(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3613398号
(P3613398)
(45)発行日　平成17年1月26日(2005.1.26)　(24)登録日　平成16年11月5日(2004.11.5)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA
A61K 38/43	A61K	39/395	P
A61K 39/395	A61P	11/00	
A61P 11/00	A61P	37/00	
A61P 37/00	C07H	21/04	B

請求項の数 33　(全 63 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-511017
(86)(22)出願日　平成6年10月6日(1994.10.6)
(65)公表番号　特表平8-504603
(43)公表日　平成8年5月21日(1996.5.21)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/011340
(87)国際公開番号　WO1995/009921
(87)国際公開日　平成7年4月13日(1995.4.13)
審査請求日　平成13年10月9日(2001.10.9)
(31)優先権主張番号　08/133,803
(32)優先日　平成5年10月6日(1993.10.6)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　HB11724
微生物の受託番号　ATCC　HB11725

(73)特許権者
イコス　コーポレイション
アメリカ合衆国　９８０２１　ワシントン　ボウゼル　エス，イー．，　２０ス　アベニュー　２２０２１
(74)代理人
弁理士　角田　嘉宏
(72)発明者　コーセンズ，　ローレンス，　エス．
アメリカ合衆国　９４６０２　カリフォルニア　オークランド　エヴァレット　アベニュー　４３１６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列からなるヒト血漿PAF－AHポリペプチドをコードする精製および単離したポリヌクレオチド。
【請求項２】
DNAである請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３】
前記DNAが、cDNAまたはその生物学的複製物である請求項２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４】
前記DNAが、配列番号:7に記載の塩基配列からなる請求項２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項５】
前記DNAが、配列番号:8に記載のアミノ酸配列の第42位のアミノ酸から第441位のアミノ酸に至る連続するアミノ酸からなるポリペプチドをコードする、請求項２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項６】
前記DNAが、ゲノムDNAまたはその生物学的複製物である請求項２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項７】
前記ゲノムDNAが、内在性発現制御DNA配列をさらに含む請求項６に記載のポリヌクレオチド。

【請求項８】
前記DNAが、全体的または部分的に化学的に合成されたDNAまたはその生物学的複製物である請求項２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項９】
ヒト血漿PAF－AHポリペプチドをコードする精製および単離したポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドが、
（ａ）配列番号:7に記載の塩基配列を有するDNA、
（ｂ）前掲（ａ）DNAに、ストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズするDNA、および
（ｃ）遺伝コードの縮重を伴わなければ、前掲（ａ）または（ｂ）のDNAに、ストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズしうるDNA、からなる群より選択される、
ことを特徴とするポリヌクレオチド。
【請求項１０】
PAFから^{3}H－アセテートを加水分解する、ヒト血漿PAF－AHポリペプチドの断片、変異体または変異体断片をコードする精製および単離したポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドが、
（ａ）配列番号:7に記載の塩基配列を有するDNAに、ストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズするDNA、および
（ｂ）遺伝コードの縮重を伴わなければ、配列番号:7に記載の塩基配列を有するDNAに、ストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズしうるDNA、からなる群より選択される、
ことを特徴とするポリヌクレオチド。
【請求項１１】
ヒト血漿PAF－AHポリペプチド変異体をコードする精製および単離したポリヌクレオチドであって、当該変異体が、ヒト血漿PAF－AHに特異的な酵素活性または免疫学的特性を有し、かつ、配列番号:8に記載のアミノ酸配列の第42位のアミノ酸から第441位のアミノ酸に至る連続するアミノ酸からなるポリペプチドの一つ以上のアミノ酸を欠失または置換せしめ、または一つ以上のアミノ酸を当該連続するアミノ酸に付加せしめてなるポリペプチドである、ことを特徴とするポリヌクレオチド。
【請求項１２】
請求項４に記載のポリヌクレオチドに特異的なアンチセンスポリヌクレオチド。
【請求項１３】
請求項６に記載のポリヌクレオチドのRNA転写物。
【請求項１４】
配列番号:21に記載のアミノ酸配列からなるマウス血漿PAF－AHポリペプチドをコードする精製および単離したポリヌクレオチド。
【請求項１５】
配列番号:22に記載のアミノ酸配列からなるイヌ血漿PAF－AHポリペプチドをコードする精製および単離したポリヌクレオチド。
【請求項１６】
請求項２、９、10または11に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１７】
前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結される発現制御DNA配列をさらに含む請求項16に記載のベクター。
【請求項１８】
その内部で、ヒト血漿PAF－AHポリペプチドまたはその誘導体、すなわち、ヒト血漿PAF－AHポリペプチドに特異的な酵素活性または免疫学的特性を有する誘導体の発現を許容する方法にて、請求項16または17に記載のベクターで、安定に形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。
【請求項１９】
ヒト血漿PAF－AHポリペプチドの製造方法であって、当該方法が、以下の工程、すなわち、

請求項18に記載の宿主細胞を、好適な栄養培地にて生育せしめ、および
ヒト血漿PAF－AHポリペプチドまたはその誘導体を、当該細胞またはその生育培地から単離する、
工程を含む、ことを特徴とするヒト血漿PAF－AHポリペプチドの製造方法。
【請求項２０】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列からなる精製および単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチド。
【請求項２１】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列から、そのＮ末端領域内の最大で19個のアミノ酸を欠失して得た残余のアミノ酸配列からなる精製および単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチド断片。
【請求項２２】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列から、そのＣ末端領域内の最大で30個のアミノ酸を欠失して得た残余のアミノ酸配列からなる精製および単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチド断片。
【請求項２３】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列からなる精製および単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチドの変異体であって、以下のアミノ酸置換、すなわち、
（ａ）S108A、
（ｂ）S273A、
（ｃ）D296A、
（ｄ）D338A、
（ｅ）H351A、
（ｆ）H395A、
（ｇ）H399A、
（ｈ）C67S、
（ｉ）C229S、
（ｊ）C291S、
（ｋ）C334S、および
（ｌ）C407S
からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、
ことを特徴とするヒト血漿PAF－AHポリペプチドの変異体。
【請求項２４】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列の第42位のアミノ酸から第441位のアミノ酸に至る連続するアミノ酸からなる、精製され単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチド。
【請求項２５】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列からなる精製および単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体。
【請求項２６】
ハイブリドーマ細胞90G11D（ATCC HB 11724）により産生されたモノクローナル抗体。
【請求項２７】
ハイブリドーマ細胞90F2D（ATCC HB 11725）により産生されたモノクローナル抗体。
【請求項２８】
ヒト型化モノクローナル抗体である請求項25に記載のモノクローナル抗体。
【請求項２９】
請求項25に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。
【請求項３０】
ハイブリドーマ細胞90G11D（ATCC HB 11724）。
【請求項３１】
ハイブリドーマ細胞90F2D（ATCC HB 11725）。

【請求項３２】
配列番号:8に記載のアミノ酸配列からなる精製および単離したヒト血漿PAF－AHポリペプチドの第279位のアミノ酸残基が、フェニルアラニンからバリンへ置換することに起因して生じる、ヒト血漿PAF－AH遺伝子での遺伝的傷害の検出方法であって、当該方法が、制限酵素切断断片長多型性分析を用いて、野生型と変異型対立遺伝子とを識別する、工程を含む、ことを特徴とするヒト血漿PAF－AH遺伝子での遺伝的傷害の検出方法。
【請求項３３】
ヒト血漿PAF－AH遺伝子での遺伝的傷害の有無を遺伝学的にスクリーニングする方法であって、以下の工程、すなわち、
（ａ）検体からヒト血漿PAF－AH遺伝子内のすべてのまたは一部のDNAを単離し、および
（ｂ）単離したDNAと、配列番号:7に記載の塩基配列とを比較して、検体での遺伝的傷害の存在が比較結果の不一致として表現される、
工程を含む、ことを特徴とするヒト血漿PAF－AH遺伝子での遺伝的傷害の有無を遺伝学的にスクリーニングする方法。
【発明の詳細な説明】
［産業上の利用分野］
本発明は、一般に血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼに関し、さらに詳細には、ヒト血漿の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼをコードする新規な精製され単離されたポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドがコードする血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ産物、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ産物の組換え生産のための材料及び方法、ならびに血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼに特異的な抗体物質に関する。
［従来技術及び発明が解決しようとする課題］
本出願は、1993年10月６日に出願せる、係属中の米国特許出願第08/133,803号の一部継続出願である。
血小板活性化因子（PAF）は、種々の細胞種により合成される、生物学的に活性を有するリン脂質である。in vivoで且つ10^{-10}～10^{-9}Mという通常濃度で、PAFは、特異的なＧタンパク質がカップリングした細胞表面受容体に結合することにより、血小板及び好中球などの標的細胞を活性化する（ベナブル（Venable）ら、J.Lipid Res.、34巻、691～701頁、（1993））。PAFは１－Ｏ－アルキル－２－アセチル－sn－グリセロ－３－ホスフォコリン構造を有する。至適な生物学的活性のためには、PAFグリセロール骨格のsn－１位が脂肪族アルコールとエーテル結合をなしておらなければならず、また、sn－３位がホスフォコリン先頭部（head group）を有していなければならない。
通常の生理学的プロセス（例えば、炎症、鬱血及び分娩）においてPAFは機能し、病理学的炎症応答（例えば、喘息、アナフィラキシー、敗血病性ショック及び関節炎）において影響を受ける（ベナブルら、前出、及びリンドバーグ（Lindsberg）ら、Ann.Neurol.、30巻、117～129頁（1991））。病理学的応答におけるPAFの関与の可能性は、PAFへの活性修飾の試みを喚起し、そして、これらの試みで主に焦点が向けられるのは、PAFの細胞表面受容体に対する結合を阻害する、PAFの活性の拮抗剤の開発となっている。例えば、ヒュアー（Heuer）ら、Clin.Exp.Allergy、22巻、980～983頁、（1992）を参照されたい。
PAFの合成及び分泌は、その分解及びクリアランスと同様、厳密に制御されているようである。PAFの病理学的炎症作用が、過剰生産、不適切な生産または分解の払底を増大せしめるPAF調節機構の不全が原因で起こる限りにおいては、PAFの活性を修飾する代替手段が、炎症の解消に導くような自然のプロセスを模倣するかまたは増大させることに関与するであろう。マクロファージ（スタッフォリニ（Stafforini）ら、J.Biol.Chem.、265巻、17号、9682～9687頁、（1990））、肝細胞及びヒト肝癌細胞系HepG2（サトー（Satoh）ら、J.Clin.Invest.、87巻、476～481頁、（1991）及びターベット（Tarbet）ら、J.Biol.Chem.、266巻、25号、16667～16673頁、（1991））は、PAFを不活性化するPAFアセチルヒドロラーゼ（PAF－AH）の酵素活性を放出することが報告されている。PAFを不活性化することに加えて、PAF－AHは炎症を媒介するアラキドン酸カスケードの産物などの酸化的に断片化したリン脂質をも不活性化する。ストレムラー（Stremler）ら、J.Biol.Chem.、26

6巻、17号、11095～11103頁、（1991）を参照されたい。PAF－AHによるPAFの不活性化は、主にPAFのsn－２のアセチル基の加水分解によって引起こされ、また、PAF－AHはsn－２のアシル基を除去することにより、酸化的に断片化されたリン脂質を代謝する。２つの型のPAF－AHが同定されている。すなわち、内皮細胞及び赤血球などの種々の細胞型及び組織中に見出される細胞質型、ならびに血漿及び血清中に見出される細胞外型である。血漿PAF－AHは、PAFを除く無傷の（intact）リン脂質を加水分解せず、そしてこの基質特異性のために、この酵素は、完全に活性な状態で有害な作用なしにin vivoで循環することができる。血漿PAF－AHによって、ex vivoでのヒト血液におけるPAFの分解のすべてが説明されるように思われる（スタッフォリニら、J.Biol.Chem.、262巻、９号、4223～4230頁、（1987））。

細胞質及び血漿のPAF－AHが同様な基質特異性を有するようである一方で、血漿PAF－AHは、細胞質PAF－AH及び特徴が明らかとなった他のリパーゼと、血漿PAF－AHとを差別化する生化学的特徴を有する。特に、血漿PAF－AHは、リポタンパク質粒子に会合し、ジイソプロピルフルオロホスフェートによって阻害され、カルシウムイオンによっては影響を受けず、タンパク質分解酵素には比較的抵抗性であり、そして43,000ダルトンの見かけの分子量を有する。スタッフォリニら（1987）、前出、を参照されたい。同じスタッフォリニらの文献に、ヒト血漿からのPAF－AHの部分精製の手法及びその手法を用いることによって得られる血漿物質のアミノ酸組成が記載されている。細胞質PAF－AHは、スタッフォリニら、J.Biol.Chem.、268巻、６号、3857～3865頁、（1993）において報告されているように、赤血球から精製されており、そしてその文献に細胞質PAF－AHの10のアミノ末端残基もまた記載されている。ハットリ（Hattori）ら、J.Biol.Chem.、268巻、25号、18748～18753頁、（1993）、はウシ脳からの細胞質PAF－AHの精製を記載している。これまでの特許出願に続いて、ハットリら、J.Biol.Chem.、269巻、237号、23150～23155頁、（1994）においてウシ脳の細胞質PAF－AHのヌクレオチド配列が公表された。今日まで、PAF－AHの血漿型のヌクレオチド配列は公表されていない。

PAF－AHの組換えによる生産により、in vivoでの炎症の消散の正常なプロセスを模倣または増大するために、外来のPAF－AHを利用することが可能となるであろう。

PAF－AHは血漿中に通常見出される産物であるので、PAF－AHの投与によって、PAF受容体拮抗剤の投与よりも生理学上の利点が提供されるであろう。さらに、PAFと構造的に関連性のあるPAF受容体拮抗剤は、本来のPAF－AH活性を阻害し、PAF及び酸化的に断片化されたリン脂質の望ましい代謝が、それによって妨げられる。

このように、PAF受容体拮抗剤によるPAF－AH活性の阻害は、その拮抗剤によるPAF受容体の競合的阻害を妨げる。ストレムラーら、前出、を参照されたい。加えて、急性の炎症の局所において、例えばオキシダントの放出の結果本来のPAF－AH酵素の不活性化が起こり、次には、PAF受容体と結合させるため外から投与されるPAF受容体拮抗剤のいずれのものとも競合するであろうPAF及びPAF様化合物の局所レベルを上昇せしめる結果となる。対照的に、組換えPAF－AHを用いた処置により、内在性のPAF－AH活性が増大され、そして不活性化された内在性酵素が補われるであろう。このように、当該技術分野においてヒト血漿PAF－AHをコードするポリヌクレオチド配列を同定及び単離し、PAF－AHの組換え生産に有用な材料及び方法を開発し、そして血漿中でのPAF－AHの検出用の試薬を作り出す必要性がある。

［課題を解決するための手段］

本発明は、ヒト血漿PAF－AHまたはその酵素的に活性を有する断片をコードする、新規な、精製され、単離されたポリヌクレオチド（すなわち、いずれもセンス及びアンチセンスストランドの、DNA及びRNA）提供する。本発明の好ましいDNA配列には、ゲノム及びcDNA配列ばかりでなく、全体または部分的に化学合成されたDNA配列が含まれる。配列番号:7で示されるPAF－AHをコードするDNA配列及び、標準のストリンジェンシーの条件下で該配列のノンコーディングストランドとハイブリダイズするDNA配列または遺伝コードの縮重（redundancy of the genetic code）を伴わなければハイブリダイズするであろうDNA配列が、本発明で企図される。さらに本発明で企図されるのは、本発明のDNA配列の生物学

的複製物（すなわち、in vivoまたはin vitroで作製された、単離されたDNA配列のコピー）である。PAF－AH配列を組込んだプラスミド及びウイルスDNAベクターなどの自律的に複製する組換え構築体ならびに、特にPAF－AHをコードするDNAが内在性または外来性発現制御DNA配列及び転写ターミネーターと作動可能に結合されるベクターもまた、提供される。

本発明の他の局面において、所望のDNA配列がその中で発現されることを許容する方法で、原核性または真核性宿主細胞が、本発明のDNA配列で安定に形質転換される。PAF－AH産物を発現する宿主細胞は、多岐にわたる有用な目的に役立つことができる。このような細胞は、PAF－AHと特異的に免疫反応性を有する、抗体物質の開発のための抗原の貴重なソースを構成する。本発明の宿主細胞は、細胞が好適な培養培地中で生育され、そして細胞からまたは細胞が生育される培地から、例えば免疫アフィニティー精製によって、所望のポリペプチド産物が単離される、PAF－AHの大規模な製造法において顕著に有用である。

血漿からPAF－AHを精製するための、本発明により企図される非免疫学的方法には、（ａ）低密度リポタンパク質粒子を単離する、（ｂ）該低密度タンパク質粒子を10mM CHAPSを含む緩衝液中にて可溶化し、第１のPAF－AH酵素溶液を作製する、（ｃ）該第１のPAF－AH酵素溶液をDEAE陰イオン交換カラムにアプライする、（ｄ）1mM CHAPSを含むおよそpH7.5の緩衝液を用いて該DEAE陰イオン交換カラムを洗浄する、（ｅ）０～0.5M NaClの濃度勾配でなるおよそpH7.5の緩衝液を用いて、該DEAE陰イオン交換カラムからPAF－AH酵素を溶出して画分とする、（ｆ）該DEAE陰イオン交換カラムから溶出した、PAF－AH酵素活性を有する画分をプールする、（ｇ）該DEAE陰イオン交換カラムからの、該プールした活性画分を、10mM CHAPSに調整して、第２のPAF－AH酵素溶液を作製する、（ｈ）ブルーダイリガンドアフィニティーカラムに、該第２のPAF－AH酵素溶液をアプライする、（ｉ）該ブルーダイリガンドアフィニティーカラムから10mM CHAPS及びカオトロピック塩を含む緩衝液を用いてPAF－AH酵素を溶出する、（ｊ）該ブルーダイリガンドアフィニティーカラムからの溶出液を、Cuリガンドアフィニティーカラムにアプライする、（ｋ）10mM CHAPS及びイミダゾールを含む緩衝液を用いて、該CuリガンドアフィニティーカラムからPAF－AH酵素を溶出する、（１）該Cuリガンドアフィニティーカラムからの溶出液をSDS－PAGEに供する、そして、（ｍ）SDS－ポリアクリルアミドゲルから、およそ44kDaのPAF－AH酵素を単離するという工程が含まれる。好ましくは、工程（ｂ）の緩衝液は25mMトリス－塩酸、10mM CHAPS、pH7.5であり、工程（ｄ）の緩衝液は25mMトリス－塩酸、1mM CHAPSであり、工程（ｈ）のカラムはブルーセファロースファストフローカラムであり、工程（ｉ）の緩衝液は25mMトリス－塩酸、10mM CHAPS、0.5M KSCN、pH7.5であり、工程（ｊ）のカラムはCuキレーティングセファロースカラムであり、そして工程（ｋ）の緩衝液はpHが約pH7.5～8.0の範囲にある、25mMトリス－塩酸、10mM CHAPS、0.5M NaCl、50mMイミダゾールである。

本発明により企図される、PAF－AHを生産する大腸菌（E.Coli）から酵素的に活性なPAF－AHを精製するための方法は、（ａ）PAF－AH酵素を生産する、溶菌した（lysed）大腸菌から遠心上清を調製する、（ｂ）ブルーダイリガンドアフィニティーカラムに、該遠心上清をアプライする、（ｃ）該ブルーダイリガンドアフィニティーカラムから、10mM CHAPS及びカオトロピック塩を含む緩衝液を用いてPAF－AH酵素を溶出する、（ｄ）該ブルーダイリガンドアフィニティーカラムからの溶出液を、Cuリガンドアフィニティーカラムにアプライする、及び、（ｅ）10mM CHAPS及びイミダゾールを含む緩衝液を用いて、該CuリガンドアフィニティーカラムからPAF－AH酵素を溶出する、という工程を含む。好ましくは、工程（ｂ）のカラムはブルーセファロースファストフローカラムであり、工程（ｃ）の緩衝液は25mMトリス－塩酸、10mM CHAPS、0.5M KSCN、pH7.5であり、工程（ｄ）のカラムはCuキレーティングセファロースカラムであり、そして工程（ｅ）の緩衝液は25mMトリス－塩酸、10mM CHAPS、0.5M NaCl、100mMイミダゾール、pH7.5である。

本発明により企図される、PAF－AHを生産する大腸菌から酵素的に活性なPAF－AHを精製するための他の方法は、（ａ）PAF－AH酵素を生産する、溶菌した大腸菌から遠心上清を調製する、（ｂ）該遠心上清を、10mM CHAPSを含む低pH緩衝液で希釈する、（ｃ）該希釈さ

れた遠心上清を、約pH7.5にて平衡化した陽イオン交換カラムにアプライする、（ｄ）1Mの塩を用いて該陽イオン交換カラムからPAF－AH酵素を溶出する、（ｅ）該陽イオン交換カラムからの該溶出液のpHをあげ、そして該溶出液の塩濃度を約0.5Mの塩に調整する、（ｆ）ブルーダイリガンドアフィニティーカラムに、該陽イオン交換カラムからの該調整された溶出液をアプライする、（ｇ）該ブルーダイリガンドアフィニティーカラムから、約2M～約3Mの塩を含む緩衝液を用いてPAF－AH酵素を溶出する、及び、（ｈ）該ブルーダイリガンドアフィニティーカラムからの該溶出液を、約0.1％ツイーンを含む緩衝液を用いて透析するという工程を含む。

好ましくは、工程（ｂ）の緩衝液は25mM MES、10mM CHAPS、1mM EDTA、pH4.9であり、工程（ｃ）のカラムは、25mM MES、10mM CHAPS、1mM EDTA、50mM NaCl、pH5.5で平衡化したＳセファロースカラムであって、PAF－AHは、工程（ｄ）において、1mM NaClを用いて溶出され、工程（ｅ）における溶出液のpHは、2Mトリスベースを用いてpH7.5に調整され、工程（ｆ）におけるカラムはセファロースカラムであり、工程（ｇ）における緩衝液は25mMトリス、10mM CHAPS、3M NaCl、1mM EDTA、pH7.5であり、また、工程（ｈ）における緩衝液は25mMトリス、0.5M NaCl、0.1％ツイーン80、pH7.5である。

PAF－AH産物は天然の細胞ソースからの単離物として得られることができ、または化学的に合成されてもよいが、好ましくは、本発明の原核性または真核性宿主細胞が関与する組換え手法によって生産される。配列番号:8で示されるアミノ酸配列の一部またはすべてを有するPAF－AH産物が企図される。哺乳動物宿主細胞を用いることで、本発明の組換え発現産物に至適な生物学的活性を賦与するのに必要であるかもしれない転写後の修飾（例えば、ミリストレーション、グリコシレーション、トランケーション、リピデーション、及び、チロシン、セリンまたはスレオニンのリン酸化）がなされることが期待される。本発明のPAF－AH産物は、完全長のポリペプチド、断片または誘導体であってよい。誘導体は、１以上の特定の（specified）（すなわち、天然にコードされる）アミノ酸が欠失もしくは置換されるかまたは、１以上の非特定のアミノ酸が付加された、PAF－AH誘導体からなり、（１）PAF－AHに特異的な１以上の酵素活性または免疫学的特性を損失することなく、または（２）PAF－AHの特定の生物学的活性を特異的に損なわせしめるとよい。PAF－AHに結合するタンパク質または他の分子を、その活性を修飾するために用いてもよい。

