(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3663228号
(P3663228)
(45)発行日　平成17年6月22日(2005.6.22)　(24)登録日　平成17年4月1日(2005.4.1)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C07K 16/18	C07K 16/18	
// C07K 14/47	C12N 15/00	ZNAA
C12N 15/09	C07K 14/47	

請求項の数 2　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願平7-83154
(22)出願日　平成7年3月14日(1995.3.14)
(65)公開番号　特開平8-245700
(43)公開日　平成8年9月24日(1996.9.24)
審査請求日　平成14年1月18日(2002.1.18)

(73)特許権者　390004097
株式会社医学生物学研究所
愛知県名古屋市中区丸の内３丁目５番１０号　住友商事丸の内ビル５Ｆ
(74)代理人　100082500
弁理士　足立　勉
(72)発明者　塩坂　貞夫
奈良県生駒市真弓南１－６－３３

審査官　高堀　栄二

(56)参考文献　EMBO J.,Vol.4,No.1(1985)p.133-138

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ニューロプシンに対する抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列表の配列番号１のアミノ酸配列で示される新規なニューロプシンに対する新規な抗体。
【請求項２】
配列表の配列番号２に示す新規なアミノ酸配列を含む蛋白質に対する新規な抗体であって、
配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列を抗原として用いる抗体。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、セリンプロテアーゼ活性を有する新規な蛋白質であるニューロプシンを抗原として得られる抗体に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】
学習や記憶といった脳の機能の解明は従来より多くの研究者の関心を引きつけてきたが、脳内の組織の一つである海馬が学習・記憶に重要な役割を果たしていることが、記憶障害を起こした患者の臨床神経心理学的な検討及び破壊実験・電気生理学的実験に代表される実験動物を用いた研究から明らかになってきた。
【０００３】

一方、海馬は長期増強や、長期減少、発作、興奮といった脳の可塑性に関係する多くの事象と関連していることも知られている。
外的要因の一時的な変化が起こると中枢神経系は感覚系を介して活動状態を変えるが、外的要因の変化が除かれた後にも神経系の変化が持続するような場合、このような脳の性質を「脳の可塑性」と呼ぶ。つまり、学習・記憶をする際、一時的な経験により脳の機能状態が長期間にわたり持続的に変化しうるのは「脳の可塑性」によると考えられている。
【０００４】
発作や長期増強が引き起こされた脳から得られた海馬ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、脳の可塑性に関係すると思われる多くの遺伝子が見いだされており、それらの遺伝子の中にはいくつかの転写因子の遺伝子が含まれていた（ネイチャー（Nature）第３６３巻第７１８～７２２頁（１９９３年）におけるNedivi らの報告、ネイチャー（Nature）第３６１巻第４５３～４５７頁（１９９３年）におけるQianらの報告、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス（J. Neurosci）第１３巻第４７７６～４７８８頁（１９９３年）におけるWorley らの報告、参照）。また、脳の刺激によってｍＲＮＡレベルが変化することが、プロテインキナーゼ、ＧＡＢＡ　Ａレセプターβアイソフォーム、ｃ－ｆｏｓ、ｃ－ｊｕｎ（前出のWorleyらの報告参照）及び神経指向性の因子についても観察された（ニューロン（Neuron）第７巻第１６５～１７６頁（１９９１年）におけるErnfors らの報告、ニューロン（Neuron）第８巻第１１２７～１１３８頁（１９９２年）におけるDugich-Djorjevicらの報告、ニューロン（Neuron）第６巻第９３７～９４８頁（１９９１年）におけるIsacksonらの報告、ニューロン（Neuron）第９巻第５３９～５４８頁（１９９２年）におけるMackler らの報告、モレキュラー・ブレイン・リサーチ（Mol. Brain Res.）第１３巻第２７～３３頁（１９９２年）におけるRocamoraらの報告、参照）。これらのことから、明らかに多くの蛋白質が記憶や退行的な疾患（例えばアルツハイマー病）、発達、再生及び脳の機能不全（例えば癲癇）のような海馬の可塑的な出来事に関与していると見られている。
【０００５】
セリンプロテアーゼも中枢神経系において神経の活性化に依存して誘発されてくる蛋白質であり、発達や退縮のような脳の可塑的な事象に関係していると考えられている（トレンズ・イン・ニューロサイエンス（Trends Neurosci.）第１１巻第５４１～５４４頁（１９８８年）におけるMonardらの報告、前出のQianらの報告、参照）。
【０００６】
そこで、塩坂（本発明の発明者）は、海馬の機能発現のために特異的に発現している新たなセリンプロテアーゼを同定するため、セリンプロテアーゼのキーとなるアミノ酸配列を基にしたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて一連の逆転写ポリメラーゼチェイン反応法を行う中から、新たな蛋白質ニューロプシンをコードする遺伝子配列を見いだすことに成功した。尚、ニューロプシン及びその遺伝子配列等については、別途、特許出願中であり、未だ公知化されていない。
【０００７】
【発明が解決しようとする課題】
かかるニューロプシンを認識することは、脳の機能即ち記憶や学習機構等の解明の手がかりを与え、更に退行的な疾患（例えばアルツハイマー病）、脳の機能不全（例えば癲癇）あるいは免疫不全を解決する上で非常に有用であるため、かかるニューロプシンを認識できる物質の開発が望まれていた。
【０００８】
本発明は上記課題に鑑みなされたものであり、脳の可塑性に関与する新規なタンパク質であるニューロプシンの検出を可能とする抗体を提供することを目的とする。
【０００９】
【課題を解決するための手段及び作用】
本発明の第１は、配列表の配列番号１のアミノ酸配列で示される新規なニューロプシンに対する新規な抗体に関するものであり、本発明の第２は、配列表の配列番号２に示す新

