

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4831560号
(P4831560)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 9/50 (2006.01) C 1 2 N 9/50 Z N A
G O 1 N 33/15 (2006.01) G O 1 N 33/15 Z
C 1 2 Q 1/37 (2006.01) C 1 2 Q 1/37

請求項の数 2 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2005-105436 (P2005-105436)	(73) 特許権者	803000089 株式会社 鹿児島 T L O
(22) 出願日	平成17年3月31日 (2005.3.31)		鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番40号 鹿児島大学地域共同研究センター1階
(65) 公開番号	特開2005-312448 (P2005-312448A)	(74) 代理人	100064458 弁理士 田中 正治
(43) 公開日	平成17年11月10日 (2005.11.10)		
審査請求日	平成20年3月21日 (2008.3.21)	(72) 発明者	内木場 哲也 鹿児島県揖宿郡喜入町瀬々串4253-2
(31) 優先権主張番号	特願2004-108175 (P2004-108175)	(72) 発明者	米澤 弘夫 鹿児島県鹿児島市西紫原町13-3
(32) 優先日	平成16年3月31日 (2004.3.31)	(72) 発明者	有馬 一成 鹿児島県鹿児島市明和4丁目14番9号-33
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	審査官	伊達 利奈

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質及びその製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から精製された、

(a) 分子量をクーマシブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

(b) Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の蛍光基質水溶液中で、ジソプロピルフルオロフォスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば加水分解しないが、モノヨード酢酸及びペプスタチンA中のいずれが存在していても加水分解し、

(c) ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

(d) -エンドルフィンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の-エンドルフィン水溶液中で、当該-エンドルフィンのThr6-Ser7間について加水分解する、
 という特性を有するプロテアーゼを含有している剤であることを特徴とするスギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質。

【請求項2】

スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉が

ら当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から、

(a)分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

(b)Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の蛍光基質水溶液中で、ジイソプロピルフルオロフォスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば加水分解しないが、モノヨード酢酸及びペプスタチンA中のいずれが存在していても加水分解し、

(c)ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

(d) -エンドルフィンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の -エンドルフィン水溶液中で、当該 -エンドルフィンのThr6-Ser7間について加水分解する、
という特性を有するプロテアーゼを含有している剤を、

(1)スギ花粉に0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液を加えて得られた水溶液をホモナイズして遠心分離し、その上清液を得、

(2)その上清液に硫酸アンモニウムを加えて遠心分離し、その上清液を得、

(3)その上清液をクロマトグラフィーにかけてプロテアーゼ溶解水溶液を得、

(4)そのプロテアーゼ溶解水溶液の濃縮溶液を上記プロテアーゼを含有している剤として得る

という一連の工程をとることによって、スギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質として精製することを特徴とするスギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質の製法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、スギ花粉症を予防乃至治療するための物質をスクリーニングするために用いる標的物質、及びその製法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、(1)スギ花粉がヒトの体内に侵入すれば、そのスギ花粉中の抗原性物質であるスギ花粉アレルゲンのために、それに対するイムノグロブリンE抗体を、ヒトの体内に産生し、その状態で、次にスギ花粉がヒトの体内に侵入すれば、そのスギ花粉中のスギ花粉アレルゲンとそれまでに産生されていたイムノグロブリンE抗体とが免疫反応を起こし、ヒトがアレルギー症状を呈することになり、これが、スギ花粉症であるとされ、従って、スギ花粉症の主因が、スギ花粉アレルゲンであるとされ、また、(2)上述したスギ花粉アレルゲンには、「Crypj-1」と称されているタンパク質でなるアレルゲンと「Crypj-2」と称されているタンパク質でなるアレルゲンとが存在するが、スギ花粉から、スギ花粉アレルゲン(「Crypj-1」、「Crypj-2」)中のT細胞エピトープのみからなる低分子のペプチドを精製し、そのペプチドを、ヒトに投与すれば、減感作の作用で、副作用を伴うことなしに、スギ花粉症を予防乃至治療することができることとされている、という知見(特許文献1参照)に基づき、スギ花粉症の患者を対象とした対症療法剤の研究が多々なされている。