本発明によりさらに企図されるものには、抗体物質（例えば、モノクローナル及びポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、CDR－移植抗体（grafted anti bodies）等）及びPAF－AHに特異性を有する他の結合タンパク質もある。特に本発明の実例となる結合タンパク質は、1994年９月30日に、20852メリーランド州、ロックビル（Rockville）、パークロウンドライブ（Parklawn Drive）12301のアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）に寄託され、それぞれHB11724及びHB11725の寄託番号を与えられた、ハイブリドーマ90G11D及び90F2Dによって生産されるモノクローナル抗体である。PAF－AHに特異的に結合するタンパク質または他の分子（たとえば脂質または小分子）は、血漿から単離されたPAF－AH、組換えPAF－AH、PAF－AH誘導体またはこのような産物を発現する細胞を用いて同定することができる。さらには、結合タンパク質は、PAF－AHの精製のためばかりでなく免疫用の組成物において有用であり、また、既知の免疫学的手法による液体及び組織試料中のPAF－AHの検出または定量に有用である。PAF－AH特異的抗体物質に特異的な抗イディオタイプ抗体もまた企図される。

本発明のDNA及びアミノ酸配列の開示が寄与する情報の科学的価値は明白である。

一連の例として、PAF－AHに対するcDNA配列を知ることで、PAF－AHをコードするゲノムDNA配列のDNA/DNAハイブリダイゼーションによる単離や、プロモーター、オペレーター等のPAF－AH発現の制御調節配列を特定することが可能となる。当該技術分野において標準のストリンジェンシーの条件下で、本発明のDNA配列を用いて行われるDNA/DNAハイブリダイゼーション手法により、PAF－AHの対立変異体（allelic variant）、PAF－AHの１以上の生化学的及び／または免疫学的特性を担う構造的に関連のある他のタンパク質、ならびにPAF－AHと相同のヒト以外の種のタンパク質をコードするDNAの単離を許容することが、同様に期待される。本発明により提供されるDNA配列の情報によって、相同組換えまたは、

機能を有するPAF－AH酵素を発現しない齧歯類またはPAF－AH酵素変異体を発現する齧歯類の「ノックアウト」ストラテジー（例えば、カペッチ（Kapecchi）、Science、244巻、1288～1292頁、（1989）を参照されたい）による開発もまた可能となる。本発明のポリヌクレオチドを好適にラベルした場合、細胞がPAF－AH酵素を合成する能力を検出するハイブリダイゼーション分析において有用である。本発明のポリヌクレオチドは、１または複数の疾病状態の基礎になる、PAF－AH遺伝子座における１または複数の遺伝的変更を同定するために有用な診断法のための基礎となるかもしれない。さらに本発明によって入手可能となるものに、PAF－AHを通常発現している細胞による、PAF－AHの発現調節に関係するアンチセンスポリヌクレオチドもある。

哺乳動物、特にヒトの被検者に、病理学的炎症状態の改善を目的として、本発明のPAF－AH調製物を投与することが企図される。病理学的炎症状態におけるPAFの関与が暗示されることに基づき、例えば、喘息（ミワ（Miwa）ら、J.Clin.Invest.、82巻、1983～1991頁、（1988）、シー（Hsieh）ら、J.Allergy Clin.Immunol.91巻、650～657頁、（1993）、及びヤマシタ（Yamashita）ら、Allergy、49巻、60～63頁、（1994））、アナフィラキシー（ベナブルら、前出）、ショック（ベナブルら、前出）、再灌流傷害（reperfusion injury）及び中枢神経系虚血（リンドバーグら（1991）、前出）抗原誘発性関節炎（ザルコ（Zarco）ら、Clin.Exp.Immunol.、88巻、318～323頁、（1992））粥腫形成（atherogenesis）（ハンドレイ（Handley）ら、Drug Dev.Res.、７巻、361～375頁、（1986））、クローン病（デニゾット（Denizot）ら、Digestive Diseases and Sciences、37巻、３号、432～437頁、（1992））、虚血性腸壊死／壊死性小腸結腸炎（デニゾットら、前出、及びカプラン（Caplan）ら、Acta Paediatr.、追補、396巻、11～17頁、（1994））、潰瘍性結腸炎症（デニゾットら、前出）、虚血性発作（サトー（Satoh）ら、Stroke、23巻、1090～1092頁、（1992））、虚血性脳傷害（リンドバーグら、Stroke、21巻、1452～1457頁、（1990）及びリンドバーグら（1991）前出）、全身性紅斑性狼瘡（マツザキ（Matsuzaki）ら、Clinica Chimica Acta、210巻、139～144頁、（1992））、急性膵炎（カルド（Kald）ら、Pancreas、８巻、４号、440～442頁、（1993））、敗血症、カルドら、前出）、急性後天性連鎖球菌性（acute post streptococcal）糸球体腎炎（メッツァノ（Mezzano）ら、J.Am.Soc.Nephrol.、４巻、235～242頁、（1993））、IL－２治療により引き起こされる肺浮種（ラビノビッチ（Rabinovici）ら、J.Clin.Invest.、89巻、1669～1673頁、（1992））、アレルギー性炎症（ワタナベ（Watanabe）ら、Br.J.Pharmacol.、111巻、123～130頁、（1994））、虚血性腎不全（グリノ（Grino）ら、Annals of Internal Medicine、121巻、５号、345～347頁、（1994））、早期分娩（preterm labor）（ホフマン（Hoffman）ら、Am.J.Obstet.Gynecol.、162巻、２号、525～528頁、（1990）及びマキ（Maki）ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、85巻、728～732頁、（1988））、ならびに成人呼吸窮迫症候群（adult respiratory distress syndrome）ラビノビッチら、J.Appl.Physiol.、74巻、４号、1791～1802頁、（1993）、マツモトら、Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.、19巻、509～515頁、（1992）及びロドリゲツ－ロイジン（Rodriguez－Roisin）ら、J.Clin.Invest.、93巻、188～194頁、（1994））などの治療において、PAF－AHを投与することが示唆される。

前記の病理学的状態の多くの動物モデルが当該技術分野において記載されている。例えば、喘息、鼻炎、及び湿疹に対するマウスモデルが本願明細書の実施例16に記載され、関節炎に対するウサギモデルがザルコら、前出、に記載され、虚血性腸壊死／壊死性小腸結腸炎に対するラットのモデルがフルカワ（Furukawa）ら、Ped.Res.、34巻、２号、237～241頁、（1993）及びカプランら、前出、に記載され、発作に対するウサギのモデルがリンドバーグら（1990）、前出、に記載され、狼瘡に対するマウスのモデルがマツザキら、前出、に記載され、急性膵炎に対するラットのモデルがカルドら、前出、に記載され、IL－２治療により引き起こされる肺浮腫に対するラットのモデルがラビノビッチら、前出、に記載され、アレルギー性炎症のラットのモデルがワタナベら、前出、に記載され、腎異系移植のウサギのモデルがワトソン（Watson）ら、Transplantation、56巻、４号、1047～1049頁、（1993）に記載され、ならびに成人呼吸窮迫症候群のラットのモデルがラビノビッ

チら、前出、に記載されている。
本発明により特に企図されるのは、哺乳動物中で内在性PAF－AH活性を補足し、病因となる量のPAFを不活性化するに足る量のPAF－AHを、哺乳動物に投与することからなる、PAF－AHが媒介する病理学的状態が疑われるかまたは罹患している哺乳動物の治療法に用いられるPAF－AH組成物である。
本発明により企図される治療用組成物は、PAF－AH及び生理学的に許容しうる希釈剤（賦形剤）または担体を含み、また、抗炎症効果を有する他の試薬を含んでもよい。指示される投与量は、内在性PAF－AH活性を補い、且つ病理的状態をもたらす量のPAFを不活性化するに足る量であろう。一般的な投与量の考慮のためには、Remmington's Pharmaceutical Science、18版、Mack Publishing Co.、イーストン、ペンシルベニア州（1990）を参照されたい。投与量は、約0.1～約1000μg PAF－AH/kg体重の間で変動するであろう。本発明の治療用組成物は、処置すべき病理学的状態に依存して、種々の経路により投与されうる。例えば、投与は、静脈内、皮下、経口、座薬、及び／または肺を経由する経路により投与されてもよい。
肺の病理学的状態のためには、肺を経由する経路によるPAF－AHの投与が特に指示される。肺を経由する投与における用途のために企図されるのは、例えば、当該技術分野において標準的な、噴霧器、投与量吸入器（dose inhaler）、及び粉末吸入器（powder inhaler）を含む広範な送達（delivery）デバイスである。エアロゾル調剤の吸入による肺及び循環系への種々のタンパク質の送達は、アジェイ（Adjei）ら、Pharm.Res.、７巻、６号、565～569頁、（1990）（ロイプロリド　アセテート（leuprolide acetate））、ブラケット（Braquet）ら、J.Cardio.Pharm.、13巻（追補５）:s.143～146頁、（1989）（エンドセリン－１）、ハッバード（Hubbard）ら、Annals of Internal Medicine、III巻、３号、206～212頁、（1989）（α１－アンチトリプシン）、スミス（Smith）ら、J.Clin.Invest.、84巻、1145～1146頁、（1989）（α－１－プロテナーゼインヒビター）、デブス（Debs）ら、J.Immunol.、140巻、3482～3488頁、（1933）（組換えガンマインターフェロン及び腫瘍壊死因子アルファ）、1994年９月15日公開の、特許協力条約（PCT）国際公開番号第WO 94/20069号（組換え係留化（pegylated）顆粒球コロニー刺激因子）に記載されている。
［実施例］
以下の実施例により本発明を例証する。実施例１は、ヒト血漿からのPAF－AHの新規な精製法を示す。実施例２は、精製されたヒト血漿PAF－AHのアミノ酸マイクロ配列決定を記載する。ヒト血漿PAF－AHをコードする全長のcDNAのクローニングを、実施例３に記載する。ヒト血漿PAF－AH遺伝子の、推定されるスプライス変異体の同定を実施例４に記載する。ヒト血漿PAF－AHをコードするゲノム配列のクローニングを、実施例５に記載する。実施例６は、ヒト血漿PAF－AH cDNAと相同な、イヌ、マウス、ラット及びマカクのcDNAのクローニングを記載する。
実施例７は、COS 7細胞で一過性に発現された組換えPAF－AHの酵素活性の証拠となる分析結果を示す。実施例８は、大腸菌及び酵母（S.cerevisiae）におけるヒトPAF－AHの発現を記載する。実施例９は、大腸菌からの組換えPAF－AHの精製のためのプロトコル、及びその酵素活性を確証する分析を示す。実施例10は、アミノ酸置換誘導体ならびにアミノ末端側及びカルボキシ末端側の欠損産物を含む種々の組換えPAF－AH産物を記載する。種々の組織及び細胞系におけるヒト血漿PAF－AH　RNAの発現に対するノザンブロットアッセイの結果を、実施例11に示し、一方in situハイブリダイゼーションの結果を実施例12に示す。実施例13には、ヒト血漿PAF－AHに特異的なモノクローナル抗体の作製を記載する。
実施例14、15及び16は、それぞれ、ラットにおける急性炎症、胸膜炎及び喘息への、本発明の組換えPAF－AH産物の投与の、in vivoでの治療的効果を記載する。
実施例17はPAF－AH活性の欠損を示すヒト患者の血清のイムノアッセイの結果を示し、また、明らかにその欠損の原因と思われる、その患者における遺伝的傷害の同定を記載する。
実施例１

アミノ酸配列決定のための材料を供給するために、ヒト血漿からPAF－AHを精製した。

A. 精製条件の至適化

最初に、リンタングステン酸（phosphotungstate）を用いて、血漿から低密度リポタンパク質（LDL）粒子を、沈澱させ、次いで0.1%ツイーン20中に可溶化し、そしてスタッフォリニら（1987）、前出、の方法に従って、DEAEカラム（ファルマシア（Pharmacia）社、ウプサラ（Uppsala）、スウェーデン）のクロマトグラフィーに供したが、可溶化の再評価及び引き続いての精製条件に必要なDEAEカラムからのPAF－AH活性体の溶出は、一致しないものであった。

ツイーン20、CHAPS（ピアスケミカル社（Pierce Chemical Co.,）ロックフォード（Rockford）イリノイ州）及びオクチルグルコシドを、LDL粒子の可溶化能について、遠心及びゲル濾過クロマトグラフィーにより評価した。CHAPSにより、可溶化した活性体の回収がツイーン20よりも25%上回り、またオクチルグルコシドよりも300%上回る回収がなされた。次いで、10mM CHAPSで可溶化したLDL沈澱物を、DEAEセファロースファストフローカラム（陰イオン交換カラム、ファルマシア社）で、1mMCHAPSを含む緩衝液を用いて分画して、次なるカラムの評価用の部分精製したPAF－AHの大量のプール（「DEAEプール」）を得た。

DEAEプールは、さらなるPAF－AH活性体の精製における有用性について、種々のクロマトグラフィーカラムをテストするための出発材料として用いた。テストしたカラムとしては、ブルーセファロースファストフロー（ファルマシア社）（ダイリガンドアフィニティーカラム）、Ｓ－セファロースファストフロー（ファルマシア社）（陽イオン交換カラム）、Cuキレーティングセファロース（ファルマシア社）（金属リガンドアフィニティーカラム）、フラクトゲルＳ（イー・エム・セパレーションズ（EM Separations）社）、ギッブスタウン（Gibbstown）、ニュージャージー州）（陽イオン交換カラム）、及びセファクリル（Sephacryl）－200（ファルマシア社）（ゲル濾過カラム）が挙げられる。これらのクロマトグラフィー手法では、1mM CHAPSで操作した場合、すべて低く、満足のいかないレベルの精製にとどまった。引き続き1mM CHAPS中でセファクリルＳ－200のゲル濾過クロマトグラフィーを行うと、期待された44kDaのおおよそのサイズというよりもむしろ、広範なサイズ範囲にわたって溶出する酵素的に活性な画分が得られた。

まとめて考えると、これらの結果は、LDLリポタンパク質が溶液中で凝集していることを示唆していた。

そこで、PAF－AH活性体の凝集について分析用ゲル濾過クロマトグラフィーにより、異なるLDL試料を評価した。DEAEプール及び新たに可溶化したLDL沈澱物からの試料は、1mM CHAPSを含む緩衝液で平衡化したスペローズ（Superose）12（ファルマシア社）で分析した。いずれの試料とも、殆どの活性体が150kDaを越える、きわめて広い範囲の分子量にわたって溶出した。次いで10mM CHAPSを含む緩衝液で平衡化したスペローズ12で試料を分析したところ、活性体の大半がPAF－AH活性体について期待された44kDa付近に溶出された。しかしながら、試料には、凝集物に相当する高分子量の領域に、いくらかのPAF－AH活性体が含まれていた。

引き続き、他の試料をゲル濾過によってテストすると、およそ44kDaの範囲に専らPAF－AH活性体を溶出した。これらの試料とは、0.5M NaClの存在下で10mM CHAPS中で可溶化したLDL沈澱物及び、DEAEカラムから溶出した後10mM CHAPSに調整した新たなDEAEプールであった。このデータにより、非凝集性のPAF－AHを維持するために、少なくとも10mMのCHAPSが必要であることが示唆される。DEAEのクロマトグラフィーの後、但し引き続いてのクロマトグラフィー工程の前に、1mMから10mMへとCHAPS濃度を高めることで、精製に劇的な差が生じた。例えば、Ｓ－セファロースファストフローでの PAF－AHの精製の度合いは、２倍から10倍へと増大した。PAF－AH活性体は、1mM CHAPS中でブルーセファロースファストフローカラムに不可逆的に結合したが、このカラムにおいて10mM CHAPSで最も高いレベルの精製がなされた。10mM CHAPSを前もって添加しても、DEAEクロマトグラフィーは改善されなかった。

ブルーセファロースファストフローカラムの後のCuキレーティングセファロースのクロマ

トグラフィーで、PAF－AH活性体が15倍濃縮された。試料が煮沸されない限りにおいて、還元SDS－ポリアクリルアミドゲルからPAF－AH活性体を回収できることも、判定された。Cuキレーティングセファロースカラムから溶出された物質の活性は、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供すると、ゲルを銀染色した場合に見られる主たるタンパク質のバンドに一致した。

B. PAF－AH精製プロトコル

かくして、アミノ酸配列決定用のPAF－AHを精製するために用いる新規のプロトコルは、４℃で実施される以下の工程からなるものであった。ヒト血漿を、１リットルのナルゲンボトル中、900mlアリコート（aiquot）づつに分割し、pH8.6に調整した。次いで90mlの3.85％リンタングステン酸ナトリウムに続き23mlの2M $MgCl_2$を添加することにより、LDL粒子を沈澱させた。その後、血漿を3600gにて15分間遠心した。ペレットを800mlの0.2％クエン酸ナトリウム中に再懸濁させた。10g NaCl及び24mlの2M $MgCl_2$を添加することにより、再びLDLを沈澱させた。3600gにて15分間遠心することにより、LDL粒子をペレットとした。この洗浄を２度繰り返した。次にペレットを－20℃で凍結せしめた。5Lの血漿からのLDL粒子を、5Lの緩衝液Ａ（25mMトリス塩酸、10mM CHAPS、pH7.5）中に再懸濁させて一晩撹拌した。可溶化したLDL粒子を3600gにて1.5時間遠心した。上清を集めて、残っている固形物をすべて除去するために、ワットマン（Whatman）113濾紙を用いて濾過した。可溶化したLDL上清を、緩衝液Ｂ（25mMトリス塩酸、1mM CHAPS、pH7.5）で平衡化したDEAEセファロースファストフローカラム（11cm×10cm、1L樹脂容量、80ml/分）に負荷した。吸光度がベースラインに戻るまで、緩衝液Ｂを用いてカラムを洗浄した。8Lの、０～0.5M NaClの濃度勾配を用いてタンパク質を溶出し、480mlの画分を集めた。

この工程は、以下のブルセファロースファストフローカラムへ結合させるために必須であった。本質的に実施例４に記載の方法によって、各画分についてアセチルヒドロラーゼ活性を分析した。活性画分をプールし、該プールを約10mM CHAPSとするために十分なCHAPSを添加した。0.5M NaClを含む緩衝液Ａで平衡化したブルセファロースファストフローカラム（5cm×10cm、200mlベッド容量）に、DEAEプールを4ml/分にて一晩かけて負荷した。吸光度がベースラインに戻るまで、16ml/分にて平衡化緩衝液を用いてカラムを洗浄した。PAF－AH活性体は、16ml/分にて、0.5M KSCN（カオトロピック塩）を含む緩衝液Ａを用いて段階的に溶出し、50mlの画分を集めた。この工程の結果、1000倍を越える精製がなされた。活性画分をプールし、1Mトリス塩酸、pH8.0を用いてそのプールをpH8.0に調整した。ブルセファロースファストフロークロマトグラフィーからの活性なプールは、緩衝液Ｃ（25mMトリス塩酸、10mM CHAPS、0.5M NaCl、pH8.0（pH7.5でも有効であった））で平衡化したCuキレーティングセファロースカラム（2.5cm×2cm、10mlベッド容量、4ml/分）に負荷し、カラムを50mlの緩衝液Ｃを用いて洗浄した。PAF－AH活性体は、50mMイミダゾールを含む緩衝液Ｃを100ml用いて溶出し、10mlの画分を集めた。PAF－AH活性を含む画分をプールし、緩衝液Ａに対して透析した。PAF－AH活性体の15倍の濃縮がなされることに加えて、Cuキレーティングセファロースカラムにより若干の精製が行われた。Cuキレーティングセファロースプールを、37℃にて15分間、50mM DTT中で還元し、0.75mm、7.5％ポリアクリルアミドゲルに負荷した。0.5cm毎にゲルの薄片を切断し、200μｌの25mMトリス塩酸、10mM CHAPS、150mM NaClを含む使い捨てのマイクロフュージュ（microfuge）チューブに入れた。薄片を粉砕し、４℃にて一晩インキュベートさせておいた。次いで各ゲル薄片の上清をPAF－AH活性についてアッセイして、SDS－PAGE上のいずれのタンパク質バンドがPAF－AH活性を含むかを判定した。PAF－AH活性は、およそ44kDaのバンドにおいて見出された。平行して実験を行った２つのゲルからのタンパク質をPVDF膜（イモビロン（Immobilon）－Ｐ、ミリポア（Millipore）社）に電気を用いて転写し、クマシーブルーで染色した。そのPVDF膜の写真を図１に示す。

以下の表１に示すように、5Lのヒト血漿からおよそ200μｇのPAF－AHが、２×10^{6}倍精製された。それに比べて、スタッフォリニら（1987）、前出、には、PAF－AH活性体の３×10^{4}倍の精製が記載されているのである。

表１

試料	容量 (ml)	活性 (cpm x 10^6)	総活性 (cpm x 10^9)	タンパク質濃度 (mg/ml)	比活性 (cpm x 10^6)	活性の回収率 %		精製倍率	
						工程	累積	工程	累積
血漿	5000	23	116	62	0.37	100	100	1	1
LDL	4500	22	97	1.76	12	84	84	33	33
DEAE	4200	49	207	1.08	46	212	178	3.7	124
ブルー	165	881	14	0.02	54200	70	126	1190	1.5×10^5
Cu	12	12700	152	0.15	82200	104	131	1.5	2.2×10^5
SDS-PAGE	-	-	-	-	-	-	-	～10	2.2×10^6

要約すると、以下の工程、すなわち、（１）10mM CHAPS中での可溶化及びクロマトグラフィー、（２）ブルーセファロースファストフローなどのブルーリガンドアフィニティーカラムでのクロマトグラフィー、（３）Cuキレーティングセファロースなどの Cuリガンドアフィニティーカラムでのクロマトグラフィー、ならびに（４）SDS－PAGEからのPAF－AHの溶出、が独自のものであり、微量試料を用いたアミノ酸配列決定用の血漿PAF－AHを成功裡に精製するために重大である。

実施例２

アミノ酸配列決定のため、実施例１に記載のPAF－AHを含むPVDF膜からの、およそ44kDaタンパク質のバンドを切除し、アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）473Aプロテインシーケンサーを用いて配列決定した。PAF－AH活性体に対応する～44kDaのタンパク質バンドのＮ－末端配列分析により、そのバンドが２つのメジャーな配列と２つのマイナーな配列を含むことが示唆された。その２つのメジャーな配列の割合は1:1であり、よって配列データを解読するのは困難であった。