規なアミノ酸配列を含む蛋白質に対する新規な抗体であって、配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列を抗原として用いる抗体に関するものである。

【００１０】

ここで、ニューロプシンとは、脳の海馬中に特異的に存在する新規な蛋白質であり、塩坂（本発明者の一人）によりそのアミノ酸配列及び遺伝子配列が決定されたものである。このニューロプシンは、配列表の配列番号１に示すようなアミノ酸配列を有する物質である。

【００１１】

このニューロプシンに対する抗体は、ニューロプシンそのものを免疫原として用いてもよいが、配列表の配列番号１に示すニューロプシン分子中の５～３０個、あるいはそれ以上の連続するアミノ酸残基からなる部分ペプチド（例えば、配列表の配列番号２）を抗原として用いてもよい。

【００１２】

このニューロプシンは、これをコードする遺伝子配列（配列表の配列番号３）が塩坂（本発明者の一人）により解明されたことから、遺伝子組み換えの技法によりバクテリアや昆虫細胞、哺乳動物細胞等の細胞内で発現させることによって得られるほか、通常のペプチド合成の手法によって合成することも可能である。

【００１３】

ニューロプシンに対する抗体を得るには、このペプチドをそのまま動物に免疫してもよいが、部分ペプチドを用いる場合には、通常このペプチドとウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）やスカシガイヘモシアニン（ＫＬＨ）等のキャリアー蛋白質とを化学的に架橋したものを動物に免疫した方が好ましい。動物としては、通常、抗体産生に利用されるウサギ、ヤギ、ヒツジ、ラット、モルモット等の他、マウスを用いてもよい。

【００１４】

得られた抗血清から、例えば、次のようにして本発明の抗体を調製する。即ち、抗血清を３３％飽和硫安で沈殿させ、イムノグロブリンＧ（ＩｇＧ）画分を得る。ＢＳＡ等のキャリアー蛋白質を用いた場合には、これらキャリアー蛋白質に対する抗体も含まれていると考えられるので、このような場合にはこのＩｇＧ画分を、キャリアー蛋白質を結合させたセファロースカラムに通してキャリアー蛋白質に対する抗体を吸着させ、通過画分を回収する。このようにして得た画分には抗キャリアー蛋白質抗体を含まない目的とする抗体を含む画分を回収できる。さらに、この画分を用いてニューロプシンを結合させたセファロースカラムに通し、アフィニティークロマトグラフィーを行えば、精製抗ニューロプシン部分ペプチド抗体、即ちニューロプシンに対する抗体を得ることができる。

【００１５】

ニューロプシンに対する抗体はまた、マウス、ラット等に免疫後、その脾臓細胞を取り出し、適当なミエローマ細胞と融合させることによって抗体を産製する融合細胞を作出し、モノクローナル抗体として得ることもできる。

さて、このようにして得られた抗体がニューロプシンを認識するかどうか確認するためには、例えば、以下に述べるような公知のイムノブロッティング法を用いればよい。即ち、ニューロプシン若しくはその部分ペプチドを含む試料を、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）にかけ、泳動後、ゲル内の蛋白質をニトロセルロース膜に転写させる。次にこの膜を、上述のようにして得られた抗体（一次抗体）とインキュベートした後、ペルオキシダーゼ結合二次抗体を用いて、一次抗体と特異的に反応する蛋白質バンドを発色させるのである。

【００１６】

一方、本発明に係る抗体を用いて免疫組織化学的染色を行えば、組織内におけるニューロプシンの局在を知ることができ、刺激によるニューロプシンの発現の変化を見ることによって学習・記憶に関するニューロプシンのより正確な役割を知ることができる。

【００１７】

本発明に係る記抗体を用いた組織切片の免疫組織化学的染色は、通常の方法に従えばよい

。例えば、組織標本をパラフィンに包埋した後、切片をスライドグラスに固定し、本発明に係る抗体（一次抗体）とインキュベートする。一次抗体と特異的に反応する抗原は、ビオチン結合二次抗体及びアビジン結合ペルオキシダーゼを用いて発色させることにより、容易に識別できる。

【００１８】

本発明に係る抗体は、マウスのニューロプシンのみでなく、ヒトのニューロプシンとも反応することから、放射免疫測定法（ＲＩＡ法）や、酵素免疫測定法（ＥＩＡ法）によるヒト体液中のニューロプシンの測定にも用いることができる。

