

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4326626号
(P4326626)

(45) 発行日 平成21年9月9日(2009.9.9)

(24) 登録日 平成21年6月19日(2009.6.19)

(51) Int. Cl.

F 1

C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	

請求項の数 20 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-158571
 (22) 出願日 平成11年6月4日(1999.6.4)
 (65) 公開番号 特開2000-342270 (P2000-342270A)
 (43) 公開日 平成12年12月12日(2000.12.12)
 審査請求日 平成18年3月15日(2006.3.15)

(73) 特許権者 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
 (74) 代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (72) 発明者 遠藤 仁
 神奈川県相模原市由野台1-23-7
 (72) 発明者 金井 好克
 東京都八王子市台町1丁目2-3
 審査官 田中 晴絵

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーター及びその遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

中性アミノ酸トランスポーターであって、中性アミノ酸であるグリシン、アラニン、セリン、システイン、スレオニン、グルタミン、アスパラギン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンに対する広い基質選択性を有し、アミノ酸輸送活性化因子4F2hcにより活性化され、配列番号2又は6で示されるアミノ酸配列、又は、配列番号2又は6で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項2】

促進拡散型の中性アミノ酸トランスポーターである請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】

ヒト又はラット由来である請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項4】

臓器、組織、もしくは培養細胞由来である請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項5】

請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項6】

配列番号1又は5で示される塩基配列、又は、哺乳動物由来であり配列番号1又は5で

10

20

示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得る80%以上の塩基配列のホモロジーを有する塩基配列からなり、中性アミノ酸であるグリシン、アラニン、セリン、システイン、スレオニン、グルタミン、アスパラギン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンに対する広い基質選択性を有し、アミノ酸輸送活性化因子4F2hcにより活性化されるタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項7】

ヒト又はラット由来である請求項5又は6に記載の遺伝子。

【請求項8】

臓器、組織、もしくは培養細胞由来である請求項7に記載の遺伝子。

10

【請求項9】

請求項5～8のいずれかに記載の遺伝子もしくは該遺伝子の中のタンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミド。

【請求項10】

プラスミドが、発現プラスミドである請求項9に記載のプラスミド。

【請求項11】

請求項9又は10に記載のプラスミドで形質転換された宿主細胞。

【請求項12】

配列番号1又は5で示される塩基配列の中の連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含み、請求項5～8のいずれかに記載の遺伝子を検出するためのプローブとして使用するヌクレオチド。

20

【請求項13】

配列番号1又は5で示される塩基配列の中の連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含み、請求項5～8のいずれかに記載の遺伝子の発現を変調させるために使用するヌクレオチド。

【請求項14】

請求項1～4のいずれかに記載するタンパク質に対する抗体。

【請求項15】

請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質又は当該タンパク質を含有する細胞を用いて、該タンパク質の有する中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力に対する被検物質の基質としての作用を測定する方法。

30

【請求項16】

輸送活性化因子4F2hcを併用する請求項15に記載の方法。

【請求項17】

被検物質が薬物又は毒物若しくは外来性異物である請求項15又は16に記載の方法。

【請求項18】

請求項15～17のいずれかに記載の方法により、腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーターLAT1と対比して、請求項1～4のいずれかに記載の非腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーターにより細胞に取り込まれ易い又は取り込まれにくい物質をスクリーニングする方法。

40

【請求項19】

腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーターLAT1には取り込まれ易いが、請求項1～4のいずれかに記載の非腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーターLAT2には取り込まれにくい物質をスクリーニングする請求項18に記載の方法。

【請求項20】

脳、胎盤もしくは精巣におけるスクリーニングである請求項18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、中性アミノ酸及びその類似物質の輸送に関与する新規な蛋白質、それをコード

50

する遺伝子、及びそれを用いた薬物のその遺伝子がコードするタンパク質に関する。また、本発明は、当該タンパク質を用いて被検物質の細胞内への取り込み又は細胞外への放出についての動態を測定する方法、及び当該方法を用いた被検物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞は、栄養としてアミノ酸を常時取り込むことを必要とするが、この機能は細胞膜に存在する膜タンパク質であるアミノ酸トランスポーターによって担われている。栄養としてアミノ酸を常時取り込むことがアミノ酸トランスポーターの元来の役割であるが、多細胞生物においてはアミノ酸トランスポーターが組織に組み込まれることにより、その組織の形態的特徴を反映した多彩な機能が賦与されている。例えば、上皮組織における上皮輸送と神経組織における放出された神経伝達物質の回収などが知られている。

アミノ酸トランスポーターは、輸送するアミノ酸の種類に応じて、大きく塩基性アミノ酸トランスポーター、酸性アミノ酸トランスポーター、及び中性アミノ酸トランスポーターに分けられる。塩基性アミノ酸は主に Na^+ 非依存性輸送系 y^+ や b^0 、 $^+$ によって、酸性アミノ酸は Na^+ 依存性輸送系 X^- 、 A 、 G によって輸送される。多くのアミノ酸が属する中性アミノ酸では、 Na^+ 非依存性輸送系 L 、 Na^+ 依存性輸送系 A 、 ASC 及び B^0 が重要であるとされている。

特に中性アミノ酸輸送系 L は、多くの必須アミノ酸の細胞への供給を担当することから、細胞栄養において最も重要な輸送機構のひとつであると同時に、腸管からの吸収、腎尿管からの再吸収、血液・組織関門の通過においても重要な役割を果たしている。また、中性アミノ酸輸送系 L は、基質選択性が広いことから、中性アミノ酸類似物質もしくは中性アミノ酸類似の構造を有する薬物や毒物を輸送することでも知られていた。

【0003】

中性アミノ酸輸送系 L は、もともとは、腫瘍細胞株で始めて記載され、その後、培養細胞、膜小胞標本、摘出臓器標本もしくは生体内 (*in vivo*) 標本を用いて検討されてきた [Christensen, *Physiol.Rev.*, 70, 43 (1990)]。中性アミノ酸輸送系 L は、ナトリウム非依存的な、すなわちその機能にナトリウムイオンを必要としないトランスポーターである。その輸送基質選択性や輸送特性は、細胞や組織により多少の差異があることが知られていた。

【0004】

しかし、従来の方法では、中性アミノ酸及びその類似物質の輸送の詳細や、細胞の生存もしくは増殖に対する中性アミノ酸輸送系 L の役割を解析することは困難であり、中性アミノ酸輸送系 L の機能を担う中性アミノ酸トランスポーターの遺伝子を単離して詳細な機能解析を可能とすることが望まれていた。

【0005】

中性アミノ酸トランスポーターとしては、ナトリウム依存的なトランスポーターとして、 ASCT1 および ASCT2 がクローニングされている [Kanai, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 9, 565 (1997)]。しかし、これらは、アラニン、セリン、システイン、スレオニン、グルタミンを主な基質とするものであり、中性アミノ酸輸送系 L とは基質選択性が異なっている。また、グリシントランスポーターとプロリントランスポーターがクローニングされているが [Amara and Kuhar, *Annu.Rev.Neurosci.*, 16, 73 (1993)]、これも中性アミノ酸輸送系 L とは異なる。

【0006】

トランスポーター自体ではないが、アミノ酸トランスポーターの活性化因子であると考えられている膜貫通構造を一回しか持たない二型膜糖タンパク質である rBAT 及び 4F2hc (4F2 heavy chain (腫瘍細胞や活性化リンパ球の細胞表面抗原として見出された。)) の cDNA がクローニングされており、それらをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させると中性アミノ酸とともに塩基性アミノ酸の取り込みを活性化することが知られている [Palacin, *J., Exp. Biol.*, 196, 123 (1994)]。

【 0 0 0 7 】

中性アミノ酸輸送系 L の一つのアイソフォームとして中性アミノ酸トランスポーター L A T 1 がクローニングされた [Kanai, et al., J. Biol. Chem., 273, 23629 (1998)]。L A T 1 は、補助因子 4 F 2 h c と共存することによってのみ機能することが示された。L A T 1 は Na^+ に依存せず、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ヒスチジンを輸送する交換輸送活性を示し、以前に腫瘍細胞で記載された輸送系 L の活性と類似の機能特性を示す。L A T 1 は培養腫瘍細胞株およびヒト悪性腫瘍組織で高発現する。また、L A T 1 は、グリシン、アラニン、セリン、システイン、スレオニンなどの小型の中性アミノ酸は輸送しない。

【 0 0 0 8 】

さらに、中性アミノ酸トランスポーター L A T 1 の類似蛋白質として、中性アミノ酸及び塩基性アミノ酸を輸送する輸送系 y^+ L の機能を有する y^+ L A T 1 と y^+ L A T 2 がクローニングされた [Torrents, et al., J. Biol. Chem., 273, 32437 (1998)]。また、 y^+ L A T 1、 y^+ L A T 2 共に補助因子 4 F 2 h c と共存することによってのみ機能することが示された。 y^+ L A T 1 と y^+ L A T 2 は、中性アミノ酸としてはグルタミン、ロイシン、イソロイシンを主に輸送し、中性アミノ酸に対する基質選択性は狭い。

【 0 0 0 9 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明の目的は、広い基質選択性を有し、輸送系 L の機能を担う、L A T 1 とは異なる中性アミノ酸トランスポーターの遺伝子及びその遺伝子がコードするポリペプチドである中性アミノ酸トランスポーターを提供することにある。その他の目的については、以下の記載より明らかである。

【 0 0 1 0 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、L A T 1 の c D N A の翻訳領域の塩基配列を用いて E S T (expressed sequence tag) データベースを検索し、L A T 1 と類似の塩基配列を同定した。それに相当するプローブを作製して c D N A ライブラリーをスクリーニングし、新規タンパク質をコードする遺伝子をクローニングした。さらに、この遺伝子の産物をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させて、この遺伝子の産物が機能を発揮するためには 4 F 2 h c が必須であること、及び発現する機能は、中性アミノ酸輸送系 L に相当するが、L A T 1 とは異なり広い基質選択性を有することを確認し、新規な中性アミノ酸トランスポーター L A T 2 を見出し、本発明を完成するにいたった。

【 0 0 1 1 】

本発明は、中性アミノ酸トランスポーターであって、中性アミノ酸に対する広い基質選択性を有し、アミノ酸輸送活性化因子 4 F 2 h c により活性化され、かつ非腫瘍性であるタンパク質、好ましくはさらに促通拡散型の中性アミノ酸トランスポーターであるタンパク質に関する。本発明のヒト由来のタンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 6 に示し、ラット由来のタンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に示す。したがって、本発明は、前記した性質を有する配列番号 2 又は 6 で示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 2 又は 6 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる前記した性質を有するタンパク質に関する。

【 0 0 1 2 】

本発明は、前記したタンパク質をコードする遺伝子、それを含有するプラスミド、及び、当該プラスミドで形質転換された細胞に関する。本発明は、配列番号 1 又は 5 で示される塩基配列の中の連続する 1 4 塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチド、及びその使用に関する。

また、本発明は、前記したタンパク質に対する抗体に関する。

【 0 0 1 3 】

さらに本発明は、前記したタンパク質又は当該タンパク質を含有する細胞を用いて、該タンパク質の有する中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力に対する被検物質の基質

10

20

30

40

50

としての作用を測定する方法、及び、それらを用いて被検物質の生体内における中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力に対する体内動態を測定するための方法に関する。また、本発明は、これらの方法により、中性アミノ酸トランスポーターにより細胞に取り込まれ易い又は取り込まれにくい物質をスリーニングする方法に関する。

【0014】

本発明の中性アミノ酸を輸送する能力を有する新規タンパク質、すなわち中性アミノ酸トランスポーターLAT2 (L-type amino acid transporter 2) は、アミノ酸輸送活性化因子4F2hcと共存することにより、グリシン、アラニン、セリン、システイン、スレオニン、グルタミン、アスパラギン、ロイシン、イソロイシン、パリン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンなどの中性アミノ酸を輸送する(取り込む)能力を有する。本発明のLAT2は、さらにL-DOPAを受け入れることから、中性アミノ酸類似の構造を持つ薬物を輸送する広い基質選択性を有すると考えられる。

10

【0015】

また、本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2は、生体内においては小腸、腎、胎盤、脳、精巣、骨格筋に主に発現している。しかし、LAT1の強発現の見られるラットC6グリオーマ細胞株には発現は認められない。LAT1が腫瘍細胞型の輸送系L中性アミノ酸トランスポーターであるのに対し、LAT2は非腫瘍細胞型の輸送系L中性アミノ酸トランスポーターである。さらに、アミノ酸及びそれと類似構造を持つ薬物、毒物、外来性異物の、腸管吸収、腎尿細管からの再吸収、血液・脳関門、胎盤関門、精巣関門の通過を担当する輸送系L中性アミノ酸トランスポーターであると考えられる。

20

【0016】

【発明の実施の形態】

後記配列表の配列番号1は、ラット小腸由来の中性アミノ酸トランスポーター(ラットLAT2)の遺伝子の全長cDNA塩基配列(約4.1kbp)を示し、配列番号2にはその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列(533アミノ酸)を示す。配列番号3は、ラットの4F2hcのcDNAの塩基配列(1940bp)を示し、配列番号4はそれによって翻訳される蛋白質(527アミノ酸)を示す。

配列番号5はヒト腎由来の中性アミノ酸トランスポーター(ヒトLAT2)の遺伝子の全長cDNA塩基配列(約4.2kbp)を示し、配列番号6にはその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列(535アミノ酸)を示す。配列番号7は、ヒト胎盤由来の4F2hc(ヒト4F2hc)の遺伝子の全長cDNA塩基配列(約1.9kbp)を示し、配列番号8にはその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列(524アミノ酸)を示す。

30

【0017】

前記配列番号1、2、5及び6に示されるLAT2の塩基配列もしくはアミノ酸配列について、既知DNAデータベース(GenBankおよびEMBL)及びプロテインデータベース(NBRF及びSWISS-PROT)に含まれるすべての配列に対してホモロジー検索を行った結果、一致するものはなく、これらの配列は、新規なものであると考えられる。

40

【0018】

本発明のタンパク質としては、配列番号2又は6で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば配列番号2又は6で示されたアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、中性アミノ酸輸送活性が失われない程度であればよく、通常1~約106個、好ましくは1~約53個である。このようなタンパク質は、配列番号2又は6で示されたアミノ酸配列と通常、1~80%、好ましくは1~90%のアミノ酸配列のホモロジーを有する。

【0019】

50

また、本発明の遺伝子としては、配列番号 1 又は 5 で示された塩基配列を有するもののほか、配列番号 1 又は 5 で示された配列番号 1 又は 5 で示された塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る DNA を含むものが挙げられる。このようにハイブリダイズし得る DNA は、その DNA にコードされるタンパク質が中性アミノ酸を輸送する能力を有するものであればよい。このような DNA は配列番号 1 又は 5 で示された塩基配列と通常、70%以上、好ましくは80%以上の塩基配列のホモロジーを有する。このような DNA としては、自然界で発見される変異型遺伝子、人為的に改変した変異型遺伝子、異種生物由来の相同遺伝子等が含まれる。

【0020】

本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常、ハイブリダイゼーションを、5×SSC又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、37～42の温度条件下、約12時間行い、5×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液などで必要に応じて予備洗浄を行った後、1×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。

10

【0021】

本発明の中性アミノ酸トランスポーター遺伝子は、適当な哺乳動物の組織や細胞を遺伝子源として用いてスクリーニングを行うことにより単離取得できる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラット及びマウスなどの非ヒト動物のほか、ヒトが挙げられる。

