



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, C07K 14/47, 16/40, C12N 5/06, 9/64, C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/05290</p> <p>(43) 国際公開日 1999年2月4日(04.02.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03324</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月24日(24.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/213969 1997年7月24日(24.07.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 鶴岡伸夫(TSURUOKA, Nobuo)[JP/JP] 〒567-0827 大阪府茨木市稲葉町18-7-501 Osaka, (JP) 山城恭子(YAMASHIRO, Kyoko)[JP/JP] 〒569-0852 大阪府高槻市北柳川町15-13-211 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)[JP/JP] 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: NOVEL SERINE PROTEASE</p> <p>(54)発明の名称 新規セリンプロテアーゼ</p> <p>(57) Abstract A serine protease or peptide fragments thereof having an amino acid sequence identical with that of serine protease as shown in SEQ ID NO: 6 or amino acid sequences derived therefrom by deletion or substitution of a part of the same or addition of one or more amino acids thereto.</p>		

(57)要約

配列番号 6 に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に 1 乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

## 新規セリンプロテアーゼ

## 技術分野

本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードするDNA、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に関与していることがわかっている (Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984)。

近年、中枢神経系においてもセリンプロテアーゼが生理的に重要な機能分子として働いていることが確認されるようになった。例えば、脳内において発現しているセリンプロテアーゼとしては、組織型プラスミノゲンアクチベーター (Sappiro, A-D., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwent, A., and Vassalli, J-D., J. Clin. Invest., 92, 679-685, 1993)、トロンビン (Monard, D. Trends Neurosci., 11, 541-544, 1988)、ヒトトリプシンIV (Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Müller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993)、ニューロプシン (Chen, Z-L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and

Shiosaka, S., *J. Neurosci.*, 15(7), 5088-5097, 1995)、ニューロシン (Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Kodama, S., Tsujimoto, M., Yamamura, Y., Tanaka, T., Nakazato, H., and Yamaguchi, N., *Biochim. Biophys. Acta*, 1350, 11-14, 1997)などが知られている。

これら脳内におけるセリンプロテアーゼは、ニューロンの神経突起の伸展に関与するばかりでなく、標的ニューロンとのシナプス形成過程に関与していることが想定されている (Liu, Y., Fields, R. D., Fitzgerald, S., Festoff, B. W., and Nelson, P. G., *J. Neurobiol.*, 25, 325, 1994)。

しかしながら、これらセリンプロテアーゼの脳内における生理機能についてはほとんど解明されていない。また、脳内に発現し重要な生理機能を担うセリンプロテアーゼがその他多数存在することが予想されるがその多くは特定されていないのが現状である。

一方、凝固線溶補体系のある種のセリンプロテアーゼタンパク質は、クリングルドメイン、EGF-like構造、フィンガー構造、 $\gamma$ -carboxyglutamic acidドメインならびにアップルドメインなどの構造をN末端側に有している (Furie, B., and Furie, B. C., *Cell*, 53, 505-518, 1988)。例えば、クリングルドメインを持つセリンプロテアーゼタンパク質としてはウロキナーゼ、プラスミノゲンアクチベーター、プラスミノゲンなどが知られている。

クリングルドメインは、フィブリン、ヘパリンおよびリシンアナログとの結合能を有し (Scanu, A. M. and Edelstein, C., *Biochimica. Biophysica. Acta*, 1256, 1-12, 1995)、血液線溶系においては、析出したフィブリンにプラスミノゲンアクチベーターがクリングルドメインを介して結合し、近傍に結合したプラスミンを活性化することが示されている。さらに、血管新生抑制因子アンジオスタチンが

、プラスミノゲン分子中のクリングルドメインであることが明らかとなり (Cao, Y., Ji, R. W., Davidson, D., Scaller, J., Marti, D., Söndel, S., McCance, S. G., O'Reilly, M. S., Llinás, M., and Folkman, J., *J. Biol. Chem.*, 271, 29461-29467, 1996)、クリングルドメイン構造単独の生理活性が初めて示された。

また、マクロファージスカベンジャーレセプターにおいて認められたスカベンジャーレセプターシステインリッチ (S R C R) ドメイン構造を有する一連のタンパク質群として、サイクロフィリンC結合蛋白質、スペラクト (S p e r a c t) レセプター、コンプリメントファクター I、CD 5、CD 6 などの存在が知られている (Resnick, D., Pearson, A., and Krieger, M., *Trends. Biochem. Sci.*, 19, 5-8, 1994)。

サイクロフィリンC結合蛋白質やコンプリメントファクター I は分泌タンパク質であるのに対して、スペラクト (S p e r a c t) レセプターやCD 5 およびCD 6 は、膜結合型タンパク質であることが知られている。このうち、膜結合型タンパク質CD 6 と結合するタンパク質が活性化白血球接着分子 (A L C A M) であることが見い出され、CD 6 のS R C Rドメイン構造に結合位置があることがわかった (Whitney, G. S., Starling, G. C., Bowen, M. A., Modrell, B., Siadak, A. W., and Aruffo, A. J. *Biol. Chem.*, 270, 18187-18190, 1995)。

さらに、CD 6 のリガンドであるA L C A Mは、活性化リンパ球やニューロンに発現していることが知られており、CD 6 は、A L C A Mとの相互作用を介して免疫系や神経系における恒常性の維持に一定の制御機能を果たしていることが推察される。

このように、複数のドメイン構造を有するタンパク質は、各ドメインが固有の機能を有するばかりでなく、各ドメインの機能が連関

して特異的な認識機能を持って機能しているものと考えられている。  
。

#### 発明の開示

本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼDNAを提供することにある。さらに、本発明は当該DNAを用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、脳内に発現するセリンプロテアーゼをコードするcDNAに良く保存されている領域をプローブとして用い、5'翻訳領域が特徴的なcDNAをスクリーニングすることにより、新規機能タンパク質をコードするcDNAを単離し、本発明を完成させるに至った。

従って本発明は、(1)図7～12(配列番号：6)に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(2)図7～12(配列番号：6)に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼ

ドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(3) 図7～12 (配列番号: 6) に示すアミノ酸番号40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(4) 図7～12 (配列番号: 6) に示すアミノ酸番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433までまたは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ (SRCR) ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるSRCRドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを提供する。

本発明はさらに、(6) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードするDNAを提供する。

本発明はさらに、(7) 前記(5)又は(6)に記載のDNAを含んでなる発現ベクターを提供する。

本発明はさらに、(8)前記(7)に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主を提供する。

本発明はさらに、(9)前記(8)に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法を提供する。

本発明はさらに、(10)前記(1)から(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体を提供する。

本発明はさらに、(11)前記(1)から(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記(5)または(6)に記載のDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図2はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図3はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図4はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図5はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図6はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 7 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 8 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 9 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 0 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 1 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 2 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 3 は、マウスの各臓器におけるセリンプロテアーゼ遺伝子の転写を示す Northern blotting の結果を示す電気泳動図である。

#### 発明の実施の形態

マウスセリンプロテアーゼをコードする c D N A のクローニングは、先ず、常法に従って単離調製したマウス脳由来 m R N A から c D N A ライブラリーを作製し、次に、作製した c D N A ライブラリーをセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインした P C R プライマーを用いた P C R により行なった。ここで得られた P C R 産物をプローブとして、5' 翻訳領域が長く新規機能タンパク質をコードすると予想されるクローンのスクリーニングを実施した。

その結果、本発明者らは、マウス B S S P - 3 と命名した 2. 7 kb の c D N A を単離することに成功した。得られた c D N A 配列を常法により調べた結果、マウス B S S P - 3 c D N A は、セリンプロテアーゼドメインばかりでなくクリングルドメインならびにス

カベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。単離したマウス BSSP-3 cDNA は、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。具体例を実施例1に記載する。

次に、単離したマウス BSSP-3 cDNA 全長をプローブとして、マウス各臓器およびマウス脳各部位におけるマウス BSSP-3 mRNA の発現を確認したところ、マウス各臓器においては、特に脳に強い発現を認め、肺および腎臓においても発現を認めた。また、マウス脳各部位においては、大脳および脳幹に強い発現を認め、延髄においても発現を認めた。その大きさはいずれの場合においても約 2.7 kb の大きさのみであった。検討した脳各部位のうち、マウス BSSP-3 mRNA の発現は小脳では認められなかった。具体例を実施例2に記載する。このことから、マウス BSSP-3 mRNA は、実際にマウス臓器で発現していることが確認された。

さらに、マウス BSSP-3 cDNA をプローブにしてヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、ヒト BSSP-3 cDNA を単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒト BSSP-3 cDNA がマウス BSSP-3 cDNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。具体例を実施例3に記載する。さらに、本発明者は、ヒト BSSP-3 cDNA のうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードする DNA を COS-1 細胞で発現したところ、

明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。具体例を実施例 4 に記載する。

以上の結果から、今回単離したマウスおよびヒト B S S P - 3 c D N A は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼドメイン、新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることばかりでなく、セリンプロテアーゼドメインが酵素活性を持った機能タンパク質であることが明らかとなった。

本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、その複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウス B S S P - 3 c D N A およびマウス B S S P - 3 c D N A がコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒト B S S P - 3 c D N A およびヒト B S S P - 3 c D N A がコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手法を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。

その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療

も可能である。

以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードするDNAのヌクレオチド配列として図1～6（配列番号：3）および図7～12（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼのDNAはこれに限定されない。一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAを得るには、実施例に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードするDNAは、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

例えば、実施例1に示すようなDNA（ヌクレオチド）プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によりクローニングすることができる。

本発明のDNAはさらにセリンプロテアーゼ活性を有する蛋白または糖蛋白をコードし、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）のヌクレオチド配列とハイブリダイズするDNAも含まれる。また、ハイブリダイゼーションの一般的方法は当業者においてよく知られており（例えば、実験医学臨時増刊号、羊土社、“バイオテクノロジー実験法シリーズ遺伝子工学総集編”、Vo

1.5, No. 11, 24-60, 1987)、活性測定もまた当業者によく知られている。

ゲノムからクローニングする場合、実施例において使用した種々のプライマーヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のためプローブとして使用することができる。また、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に記載するヌクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的な方法は当業界においてよく知られている（Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第5章及び第6章）。

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAはまた、化学合成によっても調製することができる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396 DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に示されるヌクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードするDNAは、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法（site-directed mutagenesis）等常法に従って得ることもできる（例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第8章を参照のこと）。

こうして、一旦アミノ酸配列が決定されれば、この天然アミノ酸

配列に1～複数のアミノ酸が付加されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列から1～複数個のアミノ酸が除去されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列中の1～複数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、さらには、上記のアミノ酸付加変異、アミノ酸除去変異及びアミノ酸置換変異が組合わされた変異を有しなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチドなど、種々の変異型セリンプロテアーゼを設計し、それを製造することができる。

上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の変異におけるアミノ酸の数は、特に限定されないが、付加については、例えば、本発明のセリンプロテアーゼとのハイブリッド蛋白に用いられる機能性蛋白のアミノ酸の数（例えば、マルトースバインディングプロテイン（*maltose-binding protein*）等の公知の抽出精製もしくは安定化用蛋白または各種生理活性蛋白や本セリンプロテアーゼに付加されたシグナルペプチドのそれに依存し、すなわち、当該変異の目的に依存して決定される。例えば、1～50、好ましくは、1～10の付加があげられる。

また、除去については、除去されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～30、好ましくは1～20、また、本セリンプロテアーゼの活性領域以外の領域のアミノ酸の数があげられる。さらに、置換については、置換されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～10、好ましくは、1～5があげられる。

また、本発明においては、図1～6（配列番号：4）または図7

～12（配列番号：6）に示すそれぞれアミノ酸番号517から761までまたは578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメイン、図1～6（配列番号：4）または図7～12（配列番号：6）に示すそれぞれアミノ酸番号85から157までまたは40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメイン、または図1～6（配列番号：4）または図7～12（配列番号：6）に示すそれぞれアミノ酸番号166から266まで、番号273から372までもしくは番号386から486までまたは番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433まで、もしくは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ（SRCR）ドメインを提供し、これらドメインの作製は、後記する方法またはそれ自体公知のペプチド合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行うことができ、また本発明のドメインの活性を維持する変異型ドメインまたはそれをコードするDNAも同様に作製することができる。

上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインのDNAが得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼまたはドメインを製造することができる。すなわち、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインをコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物（細胞又は培地）から目的とするセリンプロテアーゼまたはドメインを撮取する。

本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などのC<sub>1</sub>-。アシル化または欠失等がされた形で得られてもよ

い。発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインの構造遺伝子5'側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。具体的例示としては、実施例4に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i)、バシルス属 (B a c i l l u s) 細菌、例えばバシルス・ズブチリス (B. s u b t i l i s) 等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス (S a c c h a r o m y c e s) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビスエー (S. s e r e v i s i a e)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a)、キャベツルーパー細胞 (T r i c h o p l u s i a n i)、カイコ細胞 (B o m b y x m o r i)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、COS-1細胞、Vero細胞、CHO細胞、L細胞、ミエローマ細胞、C127細胞、BALB/c 3T3細胞、Sp-2/O細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス(バキュロ(昆虫)、ワクチニア(動物細胞))等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択

され、例えば細菌用プロモーターとしては *lac* プロモーター、*trp* プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、*adh I* プロモーター、*p q k* プロモーター等が使用される。

また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としては *Simian Virus 40* の *early* もしくは *late* プロモーター、*CMV* プロモーター、*HSV-TK* プロモーターまたは *SR $\alpha$*  プロモーター等があげられる。また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（メトトレキセート耐性）、*neo* 遺伝子（*G 4 1 8* 耐性）等）等を含んでいるのを好ましい。なお、エンハンサーを使用する場合、例えば *SV 40* のエンハンサー等を遺伝子上流または下流に挿入する。

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からのセリンプロテアーゼまたはドメインの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、機能的タンパク質であることから、病態解析に有用な手段を提供し、本タンパク質を用いる生理活性物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプ

チド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の生理活性の測定を行なうことにより、例えばセリンプロテアーゼ阻害物質の場合は、実施例4と同様にして、行うことができる。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記したセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドをコードするDNAで形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記生理活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンスまたはアンチセンス法による遺伝子発現促進または抑制治療や生体内生理機能解明の有用な手段として提供され、解明された情報を基に新規医薬のスクリーニングにも用いられる。

さらにまた、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードするDNAは、上記スクリーニング方法を実施する際に用いる形態でキットとして提供できる。

部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリンプロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げる事ができる。なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼまたはドメインの切断により行なうことができる。

また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。

本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを用いる生理活性物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドもしくはそれらをコードするDNAまたは該セリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。

なお、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化（グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド等で）して用いることができる。また、該セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを用いる場合は、遺伝子発現促進または抑制を評価する手法、例えばルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を用いて、行うことができる。

## 実施例

### 実施例 1. プローブ用新規セリンプロテアーゼモチーフ cDNA のクローニング

### (1) セリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCR

マウス脳mRNAの調製は、RTG-T-primed first-strand kit (Pharmacia) を用いて添付の文書に従って行った。得られたmRNA 5  $\mu$ l (約6  $\mu$ g) にオリゴdTプライマー 2  $\mu$ l (1  $\mu$ g) を加え、70  $^{\circ}$ Cで10分間熱した後、水中で急冷した。

この熱変性mRNAに、4  $\mu$ lの5xFirst strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ lの10 mM dNTP, 2  $\mu$ lの0.1 M DTT, ジオチルピロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水および5  $\mu$ l (1000 U) のSuper Script II RTを加え、37  $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。こうして得られたFirst strand cDNAをテンプレートとしてセリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCRを行なった。

プライマーとして、活性残基 (His) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys) を基に配列番号: 1 に示すオリゴマーKY185 (5' -GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG-3') および活性残基 (Ser) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu) を基に配列番号: 2 に示すオリゴマーKY189 (3' -CCV CTR AGD CCN CCN GGC GA-5) をそれぞれ合成したものを利用した。Taq DNA polymerase (Amersham社) を用いてPCRを行った後、PCR反応液をpCRIIベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。

### (2) スクリーニング用マウス脳mRNAの単離精製

マウス脳mRNAの調製は、Fast Track mRNA

I s o l a t i o n k i t ( I n v i t r o g e n 社 ) を用いて添付の文書に従って行った。すなわち、摘出したマウスの全脳に 15 ml の L y s i s B u f f e r を加え、テフロンホモジナイザーでただちにホモジナイズした。ホモジナイズした組織は、注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通したのち、50 ml の遠心管に入れ、45 °C の水浴中で 1 時間インキュベーションした。

インキュベーション後、4000 × g で 5 分間遠心して得られた上清を別の 50 ml の遠心管に入れ、そこに 5 M N a C l 溶液を 950 μ l 加えた後、再び注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通した。次に、この溶液にオリゴ ( d T ) セルロースを 1 錠加え、2 分間膨潤させた後、1 時間ゆっくり振動させた。1 時間後、2000 × g で 5 分間遠心し、上清を吸引した後、20 ml の結合緩衝液に懸濁後、遠心した沈渣をさらに 10 ml の結合緩衝液で洗浄した。

次に、10 ml の低塩濃度洗浄液で 3 回洗浄した。最終洗浄後、オリゴ ( d T ) セルロースを 800 μ l の低塩濃度洗浄液に懸濁し、スピнкаラムに入れ、5000 × g で 10 秒間の遠心洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、200 μ l の溶離緩衝液を加え、5000 × g で 10 秒間の遠心を 2 回繰り返すことにより 400 μ l の m R N A 溶液を得た。m R N A 溶液から常法に従い、エタノール沈殿により m R N A を回収し、20 μ l の D E P C 処理した蒸留水に溶解した。

### ( 3 ) c D N A ライブラリーからのスクリーニング

#### < 工程 1 > c D N A の合成

実施例 1 ( 2 ) で得られた m R N A 5 μ l ( 約 6 μ g ) にオリゴ d T N o t I プライマー 2 μ l ( 1 μ g ) を加え、70 °C で 10 分間熱した後、水中で急冷した。この熱変性 m R N A に、4 μ l の

5 x 第一鎖緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 μl の 10 mM dNTP, 2 μl の 0.1 M DTT, DEPC 処理した蒸留水および 5 μl (1000 U) の Super Script II RT を加え、37°C で 1 時間反応させた。

次に、この反応液に 91 μl の DEPC 処理した蒸留水、30 μl の 5 x 第二鎖緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 6.9, 450 mM KCl, 23 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM β-NAD<sup>+</sup>, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 3 μl の 10 mM dNTP, 1 μl (10 U) の大腸菌 DNA リガーゼ、4 μl (40 U) の大腸菌 DNA ポリメラーゼおよび 1 μl (2 U) の大腸菌 RNase H を加え、16°C で 2 時間反応後、2 μl (10 U) の T4 DNA ポリメラーゼを加え 16°C で 5 分間反応させた。

さらに、この溶液に 10 μl の 0.5 M EDTA を加えて混合した後、150 μl のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌後 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に、10 μl の 5 M KOAc, 400 μl のエタノールを加え攪拌し、15,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 500 μl の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、25 μl の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

#### <工程 2> EcoRI アダプターの付加

前工程で得られた 2 本鎖 cDNA 25 μl に 10 μl の 5 × T4 DNA 連結緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (w/v), PEG 8000), EcoRI アダプター溶液 10

$\mu$ l (10  $\mu$ g) および 5  $\mu$ l (5 U) の T4 DNA ligase を加え、16 °C にて 16 時間反応後、50  $\mu$ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌後 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に、5  $\mu$ l の 5 M KOAc, 125  $\mu$ l のエタノールを加え攪拌し、-80 °C, 20 分間冷却後、15,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 200  $\mu$ l の 70 % エタノールで洗い、軽く風乾後、40  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

〈工程 3〉  $\lambda$ gt 10 とのライゲーション

サイズ分画した cDNA 溶液 3 ml に  $\lambda$ gt 10 (EcoRI 切断) 1  $\mu$ l (50 ng) を加え、11  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水、4  $\mu$ l の 5 × T4 DNA 連結緩衝液、1  $\mu$ l の 5 × T4 DNA リガーゼを加え室温で 3 時間反応させた。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 抽出を行い、5  $\mu$ l (5  $\mu$ g) の yeast tRNA, 5  $\mu$ l の 5 M KOAc および 125  $\mu$ l のエタノールを加え攪拌し、-80 °C 20 分間冷却後、15,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 200  $\mu$ l の 70 % エタノールで洗い、軽く風乾後、5  $\mu$ l の TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解した。

〈工程 4〉 パッケージング

工程 3 で得られたライゲーション後 cDNA を Gigapack Packaging Extracts (Stratagene) を用いてパッケージングした。すなわち、0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l のライゲーション後 cDNA 溶液 1  $\mu$ l にキット添付の Freeze-thaw Extract 10  $\mu$ l を加えた後、さらに、キット

添付の Sonic Extract 15  $\mu$ l を直ちに加えよく攪拌した。室温で2時間放置後、500  $\mu$ l のファージ希釈緩衝液（100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.01%ゼラチン）を加え、さらに、20  $\mu$ l のクロロホルムを加えた。よく混和した後、室温で15000 rpm, 5分間遠心した上清を回収し、ファージ液を得た。常法に従い、このファージ液はタイトレーション後、宿主大腸菌に感染させた。

#### 〈工程5〉ライブラリーのスクリーニング

実施例1(1)で得られたDNA断片を BcaBest DNA labeling kit (Takara) を用いて  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP で標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、前工程で得られた約40万クロンのcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、約40万個のクロンから、挿入DNA断片の最も長いクロン pUC18/mBSSP-3/1-1 を得た。

pUC18/mBSSP-3/1-1 のcDNAの全長は2,597塩基対で、244塩基対の5'非翻訳領域、2283塩基対の翻訳領域、70塩基対の3'非翻訳領域から成り、その翻訳領域はセリンプロテアーゼドメイン（アミノ酸番号：517～761）をコードするばかりでなくクリングルドメイン（アミノ酸番号：85～157）ならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン（アミノ酸番号 ドメイン1：166～266、ドメイン2：273～372、ドメイン3：386～486）を含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。pUC18/mBSSP-3/1-1 のcDNAの塩基配列および対応するアミノ酸配列を図1～6（配列番号：3）に示した。

実施例 2. mBSSP-3 の Northern blotting による発現部位の検討

マウス脳の total RNA は、トリゾル試薬（ライフテクノロジー）を用いて添付の文書に従って調製した。すなわち、マウスの大脳、脳幹、小脳および延髄を摘出したのちポリトロンでただちにホモジナイズし、組織容量の 10 倍量（約 3 ml）のトリゾル試薬を加えることにより組織を溶解した。さらに、クロロホルム 600  $\mu$ l を加えて攪拌し、15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心した。遠心後、水相を回収し、回収した水相に 1500  $\mu$ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心した。

得られたマウスの脳の各部位の全 RNA の沈殿を 400  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した後、常法に従いメンブランフィルターにブロットした。次に、pUC18/mBSSP-3/1-1 を制限酵素 EcoRI で消化し、約 2.7 kbp の DNA 断片を単離・精製し、前述の方法で  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP で標識することによりプローブを作製した。

このプローブを前述のマウス脳各部位から調製した total RNA をブロットしたメンブランフィルターおよび市販の各種臓器から調製した mRNA をブロットしたメンブランフィルター（クロンテック社）と 55°C で一晩ハイブリダイズさせた後、それぞれのメンブランフィルターを 0.1% SDS を含む 2xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Sodium citrate) で室温、20 分間、続いて、0.1xSSC, 0.1% SDS に替え 65°C, 30 分間で 2 回洗い、BAS2000 用イメージングプレート（富士写真フィルム）に 30 分間露光させた。

その結果を図 13 に示した。各臓器の発現では、脳、肺および腎

臓で発現していることが確認された。脳の各部位では、大脳および脳幹で強い発現を認め、また、延髄でも弱い発現を認めたが、小脳での発現は認められなかった。発現は、いずれの場合も約 2.7 kb p の大きさのみであった。

### 実施例 3. ヒト BSSP-3 cDNA のクローニング

ヒト脳 cDNA ライブラリーは、クロンテック社より購入した。マウス BSSP-3 cDNA 断片をグルタルアルデヒドを用いて蛍光標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、約 40 万クローンのヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、pUC18/hBSSP-3 を得た。

pUC18/hBSSP-3 cDNA の翻訳領域は、マウス BSSP-3 cDNA と同様にセリンプロテアーゼドメイン（アミノ酸番号：578～822）をコードするばかりでなくクリングルドメイン（アミノ酸番号：40～112）ならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン（アミノ酸番号 ドメイン 1：117～217、ドメイン 2：227～327、ドメイン 3：334～433、ドメイン 4：447～547）を含む機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。

しかしながら、マウス BSSP-3 cDNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインがマウス BSSP-3 では 3 つであるのに対して、ヒト BSSP-3 は 4 つであることが明らかとなった。pUC18/hBSSP-3 の塩基配列および対応するアミノ酸配列を図 7～12（配列番号：5）に示す。

### 実施例 4. ヒト BSSP-3 cDNA がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

#### (1) 発現プラスミドの構築

pUC18/hBSSP-3のDNA断片とpdKCRベクターDNA断片を常法に従いライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法により解析して目的とするセリンプロテアーゼhBSSP-3発現プラスミドpdKCR/hBSSP-3を得た。

次に、トリプシンIIの開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ5'側上流にEcoRI, 3'側下流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。これらプライマーを用い、pCR/TrypsinIIプラスミドをテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(EcoRIおよびBspMI)で消化後、約75bpのDNA断片を単離・精製した。同様に、ヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNAの上流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにデザインしたプライマーを用い、pdKCR/hBSSP-3をテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で消化後、DNA断片を単離・精製した。

次に、得られたトリプシンIIのシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードするDNA断片とヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNA断片を、常法に従い、制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で前消化したpdKCR/hBSSP-3ベクターにライゲーションし、大腸菌JM109を形質変換させた。形質変換したコロニーのうち目的とするキメラDNAを含むコロニーをPCR法により確認し、発現プラスミド(pdKCR/Trip-hBSSP-3)を得た。

## (2) COS-1細胞における発現

実施例4(1)で作製したキメラ遺伝子DNAをリポフェクチン

(Life Technologies) を用いて COS-1 細胞にトランスフェクションした。すなわち、直径 10 cm の培養用ディッシュ (Corning, 430167) に 10% ウシ胎児血清を含むダルベコの最少必須培地 (DMEM, 日水製薬) で COS-1 細胞を  $5 \times 10^5$  細胞植え込んだ。翌日、Opti-MEM 培地 (Life Technologies) 5 ml で細胞をリンスした後、新しい 5 ml の Opti-MEM 培地を加え、37°C で 2 時間培養した。

培養後、ディッシュ 1 枚あたり、上述のプラスミド 1  $\mu$ g およびリポフェクチン 5  $\mu$ g の混液を加え、37°C で 5 時間培養した。培養後、Opti-MEM 培地を 5 ml 加え、合計 10 ml とし、37°C で 72 時間培養した。培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。また、コントロールとして、発現プラスミド pdKCR のみを COS-1 細胞にトランスフェクションした培養上清も調製した。

### (3) 酵素活性の測定

実施例 4 (2) で得られた培養上清中の酵素活性を測定した。すなわち、COS-1 細胞の培養上清 45  $\mu$ l にエンテロキナーゼ (10 mg/ml, Biozyme Laboratories) 5  $\mu$ l を混和し、37°C で 2 時間反応させた。次に、DMSO に溶解した合成基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (ペプチド研究所) を 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 で希釈した 0.2 mM 基質溶液を 50  $\mu$ l 加え、4°C で 16 時間反応させた。反応後、励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm における蛍光を測定した。その結果、Trp-hBSSP-3 を発現した COS-1 細胞の培養上清をエンテロキナーゼ消化した時のみ、酵素活性を認めた。

以上の結果から、ヒト BSSP-3 のセリンプロテアーゼドメイン

ンは、酵素活性を持つ機能タンパク質であることが明らかとなった。  
。

#### 発明の効果

本発明者らは、マウス脳 cDNA ライブラリーから新規セリンプロテアーゼドメインばかりでなく新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードするマウス BSSP-3 cDNA を単離した。単離したマウス BSSP-3 cDNA は、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。また、単離したマウス BSSP-3 mRNA の発現部位の検討結果から、本発明者らは、マウス BSSP-3 mRNA が脳に強く発現していること、脳のうち特に大脳および脳幹で強く発現していることを明らかにした。

次に、マウス BSSP-3 cDNA をプローブにして、ヒト脳 cDNA ライブラリーからヒト BSSP-3 cDNA を単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒト BSSP-3 cDNA がマウス BSSP-3 cDNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。

さらに本発明者らは、ヒト BSSP-3 cDNA のうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードする DNA を COS-1 細胞で発現したところ、明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、そ

の複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウスBSSP-3 cDNAおよびマウスBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。

また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒトBSSP-3 cDNAおよびヒトBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手段を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。

さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療も可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：6に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

2. 配列番号：6に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼドメインまたはその部分ペプチド。

3. 配列番号：6に示すアミノ酸番号40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチド。

4. 配列番号：6に示すアミノ酸番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433までまたは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ（SRCR）ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるSRCRドメインまたはその部分ペプチド。

5. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする DNA。
6. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードする DNA。
7. 請求項 5 または 6 に記載の DNA を含んでなる発現ベクター。
8. 請求項 7 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
9. 請求項 8 に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法。
10. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体。
11. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは請求項 5 または 6 に記載の DNA を用いる生理活性物質のスクリーニング方法。

# Fig.1

CGAGGGTGGGTGGAGGTCGGACTCCGGGCTACAGAGCTCCTGGCCCTCATCGCCCTCTGG	60
CTCCAGCCCTTGTCTCGCGGGCTGACCCCTTGGGTCCCGGTGTGATCCTCCAGCTGCC	120
CGGGCTGGACAGCAGGGCGGGCGGAGCGTGGAGGGGCTCTAGGACTCTGCCG	180
GCCCCGCCCCCTCCCGGGGACCCGGAGCCAGCATGGACCACACTCGGGCCCGC	240
AGCC	244
ATGGCGCTCGCCCGCTGCGTGTGATTTAGGGGCACCTGTCTGTAGTGGCC	301
MetAlaLeuAlaArgCysValLeuAlaValIleLeuGlyAlaLeuSerValValAla	19
CGCGTGATCCGGTCTCGCGCTCTCCCTTCACCCGCCGCATCCGTCCCCACCGGTTCC	361
ArgAlaAspProValSerArgSerProLeuHisArgProHisProSerProProArgSer	39
CAACACGGCCTACTTCCCAGCTCGCGGGCCACCCAGGACCCCGGCTTCCCCGCTC	421
GlnHisAlaHisTyrLeuProSerSerArgArgProProArgThrProArgPheProLeu	59
CCGCTGCGGATCCCCGCTGCCAGCCCGCAGGTCTCAGCACCGGGCACACGCCCCCG	481
ProLeuArgIleProAlaAlaGlnArgProGlnValLeuSerThrGlyHisThrProPro	79
ACGATTCCACCGCGCTCGGGGCAGGAGTCGTGGGCAATGCCACCAACCTCGGCGTC	541
ThrIleProArgArgCysGlyAlaGlyGluSerTrpGlyAsnAlaThrAsnLeuGlyVal	99
CCGTGTCTACACTGGGACGAGGTGCCGCCCTTCTGGAGGGTCCGCCCGCCAGTTGG	601
ProCysLeuHisTrpAspGluValProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrp	119

## Fig. 2

GCTGAGCTGCCGAGGGCAGCCGCACAACCTTCGCCGGAGCCCGGATGGCTCGGGCAGACCT	661
AlaGluLeuArgGlyGlnProHisAsnPheCysArgSerProAspGlySerGlyArgPro	139
TGGTGCTTCTATCCGGAATGCCCCAGGGCAAAGTAGACTGGGGCTACTGCCGATTGTGGTCAA	721
TrpCysPheTyrArgAsnAlaGlnGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysGlyGln	159
GGCCCCGGTTGCCCGTCATTCGCCCTTGTGGTGGGAACAGTGGGCATGAAGTCCAGTG	781
GlyProAlaLeuProValIleArgLeuValGlyGlyAsnSerGlyHisGluGlyArgVal	179
GAGCTGTACCACGCTGGCCAGTGGGGACCAATCTGTGACGCCAATGGGACAAATGCAGAC	841
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlnTrpAspAsnAlaAsp	199
GCAGACGTCATCTGTAGGCAGCTGGGGCTCAGTGGCATTGCCCAAAGCATGGCATCAGGCA	901
AlaAspValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	219
CATTTGGGGAAGGATCTGGCCCAATAATTGTTGGATGAAGTACGCTGCACCCGGAACCGAG	961
HisPheGlyGluGlySerGlyProIleLeuLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	239
CTGTCAATTGAGCAATGTCCAAAAGAGTTCCCTGGGGCCGAACATAACTGTGGCCATAAAGAA	1021
LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	259

# Fig.3

GATGCTGGAGTGTCTTGTGTTCCCTTAACAGATGGTGTCACTCAGACTGGCAGGAGGAAAA	1081
AspAlaGlyValSerCysValProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys	279
AGTACCCATGAAGGTCGCCCTGGAGGTCTACTACAAGGGCAGTGGGGACAGTCTGTGAT	1141
SerThrHisGluGlyArgLeuGluValTyrTyrLysGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	299
GATGGCTGGACTGAGATGAACACATACGTGGCTTGTTCGACTGCTGGGATTTAAATACGGC	1201
AspGlyTrpThrGluMetAsnThrTyrValAlaCysArgLeuLeuGlyPheLysTyrGly	319
AAACAGTCCCTCTGTGAACCATTTTGATGGCAGCAACAGGCCCATATGGCTGGATGACCGTC	1261
LysGlnSerSerValAsnHisPheAspGlySerAsnArgProIleTrpLeuAspAspVal	339
AGCTGCTCAGGAAAAGATCAGCTTCATTCAGTGTCCAGGAGACAGTGGGGAAGGCAT	1321
SerCysSerGlyLysGluValSerPheIleGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	359
GACTGCAGCCATAGAGAAAGATGTGGGCCCTCACCTGCTATCCTGACAGCGATGGACATAGG	1381
AspCysSerHisArgGluAspValGlyLeuThrCysTyrProAspSerAspGlyHisArg	379
CTTTCAGGTTTCCCATCAGACTAGTGGATGGAGAGAAATAAGAAGGACGAGGTG	1441
LeuSerProGlyPheProIleArgLeuValAspGlyGluAsnLysLysGluGlyArgVal	399

## Fig.4

GAGGTTTTGTCAATGGCCAATGGGAACAATCTGCGATGACGGATGGACCGATAAGCAT	1501
GluValPheValAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysHis	419
GCAGCTGTGATCTGCCGGCAGCTTGGCTATAAGGGTCTGCCAGAGCAAGGACTATGGCT	1561
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla	439
TATTTTGGGGAAGGAAAAGCCCCCATCCACATGGATAATGTGAAGTGCACAGGAAATGAG	1621
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisMetAspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	459
AAGGCCCTGGCTGACTGTGTCAAAACAAGACATTTGAAAGGCACAACTGCCGCCACAGTGAG	1681
LysAlaLeuAlaAspCysValLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	479
GATGCAGGAGTCATCTGTGACTATTTAGAGAAGAAAGCATCAAGTAGTGGTAAATAAGAG	1741
AspAlaGlyValIleCysAspTyrLeuGluLysLysAlaSerSerSerGlyAsnLysGlu	499
ATGCTCTCATCTGGATGTGGACTGAGGTACTGCACCCTGGCAGAAACGGATCATTTGGT	1801
MetLeuSerSerGlyCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	519
GGGAACAATTCTTTAAGGGGTCCCTGGCCCTTGGCAGGCTTCCCTCAGGCTGAGGTCGGCC	1861
GlyAsnAsnSerLeuArgGlyAlaTrpProTrpGlnAlaSerLeuArgLeuArgSerAla	539

## Fig.5

CATGGAGACGGCAGGCTGCTTTGTGGAGCTACCCCTTCTGAGTAGCTGCTGGTCCCTGACA	1921
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuLeuSerSerCysTrpValLeuThr	559
GCTGCACACTGCTTCAAAAAGGTACGGAAACAACCTCGAGGAGCTATGCAGTTCGAGTTGGG	1981
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnSerArgSerTyrAlaValArgValGly	579
GATTATCATCTGGTACCAGAGGAGTTTGAACAAGAAAATAGGGGTTCAACAGATTGTG	2041
AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGlnGluIleGlyValGlnGlnIleVal	599
ATTCACAGGAACACAGGCCAGACAGAGCGACTATGACATTGCCCTGGTTAGATTGCAA	2101
IleHisArgAsnTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	619
GGACCAGGGAGCAATGTGCCAGACTAAGCACCCACGTTTGGCCAGCCTGTTACCTCTA	2161
GlyProGlyGluGlnCysAlaArgLeuSerThrHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	639
TGGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCCCTCCAACCTGTCCACATAACAGGATGGGAGACACA	2221
TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysHisIleThrGlyTrpGlyAspThr	659
GGTCGTGCCCTACTCAAGAACTCTACAACAAGCTGCTGTGCCCTCTGTACCCCAAGAGGTTT	2281
GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaAlaValProLeuLeuProLysArgPhe	679

Fig.6

TGTAAGAGAGGTACAAGGGACTATTTACTGGGAGAAATGCTCTGTGCTGGGAACCTCCAA	2341
CysLysGluArgTyrLysGlyLeuPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuGln	699
GAAGACAACCGTGTGGACAGCTGCCAGGGAGACAGTGGAGGACCACTCATGTGTGAAAAG	2401
GluAspAsnArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluLys	719
CCTGATGAGTCCCTGGGTTGTGTATGGGGTGACTTCCCTGGGGGTATGGATGTGGAGTCAAA	2461
ProAspGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys	739
GACACTCCTGGAGTTTATACCAGAGTCCCCGCCCTTTGTACCTTGGATAAAAAGTGCACC	2521
AspThrProGlyValTyrThrArgValProAlaPheValProTrpIleLysSerValThr	759
AGTCGTAACTTATGGAAAGCTCAAGAAAAATAGTAAAAACAGTAACCATTCAGTCTTCATA	2581
SerLeu***	761
CTTGGCACCCATGCCAGAAAAAATAAAAAAAAAA	2614

Fig.7

CCGACGCGGTCCGCCGCCGCTCTCCCGCGCTTCCCGGCCCCCGCGGGCGCTCCCT 60  
 ProThrArgProProProLeuProArgPheProArgProProArgAlaLeuPro 20  
 GCCAGCGCCGCACGCCCTCCAGCGCGGCACACGCCCGCCCGCCCTGGGGCTGC 120  
 AlaGlnArgProHisAlaLeuGlnAlaGlyHisThrProArgProHisProTrpGlyCys 40  
 CCGCGCGGAGCCATGGGTGACGGACTTCGGCGCCCGCGTGTCTGCGGTGGCGG 180  
 ProAlaGlyGluProTrpValSerValThrAspPheGlyAlaProCysLeuArgTrpAla 60  
 GAGGTGCCACCCCTTCCGTGGAGCGGTCCGCCCCAGCGAGCTGGGCTCAGCTCGAGGACAG 240  
 GluValProProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrpAlaGlnLeuArgGlyGln 80  
 CGCCACAAC TTTGTGCGAGCCCCGACGGCGGGGCGAGACCCCTGGTGTTCACGGAGAC 300  
 ArgHisAsnPheCysArgSerProAspGlyAlaGlyArgProTrpCysPheTyrGlyAsp 100  
 GCCCGTGCAAGGTGGACTGGGGCTACTGCCGACTGCAGACACGGATCAGTACGACTTCGT 360  
 AlaArgGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysArgHisGlySerValArgLeuArg 120  
 GGCGGCAAAAATGAGTTTGAAGGCACAGTGGAAAGTATATGCAAGTGGAGTTGGGGCACT 420  
 GlyGlyLysAsnGluPheGluGlyThrValGluValTyrAlaSerGlyValTrpGlyThr 140

# Fig.8

GTCTGTAGCAGCCACTGGGATGATTCCTGATGCATCAGTCATTTGTCCACCAGCTGCAGCTG	480
ValCysSerSerHisTrpAspSerAspAlaSerValIleCysHisGlnLeuGlnLeu	160
GGAGGAAAAGGAATAGCAAAAACCCCGTTTCTGGACTGGGCCTTATTTCCCATTTAT	540
GlyGlyLysGlyIleAlaLysGlnThrProPheSerGlyLeuGlyLeuIleProIleTyr	180
TGGAGCAATGTCCGTTGCCGAGGAGATGAAGAAAATATACTGCTTTGTGAAAAAGACATC	600
TrpSerAsnValArgCysArgGlyAspGluGluAsnIleLeuLeuCysGluLysAspIle	200
TGGCAGGGTGGGGTGTGTCCTCAGAAAGATGGCAGCTGCTGCACGTGTAGCTTTTCCCAT	660
TrpGlnGlyGlyValCysProGlnLysMetAlaAlaValThrCysSerPheSerHis	220
GGCCAAACGTTCCCCATCATTCGCCCTTGCTGGAGGCAGCAGTGTGCATGAAGCCGGGTG	720
GlyProThrPheProIleIleArgLeuAlaGlyGlySerSerValHisGluGlyArgVal	240
GAGCTTACCATGCTGGCCAGTGGGAACCGTTTGTGATGACCAATGGGATGATGCCGAT	780
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrValCysAspAspGlnTrpAspAlaAsp	260
GCAGAAGTGATCTGCAGGCAGCTGGGCCCTCAGTGGCATTTGCCAAAGCATGGCATCAGGCA	840
AlaGluValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	280

## Fig.9

TATTTGGGAAGGCTGGCCAGTTATGTTGGATGAAGTACCGTGCACCTGGGAATGAG	900
TyrPheGlyGluGlySerGlyProValMetLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	300
CTTTCAATTGAGCAGTGTCCAAGAGCTCCTGGGAGAGCATAACTGTGGCCATAAAGAA	960
LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	320
GATGCTGGAGTGTCCCTGTACCCCTTAACAGATGGGGTTCATCAGACTTGCAGGTGGGAAA	1020
AspAlaGlyValSerCysThrProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys	340
GGCAGCCATGAGGGTCGCTTGAGGTAATATACAGAGCCAGTGGGAACTGTCGTGTGAT	1080
GlySerHisGluGlyArgLeuGluValTyrTyrArgGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	360
GATGGCTGGACTGAGCTGAATACATACGTGGTTTGTTCGACAGTTGGGATTTAAATATGGT	1140
AspGlyTrpThrGluLeuAsnThrTyrValValCysArgGlnLeuGlyPheLysTyrGly	380
AAACAAGCATCTGCCAACCATTTGAAGAAAGCACAGGGCCCATATGGTTGGATGACGTC	1200
LysGlnAlaSerAlaAsnHisPheGluGluSerThrGlyProIleTrpLeuAspAspVal	400
AGTGTCTCAGGAAAGGAAACCAGATTTCTTCAGTGTTCAGGCGACAGTGGGAAAGGCAT	1260
SerCysSerGlyLysGluThrArgPheLeuGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	420

## Fig.10

GACTGCAGCCACCGGAAGATGTAGCAATTGCCCTGCTACCCCTGGCGGCGGAGGCACACAGG 1320  
 AspCysSerHisArgGluAspValSerIleAlaCysTyrProGlyGlyGluGlyHisArg 440  
 CTCTCTCTGGGTTTCCCTGTCAGACTGATGGATGGAGAAAATAAGAAAAGGACCGAGTG 1380  
 LeuSerLeuGlyPheProValArgLeuMetAspGlyGluAsnLysLysGluGlyArgVal 460  
 GAGGTTTTTATCAATGGCCAGTGGGAAACAATCTGTGATGATGGATGGACTGATAAGGAT 1440  
 GluValPheIleAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysASP 480  
 GCAGCTGTGATCTGTCTCAGCTTGGCTACAAGGTCCTGCCAGAGCAAGAACCATGGCT 1500  
 AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla 500  
 TACTTTGGAGAAAGGAAAGGACCCCATCCATGTGGATAATGTGAAGTGCACAGGAAAATGAG 1560  
 TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisValAspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu 520  
 AGGTCCCTGGCTGACTGTATCAAGCAAGATATTGGAAGACACAACCTGCCGCCACAGTGAA 1620  
 ArgSerLeuAlaAspCysIleLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu 540  
 GATGCAGGAGTTATTTGTGATTAATTTGGCAAGAAGCCCTCAGGTAACAGTAATAAAGAG 1680  
 AspAlaGlyValIleCysAspTyrPheGlyLysLysAlaSerGlyAsnSerAsnLysGlu 560

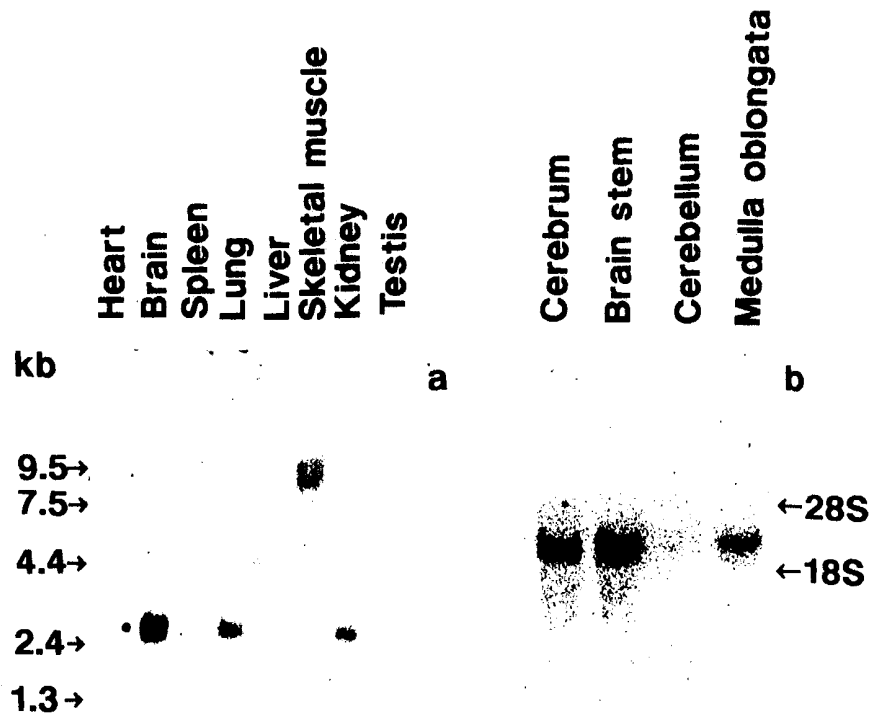
Fig.11

TCCCCTCATCTGTTTGTGGCTTGAGATTACTGCACCCGTCCGGCAGAAAGCGGATCATTTGGT	1740
SerLeuSerSerValCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	580
GGGAAAAATTCITTAAGGGTGGTTGGCCTTGGCAGGTTTCCCTCCGGCTGAAGTCATCC	1800
GlyLysAsnSerLeuArgGlyTrpProTrpGlnValSerLeuArgLeuLysSerSer	600
CATGGAGATGGCAGGCTCCTCTGCGGGCTACGCTCCTGAGTAGCTGCTGGGTCCTCACA	1860
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuLeuSerSerCysTrpValLeuThr	620
GCAGCACACTGTTTCAAGAGGTATGGCAACAGCACTAGGAGCTATGCTGTAGGGTTGGA	1920
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnSerThrArgSerTyrAlaValArgValGly	640
GATTATCACTCTGGTACCAGAGGAGTTTGAGGAAGAAATTTGGAGTTCAACAGATTGTG	1980
AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGluIleGlyValGlnGlnIleVal	660
ATTCAATCCGGAGTATCGACCCGACCCAGTGATTATGACATAGCCCTGGTTAGATTACAA	2040
IleHisArgGluTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	680
GGACCAGAAGCAATGTGCCAGATTCAGCAGCCATGTTTGGCCAGCCCTGTTTACCCTC	2100
GlyProGluGluGlnCysAlaArgPheSerSerHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	700

# Fig.12

TGGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCATCCAACCTGTTACATAAACAGGATGGGGTGACACA 2160  
 TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysTyrIleThrGlyTrpGlyAspThr 720  
  
 GGACGAGCCATTCAAGAACACTACAACAAGCAGCCATTCCCTTACTTCCATAAAGGTTT 2220  
 GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnAlaIleProLeuLeuProLysArgPhe 740  
  
 TGTGAAGAACGTTATAAGGGTCGGTTTACAGGGAGAAATGCTTTGTGCTGGAAACCTCCAT 2280  
 CysGluGluArgTyrLysGlyArgPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuHis 760  
  
 GAACACAAACGGGTGGACAGCTGCCAGGGAGACAGCGGAGGACCACCTCATGTGTGAACGG 2340  
 GluHisLysArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluArg 780  
  
 CCCGGAGAGAGCTGGGTGGTGTATGGGGTGACCCTCCTGGGGGTATGGCTGTGGAGTCAAG 2400  
 ProGlyGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys 800  
  
 GATTCCTCGTGTATACCAAAGTCTCAGCCCTTGTACCTTGGATAAAAAGTGCACC 2460  
 AspSerProGlyValTyrThrLysValSerAlaPheValProTrpIleLysSerValThr 820  
  
 AAACGTAAATTCATGGAAACTTCAAAGCAGCATTTAAACAATAAATGGAAAACCTTGAAC 2520  
 LysLeu\*\*\* 822  
  
 CCCCACTATTAGCACTCAGCAGAGATGACAACAACCGGCAAG 2562

Fig.13



## 配 列 表

## SEQUENCE LISTING

- < 1 1 0 > Suntory Limited  
< 1 2 0 > Novel Serine Protease  
< 1 3 0 > STY-F867/PCT  
< 1 4 0 >  
< 1 4 1 >  
< 1 5 0 >  
< 1 5 1 > 1997-07-24  
< 1 6 0 > 6  
< 2 1 0 > 1  
< 2 1 1 > 20  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial Sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 3 > Synthetic DNA  
< 4 0 0 > 1  
GTGCTCACNG CNGCBCAYTG  
< 2 1 0 > 2  
< 2 1 1 > 20  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial Sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 3 > Synthetic DNA  
< 4 0 0 > 2  
AGCGGNCCNC CDGARTCVCC  
< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2614

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Mouse

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 3

cgaggggtggg	gtggaggtcg	gactccgggc	tacagagctc	ctggcgctca	tcgcctctgg	60
ctccagcctt	tgcttcgcgg	ggctgacct	ttgggtcccg	gtgtgatcct	ccagetgccc	120
cgggggctgg	gacagcaggg	cggcggcgcg	agcgtgggag	ggggctctag	gactctgccc	180
gccccgcccc	gccccctccg	cggggaccgg	gagcccagca	tggaccacac	tcggcgccgc	240
agcc atg gcg ctc gcc cgc tgc gtg ctg gct gtg att tta ggg gca ctg						289
Met Ala Leu Ala Arg Cys Val Leu Ala Val Ile Leu Gly Ala Leu						
1	5	10	15			
tct gta gtg gcc cgc gct gat ccg gtc tcg cgc tct ccc ctt cac cgc						337
Ser Val Val Ala Arg Ala Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Leu His Arg						
	20	25	30			
ccg cat ccg tcc cca ccg cgt tcc caa cac gcg cac tac ctt ccc agc						385
Pro His Pro Ser Pro Pro Arg Ser Gln His Ala His Tyr Leu Pro Ser						
	35	40	45			
tcg cgg cgg cca ccc agg acc ccg cgc ttc ccg ctc ccg ctg cgg atc						433
Ser Arg Arg Pro Pro Arg Thr Pro Arg Phe Pro Leu Pro Leu Arg Ile						
	50	55	60			
ccc gct gcc cag cgc ccg cag gtc ctc agc acc ggg cac acg ccc ccg						481
Pro Ala Ala Gln Arg Pro Gln Val Leu Ser Thr Gly His Thr Pro Pro						
	65	70	75			

```

aac att cca cgc cgc tgc ggg gca gga gag tcg tgg ggc aat gcc acc 529
Thr Ile Pro Arg Arg Cys Gly Ala Gly Glu Ser Trp Gly Asn Ala Thr
      80                85                90                95
aac ctc ggc gtc ccg tgt cta cac tgg gac gag gtg ccg ccc ttc ctg 577
Asn Leu Gly Val Pro Cys Leu His Trp Asp Glu Val Pro Pro Phe Leu
                100                105                110
gag cgg tcg ccc ccg gcc agt tgg gct gag ctg cga ggg cag ccg cac 625
Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Glu Leu Arg Gly Gln Pro His
                115                120                125
aac ttc tgc cgg agc ccg gat ggc tcg ggc aga cct tgg tgc ttc tat 673
Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ser Gly Arg Pro Trp Cys Phe Tyr
                130                135                140
cgg aat gcc cag ggc aaa gta gac tgg ggc tac tgc gat tgt ggt caa 721
Arg Asn Ala Gln Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys Gly Gln
                145                150                155
ggc ccg gcg ttg ccc gtc att cgc ctt gtt ggt ggg aac agt ggg cat 769
Gly Pro Ala Leu Pro Val Ile Arg Leu Val Gly Gly Asn Ser Gly His
                160                165                170                175
gaa ggt cga gtg gag ctg tac cac gct ggc cag tgg ggg acc atc tgt 817
Glu Gly Arg Val Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys
                180                185                190
gac gac caa tgg gac aat gca gac gca gac gtc atc tgt agg cag ctg 865
Asp Asp Gln Trp Asp Asn Ala Asp Ala Asp Val Ile Cys Arg Gln Leu
                195                200                205
ggg ctc agt ggc att gcc aaa gca tgg cat cag gca cat ttt ggg gaa 913
Gly Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala His Phe Gly Glu
                210                215                220

```

--gga tct ggc cca ata ttg ttg gat gaa gta cgc tgc acc gga aac gag 961  
 Gly Ser Gly Pro Ile Leu Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu  
 225 230 235  
 ctg tca att gag caa tgt cca aag agt tcc tgg ggc gaa cat aac tgt 1009  
 Leu Ser Ile Glu Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys  
 240 245 250 255  
 ggc cat aaa gaa gat gct gga gtg tct tgt gtt cct cta aca gat ggt 1057  
 Gly His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ser Cys Val Pro Leu Thr Asp Gly  
 260 265 270  
 gtc atc aga ctg gca gga gga aaa agt acc cat gaa ggt cgc ctg gag 1105  
 Val Ile Arg Leu Ala Gly Gly Lys Ser Thr His Glu Gly Arg Leu Glu  
 275 280 285  
 gtc tac tac aag ggg cag tgg ggg aca gtc tgt gat gat ggc tgg act 1153  
 Val Tyr Tyr Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr  
 290 295 300  
 gag atg aac aca tac gtg gct tgt cga ctg ctg gga ttt aaa tac ggc 1201  
 Glu Met Asn Thr Tyr Val Ala Cys Arg Leu Leu Gly Phe Lys Tyr Gly  
 305 310 315  
 aaa cag tcc tct gtg aac cat ttt gat ggc agc aac agg ccc ata tgg 1249  
 Lys Gln Ser Ser Val Asn His Phe Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ile Trp  
 320 325 330 335  
 ctg gat gac gtc agc tgc tca gga aaa gaa gtc agc ttc att cag tgt 1297  
 Leu Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Val Ser Phe Ile Gln Cys  
 340 345 350  
 tcc agg aga cag tgg gga agg cat gac tgc agc cat aga gaa gat gtg 1345  
 Ser Arg Arg Gln Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val  
 355 360 365

..ggc ctc acc tgc tat cct gac agc gat gga cat agg ctt tct cca ggt 1393  
 Gly Leu Thr Cys Tyr Pro Asp Ser Asp Gly His Arg Leu Ser Pro Gly  
 370 375 380  
 ttt ccc atc aga cta gtg gat gga gag aat aag aag gaa gga cga gtg 1441  
 Phe Pro Ile Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val  
 385 390 395  
 gag gtt ttt gtc aat ggc caa tgg gga aca atc tgc gat gac gga tgg 1489  
 Glu Val Phe Val Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp  
 400 405 410 415  
 acc gat aag cat gca gct gtg atc tgc cgg cag ctt ggc tat aag ggt 1537  
 Thr Asp Lys His Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly  
 420 425 430  
 cct gcc aga gca agg act atg gct tat ttt ggg gaa gga aaa ggc ccc 1585  
 Pro Ala Arg Ala Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro  
 435 440 445  
 atc cac atg gat aat gtg aag tgc aca gga aat gag aag gcc ctg gct 1633  
 Ile His Met Asp Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ala Leu Ala  
 450 455 460  
 gac tgt gtc aaa caa gac att gga agg cac aac tgc cgc cac agt gag 1681  
 Asp Cys Val Lys Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu  
 465 470 475  
 gat gca gga gtc atc tgt gac tat tta gag aag aaa gca tca agt agt 1729  
 Asp Ala Gly Val Ile Cys Asp Tyr Leu Glu Lys Lys Ala Ser Ser Ser  
 480 485 490 495  
 ggt aat aaa gag atg ctc tca tct gga tgt gga ctg agg tta ctg cac 1777  
 Gly Asn Lys Glu Met Leu Ser Ser Gly Cys Gly Leu Arg Leu Leu His  
 500 505 510

-- cgt cgg cag aaa cgg atc att ggt ggg aac aat tct tta agg ggt gcc 1825  
 Arg Arg Gln Lys Arg Ile Ile Gly Gly Asn Asn Ser Leu Arg Gly Ala  
                   515                                  520                                  525  
 tgg cct tgg cag gct tcc ctc agg ctg agg tcg gcc cat gga gac ggc 1873  
 Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Leu Arg Ser Ala His Gly Asp Gly  
                   530                                  535                                  540  
 agg ctg ctt tgt gga gct acc ctt ctg agt agc tgc tgg gtc ctg aca 1921  
 Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr  
                   545                                  550                                  555  
 gct gca cac tgc ttc aaa agg tac gga aac aac tcg agg agc tat gca 1969  
 Ala Ala His Cys Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Ser Arg Ser Tyr Ala  
 560                                  565                                  570                                  575  
 gtt cga gtt ggg gat tat cat act ctg gta cca gag gag ttt gaa caa 2017  
 Val Arg Val Gly Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Gln  
                                   580                                  585                                  590  
 gaa ata ggg gtt caa cag att gtg att cac agg aac tac agg cca gac 2065  
 Glu Ile Gly Val Gln Gln Ile Val Ile His Arg Asn Tyr Arg Pro Asp  
                                   595                                  600                                  605  
 aga agc gac tat gac att gcc ctg gtt aga ttg caa gga cca ggg gag 2113  
 Arg Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Gly Glu  
                   610                                  615                                  620  
 caa tgt gcc aga cta agc acc cac gtt ttg cca gcc tgt tta cct cta 2161  
 Gln Cys Ala Arg Leu Ser Thr His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro leu  
                   625                                  630                                  635  
 tgg aga gag agg cca cag aaa aca gcc tcc aac tgt cac ata aca gga 2209  
 Trp Arg Glu Arg Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys His Ile Thr Gly  
 640                                  645                                  650                                  655

```

- ttg gga gac aca ggt cgt gcc tac tca aga act cta caa caa gct gct 2257
  Trp Gly Asp Thr Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala
      660                665                670
  gtg cct ctg tta ccc aag agg ttt tgt aaa gag agg tac aag gga cta 2305
  Val Pro Leu Leu Pro Lys Arg Phe Cys Lys Glu Arg Tyr Lys Gly Leu
      675                680                685
  ttt act ggg aga atg ctc tgt gct ggg aac ctc caa gaa gac aac cgt 2353
  Phe Thr Gly Arg Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu Gln Glu Asp Asn Arg
      690                695                700
  gtg gac agc tgc cag gga gac agt gga gga cca ctc atg tgt gaa aag 2401
  Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Lys
      705                710                715
  cct gat gag tcc tgg gtt gtg tat ggg gtg act tcc tgg ggg tat gga 2449
  Pro Asp Glu Ser Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly
      720                725                730                735
  tgt gga gtc aaa gac act cct gga gtt tat acc aga gtc ccc gcc ttt 2497
  Cys Gly Val Lys Asp Thr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Pro Ala Phe
      740                745                750
  gta cct tgg ata aaa agt gtc acc agt ctg taacttatgg aaagctcaag 2547
  Val Pro Trp Ile Lys Ser Val Thr Ser Leu
      755                760
  aaaatagtaa aacagtaacc attcagtctt catacttggc accatgccag aaaaaaaaaa 2607
  aaaaaaa 2614
  < 2 1 0 > 4
  < 2 1 1 > 761
  < 2 1 2 > PRT
  < 2 1 3 > Mouse

```

-- &lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt;

&lt; 4 0 0 &gt; 4

Met Ala Leu Ala Arg Cys Val Leu Ala Val Ile Leu Gly Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Val Val Ala Arg Ala Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Leu His Arg Pro  
 20 25 30  
 His Pro Ser Pro Pro Arg Ser Gln His Ala His Tyr Leu Pro Ser Ser  
 35 40 45  
 Arg Arg Pro Pro Arg Thr Pro Arg Phe Pro Leu Pro Leu Arg Ile Pro  
 50 55 60  
 Ala Ala Gln Arg Pro Gln Val Leu Ser Thr Gly His Thr Pro Pro Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Arg Arg Cys Gly Ala Gly Glu Ser Trp Gly Asn Ala Thr Asn  
 85 90 95  
 Leu Gly Val Pro Cys Leu His Trp Asp Glu Val Pro Pro Phe Leu Glu  
 100 105 110  
 Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Glu Leu Arg Gly Gln Pro His Asn  
 115 120 125  
 Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ser Gly Arg Pro Trp Cys Phe Tyr Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Gln Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys Gly Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Leu Pro Val Ile Arg Leu Val Gly Gly Asn Ser Gly His Glu  
 165 170 175  
 Gly Arg Val Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp  
 180 185 190

Asp Gln Trp Asp Asn Ala Asp Ala Asp Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly  
 195 200 205  
 Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala His Phe Gly Glu Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Pro Ile Leu Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Ile Glu Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly  
 245 250 255  
 His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ser Cys Val Pro Leu Thr Asp Gly Val  
 260 265 270  
 Ile Arg Leu Ala Gly Gly Lys Ser Thr His Glu Gly Arg Leu Glu Val  
 275 280 285  
 Tyr Tyr Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu  
 290 295 300  
 Met Asn Thr Tyr Val Ala Cys Arg Leu Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Ser Val Asn His Phe Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ile Trp Leu  
 325 330 335  
 Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Val Ser Phe Ile Gln Cys Ser  
 340 345 350  
 Arg Arg Gln Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Gly  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Tyr Pro Asp Ser Asp Gly His Arg Leu Ser Pro Gly Phe  
 370 375 380  
 Pro Ile Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu  
 385 390 395 400

Val Phe Val Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr  
 405 410 415

Asp Lys His Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro  
 420 425 430

Ala Arg Ala Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile  
 435 440 445

His Met Asp Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ala Leu Ala Asp  
 450 455 460

Cys Val Lys Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp  
 465 470 475 480

Ala Gly Val Ile Cys Asp Tyr Leu Glu Lys Lys Ala Ser Ser Ser Gly  
 485 490 495

Asn Lys Glu Met Leu Ser Ser Gly Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg  
 500 505 510

Arg Gln Lys Arg Ile Ile Gly Gly Asn Asn Ser Leu Arg Gly Ala Trp  
 515 520 525

Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Leu Arg Ser Ala His Gly Asp Gly Arg  
 530 535 540

Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala  
 545 550 555 560

Ala His Cys Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Ser Arg Ser Tyr Ala Val  
 565 570 575

Arg Val Gly Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Gln Glu  
 580 585 590

Ile Gly Val Gln Gln Ile Val Ile His Arg Asn Tyr Arg Pro Asp Arg  
 595 600 605

Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Gly Glu Gln  
 610 615 620  
 Cys Ala Arg Leu Ser Thr His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro leu Trp  
 625 630 635 640  
 Arg Glu Arg Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys His Ile Thr Gly Trp  
 645 650 655  
 Gly Asp Thr Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Val  
 660 665 670  
 Pro Leu Leu Pro Lys Arg Phe Cys Lys Glu Arg Tyr Lys Gly Leu Phe  
 675 680 685  
 Thr Gly Arg Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu Gln Glu Asp Asn Arg Val  
 690 695 700  
 Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Lys Pro  
 705 710 715 720  
 Asp Glu Ser Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys  
 725 730 735  
 Gly Val Lys Asp Thr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Pro Ala Phe Val  
 740 745 750  
 Pro Trp Ile Lys Ser Val Thr Ser Leu  
 755 760

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 2562

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Human

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 5

ccg acg acg cgt ccg ccg ccg cct ctc ccg cgc ttc ccg cgc ccc ccg 48  
 Pro Thr Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Phe Pro Arg Pro Pro  
 1 5 10 15  
 cgg gcg ctc cct gcc cag cgc ccg cac gcc ctc cag gcc ggg cac acg 96  
 Arg Ala Leu Pro Ala Gln Arg Pro His Ala Leu Gln Ala Gly His Thr  
 20 25 30  
 ccc cgg ccg cac ccc tgg ggc tgc ccc gcc ggc gag cca tgg gtc agc 144  
 Pro Arg Pro His Pro Trp Gly Cys Pro Ala Gly Glu Pro Trp Val Ser  
 35 40 45  
 gtg acg gac ttc ggc gcc ccg tgt ctg cgg tgg gcg gag gtg cca ccc 192  
 Val Thr Asp Phe Gly Ala Pro Cys Leu Arg Trp Ala Glu Val Pro Pro  
 50 55 60  
 ttc ctg gag cgg tgc ccc cca gcg agc tgg gct cag ctg cga gga cag 240  
 Phe Leu Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Gln Leu Arg Gly Gln  
 65 70 75 80  
 cgc cac aac ttt tgt cgg agc ccc gac ggc gcg ggc aga ccc tgg tgt 288  
 Arg His Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ala Gly Arg Pro Trp Cys  
 85 90 95  
 ttc tac gga gac gcc cgt ggc aag gtg gac tgg ggc tac tgc gac tgc 336  
 Phe Tyr Gly Asp Ala Arg Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys  
 100 105 110  
 aga cac gga tca gta cga ctt cgt ggc ggc aaa aat gag ttt gaa ggc 384  
 Arg His Gly Ser Val Arg Leu Arg Gly Gly Lys Asn Glu Phe Glu Gly  
 115 120 125  
 aca gtg gaa gta tat gca agt gga gtt tgg ggc act gtc tgt agc agc 432  
 Thr Val Glu Val Tyr Ala Ser Gly Val Trp Gly Thr Val Cys Ser Ser  
 130 135 140

- cac tgg gat gat tct gat gca tca gtc att tgt cac cag ctg cag ctg 480  
 His Trp Asp Asp Ser Asp Ala Ser Val Ile Cys His Gln Leu Gln Leu  
 145 150 155 160  
 gga gga aaa gga ata gca aaa caa acc ccg ttt tct gga ctg ggc ctt 528  
 Gly Gly Lys Gly Ile Ala Lys Gln Thr Pro Phe Ser Gly Leu Gly Leu  
 165 170 175  
 att ccc att tat tgg agc aat gtc cgt tgc cga gga gat gaa gaa aat 576  
 Ile Pro Ile Tyr Trp Ser Asn Val Arg Cys Arg Gly Asp Glu Glu Asn  
 180 185 190  
 ata ctg ctt tgt gaa aaa gac atc tgg cag ggt ggg gtg tgt cct cag 624  
 Ile Leu Leu Cys Glu Lys Asp Ile Trp Gln Gly Gly Val Cys Pro Gln  
 195 200 205  
 aag atg gca gct gct gtc acg tgt agc ttt tcc cat ggc cca acg ttc 672  
 Lys Met Ala Ala Ala Val Thr Cys Ser Phe Ser His Gly Pro Thr Phe  
 210 215 220  
 ccc atc att cgc ctt gct gga ggc agc agt gtg cat gaa ggc cgg gtg 720  
 Pro Ile Ile Arg Leu Ala Gly Gly Ser Ser Val His Glu Gly Arg Val  
 225 230 235 240  
 gag ctc tac cat gct ggc cag tgg gga acc gtt tgt gat gac caa tgg 768  
 Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gln Trp  
 245 250 255  
 gat gat gcc gat gca gaa gtg atc tgc agg cag ctg ggc ctc agt ggc 816  
 Asp Asp Ala Asp Ala Glu Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Leu Ser Gly  
 260 265 270  
 att gcc aaa gca tgg cat cag gca tat ttt ggg gaa ggg tct ggc cca 864  
 Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro  
 275 280 285

ggtt atg ttg gat gaa gta cgc tgc act ggg aat gag ctt tca att gag	912
Val Met Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu Ser Ile Glu	
290 295 300	
cag tgt cca aag agc tcc tgg gga gag cat aac tgt ggc cat aaa gaa	960
Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly His Lys Glu	
305 310 315 320	
gat gct gga gtg tcc tgt acc cct cta aca gat ggg gtc atc aga ctt	1008
Asp Ala Gly Val Ser Cys Thr Pro Leu Thr Asp Gly Val Ile Arg Leu	
325 330 335	
gca ggt ggg aaa ggc agc cat gag ggt cgc ttg gag gta tat tac aga	1056
Ala Gly Gly Lys Gly Ser His Glu Gly Arg Leu Glu Val Tyr Tyr Arg	
340 345 350	
ggc cag tgg gga act gtc tgt gat gat ggc tgg act gag ctg aat aca	1104
Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu Leu Asn Thr	
355 360 365	
tac gtg gtt tgt cga cag ttg gga ttt aaa tat ggt aaa caa gca tct	1152
Tyr Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys Gln Ala Ser	
370 375 380	
gcc aac cat ttt gaa gaa agc aca ggg ccc ata tgg ttg gat gac gtc	1200
Ala Asn His Phe Glu Glu Ser Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asp Val	
385 390 395 400	
agc tgc tca gga aag gaa acc aga ttt ctt cag tgt tcc agg cga cag	1248
Ser Cys Ser Gly Lys Glu Thr Arg Phe Leu Gln Cys Ser Arg Arg Gln	
405 410 415	
tgg gga agg cat gac tgc agc cac cgc gaa gat gtt agc att gcc tgc	1296
Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Ser Ile Ala Cys	
420 425 430	