SDSゲルで分離された２つのメジャーなタンパク質の配列を判別するため、およそ44kDaのバンドを含む平行して実験を行った２枚のPVDF膜を半分に切断し膜の上部と下部とが別個に配列決定に供されるようにした。

膜の下半分について得られたＮ－末端配列は、

配列番号:1

FKDLGEENFKALVLIAF

であった。タンパク質データベースの検索により、この配列がヒト血清アルブミンの断片であることが明らかとなった。同じPVDF膜の上半分についても配列決定を行い、決定したＮ－末端アミノ酸配列は、

配列番号:2

IQVLMAAASFGQTKIP

であった。この配列は、検索したデータベースの中のいずれのタンパク質にもマッチせず、また、スタッフォリニら（1993）、前出、における赤血球の細胞質PAF－AHについて報告された、

配列番号:3

MKPLVVFVLGG

のＮ－末端アミノ酸配列とも異なっていた。新規配列（配列番号:2）を、以下の実施例３に記載のように、ヒト血漿PAF－AHのcDNAクローニングに利用した。

実施例３

ヒト血漿PAF－AHをコードする全長のクローンを、マクロファージcDNAライブラリーから単離した。

A. マクロファージcDNAライブラリーの構築

末梢血単球由来のマクロファージから、ポリA^+RNAを採取した。インビトロゲンコピーキット（Invitrogen Copy Kit）（サンディエゴ、カリフォルニア州）を用いて、二本鎖の、ブラントエンドとした（blunt－ended）cDNAを作製し、哺乳動物発現ベクター、pRc/CMV（インビトロゲン）へと挿入する前に、そのcDNAにBst XIアダプターを連結した。エレクトロポレーションにより、得られたプラスミドを大腸菌株XL－１ブルーに導入した。形質転換された菌を、総計978枚のアガロースプレート１枚当たりおよそ3000コロニーの密度で播種した。各プレートから別々に調整したプラスミドDNAは、個々のプールとして保持し、また、それぞれ300,000クローンを表す、より大きなプールへと集めることも行った。

B. PCRによるライブラリースクリーニング

実施例２に記載の新規なＮ－末端アミノ酸配列に基づく、縮重アンチセンスオリゴヌクレオチドPCRプライマーを利用した、ポリメラーゼ連鎖反応により、マクロファージライブラリーをスクリーニングした。プライマーの配列を、以下にIUPAC命名法に従って記載するが、ここで「Ｉ」は、イノシンである。

配列番号:4

5’ ACATGAATTCGGIATCYTTIGTYTGICCRAA 3’

プライマーの各コドンの第３位のヌクレオチドを選択するのに、ワダ（Wada）ら、Nuc.Acids Res.、19S巻、1981～1986頁、（1991）のコドン選択表を用いた。プライマーは、300,000クローンのマクロファージライブラリープールをスクリーニングするために、いずれもpRc/CMVのクローニング部位の側に位置するSP6またはT7プロモーター配列のどちらかに特異的なプライマーと組合わせて用いた。すべてのPCR反応には、100ngの鋳型cDNA、１μｇの各プライマー、0.125mMの各dNTP、10mMのトリス塩酸、pH8.4、50mM $MgCl_2$及び2.5単位のTaqポリメラーゼが含まれていた。94℃、４分間で最初の変性工程を行なった後、94℃で１分、60℃で１分そして72℃で２分の増幅を30サイクル行った。その結果得られたPCR産物は、ｐブルースクリプトSK⁻（ストラタジーン（Stratagene）社、ラ・ジョラ（La Jolla）、カリフォルニア州）中にクローン化し、そしてそのヌクレオチド配列を、ダイデオキシチェーンターミネーター法により決定した。PCR産物は、新規ペプチド配列により予測される配列を含み、配列番号:7のヌクレオチド１～331に対応するものである。

以下に記すPCRプライマーは、前記のクローン化したPCR断片に特異的なものであり、全長のクローンを同定するためにデザインした。

センスプライマー（配列番号:5）

5’ TATTTCTAGAAGTGTGGTGGAACTCGCTGG 3’

アンチセンスプライマー（配列番号:6）

5’ CGATGAATTCAGCTTGCAGCAGCCATCAGTAC 3’

これらのプライマーを利用するPCR反応を前記のごとくに実施し、最初に300,000クローンのcDNAプールを、次いでより小さい3000クローンのプールの適切なサブセット（subset）をスクリーニングした。その後、期待されるサイズのPCR産物を生産している3000クローンのプール３つを、菌の形質転換のために用いた。

C. ハイブリダイゼーションによるライブラリースクリーニング

形質転換された菌からのDNAを、元のクローン化したPCR断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションによって、引き続きスクリーニングした。コロニーをニトロセルロース上にブロットし、50％ホルムアミド、0.75M塩化ナトリウム、0.075Mクエン酸ナトリウム、0.05Mリン酸ナトリウム、pH6.5、１％ポリビニルピロリドン、１％フィコール、１％ウシ血清アルブミン及び50ng/mlの超音波処理済サケ精子DNA中でプレハイブリダイゼーシ

ョン及びハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションプローブは、ランダムヘキサマープライミングによってラベルした。42℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った後、ブロットを、42℃にて、0.03M塩化ナトリウム、3mMクエン酸ナトリウム、0.1％SDS中で良く洗浄した。10のハイブリダイズするクローンのヌクレオチド配列を決定した。クローンのうちの１つ、クローンsAH 406－３は、ヒト血漿から精製したPAF－AH活性体の元のペプチド配列により予測される配列を含んでいた。ヒト血漿PAF－AHのDNA及び決定したアミノ酸配列を、それぞれ配列番号:7及び８に記す。

クローンsAH 406－３は、予測される441アミノ酸のタンパク質をコードする読み取り枠を有する1.52kbのインサートを含む。アミノ末端において、比較的疎水性の領域である41残基が、タンパク質マイクロ配列決定により同定されたＮ－末端アミノ酸（配列番号:8の42位のイソロイシン）の前に存在する。しかして、コードされているタンパク質は、長いシグナル配列かまたは、切断されて機能を有する成熟タンパク質を生じる付加的なペプチドをシグナル配列に加えて有しているかもしれない。シグナル配列の存在が、分泌タンパク質の１つの特徴である。それに加えて、あらゆる既知の哺乳動物リパーゼ、微生物リパーゼ及びセリンプロテアーゼの活性部位のセリンを含むと信じられている、コンセンサスGxSxGモチーフが、クローンsAH 406－３がコードするタンパク質に含まれている（配列番号:8のアミノ酸271～275）。チャプス（Chapus）ら、Biochimie、70巻、1223～1224頁、（1988）及びブレンナー（Brenner）、Nature、334巻、528～530頁、（1988）を参照されたい。

以下の表２は、配列番号:8より予測される本発明のヒト血漿PAF－AHのアミノ酸組成と、スタッフォリニら（1987）、前出、に記載の、称するところによれば精製されたものの、アミノ酸組成の比較である。

表２

	クローン sAH 406-3	スタッフォリニら
Ala	26	24
Asp及びAsn	48	37
Cys	5	14
Glu及びGln	36	42
Phe	22	12
Gly	29	58
His	13	24
Ile	31	17
Lys	26	50
Leu	40	26
Met	10	7
Pro	15	11
Arg	18	16
Ser	27	36
Thr	20	15
Val	13	14
Trp	7	確定されず
Tyr	14	13

本発明のヒト血漿PAF－AH成熟型のアミノ酸組成と、ヒト血漿PAF－AHであると称されている、以前に精製された物質のアミノ酸組成は明らかに異なっていた。
前出のハットリらのウシ脳細胞質PAF－AHのヌクレオチド及び決定されたアミノ酸配列と、本発明のヒト血漿PAF－AHのヌクレオチド及びアミノ酸配列とのアラインメントを試みると、配列における有意な構造的類似性は、なんら観察されなかった。

実施例４

PAF－AH cDNAの5'非翻訳領域（配列番号:7のヌクレオチド31～52）及び3'端における翻訳終止コドンにわたる領域（配列番号:7のヌクレオチド1465～1487）にハイブリダイズするプライマーを用いて、マクロファージ及び刺激したPBMC cDNAについてPCRを実施すると、ヒトPAF－AH遺伝子の推定されるスプライスバリアントが１つ検出された。PCR反応により、ゲル上に２つのバンドが得られ、１つは実施例３のPAF－AH cDNAの予期されるサイズに対応しており、いま１つはそれより約100bp短かった。両方のバンドの配列決定により、

大きい方のバンドが実施例３のPAF－AH cDNAであって、一方短い方のバンドは血漿PAF－AHのシグナル及びプロペプチド配列と推定される領域をコードするPAF－AH配列のエキソン２（以下の実施例５）を欠失していた。触媒活性３つ組残基（catalytic triad）と思われるアミノ酸及びすべてのシステインが、短い方のクローンに存在していたので、該クローンがコードするタンパク質の生化学的活性は血漿の酵素の活性に匹敵するかもしれないと思われる。

実施例５

ヒト血漿PAF－AHのゲノム配列も単離した。高いストリンジェンシーの条件下でのDNAハイブリダイゼーションにより、ヒトゲノムDNAを含むラムダ及びP1ファージクローンを単離することによって、PAF－AH遺伝子の構造を決定した。ファージクローンの断片をサブクローン化し、そしてcDNAクローンsAH 406－３全体において一定の間隔でアニール（anneal）するよう設計されたプライマーを用いて配列決定した。さらにエキソンの側部に位置するイントロン領域と再結合するよう設計された新たな配列決定用プライマーを、配列を確認するために、エキソン－イントロン境界を越えて、改めて配列決定を行うために用いた。エキソン／イントロン境界は、ゲノム配列とcDNA配列とが分岐する点として明らかにされた。

これらの分析により、ヒトPAF－AH遺伝子が12のエキソンからなることが明らかとなった。

エキソン１、２、３、４、５、６、及び７の一部は、ラムダFIX（ストラタジーン社）中で構築された雄性胎児の胎盤のライブラリーから単離された。ニトロセルロース上にファージプラークをブロットし、50％ホルムアミド、0.75M塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム（pH6.5）、１％ポリビニルピロリドン、１％フィコール、１％ウシ血清アルブミン、及び50ng/mlの超音波処理済サケ精子DNA中でプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションを行った。エキソン２～６及び７の一部を含むファージクローンを同定するために用いるハイブリダイゼーション用プローブは、cDNAクローンsAH 406－３全体で構成されるものであった。エキソン１を含むクローンは、cDNAクローンの5'端由来の断片（配列番号:7のヌクレオチド１～312）を用いて同定した。両プローブとも、ヘキサマーランダムプライミングによって、^{32}Pでラベルした。42℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った後、ブロットを、42℃にして、30mM塩化ナトリウム、3mMクエン酸ナトリウム、0.1％SDS中で良く洗浄した。エキソン１、２、３、４、５、及び６のDNA配列に加えて、部分的な周囲のイントロン配列を、それぞれ配列番号:9、10、11、12、13及び14に記す。

エキソン７の残部ならびにエキソン８、９、10、11、及び12は、ヒトP1ゲノムライブラリーから単離したP1クローンからサブクローン化した。ニトロセルロース上にP1ファージプラークをブロットし、0.75M塩化ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム（pH7.4）、5mM EDTA、１％ポリビニルピロリドン、１％フィコール、１％ウシ血清アルブミン、0.5％SDS、及び0.1mg/mlの総ヒトDNA中でプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションを行った。ヘキサマーランダウプライミングによって^{32}Pでラベルしたハイブリダイゼーションプローブは、前記のように単離したラムダクローンの3'端から由来するゲノムDNAの2.6kbのEcoR1断片で構成されていた。この断片は、ファージクローン上に存在するエキソン６及びエキソン７の一部を含んでいた。65℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った後、前記のようにブロットを洗浄した。エキソン７、８、９、10、11、及び12のDNA配列に加えて、部分的な周囲のイントロン配列を、それぞれ配列番号:15、16、17、18、19、及び20に記す。

実施例６

全長の血漿PAF－AH cDNAクローンを、マウス及びイヌ脾臓cDNAライブラリーから単離し、ラット胸腺cDNAライブラリーから部分的なラットのクローンを単離した。

クローンは、低いストリンジェンシーでのハイブリダイゼーションにより同定した（ハイブリダイゼーション条件は、50％ホルムアミドの代わりに20％ホルムアミドを用いたこと以外は、前記実施例５のエキソン１～６について記載したと同じであった）。ヒトPAF－A

H sAH 406－３ cDNAクローンの1kb Hind III断片（配列番号:7のヌクレオチド309～1322）をプローブとして用いた。加えて、部分的なサルのクローンを、配列番号:7のヌクレオチド285～303及び851～867に基づくプライマーを用いて、PCRによりマカク脳cDNAから単離した。マウス、イヌ、ラット、及びマカクのcDNAクローンのヌクレオチド及び決定されたアミノ酸配列を、それぞれ配列番号:21、22、23、及び24に記す。
それらのcDNAクローンとヒトcDNAクローンの決定されたアミノ酸配列を比較することにより、以下の表３に示す、アミノ酸の同一性のパーセンテージ値が得られた。

表３

	ヒト	イヌ	マウス
イヌ	80		
マウス	66	64	
サル	92	82	69
ラット	74	69	82

実施例７

ヒト血漿PAF－AH cDNAクローンsAH 406－３（実施例３）が、PAF－AH活性を有するタンパク質をコードしているか否かを確定するため、pRc/CMV発現構築体をCOS7細胞内で一過性に発現させた。DEAEデキストラン法によりトランスフェクトして３日後に、COS細胞培地をPAF－AH活性についてアッセイした。
60mm組織培養ディッシュ当たり300,000細胞の密度で、細胞を播種した。次の日、0.5mg/ml DEAEデキストラン、0.1mMクロロキン及び５～10μｇのプラスミドDNAを含有するDMEM中で細胞を２時間インキュベートした。次いで細胞を、10％DMSOを含むリン酸緩衝生理食塩水中で１分間処理し、培地で洗浄し、そしてジイソプロピルフルオロホスフェート（DFP）を用いて前処理して内在性ウシ血清のPAF－AHを不活性化しておいた子牛胎児血清10％を含有するDMEM中でインキュベートした。３日間インキュベートした後、トランスフェクトした細胞からの培地をPAF－AH活性について分析した。10mM EDTAまたは1mM DFPのいずれかの存在下または非存在下で分析を行い、スタッフォリニら（1987）、前出、により以前に血漿PAF－AHについて報告されたように、組換え酵素がカルシウム非依存性でありセリンエステラーゼ阻害剤DFPによって阻害されるか否かを判定した。陰性の対照には、インサートを欠くpRc/CMVかまたはsAH 406－３インサートを逆方向に有するpRc/CMVを用いてトランスフェクトした細胞が含まれていた。
トランスフェクト体上清におけるPAF－AH活性は以下の変更を加えて、スタッフォリニら（1990）、前出、の方法により測定した。要約すると、［アセチル－^{3}H］PAF（ニューイングランドヌクレアー（New England Nuclear）社、ボストン、マサチューセッツ州）からの^{3}H－アセテートの加水分解を測定することによりPAF－AH活性を測定した。水性の遊離^{3}H－アセテートは、オクタデシルシリカゲルカートリッジ（ベーカーリサーチプロダクツ（Baker Research Products）社、フィリプスバーグ（Phillipsburg）、ペンシルベニア州）を用いた逆相カラムクロマトグラフィーにより、ラベルされた基質から分離した。50μｌの反応液容量で0.1Mヘペス緩衝液、pH7.2中、10μｌのトランスフェクト体の上清を用いて、アッセイを行った。
標識：非標識（cold）のPAFの割合を1:5として、１反応当たり計50ピコモルの基質を用いた。37℃にて30分間反応掖をインキュベートし、40μｌの10M酢酸を添加することによって停止した。オクタデシルシリカゲルカートリッジを通して溶液を洗浄し、次いでカート

リッジは0.1M酢酸ナトリウムですすいだ。各試料からの水性溶出液を集めて、液体シンチレーションカウンターで１分間計測した。酵素活性は、１分当たりのカウント数で表した。

図２に示すように、sAH 406－３でトランスフェクトした細胞からの培地は、バックグラウンドよりも４倍のレベルでPAF－AH活性を有していた。この活性は、EDTAの存在によっては影響を受けなかったが、1mM DFPにより阻止された。これらの観察から、クローンsAH 406－３が、ヒト血漿酵素PAF－AHに一致した活性体をコードしていることが証明された。

実施例８

大腸菌発現ベクター内へのサブクローニングが容易に行える、クローンsAH 406－３からのヒト血漿PAF－AH cDNAのタンパク質をコードする断片を作製するために、PCRを用いた。サブクローン化したセグメントは、Ile_{42}（配列番号:8、ヒト血漿から精製された酵素のＮ－端末残基）をコードするコドンを有するヒト遺伝子の5'端で始まるものであった。構築体中には、本来の終止コドンまでの遺伝子の残部が含まれた。利用した5'センスPCRプライマーは、

配列番号:25

5'TATTCTAGAATTATGATACAAGTATTAATGGCTGCTGCAAG 3'であり、翻訳開始コドン（下線部）のみならずXba Iクローニング部位を含むものであった。利用した3'アンチセンスプライマーは、

配列番号:26

5'ATTGATATCCTAATTGTATTTCTCTATTCCTG 3'であって、sAH 406－３の終止コドンに及び、EcoR Vクローニング部位を含むものであった。PCR反応は、本質的に実施例３に記載のように実施した。その結果得られたPCR産物は、Xba IおよびEcoR Vを用いて消化し、そして、クローニング部位に近接した上流にTrpプロモーター（デボエ（deBoer）ら、PNAS、80巻、21～25頁、（1983））を含むpBR322ベクター内にサブクローン化した。大腸菌株XL－１ブルーをその発現構築体で形質転換し、次いで100μg/mlのカルベニシリン（carbenicillin）を含むＬブロス（broth）中で培養した。一晩培養した培養物からの形質転換体をペレットとし、50mMトリス塩酸、pH7.5、50mM NaCl、10mM CHAPS、1mM EDTA、100μg/mlリソゾーム、及び0.05トリプシン阻害単位（TIU）/mlのアプロチニン（Aprotinin）を含む溶菌用緩衝液中に再懸濁した。氷上で１時間インキュベートし、２分間超音波処理を施した後、実施例４に記載の方法により、PAF－AH活性について溶菌物をアッセイした。発現構築体（trp AHと名付けた）で形質転換された大腸菌は、PAF－AH活性を有する産物を作り出していた。実施例９の表６を参照されたい。

tac IIプロモーター（デボエ、前出）、サルモネラ菌（Salmonella typhimurium）からのアラビノース（ara）Ｂプロモーター（ホルビッツ（Horwitz）ら、Gene、14巻、309～319頁、（1981））、及びバクテリオファージT7プロモーターの、３種類のプロモーターを含む構築体もまた、大腸菌内でのヒトPAF－AH配列の発現を行うために利用した。Trpプロモーター（pUC trp AH）、tac IIプロモーター（pUC tac AH）、及びaraBプロモーター（pUC ara AH）からなる構築体をプラスミドpUC19（ニューイングランドバイオラブス（New England Biolabs）社、マサチューセッツ州）の中に組み立て、一方T7プロモーターからなる構築体（pET AH）はプラスミドpET15B（ノバゲン（Novagen）社、マディソン、ウィスコンシン州）の中に組み立てた。T7プロモーター領域のリボソーム結合部位に融合されたaraBプロモーターで構成されるハイブリッドプロモーター、pHAB/PHを含む構築体もまた、pET15Bの中に組み立てた。すべての大腸菌構築体が、20～50U/ml/OD_{600}の範囲内でPAF－AH活性を生産した。この活性は、総細胞タンパク質の１％以上が総組換え体タンパク質に対応することを示す。

組換えヒトPAF－AHは、酵母菌（Saccharomyces cerevisiae）内でも発現させた。rPAF－AH発現を行なうために酵母ADH2プロモーターを用い、7U/ml/OD_{600}を生産した（下記、表４）。

表４

構築体		菌株	酵素活性 (U/ml/OD)
pUC tac AH	*tac*	大腸菌 W3110	30
pUC trp AH	*trp*	大腸菌 W3110	40
pUC ara AH	*ara*B	大腸菌 W3110	20
pET AH	T7	大腸菌 BL21(DE3) (ノバゲン)	50
	*ara*B/T7	大腸菌 XL-1	34
pHAB/PH			
pYep ADH2 AH	ADH2	酵母 BJ2.28	7

アミノ末端側を伸長した大腸菌発現構築体のいくつかについてもPAF－AHの生産について検討を行った。天然型の血漿PAF－AHのＮ－末端は、アミノ酸配列決定（実施例２）によりIle_{42}として同定された。しかしながら、Ile_{42}に近接した上流の配列は、シグナル配列切断部位で見出されるアミノ酸には一致していない（すなわち、リジンが－１位に見出されないので、「－３－１ルール」には従っていない、フォン・ヘイネ（von Heijne）、Nuc.Acids Res.、14巻、4683～4690頁、（1986）を参照されたい）。おそらくは、より古典的なシグナル配列（M_1～A_{17}）が、細胞分泌系により認識され、引き続きタンパク質内部分解性切断（endoproteolytic cleavage）が行われる。開始のメチオニンで始まるPAF－AHに対する全コード配列（配列番号:7のヌクレオチド162～1487）を、大腸菌内で発現するために、trpプロモーターを用いて作った。表５に示すように、この構築体は活性なPAF－AHを産生したが、Ile_{42}で始まる元の構築体のレベルの約50分の１しか発現しなかった。Val_{18}で始まる他の発現構築体（配列番号:7のヌクレオチド213～1487）は、元の構築体の約３分の１のレベルで、活性なPAF－AHを生産した。これらの結果より、大腸菌において生産される組換えPAF－AHの活性に対して、アミノ末端部の延長は重要または必須ではないことが示唆される。

表５

構築体	PAF-AH 活性 (U/ml/OD_{600})	
	ﾗｲｾｰﾄ	培地
pUC trp AH	177.7	0.030
pUC trp AH Met_{1}	3.1	0.003
pUC trp AH Val_{18}	54.6	0.033

実施例９

大腸菌内で発現される組換えヒト血漿PAF－AH（Ile_{42}で始まる）を、種々の方法により単一のクマシーブルー染色SDS－PAGEバンドにまで精製し、そして本来のPAF－AH酵素が示す活性についてアッセイした。

