

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-342270
(P2000-342270A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000. 12. 12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
		16/18	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/06	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数24 OL (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-158571	(71) 出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22) 出願日	平成11年6月4日 (1999. 6. 4)	(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
		(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生

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) 【要約】

【課題】 本発明は、新規な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れをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 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中性アミノ酸トランスポーター、より詳細には新規な中性アミノ酸トランスポーター L A T 2、それをコードする遺伝子、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。

【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。

【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】 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請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 5】 臓器、組織、もしくは培養細胞由来である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 6】 請求項 1 ~ 5 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 7】 配列番号 1 又は 5 で示される塩基配列、又は、配列番号 1 又は 5 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列からなる遺伝子。

【請求項 8】 ヒト又はラット由来である請求項 6 又は 7 に記載の遺伝子。

【請求項 9】 臓器、組織、もしくは培養細胞由来である請求項 8 に記載の遺伝子。

【請求項 10】 請求項 6 ~ 9 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 11】 プラスミドが、発現プラスミドである請求項 10 に記載のプラスミド。

【請求項 12】 請求項 10 又は 11 に記載のプラスミドで形質転換された宿主細胞。

【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むヌクレオチド。

【請求項 14】 中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を検出するためのプローブとして使用するものである請求項 13 に記載のヌクレオチド。

【請求項 15】 中性アミノ酸及びその類似物質を輸送する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現を変調させるために使用するものである請求項 13 に記載のヌクレオチド。

【請求項 16】 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載するタンパク質に対する抗体。

【請求項 17】 請求項 1 ~ 5 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。

【請求項 18】 請求項 1 ~ 5 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、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。

【請求項 19】 輸送活性化因子 4 F 2 h c を併用する請求項 17 又は 18 に記載の方法。

【請求項 20】 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 17 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】 請求項 17 ~ 20 のいずれかに記載の方法により、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クリーニングする方法。

【請求項 22】 腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーター L A T 1 との対比を行う請求項 21 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 23】 腫瘍細胞型中性アミノ酸トランスポーター L A T 1 には取り込まれ易いが、請求項 1 ~ 5 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 L A T 2 には取り込まれ易い物質をスクリーニングする請求項 21 又は 22 に記載の方法。

【請求項 24】 血液・脳関門、胎盤関門もしくは精巢関門におけるスクリーニングである請求項 21 又は 22 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、腎尿細管からの再吸収、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、それらを用いて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)]。

【0007】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 $LAT1$ がクローニングされた [Kanai, et al., *J. Biol. Chem.*, 273, 23629 (1998)]。 $LAT1$ は、補助因子 $4F2hc$ と共存することによってのみ機能することが示された。 $LAT1$ 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。 $LAT1$ 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、 $LAT1$ 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。

【0008】さらに、中性アミノ酸トランスポーター $LAT1$ 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^+LAT1 と y^+LAT2 がクローニングされた [Torrents, et al., *J. Biol. Chem.*, 273, 32437 (1998)]。また、 y^+LAT1 、 y^+LAT2 共に補助因子 $4F2hc$ 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^+LAT1 と y^+LAT2 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。

【0009】

【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、 $LAT1$ と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。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、 $LAT1$ の $cDNA$ の翻訳領域の塩基配列を用いて EST (expressed sequence tag) データベースを検索し、 $LAT1$ 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 $cDNA$ 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 $4F2hc$ 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、 $LAT1$ 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 $LAT2$ を見出し、本発明を完成するにいたった。

【0011】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 $4F2hc$ 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進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。

【0012】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14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。

【0013】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ク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、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。

【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。

【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。

【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。

【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】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八

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。

【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。

【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、GenBank™/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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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1a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。

【0031】広い基質選択性を有する中性アミノ酸トランスporter 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。

【0032】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porter 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porter 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porter、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、通常の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porter 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。

【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porter 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) での透過効率についての、インビトロでの試験に使用できる。

【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porter 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porter 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。

【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porter 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porter LAT1 とを用いて、腫瘍細胞の中性アミノ酸トランスporter を抑制し、かつ非腫瘍細胞の中性アミノ酸トランスporter 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。

【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porter 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porter LAT1 との対比を行うこと

のより、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。

【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年に発行]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。

【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pBluescript IISK-(Stratagene社製)へサブクローン化した。

