

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002 - 536021

(P2002 - 536021A)

(43)公表日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 16/40	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 3
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		9/48	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 79数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 598646(P2000 - 598646)

(86)(22)出願日 平成12年2月11日(2000.2.11)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月13日(2001.8.13)

(86)国際出願番号 PCT/CA00/00147

(87)国際公開番号 W000/47750

(87)国際公開日 平成12年8月17日(2000.8.17)

(31)優先権主張番号 2,260,376

(32)優先日 平成11年2月11日(1999.2.11)

(33)優先権主張国 カナダ(CA)

(71)出願人 ユニベルシテ ドゥ モントリオール
カナダ国,ケベック エイチ3ティー 1ジェ
イ4,モントリオール,エドゥアル-モン
プティ 2900

(72)発明者 デスグロセイラル, リュク
カナダ国,ケベック ジェイ3エヌ 1エル1
,サン-バジル-ル-グラン,デ ジェス
ブルー 18

(72)発明者 ボワロー, ギュイ
カナダ国,ケベック ジェイ4ワイ 1イー6
,プロサール マルエルブ 7645

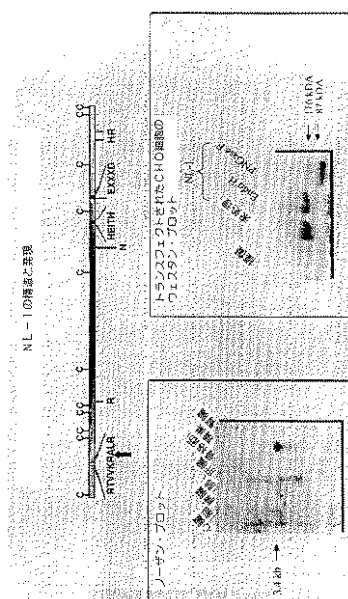
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ネプリリジン (N e p r i l y s i n) ファミリーの新規メタロプロテアーゼ

(57)【要約】

本願明細書中、我々は、NEP様ファミリーのメンバーを同定し、かつ、クローン化することを我々をして可能ならしめるRT-PCR戦略を記載する。ジンシン (z i n c i n s) のためのHEXXHコンセンサス配列のいずれかの側に置かれたコンセンサス配列に対応する縮重オリゴヌクレオチド・プライマーを設計し、そしてマウスとヒトの精巢cDNAを用いたRT-PCRにおいて使用した。上記クラスの酵素の配列から予測される長さをもつDNA断片を得た。これらのDNA断片をクローン化し、そして配列決定した。cDNAライブラリーをスクリーニングするために、上記PCR戦略及びプローブとして上記PCR断片を使用して、上記ファミリーの知られたメンバーに加えて、3つのジンシン様ペプチダーゼを同定した。これらのcDNA配列は、ノーザン及びインサイチュ-ハイブリダイゼーションのための特異的なプローブを誘導し、そして上記遺伝子を位置決めするためにヒト染色体をプローブし、そして遺伝子疾患との可能性のある関連を確立することを可能にした。さらに、これらのcDNA配列を、特異的抗体を産生するために大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) 内で組換え融合タンパク質を製造するために使用した。最後に、上記cDNA配列を哺乳動物の発現ベクター内



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列 His - Glu - Xaa - Xaa - His {ここで、Xaa はいずれかのアミノ酸である。} のいずれかの側に位置する保存配列に由来する縮重オリゴヌクレオチドによる組織核酸のプロービングの間に見い出される中性エンドペプチダーゼ様メタロペプチダーゼであって、図3、4、及び5に示すアミノ酸配列から選ばれる配列をもつもの、その断片、及び上記配列と少なくとも約80%のホモロジーを共有するその変異体。

【請求項2】 図3に示すアミノ酸配列をもつ、請求項1に記載のメタロペプチダーゼ。

【請求項3】 図4に示すアミノ酸配列をもつ、請求項1に記載のメタロペプチダーゼ。

【請求項4】 図5に示すアミノ酸配列をもつ、請求項1に記載のメタロペプチダーゼ。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のメタロペプチダーゼをコードする核酸。

【請求項6】 請求項5に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項7】 請求項5に記載の核酸を発現する組換え宿主細胞。

【請求項8】 成長支持培地中で請求項7に記載の組換え宿主細胞を培養し、そして上記宿主細胞又は上記培養基からメタロペプチダーゼを回収することを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のメタロペプチダーゼの製造方法。

【請求項9】 中性エンドペプチダーゼ (NEP) に関連する新規分子のスクリーニング方法であって、以下のステップ：

- NEPのヌクレオチド配列とNEPに関連する知られた分子の配列をアライメントし；

- His - Glu - Xaa - Xaa - His 配列 {ここで、Xaa はいずれかのアミノ酸である。} を含む配列のいずれかの側のコンセンサス配列を評価し；

- 上記コンセンサス配列の縮重配列を合成し；

- ハイブリダイゼーション複合体が、サンプルの核酸と上記縮重配列の間に形成されることができるとなる条件下で、上記縮重配列を、上記新規分子の発現を

受け入れることができるサンプルのパネルの核酸と接触させ；

- N E Pに関連する分子を含むサンプルの指標として、上記ハイブリダイゼーション複合体の形成を検出し；そして

- 上記ハイブリダイゼーション複合体を含む核酸をシーケンシングする；
を含み、それによりN E Pとホモロジーを共有する新規配列がN E Pに関連する新規分子であるとする、前記方法。

【請求項10】 前記縮重配列が図2から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 図2中の配列から選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項12】 請求項11のオリゴヌクレオチドの中の1以上を含む物。

【請求項13】 図3又は4中に示すアミノ酸配列のN-末端部分であって、フリリン認識配列で終わるものをコードする核酸を含む組換えベクター。

【請求項14】 請求項13に記載の組換えベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項15】 C-末端エクドメインを有する着目のメンブラン・タンパク質の可溶化形態の製造方法であって、上記可溶化形態が、上記エクドメインから本質的に成り、そして以下のステップ：

- 本質的に上記エクドメインをコードする核酸を得；

- 請求項13に記載の組換えベクターのN-末端部分のC-末端と、上記核酸を、相内で融合し；

- 培養基の存在下で上記融合核酸が宿主細胞内で発現されるようにし、ここで宿主細胞は、フリリンを発現するか又は発現するようにされ；そして

- 上記培養基中の上記可溶化形態を回収する、
を含む、前記方法。

【請求項16】 前記着目のタンパク質が、NL-3又は -エンドルフィンである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記メタロペプチダーゼのエクドメインから本質的に成る、請求項1～4のいずれか1項に記載のメタロペプチダーゼの可溶化形態。

【請求項18】 請求項17に記載の可溶化メタロペプチダーゼを含む組成

物。

【請求項19】 少なくとも長さ12の核酸を有する、請求項4に記載の核酸由来のオリゴヌクレオチド。

【請求項20】 請求項1～4のいずれか1項に記載のメタロペプチダーゼに対する抗体。

【請求項21】 免疫複合体が抗体とメタロペプチダーゼの間に形成されるような条件下で、サンプルを請求項20に記載の抗体と接触させるステップ、及び上記サンプル中の上記メタロペプチダーゼの存在又は量の指標として免疫複合体の存在又は量を検出するステップを含む上記サンプル中の請求項1～4の中のいずれか1項に記載のメタロペプチダーゼの存在又は量の検出方法。

【請求項22】 サンプル中の請求項1～4のいずれか1項に記載のメタロペプチダーゼの存在又は量の検出方法であって、以下のステップ：ハイブリダイゼーション複合体が、上記サンプルの標的核酸と上記メタロペプチダーゼをコードする核酸又はオリゴヌクレオチドの間で形成されることができるとような条件下で、標的核酸を含むことを受け入れる上記サンプルを、請求項5に記載の核酸又は請求項19に記載のオリゴヌクレオチドと接触させ、そして上記サンプル中の上記メタロペプチダーゼの存在の指標として上記ハイブリダイゼーション複合体の形成を検出する、を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明の背景

生理学的な応答を顕出するために酵母から哺乳動物の細胞により、ペプチドが使用される。メッセンジャーとしてのペプチドの使用は、通常以下のステップを含む：1) 特定の細胞による上記ペプチドの生産及び放出、2) 標的細胞の表面上のレセプターとの上記ペプチドの相互作用、及び3) その作用を終了させる上記ペプチドの分解。このスキームの最初と最後のステップは、プロテアーゼ/ペプチダーゼの参加を要求する。膜会合亜鉛 - メタロペプチダーゼが上記ステップの両者において重要な役割を演じているという証拠が増えている。生理活性ペプチドへのプロホルモン前駆体の活性化は、一般に、Trans - Golgi Network内又はその細胞の分泌顆粒内にあるズブチリシン (Subtilisin) ファミリーのプロテアーゼにより行われるけれども (レビューのためには：(Seidah and chretien, 1995) を参照のこと)、2 ~ 3のペプチドは最終的なプロセッシング・ステップを必要とする。このステップは、膜会合亜鉛 - メタロペプチダーゼの作用を含む。2つのケースが特によく文書化されている：不活性なアンギオテンシンIをアンギオテンシンIIに解裂させるアンギオテンシン変換酵素 (ACE) (Corvol and Williams, 1997)、及び大きなエンドセリン (endothelins) のアイソフォームをエンドセリンに解裂させるエンドセリン変換酵素 (ECEs) (Turner, 1997a) である。ペプチド活性化におけるそれらの役割に加えて、細胞表面亜鉛 - メタロペプチダーゼは、活性ペプチドを不活性断片に分解することによりペプチド作動性シグナルの終了にも関係していた。上記ペプチダーゼの最もよく知られたものの中の1は、おそらく、いくつかの生理活性ペプチドの生理学的分解に関係する中性エンドペプチダーゼ - 24.11 (ネプリリジン (Nepriylsin, NEP)) (Kenny, 1993) である。興味深いことに、NEPとECEsは、有意な構造類似性を示し、そしてPEX、新たに発現されたが未だ特徴付けされていないペプチダーゼ、及びKELL血液群タンパク質をも含むペプチダーゼのファミリーのメンバーであるようである (T

urner and Tanzawa, 1997b)。生理活性ペプチド活性の調節剤としてのそれらの重要な役割のために、上記酵素（より特にNEP及びECEs）は、ACE阻害剤が血圧を制御するために使用されるのと同様の方法で、治療的介入のための推定標的として同定されてきた。リン酸の恒常性に関するようである上記ファミリーの他のメンバーである、PEXの最近の発見は、他の未だ知られていないメンバーが存在するかもしれないという可能性を提起した。

【0002】

NEP様ファミリーのメンバーは、3つの別個のドメイン：短いNH₂-末端細胞質配列、単トランスメンブラン領域、及びその酵素の触媒活性に責任を負う大きな細胞外又はエクトドメインから成るタイプII膜タンパク質である。活性酵素のコンホメーションを安定化させるジスルフィド橋に関係する、可能性のあるN-グリコシル化部位とシステイン残基が存在する。これらの酵素は、それらの活性部位内にZn原子をもつ金属酵素である。それ故、それらは、2つのヒスチジン残基が亜鉛リガンドであるところの活性部位コンセンサス配列HEXXHにより特徴付けられるジンシン(zincin)ファミリーのペプチダーゼ(Hooper, 1994)に属する。NEP様ファミリーのペプチダーゼのメンバー中、第3の亜鉛リガンドは、上記コンセンサス配列のカルボキシ末端側にあるグルタミン酸残基である。この特徴により、それらは、グルジンシン(gluzincin)サブ-ファミリー内に置かれる(Hooper, 1994)。グルジンシンに関するモデル酵素は、その3D構造がX線結晶学により決定されているところのバクテリア・プロテアーゼであるサーモリシン(thermolysin(TLN))である(Holmes and Matthews, 1982)。NEPの活性部位は、部位指定突然変異誘発により詳しく研究されており、そして亜鉛結合に関係する(Devault et al., 1988b; Le Moual et al., 1991; Le Moual et al., 1994)、触媒(Devault et al., 1988a; Dion et al., 1993)、又は基質結合(Vijayaraghavan et al., 1990; Beaumont et al., 1991; Dion et al., 1995; Marie-Claire et al., 1997)に関係するいくつかの残基が同定されている(最近のレビューについては、Crine et al., 1997

を参照のこと)。

【0003】

本発明の要約

今般、我々は、ペプチダーゼの上記重要なファミリーの他のメンバーを探索するためのRT-PCR戦略を開発した。この戦略は、3つの追加のNEP様(NL)メタロペプチダーゼ(NL-1, NL-2、及びNL-3という)の分子クローニングと特徴付けを可能にする。上記研究を通じて得られる知識は、上記酵素及びそれらの発現パターンのさらなる生化学的特徴付けのための試薬(核酸プローブ及びプライマー、抗体、及び活性な組換え酵素)の作製を可能にし、そして治療剤として使用されることができであろう特定の阻害剤の理論的設計をかなり助けるであろう。

【0004】

従って、本発明は以下の物に関する：

- A. 新規NEP関連酵素をスクリーニングするための縮重プライマー；
- B. NEP-関連酵素としてのNL-1, NL-2、及びNL-3タンパク質；
- C. 上記酵素をコードする核酸；
- D. 上記酵素に対する抗体；
- E. 上記酵素をコードする核酸を含む組換えベクター及びそれにより形質転換された宿主；
- F. NL-1, NL-2、及びNL-3遺伝子のとハイブリダイズし、そしてこれを検出するための、又は遺伝子断片を増幅し、そして生成するためのプローブ又はプライマーとして有用な核酸の断片；
- G. NL-1, NL-2、及びNL-3の可溶性形態；及び
- H. フリン(furin)認識部位をコードする配列で終わるNL-1又はNL-2のN-末端部分を含む核酸であって、着目のいずれかのタンパク質のエクトドメインとの融合タンパク質の製造のために、そして培地中への(上記エクトドメインを含有する)着目の上記タンパク質の可溶性形態を放出するために有用であるもの。

【0005】

また、本発明は以下の方法にも関する：

A．高く保存されて、領域内、すなわち亜鉛結合部位付近のNEPファミリー・メンバーの領域から選ばれた縮重プライマー又はプローブを利用するNEP-関連酵素をスクリーニングするための方法；及び

B．上記組換え宿主を培養し、そしてそれからNL-1，NL-2、及びNL-3遺伝子産物を回収するステップを含む、NL-1，NL-2、及びNL-3を製造する方法。

【0006】

本発明を、特定の態様と添付図面を参照して以下に説明するが、これらの目的は、本発明の範囲を限定することではなく説明することである。

【0007】

第1章中に、NL-1，NL-2、及びNL-3の同定及び位置決定を導く一般手順を与える。第2章中で、NL-1について行われた研究を完成し又は繰り返すための僅かに異なる手順を与える。

【0008】

本発明の好ましい態様の説明

第1章

材料及び方法

DNA及びRNA操作

全てのDNA操作とノーザン・プロット分析を、標準的なプロトコールに従って行った(Ausubel et al., 1988; Sambrook et al., 1989)。

【0009】

mRNA精製とcDNA合成

mRNAを、Quick Prep Micro mRNA精製キット(Pharmacia Biotech)を用いてマウス精巢から調製した。精製されたmRNAを、すぐに使用できる状態になるまで、-70 で保存した。第1ストランドcDNAを、the First-Strand cDNA合成キット

(Pharmacia Biotech) を用いて1 μ g の mRNA から合成した。ヒト精巣 cDNA ライブラリーを Clontech から得た。

【0010】

ポリメラーゼ・チェイン・リアクションのプロトコール

PCR を、1mM $MgCl_2$ 、2 μ M の各プライマー・オリゴヌクレオチド、20 μ M の各 dNTP、及び5% DMSO を含む、100 μ l の最終容量中、5 μ l の cDNA テンプレートと1 μ l の Taq DNA ポリメラーゼを用いて DNA サーマル・サイクラー内で行った。サイクリング・プロフィールは、94 5 分間の開始変性ステップ、その後の30 サイクルの、94 1 分間、40 1 分間、及び72 1.5 分間を含んだ。最後の伸長ステップを10 分間72 で行った。増幅された DNA を、2% アガロース・ゲル上にロードし、そして臭化エチジウムで染色することにより可視化した。500 ~ 700 bp の間のサイズの範囲にある断片を、切断し、そして上記ゲルから溶出した。必要に応じて、10 μ l の、第1 PCR 反応物、又は上記アガロース・ゲルから切断された溶出バンドを用いて、第2 ラウンドの PCR を、ネステド (nested) オリゴヌクレオチド・プライマーを用いて行った。得られた断片を、供給者の推奨に従って pCR2.1 ベクター (Invitrogen) 内でライゲートした。DH5 大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞を、上記ライゲーション混合物により形質転換し、そしてカナマイシンの存在下で 2YT プレート上で培養した。プラスミドを、耐性細胞から調製し、そして配列決定した。

【0011】

マウス組織上でのインサイチュール・ハイブリダイゼーション及びヒト遺伝子の染色体上の位置決定

全マウス・スライス又は単離組織上のインサイチュール・ハイブリダイゼーションを、先に記載されたように行った (Ruchon et al., 1998)。

【0012】

ヒト NL - 2 及び NL - 3 遺伝子の染色体上の位置を決定するために、バンドされたヒト染色体に遺伝子を直接マッピングする技術を使用した。分裂中期の染

色体を、正常なヒト末梢血から培養したリンパ球から得た。細胞を、チミジンを
用いて同期させ、そしてS期の最後の部分の間、5 - プロモデオキシウリジン (
Brd U) で処理して、R - banding を作製した。上記プローブのビオ
チン標識付けを、ニック - トランスレーションにより行い (Bionick , B
RL)、そして上記プローブを間接免疫蛍光により可視化した。

【0013】

抗体産生

上記の新規ペプチダーゼに対する抗体を作るために、各タンパク質のcDNA
配列を、上記ファミリーの他のメンバーの配列と比較し、そしてより低いホモロ
ジーを示す配列セグメントを使用した。上記配列は、NL - 1 に関してアミノ酸
残基273 ~ 354、NL - 2 に関して75 ~ 209、そしてNL - 3 に関して
143 ~ 465 に由来する。上記cDNA断片を、グルタチオン - S - トランス
フェラーゼ (GST) から下流に、かつ、相内で、ベクター pGEX2T (P
harmacia Biotechnology) 内にクローニングした。プラ
スミドを、E . coli 株AP401 内に形質転換し、そして上記融合タンパク
質の合成の誘導及び精製を、供給者により推奨されるように行った。NLポリペ
プチドを、トロンピンを用いて上記融合タンパク質から解裂させ、そしてSDS
- PAGE により精製した。NLポリペプチドを、以下のスケジュールに従って
、ウサギ (rabbits) 又はマウスに注射した：ウサギに関しては、150
µg のタンパク質の開始注射、開始注射から4週間及び8週間後の同一量のブー
スト；マウスに関しては、100 µg のタンパク質の開始注射、3週間及び6週
間後の同一量のブースト。最後の注射から1ヶ月後に、上記動物から血清を集め
、そして初期のE . coli 産成抗原、及び哺乳動物細胞系内で製造された組換
えタンパク質に対する免疫プロットングによりテストした。

