(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2004-222722
(P2004-222722A)
(43)公開日　平成16年8月12日(2004.8.12)

(51)Int.Cl.[7]		F I			テーマコード（参考）
C12N	15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K	38/00	A61P	1/04		4B050
A61P	1/04	A61P	1/16		4B063
A61P	1/16	A61P	7/00		4B065
A61P	7/00	A61P	7/02		4C084

審査請求 未請求　請求項の数 17　ＯＬ　（全 27 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-431333(P2003-431333)
(22)出願日　平成15年12月25日(2003.12.25)
(62)分割の表示　特願平10-169158の分割
原出願日　平成10年6月3日(1998.6.3)
(31)優先権主張番号　特願平9-160422
(32)優先日　平成9年6月3日(1997.6.3)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　000001100
呉羽化学工業株式会社
東京都中央区日本橋堀留町１丁目９番１１号
(74)代理人　100090251
弁理士　森田　憲一
(72)発明者　広瀬　国孝
東京都練馬区春日町４丁目８番１６号
(72)発明者　井野口　英司
群馬県館林市北成島町７３４の２
(72)発明者　箱崎　充徳
埼玉県川口市芝中田１丁目３０番３号　メゾン高柳１０２号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質、それをコードする遺伝子、医薬組成物、及びヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の免疫学的分析方法

(57)【要約】
【課題】白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させることができる新規タンパク質、それをコードする遺伝子、医薬組成物、及び前記タンパク質の免疫学的分析方法を提供する。
【解決手段】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、アミノ酸残基７２７個からなり、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及び３個のトロンボスポンジンドメインを有する。本発明の医薬組成物は、有効成分として前記タンパク質を含有する。本発明の免疫学的分析方法では、前記タンパク質と特異的に反応することのできる免疫反応性物質を用いる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むことを特徴とするタンパク質。
【請求項２】
配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列において、１ないし数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつヒトＡＤＡＭＴＳ－１活性を有することを特徴とするタンパク質。
【請求項３】
請求項１又は２に記載のタンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子。
【請求項４】
配列表の配列番号１の配列で表わされる塩基配列を含む、請求項３に記載の遺伝子。
【請求項５】
請求項３又は４に記載の遺伝子を含むことを特徴とするベクター。
【請求項６】
請求項５に記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体。
【請求項７】
請求項１又は２に記載のタンパク質を含むことを特徴とする医薬組成物。
【請求項８】
白血球減少剤である、請求項７に記載の医薬組成物。
【請求項９】
血小板減少剤である、請求項７に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
赤血球増加剤である、請求項７に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
請求項１又は２に記載のタンパク質と特異的に反応することを特徴とする免疫反応性物質。
【請求項１２】
配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質と、被検試料とを接触させ、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と前記免疫反応性物質との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の免疫学的分析方法。
【請求項１３】
被検試料における、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を分析することを特徴とする、免疫状態の体外検出方法。
【請求項１４】
配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドと、被検試料とを接触させ、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡと前記遺伝子との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの分析方法。
【請求項１５】
被検試料における、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡを分析することを特徴とする、免疫状態の体外検出方法。
【請求項１６】
配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質を含有することを特徴とする、免疫状態の分析試薬。
【請求項１７】
配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タ

ンパク質のｍＲＮＡの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、免疫状態の分析試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質、それをコードする遺伝子、医薬組成物、及びヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の免疫学的分析方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

マウスＡＤＡＭＴＳ（Ａ ｄｉｓｉｎｔｅｇｒｉｎ ａｎｄ ｍｅｔａｌｌｏｐｒｏｔｅｉｎａｓｅ ｗｉｔｈ ｔｈｒｏｍｂｏｓｐｏｎｄｉｎ ｍｏｔｉｆｓ）－１遺伝子は、マウスに移植すると癌悪疫質を引き起こすマウス大腸癌細胞株から、ｃＤＮＡとして単離された遺伝子であり、この遺伝子にコードされるマウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及び３個のトロンボスポンジンドメインを有するユニークなタンパク質である［Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２，５５６－５６２（１９９７）］。

【０００３】

マウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の生理学的機能は未だに不明であるが、前記タンパク質に含まれている個々の機能ドメインについては、すでに種々の報告がある。

例えば、ヘビ毒のディスインテグリンは、システィンに富み、抗血液凝固作用を有するタンパク質のファミリーに属する［Ｓｅｍｉｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，３１，２８９－３００（１９９４）］。

【０００４】

また、例えば、マトリックスメタロプロテアーゼドメインとディスインテグリンドメインとを有するタンパク質ファミリーとしては、従来から、ＡＤＡＭ（Ａ ｄｉｓｉｎｔｅｇｒｉｎ ａｎｄ ｍｅｔａｌｌｏｐｒｏｔｅｉｎａｓｅ）ファミリーが知られている［Ｎａｔｕｒｅ，３７７，６５２－６５６（１９９５）；Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．，５，１５１－１５７（１９９３）；Ｎａｔｕｒｅ，３５６，２４８－２５２（１９９２）］。

これまでにＡＤＡＭファミリーとして知られるタンパク質としては、例えば、ファーティリン（ｆｅｒｔｉｌｉｎ）、エピダーマルアピカルプロテイン（ｅｐｉｄｅｒｍａｌ ａｐｉｃａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ）、シリテスチン（ｃｙｒｉｔｅｓｔｉｎ）、ＭＤＣ（システイン含有量の高いメタロプロテアーゼ様ディスインテグリン様タンパク質；ｍｅｔａｌｌｏｐｒｏｔｅａｓｅ－ｌｉｋｅ，ｄｉｓｉｎｔｅｇｒｉｎ－ｌｉｋｅ ａｎｄ ｃｙｓｔｅｉｎ－ｒｉｃｈ ｐｒｏｔｅｉｎ）、メルトリン（ｍｅｌｔｒｉｎ）、ＭＳ２、及びメタージディン（ｍｅｔａｒｇｉｄｉｎ）を挙げることができる［Ｎａｔｕｒｅ，３７７，６５２－６５６（１９９５）；Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．５，１５１－１５７（１９９３）；Ｎａｔｕｒｅ，３５６，２４８－２５２（１９９２）；Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，２８６，６７１－６７５（１９９２）；Ｄｅｖ．Ｇｒｏｗｔｈ．Ｄｉｆｆｅｒ．，３６，４９－５８（１９９４）；Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２，５８５－５９１（１９９０）；Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１，４５９３－４５９６（１９９６）］。

ファーティリンは、インテグリンを介する精子と卵子の結合に関与しているとの報告［Ｎａｔｕｒｅ，３５６，２４８－２５２（１９９２）］があり、メルトリンは、筋間形成に関与しているとの報告［Ｎａｔｕｒｅ，３７７，６５２－６５６（１９９５）］がある。主として中枢神経などで発現しているＭＤＣは、ヒト乳癌の抑制に働く候補タンパク質である［Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．５，１５１－１５７（１９９３）］。また、ＭＳ２は、マクロファージの１つの抗原として働いている［Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２，５８５－５９１（１９９０）］。しかし、これらＡＤＡＭファミリーに属するタンパク質の生理学的役割は依然として多くは不明である。

【０００５】

マウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン及びディスインテグリンドメインを有するので、ＡＤＡＭファミリーに属するが、トロンボスポンジンドメインを有する点で、従来公知のＡＤＡＭファミリーに属するタンパク質とは異なる。

マトリックスメタロプロテアーゼドメイン及びディスインテグリンドメインを有するＡＤＡＭファミリーには、先に述べたように、骨や筋肉代謝、癌増殖抑制、又は受精に関与する各種タンパク質が含まれ、また、トロンボスポンジンには血管新生阻害作用、及び癌抑制作用があることから、マウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質には特徴的生理機能があると思われる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明者は、未知のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を取得することを目指して、既知のマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を基に設計した各種プローブを用いて、ヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリーからプラークハイブリダイゼーション法によりヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子を取得しようと試みたところ、目的の遺伝子を取得することはできなかった。また、既知のマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を基に設計した各種プライマーを用いて、ヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリーを鋳型とするＰＣＲ法を通常の条件で実施することによって目的遺伝子の取得を試みたが、成功しなかった。そこで、本発明者は、前記のプライマーを用いて、通常よりも緩い条件、すなわち、アニーリング温度を通常よりも低い条件で、ヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリーを鋳型とするＰＣＲ法を実施することにより、新規のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子を単離することができた。こうして得られた遺伝子を大腸菌で産生させ、得られた組換えヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の生物活性を検討したところ、驚くべきことに、新規のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質が、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させる活性を有することが判明した。このような造血機能に影響を与える活性は、プライマーを設計するのに参照したマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の由来からは予想することができず、また、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質に含まれる各ドメインの機能からも予想することができないものである。本発明は、このような知見に基づくものである。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明は、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むことを特徴とするタンパク質に関する。

また、本発明は、前記タンパク質又はその改変体をコードすることを特徴とする遺伝子に関する。

また、本発明は、前記遺伝子を含むことを特徴とするベクターに関する。

また、本発明は、前記ベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体に関する。

【０００８】

また、本発明は、前記タンパク質又はその改変体を含有することを特徴とする医薬組成物に関する。

また、本発明は、前記タンパク質又はその改変体と特異的に反応することを特徴とする免疫反応性物質（例えば、ポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体、若しくはこれらの抗体フラグメント、又は抗血清など）に関する。

また、本発明は、前記免疫反応性物質と、被検試料とを接触させ、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と前記免疫反応性物質との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の免疫学的分析方法に関する。

また、本発明は、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドと、被検試料とを接触させ、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡと前記遺伝

子との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの分析方法に関する。

【０００９】

また、本発明は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質、又はそのｍＲＮＡを分析することを特徴とする、免疫状態の体外検出方法に関する。

