

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		35/76	4 B 0 5 0
35/76		39/395	D 4 B 0 6 3
38/46			N 4 B 0 6 5
39/395		45/00	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 26数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－331498(P2001－331498)	(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10月29日(2001.10.29)	(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	深山 勝義 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
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 プロテアーゼ活性を有する蛋白質

(57)【要約】

【課題】 ADAMTSファミリーに属する蛋白質の多様性を解明し、その用途を見出すこと。

【解決手段】 かずさDNA研究所でクローニングされた公知の遺伝子K I A A 1 3 1 2の配列的特徴と生物学的機能の検討から、該遺伝子の遺伝子産物が公知のADAMTSファミリーに属する蛋白質と比較してT s p 1ドメインを11回繰り返すという大きな構造的差異を持ち、かつプロテアーゼ活性を有していることを見出し、該遺伝子産物の用途を見出した。また、本発明に係るペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、これらをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該蛋白質を認識する抗体、これらを利用した化合物の同定方法、該同定方法で同定された化合物などを提供し、これらを利用した医薬組成物および診断のための測定方法等を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロテアーゼ活性を有する下記の群より選ばれるペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質；

- ①配列表の配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド、
- ②配列表の配列番号1のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- ③配列表の配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつカゼイン分解活性を有するペプチド、および、
- ④前記①から③のアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有し、かつカゼイン分解活性を有するペプチド。

【請求項2】 トロンボスポンジン タイプ1 (Tsp1) ドメインを有し、該ドメインの数が5個以上30個以下である請求項1に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質。

【請求項3】 トロンボスポンジン タイプ1 (Tsp1) ドメインを有し、該ドメインの数が10個以上30個以下である請求項1に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質。

【請求項4】 細胞外マトリックスを分解する請求項1から請求項3のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質。

【請求項5】 請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質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6】 カゼイン分解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7】 請求項5または請求項6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8】 配列表の配列番号2の塩基配列またはその相補的塩基配列の少なくとも約15個の連続する塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項9】 請求項5から請求項8のいずれか1つの請求項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

【請求項10】 請求項9に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項11】 請求項10に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質の製造法。

【請求項12】 請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質を免疫学的に認識する抗体。

【請求項13】 請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質の活性を促進する化合物の同定方法、および／または請求項5から請求項8のいずれか1つの請求項に記載のポリヌクレオチドの発現を促進する化合物の同定方法であって、請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、請求項5から請求項8のいずれか1つの請求項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、請求項9に記載のベクター、請求項10に記載の形質転換体、および請求項12に記載の抗体のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法。

【請求項14】 請求項13に記載の方法によって同定された化合物。

【請求項15】 請求項13に記載の方法によって同定された化合物からなる細胞外マトリックス分解促進剤。

【請求項16】 請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、請求項5から請求項8のいずれか1つの請求項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、請求項9に記載のベクター、請求項10に記載の形質転換体、請求項14に記載の化合物、および請求項15に記載の細胞外マトリックス分解促進剤のうち、少なくともいずれか1つを含有する医薬組成物。

【請求項17】 細胞外マトリックス分解が関連する疾患の病的症状の進行防止および／または治療剤である請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】 請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、請求項5から請求項8のいずれか1つの請求項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、請求項9に記載のベクター、請求項10に記載の形質転換体、請求項12に記載の抗体、請求項14に記載の化合物、および請求項15に記載の細胞外マトリックス分解促進剤のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする疾患診断のための測定方法。

【請求項19】 生体における請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質の活性、あるいはその発現が関連した疾患診断のための測定方法であって、(a) 生体由来試料中の請求項1から請求項4のいずれか1つの請求項に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、および／または (b) 生体由来試料中の請求項5から請求項8のいずれか1つの請求項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖をマーカーとして分析することを含む測定方法。

【請求項20】 請求項18または請求項19に記載の疾患診断のための測定方法であって、疾患が、細胞外マトリックス分解が関連する疾患である測定方法。

【請求項21】 請求項18から請求項20のいずれか1つの請求項に記載の測定方法に使用される診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ADAMTS (a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e a s e w i t h t h r o m b o s p o n d i n m o t i f s) ファミリーに属するプロテアーゼ活性を有するペプチドまたは蛋白質に関し、構造的特徴としてトロンボスポンジン・タイプ1 (t h r o m b o s p o n d i n t y p e 1) (以下Tsp1と略す) ドメインを多数含有するペプチドまたは蛋白質に関する。10 また本発明は、上記ペプチドまたは蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該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、該形質転換体もしくは該組換えベクターを使った上記ペプチドまたは蛋白質の製造法、該ペプチドまたは蛋白質に対する抗体、これらを利用した化合物の同定方法および同定された化合物、該化合物の用途、これらに係わる医薬組成物、およびこれらに係わる疾患の診断のための測定方法または測定キットに関する。

【0002】

【従来の技術】ADAMTSファミリーに属する蛋白質は、Tsp1ドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、およびディスインテグリン様ドメインという特徴的なドメインを有する分泌型蛋白質である〔J. Biol. Chem. 274 (1999), p. 23349-23357〕〔J. Biol. Chem. 274 (1999), p. 23443-23450〕〔FEBS Letters 478 (2000), p. 241-245〕。また、ADAMTSファミリーに属する蛋白質は既に11種類が報告されているが、それらは、ADAM 30 TS-4 (アグリカナーゼ1)、ADAMTS-5 (アグリカナーゼ2) のような細胞外マトリックス (E x t r a c e l l u l a r m a t r i x) (ECM) を構成するアグリカン切断活性を持つもの、ADAMTS-2 (pNPI) のようなプロコラーゲン切断活性をもつもの、ADAMTS-1 (METH1) やADAMTS-8 (METH2) のような血管新生阻害作用を持つものである。

【0003】上記のメタロプロテアーゼドメインは、細胞外マトリックスの分解に関与し、細胞外マトリックス 40 を構成するコラーゲンやアグリカン等を切断 (開裂) する機能をもつ。

【0004】また、Tsp1ドメインは、血小板のα顆粒の成分であるトロンボスポンジン (t h r o m b o s p o n d i n) (Tsp) の385-522アミノ酸配列領域に認められる特徴のあるドメインであり、TSPは血小板凝集に伴って放出されるヘパリン結合性の糖蛋白質であり、5種のファミリーが報告されている。

【0005】Tsp1ドメインは、コラーゲンやフィブ 50 ロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンといった細

胞外マトリックスにTspが結合するのに重要な部位である。また、TSPが血管内皮細胞の接着、増殖を抑制し、遊走も強力に阻害することが報告され、TSPの血管新生抑制作用において、Tsp1はbEGFの内皮細胞への結合を阻害したり、内皮細胞のアポトーシスを誘導したりするといった重要な役割をもっていることも報告されている。

【0006】公知のADAMTSファミリーに属する蛋白質は、ヒトでは最大4個のTsp1ドメインを保有しており、Tsp1ドメインは、上記のように細胞外マトリックス (ECM) を構成する酸性ムコ多糖と結合することが報告されている。しかし、その含有するTsp1ドメイン数の機能および構造的意義については報告されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明の課題は、ADAMTSファミリーに属する蛋白質、特にTsp1ドメインの存在を指標としてcDNAひいては蛋白質を検索することにより、新規な機能を有するペプチドを確保し、その多様性を解明して、Tsp1ドメインの関与する生体機能、特に細胞外マトリックスの分解や血管新生に係わる疾患の解明や、その疾患の病的症状の進行防止、治療および診断を可能とすることである。

【0008】より具体的には、本発明の課題はADAMTSファミリーに属するプロテアーゼ活性を有するペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質に関し、構造的特徴としてTsp1ドメインを多数含有するペプチドまたは蛋白質の用途を提供することである。

【0009】また本発明の別の課題は、上記ペプチドまたは蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該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した形質転換体、上記ペプチドまたは蛋白質に対する抗体、これらを利用して同定した化合物、これらを利用した医薬組成物、これらを利用した同定方法、上記形質転換体もしくは上記組換えベクターを使った上記ペプチドまたは蛋白質の製造法、上記化合物の用途、および上記ペプチドまたは蛋白質に係わる疾患の診断に用いる測定方法もしくは測定キットを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、かずさDNA研究所でクローニングされた遺伝子KIAA1312に着目し、その配列的特徴と生物学的機能の検討から、該遺伝子の遺伝子産物が公知のADAMTSファミリー蛋白質と比較して、Tsp1ドメインを11回繰り返すという大きな構造的差異を持ち、かつプロテアーゼ活性を有していることを見出した。本発明者等は、この知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、(1)プロテアーゼ活性を有する下記の群より選

ばれるペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質；

①配列表の配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド、

②配列表の配列番号1のアミノ酸配列を含有するペプチド、

③配列表の配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつカゼイン分解活性を有するペプチド、および、

④前記①から③のアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有し、かつカゼイン分解活性を有するペプチド、(2) トロンボスポンジン タイプ1 (Tsp1) ドメインを有し、該ドメインの数が5個以上30個以下である前記(1)に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、(3) トロンボスポンジン タイプ1 (Tsp1) ドメインを有し、該ドメインの数が10個以上30個以下である前記(1)に記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、(4) 細胞外マトリックスを分解する前記(1)から(3)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、(5) 前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(6) カゼイン分解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、(7) 前記(5)または(6)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、(8) 配列表の配列番号2の塩基配列またはその相補的塩基配列の少なくとも約15個の連続する塩基配列を有するポリヌクレオチド、(9) 前記(5)から(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター、(10) 前記(9)に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、(11) 前記(10)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質の製造法、(12) 前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質を免疫学的に認識する抗体、(13) 前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質の活性を促進する化合物の同定方法、および/または前記(5)から(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現を促進する化合物の同定方法であって、前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、前記(5)から(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、前記(9)に記載のベクター、前記(10)に記載の形質転換体、および前記(12)に記載の抗体のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法、(14) 前記(13)に記載の方法によって同定された

