

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-329040

(P2004-329040A)

(43) 公開日 平成16年11月25日(2004.11.25)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>             | F I                   | テーマコード (参考) |
|--|-----------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/09</b>                   | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>A 6 1 K 38/46</b>                   | A 6 1 K 39/395 D      | 4 B O 5 0   |
| <b>A 6 1 K 39/395</b>                  | A 6 1 K 45/00         | 4 B O 6 3   |
| <b>A 6 1 K 45/00</b>                   | A 6 1 K 48/00         | 4 B O 6 4   |
| <b>A 6 1 K 48/00</b>                   | A 6 1 P 3/06          | 4 B O 6 5   |
| 審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 109 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|           |                              |          |  |
|-----------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2003-126187 (P2003-126187) | (71) 出願人 | 390010205<br>第一ファインケミカル株式会社<br>富山県高岡市長慶寺530番地                                    |
| (22) 出願日  | 平成15年5月1日(2003.5.1)          | (74) 代理人 | 100097582<br>弁理士 水野 昭宣   |
|           |                              | (72) 発明者 | カル・ミグエル・サンティアゴ<br>スペイン国 33400 アストリアス<br>アビレス シー/ コバドンガ エヌ<br>5, 5 ディー            |
|           |                              | (72) 発明者 | ガラバヤ・フェルナンデス・セシリア<br>スペイン国 33416 アストリアス<br>コルベラ ラス ベガス シー/ アス<br>トリアス エヌ 1, 3 シー |
| 最終頁に続く    |                              |          |  |

(54) 【発明の名称】 ポリセララーゼ-1及びその利用

## (57) 【要約】

【課題】プロテアーゼによるタンパク質プロセッシングは、多様なプロセスにおいて生物学的及び生理学的現象の様々な段階で重要な働きをしている。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、多様なプロテアーゼ関与の現象・機構を解明することは、正常や病的なプロセスの解明に有用である。

【解決手段】デグラドームを完全に得ることを目指しセリンプロテアーゼ類に着目し研究を行った結果、一連のプロテアーゼが一行に緊密に配置された遺伝子を同定した。該遺伝子並びにそれでコードされるタンパク質「ポリセララーゼ-I」構造の解明により、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である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

- (i) ポリセラゼ - I タンパク質、
- (ii) (a) セラゼ - 1 タンパク質、(b) セラゼ - 2 タンパク質、(c) セラゼ - 3 タンパク質、(d) セラゼ - 1 及びセラゼ - 2 を共に含有しているタンパク質、(e) セラゼ - 1、セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質、及び(f) セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質から成る群から選ばれたタンパク質、
- (iii) (A) 配列番号：13 又は図1～2の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、ホモログ、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の変化、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、
- (iv) 配列番号：14 又は図1～2のアミノ酸配列、配列番号：15 のアミノ酸配列及び配列番号：16 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、
- (v) (a) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{190} \sim \text{Glu}^{433}$  のポリペプチド、(b) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  のポリペプチド、(c) 配列番号：14 の  $\text{Asp}^{816} \sim \text{Gln}^{1055}$  のポリペプチド、(d) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{190} \sim \text{Glu}^{433}$  の配列及び  $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  の配列を共に有するポリペプチド、(e) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{190} \sim \text{Glu}^{433}$  の配列、 $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  の配列及び  $\text{Asp}^{816} \sim \text{Gln}^{1055}$  の配列を共に有するポリペプチド、(f) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  の配列及び  $\text{Asp}^{816} \sim \text{Gln}^{1055}$  の配列を共に有するポリペプチドから成る群から選ばれた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、
- (vi) 前記(i) 又は(ii)のタンパク質並びに(iii)～(v)のいずれか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)又は(ii)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(iii)～(v)のいずれか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
- (vii) 配列番号：14 又は図1～2のアミノ酸配列、配列番号：15 のアミノ酸配列及び配列番号：16 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
- (viii) 前記(i)～(vii)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2】

- (i) ポリセラゼ - I タンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- (ii) (a) セラゼ - 1 タンパク質、(b) セラゼ - 2 タンパク質、(c) セラゼ - 3 タンパク質、(d) セラゼ - 1 及びセラゼ - 2 を共に含有しているタンパク質、(e) セラゼ - 1、セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質、及び(f) セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質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、
- (iii) 配列番号：14 又は図1～2のアミノ酸配列、配列番号：15 のアミノ酸配列及び配列番号：16 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

( i v ) ( A ) 配列番号：13 又は図1～2の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、ホモログ、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の変化、ホメオスタシスあるいは血管新生のプロセスに關与するもの、

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、

( v ) ( a ) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{190} \sim \text{Glu}^{433}$  のポリペプチド、( b ) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  のポリペプチド、( c ) 配列番号：14 の  $\text{Asp}^{816} \sim \text{Gln}^{1055}$  のポリペプチド、( d ) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{190} \sim \text{Glu}^{433}$  の配列及び  $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  の配列を共に有する 10  
ポリペプチド、( e ) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{190} \sim \text{Glu}^{433}$  の配列、 $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  の配列及び  $\text{Asp}^{816} \sim \text{Gln}^{1055}$  の配列を共に有するポリペプチド及び ( f ) 配列番号：14 の  $\text{Glu}^{491} \sim \text{Glu}^{733}$  の配列及び  $\text{Asp}^{816} \sim \text{Gln}^{1055}$  の配列を共に有するポリペプチドから成る群から選ばれたポリペ  
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、

( v i ) ( i ) 又は ( i i ) のタンパク質のアミノ酸配列あるいは ( i i ) のアミノ酸配列又は ( v ) のポリペプチドにおける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 ) 又は ( i 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 ( i i i ) ~ ( v ) のいずれかのポリペプチドの示す生物学的活性又は ( i v ) で言及 20  
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 i i ) 配列番号：13 又は図1～2からなるDNA から選択された10個又は15個以上の連続した塩基配列を有するヌクレオチド配列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 ) 又は ( i 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 ( i i i ) ~ ( v ) のいずれかのポリペプチドの示す生物学的活性又は ( i v ) 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

( v i i i ) 配列番号：13 又は図1～2の配列の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90% 以上の相同性を有し且つ ( i ) 又は ( i i ) のタンパク質の示 30  
す生物学的活性を有するか、あるいは ( i i i ) ~ ( v ) のいずれかのポリペプチドの示す生物学的活性又は ( i v ) 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3】

請求項2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4】

請求項2記載のポリヌクレオチド又は請求項3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5】

請求項4記載の宿主細胞を培養条件下に維持して、請求項1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1記載のタンパク質又はポリペプチドの製造方法。 40

【請求項6】

請求項1記載の ( i ) ~ ( v i ) 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7】

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6記載の抗体。

【請求項8】

( i ) 請求項 6 記載の抗体又は ( i i ) 請求項 1 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を含むことを特徴とする請求項 1 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 9】

請求項 6 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 1 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 10】

( 1 ) 請求項 1 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 6 記載の抗体、( 3 ) 請求項 2 記載のポリヌクレオチド、( 4 ) 請求項 3 記載の組換えベクター及び( 5 ) 請求項 4 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。 10

【請求項 11】

請求項 1 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；あるいは請求項 2 記載のポリヌクレオチド；あるいは請求項 6 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 12】

請求項 1 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。 20

【請求項 13】

請求項 1 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及びスクリーニングキット。

【請求項 14】

組換えあるいは合成タンパク質又はポリペプチド生産のための、  
配列番号：13 及び 14 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号：15 の配列並びに配列番号：16 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 15】

抗体作製のための、  
配列番号：13 及び 14 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号：15 の配列並びに配列番号：16 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。 30

【請求項 16】

ポリセラゼ - I 活性，セラゼ - 1 活性，セラゼ - 2 活性，セラゼ - 3、ポリセラゼ - I T M 及びポリセラゼ - I L D L R 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、  
配列番号：13 及び 14 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号：15 の配列並びに配列番号：16 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 17】

ポリセラゼ - I に関する活性を持っているタンパク質及び / 又は該ポリセラゼ - I 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、  
配列番号：13 及び 14 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号：15 の配列並びに配列番号：16 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。 40

【請求項 18】

ポリセラゼ - I に関して及び / 又は該ポリセラゼ - I 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合物を製造するための、  
配列番号：13 及び 14 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号：15 の配列並びに配列番号：16 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 19】

ポリセラゼ - I 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、  
 ( i ) オリゴヌクレオチドプライマーを使用する核酸の PCR による増幅、又は  
 ( i i ) cDNA のライブラリーとハイブリダイズするプローブの使用  
 を含み、

配列番号： 13 及び 14 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 15 の配列並びに配列番号  
 : 16 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を含むことを特  
 徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

10

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）のホモログを含む変異体及び誘導體；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  
 のホモログを含む変異体及び誘導體の製造法；該ポリペプチド（あるいはタンパク質）の  
 阻害剤、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）、ホモログ、変異体、誘導體、阻害剤、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。

本発明はタンパク質分解活性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、排卵、受精、妊娠、骨形成、創傷治癒、再生プロセス、  
 神経成長、抗原提示などの免疫応答、血管新生、凝固のような生理学的状態に関連して  
 いるものが挙げられ、さらに癌細胞の浸潤、転移、関節炎、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及び神経退化のプロセスのような生理学的状態に関  
 連したものが挙げられる。特に本発明は複数のセリンプロテアーゼを単一の遺伝子産物と  
 して生成せしめる能力を有する遺伝子に関連した技術・知識を提供するものであり、ヒト  
 プロテアーゼ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、及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。

20

【0002】

30

【従来の技術】

プロテアーゼは、構造的及び機能的に異なっている様々なタンパク質のグループを含んで  
 おり、共通した能力、すなわちペプチド結合を加水分解する能力を持っている（非特許  
 文献 1： Barrett, A. J. et al., Handbook of  
 proteolytic enzymes, Academic Press, San  
 Diego, 1998）。現在まで、500 を越える互いに異なるヒトのプロテア  
 ーゼ及びホモログが分子レベルで同定され特徴づけられている（非特許文献 2： L o  
 pez - Otin, C. et al., Nat. Rev. Mol. Cell  
 Biol., 3: 509 - 519, 2002）。酵素のこの大きなグループを  
 含んでの機能についての研究は、そもそもは、タンパク質異化作用に関連した非特異的な  
 反応におけるそれらの役割を解析することを目標にしていた。しかしながら、最近では、  
 タンパク質分解というものが、細胞の生死がそれに依存するといった多くの出来事を制御  
 するための基本メカニズムを表わしているということが広く認識されるに至ってきている  
 。したがって、プロテアーゼは、特定の基質を高度に選択的且つ限定して開裂せしめると  
 いったそれらの能力を介して、多数のタンパク質の細胞内外での適切な局在化、膜結合タ  
 ンパク質からの外部ドメイン（エクドメイン, ectodomain）のシェディング、さらにはサイトカイン、成長因子（増殖因子）及びペプチド・ホルモンの活性化並び  
 に不活性化をコントロールしている（非特許文献 2）。

40

【0003】

これらのタンパク質分解プロセッシングというものは、細胞周期の進行、形態形成及び組

50

織リモデリングを含む不可欠な生物学的プロセス、細胞増殖、転移、血管新生やアポトーシスに影響を及ぼすことが見出されてきている。プロテアーゼを媒介とした機能は、例えば、排卵、受精、妊娠、骨形成、創傷治癒、神経成長及び抗原提示のような生理的なプロセスの中心をなすものである。更に、プロテアーゼの構造、機能及び制御における変化は、例えば、癌、関節炎、心血管の障害及び神経変性病のようなヒトの疾病の根底に横たわるものでもある（非特許文献3： Southan, C., FEBS Lett., 498: 214-218, 2001; 非特許文献4： Lin, C. Y. et al., J. Biol. Chem., 274: 18231-18236, 1999; 非特許文献5： Egeblad, M., et al., Nature Rev. Cancer, 2: 161-174, 2002）。ヒトのタンパク質分解システムがより複雑なものであることが判明してくるにしたがい、プロテアーゼの分野で生じた多数の疑問点を明らかにしていくためのグローバル化した概念やアプローチを導入することが必要とされている。こうしたことから、本発明者等は、細胞、組織若しくは生物体により、特定の瞬間又は状況の下で発現されるプロテアーゼの完全なセットを明らかにするために、用語、デグラドーム (degradome) を創り出した（非特許文献2）。そして、デグラドームを完全に得ようとすることに焦点を置いた研究は、このヒトのタンパク質分解システムの複雑さを解明していくことを目的としているものである。

【0004】

【非特許文献1】

Barrett, A. J. et al., Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press, San Diego, 1998

【非特許文献2】

Lopez-Otin, C. et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3: 509-519, 2002

【非特許文献3】

Southan, C., FEBS Lett., 498: 214-218, 2001

【非特許文献4】

Lin, C. Y. et al., J. Biol. Chem., 274: 18231-18236, 1999

【非特許文献5】

Egeblad, M., et al., Nature Rev. Cancer, 2: 161-174, 2002

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

ヒトの組織中で存在する、そして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、単一の翻訳物から、独立したプロテアーゼ領域を産生するポリプロテアーゼタンパク質を捜し出すことは、ヒトのデグラドームの複雑性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】

本発明者らは、デグラドームに立脚し、相同性（ホモロジー）を利用してある種の特徴配列、例えばプロテアーゼタンパク質の特徴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し、それに基づいて分子クローニング法を駆使した系統的な研究を広範に進める中で、代表的なプロテアーゼであるセリンプロテアーゼ構造に関連して、ユニークな構造を有する遺伝子を発見することに成功した。そして該新しく予測される遺伝子を、ヒト組織のRNAやcDNAライブラリーを利用し、PCR増幅により、さらには増幅されたフラグメントを使用したハイブリダイゼーション技術、RACEを繰り返し、5'端と3'端方向に伸張するなどの手法により、ターゲット遺伝子をクローニン

グシ、ヒトクローンの配列決定（シーケンシング）及び特性決定を行い、モザイクタンパク質をコードする遺伝子を取得することに成功した。

【0007】

本発明は、次のものを提供している。

〔1〕 (i) ポリセラゼ - I タンパク質、

(ii) (a) セラゼ - 1 タンパク質、(b) セラゼ - 2 タンパク質、(c) セラゼ - 3 タンパク質、(d) セラゼ - 1 及びセラゼ - 2 を共に含有しているタンパク質、(e) セラゼ - 1、セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質、及び(f) セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質から成る群から選ばれたタンパク質、

10

(iii) (A) 配列番号：13 又は図1～2の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、ホモログ、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の変化、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、

(iv) 配列番号：14 又は図1～2のアミノ酸配列、配列番号：15のアミノ酸配列及び配列番号：16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、

(v) (a) 配列番号：14のGlu<sup>190</sup>～Glu<sup>433</sup>のポリペプチド、(b) 配列番号：14のGlu<sup>491</sup>～Glu<sup>733</sup>のポリペプチド、(c) 配列番号：14のAsp<sup>816</sup>～Gln<sup>1055</sup>のポリペプチド、(d) 配列番号：14のGlu<sup>190</sup>～Glu<sup>433</sup>の配列及びGlu<sup>491</sup>～Glu<sup>733</sup>の配列を共に有するポリペプチド、(e) 配列番号：14のGlu<sup>190</sup>～Glu<sup>433</sup>の配列、Glu<sup>491</sup>～Glu<sup>733</sup>の配列及びAsp<sup>816</sup>～Gln<sup>1055</sup>の配列を共に有するポリペプチド、(f) 配列番号：14のGlu<sup>491</sup>～Glu<sup>733</sup>の配列及びAsp<sup>816</sup>～Gln<sup>1055</sup>の配列を共に有するポリペプチドから成る群から選ばれた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、

20

(vi) 前記(i)又は(ii)のタンパク質並びに(iii)～(v)のいずれか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)又は(ii)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(iii)～(v)のいずれか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

30

(vii) 配列番号：14 又は図1～2のアミノ酸配列、配列番号：15のアミノ酸配列及び配列番号：16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

40

(viii) 前記(i)～(vii)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。

【0008】

〔2〕 (i) ポリセラゼ - I タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(ii) (a) セラゼ - 1 タンパク質、(b) セラゼ - 2 タンパク質、(c) セラゼ - 3 タンパク質、(d) セラゼ - 1 及びセラゼ - 2 を共に含有しているタンパク質、(e) セラゼ - 1、セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質、及び(f) セラゼ - 2 及びセラゼ - 3 を共に含有しているタンパク質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、

(iii) 配列番号：14 又は図1～2のアミノ酸配列、配列番号：15のアミノ

50

酸配列及び配列番号：16のアミノ酸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、

(iv) (A) 配列番号：13又は図1~2の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、ホモログ、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の変化、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、

(v) (a) 配列番号：14のGlu<sup>190</sup>~Glu<sup>433</sup>のポリペプチド、(b) 配列番号：14のGlu<sup>491</sup>~Glu<sup>733</sup>のポリペプチド、(c) 配列番号：14のAsp<sup>816</sup>~Gln<sup>1055</sup>のポリペプチド、(d) 配列番号：14のGlu<sup>190</sup>~Glu<sup>433</sup>の配列及びGlu<sup>491</sup>~Glu<sup>733</sup>の配列を共に有するポリペプチド、(e) 配列番号：14のGlu<sup>190</sup>~Glu<sup>433</sup>の配列、Glu<sup>491</sup>~Glu<sup>733</sup>の配列及びAsp<sup>816</sup>~Gln<sup>1055</sup>の配列を共に有するポリペプチド及び(f) 配列番号：14のGlu<sup>491</sup>~Glu<sup>733</sup>の配列及びAsp<sup>816</sup>~Gln<sup>1055</sup>の配列を共に有するポリペプチドから成る群から選ばれた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、

(vi) (i)又は(ii)のタンパク質のアミノ酸配列あるいは(ii)のアミノ酸配列又は(v)のポリペプチドにおける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)又は(ii)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)~(v)のいずれかのポリペプチドの示す生物学的活性又は(iv)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、

(vii) 配列番号：13又は図1~2からなるDNAから選択された10個又は15個以上の連続した塩基配列を有するヌクレオチド配列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)又は(ii)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(iii)~(v)のいずれかのポリペプチドの示す生物学的活性又は(iv)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

(viii) 配列番号：13又は図1~2の配列の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90%以上の相同性を有し且つ(i)又は(ii)のタンパク質の示す生物学的活性を有するか、あるいは(iii)~(v)のいずれかの示す生物学的活性又は(iv)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。

#### 【0009】

[3] 上記[2]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。

[4] 上記[2]記載のポリヌクレオチド又は上記[3]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。

[5] 上記[4]記載の宿主細胞を培養条件下に維持して、上記[1]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[1]記載のタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

[6] 上記[1]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。

[7] 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[6]記載の抗体。

#### 【0010】

[8] (i) 上記[6]記載の抗体又は(ii)上記[1]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を含むことを特徴とする上記[1]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