【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。

【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

LAT1の翻訳領域の塩基配列を用いたEST(expressed sequence tag)データベースの検索によって得られたLAT1類似配列 GenBankTM/EBI/DBJ accession No. N32639の35-54bpに相当するセンスプライマー(5'-ctcttcacatgcatctccac-3')と、397-416bpに相当するアンチセンスプライマー(5'-ggtacacgaccacacacatc-3')、およびIMAGE(Integrated and Molecular Analysis of Genoms and their Expression)cDNAクローン No. 267666をテンプレートとして用い、DNA断片をPCR法によって増幅した。得られたDNA断片を32P-dCTPでラベルしてプローブとして用いて、ラット小腸cDNAライブラリーをスクリーニングした。

【0045】cDNAライブラリーはラット小腸由来ポリ(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。32P-dCTP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0.1xSSC/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に組み込み込んだ。

【0046】得られたクローンすなわち、ラット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(Applied Biosystems社)により、cDNAの塩基配列を決定した。これにより、ラットLAT2遺伝子の塩基配列が得られた。また、cDNAの塩基配列を常法により解析して、cDNAの翻訳領域とそこにコードされるLAT2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】LAT2はラットLAT1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 $y + LAT1$ と47%、 $y + LAT2$ 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 $LAT2$ と、公知のラット $LAT1$ 、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、 $LAT2$ 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、 $LAT2$ 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、 $LAT2$ の cRNA から $LAT2$ タンパク質を合成し、電気泳動を行った。その結果、49 kDa のバンドが得られ、イヌ睪嚢ミクロゾーム画分 (Microsomes) 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 (EndoH) 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 (ノーザンブロットングによる解析)

$LAT2$ 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トングを以下のようにして行った。3 μ g 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トランスファーした。このフィルターを42度、 $32P$ -dCTP でラベルした $LAT2$ 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度にて、0.1% SDS を含む $0.1 \times SSC$ で洗浄した。

【0051】ノーザンブロットングの結果 (図3のa)、小腸、腎、胎盤、精巣、脳、骨格筋において4.4 k b 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、4.4 k b 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トングを以下のようにして行った。3 μ g 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トランスファーした。このフィルターを42度、 $32P$ -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度にて、0.1% SDS を含む $0.1 \times SSC$ で洗浄した。

【0053】ノーザンブロットングの結果 (図3のb)、あらゆる臓器に2.2 k b 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。

【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 17 ng、ラット $4F2hc$ 遺伝子 cRNA 8 ng、もしくはラット $LAT2$ 遺伝子 cRNA 17 ng / ラット $4F2hc$ 遺伝子 cRNA 8 ng 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。

【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 (50 μ M) を含む Na イオンを含まない取り込み用溶液 (Na⁺-free uptake solution) [100 mM 塩化コリン、2 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、5 mM HEPES、pH 7.4] 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】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。

【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。

【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)記載の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 ± 33.6 μM (平均 ± 標準誤差, n = 4)であった。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Km値およびVmax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Vmax値は、ロイシンのVmax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Km値とVmax値をまとめて示したものである。表1中の各々のVmax値は、ロイシンのVmax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)記載の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 μM)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、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¹⁴C-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N-(メチルアミノ)イソ酪酸(N-(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¹⁴C-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¹⁴C-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¹⁴C-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、¹⁴C-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(¹⁴C化合物)、L-アラニン(¹⁴C化合物)、L-セリン(¹⁴C化合物)、L-スレオニン(¹⁴C化合物)、L-システイン(¹⁴C化合物)、L-アスパラギン(¹⁴C化合物)、L-グルタミン(¹⁴C化合物)、L-メチオニン(¹⁴C化合物)、L-ロイシン(¹⁴C化合物)、L-イソロイシン(¹⁴C化合物)、L-バリン(¹⁴C化合物)、L-フェニルアラニン(¹⁴C化合物)、L-チロシン(¹⁴C化合物)、L-トリプトファン(¹⁴C化合物)、L-ヒスチジン(¹⁴C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(¹⁴C化合物)、L-グルタミン酸(¹⁴C化合物)、L-リジン(¹⁴C化合物)、L-アルギニン(¹⁴C化合物)、L-プロリン(¹⁴C化合物)、L-シスチン(

