ser Trp Lys Asp Met Phe Ala Phe Met Gly Ser Leu	
265 270 275	
gac acc aag ggc acc agc tac aag tat gca gta gca ctt gct ggc ccc	1039
Asp Thr Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Tyr Ala Val Ala Leu Ala Gly Pro	
280 285 290	
gcc ctg gag ctg cac aac tgc gtg gcc aag ttg ctg gcc cac ccg ctg	1087
Ala Leu Glu Leu His Asn Cys Val Ala Lys Leu Leu Ala His Pro Leu	
295 300 305	
cag agg ccc tgc cag agc cac gcg agc tat agc ctg ctg gaa gag gac	1135
Gln Arg Pro Cys Gln Ser His Ala Ser Tyr Ser Leu Leu Glu Glu Asp	
310 315 320	
gaa gag gcc ggt gag ggg gga ggc cac tgt gtg aca act cca cac cgt	1183
Glu Glu Ala Gly Glu Gly Gly Gly His Cys Val Thr Thr Pro His Arg	
325 330 335 340	

ccc atg agg aga gaa ccc aca ccc teg tea ctg gea cat gct caa tct 1231
 Pro Met Arg Arg Glu Pro Thr Pro Ser Ser Leu Ala His Ala Gln Ser
 345 350 355
 cac act gtc cac tgt aaa gtc att ctt cct ggg acc att ttt gtc atc 1279
 His Thr Val His Cys Lys Val Ile Leu Pro Gly Thr Ile Phe Val Ile
 360 365 370
 gga ata aaa gtc tgaggcccca gaaaaaaaaa a 1312
 Gly Ile Lys Val
 375

<210> 24

<211> 376

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

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

Ser Gln Lys Met Val Glu Met Phe Val Arg Thr Lys His Lys Ile Asp
 130 135 140
 Lys Ser His Glu Phe Ala Leu Val Val Val Asn Asp Asp Ser Ala Trp
 145 150 155 160
 Leu Ser Gly Leu Thr Ser Asp Pro Arg Glu Leu Cys Ser Cys Leu Tyr
 165 170 175
 Asp Leu Glu Thr Ala Ser Cys Ser Thr Phe Asn Leu Glu Gly Leu Phe
 180 185 190
 Ser Leu Ile Gln Gln Lys Thr Glu Leu Pro Val Thr Glu Asn Val Gln
 195 200 205
 Thr Ile Pro Pro Pro Tyr Val Val Arg Thr Ile Leu Val Tyr Ser Arg
 210 215 220
 Pro Pro Cys Gln Pro Gln Phe Ser Leu Thr Glu Pro Met Lys Lys Met
 225 230 235 240
 Phe Gln Cys Pro Tyr Phe Phe Phe Asp Ile Ile Tyr Ile His Ser Gly
 245 250 255
 Pro Glu Glu Lys Glu Asp Asp Met Ser Trp Lys Asp Met Phe Ala Phe
 260 265 270
 Met Gly Ser Leu Asp Thr Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Tyr Ala Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Gly Pro Ala Leu Glu Leu His Asn Cys Val Ala Lys Leu Leu
 290 295 300
 Ala His Pro Leu Gln Arg Pro Cys Gln Ser His Ala Ser Tyr Ser Leu
 305 310 315 320
 Leu Glu Glu Asp Glu Glu Ala Gly Glu Gly Gly Gly His Cys Val Thr
 325 330 335
 Thr Pro His Arg Pro Met Arg Arg Glu Pro Thr Pro Ser Ser Leu Ala
 340 345 350
 His Ala Gln Ser His Thr Val His Cys Lys Val Ile Leu Pro Gly Thr
 355 360 365

Ile Phe Val Ile Gly Ile Lys Val

370 375

<210> 25

<211> 1670

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (19)..(1557)

<400> 25

gcgggcgggc gggcggac atg gcg gcc aac atg tac cgg gtc gga gat tat 51

Met Ala Ala Asn Met Tyr Arg Val Gly Asp Tyr

1 5 10

gtt tac ttt gag aat tcg tcc agc aac cca tac cta atc aga agg ata 99

Val Tyr Phe Glu Asn Ser Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Ile Arg Arg Ile

15 20 25

gag gaa ctc aac aag act gca agc ggc aat gtg gaa gcc aaa gta gtc 147

Glu Glu Leu Asn Lys Thr Ala Ser Gly Asn Val Glu Ala Lys Val Val

30 35 40

tgc ttt tat aga aga cgg gac atc tcc aac acg ctg ata atg ctt gcc 195

Cys Phe Tyr Arg Arg Arg Asp Ile Ser Asn Thr Leu Ile Met Leu Ala

45 50 55

gat aag cat gct aaa gaa act gag gaa gaa tca gag acg acg gtt gag 243

Asp Lys His Ala Lys Glu Thr Glu Glu Glu Ser Glu Thr Thr Val Glu

60 65 70 75

gct gac ttg acg gag aag cag aag cac cag ctg aaa cac agg gag ctc 291

Ala Asp Leu Thr Glu Lys Gln Lys His Gln Leu Lys His Arg Glu Leu

80 85 90

ttt ctg tcc cgc cag tat gag tcc ctg cct gca aca cat atc agg ggg 339

Phe Leu Ser Arg Gln Tyr Glu Ser Leu Pro Ala Thr His Ile Arg Gly

	95		100		105		
aag tgc agc gtg gcc ctg ctg aac gag aca gaa tca gtg ctg tca tac						387	
Lys Cys Ser Val Ala Leu Leu Asn Glu Thr Glu Ser Val Leu Ser Tyr							
	110		115		120		
ctt gac aaa gag gat acc ttc ttc tac tca ttg gtg tat gac cct tcc						435	
Leu Asp Lys Glu Asp Thr Phe Phe Tyr Ser Leu Val Tyr Asp Pro Ser							
	125		130		135		
gtg aaa aca tta ttg gct gac aaa ggt gaa atc aga gtg ggc cca aag						483	
Val Lys Thr Leu Leu Ala Asp Lys Gly Glu Ile Arg Val Gly Pro Lys							
	140		145		150		155
tac caa gcc gac att cca gac gtg ctg ccg gaa ggc gac tca gat gag						531	
Tyr Gln Ala Asp Ile Pro Asp Val Leu Pro Glu Gly Asp Ser Asp Glu							
	160		165		170		
agg gaa caa tca aaa ttg gaa gtt aag gtt tgg gac ccc aat agt ccg						579	
Arg Glu Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Val Trp Asp Pro Asn Ser Pro							
	175		180		185		
ctt acg gat cga cag att gac cag ttt tta gtt gta gcc cgt gcc gtg						627	
Leu Thr Asp Arg Gln Ile Asp Gln Phe Leu Val Val Ala Arg Ala Val							
	190		195		200		
gga aca ttt gcc cgt gcc ctg gat tgc agc agc tct gtg agg cag ccc						675	
Gly Thr Phe Ala Arg Ala Leu Asp Cys Ser Ser Ser Val Arg Gln Pro							
	205		210		215		
agc ctg cat atg agc gcg gct gcg gcc tcc cga gac atc acc ttg ttc						723	
Ser Leu His Met Ser Ala Ala Ala Ser Arg Asp Ile Thr Leu Phe							
	220		225		230		235
cat gcc atg gac acg ctg tat agg cac ggc tat gac ctc agc agt gcc						771	
His Ala Met Asp Thr Leu Tyr Arg His Gly Tyr Asp Leu Ser Ser Ala							
	240		245		250		
atc agt gtg ctg gtg cca ctc gga ggg ccg gtc ctg tgc agg gac gag						819	
Ile Ser Val Leu Val Pro Leu Gly Gly Pro Val Leu Cys Arg Asp Glu							