遺伝子のスクリーニング及び単離は、ホモロジークローニング法などにより好適に実施できる。

20

【0022】

例えば、ラット小腸やヒト腎臓を遺伝子源として用い、これから mRNA (ポリ(A)+RNA) を調製する。これから cDNA ライブラリーを構築し、EST (expressed sequence tag) データベースの検索によって得られる LAT1 類似配列 (例えば、GenBankTM/EBI/DBJ accession No. N32639) に相当するプローブを用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって LAT2 遺伝子の cDNA を含むクローンを得ることができる。

得られた cDNA については、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、すなわち、LAT2 のアミノ酸配列を決定することができる。

30

【0023】

得られた cDNA が、中性アミノ酸トランスポーター遺伝子の cDNA であること、すなわちは cDNA にコードされた遺伝子産物が中性アミノ酸トランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。すなわち、得られた LAT2 遺伝子の cDNA から調製したこれに相補的な RNA (cRNA) (キャプ化されたもの) を 4F2hc の cRNA とともに卵母細胞内に導入して発現させ、中性アミノ酸を細胞内へ輸送する (取り込む) 能力を、前記と同様、適当な中性アミノ酸を基質とする通常の実験 [Kanai and Hediger, Nature, 360, 467-471 (1992)] により、細胞内への基質の取り込みを測定することにより確認できる。

40

【0024】

得られた LAT2 遺伝子の cDNA から調整した、これに相補的な RNA (cRNA) を用いて、インビトロ翻訳法 [Hediger, et al., Biochim. Biophys. Acta., 1064, 360 (1991)] により、LAT2 タンパク質を合成し、電気泳動によりタンパク質のサイズ、糖付加の有無等を検討することができる。

【0025】

4F2hc の遺伝子の cDNA はすでに報告されている [Broer, et al., Biochem. J., 312, 863項 (1995)] ので、この配列情報から、PCR 法などを用いて、容易に 4F2hc の遺伝子を得ることが可能である。得られた 4F2hc の cDNA から、cRNA (キャプ化されたもの) を合成できる。

50

【0026】

また、発現細胞について、同様の取り込み実験を応用して、LAT2の特性、例えば、LAT2がアミノ酸の促進拡散型の輸送を行っているという特性や、LAT2の基質選択性、pH依存性などを調べることができる。

得られたLAT2遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製された適当なcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。

【0027】

また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列（配列番号1又は5に示された塩基配列、もしくはその一部）の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR（Polymerase Chain Reaction）法によりcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーから遺伝子を単離することができる。

10

【0028】

cDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは、例えば、「Molecular cloning」[Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Pressより1989年に発刊]に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを用いてもよい。

【0029】

本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーター（LAT2）は、例えば、それをコードするcDNAを用い、遺伝子組換え技術により生産することができる。例えば、LAT2をコードするDNA（cDNA等）を適当な発現ベクターに組み込み、得られた組換えDNAを適当な宿主細胞に導入することができる。ポリペプチド生産するための発現系（宿主-ベクター系）としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞及び哺乳類細胞の発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞及び哺乳類細胞を用いることが好ましい。

20

【0030】

例えば、ポリペプチドを哺乳類細胞で発現させる場合には、広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2をコードするDNAを、適当な発現ベクター（例えば、アデノウイルス系ベクター、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等）中の適当なプロモーター（例えば、サイトメガロウイルスプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1αプロモーター等）の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次に、得られた発現ベクターで適当な動物細胞を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、目的とするポリペプチドが生産される。宿主とする哺乳動物細胞としては、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、又はヒトHeLa細胞などの細胞株などが挙げられる。

30

【0031】

広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2をコードするDNAとしては、例えば、配列番号1又は5で示される塩基配列を有するcDNAを用いることができるほか、前記のcDNA配列に限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAとして用いることもできる。この場合、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは各々1～6種類知られており、用いるコドンの選択は任意で良いが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列を持つDNAは、DNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位特異的変異導入法（site specific mutagenesis）[Mark, D.F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A., 81, 5662 (1984)]等によって実施できる。

40

【0032】

50

本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーター又はこれと免疫学的同等性を有するポリペプチドを用いて、その抗体を取得することができる。抗体は、広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターの検出や精製などに利用できる。抗体は、本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーター、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチドなどを抗原として用いて製造できる。ポリクロナール抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に抗原を接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができ、モノクロナール抗体は、通常ハイブリドーマ法などの技術により製造できる。

【0033】

本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2、その遺伝子およびその発現細胞は、LAT2により輸送される薬物（例えば、L-DOPA等）の、細胞膜通過や、LAT2が存在すると予想される部位（例えば小腸上皮、腎尿細管上皮、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門など）での透過効率についての、インビトロでの試験に使用できる。また、LAT2を発現する細胞膜や、LAT2が存在すると予想される部位（例えば小腸上皮、腎尿細管上皮、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門など）を効率良く透過する薬物の開発に使用できる。さらに、LAT2を発現する細胞膜や、LAT2が存在すると予想される部位（例えば小腸上皮、腎尿細管脳皮、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門など）での薬物間相互作用のインビトロでの試験に使用できる。

10

【0034】

本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2、その遺伝子およびその発現細胞は、LAT2により輸送される毒物（例えば、メチル水銀のシステイン抱合体等）や外来性異物の、細胞膜通過や、LAT2が存在すると予想される部位（例えば小腸上皮、腎尿細管上皮、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門など）での透過率についての、インビトロでの試験に使用できる。

20

【0035】

本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2を抑制することにより、LAT2を発現する細胞膜や、LAT2が存在すると予想される部位（例えば小腸上皮、腎尿細管上皮、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門など）の毒物（例えば、メチル水銀のシステイン抱合体等）や外来性異物の透過を制限することができる。また、本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2、その遺伝子およびその発現細胞は、LAT2により輸送される毒物（例えば、メチル水銀のシステイン抱合体等）や外来性異物の、細胞膜通過や、LAT2が存在すると予想される部位（例えば小腸上皮、腎尿細管上皮、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門など）の透過を制限する薬物（LAT2の特異的なインヒビター等）の開発に使用できる。

30

【0036】

また、本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2は非腫瘍細胞に発現するため、これと腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーターLAT1とを用いて、腫瘍細胞の中性アミノ酸トランスポーターを抑制し、かつ非腫瘍細胞の中性アミノ酸トランスポーターは抑制しない薬物を開発することができる。腫瘍細胞型LAT1の抑制薬は、腫瘍細胞増殖抑制効果を有するため、非腫瘍細胞LAT2を用いることにより、正常細胞に対する作用（副作用）の少ない薬物を開発することができる。

40

【0037】

したがって、本発明は、本発明の前記したタンパク質又は当該タンパク質を含有する細胞を用いて、該タンパク質の有する中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力に対する被検物質の基質としての作用を測定する方法、又は、本発明の前記したタンパク質又は当該タンパク質を含有する細胞を用いて、被検物質の生体内における中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力に対する体内動態を測定するための方法を提供するものである。本発明の前記したタンパク質を含有する細胞としては、本発明のタンパク質を細胞系に賦与して製造してもよく、また本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する遺伝子を

50

用いて形質転換した細胞により製造してもよく、さらに、本発明の前記したタンパク質を含有する生体の細胞を使用することもできる。

【0038】

さらに、本発明は、前記した方法により、中性アミノ酸トランスポーターにより細胞に取り込まれ易い又は取り込まれにくい物質をスクリーニングする方法を提供するものであり、本発明のスクリーニング方法により薬物又は毒物の臓器又は組織に対する特異性をスクリーニングすることができる。

例えば、腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーターLAT1との対比を行うことにより、腫瘍細胞に特異的に取り込まれる薬物又は毒物をスクリーニングすることができる。また、血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巣関門などの生体内の各種関門に対する特異性をスクリーニングすることができる。

10

【0039】

【実施例】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【0040】

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「Molecular cloning」[Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Press より 1989 年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

20

【0041】

実施例1 ラット中性アミノ酸トランスポーターLAT2のcDNAのクローニング

(1) ラット4F2hcのcDNAの単離とcRNAの調製

cDNAライブラリーはラット肝から精製したポリ(A)⁺RNAから、cDNA合成用キット(商品名: Superscript Choice System、ギブコ社製)を使用して作製し、ファージベクター ZipLox (ギブコ社製)の制限酵素EcoRI切断部位に組み込んだ。PCR法にて、ラット4F2hc遺伝子[Broer, et al., Biochem.J., 312, 863 (1995)]の第135-580番目の塩基に相当するセグメントを増幅し、これを³²P-dCTPでラベルしてプローブとして用いて、ラット肝cDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37のハイブリダイゼーション用溶液中一晩行い、フィルター膜は、37で0.1xSSC/0.1%SDSで洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5xSSC、3xデンハード液(Denhard's液)0.2%SDS、10%硫酸デキストラン、50%ホルムアミド、0.01%Antiform B(商品名、シグマ社)(消泡剤)、0.2mg/mlサーモン精子変性DNA、2.5mMピロリン酸ナトリウム、25mM MESを含むpH6.5の緩衝液を用いた。cDNAを組み込んだ ZipLoxファージのcDNA部分を、プラスミドpZL1に組み込み、さらにプラスミドpBluescript IISK-(Stratagene社製)へサブクローン化した。

30

【0042】

得られたクローンすなわち、ラット4F2hcのcDNAを含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマー、塩基配列決定用キット(商品名: Sequenase ver. 2.0、アマシャム社製)を用いてダイデオキシ法により、cDNAの塩基配列を決定した。これにより、クローニングしたcDNAがラット4F2hc遺伝子のものであることが確認できた。得られた4F2hcの塩基配列を後記配列表の配列番号3に示した。そのアミノ酸配列を配列番号4に示した。

40

【0043】

上記より得られたラット4F2hcのcDNAを含むプラスミドから、T7RNAポリメラーゼを用いて、cRNA(cDNAに相補的なRNA)調製した。

【0044】

(2) ラット中性アミノ酸トランスポーターLAT2のcDNAの単離とcRNAの調製

50

L A T 1 の翻訳領域の塩基配列を用いた E S T (expressed sequence tag) データベースの検索によって得られた L A T 1 類似配列 GenBankTM / EBI / DDBJ accession No. N32639 の 35 - 54 bp に相当するセンスプライマー (5'-ctcttcacatgcatctccac-3') と、397 - 416 bp に相当するアンチセンスプライマー (5'-ggtacacgaccacacacatc-3')、および I M A G E (Integrated and Molecular Analysis of Genoms and their Expression) c D N A クローン No. 267666 をテンプレートとして用い、D N A 断片を P C R 法によって増幅した。得られた D N A 断片を ³²P - d C T P でラベルしてプローブとして用いて、ラット小腸 c D N A ライブラリーをスクリーニングした。

【0045】

c D N A ライブラリーはラット小腸由来ポリ (A) + R N A から、c D N A 合成用キット (商品名: Superscript Choice System、ギブコ社製) を使用して作製し、ファージベクター ZipLox (ギブコ社製) の制限酵素 E c o R I 切断部位に組み込んだ。³²P - d C T P でラベルしてプローブによるハイブリダイゼーションは、37 のハイブリダイゼーション用溶液中一晩行い、フィルター膜は、37 で 0.1 x S S C / 0.1 % S D S で洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5 x S S C、3 x デンハード液 (Denhard's 液) 0.2 % S D S、10 % 硫酸デキストラン、50 % ホルムアミド、0.01 % A n t i f o r m B (商品名、シグマ社) (消泡剤)、0.2 mg / ml サーマン精子変性 D N A、2.5 mM ピロリン酸ナトリウム、25 mM M E S を含む pH 6.5 の緩衝液を用いた。c D N A を組み込んだ ZipLox ファージの c D N A 部分を、プラスミド p Z L 1 に組み込み込んだ。

【0046】

得られたクローンすなわち、ラット L A T 2 の c D N A を含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマーを用いてダイターミネーターサイクルシーケンシング法 (Applied Biosystems 社) により、c D N A の塩基配列を決定した。

これにより、ラット L A T 2 遺伝子の塩基配列が得られた。また、c D N A の塩基配列を常法により解析して、c D N A の翻訳領域とそこにコードされる L A T 2 のアミノ酸配列を決定した。

これらの配列を、後記配列表の配列番号 1 に示した。そのアミノ酸配列を配列番号 2 に示した。

【0047】

L A T 2 はラット L A T 1 と 50 % のアミノ酸配列の相同性を有していた。また、中性および塩基性アミノ酸輸送系 y + L に相当するヒトトランスポーター y + L A T 1 と 47 %、y + L A T 2 と 45 % の相同性を有していた。これらのアミノ酸配列の比較を図 1 に示した。

【0048】

図 1 は、本発明のラット L A T 2 と、公知のラット L A T 1、ヒト y + L A T 1 およびヒト y + L A T 2 のアミノ酸配列の比較を示したものである。

S O S U I アルゴリズム [Hirokawa, T., et al., Bioinformatics, 14, 378 (1998年)] により、L A T 2 のアミノ酸配列を解析した結果、図 1 に示したように、12 個の膜貫通領域 (membrane-spanning domain) が予想された (図 1 に付線を付した部分)。また、第 2 の親水性ループにチロシンリン酸化部位、N - 末端細胞内領域、第 8 の親水性ループ、および C - 末端細胞内領域にプロテインキナーゼ C 依存性のリン酸化部位と考えられる部位があった。

【0049】

(3) インビトロ翻訳による、L A T 2 タンパク質の解析

インビトロ翻訳法 [Hediger, et al., Biochim. Biophys. Acta., 1064, 360 (1991)] により、L A T 2 の c R N A から L A T 2 タンパク質を合成し、電気泳動を行った。

その結果、49 k D a のバンドが得られ、イヌ膵臓ミクロゾーム画分 (M i c r o s o m e s) の存在下で糖付加を受けず、糖鎖分解酵素エンドグリコシダーゼ H (E n d o H)

10

20

30

40

50

によってバンドのサイズは変化しなかった(図2参照)。

したがって、LAT2は、糖付加部位を持たないタンパク質であることが示された。

【0050】

(4) ラットの種々の組織におけるLAT2遺伝子および4F2hc遺伝子の発現(ノーザンブロッティングによる解析)

LAT2遺伝子の第1126-1591番目の塩基に相当するcDNA断片を制限酵素HincIIで切り出し、³²P-dCTPでラベルしてプローブとして用いて、ラットの種々の組織及びラット由来の培養腫瘍細胞株C6グリオーマ細胞から抽出したRNAに対してノーザンブロッティングを以下のようにして行った。3μgのポリ(A)⁺RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターに転写した。このフィルターを42℃で、³²P-dCTPでラベルしたLAT2cDNA断片を含んだハイブリダイゼーション液で1晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、65℃にて、0.1%SDSを含む0.1×SSCで洗浄した。

10

【0051】

ノーザンブロッティングの結果(図3のa)、小腸、腎、胎盤、精巣、脳、骨格筋において4.4kb付近にバンドが検出された。ラット腫瘍細胞株C6グリオーマ細胞では、LAT2の発現は検出されなかった。