【特許文献1】特開2003-2897号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、従来、スギ花粉症を予防乃至治療するに適切な物質をスクリーニングし、そのスクリーニングされた物質を以って、スギ花粉症を予防乃至治療する、という研究はほとんどなされていない。

【0004】

10

20

30

40

50

それは、スギ花粉症を予防乃至治療するための物質をスクリーニングするために用いて効果的なスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の提案がなされていなかったことによる。

【0005】

よって、本発明は、スギ花粉症を予防乃至治療するための物質をスクリーニングするために用いて効果的な、新規なスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質、及びその製法を提案せんとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者等は、スギ花粉症を予防乃至治療するための物質をスクリーニングするために用いて効果的なスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質を提案すべく種々の実験を重ねたところ、

(1)スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬すれば、その0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に、スギ花粉から、30秒～3分以内でも、「プロテアーゼ」が溶出すること、従って、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬することで、スギ花粉から0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に30秒～3分以内に溶出した「プロテアーゼ」を含有しているプロテアーゼ含有水溶液を得ることができること、

(2)[背景技術]で上述したスギ花粉による免疫反応は、より詳しくは、スギ花粉がヒトの体内に侵入し、その侵入したスギ花粉のアレルゲンが、ヒトの抗原提示細胞内にその細胞内のプロテアーゼによって取り込まれる、ということで引き起こされるが、スギ花粉がヒトの体内に侵入し、スギ花粉アレルゲンがヒトの抗原提示細胞内に取り込まれるまでの時間は、「30秒～3分以内」というごく短い時間であり、その「30秒～3分以内」という時間は、上記(1)で「スギ花粉から0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に30秒～3分以内に溶出した「プロテアーゼ」」としている中における「30秒～3分以内」という時間に対応していること、

(3)上記(1)で「スギ花粉から0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に30秒～3分以内に溶出した「プロテアーゼ」」としているその「プロテアーゼ」が、ヒトの鼻粘膜や咽頭のびらん状神経末端を構成しているペプチドホルモンや神経ペプチドなどでなる基質を溶質としている水溶液中で、その基質を加水分解すること、従って、いま述べた「プロテアーゼ」が、ヒトの鼻粘膜や咽頭のびらん状神経末端を構成しているペプチドホルモンや神経ペプチドなどに対し、加水分解活性(酵素活性)を有すること、

(4)上記(1)、(2)及び(3)で述べたことから、上記(3)で述べた「プロテアーゼ」がヒトの鼻粘膜や咽頭に侵入したとすれば、その「プロテアーゼ」がヒトの鼻粘膜や咽頭のびらん状神経末端を構成しているペプチドホルモンや神経ペプチドなどを加水分解し、それがヒトの呼吸中枢をかく乱し、ヒトにスギ花粉症にみられると同様の急性の喘息様の発作を生じさせたりし、よって、その「プロテアーゼ」が神経中枢に影響を与えることによるスギ花粉症をヒトに生じさせること、

(5)上記(1)、(2)及び(3)で述べたことから、上記(3)で述べた「プロテアーゼ」がヒトの鼻粘膜や咽頭に侵入したとすれば、その前にスギ花粉がヒトの体内に侵入していれば、そのスギ花粉中のスギ花粉アレルゲンであるCrypj-1及びCrypj-2を、いま侵入した上記(3)で述べた「プロテアーゼ」が加水分解し、よって、上記(3)で述べた「プロテアーゼ」が免疫反応によるスギ花粉症をヒトに生じさせること、

(6)以上のこと、及び後述する[実施例1]の記載をもとに、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から、

(a)分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

(b)Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の蛍光基質水

10

20

30

40

50

溶液中で、ジイソプロピルフルオロフォスフェートの2mmol/Lの濃度以上での存在のもとでは加水分解しないが、モノヨード酢酸及びペプスタチンA中のいずれが存在しても加水分解し、

(c)ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

(d) -エンドルフィンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の -エンドルフィン水溶液中で、当該 -エンドルフィンのThr6-Ser7間について加水分解する、
 という特性を有するプロテアーゼを含有する剤を精製すれば、その精製によって得られるプロテアーゼを含有する剤が、スギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質たり得ること、
 を確認乃至推認するに到った。

10

【0007】

本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質は、上述した確認乃至推認に基づき提案されたもので、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から精製された、

(a)分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

(b)Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の蛍光基質水溶液中で、ジイソプロピルフルオロフォスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば加水分解しないが、モノヨード酢酸及びペプスタチンA中のいずれが存在していても加水分解し、

20

(c)ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

(d) -エンドルフィンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の -エンドルフィン水溶液中で、当該 -エンドルフィンのThr6-Ser7間について加水分解する、
 という特性を有するプロテアーゼを含有している剤でなる、というものである。

【0008】

また、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法も、上述した確認乃至推認に基づき提案されたもので、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から、

30

(a)分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

(b)Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の蛍光基質水溶液中で、ジイソプロピルフルオロフォスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば加水分解しないが、モノヨード酢酸及びペプスタチンA中のいずれが存在していても加水分解し、

40

(c)ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

(d) -エンドルフィンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の -エンドルフィン水溶液中で、当該 -エンドルフィンのThr6-Ser7間について加水分解する、
 という特性を有するプロテアーゼを含有している剤を、(1)スギ花粉に0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液を加えて得られた水溶液をホモナイズして遠心分離し、その上清液を得、(2)その上清液に硫酸アンモニウムを加えて遠心分離し、その上清液を得、(3)その上清液をクロマトグラフィーにかけてプロテアーゼ溶解水溶液を得、(4)そのプロテアーゼ溶解水溶液の濃縮溶液を上記プロテアーゼを含有している剤として得るという一連の工程をとることによって、スギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質とし

50

て精製する、というものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質によれば、それが段落[0007]で述べた特性を有するプロテアーゼを含有している剤であることから、そのプロテアーゼの特性、とくに段落[0007]中の(b)、(c)及び(d)に記載の特性を利用して、スギ花粉症を予防乃至治療するのに適切な物質を効果的にスクリーニングすることができる。

【0010】

本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法によれば、スギ花粉症を予防乃至治療するのに適切な物質を効果的にスクリーニングすることができる。本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質を、容易に製造することができる。

10

【実施例1】

【0011】

次に、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の実施例を、それを製造する本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例とともに述べよう。

【0012】

本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の実施例は、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼ含有しているプロテアーゼ含有水溶液から、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤を用いている剤であるというものである。

20

【0013】

このことから、いま、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の実施例を製造する、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例を述べれば、次のとおりである。

【0014】

すなわち、

30

(1)まず、スギ花粉の1gに、0.3mol/L塩化ナトリウム、2mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、及び2mmol/Lシステインを含有している、pHが7.4～8.0である0.2mol/Lリン酸緩衝液の24mLを、0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液として、加え、それによって得られた水溶液について、その温度を20℃に1時間保って後、ガラス製ホモジナイザーでホモジナイズし、そのホモジナイズされた水溶液に対し、10,000rpm、6分間の遠心分離を施しそれによる上清液を得、

(2)次で、その上清液に、硫酸アンモニウムを、45%飽和になるように加え、それによって得られた溶液に対し、その温度を7℃に1時間保ってから、10,000rpm、6分間の遠心分離を施し、それによる上清液を得、

(3)次で、その上清液を、飽和硫酸アンモニウムを45%含有している、pHが7.4～8.0である10mmol/Lリン酸緩衝液によって平衡化したButyl-Sepharose疎水クロマトグラフィーにかけ、pH7.4～8.0の10mmol/Lリン酸緩衝液に対するリニアグラジエントで、プロテアーゼを溶解している溶液を得、

40

(4)そのプロテアーゼを溶解している溶液を、限外ろ過器で濃縮し、それによる濃縮溶液を得、その濃縮溶液を、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼ含有しているプロテアーゼ含有水溶液から精製された、後述する特性を有するプロテアーゼを含有している剤として、得た。

【0015】

以上が、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の実施例を

50

製造する、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例である。

【0016】

このような本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例は、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒～3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から、後述する特性を有するプロテアーゼを含有している剤を、スギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質として精製する、というものであることは明らかであるが、いま、そのような本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤におけるプロテアーゼの特性をみるに、それは、次のとおりである。

10

【0017】

まず、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤の特性の理解の容易のため、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬すれば、30秒～3分以内に、その0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質に対して加水分解活性（酵素活性）を有するプロテアーゼが溶出する、ということを確認すれば、次のとおりである。

【0018】

すなわち、

20

(ア)(i)スギ花粉の5mgに、0.3mol/L塩化ナトリウム、2mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、及び2mmol/Lシステインを含有している、pHが7.4～8.0である0.2mol/Lリン酸緩衝液の100 μ Lを、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例における、段落[0014]記載の0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液に準じた0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液として加え、それによる得られた懸濁液を得、

(ii)次で、その懸濁液について、その懸濁液を得てから、一定時間後に、生物顕微鏡によって観察したところ、いま「その懸濁液を得てから、一定時間後に、」と述べたその「一定時間」を、30秒～3分以内としても、その懸濁液中にスギ花粉の内容物が漏出していること、

30

(イ)(i)上記(イ)(i)の懸濁液を得、

(ii)次で、その懸濁液に対し、その温度を37 $^{\circ}$ Cにして後、一定時間後に、10,000rpm、1分間の遠心分離を施し、それによる上清液を得、

(iii)次で、その上清液について、クーマシーブルー染色法によって、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像を観察したところ、上記(ii)で「その懸濁液に対し、その温度を37 $^{\circ}$ Cにして後、一定時間後に、」と述べたその「一定時間」を30秒～3分以内としても、その上清液中に、スギ花粉による、抗原タンパク質（スギ花粉アレルゲン）を含んでいるタンパク質が、漏出していること、

(ウ)上記(イ)(i)の懸濁液を得、

(ii)次で、その懸濁液に対し、その温度を37 $^{\circ}$ Cに保って後、一定時間後に、10,000rpm、1分間の遠心分離を施し、それによる上清液を得、

40

(iii)次で、その上清液の20 μ Lと、10mmol/L Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を溶解しているジメチルスルホキシド溶液の5 μ Lと、0.3mol/L塩化ナトリウム、2mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、及び2mmol/Lシステインを含有している、pHが7.4～8.0である0.2mol/Lリン酸緩衝液の2975 μ Lとの混合液を得、

(iv)次で、その混合液について、その蛍光強度を、その混合液の温度を37 $^{\circ}$ Cに2時間保ってから、励起波長380nm、蛍光波長460nmの蛍光を用いて測定したところ、上記(ii)で「その懸濁液に対し、その温度を37 $^{\circ}$ Cに保って後、一定時間後に、」と述べたその「一定時間」を30秒～3分以内としても、その混合液の蛍光強度が増大すること、

50

を確認した。

【0019】

本発明者等は、このような確認をもとに、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬すれば、30秒～3分以内に、その0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質に対して加水分解活性（酵素活性）を有するプロテアーゼが溶出する、ということを確認した。

【0020】

次に、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤におけるプロテアーゼの特性を、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬すれば、30秒～3分以内に、0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中にSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質に対して加水分解活性（酵素活性）を有するプロテアーゼが溶出する、ということの上述した確認のもとで、それを加味して、みるに、それは次のとおりである。

【0021】

すなわち、

(a-1)上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、段落[0014]に記載のプロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液について、クーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像を観察したところ、その電気泳動像中に、分子量既知のマーカープロテアーゼ（タンパク質）との比較から、分子量67,000と見積もられる位置に、単一のバンドが存在する、ということを確認した。

【0022】

本発明者等は、このような確認をもとに、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とする、という特性を有することを推認した。

【0023】

また、

(a-2)上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、段落[0014]に記載のプロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液について、エドマン法によるアミノ酸配列分析装置を用いたアミノ酸配列分析を行ったところ、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、N末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-としていることを確認した。

【0024】

本発明者等は、このような確認をもとに、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、N末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とする、という特性を有することを推認した。

【0025】

さらに、

(b-1)上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、段落[0014]に記載のプロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液と、セリンプロテアーゼ阻害剤である、4mmol/Lの濃度を有するジイソプロピルフルオロホスフェートとを、1対1の容量比で混合し、その混合液について、その温度を30 に保ってから、1時間後に、その混合液による、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質の加水分解活性の測定を行ったところ、その混合液が本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製されたプロテアーゼを含有している剤を含有しているにも拘らず、その混合液によるSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基

10

20

30

40

50

質の加水分解活性が、実質的に喪失しており、そして、このようなことは、その混合液を構成しているジイソプロピルフルオロホスフェートの濃度が、4mmol/L以下であっても2mmol/L以上であれば、また、4mmol/L以上であっても、同様であることを確認した。

【0026】

本発明者等は、このような確認をもとに、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の水溶液中で、ジイソプロピルフルオロホスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば、加水分解しない、という特性を有することを推認した。

10

【0027】

また、

(b-2)上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって製造された、段落[0014]に記載のプロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液と、システインプロテアーゼ阻害剤である4mmol/Lモノヨード酢酸とを混合し、その混合液

について、上記(b-1)の場合と同様の、その混合液によるSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質の加水分解活性を測定したところ、その混合液がシステインプロテアーゼ阻害剤である4mmol/Lモノヨード酢酸を含有しているにも拘らず、混合液によるSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質の加水分解活性が、実質的に喪失していず、そしてこのようなことは、この(b-2)で上述した測定において、混合液が含有しているシステインプロテアーゼ阻害剤である4mmol/Lモノヨード酢酸を0.01mmol/Lペプスタチン (pepstatin) Aに代えたことを除いて(b-2)で上述した測定でも、同様であることを確認した。

20

【0028】

本発明者等は、このような確認をもとに、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の蛍光基質水溶液中で、モノヨード酢酸及びペプスタチンA中のいずれが存在していても、加水分解する、という特性を有する、ということ

30

【0029】

さらに、

(c)

5 μ mol/Lニューロテンシンを溶解している、pHが7.4～8.0である0.2mol/L リン酸緩衝液の200 μ Lに、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、段落[0014]に記載のプロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液の5 μ Lを加え、それによって得られた混合液について、37 $^{\circ}$ Cの温度に3時間保つて後、TOF-MASS質量分析装置を用いた分析を行ったところ、pGlu1-Ile12に相当するペプチドが存在することを確認した。

【0030】

40

本発明者等は、このような確認をもとに、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4～pH8.0の水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解する、という特性を有することを推認した。

【0031】

また、

(d)

5 μ mol/L β -エンドルフィンを溶解している、pHが7.4～8.0である0.2mol/L リン酸緩衝液の200 μ Lに、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物

50

質の製法の実施例によって精製された、段落[0014]に記載のプロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液の5 μ Lを加え、それによって得られた混合液について、37 の温度で3時間保って後、TOF-MASS質量分析装置を用いた分析を行ったところ、Tyr1-Thr6に相当するペプチドが存在することを確認した。

【0032】

本発明者等は、このような確認をもとに、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によって精製された、プロテアーゼを含有している剤としての濃縮溶液におけるプロテアーゼが、 α -エンドルフィン β を、それを溶質とするpH7.4~pH8.0の水溶液中で、当該 α -エンドルフィン β のThr6-Ser7間について加水分解する、という特性を有する、ということを確認した。

10

【0033】

上述したところから、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例が、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒~3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から精製された、

【0034】

このことから、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の実施例が、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒~3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から精製された、

(a)分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

20

(b)Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4~pH8.0の蛍光基質水溶液中で、ジイソプロピルフルオロフォスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば加水分解しないが、モノヨード酢酸またはペプスタチンAが存在していても加水分解し、

(c)ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4~pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

(d) α -エンドルフィン β を、それを溶質とするpH7.4~pH8.0の α -エンドルフィン β 水溶液中で、当該 α -エンドルフィン β のThr6-Ser7間について加水分解する、

30

という特性を有するプロテアーゼを含有している剤でなる、ということが明らかとなった。

【0035】

また、このような本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質の実施例によれば、詳細説明は省略するが、[発明の効果]の項で上述した効果が得られることは明らかである。

【0036】

さらに、上述したところから、本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法は、スギ花粉を0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液中に浸漬して得られた、スギ花粉から当該水溶液中に30秒~3分以内に溶出したプロテアーゼを含有しているプロテアーゼ含有水溶液から、

40

(a)分子量をクーマシーブルー染色法によるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像の観測から決定された値67,000とし且つN末端配列をAla-Glu-Thr-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Thr-Val-Lys-Pro-Phe-とし、

(b)Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA蛍光基質を、それを溶質とするpH7.4~pH8.0の蛍光基質水溶液中で、ジイソプロピルフルオロフォスフェートが2mmol/Lの濃度以上で存在していれば加水分解しないが、モノヨード酢酸またはペプスタチンAが存在していても加水分解し、

(c)ニューロテンシンを、それを溶質とするpH7.4~pH8.0のニューロテンシン水溶液中で、当該ニューロテンシンのIle12-Leu13間について加水分解し、

50

(d) β -エンドルフィンを、それを溶質とするpH7.4~pH8.0の β -エンドルフィン水溶液中で、当該 β -エンドルフィンのThr6-Ser7間について加水分解する、という特性を有するプロテアーゼを含有している剤を、(1)スギ花粉に0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む水溶液を加えて得られた水溶液をホモナイズして遠心分離し、その上清液を得、(2)その上清液に硫酸アンモニウムを加えて遠心分離し、その上清液を得、(3)その上清液をクロマトグラフィーにかけてプロテアーゼ溶解水溶液を得、(4)そのプロテアーゼ溶解水溶液の濃縮溶液を上記プロテアーゼを含有している剤として得るという一連の工程をとることによって、スギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質として精製する、ということが明らかとなった。

【0037】

また、このような本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質の製法の実施例によれば、詳細説明は省略するが、[発明の効果]の項で上述した効果が得られることは明らかである。

【0038】

なお、上述した本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用スクリーニング用標的物質、及びその製法の実施例においては、段落[0014]中の(1)~(4)に記載の順次の工程を経て得られたプロテアーゼを溶解している溶液としての濃縮溶液を以って、段落[0034]中の(a)~(d)に記載の特性を有するプロテアーゼを含有している剤とする、という場合を述べたが、段落[0014]中の(1)~(4)に記載の順次の工程に準じたまたは代えた工程を経て得られた段落[0014]に記載の濃縮溶液に準じたまたは相当する溶液を以って、段落[0034]中の(a)~(d)に記載の特性を有するプロテアーゼを含有している剤とするようにすることもでき、その他、本発明の精神を脱することなしに、種々の変型、変更をなし得ることは明らかである。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明によるスギ花粉症予防乃至治療用物質スクリーニング用標的物質、及びその製法は、スギ花粉症を予防乃至治療するのに適切な物質をスクリーニングすることができる物質、及びその製法として、広く使用することができる。

【配列表】

000483156000001.app

10

20

30

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表平09-504164(JP,A)
国際公開第2003/102189(WO,A1)
特開平06-066800(JP,A)
特開平10-306025(JP,A)
日本農芸化学会西日本支部会大会およびシンポジウム講演要旨集,1999,Vol.244,p.50,#Cpm3
生化学,2001,Vol.73,No.11,p.1370,#SA-3
Phytochemistry,1998,Vol.47,No.4,pp.593-598
生化学,2000,Vol.72,No.8,p.827,#1P-716
日本花粉学会会誌,2003,Vol.49,No.2,pp.71-77

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 9/00-9/99
C12N 15/00-15/90

PubMed
UniProt/GeneSeq
JSTPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)