

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00			N 4 B 0 2 4
39/395		A 6 1 P 29/00	4 B 0 5 0
		C 0 7 K 16/40	4 B 0 6 3
A 6 1 P 29/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 21数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－133620(P2001－133620)	(71)出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22)出願日	平成13年4月27日(2001.4.27)	(72)発明者	横田 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内
		(72)発明者	荒井 康子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内
		(74)代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アミノペプチダーゼB

(57)【要約】

【課題】 ヒトのアミノペプチダーゼB（A P B）を見出し、その生体における役割を明確化し、その機能または生理学的作用を制御することによる新規な診断手段、医薬用組成物を提供すること。

【解決手段】 ヒトcDNAライブラリーからラットA P B遺伝子とのホモロジー検索を行って選出した遺伝子の全長を決定し、該遺伝子が大腸菌発現系で発現させて該遺伝子がコードする蛋白質を得るとともに、該蛋白質がA P Bであることを合成基質を用いて確認し、該蛋白質、その機能または生理学的作用を制御することによる新規な疾病診断手段および医薬用組成物を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群より選ばれるアミノペプチダーゼB活性を有するペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

②前記①のペプチドを含有するペプチド、および

③前記①のペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド。

【請求項2】 下記の群より選ばれるH-アルギニン-7-アミド-4-メチルクマリン・2塩酸を分解する活性を有するペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

②前記①のペプチドを含有するペプチド、および

③前記①のペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド。

【請求項3】 請求項1もしくは2に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項4】 アミノペプチダーゼB活性、および／またはH-アルギニン-7-アミド-4-メチルクマリン・2塩酸を分解する活性を有するペプチドをコードする、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項5】 請求項3もしくは4に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項7】 プラスミド pDONR201/APB #4。

【請求項8】 プラスミド pDEST17/hAPB #1。

【請求項9】 請求項6に記載の組換えベクターまたは請求項7もしくは8に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項9に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1または2に記載のペプチドの製造方法。

【請求項11】 請求項1もしくは2に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項12】 請求項11に記載の抗体であって、アミノペプチダーゼB活性を抑制する抗体。

【請求項13】 請求項1もしくは2に記載のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、および／または請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、請求項1もしくは2に記載のペプチド、請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項6に

記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、化合物が該ペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ペプチドの活性または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する方法。

【請求項14】 請求項1もしくは2に記載のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、および／または請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、化合物が該ペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ペプチドの活性または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する方法。

【請求項15】 請求項1もしくは2に記載のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、および／または請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、請求項9に記載の形質転換体と化合物とを接触させ、請求項1もしくは2に記載のペプチドの発現の有無を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、化合物が請求項1もしくは2に記載のペプチドの発現を促進または阻害するかどうかを決定する方法。

【請求項16】 請求項13から15のいずれか1項に記載の方法によって得られた化合物。

【請求項17】 請求項1もしくは2に記載のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、または請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物。

【請求項18】 請求項1もしくは2に記載のペプチド、請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項6に記載のベクター、請求項7もしくは8に記載のプラスミド、請求項9に記載の形質転換体、請求項11もしくは12に記載の抗体、または請求項16もしくは17に記載の化合物のうちの、少なくともい

ずれか一つを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項19】 請求項1もしくは2に記載のペプチド、請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項6に記載のベクター、請求項7もしくは8に記載のプラスミド、請求項9に記載の形質転換体、請求項11もしくは12に記載の抗体、または請求項16もしくは17に記載の化合物のうちの、少なくともい

【請求項20】 請求項1もしくは2に記載のペプチドの発現または活性に関連した炎症性疾患の診断のための測定方法であって、(a)該ペプチドをコードしている核酸および／または(b)試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項21】 請求項1もしくは2に記載のペプチド、請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、または請求項11もしくは12に記載の抗体のうちの、少なくとも1つを含んでなる、(a)該ペプチドをコードしている核酸および／または(b)試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法に使用する試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アミノペプチダーゼB活性をもつペプチドおよびそれをコードする遺伝子に関し、詳しくはラットのアミノペプチダーゼBと高い相同性を示すヒトのアミノペプチダーゼBに関する。

【0002】

【従来の技術】アミノペプチダーゼB(以下APBと略称することもある)は、ペプチドのN末端がアルギニン(Arg)および／またはリジン(Lys)の時に、該Argおよび／またはLys残基を特異的に切断するZn²⁺依存性のエキソペプチダーゼであり、主にラット細胞を用いた研究でその機能解析が進められてきた。ラットのアミノペプチダーゼBは、炎症やアレルギー反応等の伝達物質であるロイコトリエンA4(Leukotriene A4)の加水分解酵素と類似したモチーフを有しており、細胞膜内に存在し、細胞外にも分泌される蛋白質であることが知られている(The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 31, 747-750, 1999)。APBが作用する合成基質としては、Arg-Leu-エンケファリン(enkephalin)、Arg-Met-enkephalin、Arg-Lys-ソマトスタチン(somatostatin)等が知られている。また、ラットAPBは、大脳皮質、副睾丸、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、筋肉、脾臓等の多種の臓器でその存在が認められている。このようにラットのAPBについてはその役割が解明されつつあったが、この酵素のヒト・ホモログ(homologue)についての報告はなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題のひとつは、ヒト・アミノペプチダーゼB(APB)を見出し提供することである。また本発明の別の課題は、ヒトAPBの生体における役割を明確化し、その機能または生理学的作用を制御することによる疾病診断手段および医薬用組成物を提供しようとするものである。

【0004】

【課題解決のための手段】上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、ヒトAPB遺伝子および蛋白質を得ることに成功した。より具体的には、GenBankのヒトcDNAライブラリーからラットAPB遺伝子とのホモロジー検索を行って選出した遺伝子の全長を決定し、該遺伝子を大腸菌発現系で発現させて該遺伝子がコードする蛋白質を得た。さらに、得られた蛋白質がAPBであることを、合成基質を用いた酵素活性の確認およびAPB阻害剤であるピューロマイシン(puromycin)による酵素活性阻害により初めて確認するとともに、該蛋白質の機能または生理学的作用を制御することによる疾病診断手段および医薬用組成物を提供することによって本発明を完成した。

【0005】すなわち本発明は、(1)下記の群より選ばれるアミノペプチダーゼB活性を有するペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

②前記①のペプチドを含有するペプチド、および

③前記①のペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、

(2)下記の群より選ばれるH-アルギニン-7-アミド-4-メチルクマリン・2塩酸を分解する活性を有するペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

②前記①のペプチドを含有するペプチド、および

③前記①のペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、

(3)前記(1)もしくは(2)のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(4)アミノペプチダーゼB活性、および／またはH-アルギニン-7-アミド-4-メチルクマリン・2塩酸を分解する活性を有するペプチドをコードする、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(5)前記(3)もしくは(4)のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、(6)前記(3)から(5)のいずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、(7)プラスミド pDONR201/APB#4、(8)プラスミド pDEST17/hAPB#1、(9)前記(6)の組換えベクターまたは前記(7)もしくは(8)のプラスミドで形質転換された形質転換体、(10)前記(9)の形質転換体を培養する工程を含む、前記(1)または(2)のペプチドの製造方法、(11)前記(1)もしくは(2)のペプチドを免疫学的に認識する抗体、(12)前記(11)の抗体であって、アミノペプチダーゼB活性を抑制する抗体、(13)前記(1)もしくは(2)のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、および／または前記(3)から(5)のいずれかの

ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、前記（１）もしくは（２）のペプチド、前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチド、前記（６）のベクター、前記（７）もしくは（８）のプラスミド、前記（９）の形質転換体、または前記（１１）もしくは（１２）の抗体のうちの、少なくともいずれか一つを用いることを特徴とするスクリーニング方法、（１４）前記（１）もしくは（２）のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、および／または前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、化合物が該ペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ペプチドの活性または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する方法、（１５）前記（１）もしくは（２）のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、および／または前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、前記（９）の形質転換体と化合物とを接触させ、前記（１）もしくは（２）のペプチドの発現の有無を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、化合物が前記（１）もしくは（２）のペプチドの発現を促進または阻害するかどうかを決定する方法、（１６）前記（１３）から（１５）のいずれかの方法によって得られた化合物、（１７）前記（１）もしくは（２）のペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは促進する化合物、または前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物、（１８）前記（１）もしくは（２）のペプチド、前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチド、前記（６）のベクター、前記（７）もしくは（８）のプラスミド、前記（９）の形質転換体、前記（１１）もしくは（１２）の抗体、または前記（１６）もしくは（１７）の化合物のうちの、少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする医薬組成物、（１９）前記（１）もしくは（２）のペプチド、前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチド、前記（６）のベクター、前記（７）もしくは（８）のプラスミド、前記（９）の形質転換体、前記（１１）もしくは（１２）の抗体、または前記（１６）もしくは（１７）の化合物のうちの、少なくともいずれか一つを含有すること

を特徴とする抗炎症剤、（２０）前記（１）もしくは（２）のペプチドの発現または活性に関連した炎症性疾患の診断のための測定方法であって、（ａ）該ペプチドをコードしている核酸および／または（ｂ）試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法、（２１）前記（１）もしくは（２）のペプチド、前記（３）から（５）のいずれかのポリヌクレオチド、または前記（１１）もしくは（１２）の抗体のうちの、少なくとも１つを含んでなる、（ａ）該ペプチドをコードしている核酸および／または（ｂ）試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む測定方法に使用する試薬キット、からなる。

【０００６】

【発明の実施の形態】（ヒトAPB）本発明において提供されるヒトAPBは、ヒトcDNAライブラリー（GenBank）からラットAPBとのホモロジー検索を行って選出したもの（AK026644；Kat11853）について、その全長cDNAを決定して得た遺伝子がコードするペプチドである。該遺伝子は、ラットのAPBと高い相同性を示し、その遺伝子産物はアミノペプチダーゼB活性を有し、合成基質H-アルギニン-7-アミド-4-メチルクマリン・2塩酸（H-Arg-AMC・2HCl）を分解できる。また、該遺伝子産物は650残基のアミノ酸からなり、322番目のバリン（Val）から331番目のトリプトファン（Trp）に亜鉛金属プロテアーゼ（zinc metalloprotease）モチーフを有していた。これらのことから、本発明で取得した遺伝子は新規な亜鉛金属ペプチダーゼをコードしていることが確認された。また、該遺伝子産物の325番目のヒスチジン（His）から348番目のグルタミン酸（Glu）には、ラットAPBと同様に、ロイコトリエンA4加水分解酵素と類似するモチーフが存在することが判明した。以下、この遺伝子をAPB遺伝子と呼び、その遺伝子産物をAPBと呼ぶ。

【０００７】前記APB遺伝子の塩基配列は2001年3月にGenBankに開示されているもの（アクセッション番号：BC001064）と同一であり、その推定アミノ酸配列は2000年12月にNational Institutes of Health, Mammalian Gene Collectionにより公知となっている（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/AAH01064>）。しかし、それらは単に塩基配列もしくは推定アミノ酸配列を開示するのみであり、その機能や有用性等に関する開示や示唆は一切なかった。

【０００８】（ペプチド）本発明は、上記APBおよびその由来物であるペプチドを提供する。ここで、ペプチドとはアミノ酸が2分子以上ペプチド結合で連結した物質を意味し、蛋白質、ポリペプチド、オリゴペプチド等を包含する。

【0009】本発明に係るAPBは、上記APB遺伝子がコードするペプチドであり、該遺伝子を大腸菌等の細胞で発現させて得られたペプチドである。該ペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであり得る。また、本発明に係るペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有するペプチドであってもよい。

【0010】また、本発明に係るペプチドは配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドと、アミノ酸配列上で約40%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%、特に好ましくは約95%以上の相同性を有し、かつ少なくともAPB活性および／または合成基質 $H-Arg-AMC \cdot 2HCl$ を分解する活性を有するペプチドであってもよい。アミノ酸配列の相同性を決定する方法は自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等を挙げることができる。本発明に係るペプチドは、相同性をもつペプチドから、少なくともAPB活性および／または合成基質 $H-Arg-AMC \cdot 2HCl$ を分解する活性を指標にして選別することができる (Neuroscience Research 9, 73-81, 1991)。

【0011】さらに、上記ペプチドを基にして、少なくともAPB活性および／または合成基質 $H-Arg-AMC \cdot 2HCl$ を分解する活性を指標とすることにより、1個以上、例えば1~100個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に好ましくは1個ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドも提供される。欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法 (PCR) 等を、単独または適宜組み合わせ、例えばサ姆ブルック等編 [モレキュラークロニング, アラボラトリーマニュアル 第2版] コールドスプリングハーバーラボラトリー, 1989、村松正實編 [ラボマニュアル遺伝子工学] 丸善株式会社, 1988、エールリッヒ, HE. 編 [PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用] ストックトンプレス, 1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術 (Science, 219, 666, 1983) を利用することができる。

【0012】上記のような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質 (物性、活性、または免疫学的活性等) を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸 (極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミ

ノ酸、芳香族アミノ酸等) の間での相互置換は容易に想定される。

【0013】また、本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの部分配列を有するペプチドをも包含する。これらは例えば試薬、標準物質、免疫原等として利用できる。本発明に係るペプチドは、最小単位として、4~8個以上のアミノ酸、好ましくは10個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸からなるものであり、好ましくは免疫学的に認識され得るペプチド、例えばエピトープペプチドである。

【0014】本発明に係るペプチドは、試薬、標準物質、または後述するようにAPBに特異的な抗体を作製するための抗原として単独またはキャリア (例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン等) と結合して使用できる。これらのように別種の蛋白質または物質を結合したペプチドも本発明の範囲に包含される。

【0015】本発明においては、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドと同様のAPB酵素活性を有するペプチドまたはその最小活性単位 (領域もしくはドメイン) も提供されるが、それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したペプチドが提供される。これらは、例えばAPB活性様物質もしくはAPB拮抗物質として、またはAPB活性を調節する物質のスクリーニング等において有用である。

【0016】さらに、本発明に係るペプチドの検出または精製を容易にするために、あるいは別の機能を付加するために、N末端側やC末端側に別のペプチド、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、またはFLAG-tag等のペプチドを、直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易であり、これらの別の物質を結合したペプチド等も本発明の範囲に包含される。

【0017】(ポリヌクレオチド) 本発明は、上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖を提供する。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖であり得る。好ましくは、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

【0018】さらに本発明は、上記ポリヌクレオチドまたはその相補鎖、好ましくは配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサ姆ブルック等編 [モレキュラークロニング, アラボラトリーマニュアル 第

2版] コールドスプリングハーバーラボラトリー, (1989) 等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖に対する相同性において、少なくとも約40%、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上10の相同性を示すポリヌクレオチドでありうる。また本発明に係るポリヌクレオチドは、指定された塩基配列の領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびその相補鎖を包含する。

【0019】これらのポリヌクレオチドは、本発明に係るペプチド等の製造において有用である。さらに、APBをコードする核酸、例えば、その遺伝子もしくはmRNAの検出のためのプローブもしくはプライマーとして、または遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として有用である。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドによってAPBの発現を特異的に阻害するためには、APBに固有な領域の塩基配列を用いることが好ましい。