化合物、(15) 前記(13)に記載の方法によって同定された化合物からなる細胞外マトリックス分解促進剤、(16) 前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、前記(5)から(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、前記(9)に記載のベクター、前記(10)に記載の形質転換体、前記(12)に記載の抗体、前記(14)に記載の化合物、および前記(15)に記載の細胞外マトリックス分解促進剤のうち、少なくともいずれか1つを含有する医薬組成物、(17) 細胞外マトリックス分解に関連する疾患の病的症状の進行防止および/または治療剤である前記(16)に記載の医薬組成物、(18) 前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、前記

(5)から(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、前記(9)に記載のベクター、前記(10)に記載の形質転換体、前記(12)に記載の抗体、前記(14)に記載の化合物、および前記(15)に記載の細胞外マトリックス分解促進剤のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする疾患診断のための測定方法、(19) 生体における前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質の活性、あるいはその発現に関連した疾患の診断のための測定方法であって、(a) 生体由来試料中の前記(1)から(4)のいずれかに記載のペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、および/または(b) 生体由来試料中の前記(5)から(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖をマーカーとして分析することを含む測定方法、(20) 前記(18)または(19)に記載の疾患診断のための測定方法であって、疾患が、細胞外マトリックス分解に関連する疾患である測定方法、(21) 前記(18)から(20)のいずれかに記載の方法に使用される診断キット、である。

【0011】

【発明の実施の形態】(プロテアーゼ活性を有するペプチド、蛋白質) 発明者らが着目したかずさDNA研究所でクローニングされた遺伝子KIAA1312は、バイオインフォマティクス(bioinformatics)を用いた解析により、ADAMTSファミリーと類似したドメインをもち、オープンリーディングフレーム(以下ORFという)の5'側配列が欠損しているものの、活性発現に必要な基本モチーフ(motif)を含む領域はすべて有すると推定された。

【0012】本発明者らは、後述の実施例で示すように、大腸菌を用いた遺伝子発現系で本発明に係る上記の遺伝子を発現させ、得られた蛋白質を精製し、カゼイン分解能を指標として該蛋白質がカゼインを濃度依存的に分解するプロテアーゼ活性を有していることを見出した。また、該蛋白質は図1に示したようにTsp1ドメ

インを11個(11領域)有するという特徴をもっていた。

【0013】本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質は、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列と同一、または実質的に同一なアミノ酸配列およびこれらを含む蛋白質を含む。上記プロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質は、ヒトや哺乳動物の細胞、またはそれらの細胞が存在する組織に由来する蛋白質でもよく、また合成蛋白質でもよい。これらはカゼイン分解能を有するかぎりにおいてプロテアーゼ活性を有する蛋白質として有用である。本明細書において、ペプチドは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドを意味する。また、長鎖のペプチドを蛋白質ということもある。

【0014】配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と約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%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列が挙げられる。これらはカゼイン分解能を有するかぎりにおいてプロテアーゼ活性を有する蛋白質として有用である。アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、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が可能である。また、カゼイン分解能の測定は、例えば後述する実施例に記載した方法等の、公知の方法を用いて実施できる。

【0015】上記プロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを含む蛋白質は、成熟蛋白質の形態であってもよく、あるいは融合蛋白質等、大型の蛋白質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基等の精製を促進する配列、または組換え生産を行っている間の安定性のためのさらなる配列を含むものであってもよい。

【0016】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を含むペプチド、あるいはその部分配列を含むペプチドもその範囲を含む。

【0017】本発明に係るペプチドの部分配列からなるペプチドは、その最小単位としては5個以上のアミノ酸、好ましくは8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で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に認識しうるペプチドを本発明の対象とする。これらのペプチドは、試薬もしくは標準物質、または後述するように本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチド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、キーホールリンペイトヘモシア

ニンまたは卵白アルブミン)と結合して使用できる。

【0018】このように特定された本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを含む蛋白質を基にして、カゼイン分解活性を指標とすることにより、アミノ酸の欠失・置換・付加あるいは挿入といった変異を、1個以上、例えば1~100個、好ましくは1~60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ないし数個有するアミノ酸配列からなるペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質も提供される。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)を単独または適宜組合わせて、例えば、Sambrookら編[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed.], Cold Spring Harbor Laboratory Press(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)、Ehrlich, H.E. 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(1983), p. 666)を利用することができる。上記のような変異の導入において、当該ポリ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は、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。

【0019】さらに、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質は、構造的特徴として5個以上、より好ましくは10個以上のTsp1ドメインを有するペプチドまたは蛋白質も包含する。

【0020】発明者らは、Tsp1ドメイン数がECMとの結合親和性に強く関わって、本発明のプロテアーゼ活性を有するペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質が生体内のECMに多量におよび/または強く結合し、公知のADAMTSファミリーに属する蛋白質より長時間結合できると考えている。また、Tsp1ドメインのECMへの結合親和性を利用して、該蛋白質の効果をさらに増強できると考えている。例えば、本発明に係るペプチドが含有するTsp1ドメイン数を公知の遺伝子組換え法等を用いて増加させることにより、ECMへの結合を多量にあるいは長時間結合させ、該蛋白質の保有するプロテアーゼ活性を全体として高めたり、長時間作用させたりできる。

【0021】従って、ADAMTSファミリーに属する他の公知の蛋白質に比べ、該ペプチドまたは該蛋白質に

よる基質分解速度や基質分解量を、Tsp1ドメインによる強い親和性により著しく早くおよび／または大きくできる。一方、公知の遺伝子組換え法等を用いてTsp1ドメイン数を減少させれば、該蛋白質のプロテアーゼ活性の効果を減弱させることも可能である。

【0022】別の観点から見ると、Tsp1ドメイン数は該ドメインを有する蛋白質の特異性にかかわり、組織や細胞の基底膜あるいは細胞外マトリックスの構成成分に対する高い結合特異性を惹起すると発明者らは考えている。すなわち、その結合特異性により、該ペプチドまたは該蛋白質が特定の組織に、例えば脳に、あるいは分解する基質の選択を行っていると考えている。基質に対する結合特異性を確認するためには、例えばECMの1つであるアグリカンの分解特性を検討することにより可能であり、分解したアミノ酸配列の情報をもとに公知のデータベースで生体内基質を検索すればことが足りる。

【0023】さらに後述する関連疾患の病態時には、上記の強い親和性や高い特異性により、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質が主要な役割を果たしていると発明者らは考え、これらのTsp1ドメインの含有数を変化させ該蛋白質の機能を増強、特にECMの分解を促進することにより、より効果的な該関連疾患の症状進行の防止および／または治療がおこなえると考えている。

【0024】例えば、アルツハイマー病の原因物質と考えられているベータアミロイドによりADAMTSファミリーに属する蛋白質の一つであるADAMTS-4が脳において誘導されることが報告〔Neurosci. Lett. 289 (2000), p. 177-180〕されている。脳内でベータアミロイドが凝集し、沈着することにより神経細胞死は惹起されると一般的に考えられていることから、ベータアミロイドで誘導されるプロテアーゼはベータアミロイドを分解するために、あるいは病態を回復させるために発現しているとも考えられる。

【0025】本発明者らは、後述する実施例において本発明に係るTsp1ドメインを有し、かつプロテアーゼ活性を有する蛋白質をコードするmRNAが脳に存在していることを確認した。本発明に係る該蛋白質がベータアミロイドにより誘導されるかどうかは公知の方法で確認することができ、したがって本発明に係る該蛋白質のプロテアーゼ活性を促進すれば、アルツハイマー病における沈着あるいは増加するベータアミロイドを分解して神経細胞死を防止でき、および／または変性した細胞外マトリックスを速やかに分解して正常組織を再構成させ神経細胞の脱落を阻止することが可能であると考えている。

【0026】本発明のTsp1ドメイン数の構造については、1つのTsp1ドメインがありスペーサーを介して繰り返しTsp1ドメインを有する構造が前述したE

CMなどへの結合等に重要であると発明者らは考えている。

【0027】進化の過程で起きるドメイン単位等の重複進化などを考慮すると、上記構造を含む11個のドメイン単位が重複され、つまり「1ドメインスペーサー10ドメイン」の構造重複、例えば2回で22個、3回で33個が起りえる。

【0028】また、別の観点では1ドメインスペーサー後の「n個のドメイン」の重複、例えばnが10個、20個あるいは30個等が起りえる。従って、上記構造に由来する結合親和性および／または特異性を発揮するためには、構造の繰り返しが必須と考えられ、5個以上、好ましくは10個、より好ましくは20個、さらに好ましくは30個のドメインがあればよい。

【0029】これらのTsp1ドメイン数を増減させることは自体公知の遺伝子工学的技術、例えば該当するコード領域のポリヌクレオチドの挿入あるいは欠損等の方法により、可能である。

【0030】また、本発明に係るペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質が、ADAMTSファミリー蛋白質の1つであるADAMTS-1の活性中心と同じモチーフを有することから、ADAMTS-1と同様の基質を同じ開裂部位で、例えば基質がアグリカンであるときはセリン-グルタミン-グルタミン酸-ロイシン (SQEL) のグルタミン酸-ロイシンの間で切断すると考えられる。従って、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質は、細胞外マトリックス、アグリカン、カゼイン、またはADAMTS-1による開裂部位のアミノ酸配列を有するペプチドのいずれかを分解することのできるペプチドまたは蛋白質であり得る。