【0014】

モノクローナル抗体の作製

抗体を産生するように選ばれたNLsのアミノ酸セグメントに対応するcDN
A断片を、E . coli 内でGST融合タンパク質を構築するために使用した。
この融合タンパク質を、供給者の指示に従って (Amersham - Pharm

a c i a) グルタチオン - S e p h a r o s e カラム上でのアフィニティー・クロマトグラフィーにより E . c o l i 抽出物から精製した。トロンビン解裂の後、G S T 融合タンパク質の N L 部分を、ポリアクリルアミド・ゲルからの電気溶出により、さらに精製した。この材料を、4匹のマウスを免疫感作させるために使用した(約 50 μ g の N L ポリペプチドの 5 注射)。上記免疫感作スケジュール後各マウスから血液を集め、そしてマウス血清中の抗体の存在を、E . c o l i 抽出物からの N L ポリペプチドにより被覆されたマイクロタイター・プレートを用いて E L I S A により評価した。マウスを、上記 N L 発現ベクターでトランスフェクトされた哺乳動物細胞のウェスタン・ブロッティング抽出物により N L 抗体の存在についてもテストした。(E L I S A により計測されるとき) N L 特異的抗体のその高い力価のために選ばれた 1 匹のマウスを殺し、そしてその脾臓細胞を、先に記載されたように(C r i n e 1985)、骨髓腫細胞(株: A T C C からの P 3 - X 6 3 A g . 6 5 3) との融合により不死化した。ハイブリドーマ細胞を、H A T 選択培地中でのそれらの増殖能について選択し、そして数ラウンドの限界希釈によりクローン化した。酵素 N L - 1 , N L - 2、及び N L - 3 に対する適正なアフィニティー及び特異性を示すハイブリドーマを選択した。

【0015】

培養された哺乳動物細胞内での N L s の発現及び酵素アッセイ

N L - 1 と N L - 3 のための c D N A s を、ベクター p c D N A 3 又は p R c C M V (I n v i t r o g e n) 内でクローニングし、そして我々の実験室において既に記載されている手順(D e v a u l t e t a l . , 1988a) に従って、哺乳動物細胞系内にトランスフェクションにより導入した。細胞タンパク質の抽出物又は培養基の調製手順は、先の論文(D e v a u l t e t a l . , 1988a ; L e m a y e t a l . , 1989) 中にも記載されている。上記抽出物中の N L s の存在を、特異的な抗体を用いた免疫ブロッティングによりモニターした。

【0016】

細胞タンパク質の抽出物と培養基を、酵素活性についてアッセイした。2つの

テストを行った。第1のテストは、基質として〔³H〕-Tyr-(D)Ala₂-Leu-エンケファリンを使用し、そしてLemay et al., (1989)に従って行われた。第2のテストは、基質としてブラジキニン(bradikinin)を使用し、そしてRaut et al. (1999)により記載されたように行われた。

【0017】

結果

NL-1, NEPファミリーの新規メンバーのクローニング

ECEs, PEX、及びKELLの過去2~3年における分子クローニングは、これらのタンパク質の全てがNEPと50~60%の間の類似性をもつことを示した。この観察は、上記ペプチダーゼが広がったファミリーの部分であること、そして発見されるべき追加のメンバーが未だ存在するであろうということを我々に信じさせた。この仮定をテストするために、我々は、NEP様ファミリーのメンバーのアミノ酸配列をアラインメントし、そしてRT-PCR反応において使用されるべき縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計した(図1と2)。これらのプライマーは、ジンシン(Zincins)のためのHEXXHコンセンサス配列のいずれかの側に配置された。それらは高く縮重であるため、プライマー1と2を、それぞれ2つのプール、1A-1B、と2A-2Bに垂分割した(図2)。上記ファミリーのペプチダーゼに対応するPCR増幅されたDNA断片は、いずれも、通常、上記コンセンサス配列を含むはずであり、そして上記クローン化された断片のシーケンシングにより容易に認識されるはずである。この戦略を用いて、我々は、まず、プライマー対1A-3と1B-3を用いたPCR反応を行った。増幅されたDNAは、ほとんど、約700bpから始まり、そして100bpまで下るスミア(smear)として移動する。予想された断片は約550bp付近にあるはずなので、我々は、500bpよりも長いDNA断片に対応するセクションを、上記ゲルから単離した。第2ラウンドのPCR反応を、プライマー2A-3と2B-3を用いて、第1反応の粗PCR産物と単離DNAバンドの両者を用いて行った。予想された296bp断片が、上記ゲル上に見られた(示さず)。

【0018】

上記DNA断片のクローニングは、約350クローンを生成した。その中で44をシーケンシングした。これらの中の9つは、挿入物をもたず、又はNEPファミリーに関係しない配列に対応し、24は、NEPに対応し、3がPEXに対応し、そして8が、上記ファミリーの1の推定新規メンバーに対応した。なぜなら、それらは全て、ジンシンのためのHEXXHコンセンサス配列を含み、かつ、マウスNEPと65%のホモロジーを示したからである(図3のボックス内を参照のこと)。この断片は、次に、マウス精巣cDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され、そして2592ヌクレオチドの全体cDNAを単離することを我々をして可能にした(図3)。上記ファミリーの他のメンバーを用いた、上記配列の同定を、表1中に表す。この新規メンバーを、NEP様ペプチダーゼ1の代わりに、NL-1と呼んだ。

【0019】

NL-2とNL-3のクローニング

マウス精巣cDNAからのNEPファミリーの酵素の増幅のために記載したものと類似の戦略を、2つの異なるオリゴヌクレオチドプライマーを用いてヒト精巣cDNAライブラリーとともに使用した。今回は、約900bpのDNA断片を得て、これをクローニングした。10のクローンが配列決定され、これはNEPの存在を、そして我々がNL-2とNL-3と呼んだ上記ファミリーの2つの新規ペプチダーゼを明らかにした。

【0020】

NL-2 PCR断片は長さ879ヌクレオチドであり、そしてこの推定ペプチダーゼのカルボキシ末端ドメイン内におそらく位置する293アミノ酸残基セグメントをコードしていた(括弧内図4参照のこと)。このPCR断片を、次に、ラムダgt10ヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングするために使用した。それは、NL-2 PCR断片と部分的に重複する他のcDNA断片の単離を許容した。上記ラムダ・クローンと上記PCR断片の融合は、770アミノ酸残基のオープン・リーディング・フレームをもたらした。ヒト精巣cDNAライブラリーとともに5 RACEプロトコールを使用することが、NL-2 O

R Fの配列の完成を許容した(図4)。このORFは、マウスNL-1タンパク質に約80%同一である推定タンパク質をコードする(図6)。種を横断して、NEP, PEX, ECEsのサブファミリーのメンバーは、高く(94%超の同一性)保存された配列をもつ。80%を超える配列同一性は、新規ヒト・タンパク質とマウスNL-1の間にのみ存在するけれども、これらのタンパク質は、NL-2タンパク質がNL-1のヒト同族体であるかもしれないという事実を可能にするユニークな特徴を共有する。上記ファミリーの他のメンバーとのNL-2の同一性を表1に示す。

【0021】

NL-3をコードする879bp PCR断片は、293アミノ酸残基のオープン・リーディング・フレームを示した(図5、括弧内)。NL-3の配列分析は、それが、公開されたDNAデータ・バンク中に存在するマウス胚組織からのEST配列に94.2%同一であることを示した。American Tissue and Cell Culture(ATCC)から商業的に入手可能なこのマウスEST配列は、先に我々の実験室から得られたものである。

【0022】

NL-3 PCR断片を用いたヒト組織のノーザン・ブロット分析は脊髄内での上記タンパク質の発現を示したので(以下参照)、同一のPCR DNA断片を、ファージベクター内で構築されたヒト脊髄cDNAライブラリーをハイブリダイゼーションによりスクリーニングするために使用した。1のクローンは、PCR断片の293アミノ酸残基ORFを包含する752アミノ酸残基の全長ORFを含んでいた。さらなるプロービング、クローニング、及びシーケンシングは、図5中に示す、NL-3全体配列の獲得を導いた。

【0023】

図6は、新規NEP様酵素のアミノ酸配列の比較を表し、そして表1は、上記ファミリーのメンバー間の同一性の程度を示す。

【0024】

NL-1, NL-2、及びNL-3ペプチダーゼの細胞内分布

NL-1, NL-2、及びNL-3の組織分布の決定は、それが関係するところ

のペプチド作動性系を同定するための手がかりを提供しうる。NL - 1、及び / 又はNL - 2、及び / 又はNL - 3の生理学的機能がNEP及び / 又はECESの機能と重複することができるかどうかを決定するために、上記ペプチダーゼの組織分布を、NEP及びECESのものと比較することは特に重要であろう。

【0025】

我々のマウスcDNAを用いた、インサイチュール・ハイブリダイゼーション (ISH) を、先にPEXに関して行われたように (Ruchon et al., 1998)、マウス発達の間の、NL - 1の空間的及び時間的発現を測定するために使用した。胎児全体 (12, 15、及び19 dpc)、及び成体マウス (1, 3及び6日齢) の逐次切片を、 $[^{35}\text{S}]$ -標識RNAプローブとハイブリダイズさせた。図7は、この技術によりNL - 1を発現することが同定された唯一の組織であったマウス精巣の1切片を示した。輸精小管 (seminiferous tubules) の細胞が特異的に標識されたが、上記小管の中心付近に位置する精子細胞 (spermatids) が、最も強い標識を示した。これらの細胞は、精子 (spermatozooids) への成熟の最後の段階にある。精巣内のNL - 1の存在を今回、マウス組織のノーザン分析により確認した (図10を参照のこと)。他の組織は、より感度の良いアッセイであるRT - PCTにより分析されるとき、NL - 1を発現する (示さず)。

【0026】

同様のアプローチを、ATCCから得られたマウスESTを用いてNL - 3の局在化を決定するために使用した。図8は、胚の発達の17日目、及び生後4日目における全マウスの切片を示す。それがニューロンと会合するところの脳 (図9)、脊髄、肝臓、脾臓、及び骨を含むいくつかの組織は、上記推定ペプチダーゼを発現している。標識は、Hypマウス、低リン酸血症くる病 (rickets) のための動物モデルからの骨の内でもより強かった (図8)。骨内では、NL - 3は、骨芽細胞により発現されていることが分かった (示さず)。

【0027】

ノーザン・プロットング実験を、NL - 2とNL - 3プローブを用いていくつかの組織に対して行った。ヒトの多組織ノーザン・プロット (Clontec

h) を、特異的プローブとハイブリダイズさせた。約4.0 kbの単一RNAバンドが、NL-2のためのプローブにより出現した。NL-2の発現は、脳と脊髄に制限されている(示さず)。しかしながら、RT-PCRは、精巣内での上記酵素の存在を示した(示さず)。

【0028】

約3.0 kbの単一RNAバンドが、NL-3のための特異的プローブにより検出された(示さず)。NL-3の発現は、主に、卵巣、脊髄、及び副腎内で観察された。

【0029】

NL-2とNL-3のためのヒト遺伝子の染色体上の位置決定

脊椎動物における新規メタロペプチダーゼの機能についての手がかりを得る手段として、我々は、ヒトにおける遺伝子座とマップされた遺伝子病の間の可能性のあるリンクを探求するために、ヒト染色体上の新規cDNAを局在化した。そうするために、我々は、高分解能の蛍光インサイチュール・ハイブリダイゼーション(FISH)によりNL-2とNL-3遺伝子をマップした。NL-2は、染色体バンド1p36に局在化された。ヒトにおけるNL-2の細胞分布に矛盾せず、CNSの遺伝子病、例えば、失読症(dyslexia)、神経管欠損症(neural tube defect)、神経芽細胞腫(neuroblastoma)、シャルコー-マリー-トゥース(Charcot-Marie-Tooth)病のニューロン型は、全て、上記領域内にマップされており、そしてヒトにおけるNL-2の役割のための潜在的な標的を表す。NL-3は、染色体バンド2q37に局在化された。骨におけるNL-3の役割と矛盾せず、オールブライト遺伝性骨形成異常(Albright hereditary osteodystrophy)を、同一染色体座にマップした(Phelan et al., 1995)。

【0030】

以上から、NL-2とNL-3は、それぞれ、ヒト染色体座1p36と2q37に関係する疾患又は失調のためのマーカーとして直ちに有用であると予想されるメタロペプチダーゼである。知られた疾患に関わる染色体バンド上のそれらの

位置決定は、それらが、疾患の発達の原因又は結果として、発現され又は1以上の遺伝子と同時発現されうることを示唆する。これらの酵素は、単独で又は疾患に関係する他の遺伝子とともに、アップ・レギュレート又はダウン・レギュレートされることができる。それ故、NL-2又はNL-3に特異的な抗体又は他のリガンドは、診断目的のために、並びに核酸ハイブリダイゼーション又は増幅技術を用いた診断アッセイにおけるプライマー又はプローブとして使用されることができる。あるいは、NL-2及びNL-3の各酸に対するプライマー又はプローブは、極近位に置かれ、かつ、上記疾患に関係する遺伝子の突然変異をマッピングするために有用であろう。それ故、NL-2とNL-3遺伝子産物がどのような機能を有していたとしても、それらの染色体上の位置決定は、1の診断用途を提供する。この位置決定及び組織分布は、上記酵素の厳密な機能を明らかにするために調べられるであろう疾患及び組織に関する情報を提供する。

【0031】

NL-1は、NL-2に似ており、NL-1は、アミノ配列において約80%のホモロジーを、NL-2と共有し、そして構造的特徴、例えば、そのエクドメインの近位端に置かれたフリリン認識配列を共有する。NL-2は、マウスNL-1のヒト同族体であるかもしれない。そうである場合、これら2つのタンパク質は、実質的な縮重度をもつであろうし、そして、おそらく、種間で変わる異なる活性特性をもつであろう。

【0032】

NL-1の染色体上位置決定は、The Jackson Laboratory Backcross DNA Panel Mapping Resourceとの共同研究においてSingle Strand Conformational Polymorphism(SSCP)によりマウス・ゲノム内で決定された。NL-1は、NL-2遺伝子が置かれているヒト染色体領域1p36に対応するマウス第4染色体の遠位領域に局在化した。このことは、NL-1とNL-2が種変異体であるという我々の仮説を強化する。

【0033】

NLsに対する抗体の産生

注射された動物から集めた抗血清を、E. coli内で作られたGST-抗原

融合タンパク質に対する免疫ブロッティングにより、まず、テストした。1のウサギからの抗血清は、NL-1-関連ポリペプチドを認識し、そして1のマウス及び1のウサギからの抗血清は、NL-3-関連ポリペプチドと反応した(結果を示さず)。上記ウサギ抗血清よりも特異的であるようであった、抗NL-1抗血清とマウス抗NL-3抗血清を、NL-1又はNL-3を発現する細胞からのタンパク質の抽出物と培養基に対する免疫ブロッティングにより、次に、テストした(以下を参照のこと)。

【0034】

CHO細胞内でのNL-1の発現

全長NL-1タンパク質をコードするcDNAを、哺乳動物発現ベクターpcDNA3-RSV内でクローニングし、そしてCHO細胞内でトランスフェクトさせた。安定した細胞系を、薬物G418を用いた選択により確立し、そしてNL-1の存在についての免疫ブロッティングによりテストした。

【0035】

少量のNL-1が、トランスフェクトされたCHO細胞の抽出物中に見つかった(結果を示さず)。この細胞内種は、エンドH消化を受け易く、このことは、この糖部分が成熟していないことを示し、そしてER局在化を示唆する(結果を示さず)。トランスフェクトされたCHO細胞の培養基は、可溶性NL-1の存在を示した(図10)。この細胞外種は、エンドHに対して抵抗性であり、このことは、遅い分泌経路を通しての真の輸送を示唆している。NL-1のcDNA配列は、タイプIIトランスメンブラン・タンパク質を予想する。それによりNL-1が可溶性タンパク質に形質転換されるところのメカニズムは、現在知られていない。しかしながら、アミノ酸配列の検査は、残基58~65の推定フリン解裂部位の存在を現した(図3)。同様の部位が、NL-2配列中に存在する。

【0036】

NL-1の可溶性形態を、基質として[³H]-Tyr-(D)Ala₂-Leu-エンケファリンとブラジキニン(bradykinin)を用いた活性についてアッセイした。図11は、NL-1がエンケファリン基質を分解することができること(K_m=18±10µM)、そしてこの活性が、ホスホラミドン(

phosphoramidon) ($IC_{50} = 0.9 \pm 0.3 \text{ nM}$) とチオルファン (thiorphan) ($K_m = 47 \pm 12 \text{ nM}$)、NEPファミリーの酵素の一般的阻害剤により阻害されることができるとことを示す。ブラジキニンは、NL-1のための基質でもある(示さず)。

【0037】

分泌を促進するためのNL-1アミノ・末端ドメインの使用

NL-1エクトドメインが、おそらくフリンによるそのトランスメンブラン・セグメントの解裂を通じて解裂されるという観察は、(開始メチオニンからフリン部位まで)NL-1アミノ・末端ドメインにスプライスされるであろう外来タンパク質の分泌を促進するという可能性を提起する。この仮説をテストするために、(第3システインから末端までの)NL-3のエクトドメインを、PCR戦略を用いてNL-1アミノ末端ドメインにスプライスし、そしてその組換えDNAを発現ベクターpRcCMV内でクローン化した。融合タンパク質は、COS-1とHEK293細胞内への上記ベクターのトランスフェクションにより発現された。トランスフェクトされた細胞の培養基を、NL-3に対するマウス抗血清を用いた免疫プロットングにより分析した。図12は、両COS-1及びHEK293細胞の消費された培養基中のNL-3の存在を示す。この結果は、NL-1アミノ・末端ドメインが、外来タンパク質の分泌を促進するために使用されることができるとことを示している。

【0038】

NL-3の可溶性形態を、基質として [^3H] - Tyr - (D)Ala₂ - Leu - エンケファリンを用いて活性についてアッセイした。

【0039】

先の実験は、他の膜付着タンパク質エクトドメインの分泌を促進するためにNL-1のアミノ・末端ドメインを使用することができることを示した。同一の戦略が小さなペプチドの分泌を促進するために使用されることができかどうかを確認するために、PCR戦略を、ヒト - エンドルフィンにNL-1のアミノ末端ドメインにスプライスするために使用し、そして組換えDNAを、ベクターpRcCMV内でクローニングした。融合タンパク質を、COS-1とHEK293

細胞内での上記ベクターのトランスフェクションにより発現させた。トランスフェクトされた細胞の培養基を、トランスフェクションから48時間後に集め、そして上記ペプチドを先に記載されたように(Noel et al., 1989)精製した。上記抽出物中の β -エンドルフィンの存在を、ラジオイムノアッセイにより検出した。これらの結果は、COS-1とHEK293細胞の両者が、培養基1ml当たり約100Pgの β -エンドルフィンを生産したことを示した。それ故、フリリン認識部位で終わるNL-1とNL-2のN-末端は、着目のタンパク質の可溶性形態を製造するために有用であろう。

【0040】

セクション2)

材料及び方法

DNA操作

全てのDNA操作、ファージ・ライブラリー・スクリーニング、及びプラスミド調製を、標準的なプロトコール(Ausubel 1988; Sambrook 1989)に従って行った。部位指定突然変異誘発を、先に記載されたように(Le Moual 1994)、PCRベースの戦略を用いて行った。

【0041】

ネフリリジン・ファミリーの新規メンバーの同定のためのmRNA精製及びRT-PCRプロトコール

mRNAを、Quick Prep Micro mRNA精製キット(Pharmacia Biotech)を用いてマウス精巢から調製した。第1ストランドcDNAを、第1ストランドcDNA合成キット(Pharmacia Biotech)を用いて1 μ gのmRNAから合成した。それぞれ、NEP配列のアミノ酸残基459~465、及び552~560に対応する2つのセンス・プライマー、オリゴヌクレオチド3817(5'-TGGATGGAT/CGA/CIGG/AIACIA/CA-3')、及びオリゴヌクレオチド3719(5'-A/GTIGTITTT/CCCIGCIGGIA/GT/AIC/TTG/CCA-3')、並びにアミノ酸残基646~654に対応する1のアンチセンス・プライマー、オリゴヌクレオチド3720(5'-AIICCI CC

