

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4995398号
(P4995398)

(45) 発行日 平成24年8月8日(2012.8.8)

(24) 登録日 平成24年5月18日(2012.5.18)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 Z
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 55 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-522509 (P2002-522509)	(73) 特許権者	000001029
(86) (22) 出願日	平成13年8月31日(2001.8.31)		協和発酵キリン株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2001/007563		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02002/018602	(73) 特許権者	500410259
(87) 国際公開日	平成14年3月7日(2002.3.7)		成松 久
審査請求日	平成20年4月25日(2008.4.25)		東京都東大和市向原5-1082-1
(31) 優先権主張番号	特願2000-265430 (P2000-265430)	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成12年9月1日(2000.9.1)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100120905
			弁理士 深見 伸子
		(74) 代理人	100106574
			弁理士 岩橋 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項2】

配列番号1で表されるアミノ酸配列の39番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項3】

請求項1または2記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1~5個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項4】

請求項1または2記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項5】

1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項3または4記載のポリペプチド。

【請求項6】

1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i)ガラクトース、N-アセチ

10

20

ルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質が、ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロボシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド) である請求項 6 記載のポリペプチド。

10

【請求項 8】

複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項 6 または 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分として含有する糖鎖合成剤。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。

20

【請求項 11】

配列番号 2 で表される塩基配列を有する DNA。

【請求項 12】

配列番号 2 で表される塩基配列の 135 ~ 1268 番目の塩基配列を有する DNA。

【請求項 13】

配列番号 2 で表される塩基配列の 249 ~ 1268 番目の塩基配列を有する DNA。

【請求項 14】

請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

30

【請求項 15】

1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項 14 に記載の DNA。

【請求項 16】

1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項 14 または 15 記載の DNA。

40

【請求項 17】

ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質が、ラクトシルセラミドまたはパラグロボシドである請求項 16 記載の DNA。

【請求項 18】

複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプ

50

チドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である請求項 16 または 17 記載の DNA。

【請求項 19】

請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列と相補的な配列を有する DNA。

【請求項 20】

請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組込んで得られる組換え体ベクター。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の組換え体ベクターを保有する ヒト個体を除く 形質転換体。

10

【請求項 22】

形質転換体が微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体である、請求項 21 記載の形質転換体。

【請求項 23】

微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 24】

動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO 細胞、BHK 細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa 細胞、Namalwa KJM-1 細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞からなる群より選ばれる動物細胞である、請求項 22 記載の形質転換体。

20

【請求項 25】

植物細胞が、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、大豆、アブラナ、アルファルファ、イネ、小麦、大麦、ライ麦、トウモロコシ、または亜麻の植物細胞からなる群より選ばれる植物細胞である、請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 26】

昆虫細胞が、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞、Trichoplusia ni の卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞からなる群より選ばれる昆虫細胞である、請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 27】

形質転換体が、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物である形質転換体である、請求項 21 記載の形質転換体。

30

【請求項 28】

請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項 29】

請求項 27 記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを該動物中に生成、蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

40

【請求項 30】

蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 29 記載の製造法。

【請求項 31】

請求項 27 記載のトランスジェニック植物を栽培し、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 32】

請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の DNA を用い、in vitro での転写・翻訳系により請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

50

【請求項 33】

請求項 9 記載の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

- (a) 該酵素源、
 (b) i) ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロポシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iv) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および
 (c) ウリジン - 5' - ニリン酸 N - アセチルグルコサミン (UDP - GlcNAc) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトース残基に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

10

【請求項 34】

請求項 9 記載の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

- (a) 該酵素源、
 (b) GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素、
 (c) i) ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロポシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iv) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質、および v) 請求項 32 または 33 記載の方法により得られる糖鎖または複合糖質からなる群より選ばれる受容基質、
 (d) ウリジン - 5' - ニリン酸 N - アセチルラクトサミン (UDP - GlcNAc)、および
 (e) ウリジン - 5' - ニリン酸ガラクトース (UDP - Gal) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端にポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された反応産物を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された該糖鎖または複合糖質の製造法。

20

30

【請求項 35】

請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を用い、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド、ラクト系糖脂質 (Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドを骨格として有する糖脂質)、ネオラクト系糖脂質 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドを骨格として有する糖脂質)、GlcNAc 1 - 3 Gal 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 3 GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc 構造を有する糖、(Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 GlcNAc 構造を有し n が 1 以上である糖、および (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 Glc 構造を有し n が 1 以上である糖からなる群より選ばれる糖からなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成、蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

40

【請求項 36】

50

請求項 27 記載の非ヒトトランスジェニック動物を用い、 $\text{Gal}1-3\text{GlcNAc}1-4\text{Glc}$ -セラミド、ラクト系糖脂質 ($\text{Gal}1-3\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{Glc}$ -セラミドを骨格として有する糖脂質)、ネオラクト系糖脂質 ($\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{Glc}$ -セラミドを骨格として有する糖脂質)、 $\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-3\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{Glc}$ 構造を有する糖、($\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}1-3$)_n $\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有し n が 1 以上である糖、および ($\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}1-3$)_n $\text{Gal}1-4\text{Glc}$ 構造を有し n が 1 以上である糖からなる群より選ばれる糖からなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複

10

【請求項 37】

複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項 33 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 38】

蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 36 記載の製造法。

【請求項 39】

請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の DNA が有する塩基配列の連続した 24 ~ 120 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体であるオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 40】

請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 39 記載のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション法により、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項 41】

請求項 39 記載のオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

30

【請求項 42】

請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 39 記載のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション法により、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出する方法。

【請求項 43】

請求項 39 記載のオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出する方法。

【請求項 44】

請求項 39 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 ~ 8 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写または mRNA の翻訳を抑制する方法。

40

【請求項 45】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 46】

請求項 45 記載の抗体を用いる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項 47】

請求項 45 記載の抗体を用い、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【請求項 48】

50

請求項 4 5 記載の抗体を含有する免疫組織染色剤。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、被験試料による該ポリペプチドが有する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の変動を測定することを特徴とする、該ポリペプチドが有する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 5 0】

1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項 4 9 記載のスクリーニング法。

10

【請求項 5 1】

1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) ガラクトース、N - アセチルラクタミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (lactose; Gal 1 - 4 Glc)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクタミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iii) ガラクトース、N - アセチルラクタミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項 4 9 または 5 0 記載のスクリーニング法。

【請求項 5 2】

ガラクトース、N - アセチルラクタミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質が、ラクトシルセラミドまたはパラグロボシドである請求項 5 1 記載のスクリーニング法。

20

【請求項 5 3】

複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項 5 1 または 5 2 記載のスクリーニング法。

【請求項 5 4】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、パラグロボシドを認識する抗体、またはポリ - N - アセチルラクタミン糖鎖を認識する抗体およびレクチンからなる群より選ばれる少なくとも一種を用い、パラグロボシドまたはポリ - N - アセチルラクタミン糖鎖を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

30

【請求項 5 5】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項 4 5 記載の抗体を用い、該ポリペプチドを定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

40

本発明は、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性およびパラグロボシド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドを有効成分として含有する糖鎖合成剤、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含有する炎症、癌または癌転移検出剤、該 DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する形質転換体、該形質転換体を利用した該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドを用いた糖鎖または複合糖質の製造法、該形質転換体を利用した糖鎖または複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする DNA より得られるオリゴヌクレオチドを用いた炎症、癌または癌転移の検出法、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いた免疫組織染色法、該抗体を含有する免疫組織染色剤、炎症性疾患、癌または癌転移の診断薬、該ポリペプチド、該 DNA、該組換え体

50

ベクター、または該抗体を含有する医薬、該ポリペプチドのラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性およびパラグロボシド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法、該遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法、該遺伝子の転写を司るプロモーターDNA、該プロモーターDNAによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法、これらのスクリーニング法により得られる化合物、および該遺伝子を欠損または変異させた非ヒトノックアウト動物等に関する。

【0002】

背景技術

ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素は、ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) の非還元末端に存在するガラクトース残基に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性を有する酵素である。ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) からは、ネオラクト系糖脂質、ラクト系糖脂質、ガングリオ系糖脂質、グロボ系糖脂質、およびイソグロボ系糖脂質が合成されるが、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素は、ネオラクト系糖脂質とラクト系糖脂質の合成の鍵酵素である。

10

【0003】

ラクトシルセラミドに GM3 合成酵素が働くとガングリオシド GM3 (NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド) が合成される。ラクトシルセラミドに GM2 合成酵素が働くとアシアロ GM2 (GalNAc 1 - 4 Gal 1 - 4 Glc - セラミド) が合成される。GM3 やアシアロ GM2 からは他の多くのガングリオシドが合成されることから、GM3 合成酵素や GM2 合成酵素はガングリオ系糖脂質の合成の鍵酵素と言える。一方、ラクトシルセラミドにラクトシルセラミド 1, 4 - ガラクトース転移酵素が働くと Gal 1 - 4 Gal 1 - 4 Glc - セラミドが合成され、次いで一連のグロボ系糖脂質が合成される。ラクトシルセラミドにラクトシルセラミド 1, 3 - ガラクトース転移酵素が働くと Gal 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドが合成され、次いで一連のイソグロボ系糖脂質が合成される。

20

【0004】

従って、ラクトシルセラミド 1, 4 - ガラクトース転移酵素およびラクトシルセラミド 1, 3 - ガラクトース転移酵素は、それぞれグロボ系糖脂質とイソグロボ系糖脂質の合成の鍵酵素と言える。ある細胞においてどのタイプの糖脂質が合成されるかは、上記鍵酵素の発現や発現量によってコントロールされていると考えられる。

30

【0005】

ネオラクト系糖脂質は Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド骨格を有する糖脂質であり、ラクト系糖脂質は Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド骨格を有する糖脂質である。代表的なネオラクト系糖脂質としては、パラグロボシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、シアリルパラグロボシド (NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドなどがある。代表的なラクト系糖脂質としては、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド、NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド、NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 3 (Fuc 1 - 4) GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドなどがある。

40

【0006】

多くのヒトの癌 (特に大腸癌または胃癌) においては、フコースやシアル酸が付加したラクト系またはネオラクト系の糖脂質が大量に蓄積していることが明らかになっている (Annu. Rev. Immunol., 2, 103 (1984)、Chem. Phys. Lipids, 42, 209 (1986))。大腸癌組織とその周辺の正常組織、あるいは各種大腸癌細胞株における糖転移酵素活性を測定した結果、大腸癌組織や各種大腸癌細

50

胞株ではラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の活性が増加していることが判明した〔*J. Biol. Chem.*, 262, 15649 (1987)〕。この結果は、大腸癌におけるラクト系またはネオラクト系の糖脂質の増加が、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の増加によりもたらされていることを示唆している。

【0007】

ヒトの前骨髄球細胞株であるHL-60をジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide) またはレチノイン酸で処理すると顆粒球系の細胞に分化する。一方、HL-60をホルボール-12-ミリステート-13-アセテート (PMA) 等のホルボールエステルで処理すると単球系マクロファージに分化する。顆粒球系の細胞への分化の際にはネオラクト系糖脂質 (パラグロボシドやシアリルパラグロボシド) が増加しガングリオシドGM3が減少するのに対し、単球系マクロファージへの分化の際にはガングリオシドGM3が増加しネオラクト系糖脂質が減少する。また、HL-60にネオラクト系糖脂質を添加して培養すると顆粒球系の細胞に分化し、HL-60にガングリオシドGM3を添加して培養すると単球系マクロファージへと分化する。以上の結果は、特定の糖脂質の発現が分化誘導や分化の方向の決定に重要であることを示している。HL-60をレチノイン酸で処理すると、GM3合成酵素活性は変化しないがラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加する〔*J. Biol. Chem.*, 267, 23507 (1992)〕。従って、レチノイン酸で処理したHL-60においては、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の増加が原因となつてネオラクト系糖脂質の増加とガングリオシドGM3の減少を引き起こし、その結果として顆粒球系の細胞へと分化すると考えられる。一方、HL-60をPMAで処理すると、GM3合成酵素活性が増加し、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が減少する〔*J. Biol. Chem.*, 267, 23507 (1992)〕。

【0008】

従って、PMAで処理したHL-60においては、GM3合成酵素活性の増加とラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の低下が原因となつてガングリオシドGM3の増加とネオラクト系糖脂質の減少を引き起こし、その結果として単球系マクロファージへと分化すると考えられる。ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素とGM3合成酵素は、前骨髄球細胞の分化誘導と分化方向の決定に重要な役割を果たしていると考えられる。

【0009】

白血球は、種類と分化ステージに応じて異なった糖脂質を発現していることが知られている。例えば、成熟した骨髄性細胞は、中性のネオラクト系の糖脂質のみを発現している〔*Mol. Cell. Biochem.*, 47, 81 (1982)、*J. Biol. Chem.*, 260, 1067 (1985)〕。一方、成熟したリンパ球細胞は、グロブ系の糖脂質のみを発現している〔*Mol. Cell. Biochem.*, 47, 81 (1982)〕。白血球細胞株を用いた解析により、上記の糖脂質の違いはラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の違いが原因であることが示唆されている。K-562、KG-1、HL-60などの骨髄性細胞株では、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出されるのに対し、Reh、CCRF-CEM、MOLT-4、Ramos、RPMI 8226などのリンパ球系細胞株では本酵素活性が検出されないことが明らかになっている〔*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 125 (1993)〕。

【0010】

グルクロン酸 3 - 硫酸を糖鎖の非還元末端に有する糖脂質 (例えば、SO₄3GlcA 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc - セラミド) は、神経系の分化の際に特定の時期に特定の場所で発現することが知られている。これらの糖脂質は、神経系の細胞の相互認識や神経のマイグレーションなどに関与していることが示唆

10

20

30

40

50

されている〔*J. Biol. Chem.*, 273, 8508 (1998)〕。神経細胞におけるグルクロン酸3-硫酸含有糖脂質 ($\text{SO}_4\text{Gal}1-3\text{Glc}1-4\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{Glc}$ -セラミド)の発現は、ラクトシルセラミド1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素によって制御されていることから、ラクトシルセラミド1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の発現により、神経細胞の相互認識やマイグレーションがコントロールされていると考えられる〔*J. Biol. Chem.*, 273, 8508 (1998)〕。グルクロン酸3-硫酸は、ヒトNK細胞のマーカーに対する単クローン抗体HNK-1によっても認識されることから、HNK-1エpitepとも呼ばれている。従って、グルクロン酸3-硫酸含有糖脂質は、NK細胞の機能にも重要な役割を演じていると考えられている。

10

【0011】

$\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}$ 構造を有する糖鎖は、ネオラクト系やラクト系の糖脂質の糖鎖中に存在する他、糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖やO-グリコシド結合型糖鎖中、およびオリゴ糖中にも存在する。例えば、 $\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}$ 構造を有するオリゴ糖としては、ヒトの乳中に存在するラクト-N-ネオテトラオース ($\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{Glc}$) やラクト-N-テトラオース ($\text{Gal}1-3\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}1-4\text{Glc}$)、あるいはそれらを母核とする様々なオリゴ糖が挙げられる〔*Acta Paediatrica*, 82, 903 (1993)〕。 $\text{GlcNAc}1-3\text{Gal}$ 構造は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の構成要素にもなっている。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、N-アセチルラクトサミンが1,3結合で繰り返し結合した構造〔($\text{Gal}1-4\text{GlcNAc}1-3$)_n; nは2以上〕を有する糖鎖で、糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖やO-グリコシド結合型糖鎖中に存在するほか、糖脂質の糖鎖中やオリゴ糖中にも存在する。ラクトシルセラミド1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が、ラクトシルセラミド以外の基質、例えば、パラグロボシド、糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖やO-グリコシド結合型糖鎖、またはオリゴ糖を基質とするかどうかについては明らかになっていない。

20

【0012】

ラクトシルセラミド1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性は、これまでに大腸組織、大腸癌組織、大腸癌細胞株 (Colo205、SW403等)、ミエロイド系細胞株 (K-562、KG-1、HL-60) で検出されているが、ラクトシルセラミド1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が高純度で精製された報告はない〔*J. Biol. Chem.*, 262, 15649 (1987)、*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260, 461 (1988)、*Carbohydrate Research*, 209, 261 (1991)、*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 125 (1993)〕。

30

【0013】

一方、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性を有する酵素(以下Gal1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素という。)に関しては、これまでに部分精製の報告があるが、これらの酵素がラクトシルセラミドを基質とするかどうかは明らかになっていない〔*J. Biol. Chem.*, 268, 27118 (1993)、*J. Biol. Chem.*, 267, 2994 (1992)、*J. Biol. Chem.*, 263, 12461 (1988)、*Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 42, 77 (1989)〕。

40

【0014】

遺伝子のクローン化については、これまでに2種のGal1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子がクローン化されている〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14294-14299 (1997)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 406-411 (1999)〕。この内の1つである 3

50

GnTは、*in vitro*においてパラグロボシドを基質とすることが示されているが、ラクトシルセラミドを基質とした場合の活性は弱い〔*Glycobiology*, 9, 1123 (1999)〕。また、 3GnT が細胞内でラクトシルセラミドやパラグロボシドを基質とするかどうかについては明らかにされていない。さらに別のGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が存在するかどうかについては不明である。

【0015】

GlcnAc 1-3Gal構造を有する糖鎖は非常にたくさん存在することから、Gal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、受容基質特異性や発現組織が異なる複数の酵素が存在し、それぞれ別の機能を担っている可能性が高いと考えられている。従って、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、受容基質特異性を調べることにより、ラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を同定することができると考えられる。

10

【0016】

上述したように、ヒトの乳中にはラクト-N-ネオテトラオース(Gal 1-4GlcnAc 1-3Gal 1-4Glc)やラクト-N-テトラオース(Gal 1-3GlcnAc 1-3Gal 1-4Glc)、あるいはそれらを母核とする構造を有する様々なオリゴ糖が存在することが知られている〔*Acta Paediatrica*, 82, 903 (1993)〕。該オリゴ糖は共通してGlcnAc 1-3Gal構造を有している。また、該オリゴ糖の中にはポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖を有するオリゴ糖も含まれる。これらのオリゴ糖には、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防ぐ働きや、毒素を中和する働きがあると考えられている。また、善玉の腸内細菌であるビフィズス菌の増殖を促す活性もある。一方、ウシやマウスなどの動物の乳中に存在するオリゴ糖の種類は少なく、大部分がラクトースであり、ヒト乳中に存在する上記オリゴ糖はほとんど存在しない。

20

【0017】

ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖、あるいはそれらが含まれたミルクを効率よく生産することができれば、産業上非常に有用である。ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖の合成に関与するGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、上記オリゴ糖の効率的な合成に使用可能と考えられるが、該酵素は明らかになっていない。

30

【0018】

GlcnAc 1-3Gal構造を有する糖鎖の中で、特にポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖は、多くの機能性糖鎖(セレクチンリガンド糖鎖、微生物やウイルスの受容体糖鎖、SSEA-1糖鎖、癌関連糖鎖など)の骨格糖鎖となっており、胚発生、細胞分化、あるいは炎症や癌などの疾患と深く関わっている。また、ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖は、糖タンパク質の安定化にも重要な役割を果たしている。

【0019】

それぞれの場面で機能しているポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖の合成に関与するGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なる可能性があるため、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が存在する可能性がある。ラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、ラクトシルセラミドに加え、非還元末端にGal 1-4GlcまたはGal 1-4GlcnAcを有する糖鎖(例えばパラグロボシド)にもN-アセチルラクタミンを転移し、ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖の合成に関与する可能性がある。

40

【0020】

以下、ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖の合成、機能、応用について記す。

ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖は、GlcnAc 1, 4-ガラクトース転移酵素(糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基に 1, 4結合でガラク

50

トースを転移する活性を有する酵素)とGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が交互に働くことにより合成される。GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素に関しては、これまでに4種類の酵素(4Gal - T1、4Gal - T2、4Gal - T3、4Gal - T4)の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている〔J. Biol. Chem. 272, 31979 - 31991 (1997)、J. Biol. Chem. 273, 29331 - 29340 (1997)〕。

【0021】

直鎖型または分岐型のポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖上には、フコース、シアル酸、N - アセチルガラクトサミン、ガラクトースなどの糖、または硫酸基などが付加し、細胞特異的あるいは時期特異的に様々な糖鎖(機能性糖鎖、血液型糖鎖、癌関連糖鎖など)が形成される〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(1)~(6)、講談社、(1993年)〕。

10

【0022】

顆粒球、単球、または活性化T細胞上には、糖鎖の末端にシアリルルイスx糖鎖〔NeuAc 2 - 3Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3)GlcNAc〕を有するポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖が存在していることが知られており、これらの糖鎖は接着分子であるE - セレクチンやP - セレクチンのリガンドとして機能し、これらの白血球が炎症部位へ集積するのに関与していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(1)~(6)、講談社、(1993年)〕。

20

【0023】

また、大腸癌などの癌細胞上にも、末端にシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖〔NeuAc 2 - 3Gal 1 - 3 (Fuc 1 - 4)GlcNAc〕を有するポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖が存在していることが知られており、これらの糖鎖もE - セレクチンやP - セレクチンのリガンドとして機能し、癌の転移に関与していることが示唆されている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(1)~(6)、講談社、(1993年)〕。

【0024】

ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖の構造は、胚発生、細胞分化、または細胞の癌化の過程で変化することが知られている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(1)~(6)、講談社、(1993年)〕。ヒトの胎児の赤血球では直鎖型のポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖が発現しているのに対し、成人の赤血球では分岐型のポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖が発現する〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(1)「糖鎖の多様な世界」、講談社、1993年〕。これら赤血球上のポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖の末端には、ABO式の血液型抗原が発現している。分岐したポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖のそれぞれの末端に血液型抗原が発現されると多価の抗原となり、血液型糖鎖に対する抗体との結合能は、直鎖型の抗原に比較して 10^3 以上も増加する。

30

【0025】

マウスの初期胚の発生過程においては、一連の糖鎖抗原が規則正しく発現されることが知られている。SSEA - 1 (stage specific embryonic antigen - 1) 抗原は、ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖末端に存在するルイスx糖鎖〔Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3)GlcNAc〕であるが、この抗原の発現は8細胞期に始まり、桑実胚でピークとなり、胚盤胞期以降は徐々に消失していく〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(3)「細胞社会のグリコバイオロジー」、講談社、1993年〕。桑実胚期は、それまで細胞分裂による単純な数的増加を繰り返してきた胚細胞が、初めて分化した「形態」をもった胚盤胞の段階へ移行していく移行期にあたる。桑実胚の細胞は胚盤胞を形成する直前に互いに緊密に寄り集まり、細胞緊密化 (cell compact ion) を起こす。SSEA - 1 抗原を有するオリゴ糖を添加すると、この細胞緊密化は阻害され、その後の正常な発生も阻害される〔J. 40

40

50

Exp. Med., 160, 1591 (1984)〕。また、マウスのテラトカルシノーマ細胞の接着が、抗SSEA-1抗体により阻害されることも知られている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ(3)「細胞社会のグリコバイオロジー」、講談社、1993年〕。以上のことは、SSEA-1抗原が接着分子あるいは糖鎖シグナルとして作用し、初期胚の発生に重要な役割を果たしていることを示している。

【0026】

癌細胞では、対応する正常細胞に比較して、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を多く発現することが知られている〔J. Biol. Chem., 259, 10834 (1984)、J. Biol. Chem., 261, 10772 (1986)、J. Biol. Chem., 266, 1772 (1991)、J. Biol. Chem., 267, 5700 (1992)〕。NIH3T3細胞にN-rasプロトオンコジーンを発現させると、細胞表面のN-結合型糖鎖の分子量が増加し、細胞は浸潤能を獲得するが、この時、N-結合型糖鎖中のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の量が増加するとともに、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する 1,4-ガラクトース転移酵素と 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性が増加していることが知られている〔J. Biol. Chem., 266, 21674 (1991)〕。

10

【0027】

ガレクチンは、 α -ガラクトシドに親和性を有する一群のレクチンで、細胞の接着や情報伝達に関与し、癌などの疾患との関連も示唆されている〔Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 9, 9 (1997)〕。哺乳類ではこれまでに10種類のもが知られている。このうちガレクチン-1および-3は、直鎖上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖と高親和性で結合することが知られており、それらの糖鎖を含有する特定の糖タンパク質が、これらのガレクチンのリガンドであると推定されている〔Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 9, 9 (1997)、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 9, 47 (1997)〕。末端にシアル酸が付加したポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、マイコプラズマや微生物の受容体となっている〔Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)〕。

20

【0028】

このように、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、多くの機能性糖鎖(セレクチンリガンド糖鎖、微生物やウイルスの受容体糖鎖、SSEA-1糖鎖、癌関連糖鎖など)や血液型糖鎖の骨格糖鎖を形成し、それらの糖鎖を効率的に提示するのに重要な役割を果たしている。

30

【0029】

シアリルルイスx糖鎖を有するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、セレクチンのアンタゴニストとして、抗炎症効果あるいは癌転移抑制効果を有する医薬品となることが期待される。

【0030】

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖上に多価(4個)のシアリルルイスx糖鎖(4糖)が結合したオリゴ糖では、多価にしていないシアリルルイスxオリゴ糖(4糖)に比較して、1/100以下の低濃度でセレクチンアンタゴニストとしての活性を示すことが知られている〔J. Exp. Med., 182, 1133 (1995)、Glycobiology, 6, 65 (1996)、Glycobiology, 7, 453 (1997)、Eur. J. Immunol., 27, 1360 (1997)〕。これらのオリゴ糖のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖部分の合成には、部分精製された 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が利用されたが、この酵素の供給が律速となり、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を多量に合成することは難しい〔Glycobiology, 7, 453 (1997)〕。

40

【0031】

50

一方、化学合成によってもポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を合成可能であるが、その合成は非常に煩雑なステップを必要とする〔*Tetrahedron Letter*, 24, 5223 (1997)〕。

【0032】

以上のことより、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の効率良い合成法が求められている。これまでにクローン化された2種のGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や該酵素遺伝子を利用することもできるが、目的に応じて基質特異性や機能の異なる別のGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（例えば、ラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素）や該酵素遺伝子を用いた方が効率が良い場合があると考えられる。

10

【0033】

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、糖タンパク質の安定化にも重要である。lysosome associated membrane glycoprotein-1 (lamp-1) および lysosome associated membrane glycoprotein-2 (lamp-2) は、リソソームに存在する糖タンパク質（一部は細胞表面にも存在する）で、リソソーム膜の内面をほとんどもれなく覆っている。lamp-1 および lamp-2 には多くの糖鎖（いくつかはポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を含む）が付加しており、lamp-1 および lamp-2 がリソソーム中の加水分解酵素によって分解されるのを防いでいる。ヒトの前骨髄球細胞株であるHL-60をジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide) で処理すると、顆粒球系の細胞に分化するが、この分化の過程で、lamp-1 および lamp-2 に付加するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の数が増加し、それとともにlamp-1 および lamp-2 の代謝速度（分解速度）が低下することが知られている〔*J. Biol. Chem.*, 265, 20476 (1990)〕。

20

【0034】

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成能を増加させた例としては、以下に示した例が挙げられる。

F9細胞をレチノイン酸で処理した場合や、Swiss 3T3細胞をTGF- β で処理した場合に、細胞の膜結合糖タンパク質の糖鎖にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付加することが示されている〔*J. Biol. Chem.*, 268, 1242 (1993)〕、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1221, 330 (1994)〕。

30

【0035】

NIH3T3細胞にN-rasプロトオンコジーンを発現させると、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する1, 4-ガラクトース転移酵素と1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性が増加し、膜タンパク質のN-結合型糖鎖中のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖量が増加することが知られている〔*J. Biol. Chem.*, 266, 21674 (1991)〕。T細胞株EL-4中でコア2 1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を発現させると、細胞表面の膜タンパク質であるCD43、CD45、またはCD44の分子量が増加する〔*J. Biol. Chem.*, 271, 18732 (1996)〕。これは、コア2 1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素により合成された糖鎖が、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素のよい基質となるためと考えられる。

40

【0036】

また、HL-60細胞を27 で培養すると、lamp-1またはlamp-2に付加するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の量が増加することが知られている〔*J. Biol. Chem.*, 266, 23185 (1991)〕。

【0037】

しかし、組換え糖タンパク質の生産に適した宿主細胞（例えばNamalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、CHO細胞など）において、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の付加された組換え糖蛋白質を効率よく生産させることに関してはこれまでに

50

報告されていない。従って、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の付加された組換え糖蛋白質を効率よく生産することのできる方法の開発は、産業上重要な課題である。

【 0 0 3 8 】

これまでにクローン化された 2 種の Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を利用することもできるが、目的に応じて基質特異性や機能の異なる別の Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子（例えば、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素）を用いた方が効率がよい場合があると考えられる。

【 0 0 3 9 】

発明の開示

本発明の目的は、 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチドを利用し、有用糖鎖の合成、抗炎症、抗感染症、癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の安定化等の改善法、炎症性疾患や癌の種類や悪性度の診断法を提供することにある。

【 0 0 4 0 】

本発明は、以下の (1) ~ (7 9) に関する。

(1) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 3 9 番目から 3 7 8 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(3) (1) または (2) 記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド。

(4) (1) または (2) 記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列と 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド。

(5) 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である (3) および (4) のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【 0 0 4 1 】

(6) 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、 i) ガラクトース、 N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、 Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、 ii) ガラクトース、 N - アセチルラクトサミン、 Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iii) ガラクトース、 N - アセチルラクトサミン、 Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンを転移する活性である (3) ~ (5) のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

(7) ガラクトース、 N - アセチルラクトサミン、 Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質が、ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロポシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド) である (6) 記載のポリペプチド。

(8) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、 (6) または (7) に記載のポリペプチド。

(9) (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分として含有する糖鎖合成剤。

(1 0) (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。

【 0 0 4 2 】

(1 1) 配列番号 2 で表される塩基配列を有する DNA。

(1 2) 配列番号 2 で表される塩基配列の 1 3 5 ~ 1 2 6 8 番目の塩基配列を有する D

10

20

30

40

50

NA。

(13) 配列番号2で表される塩基配列の249～1268番目の塩基配列を有するDNA。

(14) (10)～(13)のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(15) 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である(14)に記載のDNA。

【0043】

(16) 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i)ガラクトース、N-アセチルラクトサミン(Gal 1-4GlcNAc)、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース(Gal 1-4Glc)、ii)ガラクトース、N-アセチルラクトサミン、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびii)ガラクトース、N-アセチルラクトサミン、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である(14)または(15)記載のDNA。

(17) ガラクトース、N-アセチルラクトサミン、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質が、ラクトシルセラミドまたはパラグロ

(18) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である(16)または(17)記載のDNA。

(19) (10)～(18)のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNA。

(20) (10)～(18)のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換え体ベクター。

【0044】

(21) (10)～(18)のいずれか1項に記載のDNAと相同な配列からなるRNAをベクターに組込んで得られる組換え体ベクター。

(22) (20)または(21)に記載の組換え体ベクターを保有する形質転換体。

(23) 形質転換体が微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体である、(22)記載の形質転換体。

(24) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、(23)記載の形質転換体。

(25) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞からなる群より選ばれる動物細胞である、(23)記載の形質転換体。

【0045】

(26) 植物細胞が、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、大豆、アブラナ、アルファルファ、イネ、小麦、大麦、ライ麦、トウモロコシ、または亜麻の植物細胞からなる群より選ばれる植物細胞である、(23)記載の形質転換体。

(27) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusianiの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞からなる群より選ばれる昆虫細胞である、(23)記載の形質転換体。

(28) 形質転換体が、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物である形質転換体である、(22)記載の形質転換体。

(29) (22)～(27)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に(1)～(

10

20

30

40

50

8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

(30) (28) 記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、(1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを該動物中に生成、蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【0046】

(31) 蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、(30) 記載の製造法。

(32) (28) 記載のトランスジェニック植物を栽培し、(1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(33) (10) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の DNA を用い、in vitro での転写・翻訳系により(1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(34) (9) 記載の糖鎖合成剤を酵素源として用い、(a) 該酵素源、(b) i) ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロボシド (Gal 1 - 4 Glc NA c 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 Glc NA c)、Gal 1 - 3 Glc NA c またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 Glc NA c)、Gal 1 - 3 Glc NA c またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iv) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 Glc NA c またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および (c) ウリジン - 5' - ニリン酸 N - アセチルグルコサミン (UDP - Glc NA c) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトース残基に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

(35) (34) 記載の方法により得られる N - アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を受容基質として用い、(a) 該受容基質、(b) Glc NA c 1, 4 - ガラクトース転移酵素、および (c) ウリジン - 5' - ニリン酸ガラクトース (UDP - Gal) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端の N - アセチルグルコサミン残基に 1, 4 結合でガラクトースが付与された反応産物を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ガラクトースが付与された該糖鎖または複合糖質の製造法。

【0047】

(36) (9) 記載の糖鎖合成剤を酵素源として用い、(a) 該酵素源、(b) Glc NA c 1, 4 - ガラクトース転移酵素、(c) i) ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロボシド (Gal 1 - 4 Glc NA c 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 Glc NA c)、Gal 1 - 3 Glc NA c またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 Glc NA c)、Gal 1 - 3 Glc NA c またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iv) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 Glc NA c またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質、および v) (34) または (35) 記載の方法により得られる糖鎖または複合糖質からなる群より選ばれる受容基質、(d) ウリジン - 5' - ニリン酸 N - アセチルラクトサミン (UDP - Glc NA c)、および (e) ウリジン - 5' - ニリン酸ガラクトース (UDP - Gal) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端にポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された反応産物を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された該糖鎖または複合糖

10

20

30

40

50

質の製造法。

(37) (22) ~ (27) のいずれか1項に記載の形質転換体を用い、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc -セラミド、ラクト系糖脂質 (Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc -セラミドを骨格として有する糖脂質)、ネオラクト系糖脂質 (Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc -セラミドを骨格として有する糖脂質)、GlcNAc 1-3Gal 構造を有する糖、GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1-3Gal 1-3GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc 構造を有する糖、(Gal 1-4GlcNAc 1-3)_nGal 1-4GlcNAc 構造を有しnが1以上である糖、および (Gal 1-4GlcNAc 1-3)_nGal 1-4Glc 構造を有しnが1以上である糖からなる群より選ばれる糖からなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成、蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

10

(38) (28) 記載の非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物を用い、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc -セラミド、ラクト系糖脂質 (Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc -セラミドを骨格として有する糖脂質)、ネオラクト系糖脂質 (Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc -セラミドを骨格として有する糖脂質)、GlcNAc 1-3Gal 構造を有する糖、GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1-3Gal 1-3GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc 構造を有する糖、(Gal 1-4GlcNAc 1-3)_nGal 1-4GlcNAc 構造を有しnが1以上である糖、および (Gal 1-4GlcNAc 1-3)_nGal 1-4Glc 構造を有しnが1以上である糖からなる群より選ばれる糖からなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成、蓄積させ、該個体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

20

(39) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、(34) ~ (38) のいずれか1項に記載の製造法。

(40) 蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、(38) 記載の製造法。

【0048】

30

(41) (10) ~ (19) のいずれか1項に記載のDNAが有する塩基配列の連続した5 ~ 120塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチドおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体であるオリゴヌクレオチド。

(42) (10) ~ (19) のいずれか1項に記載のDNA、該DNAの部分断片、または(41) 記載のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション法により、(1) ~ (8) のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(43) (41) 記載のオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、(1) ~ (8) のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

40

(44) (42) または(43) 記載の方法を用いた、炎症、癌または癌転移の検出法。

(45) (10) ~ (19) のいずれか1項に記載のDNA、該DNAの部分断片、または(41) 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、炎症、癌または癌転移の検出剤。

【0049】

(46) (1) ~ (8) のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することによる、該遺伝子の機能異常の診断方法。

(47) (10) ~ (19) のいずれか1項に記載のDNA、該DNAの部分断片、または(41) 記載のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション法により、(1) ~ (8) のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出する方

50

法。

(48) (41)記載のオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、(1)～(8)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出する方法。

(49) (41)記載のオリゴヌクレオチドを用い、(1)～(8)記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(50) (1)～(8)のいずれか1項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

【0050】

(51) (50)記載の抗体を用いる、(1)～(8)のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(52) (50)記載の抗体を用い、(1)～(8)のいずれか1項に記載のポリペプチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

(53) (50)記載の抗体を含有する免疫組織染色剤。

(54) (1)～(8)のいずれか1項に記載のポリペプチドを含有する医薬。

(55) 医薬が、炎症性疾患、癌または癌転移の治療、予防および/または診断のための医薬である(54)記載の医薬。

【0051】

(56) (10)～(19)のいずれか1項に記載のDNA、該DNAの部分断片または(41)記載のオリゴヌクレオチドを含有する医薬。

(57) 医薬が、炎症性疾患、癌または癌転移の治療、予防および/または診断のための医薬である(56)記載の医薬。

(58) (20)または(21)記載の組換え体ベクターを含有する医薬。

(59) 医薬が、炎症性疾患、癌または癌転移の治療、予防および/または診断のための医薬である(58)記載の医薬。

(60) (50)記載の抗体を含有する医薬。

【0052】

(61) 医薬が、炎症性疾患、癌または癌転移の治療、予防および/または診断のための医薬である(60)記載の医薬。

(62) (1)～(8)のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、被験試料による該ポリペプチドが有する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の変動を測定することを特徴とする、該ポリペプチドが有する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

(63) 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に 1, 3 結合でN - アセチルグルコサミンを転移する活性である(62)記載のスクリーニング法。

(64) 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) ガラクトース、N - アセチルラクタサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクタサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびiii) ガラクトース、N - アセチルラクタサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1, 3 結合でN - アセチルグルコサミンを転移する活性である(62)または(63)記載のスクリーニング法。

(65) ガラクトース、N - アセチルラクタサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質が、ラクトシルセラミドまたはパラグロポシドである(64)記載のスクリーニング法。

【0053】

(66) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカンおよびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、(64)または(65)記載のスクリーニング法。

10

20

30

40

50

(67) (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、パラグロボシドを認識する抗体、またはポリ - N - アセチルラクタミン糖鎖を認識する抗体およびレクチンからなる群より選ばれる少なくとも一種を用い、パラグロボシドまたはポリ - N - アセチルラクタミン糖鎖を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(68) (1) ~ (8) 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、(50) 記載の抗体を用い、該ポリペプチドを定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(69) (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーター DNA。

(70) プロモーター DNA が、白血球細胞、神経細胞、気管の細胞、肺細胞、大腸細胞、胎盤の細胞、神経芽細胞腫細胞、グリオブラストーマ細胞、大腸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞および白血病細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、(69) 記載のプロモーター DNA。

【0054】

(71) プロモーター DNA が、ヒト、ラットまたはマウス由来のプロモーター DNA である、(69) または (70) 記載のプロモーター DNA。

(72) (69) ~ (71) のいずれか 1 項に記載のプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被検試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物を定量することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(73) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、(72) 記載のスクリーニング法。

(74) (62) ~ (68)、(72) および (73) のいずれか 1 項に記載のスクリーニング法により得られる化合物。

(75) (1) ~ (8) 記載のポリペプチドをコードする DNA を欠損または変異させた非ヒトノックアウト動物。

【0055】

(76) 非ヒトノックアウト動物がマウスである、(75) 記載のノックアウト動物。

(77) (10) ~ (18) 記載の DNA 若しくは該 DNA と相同な配列からなる RNA、または (20) または (21) 記載の組換え体ベクターを細胞へ導入し、(1) ~ (8) 記載のポリペプチドを発現させることを特徴とする、細胞の分化、相互認識、移動を制御する方法。

(78) 細胞が、血球細胞、神経細胞、幹細胞または癌細胞のいずれかより選ばれる細胞である (77) 記載の方法。

(79) (10) ~ (18) 記載の DNA 若しくは該 DNA と相同な配列からなる RNA、または (20) または (21) 記載の組換え体ベクターを前骨髄球細胞へ導入して (1) ~ (8) 記載のポリペプチドを発現させることを特徴とする、前骨髄球細胞の顆粒球細胞への分化を促進する方法。

【0056】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のポリペプチドをコードする DNA の取得、ならびに該 DNA およびオリゴヌクレオチドの製造

特開平 6 - 181759 で開示されている $\text{GlcNAc} 1, 3$ -ガラクトース転移酵素 (以下、 $\text{Gal} 1 - 3 \text{GlcNAc}$ と略記する; 別名 WM1) は $\text{Gal} 1 - 3 \text{GlcNAc}$ 構造の合成に関与する $\text{GlcNAc} 1, 3$ -ガラクトース転移酵素である。遺伝子データベースから、BLAST [J. Mol. Biol. 251, 403 - 410 (1990)]

10

20

30

40

50

)、FASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-69)、FrameSearch [Compugen社製]等のプログラムを利用して、本酵素遺伝子と同一性のある遺伝子または本酵素とアミノ酸レベルで同一性を有する蛋白質をコードする可能性のある遺伝子を検索することにより本発明のポリペプチドをコードするDNAあるいは該DNAの一部の塩基配列の情報を取得することができる。データベースとしてはGenBank、EMBL、Geneseq (Derwent Publications社)等の公的なデータベースを利用することもできるし、私的なデータベースも利用できる。このようにして得られた 3Gal-T1 遺伝子とアミノ酸レベルで同一性を有する蛋白質をコードする可能性のある遺伝子の塩基配列として配列番号3に示したラットcDNAの塩基配列をあげることができる。また配列番号3の塩基配列と同一性を有するヒトcDNAの塩基配列としてGenBank番号AI039637のヒトEST配列をあげることができる。これらの配列は本発明のポリペプチドをコードするDNAの一部の塩基配列である。

10

【0057】

各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型にして、上記で得られた配列に特異的なプライマーを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略記する) [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す) およびPCR Protocols Academic Press (1990)]を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAの存在を検出することができる。また、同様にして本発明のポリペプチドをコードするDNAのDNA断片を取得することができる。

20

【0058】

得られたDNA断片が不完全長の場合は、以下のようにしてその全長cDNAを得ることができる。

上記で取得したDNA断片をプローブとして、該DNAが存在することが確認された臓器または細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、全長cDNAを取得することができる。

30

また、該DNAが存在することが確認された一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、5'RACE法と3'RACE法を行うことにより、該当する配列を有するcDNAの5'末端側の断片と3'末端側の断片を取得することができる。両断片を連結することにより、全長cDNAを取得できる。

【0059】

各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAは、常法または市販されているキットに従って調製することができる。一例を以下に示す。

各種臓器または各種細胞から酸グアニジウム チオシアネート フェノール-クロロホルム法 [Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987)]により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI (Life Technologies社製)で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPTTM Pre-amplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社製)により一本鎖cDNAを合成する。一本鎖cDNAとしては、例えばヒト大腸癌細胞株colo205やヒト胃粘膜から上記の方法で作製した一本鎖cDNAを挙げることができる。

40

【0060】

cDNAライブラリーは常法により作製することができる。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やCurrent Protocols

50

in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 - 1997) (以下、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す) サプリメント1~38等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースク립ト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; GIBCO BRL社製] やザップ-cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、STRATAGENE社製] を用いる方法等が挙げられる。各種臓器または各種細胞由来のcDNAライブラリーは、市販されているものを購入することによっても入手できる。

10

【0061】

cDNAライブラリーを作製するための、クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript SK(-)、pBluescript IISK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、ZAP II (STRATAGENE社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、Triplex (Clontech社製)、Excel (Pharmacia社製)、pT7T318U (Pharmacia社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 - 22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]、pCXN2 [Gene, 108, 193 (1991)] 等を挙げる事ができる。

20

【0062】

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRT^M Strain [STRATAGENE社製] および Escherichia coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等が用いられる。

30

【0063】

cDNAライブラリーとして、例えば以下のようにして作製したcDNAライブラリーを挙げる事ができる。

40

ヒト胃粘膜のpoly(A)⁺RNAよりcDNA合成システム(cDNA Synthesis System、GIBCO BRL社製)を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalIアダプター(Super Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製)を付加した後、クローニングベクター ZAP II (ZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit、STRATAGENE社製)のEcoRI部位に挿入し、Gigapack III Gold Packaging Extract (STRATAGENE社製)を用いてin vitroパッケージングを行うことにより、cDNAライブラリーを作製する。

50

また、市販の cDNA ライブラリーを購入して使用することもできる。

【0064】

データベース検索で明らかになった候補遺伝子の塩基配列を基に、該遺伝子に特異的なプライマーを設計し、上記のようにして取得した一本鎖 cDNA または cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行う。増幅断片が得られた際には、該断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。サブクローニングは、増幅 DNA 断片をそのまま、あるいは制限酵素や DNA ポリメラーゼで処理後、常法によりベクターに組み込むことにより行うことができる。ベクターとしては、pBluescript SK(-)、pBluescript II SK(+) (いずれも STRATAGENE 社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Amp SK(+) [STRATAGENE 社製、Strategies, 5, 6264 (1992)]、pT7Blue [Novagen 社製]、pCRII [Invitrogen 社製、Biotechnology, 9, 657 (1991)]、pCR-TRAP [Genehunter 社製]、pNOTAT7 (5' 3' 社製) などが挙げられる。

10

【0065】

サブクローン化された PCR 増幅断片の塩基配列を決定することにより、目的の DNA 断片が取得されたか確認する。塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法、[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは 373A・DNA シークエンサー [Perkin Elmer 社製] 等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

20

上記で作製した cDNA ライブラリーに対して、該 DNA 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング 第 2 版) を行うことにより、3Gal-T1 とアミノ酸レベルで相同性を有する蛋白質をコードする可能性のある cDNA を取得することができる。プローブとしては、該 DNA 断片をアイソトープあるいはジゴキシゲニン (digoxigenin) 標識したものを使用することができる。

【0066】

上記の方法により取得された DNA の塩基配列は、該 DNA 断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第 2 版等に記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは DNA シークエンサー 373A (Perkin Elmer 社製)、DNA シークエンサー 377 (Perkin Elmer 社製)、DNA シークエンサー model 4000L (LI-COR 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

30

【0067】

該方法により取得される本発明の DNA として、例えば、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の内、39 番目から 378 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする DNA 等を挙げることができる。具体的には、配列番号 2 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 2 で表される塩基配列の内、135 ~ 1268 番目の塩基配列を有する DNA、または配列番号 2 で表される塩基配列の内、249 ~ 1268 番目の塩基配列を有する DNA 等を挙げることができる。

40

【0068】

尚、配列番号 2 で表される塩基配列は、配列番号 1 で表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 cDNA 由来の塩基配列であり、配列番号 2 で表される塩基配列の内、135 ~ 1268 番目の塩基配列は、該ポリペプチドのコード領域のみの塩基配列であり、配列番号 2 で表される塩基配列の内、249 ~ 1268 番目の塩基配列は、該ポリペプチドの糖転移酵素活性を有する領域をコードする塩基配列である。

50

配列番号2で表される塩基配列の内、135～1268番目の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G6、pCXN2-G6、pBS-G6を挙げることができる。

【0069】

一般に1つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、配列番号2とは異なる塩基配列を有するDNAであっても本発明のポリペプチドをコードしていれば本発明のDNAに含まれる。

【0070】

また、上記の方法で得られた本発明のDNAの塩基配列の情報に基づき、本発明のDNAの塩基配列の全体あるいは任意の部分について、その5'端の15～30塩基の配列を含むDNAおよび3'端の15～30塩基の配列と相補的な配列を含むDNAをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、PCRを行うことによって、本発明のDNAおよびその任意の部分の断片を調製することができる。プライマーに用いるDNAはアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社の380A、392、3900等のDNA合成機により合成できる。

10

【0071】

また、本発明のDNAがコードするポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても本発明のDNAを調製することができる。DNAの化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したアプライド・バイオシステムズ社製のDNA合成機380A、392、3900等を用いて行うことができる。

20

【0072】

また、上記の方法で取得したDNAの塩基配列と相補的な配列を有するDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的のDNAを取得することができる。例えば、他種(マウス、ラット、ウシ、サルなど)の生物のホモログDNAなどをクローニングできる。具体的には、配列番号3で表されるラットのホモログDNAが挙げられる。

【0073】

本発明のポリペプチドをコードするDNAはDNA合成機で合成する方法を除いては、二本鎖DNAとして取得され、本発明のポリペプチドをコードするセンス鎖のDNAおよび該DNAの塩基配列と相補的な配列を有するDNAからなる。両DNAは100で5分間加熱し、氷上で急冷することにより分離させることができる。本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と相補的な配列を有するDNAは、上記のようにして分離した本発明のポリペプチドをコードするセンス鎖のDNAを鋳型として、その3'端の5～30塩基の配列と相補的な配列からなるDNAをプライマーとし、dNTPの存在下でDNAポリメラーゼの反応を行うことによっても合成できる。

30

【0074】

該ストリンジентな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記で取得したDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプ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得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0mol/lの塩化ナトリウム存在下、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溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l塩化ナトリウム、15mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる)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DNAを挙げることができる。

40

【0075】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコ

50

ールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST (J. Mol. Biol., 215, 403 (1990))やFASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990))などの解析ソフトで、デフォルト(初期設定)のパラメータを用いて計算したときに、上記で取得したDNAと少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

10

【0076】

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クロニング第2版等に記載の常法により、あるいは該DNAの塩基配列情報よりDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するセンス・オリゴヌクレオチド、本発明のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列の一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0077】

該オリゴヌクレオチドとしては、本発明のDNAの有する塩基配列または該塩基配列と相補的な塩基配列中の連続した5~120塩基、より好ましくは連続した5~60塩基と同じ配列を有するDNAを挙げることができ、具体的には、配列番号2で表される塩基配列中の連続した5~120塩基と同じ配列を有するDNAまたは配列番号2で表される塩基配列と相補的な配列中の連続した5~120塩基と同じ配列を有するDNAを挙げることができる。フォワードプライマーおよびリバースプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(Tm)および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には配列番号25および28等に示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを挙げることができる。

20

【0078】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

【0079】

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォ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'ホスフォ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、オリゴヌクレオチド中のリボースが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、あるいは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等を挙げることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

30

40

【0080】

以上のようにして取得される本発明のDNAがコードする本発明のポリペプチドとしては、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の39番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、前記ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコ

50

サミン転移酵素活性およびパラグロボシド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド、または前記ポリペプチドの有するアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性およびパラグロボシド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド等を挙げることができる。

【0081】

上記のアミノ酸配列を有するポリペプチドにおいて1以上のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。欠失、置換および/または付加されるアミノ酸の数は1から数個であり、その数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法などの周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

【0082】

また、本発明のポリペプチドとしては、配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む。配列番号1記載のアミノ酸配列との相同性は、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-69)等の解析ソフトで、デフォルト(初期設定)のパラメータを用いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上の相同性を有していることが好ましい。例えば、他種(マウス、ラット、ウシ、サルなど)の生物のホモログのポリペプチドを挙げることができる。具体的には、配列番号3で表されるラットのポリペプチドが挙げられる。

本発明のポリペプチドが 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することは下記(3)に記載の方法で確認することができる。

【0083】

(2) 本発明のポリペプチドの製造

上記の方法により得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー・サプリメント1~38等に記載された方法等を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0084】

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体(ヒト個体を除く)や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記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み込みが可能で、本発明のポリペプチドをコードするDNA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を用いることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のポリペプチドをコードするDNA、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0085】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもBoehringer Mannheim社より市販）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、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）〕、pBlue IISK（-）（STRATAGENE社製）、pTrs30（FERMBP-5407）、pTrs32（FERMBP-5408）、pGHA2（FERMBP-400）、pGKA2（FERMB-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pGEX（Pharmacia社製）、pETシステム（Novagen社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社製）、pMAL-c2（New England Biolabs社製）等を例示することができる。

【0086】

プロモーターとしては、大腸菌等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。例えば、trpプロモーター（P_{trp}）、lacプロモーター（P_{lac}）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌や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P_{trp}を2つ直列させたプロモーター（P_{trp}x2）、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。

【0087】

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0088】

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0089】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、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微生物、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、Escherichia coli BL21（DE3）、Escherichia coli BL21（DE3）pLysS、Escherichia coli HMS174（DE3）、Escherichia coli HMS174（

10

20

30

40

50

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 acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110を挙げる事ができる。

10

【0090】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ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、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Res. , 16, 6127 (1988)〕、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMol. Gen. Genet. , 168, 111 (1979)に記載の方法等を挙げる事ができる。

20

【0091】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

【0092】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げる事ができる。

30

【0093】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株を挙げる事ができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等を挙げる事ができる。

【0094】

組換えベクターの導入方法としては、酵母に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、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol. , 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol. , 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)記載の方法等を挙げる事ができる。

40

【0095】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNA I/Amp (Invitrogen社製)、pCDNA I (フナコシ社製)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)、フナコシ社製〕、pAGE107〔特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochemistry, 50

50

101, 1307 (1987)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)]、pAMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)]、pAS3-3 (特開平2-227075)等を例示することができる。

【0096】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス(Moloney Murine Leukemia Virus)のロング・ターミナル・リピート・プロモーター(Long Terminal Repeat Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

10

【0097】

宿主細胞としては、DNAを細胞内に導入できる動物細胞であるならいかなる細胞も用いることができる。例えば、哺乳動物の細胞としてはヒト、サル、マウス、ラット、モルモットまたはミンクの細胞などを用いることができる。具体的には、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞(ATCC CRL-9096、ATCC CCL-61)、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞(ATCC CRL-1432)またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637(特開昭63-299)、ヒト大腸癌細胞株等を挙げることができる。

20

【0098】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NSO等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293、293 [J. Gen. Virol. 36, 59-72 (1977)]等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1(ATCC CRL-1650)、COS-7(ATCC CRL-1651)、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等を挙げることができる。

治療用タンパク質性医薬品の製造などが目的の場合は、哺乳動物の細胞、特にCHO細胞を宿主とすることが好ましい。

30

【0099】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に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、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、DEAEデキストラン法(羊土社 バイオマニュアルシリーズ4, 16)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、マイクロインジェクション法(羊土社 バイオマニュアルシリーズ4, 36)、アデノウイルス法(羊土社 バイオマニュアルシリーズ4, 43)、ワクシニアウイルス(羊土社 バイオマニュアルシリーズ4, 59)レトロウイルスベクター(羊土社 バイオマニュアルシリーズ4, 74)等を用いることができる。

40

【0100】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー・サプリメント1~38 (Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47 (198

50

8)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0101】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

【0102】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392 (Pharmingen社製)、pVL1393 (Pharmingen社製)、pBlueBacII (Invitrogen社製)等を挙げるることができる。

【0103】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

【0104】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル)等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh5 (別名BTI-TN-5B1-4、Invitrogen社製)等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等を挙げるすることができる。

【0105】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等を挙げるすることができる。

【0106】

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等を挙げるすることができる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)]に準じてポリペプチドを生産することができる。

【0107】

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等を挙げるすることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率を上げることができる。

【0108】

宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ニンジン、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等を挙げるることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に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、アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)、特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第26

10

20

30

40

50

06856、特許第2517813)等を挙げることができる。

【0109】

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体(トランスジェニック植物)を造成することもできる。

【0110】

動物個体(ヒト個体を除く)を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法[American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S(1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S(1996)、Bio/Technology, 9, 830(1991)]に準じて、遺伝子を導入した動物(ヒトを除く)中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

10

【0111】

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるカゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0112】

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

20

【0113】

形質転換体が動物個体(ヒト個体を除く)または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドを該動物中に生成、蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成、蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク(特開昭63-309192)、卵等を挙げることができる。

30

【0114】

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドを該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0115】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

40

【0116】

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0117】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解

50

物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等がを用いることができる。

【0118】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0119】

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0120】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0121】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0122】

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0123】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharming社)、Sf-900 IISFM培地(GIBCO BRL社製)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。培養は、pH6～7、培養温度25～30℃がよく、培養時間は、通常1～5日間である。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0124】

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

10

20

30

40

50

【0125】

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発現させることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプII型の膜タンパク質のトポロジーを有し、N末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半のC末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

10

【0126】

本発明の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の14アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く18アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると予想することができる。従って、45番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

【0127】

幹領域は、他の1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素や1, 3 - ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素や1, 3 - ガラクトース転移酵素の幹領域に関する知見を基に推定した。具体的には、本願の実施例4および特開平6 - 181759に開示された知見をもとに推定することができる。例えば、配列番号1の36番目から378番目のアミノ酸を含む分泌型ポリペプチド、または配列番号1の39番目から378番目のアミノ酸を含む分泌型ポリペプチドは、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する。

20

【0128】

上記のポリペプチド全長または1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する領域 (触媒領域) を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クロニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、- ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS - トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン (GFP)、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどが挙げられる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469 - 474 (1995)〕。

30

【0129】

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造に応じて適宜、選択することができる。

40

【0130】

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)〕、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平05 - 336963、WO94123021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0131】

50

即ち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0132】

具体的には、触媒部位を含むと考えられるアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。

【0133】

精製・検出用のタグとしては、ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどが挙げられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474(1995)〕。

【0134】

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0135】

本発明のポリペプチドの製造法として他に、本発明のDNAを用いたin vitroでの転写・翻訳系による製造法がある。in vitro転写・翻訳系とは、無細胞システムを用いてDNAからmRNAへの転写、およびmRNAから蛋白質への翻訳を行うことによりポリペプチドを生産する系のことであり、目的のDNAまたは目的のmRNAから目的のポリペプチドを生産できる無細胞システムであればどのようなものでも用いることができる。代表的な無細胞翻訳系として、例えば、ウサギの網状赤血球ライゼート(Rabbit Reticulocyte Lysate)や小麦杯ライゼート(Wheat Germ Lysate)を用いた系などが挙げられる。in vitro転写・翻訳系は各社からキットが販売されており、市販のキットを用いてポリペプチドを比較的容易に製造できるようになっている。市販キットとして例えば、In Vitro ExpressTM Translation Kit(STRATAGENE社製)が挙げられる。また、本発明のポリペプチドは、公知の方法〔J. Biomolecular NMR，6，129-134、Science，242，1162-1164、J. Biochem.，110，166-168(1991)〕に準じたin vitro転写・翻訳系を用いて生産することもできる。

【0136】

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0137】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフ

10

20

30

40

50

イニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

【0138】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0139】

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0140】

また、通常の糖転移酵素の精製方法 (Methods in Enzymology, 83, 458) に準じて精製できる。

【0141】

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)〕。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

【0142】

更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0143】

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック(Advanced ChemTech)社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシアバイオテク社製、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント(Protein Technology Instrument)社製、シンセセル・ベガ(Synthesell-Vega)社製、パーセプティブ(PerSeptive)社製、島津製作所製等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0144】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

【0145】

(3) 本発明のポリペプチドの活性測定と利用

本発明のポリペプチドの発現ベクターを保有する形質転換体から調製した細胞抽出液、あるいは該形質転換体またはその培養物から単離精製した本発明のポリペプチドを酵素サンプルとして用い、公知の測定法〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1

10

20

30

40

50

993)、*J. Biol. Chem.*, 267, 23507 (1992)、*J. Biol. Chem.*, 267, 2994 (1992)、*J. Biol. Chem.*, 263, 12461 (1988)、*Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 42, 77 (1989)、*FEBS Lett.*, 462, 289 (1999)、*J. Biol. Chem.*, 269, 14730 - 14737 (1994)、*J. Biol. Chem.*, 267, 2994 (1992)、*Anal. Biochem.*, 189, 151 - 162 (1990)、*J. Biol. Chem.*, 273, 433 - 440 (1998) に基づいて本発明のポリペプチドの 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定することができる。また、種々の受容基質を用いて測定することにより、本発明のポリペプチドの受容基質の特異性を調べることができる。

10

【0146】

酵素サンプルとして細胞抽出液を用いる場合は、宿主細胞自身もつ糖転移酵素活性の影響を除くため、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含まないコントロールベクターを導入した形質転換体の細胞抽出液をコントロールとして、その 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を比較する。コントロールと比較して 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加していれば、形質転換体が保有する本発明のDNAがコードするポリペプチドは、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有しているといえる。

【0147】

複数の Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素を発現している細胞や組織の場合、細胞や組織の抽出液を酵素源とした酵素学的解析では、発現している Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の各々を特定すること、ならびにそれらの Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の各々についての酵素学的特性を明らかにすることはできない。(2)に記載の方法により本発明のポリペプチドを精製することにより、該ポリペプチドが有する Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の酵素学的特性を明らかにすることができる。

20

【0148】

以下に測定法の例を示す。

(i) 蛍光標識したオリゴ糖を受容基質として用いる方法

2 - アミノベンゼン化あるいはピリジルアミノ化により蛍光標識したオリゴ糖を受容基質とし、UDP - GlcNAcを糖供与体として反応を行い、反応液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する。2 - アミノベンゼン化糖鎖基質の調製は、SIGMA 2AB glycan labelling kit (Oxford Glycoscience社製)を用いて、キットの説明書に従って行うことができる。ピリジルアミノ化による蛍光標識は常法(*Agric. Biol. Chem.*, 54, 2169 (1990))により行うことができる。糖供与体のUDP - GlcNAcを添加しない場合に比べて添加した場合に増加するピークを生成物のピークとする。生成物の量をその蛍光強度から測定し、添加した受容基質に対する生成物の割合を、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性とする。生成物の同定は、生成物のHPLCの保持時間が、スタンダード(反応に用いた受容基質のオリゴ糖の還元末端に1, 3結合でN - アセチルグルコサミンが付加した構造の標識オリゴ糖)の保持時間と一致することを指標に行うことができる。

30

40

【0149】

(ii) 無標識のオリゴ糖を受容基質に用いる方法

標識しないオリゴ糖を受容基質として用いて(i)と同様に反応を行い、HPLCの代わりに高速陰イオン交換クロマトグラフィーで反応液を分析する。糖供与体のUDP - GlcNAcを添加しない場合に比べて添加した場合に増加するピークを生成物のピークとして生成物の量を測定し、添加した受容基質に対する生成物の割合を、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性とする。添加した受容基質に対する生成物の割合を、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性とする。生成物の同定は、生成物の高速

50

陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出時間が、スタンダード（反応に用いた受容基質のオリゴ糖の還元末端に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンが付加した構造のオリゴ糖）の溶出時間と一致することを指標に行うことができる。

【0150】

(iii) 糖脂質を受容基質に用いる方法

糖脂質を受容基質とし、UDP - [¹⁴C] GlcNAc を糖供与体として反応を行う。反応液から逆相クロマトグラフィーにより糖脂質を抽出し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートを用いて展開する。プレート上の放射能を測定することにより生成物の検出と定量を行う。添加した受容基質に対する生成物の割合を 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性とする。生成物の同定は、生成物の R_f 値がスタンダード（受容基質に用いた糖脂質の還元末端に 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミンが付加した構造の糖脂質）の R_f 値と一致することを指標に行うことができる。

10

【0151】

また、以下のようにして本発明のポリペプチドが *in vivo* での糖鎖の合成に関与するか否かを解析することができる。(2) の記載に基づいて、動物細胞に本発明の DNA を含む発現ベクターを導入して作製した形質転換細胞を培養し、本発明のポリペプチドを発現させる。該形質転換細胞について、各種の糖鎖（ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖、シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖）に特異的に結合する抗体やレクチンを用いて蛍光染色した後、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACS と略記する) を用いて、抗体やレクチンが結合する糖鎖の量を解析する。

20

【0152】

例えば、本発明のポリペプチドをコードする DNA を含まないコントロールベクターを導入した形質転換細胞と比較して、ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖量の増加を確認することにより、本発明の DNA がコードするポリペプチドが、ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖の合成に関与する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していることがわかる。

【0153】

ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖を認識する抗体やレクチンとしては、ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖を認識するものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖を認識する抗体としては、直鎖状のポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖 (i 抗原) を特異的に認識する抗 i 抗体、および分岐鎖を有するポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖 (I 抗原) を特異的に認識する抗 I 抗体 [J. Biol. Chem., 254, 3221 (1979)]、ポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖を認識するレクチンとしては、pokeweed mitogen (PWM と略す)、Lycopersicon esculentum agglutinin (LEA と略す)、Datura stramonium agglutinin (DSA と略す) を用いることができる [J. Biol. Chem., 282, 8179 - 8189 (1987)、J. Biol. Chem., 259, 6253 - 6260 (1984)、J. Biol. Chem., 262, 1602 - 1607 (1987)、Carbohydr. Res., 120, 187 - 195 (1983)、Carbohydr. Res., 120, 283 - 292 (1983)、Glycoconjugate J., 7, 323 - 334 (1990)]。

30

40

【0154】

本発明のポリペプチドが糖タンパク質や糖脂質等の複合糖質の糖鎖の *in vivo* での合成に関与していることは、上記の方法において、該形質転換細胞の培養時にそれぞれの複合糖質の糖鎖に特異的な糖鎖合成阻害剤を添加し、糖鎖の合成を阻害した細胞を FACS 解析することにより確認できる。例えば、糖蛋白質の O 結合型糖鎖の合成に特異的な阻害剤の存在下で、該形質転換細胞を培養した後、該形質転換細胞をポリ - N - アセチラクトサミン糖鎖を認識する抗体を用いて蛍光染色し FACS 解析したときに、ポリ - N

50

- アセチルラクトサミン糖鎖量が低下していることにより、本発明のポリペプチドが糖蛋白質のO結合型糖鎖中のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与していることがわかる。

【0155】

複合糖質の糖鎖に特異的な糖鎖合成阻害剤としては、糖蛋白質のO結合型糖鎖の合成阻害剤であるBenzyl-GalNAc、糖蛋白質のN結合型糖鎖の合成阻害剤として働くマンノシダーゼII阻害剤のスウィンソニン、糖脂質糖鎖の合成阻害剤として働くグルコシルセラミド合成酵素の阻害剤であるD-PDMP(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol)等をあげることができる。

10

【0156】

また、動物細胞に本発明のポリペプチドの発現ベクターを導入した形質転換細胞と本発明のポリペプチドをコードするDNAを含まないコントロールベクターを導入した形質転換細胞から糖脂質を抽出し、両者の糖脂質の組成をTLCプレートを用いて分析し比較することにより、本発明のポリペプチドが糖脂質の糖鎖の合成に関与することを確認できる。糖脂質の抽出および組成の分析は公知の方法〔秀潤社 細胞工学別冊 グライコバイオロジー実験プロトコール、Anal. Biochem., 223, 232(1994)〕に従って行うことができる。TLCプレートで展開した糖脂質はオルシノール染色、あるいは特定の糖鎖構造と結合する抗体を用いた免疫染色により検出および定量をし、スタンダードとなる糖脂質のRf値と比較することにより同定する。例えば、N-アセチルラクトサミン構造を認識する抗体を用いてパラグロボシド(Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc-セラミド)およびネオラクトヘキサオシルセラミド(Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc-セラミド)を免疫染色したとき、本発明のポリペプチドを発現する形質転換細胞がコントロールの形質転換細胞と比較して、パラグロボシドおよびネオラクトヘキサオシルセラミドの量が増加していることにより、本発明のポリペプチドがパラグロボシドおよびネオラクトヘキサオシルセラミドの合成に関与していることがわかる。

20

【0157】

本発明のポリペプチドは、炎症性疾患、癌、癌の転移等、本発明のポリペプチドの発現変動を伴う疾患の治療、予防および/または診断のための医薬として利用することができる。

30

【0158】

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、薬剤として該ポリペプチド単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の坦体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0159】

40

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

50

【0160】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0161】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0162】

さらに、本発明のラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAを取得できたことで、以下に示すような機能解析や応用が可能になる。

(i) 分子生物学的手法、あるいはノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなどを用いた本発明のポリペプチドの機能解析。

(ii) 本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現分布解析。

(iii) 本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現と各種疾患との関連の解析。

(iv) 本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現を指標とした疾患の診断。

(v) 本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現を指標とした細胞の種類や分化ステージの同定。

(vi) 本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現や本発明のポリペプチドが有する酵素活性を増強または抑制する化合物の探索。

(vii) 本発明のポリペプチドを用いた有用糖鎖の合成。

以下に、本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの使用例について具体的に記す。

【0163】

(4) N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造と利用

本発明のポリペプチドは、受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に 1, 3 結合でN - アセチルグルコサミンを転移する活性、即ち 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有している。従って、本発明のポリペプチドは、糖鎖合成剤として利用できる。受容基質としては、例えば、i) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン ($\text{Gal} \ 1 - 4 \text{GlcNAc}$)、 $\text{Gal} \ 1 - 3 \text{GlcNAc}$ またはラクトース ($\text{Gal} \ 1 - 4 \text{Glc}$)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \ 1 - 3 \text{GlcNAc}$ またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびiii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \ 1 - 3 \text{GlcNAc}$ またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質等が挙げられる。本発明のポリペプチドは上記i) ~ iii) より選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1, 3 結合でN - アセチルグルコサミンを転移する酵素活性を有する。複合糖質としては、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質が挙げられる。ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \ 1 - 3 \text{GlcNAc}$ またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質としては、例えば、ラクトシルセラミドまたはパラグロボシドなどが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0164】

N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造としては、GlcNAc 1 - 3 Gal 構造、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 構造、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 3 GlcNAc 構造、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc 構造、(Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 GlcNAc 構造 (n は 1 以上の整数)、または (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 Glc 構造 (n は 1 以上の整数) 等を挙げることができる。

【0165】

以下にその詳細を記す。

(i) 本発明のポリペプチドをコードする DNA を導入した形質転換体を用いた糖鎖の製造法

上記 (3) で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質、具体的には、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド、ラクト系糖脂質 (Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドを骨格として有する糖脂質)、ネオラクト系糖脂質 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドを骨格として有する糖脂質)、GlcNAc 1 - 3 Gal 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 3 GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc 構造を有する糖、(Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 GlcNAc 構造を有し n が 1 以上である糖、および (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 Glc 構造を有し n が 1 以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成、蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することにより、該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

【0166】

培養は上記 (3) に準じて行うことができる。上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質 (例えば医薬用組換え糖タンパク質) を、糖鎖合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質に N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

【0167】

(ii) 本発明のポリペプチドをコードする DNA を導入した動物個体または植物個体を用いた糖鎖の製造法

上記 (3) で取得した動物個体または植物個体を用い、上記 (3) の方法に準じて、N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0168】

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明の DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質、具体的には、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド、ラクト系糖脂質 (Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドを骨格として有する糖脂質)、ネオラクト系糖脂質 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミドを骨格として有する糖脂質)、GlcNAc 1 - 3 Gal 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 3 GlcNAc 構造を有する糖、GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc 構造を有する糖、(Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 - 4 GlcNAc 構造を有し n が 1 以上である糖、および (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3)_n Gal 1 -

10

20

30

40

50

4 G l c 構造を有し n が 1 以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、N - アセチルグルコサミンが 1 , 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【 0 1 6 9 】

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等を挙げることができる。

【 0 1 7 0 】

植物個体の場合、例えば、本発明の D N A を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、N - アセチルグルコサミンが 1 , 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、N - アセチルグルコサミンが 1 , 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【 0 1 7 1 】

(i i i) 本発明のポリペプチドを用いた糖鎖の製造法

上記 (3) 記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、ガラクトース単糖、ガラクトース残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはガラクトース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、該糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基またはガラクトース単糖に、N - アセチルグルコサミンが 1 , 3 結合で付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

【 0 1 7 2 】

即ち、i) ラクトシルセラミド (G a l 1 - 4 G l c - セラミド) またはパラグロシド (G a l 1 - 4 G l c N A c 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c - セラミド)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (G a l 1 - 4 G l c N A c)、G a l 1 - 3 G l c N A c、G a l 1 - 3 G a l N A c、またはラクトース (G a l 1 - 4 G l c)、iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (G a l 1 - 4 G l c N A c)、G a l 1 - 3 G l c N A c またはラクトース (G a l 1 - 4 G l c) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iv) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、G a l 1 - 3 G l c N A c またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質からなる群より選ばれる少なくとも一種を受容基質として、上記 (3) 記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびウリジン - 5 ' - ニリン酸 N - アセチルグルコサミン (以下、U D P - G l c N A c と称する) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトースまたはガラクトース残基に 1 , 3 結合で N - アセチルグルコサミンが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

【 0 1 7 3 】

酵素源は、ラクト - N - ネオテトラオース (l a c t o - N - n e o t e t r a o s e , G a l 1 - 4 G l c N A c 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c) を基質として、37 で 1 分間に 1 μ モルの G l c N A c 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c N A c 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c を生成することのできる活性を 1 単位 (U) として、0 . 1 m U / l ~ 1 0 , 0 0 0 U / l であり、好ましくは 1 m U / l ~ 1 , 0 0 0 U / l の濃度で用いる。

【 0 1 7 4 】

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などを挙げることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。また、上記 (2) 記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記 (2) 記載の非ヒトトランスジェニック動物より得られたミルクを水性媒体として用いることもできる。水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

10

20

30

40

50

【0175】

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミン S - 215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオン F 2 - 40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミン F B、日本油脂社製）などの三級アミン類など、N - アセチルグルコサミンが 1, 3 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1 種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常 0.1 ~ 50 g / l の濃度で用いられる。

10

【0176】

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常 0.1 ~ 50 ml / l の濃度で用いられる。UDP - GlcNAc としては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。該 UDP - GlcNAc は 0.1 ~ 500 mmol / l の濃度で用いることができる。

【0177】

上記において、ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc、またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖としては、上記の他に、Gal 1 - 3 GalNAc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc、Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc、Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNAc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) Glc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) GlcNAc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) Glc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) GlcNAc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 (GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 Glc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 (GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 GlcNAc、Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 GlcNAc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 (GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 Glc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 GlcNAc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 Glc、Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 6) Gal 1 - 4 GlcNAc、またはこれらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有するオリゴ糖などを挙げることができる。ガラクトース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質としては、上記オリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖を含有する複合糖質、あるいはアシアロ複合型 N 結合型糖鎖を含有する複合糖質などを挙げることができる。具体的には、例えば、ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) やパラグロボシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド) などの糖脂質を挙げることができる。

20

30

40

【0178】

受容基質は 0.01 ~ 500 mmol / l の濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じて $MnCl_2$ 等の無機塩、 β -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。生成反応は水性媒体中、pH 5 ~ 10、好ましくは pH 6 ~ 8、20 ~ 50 の条件で 1 ~ 96 時間行う。

50

【0179】

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編，続生化学実験講座，第4巻，複合糖質研究法Ⅰ，Ⅱ，東京化学同人，（1986年）、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修，グリコバイオロジー実験プロトコール，秀潤社，（1996年）〕。

【0180】

また、上記方法により得られるN - アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を受容基質として用い、(a) 該受容基質、(b) GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素、および(c) ウリジン - 5' - ニリン酸ガラクトース（以下、UDP - Gal と称す）を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端のN - アセチルグルコサミン残基に 1, 4 結合でガラクトースが付与された反応産物を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を採取することにより該ガラクトースが付与された該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

10

【0181】

また、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖〔(Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3) 構造が2回以上繰り返す糖鎖〕は、GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素とGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が交互に働くことにより合成されることが知られている。従って、GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素と本発明のGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを用いて、in vitroでポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖を合成することができる。

20

【0182】

即ち、本発明のポリペプチドを酵素源として用い、(a) GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素、(b) i) ラクトシルセラミド (Gal 1 - 4 Glc - セラミド) またはパラグロポシド (Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc - セラミド)、ii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc)、iii) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン (Gal 1 - 4 GlcNAc)、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース (Gal 1 - 4 Glc) 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iv) ガラクトース、N - アセチルラクトサミン、Gal 1 - 3 GlcNAc またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質、およびv) 上記の方法により得られる糖鎖または複合糖質から選ばれる受容基質、(c) ウリジン - 5' - ニリン酸N - アセチルラクトサミン (UDP - GlcNAc)、および(d) ウリジン - 5' - ニリン酸ガラクトース (UDP - Gal) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端にポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された反応産物を生成、蓄積させ、該水性媒体中より該ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を採取することにより、該ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付与された該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

30

【0183】

さらに、GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素遺伝子と本発明のGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを細胞中で共発現することにより、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖あるいは該糖鎖が付加した複合糖質を生産することができる。GlcNAc 1, 4 - ガラクトース転移酵素はほとんどの細胞で発現しているため、Gal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAのみを細胞中で発現することによっても、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖あるいは該糖鎖が付加した複合糖質を生産することができる。

40

【0184】

(iv) 各種糖鎖または複合糖質の利用法

50

以上のようにして製造された各種糖鎖または複合糖質の利用法として、例えば以下のような応用が考えられる。

【0185】

ヒトの乳中にはラクト-N-ネオテトラオース (Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc) やラクト-N-テトラオース (Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc)、あるいはそれらを母核とする構造を有する様々なオリゴ糖が存在することが知られている [Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)]。該オリゴ糖は共通してGlcNAc 1-3Gal構造を有している。また、該オリゴ糖の中にはポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を有するオリゴ糖も含まれる。これらのオリゴ糖には、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防ぐ働きや、毒素を中和する働きがあると考えられている。また、善玉の腸内細菌であるビフィズス菌の増殖を促す活性も知られている。一方、ウシやマウスなどの動物の乳中に存在するオリゴ糖の種類は少なく、大部分がラクトースであり、ヒト乳中に存在する上記オリゴ糖はほとんど存在しない。

10

【0186】

ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖、あるいはそれらが含まれたミルクを効率よく生産することができれば、産業上非常に有用と考えられる。本発明のラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドが、乳腺においてヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖の合成に関与している可能性があり、抗感染症および善玉ビフィズス菌の増殖促進に有効なオリゴ糖の生産に利用できる可能性がある。

20

【0187】

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、タンパク質の安定化に寄与していることから、任意のタンパク質に人為的にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を付加することにより、タンパク質を安定化することができる。また、血中タンパク質の腎臓からのクリアランス速度は、タンパク質の実効分子量が大きいほど遅くなることから、任意のタンパク質に人為的にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を付加し、実効分子量を増加させることにより、腎臓からのクリアランス速度を低下させ、血中安定性を増加させることができる。さらに、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を付加することにより、任意のタンパク質を特定の細胞にターゲティングすることもできる。

【0188】

(5) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドの利用

本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いた利用法について、以下にその詳細を記す。

【0189】

(i) 本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量の定量

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量、または遺伝子の構造変化を検出することができる。

【0190】

本発明のポリペプチドをコードするmRNAの発現量を定量または本発明のポリペプチドをコードするDNAやmRNAの構造変化を検出する方法としては、例えば(a)ノーザンブロット法 (b) in situハイブリダイゼーション法、(c)定量的PCR法/リアルタイムPCR (real-time PCR) 法、(d)デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、(e)DNAマイクロアレイ法/DNAチップ法、(f)RNAase保護アッセイ法などの方法等が挙げられる。

40

【0191】

上記方法による分析に供する検体としては、培養細胞あるいは各種組織、血清、唾液等の生体試料、(3)に記載した形質転換体から取得したDNA、mRNAあるいは全RNAが用いられる。以後、該mRNAおよび全RNAを検体由来RNAと称する。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したもの

50

を用いることもできる。

【0192】

ノーザンブロット法では、検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写し、本発明のDNAより調製した標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、本発明のポリペプチドをコードするmRNAに特異的に結合したバンドを検出することにより、該mRNAの発現量ならびに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼーションを行う際には、検体由来RNA中の該mRNAとプローブが安定なハイブリッドを形成する条件でインキュベーションする。偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えば、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている。

10

【0193】

ノーザンブロット法に用いる標識プローブは、例えば、公知の方法（ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたはキナーゼ）により放射性同位体、ビオチン、蛍光基、化学発光基等を、本発明のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNA、該DNAの100塩基以上の部分断片、あるいは該DNAの配列から設計したオリゴヌクレオチドに取り込ませることで調製できる。標識プローブの結合量は該mRNAの発現量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することで該mRNAの発現量を定量することができる。また、標識プローブ結合部位を分析することで、該mRNAの構造変化を知ることができる。

20

【0194】

上記標識プローブ、および生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いてハイブリダイゼーションならびに洗浄の工程を行う i n s i t u ハイブリダイゼーション法によって、該mRNAの発現量を検出することができる。 i n s i t u ハイブリダイゼーション法で、偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えば、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている。

30

【0195】

定量的PCR法、デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、あるいはDNAマイクロアレイ法/DNAチップ法等による該mRNAの検出は、検体由来RNA、または該RNAから逆転写酵素を用いて合成したcDNAを用いて行うことができる。以後、該cDNAを検体由来cDNAと称する。cDNAの合成には、ランダムプライマーまたはオリゴdTプライマーを用いることができる。

【0196】

定量的PCR法では、検体由来cDNAをテンプレートとし、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマー（本発明のDNAが有する塩基配列の連続した5～120塩基と同じ配列を有するDNAおよび本発明のDNAが有する塩基配列と相補的な塩基配列の連続した5～120塩基と同じ配列を有するDNAの1組のオリゴヌクレオチドからなる）を用いてPCRを行うことで、本発明のポリペプチドをコードするmRNA由来のDNA断片が増幅される。該増幅DNA断片の量は該mRNAの発現量を反映することから、アクチンやグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、以下G3PDHと略記する。）等をコードするDNAを内部コントロールとして置くことで該mRNAの量を定量することが可能である。また、該増幅DNA断片をゲル電気泳動により分離することで、該mRNAの構造の変化を知ることができる。本検出法では、標的配列を特異的にかつ効率的に増幅する適当なプライマーを用いることが望ましい。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的c

40

50

DNAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAからはずれる等の条件に基づき設計することができる。増幅DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加しているPCR反応の内に行うことが必要である。このようなPCR反応は、各反応ごとに生産される該増幅DNA断片を回収してゲル電気泳動で定量分析することで知ることができる。

【0197】

リアルタイムPCR法〔Junko Stevens, 実験医学(増刊), 15, 46-51(1997)〕は、上記の定量的PCRと原理は同一で、TaqManプローブと2種類の蛍光色素でそれぞれラベルされたフォワードプライマー、リバースプライマーを用いてPCRを行い、増幅されたDNA断片の量を放出される蛍光量としてリアルタイムに検出できる。

10

【0198】

検体由来cDNAをプローブとして、本発明のDNAを固定化させたフィルターあるいはスライドガラスやシリコンなどの基盤に対してハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの発現量の変動を検出することができる。このような原理に基づく方法には、デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法〔Trends in Genetics, 7, 314-317(1991)〕やDNAマイクロアレイ法/DNAチップ法〔Genome Research, 6, 639-645(1996)〕と呼ばれる方法がある。いずれの方法もフィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDHなどの内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体の間での該mRNAの発現の違いを正確に検出することができる。また対照検体と標的検体由来のRNAをもとにそれぞれ異なる標識dNTPを用いて標識cDNA合成を行い、1枚のフィルターあるいは1枚の基盤に二つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることで正確な該mRNAの発現量の定量を行うことができる。

20

【0199】

RNAse保護アッセイ法では、まず本発明のDNAの3'端にT7プロモーター、SP6プロモーターなどのプロモーター配列を結合した後、標識したrNTPの存在下、RNAポリメラーゼを用いて*in vitro*で転写を行わせることにより、標識されたアンチセンスRNAを合成する。該標識アンチセンスRNAは、検体由来RNAと結合させて、RNA-RNAハイブリッドを形成させた後、RNAseで消化し、消化から保護されたRNA断片をゲル電気泳動によりバンドを形成させ検出する。得られたバンドを定量することで、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの発現量を定量することができる。

30

【0200】

上記に挙げた検出方法は、炎症性疾患、癌または癌の転移等、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現変化を伴う疾患の検出または診断に利用することができる。上記の検出または診断を行う場合は、炎症性疾患、癌または癌の転移を有する患者、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現変化を伴う疾患を有する患者、また健常者より取得したDNA、mRNAあるいは全RNAを検体として用いる。該DNA、mRNAあるいは全RNAは、患者または健常者の各種組織、血清、唾液等の生体試料、あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞から取得することができる。複数の患者および健常者の検体について本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を上記にあげた検出方法で測定して比較し、患者および健常者の該遺伝子の発現レベルの範囲を決定する。被験者の検体の該遺伝子の発現レベルを健常者の発現レベルと比較することにより、該遺伝子の発現変化を伴う疾患の検出または診断を行うことができる。

40

【0201】

尚、本発明のポリペプチド以外にも既に2種類のGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素がクローニングされているが、特定のGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の発現を検出するためには、遺伝子の塩基配列に基づいた検出法(例えばノーザンハイブリダイゼーション法やPCR法)を用いる必要がある。本発明のDNA

50

により、既にクローン化された2種の酵素と区別して、その発現を正確に調べることが可能となる。

【0202】

以下に発現量の定量の具体例を記す。

ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の発現により、血球細胞の分化、神経細胞の相互認識やマイグレーションが制御されていると考えられており、本酵素の発現異常や、本酵素の変異による活性低下や活性増強により、各種疾患が起こる可能性が推測されているが、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を定量することで、上記各種疾患の診断を行うことができる。

【0203】

例えば、骨髄性白血病とリンパ球性白血病の治療は異なることから、この2種の白血病を正確に区別する方法があれば、医療上非常に有用であると考えられている。骨髄系細胞株では、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出されるのに対し、リンパ球系細胞株では活性が検出されないことから、骨髄性白血病の細胞では本発明のポリペプチドをコードする遺伝子が発現し、リンパ球性白血病の細胞では本発明のポリペプチドをコードする遺伝子が発現していないと推定される。患者から採取した白血病細胞からmRNA、全RNAまたはcDNAを調製し、本発明のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAまたは該DNAの100bp以上の部分断片あるいは本発明のDNAの塩基配列より設計した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量することで、骨髄性白血病とリンパ球性白血病を区別できる。

【0204】

(ii) 本発明のDNAのプロモーター領域および転写制御領域の取得、同定

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993年)〕を用いて、該DNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得、同定することが可能である。

【0205】

マウス、ラットあるいはヒトの細胞や組織から単離した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブラリーに対して、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチド(特にcDNAの5'側の部分)をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーション等の方法でスクリーニングすることにより、本発明のDNAのマウス、ラットあるいはヒトのゲノムDNA上のプロモーター領域および転写制御領域を得ることができる。また、得られたゲノムDNAの塩基配列とcDNAの塩基配列を比較することにより該DNAのエキソン/イントロン構造を明らかにすることができる。なお、同様の方法を用いて、他の非ヒトほ乳動物においても該DNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得することができる。

【0206】

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。従って、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されているヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

【0207】

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域および転写制御領域が挙げられる。転写制御領域としては、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の基本転写を増強するエンハンサー配列および減弱するサイレンサー配列などを含む領域が挙げられる。例えば、白血球細胞、神経細胞、気管の細胞、肺細胞、大腸細胞、胎盤の細胞、神経芽細胞腫細胞

10

20

30

40

50

、グリオブラストーマ細胞、大腸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞および白血病細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーター領域および転写制御領域を挙げることができる。得られたプロモーターおよび転写制御領域は後述のスクリーニング方法に利用することができる他、該遺伝子の転写の制御機構を解析するのに役立つ。

【0208】

(iii) 本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異および多型の検出

本発明の新規 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素はポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成にも関与することから、白血球におけるシアリルルイス x 糖鎖や、癌細胞における癌関連糖鎖 (シアリルルイス x 糖鎖、シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ダイメリック・ルイス a 糖鎖) の合成に関与すると考えられる。従って、本発明のDNAの変異や多型を調べることにより、炎症性疾患、癌または癌転移の診断、あるいは癌の予後の予測が可能と考えられる。

10

【0209】

また、本発明のDNAまたはポリペプチドを用いて、本発明のDNAの多型および変異と、該DNAが発現している臓器における疾患との関連を調べることにより、該遺伝子の多型および変異に基づく該遺伝子の機能異常など他の疾患の診断にも利用できる。

【0210】

以下に本発明のDNAの変異を検出する方法について述べる。

本発明のDNA中に存在する疾患の原因となる変異の存在の有無を評価するための最も明確な試験は、対照集団からのDNAと疾患患者からのDNAとを直接比較することである。

20

【0211】

具体的には、本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異が原因となっている疾患の患者ならび健常者から、組織、血清、唾液等のヒト生体試料、あるいは該生体試料から樹立した初代培養細胞を集め、該生体試料または該初代培養細胞からDNAを抽出する (以後、該DNAを検体由来DNAと称する)。次いで、該検体由来DNAをテンプレートとして、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅する。別法として、上記の生体試料または該初代培養細胞由来のcDNAをテンプレートとして同様のPCRを行うことで、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅することができる。このようにして取得した患者由来の該増幅DNAと健常者由来の該増幅DNAを比較することにより、変異の有無を調べることができる。比較の方法としては、該増幅DNAの塩基配列を直接調べる方法、野生型の配列を有するDNAと変異を有するDNAとのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法 (下記参照) 等を用いることができる。

30

【0212】

また、本発明のポリペプチドをコードするDNAに上記疾患の原因となる変異があるかどうかを検出する方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA鎖と変異対立遺伝子を有するDNA鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。

【0213】

ヘテロ二本鎖を検出する方法には、(a) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法 [Trends Genet., 7, 5 (1991)]、(b) 一本鎖コンフォメーション多型解析法 [Genomics, 16, 325 - 332 (1993)]、(c) ミスマッチの化学的切断法 (CCM, chemical cleavage of mismatches) [Human Molecular Genetics (1996), Tom Strachan and Andrew P. Read (BIOS Scientific Publishers Limited)]、(d) ミスマッチの酵素的切断法 [Nature Genetics, 9, 103 - 104 (1996)]、(e) 変性ゲル電気泳動法 [Mutat. Res., 288, 103 - 112 (1993)] 等の方法が挙げられる。

40

50

【0214】

(a) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法

検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートとして、配列番号2に記載の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅する。プライマーは、200bp以下のDNAが増幅するようにデザインする。増幅したDNA（患者由来のDNA、または患者由来の増幅DNAと健常人由来の増幅DNAを混合したもの）を熱変性により一本鎖DNAに変換後、緩やかに温度を下げることにより、再度二本鎖DNAを形成させる。該二本鎖DNAをポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。ヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遅く、それらは余分なバンドとして検出することができる。特製のゲル（Hydro-link, MDEなど）を用いた方が分離度はよい。200bpよりも小さい断片の検索ならば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基置換を検出可能である。ヘテロ二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション多型解析と組み合わせた1枚のゲルで行うことが望ましい。

10

【0215】

(b) 一本鎖コンフォメーション多型解析法（SSCP解析；single strand conformation polymorphism analysis）

(a)に記載した方法で調製した増幅DNAを変性後、未変性ポリアクリルアミドゲル中で泳動する。DNA増幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色素で標識するか、または未標識の増幅産物を銀染色することにより、増幅した該DNAをバンドとして検出することができる。野生型のパターンとの相違を明らかにするために、コントロールの検体も同時に泳動すると、変異を持った断片を移動度の違いから検出できる。

20

【0216】

(c) ミスマッチの化学的切断法（CCM法）

検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートとして、配列番号2に記載の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅する。次いで、本発明のDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり込ませた標識DNAと該増幅DNAをハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することでミスマッチしている場所のDNAの一方の鎖を切断させ変異を検出することができる。CCM法は最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

30

【0217】

(d) ミスマッチの酵素的切断法

上記(c)の四酸化オスミウムの代わりにT4ファージリゾルベースとエンドヌクレアーゼVIIのような細胞内でミスマッチの修復に関与する酵素とRNaseAと組み合わせることで、酵素的にミスマッチを切断することもできる。

【0218】

(e) 変性ゲル電気泳動法（denaturing gradient gel electrophoresis：DGGE法）

(c)に記載した方法で調製した増幅DNAを、化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。増幅したDNA断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。該DNAに変異がある場合とない場合では増幅したDNAのゲル内での移動度が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ（G：C）末端を付けるとよい。

40

【0219】

該DNAの変異を検出する別の方法として、タンパク質短縮試験（protein truncation test：PTT法）〔Genomics, 20, 1-4 (1994)〕がある。該試験によりポリペプチドの欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。具体的には、検体由来cDNA（染色体遺伝子にイントロンがない場合には検体由来DNAも使用

50

可能)をテンプレートとして、配列番号2に記載の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことにより、本発明のポリペプチド全長をコードするDNAを増幅する。その際、該ポリペプチドのN末端側に対応するプライマーの5'末端には、T7プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列を付加しておく。該増幅DNAを用いて*in vitro*転写、翻訳を行うことにより、ポリペプチドを生産することができる。該ポリペプチドをゲルに泳動した際の泳動位置から、ポリペプチドの欠損を生み出す変異の有無を知ることができる。該ポリペプチドの泳動位置が完全長ポリペプチドに相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在しない。一方、該ポリペプチドに欠損がある場合は、完全長ポリペプチドより小さい位置に該ポリペプチドは泳動され、該位置より変異の位置を予測することができる。

10

【0220】

本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子中のコード領域以外の変異に起因する疾患も存在し得る。非コード領域中の変異に起因する疾患の患者では、mRNAのサイズや発現量に異常が検出されるため、ノーザンハイブリダイゼーションやPCR法によりそれらの異常を調べることができる。

【0221】

非コード領域における変異の存在が示唆された場合は、該遺伝子のプロモーター領域、転写制御領域、あるいはイントロン領域に変異があるかどうかを検査する。上記遺伝子領域は、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAをハイブリダイゼーション用のプローブとして用いることにより、クローン化することができる。また、上記遺伝子領域の配列情報は、各種データベースに登録されたヒト染色体遺伝子配列と比較することによっても得られる場合がある。実施例12に示したように、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の場合にはイントロンは存在しなかった。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。

20

【0222】

本発明のDNAの多型解析は、該DNAの遺伝子配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンプロット法、ダイレクトシーケンス法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子多型を解析することができる〔臨床検査, 42, 1507-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)〕。

【0223】

見いだされた変異や多型は、Handbook of Human Genetics Linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore (1994)に記載された方法に従い統計処理を行うことで、疾患との連鎖があるSNPs (シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム)として同定することができる。また、上記疾患の病歴を持つ家族から、先に示した方法に従いDNAを取得し、変異を検出することで、疾患の診断をすることができる。

30

【0224】

(iv)本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写および翻訳の抑制

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕等を用い、本発明のタンパク質をコードするDNAの転写または翻訳を抑制することができる。例えば、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。即ち、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いることにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写、または本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を、それぞれ抑制できる。該抑制方法は、炎症性疾患、癌、癌の転移等、本発明のポリペプチドをコードするDN

40

50

Aの発現変動を伴う疾患の治療または予防のための医薬として利用することができる。

【0225】

本発明のポリペプチドは、癌細胞においてネオラクト系糖脂質やラクト系糖脂質の合成に関与していると考えられる。従って、本発明のDNAの転写およびポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制することにより、癌の治療が可能と考えられる。

【0226】

また、上述の炎症反応と癌転移の機構を考慮すると、白血球や癌細胞上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制することによって、炎症反応を抑制したり癌転移を防止することが期待できる。本発明のDNAの転写およびポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制することにより、白血球や癌細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制することができる可能性がある。

10

【0227】

また、特定の白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なることが考えられる。ラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が、特定の白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与している可能性があり、本発明のDNAの転写およびポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制することにより、該ポリペプチドを発現している特定の白血球や癌細胞のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成を特異的に抑制することができると考えられる。

【0228】

20

(v) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNA、該DNAの部分断片または本発明のオリゴヌクレオチドを含有する医薬は、(3)に記載した本発明のポリペプチドを含有する医薬に準じた方法で作製および投与することができる。

【0229】

(6) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(3)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

30

【0230】

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0231】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊1976年、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

40

【0232】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0233】

分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、または

50

DEAE - セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG - カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法が挙げられる。

【0234】

(ii) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

10

【0235】

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8 - アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3 - X63Ag8 - U1(以下、P3 - U1と略す)[Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1(1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511(1976)]、SP2/0 - Ag14(SP - 2)[Nature, 276, 269(1978)]、P3 - X63 - Ag8653(653)[J. Immunol., 123, 1548(1979)]、P3 - X63 - Ag8(X63)[Nature, 256, 495(1975)]等を用いることができる。

20

【0236】

これらの細胞株は、8 - アザグアニン培地[RPMI - 1640培地にグルタミン(1.5mmol/l)、2 - メルカプトエタノール(5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン(10µg/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8 - アザグアニン(15µg/ml)を加えた培地で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

30

【0237】

(c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5～10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0238】

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール - 1000(PEG - 1000)2g、MEM2mlおよびジメチルスルホキシド(DMSO)0.7mlを混合した溶液を0.2～1ml添加し、更に1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。

40

【0239】

該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地[正常培地にヒポキサンチン(10^{-4} M)、チミジン(1.5×10^{-5} M)およびアミノプテリン(4×10^{-7} M)を加えた培地]100ml中に懸濁する。

【0240】

該懸濁液を96穴培養用プレートに100µl/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベ

50

ーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディーズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0241】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法を挙げることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスIgG抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

10

【0242】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0243】

(d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane) 0.5 mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5～20×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

20

【0244】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

30

【0245】

(e) 中和抗体

本発明の抗体には、本発明のポリペプチドと結合することにより本発明のポリペプチドの活性を抑制できる性質を持つ中和抗体が含まれる。(3)に記載の方法で本発明のポリペプチドの活性を測定するときに、上記で得られた抗体を添加して測定し、該抗体を添加しなかった場合と比較して本発明のポリペプチドの活性が低下する場合には、該抗体が中和抗体であると確認できる。

【0246】

(7) 本発明の抗体の利用

(i) 本発明のポリペプチドの検出および定量

本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む細胞または組織を免疫学的に検出することができる。該検出法は、炎症性疾患、癌、または癌の転移等、本発明のポリペプチドの発現変動が伴う疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、タンパク質の定量にも用いられる。

40

【0247】

免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、ドットブ

50

ロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチE L I S A法〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック）（1987）、続生化学実験講座5，免疫生化学研究法（東京化学同人）（1986）〕等が挙げられる。

【0248】

蛍光抗体法とは、本発明のポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（F I T C）などの蛍光物質でラベルした抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0249】

酵素免疫測定法（E L I S A法）とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

【0250】

放射性物質標識免疫抗体法（R I A）とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

【0251】

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0252】

ウェスタンブロットティング法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕で分画した後、該ゲルをP V D F膜あるいはニトロセルロース膜にブロットティングし、該膜に本発明の該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【0253】

ドットブロットティング法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース膜にブロットティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【0254】

免疫沈降法とは、本発明のポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体と反応させた後、プロテインG - セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

【0255】

サンドイッチE L I S A法とは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を吸着させたプレートに、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、F I T Cなどの蛍光物質、またはペルオキシダーゼやビオチンなどの酵素で標識した本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体（上記抗体とは抗原認識部位が異なる）を反応させ、標識物質に応じた反応を行

10

20

30

40

50

う方法である。

【0256】

尚、本発明のポリペプチド以外にも既に2種類のGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素がクローニングされているが、特定のGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の発現を検出するためには、特異的抗体を用いた免疫学的検出を用いる必要がある。従って、本発明の抗体により、本発明のポリペプチドの発現を正確に調べることが可能となる。

【0257】

(ii) 炎症性疾患や癌の診断および治療への利用

ヒト生体試料ならびヒト初代培養細胞での、該ポリペプチドの発現量の変化ならびに発現しているポリペプチドの構造変化を同定することは、将来、疾患を発症する危険性や既に発症した疾患の原因を知る上で有用である。

【0258】

本発明のポリペプチドは、白血球や癌細胞においてネオラクト系糖脂質やラクト系糖脂質の合成、あるいはポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与していることが示唆される。従って、本発明の抗体を用いて、白血球または癌細胞等における本発明のポリペプチドの発現量を調べたり、本発明の中和抗体を用いて本発明のポリペプチドの活性を制御することにより、炎症性疾患や癌の悪性度の診断、予防および治療が可能となる。

【0259】

また、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素の発現により、血球細胞の分化、神経細胞の相互認識やマイグレーションが制御されていると考えられており、本酵素の発現異常や、本酵素の変異による活性低下や活性増強により、各種疾患が起こる可能性がある。従って、本発明の抗体を用いて、血球細胞または神経細胞における本発明のポリペプチドの発現量を調べたり、本発明の中和抗体を用いて本発明のポリペプチドの活性を制御することにより、血球細胞の分化、または神経細胞の相互認識やマイグレーションが関与する疾患の診断、予防および治療が可能となる。

【0260】

例えば、骨髄性白血病とリンパ球性白血病の治療は異なることから、この2種の白血病を正確に区別する方法があれば、医療上非常に有用であると考えられる。骨髄系細胞株では、ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出されるのに対し、リンパ球系細胞株では活性が検出されないことから、骨髄性白血病の細胞では本発明のポリペプチドが発現し、リンパ球性白血病の細胞では本発明のポリペプチドが発現していないと推定される。患者から採取した白血病細胞における本酵素蛋白質の発現を本発明の抗体で検出することにより、骨髄性白血病とリンパ球性白血病を区別できる可能性がある。

【0261】

また、特定の白血球や癌細胞においてポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素は異なることが考えられる。ラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素が、特定の白血球や癌細胞においてポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与している可能性があり、本発明のポリペプチドが有するラクトシルセラミド 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を中和抗体により抑制することにより、該ポリペプチドを発現している特定の白血球や癌細胞のポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成を特異的に抑制することができる。

【0262】

該ポリペプチドの発現量や構造変化を検出して診断する方法としては、上記の蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0263】

上記方法による診断に供する検体としては、炎症性疾患、癌または癌の転移等、本発明のポリペプチドの発現変動が伴うことが知られている疾患の患者より取得した組織、血液、血清、尿、便、唾液等の生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞ならびに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0264】

免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等が挙げられる。

免疫学的に定量する方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等が挙げられる。

10

【0265】

本発明の抗体を含有する医薬は、(3)に記載した本発明のポリペプチドを含有する医薬に準じた方法で作製および投与することができる。

【0266】

(8)本発明のポリペプチドを生産する組換えウイルスベクターの調製法

以下に、本発明のポリペプチドを特定のヒト組織内で生産するための組換えウイルスベクターの調製法について述べる。

20

【0267】

本発明のDNAの完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。例えば、配列番号2で表される塩基配列を有するDNA、配列番号2で表される塩基配列の135～1268番目の塩基配列を有するDNA、または配列番号2で表される塩基配列の249～1268番目の塩基配列を有するDNA等が挙げられる。

【0268】

完全長cDNA、あるいは該DNA断片をウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。

【0269】

RNAウイルスベクターの場合には、本発明の遺伝子の完全長cDNAに相同なcRNA、若しくは該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片に相同なRNA断片を調整し、それらを、ウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスを造成する。RNA断片は、2本鎖の他、ウイルスベクターの種類に応じて、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のどちらか一方の1本鎖を選択する。例えば、レトロウイルスベクターの場合は、センス鎖に相同するRNAを、センダイウイルスベクターの場合は、逆にアンチセンス鎖に相同なRNAを選択する。

30

【0270】

該組換えウイルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、対応する組換えウイルスベクターにおいて欠損しているウイルスのパッケージングに必要な遺伝子がコードするタンパク質を補給できる細胞は全て用いることができ、例えば下記タンパク質を発現したヒト腎臓由来のHEK293細胞やマウス繊維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。

40

【0271】

パッケージング細胞で補給するタンパク質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来のgag, pol, envなどのタンパク質が、レンチウイルスベクターの場合はHIVウイルス由来のgag, pol, env, vpr, vpu, vif, tat, rev, nefなどのタンパク質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来のE1A・E1Bなどのタンパク質が、アデノ随伴ウイルスの場合はRep(p5, p19, p40), Vp(Cap)などのタンパク質が、センダイウイルスの

50

場合はNP、P/C、L、M、F、HNなどのタンパク質が挙げられる。

【0272】

ウイルスベクターとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞で本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Res., 18, 3587-3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]等が用いられる。

10

【0273】

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0274】

パッケージング細胞への組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法〔特開平2-227075号公報〕、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等を挙げることができる。

20

【0275】

本発明のDNAおよび該DNAに相同な配列からなるRNAを含有するウイルスベクターは、後述する遺伝子治療剤として、炎症性疾患、癌、癌の転移等、本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現変動を伴う疾患の治療または予防のための医薬として利用することができる。

【0276】

(9)スクリーニング法への応用

本発明のポリペプチドは、1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性即ち、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性を有している。具体的には、i)ガラクトース、N-アセチルラクトサミン(Gal 1-4GlcNAc)、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース(Gal 1-4Glc)、ii)ガラクトース、N-アセチルラクトサミン、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびiii)ラクトシルセラミドまたはパラグロボシドを含む、ガラクトース、N-アセチルラクトサミン、Gal 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性を有している。従って、本発明のポリペプチドと被験試料とを接触させることにより、上記の活性を変動させる化合物をスクリー

30

40

【0277】

また、本発明のポリペプチドは、各種細胞においてネオラクト系糖脂質やラクト系糖脂質の合成、あるいはポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与することから、該ポリペプチドの1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるネオラクト系糖脂質、ラクト系糖脂質、あるいはポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を増加または低下させることが可能である。

【0278】

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞に

50

おけるネオラクト系糖脂質、ラクト系糖脂質、あるいはポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を制御することが可能である。

【 0 2 7 9 】

ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖上に存在するシアリルルイス x 糖鎖やシアリルルイス a 糖鎖は、セレクトインのリガンドとなることが知られていることから、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を抑制する化合物は、抗炎症や癌転移抑制に有用と考えられる。一方、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を増加させる化合物は、ポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の合成やポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖が付加した複合糖質の生産に有用と考えられる。

【 0 2 8 0 】

該化合物は、以下 (i) ~ (v i) に示す方法により取得可能である。

(i) 上記 (3) で記載した方法を用いて調製した本発明のポリペプチド (精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清) を酵素として用い、被験化合物の存在下、(3) に記載した方法を用いて 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定し、1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し、取得する。

【 0 2 8 1 】

(i i) 本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記 (2) で記載した形質転換体を、被験化合物の存在下、上記 (2) で記載の培養法で 2 時間から 1 週間培養後、細胞表面のパラグロボシドまたはポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の量を、パラグロボシドを認識する抗体、またはポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体 (抗 i 抗体、抗 I 抗体) やレクチン (L E A 、 P W M 、 D S A) を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し、取得する。

【 0 2 8 2 】

上記抗体やレクチンを用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いる E L I S A 法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法を挙げることができる。また、F A C S を用いて測定することもできる。

【 0 2 8 3 】

(i i i) 該ポリペプチドの一部を構成するペプチドを多数、プラスチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合成し、該ペプチドに選択的に結合する化合物を効率的にスクリーニングした後 (W O 8 4 / 0 3 5 6 4) 、上記 (i) 、(i i) の方法で 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を増加または低下させる活性、あるいはパラグロボシドやポリ - N - アセチルラクトサミン糖鎖の量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し、取得する。

【 0 2 8 4 】

(i v) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験化合物の存在下、上記 (2) で記載の培養法で 2 時間から 1 週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記 (6) で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し、取得する。

該ポリペプチドの発現の増減は、上記 (7) に記載した蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (E L I S A 法) 、放射性物質標識免疫抗体法 (R I A) 、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (A B C 法、C S A 法等) 、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチ E L I S A 法により検出できる。

【 0 2 8 5 】

(v) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験化合物の存在下、上記 (2) で記載の培養法で 2 時間から 1 週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする D N A 転写産物の量を、上記 (4) で記載したノーザンハイブリダイゼーション法、P C R 法または R N a s e 保護アッセイ法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し、取得する。

【 0 2 8 6 】

10

20

30

40

50

(vi) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(2)記載の動物細胞に、上記(2)に記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得する。該形質転換体を、被験化合物の存在下、上記(2)記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993)、*Biotechniques*, 20, 914(1996)、*J. Antibiotics*, 49, 453(1996)、*Trends in Biochemical Sciences*, 20, 448(1995)、細胞工学, 16, 581(1997)〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し、取得する。

10

【0287】

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等を挙げることができる。

【0288】

本発明のポリペプチドは、癌細胞においてネオラクト系糖脂質やラクト系糖脂質の合成に関与していると考えられる。従って、上記スクリーニングによって取得される本発明のポリペプチドまたはDNAの発現を抑制する化合物を用いることにより、癌細胞におけるネオラクト系糖脂質やラクト系糖脂質の合成を抑制し、癌の治療が可能と考えられる。

20

【0289】

また、上述の炎症反応と癌転移の機構を考慮すると、白血球や癌細胞上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制することによって、炎症反応を抑制したり癌転移を防止することが期待できる。上記スクリーニングによって取得される本発明のポリペプチドまたはDNAの発現を抑制する化合物を用いることにより、白血球や癌細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制し、炎症反応を抑制したり癌転移を防止することが可能となると考えられる。

【0290】

特定の白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なることが考えられる。ラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が、特定の白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与している可能性があり、本発明のDNAまたはポリペプチドの発現を抑制する化合物により、該ポリペプチドを発現している特定の白血球や癌細胞のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成を特異的に抑制することが期待できる。

30

【0291】

(10) 非ヒトロックアウト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、*Nature*, 326, 6110, 295(1987)、*Cell*, 51, 3, 503(1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、*Nature*, 350, 6315, 243(1991)〕。

40

【0292】

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の

50

双方に変異が入った、ホモ個体（非ヒトノックアウト動物）を得ることができる。

【0293】

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

【0294】

またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-LoxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。この方法としては、脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させる方法〔Cell, 87, 7, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウイルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させる方法〔Science, 278, 5335, (1997)〕があげられる。

【0295】

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

【0296】

このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。従って、本発明の非ヒトノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0297】

(11) 本発明のDNAおよび該DNAに相同な配列からなるRNAを含有する遺伝子治療剤

本発明のDNAおよび該DNAに相同な配列からなるRNAを含有するウイルスベクターを用いた遺伝子治療剤は、(7)項で作製した組換えウイルスベクターおよび遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる〔Nature Genet., 8, 42 (1994)〕。本発明のDNAおよび該DNAに相同な配列からなるRNAを含有するウイルスベクターを用いた遺伝子治療剤は、炎症性疾患、癌、癌の転移等、本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの発現変動を伴う疾患の治療または予防のための医薬として利用することができる。

【0298】

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治療に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、患者の治療部位に吸収されるように、局所的に投与方法を挙げることができる。

【0299】

適当なサイズの本発明のDNAを、アデノウイルス・ヘキソン・タンパク質に特異的なポリリジン-コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを作製し、得られたコン

10

20

30

40

50

プレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的に遺伝子を発現させることができる。

【0300】

RNAウイルスベクターとしてはレトロウイルスベクターの他、(-)鎖RNAウイルスであるセンダイウイルスをベースにしたウイルスベクターも開発されており(特願平9-517213、特願平9-517214)、遺伝子治療を目的として本発明のDNAを組み込んだセンダイウイルスベクターを作製することができる。

該DNAは、非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送することができる。

【0301】

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法〔*Viriology*, 52, 456-467(1973); *Science*, 209, 1414-1422(1980)〕、マイクロインジェクション法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5399-5403(1980); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7380-7384(1980); *Cell*, 27, 223-231(1981); *Nature*, 294, 92-94(1981)〕、リポソームを介した膜融合-介在移入法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417(1987); *Biochemistry*, 28, 9508-9514(1989); *J. Biol. Chem.*, 264, 12126-12129(1989)〕; *Hum. Gene Ther.*, 3, 267-275(1992); *Science*, 249, 1285-1288(1990); *Circulation*, 83, 2007-2011(1992)〕あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移入法〔*Science*, 247, 1465-1468(1990); *J. Biol. Chem.*, 266, 14338-14342(1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3655-3659(1991); *J. Biol. Chem.*, 264, 16985-16987(1989); *BioTechniques*, 11, 474-485(1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3410-3414(1990); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4255-4259(1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4033-4037(1990); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8850-8854(1991); *Hum. Gene Ther.*, 3, 147-154(1991)〕等を挙げることができる。

【0302】

リポソームを介した膜融合-介在移入法ではリポソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告されている〔*Hum. Gene Ther.*, 3, 399-410(1992)〕。従って同様の効果が本発明のDNAおよびポリペプチドが関与する疾患病巣でも期待される。DNAを病巣に直接ターゲティングするには、直接DNA取り込み技術が好ましい。受容体-媒介DNA移入は、例えば、ポリリジンを介して、タンパク質リガンドにDNA(通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる)をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞または組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。当該リガンド-DNAコンジュゲートは、所望により、血管に直接注射することができ、受容体結合およびDNA-タンパク質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNAの細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

【0303】

本発明のDNA、該DNAと相同な配列からなるRNAまたは該核酸を含む組換えベクター等を含む上記の遺伝子治療剤を、細胞へ導入し、該DNAにコードされるポリペプチドを発現させることにより、該細胞の分化、相互認識、移動などを制御することがで

10

20

30

40

50

きる。その際の細胞として、例えば、血球細胞、神経細胞、幹細胞または癌細胞等が挙げられる。

【0304】

また、上記遺伝子治療剤を、前骨髄球細胞へ導入して発現させることにより、前骨髄球細胞の顆粒球細胞への分化を促進することができる。

【0305】

以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。但し、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

【0306】

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例に記載の遺伝子操作的手法として、特に断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された公知の方法を用いた。

【0307】

(実施例1) ラット頸骨由来cDNAライブラリーからの 1,3-ガラクトース転移酵素ホモログ(ラットG6)遺伝子のクローニング

(1) RNAの調製

ラット頸骨から、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymology, 154, 3(1987)〕により、全RNA 2.2mgを調製した。次いで、全RNA 2.0mgをオリゴdTセルロースカラム(Collaborative Research社製)に通過させることにより、poly(A)⁺ RNAとしてmRNA 15.7μgを取得した。

【0308】

(2) cDNAライブラリーの作製

上記(2)で取得したmRNA 4.0μgを用いて、リンカープライマー法〔野島博編、遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社、1994年〕に従い、cDNA合成、BamHIアダプターの付加、NotIによる切断反応を行った。得られた2本鎖cDNAを、プラスミドpBluescript IISK(-)のBamHI-NotI間に挿入することにより、cDNAの5'端が常にベクターのBamHIサイト側にあるcDNAライブラリーを造成した。cDNAライブラリー造成用の宿主としては、大腸菌MC1061A〔モレキュラー・クローニング 第2版〕を用いた。

【0309】

(3) ランダムシーケンス

上記(2)で得られた各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有するcDNAの5'末端および3'末端の300~400bpの塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、市販のキット(Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製)とDNAシーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems社製)を用いて行った。プライマーとしては、T3プライマー(STRATAGENE社製)およびT7プライマー(STRATAGENE社製)を使用した。

【0310】

得られた塩基配列についてはBLAST〔J. Mol. Biol. 215, 403-410(1990)〕、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列に関してはFrame Search〔Compugen社製〕のプログラムを利用して、相同性のある遺伝子や蛋白質の解析を行った。その結果、OVX2-038と名づけたプラスミドが含有するcDNAは、1,3-ガラクトース転移酵素 3Gal-T1(別名WM1:特開平6-181759)と相同性を有する蛋白質をコードすると考えられた。OVX2-038が含有するcDNAの塩基配列(738bp)を配列番号3に、該DNAがコードすると考えら

10

20

30

40

50

れるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号32に示す。OVX2-038が含有するcDNAは、ラットの1,3-ガラクトース転移酵素ホモログ(ラットG6と命名)をコードするcDNAの部分断片であると考えられた。

【0311】

(実施例2) ヒトG6をコードする遺伝子の検索

実施例1で取得したラットG6cDNAに対応するヒトG6遺伝子の検索を行った。遺伝子データベースから、BLAST[J. Mol. Biol. 215, 403-410(1990)]およびFrameSearch(Compugen社製)のプログラムを利用して、実施例1で取得したOVX2-038が含有するcDNAの塩基配列(配列番号3に記載)と相同性のある遺伝子、または該cDNAがコードすると思われるポリペプチド(配列番号32に記載)とアミノ酸レベルで相同性を有するポリペプチドをコードする可能性のある遺伝子を検索した結果、一つのEST(expressed sequence tag)配列(GenBank番号AI039637)を見出した。該EST配列は428bpであり、この配列情報だけでは、このESTに対応する遺伝子のコードするポリペプチドの全アミノ酸配列や該ポリペプチドの機能は分からない。

10

【0312】

(実施例3) ヒトG6cDNAのクローン化

実施例2で見出したEST配列(GenBank番号AI039637)に特異的なプライマーセットを設計し、候補遺伝子断片のクローン化を試みた。プライマーとしては、配列番号4で表される塩基配列を有するCB-462と配列番号5で表される塩基配列を有するCB-464を使用した。該プライマーセットを用いて、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNA、あるいは各種cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、ヒトG6cDNAの存在を調べた。その結果、ヒト大腸癌細胞株Colo205由来のcDNAライブラリー、またはヒト胃粘膜由来のcDNAライブラリーを鋳型とした時に、約250bpのDNA断片が増幅された。

20

【0313】

該増幅断片をプローブとして、上記2種のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、約3kbのヒトG6cDNAクローンを得た。該クローンは5'末端を欠失していたため、5'RACE法を用いてヒトG6cDNAの5'末端側のDNAを取得した。ヒトG6cDNAの約3kbのcDNAクローンと5'末端側のDNAの塩基配列を決定し、それらの配列をつなぎ合わせることでヒトG6cDNAの全長配列(配列番号2)を決定した。該配列を基に造成したプライマーを用いてPCRを行い、コーディング領域全部を含むDNA断片を取得した。該DNA断片の配列を決定し、PCRに由来する塩基配列に由来する塩基配列の変異がないことを確認した。具体的な方法を以下に示す。

30

【0314】

(1) ヒト大腸癌細胞株Colo205由来cDNAのライブラリーの作製とPCRによる解析

ヒト大腸癌細胞株Colo205より、mRNA抽出キットであるOligotexTM-dT30<super>(Roche社製)を用いて、約30μgのmRNAを取得した。具体的試薬および方法は、キットに添付されている説明書に従った。取得したmRNA 8μgとSUPERSCRIPT Choice System for cDNA Synthesisキット(GIBCO BRL社製)を用い、オリゴdTをプライマーとして二本鎖cDNAを合成した。

40

【0315】

これら二本鎖cDNAの両末端に以下の方法でSfiIリンカーを付与した。SfiIリンカーを構成する配列番号6で表される塩基配列を有する一本鎖DNA(11塩基)および配列番号7で表される塩基配列を有する一本鎖DNA(8塩基)を380A・DNA合成機(Applied Biosystems社製)を用いて合成した。

【0316】

該合成一本鎖DNAをそれぞれ50μgずつ、別々に50mmol/l トリス-HC

50

1 (pH 7.5)、10 mmol/l MgCl₂、5 mmol/l ジチオスレイトール (以下、DTTと略記する)、0.1 mmol/l EDTA (エチレンジアミン4酢酸) および1 mmol/l ATPを含む緩衝液 (以下、T4キナーゼ緩衝液と略記する) 50 μlに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 30単位を加えて、37 で16時間リン酸化反応を行ない、5'末端をリン酸化した。

【0317】

5'末端をリン酸化した、11塩基の合成DNA 4 μg、8塩基の合成DNA 2.9 μg および上記で合成した二本鎖cDNAをT4リガーゼ緩衝液45 μlに溶解後、T4 DNAリガーゼ1050単位を加え、16 で16時間反応させ、該二本鎖cDNA各々に SfiIリンカーを付与した。

10

得られた反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.5 kb以上のDNA断片を回収した。

【0318】

直接発現クローニングベクター (Expression Cloning Vector) であるpAMo (J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)) 24 μgを、10 mmol/l トリス-HCl (pH 7.5)、6 mmol/l MgCl₂、50 mmol/l NaCl、6 mmol/l 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液 (以下、Y-50緩衝液と略記する) 590 μlに溶解後、80単位のSfiI (宝酒造社製、以下、特に断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものをを用いた) を加え、37 で16時間消化反応を行った。

20

【0319】

該反応液に40単位のBamHIを加え、37 で2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約8.8 kbのDNA断片を回収した。

【0320】

上記で調製したSfiIリンカーを付与した二本鎖cDNA (mRNA 8 μg由来分) をT4リガーゼ緩衝液250 μlに溶解後、それぞれの溶解液に、該約8.8 kbのDNA断片2 μgおよびT4 DNAリガーゼ2000単位を加えて、16 で16時間結合反応を行った。

反応後、それぞれの反応液にトランスファーRNA (tRNA) 5 μgを添加し、エタノール沈殿後、10 mmol/l トリス-HCl (pH 8.0) および1 mmol/l EDTAからなる緩衝液 (以下、TE緩衝液と略記する) 20 μlに溶解した。

30

【0321】

該反応液を用い、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] により大腸菌LE392株 [モレキュラー・クローニング第2版] を形質転換し、約100万個のアンピシリン耐性を有する形質転換体を取得し、cDNAライブラリーを構築した。

【0322】

更に、該cDNAライブラリー (大腸菌) および、プラスミド調製キットである/plasmid/maxikit (QIAGEN社製、商品番号41031) を用い、cDNAを含有するプラスミドを調製した。

40

【0323】

該プラスミドDNAを鋳型、配列番号4で表される塩基配列を有するCB-462と配列番号5で表される塩基配列を有するCB-464をプライマーとして用いてPCRを行い、ヒトG6cDNAの存在を調べた。PCRは以下の条件で行った。10 ng/ml プラスミドDNA、10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3)、50 mmol/l KCl、1.5 mmol/l MgCl₂、0.2 mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μmol/l ヒトG6遺伝子特異的プライマー (CB-462およびCB-464)、1 unit AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin Elmer社製) からなる反応溶液 (50 μl) を95

50

で11分間加熱後、95 で30秒間、55 で1分間、72 で2分間からなる反応を1サイクルとして50サイクル行った。PCRの結果、いくつかのプールからヒトG6cDNA由来と思われる約250bpのDNA断片が増幅された。

【0324】

(2) ヒト胃粘膜cDNAライブラリーの作製

ヒト胃粘膜cDNAライブラリーは以下のように作製した。ヒト胃粘膜のpoly(A)⁺RNAよりcDNA合成システム(cDNA Synthesis System、GIBCO BRL社製)を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalIアダプター(Super Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製)を付加した後、クローニングベクター ZAP II(ZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit、STRATAGENE社製)のEcoRI部位に挿入し、Gigapack III Gold Packaging Extract(STRATAGENE社製)を用いてin vitroパッケージングを行うことにより、cDNAライブラリーを作製した。

【0325】

該胃粘膜cDNAライブラリー(ファージライブラリー)を約5万種の独立クローン毎にプール分けした後、各プールのファージ(約 1×10^7 個)を鋳型としてPCRを行った。方法は99 で10分間、熱処理したファージ(約 1×10^7 個)を鋳型として用いた以外は、上記(1)で述べた方法と同じである。PCRの結果、いくつかのプールからヒトG6cDNA由来と思われる約250bpのDNA断片が増幅された。該DNA断片をPrep-A-Gene DNA Purification Kit(BIO RAD社製)を用いて精製し、制限酵素(AvaIIまたはRsaI)切断により該増幅断片が上記EST配列(GenBank番号AI039637)の部分配列(配列番号2の946番目から1196番目に示した配列、251bp)を有することを確認した。該増幅断片は、AvaII切断により、96bp、80bp、72bpの3つのDNA断片に、RsaI切断により176bp、72bpの2つのDNA断片に消化された。

【0326】

(3) ヒトG6cDNAのクローン化

Multiprime DNA Labelling System(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、上記(2)で取得した約250bpのPCR増幅DNA断片をラジオアイソトープで標識し、プローブの作製を行った。50ngの該DNA断片とランダムプライマー、ラジオアイソトープ($[\text{ } - ^{32} \text{P}] \text{dCTP}$)を含む反応溶液50 μ lを37 で30分間反応させた。反応液の組成と操作はキットの説明書に従った。次いで、ボルテックスにより反応を停止させ、Sephadex G-50カラムを用いたゲルろ過により、ラジオアイソトープ標識プローブの精製を行った。

【0327】

上記(2)で増幅が見られた胃粘膜cDNAライブラリーの7プール(合計約35万独立クローン)について、ラジオアイソトープ標識プローブを用いたブランクハイブリダイゼーションを行った。

【0328】

ブランク由来のDNAをトランスファーしたフィルター(バイオダインA: PALL社製)を、5倍濃度のSSPE[1倍濃度のSSPEの組成は、180mmol/l塩化ナトリウム、10mmol/lリン酸二水素ナトリウム、1mmol/l EDTAよりなる(pH7.4)]、5倍濃度のデンハルト溶液[1倍濃度のデンハルト溶液の組成は、0.02%(W/V)ウシ血清アルブミン、0.02%(W/V)フィコール400、0.02%(W/V)ポリビニルピロリドンよりなる]、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、20 μ g/mlサケ精子DNAよりなる緩衝液(以下ハイブリダイゼーション用緩衝液と呼ぶ)25mlに浸し、65 で1時間プレハイブリダイゼーションを行った。

【0329】

次いで、該フィルターを上記で作製したラジオアイソトープ標識プローブを含むハイブリダイゼーション用緩衝液10mlに浸し、65℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0330】

その後、0.1倍濃度のSSC〔1倍濃度のSSCの組成は、15mmol/lクエン酸ナトリウム、150mmol/l塩化ナトリウムよりなる(pH7.0)〕、0.1% SDSよりなる緩衝液中で42℃、20分間浸漬する条件で2回洗浄した。

【0331】

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする11個の独立したファージクローンが得られた。STRATAGENE社製のキットを用いて*in vivo excision*を行い、各ファージクローンをプラスミドクローンに変換した。これにより、各ファージクローンのインサートcDNAがpBluescript SK(-)に挿入された形のプラスミドを取得することができる。方法はキットの説明書に従った。

10

【0332】

上記で取得した11種のプラスミドを制限酵素EcoRIで切断し、各プラスミドが含むcDNAのサイズを調べた。その結果、全てのプラスミドは約3kbのcDNAを含むことが明らかになった。複数の制限酵素(PstI、HindIIIまたはBsmI)による切断パターンから、11種のプラスミドは全て同一であると考えられた。これらのプラスミドの1つをpBS-G6sと命名した。

20

【0333】

(4) プラスミドpBS-G6s中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定

上記(3)で得られたpBS-G6s含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。

pBluescript SK(-)中の配列に特異的なプライマー〔M13(-20) PrimerおよびM13 Reverse primer: TOYOBO社製〕を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。

30

【0334】

塩基配列の決定には、DNAシーケンサーmodel 4000L(LI-COR社製)と反応キット(SequitheRM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc: エア・ブラウン社製)、またはDNAシーケンサー377(Perkin Elmer社製)と反応キット(ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: Applied Biosystems社製)を使用した。

【0335】

pBS-G6sが含むcDNAは、配列番号2の989番目から3750番目に示した塩基配列(全塩基配列2762bp)を有することが明らかになった。該塩基配列より、該cDNAはヒト1,3-ガラクトース転移酵素ホモログ(ヒトG6)をコードすると考えられたが、N末端側のポリペプチド部分を欠失していた。

40

【0336】

(5) ヒトG6の全長cDNAのクローン化

上記(1)の結果から、大腸癌細胞株Colo205でヒトG6転写物が発現していることが明らかとなった。そこで、Colo205の全RNAを鋳型として5'RACE法を行うことにより、ヒトG6cDNAの5'側DNA断片の取得を試みた。5'RACE法は、キット(5'-RACE Systems for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2; Life Technologies社製)を用いて行った。

50

【0337】

G6 cDNA 特異的プライマーとしては、配列番号8および9に示した塩基配列を有する合成DNAを用いた。その結果、約460bpのDNA断片が増幅された。該DNA断片を常法に従って平滑末端化した後、pBluescript SK(-)のEcoRV部位に組み込んだ。次いで、pBluescript SK(-)中の配列に特異的なプライマー〔M13(-20)PrimerおよびM13 Reverse primer: TOYOBO社製〕を用いて、該DNA断片の配列を決定した。塩基配列の決定には、DNAシーケンサーmodel 4000L(LI-COR社製)またはDNAシーケンサー377(Perkin Elmer社製)、ならびに各シーケンサー用の反応キットを使用した。該DNA断片(RO2-16と命名)は、配列番号2の513番目から969番目に示した塩基配列(全塩基配列457bp)を有していた。該DNA断片はG6ポリペプチドのN末端側はカバーできていなかった。そこで、さらに以下の実験を行った。

10

【0338】

上記(2)で造成した胃粘膜cDNAライブラリーを鋳型として、ベクターに特異的なプライマーとヒトG6cDNAに特異的なプライマーを用いてPCRを行うことによって、ヒトG6cDNAの5'末端側のDNA断片を増幅することができる。具体的には、ベクターに特異的なプライマーとしてpBluescript SK(-)中の配列に特異的なプライマーであるM13 Reverse primer(TOYOBO社製)、ヒトG6cDNA特異的プライマーとして配列番号10で表される塩基配列を有する合成DNAを用いた。PCR反応は、50ng/mlのcDNAライブラリー(プラスミド)を鋳型として、上記(1)に記載の条件で行った。次いで、該PCR反応液1μlを鋳型、pBluescript SK(-)中の配列に特異的なプライマーとしてM13 Reverse primer(TOYOBO社製)、ヒトG6cDNA特異的プライマーとして配列番号9で表される塩基配列を有する合成DNAを用いてPCRを行った。PCR反応は上記(1)に記載の条件で行った。その結果、約1kbのDNA断片が増幅された。

20

【0339】

該DNA断片を常法に従って平滑末端化した後、pBluescript SK(-)のEcoRV部位に組み込んだ。次いで、pBluescript SK(-)中の配列に特異的なプライマー〔M13(-20)PrimerまたはM13 Reverse primer: いずれもTOYOBO社製〕を用いて、該DNA断片の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該DNA断片の全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、DNAシーケンサーmodel 4000L(LI-COR社製)またはDNAシーケンサー377(Perkin Elmer社製)、ならびに各シーケンサー用の反応キットを使用した。該DNA断片(No.19と命名)は、配列番号2の1番目から969番目に示した塩基配列(全塩基配列969bp)を有していた。

30

【0340】

上記で決定したpBS-G6sが含むcDNAの配列、上記(2)で決定したPCR断片の配列、RO2-16の配列、およびNo.19の配列を連結することにより、G6ポリペプチド全長をコードするcDNAの塩基配列を決定した。決定したヒトG6全長cDNAの塩基配列(3750bp)を配列番号2に示した。該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する378アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドをG6ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号1に示す。

40

【0341】

G6ポリペプチド全長をコードするDNAを取得するために、ヒト大腸癌細胞株Colo205のcDNAライブラリーを鋳型として、ヒトG6cDNAに特異的なプライマーを用いてPCRを行った。具体的には、50ng/mlのcDNAライブラリー(プラスミド)、EcoRI認識配列を付加したプライマー〔CB-497(配列番号11)とC

50

B-501(配列番号12)]、およびPlatinum Pfx DNA polymerase(GIBCO BRL社製)を含む反応溶液50μl(詳しい組成はPlatinum Pfx DNA polymeraseキットの説明書に従った)を94で2分間加熱後、94で20秒間、55で45秒間、68で2分間からなる反応を1サイクルとして、45サイクルの反応を行うことによりPCRを行った。その結果、約1.3kbのDNA断片が増幅された。該断片をEcoRIで消化後、pBluescript SK(-)のEcoRI部位に挿入することにより、プラスミドpBS-G6を取得した。組み込まれたDNA断片の配列を決定した結果、該DNA断片は配列番号2の46番目から1372番目で示される塩基配列を有することが確認された。塩基配列の決定には、DNAシーケンサー377(Perkin Elmer社製)と該シーケンサー用の反応キット、およびヒトG6cDNA特異的プライマーを使用した。該DNA断片は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する378アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドはG6ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有していた。PCRで増幅された約1.3kbのDNA断片を用いてダイレクトシーケンスを行うことにより、pBS-G6中に組み込まれたPCR増幅DNA断片の配列にエラーがなかったことを確認した。

10

【0342】

上記で決定したpBS-G6sが含むcDNAの配列、No.19の配列、およびpBS-G6の含むPCR増幅DNA断片の配列を連結することにより、G6ポリペプチド全長をコードするcDNAの塩基配列を決定した。決定したヒトG6全長cDNAの塩基配列(3750bp)は配列番号2と同じ塩基配列を有していた。

20

【0343】

(実施例4) 相同性解析

G6ポリペプチドは、これまでにクローン化された5種のヒト1,3-ガラクトース転移酵素3Gal-T1(特開平6-181759)、3Gal-T2[J. Biol. Chem., 273, 433-440(1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770-12778(1998)]、3Gal-T3[J. Biol. Chem., 273, 12770-12778(1998)]、3Gal-T4[J. Biol. Chem., 273, 12770-12778(1998)]、3Gal-T5[J. Biol. Chem., 274, 12499-12507(1999)]とアミノ酸レベルでそれぞれ35.6%、32.8%、30.8%、30.3%、および33.9%の相同性を示した。また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒト1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(3GnT1)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 406-411(1999)]とアミノ酸レベルで29.4%の相同性を示した。

30

【0344】

アミノ酸配列(配列番号1)から、G6ポリペプチドは糖転移酵素に特徴的なタイプI型の膜タンパク質であると考えられる。N末端の14アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く18アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見[特開平6-181759]を基に、幹領域は少なくとも12アミノ酸からなると予想された。従って、45番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

40

【0345】

これらの結果および後述する実施例6、7、9および10の結果より、該ポリペプチドは新規な1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であり、配列番号1の36番目から378番目および配列番号1の39番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、分泌型ポリペプチドであることが明らかとなった。

【0346】

50

(実施例5) 動物細胞用発現プラスミドの造成

実施例3で取得したヒトG6cDNAがコードするG6ポリペプチドを動物細胞で発現させるために、ヒトG6cDNAを発現ベクターpAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782(1993)、別名pAMoPRC3Sc(特開平5-336963)〕、あるいはpCXN2〔Gene, 108, 193(1991)〕に組み込み、発現プラスミドの造成を行った。

【0347】

(1) G6ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G6の造成

pBS-G6を制限酵素EcoRIで切断後、DNAポリメラーゼ・クレノー断片により平滑末端に変換した。その後、実施例3の(1)で作製したSfiIリンカーを付与し、約1350bpのSfiI断片を取得した。一方、pAMoをSfiIとBamHIで切断後、8.7kbのSfiI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G6を造成した。

10

【0348】

(2) G6ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpCXN2-G6の造成

pBS-G6を制限酵素EcoRIで切断後、約1330bpのEcoRI断片を取得した。一方、pCXN2をEcoRIで切断後、約3kbのEcoRI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、発現プラスミドpCXN2-G6を造成した。

【0349】

(実施例6) G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入したヒト培養細胞におけるポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成

20

(1) Namalwa細胞を宿主とした安定形質転換株の取得

コントロールプラスミド(pAMo)および実施例5で造成したG6ポリペプチド発現プラスミド(pAMo-G6)を、それぞれ1μg/μlになるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133(1990)〕によりヒトB細胞株Namalwa細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

1.6×10⁶細胞あたり4μgのプラスミドを導入した後、10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640培地〔7.5% NaHCO₃を1/40量、200mmol/l L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000units/mlペニシリン、5000μg/mlストレプトマイシン)を0.5%添加したRPMI1640培地(日水製薬社製)。以下、RPMI1640培地とは、上記の添加物を添加したRPMI1640培地をいう。〕8mlに懸濁し、CO₂インキュベーターで37℃で24時間培養した。培養後、G418(GIBCO社製)を0.8mg/mlになるように添加し、更に14日間培養し安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.8mg/mlのG418と10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で継代した。

30

【0350】

(2) HCT-15細胞を宿主とした安定形質転換株の取得

コントロールプラスミド(pCXN2)および実施例5で造成したG6ポリペプチド発現プラスミド(pCXN2-G6)を、それぞれ1μg/μlになるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133(1990)〕によりヒト大腸癌細胞株HCT-15細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

40

【0351】

8×10⁶細胞あたり10μgのプラスミドを導入した後、10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640培地8mlに懸濁し、CO₂インキュベーターで37℃で24時間培養した。

【0352】

培養後、G418(GIBCO社製)を0.8mg/mlになるように添加し、更に20日間培養し安定形質転換株を取得した。また、限界希釈法を用いて該形質転換細胞からシングルクローンも取得した。該安定形質転換株は、0.8mg/mlのG418と10

50

%のウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地で継代した。

【0353】

(3) 各形質転換細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量の測定

以下、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗i抗体(OSK28)を用いた具体例を示す。

【0354】

上記(2)で作製したpCXN2-G6またはpCXN2を導入したHCT-15細胞(各 5×10^6 個)を、3mlのリン酸緩衝液PBS(8g/l NaCl、0.2g/l KCl、1.15g/l Na_2HPO_4 (無水)、0.2g/l KH_2PO_4)を用いて洗浄を行った。

10

【0355】

上記細胞(約 1×10^6 個)をマイクロチューブ(1.5ml: Eppendorf社製)にとり、遠心分離(550xg、7分間)により細胞を集めた。

【0356】

該細胞を0.9mlの0.1%のアジ化ナトリウムを含むPBS(A-PBS: 8g/l NaCl、0.2g/l KCl、1.15g/l Na_2HPO_4 (無水)、0.2g/l KH_2PO_4 、0.1%アジ化ナトリウム)で洗浄した後、該洗浄細胞に、A-PBSで10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体(OSK28)を100 μl (下記精製抗体を20倍希釈したもの)加えて懸濁し、4

20

暗所で30分間反応させた。OSK28(精製抗体)は、大阪府赤十字血液センター研究1課の高橋順子先生より供与を受けた。OSK28は、抗Tja+抗i抗体を産生するヒトのリンパ球からEBV-ハイブリドーマ法を用いて樹立された不死化B細胞株が生産するヒトモノクローナル抗体(IgM抗体)である。本実験で使用した精製OSK28は、上記B細胞株を大量培養後、発明の実施の形態の(6)の(i)に記載した方法を用いて精製されたものである。

【0357】

反応後、細胞を3mlのA-PBSで2回洗浄した後、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したFITC標識抗ヒトIgM抗体[医学生物学研究所(MBL)製]を100 μl 加えて懸濁し、4で1時間反応させた。反応後に細胞を3mlのA-PBSで2回洗浄し、200 μl の0.5%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁、固定した。これをFACS(エピックス・エリート・フローサイトメーター)を用いて解析を行った。また対照実験として、抗体の代わりにA-PBSを用いて同様の解析を行った。

30

【0358】

G6ポリペプチドの発現プラスミド(pCXN2-G6)またはコントロールプラスミドpCXN2を導入したHCT-15細胞に対し、各種抗糖鎖抗体(OSK28、KM93、PM81、CA19-9、KM231、TT42、または7LE)を用いた間接蛍光抗体染色を行った後、FACSを用いて解析した結果を第1図に示す。間接蛍光抗体染色を用いたFACS解析は常法[J. Biol. Chem., 274, 12499-12507(1999)]に従った。

【0359】

pCXN2-G6を導入した細胞においては、pCXN2を導入した細胞に比較して、OSK28への反応性が増加していた(第1図)。これらの結果は、G6ポリペプチドをHCT-15細胞で発現させることにより、細胞表面の糖タンパク質あるいは糖脂質の糖鎖上にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が新たに合成されたことを意味している。

40

【0360】

一方、シアリルルイスa糖鎖に対する抗体であるCA19-9またはKM231を用いて蛍光染色を行った時には、pCXN2-G6を導入したHCT-15細胞とpCXN2を導入したHCT-15細胞において抗体への反応性は変化しなかった(第1図)。HCT-15細胞は1,3/1,4-フコース転移酵素(Fuc-TIII)を発現しており、該細胞に1,3-ガラクトース転移酵素を発現させると上記抗体で検出されるシア

50

リルルイス a 糖鎖が合成されることが知られている〔*J. Biol. Chem.*, 274, 12499-12507 (1999)〕。従って、以上の結果は G6 ポリペプチドが G1cNAc 1,3-ガラクトース転移酵素活性を有していないことを示している。

【0361】

同様に、シアリルルイス x 糖鎖に対する抗体である KM93、ルイス x 糖鎖に対する抗体である PM81、ルイス b 糖鎖に対する抗体である TT42、またはルイス a 糖鎖に対する抗体である 7LE を用いて蛍光染色を行った時にも、pCXN2-G6 を導入した HCT-15 細胞と pCXN2 を導入した HCT-15 細胞において抗体への反応性は変化しなかった(第1図)。

【0362】

(4) 糖鎖合成阻害剤を用いた実験

G6 ポリペプチドが、糖タンパク質糖鎖または糖脂質糖鎖の合成に関与しているかを検討するために、糖鎖合成阻害剤を用いた実験を行った。上記(2)で取得した pCXN2-G6 を導入した HCT-15 細胞(シングルクローン)を各種の糖鎖合成阻害剤の存在下で5日間培養後、OSK28を用いてFACSによる解析をした。糖蛋白質のO結合型糖鎖の阻害剤としては、Benzyl-GalNAc(SIGMA社製)を4mmol/lの濃度で使用した。糖蛋白質のN結合型糖鎖の阻害剤としては、マンノシダーゼI阻害剤のスワインソニン(Swainsonine:生化学工業株式会社製)を10μg/mlの濃度で使用した。糖脂質糖鎖の阻害剤としては、グルコシルセラミド合成酵素の阻害剤であるD-PDMP(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol:Matreya社製)を10μmol/lの濃度で使用した。また、D-PDMPのネガティブコントロールとして、L-PDMP(L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol:Matreya社製)を10μmol/lの濃度で使用した。培養方法は上記(2)に従った。結果を第2図に示す。コントロールとして、ベクター(pCXN2)を導入したHCT-15細胞に対してOSK28を用いた間接蛍光抗体染色を行った結果を併せて示している。

【0363】

糖鎖合成阻害剤 Benzyl-GalNAc の存在下で培養した際には、非存在下に比べて OSK28 抗体への反応性が大幅に低下していた。このことは、G6 ポリペプチドを発現させた HCT-15 細胞で観察されたポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の de novo 合成は、主に糖蛋白質のO結合型糖鎖上で起こっていることを示唆している。一方、スワインソニン処理した細胞でも OSK28 抗体への反応性が低下していたことから、G6 ポリペプチドを発現させた HCT-15 細胞で観察されたポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の de novo 合成は、糖蛋白質のN結合型糖鎖上でも起こっていることを示唆している。以上の結果から、動物細胞中で高発現させた場合、G6 ポリペプチドは糖蛋白質糖鎖上にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を合成することができると考えられる。

【0364】

また、G6 ポリペプチドを発現させた細胞から分泌される糖蛋白質やオリゴ糖の糖鎖にも、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が新たに合成されることが考えられる。従って、G6 ポリペプチドを発現させた細胞を宿主として有用な糖タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖蛋白質にポリ-N-アセチルラクトサミンを含有する糖鎖を付与することが可能である。

【0365】

(実施例7) G6 ポリペプチドの発現プラスミドを導入したヒト培養細胞における 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

実施例6の(1)で取得した、G6 ポリペプチドの発現プラスミドを導入した安定形質転換細胞(Namalwa細胞)の細胞抽出液を用いて、1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を調べた。

10

20

30

40

50

【0366】

(1) 2-アミノベンゼン化オリゴ糖を基質とした活性測定

実施例6の(1)で取得した形質転換細胞(約 2×10^7 個)をマイクロチューブ(1.5ml: Eppendorf社製)にとり、遠心分離(550×g、7分間)により細胞を集めた。該細胞を0.9mlのPBSで洗浄した後、該洗浄細胞を20mmol/l HEPES(pH7.2)、2% Triron X-100からなる溶液(100μl)に懸濁し、超音波破碎機(Bioruptor; コスモ・バイオ社製)を用いて細胞を破碎した。4で1時間放置した後、遠心分離(550×g、7分間)により上清を取得した。該上清を酵素サンプルとした。

【0367】

上記酵素サンプルと2-アミノベンゼン化糖鎖基質を用いて、1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。

【0368】

2-アミノベンゼン化糖鎖基質の調製は、SIGMA, 2AB glycan labeling kit(Oxford Glycoscience社製)を用いて、キットの説明書に従って行った。ラクト-N-ネオテトラオース(Lacto-N-neotetraose, Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc; 以下、LNnTと略記する)とGal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc(以下、2LNと略記する場合がある)を2-アミノベンゼン化したものを基質として使用した。LNnTはオックスフォード・グライコシステムズ社から購入した。2LNは生化学工業株式会社より入手した。

【0369】

活性測定は公知の方法〔FEBS, 462, 289(1999)、J. Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)、J. Biol. Chem., 267, 23507(1992)、J. Biol. Chem., 267, 2994(1992)〕を用いた。具体的には、20μlのアッセイ溶液〔150mmol/l MOPS(pH7.5)、50mmol/l UDP-GlcNAc(SIGMA社製)、20mmol/l カコジル酸ナトリウム(pH7.2)、0.4% Triron CF-54、10mmol/l MnCl₂、15mmol/l 2-アミノベンゼン化糖鎖基質、上記細胞抽出液(蛋白質20μg分)〕中で37、16時間反応後、生産物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により検出した。該細胞抽出液の蛋白質濃度は、DC Protein Assayキット(BIORAD社製)を用いて、キットの説明書に従って行った。

【0370】

UDP-GlcNAc(糖供与体)を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLCで解析し、UDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

【0371】

反応が終了したアッセイ溶液を100で5分間処理後、HPLC用純水50μlを加え、10,000×gで5分間遠心分離して上清を取得した。アッセイ溶液の入っていたチューブに再度HPLC用純水50μlを加えてチューブを洗浄後、10,000×gで5分間遠心分離して上清を取得し、最初の上清と合わせた。次いで、該上清をUltrafree-MCカラム(Millipore社製)に通した後、その一部(10μl)をHPLCに供した。Ultrafree-MCカラムの使用法は付属の説明書に従って行った。

【0372】

HPLCは、カラムとしてTSK-gel ODS-80Tsカラム(4.6×300mm; 東ソー)、溶出液として7%メタノール含有0.02mol/l 酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.0)を用い、溶出温度50、流速1ml/分の条件で行った。生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920(日本分光社製)を用いて

10

20

30

40

50

行った（励起波長330nm、放射波長420nm）。

【0373】

生成物の同定は、スタンダード糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。スタンダード糖鎖としては、2-アミノベンゼン化したGlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glcを使用した。

【0374】

生成物の定量は、2-アミノベンゼン化したグルコースポリマー（Oxford Glycoscience社製）をスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

【0375】

コントロールプラスミド（pAMo）またはG6ポリペプチドの発現プラスミド（pAMo-G6）を導入した安定形質転換細胞（Namalwa細胞）の細胞抽出液を用いて活性測定を行った結果、生産物（GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc）に転換された基質（LNnT）の割合は、コントロールプラスミドを導入した細胞ではほぼ0%であったのに対し、G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、6.11%に増加していた。また、生産物（GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc）に転換された基質（Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc）の割合は、コントロールプラスミドを導入した細胞ではほぼ0%であったのに対し、G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、3.95%に増加していた。即ち、G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、コントロールプラスミドを導入した細胞に比較して、1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加していることが判明した。

【0376】

以上の結果から、G6ポリペプチドは、新規な1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることが証明された。この結果は、G6ポリペプチドを用いて、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、N-アセチルグルコサミンが1,3結合で付加した糖鎖を合成可能なことを示している。

【0377】

(2) 糖脂質を基質とした活性測定

既知の方法〔FEBs, 462, 289 (1999)、J. Biol. Chem., 269, 14730-14737 (1994)、J. Biol. Chem., 267, 23507 (1992)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)〕に準じて、糖脂質を基質としてG6ポリペプチドの1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。具体的には20μlの反応溶液〔150mmol/lカコジル酸ナトリウム（pH7.2）、10mmol/l UDP-GlcNAc（SIGMA社製）、480μmol/l UDP-[¹⁴C]GlcNAc（Amersham社製）、0.4% Triton CF-54、10mmol/l MnCl₂、250μmol/l 糖脂質、上記(1)で調製した細胞抽出液（蛋白質20μg分）〕中で37℃、16時間反応した。糖脂質としては、ラクトシルセラミド（lactosylceramide: SIGMA社製）およびパラグロボシド（paragloboside: 東京医科歯科大学 榎泰典先生より入手）を使用した。反応終了後、0.1mol/l KClを200μl加え、軽く遠心後上清を取得した。10mlのメタノールで1回洗浄後、10mlの0.1mol/l KClで2回洗浄して平衡化したSep-Pak plus C18 Cartridge（Waters）に該上清を通し、上清中の糖脂質をカートリッジに吸着させた。10mlのHPLC用純水にて2回カートリッジを洗浄後、5mlのメタノールで吸着した糖脂質を溶出した。真空乾燥機にて溶出液を10μl程度まで濃縮後、該濃縮液をTLCプレート（HPTLC plate Silica gel 60: MERCK社製）にスポットし、クロロホルム:メタノール:水（0.2% CaCl₂含む）=65:35:8の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。TLCプレートの上端から5mmの所まで展開し、プレートを乾燥後、バイオ・イメージアナライザーBAS2000（富士写

10

20

30

40

50

真フィルム社製)を用いて糖脂質に取り込まれた放射線の量を測定した。

【0378】

コントロールプラスミド(pAMo)またはG6ポリペプチドの発現プラスミド(pAMo-G6)を導入した安定形質転換細胞(Nam1wa細胞)の細胞抽出液を用いて活性測定を行った結果、ラクトシルセラミドを基質とした場合、コントロールプラスミドを導入した細胞では活性が検出されなかったのに対し、G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、明らかな活性が検出された(生産物への転換効率0.125%)。パラグロボシドを基質とした場合、コントロールプラスミドを導入した細胞でも弱い活性(生産物への転換効率0.006%)が検出されたが、G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、明らかに活性が増加していた(生産物への転換効率0.126%)。以上の結果と上記(1)の結果から、G6ポリペプチドは、ラクトシルセラミドおよびパラグロボシドを基質とする新規な1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることが証明された。ラクトシルセラミドを基質として用いた時のG6ポリペプチドの活性を100%とすると、パラグロボシドを基質として用いた時の活性は96%であった。

10

【0379】

また上記の結果は、G6ポリペプチドを用いて、ラクトシルセラミドやパラグロボシドなどの糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、N-アセチルグルコサミンが1,3結合で付加した糖脂質を合成可能なことを示している。

【0380】

(実施例8) 昆虫細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型G6ポリペプチドの分泌生産クローン化した1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素G6は、その一次配列から、N末端の14アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く18アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残り

20

の大半のC末端部分からなると考えられた。そこで、G6ポリペプチドのN末端の14アミノ酸からなる細胞質領域、18アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部(3アミノ酸、または6アミノ酸)を除去し、該除去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAGペプチドを付加することによりG6ポリペプチドの分泌発現を試みた。

【0381】

(1) 動物細胞用FLAGペプチド融合型分泌ベクターpAMoF2の造成
配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するFLAGペプチドを任意のタンパク質のN末端に付加した形で分泌発現するための分泌ベクターpAMoF2の造成を行った。

30

pAMoをHindIIIとAsp718で切断することにより、約8.7kbのHindIII-Asp718断片を取得した。HindIII切断部位とAsp718切断部位を連結するためのリンカーとして以下の6種のDNA(IgK-1(塩基配列:配列番号14)、IgK-2(塩基配列:配列番号15)、IgK-3(塩基配列:配列番号16)、IgK-4(塩基配列:配列番号17)、IgK-5(塩基配列:配列番号18)、IgK-6(塩基配列:配列番号19))を合成した。なお、これらのDNAによって構築されるリンカーは免疫グロブリンのシグナル配列およびFLAGペプチドをコードし、PmaCI、StuI、SnaBIの各制限酵素切断部位が組み込まれている。6種のDNAはそれぞれアプライド・バイオシステムズ社製の380A・DNA合成機を用いて合成した。合成したDNAは、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製、以下同じ)を用いてリン酸化した後使用した。

40

上記で取得した6種のリン酸化合成DNAと約8.7kbのHindIII-Asp718断片を結合することにより、プラスミドpAMoF2を構築した。

【0382】

(2) プラスミドpAMoF2-i52Sの造成
PCR用のプライマーとして、配列番号20で表される塩基配列を有するDNA(以下、C12-7と呼ぶ)および配列番号21で表される塩基配列を有するDNA(以下、C

50

12-9と呼ぶ)を合成した(サウディー・テクノロジーから購入することも可能)。C12-7にはBamHIサイトがC12-9にはNotIサイトが導入されるようにデザインされている。

【0383】

PCRは、宝酒造社製のキット(GeneAmpTM DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaqTM Recombinant Taq DNA Polymerase)を用いて行った。反応液の調製はキットの方法に従って行い、DNAサーマルサイクラー(PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler; 宝酒造社販売)を用いて、94 で30秒、65 で1分、72 で2分の反応を10サイクル行った後、さらに72 で7分間反応させた。鑄型としてはプラスミドpAMo-i(特開平11-236398)を10ng使用した。該PCRにより、約1.1kbのDNA断片を取得した。

約1.1kbのPCR増幅DNA断片とT-ベクターpT7Blue(Novagen社製)を結合することにより、プラスミドpT7B-i52S No.3を構築した。

【0384】

次いでプラスミドpAMoF2-i52Sの造成を行った。

pAMoF2をStuIとBanIIIで切断し、約7.2kbのStuI-BanIII断片を取得した。pAMoをBanIIIとNotIで切断し、約1.7kbのBanIII-NotI断片を取得した。pT7B-i52S No.3をBamHIで切断後、大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片を用いてBamHI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変え、引き続きNotIで切断することにより、約1.1kbのBamHI(平滑末端)-NotI断片を取得した。

【0385】

上記で得られた、約7.2kbのStuI BanIII断片、約1.7kbのBanIII-NotI断片および約1.1kbのBamHI(平滑末端)-NotI断片を結合し、プラスミドpAMoF2-i52Sを構築した。

【0386】

(3) プラスミドpBS-G6sec1およびpBS-G6sec2の造成

G6ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号1の36番目のアスパラギン酸から378番目のイソロイシンまで、または配列番号1の39番目のイソロイシンから378番目のイソロイシンまで〕をコードするDNA断片のサブクローン化を行った。

【0387】

配列番号22で表される塩基配列を有するCB-543と配列番号23で表される塩基配列を有するCB-545をプライマー、実施例3で造成したプラスミドpBS-G6を鑄型としてPCRを行うことにより、配列番号1の36番目のアスパラギン酸から378番目のイソロイシンまでをコードする約1.0kbのDNA断片を調製した。CB-543にはBamHI切断サイトが、CB-545にはXbaI切断サイトが付加してある。PCR増幅断片をBamHIとXbaIで切断後、ベクターpBluescript SK(-)のBamHI-XbaI間に組み込むことにより、pBS-G6sec1を造成した。

【0388】

配列番号24で表される塩基配列を有するCB-544と配列番号25で表される塩基配列を有するCB-545をプライマー、実施例3で造成したプラスミドpBS-G6を鑄型としてPCRを行うことにより、配列番号1の39番目のイソロイシンから378番目のイソロイシンまでをコードする約1.0kbのDNA断片を調製した。CB-544にはBamHI切断サイトが、CB-545にはXbaI切断サイトが付加してある。PCR増幅断片をBamHIとXbaIで切断後、ベクターpBluescript SK(-)のBamHI-XbaI間に組み込むことにより、pBS-G6sec2を造成した。

【0389】

10

20

30

40

50

PCRはPlatinum Pfx DNA polymerase (GIBCO BRL社製)を用いた。鋳型としてはプラスミドpBS-G6を1ng使用した。PCR反応溶液50μlを94で2分間加熱後、次いで94で20秒間、55で45秒間、68で2分間からなる反応を1サイクルとして、25サイクルの反応を行った。方法はPlatinum Pfx DNA polymeraseキットの説明書に従った。

pBS-G6sec1およびpBS-G6sec2中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

【0390】

(4) FLAGペプチド融合型G6ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現するための組換えウィルスの作製

10

目的タンパク質をコードするDNAをトランスファーベクターと呼ばれる特殊なプラスミドに組み込む工程(工程1)と、工程1で作製した目的DNAを組み込んだトランスファーベクターと野生型ウィルスとを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組換えウィルスを取得する工程(工程2)の2工程で、組換えウィルスを作製した。該工程は、ファージン社製バキュロゴールドスターターキット(製品番号PM-21001K)を用い、該キットのマニュアルに従い以下の手順で行った。

【0391】

(工程1) FLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチドをコードするDNAのトランスファーベクターへの組み込み

トランスファーベクターpVL1393(Pharmingen社製)のBamHIサイトとNotIサイトの間、FLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだプラスミドpVL1393-F2G6sec1およびpVL1393-F2G6sec2の造成を行った。

20

【0392】

上記(2)で作製したpAMoF2-i52Sを制限酵素HindIIIとNotIで切断し、1.2kbのHindIII-NotI断片を得た。

pVL1393由来を制限酵素BamHIとBstPIで切断し、3.2kbのBamHI-BstPI断片を得た。

pVL1393由来を制限酵素NotIとBstPIで切断し、6.4kbのNotI-BstPI断片を得た。

30

BamHIサイトとHindIIIサイトを連結するためのリンカーとして配列番号26、27に示すDNAを合成し、T4 polynucleotide kinaseを用いて5'末端のリン酸化を行った。

【0393】

上記3断片とリンカーを結合することにより、pVL1393-F2i52S2を造成した。

pVL1393-F2i52S2をBamHIとNotIで切断し、約9.6kbのBamHI-NotI断片を取得した。また、上記(3)で造成したpBS-G6sec1を制限酵素BamHIとNotIで切断し、約1.0kbのBamHI-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、プラスミドpVL1393-F2G6sec1を造成した。

40

【0394】

pVL1393-F2i52S2をBamHIとNotIで切断し、約9.6kbのBamHI-NotI断片を取得した。また、上記(3)で造成したpBS-G6sec2を制限酵素BamHIとNotIで切断し、約1.0kbのBamHI-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、プラスミドpVL1393-F2G6sec2を造成した。

【0395】

(工程2)組換えウィルスの作製

TNM-FHインセクトメディウム(Pharmingen社製)を用いて培養した昆

50

虫細胞 S f 9 (P h a r m i n g e n 社製) に、線状バキュロウイルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウイルス DNA (B a c u l o G o l d b a c u l o v i r u s D N A)、P h a r m i n g e n 社製] および上記で作製したプラスミド (p V L 1 3 9 3 - F 2 G 6 s e c 1 または p V L 1 3 9 3 - F 2 G 6 s e c 2) をリポフェクチン法 [蛋白質核酸酵素、37, 2701 (1992)] により導入することにより、組換えバキュロウイルスを作製した。以下、p V L 1 3 9 3 - F 2 G 6 s e c 1 由来の組換えバキュロウイルスを作製する方法を記す。p V L 1 3 9 3 - F 2 G 6 s e c 2 由来の組換えバキュロウイルスの作製も同様にして行った。

【 0 3 9 6 】

1 ~ 5 μ g の p V L 1 3 9 3 - F 2 G 6 s e c 1 と 1 5 n g の線状バキュロウイルス DNA を 1 2 μ l の蒸留水に溶解後、リポフェクチン (G I B C O B R L 社製) 6 μ l (6 μ g) と蒸留水 6 μ l とを混和したものを添加し、室温で 1 5 分間放置した。

10

【 0 3 9 7 】

約 2×10^6 個の S f 9 細胞を 2 m l の S f 9 0 0 - I I 培地 (G I B C O B R L 社製) に懸濁し、直径 3 5 m m の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた後、p V L 1 3 9 3 - F 2 G 6 s e c 1、線状バキュロウイルス DNA、およびリポフェクチンの混和溶液全量を添加し、27 で 3 日間培養した。

【 0 3 9 8 】

該培養液より、組換えウイルスを含む培養上清 1 m l を採取した。

該培養上清を取得したシャーレには、T N M - F H インセクトメディウムを新たに 1 m l 加え、更に 27 で 4 日間培養した。培養後、同様にして組換えウイルスを含む培養上清を更に 1 . 5 m l 取得した。

20

【 0 3 9 9 】

(5) 組み換えウイルス溶液の取得

約 8×10^6 個の S f 9 細胞を 5 m l の E X - C E L L 4 0 0 培地 (J R H 社製) に懸濁し、2 5 c m ² フラスコ (G r e i n e r 社製) に入れ、室温で 3 0 分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに 1 m l の E X - C E L L 4 0 0 培地と上記 (4) で取得した組換えウイルスを含む培養上清 1 m l を添加した。

【 0 4 0 0 】

添加後、室温で 1 時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させた後、T N M - F H インセクトメディウムを 4 m l 加え、27 で 4 日間培養した。

30

該培養液を 1 5 0 0 \times g で 1 0 分間遠心分離することにより、組換えウイルスの感染した S f 9 細胞および組換えウイルス溶液 5 . 5 m l を得た。

【 0 4 0 1 】

約 2×10^7 個の S f 9 細胞を 1 5 m l の E X - C E L L 4 0 0 培地に懸濁し、7 5 c m ² フラスコ (G r e i n e r 社製) に入れ、室温で 3 0 分間放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに 5 m l の E X - C E L L 4 0 0 培地と上記で取得した組み換えウイルス溶液 1 m l を添加した。

【 0 4 0 2 】

添加後、室温で 1 時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させた後、T N M - F H インセクトメディウムを 1 0 m l 加え、27 で 4 日間培養した。

40

該培養液を 1 5 0 0 \times g で 1 0 分間遠心分離することにより、組換えウイルスが感染した S f 9 細胞および組み換えウイルス溶液 1 5 m l を得た。

【 0 4 0 3 】

該組み換えウイルス溶液のウイルスの力価は以下の方法で算定することができる (P h a r m i n g e n 社製バキュロゴールドスターターキット・マニュアルに基づく) 。

【 0 4 0 4 】

約 6×10^6 個の S f 9 細胞を 4 m l の E X - C E L L 4 0 0 培地に懸濁し、直径 6 0 m m の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 3 0 分間放置して細胞をシャーレに付着させた後、上清を除き、該シャーレに E X - C E L L 4 0 0 培地 4 0 0 μ l および

50

EX-CELL 400 培地で 10^{-4} または 10^{-5} に希釈した上記組み換えウイルス溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加する。

【0405】

添加後、該シャーレを室温で1時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させる。

【0406】

接触後、シャーレより培地を除去し、該シャーレに、2%低融点アガロース〔アガープラク・アガロース (Agar plaque Agarose); Pharmingen 社製〕を含む 2 ml の EX-CELL 400 培地 (42 に保温) と、 2 ml の TNM-FH インセクトメディウム (42 に保温) の混合液を流し込み、室温で15分間放置する。

10

【0407】

放置後、乾燥を防ぐために該シャーレにビニルテープをまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27 で5日間培養する。

培養後、該シャーレに0.01%ニュートラルレッドを含むPBS緩衝液 1 ml を加え、更に1日培養した後、出現したプラークの数を数える。

【0408】

(6) FLAGペプチド融合型G6ポリペプチドの分泌生産と精製

プラスミド pVL1393-F2G6sec1 または pVL1393-F2G6sec2 由来の組換えウイルスのコードするG6ポリペプチドは、FLAGペプチドとの融合タンパク質として分泌発現されることになるため、抗FLAG M1アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel; コスモ・バイオ社製) を用いて、容易に精製が可能である。

20

【0409】

pVL1393-F2G6sec1 由来の組換えウイルスは、8アミノ酸からなるFLAGペプチドのC末端に、Gly残基とSer残基を介して、G6ポリペプチドの推定触媒領域〔配列番号1の36番目のアスパラギン酸から378番目のイソロイシンまで〕が融合したポリペプチドを分泌生産することができる。

【0410】

pVL1393-F2G6sec2 由来の組換えウイルスは、8アミノ酸からなるFLAGペプチドのC末端に、Gly残基とSer残基を介して、G6ポリペプチドの推定触媒領域〔配列番号1の39番目のイソロイシンから378番目のイソロイシンまで〕が融合したポリペプチドを分泌生産することができる。

30

【0411】

約 2×10^7 個の Sf21 細胞を 15 ml の EX-CELL 400 培地に懸濁し、 75 cm^2 フラスコ (Greiner 社製) に入れ、室温で30分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに 4 ml の EX-CELL 400 培地と上記(5) で取得した組み換えウイルス溶液 1 ml を添加した。

【0412】

添加後、室温で1時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させた後、TNM-FH インセクトメディウムを 10 ml 加え、27 で4日間培養した。該培養液を $1500 \times g$ で10分間遠心分離することにより、培養上清を各 15 ml ずつ得た。

40

【0413】

上記で取得した培養上清 15 ml にアジ化ナトリウム、塩化ナトリウム、および塩化カルシウムを、それぞれ最終濃度0.1%、 150 mmol/l 、および 2 mmol/l になるように添加した後、抗FLAG M1アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel; コスモ・バイオ社製) を $100 \mu\text{l}$ 添加し、4 で一晩ゆっくり攪拌した。

【0414】

50

攪拌後、160×gで10分間、遠心分離することにより抗FLAG M1アフィニティーゲルを回収し、該ゲルを50mmol/l トリス-塩酸(pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、1mmol/l 塩化カルシウムを含む緩衝液1mlで2回洗浄した。

【0415】

洗浄後、該ゲルに50mmol/l トリス-塩酸(pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、2mmol/l EDTAを含む緩衝液30μlを添加し、4で30分間処理することにより、ゲルに吸着したタンパク質を溶出した。その後、160×gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。

【0416】

該ゲルに再度50mmol/l トリス-塩酸(pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、2mmol/l EDTAを含む緩衝液30μlを添加し、4で10分間処理した後、160×gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。その後、上記の操作を再度行い、合計3回溶出操作を行い、計85μlの溶出液を取得した。

該溶出液には、最終濃度が4mmol/lになるように1mol/l塩化カルシウムを添加した。

【0417】

このようにして調製した溶出液の8μlを用いてSDS-PAGEを行った後、銀染色または抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。銀染色は銀染色IIキットワコー(和光純薬工業株式会社製)を用いて行った。方法はキットの説明書に従った。抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングは、YEAST AMINO-TERMINAL FLAG EXPRESSION KIT(SIGMA社製)を用いて行った。方法はキットの説明書に従った。

【0418】

銀染色または抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を第3図に示す。第3図のAは、FLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチドの発現プラスミド[pVL1393-F2G6sec1(レーン3、4)またはpVL1393-F2G6sec2(レーン5、6)]由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清(レーン4、6)から、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いてFLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチド(G6sec1またはG6sec2)を精製し(レーン3、5)、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、銀染色を行った結果を示した図である。コントロールとして、プラスミドpVL1393由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清(レーン2)から同様にしてサンプルを調製した(レーン1)。矢印は、生産された分泌型G6ポリペプチドの位置と大きさを示している。

【0419】

第3図のBは、FLAGペプチド融合分泌型G6の発現プラスミド[pVL1393-F2G6sec1(レーン2)またはpVL1393-F2G6sec2(レーン3)]由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いてFLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチド(G6sec1またはG6sec2)を精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、抗FLAGペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果を示した図である。コントロールとして、プラスミドpVL1393由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から同様にしてサンプルを調製した(レーン1)。矢印は、生産された分泌型G6ポリペプチドの位置と大きさを示している。

【0420】

その結果、pVL1393-F2G6sec1由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液を使用した際には、約41~47kDのブロードなバンドが確認された。メインのバンドの大きさは約43kDであった。該組換えウイルスは、8アミノ酸からなるFLAGペプチドのC末端に、Gly残基とSer残基を介して、G6ポリペプチドの推定触媒領域〔配列番号1の36番目のアスパラギン酸から378番

10

20

30

40

50

目のイソロイシンまで)が融合したポリペプチドを分泌生産すると考えられるので、アミノ酸配列から計算されるポリペプチドの分子量は40.95 kDである。検出されたバンドの分子量が計算値に比較して大きいのは、糖鎖が付加したためと考えられる。該ポリペプチドはN結合型糖鎖の推定付加部位を4個有している。バンドがブロードなのは、付加する糖鎖の数や大きさが異なるポリペプチドが存在することを示している。

【0421】

pVL1393-F2G6sec2由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液を使用した際にも、約41~47 kDのブロードなバンドが確認された。メインのバンドの大きさは約43 kDであった。該組換えウイルスは、8アミノ酸からなるFLAGペプチドのC末端に、Gly残基とSer残基を介して、G6ポリペプチドの推定触媒領域〔配列番号1の39番目のイソロイシンから378番目のイソロイシンまで〕が融合したポリペプチドを分泌生産すると考えられるので、アミノ酸配列から計算されるポリペプチドの分子量は40.6 kDである。検出されたバンドの分子量が計算値に比較して大きいのは、糖鎖が付加したためと考えられる。該ポリペプチドはN結合型糖鎖の推定付加部位を4個有している。バンドがブロードなのは、付加する糖鎖の数や大きさが異なるポリペプチドが存在することを示している。

【0422】

一方、ベクターであるpVL1393由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液を使用した際には、該バンドは検出されなかった。

抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出されたバンドの強度は、pVL1393-F2G6sec1由来の組換えウイルス由来の溶出液で検出されたバンドの強度を1とした時、pVL1393-F2G6sec2由来の組換えウイルス由来の溶出液で検出されたバンドの強度は1.05であった。

【0423】

以上の結果より、昆虫細胞を用いてFLAGペプチド融合型G6ポリペプチドを分泌生産可能なこと、および該ポリペプチドを抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

【0424】

(実施例9) 昆虫細胞で生産したFLAGペプチド融合型G6ポリペプチドを用いた活性検討

各種基質を用いて、実施例8で生産・精製したFLAGペプチド融合型G6ポリペプチドの1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。

【0425】

(1) 2-アミノベンゼン化オリゴ糖を基質として用いた活性測定 実施例8の(6)で調製した溶出液を用いて、昆虫細胞で分泌生産させたFLAGペプチド融合型G6ポリペプチドの1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は実施例7の方法を用いた。

【0426】

基質としては、オリゴ糖〔LNnT、Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc (以下、2LNと略記する)、Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc (以下、3LNと略記する)、Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc (以下、4LNと略記する)、Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc (以下、5LNと略記する)、またはGal 1-4(SO₃-6)GlcNAc 1-3Gal 1-4(SO₃-6)GlcNAc (以下、L2L2と略記する)〕を2-アミノベンゼン化したものを使用した。オリゴ糖の2-アミノベンゼン化は、SIGMA 2AB glycan labelling kit (Oxford Glycoscience社製)を用いて、キットの説明書に従って行った。LNnTはオックスフォード

10

20

30

40

50

・グライコシステムズ社から購入した。それ以外のオリゴ糖は生化学工業株式会社より入手した。

【0427】

具体的には、20 μ lのアッセイ溶液〔150 mmol/l カコジル酸ナトリウム (pH 7.2)、50 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社製)、0.4% Tririon CF-54、10 mmol/l $MnCl_2$ 、5 μ mol/l 2-アミノベンゼン化糖鎖基質、上記精製酵素溶液〕中で37、16時間反応後、生産物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC、詳細は後述する) により検出した。酵素としては、実施例8の(6)において、pVL1393-F2G6sec1由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液 (1.5 μ l)、またはpVL1393-F2G6sec2由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液 (1.4 μ l) を使用した。

10

【0428】

反応が終了したアッセイ溶液を100 で5分間処理後、HPLC用純水50 μ lを加え、10,000 \times gで5分間遠心して上清を取得した。アッセイ溶液の入っていたチューブに再度HPLC用純水50 μ lを加えてチューブを洗浄後、10,000 \times gで5分間遠心して上清を取得し、最初の上清と合わせた。次いで、該上清をUltrafree-MCカラム (Millipore社製) に通した後、その一部 (10 μ l) をHPLCに供した。Ultrafree-MCカラムの使用法は付属の説明書に従って行った。

【0429】

HPLCは、カラムとしてTSK-gel ODS-80Tsカラム (4.6 \times 300 mm; 東ソー)、溶出液として7%メタノール含有0.02 mol/l 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) を用い、溶出温度50、流速1 ml/分の条件で行った。

20

【0430】

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920 (日本分光社製) を用いて行った (励起波長330 nm、放射波長420 nm)。

【0431】

pVL1393-F2G6sec1由来の組換えウイルスを用いて生産・精製した分泌型酵素 (G6sec1と呼ぶ) およびpVL1393-F2G6sec2由来の組換えウイルスを用いて生産・精製した分泌型酵素 (G6sec2と呼ぶ) 用いて活性測定を行った結果、いずれも 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を示した。LNnTを基質とした時の生産物への転換効率は、G6sec1を用いた時が9.85%、G6sec2を用いた時が11.2%であった。G6sec1またはG6sec2を用いて基質特異性の検討を行った結果を第1表に示す (第1表実験1)。表には、2-アミノベンゼン化LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を示した。一方、pVL1393由来の組換えウイルス (コントロールウイルス) を用いて調製したサンプルには活性は検出されなかった。

30

【0432】

また、実施例8の(6)で示した方法を用いて再度精製酵素 (G6sec2) を調製し、再度基質特異性の検討を行った結果を第1表に合わせて示す (第1表実験2)。pVL1393-F2G6sec2由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清30 mlから精製酵素 (280 μ l) を調製し、その4 μ lを用いてアッセイを行った。表には、2-アミノベンゼン化LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を示した。LNnTを基質とした時の生産物への転換効率は26.2%であった。

40

【0433】

【表1】

第1表

2-アミノベンゼン化オリゴ糖を基質とした β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G6) の基質特異性

基質名	相対活性 (%)		
	実験1		実験2
	G6sec1	G6sec2	G6sec2
LNnT	100	100	100
2LN	81.4	86.8	65.3
3LN	92.9	95.8	79.2
4LN	13.2	21.5	10.0
5LN	9.3	11.5	12.3
L2L2			5.9

10

20

【0434】

この結果、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖 (2LN、3LN、4LN、および5LN) もG6ポリペプチドの基質となることが判明した。短いポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖 (2LN、3LN) は、長いポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖 (4LN、5LN) に比較して、G6ポリペプチドの基質になりやすいことも明らかになった。また、硫酸基が付加したポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖であるL2L2もG6ポリペプチドの基質となることが判明した。

【0435】

G6sec1またはG6sec2が吸着した抗FLAG M1アフィニティーゲル (酵素を溶出する前のゲル) を酵素として用いた場合も、1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が検出された。酵素としては、上記の1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性測定に使用した溶出液に相当する量のゲルを使用した。LNnTを基質としたときの転換効率は、G6sec1吸着ゲルを使用した際には6.64%、G6sec1吸着ゲルを使用した際には20.2%であった。

30

【0436】

この結果は、ゲルに酵素を吸着した状態でも糖鎖合成が可能なことを示している。一方、pVL1393由来の組換えウイルス (コントロールウイルス) を用いて同様に調製したゲルには活性は検出されなかった。

【0437】

一方、G6sec1およびG6sec2は、GlcNAc 1, 3-ガラクトース転移酵素活性は示さなかった。1, 3-ガラクトース転移酵素活性測定は、常法 [J. Biol. Chem., 274, 12499-12507 (1999)] に準じて行った。20 μ lのアッセイ溶液 [14mmol/l HEPES (pH7.4)、75 μ mol/l UDP-Gal (SIGMA社製)、11mmol/l MnCl₂、88pmol/l 糖鎖基質、上記精製酵素] 中で37、16時間反応した。使用した酵素量は、1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定に使用した量と同じである。基質としては、2-アミノベンゼン化したGlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc (以下、GlcNAc-2LNと略記する) を使用した。該糖鎖は、2-アミノベンゼン化したLN3を -ガラクトシダーゼ処理して末端の

40

50

ガラクトース残基を除去することによって作製した。具体的には、約60 nmolの2-アミノベンゼン化したLN3に対し、100ミリユニットの α -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製)を加え、37℃で16時間反応後、100℃で5分間の熱処理により α -ガラクトシダーゼを失活させることにより調製した。

【0438】

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させたFLAGペプチド融合型G6ポリペプチド(G6sec1またはG6sec2)は、1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するが1,3-ガラクトース転移酵素活性は有さないことが示された。この結果から、G6ポリペプチドが1,3-ガラクトース転移酵素ではなく1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることが再度確認された。1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素G6は、FLAGペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能で、生産された融合タンパク質は抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。生産した融合タンパク質は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖などの糖鎖の合成に使用できることが示された。

Namalwa細胞で生産させた場合に比較して、昆虫細胞で生産させた場合は、酵素の生産量が高いことが明らかになった。

【0439】

(2)ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質として用いた活性測定

30 μ lのアッセイ溶液〔150 mmol/lカコジル酸ナトリウム(pH 7.2)、50 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社製)、0.4% Tririon CF-54、10 mmol/l MnCl₂、50 μ mol/lピリジルアミノ化糖鎖基質、精製酵素溶液(G6sec2)〕中で37℃、14.5時間反応後、生産物をHPLCにより検出した。精製酵素(G6sec2)は、実施例8の(6)で示した方法に従って取得した。pVL1393-F2G6sec2由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清30 mlから精製酵素(280 μ l)を調製し、その5 μ lを用いてアッセイを行った。基質としては、LnNT、ラクト-N-テトラオース(Lacto-N-tetraose, Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc; 以下LNNTと略記する)、ラクト-N-フコペンタオースII(Lacto-N-fucopentaose II, Gal 1-3(Fuc 1-4)GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc; 以下LNFP-IIと略記する)、ラクト-N-フコペンタオースIII(Lacto-N-fucopentaose III, Gal 1-4(Fuc 1-3)GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc; 以下LNFP-IIIと略記する)、ラクト-N-フコペンタオースV(Lacto-N-fucopentaose V, Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-4(Fuc 1-3)Glc; 以下LNFP-Vと略記する)、およびラクト-N-ダイフコヘキサオースII(Lacto-N-difucohexaose II, Gal 1-3(Fuc 1-4)GlcNAc 1-3Gal 1-4(Fuc 1-3)Glc; 以下LNDFH-IIと略記する)(いずれもOxford Glycosystems社製)を、アミノピリジンで蛍光標識したものを使用した。基質の蛍光標識は、常法〔Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)〕に従って行った。

【0440】

それぞれの基質について、UDP-GlcNAc(糖供与体)を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPLCで解析しUDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で5分間処理後、10,000 \times gで5分間遠心分離して上清を取得し、その一部(5 μ l)をHPLCに供した。

【0441】

HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム(4.6 \times 300 mm; 東ソー)を使用し、溶出液として0.02 mol/l酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)を用い、溶出温度50℃、流速0.5 ml/分の条件で行った。

生成物の検出・定量は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920（日本分光社製）を用いて行った（励起波長320nm、放射波長400nm）。

LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第2表に示した。

【0442】

【表2】

第2表

ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G6)の基質特異性

10

基質名	相対活性 (%)
LNnT	100
LNT	5.5
LNFP-II	<0.05
LNFP-III	4.9
LNDFH-II	<0.05
LNFP-V	4.9

20

【0443】

LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は12.8%であった。LNnTはG6ポリペプチド(G6sec2)の良い基質となるが、LNT、LNFP-III、およびLNFP-Vは、ほとんど基質にならないことが明らかになった。また、LNT中の非還元末端から2番目に存在するGlcNAc残基にフコースが1,4結合で付加したオリゴ糖であるLNFP-IIやLNDFH-IIは、G6ポリペプチドの基質にならないことも明らかになった。

【0444】

30

(3) 無標識オリゴ糖を基質として用いた活性測定

糖転移酵素反応は以下のようにして行った。40 μ lのアッセイ溶液〔50mmol/l MOPS (pH7.5)、5mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社製)、5mmol/l MnCl₂、10mmol/l 糖鎖基質、精製酵素溶液(G6sec2)〕中で37、16時間反応した。次いで、100 で5分間処理後、10,000 \times gで20分間遠心分離して上清を取得し、その一部をHPAE/PAD (High Performance Anion Pulsed Amperometric Detection; DIONEX社製)を用いて解析した。具体的方法は常法〔Anal. Biochem., 189, 151-162 (1990)、J. Biol. Chem., 273, 433-440 (1998)〕に準じて行った。

40

【0445】

精製酵素(G6sec2)としては、上記(2)で取得した酵素を10 μ l使用した。基質としては、無標識のオリゴ糖〔ラクトース(lactose, Gal 1-4Glc)およびLNnT〕を用いた。

それぞれの基質について、UDP-GlcNAc(糖供与体)を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPAE/PADを用いて解析、UDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。生成物の同定は、スタンダード糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。スタンダード糖鎖としては、GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcおよびGlcNAc 1-3Gal 1-4Glc NAc 1-3Gal 1-4Glcを使用した。

50

【0446】

L N n Tを基質とした時の生産物への転換効率は0.48%、ラクトースを基質とした時の生産物への転換効率は0.30%であった。L N n Tを基質とした時の活性を100%とすると、ラクトースを基質とした時の相対活性は62.5%となる。以上の結果、1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 (G 6) は、L N n Tに加えてラクトースも良い基質とすることが判明した。

【0447】

(4) 糖脂質を基質として用いた活性測定

既知の方法〔F E B S, 462, 289 (1999)、J. Biol. Chem., 269, 14730 - 14737 (1994)、J. Biol. Chem., 267, 23507 (1992)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)〕に準じて、糖脂質を基質としてG 6ポリペプチドの1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。具体的には20 μ lの反応溶液〔150 mmol/lカコジル酸ナトリウム (pH 7.2)、10 mmol/l UDP - G l c N A c (S I G M A社製)、480 μ mol/l UDP - [¹⁴C]G l c N A c (A m e r s h a m社製)、0.4% T r i r o n C F - 54、10 mmol/l M n C l ₂、250 μ mol/l 糖脂質、精製酵素 (G 6 s e c 2)〕中で37、16時間反応した。精製酵素 (G 6 s e c 2)としては、上記(2)で取得した酵素を10 μ l使用した。糖脂質としては、ラクトシルセラミド (l a c t o s y l c e r a m i d e)、パラグロボシド (p a r a g l o b o s i d e)、ガラクトシルセラミド (g a l a c t o s y l c e r a m i d e) (タイプI)、およびガラクトシルセラミド (g a l a c t o s y l c e r a m i d e) (タイプII)を使用した。パラグロボシドは東京医科歯科大学榎泰典先生より入手した。それ以外の糖脂質はS I G M A社より購入した。反応終了後、0.1 mol/l K C lを200 μ l加え、軽く遠心後上清を取得した。10 mlのメタノールで1回洗浄後、10 mlの0.1 mol/l K C lで2回洗浄して平衡化したS e p - P a k p l u s C 18 C a r t r i d g e (W a t e r s社製)に該上清を通し、上清中の糖脂質をカートリッジに吸着させた。10 mlのH P L C用純水にて2回カートリッジを洗浄後、5 mlのメタノールで吸着した糖脂質を溶出した。真空乾燥機にて溶出液を10 μ l程度まで濃縮後、該濃縮液をT L Cプレート (H P T L C p l a t e S i l i c a g e l 60 : M E R C K社製)にプロットし、クロロホルム：メタノール：水 (0.2% C a C l ₂含む) = 65 : 35 : 8の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。T L Cプレートの上端から5 mmの所まで展開し、プレートを乾燥後、バイオ・イメージアナライザー B A S 2000 (富士写真フィルム社製)を用いて糖脂質に取り込まれた放射線の量を測定した。

【0448】

F L A G融合型G 6ポリペプチド (G 6 s e c 2) は、ラクトシルセラミドおよびパラグロボシドを基質にすることが判明した。ラクトシルセラミドおよびパラグロボシドを基質とした時の生産物への転換効率は、それぞれ5.39%と25.2%であった。ラクトシルセラミドを基質として用いた時のG 6ポリペプチドの活性を100%とすると、パラグロボシドを基質として用いた時の活性は468%であった。

一方、G 6ポリペプチド (G 6 s e c 2) は、ガラクトシルセラミド (タイプI) およびガラクトシルセラミド (タイプII) に対しては活性を示さなかった。

【0449】

以上の結果から、G 6ポリペプチドは、ラクトシルセラミドおよびパラグロボシドをよい基質とする1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素であることが明らかになった。実施例7の(2)の結果と比較することにより、分泌型G 6 (G 6 s e c 2)では、ラクトシルセラミドよりパラグロボシドを基質としやすくなったことがわかる。既知の1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素である3 G n Tは、i n v i t r oにおいてパラグロボシドを基質とすることが示されているが、ラクトシルセラミドを基質とした場合の活性は低い〔G l y c o b i o l o g y, 9, 1123 (1999)〕。したがっ

て、G6ポリペプチドは 3GnTとは基質特異性が異なる 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素と考えられる。

【0450】

また、G6ポリペプチドとGlcNAc 1,4-ガラクトース転移酵素を併用することで、例えば、ラクトシルセラミドからパラグロボシド、パラグロボシドからネオラクトヘキサシルセラミド(Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc-セラミド)、またはラクトシルセラミドからネオラクトヘキサシルセラミドを合成することができる。

【0451】

(実施例10) G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入したヒト培養細胞における糖脂質の合成

10

実施例6の(1)で作製したpAMo-G6を導入したNamalwa細胞(10^8 個)、ベクターpAMoを導入したNamalwa細胞(10^8 個)、およびプラスミドを導入していないNamalwa細胞から中性糖脂質を抽出し、イムノ-TLC(Immunotlc)法を用いて、糖鎖の非還元末端にN-アセチルラクトサミン構造を有する糖脂質の組成と発現量について比較した。方法は、既知の方法〔秀純社 細胞工学別冊 グライコバイオロジー実験プロトコール、Anal. Biochem., 223, 232 (1994)〕に従った。抗体としては、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン構造を認識できるモノクローナル抗体〔抗N-アセチルラクトサミン抗体1B2-1B7: Arch. Biochem. Biophys., 303, 125 (1993)、Infect. Immun., 64, 4129 (1996)、J. Comp. Neurol., 22, 607 (1988)〕抗体を使用した。

20

【0452】

10^7 個分の中性糖脂質をTLCプレート(HPTLC plate Silica gel 60:MERCK社製)にスポットし、クロロホルム:メタノール:水(0.2% CaCl₂含む)=60:35:8の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。スタンダード糖脂質として、オルシノール染色の場合にはグルコシルセラミド(2 μ g;以下、GlcCerと略記する場合がある。)、ラクトシルセラミド(2 μ g;以下、LacCerと略記する場合がある。)、ラクトトリアシルセラミド(0.5 μ g;以下、Lc₃Cerと略記する場合がある。)、およびパラグロボシド(0.5 μ g;以下、nLc₄Cerと略記する場合がある。)を、免疫染色の場合にはパラグロボシド(nLc₄Cer)およびネオラクトヘキサシルセラミド(以下、nLc₆Cerと略記する場合がある。)をスポットした。スタンダード糖脂質以外は同じプレートを2枚作製し、1枚はオルシノール染色、1枚は免疫染色に用いた。

30

【0453】

展開後のプレートをイソプロパノール:水(0.2% CaCl₂含む):メタノール=40:20:7の組成からなる溶液に20秒間浸した。次いで、プレートにPVDF膜(Immobilon:Millipore社製)とglass microfiber filter(ATTO社製)を被せ、TLC Thermal Blotter(ATTO社製)を用いて、プレート上の糖脂質をPVDF膜に移した。使用した条件は、180、レベル8、45秒間である。該PVDF膜を、5%スキムミルク、TBS-Tween 20からなる溶液中に1時間浸した後、抗N-アセチルラクトサミン抗体1B2-1B7(ハイブリドーマの培養上清)を100分の1量含む5%スキムミルク、TBS-Tween 20からなる溶液中に2時間浸した。該PVDF膜をTBS-Tween 20で3回洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体(0.4 μ g/ml:Jackson社製)を含む5%スキムミルク、TBS-Tween 20からなる溶液中に1時間浸した。該PVDF膜をTBS-Tween 20で3回洗浄後、ECLシステム(Amarsham Pharmacia社製)を用いて抗体が結合した糖脂質を検出した。

40

【0454】

50

オルシノール染色の結果を第4図のA、免疫染色の結果を第4図のBに示す。第4図Aのレーン1は、スタンダード糖脂質 (GlcCer、LacCer、Lc₃Cer、nLc₄Cer) を展開したものであり、レーン2は、プラスミドを導入していない Namalwa 細胞、レーン3は、ベクター-pAMoを導入した Namalwa 細胞、レーン4は、pAMo-G6を導入した Namalwa 細胞 (レーン4) それぞれから中性糖脂質を抽出し、TLCプレートに展開後、オルシノール染色を行った結果を示している。第4図Bのレーン1は、スタンダード糖脂質 (nLc₄Cer、nLc₆Cer) を展開したものであり、レーン2は、プラスミドを導入していない Namalwa 細胞、レーン3は、ベクター-pAMoを導入した Namalwa 細胞、レーン4は、pAMo-G6を導入した Namalwa 細胞 (レーン4) それぞれから中性糖脂質を抽出し、TLCプレートに展開後、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン構造を認識できる抗体 (抗N-アセチルラクトサミン抗体1B2) を用いた抗体染色を行った結果を示している。Bの矢印は、pAMo-G6を導入した Namalwa 細胞で発現が増加した糖脂質 (nLc₄CerとnLc₆Cer) の位置を示している。

【0455】

G6ポリペプチドを発現する Namalwa 細胞では、ベクターを導入した Namalwa 細胞やプラスミドを導入していない Namalwa 細胞に比較して、糖鎖の非還元末端にN-アセチルラクトサミン構造を有する糖脂質であるパラグロボシド (nLc₄Cer) およびネオラクトヘキサオシルセラミド (Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc-セラミド: 図中においてnLc₆Cerと略記した) の量が増加していることが明らかになった (第4図のB)。ベクターを導入した Namalwa 細胞とプラスミドを導入していない Namalwa 細胞の間では差は見られなかった (第4図のB)。

【0456】

以上の結果および実施例9の結果から、G6ポリペプチドは細胞内においてN-アセチルラクトサミン構造を有する糖脂質の合成に関与していることが明らかになった。実施例9に示したように、G6ポリペプチドはラクトシルセラミド (Gal 1-4Glc-セラミド) を基質としてラクトトリアオシルセラミド (GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc-セラミド) を合成できる。適当な 1, 4-ガラクトース転移酵素を発現する細胞 (例えば Namalwa 細胞) においては、G6ポリペプチドによって合成されたラクトトリアオシルセラミドは、該 1, 4-ガラクトース転移酵素によってさらにガラクトースが 1, 4結合で付加されることにより、パラグロボシド (Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc-セラミド) に変換されると考えられる。以上の結果は、G6ポリペプチドを適当な細胞 (ラクトシルセラミドやパラグロボシドなどのG6ポリペプチドの基質となる糖脂質を発現している細胞) で発現させることによって、基質となる糖脂質糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンが 1, 3結合で付加した糖脂質が合成可能であることを示している。また、細胞が適当な 1, 4-ガラクトース転移酵素を発現する場合は、基質となる糖脂質糖鎖の非還元末端にN-アセチルラクトサミン構造またはポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付加した糖脂質を合成可能であることを示している。

【0457】

以上の結果は、G6ポリペプチドは細胞内においてラクトシルセラミド 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素として働き、ネオラクト系糖脂質やラクト系糖脂質の合成に関与していることを示している。また、GlcNAc 1, 4-ガラクトース転移酵素と共同して働くことにより、G6ポリペプチドは細胞内においてネオラクトヘキサオシルセラミドなどのポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を有する糖脂質の合成にも関与していると考えられる。

【0458】

既知の酵素 (3GnT) は、in vitroにおいてラクトシルセラミドに対して弱い 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を示すことが示されているが、実

10

20

30

40

50

際に細胞内でラクトシルセラミドを基質としうるかについては示されていない。

【0459】

(実施例11) G6遺伝子の転写産物の各種細胞における発現量の検討

G6遺伝子の転写産物の定量は、常法〔Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平6-181759〕に従って定量的PCR法により行った。

遺伝子の発現量を補正するための -アクチン転写産物の定量も同様に定量的PCR法により行った。

【0460】

(1) 各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAの合成

細胞株としては、大腸癌細胞株(Colo201、Colo205、HCT-15、SW480、SW620、WiDR、LS180)、肺癌細胞株(AOI、EBC-1、PC-1、A549、ABC-1、EHHA-9、HAL8、HAL24、LX-1、PC-7、PC-9、PC-12、RERF-LC-MS)、胃癌細胞株(KATOIII、MKN1、MKN7、MKN28、MKN45、MKN74、TMK1、HSC43)、神経芽細胞腫(NAGAI、NB-9、SCCH-26、IMR32、SK-N-SH)、グリオブラストーマ細胞株(A172、KG-1-C、YKG-1、T98G、U251、U-118-MG、G1-1)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、前立腺癌細胞株PC-3、肝臓癌細胞株HepG2、赤白血病細胞種K562、顆粒球/単球系細胞株(HL-60、U-937、U266)、T細胞株Jurkat、B細胞株(Namalwa KJM-1、Namalwa、Daudi、Ramos、NAL-1、Raji)を用いた。Jurkatは愛知癌センターより入手した。KATOIIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。それ以外の細胞はJapanese Collection of Research Bioresources(JCRB) cell bank〔インターネットアドレス<http://cellbank.nih.s.go.jp/>〕または、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)より入手できる。

【0461】

また、健康な成人の末梢血よりナイコメッド・ファーマ(Nycomed Pharma)社製のキットであるPolymorphprepTMを用いて多形核白血球と単核球を分離取得した。取得した単核球は常法〔J. Immunol., 130, 706 (1983)〕に従ってさらに単球およびリンパ球に分離して取得した。

各細胞の全RNAは常法〔Biochemistry, 18, 5294 (1977)〕に従って調製した。全RNAから一本鎖cDNAの合成はキット(SUPERTM Pre amplification System: BRL社製)を用いて行った。細胞株については5μgの全RNAから、抹消由来血球細胞については1μgの全RNAから一本鎖cDNAを合成し、それぞれ水で50倍および10倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーを使用した。

【0462】

(2) ヒト各種組織由来の一本鎖cDNAの合成

ヒト各種臓器由来のmRNA(Clontech社製)から、上記(1)と同様にして一本鎖cDNAを合成した。1μgのmRNAから一本鎖cDNAを合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーを用いた。mRNAとしては、以下の35種の臓器由来のmRNAを使用した。1副腎、2脳、3尾状核、4海馬、5黒質、6視床、7腎、8膵臓、9脳下垂体、10小腸、11骨髄、12扁桃腺、13小脳、14脳梁、15胎児脳、16胎児腎、17胎児肝臓、18胎児肺、19心臓、20肝臓、21肺、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25前立腺、26唾液腺、27骨格筋、28脊髄、29脾臓、30胃、31精巣、32胸腺、33甲状腺、34気管、35子宮。

また、ヒト大腸組織から全RNAを調製し、上記(1)の細胞株と同様にして、全RN

10

20

30

40

50

A 5 μ g を鋳型として一本鎖 cDNA を合成した。

【0463】

(3) 定量的 PCR 用のスタンダードおよび内部コントロールの調製

実施例 3 の (5) で造成した pBS - G6 を用いて、スタンダードおよび内部コントロールの造成を行った〔下記 (a)、(b) 参照〕。

- アクチンの転写産物の定量は既報〔J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平 6 - 181759〕と同様に行った。 - アクチン転写産物の定量においては、pUC119 - ACT および pUC119 - ACTd を cDNA 部分を切り出す制限酵素 (HindIII と Asp718) で切断して直鎖状 DNA に変換した後、それぞれスタンダードおよび内部コントロールとして用いた〔J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平 6 - 181759〕。各プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー RNA を 1 μ g/ml で含む水で段階的に希釈して使用した。

10

【0464】

(a) G6 転写産物定量用スタンダードの調製

実施例 3 の (5) で造成した pBS - G6 を、G6 cDNA 部分を切り出す制限酵素 (EcoRI) で切断して直鎖状 DNA に変換したものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー RNA を 1 μ g/ml で含む水で段階的に希釈して使用した。

(b) G6 転写産物定量用内部コントロールの調製

pBS - G6 を制限酵素 MscI と BglII で切断後、該直鎖状 DNA をセルフライゲーションさせることにより、G6 cDNA 中の 243 bp を欠失した pBS - G6d を造成した。pBS - G6d を G6 cDNA 部分を切り出す制限酵素 (EcoRI) で切断して直鎖状 DNA に変換したものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー RNA を 1 μ g/ml で含む水で段階的に希釈して使用した。

20

【0465】

(4) 定量的 PCR 法を用いた G6 遺伝子の転写産物の定量

上記 (1) および (2) で調製した細胞株および正常組織由来の一本鎖 cDNA を鋳型として定量的 PCR 法である Competitive - PCR を行った。PCR 用プライマーとしては、G6 転写物検出用には配列番号 25 で表される塩基配列を有する CB513 と配列番号 28 で表される塩基配列を有する CB515 を使用した。アクチン転写物検出用には配列番号 29 で表される塩基配列を有する CB53 と配列番号 30 で表される塩基配列を有する CB54 を使用した。また、(3) で作製したスタンダードと内部コントロールを鋳型として同様に PCR を行うことにより検量線を作製した。

30

【0466】

上記一本鎖 cDNA 10 μ l および内部コントロール用プラスミド 10 μ l (1 fg) を含む 50 μ l の反応溶液〔10 mmol/l Tris - HCl (pH 8.3)、50 mmol/l KCl、1.5 mmol/l MgCl₂、0.2 mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μ mol/l KCl 遺伝子特異的プライマー〕に、DNA ポリメラーゼ AmpliTaq GoldTM (Perkin Elmer 社製) を添加して PCR を行った。内部コントロール用プラスミドの量、あるいはスタンダード用プラスミドの量は組織ごと、細胞ごとに適宜変えて定量を行った。

40

【0467】

PCR は、以下の条件で行った。

G6 転写産物定量の際は、95 で 11 分間の加熱後、95 で 30 秒間、60 で 1 分間、72 で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして、42 サイクル行った。

アクチン転写産物定量の際は、95 で 11 分間の加熱後、95 で 1 分間、65 で 1 分間、72 で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして、24 サイクル行った。

PCR 後の溶液のうち 10 μ l を 1% のアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウ

50

ムブロマイド染色後、写真を撮影した。写真をNIHイメージシステムによりスキャンングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。より正確な転写産物の定量を行なうために、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードおよび内部コントロールの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

【0468】

細胞由来の一本鎖cDNAのかわりに上記(3)で調製したスタンダードを0.125 fg、0.25 fg、0.5 fg、1 fg、2 fg、4 fg用いてPCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

【0469】

上記G6転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G6転写産物およびG6のスタンダードからは458 bpのDNA断片が、G6の内部コントロールからは215 bpのDNA断片が増幅する(第5図写真)。

10

【0470】

上記 - アクチン転写産物定量用プライマーを用いた場合は、 - アクチン転写産物および - アクチンのスタンダードからは649 bpのDNA断片が、 - アクチンの内部コントロールからは439 bpのDNA断片が増幅する(第5図写真)。

【0471】

G6転写産物の量を、 - アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第5図ヒストグラムおよび第3-1表および第3-2表に示した。

【表3】

20

第3-1表

G6転写産物の各種細胞株における発現量

細胞株	細胞の種類	G6転写物/ β -アクチン転写物 ($\times 1000$)	
Colo201	colon adenocarcinoma	0.43	
Colo205	colon adenocarcinoma	3.08	
HCT15	colon adenocarcinoma	0.43	
SW480	colon adenocarcinoma	0.36	10
SW620	colon adenocarcinoma	0.50	
WiDr	colon adenocarcinoma	0.79	
LS180	colon adenocarcinoma	0.27	
AOI	lung squamous cell carcinoma	0.24	
EBC-1	lung squamous cell carcinoma	1.04	
PC-1	lung squamous cell carcinoma	0.57	
A545	lung adenocarcinoma	0.14	
ABC-1	lung adenocarcinoma	0.18	
EHHA-9	lung adenocarcinoma	0.17	20
HAL8	lung adenocarcinoma	2.51	
HAL24	lung adenocarcinoma	0.41	
LX-1	lung adenocarcinoma	2.07	
PC-7	lung adenocarcinoma	7.24	
PC-9	lung adenocarcinoma	0.44	
PC-12	lung adenocarcinoma	0.57	
RERF-LC-MS	lung adenocarcinoma	3.62	
KATOIII	stomach cancer	3.37	
MKN1	stomach cancer	0.35	30
MKN7	stomach cancer	1.29	
MKN28	stomach cancer	4.84	
MKN45	stomach cancer	0.12	
MKN74	stomach cancer	2.62	
TMK1	stomach cancer	0.16	
HSC43	stomach cancer	1.06	

第3-2表

G 6 転写産物の各種細胞株における発現量

細胞株	細胞の種類	G 6 転写物/ β -アクチン転写物 ($\times 1000$)	
NAGAI	neuroblastoma	0.07	
NB-9	neuroblastoma	1.74	
SCCH-26	neuroblastoma	1.71	
IRM32	neuroblastoma	1.63	10
SK-N-SH	glioblastoma	1.20	
A172	glioblastoma	0.71	
KG-1-C	glioblastoma	0.04	
YKG-1	glioblastoma	0.42	
T98G	glioblastoma	0.30	
U251	glioblastoma	1.38	
U-118-MG	glioblastoma	0.51	
G1-1	glioblastoma	0.12	20
Capan-1	pancreas adenocarcinoma	1.51	20
Capan-2	pancreas adenocarcinoma	0.19	
PC-3	prostate adenocarcinoma	0.86	
HepG2	hepatocellular carcinoma	0.00	
K562	clonic myelogenous leukemia	0.06	
U-937	histiocytic lymphoma	0.55	
HL-60	promyelocytic leukemia	0.91	
Namalwa	Burkitt's lymphoma	0.04	
Namalwa KJM-1	Burkitt's lymphoma	0.38	30
Daudi	Burkitt's lymphoma	0.00	
Raji	Burkitt's lymphoma	0.02	
Ramos	Burkitt's lymphoma	0.01	
U266	myeloma	0.03	
Jurkat	acute T cell leukemia	0.05	
NALL-1	lymphoblastic leukemia	1.06	

【0472】

G 6 転写産物は調べた36種のヒト組織のほとんどで発現していた(第5図)。発現量は組織により異なり、小脳、下垂体、気管、肺、大腸、胎盤、精巣などの組織で比較的多く発現していた。また、ヒト末梢血より分離した単球およびリンパ球細胞でもG 6 転写産物が発現していた。

【0473】

細胞株においては、大腸癌細胞株Colo205、肺癌細胞株(EBC1、HAL8、LX-1、PC-7、RERF-LC-MS)、胃癌細胞株(KATO III、MKN7、MKN28、MKN74、HSC43)、神経芽細胞腫細胞株(NB9、SCCH-26、IMR32、SK-N-SH)、グリオブラストーマ細胞株(U251)、膵臓癌細胞株(Capan-1)、B細胞株(NALL-1)で比較的多く発現していた(第3

40

50

- 1表, 第3 - 2表)。

【0474】

(実施例12) G6ポリペプチドをコードする染色体遺伝子の構造解析

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。従って、本発明のG6cDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のG6ポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子(G6染色体遺伝子と呼ぶ)を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。G6cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

10

【0475】

ヒトG6cDNAの塩基配列(配列番号2)とGenBank[インターネット上のNational Center for Biotechnology Information(NCBI)のホームページ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)からアクセスできる]に登録されている配列とを比較した結果、登録番号AC025833(2000年5月30日公開)のヒト染色体ワーキングドラフト配列(131716bp)の一部[67758番目から72176番目の配列からなるアセンブリー配列(assembly sequence):配列番号30に示す]が、G6cDNAの塩基配列と一致することが判明した。解析の結果、配列番号2で表される塩基配列を有するG6cDNA配列の1番目から3721番目の塩基は、配列番号30の653番目から4373番目の塩基と一致した。従って、配列番号2に示したG6cDNA部分は1個のエクソンから構成されていることが明らかとなった。配列番号2に示したG6cDNA配列の3702番目から3707番目に存在するAATAAAからなる配列は、ポリアデニレーションシグナルと考えられた。該エクソンの上流配列(654bp)は、G6染色体遺伝子のプロモーター領域(転写制御領域を含む)と考えられた。該プロモーター領域(654bp)について、配列解析ソフトGENETYX-MAC10.1のTranscription Factor Database[Nucleic Acids Research, 18, 1749(1990)、Trends in Biochemical Sciences, 16, 455(1991)、Nucleic Acids Research, 20S, 2091(1992)、Nucleic Acids Research, 21S, 3117(1993)]をもとに作成されたMotif Search Programを用いて、転写因子の結合配列のコンセンサス配列の存在について解析した結果、該配列はプロモーター領域を有する配列であると判断された。

20

30

【0476】

登録番号AC025833の配列は、ヒトの1番染色体由来であることから、G6染色体遺伝子はヒトの1番染色体に位置することが判明した。G6染色体遺伝子の染色体上の位置と構造(プロモーター領域とエクソン領域)は、本発明によってG6cDNAの構造とコードするポリペプチドの機能が明らかになったことにより、初めて特定できたものである。また、登録番号AC025833の配列が1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G6ポリペプチド)をコードするというこれはこれまでに明らかにはなっていな

40

【0477】

産業上の利用可能性

本発明は、1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたGlcNAc1-3Gal構造を有する糖鎖、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたGlcNAc1-3Gal構造を有する糖鎖、ポリ-N-アセチル

50

ラクトサミン糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる物質のスクリーニング法、該 DNA あるいは該抗体を用いた炎症性疾患や癌（大腸癌、膵臓癌、胃癌など）の診断法、該 DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる物質を用いた炎症性疾患や癌（大腸癌、膵臓癌、胃癌など）の治療法を提供することができる。

【 0 4 7 8 】

「配列表フリーテキスト」

配列番号 4 - 合成 DNA	10
配列番号 5 - 合成 DNA	
配列番号 6 - 合成 DNA	
配列番号 7 - 合成 DNA	
配列番号 8 - 合成 DNA	
配列番号 9 - 合成 DNA	
配列番号 10 - 合成 DNA	
配列番号 11 - 合成 DNA	
配列番号 12 - 合成 DNA	
配列番号 13 - FLAG ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 14 - 合成 DNA	20
配列番号 15 - 合成 DNA	
配列番号 16 - 合成 DNA	
配列番号 17 - 合成 DNA	
配列番号 18 - 合成 DNA	
配列番号 19 - 合成 DNA	
配列番号 20 - 合成 DNA	
配列番号 21 - 合成 DNA	
配列番号 22 - 合成 DNA	
配列番号 23 - 合成 DNA	
配列番号 24 - 合成 DNA	30
配列番号 25 - 合成 DNA	
配列番号 26 - 合成 DNA	
配列番号 28 - 合成 DNA	
配列番号 29 - 合成 DNA	
配列番号 31 - 合成 DNA	

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD

NARIMATSU HISASHI

<120> Novel Polypeptide 40

<130> P02-1088

<140> JP 2002-522509

<141> 2001-08-31

<150> JP 2000-265430

<151> 2000-09-01

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 378

<212> PRT 50

<210> 2
 <211> 3750
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (135)..(1271)
 <400> 2

```

aagaagactt ccatttttaa tgaccaacat gtattaagat ggacacctac tctacgaaac 60
acgaagtctc atggctcga agaagcccgt gcctgtttaa aactgacccct aactaaaaac 120
agacttgagt ggat atg aga atg ttg gtt agt ggc aga aga gtc aaa aaa 170
          Met Arg Met Leu Val Ser Gly Arg Arg Val Lys Lys
                1             5             10
tgg cag tta att att cag tta ttt gct act tgt ttt tta gcg agc ctc 218
Trp Gln Leu Ile Ile Gln Leu Phe Ala Thr Cys Phe Leu Ala Ser Leu
          15             20             25
atg ttt ttt tgg gaa cca atc gat aat cac att gtg agc cat atg aag 266
Met Phe Phe Trp Glu Pro Ile Asp Asn His Ile Val Ser His Met Lys
          30             35             40
tca tat tct tac aga tac ctc ata aat agc tat gac ttt gtg aat gat 314
Ser Tyr Ser Tyr Arg Tyr Leu Ile Asn Ser Tyr Asp Phe Val Asn Asp
45             50             55             60
acc ctg tct ctt aag cac acc tca gcg ggg cct cgc tac caa tac ttg 362
Thr Leu Ser Leu Lys His Thr Ser Ala Gly Pro Arg Tyr Gln Tyr Leu
          65             70             75
att aac cac aag gaa aag tgt caa gct caa gac gtc ctc ctt tta ctg 410
Ile Asn His Lys Glu Lys Cys Gln Ala Gln Asp Val Leu Leu Leu Leu
          80             85             90
ttt gta aaa act gct cct gaa aac tat gat cga cgt tcc gga att aga 458
Phe Val Lys Thr Ala Pro Glu Asn Tyr Asp Arg Arg Ser Gly Ile Arg
          95             100            105
agg acg tgg ggc aat gaa aat tat gtt cgg tct cag ctg aat gcc aac 506
Arg Thr Trp Gly Asn Glu Asn Tyr Val Arg Ser Gln Leu Asn Ala Asn
          110            115            120
atc aaa act ctg ttt gcc tta gga act cct aat cca ctg gag gga gaa 554
Ile Lys Thr Leu Phe Ala Leu Gly Thr Pro Asn Pro Leu Glu Gly Glu
125             130             135             140
gaa cta caa aga aaa ctg gct tgg gaa gat caa agg tac aat gat ata 602
Glu Leu Gln Arg Lys Leu Ala Trp Glu Asp Gln Arg Tyr Asn Asp Ile
          145             150             155
att cag caa gac ttt gtt gat tct ttc tac aat ctt act ctg aaa tta 650
Ile Gln Gln Asp Phe Val Asp Ser Phe Tyr Asn Leu Thr Leu Lys Leu
          160             165             170
ctt atg cag ttc agt tgg gca aat acc tat tgt cca cat gcc aaa ttt 698
Leu Met Gln Phe Ser Trp Ala Asn Thr Tyr Cys Pro His Ala Lys Phe
          175             180             185
ctt atg act gct gat gat gac ata ttt att cac atg cca aat ctg att 746
Leu Met Thr Ala Asp Asp Asp Ile Phe Ile His Met Pro Asn Leu Ile
          190             195             200
gag tac ctt caa agt tta gaa caa att ggt gtt caa gac ttt tgg att 794
  
```

Glu Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Gln Ile Gly Val Gln Asp Phe Trp Ile
205 210 215 220
ggt cgt gtt cat cgt ggt gcc cct ccc att aga gat aaa agc agc aaa 842
Gly Arg Val His Arg Gly Ala Pro Pro Ile Arg Asp Lys Ser Ser Lys
225 230 235
tac tac gtg tcc tat gaa atg tac cag tgg cca gct tac cct gac tac 890
Tyr Tyr Val Ser Tyr Glu Met Tyr Gln Trp Pro Ala Tyr Pro Asp Tyr
240 245 250
aca gcc gga gct gcc tat gta atc tcc ggt gat gta gct gcc aaa gtc 938
Thr Ala Gly Ala Ala Tyr Val Ile Ser Gly Asp Val Ala Ala Lys Val 10
255 260 265
tat gag gca tca cag aca cta aat tca agt ctt tac ata gac gat gtg 986
Tyr Glu Ala Ser Gln Thr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Ile Asp Asp Val
270 275 280
ttc atg ggc ctc tgt gcc aat aaa ata ggg ata gta ccg cag gac cat 1034
Phe Met Gly Leu Cys Ala Asn Lys Ile Gly Ile Val Pro Gln Asp His
285 290 295 300
gtg ttt ttt tct gga gag ggt aaa act cct tat cat ccc tgc atc tat 1082
Val Phe Phe Ser Gly Glu Gly Lys Thr Pro Tyr His Pro Cys Ile Tyr
05 310 315 20
gaa aaa atg atg aca tct cat gga cac tta gaa gat ctc cag gac ctt 1130
Glu Lys Met Met Thr Ser His Gly His Leu Glu Asp Leu Gln Asp Leu
320 325 330
tgg aag aat gct aca gat cct aaa gta aaa acc att tcc aaa ggt ttt 1178
Trp Lys Asn Ala Thr Asp Pro Lys Val Lys Thr Ile Ser Lys Gly Phe
335 340 345
ttt ggt caa ata tac tgc aga tta atg aag ata att ctc ctt tgt aaa 1226
Phe Gly Gln Ile Tyr Cys Arg Leu Met Lys Ile Ile Leu Leu Cys Lys
350 355 360
att agc tat gtg gac aca tac cct tgt agg gct gcg ttt atc taa 1271 30
Ile Ser Tyr Val Asp Thr Tyr Pro Cys Arg Ala Ala Phe Ile
365 370 375
tagtacttga atgttgtatg ttttactgt cactgagtca aacctggatg aaaaaaacct 1331
ttaaagtgtc gtctataccc taagtaaaat gaggacgaaa gacaaatatt ttgaaagcct 1391
agtccatcag aatgtttctt tgattctaga agctgtttaa taccacttat ctacttcatt 1451
gcctaagttc atttcaaaga atttgtatit agaaaagggt tatattatta gtgaaaacaa 1511
aactaaaggg aagttcaagt tctcatgtaa tgccacatat atacttgagg ttagagatg 1571
ttattaagaa gttttgatgt tagaataatt gcttttggaa aataccaaat gaacgtacag 1631
tacaacattt caaggaaatg aatatattgt tagaccaggt aagcaagttt atttttgtta 1691
aagagcactt ggtggaggta gtaggggcag ggaaagggtca gcataggaga gaaagttcat 1751 40
gaatctggta aaacagtctc ttgttcttaa gaggagatgt agaaaaatgt gtacaatgtt 1811
attataaaca gacaaatcac gtcttaccac atccatgtag ctactgggtgt tagagtcatt 1871
aaaataacct tttttgcatc ttttttcaaa gtttaatgtg aactttttaga aaagtgatta 1931
atgttgccct aatactttat atgtttttta tggatTTTT ttttaagtatt agaaaatgac 1991
acataacacg ggcagctggt tgcctatagg gtccttctct agggagaaac cattgttaat 2051
tcaaataagc tgattttaat gacgttttca actggTTTT aatatttcaa tattggctctg 2111
tgtttaagt ttgtatttga atgtaattta catagaggaa tataataatg gagagacttc 2171
aatggaaaag acagaacatt acaagcctaa tgtctccata attttataaa atgaaatctt 2231
agtgtctaaa tccttgfact gattactaaa attaacccac tcctcccaa caaggtctta 2291
taaaccacag cactttgttc caagttcaga gttttaaatt gagagcatta aacatcaaag 2351 50

```

ttataatc taaaacaatt ttttttcat caataactgt cagaggatgat ctttattttc 2411
taaatatttc aaacttgaaa acagagtaaa aaagtgatag aaaagttgcc agtttggggg 2471
taaagcattt ttaaagctgc atgttccttg taatcaaaga gatgtgtctg agatctaata 2531
gagtaagtta cttttatttt acaaagcagg ataaaaatgt ggctataata cacactacct 2591
cccttacta cagaaagaac taggtgggtg ctactgctag ggagattata tgaaggccaa 2651
aataatgact tcagcaagag tgactgaact cactctaagg cctttgactg cagaggcacc 2711
tgttagggaa aatcagatgt ctcatataat aaggatgatg cggaacacg caaaacaaaa 2771
cgaaaaaaga tttctcagta tacacaactg aatgatgata cttacaattt ttagcaggta 2831
gctttttaat gtttacagaa attttaattt ttttctattt tgaatttga ggcttgttta 2891
cattgcttag ataattttaga atttttaact aatgtcaaaa ctacagtgtc aaacattcta 2951
ggttgtagtt actttcagag tagatacagg gtttagatc attacagttt aagttttctg 3011
accaatataa aaaacataga gaacaaaagc atatttgacc aagcaacaag cttataatta 3071
atttttatta gttgattgat taatgatgta ttgccttttg cccatatata ccctgtgat 3131
ctatacttgg aagtgtttta ggttgccatt ggttgaaac ataagtgtct ctggccatca 3191
aagtgatctt gtttacagca gtgcttttgt gaaacaatta tttatttgcg gaaagagctc 3251
ttctgaactg tgcctttta attttgcctt agaatagaat ggaacaagtt taaatttcaa 3311
ggaaatatga aggcacttcc ttttttcta agaaggaagt tgctagatga ttccttcac 3371
acactfactt aaagtactga gaagagtatc tgtaataaaa agggttccaa ctttttaaaa 3431
aagaaggaaa aaactttttg gtgctccagt gtagggctat ctttttaaaa aatgtcaaca 3491
aagggaaaat taactatcag ctggatggg cacttgaata gaagatgggt atacacagtg 3551
ttattgttaa aattttttta cttttgggtt ggtttgcatc tttttccat attgttaatt 3611
ttataccaaa atgttaataa tttgtattac ttgaattttg ctcttgtatg gcaaaaataa 3671
tagtgagttt aaaaaaaatc tatagtttcc aataaacaac tgaaaaatta aaaaaaaaaa 3731
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3750

```

10

20

<210> 3

<211> 738

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(738)

<400> 3

```

c tac gag cga cgt tct gcc atc aga aag acg tgg ggc aac gag aat tac 49

```

```

Tyr Glu Arg Arg Ser Ala Ile Arg Lys Thr Trp Gly Asn Glu Asn Tyr

```

```

1 5 10 15

```

```

gtc cag tct cag ctc aac gcc aac atc aaa att ctg ttc gcg tta gga 97

```

```

Val Gln Ser Gln Leu Asn Ala Asn Ile Lys Ile Leu Phe Ala Leu Gly

```

```

20 25 30

```

```

act cct cat cca ctg aag gga aaa gag ctg caa aaa aga ctg att tgg 145

```

```

Thr Pro His Pro Leu Lys Gly Lys Glu Leu Gln Lys Arg Leu Ile Trp

```

```

35 40 45

```

```

gaa gat caa gtg tac cac gac ata att cag caa gat ttc act gat tct 193

```

```

Glu Asp Gln Val Tyr His Asp Ile Ile Gln Gln Asp Phe Thr Asp Ser

```

```

50 55 60

```

```

ttc cac aat ctt act ttt aaa ttt ctt ctt cag ttc ggc tgg gca aac 241

```

```

Phe His Asn Leu Thr Phe Lys Phe Leu Leu Gln Phe Gly Trp Ala Asn

```

```

65 70 75 80

```

```

acc ttt tgc cca cat gcc aga ttc ctg atg act gct gat gat gac ata 289

```

```

Thr Phe Cys Pro His Ala Arg Phe Leu Met Thr Ala Asp Asp Asp Ile

```

```

85 90 95

```

30

40

50

ttt atc cac atg cca aat ctc att gaa tac ctt caa ggg ctg gag cag	337	
Phe Ile His Met Pro Asn Leu Ile Glu Tyr Leu Gln Gly Leu Glu Gln		
100 105 110		
gtt gga gtt cga gac ttt tgg att ggt cac gtt cac cga ggg ggc cct	385	
Val Gly Val Arg Asp Phe Trp Ile Gly His Val His Arg Gly Gly Pro		
115 120 125		
cct gtt aga gac aaa agt agc aag tac tat gtt ccc tat gaa atg tac	433	
Pro Val Arg Asp Lys Ser Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Tyr Glu Met Tyr		
130 135 140		
aag tgg cca gcc tac cct gac tat acc gcc ggt gct gcc tat gtc gtc	481	10
Lys Trp Pro Ala Tyr Pro Asp Tyr Thr Ala Gly Ala Ala Tyr Val Val		
145 150 155 160		
tcc aac gat gta gct gcc aaa atc tat gag gca tca cag acg ctg aat	529	
Ser Asn Asp Val Ala Ala Lys Ile Tyr Glu Ala Ser Gln Thr Leu Asn		
165 170 175		
tcc agc atg tac ata gac gat gtg ttc atg ggc ctc tgc gcc aat aaa	577	
Ser Ser Met Tyr Ile Asp Asp Val Phe Met Gly Leu Cys Ala Asn Lys		
180 185 190		
gtg ggg gtc gtg cca cag gac cat gta ttt ttc tct ggg gaa ggg aag	625	20
Val Gly Val Val Pro Gln Asp His Val Phe Phe Ser Gly Glu Gly Lys		
195 200 205		
att cct tac cat ccc tgc atc tat gaa aag atg ata acg tct cat gga	673	
Ile Pro Tyr His Pro Cys Ile Tyr Glu Lys Met Ile Thr Ser His Gly		
210 215 220		
cac tca caa gac cta cag gac ctc tgg gtg gag gcc aca gat cct aaa	721	
His Ser Gln Asp Leu Gln Asp Leu Trp Val Glu Ala Thr Asp Pro Lys		
225 230 235 240		
gtg aag gac att tcg aa	738	
Val Lys Asp Ile Ser		
<210> 4		30
<211> 14		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic DNA		
<400> 4		
catcacagac actaaattca agtc	14	
<210> 5		
<211> 14		
<212> DNA		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic DNA		
<400> 5		
gcagtatatt tgaccaaaaa aacc	14	
<210> 6		
<211> 11		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		50

<223> synthetic DNA
 <400> 6
 ctttagagca c 11
 <210> 7
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 7 10
 ctctaaag 8
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 8
 ggggtaccat agatgcagg atgataagg 29
 <210> 9 20
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 9
 ggggtaccga cttgaattta ggtctgtga tg 32
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA 30
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 10
 ggggtaccat ctgtagcatt ctccaaagg 30
 <210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> 40
 <223> synthetic DNA
 <400> 11
 ggaattccc tactctacga aacacgaagt tc 32
 <210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 12 50

ggaattccct ttcgtcctca tttacttag gg 32
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> commercially available amino acid sequence
 <400> 13
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 14
 agcttgccgc caccatgcat tttcaagtgc agattttca 39
 <210> 15
 <211> 39 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 15
 gcttcctgct aatcagtgcc tcagtcataa tgtcacgtg 39
 <210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 16
 gagattacaa ggacgacgat gacaaggcct acgtag 36
 <210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA 40
 <400> 17
 gaagctgaaa atctgcactt gaaaatgcat ggtggcggca 40
 <210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 18
 atctccacgt gacattatga ctgaggcact gattagcag 39 50

<210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 19
 gtacctacgt aggccttgtc atcgctgtcc ttgta 35
 <210> 20
 <211> 30 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 20
 cgcgatcct cccacggtc cgtggaccag 30
 <210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 21
 atagtttagc ggccgcgga gggctcagca gcgtcg 36
 <210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA 30
 <400> 22
 cgggatccga taatcacatt gtgagccata tg 32
 <210> 23
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 23
 gctctagatg acagtgaaa catacaacat tc 32 40
 <210> 24
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 24
 cgggatccat tgtgagccat atgaagtc at 32
 <210> 25
 <211> 24 50

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 25
 tcttatgact gctgatgatg acat 24
 <210> 26
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 26
 gatcatcgcg aga 13
 <210> 27
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA 20
 <400> 27
 agcttctcgc gat 13
 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 28
 ctttaggatc tgtagcattc ttcc 24 30
 <210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic DNA
 <400> 29
 gatatgccg cgctcgtcgt cgac 24
 <210> 30
 <211> 4419 40
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(652)
 <220>
 <221> exon
 <222> (653)..(4373)
 <220>
 <221> CDS 50

<222> (787)..(1923)

<400> 30

```

ttaaataaaa agaaaaaaga agtcttactc ttattcctgc cttgtctggg gcaagcctta 60
atggattttt actgctgtga attttctttt cattgaagat tttgccttga tctatgtatc 120
tgctttcatc ctgaccatat tcaagtcagt atattcatga atgtacctgt ttgtgaaatt 180
tgaacttaag tatacacgat tatagccgtt tgggaagcct tttttttttt ttttttaaga 240
gtaggagtag aaaaaggtct ctgtactctg aatgggaaga cagtgtaaag caattttttc 300
ccttttcctg tcctccttta aaaaaataa acagccgat gcctctgcta agtactaact 360
acctcatcac cttttgtgca gacagggcag gttacatttg gttttaagga attaggaata 420
tgtttctttc cagcacctta gtaaccacg cgattgtgat tcttttctct tcttgactgt 480
gatagggtggc atggaatatt cacatgggag agccgcatga ggccgcccac cagccttcct 540
gaaggatgcc cgtgtggaag aattttgacg tgccagtgic ctcgttctac aggggtgttc 600
attcttccgc aatctcagaa aatgggact aaaagaaact attttgtaaa ataagaagac 660
ttccattttt aatgaccaac atgtattaag atggacacct actctacgaa acacgaagtt 720
ctatgggtctc gaagaagccc gtgcctgttt aaaactgata ctaactaaaa acagacttga 780
gtggat atg aga atg ttg gtt agt ggc aga aga gtc aaa aaa tgg cag 828
      Met Arg Met Leu Val Ser Gly Arg Arg Val Lys Lys Trp Gln
          1           5           10
tta att att cag tta ttt gct act tgt ttt tta gcg agc ctc atg ttt 876
Leu Ile Ile Gln Leu Phe Ala Thr Cys Phe Leu Ala Ser Leu Met Phe 920
15           20           25           30
ttt tgg gaa cca atc gat aat cac att gtg agc cat atg aag tca tat 924
Phe Trp Glu Pro Ile Asp Asn His Ile Val Ser His Met Lys Ser Tyr
          35           40           45
tct tac aga tac ctc ata aat agc tat gac ttt gtg aat gat acc ctg 972
Ser Tyr Arg Tyr Leu Ile Asn Ser Tyr Asp Phe Val Asn Asp Thr Leu
          50           55           60
tct ctt aag cac acc tca gcg ggg cct cgc tac caa tac ttg att aac 1020
Ser Leu Lys His Thr Ser Ala Gly Pro Arg Tyr Gln Tyr Leu Ile Asn
          65           70           75
cac aag gaa aag tgt caa gct caa gac gtc ctc ctt tta ctg ttt gta 1068
His Lys Glu Lys Cys Gln Ala Gln Asp Val Leu Leu Leu Leu Phe Val
          80           85           90
aaa act gct cct gaa aac tat gat cga cgt tcc gga att aga agg acg 1116
Lys Thr Ala Pro Glu Asn Tyr Asp Arg Arg Ser Gly Ile Arg Arg Thr
95           100           105           110
tgg ggc aat gaa aat tat gtt cgg tct cag ctg aat gcc aac atc aaa 1164
Trp Gly Asn Glu Asn Tyr Val Arg Ser Gln Leu Asn Ala Asn Ile Lys
          115           120           125
act ctg ttt gcc tta gga act cct aat cca ctg gag gga gaa gaa cta 1212
Thr Leu Phe Ala Leu Gly Thr Pro Asn Pro Leu Glu Gly Glu Glu Leu
          30           135           140
caa aga aaa ctg gct tgg gaa gat caa agg tac aat gat ata att cag 1260
Gln Arg Lys Leu Ala Trp Glu Asp Gln Arg Tyr Asn Asp Ile Ile Gln
          145           150           155
caa gac ttt gtt gat tct ttc tac aat ctt act ctg aaa tta ctt atg 1308
Gln Asp Phe Val Asp Ser Phe Tyr Asn Leu Thr Leu Lys Leu Leu Met
          160           165           170
cag ttc agt tgg gca aat acc tat tgt cca cat gcc aaa ttt ctt atg 1356
Gln Phe Ser Trp Ala Asn Thr Tyr Cys Pro His Ala Lys Phe Leu Met

```

175	180	185	190	
act gct gat gat gac ata ttt att cac atg cca aat ctg att gag tac				1404
Thr Ala Asp Asp Asp Ile Phe Ile His Met Pro Asn Leu Ile Glu Tyr				
	195	200	205	
ctt caa agt tta gaa caa att ggt gtt caa gac ttt tgg att ggt cgt				1452
Leu Gln Ser Leu Glu Gln Ile Gly Val Gln Asp Phe Trp Ile Gly Arg				
	210	215	220	
gtt cat cgt ggt gcc cct ccc att aga gat aaa agc agc aaa tac tac				1500
Val His Arg Gly Ala Pro Pro Ile Arg Asp Lys Ser Ser Lys Tyr Tyr				
	225	230	235	10
gtg tcc tat gaa atg tac cag tgg cca gct tac cct gac tac aca gcc				1548
Val Ser Tyr Glu Met Tyr Gln Trp Pro Ala Tyr Pro Asp Tyr Thr Ala				
	240	245	250	
gga gct gcc tat gta atc tcc ggt gat gta gct gcc aaa gtc tat gag				1596
Gly Ala Ala Tyr Val Ile Ser Gly Asp Val Ala Ala Lys Val Tyr Glu				
	255	260	265	270
gca tca cag aca cta aat tca agt ctt tac ata gac gat gtg ttc atg				1644
Ala Ser Gln Thr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Ile Asp Asp Val Phe Met				
	275	280	285	
ggc ctc tgt gcc aat aaa ata ggg ata gta ccg cag gac cat gtg ttt				1692
Gly Leu Cys Ala Asn Lys Ile Gly Ile Val Pro Gln Asp His Val Phe				20
	290	295	300	
ttt tct gga gag ggt aaa act cct tat cat ccc tgc atc tat gaa aaa				1740
Phe Ser Gly Glu Gly Lys Thr Pro Tyr His Pro Cys Ile Tyr Glu Lys				
	305	310	315	
atg atg aca tct cat gga cac tta gaa gat ctc cag gac ctt tgg aag				1788
Met Met Thr Ser His Gly His Leu Glu Asp Leu Gln Asp Leu Trp Lys				
	320	325	330	
aat gct aca gat cct aaa gta aaa acc att tcc aaa ggt ttt ttt ggt				1836
Asn Ala Thr Asp Pro Lys Val Lys Thr Ile Ser Lys Gly Phe Phe Gly				30
	335	340	345	350
caa ata tac tgc aga tta atg aag ata att ctc ctt tgt aaa att agc				1884
Gln Ile Tyr Cys Arg Leu Met Lys Ile Ile Leu Leu Cys Lys Ile Ser				
	355	360	365	
tat gtg gac aca tac cct tgt agg gct gcg ttt atc taa tagtacttga				1933
Tyr Val Asp Thr Tyr Pro Cys Arg Ala Ala Phe Ile				
	370	375		
atgttgatg ttttactgt cactgagtca aacctggatg aaaaaaacct ttaaagtctc				1993
gtctatacc taagtaaaat gaggacgaaa gacaaatatt ttgaaagcct agtccatcag				2053
aatgtttctt tgattctaga agctgtttaa taccattat ctacttcatt gcctaagttc				2113
atttcaaaga atttgtattt agaaaagggt tatattatta gtgaaaacaa aactaaaggg				2173
aagttcaagt tctcatgtaa tgccacatat atacttgagg ttagagatg ttattaagaa				2233
gttttgatg tagaataatt gcttttgaa aataccaaat gaacgtacag tacaacattt				2293
caaggaaatg aatatattgt tagaccaggt aagcaagttt atttttgtta aagagcactt				2353
ggtggaggtg gtaggggcag ggaagggtca gcataggaga gaaagttcat gaatctggta				2413
aaacagtctc ttgttcttaa gaggagatgt agaaaaatgt gtacaatgtt attataaaca				2473
gacaaatcac gtcttaccac atccatgtag ctactggtgt tagagtcatt aaaatacctt				2533
tttttgcatc ttttttcaaa gtftaatgtg aactttttaga aaagtgatta atgttgccct				2593
aatactttat atgtttttta tggatttttt tttaagtatt agaaaatgac acataacacg				2653
ggcagctggt tgctcatagg gtcccttctct agggagaaac cattgtttaat tcaataagc				2713
				50

tgattttaat gacgttttca actggttttt aaatattcaa tattggctctg tgtttaagtt 2773
 tgttatttga atgtaattta catagaggaa tataataatg gagagacttc aaatggaaag 2833
 acagaacatt acaagcctaa tgtctccata attttataaa atgaaatctt agtgtctaaa 2893
 tccttgact gattactaaa attaaccacac tcctcccaa caaggtctta taaaccacag 2953
 cactttgttc caagttcaga gttttaaatt gagagcatta aacatcaaag ttataatatic 3013
 taaaacaatt ttttttcat caataactgt cagaggtgat ctttttttc taaatatttc 3073
 aaacttgaaa acagagtaaa aaagtgatag aaaagttgcc agtttggggt taaagcattt 3133
 ttaaagctgc atgttccttg taatcaaaga gatgtgtctg agatctaata gagtaagtta 3193
 ctttttttt acaaagcagg ataaaaatgt ggctataata cacactacct cccttacta 3253
 cagaaagaac taggtgggtg ctactgctag ggagattata tgaaggccaa aataatgact 3313
 tcagcaagag tgactgaact cactctaagg cctttgactg cagaggcacc tgttagggaa 3373
 aatcagatgt ctcatataat aaggtgatgt cggaaacacg caaaacaaaa cgaaaaaaga 3433
 tttctcagta tacacaactg aatgatgata cttacaattt ttagcaggta gctttttaat 3493
 gtttacagaa attttaattt ttttctattt tgaatttga ggcttgttta cattgcttag 3553
 ataattttaga atttttaact aatgtcaaaa ctacagtgtc aaacattcta ggttgtagtt 3613
 actttcagag tagatacagg gttttagatc attacagttt aagttttctg accaattaaa 3673
 aaaacataga gaacaaaagc atatttgacc aagcaacaag cttataatta atttttatta 3733
 gttgatgatg taatgatgta ttgccttttg cccatatata ccctgtgtat ctatactgg 3793
 aagtgtttaa ggttgccatt ggttgaaac ataagtgtct ctggccatca aagtgatctt 3853
 gtttacagca gtgcttttgt gaaacaatta tttatttgc tgaagagctc ttctgaactg 3913
 tgtcctttta atttttgctt agaatagaat ggaacaagtt taaatttcaa ggaaatatga 3973
 aggcacttcc tttttttcta agaaggaagt tgctagatga ttcccttcatc acacttactt 4033
 aaagtactga gaagagtatc tgtaataaaa agggttccaa ctttttaaaa aagaaggaaa 4093
 aaactttttg gtgctccagt gtagggctat ctttttaaaa aatgtcaaca aagggaaaat 4153
 aaactatcag cttggatggt cacttgaata gaagatggtt atacacagtg ttattgttaa 4213
 aattttttta ccttttggtt ggtttgcatc ttttttccat attgttaatt ttataccaaa 4273
 atgttaaata tttgtattac ttgaattttg ctcttgtatg gcaaaataat tagtgagttt 4333
 aaaaaaatc tatagtttcc aataaacaac tgaaaaatta tcatgagaag ggtattttaa 4393
 ctttttcatg aacattgctt atataa 4419

10

20

30

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 31

caggaaggaa ggctggaaga gtgc 24

<210> 32

<211> 245

<212> PRT

40

<213> Rattus norvegicus

<400> 32

Tyr Glu Arg Arg Ser Ala Ile Arg Lys Thr Trp Gly Asn Glu Asn Tyr

1

5

10

15

Val Gln Ser Gln Leu Asn Ala Asn Ile Lys Ile Leu Phe Ala Leu Gly

20

25

30

Thr Pro His Pro Leu Lys Gly Lys Glu Leu Gln Lys Arg Leu Ile Trp

35

40

45

Glu Asp Gln Val Tyr His Asp Ile Ile Gln Gln Asp Phe Thr Asp Ser

50

55

60

50

Phe His Asn Leu Thr Phe Lys Phe Leu Leu Gln Phe Gly Trp Ala Asn
 65 70 75 80
 Thr Phe Cys Pro His Ala Arg Phe Leu Met Thr Ala Asp Asp Asp Ile
 85 90 95
 Phe Ile His Met Pro Asn Leu Ile Glu Tyr Leu Gln Gly Leu Glu Gln
 100 105 110
 Val Gly Val Arg Asp Phe Trp Ile Gly His Val His Arg Gly Gly Pro
 115 120 125
 Pro Val Arg Asp Lys Ser Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Tyr Glu Met Tyr
 130 135 140
 Lys Trp Pro Ala Tyr Pro Asp Tyr Thr Ala Gly Ala Ala Tyr Val Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Asp Val Ala Ala Lys Ile Tyr Glu Ala Ser Gln Thr Leu Asn
 165 170 175
 Ser Ser Met Tyr Ile Asp Asp Val Phe Met Gly Leu Cys Ala Asn Lys
 180 185 190
 Val Gly Val Val Pro Gln Asp His Val Phe Phe Ser Gly Glu Gly Lys
 195 200 205
 Ile Pro Tyr His Pro Cys Ile Tyr Glu Lys Met Ile Thr Ser His Gly
 210 215 220
 His Ser Gln Asp Leu Gln Asp Leu Trp Val Glu Ala Thr Asp Pro Lys
 225 230 235 240
 Val Lys Asp Ile Ser
 245

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図 G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入したHCT-15細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量をFACSを用いて解析した結果を示した図である。

【図2】第2図 G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入したHCT-15細胞を各種糖鎖合成阻害剤で処理した後に、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量をFACSを用いて解析することにより、G6ポリペプチドが糖タンパク質糖鎖または糖脂質糖鎖の合成に関与しているか検討した結果を示した図である。

30

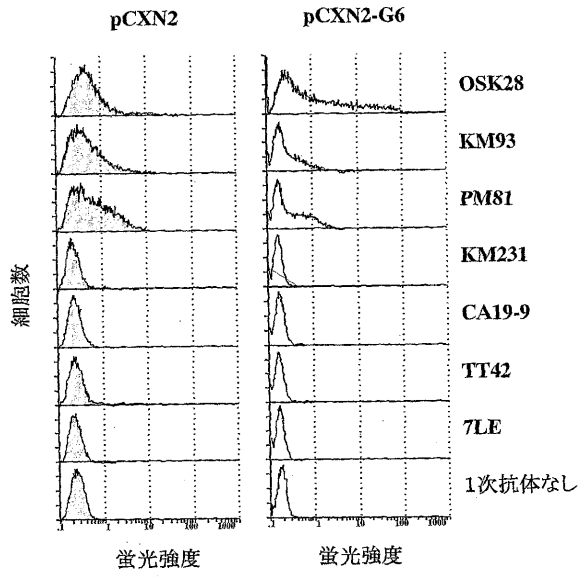
【図3】第3図 昆虫細胞で生産させたFLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチドを精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、銀染色を行った結果を示した図である。Bは、昆虫細胞で生産させたFLAGペプチド融合分泌型G6ポリペプチドを精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、抗FLAGペプチド抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果を示した図である。

【図4】第4図 G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入したNamalwa細胞から中性糖脂質を抽出し、TLCプレートに展開後、オルシノール染色を行った結果を示した図である。Bは、G6ポリペプチドの発現プラスミドを導入したNamalwa細胞から中性糖脂質を抽出し、TLCプレートに展開後、抗N-アセチルラクトサミン抗体1B2を用いた抗体染色を行った結果を示した図である。

40

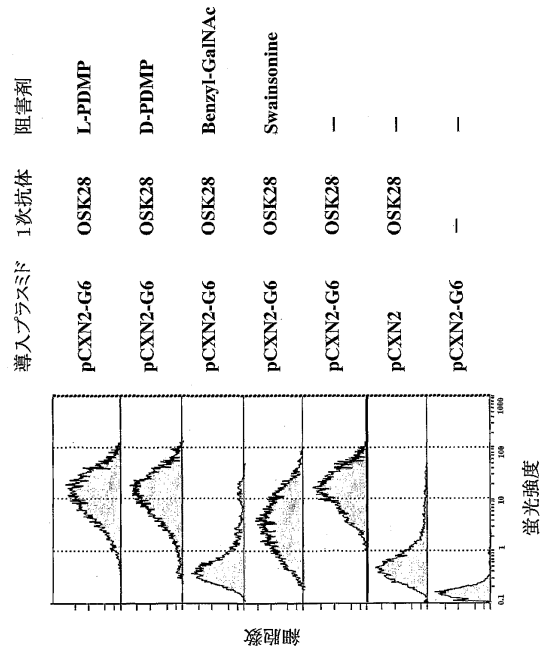
【図5】第5図 は、Competitive-PCR法を用いて、36種のヒト臓器におけるG6転写物および -アクチン転写物の発現量を調べた電気泳動の図である。ヒストグラムは、 -アクチンの発現量を1000とした時のG6転写物の発現量を示したグラフである。

【 図 1 】



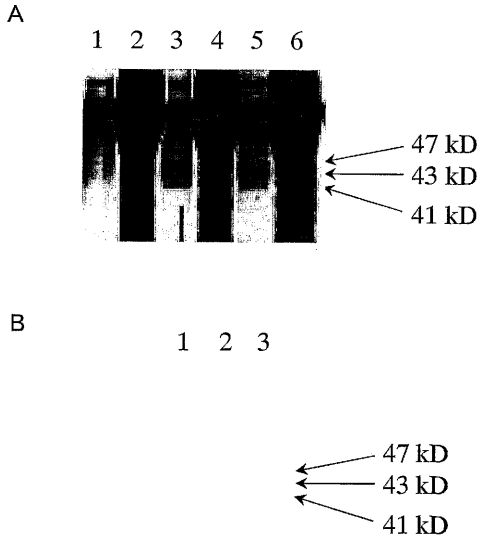
第1図

【 図 2 】



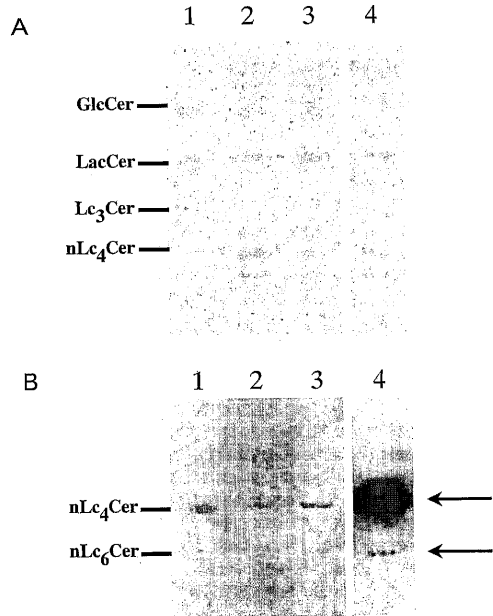
第2図

【 図 3 】



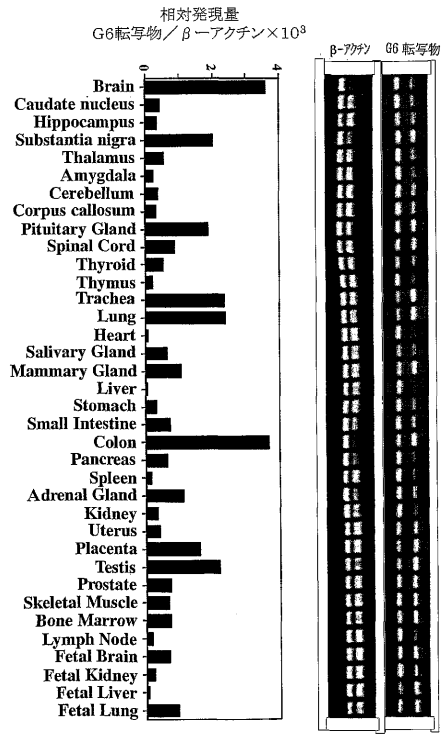
第3図

【 図 4 】



第4図

【 図 5 】



第 5 図

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 3
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	C 0 7 K	16/40
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 Y
C 1 2 Q	1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48 Z
		G 0 1 N	33/50 Z

- (72)発明者 成松 久
東京都東大和市向原5 - 1 0 8 2 - 1
- (72)発明者 佐々木 克敏
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 夏目 歩
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 美王 宏之
東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 本社内
- (72)発明者 中川 智
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 関根 進
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 榎谷内 晶
東京都東久留米市下里1 - 1 1 - 4 2

審査官 上條 肇

- (56)参考文献 FEBS Lett.(2000 May),Vol.473,No.2,p.165-168
Proc Natl Acad Sci USA(1999),Vol.96,No.8,p.4692-4697

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/54
C12N 9/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	新型多肽		
公开(公告)号	JP4995398B2	公开(公告)日	2012-08-08
申请号	JP2002522509	申请日	2001-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	尚志成松		
申请(专利权)人(译)	协和醗酵工业株式会社 尚志成松		
当前申请(专利权)人(译)	协和醗酵キリン株式会社 尚志成松		
[标]发明人	成松久 佐々木克敏 夏目步 美王宏之 中川智 関根進 梅谷内晶		
发明人	成松久 佐々木克敏 夏目步 美王宏之 中川智 関根進 梅谷内晶		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/113 C12N9/10 C12P19/04 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 C07K16/40 G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/48 G01N33/50 C12N1/11 C12N9/12 C12N15/54		
CPC分类号	C12N9/1051 A01K2217/05 A01K2217/075 C07K2319/00 C12N9/1241 C12N2799/026 C12Y204/0108		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.G C12N9/10 C12P19/04.Z C12N1/21 C12N5/00.102 C12N5/00.103 C12Q1/68.A C07K16/40 G01N33/53.Y C12Q1/02 C12Q1/48.Z G01N33/50.Z		
代理人(译)	岩桥幸		
审查员(译)	肇蜂		
优先权	2000265430 2000-09-01 JP		
其他公开文献	JPWO2002018602A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种具有 β 1,3-N-乙酰葡糖胺基转移酶活性的新多肽，用于合成包含该多肽的糖链的试剂，使用该合成糖链的试剂制备糖链或复合碳水化合物的方法，编码多肽的DNA，产生多肽的方法，抗多肽的抗体，以及使用DNA或抗体治疗炎症，癌症或肿瘤转移的诊断方法和药物。本发明可用于合成有用的糖链并诊断和治疗炎性疾病，癌症或肿瘤转移。

質特異性

基質名	相对活性 (%)
LNnT	100
LNT	5.5
LNFP-II	<0.05
LNFP-III	4.9
LNDFH-II	<0.05
LNFP-V	4.9