A. 組換えPAF－AHの精製

利用した第１の精製手法は、本来のPAF－AHについて実施例１において記載した手法と類似している。以下の工程は、４℃にて実施した。PAF－AHを生産している大腸菌（発現構築体trp AHで形質転換したもの）50mlからの菌体を、実施例８に記載のように溶菌した。10,000gで20分間遠心することにより、残渣を除去した。緩衝液Ｄ（25mMトリス－塩酸、10mM CHAPS、0.5M NaCl、pH7.5）で平衡化したブルーセファロースファストフローカラム（2.5cm×4cm、20mlベッド容量）に、0.8ml/分でその上清を負荷した。カラムは、100mlの緩衝液Ｄで洗浄し、0.5M KSCNを含む緩衝液A 100mlで3.2ml/分にて溶出した。緩衝液Ｄで平衡化した1mlのCuキレーティングセファロースカラムに15mlの活性画分を負荷した。カラムを5mlの緩衝液Ｄで洗浄し、引き続き10mMイミダゾールを含む緩衝液Ｄを5ml用いて重力の速度で溶出した。PAF－AH活性を有する画分を、SDS－PAGEにより分析した。

精製の結果は表６に示すとおりであり、ここで単位は１時間当たりのPAF加水分解のμmol数に等しい。４℃にて得られる精製産物は、43kDaのマーカーの下に単一の強いバンドとして、直接その上下に染まっている拡散した染色部分とともに、SDS－PAGE上に現れた。組換え物質は、実施例１に記載の血漿からのPAF－AH調製物に比較して有意に、より純粋であり、より大きな比活性を呈する。

表６

試料	容量 (ml)	活性 (units/ ml)	総 活性 (units x 10^3)	タンパク 質濃度 (mg/mL)	比 活性 (units/ mg)	活性の % 回収率		精製倍率	
						工程	累積	工程	累積
溶菌物	4.5	989	4451	15.6	63	100	100	1	1
ブルー	15	64	960	0.07	914	22	22	14.4	14.4
Cu	1	2128	2128	0.55	3869	220	48	4.2	61

常温で同じ精製プロトコルを実施した場合、43kDaのマーカーの下のバンドに加えて、29kDaのマーカーの下のバンドの群が、アッセイしたゲルスライスのPAF－AH活性に呼応していた。これらの低分子量のバンドは、酵素活性を保持しているPAF－AHタンパク質分解断片であるかもしれない。

常温にて、異なる精製手法も実施した。PAF－AHを生産している大腸菌（発現構築体pUC trp AHで形質転換したもの）の菌体（100g）を200mlの溶菌用緩衝液（25mMトリス、20mM CHAPS、50mM NaCl、1mM EDTA、50μg/mlベンズアミド、pH7.5）中に再懸濁し、次いで15,000psiにてマイクロフルイダイザー（microfluidizer）を３回通すことによって溶菌した。14,300×ｇにて１時間遠心することにより、固形物を除去した。希釈用緩衝液（25mM MES（２－［Ｎ－モルフォリノ］エタンスルホン酸）、10mM CHAPS、1mM EDTA、pH4.9）中に上清を10倍希釈し、緩衝液Ｅ（25mM MES、10mM CHAPS、1mM EDTA、50mM NaCl、pH5.5）で平衡化したセファロースファストフローカラム（200ml）（陽イオン交換カラム）に25ml/分にて負荷した。１リットルの緩衝液Ｅでカラムを洗浄し、1M NaClを用いて溶出して、次いで溶出液を集めて、0.5mlの2Mトリスベースを用いてpH7.5に調整した50mlの画分とした。PAF－AH活性を含む画分をプールし、0.5M NaClに調整した。そのＳプールを、緩衝液Ｆ（25mMトリス、10mM CHAPS、0.5M NaCl、1mM EDTA、pH7.5）に平衡化したブルーセファロースファストフローカラム（2.5cm×4cm、20ml）に、1ml/分にて負荷した。カラムを100mlの緩衝液Ｆで洗浄し、4ml/分にて、3M NaClを含む緩衝液Ｆを100ml用いて溶出した。次いで、試料中のエンドトキシンレベルを低減せしめるため、ブルーセファロースファストフロークロマトグラフィー工程を繰り返した。PAF－AH活性を含む画分をプールし、緩衝液Ｇ（25mMトリス、pH7.5、0.5M NaCl、0.1%ツイーン80、1mM EDTA）に対して透析した。精製の結果を表７に示すが、ここで単位（unit）は、１時間当たりのPAF加水分解のμmol数に等しい。

表７

試料	容量 (ml)	活性 (units/ ml)	総 活性 (unit x 10^3)	タンパク 質濃度 (mg/mL)	比 活性 (units/ mg)	活性の 回収率 %		精製 倍率	
						工程	累積	工程	累積
溶菌物	200	5640	1128	57.46	98	100	100	1	1
S	111	5742	637	3.69	1557	57	56	16	16
ブルー	100	3944	394	0.84	4676	35	62	3	48

得られた精製産物は、43kDaのマーカーの下に単一の強いバンドとして、直接その上下に染まっている拡散した染色部分とともに、SDS－PAGE上に現れた。組換え物質は、実施例１に記載の血漿からのPAF－AH調製物に比較すると、有意に、より純粋であり、より大きな比活性を呈する。

本発明により企図されるさらに別の精製手法は、以下の菌の溶菌、清澄化（clarification）、及び第１のカラム工程を伴う。菌体を、溶菌用緩衝液（25mMトリス、pH7.5、150mM NaCl、１％ツイーン80、2mM EDTA）中に1:1に希釈する。冷却したマイクロフルイダイザー中に、15,000～20,000psiにて材料を３回通すことにより溶菌を実施し、その結果99%を越える細胞の破壊を引き起こさせる。

溶菌物は、希釈溶緩衝液（25mMトリス、pH8.5、1mM EDTA）中に1:20に希釈し、次いで、Ｑ－セファロースビッグビーズクロマトグラフィーメディア（ファルマシア社）を詰めて25mMトリス、pH8.5、1mM EDTA、0.015%ツイーン80で平衡化したカラムにアプライする。溶出液を25mM MES、pH5.5、1.2M硫酸アンモニウム、1mM EDTA中に1:10に希釈し、次いで同じ緩衝液に平衡化したブチルセファロースクロマトグラフィーメディア（ファルマシア社）にアプライする。25mM MES、pH5.5、0.1%ツイーン80、1mM EDTA中にPAF－AH活性が溶出される。

B.　組換えPAF－AHの活性

PAFアセチルヒドロラーゼの最も顕著な特性は、基質のsn－２位に短い残基を持つ基質に対する、著しい特異性である。この厳密な特異性により、PAFアセチルヒドロラーゼがPLA_2の他の型から区別される。かくして、組換えPAF－AHがsn－２位に長鎖脂肪酸を持つリン脂質を分解するか否かを判定するため、１－パルミトイル－２－アラキドノイル－sn－グリセロ－３－ホスフォコリン（アラキドノイルPC）の加水分解を分析した。その理由は、この物質が、よく特徴付けをなされたPLA_2の型に対する好ましい基質であるからである。本来のPAF－AHを用いた以前の研究から予測されるように、組換えPAF－AHとともにインキュベートした場合、このリン脂質は加水分解を受けなかった。追加の実験で、アラキドノイルPCを、０～125μＭの範囲の濃度で標準のPAF加水分解アッセイに入れ、それが組換えPAF－AHによるPAFの加水分解を阻害するかどうかを判定した。PAFの濃度より５倍大きい、最も高い濃度のPAF－AHにおいてさえ、PAF加水分解は何等阻害されなかった。かくのごとく、組換えPAF－AHは、本来の酵素と同じ基質特異性を呈し、長鎖の基質は認識しないものである。さらに、組換えPAF－AH酵素は、sn－２脂肪酸の酸化的切断がなされていた、酸化型リン脂質（グロタロイルPC）を速やかに分解した。本来の血漿PAF－AHは、カルシウム非依存性、及びスルフヒドリル基を修飾する化合物またはジスルフィイドを開裂せしめる化合物に対する耐性を含めた、他のホスフォリパーゼとPAF－AHとの区別がなされる種々の他の特性を有する。

本来の及び組換え血漿PAF－AH酵素のいずれも、DFPに対して感受性を有し、このことによりそれらの活性部位の一部がセリンを含んでなることが示唆される。本来の血漿PAFアセチルヒドロラーゼの希有の特徴は、それが循環しているリポタンパク質と強固に会合しており、そしてその触媒活性がリポタンパク質との環境により影響を受けることである。本発明の組換えPAF－AHをヒト血漿（内在性酵素活性を除くためにDFPで前処理したもの）とともにインキュベートすると、本来の活性体と同様に低密度及び高密度リポタンパク質と会合した。低密度リポタンパク質の修飾は、粥腫において観察されるコレステロールの沈着に必須であること、及び脂質の酸化がこの過程における初発因子であることの実質的な証拠があるので、この結果は重要である。PAF－AHはin vitroで酸化条件下に低密度リポタンパク質を修飾から保護し、そしてそのような役割をin vivoで果たしているかもしれない。したがって、炎症を消散させるためのみならず、アテローム性動脈硬化プラーク（atherosclerotic plaque）におけるリポタンパク質の酸化の抑制にも、PAF－AHの投与が指示される。

これらの結果はすべて、cDNAクローンsAH 406－３がヒト血漿PAFアセチルヒドロラーゼの活性を有するタンパク質をコードしていることを確証するものである。

実施例10

他の種々の組換えPAF－AH産物を、大腸菌内で発現させた。それらの産物には、単一のアミノ酸変異を有するPAF－AH誘導体及びPAF－AH断片が含まれる。

A. PAF－AHアミノ酸置換産物

PAF－AHは、リン脂質であるPAFを加水分解するので、リパーゼである。PAF－AHと他の特徴付けがなされたリパーゼの間に明らかな相対的類似性は存在しない一方で、構造的に特徴付けがなされたリパーゼの比較において見出される保存された残基がある。１つのセリンが、活性部位のメンバーとして同定されている。

そのセリンはアスパラギン酸残基及びヒスチジン残基とともに、そのリパーゼの活性部位を呈する触媒活性３残基群を形成する。３つの残基は、一次タンパク質配列においては近接していないが、構造的研究により、三次元空間においてはその３つの残基が近接していることが証明されている。哺乳動物リパーゼの構造の比較によれば、Asp残基が通常、活性部位のセリンに対して24アミノ酸だけＣ－末端側にあることが示唆されている。加えて、ヒスチジンは、通常、活性部位のセリンに対し、109～111アミノ酸だけＣ－末端側にある。

部位特異的突然変異及びPCRによって、ヒトPAF－AHコード配列の個々のコドンを、アラニン残基をコードするように変えて、大腸菌内で発現させた。以下の表８に示すように、ここで例えば「S108A」の略語は108位のセリン残基がアラニンに変えられていることを示すのであるが、Ser_{273}、Asp_{296}、またはHis_{351}の点突然変異により完全にPAF－AH活性が損なわれる。活性部位残基間の距離は、PAF－AH（SerからAspは23アミノ酸、SerからHisは78アミノ酸）と他のリパーゼについては類似している。これらの実験により、Ser_{273}、Asp_{296}、及びHis_{351}が、活性に対して重要な残基であり、それゆえに触媒活性３残基群の残基の候補となりそうそうであることが立証される。システインは、ジスルフィド結合を形成することができるので、タンパク質の機能的な完全性にしばしば重要である。血漿PAF－AHは５つのシステインを含んでいる。５つのうちのいずれかが酵素活性に重要であるかを判定するために、各システインを個々にセリンに突然変異せしめ、その結果得られた突然変異体を大腸菌内で発現させた。以下の表８に示すように、Cys_{229}またはCys_{291}をセリンに変換することにより、PAF－AH活性はすべては喪失されないが、有意に喪失されるという結果となった。よって、これらのシステインは、完全なPAF－AH活性にとって必要であると思われる。他の点突然変異は、PAF－AH触媒活性に殆ど、またはまったく効果を有しなかった。表８において、「＋＋＋＋」は、約40～60U/ml/OD_{600}の、野生型PAF－AH活性を表し、「＋＋＋」は、約20～40U/ml/OD_{600}活性を表し、「＋＋」は、約10～20U/ml/OD_{600}活性を表し、「＋」は、１～10U/ml/OD_{600}活性を表し、そして「－」は＜1U/ml/OD_{600}活性を示す。

表８

突然変異	PAF-AH 活性
野生型	＋＋＋＋
S108A	＋＋＋＋
S273A	－
D296A	－
D338A	＋＋＋＋
H351A	－
H395A、H399A	＋＋＋＋
C67S	＋＋＋
C229S	＋
C291S	＋
C334S	＋＋＋＋
C407S	＋＋＋

B. PAF－AH断片産物

種々の時間にわたりエキソヌクレアーゼIIIを用いてPAF－AHコード配列の3'端を消化し、その後、すべての３つの読み取り枠における終止コドンをコードするプラスミドDNAに、短くしたコード配列を連結することにより、Ｃ－末端側欠失体を調製した。10の異なる欠失体構築体を、DNA配列分析、タンパク質発現、及びPAF－AH活性により特徴付けした。21～23のＣ－末端アミノ酸を除去すると、触媒活性が大幅に低減し、52残基を除去すると完全に活性が損なわれた。図３を参照されたい。

PAF－AHのアミノ末端領域でも同様の欠失を行った。Ｎ－末端側に大腸菌チオレドキシンを付加したPAF－AHとの融合体を調製して、一貫して高レベルにPAF－AH活性体を発現させることを容易ならしめた（ラ　バリー（LaVallie）ら、Bio/technology、11巻、187～193頁、（1993））。自然にプロセッシングを受けたＮ－末端（Ile_{42}）から19アミノ酸を除去すると、融合タンパク質における酵素活性は完全に損なわれた。図３を参照されたい。

実施例11

ヒト組織におけるヒト血漿PAF－AH mRNAの発現パターンの予備分析を、ノザンブロットハイブリダイゼーションによって行った。

RNAは、RNAスタット（Stat）60（テルーテスト（Tel－Test）＂Ｂ＂、フレンズウッド（Friendswood）、テキサス州）を用いて、ヒト大脳皮質、心臓、腎臓、胎盤、胸腺及び扁桃腺から調製した。加えて、ホルボールエステルである、ホルボールミリスチルアセテート（PMA）を用いてマクロファージ様表現型に分化誘導した、ヒト造血前駆体様細胞系、THP－１（ATCC　TIB 202）からRNAを調製した。組織のRNAならびに、誘導前及び誘導後１～３日の、前骨髄球細胞THP－１細胞系から調製したRNAは、1.2%アガロースホルムアルデ

ヒドゲルで電気泳動を行い、引き続き、ニトロセルロース膜に転写した。全長のヒト血漿PAF－AH cDNAであるsAH 406－３は、ランダムプライミングによりラベリングを行い、ライブラリースクリーニングについて実施例３に記載したと同様の条件下で膜にハイブリダイズさせた。初期の結果では胸腺、扁桃腺、及びより低い度合いで胎盤のRNA中の1.8kbのバンドに、PAF－AHプローブがハイブリダイズすることが示唆された。

ヒト血液から単離した単球におけるPAF－AH RNAの発現、及び培養中にそれらがマクロファージへと自発的に分化する間のPAF－AH RNAの発現も調べた。新しい単球では殆ど、またはまったくRNAが検出されなかったが、マクロファージへと分化する間に発現が誘導されそして維持された。分化している細胞の培養培地においてPAF－AH活性の相伴う（concomitant）蓄積があった。ヒト血漿PAF－AH転写物の発現は、１日目にTHP－１細胞RNAでも観察されたが、誘導後３日目には観察されなかった。THP－１細胞は、基底状態ではPAF－AHに対するmRNAを発現していなかった。

実施例12

in situハイブリダイゼーションによって、ヒト及びマウス組織中のPAF－AHの発現を調べた。

ヒトの組織は、National Disease Research Interchange及びthe Cooperative Human Tissue Networkから得た。正常マウス脳及び脊髄、ならびにEAEステージ３マウスの脊髄は、S/JLJマウスから採取した。正常S/JLJマウスの胎児は、受胎後11～18日目に採取した。

組織切片を、少量のOCT化合物（マイルス社（Miles,Inc.,）、エルクハート（Elkhart）、インディアナ州）とともに、ティッシュ・テク（Tissue Tek）IIクリオモールド（cryomold）（マイルスラボラトリーズ社（Miles Laboratories,Inc.,）、ナパービル（Naperville）、イリノイ州）内に置いた。それらはクリオモールド内の中心に置き、クリオモールドにOCT化合物を満たし、その後、２－メチルブタン（$C_2H_5CH(CH_3)_2$、アルドリッチケミカルカンパニー社（AldrichChemical Company,Inc.,）、ミルウォーキー、ウィスコンシン州）入りの容器に入れて、そして容器は液体チッ素中に入れた。クリオモールド内の組織及びOCT化合物が一旦凍結すると、切断するまで－80℃にてそのブロックを保存しておいた。組織ブロックを６μmの厚さに切断し、ベクタボンド（Vectabond）（ベクターラボラトリーズ社（Vector Laboratories,Inc.,）、バーミンガム、カリフォルニア州）を被覆したスライドに固着させ、－70℃にて保存し、そしてそれらを暖めて且つ凝結（condensation）を除去するためにおよそ５分間50℃に置いて、その後、４℃にて20分間４％パラホルムアルデヒド中で固定して、70％、95％、100％エタノールで各等級につき１分間づつ４℃にて脱水して、次いで室温で30分間風乾させた。70％ホルムアミド/2×SSC中で70℃にて２分間切片を変性させ、２×SSCで２度すすぎ、脱水した後、30分間風乾した。in vitro RNA転写^{35}S－UTP（アマーシャム社）取り込みによって、PAF－AH遺伝子の内部の1kbのHind III断片（配列番号:7のヌクレオチド308～1323）由来のDNAから作り出された、放射能で標識した単鎖のmRNAを用いて、組織をin situでハイブリダイズさせた。プローブは250～500bpの種々に異なる長さのものを用いた。ハイブリダイゼーションは、50℃にて一晩（12～16時間）、^{35}S－標識リボプローブ（６×10^5cpm/切片）、tRNA（0.5μg/切片）及びジエチルピロカーボネート（depc）処理した水を、ハイブリダイゼーション様緩衝液に加え、50％ホルムアミド、0.3M NaCl、20mMトリス、pH7.5、10％デキストラン硫酸、１×デンハーツ（Denhardt's）溶液、100mMジチオスレトール（DTT）及び5mM EDTAという最終濃度となるようにした。ハイブリダイゼーションの後、４×SSC/10mM DTTで室温にて１時間、その後、50％ホルムアミド/1×SSC/10mM DTTで60℃にて40分間、２×SSCで室温にて30分、さらに0.1×SSCで室温にて30分、切片を洗浄した。切片を脱水し、２時間風乾してコダックNTB2写真用乳濁液（photographic emulsion）で被覆し、２時間風乾して現像（完全な暗所で４℃にて保管した後）して、ヘマトキシリン／エオシンで対比染色した。

A. 脳

小脳。マウス及びヒトのいずれの脳においても、小脳のプルキニエ細胞層内、ならびに歯状核（小脳内の４つの深核（deep nuclei）の１つ）内の個々の神経細胞体上に、強いシ

グナルが見られた。加えて、顆粒球内の個々の細胞及び灰白質の分子層内にシグナルが見られた。
海馬。ヒト海馬切片では、神経細胞体らしき、切片全体にわたる個々の細胞が強いシグナルを示した。
脳幹。ヒト及びマウスいずれもの脳幹切片上には、灰白質内の個々の細胞に強いシグナルが認められた。
皮質。（大）脳、後頭、及び側頭皮質から取ったヒト皮質切片上、ならびにマウス全脳切片上において、皮質全体の個々の細胞が、強いシグナルを示した。
皮質の異なる層における発現パターンに、差異はないように思われた。これらのin situハイブリダイゼーションの結果は、ノザンブロッティングによって得られる（大）脳皮質に対する結果とは異なっている。ノザンブロッティングの感度に比べてin situハイブリダイゼーションの感度の方がより高いことからこの差異が生じるようである。
脳下垂体。ヒト組織切片の下垂体前葉内の個々の分散細胞上に、幾分弱いシグナルが見られた。

B. ヒト結腸

健常及びクローン病の結腸のいずれも、切片の粘膜内に存在するリンパ凝集体（lymphatic aggregation）内にシグナルを呈し、シグナルのレベルはクローン病患者からの切片の方がわずかに高かった。クローン病患者の結腸では、固有層にも強いシグナルが見られた。同様に、クローン病患者の虫垂切片において高レベルのシグナルが観察され、一方健常人の虫垂ではより低いものの検出可能なシグナルを呈した。潰瘍性大腸炎患者からの切片は、リンパ凝集体にも、固有層にも明らかなシグナルを示さなかった。

C. ヒト扁桃腺及び胸腺

扁桃腺の胚中心の中及び胸腺の中の個々の細胞の分散された群に、強いシグナルか見られた。

D. ヒトリンパ腺

健常な提供者から取ったリンパ腺切片上には強いシグナルが観察されたが、一方敗血病性ショックの提供者からのリンパ節の切片においては、幾分弱いシグナルが観察された。

E. ヒト小腸

健常人及びクローン病患者の小腸のいずれも、パイエル集腺及び固有層における切片で弱いシグナルを呈し、クローン病患者の組織でのシグナルの方がわずかに高かった。

F. ヒト脾臓及び肺

脾臓（健常及び脾臓膿瘍切片）または肺（健常及び気腫切片）組織のいずれにおいても、シグナルは観察されなかった。

G. マウス脊髄

正常及びEAEステージ３の脊髄のいずれにおいても、脊髄の灰白質内に強いシグナルがあり、その発現はEAEステージ３の脊髄でわずかに高かった。EAEステージ３の脊髄において、おそらくは浸潤マクロファージ及び／または他の白血球であろうが、白質内の細胞及び血管周囲のカフス（cuffs）で、シグナルを示し、これは正常の脊髄にはなかった。

F. マウス胎児

11日目のマウス胎児において、第４脳室内の中枢神経系でシグナルが明瞭であり、脳及び脳幹へと達する間の胎児の経時的変化にわたって、そのシグナルは一定のままであった。胎児が成熟するにつれ、脊髄内の中枢神経系（12日目）、初期皮質及びガッセル半月神経節（14日目）、及び下垂体（16日目）でシグナルが明瞭となった。脊髄を残す神経の末梢神経系（14または15日目の初め）で、シグナルが観察され、さらに17日目に、胎児の頬鬚（whiskers）の周囲に強いシグナルが出現した。14日目には肝臓及び肺に、腸（15日目の初め）に、ならびに口／喉の後部（posterior portion）（16日目の初め）においても、発現が見られた。
18日目までには、発現パターンは皮質、後脳（小脳及び脳幹）、脊髄の腰椎領域を残す神経、口／喉の後部、肝臓、腎臓へと分化していき、肺及び腸においてかなり弱いシグナルが見られた。

G. 要約

扁桃腺、胸腺、リンパ腺、パイエル集腺、虫垂、及び結腸リンパ凝集体におけるPAF－AH mRNAの発現は、これらの組織に食細胞性及び抗原作用（antigen－processing）細胞として役立つ組織マクロファージが存在するので、可能性のある優勢な、PAF－AHのin vivoでの源はマクロファージであるという結論に一致する。炎症のある組織におけるPAF－AHの発現は、単球由来のマクロファージの役割が、炎症を消散させることであるという仮説に一致するであろう。PAF－AHはPAF及び前炎症性リン脂質を不活性化し、かくしてこれらのメディエーターにより開始せしめられる結果生じる炎症カスケードをダウンレギュレートすることが期待されるであろう。