更に、本発明は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、免疫状態の分析試薬に関する。

【発明の効果】

【００１０】

本発明によるタンパク質によれば、造血機能を調節することができ、例えば、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１１】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、アミノ酸残基７２７個からなり、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列からなる新規のタンパク質である。本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、図１０～図１２に示すように、Ｎ末端アミノ酸残基であるメチオニンから数えて第１２番目～第２３０番目のアミノ酸残基からなるマトリックスメタロプロテアーゼ（以下、ＭＭＰと称することがある）ドメイン、第２３５番目～第３０５番目のアミノ酸残基からなるディスインテグリン（以下、ＤＩと称することがある）ドメイン、並びに第３２２番目～第３７２番目、第６１８番目～第６６４番目、及び第６７２番目～第７２７番目のアミノ酸残基からなる３個のトロンボスポンジン（以下、ＴＳＰと称することがある）ドメインを有する。また、塩基性アミノ酸であるアルギニン及びリジンがＣ末端領域に多く存在し、このことから、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、血液中においてヘパリンやヘパラン硫酸などの硫酸化多糖分子と相互作用していると思われる。

【００１２】

本発明によるタンパク質には、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体が含まれる。

本明細書において、「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体」とは、そのアミノ酸配列が、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のアミノ酸配列、すなわち、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列であって、かつヒトＡＤＡＭＴＳ－１活性を有するタンパク質を意味する。

また、本明細書において、「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１活性」とは、造血機能に影響を与える活性、例えば、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させる活性を意味する。

更に、本発明によるタンパク質には、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含む前記タンパク質、若しくは前記改変体の一部分であり、かつヒトＡＤＡＭＴＳ－１活性を有する断片も含まれる。

【００１３】

本発明によるタンパク質は、種々の公知の方法によって得ることができる。例えば、本発明による遺伝子を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することもできるし、あるいは、公知のタンパク質化学的手法により天然由来の本発明のタンパク質を精製することもできる。

【００１４】

本発明の遺伝子には、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体

をコードする遺伝子が含まれる。なお、前記遺伝子には、ＤＮＡ及びＲＮＡの両方が含まれる。ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質をコードする遺伝子としては、例えば、配列表の配列番号１の配列で表わされる塩基配列からなる遺伝子を挙げることができる。

【００１５】

本発明の遺伝子、例えば、配列表の配列番号１の配列で表わされる塩基配列からなる遺伝子は、例えば、本発明者が前記遺伝子を最初に取得する際に用いた以下の方法により取得することができる。

すなわち、マウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を参照して適当な各種ＰＣＲ用プライマーを作製し、通常よりも緩い条件、すなわち、アニーリング温度を通常よりも低い条件で、ヒト腎臓由来のｃＤＮＡライブラリーを鋳型ＤＮＡとしてＰＣＲ法を実行することにより、ＤＮＡ断片を得ることができる。このＤＮＡ断片の塩基配列を決定し、マウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列と比較することにより、目的遺伝子であることを確認することができる。ＰＣＲ法に用いるプライマーの種類に応じて、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の全配列を取得することもできるし、あるいは、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の部分塩基配列を取得し、続いて、ＲＡＣＥ法（Ｒａｐｉｄ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃＤＮＡ ｅｎｄｓ）法［Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８５，８９９８－９００２（１９８８）］により残りの部分塩基配列を取得し、これらの部分塩基配列を遺伝子工学的手法により連結することにより全配列を取得することもできる。

【００１６】

なお、本発明者が実施した前記遺伝子取得方法においては、前記ＰＣＲプライマーの塩基配列を設計する際に、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列が未知であったので、マウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子との間で完全な相同性を示す配列を選択することは実質的に不可能であった。

本発明者は、マウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて、通常の温度条件でＰＣＲ法を実施したが、目的のＤＮＡ断片を得ることができなかった。本発明者は、同じプライマーを用いて、通常よりも緩い条件下、すなわち、通常よりも低いアニーリング温度でＰＣＲ法を実施することにより、目的とするＤＮＡ断片を得ることができた。取得したヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列と、前記プライマーの塩基配列を比較した結果、塩基配列の相同性は、充分なものではなかった。

【００１７】

本発明によってヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列が解明されたので、ＰＣＲ法におけるプライマーの設計、又はプラークハイブリダイゼーション法におけるプローブの設計に、このヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を利用することができる。このようなプライマー又はプローブを用いると、本発明の遺伝子は、本発明者がその遺伝子を最初に取得する際に用いた前記方法に限らず、公知の遺伝子取得方法、例えば、通常条件によるＰＣＲ法、又はプラークハイブリダイゼーション法などを用いても調製することができる。

なお、本発明者は、既知のマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を基に設計したプローブを用いて、プラークハイブリダイゼーション法によりヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリーから未知のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子を取得しようと試みたが、目的とする遺伝子を取得することができなかった。この原因として、用いたプローブの塩基配列の相同性が充分でなかったことを挙げることができるが、それ以外の原因として、ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡ解析を行ったところ、その発現量が非常に少なく、ｃＤＮＡライブラリーを作製しても、そのライブラリー中に含まれるヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子のコピー数が、非常に少ないためであったことを確認している。ヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の塩基配列を基に設計したプローブを使用することにより、プラークハイブリダイゼーション法によっても、本発明の遺伝子を取得することが可能である。

【００１８】

こうして得られた本発明の遺伝子を、例えば、真核生物又は原核生物を宿主として用い

て、本発明のタンパク質を発現させることができる。
目的とする遺伝子を含むＤＮＡ断片を、そのまま宿主細胞に入れても増殖しないので、プラスミドのような細胞内で複製可能な染色体外遺伝子をベクターとして、発現プラスミドを作製することができる。使用することのできるベクターは、宿主細胞内での複製に必要な遺伝情報を含み、自立的に複製することができ、しかも、宿主細胞からの単離精製が容易であり、検出可能なマーカーを有することが望ましい。
【００１９】
本発明によるＤＮＡを含む発現ベクターは、種々の市販のベクターを用いて、宿主細胞に応じて適宜構築することができ、これらの公知ベクターへのＤＮＡの挿入方法も周知である。
原核生物の宿主としては、大腸菌の菌株、例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、ＨＢ１０１、ＪＭ１０９、ＤＨ５α、ＡＧ－１、Ｋ１２株２９４（ＡＴＣＣ３１４４６）、Ｂ、χ１７７６（ＡＴＣＣ３１５３７）、Ｃ６００、若しくはＷ３１１０（Ｆ－、λ－、プロトトロフィック；ＡＴＣＣ２７３７５）を挙げることができる。また、バチラス属の菌株（例えば、枯草菌）、腸内細菌［例えば、ネズミチフス菌若しくは霊菌（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）等］、又はシュードモナス属の菌株等を挙げることができる。
【００２０】
前記の原核生物を宿主として使用する場合のベクターとしては、本発明による遺伝子を発現することができるように前記遺伝子の上流にプロモーター及びＳＤ塩基配列、更にタンパク質合成開始に必要な塩基配列・ＡＴＧを付与した発現プラスミドを使用することができる。大腸菌株等のベクターとしては、一般に、ｐＵＣ１９、ｐＢＲ３２２、又はｐＢＲ３２７等が広く用いられている。
プロモーターとしては、例えば、トリプトファン・プロモーター、P_Lプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｔｒｃプロモーター、ｌｐｐプロモーター、又はβ－ラクタマーゼプロモーター等を使用することができる。マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン耐性遺伝子、又はテトラサイクリン耐性遺伝子を挙げることができる。
【００２１】
真核微生物の宿主としては、酵母が一般に広く用いられ、その中でもサッカロミセス属酵母を有利に利用することができる。酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、ＹＲｐ７等を用いることができる。
酵母発現用の発現ベクターのプロモーターの例としては、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）、ＧＡＬ１０、３－ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、又はヘキソキナーゼなどを利用することができる。マーカー遺伝子としては、ｔｒｐｌ遺伝子等を利用することができる。
酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複製起源や終止コドン及びその他のＤＮＡ配列としては、酵母細胞に適している通常の公知のＤＮＡ配列を用いることができる。
【００２２】
高等動物の培養細胞を宿主とする場合には、例えば、赤毛ザル腎臓細胞、蚊幼虫の細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＣＯＳ－７又はＣＯＳ－１等）、マウス胎児繊維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞若しくはそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株、ヒト頸上皮細胞、ヒト胎児腎臓細胞、蛾卵巣細胞、ヒト骨髄腫細胞、又はマウス繊維芽細胞等を用いることができる。
【００２３】
前記ベクターは、一般に、本発明のＤＮＡを宿主細胞内で発現させるための機能配列、例えば、複製開始点、本発明ＤＮＡの上流に位置すべきプロモーター、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、及び／又は転写終止配列を含有している。プロモーターとしては、例えば、アデノウイルス２主後期プロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、ＳＶ４０後期プロモーター、サイトメガロウイルス、ラウスザルコーマウイルス、又は真核生物

遺伝子からのプロモーター（例えば、エストロゲン誘導ニワトリ卵アルブミン遺伝子、インターフェロン遺伝子、グルココルチコイド誘導チロシンアミノトランスフェラーゼ遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、主初期及び後期アデノウイルス遺伝子、ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子、又はα因子遺伝子等）が好ましい。

【００２４】

複製開始点としては、アデノウイルス、ＳＶ４０、ウシパピローマウイルス（ＢＰＶ）、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）、又はそれらの誘導体ベクター由来のものを用いることができる。また、この際のマーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、メトトレキセート耐性ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＲ）遺伝子、又はブラストサイアジンＳ耐性遺伝子等を用いることができる。