¹⁴C化合物)、D-ロイシン(¹⁴C化合物)、D-フェニルアラニン(¹⁴C化合物)、D-セリン(¹⁴C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、Vmaxは変化せずKmが低下する(pH7.5におけるKmは96.6µM、Vmaxは6.7pmol/oocyte/minであり、pH6.25におけるKmは57.2µM、Vmaxは7.0pmol/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¹⁴C-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150µMの¹⁴C-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¹⁴C-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(100µMあるいは1mM)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¹⁴C-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20µMの¹⁴C-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¹⁴C-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 μ M)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¹⁴C-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 μ M添加の場合を、印はロイシン1mM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 μ M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、3 \times 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(Applied 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 \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、3 \times 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、T7 RNA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
 <;120>; A Neutral amino acid transportor with broad substrate selectivity and its genes
 <;130>; PA900409
 <;160>; 8
 <;210>; 1
 <;211>; 4117
 <;212>; DNA
 <;213>; Rat
 <;400>; 1

	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					
	99	108	117	126	135
aaa cct gat cgc gag ccg gcg agc gag aag aaa gta cct gag cac					
	144	153	162	171	180
cgc tcc tcc tcc gcc ctc tcg gct aac gag aac tac ttt tac cct					
	189	198	207	216	225
cgf ggt aaa aga gac tta agg gaa ggt gga ggc gat ctg ttt cgt					
	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					
	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					
	414	423	432	441	450
ttg ttt gtt agc agt gac acg tgt gac tct cgt ttg ctg tca ctt					
	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					
	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

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

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
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

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

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

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

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
 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2574 2583 2592 2601 2610
aag aaa cct ggg ttc act act gtt tct tct 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

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

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 tcg acc tga gac cca caa agt tcc ctt tca gga

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

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

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

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

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

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

3339 3348 3357 3366 3375
 gga agg gtg ctt tcc ccc ttc cca ggg gtg ctc atc cct cac cct
 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
 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
 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
 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
 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
 3834 3843 3852 3861 3870
 tct acc cct ttc ctc cca ttc ctt cag cct gca cct gcc cct cct
 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
 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
 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 aaa a

<;210>; 2

<;211>; 533

<;212>; PRT

<;213>; Rat

<;400>; 2

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
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
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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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

<;210>; 3

<;211>; 1940

<;212>; DNA

<;213>; Rat

<;400>; 3

1

c

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

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

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
 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

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

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

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

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

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

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

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

865 974 883 892 901
 gcc acc aaa atg aag gag gct ctg agt tct 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

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 tct gac ctg caa
 Glu Asp Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Ala Ser Ser Asp Leu Gln

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

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

1180 1189 1198 1207 1216
 agc tgg agt gtg tgc 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

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

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 gtg 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

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
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

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

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

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

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

ctg c

<;210>; 4

<;211>; 527

<;212>; PRT

<;213>; Rat

<;400>; 4

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Asp Val Glu Leu Asn	15
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Leu Ser Leu Asn Pro Tyr Glu Gly Leu Leu Leu Gln Phe Pro Phe	525
Val Ala ***	527

<;210>; 5

<;211>; 4211

<;212>; DNA

<;213>; human

<;400>; 5

g

	10	19	28	37	46	55
ccg gct	gtg 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
	118	127	136	145	154	163
aaa gaa	acc cat agc	agg tgg aaa	cca gat cta	gag caa cac	cgf cag gtt	cac
	172	181	190	199	208	217
agt ttg	ttt ttc tag	aag aga aga	aag tac ctg	agg att gct	ctt ttt tcc	tac
	226	235	244	253	262	271
cgf 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
	334	343	352	361	370	379
ttt ctg	aat aag cca	ctg cct ggt	gca cag agc	aga acc atc	ctg gtt tct	gaa
	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 ttt	tta
	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
	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
	712	721	730	739	748	757
aga agg	atg gaa gaa	gga gcc agg	cac cga aac	aac acc gaa	aag aaa cac	cca
	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
	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
	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
	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

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 ccg 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

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

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

1360 1369 1378 1387 1396 1405
 ttc tgg ctg gag cca aag aat gca ttt gag aat ttc cag gaa cct gac atc gcc
 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
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