【００１９】

【実施例】

以下、本発明の好適な実施例について説明する。

［実施例１］　ニューロプシンに対する抗体の作製

（１－１）抗原の作製

ニューロプシンのｃＤＮＡ配列は配列表の配列番号３の通り塩坂（本発明の発明者）により既に決定されており、また、そのアミノ酸配列も配列表の配列番号１の通り分かっていることから（但し、未だ公知化されていない）、常法によりｃＤＮＡを合成した。

【００２０】

まず、制限酵素ＮｏｔＩで切り出したニューロプシンｃＤＮＡを同じくＮｏｔＩで切断したプラスミドベクターｐＧＥＸ（ファルマシア社（製））と混ぜ合わせ、Ｔ４リガーゼを用いて組み込み、大腸菌にトランスフェクトした。

この大腸菌を５ｍｌのアンピシリン加ＬＢ培地で３７℃一晩振盪培養した。これをさらに１ｌのＬＢ培地に加えて３７℃４時間振盪培養し、５００Ｍのイソプロピル－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトシド（ＩＰＴＧ）を１ｍｌ加え３時間振盪培養した。

【００２１】

このようにして得た培養液を４℃で９０００ｒｐｍ１５分間遠心分離し、沈殿をリン酸緩衝塩化ナトリウム液（ＰＢＳ）で３回洗浄した。その後、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、２％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を加えた２０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）２０ｍｌを加え、－２０℃で一晩放置した。そして、この液に対し３分間の超音波処理を２回行って菌体を破壊し、４℃で１５０００ｒｐｍ１５分間遠心分離し、沈殿を得た。

【００２２】

得られた沈殿を少量のＰＢＳに溶解し、これをネイチャー（Nature）第２２７巻第６８０～６８５頁（１９７０年）における Laemmliらの方法に従ってＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を行い、分子量約５５ＫＤの蛋白画分を切り出し、電気泳動的にゲルより流出した。ここで得られた蛋白は、グルタチオン－Ｓ－トランスフェレース（ＧＳＴ）とニューロプシンの融合蛋白質であった。

【００２３】

これをＰＢＳで透析し免疫原（抗原）とした。この免疫原は１００μｌずつ分注して凍結し、保存した。

（１－２）ニューロプシンに対する抗体の調製

上記（１－１）で得た免疫原（ニューロプシンを含む溶液）と、等量のフロイント・コンプリートアジュバントを混合して乳濁化させ、ニュージーランドホワイトラビットの皮下に１００μｇ抗原／匹を投与し、免疫を行った。２週、３週、４週後に同様に抗原を投与した後、さらに１週間間隔で投与を継続した。初回投与後６週目以降から採血を開始した。採血は耳動脈より１匹当り５０ｍｌとし、静置後遠心分離して抗血清を得た。

【００２４】

得られた抗血清１００ｍｌに３３％飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、ＩｇＧ画分を沈殿させ、遠心分離によって回収した沈殿を５０ｍｌのリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（ＰＢＳ）に溶解し、ＰＢＳで一晩透析することにより、ニューロプシンに対する抗体を含む溶液を得た。

［実施例２］イムノブロッティング

Time Saver cDNA Synthesis Kit（ファルマシア社製）を用いて合成したニューロプシンｃＤＮＡ（１３３３ｂｐ、配列番号３）をバキュロゴールドトランスフェクションキット（藤沢薬品工業株式会社（製））を用いてｐＶＬ１３９２（同キットの一部に組み込まれているもの）にトランスフェクトし、組換え発現ベクターを作製した。

【００２５】

細胞の形質転換は、昆虫細胞（Ｈｉｇｈ５）を培養した培養皿から培地を吸引し、１～２ＰＦＵ（プラークフォーミングユニット）のｐＶＬ１３９２ベクターを加えて２７℃で１時間静置した後、再度培地を加えて２７℃で２～３日間培養することによって行った。

【００２６】

このようにして得られた形質転換細胞（ニューロプシンｃＤＮＡを組み込んだｐＶＬ１３９２ベクターを導入した昆虫細胞（Ｈｉｇｈ５））1×10^{5} 個をＳＤＳポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液１ｍｌに懸濁し、１００℃で５分間加熱処理し、抗原溶液とした。別に分子量マーカー LMW Kit E（ファルマシア社（製））を同様に処理し、これを分子量マーカーとして使用した。

【００２７】

上記抗原溶液１０μｌ及び分子量マーカー１０μｌを前出の Laemmliらの方法により１２．５％ポリアクリルアミドゲル１枚に添加し、１５ｍＡ、１００分間室温で電気泳動し、セミドライタイプの転写装置であるザルブロットII（ザルスタット社（製））を用い、ブロッティング用メンブレンであるBLOTTING用デュラポアGVHP（ミリポア社（製））に２００ｍＡ、１時間室温で転写した。

