

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 525021

(P2003 - 525021A)

(43)公表日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		A 6 1 P 15/16	4 B 0 6 4
		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 90数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 595697(P2000 - 595697)

(86)(22)出願日 平成12年2月1日(2000.2.1)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月1日(2001.8.1)

(86)国際出願番号 PCT/US00/02675

(87)国際公開番号 W000/044395

(87)国際公開日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(31)優先権主張番号 60/118,030

(32)優先日 平成11年2月1日(1999.2.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/118,995

(32)優先日 平成11年2月8日(1999.2.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ オブ バージニア パテ  
ント ファウンデーション  
アメリカ合衆国,バージニア 22903 - 2442  
,シャルロツツビル,スイート 1 - 110,ウエ  
スト メイン ストリート 1224

(72)発明者 ヘル, ジョン  
アメリカ合衆国 22901 バージニア州,シ  
ャルロツツビル,セダー リッジ レーン  
2545

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 受精能をモジュレートするための方法および組成物

(57)【要約】

本発明は、脊椎動物のFSP95遺伝子およびそれらが  
コードするタンパク質産物、ならびにそれらの誘導体お  
よび類似体に関する。脊椎動物のFSP95タンパク質  
、誘導体および抗体の製造方法も提供する。本発明はさ  
らに、治療用組成物ならびに診断および治療方法に関し  
、受精能をモジュレート(例えば、阻害または促進)す  
るための組成物および方法、例えば避妊方法および受精  
能を促進する方法などが挙げられる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 以下の(a)または(b)を含む単離されたポリヌクレオチド ;

- a) 図3に示されるヌクレオチド配列、または
- b) 図3に示されるヌクレオチド配列の少なくとも10の連続したヌクレオチドを含む断片。

【請求項2】 以下の(a)~(d)のいずれかを含む単離されたポリヌクレオチド ;

- a) 図3に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
- b) 図3に示されるアミノ酸配列の318~335番を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
- c) 図3に示されるアミノ酸配列の368~385番を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または
- d) 図3に示されるアミノ酸配列の671~688番を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。

【請求項3】 ストリンジェントな条件下にて請求項1または2記載のポリヌクレオチドの相補配列にハイブリダイズする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1または2記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項5】 請求項1または2記載のポリヌクレオチドと、それと機能的に結合した、宿主細胞において該ヌクレオチド配列の発現を制御するヌクレオチド調節配列とを含む発現ベクター。

【請求項6】 請求項1~5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有するように遺伝子操作した宿主細胞。

【請求項7】 以下の(a)、(b)または(c)を含む単離された遺伝子産物 ;

- a) 請求項1もしくは2記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列、
- b) 図3に示されるアミノ酸配列、または

c) 図3に示される配列の少なくとも40の連続したアミノ酸に対して、挿入または欠失がない同じサイズの領域にわたって少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列。

【請求項8】 図3に示されるアミノ酸配列により特定されるタンパク質の少なくとも10の連続したアミノ酸を含む単離されたまたは組換えポリペプチドであって、図3に示されるアミノ酸配列により特定されるタンパク質に対する抗体が結合することができる、上記ポリペプチド。

【請求項9】 図3に示されるアミノ酸配列の318～335番により特定されるPKA-R11サブユニット結合ドメインを含む単離されたまたは組換えポリペプチド。

【請求項10】 図3に示されるアミノ酸配列の368～385番により特定されるPKA-R11サブユニット結合ドメインを含む単離されたまたは組換えポリペプチド。

【請求項11】 図3に示されるアミノ酸配列の671～688番により特定されるPKA-R11サブユニット結合ドメインを含む単離されたまたは組換えポリペプチド。

【請求項12】 請求項7～11のいずれか1項に記載の遺伝子産物と免疫特異的に結合する抗体。

【請求項13】 精子の運動性を阻害することができる請求項12記載の抗体。

【請求項14】 モノクローナル抗体である請求項12記載の抗体。

【請求項15】 薬学的に許容される担体および有効量の請求項12記載の抗体を含む医薬組成物。

【請求項16】 薬学的に許容される担体および有効量の請求項9～11のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項17】 精子の運動性を阻害または低減させるのに有効である請求項15または16記載の組成物を含む避妊薬。

【請求項18】 被験体において受精を阻害する方法であって、請求項15または16記載の医薬組成物を該被験体に投与することを含み、該被験体中で精

子の運動性が阻害または低減される、上記方法。

【請求項19】 FSP95もしくはその少なくとも1つのシグナル伝達経路またはFSP95を発現する細胞の活性をモジュレートする方法であって、該細胞と以下の(a)、(b)または(c)のいずれかとを接触させることを含む、上記方法：

- a) 請求項12記載の抗体、
- b) 請求項7記載の遺伝子産物、または
- c) 請求項8～11のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項20】 FSP95またはFSP95を発現する細胞の活性をモジュレートする方法であって、FSP95またはFSP95を発現する細胞とキナーゼまたはホスファターゼとを接触させることを含む、上記方法。

【請求項21】 被験体においてFSP95に対し免疫反応性である抗体の存在と関連する生殖関連疾患の存在または該疾患を発症する素因を診断またはスクリーニングする方法であって、該被験体から血清サンプルを採取し、そして該サンプル中のFSP95に対する抗体の存在を検出することを含み、ここで抗体の存在が生殖関連疾患の存在または素因を示す、上記方法。

【請求項22】 FSP95のモジュレーターを同定する方法であって、FSP95またはFSP95を発現する細胞と候補モジュレーターとを接触させ、FSP95の活性を測定または検出することを含む、上記方法。

【請求項23】 活性を精子運動性アッセイにより測定する請求項22記載の方法。

【請求項24】 生殖関連疾患のために被験体を治療する方法であって、有効量の請求項1または2記載のポリヌクレオチドを該被験体に投与することを含む、上記方法。

【請求項25】 生殖関連疾患のために被験体を治療する方法であって、有効量の請求項7記載の遺伝子産物、または請求項8～11のいずれか1項に記載のポリペプチドを該被験体に投与することを含む、上記方法。

【請求項26】 生殖関連疾患のために被験体を治療する方法であって、有効量の請求項13または14記載の抗体を投与することを含む、上記方法。

【請求項27】 請求項7記載の遺伝子産物をコードするトランスジーン、または請求項8～11のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするトランスジーンを含有するトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項28】 請求項1または2記載のポリヌクレオチドを含むトランスジーンを含有するトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項29】 FSP95の遺伝子産物の製造方法であって、請求項1または2記載のポリヌクレオチドを含有する組換え細胞を増殖させ、コードされている遺伝子産物を該細胞で発現させて、発現された遺伝子産物を回収することを含む、上記方法。

【請求項30】 1つ以上の容器中に、FSP95に対する抗体、FSP95のRNAにハイブリダイズすることができる核酸プローブ、またはFSP95遺伝子の少なくとも一部分の増幅をプライミングすることができる核酸プライマー対からなる群より選択される1種の物質を含有するキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、部分的に政府の援助によりなされたものであり、助成番号HD U54 29099およびP30 28934としてアメリカ国立衛生研究所（NIH）により資金援助を受けた。アメリカ合衆国政府は本発明において一定の権利を有するものである。

**【0002】****1. 序**

本発明は、脊椎動物のFSP95遺伝子およびそれらがコードするタンパク質産物、ならびにそれらの誘導体および類似体に関する。脊椎動物のFSP95タンパク質、誘導体および抗体の製造方法も提供する。本発明はさらに、受精能をモジュレート（例えば、阻害または促進）するための組成物および方法、例えば避妊方法および受精能を促進する方法を含む、治療用組成物ならびに診断および治療方法に関する。

**【0003】****2. 発明の背景**

射精された哺乳動物の精子は、雌の生殖管に入ると、精子が先体反応を経て透明帯に結合し貫通するための準備をする、膜および代謝変化の複雑な系を経る（全体として受精能獲得と呼ばれる）（Yanagimachi, 1994, *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E.およびNeill, J. D.編) pp. 189-317, Raven Press, New York, NY)。ウシおよびヒトの精子の受精能獲得の過程において、細胞内Ca<sup>2+</sup>（Handrowら、1989, *J. Exp. Zool.* 252: 174-182; Baldiら、1991, *J. Androl.* 12: 323-330）およびサイクリック3',5'-アデノシンーリン酸（cAMP）の増加が検出されている（ParmaudおよびMilhet, 1996, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1357-1360; Parrishら、1994, *Biol. Reprod.* 51: 1099-1108）。受精能を獲得した精子はまた、細胞内のpH上昇（Vredenburg-WilbergおよびParrish, 1995, *Mol. Reprod. Dev.* 40: 490-502）、および精子形質膜からのコレステロールの減失（ViscontiおよびKopf, 1998, *Biol. Reprod.* 59: 1-6）を特徴とする。

**【0004】**

タンパク質のチロシンリン酸化もまた哺乳動物の精子の受精能獲得および運動性と関連している。ヒトの精子は、受精能獲得の過程でタンパク質の特徴的なセットがチロシンリン酸化を受けるが、そのようなタンパク質のほんの1つがクローニングおよび存在位置の決定がなされているにすぎない (Turnerら、1998, *J. Biol. Chem.* 273:32135-32141)。マウス (Viscontiら、1995, *Development* 121: 1129-1137)、ウシ (Galantino-Homerら、1997, *Biol. Reprod.* 56: 707-719) およびヒト (Carreraら、1996, *Dev. Biol.* 180: 284-296 ; Luconiら、1996, *Biol. Reprod.* 55: 207-216 ; Leclercら、1998, *Androl.* 19: 434-443) の精子における特定のタンパク質集団上のチロシン残基のリン酸化は、精子チロシンキナーゼの活性化が受精能獲得過程で起こることを示している。受精能獲得を受ける能力が欠損しているマウスの精巣上体上部の精子は、このようなタンパク質セットのチロシンリン酸化を示さない (Viscontiら、1995, *Development* 121: 1129-1137)。

#### 【0005】

精子は、精巣上体の成熟過程で運動能力を獲得し、射精時に運動可能となり、受精能獲得過程において活性化過剰と呼ばれるはっきりとした運動パターンを表す (Yanagimachi, 1994, *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. および Neill, J. D. 編) pp. 189-317, Raven Press, New York, NY)。精子の運動性の開始および維持は、タンパク質キナーゼ基質の活性に影響を及ぼすリン酸化 - 脱リン酸化事象に関与する (Tash, 1989, *Cell Motil. Cytoskeleton* 14 : 332-339 ; Tash および Bracho, 1994, *J. Androl.* 15: 505-509)。

#### 【0006】

多くの精子タンパク質は、雄および雌の両方で免疫応答を引き起こす強力な自己抗原および同種抗原であり、抗精子抗体 (ASA) はヒトおよび動物モデルにおいて不妊症を引き起こし得る (Primakoffら、1988, *Nature* 335: 543-546 ; Kuttelら、1996, *Am. J. Reprod. Immunol.* 35: 429-433 ; Ohl および Naz, 1995, *Urology* 46: 591-602 ; Nipら、1995, *Hum. Reprod* 10 : 564-2469)。例えば、ASA は、精管切除を行っていない男性の2~8%の血清中で検出されているのに対して、精管切除後の男性の最大70%の血清中で検出されている (Raspa, 1993, *Am. F*

ain. Physician 48: 1264-1268)。不妊症カップルにおけるASAの発生率は9~36%の範囲であり、不妊症の男性においては8~21%である(Gubinら、1998, Am. J. Reprod. Immunol. 39: 157-160)。一方、一般的な集団におけるASAの出現率は0~2%の範囲である(JarowおよびSanzone, 1992, J. Urol. 148: 1805-1807)。雌の生殖管におけるASAの存在は、複数の機構を介して精子-卵相互作用に影響を及ぼす可能性があり(D'Cruzら、1991, J. Immunol. 146: 611-620; PetersおよびCoulam, 1992, Am. J. Reprod. Immunol. 27: 156-162; Menge, 1971, Proc. J. Exp. Biol. Med. 138: 98-102; Clarkeら、1986, Fertil. Steril. 46: 435-441)、その結果として受精能が低減することになりうる(Ayvaliotisら、1985, Fertil. Steril. 43: 739-742; Mandelbaumら、1987, Fertil. Steril. 47: 644-651; Kobayashiら、1990, Fertil. Steril. 54: 1107-1113)。従って、受精能をモジュレートするための新規な方法および組成物が当技術分野において必要とされている。

#### 【0007】

本節または他の節における参照文献の引用は、かかる文献が本発明の従来技術であるという承認として解釈されるべきではない。

#### 【0008】

### 3. 発明の概要

本発明は、部分的には、95kDaの新規な繊維鞘タンパク質(FSP95)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の発見に基づいている。該タンパク質は、精子の鞭毛の主部にある繊維鞘のリブ(rib)に局在化しており、ヒト精子の受精能獲得過程でチロシンリン酸化を受け、精子の運動性に役割を果たしている。853アミノ酸残基のタンパク質は、分子量94.6kDaおよびpI6.0と算出され、タンパク質キナーゼCおよびカゼインキナーゼIIのための多数の潜在的なリン酸化部位、ならびにアミノ酸435位に1つのチロシンキナーゼリン酸化部位を含有している。

#### 【0009】

本発明は、脊椎動物の95kDaの繊維鞘タンパク質(FSP95)のヌクレオチド配列、およびそれらがコードするタンパク質のアミノ酸配列、ならびにそれらの誘導体(例えば断片)および類似体に関する。FSP95ヌクレオチド配列にハイブリダ

イズ可能な核酸または該配列に対し相補的な核酸も提供する。特定の実施形態において、FSP95タンパク質は哺乳動物のタンパク質であり、好ましくはヒトのタンパク質である。

#### 【0010】

本発明は、機能的に活性を有する、すなわち、完全長（野生型）FSP95タンパク質に関連する1以上の既知の機能的活性を示すことができる、脊椎動物のFSP95誘導体および類似体に関する。かかる機能的活性としては、限定するものではないが、抗原性〔抗FSP95抗体に結合するまたは抗FSP95抗体への結合についてFSP95と競合する能力〕、免疫原性（FSP95に結合する抗体を生じる能力）が挙げられる。

#### 【0011】

本発明はさらに、脊椎動物のFSP95タンパク質の1以上のドメインを含むFSP95タンパク質の断片（ならびにそれらの誘導体および類似体）に関する。上記ドメインとしては、限定するものではないが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン、細胞内ターゲティングドメイン、RII結合部位、または上記の任意の組み合わせが挙げられる。特定の実施形態において、FSP95の断片は、アミノ酸318-335、アミノ酸368-385、および/またはアミノ酸671-688を含む。

#### 【0012】

さらにまた本発明は、脊椎動物のFSP95タンパク質に対する抗体、その誘導体および類似体を提供する。

#### 【0013】

また、例えば、組換え手法による、脊椎動物のFSP95タンパク質、誘導体および類似体の製造方法も提供する。

#### 【0014】

本発明はまた、脊椎動物のFSP95タンパク質および核酸に基づく治療および診断方法、ならびに組成物に関する。本発明は、本発明の治療用化合物の投与による精子の運動性障害の治療を提供する。かかる治療用化合物としては、限定するものではないが、FSP95タンパク質とその類似体および誘導体（断片など）；それらに対する抗体；FSP95タンパク質、類似体または誘導体をコードする核酸；

ならびにFSP95アンチセンス核酸が挙げられる。好ましい実施形態において、本発明の治療剤は不妊症を治療するために投与される。他の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、精子の運動性を低減させるために投与される。さらに他の特定の実施形態において、本発明の治療剤は精子の運動性を高めるために投与される。

#### 【0015】

一実施形態において、FSP95の機能を中和または阻害する治療剤（「アンタゴニスト治療剤」と呼ぶ。）は治療効果を得るために投与される。他の実施形態において、FSP95の機能を促進する治療剤（「アゴニスト治療剤」と呼ぶ。）は治療効果を得るために投与される。

#### 【0016】

異常または望ましくないレベルのFSP95タンパク質の発現もしくは活性または局在化に關与する精子の運動性障害は、以下により詳細に記載するように、かかるレベルを検出することにより診断することができる。

#### 【0017】

好ましい態様において、本発明の治療剤は、FSP95に対する抗体のフラグメントであって、少なくとも該抗体の結合ドメインからなるものである。さらに他の好ましい態様において、本発明の治療剤は、FSP95の断片であって、アミノ酸318-335、368-385および/または671-688を含むものである。

#### 【0018】

### 3.1 定義

本明細書で使用する略語を以下に説明する：

cAMP；サイクリック3',5'-アデノシンーリン酸、

AKAP；A-キナーゼアンカータンパク質、

PK-A；プロテインキナーゼA、

ASA；抗精子抗体、

FSP95；95kDaの繊維鞘タンパク質、

OBG；オクチル-3-D-グルコピラノシド、

BSA；ウシ血清アルブミン、

PBS ; リン酸緩衝化食塩水、  
RACE ; cDNA末端の急速増幅(rapid amplification of cDNA ends)、  
PCR ; ポリメラーゼ連鎖反応、  
IPTG ; イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド、  
rFSP95 ; 組換えFSP95、  
HSA ; ヒト血清アルブミン、  
SIY ; 精子不動値 (sperm Immobilization value)、  
pro-mAKAP82 ; マウスAKAP82の前駆体、  
pro-hAKAP82 ; ヒトAKAP82の前駆体。

#### 【0019】

#### 4. 図面の説明

( 図面の説明に関しては下記参照 )

#### 5. 詳細な説明

本発明は「FSP95 (95KDaの繊維鞘タンパク質)」のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびにこれらの誘導体および類似体を提供するものである。本発明は、このような配列を避妊および受精能のモジュレートに利用する方法をさらに提供する。

#### 【0020】

組換えFSP95タンパク質、ならびに機能ドメイン誘導体、抗体、およびリガンドを含むペプチドフラグメントの産生もまた提供される。本発明はさらに、精子を標的にして受精能をモジュレートするために上記産物を利用する組成物、キット、および方法を提供する。本発明はさらに、FSP95ポリヌクレオチドを標的とする異種遺伝子発現のために使用する治療用組成物および方法も提供する。

#### 【0021】

本発明は、FSP95タンパク質およびペプチド、ならびにFSP95に対する抗体(例えば、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用することが可能なもの)、FSP95に結合するリガンド、またはFSP95の機能、活性もしくは発現をモジュレートするリガンドをコードするヌクレオチドの使用もさらに包含する。加えて、制御ヌクレオチド、および、FSP95ポリペプチドまたはFSP95もしくはそのフラグメン

トの1種以上の機能ドメイン(例えばRII結合部位)をコードするヌクレオチドは、遺伝子治療、または細胞もしくは細胞内画分の一箇所に異種遺伝子産物を送達するために有効である。

#### 【0022】

特に、後述の小節に記載する本発明の実施形態は、FSP95、FSP95の機能ドメイン(例えば、RII結合部位などのリガンド結合ドメイン)に相当するポリペプチドまたはペプチド、変異型、末端切断型もしくは欠失型(例えば、1つ以上の機能ドメインを欠失したもの、またはそれを部分的に欠失したもの)、FSP95融合タンパク質、かかる遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列、およびこのようなFSP95の遺伝子産物を産生できる宿主細胞発現系を包含する。

#### 【0023】

本発明はまた、抗イディオタイプ抗体を含む抗体、アンタゴニストおよびアゴニスト、ならびにFSP95遺伝子の発現を阻害する化合物またはヌクレオチド構築物(転写因子インヒビター、アンチセンス分子、およびリボザイム分子、または、遺伝子もしくは制御配列を置換した構築物)、あるいは、FSP95の発現を促進する化合物またはヌクレオチド構築物(例えば、そのFSP95コード配列が、プロモーター、プロモーター/エンハンサーなどの発現調節エレメントと機能的な形で連結している発現構築物)をも包含する。本発明はまた、ヒト(もしくはその突然変異体)のFSP95制御配列またはタンパク質コード配列を発現するように、あるいは、動物の内在性FSP95の発現を阻害またはロックアウトするように、遺伝子操作した宿主細胞および動物を提供する。

#### 【0024】

FSP95産物および融合タンパク質産物(即ち、該タンパク質、または例えばRII結合部位などの該タンパク質のドメインの融合物)、抗体および抗イディオタイプ抗体(Fabフラグメントを含む)、モジュレーターならびにリガンドを、受精能をモジュレートするための治療薬として用いることができる。

#### 【0025】

FSP95と相互作用する薬剤、低分子物質、またはタンパク質をスクリーニングする方法を本発明は提供する。本発明は、FSP95に結合するかもしくはその活性

をモジュレートすることにより、受精能に対する治療薬または診断マーカーとして有用な低分子物質、化合物、組換えタンパク質、ペプチド、核酸、抗体などをスクリーニングするためのin vivoおよびin vitroの両方の方法を包含する。

#### 【0026】

FSP95ポリヌクレオチド(即ち、FSP95遺伝子のコード領域、または制御領域)ならびに、融合タンパク質産物(即ち、FSP95タンパク質または例えばRII結合部位のような該タンパク質のドメインと他の異種ポリペプチドとの融合物)、抗体(抗イディオタイプ抗体およびFabフラグメントを含むがこれらに限定はしない)、モジュレーター、およびリガンドを薬物送達または遺伝子治療に利用できる。従って、本発明は、避妊、ならびに不妊症および癌の治療のための医薬製剤および方法をも包含する。

#### 【0027】

本発明の様々な態様は、以下の小節にて詳細に記述する。

#### 【0028】

### 5.1 FSP95核酸

本発明は、精製FSP95から得たペプチド配列を基に設計した縮重プライマーを用いてスクリーニングしたヒト精巣cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより同定したFSP95核酸のヌクレオチド配列を提供する。特定したFSP95遺伝子の核酸配列を本明細書中に記載する。本明細書中に用いる場合、「FSP95核酸」という語句は：

- (a) 図3に示すFSP95のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
- (b) 図3および図4に示すFSP95のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするあらゆる核酸配列、
- (c) 高ストリンジェントな条件下で(例えば、0.5M NaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中で65にてフィルターに結合しているDNAへのハイブリダイゼーション、そして、0.1xSSC/0.1%SDS中で68にて洗浄(Ausubel F. M.ら編、1989、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., およびJohn Wiley & sons, Inc., New York, 2.10.3頁))、図3および図4に示すFSP95のアミノ酸配列のいずれかをコードするDNA配

列の相補配列にハイブリダイズするあらゆるヌクレオチド配列、および/または

(d) 中程度のストリンジェントな条件(例えば、0.2xSSC/0.1%SDS中で42 にて洗浄(Ausubel F.M.ら、1989、上述))のような、上記条件よりも低ストリンジェントな条件下で、図3に示すFSP95内のアミノ酸配列のいずれかをコードするDNA配列の相補配列にハイブリダイズし、FSP95遺伝子産物に機能的に同等な遺伝子産物をコードする、あらゆるDNA配列、を指す。