さらに長時間感光で、肺および大腸において、4.4kb付近にLAT2のかすかなバンドが検出された。

【0052】

4F2hc遺伝子の第211-656番目の塩基に相当するcDNA断片をPCR法で増幅し、³²P-dCTPでラベルしてプローブとして用いて、ラットの種々の組織及びラット由来の培養腫瘍細胞株C6グリオーマ細胞から抽出したRNAに対してノーザンブロッティングを以下のようにして行った。3μgのポリ(A)⁺RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターに転写した。このフィルターを42℃で、³²P-dCTPでラベルした4F2hcのcDNA断片を含んだハイブリダイゼーション液で1晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、65℃にて、0.1%SDSを含む0.1×SSCで洗浄した。

20

【0053】

ノーザンブロッティングの結果(図3のb)、あらゆる臓器に2.2kb付近にバンドが検出された。特に、腎、小腸、大腸、胎盤、脾臓において強い発現が検出された。

30

【0054】

実施例2 中性アミノ酸トランスポーターLAT2の特徴づけ

(1) LAT2の輸送活性における4F2hcの役割

ラットLAT2遺伝子cRNAを単独で卵母細胞に発現させた場合と、ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に卵母細胞に発現させた場合のロイシンの取り込みを比較した。

ラットLAT2遺伝子cRNA 17ng、ラット4F2hc遺伝子cRNA 8ng、もしくはラットLAT2遺伝子cRNA 17ng/ラット4F2hc遺伝子cRNA 8ngを、卵母細胞に注入することによって発現させ3日間培養した。

40

【0055】

LAT2遺伝子cRNA、4F2hc遺伝子cRNA、もしくはLAT2遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを注入した卵母細胞について、基質としてロイシンを用い、基質の取り込み実験を金井らの方法(Kanai and Hediger, Nature, 360, 467-471 (1992))に準じて以下のように行った。基質として¹⁴C-ロイシン(50μM)を含むNaイオンを含まない取り込み用溶液(Na⁺-free uptake solution) [100mM塩化コリン、2mM塩化カリウム、1.8mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウム、5mM HEPES、pH7.4]中にて卵母細胞を15分間放置して、細胞内に取り込まれた放射能のカウントで基質の取り込み率を測定した。

【0056】

50

その結果を図4に示す。ロイシンの取り込みは、LAT2のみを発現させた卵母細胞では、対照として水を注入した卵母細胞と同レベルであったが、LAT2と4F2hcを共に発現させた卵母細胞では大きなロイシンの取り込みを示しており、LAT2が機能を発揮するためには、4F2hcが必要であると考えられた。

【0057】

(2) LAT2の輸送活性の塩依存性

ラットLAT2遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において培地に添加する塩の影響を調べた。

ロイシンの取り込み実験は、ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例2(1)に記載の方法に準じて実施した。但し、取り込み用溶液は、ナトリウムイオンの影響をみる場合は、Naイオンを含まない取り込み用溶液(Na⁺-free uptake solution)にかえて、標準取り込み用溶液(uptake solution) [100mM塩化コリンを100mM塩化ナトリウムに変えたもの]を用いた。塩素イオンの影響をみる場合は、標準取り込み用溶液(uptake solution)にかえて、グルコン酸取り込み用溶液(uptake solution) [100mM塩化ナトリウムを100mMグルコン酸ナトリウムに変えたもの]を用いた。

10

【0058】

その結果を図5に示す。細胞外のコリンをナトリウムに変えても、細胞外の塩素イオンをグルコン酸イオンに変えても、ロイシン取り込みに何ら影響を与えなかった。このことから、LAT2はナトリウムイオン及び塩素イオンに非依存的に働くトランスポーターであることが示された。

20

【0059】

(3) LAT2のミカエリス-メンテン動力学試験

広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2のミカエリス-メンテン動力学試験を行った。基質ロイシンの濃度の違いによるロイシン取り込み率の変化を調べることにより、LAT2のミカエリス-メンテン動力学試験を行った。

ロイシンの取り込み実験は、ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例2(1)記載方法に準じて実施した。その結果を図6に示す。

これに基づいてKm値を算出すると、 $119.7 \pm 33.6 \mu\text{M}$ (平均 \pm 標準誤差、n=4)であった。

30

ロイシン以外のLAT2の基質となるアミノ酸においても同様にミカエリス-メンテン動力学試験を行い、Km値とVmax値を算出し、表1に示した。

【0060】

【表1】

基質となる各アミノ酸の K_m 値および V_{max} 値

アミノ酸	K_m	V_{max}^a
	μM	
L-ロイシン	119 ^c	(1.00)
グリシン	265	0.21
L-アラニン	187	1.11
L-セリン	116	0.96
L-スレオニン	68.6	0.93
L-システイン	109	0.83
L-アスパラギン	80.7	0.80
L-グルタミン	151	1.01
L-イソロイシン	96.7	0.79
L-バリン	124	0.86
L-メチオニン	204	0.94
L-フェニルアラニン	45.0	0.68
L-チロシン	35.9	0.68
L-トリプトファン	57.6	0.89
L-ヒスチジン	181	1.04

^a 各々のアミノ酸の V_{max} 値は、ロイシンの V_{max} 値に対する比率で示した。

表1は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるアミノ酸取り込みの K_m 値と V_{max} 値をまとめて示したものである。表1中の各々の V_{max} 値は、ロイシンの V_{max} 値を1.00とした場合の比率で示されている。

【0061】

(4) LAT2の基質選択性(アミノ酸及びその類似物質添加による阻害実験)

ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞によるロイシンの取り込み実験において、系への各種アミノ酸及びその類似物質添加の影響を調べた。

ロイシンの取り込み実験は、ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例2(1)記載方法に準じて実施した。但し、Naイオンを含まない取り込み用溶液(Na⁺-free uptake solution)を用い、5mMの各種化合物(非標識)の存在下及び非存在下で、¹⁴C-ロイシン(50 μ M)の取り込みを測定した。

【0062】

その結果を図7に示す。グリシンおよび各種の中性L-アミノ酸で、cis-阻害効果が観察された。特に、アラニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンはLAT2を介した¹⁴C-ロイシンの取り込みを強く阻害した。

【0063】

同様な方法により、D-アミノ酸を検討した。結果を図8に示す。D-アミノ酸のうち、

10

20

30

40

50

D - セリン、D - システイン、および D - アスパラギンは、LAT2 を介する ^{14}C - ロイシンの取り込みを中等度に阻害した。

【0064】

同様な方法により、アミノ酸類似物質を検討した。結果を図9及び図10に示す。図9中における、BCHは2-アミノ-2-ノルボルナン-カルボン酸(2-amino-2-norbornane-carboxylic acid)を示し、AIBは2-アミノイソ酪酸(2-aminoisobutyric acid)を示し、MeAIBは-(メチルアミノ)イソ酪酸(-(methylamino)isobutyric acid)を示す。

標準アミノ酸以外の物質でも、中性アミノ酸取り込み阻害薬として知られていたBCHもLAT2を介した ^{14}C -ロイシンの取り込みを阻害した。また、アミノ酸類似薬物であるL-DOPA(パーキンソン病治療薬)も、LAT2を介した ^{14}C -ロイシンの取り込みを阻害した(図10参照)。酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸は、LAT1を介した ^{14}C -ロイシンの取り込みに影響を与えなかった(図7参照)。

【0065】

(5) LAT2の基質選択性(各種アミノ酸及びその類似物質を基質とする取り込み試験)

各種アミノ酸及びその類似物質を基質として、LAT2による取り込みを調べた。

各種アミノ酸及びその類似物質の取り込み実験は、ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例2(1)記載方法に準じて実施した。但し、基質としては、 ^{14}C -ロイシンに変えて、放射能ラベルされた各種の化合物を用いた。

【0066】

その結果を図11に示す。グリシン(^{14}C 化合物)、L-アラニン(^{14}C 化合物)、L-セリン(^{14}C 化合物)、L-スレオニン(^{14}C 化合物)、L-システイン(^{14}C 化合物)、L-アスパラギン(^{14}C 化合物)、L-グルタミン(^{14}C 化合物)、L-メチオニン(^{14}C 化合物)、L-ロイシン(^{14}C 化合物)、L-イソロイシン(^{14}C 化合物)、L-バリン(^{14}C 化合物)、L-フェニルアラニン(^{14}C 化合物)、L-チロシン(^{14}C 化合物)、L-トリプトファン(^{14}C 化合物)、L-ヒスチジン(^{14}C 化合物)を基質とした場合に、卵母細胞への取り込みが認められた。

L-アスパラギン酸(^{14}C 化合物)、L-グルタミン酸(^{14}C 化合物)、L-リジン(^{14}C 化合物)、L-アルギニン(^{14}C 化合物)、L-プロリン(^{14}C 化合物)、L-シスチン(^{14}C 化合物)、D-ロイシン(^{14}C 化合物)、D-フェニルアラニン(^{14}C 化合物)、D-セリン(^{14}C 化合物)に関しては、有意な取り込みは認められなかった。

【0067】

(6) LAT2の輸送活性のpH依存性

ラットLAT2遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験においてpHの影響を調べた。

ロイシンの取り込み実験は、ラットLAT2遺伝子cRNAとラット4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を用い、前記実施例2(1)に記載の方法に準じて実施した。

その結果を図12に示す。pH6.25においてロイシン取り込みが最大となり、LAT2の機能はpHに依存することが明らかとなった。図12中における*印は、有意差($p < 0.05$)があることを示す。

【0068】

さらに、pH6.25とpH7.5においてロイシン取り込みの濃度依存性を比較した。結果を図13に示す。図13中の○はpH7.5の場合における、また△はpH6.25の場合におけるロイシン取り込みの濃度依存性を示す。

pHを下げることにより、 V_{max} は変化せず K_m が低下する(pH7.5における K_m は $96.6\ \mu\text{M}$ 、 V_{max} は $6.7\ \text{pmol}/\text{oocyte}/\text{min}$ であり、pH6.2

10

20

30

40

50

5における K_m は $57.2 \mu M$ 、 V_{max} は $7.0 \text{ pmol / oocyte / min}$ 、すなわち親和性が増加することによりロイシン取り込みが増加することが明らかとなった。

【0069】

(7) LAT2を介するアミノ酸の放出試験

ラットLAT2遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞において、前負荷した ^{14}C -ロイシンのLAT2を介する放出を調べた。

ラットLAT2遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞を $150 \mu M$ の ^{14}C -ロイシンを含む Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)中に30分間放置することにより ^{14}C -ロイシンを取り込ませ、氷冷のロイシンを含まない Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)で洗浄した後、室温(18 ~ 22)のロイシン(100 μM あるいは1 mM)添加あるいは未添加の Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)に移し、細胞外に放出される ^{14}C -ロイシンの量を測定した。また、ラットLAT1遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを共に注入した卵母細胞[Kanai, et al., J. Biol. Chem., 273, 23629 (1998)]を $20 \mu M$ の ^{14}C -ロイシンを含む Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)中に30分間放置することにより ^{14}C -ロイシンを取り込ませ、氷冷のロイシンを含まない Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)で洗浄した後、室温(18 ~ 22)のロイシン(100 μM)添加あるいは未添加の Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)に移し、細胞外に放出される ^{14}C -ロイシンの量を測定した。

【0070】

その結果を図14(LAT2の場合)及び図15(LAT1の場合)に示す。図14の印は Na^+ イオンを含まない取り込み用溶液(Na^+ -free uptake solution)へのロイシン未添加の場合を、印はロイシン100 μM 添加の場合を、印はロイシン1 mM添加の場合を示す。図15の印はロイシン未添加の場合を、印はロイシン100 μM 添加の場合を示す。

交換輸送型トランスポーターであるLAT1においては細胞外にロイシンを添加した場合のみロイシンの放出が観察されたが(図15参照)、LAT2においては細胞外にロイシンを添加するしないにかかわらずロイシンの放出が生じることが明らかになり、LAT2は促進拡散型のトランスポーターであることが示された(図14参照)。

【0071】

実施例3 広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターのヒトcDNAのクローニング及び機能の確認

(1) ヒトLAT2のcDNAの単離とcRNAの調製

cDNAライブラリーはヒト腎由来ポリ(A)⁺RNA(クロンテック社から購入)から、cDNA合成用キット(商品名: Superscript Choice System、ギブコ社製)を使用して作製し、ファージベクター ZipLox(ギブコ社製)の制限酵素EcoRI切断部位に組み込んだ。実施例1(2)で使用したプローブを用いて、ヒト腎cDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37のハイブリダイゼーション用溶液中一晩行い、フィルター膜は、37で $0.1 \times SSC / 0.1\% SDS$ で洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、 $5 \times SSC$ 、3xデンハード液(Denhardt's液)0.2% SDS、10%硫酸デキストラン、50%ホルムアミド、0.01% Antiformin B(商品名、シグマ社)(消泡剤)、0.2 mg/mlサーモン精子変性DNA、2.5 mMピロリン酸ナトリウム、25 mM MESを含むpH 6.5の緩衝液を用いた。cDNAを組み込んだ ZipLoxファージのcDNA部分を、プラスミドpZL1に組み込んだ。

【0072】

得られたクローンすなわち、ヒトLAT2のcDNAを含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマーを用いてダイターミネーターサイクルシーケンシング法(Ap

10

20

30

40

50

plied Biosystems社)により、cDNAの塩基配列を決定した。

得られたヒトLAT2の塩基配列を後記配列表の配列番号5に、そのアミノ酸配列を配列番号6にそれぞれ示した。

上記より得られたヒトLAT2のcDNAを含むプラスミドから、SP6 RNAポリメラーゼを用いて、cRNA(cDNAに相補的なRNA)を調製した。

【0073】

(2) ヒト4F2hcのcDNAの単離とcRNAの調製

cDNAライブラリーはヒト胎盤由来ポリ(A)⁺RNA(Clontech社から購入)から、cDNA合成用キット(商品名: Superscript Choice System、ギブコ社製)を使用して作成し、ファージベクター ZipLox(ギブコ社製)の制限酵素EcoRI切断部位に組み込んだ。PCR法にて、ラット4F2hc遺伝子[Broer, et al., Biochem. J., 312, 863 (1995)]の第135 - 580番目の塩基に相当するセグメントを増幅し、これを³²P-dCTPでラベルしてプローブとして用いて、ヒト胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37のハイブリダイゼーション用溶液中一晩行い、フィルター膜は、37で0.1×SSC/0.1%SDSで洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5×SSC、3×デンハード液(Denhardt's液)0.2%SDS、10%硫酸デキストラン、50%ホルムアミド、0.01%Antiform B(商品名、シグマ社)(消泡剤)、0.2mg/mlサーモン精子変性DNA、2.5mMピロリン酸ナトリウム、25mMMEsを含むpH6.5の緩衝液を用いた。cDNAを組み込んだZipLoxファージのcDNA部分を、プラスミドpZL1に組み換えた。

【0074】

得られたクローンすなわち、ヒト4F2hcのcDNAを含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマーを用いてダイターミネーターサイクルシーケンシング法(Applied Biosystems社)により、cDNAの塩基配列を決定した。これにより、クローニングしたcDNAがヒト4F2hc遺伝子のものであることが確認できた。

得られたヒト4F2hcの塩基配列を後記配列表の配列番号7に、アミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示した。

上記より得られたヒト4F2hcのcDNAを含むプラスミドから、T7RNAポリメラーゼを用いてcRNA(cDNAに相補的なRNA)を調製した。

【0075】

(3) ヒトLAT2の機能の確認

ヒトLAT2遺伝子cRNAを単独で卵母細胞に発現させた場合と、ヒトLAT2遺伝子cRNAとヒト4F2hc遺伝子cRNAを共に卵母細胞に発現させた場合のロイシンの取り込みを比較した。

