



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5 C07K 13/00, C12P 21/02 C12N 15/12 // C12N 9/99 A61K 37/02</p>	<p>AI</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 91/01999</p> <p>(43) 国際公開日 1991年2月21日 (21. 02. 1991)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP90/00996 (22) 国際出願日 1990年8月3日(03. 08. 90)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平1/200246 1989年8月3日(03. 08. 89) JP 特願平2/89085 1990年4月5日(05. 04. 90) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 諏訪頼正 (SUWA, Yorimasa)[JP/JP] 〒160 東京都新宿区新宿7丁目24番13号 Tokyo, (JP) 今泉 厚 (IMAZUMI, Atsushi)[JP/JP] 〒191 東京都日野市西平山5丁目10番8号 Tokyo, (JP) 岡田昌宏 (OKADA, Masahiro)[JP/JP] 〒191 東京都日野市多摩平3丁目5番18号 Tokyo, (JP) 工藤一郎 (KUDO, Ichiro)[JP/JP] 〒145 東京都大田区南千束1丁目28番15号 Tokyo, (JP) 井上圭三 (INOUE, Keizo)[JP/JP] 〒135 東京都江東区越中島1丁目3番17-605 Tokyo, (JP) 鈴木洋二 (SUZUKI, Yoji)[JP/JP] 〒191 東京都日野市東豊田2丁目24番10号 Tokyo, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 前田純博 (MAYEDA, Sumihiro) 〒100 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 帝人株式会社 知的財産部 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 * DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITING PROTEIN ORIGINATING IN INFLAMED REGION, PRODUCTION THEREOF, AND GENE THEREFOR</p>		
<p>(54) 発明の名称 炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白、その製造方法およびその遺伝子</p>		
<p>Glu Asp Val Pro Ala Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val 12 Pro Asp Thr Asp Ser Gln Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Ala Gln Asp Ala Val Asp Gly Gln Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser Gly Cys Gly Gln Gln Asn Met Ile Gly Met Thr 60 Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp Gln Thr Gln Gln Trp Gln Lys Phe Gly Leu Gln Lys Arg Gln Gln Ala Leu Gln Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Lys Gln Pro Ser Ser Ala Tyr Ala 108 Ala Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Ala Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Gln Lys Gln Lys Pro Asp 156 Gly Val Phe Gln Gln Asp Gly Pro Val Ile His Gln</p>	<p>Glu Met Ile Gly Gly Phe Arg Asn Thr Lys Gln Ala 180 Asp Val Ser Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu Gln Gln Ala Arg Asp Ile Cys Gln Gly Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Asn Lys Ala Gly Gln Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Leu Asn Leu Gln Arg Pro Tyr 228 Thr Val Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys Leu Gln Gln Pro Tyr Leu Thr Lys Phe Leu Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn Arg Trp Gln Gln Pro Gly Gln Gln Leu Tyr Asn Val Gln Ala Thr Ser Tyr 276 Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp Ser Val Pro Pro Val Val Arg Trp Leu Asn Gln Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln 324 Thr Asp Val Pro Asp His Lys Asp Leu Asn Met Asp Val Ser Leu His Leu Pro Ser Arg 344</p>	
<p>(57) Abstract A phospholipase A₂ inhibiting protein originating in inflamed regions and having a sequence of 334 amino acids as shown or a physiologically equivalent amino acid sequence, a method of producing said protein by enzymatically treating the serum of a mammal, and a gene which codes for said protein.</p>		

* 追って通知があるまで、出願日が1990年10月3日より前の国際出願におけるDEの指定は、先のドイツ民主共和国の領域を除く、ドイツ連邦共和国の領域において有効である。

(57) 要約

第1図に示す334個のアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白、哺乳動物の血清を酵素処理することを特徴とする該阻害蛋白の製造方法、および該阻害蛋白をコードする遺伝子。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NO ノルウェー
BJ ベナン	HU ハンガリー	PL ポーランド
BR ブラジル	IT イタリア	RO ルーマニア
CA カナダ	JP 日本	SD スーダン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CG コンゴ	KR 大韓民国	SN セネガル
CH スイス	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CM カメルーン	LK スリランカ	TD チャード
DE 西ドイツ	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DK デンマーク	MC モナコ	US 米国

明 細 書

発明の名称

炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白、その製造方法およびその遺伝子

技術分野

- 5 本発明は炎症の進行に関与するホスホリパーゼA₂に対する阻害蛋白、その製造方法及びその遺伝子に関する。更に詳しくはラット又はヒトの炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白、その製造方法及びその遺伝子に関する。

10 背景技術

- ステロイド剤は強力な抗炎症薬として、多くの炎症性疾患の治療に用いられてきた。しかし、ステロイドはそのホルモン作用により様々な副作用を持つため、その使用は比較的重篤な患者に限らざるを得ない。したがって
- 15 ステロイドと同等の抗炎症作用を持ち、かつ副作用の少ない新規医薬品の開発が、炎症性疾患の治療にあたる医師にとって最大の要求となっている。

- ステロイドが抗炎症作用を発揮するメカニズムの一つとして、炎症局所においてホスホリパーゼA₂を阻害する蛋白を合成誘導することにより、この酵素によるアラキドン酸の遊離を抑制し、その結果起炎的な作用を持つ
- 20 アラキドン酸代謝物の産生を低下させることが考えられ

ている (Flower et al. Nature 278, 456, 1979)。この
ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白は、上記の要求を満足する
活性を持つことが期待されるため、数多くの研究者によ
り、その単離・精製と抗炎症作用評価の試みが行われて
5 きた。

しかしながら、これまでのところステロイドに匹敵す
るほどの強力な抗炎症作用を示すものは見いだされてい
ない。その原因として次の2つが考えられる。

すなわち、

- 10 (1) 従来の研究では阻害活性の評価系に膵臓由来の酵素
を用いていたが、炎症局所由来のホスホリパーゼ A₂
は膵由来ホスホリパーゼ A₂ とは異なる構造及び酵素活
性を持つものであること
- 15 (2) ホスホリパーゼ A₂ に直接作用するものではなく、
基質側との相互作用による見かけ上の阻害活性を検出
していたこと

である。

本発明者らは、これらの問題点に着目し、まず、カゼ
イン投与により腹膜炎を起こしたラットの腹腔浸出液よ
りホスホリパーゼ A₂ を精製した。
20

また、本発明者らはヒト炎症局所、すなわち、慢性関
節リウマチ患者関節液よりホスホリパーゼ A₂ を精製す
ることに成功し (W089/05851号明細書 (特願昭62-
325255号)、Hara et al, J. Biochem. 104, 326-328

1988)、ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂はラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂と酵素活性及び構造において極めてよく似たものであることを明らかにした。すなわち、酵素活性においては、両酵素ともにホスファチジルエタノールアミンに対して高い特異性を有していた。5
膵臓由来のホスホリパーゼA₂はこのような基質特異性を有さない。また、構造においては、N末端34個のアミノ酸配列を比較した結果、ラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂とヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂とのホモロジーは67%であるのに対し、ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂とヒト膵臓ホスホリパーゼA₂とのホモロジーは45%にすぎないことが明らかになった。10

一方本発明者らは、ラット腹腔浸出液から精製したホスホリパーゼA₂を特異的に阻害する蛋白を、デキサメサゾン投与ラットの腹腔洗浄液中に見出し、これを精製して約35kDaと40kDaの蛋白を得、各々のN末端アミノ酸配列を決定した(特開昭63-246397号公報(特願昭62-79693号))。15

また本発明者らは、ヒト慢性関節リウマチ患者関節液由来ホスホリパーゼA₂を特異的に阻害する蛋白として、20
ヒト補体C3を酵素処理した分解物である約33kDaの蛋白を得、そのN端部アミノ酸配列を決定した(特開平2-91100号公報(特願昭63-242556号))。

これらの阻害蛋白は膵由来のホスホリパーゼA₂等に

対しては全く阻害活性を示さなかった。すなわち、これらの阻害蛋白は、従来の研究において問題となっていた上記の2点を克服した活性を持つ点で全くユニークなものであり、従来のホスホリパーゼA₂阻害蛋白よりはるかに強力な抗炎症作用を示すことが期待できる。

しかしながら、炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の全アミノ酸配列は未だ解明されていなかった。また、ラットの腹腔洗浄液から抽出精製する方法またはヒトC3をプロテアーゼで分解する方法を用いる場合、抗炎症作用を評価するのに十分な量のホスホリパーゼA₂阻害蛋白を得ることは極めて困難である。

一方、本発明者らによればラット腹腔洗浄液より精製した炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白のN末端アミノ酸配列はヒト補体C3 α 鎖のアミノ酸配列の一部と極めて高いホモロジーを有しており、C3の分解物C3dgまたはC3dと類似の蛋白であると考えられた。

ヒト補体C3は血清中のプロテアーゼによって段階的に分解され、最終的にC3dgまたはC3dが生成することが知られている。また、慢性関節リウマチ患者関節液において、免疫化学的方法により、高いC3dg値が検出されること、及びその値が病態の重症度と相関を示すことが知られている(Nydegger et al. J. Clin. Invest. 59, 862-868 1977)。

従来、補体C3と炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻

害蛋白との関係に関するものとしては、既述の特開平2-91100号公報がある。しかしながら特開平2-91100号公報には、該阻害蛋白の全アミノ酸配列や遺伝子についての記載は全くなされていない。

- 5 また補体C3のなかでもその分解物であるC3dgと該阻害蛋白との関係についての記載や、血清を酵素処理することによる該阻害蛋白の製造方法についても何ら記載もされていないのである。

10 本発明の目的は、炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の全アミノ酸配列を明らかにすることにある。

さらに本発明の目的は、そのようなアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白をコードするDNA配列を明らかにし、この蛋白を大量に供給できる製造方法を提供することにある。

15 発明の開示

かかる従来技術の問題点に鑑みて本発明者らは鋭意検討の結果、1032個の塩基でコードされ、344個のアミノ酸からなる蛋白、および1047個の塩基でコードされ、349個のアミノ酸からなる蛋白が各々炎症局所由来ホス
20 ホリパーゼA₂阻害活性を有することを知見して本発明に到達したものである。

すなわち本発明は、第1図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白である。

また本発明は哺乳動物の血清を酵素処理することを特徴とする第1図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の製造方法である。

- 5 更にまた本発明は、第1図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白をコードする炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の遺伝子である。

10 また本発明は、第3図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有するヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白である。

また本発明はヒト血清を酵素処理することを特徴とする第3図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有するヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の製造方法である。

15

更にまた本発明は、第3図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有するヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白をコードする遺伝子である。

20 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白-ラット（阻害蛋白-ラット）のアミノ酸配列を示す。

第2図は、本発明の阻害蛋白-ラットの遺伝子を含む

DNA塩基配列の一例を示す。

第3図は、本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白-ヒト（阻害蛋白-ヒト）のアミノ酸配列を示す。

5 第4図は、本発明の阻害蛋白-ヒトの遺伝子のDNA塩基配列の一例を示す。

第5図は、アニオン交換HPLCを用いた場合の阻害蛋白-ラットの溶出パターンを示す。

10 第6図は、ゲル濾過HPLCを用いた場合の阻害蛋白-ラットの溶出パターンを示す。

第7図は、アニオン交換HPLCを用いた場合の阻害蛋白-ラットの溶出パターンを示す。

第8図は、逆相HPLCを用いた場合の阻害蛋白-ラットの溶出パターンを示す。

15 第9図は、阻害蛋白-ラットのSDS-PAGEを示す。

第10図は、本発明の阻害蛋白-ラットの阻害活性を示す。

20 第11図（同a及び同b）は、ともに本発明の阻害蛋白-ラットの各種ホスホリパーゼA₂阻害活性を示す。

第12図は、未処理及び37℃処理したヒト血清のウェスタンブロッティングの結果を示す。

第13図は、分取用サイズのアニオン交換HPLCを用いた場合の阻害蛋白-ヒトの溶出パターン（第13図

a) と SDS-PAGE (同 b) を示す。

第 14 図は、分析用サイズのアニオン交換 HPLC を用いた場合の阻害蛋白-ヒトの溶出パターン (第 14 図 a) と SDS-PAGE (同 b) を示す。

5 第 15 図は、ゲル濾過 HPLC を用いた場合の阻害蛋白-ヒトの溶出パターン (第 15 図 a) と SDS-PAGE (同 b) を示す。

第 16 図は、逆相 HPLC を用いた場合の阻害蛋白-ヒトの溶出パターン (第 16 図 a) と SDS-PAGE (同 b) を示す。

10

第 17 図は、本発明の阻害蛋白-ヒトの阻害活性を示す。

第 18 図は、本発明の阻害蛋白-ラットの遺伝子を含む塩基配列決定のストラテジーを示す。

15 第 19 図は、ラット C3 のアミノ酸配列のうち、ヒト C3 のファクター I による切断部位近傍のアミノ酸配列に相当する部分を示す。

第 20 図は、本発明の阻害蛋白-ヒトの SDS-PAGE (第 20 図 a) 及びウェスタンブロッティング (同 b) の結果を示す。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白は、第 1 図に示す 344 個のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は第 3 図に示す 349 個のアミノ酸配列からなるポリ