#### 【0029】

本発明はまた、上記(a)~(d)までのヌクレオチド配列にハイブリダイズする、即ちその相補配列である、哺乳動物の核酸、好ましくはDNA分子に由来する核酸分子も含む。この際のハイブリダイゼーション条件は、上述のように、高ストリンジェントであるか、またはそれよりも低ストリンジェントな条件であってよい。核酸分子がデオキシオリゴヌクレオチド(「オリゴ」)である場合、高ストリンジェントな条件とは、例えば、6xSSC/0.05%ピロリン酸ナトリウム中で37 (14塩基のオリゴの場合)、48 (17塩基のオリゴの場合)、55 (20塩基のオリゴの場合)、および60 (23塩基のオリゴの場合)にて洗浄するような条件を指す場合がある。これらの核酸分子は、例えば、FSP95遺伝子を制御するために有用な(FSP95核酸配列の増幅反応におけるアンチセンスプライマー用に、または該アンチセンスプライマーとして有用な)FSP95のアンチセンス核酸分子をコードするか、またはかかるアンチセンス核酸分子として機能しうる。FSP95遺伝子の制御に関しては、癌に関連する細胞増殖を阻止するために、上記技術を用いて、例えばFSP95の制御経路を調節することができる。さらに、かかる配列は、リボザイムおよびまたは三重鎖配列の一部として用いることができ、また、FSP95遺伝子の制御においても有用でありうる。さらに、かかる分子を、例えば、FSP95に関連する障害(例えば、不妊症もしくは癌などの受精障害または増殖障害など)の原因を担っている特定のFSP95対立遺伝子の存在を検出するための診断方法の構成要素として使用できる。

#### 【0030】

本発明の核酸分子はさらに、上記(a)~(d)のFSP95ヌクレオチド配列によりコ

ードされるポリペプチドに対して、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはもっと高いアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

#### 【0031】

2種のアミノ酸配列または2種の核酸の同一性パーセントを決定するために、最適な比較を目的として配列をアラインする(例えば、第1のアミノ酸または核酸配列の配列内に、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのためにギャップを導入してもよい)。その後、対応するアミノ酸またはヌクレオチドのポジションにあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のあるポジションに、第2の配列の対応するポジションにあるものと同じアミノ酸残基またはヌクレオチドがある場合、これらの分子はそのポジションでは一致している。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列が共有する一致するポジションの数の関数である(即ち、同一性パーセントは、一致したオーバーラップするポジションの数をオーバーラップするポジションの総数で割り、100を掛けたものである)。ある実施形態では、2つの配列は同じ長さである。

#### 【0032】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて実施することもできる。2つの配列の比較に用いる好ましい数学的アルゴリズムとしては、限定するわけではないが、KarlinおよびAltschul、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264~2268に記載のアルゴリズム、KarlinおよびAltschul、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877に記載のように改変したものが挙げられる。このようなアルゴリズムを、Altschulら、1990、J. Mol. Biol. 215: 403~410に記載のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組込む。BLASTヌクレオチド検索を、スコアを100、配列(ワード)の長さを12としてNBLASTプログラムを用いて実施して、本発明の核酸分子に相同的なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、スコアを50、配列(ワード)の長さを3としてXBLASTプログラムを用いて実施して、本発明のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列を得ることができる。比較する目的のためのギャップを有するアラインメント

を得るためには、ギャップ付きBLAST(Gapped BLAST)を、Altschulら、1997、Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されているように利用することができる。あるいはまた、PSI-Blastを用いて、分子間の距離的關係を検出する繰り返し検索を実施することもできる(Altschulら、1997、上述)。BLAST、ギャップ付きBLAST、およびPSI-Blastプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを用いてよい(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。配列の比較に用いる他の好ましい数学的アルゴリズムとしては、限定するわけではないが、MyersおよびMiller、1988、CABIOS 4 : 11~17に記載のアルゴリズムが挙げられる。このようなアルゴリズムを、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込む。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを用いる場合、PAM120重量残基表(PAM120 weight residue table)を用い、ギャップ長ペナルティーを12、ギャップペナルティーを4で用いることができる。

#### 【0033】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを考慮して、またはこれを考慮せずに、上述と同様の技法を用いて算定できる。同一性パーセントを計算する際、典型的には正確な一致のみを計数する。

#### 【0034】

本発明はさらに、本明細書中に開示するあらゆるヌクレオチド配列の断片も含む。

#### 【0035】

特定の実施形態では、FSP95核酸の断片は、FSP95 PKA RIIサブユニット結合ドメインの配列をコードする。

#### 【0036】

本明細書中に用いる場合、FSP95 PKA RIIサブユニット結合のドメイン配列は、

(a) 例えば、318~335 (LKKVLLKHAKEVVSIDLID)、368~385 (QKATDMDAMLRKLYNVM)、または671~688 (EHLMSVMKLCVLIKSC)のアミノ酸を含む、PKA RIIサブユニット結合ドメインペプチド、などのペプチドをコードするあらゆるDNA配列、

(b) 高ストリンジェントな条件下で(例えば、0.5M NaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中で65℃にてフィルターに結合しているDNAへのハイブリダイゼーション、そして、0.1xSSC/0.1%SDS中で68℃にて洗浄(Ausubel F. M.ら編、1989、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., およびJohn Wiley & Sons, Inc., New York, 2.10.3頁))、(a)または(b)に記載のPKA RIIサブユニット結合ドメインの配列をコードするDNA配列の相補配列にハイブリダイズするあらゆるDNA配列、および/または

(c) 中程度のストリンジェントな条件(例えば、0.2xSSC/0.1%SDS中で42℃にて洗浄(Ausubel F.M.ら、1989、上述))などの、上記条件より低ストリンジェントな条件下で、(a)または(b)に記載のPKA RIIサブユニット結合ドメインの配列をコードするDNA配列の相補配列にハイブリダイズし、FSP95 PKA RIIサブユニット結合ドメインに機能的に同等な遺伝子産物をコードする、あらゆるDNA配列、を含む。

#### 【0037】

本発明は、単離または精製された形のFSP95 PKA RIIサブユニット結合ドメインの配列、ならびにFSP95に対して異種であるタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸と機能的な形で連結されたPKA RIIサブユニット結合ドメインの配列を含む組成物を包含する。

#### 【0038】

本発明のFSP95配列は、真核生物のゲノム、好ましくは哺乳動物のゲノム、および、さらに好ましくはヒトゲノムに由来する。特定の実施形態では、本発明のヌクレオチドは、高ストリンジェントな条件下で、図3に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズする哺乳動物ゲノム由来のあらゆるDNA配列を包含する。特定の実施形態では、本発明のヌクレオチドは、高ストリンジェントな条件下で、図3に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし、精子の運動性に関与し、PKA RIIサブユニット結合ドメインを含む遺伝子産物をコードする、哺乳動物ゲノム由来のあらゆるDNA配列を包含する。

#### 【0039】

所定のアミノ酸配列をコードする核酸を参照する場合、該核酸とはcDNA分子だ

けではなく、例えばgDNA配列(これからmRNA分子種が転写され、該分子種が所定のアミノ酸配列をコードするようにプロセッシングされる)も指すと解されるべきである。

【0040】

本発明はさらに、FSP95遺伝子を制御する核酸を含む。FSP95遺伝子のゲノム配列は非コード5'隣接領域内に制御配列を含む。FSP95遺伝子の5'制御配列は、図3に示すヌクレオチド配列の-5000、-3000、-2000、-1000、または-500の位置にあるヌクレオチドから+10、+100、または+300の位置にあるヌクレオチドまでのヌクレオチド配列の間に位置するポリヌクレオチド配列を含む。

【0041】

本発明はまた、

- (a) 前記FSP95コード配列および/またはその相補配列(即ち、アンチセンス)のいずれかを含有するベクター、
  - (b) 前記FSP95コード配列のいずれかを、該コード配列の発現を指令する制御エレメントに機能的な形で連結して含有する発現ベクター、そして
  - (c) 前記FSP95コード配列のいずれかを、宿主細胞内で該コード配列の発現を指令する制御エレメントに機能的な形で連結して含有する遺伝子操作した宿主細胞、
- をも包含する。

【0042】

本明細書中で用いる場合、制御エレメントは、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、ならびに発現を起動および制御する当業者に公知の他のエレメントを含むが、これらに限定はしない。かかる制御エレメントには、サイトメガロウイルスhCMVの最初期遺伝子、アデノウイルスSV40の初期遺伝子または後期遺伝子、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージAの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の調節領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、および酵母 接合因子のプロモーターが含まれるが、これらに限定はされない。

【0043】

ある実施形態では、本発明のFSP95の核酸配列は哺乳動物の核酸配列であり、好ましくはヒトの配列である。

#### 【0044】

さらに他の実施形態では、本発明のFSP95の核酸配列は、図3および図4に示すアミノ酸配列に対応するポリペプチド部分(即ち、これらアミノ酸配列に類似性のあるアミノ酸配列を示すポリペプチド部分)を含むFSP95遺伝子産物をコードする核酸配列であり、この場合の対応する部分とは、FSP95遺伝子産物の全長にわたって平均すると、図3および図4に示される配列と約50%以上のアミノ酸の同一性を示す部分である。

#### 【0045】

特定の実施形態では、核酸をコードするFSP95は、図3に示すヌクレオチド配列もしくはそのコード領域のcDNA配列、またはFSP95タンパク質(例えば、図3および図4に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質)をコードする核酸を含む。本発明は、FSP95核酸配列の少なくとも8個のヌクレオチド(即ちハイブリダイゼーションできる部分)からなる単離または精製された核酸を提供し、他の実施形態では、該核酸は、FSP95配列の少なくとも25個の(連続した)ヌクレオチド、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、2900、もしくは2941個の隣接するヌクレオチド、または全長のFSP95コード配列からなる。例えば、ある実施形態では、本発明は、図3に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド1~200、201~250、251~300、301~350、351~400、401~450、451~500、501~750、751~1000、1001~1501、もしくは1501~2000、2001~2500、もしくは2501~2941からなる単離または精製された核酸を提供する。他の実施形態では、該核酸は、25、50、75、100、200、300、400、500、1000、1500、2000、2500、または2941ヌクレオチド長より短い。核酸は一本鎖でも二本鎖でもよい。本発明はまた、前記配列とハイブリダイズできる、または前記配列に相補的な核酸も提供する。特定の態様では、FSP95遺伝子の少なくとも10、25、50、100、200、300、400、500、1000、1500、2000、2500ヌクレオチド、またはFSP95遺伝子の全コード領域に対して相補的な配列を含む核酸が提供される。当業者であれば理解するとおり、本発明は、上述の図3に示すヌクレオチド配列のcDNA

配列をもたらすゲノムDNA配列をも包含する。

【0046】

図3に示すヌクレオチド配列において開示されるヒトFSP95核酸配列に加えて、他のFSP95核酸配列は、本明細書中に開示するFSP95の核酸配列と組み合わせて当技術分野で公知の分子生物学的技法を使用することにより、過度の実験をすることなく特定することができ、容易に単離できる。これらの他の配列は、本発明の範囲内である。例えば、図3に示すヌクレオチド配列に開示されたものと同じ遺伝子座または異なる遺伝子座にある、別のヒトFSPの核酸配列を容易に単離できる。例えば、ヒトゲノム中の他の遺伝子座または物理的な位置にある、FSP95遺伝子産物の1つ以上のドメインに極めて高い相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子、およびFSP95遺伝子産物と機能的に同等の遺伝子産物をコードする遺伝子が存在し得る。さらに、他種に存在するFSP95に相同的な核酸配列も容易に同定および単離できる。

【0047】

図3に示すヌクレオチド配列に開示される配列と同一の遺伝子座および物理的な位置に存在するFSP95核酸配列の同定および単離に関しては、このような配列は、例えば、標準的配列決定技術および細菌人工染色体(BAC)およびP1人工染色体(PAC)技術を用いることにより容易に得ることができる。

【0048】

ヒトまたは他種(例えばマウス)のFSP遺伝子または核酸の相同体をクローニングするには、本明細書中に開示される単離されたFSP95核酸配列を標識し、それを用いて対象とする生物(例えばマウス)に由来する適当な細胞または組織(例えば精巣)から得られたmRNAから構築したcDNAライブラリーをスクリーニングする。cDNAライブラリーが、標識した配列が由来する生物種とは異なる生物に由来する場合は、使用するハイブリダイゼーション条件はより低ストリンジェントな条件とすべきである。

【0049】

あるいはまた、標識した断片を用いて、さらに、対象の生物に由来するゲノムライブラリーを、適切なストリンジェントな条件を用いてスクリーニングしても

よい。低ストリンジェントな条件とは、当技術分野では公知であり、ライブラリーおよび標識した配列が由来する特定の生物に応じて予測できる通りに変わる。かかる条件に関する指針には、例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Press, N.Y.; およびAusbelら(上述)を参照のこと。さらに、FSP95遺伝子の相同体は、例えば、本明細書中に開示されるいずれかのFSP95内にあるアミノ酸配列に基づいて設計した2つの変性オリゴヌクレオチドプライマープールを用いてPCRを行うことにより、ヒト核酸から単離することができる。

#### 【0050】

該PCR産物をサブクローニングして配列決定し、増幅された配列がFSP95遺伝子核酸配列の配列であることを確かめるとよい。その後、該PCR断片を用いて、様々な方法により全長cDNAクローンを単離できる。例えば、その増幅断片を標識し、それを用いてバクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングすることができる。あるいはまた、標識化断片を用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、ゲノム由来のクローンを単離できる。

#### 【0051】

PCR技術は、全長cDNA配列を単離するのに用いることもできる。例えば、標準的手法に従って、適切な細胞または組織(例えば精巣)を供給源として、そこからRNAを単離することができる。第1鎖合成を誘導するために該増幅断片のほぼ5'末端部に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、RNAの逆転写反応を実施するとよい。その後、ここで得られたRNA/DNAハイブリッドに、標準的な末端トランスフェラーゼ反応を用いてグアニンテールを末端に付加することができ、該ハイブリッドは、RNase Hで消化して、その後、ポリ-Cプライマーを用いて第2鎖の合成を誘導することができる。従って、該増幅断片の上流にあるcDNA配列は、容易に単離できる。利用できるクローニング法の解説としては、Sambrookら(上述)を参照のこと。

#### 【0052】

FSP95核酸配列をさらに用いて、FSP95遺伝子の対立遺伝子を同定することもできる。このような突然変異対立遺伝子を、例えば受精障害などのFSP95遺伝子障

害の症状の原因となる遺伝子型を有することが判明しているか、またはそう推測される個体から単離することができる。このような対立遺伝子は本発明の範囲内である。

#### 【0053】

FSP95対立遺伝子は、一本鎖高次構造多型(SSCP)突然変異検出技術、サザンブロット、および/またはPCR増幅技術により同定することができる。プロモーター領域を含む全FSP95配列のオーバーラップする領域を増幅するためのプライマーは、通例どおり設計できる。ある実施形態では、プライマーをエキソンとイントロンの境界を含むように設計して、まず、コード領域を突然変異について調べることができる。正常および症状のある個体のリンパ細胞から単離されたゲノムDNAをPCRの鋳型として用いる。正常および症状のある個体からのPCR産物を、一本鎖高次構造多型(SSCP)突然変異検出技術および/または配列決定によって比較する。SSCP解析は以下の通り実施する：

ゲノムDNA100ngを、最終濃度が10pmolの各プライマー、0.5UのTaq DNAポリメラーゼ(Promega)、2.5 μMのdNTPs(Pharmacia)中の1 μCiの  $-[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN; 比活性3000Ci/mmol)、10mMのTris-HCl(pH8.8)、50mMのKCl、1mMのMgCl<sub>2</sub>、0.01%のゼラチンとなるように添加した10 μl反応液中で増幅させる。サーマルサイクラー(MJ Research, Boston, MA, USA)で、変性(94 °C)、アニーリング(プライマーの融解温度によって56 ~ 64 °C)、および伸長(72 °C)のサイクルを30サイクル行った後、最後の伸長反応を72 °Cで7分間行う。反応混合物の2 μlを0.1%SDS、10mMのEDTAで希釈した後、20mMのNaOHを含むシーケンシング停止溶液と1 : 1で混合する。サンプルを95 °Cで5分間加熱して、氷上で3分間冷却した後、その3 μlを5%(v/v)グリセロールを含む6%アクリルアミド/TBEゲルに載せる。室温で12~15時間8Wにてゲルを泳動する。種々の時間にわたって-70 °Cで増感スクリーンを用いてフィルムに暴露することにより、オートラジオグラフィーを実施する。その後、突然変異型FSP95遺伝子産物の機能の消失または変化の原因となる突然変異を調べることができる。

#### 【0054】

あるいはまた、例えばPCRを用いて、突然変異型FSP95遺伝子のcDNAを単離する

ことができる。この際、突然変異型FSP95対立遺伝子を有すると推定される個体で発現していることが判明しているか、またはそう推測される組織から単離したmRNAにオリゴ-dTオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、逆転写酵素を用いて新しい鎖を伸長させることにより、cDNAの第1鎖を合成できる。その後、正常な遺伝子の5'末端に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いてcDNAの第2鎖を合成する。これら2つのプライマーを用いて、この生成物を、PCRにより増幅して適切なベクター内にクローニングし、当技術分野で公知の方法によるDNA配列解析に供する。突然変異型FSP95対立遺伝子のDNA配列を正常なFSP95対立遺伝子のDNA配列と比較することにより、突然変異型FSP遺伝子産物の機能の消失または変化の原因となる突然変異を調べることが可能である。

#### 【0055】

あるいはまた、突然変異型FSP95対立遺伝子を有することが推測されるか、もしくはそう判明している個体から得たDNAを用いてゲノムライブラリーを構築でき、または、突然変異型FSP95対立遺伝子を発現していることが判明しているか、もしくはそう推測される組織から得たRNAを用いてcDNAライブラリーを構築することができる。その後、損傷の無いFSP95遺伝子または適当なその断片を標識し、それをプローブとして使用して上記ライブラリー中の相当する突然変異型FSP95対立遺伝子を同定できる。その後、突然変異型FSP95核酸配列を含むクローンを精製し、当技術分野で公知の方法により配列解析に供することが可能である。

#### 【0056】

さらに、発現ライブラリーを、例えば、突然変異型FSP95対立遺伝子を有することが推測されるか、もしくはそう判明している個体の、突然変異型FSP95対立遺伝子を発現していることが判明しているか、またはそう推測される組織から単離したRNAから合成したcDNAを用いて構築することができる。このようにして、推定される突然変異組織により作成された遺伝子産物を発現させ、5.3節に後述するように正常なFSP95遺伝子産物に対して誘起させた抗体と標準的抗体スクリーニング技術を組み合わせて用いてスクリーニングすることができる(スクリーニング技術については、例えばHarlowおよびLane編、1988、"Antibodies; A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harborを参照のこと

と)。

【0057】

FSP95タンパク質の誘導体および類似体をコードする核酸、およびFSP95アンチセンス核酸は、上述の方法により単離できる。本明細書中に用いる場合、「FSP95タンパク質のフラグメントまたは一部をコードする核酸」という語句は、FSP95の上述のフラグメントまたは一部のみをコードする核酸をいい、連続的な配列であるFSP95タンパク質の他の隣接部分をコードする核酸を指すのではない。

【0058】

同種または異種の他のFSP95の核酸の間で保存されている(即ち、相同性のある)領域を含むFSP95核酸の断片もまた提供される。1種以上のFSP95ドメインをコードする核酸を上述の方法により単離することができる。

【0059】

FSP95突然変異が機能の変化を有する発現遺伝子産物をもたらす(例えば、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異の結果として)ような場合、FSP95遺伝子産物に対する一連のポリクローナル抗体が該突然変異型FSP95遺伝子産物と交差反応すると考えられる。標識したこれらの抗体を用いる反応により検出されたライブラリーのクローンを精製して、当技術分野で公知の方法による配列解析に供することができる。

【0060】

## 5.2. FSP95タンパク質およびポリペプチド

本発明はさらに、FSP95によりコードされるタンパク質およびアミノ酸配列、ならびにこれらの誘導体(例えば断片)および類似体を提供する。特に、本発明は、機能的に活性を有する、すなわち全長(野生型)FSP95タンパク質に関係する1以上の機能的活性を示すことができる、FSP95誘導体および類似体を提供する。このような機能的活性としては、PKAのRIIサブユニットへの結合、リン酸化、精子運動性のモジュレート、精子マーカー、抗原性(抗FSP95抗体への結合能または結合についてのFSP95との競合能)および免疫原性(FSP95に結合する抗体を生成する能力)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明はさらに、FSP95タンパク質の1以上のドメインを含むFSP95の断片(ならびにこれらの誘導体

および類似体)を提供する。具体的な実施形態において、FSP95タンパク質はヒトのタンパク質である。

#### 【0061】

図3および図4に示したアミノ酸配列は、FSP95遺伝子産物を表す。FSP95遺伝子産物は、本明細書中においてしばしば「FSP95」とも呼ばれ、上記第5.1節で記載したFSP95核酸配列によりコードされた産物を含む。本発明に従って、FSP95遺伝子産物をコードする核酸配列は、哺乳動物ゲノムを含む真核生物ゲノムに由来するものである。好適な実施形態において、FSP95産物をコードする核酸配列は、ヒトゲノムに由来するものである。

#### 【0062】

FSP95タンパク質、ポリペプチドおよびこれらのペプチド断片は、様々な用途のために調製することができる。例えばこのような分子は、抗体を産生するため、診断的および治療的アッセイで使用するため、精子運動性に関与する他の精子遺伝子産物を同定するため、または精子運動性をモジュレートする化合物を同定するために使用することができる。

#### 【0063】

さらに、本発明のFSP95産物は、機能的に同等な(第5.1節の定義を参照されたい)産物を表すタンパク質を含み得る。機能的に同等なFSP95産物は、上記第5.1節で記載したFSP95核酸配列によりコードされるアミノ酸配列の中のおよび/またはこれに隣接するアミノ酸残基の欠失(中間部欠失を含む)、付加(融合タンパク質を生成する付加を含む)、または置換を含んでいてもよいが、これらの改変は、その変化が機能的に同等なFSP95遺伝子産物を生成するような「サイレント」変化をもたらすようなものである。アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性および/または両親媒性の性質の類似性に基づいて行うことができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられ、極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられ、正電荷(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが

挙げられ、ならびに負電荷（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。

【0064】

本発明に包含されるFSP95タンパク質の具体的な機能的変異体としては、ヒト精子の調製物（タンパク質）から得られる以下のキロダルトン分子量（MW）および等電点（pI）を有する免疫反応性タンパク質が挙げられる。

【0065】

或いは、機能の改変が望まれる場合、遺伝子操作により欠失または非保存的改変を行って、改変されたFSP95遺伝子産物を精製することができる。このような改変は、例えばFSP95産物の生物学的機能のうちの1以上を改変することができる。さらに、このような改変は、選択された宿主細胞内における発現やスケールアップ（scale up）等により適したFSP95産物を生成するように選択してもよい。例えば、1つの実施形態において、システイン残基を欠失させたり、または他のアミノ酸残基で置換して、ジスルフィド結合を除去することができる。他の実施形態において、チロシン残基を欠失させるかまたは他のアミノ酸残基で置換して、チロシンのリン酸化を排除することができる。