ヒトLAT2遺伝子cRNA 17ng、ヒト4F2hc遺伝子cRNA 8ng、もしくはヒトLAT2遺伝子cRNA 17ng/ヒト4F2hc遺伝子cRNA 8ngを、卵母細胞に注入することによって発現させ3日間培養した。

LAT2遺伝子cRNA、4F2hc遺伝子cRNA、もしくはLAT2遺伝子cRNAと4F2hc遺伝子cRNAを注入した卵母細胞について、基質としてロイシンを用い、基質の取り込み実験を実施例2(1)に準じて行った。

【0076】

その結果、ロイシンの取り込みは、ラットと同様、LAT2のみを発現させた卵母細胞では、対照として水を注入した卵母細胞と同レベルであったが、LAT2と4F2hcを共に発現させた卵母細胞では大きなロイシンの取り込みが観察された。よって、ヒトLAT2もラットLAT2と同様、4F2hcと共存することにより始めて機能を発揮することが示された。

【0077】

【発明の効果】

本発明の広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスポーターLAT2およびその遺伝

10

20

30

40

50

子は、薬物や毒物の細胞膜通過や血液・組織関門通過のインビトロでの解析など、薬物動態や毒物動態の分子レベルでの解明、および細胞膜や血液・組織関門を効率良く透過する薬物や、毒物の透過を抑制する薬物の開発に有用と考えられる。さらに、腫瘍細胞型トランスポーターでLAT1の抑制薬に細胞増殖抑制効果があることから、LAT1を抑制し、非腫瘍細胞型トランスポーターLAT2を抑制しない化合物を見い出すことにより、副作用の少ない抗腫瘍薬を開発し得ると考えられる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

10

<120> A Neutral amino acid transportor with broad substrate selectivity and its genes

<130> PA900409

20

<160> 8

<210> 1

<211> 4117

<212> DNA

<213> Rat

<400> 1

30

9 18 27 36 45
gcc acc ctg ccc tca cag atg gaa cga tct gcg gcg tga gca cgg

54 63 72 81 90
agc tcg gag cgg aca agg gcg aga agg ggc gac cgc agc agg tgg

40

99 108 117 126 135
aaa cct gat cgc gag ccg gcg agc gag aag aaa gta cct gag cac

50

144 153 162 171 180
cgc tcc tcc tcc gcc ctc tgc gct aac gag aac tac ttt tac cct

189 198 207 216 225
cgt ggt aaa aga gac tta agg gaa ggt gga ggc gat ctg ttt cgt

10

234 243 252 261 270
tag gag ggc tgc agg gaa att ctg acc aga gca agc cgc cgc ccg

279 288 297 306 315
gta cac cga gca gag cca tcc tgg gct tct gaa gat aaa cgc ttt

20

324 333 342 351 369
ccg gag aat tcc agc tgg agt cgc tgg tac agt tct att ttt gta

369 378 387 396 405
ttt aga tat ata tgt tct ttg cct tcc att taa aaa gca cgg ccc

30

414 423 432 441 450
ttg ttt gtt agc agt gac acg tgt gac tct cgt ttg ctg tca ctt

40

459 468 477 486 495

tta gag cct agg agc gct cgc tct ccg ttt ctg aaa agg gcg ttc

504 513 522 531 540

taa ttg gaa act tgt ttt tcc gcg tat ctc tgc att tat acg cac

10

549 558 567 576 585

gag cgt tta gaa aga gac tgc tct ttt tag ctt ttg gtg gtc gga

594 603 612 621 630

acc cta cgg aga aag atg gaa aag gga acc cga cag cga aac aac

Met Glu Lys Gly Thr Arg Gln Arg Asn Asn

20

639 648 657 666 675

acc gcg aag aac cac ccg gac cgc gga tct gac acc agc cct gag

Thr Ala Lys Asn His Pro Asp Arg Gly Ser Asp Thr Ser Pro Glu

684 696 702 711 720

gcc gag gct agc tcg gga ggg ggc gga gta gcc ctg aag aaa gag

Ala Glu Ala Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Leu Lys Lys Glu

30

729 738 747 756 765

atc gga ttg gtc agc gcc tgt ggt atc att gta ggg aac atc att

Ile Gly Leu Val Ser Ala Cys Gly Ile Ile Val Gly Asn Ile Ile

774 783 792 801 810

ggc tcc gga atc ttc gtc tca cca aag ggt gtg ctg gag aac gct

40

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

819 828 837 846 855

ggc tcg gtg ggc ctt gct ctc att gtc tgg atc gtg acg ggt gtc
Gly Ser Val Gly Leu Ala Leu Ile Val Trp Ile Val Thr Gly Val

864 973 882 891 900

atc acg gct gtg gga gct ctc tgc tat gct gaa cta ggt gtc acc
Ile Thr Ala Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Val Thr

10

909 918 927 936 945

atc cct aaa tct gga ggt gat tac tcc tat gtc aag gac atc ttc
Ile Pro Lys Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Tyr Val Lys Asp Ile Phe

20

954 963 972 981 990

gga gga ctg gct ggg ttc ctg cgg cta tgg att gct gtg ctg gtg
Gly Gly Leu Ala Gly Phe Leu Arg Leu Trp Ile Ala Val Leu Val

999 1008 1017 1026 1035

atc tac ccc acc aac caa gct gtc atc gcc ctc acc ttc tcc aac
Ile Tyr Pro Thr Asn Gln Ala Val Ile Ala Leu Thr Phe Ser Asn

30

1044 1053 1062 1071 1080

tat gtg ctg cag cca ctc ttc cct acc tgc ttc ccc cct gag tcc
Tyr Val Leu Gln Pro Leu Phe Pro Thr Cys Phe Pro Pro Glu Ser

1089 1098 1107 1116 1125

ggc ctg cga ctc ctg gct gcc atc tgc ctg ttg ctg ctc aca tgg
Gly Leu Arg Leu Leu Ala Ala Ile Cys Leu Leu Leu Leu Thr Trp

40

1134 1143 1152 1161 1170
 gtc aac tgc tcc agt gtc cga tgg gcc acc cgg gtt caa gat atc
 Val Asn Cys Ser Ser Val Arg Trp Ala Thr Arg Val Gln Asp Ile

1179 1188 1197 1206 1215
 ttc acg gct ggg aag ctc ctg gcc ctg gct ctg atc atc atc atg
 Phe Thr Ala Gly Lys Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile Ile Ile Met

10

1224 1233 1242 1251 1260
 ggt gtt gtg cag ata tgc aaa gga gaa ttc ttt tgg ctg gag cca
 Gly Val Val Gln Ile Cys Lys Gly Glu Phe Phe Trp Leu Glu Pro

20

1269 1278 1287 1296 1305
 aag aat gca ttt gag aat ttc caa gaa cca gac atc ggc ctc gtc
 Lys Asn Ala Phe Glu Asn Phe Gln Glu Pro Asp Ile Gly Leu Val

1314 1323 1332 1341 1350
 gct ctg gct ttc ctc cag ggc tcc ttt gcc tac gga ggc tgg aac
 Ala Leu Ala Phe Leu Gln Gly Ser Phe Ala Tyr Gly Gly Trp Asn

30

1359 1368 1377 1386 1395
 ttc ctt aat tac gtg acg gag gaa ctt gtg gat cct tac aag aac
 Phe Leu Asn Tyr Val Thr Glu Glu Leu Val Asp Pro Tyr Lys Asn

1404 1413 1422 1431 1440
 ctt cct aga gcc atc ttc att tcc atc cca ctg gtc aca ttt gtg
 Leu Pro Arg Ala Ile Phe Ile Ser Ile Pro Leu Val Thr Phe Val

40

1449 1458 1467 1476 1485
 tac gtc ttt gct aat atc gcc tat gtc act gca atg tcc ccc cag
 Tyr Val Phe Ala Asn Ile Ala Tyr Val Thr Ala Met Ser Pro Gln

1494 1503 1512 1521 1530
 gag ctg ctg gcc tca aat gca gtc gct gtg act ttt gga gag aag
 Glu Leu Leu Ala Ser Asn Ala Val Ala Val Thr Phe Gly Glu Lys

10

1539 1548 1557 1566 1575
 ctc cta ggg gtc atg gcc tgg atc atg ccc att tcc gtc gcc ctg
 Leu Leu Gly Val Met Ala Trp Ile Met Pro Ile Ser Val Ala Leu

1584 1593 1602 1611 1620
 tcc aca ttt ggt gga gtc aac ggt tcc ctc ttc acc tcc tcc cgg
 Ser Thr Phe Gly Gly Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg

20

1629 1638 1647 1656 1665
 ctg ttc ttt gct gga gcc aga gaa ggc cac ctt ccc agc gtg tta
 Leu Phe Phe Ala Gly Ala Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Val Leu

30

1674 1683 1692 1701 1710
 gcc atg atc cac gtg aag cgc tgc acc cca atc cca gca ctg ctc
 Ala Met Ile His Val Lys Arg Cys Thr Pro Ile Pro Ala Leu Leu

1719 1728 1737 1746 1755
 ttc aca tgc ctc tcc acc ctg ctg atg ctg gtc acc agt gac atg
 Phe Thr Cys Leu Ser Thr Leu Leu Met Leu Val Thr Ser Asp Met

40

1764 1773 1782 1791 1800
 tat aca ctc atc aac tac gtg ggc ttc atc aac tac ctc ttc tac
 Tyr Thr Leu Ile Asn Tyr Val Gly Phe Ile Asn Tyr Leu Phe Tyr

1809 1818 1827 1836 1845
 ggg gtt aca gtt gca gga cag ata gtc ctt cgc tgg aag aag cct
 Gly Val Thr Val Ala Gly Gln Ile Val Leu Arg Trp Lys Lys Pro

10

1854 1863 1872 1881 1890
 gac atc ccc cgc ccc atc aag atc agc ctg ctg ttt ccc atc atc
 Asp Ile Pro Arg Pro Ile Lys Ile Ser Leu Leu Phe Pro Ile Ile

1899 1908 1917 1926 1935
 tac ttg ctg ttc tgg gcc ttc ctg ctg att ttc agc ctg tgg tca
 Tyr Leu Leu Phe Trp Ala Phe Leu Leu Ile Phe Ser Leu Trp Ser

20

1944 1953 1962 1971 1980
 gag cca gta gta tgc ggc att ggc ctt gcc atc atg ctg acg ggt
 Glu Pro Val Val Cys Gly Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Thr Gly

1989 1998 2007 2016 2025
 gtt cct gta tac ttc ctg ggt gtc tac tgg caa cac aaa ccc aag
 Val Pro Val Tyr Phe Leu Gly Val Tyr Trp Gln His Lys Pro Lys

30

2034 2043 2052 2061 2070
 tgt ttc aat gac ttc att gag tcc cta act cta gtg agt cag aag
 Cys Phe Asn Asp Phe Ile Glu Ser Leu Thr Leu Val Ser Gln Lys

40

2079 2088 2097 2106 2115

atg tgt gtg gtc gtg tat ccc cag gag ggg gac tcg ggg acc gag
 Met Cys Val Val Val Tyr Pro Gln Glu Gly Asp Ser Gly Thr Glu

2124 2133 2142 2151 2160
 gaa aca att gat gac gta gag gaa caa cac aag cct atc ttc cag
 Glu Thr Ile Asp Asp Val Glu Glu Gln His Lys Pro Ile Phe Gln

10

2169 2178 2189 2196 2205
 cct act cct gtc aag gac cca gac tcg gag gag cag ccc tga aga
 Pro Thr Pro Val Lys Asp Pro Asp Ser Glu Glu Gln Pro ***

2214 2223 2232 2241 2250
 ctg cca gcc ttt aac tgg cca ccc ccc ctt cat cct ttc tgc cct

20

2259 2268 2277 2286 2295
 gta tcc ctg cct agg tcc ccc caa cac aca cac aca cac aca cac

2304 2313 2322 2331 2340
 aca cac act cac aca cac aca cac aca cac aca cac aca cac aca

30

2349 2358 2367 2376 2385
 cac aca ctt ctg tta ggc agg ggc aag acc tgg gtg tcc aca gcg

2394 2403 2412 2421 2430
 aga cat tct aaa caa aga ccc tga cct ttg tac cca aag aac ctg

40

2439 2448 2457 2466 2475
ctt cca gca cca agg ccc atg gtc aag gtc agt gca ccg gga cct

2484 2493 2502 2511 2520
gca cac acc cta agg ttt aga gga gag tgg agg tgc cat tgg tac

10

2529 2538 2547 2556 2565
cct aca ggg cct ttc ctc ctg ggc cca tgc tet tta ggt gcc tet

20

2574 2583 2592 2601 2610
aag aaa cct ggg ttc act act gtt tet tet ccc taa ccc tga gcc

2619 2628 2637 2646 2655
cag gca aag cct cca ctg gaa aaa agg tag cat ccc cag tga gtt

30

2664 2673 2682 2691 2700
agt tgg gga aga caa ctc aaa ttg tca cca tta aca gtc agc tgg

2709 2718 2727 2736 2745
gga gac tca gat gtg gct tca ttc acc agg gag cca aaa ggc aga

40

2754 2763 2772 2781 2790
ggg ctc act tct ctt tgc ctt ctg cac tct gta cta cca cgg ctc

2799 2808 2817 2826 2835
cac tgc cca gcc tgc acc tga gac cca caa agt tcc ctt tca gga

10

2844 2853 2862 2871 2880
tgc ctc ttc ccc aca gag cta agg acc aag aag gag gac tgc ccc

2889 2898 2907 2916 2925
cct ccc ccc cag ctc tca gcc agg ctt gtg gaa tat ata ggg aaa

20

2934 2943 2952 2961 2970
ggc tca gac tgc aga agc caa gcc ctg ccc cac ccc tgc ccc tgc

30

2979 2988 2997 3006 3015
ctc ctg tcc tct tgt ggt gcc aaa gct ccc tga agc aga aaa act

3024 3033 3042 3051 3060
tct tat att cag tct aac aga cct atc tct ctt aag ggc aaa gcg

40

3069 3078 3087 3096 3105
act cag ctc ctc cct gtc ccc ctg tgt gaa aga aag agc agt agc

3114 3123 3132 3141 3150
cct ctt ctc cca gca gct ctg ccc act cac aga tct gcc tgc cgt

10

3159 3168 3177 3186 3195
cct cct ctt tcc tcc cct gga cct tgg ctc aag gac cag gta tga

3204 3213 3222 3231 3240
agg atc ccc caa gtc ctt cag gcc tga agt aag agt caa ccc agc

20

3249 3258 3267 3276 3285
ctt aag tca tct ccc atc caa gaa ctg ggt cta aaa cgt tcc cca

3294 3303 3312 3321 3330
ttt cta acc ttc aag aca gac ctg atg tta aat cct tcc ctg gaa

30

3339 3348 3357 3366 3375
gga agg gtg ctt tcc ccc ttc cca ggg gtg ctc atc cct cac cct

40

3384 3393 3402 3411 3420

ggg gag acc atg ttg gtg agg tag ggg gag aat gtt ttc tga agg

3429 3438 3447 3456 3465
cca gtt cct ctc ccc tcc tcc agc tca aaa caa tct cac cgt cct

10

3474 3483 3492 3501 3510
cct gcc atc cca ttt ggg aca aga tga cag gat ggc act cac ttt

