

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3973253号

(P3973253)

(45) 発行日 平成19年9月12日(2007.9.12)

(24) 登録日 平成19年6月22日(2007.6.22)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	
G O 1 N 33/573 (2006.01)	G O 1 N 33/573	A
請求項の数 16 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平9-20970	(73) 特許権者	504447707
(22) 出願日	平成9年1月20日(1997.1.20)		サノフィーアベンティス、ドイツュラント
(65) 公開番号	特開平9-191889		、ゲゼルシャフト、ミット、ベシュレンク
(43) 公開日	平成9年7月29日(1997.7.29)		テル、ハフツング
審査請求日	平成15年11月20日(2003.11.20)		SANOFI-AVENTIS DEUT
(31) 優先権主張番号	96100682.2		SCHLAND GMBH
(32) 優先日	平成8年1月18日(1996.1.18)		ドイツ連邦共和国フランクフルト、ブリュ
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		ーニングシュトラーセ、50
		(74) 代理人	100064285
			弁理士 佐藤 一雄
		(74) 代理人	100067079
			弁理士 小野寺 捷洋
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アグレカナーゼのタンパク質分解活性試験用組換え基質 (rAGG1)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

基質が、

- a) C D 5 のシグナル配列、
- b) M 1 モノクローナル抗体検出のための F L A G (登録商標) - エピトープ、
- c) ヒトアグレカンの球間ドメイン、
- d) ヒト I g G 1 のヒンジ領域、
- e) ヒト I g G 1 の C H 2 領域、および
- f) ヒト I g G 1 の C H 3 領域

を含んでなる構成要素の群を含む、イン・ビトロでの試験系におけるアグレカナーゼの組換え基質。 10

【請求項2】

- a) 基質が配列番号3のアミノ酸配列を有するか、または
- b) 配列番号3のアミノ酸配列であって、アミノ酸34がA1aに変異したものである

、

請求項1に記載の組換え基質。

【請求項3】

請求項1または2に記載の組換え基質をコードするDNA。

【請求項4】

- a) DNAが配列番号4のヌクレオチド2350～4114のヌクレオチド配列を有す 20

る、

b) DNAが配列番号4のヌクレオチド2350～4114のヌクレオチド配列であって、ヌクレオチド2448がCに変異し、ヌクレオチド2450がCに変異し、ヌクレオチド2451がAに変異したものを有する、または

c) DNAがストリンジェント条件下で配列番号4に示したDNAとハイブリダイズする、

請求項3に記載のDNA。

【請求項5】

請求項4に記載のヌクレオチド配列を有するDNA断片を含むベクター。

【請求項6】

請求項5に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項7】

アグレカナーゼの活性を試験するための細胞培養系における、請求項1または2に記載の組換え基質の使用。

【請求項8】

細胞培養系が固有の内因性プロテオグリカンおよび他の細胞外成分を含まない、請求項7に記載の組換え基質の使用。

【請求項9】

アグレカナーゼの活性を抗体による開裂生成物の検出によって試験する、請求項7または8に記載の組換え基質の使用。

【請求項10】

基質における新規な酵素開裂部位を検出するための、請求項1または2に記載の組換え基質の使用。

【請求項11】

アフィニティクロマトグラフィによってアグレカナーゼを精製するための、請求項1または2に記載の組換え基質の使用。

【請求項12】

アグレカナーゼ阻害剤をスクリーニングするための請求項1または2に記載の組換え基質の使用。

【請求項13】

骨関節症の開始または進行を監視する方法であって、骨関節症を有することが疑われるまたは知られているヒトからの生物学的流体の試料を、請求項1または2に記載の組換え基質によってアグレカナーゼの存在について分析を行う方法。

【請求項14】

上記生物学的流体が、滑液、尿、血清およびリンパ液からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

上記方法を、疾病の進行を観察して治療の有効性を決定するのに使用する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

請求項1または2に記載の組換え基質および抗体を含み、アグレカナーゼ開裂生成物を検出するための診断助剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、細胞培養系における「アグレカナーゼ」のタンパク質分解活性を試験するための人工組換え基質（rAGG1）および天然アグレカンに関する。

【0002】

背景技術

10

20

30

40

50

結合組織におけるプロテオグリカン分解の機構は複雑であり、複数の化合物および経路が関与している。アグレカンの異化作用の検討では、用いられる実験系主要な軟骨細胞で確立された軟骨細胞系の単層培養物(Hughes CE, Caterson B, Fosang AJ, Roughley PJ, Mort JS., *Biochem. J.* 1995; 305: 799-804; Lark MW, Gordy JT, Weidner JR ら, *J. Biol. Chem.* 1995; 270(6): 2550-2556)、および各種の解剖学的部位および動物種からの軟骨を用いる外植片培養物(Flannery CR, Lark MW, Sandy JD, *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 1008-1014; Sandy JD, Brown HL, Lowther DA, *Biochim Biophys Acta* 1978; 543: 536-44; Tyler JA, *Biochem. J.* 1985; 225: 493-507)を含んでいた。I L-1 および T N F のようなサイトカインの添加が、細胞外マトリックスの分解を促進する化合物として広汎に用いられてきた(Hughes CE ら, 1995; Morales TI, Roberts AB, *Arch Biochem Biophys* 1992; 293 (1): 79-84; Forsang AJ, Tyler JA, Hardingham TE, *Matrix* 1991; 11: 17-24)。特に、これら二種類のサイトカインは、アグレカンの異化作用を標的とすることが示されている。数件の研究により、アグレカンのタンパク質コアに沿った特異的開裂部位を定義する多数の重要な発見がなされてきた(Ilic MZ, Handley CJ, Robinson HC, Mok M T, *Arch Biochem Biophys* 1992; 294(1): 115-22; Loulakis P, Shrikhande A, Davis G, Maniglia CA, 酵素開裂の推定部位(Putative site(s) of enzymic cleavage), *Biochem J* 1992; 284: 589-593; Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, Flannery CR, *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 8683-8685)。全体として、少なくとも7個の開裂部位があると思われ、軟骨プロテオグリカン分解生成物のアミノ酸配列分析により、アミノ酸残基 A s n³⁴¹ - P h e³⁴² および G l u³⁷³ - A l a³⁷⁴ の間に球間(interglobular)ドメイン(I G D)内に存在するアグレカンにおけるタンパク質分解開裂の2個の主要な部位が定義されている(ヒト配列表)(Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y, *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 894-902)。前者の開裂部位は、ヒアルロン酸塩と錯体形成した組織に残っている50~60 kDaのG1ドメインからなるC-末端異化断片(... D I P E N)を生じる(Flannery CR ら, 1992)。最近の研究において、Fosang ら(Fosang AJ, Last K, Brown L, Jackson DC, Gardiner P, *Trans. Orthop. Res. Soc.* 1995; 20: 4)は、多種多様な関節炎と診断された患者からの滑液においてこの開裂部位からN-末端断片(F F G...)も同定した。同様に、Witt ら(Witt M, Fosang AJ, Hughes CE, Hardingham TE, *Trans. Orthop. Res. Soc.* 1995; 20: 122)は、コントロールおよびI L-1で刺激したブタ外植片培養物からの培地試料中にこれらのグリコースアミノグリカン含有N-末端断片を見いだした。後者の開裂部位は、関節炎患者の滑液から単離された主要なアグレカン分解生成物と思われ(Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD, *Arth. Rheum.* 1993; 36: 1214-1222)、かつI L-1またはレチノイン酸で処理した軟骨外植片培養物からの培地にも見られる(Hughes CE ら, 1995; Sandy JD ら, 1991)グリコースアミノグリカン含有N-末端断片(A R G...)を生成する。最近の研究(Lark MW ら, 1995)では、レチノイン酸で処理したラット軟骨肉腫細胞中のC-末端断片(... E G E)が同定された。このG l u³⁷³ - A l a³⁷⁴の開裂に関与するタンパク質分解活性は同定されていないが、G l u-X a aペプチド結合(但し、X a aはA l a、G l yまたはL e uである)に特異性を有するものと思われる。この今までのところ特定されていない活性は「アグレカナーゼ(Fosang AJ, Neame PJ, Last K, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA, *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19470-19474)」と呼ばれている。分子内の開裂の部位は十分に特定されているが、多数の様々なプロテオグリカン分解生成物の生成に関与する化合物の多くは今だ同定されていない。培養系は、プロテオグリカンの異化作用を促進する各種の化合物で操作され、その分解に関与する(複数の)化合物を見いだす努力がなされてきた。しかしながら、これらの研究は、アグレカンの分解に関与する特定の化合物を特定することはできなかった(Flannery CR, Sandy JD, *Trans. Orthop. Res. Soc.* 1993)。それにも拘らず、精製したアグレカンおよび改変したアグレカンを精製した酵素製剤の基質として用いる実験データから、これらの酵素の特異的な開裂部位について幾らかの情報が得られている。しかし、このイン・ビトロでの研究は軟骨でのアグレカンの分解に関与する機構を確定しまたは化合物を同定するのに直接役立っていない(Fosang AJ ら, 1992; Fosang AJ, Neame PJ, Hardingham