- tac cct ggc ggc gag gga cac agg ctc tct ctg ggt ttt cct gtc aga	1344
Tyr Pro Gly Gly Glu Gly His Arg Leu Ser Leu Gly Phe Pro Val Arg	
435 440 445	
ctg atg gat gga gaa aat aag aaa gaa gga cga gtg gag gtt ttt atc	1392
Leu Met Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu Val Phe Ile	
450 455 460	
aat ggc cag tgg gga aca atc tgt gat gat gga tgg act gat aag gat	1440
Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr Asp Lys Asp	
465 470 475 480	
gca gct gtg atc tgt cgt cag ctt ggc tac aag ggt cct gcc aga gca	1488
Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro Ala Arg Ala	
485 490 495	
aga acc atg gct tac ttt gga gaa gga aaa gga ccc atc cat gtg gat	1536
Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile His Val Asp	
500 505 510	
aat gtg aag tgc aca gga aat gag agg tcc ttg gct gac tgt atc aag	1584
Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Arg Ser Leu Ala Asp Cys Ile Lys	
515 520 525	
caa gat att gga aga cac aac tgc cgc cac agt gaa gat gca gga gtt	1632
Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp Ala Gly Val	
530 535 540	
att tgt gat tat ttt ggc aag aag gcc tca ggt aac agt aat aaa gag	1680
Ile Cys Asp Tyr Phe Gly Lys Lys Ala Ser Gly Asn Ser Asn Lys Glu	
545 550 555 560	
tcc ctc tca tct gtt tgt ggc ttg aga tta ctg cac cgt cgg cag aag	1728
Ser Leu Ser Ser Val Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg Arg Gln Lys	
565 570 575	

- cgg atc att ggt ggg aaa aat tct tta agg ggt ggt tgg cct tgg cag 1776  
 Arg Ile Ile Gly Gly Lys Asn Ser Leu Arg Gly Gly Trp Pro Trp Gln  
                   580                                  585                                  590  
 gtt tcc ctc cgg ctg aag tca tcc cat gga gat ggc agg ctc ctc tgc 1824  
 Val Ser Leu Arg Leu Lys Ser Ser His Gly Asp Gly Arg Leu Leu Cys  
                   595                                  600                                  605  
 ggg gct acg ctc ctg agt agc tgc tgg gtc ctc aca gca gca cac tgt 1872  
 Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys  
                   610                                  615                                  620  
 ttc aag agg tat ggc aac agc act agg agc tat gct gtt agg gtt gga 1920  
 Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Ser Thr Arg Ser Tyr Ala Val Arg Val Gly  
                   625                                  630                                  635                                  640  
 gat tat cat act ctg gta cca gag gag ttt gag gaa gaa att gga gtt 1968  
 Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Glu Glu Ile Gly Val  
                                   645                                  650                                  655  
 caa cag att gtg att cat cgg gag tat cga ccc gac cgc agt gat tat 2016  
 Gln Gln Ile Val Ile His Arg Glu Tyr Arg Pro Asp Arg Ser Asp Tyr  
                                   660                                  665                                  670  
 gac ata gcc ctg gtt aga tta caa gga cca gaa gag caa tgt gcc aga 2064  
 Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Glu Glu Gln Cys Ala Arg  
                   675                                  680                                  685  
 ttc agc agc cat gtt ttg cca gcc tgt tta cca ctc tgg aga gag agg 2112  
 Phe Ser Ser His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Leu Trp Arg Glu Arg  
                   690                                  695                                  700  
 cca cag aaa aca gca tcc aac tgt tac ata aca gga tgg ggt gac aca 2160  
 Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Asp Thr  
                   705                                  710                                  715                                  720

gga cga gcc tat tca aga aca cta caa caa gca gcc att ccc tta ctt 2208  
 Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ile Pro Leu Leu  
                             725                            730                            735  
 cct aaa agg ttt tgt gaa gaa cgt tat aag ggt cgg ttt aca ggg aga 2256  
 Pro Lys Arg Phe Cys Glu Glu Arg Tyr Lys Gly Arg Phe Thr Gly Arg  
                             740                            745                            750  
 atg ctt tgt gct gga aac ctc cat gaa cac aaa cgc gtg gac agc tgc 2304  
 Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu His Glu His Lys Arg Val Asp Ser Cys  
                             755                            760                            765  
 cag gga gac agc gga gga cca ctc atg tgt gaa cgg ccc gga gag agc 2352  
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Arg Pro Gly Glu Ser  
                             770                            775                            780  
 tgg gtg gtg tat ggg gtg acc tcc tgg ggg tat ggc tgt gga gtc aag 2400  
 Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Val Lys  
                             785                            790                            795                            800  
 gat tct cct ggt gtt tat acc aaa gtc tca gcc ttt gta cct tgg ata 2448  
 Asp Ser Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Phe Val Pro Trp Ile  
                             805                            810                            815  
 aaa agt gtc acc aaa ctg taattcttca tggaaacttc aaagcagcat 2496  
 Lys Ser Val Thr Lys Leu  
                             820  
 ttaaacaat ggaaaacttt gaacccccac tattagcact cagcagagat gacaacaaac 2556  
 ggcaag 2562  
 < 2 1 0 > 6  
 < 2 1 1 > 822  
 < 2 1 2 > PRT  
 < 2 1 3 > Human

.. &lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt;

&lt; 4 0 0 &gt; 6

Pro Thr Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Phe Pro Arg Pro Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Leu Pro Ala Gln Arg Pro His Ala Leu Gln Ala Gly His Thr  
 20 25 30  
 Pro Arg Pro His Pro Trp Gly Cys Pro Ala Gly Glu Pro Trp Val Ser  
 35 40 45  
 Val Thr Asp Phe Gly Ala Pro Cys Leu Arg Trp Ala Glu Val Pro Pro  
 50 55 60  
 Phe Leu Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Gln Leu Arg Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Arg His Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ala Gly Arg Pro Trp Cys  
 85 90 95  
 Phe Tyr Gly Asp Ala Arg Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys  
 100 105 110  
 Arg His Gly Ser Val Arg Leu Arg Gly Gly Lys Asn Glu Phe Glu Gly  
 115 120 125  
 Thr Val Glu Val Tyr Ala Ser Gly Val Trp Gly Thr Val Cys Ser Ser  
 130 135 140  
 His Trp Asp Asp Ser Asp Ala Ser Val Ile Cys His Gln Leu Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Lys Gly Ile Ala Lys Gln Thr Pro Phe Ser Gly Leu Gly Leu  
 165 170 175  
 Ile Pro Ile Tyr Trp Ser Asn Val Arg Cys Arg Gly Asp Glu Glu Asn  
 180 185 190

Ile Leu Leu Cys Glu Lys Asp Ile Trp Gln Gly Gly Val Cys Pro Gln  
 195 200 205  
 Lys Met Ala Ala Ala Val Thr Cys Ser Phe Ser His Gly Pro Thr Phe  
 210 215 220  
 Pro Ile Ile Arg Leu Ala Gly Gly Ser Ser Val His Glu Gly Arg Val  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gln Trp  
 245 250 255  
 Asp Asp Ala Asp Ala Glu Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Leu Ser Gly  
 260 265 270  
 Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro  
 275 280 285  
 Val Met Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu Ser Ile Glu  
 290 295 300  
 Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly His Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Gly Val Ser Cys Thr Pro Leu Thr Asp Gly Val Ile Arg Leu  
 325 330 335  
 Ala Gly Gly Lys Gly Ser His Glu Gly Arg Leu Glu Val Tyr Tyr Arg  
 340 345 350  
 Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu Leu Asn Thr  
 355 360 365  
 Tyr Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys Gln Ala Ser  
 370 375 380  
 Ala Asn His Phe Glu Glu Ser Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asp Val  
 385 390 395 400

Ser Cys Ser Gly Lys Glu Thr Arg Phe Leu Gln Cys Ser Arg Arg Gln  
 405 410 415

Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Ser Ile Ala Cys  
 420 425 430

Tyr Pro Gly Gly Glu Gly His Arg Leu Ser Leu Gly Phe Pro Val Arg  
 435 440 445

Leu Met Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu Val Phe Ile  
 450 455 460

Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr Asp Lys Asp  
 465 470 475 480

Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro Ala Arg Ala  
 485 490 495

Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile His Val Asp  
 500 505 510

Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Arg Ser Leu Ala Asp Cys Ile Lys  
 515 520 525

Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp Ala Gly Val  
 530 535 540

Ile Cys Asp Tyr Phe Gly Lys Lys Ala Ser Gly Asn Ser Asn Lys Glu  
 545 550 555 560

Ser Leu Ser Ser Val Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg Arg Gln Lys  
 565 570 575

Arg Ile Ile Gly Gly Lys Asn Ser Leu Arg Gly Gly Trp Pro Trp Gln  
 580 585 590

Val Ser Leu Arg Leu Lys Ser Ser His Gly Asp Gly Arg Leu Leu Cys  
 595 600 605

Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys  
 610 615 620  
 Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Ser Thr Arg Ser Tyr Ala Val Arg Val Gly  
 625 630 635 640  
 Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Glu Glu Ile Gly Val  
 645 650 655  
 Gln Gln Ile Val Ile His Arg Glu Tyr Arg Pro Asp Arg Ser Asp Tyr  
 660 665 670  
 Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Glu Glu Gln Cys Ala Arg  
 675 680 685  
 Phe Ser Ser His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Leu Trp Arg Glu Arg  
 690 695 700  
 Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Asp Thr  
 705 710 715 720  
 Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ile Pro Leu Leu  
 725 730 735  
 Pro Lys Arg Phe Cys Glu Glu Arg Tyr Lys Gly Arg Phe Thr Gly Arg  
 740 745 750  
 Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu His Glu His Lys Arg Val Asp Ser Cys  
 755 760 765  
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Arg Pro Gly Glu Ser  
 770 775 780  
 Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Val Lys  
 785 790 795 800  
 Asp Ser Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Phe Val Pro Trp Ile  
 805 810 815

-Lys Ser Val Thr Lys Leu

820

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/03324

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN), Swiss-Prot/PIR/GENESEQ</p>												
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X, P</td> <td>KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p.143-147</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A, P</td> <td>YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p.386-392</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p.143-147	1-11	A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p.386-392	1-11	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p.143-147	1-11										
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p.386-392	1-11										
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.    <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
<p>Date of the actual completion of the international search 31 August, 1998 (31. 08. 98)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 8 September, 1998 (08. 09. 98)</p>										
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>										
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>										

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CA (STN)  
 REGISTRY (STN)  
 Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p. 143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p. 386-392	1-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー  
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 31.08.98  
 国際調査報告の発送日 08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉住 和之 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3449	4 B	9165
--	--	-----	------