3519 3528 3537 3546 3555
gga gac ctc aga aaa gcc cct tcc agg aga gct gct ggt ctg tgc

20

3564 3573 3582 3591 3600
tgt aca gga agg gtg aca gca tct gcc ttc tcc tgg cag cct cca

3609 3618 3627 3636 3645
cac ctg ctg tgc tta gga cag gat cct ttg atc aca aag cag aac

30

3654 3663 3672 3681 3690
cct aat cct gtt cca tct act caa act gga aca ccc agg ggc ctt

3699 3708 3717 3726 3735
ttc ctg gtc tcc caa ctt ccc acc tag ctc acc cta ccc cta act

40

3744 3753 3762 3771 3780
ggt gag agg ctg agt ttg ggc tga att gtg gcc ctt cag aat aca

3789 3798 3807 3816 3825
gtc cag gca ggc tgt ggg gcc tct ggg ggg gcc agg gac cac ccc

10

3834 3843 3852 3861 3870
tct acc cct ttc ctc cca ttc ctt cag cct gca cct gcc cct cct

20

3879 3888 3897 3906 3915
tga att att gtc tct ctc tct ctt ttt ttt ttt aag tgg atg cct

3924 3933 3942 3951 3960
tac ttt ttg gat aac tat ttt tga agc tgg tat ttc tat ttc ttt

30

3969 3978 3987 3996 4005
tgg att ttt taa tgt atg gtg gtt tgg ggg cag agc tag aac ctt

4014 4023 4032 4041 4050
aat cgt ctg tcg ctg agt tca ttt agg ttt taa att tta ttg gtt

40

4059 4068 4077 4086 4095
 tgt ttt atg gag tat ttt ctt ttc tcg taa taa aat ttt aaa tgg

4104 4113
 aaa tga aaa aaa aaa aaa a

10

<210> 2

<211> 533

<212> PRT

<213> Rat

<400> 2

20

Met Glu Lys Gly Thr Arg Gln Arg Asn Asn Thr Ala Lys Asn His 15

Pro Asp Arg Gly Ser Asp Thr Ser Pro Glu Ala Glu Ala Ser Ser 30

Gly Gly Gly Gly Val Ala Leu Lys Lys Glu Ile Gly Leu Val Ser 45

30

Ala Cys Gly Ile Ile Val Gly Asn Ile Ile Gly Ser Gly Ile Phe 60

Val Ser Pro Lys Gly Val Leu Glu Asn Ala Gly Ser Val Gly Leu 75

Ala Leu Ile Val Trp Ile Val Thr Gly Val Ile Thr Ala Val Gly 90

Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Val Thr Ile Pro Lys Ser Gly 105

40

Gly Asp Tyr Ser Tyr Val Lys Asp Ile Phe Gly Gly Leu Ala Gly	120	
Phe Leu Arg Leu Trp Ile Ala Val Leu Val Ile Tyr Pro Thr Asn	135	
Gln Ala Val Ile Ala Leu Thr Phe Ser Asn Tyr Val Leu Gln Pro	150	
Leu Phe Pro Thr Cys Phe Pro Pro Glu Ser Gly Leu Arg Leu Leu	165	10
Ala Ala Ile Cys Leu Leu Leu Leu Thr Trp Val Asn Cys Ser Ser	180	
Val Arg Trp Ala Thr Arg Val Gln Asp Ile Phe Thr Ala Gly Lys	195	
Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile Ile Ile Met Gly Val Val Gln Ile	210	20
Cys Lys Gly Glu Phe Phe Trp Leu Glu Pro Lys Asn Ala Phe Glu	225	
Asn Phe Gln Glu Pro Asp Ile Gly Leu Val Ala Leu Ala Phe Leu	240	
Gln Gly Ser Phe Ala Tyr Gly Gly Trp Asn Phe Leu Asn Tyr Val	255	
Thr Glu Glu Leu Val Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Arg Ala Ile	270	30
Phe Ile Ser Ile Pro Leu Val Thr Phe Val Tyr Val Phe Ala Asn	285	
Ile Ala Tyr Val Thr Ala Met Ser Pro Gln Glu Leu Leu Ala Ser	300	
Asn Ala Val Ala Val Thr Phe Gly Glu Lys Leu Leu Gly Val Met	315	40
Ala Trp Ile Met Pro Ile Ser Val Ala Leu Ser Thr Phe Gly Gly	330	

Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu Phe Phe Ala Gly	345	
Ala Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Val Leu Ala Met Ile His Val	360	
Lys Arg Cys Thr Pro Ile Pro Ala Leu Leu Phe Thr Cys Leu Ser	375	
Thr Leu Leu Met Leu Val Thr Ser Asp Met Tyr Thr Leu Ile Asn	390	10
Tyr Val Gly Phe Ile Asn Tyr Leu Phe Tyr Gly Val Thr Val Ala	405	
Gly Gln Ile Val Leu Arg Trp Lys Lys Pro Asp Ile Pro Arg Pro	420	
Ile Lys Ile Ser Leu Leu Phe Pro Ile Ile Tyr Leu Leu Phe Trp	435	20
Ala Phe Leu Leu Ile Phe Ser Leu Trp Ser Glu Pro Val Val Cys	450	
Gly Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Thr Gly Val Pro Val Tyr Phe	465	
Leu Gly Val Tyr Trp Gln His Lys Pro Lys Cys Phe Asn Asp Phe	480	30
Ile Glu Ser Leu Thr Leu Val Ser Gln Lys Met Cys Val Val Val	495	
Tyr Pro Gln Glu Gly Asp Ser Gly Thr Glu Glu Thr Ile Asp Asp	510	
Val Glu Glu Gln His Lys Pro Ile Phe Gln Pro Thr Pro Val Lys	525	
Asp Pro Asp Ser Glu Glu Gln Pro ***	533	40

<210> 3
<211> 1940
<212> DNA
<213> Rat
<400> 3

10

1

c

10 19 28 37 46
aca acc acc aaa tat atc cac acg ttg acg tga ttt ctt gcc ctt

20

55 64 73 82 91
act cac act aag ccc gcg tgt cga tcc atc tct atg gat ccc gaa

100 109 118 127 136
cct act gaa cac tcc acc ggc ggc ggc tgc gtt ccc cgc cag ccg

30

145 154 163 172 181
ccc agc gcg cag acg ggg ctt gat gtc cag gtt gtc agc gca gct

190 199 208 217 226
ggc gac tca ggt acc atg agc cag gac acc gaa gtg gac atg aaa

40

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys

235 244 253 262 271
gat gtg gag ctg aac gag ctg gaa ccg gag aag cag cct atg aat
Asp Val Glu Leu Asn Glu Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn

280 289 298 307 316
gca gcg gac ggg gcg gca gcc ggg gag aag aac ggt ctg gtg aag
Ala Ala Asp Gly Ala Ala Ala Gly Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys

10

325 334 343 352 361
att aag gtg gcc gaa gac gag gcg gaa gcc ggg gtc aag ttc aca
Ile Lys Val Ala Glu Asp Glu Ala Glu Ala Gly Val Lys Phe Thr

20

370 379 388 397 406
ggc tta tcc aag gag gag cta ttg aag gta gct ggc agc ccg ggc
Gly Leu Ser Lys Glu Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly

415 424 433 442 451
tgg gtg cgc acc cgc tgg gcg ctg ctg ctg ctc ttc tgg ctc ggt
Trp Val Arg Thr Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly

30

460 469 478 487 496
tgg ctg ggt atg ctg gcg ggc gcc gtg gtt atc atc gtt cgg gcg
Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala

505 514 523 532 541
cca cgc tgc cgt gag ctg ccg gta cag aga tgg tgg cac aag ggc
Pro Arg Cys Arg Glu Leu Pro Val Gln Arg Trp Trp His Lys Gly

40

550 559 568 577 586
 gcc ctc tac cgc atc ggc gac ctt cag gcc ttc gta ggc ccg gaa
 Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp Leu Gln Ala Phe Val Gly Pro Glu

595 604 613 622 631
 gcg aga ggc ata gct ggt ctg aag aac cat ctg gag tac ttg agc
 Ala Arg Gly Ile Ala Gly Leu Lys Asn His Leu Glu Tyr Leu Ser

10

640 649 658 667 676
 acc ctg aag gtg aag ggc cta gtt ttg ggc cca att cac aag aac
 Thr Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly Pro Ile His Lys Asn

685 697 703 712 721
 cag aag gat gaa gtc aat gaa acc gac ttg aaa cag att gat ccc
 Gln Lys Asp Glu Val Asn Glu Thr Asp Leu Lys Gln Ile Asp Pro

20

730 739 748 757 766
 gat tta ggc tcc cag gaa gat ttt aaa gac ctt cta caa agt gcc
 Asp Leu Gly Ser Gln Glu Asp Phe Lys Asp Leu Leu Gln Ser Ala

30

775 784 793 802 811
 aag aaa aag agc att cac atc att ttg gac ctc act ccc aac tat
 Lys Lys Lys Ser Ile His Ile Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn Tyr

820 821 838 847 856
 aag ggc cag aat gca tgg ttc ctc cct cct cag gct gac att gta
 Lys Gly Gln Asn Ala Trp Phe Leu Pro Pro Gln Ala Asp Ile Val

40

865 974 883 892 901
 gcc acc aaa atg aag gag gct ctg agt tet tgg ttg cag gac ggt
 Ala Thr Lys Met Lys Glu Ala Leu Ser Ser Trp Leu Gln Asp Gly

910 919 928 937 946
 gtg gat ggg ttc caa gtt cgg gat gtg gga aag ctg gcg aat gca
 Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Val Gly Lys Leu Ala Asn Ala

10

955 964 973 982 991
 tcc ttg tac ttg gct gag tgg cag aat atc acc aag aac ttc agt
 Ser Leu Tyr Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Asn Phe Ser

1000 1009 1018 1027 1036
 gag gac agg ctt ttg att gca ggg acc gcg tcc tet gac ctg caa
 Glu Asp Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Ala Ser Ser Asp Leu Gln

20

1045 1054 1063 1072 1081
 caa att gtc aac ata ctt gaa tcc acc agc gat ctg ctg ctg acc
 Gln Ile Val Asn Ile Leu Glu Ser Thr Ser Asp Leu Leu Leu Thr

1090 1099 1108 1117 1126
 agc tca tac ctg tca cag ccc gtt ttc act ggg gag cat gca gaa
 Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Pro Val Phe Thr Gly Glu His Ala Glu

30

1135 1144 1153 1162 1171
 ctc cta gtg att aag tat ttg aat gcc act ggc agc cgc tgg tgc
 Leu Leu Val Ile Lys Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Ser Arg Trp Cys

40

1180 1189 1198 1207 1216

agc tgg agt gtg tcg cag gca gga ctc ctg aca tcc ttt ata ccg
 Ser Trp Ser Val Ser Gln Ala Gly Leu Leu Thr Ser Phe Ile Pro

1225 1234 1243 1252 1261
 gct cag ttt ctc cga ctc tac cag ctg ctg ctc ttc act ctg cca
 Ala Gln Phe Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Leu Leu Phe Thr Leu Pro

10

1270 1279 1288 1297 1306
 gga act cct gtt ttc agc tat ggg gat gag ctt ggc ctt cag gca
 Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly Asp Glu Leu Gly Leu Gln Ala

1315 1324 1333 1342 1351
 gtt gcc ctt cct gga cag cct atg gag gct cca ttc atg ctg tgg
 Val Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu Ala Pro Phe Met Leu Trp

20

1360 1369 1378 1387 1396
 aat gag tct agc aac tcc caa acc tca agt cct gta agc ctc aac
 Asn Glu Ser Ser Asn Ser Gln Thr Ser Ser Pro Val Ser Leu Asn

1405 1414 1423 1432 1441
 atg aca gig aag ggc caa aat gaa gac ccc ggc tcc ctc ctc acc
 Met Thr Val Lys Gly Gln Asn Glu Asp Pro Gly Ser Leu Leu Thr

30

1450 1459 1468 1477 1486
 cag ttc cgg cga ctg agt gac ctc cgt ggt aag gag cgc tct ctg
 Gln Phe Arg Arg Leu Ser Asp Leu Arg Gly Lys Glu Arg Ser Leu

1495 1504 1513 1522 1531
 tta cac ggt gac ttt gat gca ctg tct tcc tca tct ggc ctc ttc

40

Leu His Gly Asp Phe Asp Ala Leu Ser Ser Ser Ser Gly Leu Phe

1540 1549 1558 1567 1576
 tcc tac gtc cgc cac tgg gac cag aat gag cgt tac ctg gtg gtg
 Ser Tyr Val Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val

1585 1594 1603 1612 1621
 ctc aac ttc cag gat gtg ggc ctg tca gcc agg gta gga gcc tcc
 Leu Asn Phe Gln Asp Val Gly Leu Ser Ala Arg Val Gly Ala Ser

10

1630 1639 1648 1657 1666
 aac ctc cct gct ggc ata agc ctg cca gcc agt gct aac ctt ttg
 Asn Leu Pro Ala Gly Ile Ser Leu Pro Ala Ser Ala Asn Leu Leu

20

1675 1684 1693 1702 1711
 ctt agt act gac agc acc cgg cta agc cgt gag gag ggc acc tcc
 Leu Ser Thr Asp Ser Thr Arg Leu Ser Arg Glu Glu Gly Thr Ser

1720 1729 1738 1747 1756
 ctg agc ctg gaa aac ctg agc ctg aat cct tat gag ggc ttg ttg
 Leu Ser Leu Glu Asn Leu Ser Leu Asn Pro Tyr Glu Gly Leu Leu

30

1765 1774 1783 1792 1801
 tta cag ttc cct ttt gtg gcc tga tcc ctc tac aca gaa cct gcc
 Leu Gln Phe Pro Phe Val Ala ***

1810 1819 1828 1837 1846
 acc ctt ctt tcc tct ctc agg cct ttg gaa ttc tgg tct ttc tct

40

1855 1864 1873 1882 1891
 cct tat ttt gtt ttt gtt ttt aaa ctt ttg cag att aca tat gaa

1900 1909 1918 1927 1936
 ttc tta cac tgg gtg ttt ttg tct tca aaa taa aaa aaa tca ccc

10

ctg c

<210> 4

20

<211> 527

<212> PRT

<213> Rat

<400> 4

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Asp Val Glu Leu Asn 15

30

Glu Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Asp Gly Ala 30

Ala Ala Gly Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala Glu 45

Asp Glu Ala Glu Ala Gly Val Lys Phe Thr Gly Leu Ser Lys Glu 60

Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr Arg 75

40

Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu	90	
Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu	105	
Leu Pro Val Gln Arg Trp Trp His Lys Gly Ala Leu Tyr Arg Ile	120	
Gly Asp Leu Gln Ala Phe Val Gly Pro Glu Ala Arg Gly Ile Ala	135	10
Gly Leu Lys Asn His Leu Glu Tyr Leu Ser Thr Leu Lys Val Lys	150	
Gly Leu Val Leu Gly Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Glu Val	165	
Asn Glu Thr Asp Leu Lys Gln Ile Asp Pro Asp Leu Gly Ser Gln	180	20
Glu Asp Phe Lys Asp Leu Leu Gln Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile	195	
His Ile Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn Tyr Lys Gly Gln Asn Ala	210	
Trp Phe Leu Pro Pro Gln Ala Asp Ile Val Ala Thr Lys Met Lys	225	
Glu Ala Leu Ser Ser Trp Leu Gln Asp Gly Val Asp Gly Phe Gln	240	30
Val Arg Asp Val Gly Lys Leu Ala Asn Ala Ser Leu Tyr Leu Ala	255	
Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Asn Phe Ser Glu Asp Arg Leu Leu	270	
Ile Ala Gly Thr Ala Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Val Asn Ile	285	40
Leu Glu Ser Thr Ser Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu Ser	300	