【0066】

FSP95タンパク質の1以上のドメインに対応するペプチドおよび/またはタンパク質、ならびにFSP95タンパク質またはFSP95タンパク質の一部（末端切断型FSP95タンパク質もしくはペプチド）またはFSP95タンパク質ドメインが無関係のタンパク質に融合された融合タンパク質も、本発明の範囲内に含まれる。このようなタンパク質およびペプチドは、上記第5.1節に開示したFSP95ヌクレオチド配列に基づいて、および/または本明細書に開示したFSP95アミノ酸配列に基づいて、設計することができる。融合タンパク質としては、FSP95タンパク質もしくはペプチドを安定化させてin vivoにおける半減期を長くするIgFc融合体、その融合タンパク質の細胞膜への結合を可能とする任意のアミノ酸配列との融合体、あるいはマーカー機能を果たす酵素、蛍光タンパク質、発光タンパク質、またはフラッグエピトープタンパク質もしくはペプチドとFSP95タンパク質ドメインとの融合体が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0067】

また本発明のFSP95タンパク質は、cDNA配列の少なくとも1つのエクソンによってコードされるドメインまたはその断片が欠失しているFSP95タンパク質配列も含む。

## 【0068】

本発明のFSP95ポリペプチドはさらに、翻訳後修飾（ステアリン化（stearylation）、ミリストイル化、パルミチン化（palmitation）、グリコシル化、アセチル化およびリン酸化を含むがこれらに限定されない）を含んでもよい。好適な実施形態において、FSP95ポリペプチドは、ステアリン化、ミリストイル化、パルミチン化、および親油性アミノ酸の取り込みなどの技法を用いて修飾し、これらを膜透過性とする。天然FSP95タンパク質がこのような修飾を可能する認識モチーフを持たない場合、酵素認識シグナル等のモチーフをコードするFSP95遺伝子のヌクレオチド配列の中に導入して修飾FSP95遺伝子産物を生成することは、当業者にとって外資手段である。

## 【0069】

5.3. ペプチドおよびペプチド類似体の調製5.3.1. 化学合成

本発明のペプチドまたはその類似体は、事実上、ペプチドおよびペプチド類似体を調製するためのどのような公知技術を用いて調製してもよい。例えば、ペプチドは、従来の溶液または固相ペプチド合成法を用いて直鎖状で調製してその樹脂から切断した後、精製工程を行って調製することができる（Creighton, 1983, Protein Structures And Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y.）。本明細書中に記載されるペプチドを合成するのに適した手法は、当分野では周知である。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定によって確認することができる（例えばEdman分解法および質量分析法）。

## 【0070】

さらに、該ペプチドの類似体および誘導体は、化学合成することができる。本発明のペプチドの各アミノ酸の間の結合は、アミド、置換アミドまたはアミドの同配体であってもよい。非古典的なアミノ酸または化学的アミノ酸類似体は、置

換または付加によって該配列中に導入することができる。非古典的アミノ酸としては、一般的アミノ酸のD-異性体、 $\beta$ -アミノイソブチル酸、4-アミノブチル酸 (Abu) 2-アミノブチル酸、 $\gamma$ -Abu、 $\gamma$ -Ahx、6-アミノヘキサン酸 (Aib) 2-アミノイソブチル酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 $\beta$ -アラニン、フルオロ-アミノ酸、デザイナ-アミノ酸 (例えば  $\beta$ -メチルアミノ酸、 $\gamma$ -メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸など) およびアミノ酸類似体全般が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸はD(右旋性)またはL(左旋性)であってもよい。

#### 【0071】

環化ペプチドは、直鎖状ペプチドの末端にCys残基を付加することにより形成することができる。ジスルフィド結合の形成が望ましい場合は、ジスルフィド結合は、一般に弱い酸化剤の存在下で行われる。化学酸化剤を用いても良いし、または化合物を単に大気中の酸素にさらしてこれらの結合を形成することもできる。当分野では様々な方法が公知であり、例えばTam, J.P.ら, 1979, Synthesis 9 55-957; Stewartら, 1984, Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版, Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmedら, 1975, J.Biol. Chem. 250: 8477-8482 ;およびPermingtonら, 1991 Peptides 1990 164-166, GiraltおよびAndreu編, ESCOM Leiden, The Netherlandsによって記載された方法が挙げられる。さらに他の方法は、Kamberら, 1980, Helv Chim. Acta 63:899-915に記載されている。固相支持体上で行われる方法は、Albericio, 1985, Int. J. Peptide Protein Res. 26:92-97により記載されている。本発明のペプチドにおいてジスルフィド結合を形成するためには、これらの方法のいずれを使用してもよい。

#### 【0072】

##### 5.3.2. 組換え合成

遺伝子によりコードされたアミノ酸によってそのペプチド全体が構成される場合、またはそのペプチドの一部がそのように構成される場合、そのペプチドまたはその関連部分は、従来の組換え遺伝子操作技法を用いて合成することもできる

。

## 【0073】

組換え産生の場合、直鎖状のペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を適当な発現ベクター（即ち挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクター、またはRNAウイルスベクターの場合は複製および翻訳に必要なエレメントを含むベクター）の中に挿入する。次にこの発現ベクターを適当な標的細胞中にトランスフェクトし、この標的細胞が該ペプチドを発現する。次に、用いる発現系に応じて、当分野で周知の手法によって、発現されたペプチドを単離する。組換えタンパク質およびペプチドの産生方法は、当分野では周知である（例えばManiatisら、1989、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; およびAusubelら、1989、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.を参照されたい）。ヒトGAD65のコード配列が記載されている（Buら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:2115-2119; BuおよびTobin、1994、Genomics 21:222-228）。本明細書中の開示に基づいた拮抗的ペプチドをコードするために天然配列にコドン置換を導入するための方法は、当業者には周知である。

。

## 【0074】

5.3.3. 組換えFSP95タンパク質、ベクターおよび細胞

FSP95遺伝子産物、そのペプチド断片およびその融合タンパク質は、当分野で周知の技法を用いた組換えDNA技法によって産生することができる。このように、FSP95遺伝子配列を含む核酸を発現させることによって本発明のFSP95遺伝子ポリペプチド、ペプチド、融合ペプチドおよび融合ポリペプチドを調製するための方法を、本明細書中に記載する。当業者に周知の方法を用いて、FSP95遺伝子産物のコード配列ならびに適当な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えばin vitro組換えDNA技法、合成技法およびin vivo遺伝子組換え法が含まれる。例えばSambrookら、1989（前掲）およびAusubelら、1989（前掲）に記載された技法を参照されたい。あるいは、FSP95遺伝子産物の配列をコードすることができるRNAは、例えば合成装置を

用いて化学合成してもよい。例えば“Oligonucleotide Synthesis”，1994，Gait編，IRL Press，Oxfordに記載された技術を参照されたい。

#### 【0075】

種々の宿主発現ベクター系を用いて、本発明のFSP95遺伝子のコード配列を発現させることができる。このような宿主発現系は、目的のコード配列を産生して精製するために用いるビークルだけでなく、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトしたときに本発明のFSP95遺伝子産物をin situで発現することができる細胞も指す。これらの発現系には以下の微生物が挙げられるがこれらに限定されない：FSP95遺伝子産物のコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば大腸菌、枯草菌）；FSP95遺伝子産物のコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えばサッカロミセス属、ピチア属）；FSP95遺伝子産物のコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；FSP95遺伝子産物のコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルスCaMV；タバコモザイクウイルスTMV）を感染させた、またはFSP95遺伝子産物のコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えばTiプラスミド）で形質転換した植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えばアデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えばCOS、CHO、BHK、293、3T3）。

#### 【0076】

細菌系において、発現されるFSP95遺伝子産物のための用途に応じて、多くの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、このようなタンパク質を大量に産生する場合、FSP95タンパク質の医薬組成物を生成するまたはFSP95タンパク質に対する抗体を産生するには、例えば容易に精製される融合タンパク質産物の高レベル発現を指令するベクターが望ましいであろう。このようなベクターには、大腸菌発現ベクターpUR278（Rutherら，1983，EMBO J. 2，1791）（この

ベクターでは、融合タンパク質が生成されるように、FSP95遺伝子産物のコード配列をlacZコード領域に読取り枠を合わせて該ベクター中に個々にライゲートし得る)、pINベクター (InouyeおよびInouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13, 3101-3109; Van HeekeおよびSchuster, 1989, J. Biol. Chem. 264, 5503-5509) 等が含まれるが、これらに限定されない。pGEXベクターを用いて外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させることもできる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させた後に遊離グルタチオンの存在下で溶出させることによって、溶解した細胞から簡単に精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物がGST成分から放出されるように、トロンピンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

#### 【0077】

昆虫細胞系では、外来遺伝子を発現させるためにベクターとしてオートグラフィア・カリフォルニア (*Autographa californica*) の核多角体病ウイルス (AcNPV) を用いる。このウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞中で増殖する。該ウイルスの非必須領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) の中にFSP95遺伝子のコード配列を個々にクローニングし、AcNPVプロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。FSP95遺伝子のコード配列を首尾良く挿入すれば、ポリヘドリン遺伝子の不活化および非閉塞組換えウイルス (即ち、ポリヘドリン (polyhedrin) 遺伝子によってコードされるタンパク質様外被を持たないウイルスなど) の産生につながる。次にこれらの組換えウイルスを用いてスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞を感染させ、該細胞中で挿入した遺伝子を発現させる (例えばSmithら, 1983, J. Virol. 46, 584; Smith, 米国特許第4,215,051号を参照されたい)。

#### 【0078】

哺乳動物宿主細胞では、多くのウイルスに基づく発現系を用いることができる。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合、目的のFSP95遺伝子のコード配列をアデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば後期プロモーターおよび

3部 ( tripartite ) リーダー配列 ) に連結させることができる。次に *in vitro* もしくは *in vivo* 組換えによりこのキメラ遺伝子をアデノウイルスゲノム中に挿入することができる。該ウイルスゲノムの非必須領域 ( 例えばE1またはE3領域 ) に挿入すると、感染宿主中で生存可能であり且つFSP95遺伝子産物を発現することができる組換えウイルスを得ることができる ( 例えばLoganおよびShenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-3659を参照されたい )。挿入されたFSP95遺伝子産物のコード配列の効率的な翻訳のために特異的開始シグナルが必要な場合もある。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。それ自身の開始コドンおよび隣接配列を含むFSP95遺伝子全体を適当な発現ベクターに挿入する場合、更なる翻訳制御シグナルを加える必要はない。しかし、FSP95遺伝子のコード配列の一部のみを挿入する場合には、外来翻訳制御シグナル ( おそらくATG開始コドンを含む ) を挿入しなければならない。さらに、挿入物全体の翻訳を確実に行わせるために、所望のコード配列の読み枠に開始コドンを揃えなければならない。これらの外来翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、様々な起源 ( 天然および合成の両方を含む ) に由来するものであってよい。適当な転写エンハンサーエレメント、転写終結因子等を含有させることによって発現効率を上げることができる ( Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol. 153, 516-544を参照されたい )。

#### 【 0 0 7 9 】

さらに、挿入された配列の発現をモジュレートする宿主細胞系、または望ましい特定の方法で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞系を選択してもよい。タンパク質産物のこのような修飾 ( 例えばグリコシル化 ) およびプロセッシング ( 例えば切断 ) は、そのタンパク質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシングならびにタンパク質および遺伝子産物の修飾のための特徴的および特異的なメカニズムを有する。適当な細胞系または宿主系は、発現される外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実に行えるように選択することができる。このため、一次転写産物の適切なプロセッシング、該遺伝子産物のグルコシル化およびリン酸化のための細胞装置を持つ真核生物の宿主細胞を使用することができる。このような哺乳動物の宿主細胞には、CHO、VERO

、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3およびWI38が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0080】

組換えタンパク質を長時間にわたり高い収量で産生するためには、安定な発現が好ましい。例えば、FSP95遺伝子産物を安定に発現する細胞系を遺伝子操作により作製することができる。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー配列、転写終結因子、ポリアダニル化部位等）によって制御されるDNAおよび選択マーカを用いて宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAの導入後に、遺伝子操作した細胞を富化培地中で1～2日間増殖させた後、選択培地に移しかえてもよい。組換えプラスミド中の選択マーカは、その選択に対する耐性を付与し、そして細胞の染色体の中に該プラスミドを安定に組み込ませ、該細胞を増殖させて細胞増殖巣を形成させる。この細胞増殖巣は、後でクローニングして細胞系に増殖させることができる。この方法は、FSP95遺伝子産物を発現する細胞系を遺伝子操作により作製するために有利に使用することができる。このように遺伝子操作された細胞系は、FSP95遺伝子産物の内因性活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用である。

#### 【0081】

ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら，1977，Cell 11:223）、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（SzybalskaおよびSzybalski，1962，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026）およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら，1980，Cell 22: 817）遺伝子など（ただしこれらに限定されない）の多くの選択系を用いることができる。これらの遺伝子はそれぞれtk<sup>+</sup>，hgprt<sup>+</sup>またはaprt<sup>+</sup>細胞でそれぞれ使用することができる。また、代謝拮抗物質耐性は以下の遺伝子の選択基準として用いることができる：ミコフェノール酸に対する耐性を付与するdhfr（MulliganおよびBerg，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072）；アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo（Colberre-Garapinら，1981，J. Mol. Biol. 150:1）；およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro（Santerreら，1984，Gene 30:147

)。

#### 【0082】

あるいは、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を利用することにより任意の融合タンパク質を簡単に精製することができる。例えば、Janknechtらにより記載された系によって、ヒト細胞系において発現される非変性融合タンパク質を簡単に精製することができる (Janknechtら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA88, ; 8972-8976)。この系では、目的の遺伝子をワクシニア組換えプラスミド中にサブクローニングし、その遺伝子のオープンリーディングフレームを翻訳の際に6つのヒスチジン残基を含むアミノ末端タグに融合させる。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞から得た抽出物を $\text{Ni}^{2+}$ ニトリロ酢酸-アガロースカラムにローディングし、イミダゾールを含む緩衝液を用いてヒスチジン標識タンパク質を選択的に溶出する。

#### 【0083】

或いはまた、細胞内、細胞系内、または微生物内における内因性FSP95遺伝子の発現特性は、異種DNA調節エレメントを安定な細胞系もしくはクローニングされた微生物のゲノムの中に挿入し、その挿入された調節エレメントが該内因性FSP95遺伝子に機能しうる形で連結されるようにすることにより、改変することができる。例えば、通常「転写的にサイレント」である内因性FSP95遺伝子(すなわち細胞内、細胞系内または微生物内において通常は発現されないまたは非常に低レベルでのみ発現されるFSP遺伝子)を、その細胞内、細胞系内または微生物内で通常発現される遺伝子産物の発現を促進することができる調節エレメントを挿入することによって、活性化させることができる。或いは、転写的にサイレントな内因性FSP95遺伝子を、複数の細胞型にわたって機能する無差別の調節エレメントを挿入することによって活性化してもよい。

#### 【0084】

当業者に周知であり例えばChappelの米国特許第5,272,071号、国際特許出願公開番号第W091/06667号(1991年5月16日発行)に記載されたターゲッティング相同組換え等の技術を用いて、異種調節エレメントを、該エレメントが内因性FSP遺伝子と機能しうる形で連結されるように安定な細胞系またはクローニングされ

た微生物の中に挿入することができる。

【0085】

FSP95遺伝子産物は、トランスジェニック動物内において発現させることもできる。マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、マイクロブタ、ヤギ、ヒツジおよび非ヒト霊長類（例えばヒヒ、サルおよびチンパンジーなど）を含む（ただしこれらに限定されない）あらゆる種の動物を用いてFSP95トランスジェニック動物を作製することができる。本明細書中で使用される「トランスジェニック」という用語は、異なる種に由来するFSP95遺伝子配列を発現する動物（例えばヒトFSP95配列を発現するマウス）だけでなく、内因性（すなわち同種の）FSP95配列を過剰発現するよう遺伝子操作された動物または内因性FSP95遺伝子配列を発現しないように遺伝子操作された動物（すなわち「ノックアウト」動物）、ならびにこれらの子孫を指す。

【0086】

当分野で公知の技術を用いて、FSP95遺伝子のトランスジーンを動物の体内に導入し、トランスジェニック動物の創始系（founder line）を作製することができる。このような技法には、前核微量注入法（HoppeおよびWagner, 1989, 米国特許第4,873,191号）、レトロウイルスが媒介する生殖系への遺伝子導入（van der Puttenら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152）；胚幹細胞中における遺伝子ターゲティング（Thompsonら, 1989, Cell 56: 313-321）；胚のエレクトロポレーション（Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1803-1814）；および精子が媒介する遺伝子導入（Lavitranoら, 1989, Cell 57: 717-723）が含まれるが、これらに限定されない。このような技法の概説については、Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229を参照されたい。

【0087】

例えば静止期へと誘導した培養胚細胞、胎児細胞または成体細胞に由来する核の除核卵母細胞中への核移入等の当分野で公知の任意の技法を用いて、FSP95トランスジーンを含むトランスジェニック動物のクローンを作製することができる（Campbellら, 1996, Nature 380,: 64-66; Wilmutら, Nature 385,: 810-813）。

## 【0088】

本発明は、すべての細胞中にFSP95トランスジーンを担持するトランスジェニック動物、ならびに全ての細胞ではなく一部の細胞中に該トランスジーンを担持する動物（例えばモザイク動物）を提供する。トランスジーンは、単一のトランスジーンとして、またはコンカテマーとして組み込まれる（例えば頭と頭または頭と尾を突き合わせて並列に並べたもの）。またトランスジーンは、例えばLaskoら（Laskoら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-6236）の教示に従って特定の細胞型中に選択的に導入され活性化されてもよい。このような細胞型特異的活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、当業者には自明である。FSP95遺伝子のトランスジーンを内因性FSP95遺伝子の染色体部位の中に組み込むことが望ましい場合、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡単にまとめると、このような技法を用いる場合、内因性FSP95遺伝子に対しある程度のヌクレオチド配列相同性を含むベクターを、染色体配列との相同組換えによって、内因性FSP95遺伝子のヌクレオチド配列中に組み込んでその機能を破壊する目的のために設計する。またトランスジーンは、例えばGuら（Guら, 1994, Science 265, 103-106）の教示に従って特定の細胞型の中に選択的に導入し、その細胞型においてのみ内因性FSP95遺伝子を不活化することができる。このような細胞型特異的不活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、当業者には自明である。

## 【0089】

トランスジェニック動物を作製したら、標準的な技法を用いて組換えFSP95遺伝子の表現型発現をアッセイすることができる。動物組織を分析するためにサザンブロット分析またはPCR技法によって最初のスクリーニングを行い、トランスジーンが組み込まれたか否かをアッセイすることができる。またトランスジェニック動物の組織中のトランスジーンのみRNA発現レベルは、動物から得た組織サンプルのノーザンブロット分析、in situハイブリダイゼーション分析およびRT-PCR(逆転写酵素PCR)等の技法（ただしこれらに限定されない）を用いて評価することもできる。またFSP95遺伝子発現組織のサンプルは、FSP95トランスジーン産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的に評価することもできる。

## 【0090】

FSP95遺伝子産物またはそのペプチド断片は、様々な用途のために調製することができる。例えばこのような遺伝子産物またはそのペプチド断片は、抗体の産生のため、診断アッセイにおいて、または精子運動性に関与する他の細胞内もしくは細胞外遺伝子産物のマッピングおよび同定のために、用いることができる。このようなFSP95遺伝子産物には、FSP95遺伝子産物の1以上のドメインに対応するペプチドまたはポリペプチド等の可溶性誘導体（特に修飾により1以上の疎水性ドメインを欠失させたFSP95遺伝子産物）が含まれるが、これらに限定されない。或いは、FSP95タンパク質に対する抗体またはFSP95遺伝子産物を模倣する抗イディオタイプ抗体（Fabフラグメントを含む）、アンタゴニスト、またはアゴニストを用いて、生殖能疾患などのFSP95関連疾患を治療することができる。さらに他の方法において、FSP95遺伝子産物を被験体に直接投与して、精子運動性をモジュレートすることができる（例えば避妊薬としてまたは生殖能の増強するための使用）。他の実施形態において、このようなFSP95遺伝子産物をコードするヌクレオチド構築物を用いて、宿主細胞を遺伝子操作し、このようなFSP95遺伝子産物をin vivoで発現させることができる。これらの遺伝子操作された細胞は、FSP95遺伝子産物、FSP95ペプチドまたは可溶性FSP95ポリペプチドの連続的な供給を行う体内において「バイオリクター」として機能することができる。

## 【0091】

5.3.4 FSP95の1以上のドメインを含む組成物

特定の実施形態において、本発明はFSP95断片、またはFSP95タンパク質の1以上のドメイン（例えば核転位ドメイン）を含むまたは該ドメインからなる断片の類似体および誘導体を提供する。

## 【0092】

特定の実施形態は、ヒトFSP95タンパク質の特定の断片に最も相同的なそれぞれのFSP95タンパク質の断片である、FSP95の特定の断片を含む分子を提供する。FSP95相同体のドメインを含む断片は、第5.3.2節または第6節に記載されるタンパク質分析方法によって同定することができる。

## 【0093】

特定の実施形態において、本発明は、機能的R11サブユニット結合ドメインを有するFSP95タンパク質の断片、誘導体または類似体を提供する。機能的R11サブユニット結合ドメインをコードする核酸配列については上記第5.1節を参照されたい。他の具体的な実施形態において、本発明は、異種タンパク質に機能的に連結されたFSP95 R11サブユニット結合ドメインを含む融合タンパク質を提供する。この融合タンパク質は、該異種タンパク質を核に転位させるのに有用である。次の6つの残基の中の3つのリジンの前のプロリンは、核へのタンパク質の転位を指令することが分かっている(Hicks, G.R.およびRaikhel, N.V. (1995). Protein import into the nucleus: an integrated view. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11,155-158)。更に詳細な説明については後の第5.6節を参照されたい。

#### 【0094】

他の具体的な実施形態において、FSP95タンパク質の1以上のドメイン(またはその機能的部分)を含み且つFSP95タンパク質の1以上のドメイン(またはその機能的部分)を欠損する分子が提供される。具体的な実施例において、R11サブユニット結合ドメインを欠損するFSP95タンパク質誘導体が提供される。

#### 【0095】

### 5.4 FSP95抗体

本発明によれば、FSP95、その断片もしくは他の誘導体、またはそれらの類似体を免疫原として用いて、そのような免疫原に免疫特異的に結合する抗体を作製することができる。そのような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fab断片およびFab発現ライブラリーが挙げられるが、それらに限定されるものではない。具体的な実施形態では、ヒトFSP95タンパク質に対する抗体が作製される。別の実施形態では、FSP95のドメイン(例えば、R11サブユニット結合ドメイン)に対する抗体が作製される。