10

20

30

40

50

部のペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬。

〔 9 〕 上記〔 6 〕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〔 1 〕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。

〔 10 〕 ( 1 ) 上記〔 1 〕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〔 6 〕記載の抗体、( 3 ) 上記〔 2 〕記載のポリヌクレオチド、( 4 ) 上記〔 3 〕記載の組換えベクター及び( 5 ) 上記〔 4 〕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。

〔 11 〕 上記〔 1 〕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〔 2 〕記載のポリヌクレオチド；あるいは上記〔 6 〕記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬。 10

〔 12 〕 上記〔 1 〕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。

〔 13 〕 上記〔 1 〕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及びスクリーニングキット。

【 0 0 1 1 】

〔 14 〕 組換えあるいは合成タンパク質又はポリペプチド生産のための、配列番号： 1 3 及び 1 4 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 1 5 の配列並びに配列番号： 1 6 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。 20

〔 15 〕 抗体作製のための、配列番号： 1 3 及び 1 4 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 1 5 の配列並びに配列番号： 1 6 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。

〔 16 〕 ポリセラゼ - I 活性， セラゼ - 1 活性， セラゼ - 2 活性， セラゼ - 3、ポリセラゼ - I 膜貫通 ( T M ) 及びポリセラゼ - I 低密度リポプロテイン・レセプター・ドメイン・クラス A ( L D L R ) 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、

配列番号： 1 3 及び 1 4 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 1 5 の配列並びに配列番号： 1 6 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。 30

〔 17 〕 ポリセラゼ - I に関する活性を持っているタンパク質及び / 又は該ポリセラゼ - I 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、配列番号： 1 3 及び 1 4 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 1 5 の配列並びに配列番号： 1 6 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。

〔 18 〕 ポリセラゼ - I に関して及び / 又は該ポリセラゼ - I 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、

配列番号： 1 3 及び 1 4 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 1 5 の配列並びに配列番号： 1 6 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。 40

〔 19 〕 ポリセラゼ - I 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、

( i ) オリゴヌクレオチドプライマーを使用する核酸の P C R による増幅、又は

( i i ) c D N A のライブラリーとハイブリダイズするプローブの使用を含み、

配列番号： 1 3 及び 1 4 並びに図 1 及び 2 の配列、配列番号： 1 5 の配列並びに配列番号： 1 6 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を含むことを特徴とする方法。

〔 20 〕 ポリセラゼ - I タンパク質が、ヒト由来、マウス由来又はラット由来のものであることを特徴とする上記〔 1 〕記載のタンパク質若しくはポリペプチド又はその部 50

分ペプチドあるいはその塩。

〔 2 1 〕 ポリセラゼ - I タンパク質が、ヒト由来、マウス由来又はラット由来のものであることを特徴とする上記〔 2 〕記載のポリヌクレオチド。

〔 2 2 〕 ポリセラゼ - I が、ヒト由来、マウス由来又はラット由来のものであることを特徴とする上記〔 1 4 〕～〔 1 8 〕のいずれかに記載の使用。

〔 2 3 〕 ポリセラゼ - I タンパク質が、ヒト由来、マウス由来又はラット由来のものであることを特徴とする上記〔 1 9 〕記載の方法。

〔 2 4 〕 上記〔 1 〕 ( v i i ) のドメインが、セラゼ - 1、セラゼ - 2、セラゼ - 3、ポリセラゼ - I T M 及びポリセラゼ - I L D L R から成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔 1 〕記載のタンパク質若しくはポリペプチド又はその部分ペプチドあるいはその塩。

10

#### 【 0 0 1 2 〕

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など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。

20

#### 【 0 0 1 3 〕

##### 【 発明の実施の形態 】

本明細書において「ポリセラゼ I」(又はポリセラゼ I タンパク質あるいはポリセラゼ I ポリペプチド)とは、それぞれ既知のセリンプロテアーゼに類似した複数の酵素活性ドメインを複雑な構成で一つの遺伝子上に保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。本明細書で開示し説明してある特徴的な領域(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のは、本発明で意図するポリセラゼ I タンパク質又はそのホモログの範囲内にあると考えてよい。該ポリセラゼ I は、その N 端側より膜貫通 ( t r a n s m e m b r a n e , T M ) ドメイン、低密度リポプロテイン・レセプター ( l o w d e n s i t y l i p o p r o t e i n r e c e p t o r , L D L R ) ドメイン、セラゼ - 1、セラゼ - 2、そしてセラゼ - 3 が線型に配置された構造を有している。かくして、本発明のタンパク質としては、ポリセラゼ I に関連するもの、例えばセラゼ - 1、セラゼ - 2、そしてセラゼ - 3 のそれぞれ、セラゼ - 1・ドメインとセラゼ - 2・ドメインとを共に持つもの、セラゼ - 2・ドメインとセラゼ - 3・ドメインとを共に持つもの、セラゼ - 1・ドメインとセラゼ - 2・ドメインとセラゼ - 3・ドメインとを共に持つものが含まれる。該タンパク質としては、配列表の配列番号: 1 4 の G l u <sup>1 9 0</sup> ~ G l u <sup>4 3 3</sup>、G l u <sup>4 9 1</sup> ~ G l u <sup>7 3 3</sup> 又は A s p <sup>8 1 6</sup> ~ G l n <sup>1 0 5</sup> <sup>5</sup> を有するもの、配列番号: 1 4 の G l u <sup>1 9 0</sup> ~ G l u <sup>4 3 3</sup> の配列及び G l u <sup>4 9 1</sup> ~ G l u <sup>7 3 3</sup> の配列を共に有するもの、配列番号: 1 4 の G l u <sup>1 9 0</sup> ~ G l u <sup>4 3 3</sup> の配列、G l u <sup>4 9 1</sup> ~ G l u <sup>7 3 3</sup> の配列及び A s p <sup>8 1 6</sup> ~ G l n <sup>1 0 5</sup> <sup>5</sup> の配列を共に有するもの、配列番号: 1 4 の G l u <sup>4 9 1</sup> ~ G l u <sup>7 3 3</sup> の配列及び A s p <sup>8 1 6</sup> ~ G l n <sup>1 0 5</sup> <sup>5</sup> の配列を共に有するものなども含まれる。該タンパク質としては、配列番号: 1 4 の A r g <sup>2 0 2</sup>、A r g <sup>5 0 3</sup> 又は A r g <sup>8 2 6</sup> の後に位置するトリプシン様プロテアーゼのコンセンサス活性化部位を有するもの、セリンプロテアーゼにおけるコンセンサス・モチーフ G l y - A s p - S e r - G l y - G l y (例えば、配列番号: 1 4 の 3 8 5 ~ 3 8 9 位、6 8 5 ~ 6 8 9 位) 及びそれに相当する変異部位 G l y - A s p - A l a - G l y - G l y (例えば、配列番号: 1 4 の 1 0 0 7 ~ 1 0 1 1 位) から成る群から選ばれたものモチーフの複数を線型にある間隔において配置して含有するもの、配列 S e r - T r p - G l y (例えば、配列番号: 1 4 の 4 0

30

40

50

7 ~ 409 位、707 ~ 709 位及び1029 ~ 1031 位)を複数有するもの、触媒活性に必要な His 残基及び Asp 残基(例えば、配列番号: 14 の His<sup>243</sup> と Asp<sup>292</sup>、His<sup>544</sup> と Asp<sup>592</sup>、そして His<sup>868</sup> と Asp<sup>915</sup>)を複数有するもの、触媒領域の3個の S-S 結合の形成に關与する6個の Cys 残基(例えば、配列番号: 14 の Cys<sup>228</sup> - Cys<sup>244</sup>, Cys<sup>358</sup> - Cys<sup>372</sup> 及び Cys<sup>383</sup> - Cys<sup>412</sup> のセット、Cys<sup>529</sup> - Cys<sup>545</sup>, Cys<sup>58</sup> - Cys<sup>672</sup> 及び Cys<sup>682</sup> - Cys<sup>712</sup> のセット、そして Cys<sup>853</sup> - Cys<sup>869</sup>, Cys<sup>980</sup> - Cys<sup>994</sup> 及び Cys<sup>1005</sup> - Cys<sup>1034</sup> のセット)を有するものなどが挙げられる。

本発明の代表的なポリセラゼ I タンパク質としては、配列表の配列番号: 13 (図 1 ~ 2) 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: 14 (図 1 ~ 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(ホモログ)(例えば配列表の配列番号: 15 又は16のアミノ酸配列を有するポリペプチドなど)が挙げられ、例えば、配列番号: 14 のアミノ酸配列のうち少なくとも 5 ~ 1059 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配列番号: 14 の各ドメイン(TMドメイン、LDLRドメイン、セラゼ-1ドメイン、セラゼ-2ドメイン、セラゼ-3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。

#### 【0014】

本発明のポリセラゼ I ポリペプチドとしては、配列番号: 14 (図 1 ~ 2)、配列番号: 15 又は配列番号: 16 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、あるいは該配列番号: 14 (図 1 ~ 2)、配列番号: 15 又は配列番号: 16 のアミノ酸配列のアミノ酸配列のうち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。本発明のポリセラゼ I 関連ポリペプチドとしては、配列番号: 14 (図 1 ~ 2) 及び図 3 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。

#### 【0015】

本発明の当該ポリセラゼ I タンパク質、セラゼ-1タンパク質、セラゼ-2タンパク質、ポリセラゼ I TMタンパク質、ポリセラゼ I LDLR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配列番号: 14 (又は図 1 ~ 2) 又は図 3 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、配列表の配列番号: 13 又は図 1 ~ 2 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、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%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つ配列番号: 14、又は図 1 ~ 2 あるいは図 3 のアミノ酸配列のうち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。当該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。当該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、例えばストリンジントな条件で配列表の配列番号：13、あるいは図1～2の塩基配列又は図3に示されたアミノ酸配列をコードする塩基配列のうち5個以上の連続した塩基を持つ配列、好ましくは10個以上の塩基を持つ配列、より好ましくは15個以上の塩基を持つ配列、さらに好ましくは20個以上の塩基を持つ配列とハイブリダイズし、当該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。

10

#### 【0016】

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 (1989), 3rd Edition (2001))", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 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)。

20

30

40

#### 【0017】

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

50

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.), *Bio computing: 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-Stockton Press, New York, (1991) など)。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) など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 Res.*, 12: 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403 (1990)) などが挙げられるが、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。

#### 【0018】

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、例えば酸化、還元、メチル化などのアルキル化、ホルミル化やアセチル化などのアシル化、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 $\gamma$ -カルボキシル化、水酸化及びADP-リボシル化などが挙げられ、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)などの記載を参照できる。

#### 【0019】

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、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989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、鋳型内に存在する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、ターゲットの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ターゲット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が、それには限定されない。プライマーは、好ましくは5個又は10個以上の塩基、さらに10個又は15個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、15~35個の塩基、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。本PCR法には、逆転写PCR (polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE (cDNA末端の迅速増幅; rapid amplification of cDNA ends)、逆PCR (reverse PCR)などの技術も含まれる。

#### 【0020】

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、例えば上記文献 (Erlich ed.)に加え、R. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988; 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. Fr

ohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988); 米国特許第 4,683,195号明細書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。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。

10

## 【0021】

PCR反応は、代表的な場合には、例えば鋳型（例えば、染色体DNAあるいはmRNAを鋳型にして合成されたDNA； 1st strand DNA）と該遺伝子などのターゲット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 5~150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Tm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分程度がおおよその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。

20

## 【0022】

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、J. W. Engels, et al., 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、フォスホトリエステル法、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、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、マーカの付された塩基を含有してよい。

30

40

## 【0023】

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。

## 【0024】

50

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～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及び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。

#### 【0025】

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及び1.5M NaClを含有する液などを挙げるのができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl含有0.5M Tris-HCl緩衝液、pH8.0などを挙げるのができ、緩衝液としては、例えば、2×SSPE(0.36M NaCl、20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び2mM EDTA)などを挙げるのができる。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。

#### 【0026】

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ー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 及び10mM MgSO<sub>4</sub> 含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5)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。

#### 【0027】

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、尿細管細胞、結合組織細胞などの組織・細胞、さらには各種腫瘍組織、ガン細胞など)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など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[<sup>-32</sup>P]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。

10

20

#### 【0028】

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 MgSO<sub>4</sub> 含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.8)などに懸濁し、DNase I 及び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プラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうし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。

30

40

#### 【0029】

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cDN

50

A、合成DNA、mRNA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、さらにはそのホモログも包含されてよい。核酸は、本発明で記載するペプチド又はペプチド群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）、例えばセラゼ-1、-2、-3、ポリセラゼ-I、ポリセラゼ-I内の膜貫通(TM)ドメイン及び低密度リポプロテイン・レセプター・クラスA(LDLレセプター・クラスA; LDLR)ドメインのそれぞれ、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（ホモログを含む）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包含されてよい。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%以上の相同性を示すものを指すものであってよい。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又は10個以上の塩基配列、好ましくは10又は15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。

#### 【0030】

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<sup>TM</sup> SK(+) (Stratagene社)、pGEM-T (Promega社)、pAmp<sup>TM</sup> (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、RACEを適用することができる。

#### 【0031】

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<sup>TM</sup> (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）、カチオン性脂質複合体形成法などのリポソーム法、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、*biolistic*粒子導入法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。核酸導入法は、トランスフェクションにより効率的に行い得るような技術的改良が図られており、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、例えばInvitrogen社、QIAGEN社などの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。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。

#### 【0032】

所定の遺伝子など（本発明で得られたDNAなど）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、枯草菌などの原核細胞宿主、酵母、293T細胞、CHO細胞、COS細胞などの真核細胞宿主、Sf21などの昆虫細胞宿主）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（ハイブリッ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）など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<sub>L</sub>プロモーターなどを、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、MMTVLTRプロモーター、RSVLTRプロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーターなどを、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーターなどを使用し得る。さらにCYC1、HIS3、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TP1、AOX1などの制御系を使用することもできる。

#### 【0033】

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10~100bp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、 $\alpha$ -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（1

00-270 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。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 KST<sup>TM</sup> (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, pKK223 (Pharmacia社) 10, 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、YE p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。

#### 【0034】

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 20 挙げられ、例えば NM533, XL1-Blue, C600, DH1, DH5, DH11S, DH12S, DH5, DH10B, HB101, MC1061, JM109, STBL2, 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 reesia*, その他の酵母株などが挙げられる。

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 30 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、チャニーズ・ハムスター細胞由来の CHO 細胞、CHO DHFR<sup>-</sup>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* (fruit fly), 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。 40

## 【0035】

本発明の遺伝子工学的的手法においては、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できる。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。

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、メトトレキサート（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、枯草菌などの原核細胞宿主、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、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例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、バ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。

## 【0036】

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、例えば約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、リゾチーム及び/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、遠心分離やろ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。

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、抗体又は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、モノクローナル抗体結合アフィニティ・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

#### 【0037】

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、所定の核酸の塩基配列に適宜、1個ないし複数個以上の塩基（ヌクレオチド塩基）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核酸（ホモログを含む）としたり、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（ホモログを含む）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 I I」、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 I I I（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, Academic 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., Nucleic Acids Res., 10: 6487, 1987；Carter et al., Nucleic 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などの方法が挙げられる。

#### 【0038】

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、ヒスタジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ $\beta$ -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、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., Mol. Cell. Biol., 8: pp. 2159-2165 (1988); Evan et al., Mol. Cell. Biol., 5: pp. 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。

#### 【0039】

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 バリエーション)、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とバイオイメーキング、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。

#### 【0040】

得られた本発明のポリペプチド (又はタンパク質) は、化学的な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 ( - C O O H ) またはカルボキシレート ( - C O O <sup>-</sup> ) であるが、C 末端がアミド ( - C O N H <sub>2</sub> ) またはエステル ( - C O O R ) 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 C<sub>1</sub> - <sub>6</sub> アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C<sub>3</sub> - <sub>8</sub> シクロアルキル基、例えば、フェニル、  
 - ナフチルなどの C<sub>6</sub> - <sub>12</sub> アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル - C<sub>1</sub> - <sub>2</sub> アルキル基もしくは - ナフチルメチルなどの - ナフチル - C<sub>1</sub> - <sub>2</sub> アルキル基などの C<sub>7</sub> - <sub>14</sub> 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  
 バ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。

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 C<sub>1</sub> - <sub>5</sub> アルキル - カルボニル基などの C<sub>1</sub> - <sub>6</sub> アシル基など ) で保護されているもの、N 端側が生体内で切断され生成した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、- O H 、 - C O O H 、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 C<sub>1</sub> - <sub>6</sub> 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。

#### 【 0 0 4 1 】

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 V I I、タンパク質工学」、東京化学同人 ( 1 9 9 3 ) 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ことも含まれてよい。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 . C r e i g h t o n , P r o t e i n s : S t r u c t u r e a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s , p p . 7 9 - 8 6 W . H . F r e e m a n & C o . , S a n F r a n c i s c o , U S A ( 1 9 8 3 ) など ) 。

#### 【 0 0 4 2 】

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、ヒトポリセラ  
 ゼ - I、セラゼ - 1、- 2、- 3、ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び L D  
 L R ドメイン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 ~ 8 0 個、好ましくは 1 ~ 6 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 4 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 0 個、特には 1 ~ 1 0 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 ~ 8 0 個、好ましくは 1 ~ 6 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 4 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 0 個、特には 1 ~ 1 0 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 ~ 8 0 個、好ましくは 1 ~ 6 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 4 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 0 個、特には 1 ~ 1 0 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。

#### 【 0 0 4 3 】

天然のヒトポリセラゼ - I、天然のセラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び L D L R ドメイン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ヒトポリセラゼ - I、天然のセラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び L D L R ドメイン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、配列表の配列番号：14 又は図 1 ~ 2、あるいは図 3 の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とは、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、ヒトポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び L D L R ドメイン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、該ヒトポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン又はポリセラゼ - I 内の L D L R ドメインの構成アミ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、配列番号：14 又は図 1 ~ 2、あるいは図 3 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。

#### 【0044】

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、細胞に変化をもたらす活性、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。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。

#### 【0045】

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。

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、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。

#### 【0046】

本明細書中で開示したポリセラゼ - I 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 ) とも適宜組合わせて、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、本発明の各ポリセラゼ - I 変異体 ( セラゼ - 1 , - 2 , - 3 , ポリセラゼ - I , ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び L D L R ドメインのそれぞれ変異体を含む ) 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 ) を使用しての 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ティング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ー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ての質量分析 ( MS ) ( これにはエレクトロスプレーイオン化法 ( electrospray ionization : ESI ) , マトリッ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 - イオント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ポリセラゼ - I ( セラゼ - 1 , -