【００２８】

転写後、分子量マーカーを転写したメンブレンはクマシブリリアントブルー染色液に浸し、染色した後、脱色液にて脱色した。

抗原を転写したメンブレンは、１０％スキムミルクで４℃一晩ブロッキングした後、実施例（１－２）で作製した抗体をＰＢＳで１００倍希釈して、この液にメンブレンを浸し、４℃で一晩反応させた。０．０５％ツイーン２０を含むＰＢＳで洗浄した後、１％ウシ血清アルブミンを含むＰＢＳで１０００倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギＩｇＧ（（株）医学生物学研究所（製））に室温で１時間反応させ、再度洗浄し、０．０５％の３，３’ヂアミノベンチジン４塩酸塩と０．４５％の過酸化水素を含むＰＢＳに浸けたとき、分子量３３ＫＤにバンドを生じた。これはニューロプシンに対応するものである。

【００２９】

一方、ベクターを導入しない昆虫細胞（Ｈｉｇｈ５）を同様に処理してブロッティングを行ったとき、対応する位置にバンドは生じなかった。

以上のイムノブロッティングの結果を図１に示す。図１のレーンＭは分子量マーカーを表し、レーン１及び２はニューロプシンのｃＤＮＡを組み込んだｐＶＬ１３９２ベクターを導入した昆虫細胞（Ｈｉｇｈ５）を抗原として用いた結果を表す。レーン３は、ベクターを導入しない昆虫細胞（Ｈｉｇｈ５）を抗原として用いた結果を表す。

【００３０】

この図１の結果から、ニューロプシンの遺伝子を組み込んだ細胞を抗原とした場合にのみ反応が見られることから、当該抗体がニューロプシンを認識していることが証明された。

［実施例３］免疫組織化学染色

実施例１で得た抗体がニューロプシンを認識するかどうかを確認するために、以下に述べるような公知の免疫組織化学染色を行った。

【００３１】

即ち、ニューロプシンを発現している細胞を４％パラフォルムアルデヒド含０．１％Ｍリン酸緩衝液などの固定液にて固定し、抗体希釈液（１％ウシ血アルブミン含リン酸緩衝生理食塩水）にて１０００倍に希釈した本抗体を用いて、４℃、１夜、湿潤箱内にて反応させた。未反応の抗体をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、蛍光物質を標識した抗ＩｇＧ抗体もしくはペルオキシダーゼなどを利用した発色法によってニューロプシンを同定した。

【００３２】

図２はこのようにして発色させた免疫組織化学染色の写真である。この写真において、輪郭の薄い球状体は発現ベクターを感染させた昆虫細胞であり、その中に見られる白い球状体がニューロプシンの免疫反応産物（発現ベクターを感染させた昆虫細胞によって産生されたニューロプシン）である。

［実施例４］酵素免疫測定法

（４－１）マイクロプレート型試薬の作製

実施例１で得たニューロプシンに対する抗体を０．１％アジ化ナトリウムを添加した０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）に透析し、同緩衝液で蛋白濃度０．０１ｍｇ／ｍｌに調製した。この液を９６穴マイクロプレート（ヌンク社製マキシソープ）の各ウエルに１００μｌずつ添加し、４℃で約１８時間静置して抗体を結合させた。

【００３３】

抗体結合後、ウエル内の溶液を除き、１％ウシアルブミン（ＢＳＡ）と１０％ショ糖を含むリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）３００μｌを加えて３７℃で２時間静置反応させ、マイクロプレートのウエルの抗体未結合部分をブロックした。このブロッキングは、以後の反応工程において標識抗体がマイクロプレートの壁面に非特異的に結合することにより、測定系の定量性が損なわれないようにするために行った。

【００３４】

ブロッキングの後、ウエル内のブロッキング液を除き、室温で完全に風乾させ、マイクロプレート型試薬を得た。

（４－２）ペルオキシダーゼ標識抗体の作製

実施例１で得たニューロプシンに対する抗体のＩｇＧ分画を０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ４．２）に透析し、蛋白濃度を５ｍｇ／ｍｌとなるように調製した後、総蛋白量の３％のペプシンを加えて３７℃で一晩攪拌し反応を行った。２Ｍトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）を適量加えて反応を停止させた後、０．２Ｍ塩化ナトリウムを含有する０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）で平衡化したウルトロゲルＡｃＡ４４（ＬＫＢ社（製））カラム（２．０×６０ｃｍ）でゲルろ過を行い、Ｆ（ａｂ’）分画２．５ｍｇを得た。

【００３５】

スクシミジル　４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ジーベンケミカル社（Zieben Chemical Co. Ltd.）製）を用いたヒンジ法（ジャーナル・オブ・イムノアッセイ（J. Immunoassay）第４巻第２０９頁（１９８３年））に従い、ＰＯＤ［Horseradish peroxidase：シグマ社（製））を、上記で得た抗ニューロプシン抗体のＩｇＧ／Ｆ（ａｂ’）にＳＨ基を介して結合させて、ペルオキシダーゼ標識抗体を得た。

