

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-82076

(P2009-82076A)

(43) 公開日 平成21年4月23日(2009.4.23)

|                                       |                       |             |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                          | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>        | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>C O 7 K 14/47 (2006.01)</b>        | C O 7 K 14/47         | 4 B O 6 5   |
| <b>C O 7 K 14/705 (2006.01)</b>       | C O 7 K 14/705        | 4 H O 4 5   |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>         | C 1 2 N 1/15          |             |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>         | C 1 2 N 1/19          |             |
| 審査請求 未請求 請求項の数 89 O L (全 83 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|           |                              |          |                       |
|-----------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2007-256664 (P2007-256664) | (71) 出願人 | 501203344             |
| (22) 出願日  | 平成19年9月28日 (2007. 9. 28)     |          | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 |
|           |                              |          | 茨城県つくば市観音台3-1-1       |
|           |                              | (74) 代理人 | 100078282             |
|           |                              |          | 弁理士 山本 秀策             |
|           |                              | (74) 代理人 | 100062409             |
|           |                              |          | 弁理士 安村 高明             |
|           |                              | (74) 代理人 | 100113413             |
|           |                              |          | 弁理士 森下 夏樹             |
|           |                              | (71) 出願人 | 508311396             |
|           |                              |          | 株式会社ファルミット            |
|           |                              |          | 千葉県市川市相之川4丁目15番12号    |
|           |                              | 最終頁に続く   |                       |

(54) 【発明の名称】 変異受容体、ならびにこれを用いる生活習慣病関連因子検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】汎用的な変性L D L 検出アッセイおよびA G E 検出アッセイにおいて使用するための安定な検出用分子を提供すること。

【解決手段】(1) 特定のアミノ酸配列；(2) 特定のアミノ酸配列において、90位および107位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含み、かつ天然型L O X-1の活性を示す、アミノ酸配列；および(3) 特定の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸配列は、特定の対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型L O X-1の活性を示す、アミノ酸配列；からなる群より選択される配列を含む、ポリペプチド。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(1) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、90 位および 107 位以外のアミノ酸位置で 1 または数個の置換、付加および／または欠失を含み、かつ天然型 LOX-1 の活性を示す、アミノ酸配列；および

(3) 配列番号 1 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において 90 位および 107 位のアミノ酸配列は、配列番号 2 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 LOX-1 の活性を示す、アミノ酸配列；

からなる群より選択される配列を含む、ポリペプチド。

## 【請求項 2】

前記置換は、保存的置換である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

前記欠失は、配列番号 2 の 126 位～131 位までのいずれか 1～6 個のアミノ酸の欠失、58 位～63 位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは 1 位のアミノ酸の欠失またはこれらの任意の組み合わせである、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

前記付加は、配列番号 4 の 61 位～142 位から選択される任意の連続する 1～82 個のアミノ酸配列の付加である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

前記付加は、フレキシブルなリンカー配列もしくはその反復配列、または LDL 受容体関連タンパク質 (LRP) の EGF 反復配列 (上皮増殖因子受容体様システインリッチドメイン) を含む配列の付加である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 6】

前記リンカー配列は、Gly-Gly-Ser、配列番号 15、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列である、請求項 5 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 8】

前記天然型 LOX-1 の活性は、変性 LDL の認識能である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 9】

タグ配列をさらに有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 10】

前記タグ配列は、配列番号 17、配列番号 18、または配列番号 19 である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 11】

標識をさらに含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 12】

(1) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、172 位および 189 位以外のアミノ酸位置で 1 または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型 LOX-1 の活性を示すアミノ酸配列；および

(3) 配列番号 7 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において 172 位および 189 位のアミノ酸配列は、配列番号 8 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 LOX-1 の活性を示す、アミノ酸配列；

からなる群より選択される配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 13】

前記置換は、保存的置換である、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記欠失は、配列番号 8 の 2 0 8 位～2 1 3 位までのいずれか 1～6 個のアミノ酸の欠失、1 4 0 位～1 4 5 位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは 1 位～8 2 位から選択される任意の連続する 1～8 2 個のアミノ酸配列の欠失である、またはこれらの任意の組み合わせである、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

前記天然型 L O X - 1 の活性は、変性 L O X - 1 の認識能である、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

タグ配列をさらに有する、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

前記タグ配列は、配列番号 1 7、配列番号 1 8、または配列番号 1 9 である、請求項 1 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8】

標識をさらに含む、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載のポリペプチドの二量体。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載のポリペプチドの多量体。

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含むポリペプチドがジスルフィド結合によって結合されている、二量体。

【請求項 2 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子であって、該核酸分子は、

(1) 配列番号 1 に示される核酸配列；および

(2) (1) の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列であって、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列において 9 0 位および 1 0 7 位のアミノ酸配列は、配列番号 2 における対応するアミノ酸を保持し、かつ L O X - 1 の活性を示す、核酸配列

からなる群より選択される配列を含む、核酸分子。

【請求項 2 3】

前記 L O X - 1 の活性は、変性 L D L の認識能である、請求項 2 2 に記載の核酸分子。

【請求項 2 4】

タグをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 2 2 に記載の核酸分子。

【請求項 2 5】

請求項 2 2 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 2 6】

請求項 2 2 に記載の核酸分子を含む、細胞。

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドを発現した細胞。

【請求項 2 8】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む、変性 L D L 検出剤。

【請求項 2 9】

請求項 1 に記載のポリペプチドおよび基材を含む、変性 L D L 検出用デバイス。

【請求項 3 0】

前記基材は、ビーズ、金粒子、プレート、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、金属薄膜、フィルター、チューブ、ダイヤモンド様炭素皮膜ステンレスである、請求項 2 9 に記載の検出用デバイス。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

前記ビーズは、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂、天然樹脂、プラスチック、ゼラチン、シリカゲル、金属、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、アガロース、ポリアミノ酸、セルロース、ハイドロキシアパタイト、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、セルロースアセテート、ポリメチルメタクリレート、セルロースジアセテート、メチレンビニルアルコールから作製されるビーズを含む、請求項 30 に記載の検出用デバイス。

【請求項 32】

被験体のサンプル中の変性 LDL を検出する方法であって、該方法は、

(A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 該サンプルと、以下：

(1) 請求項 1 に記載のポリペプチド；

(2) 請求項 12 に記載のポリペプチド；

(3) 請求項 19 もしくは 21 に記載の該ポリペプチドの二量体；

(4) 請求項 20 に記載の該ポリペプチドの多量体；

(5) 請求項 28 に記載の変性 LDL 検出剤；または

(6) 請求項 29 に記載の変性 LDL 検出用デバイス、

のうちのいずれかとを接触させて、該 C 型レクチン様ドメインポリペプチドと該変性 LDL との複合体を形成させる工程；および

(C) 該複合体を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 33】

前記サンプルは、LDL を含む体液である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 LDL を含む体液は、血液、血清、血漿、髄液、漿膜腔液、肺胞洗浄液である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記変性 LDL は、酸化 LDL、マロンジアルデヒド化 LDL、アセチル化 LDL、アクロレイン修飾 LDL、ノネナール修飾 LDL、サクシニル化 LDL、または糖化 LDL から選択される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

前記複合体を検出する工程は、光学的に検出する工程、物理的に検出する工程または化学的に検出する工程を包含する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

被験体のサンプル中の変性 LDL を検出する方法であって、該方法は、

(A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 該サンプル中の変性 LDL を標識する工程；

(C) 該サンプルと、請求項 27 に記載の細胞とを接触させる工程；および

(D) 該細胞中に取り込まれた、該サンプル中の変性 LDL を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 38】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む、変性 LDL 検出用キット。

【請求項 39】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む変性 LDL 検出剤と、該変性 LDL 検出剤と変性 LDL との複合体を検出するための手段と、を備える、変性 LDL 検出システム。

【請求項 40】

前記検出手段は、光学的検出手段、物理的検出手段または化学的検出手段を包含する、請求項 39 に記載のシステム。

【請求項 41】

前記光学的検出手段は、分光光度計、FACS、比色計、蛍光光度計、化学発光検出器、電気化学発光検出器、イメージアナライザー、または顕微鏡を包含する、請求項 40 に記

10

20

30

40

50

載のシステム。

【請求項 4 2】

前記物理的検出手段は、電気検出、表面プラズモン共鳴、水晶発振マイクロバランス、または熱測定を包含する、請求項 4 0 に記載のシステム。

【請求項 4 3】

前記化学的手段は、質量分析、または高速液体クロマトグラフィーを包含する、請求項 4 0 に記載のシステム。

【請求項 4 4】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む、動脈硬化診断剤。

【請求項 4 5】

変性 L D L によって引き起こされる疾患の診断を支援する方法であって、該方法は、

(A) 該疾患に罹患していると疑われる被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 該疾患に罹患していないコントロール被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(C) 該サンプルと、以下：

(1) 請求項 1 に記載のポリペプチド；

(2) 請求項 1 2 に記載のポリペプチド；

(3) 請求項 1 9 もしくは 2 1 に記載の該ポリペプチドの二量体；

(4) 請求項 2 0 に記載の該ポリペプチドの多量体；

(5) 請求項 2 8 に記載の変性 L D L 検出剤；または

(6) 請求項 2 9 に記載の変性 L D L 検出用デバイス；または

(7) 請求項 4 4 に記載の動脈硬化診断剤、

のうちのいずれかとを接触させて、該 C 型レクチン様ドメインポリペプチドと該変性 L D L との複合体を形成させる工程；および

(D) 該複合体を検出する工程、

(E) 該被験体から単離されたサンプル中の複合体の量と、該コントロール被験体から単離されたサンプル中の複合体の量とを比較して、該被験体中の変性 L D L の該コントロール被験体に対する相対値を算出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 4 6】

前記変性 L D L により引き起こされる疾患は、前記変性 L D L により引き起こされる疾患は、動脈硬化症、虚血性心疾患、脳血管障害、大動脈瘤、腎梗塞、および高脂血症からなる群より選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記虚血性心疾患は、心筋梗塞、または狭心症を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記脳血管障害は、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、または一過性脳虚血発作を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

請求項 1 に記載のポリペプチドの、変性 L D L により引き起こされる疾患の診断のための医薬の製造のための使用。

【請求項 5 0】

後期糖化反応生成物レセプター (R A G E) ポリペプチドであって、該ポリペプチドは、

(1) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、9 2 位および 9 5 位以外のアミノ酸位置で 1 または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型 R A G E の活性を示すアミノ酸配列；および

(3) 配列番号 1 1 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードさ

10

20

30

40

50

れるアミノ酸配列において 92 位および 95 位のアミノ酸配列は、配列番号 12 における対応するアミノ酸を保持している、アミノ酸配列；  
 からなる群より選択される配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 51】

前記置換は、保存的置換である、請求項 50 に記載のポリペプチド。

【請求項 52】

前記欠失は、配列番号 12 の 1 位～15 位である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 53】

前記付加は、配列番号 10 の 1 位～22 位から選択される任意の 1～22 個のアミノ酸配列の N 末端側への付加、配列番号 10 の 121 位～404 位から選択される任意の連続する 1～283 個のアミノ酸の付加、あるいはフレキシブルなリンカー配列もしくはその反復配列、または LDL 受容体関連タンパク質 (LRP) の EGF 反復配列 (上皮増殖因子受容体様システインリッチドメインを含む配列の付加である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 54】

前記リンカー配列は、Gly-Gly-Ser、配列番号 15、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列である、請求項 53 に記載のポリペプチド。

【請求項 55】

前記天然型 RAGE の活性は、AGE の認識能である、請求項 50 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 56】

タグ配列をさらに有する、請求項 50 に記載のポリペプチド。

【請求項 57】

前記タグ配列は、配列番号 17、配列番号 18、または配列番号 19 である、請求項 56 に記載のポリペプチド。

【請求項 58】

(1) 配列番号 14 に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号 14 に示されるアミノ酸配列において、92 位、95 位、206 位および 250 位以外のアミノ酸位置で 1 または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型 RAGE の活性を示すアミノ酸配列；および

30

(3) 配列番号 13 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において 92 位、95 位、206 位および 250 位のアミノ酸配列は、配列番号 14 における対応するアミノ酸を保持している、アミノ酸配列、  
 からなる群より選択される配列を含む、請求項 50 に記載のポリペプチド。

【請求項 59】

前記天然型 RAGE の活性は、AGE の認識能である、請求項 58 に記載のポリペプチド。

【請求項 60】

タグ配列をさらに有する、請求項 58 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 61】

前記タグ配列は、配列番号 17、配列番号 18、または配列番号 19 である、請求項 60 に記載のポリペプチド。

【請求項 62】

請求項 50 に記載の後期糖化反応生成物レセプター (RAGE) ポリペプチドをコードする核酸分子であって、該核酸分子は、

(1) 配列番号 11 に示される核酸配列；および

(2) (1) の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列であって、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列において 92 位および 95 位のアミノ酸配列は、配列番号 12 における対応するアミノ酸を保持し、かつ

50

天然型 R A G E の活性を示す、核酸配列；  
 からなる群より選択される配列を含む、核酸分子。

【請求項 6 3】

前記天然型 R A G E の活性は、A G E の認識能である、請求項 6 2 に記載の核酸分子。

【請求項 6 4】

タグをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 6 2 に記載の核酸分子。

【請求項 6 5】

請求項 6 2 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 6 6】

請求項 6 2 に記載の核酸分子を含む、細胞。

10

【請求項 6 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドを発現した細胞。

【請求項 6 8】

請求項 5 0 に記載のポリペプチドを含む、後期糖化反応生成物（A G E）検出剤。

【請求項 6 9】

請求項 5 0 に記載のポリペプチドおよび基材を含む、A G E 検出用デバイス。

【請求項 7 0】

前記基材は、ビーズ、金粒子、プレート、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、金属薄膜、フィルター、チューブ、ダイヤモンド様炭素皮膜ステンレスを含む、請求項 6 9 に記載の検出用デバイス。

20

【請求項 7 1】

前記ビーズは、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂、天然樹脂、プラスチック、ゼラチン、シリカゲル、金属、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、アガロース、ポリアミノ酸、セルロース、ハイドロキシアパタイト、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、セルロースアセテート、ポリメチルメタクリレート、セルロースジアセテート、メチレンビニルアルコールから作製されるビーズを含む、請求項 7 0 に記載の検出用デバイス。

【請求項 7 2】

A G E を検出する方法であって、該方法は、

（A）被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

30

（B）該サンプルと、以下：

（1）請求項 5 0 に記載のポリペプチド；

（2）請求項 5 8 に記載のポリペプチド；

（3）請求項 6 8 に記載の A G E 検出剤；または

（4）請求項 6 9 に記載の A G E 検出用デバイス、

のうちのいずれかとを接触させて、該ポリペプチドと該 A G E との複合体を形成させる工程；および

（C）該複合体を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 7 3】

40

前記サンプルは、タンパク質を含む体液である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記タンパク質を含む体液は、血液、血清、血漿、髄液、漿膜腔液、関節液、肺胞洗浄液、涙液または尿を含む体液である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記 A G E は糖化タンパク質である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記複合体を検出する工程は、光学的に検出する工程、物理的に検出する工程または化学的に検出する工程を包含する、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 7】

50

被験体のサンプル中の A G E を検出する方法であって、該方法は、

- (A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；
- (B) 該サンプル中の A G E を標識する工程；
- (C) 該サンプルと、請求項 6 7 に記載の細胞とを接触させる工程；および
- (D) 該細胞中に取り込まれた、該サンプル中の A G E を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 7 8】

請求項 5 0 に記載のポリペプチドを含む、A G E 検出用キット。

【請求項 7 9】

請求項 5 0 に記載のポリペプチドを含む A G E 検出剤と該 A G E 検出剤と A G E との複合体を検出するための手段とを備える、A G E 検出システム。 10

【請求項 8 0】

前記検出手段は、光学的検出手段、物理的検出手段または化学的検出手段を包含する、請求項 7 9 に記載のシステム。

【請求項 8 1】

前記光学的検出手段は、分光光度計、F A C S、比色計、蛍光光度計、化学発光検出器、電気化学発光検出器、イメージアナライザー、または顕微鏡を包含する、請求項 8 0 に記載のシステム。

【請求項 8 2】

前記物理的検出手段は、電気検出、表面プラズモン共鳴、水晶発振マイクロバランス、または熱測定を包含する、請求項 8 0 に記載のシステム。 20

【請求項 8 3】

前記化学的手段は、質量分析、または高速液体クロマトグラフィーを包含する、請求項 8 0 に記載のシステム。

【請求項 8 4】

請求項 5 0 に記載のポリペプチドを含む、糖尿病性血管障害診断剤。

【請求項 8 5】

A G E により引き起こされる疾患の診断を支援する方法であって、該方法は、

(A) 糖尿病性血管障害に罹患していると疑われる被験体から単離されたサンプルを提供する工程； 30

(B) 糖尿病性血管障害に罹患していないコントロール被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(C) 該サンプルと、以下：

- (1) 請求項 5 0 に記載のポリペプチド；
- (2) 請求項 5 8 に記載のポリペプチド；
- (3) 請求項 6 8 に記載の A G E 検出剤；
- (4) 請求項 6 9 に記載の A G E 検出用デバイス；または
- (5) 請求項 8 4 に記載の糖尿病性血管障害診断剤、

のうちのいずれかとを接触させて、該 R A G E 様ポリペプチドと該 A G E との複合体を形成させる工程；および 40

(D) 該複合体を検出する工程、

(E) 該被験体から単離されたサンプル中の複合体の量と、該コントロール被験体から単離されたサンプル中の複合体の量とを比較して、該被験体中の A G E の該コントロール被験体に対する相対値を算出する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 8 6】

前記 A G E により引き起こされる疾患は、糖尿病、糖尿病性血管障害、細小血管症、および大血管障害からなる群より選択される、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記細小血管症は、腎症、網膜症、または神経症を含む、請求項 8 6 に記載の方法。 50



## 【請求項 88】

前記大血管障害は、虚血性心疾患、脳血管疾患、または閉塞性動脈硬化症を含む、請求項 86 に記載の方法。

## 【請求項 89】

請求項 50 に記載のタンパク質の、AGE により引き起こされる疾患の診断剤の製造のための使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、LOX-1 変異体および RAGE 変異体、ならびにこれらを用いて生活習慣病危険因子を検出する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

レクチン様酸化低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体 1 (Lectin-like Oxidized LDL receptor: 本明細書中以降、LOX-1 ともいう) は、アテローム発生の原因となる酸化 LDL (本明細書中以降、OxLDL ともいう) のような変性 LDL に対する特有のスカベンジャー受容体であり、1997 年に、培養ウシ大動脈内皮細胞において初めて同定された。LOX-1 は、他のスカベンジャー受容体と機能的には類似しているにもかかわらず、構造的には異なる独特の構造を有している。

## 【0003】

ウシ LOX-1 (bLOX-1) は、C 型レクチンファミリーに属する 273 アミノ酸残基からなる分子量約 50 kDa の糖タンパク質であり、N 末端が細胞質内にあり、C 末端が細胞外に出ている細胞膜 1 回貫通型の II 型膜タンパク質である。ヒト LOX-1 (hLOX-1) はまた、C 型レクチンファミリーに属する 273 アミノ酸残基からなる約 30 kDa (139 位および 183 位の糖鎖付加により、分子量約 40 kDa) の II 型膜タンパク質である。この受容体は、構造的には、以下の 4 つのドメインからなる: N 末端側の細胞質ドメイン、疎水性膜貫通ドメイン、ネックドメイン、および C 型レクチン様ドメイン (本明細書中以降、CTLD という)。この CTLD は、種間で、特に、6 個のシステイン残基の位置で高度に保存されており、LOX-1 のリガンドを認識するための機能的ドメインである。この CTLD 中の 6 個のシステイン残基は、hLOX-1 の分子内ジスルフィド結合に関与している。この保存された CTLD に加えて、hLOX-1 および他の既知の種におけるネックドメインは、高い配列同一性を有している。また、Xie ら (非特許文献 1: Protein Expression and Purification 32: 68-74 (2003)) によれば、CTLD が変性 LDL を結合するのに十分な最小ドメインであり、たとえ CTLD がグリコシル化されていなくても、変性 LDL を認識および結合できることが明らかにされた。

## 【0004】

これまでの研究により、LOX-1 は、血管内皮細胞のみならず、マクロファージおよび活性化血管平滑筋細胞において発現されており、構造的に関連性のない種々の高分子 (変性 LDL、細菌、老化赤血球、アポトーシスを受けた細胞、および血小板があげられる) を認識し、生体防御機構や炎症性機転などの種々の生命現象において重要な役割を果たしていること、そしてその発現は種々の条件下で、高脂血症、糖尿病、高血糖、高血圧症、高血圧性腎硬化症、動脈硬化、虚血再灌流傷害、血管バルーン傷害後のような病態; ならびに酸化 LDL、アンジオテンシン II、エンドセリン、TNF- $\alpha$ 、後期糖化反応生成物 (AGE)、TGF- $\beta$ 、8-イソプロスタグランジン F<sub>2 $\alpha$</sub> 、ズリ応力のような刺激によって、調節されていることが分かっている (非特許文献 2: Folia Pharmacol. Jpn. 127, 103-107 (2006))。

## 【0005】

変性 LDL 測定に関しては、疾病の早期診断、機能性食品の予防効果評価、生活改善や投薬による治療効果の評価など様々な分野での活用が期待されている。これまで、ヒト血

10

20

30

40

50

漿中の動脈硬化危険因子である変性LDLの測定には、モノクローナル抗体が用いられてきたが、特に変性LDLは分子の修飾構造は一定ではなく、意味のある分子種が明確でないなどの理由で、モノクローナル抗体による検出にも問題が多い。

#### 【0006】

後期糖化反応生成物 (Advanced Glycation End Products : 本明細書中以降、AGEという) は、糖尿病患者の生活の質を損ねる元凶である血管合併症として知られる糖尿病性血管障害の発症・進展に関与している。血管合併症による眼、神経、腎臓の障害は、それぞれ糖尿病網膜症、神経症、腎症 (あわせて三大合併症) とよばれており、糖尿病患者に特徴的な病態である。

#### 【0007】

AGEを認識する受容体 (Receptor for AGE : 本明細書中以降、RAGEという) は、1992年に、ウシ肺から同定され、AGEと結合するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する、分子量約35kDaのI型膜タンパク質 (糖鎖修飾を受けた完全なRAGEは、分子量55kDa) である。RAGEの細胞外ドメインは、1つのV型イムノグロブリンドメイン、続いて、2つのC型イムノグロブリンドメイン (C1領域およびC2領域) の3つのイムノグロブリンフォールド構造を取るドメインが結合した構造を取っている。RAGEはまた、細胞膜1回貫通型のドメインおよび43アミノ酸の細胞内ドメインを含む。RAGEは、多様なクラスのリガンド (AGE、S100/カルグラニユリン (calgranulin)、アンホテリンおよびアミロイドβペプチド (およびβ-シート原線維のクラス)) と相互作用する。Vドメインは、リガンド結

10

20

#### 【0008】

RAGEは、正常組織および血管系においては低レベルでしか発現されない。しかし、この受容体は、そのリガンドが蓄積した場所においてアップレギュレートされる。例えば、糖尿病患者の血管では、RAGEの代表的リガンドとしては、以下のAGE構造体が挙げられる : (カルボキシメチル) リジン-タンパク質付加物 (インビボで存在する主なAGE)、カルボキシエチル-リジン (CEL) タンパク質付加物、ペントシジン-付加物 (コラーゲンおよび基底膜の不安定化に関連した糖尿病組織において見いだされる主要なAGE架橋物質)、ピラリン、イミダゾロン、メチルグリオキサール (他の範囲のAGEの形成の前駆体)、クロスリン、フルオロリンク、プロピリジン、アルグピリミジン、ベスパーリジン、グリオキサール誘導リジンダイマー、デオキシグルコサミン誘導リジンダイマーなど。RAGEの発現は、糖尿病血管系において内皮細胞、平滑筋細胞、および浸潤性単核食細胞で増加している。AGE-RAGE相互作用は、血管系ホメオスタシスにおいて重要な細胞の特性を変化させる。例えば、RAGEがAGEと結合した後、内皮細胞は、VCAM-1、組織因子、およびIL-6の発現、ならびに高分子へのそれらの透過性を増加させる。単核食細胞において、RAGEは、サイトカインおよび増殖因子の発現を活性化し、可溶性AGEに応じて細胞移動を誘導するのに対して、走触性は、固定リガンドで起こる (非特許文献4 : J. Clin. Invest. 108 : 949-955 (2001)) 。

30

40

#### 【0009】

これまでに、変性LDLを検出するために、抗酸化ホスファチジルコリンモノクローナル抗体および抗ヒトアポリポプロテインB抗体などが、そしてAGEを検出するために抗AGEモノクローナル抗体および抗ペントシジンモノクローナル抗体、AGE構造体を加水分解後のHPLCなどが用いられてきた。

#### 【0010】

また、LOX-1およびRAGEの細胞外領域には、血液中などに存在する特異性の高いプロテアーゼの認識部位は存在せず、切断をうけることはないと予想されてきた。しかし、実際、LOX-1の細胞外領域は、過剰量のトロンビンなどによって分解が起こり、

50

RAGEの細胞外領域（sRAGE1という）は、過剰量のトロンビン、第Xa因子などによって切断が起こることを発明者らは初めて明らかにした。これらのプロテアーゼによる分解は、LOX-1およびRAGEを変性LDL/AGE検出アッセイなどにおいて活用する際に大きな問題となる。

#### 【0011】

また、変性LDLおよびAGEは分子の修飾構造が一定ではなく、バイオマーカーとして意味のある分子種が明確でないために、モノクローナル抗体、HPLCなどによる定量的検出にも問題が多い。LOX-1は、それぞれ、幅広い分子種の変性LDLおよびAGEを認識可能な曖昧さがありながら、変性を受けたLDLには鋭敏に反応する可能性が高い。そしてRAGEは幅広い分子種のAGEを認識可能なマルチリガンドレセプターであり、生体内のAGEを鋭敏に検出する可能性が高い。

【非特許文献1】Protein Expression and Purification 32:68-74 (2003)

【非特許文献2】Folia Pharmacol. Jpn. 127, 103-107 (2006)

【非特許文献3】Circ Res. 2003;93:1159-1169

【非特許文献4】J. Clin. Invest. 108:949-955 (2001)

【特許文献1】特開2002-320489

【特許文献2】特開2002-181820

【特許文献3】特開2003-36499

【特許文献4】特開2003-238404

【特許文献5】特開2003-125786

【特許文献6】特開2002-17353

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0012】

抗体に代わる、幅広い分子種の変性LDLおよびAGEを特異的に認識するペプチドを得ることが望まれる。

【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

そこで本発明者らは、鋭意工夫した結果、認識能に影響を与えずにプロテアーゼ耐性を増したLOX-1およびRAGEの変異体を開発することに成功した。

#### 【0014】

従って、本発明はまた、LOX-1およびRAGEの変異体を使用して変性LDLおよびAGEを検出する方法を提供する。

#### 【0015】

一局面において、本発明は、以下を含み得るC型レクチン様ドメインポリペプチドを提供し得る：

(1) 配列番号2に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、90位および107位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示す、アミノ酸配列；または

(3) 配列番号1に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸配列は、配列番号2における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示す、アミノ酸配列。

#### 【0016】

一実施形態において、上記置換は、保存的置換であり得る。

#### 【0017】

一実施形態において、上記欠失は、配列番号2の126位～131位までのいずれか1

10

20

30

40

50

～6個のアミノ酸の欠失、58位～63位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは1位のアミノ酸の欠失またはこれらの任意の組み合わせであり得る。