10

20

30

40

50

2, - 3, ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び L D L R ドメインのそれぞれを含む) 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。

【0047】

本発明の当該ポリセラゼ - I 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、配列番号：14 又は図1～2、あるいは図3のポリペプチド、配列番号：13 の配列あるいは図1～2のヌクレオチド配列から転写され且つスプライシングされていないか又は特異的にスプライシングされた 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してよい。従って、類縁体又は類似体(ホモログ)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などが包含される。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。

10

【0048】

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ポリセラゼ - I タンパク質のポリペプチド、さらにその類縁体(ホモログを含む)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、タンパク質の酵素活性を発現させたり、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、さらには、ドミナント・ネガティブ効果を示すものであってよい。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プロ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。本発明のポリセラゼ - I 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。さらに、ドミナント・ネガティブ効果を示すものや構成ドメインのそれぞれが担う活性を示すもの、例えば各ドメインからなるものあるいは該ドメインの複数が組み合わせられたものなどであってよい。

20

30

40

【0049】

本発明では当該ポリセラゼ - I 遺伝子(当該ポリセラゼ - I タンパク質及びその変異体(ホモログを含む)、修飾体、誘導体などの関連遺伝子を含む)あるいはポリセラゼ - I、その一部又はホモログを発現できる組換え DNA 分子を宿主に移入し、当該ポリセラゼ - I タンパク質、ホモログ又はその一部を発現させ、目的とする当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I タンパク質又はホモログ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

50

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。本発明のポリセラゼ - I , セラゼ - 1 , - 2 , - 3 , ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン又はポリセラゼ - I 内の L D L R ドメインあるいはその塩は、当該ポリセラゼ - I タンパク質無形成症、当該ポリセラゼ - I タンパク質発現不全症、当該ポリセラゼ - I タンパク質遺伝子欠損症など病状を呈する当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I タンパク質、変異体（ホモログを含む）、修飾体、誘導体を含む医薬を用いれば、当該ポリセラゼ - I 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全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ポリセラゼ - I タンパク質又はその誘導産物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などを該患者に投与することによるか、( B ) 本発明の D N A 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などを発現させることによるか、( C ) 本発明の D N A 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などを補充するなどして、該患者における当該症状を改善したりする。

#### 【 0 0 5 0 】

別の面では、本発明はポリセラゼ - I タンパク質、セラゼ - 1 , - 2 , - 3 , ポリセラゼ - I 内の T M ドメイン又はポリセラゼ - I 内の L D L R ドメインの天然型（ネイティブ）のタンパク質（特に、内在性（ e n d o g e n o u s ）ポリセラゼ - I タンパク質）に関し、各ポリセラゼ - I タンパク質に関連付けられる活性（例えば、細胞の変化の誘導あるいはプロテアーゼ活性など）を有し且つ配列番号： 1 4 のアミノ酸配列、図 1 ~ 2 のアミノ酸配列、図 3 のアミノ酸配列及びその一部から成る群から選ばれた配列のうちの、( 1 ) ポリセラゼ - I の少なくとも 1 ~ 1 0 5 9 個、( 2 ) セラゼ - 1、( 3 ) セラゼ - 2、( 4 ) セラゼ - 3、( 4 ) T M ドメイン又は L D L R ドメイン、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 D N A や R N A などの核酸に関する。またこうした核酸、特に D N A は、( a ) 配列表の配列番号： 1 4 のアミノ酸配列、図 1 ~ 2 のアミノ酸配列及び図 3 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 D N A 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。

#### 【 0 0 5 1 】

本発明の D N A 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、例えば当該ポリセラゼ - I 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 D N A 及び c D N A 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 D N A 配列は、例えば当該ポリセラゼ - I 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 D N A 及び c D N A 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、P C R 法、さらには逆転写酵素（ R T ）を用いた P C R 法（ R T - P C R ）を利用することが出来る。当該ポリセラゼ - I タンパク質 c D N A 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ポリセラゼ-I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ポリセラゼ-I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、当該ポリセラゼ-I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)<sup>+</sup> 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ポリセラゼ-Iタンパク質 mRNA の発現や当該ポリセラゼ-I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、及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与する当該ポリセラゼ-Iタンパク質の役割、その酵素活性の役割、また細胞変化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、関節炎、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及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)、特に細胞の変化やセリン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などの研究の発展に貢献できる。当該ポリセラゼ-I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。そうした診断は、当該ポリセラゼ-I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。

#### 【0052】

こうして典型的には本発明は、当該ポリセラゼ-I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、当該ポリセラゼ-Iタンパク質に対する阻害物質を用い、被検試料中の当該ポリセラゼ-I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ポリセラゼ-I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ポリセラゼ-I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、及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与する各ポリセラゼ-I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、神経変性疾患及びがんの浸潤・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、各ポリセラゼ-I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。

#### 【0053】

本発明に従えば、ヒトポリセラゼ-I、ヒトポリセラゼ-I由来セラゼ-1、ヒトポリセラゼ-I由来セラゼ-2、ヒトポリセラゼ-I由来TM及びヒトポリセラゼ-I由来LDLR, マウスやラットの対応するポリセラゼ-I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) ポリセラゼ-I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) ポリセラゼ-I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 又は鋳型サンプルを用いてのPCRによる増幅；



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。

【0056】

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、好ましくは抗ポリセラゼ - I 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る。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などを使用したり、そこで説明した操作など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  $\text{Tris-HCl}$  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などの中で、例えば、 $\text{pH}$  約 4 ~ 約 10 (好ましくは、 $\text{pH}$  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、本発明の当該ポリセラゼ - I 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〕。

【0057】

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など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、 $\text{N, N'}$ -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。

本発明の当該ポリセラゼ - I タンパク質 (セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の  $\text{TM}$  ドメイン又はポリセラゼ - I 内の  $\text{LDLR}$  ドメインを含む) 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の変化誘導活性など) 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、当該ポリセラゼ - I 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、本発明の当該ポリセラゼ - I タンパク質 (セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の  $\text{TM}$  ドメイン又はポリセラゼ - I 内の  $\text{LDLR}$  ドメインを含む) 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変化誘導活性など) 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、過ポリセラ

ーゼ - I 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。

【0058】

本発明で同定されたDNA（例えば、ポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内のTMDメイン及びポリセラゼ - I 内のLDLRドメインのそれぞれをコードする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う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。例えば、マウスに当該DNAを導入する場合、これと相同性が高い動物由来の当該DNAを動物細胞で発現させう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、例えばマウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって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<sub>1</sub> (BDF<sub>1</sub>)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、メタロチオネインなどのユビキタス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同定された特徴あるDNA（例えば、ポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内のTMDメイン及びLDLRドメインのそれぞれをコードするDNA）の転移は、対象動物の胚芽細胞及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及び体細胞の全てに該ターゲットをコードする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及び体細胞の全てにおいて、該ターゲットタンパク質を発現できる可能性を有している。

該ターゲット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ート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。該ターゲット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。また当該ポリセラゼ - I 遺伝子あるいはその他の関連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。

【0059】

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、ポリセラゼ - I に関連したタンパク質について分析することができる。該ターゲット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、例えば脳、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、例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、当該ターゲット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; Constantini, F. & Jaenisch, R. (eds.): Genetic manipulation of the ear

10

20

30

40

50

ly 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。

#### 【0060】

本発明で同定された遺伝子（例えば、ヒトポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の TMDメインあるいは LDLR ドメインのそれぞれ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。例えば、該遺伝子の翻訳開始コドンの前後 4 kb を含むおよそ 8 kb 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 - poly A 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などで導入、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、マウスの当該ポリセラゼ - I 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ポリセラゼ - I 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。

#### 【0061】

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及び体細胞の全てにおいて、マウスの当該ターゲット遺伝子のみが破壊され、マウスの対応ポリセラゼ - I 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、老化及び死など個体のライフサイクルにおける当該ポリセラゼ - I の役割や各臓器、組織における該ポリセラゼ - I の機能を解析するのに有用である。また、ポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の TMDメイン及び LDLR ドメインのそれぞれ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ポリセラゼ - I 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などに関連した技術は、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; Pinkert, Carl A. ed., Transgenic Animal Technology: a Laboratory Handbook, Academic Press (2nd Edition, 2003) 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。

## 【0062】

本発明に従えば、当該ポリセラゼ - I 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ポリセラゼ - I 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、対象ポリセラゼ - I 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、あるいは対象ポリセラゼ - I 関連 mRNA との相互作用などを介して当該ポリセラゼ - I 遺伝子の発現を調節・制御することができる。対象ポリセラゼ - I 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、及び対象ポリセラゼ - I 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ポリセラゼ - I 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' 端パリンドローム領域、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。

10

## 【0063】

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。

20

30

40

## 【0064】

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のが挙げられるが、それ

50

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、リポゾーム、ミク로스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、あるいはポリセラゼ - I、セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の TM ドメイン及びポリセラゼ - I 内の LDLR ドメインのそれぞれ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。

#### 【0065】

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、所望の当該ポリセラゼ - I タンパク質ポリペプチド及び関連ペプチド断片（セラゼ - 1, - 2, - 3, ポリセラゼ - I 内の TM ドメイン、ポリセラゼ - I 内の LDLR ドメイン及びそれらのペプチドフラグメントも含む）に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種抗原決定基（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')<sub>2</sub>, 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（trio me）などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イデオタイプ抗体、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、本明細書に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、天然型の当該ポリセラゼ - I ポリペプチドを特異的に識別できるものであり、例えば、公知のセリンプロテアーゼ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。本発明のポリセラゼ - I の特徴的な配列、例えば SEQ ID NO: 14 のアミノ酸配列のうち存在する連続したアミノ酸配列、例えば 5 ~ 10 個あるいは 7 ~ 15 個、あるいはそれ以上の数のアミノ酸残基からな

る、連続したアミノ酸配列、該特徴的な配列を実質的に維持しているものなどを、特異的に認識できる抗体なども挙げられる。該特徴的な配列は、前記した相同性の説明で言及したように、データベースと適切な検索プログラムを使用して決定できる。

【0066】

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）。

【0067】

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：  
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 Enzym* 50

ology", 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)。

#### 【0068】

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ン化
6. モノクローナル抗体の製造

#### 【0069】

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、当該ポリセラゼ-I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、決定された当該ポリセラゼ-I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配列番号: 14 (図1及び2)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。

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、当該ポリセラゼ-I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、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 (K L H)、牛血清アルブミン (B S A)、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 B C G などが挙げられる。

#### 【0070】

10

#### 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 I I I、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(R i b i)アジュバント、百日咳ワクチン、B C G、リピッド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B A L B / 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  $\mu$ g/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B A L B / c系マウスの他、B A L B / 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などを包含する。

20

30

#### 【0071】

#### 3. ミエローマ細胞(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、当該分野で知られたものから選択することができ、例えば P 3 - N S - 1 - A g 4 - 1 ( N S - 1 , E u r . J . I m m u n o l . , 6 : 5 1 1 - 5 1 9 , 1 9 7 6 )、S P - 2 / 0 - A g 1 4 ( S P - 2 , N a t u r e , 2 7 6 : 2 6 9 - 2 7 0 , 1 9 7 8 )、マウスミエローマ M O P C - 2 1 セルライン由来の P 3 - X 6 3 - A g 8 - U 1 ( P 3 U 1 , C u r r . T o p i c s M i c r o b i o l . I m m u n o l . , 8 1 : 1 - 7 , 1 9 7 8 )、P 3 - X 6 3 - A g 8 ( X 6 3 , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 , 1 9 7 5 )、P 3 - X 6 3 - A g 8 - 6 5 3 ( 6 5 3 , J . I m m u n o l . , 1 2 3 : 1 5 4 8 - 1 5 5 0 , 1 9 7 9 ) 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マ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  $\mu$ g/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

40

50

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。

#### 【0072】

##### 4. 抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合

上記〔2. 免疫原性抗原による動物の免疫〕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(PEG)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

10

20

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。

#### 【0073】

##### 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、FCSC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。

30

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うる。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。

40

#### 【0074】

##### 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、FCSC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。この場合ミエローム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

50

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

10

## 【0075】

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など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: 6581, 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。

20

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))。

30

40

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')<sub>2</sub>といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

## 【0076】

50

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。

#### 【0077】

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ポリセラゼ-I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、他方を当該ポリセラゼ-Iタンパク質に対する別の種類の抗体とし、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、すなわち当該ポリセラゼ-I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などは、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、緩衝液などの濃度、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、検体試料の性質など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。

#### 【0078】

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、キュベット、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。

#### 【0079】

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、化学ルミネッセンス化合物、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ことができる。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ことができる。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。

代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^3\ ^2\text{P}]$ 、 $[^1\ ^2\ ^5\text{I}]$ 、 $[^3\ ^1\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^1\ ^4\text{C}]$ 、 $[^3\ ^5\text{S}]$  などが挙げられる。

#### 【0080】

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（HRP）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フォ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体、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体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体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。

#### 【0081】

酵素標識は、ピ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。

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HRP、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ッ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

10

20

30

40

50

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、フィコビリプロテイン、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。

#### 【0082】

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。

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 (SPDP)、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)プロピオンイミデート、メチル - 4 - メルカプトブチリルイミデート、メチル - 3 - メルカプトプロピオンイミデート、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。

#### 【0083】

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及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、ホット・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。

10

20

30

40

50

## 【0084】

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中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ク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、膝液、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、操作などの設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法に当業者の通常の方法を加えて、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。

## 【0085】

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）。

【0086】

本発明の抗ポリセラゼ - I 抗体（抗ヒトセラゼ - 1, - 2 又は - 3 抗体、抗ヒトポリセラゼ - I TM ドメイン抗体、抗ヒトポリセラゼ - I LDLR ドメイン抗体及び抗ヒトポリセラゼ - I ペプチドフラグメント抗体を含む）、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ポリセラゼ - I 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。

当該ポリセラゼ - I タンパク質及びその関連ペプチド断片に対する抗体は、当該ポリセラゼ - I タンパク質によるタンパク質分解、さらには細胞外マトリックス成分の分解、ガンを含めた腫瘍の進行、転移、ホメオスタシスあるいは血管新生など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、さらには当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I 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) 当該ポリセラゼ - I 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) 当該ポリセラゼ - I 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変化、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) 当該ポリセラゼ - I タンパク質の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) 当該ポリセラゼ - I タンパク質の発現量を測定したり、(v) 活性化されたセラゼタンパク質の変化を検出及び/又は測定したり、(vi) 当該ポリセラゼ - I 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) 該当該ポリセラゼ - I 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、関節炎、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及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、当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I 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。

【0087】

本発明の活性成分〔例えば、(a) 当該ポリセラゼ - I 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(ホモログを含む)など、(b) 当該ポリセラゼ - I タンパク質あるいは当該ポリセラゼ - I ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸など、(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) 当該ポリセラゼ - I タンパク質(セラゼ - 1 やセラゼ - 2 も含む)の活性を制御する化合物(当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I 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、例えば当該ポリセラゼ - I (セラゼ - 1 やセラゼ - 2 も含む)の酵素活性阻害剤またはそれらの塩などは、通常単独或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、または非経口投与など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。

#### 【0088】

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、脊髓腔内、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、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品などが挙げられる。

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、ベヒクル、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など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。

#### 【0089】

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、例えば注射剤などが挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロス水溶液、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。

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、例えばアルコール（例えばエタノールなど）、ポリアルコール（例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（例えばポリソルベート 80<sup>TM</sup>、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、適当なアンプルに充填される。

10

#### 【0090】

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、例えばピーナッツ油、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。

20

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、坐剤などが挙げられる。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）などを添加し、慣用の方法により調製される。

30

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デ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及び抗真菌剤を含む防腐剤及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などの、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。使用する賦形剤及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、防腐剤及び緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。

40

#### 【0091】

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などが挙げられる。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。

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（PE

50

G) 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。

#### 【0092】

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。遺伝子治療技術は、当該分野で知られた手法を適用でき、例えば、Peter J. Quesenberry (Ed.), Stem Cell Biology and Gene Therapy, Wiley Europe (1998) などに開示してあり、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められるものである。

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。

医薬品製造にあたっては、その添加剤などや調製法などは、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。

#### 【0093】

本発明の活性成分は、当該ポリセラゼ - I の活性(例えば、ヒトセラゼ - 1, - 2, - 3、ヒトポリセラゼ - I 内のTMドメイン及び/又はヒトポリセラゼ - I 内のLDLRドメインの生物活性など)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) 当該ポリセラゼ - I タンパク質、その変異体ポリペプチド(ホモログを含む)、その一部のペプチドまたはそれらの塩など、(b) 該当該ポリセラゼ - I タンパク質をコードするDNA、当該ポリセラゼ - I タンパク質変異体ポリペプチドをコードするDNA などの核酸など、(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) 当該ポリセラゼ - I 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

10

20

30

40

50

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。

本発明の活性成分は、当該ポリセラゼ - I (ヒトセラゼ - 1, - 2, - 3、ヒトポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び/又はヒトポリセラゼ - I 内の L D L R ドメインなど)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、当該ポリセラゼ - I の活性発現の制御(促進あるいは抑制・阻害)に有用であり、当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I (ヒトセラゼ - 1, - 2, - 3、ヒトポリセラゼ - I 内の T M ドメイン及び/又はヒトポリセラゼ - I 内の L D L R ドメインなど)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(当該ポリセラゼ - I 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、該ポリセラゼ - I 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。

#### 【0094】

さらに、本発明では、(a) 当該ポリセラゼ - I タンパク質のアミノ酸配列(例えば、配列番号: 14 のアミノ酸配列)に基づいて分子設計を施して、当該ポリセラゼ - I 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。

#### 【0095】

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。

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 : アスパラギン酸 (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：

A , a : アデニン

G , g : グアニン

C , c : シトシン

T , t : チミン

【0096】

【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。以下の実施例における通常慣用されるDNAクローニングを含めた技術としては、標準的な実験マニュアル、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) & J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001) に記載されるように実施できる。また特にPCR法では、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) など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) や添付の薬品などを使用している。

【0097】

実施例 1

実施例 1 ポリセラゼ - I 分子クローニング

(1) 方法

BLAST プログラムを使用してヒトゲノムデータベースのコンピューター・サーチを行った結果、ヒトのDNA コンテグ (contig) NT\_\_011245 (染色体 19p13) の中に3つの領域を同定した。概念上の翻訳をしてみると、セリンプロテアーゼ類と構造的に認めるに足る特徴の存在を示していた。次に、これらのプロテアーゼ類のcDNAをクローン化するため、PCRに基づいたアプローチを設計した。この戦略では、最初に、該クラスターの中に存在する中央のプロテアーゼ遺伝子と推定される遺伝子から誘導される特異的オリゴヌクレオチドを使用することを含んでいる。デザインしたプライマーの配列は、