【0020】またここで、APBまたは同様の活性を有するペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性、少なくともAPB活性および／または合成基質H-Ar g-AMC・2HC l を分解する活性を指標にして選別することにより行うことができる。蛋白質発現系としては、例えば無細胞蛋白質発現系を利用でき、小麦胚芽、家兔網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる(Nature, 179, 160~161, 1957)。

【0021】(組換えベクター) 上記ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組み込むことにより、組換えベクターを得ることができる。使用するベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。ベクターDNAは、宿主の種類により選択され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等、とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製される。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適当な制限酵素を選

択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。

【0022】本発明においては、ベクターDNAとしてプラスミドDNAを用い、後述する実施例中に示すように、上記APB遺伝子を含むプラスミドである、プラスミドpDONR201/APB#4およびプラスミドpDEST17/hAPB#1を作製した。

【0023】(形質転換体) 本発明では、上記ポリヌクレオチドをベクターDNAに組み込んで得られた組換えベクターを用いて、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、または動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術により、本発明に係るAPBならびにその由来物からなるペプチドを提供可能である。

【0024】形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、またはウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。本発明の具体例においては、宿主として大腸菌を利用し、上記プラスミドにより形質転換体を得たが、無論これに限定されるものではない。

【0025】形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、形質転換体により発現されるAPBまたはその由来物からなるペプチドの活性、特に少なくともAPB活性および／または合成基質H-Ar g-AMC・2HC l を分解する活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

【0026】(APBおよびその由来物の回収) 上記形質転換体を培養した培地からのAPBまたはその由来物からなるペプチドの回収は、少なくともAPB活性および／または合成基質H-Ar g-AMC・2HC l を分解する活性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせるか、溶解度差に基づく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。好ましくは、回収しようとするペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに対する抗体を作成し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【0027】(抗体) 抗体は、本発明に係るAPBまたはその由来物からなるペプチドを抗原として用いて作製する。抗原はAPB自体でもまたはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。APBに特異的な抗体を作製するためには、該APBに固有なアミノ酸配列からな

る領域を用いることが好ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的にAPBまたはその由来物からなるペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

【0028】抗体を産生するためには、自体公知の抗体10 作製法を利用できる。例えば、本発明に係るAPBまたはその由来物からなるペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で単独または担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこななければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

【0029】ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施20 された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

【0030】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3X63Ag8株等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作30 成してこれをクローン化し、上記APBを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

【0031】かくして得られた、APBまたはその由来物であるペプチドを認識し結合しうるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、本発明に係るペプチドの精製用抗体、試薬、または標識マーカー等として利用できる。特にAPBの活性を抑制し得る抗体、例えばAPBの酵素活性を抑制しうる抗体は、本発明からなるAPB40 の活性を調節するために使用でき、そのためAPBが関連する疾患、例えば炎症やアレルギー疾患等、の治療・予防のために有用である。

【0032】（スクリーニング）本発明に係るAPBまたはその由来物からなるペプチド、上記ポリヌクレオチドおよびその相補鎖、上記ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、上記プラスミド、ならびに上記APBまたはその由来物からなるペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組み合わせることによって、上記APBまたはその由来物からなるペプチドに対する活性50

阻害剤または活性促進剤のスクリーニングに有効な手段を提供する。例えば、上記ペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調節剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。

【0033】例えば、本発明に係るAPBまたはその由来物からなるペプチドとスクリーニングされる化合物との間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下でこれらペプチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、上記APBまたはその由来物からなるペプチドの活性を促進または阻害する化合物を同定可能である。具体的には、例えば、上記APBとスクリーニングされる化合物とを接触させ、該APBの酵素活性を定量することにより、該APBを阻害もしくは促進する化合物を同定できる。APBの酵素活性は、簡便には、合成基質 $\text{H-Arg-AMC} \cdot 2\text{HCl}$ の分解を指標として、分解により生じるAMCの蛍光強度を測定することにより定量できる。上記検出のためのシグナルとしては、蛍光に限らず、APBの活性または生理学的作用を検出しうるものであればよい。実際に、APBを阻害する化合物としてピューロマイシン（puromycin）が同定された（実施例5）。

【0034】また、本発明に係るAPBまたはその由来物からなるペプチドをコードしているポリヌクレオチドとスクリーニングされる化合物との間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下でこれらポリヌクレオチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在もしくは不存在または変化を検出することにより、これらポリヌクレオチドに結合し得る化合物を同定可能である。得られた化合物から、さらに形質転換体を用いた下記の方法により、これらポリヌクレオチドの発現を阻害し得る化合物を同定可能である。

【0035】さらにまた、本発明に係る形質転換体を用いて、スクリーニングされる化合物または上記得られた化合物とを適当な条件下で接触させ、本発明に係るAPBの発現の有無または変化を検出することにより、該APBの発現を阻害または促進し得る化合物を同定可能である。APBの発現の有無または変化を検出するには、簡便には、発現されるAPBの酵素活性を、例えば合成基質 $\text{H-Arg-AMC} \cdot 2\text{HCl}$ の分解を指標として、分解により生じるAMCの蛍光シグナルを測定する。また、APBの発現の有無または変化を検出するために、検出のためのシグナルもしくはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルもしくはマーカーの存在もしくは不存在または変化を検出してもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に

検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼやグリーン蛍光蛋白質（GFP）など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子など、または検出用のタグ、例えば6×Hisタグなど、公知のものが利用できる。これらのシグナルまたはマーカーを組み込んだベクターを作成し、該ベクターを形質転換体に導入すればよい。また、これらのシグナルまたはマーカーの検出方法は、当業者には周知のものである。

【0036】（化合物）上記手段で得られた化合物は、本発明に係るAPBまたはその由来物からなるペプチドに関する活性阻害剤、活性拮抗剤、または活性促進剤の候補化合物として利用可能である。本発明に係るAPBの活性を阻害する化合物として、ピューロマイシン等を例示することができる。また、遺伝子レベルでの上記APBまたはその由来物に対する発現阻害剤または発現促進剤の候補化合物としても利用可能である。これらの候補化合物は、上記APBの発現や活性の増加、減少または欠失等に関連する各種病的症状、例えば炎症やアレルギー疾患等、の予防・治療効果が期待できる。

【0037】（医薬組成物）かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。また本発明からなるAPBまたはその由来物からなるペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドおよびその相補鎖、本発明に係るポリヌクレオチドを含有するベクター、本発明に係るプラスミド、ならびにAPBまたはその由来物からなるペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体が、診断マーカーや試薬等の疾病診断手段として、あるいはAPBの活性および／または発現を阻害、拮抗、または促進する機能を利用した治療薬等（阻害剤、拮抗剤、促進剤等）の医薬手段として使用することができる。すなわち本発明は、これらを単独または複数組み合わせる利用することによって、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0038】本発明に係るヒトAPBの発現およびその活性が過剰な場合、有効量の上記阻害剤を医薬上許容される担体とともに対象に投与して、当該APBの活性を阻害し、そのことにより異常な症状を改善することができる。さらに、発現ブロック法を用いて内在性の上記APBをコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成させた、あるいは別個に投与された当該遺伝子のアンチセンス配列を使用して当該遺伝子の発現を阻害できる。これらのオリゴヌクレオチドは、上記本発明に係るポリヌクレオチドを基にして設計し合成できる。当該オリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインビボで発現させる

こともできる。

【0039】本発明に係るAPBには、ラットAPBと同様に、ロイコトリエンA4加水分解酵素と類似するモチーフが存在しており、特に炎症やアレルギー疾患等に関連するものと考えられる。従って、上記阻害剤または拮抗剤は、抗炎症作用を有するものとして有用である。