【0031】(ポリヌクレオチド) 本発明に係るポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、上記プロテアーゼ活性を有するペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、例えば配列表の配列番号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を意味する。これらは例えば本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。好ましいポリヌクレオチドの塩基配列は、配列表の配列番号2に記載している。

【0032】別の態様において本発明は、上記プロテアーゼ活性を有するペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質のアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1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またはその相補鎖、好ましくは配列表の配列番号2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できる。ハイブリダイ

ゼーションの条件は、例えば、Sambrookら編[Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第2版], コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー, 1989年等に従うことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものであるが、その一例としては、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/mlの変性剪断サケ・精子DNAを含む溶液中、42℃で一晩、次いで、約65℃において0.1xSSC中での洗浄といった条件であってもよい。

【0033】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良い。例えば、配列表の配列番号2の塩基配列またはその相補的配列に対する相同性において、少なくとも約40%、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%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドであり得る。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個以上のポリヌクレオチド、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該相補鎖を包含する。

【0034】上記本発明に係るポリヌクレオチドは、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の製造に、または該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、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(primer)として、またはその遺伝子発現を促進または阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として、機能性遺伝子スクリーニング技術であるAntisense display法の材料として有用である。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドおよびオリゴ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。例えば、アンチセンスによって本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の発現を特異的に阻害するためには、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質に固有な領域の塩基配列を用いることが想定される。一方、Tsp1ドメイン含有蛋白質間の保存配列を用いることにより本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドを含む複数のTsp1ドメイン含有蛋白質の発現を同時に阻害することも可能と考える。

【0035】ここで、新規Tsp1ドメイン含有蛋白質

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には、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、その生理活性特にカゼイン分解活性を指標にして行うことができる。無細胞蛋白質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、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(1957), p. 160-161)。

【0036】また、本発明に係るポリヌクレオチドは、それにコードされるアミノ酸配列を変化させてもよく、コードされるペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠損、融合および末端切断を招く場合があるが、本発明はこれらのものも包含する。これらの変化は1またはそれ以上の置換、付加、欠損が任意の組合わせで起こることにより、アミノ酸配列が変化し得るものであり、これらの変化は、突然変異技術、直接的合成、および当業者に既知のその他の組換え技術により製造できる。

【0037】(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に組込むことにより、組換えベクターを得ることができる。ベクターは、用いる宿主の種類により選択され、発現目的の遺伝子と複製や制御に関する情報を担持した遺伝子、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、マーカー配列等を構成要素とし、これらを自体公知の方法によって組合わせて作製される。前記ベクターに本発明に係るポリヌクレオチド等を組込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。なお、マーカー配列としては、ヘキサースチジンペプチドまたはHAタグが好適に例示される。

【0038】ベクターには、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、ならびにそれらを組合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等がある。

【0039】(形質転換体) 形質転換には自体公知の手段が応用でき、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましくは、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が用いられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系が使用できる。

【0040】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、発現産生される本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の生物活性を

マーカーにしておこなってもよいが、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によって生産してもよい。

【0041】また、発現系の構築物には発現を抑制あるいは促進する領域を含有させることができる。通常、宿主中にDNAを保持、伸長または発現するためには、蛋白質を発現するのに適した任意の系またはベクターを選択することが必要となる。これらは周知の技術により適当なDNA配列を発現系に挿入することができる。また、翻訳蛋白質を、小胞体内腔、ペリプラスミックスペースまたは細胞外環境へ分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現する蛋白質に組込むことができる。これらのシグナルは蛋白質に本来のものであってもよく、あるいは異種性のシグナルであってもよい。

【0042】また、本発明では、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、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、または本発明に係るDNA由来のRNAを用いた無細胞系蛋白質合成法により、本発明からなるプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質を提供可能である。後述する実施例においては、大腸菌を用いた遺伝子発現系を利用したが、無論これに限定されるものではない。

【0043】本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質は、培地中に分泌される場合、培地を回収し、該ペプチドもしくは該蛋白質を回収し精製することができる。さらに、細胞内に生成される場合、まず細胞を溶解し、次いで該ペプチドもしくは該蛋白質を回収することによって、これらを得ることができる。

【0044】その方法には例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー等がある。また、高速液体クロマトグラフィーを精製に用いることもできる。

【0045】さらに蛋白質が単離および／または精製中に変性した場合、再び活性な立体配座にするために、蛋白再生のための周知の技法を用いることができる。

【0046】(抗体) 抗体は、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを含む蛋白質を抗原として用いることにより作製することができる。抗原は当該ペプチドもしくは該ペプチドを含む蛋白質、またはその断片でもよく、断片の場合には少なくとも5個、好ましくは少なくとも8個、より好ましくは少なくとも10個、さらに好ましくは12個、特に好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質に対して免疫学的に特異的な抗体を作製

するためには、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質に固有な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、免疫学的に本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを認識または結合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。ここで、免疫学的に特異的とは、先行技術の他の関連蛋白質に対する親和性よりも、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質に対する親和性が実質的に大きいことを意味する。

【0047】抗体を産生するためには、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチド、該ペプチドを有する蛋白質、または該ペプチドの断片を、アジュバントの存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いて、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導をおこなうことによって行われる。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、ヒツジ、ウマ、ウシ、ニワトリ等が好適に用いられる。

【0048】ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施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。好ましい回収法としては、免疫アフィニティークロマトグラフィー法が挙げられる。

【0049】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成してこれをクローン化し、上記ポリペプチドまたはペプチド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。

【0050】本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質を認識し結合し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該ペプチドまたは該蛋白質の精製用抗体、試薬、または標識マーカー等として利用できる。また、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の活性を阻害する抗体や、細胞外マトリックス、アグリカン、カゼイン、またはADAMTS-1による開裂部位のアミノ酸配列を有するペプチドを分解するプロテアーゼの

活性を阻害する抗体、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の細胞外マトリックスへの結合を阻害する抗体は、細胞外マトリックスの分解が過剰な病態、あるいは血管新生が不十分である病態等で有用になる。さらに本発明の抗体は、抗原と結合するFab部分が本発明由来でありFc部分がヒト由来であるヒト化抗体（キメラ抗体）も包含する。ヒト化抗体の作成方法は自体公知の方法を用いることができ、該ヒト化抗体を上記病態の治療に使用できると考える。

【0051】（化合物の同定方法）かくして調製された本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質、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、これらの塩基配列を含むベクター、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた形質転換体、またはこれらを用いる蛋白質合成系、ならびに本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質を免疫学的に認識する抗体等は、単独または複数を組合わせることによって、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の活性を促進あるいは阻害する化合物等を同定するのに有効な手段を提供する。

【0052】例えば、ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の立体構造に基づくドラッグデザインによる化合物のプロテアーゼ活性促進剤または阻害剤の同定、細胞外マトリックス結合促進剤または阻害剤の同定や、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現促進剤または阻害剤の同定、抗体を利用した抗体認識物質の同定等が可能であり、これらを自体公知の医薬品スクリーニングシステムにも使用できる。

【0053】同定方法として例えば、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質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、該条件下でこれら該ペプチド等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、上記該ペプチド等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、上記プロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質とスクリーニングされる化合物とを接触させ、該ペプチド等のプロテアーゼ活性を定量することにより、該ペプチドを促進もしくは阻害する化合物を同定できる。

【0054】また、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質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

クレオチドに結合する化合物を同定できる。得られた化合物から、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促進もしくは阻害できる化合物を同定できる。

【0055】さらに、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、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の発現の有無または変化を検出することにより、該ペプチド等の発現を促進または阻害する化合物を同定可能である。該ペプチド等の発現の有無または変化を検出するには、簡便には、発現されるペプチド等の酵素活性を、例えば蛍光カゼインの分解を指標として測定できる。また、ペプチド等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。

【0056】（化合物）このようにして選別あるいは同定された化合物（化合物としては塩や水和物を形成しても良く、天然物も包含する）は、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の活性促進剤または活性阻害剤の候補化合物として利用可能である。また、上記プロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の遺伝子レベルでの発現促進剤、発現阻害剤等の候補化合物としても利用可能である。特にプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の活性促進剤や、該蛋白質の遺伝子レベルでの発現促進剤は有用である。さらに細胞外マトリックス分解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、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質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の進行を防止および／または治療効果を期待できる。

【0057】（医薬組成物）かくして選別あるいは同定された候補化合物等は、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。また本発明に係るプロテアーゼ活性を

有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質、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、これらの塩基配列を含むベクター、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた形質転換体、ならびに本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質を免疫学的に認識する抗体等は、本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の活性および／または発現を促進または抑制する機能を利用した治療薬等（促進剤、拮抗剤、阻害剤等）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合わせて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、化合物等各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0058】本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の発現およびその活性の低下や欠失等に関連する異常な症状の治療には、1つの方法として本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質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を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、対象中の細胞内で本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質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、治療に使用するペプチドもしくは該ペプチドを有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。

【0059】また、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の発現およびその活性が過剰な場合、例えば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、当該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の活性を阻害し、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ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質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。

【0060】本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質が関連する疾患としては、細胞外マトリックスの分解が関連する疾患等が挙げられる。また、該ペプチドもしくは該蛋白質がTsp1ドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、およびディスインテグリン様ドメインを有するADAMTSファミリー蛋白質と構造的特徴およびプロテアーゼ活性においては類似していることから、ADAMTSファミリー蛋白質が関与すると考えられる各種疾患、例えば、癌、腫瘍性浸潤および転移、難治性疾患、慢性関節リウマチ、動脈硬化、変形性関節症、歯周疾患、異所性脈管形成、潰瘍形成、骨疾患、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染症、または糖尿病合併症、炎症性疾患、痴呆、アルツハイマー病等が、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質が関連する疾患として挙げられる。特に癌や腫瘍性疾患、炎症性疾患、痴呆やアルツハイマー病等への関与は重要である。

【0061】（診断のための測定方法および試薬、診断用キット）本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質、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、これらの塩基配列を含むベクター、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた形質転換体、ならびに本発明に係るプロテアーゼ活性を有するペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質を免疫学的に認識する抗体等は、それ自体が診断マーカーや試薬等の疾患診断手段として使用可能であり、これらを複数組合わせて上記疾患の診断のための測定方法にも用いることができる。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。

【0062】本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の発現または活性に関連した疾患の診断のための測定方法は、例えば当該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質をコードしているポリヌクレオチドとの相互作用や反応性を利用して、相応するポリヌクレオチドの存在量を決定すること、および／または当該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質について個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の存在、個体由来の試料中の存在量を測定することによって行うことができる。詳しくは、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質を、および／または該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖を診断マーカーとして分

析するのである。試料中の当該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質の検出またはその存在量の測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やELISA等がある。また、本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖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、ノーザンブロットティ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測定することができる。

【0063】測定に供与される試料としては、例えば個体由来の細胞、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、ポリヌクレオチド等の検出には、上記各試料から自体公知の調製方法により得られる。ポリヌクレオチドまたはその相補鎖は、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。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。増幅したDNAを、標識し*

プライマー：

KIAA1312-S01；

5'-CGTTTTTTATCCTATCCACGG-3'

KIAA1312-R02；

5'-TTACAGTTCCCAGGACGGTACCTCTGA-3'

KIAA1312-S03；

5'-TTGTCCACACGACGCTGCATG-3'

KIAA1312-R04；

5'-ATGACATGCTGGGGACTCTTAAC-3'

KIAA1312-S05；

5'-CAGCGGCTTAGCAACAGAGGC-3'

KIAA1312-R06；

5'-TTCGTTAAGCAAACACTCGCC-3'

KIAA1312-S07；

5'-TATAGAAGCTGTTCTATTAGTG-3'

KIAA1312-R08；

5'-TCCTCCTCGGCACTTTCTGTG-3'

KIAA1312-S09；

5'-GGCGAGTGTTTGCTTAACGAAC-3'

KIAA1312-R10；

5'-CACAGTCGTTTGCGGTGTATC-3'

KIAA1312-S11；

5'-ACTGTGTAGGACGTAGAATGA-3'

KIAA1312-R12；

5'-AGGGTAGCACAGGCACTCTCG-3'

KIAA1312-S13；

5'-GGTGGCGATAATTCTTCATGC-3'

KIAA1312-R14；

5'-CGATCTTCACCAAACCTGACAC-3'

*た上記ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖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。

【0064】上記測定方法により本発明に係るペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質およびそれをコードするポリヌクレオチド等の変異、減少、増加を検出することにより、当該ペプチドもしくは該ペプチドを有する蛋白質に関連する疾病、例えば上記の疾患の診断が可能となる。

【0065】

【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。

【0066】（実施例1）本発明に係るペプチドをコードする遺伝子の塩基配列の決定 ヒト脳由来poly(A)+RNA(Clontech)500ngより、ランダムヘキサマーを使用して逆転写反応を行い、cDNAを合成した。また、かずさDNA研究所により決定された塩基配列を基に下記に示すプライマーを設計した。

【0067】

KIAA1312-S15;
 5'-CATGGGCCATGGCAAGCATGC-3'
 KIAA1312-R16;
 5'-CTCCTGCTGGCAACATGCCAC-3'
 KIAA1312-S17;
 5'-ATGATGTACTGGATGACAGCA-3'
 KIAA1312-R18;
 5'-AATTCACCTTTACTGCTTGAT-3'
 KIAA1312-S19;
 5'-GGACTGTGAATTACCATCATG-3'
 KIAA1312-R20;
 5'-AGCGCACATTGGGAAGCAGAC-3'
 KIAA1312-S21;
 5'-TTGTCCACACGACGCTGCATG-3'
 KIAA1312-R22;
 5'-TTATTGCACCAGAGCCGTCTG-3'
 KIAA1312-S23;
 5'-CACAGAAAGTGCCGAGGAGGA-3'
 KIAA1312-R24;
 5'-CATGCAGCGTCGTGTGGACAAG-3'
 KIAA1312-S25;
 5'-CTGTGTCCAGGGCCTTTGCCG-3'
 KIAA1312-R26;
 5'-TAGCCTCAAGTCTCCACATTC-3'
 KIAA1312-S27;
 5'-CAGACAGTGGCTTAGCTCAGC-3'
 KIAA1312-R28;
 5'-CTCATCCCTCTGCCACTCTCA-3' 22

【0068】について、上記合成したcDNAを鋳型として、上記設計したプライマーのうちKIAA1312-S01とKIAA1312-R06、KIAA1312-S09とKIAA1312-R20、KIAA1312-S11とKIAA1312-R18、KIAA1312-S13とKIAA1312-R16、KIAA1312-S15とKIAA1312-R14、KIAA1312-S17とKIAA1312-R12、KIAA1312-S19とKIAA1312-R10、KIAA1312-S27とKIAA1312-R08、KIAA1312-S23とKIAA1312-R26のそれぞれの組合わせを用い、RT-PCRを実施した。PCR産物は予想されるサイズにすべて検出された。これらPCR産物について平滑末端化、リン酸化処理を施し、pBluescript KS(+) (SmaI消化、脱リン酸化処理)にサブクローニングして塩基配列を決定した。

【0069】塩基配列の決定にはThermo sequenase Cy5.5 dyeterminator sequencing kit (Amersham 20 pharmacia biotech)を使用して、各種ベクター1μgを鋳型としてシーケンス反応を実施

した。反応は上記の任意のプライマーを使用して94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で1分間を1サイクルとして40サイクル繰り返した。塩基配列の解析は蛍光シーケンサー (GeneRapid, Amersham pharmacia biotech)を使用した。各試料2μlを、電圧1250V、電流30mA、温度50℃、レーザー50%の条件で泳動した。

【0070】この結果、PCR産物の塩基配列は、かざさDNA研究所でクローニングされた遺伝子KIAA1312の塩基配列と完全に一致し、KIAA1312の配列にはイントロン等も含まれていないことが確認された。また、ヒト脳組織においてKIAA1312と塩基配列が一致するmRNAの存在を見出した。

【0071】(実施例2)発現ベクターの構築
 KIAA1312遺伝子産物を得るために、ゲートウェイ クローニング システム (Gateway cloning system) (Invitrogen Life technologies)を使用し、大腸菌発現系を利用して発現ベクターを構築した。抗体による検出およびニッケル親和性カラム (Ni-affinity column)を利用した精製を可能とするため、該遺伝子産物である蛋白質を、そのN末端にヒスチ

ジンタグが付加された融合蛋白質 (His-tagged N-terminal fusion protein) (図2) として発現させ得る発現ベクターを構築した。

【0072】ところで、ADAMTSファミリーの1つであるアグリカナーゼ-1はアグリカナーゼ-1前駆体蛋白質として生体内で産生され、セリンプロテアーゼであるフリニンによりプロペプチド領域が切断され、活性型となることが知られている。そこで、リーディングフレーム (Reading frame) が一致するように組込むため、PCRによりKIAA1312の活性型領域を増幅した。PCRはpBS-KIAA1312 (かずさDNA研究所) を鋳型とし、Taq DNAポリメラーゼ (Expand high-fidelity PCR system) (Roche) と下記プライマーを使用し、下記反応条件で実施した。

【0073】プライマー：

B/X/KIAA1312S01；

5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTTATCCTATCCACGG-3'

B/KIAA1312R02；

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAGTTCCAGGACGTACCTCTGA-3'

PCR反応条件：94℃で2分間を1サイクル、94℃で30秒間、60℃で1分間、68℃で5分間を1サイクルとして30サイクル、68℃で5分間を1サイクル。

【0074】上記PCR産物はBP clonase enzyme mixを使用して、各種発現ベクター構築の基礎となるpDONR201ベクターに組み込み、pDONR/X/KIAA1312ベクターを得た。なお、全塩基配列を検討した結果、アミノ酸置換を伴う変異が1ヵ所認められたことから、この変異を含む領域を、正常配列を含む領域と組換えた。すなわち、pDONR/X/KIAA1312をPacIおよびScaI処理して変異を含む領域を除去した後、pBS-KIAA1312からPacIおよびScaI処理して得た正常配列を含む領域に組換え、塩基配列を検討し正常配列であることを確認した。

【0075】さらに、pDONR/X/KIAA1312ベクターをLR clonase enzyme mixを使用してpDEST17ベクターに組み込み、His6 N-terminal fusion KIAA1312 (以下H6-KIAA1312あるいはH6-fh11767と記載する) 蛋白質発現ベクター (pDEST17/X/KIAA1312ベクター) を得た。

【0076】また、KIAA1312蛋白質は活性中心に亜鉛金属 (Zn) を配位するメタロプロテアーゼであ

ると推測されることから、その機能を消失させるため、亜鉛金属 (Zn) 結合モチーフを欠失させたΔKIAA1312蛋白質発現ベクターも合わせて構築した (図2)。

【0077】すなわち、KIAA1312 cDNA内の特異的な制限酵素 (AatI) およびPCRを利用して、プロテアーゼの活性中心と予測される領域 (アミノ酸配列上で第147番目-第158番目) を含む部分をコードする領域を除去した欠失変異体を構築した。