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

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

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

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

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

2386 2395 2404 2413 2422 2431

ggt ccc gcc aac aca tgc gag tac aca cac acc cct ctc tct gct ttt gtc agg
 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
 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
 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
 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 tct gcc ctc ttt cct gcc cct ccc cat cat acc tgc acc cac ccc agc
 2872 2881 2890 2899 2908 2917
 cag ggc tcc ctg tcc aga att cgg ttc tcc tca gga cgc caa ctc cca gag cta
 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 cta
 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
 3466 3475 3484 3493 3502 3511
 att ggc tga agc cca gtt cct ttc cca tcc atc ccc aac tcc aat aat ccc cca
 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
 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
 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
 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
 3952 3961 3970 3979 3988 3997
 tat tcc ctc ttt tct cat tcc tcc aac ttc ctc ccc tcc ttc aat tat ttt ttt
 4006 4015 4024 4033 4042 4051
 gta aag ttg atg cct tac ttt ttg 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 ttg ttt tgg ggg atg gag tta gaa cct
 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
 <;210>; 6
 <;211>; 535
 <;212>; PRT
 <;213>; human
 <;400>; 6
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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

<;210>; 7

<;211>; 1897

<;212>; DNA

<;213>; human

<;400>; 7

	9	18	27	36	45	54
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
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 ccg						
Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala Ala Met Ser Leu Ala						
	225	234	243	252	261	270
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
gcg gca gcc gcg gct aag ttc acg gcc 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 gcc agc ccc gcc 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 gcc tgg ctc gcc atg ctt gct ggt gcc gtg gtc ata atc gtg cga gcg ccg						
Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro						
	441	450	459	468	477	486
cgt tgt cgc gag cta ccg gcg cag aag tgg tgg cac acg gcc 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