【0040】また、本発明に係るAPBの発現およびその活性の減少や欠失等に関連する異常な症状の治療には、1つの方法として当該APB自体あるいはAPBをコードする遺伝子を活性化する治療上有効量の促進剤を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な症状を改善することの特徴とする方法が挙げられる。あるいは、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞内で当該APBを生成せしめてもよい。上記ポリヌクレオチドを利用した遺伝子治療は、公知の方法が利用できる。例えば、上記のごとく本発明に係るポリヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作製して遺伝子治療に利用すればよい。また、遺伝子治療において、治療に使用する蛋白質を対象中において生成させることもできる。例えば、当該蛋白質をコードしているDNAまたはRNAを用いて、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエクスピボ（*ex vivo*）において対象由来の細胞を処理し、次いで、細胞を対象に導入することもできる。

【0041】（診断のための測定方法および試薬）本発明に係るAPBおよびその由来物からなるペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、ならびに当該APBおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用可能である。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチドまたはポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0042】本発明に係るAPBおよびその由来物からなるペプチドの発現または活性に関連した疾患の診断手段は、例えば当該APBをコードしている核酸との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在量を決定すること、および／または当該APBについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該APBの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。詳しくは、本発明に係るヒトAPBを診断マーカーとして検定するのである。試料中の当該APBの検出またはその存在量の決定に用いることができる測定法は当業者に周知である。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等がある。また、本発明に係るヒトAPBをコードするポリヌクレオ

チドの検出法および定量法としては、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロットイングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いてRNAレベルで測定することができる。

【0043】測定される試料として、個体由来の細胞、例えば血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等を挙げることができる。また、測定される核酸は、上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRもしくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを標識した上記APBをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定することができる。

【0044】上記測定により本発明に係るAPBおよび該APBをコードするDNAの変異、減少、増加を検出することにより、当該APBが関連する疾患、例えば、炎症やアレルギー疾患等の診断が可能となる。

【0045】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0046】

【実施例1】ヒトAPBの同定

GenBankのヒトcDNAライブラリーから、バイオインフォマティクス(bioinformatics)によるラットAPBとのホモロジー検索を行い、該モチーフを有するcDNA(アクセッション番号AK026644; Kat11853)を選出した。該cDNAはN末端側の一部が欠失していると考えられたため、その全長cDNAを決定するために、ゲノムDNAのデータベースを基にN末端側の配列を予想し、PCRに用いる下記のプライマー(表1)を設計してRT-PCR法により欠失している部分をクローニングした(図1)。

【0047】

【表1】

(Mix2)

10× Expand HF buffer	5 μl
Expand HF (3.5U/ml)	0.8 μl
H ₂ O	19.2 μl
	25 μl

【0052】

(センスプライマー)

Pr-KAT-S01 5'-GCCATGGTTAGCGGCGAGCA-3'

Pr-KAT-S03 5'-CGCTCCTTGGCAGATGTCAT-3'

Pr-KAT-S05 5'-GAAGCCCTTCGTGTACACCC-3'

Pr-KAT-S07 5'-CCGTGACGGCTCTGCGGCCATGG-3'

Pr-KAT-S09 5'-CTGTGACGAGGAGTACAACGGGG-3'

(アンチセンスプライマー)

Pr-KAT-AS02 5'-ATGACATCTGCCAAGGAGCG-3'

Pr-KAT-AS04 5'-CTAACTGCCCTTGGGTGCCA-3'

Pr-KAT-AS06 5'-ACAGCTGTGAAGCCATCTGG-3'

Pr-KAT-AS08 5'-GAGGATCCGGTTTAGACAGCCTG-3'

Pr-KAT-AS10 5'-TGGGATCCTGATCCTGATACCC-3'

*【0048】(逆転写反応:cDNA化)まず、ヒト脳由来mRNAを鋳型としてGIBCO BRL社のSUPERSCRIPT IIキットを使用して逆転写反応を行った。オリゴ(dT₁₂₋₁₈)プライマー[oligo(dT₁₂₋₁₈) primer](0.5 μg/μl)1 μlあるいはランダムプライマー(random primer)(50 ng/μl)1 μl、ヒト脳由来mRNA(1 μg/μl)0.2 μl、H₂O 10.8 μlを混合し、70℃で10分間加熱して氷冷後、5× First Strand buffer 4 μl、0.1M SUPERSCRIPT II 2 μl、10mM dNTP Mix 1 μlを添加した。続いてSUPERSCRIPT II(200U/μl)を1 μl添加して室温で10分間、42℃で50分間、70℃で15分間反応を行い、ヒト脳由来mRNAからcDNAを調製した。

【0049】(PCR反応)PCR反応はベーリンガー社 Expand High Fidelity PCR Systemを使用して行った。各プライマーの組み合わせで、以下に示すMix1とMix2のそれぞれ25 μlを混合し、下記条件でPCR反応を行った。

【0050】
(Mix1)

dNTP Mix (各1.25mM)	5 μl
センスプライマー	20 pmol
アンチセンスプライマー	20 pmol
cDNA	2 μl
H ₂ O	X μl
	25 μl

【0051】

PCR運転条件

《Pr-KAT-S05とPr-KAT-AS02の組み合わせ、Pr-KAT

-S09とPr-KAT-AS10の組み合わせの時》

プレ (pre)	95℃	3分間
1	95℃	30秒間
2	56℃	30秒間
3	72℃	1分間

(ステップ1-3は10サイクル)

4	95℃	30秒間
5	62℃	30秒間
6	72℃	1分間

【0053】

(ステップ4-6は25サイクル)

《Pr-KAT-S03とPr-KAT-AS04の組み合わせの時》

プレ (pre)	94℃	3分間
1	94℃	30秒間
2	56℃	30秒間
3	72℃	2分間

(ステップ1-3は30サイクル)

18

【0054】 (サブクローニング) (アガロースゲル) を用いて得られたcDNAを鋳型とし、Pr-KAT-S05とPr-KAT-AS02の組み合わせ、またはPr-KAT-S09とPr-KAT-AS10の組み合わせを用いて得られたPCR産物を電気泳動(1%アガロースゲル)により精製した。その後、得られた各PCR産物をTaKaRa社のBKLキットを用いて平滑末端化およびリン酸化処理した。PCR反応液 2μl、10× Blunting Kination buffer 2μl、Blunting Kination Enzyme Mix 1μl、H₂O 15μlを37℃で10分間反応させた後、micropure-EZフィルターカップにアプライし、15000rpmで30秒間遠心処理した。通過したPCR産物の一部をpBluescript (KS-) ベクター (SmaI消化後BAP処理) とライゲーションし、コンピテントセル (JM109) にトランスフォーメーションした。オリゴ (dT₁₂₋₁₈) プライマーを用いて得られたcDNAを鋳型とし、Pr-KAT-S03とPr-KAT-AS04の組み合わせを使用して得られたPCR産物はpBluescript (SK-) ベクターを用いて前記同様に処理し、コンピテントセル (JM109) にトランスフォーメーションした。トランスフォーメーション後、大腸菌コロニーについてPCR (パーキンエルマー社 Ampli-Taq使用) によりインサート (PCR産物) の有無および方向を確認し、塩基配列の確認を行った。

【0055】 (cDNAライブラリー・スクリーニング) 5'側領域のサブクローニングについては、データ

3分間ス上で予想した領域の一部を除き、前記ヒト脳由来mRNAより行ったRT-PCRではクローニングできなかった。この領域はGCリッチであるため増幅されにくいと考えられた。そこで前記サブクローニングしたクローンのうちKat11853の3'側約600bpをプローブとしてヒト脳由来cDNAライブラリーよりハイブリダイゼーションを行った。

【0056】 (5'側領域のサブクローニング) ヒト脳由来cDNAライブラリーを鋳型として直接PCRでクローニングを行った。CLONTECH社 Advantage-GC cDNA PCR Kitを用い、最初にPr-λgt11-S1とPr-KAT-AS06の組み合わせでPCRを行った。続いてそのPCR反応液を鋳型としてPr-KAT-S07とPr-KAT-AS06の組み合わせ、またはPr-KAT-S07とPr-KAT-AS08の組み合わせでPCRを行った (図2)。