ペプチドであるが、それと実質的に同等の生物活性が保持されているならば、上記アミノ酸配列に部分的な置換、欠失、挿入などがなされて構成されるポリペプチドも本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白に含まれる。

本発明の製造方法においては、哺乳動物、例えばヒト、ラット等の血清を酵素処理して上記アミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白を製造できるが、かかる製造方法における酵素処理とは、例えば、血清を直接37℃で6日～10日間処理するか、あるいは同血清からC3を精製しこれをFactor Iを用いて通常の酵素処理操作に付すことをいう。

更にまた、本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の遺伝子の一例は第2図又は第4図に示す1032個又は1047個のDNA塩基配列からなるが、一本鎖DNA、又はこの一本鎖DNAと相補DNAとからなる二本鎖DNAのいずれもその範疇に含まれる。更に上記阻害蛋白のアミノ酸配列をコードするものであれば、上記塩基配列に部分的な置換、欠失、挿入がなされて構成されるDNA、上記塩基配列を含むDNA、および上記塩基配列の一部分のみを有するDNAも当然本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の遺伝子に含まれる。

次に本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の全アミノ酸配列及びこの阻害蛋白の遺伝子に至る迄

の本発明の手法につき説明する。

本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白は、血清をVik (Vik, D.P. et al. J. Immunol. 134, 2571, 1985) らの方法により熱処理するか酵素処理後、得られたサンプルを炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 活性を指標としてアニオン交換HPLC, ゲル濾過HPLC, 逆相HPLC等によって単離・精製する。

かかる血清としては、哺乳動物の血清、なかでも好ましくはラット血清、又はヒト血清を用いることができる。

次いで、このように単離・精製されたサンプルを気相プロテインシーケンサー (Applied Biosystem 社) により、N末端アミノ酸配列を決定する。

一方、本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白の遺伝子は、例えばラットの場合であればラット肝cDNAライブラリーをプローブとしてマウスC3cDNA (de Bruijn, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 708, 1985) を用いてスクリーニングする。

得られたラットC3cDNAのポジティブクローンのうち、λrC3/11が挿入遺伝子断片が約2.7Kbpと最も長く、C3dgと類似の蛋白と考えられる本発明の阻害蛋白をコードする遺伝子部分を完全に含んでいるものと考えた。

そこで、このクローンの塩基配列を決定し、更に前述の本阻害蛋白のN末端アミノ酸配列を指標にして本阻害

蛋白の遺伝子の塩基配列を決定する。

またヒトの場合には、まず単離・精製されたサンプルのN末端アミノ酸配列を決定し、このアミノ酸配列を指標としてヒトC3遺伝子 (de Bruijn et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 708-712, 1985) の塩基配列から本阻害蛋白の遺伝子の全塩基配列を決定する。

更に、この全塩基配列より、本阻害蛋白の全アミノ酸配列を決定する。

本発明において用いられた各種試験、測定法は以下のとおりである。

(1) 炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害活性の測定法

酵素としてカゼイン誘導ラット腹腔浸出液又は慢性関節リウマチ患者関節液より単離・精製したホスホリパーゼA₂ を用い、基質としては¹⁴C-酢酸と共に培養したE. Coli より抽出、精製した¹⁴C-ホスファチジルエタノールアミン (約2,000dpm/nmol, 1mM) を用いた。

酵素反応は、50 μ l の0.5M Tris · HCl (pH9.0), 25 μ l の40mM CaCl₂, 25 μ l の基質にサンプルおよび水を加えて総量240 μ l として混合し最後に10 μ l の酵素液 (0.1ng/ μ l) を加え、37°Cにて10分間反応させたのち、Dole's試薬 (1.5 ml) を加えて反応を停止し、Doleの方法に従って生成した¹⁴C-脂肪酸を抽出し、液体シンチレーション・カウンターで測定した。

(2) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびウェスタン・ブロッティング

酵素処理又はHPLCにより得られたサンプルに1/10量の色素液(0.1%BPB, XC, 10%SDS)を加え、100℃5分間熱処理後、12.5%ポリアクリルアミドゲルにアプライし、1%SDS存在下、15~25mAで1.5時間電気泳動した。還元状態での解析のためにはサンプルに2-メルカプトエタノール(2ME)を加えた。泳動後、蛋白の検出のためにCBBで染色した。

また、同様に泳動した後ミリポア社エレクトロブロッティング装置を用いて、蛋白をゲルからニトロセルロース・フィルターに移した。抗ヒトC3dヒツジ血清(Dako), 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ結合抗ヒツジIgG抗体(Cappel)および基質として4-クロロ-1-ナフトール(Bio-Rad)を用い、酵素抗体染色法によりC3dのバンドを検出した。

(3) 蛋白N末端アミノ酸配列の決定法

気相プロテイン・シークエンサー(アプライド・バイオシステム477A)およびHPLC(アプライド・バイオシステム120A)を用いた。

すなわち、0.1%TFAに溶解したサンプル100 μ lを、上記気相プロテイン・シークエンサーにアプライした。自動的にエドマン分解されたPTH(フェニ

ルチオヒダントイン) アミノ酸誘導体は、その後、高速液体クロマトグラフィーにて各アミノ酸として分析された。

(4) 蛋白C末端アミノ酸配列の決定法

5 サンプル約150 μg を100 μl の8 M尿素-125mM
 トリス塩酸バッファー (pH7.6) に溶解し、2 μl の2-
 メルカプトエタノールを加え37°C, 4時間置いた後、
 2 μl の4-ビニルピリジンを加え、37°C, 45分間反
 応させた。本サンプルを逆相HPLC (Vydac 218TP54)
10 にて脱塩後、凍結乾燥する。本サンプルを200 μl の
 8 M尿素-1%炭酸水素アンモニウム溶液に溶解し、
 これに600 μl の1%炭酸水素アンモニウム溶液を加
 えた後、1 μg の α -キモトリプシンを加え、37°Cで
 16時間反応させた。ここでキモトリプシンを用いたの
15 は本蛋白のC末端がArgと予想されたためである。

 反応溶液に酢酸を加えてpHを約5にし、20mM
 CaCl₂ を含む50mM酢酸ナトリウムバッファー (pH5.0)
 で平衡化したアンハイドロキモトリプシンアガロース
 カラム (宝酒造, ベッド体積1.5 ml) に添加した。

20 C末端フラグメントを素通り画分に回収し、(3) と
 同様にしてアミノ酸配列を決定することにより本阻害
 蛋白のC末端アミノ酸配列を決定した。

 本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白は、
 本発明によってその全アミノ酸配列が明らかになったの

で、公知の化学合成法によって製造することもできるが、遺伝子組換え法によって容易かつ大量に製造することができる。

5 このようにして得られた炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白はそれ自体抗炎症剤として利用するだけでなく、かかる蛋白を抗原として得られた抗体等を用いて炎症性疾患の診断方法、あるいはそのためのキットとして利用することができる。

実施例

10 以下実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例 1

ラット炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白（以下、「阻害蛋白-ラット」と略す）の調製および活性測定

15 (A) 阻害蛋白-ラットの調製

(1) ラット血清（日生材）に 0.1 % NaN₃ を加え、37 °C で 10 日間処理した。これにプロテアーゼ・インヒビター（20 μg / ml アプロチニン、10 μg / ml ダイストリアプシンインヒビター、0.5 mM EDTA）を加えた後、3 ℓ の 20 mM Tris · HCl, pH 7.5 に対して 2 回透析を行った。

20 (2) (1) で得られた透析後のサンプル（蛋白濃度約 30 mg / ml）を 20 倍稀釈し、遠心分離操作により不溶物を取り除いた後、以下のようにして目的蛋白を単離

・精製した。

まず、サンプルを分取用サイズのアニオン交換H
P L C (T S K g e 1 D E A E - 5 P W) で分画した (第 5 図) 。
第 5 図において、実線は U V 280nm における吸収、
5 破線は NaCl 濃度勾配を示す。

溶出は 20mM Tris-HCl, pH7.5-NaCl (0→0.35M),
2.5 ml / min, 2min. / tube で行った。カラムサイズ
は 21.5φ × 30cm である。

次いで、第 5 図に示されたフラクション中の S D
10 S - P A G E で 39kDa のバンドが検出されたフラク
ション Nr. 61-63 の部分を集め、濃縮し、これをゲル
濾過 H P L C (T S K g e 1 G 3 0 0 0 S W) で更に分画した (第
6 図) 。第 6 図において、実線は U V 280nm におけ
る吸収、矢印は分子量マーカーの溶出位置を示す。

15 溶出条件は 20mM Tris-HCl, pH7.5-1M NaCl, 0.5
ml / min, 2min. / tube である。

次に第 6 図中の S D S - P A G E で 39kDa のバン
ドが検出されたフラクション Nr. 19-20 のピーク部分
を集め、分析用サイズのアニオン交換 H P L C (T S
20 K g e 1 D E A E - 5 P W) で精製した (第 7 図) 。第 7 図にお
いて実線は U V 280nm における吸収、破線は NaCl 濃
度勾配を示す。

精製は、20mM Tris-HCl, pH7.5-NaCl (0→1.0M),
1.0 ml / min, 2min. / tube で行った。

最後に第7図中のメイン・ピークのフラクション
Nr.16 を更に逆相HPLC (Bio-RadRP304) で精製
した(第8図)。第8図において実線はUV 210nm
における吸収、破線はCH₃CN濃度勾配を示す。精製
5 は、0.1% TFA / CH₃CN 0~80%, 1 ml / min.,
2 min. / tubeで行った。

このようにして得られた阻害蛋白-ラット(フラ
クションNr.30)はSDS-PAGEで単一のバンド
(推定分子量約39kDa)を示した(第9図)。SDS
10 -PAGEは、フラクションNr.29-33の各サンプル
を10倍濃縮し、行った。

(B) 阻害蛋白-ラットのホスホリパーゼA₂ 阻害活性

(A) で得られた本発明の阻害蛋白(逆相HPLCフ
ラクションNr.30, 蛋白濃度40 μg / ml)の炎症局所
15 由来ホスホリパーゼA₂ およびその他のホスホリパー
ゼA₂ に対する阻害活性を、前述のホスホリパーゼ
A₂ 阻害活性の測定法によって測定した(酵素として
ラット血小板分泌性のホスホリパーゼA₂ を用いた。
本酵素はラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ と同
20 一のものである。)。

(1) 本発明の阻害蛋白のラットホスホリパーゼA₂ 阻
害活性を見るために、阻害蛋白の種々の量(3, 6,
9, 12, 15, 18ng)で測定した。結果を第10図に
示した。

第10図から本阻害蛋白はラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂を用量依存的に阻害することが明らかである。1ngのホスホリパーゼA₂活性を50%阻害するのに必要な阻害蛋白量は約6ngであり、

5 IC₅₀値は 0.8×10^{-9} Mであった。

(2) ホスホリパーゼA₂として、ラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂のほかに、ヒト慢性関節リウマチ患者関節由来ホスホリパーゼA₂（特開昭63-246397号公報）、*Crotalus adamanteus* venom（マムシ毒）ホスホリパーゼA₂（Sigma社製）、ブタ膵臓ホスホリパーゼA₂（Sigma社製）、*Naja naja* venom（コブラ毒）ホスホリパーゼA₂（Sigma社製）を用い、同一条件で本発明の阻害蛋白による阻害活性を測定し、結果を第11図a, 同bに各々示した。

15

第11図から明らかなように、本阻害蛋白はラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂（○-○）、ヒト慢性関節リウマチ患者関節液由来ホスホリパーゼA₂（△-△）、*Crotalus adamanteus* venom ホスホリパーゼA₂（□-□）に対しては、ほぼ同等の阻害活性を示したが、ブタ膵臓ホスホリパーゼA₂（×-×）、*Naja naja* venom ホスホリパーゼA₂（×……×）に対しては全く阻害活性を示さなかった。これにより、本阻害蛋白は炎症局所由来ホスホ

20

リパーゼ A₂ に対して特異的に阻害作用を示すことが明らかとなった。

(3) (A) で得られた本阻害蛋白について、活性測定系の基質濃度を 0.1 ~ 0.35mM と変化させても本阻害蛋白の阻害活性に変化は見られなかった。また、活性測定の前に本阻害蛋白を酵素とプレインキュベーションしても阻害活性に変化は見られなかった。