（４－３）検量線の作製

実施例１で得たニューロプシンとＧＳＴの融合蛋白をＰＢＳで希釈し、６～１００μｇ／ｍｌ（６、１２、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）の溶液をそれぞれ調製し、この液１００μｌを上記（４－１）で作製したマイクロプレート型試薬に分注した。同時にＰＢＳのみを１００μｌ分注し、盲検とした。以上の反応系を室温にて１時間静置し、反応終了後ＰＢＳで３回洗浄後、同緩衝液をよく取り除いた。

【００３６】

上記（４－２）で作製したペルオキシダーゼ標識抗ニューロプシン抗体を０．１％ＢＳＡ、０．１５ＭＮａＣｌを添加した１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ８．０）にて２５０～１０００倍に希釈し、上記で抗原・抗体反応させたマイクロプレートに各ウエル１００μｌずつ分注して室温にて１時間静置後、ＰＢＳにて３回洗浄後、同洗浄液を除いた。

【００３７】

テトラメチルベンチジン２塩酸塩（シグマ社（製））を１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ６．８）に溶解し、１．６ｍＭの溶液を作製した。この液と、過酸化水素を１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ６．８）で希釈して１０ｍＭとした溶液を等量混合して酵素基質液とした。

【００３８】
ペルオキシダーゼ標識抗ニューロプシン抗体で処理したマイクロプレートの各ウエルにつき上記酵素基質液を１００μｌずつ分注し、室温にて１０～２０分間静置後、１．５Ｎリン酸を１ウエルにつき１００μｌずつ分注し、ｐＨを下げることによりペルオキシダーゼの酵素活性を停止させた。
【００３９】
こうしてマイクロプレートの各ウエルに生じた発色の程度は、吸光度計（東ソー社（製）ＭＰＲ－Ａ４）にて波長４５０ｎｍでの吸光度を測定することにより検出した。その結果を下記表１及び図３に示す。
【００４０】
【表１】

ニューロプシンの濃度（μｇ／ｍｌ）	吸光度（Ａ４５０）
0	0．０５６
6	0．１０２
１２	0．２０５
２５	0．４２４
５０	0．８０５
１００	1．８７５

【００４１】
（４－４）ニューロプシンの濃度測定
図３を検量線として用いることにより、体液その他の溶液中のニューロプシンの濃度を測定することができる。
［参考例］ニューロプシンをコードする遺伝子のクローニングと塩基配列決定
（参１－１）ＲＴ－ＰＣＲ
ＮＧＦ－γのセリンプロテアーゼドメイン中に保存されているアミノ酸残基Ｈｉｓ^{65}とＳｅｒ^{213}の領域に対応する、下記表２に示すような２種類のＰＣＲプライマーを合成した。
【００４２】
【表２】

5’-CTCACAGCTGCCCACTGC-3’

5’-TGGGCCTCCTGAGTCACCCTTGC-3’

【００４３】
Ｂａｌｂ／ｃマウス（５週齢、雄）の海馬よりFast Track mRNA抽出キット（Invitrogen社（製））によりｍＲＮＡを抽出し、２μｇのｍＲＮＡを使ってランダムプライマー法により逆転写酵素により一本鎖ｃＤＮＡを合成した。引き続き Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社（製））により、上記ＰＣＲプライマーを使いＰＣＲを行った。ＰＣＲは９４℃で２分の熱処理の後、９４℃で１分、５０℃で２分、７２℃で３分のサーマルサイクルを４０回繰り返し、最後に７２℃で１０分の条件で行った。ＰＣＲ産物は、その後アガロース電気泳動により分析し、約０．４ｋｂ－０．５ｋｂのサイズのバンドを確認したので、ゲルより切り出し、ＤＮＡを抽出した。抽出したＤＮＡはその後Klenow酵素により平滑末端にし、あらかじめ HindIII/Xholで切ったpBluescript II KS +（Stratagene社）を同様の方法で平滑末端にしたものにつないだ。このＤＮＡサンプルは引き続き、ＤＨ５αに形質転換した。

【００４４】
このようにして得られたクローンをＢ４１と名付け、その全塩基配列をジデオキシ法により決定した。その結果を配列表の配列番号４に示す。Ｂ４１はホモロジー検索の結果、ヌクレオチドレベルでＮＧＦ－γと３２％、ＥＧＦ－ＢＰと４０％、ｔＰＡと４７％、ＮＧＦ－αと５０％のホモロジーがある新規なセリンプロテアーゼであることが推定された。以後、Ｂ４１クローンは完全長のｃＤＮＡを得るためのプローブとした。
（参１－２）ｃＤＮＡライブラリーの作製とスクリーニング
上記の海馬から得られた２μｇのｍＲＮＡよりTime Saver cDNA合成キット（Pharmacia社（製））でｃＤＮＡ合成を行い、ＥｃｏＲＩ／ＮｏｔＩアダプターを両端に付け、λgt10ファージベクターにつないで、Gigapack II packaging extract（Stratagene 社（製））を用いてパッケージした。約２×１０^{7} のライブラリーができた。
【００４５】
約４×１０^{5} プラークを Hybond-N^{+}（Amersham社（製））のメンブレンフィルターに写し、以下のようにプラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。すなわちハイブリダイゼーションの条件は５×ＳＳＰＥ、２×Denhardt液、０．１％ＳＤＳ、４０％ホルムアミドに２５０μg/mlの変性サケ精巣ＤＮＡを加え、４２℃で６時間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後、ランダムプライマー法により^{32}ＰｄＣＴＰ（Amersham社（製））でラベルしたＢ４１プローブを加え、引き続き同じ条件で１８時間ハイブリダイゼーションを行った。その後フィルターを６５℃の２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳを含む液で数回洗い、風乾後、オートラジオグラフィーでポジティブクローンを選別した。その結果、６個のポジティブクローンが得られた。各プレートライセートよりファージを精製して、さらにファージＤＮＡを抽出し、インサートをサイトにサブクローニングし、制限酵素マッピング、塩基配列決定に供した。
（参１－３）　ニューロプシン遺伝子
制限酵素マッピングの結果（図４参照、図４にて、ＢはＢａｍＨＩ、ＸはＸｂａＩ、ＲはＲｓａＩ、ＰはＰｓｔＩである）、得られた６個のクローン（ＮＰ５、ＮＰ１、ＮＰ３、ＮＰ４、ＮＰ６、ＮＰ８）はそれぞれオーバーラップすることがわかり、このうちＮＰ５が一番長く、約１．３ｋｂのインサートを含むことがわかった。他は約０．８ｋｂであったので、ＮＰ５についてさらに解析し、全塩基配列を決定した。その結果、配列表の配列番号３に示すように、全長は１３３３ｂｐで、７８０ｂｐからなるオープンリーディングフレームが判明した。翻訳開始コドンはｎｔ４８７－４８９（ＡＴＧ）、又終始コドンはｎｔ１２６７－１２６９（ＴＧＡ）と推定される。即ち、４８６ｂｐからなる５’非コーディング領域と６４ｂｐからなる３’非コーディング領域（終始コドンとポリＡを含む）に挟まれた７８０ｂｐからなるコーディング領域を含むことがわかった。これはアミノ酸残基２６０個からなり、その配列から推定される分子量は約２万６千ダルトンと判明した。このタンパク質をニューロプシンと命名した。
【００４６】
配列表の配列番号１には、塩基配列から演繹されるニューロプシンのアミノ酸の一次構造を示す。ニューロプシンはアミノ酸配列レベルでのホモロジー検索の結果、ＥＧＦ－ＢＰと約４３％、ＮＧＦ－γと４１％、ＮＧＦ－αと３９％、トリプシン３８％、ｔＰＡと１８％のホモロジーがあることがわかり、セリンプロテアーゼの一種と推定された。このことはＨｉｓ^{73} 、Ａｓｐ^{120}、Ｓｅｒ^{212} とセリンプロテアーゼに特徴的なアミノ酸が含まれていることからも推定される。さらにアミノ酸１１０－１１２に、Ａｓｎ－Ａｓｎ－Ｓｅｒと糖鎖結合部位を含み糖タンパク質であることも推定される。
【００４７】
【発明の効果】
以上詳述したように、本発明に係るニューロプシンに対する抗体によれば、免疫組織化学的手法を用いることにより、脳内におけるニューロプシンの存在を検出できるほか、酵素免疫測定法を用いることにより、体液その他溶液中のニューロプシンの濃度の測定に利用できるという効果が得られる。

【００４８】
また、ニューロプシンを認識することは、脳の機能即ち記憶や学習機構等の解明の手がかりを与え、更に退行的な疾患（例えばアルツハイマー病）、脳の機能不全（例えば癲癇）あるいは免疫不全を解決する上で非常に有用であるため、本発明に係るニューロプシンに対する抗体は利用価値が高いものである。
【００４９】
【配列表】
配列番号：１
配列の長さ：２６０
配列の型：アミノ酸
トポロジー：不明
配列の種類：蛋白質
配列：

Met Gly Arg Pro Pro Pro Cys Ala Ile Gln Pro Trp Ile Leu Leu
5 10 15
Leu Leu Phe Met Gly Ala Trp Ala Gly Leu Thr Arg Ala Gln Gly
20 25 30
Ser Lys Ile Leu Glu Gly Arg Glu Cys Ile Pro His Ser Gln Pro
35 40 45
Trp Gln Ala Ala Leu Phe Gln Gly Glu Arg Leu Ile Cys Gly Gly
50 55 60
Val Leu Val Gly Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys
65 70 75
Lys Gln Lys Tyr Ser Val Arg Leu Gly Asp His Ser Leu Gln Ser
80 85 90
Arg Asp Gln Pro Glu Gln Glu Ile Gln Val Ala Gln Ser Ile Gln
95 100 105
His Pro Cys Tyr Asn Asn Ser Asn Pro Glu Asp His Ser His Asp
110 115 120
Ile Met Leu Ile Arg Leu Gln Asn Ser Ala Asn Leu Gly Asp Lys
125 130 135
Val Lys Pro Val Gln Leu Ala Asn Leu Cys Pro Lys Val Gly Gln
140 145 150
Lys Cys Ile Ile Ser Gly Trp Gly Thr Val Thr Ser Pro Gln Glu
155 160 165
Asn Phe Pro Asn Thr Leu Asn Cys Ala Glu Val Lys Ile Tyr Ser
170 175 180
Gln Asn Lys Cys Glu Arg Ala Tyr Pro Gly Lys Ile Thr Glu Gly
185 190 195
Met Val Cys Ala Gly Ser Ser Asn Gly Ala Asp Thr Cys Gln Gly
200 205 210
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asp Gly Met Leu Gln Gly Ile