【0057】 PCR産物を電気泳動(1%アガロースゲル)により精製した。その後得られたPCR産物をTaKaRa社のBKLキットを用い平滑末端化およびリン酸化処理した。PCR反応液 5μl、10× Blunting Kination buffer 2μl、Blunting Kination Enzyme Mix 1μl、H₂O 10μlを混合して37℃で10分間反応させた後、micropure-EZフィルターカップに添加し、15000rpmで30秒間遠心処理した。通過したPCR産物の一部をpBluescript (SK-) ベクター (SmaI消化後BAP処理) とライゲーションし、その後該ベクターをコ

ンピテントセル (JM109) に形質転換 (transformation) した。形質転換後の大腸菌コロニーについてPCR (パーキンエルマー社 AmpliTaq 使用) によりインサート (PCR産物) の有無および方向を確認し、塩基配列の確認を行った。

【0058】 (全長cDNAの構築) ヒト脳由来cDNAライブラリーよりPr-KAT-S07とPr-KAT-AS08の組み合わせで行ったPCRでサブクローニングしたpBS/APB (7-8) #19と、前記RT-PCRでサブクローニングした領域 (3クローン) 10をつなぎ合せて全長cDNA [pBS/APB (7-4) #1] を構築した (図3)。

【0059】 (ヒトAPBの同定) ヒトAPBは650残基のアミノ酸からなり322番目のValから331番目のTrpに亜鉛金属プロテアーゼモチーフを有していた。発現に用いたヒトAPBはゲノムDNAのデータベースおよびGenBankの塩基配列と比較すると数塩基異なっていた。5、6番目のTTがCG (Val→*

〈センスプライマー〉

Pr-DkS03

5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCGAGCGGCGAGCAT-3'

〈アンチセンスプライマー〉

Pr-DONRkat-AS02

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAACTGCCCTTGGGTGCC-3'

【0062】 次にPCR産物をTE-bufferで200μlとし30%PEG8000/30mM MgCl₂を100μl添加し、室温で遠心処理 (15000rpmで10分間) した後、ペレットを70%エタノールで洗浄して乾燥し、TE-buffer 10μlに溶解した。その後PCR産物1μl、エンタリーベクタ 30ー (pDONR201:150ng/μl) 0.5μl、BP clonase reaction buffer 1μl、TE-buffer 1.5μlを氷上で混合 (合計4μl) し、BP clonase enzyme mix 1μlを添加後25℃で1時間反応させた。反応後、proteinase K 0.5μlを添加し、37℃で10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1μlをコンピテントセル (JM109) に形質転換し、サブクロー 40ニングした後pDONR201/APB#1およびpDONR201/APB#3を得た。

【0063】 (エンタリーベクターの構築) (2) pDONR201/APB#1のAPB翻訳領域のシークエンスを行ったところ、1748番目のAがGに変異していた。pDONR201/APB#3について、pDONR201/APB#1で変異が確認された箇所前後のシークエンスを行ったところ、変異は確認されなかったため、PvuI (エンタリーベクター内制限酵素部位) およびEcoRV消化により変異部分を除去したpDONR201/APB#1に、pDONR201/A 50

*Ala)、866番目のCがT (Pro→Leu)、1337番目のGがA (Arg→Lys)、1428番目のCがT (Gly→Gly) となっていたがPCRによる変異ではないと考えられた。塩基配列を配列表の配列番号2に示した。

【0060】

【実施例2】 大腸菌発現ベクターの構築 (エンタリーベクターの構築) (1)

実施例1で得られた全長cDNAの大腸菌での発現ベクターおよび発現系の構築をSTRATAGENE社 Gateway System Kitを用いて行った。pBS/APB (7-4) #1を鋳型とし、CLONTECH社 Advantage-GC cDNA PCR Kitにより、下記に示すプライマー (表2) を用いて目的遺伝子の蛋白質翻訳領域の増幅を行った。

【0061】

【表2】

PB#3からPvuIおよびEcoRV消化により得た約2kbp断片を結合し、新たにpDONR201/APB#4を構築した (図4)。

【0064】 (発現ベクターの構築) pDONR201/APB#4を用い、6×Hisタグとの融合蛋白質として発現するベクターを構築した。pDONR201/APB#4 (50ng/μl) 1μl、6×Hisタグ発現ベクター (pDEST17:150ng/μl) 0.5μl、LR clonase reaction buffer 1μl、TE-buffer 1.5μlを氷上で混合 (合計4μl) し、LR clonase enzyme mix 1μlを添加後25℃で1時間反応させた。反応後proteinase K 0.5μlを添加し、37℃で10分間インキュベーションして酵素ミックスを失活させた。この反応液1μlをコンピテントセル (BL21-SI) に形質転換させ、発現ベクター (pDEST17/hAPB#1) を得た (図5)。

【0065】

【実施例3】 (大腸菌発現系の構築) pDEST17/hAPB#1についてNaClによる目的蛋白質の産生誘導について検討した。大腸菌 (BL21-SI) をLB-Amp [NaCl (-)] 10mlで37℃にて一晚培養した。この前培養液を6ml添加したLB-Amp [NaCl (-)] 合計66mlでOD₆₀₀が1.0前後となるまで37℃で2.5時間本培養した。得ら

れた培養液を31mlずつに分注し、その一方に5M NaClを1.86ml添加(終濃度0.3M)し、さらに37℃で3時間培養した。またネガティブコントロールとしてH₂Oを1.86ml添加し同様に培養した。培養後、各培養液(10mlまたは1.5ml)を遠心処理し集菌した。

【0066】得られた大腸菌ペレット(培養液1.5ml分)を2% SDS/20mM Tris (pH7.4) 300ml にけん濁し、超音波処理後に遠心処理(15000rpmで10分間、10℃)した。遠心処理上清を2-メルカプトエタノールを含む2× サンプルバッファー(2% SDS/50mM Tris (pH8.0)/30% グリセロール/0.01% ブロモフェノールブルー)と等量ずつ混合し、煮沸(boiling)2分間後、5-20% ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行った。

【0067】その結果、実施例1で得られた全長cDNAがコードする蛋白質と6×Hisタグとの融合蛋白質と考えられる約74kDのバンドが検出された。またコントロール実験として同様に他系統のプロテアーゼであるユビキチン特異プロテアーゼ(USP)についても検討し産生誘導を示した(図6)。

【0068】

【実施例4】酵素活性の検討: *Neuroscience Research Communications* 9, 73-81, 1991

(試料の調整) 実施例3と同様の方法で得た大腸菌ペレット(培養液10ml分)を50mM NaPO₄ (pH6.5)/150mM NaCl 1ml にけん濁し、超音波処理後に遠心処理(15000rpmで10分間、4℃)した。遠心処理後の大腸菌粗抽出液(crude extract)を用い、総蛋白質量の定量を行った。定量にはPIERCE社のBCA assay キットを用いた。検量線はウシ血清アルブミン(BSA)(H₂O中2mg/ml)を用い、1mg/mlよりH₂Oで倍々希釈(7段階)した標準液より作製した。抽出液は原液よりH₂Oで倍々希釈(8段階)した。標準液および希釈した各抽出液を96穴プレートに50μl/ウエルずつ分注し、試薬Aと試薬Bを50:1の割合で混合し、それを200μl/ウエルずつ分注し混合、37℃で30分間反応させてOD₅₅₀を測定した。検量線より各抽出液の総蛋白質量を算出した。遠心処理上清の一部を2-メルカプトエタノールを含む2× サンプルバッファー(2% SDS/50mM Tris (pH8.0)/30% グリセロール/0.01% ブロモフェノールブルー)と等量ずつ混合して2分間煮沸後、5-20%ポリアクリルアミドゲルにて泳動した。その後ウェスタンブロッティングを行い可溶性画分での目的蛋白質の存在について検討した。PVDFメンブレンを100% メタノールで15秒間、H₂O