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

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

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

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

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

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

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
 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
 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
 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
 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

```

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 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
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
Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys Gly Arg Leu Asp Tyr Leu     150
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
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
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
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
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
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
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
Pro Tyr Ala Ala ***                                             524

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、ラット LAT 2 とラット LAT 1、ヒト y + LAT 1 およびヒト y + LAT 2 のアミノ酸配列の比較を示す。ラット LAT 2 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 LAT 2 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、イヌ豚臓マイクロゾーム画分であり、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)をノーザンブロッティ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。

【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。

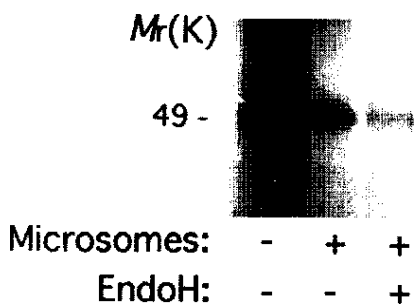
【図12】図12は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるロイシン取り込み実験においてpHの影響を調べた結果を示す。

【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。

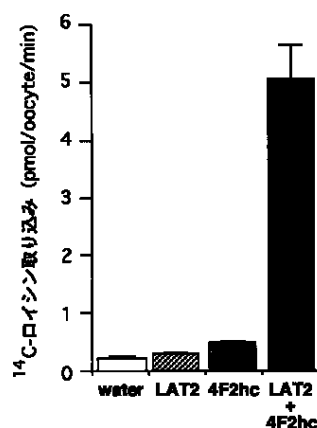
【図14】図14は、ラットLAT2遺伝子のcRNA及びラット4F2hc遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による¹⁴C-ロイシンの放出を調べた結果を示す。印はNaイオンを含まない取り込み用溶液(Na⁺-free uptake solution)へのロイシン未添加の場合を、印はロイシン100μM添加の場合を、印はロイシン1mM添加の場合を示す。

【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。

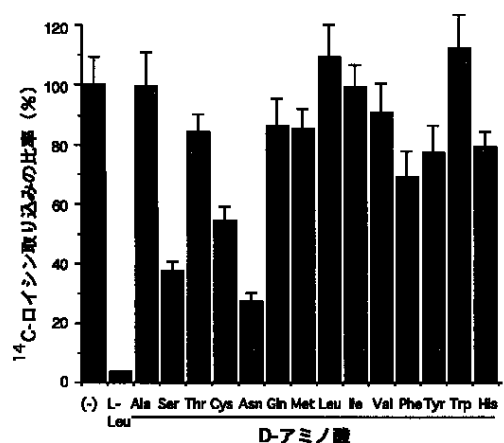
【図2】



【図4】



【図8】



*
 LAT2 -----KNHPDGRSDTSPEAES SSGGVAAL KKEGVSACG TVGNETGSDTFVSPKGV E NAGE V E I A L I V I V I T A V I T A V I G A L C Y A E L G E T I
 LAT1 -----AAEERQAREKMLRARRDGDADREKNTLEQRNTEIIRGVA I V G T I G S G I N F I T P T K E A G S P L S I V A M M V C V S I V G A L C Y A E L G E T I
 y+LAT1 -----S I E V E V - - A S P E V I T S P L E D G A P P E Q K K I E E S I N I C L I S H M G S G I F V S P G V G I Y S S F V I T A V I G A L C Y A E L G E T I
 y+LAT2 -----E T P T Y H L V P N T S S Q V E E D - V S S P P Q R S S E T M Q K K E E S I E N G S L V M G H M G S G I F V S P K G V I H T A S Y G H S I V I A I G A L C Y A E L G E T I

#3
 LAT2 -----P S G G Y S V K D I G A G L R I A V V Y I N G A M L L S R V D E P T S G L R L I I L L N W K S R R R Y G D T P A G L L A L I I I V V G I
 LAT1 -----S S G G Y A M E V Y G S P A L K W E L I E R P S S O Y E V A L V A T Y L E K V P T P V P E F A K V A C L V L E T A Y V A K A I R V D D A F A A L E L A L I L L E F I O M
 y+LAT1 -----E K S G S T A T T I E P A F G F L A T R I E W T S L L E E P T S O A T D A I T P A N I M V R I E P S C F A Y A S R L A S A G C L L E T I I I R C A Y A M G I L Y D I P T Y A V E A L I A V V A I V R E