215 220 225

Thr Ser Trp Gly Ser Asp Pro Cys Gly Lys Pro Glu Lys Pro Gly

230 235 240

Val Tyr Thr Lys Ile Cys Arg Tyr Thr Thr Trp Ile Lys Lys Thr

245 250 255

Met Asp Asn Arg Asp

260

配列番号：２
配列の長さ：１２１
配列の型：アミノ酸
トポロジー：不明
配列の種類：蛋白質
配列：

Glu Gln Glu Ile Gln Val Ala Gln Ser Ile Gln His Pro Cys Tyr

5 10 15

Asn Asn Ser Asn Pro Glu Asp His Ser His Asp Ile Met Leu Ile

20 25 30

Arg Leu Gln Asn Ser Ala Asn Leu Gly Asp Lys Val Lys Pro Val

35 40 45

Gln Leu Ala Asn Leu Cys Pro Lys Val Gly Gln Lys Cys Ile Ile

50 55 60

Ser Gly Trp Gly Thr Val Thr Ser Pro Gln Glu Asn Phe Pro Asn

65 70 75

Thr Leu Asn Cys Ala Glu Val Lys Ile Tyr Ser Gln Asn Lys Cys

80 85 90

Glu Arg Ala Tyr Pro Gly Lys Ile Thr Glu Gly Met Val Cys Ala

95 100 105

Gly Ser Ser Asn Gly Ala Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly

110 115 120

Pro

配列番号：３
配列の長さ：１３３３
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列：

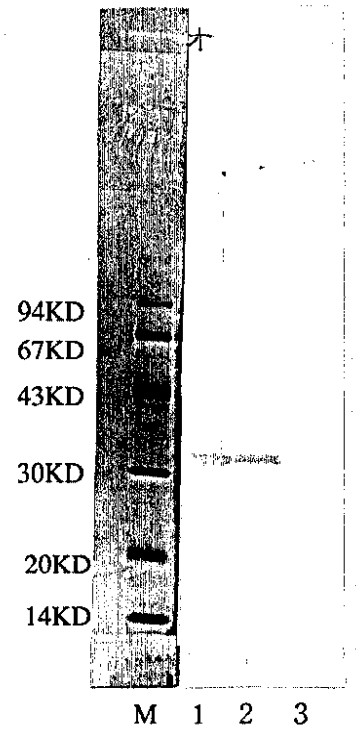
GACACACCGAAGGGAAGTCCGGGGGCCTCTTCCACCGAGTCCGAGTGACCCCGCCCCTTG 60
CATTCTGGAAGGTGAGGCGCAGAGGTCCCCAGACACGGACCTCAGGCGCAGGGAGGTCCC 120
CTTTCTCTGAGCCCAGGACCCTCCCACCCCCAGGCTCACATTCTTTCTCTCAGGATCTTC 180
AAGCGGGTCTCTTAAGCTCCCTCTTCCCCAGGACGTTGGAGTCACAGCCTCAGATCTTTC 240
TCTCCAATCTCACAAGTGGGCCAGAACTCCTTTATAATGTCTGGATCCCCAACAGCAAGC 300
TCTCCCCCACACTAAAATTCGGGGATCTAGAGCTCTGCCCTAGCTTTCTCAGCCCCTAGC 360
TCCATCCTCCAGCAAGACTCAAGACAGCTCCGGAAACACCTCCTTCCCCCAGTTCCCCAG 420
ACAACAAGATCTCAGGCTCCTCCCTCGGACTTCCTCTTAGTTCCACCCTCTTCCTCAGAG 480
GCCACCATGGGACGCCCCCCACCCTGTGCAATCCAGCCGTGGATCCTTCTGCTTCTGTTC 540
ATGGGAGCGTGGGCAGGGCTCACCAGAGCTCAGGGCTCCAAGATCCTGGAAGGTCGAGAG 600
TGTATACCCCACTCCCAGCCTTGGCAGGCAGCCTTGTTCCAGGGCGAGAGACTGATCTGT 660
GGGGGTGTCCTGGTTGGAGACAGATGGGTCCTCACGGCAGCCCACTGCAAAAAACAGAAG 720
TACTCCGTGCGTCTGGGTGATCATAGCCTCCAGAGCAGAGATCAGCCGGAGCAGGAGATC 780
CAGGTGGCTCAGTCTATCCAGCATCCTTGCTACAACAACAGCAACCCAGAAGATCACAGT 840
CACGATATAATGCTCATTCGACTGCAGAACTCAGCAAACCTCGGGGACAAGGTGAAGCCG 900
GTCCAACTGGCCAATCTGTGTCCCAAAGTTGGCCAGAAGTGCATCATATCAGGCTGGGGC 960
ACTGTCACCAGCCCTCAAGAGAACTTTCCAAACACCCTCAACTGTGCGGAAGTGAAAATC 1020
TATTCCCAGAACAAGTGTGAGAGAGCCTATCCAGGGAAGATCACCGAGGGCATGGTCTGT 1080
GCTGGCAGCAGCAATGGAGCTGACACGTGCCAGGGTGACTCAGGAGGCCCTCTGGTGTGC 1140
GACGGGATGCTCCAGGGCATCACCTCATGGGGCTCAGACCCCTGTGGGAAACCCGAGAAA 1200
CCTGGAGTCTACACCAAAATCTGCCGCTACACTACCTGGATCAAGAAGACCATGGACAAC 1260
AGGGACTGATCCTGGTGTGTGTGTGGGGGGGGGGTTGTCAATAAACACCACCATTGGTTG 1320
GCAAAAAAAAAAA 1333