IA / TC / TA / GTCIGCIG / AC / TA / GTTT / CTC - 3)
 (図1と2を参照のこと) を合成した。PCRを、1mM MgCl₂、2μMの各オリゴヌクレオチド3817と3720、200μMの各dNTP、及び5% DMSOを含む100μlの最終容量中、5μlのcDNAテンプレートと1μlのTaqDNAポリメラーゼを用いて行った。サイクリング・プロフィールは、94 5分間の最初の変性ステップ、30サイクルの、1分間94 、1分間40 、及び1.5分間72 、並びに72 10分間の最終伸張ステップを含んだ。増幅されたDNAの1/2を2%アガロース・ゲル上で分画し、そして500~700bpの間のサイズ範囲の断片を精製し、そして50μlの最終容量中に再懸濁させた。第2ラウンドのPCRを、テンプレートとして、10μlの第1PCR反応物又は5μlの精製断片を用いて、プライマー3719とプライマー3720とともにを行い、そして新たなPCR生成物を、pCR2.1ベクター (Invitrogen) 内にライゲートした。いくつかの同一クローンが、NEPファミリーの潜在的な新規メンバーに対応した。我々はこのメンバーをNEP-様1の代わりにNL1と呼んだ。

【0042】

全長NL1 cDNAのクローニング

クローン化されたNL1 PCR断片を、マウス精巢 Uni-ZAP (商標) XR cDNAライブラリー (Stratagene) をスクリーニングするためのプローブとして使用した。100の陽性ファージの中の12をブランク精製し、そしてpBS SKベクター (Stratagene) 内にサブクローニングした。分析された最長のクローンは不完全なORF (pBS-NL1A) を提示したので、ベクター (5' - TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAG - 3'、センス・プライマー)、及びNL1 (5' - ACCAAACCTTTCTCTGTAGCTCC - 3'、アンチセンス・プライマー、NL1のnt 1303~1324) 内にあるプライマーを用いた5' RACEを、残った半精製された陽性クローンのDNAに対して、その後行った。増幅を、50ngのDNA、4mMのMgSO₄、1μMの各オリゴヌクレオチド、200μMの各dNTP、及び10%のDMSOを含有する100μlの最終容量中の1μlのVent

ポリメラーゼを用いて行った。サイクリング・パラメーターは、94 1分間の開初変性ステップ、25サイクルの、94 30秒間、60 30秒間、及び72 1分間、並びに72 10分間のインキュベーションを含んだ。予想された長さのPCR断片をpCR2.1ベクター内にサブクローニングしたが(クローンpCR-NL1A)、シーケンシングは開始ATGコドンを現わさなかった。次に、ネスト化された5 RACEを、供給者により推奨されるように、(上記キットからの)センス・オリゴヌクレオチドAP1とAP2、並びにNL1アンチセンス・オリゴヌクレオチド5'-CCTGAGGGCTCGTTTTAC AACCGTCCT-3'(NL1のnt503~529)と5'-CTCATCCCAGGAGAAGTGTAGCAGGCT-3'(NL1のnt475~502)を用いたMarathon Ready cDNAキット(Clontech)を使用してマウス精巣cDNAについて行った。得られた断片を、pCR2.1ベクター内にクローン化した(pCR-NL1B)。10塩基対だけが上記開始ATGコドンに関して失われていたので、我々は、上記のようにVentポリメラーゼを用いたセンス・プライマー5'-CCACCATGGTGGAGAGAGCAGGCTGGTGTCTCGGAAGAAG-3'(NL1のnt332~364;失われた10ヌクレオチドに下線を引いた)、及びアンチセンス・プライマー5'-ACCAAACCTTTCCTGTAGCTCC-3'(NL1のnt1303~1324)を用いてクローンpCR-NL1AをPCR増幅することにより上記cDNAの5'末端を再構築した。次に、上記DNA断片を、pCR2.1内に挿入した(クローンpCR-NL1C)。全長ORFを、EcoRIとPflM1を用いたpBS-NL1AとpCR-NL1Cの消化の後に再構築した。NL1 cDNAの5'末端をpCR-NL1から切除し、そしてそれぞれ対応部位においてpBS-NL1A内にライゲートして、プラスミドpBS-NL1Bを得た。

【0043】

発現試験のために、NL1の全長cDNAに対応する、pBS-NL1Bから生成したBamHI/ApaI断片をpCDNA3/RSV[18]ベクター内に挿入した。

【0044】

ポリクローナル抗体の産生

NL1とのGST融合タンパク質の大腸菌内での製造のためのプラスミドを、pGEX-4T-3発現ベクター(Pharmacia Biotechnologies)を用いて構築した。NL1からの255bp断片を、センス・プライマー5'-GCTACGGGATCCGTGGCCACTATGCTTAGGA A-3 (nt1139~1158)とアンチセンス・プライマー5'-CGATTGCTCGAGTGGGAACAGCTCGACTTCCA-3 (nt1377~1396)を用いたVentポリメラーゼによるPCRにより増幅した。pGEX-4T-3と上記PCR産物の両者を、BamHIとXhoIで消化し、そしてライゲートした。組換えタンパク質を、供給者の指示に従って、製造し、そして精製した。5週齢の雌balb/cマウスを、フロイント・アジュバント中の20µgの上記組換えNL1断片で3ヶ月間毎月免疫化し、そして抗血清をその後回収した。

【0045】

細胞培養及びトランスフェクション

ヒト胚性腎(HEK293)細胞を、100%ウシ胎児血清(FBS)を含み、そして60µg/mlにおいてペニシリン、100µg/mlにおいてストレプトマイシン、そして0.25µg/mlにおいてフオンジゾン(fongizone)を補われたDMEM培地中で維持した。適当なプラスミドによる細胞のトランスフェクションを、カルシウム/ホスフェート-DNA共沈法(Chang 1987)により行った。永久細胞系を樹立するために、G418選択を、12日間400µg/mlでそして徐々に100µg/mlまで低下させたトランスフェクションから48時間後に開始させた。

【0046】

pRcCMV-sNEPでトランスフェクトされたLLC-PK₁細胞を、先に記載されたように(Lanctot 1995)維持した。

【0047】

免疫プロット分析

免疫プロット分析のために、2 mM酪酸ナトリウムを含有する合成DMEM培地中で、細胞を16時間インキュベートした。細胞のタンパク質を先に記載されたように(Dion 1995)可溶化した。培養基中で回収された分泌タンパク質を、限外濾過により約10倍濃縮した。免疫プロット分析を、NL1に特異的なポリクローナル抗体又は1-抗トリプシン・インヒビター抗体、その後の適当なホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ-コンジュゲート1gG(Vector Laboratories)を用いたNENルネッサンス・キット(Calbiochem; La Jolla, CA)を使用して行った。

【0048】

グリコシル化試験のために、タンパク質を、その供給者(NEB)により示唆されるように、エンドグルコシダーゼH(endo H)又はペプチド:N-グルコシダーゼ(PNGase F)とともにインキュベートした。

【0049】

酵素活性アッセイ

NL1活性を、既に記載されているように(Dion 1995; Devault 1988)、(チロシル-[3,5-³H])(D-Ala₂)-Leu₅-エンケファリン(50 Ci/mmol)(Research Products International Inc.)を用いて、モニターし、そしてsNEP活性に対して比較した。Km値を、同位体希釈法により測定した。ホスフォラミドン(phosphoramidon)とチオールファン(thiorphan)の阻害効果も、先に記載されたように評価した(Dion 1995)。

【0050】

Leu-エンケファリンの加水分解のHPLC分析

5 µgのLeu₅-エンケファリンを、0.1 mMのホスフォラミドンの不存在下又は存在下で、NL1(約300 µgの全タンパク質)を発現するHEK293細胞又はsNEP(約30 µgの全タンパク質)を発現するLLC-Pk₁細胞の濃縮培地、とともに、50 mM MES, pH6.5中で1時間37 °Cでインキュベートした。加水分解産物を、先に記載されたように〔23〕逆相HPLCにより分離した。Tyr-Gly-GlyとPhe-Leuの両者を、合成マーカ

ー・ペプチドの溶離プロフィールにより同定した。

【0051】

ノーザン・プロット分析

マウス多組織ポリ(A)⁺ mRNAプロット(Clontech)を、Express Hyb溶液(Clontech)中の[³²P]dCTPランダム・プライマー標識されたプローブとハイブリダイズさせた。このプロットを、製造者の推奨に従って洗浄し、そして増感スクリーンを用いて-80℃で7日間フジRXフィルムに露出させた。

【0052】

マウス組織のRT-PCRスクリーニング

第1ストランドcDNA合成を、Gene Amp RNA PCR Core Kit(Perkin Elmer)を使用して、マウス組織からの全RNA 1µgとプライマーとしてオリゴ(dT)を用いて行った。上記PCR反応のために、Taqポリメラーゼとともに、5'-TGGCGAGAGTGTGTTCAGCTATGTC-3' と5'-CTTCCAAAATGTAGTTCAGGGTAGCCAATC-3' を使用した。上記PCR生成物の1/10を4%アガロース・ゲル上で可視化した。

【0053】

インサイチュウ・ハイブリダイゼーション

1SHのためのcRNAプローブの合成のためのプラスミドを構築するために、テンプレートとしてpCR-NL1Aを使用して、センス・プライマー5'-GGAGCCATAGTGACTCTGGGTGTC-3' (nt416~439)とアンチセンス・プライマー5'-GACGCTCAGCAGGGGCTCAGAGTC-3' (nt842~865)を用いたPCRにより452bp断片を増幅した。増幅生成物をpCRIIベクター(Invitrogen)内に挿入した。リボプローブの合成と1SHのためのプロトコールは、先に記載されたようなものであった(Ruchon 1998)。

【0054】

結果

マウスNL1 cDNAのクローニング、及び配列分析

NEPファミリーの新規メンバーのためのcDNAを単離するために、我々は、NEP, ECE-1とPHEXがかなりの配列同一性をもつ領域を共有するという事実に基づくRT-PCR戦略を開発した。ネスト化プライマーを用いた精巢mRNAについてのRT-PCRの後、約300bpのDNA断片を増幅した。このDNA断片をクローン化し、そして24の独立のコロニーからのプラスミドを配列決定した：3つのクローンは挿入がなく、4つのクローンはNEPファミリーに関係ないDNA断片をもち、7つのクローンはマウスNEPに対応する配列をもち、そして3つのクローンはマウスPHEXに対応する配列をもっていた。このことは、我々のアプローチが、上記ファミリーのメンバーの同定を効率的に可能にしていたことを示すものであった。さらに、7つの同一クローンが、NEPファミリーのメンバーに対して配列類似性を提示する新規cDNAをもっていた。全長cDNAは、材料及び方法において記載したように、マウス精巢cDNAライブラリーをスクリーニングし、その後5'RACEを行うことにより、その後に得られた。そのヌクレオチドと演繹アミノ酸配列は、(以下、NL1という)新規NEP-様タンパク質をクローン化したことを確信させた。

【0055】

NL1 cDNAは、2925ntにわたり、それは、331ntをもつ5'非翻訳領域、nt332~nt2626の2295ntをもつオープン・リーディング・フレーム、そして299ntをもつ3'非翻訳領域を含む。推定された開始ATGの廻りの配列は、Kozakコンセンサス(Kozak 1986)に一致する。NL1の演繹されたアミノ酸配列は、短いN-末端細胞質テール、ユニークな推定トランスメンブラン・ドメイン、及び大きなC-末端細胞外ドメインを包含する765アミノ酸残基からなる推定タイプIIトランスメンブラン・タンパク質を現す。このエクトドメインは、9つの潜在的N-グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)と、上記ファミリーの全メンバーの中で保存されたものに対応する、10のシステイン残基を含み、これらは、適正な折り畳みと活性なコンホメーションでの上記タンパク質の維持におそらく関係する。NEPの活性部位の部分として知られている全てのアミノ酸残基のがNL1中に存在す

る。予想されたタンパク質は、上記ファミリーの他のメンバーのいずれよりもNEPに対する高い類似性を示す。

【0056】

NL1はネプリリジン・ファミリーのタンパク質と多くの特徴を共有しているけれども、極立った局面がそれを他のものから区別している：そのエクドメインの最初の保存システイン残基は、それがNEP(9残基)又は上記ファミリーの他のいずれかのメンバー内にあるよりも、NL1内で上記の予想されたトランスメンブラン・ドメインからより遠くにある(34アミノ酸残基)。さらに、我々は、上記トランスメンブラン・ドメインの終わりと同じ最初のシステインとの間に、推定フリン解裂部位(-Arg₅₈-Thr-Val-Val-Lys-Arg₆₃-)があることに気づいた。この観察は、NL1が、膜結合タンパク質よりもむしろ分泌されたものとして存在することができることを示唆している。

【0057】

HEK293細胞内でのNL1発現

HEK293細胞を、NL1 cDNAを含むpCDNA3/RSV発現ベクターでトランスフェクトし、そして材料及び方法において記載したように(HEK/NL1細胞)、永久細胞系と樹立した。ポリクローナル抗体による免疫プロットティングは、16時間の培養後、ほとんどのNL1が、その細胞抽出物中の少量の酵素とともに培養基中に存在した。分泌され、そして細胞に会合したNL1は、それぞれ、約125と110kDaの見かけ分子質量をもっていた。NL1の糖添加状態を特徴付けるために、我々は次に、上記組換えタンパク質をペプチド：N-グリコシダーゼF(PNGase F)とエンドグリコシダーゼH(エンドH)による脱グリコシル化に供した。PNGase Fは、高マンノース、及びゴルジ体(Golgi complex)内に添加された最も複雑なN結合オリゴ糖を除去する。反対に、エンドHは、REER内のタンパク質上に存在するがゴルジ体内に未だ輸送されていない。高マンノース・タイプのN-結合オリゴ糖側鎖を除去する；従って、エンドHに対する耐性は、そのタンパク質がゴルジ体内に移動しているかどうかの指標として使用されることができる。PNGase F処理は、細胞は会合し及び分泌されたNL1が、それらの電気泳動易動度が

消化後に増加することから、N-グリコシル化されていたことを示した。しかしながら、分泌されたNL1は、PNGase F処理後、ダブレットとして移動した。1つ目のバンドは細胞会合形態のものとともに移動し、そして2つ目のバンドは、より遅い移動速度をもっていた。未処理の、そしてエンドH消化された分泌NL1はSDS-PAGEにより単一バンドとして見られたので、我々の観察は、分泌されたNL1の割合が、N-結合オリゴ糖のいくらかをPNGase F消化に対して耐性にする、さらなるREER後翻訳後修飾を経験するということを示唆している。

【0058】

分泌されたNL1とは反対に、細胞抽出物からのNL1は、エンドH処理を受け易かった。この結果は、上記2つの種の糖添加状態の違いを示し、そしてトランスフェクトされた細胞内で観察された細胞会合形態が、ゴジル体内に通過していない細胞内種であるということを示唆している。

【0059】

ズブチリシン様コンベルターゼ (subtilisin-like convertase) によるNL1のプロセッシング

哺乳動物のズブチリシン様コンベルターゼ・ファミリーのメンバーが、トランスフェクトされた細胞の培養基中に存在するNL1に責任を負っているかどうかを決定するために、我々は、一定量のプラスミドpCDNA3/RSV/NL1と増加量のプラスミドpCDNA3/CMV/PDX (Benjannet 1997) を用いてHEX293細胞を一過性に同時トランスフェクトさせた。後者のベクターは、1-抗トリプシンPortland変種、1-PDX、ズブチリシン様コンベルターゼの知られた阻害剤 (Anderson 1993) の発現を促進させる。NL1と1-PDXの両者を発現する細胞の培養基の免疫プロット分析は、NL1分泌が、1-PDXの存在により強く阻害されたことを示した；1-PDXの量とNL1分泌の阻害レベルとの間に、一定の関係が観察された。

【0060】

上記ズブチリシン様コンベルターゼによるタンパク質分解が、NL1エクトド

メイン内で同定された推定フリン解裂部位 (- A r g₅₈ - T h r - V a l - V a l - L y s - A r g₆₃ -) において生じていたかどうかを確かめるために、アミノ酸残基 A s n₆₂ - G l y₆₃ を、ベクター p c D N A 3 / R S V / N L 1 内、及び突然変異体タンパク質を発現する H E K 2 9 3 細胞 (H E K / N L 1 m u t 細胞) を樹立するために使用された突然変異したベクター内での部位指定突然変異誘発により、 L y s₆₂ - A r g₆₃ の代わりに置いた。 H E K / N L 1 m u t 細胞の培養基の免疫ブロット分析は、その突然変異が N L 1 の分泌を完全に廃止したことを示した。さらに、 1 2 7 k D a の分子量をもつ N L 1 の他の形態が、上記細胞の抽出物中で検出された。この新規な種は、エンド H 消化に対して耐性であり、そして H E K / N L 1 m u t 細胞が C h i d i a c e t a l . 1 9 9 6 に従って分画されたとき、膜と会合して存在していた (結果を示さず) 。

【 0 0 6 1 】

N L 1 酵素活性

H E K 2 9 3 と H E K / N L 1 細胞からの培養基を、基質 (チロシル - [3 , 5 - ³H]) (D - A l a₂) - L e u₅ - エンケファリン、知られた N E P 基質を用いて、酵素活性についてテストした。活性は、 H E K 細胞中ではなく、 H E K / N L 1 細胞の培養基中で、検出された。この活性は、 N L 1 の量及びインキュベーション期間とともに線形で上昇した。このことは、上記基質の消化が、 N L 1 酵素活性に因るものであったということを示している。

【 0 0 6 2 】

我々は、同一基質を用いて N L 1 の酵素パラメーターを特徴付け、そしてそれらを、 N E P の操作された可溶性形態 (s N E P) (L e m a y 1 9 8 9) のパラメーターと比較した。 D - A l a₂ - L e u₅ - エンケファリンについての N L 1 アフィニティーは、それぞれ、 1 8 μ M と 7 3 μ M のそれらの K m 値により示されるように、 s N E P のものよりも僅かに高かった。阻害アッセイは、ホスフォラミドンが、それぞれ、 0 . 9 n M と 0 . 5 n M の I C₅₀ 値をもって、 N L 1 と s N E P 活性に対して類似の効果をもち、そしてチオルファン (t h i o r p h a n) 、 N E P の特異的インヒビターは、 N E P について 8 n M の I C₅₀ と比較したとき、 4 7 n M の I C₅₀ をもって N L 1 を阻害した。

【0063】

ひじょうに低レベルのホスホラミドン・感受性活性が、HEK/NL1細胞の抽出物中で検出され(データを示さず)、これは、免疫ブロッティングにより観察された少量のNL1と矛盾しないものであった。

【0064】

NL1がNEPに類似する解裂部位特異性をもっていたかどうかを決定するために、我々は、HEK/NL1細胞の培地から回収したNL1の存在下又はsNEPの存在下でLeu₅-エンケファリンをインキュベートし、そしてRP-HPLCによりその分解産物を分析した。標準的なTyr-Gly-Gly、及びPhe-Leuペプチドとともに移動するピークを、両RP-HPLCプロフィールにおいて観察された。このことは、両酵素は、Gly₃-Phe₄ペプチド・ボンドにおいて上記基質を解裂させたことを示している。このエンケファリン分解活性は、ホスホラミドン(1 μM)により完全に阻害された。

【0065】

NL1 mRNAの組織及び細胞分析

NL1 mRNAの組織分布を、NL1 cDNAのコーディング領域に対応する特異的プローブを用いたノーザン・ブロット分析により測定した。3.4 kbの単一転写産物は、テストされた全マウス組織の中で精巣内だけに検出された。マウス組織を、RT-PCRによってもスクリーンした。このより高感度の技術を用いて、心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、及び腎臓を含むいくつかの他の組織中にNL1の発現が観察された。上記ノーザン・ブロットの結果に一致して、厳密には定量的ではないけれども、RT-PCR分析は、他の組織中よりも精巣内でより多くのNL1 mRNAを検出した。