これらの結果から本阻害蛋白の活性は基質との相互作用によるものではないと考えられた。

(4) 以上の結果から本阻害蛋白は、ラット腹腔由来の炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白と分子量がほぼ同一でかつ同じ活性を有する蛋白であることが明らかとなった。

実施例 2

ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白（以下、「阻害蛋白-ヒト」と略す）の調製及び活性測定

(A) 阻害蛋白-ヒトの調製

(1) ヒト血清 30ml に 0.1 % NaN₃ を加え、37℃ で 10 日間処理した。

処理及び未処理サンプルをそれぞれ 50 倍希釈後、常法にしたがって SDS-PAGE 後ウェスタン・ブロッティングによりフィルターに移した。このフィルターについて抗ヒト C3d 血清を用いて酵素抗体染色法を行った結果、未処理血清では 100kDa 以上

のバンドのみが検出され、37℃処理血清では39kDa
のバンドのみが検出された（第12図）。この結果
から、37℃処理により、C3が血清中の酵素によっ
て切断されてC3dgが生成していることが確認され
た。そこでこの血清にプロテアーゼ・インヒビタ
ー（20 μ g/mlアプロチニン、10 μ g/mlダイズト
リプシンインヒビター、0.5mM EDTA）を加えた
後、3 ℓ の20mM Tris・HCl, pH 7.5に対して2回
透析を行った。

- 5
- 10 (2) (1) で得られた透析後のサンプル（蛋白濃度約30
mg/ml）を20倍希釈し、遠心分離操作により不溶物
を取り除いた後、以下のようにして目的蛋白を単離
・精製した。

まず、サンプルを分取用サイズのアニオン交換H
P L C（TSKgelDEAE-5PW）で分画した（第13図）。
15 第13図aにおいて、実線はUV280nmにおける吸
収、破線はNaCl濃度勾配を示す。溶出は20mM Tris
-HCl, pH 7.5-NaCl（0 \rightarrow 0.35M）, 2.5 ml/min,
2 min/tubeで行った。カラムサイズは21.5mm ϕ \times
20 30cmである。

次いで、第13図bに示されたフラクション中の
S D S - P A G Eで39kDaのバンドが検出されたフ
ラクションNr. 52-54の部分を集め4倍希釈後、これ
を分析用サイズのアニオン交換H P L C（TSKgelDE

AE-5PW) で精製した (第14図)。第14図aにおいて実線はUV 280 nmにおける吸収、破線はNaCl濃度勾配を、棒グラフはヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害活性を示す。

5 精製は、20mM Tris - HCl, pH 7.5 - NaCl (0 → 1.0M), 1.0 ml/min, 2 min / tubeで行った。

次に第14図b中のSDS-PAGEで39 kDaのバンドが検出され、ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害活性の最も強かったフラクションNr. 1
10 3のピーク部分を集め、ゲル透過HPLC (TSKgel G3000SW)で更に分画した (第15図)。第15図aにおいて、実線はUV 280nm における吸収を、棒グラフはヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害活性を示す。

15 溶出条件は20mM Tris - HCl, pH 7.5 - 1M NaCl
0.5 ml/min, 2 min / tubeで行った。

最後に第15図b中のSDS-PAGEで39kDaのバンドが検出され、ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害活性の最も強かったフラクションNr.
20 20, 21を更に逆相HPLC (Bio-Rad RP304)で精製した (第16図)。第16図aにおいて実線はUV 210nm における吸収、破線はCH₃CN濃度勾配を示す。精製は、0.1% TFA / CH₃CN 0 ~ 80%,
1 ml/min, 2 min / tubeで行った。

第16図b中のSDS-PAGEに示したように分子量39kDaの阻害蛋白-ヒトはフラクションNr. 30に溶出したが、フラクションNr. 23に主に溶出しているアルブミンとみられる蛋白が若干混在していることがわかった。しかし、アルブミンは強いホスホリパーゼA₂阻害活性を持たないこと、及びフラクションNr. 23もホスホリパーゼA₂阻害活性を示さなかったことから、阻害蛋白-ヒトの活性測定には影響を及ぼさないものと考えた。

10 (B) 阻害蛋白-ヒトのホスホリパーゼA₂阻害活性

(A) で得られた本発明の阻害蛋白-ヒト（逆相HPLCフラクションNr. 30、蛋白濃度約15ng/ μ l）のヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂及びその他のホスホリパーゼA₂に対する阻害活性を、前述のホスホリパーゼA₂阻害活性の測定法によって測定した。

15 その結果を第17図及び下記第1表に示した。

第 1 表

ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白の各種ホスホリパーゼ A₂ に対する活性の比較

	ホスホリパーゼ A ₂ の種類	ホスホリパーゼ A ₂ 阻害活性 (%) *
5	慢性関節リウマチ患者関節液 (ヒト炎症局所由来)	47.4
	ラット血小板 (ラット炎症局所由来)	22.0
10	ブタ膵臓	6.5

* ホスホリパーゼ A₂ 1 ng に対して阻害蛋白
— ヒト約 15 ng を加えた時の阻害活性

第 17 図から本阻害蛋白はヒト炎症局所由来ホスホリ
15 パーゼ A₂ を用量依存的に阻害することが明らかである。
また、1 ng のヒト炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 活性
を阻害するのに必要な阻害蛋白量は約 50 ng であった。さ
らに第 1 表から明らかのように、本阻害蛋白はラット炎
症局所由来ホスホリパーゼ A₂ は阻害したが、ブタ膵臓
20 ホスホリパーゼ A₂ に対しては有意な阻害活性を示さな
かった。

以上の結果から、本阻害蛋白はヒト炎症局所由来ホ
スホリパーゼ A₂ を特異的に阻害する活性を有するこ
とが明らかである。

実施例 3

ラット炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白の同定

(A) 阻害蛋白-ラットの N 末端アミノ酸配列の決定

5 実施例 1 (A) で単離・精製した分子量約 39kDa の阻害蛋白について、Applied Biosystem 社の気相プロテインシークエンサー 477 A を用いて N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、下記のような配列であることが判明した。

10

NH₂ -Glu-Asp-Val-Pro-Ala-Ala-Asp-Leu-Ser-

これは、後に述べるラット C3 cDNA の塩基配列から推定される C3 dg の N 末端配列と完全に一致しており、また、デキサメサゾン処理ラットの腹腔洗浄液より精製した炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白の N 末端アミノ酸配列とも完全に一致していた。

15

(B) 該阻害蛋白の C 末端フラグメントについて (A) と同様にアミノ酸配列を決定し、以下の配列を得た。

20

Gln-Thr-Asp-Val-Pro-Asp-His-Lys-Asp-Leu-Asn-
Met-Asp-Val-Ser-Leu-His-Leu-Pro-Ser-Arg

これは後に述べるラット C3 cDNA の塩基配列か

ら推定される C 3 dg の C 末端配列と完全に一致していた。

(C) 阻害蛋白-ラットのウエスタンブロッティング

実施例 1 (A) で単離・精製した分子量約 39kDa の阻
害蛋白-ラットを常法に従って SDS-ポリアクリル
5 アミドゲル電気泳動後、ミリポア社製エレクトロブ
ロッキング装置を用い、同社プロトコールに従ってニ
トロセルロースメンブレンフィルターに移した。この
フィルターについて、抗ヒト C 3 d ウサギ血清
10 (DAKOPATTS) を一次抗体、抗ウサギ IgG ワサビペルオ
キシダーゼ結合ヤギ IgG フラクション (CAPPEL) を二次
抗体とし、基質として 4-クロロ-1-ナフトール
(Bio-Rad) を用いて酵素抗体染色を行った。

その結果本阻害蛋白は抗ヒト C 3 d 血清と特異的に
15 反応した。

以上 (A) ~ (C) から、本阻害蛋白はラット C 3 dg で
あることが確認された。

実施例 4

ラット炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白遺伝
20 子のクローニング

(A) マウス C 3 c DNA 断片の調製

マウス C 3 c DNA 断片を含むプラスミド pFC4/
5.4 (J. B. C. 260, 10936, 1986) の Hind III 消化物から、
低融点アガロースゲル電気泳動にて 2.2kbp 断片を分離

した。また *Stu* I 消化物からも同様な操作で 1.8 kbp 断片を得た。

(B) cDNA のスクリーニング

5 ラット肝 cDNA λ gt11 ライブラリー (クロンテック社製) をスクリーニングの素材として用い、クロンテック社実験プロトコールの記載に従ってスクリーニングした。

すなわち、 λ gt11 ファージを感染させた *E. coli* 1090 株を 37°C、5 時間培養して得られた約 5 万個の形質転換体群を対象としてナイロンフィルターメンブレンにレプリカし、0.5M NaOH - 1.5M NaCl につけて DNA を変性させ、1.5M NaCl - 1 mM EDTA を含有するトリス塩酸バッファー (pH 7.2) で中和した。その後、10 フィルターを風乾し、トランスイルミネーターにて紫外線を 3 分間照射して DNA をフィルターに固定した。15

スクリーニング用プローブとしては、上記 (A) で得られたマウス C3 cDNA 断片を 32 P で標識したものをを用いた。

20 上記被験フィルター上の形質転換体群をこのプローブにて 65°C のハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、オートラジオグラムでの感光により判定したところ、約 5 万個の形質転換体群の内 7 個がポジティブクローンであった。これらのポジティブクローンを各々 λ r C 3 / 11 ~ 17 と命名した。

これらのクローンをEcoRI消化後、アガロースゲル電気泳動を行いサザンハイブリダイゼーションにより挿入遺伝子断片の鎖長を解析した。その結果、7つのクローンのなかでλ r C 3 / 11の挿入遺伝子断片が最も長く、このクローンはEcoRIにより0.7kbpと2.0kbpに切断される全長2.7kbpの挿入遺伝子断片を持つことが判明した。

(C) ラットC3cDNAの塩基配列の決定

λ r C 3 / 11のファージDNAを抽出した後、EcoRIで切断して0.7kbpと2.0kbpのDNA断片を得た。この断片をシーケンシング用クローニングベクターpUC19 およびシーケンシング用ファージM13MP19RF DNA（宝酒造）のEcoRI部位に挿入した。0.7kbp断片はさらにBamHI消化により得られた0.1kbp断片と0.6kbp断片をシーケンシング用ベクターpUC118のEcoRI、BamHI二重消化物に挿入し、両末端から塩基配列を決定した。

配列解析は7-DEAZA法（Mizusawa, et. al, Nucleic Acid Res. 14, 1319, 1986）に従った。2kbp断片については確定した周辺部に対応したプライマーを順次合成して塩基配列解析を進めるHoodらの手法（Hood, et. al, Anal. Biochem. 154, 353, 1986）を用いた。

第18図にλ r C 3 / 11の塩基配列決定のストラテ

ジーを示す。最上段の数字は中断において枠で仕切られたラットC3 dg部分を基準として示した塩基の番号であり、EcoRI等是用いられた制限酵素名であり、括弧内の数字は切断部位又は塩基配列決定の開始位置
5 (塩基番号)である。水平な矢印はそれぞれの制限酵素およびプライマーによる塩基配列決定の方向と範囲を示している。

実施例5

ラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白遺伝子
10 子の塩基配列および該蛋白のアミノ酸配列の決定

(1) N末端およびC末端の決定

実施例4で判明したラットC3 cDNAクローンの塩基配列(C)から推定されるラットC3のアミノ酸配列のうち、ヒトC3のファクターIによる切断部位近傍のアミノ酸配列に相当する部分を第19図に示す。
15

ヒトC3は α 鎖の²⁸³Arg - ²⁸⁴Gluの間でファクターIにより切断されるが、ラットC3ではこれに対応する部位はGln-Glyに変異しており、5残基C末端側にArg-Gluが存在する。そして、この部位で切断されて生成するフラグメントのN末端アミノ酸配列はラット血清より精製した本発明の阻害蛋白のN末端アミノ酸配列と完全に一致している。
20

従って、ラットC3はこの部位でヒトのファクターIと同様の活性を持つ酵素により切断されると考えら

れる。

一方、ヒトC3 α 鎖の⁶³²Arg - ⁶³³Serと
⁶⁴⁹Arg - ⁶⁵⁰SerはラットC3でも保存されていた。
また、この部位で切断されて生成するフラグメントの
C末端アミノ酸配列はラット血清より精製した本発明
5 の阻害蛋白のC末端アミノ酸配列と完全に一致してい
る。ヒトと同様にこれらの位置でファクターIにより
切断され、本発明の阻害蛋白のC末端はヒトC3dgの
C末端と一致しているものと考えられる。