TE, Murphy G, Hamilton JA, J. Biol. Chem. 1991; 266: 15579-15582; Fosang AJ, Last K, Neame PJ ら, Biochem. J. 1994; 304: 347-351)。

【0003】

過去の研究(Hughes CEら, 1995; Hughes CE, Caterson B, White RJ, Roughley PJ, Mort JS, J. Biol. Chem. 1992; 267: 16011-16014)において、本発明者らは特異的なプロテイナーゼによって開裂された生成物(プロテオグリカン凝集体の異化作用生成物)に特異的な多数のモノクローナル抗体を開発した。これらの抗体は、軟骨外植片培養系においてプロテオグリカンの分解機構の研究における手段として有用であることが明らかにされた。この最新の研究の目的は、アグレカンの I G D における³⁷⁴A R G S V I... 部位におけるアグレカンの開裂に関与する化合物の同定を一層促進する培養系を更に開発すること

10

【0004】

【発明の概要】

本明細書において、本発明者らは、固有の内因性プロテオグリカンおよび他の細胞外成分を含まない細胞培養系において人工的組換え基質に対する「アグレカナーゼ」の活性を研究することができるようにするイン・ビトロの培養系の開発を説明する。アグレカンの I G D における重要な開裂部位に対する過去に特定されたネオエピトープ抗体を使用することによって、この系における「アグレカナーゼ」のタンパク質分解作用によって精製した生成物の監視が容易になった。

【0005】

20

それ故、本発明の一態様は、イン・ビトロ試験系におけるアグレカナーゼの組換え基質であり、好ましくは

- a) C D 5 のシグナル配列、
- b) M 1 モノクローナル抗体検出のための F L A G - エピトープ、
- c) ヒトアグレカンの球間ドメイン、
- d) ヒト I g G 1 のヒンジ領域、
- e) ヒト I g G 1 の C H 2 領域、および
- f) ヒト I g G 1 の C H 3 領域

を含んでなる構成要素の群を含む組換え基質である。

【0006】

30

本発明の好ましい態様は、配列番号 3 のアミノ酸配列またはその部分を有するか、または配列番号 3 のアミノ酸配列またはその部分であって、アミノ酸 3 4 が A 1 a に変異した組換え基質である。

【0007】

【発明の具体的説明】

本発明のもう一つの態様は、上記の組換え基質をコードする D N A であり、好ましくは配列番号 4 のヌクレオチド 2 3 5 0 ~ 4 1 1 4 のヌクレオチド配列またはその部分を有する、配列番号 4 のヌクレオチド 2 3 5 0 ~ 4 1 1 4 のヌクレオチド配列またはその部分であって、ヌクレオチド 2 4 4 8 が C に変異し、ヌクレオチド 2 4 5 0 が C に変異し、ヌクレオチド 2 4 5 1 が A に変異したものを有する、またはストリンジュント条件下で配列番号 4 に示した D N A とハイブリダイゼーションを行う、D N A である。

40

【0008】

本発明によるストリンジュント条件下でのハイブリダイゼーションとは、 $6 \times S S C$ (または $6 \times S S P E$)、 $0.5\% S D S$ および $100 \mu g / m l$ の変性したサケ精子 D N A 断片を含むハイブリダイゼーション溶液中で標識したプローブの融点下の $20 \sim 25^{\circ}C$ の温度におけるハイブリダイゼーションを意味する (Sambrook ら, 「分子クローニング実験室便覧(Molecular Cloning - A Laboratory Manual)」, 第 2 版, 1989 年, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 巻, 第 9 章, 9.52 ~ 9.55 頁)。

【0009】

本発明の他の態様は、上記のヌクレオチド配列を有する D N A 断片を含むベクター、およ

50

び前記ベクターを含む宿主細胞である。

【0010】

本発明のもう一つの態様は、アグレカナーゼの活性を試験する目的での細胞培養系での上記の組換え基質の使用であり、好ましくは上記細胞培養系が固有の内因性プロテオグリカンおよび他の細胞外成分を含まない、使用である。

【0011】

本発明のもう一つの態様は、アグレカナーゼの活性の試験を抗体による開裂生成物の検出によって行う、上記の組換え基質の使用である。

【0012】

本発明のもう一つの態様は、組換え基質における新規な酵素開裂部位の検出を行うための上記基質の使用である。 10

【0013】

本発明のもう一つの態様は、アフィニティークロマトグラフィーによってアグレカナーゼを精製するための、またはアグレカナーゼ cDNA を単離するための機能性クローニング系における上記の組換え基質の使用である。

【0014】

本発明のもう一つの態様は、骨関節症の開始または進行を監視する方法であって、骨関節症を有することが疑われるまたは知られているヒトからの生物学的流体の試料を、上記の組換え基質によるアグレカナーゼの存在について分析を行い、上記生物学的流体が、滑液、尿、血清およびリンパ液からなる群から選択されることを特徴とする方法である。 20

【0015】

本発明のもう一つの態様は、疾病の進行を観察して治療の有効性を決定することに使用する、上記の方法である。

【0016】

本発明のもう一つの態様は、アグレカナーゼ阻害剤をスクリーニングする目的での上記の組換え基質の使用である。

【0017】

本発明のもう一つの態様は、上記の組換え基質および抗体を含み、アグレカナーゼ開裂生成物を検出するための診断助剤である。

【0018】

以下において、本発明を実施例、および図面によって詳細に説明する。 30

なお、図6および7のアミノ酸配列は配列番号3の配列と、図8～11の塩基配列は配列番号4の配列と、それぞれ対応する。

【0019】

【実施例】

材料

アルカリホスファターゼと結合した第二の抗体およびウェスタンブロット分析に用いられる基質は、Protoplot Western blot AP 系（カタログ番号W3920）としてPromegaから得た。ニトロセルロース（孔径0.2 μm）は、Schleicher and Schnellから入手した。モノクローナル抗体M1および抗FLAG M1アフィニティゲルは、いずれも Kodak から入手した。抗ヒトIgモノクローナル抗体は、Capell、Durhamから入手した。モノクローナル抗体BC-3、2-B-6および3-B-3は、腹水として調製した(Hughes CEら, 1995)。R x 細胞系は、Dr. Jim Kimura, Bone Research Center, Henry Ford Hospital, デトロイト, ミシガン州の好意により提供を受けた。 40