配列番号：４
配列の長さ：４１１
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列：

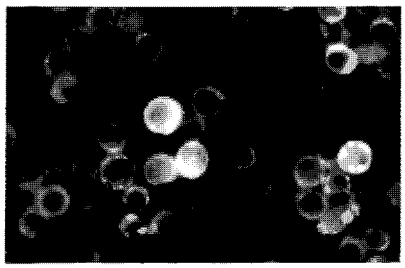
CTCACAGCTGCCCACTGCAAAAAACAGAAGTACTCCGTGCGTCTGGGTGATCATAGCCTC 60
CAGAGCAGAGATCAGCCGGAGCAGGAGATCCAGGTGGCTCAGTCTATCCAGCATCCTTGC 120
TACAACAACAGCAACCCAGAAGATCACAGTCACGATATAATGCTCATTCGACTGCAGAAC 180
TCAGCAAACCTCGGGGACAAGGTGAAGCCGGTCCAACTGGCCAATCTGTGTCCCAAAGTT 240
GGCCAGAAGTGCATCATATCAGGCTGGGGCACTGTCACCAGCCCTCAAGAGAACTTTCCA 300
AACACCCTCAACTGTGCGGAAGTGAAAATCTATTCCCAGAACAAGTGTGAGAGAGCCTAT 360
CCAGGGAAGATCACCGAGGGCATGGTCTGTGCTGGCAGCAGCAATGGAGCTGACACGTGC 390
AAGGGTGACTCAGGAGGCCCA 411

【図面の簡単な説明】
【図１】　ニューロプシンに対する抗体を用いたイムノブロッティングの結果を示す説明図（メンブレンの写し）である。
【図２】　ニューロプシンに対する抗体を用いた免疫組織化学染色の写真である。
【図３】　ニューロプシンの濃度測定に用いる検量線のグラフである。
【図４】　参考例の（参１－２）で得られた６個のクローンの制限酵素地図である。

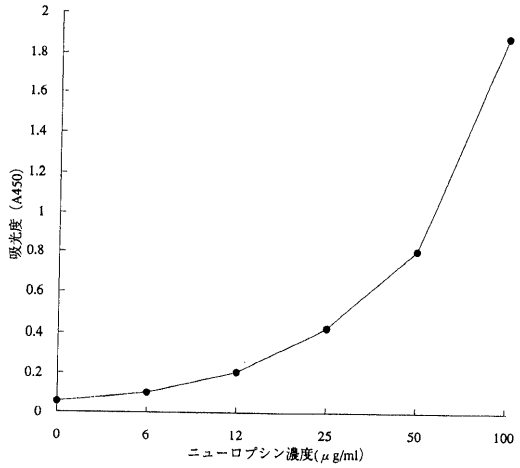
【図１】



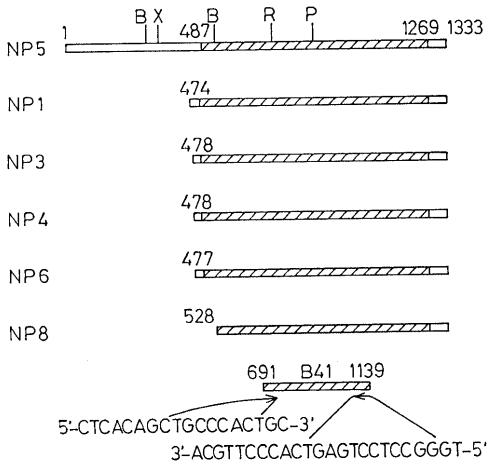
【図２】



【図３】


吸光度（A450）
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
6
12
25
50
100
ニューロプシン濃度(μg/ml)

【図４】


B X
B
R
P
1
487
1269 1333
NP5
NP1
474
NP3
478
NP4
478
NP6
477
NP8
528
691 B41 1139
5'-CTCACAGCTGCCCACTGC-3'
3'-ACGTTCCCACTGAGTCCTCCGGGT-5'

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed