

(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2003 - 180384

(P2003 - 180384A)

(43)公開日 平成15年7月2日(2003.7.2)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 7/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 7/02		9/10 101	4 B 0 6 3
9/10	101	19/02	4 B 0 6 4
19/02		29/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 85数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 277172(P2002 - 277172)

(22)出願日 平成14年9月24日(2002.9.24)

(31)優先権主張番号 P200102165

(32)優先日 平成13年9月24日(2001.9.24)

(33)優先権主張国 スペイン(ES)

(31)優先権主張番号 P200102166

(32)優先日 平成13年9月24日(2001.9.24)

(33)優先権主張国 スペイン(ES)

(31)優先権主張番号 P200102167

(32)優先日 平成13年9月24日(2001.9.24)

(33)優先権主張国 スペイン(ES)

(71)出願人 390010205

第一ファインケミカル株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

(72)発明者 カル・ミグエル・サンティアゴ

スペイン国 33400 アストリアス アビレ

ス シー/ コパドンガ エヌ 5,5 ディ

ー

(72)発明者 オバヤ・ゴンザレス・アルバロ・ジェサス

スペイン国 33208 アストリアス ギジョ

ン シー/ アロンソ オジェダ エヌ 7

,4 ディー

(74)代理人 100097582

弁理士 水野 昭宣

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ADAMTS - 15 , - 16 , - 17 , - 18 及び - 19

(57)【要約】

【課題】 接着と細胞外タンパク分解という二つの機能を有し、多機能のタンパクであるADAMs ファミリーに属する新たなタンパクを検索してその性質を明らかにすることは、免疫応答、血管新生、凝固、創傷治癒、再生プロセス、胚着床、胎児の発育、さらには癌細胞の浸潤、転移、リウマチあるいは心臓血管におけるプロセス、血液学的な及び神経退化のプロセスといった様々な生理的且つ生物学的現象の研究で、さらには正常や病的なプロセスの解明に有用である。

【解決手段】 相同性 (ホモロジー) に基づく分子クローニング法を使用し、ADAMTS-15、-16、-17、-18及び-19 と確認同定された新規タンパク並びにそれをコードする核酸が得られた。遺伝子組換え技術などを利用し該タンパクの測定が可能となり、その生理学的・生物学的活性などを解明する手段が入手でき、該タンパクに起因する生理現象、関連疾患の診断、原因究明、予知などに利用可能。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法であって、

a) ADAMTS タンパク質中の保存領域のヌクレオチド配列を発現遺伝子のデータベースで見つかったヌクレオチドの部分配列と比較すること;

b) ADAMTSsに対するホモロジー(同一性)を保持しているフラグメントの同定並びに該フラグメント配列が発現されているヒト組織の全RNAを用いてのPCRによる増幅;

c) ヒトcDNAのライブラリーとハイブリダイズするプローブとして、該増幅されたフラグメントを使用することあるいは取得配列を5'端または3'端に向けて伸張するための該増幅されたフラグメントを使用すること;及び

d) 得られたcDNAクローンを単離し、該ヌクレオチドの完全な配列を決定することからなる群から選ばれた処理を行うことを特徴とするヒトADAMTS-15、-16、-17、-18及び-19から成る群から選ばれたタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法。

【請求項2】 ヒトタンパク質をコードしている同定された配列が、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18及びADAMTS-19から成る群から選ばれたものをコードする配列であることを特徴とする請求項1記載のタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法。

【請求項3】 (a) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:1 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:2に示されたもの、

(b) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:3 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:4に示されたもの、

(c) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:5 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:6に示されたもの、

(d) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:7 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:8に示されたもの、及び

(e) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:9 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:10 に示されたものから成る群から選ばれたことを特徴とする請求項1又は2記載のタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法。

【請求項4】 ADAMTS-15活性、ADAMTS-16活性、ADAMTS-17活性、ADAMTS-18活性及びADAMTS-19活性から成る群から選ばれた活性に対する阻害剤をデザインするための、

SEQ ID NO:1~10の配列から成る群から選ばれた配列の

全部あるいはその一部の使用。

【請求項5】 組換えあるいは合成タンパク質生産のための、

SEQ ID NO:1~10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用。

【請求項6】 抗体作製のための、

SEQ ID NO:1~10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用。

【請求項7】 ADAMTSsに関して記載されている活性を持っているタンパク質及び/又は該ADAMTSsをコードする遺伝子を検出するためのシステムを構築するための、SEQ ID NO:1~10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用。

【請求項8】 ADAMTSに関して及び/又は該ADAMTSsをコードする遺伝子に関してメディエートされる病気発生プロセスを処置するための活性化化合物を製造するための、

SEQ ID NO:1~10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用。

【請求項9】 (i) ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質、

(ii) (A) SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:5のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:7のヌクレオチド配列及びSEQ ID NO:9のヌクレオチド配列から成る群から選ばれたヌクレオチド配列及び(B)その多形型配列、オルターナティブスプライシング産物、変異体、誘導体配列あるいは部分配列であって且つタンパク分解活性を持つ酵素をコードするかあるいは細胞接着、ホメオスタシスあるいは血管新生のプロセスに関与するもの、から成る群から選ばれたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列の全部あるいはその一部を有するポリペプチド、

(iii) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列からなるポリペプチドあるいはその一部の配列からなるポリペプチド、

(iv) 前記(i)のタンパク質並びに(ii)及び(iii)のポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか一において、1個以上のアミノ酸あるいは1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)または(iii)のポリペプチドの示す生物学的活性を有するポリペプチド、及び

(v) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列に存在する各ドメインのいずれか一に対し少なくとも50%以上、あるいは60%以上、又は少

なくとも70%より高い相同性を有しているもの、あるいはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するポリペプチドから成る群から選ばれたものであることを特徴とするタンパク質若しくはポリペプチド又はその塩、あるいは(vi)前記(i)~(v)のいずれか一記載のタンパク質若しくはポリペプチドの部分ペプチド又はその塩。

【請求項10】 請求項9記載の(i)~(vi)のいずれか一記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩に特異的に結合することを特徴とする抗体。

【請求項11】 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項10記載の抗体。

【請求項12】 (i) ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(ii) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列からなるポリペプチドあるいはその一部の配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(iii) (A) SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:5のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:7のヌクレオチド配列及びSEQ ID NO:9のヌクレオチド配列から成る群から選ばれた配列及び(B)その多形型配列、オルターナティブスプライシング産物、変異体、誘導体配列あるいは部分配列であって且つタンパク分解活性を持つ酵素をコードするかあるいは細胞接着、ホメオスタシスあるいは血管新生のプロセスに関与するもの、から成る群から選ばれた配列からなるポリヌクレオチド、

(iv) (i)のタンパク質のアミノ酸配列又は(ii)のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸あるいは1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)のポリペプチドの示す生物学的活性又は(iii)で言及した生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(v) SEQ ID NO:1の配列、SEQ ID NO:3の配列、SEQ ID NO:5の配列、SEQ ID NO:7の配列及びSEQ ID NO:9の配列から成る群から選ばれた配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)のポリペプチドの示す生物学的活性又は(iii)で言及した生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び

(vi) SEQ ID NO:1の配列、SEQ ID NO:3の配列、SEQ ID NO:5の配列、SEQ ID NO:7の配列及びSEQ ID NO:9の配

*列から成る群から選ばれた配列の少なくともCDSに対して少なくとも50%以上、さらには60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、あるいは95%以上の相同性を有し且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)のポリペプチドの示す生物学的活性又は(iii)で言及した生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから成る群から選ばれたものであることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項13】 請求項12記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする組換えベクター。

【請求項14】 請求項12記載のポリヌクレオチド又は請求項13記載のベクターで宿主細胞を形質転換されて得られたことを特徴とする形質転換された宿主細胞。

【請求項15】 請求項14記載の宿主細胞を培養条件下に維持して、請求項9記載のタンパク質又はポリペプチドを発現せしめ、得られた発現ポリペプチドを分離することを特徴とする請求項9記載のタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【請求項16】 請求項10記載の抗体を含むことを特徴とする請求項9記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬。

【請求項17】 請求項10記載の抗体を測定試薬として用いることを特徴とする請求項9記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法。

【請求項18】 (1)請求項9記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩、(2)請求項10記載の抗体、(3)請求項12記載のポリヌクレオチド、(4)請求項13記載の組換えベクター及び(5)請求項14記載の形質転換された細胞から成る群から選ばれたものを含有することを特徴とする組成物。

【請求項19】 請求項9記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩、その一部のペプチドまたはこれらの塩；あるいは請求項12記載のポリヌクレオチド；あるいは請求項10記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬。

【請求項20】 請求項9記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩、その一部のペプチドまたはこれらの塩の、生物学的活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有していることを特徴とする医薬。

【請求項21】 請求項9記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩、その一部のペプチドまたはこれらの塩の、生物学的活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法およびスクリーニングキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規に同定された

ポリヌクレオチド(あるいは核酸)及びポリペプチド(あるいはタンパク質)(又はその一部)あるいはその塩;該ポリヌクレオチド(あるいは核酸)及びポリペプチド(あるいはタンパク質)の変異体及び誘導体;該ポリヌクレオチド(あるいは核酸)及びポリペプチド(あるいはタンパク質)、並びにそれらの変異体及び誘導体の製造法;該ポリペプチド(あるいはタンパク質)のアゴニスト及びアンタゴニスト;該ポリペプチド(あるいはタンパク質)に対する抗体、特にモノクローナル抗体;並びに該ポリヌクレオチド(あるいは核酸)、ポリペプチド(あるいはタンパク質)、変異体、誘導体、アゴニスト及びアンタゴニストの用途に関するものである。本発明は細胞接着や組織リモデリングといった生物学的過程(プロセス)に関するものである。そういった生物学的過程としては、免疫応答、血管新生、凝固、創傷治癒、再生プロセス、胚移植あるいは胎児発達のよう生理学的条件に関連しているものが挙げられ、さらに癌細胞の浸潤、転移、リウマチあるいは心臓血管におけるプロセス、血液学的なプロセスおよび神経退化のプロセスのような生理学的条件に関連したものが挙げられる。特に本発明は細胞接着領域(ドメイン)やマトロプロテアーゼ領域(ドメイン)を含有している、ヒトADAMTS-15、-16、-17、-18及び-19タンパク質を発見且つ確認することに関し、また本タンパク質をエンコードしている遺伝子にも関し、さらには、それらの可能な阻害剤にも関し、また、その構造分析、および正常や病的なプロセスにおける関連した事項に関する。

【0002】

【従来の技術】ADAMs (a disintegrin and metalloprotease domain)あるいは細胞ディスインテグリンと呼ばれるタンパク質は、接着と細胞外タンパク分解(非特許文献1参照)という二つの機能を有するという潜在的な能力のゆえに、かなり関心を引きつけつつある、多機能のタンパク質で、そのファミリーの数は増加しつつある。これらのタンパク質は、プロ領域(ドメイン)およびマトロプロテアーゼ領域(ドメイン)、ディスインテグリン様領域(ドメイン)、シスチンリッチ領域(ドメイン)、上皮成長因子(EGF)様領域(ドメイン)、膜貫通領域(ドメイン)および細胞質領域(ドメイン)から成る特異なドメイン構造を示している。これら領域のいくつかは、ヘビ毒タンパク質の一つのファミリーに類似している(非特許文献2参照)。ADAMsおよびヘビ毒タンパク質は、共に触媒活性領域中のHEXXHXXGXXHD配列の存在で特色づけられる、レプロリシン類(reprolysins)のスーパーファミリーを構成する。ADAMsは、種々の哺乳組織やXenopus laevis, Drosophila melanogaster およびCaenorhabditis elegansのようなその他の真核生物(植物、酵母あるいはバクテリアを除く)に見出されている。初期には、ADAMsは、生殖過程に関連しているものとされていたが、その機能的役割というもののスペク

トルはかなり拡張せしめられてきている(非特許文献3参照)。たとえば、メルトリン-(ADAM-12)は、筋芽細胞融合に深く関与している。また、メルトリン-とメルトリン-は、骨芽細胞の分化過程に関与している。MS2やデシン(decysin)のような他のADAMsは、免疫応答に関与することができる。最近、いくつかの研究により基質特異性はもとより、いくつかのADAMsの酵素学的性質が特定されてきている。このように、ADAM-9、ADAM-10あるいはADAM-17は、膜結合サイトカインや成長因子をシェディングすることによるシグナルパスウェイの活性化に関与するプロテアーゼのように働くことが出来る。

【0003】C-末端領域に複数のスロンボスポンジン様繰り返し(リピート)を有することを特徴とする一連の新規ADAM関連タンパク質が見出された後に、本ファミリーのタンパク質の構造的および機能的複雑さが増大することになった(非特許文献4参照)。本新ファミリーの最初のメンバーは、ADAMTS-1 (ADAM with thrombospondin domains: スロンボスポンジンを持つADAM)と呼ばれ、種々の炎症過程と関連するのと同様に、癌性悪液質の発生と関連しての結果として確認され同定された。次にADAMTS-2が確認同定され、それはプロコラーゲンIIアミノプロテアーゼ活性を示した。その欠損は、ヒトでのエーラス-ダンロス(Ehlers-Danlos)症候群VIIIC型を引き起こす(非特許文献5参照)。同様なタイプの活性は、第二のプロコラーゲンアミノプロテアーゼとして確認同定されたADAMTS-3で述べられている。本ファミリーの他のメンバーは、ADAMTS-4とADAMTS-5/11と呼ばれるタンパク質で、関節疾患における軟骨アグリカン分解に関与するアグリカナーゼである。ADAMTS-1とADAMTS-8は血管障害活性を持つタンパク質として特色づけられている。ADAMTS-6、-7、-9および-12は、構造レベルで特色づけられているだけで、それらの機能的意義はまだ不明である。これらのタンパク質のすべては、ドメインとして類似した構成を共有しているが、それらはADAMsとは実質的に違いがあることを示している。全てのADAMTSは、EGF様領域、膜貫通域および細胞質テールを欠損しているが、スロンボスポンジン様繰り返しを複数含有している。これ等のタンパク質が含有している重要で且つ当面の問題に関連する機能的役割というものが、本ファミリーのプロテアーゼの新メンバーを捜し出すことを目的とする研究を促進しているのである。

【0004】

【非特許文献1】Cell, 90: 589, 1997

【非特許文献2】Method Enzymol., 248: 345, 1995

【非特許文献3】Curr. Opin. Cell Biol., 10: 654, 1998

【非特許文献4】J. Biol. Chem., 274: 25555, 1999

【非特許文献5】Am. J. Hum. Gen., 65: 308, 1999

【0005】

【発明が解決しようとする課題】重要で且つ多様な生理的及び生物学的働きを持つと思われるADAMTSs のファミリーに属する新メンバーを捜し出すことは、細胞接着や組織リモデリングなどといった生物学的過程（プロセス）を解明する上で大きな意味がある。

【0006】

【課題を解決するための手段】新規なヒトADAMTSs を確認し同定するのに用いられる戦略の一つは、相同性（ホモロジー）に基づく分子クローニング法を使用するものである。これを遂行するための多数の方法の中の一つは、既報のADAMTS遺伝子類の配列と類似性を示す遺伝子配列のフラグメントをデータベース上で探索することに基づき確認同定した後、ADAMTS配列と相同性を示すと推定されるフラグメントを、新しく予測される遺伝子の発現が起こると考えられるヒト組織のRNAを用いたPCRによって、増幅することができる。次にこれらの増幅されたフラグメントは、該RNAから作成されたcDNAライブラリーとハイブリダイズするためのプローブとして使用されることができる。あるいは、得られたフラグメントは、RACE(cDNA末端の迅速増幅；Rapid amplification of cDNA ends) を繰り返し行い、5'端と3'端方向に伸張することができる。最後に、これらの標準的な分子生物学的手法を用い、ヒトクローンの配列決定（シーケンシング）および特性決定を行えば、概念的に翻訳してみるによりタンパク質を確認することができ、正常並びに病的な過程（プロセス）においてその推定される場所の役割を明らかにし、決定することができるようになる。こういった考えに基づいて本発明者等は鋭意研究調査並びに実験を進め、その結果、これまでとは異なるものを見出し、本発明を完成させた。

【0007】すなわち、本発明は

〔1〕ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法であって、

- a) ADAMTS タンパク質中の保存領域のヌクレオチド配列を発現遺伝子のデータバンクで見つかったヌクレオチドの部分配列と比較すること、
- b) ADAMTSsに対するホモロジー（同一性）を保持しているフラグメントの同定並びに該フラグメント配列が発現されているヒト組織の全RNAを用いてのPCRによる増幅、
- c) ヒトcDNAのライブラリーとハイブリダイズするプローブとして、該増幅されたフラグメントを使用することあるいは取得配列を5'端または3'端に向けて伸張するための該増幅されたフラグメントを使用すること、及び
- d) 得られたcDNAクローンを単離し、該ヌクレオチドの完全な配列を決定することからなる群から選ばれた処理を行うことを特徴とするヒトADAMTS-15、-16、-17、-18及び-19から成る群から選ばれたタンパク質又はそれ

をコードする遺伝子配列を同定する方法；

〔2〕ヒトタンパク質をコードしている同定された配列が、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18及びADAMTS-19から成る群から選ばれたものをコードする配列であることを特徴とする上記〔1〕記載のタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法；

〔3〕(a) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:1 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:2に示されたものの、

(b) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:3 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:4に示されたもの、

(c) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:5 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:6に示されたもの、

(d) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:7 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:8に示されたもの、及び

(e) 同定されたヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:9 に示されたもので、該ヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列がSEQ ID NO:10 に示されたものから成る群から選ばれたことを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕記載のタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法；

【0008】〔4〕ADAMTS-15活性、ADAMTS-16活性、ADAMTS-17活性、ADAMTS-18活性及びADAMTS-19活性から成る群から選ばれた活性に対する阻害剤をデザインするための、SEQ ID NO:1～10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用（その用途、使用方法あるいは該阻害剤スクリーニング用剤を含む）；

〔5〕組換えあるいは合成タンパク質生産のための、SEQ ID NO:1～10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用（その用途、使用方法あるいは該組換えあるいは合成タンパク質生産用剤を含む）；

【0009】〔6〕抗体作製のための、SEQ ID NO:1～10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用（その用途、使用方法あるいは抗体作製用剤を含む）；

〔7〕ADAMTSs に関して記載されている活性を持っているタンパク質及び/又は該ADAMTSs をコードする遺伝子を検出するためのシステムを構築するための、SEQ ID NO:1～10の配列から成る群から選ばれた配列の全部あるいはその一部の使用（その用途、使用方法あるいは該システム構築用剤を含む）；及び

〔8〕ADAMTSs に関して及び/又は該ADAMTSs をコードする遺伝子に関してメディエートされる病気発生プロセスを処置するための活性化化合物を製造するための、SEQ ID NO:1～10の配列から成る群から選ばれた配列の全部

あるいはその一部の使用（その用途、使用方法あるいは該活性化化合物製造用剤を含む）を提供するものである。

【0010】本発明は、

〔9〕 (i) ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質、(ii) (A) SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:5のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:7のヌクレオチド配列及びSEQ ID NO:9のヌクレオチド配列から成る群から選ばれたヌクレオチド配列及び(B)その多形型配列、オールターナティブプライシング産物、変異体、誘導体配列あるいは部分配列であって且つタンパク分解活性を持つ酵素をコードするかあるいは細胞接着、ホメオスタシスあるいは血管新生のプロセスに関与するもの、から成る群から選ばれたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列の全部あるいはその一部を有するポリペプチド、(iii) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列からなるポリペプチドあるいはその一部の配列からなるポリペプチド、(iv) 前記(i)のタンパク質並びに(ii)及び(iii)のポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか一において、1個以上のアミノ酸あるいは1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)または(iii)のポリペプチドの示す生物学的活性を有するポリペプチド、及び(v) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列に存在する各ドメインのいずれか一に対し少なくとも50%以上、あるいは60%以上、又は少なくとも70%より高い相同性を有しているもの、あるいはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するポリペプチドから成る群から選ばれたものであることを特徴とするタンパク質若しくはポリペプチド又はその塩、あるいは(vi) 前記(i)~(v)のいずれか一記載のタンパク質若しくはポリペプチドの部分ペプチド又はその塩；

【0011】〔10〕 上記〔9〕記載の(i)~(vi)のいずれか一記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩に特異的に結合することを特徴とする抗体；

〔11〕 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔10〕記載の抗体；

〔12〕 (i) ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質をコードするポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID N

0:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列からなるポリペプチドあるいはその一部の配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(iii) (A) SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:5のヌクレオチド配列、SEQ ID NO:7のヌクレオチド配列及びSEQ ID NO:9のヌクレオチド配列から成る群から選ばれた配列及び(B)その多形型配列、オールターナティブプライシング産物、変異体、誘導体配列あるいは部分配列であって且つタンパク分解活性を持つ酵素をコードするかあるいは細胞接着、ホメオスタシスあるいは血管新生のプロセスに関与するもの、から成る群から選ばれた配列からなるポリヌクレオチド、(iv) (i)のタンパク質のアミノ酸配列又は(ii)のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸あるいは1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)のポリペプチドの示す生物学的活性又は(iii)で言及した生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(v) SEQ ID NO:1の配列、SEQ ID NO:3の配列、SEQ ID NO:5の配列、SEQ ID NO:7の配列及びSEQ ID NO:9の配列から成る群から選ばれた配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)のポリペプチドの示す生物学的活性又は(iii)で言及した生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び(vi) SEQ ID NO:1の配列、SEQ ID NO:3の配列、SEQ ID NO:5の配列、SEQ ID NO:7の配列及びSEQ ID NO:9の配列から成る群から選ばれた配列の少なくともコーディングシーケンス(coding sequence, CDS)に対して少なくとも50%以上、さらには60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、あるいは95%以上の相同性を有し且つ(i)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(ii)のポリペプチドの示す生物学的活性又は(iii)で言及した生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから成る群から選ばれたものであることを特徴とするポリヌクレオチド；

【0012】〔13〕 上記〔12〕記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする組換えベクター；

〔14〕 上記〔12〕記載のポリヌクレオチド又は上記〔13〕記載のベクターで宿主細胞を形質転換されて得られたことを特徴とする形質転換された宿主細胞；

〔15〕 上記〔14〕記載の宿主細胞を培養条件下に維持して、上記〔9〕記載のタンパク質又はポリペプチドを発現せしめ、得られた発現ポリペプチドを分離することを特徴とする上記〔9〕記載のタンパク質又はポリペプチドの製造方法；

〔16〕 上記〔10〕記載の抗体を含むことを特徴と

する上記〔9〕記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬；

〔17〕 上記〔10〕記載の抗体を測定試薬として用いることを特徴とする上記〔9〕記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法；

〔18〕 (1) 上記〔9〕記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩あるいはその一部のペプチドまたはその塩、(2) 上記〔10〕記載の抗体、(3) 上記〔12〕記載のポリヌクレオチド、(4) 上記〔13〕記載の組換えベクター及び(5) 上記〔14〕記載の形質転換された細胞から成る群から選ばれたものを含むことを特徴とする組成物；

〔19〕 上記〔9〕記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩、その一部のペプチドまたはそれらの塩；あるいは上記〔12〕記載のポリヌクレオチド；あるいは上記〔10〕記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬；

〔20〕 上記〔9〕記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩、その一部のペプチドまたはそれらの塩の、生物学的活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有していることを特徴とする医薬；及び
〔21〕 上記〔9〕記載のタンパク質若しくはポリペプチドまたはその塩、その一部のペプチドまたはそれらの塩の、生物学的活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法およびスクリーニングキットを提供する。

【0013】本発明の目的の一つは、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18及びADAMTS-19から成る群から選ばれた新規ヒトタンパク質をコードするヒト遺伝子を確認同定することにある。本発明の第二の目的は、ヒト組織中のヒトADAMTS-15遺伝子、ヒトADAMTS-16遺伝子、ヒトADAMTS-17遺伝子、ヒトADAMTS-18遺伝子及びヒトADAMTS-19遺伝子から成る群から選ばれた遺伝子の発現を解析することにある。本発明の第三の目的はヒト腫瘍中のヒトADAMTS-15 遺伝子、ヒトADAMTS-16遺伝子、ヒトADAMTS-17遺伝子、ヒトADAMTS-18遺伝子及びヒトADAMTS-19遺伝子から成る群から選ばれた遺伝子の発現を解析することにある。

【0014】本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び/又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特

許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明では、「遺伝子組換え技術」を利用して所定の核酸を単離・配列決定したり、組換え体を作製したり、所定のペプチドを得ることができる。本明細書中使用できる遺伝子組換え技術としては、当該分野で知られたものが挙げられ、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III (組換えDNA 技術)」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0016】本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出することができる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G.

(Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stokton Press, New York, (1991) 等)。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), Guide to Huge Computers, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) 等に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータープログラム法としては、GCG プログラムパッケージ(Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215: 403 (1990)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

【0017】本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、以下に記載するような如何なるポリペプチドを指すものであってもよい。ポリペプチドの基本的な構造は周知であり、当該技術分野において非常に数多くの参考書及びその他の刊行物に記載がある。こうしたことに鑑み、本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合又は修飾したペプチド結合により互いに結合しているような2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又は任意のタンパク質を意味する。本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、当該分野において、例えばペプチド、オリゴペプチドあるいはペプチドオリゴマーとも称せられる短い鎖のもの、及びタンパク質と一般的に言われ、多くの形態のものが知られている長い鎖のものの両方を通常意味してよい。ポリペプチドは、しばしば、通常、天然型アミノ酸(天然に存在しているアミノ酸: あるいは遺伝子でコードされるアミノ酸)と称されるアミノ酸以外のアミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチドは、また末端アミノ酸残基を含めて、その多くのアミノ酸残基が翻訳された後にプロセッシング及びその他の改変(あるいは修飾)されるといった天然の工程によるのみならず、当業者に周知の化学的改変技術によっても、上記のポリペプチドはそれが改変(修飾)できることは理解されよう。該ポリペプチドに加えらる改変(修飾)については、多くの形態のものが知られており、それらは当該分野の基礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。幾つかの

とりわけ常套的な改変・修飾としては、例えばアルキル化、アシル化、エステル化、アミド化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、リン酸化、グルタミン酸残基の - カルボキシル化、水酸化及びADP-リボシル化等が挙げられ、例えばT. E. Creighton, Proteins-Structure and Molecular Properties, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); B.C. Johnson (Ed.), Posttranslational Covalent Modification of Proteins, Academic Press, New York, (1983) (Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects", pp.1-12); Seifter et al., "Analysis for Protein Modifications and nonprotein cofactors", Methods in Enzymology, 182: 626-646 (1990); Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging", Ann. N. Y. Acad. Sci., 663: p.48-62 (1992)等の記載を参照できる。

【0018】本明細書において「ADAMTS-15タンパク質」(又はADAMTS-15ポリペプチド)、「ADAMTS-16タンパク質」(又はADAMTS-16ポリペプチド)、「ADAMTS-17タンパク質」(又はADAMTS-17ポリペプチド)、「ADAMTS-18タンパク質」(又はADAMTS-18ポリペプチド)及び「ADAMTS-19タンパク質」(又はADAMTS-19ポリペプチド)とは、それぞれ既知のADAMTSに類似して、メタロプロテアーゼ領域(ドメイン)とディスインテグリン領域(ドメイン)を有しているペプチドであって、本発明で開示されている新規なペプチドを指している。該ADAMTSタンパク質のそれぞれは、潜在型酵素形態を維持するように働くと考えられるプロ領域(ドメイン)が認められ、さらにフーリンまたはフーリン様プロテアーゼといったプロタンパク変換酵素に感受性領域を持ち、そして触媒領域(ドメイン)も認められ、該触媒領域は、活性部位に触媒作用 Zn^{2+} 原子を配位するのに関与する配列、HEXXHXXGXXHDを含有しており、その配列は、Asp残基で終わっていることを特徴としている。また、該ADAMTSタンパク質のそれぞれは、前記 Zn^{2+} 結合部位のC末端側のいくつかの残基において、レプロリシン類やMMPsに特徴的な"Met-turn"を形成するMet残基があり、また、ディスインテグリン領域(ドメイン)は触媒領域の後に位置しており、そのサイズは他のADAMTSに類似しており、全てのメンバー中でよく保存されているところの、8個のCysを保持しているとの特徴もある。該ADAMTSタンパク質のそれぞれは、そのシステインリッチ領域(ドメイン)で他のADAMTSs 中の同等の領域と高い%で同一性(約50%)を示し、そしてさらに、他の全ADAMTSs 中で保存されているところの、10個のCys残基を示しているといったものである。上記した特徴的な領域(ドメイン)の全部あるいはその一部をその一体性を損なわない範囲で保有するものは、本発明で意図するADAMTSタンパク質の範囲内にあると考えてよい。

【0019】本発明の代表的なADAMTS-15タンパク質と

しては、配列表の配列番号:1(SEQ IDNO:1) のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:2(SEQ ID NO:2) のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、SEQ ID NO:2 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5~950 個の連続したアミノ酸残基を有し且つ酵素活性あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表のSEQ ID NO:2 の各ドメインのいずれか一つと少なくとも50% より高い相同性、あるいは少なくとも60% より高い相同性、あるいは少なくとも70% より高い相同性、あるいは少なくとも80% より高い相同性、あるいは少なくとも90% より高い相同性、あるいは少なくとも95% 以上の相同性、あるいは少なくとも98% 以上の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。本発明の代表的なADAMTS-16タンパク質としては、配列表の配列番号:3(SEQ IDNO:3) のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:4(SEQ ID NO:4) のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、SEQ ID NO:4 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5~1072個の連続したアミノ酸残基を有し且つ酵素活性あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表のSEQ ID NO:4 の各ドメインのいずれか一つと少なくとも50% より高い相同性、あるいは少なくとも60% より高い相同性、あるいは少なくとも70% より高い相同性、あるいは少なくとも80% より高い相同性、あるいは少なくとも90% より高い相同性、あるいは少なくとも95% 以上の相同性、あるいは少なくとも98% 以上の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。本発明のADAMTS-16の特徴的な配列としては、SEQ ID NO:4 のアミノ酸配列のうちの1063~1072番目に存在する連続したC末端のアミノ酸配列 VGALVSRERG が挙げられ、本発明のADAMTS-16タンパク質としては、該特徴的な配列を実質的に維持しているもの、例えば1072番目のアミノ酸残基をC末端としたもの、あるいはそれから1~9 個のC末端側のアミノ酸残基を欠いているものなどが挙げられる。

【0020】本発明の代表的なADAMTS-17タンパク質としては、配列表の配列番号:5(SEQ IDNO:5) のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:6(SEQ ID NO:6) のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、SEQ ID NO:6 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5~1095個の連続したアミノ酸残基を有し且つ酵素活性あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表のSEQ ID NO:6 の各ドメインのいずれか一つと少なくとも50% より高い相同性、あるいは少な

くとも60% より高い相同性、あるいは少なくとも70% より高い相同性、あるいは少なくとも80% より高い相同性、あるいは少なくとも90% より高い相同性、あるいは少なくとも95% 以上の相同性、あるいは少なくとも98% 以上の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。本発明の代表的なADAMTS-18タンパク質としては、配列表の配列番号:7(SEQ IDNO:7) のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:8(SEQ ID NO:8) のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、SEQ ID NO:8 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5~1081個の連続したアミノ酸残基を有し且つ酵素活性あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表のSEQ ID NO:8 の各ドメインのいずれか一つと少なくとも50% より高い相同性、あるいは少なくとも60% より高い相同性、あるいは少なくとも70% より高い相同性、あるいは少なくとも80% より高い相同性、あるいは少なくとも90% より高い相同性、あるいは少なくとも95% 以上の相同性、あるいは少なくとも98% 以上の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。

【0021】本発明の代表的なADAMTS-19タンパク質としては、配列表の配列番号:9(SEQ IDNO:9) のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:10(SEQ ID NO:10) のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、SEQ ID NO:10のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5~1207個の連続したアミノ酸残基を有し且つ酵素活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表のSEQ ID NO:10の各ドメインのいずれか一つと少なくとも50% より高い相同性、あるいは少なくとも60% より高い相同性、あるいは少なくとも70% より高い相同性、あるいは少なくとも80% より高い相同性、あるいは少なくとも90% より高い相同性、あるいは少なくとも95% 以上の相同性、あるいは少なくとも98% 以上の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。本発明のヒトADAMTSポリペプチドとしては、SEQ ID NO:2 のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列又はSEQ ID NO:10のアミノ酸配列の全部又は一部を含む連続したアミノ酸残基、あるいは該SEQ ID NO:2, 4, 6, 8及び10のアミノ酸配列のうちの連続したアミノ酸残基5個以上、好ましくは10個以上、また好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上、より好ましくは40個以上、また好ましくは50個以上、さらに好ましくは60個以上、もっと好ましくは70個以上、また好ましくは80個以上、さらに好ましくは90個以上、もっとも好ましくは100 個以上、また好ましくは110個以上を有するものが挙げられる。本発明のADAMTS関連ポリペプチドとしては、SEQ ID

NO:2, 4, 6, 8及び10から成る群から選ばれたアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい(開始コドンに対応するMetを欠いていてもよい)。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。

【0022】本発明の当該ADAMTSタンパク質又はポリペプチド(ADAMTS-15タンパク質又はポリペプチド、ADAMTS-16タンパク質又はポリペプチド、ADAMTS-17タンパク質又はポリペプチド、ADAMTS-18タンパク質又はポリペプチド及びADAMTS-19タンパク質又はポリペプチド)をコードする核酸は、代表的には配列表のSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8あるいはSEQ ID NO:10で表されるペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、例えば、配列表のSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7あるいはSEQ ID NO:9で表される塩基配列の少なくともペプチドコード領域により構成される塩基配列を含有するもの(各特徴的なドメインのみをコードするものも包含する)、コード配列に開始コドン(Metをコードするコドン)及び終止コドンを付加したものの、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を持ち且つSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8あるいはSEQ ID NO:10のアミノ酸配列のうちの少なくとも特徴的な連続したアミノ酸残基を有し、尚且つ酵素活性あるいは同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。例えば、ADAMTS-16は、C末端に特徴的な配列 VGALVSRERG (1063-1072番)を有しており、該特徴的な配列を実質的に維持してコードしているもの、例えばSEQ ID NO:4のアミノ酸配列のうちの1072番目のアミノ酸残基をC末端としたものをコードしているもの(例えば、3'端にGTAGGTGCACTGGTCTCGCGGAGCGAGTTGAあるいはそれに相当する塩基配列を有するものを含む)、あるいはそれから1~9個のC末端側のアミノ酸残基を欠いているものなどを特徴的にコードしているものなどが挙げられる。当該ADAMTSタンパク質をコードする核酸は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNAハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。該当該ADAMTSタンパク質をコードする核酸の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。さらには、以下説明するように、本発明の核酸は、本発明のペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で配列表のSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7あるいはSEQ ID NO:9の塩基配列のうちの連続した5個以上の

塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、該当該ADAMTSタンパク質と実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。

【0023】本明細書中、「ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(polymerase chain reaction)」又は「PCR」とは、一般的に、米国特許第4,683,195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCR法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用することができる。5'端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含むか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また3'端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含むか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅できるように選択することが好ましい。プライマーは、好ましくは5個以上の塩基、さらに好ましくは10個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは18~25個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

【0024】PCR反応は、代表的な場合には、例えば鋳型(例えば、mRNAを鋳型にして合成されたDNA; 1st strand DNA)と該遺伝子に基づいてデザインされたプライマ

ーとを、10×反応緩衝液 (Taq DNA ポリメラーゼに添付されている)、dNTPs (デオキシヌクレオシド三リン酸 dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物)、Taq DNA ポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetus社などの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCR サイクル条件下にそのサイクルを25~60回繰り返すが、増幅のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCR サイクル条件としては、例えば、変性90~95 5~100 秒、アニーリング40~60 5 10 ~150 秒、伸長65~75 30 ~300 秒のサイクル、好ましくは変性 94 15 秒、アニーリング 58 15 秒、伸長 72 45 秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR 産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと鋳型DNA とのハイブリッドのT_m値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1 分程度がおおよそ目安であるが、より短い時間を選択すること 20 も場合により可能である。

【0025】本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol.28, p.716-734 (1989) に記載されているような既知の方法、例えば、フォスフォトリエステル法、フォスフォジエステル法、フォスファイト法、フォスフォアミダイト法、フォスフォネート法などの方法により化学合成されることができる。通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有してよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有してよいし、場合によっては、マーカーの付された塩基を含有してよい。

【0026】所定の核酸を同定したりするには、ハイブリダイゼーション技術を利用することができる。該ハイブリダイゼーションは、上記「遺伝子組換え技術」を開示する文献記載の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションは、DNA などの核酸を含有しているサンプルをナイロンフィルターなどの膜を含めた担体に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その担体 (例えば、膜など) に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA 断片と、ハイブリダイゼーション用緩衝液中で反応させて行われる。ハイブリダイゼーション処理は、普通約 35~約80、より好適には約50~約65 で、約15分間~ 50

約36時間、より好適には約1~約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55 で約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham社) などを用いることができる。転写した担体 (例えば、膜など) の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また担体 (例えば、膜など) の固定化処理としては、普通約40~約100、より好適には約70~約90 で、約15分間~約24時間、より好適には約1~約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターなどの担体を約80 で約2 時間ベーキングすることにより固定化が行われる。転写した担体 (例えば、膜など) の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 含有 50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜を含めた担体としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができる。

【0027】上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5M NaOH および1.5M NaCl を含有する液などを挙げることができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl 含有 0.5M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0などを挙げることもでき、緩衝液としては、例えば、2×SSPE (0.36M NaCl、20mM Na₂HPO₄および2mM EDTA)などを挙げることもできる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した担体 (例えば、膜など) はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液 [50% formamide、5×Denhardt's溶液 (0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinyl pyrrolidone)、5×SSPE、0.1% SDS、100 µg/ml 熱変性サケ精子DNA]などに浸し、約35~約50、好ましくは約42 で、約4~約24時間、好ましくは約6~約8 時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA 断片の変性は、例えば、約70~約100、好ましくは約100 で、約1~約60分間、好ましくは約5分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム

濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85、好ましくは約50～約70、より好ましくは約60～約65の条件を示す。

【0028】ハイブリダイゼーション完了後、フィルターなどの担体を十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA断片以外の標識プローブを取り除くなどしてから検出処理をすることができる。フィルターなどの担体の洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1% SDS含有0.5×SSC (0.15M NaCl、15mM クエン酸) 溶液などで洗うことにより実施できる。ハイブリダイズした核酸は、代表的にはオートラジオグラフィにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択して検出に用いることもできる。検出したシグナルに相当する核酸バンドを、適切な緩衝液、例えば、SM溶液(100mM NaCl および10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5)などに懸濁し、ついでこの懸濁液を適度に希釈して、所定の核酸を単離・精製、そしてさらなる増幅処理にかけることができる。ハイブリダイゼーション処理により遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーなどを含めた核酸サンプルから目的核酸をスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。クローニングされているヒト由来のcDNAライブラリー、例えば種々のヒト由来の組織あるいは培養細胞(特に、ヒトの腎臓、脳、松果体、下垂体後葉、神経細胞、網膜、網膜血管細胞、網膜神経細胞、胸腺、血管、内皮細胞、血管平滑筋細胞、血液細胞、マクロファージ、リンパ球、精巣、卵巣、子宮、腸、心臓、肝臓、膵臓、小腸、大腸、歯肉関連細胞、皮膚関連細胞、糸球体細胞、尿管細胞、結合組織細胞などの組織・細胞、さらには各種腫瘍組織、ガン細胞等)cDNAライブラリーを使用できる。さらに鋳型などとして用いるcDNAライブラリーは、市販の種々の組織由来cDNAライブラリーを直接使用することもでき、例えばStratagene社、Invitrogen社、Clontech社などから市販されたcDNAライブラリーを用いることができる。典型的な例では、ヒト組織・細胞から調製した遺伝子ライブラリー、例えばヒトP1 artificial chromosome ゲノミックライブラリー(Human Genome Mapping Resource Center)、ヒト組織cDNAライブラリー(例えば、Clontech社などから入手可能)を用いることができる。種々のヒト組織あるいは培養細胞等から構築されたヒトゲノミックDNAライブラリーあるいはヒト由来cDNAライブラリーをプローブを使用してスクリーニングできる。プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムDNAラベリングキット(Boehringer Mannheim社)などを使用して行うことができる。例えば、random-primingキット(Pharmacia LKB社、Uppsala)などを使用して、プローブ用DNAを[⁻³²P]

dCTP (Amersham社)などで標識し、放射活性を持つプローブを得ることができる。

【0029】所定の核酸を保有する、ファージ粒子、組換えプラスミド、組換えベクターなどは、当該分野で普通に使用される方法でそれを精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法(Molecular Cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989)、電気泳動法などにより精製することができる。ファージ粒子などからは、当該分野で普通に使用される方法でDNAを精製分離することができ、例えば、得られたファージなどをTM溶液(10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.8)などに懸濁し、DNase I およびRNase Aなどで処理後、20mM EDTA、50μg/ml Proteinase K 及び0.5% SDS 混合液などを加え、約65、約1時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させ、次に得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10mM EDTA 含有10mM Tris-HCl 緩衝液、pH8.0)に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNAは、サブクローニングなどにより大量に得ることも可能であり、例えばサブクローニングは、宿主として大腸菌を用いたサブクローニングにより得られたDNAも、上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

【0030】本明細書において、核酸(又はポリヌクレオチド)は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNAハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。核酸の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも含まれてよい。核酸は、本発明で記載するペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また核酸は、対象ポリペプチド(タンパク質)、例えばADAMTS-15、-16、-17、-18及び-19のそれぞれ、あるいはそれらの部分配列と同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチド(それと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものを含むし、それと高い相同性を有するものも含まれてよい)をコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。ヒト、チンパンジー、サル、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギなどの哺乳動物由来のものも含まれてもよい。本明細書で「高い相同性」といった場合当該対象配列の長さにもよるが、例えば50%以上、さらには60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、そして特定の場合には95%以上で、特に好ましくは97%以上であってよ

い。該「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で問題の配列を有するものにハイブリダイズするものであってよく、例えば当該塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、当該ポリペプチドと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。

【0031】本明細書において、得られたPCR産物などの核酸(DNAを含む)は、通常1~2%アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いて抽出する。抽出されたDNAは適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18などのpUC系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピテント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR産物はその塩基配列を解析される。PCR産物のクローニングには、例えば、p-Direct (Clontech社)、pCR-Script™ SK(+) (Stratagene社)、pGEM-T (Promega社)、pAmp™ (Gibco-BRL社)などの市販のプラスミドベクターを用いることができる。宿主細胞の形質転換をするには、例えばファージベクターを使用したり、カルシウム法、ルビジウム/カルシウム法、カルシウム/マンガン法、TFB 高効率法、FSB 凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる(D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983など)。目的とするDNAを単離するためには、逆転写PCR (polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE (rapid amplification of cDNA ends) を適用することができる。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols" (M. A. Frohman, "a guide to methods and applications"), pp.28-38, Academic Press, New York (1990)などに記載された方法に従って行うことができる。

【0032】DNAは、必要に応じてクローニングでき、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YACなどが利用できる。好ましくはファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、gt10、gt11、DASHII、FIXII、EMBL3、ZAPII™ (Stratagene社)などが利用できる。また、得られたDNAを、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX、pMAMneo、pKG5などのベクターに組み込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO細胞、COS細胞などで発現させることができる。また、該DNA

断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA断片として、または適当なベクターに組み込み、そして動物に導入して、所定の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成することができる。動物としては、哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。所定の遺伝子産物の確認を、当該外来遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法(例えば、F. L. Graham et al., Virology, 52: 456, 1973など)、DEAE-デキストラン法(例えば、D. Warden et al., J. Gen. Virol., 3: 371, 1968など)、エレクトロポレーション法(例えば、E. Neumann et al., EMBO J, 1: 841, 1982など)、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして所定の遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

【0033】所定の遺伝子など(本発明で得られたDNAなどを)を組み込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞(例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、293T細胞、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主)中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。もちろん、市販のキットや試薬に添付のものから選んで使用することもできる。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列(ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む)等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター(trp)、ラクトースプロモーター(lac)、トリプトファン・ラクトースプロモーター(tac)、リポプロテインプロモーター(lpp)、ファージP_Lプロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。さらにCYC1、HIS3、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU

2, EN0, TP1, AOX1等の制御系を使用することもできる。

【0034】所望ポリペプチドをコードするDNAのトランスクリプションを促進するためエンハンサーをベクターに挿入することができ、そうしたエンハンサーとしてはプロモーターに働いてトランスクリプションを促進する作用を持つ、通常約10~100 bpの cis作用を持つエレメントのものが挙げられる。多くのエンハンサーが、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、インシュリンなどの哺乳動物遺伝子から知られている。代表的には、真核細胞感染性ウイルスから得られるエンハンサーが好適に使用でき、例えばレプリケーションオリジンのレート領域にあるSV40エンハンサー (100-270 bp)、サイトメガロウイルスの初期プロモーターのエンハンサー、ポリオーマのレプリケーションオリジンのレート領域にあるエンハンサー、アデノウイルスのエンハンサーなどの例が挙げられる。また、必要に応じて、宿主にあったシグナル配列を付加することもでき、それらは当業者によく知られているものを使用できる。

【0035】大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KS™ (Stratagene社)などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、例えばpAS、pKK23 (Pharmacia社)、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B (Invitrogen社)なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、例えばSV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、具体的にはpcD、pcD-SR、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene社)などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えばNM533、XL1-Blue、C600、DH1、DH5、DH11S、DH12S、DH5、DH10B、HB101、MC1061、JM109、S TBL2、B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。宿主細胞が酵母の場合、例えば *Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、*Kluyveromyces* 株、*Candida*、*Trichoderma reesei*、その他の酵母株などが挙げられる。

【0036】宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、ヒト腎細胞由来293細胞、ヒト表皮細胞由来A431細胞、ヒト結腸由来205細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR⁻細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来

NIH 3T3細胞、マウスL細胞、9BHK、HL-60、U937、HaK、Jurkat細胞、その他の形質転換されて得られたセルライン、通常の二倍体細胞、インビトロの一次培養組織から誘導された細胞株などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus)、それに由来するものあるいはその他の適切なものをベクターとし、*Spodoptera frugiperda* (caterpillar)、*Aedes aegypti* (mosquito)、*Aedes albopictus* (mosquito)、*Drosophila melanogaster* (fruitfly)、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる (例えば、Luckow et al., *Bio/Technology*, 6, 47-55 (1988); Setlow, J. K. et al. (eds.), *Genetic Engineering*, Vol. 8, pp.277-279, Plenum Publishing, 1986; Maeda et al., *Nature*, 315, pp.592-594 (1985))。 *Agrobacterium tumefaciens*などを利用して、植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.*, 13: r165, 1985; S. Linn et al. ed. *Nucleases*, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982; R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.*, 19: Suppl. 2077, 1991などに記載のものが挙げられる。

【0037】本発明に従い、ポリペプチド(又はタンパク質)をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカーを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、dhfr遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のポリペプチドをコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、

たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地のpHは約5~約8が望ましい。

【0038】培養は、例えば大腸菌では通常約15~約45で約3~約75時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~約20%の胎児牛血清を含むMEM 培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6~約8であるのが好ましい。培養は通常約30~約40で約15~約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。所定の遺伝子産物を発現している形質転換体はそのまま利用可能であるが、その細胞ホモジュネートとしても利用できるが、所定の遺伝子産物を単離して用いることもできる。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離や過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100 (商品名)、ツウィーン-20 (商品名)などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

【0039】このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0040】さらに得られた本発明のポリペプチド(又はタンパク質)は、化学的手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などに行うことができる。本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェニルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

【0041】さらに、本発明のポリペプチド(又はタンパク質)には、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₅アルキル-カルボニル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

【0042】さらに、本発明に係わる遺伝子の塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、所定のポリペプチドのアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するポリペプチドを製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、例えば日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105(広瀬進)、東京化学同人(1986);日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、p233(広瀬進)、東京化学同人(1992); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350& p. 367, Acad

emic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells et al., *Gene*, 34: 315, 1985; T. Grundstroem et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 3305, 1985; J. Taylor et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., *Gene*, 44: 177, 1986 などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)(Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10: 6487, 1987; Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13: 4331, 1986), カセット変異導入法(cassette mutagenesis: Wells et al., *Gene*, 34:315, 1985), 制限部位選択変異導入法(restriction selection mutagenesis: Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London Ser A*, 317: 415, 1986), アラニン・スキャンニング法(Cunningham & Wells, *Science*, 244: 1081-1085, 1989), PCR 変異導入法, Kunkel法, dNTP[S]法(Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

【0043】また、遺伝子組換え法で製造する時に融合ポリペプチド(融合タンパク質)として発現させ、生体内あるいは生体外で、所望のポリペプチドと実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合ポリペプチドはその融合部を利用してアフィニティークロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合ポリペプチドとしては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、-ガラクトシダーゼ(-gal)、マルトース結合タンパク(MBP), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン(TRX)又は Cre Recombinaseのアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、ポリヒスチジン(poly-His)又はポリヒスチジン-グリシン(poly-His-Gly)タグ、また該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G などが挙げられる(Field et al., *Molecular and Cellular Biology*, 8: pp.2159-2165 (1988); Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: p.3610-3616 (1985); Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6): pp.547-553 (1990); Hopp et al., *BioTechnology*, 6: pp.1204-1210 (1988); Martin et al.,

Science, 255: pp.192-194 (1992); Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: pp.15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: pp.6393-6397 (1990) など)。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。

【0044】さらに融合ポリペプチドとしては、検出可能なタンパク質となるようなマーカーを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカーは、ビオチン/ストレプトアビジン系の Biotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体(GFPパリアント)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質(yellow fluorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質(cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質(blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ(*Renilla reniformis*)由来のGFPなどが挙げられる(宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座3-GFPとバイオイメージング、羊土社(2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体(モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む)を使用して検出を行うこともできる。こうした融合ポリペプチドの発現及び精製は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。得られたタンパク質(ペプチドあるいはポリペプチドを包含してよい)は、それを酵素免疫測定法など知られた手法で、適当な担体あるいは固相に結合せしめて固相化することができる。固相化タンパク質、固相化ペプチドは、便利に結合アッセイや物質のスクリーニングに使用できる。

【0045】ポリペプチドやタンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生物化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するという事も含まれてよい。該修飾・改変のうちには、脱アミノ化、ヒドロキシル化、カルボキシル化、リン酸化、硫酸化、メチル化などのアルキル化、アセチル化などのアシル化、エステル化、アミド化、開環、閉環、グリコシル化、含有糖鎖の種類を違うものに変えること、含有糖鎖の数を増減すること、脂質結合、D-体アミノ酸残基への置換などであってもよい。それらの方法は、当該分野で知られている(例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*

ies, pp.79-86 W.H. Freeman & Co., San Francisco, US A (1983) 等)。本発明のヒト由来のペプチドあるいはポリペプチド(又はタンパク質)は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよい。本発明のヒト由来のペプチドは、ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質に特有なアミノ酸残基が1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さら

10 に好ましくは1~20個、特には1~10個など)欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。

【0046】天然のヒトADAMTS-15、天然のヒトADAMTS-16、天然のヒトADAMTS-17、天然のヒトADAMTS-18及び天然のヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質の特徴であるドメイン構造あるいは基質結合能が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のペプチドあるいはポリペプチドは天然のヒトADAMTS-15、天然のヒトADAMTS-16、天然のヒトADAMTS-17、天然のヒトADAMTS-18及び天然のヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然の

30 のものと実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明のヒト由来のタンパク質(又はペプチドあるいはポリペプチド)は、例えば、配列表のSEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれたアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上

40 の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられる。本発明のヒト由来のタンパク質の一部のものは、該ヒト由来のタンパク質の一部のペプチド(すなわち、該タンパク質の部分ペプチド)であって、本発明の、ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質と実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、該ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18又はヒトADAMTS-19の構成アミ

50

ノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは50個以上、より好ましくは70個以上、もっと好ましくは100個以上、ある場合には200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例えば、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:10で示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

【0047】本明細書において、「実質的に同等」とはタンパク質の活性、例えば、酵素活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、細胞接着活性、細胞外タンパク分解活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、酵素活性などの活性が、同等(例えば、約0.001~約1000倍、好ましくは約0.01~約100倍、より好ましくは約0.1~約20倍、さらに好ましくは約0.5~約2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。次に、アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、しばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないし、こうした場合、その置換、欠失、あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。

30 該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性(中性)としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸(塩基性アミノ酸)としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸(酸性アミノ酸)としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる。こうした方法では、例えばタンパク質あるいはペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、そうした試薬としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなど

50

カルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。

【0048】本発明のペプチド（又はポリペプチド）は、それが遊離型のものとして得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換することができる、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離型のものあるいは他の塩に変換することができる。本発明のペプチド（又はポリペプチド）の塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

【0049】本発明の当該ADAMTSタンパク質及びその変異体、修飾体、誘導体などは、上記で説明したような分離・精製処理を施すことができる。本発明では、「断片」、「誘導体」及び「類縁体」なる用語は、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8あるいはSEQ ID NO:10のポリペプチド、SEQ ID NO:1の配列、SEQ ID NO:3の配列、SEQ ID NO:5の配列、SEQ ID NO:7の配列あるいはSEQ ID NO:9の配列から転写され且つスライシングされていないか又は特異的にスライシングされた hnRNA又はmRNAによりコードされるポリペプチド、又はゲノミックDNAによりコードされるポリペプチドに関連して、その「断片」、「誘導体」又は「類縁体」と称した場合、このようなポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能又は活性を有しているポリペプチドを意味する。従って、類似体にはプロタンパク質部分が切断されて活性成熟ポリペプチドを産生するような、活性化できるプロタンパク質等が包含される。本発明のポリペプチドは組換えポリペプチド、天然ポリペプチド又は合成ポリペプチドでよい。特定の好ましい態様では、これは組換えポリペプチドである。

【0050】一方では、本発明は上記したポリペプチドをコードするDNA配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有する当該ADAMTSタンパク質のポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードするDNA配列も包含する。本発明のポリヌクレオチドは、アミノ末端に付加アミノ酸又はカルボキシル末端に付加アミノ酸を加えた成熟タンパク質、又は成熟タンパク質に内在するポリペプチド（例えば、成熟形態で一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合）のアミノ酸をコードしているもの

であることができる。このような配列は、前駆体から成熟形態のタンパク質へのプロセッシングにおいても何らかの働きをなすものであってよく、例えば、タンパク質の移動や輸送を促進したり、タンパク質の半減期を延長もしくは短縮したり、又はタンパク質を操作してその検出もしくは産生を容易にすることができるものであってよい。一般的には、例えば、付加アミノ酸は、細胞酵素によりプロセッシングされ、成熟タンパク質から取り除かれる。1又はそれ以上のプロ配列と融合した成熟形態ポリペプチドを有する前駆タンパク質は、不活性形態ポリペプチドであることができる。プロ配列が除去されると、このような不活性前駆体は、通常活性化される。プロ配列のいくつか又は全ては、活性化の前に除去できる。通常、このような前駆体はプロタンパク質と称される。本発明のポリペプチドは、成熟タンパク質、リーダー配列を付加してある成熟タンパク質（プレタンパク質と称することができる）、プレタンパク質のリーダー配列ではない1又はそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、又はリーダー配列及び1又はそれ以上のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレタンパク質であってよい。また、該プロ配列は通常活性形態ポリペプチド及び成熟形態ポリペプチドを産み出すようなプロセッシングの段階で除去され得る。

【0051】本発明では当該ADAMTS遺伝子（当該ADAMTSタンパク質及びその変異体、修飾体、誘導体などの関連遺伝子を含む）あるいはADAMTSを発現できる組換えDNA分子を宿主に移入し、当該ADAMTSタンパク質を発現させ、目的とする当該ADAMTSタンパク質を得る方法が提供される。こうして本発明によれば、当該ADAMTSタンパク質の遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェクタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。本発明のADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18、ADAMTS-19あるいはその塩は、当該ADAMTSタンパク質無形成症、当該ADAMTSタンパク質発現不全症、当該ADAMTSタンパク質遺伝子欠損症など病状を呈する当該ADAMTSタンパク質関連機能不全疾患の治療に有用であると考えられる。すなわち、当該ADAMTSタンパク質、変異体、修飾体、誘導体を含有する医薬を用いれば、当該ADAMTSタンパク質による活性が不十分であることに起因する疾患患者を健常な状態にすることが可能である。例えば、生体内において当該ADAMTSタンパク質が減少あるいは欠損しているために、細胞における当該生物学的活性が十分に得られていないか、あるいは正常でない症状の患者の場合には、(A) 本発明のタンパク質等を該患者に投与することによるか、(B) 本発明のDNAなどの核酸を該患者に投与して、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによるか、(C) 本発明のDNAなどの核酸を発現可能に導入した細胞を該患者に移植することによって、生体内に本発明のタンパク質等を補充する等して、該患者における当該症状を改善したりする。

【0052】別の面では、本発明はADAMTSタンパク質ファミリーに属する天然型（ネイティブ）の各当該ADAMTSタンパク質（特に、内在性(endogenous)ADAMTSタンパク質）に関し、各ADAMTSタンパク質に関連付けられる活性（例えば、細胞接着性あるいはプロテアーゼ活性など）を有し且つSEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列のうちの、(1) ADAMTS-15 では少なくとも1~950個、(2) ADAMTS-16 では少なくとも1~1072個、(3) ADAMTS-17 では少なくとも1~1095個、(4) ADAMTS-18 では少なくとも1~1081個、(5) ADAMTS-19 では少なくとも1~1207個、の連続したアミノ酸残基を有するポリペプチドの一種であり且つ天然の当該ヒトADAMTSタンパク質と実質的に同等な活性を有することを特徴とするポリペプチドまたはその塩、より好ましくは当該ADAMTSタンパク質またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つ該タンパク質の少なくとも一部あるいは全部を有するポリペプチドを、大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物で発現させることを可能にするDNA やRNA などの核酸に関する。またこうした核酸、特にDNA は、(a) 配列表のSEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列をコードできる配列あるいはそれと相補的な配列、(b) 該(a) のDNA 配列またはその断片とハイブリダイズすることのできる配列、及び(c) 該(a) 又は(b)の配列にハイブリダイズすることのできる縮重コードを持った配列であることができる。ここでハイブリダイズの条件としては、ストリンジェントな条件であることができる。こうした核酸で形質転換され、本発明の該ポリペプチドを発現できる大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物も本発明の特徴をなす。

【0053】本発明のDNA 配列は、これまで知られていなかった哺乳動物のタンパク質のアミノ酸配列に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えば当該ADAMTSタンパク質及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA 及びcDNA の単離及び検知のためのプローブの設計などが挙げられる。本発明のDNA 配列は、例えば当該ADAMTSタンパク質及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはマウス、ラットやヒトの、ゲノムDNA 及びcDNA の単離及び検知のためのプローブとして有用である。プローブは、必要に応じて、抗体に関連して挙げられている標識を付与しておくことができる。遺伝子の単離にあたっては、PCR 法、さらには逆転写酵素 (RT) を用いたPCR 法 (RT-PCR)を利用することが出来る。当該ADAMTSタン

パク質 cDNA 及びその関連DNA は、クローニングされ、配列決定された当該ADAMTSタンパク質 cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNA プライマーをデザインして化学合成し、得られたDNA プライマーを用いて、PCR 法、RT-PCR、その他の方法を用いて当該ADAMTSタンパク質関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。例えば、当該ADAMTSタンパク質 mRNA のヒト組織中での発現を各種の組織由来poly (A)⁺ RNA に対するノーザンブロット分析により検討することができる。本発明のcDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・プロテイング、サザン・プロテイング、in situ ハイブリダイゼーションなどによりヒト組織中での当該ADAMTSタンパク質 mRNA の発現や当該ADAMTSタンパク質遺伝子自体などを検出・測定でき、ヒト組織における細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および組織マトリックスや骨の改変を含む、多くの正常な細胞のプロセスに関する当該ADAMTSタンパク質の役割、その酵素活性の役割、また細胞接着や組織リモデリングといった生物学的過程（プロセス）に関する現象、さらには、免疫応答、血管新生、凝固、創傷治癒、再生プロセス、胚移植あるいは胎児発達のような生理学的条件に関連して生起する生物学的過程（プロセス）、さらに癌細胞の浸潤、転移、リウマチあるいは心臓血管におけるプロセス、血液学的なプロセスおよび神経退化のプロセスのような生理学的条件に関連した生物学的過程（プロセス）、特に細胞接着やメタロプロテアーゼ活性に関連したがんの浸潤・転移の様な多くの疾患等の研究の発展に貢献できる。当該ADAMTSタンパク質に関連した疾患の遺伝子診断にも利用できる。こうした診断は、当該ADAMTSタンパク質及び関連タンパク質をコードする核酸の異常、例えば損傷、突然変異、発現低下、発現過多などを診断するものであることができる。

【0054】こうして典型的には本発明は、当該ADAMTSタンパク質遺伝子、それから誘導されたプローブを用い、あるいはさらに必要に応じ、当該ADAMTSタンパク質に対する阻害物質を用い、被検試料中の当該ADAMTSタンパク質あるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供する。本発明はこうした当該ADAMTSタンパク質あるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記方法を用いて当該ADAMTSタンパク質あるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することにより、細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および組織マトリックスあるいは骨の改変など、多くの正常な細胞のプロセスに関する各ADAMTSタンパク質の役割、動脈硬化症、血栓症、高脂血症、アレルギー疾患、炎症性疾患、神経変性疾患およびがんの浸潤・転

移の様な多くの疾患などをモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供する。したがって、医学的・生理学的分野における上記試薬の各種利用、各ADAMTSタンパク質の作用に起因する応答・症状・疾患の研究・解析・測定、診断、予防、治療などの目的で上記試薬を使用することは、すべて本発明のその実施態様のうちに含まれると理解される。

【0055】本発明に従えば、ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及びヒトADAMTS-19から成る群から選ばれたタンパク質又はそれをコードする遺伝子配列を同定する方法が提供される。該同定方法は、典型的な場合、

- a) ADAMTS タンパク質中の保存領域のヌクレオチド配列を発現遺伝子のデータベースで見つかったヌクレオチドの部分配列と比較すること；
- b) ADAMTSsに対するホモロジー（同一性）を保持しているフラグメントの同定並びに該フラグメント配列が発現されているヒト組織の全RNAを用いてのPCRによる増幅；
- c) ヒトcDNAのライブラリーとハイブリダイズするプローブとして、該増幅されたフラグメントを使用すること
- d) 得られたcDNAクローンを単離し、該ヌクレオチドの完全な配列を決定することからなる群から選ばれた処理を行うことを特徴とする。

【0056】本発明に従えば、本発明の当該ADAMTSの遺伝子診断法（検出方法）が提供できる。該遺伝子診断法では、(a) 核酸試料を得る工程、(b) 工程(a)にて得られた核酸試料を、例えばPCR法、RNAポリメラーゼを利用した核酸増幅法、鎖置換増幅法などで遺伝子増幅し、例えば該当該ADAMTSタンパク質遺伝子に存在する変異部位などを含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、及び(c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程を含む態様が挙げられる。増幅の対象となる、変異部位を含む領域としては、本発明の当該ADAMTSタンパク質の遺伝子の塩基配列のうち、疾患の原因となる変異を含んでいる領域であれば特に限定されず、例えば、配列表のSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7あるいはSEQ ID NO:9に示される塩基配列の中の任意の位置の塩基を含む領域が挙げられる。上記工程(c)においては、当該分野で当業者に知られている変異の存在に検出方法の中から適切な方法を選んでそれを適用でき、特に限定されないが、例えばASPCR (allele-specific PCR) 法により得られたDNA断片長を調べることで検出することができる。DNA断片長を調べる方法は、特に限定されるものではないが、例えば蛍光DNAシーケンサーなどを使用することができる。本工程で使用される変異検出法としては、例えば制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) を検出して調べる方法などが挙げられる。ま

た、変異の検出には、例えば変異部位を含む適当なDNA片をプローブに用いるハイブリダイゼーション法や、SSCP法（単鎖高次構造多型）のような公知の変異検出法を使用してもよい。本発明の遺伝子診断に従い、本発明の当該ADAMTSタンパク質に関係した遺伝子診断が可能である。例えば各種疾患、がんなどへの罹患抵抗性・感受性決定の一素因と考えられる本発明の当該ADAMTSタンパク質の発現や多型を遺伝子診断し、さらに、当該診断結果に基づき関連疾患罹病へのリスクを下げるような遺伝子治療を行うことが可能となる。

【0057】本明細書中で開示したADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18、ADAMTS-19及びそれに関連したタンパク質、そのフラグメント、さらにはDNAを含めた核酸(mRNAやオリゴヌクレオチドを含む)は、それらを単独あるいは有機的に使用し、更には以下で説明する技術（アンチセンス法、モノクローナル抗体を含めた抗体、トランスジェニック動物など）とも適宜組合せて、ゲノミクス及びプロテオミクス技術に応用できる。例えば、本発明の各ADAMTS変異体は、ドミナントネガティブ効果を利用した機能解析にも利用可能である。また、二本鎖RNA(dsRNA)を使用するRNAi (RNA interference) 技術への応用の途もある。かくして、一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphisms)を中心とした遺伝子多型解析、核酸アレイ、タンパク質アレイを使用した遺伝子発現解析、遺伝子機能解析、タンパク質間相互作用解析、関連疾患解析、疾患治療薬解析をすることが可能となる。例えば、核酸アレイ技術では、cDNAライブラリーを使用したり、PCR技術で得たDNAを基板上にスポット装置で高密度に配置して、ハイブリダイゼーションを利用して試料の解析が行われる。該アレイ化は、針あるいはピンを使用して、あるいはインクジェットプリンティング技術などでもって、スライドガラス、シリコン板、プラスチックプレートなどの基板のそれぞれ固有の位置にDNAが付着せしめられることによりそれを実施することができる。該核酸アレイ上でのハイブリダイゼーションの結果得られるシグナルを観察してデータを取得する。該シグナルは、蛍光色素などの標識（例えば、Cy3、Cy5、BODIPY、FITC、Alexa Fluor dyes（商品名）、Texas red（商品名）など）より得られるものであってよい。検知にはレーザーキャナーなどを利用することもでき、得られたデータは適当なアルゴリズムに従ったプログラムを備えたコンピュータシステムで処理されてよい。また、タンパク質アレイ技術では、タグを付された組換え発現タンパク質産物を利用してよく、二次元電気泳動(2-DE)、酵素消化フラグメントを含めた質量分析(MS)(これにはエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization: ESI)、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)などの技術が含まれ、MALDI-TOF分析計、ESI-3連四重極分析計、ESI-イオン

ラップ分析計などを使用してよい)、染色技術、同位体標識及び解析、画像処理技術などが利用されることができ。したがって、本発明には上記で得られるあるいは利用できるADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18、ADAMTS-19 及びそれに対する抗体に関連したソフトウェア、データベースなども含まれてよい。

【0058】本発明の当該ADAMTSタンパク質などのポリペプチド等は、本発明で同定された当該ADAMTSタンパク質等の、生物学的活性などの機能(例えば、細胞接着、プロテアーゼ活性など)を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩をスクリーニングするための試薬として有用である。かくして、本発明の当該ADAMTSタンパク質などのポリペプチド、その一部のペプチド又はそれらの塩を用いた、本発明の当該ADAMTSタンパク質といったタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などの生物学的活性などの機能(例えば、細胞接着、プロテアーゼ活性など)を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩のスクリーニング方法も提供される。該スクリーニングでは、例えば(i)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩(該タンパク質を発現する形質転換体を含んでいてもよい、以下同様)などに適当な基質あるいはリガンドを接触させた場合と、(ii)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などに基質あるいはリガンド及び試験試料を接触させた場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性(例えば、各ADAMTSタンパク質と生体成分との間の相互作用に関連した活性、タンパク分解活性など)を測定して、比較する。基質としては、各ADAMTSタンパク質の基質となることのできるものであれば何れのものであってよい。例えば、公知のADAMTSタンパク質の基質として知られているものの中から選んで用いることができるが、好ましくは合成された化合物などを使用できる。基質は、そのまま使用できるが、好ましくはフルオレッセインなどの蛍光、酵素や放射性物質で標識したものを使用できる。

【0059】試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗ADAMTS抗体、酵素阻害剤、サイトカイン、各種インヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでいてよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該スクリーニングは、通常の場合の結合活性あるいは酵素活性の測定法に準じて実施することができ、例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。使用ペプチドなどは、活性化剤で処理したり、その

前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常Tris-HCl緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4~約10(好ましくは、pH約6~約8)において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該ADAMTSタンパク質あるいはそれと実質的に同等な活性を有するポリペプチドあるいはペプチドに関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、Methods in Enzymology, Academic Press 社(USA)発行)など参照〕。

【0060】本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進あるいは阻害する化合物である。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

【0061】本発明の当該ADAMTSタンパク質(ADAMTS-15, ADAMTS-16, ADAMTS-17, ADAMTS-18あるいはADAMTS-19)の生物学的活性などの機能(例えば、プロテアーゼ活性あるいは細胞接着活性など)を促進する化合物(アゴニスト、あるいは促進剤)又はその塩は、当該ADAMTSタンパク質機能不全症状などの各種の疾病の治療及び/又は予防剤として有用な医薬として使用できる。一方、本

発明の当該ADAMTSタンパク質(ADAMTS-15, ADAMTS-16, ADAMTS-17, ADAMTS-18あるいはADAMTS-19)の生物学的活性などの機能(例えば、プロテアーゼ活性あるいは細胞接着活性など)を阻害する化合物(アンタゴニスト、あるいは阻害剤)又はその塩は、過ADAMTSタンパク質機能症に起因した疾患や病気、がん(浸潤・転移を含む)などの各種の疾病の治療及び/又は予防剤などの医薬として使用できる。

【0062】本発明で得られたDNA(例えば、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18あるいはADAMTS-19をコードするDNA)を対象動物に転移させるにあたっては、それをDNA断片としてあるいは該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合して用いるのが一般に有利である。たとえば、マウスに当該DNAを導入する場合、これと相溶性が高い動物由来の当該DNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、対象動物の受精卵、たとえばマウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってそのタンパク質を高産生する遺伝子導入(トランスジェニック)マウスを作出できる。マウスとしては、特に純系のマウスに限定されないが、例えば、C57BL/6、Balb/C、C3H、(C57BL/6×DBA/2) F_1 (BDF₁)などが挙げられる。このプロモーターとしては、例えばウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタな発現プロモーターなどが好ましく使用しうる。また該DNAを導入する場合、組換えレトロウイルスに組み換えて、それをを用いて行うこともできる。好適には対象DNAを導入されたマウス受精卵は、例えば、ICRのような仮親のマウスを使用して生育せしめることができる。受精卵細胞段階における本発明で得られたDNA(例えば、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18あるいはADAMTS-19をコードするDNA)の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において当該タンパク質をコードするDNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに該ADAMTSをコードするDNAを有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにおいて、該ADAMTSタンパク質を発現できる可能性を有している。

【0063】該ADAMTS DNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴット動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。該ADAMTS DNAが導入された動物は、該タンパク質が高発現させられているので、該タンパク質に対する阻害剤(インヒビター)のスクリーニング用の動物

などとして有用である。また当該ADAMTS遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスDNAなどのスクリーニング用の動物などとして有用である。この遺伝子導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、遺伝子導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現されたタンパク質・組織を分析することにより、ADAMTSに関連したタンパク質について分析することができる。該ADAMTSタンパク質を産生する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、たとえば脳、胸腺、血管内皮細胞などの血管細胞、血液細胞、精巣、脳、腸、腎臓やその他の組織由来の細胞についてその機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、たとえば各種組織の機能を高めるような医薬開発に資することも可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、当該ADAMTSタンパク質を単離精製することも可能である。トランスジェニックマウスなどに関連した技術は、例えば、Brinster, R. L., et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438, 1985; Costantini, F. & Jaenisch, R. (eds.): Genetic manipulation of the early mammalian embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

【0064】本発明で得られた遺伝子(例えば、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18あるいはADAMTS-19に相当するマウスタンパク質をコードするDNA)に変異をもち、マウスの当該タンパク質を全く発現しない変異マウス(ノックアウトマウス)を作出することができる。たとえば、該遺伝子の翻訳開始コドンの前後4kbを含むおよそ8kbのゲノムDNAの中央近傍に位置し翻訳開始コドンに近いエキソンにneo耐性遺伝子-polyA付加シグナルからなる遺伝子カセットを挿入した変異遺伝子を持つターゲティングベクターを構築することができる。挿入する遺伝子カセットはneo耐性遺伝子カセット以外にDT-Aカセット、tkカセット、lacZカセットなどが挙げられる。ターゲティングベクターを直鎖状に開き、樹立したマウス胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES細胞)にエレクトロポレーションで導入、さらに培養してneo耐性を獲得したES細胞を選別する。ES細胞は129、C57BL/6、F1(C57BL/6×CBA)マウスなどのマウス系統から選択して調製することができる。neo耐性を獲得したES細胞は、マウスの当該ADAMTS遺伝子領域において遺伝子カセットを挿入したターゲティングベクターと相同組換えを起こしていると想定され、少なくともマウスの該ADAMTS遺伝子アレルのうち一つは破壊され、マウスの該タンパク質を正常に発現できなくなる。選別には挿入した遺伝子カセットによりそれぞれ適当な方法が選択され、また、変異の導入はPCR、サザンハイブリダイゼー

ションあるいはノーザンハイブリダイゼーションなどの方法を用いて確認することができる。

【0065】変異を導入したES細胞は、C57BL/6、BALB/c、ICR マウスなどから取り出した8細胞期胚に注入、1日培養し胚盤胞に発生したものをICRのような仮親に移植することで個体まで生育させることができる。生まれる子マウスは変異をもつES細胞と正常な宿主胚に由来するキメラマウスで、ES細胞に由来する細胞がどの程度含まれるかは個体の毛色で判断する。従って、ES細胞と宿主胚は毛色の異なった系統の組み合わせが望ましい。得られたキメラマウスの変異はヘテロであり、これらを適宜交配することでホモ変異マウスを得ることができる。このようにして得られたホモ変異マウスは生殖細胞および体細胞の全てにおいて、マウスの当該ADAMTS遺伝子のみが破壊され、マウスの対応ADAMTSを全く発現せず、繁殖継代される子孫もまた同様の表現系をもつ。このノックアウトマウスは正常マウスとの比較において、発生、成長、生殖、老化および死など個体のライフサイクルにおける当該ADAMTSの役割や各臓器、組織における該ADAMTSの機能を解析するのに有用である。また、ADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18あるいはADAMTS-19の生物活性に関連した医薬品開発にも応用できる。ノックアウトマウスはこれらモデル動物としてだけでなく、組織培養のための細胞源として使用することもでき、細胞レベルでの当該ADAMTSの機能解析などに供することができる。ノックアウトマウス等に関連した技術は、例えば、Mansour, S. L., et al.; Nature, 336: 348-352, 1988; Joyner, A. L., ed.; Gene targeting, IRL Press, 1993; 相沢慎一, ジーンターゲティングES細胞を用いた変異マウスの作成, 羊土社, 1995などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

【0066】本発明に従えば、当該ADAMTS遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンス・オリゴヌクレオチド(核酸)を、クローン化したあるいは決定された当該ADAMTSをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成することができる。そうしたオリゴヌクレオチド(核酸)は、対象ADAMTS遺伝子のmRNAとハイブリダイズすることができ、該mRNAの機能を阻害することができるか、あるいは対象ADAMTS関連mRNAとの相互作用などを介して当該ADAMTS遺伝子の発現を調節・制御することができる。対象ADAMTS関連遺伝子の選択された配列に相補的なオリゴヌクレオチド、及び対象ADAMTS関連遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドは、生体内及び生体外で当該ADAMTS遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、またそれに関連した病気などの治療又は診断に有用である。当該遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質

コード領域、ORF 翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは、好ましい対象領域として選択しうるが、当該遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0067】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なオリゴヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドとの関係を意味し、それは、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販のタンパク質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー)又は特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えばタンパク質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、公知のプリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0068】本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のもが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えばJ. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, 8: 247, 1992; 8: 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993などに開示がある。本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有して良く、リボゾーム、ミクロソフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうした付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはADAMTS-15、ADAMTS-16、ADAMTS-17、ADAMTS-18あるいはADAMTS-19の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0069】本明細書中、「抗体」との用語は、広義の意味で使用されるものであってよく、所望の当該ADAMTSタンパク質ポリペプチド及び関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また1価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)

分子並びにそれらのフラグメント及び誘導体も表すものであり、F(ab')₂、Fab'及びFabといったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ(epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又は、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合又はハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体又は結合特性を有する抗体を包含してよい。特に好ましい本発明の抗体は、天然型の当該ADAMTSポリペプチドを特異的に識別できるものであり、例えば、公知のADAMTS類タンパク質とは区別してそれを認識できるものである。本発明のADAMTS-16の特徴的な配列、例えばSEQ ID NO:4のアミノ酸配列のうちの1063~1072番目に存在する連続したC末端のアミノ酸配列VGALVSRERG、該特徴的な配列を実質的に維持しているもの、例えば1072番目のアミノ酸残基をC末端としたもの、あるいはそれから1~9個のC末端側のアミノ酸残基を欠いているものなどを特異的に認識できる抗体なども挙げられる。

【0070】抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基(エピトープ)に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の(ポリクローナル)抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それらは、所望の生物活性を示す限り、その由来やイムノグロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり(例えば、ヒト化抗体)、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えた

り、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる(例えば、米国特許第4816567号; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 など)。モノクローナル抗体を製造する好適な方法の例には、ハイブリドーマ法(G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp.495-497 (1975)); ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor et al., Immunology Today, 4, pp.72-79 (1983); Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987); トリオーマ法; EBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96 (1985))(ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法); 米国特許第4946778号(単鎖抗体の産生のための技術)が挙げられる他、抗体に関して以下の文献が挙げられる:

【0071】S. Biocca et al., EMBO J, 9, pp.101-108 (1990); R.E. Bird et al., Science, 242, pp.423-426 (1988); M.A. Boss et al., Nucl. Acids Res., 12, pp.3791-3806 (1984); J. Bukovsky et al., Hybridoma, 6, pp.219-228 (1987); M. DAINO et al., Anal. Biochem., 166, pp.223-229 (1987); J.S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp.5879-5883 (1988); P.T. Jones et al., Nature, 321, pp.522-525 (1986); J.J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); S. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984); V.T. Oi et al., BioTechniques, 4, pp.214-221 (1986); L. Riechmann et al., Nature, 332, pp.323-327 (1988); A. Tramontano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp.6736-6740 (1986); C. Wood et al., Nature, 314, pp.446-449 (1985); Nature, 314, pp.452-454 (1985) あるいはそこで引用された文献(それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる)。

【0072】本発明に係るモノクローナル抗体は、それらが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種から誘導される又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモローガスであるが、一方、鎖の残部は、別の種から誘導される又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモローガスである、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を特に包含する(米国特許第4816567号明細書; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984))。以下、

モノクローナル抗体を例に挙げて、抗体の作製につき詳しく説明する。本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術(例えば、G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp.495-497 (1975))など)を利用して得られたモノクローナル抗体であってよく、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローナ化
6. モノクローナル抗体の製造

【0073】1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、上記で記載してあるように、当該ADAMTSポリペプチド又はそれから誘導された断片を単離したものをを用いることもできるが、決定された当該ADAMTSタンパク質のアミノ酸配列情報を基に、適当なオリゴペプチドを化学合成しそれを抗原として利用することができる。代表的には配列表のSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8あるいはSEQ ID NO:10に存在するアミノ酸残基のうちの連続した少なくとも5個のアミノ酸を有するペプチドが挙げられる。例えばSEQ ID NO:4のアミノ酸配列の場合、特徴的な配列、例えばその1063~1072番目に存在する連続したC末端のアミノ酸配列VGLVSRERGから適当な部分を選ぶことも挙げられる。抗原は、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できるが、免疫原性コンジュゲートなどにしてもよい。例えば、免疫原として用いる抗原は、当該ADAMTSタンパク質を断片化したもの、あるいはそのアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片であってもよい。また、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテン-タンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみと反応できる(あるいは特定の配列のみを認識できる)モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)、

牛血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

【0074】2. 免疫原性抗原による動物の免疫

免疫は、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12、分子免疫学 III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。免疫化剤を（必要に応じアジュバントと共に）一回又はそれ以上の回数哺乳動物に注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び/又はアジュバントを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質（例えば上記担体タンパク質類など）とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リビッドA、リボソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウス、ハムスター、その他の適当な動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~約400 µg/動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしては

BALB/c系マウスその他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。本発明の抗体は、こうして得られ免疫された動物から得られたものであってよく、例えば、抗血清、ポリクローナル抗体等を包含する。

【0075】3. ミエローム細胞（骨髄腫細胞）の調製

細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えば P3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、SP-2/0-Ag14 (SP-2, Nature, 276: 269 ~ 270, 1978)、マウスミエローム MOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Curr. topics Microbiol. Immunol., 81: 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256: 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979) などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローム細胞株はダルベッコMEM 培地 (DMEM培地)、RPMI-1640 培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(FCS)などを加え、さ

らに8-アザグアニン（例えば5~45 µg/ml）を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37で完全に解凍したのち RPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

【0076】4. 抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合

上記2.の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3.の工程に従い得られたミエローム細胞株を、例えば最小必須培地 (MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640 培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを0.5~2ml加えることができ、分子量が1,000~8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000~4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞（リンパ球）：ミエローム細胞株の割合は、例えば1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1~7:1とすることができる。融合反応を1~10分間行い、次にRPMI-1640 培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【0077】5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM 培地、RPMI-1640 培地などの培地、所謂 HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1~3日ごとに HAT培地で半量ずつ交換するというように処理することができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8~16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂 HT培地で1~4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射

免疫分析(RIA)、酵素免疫分析(ELISA)、蛍光免疫分析(FIA)などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置(FACS)などで、所定の断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

【0078】6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいは例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片(例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など)を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0079】また、トランスジェニックマウス又はその他の生物、例えば、その他の哺乳動物は、本発明の免疫原ポリペプチド産物に対するヒト化抗体等の抗体を発現するのに用いることができる。またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。当該モノクローナル抗体をコードする核酸は、例えばマウス抗体の重鎖や軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用するなどの

慣用の手法で単離し配列決定することができる。一旦単離されたDNAは、上記したようにして発現ベクターに入れ、CHO、COSなどの宿主細胞に入れることができる。該DNAは、例えばホモジニアスなマウスの配列に代えて、ヒトの重鎖や軽鎖の定常領域ドメインをコードする配列に置換するなどして修飾することが可能である(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 658-661, 1984)。かくして所望の結合特異性を有するキメラ抗体やハイブリッド抗体も調製することが可能である。また、抗体は、下記するような縮合剤を用いることを含めた化学的なタンパク質合成技術を適用して、キメラ抗体やハイブリッド抗体を調製するなどの修飾をすることも可能である。ヒト化抗体は、当該分野で知られた技術により行うことが可能である(例えば、Jones et al., Nature, 321: pp.522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: pp.323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: pp.1534-1536 (1988))。ヒトモノクローナル抗体も、当該分野で知られた技術により行うことが可能で、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのヒトミエローマ細胞やヒト・マウスヘテロミエローマ細胞は当該分野で知られている(Kozbor, J. Immunol., 133, pp. 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))。パイスペシフィックな抗体を製造する方法も当該分野で知られている(Millstein et al., Nature, 305: pp.537-539 (1983); WO93/08829; Traunecker et al., EMBO J., 10: pp. 3655-3659 (1991); Suresh et al., "Methods in Enzymology", Vol. 121, pp.210 (1986))。

【0080】さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当該分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13巻, 1014-1021頁(1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: pp.219-231 (1981);及び"Methods in Enzymology", Vol. 184, pp.138-163 (1990)により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいは-D-ガラクトシダーゼなど)、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

【0081】本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、一方を本発明の当該ADAMTSタンパク質及びその関連ペプチド断片に対する抗体とし、他方を当該ADAMTSタンパク質のC末端側残基に対する抗体とし、そして一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわち当該ADAMTSポリペプチド断片抗原の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

【0082】抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカ-アルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリ

ング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質(物体)の表面などが挙げられる。

【0083】これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られる抗原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げるができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げるができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

【0084】代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などが挙げられる。代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌-D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリホスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導體、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導體、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導體、ジオキセタン誘導體などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分

子膜電極などであることもできる。酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

【0085】本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと-D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。蛍光物質あるいは化学ルミネセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコピロプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

【0086】縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミド

ート、メチル-4-メルカプトブチリルイミド、メチル-3-メルカプトプロピオンイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

【0087】本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。測定にあたっては至適pH、例えばpH約4~約9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、Tris-HCl緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗原抗体反応は約0~約60の間の温度で行うことが好ましい。酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗原抗体反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

【0088】抗原抗体反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗原抗体反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好まし

い。当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることができる。本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば胸腺、睾丸、腸、腎臓、脳、乳癌、卵巣癌、結腸・直腸癌、血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、膵液、胆汁液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジュネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。これら個々の免疫学的測定法を含めた各種の分析・定量法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

【0089】これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第2版）、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第3版）、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などあるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）〕。

【0090】本発明の抗ADAMTS抗体（抗ヒトADAMTS-15抗体、抗ヒトADAMTS-16抗体、抗ヒトADAMTS-17抗体、抗ヒトADAMTS-18抗体及び抗ヒトADAMTS-19抗体）、特にモノクローナル抗体を用いて、エピトープマッピングを行うこともでき、各エピトープを認識する抗体を用いれば当該ADAMTSタンパク質及びその関連ペプチド断片などの検知・測定を行うことができる。当該ADAMTSタンパク質及びその関連ペプチド断片に対する抗体は、当該ADAMTSタンパク質による細胞接着、ホメオスタシスあるいは血管新生のプロセスへの制御あるいは促進または抑制などの現象の検出及び/又は測定、さらには当該ADAMTSタンパク質の過剰あるいは減少により生ずる各種の生理活性物質あるいは生理現象又は生物現象の検出及び/又は測定、また、当該ADAMTSタンパク質産生を制御する因子や機構の研究・開発などに有用である。該抗体、特にモノクローナル抗体は、(i) 当該ADAMTSタンパク質とその基質あるいは制御因子との間での相互作用に起因する組織あるいは細胞が関連する障害、異常及び/又は疾患を検出したり、(ii) 当該ADAMTSタンパク質とその基質あるいは制御因子との間での相互作用に起因する細胞の腫瘍化、細胞の移動、浸潤、遊走及び/又は転移あるいはその可能性を検出したり、(iii) 当該ADAMTSタンパク質の細胞接着あるいは酵素活性に関連して生ずる障害、異常及び/又は疾患あるいはその可能性を検出したり、(iv) 当該ADAMTSタンパク質の発現量を測定したり、(v) 活性化されたADAMTSタンパク質の変化を検出及び/又は測定したり、(vi) 当該ADAMTSタンパク質産生を制御する化合物などの探索をしたり、及び/又は(vii) 該当該ADAMTSタンパク質産生を制御する化合物の活性の検出及び/又は測定をしたりなどするのに有用である。免疫応答、血管新生、血液凝固、創傷治癒、再生プロセス、胚着床、胎児発達などのプロセス、癌細胞の浸潤、転移、リウマチあるいは心臓血管におけるプロセス、血液学的なプロセスおよび神経退化のプロセス、細胞の異常、組織の異常、がんの移動性、浸潤性、走化性及び/又は転移性の程度を知るのに使用できると期待される。本発明に従えば、当該ADAMTSタンパク質による様々な生理活性あるいは生物活性による現象・作用の促進活性あるいは抑制・阻害活性を検出及び/又は測定し、組織の疾患予防・治療剤、抗炎症剤、抗がん剤、がん転移阻害剤、動脈硬化

症治療剤、関節破壊治療剤、抗アレルギー剤及び/又は免疫抑制剤の効果判定モニターとして使用することが可能となる。また、本発明では、当該ADAMTSタンパク質による組織・細胞あるいはタンパク質の異常化現象の検出及び/又は測定方法やそのための試薬が提供できる。

【0091】本発明の活性成分〔例えば、(a) 当該ADAMTSポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、それに関連するペプチド等、(b) 該当該ADAMTSタンパク質あるいは当該ADAMTSポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片(モノクローナル抗体を包含する)またはその誘導体、(d) 当該ADAMTSタンパク質の活性を制御する化合物(当該ADAMTSタンパク質の活性を促進したりあるいは抑制・阻害するなどの現象、あるいは組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を促進あるいは抑制及び/又は阻害する化合物)またはその塩、当該ADAMTSタンパク質産生を制御する化合物またはその塩、(e) 本発明のDNAなどの核酸に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドなど、(f) 本発明を使用して見出された活性物質など)を医薬として用いる場合、例えば当該ADAMTSの酵素活性阻害剤またはそれらの塩等は、通常単独あるいは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態(吸入法、あるいは直腸投与も包含される)によってもよい。また、本発明の活性成分は、各種医薬、例えば抗腫瘍剤(抗がん剤)、腫瘍移転阻害剤、血栓形成阻害剤、関節破壊治療剤、鎮痛剤、消炎剤及び/又は免疫抑制剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

【0092】そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的(例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髄腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など)に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ

剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤(例えば、直腸坐剤)、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ペヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

【0093】注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)を含む等張液などが挙げられ、薬理的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール(たとえばエタノールなど)、ポリアルコール(たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80TM、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。

【0094】非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容

される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒクルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を0.1～10重量%程度含有するように調製されることができる。局所的、例えば口腔、又は直腸的使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬理的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬理的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤（白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール400、マクロゴール軟膏など）等を添加し、慣用の方法により調製される。

【0095】歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエドト酸二ナトリウムのような緩衝剤；酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を0.1～95重量%程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局部麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

【0096】また、活性成分がタンパク質やポリペプチドである場合、ポリエチレングリコール(PEG)は、哺乳動物中で極めて毒性が低いことから、それを結合させる

ことは特に有用である。また、PEGを結合せしめると、異種性化合物の免疫原性及び抗原性を効果的に減少せしめることができる場合がある。該化合物は、マイクロカプセル装置の中に入れて与えてもよい。PEGのようなポリマーは、アミノ末端のアミノ酸の-アミノ基、リジン側鎖の-アミノ基、アスパラギン酸又はグルタミン酸側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸の-カルボキシル基、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に付着したグリコシル鎖の活性化された誘導体に、簡便に付着させることができる。タンパク質との直接的な反応に適した多くの活性化された形態のPEGが知られている。タンパク質のアミノ基と反応させるのに有用なPEG試薬としては、カルボン酸、カルボネート誘導体の活性エステル、特に、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾール、又は1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルフォネートであるものが挙げられる。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含有するPEG試薬は、タンパク質中の過ヨウ素酸化によって生成したアルデヒドとの反応に有用である。

【0097】さらに、本発明のDNAなどの核酸を上記したような治療及び/又は予防剤として用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で使用される適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由来のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明のDNAなどの核酸は通常の知られた方法で投与でき、そのまま、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記したような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

【0098】医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。本発明の活性成分は、当該ADAMTSの活性（例えば、ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及び/又はヒトAD

AMTS-19の生物活性などを制御（促進あるいは抑制・阻害）するといった生物学的活性をもつものであれば特に限定されないが、好ましくは有利な作用を持つものが挙げられる。本発明の活性成分は、例えば、(a) 当該ADAMTSタンパク質、その変異体ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩等、(b) 当該ADAMTSタンパク質をコードするDNA、当該ADAMTSタンパク質変異体ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) 当該ADAMTSタンパク質による生体成分との間の相互作用を制御（促進あるいは抑制・阻害）するといった生物学的活性に有利な作用をもつ化合物またはその塩などが包含される。

【0099】本発明の活性成分は、当該ADAMTS（ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及び/又はヒトADAMTS-19）と生体成分との間の相互作用に起因する各種組織あるいは細胞における変化を制御（促進あるいは抑制・阻害）するのに有用と期待される。また、該活性成分は、当該ADAMTSの活性発現の制御（促進あるいは抑制・阻害）に有用であり、当該ADAMTSと生体成分との間の相互作用に起因する障害、異常及び/又は疾患の予防あるいは治療に有用である。また、当該ADAMTS（ヒトADAMTS-15、ヒトADAMTS-16、ヒトADAMTS-17、ヒトADAMTS-18及び/又はヒトADAMTS-19）が関与する腫瘍細胞などの移動、浸潤、遊走及び/又は転移の制御、例えば抑制に有用であると期待される。本発明の活性成分（当該ADAMTSタンパク質及びその関連ペプチドを含む）は、悪性腫瘍、すなわち、がんの移動、浸潤及び/又は転移の阻止及び/又は抑制するのに有用で、血管形成・新生阻害剤、抗腫瘍剤及び/又はがん転移抑制剤として期待できる。また、血液系細胞の、該ADAMTSが関与した障害、異常及び/又は疾患の予防あるいは治療にも有用で、動脈硬化症治療・予防剤、血栓症治療・予防剤、消炎剤及び/又は免疫抑制剤としても期待できる。さらに、抗リウマチ剤、関節破壊治療剤などとしても期待できる。

【0100】さらに、本発明では、(a) 当該ADAMTSタンパク質のアミノ酸配列（例えば、SEQ ID NO:2のアミノ*

タンパク質、ペプチドなどのアミノ酸配列に関しては：

A: アラニン (Ala)	M: メチオニン (Met)
C: システイン (Cys)	N: アスパラギン (Asn)
D: アスパラギン (Asp)	P: プロリン (Pro)
E: グルタミン酸 (Glu)	Q: グルタミン (Gln)
F: フェニルアラニン (Phe)	R: アルギニン (Arg)
G: グリシン (Gly)	S: セリン (Ser)
H: ヒスチジン (His)	T: スレオニン (Thr)
I: イソロイシン (Ile)	V: バリン (Val)
K: リジン (Lys)	W: トリプトファン (Trp)
L: ロイシン (Leu)	Y: チロシン (Tyr)

ヌクレオチド配列に関しては：

*酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列から成る群から選ばれた配列）に基づいて分子設計を施して、当該ADAMTSと生体成分との間の相互作用を制御（促進あるいは抑制・阻害）する活性を有する物質を得るのに使用できる。こうして得られる物質も本発明の思想の範囲内のものであるし、本発明の活性成分として扱うことができる。該配列から特定の特徴部分を選択し、(i) そのうちの薬理作用団をイソスターで置き換えることによりなされるか、(ii) 構成アミノ酸残基の少なくとも1個をD体のアミノ酸残基に置き換えるか、(iii) アミノ酸残基の側鎖を修飾するか、(iv) 該配列に存在するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を配置して連結するか、(v) 立体構造を解析してmimic体をデザインすることなど、当該分野で採用される技術を駆使して行うことができる（例えば、首藤 紘一 編 医薬品の開発7巻（分子設計）、平成2年6月25日発行、株式会社廣川書店及びそこで引用している文献や論文など）。そうした技術の一部は、上記で説明したものを含んでいる。本出願はスペイン国に出願された出願番号 P200102165（出願日：2001年9月24日）、出願番号 P200102166（出願日：2001年9月24日）、出願番号 P200102167（出願日：2001年9月24日）、出願番号 P200102192（出願日：2001年9月25日）及び出願番号 P200102193（出願日：2001年9月25日）を優先権主張の基礎としており、その内容はそれらを参照することにより本明細書にすべて含まれるものである。同様に、本願明細書に開示の発明の内容のある部分は、Gene, 283, pp.49-62(2002)に開示してあり、その内容（そこで引用された文献記載の内容も含まれる）はそれらを参照することにより本明細書にすべて含まれるものである。

【0101】明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。代表的な用語の意味を以下に示す。

A: アデニン
C: シトシ

G: グアニン
T: チミン

66

【0102】

【実施例】以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNA クローニングでは J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 及び D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 特にPCR 法では、H. A. Erlich et al., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及び M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990) に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書 (protocols) や添付の薬品等を使用している。

【0103】実施例1

〔ADAMTS-15〕

(A) 新規なADAMTSをコードするヒト遺伝子を同定する目的で、次の探索を行った。すなわち、今日までに同定されたヒトADAMTS間で保存されたアミノ酸配列を、Gen Bank™のExpressed Sequence Tags (ESTs)部門でのプログラムTBLASTN(J. Mol. Biol., 215, 403, 1990)を用いてのサーチのためのクエリーとして用いて、当該サーチを行った。新規なADAMTSのメタロプロテアーゼとディスインテグリン領域に相当する配列が、ヒトゲノムDNA中で同定された。これらの領域の増幅は、20 pmol の二種のオリゴヌクレオチド:AD(15)-1 (5'-GTCCAATCTCTCTGGAGC-3'; SEQ ID NO: 11)およびAD(15)-2 (5'-AGCTGCTCTGTCATTGAGGACG-3'; SEQ ID NO: 12)、ヒト胎児肝臓cDNAライブラリーのDNA 1 µg, 0.2 mM dNTPs および1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いて行われた。その増幅は、変性(15秒, 94 °C)、アニリング(20秒, 64 °C)そして伸張(40秒, 68 °C)からなる40サイクルをPerkin-Elmer社製G

eneAmp2300装置でもって行われた。その増幅フラグメント、すなわち、460pbの増幅フラグメントは、アガロースゲル電気泳動により分離され、GeneClean™で抽出された。該フラグメントは、pUC18ベクターにクローニングの後、Perkin-Elmer社ABI-PRISM310A 装置で配列決定して確認された。本フラグメントを概念的に翻訳してみると、それがADAMTSファミリーの新メンバーである事が確認された。

【0104】(B) この新しいADAMTS遺伝子の全配列を得るために、cDNA末端の迅速増幅技術(RACE)およびヒト胎児肝臓のRNAを用いて、AD(15)-1およびAD(15)-2で増幅されたフラグメントの5'端と3'端の伸張を実施した。Clontech社のMarathon法を用いる増幅連続繰り返しの後、同一フレーム中に開始コドンと終止コドンを含有するフラグメントを得た。最後に、オリゴヌクレオチド:A DTS15F (5'-ATGCTTCTGCTGGGCATCCTA-3'; SEQ ID NO: 13)とADTS15R (5'-TCAGCACGGCCTCAGGACGCA-3'; SEQ ID NO: 14)を用いてADAMTS-15の全長cDNAを増幅した。配列をコンピューター解析することにより、950個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)の存在を確認した。本タンパク質はADAMTS-15と呼ばれ、それをコードする核酸配列と共にそのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 1に記載する。なお、ADAMTS-15アミノ酸配列はSEQ ID NO: 2にも記載されている。ADAMTS-15とデータバンク中でのアクセス可能な他の配列とのアライメントは、他のADAMと高い類似性を示し、さらにまた、ADAMTS (J. Biol. Chem., 274, 25555, 1999)とはより高い特異的な類似性を示した。本タンパク質は、シグナル配列、プロペプチド、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリンとシステインリッチ領域といくつかのタイプIスロンボスポンジン様リピートを含有しており、これらの酵素の特徴的なドメイン構造のすべてを有している。

【0105】(C) 予測されるADAMTS-15のアミノ酸配列をより詳細に解析すると、潜在型酵素に保つのに関与しているCys残基を174番目に持っているプロ領域を含有することが判明した。本プロ領域は、フーリンまたはフーリン様プロテアーゼのようなプロタンパク変換酵素による本酵素の細胞内活性化をメディエートすることのできる基本的な領域(basic region)で終わっている。その触媒領域は、活性部位に触媒作用Zn²⁺原子を配位するのに関与する配列、HEXXHXXNXXHD (361-372番)を含有している。ADAMTSs 触媒領域配列、HEXXHXXGXXHDとほぼ一致している。本配列は、Asp残基で終わっており、該Asp残基は、MMPsのような他のメタロプロテアーゼからレプロリシン類(reprolysins)を区別しているものである。このZn²⁺結合部位のC末端側のいくつかの残基において、レプロリシン類やMMPsに特徴的な"Met-turn"を形成

するMet残基がある(390番)。ディスインテグリン領域(ドメイン)は触媒領域の後にみられ、そのサイズは他のADAMTSに類似しており、全てのメンバー中でよく保存されているところの、8個のCysを保持している。最後に、システインリッチ領域(ドメイン)は他のADAMTSs中の同等の領域と高い%で同一性(約50%)を示し、そしてさらに、他の全ADAMTSs中で保存されているところの、10個のCys残基を示している。これらの全てのデータより、クローン化された遺伝子を概念的に翻訳すると、その得られた予測されるタンパク質は、ADAMTSファミリーに属すると結論づけられ、そしてその公的に認証された名前は、「ADAMTS-15」である。本配列は、EMBL遺伝子データベースのアクセッション No. AJ315733として保存されている(SEQ ID NO:1に示された配列は、GenBank™データベースに2001年6月23日に寄託された)。SEQ ID NO:1に記載した単離DNAとポリペプチドおよびそれらから導かれた部分配列は、化学的に合成することもできる。

【0106】(D) 次に、ヒト組織中のADAMTS-15遺伝子発現を分析した。分析のために、ヒト成人組織(前立腺、脳、胸、下顎腺、内皮、胎盤、肝臓、大動脈、卵巣)と胎児組織(心臓、肺、肝臓、腎臓)の異なったcDNAライブラリーよりPCRによる増幅を遂行した。これを実施するため特異的オリゴヌクレオチド; AD(15)-1及びAD(15)-2(それぞれ20 pmol), 1 µg cDNA, 0.2 nM dNTPsおよび1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いてPCR増幅反応を実施した。PCR増幅は、Perkin-Elmer社のGeneAmp 2400を用いて、変性(15秒、94)、アニ-リング(20秒、64)そして伸張(60秒、68)からなる35サイクルで実施した。図1に示されるように、増幅産物は、胎児肝臓、腎臓ライブラリーで得られた。配列の確認は、DRターミネーターTaq FSキット(Applied Biosystems社)を用いてフラグメントの直接の配列決定と自動DNAシクエンサーABI-PRISM 310A(Perkin-Elmer社)により行った。さらに、ヒト腫瘍サンプル中のADAMTS-15遺伝子発現を調査したが、これは上記したPCRと類似の方法により行われた。このためには、乳癌と骨肉腫cDNAライブラリーを用いた(図1)。

【0107】実施例2

ADAMTS-16

(A) 新規なADAMTSをコードするヒト遺伝子を同定する目的で、次の探索を行った。すなわち、今日までに同定されたヒトADAMTS間で保存されたアミノ酸配列を、GenBank™のExpressed Sequence Tags (ESTs)部門でのプログラムTBLASTN(J. Mol. Biol., 215, 403, 1990)を用いてのサーチのためのクエリーとして用いて、当該サーチを行った。新規なADAMTSのメタロプロテアーゼとディスインテグリン領域に相当する配列が、ヒトゲノムDNA中で同定された。これらの領域の増幅は、20 pmol の二

種のオリゴヌクレオチド:AD(16)-1 (5'-ATGGAGAAGGGAACATGTGC-3'; SEQ ID NO: 15)およびAD(16)-2 (5'-GTCCAGTAGCGATTAAGTTC-3'; SEQ ID NO: 16)、ヒト胎児肺臓cDNAライブラリーのDNA 1 µg, 0.2 mM dNTPs および1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いて行われた。また、変性(15秒、94)、アニ-リング(20秒、64)そして伸張(40秒、68)からなる40サイクルをPerkin-Elmer社製GeneAmp2300装置で行って増幅した。460pbの増幅フラグメントは、アガロースゲル電気泳動により分離され、GeneClean™で抽出された。フラグメントは、pUC18ベクターにクローニングの後、Perkin-Elmer社ABI-PRISM310A装置で配列決定して確認された。本フラグメントを概念的に翻訳すると、それがADAMTSファミリーの新メンバーである事が確認された。

【0108】(B) この新しいADAMTS遺伝子の全配列を得るために、cDNA末端の迅速増幅技術(RACE)およびヒト胎児肝臓のRNAを用いて、AD(16)-1およびAD(16)-2で増幅されたフラグメントの5'端と3'端の伸張を実施した。Clontech社のMarathon法を用いる増幅連続繰り返しの後、同一フレーム中に開始コドンと終止コドンを含むフラグメントを得た。最後に、オリゴヌクレオチド:ADTS16F (5'-ATGAAGCCCGCGCGCGGA-3'; SEQ ID NO: 17)とADTS16R (5'-TCAACCTCGCTCCCGCGAGAC-3'; SEQ ID NO: 18)を用いてADAMTS-16の全長cDNAを増幅した。配列をコンピューター解析することにより、1072個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレームの存在を確認した。本タンパク質はADAMTS-16と呼ばれ、それをコードする核酸配列と共にそのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 3に記載する。なお、ADAMTS-16アミノ酸配列はSEQ ID NO: 4にも記載されている。ADAMTS-16とデータベース中でのアクセス可能な他の配列とのアライメントは、他のADAMTSと高い類似性を示し、さらにまた、ADAMTS (J. Biol. Chem., 274, 25555, 1999)とはより高い特異的な類似性を示した。本タンパク質は、シグナル配列、プロペプチド、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリンとシステインリッチ領域といくつかのタイプIスロンボスポンジン様リピートを含むしており、これらの酵素の特徴的なドメイン構造のすべてを有している。

【0109】(C) 予測されるADAMTS-16のアミノ酸配列をより詳細に解析すると、潜在型酵素に保つのに関与しているCys残基を249番目に持っているプロ領域を含むことが判明した。本プロ領域は、フーリンまたはフーリン様プロテアーゼのようなプロタンパク変換酵素による本酵素の細胞内活性化をメディエートすることのできる基本的な領域(basic region)で終わっている。その触媒領域は、活性部位に触媒作用Zn²⁺原子を配位するのに関与する配列、HEXXHXXGXXHD (433-444番)を含むしている。本配列は、Asp残基で終わっており、該Asp残基

は、MMPsのような他のメタロプロテアーゼからレプロリシン類(reprolysins)を区別しているものである。このZn²⁺結合部位のC末端側のいくつかの残基において、レプロリシン類やMMPsに特徴的な"Met-turn"を形成するMet残基がある(458番)。ディスインテグリン領域(ドメイン)は触媒領域の後にみられ、そのサイズは他のADAMTSに類似しており、全てのメンバー中でよく保存されているところの、8個のCysを保持している。最後に、システインリッチ領域(ドメイン)は他のADAMTSs中の同等の領域と高い%で同一性(約50%)を示し、そしてさらに、他の全ADAMTSs中で保存されているところの、10個のCys残基を示している。これらの全てのデータより、クローン化された遺伝子を概念的に翻訳すると、その得られた予測されるタンパク質は、ADAMTSファミリーに属すると結論づけられ、そしてその公的に認証された名前は、「ADAMTS-16」である。本配列は、EMBL遺伝子データバンクのアクセッション No. AJ315734として保存されている(SEQ ID NO:3に示された配列は、GenBankTMデータベースに2001年6月23日に寄託された)。SEQ ID NO:3に記載した単離DNAとポリペプチドおよびそれらから導かれた部分配列は、化学的に合成することもできる。

【0110】(D) 次に、ヒト組織中のADAMTS-16遺伝子発現を分析した。分析のために、ヒト成人組織(前立腺、脳、胸、下顎腺、内皮、胎盤、肝臓、大動脈、卵巣)と胎児組織(心臓、肺、肝臓、腎臓)の異なったcDNAライブラリーよりPCRによる増幅を遂行した。これを実施するため特異的オリゴヌクレオチド; AD(16)-1及びAD(16)-2(それぞれ20 pmol), 1 µg cDNA, 0.2 nM dNTPsおよび1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いてPCR増幅反応を実施した。PCR増幅は、Perkin-Elmer社のGeneAmp 2400を用いて、変性(15秒、94 °C), アニ-リング(20秒、64 °C)そして伸張(60秒、68 °C)からなる35サイクルで実施した。図2に示されるように、増幅産物は、胎児肺cDNAライブラリー及び胎児腎臓cDNAライブラリーで得られ、さらに成人脳cDNAライブラリー及び成人卵巣cDNAライブラリーで得られた。配列の確認は、DRターミネーターTaqFSキット(Applied Biosystems社)を用いてフラグメントの直接の配列決定と自動DNAシクエンサーABI-PRISM 310A(Perkin-Elmer社)により行った。さらに、ヒト腫瘍サンプル中のADAMTS-16遺伝子発現を調査したが、これは上記したPCRと類似の方法により行われた。このためには、乳癌と骨肉腫cDNAライブラリーを用いた(図2)。本発明のADAMTSsにおいては、スプライシングバリエーションの存在も考えられるが、そうしたスプライシングバリエーションがある場合も本明細書で説明された技術に従う限り、本発明の範囲内のものである。ADAMTS-16は、特徴的なC末端を有しているが、該特徴と、発現部位、例えばヒト胎児肺、胎児腎臓、成人脳、成人卵巣

などとの関連性を有する機能性のADAMTS-16タンパク質並びにそれをコードする遺伝子配列も、本発明の特徴の一つとして理解され、それが本発明の範囲内の一つであってよい。

【0111】実施例3

ADAMTS-17

(A) 新規なADAMTSをコードするヒト遺伝子を同定する目的で、次の探索を行った。すなわち、今日までに同定されたヒトADAMTSs間で保存されたアミノ酸配列を、GenBankTMのExpressed Sequence Tags (ESTs)部門でのプログラムTBLASTN(J. Mol. Biol., 215, 403, 1990)を用いてのサーチのためのクエリーとして用いて、当該サーチを行った。新規なADAMTSのメタロプロテアーゼとディスインテグリン領域に相当する配列が、ヒトゲノムDNA中で同定された。これらの領域の増幅は、20 pmolの二種のオリゴヌクレオチド:AD(17)-1(5'-CACGCAGCCTGGAGCAGGTG-3'; SEQ ID NO: 19)およびAD(17)-2(5'-AGGATGGCAATGGCTTCAGG-3'; SEQ ID NO: 20)、ヒト胎児肺cDNAライブラリーのDNA 1 µg, 0.2 mM dNTPs および1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いて行われた。また、変性(15秒、94 °C)、アニ-リング(20秒、64 °C)そして伸張(40秒、68 °C)からなる40サイクルをPerkin-Elmer社製GeneAmp2300装置で行って増幅した。460pbの増幅フラグメントは、アガロースゲル電気泳動により分離され、GeneCleanTMで抽出された。フラグメントは、pUC18ベクターにクローニングの後、Perkin-Elmer社ABI-PRISM310A装置で配列決定して確認された。本フラグメントを概念的に翻訳すると、それがADAMTSファミリーの新メンバーである事が確認された。

【0112】(B) この新しいADAMTS遺伝子の全配列を得るために、cDNA末端の迅速増幅技術(RACE)およびヒト胎児肝臓のRNAを用いて、AD(17)-1およびAD(17)-2で増幅されたフラグメントの5'端と3'端の伸張を実施した。Clontech社のMarathon法を用いる増幅連続繰り返しの後、同一フレーム中に開始コドンと終止コドンを含むフラグメントを得た。最後に、オリゴヌクレオチド:A DTS17F(5'-ATGTGTGACGGCGCCCTGCTG-3'; SEQ ID NO: 21)とADTS17R(5'-TCACGAGCTCGCGGTGGCTG-3'; SEQ ID NO: 22)を用いてADAMTS-17の全長cDNAを増幅した。配列をコンピューター解析することにより、1095個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレームの存在を確認した。本タンパク質はADAMTS-17と呼ばれ、それをコードする核酸配列と共にそのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 5に記載する。なお、ADAMTS-17アミノ酸配列はSEQ ID NO: 6にも記載されている。ADAMTS-17とデータバンク中でのアクセス可能な他の配列とのアライメントは、他のADAMと高い類似性を示し、さらにまた、ADAMTS(J. Biol. Chem., 274, 25555, 1999)とはより高い特異的な類似性を示した。本タンパク質は、

シグナル配列、プロペプチド、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリンとシステインリッチ領域といくつかのタイプIスロンボスポンジン様リピートを含有しており、これらの酵素の特徴的なドメイン構造のすべてを有している。

【0113】(C) 予測されるADAMTS-17のアミノ酸配列をより詳細に解析すると、潜在型酵素に保つのに関与しているCys残基を201番目に持っているプロ領域を含有することが判明した。本プロ領域は、フーリンまたはフーリン様プロテアーゼのようなプロタンパク変換酵素による本酵素の細胞内活性化をメディエートすることのできる基本的な領域(basic region)で終わっている。その触媒領域は、活性部位に触媒作用 Zn^{2+} 原子を配位するのに関与する配列、HEXXHXXGXXHD (389-400番)を含有している。本配列は、Asp残基で終わっており、該Asp残基は、MMPsのような他のメタロプロテアーゼからレプロリシン類(reprolysins)を区別しているものである。この Zn^{2+} 結合部位のC末端側のいくつかの残基において、レプロリシン類やMMPsに特徴的な"Met-turn"を形成するMet残基がある(413番)。ディスインテグリン領域(ドメイン)は触媒領域の後にみられ、そのサイズは他のADAMTSに類似しており、全てのメンバー中でよく保存されているところの、8個のCysを保持している。最後に、システインリッチ領域(ドメイン)は他のADAMTSs中の同等の領域と高い%で同一性(約50%)を示し、そしてさらに、他の全ADAMTSs中で保存されているところの、10個のCys残基を示している。これらの全てのデータより、クローン化された遺伝子を概念的に翻訳すると、その得られた予測されるタンパク質は、ADAMTSファミリーに属すると結論づけられ、そしてその公的に認証された名前、"ADAMTS-17"である。本配列は、EMBL遺伝子データバンクのアクセッション No. AJ315735として保存されている(SEQ ID NO:5に示された配列は、GenBankTMデータベースに2001年6月23日に寄託された)。SEQ ID NO:5に記載した単離DNAとポリペプチドおよびそれらから導かれた部分配列は、化学的に合成することもできる。

【0114】(D) 次に、ヒト組織中のADAMTS-17遺伝子発現を分析した。分析のために、ヒト成人組織(前立腺、脳、胸、下顎腺、内皮、胎盤、肝臓、大動脈、卵巣)と胎児組織(心臓、肺、肝臓、腎臓)の異なるcDNAライブラリーよりPCRによる増幅を遂行した。これを実施するため特異的オリゴヌクレオチド; AD(17)-1及びAD(17)-2(それぞれ20 pmol), 1 µg cDNA, 0.2 nM dNTPsおよび1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いてPCR増幅反応を実施した。PCR増幅は、Perkin-Elmer社のGeneAmp 2400を用いて、変性(15秒、94 °C)、アニリング(20秒、64 °C)そして伸張(60秒、68 °C)からなる35サイクルで実施した。図3に示されるように、増幅産物は、胎児肺cDNA

NAライブラリー、成人卵巣cDNAライブラリーで得られた。配列の確認は、DRターミネーターTaq FSキット(Applied Biosystems社)を用いてフラグメントの直接の配列決定と自動DNAシクエンサーABI-PRISM 310A(Perkin-Elmer社)により行った。さらに、ヒト腫瘍サンプル中のADAMTS-17遺伝子発現を調査したが、これは上記したPCRと類似の方法により行われた。このためには、乳癌と骨肉腫cDNAライブラリーを用いた(図3)。

【0115】実施例4

ADAMTS-18
(A) 新規なADAMTSをコードするヒト遺伝子を同定する目的で、次の探索を行った。すなわち、今日までに同定されたヒトADAMTSs間で保存されたアミノ酸配列を、GenBankTMのExpressed Sequence Tags (ESTs)部門でのプログラムTBLASTN(J. Mol. Biol., 215, 403, 1990)を用いてのサーチのためのクエリーとして用いて、当該サーチを行った。新規なADAMTSのメタロプロテアーゼとディスインテグリン領域に相当する配列が、ヒトゲノムDNA中で同定された。これらの領域の増幅は、20 pmolの二種のオリゴヌクレオチド、AD(18)-1 (5'-GTGGGATGTGCTCTAAGTAC-3'; SEQ ID NO: 23)およびAD(18)-2 (5'-ATGCTGGTTGAGGTACAGGC-3'; SEQ ID NO: 24)、ヒト胎児肺cDNAライブラリーのDNA 1 µg, 0.2 mM dNTPs および1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いて行われた。また、変性(15秒、94 °C)、アニリング(20秒、64 °C)そして伸張(40秒、68 °C)からなる40サイクルをPerkin-Elmer社製GeneAmp2300装置で行って増幅した。460pbの増幅フラグメントは、アガロースゲル電気泳動により分離され、GeneCleanTMで抽出された。フラグメントは、pUC18ベクターにクローニングの後、Perkin-Elmer社ABI-PRISM310A装置で配列決定して確認された。本フラグメントを概念的に翻訳すると、それがADAMTSファミリーの新メンバーである事が確認された。

【0116】(B) この新しいADAMTS遺伝子の全配列を得るために、cDNA末端の迅速増幅技術(RACE)およびヒト胎児肝臓のRNAを用いて、AD(18)-1およびAD(18)-2で増幅されたフラグメントの5'端と3'端の伸張を実施した。Clontech社のMarathon法を用いる増幅連続繰り返しの後、同一フレーム中に開始コドンと終止コドンを含むフラグメントを得た。最後に、オリゴヌクレオチドADTS18F (5'-ATGGAGTGGCCCTCCTGCTC-3'; SEQ ID NO: 25)とADTS18R (5'-TCATGTCACCGGGGAGGCAGC-3'; SEQ ID NO: 26)を用いてADAMTS-18の全長cDNAを増幅した。配列をコンピューター解析することにより、1081個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレームの存在を確認した。本タンパク質はADAMTS-18と呼ばれ、それをコードする核酸配列と共にそのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 7に記載する。なお、ADAMTS-18アミノ酸配列はSEQ ID NO: 8にも記載されている。ADAMTS

-18とデータバンク中でのアクセス可能な他の配列とのアライメントは、他のADAMと高い類似性を示し、さらにまた、ADAMTS (J. Biol. Chem., 274, 25555, 1999)とはより高い特異的な類似性を示した。本タンパク質は、シグナル配列、プロペプチド、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリンとシステインリッチ領域といくつかのタイプIスロンボスポンジン様リピートを含有しており、これらの酵素の特徴的なドメイン構造のすべてを有している。

【0117】(C) 予測されるADAMTS-18のアミノ酸配列をより詳細に解析すると、潜在型酵素に保つのに関与しているCys残基を254番目に持っているプロ領域を含有することが判明した。本プロ領域は、フォーリンまたはフォーリン様プロテアーゼのようなプロタンパク変換酵素による本酵素の細胞内活性化をメディエートすることのできる基本的な領域(basic region)で終わっている。その触媒領域は、活性部位に触媒作用 Zn^{2+} 原子を配位するのに関与する配列、HEXXHXXGXXHD (435-446番)を含有している。本配列は、Asp残基で終わっており、該Asp残基は、MMPsのような他のメタロプロテアーゼからレプロリシン類(reprolysins)を区別しているものである。この Zn^{2+} 結合部位のC末端側のいくつかの残基において、レプロリシン類やMMPsに特徴的な"Met-turn"を形成するMet残基がある(460番)。ディスインテグリン領域(ドメイン)は触媒領域の後にみられ、そのサイズは他のADAMTSに類似しており、全てのメンバー中でよく保存されているところの、8個のCysを保持している。最後に、システインリッチ領域(ドメイン)は他のADAMTSs中の同等の領域と高い%で同一性(約50%)を示し、そしてさらに、他の全ADAMTSs中で保存されているところの、10個のCys残基を示している。これらの全てのデータより、クローン化された遺伝子を概念的に翻訳すると、その得られた予測されるタンパク質は、ADAMTSファミリーに属すると結論づけられ、そしてその公的に認証された名前は、「ADAMTS-18」である。本配列は、EMBL遺伝子データバンクのアクセス No. AJ311903として保存されている(SEQ ID NO:7に示された配列は、GenBank™データベースに2001年7月30日に寄託された)。SEQ ID NO:7に記載した単離DNAとポリペプチドおよびそれらから導かれた部分配列は、化学的に合成することもできる。

【0118】(D) 次に、ヒト組織中のADAMTS-18遺伝子発現を分析した。分析のために、ヒト成人組織(前立腺、脳、胸、下顎腺、内皮、胎盤、肝臓、大動脈、卵巣)と胎児組織(心臓、肺、肝臓、腎臓)の異なったcDNAライブラリーよりPCRによる増幅を遂行した。これを実施するため特異的オリゴヌクレオチド; AD(18)-1及びAD(18)-2(それぞれ20 pmol), 1 µg cDNA, 0.2 nM dNTPsおよび1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いてPCR増幅反応を

実施した。PCR増幅は、Perkin-Elmer社のGeneAmp 2400を用いて、変性(15秒、94 °C), アニ-リング(20秒、64 °C)そして伸張(60秒、68 °C)からなる35サイクルで実施した。図4に示されるように、増幅産物は、胎児肺cDNAライブラリー、胎児腎臓cDNAライブラリーで得られ、さらに成人脳cDNAライブラリー、成人下顎腺cDNAライブラリー及び成人内皮cDNAライブラリーで得られた。配列の確認は、DRターミネーターTaq FSキット(Applied Biosystems社)を用いてフラグメントの直接の配列決定と自動DNAシクエンサーABI-PRISM 310A (Perkin-Elmer社)により行った。さらに、ヒト腫瘍サンプル中のADAMTS-18遺伝子発現を調査したが、これは上記したPCRと類似の方法により行われた。このためには、乳癌と骨肉腫cDNAライブラリーを用いた(図4)。

【0119】実施例5

ADAMTS-19

(A) 新規なADAMTSをコードするヒト遺伝子を同定する目的で、次の探索を行った。すなわち、今日までに同定されたヒトADAMTSs間で保存されたアミノ酸配列を、GenBank™のExpressed Sequence Tags (ESTs)部門でのプログラムTBLASTN(J. Mol. Biol., 215, 403, 1990)を用いてのサーチのためのクエリーとして用いて、当該サーチを行った。新規なADAMTSのメタロプロテアーゼとディスインテグリン領域に相当する配列が、ヒトゲノムDNA中で同定された。これらの領域の増幅は、20 pmolの二種のオリゴヌクレオチド、AD(19)-1 (5'-ACCTCCTCCACAA GTGGCATC-3'; SEQ ID NO: 27) およびAD(19)-2 (5'-GCT TACTTGAGTGAATGTGTAG-3'; SEQ ID NO: 28)、ヒト胎児肺cDNAライブラリーのDNA 1 µg, 0.2 mM dNTPs および1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche社)を用いて行われた。また、変性(15秒、94 °C)、アニ-リング(20秒、64 °C)そして伸張(40秒、68 °C)からなる40サイクルをPerkin-Elmer社製GeneAmp2300装置で行って増幅した。460pbの増幅フラグメントは、アガロースゲル電気泳動により分離され、GeneClean™で抽出された。フラグメントは、pUC18ベクターにクローニングの後、Perkin-Elmer社ABI-PRISM310A装置で配列決定して確認された。本フラグメントを概念的に翻訳すると、それがADAMTSファミリーの新メンバーである事が確認された。

【0120】(B) この新しいADAMTS遺伝子の全配列を得るために、cDNA末端の迅速増幅技術(RACE)およびヒト胎児肝臓のRNAを用いて、AD(19)-1およびAD(19)-2で増幅されたフラグメントの5'端と3'端の伸張を実施した。Clontech社のMarathon法を用いる増幅連続繰り返しの後、同一フレーム中に開始コドンと終止コドンを含むフラグメントを得た。最後に、オリゴヌクレオチドADTS19F (5'-ATGCGCCTGACTCACATCTGC-3'; SEQ ID NO: 29)とADTS19R (5'-TTATAAATAATGTAATTGCCA-3'; SEQ ID NO: 30)を用いてADAMTS-19の全長cDNAを増幅した。配列

をコンピュータ解析することにより、1207個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレームの存在を確認した。本タンパク質はADAMTS-19と呼ばれ、それをコードする核酸配列と共にそのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 9に記載する。なお、ADAMTS-19アミノ酸配列はSEQ ID NO: 10にも記載されている。ADAMTS-19とデータバンク中でのアクセス可能な他の配列とのアライメントは、他のADAMと高い類似性を示し、さらにまた、ADAMTS (J. Biol. Chem., 274, 25555, 1999)とはより高い特異的な類似性を示した。本タンパク質は、シグナル配列、プロペプチド、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリンとシステインリッチ領域といくつかのタイプIスロンボスポンジン様リピートを含んでおり、これらの酵素の特徴的なドメイン構造のすべてを有している。

【0121】(C) 予測されるADAMTS-19のアミノ酸配列をより詳細に解析すると、潜在型酵素に保つのに関与しているCys残基を294番目に持っているプロ領域を含有することが判明した。本プロ領域は、フォーリンまたはフォーリン様プロテアーゼのようなプロタンパク変換酵素による本酵素の細胞内活性化をメディエートすることのできる基本的な領域(basic region)で終わっている。その触媒領域は、活性部位に触媒作用 Zn^{2+} 原子を配位するのに関与する配列、HEXXHXXGXXHD (482-493番)を含有している。本配列は、Asp残基で終わっており、該Asp残基は、MMPsのような他のメタロプロテアーゼからレプロリシン類(reprolysins)を区別しているものである。この Zn^{2+} 結合部位のC末端側のいくつかの残基において、レプロリシン類やMMPsに特徴的な"Met-turn"を形成するMet残基がある(506番)。ディスインテグリン領域(ドメイン)は触媒領域の後にみられ、そのサイズは他のADAMTSに類似しており、全てのメンバー中でよく保存されているところの、8個のCysを保持している。最後に、システインリッチ領域(ドメイン)は他のADAMTSs中の同等の領域と高い%で同一性(約50%)を示し、そしてさらに、他の全ADAMTSs中で保存されているところの、10個のCys残基を示している。これらの全てのデータより、クローン化された遺伝子を概念的に翻訳すると、その得られた予測されるタンパク質は、ADAMTSファミリーに属すると結論づけられ、そしてその公的に認証された名前が、「ADAMTS-19」である。本配列は、EMBL遺伝子データバンクのアクセッション No. AJ311904として保存されている(SEQ ID NO:9に示された配列は、GenBank™データベースに2001年7月30日に寄託された)。SEQ ID NO:9に記載した単離DNAとポリペプチドおよびそれらから導かれた部分配列は、化学的に合成することもできる。

【0122】(D) 次に、ヒト組織中のADAMTS-19遺伝子発現を分析した。分析のために、ヒト成人組織(前立腺、脳、胸、下顎腺、内皮、胎盤、肝臓、大動脈、卵

巣)と胎児組織(心臓、肺、肝臓、腎臓)の異なったcDNAライブラリーよりPCRによる増幅を遂行した。これを実施するため特異的オリゴヌクレオチド; AD(19)-1及びAD(19)-2(それぞれ20 pmol), 1 µg cDNA, 0.2 nM dNTPsおよび1.25U TaqDNAポリメラーゼ(終容量50 µl、緩衝液 ExpandLong 3, Roche 社)を用いてPCR増幅反応を実施した。PCR増幅は、Perkin-Elmer社のGeneAmp 2400を用いて、変性(15秒、94 °C), アニ-リング(20秒、64 °C)そして伸張(60秒、68 °C)からなる35サイクルで実施した。図5に示されるように、増幅産物は、胎児肺cDNAライブラリーで得られた。配列の確認は、DRターミネイター-Taq FSキット(Applied Biosystems 社)を用いてフラグメントの直接の配列決定と自動DNAシクエンサーABI-PRISM 310A (Perkin-Elmer 社)により行った。さらに、ヒト腫瘍サンプル中のADAMTS-19遺伝子発現を調査したが、これは上記したPCRと類似の方法により行われた。このためには、乳癌と骨肉腫cDNAライブラリーを用いた(図5)。上記と同様のPCR産物が骨肉腫cDNAライブラリーで得られた。

【0123】実施例6

〔モノクローナル抗体の作成〕

(a) 免疫源

免疫に用いる抗原は、組換えヒトADAMTS-15、組換えヒトADAMTS-16、組換えヒトADAMTS-17、組換えヒトADAMTS-18及び組換えヒトADAMTS-19をはじめ、配列表のSEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:10のアミノ酸配列を基にデザインされた合成ペプチドを使用することができる。さらに、免疫に用いる抗原は、得られたcDNAを動物細胞発現ベクターに連結し、これをCHO細胞、COS細胞などで発現させて得られる当該組換えADAMTSタンパク質を使用することも可能である。これらの抗原タンパク質は、イオン交換、ゲル濾過またはそれ以外の各種クロマトグラフィーによって精製できる。精製した免疫用抗原を一般的な方法で免疫し、抗体産生細胞を誘導、細胞融合によりハイブリドーマとして抗体産生細胞を得ることができる。さらに精製した免疫用抗原に対する反応性に基づいてクローニング、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして株化できる。また、当該ADAMTSタンパク質特異的モノクローナル抗体を得るための免疫源としては、当該ADAMTSタンパク質に特徴的なアミノ酸配列を持つハプテン化合成ペプチドが使用できる。例えば、C末端には上記SEQ ID NO:2~10のアミノ酸配列から選択された連続した少なくとも3個以上、好ましくは5個以上の連続したペプチド配列を含むことが特に好ましい。

【0124】(b) 抗原ポリペプチドの調製

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列あるいはSEQ ID NO:10のアミノ酸配列中より特徴

的な配列を選択し、合成する。ペプチドはペプチド合成機（ペプチドシンセサイザー9600、Milligen/Biosearch社）を使用して、Fmoc-bop法で合成する。ポリペプチドのN末端にはシステインを導入する。合成したペプチドはμ Bondasphere, C18カラム（Waters社）を用いた高速液体クロマトグラフィーなどにより精製する。

(c) ポリペプチドとBSAの複合体の調製

システイン残基を介してウシ血清アルブミン（BSA）と結合させ、抗原コンジュゲートとする。10.1mgのBSAを1mLの0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解したものと1.14mgのEMCS(N-(γ -maleimidocaproyloxy)-succinimide)を24.9μLのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30、30分間反応させ、ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したSephadex G-25ゲル(Pharmacia社)カラム(直径13mm、長さ120mm)でゲルろ過する。前記(b)で合成したポリペプチドを0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解し、マレイミド結合BSAに対し約50倍モル量を混合する。すなわち、ポリペプチドに対しマレイミド結合BSAを混合し、4、20時間インキュベートし、BSA-ポリペプチド複合体を調製する。得られ20るBSA-ポリペプチド複合体を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で希釈した後、150μLずつに分注して-30で凍結保存する。

【0125】(d) 抗体産生細胞の調製

前記(c)で調製したBSA-ポリペプチド複合体を完全フロインドアジュバントと共に6週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫する。約18日目に0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解したBSA-ポリペプチド複合体を初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫する。さらに約52日目に0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解したBSA-ポリ30ペプチド複合体を静脈内投与し、最終免疫とする。その4日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製する。

(e) 細胞融合

細胞融合には、以下の材料および方法を用いる。RPMI-1640培地：RPMI-1640(Flow Lab.)に重炭酸ナトリウム(24mM)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、ペニシリンGカリウム(50U/ml)、硫酸アミカシン(100μg/ml)を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2μm東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過する。NS-1培地：上記RPMI-1640培地に除菌ろ過したウシ胎児血清(FCS, M.A. Bioproducts社)を15%(v/v)の濃度になるように加える。PEG-4000溶液：RPMI-1640培地にポリエチレングリコール-4000(PEG-4000, Merk&Co.社)を50%(w/w)になるように加えた無血清培地を調製する。8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2(SP2/0-Ag14)との融合は、Selected Method in culture immunology p351~372(ed. B. B. Mishell and S. N. Shiigi), W. H. Freeman and Company(1980)に記載のOiらの方法を若干改変して行う。

【0126】前記(d)で調製した有核脾細胞(生細胞率 50

100%)とミエローマ細胞(生細胞率100%)とを約5:1~10:1の比率で以下の手順で融合する。ポリペプチド免疫脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI1640培地で洗浄する。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞とミエローマ細胞を混合する。すなわち、約 4.0×10^8 個の有核脾細胞に対し約 8.0×10^7 個のミエローマ細胞を混合する。次に、それぞれの細胞混合液を遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去する。沈殿した細胞に37に加温した50%PEG-4000含有RPMI-1640培地(ミエローマ細胞が約 3×10^7 個/mLとなるよう体積を決定する)を滴下し、攪拌し、細胞を再懸濁、分散させる。次に添加した50%PEG-4000含有RPMI-1640培地の2倍体積の37に加温したRPMI-1640培地を滴下する。さらに添加した50%PEG-4000含有RPMI-1640培地の7倍体積のRPMI-1640培地を常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させる。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去する。次に、ミエローマ細胞が約 3×10^6 個/mLとなるように37に加温したNS-1培地を沈殿した細胞に速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピペティングで分散する。さらに同培地を加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウエルにウエル当りミエローマ細胞が約 6.0×10^5 個となるように接種する。それぞれの細胞を加えた上記マイクロウエルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37、湿度100%で培養する。

【0127】(f) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1)使用した培地は以下の通りである。

HAT培地：前記(e)項で述べたNS-1培地に更にヒポキサンチン(100μM)、アミノプテリン(0.4μM)およびチミジン(16μM)を加える。

HT培地：アミノプテリンを除去した以外は上記HAT培地と同一組成のものである。

(2)前記(e)項の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパスツールピペットでHAT培地2滴(約0.1ml)を加える。2、3、5、8日目に培地の半分(約0.1ml)を新しいHAT培地で置き換え、10日目に培地の半分を新しいHT培地で置き換える。ハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウエルについて固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウエルを調べる。まず、20mM炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈した抗原ポリペプチドでポリスチレン製96穴プレートをコート(100ng/ウエル)し、次に0.05% Tween20含有PBSを用いて洗浄して未吸着のペプチドを除く。各ウエルにハイブリドーマの生育が確認されたウエルの培養上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置する。洗浄後、2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Cappel社)を加え、さらに室温で約1時間静置する。洗浄後、基質である過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え発色させる。各ウエルに2N硫酸を加え発色反応を停止し、発色の程度をマイクロプレート用吸

光度測定器 (MRP-A4、東ソー社) を用いて450nm の吸光度で測定する。

【0128】(g) ハイブリドーマのクローニング

上記(f) 項で得られた抗原ペプチドに対する陽性ウエル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローニ化する。すなわち、NS-1培地1 ml当りフィーダーとして約 10^7 個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルにハイブリドーマをウエル当り5 個、1 個、0.5 個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加える。5 日目、12日目に全ウエルに約0.1mlのNS-1培地を追加する。クローニング開始後肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認めたもの、コロニー形成陰性ウエルが50%以上である群について (f) 項に記載したELISA を行う。調べた全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数が1 個のウエルを4 ~6 個選択し、再クローニングを行う。最終的にそれぞれのポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。

(h) モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

前述したELISA に従い、それぞれのポリペプチドをコートしたポリスチレン製96穴プレートに、前記(g) 項で得られたハイブリドーマの上清を加える。次にPBS で洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG 抗体 (Zymed Lab.社) を加える。PBS により洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H + L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノ-ジ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブクラスを決定する。

【0129】(i) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られたハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清からモノクローナル抗体を得ることができる。また、得られたハイブリドーマ 10^7 個を予め1 週間前にプリスタン腹腔内投与したマウス (Balb/c系、雌、6 週齢) に同じく腹腔内投与し、1 ~2 週間後、腹水中からも4 ~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgG クラスの抗体をプロテインA アフィゲル (Bio-Rad社) に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液、pH5.0 で溶出することにより精製する。

【0130】実施例7

〔ウエスタンブロッティング〕当該ヒトADAMTSタンパク質を発現するCOS7細胞の培養上清、精製組換えヒトADAMTSタンパク質およびヒト組織抽出タンパク質を還元条件下、10% SDS-PAGEで分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (Millipore社) に転写する。続いて1% BSA, 5%スキムミルクおよび0.1% Tween 20 含有PBS (ブロッキング緩衝液) を用いて室温でブロッキングした後、当該ヒトADAMTSタンパク質に対する特異抗体を発現するハイブリドーマ細胞株の培養上清中、25 でインキ

ュベートする。それぞれの膜を0.1% Tween 20 含有PBS (0.1%PBS-T)で4 回洗浄し、結合した抗体をブロッキング緩衝液で希釈したHRP 結合ヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体(Amersham Pharmacia社) と25 で反応させる。反応後、膜を0.1% PBS-Tで4回洗浄し、結合した抗体をEnhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia社) により検出する。また陽性コントロールは、当該ヒトADAMTSタンパク質発現COS7細胞培養上清、およびヒト組織抽出タンパク質を用い、ブロッキング緩衝液で希釈したウサギ抗ヒトADAMTS抗血清およびブロッキング緩衝液で希釈したHRP 結合ヤギ抗ウサギIgG(H+L)抗体 (Zymed社) により同様に処理し、ECL で検出する。

【0131】実施例8

〔サンドイッチEIA〕下記の方法に従えば、実施例6で調製される、それぞれの抗ADAMTSタンパク質抗体から少なくとも1 種を選択し、抗ADAMTSタンパク質抗体の2 種の適当な組み合わせによって各ヒトADAMTSタンパク質を特異的に検出・測定するサンドイッチEIA 系が構成できる。EIA 系は1 ステップ法、2 ステップ法のいずれも可能であり、標識抗体はFab'-HRPに限定されない。各反応緩衝液の組成や反応条件は測定の目的に応じて、短縮、延長など調整できる。また、標準品となるヒトADAMTSタンパク質は、組織培養上清、細胞培養上清または本明細書記載あるいはそれ以外の方法で発現した組換え体から精製することができる。精製にはイオン交換、ゲルろ過、当該抗ヒトADAMTSタンパク質モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーまたそれ以外の各種アフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによって達成される。

30 (a) 標識抗体の調製

抗ヒトADAMTSタンパク質モノクローナル抗体を0.1M NaCl 含有0.1M酢酸緩衝液、pH4.2 に抗体量の2%(W/W) のペプシンを加え、37、24時間消化する。消化物に3M Tris-HCl、pH7.5 を添加し、反応を停止する。0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したウルトロゲルAcA54 カラム (Pharmacia社) によるゲルろ過でF(ab')₂画分を分取する。このF(ab')₂ 画分に最終濃度0.01M となるようにシステアミン塩酸塩を添加し、37、1.5 時間還元し、5mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0 で平衡化したウルトロゲルAcA54 カラムによるゲルろ過でFab'画分を分取する。上記の操作とは別にHRP を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0 に溶解、HRP の25倍モル量のEMCSをDMF 溶液として加え、30、30分間反応させる。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0 で平衡化したNICK-5カラム(Pharmacia社) でゲルろ過しマレイミド標識HRP 画分を分取する。Fab'画分とマレイミド標識HRP を等モルとなるように両画分を混合し4、20時間反応させた後、Fab'の10倍モル量のN-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックする。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5 で平衡化したウルトロゲルAcA54 カラムでゲルろ過し、Fab'-HRP標識抗体

を分取する。これに0.1% BSAおよび0.001%クロルヘキシジンを添加して4℃で保存する。

【0132】(b) モノクローナル抗体結合担体の調製
抗ヒトADAMTSタンパク質モノクローナル抗体を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5 に溶解し、50 µg/mLの濃度に調製する。このモノクローナル抗体溶液を96穴マイクロプレートにウエルあたり100 µL ずつ加え、4℃、18時間静置する。モノクローナル抗体溶液を除去し、生理食塩液で1回、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0 で3回洗浄後、1% BSA、0.1M NaCl

(c) 1ステップサンドイッチEIA法

精製した当該ヒトADAMTSタンパク質画分を標準抗原としてヒトADAMTSタンパク質定量用標準曲線を作成する。1% BSA、0.05% Brij35、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0 で段階希釈した標準ヒトADAMTSタンパク質を60 µL ずつ分注、それぞれに1% BSA、0.05% Brij35、0.05% Tween 20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0 で100ng/50 µL に調製した標識抗体Fab'-HRPを60 µL ずつ添加し十分混和する。調製した抗体結合マイクロプレートを0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0 で3回洗浄し、標準抗原と標識抗体混合液を100 µL/ウエルずつ添加する。室温で1時間反応した後0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0 で3回洗浄する。次に、6%ジメチルホルムアミド、0.005%過酸化水素含有0.1 M 酢酸緩衝液(pH5.5)に溶解した0.01% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンをウエルあたり100 µL 添加し、室温で20分間反応後、2N 硫酸を100 µL 添加し反応を停止する。この反応混液の450 nmをマイクロプレートリーダーを用いて測定し、標準曲線を求める。測定検体は、ヒト血清、脊髄液、血漿、関節液、尿および唾液などヒトに由来する体液成分、各種ヒト組織の抽出液、ヒト由来あるいは組換え体など各種培養細胞の細胞抽出液、培養上清などから調製される。それぞれの測定検体は、当該標準ヒトADAMTSタンパク質にかえて上記の1ステップサンドイッチEIAに供し、標準ヒトADAMTSタンパク質と同時に反応を進行さ*

*せる。測定検体から得られた吸光度を標準曲線にあてはめ、測定検体に含まれるヒトADAMTSタンパク質の量を算出する。

【0133】

【発明の効果】天然型の新規ADAMTSタンパク質を確認出来たことから、この情報を利用して該タンパク質を測定することが可能となり、その生理学的活性や生物学的活性などを解明する手段が入手でき、さらに該タンパク質に起因する生理現象、関連疾患の診断、原因究明、リスク予知などに有用である。当該ヒトADAMTSタンパク質に対するモノクローナル抗体を始めとした抗体などの活性物質を作製し、これを用いた当該タンパク質の測定系を開発することが可能で、細胞接着や組織リモデリングといった生物学的過程(プロセス)、例えば、免疫応答、血管新生、凝固、創傷治癒、再生プロセス、胚着床あるいは胎児発達のような生理学的条件の解明・研究、さらに癌細胞の浸潤、転移、リウマチあるいは心臓血管におけるプロセス、血液学的なプロセスおよび神経退化のプロセスのような生理学的条件に関連した正常あるいは病的な現象の検出・測定・予知などに役立つ。また、当該ADAMTSタンパク質の産生を制御する化合物の開発も可能となるし、がんの転移、浸潤の診断などにも有用である。本発明により、当該ADAMTSポリペプチド若しくはその塩、さらにはそれを基礎とした変異体、修飾体、誘導体などをデザインして得ることが可能となり、またそれらをコードする核酸、該核酸を有するベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞が提供でき、当該ADAMTSタンパク質に関連した疾患、例えば老化に付随した各種疾患、動脈硬化症、生体内タンパク質の関係した疾患あるいは病気の発症及び/又は進展、及び腫瘍の浸潤又は拡散などの病的な状態あるいは症状の研究に役立つし、医薬品、診断薬、さらには遺伝子診断や遺伝子治療の途を開くと期待できる。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

【0134】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI FINE CHEMICAL CO., LTD.
<120> ADAMTS-15, -16, -17, -18 and -19
<130> P-02NF389
<150> ES200102165
<151> 2001-09-24
<150> ES200102166
<151> 2001-09-24
<150> ES200102167
<151> 2001-09-24

<150> ES200102192

<151> 2001-09-25

<150> ES200102193

<151> 2001-09-25

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2853)

<223>

<400> 1

atg ctt ctg ctg ggc atc cta acc ctg gct

ttc gcc ggg cga acc gct 48

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala

Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1

5

10

15

gga ggc tct gag cca gag cgg gag gta gtc

gtt ccc atc cga ctg gac 96

Gly Gly Ser Glu Pro Glu Arg Glu Val Val

Val Pro Ile Arg Leu Asp

20

25

30

ccg gac att aac ggc cgc cgc tac tac tgg

cgg ggt ccc gag gac tcc 144

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp

Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35

40

45

ggg gat cag gga ctc att ttt cag atc aca

gca ttt cag gag gac ttt 192

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr

Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50

55

60

tac cta cac ctg acg ccg gat gct cag ttc

ttg gct ccc gcc ttc tcc 240

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe

Leu Ala Pro Ala Phe Ser

65

70

75

80

act gag cat ctg ggc gtc ccc ctc cag ggg

ctc acc ggg ggc tct tca 288

Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly

Leu Thr Gly Gly Ser Ser

85

90

95

gac ctg cga cgc tgc ttc tat tct ggg gac

Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg
Ala Leu Asp Pro Tyr Lys
180 185 190

ccg cgg cgg gcg ggc ttc ggg gag agt cgt
agc cgg cgc agg tct ggg 624
Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg
Ser Arg Arg Arg Ser Gly
195 200 205

cgc gcc aag cgt ttc gtg tct atc ccg cgg
tac gtg gag acg ctg gtg 672
Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg
Tyr Val Glu Thr Leu Val
210 215 220

gtc gcg gac gag tca atg gtc aag ttc cac
ggc gcg gac ctg gaa cat 720
Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His
Gly Ala Asp Leu Glu His
225 230 235 240

tat ctg ctg acg ctg ctg gca acg gcg gcg
cga ctc tac cgc cat ccc 768
Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Ala Ala
Arg Leu Tyr Arg His Pro
245 250 255

agc atc ctc aac ccc atc aac atc gtt gtg
gtc aag gtg ctg ctt ctt 816
Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val
Val Lys Val Leu Leu Leu
260 265 270

aga gat cgt gac tcc ggg ccc aag gtc acc
ggc aat gcg gcc ctg acg 864
Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr
Gly Asn Ala Ala Leu Thr
275 280 285

ctg cgc aac ttc tgt gcc tgg cag aag aag
ctg aac aaa gtg agt gac 912
Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys
Leu Asn Lys Val Ser Asp
290 295 300

aag cac ccc gag tac tgg gac act gcc atc
ctc ttc acc agg cag gac 960
Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile
Leu Phe Thr Arg Gln Asp
305 310 315 320

ctg tgt gga gcc acc acc tgt gac acc ctg

gag ctg gct ttt ggc gtg ggc tcc aag ccc
 tgt cct tac atg cag tac 1392
 Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro
 Cys Pro Tyr Met Gln Tyr
 450 455 460

tgc acc aag ctg tgg tgc acc ggg aag gcc
 aag gga cag atg gtg tgc 1440
 Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala
 Lys Gly Gln Met Val Cys
 465 470 475 480

cag acc cgc cac ttc ccc tgg gcc gat ggc
 acc agc tgt ggc gag ggc 1488
 Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly
 Thr Ser Cys Gly Glu Gly
 485 490 495

aag ctc tgc ctc aaa ggg gcc tgc gtg gag
 aga cac aac ctc aac aag 1536
 Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu
 Arg His Asn Leu Asn Lys
 500 505 510

cac agg gtg gat ggt tcc tgg gcc aaa tgg
 gat ccc tat ggc ccc tgc 1584
 His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp
 Asp Pro Tyr Gly Pro Cys
 515 520 525

tcg cgc aca tgt ggt ggg ggc gtg cag ctg
 gcc agg agg cag tgc acc 1632
 Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Leu
 Ala Arg Arg Gln Cys Thr
 530 535 540

aac ccc acc cct gcc aac ggg ggc aag tac
 tgc gag gga gtg agg gtg 1680
 Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr
 Cys Glu Gly Val Arg Val
 545 550 555 560

aaa tac cga tcc tgc aac ctg gag ccc tgc
 ccc agc tca gcc tcc gga 1728
 Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys
 Pro Ser Ser Ala Ser Gly
 565 570 575

aag agc ttc cgg gag gag cag tgt gag gct
 ttc aac ggc tac aac cac 1776
 Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala
 Phe Asn Gly Tyr Asn His
 580 585 590

705 710 715 7
 20
 ggg gat gac aac tac ctg gct ctg aag aac
 agc caa ggc aag tac ctg 2208
 Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn
 Ser Gln Gly Lys Tyr Leu
 725 730 735

 ctc aac ggg cat ttc gtg gtg tcg gcg gtg
 gag cgg gac ctg gtg gtg 2256
 Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val
 Glu Arg Asp Leu Val Val
 740 745 750

 aag ggc agt ctg ctg cgg tac agc ggc acg
 ggc aca gcg gtg gag agc 2304
 Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr
 Gly Thr Ala Val Glu Ser
 755 760 765

 ctg cag gct tcc cgg ccc atc ctg gag ccg
 ctg acc gtg gag gtc ctc 2352
 Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro
 Leu Thr Val Glu Val Leu
 770 775 780

 tcc gtg ggg aag atg aca ccg ccc cgg gtc
 cgc tac tcc ttc tat ctg 2400
 Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val
 Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu
 785 790 795 8
 00
 ccc aaa gag cct cgg gag gac aag tcc tct
 cat ccc aag gac ccc cgg 2448
 Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser
 His Pro Lys Asp Pro Arg
 805 810 815

 gga ccc tct gtc ttg cac aac agc gtc ctc
 agc ctc tcc aac cag gtg 2496
 Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu
 Ser Leu Ser Asn Gln Val
 820 825 830

 gag cag ccg gac gac agg ccc cct gca cgc
 tgg gtg gct ggc agc tgg 2544
 Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg
 Trp Val Ala Gly Ser Trp
 835 840 845

 ggg ccg tgc tcc gcg agc tgc ggc agt ggc
 ctg cag aag cgg gcg gtg 2592
 Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly

<400> 2

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala
Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Pro Glu Arg Glu Val Val
Val Pro Ile Arg Leu Asp

20 25 30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp
Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr
Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50 55 60

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe
Leu Ala Pro Ala Phe Ser

65 70 75 80

Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly
Leu Thr Gly Gly Ser Ser

85 90 95

Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp
Val Asn Ala Glu Pro Asp

100 105 110

Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly
Leu Arg Gly Ala Phe Gly

115 120 125

Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro
Leu Pro Asn Ala Ser Ala

130 135 140

Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala
His Leu Leu Gln Arg Arg

145 150 155 1

60

Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro
Thr Ser Arg Cys Gly Val

165 170 175

Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg
Ala Leu Asp Pro Tyr Lys

180 185 190

Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg
Ser Arg Arg Ser Gly

195 200 205

370	375	380	
Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu			
Ile Gln Ile Asp Arg Ala			
385	390	395	4
00			
Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile			
Ile Thr Asp Phe Leu Asp			
	405	410	415
Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln			
Pro Ser Lys Pro Ile Ser			
	420	425	430
Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr			
Thr Leu Ser Gln Gln Cys			
	435	440	445
Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro			
Cys Pro Tyr Met Gln Tyr			
	450	455	460
Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala			
Lys Gly Gln Met Val Cys			
465	470	475	4
80			
Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly			
Thr Ser Cys Gly Glu Gly			
	485	490	495
Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu			
Arg His Asn Leu Asn Lys			
	500	505	510
His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp			
Asp Pro Tyr Gly Pro Cys			
	515	520	525
Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Leu			
Ala Arg Arg Gln Cys Thr			
	530	535	540
Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr			
Cys Glu Gly Val Arg Val			
545	550	555	5
60			
Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys			
Pro Ser Ser Ala Ser Gly			
	565	570	575

	740	745	750	
Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser	755	760	765	
Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu	770	775	780	
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu	785	790	795	800
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg	805	810	815	
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val	820	825	830	
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp	835	840	845	
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val	850	855	860	
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala	865	870	875	880
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr	885	890	895	
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly	900	905	910	
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu	915	920	925	
Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe	930	935	940	
Cys Val Leu Arg Pro Cys				

50	55	60	
gcc tac gag gtt gac cac agg ggc gat tac			
gtg tcc cat gaa atc atg 240			
Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr			
Val Ser His Glu Ile Met			
65	70	75	80
cac cat cag cgg cgg aga aga gca gtg gcc			
gtg tcc gag gtt gag tct 288			
His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala			
Val Ser Glu Val Glu Ser			
85	90		95
ctt cac ctt cgg ctg aaa ggc ccc agg cac			
gac ttc cac atg gat ctg 336			
Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Pro Arg His			
Asp Phe His Met Asp Leu			
100	105		110
agg act tcc agc agc cta gtg gct cct ggc			
ttt att gtg cag acg ttg 384			
Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly			
Phe Ile Val Gln Thr Leu			
115	120		125
gga aag aca ggc act aag tct gtg cag act			
tta ccg cca gag gac ttc 432			
Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr			
Leu Pro Pro Glu Asp Phe			
130	135		140
tgt ttc tat caa ggc tct ttg cga tca cac			
aga aac tcc tca gtg gcc 480			
Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His			
Arg Asn Ser Ser Val Ala			
145	150	155	1
60			
ctt tca acc tgc caa ggc ttg tca ggc atg			
ata cga aca gaa gag gca 528			
Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met			
Ile Arg Thr Glu Glu Ala			
165	170		175
gat tac ttc cta agg cca ctt cct tca cac			
ctc tca tgg aaa ctc ggc 576			
Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His			
Leu Ser Trp Lys Leu Gly			
180	185		190
aga gct gcc caa ggc agc tcg cca tcc cac			
gta ctg tac aag aga tcc 624			
Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His			

Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr
 Ile Gly Gly Asn Ile Asn
 325 330 335

att gca att gta ggt ctg att ctt cta gaa
 gat gaa cag cca gga ctg 1056
 Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu
 Asp Glu Gln Pro Gly Leu
 340 345 350

gtg ata agt cac cac gca gac cac acc tta
 agt agc ttc tgc cag tgg 1104
 Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu
 Ser Ser Phe Cys Gln Trp
 355 360 365

cag tct gga ttg atg ggg aaa gat ggg act
 cgt cat gac cac gcc atc 1152
 Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr
 Arg His Asp His Ala Ile
 370 375 380

tta ctg act ggt ctg gat ata tgt tcc tgg
 aag aat gag ccc tgt gac 1200
 Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp
 Lys Asn Glu Pro Cys Asp
 385 390 395 4
 00

act ttg gga ttt gca ccc ata agt gga atg
 tgt agt aaa tat cgc agc 1248
 Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met
 Cys Ser Lys Tyr Arg Ser
 405 410 415

tgc acg att aat gaa gat aca ggt ctt gga
 ctg gcc ttc acc att gcc 1296
 Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly
 Leu Ala Phe Thr Ile Ala
 420 425 430

cat gag tct gga cac aac ttt ggc atg att
 cat gat gga gaa ggg aac 1344
 His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile
 His Asp Gly Glu Gly Asn
 435 440 445

atg tgt aaa aag tcc gag ggc aac atc atg
 tcc cct aca ttg gca gga 1392
 Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met
 Ser Pro Thr Leu Ala Gly
 450 455 460

cgc aat gga gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc

tct tct tgg tcc cca tgc tcc agg acc tgc
gga ggg gga gta tct cat 1824
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys
Gly Gly Gly Val Ser His
595 600 605

agg agt cgc ctc tgc acc aac ccc aag cca
tcg cat gga ggg aag ttc 1872
Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro
Ser His Gly Gly Lys Phe
610 615 620

tgt gag ggc tcc act cgc act ctg aag ctc
tgc aac agt cag aaa tgt 1920
Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu
Cys Asn Ser Gln Lys Cys
625 630 635 6
40

ccc cgg gac agt gtt gac ttc cgt gct gct
cag tgt gcc gag cac aac 1968
Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala
Gln Cys Ala Glu His Asn
645 650 655

agc aga cga ttc aga ggg cgg cac tac aag
tgg aag cct tac act caa 2016
Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys
Trp Lys Pro Tyr Thr Gln
660 665 670

gta gaa gat cag gac tta tgc aaa ctc tac
tgt atc gca gaa gga ttt 2064
Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr
Cys Ile Ala Glu Gly Phe
675 680 685

gat ttc ttc ttt tct ttg tca aat aaa gtc
aaa gat ggg act cca tgc 2112
Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val
Lys Asp Gly Thr Pro Cys
690 695 700

tcg gag gat agc cgt aat gtt tgt ata gat
ggg ata tgt gag aga gtt 2160
Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp
Gly Ile Cys Glu Arg Val
705 710 715 7
20

gga tgt gac aat gtc ctt gga tct gat gct
gtt gaa gac gtc tgt ggg 2208
Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala
Val Glu Asp Val Cys Gly
725 730 735

850	855	860	
cag ccc cct gcc cag ccc agc tac act tgg			
gcc atc gtg cgc tct gag	2640		
Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp			
Ala Ile Val Arg Ser Glu			
865	870	875	8
80			
tgc tcc gtg tcc tgc gga ggg gga cag atg			
acc gtg aga gag ggc tgc	2688		
Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met			
Thr Val Arg Glu Gly Cys			
	885	890	895
tac aga gac ctg aag ttt caa gta aat atg			
tcc ttc tgc aat ccc aag	2736		
Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met			
Ser Phe Cys Asn Pro Lys			
	900	905	910
aca cga cct gtc acg ggg ctg gtg cct tgc			
aaa gta tct gcc tgt cct	2784		
Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys			
Lys Val Ser Ala Cys Pro			
	915	920	925
ccc agc tgg tcc gtg ggg aac tgg agt gcc			
tgc agt cgg acg tgt ggc	2832		
Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala			
Cys Ser Arg Thr Cys Gly			
	930	935	940
ggg ggt gcc cag agc cgc ccc gtg cag tgc			
aca cgg cgg gtg cac tat	2880		
Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys			
Thr Arg Arg Val His Tyr			
945	950	955	9
60			
gac tcg gag cca gtc ccg gcc agc ctg tgc			
cct cag cct gct ccc tcc	2928		
Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys			
Pro Gln Pro Ala Pro Ser			
	965	970	975
agc agg cag gcc tgc aac tct cag agc tgc			
cca cct gca tgg agc gcc	2976		
Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys			
Pro Pro Ala Trp Ser Ala			
	980	985	990
ggg ccc tgg gca gag tgc tca cac acc tgt			
ggg aag ggg tgg agg aag	3024		
Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys			

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

Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp 385 390 395 400	4
Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser 405 410 415	
Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala 420 425 430	
His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn 435 440 445	
Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly 450 455 460	
Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His 465 470 475 480	4
Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys 485 490 495	
Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr 500 505 510	
Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu 515 520 525	
Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His 530 535 540	
Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly 545 550 555 560	5
Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys 565 570 575	
Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp 580 585 590	
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys	

755	760	765	
Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu			
Met Asn Val Ser Thr Ser			
770	775	780	
Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg			
Tyr Tyr Leu Asn Gly His			
785	790	795	8
00			
Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys			
Phe Ser Gly Thr Thr Phe			
	805	810	815
Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu			
Asn Leu Ile Ala Thr Gly			
	820	825	830
Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu			
Leu Phe Gln Gly Arg Asn			
	835	840	845
Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro			
Arg Leu Gly Thr Glu Lys			
	850	855	860
Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp			
Ala Ile Val Arg Ser Glu			
865	870	875	8
80			
Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met			
Thr Val Arg Glu Gly Cys			
	885	890	895
Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met			
Ser Phe Cys Asn Pro Lys			
	900	905	910
Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys			
Lys Val Ser Ala Cys Pro			
	915	920	925
Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala			
Cys Ser Arg Thr Cys Gly			
	930	935	940
Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys			
Thr Arg Arg Val His Tyr			
945	950	955	9
60			
Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys			
Pro Gln Pro Ala Pro Ser			

<223>

<400> 5

atg tgt gac ggc gcc ctg ctg cct ccg ctc

gtc ctg ccc gtg ctg ctg 48

Met Cys Asp Gly Ala Leu Leu Pro Pro Leu

Val Leu Pro Val Leu Leu

1

5

10

15

ctg ctg gtt tgg gga ctg gac ccg ggc aca

gct gtc ggc gac gcg gcg 96

Leu Leu Val Trp Gly Leu Asp Pro Gly Thr

Ala Val Gly Asp Ala Ala

20

25

30

gcc gac gtg gag gtg gtg ctc ccg tgg cgg

gtg cgc ccc gac gac gtg 144

Ala Asp Val Glu Val Val Leu Pro Trp Arg

Val Arg Pro Asp Asp Val

35

40

45

cac ctg ccg ccg ctg ccc gca gcc ccc ggg

ccc cga cgg cgg cga cgc 192

His Leu Pro Pro Leu Pro Ala Ala Pro Gly

Pro Arg Arg Arg Arg Arg

50

55

60

ccc cgc acg ccc cca gcc gcc ccg cgc gcc

cgg ccc gga gag cgc gcc 240

Pro Arg Thr Pro Pro Ala Ala Pro Arg Ala

Arg Pro Gly Glu Arg Ala

65

70

75

80

ctg ctg ctg cac ctg ccg gcc ttc ggg cgc

gac ctg tac ctt cag ctg 288

Leu Leu Leu His Leu Pro Ala Phe Gly Arg

Asp Leu Tyr Leu Gln Leu

85

90

95

cgc cgc gac ctg cgc ttc ctg tcc cga ggc

ttc gag gtg gag gag gcg 336

Arg Arg Asp Leu Arg Phe Leu Ser Arg Gly

Phe Glu Val Glu Glu Ala

100

105

110

ggc gcg gcc cgg cgc cgc ggc cgc ccc gcc

gag ctg tgc ttc tac tcg 384

Gly Ala Ala Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala

Glu Leu Cys Phe Tyr Ser

115

120

125

ggc cgt gtg ctc ggc cac ccc ggc tcc ctc

gtc tcg ctc agc gcc tgc 432

Gly Arg Val Leu Gly His Pro Gly Ser Leu

atc ctg acc gtc atg aac atg gta tac aat
 atg ttt cag cac cag agc 816
 Ile Leu Thr Val Met Asn Met Val Tyr Asn
 Met Phe Gln His Gln Ser
 260 265 270

ctg ggg att aaa att aac att caa gtg acc
 aag ctt gtc ctg cta cga 864
 Leu Gly Ile Lys Ile Asn Ile Gln Val Thr
 Lys Leu Val Leu Leu Arg
 275 280 285

caa cgt ccc gct aag ttg tcc att ggg cac
 cat ggt gag cgg tcc ctg 912
 Gln Arg Pro Ala Lys Leu Ser Ile Gly His
 His Gly Glu Arg Ser Leu
 290 295 300

gag agc ttc tgt cac tgg cag aac gag gag
 tat gga gga gcg cga tac 960
 Glu Ser Phe Cys His Trp Gln Asn Glu Glu
 Tyr Gly Gly Ala Arg Tyr
 305 310 315 3
 20

ctc ggc aat aac cag gtt ccc ggc ggg aag
 gac gac ccg ccc ctg gtg 1008
 Leu Gly Asn Asn Gln Val Pro Gly Gly Lys
 Asp Asp Pro Pro Leu Val
 325 330 335

gat gct gct gtg ttt gtg acc agg aca gat
 ttc tgt gta cac aaa gat 1056
 Asp Ala Ala Val Phe Val Thr Arg Thr Asp
 Phe Cys Val His Lys Asp
 340 345 350

gaa ccg tgt gac act gtt gga att gct tac
 tta gga ggt gtg tgc agt 1104
 Glu Pro Cys Asp Thr Val Gly Ile Ala Tyr
 Leu Gly Gly Val Cys Ser
 355 360 365

gct aag agg aag tgt gtg ctt gcc gaa gac
 aat ggt ctc aat ttg gcc 1152
 Ala Lys Arg Lys Cys Val Leu Ala Glu Asp
 Asn Gly Leu Asn Leu Ala
 370 375 380

ttt acc atc gcc cat gag ctg ggc cac aac
 ttg ggc atg aac cac gac 1200
 Phe Thr Ile Ala His Glu Leu Gly His Asn
 Leu Gly Met Asn His Asp
 385 390 395 4

515	520	525	
gcg ggg gag tgc gtg agc aag acg ccc atc			
ccg gag cat gtg gac gga 1632			
Ala Gly Glu Cys Val Ser Lys Thr Pro Ile			
Pro Glu His Val Asp Gly			
530	535	540	
gac tgg agc ccg tgg ggc gcc tgg agc atg			
tgc agc cga aca tgt ggg 1680			
Asp Trp Ser Pro Trp Gly Ala Trp Ser Met			
Cys Ser Arg Thr Cys Gly			
545	550	555	5
60			
acg gga gcc cgc ttc agg cag agg aaa tgt			
gac aac ccc ccc cct ggg 1728			
Thr Gly Ala Arg Phe Arg Gln Arg Lys Cys			
Asp Asn Pro Pro Pro Gly			
565	570	575	
cct gga ggc aca cac tgc ccg ggt gcc agt			
gta gaa cat gcg gtc tgc 1776			
Pro Gly Gly Thr His Cys Pro Gly Ala Ser			
Val Glu His Ala Val Cys			
580	585	590	
gag aac ctg ccc tgc ccc aag ggt ctg ccc			
agc ttc cgg gac cag cag 1824			
Glu Asn Leu Pro Cys Pro Lys Gly Leu Pro			
Ser Phe Arg Asp Gln Gln			
595	600	605	
tgc cag gca cac gac cgg ctg agc ccc aag			
aag aaa ggc ctg ctg aca 1872			
Cys Gln Ala His Asp Arg Leu Ser Pro Lys			
Lys Lys Gly Leu Leu Thr			
610	615	620	
gcc gtg gtg gtt gac gat aag cca tgt gaa			
ctc tac tgc tcg ccc ctc 1920			
Ala Val Val Val Asp Asp Lys Pro Cys Glu			
Leu Tyr Cys Ser Pro Leu			
625	630	635	6
40			
ggg aag gag tcc cca ctg ctg gtg gcc gac			
agg gtc ctg gac ggt aca 1968			
Gly Lys Glu Ser Pro Leu Leu Val Ala Asp			
Arg Val Leu Asp Gly Thr			
645	650	655	
ccc tgc ggg ccc tac gag act gat ctc tgc			
gtg cac ggc aag tgc cag 2016			
Pro Cys Gly Pro Tyr Glu Thr Asp Leu Cys			

Asn Arg Thr Ala Glu Asn Gln Ser Glu Pro
 Glu Lys Pro Gln Asp Ser
 785 790 795 800

ttg ttc atc tgg acc cac agc ggc tgg gaa
 ggg tgc agt gtg cag tgc 2448
 Leu Phe Ile Trp Thr His Ser Gly Trp Glu
 Gly Cys Ser Val Gln Cys
 805 810 815

ggc gga ggg gag cgc aga acc atc gtc tcg
 tgt aca cgg att gtc aac 2496
 Gly Gly Gly Glu Arg Arg Thr Ile Val Ser
 Cys Thr Arg Ile Val Asn
 820 825 830

aag acc aca act ctg gtg aac gac agt gac
 tgc cct caa gca agc cgc 2544
 Lys Thr Thr Thr Leu Val Asn Asp Ser Asp
 Cys Pro Gln Ala Ser Arg
 835 840 845

cca gag ccc cag gtc cga agg tgc aac ttg
 cac ccc tgc cag tca cgg 2592
 Pro Glu Pro Gln Val Arg Arg Cys Asn Leu
 His Pro Cys Gln Ser Arg
 850 855 860

tgg gtg gca ggc ccg tgg agc ccc tgc tcg
 gcg acc tgt gag aaa ggc 2640
 Trp Val Ala Gly Pro Trp Ser Pro Cys Ser
 Ala Thr Cys Glu Lys Gly
 865 870 875 880

ttc cag cac cgg gag gtg acc tgc gtg tac
 cag ctg cag aac ggc aca 2688
 Phe Gln His Arg Glu Val Thr Cys Val Tyr
 Gln Leu Gln Asn Gly Thr
 885 890 895

cac gtc gct acg cgg ccc ctc tac tgc ccg
 ggc ccc cgg ccg gcg gca 2736
 His Val Ala Thr Arg Pro Leu Tyr Cys Pro
 Gly Pro Arg Pro Ala Ala
 900 905 910

gtg cag agc tgt gaa ggc cag gac tgc ctg
 tcc atc tgg gag gcg tct 2784
 Val Gln Ser Cys Glu Gly Gln Asp Cys Leu
 Ser Ile Trp Glu Ala Ser
 915 920 925

gag tgg tca cag tgc tct gcc agc tgt ggt

tgg acg gta tat tgc cgg gtc atc cga gaa
 aag aac ctc tgc cag 3204
 Trp Thr Val Tyr Cys Arg Val Ile Arg Glu
 Lys Asn Leu Cys Gln
 1055 1060 1065

gac atg cgg tgg tac cag cgc tgc tgc cag
 acc tgc agg gac ttc 3249
 Asp Met Arg Trp Tyr Gln Arg Cys Cys Gln
 Thr Cys Arg Asp Phe
 1070 1075 1080

tat gca aac aag atg cgc cag cca ccg ccg
 agc tcg tga cagcagtc 3298
 Tyr Ala Asn Lys Met Arg Gln Pro Pro Pro
 Ser Ser
 1085 1090 1095

caagggtcgc tcaa
 3312

<210> 6

<211> 1095

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Cys Asp Gly Ala Leu Leu Pro Pro Leu
 Val Leu Pro Val Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Val Trp Gly Leu Asp Pro Gly Thr
 Ala Val Gly Asp Ala Ala
 20 25 30

Ala Asp Val Glu Val Val Leu Pro Trp Arg
 Val Arg Pro Asp Asp Val
 35 40 45

His Leu Pro Pro Leu Pro Ala Ala Pro Gly
 Pro Arg Arg Arg Arg Arg
 50 55 60

Pro Arg Thr Pro Pro Ala Ala Pro Arg Ala
 Arg Pro Gly Glu Arg Ala
 65 70 75 80

Leu Leu Leu His Leu Pro Ala Phe Gly Arg
 Asp Leu Tyr Leu Gln Leu
 85 90 95

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

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

Ala Val Val Val Asp Asp Lys Pro Cys Glu Leu Tyr Cys Ser Pro Leu 625 630 635 6
40 Gly Lys Glu Ser Pro Leu Leu Val Ala Asp Arg Val Leu Asp Gly Thr 645 650 655
Pro Cys Gly Pro Tyr Glu Thr Asp Leu Cys Val His Gly Lys Cys Gln 660 665 670
Lys Ile Gly Cys Asp Gly Ile Ile Gly Ser Ala Ala Lys Glu Asp Arg 675 680 685
Cys Gly Val Cys Ser Gly Asp Gly Lys Thr Cys His Leu Val Lys Gly 690 695 700
Asp Phe Ser His Ala Arg Gly Thr Ala Leu Lys Asp Ser Gly Lys Gly 705 710 715 7
20 Ser Ile Asn Ser Asp Trp Lys Ile Glu Leu Pro Gly Glu Phe Gln Ile 725 730 735
Ala Gly Thr Thr Val Arg Tyr Val Arg Arg Gly Leu Trp Glu Lys Ile 740 745 750
Ser Ala Lys Gly Pro Thr Lys Leu Pro Leu His Leu Met Val Leu Leu 755 760 765
Phe His Asp Gln Asp Tyr Gly Ile His Tyr Glu Tyr Thr Val Pro Val 770 775 780
Asn Arg Thr Ala Glu Asn Gln Ser Glu Pro Glu Lys Pro Gln Asp Ser 785 790 795 8
00 Leu Phe Ile Trp Thr His Ser Gly Trp Glu Gly Cys Ser Val Gln Cys 805 810 815
Gly Gly Gly Glu Arg Arg Thr Ile Val Ser Cys Thr Arg Ile Val Asn 820 825 830

995	1000	1005
Ser Glu Cys Pro Ala Leu Ser Lys Pro Ala Pro Tyr Arg Gln Cys		
1010	1015	1020
Tyr Gln Glu Val Cys Asn Asp Arg Ile Asn Ala Asn Thr Ile Thr		
1025	1030	1035
Ser Pro Arg Leu Ala Ala Leu Thr Tyr Lys Cys Thr Arg Asp Gln		
1040	1045	1050
Trp Thr Val Tyr Cys Arg Val Ile Arg Glu Lys Asn Leu Cys Gln		
1055	1060	1065
Asp Met Arg Trp Tyr Gln Arg Cys Cys Gln Thr Cys Arg Asp Phe		
1070	1075	1080
Tyr Ala Asn Lys Met Arg Gln Pro Pro Pro Ser Ser		
1085	1090	1095
<210> 7		
<211> 3264		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(3246)		
<223>		
<400> 7		
atg gag tgc gcc ctc ctg ctc gcg tgt gcc ttc ccg gct gcg ggt tcg 48		
Met Glu Cys Ala Leu Leu Leu Ala Cys Ala Phe Pro Ala Ala Gly Ser		
1 5 10		15
ggc ccg ccg agg ggc ctg gcg gga ctg ggg cgc gtg gcc aag gcg ctc 96		
Gly Pro Pro Arg Gly Leu Ala Gly Leu Gly Arg Val Ala Lys Ala Leu		
20 25		30
cag ctg tgc tgc ctc tgc tgt gcg tcg gtc gcc gcg gcc tta gcc agt 144		
Gln Leu Cys Cys Leu Cys Cys Ala Ser Val Ala Ala Ala Leu Ala Ser		
35 40		45

tat cag gga ttt atc aga aat gac agc tcc
 tcc tct gtc gct gtg tct 480
 Tyr Gln Gly Phe Ile Arg Asn Asp Ser Ser
 Ser Ser Val Ala Val Ser
 145 150 155 1

60
 acg tgt gct ggc ttg tca ggt tta ata agg
 aca cga aaa aat gaa ttc 528
 Thr Cys Ala Gly Leu Ser Gly Leu Ile Arg
 Thr Arg Lys Asn Glu Phe
 165 170 175

ctc atc tcg cca tta cct cag ctt ctg gcc
 cag gaa cac aac tac agc 576
 Leu Ile Ser Pro Leu Pro Gln Leu Leu Ala
 Gln Glu His Asn Tyr Ser
 180 185 190

tcc cct gcg ggt cac cat cct cac gta ctg
 tac aaa agg aca gca gag 624
 Ser Pro Ala Gly His His Pro His Val Leu
 Tyr Lys Arg Thr Ala Glu
 195 200 205

gag aag atc cag cgg tac cgt ggc tac ccc
 ggc tct ggc cgg aat tat 672
 Glu Lys Ile Gln Arg Tyr Arg Gly Tyr Pro
 Gly Ser Gly Arg Asn Tyr
 210 215 220

cct ggt tac tcc cca agt cac att ccc cat
 gca tct cag agt cga gag 720
 Pro Gly Tyr Ser Pro Ser His Ile Pro His
 Ala Ser Gln Ser Arg Glu
 225 230 235 2

40
 aca gag tat cac cat cga agg ttg caa aag
 cag cat ttt tgt gga cga 768
 Thr Glu Tyr His His Arg Arg Leu Gln Lys
 Gln His Phe Cys Gly Arg
 245 250 255

cgc aag aaa tat gct ccc aag cct ccc aca
 gag gac acc tat cta agg 816
 Arg Lys Lys Tyr Ala Pro Lys Pro Pro Thr
 Glu Asp Thr Tyr Leu Arg
 260 265 270

ttt gat gaa tat ggg agc tct ggg cga ccc
 aga aga tca gct gga aaa 864
 Phe Asp Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Arg Pro
 Arg Arg Ser Ala Gly Lys
 275 280 285

405	410	415
cga agt tgt acc atc aat gag gac aca gga ctt ggc ctt gcc ttc acc 1296 Arg Ser Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr 420 425 430		
atc gct cat gag tca ggg cac aac ttt ggt atg att cac gac gga gaa 1344 Ile Ala His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu 435 440 445		
ggg aat ccc tgc aga aag gct gaa ggc aat atc atg tct ccc aca ctg 1392 Gly Asn Pro Cys Arg Lys Ala Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu 450 455 460		
acc gga aac aat gga gtg ttt tca tgg tct tcc tgc agc cgc cag tat 1440 Thr Gly Asn Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg Gln Tyr 465 470 475 4		
ctc aag aaa ttc ctc agc aca cct cag gcg ggg tgt cta gtg gat gag 1488 Leu Lys Lys Phe Leu Ser Thr Pro Gln Ala Gly Cys Leu Val Asp Glu 485 490 495		
ccc aag caa gca gga cag tat aaa tat ccg gac aaa cta cca gga cag 1536 Pro Lys Gln Ala Gly Gln Tyr Lys Tyr Pro Asp Lys Leu Pro Gly Gln 500 505 510		
att tat gat gct gac aca cag tgt aaa tgg caa ttt gga gca aaa gcc 1584 Ile Tyr Asp Ala Asp Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Ala Lys Ala 515 520 525		
aag tta tgc agc ctt ggt ttt gtg aag gat att tgc aaa tca ctt tgg 1632 Lys Leu Cys Ser Leu Gly Phe Val Lys Asp Ile Cys Lys Ser Leu Trp 530 535 540		
tgc cac cga gta ggc cac agg tgt gag acc aag ttt atg ccc gca gca 1680 Cys His Arg Val Gly His Arg Cys Glu Thr		

Thr Lys Val Glu Glu Glu Asp Arg Cys Lys
 Leu Tyr Cys Lys Ala Glu
 675 680 685

aac ttt gaa ttt ttt ttt gca atg tcc ggc
 aaa gtg aaa gat gga act 2112
 Asn Phe Glu Phe Phe Phe Ala Met Ser Gly
 Lys Val Lys Asp Gly Thr
 690 695 700

ccc tgc tcc cca aac aaa aat gat gtt tgt
 att gac ggg gtt tgt gaa 2160
 Pro Cys Ser Pro Asn Lys Asn Asp Val Cys
 Ile Asp Gly Val Cys Glu
 705 710 715 7

20
 cta gtg gga tgt gat cat gaa cta ggc tct
 aaa gca gtt tca gat gct 2208
 Leu Val Gly Cys Asp His Glu Leu Gly Ser
 Lys Ala Val Ser Asp Ala
 725 730 735

tgt ggc gtt tgc aaa ggt gat aat tca act
 tgc aag ttt tat aaa ggc 2256
 Cys Gly Val Cys Lys Gly Asp Asn Ser Thr
 Cys Lys Phe Tyr Lys Gly
 740 745 750

ctg tac ctc aac cag cat aaa gca aat gaa
 tat tat ccg gtg gtc ctc 2304
 Leu Tyr Leu Asn Gln His Lys Ala Asn Glu
 Tyr Tyr Pro Val Val Leu
 755 760 765

att cca gct ggc gcc cga agc atc gaa atc
 cag gag ctg cag gtt tcc 2352
 Ile Pro Ala Gly Ala Arg Ser Ile Glu Ile
 Gln Glu Leu Gln Val Ser
 770 775 780

tcc agt tac ctc gca gtt cga agc ctc agt
 caa aag tat tac ctc acc 2400
 Ser Ser Tyr Leu Ala Val Arg Ser Leu Ser
 Gln Lys Tyr Tyr Leu Thr
 785 790 795 8

00
 ggg ggc tgg agc atc gac tgg cct ggg gag
 ttc ccc ttc gct ggg acc 2448
 Gly Gly Trp Ser Ile Asp Trp Pro Gly Glu
 Phe Pro Phe Ala Gly Thr
 805 810 815

acg ttt gaa tac cag cgc tct ttc aac cgc

tcc tgt gct gga ggc cag cag agc cga aag
 atc cag tgt gtg caa aag 2880
 Ser Cys Ala Gly Gly Gln Gln Ser Arg Lys
 Ile Gln Cys Val Gln Lys
 945 950 955 9

aag ccc ttc caa aag gag gaa gca gtg ttg
 cat tct ctc tgt cca gta 2928
 Lys Pro Phe Gln Lys Glu Glu Ala Val Leu
 His Ser Leu Cys Pro Val
 965 970 975

agc aca ccc act cag gtc caa gcc tgc aac
 agc cat gcc tgc cct cca 2976
 Ser Thr Pro Thr Gln Val Gln Ala Cys Asn
 Ser His Ala Cys Pro Pro
 980 985 990

caa tgg agc ctt gga ccc tgg tct cag tgt
 tcc aag acc tgt gga cga 3024
 Gln Trp Ser Leu Gly Pro Trp Ser Gln Cys
 Ser Lys Thr Cys Gly Arg
 995 1000 1005

ggg gtg agg aag cgt gaa ctc ctc tgc aag
 ggc tct gcc gca gaa 3069
 Gly Val Arg Lys Arg Glu Leu Leu Cys Lys
 Gly Ser Ala Ala Glu
 1010 1015 1020

acc ctc ccc gag agc cag tgt acc agt ctc
 ccc aga cct gag ctg 3114
 Thr Leu Pro Glu Ser Gln Cys Thr Ser Leu
 Pro Arg Pro Glu Leu
 1025 1030 1035

cag gag ggc tgt gtg ctt gga cga tgt ccc
 aag aac agc cgg cta 3159
 Gln Glu Gly Cys Val Leu Gly Arg Cys Pro
 Lys Asn Ser Arg Leu
 1040 1045 1050

cag tgg gtc gct tct tcg tgg agc gag gta
 tgg att aga agt cac 3204
 Gln Trp Val Ala Ser Ser Trp Ser Glu Val
 Trp Ile Arg Ser His
 1055 1060 1065

tgc tgg gtc agg aga ttg aga cca tcc tgg
 cta aca cag tga 3246
 Cys Trp Val Arg Arg Leu Arg Pro Ser Trp
 Leu Thr Gln
 1070 1075 1080

130	135	140	
Tyr Gln Gly Phe Ile Arg Asn Asp Ser Ser			
Ser Ser Val Ala Val Ser			
145	150	155	1
60			
Thr Cys Ala Gly Leu Ser Gly Leu Ile Arg			
Thr Arg Lys Asn Glu Phe			
	165	170	175
Leu Ile Ser Pro Leu Pro Gln Leu Leu Ala			
Gln Glu His Asn Tyr Ser			
	180	185	190
Ser Pro Ala Gly His His Pro His Val Leu			
Tyr Lys Arg Thr Ala Glu			
	195	200	205
Glu Lys Ile Gln Arg Tyr Arg Gly Tyr Pro			
Gly Ser Gly Arg Asn Tyr			
210	215	220	
Pro Gly Tyr Ser Pro Ser His Ile Pro His			
Ala Ser Gln Ser Arg Glu			
225	230	235	2
40			
Thr Glu Tyr His His Arg Arg Leu Gln Lys			
Gln His Phe Cys Gly Arg			
	245	250	255
Arg Lys Lys Tyr Ala Pro Lys Pro Pro Thr			
Glu Asp Thr Tyr Leu Arg			
	260	265	270
Phe Asp Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Arg Pro			
Arg Arg Ser Ala Gly Lys			
	275	280	285
Ser Gln Lys Gly Leu Asn Val Glu Thr Leu			
Val Val Ala Asp Lys Lys			
290	295	300	
Met Val Glu Lys His Gly Lys Gly Asn Val			
Thr Thr Tyr Ile Leu Thr			
305	310	315	3
20			
Val Met Lys Val Ser Gly Leu Phe Lys Asp			
Gly Thr Ile Gly Ser Asp			
	325	330	335

	500	505	510	
Ile Tyr Asp Ala Asp Thr Gln Cys Lys Trp				
Gln Phe Gly Ala Lys Ala				
	515	520	525	
Lys Leu Cys Ser Leu Gly Phe Val Lys Asp				
Ile Cys Lys Ser Leu Trp				
	530	535	540	
Cys His Arg Val Gly His Arg Cys Glu Thr				
Lys Phe Met Pro Ala Ala				
545		550	555	5
60				
Glu Gly Thr Val Cys Gly Leu Ser Met Trp				
Cys Arg Gln Gly Gln Cys				
	565	570	575	
Val Lys Phe Gly Glu Leu Gly Pro Arg Pro				
Ile His Gly Gln Trp Ser				
	580	585	590	
Ala Trp Ser Lys Trp Ser Glu Cys Ser Arg				
Thr Cys Gly Gly Gly Val				
	595	600	605	
Lys Phe Gln Glu Arg His Cys Asn Asn Pro				
Lys Pro Gln Tyr Gly Gly				
	610	615	620	
Ile Phe Cys Pro Gly Ser Ser Arg Ile Tyr				
Gln Leu Cys Asn Ile Asn				
625		630	635	6
40				
Pro Cys Asn Glu Asn Ser Leu Asp Phe Arg				
Ala Gln Gln Cys Ala Glu				
	645	650	655	
Tyr Asn Ser Lys Pro Phe Arg Gly Trp Phe				
Tyr Gln Trp Lys Pro Tyr				
	660	665	670	
Thr Lys Val Glu Glu Glu Asp Arg Cys Lys				
Leu Tyr Cys Lys Ala Glu				
	675	680	685	
Asn Phe Glu Phe Phe Phe Ala Met Ser Gly				
Lys Val Lys Asp Gly Thr				
	690	695	700	
Pro Cys Ser Pro Asn Lys Asn Asp Val Cys				
Ile Asp Gly Val Cys Glu				

Gln Ser Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Tyr Ile Asn Val Lys	885	890	895
Ala Ile Cys Leu Arg Asp Gln Asn Thr Gln Val Asn Ser Ser Phe Cys	900	905	910
Ser Ala Lys Thr Lys Pro Val Thr Glu Pro Lys Ile Cys Asn Ala Phe	915	920	925
Ser Cys Pro Ala Tyr Trp Met Pro Gly Glu Trp Ser Thr Cys Ser Lys	930	935	940
Ser Cys Ala Gly Gly Gln Gln Ser Arg Lys Ile Gln Cys Val Gln Lys	945	950	955
Lys Pro Phe Gln Lys Glu Glu Ala Val Leu His Ser Leu Cys Pro Val	965	970	975
Ser Thr Pro Thr Gln Val Gln Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Pro Pro	980	985	990
Gln Trp Ser Leu Gly Pro Trp Ser Gln Cys Ser Lys Thr Cys Gly Arg	995	1000	1005
Gly Val Arg Lys Arg Glu Leu Leu Cys Lys Gly Ser Ala Ala Glu	1010	1015	1020
Thr Leu Pro Glu Ser Gln Cys Thr Ser Leu Pro Arg Pro Glu Leu	1025	1030	1035
Gln Glu Gly Cys Val Leu Gly Arg Cys Pro Lys Asn Ser Arg Leu	1040	1045	1050
Gln Trp Val Ala Ser Ser Trp Ser Glu Val Trp Ile Arg Ser His	1055	1060	1065
Cys Trp Val Arg Arg Leu Arg Pro Ser Trp Leu Thr Gln	1070	1075	1080

65	70	75	80
cgc gag gtg cgc tct gtg gct ccg gtg cct			
ttg gag gag ccc gtg gag 288			
Arg Glu Val Arg Ser Val Ala Pro Val Pro			
Leu Glu Glu Pro Val Glu			
	85	90	95
ggc cga tca gag tcc cgg ctc cgg ccc ccg			
ccg ccg tcg gag ggt gag 336			
Gly Arg Ser Glu Ser Arg Leu Arg Pro Pro			
Pro Pro Ser Glu Gly Glu			
	100	105	110
gag gac gag gag ctc gag tcg cag gag ctg			
ccg cgg gga tcc agc ggg 384			
Glu Asp Glu Glu Leu Glu Ser Gln Glu Leu			
Pro Arg Gly Ser Ser Gly			
	115	120	125
gct gcc gcc ttg tcc ccg ggc gcc ccg gcc			
tcg tgg cag ccg ccg cct 432			
Ala Ala Ala Leu Ser Pro Gly Ala Pro Ala			
Ser Trp Gln Pro Pro Pro			
	130	135	140
ccc ccg cag ccg ccc ccg tcc ccg ccc ccg			
gcc cag cat gcc gag ccg 480			
Pro Pro Gln Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro			
Ala Gln His Ala Glu Pro			
145	150	155	1
60			
gat ggc gac gaa gtg ttg ctg cgg atc ccg			
gcc ttc tct cgg gac ctg 528			
Asp Gly Asp Glu Val Leu Leu Arg Ile Pro			
Ala Phe Ser Arg Asp Leu			
	165	170	175
tac ctg ctg ctc cgg aga gac ggc cgc ttc			
ctg gcg ccg cgc ttc gca 576			
Tyr Leu Leu Leu Arg Arg Asp Gly Arg Phe			
Leu Ala Pro Arg Phe Ala			
	180	185	190
gtg gaa cag cgg cca aat ccc ggc ccc ggc			
ccc acg ggg gca gca tcc 624			
Val Glu Gln Arg Pro Asn Pro Gly Pro Gly			
Pro Thr Gly Ala Ala Ser			
	195	200	205
gcc ccg caa cct ccc gcg cca cca gac gca			
ggc tgc ttc tac acc gga 672			
Ala Pro Gln Pro Pro Ala Pro Pro Asp Ala			

Met Val Ser Tyr His Gly Ala Asp Ala Ala
 Arg Arg Phe Ile Leu Thr
 340 345 350

atc tta aat atg gta ttt aac ctt ttc caa
 cac aag agt ctg ggt gtg 1104
 Ile Leu Asn Met Val Phe Asn Leu Phe Gln
 His Lys Ser Leu Gly Val
 355 360 365

cag gtc aat ctt cgt gtg ata aag ctt att
 ctg ctc cat gaa act cca 1152
 Gln Val Asn Leu Arg Val Ile Lys Leu Ile
 Leu Leu His Glu Thr Pro
 370 375 380

cca gaa cta tat att ggg cat cat gga gaa
 aaa atg cta gag agt ttt 1200
 Pro Glu Leu Tyr Ile Gly His His Gly Glu
 Lys Met Leu Glu Ser Phe
 385 390 395 400

tgt aag tgg caa cat gaa gaa ttt ggc aaa
 aag aat gat ata cat tta 1248
 Cys Lys Trp Gln His Glu Glu Phe Gly Lys
 Lys Asn Asp Ile His Leu
 405 410 415

gag atg tca aca aac tgg ggg gaa gac atg
 act tca gtg gat gca gct 1296
 Glu Met Ser Thr Asn Trp Gly Glu Asp Met
 Thr Ser Val Asp Ala Ala
 420 425 430

ata ctt ata aca agg aaa gat ttc tgt gtg
 cac aaa gat gaa cca tgt 1344
 Ile Leu Ile Thr Arg Lys Asp Phe Cys Val
 His Lys Asp Glu Pro Cys
 435 440 445

gat act gtt ggt ata gct tac ttg agt gga
 atg tgt agt gaa aag aga 1392
 Asp Thr Val Gly Ile Ala Tyr Leu Ser Gly
 Met Cys Ser Glu Lys Arg
 450 455 460

aaa tgt att att gct gaa gac aat ggc ttg
 aat ctt gct ttt aca att 1440
 Lys Cys Ile Ile Ala Glu Asp Asn Gly Leu
 Asn Leu Ala Phe Thr Ile
 465 470 475 480

gct cat gaa atg ggt cac aac atg ggc att

atg gat gga act gac tgt gac ctt ggt aag
 tgg tgt aag gct gga gaa 1872
 Met Asp Gly Thr Asp Cys Asp Leu Gly Lys
 Trp Cys Lys Ala Gly Glu
 610 615 620

tgt acc agc agg acc tca gca cct gaa cat
 ctg gcc gga gag tgg agc 1920
 Cys Thr Ser Arg Thr Ser Ala Pro Glu His
 Leu Ala Gly Glu Trp Ser
 625 630 635 6
 40

ctg tgg agt cct tgt agc cga acc tgc agt
 gct ggg atc agc agt cga 1968
 Leu Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Ser
 Ala Gly Ile Ser Ser Arg
 645 650 655

gag cgc aaa tgt cct ggg cta gat tct gaa
 gca agg gat tgt aat ggt 2016
 Glu Arg Lys Cys Pro Gly Leu Asp Ser Glu
 Ala Arg Asp Cys Asn Gly
 660 665 670

ccc aga aaa caa tac aga ata tgt gag aat
 cca cct tgt cct gca ggt 2064
 Pro Arg Lys Gln Tyr Arg Ile Cys Glu Asn
 Pro Pro Cys Pro Ala Gly
 675 680 685

ttg cct gga ttc aga gac tgg caa tgt cag
 gct tat agt gtt aga act 2112
 Leu Pro Gly Phe Arg Asp Trp Gln Cys Gln
 Ala Tyr Ser Val Arg Thr
 690 695 700

tcc tcc cca aag cat ata ctt cag tgg caa
 gct gtc ctg gat gaa gaa 2160
 Ser Ser Pro Lys His Ile Leu Gln Trp Gln
 Ala Val Leu Asp Glu Glu
 705 710 715 7
 20

aaa cca tgt gcc ttg ttt tgc tct cct gtt
 gga aaa gaa cag cct att 2208
 Lys Pro Cys Ala Leu Phe Cys Ser Pro Val
 Gly Lys Glu Gln Pro Ile
 725 730 735

ctt cta tca gaa aaa gtg atg gat gga act
 tct tgt ggc tat cag gga 2256
 Leu Leu Ser Glu Lys Val Met Asp Gly Thr
 Ser Cys Gly Tyr Gln Gly
 740 745 750

865	870	875	8
80			
ctt ctg gtg ctc ctg ttt cag gat cag aat			
tat ggt ctt cac tat gaa 2688			
Leu Leu Val Leu Leu Phe Gln Asp Gln Asn			
Tyr Gly Leu His Tyr Glu			
	885	890	895
tac act atc cca tca gac cct ctt cca gaa			
aac cag agc tct aaa gca 2736			
Tyr Thr Ile Pro Ser Asp Pro Leu Pro Glu			
Asn Gln Ser Ser Lys Ala			
	900	905	910
cct gag ccc ctc ttc atg tgg aca cac aca			
agc tgg gaa gat tgc gat 2784			
Pro Glu Pro Leu Phe Met Trp Thr His Thr			
Ser Trp Glu Asp Cys Asp			
	915	920	925
gcc act tgt gga gga gga gaa agg aag aca			
aca gtg tcc tgc aca aaa 2832			
Ala Thr Cys Gly Gly Gly Glu Arg Lys Thr			
Thr Val Ser Cys Thr Lys			
	930	935	940
atc atg agc aaa aat atc agc att gtg gac			
aat gag aaa tgc aaa tac 2880			
Ile Met Ser Lys Asn Ile Ser Ile Val Asp			
Asn Glu Lys Cys Lys Tyr			
945	950	955	9
60			
tta acc aag cca gag cca cag att cga aag			
tgc aat gag caa cca tgt 2928			
Leu Thr Lys Pro Glu Pro Gln Ile Arg Lys			
Cys Asn Glu Gln Pro Cys			
	965	970	975
caa aca agg tgg atg atg aca gaa tgg acc			
cct tgt tca cga act tgt 2976			
Gln Thr Arg Trp Met Met Thr Glu Trp Thr			
Pro Cys Ser Arg Thr Cys			
	980	985	990
gga aaa gga atg cag agc aga caa gtg gcc			
tgt acc caa caa ctg agc 3024			
Gly Lys Gly Met Gln Ser Arg Gln Val Ala			
Cys Thr Gln Gln Leu Ser			
	995	1000	1005
aat gga aca ctg att aga gcc cga gag agg			
gac tgc att ggg ccc 3069			
Asn Gly Thr Leu Ile Arg Ala Arg Glu Arg			

Ser Glu Lys Pro Ala Ala Tyr Arg Pro Cys
 His Leu Gln Pro Cys
 1130 1135 1140

aat gag aaa att aat gta aat acc ata aca
 tca ccc aga ctg gct 3474
 Asn Glu Lys Ile Asn Val Asn Thr Ile Thr
 Ser Pro Arg Leu Ala
 1145 1150 1155

gct ctg act ttc aag tgc ctg gga gat cag
 tgg cca gtg tac tgc 3519
 Ala Leu Thr Phe Lys Cys Leu Gly Asp Gln
 Trp Pro Val Tyr Cys
 1160 1165 1170

cga gtg ata cgt gaa aag aac cta tgt cag
 gac atg cgg tgg tat 3564
 Arg Val Ile Arg Glu Lys Asn Leu Cys Gln
 Asp Met Arg Trp Tyr
 1175 1180 1185

cag cgc tgc tgt gaa aca tgc agg gac ttc
 tat gcc caa aag ctg 3609
 Gln Arg Cys Cys Glu Thr Cys Arg Asp Phe
 Tyr Ala Gln Lys Leu
 1190 1195 1200

cag cag aag agt tga cctctagcag gctggct
 gga tcacagctct tggcaattac 3664
 Gln Gln Lys Ser
 1205

attatttata aacacacaca cttagcatggt tt
 3696

<210> 10
 <211> 1207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Met Arg Leu Thr His Ile Cys Cys Cys Cys
 Leu Leu Tyr Gln Leu Gly
 1 5 10 15

Phe Leu Ser Asn Gly Ile Val Ser Glu Leu
 Gln Phe Ala Pro Asp Arg
 20 25 30

Glu Glu Trp Glu Val Val Phe Pro Ala Leu
 Trp Arg Arg Glu Pro Val
 35 40 45

Ala Pro Gln Pro Pro Ala Pro Pro Asp Ala Gly Cys Phe Tyr Thr Gly 210 215 220		
Ala Val Leu Arg His Pro Gly Ser Leu Ala Ser Phe Ser Thr Cys Gly 225 230 235 2		
40 Gly Gly Leu Met Gly Phe Ile Gln Leu Asn Glu Asp Phe Ile Phe Ile 245 250 255		
Glu Pro Leu Asn Asp Thr Met Ala Ile Thr Gly His Pro His Arg Val 260 265 270		
Tyr Arg Gln Lys Arg Ser Met Glu Glu Lys Val Thr Glu Lys Ser Ala 275 280 285		
Leu His Ser His Tyr Cys Gly Ile Ile Ser Asp Lys Gly Arg Pro Arg 290 295 300		
Ser Arg Lys Ile Ala Glu Ser Gly Arg Gly Lys Arg Tyr Ser Tyr Lys 305 310 315 3		
20 Leu Pro Gln Glu Tyr Asn Ile Glu Thr Val Val Val Ala Asp Pro Ala 325 330 335		
Met Val Ser Tyr His Gly Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ile Leu Thr 340 345 350		
Ile Leu Asn Met Val Phe Asn Leu Phe Gln His Lys Ser Leu Gly Val 355 360 365		
Gln Val Asn Leu Arg Val Ile Lys Leu Ile Leu Leu His Glu Thr Pro 370 375 380		
Pro Glu Leu Tyr Ile Gly His His Gly Glu Lys Met Leu Glu Ser Phe 385 390 395 4		
00 Cys Lys Trp Gln His Glu Glu Phe Gly Lys Lys Asn Asp Ile His Leu 405 410 415		

Ala Ser Phe Cys Gln Glu Met Gln His Val Ile Cys Thr Gly Leu Trp	580	585	590
Cys Lys Val Glu Gly Glu Lys Glu Cys Arg Thr Lys Leu Asp Pro Pro	595	600	605
Met Asp Gly Thr Asp Cys Asp Leu Gly Lys Trp Cys Lys Ala Gly Glu	610	615	620
Cys Thr Ser Arg Thr Ser Ala Pro Glu His Leu Ala Gly Glu Trp Ser	625	630	635
40 Leu Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Ser Ala Gly Ile Ser Ser Arg	645	650	655
Glu Arg Lys Cys Pro Gly Leu Asp Ser Glu Ala Arg Asp Cys Asn Gly	660	665	670
Pro Arg Lys Gln Tyr Arg Ile Cys Glu Asn Pro Pro Cys Pro Ala Gly	675	680	685
Leu Pro Gly Phe Arg Asp Trp Gln Cys Gln Ala Tyr Ser Val Arg Thr	690	695	700
Ser Ser Pro Lys His Ile Leu Gln Trp Gln Ala Val Leu Asp Glu Glu	705	710	715
20 Lys Pro Cys Ala Leu Phe Cys Ser Pro Val Gly Lys Glu Gln Pro Ile	725	730	735
Leu Leu Ser Glu Lys Val Met Asp Gly Thr Ser Cys Gly Tyr Gln Gly	740	745	750
Leu Asp Ile Cys Ala Asn Gly Arg Cys Gln Lys Val Gly Cys Asp Gly	755	760	765
Leu Leu Gly Ser Leu Ala Arg Glu Asp His Cys Gly Val Cys Asn Gly	770	775	780
Asn Gly Lys Ser Cys Lys Ile Ile Lys Gly			

945	950	955	9
60			
Leu Thr Lys Pro Glu Pro Gln Ile Arg Lys			
Cys Asn Glu Gln Pro Cys			
	965	970	975
Gln Thr Arg Trp Met Met Thr Glu Trp Thr			
Pro Cys Ser Arg Thr Cys			
	980	985	990
Gly Lys Gly Met Gln Ser Arg Gln Val Ala			
Cys Thr Gln Gln Leu Ser			
	995	1000	1005
Asn Gly Thr Leu Ile Arg Ala Arg Glu Arg			
Asp Cys Ile Gly Pro			
	1010	1015	1020
Lys Pro Ala Ser Ala Gln Arg Cys Glu Gly			
Gln Asp Cys Met Thr			
	1025	1030	1035
Val Trp Glu Ala Gly Val Trp Ser Glu Phe			
Ser Val Lys Cys Gly			
	1040	1045	1050
Lys Gly Ile Arg His Arg Thr Val Arg Cys			
Thr Asn Pro Arg Lys			
	1055	1060	1065
Lys Cys Val Leu Ser Thr Arg Pro Arg Glu			
Ala Glu Asp Cys Glu			
	1070	1075	1080
Asp Tyr Ser Lys Cys Tyr Val Trp Arg Met			
Gly Asp Trp Ser Lys			
	1085	1090	1095
Cys Ser Ile Thr Cys Gly Lys Gly Met Gln			
Ser Arg Val Ile Gln			
	1100	1105	1110
Cys Met His Lys Ile Thr Gly Arg His Gly			
Asn Glu Cys Phe Ser			
	1115	1120	1125
Ser Glu Lys Pro Ala Ala Tyr Arg Pro Cys			
His Leu Gln Pro Cys			
	1130	1135	1140
Asn Glu Lys Ile Asn Val Asn Thr Ile Thr			
Ser Pro Arg Leu Ala			

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 12
agctgctctg tcattgagga cg
22

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 13
atgcttctgc tgggcatcct a
21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 14
tcagcacggc ctcaggacgc a
21

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 15
atggagaagg gaacatgtgc
20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

atgaagcccc gcgcgcgcg a
21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificia

l Sequence: Oligonucleotide to act as
a p

rimer for PCR

<400> 18

tcaacctcgc tcccgcgaga c
21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificia

l Sequence: Oligonucleotide to act as
a p

rimer for PCR

<400> 19

cacgcagcct ggagcaggtg
20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificia

l Sequence: Oligonucleotide to act as
a p

rimer for PCR

<400> 20

aggatggcaa tggcttcagg
20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificia

l Sequence: Oligonucleotide to act as
a p

rimer for PCR

<400> 21

atgtgtgacg ggccctgct g
21

<210> 22

<211> 21

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificia
| Sequence: Oligonucleotide to act as
a p
rimer for PCR
<400> 23
gtgggatgtg ctctaagtac
20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificia
| Sequence: Oligonucleotide to act as
a p
rimer for PCR
<400> 24
atgctggttg aggtacaggc
20

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificia
| Sequence: Oligonucleotide to act as
a p
rimer for PCR
<400> 25
atggagtgcg ccctcctgct c
21

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificia
| Sequence: Oligonucleotide to act as
a p
rimer for PCR
<400> 26
tcatgtcacc ggggaggcag c
21

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificia
| Sequence: Oligonucleotide to act as

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB01 BB20 BB41
BB50 BB51 CB01 DA13 DA36
FA29 FB02 FB03 FB05 FB06
FB07 GC10
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02
DA06 DA12 EA04 GA03 HA15
4B063 QQ43 QQ79 QR32 QR48 QR51
QS25 QS35 QS36 QX01
4B064 AG01 AG27 CA10 CA20 CC24
CE04 CE12 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 AB05
BA01 BA08 CA24 CA25 CA44
CA46
4C084 AA17 NA14 ZA452 ZA542
ZA962 ZB082 ZB112 ZB152
ZB262 ZC022
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
GA21

专利名称(译)	ADAMTS-15 , -16 , -17 , -18和-19		
公开(公告)号	JP2003180384A	公开(公告)日	2003-07-02
申请号	JP2002277172	申请日	2002-09-24
申请(专利权)人(译)	第一ファインケミカル株式会社		
[标]发明人	カルミグエルサンティアゴ オバヤゴンザレスアルバロジェサス ラマザレスプラダマリア ガラバヤフェルナンデスセシリア ロベスオーティンカルロス		
发明人	カル・ミグエル・サンティアゴ オバヤ・ゴンザレス・アルバロ・ジェサス ラマザレス・プラダ・マリア ガラバヤ・フェルナンデス・セシリア ロベス・オーティン・カルロス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P7/02 A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61P7/02 A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/06 A61P43/00 C12N9 /6489 G01N33/6893		
FI分类号	A61K45/00 A61P7/02 A61P9/10.101 A61P19/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB01 2G045/BB20 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045 /CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA29 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024 /DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/HA15 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS25 4B063/QS35 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064 /AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA452 4C084/ZA542 4C084 /ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
优先权	2001002165 2001-09-24 ES 2001002166 2001-09-24 ES 2001002167 2001-09-24 ES 2001002192 2001-09-25 ES 2001002193 2001-09-25 ES		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：寻找属于ADAMs家族的新蛋白，它是一种具有粘附和细胞外蛋白水解双重功能的多功能蛋白，并阐明其特性，免疫应答，血管生成，凝血，伤口愈合，再生过程，胚胎植入，胎儿发育以及癌细胞入侵，转移，类风湿或心血管过程，血液学和神经退行性过程。将有助于阐明正常和病理过程。解决方案：通过基于同源性的分子克隆方法，获得了鉴定为ADAMTS-15，-16，-17，-18和-19的新型蛋白质及其编码核酸。可以使用基因重组技术等对蛋白质进行测量，阐明其生理和生物学活性的方

法等，以及由蛋白质引起的生理现象，相关疾病的诊断，病因调查，预测 可用于