 y+LAT2 -----T T S A L L E A T G F I E E R I V L W E R I G A T T I E A I I I S P E D Y L C R A A L G A L G Y A G Q D T Y V V I I L L K

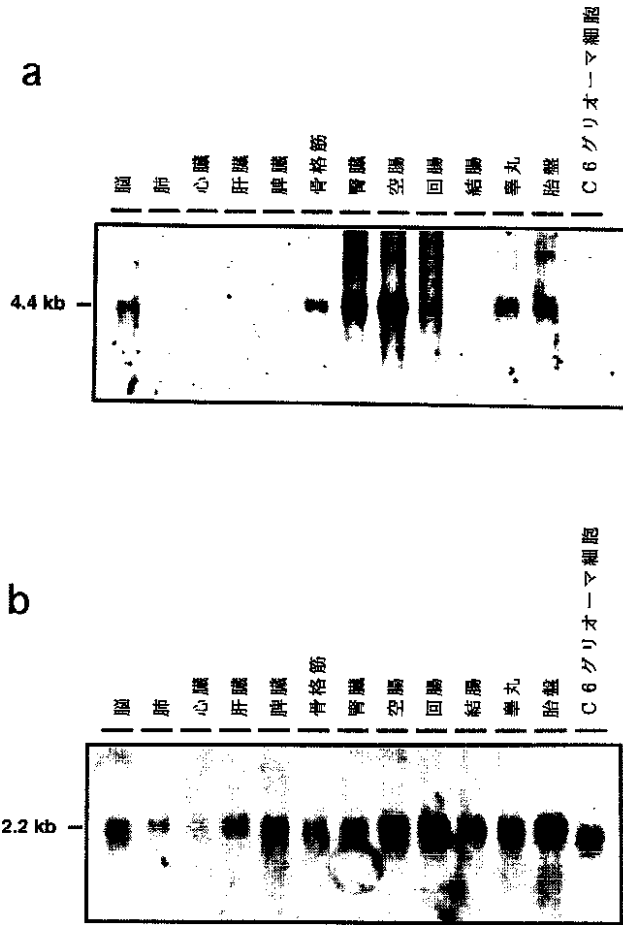
#4
 LAT2 -----K K - - - E F F M E P M A E N F Q E F D I L V A L F L Q G S A T G G M F F Y T E L V D Y K I R R A F I I P L F V V F A I I A V A N S P Q E L S N A V A I G E K L G A
 LAT1 -----G K D I G D A S M H Q L S E G - T N L D V G N I V A L Y S G F A G G M W Y N E T E E M I M P Y R I P L A I I L L V I V V N I A F I T I N Q M T E A V A I D G N Y H G A S
 y+LAT1 -----G S - - - G A S T H E E - - - E M S E G - - S S F A V G D I A E A L Y S A E F S S G N D T I N Y T E E I K N P E R H E P E S I G S M P L Y I I Y I L I N V A Y T Y E D M R D I A S D A V A Y F A D Q I F G I F N
 y+LAT2 -----C Q - - - H S E H E - - - Q D A E G - - - W M G N L S A L Y S A L S S N D I I I E E L K N E R N P A G S N P T T I I G S N P T T I I N I S O W S S A A A A A A A A A I T F M F

【図1】

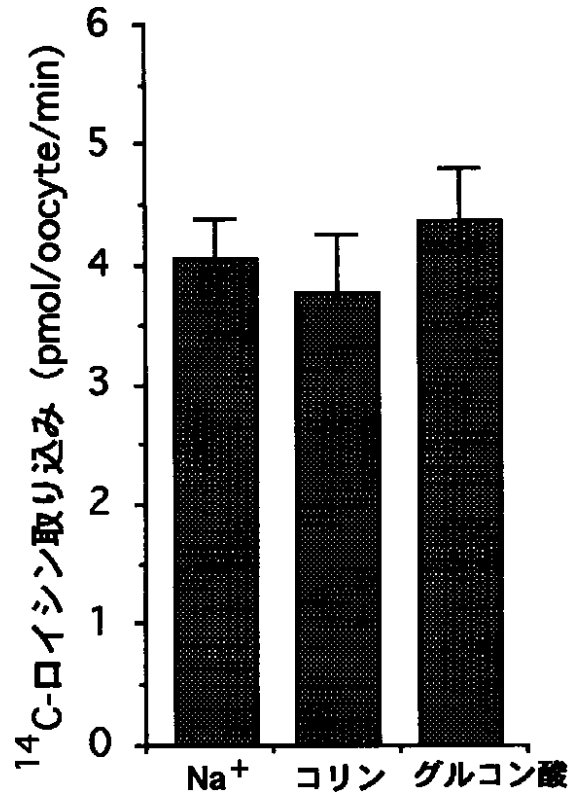
#5
 LAT2 -----H E M L S V L S I T E G V I G S L E T S S R L P F A G A R E G H L P S V E A N T E M K R C T P T P A L I T L S T L M V T S O M Y T E N V G H E N Y E V T V A Q I V R M K P D I P E P E K I S L
 LAT1 -----M T E R V F V G S E C F S V A G S L E T S S R L P F Y G R E C H L P S I E S H E P Q L L P V P S V F T A V T E M Y A F S R P E F S I E F E F E M E C A E A I I G M M W R F K P E L E R P E R V N E A
 y+LAT1 -----M E L L W A L S C G Q M A S T V A S R L P E Y G R E C H L P D A I C H E H V E R T A P S L G J H A L L I C E D E A Q L I N Y Y M F V O L S V G Q L I N K E P S P R P L K S V
 y+LAT2 -----N T E R I A V A L S E G G M A S T A S S R L P E Y G R E C H L P O L S K D H I E R E T P T P A L E N G T M A L Y I V E D V F O L I N Y E S S Y M F F V G L S V G Q L Y R N K E P K E P S P L K S V

#6
