

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4689047号
(P4689047)

(45) 発行日 平成23年5月25日(2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月25日(2011.2.25)

(51) Int.Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
請求項の数 36 (全 71 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2000-601172 (P2000-601172)
 (86) (22) 出願日 平成12年2月24日(2000.2.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2000/001070
 (87) 国際公開番号 W02000/050608
 (87) 国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)
 審査請求日 平成19年1月12日(2007.1.12)
 (31) 優先権主張番号 特願平11-47571
 (32) 優先日 平成11年2月25日(1999.2.25)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-6645

(73) 特許権者 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (72) 発明者 成松 久
 東京都東大和市向原5-1082-1
 (72) 発明者 一色 聡一郎
 東京都中野区中央1-30-2-101
 (72) 発明者 榎谷内 晶
 東京都東久留米市下里1-11-42
 (72) 発明者 佐々木 克敏
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸
 酵工業株式会社 東京研究所内

審査官 六笠 紀子

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】

以下の(a)、(b)および(c)からなる群より選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の31~310番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) (a)または(b)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Gal 1-3GlcNAc構造を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド

【請求項2】

1,3-ガラクトース転移酵素活性が、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1,3結合でガラクトースを転移する活性である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

1,3-ガラクトース転移酵素活性が、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glcの非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基、またはN-アセチルグルコサミン単糖に1,3結合でガラクトースを転移する活性である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項4】

以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群より選ばれるDNA。

(a) 請求項1~3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA

(b) 配列番号2で表される塩基配列の402～1331番目の塩基配列を有するDNA

(c) 配列番号2で表される塩基配列の492～1331番目の塩基配列を有するDNA

(d) (a)～(c)いずれかに記載のDNAと95%以上の同一性を有するDNAであり、かつGal 1-3GlcNAc構造を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA

【請求項5】

請求項4記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項6】

組換え体DNAが、プラスミドpAMo-3GT5またはプラスミドpBS-3GT5 (FERM BP-6645)である、請求項5記載の組換え体DNA。

【請求項7】

請求項4に記載のDNA、請求項5記載の組換え体DNA、または請求項6記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【請求項8】

形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群より選ばれる形質転換体である、請求項7記載の形質転換体。

【請求項9】

微生物が、Escherichia属に属する微生物である、請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】

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8記載の形質転換体。

【請求項11】

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選ばれる昆虫細胞である、請求項8記載の形質転換体。

【請求項12】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養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13】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体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法。

【請求項14】

生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項13記載の製造法。

【請求項15】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該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16】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該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。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N - アセチルグルコサミン (GlcNAc)、

ii) N - アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) N - アセチルグルコサミン残基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 ' - ニリン酸ガラクトース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 N - アセチルグルコサミンまたは N - アセチルグルコサミン残基に 1 , 3 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反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

10

【請求項 18】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) グルコース、

ii) グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) グルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質からなる群より選ばれる

受容基質、および

(c) ウリジン - 5 ' - ニリン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に 1 , 3 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反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

20

【請求項 19】

請求項 8 記載の微生物、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なる群より選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが 1 , 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【請求項 20】

請求項 8 記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが 1 , 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

30

【請求項 21】

請求項 8 記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが 1 , 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

40

【請求項 22】

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 17 ~ 21 のいずれかに記載の製造法。

【請求項 23】

生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 20 記載の製造法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA または該 DNA の連続した 23 ~ 60 塩基と同じ配列を有する断片を用い、invitroでのハイブリダイゼ

50

ーション法により、該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 25】

請求項 4 に記載の DNA または配列番号 2 または 3 で表される塩基配列を有する DNA の有する塩基配列中の連続した 23 ~ 60 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体が、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、DNA 中のリボースが 2' - O - プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体であって、これらからなる群より選ばれる DNA。

10

【請求項 26】

配列番号 20 または 21 で表される塩基配列からなる DNA。

20

【請求項 27】

請求項 25 または 26 に記載のオリゴヌクレオチドを用い、in vitro でのポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、請求項 1 ~ 3 のいずれか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 28】

請求項 1 ~ 3 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 29】

請求項 28 記載の抗体を用い、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のポリペプチドを in vitro で検出することを特徴とする、免疫学的検出法。

30

【請求項 30】

請求項 28 記載の抗体を用い、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のポリペプチドを in vitro で検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

【請求項 31】

請求項 28 記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 3 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ることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 3 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、抗シアリルルイス a 抗体、抗ルイス a 抗体、抗ルイス b 抗体または抗シアリルルイス c 抗体を用い、シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖含量を測定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。

40

【請求項 34】

請求項 1 ~ 3 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 28 記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定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。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA を欠損または変

50

異させたノックアウト非ヒト動物。

【請求項36】

ノックアウト非ヒト動物がマウスである、請求項35記載のノックアウト非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖の合成に関与する 1, 3 - ガラクトース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、該ポリペプチドを用いたタイプ 1 糖鎖含有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タイプ 1 糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法に関する。

10

背景技術

糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係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)、Glycobiology, 3, 97(1993)〕。

糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

20

Gal 1 - 3 GlcNAc 構造を有する糖鎖はタイプ 1 糖鎖と呼ばれ、ルイス式血液型抗原や癌関連糖鎖抗原の骨格糖鎖を構成している。ルイス式血液型抗原としては、ルイス a 糖鎖 (Gal 1 - 3 (Fuc 1 - 4) GlcNAc) およびルイス b 糖鎖 [Fuc 1 - 2 Gal 1 - 3 (Fuc 1 - 4) GlcNAc] が存在する。シアリルルイス a 糖鎖 [NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 3 (Fuc 1 - 4) GlcNAc] およびシアリルルイス c 糖鎖 (NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 3 GlcNAc) は、主に大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌において高頻度に検出される癌関連糖鎖であり、シアリルルイス a 糖鎖およびシアリルルイス c 糖鎖に対する抗体は癌の血清診断に利用されている。

白血球の炎症部位への集積やリンパ球のリンパ節へのホーミングには、接着分子セレクチン (E -, P -, および L - セレクチン) とその糖鎖リガンド (シアリルルイス x 糖鎖またはその関連糖鎖) の接着が関与していることが明らかとなっている。

30

シアリルルイス x 糖鎖 [NeuAc 2 - 3 Gal 1 - 4 (Fuc 1 - 3) GlcNAc] の構造異性体であるシアリルルイス a 糖鎖はセレクチンと結合することから、シアリルルイス a 糖鎖は癌の転移に関与すると考えられている。また、大腸癌や膵臓癌におけるシアリルルイス a 糖鎖の発現量が、癌の予後の悪さと相関しているという報告もある。

Gal 1 - 3 GlcNAc 構造は、GlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素によって合成される。これまでに 3 種類の GlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素 (3Gal - T1, 3Gal - T2, 3Gal - T3) 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〔特開平 6 - 181759、J. Biol. Chem., 273, 58 - 65 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 433 - 440 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770 - 12778 (1998)〕。また、基質特異性の異なる別の 1, 3 - ガラクトース転移酵素 (3Gal - T4) の遺伝子がクローン化されている〔J. Biol. Chem., 272, 24794 - 24799 (1997)、J. Biol. Chem., 273, 12770 - 12778 (1998)〕。3Gal - T4 はガングリオシド GA1、GM1 または GD1b を合成するが、Gal 1 - 3 GlcNAc 構造は合成しない。

40

大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌において、癌関連糖鎖であるシアリルルイス a 糖鎖およびシアリルルイス c 糖鎖の合成に関与する GlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素が同定できれば、該酵素または該酵素遺伝子の発現量を調べることにより、より正確な癌の診断が可能になると推定される。また、該酵素活性、または該酵素遺伝子の転写・翻訳

50

を抑制することにより、癌転移の抑制が可能になると期待される。しかし、これまでに該酵素または該酵素遺伝子は同定されていない。大腸癌細胞株 Colo 205 から GlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素が部分精製されているが、該酵素の単離、該酵素のアミノ酸配列の決定、ならびに該酵素遺伝子の単離には至っていない〔*J. Biol. Chem.*, 262, 15649 - 15658 (1987)、*Arch. Biochem. Biophys.* 270, 630 - 646 (1989)、*Arch. Biochem. Biophys.* 274, 14 - 25 (1989)〕。

セレクチンに強い結合能を有する糖鎖は、セレクチンアンタゴニストとして、炎症や癌転移の治療および予防に有用である。従って、大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌においてシアリルルイス a 糖鎖の合成に関与している 1, 3 - ガラクトース転移酵素は、セレクチンアンタゴニストの効率的合成にも利用可能と推定される。

ヒトの乳中には、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)〕。ラクト - N - テトラオース (Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 GlcNAc 1 - 4 Glc) は、ヒト乳中に多く含まれ、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防いでいると考えられている。また、ラクト - N - テトラオースには良性的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、ウシやマウス等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 3 糖以上のオリゴ糖はほとんど存在しない〔*Acta Paediatrica*, 82, 903 (1993)、*J. Biol. Chem.*, 270, 29515 (1995)〕。ラクト - N - テトラオースを母核とする様々なオリゴ糖、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思われる。したがって、これまでにクローン化された GlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素に比較して、ラクト - N - テトラオースを合成する活性のより高い酵素の開発は産業上重要な課題である。

発明の開示

本発明は、新規な 1, 3 - ガラクトース転移酵素を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および癌等の疾患の診断法を提供することを目的とする。

本発明は、以下の (1) ~ (47) に関する。

(1) シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞に存在する、シアリルルイス a 糖鎖の合成に関与する 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

上記本発明の新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞のみならずシアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖を発現している大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞にも存在する。また、これら消化器系癌細胞に存在するタイプ 1 糖鎖の効率的合成に関与する 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、公知の 3 Gal - T1、3 Gal - T2 および 3 Gal - T3 とは異なる新規な 1, 3 - ガラクトース転移酵素である。

(2) 以下の (a)、(b) および (c) からなる群より選ばれるポリペプチド：

(a) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 31 ~ 310 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

(c) (a) または (b) 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、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Gal 1 - 3 GlcNAc 構造を合成可能な 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

上記 (a) または (b) 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、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該ポリペプチドの有する Gal 1 - 3 GlcNAc 構造を合成可能な 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、*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)、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で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

10

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、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。

また、本発明のポリペプチドがGal 1-3GlcNAc構造を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するためには、配列番号1記載のアミノ酸配列と、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)] 等を用いて計算したときに(相同性の%を定義するための計算手段・方法等を記載する)、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。上記の(a)または(b)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Gal 1-3GlcNAc構造を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、公知の3Gal-T1、3Gal-T2および3Gal-T3とは異なる新規な1,3-ガラクトース転移酵素である。

20

(3) 1,3-ガラクトース転移酵素活性が、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1,3結合でガラクトースを転移する活性である上記(1)または(2)記載のポリペプチド。

(4) 1,3-ガラクトース転移酵素活性が、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glcの非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基、またはN-アセチルグルコサミン単糖に1,3結合でガラクトースを転移する活性である、上記(1)または(2)記載のポリペプチド。

30

(5) 以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群より選ばれるDNA:

(a) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNA、
(b) 配列番号2で表される塩基配列の402~1331番目の塩基配列を有するDNA

、
(c) 配列番号2で表される塩基配列の492~1331番目の塩基配列を有するDNA、および

(d) (a)~(c)いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつGal 1-3GlcNAc構造を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

40

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記(a)、(b)および(c)のDNAからなる群より選ばれる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ブロットハイブリダイゼーション法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NaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l塩化ナトリウム、15mmol/lクエン酸ナ

50

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 をあげることができる。

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、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

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)]等を用いて計算したときに(相同性の%を定義するための計算手段・方法等を記載する)、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DNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。該DNAのコードするGal 1-3GlcNAc構造を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、公知の3Gal-T1、3Gal-T2および3Gal-T3とは異なる新規な1,3-ガラクトース転移酵素である。

(6) 上記(5)記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(7) 組換え体DNAが、プラスミドpAMo-3GT5またはプラスミドpBS-3GT5(FERM BP-6645)である、上記(6)記載の組換え体DNA。

(8) 上記(5)に記載のDNA、(6)記載の組換え体DNA、または(7)記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(9) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群より選ばれる形質転換体である、上記(8)記載の形質転換体。

(10) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)記載の形質転換体。

(11) 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選ばれる動物細胞である、上記(9)記載の形質転換体。

(12) 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、上記(9)記載の形質転換体。

(13) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養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。

(14) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体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法。

(15) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(14)記載の製造法。

(16) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該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。

(17) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴

10

20

30

40

50

とする、該ポリペプチドの製造法。

(18) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N - アセチルグルコサミン (G l c N A c)、

ii) N - アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) N - アセチルグルコサミン残基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' - ニリン酸ガラクトース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N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルグルコサミン残基に 1, 3 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反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

10

(19) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) グルコース、

ii) グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) グルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質からなる群より選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン - 5' - ニリン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に 1, 3 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反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

20

(20) 上記(9)記載の微生物、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なる群より選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが 1, 3 結合でN - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

(21) 上記(9)記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが 1, 3 結合でN - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

30

(22) 上記(9)記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが 1, 3 結合でN - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

(23) 複合糖質が、糖タンパク質、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なる群より選ばれる複合糖質である、上記(18)~(22)のいずれか1つに記載の製造法。

40

(24) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(21)記載の製造法。

(25) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、該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。

(26) 上記(5)に記載のDNAまたは配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAの有する塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレ

50

オチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

(27) オリゴヌクレオチド誘導体が、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、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、上記(26)記載のオリゴヌクレオチド。

10

(28) 配列番号20または21で表される塩基配列を有するDNA。

(29) 上記(26)~(28)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、上記(1)~(4)のいずれか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。

20

(30) 上記(25)または(29)記載の方法を用いた癌または癌転移の検出法。

(31) 上記(5)、(26)~(28)記載のDNAおよび配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAから得られるDNAを用い、上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(32) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを認識する抗体。

(33) 上記(32)記載の抗体を用いる、上記(1)~(4)のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(34) 上記(32)記載の抗体を用い、上記(1)~(4)のいずれか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。

30

(35) 上記(32)記載の抗体を含有する免疫組織染色剤。

(36) 上記(32)記載の抗体を含有する、癌または癌転移の診断薬。

(37) 上記(1)~(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

(38) 上記(1)~(4)のいずれか1つ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、抗シアリルルイスa抗体、抗ルイスa抗体、抗ルイスb抗体または抗シアリルルイスc抗体を用い、シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖含量を測定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。

40

(39) 上記(1)~(4)のいずれか1つ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、上記(32)記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定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。

(40) 上記(1)~(4)のいずれか1つ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。

(41) プロモーターDNAが、小腸細胞、大腸細胞、膵臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、膵癌細胞および胃癌細胞からなる群より選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(40)記載のプロモーターDNA。

(42) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、

50

上記(40)または(41)記載のプロモーターDNA。

(43) プロモーターDNAが配列番号3で表される塩基配列の1~5000番目の塩基配列中の連続する50~5000bpのDNA配列を有する、上記(40)~(42)のいずれか1つに記載のプロモーターDNA。

(44) 上記(40)~(43)のいずれか1つ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、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定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。