PAFは、脳組織内全体で検出されており、培養しているラット脳顆粒球細胞によって分泌されている。in vitro及びin vivoでの実験により、PAFは神経組織内の特異的な受容体に結合し、そしてカルシウムの動員、転写活性化遺伝子のアップレギュレーション、及び神経前駆細胞系であるPC12の分化などの、機能的変化及び表現型の変化を誘導することが証明されている。これらの観察により、脳内でのPAFについての生理学的役割が示唆され、そしてこれに一致して、海馬の組織切片培養物とPAF誘導体及びPAF拮抗剤を用いた最近の実験により、海馬の長期協力作用（long term potentiation）における重要な逆行性（retrograde）メッセンジャーとしてPAFが関わっていることが示されている。それ故、炎症におけるその病理学的作用に加えて、PAFは通例の神経シグナルプロセスに関与しているようである。脳内でのPAF－AHの細胞外の発現は、PAFが媒介するシグナル発生の持続時間及び強さを制御するのに役立つかもしれない。

実施例13

組換えヒト血漿PAF－AHに特異的なモノクローナル抗体を、抗原として大腸菌が生産したPAF－AHを用いて作った。

マウス＃1342に、０日、19日、及び40日目に組換えPAF－AHを注射した。融合前の追加抗原刺激のため、抗原を含むPBSをマウスに注射し、４日後にマウスを屠殺してその脾臓を無菌的に取り出し、無血清のRPMI、10ml中に入れた。2mM L－グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、100単位/mlペニシリン、及び100μg/mlストレプトマイシン（RPMI）（ギブコ（Gibco）社、カナダ）を補った、無血清のPRMI 1640の中に沈めた２枚の顕微鏡スライドガラスの氷結させた端部間でその脾臓を粉砕することにより、単一細胞懸濁液を形成させた。細胞懸濁液は、無菌の70－メッシュ ナイテックス（Nitex）セルストレーナー（ベクトンディッキンソン（Becton Dickinson）社、パーシパニー（Parsippany）、ニュージャージー州）を通して濾過し、200gで５分間遠心し、そのペレットを20mlの無血清RPMI中に再懸濁することにより２回の洗浄を行った。投薬を受けたことがない３匹のBalb/cマウスから取った胸腺細胞を、同様に調達した。11％ウシ胎児血清（FBS）（ハイクローンラボラトリーズ社（Hyclone Laboratories,Inc.,）、ロガン（Logan）、ユタ州）を含むRPMI中で、融合前の３日間対数増殖期に保ったNS－１ミエローマ細胞を、200gで５分間遠心して、ペレットを前の段落に記載したように２回洗浄した。

1×10^8の脾臓細胞を、2.0×10^7のNS－１細胞と合わせ、遠心して、上清は吸引した。細胞ペレットを、チューブを軽く叩くことによって動かし（dislodged）、37℃のPEG 1500（75mMヘペス、pH8.0中、50％）（ベーリンガーマンハイム（BoehringerMannheim）社）1mlを、１分間にわたって撹拌しながら添加し、引き続き、７分にわたって7mlの無血清RPMIを添加した。追加に8mlのRPMIを添加し、細胞を200gで10分間遠心した。上清を廃棄した後、ペレットを、15％FBS、100μMヒポキサンチンナトリウム、0.4μMアミノプテリン、16μMチミジン（HAT）（ギブコ社）、25単位/ml IL－６（ベーリンガーマンハイム社）、及び1.5×10^6胸腺細胞/mlを含むRPMI 200ml中に再懸濁して、10枚のコーニング（Corning）平底96ウェル組織培養プレート（コーニング社、コーニング、ニューヨーク州）の中に播種した。融合後２、４及び６日に、100μｌの培地を融合プレートのウェルから除去し、新鮮な培地に置き換えた。８日目に、ELISAによって融合をスクリーニングし、組換えPAF－AHに結合するマウスIgGの存在について調べた。イムロン（Immulon）４プレート（ダイナテック（Dynatech）社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）を、25mMトリス

、pH7.5中に希釈した組換えPAF－AH、100ng/ウェルで、37℃にて２時間被覆した。被覆用溶液を吸引し、200μl/ウェルのブロッキング溶液（CMF－PBS中に希釈した0.5%フィッシュスキンゼラチン（シグマ（Sigma）社））を添加して、37℃にて30分間インキュベートした。0.05%ツイーン20を含むPBS（PBST）でプレートを３回洗浄し、50μｌの培養上清を加えた。37℃にて30分間インキュベートし、前記のように洗浄した後、PBSTで1:3500に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ複合ヤギ抗マウスIgG（fc）（ジャクソンイムノリサーチ（Jackson ImmunoResearch）社、ウェストグローブ（West Grove）、ペンシルベニア州）50μｌを添加した。前記のようにプレートをインキュベートし、PBSTで４回洗浄して、100mMクエン酸、pH4.5中、1mg/ml o－フェニレンジアミン（シグマ社）及び0.1μl/mlの30%H_2O_2で構成される基質100μＬを添加した。

50μｌの15%H_2SO_4を添加して、５分で呈色反応を停止した。プレートリーダー（ダイナテック社）でA_{490}を読み取った。

選択したフュージョンウェル（fusion well）を、96ウェルプレートの中に希釈し、５日後にコロニー数／ウェルを目視的に評価することにより、２回のクローン化を行った。クローン化したハイブリドーマは、90D1E、90E3A、90E6C、90G11D（ATCC HB 11724）、及び90F2D（ATCC HB 11725）であった。

ハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体は、イソストリップ（Isostrip）システム（ベーリンガーマンハイム社、インディアナポリス、インディアナ州）を用いてイソタイプを判別した（isotyped）。その結果、融合90からのハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体がすべてIgG_1であることが示された。

実施例14

ラット足の浮腫モデル（ヘンリークス（Henriques）ら、Br.J.Pharmacol.、106巻、579～582頁、（1992））を用いて、急性炎症に対する本発明の組換えPAF－AHのin vivoでの治療効果を評価するために、実験研究を行った。これらの研究の結果、PAF－AHがPAFで誘発した浮腫を阻止することが立証された。２つの市販されているPAFアンタゴニストと、PAF－AHの有効性とを比較するために、平行して実験を行った。

A. PAF－AHの調製

PAF－AH発現のベクターput trp AHで形質転換した大腸菌を、マイクロフルイダイザー内で溶菌し、固形物は遠心により除いて、細胞上清をＳ－セファロースカラム（ファルマシア社）に負荷した。50mM NaCl、10mM CHAPS、25mM MES及び1mM EDTA、pH5.5からなる緩衝液でカラムを良く洗浄した。緩衝液のNaCl濃度を1Mにまで上げることによってPAF－AHを溶出した。その後、ブルーセファロースカラム（ファルマシア社）を用いたアフィニティークロマトグラフィーを、追加の精製工程として用いた。ブルーセファロースカラムにPAF－AH調製物を負荷する前に試料を1:2に希釈して、0.5MにまでNaCl濃度を下げ、さらにpHを7.5に調製した。0.5M NaCl、25mMトリス、10mM CHAPS及び1mM EDTA、pH7.5からなる緩衝液でブルーセファロースカラムを良く洗浄した後、NaCl濃度を3.0Mにまで上げることでPAF－AHを溶出した。

この方法で単離したPAF－AHの純度は、通常、SDS－PAGEにより評価すると95%であり、活性は5000～10,000U/mlの範囲内にあった。各PAF－AH調製物に対してなされた追加のクオリティーコントロールとして、エンドトキシンレベル及び新鮮に獲得したラット赤血球への溶血活性の測定が挙げられた。25mMトリス、10mM CHAPS、0.5M NaCl、pH7.5を含む緩衝液が、酵素の保管用媒体としてだけでなく、投与のための担体として機能した。実験に用いた投与量は、実験直前に行った酵素活性分析に基づくものであった。

B. 浮腫の誘発

180～200グラム重量の、６～８週令の雌性ロングエバンス（Long Evans）ラット（チャールスリバー（Charles River）、ウィルミントン（Wilmington）、マサチューセッツ州）を、すべての実験に用いた。実験操作の前に、動物１匹当たり、１回の投与当たり、およそ2.5mgのケタセット（Ketaset）（フォートドッジラボラトリーズ（Fort Dodge Laboratories）社、フォートドッジ、アイオワ州）、1.6mgのロンパン（Rompun）（マイルス社、シャウニーミッション（Schawnee Mission）、カンサス州）、0.2mgのエースプロマジン

（Ace Promazine）（アベコ（Aveco）社、フォートドッジ、アイオワ州）にて、麻酔用ケタセット、ロンパン及びエースプロマジンの混合物の皮下投与を用いて動物に麻酔をかけた。PAFまたはザイモサンのいずれかを以下のように投与することにより、足に浮腫を誘発させた。PAF（シグマ＃Ｐ－1402）は、クロロホルム／メタノール（9:1）中で－20℃にて保管している19.1mMの貯蔵溶液から、各実験用に新たに調製した。N_2下で乾燥して必要とされる容量にまで減じ、150mM NaCl、10mMトリス、pH7.5、及び0.25％BSAを含有する緩衝液で1:1000に希釈し、次いで５分間超音波処理した。

動物に、後足の肉趾間へ、PAF（最終投与量0.96ナノモル）50μｌを皮下投与し、１時間後、実験によっては２時間後にも、浮腫を評価した。ザイモサンＡ（シグマ＃Ａ－8800）は、PBS中、10mg/mlの懸濁液として、各実験のために新たに調製した。動物に、後足の肉趾間へ、ザイモサン（最終投与量500μｇ）50μｌを皮下投与し、２時間後に浮腫を評価した。

PAFまたはザイモサン投与直前に、及びPAFまたはザイモサン刺激後の示された時点で、足の容量を測定することにより、浮腫を定量化した。浮腫は、ミリリットルでの足の容量の増大として表した。水に漬けた足で置き換わる水の容量を計る、プレチスモメーター（UGOバシレ（Basile）、モデル＃7150）を用いて、麻酔をかけた動物の容量置換測定を行った。ある時点と次の時点とが、足を漬けることで比較できることを保証するために、後足の毛の生え際と踵の境界に消えないインクで印を付けた。この技法を用いて同じ足を繰り返し測定すると、精度が５％以内であることが示された。

C. PAF－AH投与経路及び投与量

PAF－AHは、足の肉趾間へ局所的に、または尾静脈内への静脈内（IV）注射により全身に、注射した。局所投与の場合、右後足の肉趾間皮下に100μｌのPAF－AH（4000～6000U/ml）をラットに投与した。左足は、100μｌの担体（緩衝化した塩溶液）を投与することにより、対照として用いた。PAF－AHの全身投与のために、尾静脈内より、300μｌ担体中に示したユニット数のPAF－AHを含むものをラットに静脈内投与した。対照群は、尾静脈内に静脈内注射で適切な容量の担体を与えた。

D. PAF－AHの局所投与

ラット（Ｎ＝４）に、右足肉趾間へ100μｌのPAF－AH（4000～6000U/ml）を皮下注射した。左足には100μｌの担体（緩衝化した塩溶液）を注射した。他の４匹のラットには担体のみを注射した。すべてのラットに、直ちに足への皮下注射を介してPAFで刺激し、そして刺激後１時間で足の容量を評価した。図４において、各処置群について足の容量の増大の平均値（ml）±SEMとして浮腫が表され、PAFで誘発した足の浮腫が、PAF－AHの局所投与により阻止されることを示す。PAF刺激の前にPAF－AHの局所処置を受けた群は、対照の注射を行った群に比べて炎症が低減することが示された。担体で処置した対照群で足の容量の増大が0.63ml±0.14（SEM）であるのに比して、PAF－AH群では0.08ml±0.08（SEM）認められた。

担体のみを足に注射した動物では足の容量の増大を呈しなかったので、足の容量の増大は、PAFの注射の直接的な結果である。

E. PAF－AHの静脈内投与

ラット（１群当たりＮ＝４）に、PAF刺激の前15分に、PAF－AH（300μｌ担体中、200U）または担体単独を用いて静脈内へ前処理を行った。PAF刺激の後１時間及び２時間後に、浮腫を評価した。図５において、各処置群について容量の増大の平均値（ml）±SEMとして浮腫が表され、PAFで誘発した足の浮腫が、刺激後１及び２時間で、PAF－AHの静脈内投与により阻止されることを示す。静脈内経路によって2000UのPAF－AHを与えられた群は、２時間の経時変化にわたり炎症が低減することが示された。PAF－AH処置群では容量の増大の平均値は0.10ml±0.08（SEM）であったが、これに対し、担体で処置した対照群では0.56ml±0.11（SEM）であった。

F. PAFまたはザイモサンで誘発された浮腫におけるPAF－AHによる保護の比較

ラット（１群当たりＮ＝４）に、PAF－AH（300μｌ担体中、2000U）または担体単独を用いて静脈内へ前処置を行った。前処置後15分に、前記群にPAFまたはザイモサンＡを投与

し、それぞれ１時間及び２時間後に、足の容量を評価した。図６に示すように、ここで各処置群について容量の増大の平均値（ml）±SEMとして浮腫が表され、PAF－AH（2000U）の全身投与は、PAFで誘発した足の浮腫を低減させるのに有効であったが、ザイモサンで誘発した浮腫は阻止しえなかった。0.08±0.02の容量の増大の平均値がPAF－AH処置群において認められ、これに対し、対照群については0.49±0.03であった。

G. PAF－AHによる保護の有効投与量の検討

２つの別個の実験において、ラットの群（１群当たりＮ＝３～４）に、PAF刺激の前15分に、300μｌの容量で、PAF－AHの連続的な希釈液または担体の対照を用いて静脈内前処置を行った。両足ともにPAFで刺激を行い（前記の通り）、１時間後に浮腫を評価した。図７において、各処置群について容量の増大の平均値（ml）±SEMとして浮腫が表され、PAF－AHの投与量を増大させて注射するにつれて、ラットにおけるPAFで誘発した浮腫からの保護は増大することが示される。実験において、静脈内経路により与えられたPAF－AHのID_{50}は、ラット１匹当たり40Uと80Uとの間であることが見出された。

H. 投与後の時間の機能としてのPAF－AHのin vivoでの有効性

２つの別個の実験において、２群のラット（１群当たりＮ＝３～４）に、PAF－AH（300μｌ担体中、2000U）または担体単独を用いて静脈内へ前処置を行った。投与後に、PAF－AH投与の後15分から47時間の範囲内の時点で、ラットの群にPAFを投与した。PAF刺激の１時間後に、浮腫を評価した。図８に示すように、ここで各処置群について容量の増大の平均値（ml）±SEMとして浮腫が表され、2000UのPAF－AHを投与すると、少なくとも24時間、PAFで誘発した浮腫からラットが保護される。

I. PAF－AHの薬物動態学

４匹のラットに、300μｌの容量で静脈内注射により、2000UのPAF－AHを投与した。種々の時点で血漿を集め、４℃にて保存し、二重mAb捕獲アッセイ（double mAb capture assay）を用いたELISAによってPAF－AHの血漿中の濃度を測定した。

すなわち、モノクロナール抗体90G11D（実施例13）を50mM炭酸緩衝液、pH9.6で100ng/mlに希釈し、そして４℃にて一晩、イムロン4ELISAプレートに固定化した。0.05％ツイーン20を含有するPBSで良く洗浄した後、0.5％フィッシュスキンゼラチン（シグマ社）を含むPBSで、室温にて１時間、プレートをブロッキングした。洗浄したELISAプレートに、15mM CHAPSを含むPBSで希釈した血清試料をディプリケートで添加し、室温にて１時間インキュベートした。洗浄後、モノクローナル抗体90F2D（実施例13）のビオチン複合体をPBSで５μg/mlの濃度に希釈してウェルに加え、次いで室温にて１時間インキュベートした。洗浄の後、エクストラアビジン（ExtraAvidin）（シグマ社）の1:1000希釈液を50μｌウェルに加え、室温にて１時間インキュベートした。洗浄後、基質としてOPDを用いてウェルを現像し、定量した。その後、標準曲線から酵素活性を計算した。図９で、データのポイントは平均値±SEMを表すが、180～200グラムのラットについて５～6mlの血漿に基づいて予測された濃度、平均値＝374U/ml±58.2に、血漿の酵素レベルが１時間で到達したことが示される。１時間を越えると、血漿中のレベルは徐々に減衰し、24時間で血漿中の濃度の平均値は19.3U/ml±3.4に達するが、それでもなお、酵素的アッセイによりおよそ4U/mlであることが見出されている内在性のラットPAF－AHレベルよりもかなり高い。

J. PAFアンタゴニストに対するPAF－AHの有効性

以下の３つの潜在力を有する抗炎症剤、腹腔内（IP）投与（200μｌ EtOH中、2mg）されるPAFアンタゴニストCV3988（バイオモル（Biomol）＃Ｌ－103）、腹腔内投与（200μｌ EtOH中、2mg）されるPAFアンタゴニストのアルプラゾラム（Alprazolam）（シグマ＃Ａ－8800）、または静脈内投与されるPAF－AH（2000U）、のうちの１つを用いて、ラットの群（１群当たりＮ＝４）を前処置した。対照のラットには、300μｌ容量の担体を静脈内注射した。PAFアンタゴニストはエタノールに溶解されているので、腹腔内に投与した。CV3988またはアルプラゾラムを注射したラットは、PAFアンタゴニストが循環系の中に入ることを許容するよう、PAFアンタゴニストの投与後30分にPAF刺激を施し、一方PAF－AH及び担体で処置したラットは、酵素の投与後15分で刺激を施した。確立されたPAFアンタゴニストのCV3988及びアルプラゾラムにより成し遂げられるよりはるかに、PAFで誘発した浮腫

が、PAF－AHを注射したラットで低減されることが示された。図10において、各処置群について容量の増大の平均値（ml）±SEMとして浮腫が表されている。
要約すると、PAF－AHは、in vivoでPAFにより媒介される浮腫を阻止するうえで有効である。PAF－AHの投与は、局所投与または静脈内注射による全身投与とすることができる。投与量の研究で、160～2000U/ラットの範囲の静脈内注射により、PAFが介する炎症を劇的に低減させることが見出され、また、ID_{50}の量は40～80U/ラットの範囲にあるようである。180～200グラムのラットに対する血漿容量に基づく計算により、25～40U/mlの範囲の血漿中の濃度で、PAFで誘発した浮腫が阻止されるはずであると予測される。この予測は、予備的な薬物動態学研究により支持される。2000UのPAF－AH投与量で、少なくとも24時間の間、PAFが媒介する浮腫の阻止に有効であることが見出された。PAF－AHの投与後24時間で、酵素の血漿中の濃度はおよそ25U/mlであることが見出された。PAF－AHは、試験を行った２つの既知のPAFアンタゴニストよりもさらに有効に、PAFで誘発した浮腫を阻止することが見出された。
まとめると、これらの結果により、PAFで誘発した炎症をPAF－AHが有効に阻止し、PAFが第１のメディエーターである疾患においてPAF－AHは治療的価値を有するかもしれないことが立証される。

実施例15

本発明の組換えPAF－AHを、第２のin vivoモデルであるPAFで誘発した胸膜炎において試験を行った。PAFが胸膜空間へと導入された際に脈管の漏泄（leakage）を誘発することが、すでに報告されている（ヘンリークら、前出）。雌性ラット（チャールスリバー、180～200g）に対して、0.9%とした200μｌの１％エバンスブルー染色液とともに、300μｌの組換えPAF－AH（1500μmol/ml/時、実施例14に記載の方法で調製した）または等量の対照緩衝液を、尾静脈に注射した。15分後に、ラットの胸膜空間にPAF（2.0nmol）の100μｌを注射した。PAF刺激の１時間後にラットを屠殺し、ヘパリン処理したリン酸緩衝化生理食塩水3mlで胸腔を洗浄することで、胸膜液を回収した。脈管の漏泄の程度を、620nmの吸光度で定量した胸膜空間でのエバンスブルー染色液量によって定量した。
PAF－AHで前処置されたラットが、対照動物よりも脈管の漏泄の程度がかなり小さい（80%以上の炎症の低減が認められた）ことが判明した。
前記の結果は、本発明の組換えPAF－AH酵素の、胸膜炎に罹患した被検者の治療効果を支持するものである。

実施例16

本発明の組換えPAF－AHは、抗原誘発した好酸球モデルでの有効性についても試験を行った。気道での好酸球の蓄積は、喘息、鼻炎及び湿疹を引き起こす後期免疫応答の特徴である。BALB/cマウス（チャールスリバー）は、２週間間隔で行った、4mgの水酸化アルミニウム（イムジェクト・アルム（Imject alum）、ピアスラボラトリーズ（Pierce Laboratories）社、ロックフォード、イリノイ州）中に１μｇのオボアルブミン（OVA）で構成される２度の腹腔内注射によって感作させた。２回目の免疫処置から14日後に、感作したマウスを、エアロゾル化したOVAまたは対照として生理食塩水のいずれかで刺激を施した。刺激を施す前に、各群に４匹ずつなるように、マウスを任意に４つの群に分けた。１及び３群のマウスには、25mMトリス、0.5M NaCl、1mM EDTA及び0.1%ツイーン80で構成される対照緩衝液140μｌを腹腔内注射により前処置を行った。２及び４群のマウスは、750単位（140μｌのPAF－AH緩衝液を投与した場合の活性は、5500単位/mlであった）のPAF－AHで前処置した。PAF－AHまたは緩衝液を投与して30分後、１及び２群のマウスを以下に記載するようにエアロゾル化したPBSに曝し、一方で、３及び４群のマウスはエアロゾル化したOVAに曝した。
24時間後に、140μｌの緩衝液（１及び３群）または140μｌ緩衝液中750単位のPAF－AH（２及び４群）のいずれかを静脈内に注射することにより、２回目の処置を行った。
気管での好酸球の浸潤は、感作したマウスをエアロゾル化したOVAに曝すことで誘発された。感作したマウスを、円錐形の50ml遠心用チューブ（コーニング社）の中に入れ、ネブライザー（モデル646、デビルビス社（DeVilbiss Corp.,）、サマーセット、ペンシルベ

ニア州）を用いて、20分間、0.9%の生理食塩水に溶解してエアロゾル化したOVA（50mg/ml）を強制的に吸入させた。対照マウスには、ネブライザーにて0.9%の生理食塩水を用いた以外は、上記と同様の方法にて処置した。エアロゾル化したOVAまたは生理食塩水に曝してから48時間後に、マウスを屠殺し、気管を摘出した。各群から摘出した気管を、OCTに埋設し、組織を切断するまで－70℃にて保存した。