 LAT2 -----P I I Y L F W A T L I F S E M S E P V V E D I G L A M E T T A V P V F E R V T W - - Q H K R C F N D F E S L E L V S O M M G V V Y Y Q E G D S G E T I D V E E Q H P I F Q P T P V K D P S E E Q P *
 LAT1 -----L P V F I A C L E I A S F K T L E C T G F A I I S G L P V F F A M N - - K N K N W L Q P F V V L C Q A L - Q Q V V R E T *
 y+LAT1 -----E P I M V E C T I F V A V P L Y S D T I N S L I C T A D A L S E P F E L I T R V P E H K P Y L R R I V G S A R Y L O V M S V A - - - A E M L E D G G E M P *
 y+LAT2 -----E P I V F E D S V A L I I P E F T E T I N S L I G E G A L S S V P P F M V T L E S R E F E R M L A A D E R G T Q L F C L I - - - E L D V A E E - - - K K - - - E R A T D *

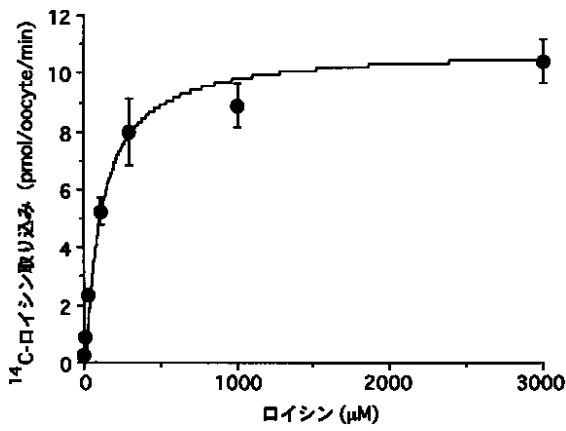
【図3】



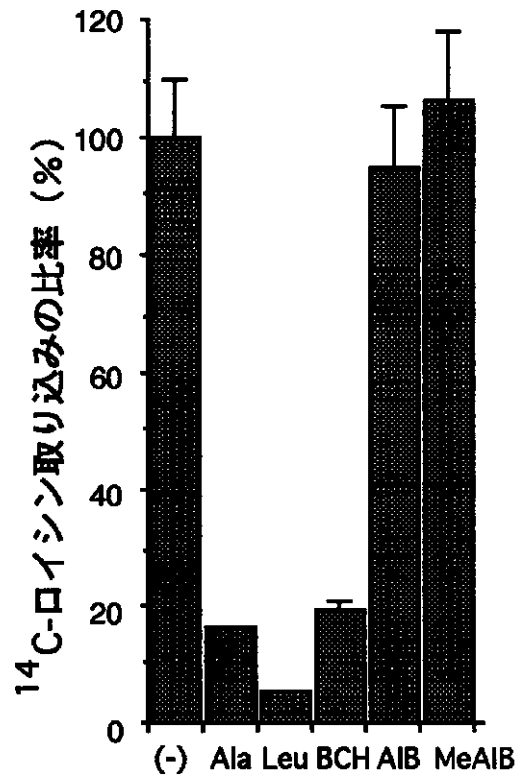
【図5】



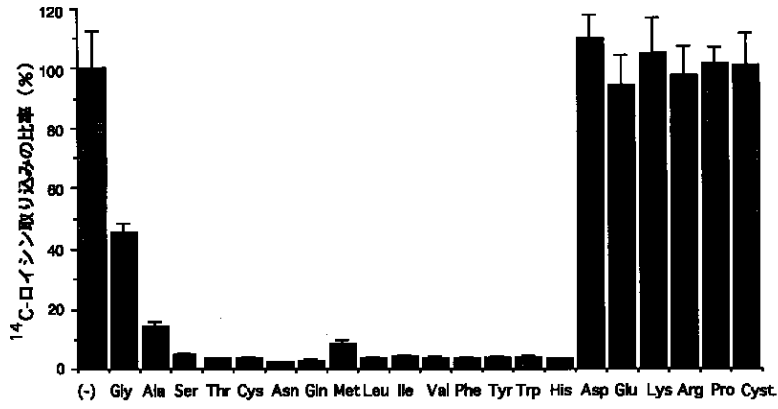
【図6】



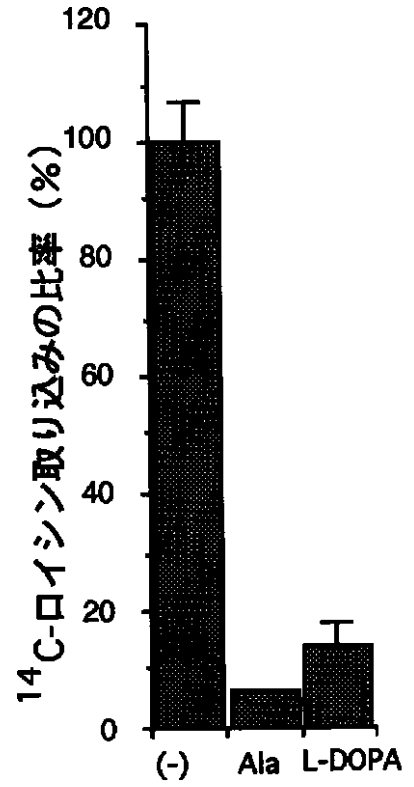
【図9】



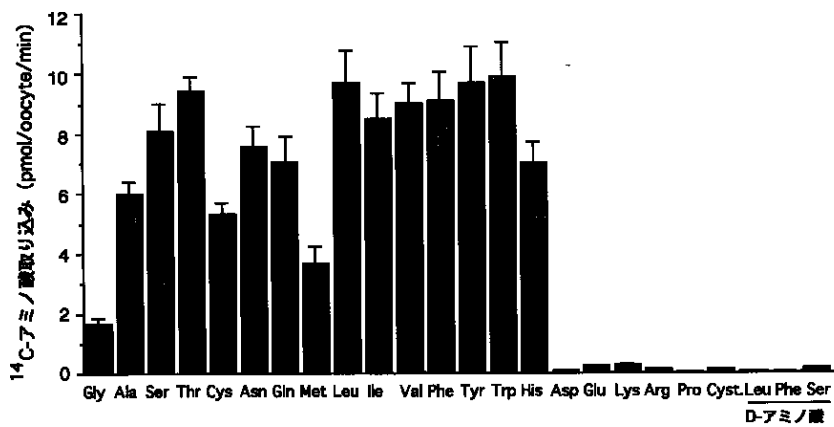
【図7】



【図10】

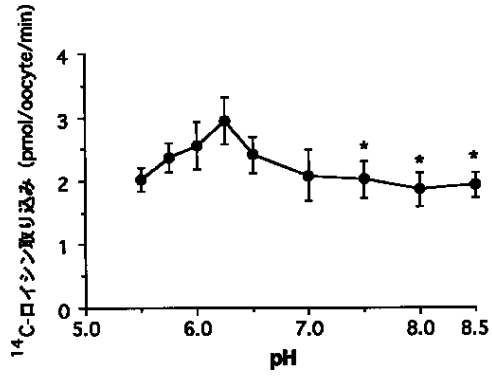


【図11】

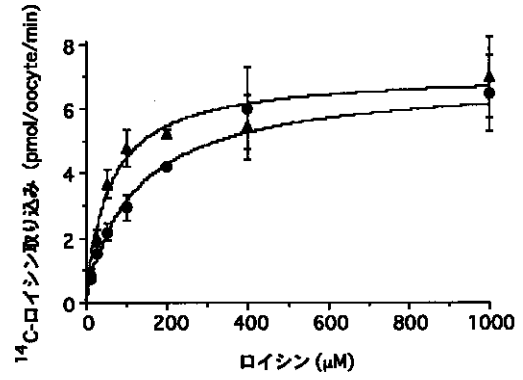


D-アミノ酸

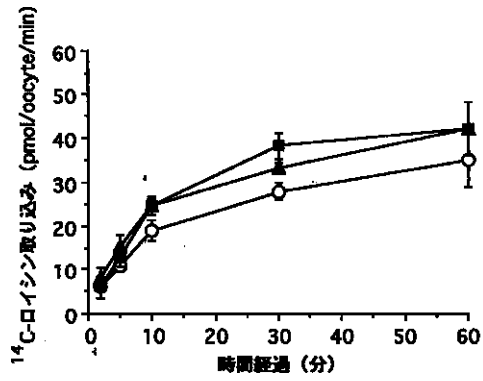
【図12】



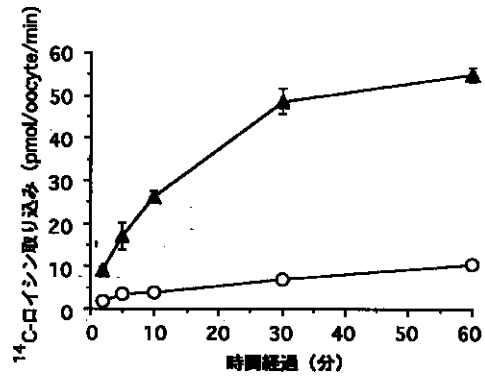
【図13】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.7

識別記号

F I

テ-マ-ド' (参考)

C 1 2 Q 1/06

G 0 1 N 33/15

Z 4 H 0 4 5

G 0 1 N 33/15

33/50

Z

33/50

33/53

D

33/53

C 1 2 N 5/00

B

//(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB20 CA25 CB01
CB17 DA12 DA13 DA14 DA36
DA78
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09
CA11 DA02 GA11 GA12 GA18
HA13 HA14
4B063 QA08 QQ52 QR49 QR77 QS38
QX07
4B064 AG01 CA10 CA19 CA50 CC01
CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA91Y AA93Y AB01
AC14 AC16 BA04 BC50 BD50
CA24 CA43 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
DA75 EA20 EA50 FA74