	255		260		265		
atg gag gag tgg tct gcc tct gaa gcc agc tta ttc gaa gaa gca ctg						867	
Met Glu Glu Trp Ser Ala Ser Glu Ala Ser Leu Phe Glu Glu Ala Leu							
	270		275		280		
gaa aaa tat ggc aaa gat ttc aat gac atc cgt cag gac ttt ctc cca						915	
Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Phe Asn Asp Ile Arg Gln Asp Phe Leu Pro							
	285		290		295		
tgg aag tcc ttg act agc atc att gaa tat tat tac atg tgg aaa act						963	
Trp Lys Ser Leu Thr Ser Ile Ile Glu Tyr Tyr Tyr Met Trp Lys Thr							
300		305		310		315	
act gac aga tac gtt caa cag aag cgc cta aaa gct gcg gaa gcc gag						1011	
Thr Asp Arg Tyr Val Gln Gln Lys Arg Leu Lys Ala Ala Glu Ala Glu							
	320		325		330		
agc aaa ctg aaa caa gtg tac atc cca act tac aaa cca aat ccc aac						1059	
Ser Lys Leu Lys Gln Val Tyr Ile Pro Thr Tyr Lys Pro Asn Pro Asn							
	335		340		345		
caa atc tcc agc agc aac ggc aag gct ggc act gtg aat gga gct gtg						1107	
Gln Ile Ser Ser Ser Asn Gly Lys Ala Gly Thr Val Asn Gly Ala Val							
	350		355		360		
ggg acc ccg ttc cag ccc cag agc gca ctc cta gga cga gcc tgt gag						1155	
Gly Thr Pro Phe Gln Pro Gln Ser Ala Leu Leu Gly Arg Ala Cys Glu							
	365		370		375		
agc tgc tat gcc aca cag tct cac cag tgg tat tcc tgg ggc cca cct						1203	
Ser Cys Tyr Ala Thr Gln Ser His Gln Trp Tyr Ser Trp Gly Pro Pro							
380		385		390		395	
aat atg cag tgt aga ctc tgt gcg acc tgc tgg ctg tat tgg aaa aag						1251	
Asn Met Gln Cys Arg Leu Cys Ala Thr Cys Trp Leu Tyr Trp Lys Lys							
	400		405		410		
tac gga ggt ctg aaa atg ccc acg cag acg gac gag gag aag gct ccc						1299	
Tyr Gly Gly Leu Lys Met Pro Thr Gln Thr Asp Glu Glu Lys Ala Pro							

415 420 425
 agc cct gcc gca gag gac ccg cgc gtg aga agc cac ctg tcc cgg cag 1347
 Ser Pro Ala Ala Glu Asp Pro Arg Val Arg Ser His Leu Ser Arg Gln
 430 435 440
 gcc ttg cag ggc atg ccg gtc cgg aac acc ggg agc ccc aag tcg gcc 1395
 Ala Leu Gln Gly Met Pro Val Arg Asn Thr Gly Ser Pro Lys Ser Ala
 445 450 455
 gtg aag acc cgc caa gct ttc ttc ctc cat act acg tat ttc aca aaa 1443
 Val Lys Thr Arg Gln Ala Phe Phe Leu His Thr Thr Tyr Phe Thr Lys
 460 465 470 475
 att gct cgt cag gtc tgc aaa aac acc ctg cgg ctg cgg cag gca gcg 1491
 Ile Ala Arg Gln Val Cys Lys Asn Thr Leu Arg Leu Arg Gln Ala Ala
 480 485 490
 aga cgg ccg ttt gtt gct att aac tat gct gcc att agg gca gaa tgt 1539
 Arg Arg Pro Phe Val Ala Ile Asn Tyr Ala Ala Ile Arg Ala Glu Cys
 495 500 505
 aag acg ctt ttc aat tct taaccttaca cgttccgctc ctcgccatcc 1587
 Lys Thr Leu Phe Asn Ser
 510
 tctctctctc cctcctctctc tctttttggtt tgtttggttg caataaacat aagttcttgt 1647
 gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 1670
 <210> 26
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 26
 Met Ala Ala Asn Met Tyr Arg Val Gly Asp Tyr Val Tyr Phe Glu Asn
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Ile Arg Arg Ile Glu Glu Leu Asn Lys
 20 25 30

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

Ala Ser Glu Ala Ser Leu Phe Glu Glu Ala Leu Glu Lys Tyr Gly Lys
 275 280 285
 Asp Phe Asn Asp Ile Arg Gln Asp Phe Leu Pro Trp Lys Ser Leu Thr
 290 295 300
 Ser Ile Ile Glu Tyr Tyr Tyr Met Trp Lys Thr Thr Asp Arg Tyr Val
 305 310 315 320
 Gln Gln Lys Arg Leu Lys Ala Ala Glu Ala Glu Ser Lys Leu Lys Gln
 325 330 335
 Val Tyr Ile Pro Thr Tyr Lys Pro Asn Pro Asn Gln Ile Ser Ser Ser
 340 345 350
 Asn Gly Lys Ala Gly Thr Val Asn Gly Ala Val Gly Thr Pro Phe Gln
 355 360 365
 Pro Gln Ser Ala Leu Leu Gly Arg Ala Cys Glu Ser Cys Tyr Ala Thr
 370 375 380
 Gln Ser His Gln Trp Tyr Ser Trp Gly Pro Pro Asn Met Gln Cys Arg
 385 390 395 400
 Leu Cys Ala Thr Cys Trp Leu Tyr Trp Lys Lys Tyr Gly Gly Leu Lys
 405 410 415
 Met Pro Thr Gln Thr Asp Glu Glu Lys Ala Pro Ser Pro Ala Ala Glu
 420 425 430
 Asp Pro Arg Val Arg Ser His Leu Ser Arg Gln Ala Leu Gln Gly Met
 435 440 445
 Pro Val Arg Asn Thr Gly Ser Pro Lys Ser Ala Val Lys Thr Arg Gln
 450 455 460
 Ala Phe Phe Leu His Thr Thr Tyr Phe Thr Lys Ile Ala Arg Gln Val
 465 470 475 480
 Cys Lys Asn Thr Leu Arg Leu Arg Gln Ala Ala Arg Arg Pro Phe Val
 485 490 495
 Ala Ile Asn Tyr Ala Ala Ile Arg Ala Glu Cys Lys Thr Leu Phe Asn
 500 505 510

Ser

<210> 27

<211> 994

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (271)..(744)

<400> 27

aaaaaagtcg ttttgatgg aagcatttca ctaattgctt tatttaagca tacaaggaa 60
 aagtcttate tgaccaatta gttgaaggg ttttattacc ttttaagaagc cattagctgg 120
 gatgaaacgc tgcaagcact tgtgtcaaaa caaataaata atgctctctc aattagcaga 180
 gaaagtggta catctgttaa attagacaca cattgcttca cacagtggcc cagccagcac 240
 cccaatgtcc ccccacccc aacaacaaa atg aca gac agc aac ttt aag cta 294