Gln Pro Val Phe Thr Gly Glu His Ala Glu Leu Leu Val Ile Lys	315	
Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Ser Arg Trp Cys Ser Trp Ser Val Ser	330	
Gln Ala Gly Leu Leu Thr Ser Phe Ile Pro Ala Gln Phe Leu Arg	345	
Leu Tyr Gln Leu Leu Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe	360	10
Ser Tyr Gly Asp Glu Leu Gly Leu Gln Ala Val Ala Leu Pro Gly	375	
Gln Pro Met Glu Ala Pro Phe Met Leu Trp Asn Glu Ser Ser Asn	390	
Ser Gln Thr Ser Ser Pro Val Ser Leu Asn Met Thr Val Lys Gly	405	20
Gln Asn Glu Asp Pro Gly Ser Leu Leu Thr Gln Phe Arg Arg Leu	420	
Ser Asp Leu Arg Gly Lys Glu Arg Ser Leu Leu His Gly Asp Phe	435	
Asp Ala Leu Ser Ser Ser Ser Gly Leu Phe Ser Tyr Val Arg His	450	30
Trp Asp Gln Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val Leu Asn Phe Gln Asp	465	
Val Gly Leu Ser Ala Arg Val Gly Ala Ser Asn Leu Pro Ala Gly	480	
Ile Ser Leu Pro Ala Ser Ala Asn Leu Leu Leu Ser Thr Asp Ser	495	
Thr Arg Leu Ser Arg Glu Glu Gly Thr Ser Leu Ser Leu Glu Asn	510	40

Leu Ser Leu Asn Pro Tyr Glu Gly Leu Leu Leu Gln Phe Pro Phe 525

Val Ala *** 527

<210> 5

<211> 4211

10

<212> DNA

<213> human

<400> 5

1

g

20

	10	19	28	37	46	55											
ccg	gct	gig	cag	tag	aac	ggg	gat	cga	aaa	gag	gaa	aac	aag	ggc	acg	aag	acc

	64	73	82	91	100	109											
agc	gag	aaa	gaa	gag	gac	acc	tgg	gaa	agg	cgg	aag	cag	aag	acg	ggg	aag	gga

30

	118	127	136	145	154	163											
aaa	gaa	acc	cat	agc	agg	tgg	aaa	cca	gat	cta	gag	caa	cac	cgt	cag	ggt	cac

	172	181	190	199	208	217											
agt	tig	ttt	ttc	tag	aag	aga	aga	aag	tac	ctg	agg	att	gct	ctt	ttt	tcc	tac

40

226 235 244 253 262 271
cgt taa tga aaa cta ctt ttg tct tca tca taa aag aaa aaa cta agg gga ggt

280 289 298 307 316 325
aaa ggc agt ctc ctg ttt tat tag ggg gag agg tga agg gaa atc cag gct cac

10

334 343 352 361 370 379
ttt ctg aat aag cca ctg cct ggt gca cag agc aga acc atc ctg gtt tct gaa

20

388 397 406 415 424 433
gac aca tcc ctt tca gca gaa ttc cag ccg gag tcg ctg gca cag ttc tat ttt

442 451 460 469 478 487
tat att taa atg tat gtc tcc cct ggc ctt ttt ttt ttt ttt ttt ttt tta

30

496 505 514 523 532 541
gca aca ctt ttc ttg ttt gta aac gcg agt gac cag aaa gtg tga atg cgg agt

550 559 568 577 586 595
agg aat att ttt cgt gtt ctc ttt tat ctg ctt gcc ttt ttt aga gag tag cag

40

604 613 622 631 640 649
 tgg ttc cta ttt cgg aaa agg acg ttc taa ttc aaa gct ctc tcc caa tat att

658 667 676 685 694 703
 tac acg aat acg cat tta gaa agg gag gca gct ttt gag gtt gca atc cta ctg

10

712 721 730 739 748 757
 aga agg atg gaa gaa gga gcc agg cac cga aac aac acc gaa aag aaa cac cca
 Met Glu Glu Gly Ala Arg His Arg Asn Asn Thr Glu Lys Lys His Pro

766 775 784 793 802 811
 ggt ggg ggc gag tcg gac gcc agc ccc gag gct ggt tcc gga ggg ggc gga gta
 Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ala Ser Pro Glu Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val

20

820 829 838 847 856 865
 gcc ctg aag aaa gag atc gga ttg gtc agt gcc tgt ggt atc atc gta ggg aac
 Ala Leu Lys Lys Glu Ile Gly Leu Val Ser Ala Cys Gly Ile Ile Val Gly Asn

30

874 883 892 901 910 919
 atc atc ggc tct gga atc ttt gtc tcg cca aag gga gtg ctg gag aat gct ggt
 Ile Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val Ser Pro Lys Gly Val Leu Glu Asn Ala Gly

928 937 946 955 964 973
 tct gtg ggc ctt gct ctc atc gtc tgg att gtg acg ggc ttc atc aca gtt gtg
 Ser Val Gly Leu Ala Leu Ile Val Trp Ile Val Thr Gly Phe Ile Thr Val Val

40

982 991 1000 1009 1018 1027
 gga gcc ctc tgc tat gct gaa ctc ggg gtc acc atc ccc aaa tct gga ggt gac
 Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Val Thr Ile Pro Lys Ser Gly Gly Asp

1036 1045 1054 1063 1072 1081
 tac tcc tat gtc aag gac atc ttc gga gga ctg gct ggg ttc ctg agg ctg tgg
 Tyr Ser Tyr Val Lys Asp Ile Phe Gly Gly Leu Ala Gly Phe Leu Arg Leu Trp

10

1090 1099 1108 1117 1126 1135
 att gct gtg ctg gtg atc tac ccc acc aac cag gct gtc atc gcc ctc acc ttc
 Ile Ala Val Leu Val Ile Tyr Pro Thr Asn Gln Ala Val Ile Ala Leu Thr Phe

1144 1153 1162 1171 1180 1189
 tcc aac tac gtg ctg cag cgg ctc ttc ccc acc tgc ttc ccc cca gag tct ggc
 Ser Asn Tyr Val Leu Gln Pro Leu Phe Pro Thr Cys Phe Pro Pro Glu Ser Gly

20

1198 1207 1216 1225 1234 1243
 ctt cgg ctc ctg gct gcc atc tgc tta ttg ctc ctc aca tgg gtc aac tgt tcc
 Leu Arg Leu Leu Ala Ala Ile Cys Leu Leu Leu Leu Thr Trp Val Asn Cys Ser

1252 1261 1270 1279 1288 1297
 agt gtg cgg tgg gcc acc cgg gtt caa gac atc ttc aca gct ggg aag ctc ctg
 Ser Val Arg Trp Ala Thr Arg Val Gln Asp Ile Phe Thr Ala Gly Lys Leu Leu

30

1306 1315 1324 1333 1342 1351
 gcc ttg gcc ctg att atc atc atg ggg att gta cag ata tgc aaa gga gag tac
 Ala Leu Ala Leu Ile Ile Ile Met Gly Ile Val Gln Ile Cys Lys Gly Glu Tyr

40

1360 1369 1378 1387 1396 1405

ttc tgg ctg gag cca aag aat gca ttt gag aat ttc cag gaa cct gac atc ggc
Phe Trp Leu Glu Pro Lys Asn Ala Phe Glu Asn Phe Gln Glu Pro Asp Ile Gly

1414 1423 1432 1441 1450 1459
ctc gtc gca ctg gct ttc ctt cag ggc tcc ttt gcc tat gga ggc tgg aac ttt
Leu Val Ala Leu Ala Phe Leu Gln Gly Ser Phe Ala Tyr Gly Gly Trp Asn Phe

1468 1477 1486 1495 1504 1513
ctg aat tac gtg act gag gag ctt gtt gat ccc tac aag aac ctt ccc aga gcc
Leu Asn Tyr Val Thr Glu Glu Leu Val Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Arg Ala

1522 1531 1540 1549 1558 1567
atc ttc atc tcc atc cca ctg gtc aca ttt gtg tat gtc ttt gcc aat gtc gct
Ile Phe Ile Ser Ile Pro Leu Val Thr Phe Val Tyr Val Phe Ala Asn Val Ala

1576 1585 1594 1603 1612 1621
tat gtc act gca atg tcc ccc cag gag ctg ctg gca tcc aac gcc gtc gct gtg
Tyr Val Thr Ala Met Ser Pro Gln Glu Leu Leu Ala Ser Asn Ala Val Ala Val

1630 1639 1648 1657 1666 1675
act ttt gga gag aag ctc cta gga gtc atg gcc tgg atc atg ccc att tct gtt
Thr Phe Gly Glu Lys Leu Leu Gly Val Met Ala Trp Ile Met Pro Ile Ser Val

1684 1693 1702 1711 1720 1729
gcc ctg tcc aca ttt gga gga gtt aat ggg tct ctc ttc acc tcc tct cgg ctg
Ala Leu Ser Thr Phe Gly Gly Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu

1738 1747 1756 1765 1774 1783
ttc ttc gct gga gcc cga gag ggc cac ctt ccc agt gtg ttg gcc atg atc cac

10

20

30

40

Phe Phe Ala Gly Ala Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Val Leu Ala Met Ile His

1792 1801 1810 1819 1828 1837
 gtg aag cgc tgc acc cca atc cca gcc ctg ctc ttc aca tgc atc tcc acc ctg
 Val Lys Arg Cys Thr Pro Ile Pro Ala Leu Leu Phe Thr Cys Ile Ser Thr Leu

1846 1855 1864 1873 1882 1891
 ctg atg ctg gtc acc agc gac atg tac aca ctc atc aac tac gtg ggc ttc atc
 Leu Met Leu Val Thr Ser Asp Met Tyr Thr Leu Ile Asn Tyr Val Gly Phe Ile

10

1900 1909 1918 1927 1936 1945
 aac tac ctc ttc tat ggg gtc acg gtt gct gga cag ata gtc ctt cgc tgg aag
 Asn Tyr Leu Phe Tyr Gly Val Thr Val Ala Gly Gln Ile Val Leu Arg Trp Lys

20

1954 1963 1972 1981 1990 1999
 aag cct gat atc ccc cgc ccc atc aag atc aac ctg ctg ttc ccc atc atc tac
 Lys Pro Asp Ile Pro Arg Pro Ile Lys Ile Asn Leu Leu Phe Pro Ile Ile Tyr

2008 2017 2026 2035 2044 2053
 ttg ctg ttc tgg gcc ttc ctg ctg gtc ttc agc ctg tgg tca gag ccg gtg gtg
 Leu Leu Phe Trp Ala Phe Leu Leu Val Phe Ser Leu Trp Ser Glu Pro Val Val

30

2062 2071 2080 2089 2098 2107
 tgt ggc att ggc ctg gcc atc atg ctg aca gga gtg cct gtc tat ttc ctg ggt
 Cys Gly Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Thr Gly Val Pro Val Tyr Phe Leu Gly

2116 2125 2134 2143 2152 2161
 gtt tac tgg caa cac aag ccc aag tgt ttc agt gac ttc att gag ctg cta acc
 Val Tyr Trp Gln His Lys Pro Lys Cys Phe Ser Asp Phe Ile Glu Leu Leu Thr

40

2170 2179 2188 2197 2206 2215
 ctg gtg agc cag aag atg tgt gtg gtc gtg tac ccc gag gtg gag cgg ggc tca
 Leu Val Ser Gln Lys Met Cys Val Val Val Tyr Pro Glu Val Glu Arg Gly Ser

2224 2233 2242 2251 2260 2269
 ggg aca gag gag gct aat gag gac atg gag gag cag cag cag ccc atg tac caa
 Gly Thr Glu Glu Ala Asn Glu Asp Met Glu Glu Gln Gln Gln Pro Met Tyr Gln

10

2278 2287 2296 2305 2314 2323
 ccc act ccc acg aag gac aag gac gtg gcg ggg cag ccc cag ccc tga gga cca
 Pro Thr Pro Thr Lys Asp Lys Asp Val Ala Gly Gln Pro Gln Pro ***

2332 2341 2350 2359 2368 2377
 cca ttc cct ggc tac tct ctc ctt cct ccc cct ttt atc cta cct ccc tgc ctt

20

2386 2395 2404 2413 2422 2431
 ggt ccc gcc aac aca tgc gag tac aca cac acc cct ctc tct gct ttt gtc agg

30

2440 2449 2458 2467 2476 2485
 cag tgg tag gac ttt ggt gtg ggt ggt gtg aga aat tgt aaa caa aaa ctg aca

2494 2503 2512 2521 2530 2539
 ttc ata ccc aaa gaa cca gcc tct cac ccc agg gtc cat gtc cca ggc ccc act

40

2548 2557 2566 2575 2584 2593
cca gtg ctg ccc aca ctc cca gct gct gga gga gag ggg aga tgc caa ggt gcc

2602 2611 2620 2629 2638 2647
ctg cag gac ctc cct ccg ggc cac acc ctc agc tgc ctc ttc agg aac cgg agc

10

2656 2665 2674 2683 2692 2701
tca tta ctg cct tcc ctc cca ggg agg ccc ctt cag aga gga gag gcc aca gga

2710 2719 2728 2737 2746 2755
gct gca ttg tgg ggg gac agg ctc aag caa ttc tgt ccc cat caa ggg gtc agc

20

2764 2773 2782 2791 2800 2809
tgg aga gac cca aga ccc tat ctg ttc acc agg gac cca aaa tcc aag ggg atg

2818 2827 2836 2845 2854 2863
ctt ccc tet gcc ctc ttt cct gcc cct ccc cat cat acc tgc acc cac ccc agc

30

2872 2881 2890 2899 2908 2917
cag ggc tcc ctg tcc aga att cgg ttc tcc tca gga cgc caa ctc cca gag cta

40

2926 2935 2944 2953 2962 2971

agg acc aag gag aag aac agc ctc tcc acc ccc aag cca ggc ggt tga gga aca

2980 2989 2998 3007 3016 3025
tat tga gaa agg ttc aga ttg cag aaa ccc agc cct gcc cct gcc tcc tgc atc

3034 3043 3052 3061 3070 3079
cag ccc cca aca tgg tgc caa agc ttc cag aag cca aaa agc ttc tga ttt tta

3088 3097 3106 3115 3124 3133
agg tag tgg gca tct ctc tcc taa tga cga agc tgc tca gca act cca cct gcc

3142 3151 3160 3167 3178 3187
cgc cgc agg aag gag cag tcc cct gct atc cct gca gcc act ccc agc aca ccc

3196 3205 3214 3223 3232 3241
gca cac agc cag cac cac cgc ccc cac cgt gca ctt ctc ctc tct ggg cct tgg

3250 3259 3268 3277 3286 3295
ctt ggg acc agg tac gaa gga tcc cca agc cct tca ggc ctg aga tca gag cca

3304 3313 3322 3331 3340 3349
gat cag cct taa gtc acc tcc cat cca aga act tgg cct aaa aat act ccc cia