【0018】

一実施形態において、上記欠失は、配列番号2の126位～131位までのいずれか1～6個のアミノ酸の欠失、58位～63位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは1位のアミノ酸の欠失またはこれらの任意の組み合わせであり得る。

【0019】

一実施形態において、上記付加は、配列番号4の61位～142位から選択される任意の連続する1～82個のアミノ酸配列の付加であり得る。さらに、上記付加は、フレキシブルなリンカー配列もしくはその反復配列、またはLDL受容体関連タンパク質(LRP)のEGF反復配列(上皮増殖因子受容体様システインリッチドメイン)を含む配列の付加であり得る。

【0020】

さらなる実施形態において、上記リンカー配列は、Gly-Gly-Ser、配列番号15、配列番号16に示されるアミノ酸配列であり得る。

【0021】

別の実施形態において、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドは、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるか、またはこのアミノ酸配列を含み得る。

【0022】

上記の実施形態において、天然型LOX-1の活性としては、例えば、変性LDLの認識能が挙げられるが、これに限定されない。

【0023】

さらなる実施形態において、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドは、タグ配列をさらに有し得る。

【0024】

好ましい実施形態において、上記のタグ配列としては、配列番号17、配列番号18、または配列番号19が挙げられるが、これらに限定されない。

【0025】

さらに別の実施形態において、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドは、標識をさらに含み得る。

【0026】

一実施形態において、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドは、

(1) 配列番号8に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、172位および189位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型LOX-1の活性を示すアミノ酸配列；または

(3) 配列番号7に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において172位および189位のアミノ酸配列は、配列番号8における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示す、アミノ酸配列；

【0027】

さらなる実施形態において、上記置換は、保存的置換であり得る。

【0028】

また、さらなる実施形態において、上記欠失は、配列番号8の208位～213位までのいずれか1～6個のアミノ酸の欠失、140位～145位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは1位～82位から選択される任意の連続する1～82個のアミノ酸配列の欠失である、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。

【0029】

上記の実施形態において、天然型LOX-1の活性としては、変性LOX-1の認識能

10

20

30

40

50

が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

一実施形態において、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドは、タグ配列をさらに有し得る。

【0031】

好ましい実施形態において、上記タグ配列としては、配列番号17、配列番号18、または配列番号19が挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

一実施形態において、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドは、標識をさらに含み得る。

【0033】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドの二量体および／または多量体および／またはジスルフィド結合によって結合されている二量体を提供し得る。

【0034】

一局面において、本発明は、C型レクチン様ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を提供しうる。ここで上記核酸分子は、

(1) 配列番号1に示される核酸配列；または

(2) (1)の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列であって、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸配列は、配列番号2における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示す、核酸配列を含み得る。

【0035】

一実施形態において、天然型LOX-1の活性としては、変性LDLの認識能が挙げられるが、これらに限定されない。

【0036】

一実施形態において、本発明の核酸分子は、タグをコードする核酸配列をさらに含み得る。

【0037】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクター、上記核酸分子を含む細胞、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドを発現した細胞を提供し得る。

【0038】

また、別の一局において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドを含む変性LDL検出剤を提供しうる。

【0039】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドおよび基材を含む変性LDL検出用デバイスを提供しうる。

【0040】

好ましい実施形態において、上記基材としては、ビーズ、金粒子、プレート、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、金属薄膜、フィルター、チューブ、ダイヤモンド様炭素被膜ステンレスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

さらに好ましい実施形態において、上記ビーズは、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂、天然樹脂、プラスチック、ゼラチン、シリカゲル、金属、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、アガロース、ポリアミノ酸、セルロース、ハイドロキシアパタイト、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、セルロースアセテート、ポリメチルメタクリレート、セルロースジアセテート、メチレンビニルアルコールから作製され得るが、使用される系に適合する限り、これらビー

10

20

30

40

50

ズはどのような材料から作られていてもよい。

【0042】

一局面において、本発明は、被験体のサンプル中の変性LDLを検出する方法を提供し得る。ここでこの方法は、

(A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 上記サンプルと、以下：

(1) 本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチド；

(2) 本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドの二量体もしくは多量体；

(3) 本発明の変性LDL検出剤；または

(4) 本発明の変性LDL検出用デバイス、

のうちのいずれかとを接触させて、上記C型レクチン様ドメインポリペプチドと上記変性LDLとの複合体を形成させる工程；および

(C) 上記複合体を検出する工程、  
を包含し得る。

【0043】

一実施形態において、上記サンプルは、LDLを含む体液であり得る。好ましい実施形態において、上記LDLを含む体液としては、血液、血清、血漿、髄液、漿膜腔液、肺胞洗浄液が挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

別の実施形態において、上記変性LDLとしては、酸化LDL、マロンジアルデヒド化LDL、アセチル化LDL、アクロレイン修飾LDL、ノネナール修飾LDL、サクシニル化LDL、または糖化LDLが挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

一実施形態において、上記複合体を検出する工程は、光学的に検出する工程、物理的に検出する工程または化学的に検出する工程を包含し得る。

【0046】

一局面において、本発明は、被験体のサンプル中の変性LDLを検出する方法を提供し得る。ここでこの方法は、

(A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 上記サンプル中の変性LDLを標識する工程；

(B) 上記サンプルと、本発明の細胞とを接触させる工程；および

(C) 上記細胞中に取り込まれた、上記サンプル中の変性LDLを検出する工程、  
を包含し得る。

【0047】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドを含む変性LDL検出用キットを提供し得る。

【0048】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドを含む変性LDL検出剤と、上記変性LDL検出剤と変性LDLとの複合体を検出するための手段と、を備える、変性LDL検出システムを提供しうる。

【0049】

一実施形態において、上記検出手段は、光学的検出手段、物理的検出手段または化学的検出手段を包含し得る。

【0050】

好ましい実施形態において、上記光学的検出手段としては、分光光度計、蛍光発色セルソーター(FACS)、比色計、蛍光光度計、化学発光検出器、電気化学発光検出器、イメージアナライザー、または顕微鏡が挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】

別の好ましい実施形態において、上記物理的検出手段としては、電気検出、表面プラズモン共鳴、水晶発振マイクロバランス、または熱測定が挙げられるが、これらに限定され

10

20

30

40

50

ない。

【0052】

さらに別の好ましい実施形態において、上記化学的手段としては、質量分析、または高速液体クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドを含む動脈硬化診断剤を提供し得る。

【0054】

一局面において、本発明は、変性LDLによって引き起こされる疾患の診断を支援する方法を提供し得る。ここでこの方法は、

(A) 上記疾患に罹患していると疑われる被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 上記疾患に罹患していないコントロール被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(C) 上記サンプルと、以下：

(1) 本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチド；

(2) 本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドの二量体もしくは多量体；

(3) 本発明の変性LDL検出剤；

(4) 本発明の変性LDL検出用デバイス；または

(5) 本発明の動脈硬化診断剤、

のうちのいずれかとを接触させて、上記C型レクチン様ドメインポリペプチドと上記変性LDLとの複合体を形成させる工程；および

(D) 上記複合体を検出する工程、

(E) 上記被験体から単離されたサンプル中の複合体の量と、上記コントロール被験体から単離されたサンプル中の複合体の量とを比較して、上記被験体中の変性LDLの上記コントロール被験体に対する相対値を算出する工程、を包含し得る。

【0055】

一実施形態において、上記変性LDLにより引き起こされる疾患としては、動脈硬化症、虚血性心疾患、脳血管障害、大動脈瘤、腎梗塞、または高脂血症が挙げられるが、これらに限定されない。虚血性心疾患としては、心筋梗塞、または狭心症が挙げられる。脳血管障害としては、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、または一過性脳虚血発作が挙げられる。

【0056】

一局面において、本発明は、本発明のC型レクチン様ドメインポリペプチドの、変性LDLにより引き起こされる疾患の診断のための医薬の製造のための使用を提供し得る。

【0057】

一局面において、本発明は、後期糖化反応生成物レセプター(RAGE)ポリペプチドを提供し得る。ここで上記ポリペプチドは、

(1) 配列番号12に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号12に示されるアミノ酸配列において、92位および95位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型RAGEの活性を示すアミノ酸配列；または

(3) 配列番号11に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において92位および95位のアミノ酸配列は、配列番号12における対応するアミノ酸を保持している、アミノ酸配列；を含む得る。

【0058】

一実施形態において、上記置換は、保存的置換であり得る。

## 【0059】

別の実施形態において、上記欠失は、配列番号12の1位～15位の欠失であり得る。

## 【0060】

なお別の実施形態において、上記付加は、配列番号10の1位～22位から選択される任意の1～22個のアミノ酸配列のN末端側への付加、配列番号10の121位～404位から選択される任意の連続する1～283個のアミノ酸の付加、あるいはフレキシブルなリンカー配列もしくはその反復配列、またはLDL受容体関連タンパク質(LRP)のEGF反復配列(上皮増殖因子受容体様システインリッチドメインを含む配列の付加であり得る。

## 【0061】

さらなる実施形態において、上記リンカー配列は、Gly-Gly-Ser、配列番号15、配列番号16に示されるアミノ酸配列であり得る。

## 【0062】

上記の実施形態において、天然型RAGEの活性としては、AGEの認識能が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0063】

好ましい実施形態において、本発明のRAGE様ポリペプチドー界面活性剤結合複合体は、タグ配列をさらに有し得る。

## 【0064】

好ましい実施形態において、上記タグ配列としては、配列番号17、配列番号18、または配列番号19が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0065】

一実施形態において、本発明のRAGE様ポリペプチドは、

(1) 配列番号14に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号14に示されるアミノ酸配列において、92位、95位、206位および250位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型RAGEの活性を示すアミノ酸配列；または

(3) 配列番号13に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において92位、95位、206位および250位のアミノ酸配列は、配列番号14における対応するアミノ酸を保持している、アミノ酸配列、を含み得る。

## 【0066】

上記の実施形態において、天然型RAGEの活性としては、AGEの認識能が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0067】

さらに好ましい実施形態において、本発明のRAGE様ポリペプチドは、タグ配列をさらに有し得る。

## 【0068】

なお好ましい実施形態において、上記タグ配列としては、配列番号17、配列番号18、または配列番号19が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0069】

一局面において、本発明は、本発明の後期糖化反応生成物レセプター(RAGE)様ポリペプチドをコードする核酸分子を提供し得る。ここで上記核酸分子は、

(1) 配列番号11に示される核酸配列；または

(2) (1)の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列であって、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列において92位および95位のアミノ酸配列は、配列番号12における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型RAGEの活性を示す、核酸配列；

を含み得る。

10

20

30

40

50



## 【0070】

上記の実施形態において、天然型 R A G E の活性としては、A G E の認識能が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0071】

一実施形態において、上記核酸分子は、タグをコードする核酸配列をさらに含み得る。

## 【0072】

一局面において、本発明は、本発明の R A G E 様ポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクター、上記核酸分子を含む細胞、または本発明の R A G E 様ポリペプチドを発現した細胞を提供し得る。

## 【0073】

一局面において、本発明は、本発明の R A G E 様ポリペプチドを含む後期糖化反応生成物 (A G E) 検出剤を提供し得る。

## 【0074】

一局面において、本発明は、本発明の R A G E 様ポリペプチドおよび基材を含む A G E 検出用デバイスを提供し得る。

## 【0075】

好ましい実施形態において、上記基材としては、ビーズ、金粒子、プレート、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、金属薄膜、フィルター、チューブ、ダイヤモンド様炭素被膜ステンレスが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0076】

さらに好ましい実施形態において、上記ビーズは、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂、天然樹脂、プラスチック、ゼラチン、シリカゲル、金属、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、アガロース、ポリアミノ酸、セルロース、ハイドロキシアパタイト、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、セルロースアセテート、ポリメチルメタクリレート、セルロースジアセテート、メチレンビニルアルコールから作製され得るが、使用される系に適合する限り、これらビーズはどのような材料から作られていてもよい。

## 【0077】

一局面において、本発明は、A G E を検出する方法を提供しうる。ここで上記方法は、  
(A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 上記サンプルと、以下：

(1) 本発明の R A G E 様ポリペプチド；

(2) 本発明の A G E 検出剤；または

(3) 本発明の A G E 検出用デバイス、

のうちのいずれかとを接触させて、上記ポリペプチドと上記 A G E との複合体を形成させる工程；および

(C) 上記複合体を検出する工程、  
を包含し得る。

## 【0078】

一実施形態において、上記サンプルは、タンパク質を含む体液であり得る。好ましい実施形態において、上記タンパク質を含む体液としては、血液、血清、血漿、髄液、漿膜腔液、関節液、肺胞洗浄液、涙液または尿を含む体液が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0079】

別の実施形態において、上記 A G E は、糖化タンパク質であり得る。

## 【0080】

一実施形態において、上記複合体を検出する工程は、光学的に検出する工程、物理的に検出する工程または化学的に検出する工程を包含し得る。

## 【0081】

一局面において、本発明は、被験体のサンプル中の A G E を検出する方法を提供し得る

10

20

30

40

50

。ここで上記方法は、

(A) 被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 上記サンプル中の A G E を標識する工程；

(C) 上記サンプルと、本発明の R A G E 様ポリペプチドを発現した細胞とを接触させる工程；および

(D) 上記細胞中に取り込まれた、上記サンプル中の A G E を検出する工程、を包含し得る。

【0082】

一局面において、本発明は、R A G E 様ポリペプチドを含む A G E 検出用キットを提供し得る。

【0083】

別の一局において、本発明は、本発明の R A G E 様ポリペプチドを含む A G E 検出剤と上記 A G E 検出剤と A G E との複合体を検出するための手段とを備える、A G E 検出システムを提供し得る。

【0084】

一実施形態において、上記検出手段は、光学的検出手段、物理的検出手段または化学的検出手段を包含し得る。

【0085】

好ましい実施形態において、上記光学的検出手段としては、分光光度計、F A C S、比色計、蛍光光度計、化学発光検出器、電気化学発光検出器、イメージアナライザー、または顕微鏡が挙げられるが、これらに限定されない。

【0086】

別の好ましい実施形態において、上記物理的検出手段としては、電気検出、表面プラズモン共鳴、水晶発振マイクロバランス、または熱測定を包含し得る。

【0087】

さらに別の好ましい実施形態において、上記化学的手段は、質量分析、または高速液体クロマトグラフィーを包含し得るが、これらに限定されない。

【0088】

一局面において、本発明は、本発明の R A G E 様ポリペプチドを含む、糖尿病性血管障害診断剤を提供し得る。

【0089】

一局面において、本発明は、A G E により引き起こされる疾患の診断を支援する方法を提供し得る。ここで上記方法は、

(A) 糖尿病性血管障害に罹患していると疑われる被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(B) 糖尿病性血管障害に罹患していないコントロール被験体から単離されたサンプルを提供する工程；

(C) 上記サンプルと、以下：

(1) 本発明の R A G E 様ポリペプチド；

(2) 本発明の A G E 検出剤；

(3) 本発明の A G E 検出用デバイス；または

(4) 本発明の糖尿病性血管障害診断剤、

のうちのいずれかとを接触させて、上記 R A G E 様ポリペプチドと上記 A G E との複合体を形成させる工程；および

(D) 上記複合体を検出する工程、

(E) 上記被験体から単離されたサンプル中の複合体の量と、上記コントロール被験体から単離されたサンプル中の複合体の量とを比較して、上記被験体中の A G E の上記コントロール被験体に対する相対値を算出する工程、を包含し得る。

【0090】

一実施形態において、上記AGEにより引き起こされる疾患としては、糖尿病、糖尿病性血管障害、細小血管症、または大血管障害が挙げられるが、これらに限定されない。細小血管症としては、腎症、網膜症、または神経症が挙げられる。大血管障害としては、虚血性心疾患、脳血管疾患、または閉塞性動脈硬化症が挙げられる。

#### 【0091】

一局面において、本発明は、本発明のRAGE様ポリペプチドの、AGEにより引き起こされる疾患の診断剤の製造のための使用を提供し得る。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0092】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

#### 【0093】

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列举する。

#### 【0094】

本明細書において使用される場合、用語「受容体」とは、1個以上のリガンドと可逆的、かつ特異的に複合体化する1個以上の結合ドメインを備える生物学的な構造であって、ここで、この複合体化は生物学的な構造を有する。受容体は、完全に細胞の外部（細胞外の受容体）、細胞膜の中（しかし、受容体の部分を細胞外部の環境および細胞質ゾルに向けている）、または完全に細胞の中（細胞内の受容体）に存在し得る。これらはまた、細胞と独立的に機能し得る。細胞膜中の受容体は、細胞を、その境界の外部の空間と連絡（例えば、シグナル伝達）させ、そして細胞の内側および外側への分子およびイオンの輸送において機能させることを可能とする。本明細書において使用する場合、受容体は、受容体全長であっても、受容体のフラグメントであってもよい。

#### 【0095】

本明細書において使用される場合、用語「レクチン様酸化低密度リポタンパク質（LDL）受容体1（Lectin-like Oxidized LDL receptor）」とは、LOX-1ともいわれ、（1）配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（2）上記配列番号4に示されるアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸の置換、付加および／または欠失を含むアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；（3）上記配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；（4）上記配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相  
同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；（5）配列番号3に示される核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（6）上記配列番号3に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；（7）上記配列番号3に示される核酸配列において1または数個のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；（8）上記配列番号3に示される核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；および（9）上記配列番号3に示される核酸配列と少なくとも80

%の配列相同性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型 L O X - 1 の活性を示すポリペプチド、のうちの1つである。

#### 【0096】

また、本明細書において使用される場合、「L O X - 1」をコードする核酸分子とは、  
(1) 配列番号3に示される核酸配列を含む核酸分子；(2) 上記配列番号3に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；(3) 上記配列番号3に示される核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸分子；(4) 上記配列番号3によって示される核酸配列と少なくとも80%の相同性を有する核酸分子；および(5) 配列番号3に示される核酸配列において1または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸分子、のうちの1つである。上記の同一性または相同性は、配列分析用ツールであるBLAST (NCBIのBLAST 2.2.9 (2004.5.12 発行))を用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。ストリンジェントな条件は配列に依存して変化し、このような条件の決定は、当業者の技術範囲内である。また、L O X - 1としては、ヒトL O X - 1 (h L O X - 1ともいう)、ウシL O X - 1 (b L O X - 1ともいう)、ブタL O X - 1、マウスL O X - 1、ウサギL O X - 1のような哺乳動物のL O X - 1が挙げられるが、これらに限定されない。b L O X - 1は、C型レクチンファミリーに属する273アミノ酸残基からなる分子量約50 kDaの糖タンパク質であり、N末端が細胞質内にあり、C末端が細胞外に出ている細胞膜1回貫通型のII型膜タンパク質である。h L O X - 1はまた、C型レクチンファミリーに属する273アミノ酸残基からなる約30 kDaのII型膜タンパク質である。L O X - 1は、構造的には、以下の4つのドメインからなる：N末端側の細胞質ドメイン、疎水性膜貫通ドメイン、ネックドメイン、およびC型レクチン様ドメイン。本明細書において使用される場合、用語「C型レクチン様ドメイン」とは、CTLDともいい、C型レクチンファミリーに属するメンバーの糖鎖認識部位と相同性を有する。CTLDは、このメンバー間で、種間で非常によく保存されており、6個のシステイン残基の位置は、完全に保存されている。また、CTLDは、L O X - 1のリガンドを認識するための機能的ドメインであり、この中の6個のシステイン残基は、h L O X - 1の3カ所の分子内ジスルフィド結合に関与している。従って、本発明の変異L O X - 1は、配列番号4のアミノ酸配列において、144位、155位、172位、243位、256位、264位におけるシステインが保持されていることが好ましい。同様に、CTLDにおいても、配列番号4のアミノ酸配列における144位、155位、172位、243位、256位、264位におけるシステインに対応するアミノ酸が保持されていることが好ましい。この保存されたCTLDに加えて、h L O X - 1および他の既知の種におけるネックドメインは、高い配列同一性を有している。また、h L O X - 1における140位のシステインは、分子間ジスルフィド結合に関与し、h L O X - 1の二量体を形成する。しかし、この140位のシステインは、変性LDLの認識に必須ではないので、発現された場合に、必ずしもこの140位のシステインが保持されている必要はなく、変異されていてもよい。さらに、h L O X - 1では、183位のNと139位のNにおいて糖鎖が付加されている。糖鎖が付加されたh L O X - 1の分子量は、40 kDaである。通常h L O X - 1はグリコシル化されているが、たとえグリコシル化されていなくても、グリコシル化された通常のh L O X - 1と同様に、変性LDLを認識および結合できる。上記CTLDは、変性LDLを結合するのに必要十分な最小ドメインである。このL O X - 1のC末端の4残基(L R A Q)は、リガンドの認識と取り込みに必須であり、C末端の7残基(K A N L R A Q)がh L O X - 1のフォールディングと輸送に必須である。h L O X - 1のW150、R208、R229、R231、R248等がリガンド認識と取り込みに必須のアミノ酸である。L O X - 1はまた、細胞膜から切断され、可溶性形態として放出され、健常者の血中にも存在することが報告されている。

#### 【0097】

本明細書において使用される場合、用語「CTLD様ポリペプチド」とは、(1) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；(2) 上記配列番号2に示される

アミノ酸配列において1または数個のアミノ酸の置換、付加および／または欠失を含むアミノ酸配列を含むポリペプチド；（3）上記配列番号2に示されるアミノ酸配列において90位および107位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；（4）上記配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；（5）上記配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；（6）配列番号1に示される核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（7）上記配列番号1に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（8）配列番号1に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸は、配列番号2における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；（9）上記配列番号1に示される核酸配列において1または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型LOX-1の活性を示すポリペプチド；（10）上記配列番号1に示される核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；および（11）上記配列番号1に示される核酸配列と少なくとも80%の配列相同性を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、のうちの1つである。同様に、CTL D様ポリペプチドにおいても、システイン残基は、分子内ジスルフィド結合に関与しているので、本発明のCTL D様ポリペプチドにおいても、配列番号4のアミノ酸配列の144位、155位、172位、243位、256位、264位に対応するシステインが保持されていることが好ましい。

10

20

#### 【0098】

また、本明細書において使用される場合、「CTL D様ポリペプチドをコードする核酸分子」とは、（1）配列番号1に示される核酸配列；（2）上記配列番号1に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；（3）上記配列番号1に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であって、該核酸分子によってコードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸配列は、配列番号2における対応する位置のアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示す、核酸分子；（4）上記配列番号1に示される核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸分子；（5）上記配列番号1によって示される核酸配列と少なくとも80%の相同性を有する核酸分子；（6）配列番号1に示される核酸配列において1または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸分子であって、該核酸分子によってコードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸配列は、配列番号2における対応する位置のアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示す、核酸分子、のうちの1つである。上記の同一性または相同性は、配列分析用ツールであるBLAST（NCBIのBLAST 2.2.9（2004.5.12 発行））を用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。ストリンジェントな条件は配列に依存して変化し、このような条件の決定は、当業者の技術範囲内である。上記で述べたように、発現されたCTL D様ポリペプチドにおいては、分子内ジスルフィド結合に関与するシステインは保持されていることが好ましいので、本発明の核酸分子も、発現された場合に、配列番号4のアミノ酸配列の144位、155位、172位、243位、256位、264位に対応するシステインをコードしていることが好ましい。

30

40

#### 【0099】

本明細書において使用される場合、用語「リガンド」とは、特異的な受容体または受容体のファミリーに対する結合パートナーである。リガンドは、受容体に対する内因性のリガンドであるか、またはその代わりに、薬剤、薬剤候補、もしくは薬理学的手段のような

50

受容体に対する合成リガンドであり得る。

#### 【0100】

本明細書において使用される場合、「変性LDL」とは、LDLが体内で活性酸素、酸化的酵素、 $Fe^{3+}$ などと接触すること、あるいは、血管内皮細胞やマクロファージなどによる細胞依存性化学変化によって発生する種々の分子修飾を有する任意のLDL改変体である。生体内に存在する変性LDLとしては、酸化LDL、マロンジアルデヒド化LDL(MDA-LDL)、アクロレイン修飾LDL、ノネナール修飾LDL、小粒子LDL(直径255nm以下のLDL)、糖化LDLなどが挙げられるが、これらに限定されない。酸化LDLが異常値を示す場合、動脈硬化症、虚血性心疾患(心筋梗塞、狭心症など)、脳血管障害(脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、一過性脳虚血発作など)、大動脈瘤、腎梗塞、高脂血症などのような疾患が予想されるがこれらに限定されない(「今日の臨床検査 2007-2008」発行所 株式会社 南江堂、参照)。基準物質としては、MDA-LDL(正常範囲:10~80U/L)および酸化ホスファチジルコリン(正常範囲:8.4U/mL~17.6U/mL)が使用される。

10

#### 【0101】

本明細書において使用される場合、用語「後期糖化反応生成物(Advanced Glycation End Products)」とは、AGEともいわれ、糖尿病患者の生活の質を損ねる元凶である血管合併症として知られる糖尿病性血管障害の発症・進展に関与している。グルコースに代表される還元糖は、タンパク質、アミノ酸のアミノ基と非酵素的に反応して、 Schiff塩基またはアマドリ転位化合物などの糖化生成物を形成する。ここまでの反応は可逆的であり、前期反応とよばれている。その後、さらに縮合、開裂、架橋形成などの複雑かつ不可逆的な反応を経て、後期糖化反応生成物を形成する。このような一連の反応は、グリケーションと称される。AGEはまた、このような過程を経て生成された構造物の総称である。生体中に存在するAGE構造としては、カルボキシメチルリジン(CML)、カルボキエチルリジン(CEL)、ペントシジン、ピラリン、イミダゾリン、メチルグリオキサール、クロスリンなどが挙げられるが、これに限定されない。血漿中に存在するアルブミン、イムノグロブリン、オボアルブミンなどが上記の糖化を受けた産物もAGEであり、AGEとして実験系に汎用されている。血糖コントロールの指標として用いられているヘモグロビンA1cはアマドリ転移化合物であるが、AGEに包含される。また、任意のタンパク質も、AGEに変換可能である。例えば、AGEに包含されるCMLアルブミンおよびCELアルブミンは、いずれもアルブミンが糖化を受けたAGEである。このようなAGE生成反応は、生体内において循環血液中、細胞外マトリクス、細胞内のいずれでも起こり得る。例えば、糖尿病患者の血管に存在するAGEとしては、：蛍光性で架橋構造を有するもの(ペントシジン、クロスリンなど)および蛍光も架橋もないもの(カルボキシメチルリジン、ピラリン、メチルグリオキサール(MG)ーイミダゾロンなど)の2つに大別できる。AGEが異常値を示す場合、細小血管症(腎症、網膜症、神経症など)、大血管障害(虚血性心疾患、脳血管疾患、閉塞性動脈硬化症のような疾患が予想される。基準物質としては、ピラリン(正常範囲:血漿中23pmol/mL未満)、ペントシジン(正常範囲:血漿中0.00915~0.0431μg/mL(ELISAで測定した場合))などが使用される(「今日の臨床検査 2007-2008」発行所 株式会社 南江堂、参照)。

20

30

40

#### 【0102】

本明細書において使用される場合、用語「AGE受容体(Receptor for AGE)」とは、RAGEともいわれ、(1)配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；(2)上記配列番号10に示されるアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸の置換、付加および／または欠失を含むアミノ酸配列を含み、かつ天然型RAGEの活性を示すポリペプチド；(3)上記配列番号10に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ天然型RAGEの活性を示すポリペプチド；(4)上記配列番号10に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ天然型RAGEの活性を示すポリペプチド。

50

ド；（５）配列番号９に示される核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（６）上記配列番号９に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型 R A G E の活性を示すポリペプチド；（７）上記配列番号９に示される核酸配列において１または数個のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型 R A G E の活性を示すポリペプチド；（８）上記配列番号９に示される核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型 R A G E の活性を示すポリペプチド；および（９）上記配列番号９に示される核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ天然型 R A G E の活性を示すポリペプチド、のうちの１つである。

10

#### 【0103】

また、本明細書において使用される場合、「R A G E をコードする核酸分子」とは、（１）配列番号９に示される核酸配列を含む核酸分子；（２）上記配列番号９に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；（３）上記配列番号９に示される核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸分子；（４）上記配列番号９によって示される核酸配列と少なくとも 80 % の同一性を有する核酸分子；および（５）上記配列番号９に示される核酸配列において１または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸分子、のうちの１つである。上記の同一性または相同性は、配列分析用ツールである B L A S T (N C B I の B L A S T 2.2.9 (2004.5.12 発行)) を用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。ストリンジェントな条件は配列に依存して変化し、このような条件の決定は、当業者の技術範囲内である。R A G E はまた、1992 年に、ウシ肺から同定され、A G E と結合するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する、分子量約 35 k D a の I 型膜タンパク質（糖鎖修飾を受けた完全な R A G E は、分子量 55 k D a）である。R A G E の細胞外ドメインは、１つの V 型イムノグロブリンドメイン、続いて、２つの C 型イムノグロブリンドメイン（C1 領域および C2 領域）の、３つのイムノグロブリンフォールド構造を取るドメインが結合した構造を取っている。R A G E はまた、細胞膜 1 回貫通型のドメインおよび 43 アミノ酸の細胞質ドメインを含む。R A G E は、多様なクラスのリガンド（A G E、S100/カルグラニユリン、アンフォテリンおよびアミロイド-β ペプチド）と相互作用する。V ドメインは、リガンド結合に必須の部位であり、細胞質ドメインは、R A G E 媒介性細胞内シグナル伝達に必須である。R A G E はまた、各ドメイン内でジスルフィド結合を有するので、本発明の変異 R A G E は、配列番号 10 のアミノ酸配列の 38 位、99 位、144 位、208 位、259 位および 301 位に対応するシステイン残基を保持していることが好ましい。R A G E は、正常組織および血管系においては低レベルでしか発現されない。しかし、この受容体は、そのリガンドが蓄積した場所においてアップレギュレートされる。R A G E の発現は、糖尿病血管系において内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、腎メサンギウム細胞および浸潤性単核食細胞で増加している。また、A G E が蓄積している動脈硬化巣のような病的部位においても、R A G E の発現が増加している。A G E-R A G E 相互作用は、血管系ホメオスタシスにおいて重要な細胞の特性を変化させる。例えば、R A G E が A G E と結合した後、血管内皮細胞は、V C A M-1、組織因子、および I L-6 の発現、ならびに高分子へのそれらの透過性を増加させる。単核食細胞において、R A G E は、サイトカインおよび増殖因子の発現を活性化し、可溶性 A G E に応じて細胞移動を誘導するのに対して、走触性は、固定リガンドで起こる。

20

30

40

#### 【0104】

本明細書において使用される場合、用語「R A G E 様ポリペプチド」とは、（１）配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質；（２）上記配列番号 12 に示されるアミノ酸配列において１または数個の置換、付加および／または欠失を含むアミノ酸配列を含むタンパク質；（３）上記配列番号 12 に示されるアミノ酸配列において、92 位および 95 位以外のアミノ酸位置で１または数個のアミノ酸の置換、付加および／または

50

欠失を含むアミノ酸配列を含み、かつ天然型 R A G E の活性を示すポリペプチド；（４）上記配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する変異体を含むポリペプチド；（５）上記配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する変異体を含むポリペプチド；（６）配列番号 1 1 に示される核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（７）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（８）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列において 1 または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（９）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるポリペプチドであって、該コードされるアミノ酸配列において 9 2 位および 9 5 位のアミノ酸配列は、配列番号 1 2 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 R A G E の活性を示す、ポリペプチド；（１０）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；および（１１）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、のうちの 1 つである。

10

#### 【0105】

また、本明細書において使用される場合、「R A G E 8」をコードする核酸分子とは、（１）配列番号 1 1 に示される核酸分子；（２）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；（３）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であって、該核酸分子によってコードされるアミノ酸配列において 9 2 位および 9 5 位のアミノ酸配列は、配列番号 1 2 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 R A G E の活性を示す、核酸分子；（４）上記配列番号 1 1 に示される核酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸分子；（５）上記配列番号 1 1 によって示される核酸配列と少なくとも 8 0 % の相同性を有する核酸分子；（６）配列番号 1 1 に示される核酸配列において 1 または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸分子であって、該核酸分子によってコードされるアミノ酸配列において 9 2 位および 9 5 位のアミノ酸配列は、配列番号 1 2 における対応する位置のアミノ酸を保持し、かつ天然型 R A G E の活性を示す核酸分子、のうちの 1 つである。上記の同一性または相同性は、配列分析用ツールである B L A S T（N C B I の B L A S T 2. 2. 9（2004. 5. 12 発行））を用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。ストリンジェントな条件は配列に依存して変化し、このような条件の決定は、当業者の技術範囲内である。R A G E 様ポリペプチドはまた、（１）配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質；（２）上記配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において 1 または数個の置換、付加および／または欠失を含む変異体を含むタンパク質；（３）上記配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において、9 2 位、9 5 位、206 位および 250 位以外のアミノ酸位置で 1 または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型 R A G E の活性を示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；（４）上記配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；（５）上記配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；（６）上記配列番号 1 3 に示される核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むタンパク質；（７）上記配列番号 1 3 に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（８）上記配列番号 1 3 に示される核酸配列において 1 または数個のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（９）上記配列番号 1 3 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ

20

30

40

50



酸配列において 92 位、95 位、206 位および 250 位の アミノ酸配列は、配列番号 14 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 RAGE の活性を示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；(10) 上記配列番号 13 に示される核酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；および(11) 上記配列番号 13 に示される核酸配列と少なくとも 80% の配列相同性を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、のうちの 1 つである。また、好ましい RAGE 様ポリペプチドとしては、RAGE の 23～250 位をコードする RAGE 2、23～230 位をコードする RAGE 3、101～332 位をコードする RAGE 4、または 23～137 位をコードする RAGE 7、ならびにこれらのいずれかを含むポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。上記で述べたように、RAGE 様ポリペプチドにおいても、分子内ジスルフィド結合を形成することは好ましいので、配列番号 10 のアミノ酸配列の 38 位、99 位、144 位、208 位、259 位および 301 位に対応するシステインは保持されていることが好ましい。

10

#### 【0106】

また、本明細書において使用される場合、「mRAGE 1 をコードする核酸分子」とは、(1) 配列番号 13 に示される核酸分子；(2) 上記配列番号 13 に示される核酸配列に対して相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；(3) 上記配列番号 13 に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であって、該核酸分子によってコードされるアミノ酸配列において 92 位、95 位、206 位および 250 位の アミノ酸配列は、配列番号 14 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 RAGE の活性を示す、核酸分子；(4) 上記配列番号 13 に示される核酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸分子；(5) 上記配列番号 13 によって示される核酸配列と少なくとも 80% の相同性を有する核酸分子；(6) 上記配列番号 13 に示される核酸配列において 1 または数個の置換、付加および／または欠失を有する核酸分子であって、該核酸分子によってコードされるアミノ酸配列において 92 位、95 位、206 位および 250 位の アミノ酸配列は、配列番号 14 における対応する位置のアミノ酸を保持し、かつ天然型 RAGE の活性を示す核酸分子、のうちの 1 つである。上記の同一性または相同性は、配列分析用ツールである BLAST (NCBI の BLAST 2.2.9 (2004.5.12 発行)) を用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。ストリンジェントな条件は配列に依存して変化し、このような条件の決定は、当業者の技術範囲内である。発現された RAGE 様ポリペプチドにおいては、分子内ジスルフィド結合に関与するシステインは保持されていることが好ましいので、mRAGE 1 をコードする核酸分子も、発現された場合に、配列番号 10 のアミノ酸配列の 38 位、99 位、144 位、208 位、259 位および 301 位に対応するシステインをコードしていることが好ましい。好ましい RAGE 様ポリペプチドをコードする核酸分子としては、RAGE の 23～250 位をコードする RAGE 2、23～230 位をコードする RAGE 3、101～332 位をコードする RAGE 4、または 23～137 位をコードする RAGE 7、ならびにこれらのいずれかを含むポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0107】

本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の 1 または 2 以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイ

40

50

ド) および当該分野において公知の他の改変が包含される。

#### 【0108】

本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体 (例えば、縮重コドン置換体) および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された (または、すべての) コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzera, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

#### 【0109】

本明細書では「核酸分子」もまた、核酸、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、cDNA、mRNA、ゲノムDNAなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体 (改変体)」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる (別の) 核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物 (組換え形態のスプライス産物を含む) がこの定義に含まれる。したがって、本明細書では、たとえば、本発明の遺伝子には、そのスプライス変異体もまた包含され得る。

#### 【0110】

本明細書において、「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のものでも非天然のものでもよい。

#### 【0111】

本明細書において「アミノ酸誘導体」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのようなアミノ酸誘導体およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。本明細書では、

アミノ酸誘導体およびアミノ酸アナログは、アミノ酸と同じ生物学的機能を提供し得る限り代替として使用され得ることが理解される。

#### 【0112】

本明細書において「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。

10

#### 【0113】

本明細書において「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。

#### 【0114】

本明細書において「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

20

#### 【0115】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。ヌクレオチドの配列は、本明細書において「ヌクレオチド配列」または「塩基配列」という。

#### 【0116】

本明細書において「ヌクレオチド誘導体」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのようなヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのようなヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。本明細書では、ヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログは、ヌクレオチドと同じ生物学的機能を提供し得る限り、ヌクレオチドの代替として使用され得ることが理解される。

30

#### 【0117】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

40

#### 【0118】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.2.9 (2004.5.12 発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメーターの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。

#### 【0119】

本明細書において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチ

50

ド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいう。例えば、L O X - 1 においては、2 3 2 位および2 4 9 位におけるアミノ酸であり、R A G E においては、1 1 4 位、1 1 7 位、2 2 8 位、2 7 2 位におけるアミノ酸である。

#### 【0 1 2 0】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子（例えば、L O X - 1）に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。したがって、ヒトの遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物（マウス、ラット、ブタ、ウサギ、モルモット、ウシ、ヒツジなど）においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウサギ、モルモット、ウシ、ヒツジなど）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

10

#### 【0 1 2 1】

本明細書中で使用される「異種」とは、異なる配列または対応しない配列、あるいは異なる種由来の配列である、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をいう。例えば、ヒトのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、マウスのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して異種であり、そしてヒト L O X - 1 の核酸配列またはアミノ酸配列は、ヒトアルブミンのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して異種である。

20

#### 【0 1 2 2】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが  $n$ ）に対して、 $1 \sim n - 1$  までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50 およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11 など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100 およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11 など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または下限としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することができる。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用なフラグメントの長さは、そのフラグメントの基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも1つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。

30

40

#### 【0 1 2 3】

本明細書において「生物学的機能」とは、ある遺伝子またはそれに関する核酸分子もしくはポリペプチドについて言及するとき、その遺伝子、核酸分子またはポリペプチドが生体内において有し得る特定の機能をいい、これには、例えば、特異的な抗体の生成、酵素活性、抵抗性の付与等を挙げることができるがそれらに限定されない。本発明においては、例えば、L O X - 1 が変性 L D L を認識する機能、R A G E が A G E を認識する機能などを挙げることができるがそれらに限定されない。本明細書において、生物学的機能は、「生物学的活性」によって発揮され得る。本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性の

50

ことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含され、例えば、ある分子との相互作用によって別の分子が活性化または不活化される活性も包含される。2つの因子が相互作用する場合、その生物学的活性は、その二分子との間の結合およびそれによって生じる生物学的変化、例えば、一つの分子を抗体を用いて沈降させたときに他の分子も共沈するとき、2分子は結合していると考えられる。したがって、そのような共沈を見ることが一つの判断手法として挙げられる。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

#### 【0124】

したがって、「活性」は、結合（直接的または間接的のいずれか）を示すかまたは明らかにするか；応答に影響する（すなわち、いくらかの曝露または刺激に応答する測定可能な影響を有する）、種々の測定可能な指標をいい、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接結合する化合物の親和性、または例えば、いくつかの刺激後または事象後の上流または下流のタンパク質の量あるいは他の類似の機能の尺度が、挙げられる。

#### 【0125】

本明細書において「相互作用」とは、2つの物質についていうとき、一方の物質と他方の物質との間で力（例えば、分子間力（ファンデルワールス力）、水素結合、疎水性相互作用など）を及ぼしあうこという。通常、相互作用をした2つの物質は、会合または結合している状態にある。

#### 【0126】

本明細書中で使用される用語「結合」は、2つのタンパク質もしくは化合物または関連するタンパク質もしくは化合物の間、あるいはそれらの組み合わせの間での、物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用（結合）は、直接的または間接的であり得、間接的なものは、別のタンパク質または化合物の効果を介するかまたは起因する。直接的な結合とは、別のタンパク質または化合物の効果を介してもまたはそれらに起因しても起こらず、他の実質的な化学中間体を伴わない、相互作用をいう。

#### 【0127】

本明細書において第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」とは、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して、第二の物質または因子以外の物質または因子（特に、第二の物質または因子を含むサンプル中に存在する他の物質または因子）に対するよりも高い親和性で相互作用することをいう。物質または因子について特異的な相互作用としては、例えば、核酸におけるハイブリダイゼーション、タンパク質における抗原抗体反応、リガンドーレセプター反応、酵素ー基質反応など、核酸およびタンパク質の両方が関係する場合、転写因子とその転写因子の結合部位との反応など、タンパク質ー脂質相互作用、核酸ー脂質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、物質または因子がともに核酸である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して少なくとも一部に相補性を有することが包含される。また例えば、物質または因子がともにタンパク質である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」こととしては、例えば、抗原抗体反応による相互作用、レセプターーリガンド反応による相互作用、酵素ー基質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。2種類の物質または因子がタンパク質および核酸を含む場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、転写因子と、その転写因子が対象とする核酸分子の結合領域との間の相互作用が包含される。したがって、本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に相互作用する因子」とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポ

10

20

30

40

50

リペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の（特に、同一性が30%未満の）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に（例えば、統計学的に有意に）高いものを包含する。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。

#### 【0128】

本明細書中で使用される「接触（させる）」とは、化合物を、直接的または間接的のいずれかで、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して物理的に近接させることを意味する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多くの緩衝液、塩、溶液などに存在し得る。接触とは、核酸分子またはそのフラグメントをコードするポリペプチドを含む、例えば、ピーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ（例えば、遺伝子チップ）などに化合物を置くことが挙げられる。

10

#### 【0129】

本明細書において「複合体」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合体としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、配列番号2のアミノ酸を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントであって、L O X - 1に関する生物学的な活性を有する限り、それぞれの改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸分子も使用することができる。また、そのような核酸分子を含む複合体も使用することができる。

20

#### 【0130】

本明細書で使用される場合、「遺伝子導入」とは、生体内またはインビトロにおいて、標的細胞内に、天然、合成または組換えの所望の遺伝子または遺伝子断片を、導入された遺伝子とその機能を維持するように、導入することをいう。本発明において導入される遺伝子または遺伝子断片は、特定の配列を有するDNA、RNAまたはこれらの合成アナログである核酸を包含する。また、本明細書において使用される場合、遺伝子導入、形質転換、トランスフェクション、およびトランスフェクトは、互換可能に使用される。

#### 【0131】

本明細書において遺伝子について言及する場合、用語「ベクター」とは、「組換えベクター」、「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」などと互換可能に使用され、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるものをいう。そのようなベクターとしては、細菌宿主細胞において自律複製が可能である、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。

30

#### 【0132】

本明細書において使用される場合、用語「発現ベクター」は、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーターおよび、選択マーカーを含み得る。発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細菌細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

#### 【0133】

本明細書で使用される場合、「遺伝子導入活性」とは、ベクターによる「遺伝子導入」の活性をいい、導入された遺伝子の機能（例えば、発現ベクターの場合、コードされるタンパク質の発現および／またはそのタンパク質の活性など）を指標として検出され得る。

40

#### 【0134】

本明細書で使用される場合、「外来」の核酸分子とは、ある対象核酸分子内に含まれるその対象核酸分子以外の起源の核酸分子などをいう。この外来の核酸分子は、遺伝子導入ベクターによって導入された遺伝子が発現するために適切な調節配列（例えば、転写に必要なプロモーター、エンハンサー、ターミネーター、およびポリA付加シグナル、ならびに翻訳に必要なリボゾーム結合部位、開始コドン、終止コドンなど）と作動可能に連結される。本発明の別の局面において、外来遺伝子は、この外来遺伝子の発現のための調節配

50

列を含まない。

#### 【0135】

遺伝子導入ベクター内に含まれる外来遺伝子は、代表的にはDNAまたはRNAの核酸分子であるが、導入される核酸分子は、核酸アナログ分子を含んでもよい。遺伝子導入ベクター内に含まれる分子種は、単一の遺伝子分子種であっても、複数の異なる遺伝子分子種であってもよい。

#### 【0136】

原核細胞に対する「組換えベクター」としては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもRoche Molecular Biochemicalsより市販）、pKK233-2（Pharmacia）、pSE280（Invitrogen）、pGEMEX-1（Promega）、pQE-8（QIAGEN）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200（Agric. Biol. Chem., 48, 669（1984））、pLSA1（Agric. Biol. Chem., 53, 277（1989））、pGEL1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306（1985））、pBluescript II SK+（Stratagene）、pBluescript II SK（-）（Stratagene）、pTrs30（FERM BP-5407）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM B-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392（1990）〕、pGEX（Pharmacia）、pETシステム（Novagen）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen）、pMAL-c2（New England Biolabs）、pUC19〔Gene, 33, 103（1985）〕、pSTV28（宝酒造）、pUC118（宝酒造）、pPA1（特開昭63-233798）、Pinpoint Xa（Promega社製）、PAN、PAC（avidity社製）などが例示される。

#### 【0137】

真核生物に対する「組換えベクター」としては、pECFP（Clontech）、pAcGFP（Clontech）、pEYFP（Clontech）、pDsRED（Clontech）、pTRE（Clontech）、pCMV（Clontech）、pcDNA（Invitrogen）、pTarget（Promega）などが例示される。

#### 【0138】

本明細書において用いられる「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。代表的なプロモーターとしては、T7プロモーターが挙げられるがこれに限定されない。

#### 【0139】

RAGE遺伝子の発現にT7プロモーターを用いる場合は、好ましくは、T7 RNAポリメラーゼが宿主細胞ゲノム中に組み込まれたλDE3溶原菌を用いる。λDE3溶原菌としては、例えば、AD494（DE3）、AD494（DE3）pLysS、BL21（DE3）、BL21（DE3）pLysS、BL21（DE3）pLysE、BL21（DE3）placI、BL21 trxB（DE3）、BL21 trxB（DE3）pLysS、BLR（DE3）、BLR（DE3）pLysS、B834（DE3）、B834（DE3）pLysS、HMS174（DE3）、HMS174（DE3）pLysS、HMS174（DE3）pLysE、Origami（DE3）、Origami（DE3）pLysS、Origami B（DE3）、Origami B（DE3）pLysS、Rosetta（DE3）、Rosetta（DE3）pLysS、R

oseetta-gami (DE3)、Rosetta-gami (DE3) pLys S、RosettaBlue (DE3)、RosettaBlue (DE3) pLys S、Tuner (DE3)、およびTuner (DE3) pLys Sが挙げられるが、これに限定されない。(Novagen社、Madison, WI, USA)

RAGE遺伝子の発現にT7プロモーターを用いる場合、T7 RNAの天然のインヒビターであるT7 リゾチウムを欠損する宿主細胞株を用いることが、好ましい。このような宿主細胞としては、例えば、AD494 (DE3)、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) placI、BL21 trxB (DE3)、BLR (DE3)、B834 (DE3)、HMS174 (DE3)、Origami (DE3)、Origami B (DE3)、Rosetta (DE3)、Roseetta-gami (DE3)、RosettaBlue (DE3)、およびTuner (DE3) (Novagen社、Madison, WI, USA) が挙げられるが、これに限定されない。

10

#### 【0140】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

#### 【0141】

20

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチドの発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。このような遺伝子または遺伝子産物（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）の発現の増加または減少は、本発明の治療形態、予後形態または予防形態において有用であり得る。

30

#### 【0142】

「形質転換体」とは、宿主細胞を形質転換することによって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞が例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれ、本明細書においてそれらの形態をすべて包含するが、特定の文脈において特定の形態を指し得る。

#### 【0143】

形質転換体を得るための宿主細菌細胞は、生理活性を保持するポリペプチドを発現するものであれば、特に限定されず、従来から遺伝子操作において利用される各種の宿主細菌細胞を用いることができる。原核細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する原核細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No. 49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Esche

40

50



*richia coli* BL21 (DE3)、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS、*Escherichia coli* HMS174 (DE3)、*Escherichia coli* HMS174 (DE3) pLysS、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetooacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354、*Pseudomonas* sp. D-0110などが例示される。

10

#### 【0144】

上記を考慮すると、本発明において使用するのに好ましい宿主細菌細胞は、例えば、*Origami* (DE3) (Novagen社、Madison, WI, USA)である。

#### 【0145】

本明細書において、ハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」とは、標的配列に対して類似性または相同性を有するヌクレオチド鎖の相補鎖が標的配列に優先的にハイブリダイズし、そして類似性または相同性を有さないヌクレオチド鎖の相補鎖が実質的にハイブリダイズしない条件を意味する。ある核酸配列の「相補鎖」とは、核酸の塩基間の水素結合に基づいて対合する核酸配列（例えば、Aに対するT、Gに対するC）をいう。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、そして種々の状況で異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHでの特定の配列についての熱融解温度 ( $T_m$ ) より約5℃低く選択される。 $T_m$ は、規定されたイオン強度、pH、および核酸濃度下で、標的配列に相補的なヌクレオチドの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である。「ストリンジェントな条件」は配列依存的であり、そして種々の環境パラメーターによって異なる。核酸のハイブリダイゼーションの一般的な指針は、Tijssen (Tijssen (1993)、Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I、第2章「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay」、Elsevier, New York)に見出される。

20

30

#### 【0146】

代表的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度が約1.0M  $Na^+$ 未満であり、代表的には、pH7.0~8.3で約0.01~1.0Mの $Na^+$ 濃度（または他の塩）であり、そして温度は、短いヌクレオチド（例えば、10~50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃、そして長いヌクレオチド（例えば、50ヌクレオチドより長い）については少なくとも約60℃である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によって達成され得る。本明細書におけるストリンジェントな条件として、50%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS（37℃）の緩衝溶液中でのハイブリダイゼーション、および0.1×SSCで60℃での洗浄が挙げられる。

40

#### 【0147】

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラ

50

ーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムである)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38、DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、90%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

#### 【0148】

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N, Y. 1989); およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach, IV, IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム( $\text{NaDodSO}_4$ またはSDS)、Ficoll、Denhardt溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(または別の非相補的DNA)および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8～7.4で実施されるが; 代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practi

cal Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

#### 【0149】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / \text{N} - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、 $\% \text{G} + \text{C}$ は、ハイブリッド中の（グアニン＋シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致（ミスマッチ）に対して約1℃ずつ減少する。

#### 【0150】

本明細書において「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、50～65℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37～50℃である。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリンジェントな」条件は、約21%の不一致を許容する。

#### 【0151】

本明細書において「高度」にストリンジェントな条件と「中程度」にストリンジェントな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71℃である。65℃（同じイオン強度）での洗浄において、これは、約6%不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

#### 【0152】

約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaClにおける融解温度の適切な概算は、

$$T_m = (1 \text{つのA-T塩基につき } 2^{\circ}\text{C}) + (1 \text{つのG-C塩基対につき } 4^{\circ}\text{C})$$

によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである（Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox（編）（1981）を参照のこと）。

#### 【0153】

配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン（BSA）；500mMリン酸ナトリウム（ $\text{NaPO}_4$ ）；1mM EDTA；42℃の温度で7% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に2×SSC（600mM NaCl；60mMクエン酸ナトリウム）；50℃の0.1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、さらに好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン（BSA）；500mMリン酸ナトリウム（ $\text{NaPO}_4$ ）；15%ホルムアミド；1mM EDTA；7% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に50℃の1×SSC（300mM NaCl；30mMクエン酸ナトリウム）；1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、最も好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン（BSA）；200mMリン酸ナトリウム（ $\text{NaPO}_4$ ）；15%ホルムアミド；1mM EDTA

； 7 % S D S を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に 6 5 °C の 0 . 5 × S S C ( 1 5 0 m M N a C l ; 1 5 m M クエン酸ナトリウム) ; 0 . 1 % S D S を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号 1 に示す配列の 1 つまたはその一部とハイブリダイズし得る。

#### 【 0 1 5 4 】

本明細書において「相同性」は、2 以上の配列の比較において、それらの配列が進化的に祖先を共有することを示す。2 種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較により類似性に基づいた判定をおこなうか、またはストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。配列の直接の比較により類似性に基づいた判定をおこなう場合、その類似性測定過程のアライメントにおける最も単純な解釈として、同一な（もしくは等価である）文字列（塩基、アミノ酸残基など）で並置されている文字列が、これらの領域が祖先配列のまま変化しなかったものであることを示し、同一でない（もしくは、等価でない）文字列が、突然変異が一方の配列で起こったものであるとの考察が可能である。アライメントにおけるギャップ（インデル）は、配列の一方で、挿入または欠失が起こったものであると考えられる。つまり、それらの配列の同一性または類似性は高いことは、それらの配列における相同性を強く示唆することが理解される。相同性は、発現抑制剤の設計において参照される。

#### 【 0 1 5 5 】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、DNA または RNA など）が用いられ得る。

#### 【 0 1 5 6 】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも 1 0 の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも 1 1 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 2 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 3 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 4 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 5 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 6 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 7 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 8 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 1 9 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 2 0 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 2 5 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 3 0 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 4 0 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 5 0 の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも 7 0 % 相同な、より好ましくは、少なくとも 8 0 % 相同な、さらに好ましくは、少なくとも 9 0 % 相同な、少なくとも 9 5 % 相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、L A S E R G E N E , P r i m e r S e l e c t , D N A S t a r）を用いて行ってもよい。

#### 【 0 1 5 7 】

本明細書において「相補的」または「相補体」という用語は、本明細書では、相補領域全体がそのまま別の特定のポリヌクレオチドと W a t s o n & C r i c k 塩基対を形成することのできるポリヌクレオチドの配列を示す。本発明の目的で、第 1 のポリヌクレオチドの各塩基がその相補塩基と対になっている場合に、この第 1 のポリヌクレオチドは第 2 のポリヌクレオチドと相補であるとみなす。相補塩基は一般に、A と T（あるいは A と U）、または C と G である。本願明細書では、「相補」という語を「相補ポリヌクレオチド」、「相補核酸」および「相補ヌクレオチド配列」の同義語として使用する。これら

の用語は、その配列のみに基づいてポリヌクレオチドの対に適用されるものであり、2つのポリヌクレオチドが事実上結合状態にある特定のセットに適用されるものではない。

#### 【0158】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。「種相同体またはホモログ (homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、10  
相同性 (好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性) を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (ortholog)」とは、オルソログス遺伝子 (orthologous gene) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトとマウスの $\alpha$ ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの $\alpha$ ヘモグロビン遺伝子と $\beta$ ヘモグロビン遺伝子はパラログ (遺伝子重複で生じた遺伝子) である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用であることから、オルソログもまた、本発明において有用であり得る。

#### 【0159】

本明細書において「保存的 (に改変された) 改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNAポリメラーゼ、Klenowフラグメント、DNAリガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法 (特定部位指向突然変異法; Mark Zoller and Michael Smith, Methods in Enzymology, 100, 468-500 (1983)) が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変 (変異)」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン (通常メチオニンのための唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンのための唯一のコドンであるTGGを除く) が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列に40  
において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。

#### 【0160】

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、リガンド分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。50

## 【0161】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (K y t e . J および D o o l i t t l e , R . F . J . M o l . B i o l . 1 5 7 ( 1 ) : 1 0 5 - 1 3 2 , 1 9 8 2 ) 。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子 (例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原など) との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8) ; フェニルアラニン (+2.8) ; システイン/シスチン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; アラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; スレオニン (-0.7) ; セリン (-0.8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; およびアルギニン (-4.5) ) である。

10

## 【0162】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質 (例えば、リガンド結合能において等価なタンパク質) を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸 (+3.0±1) ; グルタミン酸 (+3.0±1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; スレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5±1) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; およびトリプトファン (-3.4) 。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

20

30

## 【0163】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

40

## 【0164】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、リン酸化、水酸化、アシル化 (例えば、アセチル化) などを含むが、これらに限定

50

されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

#### 【0165】

このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することでもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

#### 【0166】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加および／または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わること、または取り除かれることをいう。このような置換、付加および／または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。基準となる核酸分子またはポリペプチドにおけるこれらの変化は、目的とする機能（例えば、AGEの認識能など）が保持される限り、この核酸分子の5'末端もしくは3'末端で生じ得るか、またはこのポリペプチドを示すアミノ酸配列のアミノ末端部位もしくはカルボキシ末端部位で生じ得るか、またはそれらの末端部位の間のどこにでも生じ得、基準配列中の残基間で個々に散在する。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、AGEの認識能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、15%以内、10%以内、5%以内、または150個以下、100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

#### 【0167】

本明細書において使用される場合、用語「フレキシブルなリンカー配列」とは、特定の立体構造をとらず、連結される分子の機能に影響を与えない分子をいう。このようなリンカー配列は、当業者に周知である。リンカー配列がある分子に連結した場合に、その分子がとるべき立体構造を妨害せず、その電荷に実質的に影響を及ぼさない限り、どのようなリンカー配列を使用してもよい。

#### 【0168】

本明細書において使用される場合、用語「タグ配列」とは、受容体ーリガンドのような特異的認識機構により分子を選別するための物質をいう。このようなタグ配列は、当該分野で周知である。

#### 【0169】

本明細書において使用される場合、用語「検出剤」とは、広義には、目的の物質（例えば、変性LDL、AGEなど）を検出できるあらゆる因子をいう。

#### 【0170】

本明細書において使用される場合、用語「固相」とは、本明細書中において「基板」および「基材」と互換的に使用され、本発明のデバイスが構築される材料をいう。抗体のような分子が固定され得る平面状の支持体をいう。本発明において表面プラズモン共鳴の原理を用いて検出する場合、固相は、金、銀またはアルミニウムを含む金属薄膜を片面に持つガラス基板の基材であることが好ましい。本発明において水晶発振子マイクロバランスの原理を用いて検出する場合は、周波数変換素子（例えば水晶発振子、表面弾性波素子）を固相として用い、直接受容体を結合させる。水晶板の片面はシリコンで被覆し、もう一方の面は金電極を施したものを固相として用いる。本発明において酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）のような機構を使用する場合、一般に、固相（基材）としては、マイクロタイタープレートが使用される。基板の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。適切な基材としては、ビーズ、金粒子、マイクロタイタープレート、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、金属薄膜、フィルター、チューブ、ダイヤモンド様炭

素被膜ステンレスなどが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0171】

固相および基板として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、アミロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）以下が挙げられるがそれらに限定されない。基板は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォーステライト、炭化珪素、酸化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用できる。また、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料を用いることができる。本発明においてはまた、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、PVDF膜など、プロットングに使用される膜を用いることもできる。高密度のものを解析する場合は、ガラスなど硬度のあるものを材料として使用することが好ましい。基板として好ましい材質は、測定機器などの種々のパラメータによって変動し、当業者は、上述のような種々の材料から適切なものを適宜選択することができる。

#### 【0172】

本明細書において「チップ」は、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。本明細書において、ビオチン化受容体を固定化した固相を、受容体チップおよび／または受容体マイクロチップと呼ぶ。

#### 【0173】

（一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Curr*



ent Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

#### 【0174】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0175】

（遺伝子工学）

本発明において用いられる配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドならびにそのフラグメントおよび改変体は、遺伝子工学技術を用いて生産することができる。

#### 【0176】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチプルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献（例えば、Sambrookら、前出）に記載されている。好ましいベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソード、ウイルス粒子またはウイルスおよび組み込み可能なDNAフラグメント（すなわち、相同組換えによって宿主ゲノム中に組み込み可能なフラグメント）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0177】

ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントが連結され得る環状二重鎖DNAループをいう。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、さらなるDNAセグメントは、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクター（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター）は、これらが導入される宿主細胞中で自律的に複製し得る。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、こ

れらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で、「発現ベクター」といわれる。

#### 【0178】

従って、本明細書において「発現ベクター」または「発現プラスミド」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、哺乳動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

#### 【0179】

本発明において用いられ得る原核生物細胞に対する「組み換えベクター」としては、p cDNA 3 (+)、p Bluescript-SK (+/-)、p GEM-T、p EF-BOS、p EGFP、p HAT、p UCL8、p FT-DEST<sup>TM</sup> 42 GATEWAY、p ENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO (Invitrogen) などが例示される。原核生物細胞は、遺伝子の増幅、改変などに用いることができる。

#### 【0180】

本明細書において用いられ得る真核生物細胞に対する「組み換えベクター」としては、p ECFP (Clontech)、p AcGFP (Clontech)、p EYFP (Clontech)、p DsRED (Clontech)、p TRE (Clontech)、p CMV (Clontech)、p cDNA (Invitrogen)、p Target (Promega) などを挙げることができるがそれらに限定されない。

#### 【0181】

本明細書において「哺乳動物発現ベクター」は、本発明の遺伝子の発現を調節するプロモーターなどの種々の調節エレメントが宿主細胞中で作動可能に連結されている核酸配列をいう。本願明細書で用いる用語「制御配列」は、機能的プロモーターおよび、任意の関連する転写要素（例えば、エンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位など）を有するDNA配列をいう。本願明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子が発現し得るように、それに関するポリヌクレオチドと、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。哺乳動物発現ベクターは、好適には、哺乳動物遺伝子、プロモーター、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子およびエンハンサーを含み得る。発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

#### 【0182】

上記のような哺乳動物発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。哺乳動物発現ベクターの構築には、例えば、p ECFP系のベクター、p cDNA系のベクターなどが好適に用いられるが、これらに限定されない。

#### 【0183】

本明細書において「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、およびポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に寄与し、そして遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

#### 【0184】

本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。

#### 【0185】

プロモーターは、誘導性であっても、構成的であっても、部位特異的であっても、時期特異的であってもよいが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターが好ましい。プ

10

20

30

40

50

ロモーターとしては、例えば、哺乳動物細胞、大腸菌、酵母などの宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。

#### 【0186】

本明細書において、プロモーターの発現が「構成的」であるとは、生物のすべての組織において、その生物の成長／増殖のいずれにあってもほぼ一定の量で発現される性質をいう。具体的には、ノーザンブロット分析したとき、例えば、任意の時点で（例えば、2点以上（例えば、5日目および15日目））の同一または対応する部位のいずれにおいても、ほぼ同程度の発現量がみられるとき、本発明の定義上、発現が構成的であるという。構成的プロモーターは、通常の生育環境にある生物の恒常性維持に役割を果たしていると考えられる。本発明のプロモーターの発現が「応答性」であるとは、少なくとも1つの因子が生物体に与えられたとき、その発現量が増加する性質をいう。特に、発現量が増加する性質を因子に対して「誘導性」といい、発現量が減少する性質を因子に対して「減少性」という。「減少性」の発現は、正常時において、発現が見られることを前提としているので、「構成的」な発現と重複する概念である。これらの性質は、生物の任意の部分からRNAを抽出してノーザンブロット分析で発現量を分析することまたは発現されたタンパク質をウェスタンブロットにより定量することにより決定することができる。因子に対して誘導性のプロモーターを本発明の部位特異的組換え誘導因子をコードする核酸とともに組み込んだベクターで形質転換された哺乳動物細胞または哺乳動物（特定の組織などを含む）は、そのプロモーターの誘導活性をもつ刺激因子を用いることにより、ある条件下での部位特異的組換え配列の部位特異的組換えを行うことができる。

#### 【0187】

本発明のポリヌクレオチドは、そのまままたは改変されて、当業者に周知の方法を用いて、適切な発現ベクターに連結され、公知の遺伝子組換え技術により、宿主細胞に導入され得る。導入された遺伝子は、宿主細胞中のDNAに組み込まれて存在する。なお、宿主細胞中のDNAとは、染色体のみならず、宿主細胞中に含まれる各種オルガネラ（例えば、ミトコンドリアなど）に含まれるDNAを含む。

#### 【0188】

大腸菌を宿主細胞として使用する場合、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌およびファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター（Ptrp<sub>x2</sub>）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

#### 【0189】

本明細書において「複製起点」とは、DNA複製が開始する染色体上の特定領域をいう。複製起点は、内因性起点を含むようにそのベクターを構築することによって提供され得るか、または宿主細胞の染色体複製機構により提供され得るかのいずれかであり得る。そのベクターが、宿主細胞染色体中に組み込まれる場合、後者が十分であり得る。あるいは、ウイルス複製起点を含むベクターを使用するよりも、当業者は、選択マーカーと本発明のDNAとを同時形質転換する方法によって、哺乳動物細胞を形質転換し得る。適切な選択マーカーの例は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）またはチミジンキナーゼである（米国特許第4,399,216号を参照）。

#### 【0190】

本明細書において「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

#### 【0191】

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY；Sambrook Jら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

10

#### 【0192】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）が挙げられる。

#### 【0193】

本明細書において「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

20

#### 【0194】

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、Escherichia属、Serratia属、Bacillus属、Brevibacterium属、Corynebacterium属、Microbacterium属、Pseudomonas属などに属する原核生物細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1が例示される。

#### 【0195】

本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、DNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法[Methods. Enzymol., 194, 182(1990)]、リポフェクション法、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929(1978)]、酢酸リチウム法などが挙げられる。

30

#### 【0196】

本明細書において遺伝子発現（たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現）の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土

40

50

社（２００２）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

#### 【０１９７】

本明細書において使用される場合、用語「標識」とは、特定の物質を検出するために、この物質に結合することが既知の物質に付加される分子をいう。標識としては、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【０１９８】

本明細書において使用される場合、用語「タグ配列」とは、特定の物質を結合するための結合パートナーの役割を果たす物質（例えば、ビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジンのような関係を有する）をいう。よって、例えば、タグ配列が結合した特定の物質は、タグ配列の結合パートナーを結合させた基材を接触させることで、この特定の物質を選別することができる。代表的なタグ配列としては、m y c タグ、H i s タグ、H A、A v i タグなどが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【０１９９】

（好ましい実施形態の説明）

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にして、本発明の範囲内にある改変、変更などを容易に行うことができることが理解されるべきである。

#### 【０２００】

一局面において、本発明は、以下からなる群より配列を含む、ポリペプチドを提供し得る：

（１）配列番号２に示されるアミノ酸配列；

（２）配列番号２に示されるアミノ酸配列において、９０位および１０７位以外のアミノ酸位置で１または数個の置換、付加および／または欠失を含み、かつ天然型L O X-１の活性を示す、アミノ酸配列；および

（３）配列番号１に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において９０位および１０７位のアミノ酸配列は、配列番号２における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型L O X-１の活性を示す、アミノ酸配列。好ましいのは、配列番号２における９０位および１０７位のアミノ酸がA（アラニン）である（G 2 3 2 A / G 2 4 9 A）ポリペプチドである。このポリペプチドは、上記部位を変異させたことによって、大過剰のプロテアーゼに曝されても、分解されず、天然型L O X-１の活性を保持している。

#### 【０２０１】

本発明の一実施形態において、上記置換は、保存的置換であり得る。本発明の別の実施形態において、上記欠失は、配列番号２の１２６位～１３１位までのいずれか１～６個のアミノ酸の欠失、５８位～６３位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは１位のアミノ酸の欠失またはこれらの任意の組み合わせであり得る。本発明のなお別の実施形態において、上記付加は、配列番号４の６１位～１４２位から選択される任意の連続する１～８２個のアミノ酸配列の付加、リンカー配列もしくはその反復配列、またはL D L受容体関連タンパク質（L R P）のE G F反復配列（上皮増殖因子受容体様システインリッチドメインを含む配列）の付加であり得る。好ましいリンカー配列としては、Gly-Gly-Ser、配列番号１５、配列番号１６に示されるアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【０２０２】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号６に示されるアミノ酸配列を含み得る。

#### 【０２０３】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、

(1) 配列番号8に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、172位および189位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型LOX-1の活性を示すアミノ酸配列；および

(3) 配列番号7に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において172位および189位のアミノ酸配列は、配列番号8における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型LOX-1の活性を示す、アミノ酸配列；

からなる群より選択される配列を包含し得る。好ましいのは、配列番号8の172位および189位がA（アラニン）であるポリペプチドである。このポリペプチドは、上記部位を変異させても、天然型LOX-1の活性を保持している。

10

#### 【0204】

好ましい実施形態において、上記置換は、保存的置換であり得る。別の好ましい実施形態において、上記欠失は、配列番号8の208位～213位までのいずれか1～6個のアミノ酸の欠失、140位～145位までのいずれかのアミノ酸の欠失、もしくは1位～82位から選択される任意の連続する1～82個のアミノ酸配列の欠失である、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。好ましくは、本発明のポリペプチドは、変性LOX-1の認識能を有し得る。好ましいポリペプチドとしては、配列番号4のアミノ酸配列における144位、155位、172位、243位、256位、264位におけるシステインに対応するアミノ酸をさらに保持しているもの、および配列番号4のアミノ酸配列における140位におけるシステインに対応するアミノ酸をさらに保持しているものが挙げられる。

20

#### 【0205】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、タグ配列をさらに含み得る。上記タグ配列としては、代表的には、配列番号17、配列番号18、および配列番号19が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明のポリペプチドは、標識をさらに含み得る。代表的な標識としては、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい蛍光標識としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチアネート、ローダミン、過塩素酸1，1'-ジオクタデシル-3，3'，3'-テトラメチルインドカルボシアニン（DiD）、過塩素酸1，1'-ジオクタデシル-3，3'，37，37'-テトラメチル-endo-カルボシアニン（DiI）、Alexa、蛍光タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい化学発光標識としては、ルミノール、ルシゲニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい生物発光標識としては、ルシフェラーゼ、エクオリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0206】

好ましい一実施形態において、本発明のポリペプチドは、二量体であり得る。さらに好ましくは、本発明のポリペプチドは、多量体であり得る。別の好ましい一実施形態において、本発明のポリペプチドは、ジスルフィド結合によって結合された二量体であり得る。本発明のポリペプチドは、単量体で変性LDLを認識できるので、必ずしも二量体である必要はないが、より高い認識能を発揮するためには、二量体または多量体を形成することが好ましい。本発明のポリペプチドは、140位（ここでこの番号付けは、LOX-1のアミノ酸配列に従う）のシステインによって分子間でジスルフィド結合されるのが好ましい。このような分子間ジスルフィド結合によって、生体内で通常発現されているような状態を再現することができ、より高感度な変性LDLの認識が可能になる。

40

#### 【0207】

一局面において、本発明の核酸分子は、以下からなる群より選択される配列を包含し得る：

(1) 配列番号1に示される核酸配列；および

(2) (1)の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイ

50

ズする核酸配列であって、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列において90位および107位のアミノ酸配列は、配列番号1における対応するアミノ酸を保持し、かつLOX-1の活性を示す、核酸配列。好ましいCTLD様ポリペプチドをコードする核酸分子は、発現された場合に、配列番号2における90位および107位のアミノ酸がA（アラニン）であるポリペプチドをコードする核酸分子である。この発現されたポリペプチドは、上記部位を変異させたことによって、大過剰のプロテアーゼに曝されても、分解されず、天然型LOX-1の活性を保持している。さらに好ましい核酸分子としては、発現された場合に、発現されたポリペプチドにおいて、配列番号4のアミノ酸配列における144位、155位、172位、243位、256位、264位におけるシステインに対応するアミノ酸を保持しているもの、および配列番号4のアミノ酸配列における140位におけるシステインに対応するアミノ酸を保持しているものが挙げられる。

10

#### 【0208】

好ましい実施形態において、上記LOX-1の活性は、変性LDLの認識能であり得る。さらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、タグをコードする核酸配列をさらに含む得る。

#### 【0209】

一局面において、本発明は、上記の核酸分子を含むベクターを提供し得る。本発明において使用されるベクターは、所望の目的（発現、送達、挿入、導入など）を達成する限り、どのようなベクターを用いても良いことが理解される。

#### 【0210】

一局面において、本発明は、上記核酸分子を含む細胞、上記ポリペプチドを発現した細胞を提供し得る。このような細胞としては、原核生物細胞、真核生物細胞（酵母細胞のような下等真核生物細胞であっても、哺乳動物細胞のような高等真核生物細胞であってもよい）、樹立細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0211】

一局面において、本発明は、上記ポリペプチドを含む、変性LDL検出剤；変性LDL検出用キット；動脈硬化診断剤を提供し得る。さらに、本発明は、これらを用いて被験体のサンプル中の変性LDLを検出する方法；変性LDL検出システム；LDLによって引き起こされる疾患の診断を支援する方法を提供し得る。

#### 【0212】

本発明の検出剤および診断剤は、当該分野で周知の賦形剤を含む得る。このような賦形剤は、本発明のポリペプチドのリガンド認識能を妨害しない限り、どのようなものであってもよいことが理解される。また、このような検出剤およびキット中に含まれるポリペプチドは、液体として提供されてもよいし、使用時に適宜調製するための凍結乾燥粉末として提供されてもよい。

30

#### 【0213】

一局面において、本発明は、上記ポリペプチド、上記ポリペプチドおよび基材を含む、変性LDL検出用デバイス、上記ポリペプチドを含む変性LDL検出剤などを使用して変性LDLを検出する方法を提供し得る。

#### 【0214】

本発明の方法は、上記ポリペプチド、デバイス、検出剤などを、サンプルと接触させて、サンプル中に含まれる変性LDLと複合体を形成させる工程を包含する。上記サンプルは、LDLを含む体液であり得る。代表的には、これらの体液としては、血液、血清、血漿、髄液、漿膜腔液、肺胞洗浄液などが挙げられるが、これらに限定されない。サンプルは、予め標識されていてもよいし、そうでなくてもよい。

40

#### 【0215】

一実施形態において、上記デバイスは、採用される検出方法／検出手段に依存して、種々の形態をとり得る。上記デバイスにおいて使用される好ましい基材としては、ビーズ、金粒子、プレート（例えば、マイクロタイタープレート）、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、金属薄膜、フィルター、チューブ、ダイヤモンド様炭素被膜

50

ステンレスなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、上記ビーズは、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂、天然樹脂、プラスチック、ゼラチン、シリカゲル、金属、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、アガロース、ポリアミノ酸、セルロース、ハイドロキシアパタイト、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、セルロースアセテート、ポリメチルメタクリレート、セルロースジアセテート、メチレンビニルアルコールから作製されるビーズなどであり得る。

#### 【0216】

さらに、本発明の方法は、複合体を検出する工程を包含し得る。複合体を検出するための手段／検出方法はまた、本発明のポリペプチドに付加される標識によって変動し得る。代表的な検出手段としては、光学的検出手段、物理的検出手段、化学的検出手段が挙げられる。好ましい実施形態において、上記光学的検出手段としては、一般に、分光光度計、FACS、比色計、蛍光光度計、化学発光検出器、電気化学発光検出器、イメージアナライザー、顕微鏡などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、上記物理的検出手段としては、一般に、電気検出、表面プラズモン共鳴、水晶発振マイクロバランス、熱測定などが挙げられるが、これらに限定されない。上記化学的検出手段としては、一般に、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーなどが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0217】

最も簡便に使用される変性LDLの検出方法は、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）を採用するものである。ELISAでは、標識系として酵素とその基質を用いる結合測定法であり、当該分野で周知である。

#### 【0218】

本発明の変性LDLによって引き起こされる疾患の診断を支援する方法においては、上記疾患に罹患していない被験体（例えば、健常者）サンプルと、上記疾患に罹患していることが疑われる被験体（患者）サンプルの両方で変性LDLが検出され、これらのサンプル間で本発明のポリペプチドと変性LDLとの複合体の量が比較されて、上記疾患が疑われている被験体中の変性LDLのコントロール被験体に対する相対値が算出される。基準物質としては、MDA-LDL（正常範囲：10～80 U/L）および酸化ホスファチジルコリン（正常範囲：8.4 U/mL～17.6 U/mL）が使用される。これらの正常範囲を参考にすることもできる。この相対値が異常値である場合、上記疾患に罹患していると診断される。変性LDLによって引き起こされる疾患は、代表的には、動脈硬化症、冠動脈疾患、動脈炎、動脈硬化症に基づく冠攣縮性狭心症、拡張型心筋症、虚血性心疾患（心筋梗塞、狭心症など）、脳血管障害（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、一過性脳虚血発作など）、大動脈瘤、腎梗塞、高脂血症などなどが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0219】

さらなる一局面において、本発明は、以下からなる群より選択される配列を含む、後期糖化反応生成物レセプター（RAGE）ポリペプチドを提供し得る：

（1）配列番号12に示されるアミノ酸配列；

（2）配列番号12に示されるアミノ酸配列において、92位および95位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型RAGEの活性を示すアミノ酸配列；および

（3）配列番号11に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において92位および95位のアミノ酸配列は、配列番号12における対応するアミノ酸を保持している、アミノ酸配列。好ましいのは、配列番号12における92位および95位のアミノ酸が、それぞれQ（グルタミン）およびA（アラニン）であるRAGE様ドメインポリペプチドである。このポリペプチドは、上記部位を変異させたことによって、大過剰のプロテアーゼに曝されても、分解されず、天然型RAGEの活性



を保持している。

#### 【0220】

一実施形態において、上記置換は、保存的置換であり得る。一実施形態において、上記欠失は、1位～15位であり得る。別の実施形態において、上記付加は、配列番号10の1位～22位から選択される任意の1～22個のアミノ酸配列のN末端側への付加、配列番号10の121位～404位から選択される任意の連続する1～283個のアミノ酸の付加、あるいはフレキシブルなリンカー配列もしくはその反復配列、またはLDL受容体関連タンパク質(LRP)のEGF反復配列(上皮増殖因子受容体様システインリッチドメイン)を含む配列の付加であり得る。好ましいリンカー配列としては、Gly-Gly-Ser、配列番号15、配列番号16に示されるアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0221】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、

(1) 配列番号14に示されるアミノ酸配列；

(2) 配列番号14に示されるアミノ酸配列において、92位、95位、206位および250位以外のアミノ酸位置で1または数個の置換、付加および／または欠失を含む、天然型RAGEの活性を示すアミノ酸配列；および

(3) 配列番号13に示される核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列であって、該コードされるアミノ酸配列において92位、95位、206位および250位のアミノ酸配列は、配列番号14における対応するアミノ酸を保持している、アミノ酸配列、

20

からなる群より選択される配列を包含し得る。好ましくは、本発明のポリペプチドは、AGEの認識能を有し得る。好ましいのは、配列番号14における92位、95位、206位および250位のアミノ酸が、それぞれQ(グルタミン)、A(アラニン)、N(アスパラギン)およびI(イソロイシン)であるRAGE様ドメインポリペプチドである。このポリペプチドは、上記部位を変異させたことによって、大過剰のプロテアーゼに曝されても、分解されず、天然型RAGEの活性を保持している。さらに、好ましいRAGE様ポリペプチドとしては、RAGEの23～250位をコードするRAGE2、23～230位をコードするRAGE3、101～332位をコードするRAGE4、または23～137位をコードするRAGE7、ならびにこれらのいずれかを含むポリペプチド、および上記の対応する変異を有するポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましいRAGE様ポリペプチドとしては、配列番号10における38位、99位、144位、208位、259位および301位におけるシステインに対応するアミノ酸がさらに保持されているものが挙げられる。

30

#### 【0222】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、タグ配列をさらに含み得る。上記タグ配列としては、代表的には、配列番号17、配列番号18、および配列番号19が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明のポリペプチドは、標識をさらに含み得る。代表的な標識としては、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい蛍光標識としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチアネート、ローダミン、過塩素酸1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン(DiD)、過塩素酸1,1'-ジオクタデシル-3,3,37,37-テトラメチル-endo-カルボシアニン(DiI)、Alexa、蛍光タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい化学発光標識としては、ルミノール、ルシゲニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい生物発光標識としては、ルシフェラーゼ、エクオリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0223】

一局面において、本発明の核酸分子は、以下からなる群より選択される配列を包含し得る：

50

(1) 配列番号 11 に示される核酸配列；および

(2) (1) の核酸配列と相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列であって、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列において 92 位および 95 位のアミノ酸配列は、配列番号 12 における対応するアミノ酸を保持し、かつ天然型 R A G E の活性を示す、核酸配列。また、好ましい R A G E 様ポリペプチドをコードする核酸分子は、発現された場合に、発現されたポリペプチドにおいて、配列番号 12 における 92 位および 95 位のアミノ酸が、それぞれ Q (グルタミン) および A (アラニン) であるポリペプチドをコードする核酸分子である。このポリペプチドは、上記部位を変異させたことによって、大過剰のプロテアーゼに曝されても、分解されず、天然型 R A G E の活性を保持している。さらに、好ましい R A G E 様ポリペプチドをコードする核酸分子は、R A G E の 23 ~ 250 位をコードする R A G E 2 コード核酸分子、23 ~ 230 位をコードする R A G E 3 コード核酸分子、101 ~ 332 位をコードする R A G E 4 コード核酸分子、または 23 ~ 137 位をコードする R A G E 7 コード核酸分子、ならびにこれらのいずれかの R A G E 様ポリペプチドを含むポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい R A G E 様ポリペプチドをコードする核酸分子としては、配列番号 10 における 38 位、99 位、144 位、208 位、259 位および 301 位におけるシステインに対応するアミノ酸がさらに保持されているものが挙げられる。

#### 【0224】

好ましい実施形態において、上記天然型 R A G E の活性は、A G E の認識能であり得る。さらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、タグをコードする核酸配列をさらに含む得る。

#### 【0225】

一局面において、本発明は、上記の核酸分子を含むベクターを提供し得る。本発明において使用されるベクターは、所望の目的（発現、送達、挿入、導入など）を達成する限り、どのようなベクターを用いても良いことが理解される。

#### 【0226】

一局面において、本発明は、上記核酸分子を含む細胞、上記ポリペプチドを発現した細胞を提供し得る。このような細胞としては、原核生物細胞、真核生物細胞（酵母細胞のような下等真核生物細胞であっても、哺乳動物細胞のような高等真核生物細胞であってもよい）、樹立細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0227】

一局面において、本発明は、上記ポリペプチドを含む、A G E 検出剤；A G E 検出用キット；糖尿病性血管障害診断剤を提供し得る。さらに、本発明は、これらを用いて被験体のサンプル中の A G E を検出する方法；A G E 検出システム；A G E によって引き起こされる疾患の診断を支援する方法を提供し得る。

#### 【0228】

本発明の検出剤および診断剤は、当該分野で周知の賦形剤を含み得る。このような賦形剤は、本発明のポリペプチドのリガンド認識能を妨害しない限り、どのようなものであってもよいことが理解される。また、このような検出剤およびキット中に含まれるポリペプチドは、液体として提供されてもよいし、使用時に適宜調製するための凍結乾燥粉末として提供されてもよい。

#### 【0229】

一局面において、本発明は、上記ポリペプチド、上記ポリペプチドおよび基材を含む、A G E 検出用デバイス、上記ポリペプチドを含む A G E 検出剤などを使用して A G E を検出する方法を提供し得る。

#### 【0230】

本発明の方法は、上記ポリペプチド、デバイス、検出剤などを、サンプルと接触させて、サンプル中に含まれる A G E と複合体を形成させる工程を包含する。上記サンプルは、タンパク質を含む体液であり得る。代表的には、これらの体液としては、血液、血清、血

10

20

30

40

50

漿、髄液、漿膜腔液、関節液、肺胞洗浄液、涙液、尿などが挙げられるが、これらに限定されない。サンプルは、予め標識されていてもよいし、そうでなくてもよい。サンプルは、予め標識されていてもよいし、そうでなくてもよい。

#### 【0231】

一実施形態において、上記デバイスは、採用される検出方法／検出手段に依存して、種々の形態をとり得る。上記デバイスにおいて使用される好ましい基材としては、ビーズ、金粒子、プレート（例えば、マイクロタイタープレートが挙げられる）、試験管、チップ、磁性粒子、膜、繊維、スライドガラス、または金属薄膜などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、上記ビーズは、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂、天然樹脂、プラスチック、ゼラチン、シリカゲル、金属、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、アガロース、ポリアミノ酸、セルロース、ハイドロキシアパタイト、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、セルロースアセテート、ポリメチルメタクリレート、セルロースジアセテート、メチレンビニルアルコールから作製されるビーズなどであり得る。

10

#### 【0232】

さらに、本発明の方法は、複合体を検出する工程を包含し得る。複合体を検出するための手段／検出方法はまた、本発明のポリペプチドに付加される標識によって変動し得る。代表的な検出手段としては、光学的検出手段、物理的検出手段、化学的検出手段が挙げられる。好ましい実施形態において、上記光学的検出手段としては、一般に、分光光度計、FACS、比色計、蛍光光度計、化学発光検出器、電気化学発光検出器、イメージアナライザー、顕微鏡などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、上記物理的検出手段としては、一般に、電気検出、表面プラズモン共鳴、水晶発振マイクロバランス、熱測定などが挙げられるが、これらに限定されない。上記化学的検出手段としては、一般に、質量分析法、高速液体クロマトグラフィーなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0233】

最も簡便に使用されるAGEの検出方法は、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）とAGE構造体を加水分解後に化学的に検出する方法を採用するものである。ELISAでは、標識系として酵素とその基質を用いる結合測定法であり、当該分野で周知である。

30

#### 【0234】

本発明のAGEによって引き起こされる疾患の診断を支援する方法においては、上記疾患に罹患していない被験体（例えば、健常者）サンプルと、上記疾患に罹患していることが疑われる被験体（患者）サンプルの両方でAGEが検出され、これらのサンプル間で本発明のポリペプチドとAGEとの複合体の量が比較されて、上記疾患が疑われている被験体中のAGEのコントロール被験体に対する相対値が算出される。基準物質としては、ピラリン（正常範囲：血漿中 $23 \text{ pmol/mL}$ 未満）、ペントシジン（正常範囲：血漿中 $0.00915 \sim 0.0431 \mu\text{g/mL}$ （ELISAで測定した場合））が使用される（「今日の臨床検査 2007-2008」発行所 株式会社 南江堂、参照）。これらの正常範囲を参考にすることもできる。この相対値が異常値である場合、上記疾患に罹患していると診断される。AGEによって引き起こされる疾患は、代表的には、糖尿病、非糖尿病性の腎機能障害、糸球体腎炎、糖尿病性血管障害、腎不全、細小血管症（腎症、網膜症、神経症など）、大血管障害（虚血性心疾患、脳血管疾患、閉塞性動脈硬化症などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0235】

（使用）

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドの、変性LDLによって引き起こされる疾患（例えば、動脈硬化症など）、またはAGEによって引き起こされる疾患（例えば、糖尿病性血管障害）を診断するための薬剤を製造するための使用を提供する。ここで使用されるポリペプチドは、本明細書において上記される任意のものであり得ることが

50

理解される。

【0236】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0237】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0238】

(材料および方法)

以下に示す実施例において、特段の記載がない場合、一般的に、以下に記載される材料および方法を用いて実験を行った。

【0239】

(実施例1：LOX-1は、大過剰のプロテアーゼによって分解される)

本発明者らは、変性LDLおよびAGEを検出することにおいてより安定な変性LDL認識分子を得るために、LOX-1のリガンド認識に必須のC型レクチン様ドメイン(CTL D; LOX-1のアミノ酸配列の143位~273位)のプロテアーゼに対する安定性について試験した。

【0240】

cDNAライブラリーを、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)から単離したmRNA(W hit taker, Walkersville, MD, USA)により、コピーキット(In vit rogen, San Diego, CA, USA)を用いてcDNAライブラリーを構築した。Sawamuraら(Nature 386(6620), 73-77(1997))に示される配列(GenBankアクセッション番号NM\_002543もまた参照のこと)に基づいて、CTL Dに適合する2種類の特異的プライマー:

5'-GTGCCAGGATCCCATATGCTTGTCTCGCAAGACTGG A-3'(順方向プライマー; 配列番号20); および

5'-CAGCTTCGAGTCACTGTGCTCTTAGGTTTGCC-3'

(逆方向プライマー; 配列番号21)

を用いて増幅した。増幅転写物を、ABI PRISM310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA)を用いて、DNA配列分析により確認した。

【0241】

N末端ビオチン化タンパク質を生産するために、pET22b(Novagen, Madison, WI)のNde I切断部位の上流に、AviTagをコードする配列を挿入し、pET N-Aviベクターを構築した。CTL DをコードするDNA(配列番号1)をNde I切断部位、Xho I切断部位でpET N-Aviにクローニングした。CTL D内の分子間S-S結合を正しく構成するため、発現宿主としてOrigami B(DE3)(Novagen, USA)を用いた。上記で得られたベクターを、Origami B(DE3)に形質転換した。Origami B(DE3)は、チオレドキシンレダクターゼおよびグルタチオンレダクターゼ変異株であり、細胞質内に発現させたタンパク質のS-S結合形成を促進する性質がある。AviTagを付加する場合、AviTagおよび目的タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターと、BirA遺伝子を含む発現ベクターとで同時に形質転換させた。得られた形質転換宿主細胞を、カナマイシン(15 μg/ml)、アンピシリン(50 μg/ml)、テトラサイクリン(12.5 μg/ml)、クロラムフェニコール(34 μg/ml)を添加した(いずれも最終濃度)LB培地中で25℃で培養した。CTL Dの発現を、IPTGを添加することによって

誘導し、20℃で20時間培養した後、菌体を収菌後、TBSにて洗浄し超音波破碎した。95%程度のCTL Dは封入体を形成し、可溶性ポリペプチドとして得られるのは、5%程度であったが、可溶性ポリペプチド画分をNi-アガロースに吸着させた後、イミダゾールによる濃度勾配で溶出し、CTL Dを部分精製した。得られたCTL Dは、Ni-アガロース上に固定した状態で、DiD-AcLDLを認識し結合することを確認した。

#### 【0242】

このようにして得られたCTL D (0.25 mg/mL) をプロテアーゼ処理した。反応は、0.1 ml (最終濃度で0.02 mgのCTL D含む) の系で行い (20 mM Tris, pH 8.4、150 mM NaCl、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)、2 ユニットのトロンビン (1 ユニット (1 u) は、1 mg の対象タンパク質を分解可能な濃度である)、10 u のエンテロキナーゼ (1 u は、0.05 mg の対象タンパク質を分解可能な濃度)、または10 u の第Xa因子 (1 u は、0.05 mg の対象タンパク質を分解可能な濃度) とともに25℃で18時間反応させた。18時間後にフェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF) を添加し、反応を停止した直後に、この反応産物を、定法に従ってSDS-PAGE用に処理した。プロテアーゼ非処理である対象区は、プロテアーゼ添加と同時にPMSFを添加してプロテアーゼを不活化すると共に、直ちにSDS-PAGE用のサンプル処理に供し、-20℃にて保存した。プロテアーゼ処理区、非処理区をSDS-PAGEで泳動し、クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色に供したところ、低分子領域にCTL Dの断片が認められた (図3を参照のこと)。さらに、ペプチドマッピングを行ったところ、CTL Dは、LOX-1のR231とG232の間、およびR248とG249との間に対応する位置で切断され、この切断部位はLOX-1のリガンド認識に必須なアミノ酸残基を含むことが明らかになった (図5を参照のこと)。

#### 【0243】

従って、本発明者らは、リガンド認識能に影響を与えずにプロテアーゼ耐性が付与されたCTL D様ポリペプチドの生成を試みた。

#### 【0244】

##### (実施例2：CTL D様ポリペプチドの生成)

実施例1において得られた知見に基づいて、上記の切断部位2箇所に変異を導入したCTL D様ポリペプチド (G232A/G249A; 本実施例中、PR-CTL Dともいう) をコードする核酸を、定法に従って生成した。定法に従って、この核酸を、シアン蛍光タンパク質 (CFP) を融合させた哺乳動物用発現ベクターpECFP (Clontech, USA) に導入することによって、N末端にCFPが融合したPR-CTL Dコード核酸を含むプラスミドを構築した。CHO細胞を10% FCSを補充したF12培地中、37℃において5% CO<sub>2</sub> 加湿雰囲気下で培養した。1×10<sup>4</sup> 細胞/mLの密度で懸濁したCHO細胞400 μlを、トランスフェクションを行う24時間前に、カバーガラス上に播種した。細胞を、Lipofect AMINE試薬を用いて製造業者のプロトコルに従って、細胞をトランスフェクトし、48時間インキュベートし、CHO細胞に一過性発現させた。その後、この細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、CFPの蛍光によりCTL D様ポリペプチド発現細胞が確認できた。また、リガンドである変性LDLを蛍光色素である過塩素酸1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドカルボシアニン (DiD; Molecular Probes, Eugene, OR) により標識し、この変性LDLをCTL D様ポリペプチド発現細胞に添加したところ、リガンドの認識能および取り込み能が確認できた (図4)。

#### 【0245】

これらの結果から、PR-CTL D発現細胞は、明瞭なリガンド取り込み能を示し、プロテアーゼ耐性を付与するために行ったアミノ酸置換は、変性LDL認識能には何ら影響を与えていないことが示された。

#### 【0246】

さらに、このPR-CTL Dのプロテアーゼ感受性を検討したところ、2 u (1 u は、

1 mgの対象タンパク質を分解可能な濃度)のトロンビンで、0.02 mgのPR-CTLDを18時間処理しても分解が起こらないことが確認され、プロテアーゼ耐性CTLD様ポリペプチド(PR-CTLD)を生成することに成功した(図3)。

#### 【0247】

(実施例3：タグ配列付加CTLD様ポリペプチドの生成)

実施例2において生成したCTLD様ポリペプチド(PR-CTLD)に加えて、さらに、CTLD様ポリペプチドと同様のプロテアーゼ耐性変異を導入した長さの異なるタンパク質PR-CTLD14(ネック領域の14アミノ酸を含む、LOX-1のアミノ酸129位~273位;図5)を作成した。PR-CTLD14のアミノ酸配列には分子間S-S結合に参与するCysが含まれる。分子間S-S結合を形成しなくても認識能はあるが、細胞上で機能を発現する際には、一定以上の分子密度をとる必要がある(Xieら、DNA and Cell Biology 23(2):111-117(2004)およびMatsunagaら、Experimental Cell Research 313:1203-1214(2007))。そこで、高密度集積に寄与しえる構造として分子間S-S結合形成が可能なPR-CTLD14もまた、実施例2と同様に生成して、変性LDLを検出するアッセイ系を構築するのに使用した。

#### 【0248】

発現させたプロテアーゼ耐性のCTLD様ポリペプチド(PR-CTLDおよびPR-CTLD14)を検出/評価系において活用する際には、有効な修飾が施されていることが望ましい。そこでこれらの分子のN末側に2種類のタグ(一つは大腸菌内でビオチン化を受ける配列AviTag(GLNDIFEAQKIEWHE(配列番号17))、他方はストレプトアビジンに直接認識される配列であるStreptag(AWRHPQFGG(配列番号18))またはStreptagII(WSHPQFEK(配列番号19))を付加した。ビオチンとストレプトアビジンの結合は非共有結合で最も強く(KD=10<sup>-15</sup>M)、ストレプトアビジンを介した固定化などへの発展に際しても有効である。しかし、ビオチン化のためには、培地中へのビオチンの添加、ビオチンリガーゼを共発現させる必要があるなどの手間が掛かる。そこで、結合の強さでは劣るが(KD=10<sup>-7</sup>M)、遺伝子配列上でタグを付加し大腸菌で発現させればストレプトアビジンへの結合が可能なStreptagII(WSHPQFEK(配列番号19))付加タンパク質も生成した。いずれもpET系ベクターの5'側に、タグ配列をコードする核酸配列を導入して発現用プラスミドとした(pET N-Avi、pET N-StII)。定法に従って、これらの発現ベクターそれぞれにPR-CTLDおよびPR-CTLD14を導入して、発現構築物を生成した。AviTag付加タンパク質のビオチン化のために、pET系ベクターと同一菌体内で保持可能なpAC系ベクターにビオチンリガーゼをコードしているBirA遺伝子を導入し、発現用プラスミドを作製した(BirA/pAC)。

#### 【0249】

PR-CTLDおよびPR-CTLD14はともに、分子内S-S結合の形成が構造の安定化と機能に必須である。そこで発現宿主としてOrigami B(DE3)(Novagen, USA)を用いた。Origami B(DE3)は、チオレドキシンレダクターゼおよびグルタチオンレダクターゼ変異株であり、細胞質内に発現させたタンパク質のS-S結合形成を促進する性質がある。プロテアーゼ耐性CTLD様ポリペプチドにAviTagを付加する場合、AviTagおよび目的タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターと、BirA遺伝子を含む発現ベクターとで同時に形質転換させた。得られた形質転換宿主細胞を、カナマイシン(15 μg/ml)、アンピシリン(50 μg/ml)、テトラサイクリン(12.5 μg/ml)、クロラムフェニコール(34 μg/ml)を添加した(いずれも最終濃度)LB培地中で37℃で培養した。StreptagIIコード核酸を含む発現ベクターで形質転換した場合は、カナマイシン(15 μg/ml)、アンピシリン(50 μg/ml)、テトラサイクリン(12.5 μg/ml)を添加したLB培地中で37℃で培養した。PR-CTLDおよびPR-CTLD14の発現を、IPTGを添加することによって誘導した。

## 【0250】

予備実験として、PR-CTLDおよびPR-CTLD14を可溶性ポリペプチドとして発現するための温度条件および誘導時間を調べた。温度条件は、(1) 37℃、(2) 25℃および(3) 20℃に設定した。誘導時間は、(A) 2時間、(B) 4時間、(C) 8時間、(D) 18時間、(E) 24時間に設定した。まず、これらの宿主細胞を37℃で誘導し、誘導されたタンパク質の分子量を測定したところ、予想される分子量のタンパク質の誘導が確認されたが、100%が不溶性画分に回収された。この結果に鑑みて、誘導時間を変動させずに、誘導時の温度を25℃に下げたところ、わずかながら可溶性ポリペプチドとしての発現が確認された。さらに誘導時の温度を20℃にまで下げて、誘導時間の検討を行ったところ、可溶性ポリペプチドとして回収するためには、温度条件(3) および誘導時間(D) 18時間～(E) 24時間、特に20～24時間の誘導が適切であると結論付けられた(図6を参照のこと)。

10

## 【0251】

上記の形質転換細胞を37℃で12時間前培養した。本培養は、この前培養液を、20倍希釈になるように上記の各LB培地に添加し、25℃で旋回培養した。上記で得られた条件に基づいて、培養液の光学密度(A600)が約0.5に達したときに、培養温度を20℃に下げると同時に、1mM(最終濃度)IPTGを添加し、目的タンパク質の発現を誘導した。AviTag付加タンパク質を生成する場合は、誘導開始と同時に50μM(最終濃度)のビオチンを添加し、発現される目的タンパク質のビオチン化も同時に行わせた。誘導開始後20～24時間後に12,000rpm×5分の遠心分離により菌体をペレット化して上清を廃棄し、適量のTBSで洗浄した。

20

## 【0252】

TBSに懸濁した菌体を、超音波破碎機にて破碎後、15,000rpm×30分の遠心分離により回収される上清を可溶性画分とした。発現された目的タンパク質の90%以上が不溶性画分に残った。目的タンパク質は、精製のためのHisタグがC末側に付加されているので、Ni-アガロースに結合させた後、イミダゾールにより溶出させ精製した(図7)。検出用として付加したAviTagも精製に利用可能であり、この場合は、streptavidin Mutein matrix(Roche)に吸着後、ビオチンにより溶出させた。StrepTagIIの場合、Strep-Tactin Sepharose(IBA, US)に吸着後、desthiobiotinにより溶出させた。PR-CTLDおよびPR-CTLD14とも、1L当たりの収量は、以下の表1に示すように、0.5mg未満であった。

30

## 【0253】

## 【表1】

|           | 発現レベル | 可溶性 | 収量(純度)          | 活性 |
|-----------|-------|-----|-----------------|----|
| CTLD      | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |
| CTLD14    | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |
| PR-CTLD   | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |
| PR-CTLD14 | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |

40

## 【0254】

(実施例4：CTLD様ポリペプチドによる変性LDLの検出)

ヒト血漿中の動脈硬化危険因子である変性LDLの測定手法は、疾病の早期診断、機能性食品の予防効果評価、生活改善や投薬による治療効果の評価など様々な分野での活用が期待されている。しかし、変性LDLは分子の修飾構造が一定ではなく、意味のある分子種が明確でないために、モノクローナル抗体による変性LDLの検出は、必ずしも正確であるとは言えなかった。一方で、LOX-1は、幅広い分子種の変性LDLを認識可能な曖昧さがありながら、変性を受けたLDLには鋭敏に反応する可能性が高い。そこで、簡

50

便かつ汎用性が高いELISAシステムにおいて、抗体に代わる分子として受容体認識能を活用可能か検討した。

#### 【0255】

##### (1) リガンドの調製

リガンドとして、以下のものを使用した：LDL（変性を受けていない正常なLDL（ネガティブコントロール。ヒト血漿より調製、またはMolecular Probe, USAより購入）；完全酸化LDL（銅酸化法により調製）；部分酸化LDL（銅酸化法により調製）；マロンジアルデヒド化LDL（MDA-LDL（酸化ストレスの指標）。MDA修飾により調製）。

#### 【0256】

酸化LDLを、以下のように調製した。調製に際して、可能なものはすべて滅菌し、可能な限り無菌的に操作した。

#### 【0257】

完全酸化LDLに関しては、LDLを、必要な場合、酸化する前に予め透析して、EDTAを完全に取り除いた。このEDTA非含有LDLを、EDTA非含有PBS（以下、（－）PBSという）で1mg/mL濃度の溶液にし、その溶液に、最終濃度が5μMになるようにCuSO<sub>4</sub>を添加した。次いで、この溶液を、37℃で20時間インキュベートし、その後、50μM ブチル化ヒドロキシトルエンまたは1mM EDTA（最終濃度）を添加して、酸化を停止した。この溶液を、Tris-EDTA（50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% EDTA）またはPBS（20（－）（1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4）に対して透析した。得られた完全酸化LDL含有溶液を濾過滅菌し、その濾液に0.02% NaN<sub>3</sub>（最終濃度）を添加し、使用時まで4℃で保存した。

#### 【0258】

部分酸化LDLに関しては、同様に、EDTA非含有LDLを、EDTA非含有PBS（以下、（－）PBSという）で2mg/mL濃度の溶液にし、その溶液に、最終濃度が2μMになるようにCuSO<sub>4</sub>を添加した。次いで、この溶液を、37℃で4時間インキュベートし、その後、50μM ブチル化ヒドロキシトルエンまたは1mM EDTA（最終濃度）を添加して、酸化を停止した。この溶液を、Tris-EDTA（50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% EDTA）またはPBS（30（－）に対して透析した。得られた部分酸化LDL含有溶液を濾過滅菌し、その濾液に0.02% NaN<sub>3</sub>（最終濃度）を添加し、使用時まで4℃で保存した。

#### 【0259】

MDA-LDLを以下のように調製した。0.165mLのマロンアルデヒドビス（ジメチルアセタール）（Aldrich, USA）の急速酸加水分解（0.2mLの12M HCl）により、マロンジアルデヒドを室温で生成し、4.8mLの0.1M リン酸緩衝液（pH 6.4）をこの溶液に添加し、10M NaOHでpHを6.4に調節した。EDTA非含有LDLを、0.01M リン酸ナトリウム/0.15M NaCl/0.01% EDTA, pH 7.4（緩衝液A）中の等量のタンパク質（5～10mg/mL）と、0.1M リン酸ナトリウム（pH 6.4）中の新たに調製した0.2M マロンジアルデヒドとを混合し、この混合物を37℃で3時間インキュベートすることによって修飾した。この混合物を緩衝液Aに対して、4℃で16時間透析することにより、反応を停止した。MDA-LDL含有溶液を濾過滅菌し、その濾液に0.02% NaN<sub>3</sub>（最終濃度）を添加し、使用時まで4℃で保存した。

#### 【0260】

##### (2) CTL D様ポリペプチドによる変性LDLの検出

96穴プレート（Nunc）に、LDLおよび上記のように調製した各リガンドを、0.1μg/mL、1μg/mL、10μg/mLにTBSで希釈した後、100μL/ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置した。TBSでプレートを洗浄し、2%スキムミルク/

10

20

30

40

50



TBSにて1時間ブロッキングし、さらにTBSで洗浄した後、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した受容体（各ネイティブCTL D、ネイティブCTL D 14、PR-CTL DおよびPR-CTL D 14）溶液 $100\mu\text{l}$ を添加し、2時間室温で放置した。TBSにて十分に洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ストレプトアビジン（Roche, Germany）の $100,000\times$ 希釈溶液を $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で添加し、さらに室温で1時間放置した。TBSにて十分に洗浄後、HRPの発色基質である3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB（Sigma-Aldrich, USA）を $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で添加し、発色を確認後に反応停止液として $1\text{N HCl}$ を $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で加え、A450における吸光度を測定した。比較対照として、市販の抗酸化LDL抗体（Novus Biologicals, USA）、抗MDA-LDL抗体（Antibody shop, Denmark）を、CTL D様ポリペプチドの代わりに使用した。抗体使用時は、HRP-ストレプトアビジンの代わりに、HRP標識2次抗体を使用した。

10

#### 【0261】

その結果、PR-CTL DおよびPR-CTL D 14はともに、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度（ウェル当たりでは、 $100\text{ng}$ ）の濃度の完全酸化LDL、部分酸化LDL、MDA-LDLを十分認識可能なことが示された。未変性のLDLとも反応はするが、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ （well当たりでは $1\mu\text{g}$ ）と検出感度が低かった。また、目的タンパク質の変性LDL認識能は、以下の表2に示されるように、プロテアーゼ耐性変異を導入していないネイティブCTL D、ネイティブCTL D 14と比較しても、何ら遜色が無いことが示された。

20

#### 【0262】

さらに、市販の抗酸化LDL抗体、抗MDA-LDL抗体は、以下の表3に示されるように、未変性LDLとも反応する上、酸化LDL、MDA-LDLへの特異性が特別高いことが明らかになった。

#### 【0263】

これらの結果から、PR-CTL D、PR-CTL D 14は、ELISAにおける抗体に代わる変性LDL検出系として十分に機能し得ることが示された。

#### 【0264】

【表 2】

|                                     | リガンドなし                   |      | LDL                     |                      | 完全酸化 LDL               |                      | 中程度酸化 LDL              |                      | MDA LDL                |                      |
|-------------------------------------|--------------------------|------|-------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
|                                     | 濃 度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450 | 濃度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450                 | 濃度<br>( $\mu$<br>g/ml) | A450                 | 濃度<br>( $\mu$<br>g/ml) | A450                 | 濃度<br>( $\mu$<br>g/ml) | A450                 |
| CTLD<br>(低純度)                       | 0                        | 0.05 | 0.1<br>1<br>10          | 0.08<br>0.07<br>0.08 | 0.1<br>1<br>10         | 0.08<br>0.1<br>0.15  | 0.1<br>1<br>10         | 0.11<br>0.12<br>0.14 | 0.1<br>1<br>10         | 0.08<br>0.1<br>0.13  |
| CTLD14<br>(低純度)                     | 0                        | 0.07 | 0.1<br>1<br>10          | 0.07<br>0.06<br>0.10 | 0.1<br>1<br>10         | 0.07<br>0.09<br>0.23 | 0.1<br>1<br>10         | 0.07<br>0.09<br>0.14 | 0.1<br>1<br>10         | 0.08<br>0.08<br>0.16 |
| PR-CTLD                             | 0                        | 0.08 | 0.1<br>1<br>10          | 0.08<br>0.08<br>0.32 | 0.1<br>1<br>10         | 0.09<br>0.13<br>0.45 | 0.1<br>1<br>10         | 0.08<br>0.16<br>0.45 | 0.1<br>1<br>10         | 0.09<br>0.14<br>0.4  |
| PR-CTLD<br>14                       | 0                        | 0.06 | 0.1<br>1<br>10          | 0.06<br>0.06<br>0.16 | 0.1<br>1<br>10         | 0.09<br>0.15<br>0.36 | 0.1<br>1<br>10         | 0.08<br>0.18<br>0.46 | 0.1<br>1<br>10         | 0.09<br>0.16<br>0.55 |
| 抗<br>MDA-LDL<br>(モノクロ<br>ーナル抗<br>体) | 0                        | 0.07 | 0.1<br>1<br>10          | 0.08<br>0.13<br>0.32 | 0.1<br>1<br>10         | 0.07<br>0.08<br>0.32 | 0.1<br>1<br>10         | 0.07<br>0.13<br>0.4  | 0.1<br>1<br>10         | 0.07<br>0.11<br>0.52 |

【0265】

【表 3】

|                                | リガンドなし                   |      | LDL                     |                     | 完全酸化 LDL                |                      | 中程度酸化 LDL               |                      | MDA LDL                 |                     |
|--------------------------------|--------------------------|------|-------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
|                                | 濃 度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450 | 濃度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450                | 濃度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450                 | 濃度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450                 | 濃度<br>( $\mu$ g<br>/ml) | A450                |
| 抗 酸化<br>LDL(ポリ<br>クローナ<br>ル抗体) | 0                        | 0.08 | 0.1<br>1<br>10          | 0.08<br>0.1<br>0.35 | 0.1<br>1<br>10          | 0.08<br>0.11<br>0.47 | 0.1<br>1<br>10          | 0.08<br>0.17<br>0.48 | 0.1<br>1<br>10          | 0.07<br>0.12<br>0.4 |

【0266】

総変性LDLを捕捉した後、総変性LDLに占める各種変性LDL分子種の検出への可能性を明らかにする目的で、サンドイッチELISAシステムにおけるPR-CTLDの有効性を検討した。

【0267】

96穴のプレートに5 $\mu$ g/mlの濃度にTBSにて希釈した受容体（PR-CTLDおよびPR-CTLD14）溶液を、100 $\mu$ l/ウェルで添加した。4℃で一晩放置した後、2% スキムミルク溶液で1時間ブロッキングし、さらにTBSでの洗浄後、LDL、完全酸化LDL、部分酸化LDL、MDA-LDLの各リガンドを添加し、室温で2

10

20

30

40

50

時間反応させた。TBSにて十分に洗浄した後、抗酸化LDL抗体、または抗MDA-LDL抗体と反応させ、TBSで十分に洗浄し、次いで、HRP標識2次抗体と反応させ、TBSで十分に洗浄した。この96穴プレートに、TMBを基質として添加し、上記のようにA450の吸光度を測定した。上記で説明したように、使用した抗体の特異性が低いために、完全なタイプ分けには至らなかったが、各種LDLを捕捉後、異なった特異性の抗体などの分子を使用することにより、最初の段階で捕えられた総変性LDLを分類可能なことが示された（表4）。

【0268】

【表4】

| リガンド \ 抗体 | 抗 OxLDL の吸光度(A450) | 抗 MDA LDL の吸光度(A450) |
|-----------|--------------------|----------------------|
| LDL       | 0.11               | 0.1                  |
| 完全酸化 LDL  | 0.15               | 0.13                 |
| 中程度酸化 LDL | 0.14               | 0.13                 |
| MDA-LDL   | 0.15               | 0.23                 |

10

【0269】

（実施例5：CTL D様ポリペプチドによる変性LDL含有溶液からの変性LDLの除去）

20

溶液中に存在する変性LDLなどの除去にPR-CTL Dなどが有効であるか明らかにする目的で、PR-CTL D等をビーズ上に固定化し、この固定化ビーズに変性LDLを結合させた。Mut e i n M a t r i x 10 $\mu$ l（50%スラリー）とビオチン化CTL Dまたはビオチン化PR-CTL D（5 $\mu$ g/100 $\mu$ l TBS）を4℃で30分間反応させた。2,500rpm $\times$ 5分間のスイングローターによる遠心分離でこのMatrixを回収後、冷TBSで繰り返し洗浄した。続いて、DiD標識変性LDLと5分間反応させた後、このMatrixと上清を回収した。コントロールとして、CTL Dを結合させていないMut e i n M a t r i x 10 $\mu$ l（50%スラリー）のみを添加した実験区を設けた。回収した上清（100 $\mu$ l）を蛍光フリーのマイクロタイタープレートに分注し、マイクロタイタープレート対応の蛍光光度計（M o l e c u l a r D e v i c e）により蛍光強度を測定した。その結果、CTL DもしくはPR-CTL Dを結合したMatrixと反応させた上清からは蛍光がほとんど検出できず、CTL DおよびPR-CTL Dにより変性LDLが溶液中から完全に除去されたことが示された。

30

【0270】

上記の結果から、表5に示すように、固相上に固定化されたCTL DおよびPR-CTL Dは、変性LDLを結合し、このことによって溶液中から除去可能なことが示された。

【0271】

【表5】

|      | TBS<br>(コントロール) | 非 処 理<br>DiDAcLDL 溶液 | CTL D 結 合<br>Matrix で処理 | PR-CTL D 結 合<br>Matrix で処理 |
|------|-----------------|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| 蛍光強度 | 16              | 286                  | 18                      | 17                         |

40

【0272】

（実施例6：PR-CTL DおよびPR-CTL D14を発現する細胞株による変性LDLの検出）

変性LDLを検出する方法として、PR-CTL DおよびPR-CTL D14を発現する細胞を生成し、この細胞株を用いてサンプル中に含まれる変性LDLを蛍光強度により測定することにより検出することを試みる。

50

## 【0273】

実施例2に記載されるPR-CTLDおよびPR-CTLD14を発現する細胞を、 $1 \times 10^4$ 細胞/mLの密度でカバーガラスに播種して、80%コンフルエントになるまで定法に従って培養する。実施例4(1)に記載されるように調製したリガンドまたはヒト患者から得られたサンプルを定法に従ってDiDで標識する。この標識サンプルまたは上記の各標識リガンド4 $\mu$ gを、カバーガラスに添加し、37℃で1時間、5%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下でインキュベートする。次いで、培地にて洗浄後、観察用チャンバーに装着し、細胞に取り込まれた蛍光強度を計測する。

## 【0274】

これらの実験を行うことによって、図4に示されるように、サンプル中の変性LDLを検出できることが確認できる。

10

## 【0275】

(実施例7：PR-CTLDおよびPR-CTLD14の動脈硬化診断への応用)

実施例4(2)に記載されるように、変性LDLを測定を測定する。動脈硬化患者から得られた血漿または健常者から得られた血漿をサンプルとして使用する。96穴プレート(Nunc)に、これらサンプルを100 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置する。TBSでプレートを洗浄し、2%スキムミルク/TBSにて1時間ブロッキングおよびTBSで洗浄した後、5 $\mu$ g/mLに希釈した受容体(PR-CTLDおよびPR-CTLD14)溶液100 $\mu$ lを添加し、2時間室温で放置する。TBSにて十分に洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Roche, Germany)の100,000 $\times$ 希釈溶液を100 $\mu$ l/ウェルで添加し、さらに室温で1時間放置する。TBSにて十分に洗浄後、HRPの発色基質である3,3',5,5'

20

テトラメチルベンジジン(TMB(Sigma-Aldrich, USA))を50 $\mu$ l/ウェルで添加し、発色を確認後に反応停止液として1N HClを50 $\mu$ l/ウェルに加え、A450における吸光度を測定する。得られた吸光度値からサンプル中に含まれる変性LDLの相対量を算出する。これらの値を、臨床検査で使用される値と比較することによって、変性LDLによって引き起こされる疾患に罹患しているかどうかを予想することができる。

## 【0276】

(実施例8：RAGEは、大過剰のプロテアーゼによって分解される)

30

本発明者らは、AGEを検出することにおいてより安定なAGE認識分子を得るために、図8に模式的に示されるRAGEの細胞外ドメイン(sRAGE1; RAGEのアミノ酸配列の23位~332位)のプロテアーゼに対する安定性について試験した。

## 【0277】

ヒト肺polyA RNAを鋳型に逆転写反応後、GenBankアクセッション番号AB036432に示される配列に基づいて、RAGEに適合する2種類の特異的プライマー：

5'-GAATTCAGGATGGCAGCCGGAAACAGCAG(順方向プライマー；配列番号22)；および

5'-CTCGAGTCAAGGCCCTCCAGTACTAC-3'(逆方向プライマー；配列番号23)

40

を用いて増幅した。増幅転写物を、ABI PRISM310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、DNA配列分析により確認した。

## 【0278】

pET系ベクターの3'側にAviタグ配列をコードする核酸配列を導入して、C末端ビオチン化タンパク質の生産を可能とするベクターを構築し発現用プラスミドとした(pPET-C-Avi)。定法に従って、発現ベクターにRAGE1を導入して、発現構築物を生成した。

## 【0279】

50

RAGEは、CTLDと同様に、S-S結合の形成が構造の安定化と機能に必須である。そこで発現宿主としてOrigami B (DE3) (Novagen, USA)を用いた。Origami B (DE3)は、チオレドキシソレダクターゼおよびグルタチオンレダクターゼ変異株であり、細胞質内に発現させたタンパク質のS-S結合形成を促進する性質がある。ビオチン化ペプチドとして生産させるために、BirA遺伝子を含む発現ベクター (pET系ベクターと同一菌体内で保持可能なpAC系ベクターにビオチンリガーゼをコードしているBirA遺伝子を導入)とで同時に形質転換させた。得られた形質転換宿主細胞を、カナマイシン ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、アンピシリン ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、テトラサイクリン ( $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、クロラムフェニコール ( $34 \mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加した (いずれも最終濃度) LB培地中で  $25^\circ\text{C}$  で培養した。RAGE様ポリペプチドの発現を、IPTGを添加することによって誘導した。誘導は  $25^\circ\text{C}$  で18時間行った。 $25^\circ\text{C}$  で誘導することにより、90%以上が可溶性ポリペプチドとして発現された。誘導開始と同時に  $50 \mu\text{M}$  (最終濃度) のビオチンを添加し、発現される目的タンパク質のビオチン化も同時に行わせた。誘導開始後18時間後に12,000rpm×5分の遠心分離により菌体をペレット化して上清を廃棄し、適量のTBSで洗浄した。

10

#### 【0280】

TBSに懸濁した菌体を、超音波破碎機にて破碎後、15,000rpm×30分の遠心分離により回収される上清を可溶性画分とした。目的タンパク質は、精製のためのHisタグがC末側に付加されているので、Ni-アガロースに結合させた後、イミダゾールにより溶出させ精製した。検出用として付加したAviTagも精製に利用可能であり、この場合は、streptavidin Mutein matrix (Roche) に吸着後、ビオチンにより溶出させた。精製したタンパク質は、認識されている結合特異性およびRAGE (リボースにより糖化处理をしたBSA)、FAGE (フルクトースにより処理をしたBSA)、GAGE (グルコースにより糖化处理をしたBSA) に対する親和性を示した。このことは、この精製タンパク質がビオチン化されていることを利用し、BIACOREのストレプトアビジンセンサーチップ上に、リガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化し、このセンサーチップをBIACORE本体に挿入後、表面プラズモン共鳴 (Biacore 2000, Amersham-Pharmacia) により確認した。

20

#### 【0281】

このようにして得られたsRAGE1 ( $0.25 \text{ mg}/\text{mL}$ ) をプロテアーゼ処理した。反応は、 $0.1 \text{ mL}$  (最終濃度で  $0.02 \text{ mg}$  のsRAGE1含む) の系で行い ( $20 \text{ mM}$  Tris,  $\text{pH} 8.4$ 、 $150 \text{ mM}$  NaCl、 $2.5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ )、2ユニットのトリプシン (1uは、 $1 \text{ mg}$  の対象タンパク質を分解可能な濃度)、10uのエンテロキナーゼ (1uは、 $0.05 \text{ mg}$  の対象タンパク質を分解可能な濃度)、または10uの第Xa因子 (1uは、 $0.05 \text{ mg}$  の対象タンパク質を分解可能な濃度) とともに  $25^\circ\text{C}$  で18時間反応させた。18時間後にPMSFを添加し、反応を停止した直後に、この反応産物を、定法に従ってSDS-PAGE用に処理した。プロテアーゼ非処理である対象区は、プロテアーゼ添加と同時にPMSFを添加しプロテアーゼを不活化すると共に、直ちにSDS-PAGE用のサンプル処理に供し、 $-20^\circ\text{C}$  にて保存した。プロテアーゼ処理区、非処理区を、定法に従ってSDS-PAGEで泳動し、CBB染色に供したところ、低分子領域にsRAGEの断片が認められた (図9を参照のこと)。さらに、ペプチドマッピングを行ったところ、sRAGE1は、大過剰のトリプシンではRAGEのR114とV115の間、およびR228とV229との間に該当する位置で、大過剰の第Xa因子ではRAGEのR114とV115の間、V117とY118との間、およびM272とK273との間に該当する位置で切断されることが明らかになった (図8を参照のこと)。

30

40

#### 【0282】

従って、本発明者らは、リガンド認識能に影響を与えずにプロテアーゼ耐性が付与されたRAGE様ポリペプチドの生成を試みた。

50

## 【0283】

(実施例9：RAGE様ポリペプチドの生成)

実施例8において得られた知見に基づいて、上記の切断部位4箇所に変異を導入したsRAGE1様ポリペプチド(R114Q/V117A/R228N/M272I；本実施例中、mRAGE1ともいう)を定法に従って生成した。この核酸を、定法に従って、シアン蛍光タンパク質(CFP)を融合させた哺乳動物用発現ベクターpECFP(Clontech, USA)またはpTarget(Promega)に導入することによって、N末端にCFPが融合したmRAGE1コード核酸を含むプラスミドを構築した。CHO細胞を10% FCSを補充したF12培地中、37℃において5%CO<sub>2</sub>加湿雰囲気下で培養した。1×10<sup>4</sup>細胞/mlの密度で懸濁したCHO細胞400μlを、トランスフェクションを行う24時間前に、カバースリップ上に播種した。細胞を、LipofectAMINE試薬を用いて製造業者のプロトコルに従って、細胞をトランスフェクトし、48時間インキュベートし、CHO細胞に一過性発現させた。その後、この細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、CFPの蛍光によりmRAGE1発現細胞が確認できた。また、リガンドであるリボースにより糖化处理したBSA(R-BSA)を蛍光色素であるAlexa633(Molecular Probe)により標識し、この標識糖化BSAをmRAGE1発現細胞に添加したところ、リガンドの認識能および取り込み能が確認できた。

10

## 【0284】

mRAGE1発現細胞は、明瞭なリガンド取り込み能を示し(図10)、プロテアーゼ耐性の増大を狙ったアミノ酸置換は、リガンド認識能には影響を与えていないことが示された。

20

## 【0285】

さらに、そのプロテアーゼ感受性を検討したところ、天然型に比べ耐性が上昇していることが示され、プロテアーゼ耐性の上がったRAGE分子の作出に成功した(図11)。

## 【0286】

(実施例10：RAGEのリガンド認識能に必須の最小領域の決定)

これまで、RAGEの細胞外領域がリガンド認識に必須であることは知られていたが、細胞外領域のどの部分がリガンド認識に必要十分であるかは明らかにされていない。よってリガンド認識に必須の最小領域を決定する目的で、領域欠損などによる削りこみを行って、miniRAGEを作製した。

30

## 【0287】

miniRAGEとして、GenBankアクセッション番号AB036432に示される配列に基づいて、以下のプライマー：

順方向プライマー(RAGE1、RAGE2、RAGE3、RAGE7、RAGE8、RAGE9に共通)

5'-CTACATATGGCTCAAAACATCACAGC-3' (配列番号24)

逆方向プライマー

RAGE1については、

5'-TTACTTCGAGAGCCTGCAAGTTGGCCCC-3' (配列番号25)

40

RAGE2については、

5'-TTACTTCGAGACCAGACACGGGGCTG-3' (配列番号26)

RAGE3については、

5'-TTACTTCGAGAAAGCTACTGCTCCACC-3' (配列番号27)

RAGE7については、

5'-TTACTTCGAGAAACACCAAGCCGTGAGT-3' (配列番号28)

50

8)

RAGE 8 については、

5' - TTACTTCGAGAAATCTGGTAGACACGG - 3' (配列番号 2

9)

RAGE 9 については、

5' - TTACTTCGAGACTTGGTCTCCTTTCC - 3' (配列番号 30

)

RAGE 4 については、順方向プライマー

5' - TCGCATATGGCAATGAACAGGAATGG - 3' (配列番号 3

1)

逆方向プライマー

5' - TTACTTCGAGAGCCTGCAGTTGGCCC - 3' (配列番号 32

)

を設計し、RAGE 2 (天然型 RAGE のアミノ酸配列 23 ~ 250 位) をコードする DNA、RAGE 3 (天然型 RAGE のアミノ酸配列 23 ~ 230 位) をコードする DNA、RAGE 4 (天然型 RAGE のアミノ酸配列 101 ~ 332 位) をコードする DNA、RAGE 7 (天然型 RAGE のアミノ酸配列 23 ~ 137 位) をコードする DNA、RAGE 8 (天然型 RAGE のアミノ酸配列 23 ~ 120 位) をコードする DNA、RAGE 9 (天然型 RAGE のアミノ酸配列 23 ~ 112 位) をコードする DNA を得た。

## 【0288】

これら mini RAGE をコードする DNA を、制限酵素の認識配列を付加した特異的プライマーにより PCR により増幅した後、pCR2.1 (Invitrogen) をクローニング用ベクターとして TA クローニングを行い、塩基配列を確認した。

## 【0289】

(実施例 11: タグ配列付加 RAGE 様ポリペプチドの生成)

実施例 10 において生成した RAGE 様ポリペプチド (sRAGE 1、mRAGE 1、RAGE 2 ~ RAGE 8) を検出/評価系において活用する際には、有効な修飾が施されていることが望ましい。そこでこれらの分子の N 末側に 2 種類のタグ (一つは大腸菌内でビオチン化を受ける配列 AviTag (GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号 17))、他方はストレプトアビジンに直接認識される配列である Streptag (AWRHPQFGG (配列番号 18) または WSH PQFEK (配列番号 19)) を付加した。ビオチンとストレプトアビジンの結合は非共有結合で最も強く ( $KD = 10^{-15} M$ )、ストレプトアビジンを介した固定化などへの発展に際しても有効である。しかし、ビオチン化のためには、培地中へのビオチンの添加、ビオチンリガーゼを共発現させる必要があるなどの手間が掛かる。そこで、結合の強さでは劣るが ( $KD = 10^{-7} M$ )、遺伝子配列上でタグを付加し大腸菌で発現させればストレプトアビジンへの結合が可能な Streptag II (WSHPQFEK (配列番号 19)) 付加タンパク質も生成した。いずれも pET 系ベクターの 3' 側にタグ配列をコードする核酸配列を導入して、発現用プラスミドとした (pET C-Avi、pET C-St II)。定法に従って、これらの発現ベクターに、mRAGE および mini RAGE を導入して、発現構築物を生成した。AviTag 付加タンパク質のビオチン化のために、pET 系ベクターと同一菌体内で保持可能な pAC 系ベクターにビオチンリガーゼをコードしている BirA 遺伝子を導入した BirA/pAC を作製した。

## 【0290】

RAGE は、CTLD と同様に、S-S 結合の形成が構造の安定化と機能に必須である。そこで発現宿主として Origami B (DE3) (Novagen, USA) を用いた。Origami B (DE3) は、チオレドキシシンレダクターゼおよびグルタチオンレダクターゼ変異株であり、細胞質内に発現させたタンパク質の S-S 結合形成を促進する性質がある。RAGE 様ポリペプチド (sRAGE 1、mRAGE 1、RAGE 2 ~ RAGE 8 をまとめて「RAGE 様ポリペプチド」と称する) に AviTag を付加する場

10

20

30

40

50

合、A v i T a g およびこのポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターと、B i r A 遺伝子を含む発現ベクターとで同時に形質転換させた。得られた形質転換宿主細胞を、カナマイシン ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、アンピシリン ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、テトラサイクリン ( $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、クロラムフェニコール ( $34 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加した (いずれも最終濃度) L B 培地中で  $37^\circ\text{C}$  で培養した。S t r e p t a g I I コード核酸を含む発現ベクターで形質転換した場合は、カナマイシン ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、アンピシリン ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、テトラサイクリン ( $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加した L B 培地中で  $37^\circ\text{C}$  で培養した。R A G E 様ポリペプチドの発現を、I P T G を添加することによって誘導した。

#### 【0291】

予備実験として、R A G E 様ポリペプチドを可溶性ポリペプチドとして発現するための温度条件および誘導時間を調べた。温度条件は、(1)  $37^\circ\text{C}$ 、(2)  $25^\circ\text{C}$  および (3)  $20^\circ\text{C}$  に設定した。誘導時間は、(A) 18 時間、(B) 20 時間、および (C) 24 時間に設定した。まず、これらの宿主細胞を  $37^\circ\text{C}$  で誘導し、誘導されたタンパク質の分子量を測定したところ、大部分が不溶性画分に回収された。培養温度を  $25^\circ\text{C}$  に下げると s R A G E の場合、90% 以上が可溶性ポリペプチドとして発現されたが、m R A G E 1 の場合は、20% 程度しか可溶性ポリペプチドとして発現されなかった。各 m i n i R A G E に関しては、欠損部分が長くなるほど可溶化率が下がる傾向が観察された。R A G E 8 および R A G E 9 に関しては培養温度を下げてでも殆どが不溶性となり、可溶性ポリペプチドとして発現させるのは困難であった。上記の結果に鑑みて、培養温度を  $25^\circ\text{C}$  に維持して、誘導時間の検討を行ったところ、誘導時間 (A) 18 時間が適切であることが分かった (図 13 を参照のこと)。

#### 【0292】

上記の形質転換細胞を  $37^\circ\text{C}$  で 12 時間前培養した。本培養は、この前培養液を、20 倍希釈になるように上記の各 L B 培地に添加し、 $25^\circ\text{C}$  で旋回培養した。上記で得られた条件に基づいて、培養液の光学密度 ( $A_{600}$ ) が約 0.5 に達したときに、1 mM (最終濃度) I P T G を添加し、目的タンパク質の発現を誘導した。A v i T a g 付加タンパク質を生成する場合は、誘導開始と同時に  $50 \mu\text{M}$  (最終濃度) のビオチンを添加し、発現される目的タンパク質のビオチン化も同時に行わせた。誘導開始後 18 時間後に 12,000 r p m  $\times$  5 分の遠心分離により菌体をペレット化して上清を廃棄し、適量の T B S で洗浄した。

#### 【0293】

T B S に懸濁した菌体を、超音波破碎機にて破碎後、15,000 r p m  $\times$  30 分の遠心分離により回収される上清を可溶性画分とした。目的タンパク質は、精製のための H i s タグが C 末側に付加されているので、N i - アガロースに結合させた後、イミダゾールにより溶出させ精製した (図 13)。検出用として付加した A v i T a g も精製に利用可能であり、この場合は、s t r e p t a v i d i n M u t e i n m a t r i x (R o c h e) に吸着後、ビオチンにより溶出させた。S t r e p T a g I I の場合、S t r e p - T a c t i n S e p h a r o s e (I B A, U S) に吸着後、d e s t h i o b i o t i n により溶出させた。各 M i n i R A G E の発現効率、可溶性ポリペプチドとして発現する比率、収率などは以下の表 6 に示すとおりである。

#### 【0294】

10

20

30

40



【表 6】

|         | 発現レベル | 可溶性ポリペプチド | 収率(純度)         | 活性  |
|---------|-------|-----------|----------------|-----|
| sRAGE 1 | +++   | >90%      | 3mg /1L (>90%) | +++ |
| RAGE 2  | +++   | ≒ 70%     | 8mg/1L (>50%)  | +++ |
| RAGE 3  | +++   | ≒ 70%     | 8mg/1L (>50%)  | +++ |
| RAGE 4  | +++   | <10%      | 0.5mg/1L(60%)  | (?) |
| RAGE 7  | ++    | <20%      | 2.5mg/1L(60%)  | ++  |
| RAGE 8  | +     | ≒0        |                | +   |
| RAGE 9  | +     | ≒0        |                | ±   |
| mRAGE 1 | +++   | <20%      | 2mg/1L (80%)   | +++ |

10

## 【0295】

(実施例12：RAGE様ポリペプチドによるAGEの検出)

ヒト血液、尿中などのAGEの測定手法は、糖尿病性血管障害の早期診断、機能性食品の予防効果評価、生活改善や投薬による治療効果の評価など様々な分野での活用が期待される。しかし、AGEは分子の修飾構造が一定ではなく、バイオマーカーとして意味のある分子種が明確でないなど、モノクローナル抗体やHPLCなどによるAGEの定量的検出は、必ずしも正確であるとは言えなかった。一方でRAGEは幅広い分子種のAGEを認識可能なマルチリガンドレセプターであり、生体内のAGEを鋭敏に検出する可能性が高い。そこで、広く様々な分野で活用されており汎用性が高いELISAシステムにおいて、受容体認識能を活用可能か検討した。

20

## (1) リガンドの調製

リガンドとして、以下のものを使用した：cBSA（糖化処理をしていないBSA，ネガティブコントロールとして使用）；R-AGE（リボースにより糖化処理をしたBSA）、F-AGE（フルクトースにより処理をしたBSA）；G-AGE（グルコースにより糖化処理をしたBSA）。

30

## 【0296】

糖化BSAを、以下のように調製した。調製に際して、可能なものはすべて滅菌し、可能な限り無菌的に操作した。

## 【0297】

エタノールで洗浄したスパチュラを使用して、各糖（グルコース 4.51g、フルクトース 4.51g およびリボース 3.75g）を秤量して、滅菌したキャップ付きプラスチックチューブ中に入れた。各プラスチックチューブに、20mLの滅菌1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）を無菌的に添加し、穏やかに転倒混和することによってその溶液を混合した。最後に21mLのエンドトキシンフリーの蒸留水を添加した。各成分の最終濃度は、400mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）中、50mg/mLBSA、500mMグルコース（Glu500BSA）、500mMフルクトース（Fru500BSA）、500mMリボース（Rib500BSA）であった。Millipore Express 0.22μmフィルタ（Millipore）を使用して濾過滅菌した後、これらの糖-BSA溶液を、最大12週間、遮光して37℃でインキュベートした。1週間に1回、無菌条件下で、チューブをアルコールに浸したペーパータオルで拭いてからキャップを開け、各糖-BSA調製物を80μl取り出し、3.5mmマイクロプローブを備えたpHメーターでpHをモニターした。各糖-BSA溶液のpHを、10N水酸化ナトリウム溶液（エンドトキシンフリー）で7.4に調節した。1週間に1回pHを調節した後、5～10mLずつ分注して、分析に供するまで-80℃で保存した。未反応の糖を除去することによってこの反応を停止するために、分

40

50

注したものをすべて解凍して透析チューブに入れ、オートクレーブ処理したビーカー中で滅菌PBSに対して完全に透析した。透析チューブから糖-BSA溶液を取り出す前に、チューブの開口部を70%エタノールで滅菌した。取り出した糖-BSA溶液を、滅菌チューブに入れ、使用時まで4℃で保存した。

## (2) RAGE様ポリペプチドによるAGEの検出

96穴プレート(Nunc)に、BSAおよび上記のように調製した各リガンドを、TBSにて0.1 μg/ml、1, 5 μg/ml、10 μg/mlにTBSにて希釈した後、100 μl/ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置した。Protein-Freeブロッキング剤(Pierce, USA)により1時間ブロッキングおよびTBSで洗浄した後、5 μg/mlに希釈した受容体(sRAGE、RAGE1~RAGE8)溶液を100 μlを添加し、2時間室温で放置した。TBSにて十分に洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Roche, Germany)の100, 000×希釈溶液を100 μl/ウェルで添加し、さらに室温で1時間放置した。TBSにて十分に洗浄後、HRPの発色基質である3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン(TMB (Sigma-Aldrich, USA))を50 μl/ウェルで添加し、発色を確認後に反応停止液として1N HClを50 μl/ウェルで加え、A450における吸光度を測定した。比較対照として、市販の抗AGE抗体(Trans Genic Inc., USA)、抗ペントシジン抗体(Trans Genic Inc., USA)を各RAGE様ポリペプチドの代わりに使用した。抗体使用時は、HRP-ストレプトアビジンの代わりに、HRP標識2次抗体を使用した。

## 【0298】

その結果、4箇所に変異を導入したmRAGE1にも天然型のRAGEに遜色がない認識能が確認された。さらに、可溶性ポリペプチドとして調製可能であったRAGE2、RAGE3、およびRAGE7も認識能を有していた。

## 【0299】

以下の表7は、可溶性ポリペプチドとして発現されるRAGE様ポリペプチドについての結果を示す。いずれもネガティブコントロールであるcBSAはほとんど認識せず、特異性が強いことが示された。いずれのRAGEでも反応のバックグラウンドが高いという難点はあるが、検出感度もよく、0.1 μg/ml (ウェル当たりでは10 ng)でも十分に検出可能であり、また、生体内における反応性 R-AGE > F-AGE > G-AGEと一致した反応の強度を示した。また、バックグラウンドが高く、リガンドごとに値が異なるため、各実験においてリガンドを添加しなかった場合のA450もまた測定し、表中に示した。

## 【0300】

さらに、市販の抗AGE抗体も検出に使用可能であったが、検出感度はRAGEの方が高かった。抗ペントシジン抗体は、いずれのタイプのAGEとの反応も確認できず、ELISA系への適用は難しいことが示された。

## 【0301】

【表 7】

|                              | リガンドなし     | コントロール<br>BSA |      | リボース-AGE      |      | フルクトース<br>-AGE |      | グルコース<br>-AGE |      |
|------------------------------|------------|---------------|------|---------------|------|----------------|------|---------------|------|
|                              |            | 濃度<br>(ug/ml) | A450 | 濃度<br>(ug/ml) | A450 | 濃度<br>(ug/ml)  | A450 | 濃度<br>(ug/ml) | A450 |
| hsRAGE1                      | C-BSA 0.59 | 0.1           | 0.56 | 0.1           | 0.91 | 0.1            | 0.8  | 0.1           | 0.6  |
|                              | R-AGE 0.57 | 1             | 0.29 | 1             | 1.3  | 1              | 1.0  | 1             | 0.8  |
|                              | F-AGE 0.48 | 5             | 0.61 | 5             | 1.2  | 5              | 1.0  | 5             | 0.8  |
|                              | G-AGE 0.48 | 10            | 0.52 | 10            | 1.1  | 10             | 1.0  | 10            | 0.8  |
| mRAGE1                       | C-BSA 0.4  | 0.1           | 0.32 | 0.1           | 0.75 | 0.1            | 0.58 | 0.1           | 0.4  |
|                              | R-AGE 0.4  | 1             | 0.27 | 1             | 1.2  | 1              | 0.89 | 1             | 0.64 |
|                              | F-AGE 0.32 | 5             | 0.38 | 5             | 1.2  | 5              | 0.97 | 5             | 0.89 |
|                              | G-AGE 0.33 | 10            | 0.38 | 10            | 1.1  | 10             | 0.9  | 10            | 0.8  |
| RAGE 2                       | C-BSA 0.08 | 0.1           | 0.08 | 0.1           | 0.24 | 0.1            | 0.12 | 0.1           | 0.1  |
|                              | R-AGE 0.09 | 1             | 0.08 | 1             | 0.54 | 1              | 0.3  | 1             | 0.17 |
|                              | F-AGE 0.09 | 5             | 0.16 | 5             | 0.57 | 5              | 0.43 | 5             | 0.35 |
|                              | G-AGE 0.09 | 10            | 0.15 | 10            | 0.59 | 10             | 0.4  | 10            | 0.3  |
| RAGE 3                       | C-BSA 0.2  | 0.1           | 0.15 | 0.1           | 0.38 | 0.1            | 0.22 | 0.1           | 0.17 |
|                              | R-AGE 0.2  | 1             | 0.18 | 1             | 0.6  | 1              | 0.42 | 1             | 0.27 |
|                              | F-AGE 0.2  | 5             | 0.38 | 5             | 0.6  | 5              | 0.48 | 5             | 0.4  |
|                              | G-AGE 0.16 | 10            | 0.4  | 10            | 0.6  | 10             | 0.48 | 10            | 0.45 |
| RAGE 7                       | C-BSA 0.12 | 0.1           | 0.13 | 0.1           | 0.13 | 0.1            | 0.13 | 0.1           | 0.11 |
|                              | R-AGE 0.12 | 1             | 0.12 | 1             | 0.23 | 1              | 0.15 | 1             | 0.1  |
|                              | F-AGE 0.13 | 5             | 0.18 | 5             | 0.38 | 5              | 0.3  | 5             | 0.24 |
|                              | G-AGE 0.12 | 10            | 0.17 | 10            | 0.34 | 10             | 0.35 | 10            | 0.23 |
| 抗 AGE<br>(モノクロ<br>ーナル抗<br>体) | C-BSA 0.16 | 0.1           | 0.13 | 0.1           | 0.15 | 0.1            | 0.14 | 0.1           | 0.13 |
|                              | R-AGE 0.14 | 1             | 0.12 | 1             | 0.41 | 1              | 0.26 | 1             | 0.3  |
|                              | F-AGE 0.17 | 5             | 0.11 | 5             | 0.9  | 5              | 0.86 | 5             | 0.69 |
|                              | G-AGE 0.15 | 10            | 0.12 | 10            | 1.0  | 10             | 0.86 | 10            | 0.7  |

## 【0302】

総AGEを捕捉した後、総AGEに占める各種AGE分子種の検出への可能性を明らかにする目的で、サンドイッチELISAシステムにおけるRAGE様ポリペプチドの有効性を検討した。

## 【0303】

96穴のプレートに5 $\mu$ g/mlの濃度にTBSにて希釈した受容体（各RAGE様ポリペプチド）溶液を100 $\mu$ l/ウェルで添加した。4℃で一晩放置した後、Proetin-Freeブロッキング剤で1時間ブロッキングおよびTBSでの洗浄後、C-BSA、R-BSA、F-BSA、G-BSAの各AGEを添加し、室温で2時間反応させた。TBSにて十分に洗浄し、抗AGE抗体と反応させ、TBSで十分に洗浄し、次いで、HRP標識2次抗体と反応させ、TBSで十分に洗浄した。この96穴プレートに、TMBを基質として添加し、上記のようにA450の吸光度を測定した。上記で説明したように、使用した抗体の特異性が低いために、完全なタイプ分けには至らなかったが、各種AG

Eを捕捉後、異なった特異性の抗体などの分子を使用することにより、最初の段階で捕えられた総AGEを分類可能なことが示された（表8）。

【0304】

【表8】

| 抗体<br>リガンド | 抗 AGE 抗体の<br>吸光度(A450) | 抗ペントシジン抗体の<br>吸光度(A450) |
|------------|------------------------|-------------------------|
| cBSA       | 0.27                   | 0.2                     |
| R-AGE      | 0.3                    | 0.2                     |
| F-AGE      | 0.3                    | 0.2                     |
| G-AGE      | 0.3                    | 0.2                     |

10

【0305】

（実施例13：RAGE様ポリペプチドによるAGE含有溶液からのAGEの除去）

20

溶液中に存在するAGEなどの除去にmRAGE1などが有効であるか明らかにする目的で、RAGE様ポリペプチドをビーズ上に固定化し、この固定化ビーズにAGE（R-BSA）を結合させた。Mut e i n M a t r i xと10 $\mu$ l（50% スラリー）とビオチン化ネイティブRAGEまたはビオチン化mRAGE1（5 $\mu$ g/100 $\mu$ l TBS）を4℃で30分間反応させた。2,500rpm×5分間のスイングローターによる遠心分離でこのMatrixを回収後、冷TBSにて繰り返し洗浄した。続いて、Alexa633標識R-BSAと5分間反応させた後、Matrixと上清を回収した。コントロールとしてRAGEもmRAGE1も結合させていないMut e i n M a t r i x 10 $\mu$ l（50% スラリー）のみを添加した実験区を設けた。回収した上清（100 $\mu$ l）を蛍光フリーのマイクロタイタープレートに分注し、マイクロタイタープレート

30

【0306】

【表9】

|      | TBS<br>(コントロール) | 非処理 Alexa633<br>R-AGE 溶液 | sRAGE1 結合<br>Matrix で処理 | mRAGE1 結合<br>Matrix で処理 |
|------|-----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 蛍光強度 | 303             | 1706                     | 352                     | 316                     |

40

【0307】

（実施例14：RAGE様ポリペプチドを発現する細胞株によるAGEの検出）

AGEを検出する方法として、RAGE様ポリペプチドを発現する細胞を生成し、この細胞株を用いてサンプル中に含まれるAGEを蛍光強度により測定することにより検出することを試みる。

【0308】

実施例9に記載されるRAGE様ポリペプチドを発現する細胞を、1×10<sup>4</sup>細胞/mLの密度でチャンバ付きスライドガラスに播種して、80%コンフルエントになるまで定法に従って培養する。実施例12（1）に記載されるように調製したリガンドまたはヒト

50

患者から得られたサンプルを定法に従ってA l e x a 6 3 3で標識する。この標識サンプルまたは上記の各標識リガンド4  $\mu$  gを、カバーガラスに添加し、37℃で1時間、5% CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下でインキュベートする。次いで、培地にて洗浄後、観察用チャンパーに装着し、細胞に取り込まれた蛍光強度を計測する。  
これらの実験を行うことによって、図10に示されるように、サンプル中のAGEを検出できることが確認できる。

#### 【0309】

(実施例15：RAGE様ポリペプチドの糖尿病性血管障害への応用)

実施例12(2)に記載されるように、AGEを測定を測定する。糖尿病性血管障害患者から得られた血漿プール、糖尿病患者から得られた血漿プール、または健常者から得られた血漿プールをサンプルとして使用する。96穴プレート(Nunc)に、これらサンプルを100  $\mu$  l / ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置する。TBSでプレートを洗浄し、Protein-Freeブロッキング剤にて1時間ブロッキングおよびTBSで洗浄した後、5  $\mu$  g / mlに希釈した受容体(RAGE様ポリペプチド)溶液100  $\mu$  lを添加し、2時間室温で放置する。TBSにて十分に洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Roche, Germany)の100,000  $\times$ 希釈溶液を100  $\mu$  l / ウェルで添加し、さらに室温で1時間放置する。TBSにて十分に洗浄後、HRPの発色基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB(Sigma-Aldrich, USA))を50  $\mu$  l / ウェルで添加し、発色を確認後に反応停止液として1N HClを50  $\mu$  l / ウェルで加え、A450における吸光度を測定する。得られた吸光度値からサンプル中に含まれるAGEの相対量を算出する。これらの値を、臨床検査で使用される値と比較することによって、AGEによって引き起こされる疾患に罹患しているかどうかを予想することができる。

【産業上の利用可能性】

#### 【0310】

CTL D様ポリペプチドおよびRAGE様ポリペプチドは、動脈硬化、糖尿病性血管障害などの早期診断、機能性食品の予防効果評価、生活改善や投薬による治療効果の評価など様々な分野で活用できる。

【図面の簡単な説明】

#### 【0311】

【図1】図1は、LOX-1の模式図をあらわす。図中の数字は、LOX-1のアミノ酸配列の番号付けに従うアミノ酸残基の位置を表す。

【図2】図2は、RAGEの模式図を表す。図中の数字は、RAGEのアミノ酸配列の番号付けに従うアミノ酸残基の位置を表す。

【図3】図3は、C型レクチン様ドメイン(CTL D)およびCTL D様ポリペプチド(PR-CTL D)のプロテアーゼによる分解の程度を示す。CTL DまたはPR-CTL Dを大過剰のプロテアーゼ(T:トロンビン、E:エンテロキナーゼ、Xa:第Xa因子)とともに37℃で18時間インキュベートした後、SDS-PAGEで泳動した後、CB B染色した。Aは、天然型C型レクチン様ドメイン(ネイティブCTL D)のプロテアーゼによる分解を示す。Bは、PR-CTL D(G232A/G249A変異が導入されている)のプロテアーゼによる分解を示す。

【図4】図4は、CTL D様ポリペプチド発現細胞 による変性LDL の認識および取り込みを示す。Aは、PR-CTL DをトランスフェクトしたCHO細胞の明視野像を示す。Bは、CFPの蛍光により、PR-CTL Dの発現が確認された細胞を示す。Cは、CFPの蛍光によりPR-CTL Dの発現が確認された細胞によるDiD標識AcLDLの明瞭な取り込みを示す。

【図5】図5は、LOX-1の細胞外領域および変性LDLの認識に必須の最小領域、ならびに分子間S-S結合を形成するアミノ酸残基を含むネック由来の14アミノ酸残基とCTKDからなるCTL D14を示す。図中の矢印は、大過剰のトロンビンに対して感受性の部位を示す。

10

20

30

40

50

【図 6】図 6 は、温度および誘導時間を変化させた場合の形質転換細胞において発現された C T L D 様ポリペプチドの S D S - P A G E 像を示す。A は、P R - C T L D を含む発現ベクターで形質転換した細胞を 37℃ で培養したときの P R - C T L D の発現状態を示す。レーン 1：誘導前；レーン 2 および 3：誘導後 2 時間；レーン 4 および 5：誘導後 4 時間。レーン 2 および 4 は、可溶性画分を示す。レーン 3 および 5 は、不溶性画分を示す。発現は良好であるが、100% が不溶性として発現した。B は、誘導後 20℃ で培養したときの時の P R - C T L D の発現状態を示す。発現量は低い、可溶性画分へ発現する割合は増えた。レーン 1：誘導前；レーン 2：誘導 24 時間後の可溶性画分、レーン 3：誘導 24 時間後の不溶性画分。

【図 7】図 7 は、形質転換細胞から発現された P R - C T L D 可溶性画分を N i - アガロースに吸着させた後、0.1 M イミダゾールで洗浄し、0.5 M イミダゾールにて溶出させた結果を示す。レーン 1 は、N i - アガロース吸着画分であり、レーン 2 は、0.5 M イミダゾール溶出画分である。

【図 8】図 8 は、h R A G E および h R A G E の可溶性ドメイン (h s R A G E) および h s R A G E を構成する各ドメインを模式的に示す。図中の矢印およびアミノ酸の 1 文字表記と数字の組み合わせは、大過剰のプロテアーゼに感受性の部位を示す。括弧中の記号は、T：トロンビン、X a：第 X a 因子を示す。矢印で示される位置に、アミノ酸置換 R 114 Q、V 117 A、R 228 N、M 272 I を導入して、P R - C T L D を作製する。

【図 9】図 9 は、h s R A G E のプロテアーゼによる分解の程度を示す。h s R A G E を大過剰のプロテアーゼ (T：トロンビン、E：エンテロキナーゼ、X a：第 X a 因子) とともに 37℃ で 18 時間インキュベートし、S D S - P A G E で泳動した後、C B B 染色した。0 で示されるレーンは、プロテアーゼ非処理区の h s R A G E を泳動した。18 で示されるレーンは、18 時間のプロテアーゼ処理後の h s R A G E を泳動した。H i s タグ除去の目的のために、p E T - C - A v i にはエンテロキナーゼ認識配列が挿入されている。エンテロキナーゼによる切断は、デザインに従いタグ部分のみが除去された予想される分子量の減少が起こっている。それに対して、T や X a により処理した結果、h s R A G E にはプロテアーゼによって特異的に切断される部位が存在しないにもかかわらず、予想外の切断による断片が確認された。

【図 10】図 10 は、m R A G E 1 発現細胞 による A L e x a 633 標識 A G E の認識および取り込みを示す。A は、m R A G E (R 114 Q / V 117 A / R 228 N / M 272 I) をトランスフェクトした細胞の明視野像を示す。B は、m R A G E 発現細胞における A L e x a 633 標識 A G E の顕著な取り込みを示す。

【図 11】図 11 は、m R A G E のプロテアーゼによる分解の程度を示す。A は、h s R A G E 1 (天然型) のプロテアーゼ処理結果を示す。B は、m R A G E のプロテアーゼ処理結果を示す。それぞれ、レーン 1 は、第 X a 因子 (必要量の 100 倍濃度) 添加直後に、反応を停止させたものを示し、レーン 2 は、必要量の 10 倍濃度の第 X a 因子を添加し、23℃ で 4 時間反応させたものを示し、レーン 3 は、必要量の 100 倍濃度の第 X a 因子を添加し、23℃ で 2 時間反応させたものを示す。反応停止後に、S D S - P A G E に供し C B B 染色した。レーン 2 で h s R A G E に観察される切断された R A G E 由来のバンドが m R A G E では少なく、レーン 3 でも同様な傾向が観察され、m R A G E はプロテアーゼ抵抗性が増していることが確認された。

【図 12】図 12 は、領域欠損による h s R A G E の削りこみを示す。図中の数字は、R A G E のアミノ酸配列のアミノ酸番号付けに従う。

【図 13】図 13 は、温度および誘導時間を変化させた場合の形質転換細胞において発現された R A G E 様ポリペプチドの S D S - P A G E 像を示す。上段は、左から順に、天然型 R A G E 1 (h s R A G E 1)、m R A G E、R A G E 2、R A G E 3 および R A G E 7 の S D S - P A G E 像を示す。レーン 1 は、可溶性画分であり、レーン 2 は、不溶性画分である。欠損により分子量が小さくなるに連れ、発現量、可溶性ポリペプチドとしての発現量が共に低下した (表 6 もまた参照のこと)。下段は、M u t e i n - M a t r i x に吸着後

10

20

30

40

50

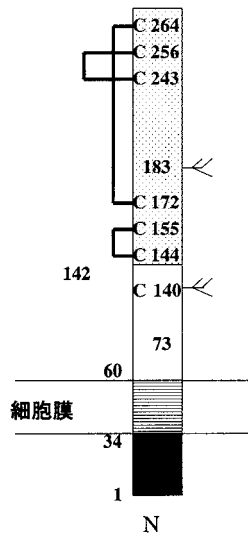
、ビオチンで溶出することにより精製したRAGE様ポリペプチドを示す。N：天然型RAGE1（hsRAGE1）；M：mRAGEを示す。

【配列表フリーテキスト】

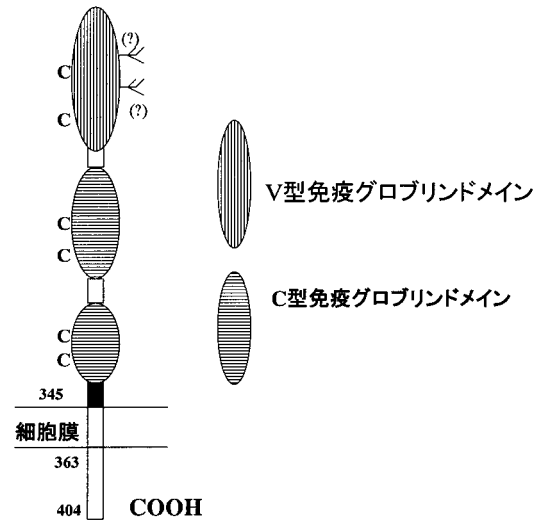
【0312】

- 配列番号1：PR-CTLDまたはCTLDをコードする核酸配列
- 配列番号2：PR-CTLDまたはCTLDのアミノ酸配列
- 配列番号3：PR-Lox-1またはLox-1をコードする核酸配列
- 配列番号4：PR-Lox-1またはLox-1のアミノ酸配列
- 配列番号5：PR-CTLD14またはCTLD14をコードする核酸配列
- 配列番号6：PR-CTLD14またはCTLD14のアミノ酸配列 10
- 配列番号7：Lox-1のCTLD+ネックまたはPR-CTLD+ネックをコードする核酸配列
- 配列番号8：Lox-1のCTLD+ネックまたはPR-CTLD+ネックのアミノ酸配列
- 配列番号9：RAGEまたはmRAGEをコードする核酸配列
- 配列番号10：RAGEまたはmRAGEのアミノ酸配列
- 配列番号11：RAGE8またはmRAGE8をコードする核酸配列
- 配列番号12：RAGE8またはmRAGE8のアミノ酸配列
- 配列番号13：RAGE1またはmRAGE1をコードする核酸配列
- 配列番号14：RAGE1またはmRAGE1のアミノ酸配列 20
- 配列番号15：Gly-Gly-Gly-Ser
- 配列番号16：Gly-Gly-Gly-Gly-Ser
- 配列番号17：AviTagのアミノ酸配列
- 配列番号18：Streptagのアミノ酸配列
- 配列番号19：StreptagIIのアミノ酸配列
- 配列番号20：CTLDの順方向プライマー
- 配列番号21：CTLDの逆方向プライマー
- 配列番号22：RAGEの順方向プライマー
- 配列番号23：RAGEの逆方向プライマー
- 配列番号24：miniRAGE（RAGE1、RAGE2、RAGE3、RAGE7、 30  
RAGE8、RAGE9）の順方向プライマー
- 配列番号25：RAGE1の逆方向プライマー
- 配列番号26：RAGE2の逆方向プライマー
- 配列番号27：RAGE3の逆方向プライマー
- 配列番号28：RAGE7の逆方向プライマー
- 配列番号29：RAGE8の逆方向プライマー
- 配列番号30：RAGE9の逆方向プライマー
- 配列番号31：RAGE4の順方向プライマー
- 配列番号32：RAGE4の逆方向プライマー

【図 1】



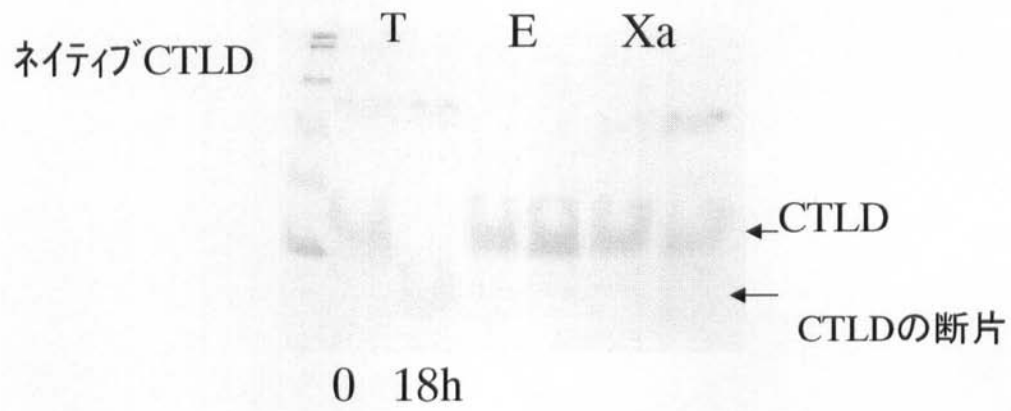
【図 2】



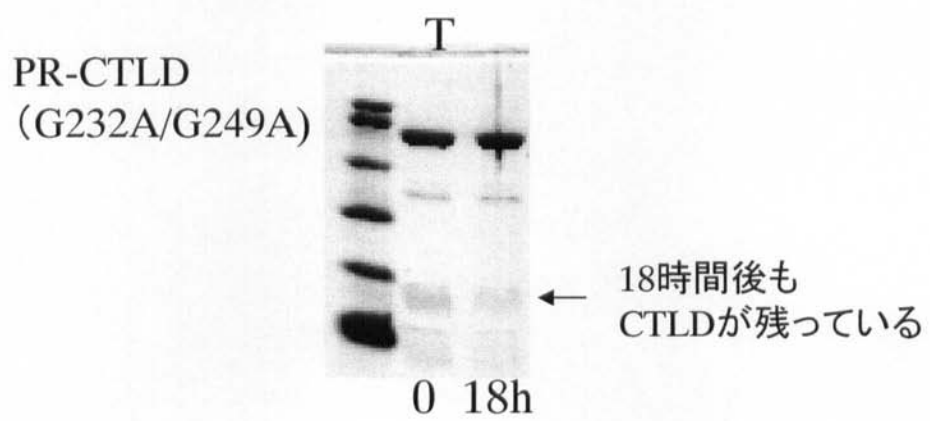


【図 3】

A

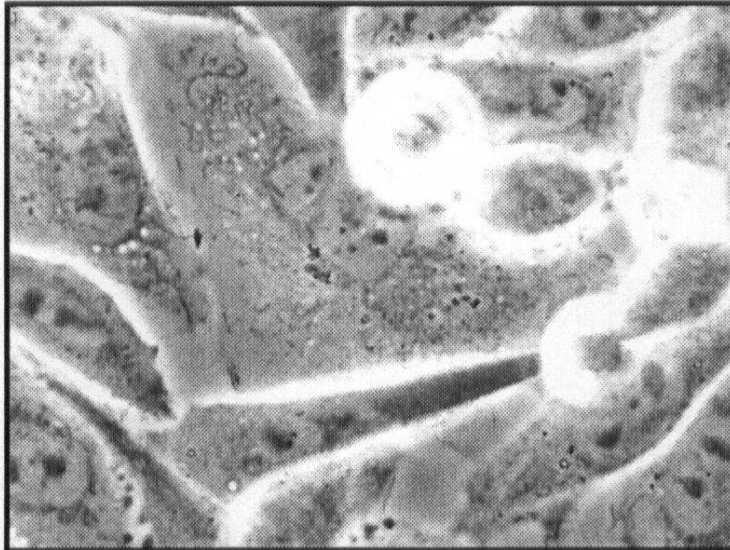


B

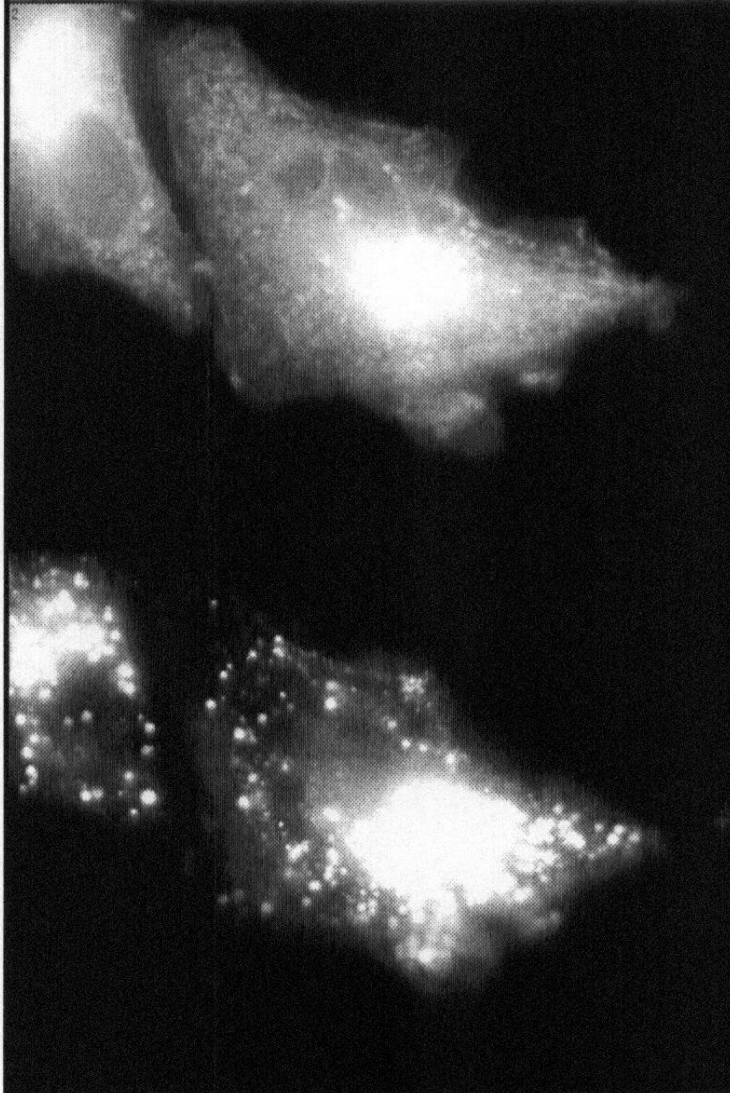


【図 4】

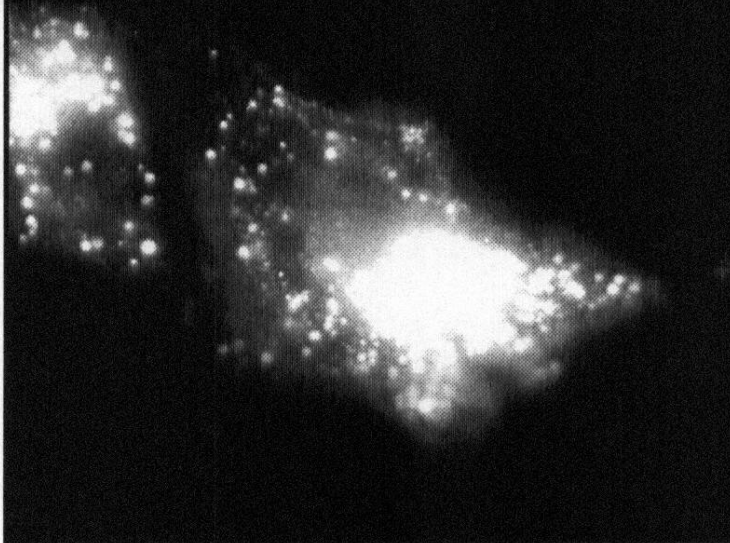
A



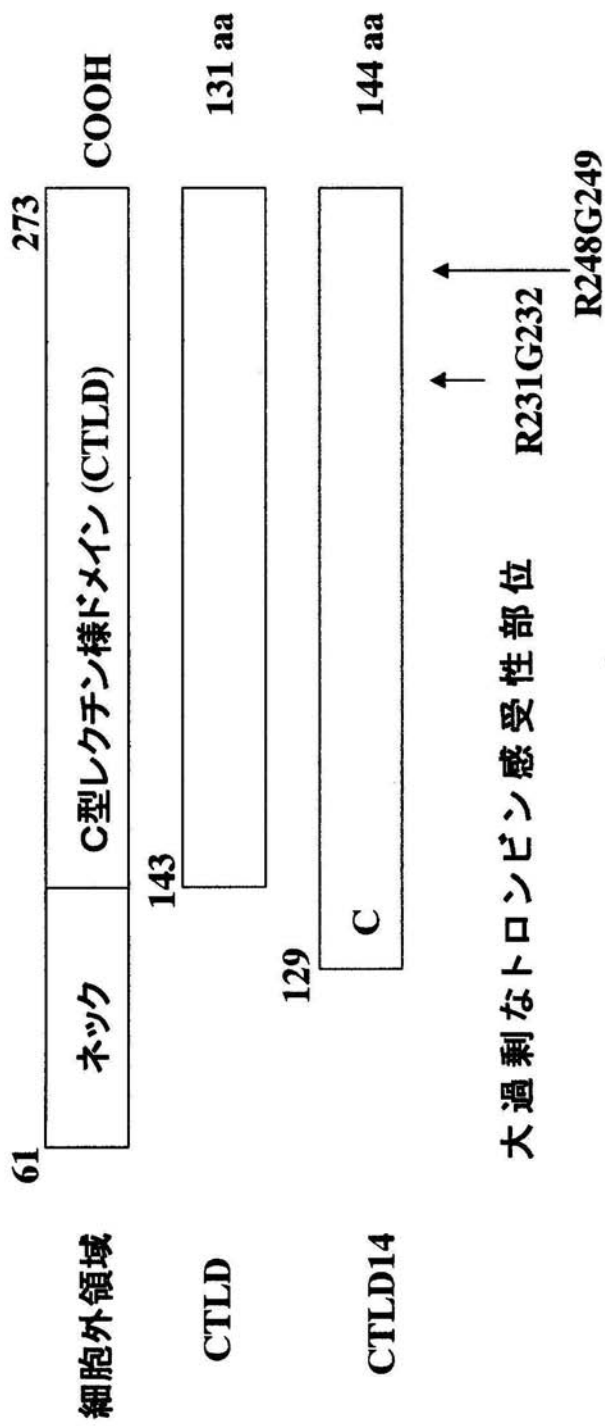
B



C

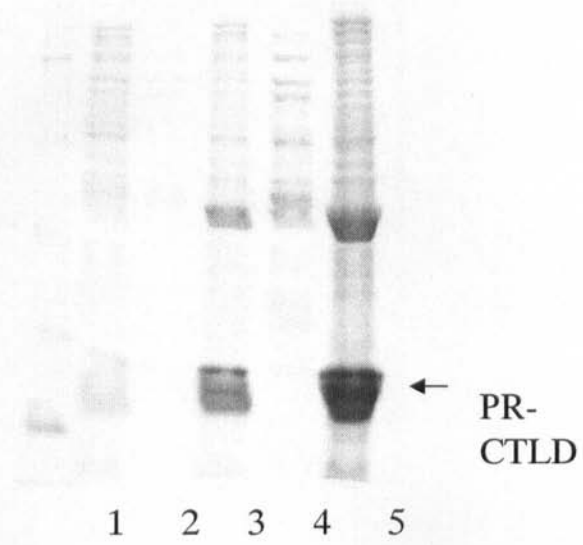


【図 5】

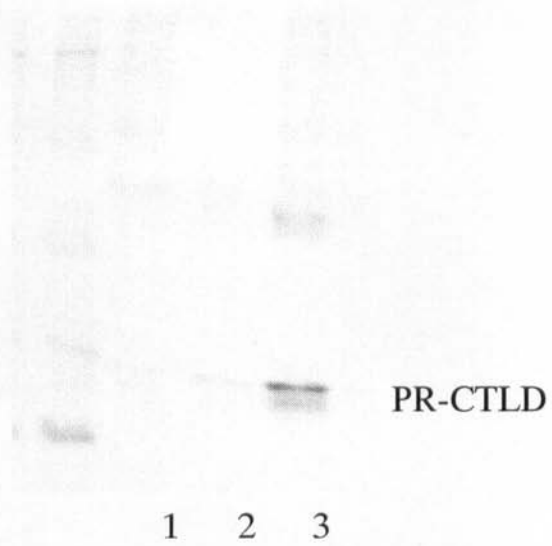


【図 6】

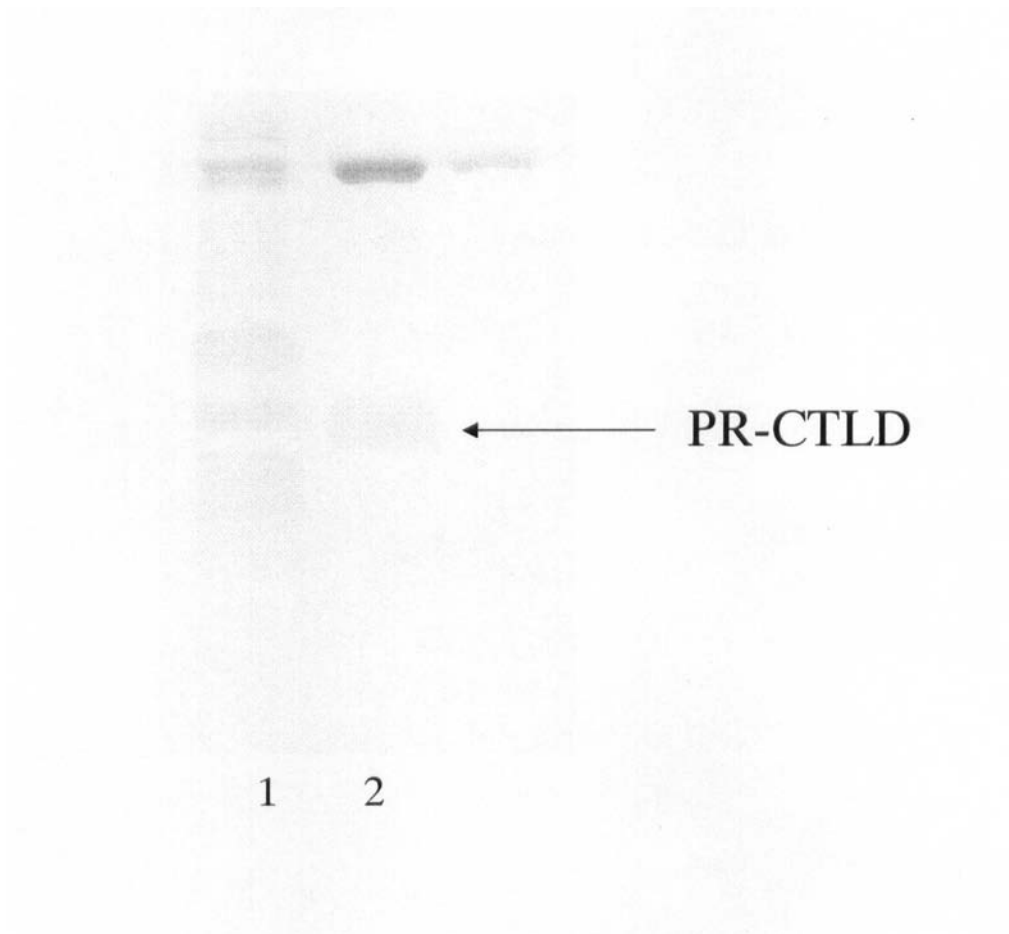
A



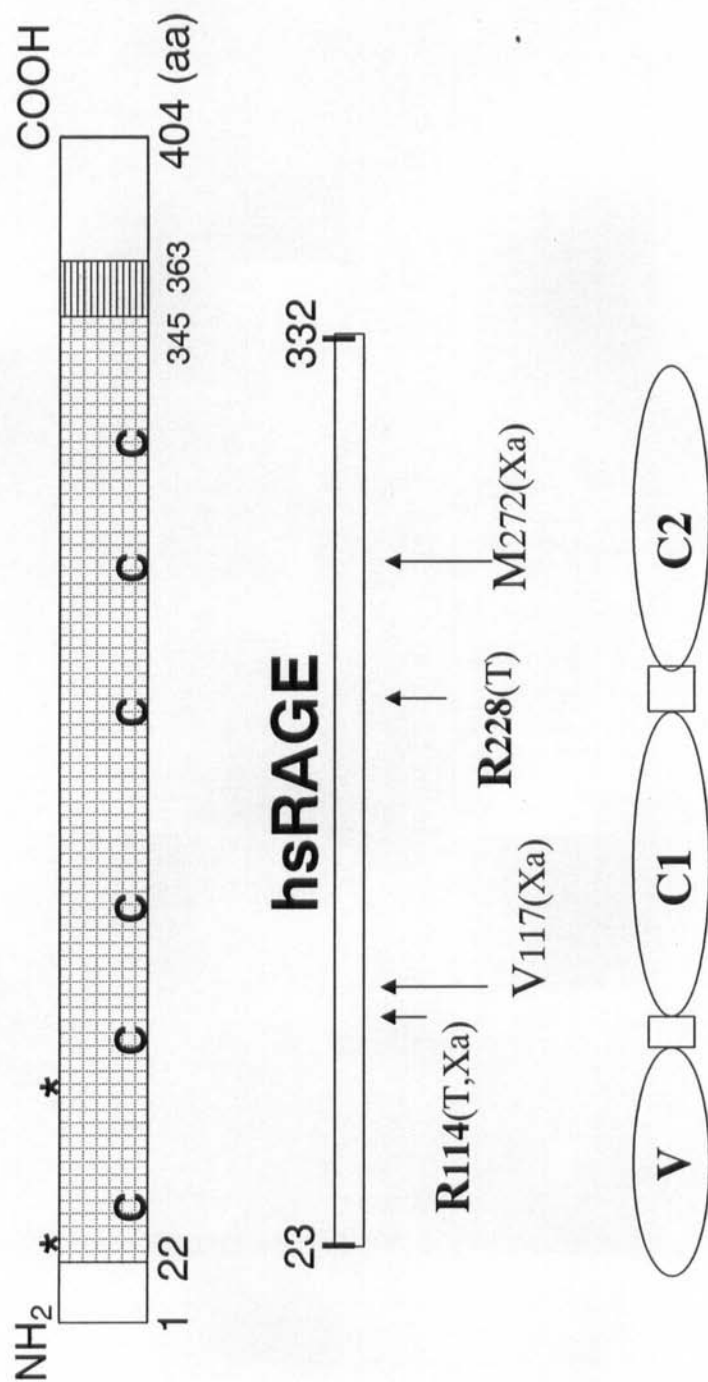
B



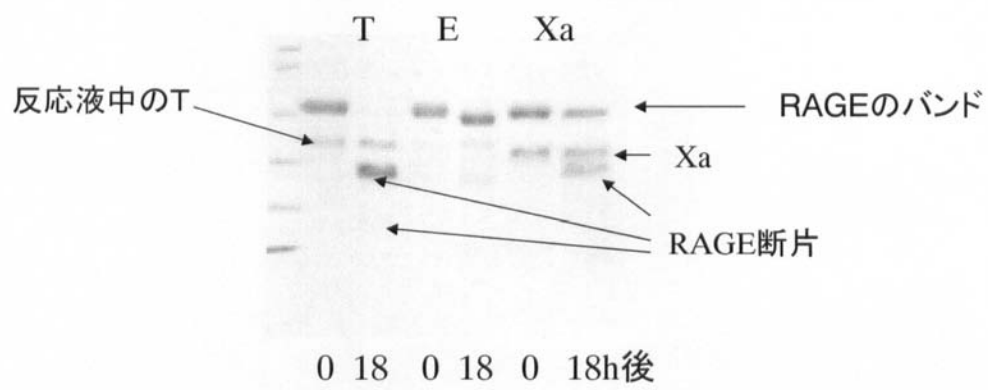
【図 7】



【図 8】

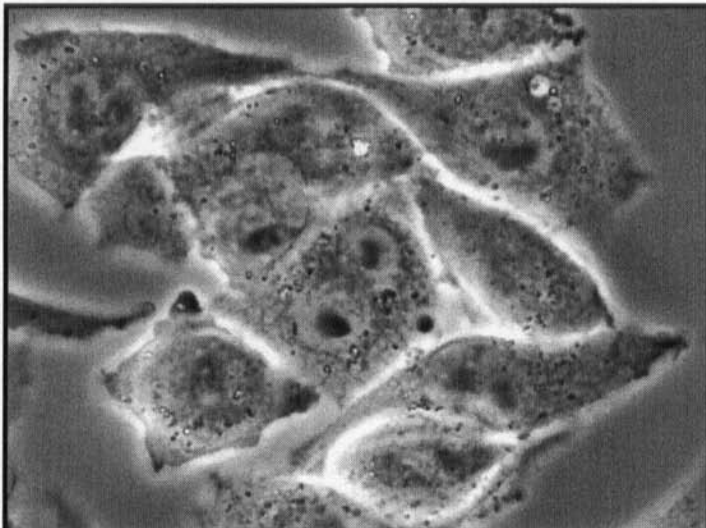


【図 9】

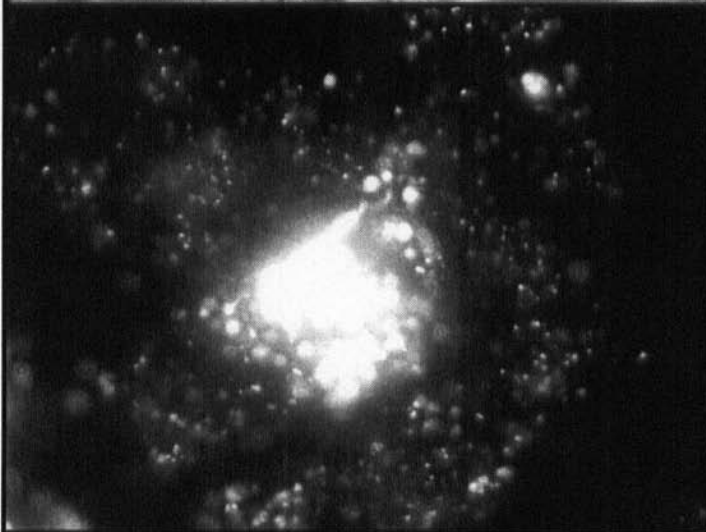


【図 10】

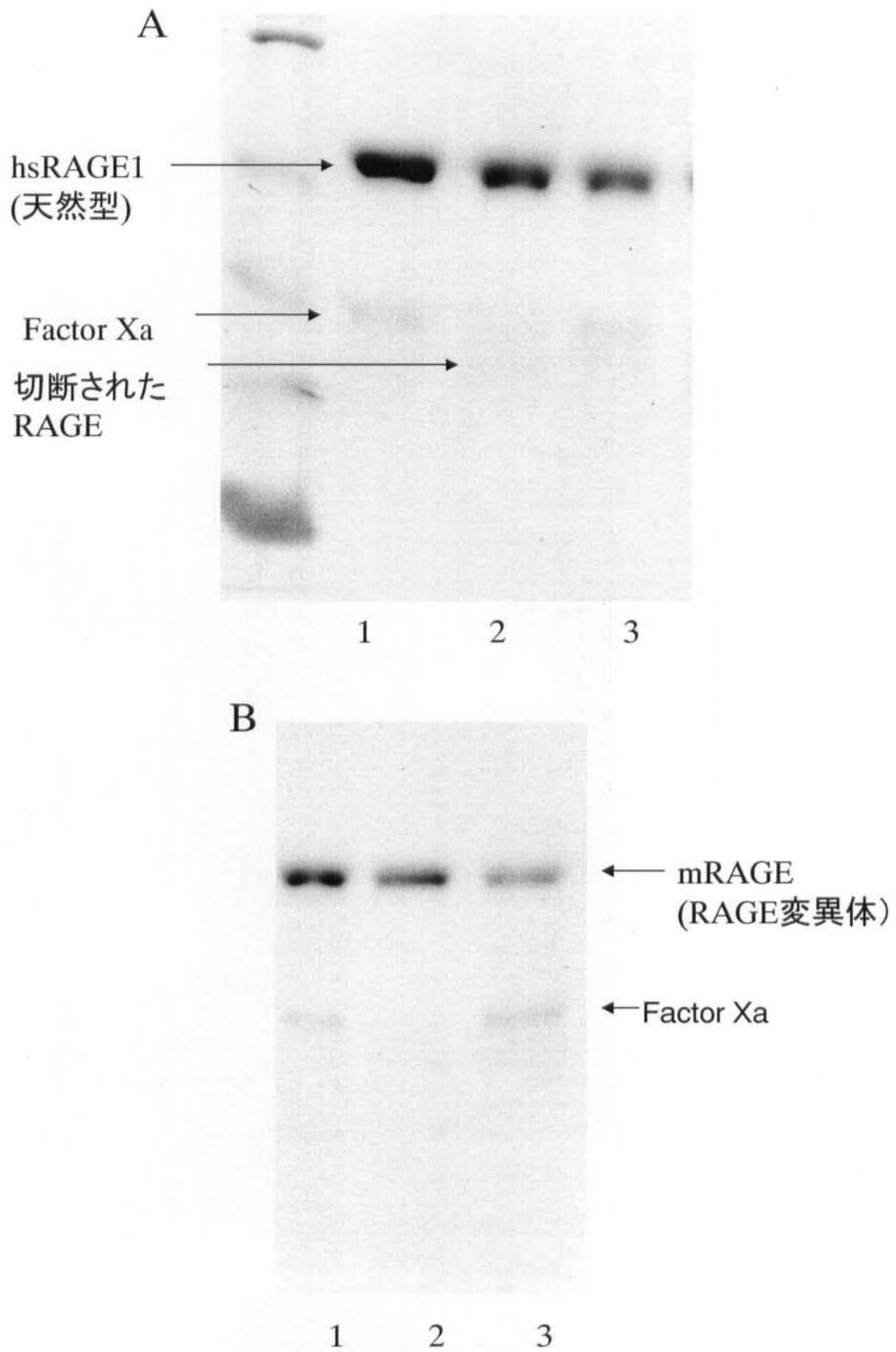
A



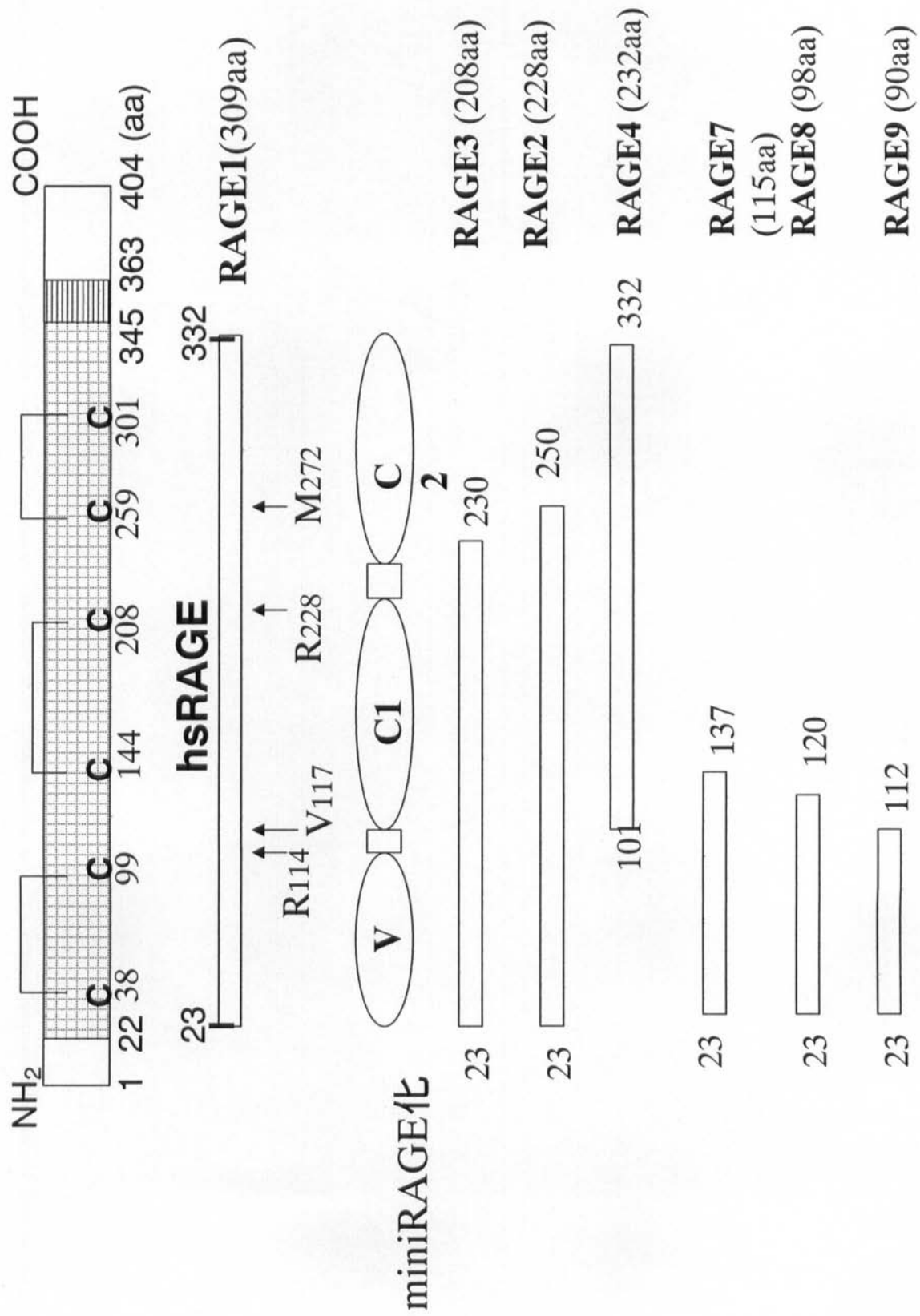
B



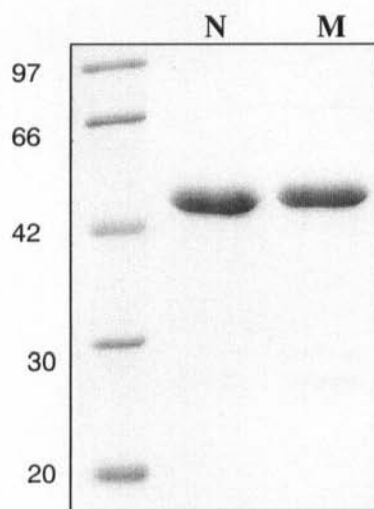
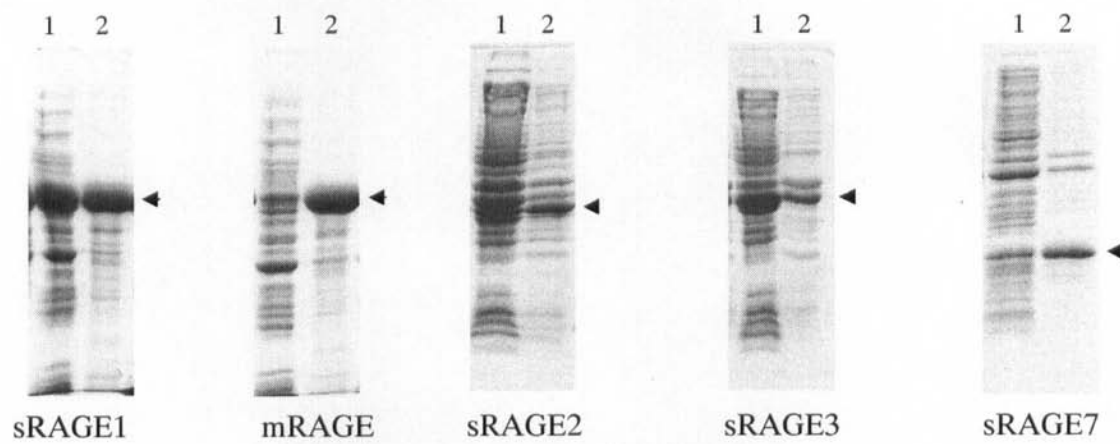
【図 1 1】







【図 1 3】



【配列表】

2009082076000001.app

|                                |  |               |  |             |
|--------------------------------|--|---------------|--|-------------|
| (51)Int.Cl.                    |  | F I           |  | テーマコード (参考) |
| <i>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</i>  |  | C 1 2 N 1/21  |  |             |
| <i>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</i>  |  | C 1 2 N 5/00  |  | A           |
| <i>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</i> |  | G 0 1 N 33/53 |  | W           |
|                                |  | G 0 1 N 33/53 |  | V           |

(72)発明者 佐藤 征二  
神奈川県厚木市森の里2丁目6-3

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 BA63 CA01 GA11 HA20  
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 DA86 EA50 FA74

|                |                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 突变受体和使用其检测生活方式疾病相关因子的方法                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2009082076A</a>                                                                                                                                                                                                       | 公开(公告)日 | 2009-04-23 |
| 申请号            | JP2007256664                                                                                                                                                                                                                        | 申请日     | 2007-09-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | Farumitto                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 独立行政法人农业·食品产业技术総合研究机构<br>株式会社ファルミット                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | 町田幸子<br>榊原祥清<br>倉持みゆき<br>佐藤征二                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| 发明人            | 町田 幸子<br>榊原 祥清<br>倉持 みゆき<br>佐藤 征二                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C07K14/47 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53                                                                                                                                                        |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/705 G01N33/92                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A G01N33/53.<br>W G01N33/53.V C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10                                                                            |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA20 4B065/AA90Y 4B065<br>/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10<br>4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                           |         |            |

#### 摘要(译)

解决的问题：提供一种稳定的检测分子，用于通用的改良LDL检测分析和AGE检测分析。 解决方案：（1）一种特定的氨基酸序列；（2）一种特定的氨基酸序列，在90位和107位以外的氨基酸位置包含一个或多个取代，添加和/或缺失，以及自然类型 具有LOX-1活性的氨基酸序列；和（3）由在严格条件下与特定核酸序列互补的核酸序列杂交的核酸序列编码的氨基酸序列，具有特定氨基酸序列的氨基酸序列中位于90和107位的氨基酸序列，该特定氨基酸序列具有特定的对应氨基酸并表现出天然存在的LOX-1的活性;一种多肽，选自：。 [选择图]无

|           | 発現レベル | 可溶性 | 収量(純度)          | 活性 |
|-----------|-------|-----|-----------------|----|
| CTLD      | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |
| CTLD14    | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |
| PR-CTLD   | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |
| PR-CTLD14 | +++   | <5% | <0.5mg/L (<70%) | ++ |