Met Thr Asp Ser Asn Phe Lys Leu

1 5

gtc tta gga aag atc ggg gcc ccg aag acc aac agc tct ttc cct etc 342

Val Leu Gly Lys Ile Gly Ala Pro Lys Thr Asn Ser Ser Phe Pro Leu

10 15 20

tcc ttc cac ccc aac tct aca aga gcc agc agg gca gca gag gga ggt 390

Ser Phe His Pro Asn Ser Thr Arg Ala Ser Arg Ala Ala Glu Gly Gly

25 30 35 40

ggt gtc cag agg ctg ggc ttc etc ccc aag gtg ctt ccc agg cac agg 438

Gly Val Gln Arg Leu Gly Phe Leu Pro Lys Val Leu Pro Arg His Arg

45 50 55

gag aga cag gtc tgt gtg act gtc agc agg tac gga gag tcc tct ttc 486

Glu Arg Gln Val Cys Val Thr Val Ser Arg Tyr Gly Glu Ser Ser Phe

60 65 70

aaa agc aat tac cct gag gta tta ccg tac cag gac atg gac act aaa 534

Lys Ser Asn Tyr Pro Glu Val Leu Pro Tyr Gln Asp Met Asp Thr Lys

75	80	85	
act tct caa agg ctc ctc atc ttc ccc aca aga aga ggc tca aca gaa	582		
Thr Ser Gln Arg Leu Leu Ile Phe Pro Thr Arg Arg Gly Ser Thr Glu			
90	95	100	
aag ggc agt ggg act cca tcg agt ggg cgc ata aag ctc ggg agc aag	630		
Lys Gly Ser Gly Thr Pro Ser Ser Gly Arg Ile Lys Leu Gly Ser Lys			
105	110	115	120
gta cag gcc gag aat cca tgc ctt cag gac acc cac cag ccc aca ccg	678		
Val Gln Ala Glu Asn Pro Cys Leu Gln Asp Thr His Gln Pro Thr Pro			
	125	130	135
cct tca ggc aga agg gga cag tcc ctc tcc cca cag gtc ctt ggg aca	726		
Pro Ser Gly Arg Arg Gly Gln Ser Leu Ser Pro Gln Val Leu Gly Thr			
	140	145	150
att tct aac cag gtg agt tagaggaaaa tcaacccccca cctctccaaa	774		
Ile Ser Asn Gln Val Ser			
155			
aaaatctatt caggaaata aattataaat aaatagtgtc cttttctta aaagtcact	834		
ttttcaagg ctttcacaac tcctcagcat gatctccaca gattgcttg agcaagtgcc	894		
ctaatttggc cagtccgcc aggagcagcc taacctcaga ggctgagagg aggtgccga	954		
gtctectccc ccagttctga agtggtagg tgggtgccgc	994		
<210> 28			
<211> 158			
<212> PRT			
<213> Rattus norvegicus			
<400> 28			
Met Thr Asp Ser Asn Phe Lys Leu Val Leu Gly Lys Ile Gly Ala Pro			
1	5	10	15
Lys Thr Asn Ser Ser Phe Pro Leu Ser Phe His Pro Asn Ser Thr Arg			
	20	25	30
Ala Ser Arg Ala Ala Glu Gly Gly Gly Val Gln Arg Leu Gly Phe Leu			

	35		40		45														
Pro	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	His	Arg	Glu	Arg	Gln	Val	Cys	Val	Thr	Val				
	50						55					60							
Ser	Arg	Tyr	Gly	Glu	Ser	Ser	Phe	Lys	Ser	Asn	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu				
	65					70					75				80				
Pro	Tyr	Gln	Asp	Met	Asp	Thr	Lys	Thr	Ser	Gln	Arg	Leu	Leu	Ile	Phe				
					85					90					95				
Pro	Thr	Arg	Arg	Gly	Ser	Thr	Glu	Lys	Gly	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Ser				
			100						105					110					
Gly	Arg	Ile	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Val	Gln	Ala	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu				
		115						120						125					
Gln	Asp	Thr	His	Gln	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Ser				
	130						135					140							
Leu	Ser	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Ile	Ser	Asn	Gln	Val	Ser						
	145					150							155						

<210> 29

<211> 716

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 29

ttccagcaga cactcttttg ccccgggggc ctgcggttg tgggcagcac gtctgacaac 60
 gggacactgc cctggcagcc agtcaccctg ccagaccctg aggagtttct gacagacagg 120
 cttgtgaggg agtatgtgag gcaggtactc aaggggctgg gcaaggggct ggtgctgtgg 180
 cgggcagggc agtgcctctg ggcccagcgc ctaggccact cgcattcctt ctgggccctg 240
 ggtgaggagc tgettccaga cagtgggaga gggcctgatg gagaggtccc caaggacaag 300
 aacggagtgc tgttcgacct caggcccttt gtggcagatc tcattgcctt catggaagga 360
 agcagacatt ccccacgata cactctgtgg ttctgtgtgg gggaatcgtg gccccaggac 420
 cagccgtggg tcaagaggct tgtgatggtc aaggttgctc ctacatgtct taaggagctg 480
 ttagagatgg cccgggaagg gggagcctca tcaactgaaa ccgtggactt gcacatctcc 540
 aacagccagc cgatctccct tacctctgac cagtacaagg cctgcctcca ggacttggtg 600

gaagacatgg acttccaggc cactggagaa acctgagccc agtcagctg ctccaataaa 660
 gcaatztatg ccaccatcac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 716

<210> 30

<211> 787

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (423)..(704)

<400> 30

ggcaaaagca gtctgtctga tcaccagagt gggagttega ggtgactgcc ttctaccgag 60
 gccgccaggt cttccagcag aactctttt gccccggggg cctgcggctg gtgggcagca 120
 cgtctgacaa cgggacactg ccctggcage cagtcaccct gccagaccct gaggagtttc 180
 tgacagacag gcttgtgagg gagtatgtga ggcaggctact caaggggctg ggcaaggggc 240
 tggtgctgtg gcgggcaggg cagtgcctct gggcccagcg cctaggccac tcgcattcct 300
 tctgggccct gggtgaggag ctgcttcag acagtgggag agggcctgat ggagaggtcc 360
 ccaaggacaa gaacggagtc gtgttcgacc tcaggccctt tgtggcagat ctattgcct 420
 tc atg gaa gga agc aga cat tcc cca cga tac act ctg tgg ttc tgt 467

Met Glu Gly Ser Arg His Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Trp Phe Cys

1 5 10 15

gtg ggg gaa tcg tgg ccc cag gac cag ccg tgg gtc aag agg ctt gtg 515
 Val Gly Glu Ser Trp Pro Gln Asp Gln Pro Trp Val Lys Arg Leu Val

20 25 30

atg gtc aag gtt gtt cct aca tgt ctt aag gag ctg tta gag atg gcc 563
 Met Val Lys Val Val Pro Thr Cys Leu Lys Glu Leu Leu Glu Met Ala