【0098】

10

20

30

40

50

P o l y s 2 f : 5' - G T C G T G G G C G G G T T C G G A G C T

〔配列番号：1〕

P o l y s 2 f - n d : 5' - C T T C T G C G G A G C A A C T G T G G T

〔配列番号：2〕

P o l y s 2 r : 5' - C A G G A A G C C T G C G C A G A T C A T

〔配列番号：3〕

P o l y s 2 r - n d : 5' - C T G C G C A G A T C A T G C G G T C T G

〔配列番号：4〕

#### 【0099】

(上記中、「f」はフォワード(forward)を示し、「r」はリバース(reverse)を示し、そして「nd」はネステッド(nested)オリゴヌクレオチドであることを示す)である。PCR 反応は、変性(94、20秒)、アニーリング(64、15秒)、伸張(68、60秒)を40サイクル行うもので、GeneAmp 2400 PCRシステム(PerkinElmer Life Sciences)を使用して行った。市販されて利用可能である異なるcDNAライブラリーとExpanded High Fidelity PCRシステム(Roche Molecular Biochemicals)を使用した。ヒトのcDNAライブラリーから増幅されたPCR産物(439bp)をクローニングし、自動的DNAシーケンサーABI-PRISM 310(PerkinElmer Life Sciences)で配列解析した。クローン化されたcDNAの5'末端と3'末端は、Marathon<sup>TM</sup> cDNA増幅キット(Clontech)を使用し、ヒトの肝臓からのRNAを用いたRACE(Rapid Amplification of cDNAs Ends)の連続操作により伸張した。各サイクルでそれぞれのエンドあたり約300bpの伸張ができた。RACEで伸張されたcDNAクローンを配列解析した結果、NT\_\_011245 DNAコンテグの中央のプロテアーゼ遺伝子の5'-端と3'-端に存在する2つの異なるプロテアーゼ遺伝子が、実際のところ、3つのプロテアーゼ様のドメインを持ったタンパク質と推定されるものをコードしていることのできる単一の遺伝子の部分であることが解明できた。この大きな遺伝子の開始コドン及び終止コドンの位置を同定できたことから、

#### 【0100】

プライマー

P o l y s A T G : 5' - A T G G A G C C C A C T G T G G C T G A C

〔配列番号：5〕

と

p o l y s E N D : 5' - C T C C T G G A T G T G C T G T C C T A T

〔配列番号：6〕

を用いたPCRによって全長のcDNAを得ることができた。PCR条件は上記のように行ったが、但し、伸張は180秒で行った。PCR産物をクローニングし、その同一性はヌクレオチドシーケンシングによって確認した。

#### 【0101】

(2)結果

新規プロテアーゼ遺伝子を捜し出すためのヒトゲノムデータベースのサーチにより、新しいセリンプロテアーゼ類をコードしていると推定される3つの領域を含んでいるDNAcontig(シーケンス済みの巨大ゲノミックDNA)を同定することができた。しかしながら、これら3つの領域を詳細に配列解析してみると、それらはお互い密に配置されており、異なったプロテアーゼ・モジュールを含んでいる単一の遺伝子の一部であることを示唆するものであることが示された。この可能性をさらに探究するために、本発明者等は、中央部のプロテアーゼ・モジュールから導かれた特異オリゴヌクレオチドを使用したPCR増幅を実施し、次に5'-及び3'-RACE増幅を行った。こうした手法により最終的に3180bpのcDNAを作り出し、クローニング及び配列決定をし

た後、3個のセリンプロテアーゼ・ドメインと予測されるドメインに関するコード情報を保持する単一のRNA転写物が存在することを明らかにした(図1及び2)。

#### 【0102】

この全長cDNA配列をコンピューター解析した結果、114,020の分子量と計算されるところの1059個のアミノ酸よりなるタンパク質をコードしていることが示された(配列表の配列番号:13及び14)。TMHMM (transmembrane helics Markov model) プログラムを用いてのSMART解析によると、本タンパク質は28番目の残基~50番目の残基間のII型膜貫通(type II transmembrane)セグメントと、154番目の位置~189番目の位置の間の低密度リポプロテイン・レセプター・ドメイン・クラスA (LDLレセプターA (LDLR)) とを保有していることが示された。このLDLレセプターAモジュールに引き続いては、3個のプロテアーゼ・ドメインが容易に認識されるものであった。すなわち、Arg<sup>202</sup>の後にトリプシン様プロテアーゼのコンセンサス活性化部位を持っている190~433位にあるセラゼ-1 (serase-1; serine protease-1)、Arg<sup>503</sup>の後のトリプシン様プロテアーゼのコンセンサス活性化部位を持っている491~733位にあるセラゼ-2 (serase-2) 及びArg<sup>826</sup>の後のタンパク質分解により活性化する816~1055位にあるセラゼ-3 (serase-3) である。また配列の一直線上にある並びより、セラゼ-1とセラゼ-2とはコンセンサス・モチーフ Gly-Asp-Ser-Gly-Gly の内に推定される触媒活性のSer残基を含有している(各々385~389位と685~689位)ことが示されている。一方、セラゼ-3は、その活性部位にそのSer残基の代わりにAla残基(Gly-Asp-Ala-Gly-Gly, 1007~1011位)を含有していることから、該第3のモジュールは触媒的に不活性であるに違いないことが示されている。更に、セリンプロテアーゼ類であることを構造的に示している特徴が、その同定されたセラゼ類にも保存されている。

10

20

#### 【0103】

かくして、適切な配向をした切れやすい結合に関して基質の側鎖と相互作用をするようにされている配列Ser-Trp-Glyが、該3個のセラゼ中に存在する(それぞれ、407~409位、707~709位及び1029~1031位)。また触媒活性に必要なHis残基及びAsp残基も保存されている(それぞれ、His<sup>243</sup>とAsp<sup>292</sup>、His<sup>544</sup>とAsp<sup>592</sup>、そしてHis<sup>868</sup>とAsp<sup>915</sup>)。また同様に触媒領域の3個のS-S結合の形成に関与する6個のCys残基も保存されている(セラゼ-1では、Cys<sup>228</sup>-Cys<sup>244</sup>, Cys<sup>358</sup>-Cys<sup>372</sup>及びCys<sup>383</sup>-Cys<sup>412</sup>、セラゼ-2では、Cys<sup>529</sup>-Cys<sup>545</sup>, Cys<sup>658</sup>-Cys<sup>672</sup>及びCys<sup>682</sup>-Cys<sup>712</sup>、そしてセラゼ-3では、Cys<sup>853</sup>-Cys<sup>869</sup>, Cys<sup>980</sup>-Cys<sup>994</sup>及びCys<sup>1005</sup>-Cys<sup>1034</sup>)。他のセリンプロテアーゼ類と同様に、第4のS-S結合はセラゼ-1のプロドメインに位置するCys<sup>191</sup>と本ドメインの触媒ドメインのCys<sup>312</sup>との間に形成されることが予想される。同様な結合は、セラゼ-2のCys<sup>492</sup>とCys<sup>612</sup>との間に、そしてセラゼ-3のCys<sup>817</sup>とCys<sup>935</sup>との間に形成されるであろう。これら推定されるS-S結合の最初のもので形成されることにより、該ポリプロテアーゼの触媒ドメインは活性化部位での開裂の後でさえ細胞表面に依然結合したままで残存するであろうことが暗示されるのである。

30

40

#### 【0104】

本同定されたヒトタンパク質中にある全てのこれらの構造的特徴は、その推定されるところのマウスやラットのオルソログ(orthologs, 類似遺伝子)中でも保持されているのであって、それらの配列はマウスやラットのゲノムデータベースの中において、該同定されたヒトの配列をクエリーとして使用することにより、推測された(図3)。ラットのオルソログをコードする遺伝子はクロモソーム7の中に位置しており、マウス

50

ポリプロテインをコードする遺伝子はクロモゾ - ム 10 の中に位置しており、それらのクロモゾ - ム 領域は、ヒト遺伝子が位置しているクロモゾ - ム 19 p 13 にシンテニーな (syntenic) 領域の中のものである。

【0105】

さらに該推定される配列を解析すると、最高の相同性 (同一性) パーセンテージを与えるものとしては、マトリプターゼ (matriptase; セラーゼ - 1 とは 46%、セラーゼ - 2 とは 43%、そしてセラーゼ - 3 とは 48% の相同性を有する) 並びにマトリプターゼ 2 (matriptase 2; セラーゼ - 1 とは 45%、セラーゼ - 2 とは 40%、そしてセラーゼ - 3 とは 48% の相同性を有する) が挙げられる。この両者は膜セリンプロテアーゼである TTSP (type II transmembrane serine proteinase) ファミリー (a subfamily of serine protease) のメンバーである。本構造解析によれば、該クローン化されたヒト肝臓 cDNA はセリンプロテアーゼと推定される 3 個のモジュールを持っている新規な膜結合ポリプロテイン (membrane-bound polypeptide) をコードしていると結論づけることができ、該新規な膜結合ポリプロテインを、ポリセラーゼ - I (polyserase - I: polyserine protease - I より) (EMBL accession number AJ488946) と呼ぶこととした。また注目すべきこととしては、ヒトポリセラーゼ - I 遺伝子の最後のエクソン (該 cDNA の 3050 位で始まる) は、ヒト難聴異緊張症 (human deafness dystonia syndrome, Roesch, K. et al., Hum. Mol. Genet., 11: 477-486, 2002) に関与することが見出されているミトコンドリア内膜 13 (mitochondrial inner membrane 13, TIMM13) 遺伝子のトランスロカゼ (translocase) の 3' - 非翻訳領域の一部とアンチセンス配向でオーバーラップしている。

【0106】

実施例 2 ポリセラーゼ - I の解析

(a) 組換えセラーゼ - 1 ドメイン及び組換えセラーゼ - 2 ドメインの産生と精製  
該クローン化された cDNA の中の第 1 番目のセリンプロテアーゼ・ドメインをコードする cDNA コンストラクト又は該クローン化された cDNA の中の第 2 番目のセリンプロテアーゼ・ドメインをコードする cDNA コンストラクトといった、2 つの cDNA コンストラクトは、次なるオリゴヌクレオチドを使用して、PCR 増幅によって作製した。

【0107】

第 1 のプロテアーゼ・ドメイン用として

mod1f : 5' - ATCGTGGGCGGCATGGAAGCA [ 配列番号 : 7 ]

及び

mod1r : 5' - CTCCAGGATCCAGTCACTAG [ 配列番号 : 8 ]、

第 2 のプロテアーゼ・ドメイン用として

mod2f : 5' - GTCGTGGGCGGGTTCTGGAGCT [ 配列番号 : 9 ]

及び

mod2r : 5' - CTCCAGGATCCAGCCCTTTAG [ 配列番号 : 10 ]。

【0108】

PCR 増幅は、変性 (95、15 秒)、アニーリング (59、10 秒) 及び伸張 (68、50 秒) を 25 サイクル行うもので、Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR system を使用して行った。PCR 産物は、発現ベクター pGEX-3X (Amersham Biosciences) の SmaI サイトにクロー

ン化した。得られたベクター (pGEX-3X-serase 1 及び pGEX-3X-serase 2) を、コンピテントな大腸菌細胞 BL21(DE3)pLysE へ導入し、0.5 mM IPTG で発現誘導を行った。細胞を遠心分離して集め、洗浄し、PBS 中へ再懸濁した。次に、細胞は超音波処理で可溶化し、4、20 分間、20,000 × g で遠心分離した。可溶化画分はグルタチオン-セファロース 4B カラム (Amersham Biosciences) を使用して、精製した。グルタチオン S-トランスフェラーゼ GST-serase 1 融合タンパク質及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ GST-serase-2 融合タンパク質を、20 mM 還元型グルタチオンで溶出し、酵素活性分析に使用した。

#### 【0109】

10

#### (b) 酵素活性分析

##### (1) 方法

組換え GST-serase-1 タンパク質及び組換え GST-serase-2 タンパク質につきその推定上の酵素活性を、合成蛍光基質 N-t-Boc-Gln-Ala-Arg-AMC、N-t-Boc-Gln-Gly-Arg-AMC、N-t-Boc-Ala-Pro-Ala-AMC 及び N-t-Boc-Ala-Phe-Lys-AMC を使用してアッセイした。通常のアッセイを、50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl, 2.5% Me<sub>2</sub>SO 含有アッセイ緩衝液中、37 °C で行った。蛍光測定は、MPF-44A PerkinElmer 分光蛍光計 (ex = 360 nm 及び em = 460 nm) で行った。阻害活性アッセイは、異なる阻害剤と該組換えタンパク質とを 37 °C、15 分間プレインキュベーションし、その後、上記の条件でインキュベーションを行った。I 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン及びフィブリノーゲンを分解処理し、SDS-PAGE で調べた。すべてのアッセイは上記のアッセイ緩衝液中 37 °C で 4 ~ 12 時間インキュベーションし、1/100 の酵素/基質比率 (w/w) で行った。

20

#### 【0110】

##### (2) 結果

セラゼ-1 及びセラゼ-2 の酵素学的諸性質の解析のため、微生物細胞中で本膜結合ポリプロテアーゼの 2 個の触媒活性ドメインと推定されるドメインを発現させた。この目的のため、これらのドメインのそれぞれをコードする cDNA を、発現ベクター pGEX-3X 中にサブクローニングし、得られたプラスミドでもって大腸菌 (E. coli) BL21(DE3)pLysS 株を形質転換せしめた。形質転換体微生物の発現誘導は、IPTG で行われ、期待されたサイズのタンパク質のバンド (それぞれ、52 kDa 及び 51 kDa) が微生物タンパク質抽出物を SDS-PAGE 分析して検出された (図 4A)。これら組換え融合タンパク質はグルタチオン (GST)-セファロースクロマトグラフィーで精製され、アフィニティーカラム溶出可溶性 GST-serase-1 タンパク質及び GST-serase-2 タンパク質は直接酵素活性分析に供された。他の GST-融合タンパク質に関して以前に記載してあるように、該融合タンパク質は 37 °C でのインキュベーション後、明らかに自動的に活性化され、各タンパク質で更なる約 26 kDa のバンドが生ずるのが見られた。これは、GST 部分がタンパク質分解により遊離された後の各触媒活性ドメインに相応するように思われる。

30

40

#### 【0111】

組換え酵素のタンパク質分解活性を、セリンプロテアーゼ類のアッセイに通常用いられている合成消光蛍光ペプチドをパネルとして用いて分析した。両酵素は非常に似た活性を示し、ペプチド N-t-Boc-Gln-Ala-Arg-AMC 及び N-t-Boc-Gln-Gly-Arg-AMC が加水分解された。N-t-Boc-Ala-Phe-Lys-AMC や N-t-Boc-Ala-Pro-Ala-AMC を含む他のペプチド類は該組換えタンパク質によっては有意には加水分解されなかった (図 4B)。この 2 種の組換えセラゼの触媒活性はセリンプロテアーゼ阻害剤フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) や 4-(2-アミノエチル)-ベンゾイルスルホニルフルオリド

50

ド (A E B S F) によって実質的に消失せしめられたが、E D T A では消失しなかった (図 4 C)。またこれらの酵素がセリンプロテアーゼの中の T T S P ファミリーの他のメンバー (Lin, C. et al., J. Biol. Chem., 274: 18231-18236, 1999; Roesch, K. et al., Hum. Mol. Genet., 11: 477-486, 2002, Hooper, J. D. et al., J. Biol. Chem., 276: 857-860, 2001) により標的とされることのできる各種マトリックスや基底膜のタンパク質成分を分解するかもしれないという可能性につきそれを評価した。当該反応を行った後、S D S - P A G E 分析をした。図 5 に示されているように、該タンパク質の双方は、I 型コラーゲン (type I collagen)、フィブロネクチン (fibronectin)、ラミニン (laminin)、そしてフィブリノーゲン (fibrinogen) を分解することができた。これら基質に対する両プロテアーゼの加水分解活性は P M S F で阻害された (図 5)。このことはこれら酵素がセリンプロテアーゼであるとの提案をより支持するものである。

10

## 【0112】

(c) ヒト組織中でのポリセラゼ - I 発現解析

(1) 方法

種々のヒト組織を使用してノーザン・プロット解析を行った。種々のヒト組織 (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋肉、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、腸、大腸及び白血球) の poly (A)<sup>+</sup> RNA を 2 μg 含んでいるナイロン・フィルターを使用し、該ナイロン・フィルターを、50% のフォルムアミド、5X SSPE (1X SSPE = 150 nM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 7.4)、10X Denhardt's 溶液、2% SDS 及び 100 μg/ml 変性ニシン精子 DNA 中で 42、3 時間プレハイブリダイズせしめた。

20

ハイブリダイゼーション処理は、次なるオリゴヌクレオチド

north F: 5' - C T T G C A G C C T G C C T G G A G G A T

配列番号: 11

及び

north R: 5' - C C T T G A G G T A G C C C C A G C C T G

配列番号: 12

30

を用いて cDNA クローンから PCR 増幅して得られた、放射性ラベルした 0.5 kb のプローブでもって行った。プレハイブリダイズと同条件で 20 時間のハイブリダイゼーション処理した後に、フィルターは、0.1% SDS 含有 0.1X SSC で 50、2 時間洗浄し、オートラジオグラフィーに供した。アクチンプローブによるハイブリダイゼーションを行って RNA の真正性 (RNA integrity) についての評価を行った。

## 【0113】

(2) 結果

ヒト組織中でのポリセラゼ - I 発現パターンを研究するため、いろいろな組織及び腫瘍細胞株から調製した poly (A)<sup>+</sup> を含有する試料につきノーザン・プロットを行い、該同定された cDNA の 5' 末端に対応するプローブとハイブリダイズさせた。腎臓、肝臓、肺及び脳を含むヒト胎児組織 (human fetal tissues) のパネル中や腫瘍細胞株 A 5 4 9 (肺癌)、Raji (バーキットリンパ腫)、MOLT-4 (リンパ芽球白血病)、K-562 (慢性脊髄白血病) 及び HeLa (頸管上皮癌) を含む各種腫瘍細胞株 (tumor cell lines) 中で約 5.4 kb の 1 個のバンドが検出された (図 6)。また、成人組織 (human adult tissues) 中、主として膵臓、筋肉、肝臓、心臓及び精巣中で 3.8 kb と 2.4 kb のマイナーな転写物が検出された。5.4 kb の主バンドはポリセラゼ - I に関して記載されている全長 cDNA を含んでいる転写物に相当すると推測される。一方、マイナーな転写物は本発明の中で見つけられたオルターナティブ・スプライシング (それはポ