【００２５】

昆虫細胞の宿主としては、例えば、ＢｍＮ４細胞、Ｓｆ９細胞、Ｓｆ２１細胞、又はＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａｎｉの卵巣細胞等を用いることができる。また、カイコの幼虫個体も用いることもできる。昆虫細胞への遺伝子導入のためには、ウイルスＤＮＡと目的遺伝子を組み込んだトランスファーベクターとを昆虫細胞に共感染させて行うことができる。ウイルスＤＮＡとしては、例えば、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ ｎｕｃｌｅａｒ ｐｏｌｙｈｅｄｒｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ、又はＡｕｔｏｇｒａｐｈｉｃａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｎｕｃｌｅａｒ ｐｏｌｙｈｅｄｒｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ等を用いることができる。目的遺伝子を挿入するトランスファーベクターとしては、例えば、ポリヘドリンプロモーターやｐ１０プロモーターベクターが使用可能であり、これらのプロモーターの下流に目的遺伝子を組み込むことができる。また、トランスファーベクターは大腸菌での複製は可能だが、昆虫細胞等では複製はできない。従って、大腸菌で大量に複製してから昆虫細胞等により発現させることが好ましい。この方法によると動物細胞の場合より発現物質を大量に回収することができる。

【００２６】

このようにして、作製した発現プラスミドを適当な宿主細胞、例えば、大腸菌若しくは酵母等の微生物細胞、又は動物細胞などへ導入することにより、本発明の形質転換体を製造することができる。ＤＮＡの導入方法としては、公知の手法、例えば、塩化カルシウム処理したコンピテント細胞の利用、プロトプラスト法、リン酸カルシウム法、又は電気せん孔法などを用いることができる。

【００２７】

本発明によるタンパク質には、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体が含まれる。本発明によるタンパク質は、造血機能に影響を与える活性を有し、例えば、血管中に投与すると、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させる活性を有する。従って、本発明は、前記の配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体を有効成分として含有する医薬組成物にも関する。

本発明の医薬組成物は、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体を、それ単独で、又は好ましくは製剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物（特にはヒト）に経口投与又は非経口投与することができる。投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。

【００２８】

これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポ

リビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル（例えば、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、若しくはプロピレングリコール脂肪酸エステル）］、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。

【００２９】

非経口投与方法としては、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。

例えば、注射剤の調製においては、有効成分としての配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。

また、本発明の医薬組成物は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の医薬組成物をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

【００３０】

本発明の医薬組成物は、これに限定されるものではないが、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体を、０．０００１～９９重量％、好ましくは０．０１～８０重量％、より好ましくは０．０１～５０重量％の量で含有することができる。

本発明の医薬組成物を用いる場合の投与量は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などにより異なり、特に制限はないが、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体量として通常成人１人当り０．０００１μｇ／ｋｇ～１０，０００μｇ／ｋｇ、好ましくは０．０００１μｇ／ｋｇ～１，０００μｇ／ｋｇ、より好ましくは０．０１μｇ／ｋｇ～１００μｇ／ｋｇ程度を、１日１～４回程度にわけて、経口的に又は非経口的に投与する。

更に、用途も医薬品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能である。

【００３１】

本発明の医薬組成物は、有効成分として配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体を含有するので、例えば、白血球減少剤、血小板減少剤、又は赤血球増加剤として有用である。

一般に、炎症時には、白血球が血液中に動員され、炎症部位に移行し、病態を進展／発症することが知られているので、本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、各種炎症疾患［例えば、リウマチ性関節炎、乾癬、喘息、肝炎、川崎病、痛風、成人呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、クローン病、潰瘍性大腸炎、敗血症、又は腎炎など］の治療に有効であると考えられる。また、本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質には、血小板数及び白血球数を減少させる作用があるので、例えば、真性多血症の治療に有効である。また、発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質には血小板数を減少させる作用があることから、本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質が抗血栓作用を有することが予想され、例えば、心筋梗塞、脳梗塞、又は多臓器不全の治療にも有効であると考えられる。更には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質には有意に赤血球数を上昇させる作用があることから、エリスロポエチンのように、貧血の治療にも有効であると考えられる。

【００３２】
免疫系刺激物質であるリポ多糖体（ＬＰＳ；例えば、１０μｇ／マウス）をマウスに投与すると、マウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の発現が、心臓及び腎臓において超誘導される［Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２，５５６－５６２（１９９７）］ことから、マウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、致死的な急性炎症時（例えば、エンドトキシンショック）に、心臓及び腎臓に対して防衛的に（ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ）に機能している可能性がある。
【００３３】
トロンボスポンジン（ＴＳＰ）は、内皮細胞増殖を特異的に抑制する血管新生抑制因子として知られており［Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１１１，７６５－７７２（１９９０）］、ＴＳＰ遺伝子を導入した癌細胞において、癌細胞の増殖・転移を抑制することが可能であるとの報告［Ｃａｎｃｅｒ．Ｒｅｓ．，５４，６５０４－６５１１（１９９４）］がなされていることから、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質も、制癌作用や癌転移抑制作用を示す可能性がある。また、ＴＳＰやディスインテグリンは骨代謝にも関与するとの最近の報告［Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２１３，１０１７－１０２５（１９９５）］から、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の骨粗鬆症などの代謝性骨疾患治療への応用も考えられる。
【００３４】
本発明の免疫反応性物質は、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質）、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質改変体と特異的に反応する。本発明の免疫反応性物質には、例えば、抗体（モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体）、これらの抗体のフラグメント［例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、又はＦｖ等］、又は抗血清などが含まれる。本発明の免疫反応性物質は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と特異的に反応するので、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の免疫学的分析方法の試薬として有用である。
【００３５】
本発明のモノクローナル抗体は、従来公知の方法、例えば、次のようにして調製することができる。
抗原を含む生理食塩水を等量のフロイント氏完全アジュバンド若しくは不完全アジュバンド、又はその等価物、例えば、Ｈｕｎｔｅｒ’ｓ ＴｉｔｅｒＭａｘ^{TM}（フナコシ；Ｃａｔ．Ｎｏ．ＹＴ００１－００，東京，日本）と乳化混合して、常用する骨髄腫細胞との適性を考慮して選択された哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、又はハムスターなど）、特にはマウス（例えば、ＢＡＬＢ／ｃマウス）の皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、又は皮内等のいずれかに投与する（初回免疫）。以後、２～４週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫を抗原液のみで行い、最終免疫から数日後に哺乳動物から脾臓を無菌的に取り出し、脾細胞を調製する。
この脾細胞を用いて、細胞融合を行う。細胞融合のもう一方の親細胞である骨髄腫細胞は公知の細胞株、例えば、Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）［Ｎａｔｕｒｅ，２５６，４９５－４９７（１９７５）］、Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）［Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，８１，１－７（１９７８）］、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３（ＡＴＣＣ受託番号：ＣＲＬ－１５８０）などを使用することができる。
【００３６】
細胞融合は、公知の方法に従い、例えば、ミルシュタインらの方法［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，７３，３－４７（１９８１）］等に準じて行うことができる。得られたハイブリドーマを移植した哺乳動物（例えば、マウス）の腹水から目的とするモノクローナル抗体を分離精製する。分離精製には、公知の方法、例えば、硫酸アンモニウムによる透析イオン交換クロマトグラフィー、プロテインＡ若しくはプロテインＧ結合多糖類担体若しくは抗マウスイムノグロブリン抗体結合多糖類担体を用いた親和性カラムクロマトグラフィー、透析、又は凍結乾燥などを用いることができる。

【００３７】
また、本発明のポリクローナル抗体は、従来公知の方法、例えば、以下に示す方法により調製することができる。すなわち、抗原を含む生理食塩水を等量のフロイント氏完全アジュバンド若しくは不完全アジュバンド、又はその等価物、例えば、Ｈｕｎｔｅｒ’ｓ ＴｉｔｅｒＭａｘ™（フナコシ；Ｃａｔ．Ｎｏ．ＹＴ００１－００，東京，日本）と乳化混合して、哺乳動物、特にはウサギ、又はヤギ等の皮下、腹腔内、又は筋肉内などのいずれかに投与する（初回免疫）。以後、２～４週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫から１～２週間後に哺乳動物の頚動脈又は心臓から血液を採取して血清を硫酸アンモニウムによって塩析することにより調製することができる。

【００３８】
本発明の抗体フラグメントは、例えば、本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を常法によりタンパク質分解酵素によって消化し、続いて、タンパク質の分離・精製の常法に従って得ることができる。

【００３９】
免疫機能刺激物質であるＬＰＳなどによりヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の産生が亢進されることなどから、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を、免疫状態の体外検出方法において免疫状態の診断マーカーと利用することができる。すなわち、被検対象者から採取した被検試料に関して、本発明の体外検出方法を適用することによって、その被検対象者の生体防御系が、種々の疾病、例えば、炎症、癌、悪疫質（例えば、癌悪疫質若しくは感染症性悪疫質など）、感染症、又は白血病などにより変化している場合には、その生体防御系に相当する免疫状態を検出することができる。一方、前記被検対象者の生体防御系が正常である場合には、その生体防御系に相当する免疫状態を検出することができる。

【００４０】
本発明において用いることのできる被検試料としては、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質が含まれている可能性があれば特に限定されるものではなく、生物学的試料、例えば、ヒト（特には患者）から採取した細胞等の組織若しくはその抽出物、又は血液（例えば、血清又は血漿）、尿、若しくは脳脊髄液等の体液などを例示することができる。また、通常の臨床検査等における被検試料であれば、特に限定されず、使用することが可能である。

【００４１】
被検試料中におけるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の分析工程では、まず最初に、前記の被検試料を、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応性のある免疫反応性物質と接触させる。この際に、もし被検試料内にヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質が存在しなければ、前記免疫反応性物質との反応が生じないが、もし被検試料内にヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質が存在すると、そのヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と前記の免疫反応性物質とが結合して、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫反応性物質との結合体が、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の存在量に応じて生成する。この結合体は、公知の方法によって簡単に検出することができるので、結合体の存在や量から前記被検試料中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の存在を検出したり、その量を測定することができる。被検試料として組織切片又は細胞を用い、蛍光抗体法又は酵素抗体法により、組織又は細胞中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を測定することも可能である。

【００４２】
ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質としては、例えば、抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗血清、抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ポリクローナル抗体、若しくは抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント等が挙げられる。これらは単独でも、また組み合わせて同時に用いることもできる。前記抗体フラグメントには、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、又はＦｖ等が含まれる。