#### 【0096】

当業界で公知の種々の手順が、FSP95に対するポリクローナル抗体、誘導体、または類似体の作製に用い得る。特定の実施形態では、図3に示す配列またはその部分配列によりコードされるFSP95のエピトープに対するウサギポリクローナル抗体を得ることができる。抗体の作製のために、天然のFSP95またはその合成

物もしくは誘導体（例えば断片）を注射することにより種々の宿主動物を免疫することができ、例えばウサギ、マウス、ラットなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。免疫学的応答を増大させるために、宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いることができ、例えばフロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのような鉱物ゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびBCG（Calmette-Guérin 桿菌）やCorynebacterium parvumのような有用である可能性のあるヒトアジュバントが挙げられるが、それらに限定されるものではない。FSP95の配列またはその類似体に対するモノクローナル抗体の調製のためには、培養下にある連続細胞系により抗体分子の作製をもたらすいずれの方法でも用いることができる。例えば、KohlerおよびMilstein（1975, Nature 256:495-497）により最初に開発されたハイブリドーマ法、ならびにトリオーマ法およびヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozborら, 1983, Immunology Today 4:72）、ならびにヒト・モノクローナル抗体を作製するためのEBV-ハイブリドーマ法（Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁）が挙げられる。本発明のもう1つの実施形態では、モノクローナル抗体は、無菌動物において作製することができる [ PCT国際公報WO 89/12690（1989年12月12日公開）を参照 ]。本発明によれば、ヒト抗体を用いることが可能であり、ヒトハイブリドーマを用いることにより（Coteら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030）、またはin vitroでヒトB細胞をEBVウイルスで形質転換することにより（Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁）得ることができる。事実、本発明によれば、適切な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と共に、FSP95に特異的なマウス抗体分子からの該遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」（Morrisonら, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855 ; Neubergerら, 1984, Nature 312:604-608 ; Takedaら, 1985, Nature 314:452-454）の作製のために開発された技法を用いることができ、そのような抗体は本発明の範囲にある。

本発明によれば、一本鎖抗体の作製のために記載されている技法（米国特許第4,946,778号）を、FSP95特異的一本鎖抗体を作製するように適合させることができる。本発明のもう1つの実施形態は、Fab発現ライブラリーの構築のために記載された技法（Huseら，1989，Science 246:1275-1281）を利用して、FSP95に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片またはその誘導體もしくは類似体の迅速かつ容易な同定を可能にする。

#### 【0098】

該分子のイディオタイプを含む抗体断片は、公知の技法により作製することができる。例えば、そのような断片としては、該抗体分子のペプシン消化により得ることができる $F(ab')_2$ 断片；該 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド結合を還元することにより得ることができるFab'断片；該抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することにより得ることができるFab断片；およびFv断片が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

#### 【0099】

抗体の作製において、所望の抗体のスクリーニングは、当業界で公知の技法、例えばELISA（固相酵素免疫測定法）により達成できる。例えば、FSP95の特定のドメインを認識する抗体を選択するためには、そのようなドメインを含むFSP95断片に結合する生成物について作製されたハイブリドーマをアッセイしてもよい。第1のFSP95相同体には特異的に結合するが、別のFSP95相同体には特異的に結合しない抗体を選択するためには、該第1のFSP95相同体に対する陽性の結合および該第2のFSP95相同体への結合の欠如に基づいて選択すればよい。

#### 【0100】

FSP95のドメインに特異的な抗体も提供され、例えばPKa RIIサブユニット結合ドメインが挙げられる。

#### 【0101】

上記の抗体は、精子含有FSP95タンパク質の同定、精子の分離、ならびに診断方法における本発明のFSP95ポリペプチドの位置特定および活性（例えばこれらのタンパク質の画像形成）、適切な生理学的サンプル中でのそれらのレベルの測定などに関連する当業界で公知の方法において用いることができる。

## 【0102】

## 5.5 FSP95リガンド

天然のものおよび/または合成のもの（例えば小さな分子またはペプチドのライブラリー）の両者を含む種々の外因性化合物のいずれもが、FSP95結合能力についてスクリーニングできる。

## 【0103】

これらの方法は全て、FSP95タンパク質または断片を被験化合物と混合し、任意の結合が起こる時間にわたって放置し、任意の結合複合体についてアッセイするステップを含む。そのような方法は全て、実質的に純粋なFSP95タンパク質、実質的に純粋な機能的ドメイン断片、融合タンパク質、抗体ならびにそれらの作製方法および使用方法の本開示内容により可能になる。

## 【0104】

1つの実施形態では、ペプチドライブラリーを用いて、本発明のFSP95のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングでき、ランダムペプチドもしくはコンビナトリアルペプチド、または非ペプチドライブラリーのような多様性ライブラリーが、FSP95に特異的に結合する分子についてスクリーニングできる。用い得る多くのライブラリーが当業界では公知であり、例えば、化学的に合成されたライブラリー、組換え（例えばファージディスプレイライブラリー）、および *in vitro* 翻訳ベースのライブラリーが挙げられる。

## 【0105】

化学的に合成されたライブラリーの例は、Fodorら、1991、*Science* 251:767-773；Houghtenら、1991、*Nature* 354:84-86；Lamら、1991、*Nature* 354:82-84；Medynski、1994、*Bio/Technology* 12:709-710；Gallopら、1994、*J. Medicinal Chemistry* 37(9):1233-1251；Ohlmeyerら、1993、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926；Erbら、1994、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-11426；Houghtenら、1992、*Biotechniques* 13:412；Jayawickremeら、1994、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1614-1618；Salmonら、1993、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11708-11712；PCT公報W093/20242；およびBrennerおよびLerner、1992、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5381-5383に記載されている。

## 【0106】

ファージディスプレイライブラリーの例は、ScottおよびSmith, 1990, Science 249:386-390 ; Devlinら, 1990, Science, 249:404-406 ; Christianら, 1992, J. Mol. Biol. 227:711-718 ; Lenstra, 1992, J. Immunol. Meth. 152:149-157 ; Kayら, 1993, Gene 128:59-65 ; およびPCT公報WO94/18318 (1994年8月18日付) に記載されている。

## 【0107】

in vitro翻訳ベースのライブラリーとしては、PCT公報WO91/05058 (1991年4月18日付け) ; およびMattheakisら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026に記載のものが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

## 【0108】

非ペプチドライブラリーの例としては、ベンゾジアゼピンライブラリー (例えばBuninら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712を参照) を使用のために適合させることができ、ペプトイドライブラリー (Simonら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371) もまた使用可能である。化学的に形質転換されたコンビナトリアルライブラリーを作製するのに用い得る、ペプチド中のアミド官能価 (functionalities) が過メチル化されているライブラリーの別の例はOstreshら (1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142) により記載されている。

## 【0109】

該ライブラリーのスクリーニングは、種々の一般的に公知の方法のいずれかにより達成することができる。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示している次の参考文献を参照されたい : ParmleyおよびSmith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218 ; ScottおよびSmith, 1990, Science 249:386-390 ; Fowlkersら, 1992; BioTechniques 13:422-427 ; Oldenburgら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397 ; Yuら, 1994, Cell 76:933-945 ; Staudtら, 1988, Science 241:577-580 ; Bockら, 1992, Nature 355:564-566 ; Tuerkら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6988-6992 ; Ellingtonら, 1992, Nature 355:850-852 ; US 5,096,815, US 5,223,409およびUS 5,198,346 (全てLadnerら

) ; RebarおよびPabo, 1993, Science 263:671-673 ; ならびにPCT公報WO 94/18318。

#### 【0110】

具体的な実施形態において、スクリーニングは、ライブラリーメンバーを、固相に固定したFSP95タンパク質（または核酸もしくは誘導体）と接触させ、該タンパク質（または核酸もしくは誘導体）と結合しているライブラリーメンバーを収集することにより行うことができる。そのようなスクリーニング方法の例として、ParmleyおよびSmith, 1988, Gene 73:305-318 ; Fowlkesら, 1992, Bio Techniques 13:422-427 ; PCT公報WO 94/18318 ; および上記で引用した文献において「パンニング」法と命名されたものが例として記載されている。

#### 【0111】

別の実施形態では、酵母において相互作用しているタンパク質またはペプチドを選択するためのツーハイブリッド系 (Fields & Song, 1989, Nature 340:245-246 ; Chienら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582) を用いて、FSP95タンパク質または誘導体に特異的に結合する分子を同定することができる。

#### 【0112】

2種以上の成分間の結合相互作用は、種々の方法で測定できる。1つのアプローチは、該成分のなかの1つを容易に検出できる標識で標識し、それを別の成分と共に、それらが正常に相互作用する条件下におき、結合した標識化成分を未結合の標識化成分から分離する分離ステップを行い、次に、結合成分の量を測定することである。この結合反応に含まれる試験物質の効果は、この物質の存在下で結合する標識化成分の量を、その不在下で結合する量と比較することにより判定できる。

#### 【0113】

このタイプの手順における分離ステップは、種々のやり方で達成できる。1つのアプローチでは、結合反応の前に該標識化成分の結合パートナー（の一方）を固相に結合させ、該結合反応の後で該固相の洗浄により未結合の標識化成分を取り除くことができる。該結合パートナーの固相への結合は、当業者に公知の種々の方法で達成でき、例えば、化学的架橋、プラスチック表面への非特異的付着、

該固相へ付着させた抗体との相互作用、該結合パートナーに付着させたりリガンド（例えばビオチン）と該固相に付着させたりリガンド結合性タンパク質（例えばストレプトアビジン）との相互作用などが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

#### 【0114】

あるいはまた、該分離ステップは、溶液中で標識化成分をその結合パートナーと相互作用し得るようにした後で達成してもよい。該標識化成分とその結合パートナーとの大きさの差により、そのような分離が可能になれば、該分離は、その結合反応の生成物を、孔部が未結合の標識化成分は通過させるがその結合パートナーまたはその結合パートナーへの標識化成分は通過させない限外濾過に通すことにより達成できる。分離はまた、該標識化成分の結合パートナーを溶液から捕捉できる任意の試薬を用いて行うこともでき、例えば該結合パートナーに対する抗体、該結合パートナーと予め結合させてあるリガンドと相互作用し得るリガンド結合性タンパク質などが挙げられる。

#### 【0115】

### 5.6 FSP95核酸、タンパク質、誘導体、抗体およびモジュレーターの診断および治療を目的とする使用のための方法および組成物

---

#### 5.6.1 精巣に対する遺伝子をターゲティングするためのFSP95調節配列の治療目的の使用

---

FSP95プロモーター配列は、異種遺伝子産物の精子細胞特異的発現を駆動するために有利に用いることができる。異種遺伝子に機能的に連結されたFSP95プロモーターのヌクレオチド配列を含むベクターは、遺伝子治療および避妊に有用であり得る。1つの実施形態では、これらの配列は、避妊または不妊の目的で用い得る。FSP95プロモーター配列は、発現されている該細胞を死滅させる遺伝子に機能的に連結されたベクターに挿入できる。そのような遺伝子の例は当業界で公知であり、例えば殺精子薬および毒素が挙げられるが、それらに限定されるものではない。別の実施形態において、そのようなベクターは、精巣特異的な増殖性障害または癌に罹患している患者の癌細胞をターゲティングするのに用いて、該癌細胞を増殖抑制または死滅させることができる。

## 【0116】

1つの実施形態において、FSP95プロモーター配列は、精巣特異的な増殖性障害または癌に罹患している患者の細胞において遺伝子治療法を用いて薬剤または毒素の精子細胞特異的発現を駆動するのに用いて、該癌細胞を増殖抑制または死滅させることができる。別の実施形態では、薬剤または毒素の精子細胞特異的発現を駆動するためにプロモーター構築物を用いる遺伝子治療法を、精巣における不妊または避妊のために用いることができる。

## 【0117】

FSP95遺伝子のゲノム配列は、共に図3のポリヌクレオチド配列の非コード5'隣接遺伝子内にある調節配列を含み、任意の公知の方法により評価できる。1つの実施形態において、FSP95遺伝子についての方法は、図3のヌクレオチド配列の-2000位のヌクレオチドと+100位のヌクレオチドとの間、より好ましくは図3の-3000位と+200位の間位置するポリヌクレオチド配列を含む。

## 【0118】

FSP95遺伝子の発現の調節に関与する図3のFSP95ポリヌクレオチド断片の5'調節配列を同定する方法は、当業者には周知である(Sambrookら, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照)。用い得る典型的な方法の一例は、レポーター遺伝子と図3のFSP95ゲノムプロモーター配列からのゲノム配列とを保有する組換えベクターを含む。簡単に説明すると、該レポーター遺伝子(例えばグリーン蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)の発現は、生物学的に活性なポリヌクレオチド断片の調節下に置かれた場合に検出される。該遺伝子の第1のエキシソンの上流に位置するゲノム配列は、任意の適切なプロモーターレポーターベクターにクローニングすることができ、該ベクターの例としては、pSEAPBasic、pSEAP-Enhancer、p gal-Basic、p gal-EnhancerまたはpEGFP-1プロモーターレポーターベクター(Clontech社製)またはpGL2-basicもしくはpGL3-basicプロモーターのないルシフェラーゼレポーター遺伝子ベクター(Promega社製)が挙げられる。これらのプロモーターレポーターベクターの各々は、迅速にアッセイ可能なタンパク質(

例えば分泌型アルカリホスファターゼ、グリーン蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、または $\beta$ -ガラクトシダーゼ)をコードするレポーター遺伝子の上流に位置する複数のクローニング部位を含む。第1のFSP95エキソンの上流の配列は、該レポーター遺伝子の上流のクローニング部位に両方向で挿入され、適切な宿主細胞に導入される。レポータータンパク質のレベルをアッセイし、該クローニング部位にインサートを含まないベクターを用いて得られるレベルと比較する。対照のベクターに関してインサートを含むベクターにおいて発現レベルの上昇があれば、該インサート内にはプロモーターが存在することを示している。

#### 【0119】

FSP95遺伝子の5'非コード領域内のプロモーター配列は、エキソヌクレアーゼIIIまたは適切な制限エンドヌクレアーゼ消化などの慣用の方法を用いて入れ子構造の5'および/または3'欠失を構築することによりさらに明確にすることができる。このようにして得られる欠失断片は、例えばColesら(Hum. Mol. Genet. 7:791-800, 1998)による記載のようにして、該プロモーターレポーターベクターに挿入して、該欠失がプロモーター活性を低下または喪失させたか否かを判定することができる。このようにして、該プロモーターの境界を規定できる。所望により、該プロモーター内の可能性のある個々の調節部位は、部位指定突然変異誘発またはリンカースキャニング(linker scanning)により同定して、該プロモーター内の可能性のある転写因子結合部位を個々に、または組み合わせて取り除くことができる。これらの突然変異の転写レベルに及ぼす効果は、突然変異をプロモーターレポーターベクター内のクローニング部位へ挿入することにより調べることができる。このタイプのアッセイは当業者には周知である(WO 97/17359、US 5,374,544、EP 582 796、US 5,698, 389、US 5,643,746、US 5,502,176およびUS 5,266,488)。

#### 【0120】

FSP95遺伝子のプロモーターの活性および特異性は、異なるタイプの細胞または組織においてFSP95プロモーターに機能的に連結された検出可能なポリヌクレオチドの発現レベルをモニタリングすることによりさらに評価できる。この検出可能なポリヌクレオチドは、所定のオリゴヌクレオチドプローブと特異的にハイ

ブリダイズするポリヌクレオチド、またはFSP95ポリペプチドまたはその断片もしくは変異体を含む検出可能なタンパク質をコードするポリヌクレオチドのいずれかであり得る。このタイプのアッセイは当業者には周知である（US 5,502,176 およびUS 5,266,488）。

#### 【0121】

FSP95遺伝子コード領域の5'末端および3'末端の双方に位置する調節エレメントを保有するポリヌクレオチドは、対象の異種ポリヌクレオチドの転写および翻訳活性を調節するのに有利に用いることができ、このポリヌクレオチドは、FSP95調節領域に関しては異種である。

#### 【0122】

したがって、本発明は、図3のヌクレオチド配列の-2000位のヌクレオチドと+100位のヌクレオチドとの間に位置するポリヌクレオチド配列、またはそれに相補的な配列またはその機能的活性断片を含む、精製、単離および組換え核酸を提供する。

#### 【0123】

本発明による図3の配列の「機能的に活性」な断片とは、組換え細胞宿主における組換えポリペプチドまたは組換えポリヌクレオチドの発現の調節領域として機能的である該ポリヌクレオチド断片を含む、または該断片からなるポリヌクレオチドを意味する。本発明の目的のために、核酸またはポリヌクレオチドが組換えポリペプチドまたは組換えポリヌクレオチドの発現の調節領域として「機能的」と言えるのは、該調節ポリヌクレオチドが転写および翻訳調節情報を含むヌクレオチド配列を含み、かつそのような配列が所望のポリペプチドまたは所望のポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列と「機能的に連結」されている場合である。

#### 【0124】

本発明による調節ポリヌクレオチドは、有利にも、所望の宿主細胞または宿主生物においてコード配列を発現させるのに用い得る組換え発現ベクターの一部となり得る。

#### 【0125】

### 5.6.2 遺伝子置換型送達または治療

精巣特異的遺伝子発現に関して、上記5.6.1節に記載したFSP95遺伝子調節配列は、例えば、精巣癌などの増殖性疾患の治療に利用できる。このような治療は、例えば、遺伝子置換型治療形態で施すことができる。特に、細胞に対して毒性の異種遺伝子産物の産生を指示する1つ以上のコピーもしくは正常FSP95遺伝子、またはFSP95遺伝子の一部を、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびレトロウイルスベクターなどの(ただしこれらに限定されない)ベクターを、DNAを細胞に導入する他の粒子(例えば、リポソーム)と共に用いて、患者内の適切な細胞に挿入できる。このような遺伝子置換型治療法では、FSP95遺伝子配列を患者内の精巣特異的細胞型に送達可能でなければならない。

#### 【0126】

別の実施形態では、送達法は、このようなFSP95遺伝子配列を、FSP95核酸配列が発現されるべき細胞の部位に直接投与することに関する。

#### 【0127】

あるいはまた、細胞(好ましくは、同原細胞(*autologous cell*))を遺伝子操作してFSP95核酸配列を発現させ、その後患者の精巣特異的疾患(例えば、癌および腫瘍形成などの増殖性疾患または分化疾患)の緩和に適した位置に導入できる。異種遺伝子配列の発現を適切なFSP95遺伝子調節配列により制御して、精巣細胞内でこのような発現を生じさせる。投与される細胞が非同原細胞である場合、導入細胞に対する宿主免疫応答を発展させない公知の技法により投与できる。例えば、細胞は、成分を細胞外環境とじかに交換させつつ導入細胞が宿主免疫系により認識されないようなカプセル形態で導入できる。

#### 【0128】

以下の6節にさらに詳細に記載するように、モチーフ分析により、図3のアミノ酸318~335番(LKKVLLKHAKEVVDLID)、368~385番(QKATDIMDAMLRKLYNVM)、および671~688番(EHLMNSVMKLCVIAKSC)において3つのPKA RIIサブユニット結合ドメインを同定した。

#### 【0129】

上記5.1および5.2節に記載するように、本発明は、FSP95 PKA RIIサブユニッ

ト結合ドメイン配列をコードする核酸配列、FSP95 PKA RIIサブユニット結合ドメインポリペプチド、およびPKA RIIサブユニット結合ドメインペプチドを、精子運動性の阻害のために用いて避妊療法に使用する方法を包含する。

#### 【0130】

つまり、本発明はまた、異種ポリヌクレオチドをコードする核酸と機能的に会合している、上述したPKA RIIサブユニット結合ドメインのDNA配列を含む単離核酸分子を包含する。本発明はまた、異種ポリペプチドと機能的に会合しているFSP95コンセンサスPKA RIIサブユニット結合ドメインを含む単離型融合タンパク質を包含する。

#### 【0131】

精巣特異的遺伝子治療に関して、本発明のFSP95 PKA RIIサブユニット結合ドメイン配列は、例えば、精子に対する遺伝子標的異種配列に使用できる。本発明はさらに、上述したプロモーター配列を、特に精子繊維鞘に対する遺伝子標的異種配列に使用することを包含する。

#### 【0132】

一実施形態では、本発明はまた、精巣特異的増殖性障害または癌の患者の細胞内で遺伝子治療技法を用いて薬剤または毒素の精子細胞特異的発現を起こして、癌細胞の成長を阻害したり殺したりするために使用できるFSP95プロモーター配列をそれぞれ単体で使用することを包含する。別の実施形態では、プロモーター構築物を、単体で、または図3のアミノ酸318~335番(LKKVLLKHAKVVSVDLID)、368~385番(QKATDIMDAMLRKLYNVM)および671~688番(EHLMNSVMKLCVILAKSC)における上記PKA RIIサブユニット結合ドメインをコードする核酸配列とそれぞれ組み合わせ用いる遺伝子治療技法を、薬剤または毒素の精子細胞特異的発現を起こさせて、精巣において不妊または避妊のために使用できる。

#### 【0133】

### 5.6.3 標的障害

特定の疾患および障害について、本発明の方法により治療または予防できる遺伝子治療疾患としては、受精能または不妊症に關与する疾患および障害、細胞増殖における欠損、または治療もしくは予防のために細胞増殖が望ましい欠損が挙

げられるがこれらに限定されない。また、異種遺伝子を精巢特異的に導入して、例えば、創傷治癒を促進したり、変性組織、病変組織または損傷組織などにおける再生を促進したりすることにより治療または予防できる遺伝子治療疾患としては、変性障害、成長欠損、低増殖性障害、身体的外傷、病変および創傷が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、精巢障害を治療する。本発明の範囲内にあると考える他の障害として受精能障害がある。他の点では正常な患者または獣医学的被験体の避妊または不妊のための遺伝子治療も本発明の範囲内に含まれる。被験体は、キツネ、ウサギ、げっ歯類動物、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなど(ただしこれらに限定されない)を含む動物であることが好ましく、哺乳動物であることが好ましく、特にヒトであることが最も好ましい。特定の実施形態では、非ヒト哺乳動物が被験体である。

#### 【0134】

#### 5.6.4 医薬調製物および投与方法

治療薬が核酸を含む場合に採用できる処方および投与方法は、上記5.1~5.6節に記載されている。さらに別の適切な処方および投与経路も、以下に記載するものから選択できる。

#### 【0135】

様々な送達系が知られており、本発明の治療薬を投与するために使用できる。例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中でのカプセル化、治療薬を発現可能な組換え細胞、受容体仲介型エンドサイトーシス(例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照)、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療核酸の構築などがある。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路が挙げられるがこれらに限定されない。化合物は、例えば、注入またはボラス注射により、上皮または粘膜皮膚内面(linings)(例えば、経口粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など)を介した吸収などの都合の良い任意の経路により投与されてもよく、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与されてもよい。投与は全身投与でも局所投与でもよい。さらに、本発明の医薬組成物を、脳室内注射および髄腔内注射などを含む任意の適切な経路により精子細胞に導入することが望ましい。脳室内注射は、例えばオマヤ

レーザーなどのレーザーに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易に行える。例えば、呼吸器または噴霧器、およびエアロゾル剤を含む製剤を用いて肺投与も採用できる。

#### 【0136】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を、治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましい場合がある。これは、例えば、注射、カテーテル、坐剤、または移植片(シアラスティック(sialastic)膜などの膜または繊維などの多孔性、非孔性またはゼラチン質材料のもの)を用いて、手術中の局所注入、または例えば術後の創傷包帯と併用した局所塗布など(ただしこれらに限定されない)により達成されうる。一実施形態では、悪性腫瘍、新形成または前新形成組織の部位(または前部位(former site))への直接注射によって投与できる。

#### 【0137】

別の実施形態では、治療薬は、特にリポソームなどの小胞に入れて送達できる(Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer中, Lopez-BeresteinおよびFidler(編), Liss, New York, 353-365頁(1989); Lopez-Berestein, 同書, 317-327頁を参照; 同書を一般的に参照のこと)。

#### 【0138】

さらに別の実施形態では、治療薬は、制御放出系に入れて送達できる。一実施形態では、ポンプが使用できる(Langer, 前掲; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwaldら, Surgery 88:507 (1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)を参照)。別の実施形態では、ポリマー材を使用できる(Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise(編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall(編), Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を参照; Levyら, Science 228:190 (1985); Duringら, Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howardら, J. Neurosurg. 71:105 (1989)も参照)。さらに別の実施形態では、制御放出系を、治療標的(すなわち、精巣)の近くに配置し、必要

量を全身用の用量の一部のみとしてもよい(例えば、Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release, 前掲, Vol. 2中, 115-138頁を参照)。

【0139】

他の制御放出系は、Langerによる概説(1990, Science 249:1527-1533)に記載されている。

【0140】

タンパク質治療薬をコードする核酸が治療薬である特定の実施形態では、核酸を、レトロウイルスベクターなどを使用して(米国特許第4,980,286号を参照のこと)適切な核酸発現ベクターの一部として構築しそれを細胞内に投与すること、または直接注射、または微粒子衝撃(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質、細胞表面受容体、もしくはトランスフェクト剤で被覆すること、または核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドと連結してそれを投与すること(例えば、Joliotら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照)などによりin vivo投与して、そのコードタンパク質の発現を促進できる。あるいはまた、核酸治療薬は、細胞内に導入され、相同組換えにより、宿主細胞DNAに取り込まれて発現させることができる。

【0141】

本発明はまた、医薬組成物を提供する。このような組成物は、治療上有効量の治療薬、および薬学的に許容される担体を含む。特定の実施形態では、「薬学的に許容される」とは、動物、特にヒトにおける使用に関して、連邦政府もしくは州政府の規制機関により許可されているか、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識されている薬局方にリストされていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と共に投与される希釈液、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。このような製薬担体は、石油、動物、野菜または合成の由来源(落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油など)の滅菌液など、水または油などの滅菌液でもよい。医薬組成物を静脈内に投与する場合には、好ましい担体は水である。食塩水、ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液も、特に注射可能な溶液のための液体担体として採用できる。適切な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコレート、

シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、組成物は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含んでいてもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、徐放剤などの形態をとってもよい。組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体と共に坐剤として処方してもよい。経口製剤は、医薬品用グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的担体を含むことができる。適切な製薬担体の例は、E.W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。このような組成物は、治療上有効量の好ましくは精製された形態の治療薬を、適量の担体と共に含んで、患者に対して適切な投与の形態を提供する。処方は、投与様式に適合しなければならない。

#### 【0142】

好ましい実施形態では、組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物として、常套手段に従って処方される。典型的に、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張性水性緩衝液に溶解した溶液である。必要であれば、組成物はまた、溶解剤、およびリグノカインなどの局所麻酔薬なども含んで注射部位における痛みを和らげてよい。一般的に、成分は、例えば活性剤の量を示すアンプルまたは小袋などの密閉封止容器に入れられた、乾燥した凍結乾燥粉末または非水分含有濃縮物として、単位投薬剤形ごとに別々または混合されて供給される。組成物を注入投与する場合、滅菌した医薬品用グレードの水または食塩水の入った注入瓶に分注できる。組成物を注射投与する場合、注射用滅菌水または食塩水のアンプルを用意して、投与前に成分を混合してもよい。

#### 【0143】

本発明の治療薬は、中性形態または塩形態として処方できる。薬学的に許容される塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導される遊離アミノ基で形成されたもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルア

ミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導される遊離カルボキシル基から形成されるものが挙げられる。

#### 【0144】

特定の障害または症状の治療に有効な本発明の治療薬の量は、障害または症状の性質に依存し、標準的な臨床的技法により決定できる。さらに、*in vitro*アッセイをさらに採用して、最適用量範囲を確認するのを助けてもよい。処方において採用される正確な用量は、投与経路、および疾患または障害の重篤度にも依存し、実施者の判断およびそれぞれの患者の状況に応じて決定されるものである。しかし、静脈内投与の適切な用量範囲は、通常、体重1キログラム当たり活性化化合物が約20~500マイクログラムである。鼻腔内投与のために適切な用量範囲は、通常、体重1kg当たり約0.01pg~1mgである。有効用量は、*in vitro*または動物モデル検査系から得た用量応答曲線からも外挿され得る。

#### 【0145】

坐剤は、通常、0.5重量%~10重量%の活性成分を含む。経口製剤は10%~95%の活性成分を含むことが好ましい。

#### 【0146】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分で充填された容器を1つ以上含む製薬パックまたはキットを提供する。このような容器は、製薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関に指定された形式にのっとった表示を場合により伴ってもよく、この表示は、ヒト投与のための製造、使用または販売の許可を機関から得ていること意味する。

#### 【0147】

### 6. 実施例

次に、ヒト精子受精能獲得の間にチロシンのリン酸化を受け、精子A-キナーゼアンカープロテイン(AKAP)と類似性を有する95kDaの新規繊維鞘タンパク質(FSP95)のクローニングおよび配列決定を記述する。FSP95は、不妊症の男性と女性からの抗精子抗体を含有する血清によって認識されるので、ヒトにおいて自己抗原性および同種抗原性の両方を示す。該853個のアミノ酸残基のタンパク質は、計算上の分子量94.6kDaおよび6.0のpIを有し、プロテインキナーゼCおよびカゼイ

ンキナーゼIIに対する多数の潜在的リン酸化部位ならびにアミノ酸435の位置にチロシンキナーゼリン酸化部位を1ヶ所有する。ノーザン分析により3.0kb未満の単一の転写産物が検出され、7つの胎児組織を含む50のヒト組織のノーザンドットプロット分析により精巣においてのみFSP95のmRNAが発現することが明らかとなった。精子を固定し、精製組換えFSP95に対する抗血清を用いて間接的免疫蛍光法および免疫学的電子顕微鏡法を実施したところ、該タンパク質は精子尾部の主要部における繊維鞘のリブ(rib)に局在していた。該分子は、受精能獲得の間により酸性であるイソ型を形成するという明白な証拠を示した。

【0148】

## 6.1 実験方法

### 6.1.1 精子の調製、受精能獲得、および精子タンパク質の抽出

ヒト精液サンプルを、3~4日間の性的禁欲に続くマスターベーションによって健康なボランティアから取得した。全サンプルをHIVに対して試験をして陰性であった。正常な精液量、精子数および運動性のある射精液を本研究において使用した(「世界保健機関(WHO) ヒト精液と頸管粘液との相互作用の検査のための実験室マニュアル(Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Cervical Mucus Interaction), 第3版, University Press, Cambridge, 1992)。室温での精液サンプルの液化に続いて、新鮮な精子を精漿、生殖細胞、白血球、および上皮細胞からパーコール(Percoll)(Pharmacia Biotech, Sweden)密度勾配遠心法によって分離し、Naaby-Hansenら, 1997, Biol. Reprod. 56:771-787(参照により本明細書に全体を組み入れる)で記載されている方法を使用してHams F-b培養液(Gibco BRL, Life Technologies, NY)中で射精液を2~3時間の範囲内で洗浄した。

【0149】

受精能を獲得した精子を得るために、運動性のある精子をヒト血清アルブミンを全く含まないBWW培養液(Irvine Scientific, CA)中で60分間スイムアップ法によって調製した(Yanagimachiら, 1979, Fertil. Steril. 31:562-574)。続いて、運動性のある精子を該上清から回収し、受精能獲得を誘導するために5%CO<sub>2</sub>中、37℃で6時間、3.0%ヒト血清アルブミン(HSA)(Sigma, St.Louis, MO)を添加

したBWW培養液でインキュベートした(Luconiら, 1996, Biol. Reprod. 55:207-216, Fenichelら, 1996, Biol. Reprod. 54:1405-1411, Ohashiら, 1995, Fertil. Steril. 63:625-630)。また、受精能獲得は、タンパク質チロシンキナーゼ阻害であるゲニステイン(genistein)200  $\mu$ Mの存在下でも行った(Carreraら, 1996, Dev. Biol. 180:284-296)。

#### 【0150】

新鮮かつ受精能を獲得した精子を、9.8%尿素、2%オクチル- $\beta$ -D-グルコピラノシド(OBG)(ESA Inc., MA)、2%(v:v)アンホライン、100mMジチオスレイオトール(Bio Rad, CA)、5mMヨードアセトアミド(Sigma, MO)、5mM EDTAならびに4つのプロテアーゼ阻害剤である2mM PMSF(Sigma, St.Louis, MO)、3mg/ml TLCK(Boehringer Mannheim, IN)、1.46mMペプスタチンA (Sigma)、および2.1mMロイペプチン(Sigma)を含有する溶解バッファー中で可溶化した。1ml中あたり5億の精子を4℃で45分間振盪することによって可溶化した。不溶性分子を10,000  $\times$  gで2分間遠心分離することによって除去し、該上清を既知のプロトコール(Naaby-Hansenら, 1997, Biol.Reprod.56:771-787)に従って精子タンパク質の2次元ゲル分離のために使用した。

#### 【0151】

##### 6.1.2 チロシンリン酸化タンパク質の検出

受精能獲得培養液(capacitation medium)中での6.0時間のインキュベーション後、精子を溶解バッファー中で可溶化した(Naaby-Hansenら, 1997, Biol.Reprod. 56:771-787)。該可溶化タンパク質を2次元SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって分離し、銀染色をした(Hochstrasserら, 1988, Anal.Biochem.173:424-435)。該タンパク質をニトロセルロース膜に電氣的にトランスファーし(Towbinら, 1979, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76:4350-4354)、膜上の非特異的結合部位を10mM Tris (pH 7.5)、0.1M NaCl、および0.05% Tween20中の、1% ウシ血清アルブミン(BSA)を用いて、37℃で20分間ブロッキングした。次に、ブロックした膜を、上記バッファーで2500倍に希釈した、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体RC-20(Transduction Laboratories, KY)を結合させたワサビペルオキシダーゼを用いて、37℃で20分間インキュベートした。該膜を十分に洗浄し、

製造業者の教示に従って化学発光増大アッセイ (enhanced chemiluminescence assay) (Amersham Corp., UK) によって陽性免疫反応スポットを検出した。RC-20は、以前に文書で説明されている (Ruff-Jamissonら, 1993, Science 261:1733-1736, Burksら, 1995, Science 269: 83-86) ホスホチロシンに対する特異性を有する、十分に特性決定されたモノクローナル抗体である。

#### 【0152】

### 6.1.3 予めスクリーニングされた不妊症の血清を用いた精子タンパク質のイムノブロットニング

血清は、不妊についてのホルモン性、感染性、または生理的原因を有しない、説明不能な不妊症の不妊男性および不妊女性から取得した。不妊患者血清中のASAを間接的イムノビーズ結合試験によって検出した (Patrizioら, 1992, Fertil. Steril. 57:183-186)。イムノブロットニング分析用に選択した血清は高いイムノビーズ結合試験スコア (すなわち、ASAに特異的なIgG、IgA、および/またはIgMを表す、60%以上の精子がビーズ結合を示したスコア) を有していた。選択した血清全てが、精子頭部または細胞全体に対する抗体を有した。

#### 【0153】

イムノブロットニング用に、精子タンパク質を抽出し、前記のとおり2次元SDS-PAGEシステムによって分離した (Naaby-Hansenら, 1997, Biol. Reprod. 56:771-787)。タンパク質の電気泳動的トランスファーに続いて、ニトロセルロース膜をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) (pH 7.4) 中ですすぎ、5%ドライミルクを加えたPBS-Tween (0.05% Tween20を10mM PBSに加えたもの) 中でブロックした。次に、1000倍に希釈した試験血清と共にプロットを4℃で一晩インキュベートした。次に、PBS-TWEENで5000倍に希釈したヤギ抗ヒトIgG/IgM 2次抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab, PA) を結合したワサビペルオキシダーゼと該プロットとを1時間インキュベートし、免疫反応性スポットを製造業者のプロトコール (Amersham Corp., UK) を使用して化学発光増大によって可視化した。

#### 【0154】

### 6.1.4 95kDa リン酸化チロシン自己抗原および同種抗原のマイクロシーケンス 2次元イムノプロットにおける自己抗原および同種抗原を含む95kDaのリン酸化

チロシンの同定に続いて、クマシーで染色したタンパク質スポットを1.5mm厚の2次元SDS-PAGEゲルから円筒形に抜き取った。該ゲルの円筒形サンプルをさいの目に切って小さな断片とした。これらの断片中のタンパク質をメタノール中で脱色し、10mMジチオスレイオトールで還元し、0.1M 重炭酸アンモニウム中の50mMヨードアセトアミド中でアルキル化した。試薬除去後、該ゲル片を50mM 重炭酸アンモニウム中の12.5ng/plトリプシンと共に37 で一晩インキュベートした。5%ギ酸中の50%アセトニトリル中で該ゲル片からペプチドを抽出し、当技術分野で公知の方法であるタンデム型質量分析によってマイクロシーケンスした。

### 【0155】

#### 6.1.5 cDNAのクローニング、配列決定、および分析

完全に分解したデオキシイノシンを含むセンスプライマー(5' -A/T-C/G-I GTI TT-C/T TT-C/T AA-C/T TT-C/T A/T/C-TI A/C-GI-3')を、質量分析によって得られるマイクロ配列の1つ、ペプチド番号6(SVFFNFI/LR)から設計し、オリゴヌクレオチドをGIBCO BRL(Life Technologies, CA)によって合成した。このフォワードプライマーおよびアダプタープライマーを用いて、cDNA3'末端高速増幅(RACE)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、25µlのアッセイシステム中で0.25ngのヒト精巢マラソンレディー-cDNA(Marathon ready cDNA)(Clontech, CA)を用いて40サイクル行なった。加熱サイクルは、94 で1.5分間を1サイクル、94 で30秒間、46 で1分間、および68 で2分間を40サイクルずつというプログラムを使用してMJ Research(Watertown, MA)製サーマルサイクラー(thermal cycler)(PTC-200 DNAエンジン)中に行なった。PCR産物を1.7% NuSieve(FMC, ME)アガロースゲル上で分離した。1.0kbのDNA断片を単離、再増幅してpCR 2.1-TOPOベクター(Invitrogen, CA)中にクローニングし、Taq DNA ポリメラーゼとともに大きな蛍光色素ターミネーター化学物質(fluorescence dye terminator chemistry)を使用してPerkin-Elmer Applied Biosystems DNAシーケンサーで配列決定した。該3' クローンは786bpのオープンリーディングフレームおよび218bpの翻訳されない領域を含んだ。同様に、cDNAの5'末端を、アダプタープライマーおよび1.0kbの3' クローンの5'末端から118bp下流にあるアンチセンス3' 遺伝子特異的プライマー(5' -AGC CTG GGG GGA GAA GAG GCC AAC GOT C-3')を使用して同じ鋳型から5' R

ACE PCR法によって増幅した。2081bpの産物が得られ、pCR 2.1-TOPOベクター中へクローン化した。該5'クローンは162bpの翻訳されない領域および1919bpのオープンリーディングフレームであることが明らかとなった。cDNAクローンをベクター由来プライマーおよび挿入特異的プライマーを使用して双方向で配列決定をした。ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列データをGenetics Computer Groupプログラムパッケージ(Wisconsin Package Program Manual, バージョン9, Madison, WI)を使用して分析した。

#### 【0156】

##### 6.1.6 ノーザンブロット分析およびドットブロット分析

8つの選ばれたヒト組織由来のポリ(A)+RNA 2 $\mu$ gを含むノーザンブロットおよび50の異なるヒト組織由来のmRNAを89~514ng含む標準化RNAドットブロットをClontech社から取得した。ノーザンブロットは、<sup>32</sup>Pで標識した、コード領域の5'末端から生じる2377bpのDNA断片およびcDNAの3'末端から生じる1007bpのDNA断片を用いてプローブした。プローブはランダムオリゴヌクレオチドプライム標識(random oligonucleotide prime labeling)(FeinbergとVolgelstein, 1983, Anal. Biochem. 132:6-13)によって調製した。ハイブリダイゼーションは、ExpressHyb溶液(Clontech)中、68 $^{\circ}$ Cで1時間行い、次に、室温で2 $\times$ SSC、0.05%SDS中で3回洗浄し、0.1 $\times$ SSC、0.1%SDS中、50 $^{\circ}$ Cで20分間の洗浄を2回行った。該ブロットを2枚の増感紙を用いて-70 $^{\circ}$ Cで60時間X線フィルムに感光させた。該ドットブロットを<sup>32</sup>Pで標識した2337bpの5' cDNAを用いてプローブした。該ブロットをサケ精子DNAおよびヒト胎盤Cot-1DNAを含むExpressHyb溶液中、65 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズした。次に、2 $\times$ SSC、1%SDS中、65 $^{\circ}$ Cで3回洗浄し、続いて0.1 $\times$ SSC、0.5%SDS中、55 $^{\circ}$ Cで追加の洗浄を2回行った。オートラジオグラフィーを2枚の増感紙を用いて-70 $^{\circ}$ Cで18時間フィルターをX線フィルムに感光させることを行なった。

#### 【0157】

##### 6.1.7 大腸菌におけるFSP95の発現および組換えタンパク質の精製

該分子を発現させるために、1~779個のアミノ酸をコードしているFSP95 cDNA (ORF)の91%をヒト精巣マラソンレディー-cDNA(Clontech, CA)からPCRによって増

幅した。プライマーは、PCR産物の5'末端にNdeI部位を、また3'末端にXhoI部位を形成するように設計した。増幅したDNAをpET28b発現ベクター(Novagen, WI)のNdeI-XhoI部位へ結合した。この結果生じた構築物は、該タンパク質のいずれかの側に6残基のヒスチジンタグを含むベクター由来の28個のアミノ酸を追加した。FSP95をコードする配列の前に、ファージT7 RNAポリメラーゼに対するプロモーター、イニシエーターATGおよび6つの連続するヒスチジンコドンが先行していた。該組換えベクターを大腸菌株NovaBlue(DE3)細胞へ導入した。この細胞は、lacプロモーターの制御下でT7 RNAポリメラーゼの染色体コピーを含む。該発現プラスミドを構築物のリーディングフレームを検証するために5'および3'末端で配列決定した。

#### 【0158】

単一の陽性コロニーをNew Brunswick Scientific 発酵槽(New Brunswick, NJ)で30 µg/mlのカナマイシンを加えたLB液体培地10Lに植え付けるために使用し、該培養物を37 °Cで波長600nmの吸光度が0.6になるまで培養した。次に組換えタンパク質発現を1.0mMイソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド(IPTG)の添加によって誘導し、もう3時間増殖を継続した。該細胞をペレット化し、0.1%NP40 (Sigma)および0.1mg/mlリゾチームを含有する1×結合バッファー(20mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5M NaCl, 5mMイミダゾール)中、氷上で30分間再懸濁し、かつ短時間超音波処理を行なった。15000 × gで15分間遠心分離した際に、生じた不溶性ペレットを6M尿素を含有する1×結合バッファー中、氷上で1時間溶解した。15000 × gで15分間遠心分離して得た尿素を溶解させた該上清を、製造業者のプロトコールに従って、Ni<sup>2+</sup>で活性化したヒスチジン結合樹脂カラム(Novagen, WI)にロードし、該組換えタンパク質を、6M尿素を含有する1×結合バッファー中の300mMイミダゾールで溶出した。該アフィニティー精製した組換えタンパク質を、低分子量の全長型分解物のいくつかを除去するために調製用SDS-PAGEによってさらに精製した。

#### 【0159】

##### 6.1.8 組換えFSP95に対する抗血清の製造およびイムノブロット分析

フロイント完全アジュバント中のゲル精製組換えタンパク質200 µgを用いてメ

スのLewisラットを免疫し、2週間の間隔を置いてフロイント不完全アジュバント中の200  $\mu$ gのタンパク質を用いて2回追加接種し、各追加接種の一週間後に採血した。FSP95に対するラット抗血清の特異性を、rFSP95およびヒト精子タンパク質抽出物に対するウェスタンブロッティングによって試験した。

#### 【0160】

イムノブロッティングのために3.5  $\mu$ gの組換えタンパク質を10%SDS-PAGEに供し、該タンパク質をニトロセルロース膜に電気泳動的にトランスファーした(原文明細書p.41)。ニトロセルロース膜を細長い形に切り(各々が150ng含有)、PBS-Tween(10mM PBS, pH 7.4, 0.05% Tween20)中の5%無脂肪粉ミルクで1時間ブロックし、ブロッキングバッファーで5000倍に希釈したラット抗血清で1時間インキュベートした。免疫学的検出を、ブロッキングバッファーで5000倍に希釈したヤギ抗ラットIgG(Jackson ImmunoResearch, PA)を結合させたワサビペルオキシダーゼで実施し、色原体基質であるジアミノベンジジン(Sigma)を用いて過酸化水素中で可視化した(原文明細書p.47)。精子タンパク質のイムノブロッティングのために、パーコールで洗浄した精子を、尿素およびOBG(精子調製法参照)を含有する溶解バッファー中で可溶化し、2次元SDS-PAGE分析に供した(原文明細書p.35)。ニトロセルロースへタンパク質を電気泳動的にトランスファーしたの に続いて、ニトロセルロース膜をブロックし、上記のように1次抗体および2次抗体を用いてプローブした。

#### 【0161】

##### 6.1.9 精子不動化マイクロアッセイ

新鮮な射精液をBWW培養液で2倍に希釈し、450  $\times$  gで5分間遠心分離した。生じたペレットを、ヒト血清アルブミン(HSA)(10mg/ml)を含有するBWW培養液で2度洗浄した。該ペレットを、5%CO<sub>2</sub>中、37  $^{\circ}$ Cで1時間、HSA(30mg/ml)含有BWWを用いて層状にした。約98%の運動性のある精子を含むスィムアップ細胞のアリコートを作業ストック溶液として1mlあたり2千万の精子となるようにスィムアップ培養液で希釈した。不動化アッセイにおいて試験するために、rFSP95に対するラット抗血清をスィムアップ培養液で1:1に希釈し、使用する前に56  $^{\circ}$ Cで30分間脱補体化した。補体源として使用されるモルモット血清を4  $^{\circ}$ Cで30分間精子に2度取り込ま