40

50

リプロテアーゼのより短い形態のもの (EMBL accession number AJ 488947) に導く) により誘導されたと推測される。

【0114】

(d) ポリセラゼ - I の翻訳後のプロセシングの解析

(1) 方法

5'末端にFLAGエピトープを持ち、3'末端にHAエピトープを持つベクターpcDNA3のEcoRV サイトに全長cDNAをクローン化し、得られた構築物 (pcDNA3-polys) をLipofectAMINE 試薬 (Life Technologies, Inc. 社) を用いて、HeLa及びCOS-7 細胞へ導入した。

大腸菌で産生された第1と第2のプロテアーゼ・モジュールに対するポリクローナル抗体は、標準の方法でもってウサギで作製された。さらに、第3のプロテアーゼ・モジュールから導かれた合成ペプチド (FDVYGDPKQWAAF; 870-882位) にマレイミド-活性化キーホールリンペット・ヘモシアニンを結合し、それに対するウサギ・ポリクローナル抗体を作製した。タンパク質のウエスタン・ブロット解析は、サンプルを12% SDS-PAGE ゲルで分離し、Hybond ECLニトロセルロース膜 (Amersham Bioscience 社) に転写して行った。ウエスタン・ブロットは  $1\mu\text{g/ml}$  の各々の抗体、若しくは抗FLAG M2 抗体 (Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak 社) 及び抗HA抗体 (Roche 社) と共にインキュベーションし、続いて、HRP 結合2次抗体 (Santa Cruz Biotech 社) を1:10000 に希釈し用いた。細胞膜リッチ画分を得るために、HeLa及びCOS-7 細胞をプレートから掻き取り、以前に報告 (Velasco, G., et al., J. Biol. Chem., 277: 37637-37646, 2002) したようにして、細胞膜画分を調製した。

【0115】

(2) 結果

3個のプロテアーゼ・モジュールに対して作製されたポリクローナル抗体をHeLa細胞中のポリセラゼ - I の検出に用いた。図7で見られるように約55 kDaと約32 kDaの2つのバンドが抗セラゼ - 1抗体でHeLa細胞抽出物中に検出された。55 kDaのセラゼ - 1免疫反応性バンドは、LDLRと膜貫通・ドメイン (推定値 56.1 kDa) を伴っている第1のプロテアーゼ・モジュールを含有しているタンパク質種に相当するものであるかもしれない。一方、32 kDa のタンパク質は、Arg<sup>20</sup> の部位でトリプシン様プロテアーゼにより消化された後の活性型セラゼ - 1 (推定値 33.9 kDa) に相当するものであるかもしれない。抗セラゼ - 2抗体は、35 kDa のバンドを検出したが、それはArg<sup>503</sup> の活性化部位で切断された後のセラゼ - 2のプロセスを受けた形態のもの (推定値 34.8 kDa) に相当するものであるかもしれない。最後に、抗セラゼ - 3抗体は約25 kDa のバンドを認識した。本約25 kDa のバンドはArg<sup>826</sup> でのプロセス化を受けた後の予想されたサイズの該ドメイン (推定値 25.7 kDa) によく一致したものであった。これらの抗体は他のより高分子のバンドも検出したが、それらは部分的にプロセス化を受けた形態のものに相当するものであるのかもしれないし、あるいは、全長タンパク質に相当するものであるのかもしれない。特異セラゼ免疫反応性バンドのいずれもポリセラゼ - I 非発現のSW480 細胞中では存在しておらず、本明細書における実験では陰性コントロールとして該細胞を使用した (図7)。

【0116】

推定されるポリセラゼ - I のプロセシングのメカニズムを更に研究するため、タンパク質の N末端にFLAGエピトープ及び C末端にHAエピトープをそれぞれ有している本酵素を発現する真核生物発現ベクターを調製した。構築物はCOS-7細胞及びHeLa細胞をそれぞれトランスフェクトするために使用した。抗FLAG抗体あるいは抗HA抗体を用いてポリセラゼ - I の内因性のものとポリセラゼ - I のトランスフェクト

型との区別を可能にした。トランスフェクトされたCOS-7細胞の膜リッチな画分を抗FLAG抗体でウエスタン・ブロット解析すると、タンパク質の大部分はインタクト(115 kDa)として残っていたが、更なるバンド、すなわち、90 kDa(膜貫通部+LDLR+セラゼ-1+セラゼ-2)、55 kDa(膜貫通部+LDLR+セラゼ-1)及び21 kDaのバンドも検出された。この最後の21 kDaのシグナルはセラゼ-1がArg<sup>202</sup>の後でトリプシン様プロテアーゼにより除去されてしまったもの(推定値22.2 kDa)で、膜貫通部とLDLRのモチーフに相当するものかもしれない。同じ実験で、膜リッチ画分をアルカリ/EDTA処理すると、抗HA抗体で115 kDaのバンド(全長タンパク質)が検出される。さらなるバンドが、115 kDaのタンパク質のプロセッシングから誘導でき、約100 kDa、55 kDa及び25 kDaの3個のより強いバンドはそれぞれセラゼ-1+セラゼ-2+セラゼ-3(推定値94 kDa)、セラゼ-2+セラゼ-3(推定値60.5 kDa)及びセラゼ-3モジュール(推定値25.7 kDa)に相当するものである(図8)。55 kDa及び25 kDaの分子量の2個のバンドが、膜リッチ画分を使用し高塩濃度(350 mM)とメルカプトエタノール(5 mM)で抽出すると、その上清中に検出された。トランスフェクトされたHeLa細胞あるいは個々のセラゼ・モジュールに対する抗体を使用すると、同様な結果が得られた。こうしたことを考え併せると、これらデータはポリセラゼ-Iが膜結合性タンパク質であり、本タンパク質は3個の明確に異なっているプロテアーゼ・ユニットの遊離をもたらす一連の連続したタンパク質分解プロセッシングを受けることを示している。これらのタンパク質はプロドメインに位置しているCys残基と各セラゼ・ドメインの触媒ドメインとの間に形成されるS-S結合により細胞膜に結合して残っているようである。

#### 【0117】

##### 実施例3 モノクローナル抗体の作製

免疫に用いる抗原としては、ヒトポリセラゼ-Iの全長、実施例2で得られた精製した融合組換えGST-serase-1若しくはGST-serase-2又はプロテアーゼ・モジュールの合成ペプチド(FDVYGDPKQWAAF、870-882位)にマレイミド-活性化キーホールリンペット・ヘモシアニンを結合したものを使用することができる。また、配列番号:14に記載したヒトポリセラゼ-Iのアミノ酸配列中より他のセリンプロテアーゼと相同性が低く、ヒトポリセラゼ-Iに特徴的な配列を選択し、合成することができる。これらの抗原タンパク質は、イオン交換、ゲルろ過、抗体アフィニティークロマトグラフィー又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。さらに免疫用抗原に対する反応性に基づいてクローニングを行い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。ただし、GST融合組換えserase-1若しくはGST融合組換えserase-2を免疫源として得られたハイブリドーマの場合には、GSTに対する抗体産生株を含んでいるので、GSTに反応する抗体産生ハイブリドーマを除去しなければならない。また、ヒトポリセラゼ-I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、ヒトポリセラゼ-Iに特徴的なアミノ酸配列を持つ合成ペプチドにキャリアータンパク質を結合させたものが使用できる。例えば、第190-433位のセラゼ-1の活性部位、第491-733位のセラゼ-2の活性部位、第816-1055位のセラゼ-3の活性部位を含む領域から、他のセリンプロテアーゼには見られない特異的で、疎水性の低い可溶性ペプチド配列を選択し使用することができる。これらのヒトポリセラゼ-Iの全長若しくは一部の領域の融合組換えタンパク質若しくはポリペプチドを免疫原として作製する抗体をここでは抗ヒトポリセラゼ-I抗体とする。

#### 【0118】

##### (a) 抗原ポリペプチドの調製

前述のようなポリペプチドは、ペプチド合成機(ペプチドシンセサイザー9600、Milligen/Bioscience)を使用して、Fmoc-bop法で合成する。ポリ

ペプチドの N 末端あるいは C 末端にはシステインを導入する。合成したペプチドは  $\mu$  Bondasphere, C18 カラム (Waters) を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製する。

(b) ポリペプチドとウシ血清アルブミン (BSA) の複合体の調製

システイン残基を介して BSA と結合させ、抗原コンジュゲートとする。BSA を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解したものと N-(6-maleimidocaproxy)-succinimide (EMCS) を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 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した PD-10 (Pharmacia) でゲルろ過する。マレイミド結合 BSA を分取し、1.5 ml 以下に濃縮する。前記 (a) で合成したそれぞれのポリペプチドを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、マレイミド結合 BSA に対し 50 倍モル量となるようにそれぞれ混合し、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。 10

【0119】

(c) 抗体産生細胞の調製

前記 (b) で調製した BSA-ポリペプチド複合体、200  $\mu$ g を完全フロインドアジュバントと共に 8 週令 Balb/c 雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫する。19 日目と 34 日目に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した複合体 200  $\mu$ g 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 69 日目に複合体 200  $\mu$ g を静脈内投与し、最終免疫とする。その 3 日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製する。 20

【0120】

(d) 細胞融合

(1) 以下の材料及び方法を用いる。RPMI-1640 培地: RPMI-1640 (Flow Lab.) に重炭酸ナトリウム (24 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、ペニシリン G カリウム (50 U/ml)、硫酸アミカシン (100  $\mu$ g/ml) を加え、ドライアイスで pH を 7.2 に調整し、0.2  $\mu$ m 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) 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.) 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 SP-2 (SP-2/0-Ag14) との融合は、Selected methods in cellular immunology, pp. 351-371 (ed. B. B. Mishell and S. M. Shiggi), W. H. Freeman and Company (1980) に記載の Oi & Herzenberg の方法を若干改変して行う。 30

(2) 前記 (c) で調製した有核脾細胞 (生細胞率 100%) とミエローマ細胞 (生細胞率 100%) とを 5:1 の比率で以下の手順で融合した。それぞれの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 RPMI 1640 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。次に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 PEG-4000 溶液を 1 分間で滴下し、1 分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させる。次に 37 に加温した RPMI 1640 培地を 2 分間で滴下した後、同培地を 2~3 分間で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。次にこの沈殿した細胞に 37 に加温した NS-1 培地を速やかに加え、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 64 ml を加えて希釈し、ポリスチレン製 96 穴マイクロウェルにウェル当り  $6.0 \times 10^5$  個/0.1 ml の細胞を加える。細胞を加えた上記マイクロウェルを 7% 炭酸ガス/93% 空气中で温度 37、湿度 100% で培養する。 40

## 【0121】

(e) 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(d) 項(1) で述べたNS-1培地に更にヒポキサンチン(H、100 μM)、アミノプテリン(A、0.4 μM)及びチミジン(T、16 μM)を加える。HT培地：A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(d) 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、11日目に培地の半分を新しいHT培地で置き換える。14日目に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。すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを抗原としたそれぞれのポリペプチドでコートし、次に洗浄用PBS(0.05% Tween20含有)を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除く。さらに各ウエルの未コート部分を1% BSAでブロックする。この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上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置する。2次抗体としてHRP 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Cappel Lab.)を加え、さらに室温で約1時間静置する。次に基質であるTMB 溶液(Calbiochem)をウエル当たり100 μl 加え、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492nmの吸光度で測定する。ポリスチレン製96穴プレートに固相化する抗原としては、前述の精製した各種組換えヒトセラゼ-1若しくはヒトセラゼ-2も使用できる。

## 【0122】

(f) ハイブリドーマのクローニング

上記(e) 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ン化する。すなわち、NS-1培地1ml 当りフィーダーとして $10^7$ 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約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウエルが50%以上である群について(e) 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。

## 【0123】

(g) 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、その上清から濃度10~100 μg/mlの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(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン、Aldrich chemicals)を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)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。

(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、(f) 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.)を加える。PBSにより洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素及び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。

【0124】

実施例4 サンドイッチEIA

実施例3で調製した抗ヒトポリセラゼ-I抗体から少なくとも1種を選択し、抗ヒトポリセラゼ-I抗体の適当な2種の組み合わせによってヒトポリセラゼ-I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あるいは延長など調整できる。また、標準品となるヒトポリセラゼ-Iタンパク質は、組織培養上清、細胞培養上清又は本明細書記載或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、当該ヒトポリセラゼ-I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。

10

【0125】

(a) 標識抗体の調製

抗ヒトポリセラゼ-I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緩衝液(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カラムによるゲルろ過でF(ab')<sub>2</sub>画分を分取する。このF(ab')<sub>2</sub>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)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及び0.001%クロルヘキシジンを添加して4で保存する。

20

30

【0126】

(b) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗ヒトポリセラゼ-Iモノクローナル抗体を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、50µg/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100µl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、0.1MNaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で3回洗浄後、1%BSA、0.1MNaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を加えブロッキングする。

40

【0127】

(c) 1ステップサンドイッチEIA法

精製したヒトポリセラゼ-I画分を標準抗原としてヒトポリセラゼ-I定量用標準曲線を作成する。1%BSA、0.05%Brij35、0.05%Tween20、0.1MNaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で段階希釈した標準ヒトポリセラゼ-Iを60µlずつ分注、それぞれに1%BSA、0.05%Brij35、0.05%Tween20、0.1MNaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で100ng/50µlに調整した標識抗体Fab'-HRPを60µlずつ添加し十分混和

50

する。調製した抗体結合マイクロプレートを 0.05% Tween 20、0.1 M NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 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% Tween 20、0.1 M NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 3 回洗浄する。次に、TMB 溶液 (Calbiochem) をウエルあたり 100 μl 添加し、室温で 20 分間反応後、2 N 硫酸を 100 μl 添加し反応を停止する。この反応混液の A<sub>492</sub> 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、尿及び唾液などの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、標準ヒトポリセラゼ - I にかえて上記 1 ステップサンドイッチ EIA に供し、標準ヒトポリセラゼ - I と同時に反応を進行させる。測定検体から得られた A<sub>492</sub> の値を得られた標準曲線にあてはめ、測定検体に含まれるヒトポリセラゼ - I の量を算出する。

10

## 【0128】

## 〔考察〕

本発明者等は、1 個のモザイクタンパク質 (mosaic protein) をコードする cDNA をクローニングすることに成功した。該モザイクタンパク質は 1 個の II 型膜貫通領域と、1 個の LDL 受容体ドメインと、3 個のセリンプロテアーゼ・モジュールとを含んでいる複雑な構成 (complex organization) を示すものである。構造的、機能的特徴からは、本複合体タンパク質 (complex protein) は膜結合セリンプロテアーゼの TTSF ファミリーの新メンバーである。そして本発明者等は、本複合体タンパク質を「ポリセラゼ - I」と名付けた。

20

1 個の単一のポリペプチド鎖に埋め込まれている数種の触媒ユニットが存在しているということは、大変に異常なものである。これに関連し、本発明者等は、2 種のヒトプロテアーゼがさらにあるということは知っている。それらはポリセラゼ - I とそのドメイン構築の点でいくらか類似しているところを示してはいるが、しかし、翻訳後のプロセッシングの点で著しく異なっている。その 2 種のヒトプロテアーゼとは、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) とカルボキシペプチダーゼ D である。

## 【0129】

ACE は、レニン - アンジオテンシンシステムにおいてキーとなる機能のゆえに、そして心臓脈管疾患における治療上の標的としての関連性から広く研究されている I 型膜メタロプロテアーゼである。本 ACE 酵素は先祖の遺伝子から複製によって生じたもので 2 個のメタロプロテアーゼ・ドメインを含んでいる遺伝子によってコードされているものである。該 2 個の ACE ドメインは、酵素学的には活性であるが、異なる触媒定数とパターンのクロライド活性化反応性を示し、さらにいくつかの競合阻害剤と異なった相互作用を示す (Wei, L. et al., J. Biol. Chem., 266: 9002 - 9008, 1991; Wei, L. et al., J. Biol. Chem., 267: 13398 - 13405, 1992)。カルボキシペプチダーゼ D は I 型膜結合酵素であり、該酵素は、3 個のメタロプロテアーゼ・ドメインを含んでおり、そのうちの 2 個は、触媒的に活性があり、かつ補体活性を示すものである。該第一のドメインは pH 6.3 ~ 7.5 において至適なもので、該第 2 番目のドメインは pH 5.0 ~ 6.5 において至適性がある。それ故、本カルボキシペプチダーゼ D 酵素は広範囲な基質に対して広い活性を示すことになる (Novikova, E. G. et al., J. Biol. Chem., 274: 28887 - 28892, 1999)。両ケース共に、ACE やカルボキシペプチダーゼ D 中に存在するプロテアーゼユニットは、完全多領域 (マルチドメイン, multidomain) 構造の必須部分にあり、ユニークな翻訳産物から遊離されたものではない。

30

40

## 【0130】

対照的に、ポリセラゼ - I は、一連のタンパク質分解プロセッシングを受けて、それに

50

より3個の独立したプロテアーゼユニットの形成が誘導される。これらセリンプロテアーゼ・ドメインのうち2個はタンパク質分解活性を持ち、セリンプロテアーゼ類をアッセイするのに使用される合成基質に対して、さらにI型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンやフィブロネグリンのような内因性タンパク質に対して強い加水分解活性を示す。そのうちの第3のセリンプロテアーゼ・ドメインは、決定的に重要な活性部位域内に位置している特別なアミノ酸残基に変化が生じていることから、非プロテアーゼ・ホモログのカテゴリーに属するとされるものである。該不活性プロテアーゼ・ホモログというものは、不活性な触媒ドメインを介して基質を結合することによりドミナントネガティブとして働き、制御活性を有する分子あるいは阻害活性を有する分子としてその役割を果たすとの推測により、デグラドミックス (degradomics) において益々その興味が持たれつつあるものである。従って、該ポリセラゼ-Iの第3のセリンプロテアーゼ・モジュールは本プロテアーゼの2個の触媒活性ドメインの活性を、幾分か、制御することができるものであるかもしれない。

10

#### 【0131】

本明細書で開示のポリセラゼ-Iのプロセッシングは単一の翻訳産物から独自のプロテアーゼ・ドメインを産生する能力を持っているといったヒトポリプロテアーゼの最初の例を提示しているのである。こういったことは、他の生物では先例がないものであるが、最近類似したことが見出されている。それは、*Xenopus laevis*からのオボキマーゼ (ovochymase) に関して記載されているものである。すなわち、3個のセリンプロテアーゼ・ドメインを有する別の複合モザイクタンパク質で、それは単一のポリタンパク質産物の翻訳後遊離されるものである (Lindsay L. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 11253-11258, 1999)。同様に、*Xenopus laevis*や*Bufo japonicus*中で同定されたオビダクチン (oviductin) は、2個のセリンプロテアーゼ・ドメインを含んでおり (Lindsay, L. L. et al., Biol. Reprod., 60: 989-995, 1999; Hiyoshi, M. et al., Dev. Biol., 243: 176-184, 2002)、それらの1個は触媒的に不活性で、それはさらに翻訳後タンパク質分解プロセッシングを受けて独自のユニットを生成する。オボキマーゼとオビダクチンの双方は、受精過程に関与するポリプロテアーゼである。しかし、それらは膜貫通ドメインを含有してはいないし、それゆえに、ポリセラゼ-Iの場合のように、TTSFファミリーに属するものではない。今日まで、オボキマーゼ様プロテアーゼやオビダクチン様プロテアーゼはヒトでは報告されていない。しかしながら、我々による最近の世界的なヒトデグラドーム (degradome) 分析は、これらの活性の候補遺伝子の存在を示してきている。予備的な結果は推定されるヒトオビダクチンプロテアーゼは1個のセリンプロテアーゼ・ドメインを、そしてオボキマーゼプロテアーゼは3個のセリンプロテアーゼ・ドメインを含有していることを示している。従って、このオボキマーゼプロテアーゼはヒト組織によって産生されるところの第2のポリセラゼを表しているのかも知れないという可能性への途を開くものである。

20

30

#### 【0132】

本明細書において、さらに、ポリセラゼ-Iの生理学的役割を解明する試みの前段階として、本発明者等は、ヒト組織中でのポリセラゼ-Iの発現パターンについて調べた。ポリセラゼ-Iの発現は各種のヒト組織で検出されているが、殆どの場合低レベルである。また、オルターナティブ・スプライシングにより創り出される更なる転写物についての証明もあり、そのことによりポリセラゼ-Iの多様性を創出する更なる機構が提供せしめられている。ポリセラゼ-Iプロテアーゼ・ドメインのうち2個は細胞外マトリックス成分を分解することができるとの発見は、本酵素がその発現が検出されたところの正常及び腫瘍組織中で起こるマトリックス分解プロセスに関与するかも知れないことを示唆している。このように、ポリセラゼ-Iは膜結合プロテアーゼであるTTSFファミリーに最も近い親類であるマトリプターゼ (matriptase) やマトリプター

40

50

ゼ - 2 ( m a t r i p t a s e - 2 ) に関して先に示唆されているのと類似した機能上の役割を果たすものであるかもしれない ( E g e b l a d , M . e t a l . , N a t u r e R e v . C a n c e r , 2 : 1 6 1 - 1 7 4 , 2 0 0 2 ; R o e s c h , K . e t a l . , H u m . M o l . G e n e t . , 1 1 : 4 7 7 - 4 8 6 , 2 0 0 2 ) 。ヒトポリセラゼ - I のネズミにおける類似遺伝子を同定できれば、本ポリプロテアーゼを欠損する変異マウス作製の可能性という問題を提起しよう。本進行中のプロジェクトにより、ポリセラゼ - I が関与している、癌の進行を含めた生理学的・病理学的過程に関する興味ある情報が得られ可能性がある。

【 0 1 3 3 】

【 発明の効果 】

本発明では、新規ポリセラゼ - I タンパク質を確認同定できたことから、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。当該ヒトポリセラゼ - I 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、タンパク質分解現象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、関節炎、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及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、当該ポリセラゼ - I 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、当該ポリセラゼ - I 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 ( ホモログを含む ) 、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、当該ポリセラゼ - I 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。

【 0 1 3 4 】

< 配列表フリーテキスト >

SEQ ID NO: 1, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 2, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 3, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 4, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 5, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 6, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 7, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R  
SEQ ID NO: 8, O l i g o n u c l e o t i d e t o a c t a s  
a p r i m e r f o r P C R

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 9, Oligonucleotide to act as  
a primer for PCR

SEQ ID NO: 10, Oligonucleotide to act as  
a primer for PCR

SEQ ID NO: 11, Oligonucleotide to act as  
a primer for PCR

SEQ ID NO: 12, Oligonucleotide to act as  
a primer for PCR

【0135】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI FINE CHEMICAL CO., LTD.

<120> Polyserase-I and Its Use

<130> P-03NF417

10

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 1

30

gtcgtggcgg ggttcggagc t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 2

cttctgcgga gcaactgtgg t 21

<210> 3

<211> 21

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 3

20

caggaagcct gcgcagatca t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 4

ctgcgcagat catgcggtct g 21

<210> 5

40

<211> 21

|  |    |    |
|--|----|----|
| ⟨212⟩ DNA  |    |    |
| ⟨213⟩ Artificial Sequence                        |    |    |
| ⟨220⟩  |    |    |
| ⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a primer for PCR |    |    |
| ⟨400⟩ 5  |    | 10 |
| atggagccca ctgtggctga c                          | 21 |    |
| ⟨210⟩ 6  |    |    |
| ⟨211⟩ 21   |    |    |
| ⟨212⟩ DNA  |    |    |
| ⟨213⟩ Artificial Sequence                        |    | 20 |
| ⟨220⟩  |    |    |
| ⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a primer for PCR |    |    |
| ⟨400⟩ 6  |    |    |
| ctccctggatg tgcctgccta t                         | 21 |    |
| ⟨210⟩ 7  |    | 30 |
| ⟨211⟩ 21   |    |    |
| ⟨212⟩ DNA  |    |    |
| ⟨213⟩ Artificial Sequence                        |    |    |
| ⟨220⟩  |    |    |
| ⟨223⟩ Oligonucleotide to act as a primer for PCR |    | 40 |
| ⟨400⟩ 7  |    |    |

atcgtgggcg gcaiggaagc a

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 8

ctccaggatc cagtcacgta g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 9

gtcgtgggcg ggttcggagc t

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 10

ctccaggatc cagcccttta g 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 11

cttgcagcct gccctggagga t 21

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 12

ccttgagga gccccagcct g 21

40

<210> 13

<211> 3180  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(3180)  
 <223>

<400> 13

|  |     |    |
|--|-----|----|
| aig gag ccc act gtg gct gac gta cac ctc gtg ccc agg aca acc aag      | 48  |    |
| Met Glu Pro Thr Val Ala Asp Val His Leu Val Pro Arg Thr Thr Lys      |     |    |
| 1                    5                    10                    15   |     |    |
| gaa gtc ccc gct ctg gat gcc gcg tgc tgt cga gcg gcc agc att ggc      | 96  | 20 |
| Glu Val Pro Ala Leu Asp Ala Ala Cys Cys Arg Ala Ala Ser Ile Gly      |     |    |
| 20                    25                    30                       |     |    |
| gtg gtg gcc acc agc ctt gtc gtc ctc acc ctg gga gtc ctt ttg gcc      | 144 |    |
| Val Val Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Thr Leu Gly Val Leu Leu Ala      |     |    |
| 35                    40                    45                       |     |    |
| ttc ctc tct aca cag ggc ttc cac gtg gac cac acg gcc gag ctg cgg      | 192 |    |
| Phe Leu Ser Thr Gln Gly Phe His Val Asp His Thr Ala Glu Leu Arg      |     | 30 |
| 50                    55                    60                       |     |    |
| gga atc cgg tgg acc agc agt ttg cgg cgg gag acc tcg gac tat cac      | 240 |    |
| Gly Ile Arg Trp Thr Ser Ser Leu Arg Arg Glu Thr Ser Asp Tyr His      |     |    |
| 65                    70                    75                    80 |     |    |
| cgc acg ctg acg ccc acc ctg gag gca ctg ctg cac ttt ctg ctg cga      | 288 |    |
| Arg Thr Leu Thr Pro Thr Leu Glu Ala Leu Leu His Phe Leu Leu Arg      |     |    |
| 85                    90                    95                       |     | 40 |
| ccc ctc cag acg ctg agc ctg ggc ctg gag gag gag cta ttg cag cga      | 336 |    |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| Pro Leu Gln Thr Leu Ser Leu Gly Leu Glu Glu Glu Leu Leu Gln Arg |     |     |
| 100   | 105 | 110 |
| ggg atc cgg gca agg ctg cgg gag cac ggc atc tcc ctg gct gcc tat |     | 384 |
| Gly Ile Arg Ala Arg Leu Arg Glu His Gly Ile Ser Leu Ala Ala Tyr |     |     |
| 115   | 120 | 125 |
| ggc aca att gtg tcg gct gag ctc aca ggg aga cat aag gga ccc ttg |     | 432 |
| Gly Thr Ile Val Ser Ala Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Gly Pro Leu |     | 10  |
| 130   | 135 | 140 |
| gca gaa aga gac ttc aaa tca ggc cgc tgt cca ggg aac tcc ttt tcc |     | 480 |
| Ala Glu Arg Asp Phe Lys Ser Gly Arg Cys Pro Gly Asn Ser Phe Ser |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
| 160   |     |     |
| tgc ggg aac agc cag tgt gtg acc aag gtg aac ccg gag tgt gac gac |     | 528 |
| Cys Gly Asn Ser Gln Cys Val Thr Lys Val Asn Pro Glu Cys Asp Asp |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| 20  |     |     |
| cag gag gac tgc tcc gat ggg tcc gac gag gcg cac tgc gag tgt ggc |     | 576 |
| Gln Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala His Cys Glu Cys Gly |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| ttg cag cct gcc tgg agg atg gcc ggc agg atc gtg ggc ggc atg gaa |     | 624 |
| Leu Gln Pro Ala Trp Arg Met Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly Met Glu |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| gca tcc ccg ggg gag ttt ccg tgg caa gcc agc ctt cga gag aac aag |     | 672 |
| Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Glu Asn Lys |     | 30  |
| 210   | 215 | 220 |
| gag cac ttc tgt ggg gcc gcc atc atc aac gcc agg tgg ctg gtg tct |     | 720 |
| Glu His Phe Cys Gly Ala Ala Ile Ile Asn Ala Arg Trp Leu Val Ser |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| 240   |     |     |
| gct gct cac tgc ttc aat gag ttc caa gac ccg acg aag tgg gtg gcc |     | 768 |
| Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Thr Lys Trp Val Ala |     | 40  |
| 245   | 250 | 255 |

|   |      |    |
|---|------|----|
| tac gtg ggt gcg acc tac ctc agc ggc tcg gag gcc agc acc gtg cgg | 816  |    |
| Tyr Val Gly Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Thr Val Arg |      |    |
| 260 265 270   |      |    |
| gcc cag gtg gtc cag atc gtc aag cac ccc ctg tac aac gcg gac acg | 864  |    |
| Ala Gln Val Val Gln Ile Val Lys His Pro Leu Tyr Asn Ala Asp Thr |      |    |
| 275 280 285   |      |    |
| gcc gac ttt gac gtg gct gtg ctg gag ctg acc agc cct ctg cct ttc | 912  | 10 |
| Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Thr Ser Pro Leu Pro Phe |      |    |
| 290 295 300   |      |    |
| ggc cgg cac atc cag ccc gtg tgc ctc ccg gct gcc aca cac atc ttc | 960  |    |
| Gly Arg His Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr His Ile Phe |      |    |
| 305 310 315 320   |      |    |
| cca ccc agc aag aag tgc ctg atc tca ggc tgg ggc tac ctc aag gag | 1008 |    |
| Pro Pro Ser Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Glu |      | 20 |
| 325 330 335   |      |    |
| gac ttc ctg gtc aag cca gag gtg ctg cag aaa gcc act gtg gag ctg | 1056 |    |
| Asp Phe Leu Val Lys Pro Glu Val Leu Gln Lys Ala Thr Val Glu Leu |      |    |
| 340 345 350   |      |    |
| ctg gac cag gca ctg tgt gcc agc ttg tac ggc cat tca ctc act gac | 1104 |    |
| Leu Asp Gln Ala Leu Cys Ala Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu Thr Asp |      |    |
| 355 360 365   |      | 30 |
| agg atg gtg tgc gct ggc tac ctg gac ggg aag gtg gac tcc tgc cag | 1152 |    |
| Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser Cys Gln |      |    |
| 370 375 380   |      |    |
| ggt gac tca gga gga ccc ctg gtc tgc gag gag ccc tct ggc cgg ttc | 1200 |    |
| Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly Arg Phe |      |    |
| 385 390 395 400   |      |    |
| ttt ctg gct ggc atc gtg agc tgg gga atc ggg tgt gcg gaa gcc cgg | 1248 | 40 |
| Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu Ala Arg |      |    |

|   |     |     |     |      |    |
|---|-----|-----|-----|------|----|
|   | 405 | 410 | 415 |      |    |
| cgt cca ggg gtc tat gcc cga gtc acc agg cta cgt gac tgg atc ctg |     |     |     | 1296 |    |
| Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp Ile Leu |     |     |     |      |    |
|   | 420 | 425 | 430 |      |    |
| gag gcc acc acc aaa gcc agc atg cct ctg gcc ccc acc atg gct cct |     |     |     | 1344 |    |
| Glu Ala Thr Thr Lys Ala Ser Met Pro Leu Ala Pro Thr Met Ala Pro |     |     |     |      |    |
|   | 435 | 440 | 445 |      | 10 |
| gcc cct gcc gcc ccc agc aca gcc tgg ccc acc agt cct gag agc cct |     |     |     | 1392 |    |
| Ala Pro Ala Ala Pro Ser Thr Ala Trp Pro Thr Ser Pro Glu Ser Pro |     |     |     |      |    |
|   | 450 | 455 | 460 |      |    |
| gtg gtc agc acc ccc acc aaa tcg atg cag gcc ctc agt acc gtg cct |     |     |     | 1440 |    |
| Val Val Ser Thr Pro Thr Lys Ser Met Gln Ala Leu Ser Thr Val Pro |     |     |     |      |    |
|   | 465 | 470 | 475 | 480  |    |
| ctt gac tgg gtc acc gtt cct aag cta caa gaa tgt ggg gcc agg cct |     |     |     | 1488 | 20 |
| Leu Asp Trp Val Thr Val Pro Lys Leu Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro |     |     |     |      |    |
|   | 485 | 490 | 495 |      |    |
| gca atg gag aag ccc acc cgg gtc gtg ggc ggg ttc gga gct gcc tcc |     |     |     | 1536 |    |
| Ala Met Glu Lys Pro Thr Arg Val Val Gly Gly Phe Gly Ala Ala Ser |     |     |     |      |    |
|   | 500 | 505 | 510 |      |    |
| ggg gag gtg ccc tgg cag gtc agc ctg aag gaa ggg tcc cgg cac ttc |     |     |     | 1584 |    |
| Gly Glu Val Pro Trp Gln Val Ser Leu Lys Glu Gly Ser Arg His Phe |     |     |     |      | 30 |
|   | 515 | 520 | 525 |      |    |
| tgc gga gca act gtg gtg ggg gac cgc tgg ctg ctg tct gcc gcc cac |     |     |     | 1632 |    |
| Cys Gly Ala Thr Val Val Gly Asp Arg Trp Leu Leu Ser Ala Ala His |     |     |     |      |    |
|   | 530 | 535 | 540 |      |    |
| tgc ttc aac cac acg aag gtg gag cag gtt cgg gcc cac ctg ggc act |     |     |     | 1680 |    |
| Cys Phe Asn His Thr Lys Val Glu Gln Val Arg Ala His Leu Gly Thr |     |     |     |      |    |
|   | 545 | 550 | 555 | 560  | 40 |
| gcg tcc ctc ctg ggc ctg ggc ggg agc ccg gtg aag atc ggg ctg cgg |     |     |     | 1728 |    |

|   |      |     |
|---|------|-----|
| Ala Ser Leu Leu Gly Leu Gly Gly Ser Pro Val Lys Ile Gly Leu Arg |      |     |
| 565   | 570  | 575 |
| cgg gta gtg ctg cac ccc ctc tac aac cct ggc atc ctg gac ttc gac | 1776 |     |
| Arg Val Val Leu His Pro Leu Tyr Asn Pro Gly Ile Leu Asp Phe Asp |      |     |
| 580   | 585  | 590 |
| ctg gct gtc ctg gag ctg gcc agc ccc ctg gcc ttc aac aaa tac atc | 1824 |     |
| Leu Ala Val Leu Glu Leu Ala Ser Pro Leu Ala Phe Asn Lys Tyr Ile |      | 10  |
| 595   | 600  | 605 |
| cag cct gtc tgc ctg ccc ctg gcc atc cag aag ttc cct gtg ggc cgg | 1872 |     |
| Gln Pro Val Cys Leu Pro Leu Ala Ile Gln Lys Phe Pro Val Gly Arg |      |     |
| 610   | 615  | 620 |
| aag tgc atg atc tcc gga tgg gga aat acg cag gaa gga aat gcc acc | 1920 |     |
| Lys Cys Met Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Gln Glu Gly Asn Ala Thr |      | 20  |
| 625   | 630  | 635 |
| 640   |      | 645 |
| aag ccc gag ctc ctg cag aag gcg tcc gtg ggc atc ata gac cag aaa | 1968 |     |
| Lys Pro Glu Leu Leu Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Ile Asp Gln Lys |      |     |
| 645   | 650  | 655 |
| acc tgt agt gtg ctc tac aac ttc tcc ctc aca gac cgc atg atc tgc | 2016 |     |
| Thr Cys Ser Val Leu Tyr Asn Phe Ser Leu Thr Asp Arg Met Ile Cys |      |     |
| 660   | 665  | 670 |
| gca ggc ttc ctg gaa ggc aaa gtc gac tcc tgc cag ggt gac tct ggg | 2064 | 30  |
| Ala Gly Phe Leu Glu Gly Lys Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly |      |     |
| 675   | 680  | 685 |
| ggc ccc ctg gcc tgc gag gag gcc cct ggc gtg ttt tat ctg gca ggg | 2112 |     |
| Gly Pro Leu Ala Cys Glu Glu Ala Pro Gly Val Phe Tyr Leu Ala Gly |      |     |
| 690   | 695  | 700 |
| atc gtg agc tgg ggt att ggc tgc gct cag gtt aag aag ccg ggc gtg | 2160 |     |
| Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Val |      | 40  |
| 705   | 710  | 715 |
|   |      | 720 |