【００４３】
本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の免疫学的分析方法では、被検試料と、ヒト

ＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質とを接触させ、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－免疫反応性物質結合体を生成させる。そして、免疫化学的測定法により、抗体に結合したヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を検出し、その量を測定することによって、被検試料中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質レベルを知ることができる。

【００４４】

免疫化学的測定法としては、原則的には、すべての慣用のイムノアッセイ、例えば、ＥＩＡ法、ＥＬＩＳＡ法、又はＲＩＡ法等を用いることができる。これらの免疫化学的測定法は、一般に次の方法に大別することができる。

（１）競合法：未知量の抗原を含む被検試料と標識剤で標識した抗原の一定量とを対応する抗体の一定量に対して競合反応させ、抗体と結合した標識抗原又は抗体と結合しなかった標識抗原の活性を測定する。

（２）サンドイッチ法：未知量の抗原を含む被検試料に、担体上に保持された過剰量の抗体を加えて反応させ（第１反応）、次に標識剤で標識した過剰量の抗体の一定量を加えて反応させる（第２反応）。担体上に保持された標識抗体又は担体上に保持されなかった標識抗体の活性を測定する。第１反応及び第２反応は同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。

標識剤が放射性同位元素である場合には、ウェルカウンター又は液体シンチレーションカウンターで測定することができる。標識剤が酵素である場合には、基質を加えて放置し、比色法又は蛍光法で酵素活性を測定することができる。標識剤が蛍光物質や発光物質であっても、それぞれ公知の方法に従って測定することができる。

【００４５】

上記の方法以外に、最近では、電気泳動したタンパク質をニトロセルロース等のフィルターに移し、抗体を用いて目的のタンパク質を検出する、ウェスタンブロット法が行われるようになってきたが、本発明におけるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の検出にももちろん利用することができる。

これらの測定法において用いる抗体は、公知の抗体標識法によって標識することができ、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、又は発光性物質等の適当なマーカーで標識しておくことができる。

放射性同位元素としては、例えば、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、又は^{35}Ｓなどを用いることができる。

【００４６】

酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、グリコシダーゼ（例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、β－グルクロニダーゼ、β－フルクトシダーゼ、α－ガラクトシダーゼ、α－グルコシダーゼ、若しくはα－マンノシダーゼ）、アミラーゼ（例えば、α－アミラーゼ、β－アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルコアミラーゼ、若しくはタカアミラーゼ）、セルラーゼ、若しくはリゾチーム等のカルボヒドラーゼ；ウレアーゼ、若しくはアスパラギナーゼ等のアミダーゼ；コリンエステラーゼ（例、アセチルコリンエステラーゼ）、ホスファターゼ（例、アルカリホスファターゼ）、スルファターゼ、若しくはリパーゼ等のエステラーゼ；デオキシリボヌクレアーゼ、若しくはリボヌクレアーゼ等のヌクレアーゼ；カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、若しくはチトクロームオキシダーゼ等の鉄・ポルフィリン酵素；チロシナーゼ、若しくはアスコルビン酸オキシダーゼ等の銅酵素；又はアルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、若しくはイソクエン酸脱水素酵素等の脱水素酵素などを用いることができる。

蛍光物質としてはフルオレスカミン、又はフルオレッセンスイソチオシアネートなどを、発光性物質としてはルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、又はルシゲニンなどをそれぞれ挙げることができる。

【００４７】

前記の各種標識からの信号の検出は、それ自体公知の方法で実施することができる。

また、抗体と標識剤とを結合させる方法としては、任意の常法、例えば、クロラミンＴ

法［Ｎａｔｕｒｅ，１９４，４９５－４９６，（１９６２）］、過ヨウ素酸法［Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２２，１０８４－１０９１，（１９７４）］、又はマレイミド法［Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，７９，２３３－２３６，（１９７６）］などを用いることができる。

【００４８】

上記測定方法のうち、例えば、ＥＩＡ法は次のように行うことができる。まず、担体（例えば、アッセイプレート）上に固定された第１抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体に被検試料を加え、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に酵素標識剤（例えばペルオキシダーゼ）を結合させた第２抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体を加え、前記結合体に第２抗体を更に結合させ、「第１抗体－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－第２抗体」結合体を生成させる。得られた「第１抗体－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－第２抗体」結合体に、前記標識酵素（ペルオキシダーゼ）の基質を加え、酵素反応による生成物の吸光度又は蛍光強度を測定することにより前記の「第１抗体－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－第２抗体」結合体に付着する標識酵素の酵素活性を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と吸光度又は蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む被検試料について得られた吸光度又は蛍光強度を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の量を測定することができる。

【００４９】

また、以下に示す方法によってＥＩＡ法を行うこともできる。すなわち、まず、担体（例えば、アッセイプレート）と被検試料とを接触することにより、被検試料内のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を担体上に固定させ、続いて抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体（１次抗体）を加え、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と１次抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に酵素標識剤（例えばペルオキシダーゼ）を結合させた抗１次抗体抗体（２次抗体）を加え前記結合体に２次抗体を結合させ、「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－１次抗体－２次抗体」結合体を生成させる。得られた「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－１次抗体－２次抗体」結合体に、前記標識酵素（ペルオキシダーゼ）の基質を加え、酵素反応による生成物の吸光度、又は蛍光強度を測定することにより、前記の「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－１次抗体－２次抗体」結合体に付着する標識酵素の酵素活性を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と吸光度又は蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む被検試料について得られた吸光度又は蛍光強度を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の量を測定することができる。

【００５０】

また、ＲＩＡ法は、例えば、次のようにして行うことができる。まず、担体（例えば、試験管）に固定された第１抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体に被検試料を加え、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に放射性同位元素標識剤（例えば、^{125}Ｉ）で標識された第２抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体を加え、前記結合体に第２抗体を更に結合させ、「第１抗体－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－第２抗体」結合体を生成させる。得られた「第１抗体－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－第２抗体」結合体の放射能活性（例えば、γ－放射能活性）を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含有する標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と放射能活性との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む被検試料について得られた放射能活性を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の量を測定することができる。

【００５１】
また、以下に示す方法によってＲＩＡ法を行うこともできる。すなわち、まず、担体（例えば、試験管）と被検試料とを接触させて被検試料内のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を前記担体上に固定させ、続いて抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗体（１次抗体）を加えてヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と１次抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に放射性同位元素標識剤（例えば、^{125}Ｉ）を結合させた抗１次抗体抗体（２次抗体）を加えて前記結合体に２次抗体を結合させ、「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－１次抗体－２次抗体」結合体を生成させる。そして、得られた「ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質－１次抗体－２次抗体」の放射能活性（例えば、γ－放射能活性）を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と放射能活性との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を含む被検試料について得られた放射能活性を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の量を測定することができる。

【００５２】
被験試料中におけるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの分析では、被験試料と、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｍＲＮＡの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドとを反応させ、生成するヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｍＲＮＡ－ポリヌクレオチド結合体の存在を検出、又はその量を測定することにより、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡを分析することができる。
上記ポリヌクレオチドは、選択された遺伝子（ＤＮＡ）から転写されたｍＲＮＡの一部と相補的な又は実質的に相補的な配列を含み、標的遺伝子から転写されたｍＲＮＡとの間で二重鎖を形成する。その標的ｍＲＮＡと安定な複合体を形成するために十分な相補性を有するいずれのポリヌクレオチドも適当であると考えられる。本発明に用いることのできるポリヌクレオチドは、実質的に標的ｍＲＮＡ内のどの領域の範囲で相補的であってもよい。ポリヌクレオチド分子は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質遺伝子に特異的なｍＲＮＡ発現の増減を検出するＤＮＡプローブとして用いることができる。すなわち、標的であるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡに特異的に付着し、分子ハイブリッドを形成することにより、細胞内のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の発現の程度を検出することができる。

【００５３】
本発明で用いることのできるポリヌクレオチドは、標的ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡの特異的塩基配列と相補的な塩基配列を適宜選択し、例えば、公知のＤＮＡ合成装置、ＰＣＲ装置、又は遺伝子クローニング等を用いて調製することができる。種々の長さのポリヌクレオチドを使用することができるが、好ましくは１０塩基以上、より好ましくは１７塩基以上を有するものが好適である。

【００５４】
前記のポリヌクレオチドは、修飾されていないポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド類似体であることができる。適当な類似体として、例えば、エチル－又はメチルホスホネート類似体、ホスホロチオエート修飾されたポリデオキシヌクレオチド［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１４，９０８１－９０９３，（１９８６）；Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１０６，６０７７－６０７９，（１９８４）］等が挙げられる。更に、近年のポリヌクレオチド類似体の製造における進歩により、例えば、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１５，６１３１－６１４８，（１９８７）］又は複合ＲＮＡ－ＤＮＡ類似体であるキメラポリヌクレオチド［ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，２１５，３２７－３３０，（１９８７）］等も使用することができる。

【００５５】
選択されたポリヌクレオチドは、電荷をもつもの、又は電荷をもたないものを含め、いかなる種類のものでもよい。ｉｎ ｖｉｔｒｏ又はｉｎ ｖｉｖｏでこのような実験を行うために、ポリヌクレオチドを公知の標識剤、例えば、放射性同位元素又は蛍光物質等で

常法によって標識することができる。放射性同位元素としては、例えば、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、又は^{35}Ｓ等がある。なかでも、放射性同位元素としてランダムプライマー法［Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１３２，６－１３，（１９８３）］を用いて^{32}Ｐで標識するのが好適である。また、より容易で危険性の少ない取扱が可能なものとして誘導体形成した蛍光色素が挙げられる。蛍光色素としては、ポリヌクレオチドと結合するすべての色素を用いることができるが、例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、４－フルオロ－７－ニトロベンゾフラザン（ＮＢＤ）、クマリン、フルオレサミン、スクシニルフルオレセイン、又はダンシル等が好適に用いられる。

【００５６】

例えば、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｃＤＮＡを用いたノーザンブロット解析によるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｍＲＮＡ量の測定は、以下のように行うことができる。すなわち、任意の体細胞又は組織からｍＲＮＡを抽出、単離し、単離したｍＲＮＡをアガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース又はナイロンメンブランに転写した後、標識ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｃＤＮＡプローブと反応させることにより、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｍＲＮＡ量を測定する。使用するヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｃＤＮＡプローブは、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｍＲＮＡに相補的なＤＮＡであり、１７塩基以上の長さをもつことが望ましい。

【００５７】

本発明の免疫状態の分析試薬は、主要成分として、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質を含む。ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質としては、例えば、抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質抗血清、抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ポリクローナル抗体、若しくは抗ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント等が挙げられる。

また、本発明の免疫状態分析試薬は、主要成分として、前記免疫反応性物質の代わりに、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質ｍＲＮＡの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む構成とすることもできる。

【００５８】

本発明の免疫状態分析試薬を用いることにより、これまで述べてきた方法に従って、被検試料中におけるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質それ自体、又はヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のｍＲＮＡを分析し、その結果から、種々の疾病により生体防御系が変化した被験対象の免疫状態を判定することができる。

【実施例】

【００５９】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【００６０】

《実施例１：ヒトＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡの単離及び塩基配列の決定》

ＰＣＲ法用のプライマーとして、マウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質［Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２，５５６－５６２（１９９７）］における３個のトロンボスポンジン（ＴＳＰ）ドメインの内、Ｎ末端から１番目のＴＳＰドメイン中のアミノ酸配列（配列表の配列番号３）に対応する塩基配列（配列表の配列番号４）からなるＤＮＡ［以下、フォワードプライマー（１）と称する］と、マウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のＣ末端のアミノ酸をコードする塩基配列及びその周辺（すなわち、上流側及び下流側領域）の塩基配列に相補的な塩基配列（配列表の配列番号５）からなるＤＮＡ［以下、バックプライマー（１）と称する］を化学合成した。

【００６１】

０．５μＭフォワードプライマー（１）、０．５μＭバックプライマー（１）、０．５ユニットＴａｑポリメラーゼ（Ｅｘ　Ｔａｑポリメラーゼ；宝酒造，京都，日本）、４０μＭ－４ｄＮＴＰ、及びＰＣＲ緩衝液［組成：１０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．３），

５０ｍＭ－ＫＣｌ］（Ｅｘ　Ｔａｑバッファー；宝酒造，京都，日本）を含む溶液９９μｌに、鋳型ＤＮＡとしてヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリー（Ｍａｒａｔｈｏｎ－Ｒｅａｄｙ　ｃＤＮＡ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）１μｌを加え、通常のＰＣＲ法に比べて低いアニーリング温度でＰＣＲ法を実施した。すなわち、変性工程を９４℃で３０秒間実施し、アニーリング工程を５０℃で３０秒間実施し、ＤＮＡ合成工程を７２℃で２分間実施するサイクルを、４０サイクル実施した。

【００６２】

得られた反応液から５μｌを取り出し、アガロースゲル（１％）電気泳動を行ったところ、図１に示すように、１．２Ｋｂの単一のＤＮＡバンドを認めた。残りの反応液を再泳動し、１．２ＫｂのＤＮＡ断片（以下、Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片と称する）を低融点アガロースゲルから回収し、ｐＣＲ^{TM}２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，サンディエゴ，カリフォルニア州，米国）にクローニングした。

【００６３】

オートマチックＤＮＡシークエンサー（ＤＳＱ１０００；島津製作所，京都，日本）により、クローニングしたＦｌａｇ．１ＤＮＡ断片の塩基配列の一部（３０３ｂｐ）を決定し、マウスＡＤＡＭＴＳ－１に対してホモロジー検索を実施した結果、７７．４％の相同性が認められた。Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片の部分塩基配列、及びその配列と相同性が認められるマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の部分塩基配列を図２に示す。図２において、「：」は、Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子との間で、対応する塩基が一致することを表わす。

更に、ランダムプライムドＤＮＡ－ラベリングキット（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　ｍａｎｍｈｅｉｍ　ＧｍｂＨ，ドイツ）を用いて^{32}ＰでラベルしたマウスＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡが、前記Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片にハイブリダイズすることを、ドットハイブリダイゼーション法［Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１６，４７４３－４７４９（１９７７）］により確認した。結果を図３に示す。コントロールであるｐＣＲ^{TM}２．１ベクターには、^{32}ＰでラベルしたマウスＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡがハイブリダイズしなかったのに対して、マウスＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡ及びＦｌａｇ．１ＤＮＡ断片には、^{32}ＰでラベルしたマウスＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡがハイブリダイズした。

以上のホモロジー検索及びドットハイブリダイゼーションの結果から、このＦｌａｇ．１ＤＮＡ断片がヒトＡＤＡＭＴＳ－１の一部であることが判明した。

【００６４】

前記Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片の上流のＤＮＡ断片を得るために、マラソンｃＤＮＡ増幅キット（Ｍａｒａｔｈｏｎ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）を用いて、ＲＡＣＥ（Ｒａｐｉｄ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃＤＮＡ　ｅｎｄｓ）法を以下のように実施した。

Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片の塩基配列に関するバックプライマーとして、Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片の３’末端領域の塩基配列に相補的な塩基配列（配列表の配列番号６）からなるＤＮＡ（以下、ＧＳＰ－１プライマーと称する）と、Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片の５’側の塩基配列に相補的な塩基配列（配列表の配列番号７）からなるＤＮＡ（以下、ＧＳＰ－２プライマーと称する）とを化学合成した。

また、フォワードプライマーとしては、前記キットに含まれるＡＰ１プライマー及びＡＰ２プライマーをそれぞれ使用した。ＡＰ１プライマーの塩基配列は、配列表の配列番号８の配列で表わされる塩基配列であり、ＡＰ２プライマーの塩基配列は、配列表の配列番号９の配列で表わされる塩基配列である。

【００６５】

ヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリー（Ｍａｒａｔｈｏｎ－Ｒｅａｄｙ　ｃＤＮＡ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）５μｌ、ＡＰ１プライマー１μｌ、ＧＳＰ－１プライマー（１０μＭ）１μｌ、Ｔａｑポリメラーゼ（Ｅｘ　Ｔａｑポリメラーゼ）（０．５ユニット）１μｌ、抗Ｔａｑポリメラーゼ抗体（Ｔａｑ

Ｓｔａｒｔ Ａｎｔｉｂｏｄｙ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）１μｌ、１０倍濃度ＰＣＲバッファー［組成：１００ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．３），５００ｍＭ－ＫＣｌ］（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）５μｌ、及び蒸留水３６μｌを混合し、ＰＣＲ反応を実施した。前記ＰＣＲ反応は、９４℃で３０秒間の工程と６８℃で４分間とからなるサイクルを３５サイクル実施した。得られた反応液を１０ｍＭトリシン－ＥＤＴＡバッファー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）で５０倍に希釈した。

【００６６】

続いて、前記希釈液５μｌ、ＡＰ２プライマー１μｌ、ＧＳＰ－２プライマー（１０μＭ）１μｌ、Ｔａｑポリメラーゼ（Ｅｘ Ｔａｑポリメラーゼ）（０．５ユニット）１μｌ、抗Ｔａｑポリメラーゼ抗体（Ｔａｑ Ｓｔａｒｔ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）１μｌ、１０倍濃度ＰＣＲバッファー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）５μｌ、及び蒸留水３６μｌを混合し、ＰＣＲ反応を実施した。前記ＰＣＲ反応は、９４℃で３０秒間の工程と６８℃で４分間の工程とからなるサイクルを２０サイクル実施した。

得られた反応液から５μｌを取り出し、１％アガロースゲル電気泳動を行ったところ、図４に示すように、約１．２Ｋｂの単一のＤＮＡバンドを得た。常法に従って、このＤＮＡ断片（以下、Ｆｌａｇ．２ＤＮＡ断片と称する）をｐＣＲ^{TM}２．１ベクターにクローニングし、Ｆｌａｇ．２ＤＮＡ断片の全塩基配列をダイターミネーターサイクルシークエンス（Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）法（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｊａｐａｎ，浦安，日本）により決定した。

【００６７】

また、Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片についても、ダイターミネーターサイクルシークエンス（Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）法（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｊａｐａｎ，浦安，日本）により全塩基配列を決定し、Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片及びＦｌａｇ．２ＤＮＡ断片の塩基配列を統合することにより、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡの全塩基配列を決定した。ヒトＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡの全塩基配列（停止コドンを含め、２１８４ｂｐ）は、配列表の配列番号１の配列で表わされる塩基配列であり、前記塩基配列から推定されるヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質のアミノ酸配列（アミノ酸残基７２７個）は、配列表の配列番号２の配列で表わされるアミノ酸配列である。なお、図２に示すＦｌａｇ．１ＤＮＡ断片の一部塩基配列と、配列表の配列番号１の配列で表わされるヒトＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡの全塩基配列との間に、一部、塩基配列が一致しない箇所があるが、図２に示す前記一部塩基配列は、配列決定の途中で得られた塩基配列であり、配列表の配列番号１の配列で表わされる塩基配列が、最終的に決定したヒトＡＤＡＭＴＳ－１ｃＤＮＡの正しい塩基配列である。

【００６８】

ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、システインに富み、Ｃ末端側領域に塩基性アミノ酸であるリジン及びアルギニンが多く分布しており、Ｎ－グリコシレーション部位（第３０７番目～第３０９番目のアミノ酸、及び第５２４番目～第５２６番目のアミノ酸）が２個存在する。

【００６９】

ヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子との塩基配列におけるホモロジーを図５～図９に、それぞれの塩基配列から予想されるアミノ酸配列におけるホモロジーを図１０～図１２に示す。

図５～図９において、「＊」は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子との間で、対応する塩基が一致することを表わす。

図１０～図１２において、「＊」は、ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とマウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質との間で、対応するアミノ酸残基が一致することを表わす。また、図１０～図１２において、「ＭＭＰドメイン」は、マトリックスメタロプロテアーゼドメ

インを意味し、第１１番目及び第１２番目のアミノ酸の間に引いた直線は、その位置からマトリックスメタロプロテアーゼドメインが始まることを表わし、「ＤＩドメイン」は、ディスインテグリンドメインを意味し、第２３４番目及び第２３５番目のアミノ酸の間に引いた直線は、その位置からディスインテグリンドメインが始まることを表わす。更に、図１０～図１２において、「ＴＳＰドメイン」は、トロンボスポンジンドメインを意味し、トロンボスポンジンドメインを構成するアミノ酸配列（３箇所）を四角形で囲んで示す。

ヒトＡＤＡＭＴＳ－１とマウスＡＤＡＭＴＳ－１とは、塩基配列において８５．５％の相同性を示し、アミノ酸配列において９０．１％の相同性を示し、マウスとヒトとの間でその配列がよく保存されているタンパク質であることが判明した。

【００７０】

《実施例２：大腸菌によるヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の調製》

（１）大腸菌発現ベクターの構築

ヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質の内、ＭＭＰドメインから下流の部分をすべて含むヒトＡＤＡＭＴＳ－１部分タンパク質をコードするＤＮＡにおいて、５’側に制限酵素ＳｍａＩ切断部位を導入し、３’側に制限酵素ＮｏｔＩ切断部位を導入するために、配列表の配列番号１０の配列で表わされる塩基配列からなるフォワードプライマー（２）及び配列表の配列番号１１の配列で表わされる塩基配列からなるバックプライマー（２）を化学合成した。

【００７１】

フォワードプライマー（２）５μｌ、バックプライマー（２）５μｌ、ヒト腎臓ｃＤＮＡライブラリー（Ｍａｒａｔｈｏｎ－Ｒｅａｄｙ ｃＤＮＡ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）１μｌ、Ｔａｑポリメラーゼ（ＥｘＴａｑポリメラーゼ）（０．５ユニット）１μｌ、抗Ｔａｑポリメラーゼ抗体（ＴａｑＳｔａｒｔ Ａｎｔｉｂｏｄｙ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）１μｌ、１０倍濃度ＰＣＲバッファー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂ．Ｉｎｃ．，パロアルト，カリフォルニア州，米国）１０μｌ、２．５ｍＭ－４ｄＮＴＰ（宝酒造，京都，日本）８μｌ、及び蒸留水６９μｌを混合し、ＰＣＲ反応を実施した。前記ＰＣＲ反応は、９４℃で１分間の工程、５５℃で４５秒間の工程、及び７２℃で２分間の工程からなるサイクルを４０サイクル実施した。

【００７２】

得られた反応液から５μｌを取り出し、１％アガロースゲル電気泳動を行ったところ、図１３に示すように、約２．２Ｋｂの単一のＤＮＡバンドを得た。常法に従って、約２．２ＫｂのＤＮＡ断片をｐＣＲ^{TM}２．１ベクターにクローニングし、得られたプラスミドを大量調製［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，９，２９８９－２９９８（１９８１）］した。大量調製したプラスミドを制限酵素ＳｍａＩ（宝酒造，京都，日本）及びＮｏｔＩ（宝酒造，京都，日本）で処理することにより得られる約２．２ＫｂのＤＮＡ断片を、大腸菌発現ベクターｐＧＥＸ－５Ｘ－１［Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ．，５８，３９０９－３９１３（１９９０）］（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，ウプサラ，スウェーデン）のＳｍａＩ－ＮｏｔＩサイトにクローニングした。得られた発現プラスミドをｐＧ／ＡＤＡＭＴＳ－１と命名した。プラスミドｐＧ／ＡＤＡＭＴＳ－１の構造を図１４に模式的に示す。ＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（以下、ＧＳＴと称することがある）（分子量＝約２６Ｋｄ）との融合タンパク質（分子量＝約９６Ｋｄ）として発現されると思われる。図１４において、「Ｏｒｉ」は、複製開始点を意味し、「Ａｍｐ^{R}」は、アンピシリン耐性遺伝子を意味し、「ｌａｑ Ｉ^{q}」は、ｌａｑリプレッサーを意味する。

【００７３】

（２）大腸菌によるＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の発現

タンパク質分解酵素活性の低い大腸菌株ＢＬ－２１（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，ウプサラ，スウェーデン）に、プラスミドｐＧ／ＡＤＡＭＴＳ－１を常法［Ｐｒｏ

ｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６９，２１１０－２１１４（１９７２）］によりトランスフォームし、そのプラスミドを保持する大腸菌クローンをアンピシリン耐性株として単離した。５つのアンピシリン耐性クローン（以下、クローン＃１～クローン＃５と称する）を無作為に選び、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含む２×ＹＴ培地（トリプトン１６ｇ，酵母抽出物１０ｇ，塩化ナトリウム５ｇを蒸留水１リットルに溶解して調製；ｐＨ７．２）２ｍｌに殖菌し、３７℃で一晩培養した。次に、１つのクローンに対して、アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）を含むＬＢ培養液１８００μｌの入った試験管２本を１組とし、それぞれの試験管に一晩培養した前記培養液２００μｌを入れた。３７℃で２時間培養した後に、２本１組の試験管の内、一方の試験管に発現誘導剤であるイソプロピル－β－Ｄ－チオ－ガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）（宝酒造，京都，日本）２０μｌ（最終濃度１．０ｍＭ）を加え、更に、３７℃で２時間培養を続けた。なお、２本１組の試験管の内、残る一方は、発現誘導剤を入れないコントロールとした。

【００７４】

培養液１ｍｌをマイクロ遠心機で遠心（１４０００ｒｐｍ，１分間）することにより菌体を集め、リン酸緩衝溶液（組成：１４０ｍＭ－ＮａＣｌ，２．７ｍＭ－ＫＣｌ，１０ｍＭ－Na_2HPO_4，１．８ｍＭ－KH_2PO_4，ｐＨ７．２；以下、ＰＢＳと称する）１００μｌで懸濁した後、２×サンプルバッファー（０．２５Ｍ－トリス－ＨＣｌ，２％ＳＤＳ，３％グリセロール，１０％β－メルカプトエタノール，０．０１％ブロモフェノールブルー；ｐＨ６．８）１００μｌに溶解した。得られた溶液１０μｌをＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、ＳＤＳ－ＰＡＧＥと称する）にかけ、クマシー染色法によって目的とするタンパク質の発現誘導を確認した。

【００７５】

結果を図１５に示す。図１５において、「＋」で示すレーンは、発現誘導剤であるＩＰＴＧを加えて培養した大腸菌を泳動したレーンであり、「－」で示すレーンは、発現誘導剤であるＩＰＴＧを加えずに培養した大腸菌を泳動したレーンである。いずれのクローンにおいても、「＋」で示すレーンには、「ＧＳＴ－ＡＤＡＭＴＳ－１」で示す位置に、分子量約１００Ｋｄのタンパク質が表われ、この分子量は、ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の予想される分子量（約９６Ｋｄ）と一致した。なお、このタンパク質は、いずれのクローンにおいても、「－」で示すレーンには表われていなかった。

５種類のクローン（クローン＃１～クローン＃５）の内、最も高い発現量を示したクローン＃２を以下の実施例に使用した。

【００７６】

（３）ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の抽出・精製

クローン＃２の一晩培養した培養液１ｍｌを２×ＹＴ培養液（１００μｇ／ｍｌアンピシリン含有）１００ｍｌに加え、３７℃で培養した。６００ｎｍにおける吸光度が約０．５になったところで、前記培養液に１００ｍＭ－ＩＰＴＧ１ｍｌを加え、更に、２時間培養を続けた。

前記培養液を遠心（３０００ｒｐｍ，３０分間）することにより、大腸菌を集菌し、得られた菌体をＰＢＳ８ｍｌに懸濁した。懸濁液に、０．５Ｍ－ＥＤＴＡ溶液１ｍｌと２５ｍｇ／ｍｌリゾチーム溶液１ｍｌとを加えて、氷中に３０分間静置した。更に、１１０μｌのトライトンＸ－１００を加えた後に、超音波破砕機（ＴＡＩＴＥＣ，越谷，日本）により氷上で菌体を破砕した。破砕液を遠心（８０００ｒｐｍ，４℃，１０分間）し、得られた沈殿を１．０％トライトンＸ－１００含有ＰＢＳ３０ｍｌに懸濁し、再び遠心（８０００ｒｐｍ，４℃，１０分間）した。

【００７７】

得られた沈殿を１０ｍＭ－ＥＤＴＡ溶液２ｍｌに懸濁し、８Ｍ尿素及び１％メルカプトエタノールを含有する５０ｍＭトリス－ＨＣｌバッファー（ｐＨ８．５）５０ｍｌを加えた。充分に混合した後に、遠心（１５０００ｒｐｍ，４℃，５分間）し、得られた上清を１０ｍＭトリス－ＨＣｌバッファー（ｐＨ８．５）５リットルに対して４℃で透析した。透析を行った溶液を遠心（１５０００ｒｐｍ，４℃，５分間）し、得られた上清を陰イオ

ンクロマトグラフィー（Ｅｃｏｎｏ－Ｐａｃ Ｈｉｇｈ Ｑ；Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂ．，ハーキュルス，カリフォルニア州，米国）に吸着させた後に、０．２～０．４Ｍ塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分を、ＰＢＳ３リットルに対して透析し、続いて、グルタチオンセファロース４Ｂ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，ウプサラ，スウェーデン）１ｍｌに吸着させた［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，９，２９８９－２９９８（１９８１）］。

【００７８】

ＰＢＳ５０ｍｌで前記グルタチオンセファロース４Ｂを洗浄した後に、１０ｍＭグルタチオン溶液８ｍｌで溶出させ［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，９，２９８９－２９９８（１９８１）］、ＧＳＴ検出キット（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，ウプサラ，スウェーデン）にてＧＳＴ活性の高い画分をプールした。

得られた画分の一部をＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけ、クマシー染色を行ったところ、図１６に示すように、ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質であることを、その分子量から確認した。大腸菌培養液１００ｍｌより目的タンパク質約１μｇを抽出・精製した。

【００７９】

得られた融合タンパク質には、ＧＳＴとヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質との間にＦａｃｔｏｒ Ｘａ等で切断することができる部位が存在するので、前記プロテアーゼで消化することによりヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質を得ることができる。このヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質は、例えば、抗体を作製するための抗原として使用することができる。

【００８０】

《実施例３：ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の造血機能に影響を与える活性の検討》

ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の造血機能に影響を与える活性を検討するために、実施例２（３）に記載の方法に基づいて、大腸菌培養液３リットルからＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の大量調製を実施し、目的タンパク質約３０μｇを得た。

ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の造血機能に影響を与える活性として、マウス尾静脈単回投与による血球系細胞数に与える作用を検討した。この評価系は、少量の目的タンパク質で実施することが可能であり、しかも、迅速に生物活性を明らかにすることができる。コントロールとしてベクターｐＧＥＸ－５Ｘ－１を導入した大腸菌から、実施例２（３）に記載の方法に基づいて抽出・精製したＧＳＴタンパク質を用いた。

【００８１】

８匹のＣ$_{57}$ＢＬ／６Ｎマウス（チャールスリバー，横浜，日本）（雄，７週令）に、ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質１μｇを尾静脈より投与し、投与してから３時間及び２４時間後に白血球、赤血球、及び血小板の数を算出した。コントロールとして、８匹のＣ$_{57}$ＢＬ／６Ｎマウス（チャールスリバー，横浜，日本）（雄，７週令）に、ＧＳＴタンパク質１μｇを尾静脈より投与し、同様に、投与してから３時間及び２４時間後に白血球、赤血球、及び血小板の数を算出した。結果を図１７に示す。図１７から明らかなように、ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質を投与したマウスでは、白血球及び血小板の数が、コントロールに比べて有意に低下し、赤血球の数が、コントロールに比べて有意に増加した。

【配列表フリーテキスト】

【００８２】

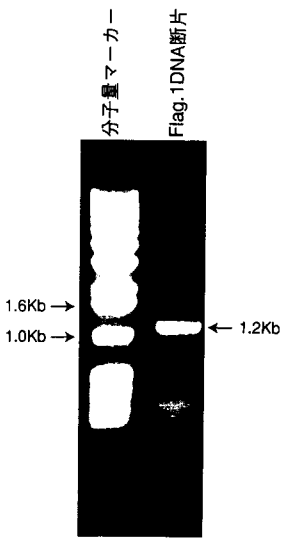
以下の配列表の数字見出し＜２２３＞には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。配列番号６～１１で表される各塩基配列は、それぞれ、ＧＳＰ－１プライマー、ＧＳＰ－２プライマー、ＡＰ１プライマー、ＡＰ２プライマー、フォワードプライマー（２）、及びバックプライマー（２）である。

【図面の簡単な説明】

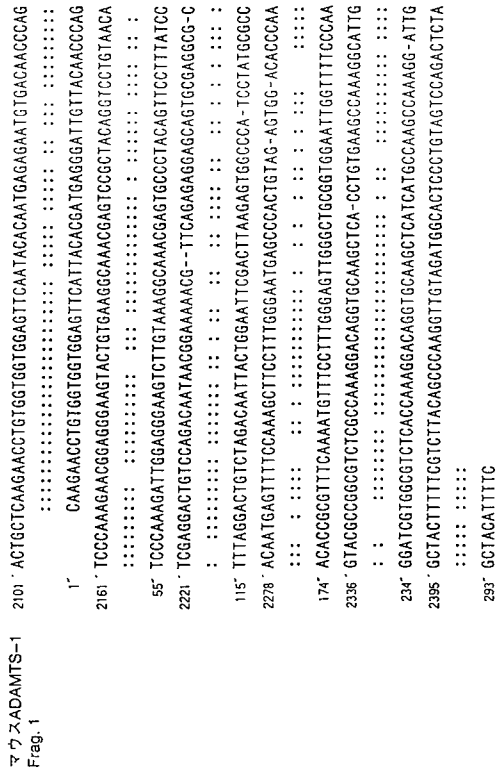
【００８３】

【図１】ＰＣＲ法により得られたＦｌａｇ．１ＤＮＡ断片の電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。
【図２】マウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とＦｌａｇ．１ＤＮＡ断片との相同性を示す説明図である。
【図３】Ｆｌａｇ．１ＤＮＡ断片のドットハイブリダイゼーションの結果を示す説明図である。
【図４】ＲＡＣＥ法により得られたＦｌａｇ．２ＤＮＡ断片の電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。
【図５】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とのホモロジー（第１番目～第４８０番目の塩基配列）を示す説明図である。
【図６】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とのホモロジー（第４８１番目～第９６０番目の塩基配列）を示す説明図である。
【図７】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とのホモロジー（第９６１番目～第１４４０番目の塩基配列）を示す説明図である。
【図８】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とのホモロジー（第１４４１番目～第１９２０番目の塩基配列）を示す説明図である。
【図９】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とマウスＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子とのホモロジー（第１９２１番目～第２１８４番目の塩基配列）を示す説明図である。
【図１０】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とマウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とのホモロジー（第１番目～第２４０番目のアミノ酸配列）を示す説明図である。
【図１１】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とマウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とのホモロジー（第２４１番目～第５１０番目のアミノ酸配列）を示す説明図である。
【図１２】本発明のヒトＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とマウスＡＤＡＭＴＳ－１タンパク質とのホモロジー（第５１１番目～第７２７番目のアミノ酸配列）を示す説明図である。
【図１３】ＰＣＲ法により得られた本発明によるヒトＡＤＡＭＴＳ－１遺伝子の完全長のｃＤＮＡの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。
【図１４】本発明のプラスミドｐＧ／ＡＤＡＭＴＳ－１の構造を模式的に示す説明図である。
【図１５】プラスミドｐＧ／ＡＤＡＭＴＳ－１により形質転換された形質転換体の電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。
【図１６】ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質の電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。
【図１７】ＧＳＴ－ヒトＡＤＡＭＴＳ－１融合タンパク質のマウス静脈単回投与による血球細胞数に与える作用を示すグラフである。

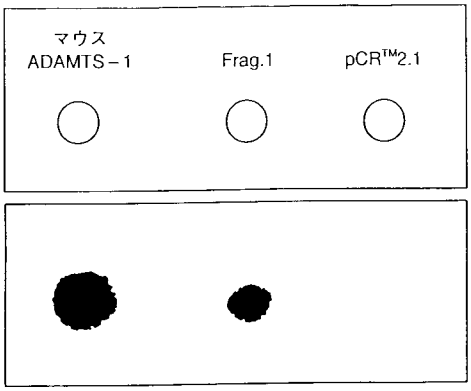
【図１】


分子量マーカー
Flag.1DNA断片
1.6Kb
1.0Kb
1.2Kb

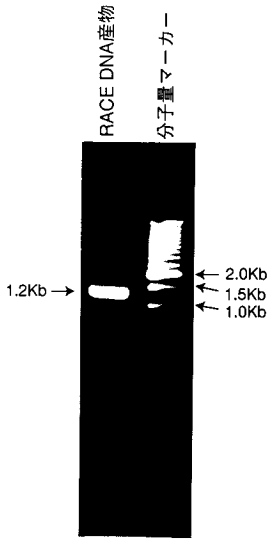
【図２】


マウスADAMTS-1
Frag.1

【図３】


マウス
ADAMTS－1
Frag.1
pCR™2.1

【図４】


RACE DNA産物
分子量マーカー
1.2Kb
2.0Kb
1.5Kb
1.0Kb

【図５】

Hu ADAMTS-1 1'
Mu ADAMTS-1 1"
61'
61"
121'
121"
181'
181"
241'
241"
301'
301"
361'
361"
421'
421"

【図６】

Hu ADAMTS-1 481'
Mu ADAMTS-1 481"
541'
541"
601'
601"
661'
661"
721'
721"
781'
781"
841'
841"
901'
901"

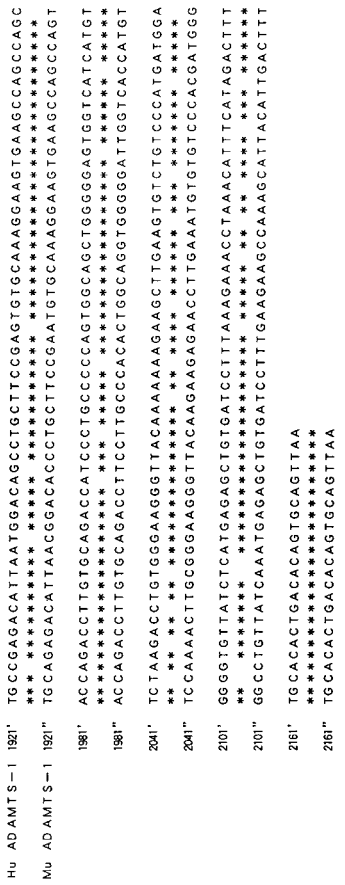
【図７】

Hu ADAMTS-1 961'
Mu ADAMTS-1 961"
1021'
1021"
1081'
1081"
1141'
1141"
1201'
1201"
1261'
1261"
1321'
1321"
1381'
1381"

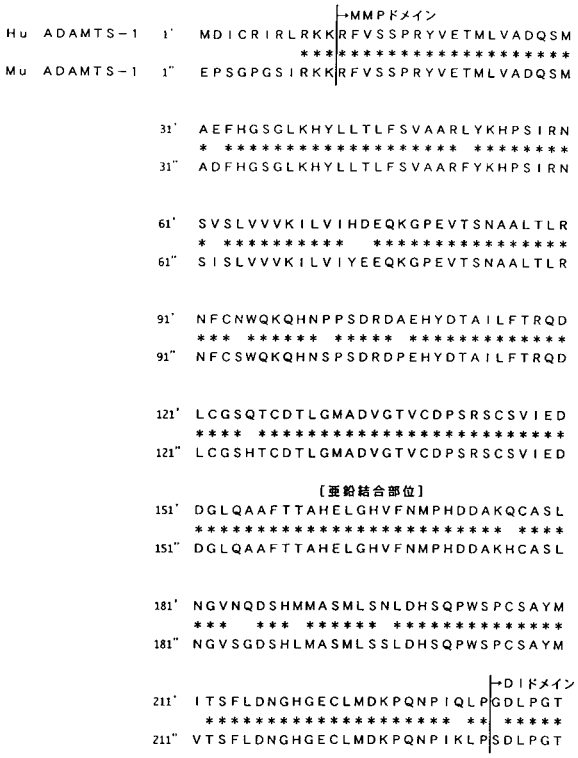
【図８】

Hu ADAMTS-1 1441'
Mu ADAMTS-1 1441"
1501'
1501"
1561'
1561"
1621'
1621"
1681'
1681"
1741'
1741"
1801'
1801"
1861'
1861"

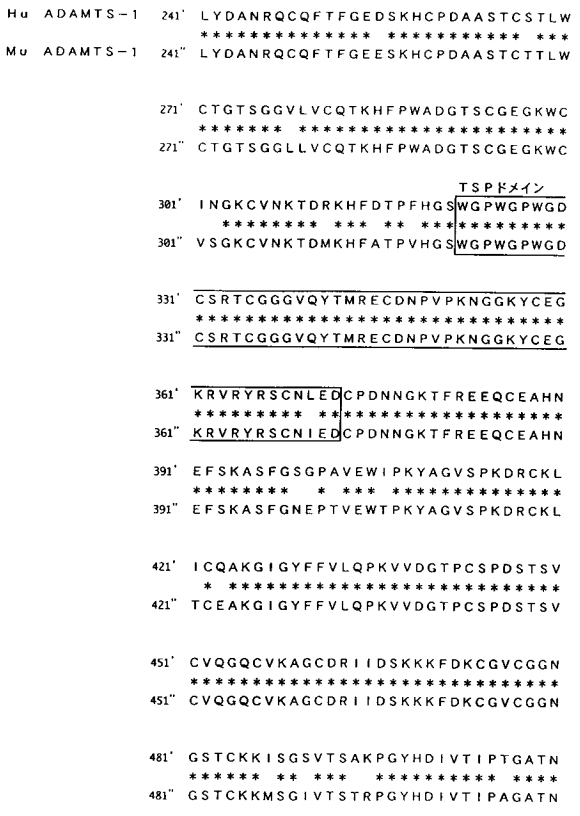
【図９】



【図１０】

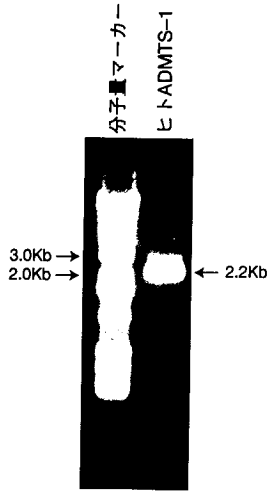


【図１１】

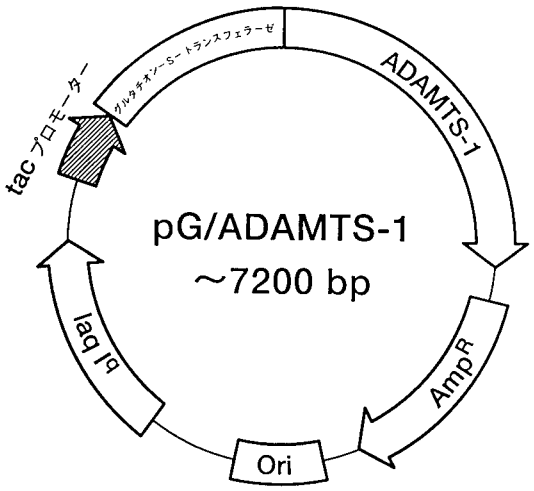


【図１２】

【図１３】

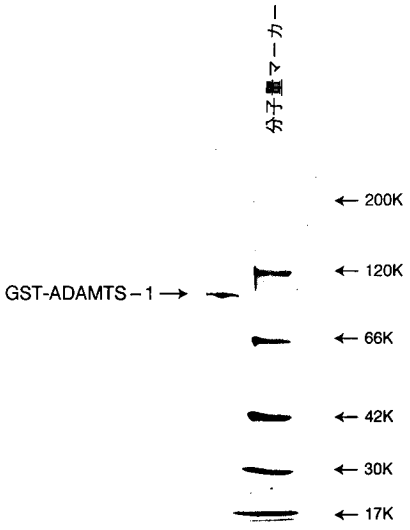


【図１４】

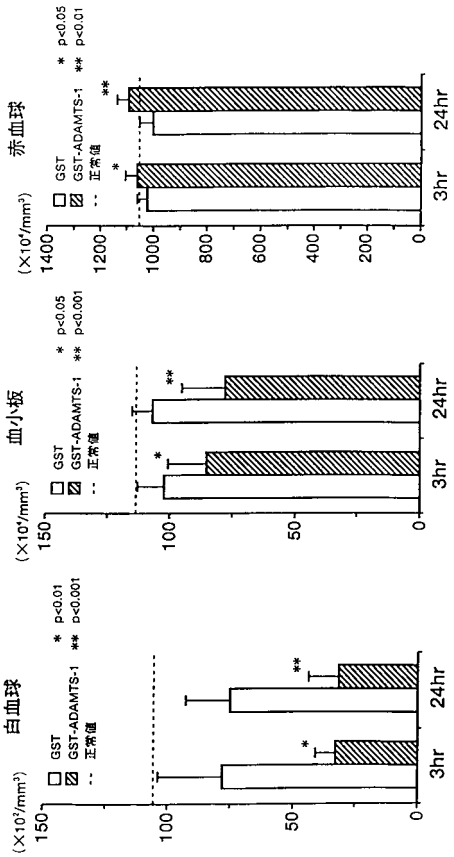


【図１５】

【図１６】



【図１７】



【配列表】

2004222722000001.app

フロントページの続き

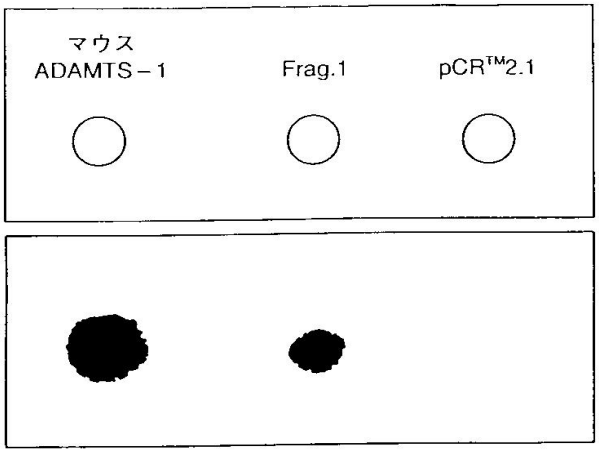
(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 7/02	Ａ６１Ｐ 7/06		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 7/06	Ａ６１Ｐ 9/10	１０３	
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 11/00		
Ａ６１Ｐ 11/00	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 11/06	Ａ６１Ｐ 13/12		
Ａ６１Ｐ 13/12	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 17/06	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 19/02	Ａ６１Ｐ 19/06		
Ａ６１Ｐ 19/06	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 31/04	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ０７Ｋ 14/745	Ｃ０７Ｋ 14/745		
Ｃ０７Ｋ 16/40	Ｃ０７Ｋ 16/40		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 9/64	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ 9/64	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		

(72)発明者 石岡 恵子
東京都小平市鈴木町２丁目１８０番８号１０３号
(72)発明者 石田 裕香子
東京都狛江市西野川４丁目６番１号 京王柴崎コーポラス５０８号
(72)発明者 松島 綱治
千葉県松戸市松戸１５９－１ 松戸第３住宅２－９０５
(72)発明者 久野 耕嗣
石川県金沢市笠舞１丁目１の１７ 白翠荘

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA07 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04 GA11 HA12 HA15
4B050 CC05 DD11 LL01 LL03
4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ44 QQ53 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA33 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 BA01 BA22 BA23 CA53 NA14 ZA362 ZA402 ZA512 ZA552 ZA612 ZA662 ZA752 ZA812 ZA892 ZB112 ZB152 ZB352 ZC312
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA65 DA75 DA89 EA24 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	人类ADAMTS-1蛋白，编码其的基因，药物组合物和人类ADAMTS的免疫学分析方法 -		
公开(公告)号	JP2004222722A	公开(公告)日	2004-08-12
申请号	JP2003431333	申请日	2003-12-25
申请(专利权)人(译)	呉羽化学工业株式会社		
[标]发明人	広瀬国孝 井野口英司 箱崎充徳 石岡恵子 石田裕香子 松島綱治 久野耕嗣		
发明人	広瀬 国孝 井野口 英司 箱崎 充徳 石岡 恵子 石田 裕香子 松島 綱治 久野 耕嗣		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P29/00 A61P31/04 C07K14/47 C07K14/745 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/10.103 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 C07K14/47 C07K14/745 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA512 4C084/ZA552 4C084/ZA612 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB352 4C084/ZC312 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA65 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	森田健一		
优先权	1997160422 1997-06-03 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够减少白细胞和血小板数量并同时增加红细胞数量的新型蛋白质，编码该蛋白质的基因，药物组合物以及对该蛋白质进行免疫分析的方法。 本发明的人ADAMTS-1蛋白由727个氨基酸残基组成，并具有基质金属蛋白酶结构域，双整合蛋白结构域和三个血小板反应蛋白结构域。 本发明的药物组合物含有蛋白质作为有效成分。 在本发明的免疫分析方法中，使用可以与蛋白质特异性反应的免疫反应性物质。 [选择图]无

【図３】