【0078】リーディングフレームが一致するように組込むため、pBS-KIAA1312 (かずさDNA研究所) を鋳型とし、Taq DNAポリメラーゼ (Expand high-fidelity PCR system) (Roche) と下記プライマーを使用し、PCRにより下記反応条件で増幅した。

【0079】プライマー：

KIAA1312ΔS01；

5'-AGCCCGGGAGTTAAGAGTCCCCAGCATGTC-3'

KIAA1312ΔR02；

5'-CTCCAGTCCAAGGCCTTCCATTGCCACAG-3'

PCR反応条件：95℃で2分間を1サイクル、95℃で30秒間、62℃で1分間、72℃で4分間を1サイクルとして27サイクル、72℃で5分間を1サイクル。

【0080】制限酵素 (SmaIおよびAatI) 処理したPCR産物をAatI処理および脱リン酸化処理したpDEST17/X/KIAA1312ベクターに組み込み、H6-ΔKIAA1312 (あるいは以下、H6-Δfh11767と記載する) 蛋白質発現ベクター (pDEST17/X/ΔKIAA1312ベクター) を得た。なお、このベクターの組換えた領域の塩基配列を検討し、変異が含まれていないことを確認した。

【0081】(実施例3) 蛋白発現系の構築

まず、産生誘導条件を検討した。H6-KIAA1312蛋白質発現ベクターを導入した菌液 (一晚培養) 200μlをLB-amp培地2mlにて、30℃で2時間培養後、2本 (700μl/チューブ) に分注した。2本をそれぞれNaCl添加群 (5M NaCl 50μl添加、終濃度0.3M) あるいは非添加群 (滅菌蒸留水50μl添加) として、さらに30℃で3時間培養後、以下の処理をしてSDS-PAGEにより発現を確認した。

【0082】菌体をバッファーT (150mM NaClを添加した20mM Tris-HCl バッファー、pH8.0) 50μlに懸濁後、超音波破碎、遠心した上清を可溶性画分とした。続いて、沈殿をバッファーTT (1% Triton-X100を添加したバッファーT) 50μlに懸濁後、超音波破碎した上清を不溶

性画分1とした。さらに、沈殿をバッファーTUI-A (10mM イミダゾール、8M 尿素を添加したバッファーT) 50 μ lに懸濁後、超音波破碎した上清を不溶性画分2とした。最後に、沈殿をバッファーTS

(2.5% SDSを添加したバッファーT) 50 μ lに懸濁後、超音波破碎した上清を不溶性画分3とした。各画分に2倍濃度のサンプルバッファー50 μ l、 β -メルカプトエタノール10 μ lを混合し、3分間煮沸後、10% アクリルアミドゲルを使用して電気泳動後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色により検出した。

【0083】NaCl添加により目的蛋白質を発現する大腸菌であるBL21-SIにおいて、H6-KIAA1312 (H6-fh11767) 蛋白質あるいは同様にH6- Δ KIAA1312 (H6- Δ fh11767) 蛋白質を発現させたところ、NaCl添加群でのみ、それぞれアミノ酸配列から推定される155kDa、150kDa付近に産生誘導が確認された (図3)。また、通常 (30 $^{\circ}$ C) の培養条件で誘導されるこれらの蛋白は、Triton-X100のような界面活性剤存在下でも可溶化せず、尿素のような変性剤の存在下でのみ可溶化することから、不溶性成分として産生されることが明らかとなった。

【0084】(実施例4) H6-KIAA1312蛋白質およびH6- Δ KIAA1312蛋白質の精製不溶性成分として産生したH6-KIAA1312蛋白質は活性型としての立体構造をとれないと推測されることから、変性剤存在下でH6-KIAA1312蛋白質およびH6- Δ KIAA1312蛋白質を可溶化し、Ni-親和性カラムにより精製した。

【0085】すなわち、H6-KIAA1312蛋白質発現株 (BL21-SI/H6-KIAA1312) あるいはH6- Δ KIAA1312蛋白質発現株 (BL21-SI/H6- Δ KIAA1312) の菌液 (一晚培養) 10mlをLB-amp培地100mlに添加して37 $^{\circ}$ Cで1.5時間培養した。5M NaCl溶液7.6mlを添加後、さらに37 $^{\circ}$ Cで3時間培養し、集菌した。プロテアーゼ阻害剤カクテル (EDTA free, Roche) および20mMジチオスレイトールを添加したバッファーT10mlに菌体それぞれを懸濁し、超音波破碎 (10秒間で6回)、遠心後の沈殿を回収した。沈殿をバッファーTUI-A (10mMイミダゾール、8M尿素を添加したバッファーT) 10mlに懸濁し、超音波破碎 (10秒間で6回)、超遠心後 (30krpm、1時間) の上清を大腸菌抽出画分とした。この抽出画分をバッファーTUI-Aで飽和したハイトラップキレーティングカラム (HiTrap chelating column) に添加後、バッファーTUI-B (50mMイミダゾール、8M尿素を添加したバッファーT) にて洗浄し、H6-KIAA1312蛋白

質をバッファーTUI-C (500mMイミダゾール、8M尿素を添加したバッファーT) で溶出した。精製過程の各画分25 μ lに2倍濃度のサンプルバッファー25 μ l、 β -メルカプトエタノール5 μ lを混合し、3分間煮沸後、上記と同様にSDS-PAGEでバンドを確認した。

【0086】その結果、複数の夾雑物が存在するものの、H6-KIAA1312蛋白質またはH6- Δ KIAA1312蛋白質を主とする溶出画分を得た。また、この溶出画分の変性剤を除去して、溶出蛋白の活性型としての立体構造を再生するため、界面活性剤存在下で透析したところ、溶出画分のすべての蛋白が可溶化し、リフォールディング (refolding) がある程度進行していることが期待された。

【0087】(実施例5) プロテアーゼ活性の測定
プロテアーゼ活性を、蛍光標識したカゼインの分解能を指標にして検討した。

【0088】H6-KIAA1312 (H6-fh11767) 蛋白質およびH6- Δ KIAA1312 (H6- Δ fh11767) 蛋白質のプロテアーゼ活性を測定するため、まず、リフォールディングを実施した。H6-KIAA1312蛋白質あるいはH6- Δ KIAA1312蛋白質を含む画分を貯留し、終濃度100mMの β -メルカプトエタノールの存在下で室温にて1時間放置した。その後、100倍容量のバッファーTTにて透析を4 $^{\circ}$ Cで3回行い、水溶性画分についてプロテアーゼ活性を測定した。H6-KIAA1312水溶性画分の蛋白濃度を0.5 μ g/ μ lに調製後、各種濃度の精製標品と蛍光標識カゼイン反応液 (終濃度10 μ g/ml) を混合し、室温で2時間インキュベーションした。インキュベーション後、蛍光プレートリーダーで励起波長485 $\pm$ 10nm、測定波長530 $\pm$ 10nmにて蛍光強度を測定した。なお、プロテアーゼ活性を、トリプシン (250ng/ml) により室温2時間でカゼインが分解される活性を1Uとして算出した。

【0089】上記測定結果から、H6-KIAA1312 (H6-fh11767) 蛋白質が濃度依存的にカゼインを分解することを明らかにした。さらに、この活性はH6- Δ KIAA1312 (H6- Δ fh11767) 蛋白質では認められないことから、大腸菌由来の夾雑物によるものではないと考えられた (図4)。したがって、本発明からなるH6-KIAA1312蛋白質は、メタロプロテアーゼとして機能する有用なものである。

【0090】

【発明の効果】以上説明したように本発明では、かずさDNA研究所でクローニングされた遺伝子KIAA1312が、その配列的特徴と生物学的機能の検討から、該遺伝子の遺伝子産物が公知のADAMTSファミリーに属する蛋白質と比較してTsplドメインを11回繰り返す

返すという大きな構造的差異を持ち、かつプロテアーゼ活性を有していることを見出し、該遺伝子産物の用途を見出した。本発明によれば、本発明に係るペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質、これらをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ペプチドや該蛋白質を認識する抗体、これらを利用して同定された化合物などを提供することができる。これらは、本発明に係るペプチドまたは該ペプチドを有する蛋白質や細胞外マトリックス関連の臨床・基礎の医療領域における研究、新規

医薬組成物や診断手段（例えばサロゲートマーカーへの応用等）の開発に有用である。

【0091】

【配列表フリーテキスト】

配列表配列番号1：プロテアーゼ活性を有する蛋白質のアミノ酸配列（フリン開裂部位からC末まで）

配列表配列番号2：プロテアーゼ活性を有する蛋白質をコードする塩基配列

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO
., LTD
<120> protease
<130> S01102911A
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1342
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Phe Leu Ser Tyr Pro Arg Phe Val Glu Val
Leu Val Val Ala Asp Asn
1 5 10 15
Arg Met Val Ser Tyr His Gly Glu Asn Leu
Gln His Tyr Ile Leu Thr
20 25 30

Leu Met Ser Ile Val Ala Ser Ile Tyr Lys
Asp Pro Ser Ile Gly Asn
35 40 45
Leu Ile Asn Ile Val Ile Val Asn Leu Ile
Val Ile His Asn Glu Gln
50 55 60
Asp Gly Pro Ser Ile Ser Phe Asn Ala Gln
Thr Thr Leu Lys Asn Phe
65 70 75 80

Cys Gln Trp Gln His Ser Lys Asn Ser Pro
Gly Gly Ile His His Asp
85 90 95
Thr Ala Val Leu Leu Thr Arg Gln Asp Ile
Cys Arg Ala His Asp Lys
100 105 110

Cys Asp Thr Leu Gly Leu Ala Glu Leu Gly
Thr Ile Cys Asp Pro Tyr
115 120 125

```


195	200	205	
Leu Asn Glu Pro Glu Ser Arg Pro Tyr Pro			
Leu Pro Val Gln Leu Pro			
210	215	220	
Gly Ile Leu Tyr Asn Val Asn Lys Gln Cys			
Glu Leu Ile Phe Gly Pro			
225	230	235	2
40			
Gly Ser Gln Val Cys Pro Tyr Met Met Gln			
Cys Arg Arg Leu Trp Cys			
245	250	255	
Asn Asn Val Asn Gly Val His Lys Gly Cys			
Arg Thr Gln His Thr Pro			
260	265	270	
Trp Ala Asp Gly Thr Glu Cys Glu Pro Gly			
Lys His Cys Lys Tyr Gly			
275	280	285	
Phe Cys Val Pro Lys Glu Met Asp Val Pro			
Val Thr Asp Gly Ser Trp			
290	295	300	
Gly Ser Trp Ser Pro Phe Gly Thr Cys Ser			
Arg Thr Cys Gly Gly Gly			
305	310	315	3
20			
Ile Lys Thr Ala Ile Arg Glu Cys Asn Arg			
Pro Glu Pro Lys Asn Gly			
325	330	335	
Gly Lys Tyr Cys Val Gly Arg Arg Met Lys			
Phe Lys Ser Cys Asn Thr			
340	345	350	
29			
Glu Pro Cys Leu Lys Gln Lys Arg Asp Phe			
Arg Ser Thr Ser Gly Ala Thr Asp Asp Asp			
Asn Tyr Ser Ala Leu Ser	360	365	
500	505	510	
His Phe Asp Gly Lys His Phe Asn Ile Asn			
Ser Ser Lys Thr Asn Phe Leu Leu Asn Gly			
Asn Ser Val Val Thr Met	375	380	
515	520	525	
Arg Trp Val Pro Lys Tyr Ser Gly Ile Leu			
Met Lys Asp Gly Cys Arg Ile Gly Asn Ala			
385	390	395	4
00 530	535	540	
Leu Phe Cys Arg Val Ala Gly Asn Thr Ala			
Ser Tyr Thr Leu Arg Asp Arg Ile Asn Ser			
Thr Asp Arg Ile	405	410	415

	580	585	590
Tyr Trp Asn Ser His Gly Pro Trp Gln Ala			
Cys Ser Lys Pro Cys Gln			
595	600	605	
Gly Glu Arg Lys Arg Lys Leu Val Cys Thr			
Arg Glu Ser Asp Gln Leu			
610	615	620	
Thr Val Ser Asp Gln Arg Cys Asp Arg Leu			
Pro Gln Pro Gly His Ile			
625	630	635	6
40			
Thr Glu Pro Cys Gly Thr Asp Cys Asp Leu			
Arg Trp His Val Ala Ser			
645	650	655	
Arg Ser Glu Cys Ser Ala Gln Cys Gly Leu			
Gly Tyr Arg Thr Leu Asp			
660	665	670	
Ile Tyr Cys Ala Lys Tyr Ser Arg Leu Asp			
Gly Lys Thr Glu Lys Val			
675	680	685	
Asp Asp Gly Phe Cys Ser Ser His Pro Lys			
Pro Ser Asn Arg Glu Lys			
690	695	700	
Cys Ser Gly Glu Cys Asn Thr Gly Gly Trp			
Arg Tyr Ser Ala Trp Thr			
705	710	715	7
20			
Glu Cys Ser Lys Ser Cys Asp Gly Gly Thr			
Gln Arg Arg Arg Ala Ile			
725	730	735	
Cys Val Asn Thr Arg Asn Asp Val Leu Asp			
Asp Ser Lys Cys Thr His			
740	745	750	
Gln Glu Lys Val Thr Ile Gln Arg Cys Ser			
Glu Phe Pro Cys Pro Gln			
755	760	765	
Trp Lys Ser Gly Asp Trp Ser Glu Cys Leu			
Val Thr Cys Gly Lys Gly			
770	775	780	
His Lys His Arg Gln Val Trp Cys Gln Phe			
Gly Glu Asp Arg Leu Asn			

Ser Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly Gln Gly			
Arg Ala Thr Arg Gln Val			
965	970	975	
Met Cys Val Asn Tyr Ser Asp His Val Ile			
Asp Arg Ser Glu Cys Asp			
980	985	990	
Gln Asp Tyr Ile Pro Glu Thr Asp Gln Asp			
Cys Ser Met Ser Pro Cys			
995	1000	1005	
Pro Gln Arg Thr Pro Asp Ser Gly Leu Ala			
Gln His Pro Phe Gln Asn			
1010	1015	1020	
Glu Asp Tyr Arg Pro Arg Ser Ala Ser Pro			
Ser Arg Thr His Val Leu			
1025	1030	1035	
1040			
Gly Gly Asn Gln Trp Arg Thr Gly Pro Trp			
Gly Ala Cys Ser Ser Thr			
1045	1050	1055	
Cys Ala Gly Gly Ser Gln Arg Arg Val Val			
Val Cys Gln Asp Glu Asn			
1060	1065	1070	
Gly Tyr Thr Ala Asn Asp Cys Val Glu Arg			
Ile Lys Pro Asp Glu Gln			
1075	1080	1085	
Arg Ala Cys Glu Ser Gly Pro Cys Pro Gln			
Trp Ala Tyr Gly Asn Trp			
1090	1095	1100	
Gly Glu Cys Thr Lys Leu Cys Gly Gly Gly			
Ile Arg Thr Arg Leu Val			
1105	1110	1115	
1120			
Val Cys Gln Arg Ser Asn Gly Glu Arg Phe			
Pro Asp Leu Ser Cys Glu			
1125	1130	1135	
Ile Leu Asp Lys Pro Pro Asp Arg Glu Gln			
Cys Asn Thr His Ala Cys			
1140	1145	1150	
Pro His Asp Ala Ala Trp Ser Thr Gly Pro			
Trp Ser Ser Cys Ser Val			
1155	1160	1165	

```

<211> 4029
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4029)
<400> 2

ttt tta tcc tat cca cgg ttt gta gaa gtc
ttg gtg gtg gca gac aac   48
Phe Leu Ser Tyr Pro Arg Phe Val Glu Val
Leu Val Val Ala Asp Asn
      1              5              10              15

aga atg gtt tca tac cat gga gaa aac ctt
caa cac tat att tta act   96
Arg Met Val Ser Tyr His Gly Glu Asn Leu
Gln His Tyr Ile Leu Thr
              20              25              30

tta atg tca att gta gcc tct atc tat aaa
gac cca agt att gga aat   144
Leu Met Ser Ile Val Ala Ser Ile Tyr Lys
Asp Pro Ser Ile Gly Asn
              35              40              45

tta att aat att gtt att gtg aac tta att
gtg att cat aat gaa cag   192
Leu Ile Asn Ile Val Ile Val Asn Leu Ile
Val Ile His Asn Glu Gln
              50              55              60

gat ggg cct tcc ata tct ttt aat gct cag
aca aca tta aaa aac ttt   240
Asp Gly Pro Ser Ile Ser Phe Asn Ala Gln
Thr Thr Leu Lys Asn Phe
      65              70              75              80

tgc cag tgg cag cat tcg aag aac agt cca
ggt gga atc cat cat gat   288
Cys Gln Trp Gln His Ser Lys Asn Ser Pro
Gly Gly Ile His His Asp
              85              90              95

act gct gtt ctc tta aca aga cag gat atc
tgc aga gct cac gac aaa   336
Thr Ala Val Leu Leu Thr Arg Gln Asp Ile
Cys Arg Ala His Asp Lys
              100             105             110

tgt gat acc tta ggc ctg gct gaa ctg gga
acc att tgt gat ccc tat   384
Cys Asp Thr Leu Gly Leu Ala Glu Leu Gly
Thr Ile Cys Asp Pro Tyr
              115             120             125

aga agc tgt tct att agt gaa gat agt gga
ttg agt aca gct ttt acg   432

```

ggc atc ctt tac aac gtg aat aaa caa tgt
 gaa ttg att ttt gga cca 720
 Gly Ile Leu Tyr Asn Val Asn Lys Gln Cys
 Glu Leu Ile Phe Gly Pro
 225 230 235 2
 40
 ggt tct cag gtg tgc cca tat atg atg cag
 tgc aga cgg ctc tgg tgc 768
 Gly Ser Gln Val Cys Pro Tyr Met Met Gln
 Cys Arg Arg Leu Trp Cys
 245 250 255

 aat aac gtc aat gga gta cac aaa ggc tgc
 cgg act cag cac aca ccc 816
 Asn Asn Val Asn Gly Val His Lys Gly Cys
 Arg Thr Gln His Thr Pro
 260 265 270

 tgg gcc gat ggg acg gag tgc gag cct gga
 aag cac tgc aag tat gga 864
 Trp Ala Asp Gly Thr Glu Cys Glu Pro Gly
 Lys His Cys Lys Tyr Gly
 275 280 285

 ttt tgt gtt ccc aaa gaa atg gat gtc ccc
 gtg aca gat gga tcc tgg 912
 Phe Cys Val Pro Lys Glu Met Asp Val Pro
 Val Thr Asp Gly Ser Trp
 290 295 300

 gga agt tgg agt ccc ttt gga acc tgc tcc
 aga aca tgt gga ggg ggc 960
 Gly Ser Trp Ser Pro Phe Gly Thr Cys Ser
 Arg Thr Cys Gly Gly Gly
 305 310 315 3
 20
 atc aaa aca gcc att cga gag tgc aac aga
 cca gaa cca aaa aat ggt 1008
 Ile Lys Thr Ala Ile Arg Glu Cys Asn Arg
 Pro Glu Pro Lys Asn Gly
 325 330 335

 gga aaa tac tgt gta gga cgt aga atg aaa
 ttt aag tcc tgc aac acg 1056
 Gly Lys Tyr Cys Val Gly Arg Arg Met Lys
 Phe Lys Ser Cys Asn Thr
 340 345 350

 gag cca tgt ctc aag cag aag cga gac ttc
 cga gat gaa cag tgt gct 1104
 Glu Pro Cys Leu Lys Gln Lys Arg Asp Phe
 Arg Asp Glu Gln Cys Ala
 355 360 365

act gtg gtc cga att cca gct ggt gct acc
aat att gat gtg cgg cag 1488
Thr Val Val Arg Ile Pro Ala Gly Ala Thr
Asn Ile Asp Val Arg Gln
485 490 495

cac agt ttc tca ggg gaa aca gac gat gac
aac tac tta gct tta tca 1536
His Ser Phe Ser Gly Glu Thr Asp Asp Asp
Asn Tyr Leu Ala Leu Ser
500 505 510

agc agt aaa ggt gaa ttc ttg cta aat gga
aac ttt gtt gtc aca atg 1584
Ser Ser Lys Gly Glu Phe Leu Leu Asn Gly
Asn Phe Val Val Thr Met
515 520 525

gcc aaa agg gaa att cgc att ggg aat gct
gtg gta gag tac agt ggg 1632
Ala Lys Arg Glu Ile Arg Ile Gly Asn Ala
Val Val Glu Tyr Ser Gly
530 535 540

tcc gag act gcc gta gaa aga att aac tca
aca gat cgc att gag caa 1680
Ser Glu Thr Ala Val Glu Arg Ile Asn Ser
Thr Asp Arg Ile Glu Gln
545 550 555 5
60

gaa ctt ttg ctt cag gtt ttg tcg gtg gga
aag ttg tac aac ccc gat 1728
Glu Leu Leu Leu Gln Val Leu Ser Val Gly
Lys Leu Tyr Asn Pro Asp
565 570 575

gta cgc tat tct ttc aat att cca att gaa
gat aaa cct cag cag ttt 1776
Val Arg Tyr Ser Phe Asn Ile Pro Ile Glu
Asp Lys Pro Gln Gln Phe
580 585 590

tac tgg aac agt cat ggg cca tgg caa gca
tgc agt aaa ccc tgc caa 1824
Tyr Trp Asn Ser His Gly Pro Trp Gln Ala
Cys Ser Lys Pro Cys Gln
595 600 605

ggg gaa cgg aaa cga aaa ctt gtt tgc acc
agg gaa tct gat cag ctt 1872
Gly Glu Arg Lys Arg Lys Leu Val Cys Thr
Arg Glu Ser Asp Gln Leu
610 615 620

740	745	750	
caa gag aaa gtt acc att cag agg tgc agt			
gag ttc cct tgt cca cag 2304			
Gln Glu Lys Val Thr Ile Gln Arg Cys Ser			
Glu Phe Pro Cys Pro Gln			
755	760	765	
tgg aaa tct gga gac tgg tca gag tgc ttg			
gtc acc tgt gga aaa ggg 2352			
Trp Lys Ser Gly Asp Trp Ser Glu Cys Leu			
Val Thr Cys Gly Lys Gly			
770	775	780	
cat aag cac cgc cag gtc tgg tgt cag ttt			
ggt gaa gat cga tta aat 2400			
His Lys His Arg Gln Val Trp Cys Gln Phe			
Gly Glu Asp Arg Leu Asn			
785	790	795	8
00			
gat aga atg tgt gac cct gag acc aag cca			
aca tct atg cag act tgt 2448			
Asp Arg Met Cys Asp Pro Glu Thr Lys Pro			
Thr Ser Met Gln Thr Cys			
805	810	815	
cag cag ccg gaa tgt gca tcc tgg cag gcg			
ggt ccc tgg gga cag tgc 2496			
Gln Gln Pro Glu Cys Ala Ser Trp Gln Ala			
Gly Pro Trp Gly Gln Cys			
820	825	830	
agt gtc act tgt gga cag gga tac cag cta			
aga gca gtg aaa tgc atc 2544			
Ser Val Thr Cys Gly Gln Gly Tyr Gln Leu			
Arg Ala Val Lys Cys Ile			
835	840	845	
att ggg act tat atg tca gtg gta gat gac			
aat gac tgt aat gca gca 2592			
Ile Gly Thr Tyr Met Ser Val Val Asp Asp			
Asn Asp Cys Asn Ala Ala			
850	855	860	
act aga cca act gat acc cag gac tgt gaa			
tta cca tca tgt cat cct 2640			
Thr Arg Pro Thr Asp Thr Gln Asp Cys Glu			
Leu Pro Ser Cys His Pro			
865	870	875	8
80			
ccc cca gct gcc ccg gaa acg agg aga agc			
aca tac agt gca cca aga 2688			

995	1000	1005
cct caa agg acc cca gac agt ggc tta gct		
cag cac ccc ttc caa aat 3072		
Pro Gln Arg Thr Pro Asp Ser Gly Leu Ala		
Gln His Pro Phe Gln Asn		
1010	1015	1020
gag gac tat cgt ccc cgg agc gcc agc ccc		
agc cgc acc cat gtg ctc 3120		
Glu Asp Tyr Arg Pro Arg Ser Ala Ser Pro		
Ser Arg Thr His Val Leu		
1025	1030	1035
1040		
ggt gga aac cag tgg aga act ggc ccc tgg		
gga gca tgt tcc agt acc 3168		
Gly Gly Asn Gln Trp Arg Thr Gly Pro Trp		
Gly Ala Cys Ser Ser Thr		
1045	1050	1055
tgt gct ggc gga tcc cag cgg cgt gtt gtt		
gta tgt cag gat gaa aat 3216		
Cys Ala Gly Gly Ser Gln Arg Arg Val Val		
Val Cys Gln Asp Glu Asn		
1060	1065	1070
gga tac acc gca aac gac tgt gtg gag aga		
ata aaa cct gat gag caa 3264		
Gly Tyr Thr Ala Asn Asp Cys Val Glu Arg		
Ile Lys Pro Asp Glu Gln		
1075	1080	1085
aga gcc tgt gaa tcc ggc cct tgt cct cag		
tgg gct tat ggc aac tgg 3312		
Arg Ala Cys Glu Ser Gly Pro Cys Pro Gln		
Trp Ala Tyr Gly Asn Trp		
1090	1095	1100
gga gag tgc act aag ctg tgt ggt gga ggc		
ata aga aca aga ctg gtg 3360		
Gly Glu Cys Thr Lys Leu Cys Gly Gly Gly		
Ile Arg Thr Arg Leu Val		
1105	1110	1115
1120		
gtc tgt cag cgg tcc aac ggt gaa cgg ttt		
cca gat ttg agc tgt gaa 3408		
Val Cys Gln Arg Ser Asn Gly Glu Arg Phe		
Pro Asp Leu Ser Cys Glu		
1125	1130	1135
att ctt gat aaa cct ccc gat cgt gag cag		
tgt aac aca cat gct tgt 3456		
Ile Leu Asp Lys Pro Pro Asp Arg Glu Gln		

Pro Arg Cys Pro Leu Tyr Thr Trp Arg Ala
 Glu Glu Trp Gln Glu Cys
 1265 1270 1275
 1280
 acc aag acc tgc ggc gaa ggc tcc agg tac
 cgc aag gtg gtg tgt gtg 3888
 Thr Lys Thr Cys Gly Glu Gly Ser Arg Tyr
 Arg Lys Val Val Cys Val
 1285 1290 1295

gat gac aac aaa aac gag gtg cat ggg gca
 cgc tgt gac gtg agc aag 3936
 Asp Asp Asn Lys Asn Glu Val His Gly Ala
 Arg Cys Asp Val Ser Lys 32

【0092】 1300

1305 a C l 添加バッファによる全溶解液、レーン3と9は

【図面の簡単な説明】

バッファTによる可溶性画分、レーン4と10はバッ

【図1】 発現させたH6-KIAA1312蛋白質のN-末端agc tgc gag tat gtc 3984

ファT Tによる不溶性画分1、レーン5と11はバッ

【図2】 発現させたH6-KIAA1312蛋白質のSer Leu

ファT Sによる不溶性画分3、レーン7は分子

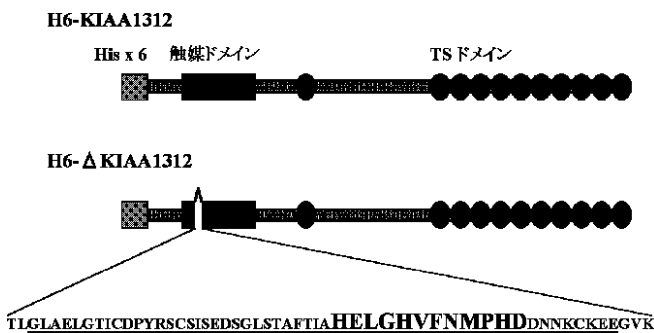
構造および該蛋白質のプロテアーゼ活性中心(太字)を含む領域を除去した欠変異体15(H6-ΔKIAA1312

【図4】 精製したH6-KIAA1312 (H6-fh11767) 蛋白質およびH6-ΔKIAA1312

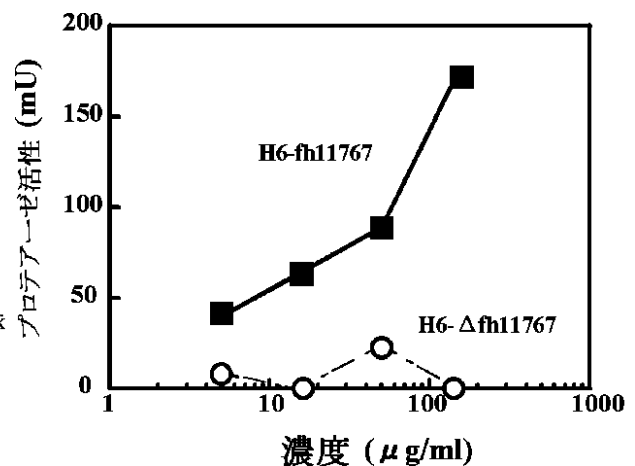
【図3】 発現させたH6-fh11767 (H6-Δfh11767) 蛋白質およびH6-KIAA1312 (H6-fh11767) 蛋白質のSDS-PAGEでの検出結果を示す図である。レーン1 (-)はNaC l 無添加バッファでの全溶解液、レーン2と8はN

を指示図である。H6-KIAA1312 (H6-fh11767) 蛋白質は濃度依存的にカゼインを分解した。また、この活性はH6-ΔKIAA1312 (H6-Δfh11767) 蛋白質では認められない。

【図2】



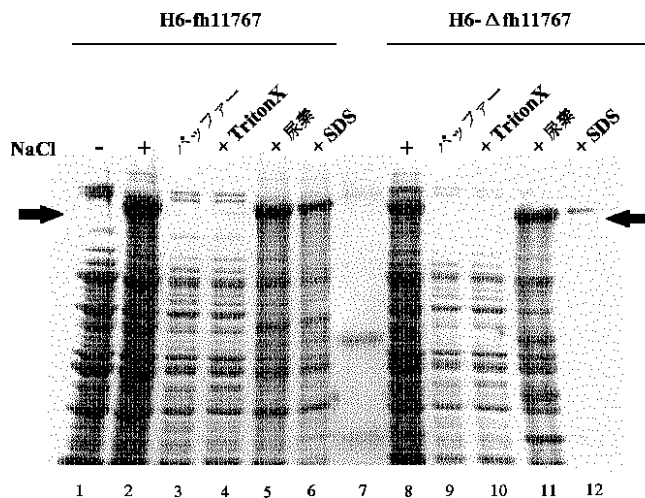
【図4】



【図1】

フューリン開裂部位
 ▼メタロプロテアーゼドメイン
 FLSYPRFEV LVVADNRMV YHGEHLQHYI LTLMSIVASI YKDPSTGNLI
 NIVIVNLIVI HNEQDGPIS FNAQTILKNF CQWQHSKNSP GGIIHDTAVL 100
 亜鉛結合モチーフ
 LTRQDICRAH DKCDTLGLAE LGTICDPYRS CSISEDSGLS TAFTIAHELG
 HVTMPHDDN MKCKEELGVKS PQKVMAPTIN FTNFWMWSK CSRKYYITFL 200
 ディスインテグリン様ドメイン
 DTGYGECILN EPESRFYFLP VQLPGLILNV NKQCELIQGF GSQVCFYMMQ
 CRLWCMNVN GVHKGCRTQH TFWADGTECE PQKHCKYQFC VPKEMDVPVT 300
 TSPドメイン
 DGSWGSWSPP GTCSTCCGGG IKTAIRECNR PEPKNGSKYC VGRMKFKSC
 NTEPCLKQKR DFRDEQCAHF DGEHFNINGL LPNVRWVPKY SGILMEDRCK 400
 LFCRVAGNTA YYQLRDRVID GTFCGQDTND ICVQGLCRQA GCDHVLNSKA
 RFDKCGVCGG DWSSCETVAG TFMVHYGYN TVVRIEAGAT NLDVRLNSFS 500
 GETDDNYLA LSSSKGEFLN NGNFVVTMAK REIRIGNAVV EYSGSETAVE
 RINSTDRIEQ ELLIQVLSVG KLYNEDVRYG FMPIEDKPQ QFYVNSHGFW 600
 QACSKPCQGE RKRKLVCIRE SDQLTVSDQR CDRLPQFGHI TEPGCTDCDL
 RWKVASRSEC SAQCGLGYRT LDIYCAKYSR LDGKTEKVDG GFCSSHPKPS 700
 TSPドメイン
 NREKCSGECN TGGWRYSAWT ECKSCDGGT QRRRAICVNT RNDVLDDSKC
 THQEKVTIQR CSEFFPCQNK SGDWECLVT CGKHHRQV WCQFGEDRLN 800
 TSPドメイン
 DRMCDFETKP TSMQTCQPE CASWQAGFW QCSVTCQGY QLRAVCEIIG
 TYMSVVDND CNAATRFDT QDCLEPSCHP PPAAPETRRS TYSAPRTQWR 900
 FGSWIFCSAT CGKGTMRVY SCRDENGSVA DESACATLPR FVAKEECSTV
 TSPドメイン
 PCGQWKALDW SSCSVTCGQG RATRQVMCVN YSDHVIDRSE CDQDIYFETD 1000
 QDCMSFPCPQ RPTDGLAQH FTQNDYRPR SASPSRTHVL GGNQWRTGFW
 GACSSTCAGG SQRRVVVQD ENGYTANDCV ERIKEDQRA CESGCPQWA 1100
 YGNWECTKL CGGGIRTRIV VCQRNGERF PDLSCILLDK PFDREQCINTH
 TSPドメイン
 ACPHDAWST GPWSSCSVSC GRGKQRNVY CMAKDGSYLE SDYCKHLAKP 1200
 TSPドメイン
 HGRKRCRGR CPRWKAGANS QCSVSCGRGV QQRHVGCQIG THKIARETEC
 TSPドメイン
 NPYTRPESER DCQGPRCPFLY TWRAEWQEC TETCCEGSSRY RKVVVCDDNK 1300
 NEVHGARCIV SKRPVDRESC SLQPCYVWI TGENSEVPSW EL*

【図3】



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)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
45/00		A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 6
48/00		1/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/02		9/08	4 H 0 4 5
1/04		9/10	1 0 1
9/08		19/00	
9/10	1 0 1	19/02	
19/00		25/28	
19/02		29/00	
25/28			1 0 1
29/00		31/18	
	1 0 1	35/00	
31/18		35/04	
35/00		43/00	1 1 1
35/04		C 0 7 K 16/40	
43/00	1 1 1	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/40		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		9/64	Z N A Z
1/21		C 1 2 Q 1/02	

	5/10		G O 1 N	33/53	D
	9/64	Z N A			M
C 1 2 Q	1/02			33/566	
G O 1 N	33/53		C 1 2 N	15/00	A
				5/00	A
	33/566		A 6 1 K	37/54	

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA12
 DA06 HA11 HA17
 4B050 CC03 DD07 FF14 LL01 LL03
 4B063 QA18 QQ06 QQ36 QR16 QR75
 4B065 AA26X AA93Y AB01 BA01
 CA33 CA44
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
 BA01 BA08 BA22 BA23 DC02
 NA14 ZA152 ZA162 ZA392
 ZA452 ZA672 ZA962 ZB112
 ZB152 ZB262 ZC352 ZC552
 4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 DD63
 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
 MA02 MA04 NA14 ZA15 ZA16
 ZA39 ZA45 ZA67 ZA96 ZB11
 ZB26 ZC35 ZC55
 4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA13
 NA14 ZA15 ZA16 ZA39 ZA45
 ZA67 ZA96 ZB11 ZB15 ZB26
 ZC35 ZC55
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 CA45 DA75 EA20 FA74 GA26

专利名称(译)	蛋白酶具有蛋白酶活性		
公开(公告)号	JP2003125771A	公开(公告)日	2003-05-07
申请号	JP2001331498	申请日	2001-10-29
申请(专利权)人(译)	第一制药有限公司		
[标]发明人	横田博 深山勝義		
发明人	横田 博 深山 勝義		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K35/76 A61K35/761 A61K38/46 A61K38/48 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/566		
FI分类号	A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P9/08 A61P9/10.101 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.ZNA.Z C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A C12N5/00.A A61K37/54 A61K35/761 A61K38/46 A61K38/48 C12N5/00.101 C12N5/10 C12N9/64.ZZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/HA11 4B024/HA17 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/FF14 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ36 4B063/QR16 4B063/QR75 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA33 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC02 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA392 4C084/ZA452 4C084/ZA672 4C084/ZA962 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA39 4C086/ZA45 4C086/ZA67 4C086/ZA96 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/MA02 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZA15 4C087/ZA16 4C087/ZA39 4C087/ZA45 4C087/ZA67 4C087/ZA96 4C087/ZB11 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZC35 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：阐明属于ADAMTS家族的蛋白质的多样性，并找出其用途。 解决方案：通过检查在Kazusa DNA研究所克隆的已知基因 KIAA1312的序列特征和生物学功能，通过比较Tsp1结构域和11个结构域，将该基因的基因产物与ADAMTS家族的已知蛋白进行了比较。他们发现它们具有重复一次的巨大结构差异并具有蛋白酶活性，并发现了该基因产物的用途。 另外，根据本发明的肽或具有该肽的蛋白质，编码该肽的多核苷酸或其互补链，识别该蛋白质的抗体，使用它们鉴定化合物的方法，通过鉴定方法鉴定的化合物 提供等，并且提供使用它们的药物组合物和用于诊断的测量方法。

【图 4】