|   |      |    |
|---|------|----|
| tac acg cgc atc acc agg cta aag ggc tgg atc ctg gag atc atg tcc | 2208 |    |
| Tyr Thr Arg Ile Thr Arg Leu Lys Gly Trp Ile Leu Glu Ile Met Ser |      |    |
| 725 730 735   |      |    |
| tcc cag ccc ctt ccc atg tet ccc ccc tgg acc aca agg atg ctg gcc | 2256 |    |
| Ser Gln Pro Leu Pro Met Ser Pro Pro Ser Thr Thr Arg Met Leu Ala |      |    |
| 740 745 750   |      |    |
| acc acc agc ccc agg acg aca gct ggc ctc aca gtc ccg ggg gcc aca | 2304 | 10 |
| Thr Thr Ser Pro Arg Thr Thr Ala Gly Leu Thr Val Pro Gly Ala Thr |      |    |
| 755 760 765   |      |    |
| ccc agc aga ccc acc cct ggg gct gcc agc agg gtg acg ggc caa cct | 2352 |    |
| Pro Ser Arg Pro Thr Pro Gly Ala Ala Ser Arg Val Thr Gly Gln Pro |      |    |
| 770 775 780   |      |    |
| gcc aac tca acc tta tet gcc gtg agc acc act gct agg gga cag acg | 2400 |    |
| Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ala Val Ser Thr Thr Ala Arg Gly Gln Thr |      | 20 |
| 785 790 795 800   |      |    |
| cca ttt cca gac gcc ccg gag gcc acc aca cac acc cag cta cca gac | 2448 |    |
| Pro Phe Pro Asp Ala Pro Glu Ala Thr Thr His Thr Gln Leu Pro Asp |      |    |
| 805 810 815   |      |    |
| igt ggc ctg gcg ccg gcc gcg ctc acc agg att gtg ggc ggc agc gca | 2496 |    |
| Cys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Ser Ala |      |    |
| 820 825 830   |      | 30 |
| gcg ggc cgt ggg gag tgg ccg tgg cag gtg agc ctg tgg ctg cgg cgc | 2544 |    |
| Ala Gly Arg Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Trp Leu Arg Arg |      |    |
| 835 840 845   |      |    |
| cgg gaa cac cgt tgc ggg gcc gtg ctg gtg gca gag agg tgg ctg ctg | 2592 |    |
| Arg Glu His Arg Cys Gly Ala Val Leu Val Ala Glu Arg Trp Leu Leu |      |    |
| 850 855 860   |      |    |
| tcg gcg gcg cac tgc ttc gac gtc tac ggg gac ccc aag cag tgg gcg | 2640 | 40 |
| Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Val Tyr Gly Asp Pro Lys Gln Trp Ala |      |    |

|   |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|
| 865   | 870  | 875  | 880  |      |
| gcc ttc cta ggc acg ccg ttc ctg agc ggc gcg gag ggg cag ctg gag |      |      |      | 2688 |
| Ala Phe Leu Gly Thr Pro Phe Leu Ser Gly Ala Glu Gly Gln Leu Glu |      |      |      |      |
|   | 885  | 890  | 895  |      |
| cgc gtg gcg cgc atc tac aag cac ccg ttc tac aat ctc tac acg ctc |      |      |      | 2736 |
| Arg Val Ala Arg Ile Tyr Lys His Pro Phe Tyr Asn Leu Tyr Thr Leu |      |      |      |      |
|   | 900  | 905  | 910  | 10   |
| gac tac gac gtg gcg ctg ctg gag ctg gcg ggg ccg gtg cgt cgc agc |      |      |      | 2784 |
| Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gly Pro Val Arg Arg Ser |      |      |      |      |
|   | 915  | 920  | 925  |      |
| cgc ctg gtg cgt ccc atc tgc ctg ccc gag ccc gcg ccg cga ccc ccg |      |      |      | 2832 |
| Arg Leu Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro Ala Pro Arg Pro Pro |      |      |      |      |
|   | 930  | 935  | 940  |      |
| gac ggc acg cgc tgc gtc atc acc ggc tgg ggc tcg gtg cgc gaa gga |      |      |      | 2880 |
| Asp Gly Thr Arg Cys Val Ile Thr Gly Trp Gly Ser Val Arg Glu Gly |      |      |      | 20   |
|   | 945  | 950  | 955  | 960  |
| ggc tcc atg gcg cgg cag ctg cag aag gcg gcc gtg cgc ctc ctc agc |      |      |      | 2928 |
| Gly Ser Met Ala Arg Gln Leu Gln Lys Ala Ala Val Arg Leu Leu Ser |      |      |      |      |
|   | 965  | 970  | 975  |      |
| gag cag acc tgc cgc cgc ttc tac cca gtg cag atc agc agc cgc atg |      |      |      | 2976 |
| Glu Gln Thr Cys Arg Arg Phe Tyr Pro Val Gln Ile Ser Ser Arg Met |      |      |      | 30   |
|   | 980  | 985  | 990  |      |
| ctg tgt gcc ggc ttc ccg cag ggt ggc gtg gac agc tgc tcg ggt gac |      |      |      | 3024 |
| Leu Cys Ala Gly Phe Pro Gln Gly Gly Val Asp Ser Cys Ser Gly Asp |      |      |      |      |
|   | 995  | 1000 | 1005 |      |
| gct ggg gga ccc ctg gcc tgc agg gag ccc tct gga cgg tgg gtg     |      |      |      | 3069 |
| Ala Gly Gly Pro Leu Ala Cys Arg Glu Pro Ser Gly Arg Trp Val     |      |      |      |      |
|   | 1010 | 1015 | 1020 | 40   |
| cta act ggg gtc act agc tgg ggc tat ggc tgt ggc cgg ccc cac     |      |      |      | 3114 |

Leu Thr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Arg Pro His  
 1025 1030 1035  
 ttc cca ggt gtc tat acc cgg gtg gca gct gtg aga ggc tgg ata 3159  
 Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala Ala Val Arg Gly Trp Ile  
 1040 1045 1050  
 gga cag cac atc cag gag tga 3180  
 Gly Gln His Ile Gln Glu 10  
 1055

<210> 14

<211> 1059

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Glu Pro Thr Val Ala Asp Val His Leu Val Pro Arg Thr Thr Lys  
 1 5 10 15

Glu Val Pro Ala Leu Asp Ala Ala Cys Cys Arg Ala Ala Ser Ile Gly 30  
 20 25 30

Val Val Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Thr Leu Gly Val Leu Leu Ala  
 35 40 45

Phe Leu Ser Thr Gln Gly Phe His Val Asp His Thr Ala Glu Leu Arg 40

50

55

60

Gly Ile Arg Trp Thr Ser Ser Leu Arg Arg Glu Thr Ser Asp Tyr His  
 65 70 75 80

Arg Thr Leu Thr Pro Thr Leu Glu Ala Leu Leu His Phe Leu Leu Arg  
 85 90 95

Pro Leu Gln Thr Leu Ser Leu Gly Leu Glu Glu Glu Leu Leu Gln Arg  
 100 105 110

Gly Ile Arg Ala Arg Leu Arg Glu His Gly Ile Ser Leu Ala Ala Tyr  
 115 120 125

Gly Thr Ile Val Ser Ala Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Gly Pro Leu  
 130 135 140

Ala Glu Arg Asp Phe Lys Ser Gly Arg Cys Pro Gly Asn Ser Phe Ser  
 145 150 155 160

Cys Gly Asn Ser Gln Cys Val Thr Lys Val Asn Pro Glu Cys Asp Asp  
 165 170 175

10

20

30

40

Gln Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala His Cys Glu Cys Gly  
 180 185 190

Leu Gln Pro Ala Trp Arg Met Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly Met Glu  
 195 200 205

10

Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Glu Asn Lys  
 210 215 220

20

Glu His Phe Cys Gly Ala Ala Ile Ile Asn Ala Arg Trp Leu Val Ser  
 225 230 235 240

Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Thr Lys Trp Val Ala  
 245 250 255

30

Tyr Val Gly Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Thr Val Arg  
 260 265 270

Ala Gln Val Val Gln Ile Val Lys His Pro Leu Tyr Asn Ala Asp Thr  
 275 280 285

40

Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Thr Ser Pro Leu Pro Phe  
 290 295 300

Gly Arg His Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr His Ile Phe  
 305 310 315 320

10

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Glu  
 325 330 335

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

20

Leu Asp Gln Ala Leu Cys Ala Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu Thr Asp  
 355 360 365

30

Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser Cys Gln  
 370 375 380

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly Arg Phe  
 385 390 395 400

40

Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu Ala Arg  
 405 410 415

Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp Ile Leu  
 420 425 430

10

Glu Ala Thr Thr Lys Ala Ser Met Pro Leu Ala Pro Thr Met Ala Pro  
 435 440 445

Ala Pro Ala Ala Pro Ser Thr Ala Trp Pro Thr Ser Pro Glu Ser Pro  
 450 455 460

20

Val Val Ser Thr Pro Thr Lys Ser Met Gln Ala Leu Ser Thr Val Pro  
 465 470 475 480

Leu Asp Trp Val Thr Val Pro Lys Leu Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro  
 485 490 495

30

Ala Met Glu Lys Pro Thr Arg Val Val Gly Gly Phe Gly Ala Ala Ser  
 500 505 510

40

Gly Glu Val Pro Trp Gln Val Ser Leu Lys Glu Gly Ser Arg His Phe

515

520

525

Cys Gly Ala Thr Val Val Gly Asp Arg Trp Leu Leu Ser Ala Ala His  
 530 535 540

Cys Phe Asn His Thr Lys Val Glu Gln Val Arg Ala His Leu Gly Thr  
 545 550 555 560

10

Ala Ser Leu Leu Gly Leu Gly Gly Ser Pro Val Lys Ile Gly Leu Arg  
 565 570 575

20

Arg Val Val Leu His Pro Leu Tyr Asn Pro Gly Ile Leu Asp Phe Asp  
 580 585 590

Leu Ala Val Leu Glu Leu Ala Ser Pro Leu Ala Phe Asn Lys Tyr Ile  
 595 600 605

30

Gln Pro Val Cys Leu Pro Leu Ala Ile Gln Lys Phe Pro Val Gly Arg  
 610 615 620

Lys Cys Met Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Gln Glu Gly Asn Ala Thr  
 625 630 635 640

40

Lys Pro Glu Leu Leu Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Ile Asp Gln Lys  
 645 650 655

Thr Cys Ser Val Leu Tyr Asn Phe Ser Leu Thr Asp Arg Met Ile Cys  
 660 665 670

10

Ala Gly Phe Leu Glu Gly Lys Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly  
 675 680 685

20

Gly Pro Leu Ala Cys Glu Glu Ala Pro Gly Val Phe Tyr Leu Ala Gly  
 690 695 700

Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Val  
 705 710 715 720

30

Tyr Thr Arg Ile Thr Arg Leu Lys Gly Trp Ile Leu Glu Ile Met Ser  
 725 730 735

Ser Gln Pro Leu Pro Met Ser Pro Pro Ser Thr Thr Arg Met Leu Ala  
 740 745 750

40

Thr Thr Ser Pro Arg Thr Thr Ala Gly Leu Thr Val Pro Gly Ala Thr  
 755 760 765

Pro Ser Arg Pro Thr Pro Gly Ala Ala Ser Arg Val Thr Gly Gln Pro  
 770 775 780

10

Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ala Val Ser Thr Thr Ala Arg Gly Gln Thr  
 785 790 795 800

Pro Phe Pro Asp Ala Pro Glu Ala Thr Thr His Thr Gln Leu Pro Asp  
 805 810 815

20

Cys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Ser Ala  
 820 825 830

30

Ala Gly Arg Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Trp Leu Arg Arg  
 835 840 845

Arg Glu His Arg Cys Gly Ala Val Leu Val Ala Glu Arg Trp Leu Leu  
 850 855 860

40



980

985

990

Leu Cys Ala Gly Phe Pro Gln Gly Gly Val Asp Ser Cys Ser Gly Asp

995

1000

1005

Ala Gly Gly Pro Leu Ala Cys Arg Glu Pro Ser Gly Arg Trp Val

1010

1015

1020

10

Leu Thr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Arg Pro His

1025

1030

1035

20

Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala Ala Val Arg Gly Trp Ile

1040

1045

1050

Gly Gln His Ile Gln Glu

1055

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1065

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

40

&lt;400&gt; 15

Met Glu Pro Thr Ala Pro Asp Leu Gln Leu Val Pro Glu Val Thr Lys  
 1                    5                    10                    15

Ala Val Ser Val Ser Ala Pro Asp Pro Gly Pro Cys Arg Thr Ala Val  
                   20                    25                    30

10

Ile Ala Val Val Gly Ile Ser Met Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Leu  
                   35                    40                    45

Ser Ala Phe Phe Ser Ala Gln Gly Ala His Val Glu His Ile Ala Glu  
                   50                    55                    60

20

Leu His Gly Ile Arg Phe Thr Ser Ser Leu Gln Gln Glu Asn Ser Asp  
 65                    70                    75                    80

30

Phe Tyr Arg Leu Leu Thr His Ala Leu Gln Thr Leu Leu His Phe Leu  
                   85                    90                    95

Leu Arg Ala Leu Gln Pro Leu Ser Leu Lys Gln Glu Ala Asp Ile Leu  
                   100                    105                    110

40

Gln Lys Gly Ile Gln Ala Arg Leu Gln Glu Gln Gly Leu Ser Leu Ala  
 115 120 125

Ala Tyr Gly Thr Ile Val Ser Val Glu Leu Thr Gly Arg Cys Glu Gly  
 130 135 140

10

Pro Val Thr Glu Arg Asp Leu Lys Ser Gly His Cys Pro Gly Asn Val  
 145 150 155 160

Phe Ser Cys Gln Asn Gly Gln Cys Val Ser Lys Glu Asn Pro Glu Cys  
 165 170 175

20

Asp Asp Arg Val Asp Cys Ser Asp Glu Ser Asp Glu Ala Gln Cys Asp  
 180 185 190

Cys Gly Trp Gln Pro Ala Trp Arg Ser Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly  
 195 200 205

30

Val Glu Ala Ala Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Glu  
 210 215 220

40

Asn His Glu His Phe Cys Gly Ala Thr Ile Ile Gly Ala Arg Trp Leu



Glu Leu Leu Asp Gln Ser Leu Cys Ser Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu  
 355 360 365

Thr Asp Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser  
 370 375 380

10

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly  
 385 390 395 400

20

Arg Phe Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu  
 405 410 415

Ala Arg Arg Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp  
 420 425 430

30

Ile Leu Glu Val Thr Ser Ala Ala Asp Met Pro Val Val Pro Thr Ala  
 435 440 445

Thr Pro Ala Pro Ala Thr Pro Ser Thr Pro Trp Pro Thr Ser Pro Glu  
 450 455 460

40

Ser Trp Ala Pro Asn Thr Phe Ala Lys Pro Thr Ala Ala Pro Ser Pro  
 465 470 475 480

Val Pro Leu His Pro Ser Thr Thr Ala Lys Pro Gln Glu Cys Gly Ala  
 485 490 495

10

Arg Pro Ala Met Asp Lys Pro Thr Arg Ile Val Gly Gly Ile Ser Ala  
 500 505 510

Val Ser Gly Glu Val Pro Trp Gln Ala Ser Leu Lys Glu Gly Pro Arg  
 515 520 525

20

His Phe Cys Gly Ala Thr Val Val Gly Asp Arg Trp Leu Leu Ser Ala  
 530 535 540

30

Ala His Cys Phe Asn His Thr Lys Val Glu Gln Val Gln Ala His Leu  
 545 550 555 560

Gly Thr Val Ser Leu Leu Gly Val Gly Gly Ser Pro Val Lys Leu Gly  
 565 570 575

40

Leu Arg Arg Val Ala Leu His Pro Arg Tyr Asn Pro Gly Ile Leu Asp  
 580 585 590

Phe Asp Val Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Pro Leu Val Phe Asn Lys  
 595 600 605

10

Tyr Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Leu Ala Ile His Lys Phe Pro Val  
 610 615 620

Gly Arg Lys Cys Met Ile Ser Gly Trp Gly Asn Met Gln Glu Gly Asn  
 625 630 635 640

20

Ala Thr Lys Pro Asp Ile Leu Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Ile Glu  
 645 650 655

Gln Lys Met Cys Gly Ala Leu Tyr Asn Phe Ser Leu Thr Asp Arg Met  
 660 665 670

30

Leu Cys Ala Gly Phe Leu Glu Gly Arg Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp  
 675 680 685

40

Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Glu Thr Pro Gly Val Phe Tyr Leu

690

695

700

Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Gln Ala Lys Lys Pro  
 705 710 715 720

Gly Val Tyr Ala Arg Ile Thr Arg Leu Lys Asp Trp Ile Leu Lys Ala  
 725 730 735

Met Ser Ser Asp Pro Ser Ser Met Ala Arg Pro His Thr Ser Ser Thr  
 740 745 750

Arg Leu Ile Pro Ser Glu Pro Pro Lys Thr Thr Ala Ala Gly Leu Ile  
 755 760 765

Ile Pro Glu Ala Thr Thr Ser Arg Leu Ala Thr Pro Arg Ala Thr Ile  
 770 775 780

Arg Val Thr Thr Arg Pro Leu Asn Thr Thr Leu Ser Ala Arg Ser Thr  
 785 790 795 800

Thr Thr Arg Gly Gln Thr Ala Ala Pro Ser Ala Pro Gly Thr Thr Ile  
 805 810 815

10

20

30

40

His Ser His Leu Pro Asp Cys Gly Leu Ala Pro Pro Gly Ala Leu Thr  
 820 825 830

Arg Ile Val Gly Gly Ser Ala Ala Ser Leu Gly Glu Trp Pro Trp Gln  
 835 840 845

10

Val Ser Leu Trp Leu Arg Arg Arg Glu His Arg Cys Gly Ala Val Leu  
 850 855 860

20

Val Ala Glu Arg Trp Leu Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Ile Tyr  
 865 870 875 880

Gly Asp Pro Met Gln Trp Ala Ala Phe Leu Gly Thr Pro Phe Leu Ser  
 885 890 895

30

Ser Thr Glu Gly Gln Leu Glu Arg Val Ala Arg Ile Tyr Arg His Pro  
 900 905 910

Phe Tyr Asn Ile Tyr Thr Leu Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Glu Leu  
 915 920 925

40

Ala Gly Pro Val Arg Arg Ser Arg Leu Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro  
 930 935 940

Gly Pro Ala Arg Pro Pro Asp Gly Ala Arg Cys Val Ile Thr Gly Trp  
 945 950 955 960

10

Gly Ser Leu Arg Glu Gly Gly Ser Met Ala Arg Gln Leu Gln Lys Ala  
 965 970 975

Ala Val Arg Val Leu Ser Glu Gln Thr Cys Arg Arg Phe Tyr Pro Val  
 980 985 990

20

Gln Ile Ser Ser Arg Met Leu Cys Ala Gly Phe Pro Gln Gly Gly Val  
 995 1000 1005

30

Asp Ser Cys Ser Gly Asp Ala Gly Gly Pro Leu Ala Cys Arg Glu  
 1010 1015 1020

Pro Ser Gly Gln Trp Val Leu Thr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr  
 1025 1030 1035

40

Gly Cys Gly Arg Pro His Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala  
 1040 1045 1050

Ala Val Leu Gly Trp Ile Gly Gln Asn Ile Gln Glu  
 1055 1060 1065

10

<210> 16

<211> 1061

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 16

20

Met Glu Pro Ala Ala Pro Asp Leu Gln Pro Val Pro Glu Val Thr Lys  
 1 5 10 15

Gly Val Pro Val Pro Thr Pro Asp Ser Gly Cys Cys Arg Ala Ala Val  
 20 25 30

30

Thr Thr Val Val Ala Ile Ser Val Ala Ser Leu Thr Leu Gly Val Leu  
 35 40 45

Ser Ala Phe Leu Ser Ala Gln Gly Val Gln Val Glu His Thr Ala Gln  
 50 55 60

40

Leu His Gly Val Arg Phe Thr Ser Leu Leu Gln Gln Glu Asn Ser Asp  
 65 70 75 80

Phe Tyr Arg Leu Leu Thr Pro Ala Leu Gln Thr Leu Leu His Phe Leu  
 85 90 95

10

Leu Arg Ala Leu Gln Pro Leu Ser Leu Asp Gln Glu Ala Asp Ile Leu  
 100 105 110

20

Gln Lys Gly Ile Gln Ala Arg Leu Gln Gly Gln Gly Leu Ser Leu Ala  
 115 120 125

Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Arg Cys Glu Gly  
 130 135 140

30

Pro Val Thr Glu Arg Asp Leu Lys Ser Gly His Cys Pro Gly Asn Ala  
 145 150 155 160

Phe Ser Cys Gln Asn Ser Gln Cys Val Ser Lys Glu Asn Pro Glu Cys  
 165 170 175

40

Asp Asp Arg Val Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala Gln Cys Asp  
 180 185 190

Cys Gly Trp Gln Pro Ala Trp Arg Ser Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly  
 195 200 205

10

Ala Glu Ala Ala Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Glu  
 210 215 220

Asn His Glu His Phe Cys Gly Ala Thr Ile Ile Gly Ala Arg Trp Leu  
 225 230 235 240

20

Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Ala Gln Trp  
 245 250 255

30

Ala Ala Gln Ala Gly Ser Val His Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Ala  
 260 265 270

Val Arg Ala Arg Val Leu Arg Ile Ala Lys His Pro Ala Tyr Asn Ala  
 275 280 285

40

Asp Thr Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Ala Arg Pro Leu  
 290 295 300

Pro Phe Gly Arg Tyr Val Gln Pro Ala Cys Leu Pro Ala Ala Thr His  
 305 310 315 320

10

Val Phe Pro Pro Arg Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu  
 325 330 335

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

20

Glu Leu Leu Asp Gln Asn Leu Cys Ser Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu  
 355 360 365

Thr Asp Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser  
 370 375 380

30

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly  
 385 390 395 400

40

Arg Phe Phe Leu Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu

405

410

415

Ala Arg Arg Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp  
420 425 430

10

Ile Leu Glu Val Thr Ser Ser Ala Asp Thr Pro Val Val Pro Thr Glu  
435 440 445

Ala Pro Ala Pro Ile Thr Pro Ser Thr Pro Trp Pro Thr Ser Pro Glu  
450 455 460

20

Ser Arg Val Pro Asn Thr Thr Ala Lys Pro Thr Val Ala Pro Thr Pro  
465 470 475 480

Ala Pro Leu His Pro Ser Thr Ala Ala Lys Pro Gln Glu Cys Gly Ala  
485 490 495

30

Arg Pro Ala Met Asp Lys Pro Thr Arg Ile Val Gly Gly Ile Ser Ala  
500 505 510

Val Ser Gly Glu Val Pro Trp Gln Ala Ser Leu Lys Glu Gly Ser Arg  
515 520 525

40

His Phe Cys Gly Ala Thr Val Val Gly Asp Arg Trp Leu Leu Ser Ala  
 530 535 540

Ala His Cys Phe Asn His Thr Lys Leu Glu Gln Val Gln Ala His Leu  
 545 550 555 560

10

Gly Thr Val Ser Leu Leu Gly Val Gly Gly Ser Pro Val Lys Leu Gly  
 565 570 575

20

Leu Arg Ser Val Ala Leu His Pro Arg Tyr Asn Pro Gly Ile Leu Asp  
 580 585 590

Phe Asp Val Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Pro Leu Val Phe Asn Lys  
 595 600 605

30

Tyr Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Leu Ala Ile His Lys Phe Pro Val  
 610 615 620

Gly Arg Lys Cys Met Ile Ser Gly Trp Gly Asn Met Gln Glu Gly Asn  
 625 630 635 640

40

Ala Thr Lys Pro Asp Ile Leu Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Ile Glu  
 645 650 655

Gln Lys Met Cys Gly Ala Leu Tyr Asn Phe Ser Leu Thr Asp Arg Met  
 660 665 670

10

Leu Cys Ala Gly Phe Leu Glu Gly Arg Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp  
 675 680 685

Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Glu Thr Pro Gly Val Phe Tyr Leu  
 690 695 700

20

Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Gln Ala Lys Lys Pro  
 705 710 715 720

30

Gly Val Tyr Ala Arg Ile Thr Arg Leu Lys Asp Trp Ile Leu Lys Ala  
 725 730 735

Met Ser Ser Asp Pro Ser Ser Thr Ala His Pro His Thr Ser Ser Thr  
 740 745 750

40

Arg Leu Ile Pro Ser Gln Pro Pro Thr Thr Thr Ala Ala Gly Leu Ile  
 755 760 765

Pro Glu Ala Ser Thr Gly Arg Pro Ala Thr Leu Arg Ala Thr Ile Arg  
 770 775 780

10

Val Thr Thr Arg Pro Leu Asn Thr Thr Leu Ser Ala Arg Ser Thr Thr  
 785 790 795 800

Thr Arg Arg Gln Thr Pro Ala Pro Gly Thr Thr Val Phe Ser His Leu  
 805 810 815

20

Pro Asp Cys Gly Leu Ala Pro Pro Gly Ala Leu Thr Arg Ile Val Gly  
 820 825 830

Gly Ser Ala Ala Ser Leu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Trp  
 835 840 845

30

Leu Arg Arg Arg Glu His Arg Cys Gly Ala Val Leu Val Ala Glu Arg  
 850 855 860

40

Trp Leu Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Val Tyr Gly Asp Pro Met



Arg Met Leu Cys Ala Gly Phe Pro Gln Gly Gly Val Asp Ser Cys Ser  
 995 1000 1005

Gly Asp Ala Gly Gly Pro Leu Ala Cys Arg Glu Pro Ser Gly Gln  
 1010 1015 1020

10

Trp Val Leu Thr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Arg  
 1025 1030 1035

20

Pro His Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala Ala Val Leu Gly  
 1040 1045 1050

Trp Ile Gly Gln Asn Ile Arg Glu  
 1055 1060

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヒトポリセラゼ-Iのヌクレオチド配列と推定アミノ酸配列を示す。図1の配列は図2に連続する。アミノ酸配列はヌクレオチド配列の下に一文字アルファベット表記で示した。膜貫通・モチーフは灰色で、またLDLRは黒塗りで示した。3個のセリンプロテアーゼ・ドメインはアンダーラインしてある。活性化部位は矢印で示した。

【図2】図1は、ヒトポリセラゼ-Iのヌクレオチド配列と推定アミノ酸配列を示す。図2の配列は図1の続きである。アミノ酸配列はヌクレオチド配列の下に一文字アルファベット表記で示した。3個のセリンプロテアーゼ・ドメインはアンダーラインしてある。活性化部位は矢印で示した。

【図3】図3は、ヒト、マウス及びラットポリセラゼのアミノ酸配列アライメントとドメイン構成を示す。A：同定されたポリセラゼ-Iの配列（ヒト）及び推定されたポリセラゼ-Iの配列（マウスとラット）で、異なるドメインが示されており、矢印は活性化部位を示す。B：ポリセラゼ-Iのドメイン構造を示す。

40

【図4】図4は、組換えセラゼ-1及び組換えセラゼ-2の産生並びにそれらの酵素活性の解析結果を示す。A：pGEX-3X（レーン2）、pGEX-3X-serase-1（レーン3）又はpGEX-3X-serase-2（レーン5）で形質転換された細菌抽出液（5 $\mu$ l）及び精製セラゼ類（各レーン4、6）をSDS-PAGEで分析した。電気泳動の写真を示す。分子量マーカー類（MWM、レーン1）のサイズは左に示した。B：蛍光ペプチドを精製セラゼ類とインキュベートし、その蛍光を360nm（ex）と460nm（em）で測定した。セラゼ-1は白棒、

50

セララーゼ - 2 は黒塗り棒で示す。C : 2 m M P M S F、2 . 5 m M E D T A 若しくは 2 m M A E B S F 存在又は非存在下での精製セララーゼ類の阻害活性のアッセイ結果を示す。

【図 5】図 5 は、タンパク質基質上でのセララーゼ - 1 及びセララーゼ - 2 の酵素活性分析の結果を示す。フィブロネクチン、I 型コラーゲン、ラミニン及びフィブリノーゲンは単独 (C - ) あるいは組換えセララーゼ - 1 及びセララーゼ - 2 の存在下でインキュベーションを行った。各々の分解フラグメントを示す。阻害活性分析では 2 m M P M S F 存在下でインキュベーションした。それぞれ電気泳動の写真を示す。

【図 6】図 6 は、ヒト組織及び腫瘍細胞株でのポリセララーゼ - I 発現分析の結果を示す。ヒト胎児及び成人組織並びに腫瘍細胞株中ポリセララーゼ - I 発現のノーザン・ブロット分析を示す。そこに示した組織及び細胞ラインの約 2  $\mu$  g ポリアデニール化 R N A をポリセララーゼ - I 全長 c D N A の 5 ' - プローブとハイブリダイズさせ分析に供した。R N A サイズマーカーの位置が示してある。フィルターはヒトアクチン・プローブとハイブリダイズさせ、異なる組織間での R N A 装填の差を確認した。それぞれ電気泳動の写真を示す。

10

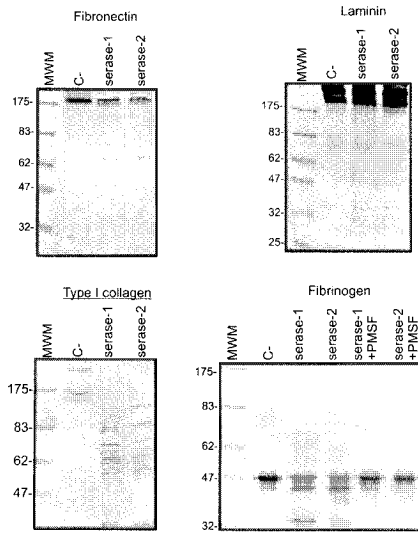
【図 7】図 7 は、ポリセララーゼ - I の翻訳後のプロセッシングの解析の結果を示す。S W 4 8 0 細胞及び H e L a 細胞の抽出液を用いて、そこに示した抗セララーゼ抗体で標識したウエスタン・ブロットを示す。電気泳動の写真である。タンパク質抽出液は電気泳動前に 2 -メルカプトエタノール処理した。各免疫反応性バンドの位置は右側に図示、分子量マーカーはブロットの左側に表示した。

20

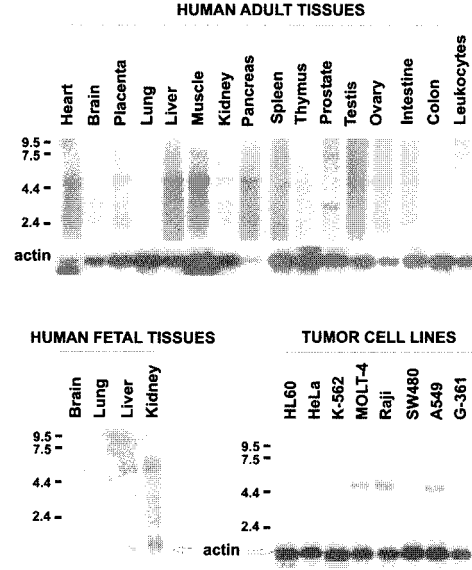
【図 8】図 8 は、ポリセララーゼ - I の翻訳後のプロセッシングの解析の結果を示す。トランスフェクトされた C O S - 7 細胞の膜リッチ画分の抗 F L A G あるいは抗 H A 抗体で標識したウエスタン・ブロットを示す。電気泳動の写真である。タンパク質抽出液は電気泳動前に 2 -メルカプトエタノール処理した。各免疫反応性バンドの位置は右側に図示、分子量マーカーはブロットの左側に表示した。P は全長 c D N A ポリセララーゼ - I でトランスフェクトされた細胞を示す。



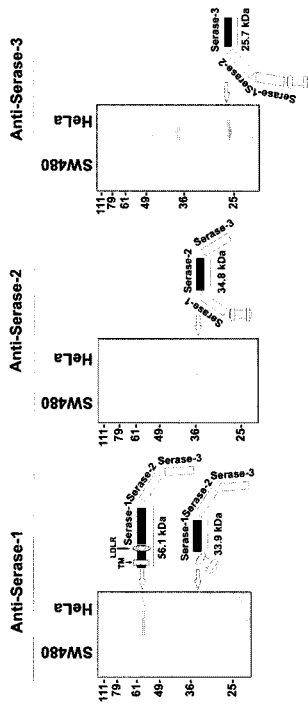
【 5 】



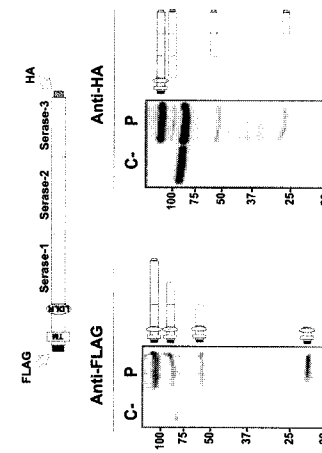
【 6 】



【 7 】



【 8 】



## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード(参考) |
|---------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P 3/06              | A 6 1 P 5/00   | 4 C 0 8 4  |
| A 6 1 P 5/00              | A 6 1 P 7/02   | 4 C 0 8 5  |
| A 6 1 P 7/02              | A 6 1 P 9/00   | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 P 9/00              | A 6 1 P 9/10   | 1 0 1      |
| A 6 1 P 9/10              | A 6 1 P 25/28  |            |
| A 6 1 P 25/28             | A 6 1 P 29/00  |            |
| A 6 1 P 29/00             | A 6 1 P 35/00  |            |
| A 6 1 P 35/00             | A 6 1 P 35/04  |            |
| A 6 1 P 35/04             | A 6 1 P 37/08  |            |
| A 6 1 P 37/08             | A 6 1 P 43/00  | 1 0 5      |
| A 6 1 P 43/00             | A 6 1 P 43/00  | 1 1 1      |
| C 0 7 K 16/40             | C 0 7 K 16/40  |            |
| C 1 2 N 1/15              | C 1 2 N 1/15   | Z T D      |
| C 1 2 N 1/19              | C 1 2 N 1/19   |            |
| C 1 2 N 1/21              | C 1 2 N 1/21   |            |
| C 1 2 N 5/10              | C 1 2 N 9/64   | Z          |
| C 1 2 N 9/64              | C 1 2 N 9/99   |            |
| C 1 2 N 9/99              | C 1 2 P 21/08  |            |
| C 1 2 P 21/08             | C 1 2 Q 1/02   |            |
| C 1 2 Q 1/02              | C 1 2 Q 1/37   |            |
| C 1 2 Q 1/37              | C 1 2 Q 1/68   | A          |
| C 1 2 Q 1/68              | G 0 1 N 33/53  | D          |
| G 0 1 N 33/53             | G 0 1 N 33/53  | M          |
| G 0 1 N 33/566            | G 0 1 N 33/566 |            |
|                           | C 1 2 N 5/00   | A          |
|                           | A 6 1 K 37/54  |            |

(72)発明者 ロペス - オーティン・カルロス  
 スペイン国 3 3 4 0 0 アストリアス サリナス シーノ パブロ ラロックス 1 0 , 6  
 ディー

(72)発明者 大内 栄子  
 富山県高岡市長慶寺 5 3 0 番地 第一ファインケミカル株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA14 CA03 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20  
 DA06 EA04 GA11 HA03 HA11 HA13 HA14 HA15 HA19 HA20  
 4B050 CC01 CC04 CC05 DD11 EE01 FF14E LL01 LL03 LL05 LL10  
 4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QQ21 QQ36 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61  
 QQ89 QQ95 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR58  
 QR62 QR77 QR80 QS16 QS32 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA26X AA58X AA72X AA87X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA33 CA43  
 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22  
 BA23 BA44 CA53 DC02 NA14 ZA152 ZA362 ZA452 ZA542 ZA962  
 ZB112 ZB132 ZB212 ZB262 ZC032 ZC332  
 4C085 AA14 DD62  
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA20 EA34 FA71 FA72

|             |  |         |            |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)     | Polyserase-I及其用途   |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2004329040A</a>  | 公开(公告)日 | 2004-11-25 |
| 申请号         | JP2003126187   | 申请日     | 2003-05-01 |
| 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<br>ガラバヤフェルナンデスセシリア<br>ロペスオーティンカルロス<br>大内栄子  |         |            |
| 发明人         | カル・ミグエル・サンティアゴ<br>ガラバヤ・フェルナンデス・セシリア<br>ロペス-オーティン・カルロス<br>大内 栄子   |         |            |
| IPC分类号      | G01N33/53 A61K38/46 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/06 A61P5/00 A61P7/02 A61P9/00<br>A61P9/10 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15<br>C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N9/99 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37<br>C12Q1/68 G01N33/566   |         |            |
| FI分类号       | C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61P3/06 A61P5/00 A61P7/02 A61P9/00<br>A61P9/10.101 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.<br>111 C07K16/40 C12N1/15.ZTD C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12N9/99 C12P21/08 C12Q1/02<br>C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/54 A61K38/02<br>A61K38/46 A61K38/48 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10   |         |            |
| F-TERM分类号   | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA14 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024<br>/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11<br>4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA19 4B024/HA20 4B050/CC01 4B050/CC04 4B050<br>/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B050/LL10<br>4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QQ21 4B063/QQ36 4B063/QQ41 4B063<br>/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35<br>4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063<br>/QR80 4B063/QS16 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02<br>4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065<br>/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065<br>/BA02 4B065/CA33 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06<br>4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084<br>/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC02 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA362 4C084<br>/ZA452 4C084/ZA542 4C084/ZA962 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084<br>/ZC032 4C084/ZC332 4C085/AA14 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75<br>4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA34 4H045/FA71 4H045/FA72 |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

#### 摘要(译)

蛋白酶处理的蛋白质在各种过程中的生物和生理现象的各个阶段起着重要的作用。通过使用基于同源性的分子克隆方法阐明蛋白酶所涉及的各种现象和机制，阐明正常和病理过程是有用的。 解决方案：为了研究完整的降解组而研究丝氨酸蛋白酶的结果是，鉴定出了一系列蛋白酶紧密排列成一行的基因。通过阐明基因的结构和由该基因编码的蛋白质“polyserase-I”，可以通过利用基因重组技术等来测量蛋白质，并且可以使用阐明其生理和生物学活性的手段。它可用于诊断由蛋白质引起的生理现象，相关疾病，病因调查，预测等。 [选择图]无