(45) 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 -グルクロニダーゼ遺伝子、 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、エクオリン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、上記(44)記載のスクリーニング法。

(46) 上記(1)~(4)のいずれか1つに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ノックアウト動物。

(47) ノックアウト動物がマウスである、上記(46)記載のノックアウト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1)本発明のシアリルルイスa糖鎖等のタイプ1糖鎖を合成可能な1,3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチドをコードするDNA(以下、新規1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子と略すこともある)の取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖を発現している、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞より、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

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、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)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リプト・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; ギブコBRL (Gibco BRL)社製] やザップ-cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等があげられる。

シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖を発現している大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞としては、例えば、シアリルルイスa糖鎖を発現しているヒト大腸癌細胞株であるColo205、Colo201、SW1116等、あるいはシアリルルイスa糖鎖を発現しているヒト膵臓癌細胞株であるCapan-2等を用いることができる。

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 [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、ZAP II (ストラタジーン社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、Triplex (クローンテック社製)、ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 2

10

20

30

40

50

68, 22782-22787 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963) 等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌 Escherichia coli 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' [ストラタジーン社製、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 SOLRTM Strain [ストラタジーン社より市販]、E. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いることができる。

10

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ライブラリーをあげることができる。

ヒト大腸癌細胞株 Colo205 由来の mRNA より GIBCO BRL 社製の cDNA 合成システム (cDNA Synthesis System) キットを用いて cDNA を合成する。

20

該 DNA の両末端に SfiI リンカーを付与した後、クローニングベクター pAMo の SfiI 部位に挿入したプラスミドを作製する。

該プラスミドを用い、E. coli LE392 を形質転換して cDNA ライブラリーを作製する。

作製した cDNA ライブラリーより目的とする DNA を含むクローンを以下の方法で選択する。

上記で作製した cDNA ライブラリーから、常法あるいはキアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである /plasmid/maxi kit (商品番号 41031) 等のキットを用いてプラスミドを調製する。

既知の4種の 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列を比較することにより、4種の 1, 3-ガラクトース転移酵素でアミノ酸配列がよく保存されている領域を2ヶ所以上見出す。

30

公知の方法 [Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab. (1995)、井上純一郎・仙波憲太郎編、ザ・プロトコールシリーズ「cDNAクローニング」、羊土社、(1996年)、Science, 241, 42 (1988)] に従って各領域のアミノ酸配列に対応する DNA 配列を有する degenerate プライマーを設計し、上記で調製した cDNA ライブラリーを鋳型としてポリメラーゼ・チェイン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCR と略記する) [モレキュラー・クローニング第2版および PCR Protocols Academic Press (1990)] を行い、増幅断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。

40

PCR 増幅断片の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 II SK(+), pBluescript SK(-) (いずれも Stratagene 社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+)[Stratagene 社製、Strategies, 5, 6264 (1992)]、pT7Blue [Novagen 社製]、pCR II [インビ

50

トロジェン社製、*Biotechnology*, 9, 657 (1991)]、pCR-T RAP [Genehunter社製]、pNOTA_T (5' 3'社製)等をあげることができる。

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、既知の1,3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を選択する。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シーケンサー[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。

10

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ブラン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、既知の1,3-ガラクトース転移酵素とホモロジーを有するポリペプチドをコードする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。

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373A・DNAシーケンサー[パーキン・エルマー(Perkin Elmer)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。

20

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号2のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、後述の実施例に記載したpAMo-3GT5、pBS-3GT5(FERM BP-6645)をあげることができる。上記のようにして取得したDNAを発現ベクターに組み込み、発現プラスミドを構築する。得られた発現プラスミドを適当な動物細胞に導入後、抗シアリルルイスa糖鎖抗体または抗シアリルルイスc糖鎖抗体を用いたフルオレッセンス・アクティベートッド・セル・ソーター(Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACSと略記する)解析により、該DNAがシアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖の合成に関与する1,3-ガラクトース転移酵素をコードするかどうかを調べることができる。

30

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで動物細胞で発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8(いずれもフナコシ社より市販)、pAGE107[特開平3-22979、*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)]、pREP4(インビトロジェン社製)、pAGE103[*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA[*J. Biol. Chem.*, 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRSA(特開平05-336963)]、pAS3-3(特開平2-227075)等を用いることができる。

40

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現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)、リポフェクション法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)]、*Virology*, 52, 456 (1973)に記載の方法等の方法をあげる

50

ことができる。

動物細胞としては、ヒトの細胞である Namalwa 細胞、Namalwa 細胞のサブラインである Namalwa KJM-1 細胞、サル細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、大腸癌細胞株である HCT-15 等をあげることができ、好ましくは、Namalwa 細胞、Namalwa KJM-1 細胞または HCT-15 をあげることができる。

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

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 RPMI 1640 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が用いられる。

培養は、通常 pH 6~8、25~40、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、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

該培養により得られた細胞を、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体または抗シアリルルイス c 糖鎖抗体を用いて蛍光染色した後、FACS を用いて解析することにより、該発現プラスミドを導入した細胞においてシアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖量が増加するかどうか検討する。シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖量が増加していれば、該 DNA はシアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖の合成に関する新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素をコードしていると考えられる。

シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖と反応する抗体であればいかなるものでも、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体または抗シアリルルイス c 糖鎖抗体として用いることができ、例えば、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体である 19-9 (Fuji re bio 社製) や KM231 (Kyowa Medex 社製)、あるいは抗シアリルルイス c 糖鎖抗体である DU-PAN-2 (Kyowa Medex 社製) をあげることができる。

以上のようにして、大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖に属する癌関連糖鎖の合成に関する、1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチドをコードする DNA を取得することができる。また、上記方法で取得した 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 記載のアミノ酸配列と比較して、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。

即ち、非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウシ、サル等由来の cDNA ライブラリーに対してスクリーニングを行うことにより、目的の DNA を取得することができる。

決定された新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素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目的の 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社製の DNA 合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製の DNA 合成機 model 392 等を用いて行うことができる。

また、後述のオリゴヌクレオチド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も、目的とする DNA を調製することができる。

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、あるいは DNA 合成機により、本発明の DNA の一部の配

10

20

30

40

50

列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、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。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2または3で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。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る場合には、両者の融解温度(T_m)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20, 21等に示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

10

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。

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あげることができる〔細胞工

20

(2)新規 1, 3-ガラクトース転移酵素ポリペプチド(以下、本発明のポリペプチドともいう)の製造

本発明のポリペプチドは、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、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、製造することができる。

30

本発明のポリペプチドをコードする全長DNAを基にして、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。

また、該ポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換したDNAを調製する。該DNAは該ポリペプチドの生産率を向上させるうえで有用である。

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNA(組換えベクター)を作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した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生産する形質転換体を得ることができる。

40

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込みが可能で、新規 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現ベクターは、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、新規 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成

50

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。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ（Promega）社製〕、pQE-8（キアゲン（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）〕、pBluescript IISK+（ストラタジーン社製）、pBluescript IISK（-）（ストラタジーン社製）、pTrs30（FERM BP-5407）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM B-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392（1990）〕、pGEX（ファルマシア社製）、pETシステム（ノバジエン社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社製）、pMAL-c2（New England Biolabs社製）、pUC19〔Gene, 33, 103（1985）〕、pSTV28（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）等を例示することができる。

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、P_{S_E}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プロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター（P_{trp} × 2）、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。

リボソーム結合配列であるシャイン-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。

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、構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

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、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイ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(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 AT

10

20

30

40

50

CC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。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 Acid 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Molecular & General Genetics, 168, 111(1979)に記載の方法等をあげることができる。

10

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)、YcP50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

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、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

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、ピチア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

20

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)記載の方法等をあげることができる。

30

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、pCDNA1/Amp、pCDNA1、pCDM8(いずれもフナコシ社より市販)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、pREP4(インビトロジェン社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307(1987)〕、pAMo、pAMoA〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787(1993)〕、別名pAMoPRSA(特開平05-336963)〕、pAS3-3(特開平2-227075)等を例示することができる。

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あげることができる。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。

40

宿主細胞としては、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、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63-29

50

9)、ヒト大腸癌細胞株等をあげることができる。

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(ATCC: CRL-1573)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、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

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)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)〕、Virology, 52, 456(1973)に記載の方法等をあげることができる。

10

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 サブルメント1~38(Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47(1988)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。

20

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。

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、pVL1393、pBlueBac111(すべてインビトロジェン社製)等をあげることができる。

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ィア・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。

30

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High 5、BTI-TN-5B1-4(インビトロジェン社製)等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

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)〕等をあげることができる。

40

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)〕等をあげることができる。

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

50

gy, 15, 45 (1997)) に準じてポリペプチドを生産することができる。

発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

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 プロモーター等をあげることができる。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あげることができる。

宿主細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、ニンジン、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

10

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 (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 2606856、特許第 2517813) 等をあげることができる。

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。

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。

20

培養は、通常 pH 5 ~ 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。

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。

動物個体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中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

30

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。

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。

40

形質転換体が動物個体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 のコードする新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有する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、新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有する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、卵等をあげることができる。

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、

50

該組換え体DNAのコードする新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有する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、新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

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、これら本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成・蓄積させ、該培養物から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。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

10

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、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、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物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、これらを含む糖蜜、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を用いることができる。

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、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、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を用いることができる。

20

無機塩としては、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。

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5時間 ~ 7日間である。

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。

30

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等を培地に添加してもよい。

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RPMI 1640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が用いられる。

40

培養は、通常pH6 ~ 8、25 ~ 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、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が昆虫細胞である場合、該細胞を培養する培地と

50

しては、一般に使用されているTNM-FH培地(ファーミンジェン社製)、Sf-900 I I SFM培地(ギブコBRL社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788(1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH6~7、25~30等の条件下で、1~5日間行う。

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。

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-ガラクトース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2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。

本発明の新規1,3-ガラクトース転移酵素の構造も、他の糖転移酵素と同様の構造を有している。

例えば、配列番号1で示されたアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドの場合、N末端の7アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも4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。他の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-ガラクトース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4アミノ酸からなると予想される。従って、31番目から310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。上記のポリペプチド全長または1,3-ガラクトース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・フルオロセセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープ等があげられる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474(1995)〕。

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を変えることにより、該方法を選択することができる。

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、WO94/23021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。

すなわち、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。

具体的には、触媒部位を含むと考えられる31番目から310番目までの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

10

20

30

40

50

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。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・フルオロセセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープ等があげられる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474(1995)〕。

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。

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。

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(ファルマシア社製)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、アフィ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。

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。

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。

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。

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、WO94/23021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)〕。

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。

10

20

30

40

50

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)〕に準じて、*in vitro* 転写・翻訳系を用いて生産することができる。

上記で取得されたポリペプチドのアミノ酸情報を基に、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本発明のポリペプチドを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、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテク社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所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。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク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。

本発明のポリペプチドの 1, 3-ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定法〔*J. Biol. Chem.*, 258, 9893-9898 (1983)、*J. Biol. Chem.*, 262, 15649-15658 (1987)、*Arch. Biochem. Biophys.*, 270, 630-646 (1989)、*Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 14-25 (1989)、特開平06-181759、*J. Biol. Chem.*, 273, 58-65 (1998)、*J. Biol. Chem.*, 273, 433-440 (1998)、*J. Biol. Chem.*, 273, 12770-12778 (1998)〕に準じて測定することができる。

(3) ガラクトースが 1, 3 結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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

上記(2)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なる群より選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが 1, 3 結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することにより、該糖鎖または該複合糖質を製造することができる。

ガラクトースが 1, 3 結合でN-アセチルグルコサミン残基に付加した構造を含有する糖鎖として、シアリルルイスa構造を含有する糖鎖、シアリルルイスc構造を含有する糖鎖、ルイスa構造を含有する糖鎖、ルイスb構造を含有する糖鎖、Gal 1-3 Gal 1-3 GlcNAc構造を含有する糖鎖、Gal 1-3 (Fuc 1-2) Gal 1-3 GlcNAc構造を含有する糖鎖、GalNAc 1-3 (Fuc 1-2) Gal 1-3 GlcNAc構造を含有する糖鎖等をあげることができる。

培養は上記(2)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、ガラクトースが 1, 3 結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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。

また、上記(2)で取得した動物個体または植物個体を用い、上記(2)の方法に準じて、ガラクトースが 1, 3 結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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。

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、ガラクトースが 1, 3 結合でN-アセチルグルコサミン、N

10

20

30

40

50

- アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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、該動物中より該生成物を採取することにより、ガラクトースが 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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。

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、卵等をあげることができる。

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、該植物中に、ガラクトースが 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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、ガラクトースが 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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。

上記(2)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、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または N - アセチルグルコサミン単糖に 1, 3 結合でガラクトースが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。

即ち、N - アセチルグルコサミン単糖、N - アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖、または N - アセチルグルコサミン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、上記(2)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 N - アセチルグルコサミンまたは N - アセチルグルコサミン残基に 1, 3 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。

上記(2)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、糖鎖の非還元末端に存在するグルコース残基またはグルコース単糖に 1, 3 結合でガラクトースが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。

即ち、グルコース単糖、グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはグルコ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、上記(2)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 UDP - Gal を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に 1, 3 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。

酵素源は、アガラクトラクト - N - ネオテトラオース (agalactolacto - N - neotetraose, GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc) を基質として、37 で 1 分間に 1 μ モルのラクト - N - テトラオース (lactolactose, Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc) を生成することのできる活性を 1 単位 (U) として、0.1 mU/l ~ 10,000 U/l であり、好ましくは 1 mU/l ~ 1,000 U/l の濃度で用いる。

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、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。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。更に、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。

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 -

10

20

30

40

50

215、日本油脂社製)等の非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブ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F2-40E、日本油脂社製)等のカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネート等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FB、日本油脂社製)等の三級アミン類等、Gal含有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0.1~50g/lの濃度で用いられる。

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、酢酸エチル等が挙げられ、通常0.1~50ml/lの濃度で用いられる。

UDP-Gal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-Galは0.1~500mmol/lの濃度で用いることができる。

上記において、N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖としては、GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc、GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc、GlcNAc 1-3(GlcNAc 1-6)Gal 1-4Glc、GlcNAc 1-3(GlcNAc 1-6)Gal 1-4GlcNAc、GlcNAc 1-3GalNAc、GlcNAc 1-6GalNAc、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等をあげることができる。N-アセチルグルコサミン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、あるいはアシアロアガラクト複合型N結合型糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

受容基質は0.01~500mmol/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MnCl₂等の無機塩、-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、pH5~10、好ましくはpH6~8、20~50の条件で1~96時間行う。

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)〕。

(4)本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製

(i)ポリクローナル抗体の作製

上述(2)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、あるいは本発明のポリペプチド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。

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50~100μg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等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。

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。

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、該血清より、下記方法によりポリクローナル抗体を分離、精製することができる。

抗体を分離、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あげられる。

(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。

(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。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} mol/l)、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。

(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(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸-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。

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、MEM 2ml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。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} mol/l)、チミジン(1.5×10^{-5} mol/l)およびアミノプテリン(4×10^{-7} mol/l)を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

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、

10

20

30

40

50

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。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

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る。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う。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。

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。

(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) 0.5ml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 $5 \sim 2.0 \times 10^6$ 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、3,000rpm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。

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。抗体のクラスとは抗体のアイソタイプのこと、ヒトでは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEがあげられる。サブクラスとは、クラス内のアイソタイプのこと、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられる。

抗体のタンパク質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(5)本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等への利用
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)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132(1992)〕を用いた癌転移抑制等の疾病の治療、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いたそれら癌の診断に利用することが可能である。

例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体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、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

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、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DNAの発現量を定量することができる。

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、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

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。した

10

20

30

40

50

がって、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、該遺伝子の構造を明らかにできる可能性がある。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。

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があげられる。例えば、ヒト大腸癌細胞あるいはヒト膵臓癌細胞で、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プロモーター領域をあげることができる。具体的には、例えば、配列番号 3 で表される塩基配列の 1 ~ 5000 番目の塩基配列中の連続する 50 ~ 5000 bp の配列を有するプロモーター DNA をあげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング法に利用することができる。

糖転移酵素遺伝子には多型や変異が存在することが知られている。例えば、ABO 式血液型の決定に関与する糖転移酵素に関しては、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより以下の 3 種の酵素が生成される。

A 型抗原の合成に関与する 1, 3 - N - アセチルガラクトサミン転移酵素、B 型抗原の合成に関与する 1, 3 - ガラクトース転移酵素、および O (H) 型糖鎖の生成に関与する活性を持たない酵素 [Nature, 345, 229 - 233 (1990)]。

またルイス式血液型の決定に関与する 1, 3 - フコース転移酵素 (Fuc - TII) の場合も、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより、活性が低下または消失した酵素が生成することが知られている [J. Biol. Chem., 269, 29271 - 29278 (1994)、Blood, 82, 2915 - 2919 (1993)、J. Biol. Chem., 269, 20987 - 20994 (1994)、J. Biol. Chem., 272, 21994 - 21998 (1997)]。

Fuc - TII 遺伝子の多型は、大腸癌における癌関連糖鎖抗原であるシアリルルイス a 糖鎖の発現と密接な関係があることが知られている [Cancer Res., 56, 330 - 338 (1996)、Cancer Res., 58, 512 - 518 (1998)]。

従って、Fuc - TII の多型を調べることにより、病気の診断や予後の予測を行うことができると考えられる。

本発明の新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素は、大腸癌や膵臓癌においてシアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖の合成に関与することから、本遺伝子の多型を調べることにより、大腸癌や膵臓癌の診断や予後の予測に利用できる。

また、本遺伝子の多型と、本遺伝子が発現している臓器 (胃、空腸、大腸、膵臓など) における疾患との関連を調べることにより、他の疾患の診断にも利用できる。

本遺伝子の多型解析は、本遺伝子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、サザンブロット法、ダイレクトシーケンシング法、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)]。

(6) 本発明のポリペプチドの利用

(a) 本発明の抗体作製への利用

本発明のポリペプチドを用い、上記 (4) の方法により本発明の抗体を作製することができる。

(b) 本発明のポリペプチドを用いる糖鎖、複合糖質製造への利用

本発明のポリペプチドを用い、ガラクトースが 1, 3 結合で N - アセチルグルコサミン、N - アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコ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。

(c) 本発明のポリペプチドの活性に関与する物質のスクリーニングへの利用

本発明のポリペプチドは、下記 (8) の (a) の方法により、該ポリペプチドの活性を増

10

20

30

40

50

強または阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

(7) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量

本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、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、免疫組織染色法等をあげることができる。

免疫学的定量法としては、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 E L I S A 法、^{1 2 6}I 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をあげることができる。

上記検出あるいは定量法は、大腸癌、膵臓癌等の診断に利用することができる。

(b) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、医薬、例えば大腸癌、膵臓癌等の疾患の治療薬として用いることができる。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該化合物単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、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、治療に際して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。

経口投与に適当な製剤としては、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、大豆油等の油類、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。

非経口投与に適当な製剤としては、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、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物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。該化合物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。

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 $10 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 8 \text{mg} / \text{kg}$ である。

(8) スクリーニング法への応用

本発明の新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素ポリペプチドは、大腸癌細胞や膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖の合成に関与することから、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるタイプ 1 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。

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、細胞にお

10

20

30

40

50

けるタイプ1糖鎖の合成量を制御することが可能である。

タイプ1糖鎖の合成量を抑制する化合物は、癌転移抑制に有用と考えられる。一方、タイプ1糖鎖の合成量を増加させる化合物は、タイプ1糖鎖の合成に有用と考えられる。

上記の化合物は、以下(a)~(e)に示す方法により取得可能である。

(a) 上記(2)で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド(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、被験試料の存在下、公知の方法〔*J. Biol. Chem.*, 258, 9893 - 9898 (1983)、*J. Biol. Chem.*, 262, 15649 - 15658 (1987)、*Arch. Biochem. Biophys.*, 270, 630 - 646 (1989)、*Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 14 - 25 (1989)、特開平06 - 181759、*J. Biol. Chem.*, 273, 58 - 65 (1998)、*J. Biol. Chem.*, 273, 433 - 440 (1998)、*J. Biol. Chem.*, 273, 12770 - 12778 (1998)〕を用いて 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を測定し、1, 3 - ガラクトース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・取得する。

10

(b) 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、被験試料の存在下、上記(2)の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のシアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖等のタイプ1糖鎖の量を、それぞれの糖鎖に対する抗体を用いて測定し、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・取得する。

20

上記抗体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ELISA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あげることができる。

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)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(4)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・取得する。

本発明の抗体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ELISA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あげることができる。

30

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、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遺伝子転写産物の量を、上記(5)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR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・取得する。

(e) 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)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、被験試料の存在下、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・取得する。

40

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遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 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、エクオリン遺伝子またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

50

(9) ノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする非ヒト動物、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)〕。

このようにして作成した胚性幹細胞クローンと、非ヒト動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)を用い、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。

該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双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト非ヒト動物)を得ることができる。

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。

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。

このような例として、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た例〔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た例〔Science, 278, 5335, (1997)〕が知られている。

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ノックアウト非ヒト動物を作製することが可能である。

このようなノックアウト非ヒト動物は任意の時期、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、本発明のノックアウト非ヒト動物は、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。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された方法を用いた。

実施例1 各種細胞株におけるタイプ1糖鎖の発現量と既知 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量の測定

各種ヒト癌細胞株におけるタイプ1糖鎖(シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖)の発現量と既知のヒト 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を測定することにより、大腸癌細胞株あるいは膵臓癌細胞株でタイプ1糖鎖の合成に参与する 1, 3 - ガラクトース転移酵素の同定を試みた。

各種細胞株におけるタイプ1糖鎖(シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖)の発現量の測定は、抗シアリルルイスa糖鎖抗体、抗ルイスa糖鎖抗体、または抗ルイスb糖鎖抗体を用いた蛍光抗体染色後、FACSを用いて解析することにより行った(第1図のA)。

各種ヒト細胞株における既知 1, 3 - ガラクトース転移酵素(3Gal-T1、3Gal-T2、3Gal-T3、3Gal-T4)遺伝子の転写物の定量は、RT-PCR法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725(199

10

20

30

40

50

0)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759、J. Biol. Chem., 273, 26729 (1998)]を用いて行った。各種細胞株における各 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる - アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した(第1図のB)。

(1) 各種細胞株におけるタイプ1糖鎖(シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖)の発現量の測定

細胞株としては、大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、胃癌細胞株(KATOIII、MKN45、MKN74)、肺癌細胞株(PC-1)、神経芽細胞腫細胞株(SK-N-MC、SK-N-SH)、リンパ腫細胞株(Namalwa、Jurkat)、前立腺癌細胞株(PC-3)を用いた。

Colo205、Colo201、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620、Capan-1、Capan-2、KATOIII、MKN45、MKN74、PC-1、SK-N-MC、SK-N-SH、Namalwa、PC-3はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection; ATCC)より入手した。また、SW1116(ATCCより入手可能)およびJurkat(理研ジーンバンク; RIKEN GENE BANKより入手可能)は愛知県がんセンターの高橋博士より入手した。

上記の細胞をそれぞれの細胞に適した培地で培養後、各細胞を抗シアリルルイスa糖鎖抗体(19-9)、抗ルイスa糖鎖抗体(7LE)、または抗ルイスb糖鎖抗体(Neokokusai社製)を用いて蛍光抗体染色し、FACSを用いて解析した。

具体的方法を以下に示す。

各細胞(約 1×10^6)をマイクロチューブ(1.5ml:エッペンドルフ社製)にとり、遠心分離($550 \times g$ 、7分間)により細胞を集めた。

該細胞を0.9mlの0.1%のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液PBS(A-PBS: 8g/l NaCl、0.2g/l KCl、 $1.15 \text{ g/l Na}_2\text{HPO}_4$ (無水)、 $0.2 \text{ g/l KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%アジ化ナトリウム)で洗浄した後、該洗浄細胞にA-PBSで約 $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈した上記抗糖鎖抗体を $20 \mu\text{l}$ 加えて懸濁し、4 で1時間反応させた。

反応後、細胞を0.9mlのA-PBSで1回洗浄した後、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)で蛍光標識した抗マウスIgM/IgG抗体(Bio-Rad社製)をA-PBSで16倍希釈した溶液を $20 \mu\text{l}$ 加えて懸濁し、4 で30分間反応させた。

反応後、細胞を0.9mlのA-PBSで1回洗浄した後、0.6mlのA-PBSに懸濁し、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター[エピックス・エリート・フローサイトメーター(EPICS Elite Flow Cytometer); コールター(COULTER)社製]を用いて解析を行なった。また対照実験として、抗糖鎖抗体の代わりにA-PBSを用いて同様の解析を行なった。

結果を第1図のAに示す。大腸癌細胞株であるColo205、Colo201、SW1116、および膵臓癌細胞株であるCapan-2においてタイプ1糖鎖が多く発現していること確認した。

(2) 各種ヒト細胞株における既知 1, 3 - ガラクトース転移酵素(3Gal-T1、3Gal-T2、3Gal-T3、3Gal-T4)遺伝子の転写物の定量

(a) 各種細胞株由来一本鎖cDNAの調製

上記(1)記載の細胞株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]により全RNAを抽出した。

全RNA各々 $6 \mu\text{g}$ に、デオキシリボヌクレアーゼI(Life Technology

10

20

30

40

50

e s社製)を5単位/mlずつ添加し、室温で5分間反応させた。反応後、65℃で15分間加熱することにより、酵素を失活させた。

得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーを用いてSUPERSCRIPTTM Pre-amplification System for First Strand cDNA System(Life Technologies社)によりcDNAを合成した。反応は20μlで行い、反応後の溶液を水で50倍希釈し、使用するまで-80℃で保管した。

(b)スタンダードと内部コントロールの調製

検量線の作成に用いるスタンダードとしては、ヒト 3Gal-T1、ヒト 3Gal-T2、ヒト 3Gal-T3、ヒト 3Gal-T4の各cDNAをpUC119または pBluescript SK(-)に組み込んだプラスミド(pUC119-3GT1、pBS-3GT2、pBS-3GT3、pBS-3GT4)を、各cDNA部分を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものをを用いた。

pUC119-3GT1は、特開平6-181759記載のプラスミドpUC119-WM1(FERM BP-4011)と同じものである。ヒト 3Gal-T2、ヒト 3Gal-T3およびヒト 3Gal-T4の各cDNAの取得は、以下のように行った。各cDNAの配列に特異的なプライマーを用いてPCRを行うことにより各cDNAの断片を取得した。

取得された各cDNA断片をプローブとして用いて、コロニーハイブリダイゼーションまたはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、それぞれのcDNAを取得した。ヒト 3Gal-T2、ヒト 3Gal-T3およびヒト 3Gal-T4の塩基配列を、LI-COR社のDNAシーケンサー(dNA sequencer model 4000L)またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー377と、各シーケンサー用の反応キットを用いて決定し、それぞれヒト 3Gal-T2、ヒト 3Gal-T3、ならびにヒト 3Gal-T4をコードすることを確認した。各cDNAは公知の配列をもとにしたPCRによっても得ることができる。

- アクチンの転写産物定量用のスタンダードとしては、pUC119-ACT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に変換したものをを用いた〔J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759〕。

内部コントロールとしては、下記のようにして調製したプラスミド(pBS-3GT1d、pBS-3GT2d、pBS-3GT3d、pBS-3GT4d)を、各cDNAを切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものをを用いた。

pUC119-3GT1において、ヒト 3Gal-T1cDNA中のBanII-EcoRV間212bpを欠失させることによりpUC119-3GT1dを作製した。

pBS-3GT2において、ヒト 3Gal-T2cDNA中のAflIII-BstEII間258bpを欠失させることによりpBS-3GT2dを作製した。

pBS-3GT3において、ヒト 3Gal-T3cDNA中のStyI-StyI間183bpを欠失させることによりpBS-3GT3dを作製した。

pBS-3GT4において、ヒト 3Gal-T4cDNA中のAccIII-StyI間253bpを欠失させることによりpBS-3GT4dを作製した。

- アクチンの転写産物定量用の内部コントロールとしては、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に変換したものをを用いた〔J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759〕。

(c)RT-PCRによる転写量の定量

上記各組織由来のcDNA 10μlおよび内部コントロール用プラスミド 10μl(10fg)を含む50μlの反応溶液〔10mmol/l Tris-HCl(pH8.3)、50mmol/l KCl、1.5mmol/l MgCl₂、0.2mmol/l dNTP、0.001%(w/v)ゼラチン、0.2μmol/l 遺伝子特異的プ

10

20

30

40

50

ライマー]で、DNAポリメラーゼ AmpliTaq GoldTM (Parkin Elmer社製)を用いてPCRを行った。

各遺伝子特異的プライマーの塩基配列を第1表に示した。また、3Gal-T1遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号4、5に、3Gal-T2遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号6、7に、3Gal-T3遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号8、9に、3Gal-T4遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号10、11に、 β -アクチン特異的プライマーの塩基配列を配列番号12、13に示した。

第1表 定量的PCRに使用した条件とプライマー

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR産物のサイズ (bp)		アニーリング 温度 (°C)
		ターゲット	コンペティター	
β 3Gal-T1	F: 5'-TTCAGCCACCTAACAGTTGCCAGG- R: 5'-ATACCTTCTTCGTGGCTTGGTGGAG-	495	283	60
β 3Gal-T2	F: 5'-TAGAAGCTAGAAGAGCTATTCCGGC- R: 5'-ACTCCCCAGTGATTGAACACAAAC-	616	358	60
β 3Gal-T3	F: 5'-CCCAATGCCAAGTACGTAATGAAG- R: 5'-TGTGGTGTTCCTTAGCATGACCTG-	474	291	60
β 3Gal-T4	F: 5'-TTGATCCCCAACCAGGAAGCTTGC- R: 5'-TGAGGCCACTGCTCCTCTGATACG-	590	337	68
β 3Gal-T5	F: 5'-ACCACCAGCAGTGCAGCCGGAAC- R: 5'-GCCACGATCCTCCTGAAGAGGCA-	554	410	65
β -Actin	F: 5'-GATATCGCCCGCTCGTCTCGTGCAC- R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-	789	639	60

*F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー

上記プライマーのセットにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードからは、第1表のターゲットのところに示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。一方、上記プライマーのセットにより、各内部コントロールからは、第1表のコンペティターのところに示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCRは、95°Cで11分間の加熱後、95°Cで1分間、各遺伝子に適した第1表に記載のアニーリング温度で1分間、72°Cで2分間からなる反応を1サイクルとして、1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子群については42サイクル、 β -アクチンについては24サイクルの条件で行った。

PCR後の溶液のうち10 μ lを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、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ニ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。

細胞由来cDNAのかわりに上記で調製したスタンダードプラスミドを1.25 fg、2.5 fg、5 fg、10 fg、20 fg、40 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。

この検量線と各細胞由来cDNAでの断片の増幅量から、各細胞でのcDNAの量を計算し、これを各細胞でのmRNA転写量すなわち遺伝子の発現量とした。なお、 β -アクチンは各細胞で普遍的に発現している遺伝子と考えられるため、どの細胞においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各細胞における β -アクチン遺伝子の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるため1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を比較する際に β -アクチンの発現量も考慮した。

各種細胞株における各1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した(第1図のB)。

3Gal-T1、3Gal-T2および3Gal-T3はGal1-3GlcnAc構造を合成する活性を有しているが、タイプ1糖鎖を多く発現している大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-

10

20

30

40

50

2)ではほとんど発現していなかった。一方、3Gal-T4は大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-2)で発現がみられたが、この酵素はGal-1-3GlcNAc構造を合成する活性を有していないことが明らかになっている。

以上の結果から、これらの細胞株においてタイプ1糖鎖の合成に関与している1,3-ガラクトース転移酵素は、新規の酵素であることが明らかになった。

実施例2 大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与する、新規1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子(cDNA)のクローン化

(1)ヒト大腸癌細胞株Colo205からのmRNAの取得

ヒト大腸癌細胞株Colo205より、ロッシュ(Roche)社製のmRNA抽出キットであるOligotexTM-dT30<super>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。

(2)ヒト大腸癌細胞株Colo205由来cDNAのライブラリーの作製

上記(1)で取得したヒト大腸癌細胞株Colo205由来のmRNA 8μg、およびGIBCO BRL社製のキット(SUPERSCRIPT Choice System for cDNA Synthesis)を用い、オリゴdTをプライマーとして2本鎖cDNAを合成した。

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リンカーの付与〕

配列番号14で示された一本鎖DNAおよび配列番号15で示された一本鎖DNAをアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

該合成一本鎖DNAをそれぞれ50μgずつ、別々に50mmol/l トリス-HCl (pH7.5)、10mmol/l MgCl₂、5mmol/l ジチオスレートール(以下、DTTと略記する)、0.1mmol/l EDTAおよび1mmol/l ATPを含む緩衝液(以下、T4キナーゼ緩衝液と略記する)50μl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、11塩基および8塩基のリンカーを取得した。

11塩基のリンカー4μg、8塩基のリンカー2.9μgおよび上記で合成した2本鎖cDNAをT4リガーゼ緩衝液45μl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DNA各々にSfiIリンカーを付与した。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.5kb以上のDNA断片を回収した。

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)〕24μgを、10mmol/l トリス-HCl (pH7.5)、6mmol/l MgCl₂、50mmol/l NaCl、6mmol/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)590μl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時間消化反応を行なった。

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

上記で調製したSfiIリンカーを付与したDNA(mRNA 8μg由来分)をT4リガーゼ緩衝液250μlに溶解後、それぞれの溶解液に、該約8.8kbのDNA断片2μgおよびT4DNAリガーゼ2000単位を加えて、16℃で16時間結合反応を行なった。

反応後、それぞれの反応液にトランスファーRNA(tRNA)5μgを添加し、エタノール沈殿後、10mmol/l トリス-HCl (pH8.0)および1mmol/l

10

20

30

40

50

EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム) からなる緩衝液 (以下、TE 緩衝液と略記する) 20 μ l に溶解した。

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。

更に、該cDNAライブラリー (大腸菌) および、キアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである *plasmid/maxi kit* (商品番号41031) を用い、cDNAを含有するプラスミドを調製した。

(3) *degenerate* プライマーを用いた新規 1, 3 - ガラクトース転移酵素 cDNA断片の取得

既知の4種の 1, 3 - ガラクトース転移酵素 (β Gal-T1、 β Gal-T2、 β Gal-T3、 β Gal-T4) のアミノ酸配列を比較することにより、4種の 1, 3 - ガラクトース転移酵素でアミノ酸配列がよく保存されている領域を3ヶ所以上見出した。該3領域をN末端側から順にモチーフ1、モチーフ2、モチーフ3と呼ぶ。上記4種の 1, 3 - ガラクトース転移酵素における各モチーフのアミノ酸配列と各モチーフの最初のアミノ酸のN末端からの番号を第2表に示す。

第2表 β Gal-Tファミリーにおいて保存されたアミノ酸配列モチーフ

	モチーフ 1	モチーフ 2	モチーフ 3
β Gal-T1	A ⁹⁹ IRETWG	Y ¹⁷² VMKTDSD	E ²⁶⁴ DVYVGLC
β Gal-T2	A ¹⁶⁹ IRQTWG	Y ²⁴⁷ VMKTDSD	E ³⁴⁰ DVYVGIC
β Gal-T3	A ⁹⁶ IRVTWG	Y ¹⁷⁵ VMKTDTD	E ²⁶⁶ DVYVGIC
β Gal-T4	A ⁸⁹ IRASWG	Y ¹⁷⁰ VLKTDDD	E ²⁹⁰ DFYVGVG

公知の方法 [Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab. (1995)、井上純一郎・仙波憲太郎編、ザ・プロトコールシリーズ「cDNAクローニング」、羊土社、(1996年)、Science, 241, 42 (1988)] に従って、各モチーフのアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する *degenerate* プライマーを設計した。フォワードプライマーとしてモチーフ1とモチーフ2に対応する2種の合成DNA (それぞれの配列を配列番号16と配列番号17に示す) を合成した。また、リバープライマーとして、モチーフ2とモチーフ3に対応する2種の合成DNA (それぞれの配列を配列番号18と配列番号19に示す) を合成した。

配列番号16記載のDNAと配列番号18記載のDNAをプライマー、上記(2)で調製したcDNAライブラリー (プラスミド) を鋳型としてPCRを行い、増幅断片の末端をDNAポリメラーゼ クレノー断片を用いて平滑末端に変換した後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) のEcoRVサイトにサブクローニングした。また、配列番号17記載のDNAと配列番号19記載のDNAをプライマー、上記(2)で調製したcDNAライブラリー (プラスミド) を鋳型としてPCRを行い、増幅断片の末端をDNAポリメラーゼ クレノー断片を用いて平滑末端に変換した後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) のEcoRVサイトにサブクローニングした。

上記(2)で調製したcDNAライブラリー (プラスミド100ng) 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%

10

20

30

40

50

(w/v)ゼラチン、0.2 μmol/l プライマー}に、1 UのDNAポリメラーゼ AmpliTaq GoldTM (Parkin Elmer社)を添加し、PCRを行った。

PCRは、95 で11分間の加熱後、95 で30秒間、35 で1分間、72 で2分間からなる反応を1サイクルとして、45サイクルの条件で行った。

サブクローニングしたPCR増幅断片の塩基配列は、EPICENTRE TECHNOLOGIES社のキット(SequitHerM EXCEL II Long-Read DNA Sequencing kit-ALF: Catalog No. SE8301A)とALF DNAシーケンサー(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を用いて決定した。

10

その結果、配列番号16記載のDNAと配列番号18記載のDNAをプライマーとして用いたPCRにより、既知の1,3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を1種取得した。該DNA断片のプライマー部分を除く配列は、配列番号2記載のDNAの643番目から851番目の塩基配列と一致していた。

また、配列番号17記載のDNAと配列番号19記載のDNAをプライマーとして用いたPCRにより、既知の1,3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を1種取得した。

該DNA断片のプライマー部分を除く配列は、配列番号2記載のDNAの876番目から1124番目の塩基配列と一致していた。

20

(4)新規1,3-ガラクトース転移酵素cDNAの取得

上記(3)で取得した2種のPCR増幅断片を混合後、マルチプライムDNA標識システム(アマシャム社)を用いて³²Pで標識し、プローブを作製した。

該プローブを用いて、上記(2)で作製したcDNAライブラリーの内の5 × 10⁵クローンについてコロニーハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度のSSPE〔1倍濃度のSSPEの組成は、180 mmol/l 塩化ナトリウム、10 mmol/l リン酸二水素ナトリウム、1 mmol/l エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)よりなる(pH 7.4)〕、0.1% SDSよりなる緩衝液中で65、10分間振とうする条件で2回、1倍濃度のSSPE、0.1% SDSからなる緩衝液中で65、15分間振とうする条件で1回、0.2 × SSPE、0.1% SDSからなる緩衝液中で65、10分間振とうする条件で2回洗浄した。

30

該コロニーハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする2個の独立したプラスミドが得られた。

(5)プラスミドpAMo-3GT5中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定

上記(4)で得られたプラスミドの1つであるpAMo-3GT5が含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。

pAMoベクター中の配列に特異的なプライマーを用いて、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。

40

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。

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー(dNA sequencer model 4000L)と反応キット(SequitHerM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc:エア・ブラウン)、またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット(ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: Applied Biosystems社)を使用した。

pAMo-3GT5が含むcDNAの全塩基配列(2775 bp)を配列番号2に示した

50

。該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する310アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。

該ポリペプチドはこれまでにクローン化された4種のヒト 1,3-ガラクトース転移酵素(3Gal-T1、3Gal-T2、3Gal-T3、3Gal-T4)とアミノ酸レベルで28%~37%の相同性を示したことから、新規な1,3-ガラクトース転移酵素であると考えられた。該アミノ酸配列のホモロジー解析は、配列解析ソフトGENETYX-MAC 10.1(ソフトウエア開発株式会社)を用いて行った。一致したアミノ酸残基数を3Gal-T5のアミノ酸残基数で割ることにより、ホモロジー(%)を算出した。

10

該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

該ポリペプチドは、N末端の7アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも4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。他の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-ガラクトース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4アミノ酸からなる予想された。したがって、31番目から310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。

以下、該cDNAをヒト3Gal-T5 cDNA、該cDNAがコードするポリペプチドをヒト3Gal-T5と呼ぶ。

20

pAMo-3GT5をHindIIIとNotIで切断することによりヒト3Gal-T5 cDNAを切り出し、pBluescript IISK(+)のHindIIIとNotIサイト間に組み込むことにより、pBS-3GT5を造成した(第2図)。pBS-3GT5を含む大腸菌であるEscherichia coli MM294/pBS-3GT5は、平成11年2月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 郵便番号305-8566)にFERM BP-6645として寄託されている。

(6)ヒト3Gal-T5発現プラスミドを導入したヒト培養細胞におけるタイプ1糖鎖の合成

コントロールプラスミド(pAMo)およびヒト3Gal-T5発現プラスミド(pAMo-3GT5)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Namalwa細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

30

1.6×10^6 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)〕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(ギブコ社製)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を含むRPMI1640で継代した。

40

該形質転換細胞について、抗シアリルルイスd糖鎖抗体(DU-PAN-2:Kyowa Medex社製)を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

間接蛍光抗体染色は、実施例1の(1)に記載した方法に従って行った。その結果、pAMo-3GT5を導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞に比較して、抗シアリルルイスc糖鎖抗体(DU-PAN-2)への反応性が大幅に増加していた(第3図のA)。

また、コントロールプラスミド(pAMo)およびヒト3Gal-T5発現プラスミド(pAMo-3GT5)を上記と同様の方法により、タイプ1糖鎖を発現していない大腸

50

癌細胞株である HCT - 15 に導入し、安定形質転換細胞を得た。次いで、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 (HCT - 3GT5L および HCT - 3GT5H) を取得した。HCT - 3GT5L における 3Gal - T5 転写物の量は、HCT - 3GT5H における 3Gal - T5 転写物の量に比較して少ない (実施例 4 および第 3 表参照)。該シングルクローンは、0.8 mg/ml の G418 を含む RPMI 1640 で継代した。

取得したシングルクローン (HCT - 3GT5H) について、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体 (19-9)、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2: Kyowa Medex 社製)、抗ルイス a 糖鎖抗体 (7LE)、または抗ルイス b 糖鎖抗体 (ネオ国際社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

10

間接蛍光抗体染色は、実施例 1 の (1) に記載した方法に従って行った。その結果、pAmo - 3GT5 を導入した細胞においては、pAmo を導入した細胞に比較して、4 種の抗体全てへの反応性が大幅に増加していることが明らかになった (第 3 図の B)。

以上の結果から、3Gal - T5 は形質転換細胞中で、タイプ 1 糖鎖 (シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖およびルイス b 糖鎖) を合成可能であることが示された。

またこの結果は、3Gal - T5 を細胞で発現させることにより、タイプ 1 糖鎖 (シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖およびルイス b 糖鎖等) を含有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質を新たに合成できることを意味している。

以上のことより、3Gal - T5 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、分泌生産される糖タンパク質にタイプ 1 糖鎖 (シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖およびルイス b 糖鎖等) を付与することが可能である。

20

(7) 各種ヒト細胞株におけるヒト 3Gal - T5 遺伝子の転写物の定量

実施例 1 の (2) の方法に従って、ヒト 3Gal - T5 遺伝子の転写物の定量を行った。

鋳型として用いる各種細胞株由来一本鎖 cDNA は、実施例 1 (1) で調製したものを使用した。

検量線の作成に用いるスタンダードとしては、上記 (5) で造成したヒト 3Gal - T5 cDNA を pBluescript II SK (+) に組み込んだプラスミド (pBS - 3GT5) を、cDNA 部分を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状 DNA に変換したものをを用いた。

30

内部コントロールとしては、下記のようにして調製したプラスミド (pBS - 3GT5d) を、cDNA を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状 DNA に変換したものをを用いた。

pBS - 3GT5 において、ヒト 3Gal - T5 cDNA 中の Eco81I - XcmI 間 144 bp を欠失させることにより pBS - 3GT5d を作成した。

RT - PCR による転写量の定量は、3Gal - T5 特異的プライマーを用いて、実施例 1 の (2) と同様にして行った。3Gal - T5 特異的プライマーの塩基配列を第 1 表ならびに配列番号 20、21 に示した。

40

3Gal - T5 特異的プライマーにより、3Gal - T5 遺伝子転写産物およびスタンダードからは、第 1 表のターゲットのところに示したサイズ (554 bp) の DNA 断片を増幅させることができる。一方、上記プライマーにより、内部コントロールからは、第 1 表のコンペティターのところに示したサイズ (410 bp) の DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 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、42 サイクル繰り返す条件で行った。

各種細胞株における 3Gal - T5 遺伝子転写産物の量を、 α -アクチンの転写産物の量を 1000 とした時の相対値として表示した (第 4 図の A)。

3Gal - T5 転写産物は、タイプ 1 糖鎖を多く発現している大腸癌細胞株 (Colo

50

205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-2)で発現していることが判明した。また、 β Gal-T5転写産物の発現は、タイプ1糖鎖の発現(第1図参照)とよく相関していた。

以上の結果と上記(5)および(6)の結果を総合すると、 β Gal-T5は、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖やシアリルルイスc糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与する、新規 β 1,3-ガラクトース転移酵素であると結論される。

(8)各種ヒト細胞株におけるCA19-9抗原含有タンパク質の発現

抗シアリルルイスa抗体(19-9)を用いたウエスタン・ブロッティング解析を行うことにより、大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、胃癌細胞株(KATOIII、MKN45、MKN74)におけるシアリルルイスa糖鎖含有タンパク質の発現について検討した。

19-9は大腸癌や膵臓癌における癌関連糖鎖の検出に利用されており、19-9で検出されるシアリルルイスa糖鎖抗原は、CA19-9抗原と呼ばれている。

各細胞(1×10^7 個)を、溶液[20mmol/l HEPES(pH7.2)、2% Triton X-100]に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。

該細胞溶解液のタンパク質濃度を、マイクロBCAタンパク質アッセイ試薬キット(PIERCE社)により測定し、10 μ gのタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した。

電気泳動後、Transblot SD cell(Bio-Rad社製)を用いて、ゲル上のタンパク質をImmobilon PVDf膜(Millipore社製)に移した。

該膜をブロッキング溶液(5%のスkimミルクを含むPBS)で4時間終夜処理することによりブロッキングした。

ブロッキング後、該膜をブロッキング溶液で希釈した10 μ g/mlの抗シアリルルイスa抗体(19-9)を用いて、室温で2時間処理した。

処理後、ECL Western blotting detection reagent(Amersham社製)を用いて該膜を処理することにより、19-9が結合したタンパク質の検出を行った。方法はキットの説明書に従った。

結果を第4図のBに示した。

CA19-9含有糖タンパク質の発現は、上記(7)で測定した β Gal-T5転写産物の発現(図4のA参照)とよく一致していた。一方、他のGlcNAc β 1,3-ガラクトース転移酵素(β Gal-T1、 β Gal-T2、 β Gal-T3)の転写物の発現は、CA19-9含有糖タンパク質の発現と相関していなかった。また、他のGlcNAc β 1,3-ガラクトース転移酵素(β Gal-T1、 β Gal-T2、 β Gal-T3)は、CA19-9含有糖タンパク質を高発現しているColo205やColo201で発現していなかった(第1図参照)。

以上の結果は、 β Gal-T5は大腸癌や膵臓癌等における癌関連抗原CA19-9の合成に関与する β 1,3-ガラクトース転移酵素であることを示している。更に、 β Gal-T5が糖タンパク質も基質として使用できることを示している。

実施例3 ヒト β Gal-T5の*in vitro*活性

実施例2で取得したヒト β Gal-T5 cDNAがコードするヒト β Gal-T5の*in vitro*での活性を以下のようにして調べた。

他の既知の β 1,3-ガラクトース転移酵素と活性を比較するため、ヒト β Gal-T1、ヒト β Gal-T2、ヒト β Gal-T3、ヒト β Gal-T4の各cDNAをpAMoに組み込んだ発現プラスミド(pAMo-3GT1、pAMo-3GT2、pAMo-3GT3、pAMo-3GT4)を造成した。

pAMo-3GT1は、特開平6-181759記載のプラスミドpUC119-WM1(FERM BP-4011)を構築するために用いたプラスミドpAMoPRWM1と

10

20

30

40

50

同じものである。

コントロールプラスミド (pAMo) または 5 種の 1, 3 - ガラクトース転移酵素発現プラスミド (pAMo - 3GT1、pAMo - 3GT2、pAMo - 3GT3、pAMo - 3GT4、または pAMo - 3GT5) を、実施例 3 に記載の方法と同様の方法により Namalwa 細胞に導入し、各形質転換細胞を得た。

実施例 1 の (2) と同様にして、該形質転換細胞から全 RNA を抽出し、定量的 RT - PCR を用いて、5 種の 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子の転写量を測定した。

結果を第 3 表に示す。

第 3 表 アガラクト LNT を基質とした時の β 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性と
各細胞における β 3Gal-T 転写物の発現量

細胞	%活性	β 3Gal-T 転写物の発現量 (β 3Gal-T/ β -actin $\times 10^3$)				
		β 3Gal-T5	β 3Gal-T1	β 3Gal-T2	β 3Gal-T3	β 3Gal-T4
Namalwa-mock	<1	<0.01	<0.01	2.1	<0.01	1.4
Namalwa-3GT1	<1	<0.01	56	2.1	<0.01	1.4
Namalwa-3GT2	<1	<0.01	<0.01	38	<0.01	1.4
Namalwa-3GT3	<1	<0.01	<0.01	2.1	42	1.4
Namalwa-3GT4	<1	<0.01	<0.01	2.1	<0.01	43
Namalwa-3GT5	100	35	<0.01	2.1	<0.01	1.4
HCT-3GT5L	18	5	<0.01	<0.01	2.2	0.1
HCT-3GT5H	48	16	<0.01	<0.01	2.2	0.1
Colo205	40	3.5	<0.01	<0.01	0.05	4.6
SW1116	22	1.4	<0.01	0.3	0.6	3.2
HCT-15	<1	<0.01	<0.01	<0.01	2.2	0.1
Capan-2	23	1.2	<0.01	<0.01	1.9	2.3
MKN45	<1	<0.01	0.04	0.5	66	<0.01
PC-1	<1	<0.01	27	0.3	<0.01	0.2

発現プラスミドを導入した細胞では、対応する 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子の転写量が、ベクターのみを導入した細胞に比較して増加していることが確認された。

一方、該形質転換細胞を溶液 [20 mmol/l HEPES (pH 7.2)、2% Triton X - 100] に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。

該細胞溶解液のタンパク質濃度は、マイクロ BCA タンパク質アッセイ試薬キット (PIERCE 社) により測定した。

該細胞溶解液を用いて、1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を測定した。

ピリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法 [特開平 6 - 181759、特開平 06 - 823021、J. Biol. Chem., 269, 14730 - 14737 (1994)] に準じて行った。

具体的には、活性測定は、10 μ l のアッセイ溶液 [14 mmol/l HEPES (pH 7.4)、75 μ mol/l UDP - Gal (SIGMA 社)、11 μ mol/l MnCl₂、0.01% Triton X - 100、25 μ mol/l ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液] 中で 37、2 時間反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生産物を同定することにより行った。

基質としては、アミノピリジンで蛍光標識したラクト - N - ネオテトラオース (Lact

10

20

30

40

50

o - N - neotetraose, Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc ; 以下、LNnTと略記する)を - ガラクトシダーゼ処理して末端のガラクトース残基を除去したもの(アガラクトLNnT, GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc)を使用した。

アガラクトLNnTは、約60nmolのアミノピリジンで蛍光標識したLNnTに対し、100ミリュニットの - 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 - ガラクトシダーゼを失活させることにより調製した。

スタンダードとしては、アミノピリジンで蛍光標識したLNnTまたはアミノピリジンで蛍光標識したラクト - N - テトラオース(Lacto - N - tetraose, Gal 1 - 3 GlcNAc 1 - 3 Gal 1 - 4 Glc ; 以下、LNTと略記する)を用いた。LNnTおよびLNT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。オリゴ糖の蛍光標識は、常法[*Agric. Biol. Chem.*, 54, 2169 (1990)]に従って行った。

UDP - Gal (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 - Galを含むアッセイ溶液中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3分間処理後、10,000 × gで5分間遠心して上清を取得し、その一部をHPLCに供した。HPLCは、TSK - gel ODS - 80Tsカラム(4.6 × 300mm; 東ソー社製)を使用し、溶出液として0.02mol/l 酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.0)を用い、溶出温度25、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)を用いて行った(励起波長320nm、放射波長400nm)。

生成物の同定は、スタンダードの糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトース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。

ヒト 3Gal - T5の活性を100とした時の、各 1, 3 - ガラクトース転移酵素の相対活性を第3表に示す。

ヒト 3Gal - T5を発現させた細胞では明らかな 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性(LNT合成活性)が検出されたが、他の 1, 3 - ガラクトース転移酵素を発現させた細胞では活性は検出されなかった。なお、コントロールプラスミド(pAmo)を導入した細胞でも活性は検出されなかった。

各 1, 3 - ガラクトース転移酵素発現プラスミドを導入した細胞において、各 1, 3 - ガラクトース転移酵素転写物は同程度発現していることから(第3表)、ヒト 3Gal - T5のGlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性(LNT合成活性)は他のGlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素(ヒト 3Gal - T1、ヒト 3Gal - T2、ヒト 3Gal - T3)に比較して強いことが判明した。なお、ヒト 3Gal - T4に関しては、GlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性はなく、GalNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有することが知られている。

以上の結果、ヒト 3Gal - T5はGlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素であることが証明された。また、ヒト 3Gal - T5の活性は他のGlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素(ヒト 3Gal - T1、ヒト 3Gal - T2、ヒト 3Gal - T3)に比較して強いことから、LNT等のタイプ1糖鎖の合成に有用であることが示された。

また、3Gal - T5転写産物の発現量とGlcNAc 1, 3 - ガラクトース転移酵素活性(LNT合成活性)が相関するかを検討するために、実施例2で取得した3Gal - T5発現プラスミドを導入したHCT - 15細胞(HCT - 3GT5LおよびHCT - 3GT5H)、ならびに実施例1で使用した大腸癌細胞株(Colo205、SW1116、HCT - 15)、膵臓癌細胞株(Capan - 2)、胃癌細胞株(MKN45)

10

20

30

40

50

および肺癌細胞株 (PC-1) について、 $^3\text{Gal-T5}$ 転写産物の発現量と $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) を測定した。

各細胞における $^3\text{Gal-T5}$ 転写産物の発現量は、実施例 1 または実施例 2 の (7) で記載した方法を用いて行った。 $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) の測定は、上記の方法に従った。

結果を第 3 表に示す。

その結果、 $^3\text{Gal-T5}$ 転写産物の発現量と $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) が相関することが判明した。例えば、HCT-3GT5H における $^3\text{Gal-T5}$ 転写物量は、HCT-3GT5L の約 3 倍であったが、HCT-3GT5H における $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) も HCT-3GT5L の約 3 倍であった。

一方、PC-1 では $^3\text{Gal-T1}$ を多く発現していたが、 $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) は検出されなかった。また、MKN45 では $^3\text{Gal-T3}$ を多く発現していたが、 $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) は検出されなかった。

以上の結果は、 $^3\text{Gal-T1}$ および $^3\text{Gal-T3}$ の $\text{GlcNAc } 1, 3\text{-Galactose}$ 転移酵素活性 (LNT 合成活性) は、 $^3\text{Gal-T5}$ に比較して弱いことを示しており、上記の Namalw 細胞を用いた結果と一致した。

実施例 4 $^3\text{Gal-T5}$ 遺伝子の各種臓器での発現

実施例 2 の (7) と同様にして、RT-PCR を用いてヒト各組織 (脳、肺、食道、胃 (体)、胃 (洞)、空腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、子宮、抹消リンパ球) における $^3\text{Gal-T5}$ 転写物の定量を行った。各組織における $^3\text{Gal-T5}$ 遺伝子転写産物の量を、 α -アクチンの転写産物の量を 1000 とした時の相対値として表示した (第 5 図)。

$^3\text{Gal-T5}$ 転写物は、胃 (体)、胃 (洞)、空腸、大腸、膵臓で有意に発現していることが明らかになった。また、脳、食道、腎臓、子宮でも少し発現がみられた。一方、肺、肝臓、脾臓、副腎、抹消リンパ球では発現はみられなかった。

実施例 5 $^3\text{Gal-T5}$ 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。したがって、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可能性がある。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。

$^3\text{Gal-T5}$ cDNA の塩基配列 (配列番号 2) と Genome Project Database に登録されている DNA 配列を比較した結果、登録番号 AF064860 の配列の一部に、 $^3\text{Gal-T5}$ の cDNA の配列が含まれていたことより、 $^3\text{Gal-T5}$ 染色体遺伝子はヒト染色体 21q22.3 に位置することが分かった。

$^3\text{Gal-T5}$ 染色体遺伝子のプロモーター領域を明らかにする目的で、5' RACE 法を用いて、Colo205 細胞より $^3\text{Gal-T5}$ cDNA の 5' 末端領域の取得を行った。5' RACE 法はキット (GIBCO 社製 5' RACE システム、バージョン 2.0) に従って行った。

Colo205 細胞由来の mRNA (1 μg) を鋳型、配列番号 22 および配列番号 23 に示す配列を有する 2 種の合成 DNA をプライマーとして、まず一本鎖 cDNA を合成した。合成後、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、該 cDNA の 3' 末端にオリゴ dC を付加した後、キットに添付されている dG テイルを有する合成 DNA をフォワードプライマー、配列番号 24 に示す配列を有する合成 DNA をリバースプライマーとして、PCR を行った。

PCR は、97 で 11 分間の加熱後、94 で 1 分間、55 で 1 分間、72 で 2 分

10

20

30

40

50

間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル繰り返す条件で行った。

増幅断片をHindIIIとSpeIで消化後、pBluescript SK(-)のHindIII-SpeI間にサブクローン化した。このようにして得られた5種のプラスミドについて塩基配列を決定した結果、Colo205細胞における3Gal-T5染色体遺伝子の転写開始点は上記の登録番号AF064860の配列上85153番目の塩基であることが明らかになった。

したがって、これより上流の領域は、少なくともColo205細胞において機能しているプロモーター領域であることが判明した。

3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域(転写制御領域を含む)は、転写開始点の上流の5kb(配列番号3で表される塩基配列の1~5000番)と推定される。

転写開始点の上流1kb(配列番号3で表される塩基配列の4001~5000番)について、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、TFSEARCH(transcription factor search)プログラム(Akiyama, Y., <http://www.rwcp.or.jp/lab/pdappl/papia.html>)を用いて解析した。

転写開始点の上流にTATAボックスは存在しなかったが、転写開始点の上流150bp中に、2つのCdxAサイト、1つのAP-1サイト、1つのMZF-1(myeloid zinc finger 1 protein)サイトが存在すると推定された。

該領域の下流にレポーター遺伝子を連結したプラスミドを、3Gal-T5を発現している細胞に導入し、レポーター遺伝子が発現するかどうかを検討することにより、プロモーター領域を実験的に特定することもできる。

3Gal-T5染色体遺伝子のエクソン領域とイントロン領域をさらに詳しく解析するために、PCR法を用いて3Gal-T5 cDNAのアイソフォームが存在するかどうかについて検討した。

実施例1で調製したColo205細胞由来の1本鎖cDNAを鋳型、配列番号22と配列番号25に示す配列を有する2種の合成DNAをプライマーとして、PCRを行った。PCRは、97で11分間の加熱後、94で1分間、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、42サイクル繰り返す条件で行った。

増幅断片をHindIIIで消化後、pBluescript SK(-)のHindIIIサイトにサブクローン化した。このようにして得られたプラスミドについて塩基配列を決定した結果、Colo205細胞において少なくとも5種類の3Gal-T5 cDNAアイソフォームが存在することが明らかとなった(第6図)。

各アイソフォームに相当するPCR増幅断片の量を比較することにより、各アイソフォームの発現量の比を求めたところ、アイソフォーム1が50%、アイソフォーム2が50%、アイソフォーム3、4、5はそれぞれ1%以下であった。各アイソフォームに相当するPCR増幅断片は、増幅断片の大きさと制限酵素処理(XbaI処理またはBsmI処理)により特定した。

以上の結果、3Gal-T5染色体遺伝子は4つのエクソンと3つのイントロンよりなることが明らかとなった。3Gal-T5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3Gal-T5染色体遺伝子の配列を合わせて配列番号3に示した。

3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域(転写制御領域を含む)の配列は、配列番号3の1~5000bpである。3Gal-T5染色体遺伝子の配列は、配列番号3の5001~10562bpである。3Gal-T5染色体遺伝子のエクソンとイントロンの位置を配列番号3の番号を用いて第4表に示した。第4表中において、大文字で示した塩基配列はエクソン部分、小文字で示した塩基配列はイントロン部分を示している。

3Gal-T5染色体遺伝子の構造(エクソン領域とイントロン領域の位置と配列)と染色体上の位置、ならびに3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域の位置と配列は、本研究によって3Gal-T5 cDNAの構造と機能が明らかになることにより、初めて特定できたものである。

10

20

30

40

第4表 β3Gal-T5染色体遺伝子のエクソン-イントロン結合部位

エクソン番号	配列番号3中の塩基配列番号	長さ (bp)	スプライスアクセプターサイトの配列	スプライスドナーサイトの配列
exon1	5001-5273	273	-----	CTGTACAGgtatttcc
exon1'	5001-5140	140	-----	CCAAGCAGgtttctgg
exon2	5459-5567	109	ctctctagAGAACCCT	GTTTGGAGgttagggct
exon3	7427-7586	160	tttcctagTGATTCCT	AGCAAAAgtgagtta
exon4	8234-10562	2329	cctttcagATGGCTTT	

10

産業上の利用可能性

本発明により、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、タイプ1糖鎖の合成に關与する 1, 3 - ガラクトース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タイプ1糖鎖含有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タイプ1糖鎖含有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大腸癌、膵臓癌、胃癌等の疾患の診断法、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活性を変動させる物質を用いた大腸癌、膵臓癌、胃癌等の疾患の治療法を提供することができる。

20

「配列表フリーテキスト」

- 配列番号4 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号5 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号6 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号7 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号8 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号9 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号10 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号11 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号12 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号13 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号14 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号15 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号16 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号17 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号18 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号19 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号20 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号21 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号22 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号23 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号24 - 人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号25 - 人工配列の説明：合成DNA

30

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL PEPTIDE

<130> 11192W01

<140>

10

<141>

<150> JP 99/47571

<151> 2000-02-25

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ala	Phe	Pro	Lys	Met	Arg	Leu	Met	Tyr	Ile	Cys	Leu	Leu	Val	Leu
1				5				10					15		

Gly	Ala	Leu	Cys	Leu	Tyr	Phe	Ser	Met	Tyr	Ser	Leu	Asn	Pro	Phe	Lys
			20					25					30		

30

Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Pro
		35					40					45			

Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Gln	Thr	Pro	Pro	Phe	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Thr
	50					55					60				

Ser	Ser	His	Lys	Gln	Leu	Ala	Glu	Arg	Met	Ala	Ile	Arg	Gln	Thr	Trp
65					70					75					80

40

Gly	Lys	Glu	Arg	Met	Val	Lys	Gly	Lys	Gln	Leu	Lys	Thr	Phe	Phe	Leu
				85						90					95

Leu Gly Thr Thr Ser Ser Ala Ala Glu Thr Lys Glu Val Asp Gln Glu	
100	105
	110
Ser Gln Arg His Gly Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Leu Asp Val Tyr	
115	120
	125
Tyr Asn Leu Thr Leu Lys Thr Met Met Gly Ile Glu Trp Val His Arg	
130	135
	140
Phe Cys Pro Gln Ala Ala Phe Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe	10
145	150
	155
	160
Ile Asn Val Asp Tyr Leu Thr Glu Leu Leu Leu Lys Lys Asn Arg Thr	
165	170
	175
Thr Arg Phe Phe Thr Gly Phe Leu Lys Leu Asn Glu Phe Pro Ile Arg	
180	185
	190
Gln Pro Phe Ser Lys Trp Phe Val Ser Lys Ser Glu Tyr Pro Trp Asp	20
195	200
	205
Arg Tyr Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Gly Asp	
210	215
	220
Val Ala Ser Gln Val Tyr Asn Val Ser Lys Ser Val Pro Tyr Ile Lys	
225	230
	235
	240
Leu Glu Asp Val Phe Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg	30
245	250
	255
Leu Glu Glu Leu His Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg	
260	265
	270
Phe Ser Val Cys Leu Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys	
275	280
	285
Pro Arg Thr Leu Leu Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly	40
290	295
	300
Glu Asp Cys Pro Pro Val	
305	310

<210> 2
 <211> 2775
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (402)..(1331)

<400> 2 10
 gtgaattcct ctttctctgc tggagctggg atattcttct tctctgccc ttggacatca 60
 gagctgcagg ctctctggcc tttggaccgg aggatttata ccaagcaggt ttctgggttc 120
 tcaggccttt ggccttggac tgatagttac accattggca tatctgggtc tgaggetett 180
 ggtettggac tgagccacac tcttggcacc ccagcgtctc cagcttgcac ggcctgtcac 240
 gtgattctg tcagaatcac catttttggg aaacaaacca agcccagaac ctgataatta 300 20
 tggagcattc tacaactgaca gttctttgag acaaatttcc tcttggcatt tacactgtgg 360
 ctttagcttt caaacagag gttctcttta cccagcaaaa a atg gct ttc ccg aag 416
Met Ala Phe Pro Lys
1 5

atg aga ttg atg tat att tgc ctt ctg gtt ctg ggg gct ctt tgt ttg 464
 Met Arg Leu Met Tyr Ile Cys Leu Leu Val Leu Gly Ala Leu Cys Leu 30
10 15 20

tat ttt agc atg tac agt cta aat cct ttc aaa gaa cag tcc ttt gtt 512
 Tyr Phe Ser Met Tyr Ser Leu Asn Pro Phe Lys Glu Gln Ser Phe Val
25 30 35

tac aag aaa gac ggg aac ttc ctt aag ctc cca gat aca gac tgc agg 560
 Tyr Lys Lys Asp Gly Asn Phe Leu Lys Leu Pro Asp Thr Asp Cys Arg 40
40 45 50

cag aca cct ccc ttc ctc gtc ctg ctg gtg acc tca tcc cac aaa cag 608
 Gln Thr Pro Pro Phe Leu Val Leu Leu Val Thr Ser Ser His Lys Gln
55 60 65

gtg ggg ctc tgc ctc gaa agg ctg aac atc aga ttg gag gag ctc cac	1184	
Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg Leu Glu Glu Leu His		
250 255 260		
tec cag ccg acc ttt ttt cca ggg ggc tta cgc ttc tcc gta tgc ctc	1232	
Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg Phe Ser Val Cys Leu		
265 270 275		
ttc agg agg atc gtg gcc tgc cac ttc atc aag cct cgg act ctc ttg	1280	10
Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys Pro Arg Thr Leu Leu		
280 285 290		
gac tac tgg cag gct cta gag aat tcc cgg ggg gaa gat tgt ccg cct	1328	
Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly Glu Asp Cys Pro Pro		
295 300 305		
gtc tgaggggagc ccagaggcac atccggacaa gtttcagata acccgtgggg	1381	
Val		20
310		
atagtttttg ctagattttg gaagaggggg cgggacagag gatgctgttc ttcagtgtctg	1441	
aaateccacgc cagaatgtcg gtgttcatga agtcactgat tagttcccac ttggtgcccc	1501	
aggcaataat aggeccgtct cttgggcacg cacactcttc atactaagtg tttgacatac	1561	
acctggattt ttgcatttca ggggtcagta tcctatgaca tgatgggtgt taccatceta	1621	30
atthttacagg caaggacaca gcagctgoga gaggtacaga aacttgtecc aaggetcaca	1681	
gccagtaggc ataggagcgg gaatgaaaat cgagcactgt cagaatctgg tgggcagccc	1741	
ctgacttgaa ccactcccac gtgctgcctc ccttaggagg ggacactgat gatgaggtct	1801	
cggagccggc atccttccat cctgtctgag tcccctccac ctcagctccc agtccttgtg	1861	
ctttttggag ctaagcctgg gatgacaaa ttcaccccag ctccttcatt cacagggctg	1921	40
gatgtagctg ggattgagtc catgttatcg gctcggtact caacacaacc caagtttccat	1981	
ccgaggaaat gtecccgcag tggatgcagc tcacatgctg aggaacaccc agctctggac	2041	

agagttctta taaatgtata aattaggctc agaaaccact gcattctgac ctgctgtaca 2101
 gactgcccac actgctgacc tgcctagega gcaggacatc ccttctgagc catctgctgc 2161
 tctctcattt catcacecca actgtccctt gtttttgatc aatggggacc agccactgcc 2221
 ccaggagcac tttaggctc tcagttcaaa ctgaaggaca gttgaactca gatggggttc 2281
 atgtgggatt ctgggagctt tctgggaatt cagttggagt caagtcagga tgctctcaag 2341 10
 gaccctcgg gctcagagcc ctaaagtggg ccttggtgaa gcagggtggt cctgcgtcca 2401
 ctteccaagc ctgagccaag ctcacttca ttgaatgtct catttggccg aggaacaact 2461
 gaactttgtg gtttctgtt tagccttcag tttgctcgc tgcctctac ccagaggttt 2521
 gtgcgagcct gtgttcagc gttgtataaa accaaggtac ttcgttagtt ttgccatc 2581
 agccatggc acgtgacatg caaagtaac ttgctcctaa ttatagaaat gatttttctt 2641 20
 ttaatttttt actttaccag actttacttt gtactcagag aagaggctc acatggctgt 2701
 gtcacatata aatgttgac taaactctta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2761
 aaaaaaaaaa aaaa 2775

<210> 3 30
 <211> 10562
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(5000)

<220> 40
 <221> exon
 <222> (5001)..(5140)

<220>
 <221> exon
 <222> (5001)..(5273)

<220>

<221> exon

<222> (5459)..(5567)

<220>

<221> exon

<222> (7427)..(7586)

<220>

<221> exon

<222> (8234)..(10562)

10

<400> 3

cgectctggc aaggtagacc ttgaaggcaa aactgagttg aggtttgtta ggacggaaat	60	
aattactgct gggcatgcag cactteccaa cgttctgtg aggcaggcag tgttattgcc	120	
agtttggcac aagggcacag gtgtagaaca cgtaagtgcc ctgggccgtg ctacaccacc	180	20
actgtgtttg agctgagatg tgaaccaggg ccttctgatt ccaaattect cattcettc	240	
atcctagcag gctgcctgcg gttagcagaa ggggactcct gtatctgctc tgcagcttct	300	
tcagctgatt tataatggaa aacagagtag atattgattt ggcaattagt gaaatattat	360	
gagaatcacc atagcaaaact tcacagtttg atcaaggatc ctgccttcaa tatctggcca	420	
actgatgtgt aaaagcagct gcaagaactt cagagctgac aaaaaagca aactccagac	480	30
tttatttctt ggaatctggt ttgtgagaca ctggcccattg aaatgetctc ccagaaaatg	540	
tcggatttgt ggtcaaataa atttgggcaa ttctacagaa catgtgtctt tttcagagat	600	
ttatitttaa ttaaacttat ttaaaaatat taacatggta caatttgcac atagtgaagt	660	
gtgcaaatct tcgctacatg gctcaatgag tttttacata tattteccacc catgtaatca	720	
ccaccgagat ctagaataga atgtattcgt ctctccagag gttectctgt tcccttgcag	780	40
tcaataatc tccaccaaag ataaacattc tgetgacttc ctteatcatt gataagtttt	840	
tcttggtttt gaacttcata taaatggaat catttcatgt ctagctcttt tcaactcaaca	900	

taacatctgt cagattaata catcgcctgt caatagtttg tagtttttat ggctgtgtag	960	
catttcattc attcattctg ctgttgatgg aaatttcttg actagagttg tgttatcaat	1020	
ttattgcctc ttggctccaa attcaccett tttgcctggt ctctggaaat gggctctgggc	1080	
cctctaaata ttttcccttt gcaatctggc tcttgaaget tatcagtgga gggctctgga	1140	
ggggcattgc aggggaaaca gtttttccct cctggttcag ggacgctggt ttggtagccc	1200	
ctgtgggtgt acaggagtac ttggcaagac agcagtttcc ccgggtacac ccgctaggtg	1260	10
ttttgtagca gagtgcattc gtgagacaac tggatgaactg ctttccctgc aacctagagg	1320	
gcagatttct ggcaagttcc agagggtgga ttccaaacat gttcctctaa tgtggatctg	1380	
cagtgatgtc tctgccattc agtgggcata gctgtgcctt ttagtgggg tctagatctc	1440	
agccctggga ttgggggcat tttctcagtt gctcaatctc agccctaggg gcagtacca	1500	
ttccttatat atggttgttt gtatattctt tggaactgtc ttgattttat tactgttagt	1560	20
ctctcattac tccactccct tattatagta aatgattctt tgtatttgac tttccctggt	1620	
caaggtacta agtggttttt ctctccctgtt tggatctaga ttgatacaat aattttttgc	1680	
aattatgagc aatgctgctg tgaacattct tgateatgtc ttagtggaca taagcaataa	1740	
ttgctgctgg gtctgtgtgc aggaatgatt tgctagatca tagcacatac gtttatctgt	1800	
agcagaaaact gccaaagtat atacagcttt ccaaagtgtg ttaatttaca tgccctgctag	1860	30
caaggtagga gaaatacagt tgcttcccaa gtagctggga ttacaggtgt gtgccaccac	1920	
tcctggctaa tttttgttag agatagggtt ttgcatggt ggccaggcta gtcttgaact	1980	
gctggcctca agtgatectg ctgccttggg ctcccaaagt gctaggatta cagggatgag	2040	
ccaccatggt cgacttcatg ataaaacttc agtggatgag gagctgcctc ttatgatgaa	2100	
caaagaaggt gttttcttga aatggaatct actcctggtg aagatgctgt gaacattggt	2160	40

gaaatgacaa gaaagaattt acagtgttac atagagttag ttgatgaagc agtagcagga	2220	
ttcgagagga tegattccaa tttcaaaata agttcttctg tgggtaaaat gctatcaaat	2280	
ggcgtcgcac gctacagaga aatctatcat gaaaggaaga gtcaattgat gtggcaaac	2340	
tcattgttgt cgtatittaa gaaattgtca ggaccacccc aaccttcaac aacctgacc	2400	
ctgatcagtc aggagccatc cacattgagg cgagaacctc cagcagtaaa aagattatga	2460	
ttctctaaag gatcagatga acattagcat ttttttaagc aataaagtat ttttacgtaa	2520	10
gatatgtatg ttatitttta ggcataatgc tattatgcat ttaatagact ccagtatatt	2580	
gtaaacataa ctttaaatgc actgggagat aaaagtattt gctcttttat gatatttgc	2640	
ttattgcagt agtctgtaat ggaaactaca ttatctcttg ggtacacctg tatacagaaa	2700	
gaaatttate atgaggaaat gctcatgcaa tgatggagge tggaaagtcc caagatctgc	2760	
agtcagcaag ttggagacce atgagagtcg atgggtgggc cccagctctgt gtttgaaggc	2820	20
ctgagaacca ggagagccaa aagctggcaa gctctggacc caggaagagc tgatgtttca	2880	
gttcaagtcc gaagcgagga aaagactgaa ggcccagetc caggcagtca ggcaggagaa	2940	
ctttcctttt actcacgaga gggtcagcat ttgttctgt tcaggctgtc aactgagtga	3000	
cccagaaaag ctggcacata acattacca tcgtgctgca agagctgcaa aacctctct	3060	
gettetaaca ctgatgetca gcccacctcc agtgggcagg gagctgggtg ccgggaggac	3120	30
ttggggttgc cagcccagtg tgggcctgga cagttgctga gaatctcct ccgccctgtg	3180	
acttcttaat tacttagagg gtcacctggt ttgctcactt cagctcactt gggagattct	3240	
ctctgettga ggcagggtt aggtccaggt ctgatgggtt ctgaagctta tacaattggg	3300	
gtggggggca ttctcttta aggaaaagaa aacagcagag gtgagctgct ctgcagctta	3360	
gettactag tctctggaa aattgctc ctaaaatgct tttctctga gaaagcccag	3420	40
gcttccaaag gcccagccag gctggcgtca gtctgggtc agctcgggg aggctccagg	3480	

ccatgtgtga cacgggagtt taceccatec cagtttccag tggagaagca tcgttctegt 3540
 ccacccccgt catgctcttt tccaccttct ccaggggaag ggatattttc agtctgtaca 3600
 acgaatccac tgaaatgta aggtgggcac agtggctctgg ggtcttcgac cttgtttata 3660
 cgtgggtgect gttactggtc gggctctgtac aggcagtttc cactggcgtt tttaccagg 3720
 ccagecctaga gtagaatgac cgcagttaa aatatagatt cctgggcccc agacctgeca 3780 10
 gaatctctgt gagatggaac ctttcaacct gggttttaa caagcctccc gggtgattct 3840
 gacactcact ggatttgaga accgtgggggt tgttcagaca gcagggacgt tgatgttgtt 3900
 cttctctcgt tectgggtgat gctgttctgt tctcccaagg cctatgcggt ggtgagaatc 3960
 tccaaggata caagacagtg atctggagcg agtgtcctga aagcagaact tagcactcag 4020
 gactgccaac acctccccg ggtttccttg gtctggaatt cccateccct ggttccacct 4080 20
 gttacatcac acctcccctt caaggaccag tgcagatgcc acgtccttca cggggetcag 4140
 aatgctcacc agcttctctt ccaccgaggg ccacagcccc tggagacccc ttgagctgag 4200
 tgctttgtcc ttgcatactc tttctggect catagtgggg cttggccatt gtcccttcac 4260
 tccagatctc tcttttcagg tccaggaagt gcactttgaa ctttaactttc cagaccccc 4320 30
 cttcagtttt ccagtcctta gagaggtgga cttctgatte ctttgtctct gtgccctgta 4380
 gcctcaggtc aggettaagg caaggtctcc tcacctgccc tggggagagt cccaggaagc 4440
 tgcacgtgcc tgtgcgggta ggatgctgat gccagattt cccgtagag agcctttccc 4500
 tatectgacg gctctagctt tgtgtgttac ttacttgctc cactttaatt caaaatgtac 4560
 ccagcaacca gcttgtgcac agttctctgg ggtttcagga gggatgtaag acataccct 4620 40
 tgcccttcag gcactatgce cagaaggggg gcagtgcct aggcagaggg cgggagccag 4680
 cagatgggat aactcagag gagcctgcag caggcagagg cagaggagaa gggaggtcta 4740

caogttctgc actgtattta tctccttcag ttccaaggtt ctctcctggc atctatattg	4800	
ctcatgagtt acagagcaaa gcctgggtgtg atggttactt ttaggtgtca acttggctgg	4860	
attaataaat acctagagaa ctggtaaagc attatttctg ggtgtgtttg tgaaggtgtt	4920	
tccagaggag attggctgtg agtcagtggg ctgagtgggg aggagctgcc ctccatgtgg	4980	
gcaggcacca tccattgact gggcccagat agaacaagaa ggcagaagaa atgtgaattc	5040	
ctctttctct getggagctg ggatattctt cttctcctgc cettggacat cagagctgca	5100	10
ggctctctgg cctttggacc cgaggattta taccaagcag gtttctgggt tctcaggcct	5160	
ttggccttgg actgatagtt acaccattgg catatctggt tctgaggctc ttggtcttgg	5220	
actgagccac actcctggca tcccagctc tccagcttgc atggcctgic acggtattc	5280	
ccaacctcog taatcacgt agccaattct tctaagaaat ttcttctcat ctatctgtct	5340	
gtctatctat ctatctgtct acctaccgac ttacctacct acctgctat ctatctttg	5400	20
attaatctac ctatcaatct ttctatctat ccataacctg ttgattegat ctctctagag	5460	
aacctgact aatacacctg gagtgcagaa tetgetggag aaactgcat tccgttattg	5520	
actggctggt caggccatac agcctgggtg tctagatgtg ttggaggta ggcttctgt	5580	
agcacagata gtgcctgttc atggctctgt cccaggtaag gcagagctag cttgtgctga	5640	
ggcttctgc tttgcagctg gcctggggtg gctaggatct ggggacacag gctgccctt	5700	30
ccagctctg tctgctggtg ctgcaggtgc ccctacctcc tcttcagtg gaaggctgce	5760	
ccccaggctc tctttaggcc caatacagac tcagccaaag atgcagatgt ctcatatag	5820	
aggattctga gctgtgactt ctggtggtaa ctccacttta ggcaggaaaa atgttcaact	5880	
gcccataaaa acaaatgacc ccgggtcatt tgggtttgce acctgctctg ccagttgggt	5940	
ttggcacctg ctctgectcc tgggaaacag tttggccaat gcactgcatg aggtgagcgc	6000	40
ccatccctgg gaatttagag cctgtgaag gtcctgagg agaggccat cagagagaa	6060	

gagaatftaa ggtttactgt taaagcaacc catagaaaag gagcagaatt attcaagcaa	6120	
ggaacaaaag tagaaaaata tttttttcc cttgcacttg gtttttatgt ttctctetaa	6180	
aatgtattgt gggggagaaa gcagtccecc aaceccctta atcagctgca tatcttagcc	6240	
atgcaaataa ataatgaaag agagaaagaa ggagagaaag agaaagaaaa gtaaaggaag	6300	
gaaggagaga aggaaggaaa gaaagaaaag aaagaaagaa actttgcagc atcctggagc	6360	
accagtccag acaagttctg gtctcctgct tgccttctgc tgtgatttct ctgaagtgc	6420	10
tggggcagg agctgggcag gaactcecca ggggtgceaa gcagagcagg tagttggcta	6480	
agtttgccct caggaaagaa gtcctggag agcgagctgg ttctagaaag ctccattatt	6540	
atattcctat tgcttttggc gaatatatgt agaacagaat ttgacaatg aaattttcag	6600	
gtgctctttt ggccatcaaa ataaccagct cttggctggg cacagtggct tgccttgta	6660	
attccagtgt tttgggagc caaggcagg gactgcgtga gccaggagt ttgagactag	6720	20
cctgggcaac atagtgaac cccatcteta caaaaaatac aaagtagaa gagtatggtg	6780	
gcatgcgct gtggtcacag ctacttggga agctgtgacc caagtcacag gaggatcgct	6840	
tgagcccagg agttcaggcc tgtagtgagc tatgattgtg ctactgtgct ccagcctggg	6900	
agacagagtg acatcaggtc tctgaaatat taaaattaa aagcccaaac caactctgct	6960	
tttcaactct teagtttcat ttcttctgt cctctctgtc ctctcaccia ggtaacatt	7020	30
tttaaagtgc cgctattgtg ttaagaattg gatttattct ctgtgttaaa ttctctcagc	7080	
attaactaca gactctgtta tgtaaataag gtaaattatc aggatgagaa gtgagactct	7140	
aatttatgag tttatcatgt ctctttaaaa agctgctagg tgctatecta acttattagg	7200	
cttgaaggat tctgggggat tggcatattg ttactgttgt ggactttgtt tgccttgatc	7260	
ataccattt tacagatgag aaaagtgagg ctgggattgg ggctcaatg cgtgctcaga	7320	40

gtcacataag tagtttgaa ggtgacgcta cagacacggt aaattgtgaa ggcctgctgg	7380	
taaggcacga gtgattgaa tgacactctt ttttttttt tcttagtgat tctgtcaga	7440	
atcaccattt ttggtaaaca aaccaagccc agaacctgat aattatggag cattctacac	7500	
tgacagttct ttgagacaaa tttcctcttg gcatttacac tgtggcttta gctttcaaac	7560	
cagaggttcc tcttaccag caaaaagtga gttatacget ttcttaatgt tataacgta	7620	
ccatggatga tctgaactt gccgaggata gcagagacgg gtgggcagaa caggaaagaa	7680	10
tcagatcaga gactgtaaaa agtaacttaa aaaaaataa ttctggcaga gacagaattt	7740	
gaaggtactt gtgcacatca gaacactgga cttgcttttt tctgggagca ggaatgctgc	7800	
ttaattagat cagagaagaa tgcaagtggc ccatacattt agatctacaa tgcgtggttt	7860	
ccagacctgc agcttgcttt gctgccttc atcatggagt catagaaggc cagagctgga	7920	
ggaccgagtg agggacctgg tgccatatcc ctacagacag gcaattggag actcccgtag	7980	20
gttaagggct gcagagcctg gaccaatgcc cagaatctct gagcttttta tcttacacca	8040	
tgaagtgaca gatgctggca gatgttagac ctttgtctt aactgtttta ccacacagca	8100	
cccgacttct gtatgcagcg aggtctaga gtttcaaaa cacgggtctc ctctcccacc	8160	
tcagcctcct agcataaaac tagacacatc ctcatgcttt tgaggtctaa tcattggatt	8220	
ttgttccttt cagatggett tcccgaagat gagattgatg tatatttgc tctgtgtct	8280	30
gggggctctt tgttgtatt ttagcatgta cagtetaaat cttttcaag aacagctctt	8340	
tgtttacaag aaagacggga acttcttaa gctcccagat acagactgca ggcagacacc	8400	
tccttctctc gtctgctgg tgacctcct ccacaaacag ttggctgagc gcatggccat	8460	
ccggcagacg tgggggaaag agaggatggt gaagggaaag cagctgaaga cattcttct	8520	
cctggggacc accagcagtg cagcggaaac gaaagaggtg gaccaggaga gccagcgaca	8580	40
cggggacatt atccagaagg atttctaga cgtctattac aatctgacce tgaagaccat	8640	

gatgggcata gaatgggtcc atcgcttttg tctcaggcg gcgtttgtga tgaaaacaga	8700	
ctcagacatg ttcacatg ttgactatct gactgaactg cttctgaaga aaaacagaac	8760	
aaccaggttt ttcactggct tcttgaaact caatgagttt cccatcaggc agccattcag	8820	
caagtggttt gtcagtaaat ctgaatatcc gtgggacagg taccacccat tctgctcgg	8880	
caccggctac gtgttttctg gcgacgtggc gagtcaggcg tacaatgtct ccaagagcgt	8940	
cccatacatt aaactggaag acgtgtttgt ggggctctgc ctgaaaggc tgaacatcag	9000	10
attggaggag ctccactccc agccgacctt ttttcaggg ggcttacgct tctccgtatg	9060	
cctcttcagg aggatcgtgg cctgccactt catcaagcct cggactctct tggactactg	9120	
gcaggctcta gagaattccc gggggaaga ttgtccgct gtctgagggg agcccagagg	9180	
cacatccgga caagtttcag ataaccctg gggatagttt ttgctagatt ttggaagagg	9240	
ggcggggaca gaggatgctg ttcttcagtg ctgaaatcca cgcagaatg tgggtgtca	9300	20
tgaagtcact gattagtcc cacttggc cccaggcaat aataggeccg tctcttgggc	9360	
acgcacaetc ttataactaa gtgtttgaca tacacctgga tttttgatt tcaggggtca	9420	
gtatcctatg acatgatggg tgttaccate ctaattttac aggcaaggac acagcagctg	9480	
cgagaggtac agaaacttgt cccaaggctc acagccagta ggcataaggag cgggaatgaa	9540	
aatcgagcac tgcagaate tgggtggcag cccctgactt gaaccactcc cacgtgctgc	9600	30
ctcccttagg aggggacaet gatgatgagg tctcggagcc ggcaccttc caccctgtc	9660	
gagtcacctc cacctcagct cccagtcctt gtgtttttg gagctaagcc tgggatgacc	9720	
aaattcacc cagctccttc attcacaggg ctggatgtag ctgggattga gtccatgtta	9780	
tggctcggc actcaacaca acccaagttt catccgagga aatgtcccc cagtggatgc	9840	
agctcacatg ctgaggaaca cccagctctg gacagagttc ttataaatgt ataaattagg	9900	40

ctcagaaacc actgcattct gacctgctgt acagactgcc cacactgctg acctgectag 9960
 cgagcaggac atcccttctg agccatctgc tgctctctca tttcaccacc ccaactgtcc 10020
 cttgtttttg atcaatgggg accagccact gccccaggag cactttaggg ctctcagttc 10080
 aaactgaagg acagttgaac tcagatgggg ttcattgtggg attctgggag ctttctggga 10140
 attcagttgg agtcaagtca ggatgctctc aaggaccctt cgggctcaga gcctaaagt 10200 10
 gggccctggg gaagcagggt ggtcctgcgt ccacttecca agcctgagcc aagctcctct 10260
 tcattgaatg tctcatttgg ccgaggaaca actgaacttt gtggtttgct gtttagcctt 10320
 cagtttgctc cgctgectcc taccagagg tttgtgcgag cctgtgttgc agggttgtat 10380
 aaaaccaagg tacttctgta gttttgccc ttcagccatg gtcacgtgac atgcaaagta 10440
 atcttgetcc taattataga aatgattttt cttttaattt tttactttac cagaatttac 10500 20
 tttgtactca gagaagagge ctcacatggc tgtgtcacat ataaatgttg gactaaacte 10560
 tt 10562

<210> 4

<211> 24 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ttcagccacc taacagttgc cagg 24

40

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

ataccttctt cgtggcttgg tggag 25

<210> 6

<211> 24 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

tagaagctag aagagctatt cggc 24

20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

actcgccagt gattgaacac aaac 24

30

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

cccaatgcca agtacgtaat gaag 24

40

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9
 tgtggtgttc cttagcatga cctg 24 10

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10 20
 ttgatcccca accaggaage ttgc 24

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA 30

<400> 11
 tgaggccact gctcctctga tacg 24

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 40
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12 gatatcgccg cgctcgtcgt cgac	24
<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA	10
<400> 13 caggaaggaa ggctggaaga gtgc	24
<210> 14 <211> 11 <212> DNA <213> Artificial Sequence	20
<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA	
<400> 14 ctttagagca c	11
<210> 15 <211> 8 <212> DNA <213> Artificial Sequence	30
<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA	
<400> 15 ctctaaag	8
<210> 16 <211> 20	40

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> i

<220> 10
<221> modified_base
<222> (9)
<223> i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> i

<220> 20
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16
gcnathmgnc aracntgggg 20

<210> 17
<211> 24
<212> DNA 30
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> i

<220>
<221> modified_base 40
<222> (15)
<223> i

<220>
<221> modified_base
<222> (21)

<223> i

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

 <400> 17
 taygtnatga aracngaytc ngay 24

 <210> 18 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> i

 <220> 20
 <221> modified_base
 <222> (19)
 <223> i

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

 <400> 18
 rterctrten gtyttcatna crta 24

 <210> 19 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (4)
 <223> i

 <220> 40
 <221> modified_base

<222> (7)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (10)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (16)

<223> i

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

rcaarnceen acrtanaert cytc

24

20

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

30

<400> 20

accaccagca gtgcagcgga aac

23

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

gccacgatcc tectgaagag gca

23

<210> 22
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22
 ctaagcttga aaggatttag actgtacatg c 31 10

<210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA 20

<400> 23
 ctaagcttgt ctgcctgcag tctgtatctg g 31

<210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24
 ctaagcttga caggccatgc aagctggag 29

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25
 ctaagcttgt gaattcctct ttctctgctg 30 50

【図面の簡単な説明】

第1図 第1図のAは、各種ヒト癌細胞株におけるタイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖）の発現量を測定した結果を示した図である。各細胞を抗シアリルルイスa糖鎖抗体（19-9）、抗ルイスa糖鎖抗体（7LE）、または抗ルイスb糖鎖抗体（Neokokusai）で蛍光抗体染色した後、FACSを用いて解析した。各抗体との反応性が強い順に+++、++、+、±、-で示した。-は抗体との反応性がなかったことを示している。NTは解析していないことを意味している。

第1図のBは、定量的PCR法を用いて、各種ヒト癌細胞株におけるヒト 3Gal-T1、ヒト 3Gal-T2、ヒト 3Gal-T3およびヒト 3Gal-T4の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各種細胞株における各 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる - アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

第2図 第2図は、プラスミドpBS-3GT5の造成工程を示した図である。

第3図 第3図のAは、コントロールプラスミド（pAMo）を導入したNamalwa細胞[Namalwa(mock)]、あるいはヒト 3Gal-T5発現プラスミド（pAMo-3GT5）を導入したNamalwa細胞（Namalwa-3GT5）について、抗シアリルルイスc糖鎖抗体（DU-PAN-2）を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、DU-PAN-2の代わりにA-PBSを用いた時の結果である。

第3図のBは、コントロールプラスミド（pAMo）を導入したHCT-15細胞[HCT15(mock)]、あるいはヒト 3Gal-T5発現プラスミド（pAMo-3GT5）を導入したHCT-15細胞（HCT-3GT5H）について、抗シアリルルイスa糖鎖抗体（19-9）、抗シアリルルイスc糖鎖抗体（DU-PAN-2）、抗ルイスa糖鎖抗体（7LE）または抗ルイスb糖鎖抗体（Neokokusai）を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、DU-PAN-2の代わりにA-PBSを用いた時の結果である。

第4図 第4図のAは、定量的PCR法を用いて、各種ヒト癌細胞株におけるヒト 3Gal-T5の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各種細胞株におけるヒト 3Gal-T5の転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる - アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

第4図のBは、ウエスタン・ブロッティング解析により、各種ヒト癌細胞株におけるCA19-9抗原含有タンパク質の発現を調べた結果を示した図である。第5図 第5図は、定量的PCR法を用いて、各種ヒト組織におけるヒト 3Gal-T5の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各組織におけるヒト 3Gal-T5の転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる - アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

第6図 第6図のAは、ヒト 3Gal-T5染色体遺伝子の構造を示した図である。4つのエクソンは四角で、イントロンは線で示してある。エクソン2中にはXbaIサイトが、エクソン3中にはBsmIサイトが存在している。コーディング領域（open reading frame）は、斜線で示してある。ヒト 3Gal-T5cDNAのアイソフォームの解析に使用したプライマー（si-1、si-2、si-3、si-4）の位置を矢印で示した。

第6図のBは、ヒト 3Gal-T5cDNAのアイソフォームの構造を示した図である。存在比は、Colo205細胞における各アイソフォームの発現量をパーセンテージで示したものである。

第6図のCは、RT-PCR法を用いて、Colo205細胞におけるヒト 3Gal-T5cDNAの各アイソフォームの発現量を調べた結果を示した図である。図6Aに示したプライマーの組み合わせでRT-PCRを行った後、第6図中に示した制限酵素（XbaIまたはBsmI）で切断してアイソフォームの特定を行った。noneは制限酵素処

10

20

30

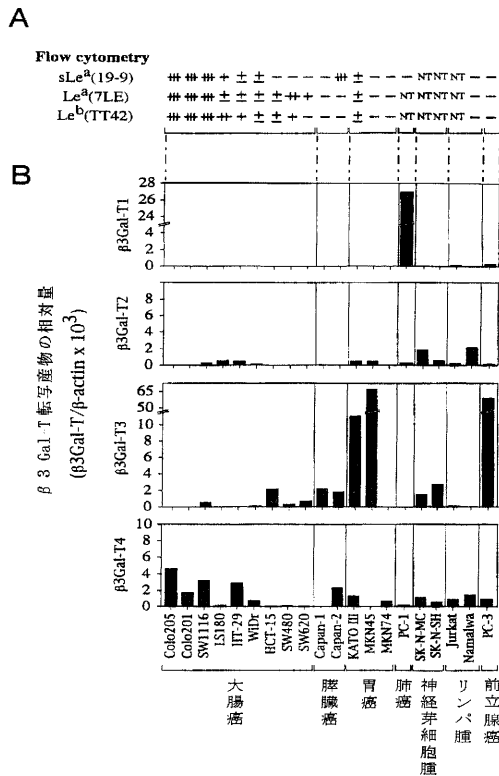
40

50

理をしないことを意味している。左のレーンは分子量マーカ－(100bpラダー)である。

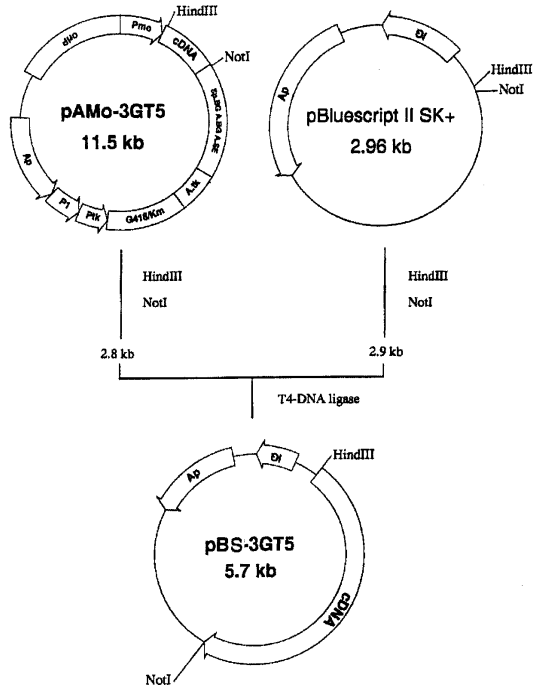
【図1】

第1図

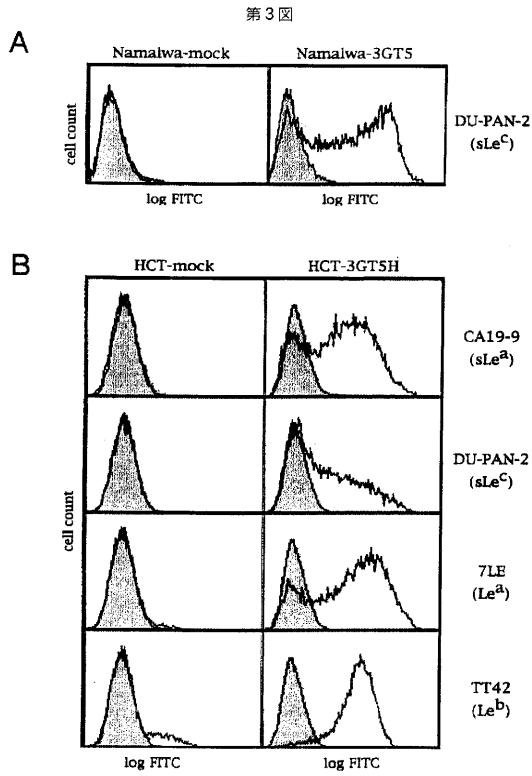


【図2】

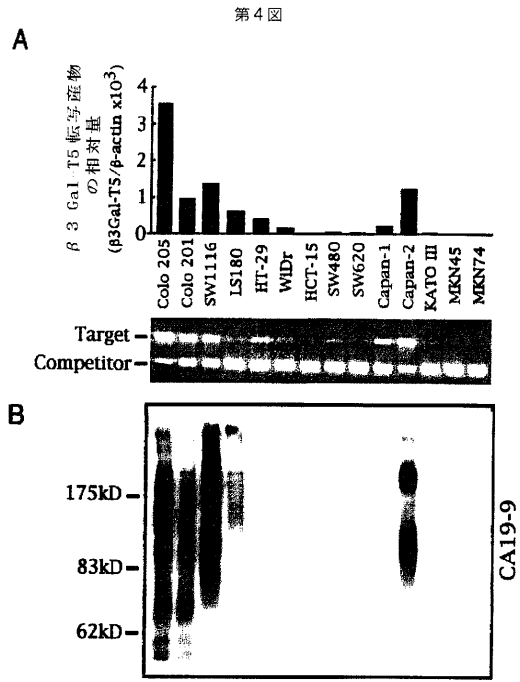
第2図



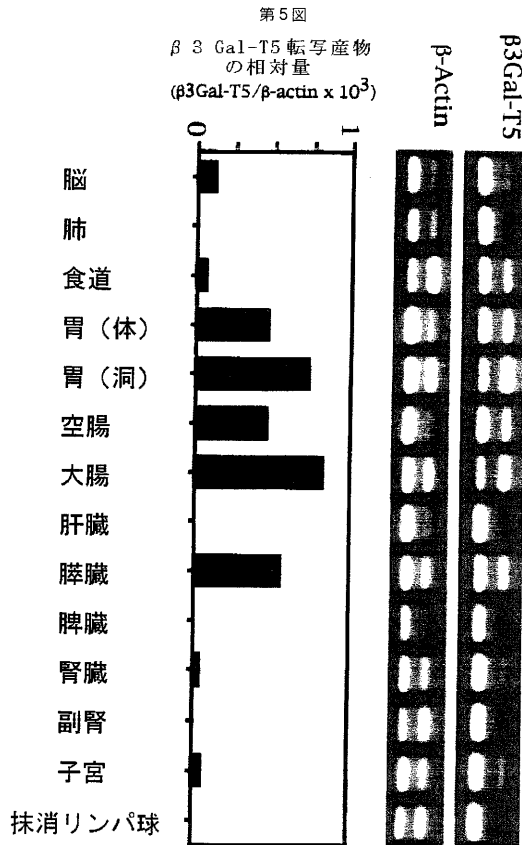
【 図 3 】



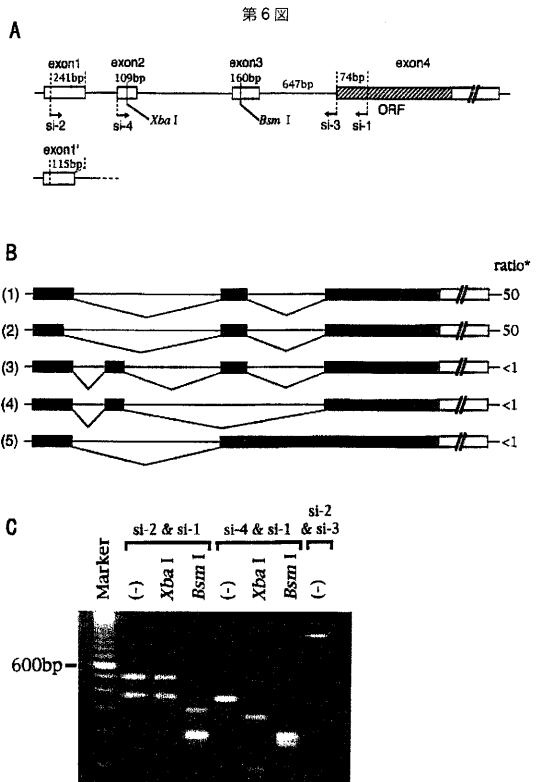
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>9/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>9/10</i>	
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>A</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>Z</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>Z</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574</i>	<i>Z</i>

(56) 参考文献 Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Jan.,1999,Vol.96,No.2 p.406-411
J.Biol.Chem.,1998,Vol.273,No.21,p.12770-12778

(58) 調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/WPI(DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	新型多肽		
公开(公告)号	JP4689047B2	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	JP2000601172	申请日	2000-02-24
申请(专利权)人(译)	协和醗酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
[标]发明人	成松久 一色聡一郎 樽谷内晶 佐々木克敏		
发明人	成松久 一色聡一郎 樽谷内晶 佐々木克敏		
IPC分类号	C12N15/09 A01H5/00 A01K67/027 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/10 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/574 A61K38/00 A61K39/00 C12N5/00 C12N15/54 C12P19/00 C12P19/04 C12P21 /08 C12R1/185 C12R1/91 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/1051 A61K38/00 A61K39/00 C12P19/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01H5/00.A A01K67/027 C12N1/21 C12N5/00.102 C12N9/10 C12P21/02.C C12Q1 /68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/574.Z		
优先权	1999047571 1999-02-25 JP		
其他公开文献	JPWO2000050608A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

根据本发明，可提供一种新的多肽，其具有参与1型糖链合成的 β 1,3-半乳糖基转移酶活性，编码所述多肽的DNA，含有所述DNA的重组载体，携带所述重组体的转化体。载体，通过使用所述多肽或所述转化体产生含有1型糖链的糖链和复合碳水化合物的方法，识别所述多肽的抗体，通过使用所述抗体检测或定量所述多肽的方法，筛选方法与所述多肽相关的物质，通过使用所述DNA或所述抗体诊断或治疗消化系统中的癌症的方法，以及通过使用通过所述筛选方法获得的物质治疗消化系统中的癌症的方法。