せた。1:1で希釈し脱補体化した抗血清を10 $\mu$ l、1ml当り2千万のスィムアップ精子を1 $\mu$ l、ならびに1:1に希釈したモルモット補体(1反応あたり10~15CHSO単位を含有)を2 $\mu$ l、マイクロPCRチューブ中、37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートすることによって改変した後に精子不動化マイクロアッセイ(Isojima と Koyama, 1989 Arch. Androl. 23:185-199)を行った。運動性のある精子の割合を、200倍の拡大率で顕微鏡的に計算盤(Humagen Fertility Diagnostics, VA)で調べた。各々の試験において熱で不活化した補体を対照として扱った。該実験は、CD59(BioSource International, CA)およびSAGA-Iモノクローナル抗体(これらは、表面抗原を認識することが知られている)を陽性対照として(JiangとPillai, 1998, Am.J.Reprod.Immunol. 39:243-248, Diekmanら, 1997, Biol.Reprod. 57:1136-1144)、ならびに精子尖体抗原SP10を認識するモノクローナル抗体(MHS-10)を陰性対照として(Fosterら, 1994, Biol.Reprod. 51:1222-1231)行った。精子不動化値(SIV)を、対照(不活化補体)中の運動性精子の割合を活性補体を有する試験血清中の運動性精子の割合で除することによって計算した。SIVが2またはそれ以上の場合、該試験血清は精子不動化抗体に対して陽性であると判断される。

#### 【0162】

##### 6.1.10 活動的または透過可能化した精子におけるFSP95の免疫蛍光の局在

---

スィムアップ精子は、30.5mlの精液を、mg/mlのHSAを含有するBWW培養液(Irvine Scientific, CA)2mmの下に5%CO<sub>2</sub>中、37 $^{\circ}$ Cで1.5時間層状化することによって調製した。次に、スィムアップ細胞を洗浄し、30mg/ml HSA含有BWW培養液中で、5%CO<sub>2</sub>中37 $^{\circ}$ Cで6時間にわたり受精能を獲得させた。該運動性の、受精能を獲得した精子を、ポリ-L-リシンで被覆したスライド(Polysciences, PA)上で風乾し、メタノール中-20 $^{\circ}$ Cで30分間透過可能化(permeabilize)し、風乾し、PBS-Tween(0.01% Tween20を含む10mM リン酸緩衝化生理食塩水)中の10%正常ヤギ血清で30分間ブロックした。次に該精子を、ブロッキングバッファーで100倍に希釈した1次抗体(ラット抗rFSP95抗体)中、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、続いて、ブロッキングバッファーで100倍に希釈した抗ラット(IgG)2次抗体(Zymed Lab, CA)を結合させた蛍光色素(シアニン, Cy3)と共に37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした

。該スライドをPBS中で洗浄し、スローフェイド(slow fade)(Molecular Probes, OR)で被覆し、カバーガラスで固定した。顕微鏡像はアクシオプラン(Axioplan)蛍光顕微鏡(Zeiss)で1000倍の拡大率で得た。活動性精子の間接的免疫蛍光法のために、受精能獲得培養液で100倍に希釈した1次抗体と共に5%CO<sub>2</sub>中、37℃で2時間インキュベートし、続いて上記の通り処理した。

#### 【0163】

##### 6.1.11 電子顕微鏡によるFSP95の免疫的局在

ブールした精子を、3%スクロース含有のHam's F10(Gibco BRL, CA)(洗浄バッファー)で2度洗浄し、4%パラホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含む洗浄バッファー中、22℃で15分間固定した。洗浄バッファーを3回交換して固定剤を除去した後、細胞を40%~100%の一連のエタノールを段階的に用いて脱水し、Lowicryl K4M(Electronmicroscopy Sciences, PA)で包埋した。該ブロックを、-20℃で72時間、紫外線光を用いて重合化し、超薄切片(100nm厚)を製造した。

#### 【0164】

薄切片の免疫染色法は、BerrymanとRodewald、1990, J.Histochem.Cytochem.38:159-170を改変したものであった。該切片を希釈していない正常ヤギ血清中で、22℃で15分間ブロックし、次に、1%正常ヤギ血清、1%BSA、および0.1%Tween 20を含有する洗浄バッファーで50倍に希釈した同じ動物由来の抗rFSP95ラット抗体、または免疫前の血清のいずれかと共に、4℃で16時間インキュベートした。洗浄バッファー中で4回すすいだ後、該切片を、100倍に希釈した5nmの金を結合させたヤギ抗-ラットIgG(Goldmark Biologicals, NJ)を用いて、22℃で1.5時間インキュベートした。該検体を蒸留水で洗浄し、酢酸ウラニルで染色した後、JEOL 100CX電子顕微鏡で調べた。

#### 【0165】

##### 6.2 結果

in vitroでの受精能獲得の際にチロシンのリン酸化を受けるヒト精子のタンパク質を同定するために、スイムアップ(swim up)後に得た活発な運動性の精子を、受精能獲得を促進することが知られている条件下で6時間にわたりインキュベ

ートした(Yanagimachi, 1994, The Physiology of Reproduction (Knobil, E., およびNeill, J. D., 編) pp.189-317, Raven Press, New York, NY)。精子タンパク質を含む抽出物を2次元SDS-PAGEにより分離し、銀染色により可視化した(図1A)。チロシンがリン酸化されたタンパク質は、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体RC20と反応させる2次元イムノプロットにより存在位置を決定した。新鮮な、受精能を獲得していない精子においては、6時間にわたり受精能を獲得させた精子(図1C)と比較して、低レベルでチロシン残基がリン酸化されたタンパク質の集合を示し(図1B)、95~55kDaの大きさの範囲にあり、かつ4.0~5.7の範囲のpIを有する数種類のタンパク質群の免疫反応性が増大したことを示した。~5.3のpIを有する主要な95kDaタンパク質が、酸性で高分子量の、チロシンがリン酸化された主要なヒト精子タンパク質の1つが見られた(図1Aおよび図1C)。抗ホスホチロシン抗体の反応は特異的であると考えられるが、なぜなら、RC20モノクローナル抗体を20mMのホスホチロシンとプレインキュベーションすることにより、免疫反応性が失われたからである(データは示さず)。さらにチロシンリン酸化は、チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステインと受精能獲得済細胞とをインキュベートした場合にはほぼ完全に行なわれなかった(図1D)。

#### 【0166】

##### 6.2.1 自己抗原および同種抗原としてのFSP95

ヒト精子タンパク質を、ASAに関して事前にスクリーニングした不妊男性被験者(図2A)および不妊女性被験者(図2B)に由来する血清を用いてイムノプロットティングすることにより、95kDaの分子量を有する精子タンパク質群の強力な免疫反応性が判明した。不妊男性に由来する15の血清サンプルのうち6つ(40%)、および不妊女性に由来する6つの血清サンプルのうち2つが前記の95kDaタンパク質の群に結合した。男性、女性それぞれ5人ずつの不妊ではない被験者のうち、2人の男性と1人の女性の血清のみが、95kDaタンパク質に対して弱い免疫反応性を示した(図2Cおよび図2D)。これらの発見は、95kDaタンパク質は特定の女性においては同種抗原性であり、特定の男性においては自己抗原性であることを示した。

#### 【0167】

### 6.2.2 95kDa抗原のマスペクトルによるマイクロシーケンス

95kDaチロシンリン酸化抗原の1つの正体に関する構造的情報を得るために、クマシー染色した2次元SDS-PAGEタンパク質スポットのマイクロシーケンスに着手した。2次元ゲルの中心から切り出したスポットの位置は、図1A中で白丸により示す。十分に分離させた2次元ゲルにおいては、取得できるタンパク質の量が低いので、アミノ酸配列の決定は、前記のゲル小片内のタンパク質スポットを37℃で一晩トリプシン消化して作成したペプチドに対してタンデムマスペクトロメトリ技術を用いて行った。抽出したペプチドを、キャピラリーカラム液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー型タンデムマスペクトルにより濃縮し、分析した。全部で18のペプチド配列を得た(表1)。分子量情報(MS-fitによるマスマッピング)およびFasta(PearsonおよびLipman, 1988, Proc. Natl. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448)を用いた配列情報の双方を用いてデータベースを検索した(その結果、ゲルから誘導したタンパク質の15%のマストレランス(mass tolerance)および1 Daペプチドのマストレランスが可能となった)が、いずれの公知のタンパク質も同定されなかった。

【0168】

### 6.2.3 FSP95のクローニングおよび配列決定分析

前記の95kDaチロシンリン酸化タンパク質をコードするcDNAを単離するために、ペプチド番号6から設計された完全縮重イノシン含有フォワードプライマーを使用して、ヒト精巣由来Marathon ready cDNA (Clontech, CA)から、3'RACE PCRにより1.0kbのcDNA小片を増幅した。同様に非翻訳領域を含む5'cDNAを、3'末端と118bpのオーバーラップを有する2.1kbのcDNAをPCRにより作成してクローニングした。全長cDNAのヌクレオチド配列(図3)は、翻訳開始部位のKozakコンセンサス(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)と一致しているフレーム内開始コドンヌクレオチドの163~165番で有する2942bpからなるものである。翻訳開始部位は、最初のATG配列の上流にある、45bpおよび72bpの2個のフレーム内停止コドンの存在により、さらに信頼し得るものであることが立証された。このcDNAは、5'末端で162bp、3'末端で218bpの非翻訳領域を有する2559bpのオープンリーディングフレーム、およびポリ(A)テールの11bp上流にポリアデニル化

シグナル(ATTTAA)(JureticおよびTheus, 1991, FEBS Lett. 290:4-8)を含んでいた。該オープンリーディングフレームは、6.0の予測pIと94.6kDaの予測分子量を有する853アミノ酸のタンパク質をコードしている。95kDaタンパク質スポットのマイクロシーケンスにより得られた18のトリプシン性ペプチドの全てが、この分子の予測アミノ酸配列中に含まれており(図3、下線部)、元々同定され、ゲル中心から取り出されたタンパク質がクローニングされたことの妥当性を示している。

#### 【0169】

FPS95の予測アミノ酸配列の分析により、N末端真核生物分泌シグナルペプチド切断部位(Nielsenら、1997, Protein Eng. 10:1-6)が存在しないことが判明した。タンパク質配列のPrositeデータベース(Bairochら、1997, Nucleic Acids Res. 25:217-221)との比較により、5個の潜在的N-結合グリコシル化部位(アミノ酸87、117、180、502、763)、15個の潜在的カゼインキナーゼIIリン酸化部位(アミノ酸21、34、52、102、109、120、223、280、440、448、549、659、691、713、816)、11個の潜在的プロテインキナーゼCリン酸化部位(アミノ酸2、89、102、217、223、236、303、367、408、484、597)、8個のミリストリル化部位(アミノ酸68、116、346、366、648、722、724、814)および1個のチロシンキナーゼリン酸化部位(アミノ酸435)の存在が示された。4個の潜在的O-結合グリコシル化部位(アミノ酸168、504、557および745)もまた見出された(Hansenら、1997, Nucleic Acid Res. 25:278-282)。FSP95推定配列により、明らかな膜貫通領域は存在しないことが判明した。

#### 【0170】

推定FSP95配列とGenBankデータベースとを、BLAST(Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)およびFASTA(PearsonおよびLipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448)を用いて比較したところ、ヒト精子FSP95と最も近いアミノ酸同一性を有するのは、マウスAKAP82の前駆体(pro-mAKAP82)であるマウス精子繊維鞘AKAP(同一性33.6%、類似性42.5%)およびヒトAKAP82の前駆体(pro-mAKAP82)であるヒト精子繊維鞘AKAP(同一性32.4%、類似性39.4%)であることが判明した(Turnerら、1998, J. Biol. Chem. 273:32135-32141, Carre

らら、1994, Dev. Biol. 165:272-284)。これらのタンパク質のアミノ酸配列アライメントにより、これらの分子の中央とN-末端領域およびC-末端領域部分に保存ドメインが含まれることが判明した(図4)。FSP95とこれらのAKAPとの間の全体的な同一性は、ヒト精子FSP95は、以前には報告のない遺伝子によりコードされていることを示唆するものである。興味深いことには、マウス精子pro-mAKAP82(Carreraら、1994, Dev. Biol. 165:272-284)の2つの潜在的な細胞内アンカードメインは、pro-hAKAP82(Turnerら、1998, J. Biol. Chem. 273:32135-32141)とヒト精子FSP95 cDNAの双方において保存されていた。これらの細胞内ターゲティング領域の双方が、高度に塩基性であるN-末端領域中に位置し、一方でこれらのタンパク質のC-末端領域はより酸性度が高く、長い脂肪族側鎖を有する。しかしながら、ヒトAKAP82およびマウスAKAP82のRU-結合ドメインは、FSP95においては保存されていない。

#### 【0171】

#### 6.2.4 ヒト組織におけるFSP95 mRNAの発現

ノーザンブロット(図5A)およびドットブロット(図5B)ハイブリダイゼーションを行い、異なるヒト組織中でのFSP95 mRNAの発現を分析した。ノーザンブロットでは、2種のFSP95プローブである2337bp 5' cDNAおよび1.0kb 3' cDNAのいずれかとハイブリダイズさせた。双方のプローブは、精巣中にのみ存在する~3.0kbのmRNAとハイブリダイズした。50種の異なるヒト組織に由来するポリ(A)<sup>+</sup> RNAを含むRNAドットブロットとハイブリダイズさせるために、2337bp 5' cDNAをプローブとして用いてより広汎なスクリーニングを行った。試験した組織の中では、精巣由来のmRNAについてのみ強力なハイブリダイゼーションシグナルが見られた。このことは、ヒト精子FSP95遺伝子の精巣特異的発現パターンを示すものである。

#### 【0172】

#### 6.2.5. rFSP95の発現とウエスタンブロット分析

FSP95を残基1~779番までコードするcDNA配列を、細菌発現ベクターpET28b中へクローニングした。細菌に対してLPTGで1.5~3時間誘導をかけた場合、97kDaの分子量を有するrFSP95が産生された(図6A)。該組換えタンパク質を、セファロース上に固定化されたNi<sup>2+</sup>に対する6個のHisドメインの高いアフィニティーを

利用して精製した(Van Dykeら、1992, Gene 111:99-104)。アフィニティー精製した組換え体FSP95をさらに分取用ゲル電気泳動でさらに精製し(図6B)、免疫原としてラットの接種に用いた。rFSP95に対するラット抗体は、rFSP95、および、元々マイクロシークエンスされた、*pI*が~5.3で95kDaのスポットとして染色された精子抽出物中に存在する「天然」FSP95、を両方とも認識した(図6Cおよび図6D)。免疫前ラット血清はrFSP95と精子タンパク質のいずれとも反応しなかった。

#### 【0173】

#### 6.2.6 ヒト精子におけるFSP95の所在の決定

FSP95が新鮮な受精能を獲得していないヒト精子に曝される可能性を、最初に改変マイクロ精子不動化アッセイ(IsojimaおよびKoyama、1989, Arch. Androl. 23:185-199)により評価した。新鮮な精子の不動化は、rFSP95に対するラット抗血清およびモルモット補体の存在下では観察されなかった( $SIV=0.91 \pm 0.12$ 、平均 $\pm$ SD;  $n=6$ )。さらに、生存中の受精能獲得済精子は、いずれのドメイン上でも免疫蛍光法によっては染色されなかった(データは図示せず)。これらの結果を総合すると、細胞表面にはFSP95が存在しないことが示唆される。

#### 【0174】

受精能獲得済でメタノールにより透過性化した、射出されたヒト精子に対する間接的免疫蛍光分析を、rFSP95に対するラット血清を用いて行い、FSP95が存在する場所は、100%の精子で、鞭毛主要部の全長(図7B)にわたると同定した。頭部(head)、中間部(midpiece)および端部(end piece)は非反応性のままであった(図7Aおよび7B)。免疫前抗血清は免疫蛍光を示さなかった(図7Cおよび7D)。

#### 【0175】

FSP95の細胞内分布を、洗浄済の射出されたヒト精子の非常に薄い切断片を、包埋後免疫標識することにより、超微細構造レベルで試験した。FSP95の所在を示す金粒子を、縦断面(longitudinal section)と横断面(cross section)の両方で、繊維鞘の全ての厚さにわたり結合させた。金粒子は外周のリブ(rib)上で観察された一方、縦に切断した円筒(longitudinal column; LC)は未染色のままであった(図8Aおよび図8B、矢印で示す)。外部の緻密な繊維および軸系には、標識は結合しなかった。免疫前対照ラット血清に曝した断面においては、金粒子はほと

んど見られなかった(図8Cおよび8D)。

【0176】

6.2.7 FSP95は受精能獲得により誘導されるチロシンリン酸化タンパク質である

---

選択し、マイクロシーケンスし、クローニングしたタンパク質が、*in vitro*での受精能獲得の際に実際にチロシンリン酸化を受けたという証拠をさらに提供するため、以下の実験を行った。受精能を獲得した精子と獲得していない精子の双方に由来するタンパク質抽出物を、高分離能(23×23cm)2次元SDS-PAGEで分離し、電気プロットし、rFSP95に対するラット抗血清および抗ホスホチロシン抗体RC20を用いて分析した。受精能を獲得していない精子の抽出物中に明瞭に見られる(図9A)、~5.3のpIを有するFSP95の免疫反応性の型は、受精能獲得済精子においては存在量が減少した(図9B)。これと共に、より酸性側のpIを有する、FSP95の新規免疫反応性の型が現れた。この酸性FSP95イソ型への荷電の変化は、受精能獲得後のチロシンリン酸化の増大(図9Cおよび図9Dを比較)およびリン酸化されたより酸性のFSP95イソ型の出現によりもたらされた。このrFSP95に対する抗体を使用した実証により、クローニングし配列決定したFSP95が受精能獲得の際にチロシンリン酸化を受け、この工程においてより酸性であるイソ型をとるという有力な証拠が提供された。

【0177】

6.3 考察

本明細書において本発明者らは、繊維鞘における局在性と95kDaの計算上の分子量を考慮してFSP95と命名した新規ヒト精子タンパク質のクローニングと特性決定を記述するものである。2次元SDS-PAGEタンパク質スポットから誘導したマイクロシーケンスによりFSP95を特性決定するために、分子の3' cDNAを、単一の遺伝子特異的イノシン含有プライマーおよびヒト精巣Marathon cDNAに由来するアダプタープライマーを用いて増幅した。得られたcDNAにより、マイクロシーケンスした4種のFSP95配列がcDNAのオープンリーディングフレーム中に存在することが判明した。同様に、cDNAの5'末端も5'RACEによりクローニングし、同定された最も5'側のメチオニンの上流にある2個のフレーム内停止コドンを見出した。このことは、報告したcDNAがFSP95の完全コード配列を表すことを示す。

同様に翻訳開始部位は必須Kozakコンセンサス配列と一致している。FSP95タンパク質スポット(表1; 図3)から得てマイクロシーケンスした18種のペプチドの全てが、予測されるアミノ酸配列内に包含されていた。これは、元々切り出したタンパク質スポットがクローニングされたことの妥当性を示す。単一のマイクロシーケンスから誘導したプライマーを用いるこのクローニングストラテジーの成功は重要である。なぜなら、このストラテジーはわずか約3週間のうちに完遂されたからである。故に、このアプローチは、マイクロシーケンスデータを完全な配列情報へ変換するための重要な方法となり、プロテオームに基づくクローニングの重要性が増していることを強調するだろう。

#### 【0178】

方法論的な見地からは、クローニング実験を開始するのに用いたペプチド配列(ペプチド6、表1)を、消化におけるペプチドのCADスペクトルの解釈、N-末端誘導ペプチド(Cardenasら、1997, Rapid Commun. Mass Spectrom. 11:1271-1278)のCADスペクトルの解釈、および合成ペプチドのCADスペクトルと消化ペプチドのCADスペクトルとの比較を組み合わせ確認したことに留意することが重要である。マススペクトルデータから導き出したアミノ酸配列とペプチド6、12および18についてのcDNAデータの比較においては、1塩基置換による些細な相違が見られた。この相違では、ペプチド6においてはFからSへの置換、ペプチド12においてはEからVへの置換またはTからAへの置換、およびペプチド18においてはEからGへの置換を生じている。これらの置換は、FSP95がマイクロシーケンスされる元になったドナーと、Clontech Marathon精巢cDNAが構築される元になったドナーとの間の、個々のDNA間の多型性によるものであろう。

#### 【0179】

ヒト精子において、受精能獲得に伴うタンパク質のチロシンリン酸化の変化パターンを特性決定することは、哺乳類の受精の準備段階である、受精能獲得に関連した変化における種々のシグナル伝達経路の関与を分析するための重要なステップである。1次元ゲル電気泳動により、ヒト精子は受精能獲得過程の間に、~105kDa、および~80kDaの高い分子量を有する主要な2種のタンパク質に対するチロシンリン酸化が増大することが、以前に示されている(Carreraら、1996, De

v. Biol. 180:284-296, Leclercら、1998, J. Androl. 19:434-443, Luconiら、1995, Mol. Cell Endocrinol. 108:35-42)。本研究においては、受精能を獲得した精子、受精能を獲得していない精子およびゲニステイン処理した精子を比較する2次元ウエスタン分析により、受精能獲得の際に増大したチロシンリン酸化を示す、抗原FSP95を含む複数の高分子量タンパク質を見出した(図2C)。ホスホチロシン含有プロットにおける存在量の多さによると、FSP95は、これまでに記述した通り、受精能獲得済ヒト精子の、主要な酸性高分子量チロシンリン酸化タンパク質の1つとして出現する。事実、FSP95における潜在的チロシンキナーゼリン酸化部位は残基番号435と同定された。ホスホチロシン残基に対する抗体と組換えFSP95に対する抗体とを用いて試験した通り、*in vitro*受精能獲得の際にFSP95が酸性イソ型へ変化した際のpIの変化(図9)は、FSP95がチロシンキナーゼ基質である有力な証拠となる。

#### 【0180】

受精能獲得済精子におけるゲニステインによるチロシンリン酸化の阻害(図2D)は、ヒト精子においてチロシンキナーゼが存在し活性であることを示唆する。チロシンキナーゼの存在は以前、射出されたヒト精子、およびイノシシ精子の中間部尾部領域において、イノシシ雄生殖細胞から精製したチロシンキナーゼに対する抗体を用いて示されている(BerrutiおよびBorgonovo, 1996, J. Cell. Sci. 109:851-858)。受精能獲得済精子においてゲニステインの存在下で見られる、受精能を獲得していない細胞よりも低い、タンパク質中のチロシン残基リン酸化の減少(図1)は、ホスファターゼの存在(おそらくはカルモジュリン依存性タンパク質ホスファターゼであるカルシニューリンの活性)によることが考えられる(Tashら、1988, J. Cell Biol. 106:1625-1633)。このような解釈は、Ca<sup>++</sup>誘導性脱リン酸化がカルモジュリン-カルシニューリン依存性であるという観察によって支持される(Carreraら、1996, Dev. Biol. 180:284-296)。哺乳類精子におけるチロシンのリン酸化は精子の機能亢進(hyperactivation)に関連するので(ViscontiおよびKopf、1998, Biol. Reprod. 59:1-6)、受精能獲得により誘導されるFSP95のチロシンリン酸化は精子の運動性に関して役割を有すると考えられる。さらに、主要なチロシンキナーゼ基質を利用可能とすることにより、これらの精子の

機能に關与し参加しているチロシンキナーゼの特性決定のための手段が提供されるであろう。

【0181】

FSP95 cDNAの予測アミノ酸と利用可能なデータベースとの比較により、マウスおよびヒト精子pro-AKAP82との最も高い相同性(それぞれ34%、32%のアミノ酸同一性)が判明した。これらのタンパク質は、PK-Aを非細胞(subcellular)位置から隔離させるプロテインキナーゼAのアンカータンパク質である。このことは、FSP95はこれらのAKAPタンパク質と共に、2つの潜在的細胞内ターゲティングドメインを有することを示唆している(図4)。これらのドメインは両方とも、AKAPと類似したN-末端塩基性領域中の75および79に位置する(Glantzら、1993, J. Biol. Chem. 268:12796-12804, Carrら、1992, J. Biol. Chem. 267:6816-16823)。しかしながら、興味深いことには、これらの精子AKAPの予測されるRII-結合ドメインは、この領域内の低い保存性および推定脂肪族ヘリックス結合モチーフの欠如から判断すると、FSP95においては欠失していると判明した(Carrら、1991, J. Biol. Chem. 266:14188-14192)。最近の研究においては、約110kDaのAKAPおよびPK-Aの制御サブユニット(RII、RIIおよびRI)の存在が、ヒト、ウシ、およびサル精子において示されている(Vijayaraghavanら、1997, J. Biol. Chem. 272:4747-4752)。さらに、PK-Aの制御サブユニットのウシ精子AKAPに対するアンカー作用は、PK-Aの触媒活性に関係なく、精子の運動性の制御に必須であることが示唆されている(Vijayaraghavanら、1997, J. Biol. Chem. 272:4747-4752)。故に、FSP95のユニークな精巢特異的発現パターン(図5)およびその精子AKAPとの類似性を考慮すると、FSP95は、ヒトに対する局所的精子抑制剤の製剤のための、細胞透過性アンカー作用阻害ペプチドを開発する可能性について探求されるであろう。さらに、FSP95の、チロシンキナーゼ基質としての同定およびその精子AKAPとの類似性により、PK-Aとチロシンキナーゼとの間にシグナル伝達経路の相互関係がある可能性を示唆する。なぜなら、チロシンリン酸化と他の動物における受精能獲得は、cAMP/PK-A依存性経路によりアップレギュレートされることが示されているからである(ViscontiおよびKopf、1998, Biol. Reprod. 59:1-6, Galantino-Homerら、1997, Biol. Reprod. 56:707-719, Viscontiら、1995,

Development 121:1139-1150)。

【0182】

男性と女性の双方に由来する、抗精子抗体を有する血清によって認識されるため、FSP95は同種抗原でもあり自己抗原でもある。この発見は、FSP95転写物の発現に関して見られた注目すべき精巣特異性と一致している。多くの精子タンパク質が天然で抗原性である。なぜなら、精子タンパク質が組織特異的であり、減数分裂が開始され精子特異的遺伝子が転写され始める思春期まで現れないからである(Tungら、1985, The Autoimmune Disease(RoseおよびMacKay編)pp.537-590, Academic Press, New York, NY)。新生児である期間中に自己トレランスが誘導される間、このような新抗原は、免疫系によっては恐らく認識されない(Tungら、1985, The Autoimmune Disease(RoseおよびMacKay編)pp.537-590, Academic Press, New York, NY)が、一方で減数分裂後に雄の生殖細胞は後期には、血液-精巣バリアおよび血液-精巣上体バリアによって免疫系から隔離されている(Setchellら、1990, J. Reprod. Immunol. 18:19-32, HoffeおよびHinton, 1984 Biol. Reprod. 30:991-1004)。しかしながら、ヒト精子特異的自己抗原および同種抗原のあるものは、不妊患者の血清によって認識される(SAGA 1、SPAG2、SPI7、FAIなど)(Diekmanら、1997, Biol. Reprod. 57:1136-1144 50, Diekmanら、1998, Mol. Reprod. Dev. 50:284-293, Leaら、1997, Fertil. Steril. 67:355-361, Nazら、1984, Science 225:342-344)が、精子表面上で発見されたものはごく少数(SAGA1など)のみである(Diekmanら、1997, Biol. Reprod. 57:1136-1144)-a critical criteria for the selection of a potential contraceptive immunogen (Herr, 1996, Contraceptive Research and Development (HarrisonおよびRosenfield編)pp. 401-429, National Academy Press, Washington DC)。このように、FSP95は避妊用ワクチン原の候補ではない。なぜなら、マイクロ精子不動化アッセイと免疫蛍光法の両方により、精子表面上には存在しないことが示されたからである。そうではなく、rFSP95に対する抗血清を使用した免疫細胞化学により、FSP95の存在する場所は尾の主要部の細胞質であると判明した。

【0183】

免疫電子顕微鏡観察により、繊維鞘のリブに関連した抗原が同定された(図8)

。この抗原は、鞭毛の収縮(beat)の形状の決定に関与すると考えられている(EddyおよびO'Brien, 1994, The Physiology of Reproduction (KnobilおよびNeill 編) Vol. 1, pp.29-77, Raven Press, New York, NY)。膜を取り除いた(demembrated)マウス精子においては、繊維鞘の頭部へのスライドは微小管の末梢端部(distal end)への押出を伴うことが示されている(SiおよびOkuno, 1993, Exp. Cell Res. 208:170-174)。この繊維鞘のスライドは、cAMP依存性であり、スライド速度はATP濃度に依存する。数種類のタンパク質が、単離したヒト精子繊維鞘のゲル上で同定されているが(MW;97, 76, 62, 55, 33, 28, 25kDa)(Jassimら、1992, Hum. Reprod. 7:86-94)、本発明者らの知る限り、ヒト精子繊維鞘タンパク質であるhAKAP82のみが、FSP95以外に分子レベルで特性決定されている(Turnerら、1998, J. Biol. Chem. 273:32135-32141)。最近、ヒト精子繊維鞘タンパク質pro-hAKAP82と92%の同一性を示しFSP95とも27%の同一性を示すが、存在が精子において未だに実証されていない予測タンパク質をコードする「hi」と命名されたヒト精巣特異的遺伝子が報告された(Mohapatraら、1998, Biochem. Biophys. Res. Commun. 244:540-545)。

#### 【0184】

繊維鞘構造における異常、特に縦方向の列の成分の分解および非対称的局在は、不妊と鞭毛の運動障害にそれぞれ関連する、重大な精子の非運動性に関連することが示されている(Chemesら、1987, Fertil. Steril. 48:664-669, Serresら、1986, Cell Motil. Cytoskeleton 6:68-76)。これらの欠陥の分子レベルでの基礎は今のところ未解明であるが、繊維鞘タンパク質をコードする遺伝子の突然変異は、鞭毛運動障害につながる繊維鞘構造の分解に関連することが考えられる。前述のFSP95遺伝子の崩壊に関する更なる研究により、該遺伝子が繊維鞘の構築において果たす役割が明確となり、かつ機能亢進および受精能獲得におけるFSP95のチロシンリン酸化の重要性を評価する助けとなるであろう。

#### 【0185】

本発明は、本発明の各態様を個々に例示するものとして意図され、記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるものではない。さらに、機能的に等価な方法および成分は、本発明の範囲内にある。実際、本明細書において示され、

記載されたものに加え、本発明の種々の改変が、これまでの記載および付随する図面から当業者には明らかとなるであろう。そのような改変もまた、添付の特許請求の範囲内に入るものと意図されている。

#### 【0186】

本明細書で引用した全ての参考文献は、参照によりあらゆる目的のために本明細書に組み入れるものとする。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

2-Dイムノプロットによる、受精能を獲得したヒト精子における高分子量の主要な酸性チロシンリン酸化タンパク質としてのFSP95の同定。スイムアップしている新鮮な精子は、ゲニステイン（プロテインチロシンキナーゼ阻害剤）の不在下および存在下にて受精能を獲得させた。2-D精子プロテオームにおけるFSP95のスポット位置は、銀染色したゲルにおいて白の長方形の枠で囲って示す（A）。チロシン残基のリン酸化を示した高分子量の酸性タンパク質（Aの枠領域）は、受精能獲得の前（B）および後（C）に、抗ホスホチロシン抗体で精査したプロットに認められる。顕著に存在する高分子量の酸性チロシンリン酸化タンパク質（約95 kDa、pI 5.1-5.5）は、受精能獲得によるリン酸化の増大を示す（C）。95kDaタンパク質のリン酸化の欠損は、ゲニステインの存在下にて受精能を獲得した細胞において観察された（D）。FSP95をマイクロシーケンシングした中心部分のスポットは矢印と共に白丸で示してある（A）。

##### 【図2】

抗精子抗体を用いた男性および女性におけるFSP95の抗原性。ヒト精子タンパク質を二次元SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーし、そしてイムノビーズ結合試験によって既に抗精子抗体についてスクリーニングされている不妊症男性（A）および不妊症女性（B）由来の血清を用いて精査した。免疫反応性タンパク質を、臨床的に生殖能力のある男性（C）および女性（D）の被験者に由来する血清を用いて精査したウエスタンプロットと比較した。両方の性の不妊症被験者に由来する血清を用いてFSP95を含む95kDaのタンパク質（矢印、マイクロシーケンシングのために選択したタンパク質スポット）は、生殖能力のあ

る被験者の血清を用いて95kDa群で観察された弱い免疫反応性と比較して、強力な免疫反応性を示したことに留意されたい。

### 【図3】

ヒト精子タンパク質FSP95のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。ヒト精子FSP95の推定アミノ酸配列をcDNA配列の下に示す。左側の数はヌクレオチド配列を指し、右側の数はアミノ酸配列を指す。オープンリーディングフレームの共通のATGおよびポリアデニル化シグナル(ATFAAA)は太字で表す。終止コドン(TAA)には星印を付してある。5-プライムおよび3-プライムの未翻訳領域はそれぞれ162 bpおよび218 bpであり、イタリック体で示す。推定タンパク質の分子量およびpIを算出したところそれぞれ94.6kDaおよび6.0であった。18個の下線を付した配列は、マイクロシーケンシングにより得たトリプシン性ペプチドを示す。推定チロシンキナーゼリン酸化部位は、枠内の太字で示す(残基435番)。この核酸配列はGenBankに提出されている(受託番号AF087003)。

### 【図4】

ヒト精子FSP95の推定アミノ酸配列とマウスおよびヒトの精子繊維鞘AKAP(マウス: pro-mAKAP82、受託番号148968; ヒト: pro-hAKAP82、受託番号AF072756)の推定アミノ酸配列との相同性比較。これらの配列は、FSP95との相同性の高い順に並べた。GCG-PILEUPプログラムを使用してアライメントを作成し、これをALSCRIPTバージョン2.0を用いてフォーマット化した。影付き領域は分子間のアミノ酸同一性および類似性を示す(ALSCRIPTにおいてカットオフ8)。保存されているAKAP様細胞内ターゲティングドメインは枠で囲って示す。マウスおよびヒトのAKAP82のN末端R11結合ドメインは下線で強調している。

### 【図5】

ヒト精子FSP95発現の分析。A: レーン毎に、それぞれのヒト組織に由来する2  $\mu$ gのポリ(A) + mRNAを含むノーザンプロット(Clontech)を放射性標識FSP95 cDNAを用いてハイブリダイズし、60時間露光した。RNAマーカの移動(kb)を左側に示す。約3.0kbの単一の転写産物は睪丸においてのみ認められた。続いてプロットをストリップに切断し、アクチンを用いて再度ハイブリダイズして、各レーンにおけるRNAレベルを評価した(データは示さない)。B: 50種のヒト組織

(Clontechより入手)に由来するポリ(A)+RNAを含むドットプロットを放射性標識FSP95 cDNAを用いてハイブリダイズし、シグナルをオートラジオグラフィで可視化した。ハイブリダイゼーションは、18時間の露光によって睾丸においてのみ認められた。ドットプロットには、以下の50種の組織に由来する基準量(89~514 ng)のポリ(A)+RNAを含有させた。すなわち、A1、脳全体；A2、扁桃；A3、尾状核；A4、小脳；A5、大脳皮質；A6、前頭葉；A7、海馬；A8、延髄；B1、後頭葉；B2、被殻；B3、黒質；B4、側頭葉；B5、視床；B6、視床下核；B7、脊髄；C1、心臓；C2、大動脈；C3、骨格筋；C4、大腸；C5、膀胱；C6、子宮；C7、前立腺；C8、胃；D1、睾丸；D2、卵巣；D3、膵臓；D4、下垂体；D5、副腎；D6、甲状腺；D7、唾液腺；D8、乳腺；E1、腎臓；E2、肝臓；E3、小腸；E4、脾臓；E5、胸腺；E6、末梢白血球；E7、リンパ節；E8、骨髄；F1、虫垂；F2、肺；F3、気管；F4、胎盤；G1、胎児脳；G2、胎児心臓；G3、胎児腎臓；G4、胎児肝臓；G5、胎児脾臓；G6、胎児胸腺；G7、胎児肺。

#### 【図6】

大腸菌からの組換えFSP95 (rFSP95) の単離ならびに組換えおよび精子FSP95のイムノプロット。ヒト精子FSP95 cDNAの一部(タンパク質の残基1-779をコードする)をpET2Sbプラスミドを用いて大腸菌で発現させ、1.0 mM IPTGを添加して誘導し、そしてニッケルイオンアフィニティーカラムクロマトグラフィー、続いて分取用ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って精製した。A: クーマシーで染色した細菌抽出物。レーン1; 非誘導、レーン2および3; 誘導の1.5時間および3.0時間後。発現されたFSP95を矢印で示す。B: 免疫に使用したクーマシー染色した精製rFSP95 (2.3 μg)。左側; 分子量マーカー。C: 5000倍希釈したrFSP95に対するラット抗血清を用いて精査したゲル精製rFSP95 (3.5 μg) のイムノプロット。レーン1: 免疫前血清、レーン2; 免疫血清。D: ゲル精製rFSP95に対するラット血清を用いて精査したヒト精子タンパク質の2-Dプロット。最初にマイクロシーケンシングしたpI-5.3における95kDa領域は抗体と免疫反応した(矢印)。pH勾配は上に示す。分子量マーカーは全てのパネルの左側に示す。

#### 【図7】

受精能を獲得し、透過可能となったヒト精子におけるFSP95の位相差 (A、C)

および間接免疫蛍光染色法 (B、D)。免疫蛍光は、免疫血清 (B) を有する鞭毛 (バー) の主部 (PP) で表すが、頭部、中間部 (MP) または端部 (EP) では蛍光が観察されなかった。免疫前血清 (D)、または生存している受精能獲得非透過性精子に対する免疫血清 (データは示さない) を用いた場合には、免疫染色は観察されなかった。

#### 【図8】

電顕を用いた、射精されたヒト精子の主部の縦断面 (A) および横断面 (B) におけるFSP95のイムノゴールドの局在化。金粒子 (矢印) は、繊維鞘 (FS) のリブ (rib) で検出されたが、縦に切断した円筒 (longitudinal column; LC) の中心部では検出されなかった。免疫反応性は、外部の緻密な繊維 (ODF) または軸系 (AX0) において検出されなかった。ラット免疫前血清で処理した対照の断面 (CおよびD) では、金粒子はまばらに検出されただけだった。

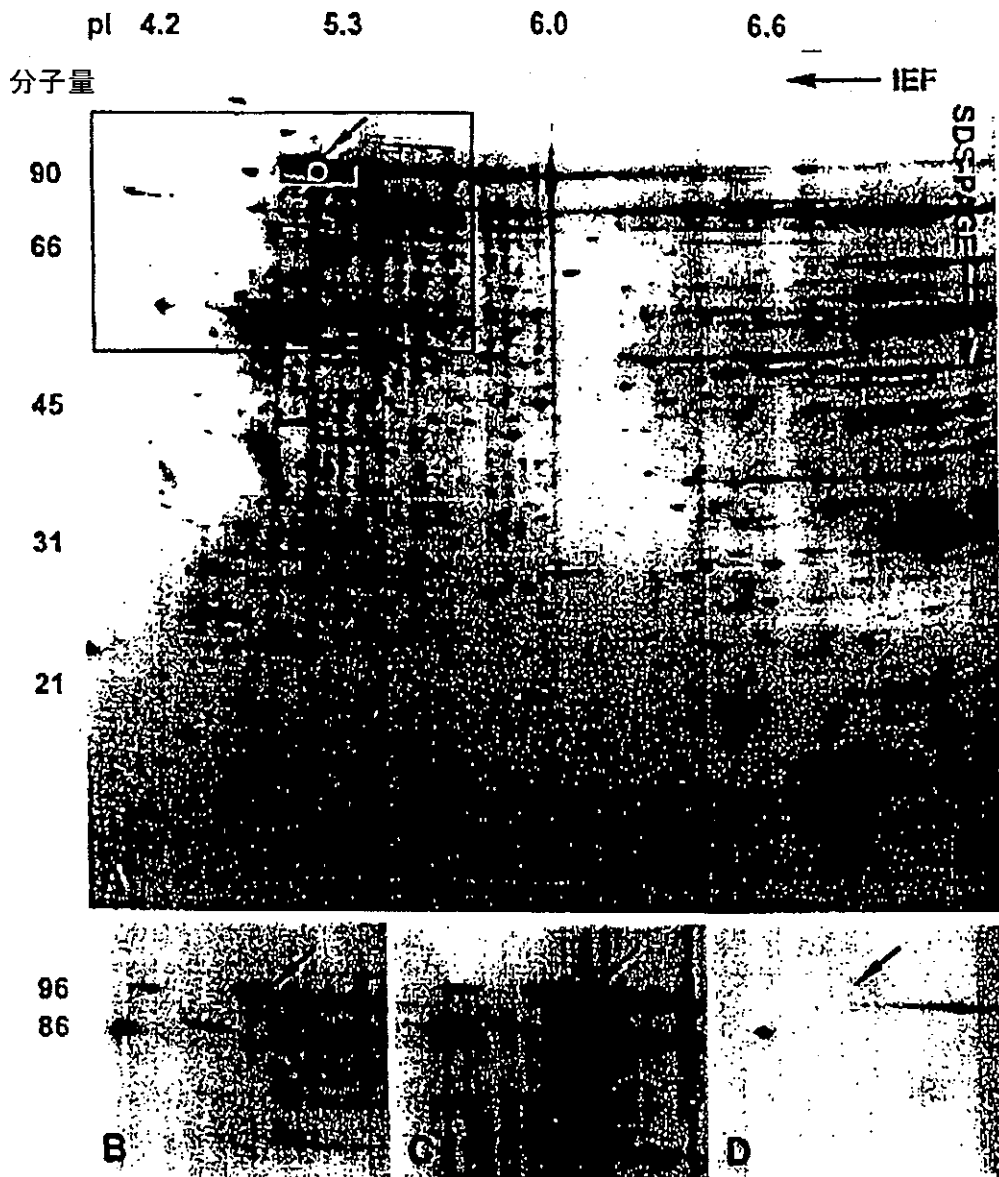
#### 【図9】

ヒト精子のin vitroでの受精能獲得過程におけるFSP95のチロシンリン酸化。2D SDS-PAGE、エレクトロブロットティング、ならびにrFSP95 (A、B) および抗ホスホチロシンモノクローナル抗体 (C、D) に対するラット抗血清を用いた精査の後に、受精能未獲得精子のタンパク質 (A、C) を、6時間かけて受精能獲得させた精子 (B、D) と比較した。pI -5.3の免疫反応形態のFSP95 (A) は受精能獲得の後であまり多量に存在しない (B)。一方、FSP95のより酸性度が高い形態は、受精能獲得後に免疫反応性であった (B、矢印)。受精能獲得後の免疫反応形態のFSP95におけるこれらの酸性電荷シフトは、チロシンリン酸化の増大およびより酸性度の高いホスホチロシン含有アイソフォームの出現により達成される (C、D、矢印)。

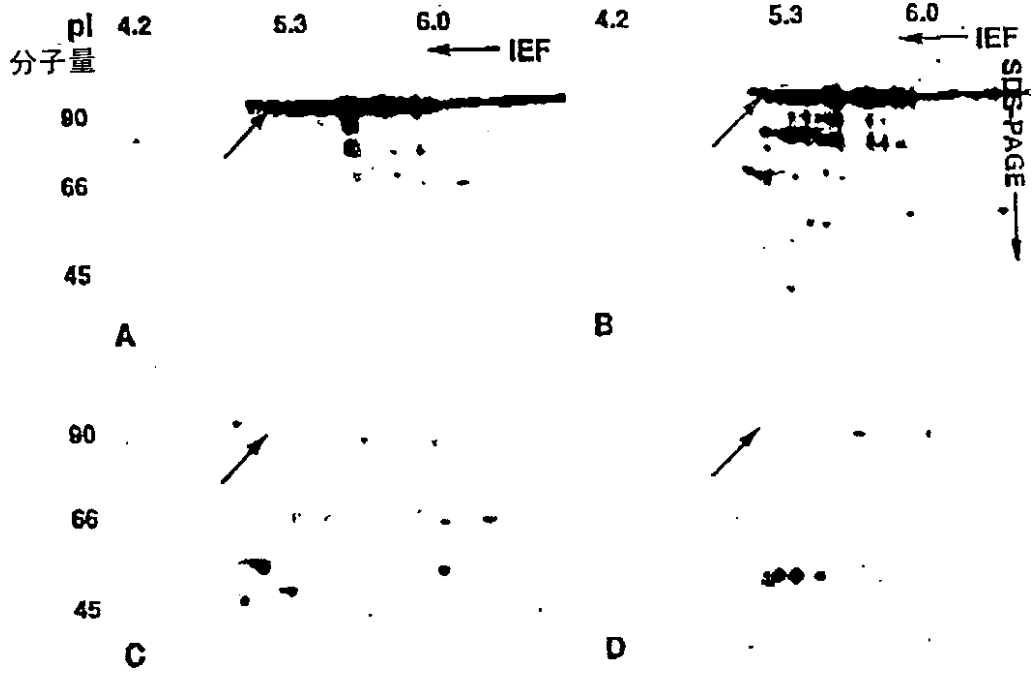
#### 【図10】

FSP95 RIIサブユニット結合ドメイン ヘリックス (アミノ酸残基 671-688) の螺旋状車輪図。疎水性残基の表面は枠で囲って示す。

【图1】



【图2】

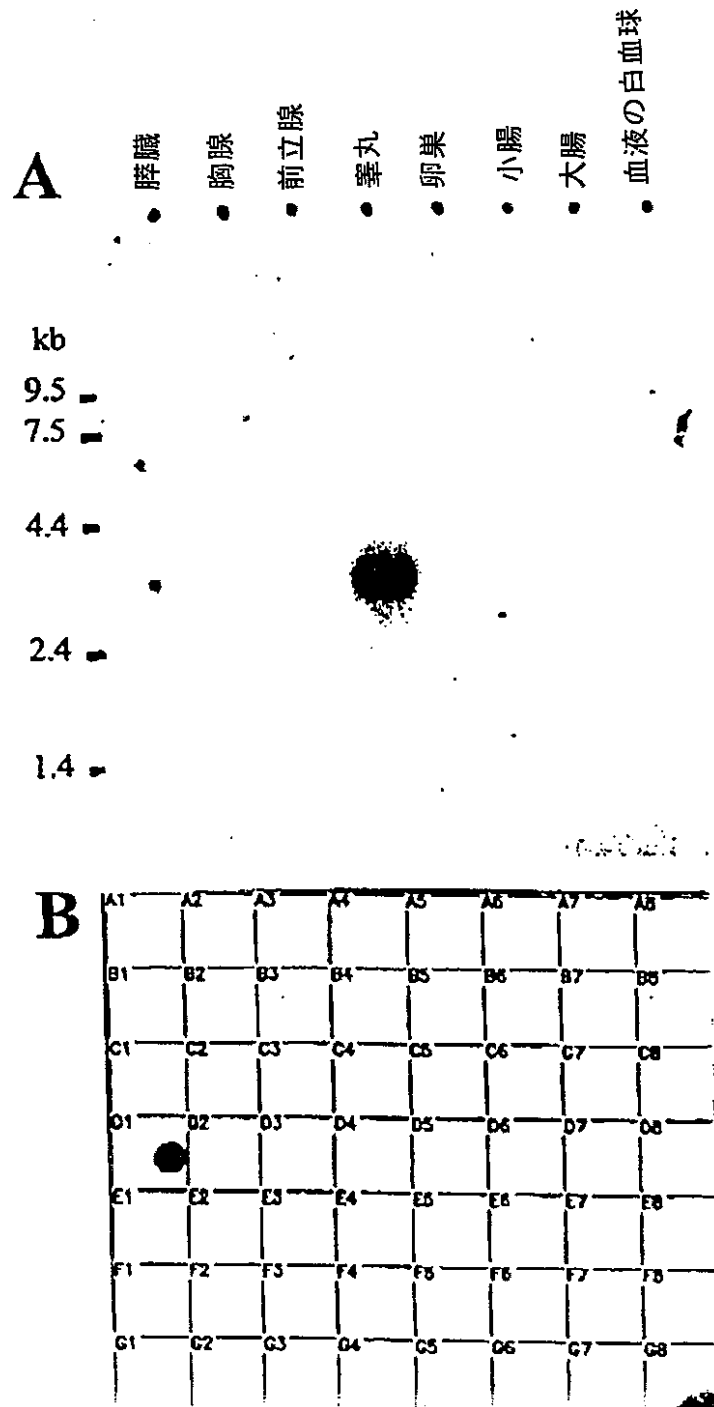


【図3】

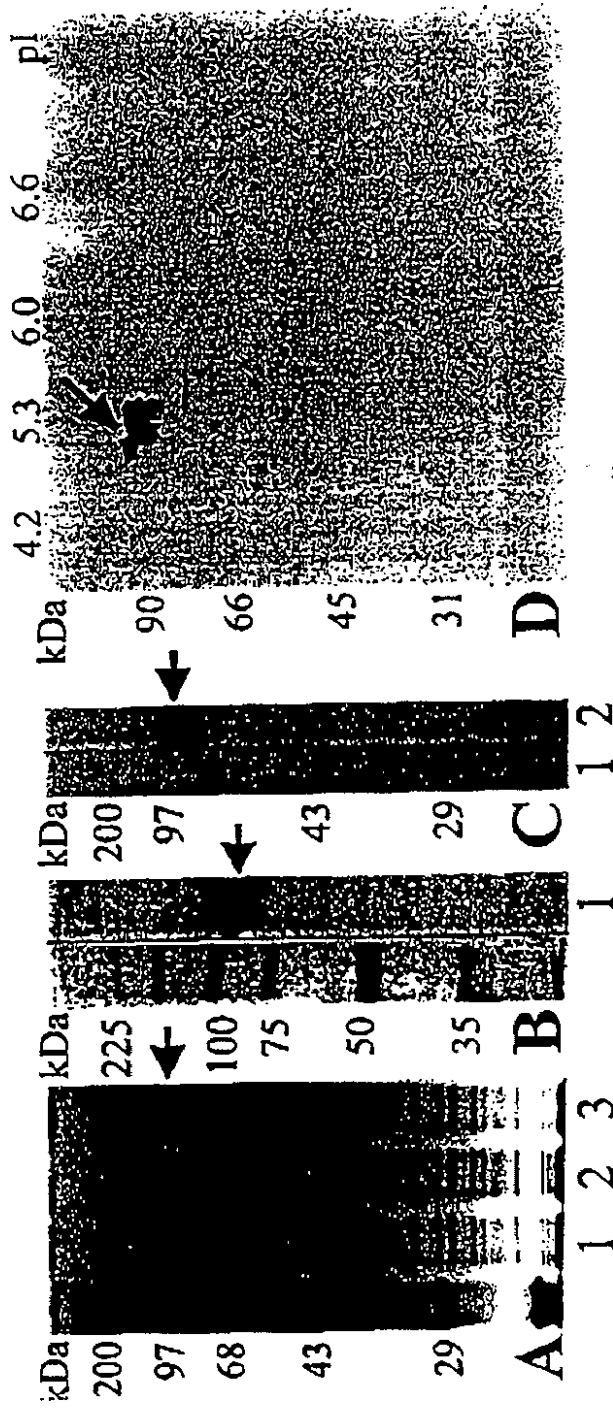
1 GACTTTAAAGTATATCTGGAGTCTTCCCTGCTCACTATTCAGTACTACAGAGATTC  
61 CTATATATTCATGCGCAGAGCGGATTAATCTGAGGATACGACAGACAAATAATTA  
121 TCAAGAGCTTCTCTCAATCTCAGAACCTATCTCTGTAAGATSTCAGAAAGGTTGAC  
HSEKVD 6  
181 TGGTTACAAAGCCAAATGAGTATGCAAAATTTGATGTCATCTCTCTGAGACACCA  
MLQSQNWGVCKVDVYSPQDNQ 26  
241 GCGCAGAGCTGCAAAATGAGACCTCCAGGATCTCTGCAAGTCTCACTCTGCTGCG  
AQDHWKNDTFGTDPVRLSMLR 46  
301 AAGAGCCTGAGAGAGATACAGCAGATTCAGAGATTTCTGCTCAAGCCGAGAAATCA  
RDLEKKSATLFFQDVRPKPQES 66  
361 TTCTGAGGAACTCCAACTCAGGAGACCCACAGAGGTTTCTCTGAGCTATTAC  
FQGETKNSEQDPHKGPFVVDY 86  
421 AACACACACAGAGGAGCTCCAGAAAGATTCATTTGAGATGACTCAGAAAGAGAT  
NTTTTKGTPEHLHPEMTHKEI 106  
481 CTTTCCAGGCGCCAGGCGCCAACTTCCAGAGGAGTTCAGTAGATGAACTTCTCTC  
PCQGFRAAGLGNQSESVDEVSX 126  
541 TATGCTAAAGCTCCAGGATCTGAGTCTAGCCATGCGCCAGAGAGATCAATGAGAG  
YANBLTNLVIAKAKKEXNEK 146  
601 ATGATGCTCTGAAAGAAATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
IDQSEMKCVYQSELYKQNEPT 166  
661 CCGCCAAAGGCTCAGTAAAGATGAGCATCAGAGCTTGTGATGAGAGCCTCTCTGATG  
PTKSLSKXASELVNMTVSA 186  
721 TCCAGGATGCTGCGCCAGAGAGGCTCTGCTGAGAGAGAGATCTGCGGATCTCA  
ERNAAFPDKAFQSDRVEQES 206  
781 CAAAGTCCCGAAATTTGAAATACAGTCCACTTTGAGATCAGGAGAGGAGCCAAAGAA  
QSEPPHLLKYKSTLKEIKESTKK 226  
841 AAGAGGCTGAGAGAGAGGCTCTCTGAGAGATCTCTCTCTATAGAGAGATTT  
RQGFDDDKPPSEKSEFPYKVF 246  
901 GATCTCTGAGAGATGATGATGATGAGAGGATGAGGATGATGATGATGATGATGATG  
ESRNGDIYAREGGRFFFRERK 266  
961 AGCTTCCAGAGGAGAGAGGCTGATGATCTTCCAGGCTCTCTGATGAGAGATGATG  
NFRGQKRPDDDFYASVQEGIM 286  
1021 AGCTATGCTGAGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
YANSEVVSDDMMVGIKMLK 306  
1081 CAAAGTAAAGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGATCTCTCTGAGAGATG  
QVFRDTTYATYLLLEKVLLEKHA 326  
1141 AAGAGGCTGAGAGATCTGAGAGATCTCTCTGAGAGATCTCTCTGAGAGATCTCTG  
KEVYVSENLITDEELRMLHSEVTG 346  
1201 AGCTGATGAGAGAGAGGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
TLEHTDTQFVSAVKATVFEHQ 366  
1261 AGCCAAAGGCTCAGATATGATGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGATCTCTG  
SQKATDIPAMLEKLYNVMF 386  
1321 GCGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGATCTCTG  
AKKVPEBYRKAQDKAVSEYEL 406  
1381 ATCTGATGAGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
XSEMGWQDPKMMNVMYANKS 426  
1441 GAGAGGCTTCCAGGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
ETELREKEMTEEPKSEEEETCA 446  
1501 AAGAGGCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
KTLGEXEIKKELTLMHXSOQ 466  
1561 AAGAGGCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
VECKSLGFQHAAPFAFHTQR 486  
1621 AAGAGGCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
EFAEDIEFEPYREDTGMLESLP 506  
1681 GCGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
FYFRPEKPKMFMHTDSEDEWAKD 526  
1741 CTGATGATGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
LIVSALLLIQTMLAQGQRKD 546  
1801 GCGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
ANSEFVEAAGTTHFRANFFPV 566  
1861 GCTGATGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
APDESCLKEBAFZVGDQEQAE 586  
1921 AAGAGGAGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
KKDLRZYFRERSEHLEFRY 606  
1981 TCCAGGCTTCCAGGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
FKRDQSPKPKVPEQPFVKEBR 626  
2041 AAGATGATGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
KLCERFLASBPRLYERDF 646  
2101 CCTGATGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
PQALLLQLTEMAVSOXDQHE 666  
2161 GCGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
QQMVVEHLMMSVMKLCVIAK 686  
2221 TCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
ECPALALFLGDDKLGDAERL 706  
2281 ACTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
TSAPFDELYECLFAKGTGA 726  
2341 GAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
EAVLQNAYQATHNEHEUTSO 746  
2401 CAGCCGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
QPFEGCAAFYIVBNMMLTD 766  
2461 ACAGCTTCCAGGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
TVQNKQLGAVLQHVAAEELN 786  
2521 GTCCGATTTGATTTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
VPILYFAGDDKGIQEKLLDL 806  
2581 TCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
SAAAYDKGCEVQEVYLSVLR 826  
2641 TATGAGAGGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGG  
YEKERQLNEAVGNVTFLOLL 846  
2701 GACTGAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTG  
DMLMVL 853  
2761 GCGCGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
2821 CAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
2881 ACTGAGATTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCCAGGATCTCTGAGAGAGGCTTCC  
2941 TG



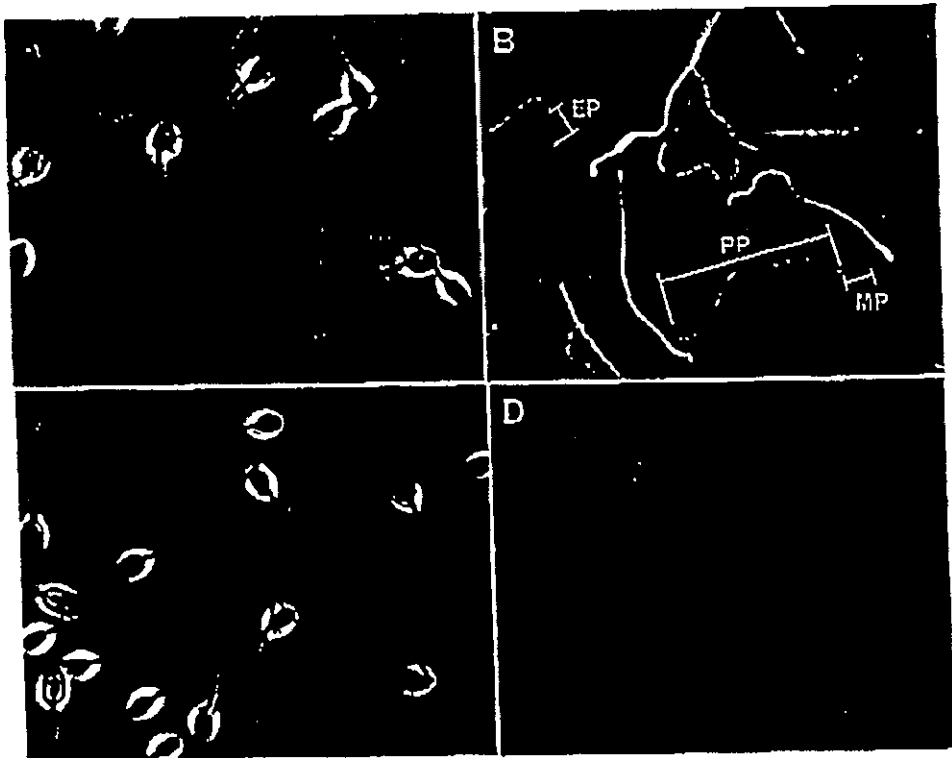
【図5】



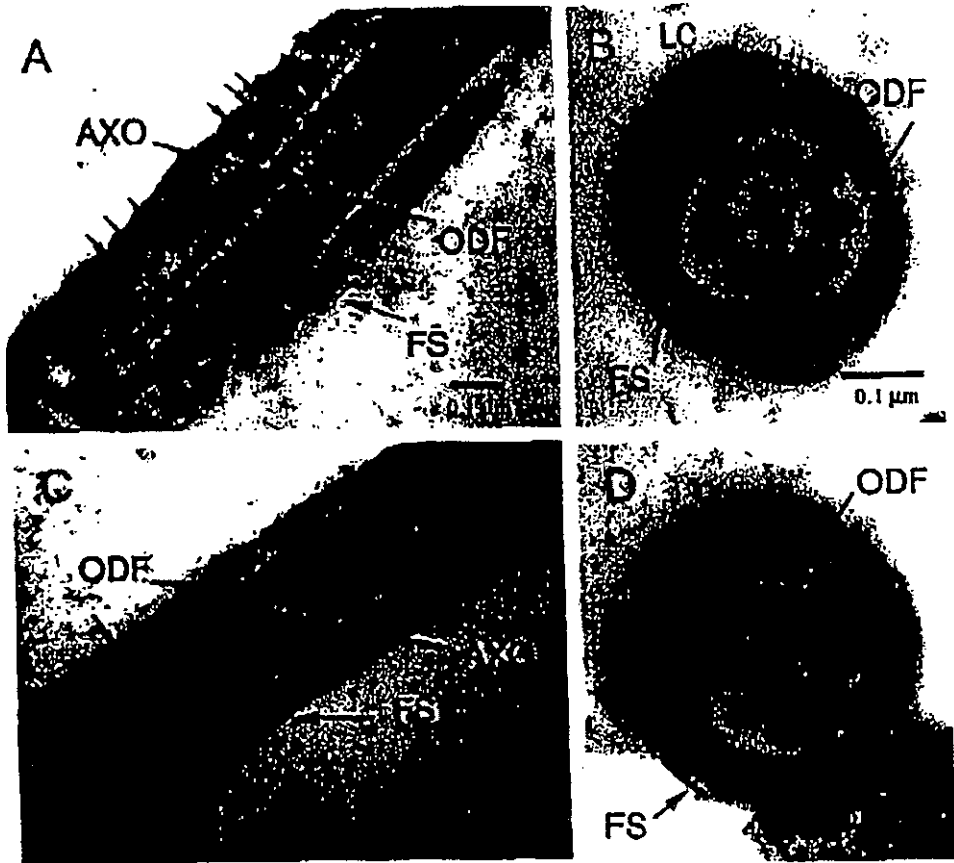
【图6】



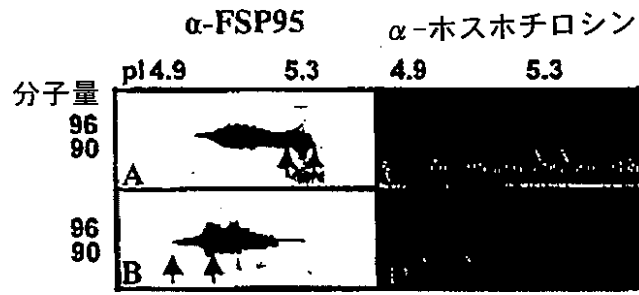
【图7】



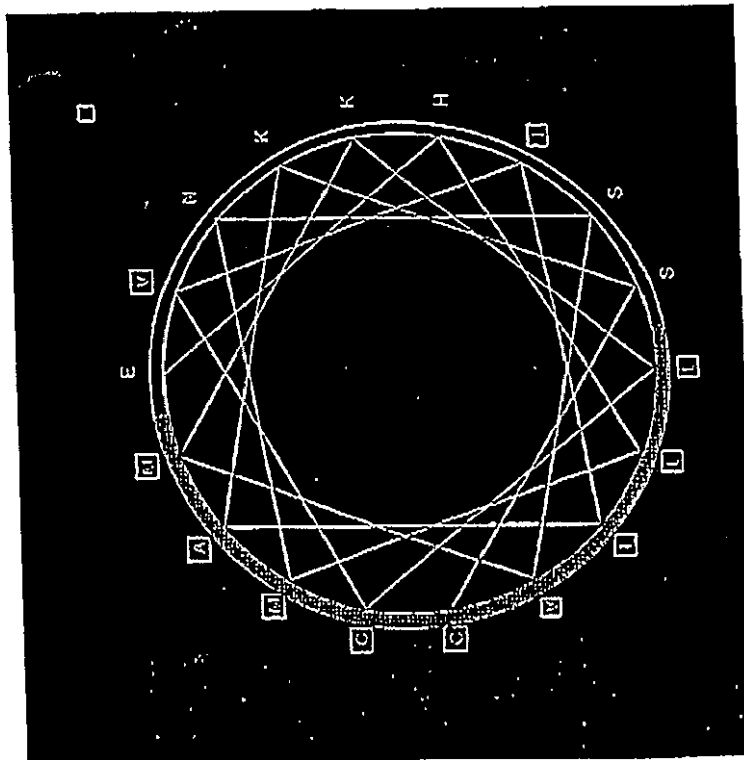
【图8】



【図9】



【図10】



残基 : E H L M N S V M K L C V I I A K S C  
671 688

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/02675
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61K 38/17 US CL : 514/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/12; 424/184.1; 435/69.3, 235.1; 530/350, 395, 412; 536/23.1, 27.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,795,634 A (GRIMES et al) 03 January 1989 (03.01.1989)	1-5, 7-16, 19-30
A	US 5,525,592 A (LACY et al) 11 June 1996 (11.06.1996)	1-5, 7-16, 19-30
A	US 5,637,300 A (DUNBAR et al) 10 June 1997 (10.06.1997)	1-5, 7-16, 19-30
A	US 5,660,997 A (SPAULDING) 26 August 1997 (26.08.1997)	1-5, 7-16, 19-30
A	US 5,672,488 A (DEAN) 30 September 1997 (30.09.1997)	1-5, 7-16, 19-30
A	BURKALDI et al. Antifertility Effects in Female Rats Immunized with Human Seminal Plasma Inhibin. Contraception. 1993. Vol.47, pages 491-498.	1-5, 7-16, 19-30
A	DIRNHOFER et al. Vaccination for Birth Control. Intl. Arch. Allergy Immunol. 1995. Vol.108, pages 350-354.	1-5, 7-16, 19-30
Y,P	MANDAL et al. FSP95, A testis specific 95 kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. Biol. Reprod. November 1999, Vol.61, No.5, pages 1184-97.	1-5, 7-16, 19-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report <b>19 JUN 2000</b>
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Christopher Low</i> Telephone No. 703-308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/02675

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claim Nos.: 6, 17, and 18  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 P	15/16	C 0 7 K	16/18	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 5
	16/18		1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
C 1 2 Q	1/02		33/53	D
G 0 1 N	33/15			N
	33/50		33/577	B
	33/53	C 1 2 P	21/08	
		C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/577		5/00	A
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 マンダル, アラピンダ  
 アメリカ合衆国 22903 バージニア州,  
 シャルロツツビル, 15番 ストリート エ  
 ヌダブリュ 326, アパートメント 2ビ  
 ー
- (72)発明者 ウォルコウイクズ, マイケル  
 アメリカ合衆国 22901 バージニア州,  
 シャルロツツビル, ハイドロウリック ロ  
 ード 2607 イー
- (72)発明者 クロツツ, ケネス  
 アメリカ合衆国 22937 バージニア州,  
 エスモント, アルベレーン チャーチ レ  
 ーン 2984

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA12 DA13 DA14  
DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA11  
DA01 DA02 DA05 DA11 EA01  
EA02 EA03 EA04 FA01 GA01  
GA11 HA01 HA03 HA11  
4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ08 QR06  
QR07 QR33 QR59 QR77 QR80  
QS05 QS36 QX02  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA10  
CA19 CA20 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y  
AB01 AB02 BA01 BA08 CA24  
CA25 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 BA22 CA18  
CA35 MA13 MA24 MA37 MA52  
MA66 NA14 ZA861  
4C085 AA13 AA14 BB11 CC04 DD22  
DD23 DD81 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA00 DA76 EA20 EA50  
FA72 FA74

专利名称(译)	用于调节生育力的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003525021A</a>	公开(公告)日	2003-08-26
申请号	JP2000595697	申请日	2000-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚大学专利基金会		
申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚专利大学基金会		
[标]发明人	ヘルジョン マンダルアラビンダ ウォルコウイクズマイケル クロツツケネス		
发明人	ヘル,ジョン マンダル,アラビンダ ウォルコウイクズ,マイケル クロツツ,ケネス		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/395 A61P15/16 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P15/16 C07K14/705		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P15/16 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33 /577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045 /FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024 /GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ01 4B063/QQ08 4B063/QR06 4B063/QR07 4B063/QR33 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063 /QS05 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084 /CA35 4C084/MA13 4C084/MA24 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA861 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD81 4C085 /EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/118030 1999-02-01 US 60/118995 1999-02-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及脊椎动物FSP95基因及其编码的蛋白质产物，及其衍生物和类似物。还提供了产生脊椎动物FSP95蛋白，衍生物和抗体的方法。本发明进一步涉及治疗性组合物以及诊断和治疗方法，包括调节（例如，抑制或促进）生育力的组合物和方法，例如避孕方法和促进生育力的方法。。

图 1 ]