【0020】

実施例1 rAGG1 遺伝子構築物の調製

rAGG1の遺伝子構築物は、リンパ細胞糖タンパク質T1/Leu-1 (CD5) のシグナル配列、長さが8個のアミノ酸のFLAG (商標名) エピトープ(Prickett KS, Amberg DC, Hopp TP, Bio Techniques 1989; 7: 580-589)、ヒト軟骨大の凝集性プロテオグリカンアグレカンの長さが127個のアミノ酸の球間ドメイン (³⁵⁰T - ⁴⁷⁶G) (Doege K 50

J ら, 1991)、長さが2個のアミノ酸のグリシンスペーサー、およびヒト I g G 1 ヒンジ、C H 2 および C H 3 不変領域をコードすることにより、予想分子質量が 41.059 d の融合タンパク質を生じる。球間ドメインをコードするアグレカン c D N A 配列を、この領域の近接(flanking)配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドとヒトヒザ軟骨の総 R N A とを用いる逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(R T - P C R) (Beverly SM, 分子生物学における最新のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、カナダ: John W iley and Sons, 1992)によって増幅した。総 R N A は、Adams ら(Adams ME, Huang DQ, Y ao LY, Sandell LJ, Anal. Biochemistry 1992; 202: 89-95)により、関節交換手術から得たヒト軟骨組織から抽出した。オリゴヌクレオチドは、F L A G エピトープおよび g - スペーサーに関する追加配列情報を含み、かつ増幅した c D N A セグメントの 5' および 3' 末端に制限酵素開裂部位を有し、続いて 3' N h e l 部位を含むように改変した C D 5 - I g G 1 発現ベクターに挿入し易くなるように設計した(Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B, Cell 1990; 61: 1303-1313)。F L A G エピトープおよび球間ドメインのアミノ末端開始をコードし且 N h e l 部位を含むプライマーを、下記の配列: 5' -CGC GGG GCT AGC CGA CTA CAA GGA CGA CGA TGA CAA GAC AGG TGA AGA CTT TGT GGA C (配列番号: 1) を用いて合成した。球間ドメインのカルボキシ末端、G - スペーサー、B a m H I 部位を含むスプライスドナー部位をコードするリバースプライマーは、配列: 5' -CGC GGG GGA TCC CCT CCC CCT GGC AAA TGC GGC TGC CC (配列番号: 2) を有する。P C R 生成物を N h e I および B a m H I で消化して、N h e I および B a m H I 切断ベクター C D 5 - I g G (Aruffo A ら, 1990) に連結した。

【0021】

実施例 2 C O S 細胞における r A G G の生産および精製

構築物を、D E A E - デキストランを介して C O S 細胞にトランスフェクションした(Hollenbaugh D, Aruffo A, 分子生物学における最新のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、カナダ: John Wiley and Sons, 1994)。トランスフェクションから 12 時間後に、D M E M、10% F C S 中で育成した細胞をトリプシン処理して、新たな皿に播種し、5 日間育成させた。3 日目に、新たな培地および 10% F C S を加えた。上清を回収して非付着細胞および破片を除いて、4℃で貯留して保存した。融合タンパク質を、抗-F L A G (商標名) M1 アフィニティーゲル(Kodak、ニューヘブン)を用いて、製造業者のプロトコルに従ってアフィニティー精製した。通常は、収率は、培養物上清 1 m l 当たり 1 ~ 5 μ g 融合タンパク質であった。

【0022】

実施例 3 組換え I G D 基質および天然アグレカンの異化作用の試験のためのレチノイン酸の存在下または非存在下でのアガロース中でのラット軟骨肉腫細胞の培養

ラット軟骨肉腫細胞を 75 c m² フラスコで培養し、5% F C S および 50 μ g / m l ゲンタマイシンを含む D M E M 培地に保持した。75 c m² フラスコ中のコンフルエント単層を 37℃で 15 ~ 20 分間攪拌しながらトリプシン処理(E D T A を含む D M E M 中 0.25% トリプシン)を行った後、D M E M 中 0.05% コラゲナーゼで 1 ~ 2 時間消化した。次いで、細胞を 4 × 10⁶ 個 / m l の濃度で D M E M に再懸濁した。24 ウェルの培養プレートに FMC Seaplaque アガロース / D M E M の 1% (重量 / 容量) 溶液を「コーティング」し(200 μ l / ウェル)、アガロースを 4℃で 30 分間インキュベーションして固化した(Aydelotte MB, Juettner KE, Conn. tissue Res. 1988; 18: 205-222)。次に、プレートを 37℃に平衡にした。ラット軟骨細胞懸濁液(上記)を Seaplaque アガロース / D M E M の 2% 溶液で希釈して、最終細胞濃度を 2 × 10⁶ 個 / m l となるようにした。アガロース細胞懸濁液 200 μ l (0.4 × 10⁶ 個)を前もって調製したアガロースプラグに重層し、この直後に組換え I G D 基質(r A G G 1)または天然のウシアグレカン(A 1 D 1) 50 μ g を適当なウェルに加え、攪拌混合した。次に、プレートを 4℃で 15 分間インキュベーションして、アガロースを固化した。次に、(レチノイン酸を含むまたは含まない)実験培地を、組換え I G D 構築物、天然のウシアグレカン(A 1 D 1) および細胞のみを含む三つ組ウェルに下記のようにして加えた。コントロール培養物

、DMEM+ゲンタマイシン ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) および処理済み培養物、DMEM+ゲンタマイシン ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) + 10^{-6}M レチノイン酸 (Hughes CE ら, 1995)。次に、アガロース細胞培養物を $5\% \text{CO}_2$ 中で 37°C で 96 時間保持した後、培地およびアガロース細胞マトリックス抽出物を更に分析した。

【0023】

実施例 4 コントロールおよびレチノイン酸で刺激したアガロース培養物からの実験的培地の分析

組換え IGD 基質培養物からの培地および細胞のみを含む培養物を、蒸留水に対して徹底的に透析し、凍結乾燥し、 10% (容量/容量) メルカプトエタノールを含む SDS-PAGE 試料緩衝液の等容に再構成した。A1D1 培養物および細胞のみを含む培養物からの培地試料を 0.1M Tris、 50mM 酢酸ナトリウム、 $\text{pH} 6.5$ に透析し、以前に報告した方法を用いて脱グリコシル化した (Hughes CE ら, 1995)。次に、試料を蒸留水に対して徹底的に透析して、凍結乾燥し、SDS-PAGE 試料緩衝液の等容に再構成した。次に、試料 (等容/ウェル) を SDS-PAGE に付し、ニトロセルロースに移し、下記の操作を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体で免疫局在化を行った (immunolocalized)。

10

【0024】

実施例 5 コントロールおよびレチノイン酸で刺激した培養物からのアガロース-細胞マトリックスの抽出

組換え IGD 基質培養物、ウシ A1D1 培養物、および細胞のみを含む培養物からのアガロースプラグを、下記の酵素阻害剤を含む 4M 塩化グアニジニウムで 4°C で 24 時間抽出した。 10mM EDTA、 5mM ベンズアミジン塩酸塩、 0.1M 6-アミノヘキサ酸、および 1mM フッ化フェネチルメタンスルホニル。アガロースゲルの残渣を遠心分離によって除去した後、上清を上記の基質のそれぞれについて処理した。次に、試料 (等容/ウェル) を SDS-PAGE に付し、ニトロセルロースに移し、下記の手続きを用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体で免疫局在化を行った。