35 40 45

cgg gaa ggg gga gcc tca tca ctg aaa acc gtg gac ttg cac atc tcc 611
 Arg Glu Gly Gly Ala Ser Ser Leu Lys Thr Val Asp Leu His Ile Ser

50 55 60

aac agc cag ccg atc tcc ctt acc tct gac cag tac aag gcc tgc etc 659

Asn Ser Gln Pro Ile Ser Leu Thr Ser Asp Gln Tyr Lys Ala Cys Leu
 65 70 75
 cag gac ttg gtg gaa gac atg gac ttc cag gcc act gga gaa acc tgagcc710
 Gln Asp Leu Val Glu Asp Met Asp Phe Gln Ala Thr Gly Glu Thr
 80 85 90
 cagctcagct gctccaataa agcaatttat gccaccatca caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 770
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 787

<210> 31

<211> 94

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 31

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

<210> 32

<211> 1570

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 32

ctgacttgaa catatggtag gtgtgcctct gtaagaatcc aggctcattc tgagttgatg 60

aaaagtctta tttggacata tgcagggttt ggctccctga acactcttgg ggggggggtc 120
 atctgacaca gtaccattta gtgactttcc caagataagc atgagttgtg tccttgagtg 180
 aaacattggc catgcatggc tgsstgggc cattgctttt gctgcttttag agcaccacgg 240
 acctggctgg tgctgagctg gtccctacag ctaatgctcg gtaaactgtc accttctggc 300
 ctctcatgg caccgggtcc ttctcttca tgtgcatgca tgacttgcag tagagcctac 360
 tcaactgatg ggagtcctg gctagagtct gctgcctggc ggcttgcagc gacggctcag 420
 tcaaggctga aaggcttts gccacacagt gaaaagtga ccatagatgg agcttctgta 480
 ccccaactgac actacctgtg tttggttgc tgggctcttg gtgctgggag tgcagcaage 540
 acaggaggta ccctcgggaa ggcggaggcc ttgcctttcc ggactcacct aggtcttgtc 600
 tttcaacttg ttgtagaagt tacaattat tctcaaagat gtctgtctca tcatgaggga 660
 aaaggaactt tcttttgttc acattcagga ctttgagggt atagtgccat aaaatgtagc 720
 aaagggcccc gtggccaga tcagtgttac attgattctg aggttacagt gtctcccacc 780
 aaacatctgc ttaggcat gcggtgtatt tgaagagggc tttgggagaa ggaagcttcc 840
 ctcttgcttt aaaccagtat gtgcatcaca tgettacggc agacatttgc taccagtgga 900
 gttctgtgga gcctggcttt ggcagctca ttcttgagga ggtggcaaaa cttggggaag 960
 ttaggtgtga gtgtgtcaa gccctgaagc cctatgatgc actgtggccc tagaaaagga 1020
 agatgcagcc tctgctgacc actgtgtcct ctgagacttg gccagctgca ggagcccaac 1080
 ctgatgttcc ctcttatec tctgtgtagt cattccttcc gcccacaaa gggagcga 1140
 acatttctca ctgtgctgct gatgctctga cctggtgtgt ctgacagata catcaggctt 1200
 tgcagggcaa aggtgattca cctaagtgtt cacacacagc aacctgaat cctacagacc 1260
 aaaaccact tctcagcagg agcctgggtc caggcccagc acctgtgtct cctaaccgag 1320
 gccagctgtg ttgggtgaag agagccatgc caagggtcca ggtgcttta gtccatgtgc 1380
 cctaccatt tggggacaga tggttttct tgtaaacttg tggacttttg aaacctgtg 1440
 actaaacagt aattaattta tatttgtgaa aaatgccact gtctggtga tttctgatgt 1500
 aaataatgtt gtttatatag tatgtattaa atttcctac cattgtaaaa aaaaaaaaaa 1560
 aaaaaaaaaa 1570

<210> 33

<211> 1089

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (97)..(1047)

<400> 33

```

ggcacgaggg gtcgcggtgg cagccgtgcg gtgcttggt ccctaagcta tccggtgcca 60
.tccttgtegc tgcggcgact cgcaacatct gacgcc atg acc gag caa atg acc 114
                                         Met Thr Glu Gln Met Thr
                                         1             5

ctt cgt ggg acc ctc aag ggc cat aat gga tgg gtt aca cag atc gcc 162
Leu Arg Gly Thr Leu Lys Gly His Asn Gly Trp Val Thr Gln Ile Ala
          10             15             20

acc act ccg cag ttc ccg gac atg atc ctg tgc ggc tct cga gac aag 210
Thr Thr Pro Gln Phe Pro Asp Met Ile Leu Ser Ala Ser Arg Asp Lys
          25             30             35

acc atc atc atg tgg aag ctg acc agg gat gag acc aac tac ggc ata 258
Thr Ile Ile Met Trp Lys Leu Thr Arg Asp Glu Thr Asn Tyr Gly Ile
          40             45             50

cca caa cgt gct ctt cga ggt cac tcc cac ttt gtt agc gat gtt gtc 306
Pro Gln Arg Ala Leu Arg Gly His Ser His Phe Val Ser Asp Val Val
          55             60             65             70

atc tcc tct gat ggc cag ttt gcc ctc tca ggc tcc tgg gat gga acc 354
Ile Ser Ser Asp Gly Gln Phe Ala Leu Ser Gly Ser Trp Asp Gly Thr
          75             80             85

cta cgc ctc tgg gat ctc aca acg ggc act acc acg aga cga ttt gtc 402
Leu Arg Leu Trp Asp Leu Thr Thr Gly Thr Thr Thr Arg Arg Phe Val
          90             95             100

ggc cac acc aag gat gtg ctg agc gtg gct ttc tcc tct gac aac cgg 450
Gly His Thr Lys Asp Val Leu Ser Val Ala Phe Ser Ser Asp Asn Arg
          105             110             115

cag att gtc tct ggg tcc cga gac aag acc att aag tta tgg aat act 498

```

Gln Ile Val Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr Ile Lys Leu Trp Asn Thr
 120 125 130
 ctg ggt gtc tgc aag tac act gtc cag gat gag agt cat tca gaa tgg 546
 Leu Gly Val Cys Lys Tyr Thr Val Gln Asp Glu Ser His Ser Glu Trp
 135 140 145 150
 gtg tct tgt gtc cgc ttc tcc ccg aac agc agc aac cct atc atc gtc 594
 Val Ser Cys Val Arg Phe Ser Pro Asn Ser Ser Asn Pro Ile Ile Val
 155 160 165
 tcc tgc gga tgg gac aag ctg gtc aag gtg tgg aat ctg gct aac tgc 642
 Ser Cys Gly Trp Asp Lys Leu Val Lys Val Trp Asn Leu Ala Asn Cys
 170 175 180
 aag cta aag acc aac cac att ggc cac act ggc tat ctg aac aca gtg 690
 Lys Leu Lys Thr Asn His Ile Gly His Thr Gly Tyr Leu Asn Thr Val
 185 190 195
 act gtc tct cca gat gga tcc ctc tgt gct tct gga ggc aag gat ggc 738
 Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu Cys Ala Ser Gly Gly Lys Asp Gly
 200 205 210
 cag gct atg ctg tgg gat ctc aat gaa ggc aag cac ctt tac aca tta 786
 Gln Ala Met Leu Trp Asp Leu Asn Glu Gly Lys His Leu Tyr Thr Leu
 215 220 225 230
 gat ggt gga gac atc atc aat gcc ttg tgc ttc agc ccc aac cgc tac 834
 Asp Gly Gly Asp Ile Ile Asn Ala Leu Cys Phe Ser Pro Asn Arg Tyr
 235 240 245
 tgg ctc tgt gct gcc act ggc ccc agt atc aag atc tgg gac ttg gag 882
 Trp Leu Cys Ala Ala Thr Gly Pro Ser Ile Lys Ile Trp Asp Leu Glu
 250 255 260
 ggc aag atc atg gta gat gaa ctg aag caa gaa gtt atc agc acc agc 930
 Gly Lys Ile Met Val Asp Glu Leu Lys Gln Glu Val Ile Ser Thr Ser
 265 270 275
 agc aag gca gag cca ccc cag tgt acc tct ttg gct tgg tct gct gat 978