気管の好酸球浸潤を評価するために、マウスの４群からの組織切片を、ルナ溶液とヘマトキシリン－エオシン溶液、またはペルオキシダーゼのいずれかで染色した。６μmの厚みの組織切片12個を、マウスの各群から切り出し、順次番号付けを行った。奇数番号が付与された切片を、ルナ溶液で以下のように染色した。

切片を、室温にて５分間、ホルマルアルコール中で固定し、室温にて２分間、水道水を３回交換して洗浄し、次いで、室温にて１分間、蒸留水を２回交換して洗浄した。組織切片を、ルナ染色液（ルナ染色液は、90mlのヴァイゲルトの鉄ヘマトキシリン及び10mlの１％ビーブリッヒスカーレットからなる）で室温にて５分間染色した。染色した切片スライドを、１％酸性アルコールに６回浸し、室温にて１分間、水道水で洗浄し、0.5%炭酸リチウム溶液に５回浸し、そして、室温にて２分間、流水の水道水で洗浄した。切片スライドを、70%、95%、100%のエタノールを用いてそれぞれ、室温にて１分間で脱水させ、室温にて１分間、キシレンを２回交換して洗浄し、そして、サイトシール（Cytoseal）60上に置いた。

ペルオキシダーゼによる染色のために、偶数番号の切片を、４℃のアセトンにて10分間で固定し、そして、風乾させた。200μｌのDAB溶液を各切片に添加し、室温にて５分間放置した。切片スライドを、室温にて５分間、水道水で洗浄し、そして、２滴の１％オスミウム酸を各切片に対して３～５秒間作用させた。切片スライドを、室温にて５分間、水道水で洗浄し、そして、25℃の室温にて、メイアーズのヘマトキシリンで対比染色した。切片スライドを、流水の水道水で５分間すすぎ、70%、95%、100%のエタノールでそれぞれ、室温にて１分間づつで脱水させた。切片スライドを、室温にて１分間、キシレンを２回交換して洗浄し、そして、サイトシール60上に載置した。

気管の粘膜下組織中の好酸球の数を評価した。１及び２群のマウスの気管には、粘膜下組織全体にわたって分散した好酸球はほとんど見出されなかった。緩衝液で前処置され、霧状のOVAに曝された、３群のマウスの気管では、予期されるとおり、粘膜下組織全体にわたり、多数の好酸球が認められた。これとは対照的に、PAF－AHで前処置され、霧状のOVAに曝された、４群のマウスの気管では、１及び２群の２つの対照群で見られる結果に匹敵して、粘膜下組織に好酸球がほとんど見られなかった。

このように、喘息、鼻炎及び湿疹において生じるような、気道での好酸球の蓄積を含む後期免疫応答を呈する被検者を、PAF－AHで治療することが指示されるのである。

実施例17

日本人の約４％は、血漿中に、低量または検出不可能なレベルのPAF－AH活性を有している。この欠損は、常染色体で劣性に起こる欠損を遺伝的に引き継いだと思われる喘息小児患者の呼吸症状と厳密に相関する（ミワら、J.Clin.Invest.、82巻、1983～1991頁（1988））。

酵素は存在するが不活性な状態、もしくはPAF－AHの生合成不能の状態からこの欠損が生じるのかを確かめるために、PAF－AH活性が欠損している複数の患者からの血漿を、PAF－AH活性について（形質変換体に関する実施例10に記載した方法によって）ならびに以下のサンドウィッチELISAにおいてモノクローナル90G11D及び90F2D（実施例13）を用いてPAF－AHの存在についての双方に関して分析をした。イムロン４平底プレート（ダイナテック社、チャンティリー、ヴァージニア州）を、100ng/ウェルのモノクローナル抗体90G11Dで被覆し、一晩置いた。このプレートを、CMF－PBSに希釈した0.5%フィシュスキンゼラチン（シグマ社）で室温にて１時間ブロックし、３回洗浄した。患者の血漿を、15mM CHAPSを含むPBSで希釈し、プレートの各ウェルに添加（50μl/ウェル）した。このプレートを、室温にて１時間インキュベートし、４回洗浄した。常法によってビオチン化し、PBSTに希釈した５μg/mlのモノクローナル抗体90F2Dの50μｌを各ウェルに添加し、プレートを

、室温にて１時間インキュベートし、そして３回洗浄した。CMF－PBSTに1/1000に希釈したエキストラアビジン（シグマ社）50μｌを引き続き各ウェルに添加し、現像前に、室温にて１時間インキュベートした。
PAF－AH活性と酵素レベルとの間の直接的な相関が観察された。患者の血清中の活性の欠如は、検出可能な酵素の欠如として反映されていた。同様に、正常な活性の半分の活性を有する血漿試料は、正常レベルのPAF－AH活性の半分の活性を有していた。これらの観察結果より、PAF－AH活性の欠損が、酵素合成の不能またはモノクローナル抗体を認識しない不活性酵素によるものであることが示唆された。
さらなる実験により、この欠損がヒト血漿PAF－AH遺伝子における遺伝的損傷によるものであることが明らかとなった。
PAF－AH欠損の個体からのゲノムDNAを単離し、PAF－AH遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRの鋳型として使用した。コーディング配列エキソンのそれぞれをまず増幅し、１つずつ配列決定した。エキソン９での一つのヌクレオチドの変更（配列番号:7の996位のＧからＴへ）が観察された。このヌクレオチドの変更の結果、PAF－AH配列の279位のフェニルアラニンからバリンへのアミノ酸置換（V279F）がもたらされた。さらに11人のPAF－AH欠損患者個体からのゲノムDNAより、エキソン９を増幅しところ、同じ点突然変異を有することが見出された。
この突然変異が酵素を失活させるか否かを試験するために、この突然変異を含む大腸菌発現構築体を、実施例10に記載したと同様の方法により作製した。大腸菌内に導入すると、発現構築体はPAF－AH活性を示さなかったが、この突然変異を伴わない対照発現構築体では活性が十分に認められた。このアミノ酸置換はおそらく、観察された活性の欠損を引き起こし、本発明のPAF－AH抗体との免疫反応性を欠如せしめる、構造的な修飾をもたらすものであると思われる。
よって、本発明のPAF－AH特異抗体は、血清中のPAF－AHの異常なレベル（正常レベルは、約１～５単位/mlである）を検出し、PAF－AHを用いた病理学的状態の治療の改善のための診断法において使用することができる。さらに、PAF－AH遺伝子の遺伝的損傷の同定は、日本人患者に認められるPAF－AH欠損の遺伝子スクリーニングを可能とする。この突然変異により、制限エンドヌクレアーゼ部位（Mae II）が新しく生じるので、活性体の対立遺伝子と変異体の対立遺伝子とを識別する、制限断片長多型性（RFLP）分析の簡単な方法を可能なものとする。レウィン（Lewin）、Genes V、オックスフォードユニバーシティープレス（Oxford University Press）ニューヨーク、ニューヨーク州（1994）の第136～141頁を参照されたい。
12人のPAF－AH欠損患者のゲノムDNAのスクリーニングをMae IIによるDNAの消化、サザンブロッティング、及びエキソン９プローブ（配列番号:17のヌクレオチド１～396）を用いたハイブリダイゼーションによって行った。すべての患者において、突然変異対立遺伝子と一致するRFLPが認められた。
本発明を特定の実施態様に関して説明してきたが、当業者であれば様々な修正や変更を施せるものと考えらえる。よって、特許請求の範囲に明記された限定のみが、本発明に付加されるべきである。
配列表
（１）一般情報
（ｉ）出願人：イコス　コーポレーション
（ii）発明の名称：血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ
（iii）配列の数:26
（iv）連絡先住所：
（Ａ）名宛人：マーシャル、オトゥール、ジェースティン、マレー　アンド　ボーラン
（Ｂ）番地:6300シアーズ　タワー、233サウス　ワッカー　ドライブ
（Ｃ）都市名：シカゴ
（Ｄ）州名：イリノイ
（Ｅ）国名：米国

（Ｆ）郵便番号:60606
（ｖ）コンピューター読取形式：
（Ａ）媒体：フロッピー　ディスク
（Ｂ）コンピューター:IBM PC互換機
（Ｃ）操作システム:PC－DOS/MS－DOS
（Ｄ）ソフトウェア：パテント　イン　リリース＃1.0、バージョン＃1.25
（vi）現出願データ：
（Ａ）出願番号：
（Ｂ）出願日：
（Ｃ）分類：
（vii）先行出願データ：
（Ａ）出願番号:US 08/133,803
（Ｂ）出願日:6－10月－1993
（viii）弁護士／弁理士情報：
（Ａ）氏名：ノーランド、グレタ　イー
（Ｂ）登録番号:35,302
（Ｃ）参照／事件番号:32205
（ix）通信情報：
（Ａ）電話：（312）474－6300
（Ｂ）ファックス：（312）474－0448
（Ｃ）テレックス:25－3658
（２）配列番号:1の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:17アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（xi）配列：配列番号:1

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
1 5 10 15

Phe

（２）配列番号:2の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:16アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（xi）配列：配列番号:2

Ile Gln Val Leu Met Ala Ala Ala Ser Phe Gly Gln Thr Lys Ile Pro
1 5 10 15

（２）配列番号:3の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:11アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（xi）配列：配列番号:3

Met Lys Pro Leu Val Val Phe Val Leu Gly Gly

1 5 10

（２）配列番号:4の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:32塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:Modified－site
（Ｂ）存在位置：グループ（13、21、27）
（Ｃ）他の情報：これら各部位でのヌクレオチドは、イソシンである。
（xi）配列：配列番号:4
ACATGAATTC GGNATCYTTG NGTYTGNCCR AA 32

（２）配列番号:5の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:30塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA
（xi）配列：配列番号:5
TATTTCTAGA AGTGTGGTGG AACTCGCTGG 30

（２）配列番号:6の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:32塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA
（xi）配列：配列番号:6
CGATGAATTC AGCTTGCAGC AGCCATCAGT AC 32

（２）配列番号:7の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:1520塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:CDS
（Ｂ）存在位置:162..1484
（xi）配列：配列番号:7
GCTGGTCGGA GGCTCGCAGT GCTGTCGGCG AGAAGCAGTC GGGTTTGGAG CGCTTGGGTC 60

GCGTTGGTGC GCGGTGGAAC GCGCCCAGGG ACCCCAGTTC CCGCGAGCAG CTCCGCGCCG 120

CGCCTGAGAG ACTAAGCTGA AACTGCTGCT CAGCTCCCAA G ATG GTG CCA CCC 173
Met Val Pro Pro
1

AAA TTG CAT GTG CTT TTC TGC CTC TGC GGC TGC CTG GCT GTG GTT TAT 221
Lys Leu His Val Leu Phe Cys Leu Cys Gly Cys Leu Ala Val Val Tyr
5 10 15 20

CCT TTT GAC TGG CAA TAC ATA AAT CCT GTT GCC CAT ATG AAA TCA TCA 269
Pro Phe Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His Met Lys Ser Ser
25 30 35

GCA TGG GTC AAC AAA ATA CAA GTA CTG ATG GCT GCT GCA AGC TTT GGC 317
Ala Trp Val Asn Lys Ile Gln Val Leu Met Ala Ala Ala Ser Phe Gly
40 45 50

CAA ACT AAA ATC CCC CGG GGA AAT GGG CCT TAT TCC GTT GGT TGT ACA 365
Gln Thr Lys Ile Pro Arg Gly Asn Gly Pro Tyr Ser Val Gly Cys Thr
55 60 65

GAC TTA ATG TTT GAT CAC ACT AAT AAG GGC ACC TTC TTG CGT TTA TAT 413
Asp Leu Met Phe Asp His Thr Asn Lys Gly Thr Phe Leu Arg Leu Tyr
70 75 80

TAT CCA TCC CAA GAT AAT GAT CGC CTT GAC ACC CTT TGG ATC CCA AAT 461
Tyr Pro Ser Gln Asp Asn Asp Arg Leu Asp Thr Leu Trp Ile Pro Asn
85 90 95 100

AAA GAA TAT TTT TGG GGT CTT AGC AAA TTT CTT GGA ACA CAC TGG CTT 509
Lys Glu Tyr Phe Trp Gly Leu Ser Lys Phe Leu Gly Thr His Trp Leu
105 110 115

ATG GGC AAC ATT TTG AGG TTA CTC TTT GGT TCA ATG ACA ACT CCT GCA 557
Met Gly Asn Ile Leu Arg Leu Leu Phe Gly Ser Met Thr Thr Pro Ala
120 125 130

```
AAC TGG AAT TCC CCT CTG AGG CCT GGT GAA AAA TAT CCA CTT GTT GTT      605
Asn Trp Asn Ser Pro Leu Arg Pro Gly Glu Lys Tyr Pro Leu Val Val
        135                 140                 145
TTT TCT CAT GGT CTT GGG GCA TTC AGG ACA CTT TAT TCT GCT ATT GGC      653
Phe Ser His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Gly
    150                 155                 160
ATT GAC CTG GCA TCT CAT GGG TTT ATA GTT GCT GCT GTA GAA CAC AGA      701
Ile Asp Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala Val Glu His Arg
165                 170                 175                 180
GAT AGA TCT GCA TCT GCA ACT TAC TAT TTC AAG GAC CAA TCT GCT GCA      749
Asp Arg Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp Gln Ser Ala Ala
                185                 190                 195
GAA ATA GGG GAC AAG TCT TGG CTC TAC CTT AGA ACC CTG AAA CAA GAG      797
Glu Ile Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr Leu Lys Gln Glu
            200                 205                 210
GAG GAG ACA CAT ATA CGA AAT GAG CAG GTA CGG CAA AGA GCA AAA GAA      845
Glu Glu Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln Arg Ala Lys Glu
        215                 220                 225
TGT TCC CAA GCT CTC AGT CTG ATT CTT GAC ATT GAT CAT GGA AAG CCA      893
Cys Ser Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp His Gly Lys Pro
    230                 235                 240
GTG AAG AAT GCA TTA GAT TTA AAG TTT GAT ATG GAA CAA CTG AAG GAC      941
Val Lys Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu Gln Leu Lys Asp
245                 250                 255                 260
TCT ATT GAT AGG GAA AAA ATA GCA GTA ATT GGA CAT TCT TTT GGT GGA      989
Ser Ile Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His Ser Phe Gly Gly
                265                 270                 275
```

GCA ACG GTT ATT CAG ACT CTT AGT GAA GAT CAG AGA TTC AGA TGT GGT 1037
Ala Thr Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg Phe Arg Cys Gly
280 285 290

ATT GCC CTG GAT GCA TGG ATG TTT CCA CTG GGT GAT GAA GTA TAT TCC 1085
Ile Ala Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp Glu Val Tyr Ser
295 300 305

AGA ATT CCT CAG CCC CTC TTT TTT ATC AAC TCT GAA TAT TTC CAA TAT 1133
Arg Ile Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu Tyr Phe Gln Tyr
310 315 320

CCT GCT AAT ATC ATA AAA ATG AAA AAA TGC TAC TCA CCT GAT AAA GAA 1181
Pro Ala Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser Pro Asp Lys Glu
325 330 335 340

AGA AAG ATG ATT ACA ATC AGG GGT TCA GTC CAC CAG AAT TTT GCT GAC 1229
Arg Lys Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln Asn Phe Ala Asp
345 350 355

TTC ACT TTT GCA ACT GGC AAA ATA ATT GGA CAC ATG CTC AAA TTA AAG 1277
Phe Thr Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met Leu Lys Leu Lys
360 365 370

GGA GAC ATA GAT TCA AAT GTA GCT ATT GAT CTT AGC AAC AAA GCT TCA 1325
Gly Asp Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Ser Asn Lys Ala Ser
375 380 385

TTA GCA TTC TTA CAA AAG CAT TTA GGA CTT CAT AAA GAT TTT GAT CAG 1373
Leu Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys Asp Phe Asp Gln
390 395 400

TGG GAC TGC TTG ATT GAA GGA GAT GAT GAG AAT CTT ATT CCA GGG ACC 1421
Trp Asp Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu Ile Pro Gly Thr
405 410 415 420

AAC ATT AAC ACA ACC AAT CAA CAC ATC ATG TTA CAG AAC TCT TCA GGA 1469

Asn Ile Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln Asn Ser Ser Gly

425 430 435

ATA GAG AAA TAC AAT TAGGATTAAA ATAGGTTTTT TAAAAAAAAA AAAAAA 1520

Ile Glu Lys Tyr Asn

440

（２）配列番号:8の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:441アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：タンパク質
（xi）配列：配列番号:8

Met Val Pro Pro Lys Leu His Val Leu Phe Cys Leu Cys Gly Cys Leu

1 5 10 15

Ala Val Val Tyr Pro Phe Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His

20 25 30

Met Lys Ser Ser Ala Trp Val Asn Lys Ile Gln Val Leu Met Ala Ala

35 40 45

Ala Ser Phe Gly Gln Thr Lys Ile Pro Arg Gly Asn Gly Pro Tyr Ser

50 55 60

Val Gly Cys Thr Asp Leu Met Phe Asp His Thr Asn Lys Gly Thr Phe

65 70 75 80

Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro Ser Gln Asp Asn Asp Arg Leu Asp Thr Leu

85 90 95

Trp Ile Pro Asn Lys Glu Tyr Phe Trp Gly Leu Ser Lys Phe Leu Gly

100 105 110

Thr His Trp Leu Met Gly Asn Ile Leu Arg Leu Leu Phe Gly Ser Met
115 120 125

Thr Thr Pro Ala Asn Trp Asn Ser Pro Leu Arg Pro Gly Glu Lys Tyr
130 135 140

Pro Leu Val Val Phe Ser His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Ala Ile Gly Ile Asp Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala
165 170 175

Val Glu His Arg Asp Arg Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp
180 185 190

Gln Ser Ala Ala Glu Ile Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr
195 200 205

Leu Lys Gln Glu Glu Glu Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln
210 215 220

Arg Ala Lys Glu Cys Ser Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp
225 230 235 240

His Gly Lys Pro Val Lys Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu
245 250 255

Gln Leu Lys Asp Ser Ile Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His
260 265 270

Ser Phe Gly Gly Ala Thr Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg
275 280 285

Phe Arg Cys Gly Ile Ala Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp
290 295 300

Glu Val Tyr Ser Arg Ile Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu
305 310 315 320

Tyr Phe Gln Tyr Pro Ala Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser
325 330 335

Pro Asp Lys Glu Arg Lys Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln
340 345 350

Asn Phe Ala Asp Phe Thr Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met
355 360 365

Leu Lys Leu Lys Gly Asp Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Ser
370 375 380

Asn Lys Ala Ser Leu Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys
385 390 395 400

Asp Phe Asp Gln Trp Asp Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu
405 410 415

Ile Pro Gly Thr Asn Ile Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln
420 425 430

Asn Ser Ser Gly Ile Glu Lys Tyr Asn
435 440

（２）配列番号:9の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:504塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:185..311
（xi）配列：配列番号:9

GCGCGCTCTA GTAGAGCCGG GCCACACACG CTCCTCCCCG TACCTCCTCC AGCATCACCG 60

AGGGGAAGGA GAGGGTCGGG CCACAAGGCG CGCTAGGCGG ACCCAGGACA CAGCCCGCGC 120

GCAGCCCACC CGCCCGGCCG CCTGCCAGGA GCTGCTGCGG CCGCGCAGCC AGGGGGACAG 180

GCGGGCTGGT CGGAGGCTCG CAGTGCTGTC GGCGAGAAGC AGTCGGGTTT GGAGCGCTTG 240

GGTCGCGTTG GTGCGCGGTG GAACGCGCCC AGGGACCCCA GTTCCCGCGA GCAGCTCCGC 300

GCCGCGCCTG AGTGAGGAGG GGCCCCGGGG GCGAGGCGGG AGTGGGAGGA AGGGCACGGT 360

CGCCGCGCTG GAGGTCGGGA CCCCGGAGCG CGACCGGCCG GGGTGGGCTC GCTGAGTCGC 420

ACCCGCTCTG CTGGCCGGAC CTGGGCTCAC AGTCCTGCAG CCCTCGGAAA CAGCGCTAGG 480

ATCCTTCGGG AGAGGAGAGA TGAC 504

（２）配列番号:10の情報
（ｉ）配列特徴：

（Ａ）配列の長さ:417塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:145..287
（xi）配列：配列番号:10

GTACCAATCT AAAACCCAGC ACAGAAAAAT ACATGTTTTA TTTTTTCCAA GTGTTACTAG 60

TACCTCAGCC TTTCTTGATT TGTCAGCTTA TTTAAGGCCT CTTCATTGCA TACTTCTTTT 120

TTCTTTTAAT CATCTGCTTC GAAGGAGACT AAGCTGAAAC TGCTGCTCAG CTCCCAAGAT 180

GGTGCCACCC AAATTGCATG TGCTTTTCTG CCTCTGCGGC TGCCTGGCTG TGGTTTATCC 240

TTTTGACTGG CAATACATAA ATCCTGTTGC CCATATGAAA TCATCAGGTA AGAGGTGTAT 300

TTGTTCAAGG TCTTGAGCAA CTGATCTGTC GCCATACTTC AAGTGGGCCC CAAGAAGTTG 360

CACATCTGCA CATCTAAACA AGTCCTATTT AAAGGCTTAT GGAGATCCTG TATTCTC 417

（２）配列番号:11の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:498塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:251..372
（xi）配列：配列番号:11

CATTAGGAGG TAACAGTCCA AGGCAGCTGA GAGAAAGGCT ATGTCTACTT TCATCTCTTT 60

ACCCTCCAAA ACCCCTACAC AGTGTTTCAA ACAGAGAGAC CCTCAATAAT TGCATATCTT 120

ACTTGTTAGG TTGAGAAAGA AAGAAGGCCA GAAACTATGG GAAGTAACTT GATTCCGTTG 180

GAATTCTTTT GCATAATAAA ATCTGATATG TAATGGATGA CAAATGAGAT AATATTTACC 240

TGTTTTTCAG CATGGGTCAA CAAAATACAA GTACTGATGG CTGCTGCAAC GTTTGGCCAA 300

ACTAAAATCC CCCGGGGAAA TGGGCCTTAT TCCGTTGGTT GTACAGACTT AATGTTTGAT 360

CACACTAATA AGGTAATGCT TTGATTTATA CAACTTATCC TGATACTCTA ATATTGTCTG 420

TCGCTATGGA CCACTAGAAG GTGTTCAAAT GTGACCTTGC CCTCACCTGA GAATGACTCA 480

TTTTCGAATT TGTATTGT 498

（２）配列番号:12の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:433塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:130..274
（xi）配列：配列番号:12