10

20

30

40

3358 3367 3376 3385 3394 3403
ttt cta acc ctc agg acg gat ctg ata tta aat gcc ttc cct ggg agg aag ggt

3412 3421 3430 3439 3448 3457
gct ttc ccc ctc cct aga ggt gcc cat tcc ata ccc tgg gag act gag gag agc

10

3466 3475 3484 3493 3502 3511
att ggc tga agc cca gtt cct ttc cca tcc atc ccc aac tcc aat aat ccc cca

20

3520 3529 3538 3547 3556 3565
ctc ctc gca ggt ctc agt gtc atg ctg tct tgg ggc agg gtg aaa ggg tag tgg

3574 3583 3592 3601 3610 3619
cag cag ggc gcc cac tct gga gat cct caa aaa agg ccc tcc tct gtg gct ggc

30

3628 3637 3646 3655 3664 3673
agc ctc tga cct ttc cct ggg ctt caa agg aag gct atg gag ttt gct gtg ggc

3682 3691 3700 3709 3718 3727
cct gca acc ttc cca gcc act cct gct gca cta agg act tag gat cct ttt atc

40

3736 3745 3754 3763 3772 3781
aca aat cgg gat tct ctc ccc cac ccc gaa ttc tgt ctg ctt aaa ctg gaa tac

3790 3799 3808 3817 3826 3835
aca gga gcc ctt cct ggc ctg gat ggt gtc tcc cag ctt ccc cgc cca gct tgc

10

3844 3853 3862 3871 3880 3889
cca ccc cat agt tgg tga gat gcc aag ttt ggt ctg agt tgt gac ccc ttc aga

3898 3907 3916 3925 3934 3943
gta gat gcc cgg cag gct ggg gtt ggc ccc tgg agg gtc agg gga cca tct tct

20

3952 3961 3970 3979 3988 3997
tat tcc ctc ttt tct cat tcc tcc aac ttc ctc ccc tcc ttc aat tat ttt ttt

30

4006 4015 4024 4033 4042 4051
gta aag tlg atg cct tac ttt tlg gat aaa tat ttt tga agc tgg tat ttc tat

4060 4069 4078 4087 4096 4105
ttc ttt tgg att ttt ttt aat gta agg tlg ttt tgg ggg atg gag tta gaa cct

40

4114 4123 4132 4141 4150 4159
 taa tga taa ttt ctt tcg ttt ggt gta ggt ttt aga gat ttg ttt tgt gga gag

4168 4177 4186 4195 4204
 gtt ttt ttc ttt tga tgt aat aaa att taa aat gga aaa aaa aaa aaa a

10

<210> 6

<211> 535

<212> PRT

<213> human

<400> 6

20

Met Glu Glu Gly Ala Arg His Arg Asn Asn Thr Glu Lys Lys His 15

Pro Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ala Ser Pro Glu Ala Gly Ser Gly 30

Gly Gly Gly Val Ala Leu Lys Lys Glu Ile Gly Leu Val Ser Ala 45

Cys Gly Ile Ile Val Gly Asn Ile Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val 60

30

Ser Pro Lys Gly Val Leu Glu Asn Ala Gly Ser Val Gly Leu Ala 75

Leu Ile Val Trp Ile Val Thr Gly Phe Ile Thr Val Val Gly Ala 90

Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Val Thr Ile Pro Lys Ser Gly Gly 105

40

Asp Tyr Ser Tyr Val Lys Asp Ile Phe Gly Gly Leu Ala Gly Phe 120

Leu Arg Leu Trp Ile Ala Val Leu Val Ile Tyr Pro Thr Asn Gln	135	
Ala Val Ile Ala Leu Thr Phe Ser Asn Tyr Val Leu Gln Pro Leu	150	
Phe Pro Thr Cys Phe Pro Pro Glu Ser Gly Leu Arg Leu Leu Ala	165	
Ala Ile Cys Leu Leu Leu Leu Thr Trp Val Asn Cys Ser Ser Val	180	10
Arg Trp Ala Thr Arg Val Gln Asp Ile Phe Thr Ala Gly Lys Leu	195	
Leu Ala Leu Ala Leu Ile Ile Ile Met Gly Ile Val Gln Ile Cys	210	
Lys Gly Glu Tyr Phe Trp Leu Glu Pro Lys Asn Ala Phe Glu Asn	225	20
Phe Gln Glu Pro Asp Ile Gly Leu Val Ala Leu Ala Phe Leu Gln	240	
Gly Ser Phe Ala Tyr Gly Gly Trp Asn Phe Leu Asn Tyr Val Thr	255	
Glu Glu Leu Val Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Arg Ala Ile Phe	270	30
Ile Ser Ile Pro Leu Val Thr Phe Val Tyr Val Phe Ala Asn Val	285	
Ala Tyr Val Thr Ala Met Ser Pro Gln Glu Leu Leu Ala Ser Asn	300	
Ala Val Ala Val Thr Phe Gly Glu Lys Leu Leu Gly Val Met Ala	315	
Trp Ile Met Pro Ile Ser Val Ala Leu Ser Thr Phe Gly Gly Val	330	40

Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu Phe Phe Ala Gly Ala	345	
Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Val Leu Ala Met Ile His Val Lys	360	
Arg Cys Thr Pro Ile Pro Ala Leu Leu Phe Thr Cys Ile Ser Thr	375	
Leu Leu Met Leu Val Thr Ser Asp Met Tyr Thr Leu Ile Asn Tyr	390	10
Val Gly Phe Ile Asn Tyr Leu Phe Tyr Gly Val Thr Val Ala Gly	405	
Gln Ile Val Leu Arg Trp Lys Lys Pro Asp Ile Pro Arg Pro Ile	420	
Lys Ile Asn Leu Leu Phe Pro Ile Ile Tyr Leu Leu Phe Trp Ala	435	20
Phe Leu Leu Val Phe Ser Leu Trp Ser Glu Pro Val Val Cys Gly	450	
Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Thr Gly Val Pro Val Tyr Phe Leu	465	
Gly Val Tyr Trp Gln His Lys Pro Lys Cys Phe Ser Asp Phe Ile	480	
Glu Leu Leu Thr Leu Val Ser Gln Lys Met Cys Val Val Val Tyr	495	30
Pro Glu Val Glu Arg Gly Ser Gly Thr Glu Glu Ala Asn Glu Asp	510	
Met Glu Glu Gln Gln Gln Pro Met Tyr Gln Pro Thr Pro Thr Lys	525	
Asp Lys Asp Val Ala Gly Gln Pro Gln Pro ***	535	40

<210> 7
 <211> 1897
 <212> DNA
 <213> human
 <400> 7

	9	18	27	36	45	54	10											
	ctg	cgc	gga	ggc	aca	gag	gcc	ggg	gag	agc	gtt	ctg	ggt	ccg	agg	gtc	cag	gta
	63	72	81	90	99	108												
	ggg	gtt	gag	cca	cca	tct	gac	cgc	aag	ctg	cgt	cgt	gtc	gcc	ggt	tct	gca	ggc
	117	126	135	144	153	162	20											
	acc	atg	agc	cag	gac	acc	gag	gtg	gat	atg	aag	gag	gtg	gag	ctg	aat	gag	tta
	Met	Ser	Gln	Asp	Thr	Glu	Val	Asp	Met	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Asn	Glu	Leu	
	171	180	189	198	207	216												
	gag	ccc	gag	aag	cag	ccg	atg	aac	gcg	gcg	tct	ggg	gcg	gcc	atg	tcc	ctg	gcg
	Glu	Pro	Glu	Lys	Gln	Pro	Met	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Met	Ser	Leu	Ala
	225	234	243	252	261	270	30											
	gga	gcc	gag	aag	aat	ggt	ctg	gtg	aag	atc	aag	gtg	gcg	gaa	gac	gag	gcg	gag
	Gly	Ala	Glu	Lys	Asn	Gly	Leu	Val	Lys	Ile	Lys	Val	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu
	279	288	297	306	315	324	40											
	gcg	gca	gcc	gcg	gct	aag	ttc	acg	ggc	ctg	tcc	aag	gag	gag	ctg	ctg	aag	gtg
	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Thr	Gly	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Val

333 342 351 360 369 378
 gca ggc agc ccc ggc tgg gta cgc acc cgc tgg gca ctg ctg ctg ctc ttc tgg
 Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp

387 396 405 414 423 432
 ctc ggc tgg ctc ggc atg ctt gct ggt gcc gtg gtc ata atc gtg cga ggc ccc
 Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro

10

441 450 459 468 477 486
 cgt tgt cgc gag cta ccg ggc cag aag tgg tgg cac acg ggc gcc ctc tac cgc
 Arg Cys Arg Glu Leu Pro Ala Gln Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr Arg

495 504 513 522 531 540
 atc ggc gac ctt cag gcc ttc cag ggc cac ggc gcg ggc aac ctg gcg ggt ctg
 Ile Gly Asp Leu Gln Ala Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu

20

549 558 567 576 585 594
 aag ggg cgt ctc gat tac ctg agc tct ctg aag gtg aag ggc ctt gtg ctg ggt
 Lys Gly Arg Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly

30

603 612 621 630 639 648
 cca att cac aag aac cag aag gat gat gtc gct cag act gac ttg ctg cag atc
 Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala Gln Thr Asp Leu Leu Gln Ile

657 666 675 684 693 702
 gac ccc aat ttt ggc tcc aag gaa gat ttt gac agt ctc ttg caa tcg gct aaa
 Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Gln Ser Ala Lys

40

711 720 729 738 747 756
 aaa aag agc atc cgt gtc att ctg gac ctt act ccc aac tac cgg ggt gag aac
 Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn Tyr Arg Gly Glu Asn

765 774 783 792 801 810
 tcg tgg ttc tcc act cag gtt gac act gtg gcc acc aag gtg aag gat gct ctg
 Ser Trp Phe Ser Thr Gln Val Asp Thr Val Ala Thr Lys Val Lys Asp Ala Leu

10

819 828 837 846 855 864
 gag ttt tgg ctg caa gct ggc gtg gat ggg ttc cag gtt cgg gac ata gag aat
 Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn

873 882 891 900 909 918
 ctg aag gat gca tcc tca ttc ttg gct gag tgg caa aat atc acc aag ggc ttc
 Leu Lys Asp Ala Ser Ser Phe Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe

20

927 936 945 954 963 972
 agt gaa gac agg ctc ttg att gcg ggg act aac tcc tcc gac ctt cag cag atc
 Ser Glu Asp Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile

981 990 999 1008 1017 1026
 ctg agc cta ctc gaa tcc aac aaa gac ttg ctg ttg act agc tca tac ctg tct
 Leu Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu Ser

30

1035 1044 1053 1062 1071 1080
 gat tct ggt tct act ggg gag cat aca aaa tcc cta gtc aca cag tat ttg aat
 Asp Ser Gly Ser Thr Gly Glu His Thr Lys Ser Leu Val Thr Gln Tyr Leu Asn

40

1089 1098 1107 1116 1125 1134

gcc act ggc aat cgc tgg tgc agc tgg agt ttg tct cag gca agg ctc ctg act
Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Ala Arg Leu Leu Thr

1143 1152 1161 1170 1179 1188
tcc ttc ttg ccg gct caa ctt ctc cga ctc tac cag ctg atg ctc ttc acc ctg
Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Met Leu Phe Thr Leu

1197 1206 1215 1224 1233 1242
cca ggg acc cct gtt ttc agc tac ggg gat gag att ggc ctg gat gca gct gcc
Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly Asp Glu Ile Gly Leu Asp Ala Ala Ala

1251 1260 1269 1278 1287 1296
ctt cct gga cag cct atg gag gct cca gtc atg ctg tgg gat gag tcc agc ttc
Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu Ala Pro Val Met Leu Trp Asp Glu Ser Ser Phe

1305 1314 1323 1332 1341 1350
cct gac atc cca ggg gct gta agt gcc aac atg act gtg aag ggc cag agt gaa
Pro Asp Ile Pro Gly Ala Val Ser Ala Asn Met Thr Val Lys Gly Gln Ser Glu

1359 1368 1377 1386 1395 1404
gac cct ggc tcc ctc ctt tcc ttg ttc cgg cgg ctg agt gac cag cgg agt aag
Asp Pro Gly Ser Leu Leu Ser Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys

1413 1422 1431 1440 1449 1458
gag cgc tcc cta ctg cat ggg gac ttc cac gcg ttc tcc gct ggg cct gga ctc
Glu Arg Ser Leu Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly Leu

1467 1476 1485 1494 1503 1512
ttc tcc tat atc cgc cac tgg gac cag aat gag cgt ttt ctg gta gtg ctt aac

10

20

30

40

Phe Ser Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val Val Leu Asn

1521 1530 1539 1548 1557 1566

ttt ggg gat gtg ggc ctc tcg gct gga ctg cag gcc tcc gac ctg cct gcc agc
Phe Gly Asp Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser Asp Leu Pro Ala Ser

1575 1584 1593 1602 1611 1620

gcc agc ctg cca gcc aag gct gac ctc ctg ctc agc acc cag cca ggc cgt gag
Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ser Thr Gln Pro Gly Arg Glu

10

1629 1638 1647 1656 1665 1674

gag ggc tcc cct ctt gag ctg gaa cgc ctg aaa ctg gag cct cac gaa ggg ctg
Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu Glu Arg Leu Lys Leu Glu Pro His Glu Gly Leu

20

1683 1692 1701 1710 1719 1728

ctg ctc cgc ttc ccc tac gcg gcc tga ctt cag cct gac atg gac cca cta ccc
Leu Leu Arg Phe Pro Tyr Ala Ala ***

1737 1746 1755 1764 1773 1782

ttc tcc ttt cct tcc cag gcc ctt tgg ctt ctg att ttt ctc ttt ttt aaa aac

30

1791 1800 1809 1818 1827 1836

aaa caa aca aac tgt tgc aga tta tga gtg aac ccc caa ata ggg tgt ttt ctg

1845 1854 1863 1872 1881 1890

cct tca aat aaa agt cac ccc tgc atg gtg aag tct tcc ctc taa aaa aaa aaa

40

aaa aaa a

<210> 8

<211> 524

<212> PRT

<213> human

<400> 8

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Glu Val Glu Leu Asn	15	
Glu Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala	30	
Ala Met Ser Leu Ala Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile	45	
Lys Val Ala Glu Asp Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Phe	60	
Thr Gly Leu Ser Lys Glu Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro	75	
Gly Trp Val Arg Thr Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu	90	30
Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg	105	
Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu Pro Ala Gln Lys Trp Trp His Thr	120	
Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp Leu Gln Ala Phe Gln Gly His	135	40
Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys Gly Arg Leu Asp Tyr Leu	150	

10

20

30

40

Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly Pro Ile His Lys	165	
Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala Gln Thr Asp Leu Leu Gln Ile Asp	180	
Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Gln Ser	195	
Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn	210	10
Tyr Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Thr Gln Val Asp Thr Val	225	
Ala Thr Lys Val Lys Asp Ala Leu Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly	240	
Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu Lys Asp Ala	255	20
Ser Ser Phe Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe Ser	270	
Glu Asp Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu Gln	285	
Gln Ile Leu Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr	300	30
Ser Ser Tyr Leu Ser Asp Ser Gly Ser Thr Gly Glu His Thr Lys	315	
Ser Leu Val Thr Gln Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys	330	
Ser Trp Ser Leu Ser Gln Ala Arg Leu Leu Thr Ser Phe Leu Pro	345	
Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Met Leu Phe Thr Leu Pro	360	40

Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly Asp Glu Ile Gly Leu Asp Ala	375	
Ala Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu Ala Pro Val Met Leu Trp	390	
Asp Glu Ser Ser Phe Pro Asp Ile Pro Gly Ala Val Ser Ala Asn	405	
Met Thr Val Lys Gly Gln Ser Glu Asp Pro Gly Ser Leu Leu Ser	420	10
Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys Glu Arg Ser Leu	435	
Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly Leu Phe	450	
Ser Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val Val	465	20
Leu Asn Phe Gly Asp Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser	480	
Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu	495	
Leu Ser Thr Gln Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu	510	
Glu Arg Leu Lys Leu Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg Phe	520	30
Pro Tyr Ala Ala ***	524	

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ラットLAT2とラットLAT1、ヒトy⁺LAT1およびヒトy⁺LAT2のアミノ酸配列の比較を示す。ラットLAT2の予想される膜貫通部位を付線で示している。

【図2】図2は、ラットLAT2のインビトロ翻訳の結果を示す図面に代わる写真である。左側は分子量を示す。Microsomesは、イヌ豚臓マイクロソーム画分であり、EndoHは糖鎖分解酵素エンドグリコシダーゼHであり、+は存在を-は非存在を示す。

【図3】図3は、ラットの各臓器組織におけるLAT2遺伝子mRNAの発現(a)および4F2hc遺伝子mRNAの発現(b)をノーザンブロットングにより解析した結果を示した図面に代わる写真である。

【図4】図4は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及び/又はラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験の結果を示す。

【図5】図5は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において添加する塩の影響を調べた結

果を示す。

【図6】図6は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において基質ロイシンの濃度の影響を調べた結果を示す。

【図7】図7は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において、系へのグリシンおよびL-アミノ酸添加の影響を調べた結果を示す。

【図8】図8は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において、系への各種D-アミノ酸添加の影響を調べた結果を示す。

10

【図9】図9は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において、系へのアミノ酸類似化合物添加の影響を調べた結果を示す。

【図10】図10は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験において、系へのL-DOPAの影響を調べた結果を示す。

【図11】図11は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による放射能標識アミノ酸の取り込みを調べた結果を示す。

【図12】図12は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験においてpHの影響を調べた結果を示す。

20

【図13】図13は、pH7.5(印)とpH6.25(印)におけるロイシン取り込みの濃度依存性を比較した結果を示す。

【図14】図14は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による¹⁴C-ロイシンの放出を調べた結果を示す。印はNaイオンを含まない取り込み用溶液(Na⁺-free uptake solution)へのロイシン未添加の場合を、印はロイシン100μM添加の場合を、印はロイシン1mM添加の場合を示す。

【図15】図15は、ラットLAT1遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による¹⁴C-ロイシンの放出を調べた結果を示す。印はロイシン未添加の場合を、印はロイシン100μM添加の場合を示す。

30

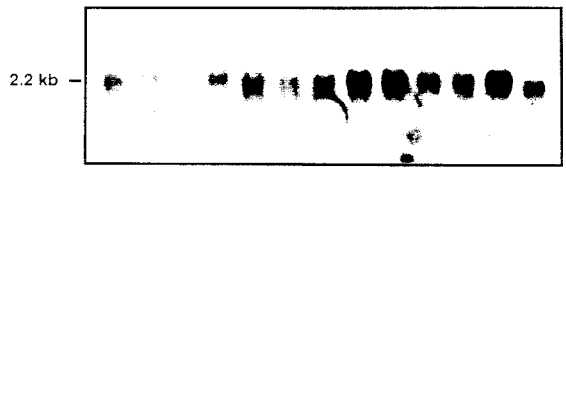
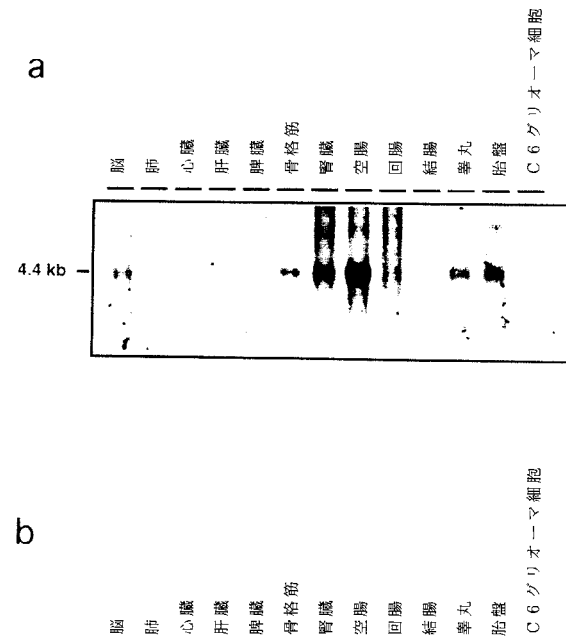
【 1 】

```

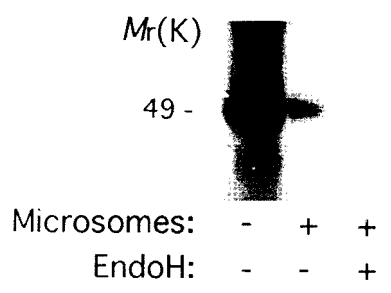
*
#3
#4
#5
#6
#7
#8
#9
#10
#11
#12
#13
#14
#15
#16
#17
#18
#19
#20
#21
#22
#23
#24
#25
#26
#27
#28
#29
#30
#31
#32
#33
#34
#35
#36
#37
#38
#39
#40
#41
#42
#43
#44
#45
#46
#47
#48
#49
#50
#51
#52
#53
#54
#55
#56
#57
#58
#59
#60
#61
#62
#63
#64
#65
#66
#67
#68
#69
#70
#71
#72
#73
#74
#75
#76
#77
#78
#79
#80
#81
#82
#83
#84
#85
#86
#87
#88
#89
#90
#91
#92
#93
#94
#95
#96
#97
#98
#99
#100

```

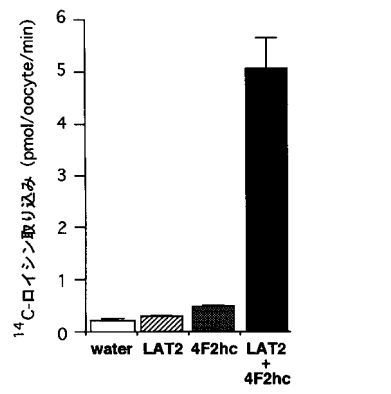
【 3 】



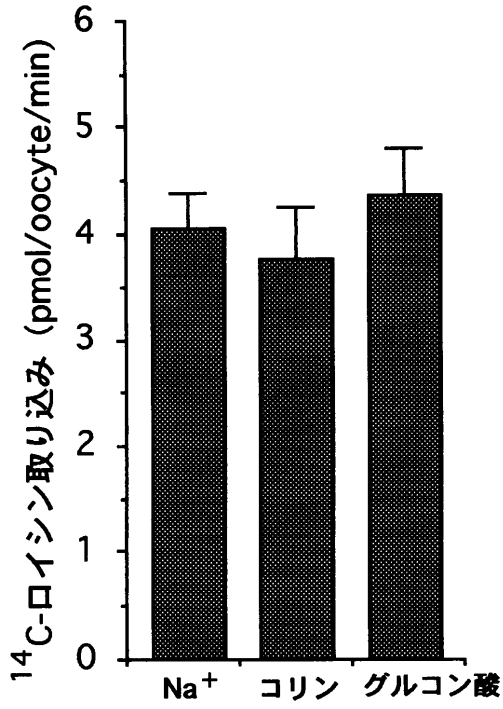
【 2 】



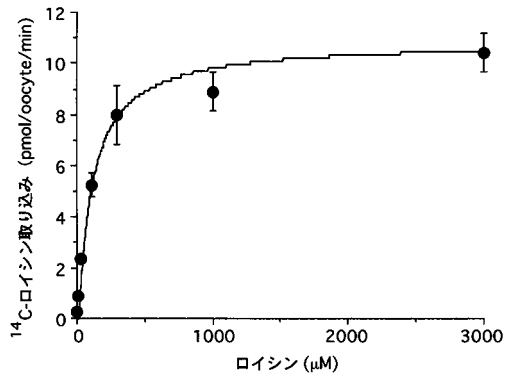
【 4 】



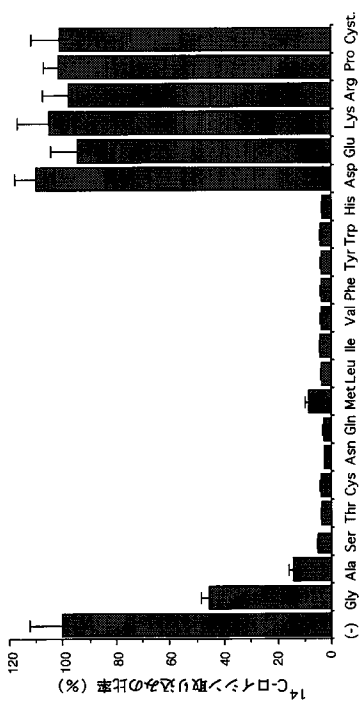
【 図 5 】



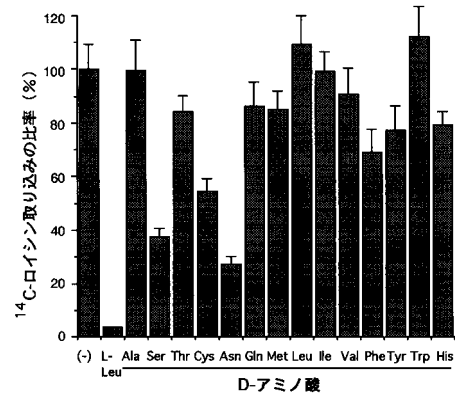
【 図 6 】



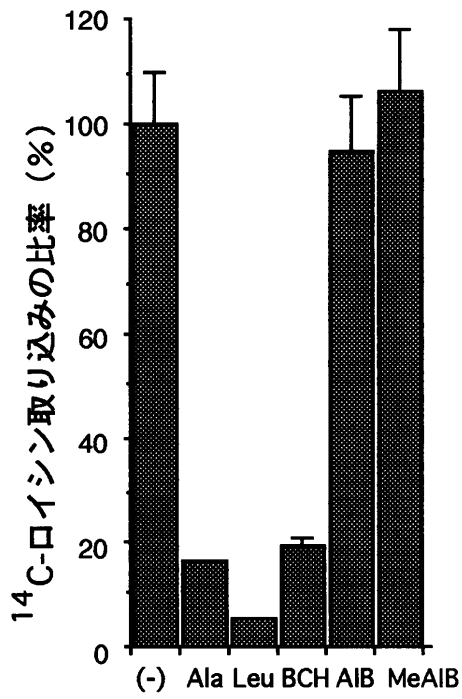
【 図 7 】



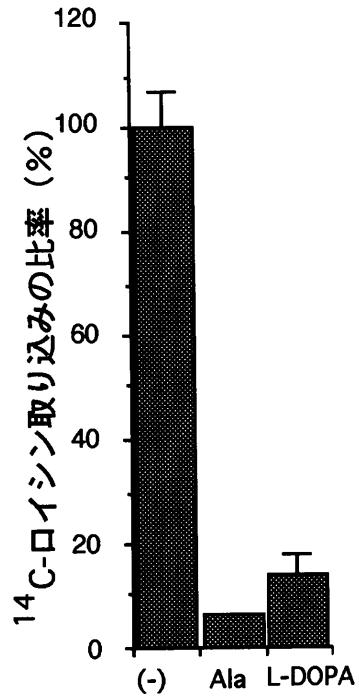
【 図 8 】



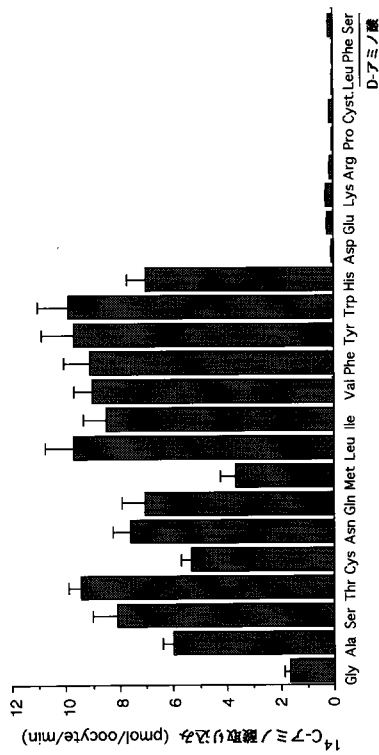
【 図 9 】



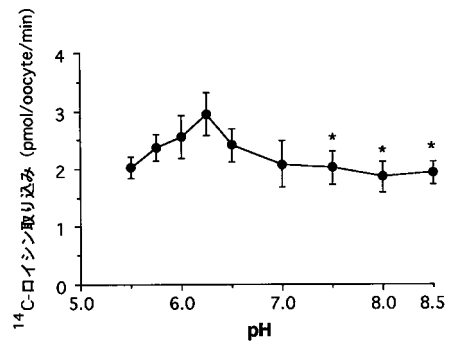
【 図 10 】



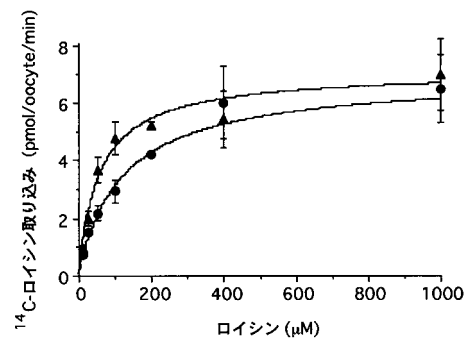
【 図 11 】



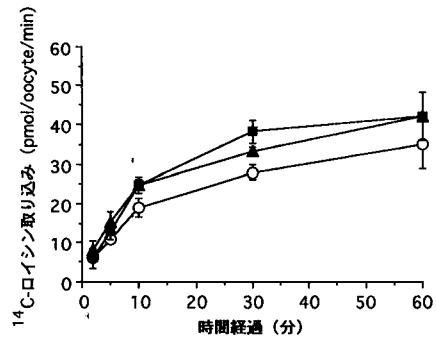
【 図 12 】



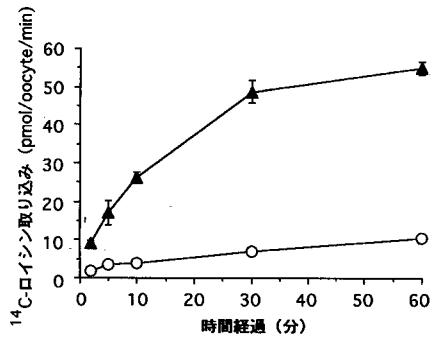
【 図 13 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>	
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>Z</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>Z</i>

- (56) 参考文献 Biochem. Biophys. Res. Commun. , 1 9 9 9 年 2 月 , Vol.255, NO.2 , p.283-288
 J. Biol. Chem. , 1 9 9 8 年 , Vol.273, No.37 , p.23629-23632
 The EMBO J. , 1 9 9 9 年 1 月 , Vol.18, No.1 , p.49-57
 J. Biol. Chem. , 1 9 9 8 年 , Vol.273, No.49 , p.32437-32445

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/47
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 PubMed
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 JSTPlus(JDreamII)