- 10 (2) ラット炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白
(C3dg) 遺伝子の全塩基配列と推定される全アミノ
酸配列

以上の結果から本発明の炎症局所由来ホスホリパー
ゼA₂阻害蛋白の全アミノ酸配列と遺伝子の全塩基配
15 列は第1図および第2図のものと判断された。本発明
の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白は1032個
の塩基でコードされ、344個のアミノ酸からなる蛋白
であった。

実施例6

20 ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白遺伝子
の全塩基配列及び本阻害蛋白の全アミノ酸配列の決定

(A) 阻害蛋白-ヒトの同定

(1) 阻害蛋白-ヒトのN末端アミノ酸配列の決定

実施例2(A)で単離・精製した分子量約39kDaの

阻害蛋白（逆相HPLCフラクションNr.30）について、前述した方法でN末端アミノ酸配列を決定した。その結果、下記のような配列であることが判明した。

5

NH₂ -Glu-Gly-Val-Asn-Lys-Glu-Asp-Ile-Pro-Pro-

これは既に知られているヒトC3dgのN末端アミノ酸配列と完全に一致した。

10 (2) 阻害蛋白-ヒトの免疫化学的解析

実施例2(A)で単離・精製した分子量約39kDaの阻害蛋白（逆相HPLCフラクションNr.30）について、前述した方法でSDS-PAGE後、ウェスタン・ブロッティングを行ってフィルターに移し、抗ヒトC3d血清を用いて酵素抗体染色法により検出した。その結果、本阻害蛋白は抗ヒトC3d血清と特異的に反応した。第20図aにSDS-PAGEの結果を示す。第20図bにウェスタン・ブロッティングの結果を示す。

20 以上、(1)、(2)の結果から、本阻害蛋白がヒトC3dgであることは明らかである。

(B) ヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白(C3dg)遺伝子の全塩基配列と本阻害蛋白の全アミノ酸配列

ヒトC3については既に cDNA クローニングが行われており、その全塩基配列及びそれから推定される全アミノ酸配列が決定されている。また、C3 遺伝子のなかでC3dgをコードする部分も決定されている

5 (de Bruijn et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 708-712, 1985)。

前述の結果から本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白-ヒトはヒトC3dgであることが明らかである。したがって、本阻害蛋白遺伝子の塩基配列はヒトC3 遺伝子の全塩基配列のうちC3dgをコードする部分と完全に一致すると考えられる。また、本阻害蛋白の全アミノ酸配列はヒトC3 遺伝子の全塩基配列から推定されるヒトC3の全アミノ酸配列のうちC3dgに相当する部分と完全に一致すると考えられる。

10 以上のことから、本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白の全アミノ酸配列とヒト炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白遺伝子の全塩基配列は第3図及び第4図のものと判断された。本発明の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂ 阻害蛋白は1047個の塩基でコードされ、349 個のアミノ酸からなる蛋白であった。

15

20

請求の範囲

1. 第1図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白。
5
2. 第1図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列の一部を有する請求の範囲第1項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白。
3. ラット血清由来の請求の範囲第1項又は第2項記載
10 の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白。
4. 哺乳動物の血清を酵素処理することを特徴とする請求の範囲第1項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の製造方法。
5. 哺乳動物がラットである請求の範囲第4項記載の炎症
15 局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の製造方法。
6. 請求の範囲第1項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の遺伝子。
7. 第2図に示すDNA塩基配列を含む請求の範囲第6
20 項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の遺伝子。
8. ラット由来の請求の範囲第6項又は第7項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼA₂阻害蛋白の遺伝子。
9. 第3図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列を有する炎症局所由来ホスホリパー

ゼ A₂ 阻害蛋白。

10. 第 3 図に示すアミノ酸配列又はこれと生理学的に同等のアミノ酸配列の一部を有する請求の範囲第 9 項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白。
- 5 11. ヒト血清を酵素処理することを特徴とする請求の範囲第 9 項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白の製造方法。
12. 請求の範囲第 9 項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白の遺伝子。
- 10 13. 第 4 図に示す DNA 塩基配列を含む請求の範囲第 1 2 項記載の炎症局所由来ホスホリパーゼ A₂ 阻害蛋白の遺伝子。

第1図-1

Glu Asp Val Pro Ala Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val 12
 Pro Asp Thr Asp Ser Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln
 Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Ala Glu Asp Ala Val
 Asp Gly Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro
 Ser Gly Cys Gly Glu Glu Asn Met Ile Gly Met Thr 60
 Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp Gln Thr
 Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu Lys Arg Gln
 Glu Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln
 Gln Leu Ala Phe Lys Gln Pro Ser Ser Ala Tyr Ala 108
 Ala Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr
 Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Ala Asn
 Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala
 Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Lys Pro Asp 156
 Gly Val Phe Gln Glu Asp Gly Pro Val Ile His Gln

第1図-2

Glu Met Ile Gly Gly Phe Arg Asn Thr Lys Glu Ala 180
 Asp Val Ser Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu
 Gln Glu Ala Arg Asp Ile Cys Glu Gly Gln Val Asn
 Ser Leu Pro Gly Ser Ile Asn Lys Ala Gly Glu Tyr
 Leu Glu Ala Ser Tyr Leu Asn Leu Gln Arg Pro Tyr 228
 Thr Val Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met
 Asn Lys Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Thr Lys Phe Leu
 Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn Arg Trp Glu Glu Pro
 Gly Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr 276
 Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp
 Ser Val Pro Pro Val Val Arg Trp Leu Asn Glu Gln
 Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala
 Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln 324
 Thr Asp Val Pro Asp His Lys Asp Leu Asn Met Asp

第1図-3

Val Ser Leu His Leu Pro Ser Arg 344

第2図-1

GAG GAT GTA CCT GCA GCA GAC CTC AGT GAC CAA GTG 36
CCA GAC ACA GAT TCT GAG ACC AGA ATT CTC CTG CAA
GGG ACC CCG GTG GCT CAG ATG GCC GAC GAG GCT GTG
GAC GGG GAG CGG CTG AAA CAC CTG ATC GTG ACC CCC
TCT GGC TGT GGG GAG CAG AAC ATG ATT GGC ATG ACA 180
CCC ACG GTC ATT GCA GTA CAC TAT CTG GAT CAG ACC
GAA CAG TGG GAG AAA TTC GGC CTA GAG AAG AGG CAA
GAA GCT CTG GAG CTC ATC AAG AAA GGG TAC ACC CAG
CAG CTG GCT TTC AAA CAG CCC AGC TCT GCC TAT GCT
GCC TTC AAC AAC CGG CCT CCC AGC ACC TGG CTG ACA 360
GCC TAT GTG GTC AAG GTC TTC TCT CTG GCT GCC AAC
CTC ATC GCC ATC GAC TCT CAG GTC CTG TGT GGG GCT
GTC AAA TGG CTG ATT CTG GAG AAA CAG AAG CCA GAT
GGT GTC TTT CAG GAG GAC GGA CCA GTG ATT CAC CAA 504

第2図-2

GAA ATG ATT GGT GGC TTC CGG AAC ACC AAG GAG GCA 540
GAT GTG TCG CTT ACA GCC TTT GTC CTC ATC GCA CTG
CAG GAA GCC AGA GAT ATC TGT GAG GGG CAG GTC AAC
AGC CTT CCC GGG AGC ATC AAC AAG GCA GGG GAG TAT
CTT GAA GCC AGT TAC CTG AAC CTG CAG AGA CCA TAC
ACA GTA GCC ATT GCT GGG TAT GCC CTG GCC CTG ATG 720
AAC AAA CTG GAG GAA CCT TAC CTC ACC AAG TTT CTG
AAC ACA GCC AAA GAT CGG AAC CGC TGG GAG GAG CCT
GGC CAG CAG CTC TAC AAT GTG GAG GCC ACC TCC TAC
GCC CTC CTG GCC CTG CTG CTG CTG AAA GAC TTT GAC
TCT GTG CCT CCT GTG GTG CGC TGG CTC AAC GAG CAA 900
AGA TAC TAC GGA GGT GGC TAT GGC TCC ACG CAG GCT
ACC TTC ATG GTA TTC CAA GCC TTG GCT CAA TAC CAA
ACA GAT GTC CCT GAC CAC AAG GAC TTG AAC ATG GAT 1008

第2図-3

GTG TCC CTG CAC CTC CCC AGC CGC 1032

第3図-1

Glu Gly Val Gln Lys Glu Asp Ile Pro Pro Ala Asp 12
 Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser Glu Thr
 Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met
 Thr Glu Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His
 Leu Ile Val Thr Pro Ser Gly Cys Gly Glu Gln Asn 60
 Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His
 Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly
 Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys
 Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg Gln Pro 180
 Ser Ser Ala Phe Ala Ala Phe Val Lys Arg Ala Pro
 Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe
 Ser Leu Ala Val Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln

第3図-2

Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu 156
Lys Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Ala
Pro Val Ile His Gln Glu Met Ile Gly Gly Leu Arg
Asn Asn Asn Glu Lys Asp Met Ala Leu Thr Ala Phe
Val Leu Ile Ser Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Cys 204
Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Thr
Lys Ala Gly Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn
Leu Gln Arg Ser Tyr Thr Val Ala Ile Ala Gly Tyr
Ala Leu Ala Gln Met Gly Arg Leu Lys Gly Pro Leu 252
Leu Asn Lys Phe Leu Thr Thr Ala Lys Asp Lys Asn
Arg Trp Glu Asp Pro Gly Lys Gln Leu Tyr Asn Val
Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu Leu Gln

第3図-3

Leu Lys Asp Phe Asp Phe Val Pro Pro Val Val Arg 300

Trp Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr

Gly Ser Thr Gln Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala

Leu Ala Gln Tyr Gln Lys Asp Ala Pro Asp His Gln

Glu Leu Asn Leu Asp Val Ser Leu Gln Leu Pro Ser 348

Arg 349

10/31

第4図-1

GAA GGA GTG CAG AAA GAG GAC ATC CCA CCT GCA GAC 36
CTC AGT GAC CAA GTC CCG GAC ACC GAG TCT GAG ACC
AGA ATT CTC CTG CAA GGG ACC CCA GTG GCC CAG ATG
ACA GAG GAT GCC GTC GAC GCG GAA CGG CTG AAG CAC
CTC ATT GTG ACC CCC TCG GGC TGC GGG GAA CAG AAC 180
ATG ATC GGC ATG ACG CCC ACG GTC ATC GCT GTG CAT
TAC CTG GAT GAA ACG GAG CAG TGG GAG AAG TTC GGC
CTA GAG AAG CGG CAG GGG GCC TTG GAG CTC ATC AAG
AAG GGG TAC ACC CAG CAG CTG GCC TTC AGA CAA CCC
AGC TCT GCC TTT GCG GCC TTC GTG AAA CGG GCA CCC 360
AGC ACC TGG CTG ACC GCC TAC GTG GTC AAG GTC TTC
TCT CTG GCT GTC AAC CTC ATC GCC ATC GAC TCC CAA
GTC CTC TGC GGG GCT GTT AAA TGG CTG ATC CTG GAG 468

第4図-2

AAG CAG AAG CCC GAC GGG GTC TTC CAG GAG GAT GCG 504
CCC GTG ATA CAC CAA GAA ATG ATT GGT GGA TTA CGG
AAC AAC AAC GAG AAA GAC ATG GCC CTC ACG GCC TTT
GTT CTC ATC TCG CTG CAG GAG GCT AAA GAT ATT TGC
GAG GAG CAG GTC AAC AGC CTG CCA GGC AGC ATC ACT
AAA GCA GGA GAC TTC CTT GAA GCC AAC TAC ATG AAC
CTA CAG AGA TCC TAC ACT GTG GCC ATT GCT GGC TAT 720
GCT CTG GCC CAG ATG GGC AGG CTG AAG GGG CCT CTT
CTT AAC AAA TTT CTG ACC ACA GCC AAA GAT AAG AAC
CGC TGG GAG GAC CCT GGT AAG CAG CTC TAC AAC GTG
GAG GCC ACA TCC TAT GCC CTC TTG GCC CTA CTG CAG
CTA AAA GAC TTT GAC TTT GTG CCT CCC GTC GTG CGT 900
TGG CTC AAT GAA CAG AGA TAC TAC GGT GGT GGC TAT 936