CAGCAGCCTA AAGTCTTAGA CTTTGTGAAC ACAGAGGTAT TGAGTCCCAC TAATTAATAT 60

CGAAAATAGC TGCTGGAATA TGTTTGAGAC ACAACTTCTC TAAAAGTGCA TTAATTTCTT 120

TCTTAACAGG GCACCTTCTT GCGTTTATAT TATCCATCCC AAGATAATGA TCACCTTGAC 180

ACCCTTTGGA TCCCAAATAA AGAATATTTT TGGGGTCTTA GCAAATTTCT TGGAACACAC 240

TGGCTTATGG GCAACATTTT GAGGTTACTC TTTGGTAAGA TTTCTGTTGA TCCTTCTTTG 300

TAGGCTCTTG CATGTATGAA AACCTTGAAA ACAACAAGAA CTTCAAGTAG TTAAGACCAA 360

AGTAGATTTT TCTTCAGTCC AAATAGCTCC TAAAATGATA AGGAAAGTAT TTCTTTAAAG 420

CCCAGGCAAC TAC 433

（２）配列番号:13の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:486塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:164..257
（xi）配列：配列番号:13

TTGGTGGGTA TCTAGTAGCA GTCTTTTTAA TGAATCTACT ATTCATCCAT AAAAAAGTAG 60

ATATAAATCA GATGGGTCTG CATTTTATGC TAATGAGATA TGAATTAAAT TCACTAGCAA 120

CACTCAGAGA AAACCTTAAC TATAACCTTC CATTGTTGTC TAGGTTCAAT GACAACTCCT 180

GCAAACTGGA ATTCCCCTCT GAGGCCTGGT GAAAAATATC CACTTGTTGT TTTTTCTCAT 240

GGTCTTGGGG CATTCAGGTA ATGTTTGAGA GGTTGAACAA TTTTGGCTTC CAGGAATAAA 300

TGACAATTTT TTTATTCAAG AAAGAAATAG CAGAGTTTGG AATGTCATGC AGGCCCTTGT 360

CTGGAGGAGT TGGGGTTCCT CAATAATTGG CTGTGGGTCT ATTGATCAGT CCTAGACCTG 420

TCTGGTCAAG TAGTTTTTTC CCTACTATCA GCTCATTGGG ATTAGCCTCA CAGCAGAGAA 480

GAAAGG 486

（２）配列番号:14の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:363塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:113..181
（xi）配列：配列番号:14

CCCCAGGCTC TACTACAGGG TGTAATGGCC TCCATGTTCC CAGTTTTATT AGTGACTCAG 60

CCTTGTAATT CATGACTGGT AGTTGTAATT CTTCCCTCTT TTTGTTTTGA AGGACACTTT 120

ATTCTGCTAT TGGCATTGAC CTGGCATCTC ATGGGTTTAT AGTTGCTGCT GTAGAACACA 180

GGTATGTTAC CTGATATAAT TGGGCTCTTT GGCCAACTAC AGGGAATGTC AATGCTCATA 240

ACTATGTTTC TAATTTTCAT AAAAGTTTAT TTAAAATGTT GATGGAACTT TCAAGTATGG 300

TAACATCATG AGCAAAAAAG GAGATTGAGT TTTATCGACT TAAAAGACTT AAAAGCACCT 360

AAC 363

（２）配列番号:15の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:441塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:68..191
（xi）配列：配列番号:15

GAACTGAGAA ACATGGTCAG ATGAGGAAGG GAAGGAGCAT GCATAAATAA TTTTGCTTGT 60

ATTATAGAGA TAGATCTGCA TCTGCAACTT ACTATTTCAA GGACCAATCT GCTGCAGAAA 120

TAGGGGACAA GTCTTGGCTC TACCTTAGAA CCCTGAAACA AGAGGAGGAG ACACATATAC 180

GAAATGAGCA GGTACATTGC AGTGAAAGGA GAGGTGGTTG GTGACCTAAA AGCATGTACA 240

AAAGGATGAC ATTTGTTAAT TTAATTTTAC ACCTGGCAAG TTATGCTCCT AGCTCTCCTA 300

TTTCCCATTC CCAAAAGATC TGTCAATAGA TTCCTGGAGC AGTAAAATTC CCTTAATGGA 360

ATATCTAGTT CATAGTAAAA ACAAAGGCAA ATACAAAAAT TTGGGAGATG ACAGTGAATA 420

TTCAGAATTC CTCGAGCCGG G 441

（２）配列番号:16の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:577塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:245..358

（xi）配列：配列番号:16

GGTTAAGTAA ATCGTCTGAA GTCACATAGT AGGTAAGGCA AAACAGAGCC AGGATTTGGA 60

CTAAGGCTAT ACCTATGTGC AAAGCTGGGG CCTGTGTCAT TATGGTAGCA AGTAATAGTC 120

ACTAATCAGA TTTCCAGTTT ATAACTGACC AACGATTTTT CCCAAATACA GCTTCTACCT 180

AAACTTTAAA ATAAGTGTTA TAACTTTTTA CTTTGTCATT TCCTTCTTCT AATAATTATA 240

TTAGGTACGG CAAAGAGCAA AAGAATGTTC CCAAGCTCTC AGTCTGATTC TTGACATTGA 300

TCATGGAAAG CCAGTGAAGA ATGCATTAGA TTTAAAGTTT GATATGGAAC AACTGAAGGT 360

AAGCTATAAA AAGTAATTTT TCTCTTGTCC TACAGTTCTT TATTGTTTTT TGTCATTTAA 420

TTTTCTGCCT ATATTGCAAG GTACAATATG ATAAAGGGCT GCAACCAGCC CCTCCCCAAT 480

GCGCACACAC AGACACACAA AGCAGTACAG GTAAAGTATT GCAGCAATGA AGAATGCATT 540

ATCTTGGACT AGATATGAAT GCAAAGTTAG TCAGTTT 577

（２）配列番号:17の情報

（ｉ）配列特徴：

（Ａ）配列の長さ:396塩基対

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）

（ix）配列の特徴：

（Ａ）配列を表す記号:exon

（Ｂ）存在位置:108..199

（xi）配列：配列番号:17

ATCAATGTAT TTACCATCCC CATGAAATGA ACAATTATAT GATTGACAAA TCATTTCTTC 60

TAACACCACG AAATAGCTAT AAATTTATAT CATGCTTTTT CAAATAGGAC TCTATTGATA 120

GGGAAAAAAT AGCAGTAATT GGACATTCTT TTGGTGGAGC AACGGTTATT CAGACTCTTA 180

GTGAAGATCA GAGATTCAGG TAAGAAAATA AGATAGTAAA GCAAGAGAAT AGTAAATTAT 240

TGGAAGAAAT TATATTGTGA GATATAATTT TTATTCAAAT TCTTAGTGAA GGAAGGGGAT 300

CTCTTGGAGT TTATAAGGCT ATTCTTTTGC CCCCATAAAA TACTCTATAT ACATTTTCCT 360

AGGCTAAAAC ATCTCCTCTC CTGCTATTAA AATCTC 396

（２）配列番号:18の情報

（ｉ）配列特徴：

（Ａ）配列の長さ:519塩基対

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）

（ix）配列の特徴：

（Ａ）配列を表す記号:exon

（Ｂ）存在位置:181..351

（xi）配列：配列番号:18

CTTACAAAGT TAATCATATC CCTTTCCCAC ATTGAAGTAT GATACCTCTT TATTCCAATC 60

AGATAACCCA TAATAAACTG GTATGGTGCG TGTCCACCAA TCCTAGCATT ATTAGGATGT 120

CCTCAATGTT GGCTAGTATG TAACCAGTTT AATTTCATCA TTGTCAACAA ATATCTACAG 180

ATGTGGTATT GCCCTGGATG CATGGATGTT TCCACTGGGT GATGAAGTAT ATTCCAGAAT 240

TCCTCAGCCC CTCTTTTTTA TCAACTCTGA ATATTTCCAA TATCCTGCTA ATATCATAAA 300

AATGAAAAAA TGCTACTCAC CTGATAAAGA AAGAAAGATG ATTACAATCA GGTAAGTATT 360

AGTGACTTAT TTCATTATGT GAAACAAACT TGAAGCTTGG GTAAATATCA ATCGATATCA 420

TTTGGTAACT ATTAAAGAAT TGCTGAATTG GTTGTTTAGA CTTTCAATAA GGAGAGAATT 480

AGATAATCTC AGTTTCTAAG TACATTTAGT CTACTCTTT 519

（２）配列番号:19の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:569塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon
（Ｂ）存在位置:156..304
（xi）配列：配列番号:19

TGAAACACAT CTAAGTAGAT CAAATTACAA GTTTTATTTC TTCTTTGGTT TTCAGTAAAC 60

AGACCAACAA GACCAGTACC TTTCCTTACA CTCTAACTAA AAAAATAATA ATTTTATCAA 120

ACAATGTGAC TTTTAAATGT CTTGTTCTCT TTTAGGGGTT CAGTCCACCA GAATTTTGCT 180

GACTTCACTT TTGCAACTGG CAAAATAATT GGACACATGC TCAAATTAAA GGGAGACATA 240

GATTCAAATG TAGCTATTGA TCTTAGCAAC AAAGCTTCAT TAGCATTCTT ACAAAAGCAT 300

TTAGGTAAGA AACTATTTTT TTCATGACCT AAACCGAGAT GAATCTCGAG GACAAAGCTG 360

TCTATCTTAA TACAGCTTTA GTACTATTTA AACTATTTCC AGTTGGTTTA CAATGGAACA 420

AAGCAGTATA TCAATTTGAA AACAGAAATT TGAGAAAGTC AATTTTGCTG CTTTACATCT 480

CTATATCATA GAAAGCAAAT CAACTGTTAA AGGTAATATT CTTTGTATGA GCTAGAGTGA 540

CTCATGTGAG GATATCGAAC GACGGTGCT 569

（２）配列番号:20の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:496塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA（ゲノミック）
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:exon

（Ｂ）存在位置:137..253
（xi）配列：配列番号:20

```
GATACAGAGG CACATCGTCT CTACCATCCT AACGGAACTT GTGTAATTTG TAAATCTTTA     60
TTGCCACCTA GGGGCATCCA AACTGTTTAA TGCTCTCAAA AGTTTAATAT GTTGATTAAC    120
ACTTTATATT TTATAGGACT TCATAAAGAT TTTGATCAGT GGGACTGCTT GATTGAAGGA    180
GATGATGAGA ATCTTATTCC AGGGACCAAC ATTAACACAA CCAATCAACA CATCATGTTA    240
CAGAACTCTT CAGGAATAGA GAAATACAAT TAGGATTAAA ATAGGTTTTT TAAAAGTCTT    300
GTTTCAAAAC TGTCTAAAAT TATGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG AGAGAGAGAG    360
AGAGAGAGAG AGAGAGAATT TTAATGTATT TTCCCAAAGG ACTCATATTT TAAAATGTAG    420
GCTATACTGT AATCGTGATT GAAGCTTGGA CTAAGAATTT TTTCCCTTT                469
```

（２）配列番号:21の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:1494塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:CDS
（Ｂ）存在位置:117..1436
（xi）配列：配列番号:21

```
GGCACGAGCT AGGATCTGAC TCGCTCTGGT GGCATTGCTG CGCTCAGGGT TCTGGGTATC     60
CGGGAGTCAG TGCAGTGACC AGAACATCAA ACTGAAGCCA CTGCTCAGCT CCTAAG        116
ATG GTA CCA CTC AAA CTG CAG GCG CTT TTC TGC CTC CTC TGC TGC CTC       164
Met Val Pro Leu Lys Leu Gln Ala Leu Phe Cys Leu Leu Cys Cys Leu
 1               5                  10                  15
CCA TGG GTC CAT CCT TTT CAC TGG CAA GAC ACA TCT TCT TTT GAC TTC       212
Pro Trp Val His Pro Phe His Trp Gln Asp Thr Ser Ser Phe Asp Phe
            20                  25                  30
AGG CCG TCA GTA ATG TTT CAC AAG CTC CAA TCG GTG ATG TCT GCT GCC       260
```

Arg Pro Ser Val Met Phe His Lys Leu Gln Ser Val Met Ser Ala Ala

35 40 45

GGC TCT GGC CAT AGT AAA ATC CCC AAA GGA AAT GGA TCG TAC CCC GTC 308

Gly Ser Gly His Ser Lys Ile Pro Lys Gly Asn Gly Ser Tyr Pro Val

50 55 60

GGT TGT ACA GAT CTG ATG TTC GGT TAT GGG AAT GAG AGC GTC TTC GTG 356

Gly Cys Thr Asp Leu Met Phe Gly Tyr Gly Asn Glu Ser Val Phe Val

65 70 75 80

CGT TTG TAC TAC CCA GCT CAA GAT CAA GGT CGC CTC GAC ACT GTT TGG 404

Arg Leu Tyr Tyr Pro Ala Gln Asp Gln Gly Arg Leu Asp Thr Val Trp

85 90 95

ATC CCA AAC AAA GAA TAT TTT TTG GGT CTT AGT ATA TTT CTT GGA ACA 452

Ile Pro Asn Lys Glu Tyr Phe Leu Gly Leu Ser Ile Phe Leu Gly Thr

100 105 110

CCC AGT ATT GTA GGC AAT ATT TTA CAC CTC TTA TAT GGT TCT CTG ACA 500

Pro Ser Ile Val Gly Asn Ile Leu His Leu Leu Tyr Gly Ser Leu Thr

115 120 125

ACT CCT GCA AGC TGG AAT TCT CCT TTA AGG ACT GGA GAA AAA TAC CCG 548

Thr Pro Ala Ser Trp Asn Ser Pro Leu Arg Thr Gly Glu Lys Tyr Pro

130 135 140

CTC ATT GTC TTT TCT CAT GGT CTC GGA GCC TTC AGG ACG ATT TAT TCT 596

Leu Ile Val Phe Ser His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Ile Tyr Ser

145 150 155 160

GCT ATT GGC ATT GGC TTG GCA TCT AAT GGG TTT ATA GTG GCC ACT GTC 644

Ala Ile Gly Ile Gly Leu Ala Ser Asn Gly Phe Ile Val Ala Thr Val

165 170 175

GAA CAC AGA GAC AGA TCT GCA TCG GCA ACT TAC TTT TTT GAA GAC CAG 692
Glu His Arg Asp Arg Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Phe Phe Glu Asp Gln
180 185 190

GTG GCT GCA AAA GTG GAA AAC AGG TCT TGG CTT TAC CTG AGA AAA GTA 740
Val Ala Ala Lys Val Glu Asn Arg Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Lys Val
195 200 205

AAA CAA GAG GAG TCG GAA AGT GTC CGG AAA GAA CAG GTT CAG CAA AGA 788
Lys Gln Glu Glu Ser Glu Ser Val Arg Lys Glu Gln Val Gln Gln Arg
210 215 220

GCA ATA GAA TGT TCC CGG GCT CTC AGT GCG ATT CTT GAC ATT GAA CAT 836
Ala Ile Glu Cys Ser Arg Ala Leu Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu His
225 230 235 240

GGA GAC CCA AAA GAG AAT GTA CTA GGT TCA GCT TTT GAC ATG AAA CAG 884
Gly Asp Pro Lys Glu Asn Val Leu Gly Ser Ala Phe Asp Met Lys Gln
245 250 255

CTG AAG GAT GCT ATT GAT GAG ACT AAA ATA GCT TTG ATG GGA CAT TCT 932
Leu Lys Asp Ala Ile Asp Glu Thr Lys Ile Ala Leu Met Gly His Ser
260 265 270

TTT GGA GGA GCA ACA GTT CTT CAA GCC CTT AGT GAG GAC CAG AGA TTC 980
Phe Gly Gly Ala Thr Val Leu Gln Ala Leu Ser Glu Asp Gln Arg Phe
275 280 285

AGA TGT GGA GTT GCT CTT GAT CCA TGG ATG TAT CCG GTG AAC GAA GAG 1028
Arg Cys Gly Val Ala Leu Asp Pro Trp Met Tyr Pro Val Asn Glu Glu
290 295 300

CTG TAC TCC AGA ACC CTC CAG CCT CTC CTC TTT ATC AAC TCT GCC AAA 1076
Leu Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Pro Leu Leu Phe Ile Asn Ser Ala Lys
305 310 315 320

TTC CAG ACT CCA AAG GAC ATC GCA AAA ATG AAA AAG TTC TAC CAG CCT 1124
Phe Gln Thr Pro Lys Asp Ile Ala Lys Met Lys Lys Phe Tyr Gln Pro
325 330 335

GAC AAG GAA AGG AAA AAT GAT TAC AAT CAA GGG CTC AGG CAC CAG AAC 1172
Asp Lys Glu Arg Lys Asn Asp Tyr Asn Gln Gly Leu Arg His Gln Asn
340 345 350

TTT GAC GAC TTT ACT TTT GTA ACT GGC AAA ATA ATT GGA AAC AAG CTG 1220
Phe Asp Asp Phe Thr Phe Val Thr Gly Lys Ile Ile Gly Asn Lys Leu
355 360 365

ACA CTG AAA GGA GAA ATC GAT TCC AGA GTA GCC ATC GAC CTC ACC AAC 1268
Thr Leu Lys Gly Glu Ile Asp Ser Arg Val Ala Ile Asp Leu Thr Asn
370 375 380

AAA GCT TCG ATG GCT TTC TTA CAA AAG CAT TTA GGG CTT CAG AAA GAC 1316
Lys Ala Ser Met Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu Gln Lys Asp
385 390 395 400

TTT GAT CAG TGG GAC CCT CTG GTG GAA GGA GAT GAT GAG AAC CTG ATT 1364
Phe Asp Gln Trp Asp Pro Leu Val Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu Ile
405 410 415

CCT GGG TCA CCC TTT GAC GCA GTC ACC CAG GCC CCG GCT CAG CAA CAC 1412
Pro Gly Ser Pro Phe Asp Ala Val Thr Gln Ala Pro Ala Gln Gln His
420 425 430

TCT CCA GGA TCA CAG ACC CAG AAT TAGAAGAACT TGCTTGTTAC ACAGTTGCCT 1466
Ser Pro Gly Ser Gln Thr Gln Asn
435 440

TTTAAAAGTA GAGTGACATG AGAGAGAG 1494

（２）配列番号:22の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:2191塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:CDS
（Ｂ）存在位置:92..1423

(xi) 配列：配列番号:22

```
CCGCGCGCTC CGGCCGGGGG ACCCTGGTTC CGGCGAGCGG CTCAGCGCGG CGCCCGGAAG      60

TTTAAGCTGA AACCACTGCT CAGCTTCCAA G ATG TTG CCA CCC AAA CTG CAT          112
                                   Met Leu Pro Pro Lys Leu His
                                    1               5

GCG CTT TTC TGC CTC TGC AGC TGC CTC ACA CTG GTT CAT CCT ATT GAC         160
Ala Leu Phe Cys Leu Cys Ser Cys Leu Thr Leu Val His Pro Ile Asp
         10                  15                  20

TGG CAA GAC CTA AAT CCT GTT GCC CAT ATT AGA TCA TCA GCA TGG GCC         208
Trp Gln Asp Leu Asn Pro Val Ala His Ile Arg Ser Ser Ala Trp Ala
     25                  30                  35

AAT AAA ATA CAA GCT CTG ATG GCT GCT GCA AGT ATT AGG CAA AGT AGA         256
Asn Lys Ile Gln Ala Leu Met Ala Ala Ala Ser Ile Arg Gln Ser Arg
 40                  45                  50                  55

ATT CCC AAA GGA AAT GGA TCT TAT TCT GTC GGT TGT ACA GAT TTG ATG         304
Ile Pro Lys Gly Asn Gly Ser Tyr Ser Val Gly Cys Thr Asp Leu Met
                 60                  65                  70

TTT GAT TAT ACT AAT AAG GGC ACC TTT TTG CGT TTG TAT TAT CCA TCG         352
Phe Asp Tyr Thr Asn Lys Gly Thr Phe Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro Ser
             75                  80                  85
```

CAA GAG GAT GAC CAC TCT GAC ACG CTT TGG ATC CCA AAC AAA GAA TAT 400
Gln Glu Asp Asp His Ser Asp Thr Leu Trp Ile Pro Asn Lys Glu Tyr
90 95 100

TTT TTT GGT CTT AGT AAA TAT CTT GGA ACA CCC TGG CTT ATG GGC AAA 448
Phe Phe Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Gly Thr Pro Trp Leu Met Gly Lys
105 110 115

ATA TTG AGC TTC TTT TTT GGT TCA GTG ACA ACT CCT GCG AAC TGG AAT 496
Ile Leu Ser Phe Phe Phe Gly Ser Val Thr Thr Pro Ala Asn Trp Asn
120 125 130 135

TCC CCT CTG AGG ACT GGT GAA AAA TAT CCA CTG ATT GTT TTT TCT CAT 544
Ser Pro Leu Arg Thr Gly Glu Lys Tyr Pro Leu Ile Val Phe Ser His
140 145 150

GGT CTT GGA GCA TTC CGG ACA ATT TAT TCT GCT ATT GGC ATT GAT CTA 592
Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Ile Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Asp Leu
155 160 165

GCA TCA CAT GGG TTC ATC GTT GCT GCT ATA GAA CAC AGA GAT GGA TCC 640
Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala Ile Glu His Arg Asp Gly Ser
170 175 180

GCC TCT GCG ACT TAC TAT TTC AAG GAC CAG TCT GCT GCA GAA ATA GGG 688
Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp Gln Ser Ala Ala Glu Ile Gly
185 190 195

AAC AAA TCT TGG TCT TAT CTT CAA GAA CTA AAA CCA GGG GAT GAG GAG 736
Asn Lys Ser Trp Ser Tyr Leu Gln Glu Leu Lys Pro Gly Asp Glu Glu
200 205 210 215

ATA CAT GTT CGA AAT GAG CAG GTA CAG AAA AGG GCA AAG GAG TGC TCC 784
Ile His Val Arg Asn Glu Gln Val Gln Lys Arg Ala Lys Glu Cys Ser
220 225 230

CAA GCT CTC AAC TTG ATT CTG GAC ATT GAT CAT GGA AGG CCA ATT AAG 832
Gln Ala Leu Asn Leu Ile Leu Asp Ile Asp His Gly Arg Pro Ile Lys
235 240 245

AAT GTA CTA GAC TTA GAG TTT GAT GTG GAA CAA CTG AAG GAC TCT ATT 880
Asn Val Leu Asp Leu Glu Phe Asp Val Glu Gln Leu Lys Asp Ser Ile
250 255 260

GAC AGG GAT AAA ATA GCA GTA ATT GGA CAT TCT TTT GGT GGA GCC ACA 928
Asp Arg Asp Lys Ile Ala Val Ile Gly His Ser Phe Gly Gly Ala Thr
265 270 275

GTT CTT CAG GCT CTT AGT GAA GAC CAG AGA TTT AGG TGC GGG ATT GCC 976
Val Leu Gln Ala Leu Ser Glu Asp Gln Arg Phe Arg Cys Gly Ile Ala
280 285 290 295

TTG GAT GCA TGG ATG CTT CCA CTG GAT GAT GCA ATA TAT TCC AGA ATC 1024
Leu Asp Ala Trp Met Leu Pro Leu Asp Asp Ala Ile Tyr Ser Arg Ile
300 305 310

CCT CAG CCC CTC TTT TTT ATT AAC TCG GAA CGG TTC CAA TTT CCT GAG 1072
Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu Arg Phe Gln Phe Pro Glu
315 320 325