【0066】

NL1 mRNA分布をより詳しく洞察するために、我々は、4日齢の新生マウスからの1SHクリオスタット矢状切片(cryostat sagittal sections)、並びに16日齢の動物(p16)、及び成体組織(心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、腎臓、及び精巣)からの切片により検査した。NL1 mRNAの存在は、成体精巣内でのみ検出された。精細管の脈管外面内の生殖細

胞だけが標識された。これらの細胞は、全ての精子形成成熟段階において丸く、かつ、長い精子細胞として同定された。精子又は精母細胞、精子又はセルトリ (Sertoli) 細胞のいずれも、標識されなかった。間質細胞もネガティブであった。対照を、非特異的バックグラウンドのみを生成するセンス・リボプローブを用いて行った (データを示さず)。テストした4日齢のマウス矢状切片と他の全ての組織はネガティブであった。

【0067】

討議

推定治療標的としてのネプリリジン・ファミリーのメンバーの高い重要性、及びペプチダーゼの重要なファミリーの新規メンバーの最近の発見は、残った上記ファミリーの他のメンバーが同定されるかどうかについて調べることを我々に促した。PCR-ベースの戦略を使用して、我々は、マウス精巢から、我々がNL1と呼ぶ新規NEP-様酵素をコードする部分的cDNAをクローン化した。全長NL1 cDNAによりコードされたアミノ酸配列の分析は、上記ファミリーのこのメンバーが最大でNEPに：55%同一性、及び74%類似性、類似していることを現した。最近、全マウス胚からの新規亜鉛メタロペプチダーゼの1次構造が報告された (Ikeda 1999)。SEPといわれるこの酵素は、別々のスプライシングに因り、可溶性形態又は細胞会合形態のいずれかで存在する。NL1は、SEPの可溶性形態とたった3つのアミノ酸の違いを示し、このことは、分泌されたSEPとNL1が同じ酵素であることを示している。我々のクローニング戦略は、マウス精巢中の少量の種であるNL1の細胞会合形態の特徴付けを許容しなかった (Ikeda 1999)。

【0068】

NL1のアミノ酸配列は、上記ファミリーの他のメンバーに類似するタイプIIの完全膜糖タンパク質のトポロジーを予想する。PNGase Fによる上記組換えタンパク質の処理は、実際、NL1が、N結合炭水化物側鎖を有していることを示した。しかしながら、9つの全ての推定N-グリコシル化部位が使用されているかどうかを正確に決定することはできないが、PNGase F処理の間の分子質量における30kDaの減少は、ほとんどがグリコシル化されていること

を示唆している。Asn - X - Ser / Thr コンセンサス内の全てのアスパラギン残基がCOS - 1細胞内で発現されるウサギNEPにおいてグリコシル化されていること、そして糖部分が上記タンパク質の安定性及び酵素活性を高め、そしてその分子内輸送を容易にすることが、既に示されている (Lafrance 1994)。3つのNEPグリコシル化Asn残基 (Asn145, Asn285、及びAsn628) は、NL1において保存されている (Asn163, Asn303、及びAsn643)。これらの残基の中で、Asn145とAsn628は、NEP酵素活性に影響を及ぼすと報告されている (Lafrance 1994)。同じ研究において、NEPの折れ畳み及び細胞内輸送に対する糖添加の効果は、いずれかの特定のものの寄与よりもむしろ全てのグリコシル化部位の累積的效果であることも示されている。NL1のグリコシル化は、NEPのものと類似性を共有している。なぜなら、我々は、それらの1次構造及び酵素活性が酷似していることを発見したからである。

【0069】

驚くべきことに、HEK293細胞のトランスフェクションによるcDNAの発現は、上記酵素のほとんどがその培養基中に分泌されることを示した。上記細胞と会合した少量のNL1は、エンドH感受性であり、これは上記細胞会合酵素が、未がRERを去っていない種であることを示唆している。予想されたトランスメンブラン・ドメインと上記エクトドメインの最初の保存されたシステイン残基との間のNL1配列中のフリン解裂部位の存在は、コンベルターゼの哺乳動物のズブチリシン様ファミリーのメンバーが上記培養基中のNL1の存在に責任を負うということを我々に信じさせた。これらの酵素は、さまざまな前駆体タンパク質、例えば、成長因子及びホルモン、レセプター、血漿タンパク質、マトリックス、メタロプロテイナーゼ、メタロプロテアーゼ - デスインテグリン、並びにウイルスのエンベロープ糖タンパク質のプロセッシングに関係している (レビューについては: (Nakayama 1997) を参照のこと)。フリン解裂部位 (- Arg₅₈ - Thr - Val - Val - Lys - Arg₆₃ -) の部位指定突然変異誘発、及び 1 - PDX、哺乳動物ズブチリシン様コンベルターゼの強力な阻害剤 (Anderson 1993) の発現は、このファミリーのエンドペ

プチダーゼのメンバーが、おそらく Arg₆₃ のカルボキシ末端における解裂による NL1 分泌に関係していることを確信させた。ズブチリシン様コンベルターゼによる解裂後に膜結合前駆体から分泌形態までプロセスされるタンパク質のほんのいくつかの例が存在し；これらは、メプリン (mep rin) とコラーゲンXV II (Milhiet 1995 ; Schacke 1998) を含む。コンベルターゼの上記ズブチリシン様ファミリーの3つのメンバー、すなわち、フリン、PC4、とPC7は、生殖細胞内で発現することが知られている (Nakayama 1992 ; Torri 1993 ; Seidah 1992 , 1996) 。これらのコンベルターゼの中の1がその膜形態から分泌されたNL1を生成するかどうかは、現在調査されている。いずれの場合においても、NL1は、分泌されるネプリリジン・ファミリーの唯一の知られたメンバーである。このユニークな特徴は、NL1が膜結合ペプチダーゼのものとは違った意味でのその生理学的役割を演じ、それにより、上記ネプリリジン・ファミリーのペプチダーゼの役割を多様化しているということを示唆する。血中及び尿中のNEPの循環形態が記載されてきたが、それらは一般に、病理学的又はストレス条件に関係していたということが重要である (Almenoff 1984 ; Deschodt-Lanckmann 1989 ; Johnson 1985 ; Soleihac 1996 ; Aviv 1995) 。

【0070】

我々は、上記フリン解裂部位において突然変異されたNL1を発現する細胞内で、エンドHによる消化に耐性の種の出現を観察した。この突然変異されたタンパク質は、細胞膜と会合していた。考え合わせると、これらの結果は、NL1がまず合成され、そしてタイプIIトランスメンブラン・タンパク質としてRER膜に挿入されるということを示す。このプロセスが生じる場所の細胞区画の正体は知られていない。しかしながら、哺乳動物のズブチリシン様コンベルターゼは、通常、分泌経路のゴルジ後 (post-Golgi) 区画において活性であり、このことは、その膜結合形態からその可溶性形態へのNL1のプロセッシングがゴルジ後の事件であるということを示唆している。

【0071】

N L 1 分泌のほとんど全ての撤廃にも拘らず、我々は、 1 - P D X と N L 1 を同時発現するか（結果を示さず）又は突然変異した N L 1 を発現する細胞内でのエンドH耐性 N L 1 のほんの僅かな蓄積を観察した。この観察は、プロセスされていない N L 1 が速く分解されることを示唆している。同類の挙動が、フリン欠陥細胞系 L o V o 内で発現される N o t c h 1 レセプター（L o g e a t 1 9 9 8）について報告された。これらのプロセスされていないタンパク質がそれにより分解されるところのメカニズムは、未だ知られていない。上記フリン解裂部位を含む、23アミノ酸ペプチドを失った S E P のスプライス形態が、細胞会合エンドH感受性分子を生成するということが指摘されていることは興味深い（I k e d a 1 9 9 9）。

【0072】

上記 N L 1 の 1 次構造に関する最も重要な観察は、N E P において基質又は阻害剤の触媒及び結合にとって必須である残基の保存である。この発見は、N L 1 が、N E P のものと類似の触媒メカニズムをもってエンドペプチダーゼとして有効に働くことができるであろうということを示唆する。この仮定は、D - A l a₂ - L e u₅ - エンケファリン、N E P 活性をモニターするためにしばしば使用されるペプチド基質も優れた N L 1 基質であるという証明により支持された。D - A l a₂ - L e u₅ - エンケファリンについての N L 1 のアフィニティーは、4 ~ 5 倍低い K m 値により反映されるように、N E P のものよりも高くさえあった。さらに、2 つのよく知られた N E P 阻害剤、ホスフォラミドンとチオルファンも、N L 1 活性を廃止した。N E P 及び E C E - 1 活性を、より低い程度ではあるが阻害するホスフォラミドン（T u r n e r 1 9 9 6）は、N L 1 と N E P に対して酷似した効果を有し、N L 1 についての I C₅₀ 値は、N E P について測定された値から 2 倍を超えて変化することはなかった。N E P のより特異性のある阻害剤であると考えられているチオルファン（T h i o r p h a n）も N L 1 活性を阻害し、I C₅₀ は N E P についてのものより 6 倍高かった。これらの結果は、N L 1 と N E P の活性部位が類似していることを示唆している。この仮説は、分泌された S E P が、サブスタンス P、ブラジキニン、及び心房性ナトリウム利尿ペプチドを含む、N E P 基質であると知られている ペプチドのセットを

分解したという観察により支持される (I k e d a 1999)。これを考え合わせると、これらの結果は、高く特異的な阻害剤のデザインについて上記ファミリーの他のメンバーを同定し、そして特徴付けることの重要性を示している。

【0073】

N L 1 と N E P が類似の触媒部位をもっていることを証明する酵素パラメーターと一致して、我々は、両酵素が、同じペプチド結合において L e u₅ - エンケファリンを解裂させたことを観察した。この結果は、N L 1 が、N E P がそうであるように、疎水性アミノ酸残基のアミノ側鎖上のペプチド結合を加水分解することを示唆している (T u r n e r 1985)。しかしながら、いくつかの他のペプチドは、上記の特異性を確認し、そして N L 1 が N E P について (M a l f r o y 1982 ; B a t e m a n 1989 ; B e a u m o n t 1991) について、そしてより最近 E C E - 1 (J o h n s o n 1999) について示されたようなジペプチルシル・カルボキシペプチダーゼ活性をもつかどうかを決定するためにテストされなければならないであろう。

【0074】

S E P の可溶性形態と細胞会合形態についての特異的プライマーを用いた R T - P C R 実験は、精巣内で優勢である S E P の可溶性形態及び他の組織内で細胞会合形態をもつ上記酵素の広い組織分布を示した (I k e d a 1999)。我々の R T - P C R 結果は、N L 1 の広い組織分布を確認した。しかしながらノーザン・ブロットィングとインサイチュール・ハイブリダイゼーション実験は、N L 1 の発現が成熟精巣の生殖細胞内で優勢であるということを示した。興味深いことに、プロエンケファリン m R N A は、精巣の生殖細胞と体細胞内で発現されることが示されている (T o r i i 1993 , S e i d a h 1992 ; K e w 1989 ; M e h t a 1994 ; K i l p a t r i c k 1986 , 1987)。精巣エンケファリン・ペプチドについて特異的な機能は、未だ定められていないが、それらは、精巣内パラクリン/オートクリン因子として働くことができるであろうと信じられている。精巣細胞の伝達の仲介物質としてのそれらの推定される役割に加えて、精子形成の間に精子形成細胞により合成されるプロエンケファリン生成物が、ヒト、ハムスター、及びヒツジの精子のアクロソーム内で

保存され、そして先体反応後の精子から放出されることも証明されている (Kew 1990)。従って、プロエンケファリン生成物が生殖プロセスの間に精子先体因子として、そして精子形成細胞により分泌される精巣内調節物質として、作用することができるという提唱されている。Leu₅-エンケファリンは、NL1のための良い基質、であることが判っているので、プロエンケファリンに起源をもつオピオイド・ペプチドは、この新規酵素のための生理学的基質として作用することができるであろう。この方法で、NL1は、上記生理活性ペプチドの活性を調節するために役立つのであろう。

【0075】

精巣は、SEPの可溶性形態が優勢であるところの唯一の組織である (Ikeda, 1999)。このことは、精巣特異的な他のスプライシングを示唆する。多様なメカニズムを通じて生じる、ペプチダーゼ又はプロホルモンの精巣特異的な分子種の発現は、過去に文書化されている (Howard 1990; Jeannotte 1987)。しかしながら、これらの精巣特異的な種の生理学的な意味は、常に明らかというわけではない。NL1又はSEPの場合、他方において細胞会合酵素の、生殖細胞による局所的な構成的な分泌が、輸精管のいくつかの他のタンパク質分解酵素のように精子形成を調節することを可能にするかもしれない。NL1の局在化及び生理学的基質同定に関するより詳しい試験が、精巣内そしておそらく生殖プロセスにおけるその役割を理解するために必要であろう。

【0076】

上記ファミリーの他のメンバーのクローニング

上記NEP-様ファミリーの他のメンバーを発現するために、我々は、ペプチド作動性の系により調節されることが知られている組織 (脳、胸腺、腎臓、心臓、肺、卵巣、膵臓、骨、骨髄、及びリンパ腫細胞) から単離されたmRNAを増幅するために、同じRT-PCR戦略を使用するであろう。実際、これらの組織の多くは、上記ファミリーの少なくとも1のメンバーを発現し、そして/又はペプチダーゼ阻害剤が大きな効果をそれに対してもつところのペプチド作動性経路を制御することが知られている。増幅された断片はクローン化され、そして得ら

れたクローンは配列決定され、そして先に記載されたように、知られたペプチダーゼの配列に比較されるであろう。他の高保存された領域内の縮重プライマーの対も、他の関連ペプチダーゼをクローニングする可能性を増加させるために設計されるであろう。

【0077】

討議

先に討議したように、今日まで知られたNEPファミリーのペプチダーゼは、しばしば、重要な生理学的役割を演じていることが見ついている。これは、NEP自体、ECEs、及びPEXについて確かに真実である（先のレビューを見よ）。この理由により、（過去においてNEPとECEについてそうであったように）上記酵素の中のいくつかは、さまざまな病理学的症状において治療剤として次に使用されることができであろう阻害剤のデザインのための面白い標的であるかもしれない。しかしながら、1の酵素のためにデザインされた阻害剤が上記ファミリーの他のメンバーをある程度阻害することもできるということがいくぶん心配である。長期間の治療における治療剤、例えば抗高血圧剤として使用されるものとして使用される阻害剤についての特異性の上記欠如は、不所望の副作用に困り予測できない問題を引き起こすかもしれない。本研究の目的は、ペプチダーゼのNEPファミリーの新規メンバーをクローニングするための戦略を開発することである。上記報告において提示された結果は、我々の戦略が首尾よいものであるということを示している。我々は、NEPファミリーの推定酵素をコードする3つのcDNAsの全体又は部分ヌクレオチド配列を決定した。

【0078】

これらのcDNA配列は、有益なツールであり、そして以下のことを行うために使用されうる：

抗体の製造

本研究において示すように、NLcDNA配列の知識は、特異的な抗体を産生するために使用されうる。例えば、これに限らないが、上記ペプチダーゼ間の低ホモロジー領域（アミノ酸残基50～450）を、その配列が上記cDNAsの翻訳から演繹されるところのペプチドを合成するために使用することができ、そ

して/又は例えば、これだけではないがG S Tに融合された上記c D N A sのバクテリアにより発現された断片を精製し、そしてポリクローナル又はモノクローナル抗体の製造のためにウサギ(r a b b i t s)又はマウス内に注射することができる。上記抗体は、以下のことを行うために使用されうる：

- そこにおいて上記ペプチダーゼが機能しているところペプチド作動性系路の、免疫組織化学的同定；

- 生物学的液体又は生検についての、免疫ブロッティング又は免疫組織化学によるN - 酵素の異常生理学の試験；

- N L 酵素阻害剤を同定するための高処理量スクリーニング・アッセイの設定。これはそれに限定されないが、固体支持体に上記N L - 酵素を付着させるために抗体を使用することによって行われることができる；

- 1セットの条件下で上記N L - 酵素に選択的に結合することができる抗体を同定し、そして典型的には上記N L - 酵素を変性させない大きなpH又は塩濃度変化を含む他のセットの条件下でそれを放出させることによる、免疫沈降又はアフィニティー・クロマトグラフィーによる上記抗体を用いたN L - 酵素の精製；

- N L - 酵素活性をブロックする抗体の同定、及び治療剤としてのそれらの使用。ブロッキング抗体は、抗血清又は腹水液をインビトロ酵素アッセイに添加し、そしてN L - 酵素活性の阻害剤を検索することにより同定されることができる。次にブロッキング抗体は、インビボにおける効果をテストするために正常な又は疾患モデル動物に注射されることができるであろう。

【0079】

特異的RNA又はDNAプローブの誘導

本研究において示すように、NEP - ファミリーのメンバーのヌクレオチド配列の知識は、ヌクレオチド配列の比較を可能にし、そして例えば、これに限られないが分子クローニング、インビトロ転写、PCR又はDNA合成を含む方法による特異的RNA又はDNAプローブの設計を容易にする。このようにして得られたプローブは、以下のことを行うために使用されうる：

- DNA及びRNA分析、例えば、ノーザン・ブロット、及びインサイチュア・ハイブリダイゼーション、染色体マッピング又はPCR試験のための特異的プ

ローブ又はオリゴヌクレオチドの誘導。これらのプローブは、生物学的液体又は生検の正常又は病理学的サンプルの遺伝子試験のために使用されることができるであろう；

- マウスにおける遺伝子ノック - アウト又はノック - インのためのベクターの作製。上記 cDNA s の 5' - 末端に由来するプローブを用いた、マウス・ゲノム・ライブラリーのロング・レンジ PCR 技術、及び / 又はスクリーニングを、大きなエクソン / イントロン領域を単離するために使用することができる。次に、我々は、相同的組換え及びノック - アウト・マウスを作るために、上記クローン化されたゲノム DNA エクソンの中の 1 以上を、ネオマイシン耐性発現カセットで置換するであろう。あるいは、NL s をコードする cDNA s が、トランスジェニック / マウス内で上記酵素の各々を過剰発現させるために使用されるであろう。上記 cDNA s を、プロモーター配列から下流にクローン化し、そしてマウス受精卵内に注射した。解答すべき特定の問題に依存して、選ばれたプロモーター配列は、全ての組織、又は細胞又は組織 - 特異的なやり方で上記ペプチダーゼの発現を可能にするであろう。注射された卵は、代理母 (foster mothers) 内に移され、そして得られたマウスがペプチダーゼ発現について分析されるであろう；

- 遺伝子治療戦略における欠陥 NL 遺伝子の置き替え。上記 NL 全長 cDNA s は、狭い又は広いレンジの組織発現をもつ構成的又は誘導プロモーターの制御下でクローン化され、そして欠陥遺伝子をもつ対象 (患者) 内に適当なベクターを用いて導入されることができるであろう；

- 上記 NL s の発現を妨害するために使用されることができるであろうオリゴヌクレオチドの合成。例えば、これに限定されないが、アンチセンス又はリボゲノム活性をもつオリゴヌクレオチドが開発されうるであろう。これらのオリゴヌクレオチドは、先に記載したように対象内に導入されることができるであろう；

- 上記ファミリーの他のメンバーの単離。低ストリンジェンシーにおける上記 cDNA プローブを用いた cDNA 及び / 又はゲノム・ライブラリーのスクリーニングは、NEP - 様ファミリーの新規メンバーをクローニングすることを可能にすることができる。あるいは、上記配列のアラインメントは、これに限定され

ないが心臓及び脳を含む組織からのmRNAを用いたRT-PCRスクリーニングのための特異的縮重オリゴヌクレオチド・プライマーを設計することを当業者として可能にするであろう。

【0080】

組換えNL-酵素の製造

本研究において示すように、組換え活性NL-酵素を、哺乳動物細胞内でのNL-cDNAsの発現により得ることができる。ネプリリジン、上記ファミリーの他のメンバーを用いた過去の実験(Devault et al., 1998; Fossiez et al., 1992; Ellefesen et al., 寄稿済)から、発現を、適当な発現ベクター内でのNL-cDNAsのクローニング後に、他の発現系内で行うこともできる。これらの発現系は、非限定的に、バキュロウイルス/昆虫細胞又は幼虫系、及びピチア・パストリス(Pichia-pastoris)-ベースの酵母系を含みうる。組換えNL-酵素の製造は、上記タンパク質の天然の膜結合又は可溶性形態又は上記酵素の遺伝子操作された可溶性形態の製造を含む。後者は、先に行われたように(Lemay et al., 1989)、非限定的に例えばプロオピオメラノコルチン(proopiomelanocortin)のものを含む解裂性シグナル・ペプチドにより上記細胞質及びトランスメンブラン・ドメインを置換することにより、又は先に記載されたように(Lemire et al., 1997)、解裂性シグナル・ペプチド内に非解裂性シグナル・ペプチド、膜アンカー・ドメインを遺伝子操作により形質転換することにより、又は本研究において行われたように、例えば非限定的にNL-1を含む天然の可溶性NLsの(開始メチオニンからアミノ酸残基300までの)アミノ末端ドメインへのNL-酵素のエクトドメインの融合により、得られることができる。これらの組換えNLsは以下のことを行うために使用されうる：

- 基質の発見。基質は、以下の中の1を使用して同定されうる。

【0081】

・現存する生理学性ペプチドのスクリーニング。ペプチドをNL-酵素の存在下でインキュベートし、そして次に分解についてHPLCにより分析する。分解

は、基質のピークの消失、及び生成物のピークの出現により観察される；

・上記目的のために特別に設計されたファージ・ライブラリー（プージ・ディスプレイ・ライブラリー）のスクリーニング。各ファージは、その表面に、そのコート・タンパク質の部分として、抗体又はいずれかの他の配列認識剤により認識されうるペプチド配列に先行されるランダム・ペプチド、を発現する。この前者の配列は、そのファージを固体支持体に付着させるのに役立つ。NL-酵素の添加の間、NL基質である上記ランダム配列が解裂されて、上記ファージを放出する。数ラウンドの解裂の後、上記酵素により認識されうるペプチドを同定するために、上記ファージ配列が決定される。

【0082】

・上記酵素が発現されているところの組織の抽出物を集め、そして溶媒（アセトニトリル又はメタノール）で上記抽出されたタンパク質を変性させることによりクロマトグラフィー分析（HPLC、キャピラリー電気泳動又はいずれかの他の高分解能分離システム）のために調製する。上記抽出物を、クロマトグラフィー分離にかける。同一抽出物を、2つのクロマトグラムの中の差を観察するために十分な期間にわたり上記酵素とインキュベートする。同定された変化をもつ領域を集め、マス・スペクトル分析にかけて、そのペプチド組成を決定する。

【0083】

・小さなペプチド・ライブラリーであって1端において蛍光団（フルオロフォア）を、そして他端においてクエンチャー基をもつものを調製する（Meldal et al. *Methods in molecular biology* 1998, 87）。上記基質を、Apletalina et al (*JBC* (1998) 273, 41, 26589-95) 中に記載した戦略を使用して同定することができる。各ヘキサペプチド・ライブラリーのために、（全部で $6 \times 20 = 120$ の個々のライブラリーについて）1の位置における1の残基の同一性は、一定のままであり、一方、残りはランダムにされる。各ライブラリーは、320万の異なるメンバーから作られ、そして上記ヘキサペプチドに沿った上記一定残基の位置、及びその同一性の両者により、同定される。NL-酵素が各ライブラリーに添加され、そしてその蛍光が記録される。上記データは、上記ヘキ

サペプチドに沿って各位置について最高の蛍光を作り出すライブラリーを同定するために体系化される。このアレンジメントは、上記ヘキサペプチドに沿った各位置における重要な残基の同一性を示唆する。最高の示唆を提示するヘキサペプチドを調製し、そして同様のやり方でテストする。このセットから、最高の蛍光をもつヘキサペプチドを選択する。

【0084】

- 酵素アッセイの設定。酵素アッセイは、一定条件のpH、塩、温度、及び時間において、先に同定された基質の上記酵素への添加から成る。得られた溶液を、加水分解されたペプチド又は無傷のペプチドについてアッセイする。このアッセイは、特異的抗体、HPLC、又は自己クエンチされる蛍光でタグ付けされたペプチドが使用されるとき (Meldal et al)、蛍光の出現により、具現化されることができる。上記酵素は、溶液中に存在し又は固体支持体に付着されることができる；

- 阻害剤の同定。阻害剤は、X-線結晶学及びその後活性関係を用いて合成ライブラリー、生物相の抽出物、及び論理設計された阻害剤から同定されることができる。各分子又は抽出画分を、先に記載した酵素試験を用いて阻害活性についてテストする。最高の阻害に責任を負う分子を、知られた手順に従ってその薬理的及び毒物学的特性を決定するために、さらにテストする。低毒性とともに最良の分配、薬理学的作用をもつ阻害剤が、医薬製造のために選択されるであろう。阻害剤又はその許容される塩の医薬として許容される配合物が、錠剤、カプセル又は注射溶液を作るために知られた賦形剤と混合することにより調製されるであろう。1 ~ 500 mgの間の医薬が患者に投与される；

- 対象（患者）への天然又は可溶性精製されたNL-酵素の注射。NL活性の欠損又は低下により引き起こされる疾患又は病理の場合、精製されたNLが患者に静脈内又はその他の方法で注射されることができるであろう。あるいは、固定化されたNL-酵素が、整形外科手術又は骨又は歯の組織内へのデバイスの移植部位に導入されることができるであろう。

【0085】

外来タンパク質及びペプチドの分泌

本研究において示されるように、（開始メチオニンからフリン部位までの）NL-1のアミノ末端ドメインは、外来タンパク質（この場合、NL-3と - エンドルフィンのエクトドメイン）の分泌を促進するために使用されることができる。

【0086】

NL-1の、そしてまた他の天然の可溶性NL-酵素のアミノ末端ドメインは以下のことを行うために使用されることができるであろう：

- 外来タンパク質の製造及び分泌の促進。これは、NL-1のアミノ末端から下流にあり、かつ、相の合った上記外来タンパク質をコードする配列を遺伝子融合することにより達成されることができる。これらのキメラ構造物は、タンパク質製造及び分泌のために上述の発現系のいずれかの内で適当なベクターの助けを借りて導入されることができるであろう；

- 生理活性ペプチドの製造及び分泌の促進。これに限らないが例えば、 - エンドルフィン、エンケファリン、サブスタンスP、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANF）、及びオステロスタチンの如き小さな生理活性ペプチドをコードする配列は、NL-1のフリン部位の直下流に、かつ、相を合わせて融合されることができるであろう。これらのDNA構築物は、生理活性ペプチドを製造するために上記のように使用されることができるであろう。

【0087】

- タンパク質又はペプチドの分泌を促進するための人工（非天然）タンパク質又はタンパク質セグメント（タンパク質ベクター）を設計するためのモデルとしての働き。これらのタンパク質ベクターは、分泌されたタンパク質を真似るように構築されることができる。この場合、それらは、小胞体シグナル・ペプチド、可変長をもつスペーサー、及び分泌のために設計されたタンパク質又はペプチドがそれに融合されることができるところのフリン解裂部位からアSEMBLされるであろう。上記スペーサー、フリン、解裂部位、及び分泌のために設計されたタンパク質又はペプチドの全長は、少なくともクロアミノ酸残基でなければならない。あるいは、このようなタンパク質ベクターは、タイプII膜タンパク質を真似るようにアSEMBLされることができるであろう。この場合、それらは、そのア

ミノ末端からカルボキシ末端まで、可変長の細胞質ドメイン、シグナル・ペプチドとしても働くトランスメンブラン・ドメイン、可変長の細胞外セグメント、及び分泌のために設計されたタンパク質又はペプチドがそれに融合されることができるところのフリン解裂部位を含むであろう。この細胞外セグメント、フリン解裂部位、及び分泌のために設計されたタンパク質又はペプチドの全長は、少なくともクロアミノ酸でなければならない。

【0088】

N L - 酵素の治療的適用

内因性ペプチドの不適当なプロセッシングは、いくつかの病気を引き起こすことができる。不適当なプロセッシングは、酵素自体、その基質、又はその支配酵素から下流の生化学的機械の他の要素の病理学的濃度から生じることができる。この意味で、支配酵素の活性を管理することにより患者を助けることができる。

【0089】

- N L - 酵素は脳に局在しており、そして - アミロイド前駆体の不適当なプロセッシングに関係するかもしれない。上記のように調製した医薬によるこのプロセスの阻害は、アルツハイマー病にかかった患者、及びプラーク形性により引き起こされる病気を患う他の患者を助けるであろう；

- N L - 酵素は、神経学的疾患、痛み又は精神医学的障害に関係する他のペプチドの不適当なプロセッシングに関係するかもしれない。適当に設計された阻害剤は、このような疾患の維持管理を助けるであろう；

- N L - 1 は、精巣内に存在し、そして精子の成熟に関係する。上記酵素により不適当にプロセスされたペプチドは、不妊を導くことができる。精液への N L - 1 の生体外添加又はインビトロ受精手順の間に精巣から直接採取された未熟精子は、受精を増加させるであろう。反対に、小分子阻害剤の使用又は抗体を用いた N L - 1 の除去は、インビトロ受精手順の間の不妊を増加させることができるであろう。N L - 1 阻害剤の投与は、受精の可能性を増加又は減少させることができる。この阻害剤は、先に記載されたように配合され、そして投与される。

【0090】

- N L - 3 は卵巣内に存在し、そして卵の成熟に関係するプロセッシングに関

係することができる。インビトロ受精手順の間に卵巣から直接採取された成熟卵へのNL-3の生体外添加は受精を増加させるであろう。反対に、小分子阻害剤の使用又は抗体によるNL-3の除去は、インビトロ受精手順の間の不妊を増加させるであろう。この阻害剤は、先に記載されたように配合され、そして投与される。

【0091】

- NL-3は骨内に存在する。以下酵素によるペプチドの不適正なプロセッシングは、骨疾患又は異常なリン酸代謝をもたらすことができる。先に記載したような阻害剤の投与が、この疾患の維持管理を可能にするであろう。

【0092】

【表1】

表1
NEP様ファミリーのメンバー間のアミノ酸配列同一性度

	hNEP	hPEX	hECE-1A	hECE-2	hKELL	sNL-1	hNL-2	hNL-3
hNEP	100*							
hPEX	35	100						
hECE-1A	39	38	100					
hECE-2	36	37	62	100				
hKELL	23	24	30	31	100			
sNL-1	55	39	39	39	26	100		
hNL-2	54	39	39	39	26	77	100	
hNL-3	35	32	37	37	28	36	34	100

* : 配列同一性のパーセンテージ

【0093】

【化1】

参考文献一覽

- Almenoff, J., Teirstein, A.S., Thornton, J.C., and Orlowski, M. (1984) *J. Lab. Clin. Med.* **103**, 420-431
- Anderson, A.D., Thomas, L., Hayflick, J.S., and Thomas, G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24887-24891
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., and Smith, J.A. (1988). *Current protocols in molecular biology* (New York: Wiley Interscience).
- Aviv, R., Gurbanov, K., Hoffman, A., Blumberg, S., and Winaver, J. (1995) *Kidney Int.* **47**, 855-860
- Bateman, R.C., Jackson D., Slaughter, C.A., Unnithan, S., Chai, Y.G., Moomaw, C., and Hersh, L.B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6151-6157
- Bawab, W., Aloyz, R.S., Crine, P., Roques, B.P., DesGroseillers, L. (1993) *Biochem. J.* **296**, 459-465
- Beaumont, A., Le Moual, H., Boileau, G., Crine, P., and Roques, B.P. (1991). Evidence that both arginine 102 and arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11). *J.Biol.Chem.* **266**, 214-220.
- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J.S., Chrétien, M., Marcinkiewicz, M., and Seidah, N.G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26210-26218.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752
- Chidiac, P., Nouet, S., and Bouvier, M. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 662-669
- Corvol, P. and Williams, T.A. (1997). Biochemical and molecular aspects of angiotensin I-converting enzyme. In *Cell-surface peptidases in health and disease*. A.J. Kenny and C.M. Boustead, eds. (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd), pp. 99-117.
- Crine, P., Dion, N., and Boileau, G. (1997). Endopeptidase-24.11. In *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease*. A.J. Kenny and C.M. Boustead, eds. (Oxford: BIOS Scientific Publishers), pp. 79-98.
- Crine, P., LeGrimellec, C., Lemieux, E., Labonté, L., Fortin, S., Blachier, A. and Aubry, M. (1985) The production and characterization of a monoclonal antibody specific for the 94000 dalton enkephalin-degrading peptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **131**, 255-261.
- Deschodt-Lanckman, M., Michaux, F., de Prez, E., Abramowicz, D., Vanherweghem, J.L., and Goldman, M. (1989) *Life Sci.* **45**, 133-141
- Devault, A., Nault, C., Zollinger, M., Fournié-Zaluski, M.-C., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1988a). Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous COS-1 cells. Characterization of the recombinant enzyme and evidence for a glutamic acid residue at the active site. *J.Biol.Chem.* **263**, 4033-4040.
- Devault, A., Sales, V., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau,

【 0 0 9 4 】

【化2】

- G. (1988b). Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site-directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett.* **231**, 54-58.
- Dion, N., Le Moual, H., Crine, P., and Boileau, G. (1993). Kinetic evidence that His-711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state. *FEBS Lett.* **318**, 301-304.
- Dion, N., Le Moual, H., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1995). Evidence that Asn⁶⁴² of neprilysin (EC 3.4.24.11) is involved in binding of the P₂' residue of substrates and inhibitors. *Biochem.J.* **311**, 623-627.
- Holmes, M.A. and Matthews, B.W. (1982). Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **160**, 623-639.
- Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1-6.
- Howard, T.E., Shai, S.Y., Langford, K.G., Martin, B.M., Bernstein, K.E. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4294-4302
- Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S.B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M., Matsuo, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32469-32477
- Jeannotte, L., Burbach, J.P., Drouin, J. (1987) *Mol. Endocrinol.* **1**, 749-757
- Johnson, A.R., Coalson, J.J., Ashton, J., Larumbide, M., and Erdos, E.G. (1985) *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 1262-1267
- Johnson, G.D., Stevenson, T., and Ahn, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4053-4058
Endocrinol. **3**, 1191-1196
- Kenny, J. (1993). Endopeptidase-24.11: Putative substrates and possible roles. *Biochem.Soc.Trans.* **21**, 663-668.
- Kew, D., Jin, D.F., Kim, F., Laddis, T., and Kilpatrick, D.L. (1989) *Mol. J. Biol Chem.* **266**, 214-220
- Kew, D., Muffly, K.E., and Kilpatrick, D.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **87**, 9143-9147
- Kilpatrick, D.L., Borland, K., and Jin, D.F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5695-5699
- Kilpatrick, D.L. and Millette, C.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **83**, 5015-5018
- Kozak, M. (1986) *Cell* **44**, 283-292
- Lafrance, M.H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P., and Lemay, G. (1994) *Biochem. J.* **302**, 451-454.
- Lancôt, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G., and Crine, P. (1995) *Biochem. J.* **305**, 165-171
- Le Moual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1991). Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J.Biol.Chem.* **266**, 15670-15674.
- Le Moual, H., Dion, N., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1994). Asp650 is

【 0 0 9 5 】

【化3】

- crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur.J.Biochem.* 221, 475-480.
- Lemay, G., Waksman, G., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1989). Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells. *J.Biol.Chem.* 264, 15620-15623.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israël, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8108-8112.
- Malfroy, B., and Schwartz, J.C. (1982) *Biochem. Biophys. Res.Com.* 106, 276-285
- Marie-Claire, C., Ruffet, E., Antonczak, S., Beaumont, A., O'Donohue, M., Roques, B.P., and Fournié-Zaluski, M.C. (1997). Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry* 36, 13938-13945.
- Mehta, N.D., Don, J., Zinn, S.A., Millette, C., Wolgemuth, D.J., and Kilpatrick, D.L. (1994) *Endocrinology* 135, 1543-1550
- Milhiet, P.E., Chevallier, S., Corbeil, D., Seidah, N.G., Crine, P., and Boileau, G. (1995) *Biochem. J.* 309, 683-688
- Monsees, T.K., Gornig, M., Schill, W.B., and Miska, W. (1998) *Andrologia* 30, 185-191
- Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.* 327, 625-635
- Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., and Murakami, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5897-5900
- Phelan, M.C., Rogers, R.C., Clarkson, K.B., Bowyer, F.P., Levine, M.A., Estabrooks, L.L., Severson, M.C., and Dobyns, W.B. (1995). Albright hereditary osteodystrophy and del(2)(q37.3) in four unrelated individuals. *Am.J.Med.Genet.* 58, 1-7.
- Raut, R., Rouleau, J.L., Blais, C. Jr, Gosselin, H., Molinaro, G., Sirois, M.G., Lepage, Y., Crine, P., and Adam, A. (1999) Bradykinin metabolism in the postinfarcted rat heart: role of ACE and neutral endopeptidase 24.11. *Am. J Physiol.* 276, H1769-H1779.
- Ruchon, A.F., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H.S., DesGroseillers, L., Crine, P., and Boileau, G. (1998). Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J.Histochem.Cytochem.* 46, 459-468.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* (New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schacke, H., Schumann, H., Hammami-Hauasli, N., Raghunath, M., and Bruckner-Tuderman, L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 25937-25943
- Seidah, N.G. and Chrétien, M. (1995). Pro-protein convertases of subtilisin/kexin family. *Methods Enzymol.* 244, 175-188.

【 0 0 9 6 】

【化 4】

- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., and Chretien, M. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1559-1570
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tadros, H., Mbikai, M., Chretien, M., and Day, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3388-3393
- Soleilhac, J.M., Lafuma, C., Porcher, J.M., Auburtin, G., and Roques, B.P. (1996) *Eur. J. Clin. Invest.* **26**, 1011-1017
- Torii, S., Yamagishi, T., Murakami, K., and Nakayama, K. (1993) *FEBS Lett.* **316**, 12-16
- Turner, A.J. (1997a). Endothelin-converting enzymes. In *Cell-surface peptidases in health and disease*. A.J. Kenny and C.M. Boustead, eds. (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd.), pp. 137-153.
- Turner, A.J. and Tanzawa, K. (1997b). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* **11**, 355-364.
- Turner, A.J., and Murphy, L. (1996) *Biochem. Pharmacol.* **51**, 91-102
- Turner, A.J., Matsas, R., and Kenny, A.J. (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1347-1356
- Vijayaraghavan, J., Kim, Y.-A., Jackson, D., Orlowski, M., and Hersh, L.B. (1990). Use of site-directed mutagenesis to identify valine-573 in the S'1 binding site of rat neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *Biochemistry* **29**, 8052-8056.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒトNEP, PEX, KELL、及びECE1ペプチダーゼのアミノ酸配列の比較を示す。ボックス内のアミノ酸配列は、オリゴヌクレオチド・プライマーを設計するために使用されたものである。上記配列の下の数と矢印は、上記プライマーとその方向を示す。

【図2】

図2は、PCR反応において使用されたオリゴヌクレオチド・プライマーの配列を表す。

【図3】

図3は、マウスNL-1 cDNAのヌクレオチド及びアミノ酸配列を表す。PCRにより得られたDNA断片の配列は括弧内にある。

【図4】

図4は、ヒトNL-2 cDNAの部分ヌクレオチド及びアミノ酸配列を表す。PCRにより得られたDNA断片の配列は括弧内にある。

【図5】

図5は、ヒトNL-3 cDNAの部分ヌクレオチド及びアミノ酸配列を表す。

【図6】

図6は、NEP, NL-1, NL-2、及びNL-3ペプチダーゼのアミノ酸配列の比較を表す。

【図7】

図7は、プローブとしてNL-1を使用したマウス精巣切片のインサイチュール・ハイブリダイゼーションを表す。

【図8】

図8は、プローブとしてマウスNL-3を使用したマウス切片のインサイチュール・ハイブリダイゼーションを表す。

【図9】

図9は、マウス骨髄切片のインサイチュール・ハイブリダイゼーションを表す。

【図10】

図10は、哺乳動物細胞内でのNL-1の発現を示す。

【図11】

図11は、組換え可溶性NL-1の活性を示す。

【図12】

図12は、NL-1アミノ末端ドメインを用いたNL-3の可溶性形態の発現を示す。

【図1-2】

270 280 290 300 310 320
 NEP1-HU NQLALEMKNVMELEKEIANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNMFSLRINGKPFPSWLN
 * * * * *
 PEX-HUM SRAEHDMKSVLRLEIKIAEIMIPHENRTSEAMY.NKMNISELSAMIP.....QFDWLG
 * * * * *
 KELL-HU SKVQEHSSLSISITSRLFQFLRPLEQRRAGKLFQMVTIDQLKEMAP.....AIDWLSC
 * * * * *
 ECE1-HU EAIRPQMQQILDFFETALANITIPQEKRRDEELIYHKVTAELQTLAP.....AINWLPF
 * * * * *
 コンセンサス M E A P E R K T L P WL

330 340 350 360 370 380
 NEP1-HU TNEIMSTVNI SITNEEDVVVYA...PEYLTKLKPI LTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSS
 * * * * *
 PEX-HUM IKKVIDTRLYPHLKDISPENVVVRVPQYFKDLFRILGSEKKTIANYLWVRMVYSRIPN
 * * * * *
 KELL-HU LQATFTPMSLSPSQSLVVHDVEYL...KNMSQLVEEMLLKQRDFLQSHMILGLVVTLSPA
 * * * * *
 ECE1-HU LNTIFYPVEINESEPIVVYDKEYL...EQISTLINT...TDRCLLNMYMIWNLVRKTSF
 * * * * *
 コンセンサス V L L N M W V

390 400 410 420 430
 NEP1-HU LSRTYKESR...NAFRKALYGT.TSETATWRRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESK
 * * * * *
 PEX-HUM LSRRFQYRW...LEFSRVIQGT.TLLPQWDKCVNFIESALPYVVGKMFVDVYFQEDKK
 * * * * *
 KELL-HU LDSQFQEARRKLSQKLRELTEQPPMPARPRWMKCEETGTFEPTLAALFVREAFGPSTR
 * * * * *
 ECE1-HU LDQRFQDA...DEKFMEVMYGTKKTKCLPRWKFCVSDTENNLGFALGPMFVKATFAEDSK
 * * * * *
 コンセンサス L FQ F GT P W CV G FV F K

440 450 460 470 480 490
 NEP1-HU HVVEDLIAQIREVFIQTLD.DLTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNE
 * * * * *
 PEX-HUM EMMEELVEGVRWAFIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYPE.FIMNDTHVNE
 * * * * *
 KELL-HU SAAMKLFATAIRDALITRLR.NLPWMNEETONMAQDKVAQLQVEMGASE.WALKPELARQE
 * * * * *
 ECE1-HU SIATEIILEIKKAFESLS.TLKWMDDEETPKSAKEKADAIYNMIGYPN.FIMDPKELDKV
 * * * * *
 コンセンサス L IR AFI L L WMD ET A EKA A GYP
 (4)
 (1A/B)

500 510 520 530 540 550
 NEP1-HU YLELNYKEDEYFENIIQNLKFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNOIVFP
 * * * * *
 PEX-HUM LKAIKFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWLRKAVPKTEWFTNPTTVNAFYASTNOIRFP
 * * * * *
 KELL-HU YND.IQLGSSFLQSVLSCVRSRLRARIVQSFLQHPQHRWKVSPWDVNAYYSVDHVIVFP
 * * * * *
 ECE1-HU FNDYTAVPDLFENAMRFFNFSWRVTADQLRKAPNRDQWSMTPPMVNAYYSPTKNEIVFP
 * * * * *
 コンセンサス YF N LR W P VNA YS N IVFP
 (2A/B)

1 (続き)

【図1-3】

	560	570	580	590	600	610
NEP1-HU	AGILQPPFFSAQQ.SNSLNYGGIGMVGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLDVWWTQQSASNF					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
PEX-HUM	AGELOKPPFFWGTEYPRSLSYGAIGVIVGHEFTHGFDNNGRKYDKNGNLDPWSTESEKF					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
KELL-HU	AGLLOPPFFHPGY.PRAVNFGAAGSIMAHELLHIFYQL...LLPGGCL....ACDNHAL					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
ECE1-HU	AGILQAPFYTRSS.PKALNFGGIGVVVGHELTHAFDDQGREYDKDGNLRPWKNSVEAF					
コンセンサス	AG LQ PFF	P L N G I G	G H E T H F D	GR	K G L W W	S F

	620	630	640	650	660	670
NEP1-HU	KEQSQCMVYQYGNFSWDLAGGQHLNGINTLGENIADHGGLGQAYRAYQNYI..KKNG.EE					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
PEX-HUM	KEKTKCMINQYSNYYWK.KAGLNVKGRKRTLGENIADNGGLREAFRAYRKWINDRRGLEE					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
KELL-HU	QEAHLCLKRHYAAF..PLPSRTSFNDSLTFLENAADVGGIAIALQAYSKRL..LRHH.GE					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
ECE1-HU	KRQTECMVEQYSNY..SVNG.EPVNGRHTLGENIADNGGLKAAYRAYQNVV..KKNG.AE					
コンセンサス	KE	CM QY N	NG	TLGENIADNGGL	A RAY	G E

	680	690	700	710	720	730
NEP1-HU	KLLPGLDLNHNKQLFFLNFAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEA					
	****	*****	**** *	**** *	**** *	**** *
PEX-HUM	PLLPGITFTNNQLFFLSYAHVRCNSYRPEAAREQVQIGAHSPQFRVNGAISNFEEFQKA					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
KELL-HU	TVLPSLDLSPQQIFFRSYAQVMCRKPSQDSH....DTHSPPHLRVHGPLSSTPAFARY					
	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *	** ** *
ECE1-HU	HSLPTLGLTNNQLFFLGFAQVWCSVRTPESSHEGLITDPHSPSRFRVIGSLSNSKEFSEH					
コンセンサス	LP L L	QLFFL	AQV C	PE	D HSP	FRV G LSN EF

	740	750
NEP1-HU	FHCRKNSYMNPEKK.CRVM	
	** ** *	** ** *
PEX-HUM	FNCPPNSTMNRGMDSCRLW	
	** ** *	** ** *
KELL-HU	FRCARGALINPSSR.CQLW	
	** ** *	** ** *
ECE1-HU	FRCPPGSPMPPHK.CEVW	
コンセンサス	F C	S MNP C W

_____ | (続き)

プライマー 配列

- (1A) 5'-TGGATGGAT/CGA/CIGG/AIACIA/CA-3'
- (1B) 5'-TGGATGGAT/CGA/CIGG/AIACIA/CG-3'
- (2A) 5'-A/GTGTGTTTT/CCCIGCIGGIA/GT/AIC/TTA/TCA-3'
- (2B) 5'-A/GTGTGTTTT/CCCIGCIGGIA/GT/AIC/TTG/CCA-3'
- (3) 5'-AIIICCICCIA/TC/TA/GTCIGCIG/AC/TA/GTTT/CTC-3'
- (4) 5'-GAT/CAAT/CT/CTIGAT/CGAA/GT/CTIAAT/CTGGA'GG-3'
- (5) 5'-T/CT/CACCAIA'ICT/GA/GCATCG/TT/CTTCATIGGG/ATG-3'



300 ala thr met leu arg lys asp gln asn leu ser lys glu ser ala met val arg glu glu met ala glu val leu glu leu glu thr his
 811 GCC ACT ATG CTT AGG AAA GAC CAG AAC CTG TCC AAG GAG AGC GCC ATG GTG CGG GAG GAG ATG GCG GAG GTG CTG GAA CTG GAG ACG GAT
 330 leu ala asn ala thr val pro gln glu lys arg his asp val thr ala leu tyr his arg met asp leu met glu leu gln glu arg phe
 901 CTG GCC AAC GCC ACA GTC CCC CAG GAG AAA AGG CAT GAT GTC ACT GCC CTG TAC CAC CGA ATG GAC CTG ATG GAG CTA CAG GAA AGG TTT
 360 gly leu lys lys gly phe asn trp thr leu phe ile gln asn val leu ser ser val glu val glu leu phe pro asp glu glu val val val
 991 GGT CTG AAG GGG TTT AAC TGG ACT CTC TTC ATA CAA AAC GTC TGG TCT TCT GTG GAA GTC GAG CTG TTC CCA GAT GAG GAG GTG GTC
 390 tyr gly ile pro tyr leu glu asn leu glu asn leu ile asp ser tyr ser ala arg thr met gln asn tyr leu val trp arg leu val
 1081 TAC GGC ATC CCC TAC CTG GAG AAT CTG GAG GAT ATC ATT GAT AGC TAC TCA GCA CGG ACC ATG CAG AAC TAC CTG GTA TGG CGC CTG GTG
 420 leu asp arg ile gly ser leu ser gln arg phe lys glu ala arg val asp tyr arg lys ala leu tyr gly thr thr val glu glu val
 1171 CTA GAT CGA ATT GGC AGC CTG ACC CAG AGA TTC AAA GAG GCG CGT GTG GAC TAC CGC AAG GCG CTG TAC GGC ACG ACC GTG GAG GAT
 450 arg trp arg glu cys val ser tyr val asn ser asn met glu ser ala val gly ser leu tyr ile lys arg ala phe ser lys asp ser
 1261 CGC TGG CGA GAG TGT GTC ACC TAT GTC AAC AGT AAC ATG GAG AGC GCC GTG GGC TCC CTC TAC ATC AAG CAG GCC TTC TCC AAG GAC AGC
 480 lys ser thr val arg glu leu ile glu lys ile arg ser val phe val asp asn leu asp glu leu asn trp met asp glu glu ser lys
 1351 AAG AGC ACG GTC AGA GAG CTG ATT GAG AAG ATA AGG TCC GTG TTT GTG GAT AAC CTG GAG CTG AAC TGG ATG GAC GAG GAA TCC AAG
 510 lys lys ala gln glu lys ala met asn ile arg glu gln ile gly tyr pro asp tyr ile leu glu asp asn lys his leu asp glu
 1441 AAG AAG GCC CAG GAA AAG GCC ATG AAT ATA CGG GAA CAG ATT GGC TAC CCT GAC TAC AAT TTG GAA GAT AAC AAT AAA CAC CTG GAT GAG
 540 glu tyr ser ser leu thr phe tyr glu asp leu tyr phe glu asn gly leu gln asn leu lys asn asn ala gln arg ser leu lys lys
 1531 GAA TAC TCC AGT TTG ACT TTC TAT GAG GAC CTG TAT TTT GAG AAC GGA CTT CAG AAC CTC CAG AAC AAT GCC CAG AGG AGC CTC AAG AAG
 570 leu arg glu lys val asp gln asn leu trp ile ile gly ala ala val val asn ala phe tyr ser pro asn arg asn gln ile val phe
 1621 CTT CGG GAA AAG GTG GAC CAG AAT CTC TGG ATC ATC GGG GCT GCA GTG GTC AAT GCA TTC TAC TCC CCA AAC AGA AAC CAG ATC GTC TTT

val leu glu leu glu thr gln leu ala lys ala thr val pro gln glu arg his asp val ile ala leu tyr his arg met gly leu
 901 GTT CTG GAG CTG GAG ACA CAG CTG GCC AAG GCC ACG GTA CCC CAG GAG AGA CAC GAC GTC ATC GCC ITG TAC CAC CGG ATG GGA CTG
 358
 glu glu leu gln ser gln phe gly leu lys gly phe asn trp thr leu phe ile gln thr val leu ser ser val lys ile lys leu leu
 991 GAG GAG CTG CAA AGC CAG TTT GGC CTG AAG GGA TTT AAC TGG ACT CTG TTC ATA CAA ACT GTG CTA TCC TCT GTC AAA ATC AAG, CTG CTG
 388
 pro asp glu glu val val tyr gly ile pro tyr leu gln asn leu glu asn ile ile asp thr tyr ser ala arg thr ile gln asn
 1081 CCA GAT GAG GAA GTG GTC TAT GGC ATC CCC TAC CTG CAG AAC CTT GAA AAC ATC ATC GAC ACC TAC TCA GCC AGG ACC ATA CAG AAC
 418
 tyr leu val trp arg leu val leu asp arg ile gly ser leu ser gln arg phe lys asp thr arg val asn tyr arg lys ala leu phe
 1171 TAC CTG GTC TGG CGC CTG GTC CTG GAC CGC ATT GGT AGC CTA AGC CAG AGA TTC AAG GAC ACA CGA GTG AAC TAC CGC AAG GCG CTG TTT
 448
 gly thr met val glu glu val arg trp arg glu cys val gly tyr val asn ser asn met glu asn ala val gly ser leu tyr val arg
 1261 GGC ACA ATG GTG GAG GAG GTG CGC TGG CGT GAA TGT GTG GGC TAC GTC AAC AGC AAC ATG GAG AAC GCC GTG GGC TCC CTC TAC GTC AGG
 478
 glu ala phe pro gly asp ser lys lys ser met val arg glu leu ile asp lys val arg thr val phe val glu thr leu asp glu leu gly
 1351 GAG GCG TTC CCT GGA GAC AGC AAG AGC ATG GTC AGA GAA CTC ATT GAC AAG GTG CGG ACA GTG TTT GTG GAG ACG CTG GAC GAG CTG GCG
 508
 trp met asp glu glu ser lys lys ala gln glu lys ala met ser ile arg glu gln ile gly his pro asp tyr ile leu glu glu
 1441 TGG ATG CAC GAG TCC AAG AAG AAG GCG CAG AAG GCC ATG AGC ATC CGG CAG CAG ATC GGG CAC CCT GAC TAC ATC CTG GAG CAG
 538
 met asn arg arg leu asp glu tyz ser asn leu asn phe ser glu asp leu tyr phe glu asn ser leu gln asn leu lys val gly
 1531 ATG AAC AGG CCC CTG CAC GAG TAC TCC AAT CTG AAC TTC TCA GAG GAC CTG TAC TTT GAG AAC AGI CTG CAG AAC CTC AAG GTG GGC
 568
 ala gln arg ser leu arg lys leu arg glu lys val asp pro asn leu trp ile ile gly ala ala val val asn ala phe tyr ser pro
 1621 GCC CAG CGG ACC CTC AGC AAG CTT CGG GAA AAG GTG CAC CCA AAT CTC TGG ATC ATC GGG GCG GCG GTG GTC AAT CCG TTC TAC TCC CCA
 598
 asn arg asn gln ile val phe pro ala gly ile leu gln pro phe phe ser lys glu gln pro gln ala leu asn phe gly gly ile
 1711 AAC CGA AAC CAG ATT GTA TTC CCT GCC GGG ATC CTC CAG CCC TTC TTC ACC AAG CAG CCA CAG GCC TTG AAC TTT GGA GCC ATT
 628

【 4 - 3 】

gly met val ile gly his glu ile thr his gly phe asp asp asp gly arg asn phe asp lys asn gly asn met met asp trp trp ser
1801 GCG ATG GTG ATC GCG CAC GAG ATC ACG CAC GGC TTT GAC CAC AAT GGC AAC TTC GAC AAG AAT GGC AAC ATG ATG CAT TGG TGG AGT
658
asn phe ser thr gln his phe arg glu gln ser glu cys met ile tyr gln thr gly asn tyr ser trp asp leu ala asp glu gln asn
1891 AAC TTC TCC ACC CAG CAC TTC CCG GAG CAG TCA CAG TCC ATG ATC TAC CAG TAC GGC AAC TAC TCC TGG GAC CTG GCA CAC GAA CAG AAC
688
val asn gly phe asn thr leu gly glu asn ile ala asp asn gly val arg gln ala tyr lys ala tyr leu lys trp met ala glu
1981 GTG AAC GGA TTC AAC ACC CTT GGG GAA AAC ATT GCT GAC AAC GGA GGG GTG CCG CAA GCC TAT AAG GCC TAC CTC AAG TGG ATG GCA GAG
718
gly gly lys asp gln glu leu pro gly leu asp leu thr his glu gln leu phe phe ile asn tyr ala gln val trp cys gly ser tyr
2071 GGT GGC AAG GAC CAG CAG CTG CCC GGC CTG GAT CTC ACC CAT GAG CAG CTC TTC TTC ATC AAC TAT GCC CAG GTG TGG TGC GGG TCC TAC
748
arg pro glu phe ala ile gln ser ile lys thr asp val his ser pro leu lys tyr arg val leu gly ser leu gln asn leu ala ala
2161 CGG CCC GAG TTC GCC ATC CAA TCC ATC AAG ACA GAC GTC CAC AGT CCC CTG AAG TAC AGG GTA CTG GGG TCG CTG CAG AAC CTG GCC GCC
770
phe ala asp thr phe his cys ala arg gly thr pro met his pro lys glu arg cys arg val trp ter
2251 TTC GCA GAC ACG TTC CAC TGT GCC CGG GGC ACC CCC ATG CAC CCC AAG GAG CGA TGC CGC GTG TGG TAG CCA AGG CCC TGC CGC GCT GTG
2341 CGG CCC ACG CCC CGC TGC TCG GAG GCA TCT GTG CGA AGG TGC AGC TAG CCG CGA CCC AGT GTA CGT CCC GCC CCG GCC AAC CAT GCC
2431 AAG CCT GCC TGC CAG GCC TCT GCG CCT GGC CTA GGG TGC AGC CAC CTG CCT GAC ACC CAG GGA TGA GCA GTG TCC AGT GCA GTA CCT GGA
2521 CCG GAG CCC CCT TCA CAG ACA CCC GCG GGG CTC AGT GCC CCC GTC ACA ACT CTG TAG AGA CAA TCA ACI GTG TCC TGC CCA CCC TTC AAG
2611 GTG CAT TGT CTT CCA GTA TCT ACA GCT TCA GAA CTT GAG CTA AGT AAA TGC TTT CAA AGA AAA AAA

536021-4 (続き)

【 図 5 - 1 】

ヒト由来NL-3 cDNAの配列

1 GGC GCT GGG AGA CAC CGG AGC CCC GCT CGG CTG CGC TGC TCC GGC TCA GGC CCC CGC TCG GCC CGA CCC GCT CGG TCA CCG CCG GCT CGG GCG
 91 CGC ACC TGC CGG CTG CGG CCC CAG GGC CAT GCG GAG GCC CAC GAG GAG GCC GGC CAC GCG CAT CCC GTA GCC CAG GTG GCC CAG GTG
 181 TGC ACC GCG GCG TCG GCG CCG ATG GAG CCC CCG TAT TCG CTG ACG CCG CAC TAC GAT GAG TTC CAA GAG GTC AAG TAC GTG AGC CGC
 cys gly ala gly gly ala arg gly ala ser leu pro pro gly phe pro leu gly ala ala arg ser ala thr gly ala arg ser gly leu
 271 TGC GGC GCG GGC GCG GCG TCC CTG CCC CCG GGC TTC CCG TTG GGC GCT GCG CCG AGC GCC ACC GGC GCC CGG TCC GGG CTG
 pro arg trp asn arg arg gly val cys leu leu ser gly leu val phe ala ala gly leu cys ala ile leu ala ala met leu ala leu
 361 CCG CGC TGG AAC CCG CGC GAG GTG TGC CTG TCG GGG CTG GTG TTC GCC GGC CTC TGC GCC ATT CTG GCG GCT ATG CTG GCC CTC
 lys tyr leu gly pro val ala ala gly gly ala cys pro gly cys pro gly arg lys ala phe ala arg ala ala arg phe leu
 451 AAG TAC CTG GGC CCG GTC CCG GGC GGC TGT CCC GAG GGC TGC CCT GAG CGC AAG GCC TTC GCG CCG GCC GCT CGC TTC CTG
 ala ala asn leu asp ala ser ile asp pro cys gln asp phe tyr ser phe ala cys gly gly trp leu arg arg his ala ile pro asp
 541 GCC GCC AAC CTG GAC GCC AGC ATC GAC CCA TGC CAG GAC TTC TAC TCG TTC GCC TGC GGC GGT TGG CTG CCG CGC CAC GCC ATC CCC GAC
 asp lys leu thr tyr gly thr ile ala ala ile gly glu gln asn glu arg leu arg leu leu ala arg pro gly gly gly pro
 631 GAC AAG CTC ACC TAT GGC ACC ATC GCG GCA ATC GGC GAG CAA AAC GAG GAG CGC CTA CCG CCG CTC CTG GCG CCG CCC GGG GGT GCG CCT
 gly gly ala ala gln arg lys val arg phe phe arg ser cys leu asp met arg glu ile glu arg leu gly pro arg pro met leu
 721 GGC GGC GCG GCC CAG CGC AAG GTG CGC GGC TTC TTC CCG TCG TGC CTC GAC ATG CGC GAG ATC GAG CGA CTG GGC CCG CGA CCC ATG CTA
 glu val ile glu asp cys gly gly trp asp leu gly gly ala glu glu arg pro gly val ala ala arg trp asp leu asn arg leu leu
 811 GAG GTC ATC GAG GAC TGC GGC GGC TGG GAC CTG GGC GGC CCG GGT CCG GGG GTC CCG GCG CGA TGG GAC CTC AAC CCG CTG
 tyr lys ala gln gly val tyr ser ala ala leu phe ser leu thr val ser leu asp asp arg asn ser ser arg tyr val ile arg
 901 TAC AAG GCG CAG GGC GTG TAC AGC GCC GCG CTC TTC TCG CTC ACC GTC AGC CTG GAC GAC AAG AAC TCC TCG CGC TAC GTC ATC GCG
 ile asp gln asp gly leu thr leu pro glu arg thr leu tyr leu ala gln asp glu ser glu lys val leu ala ala tyr arg val
 991 ATT GAC CAG GAT GGG CTC ACC CTG CCA GAG AGG ACC CTG TAC CTC GCT CAG GAT GAG GAC AGT GAG AAG GTC CTG GCA GCA TAC AGG GTG
 phe met glu arg val leu ser leu leu gly ala asp ala val glu gln lys ala gln glu ile leu gln val glu gln leu ala asn
 1081 TTC ATG GAG CGA GTG CTC AGC CTC GGT GCA GAC GCT GTG GAA CAG AAG GCC CAA GAG ATC CTG CAA GTG GAG CAG CAG CTG GCC AAC

755-5

ile thr val ser glu tyr asp asp leu arg arg arg val ser ser met tyr asn lys val thr leu gly gln leu leu gln lys ile thr pro
 1171 ATC ACT GTS TCA GAG TAT GAC GAC CTA CGG CGA GAT GTC AGC TCC ATG TAC AAC AAG GTG ACC CTG GGG CAG CTG CAG AAG ATC ACC CCC
 382
 his leu arg tip lys tip lys tip leu leu asp gln ile phe gln glu asp phe ser glu glu glu val val leu leu ala thr asp tyr met
 1261 CAC TTG CGG TGG AAG TGG CTG CTA GAC CAG ATC TTC CAG GAG GAA GAG GTG CTG GTC GCG ACA GAC TAC ATG
 412
 gln gln val ser gln leu ile arg ser thr pro his arg val leu his asn tyr leu val tip arg val val val leu ser glu his
 1351 CAG CAG GTG TCG CAG CTC ATC CGC TCC ACA CCC CAC CGG GTC CTG CAC AAC TAC CTG GTG TGG CGC GTG GTG GTC CTG AGT GAA CAC
 442
 leu ser pro pro phe arg glu ala leu his glu leu ala gln glu met glu gly ser asp lys pro gln glu leu ala arg val cys leu
 1441 CTG TCC CGC CCA TTC CGT GAG GCA CTG CAC GAG CTG GCA CAG GAG ATG GAG GGC ACC AAG CCA CAG GAG CTG GCC CGG GTC TCC
 472
 gly gln ala asn arg his phe gly met ala leu gly ala leu phe val his glu his phe ser ala ala ser lys ala lys val gln gln
 1531 GGC CAG GCC AAT CGC CAC TTT GGC ATG GCG CTT GGC GCC CTC TTT GTA CAT GAG CAC TTC TCA GCT GCC AGC AAA GCC AAG GTG CAG CAG
 502
 leu val glu asp ile lys tyr ile leu leu gly gln arg leu glu leu asp tip met asp ala glu thr arg ala ala ala arg ala lys
 1621 CTA GTG GAA GAC ATC AAG TAC ATC CTG GGC CAG CCC CTG CAG GAG CTG GAC TGG ATG GAC GCC CAG ACC AGG GCT GCT CGG GCC AAG
 532
 leu gln tyr met met val met val gly tyr pro asp phe leu leu lys pro asp ala val asp lys glu tyr glu phe glu val his glu
 1711 CTC CAG TAC ATG ATG GTS ATG GTC GGC TAC CCG GAC TTC CTG CTG AAA CCC GAT GCT GTG GAC AAG CAC TAT GAG TTT GAG GTC CAT
 562
 lys thr tyr phe lys asn ile leu asn ser ile arg phe ser ile gln leu ser val lys lys ile arg gln glu val asp lys ser thr
 1801 AAG ACC TAC TTC AAG AAC ATC TTG AAC AGC ATC CCC TTC AGC ATC CAG CTC TCA GTT AAG AAG AAT ATT CGG CAG GAG GTG GAC AAG TCC ACC
 592
 tip leu leu pro pro gln ala leu asn ala tyr tyz leu pro asn lys asn gln met val phe pro ala gly ile leu gln pro thr leu
 1891 TGG CTG CTC CCC CCA CAG CCG CTC AAT GCC TAC TAT CTA CCC AAC AAG AAC CAG ATG GTG TTC CCC CCG GCC ATC CTG CAG CCC ACC CTG
 622
 tyr asp pro asp phe pro gln ser leu asn tyz gly gly ile gly thr ile ile gly his glu leu thr his gly tyr asp asp tip gly
 1981 TAC GAC CCI GAC TTC CCA CAG TCT CTC AAC TAC GGG GGC ATC GGC ACC ATC ATT GCA CAT GAG CTG ACC CAC GGC TAC GAC GAC TGG GGG
 652

gly gln tyr asp arg ser gly asn leu leu his ttp thr glu ala ser tyr ser arg phe leu arg lys ala glu cys ile val arg
 2071 GGC CAG TAT GAC CGC TCA GGG AAC CTG CTG CAC TGG TGG ACG GAG GCC TCC TAC ACC CCC TTC CTG CGA AAG GCT GAG TGC ATC GTC CGT
 682
 leu tyr asp asn phe thr val tyr asn gln arg val asn gly lys his thr leu gly glu asn ile ala asp met gly gly leu lys leu
 2161 CTC TAT GAC AAC TTC ACT GTC TAC AAC CAG CCG GTG AAC GGG AAA CAC ACG CTT GGG GAG AAC ATC GCA GAT ATG GGC CTC AAG CTG
 712
 ala tyr his ala tyr gln lys ttp val arg glu his gly pro glu his pro leu pro arg leu lys tyr thr his asp gln leu phe phe
 2251 GCC TAC CAC GCC TAT CAG AAG TGG GTG CCG GAG CAC CCG CCA GAG CAC CCA CTT CCC CGG CTC AAG TAC ACA CAT GAC CAG CTC TTC TTC
 742
 ile ala phe ala gln asn ttp cys ile lys arg arg ser gln ser ile tyr leu gln val leu thr asp lys his ala pro glu his tyr
 2341 ATT GCC TTT GCC CAG AAC TGG TGC ATC AAG CCG CGG TCG CAG TCC ATC TAC CTG CAG GTG CTG ACT GAC AAG CAT GCC CCT GAG CAC TAC
 772
 arg val leu gly ser val ser gln phe glu glu phe gly arg val leu his cys pro lys val ser pro met asn pro ala his lys cys
 2431 AGG GTG CTG GGC AGT GTG TCC CAG TTT GAG GAG TTT GCC CGG GTT TTA CAC TGT CCA AAG GTC TCA CCC ATG AAC CCT GCC CAC AAG TGT
 775
 ser val ttp tse
 2521 TCC GTG TGG TGA CCC TGG CTG CCC GCC TGC ACC CCC CCA CTG CCC CGG CAC GAA TCA CCT CCT GCT GGC TAC CGG GGC AGG CAT GCA CCC
 2611 GGT GCC AGC CCC GCT CTG GGC ACC ACC TGC CTT CCA GCC GCT CCA GGA CCC GGT CCC GCT GCT GGC CCT CAC TTC AAG AGG GGC CTG GAG
 2701 CAG GGT GAG GCT GGA CTT TGG GGG GCT GTG AAG GAA ATA TAC TGG GGT CCC CAG ATT CTG CTC TAA GGG GGC CAG ACC CTC TGC CAG GCT
 2791 GGA TTG TAC GGG CCC CAC CTT CGC TGT GTT GCT GCA AGT CTG GTC AAA TAA ATC ACT GCA CTG TTA AAA AAA AAA AAA

— 5 (続き)

【図6-1】

NEP, NL1, NL2 and NL3間の配列の比較

	1	10	20	30	40
NEP-HUM	MG.....	KSESQMDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLL..	LTII...AV		
NL1-MOU	MV.....	ERAGWCRKKS	PGFVEYGLMVLLLLLL	GAI	VTLG.V..FY
NL2-HUM	MV.....	ESAGRAGQKR	PGFLEGGLLLLLLL	VTAALVALGVL..	YADRRGKQL
NL3-HUM	MEPPYSLTAHYDEFQEVKYVSR	CAGGARGASLP	PGFPLGAARSATGARSGLPR	WRNRREV	
	50	60	70		
NEP-HUM	TMIA.....	LYATYDD.....	GICKSSDCIKSAARLIQ.	NMDATT	
NL1-MOU	PLLTSL....	LHFSWDER	TVVKR...ALR	SSLSKSDICTTP	SCVIAAARILE.NMDQSR
NL2-HUM	PRLASR....	LCFLQEERTFV	KRKRKPRGIPEAQEV	EVCTTPGCVIAAARILQ.	NMDPTT
NL3-HUM	CLLSGLVFAAGLCAILAAML	LALKYLG	PVAAGGGACPEGC	PERKAFARAARFLAAN	LDASI
	80	90	100	110	120
NEP-HUM	EPCTDFFKYACGGW	LKRNVIPETSSRYGN	FDILRDELEV	VLDVLPKTE	DIVAVQ.KA
NL1-MOU	NPCENFYQYACGGW	LRRHVI	PETNSRYSVFDILR	DELEVILKGV	LEDSTSQHRPAVE.KA
NL2-HUM	EPCDDFYQFACGGW	LRRHVI	PETNSRYSIFDVL	RDELEVILKAV	LENSTAKDRPAVE.KA
NL3-HUM	DPCQDFYSFACGGW	LRRHAI	PDDKLT	YGTIAAIGEQNEER	LRRLRLARPGGGPGGAAQRKV
	140	150	160	170	180
NEP-HUM	KALYRSCINESAIDSR	GGEP	LLKLLPDIY	GWVATENWEQ	KYGASWTAEK
NL1-MOU	KTLYRSCMNQSVIE	KRDSEPL	LSVLKMGV	GWVAMDKW	NETMGLKWE
NL2-HUM	RTLYRSCMNQSVIE	KRGSQPL	LDILEVVG	GWVAMDRW	NETVGLEWE
NL3-HUM	RAFFRSCLDMREIER	LRGPRP	MLEVI	EDCGG	WDLGGAEERPGVAARWDLNRLLYKAQGVYS
	200	210	220	230	240
NEP-HUM	KKVLINL	LVGTDDKNSVNH	VIHIDQ	PRGLPSRDY	ECTGIYKEACTAYVDFMI
NL1-MOU	RRVLIDL	FIWNDDQNSSRH	VIYIDQ	PTLGMP	SREYFQEDNNHKVRKAYLEFMTSVATML
NL2-HUM	RRVLIDL	FIWNDDQNSSRH	IYIDQ	PTLGMP	SREYFNGGSRKVRREAYLQFMVSVATLL
NL3-HUM	AAALFSLTVSL	DDRNSSRYVIRI	DQDGL	TLPERTLYLAQ	DEDSE..KVLAAYRVFMERVL

【図6-2】

	260	270	280	290	300	310
NEP-HUM	RQEERLPIDENQLALEMNVMELEKEIANATAKP..EDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSL					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL1-MOU	RKDQNLKESAMVREEMAEVLELETHLANATVPQ..EKRHVDVTALYHRMDLMELQERFGL					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL2-HUM	REDANLPRDSCLVQEDMVQVLELETQLAKATVPQ..EERHDVIALYHRMGLEELQSQFGL					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL3-HUM	SL...LGADAV..EQKAQEILQVEQQLANITVSEYDDLRRDVSSMYNKVTLGQLQKITP.					

	320	330	340	350	360	370
NEP-HUM	EINGKPFWSLWNTNEIMSTVNI SITNEEDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWR					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL1-MOU	...KGFNWLFIQNVLSSVEVELFPDEEVVVYGI PYLENLEDIIDSYSARTMQNYLVWR					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL2-HUM	...KGFNWLFIQTVLSSVKIKLLPDEEVVVYGI PYLQNLNIIDTYSARTIQNYLVWR					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL3-HUMHLRWKWLDDQIF...QEDFSEEEVVLLATDYMQQVSQLIRSTPHRVLHNYLVWR					

	380	390	400	410	420	430
NEP-HUM	FIMDLVSSLSRITYKESRNAFRKALYGTTSATWRRCANVYVNGNMENAVGRLYVEAAFAG					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL1-MOU	LVLDRIGSLSQRFKEARVDYRKALYGTVEEVRWRECVSYVNSNMESAVGSLYIKRAFSA					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL2-HUM	LVLDRIGSLSQRFKDRVNYRKALFGTMVEEVRWRECVGYVNSNMENAVGSLYVREAFPG					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL3-HUM	VVVVLSHLSPPFREALHELAQEMEGSDKQPQLARVCLGQANRHFGMALGALFVHEHFS					

	440	450	460	470	480	490
NEP-HUM	ESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDDLTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNK.L					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL1-MOU	DSKSTVRELIEKIRSVFVDNLDELNWMDEESKKAQEKAMNIREQIGYPDYILEDNKHL					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL2-HUM	DSKSMVRELIDKVRTVVFVETLDELGWMDEESKKAQEKAMSIREQIGHYPDYILEMNRRL					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL3-HUM	ASKAKVQQLVEDIKYILGQRLEELDWMDAETRAAARAKLQYMMVMVGYPDFLLKPDA..V					

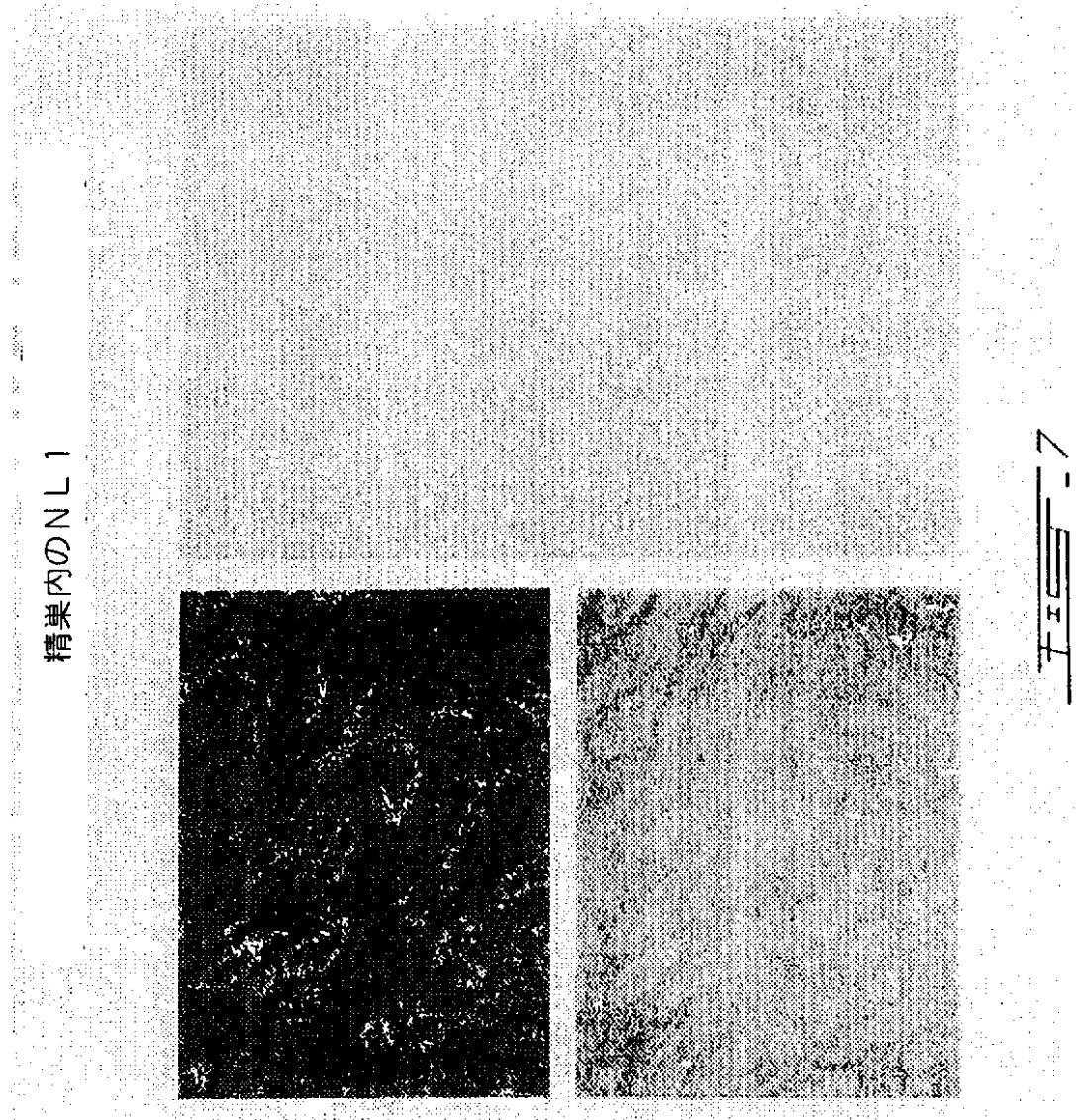
	500	510	520	530	540	550
NEP-HUM	NNEYLELNYKEDEYFENIIQNLKFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQI					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL1-MOU	DEEYSSLTFFYEDLYFENGLQNLKNAQRSLKKLREKVDQNLWII GAAVVNAFYSPNRNQI					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL2-HUM	DEEYSNLNFSEDLYFENSLQNLKVGQRSLRKLREKVDPNLWII GAAVVNAFYSPNRNQI					
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
NL3-HUM	DKE.YEFVHEKTYFKNILNSIRFSIQLSVKKIRQEVDKSTWLLPPQALNAYYLPKNQM					

五三六〇二 (続き)

【図6-3】

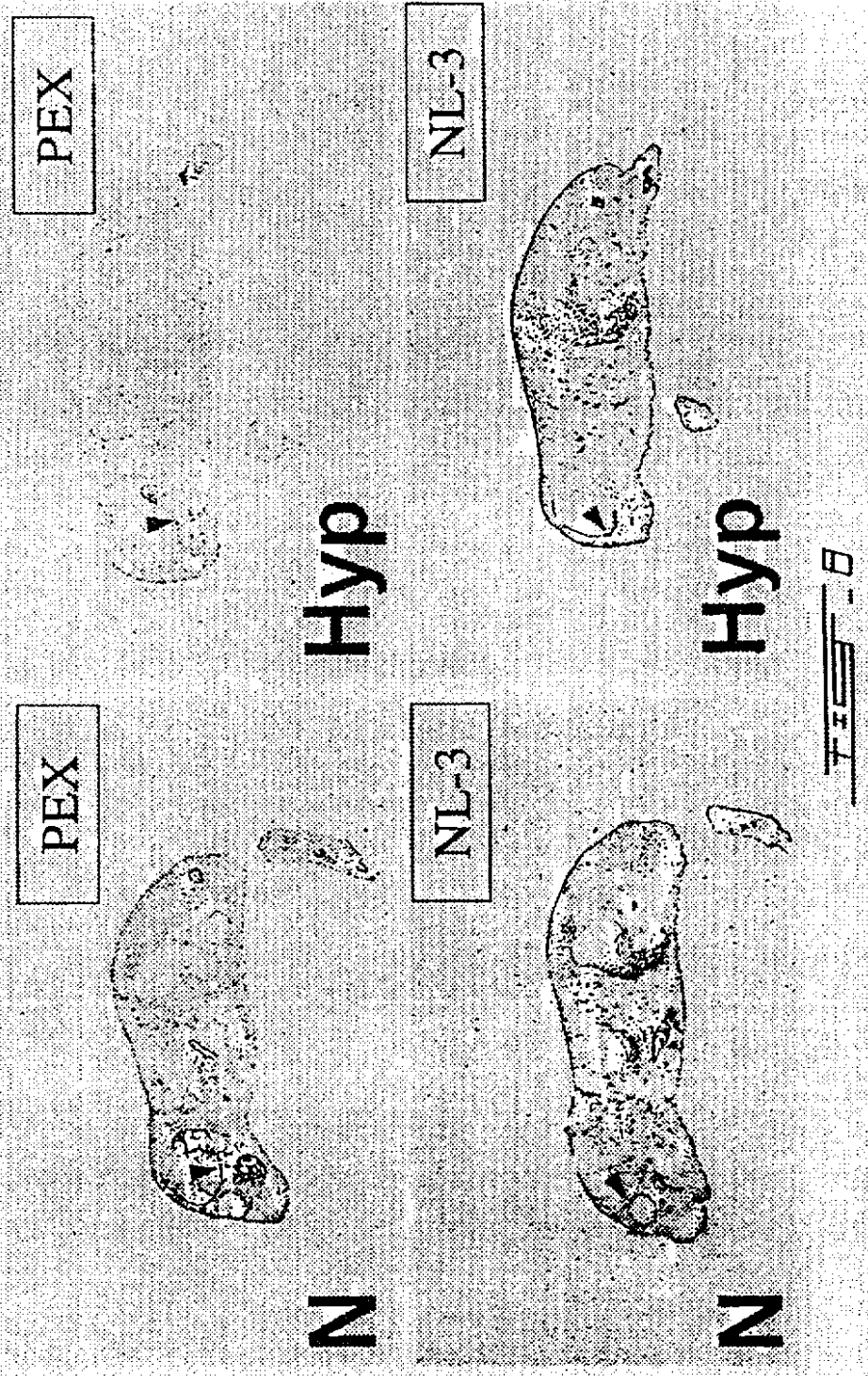
	560	570	580	590	600	610
NEP-HUM	VFPAGILQPPFFSAQQS	NSLNYGGIGM	VIGHEITHGFDDHGRN	FNKDGDLVDWWT	QQSAS	
	*****	+	***	*****	+	***
NL1-MOU	VFPAGILQPPFFSKDQP	QSLNFGGIGM	VIGHEITHGFDDN	GRNFDKNGNMLD	WWSNFSAR	
	*****	***	*****	*****	*****	*****
NL2-HUM	VFPAGILQPPFFSKEQP	QALNFGGIGM	VIGHEITHGFDDN	GRNFDKNGNMMD	WWSNFS	TQ
	*****	***	***	***	***	***
NL3-HUM	VFPAGILQPTLYDPDF	PQSLNYGGIGT	IIGHELTHGYDDW	GQYDRSGNLLH	WWTEASYS	
	620	630	640	650	660	670
NEP-HUM	NFKEQSQCVMVYQYGN	FSWDLAGGQHL	NGINTLGENIADN	GGLGQAYRAYQ	NYIKKNGEEK	
	+	*****	***	***	*****	***
NL1-MOU	HFQQSQCMYQYGNF	SWELADNQMVN	GFSTLGENIADN	GGVRQAYKAYL	RWLADGGKDQ	
	***	***	*****	*****	*****	***
NL2-HUM	HFREQSECMYQYGN	YSWDLADEQN	VNGFNTLGENI	ADN GGVRQAY	KAYLKWMAEG	GKDQ
	+	***	***	*****	***	***
NL3-HUM	RFLRKAECIVRLYDN	FT...VYNQR	VNGKHTLGENI	ADMGGLKLAY	HAYQKVVREH	GPEH
	680	690	700	710	720	730
NEP-HUM	LLPGLDLNHHKQLFF	LNFAQVWCGTY	RPEYAVNSIKT	DVHSPGNFRI	IGTLQNSAEF	SEAF
	*****	+	*****	***	***	*****
NL1-MOU	RLPGLNLTYAQLFF	INYAQVWCGSY	RPEFAVQSIKT	DVHSPLKYR	VLGSLQNLPG	FSEAF
	*****	***	*****	*****	*****	***
NL2-HUM	QLPGLDLTHEQLFF	INYAQVWCGSY	RPEFAIQSIKT	DVHSPLKYR	VLGSLQNLAA	FADTF
	***	***	***	***	***	***
NL3-HUM	PLPRLKYTHDQLFF	I AFAQNWC	IKRRSQSIYL	QVLTDKHAPE	HYRVLG	SVSQFEFGRVL
	740	750				
NEP-HUM	HCRKNSYMNPEKK	CRVW				
	***	***				
NL1-MOU	HCPRGSPMHPMKR	CRIW				
	***	***				
NL2-HUM	HCARGTPMHPKER	CRVW				
	***	***				
NL3-HUM	HCPKVS PMNPAH	KCSVW				

【図7】



【図8】

正常及びHypマウス胚内でのPEX及びNL-3の発現

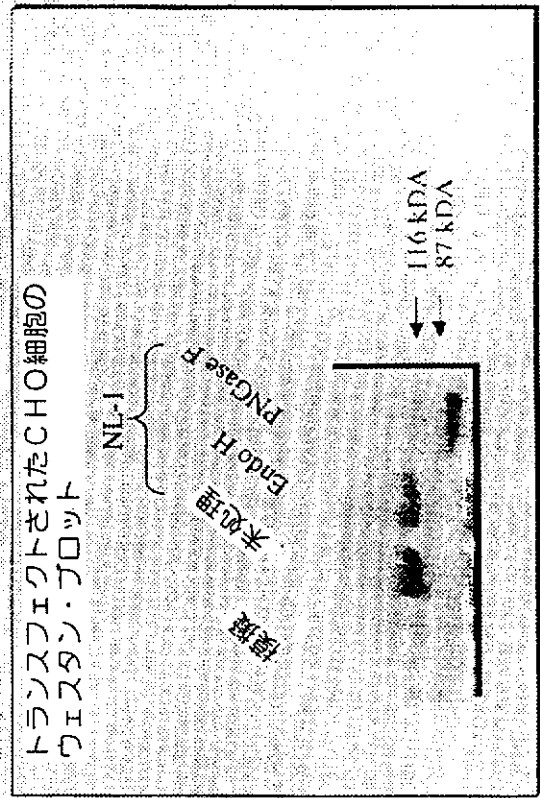
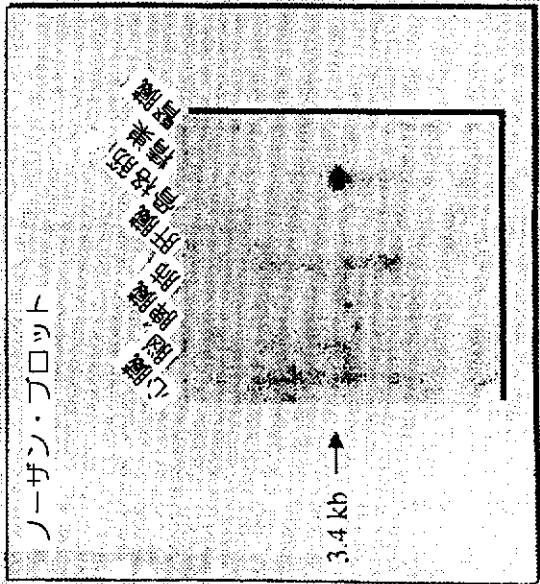


【図9】



【図10】

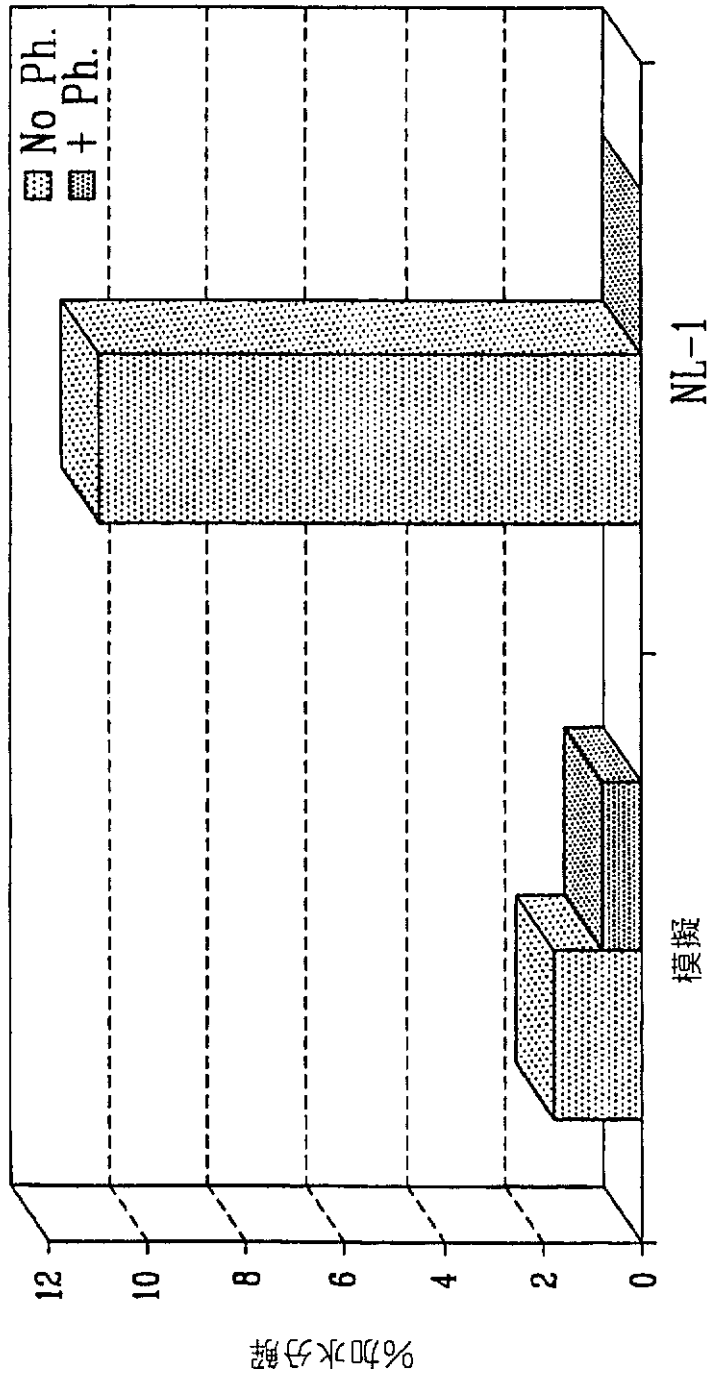
NL-1の構造と発現



7358-10

【図11】

NL-1の酵素活性



[³H]Tyr, D-Ala₂, Leu₅-エンケファリンの分解

特表2002-536021

【图12】

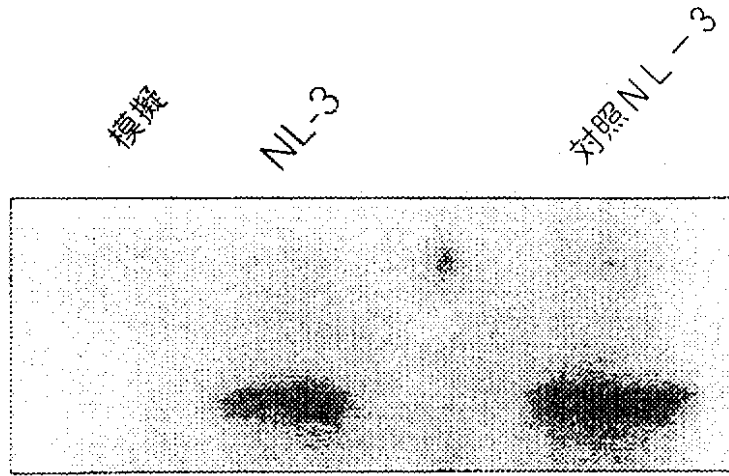


FIG. 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/CA 00/00147
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/57 C12N15/62	C12N9/64 C07K16/40
	C12N15/85 G01N33/573	C12N5/10 C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12Q C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, STRAND, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 688 640 A (MASASHI YANAGISAWA) 18 November 1997 (1997-11-18) column 2, line 65 -column 6, line 21 column 11, line 4 -column 14, line 35 column 14, line 64 -column 15, line 14 column 17, line 8 -column 18, line 20; examples 1-4 — -/-	1-8, 11-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
^a Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 11 September 2000		Date of mailing of the international search report 28.09.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CA 00/00147

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCOTT I C ET AL: "Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a human gene encoding a 33 kDa putative metalloproteinase (PRSM1)" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 174, no. 1, 26 September 1996 (1996-09-26), pages 135-143, XP004043253 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-8, 11-22
X	NIGEL M. HOOPER: "Families of Zinc metalloproteases" FEBS LETTERS, vol. 354, no. 1, 31 October 1994 (1994-10-31), pages 1-6, XP002147067 AMSTERDAM NL cited in the application page 1, right-hand column, paragraph 2 page 1, right-hand column, last paragraph -page 2, left-hand column, paragraph 1 page 5, right-hand column, paragraph 1	9,10
P, X	WO 99 53077 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 21 October 1999 (1999-10-21) page 1, line 20 -page 8, line 11; examples 1-4	1,5-8, 19-22
P, X	KOJI IKEDA ET AL.: "Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 45, 5 November 1999 (1999-11-05), pages 32469-32477, XP002140284 MD US cited in the application abstract page 32469, left-hand column, paragraph 1 -right-hand column, paragraph 1 page 32470, left-hand column, paragraph 3 page 32470, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1 page 32470, right-hand column, paragraph 3 page 32471, left-hand column, paragraph 4 -right-hand column, paragraph 4; figure 1 page 32474, right-hand column, last paragraph -page 32476, right-hand column, paragraph 2	1,5-9, 17-20,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 00/00147**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 5-8, 11-22 partially, and 2

Neutral endopeptidase-like metalloproteinase of figure 3, nucleic acid encoding it, vector and host cell comprising the same and use thereof for producing the metalloproteinase; oligonucleotides and antibodies thereof as well as their use for detecting the metalloproteinase in a sample; vector comprising a sequence encoding the N-terminal part of the metalloproteinase and use thereof for producing a soluble form of a protein of interest; soluble metalloproteinase

2. Claims: 1, 5-8, 11-22 partially, 3

Neutral endopeptidase-like metalloproteinase of figure 4, nucleic acid encoding it, vector and host cell comprising the same and use thereof for producing the metalloproteinase; oligonucleotides and antibodies thereof as well as their use for detecting the metalloproteinase in a sample; vector comprising a sequence encoding the N-terminal part of the metalloproteinase and use thereof for producing a soluble form of a protein of interest; soluble metalloproteinase

3. Claims: 1, 5-8, 11, 12, 17-22 partially, 4

Neutral endopeptidase-like metalloproteinase of figure 5, nucleic acid encoding it, vector and host cell comprising the same and use thereof for producing the metalloproteinase; oligonucleotides and antibodies thereof as well as their use for detecting the metalloproteinase in a sample; soluble metalloproteinase

4. Claims: 9, 10

Method for screening molecules related to neutral endopeptidase by using consensus sequences on either side of a His-Glu-Xaa-Xaa-His sequence

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 00/00147

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5688640 A	18-11-1997	NONE	
WO 9953077 A	21-10-1999	FR 2777291 A	15-10-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト ⁸ (参考)	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 Q	1/68	A
	9/48	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 Q	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/53		33/573	A
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/573		5/00	A

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W
) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U ,
 T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z ,
 B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C
 R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I
 , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D ,
 I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K
 Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A
 , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z ,
 P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S
 K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G
 , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA14 CA04 HA03 HA14
 4B050 CC03 FF02 LL03
 4B063 QA01 QA18 QQ36 QR59 QR62
 QS25 QS33 QS34
 4B065 AB01 BA02 CA24 CA31 CA46
 4H045 AA11 AA30 DA75 EA50 FA71

【要約の続き】

るために大腸菌 (*Escherichia coli*)
 内で組換え融合タンパク質を製造するために使用した。
 最後に、上記cDNA配列を哺乳動物の発現ベクター内
 でクローン化し、そしてさまざまな哺乳動物細胞系内に
 トランスフェクトさせて、特異的阻害剤をテストするた
 めに好適な活性組換え酵素を作製した。

专利名称(译)	Neprilysin家族的新型金属蛋白酶		
公开(公告)号	JP2002536021A	公开(公告)日	2002-10-29
申请号	JP2000598646	申请日	2000-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	蒙特利尔大学		
申请(专利权)人(译)	Yuniberushite蒙特利尔		
[标]发明人	デスグロセイラルリユク ボワローギユイ		
发明人	デスグロセイラル,リユク ボワロー,ギユイ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/48 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/57 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	C12N9/6489 C07K2319/02		
FI分类号	C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/48 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/573.A C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/HA03 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/FF02 4B050 /LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ36 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA31 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	2260376 1999-02-11 CA		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在这里，我们描述了一种RT-PCR策略，该策略使我们能够识别和克隆NEP样家族成员。设计与锌蛋白的HEXXH共有序列侧翼的共有序列相对应的简并寡核苷酸引物，并将其用于小鼠和人睾丸cDNA的RT-PCR中。从上述几类酶的序列中获得了具有预期长度的DNA片段。这些DNA片段被克隆并测序。使用PCR策略和PCR片段作为探针筛选cDNA文库，除该家族的已知成员外，还鉴定了三个gincin-like肽酶。这些cDNA序列可诱导用于Northern和原位杂交的特异性探针，探测人类染色体以定位该基因，并与遗传疾病建立潜在的联系。使成为可能。另外，这些cDNA序列用于在大肠杆菌中产生重组融合蛋白以产生特异性抗体。最后，将上述cDNA序列克隆到哺乳动物表达载体中，并转染到各种哺乳动物细胞系中，以产生适合于测试特异性抑制剂的活性重组酶。