20

【0025】

実施例 6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット分析

天然の組換え IGD 基質およびその異化作用生成物を含む試料を、Laemmli によって記載された操作を用いて SDS 中 10% ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行った (Laemmli UK, Nature 1970; 227: 680-685)。電気泳動の後、分画したタンパク質を電気泳動によりニトロセルロースに移し、以前に記載した手続きを用いて (Hughes CE ら, 1995)、抗-FLAG モノクローナルまたは抗ヒト免疫グロブリンまたはモノクローナル抗体 BC-3 (いずれも $1:1000$ の希釈度) で免疫局在化を行った。天然のウシ A1D1 およびその異化作用生成物を含む試料を $3\sim 15\%$ SDS-PAGE ゲル上で電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に移し、モノクローナル 3-B-3、2-B-6 および BC-3 の $1:1000$ 希釈度で免疫局在化した。通常は、免疫ブロットを基質と室温で $5\sim 15$ 分間インキュベーションして最適な色を展開した。

30

【0026】

実施例 7 組換え IGD 構築物の特徴

40

組換え IGD 構築物の COS 細胞へのトランスフェクションの結果、細胞が発現し、続いて組換え IGD 生成物が培地へ分泌された。抗-FLAG M1 アフィニティーゲルの使用により、トランスフェクションした細胞培地からのその精製が促進された。トランスフェクションした COS 細胞培地 1 リットルは、組換え IGD 基質 $1\sim 5\text{mg}$ を生じた。非還元条件下では、この組換え IGD 基質は、分子の免疫グロブリンドメインにおける不均一な数のシステイン残基の存在により高分子量の凝集体が形成された。この凝集体の形成により、アガロース培養物中の組換え IGD 基質の固定が促進された。還元条件下では、組換え IGD 構築物は、 10% SDS-PAGE ゲル上で分離した後に見られるように、概算 Mr が 72kDa および 39kDa の 2 種類の分子量成分として存在した。組換え IGD 基質の 2 種類の形態が存在する理由は、現在のところは不明であるが、(構築物の F

50

L A G 領域におけるエピトープを認識する) 抗 M 1 モノクローナルおよび (構築物の免疫グロブリン領域におけるエピトープを認識する) 抗 I g モノクローナル抗体はいずれも組換え I G D 構築物の両方の形態を認識した (immunolocated)。分離した組換え I G D 構築物をクーマシー染色したゲルをデンシトメーターで分析したところ、72 k D a 対 39 k D a のバンドの比率は約 10 : 1であることを示していた (結果は図示せず)。

【0027】

実施例 8 レチノイン酸で処理したおよび処理しなかったアガロース培養物からの I G D 組換え構築物の免疫化学分析

組換え I G D 基質を、レチノイン酸を用いてまたは用いずにラット軟骨肉腫の軟骨細胞を含むアガロース細胞培養物中で 96 時間固定した。培養液中での I G D 組換え基質およびその代謝物の分析は、S D S - P A G E およびウェスタンブロット分析によって検討した。(組換え基質の N - 末端において F L A G ドメインにおけるエピトープを認識する) 抗 M 1 で免疫したところ、コントロール培養物またはレチノイン酸で処理した培養物からの培地に含まれる r A G G - 1 代謝物のパターンに差は見られなかった。しかしながら、組換え基質の C - 末端において免疫グロブリンドメインにおけるエピトープを認識する) 抗 I g で免疫したところ、65 k D a で移動する追加バンドが存在することが示されており、72 k D a の未消化組換え基質の部分異化が起こったことを示唆していた。この結果は、(N - 末端における) M 1 エピトープは、I G D 組換え基質の 72 k D a 形から開裂して 65 k D a の異化生成物を生じること示している。72 k D a のバンドについて抗 M 1 での陽性の免疫染色が見られないことは、この結論を裏付けている。I G D 構築物のこの開裂が組換え基質の「アグレカナーゼ」部位で起こっていることを確かめるため、レチノイン酸で処理したおよび処理しなかった軟骨細胞培養物の培地試料を、モノクローナル抗体 B C - 3 (抗 A R G ...) を用いる免疫プロットングによって検討した。B C - 3 で免疫したところ、レチノイン酸なしの培養物には反応性は見られず、レチノイン酸で処理した培養物では 65 k D a に唯一の免疫陽性のバンドが見られた。この結果は、I G D 組換え基質の 72 k D a 形の「アグレカナーゼ」異化作用が起きたことを示している。しかしながら、39 k D a のアイソフォームが異化作用を受けたという証拠はなかった。陽性の 39 k D a 形の異化生成物について B C - 3 による免疫染色が見られないことは、r A G G - 1 製剤には 72 k D a 形が 10 倍も多くあるので、これらの異化生成物は低濃度で存在することによると思われる。65 k D a の異化生成物は r A G G - 1 の 72 k D a 形から誘導されることを確かめるため、B C - 3 免疫ブロットを抗 M 1 抗体で再プローブした。

【0028】

実施例 9 レチノイン酸で処理したおよび処理しなかったアガロース培養物からの天然のウシ A 1 D 1 の分析

この培養系における天然基質の使用についても評価を行い、これを人工の組換え基質と比較した。天然のウシアグレカン (A 1 D 1) を、レチノイン酸で処理したおよび処理しなかったラット軟骨細胞を含むアガロースと混合した。ウシ A 1 D 1 を加えなかったアガロース細胞培養物も分析して、培養の 96 時間中に合成された内因性プロテオグリカン (潜在的基質) の寄与について分析を行った。培地試料をモノクローナル抗体 2 - B - 6 で免疫したところ、細胞のみを含むアガロース培養物から採取した培地には染色は見られなかった。この結果は、培養期間に新たに合成された内因性基質の著しい寄与はなかったことを示している。レチノイン酸でおよびなしで保持された外部から添加されたウシアグレカン基質を含む培養物は、過去に幾つかの研究によって記載されたようにタンパク質コアの予想可能な配置「梯子」を示している (Hughes CE ら, 1995; Ilic MZ, Handley CJ, Robinson HC, Biochem. Internat. 1990; 21: 977-986)。同様な結果は、モノクローナル抗体 3 - B - 3 を用いても見られた (図 2、レーン 4、5 および 6)。対照的に、N - 末端配列 A R G S V ... を有する「アグレカナーゼ」によって生成したアグレカン異化生成物について抗体 B C - 3 を用いる免疫染色は、レチノイン酸処理を施した培養物のみで観察された。この B C - 3 陽性アグレカン異化生成物の総体分子量は約 160 k D a であり、他の

培養系で見られるものと同様である (Hughes CEら, 1995)。

【0029】

組換え基質および天然のウシアグレカンを有する培養物からの培地および抽出物試料は、MMP 1、2、3、7、8または9によるアグレカン IGDのタンパク質加水分解によって生成するN-末端ネオエピトープFFGV...を認識する新たに開発された抗体 (BC-14) でも精査した。BC-14を用いる免疫ブロッティングは、いずれの培養系でも陰性であった (データ省略)。この結果は、この部位におけるIGDの異化作用は起きず、この知見は他の研究室からの報告と一致することを示している (Lark MWら, 1995)。

【0030】

実施例 10

更に検討を行うため、本発明者らは組換え基質 rAGG-1mut、本発明者らの融合タンパク質 rAGG-1の一変形であって、IGDのアミド末端における代替スプライスドナーを突然変異して、別のスプライシングを防止するものを用いた。その親構築物として、rAGG-1mutは、アミノ末端タグとしてFLAGエピトープ、ヒトアグレカンのIGD、およびカルボキシ末端タグとしてヒトIgG分子の不変領域を含む。一時トランスフェクションの結果、rAGG-1mutは融合タンパク質としてのCOS細胞によって培養物上清に分泌され、還元条件下では72kDのバンドとして、また非還元条件下では140kDのバンドとして移動し、構築物のC-末端におけるヒト免疫グロブリン成分のヒンジ領域における不対システインの存在による二量体化を反映しているものと思われる。

【0031】

レチノイン酸 (RA) でシミュレーションすると、ラット軟骨肉腫細胞系RXのアガロースを埋設した細胞はアグレカナーゼを生成する。rAGG-1mutは、rAGG-1について記載されたようにアグレカナーゼ部位で異化し、これはモノクローナル抗体BC-3を用いる免疫検出によって示される。この異化生成物の66kDのサイズは、アグレカナーゼ部位での開裂の後の5.8kDの予想された損失と一致している。

【0032】

rAGG-1mutのアミノ酸配列は、rAGG-1のアミノ酸配列と位置34だけが異なり、rAGG-1mutはAla34を含み、rAGG-1はGly34を含む。

【0033】

rAGG-1mutをコードするDNAのヌクレオチド配列は、rAGG-1をコードするDNAと3個の位置で異なり、2448ではAがCに、2450ではGがCに、2451ではTがAに置換されている。

【0034】

一般的検討

これらの結果は、「アグレカナーゼ」活性の検討のための組換え基質の生産および使用の最初の報告である。また、本発明者らは、基質として作用する複雑な内因性アグレカン無しで「アグレカナーゼ」活性を監視するための新規な細胞培養物を開発した。この人工基質 (rAGG1) の独特な凝集特性により、アガロース細胞培養系におけるその固定が容易になる。更に、本発明者らは、内因性細胞外マトリックスを確立して、任意の「アグレカナーゼ」活性の基質として作用させる必要なしに新たに単離した軟骨細胞を用いることができた。組換えIGD構築物で得られた結果は、「アグレカナーゼ」部位における開裂のアグレカンのEGDについてG1および/またはG2ドメインを必要としないことを示している。更に、天然のアグレカン分子ではこの領域に剛性を与えることができるIGD内では、(rAGG-1構築物は抗硫酸ケラタン抗体5-D-4を用いるウェスタンブロット分析では陽性染色を示さない) 硫酸ケラタン鎖は必要ないと思われる (結果省略)。この新たに開発された培養系は、「アグレカナーゼ」によるアグレカン分解に関与した分子機構を更に検討するのに有用であることが明らかになるであろう。組換え基質およびネオエピトープ抗体が利用可能であるとすれば、新しい実験法が他のマトリックス高分子の異化作用の研究用に考えられる。

10

20

30

40

50

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：58

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

10

配列の特徴

特徴を表す記号：exon

存在位置：1 . . 58

配列

CGCGGGGCTA GCCGACTACA AGGACGACGA TGACAAGACA GGTGAAGACT TTGTGGAC 58

20

【0036】

配列番号：2

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

30

配列の特徴

特徴を表す記号：exon

存在位置：1 . . 38

配列

CGCGGGGGAT CCCCTCCCCC TGGCAAATGC GGCTGCCC 38

【0037】

40

配列番号：3

配列の長さ：396

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

10

```

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1           5           10           15
Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
           20           25           30
Thr Gly Glu Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly
           35           40           45
Gly Glu Glu Asp Ile Thr Val Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Met Glu
           50           55           60
Leu Pro Leu Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val
65           70           75           80
Ile Leu Thr Val Lys Pro Ile Phe Glu Val Ser Pro Ser Pro Leu Glu
           85           90           95
Pro Glu Glu Pro Phe Thr Phe Ala Pro Glu Ile Gly Ala Thr Ala Phe
           100          105          110
Ala Glu Val Glu Asn Glu Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Gly Phe
           115          120          125
Pro Thr Pro Gly Leu Gly Pro Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu
           130          135          140
Val Val Gln Val Thr Ala Val Pro Gly Gln Pro His Leu Pro Gly Gly
145          150          155          160
Gly Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

```

20

30

40

	165		170		175	
Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu Phe				
	180		185		190	
Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val				
	195		200		205	
Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe					
	210		215		220	
Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro					
225		230		235		240
Arg Glu Glu	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr					
	245		250		255	
Val Leu His	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val					
	260		265		270	
Ser Asn Lys	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala					
	275		280		285	
Lys Gly Gln	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg					
	290		295		300	
Asp Glu Leu	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly					
305		310		315		320
Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro					
	325		330		335	
Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser					
	340		345		350	
Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln					
	355		360		365	
Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His					
	370		375		380	
Tyr Thr Gln	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
385		390		395		

10

20

30

40

配列番号：4

配列の長さ：5 3 3 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：exon

存在位置：1 . . 5 3 3 7

配列

GGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG 60
GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA 120
AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG 180
CCTACATACC TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG 240
TGTCTTACCG GGTGGAAGTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA 300
ACGGGGGGTT CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC 360
CTACAGCGTG AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT 420
CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC 480
TGGTATCTTT ATAGTCTGTG CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA 540
TGCTCGTCAG GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCAAGCTA GCTTCTAGCT 600
AGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATTTTGTG AAATCAGCTC 660
ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGCCCGA 720
GATAGGGTTG AGTGTGTGTC CAGTTTGGA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC 780
CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CGCCCACTAC GTGAACCATC 840
ACCCAAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGTG CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAAGG 900
GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGAAGGGAA 960
GAAAGCGAAA GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA GCGGTACGCG TCGCGTAAC 1020
CACCACACCC GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT ACAGGGCGCG TACTATGGTT GCTTTGACGA 1080
GCACGTATAA CGTGCTTTCC TCGTTGGAAT CAGAGCGGGA GCTAAACAGG AGGCCGATTA 1140

10

20

30

40

AAGGGATTTT AGACAGGAAC GGTACGCCAG CTGGACCGCG GTCTTTCTCA ACGTAACACT 1200
 TTACAGCGGC GCGTCATTTG ATATGATGCG CCCCCTTCC CGATAAGGGA GCAGGCCAGT 1260
 AAAAGCATTAA CCCGTGGTGG GGTTCCTGAG CGGCCAAAGG GAGCAGACTC TAAATCTGCC 1320
 GTCATCGACT TCGAAGGTTT GAATCCTTCC CCCACCACCA TCACTTTCAA AAGTCCGAAA 1380
 GCTGCTCCCT GCTTGTGTGT TGGAGGTGCG TGAGTAGTGC GCGAGTAAAA TTTAAGCTAC 1440
 AACAAGGCAA GGCTTGACCG ACAATTGCAT GAAGAATCTG CTTAGGGTTA GCGTTTTTGC 1500
 GCTGCTTCGC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA 1560
 ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA 1620
 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCC GCCCAT TGACGTCAAT 1680
 AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA 1740
 CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC 1800
 CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT 1860
 ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGTGAT 1920
 GCGGTTTTTG CAGTACATCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG 1980
 TCTCCACCCC ATTGACGTCA ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC 2040
 AAAATGTCTG AACAACCTCG CCCCATTGAC GCAAATGGGC GGAATTCCTG GCGGGGACTG 2100
 GGGAGTGGCG AGCCCTCAGA TGCTGCATAT AAGCAGCTGC TTTTTCCTG TACTGGGTCT 2160
 CTCTGGTTAG ACCAGATCTG AGCCTGGGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT 2220
 AAGCCTCAAT AAAGCTTCTA GAGATCCCTC GACCTCGAGA TCCATTGTGC TCTAAAGGAG 2280
 ATACCCGGCC AGACACCCTC ACCTGCGGTG CCCAGCTGCC CAGGCTGAGG CAAGAGAAGG 2340
 CCAGAAACCA TGCCCATGGG GTCTCTGCAA CCGCTGGCCA CCTTGTACCT GCTGGGGATG 2400
 CTGGTCGCTT CCGTGCTAGC CGACTACAAG GACGACGATG ACAAGACAGG TGAAGACTTT 2460
 GTGGACATCC CAGAAAACCT CTTTGGAGTG GGGGGTGAGG AGGACATCAC CGTCCAGACA 2520
 GTGACCTGGC CTGACATGGA GCTGCCACTG CCTCGAAACA TCACTGAGGG TGAAGCCCGA 2580
 GGCAGCGTGA TCCTTACCGT AAAGCCCATC TTCGAGGTCT CCCCAGTCC CCTGGAACCC 2640
 GAGGAGCCCT TCACGTTTGC CCCTGAAATA GGGGCCACTG CCTTCGCTGA GGTGAGAAT 2700
 GAGACTGGAG AGGCCACCAG GCCCTGGGGC TTTCCACAC CTGGCCTGGG CCCTGCCACG 2760
 GCATTCACCA GTGAGGACCT CGTCGTGCAG GTGACCGCTG TCCCTGGGCA GCCGCATTTG 2820
 CCAGGGGGAG GGGATCCCGA GGGTGAGTAC TAAGCTTCAG CGCTCCTGCC TGGACGCATC 2880

10

20

30

40

CCGGCTATGC AGCCCCAGTC CAGGGCAGCA AGGCAGGCCC CGTCTGCCTC TTCACCCGGA 2940
 GGCCTCTGCC CGCCCCACTC ATGCTCAGGG AGAGGGTCTT CTGGCTTTTT CCCCAGGCTC 3000
 TGGGCAGGCA CAGGCTAGGT GCCCCTAACC CAGGCCCTGC ACACAAAGGG GCAGGTGCTG 3060
 GGCTCAGACC TGCCAAGAGC CATATCCGGG AGGACCCTGC CCCTGACCTA AGCCCACCCC 3120
 AAAGGCCAAA CTCTCCACTC CCTCAGCTCG GACACCTTCT CTCCTCCCAG ATTCCAGTAA 3180
 CTCCCAATCT TCTCTCTGCA GAGCCCAAAT CTTGTGACAA AACTCACACA TGCCCACCGT 3240
 GCCCAGGTAA GCCAGCCCAG GCCTCGCCCT CCAGCTCAAG GCGGGACAGG TGCCCTAGAG 3300
 TAGCCTGCAT CCAGGGACAG GCCCCAGCCG GGTGCTGACA CGTCCACCTC CATCTCTTCC 3360
 TCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCC AAA ACCCAAGGAC 3420
 ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA 3480
 GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA 3540
 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG 3600
 CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA 3660
 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGTGGGA CCCGTGGGGT GCGAGGGCCA 3720
 CATGGACAGA GGCCGGCTCG GCCCACCCTC TGCCCTGAGA GTGACCGCTG TACCAACCTC 3780
 TGTCCCTACA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA 3840
 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT 3900
 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT 3960
 GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG 4020
 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC 4080
 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGTGCGA CGGCCGCGAC TCTAGAGGAT 4140
 CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT GACATAATTG GACAACTAC CTACAGAGAT 4200
 TTAAAGCTCT AAGGTAAATA TAAAATTTTT AAGTGTATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT 4260
 AATTGTTTGT GTATTTTAGA TTCCAACCTA TGGAAGTAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA 4320
 TGCCTTTAAT GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC 4380
 TACTGCTGAC TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG AGAAAGGTAG AAGACCCCAA 4440
 GGACTTTTCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT GAGTCATGCT GTGTTTAGTA ATAGAACTCT 4500
 TGCTTGCTTT GCTATTTACA CCACAAAGGA AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAAATTAT 4560
 GGAAAAATAT TCTGTAACCT TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT 4620

10

20

30

40

TTTTCTTACT CCACACAGGC ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC AAAAATTGTG 4680
 TACCTTTAGC TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTTGATGT ATAGTGCCTT 4740
 GACTAGAGAT CATAATCAGC CATACCACAT TTGTAGAGGT TTTACTTGCT TAAAAAACC 4800
 TCCCACACCT CCCCCTGAAC CTGAAACATA AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT 4860
 TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG 4920
 CATTTTTTTT ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAACT CATCAATGTA TCTTATCATG 4980
 TCTGGATCCT GTGGAATGTG TGTCACTTAG GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG 5040
 GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG 5100
 GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC 5160
 CGCCCCTAAC TCCGCCCATC CCGCCCCTAA CTCCGCCAG TTCCGCCCAT TCTCCGCCCC 5220
 ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT 5280
 TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTAATTC 5337

10

【図面の簡単な説明】

20

【図1】 rAGG-1の構造を示した図である。

rAGG-1は、CD5のシグナル配列：SS、M1モノクローナル抗体検出のためのFLAG-エピトープ：FLAG、ヒトアグレカンの球間ドメイン：IGD、ヒトIgG1のヒンジ領域：H、ヒトIgG1のCH2領域：CH2、およびヒトIgG1のCH3領域：CH3からなっている。

【図2】モノクローナル抗体M1（M1-MoAb）を用いたCOS細胞におけるrAGG-1発現の検出の結果を示した写真である。

【図3】FLAGエピトープにより精製したrAGG-1の電気泳動（SDS-PAGE）写真である。レーンA：クーマシー染色、レーンB：モノクローナル抗体M1を用いるウェスタンブロット検出、レーンC：抗ヒトIgG抗血清。

30

【図4】ラット軟骨肉腫細胞からの細胞培養液中のrAGG-1のBC-3反応性を示した電気泳動写真である。

レーンA：未刺激ラット軟骨肉腫細胞の培養物からのrAGG-1はウェスタンブロット上ではBC-3モノクローナル抗体では検出されないが、レチノイン酸出刺激した細胞の培養物からのrAGG-1は検出される。レーンB、レーンC：モノクローナル抗体M1で再プロービングした後の同様なブロット。BC-3反応性断片は元の72kDバンドより約5.6kD小さく、「アグレカナーゼ」部位におけるrAGG-1の開裂を示している。

【図5】「アグレカナーゼ」活性を検出するための可能な96ウェルのフォーマットスクリーニング分析用の構造（ピン蓋を有する）を示した図である。

40

【図6】rAGG-1のアミノ酸配列（アミノ酸残基1～224番）を示した図である。アミノ酸1～24はCD5シグナル配列を、アミノ酸25～32はFLAG配列を、アミノ酸33～160はヒトアグレカン球間ドメインを、アミノ酸161～164はスペーサー配列を、アミノ酸165～179はヒトIgG1のヒンジ配列を、アミノ酸180～289はヒトIgG1のCH2領域を、アミノ酸290～396はヒトIgG1のCH3領域を、それぞれ示す。