で2分間振とう前処理し、泳動したゲルからセミドライ法で100mAにて1時間転写した。転写後、PVDFメンブレンを3% BSAを含むTBS-T(10mM Tris (pH7.5)/150mM NaCl/0.05% Tween20)で室温1時間ブロッキングし、抗Hisタグ抗体(Penta-His mouse IgG:0.2mg/ml)を3% BSA/TBS-Tで2000倍希釈して加え、室温で1時間反応させた。反応後にPVDFメンブレンをTBS-Tで10分間洗浄することを3回繰り返し、次いで二次抗体(HRP-anti mouse IgG)を10% スキムミルク/TBS-Tで3000倍希釈して加え、室温で1時間反応させた。反応後にPVDFメンブレンをTBS-Tで10分間3回洗浄した。その後Enhanced ChemiLuminescence (ECL) キットおよびHyper filmを用いてシグナルを検出し、試料とした。コントロール実験として脱ユビキチン活性が認められたUSP(pDEST17/USP#5)についても同様に誘導後3時間のSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングを行った(図7)。

【0069】前記の通り蛋白質補正して調製した大腸菌粗抽出液(50mM NaPO₄ (pH6.5)/150mM NaCl抽出液)を用い、酵素活性について検討を行った。各抽出液を総蛋白質量1.5mg/mlとなるように50mM NaPO₄ (pH6.5)/150mM NaClで希釈し、これを原液として倍々希釈(7段階)し、96穴プレートに100μl/ウエルずつ分注した。合成基質H-Arg-AMC・2HCl (BACHEM社)を75.4mMとなるよう80%酢酸に溶解した後にさらに50mM NaPO₄ (pH6.5)/150mM NaClで300倍希釈(0.25mM)し、100μl/ウエルずつ分注して混合し、37℃で30分間反応させた。反応後、蛍光強度を励起波長(excitation)360±10nm/放出波長(emission)460±10nmにて測定した。その結果、NaClによる誘導を行った大腸菌粗抽出液は高い酵素活性を示したが、未誘導のものでは酵素活性がほとんど認められなかった(図8)。

【0070】

【実施例5】活性阻害の検討: *Neuroscience Research Communications* 9, 73-81, 1991

阻害剤(ピューロマイシン)を用い酵素活性について検討した。各大腸菌抽出液を総蛋白質量0.6mg/mlとなるように50mM NaPO₄ (pH6.5)/150mM NaClで希釈し、これを原液として倍々希釈(7段階)し、96穴プレートに100μl/ウエルずつ分注した。さらに0.8mM ピューロマイシンを含む合成基質H-Arg-AMC・2HCl(0.25

mM)を100 μ l／ウェルずつ分注して混合し、37℃で30分間反応させた。反応後、蛍光強度を励起波長360 $\pm$ 10nm／放出波長460 $\pm$ 10nmで測定した。その結果、総蛋白質濃度が37.5 μ g/mlの場合、酵素活性は約80%阻害された(図9)。以上のことからここで同定したAPBは酵素活性を有していることが認められた。

【0071】

【実施例6】(ノーザンブロッティング)本遺伝子について各臓器での発現パターンについてノーザンブロッティングを行い検討した。プローブのラベリングにはアマシャムファルマシア社 AlkPhos Direct、シグナルの検出には同社 CDP-Starを使用した。DNA断片(pBS/APB(7-4)#1 $\rightarrow$ BamHI、PstI消化：目的遺伝子全長約2kbp)をH₂Oで10ng/ μ lに希釈し、その10 μ lを熱変性(95℃で5分間)させて水中で急冷した。その後、反応バッファー10 μ l、ラベリング・バッファー2 μ l、クロスリンカー溶液(cross-linker solution 1:H₂O 4)10 μ lを添加して混合し、37℃で30分間反応させた。メンブレン(CLONTECH社 Human multi tissue northern blot)をキット(AlkPhos Direct)付属のハイブリダイゼーション・バッファーで55℃にて45分間プレハイブリダイゼーションした。続いて、ラベリングしたプローブの全量を、ハイブリダイゼーション・バッファー13mlに混合し55℃で一晩ハイブリダイゼーションさせた。その後、一次洗浄バッファーにより55℃での10分間の洗浄を2回行い、次に二次洗浄バッファーで室温にて5分間の洗浄を2回行った。洗浄後、検出試薬50 μ lを添加して室温で5分間反応させた後ラップで覆*

*いX線フィルム(X-ray film)(フジフィルム)に一晩露光した。露光後にフィルムを現像した。

【0072】その結果、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓で約5kbのバンドが検出された(図10)。臓器によってシグナルの強さが異なり骨格筋、腎臓、脾臓で強く認められた。

【0073】

【発明の効果】GenBankのヒトcDNAライブラリーより選出したクローン(AK026644; Kat11853)を基に全長cDNAを決定して得られた遺伝子はアミノペプチダーゼB活性を有する蛋白質をコードすることが確認できた。この遺伝子はラットAPBとアミノ酸で80%以上の相同性を示しており、ノーザンブロッティングの結果から各臓器での発現が認められ、その発現パターンについてもラットAPBと類似していた。ラットAPBは、炎症やアレルギー反応の伝達物質であるロイコトリエンA4の加水分解酵素と類似したモチーフを有しており、細胞膜内に存在し、細胞外にも分泌される蛋白質である。本発明に係る遺伝子にもロイコトリエンA4加水分解酵素と類似したモチーフが325番目のヒスチジンから348番目のグルタミン酸からなる領域に存在していた。したがって、本蛋白質(APB)は炎症の場で重要な役割を担っていることが示唆され、本蛋白質の酵素阻害薬が抗炎症薬となる可能性が強く示唆された。かくして、本発明に係るAPB、その由来物であるペプチド、ならびにこれらをコードするポリヌクレオチドは、APBに関連する疾病、例えば炎症やアレルギー疾患等、の予防・治療薬および／または診断手段として有用である。

【0074】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO
., LTD
<120> Aminopeptidase B
<130> NP01-1042
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 650
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Met Ala Ser Gly Glu His Ser Pro Gly Ser
Gly Ala Ala Arg Arg Pro
```

1

5

10

15