12/31

第4図-3

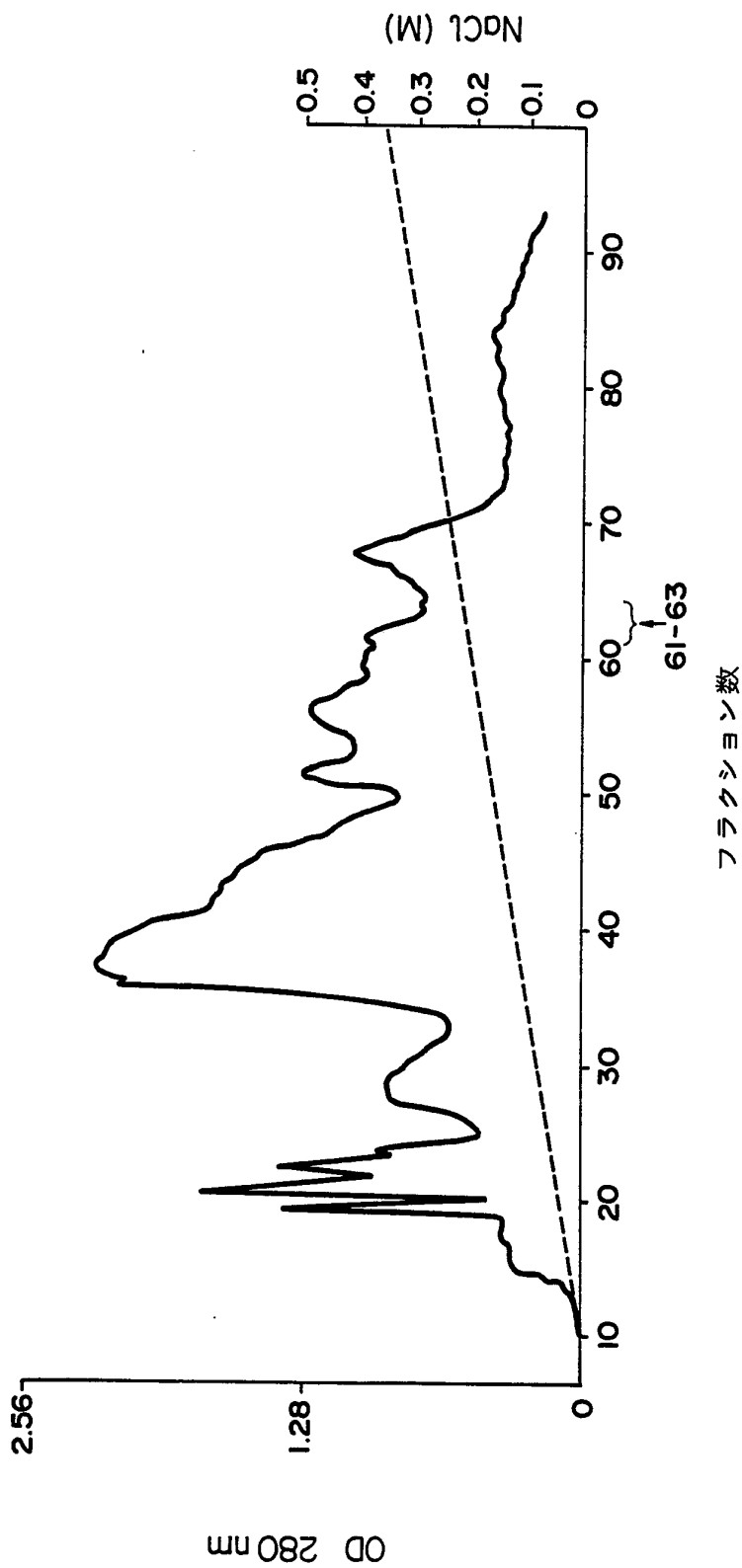
GGC TCT ACC CAG GCC ACC TTC ATG GTG TTC CAA GCC 972

TTG GCT CAA TAC CAA AAG GAC GCC CCT GAC CAC CAG

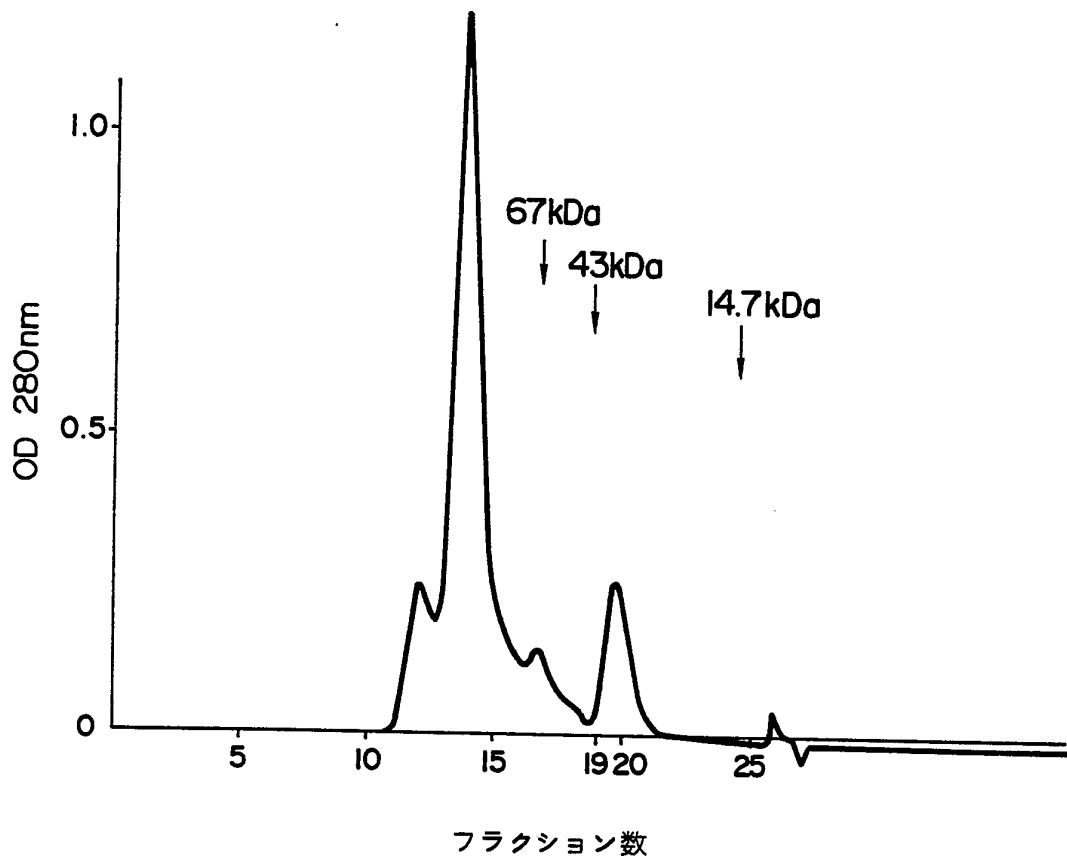
GAA CTG AAC CTT GAT GTG TCC CTC CAA CTG CCC AGC 104

CGC 1047

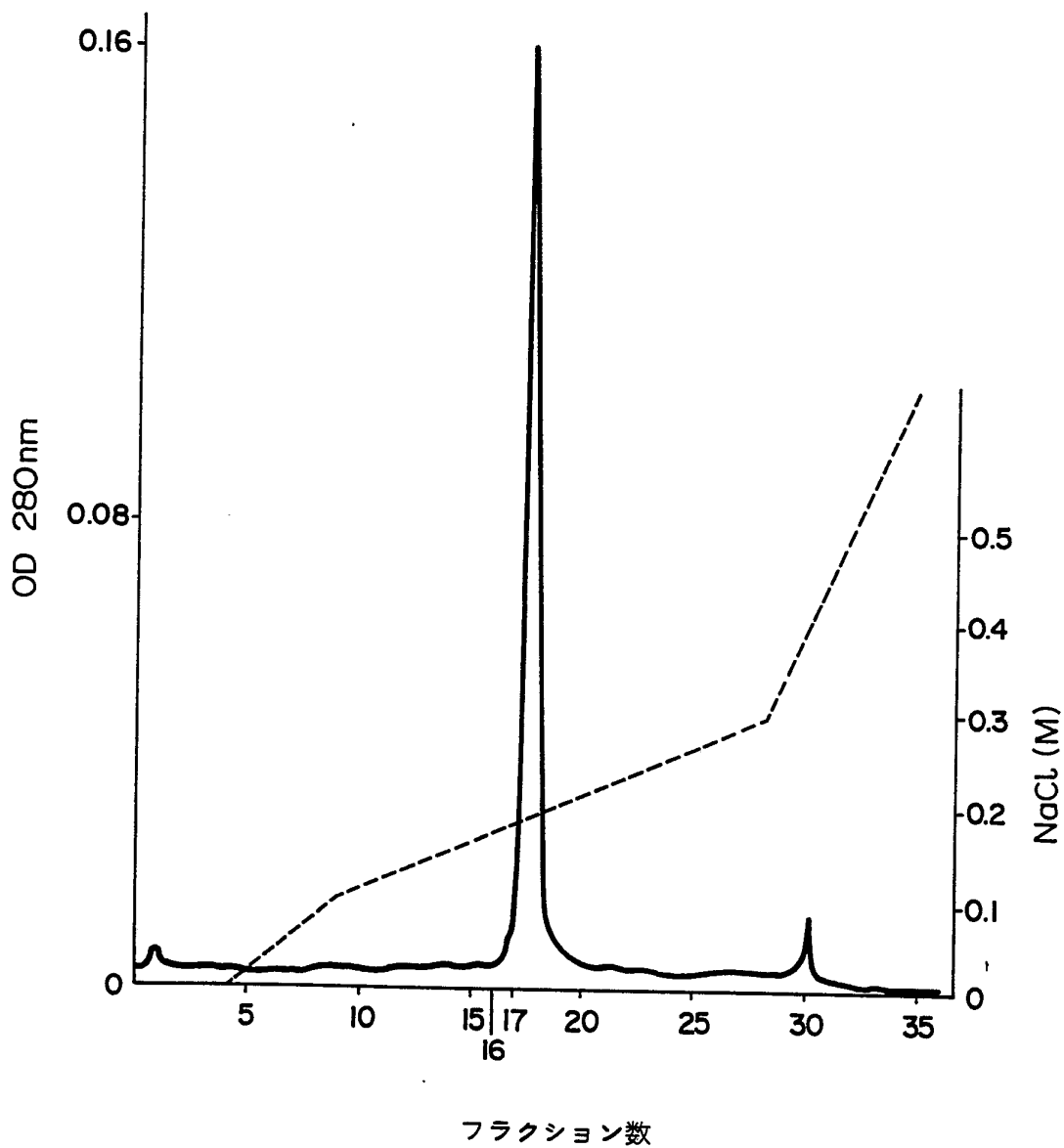
第 5 図



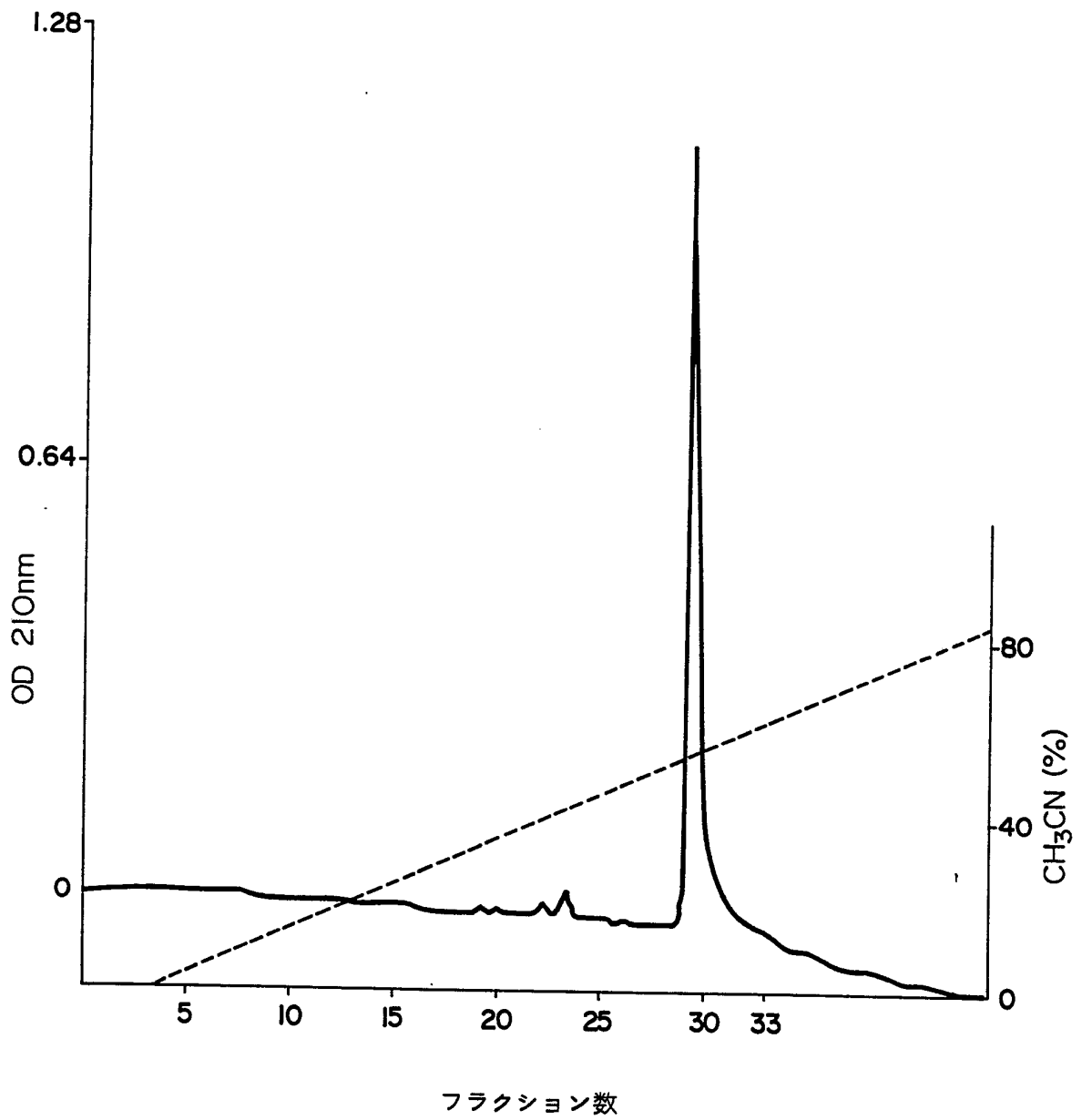
第 6 図



第 7 図



第 8 図

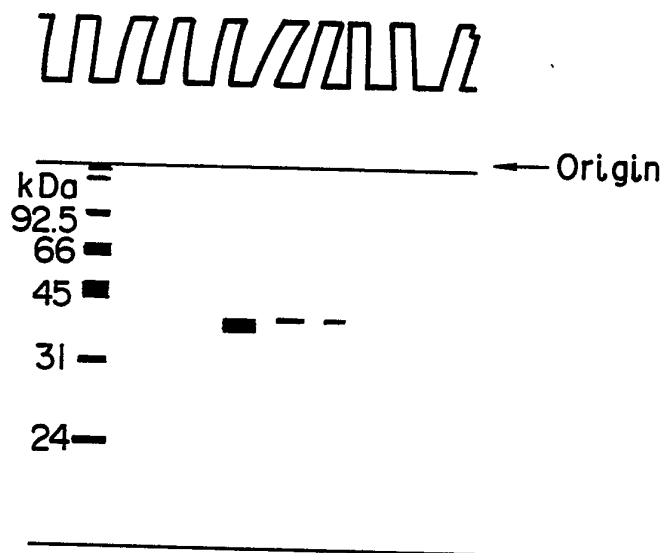


17/31

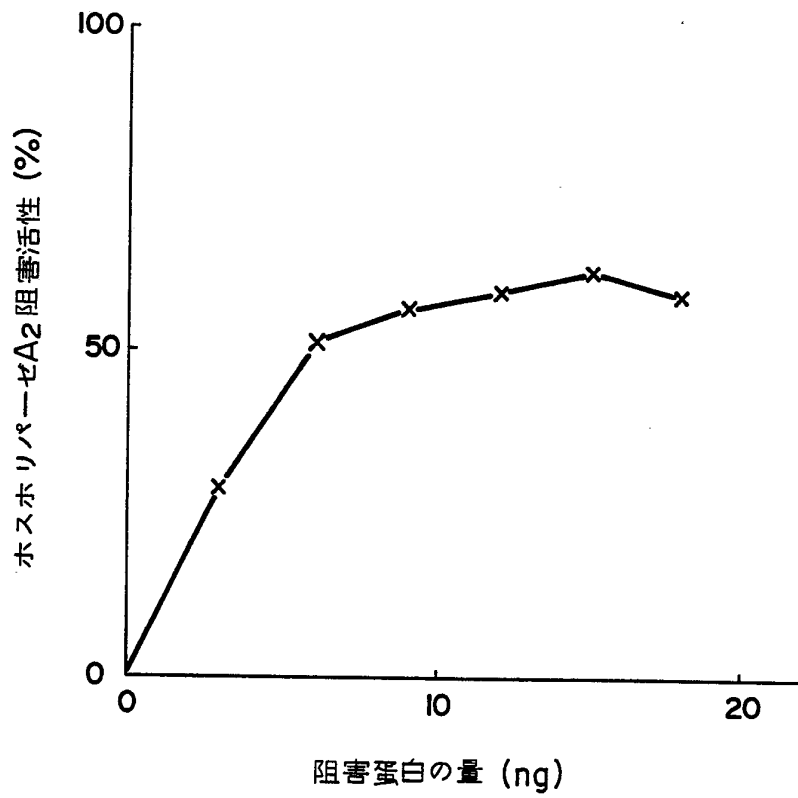
第 9 図

フラクシオンNr

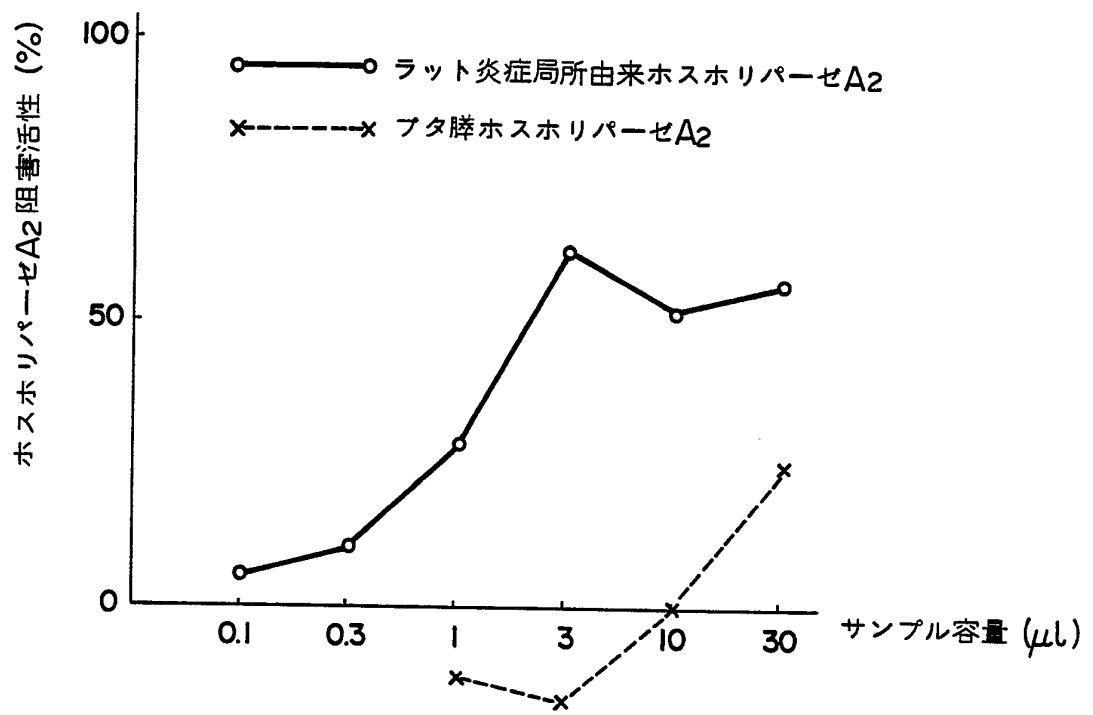
29 30 31 32 33



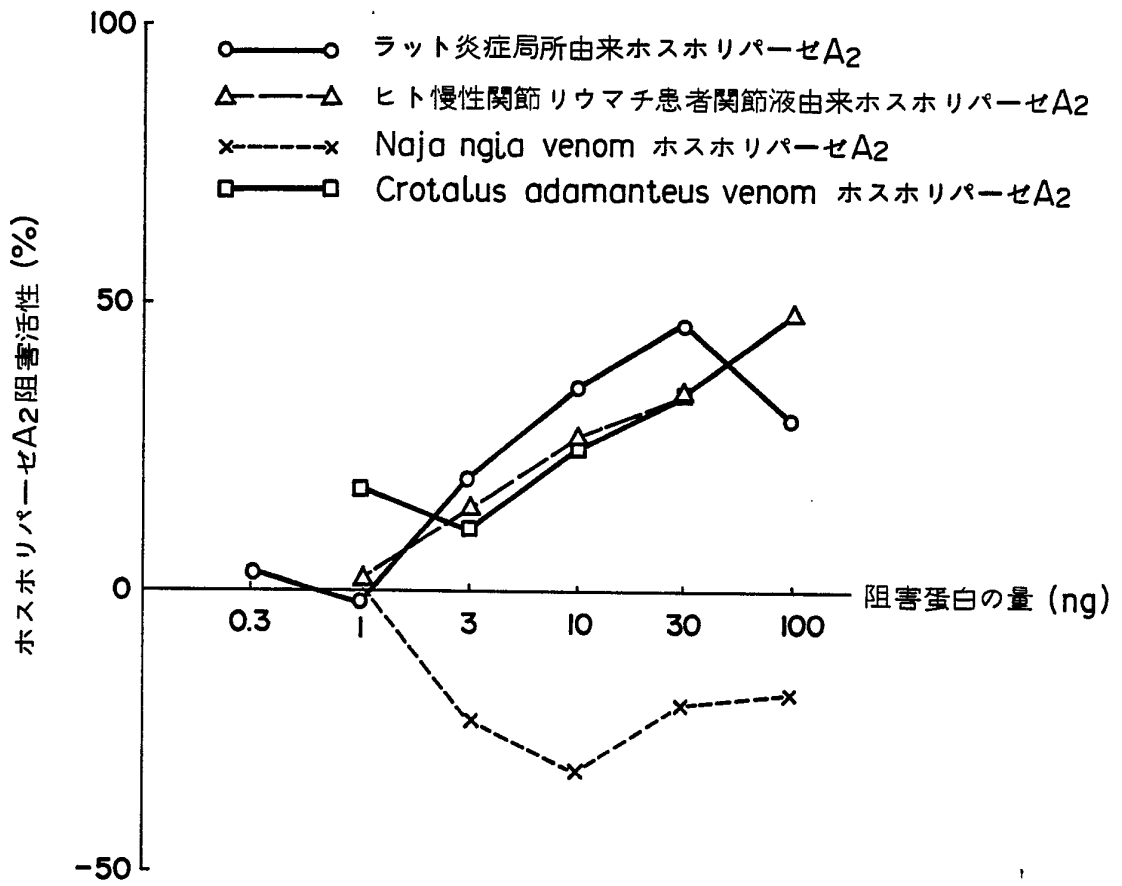
第 10 図



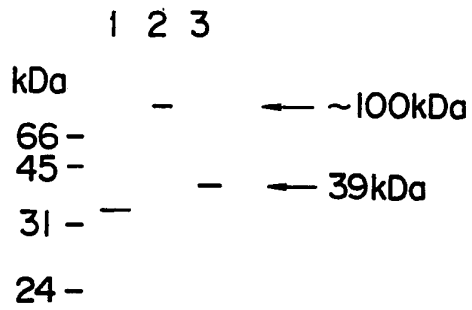
第 II 図 a



第 II 図 b



第 12 図



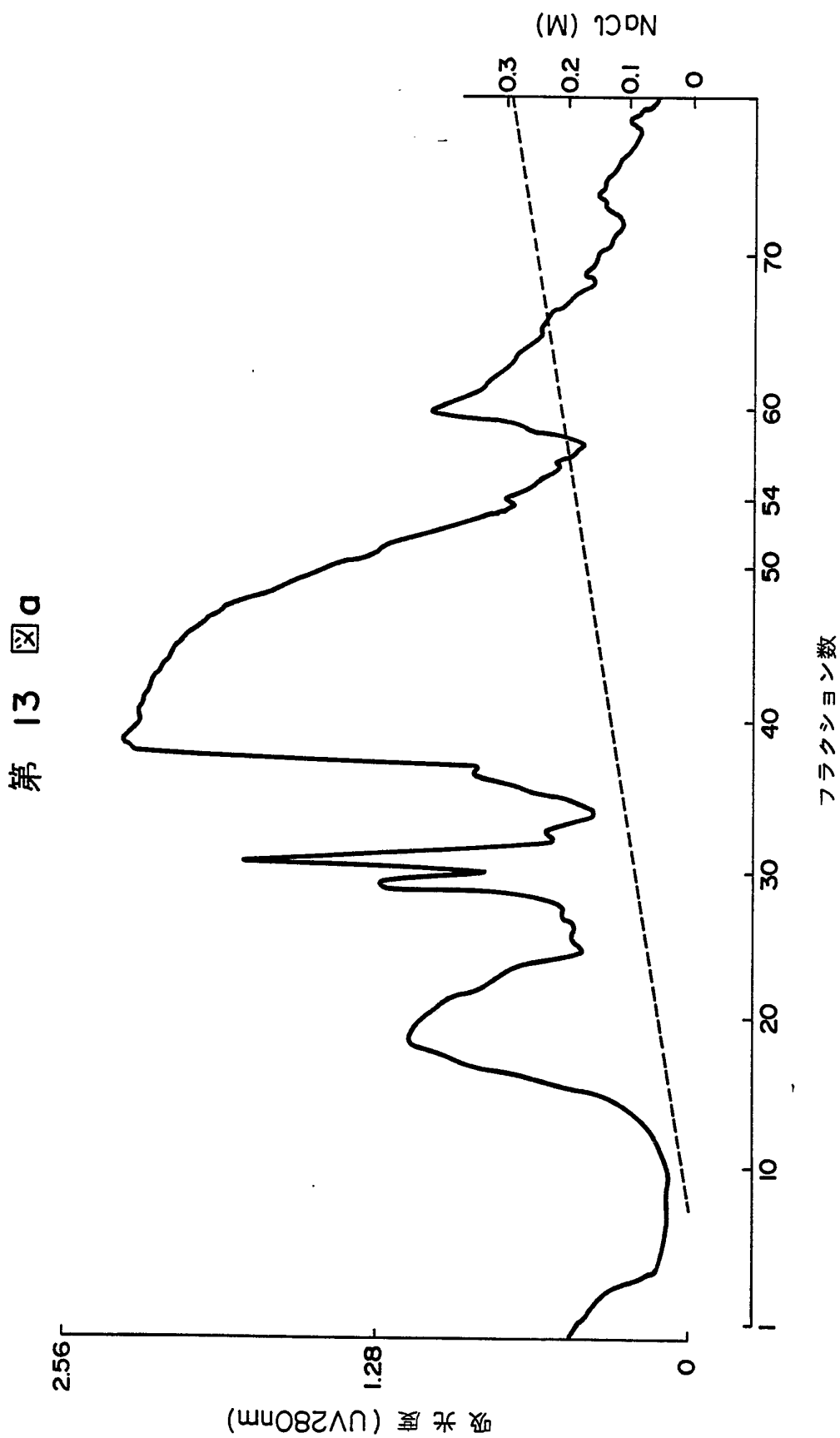
Lane 1 ヒトC3a (33kDa)

2 ヒト未処理血清

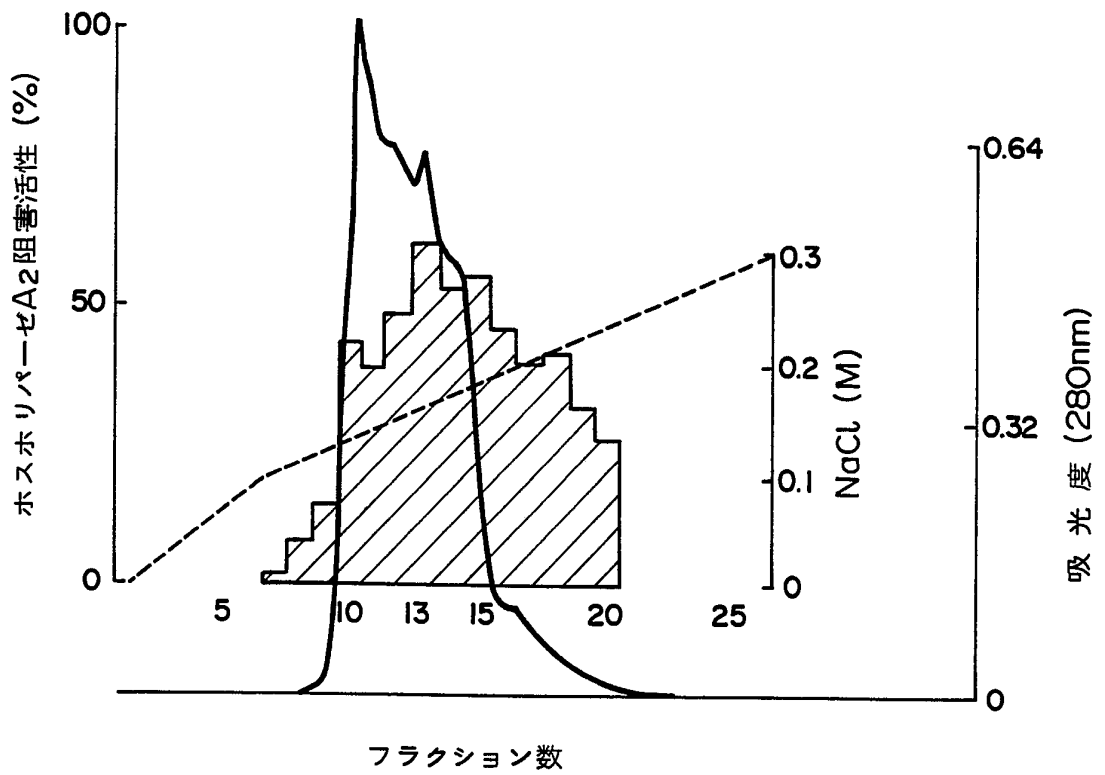
3 ヒト 37°C 処理血清

(主に ~100kDa)

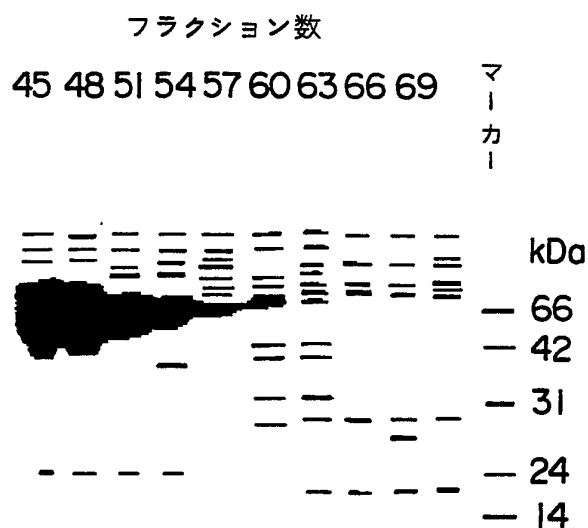
(主に 39kDa)



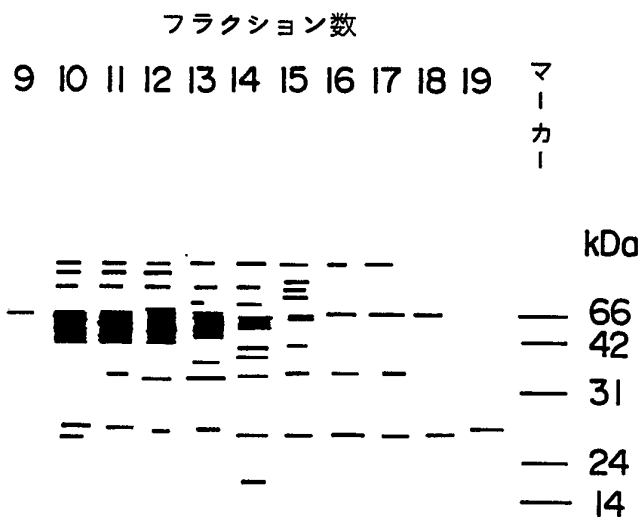
第 14 図 a



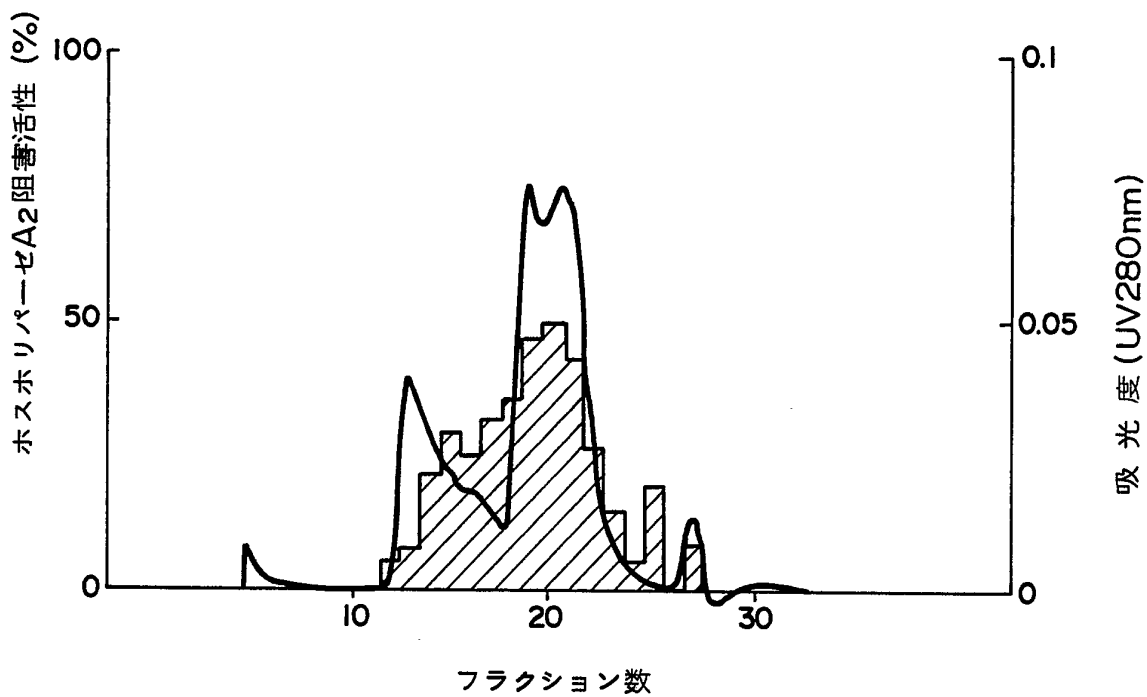
第 13 図 b



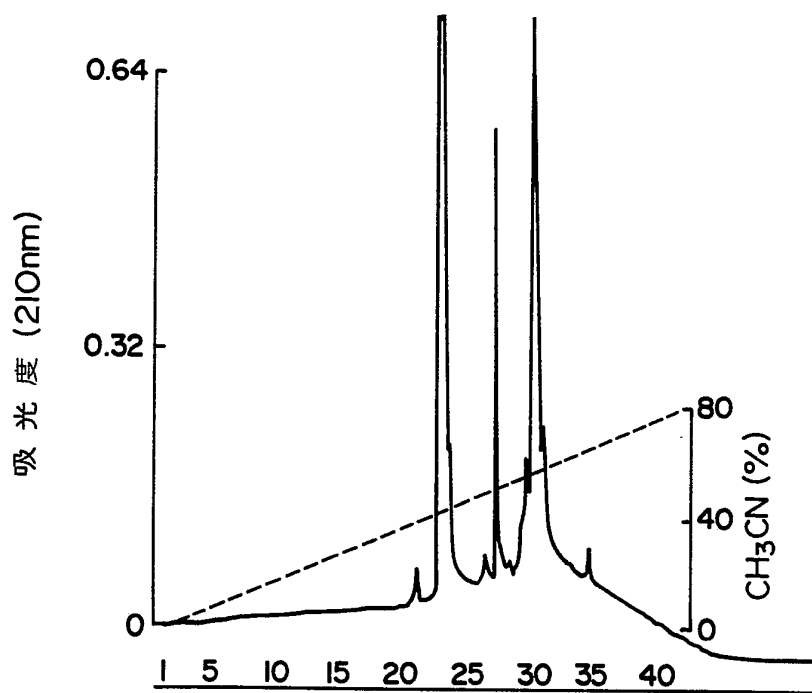
第 14 図 b



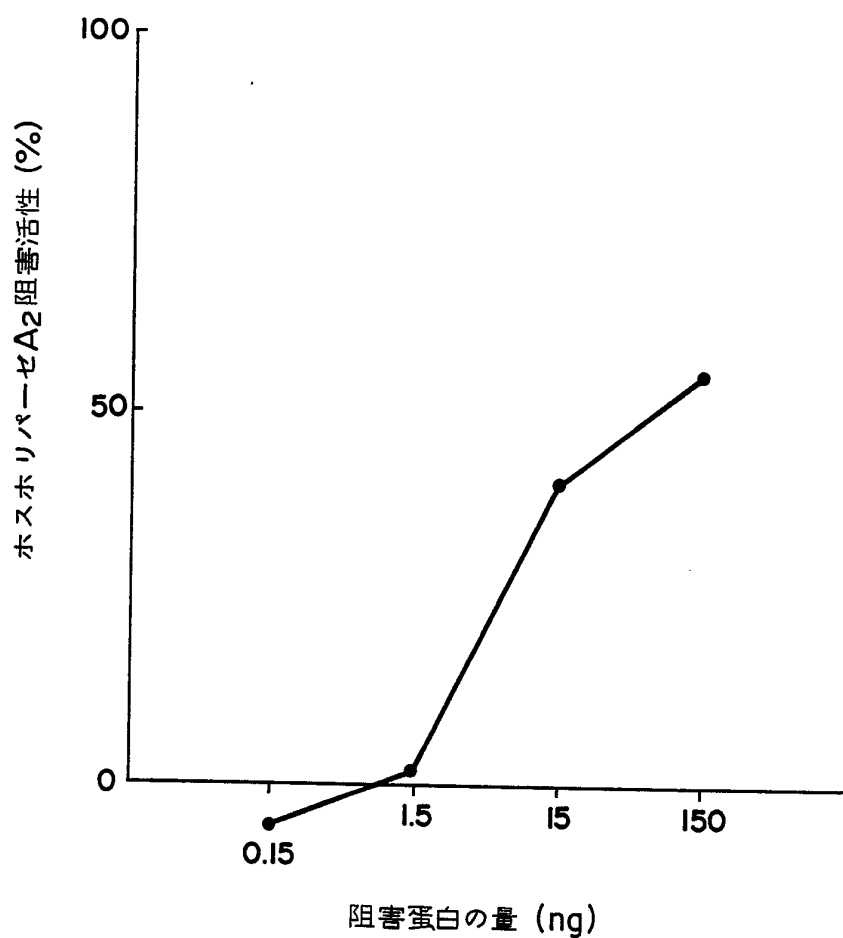
第 15 図 a



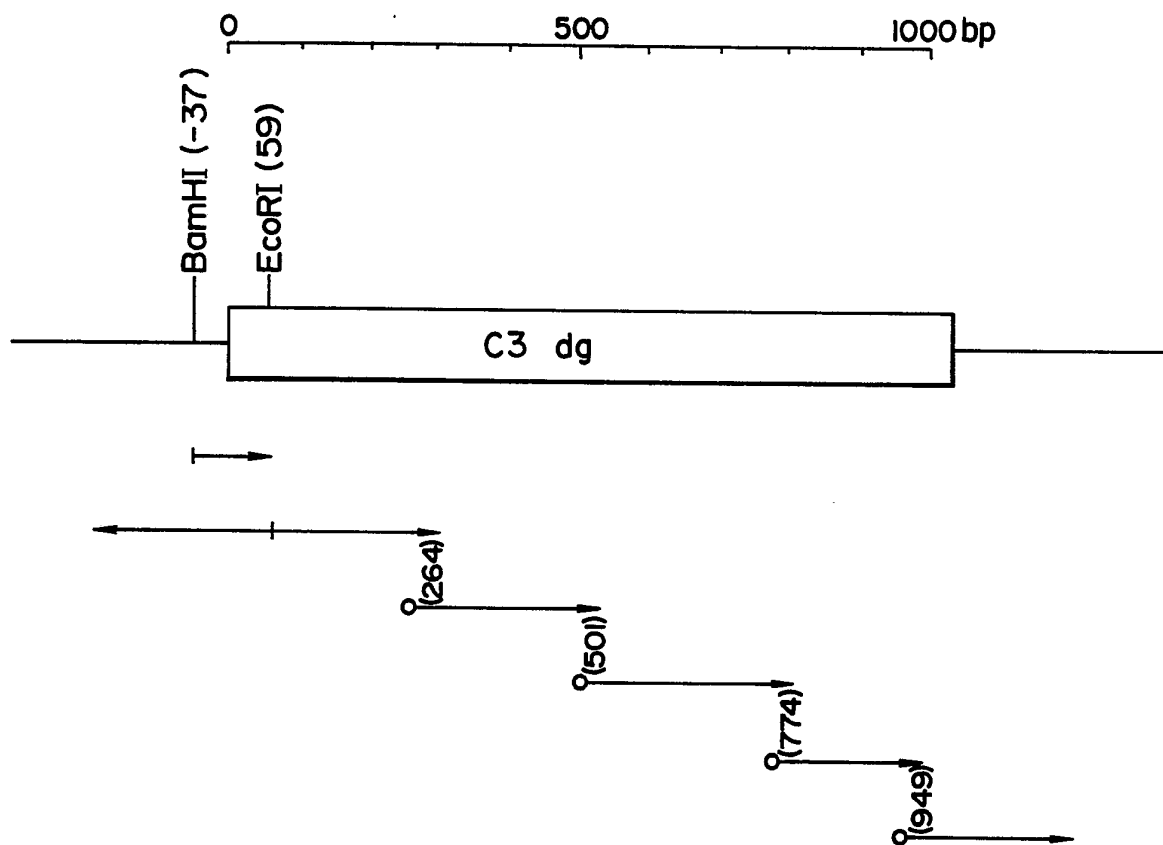
第 16 図 a



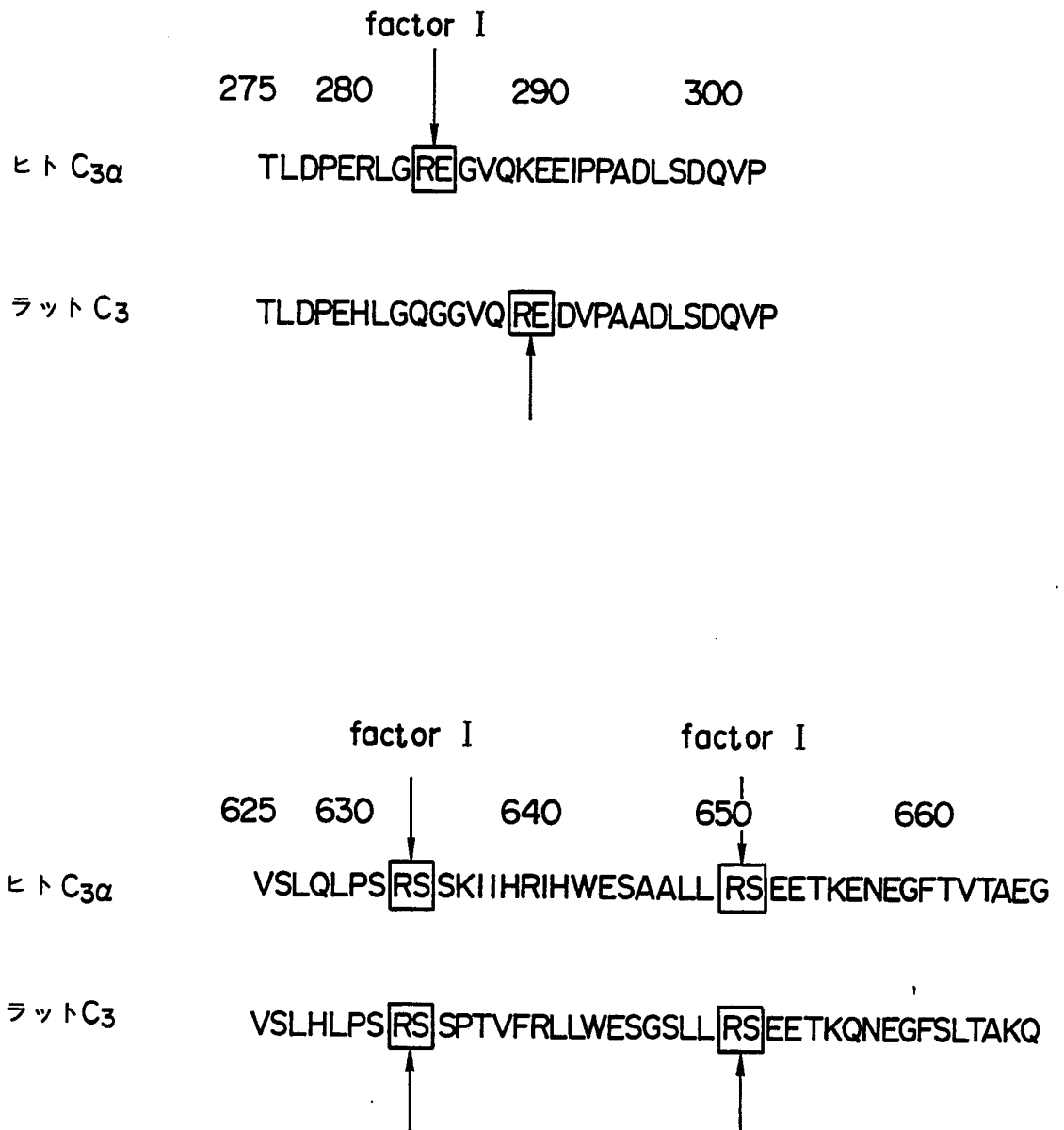
第 17 図



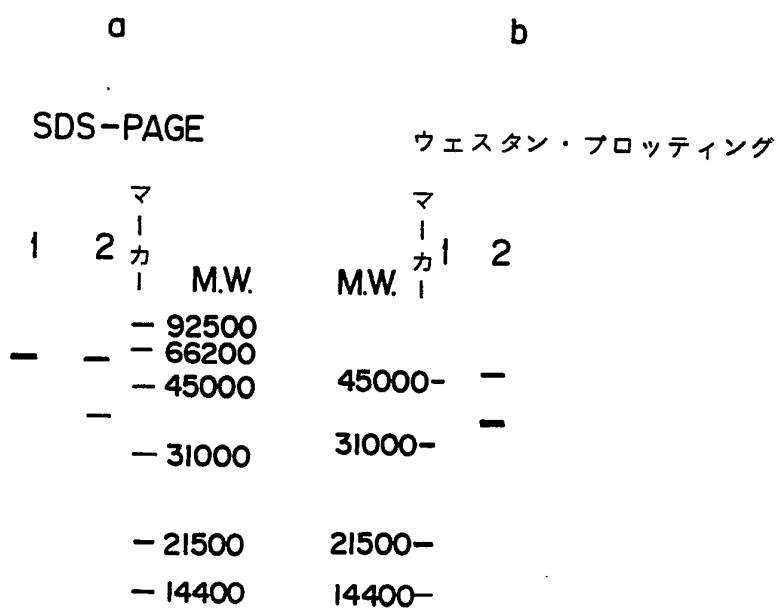
第 18 図



第 19 図



第 20 図



Lane 1 逆相カラムフラクション数 23

2 逆相カラムフラクション数 30(C3dg)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/00996

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl ⁵ C07K13/00, C12P21/02, C12N15/12// C12N9/99, A61K37/02				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁷				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	C07K13/00, 15/06, C12P21/00-21/02, C12N15/12, C12N9/99, A61K37/02			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸				
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹				
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³		
X	JP, A, 63-246397 (Teijin Ltd.), 13 October 1988 (13. 10. 88) & WO, A1, 88/7452	1 - 8		
X	JP, A, 63-500561 (Biotechnology Research Partneres Ltd.), 3 March 1988 (03. 03. 88) & WO, A1, 86/6100 & EP, A1, 218696	9 - 13		
P	Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, Vol.87, No.7, (April 1990), Yorimasa Suwa, et al. "Proteinaceous inhibitors of phospholipase A ₂ purified from inflammatory sites in rats" p.2395-2399	1 - 8		
P	JP, A, 2-91100 (Teijin Ltd.), 30 March 1990 (30. 03. 90), (Family: none)	9 - 13		
<p>¹⁰ * Special categories of cited documents:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
October 25, 1990 (25. 10. 90)	November 13, 1990 (13. 11. 90)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
Japanese Patent Office				

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 90/00996

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K13/00, C12P21/02, C12N15/12// C12N9/99, A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K13/00, 15/06, C12P21/00-21/02, C12N15/12, C12N9/99, A61K37/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
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	請求の範囲の番号
X	JP, A, 63-246397 (帝人株式会社), 13. 10月. 1988 (13. 10. 88) &WO, A1, 88/7452	1-8
X	JP, A, 63-500561 (バイオテクノロジー リサ ーチ パートナーズ, リミテッド), 3. 3月. 1988 (03. 03. 88) &WO, A1, 86/6100 & EP, A1, 218696	9-13
P	Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 第87巻, 第7号, (4月. 1990), Yorimasa Suwa, et al "Proteinaceous inhibitors of phospholipase A ₂ purified from inflammatory sites in rats" p. 2395-2399	1-8
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の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の文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
25. 10. 90	13. 11. 90	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生

第2ページから続く情報

P	<p>(III欄の続き)</p> <p>JP, A, 2-91100 (帝人株式会社), 30. 3月. 1990 (30. 03. 90), (ファミリーなし)</p>	9-13
---	---	------

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたため、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。