【図7】rAGG-1のアミノ酸配列（アミノ酸残基225～396番）を示した図である。図6の続きである。

【図8】rAGG-1の真核細胞における発現のためのベクターpCDM8-rAGG-1のヌクレオチド配列を示した図である。

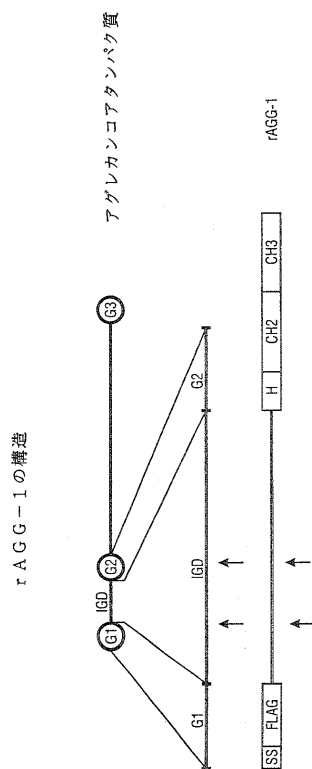
50

【図 9】 r A G G - 1 の真核細胞における発現のためのベクター p C D M 8 - r A G G - 1 のヌクレオチド配列を示した図である。図 8 の続きである。

【図 10】 r A G G - 1 の真核細胞における発現のためのベクター p C D M 8 - r A G G - 1 のヌクレオチド配列を示した図である。図 9 の続きである。

【図 11】 r A G G - 1 の真核細胞における発現のためのベクター p C D M 8 - r A G G - 1 のヌクレオチド配列を示した図である。図 10 の続きである。

【図 1】

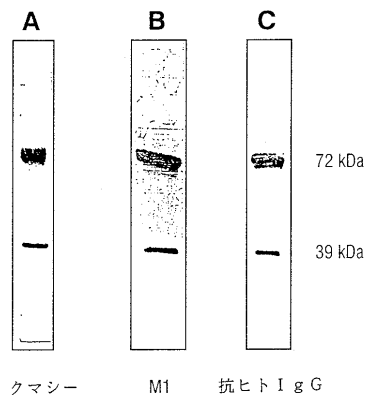


【図 2】

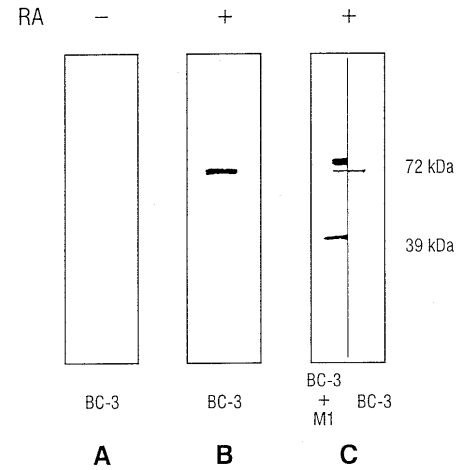
図面代用写真



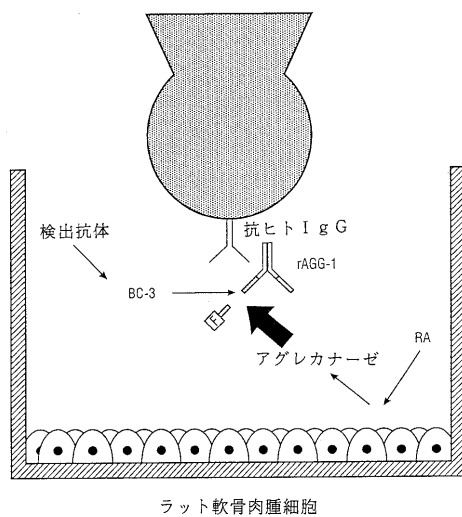
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
20 25 30

Thr Gly Glu Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly
35 40 45

Gly Glu Glu Asp Ile Thr Val Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Met Glu
50 55 60

Leu Pro Leu Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val
65 70 75 80

Ile Leu Thr Val Lys Pro Ile Phe Glu Val Ser Pro Ser Pro Leu Glu
85 90 95

Pro Glu Glu Pro Phe Thr Phe Ala Pro Glu Ile Gly Ala Thr Ala Phe
100 105 110

Ala Glu Val Glu Asn Glu Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Gly Phe
115 120 125

Pro Thr Pro Gly Leu Gly Pro Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu
130 135 140

Val Val Gln Val Thr Ala Val Pro Gly Gln Pro His Leu Pro Gly Gly
145 150 155 160

Gly Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
180 185 190

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
195 200 205

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
210 215 220

【図 7】

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
225 230 235 240	
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
245 250 255	
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
260 265 270	
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
275 280 285	
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
290 295 300	
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
305 310 315 320	
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
325 330 335	
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
340 345 350	
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	
355 360 365	
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	
370 375 380	
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
385 390 395	

【図 8】

GGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAA CCACGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTGGCG	60
GATCAAGAGC TACCACTCT TTTCCGAAG GTAACCTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA	120
AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG	180
CCTACATACC TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCGAGTGG CGATAGTCTG	240
TGCTTTACCG GGTGGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCCGGCTGA	300
ACGGGGGGTT CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC	360
CTACAGCGTG AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCGCCAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT	420
CCGCTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CCGACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC	480
TGGTATCTTT ATAGTCCTGT CGGGTTTGGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGTA	540
TGCTCGTCAG GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCAAGCTA GCTTCTAGCT	600
AGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTAAAT ATTCCGTTA ATTTTGTGT AAATCAGCTC	660
ATTTTAAAC CAATAGCCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAG AATAGCCCGA	720
GATAGGGTTG ACTGTTGTTT CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACOTGGACTC	780
CAACGTCAA GGGCGAAAAA CCGCTATCA GGGCGATGCG CGCCCACTAC GTGAACCATC	840
ACCCAAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGTG CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAGG	900
GAGCCCCGTA TTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC CTGGCAGAAA AGGAAGGAAA	960
GAAAGCGAAA GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTCTA GCGGTCAAGC TGGCGGTAA	1020
CACCAACCCC GCCGGGCTTA ATCGCGGCT ACAGGGCGCG TACTATGTT GCTTTGACGA	1080
GCACGTATAA CTTGCTTTC TCGTTGAAAT CAGACGGGGA GCTAAACAGG AGGCGGATTA	1140
AAGGGATTTT AGACAGAAC GGTACGCCAG CTGGACCGCG CTCTTCTCA ACCTAACACT	1200
TTACAGCGGC GCCTCATTTG ATATGATCG CCCCCTTCC CGATAAGGGA GCAGGCCACT	1260
AAAAGCATT ACGGTGGTG GGTCCCGAG CGGCCAAGG GAGCAGACTC TAAATCTGCC	1320

【図 9】

GTCACTGACT TCGAAGGTTG GAATCTCTCC CCGACACCA TCACCTTCAA AAGTCCGAAA	1380
GCTGCTCCCT GCTTGCTGT TGGAGTGGC TGAGTAGTGC GCGAGTAAAT TTAAGCTAC	1440
AACAAGGCAA GGCCTGACC ACAATGCTA GAAGATCTG CTTAGGTTA GCGGTTTTGC	1500
GCTGCTCCG GATCTACGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA	1560
ATAGTAATCA ATTACGGGT CATTAGTTA TAGCCATAT ATGAGCTTCC GCGTTACATA	1620
ACTTACGGTA AATGCGCGC CTGGCTGACC GCCACAGAC CCGCGCCAT TGAGCTCAAT	1680
AATGAGCTAT GTTCCCATG TAAAGCAAT AGGACCTTC CATTGAGTC AATGGGTGGA	1740
CTATTACGG TAACTGCCCT ACTTGGCAT ACATCAAGT TATCATATGC CAAGTACGCC	1800
CCCTATTGAC GTCAATGAG GTAATGGCC CGCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT	1860
ATGGGACTTT CCTACTGGC AGTACATCTA COTATTAGT ATCGCTATTA COTAGGTGAT	1920
GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT GACTCACGG GATTTCGAAG	1980
TCGCCACCCC ATTGACGTCA ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC	2040
AAAATGTCT AACAACCTCG CCCCATTGAC GCAATGGGC GGAATTCCTG GCGCGGACTG	2100
GGGACTGGCG AGCCCTCAGA TGCTGCATAT AAGCAGCTGC TTTTGCCTG TACTGGGTCT	2160
CTCTGTTAG ACCAGATCTG AGCTGGGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT	2220
AAGCCTCAAT AAGCTTCTA GAGATCCCTC GACCTCGAGA TCCATTGTGC TCTAAGGAG	2280
ATACCCGGCC AGACACCTC ACCTGGGTG CCGAGCTGCC CAGGCTGAGG CAAGAGAAGG	2340
CCAGAAACCA TGCCATGGG GTCTGTGCAA CCGCTGGCCA CTTGTACCT GCTGGGGATG	2400
CTGTGCTCT CCCTGCTAGC GCACTACAG GAGCAGATG ACAGACAGG TGAAGACTTT	2460
GTGACATCC CAGAAACTT CTTTGGAGT GGGGGTGAAG AGGACATCAC CGTCCAGACA	2520
GTGACCTGC CTGACATGGA GCTGCCACTC CCTCGAACA TCACTGAGG TGAAGCCGA	2580
GGCAGCGTGA TCTTACCTT AAGCCCATC TTGAGGTCT CCCCAGTCC CTTGGAACCC	2640