```
Leu His Ser Ala Gln Ala Val Asp Val Ala
```

Ala Phe Glu Leu Leu His Leu His Leu Asp			
Leu Arg Ala Glu Phe Gly			
35	40	45	
Pro Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ser Arg Gly			
Leu Ser Gly Thr Ala Val			
50	55	60	
Leu Asp Leu Arg Cys Leu Glu Pro Glu Gly			
Ala Ala Glu Leu Arg Leu			
65	70	75	80
Asp Ser His Pro Cys Leu Glu Val Thr Ala			
Ala Ala Leu Arg Arg Glu			
85	90	95	
Arg Pro Gly Ser Glu Glu Pro Pro Ala Glu			
Pro Val Ser Phe Tyr Thr			
100	105	110	
Gln Pro Phe Ser His Tyr Gly Gln Ala Leu			
Cys Val Ser Phe Pro Gln			
115	120	125	
Pro Cys Arg Ala Ala Glu Arg Leu Gln Val			
Leu Leu Thr Tyr Arg Val			
130	135	140	
Gly Glu Gly Pro Gly Val Cys Trp Leu Ala			
Pro Glu Gln Thr Ala Gly			
145	150	155	1
60			
Lys Lys Lys Pro Phe Val Tyr Thr Gln Gly			
Gln Ala Val Leu Asn Arg			
165	170	175	
Ala Phe Phe Pro Cys Phe Asp Thr Pro Ala			
Val Lys Tyr Lys Tyr Ser			
180	185	190	
Ala Leu Ile Glu Val Pro Asp Gly Phe Thr			
Ala Val Met Ser Ala Ser			
195	200	205	
Thr Trp Glu Lys Arg Gly Pro Asn Lys Phe			
Phe Phe Gln Met Cys Gln			
210	215	220	
Pro Ile Pro Ser Tyr Leu Ile Ala Leu Ala			
Ile Gly Asp Leu Val Ser			
225	230	235	2
40			
Ala Glu Val Gly Pro Arg Ser Arg Val Trp			

Gln Phe Asp Ser Phe Leu Lys Ala Tyr Val			
His Glu Phe Lys Phe Arg			
435	440	445	
Ser Ile Leu Ala Asp Asp Phe Leu Asp Phe			
Tyr Leu Glu Tyr Phe Pro			
450	455	460	
Glu Leu Lys Lys Lys Arg Val Asp Ile Ile			
Pro Gly Phe Glu Phe Asp			
465	470	475	4
80			
Arg Trp Leu Asn Thr Pro Gly Trp Pro Pro			
Tyr Leu Pro Asp Leu Ser			
485	490	495	
Pro Gly Asp Ser Leu Met Lys Pro Ala Glu			
Glu Leu Ala Gln Leu Trp			
500	505	510	
Ala Ala Glu Glu Leu Asp Met Lys Ala Ile			
Glu Ala Val Ala Ile Ser			
515	520	525	
Pro Trp Lys Thr Tyr Gln Leu Val Tyr Phe			
Leu Asp Lys Ile Leu Gln			
530	535	540	
Lys Ser Pro Leu Pro Pro Gly Asn Val Lys			
Lys Leu Gly Asp Thr Tyr			
545	550	555	5
60			
Pro Ser Ile Ser Asn Ala Arg Asn Ala Glu			
Leu Arg Leu Arg Trp Gly			
565	570	575	
Gln Ile Val Leu Lys Asn Asp His Gln Glu			
Asp Phe Trp Lys Val Lys			
580	585	590	
Glu Phe Leu His Asn Gln Gly Lys Gln Lys			
Tyr Thr Leu Pro Leu Tyr			
595	600	605	
His Ala Met Met Gly Gly Ser Glu Val Ala			
Gln Thr Leu Ala Lys Glu			
610	615	620	
Thr Phe Ala Ser Thr Ala Ser Gln Leu His			
Ser Asn Val Val Asn Tyr			
625	630	635	6
40			
Val Gln Gln Ile Val Ala Pro Lys Gly Ser			

Leu Asp Leu Arg Cys Leu Glu Pro Glu Gly
 Ala Ala Glu Leu Arg Leu
 65 70 75 80

gac tcg cac ccg tgc ctg gag gtg acg gcg
 gcg gcg ctg cgg cgg gag 288
 Asp Ser His Pro Cys Leu Glu Val Thr Ala
 Ala Ala Leu Arg Arg Glu
 85 90 95
 cgg ccc ggc tcg gag gag ccg cct gcg gag
 ccc gtg agc ttc tac acg 336
 Arg Pro Gly Ser Glu Glu Pro Pro Ala Glu
 Pro Val Ser Phe Tyr Thr
 100 105 110

cag ccc ttc tcg cac tat ggc cag gcc ctg
 tgc gtg tcc ttc ccg cag 384
 Gln Pro Phe Ser His Tyr Gly Gln Ala Leu
 Cys Val Ser Phe Pro Gln
 115 120 125

ccc tgc cgc gcc gcc gag cgc ctc cag gtg
 ctg ctc acc tac cgc gtc 432
 Pro Cys Arg Ala Ala Glu Arg Leu Gln Val
 Leu Leu Thr Tyr Arg Val
 130 135 140

ggg gag gga ccc ggg gtt tgc tgg ttg gct
 ccc gag cag aca gca gga 480
 Gly Glu Gly Pro Gly Val Cys Trp Leu Ala
 Pro Glu Gln Thr Ala Gly
 145 150 155 1
 60

aag aag aag ccc ttc gtg tac acc cag ggc
 cag gct gtc cta aac cgg 528
 Lys Lys Lys Pro Phe Val Tyr Thr Gln Gly
 Gln Ala Val Leu Asn Arg
 165 170 175

gcc ttc ttc cct tgc ttc gac acg cct gct
 gtt aaa tac aag tat tca 576
 Ala Phe Phe Pro Cys Phe Asp Thr Pro Ala
 Val Lys Tyr Lys Tyr Ser
 180 185 190

gct ctt att gag gtc cca gat ggc ttc aca
 gct gtg atg agt gct agc 624
 Ala Leu Ile Glu Val Pro Asp Gly Phe Thr
 Ala Val Met Ser Ala Ser
 195 200 205

acc tgg gag aag aga ggt cca aat aag ttc

Asp Val Ile Ile His Glu Ile Ser His Ser
 Trp Phe Gly Asn Leu Val
 325 330 335

acc aac gcc aac tgg ggt gaa ttc tgg ctc
 aat gaa ggt ttc acc atg 1056
 Thr Asn Ala Asn Trp Gly Glu Phe Trp Leu
 Asn Glu Gly Phe Thr Met
 340 345 350

tac gcc cag agg agg atc tcc acc atc ctc
 ttt ggc gct gcg tac acc 1104
 Tyr Ala Gln Arg Arg Ile Ser Thr Ile Leu
 Phe Gly Ala Ala Tyr Thr
 355 360 365

tgc ttg gag gct gca acg ggg cgg gct ctg
 ctg cgt caa cac atg gac 1152
 Cys Leu Glu Ala Ala Thr Gly Arg Ala Leu
 Leu Arg Gln His Met Asp
 370 375 380

atc act gga gag gaa aac cca ctc aac aag
 ctc cgc gtg aag att gaa 1200
 Ile Thr Gly Glu Glu Asn Pro Leu Asn Lys
 Leu Arg Val Lys Ile Glu
 385 390 395 4
 00

cca ggc gtt gac ccg gac gac acc tat aat
 gag acc ccc tac gag aaa 1248
 Pro Gly Val Asp Pro Asp Asp Thr Tyr Asn
 Glu Thr Pro Tyr Glu Lys
 405 410 415

ggt ttc tgc ttt gtc tca tac ctg gcc cac
 ttg gtg ggt gat cag gat 1296
 Gly Phe Cys Phe Val Ser Tyr Leu Ala His
 Leu Val Gly Asp Gln Asp
 420 425 430

cag ttt gac agt ttt ctc aag gcc tat gtg
 cat gaa ttc aaa ttc cga 1344
 Gln Phe Asp Ser Phe Leu Lys Ala Tyr Val
 His Glu Phe Lys Phe Arg
 435 440 445

agc atc tta gcc gat gac ttt ctg gac ttc
 tac ttg gaa tat ttc cct 1392
 Ser Ile Leu Ala Asp Asp Phe Leu Asp Phe
 Tyr Leu Glu Tyr Phe Pro
 450 455 460

gag ctt aag aaa aag aga gtg gat atc att

590

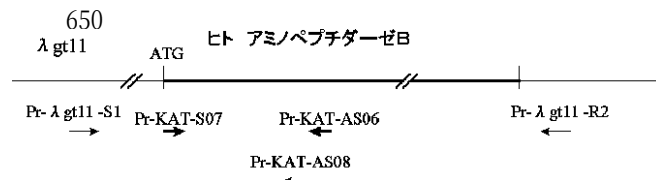
cac gca atg atg ggt ggc agt gag gtg gcc
 cag acc ctc gcc aag gag 1872
 His Ala Met Met Gly Gly Ser Glu Val Ala
 Gln Thr Leu Ala Lys Glu
 610 25 615

図である。 agc aat gtt gtc aac tat 1920 【図6】 発現誘導の検討結果を示す図である。
 【図2】 cDNAのPhoA-Seqを用いたPCRによるLeu His 【図7】 ウェスタンブロッティング分析結果を示す図
 図である。 Ser Asn Val Val Asn Tyr である。

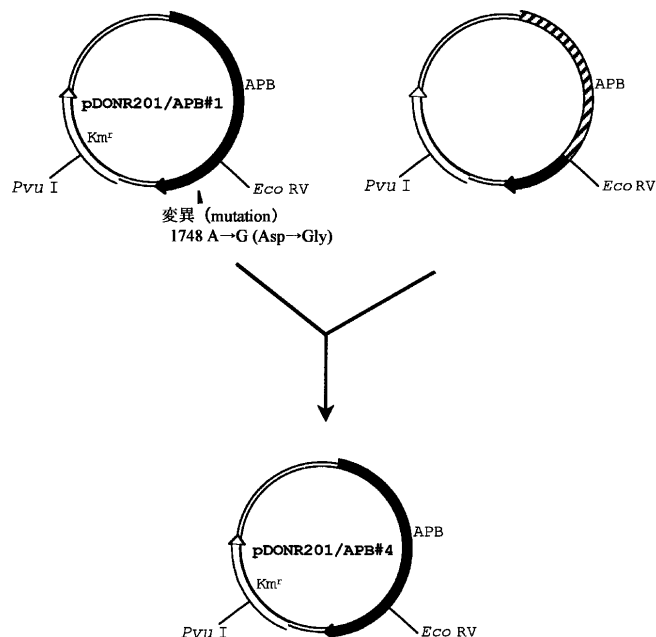
【図4】 プラスミド pD Cn Rt 2 0 t g c A C B # 4 ggc agt
の構築を示す図である。 1953 *

Val Gln Gln Ile Val Ala Pro Lys Gly Ser

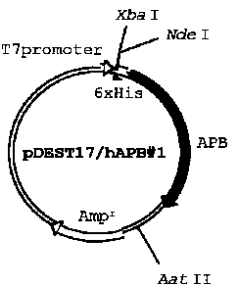
【図 2】



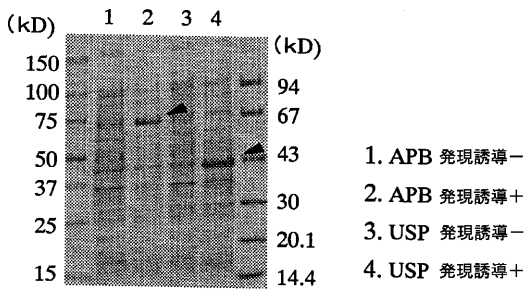
【図 4】



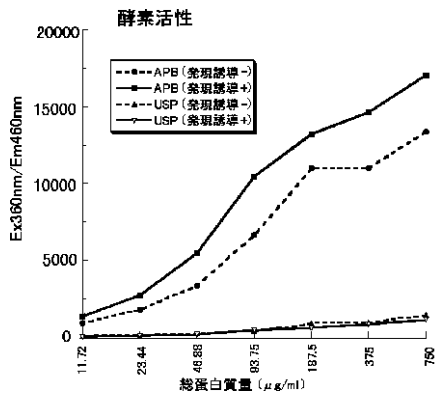
【図5】



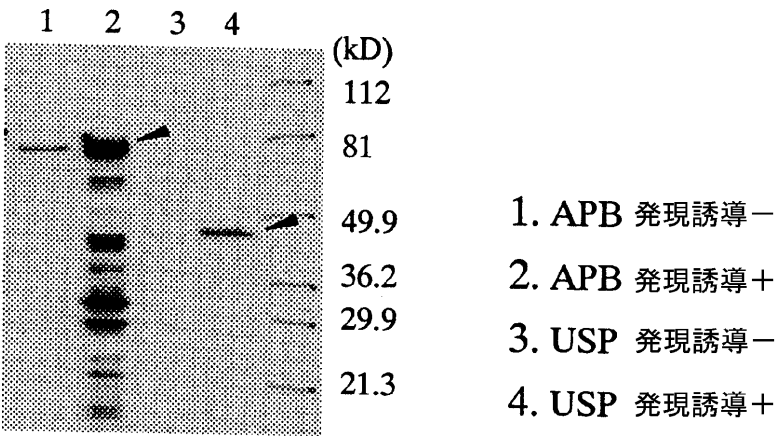
【図6】



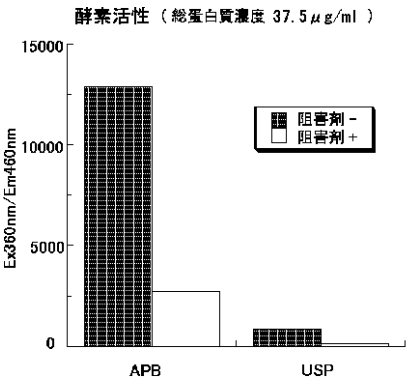
【図8】



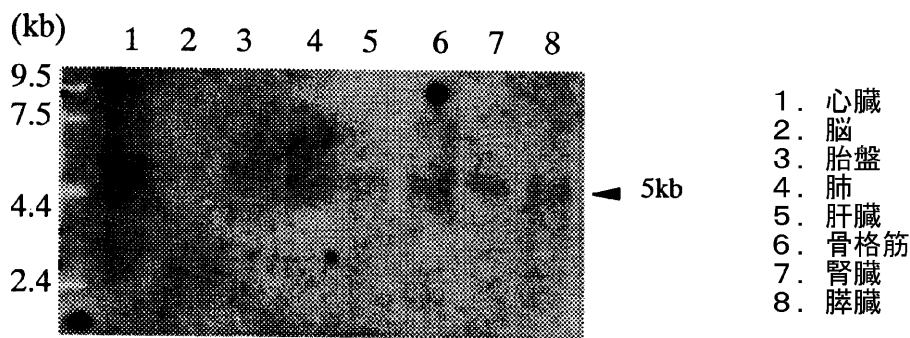
【図7】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)	
C 0 7 K	16/40	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15		1/21	4 C 0 8 5
	1/19		9/48	4 H 0 4 5
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/37	
	9/48		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/37		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	

(72)発明者 井上 竜也
東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA09
CA11 DA01 DA02 DA05 DA11
EA01 EA02 EA03 EA04 FA02
GA11 HA01 HA03 HA11
4B050 CC01 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ05 QQ13
QQ20 QQ36 QQ42 QQ52 QR08
QR16 QR33 QR55 QR57 QR59
QR62 QR74 QR80 QR82 QS05
QS25 QS26 QS34 QS36 QX02
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y
AB01 BA01 CA33 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 DC50 NA14 ZB112
4C085 AA13 BB31 CC02 CC04 CC22
DD33 DD63 DD86
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	氨肽酶B.		
公开(公告)号	JP2002369686A	公开(公告)日	2002-12-24
申请号	JP2001133620	申请日	2001-04-27
申请(专利权)人(译)	第一制药有限公司		
[标]发明人	横田博 荒井康子 井上竜也		
发明人	横田 博 荒井 康子 井上 竜也		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61P29/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/48 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/48 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ36 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR33 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS26 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB112 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC22 4C085/DD33 4C085/DD63 4C085/DD86 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	庄司隆		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：通过发现人氨肽酶B (APB)，阐明其在生物体内的作用并控制其功能或生理作用，提供一种新颖的诊断方法和药物组合物。 解决方案：将人类cDNA文库与小鼠APB基因进行同源搜索，以确定所选基因的全长，然后将该基因在大肠杆菌表达系统中表达以获得该基因编码的蛋白质。 使用合成底物确认为APB，并且通过控制蛋白质，其功能或生理作用提供了新颖的疾病诊断手段和药物组合物。

【图 4】