Ser Lys Ala Glu Pro Pro Gln Cys Thr Ser Leu Ala Trp Ser Ala Asp
 280 285 290
 ggc cag act ctg ttt gct ggc tat acc gac aac ttg gtg cgt gta tgg 1026
 Gly Gln Thr Leu Phe Ala Gly Tyr Thr Asp Asn Leu Val Arg Val Trp
 295 300 305 310
 cag gtg act att ggt acc cgc taaaagttaa tgacagactc ttagaaataa 1077
 Gln Val Thr Ile Gly Thr Arg
 315
 actggctttc tg 1089
 <210> 34
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 34
 Met Thr Glu Gln Met Thr Leu Arg Gly Thr Leu Lys Gly His Asn Gly
 1 5 10 15
 Trp Val Thr Gln Ile Ala Thr Thr Pro Gln Phe Pro Asp Met Ile Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Arg Asp Lys Thr Ile Ile Met Trp Lys Leu Thr Arg Asp
 35 40 45
 Glu Thr Asn Tyr Gly Ile Pro Gln Arg Ala Leu Arg Gly His Ser His
 50 55 60
 Phe Val Ser Asp Val Val Ile Ser Ser Asp Gly Gln Phe Ala Leu Ser
 65 70 75 80
 Gly Ser Trp Asp Gly Thr Leu Arg Leu Trp Asp Leu Thr Thr Gly Thr
 85 90 95
 Thr Thr Arg Arg Phe Val Gly His Thr Lys Asp Val Leu Ser Val Ala
 100 105 110
 Phe Ser Ser Asp Asn Arg Gln Ile Val Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr
 115 120 125

Ile Lys Leu Trp Asn Thr Leu Gly Val Cys Lys Tyr Thr Val Gln Asp
 130 135 140
 Glu Ser His Ser Glu Trp Val Ser Cys Val Arg Phe Ser Pro Asn Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Pro Ile Ile Val Ser Cys Gly Trp Asp Lys Leu Val Lys Val
 165 170 175
 Trp Asn Leu Ala Asn Cys Lys Leu Lys Thr Asn His Ile Gly His Thr
 180 185 190
 Gly Tyr Leu Asn Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu Cys Ala
 195 200 205
 Ser Gly Gly Lys Asp Gly Gln Ala Met Leu Trp Asp Leu Asn Glu Gly
 210 215 220
 Lys His Leu Tyr Thr Leu Asp Gly Gly Asp Ile Ile Asn Ala Leu Cys
 225 230 235 240
 Phe Ser Pro Asn Arg Tyr Trp Leu Cys Ala Ala Thr Gly Pro Ser Ile
 245 250 255
 Lys Ile Trp Asp Leu Glu Gly Lys Ile Met Val Asp Glu Leu Lys Gln
 260 265 270
 Glu Val Ile Ser Thr Ser Ser Lys Ala Glu Pro Pro Gln Cys Thr Ser
 275 280 285
 Leu Ala Trp Ser Ala Asp Gly Gln Thr Leu Phe Ala Gly Tyr Thr Asp
 290 295 300
 Asn Leu Val Arg Val Trp Gln Val Thr Ile Gly Thr Arg
 305 310 315

<210> 35

<211> 1317

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(1256)

<400> 35

g atg cag acc ctg gtg cta ctc ctc tgg act gga gcc ctg ctt ggg cac 49
Met Gln Thr Leu Val Leu Leu Leu Trp Thr Gly Ala Leu Leu Gly His
1 5 10 15
ggc agc agc cag aat gtc cct gac agc tct cag gat tcc cca gcc cct 97
Gly Ser Ser Gln Asn Val Pro Asp Ser Ser Gln Asp Ser Pro Ala Pro
20 25 30
gac agc acc ggg gag ccc gta gtg gag gag gat gac ccc ttc ttc aag 145
Asp Ser Thr Gly Glu Pro Val Val Glu Glu Asp Asp Pro Phe Phe Lys
35 40 45
gcc ccc gtg aac aag ttg gca gca gct gtt tcc aac ttc ggc tac gat 193
Ala Pro Val Asn Lys Leu Ala Ala Ala Val Ser Asn Phe Gly Tyr Asp
50 55 60
ctc tac cgc ctg aga tcc ggt gct gtc tca acc ggc aac att ctg ctg 241
Leu Tyr Arg Leu Arg Ser Gly Ala Val Ser Thr Gly Asn Ile Leu Leu
65 70 75 80
tct cct ctc agc gtg gcc acg gcc ctc tgc gcc ctt tcc ctg gga gct 289
Ser Pro Leu Ser Val Ala Thr Ala Leu Ser Ala Leu Ser Leu Gly Ala
85 90 95
gaa cag cga aca gag tct gtc att cac cgg gct ctc tac tac gac ttg 337
Glu Gln Arg Thr Glu Ser Val Ile His Arg Ala Leu Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110
atc aac aat cct gac atc cac agc acc tac aag gag ctc ctt gcc tct 385
Ile Asn Asn Pro Asp Ile His Ser Thr Tyr Lys Glu Leu Leu Ala Ser
115 120 125
gtt act gcc cct gag aag aac ttc aag agt gcc tcc aga att gtg ttt 433
Val Thr Ala Pro Glu Lys Asn Phe Lys Ser Ala Ser Arg Ile Val Phe
130 135 140
gag agg aaa ctt cga gta aaa tcc agc ttt gtt gct cct ctg gag aag 481

Glu Arg Lys Leu Arg Val Lys Ser Ser Phe Val Ala Pro Leu Glu Lys
 145 150 155 160
 tca tat ggg acc agg ccc cga atc ctc act ggc aac cct cgc ata gac 529
 Ser Tyr Gly Thr Arg Pro Arg Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Ile Asp
 165 170 175
 ctt cag gag att aac aac tgg gtg cag gcc cag atg aaa ggg aaa att 577
 Leu Gln Glu Ile Asn Asn Trp Val Gln Ala Gln Met Lys Gly Lys Ile
 180 185 190
 gcc cgg tct aca agg gaa atg ccc agt gcc ctc agc atc ctc ctc ctt 625
 Ala Arg Ser Thr Arg Glu Met Pro Ser Ala Leu Ser Ile Leu Leu Leu
 195 200 205
 ggc gtg gct tac ttc aag ggg cag tgg gca acc aag ttt gac tcg aga 673
 Gly Val Ala Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Ala Thr Lys Phe Asp Ser Arg
 210 215 220
 aag acg acc ctc cag gat ttt cac ttg gac gag gac agg act gtg aga 721
 Lys Thr Thr Leu Gln Asp Phe His Leu Asp Glu Asp Arg Thr Val Arg
 225 230 235 240
 gtc ccc atg atg tca gac cct aag gcc atc tta cga tat ggc ttg gac 769
 Val Pro Met Met Ser Asp Pro Lys Ala Ile Leu Arg Tyr Gly Leu Asp
 245 250 255
 tct gat ctc aac tgc aag att gcc cag ctg cct ttg aca gga agc atg 817
 Ser Asp Leu Asn Cys Lys Ile Ala Gln Leu Pro Leu Thr Gly Ser Met
 260 265 270
 agt atc atc ttc ttc ctg ccc ctg acg gtg acc cag aac ttg acc atg 865
 Ser Ile Ile Phe Phe Leu Pro Leu Thr Val Thr Gln Asn Leu Thr Met
 275 280 285
 ata gag gag agc ctc acc tct gag ttc att cat gac att gac cga gaa 913
 Ile Glu Glu Ser Leu Thr Ser Glu Phe Ile His Asp Ile Asp Arg Glu
 290 295 300
 ctg aag act atc caa gct gtg ctg act gtc ccc aag ctg aag ctg agc 961

Leu Lys Thr Ile Gln Ala Val Leu Thr Val Pro Lys Leu Lys Leu Ser
 305 310 315 320
 tat gaa ggc gac gtt acc aac tct ttg cag gac atg aag cta cag tcc 1009
 Tyr Glu Gly Asp Val Thr Asn Ser Leu Gln Asp Met Lys Leu Gln Ser
 325 330 335
 ttg ttt gag tcc cct gac ttc agc aag att acc ggc aaa cct gtg aag 1057
 Leu Phe Glu Ser Pro Asp Phe Ser Lys Ile Thr Gly Lys Pro Val Lys
 340 345 350
 ctc acc caa gtg gaa cac agg gca gct ttt gag tgg aat gag gag ggg 1105
 Leu Thr Gln Val Glu His Arg Ala Ala Phe Glu Trp Asn Glu Glu Gly
 355 360 365
 gca ggg acc agc tct aac cca gac ctc cag cct gtc cgc ctc acc ttc 1153
 Ala Gly Thr Ser Ser Asn Pro Asp Leu Gln Pro Val Arg Leu Thr Phe
 370 375 380
 ccg ctc gac tat cac ctt aac cga ccg ttc atc ttt gtt ctg agg gac 1201
 Pro Leu Asp Tyr His Leu Asn Arg Pro Phe Ile Phe Val Leu Arg Asp
 385 390 395 400
 acg gac acg ggg gcc ctc ctc ttc ata ggc aga atc ctg gac ccc agc 1249
 Thr Asp Thr Gly Ala Leu Leu Phe Ile Gly Arg Ile Leu Asp Pro Ser
 405 410 415
 agc act taattgtccc agtgcgctac agaaaacccc agagggaggg aggactgatt 1305
 Ser Thr
 acacattcca gg 1317
 <210> 36
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 36
 Met Gln Thr Leu Val Leu Leu Leu Trp Thr Gly Ala Leu Leu Gly His
 1 5 10 15

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

Ser Asp Leu Asn Cys Lys Ile Ala Gln Leu Pro Leu Thr Gly Ser Met
 260 265 270
 Ser Ile Ile Phe Phe Leu Pro Leu Thr Val Thr Gln Asn Leu Thr Met
 275 280 285
 Ile Glu Glu Ser Leu Thr Ser Glu Phe Ile His Asp Ile Asp Arg Glu
 290 295 300
 Leu Lys Thr Ile Gln Ala Val Leu Thr Val Pro Lys Leu Lys Leu Ser
 305 310 315 320
 Tyr Glu Gly Asp Val Thr Asn Ser Leu Gln Asp Met Lys Leu Gln Ser
 325 330 335
 Leu Phe Glu Ser Pro Asp Phe Ser Lys Ile Thr Gly Lys Pro Val Lys
 340 345 350
 Leu Thr Gln Val Glu His Arg Ala Ala Phe Glu Trp Asn Glu Glu Gly
 355 360 365
 Ala Gly Thr Ser Ser Asn Pro Asp Leu Gln Pro Val Arg Leu Thr Phe
 370 375 380
 Pro Leu Asp Tyr His Leu Asn Arg Pro Phe Ile Phe Val Leu Arg Asp
 385 390 395 400
 Thr Asp Thr Gly Ala Leu Leu Phe Ile Gly Arg Ile Leu Asp Pro Ser
 405 410 415

Ser Thr

<210> 37

<211> 1462

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(852)

<400> 37

ttt gct gtc ttt tcc att gct gtc tcc tca gat gga cga gaa gta cta 48

Phe Ala Val Phe Ser Ile Ala Val Ser Ser Asp Gly Arg Glu Val Leu
1 5 10 15
gga gga gcc aat gat ggc tgc ctt tat gtc ttt gac cgt gaa caa aac 96
Gly Gly Ala Asn Asp Gly Cys Leu Tyr Val Phe Asp Arg Glu Gln Asn
 20 25 30
egg cgt act ctt cag att gag tct cat gag gat gat gtg aat gca gtg 144
Arg Arg Thr Leu Gln Ile Glu Ser His Glu Asp Asp Val Asn Ala Val
 35 40 45
gcc ttt gct gac ata agc tcc cag atc ctg ttc tct ggg gga gac gat 192
Ala Phe Ala Asp Ile Ser Ser Gln Ile Leu Phe Ser Gly Gly Asp Asp
 50 55 60
gcc atc tgc aaa gtg tgg gac cga cgc acc atg cgg gag gat gac ccc 240
Ala Ile Cys Lys Val Trp Asp Arg Arg Thr Met Arg Glu Asp Asp Pro
65 70 75 80
aag cct gtg ggg gca ctg gct ggc cac cag gat ggc atc acc ttc att 288
Lys Pro Val Gly Ala Leu Ala Gly His Gln Asp Gly Ile Thr Phe Ile
 85 90 95
gac agc aag ggt gat gcc cgg tat ctc atc tcc aac tcc aaa gat cag 336
Asp Ser Lys Gly Asp Ala Arg Tyr Leu Ile Ser Asn Ser Lys Asp Gln
 100 105 110
acc att aag ctc tgg gat atc aga cgc ttt tcc agc cga gaa ggc atg 384
Thr Ile Lys Leu Trp Asp Ile Arg Arg Phe Ser Ser Arg Glu Gly Met
 115 120 125
gaa gcg tca cga ctg gct gcc aca cag cag aac tgg gac tat cgc tgg 432
Glu Ala Ser Arg Leu Ala Ala Thr Gln Gln Asn Trp Asp Tyr Arg Trp
 130 135 140
cag cag gtg ccc aag aaa gcc tgg aag aag ttg aag ctc cca ggt gac 480
Gln Gln Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Lys Leu Lys Leu Pro Gly Asp
145 150 155 160
age tcc ttg atg acc tac aga ggc cat gga gtg ctt cac act ctg atc 528

Ser Ser Leu Met Thr Tyr Arg Gly His Gly Val Leu His Thr Leu Ile
 165 170 175
 cga tgc cga ttc tcc cca gcc cac agc acg ggc cag cag ttc atc tac 576
 Arg Cys Arg Phe Ser Pro Ala His Ser Thr Gly Gln Gln Phe Ile Tyr
 180 185 190
 agc ggc tgt tct act ggc aaa gtg gtt gta tat gac ctc tta agc ggc 624
 Ser Gly Cys Ser Thr Gly Lys Val Val Val Tyr Asp Leu Leu Ser Gly
 195 200 205
 cac att gtg aag aag ctg acc aat cac aag gcc tgt gtg cgt gat gtc 672
 His Ile Val Lys Lys Leu Thr Asn His Lys Ala Cys Val Arg Asp Val
 210 215 220
 agt tgg cat ccc ttt gaa gaa aag att gtc agc agt tcg tgg gat ggg 720
 Ser Trp His Pro Phe Glu Glu Lys Ile Val Ser Ser Ser Trp Asp Gly
 225 230 235 240
 agc cta cgc ctg tgg cag tac cgc caa gct gag tac ttc cag gat gac 768
 Ser Leu Arg Leu Trp Gln Tyr Arg Gln Ala Glu Tyr Phe Gln Asp Asp
 245 250 255
 atg acc gag tct gac agg aac aga gtc tgt tcc agt ggc cct gct ccg 816
 Met Thr Glu Ser Asp Arg Asn Arg Val Cys Ser Ser Gly Pro Ala Pro
 260 265 270
 gtg ccc tgc cca tct gtg gcc ttt tcc tca cct cag tagatctgac 862
 Val Pro Cys Pro Ser Val Ala Phe Ser Ser Pro Gln
 275 280
 ctccagttct gtgtagggtg aattctcagc atattctctg cctcctcett ctttcccca 922
 tttggggagt aagtgaaga actgctgaca ctgggtagtg agagacagaa acccagagtc 982
 tgggccagg ctgagcctgg actaccgctc cccaaactgg gccaaagtgt ttctcatgc 1042
 attcataccc agtctgcttg gatttctatc tctagccaga atgtggccgg acatccatta 1102
 tctgggggtgc agcttctgcc aacaagagtc ttgagtgttt taatcatggt ctgatgtag 1162
 atatggctca tagttagac acgaggtcta aatagacca ttagcctttt gccaggtct 1222
 tcacaccaag agttagattg accaaccagg gccagtata ctggccttc tttctgagat 1282

ctttgaggga ggacaggggtg ggcagggacg tgtttcctca gcaccctctg gggtaggaac 1342
 tgtgtctgct ctcatacttg gcctttgaag tgaagagact ggtctgatgt gtgggtctca 1402
 gaactccgca gggccctact tgccattgga tcctgtcttt gctggtggcc agcagcttca 1462

<210> 38

<211> 284

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 38

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

Arg Cys Arg Phe Ser Pro Ala His Ser Thr Gly Gln Gln Phe Ile Tyr
 180 185 190
 Ser Gly Cys Ser Thr Gly Lys Val Val Val Tyr Asp Leu Leu Ser Gly
 195 200 205
 His Ile Val Lys Lys Leu Thr Asn His Lys Ala Cys Val Arg Asp Val
 210 215 220
 Ser Trp His Pro Phe Glu Glu Lys Ile Val Ser Ser Ser Trp Asp Gly
 225 230 235 240
 Ser Leu Arg Leu Trp Gln Tyr Arg Gln Ala Glu Tyr Phe Gln Asp Asp
 245 250 255
 Met Thr Glu Ser Asp Arg Asn Arg Val Cys Ser Ser Gly Pro Ala Pro
 260 265 270
 Val Pro Cys Pro Ser Val Ala Phe Ser Ser Pro Gln
 275 280

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

aattaaccct cactaaagg aac

23

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

gtaatagcgc tcactatagg gc

22

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

tcacatactc cctcacaage ct

22

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

gtaaaacgac ggccagt

17

出願人又は代理人の書類記号 1301	国際出願番号 PCT/JP01/03700
-----------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <div style="text-align: center;"> 63 頁、 20 行 </div>	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） <div style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番1中央第6（郵便番号305-8566）</div>	
寄託の日付 10.03.00	受託番号 FERM BP-7081
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

— 受理官庁記入欄 —
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 27.04.01
権限のある職員 関川 久男

— 国際事務局記入欄 —
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 18 MAY 2001 (18.05.01)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 1301	国際出願番号 PCT/JP01/03700
-----------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <u>64</u> 頁、 <u>3</u> 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番1中央第6（郵便番号305-8666,）	
寄託の日付 10.03.00	受託番号 FERM BP-7082
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

— 受理官庁記入欄 —
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 27.04.01
権限のある職員 関川 又男

— 国際事務局記入欄 —
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 18 MAY 2001 (18.05.01)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 1301	国際出願番号 PCT/JP01/03700
-----------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <div style="text-align: center;"> _____ 65 _____ 頁、 _____ 1 _____ 行 </div>	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） <div style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番1 中央第6（郵便番号305-8566）</div>	
寄託の日付 10.03.00	受託番号 FERM BP-7083
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

— 受理官庁記入欄 —
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 27.04.01
権限のある職員 関川 久男

— 国際事務局記入欄 —
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 18 MAY 2001 (18.05.01)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 1301	国際出願番号 PCT/JP01/03700
-----------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <div style="text-align: center;"> 65 頁、 11 行 </div>	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） <div style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番1 中央第6（郵便番号305-8566）</div>	
寄託の日付 10.03.00	受託番号 FERM BP-7084
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

— 受理官庁記入欄 —
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 27.04.01
権限のある職員 関川 久男

— 国際事務局記入欄 —
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 18 MAY 2001 (18.05.01)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 1301	国際出願番号 PCT/JP01/03700
-----------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 _____ 66 _____ 頁、 _____ 1 _____ 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む) 日本国茨城県つくば市東1丁目1番1中央第6 (郵便番号305-8566)	
寄託の日付 10.03.00	受託番号 FERM BP-7085
C. 追加の表示 (該当しない場合には記載しない) この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である (Rule 28 (4) EPC)。	
D. この表示を行うための指定国 (すべての指定国のために行わない場合)	
E. 追加事項の表示の提出 (該当しない場合には記載しない) 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)	

— 受理官庁記入欄 —
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 27.04.01
権限のある職員 関川 久男

— 国際事務局記入欄 —
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 18 MAY 2001 (18.05.01)
権限のある職員 五十嵐 伸司

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03700

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N1/15, 1/19, 5/00, 7/00, 15/00, C12P21/02, C12Q1/68, C07K14/47, 16/18

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 C12N1/15, 1/19, 5/00, 7/00, 15/00, C12P21/02, C12Q1/68, C07K14/47, 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroshi NOJIMA, Jikken Igaku Bessatsu, Bio Manual Series ②, "Idenshi Libruary no Sakusei-hou", Kabushiki Kaisha Youdosha, 20 February, 1994 (20.02.94), pp.124-134	1-28
A	JP 10-234378 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 08 September, 1998 (08.09.98), Claims; working examples, etc. (Family: none)	1-59
A Y	JP 11-507201 A (Cambridge Neuroscience), 29 June, 1999 (29.06.99), Claims; page 12, 12 th to 4 th lines from the bottom; working examples & WO 94/26298 A & EP 703785 A1	1-21, 29-52 22-28, 53-59
A	JP 3-7597 A (Boehringer Manniheim GMBH), 14 January, 1991 (14.01.91), Claims; working examples, etc. & EP 394819 B & DE 3922873 A	40-59

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
31 July, 2001 (31.07.01)Date of mailing of the international search report
07 August, 2001 (07.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03700

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	T. Ueno et al., Transcriptional deviation of the rat insulin-like growth factor II gene initiated at three alternative leader-exons between neonatal tissues and ascites hepatomas, <i>Biochim.Biophys.Acta</i> , 1988, Vol.950, pp.411-419, entire description, especially, Fig. 1	22-28,53-59
A	Peter K. Jackson et al, Mutation of a phenyalanine conserved in SH3-containing tyrosine kinase activates the transforming ability of c-Ab1, <i>Oncogene</i> , 1993, Vol.8, pp.1943-1956, entire description	22-28,53-59
A	K. Sakimura et al., Molecular cloning and the nucleotide sequence of cDNA to mRNA for non-neuronal enolase of rat brain and liver, <i>Nucleic Acids Res.</i> , 1985, Vol.13 (12), pp.4365-4378, entire description, especially, Fig. 3	22-28,53-59
A	M.G. Pan et al., Cloning and expression of two structurally distinct receptor-liked protein-tyrosine phosphatases generated by RNA processing from a single gene, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1993, Vol.268 (26), pp.19284-19291, entire description	22-28,53-59
A	K. Hamilet al., Cloning of rat Sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid:regulation of TSC-22 gene expression, <i>Endocrinology</i> , 1994, Vol.134(3), pp.1205-1212, entire description, especially, Fig. 2	22-28,53-59
A	M. Shyuichiro et al., Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis, <i>J.Biol.Chem.</i> , 1990, Vol.265 (16), pp.9441-9443, entire description	22-28,53-59
A	D. ron et al., Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins, <i>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</i> , 1994, Vol.91, pp.839-843, entire description	22-28,53-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03700

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Claims 1 to 21 and 29 to 52 pertain to novel DNAs showing different expression doses in fetal heart from adult heart, proteins encoding the same and antibodies against these proteins which are applicable to the diagnosis and treatment of heart diseases. Claims 22 to 28 and 53 to 59 pertain to methods of diagnosing or treating heart diseases by using known DNAs showing different expression doses in fetal heart from adult heart, proteins encoding the same and antibodies against these proteins. However, DNAs, proteins and antibodies usable in the diagnosis and treatment of heart diseases had been already known (see, for example, Kokai (unexamined patent publication) Hei 10-234378, Kokai Hei 3-7597). Thus, it does not appear that there is a technical relationship supported by respective technical features among the DNAs of SEQ ID NOS:21, 23, 25, 27, 30, 19, 32 and 37, the proteins of SEQ ID NOS:22, 24, 26, 28 and 31, the antibodies against the proteins of SEQ ID NOS:20 and 38, the DNAs of SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 33 and 35 and the proteins of SEQ ID NOS:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 34 and 36 as described in claims 1 to 21 and 29 to 52.

Such being the case, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

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.:

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/15, 1/19, 5/00, 7/00, 15/00, C12P21/02, C12Q1/68, C07K14/47, 16/18

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. Cl⁷ C12N1/15, 1/19, 5/00, 7/00, 15/00, C12P21/02, C12Q1/68, C07K14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

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
A	野島博, 実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ② 遺伝子ライブラリーの作製法, 株式会社羊土社, 20. 2月. 1994 (20. 02. 94), p. 124-134	1-28
A	JP 10-234378 A, (麒麟麦酒株式会社), 8. 9月. 1998 (08. 09. 98), 特許請求の範囲、実施例等参照, (ファミリーなし)	1-59
A Y	JP 11-507201 A, (ケンブリッジ・ニューロサイエンス), 29. 6月. 1999 (29. 06. 99), 特許請求の範囲、第12頁下から第12行~第4行及び実施例等参照, & WO 94/26298 A & EP 703785 A1	1-21, 29-52 22-28, 53-59
A	JP 3-7597 A, (ペーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング), 14. 1月. 1991 (14. 01. 91), 特許請求の範囲、実施例等参照, & EP 394819 B & DE 3922873 A	40-59

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日 31. 07. 01

国際調査報告の発送日 07.08.01

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

特許庁審査官 (権限のある職員)
 坂崎 恵美子 印
 4N 9451
 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y	T. Ueno et al, Transcriptional deviation of the rat insulin-like growth factor II gene initiated at three alternative leader-exons between neonatal tissues and ascites hepatomas, Biochim. Biophys. Acta, 1988, Vol. 950, p. 411-419, 文献全体、特にFig1参照	22-28, 53-59
A	Peter K. Jackson et al, Mutation of a phenylalanine conserved in SH3-containing tyrosine kinase activates the transforming ability of c-Abl, Oncogene, 1993, Vol. 8, p. 1943-1956, 文献全体参照	22-28, 53-59
A	K. Sakimura et al., Molecular cloning and the nucleotide sequence of cDNA to mRNA for non-neuronal enolase of rat brain and liver, Nucleic Acids Res., 1985, Vol. 13 (12), p. 4365-4378, 文献全体、特にFig3参照	22-28, 53-59
A	M.G. Pan et al., Cloning and expression of two structurally distinct receptor-like protein-tyrosine phosphatases generated by RNA processing from a single gene, J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268 (26), p. 19284-19291, 文献全体参照	22-28, 53-59
A	K. Hamilet al., Cloning of rat Sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid: regulation of TSC-22 gene expression, Endocrinology, 1994, Vol. 134 (3), p. 1205-1212, 文献全体、特にFig2参照	22-28, 53-59
A	M. Shyuichiro et al., Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis, J. Biol. Chem., 1990, Vol. 265 (16), p. 9441-9443, 文献全体参照	22-28, 53-59
A	D. ron et al., Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1994, Vol. 91, p. 839-843, 文献全体参照	22-28, 53-59

第I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 (PCT 17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 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ 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、
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II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1-21及び29-52は、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する新規DNA、それをコードするタンパク質及びそのタンパク質に対する抗体に関するものであり、心疾患の診断や治療に利用することができる。また、請求の範囲22-28及び53-59は、胎児心臓と成体心臓とで発現量が変動する既知のDNA、これをコードするタンパク質及びそのタンパク質に対する抗体を用いて心疾患の診断や治療を行う方法に関するものである。しかし、心疾患の診断や治療に用いられるDNA、タンパク質及び抗体は既に知られているから (例えば、特開平10-234378号公報、特開平3-75977号公報等参照)、請求の範囲1-21及び29-52の配列番号21, 23, 25, 27, 30, 19, 32, 37のDNA、配列番号22, 24, 26, 28, 31のタンパク質、配列番号20, 38のタンパク質に対する抗体、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 33, 35のDNA及び配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 34, 36のタンパク質は、それぞれ特別の技術的特徴によって表現された技術的相互関連性は認められない。

従って、これらの発明が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認められない。

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。

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。