【図 10】

GAGGAGCCCT TCACGTTTGC CCGTGAATA GGGGCCACTG CCTTCGCTGA GGTGAGAAT	2700
GAGACTGGAG AGGCCACCAG GCGCTGGGG TTTCCACAC CTGCGCTGG CCGTGGACG	2760
GCATTACCA GTAGGAGCT CCGCTGCGAG GTGACCGCTG TCCCTGGGCA GCGCATTTG	2820
CCAGGGGAG GGGATCCGA GGTGAGTAC TAACTTCAAG CCGCTCTGCC TGGACGATC	2880
CCGGCTATGC AGCCCCAGT CAGGCGAGCA AGGCGAGGCC CGTCTGCTT TTCACCGGA	2940
GGCTCTGCC CCGCCACTC ATGCTCAGG AGAGGCTCT TGGCTTTTT CCGCAGCTC	3000
TGGGAGGCA CAGGCTAGT GCCCTAAC CAGGCGCTG ACACAAAGG GCAGGTGCTG	3060
GGCTCAGACC TGCCAGAGC CATATCCGG AGGACCTCG CCGTACCTA AGCCACCCC	3120
AAAGGCCAAA CTCTCCACT CCGCTGCTG GACACCTCT CTCTCCGAG ATTCCAGTAA	3180
CTCCCATCT TCTCTCTGA GAGCCCAAT CTTGTGACAA AACTCACACA TGCCACCGT	3240
GCCAGGTAA GCCAGCCAG GCTCGCCCT CCAGCTCAAG GCGGACAGG TGCCCTAGAG	3300
TAGCTGCTAT CCAGGACAG GCCCAGCCG GTGCTGACA CGTCCACTC CATCTCTCC	3360
TCAGCAGCTG AACTCCTGG GGGACGCTA GTCTCTCTT TCCCCCAA ACCCAAGGAC	3420
ACCTCATGA TCTCCCGGAC CCGTGAAGT ACATGCTGG TGGTGGAGT GAGCCACGAA	3480
GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGATACGT GACGCGCTG AGGTGCATA TGCCAGACA	3540
AAGCCGCGG AGGAGCAGTA CAACAGCAG TACCGTGG TCAGCTCTCT CCGCTCTCTG	3600
CACCGAGCT GCGTGAATG CAAGGAGTAC AAGTGCAGG TCTCAACAA AGCCCTCCCA	3660
GCCCCATCG AGAAACCAT CTCCAAAGC AAAGTGGGA CCGCTGGGT GCGAGGGCCA	3720
CATGGACAGA GCGCGGCTG GCCCACCTC TGCCCTGAGA GTGACCGCT TACCAACCTC	3780
TGTCCCTACA GGGCAGCCCC GAGAACACA GGTGTACACC CTGCCCATC CCGGGATGA	3840
GCTGACRAG AACCAAGTCA GCGTGAAGT CCGTGTCAA GGCTCTCAT CCAGCGACAT	3900
CGCGGTGAG TGGGAGGACA ATGGCGGCC GGAGAACAC TACAAGACA CCGCTCCCTG	3960

【図 11】

```
GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG 4020
GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTAGAC 4080
GCAGAAGAGC CTCTCCCTCT CTCCGGGTAA ATGAGTGCGA CGGCCGCGAC TCTAGAGGAT 4140
CTTTGTGAAG GACCTTACT TCTGTGGTGT GACATAATTG GACAACTAC CTACAGAGAT 4200
TTAAAGCTCT AAGGTAAATA TAAATTTTT AAGTGTATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT 4260
AATTGTTTGT GTATTTTAGA TTCCAACTTA TGGAACTGAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA 4320
TGCCTTTAAT GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC 4380
TACTGCTGAC TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAG AGAAGGTAG AAGACCCCAA 4440
GGACTTTCCT TCGAATTGC TAAGTTTTT GAGTCATGCT GTGTTTAGTA ATAGAACTCT 4500
TGCTTGCTGT GCTATTACA CCACAAAGGA AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAATTTAT 4560
GGAAAAATAT TCTGTAACCT TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT 4620
TTTTCTTACT CCACACAGGC ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC AAAAATTGTG 4680
TACCITTAGC TTTTAAATT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTGATGT ATACTGCCCT 4740
GACTAGAGAT CATATCAGC CATACCACAT TTGTAGAGGT TTTACTTGCT TTA AAAAACC 4800
TCCCACACCT CCCCCTGAAC CTGAACATA AATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACCTGT 4860
TTATTGCAGC TTATAATGCT TACAAATAA GCAATAGCAT CACAAATTC ACAAAATRAAG 4920
CATTTTTTTC ACTGCAITCT AGTTGTGGTT TGTCCAACT CATCAATGTA TCTTATCATG 4980
TCTGGATCCT GTGGAATGTG TGTCAATTAG GGTGTGCAAA GTCCCCAGGC TCCCAGCAG 5040
GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG 5100
GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC 5160
CGCCCTAAC TCCGCCCATC CGGCCCTTAA CTCCGCCCAG TTCGCCCAT TCTCCGCCCC 5220
ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT 5280
TCCAGAACTA GTGAGGAGGC TTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTAATTC 5337
```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 16/40	(2006.01)	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 R 1/91	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
		C 1 2 R 1:91	

- (74)代理人 100091487
弁理士 中村 行孝
- (74)代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
- (72)発明者 エカールト、バルトニク
ドイツ連邦共和国ウィースバーデン - デルケンハイム、カールスルーエル、シュトラーセ、8
- (72)発明者 ベルント、アンデンミュラー
ドイツ連邦共和国フランクフルト、グリースハイマー、ウーファー、53
- (72)発明者 フランク、ビュットナー
ドイツ連邦共和国ルートビッヒスハーフェン、ベルダー、シュトラーセ、10
- (72)発明者 ブルース、カッターソン
イギリス国ウェールズ、ポントカンナ、カーディフ、スニード、ストリート、1
- (72)発明者 クレアー、ヒューズ
イギリス国ウェールズ、ポントカンナ、カーディフ、スニード、ストリート、1

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 J. Biol. Chem., 1992年, vol.267, no.27, p.19470-19474
J. Biol. Chem., 1991年, vol.266, no.2, p.894-902

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
JSTPlus(JDream2)