AAT ATC AAA AAA ATG AAA AAA TGC TAC TCA CCT GAC AAA GAA AGA AAA 1120
Asn Ile Lys Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser Pro Asp Lys Glu Arg Lys
330 335 340

ATG ATT ACA ATC AGG GGT TCA GTC CAT CAG AAC TTT GCT GAT TTC ACT 1168
Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln Asn Phe Ala Asp Phe Thr
345 350 355

TTT ACA ACT GGC AAA ATA GTT GGA TAC ATA TTC ACA TTA AAA GGA GAT 1216
Phe Thr Thr Gly Lys Ile Val Gly Tyr Ile Phe Thr Leu Lys Gly Asp
360 365 370 375

ATA GAT TCA AAT GTA GCA ATT GAT CTT TGC AAC AAA GCT TCA TTG GCA 1264
Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Cys Asn Lys Ala Ser Leu Ala
380 385 390

TTT TTA CAA AAG CAT TTA GGA CTG CGG AAA GAT TTT GAT CAG TGG GAT 1312
Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu Arg Lys Asp Phe Asp Gln Trp Asp
395 400 405

TCT TTG ATT GAA GGA AAA GAC GAA AAT CTT ATG CCA GGG ACC AAC ATT 1360
Ser Leu Ile Glu Gly Lys Asp Glu Asn Leu Met Pro Gly Thr Asn Ile
410 415 420

AAC ATC ACC AAC GAA CAT GAC ACT CTA CAG AAC TCT CCA GAA GCA GAG 1408
Asn Ile Thr Asn Glu His Asp Thr Leu Gln Asn Ser Pro Glu Ala Glu
425 430 435

AAA TCG AAT TTA GAT TAAAAGCACT TTTTTAAAGA TCTTGTTTAA AAACTGTCAA 1463
Lys Ser Asn Leu Asp
440

AAAATGTGTG TATGACTTTT AATATATTTT CTCAAATAAC TCATATTGGA AAATGTAGGC 1523
TATCCCATAA AAGTGATTGA AGCTTGGACT AGGAGGTTTT TTTCTTTAAA GAAAGATTGG 1583
TGTCTATCGA AATCATGCCA GCCTAAATTT TAATTTTACT AAAATGATGC TGTGTCAAAA 1643
TTAATAACTA CTTTTACATT CTTTAATGGA CAAGTATAAC AGGCACAAGG CTAATGAAAA 1703
CGTGTTGCAA TGACATAACA ATCCCTAAAA ATACAGATGT TCTTGCCTCT TTTTTCTATT 1763
ATAATTGAGT TTTAGCAACA TGTTATGCTA GGTAGAATTT GGAAGCACTT CCCTTTGACT 1823
TTTGGTCATG ATAAGAAAAA TTAGATCAAG CAAATGATAA AAGCAGTGTT TTACCAAGGA 1883
TTAGGGATAC TGAACAATTT CACTATGGTA ACTGAATGGG GAGTGACCAA GGGTAAAAAT 1943
ATTAAAGCCA AGGCAAAGGC AGCAGATTAG AATGGATTAA AGAGAGTTTA TAATTTGTTT 2003
GCATTTACTT GATGGTTTAT CTCATGGATT CATGAGTCAA GAAAGGTGCG TAGGACAGGC 2063
CAGGGATTCC AGTTATAACA CATTATTCAC CCAAAGGGTT CTTTAATTCT GTATGAGTAT 2123
TGGGAGTGGA TTAGCACAAT AGAGGCATAT GTTGCTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2183
AAAAAAAA 2191

（２）配列番号:23の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:517塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA

(ix) 配列の特徴：
(A) 配列を表す記号:CDS
(B) 存在位置:2..514
(xi) 配列：配列番号:23

```
G GGG CAT TCT TTT GGA GGA GCA ACA GTT TTT CAA GCC CTA AGT GAA          46
  Gly His Ser Phe Gly Gly Ala Thr Val Phe Gln Ala Leu Ser Glu
    1               5                  10                  15

GAC CAG AGA TTC AGA TGT GGG ATT GCC CTT GAT CCG TGG ATG TTT CCC        94
Asp Gln Arg Phe Arg Cys Gly Ile Ala Leu Asp Pro Trp Met Phe Pro
                20                  25                  30

GTG AGT GAG GAG CTG TAC TCC AGA GTT CCT CAG CCT CTC TTC TTT ATC       142
Val Ser Glu Glu Leu Tyr Ser Arg Val Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile
            35                  40                  45

AAC TCT GCC GAA TTC CAG ACT CCA AAG GAC ATT GCA AAA ATG AAA AAC       190
Asn Ser Ala Glu Phe Gln Thr Pro Lys Asp Ile Ala Lys Met Lys Asn
        50                  55                  60

TTC TAC CAG CCT GAC AAG GAA AGG AAA ATG ATT ACG ATC AAG GGC TCA       238
Phe Tyr Gln Pro Asp Lys Glu Arg Lys Met Ile Thr Ile Lys Gly Ser
    65                  70                  75
```

GTG CAC CAG AAT TTT GCT GAC GGG ACT TTT GTA ACT GGC AAA ATA ATT 286
Val His Gln Asn Phe Ala Asp Gly Thr Phe Val Thr Gly Lys Ile Ile
80 85 90 95

GGA AAC AAG CTG TCA CTG AAA GGA GAC ATA GAC TCC AGA GTT GCC ATA 334
Gly Asn Lys Leu Ser Leu Lys Gly Asp Ile Asp Ser Arg Val Ala Ile
100 105 110

GAC CTC ACC AAC AAG GCT TCC TTG GCT TTC TTA CAA AAA CAT TTA GGA 382
Asp Leu Thr Asn Lys Ala Ser Leu Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly
115 120 125

CTT CAT AAA GAC TTT GAT CAG TGG GAC TGT CTG GTG GAG GGA GAG AAC 430
Leu His Lys Asp Phe Asp Gln Trp Asp Cys Leu Val Glu Gly Glu Asn
130 135 140

GAG AAC CTC ATC CCG GGG TCA CCC TTT GAT GTA GTC ACC CAG TCC CCG 478
Glu Asn Leu Ile Pro Gly Ser Pro Phe Asp Val Val Thr Gln Ser Pro
145 150 155

GCT CTG CAG AGT TCT CCC GGA TCA CAC AAC CAG AAT TAG 517
Ala Leu Gln Ser Ser Pro Gly Ser His Asn Gln Asn
160 165 170

（２）配列番号:24の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:580塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（ix）配列の特徴：
（Ａ）配列を表す記号:CDS
（Ｂ）存在位置:1..580
（xi）配列：配列番号:24

CAA GTA CTG ATG GCT GCT GCA AGC TTT GGC GAA CGT AAA ATC CCT AAG 48
Gln Val Leu Met Ala Ala Ala Ser Phe Gly Glu Arg Lys Ile Pro Lys
1 5 10 15

GGA AAT GGG CCT TAT TCC GTT GGT TGT ACA GAC TTA ATG TTT GAT TAC 96
Gly Asn Gly Pro Tyr Ser Val Gly Cys Thr Asp Leu Met Phe Asp Tyr
20 25 30

ACT AAA AAG GGC ACC TTC TTG CGT TTA TAT TAT CCA TCC CAA GAT GAT 144
Thr Lys Lys Gly Thr Phe Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro Ser Gln Asp Asp
35 40 45

GAT CGC CTT GAC ACC CTT TGG ATC CCA AAT AAG GAG TAT TTT TGG GGT 192
Asp Arg Leu Asp Thr Leu Trp Ile Pro Asn Lys Glu Tyr Phe Trp Gly
50 55 60

CTT AGC AAG TAT CTT GGA AAA CAC TGG CTT ATG GGC AAC ATT TTG AGT 240
Leu Ser Lys Tyr Leu Gly Lys His Trp Leu Met Gly Asn Ile Leu Ser
65 70 75 80

TTA CTC TTT GGT TCA GTG ACA ACT CCT GCA AAC TGG AAT TCC CCT CTG 288
Leu Leu Phe Gly Ser Val Thr Thr Pro Ala Asn Trp Asn Ser Pro Leu
85 90 95

AGG CCT GGT GAA AAA TAC CCA CTT GTT GTT TTT TCT CAT GGT CTT GGA 336
Arg Pro Gly Glu Lys Tyr Pro Leu Val Val Phe Ser His Gly Leu Gly
100 105 110

GCA TTC AGG ACA ATT TAT TCT GCT ATT GGC ATT GAC CTG GCA TCT CAT 384
Ala Phe Arg Thr Ile Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Asp Leu Ala Ser His
115 120 125

GGG TTT ATA GTT GCT GCT GTA GAA CAC AGA GAT AGA TCT GCA TCT GCA 432
Gly Phe Ile Val Ala Ala Val Glu His Arg Asp Arg Ser Ala Ser Ala
130 135 140

ACT TAC TAT TTC AAG AAC CAA TCT GCT GCA GAA ATA GGG AAA AAG TCT 480
Thr Tyr Tyr Phe Lys Asn Gln Ser Ala Ala Glu Ile Gly Lys Lys Ser
145 150 155 160

TGG CTC TAC CTT AGA ACC CTG AAA GAA GAG GAG GAG ATA CAT ATA CGA 528
Trp Leu Tyr Leu Arg Thr Leu Lys Glu Glu Glu Glu Ile His Ile Arg
165 170 175

AAT AAG CAG GTA CGA CAA AGA GCA AAA GAA TGT TCC CAA GCT CTC AGT 576
Asn Lys Gln Val Arg Gln Arg Ala Lys Glu Cys Ser Gln Ala Leu Ser
180 185 190

CTG A 580
Leu

（２）配列番号:25の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:41塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA
（xi）配列：配列番号:25
TATTCTAGAA TTATGATACA AGTATTAATG GCTGCTGCAA G 41

（２）配列番号:26の情報
（ｉ）配列特徴：
（Ａ）配列の長さ:32塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:DNA
（xi）配列：配列番号:26
ATTGATATCC TAATTGTATT TCTCTATTCC TG 32

【図面の簡単な説明】
本発明の数多くの他の局面及び利点は、添付の図面を参照して、以下の詳細な説明を考慮すれば、明らかとなるであろう。
図１は、ヒト血漿から精製されたPAF－AHを含むPVDF膜の写真である。
図２は、組換えヒト血漿PAF－AHの酵素活性を示すグラフである。
図３は、組換えPAF－AH断片及びそれらの触媒活性を表す図面である。
図４は、本発明の組換えPAF－AHの局所投与による、PAFで誘発したラット足浮腫の阻止を示す棒グラフである。
図５は、PAF－AHの静脈内投与による、PAFで誘発したラット足浮腫の阻止を示す棒グラフ

である。
図６は、PAF－AHは、PAFで誘発した浮腫を阻止するものの、ザイモサン（zymosan A）で誘発した浮腫は阻止しないことを示す棒グラフである。
図7A及び図7Bは、ラット足浮腫におけるPAF－AHの抗炎症活性の量相関の結果を示す。
図8A及び図8Bは、単回投与量のPAF－AHのin vivoでの経時的な有効性を示唆する結果を示す。
図９は、ラット循環系におけるPAF－AHの薬物動態学を表す折れ線グラフである。また、
図10は、ラット足浮腫における、PAF－AHの抗炎症効果を、PAF拮抗剤のより低い効果に比較して示す、棒グラフである。

【図１】

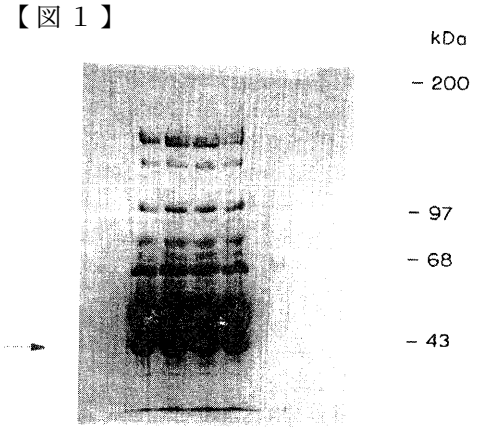
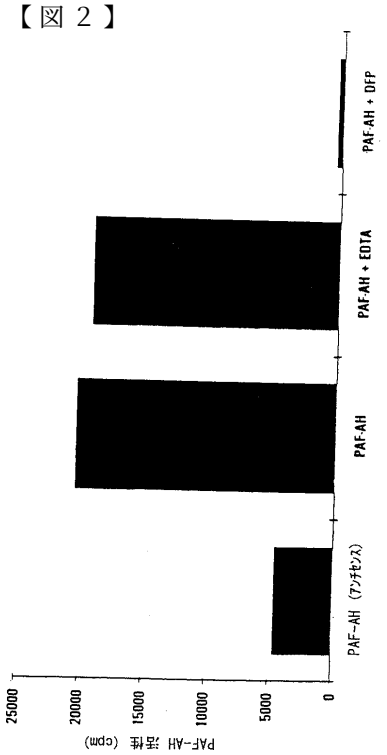
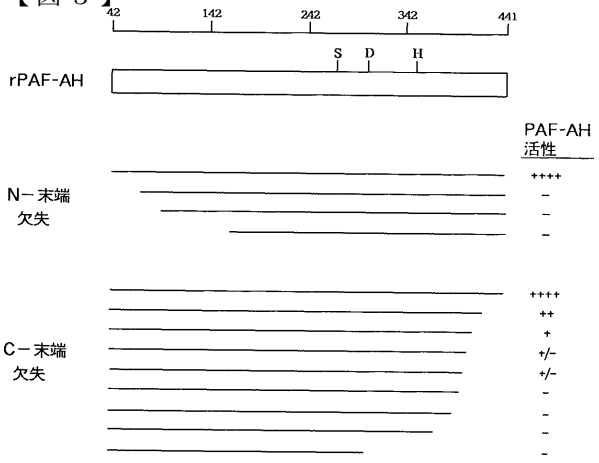


FIGURE 1

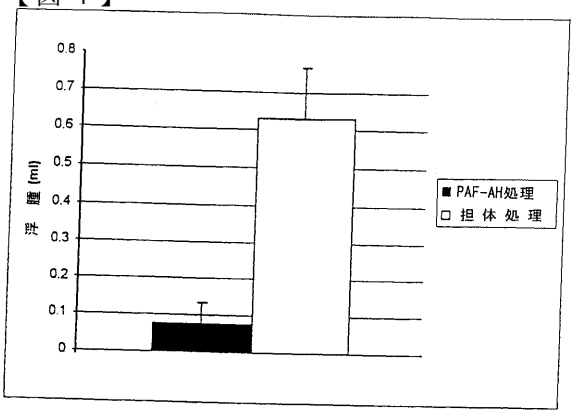
【図２】



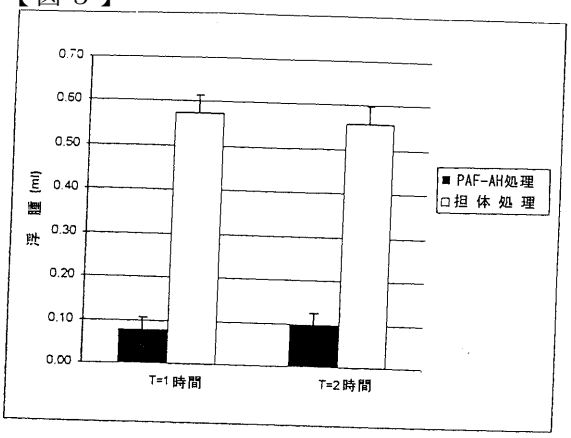
【図３】



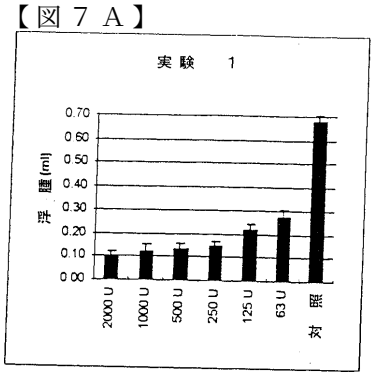
【図４】



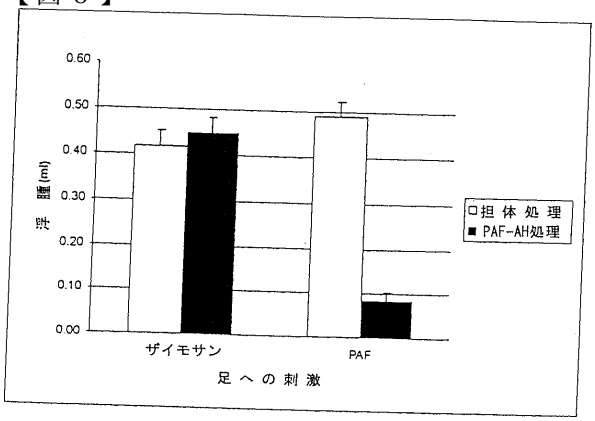
【図５】



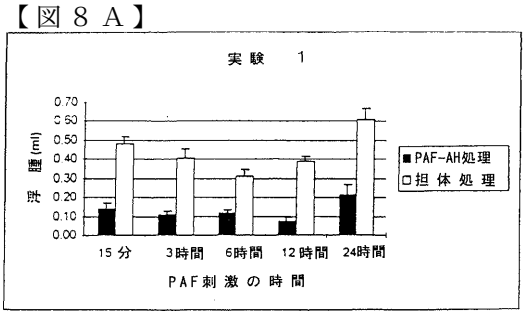
【図７Ａ】



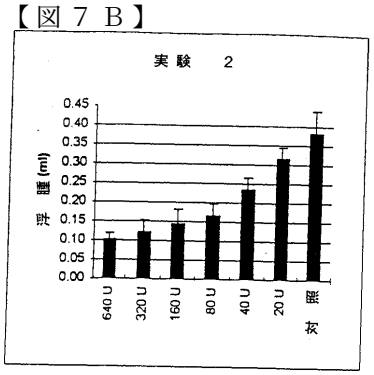
【図６】



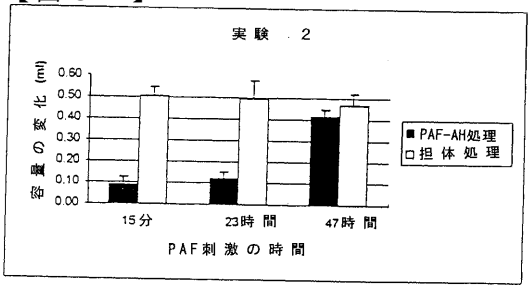
【図８Ａ】



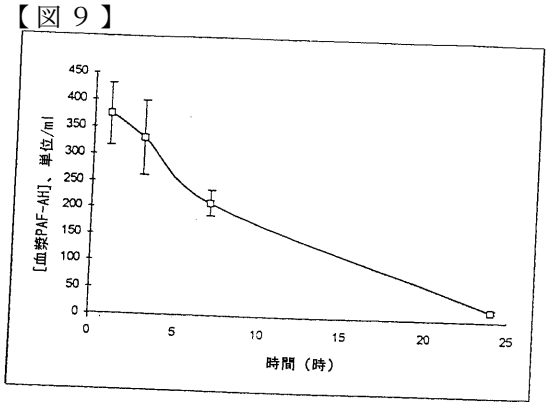
【図７Ｂ】



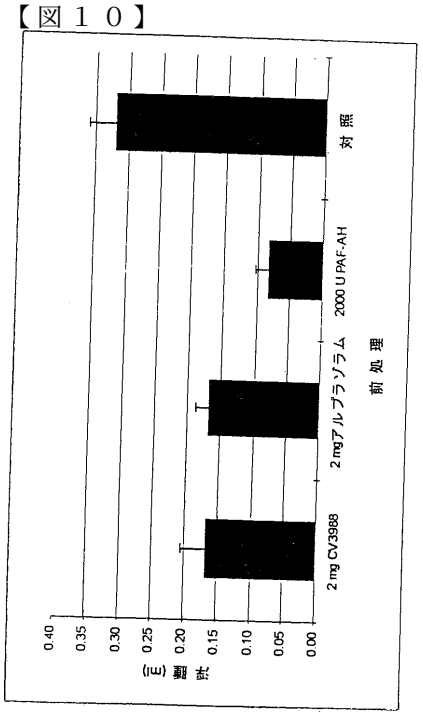
【図８Ｂ】



【図９】


[血漿PAF-AH]、単位/ml
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
時間（時）

【図１０】


対照
2000 U PAF-AH
2 mgアルプラゾラム
2 mg CV3988
前処理
増悪（%）
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	
C07H 21/04	C12N 1/19	
C12N 1/19	C12N 1/21	
C12N 1/21	C12N 9/18	
C12N 5/10	C12P 21/08	
C12N 9/18	C12Q 1/68	Z
C12N 15/02	G01N 33/53	D
C12P 21/08	G01N 33/573	A
C12Q 1/68	G01N 33/577	B
G01N 33/53	C12N 5/00	B
G01N 33/573	C12N 15/00	C
G01N 33/577	A61K 37/48	
//(C12N 1/19	C12N 1/19	
C12R 1:865)	C12R 1:865	
(C12N 1/21	C12N 1/21	
C12R 1:19)	C12R 1:19	
(C12N 5/10	C12N 5/00	B
C12R 1:91)	C12R 1:91	
(C12N 9/18	C12N 9/18	
C12R 1:91)	C12R 1:91	
(C12N 9/18	C12N 9/18	
C12R 1:19)	C12R 1:19	
(C12N 9/18	C12N 9/18	
C12R 1:865)	C12R 1:865	
(C12P 21/08	C12P 21/08	
C12R 1:91)	C12R 1:91	

(72)発明者 エバーハード, クリスティン, ディー.
アメリカ合衆国 98002 ワシントン オーバン エス. イー. 322ンド 16226
(72)発明者 グレイ, パトリック
アメリカ合衆国 98112 ワシントン シアトル 38ス プレイス イースト 2244
(72)発明者 レ トロン, ハイ
アメリカ合衆国 98107 ワシントン シアトル エヌ. ダブリュ. 5ス アベニュー 6241
(72)発明者 トエルカー, ラリー, ダブリュ.
アメリカ合衆国 98021 ワシントン ボウゼル エス. ダブリュ. 216ス ストリート 404
(72)発明者 ワイルダー, シェリル, エル.
アメリカ合衆国 98004 ワシントン ブレビュー エヌ. イー. 98ス アベニュー 2526

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 The Journal of Biological Chemistry,1990年,Vol.265,No.17,p.9682-9687
The Journal of Biological Chemistry,1987年,Vol.262,No.9,p.4223-4230
Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989年,Vol.86,p.2393-2397

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], DB名)

C12N 15/00 - 90
C12P 21/00 - 21/08
C12N 1/00 - 9/99
C07K 1/00 - 19/00
C12Q 1/00 - 70
G01N 33/00 - 98
A61K 31/00 - 48/00
A61P 1/00 - 43/00
C07H 21/00 - 04
PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
EUROPAT(QUESTEL)
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq