

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-81147

(P2004-81147A)

(43) 公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-249220 (P2002-249220)	(71) 出願人	000001856 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
(22) 出願日	平成14年8月28日 (2002.8.28)	(74) 代理人	100081400 弁理士 大野 彰夫
		(74) 代理人	100092716 弁理士 中田 ▲やす▼雄
		(74) 代理人	100115750 弁理士 矢口 敏昭
		(74) 代理人	100119622 弁理士 金原 玲子
		(72) 発明者	杉浦 雅子 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共 株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】セラミドキナーゼ遺伝子プロモーターDNA

(57) 【要約】

【課題】セラミドキナーゼ遺伝子の転写制御に関わるプロモーター領域を特定し、該プロモーターの活性を調節する物質のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】下記のa)乃至c)のいずれか一つに記載されたDNA：

a) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるDNA；

b) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有するDNA；

c) 上記a)に記載のDNAと95%以上のヌクレオチド配列同一性を有し、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有するDNA。

【選択図】なし。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の a) 乃至 c) のいずれか一つに記載された DNA :

- a) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA ;
- b) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA ;
- c) 上記 a) に記載の DNA と 95 % 以上のヌクレオチド配列同一性を有し、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA 。

【請求項 2】

10

形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) が保有する組換えプラスミドにおいて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列の 5' 末端に連結されている 2515 bp の DNA 。

【請求項 3】

下記の a) 乃至 c) のいずれか一つに記載された DNA :

- a) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 1087 で示されるヌクレオチドを 5' 末端とし、ヌクレオチド番号 2515 で示されるヌクレオチドを 3' 末端とするヌクレオチド配列からなる DNA ;
- b) 上記 a) に記載の DNA のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA ;
- c) 上記 a) に記載の DNA と 95 % 以上のヌクレオチド配列同一性を有し、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA 。

20

【請求項 4】

形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) が保有する組換えプラスミドにおいて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列の 5' 末端に連結されている 2515 bp の DNA 中の 3' 末端側の 1429 bp からなる DNA 。

【請求項 5】

配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列を含み、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA 。

30

【請求項 6】

配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1087 から 2515 で示されるヌクレオチド配列を含み、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA 。

【請求項 7】

下記の a) 乃至 d) に表される特徴を有する DNA :

- a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1087 から 2515 で示されるヌクレオチド配列を含み ;
- b) ヌクレオチド番号 2515 で示されるヌクレオチドを 3' 末端とし ;
- c) ヌクレオチド番号 1087 で示されるヌクレオチドの 5' 末端に少なくとも 1 bp 、最長で 1086 bp のポリヌクレオチドが付加し ;
- d) 哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する。

40

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 つに記載の DNA を含む組換えプラスミド。

【請求項 9】

請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 つに記載の DNA の 3' 末端に、タンパク質をコードする DNA が連結されていることを特徴とする、請求項 8 記載の組換えプラスミド。

【請求項 10】

タンパク質が、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、からなる群から選択されることを特徴と

50

する、請求項 9 記載の組換えプラスミド。

【請求項 11】

タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする、請求項 9 または 10 記載の組換えプラスミド。

【請求項 12】

形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) が保有する組換えプラスミド、pGV-hcerkp2。

【請求項 13】

請求項 8 乃至 12 のいずれか 1 つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞。

【請求項 14】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 13 記載の宿主細胞。

【請求項 15】

宿主細胞が真核細胞である、請求項 13 記載の宿主細胞。

【請求項 16】

宿主細胞が哺乳動物由来の細胞である、請求項 13 または 15 記載の宿主細胞。

【請求項 17】

形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087)。

【請求項 18】

下記の工程 i) から iii) からなる、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性調節作用を有する物質のスクリーニング方法： 20

i) 請求項 8 乃至 12 のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞を被験物質の存在下、または非存在下で培養する工程；

ii) 上記 i) の宿主細胞における、請求項 8 乃至 12 のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の DNA の 3' 末端に連結されている DNA にコードされているタンパク質の発現量を検出する工程；

iii) 上記 ii) の検出結果を、被験物質の存在下で培養した細胞と被験物質非存在下で培養した細胞との間で比較する工程。

【請求項 19】

下記の工程 i) から iii) からなる、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、HIV、2 型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常および動脈硬化から選択される一つまたは二つ以上の疾患の治療または予防効果を有する物質のスクリーニング方法： 30

i) 請求項 8 乃至 12 のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞を被験物質の存在下、または非存在下で培養する工程；

ii) 上記 i) の宿主細胞における、請求項 8 乃至 12 のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の DNA の 3' 末端に連結されている DNA にコードされているタンパク質の発現量を検出する工程；

iii) 上記 ii) の検出結果を、被験物質の存在下で培養した細胞と被験物質非存在下で培養した細胞との間で比較し、発現量が増加している場合、該被験物質が該治療または 40

【請求項 20】

下記の工程 i) から iii) からなる、癌およびその転移の治療または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：

i) 請求項 8 乃至 12 のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞を被験物質の存在下、または非存在下で培養する工程；

ii) 上記 i) の宿主細胞における、請求項 8 乃至 12 のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の DNA の 3' 末端に連結されている DNA にコードされているタンパク質の発現量を検出する工程；

iii) 上記 ii) の検出結果を被験物質の存在下で培養した細胞と被験物質非存在下で培養した細胞との間で比較し、発現量が減少している場合、該被験物質が該治療または予 50

防効果を有すると判断する工程。

【請求項 2 1】

下記の工程 i) 乃至 i i i) からなる、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、H I V、2 型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常および動脈硬化から選択される一つまたは二つ以上の疾患の治療または予防効果を有するタンパク質をコードする c D N A を同定する方法：

i) 請求項 8 乃至 1 2 のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞（以下「細胞 A」という）と、細胞 A を被験 c D N A が哺乳動物用発現ベクターに組み込まれた組換えプラスミドで形質転換することにより該被験 c D N A を一過性または安定的に発現する細胞（以下「細胞 B」という）と、細胞 A を該被験 c D N A を含まない別の組換えプラスミドで形質転換した細胞（以下「細胞 C」という）からなる群から選択される細胞を個別に培養する工程；

i i) 上記 i) の細胞 B および細胞 C または A における、請求項 8 乃至 1 2 のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の D N A の 3 ' 末端に連結されている D N A にコードされているタンパク質の発現量を測定する工程；

i i i) 上記 i i) の測定結果を比較し、該タンパク質の発現量が細胞 B において細胞 C または A よりも増加している場合、該 c D N A がコードするタンパク質が該治療または予防効果を有すると判断する工程。

10

【請求項 2 2】

下記の工程 i) 乃至 i i i) からなる、癌およびその転移の治療または予防効果を有するタンパク質をコードする c D N A を同定する方法：

i) 請求項 8 乃至 1 2 のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞（以下「細胞 A」という）と、細胞 A を被験 c D N A が哺乳動物用発現ベクターに組み込まれた組換えプラスミドで形質転換することにより該被験 c D N A を一過性または安定的に発現する細胞（以下「細胞 B」という）と、細胞 A を該被験 c D N A を含まない別の組換えプラスミドで形質転換した細胞（以下「細胞 C」という）からなる群から選択される細胞を個別に培養する工程；

i i) 上記 i) の細胞 B および細胞 C または A における、請求項 8 乃至 1 2 のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の D N A の 3 ' 末端に連結されている D N A にコードされているタンパク質の発現量を測定する工程；

i i i) 上記 i i) の測定結果を比較し、該タンパク質の発現量が細胞 B において細胞 C または A よりも減少している場合、該 c D N A がコードするタンパク質が該治療または予防効果を有すると判断する工程。

20

30

【請求項 2 3】

セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性を調節する物質を分離する方法であって、請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の D N A に該物質を含む試料を接触させ、次いで、該 D N A に結合した該物質を分離することを特徴とする方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の D N A にヒト細胞の核抽出液を含む試料を接触させ、次いで、該 D N A に結合したタンパク質を分離することを特徴とする、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性調製因子の検出方法。

40

【請求項 2 5】

下記の工程 i) および i i) を含む、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性を調節する活性を有する物質を選抜する方法：

i) 請求項 1 乃至 7 のいずれか一つに記載の D N A を標識したものに、ヒト細胞の核抽出液および被験物質を加えたもの、ならびにヒト細胞の核抽出液のみを加えたものをそれぞれ調製する；

i i) 上記 i) の各混合物試料を電気泳動し、標識された D N A を含むバンドを検出し、ヒト細胞の核抽出液のみを加えた試料で見出されるバンドと被験物質を加えた試料で見出されるバンドの間で移動度を比較し、移動度が増大するものを選択する。

50

【請求項 26】

該標識が放射標識である請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

下記 a) 乃至 b) のいずれかで表される特徴を有し、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性を調節する活性を持つヌクレオチドまたはその誘導体：

a) 配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列中の、連続した少なくとも 10 ヌクレオチドからなる；

b) 配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列中の、連続した少なくとも 10 ヌクレオチドからなる。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、各種セラミドおよびその各種光学異性体をリン酸化し、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、HIV、2 型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常、動脈硬化、癌およびその転移の原因となりうるセラミドキナーゼのプロモーター活性を有する新規 DNA および該プロモーター活性を調節する物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

スフィンゴ脂質は従来、グリセロリン脂質およびコレステロールとならぶ細胞膜の主要な構成成分の一つと考えられてきた。グリセロリン脂質は細胞膜構造の維持だけでなく、その代謝産物として多くの生理活性物質を産生させることが知られてきたが、スフィンゴ脂質についてはその代謝産物の生理活性については最近までほとんど知られていなかった。近年、いくつかのスフィンゴ脂質の代謝産物にアポトーシスの誘導や細胞増殖刺激作用などの生理活性が知られるようになり、スフィンゴ脂質の代謝酵素が生理的反応や種々の病態に密接に関連する可能性が示唆されるようになった。なかでも、セラミドは多くの細胞機能を調節するレギュレーターとして注目を集めている (Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (1995) TIBS 20, 73-77)。

20

【0003】

例えば、セラミドは TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインのセカンドメッセンジャーとして機能し、ホスホリパーゼ A₂ 等のアラキドン酸経路を活性化することが知られている (Spiegel, S. et al. (1996) Curr. Opin. Cell Biol. 8, 159-167 および Mathias, S. et al. (1993) Science 259, 519-522 参照)。すなわち、セラミドを各種炎症性疾患の増悪因子として捕らえることができる。また、HIV に感染した患者における CD4⁺ T 細胞のアポトーシスを伴う減少や脳細胞への感染の際にもセラミドが増悪因子として機能しているという報告がある (Coline, M. G. et al. (1997) Proc. Assoc. Am. Physicians 109, 146-153 および Wilt, S. et al. (1995) Ann. Neurol. 37, 381-394 参照)。さらには、2 型糖尿病や肥満において TNF- α がインシュリン抵抗性を引き起こすことが知られているが、セラミドはその下流においても増悪因子として機能していると考えられている (Begum, N. et al. (1996) Eur. J. Biochem. 238, 214-220 および Hotamisligil, G. S. et al. (1996) Science 271, 665-668 参照)。また、リポポリサッカライド (LPS) 等が引き金になり起こる敗血症においてもセラミドがセカンドメッセンジャーとして機能していると報告されている (Beutler, B. and Krays, V. (1995) J. Cardiovasc. Pharmacol. 25, S1-S8 参照)。さらには、動脈硬化層形成の引き金となる LDL の凝集反応においてもスフィンゴミエリナーゼの活性化に伴うセラミドの上昇が増悪因子として機能するという報告がある (Schissel, S. L. et al. (1996

30

40

50

) J. Clin. Invest. 98, 1455 - 1464 参照)。

【0004】

またこれらとは逆に、癌治療における放射線療法や化学療法において、癌細胞のアポトーシスをセラミドが促進することが知られている (Michael, J. M. et al. (1997) Cancer Res. 57, 3600 - 3605 および Bose, R. et al. (1995) Cell 82, 405 - 414 および Jaffrezou, J. P. et al. (1996) EMBO J. 15, 2417 - 2424 参照)。

【0005】

一方、セラミドの代謝産物であるセラミド - 1 - リン酸およびその生成酵素であるセラミドキナーゼに関してもいくつかの生理活性が知られている。例えば、脳のシナプスにおいて、カルシウム刺激に応答してセラミドキナーゼが活性化され、生成したセラミド - 1 - リン酸がシナプスからの神経伝達物質の放出を調節している (Bajjalieh, S. M. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14354 - 14360 および Shinghal, R. et al. (1993) J. Neurochem. 61, 2279 - 2285 参照)。したがって、薬剤やプロモーター等によりセラミドキナーゼの活性を調節することは、アルツハイマー病を含めた各種神経性疾患の治療法となる可能性がある。また、セラミド - 1 - リン酸は上述した各種セラミドの機能をブロックする作用があると考えられている (Dressler, K. A. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 14917 - 14921 参照)。すなわち、慢性関節炎等の各種炎症性疾患、HIV、インシュリン抵抗性が引き金となる2型糖尿病や肥満、さらには敗血症、動脈硬化といったセラミドが増悪因子として作用する疾患をセラミド - 1 - リン酸により抑制できると考えられる。さらに、セラミドキナーゼは好中球の貪食作用・活性化に関与していることから (Hinkovska-Galcheva V et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 33203 - 33209 参照)、各種感染症の進展や虚血後の臓器障害に関与する可能性が考えられる。したがって、プロモーター活性調節等によりセラミドキナーゼを活性化することは、神経性疾患、炎症、感染症、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、脂質代謝異常および動脈硬化の治療法となる可能性がある。逆に、癌の放射線療法や化学療法においてはセラミドキナーゼ活性を抑制する事により、セラミド量を保ち、治療効果を向上させる可能性も考えられる。さらに、セラミドキナーゼは心臓や脾臓、血小板、末梢白血球で遺伝子の発現量が高いため、心疾患や血栓症、免疫疾患に関与する可能性も考えられる (Sugiyama, M., et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 23294 - 23330 参照)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、セラミドキナーゼ遺伝子の転写制御に関わるプロモーター領域を特定し、該プロモーターの活性を調節する物質のスクリーニング方法を提供することにある。より具体的には、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常、動脈硬化、癌およびその転移等の予防薬および治療薬の候補物質を探索するための新規な手段を提供することにある。治療または予防薬を試験するための新規な方法および該方法において用いられるDNAが提供される。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、

(1) 下記のa)乃至c)のいずれか一つに記載されたDNA:

a) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるDNA;

b) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有するDNA;

10

20

30

40

50

c) 上記 a) に記載の DNA と 95% 以上のヌクレオチド配列同一性を有し、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA。

(2) 形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) が保有する組換えプラスミドにおいて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列の 5' 末端に連結されている 2515bp の DNA。

(3) 下記の a) 乃至 c) のいずれか一つに記載された DNA：

a) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 1087 で示されるヌクレオチドを 5' 末端とし、ヌクレオチド番号 2515 で示されるヌクレオチドを 3' 末端とするヌクレオチド配列からなる DNA；

10

b) 上記 a) に記載の DNA のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA；

c) 上記 a) に記載の DNA と 95% 以上のヌクレオチド配列同一性を有し、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA。

(4) 形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) が保有する組換えプラスミドにおいて、ホタルルシフェラーゼをコードするヌクレオチド配列の 5' 末端に連結されている 2515bp の DNA 中の 3' 末端側の 1429bp からなる DNA。

(5) 配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列を含み、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA。

20

(6) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1087 から 2515 で示されるヌクレオチド配列を含み、哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する DNA。

(7) 下記の a) 乃至 d) に表される特徴を有する DNA：

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1087 から 2515 で示されるヌクレオチド配列を含み；

b) ヌクレオチド番号 2515 で示されるヌクレオチドを 3' 末端とし；

c) ヌクレオチド番号 1087 で示されるヌクレオチドの 5' 末端に少なくとも 1bp、最長で 1086bp のポリヌクレオチドが付加し；

d) 哺乳動物由来の細胞中においてプロモーター活性を有する。

30

(8) (1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の DNA を含む組換えプラスミド。

(9) (1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の DNA の 3' 末端に、タンパク質をコードする DNA が連結されていることを特徴とする、(8) 記載の組換えプラスミド。

(10) タンパク質が、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、からなる群から選択されることを特徴とする、(9) 記載の組換えプラスミド。

(11) タンパク質がルシフェラーゼであることを特徴とする、(9) または (10) 記載の組換えプラスミド。

(12) 形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) が保有する組換えプラスミド、pGV-hcerkp2

40

(13) (8) 乃至 (12) のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞。

(14) 宿主細胞が原核細胞である、(13) 記載の宿主細胞。

(15) 宿主細胞が真核細胞である、(13) 記載の宿主細胞。

(16) 宿主細胞が哺乳動物由来の細胞である、(13) または (15) 記載の宿主細胞。

(17) 形質転換大腸菌株 *E. coli* pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087)。

(18) 下記の工程 i) から iii) からなる、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター

50

活性調節作用を有する物質のスクリーニング方法：

i) (8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞を被験物質の存在下、または非存在下で培養する工程；

ii) 上記i)の宿主細胞における、(8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、(1)乃至(7)のいずれか一つに記載のDNAの3'末端に連結されているDNAにコードされているタンパク質の発現量を検出する工程；

iii) 上記ii)の検出結果を、被験物質の存在下で培養した細胞と被験物質非存在下で培養した細胞との間で比較する工程。

(19) 下記の工程i)からiii)からなる、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常および動脈硬化から選択される一つまたは二つ以上の疾患の治療または予防効果を有する物質のスクリーニング方法： 10

i) (8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞を被験物質の存在下、または非存在下で培養する工程；

ii) 上記i)の宿主細胞における、(8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、(1)乃至(7)のいずれか一つに記載のDNAの3'末端に連結されているDNAにコードされているタンパク質の発現量を検出する工程；

iii) 上記ii)の検出結果を、被験物質の存在下で培養した細胞と被験物質非存在下で培養した細胞との間で比較し、発現量が増加している場合、該被験物質が該治療または予防効果を有すると判断する工程。 20

(20) 下記の工程i)からiii)からなる、癌およびその転移の治療または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：

i) (8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞を被験物質の存在下、または非存在下で培養する工程；

ii) 上記i)の宿主細胞における、(8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、(1)乃至(7)のいずれか一つに記載のDNAの3'末端に連結されているDNAにコードされているタンパク質の発現量を検出する工程；

iii) 上記ii)の検出結果を被験物質の存在下で培養した細胞と被験物質非存在下で培養した細胞との間で比較し、発現量が減少している場合、該被験物質が該治療または予防効果を有すると判断する工程。 30

(21) 下記の工程i)乃至iii)からなる、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常および動脈硬化から選択される一つまたは二つ以上の疾患の治療または予防効果を有するタンパク質をコードするcDNAを同定する方法：

i) (8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主細胞（以下「細胞A」という）と、細胞Aを被験cDNAが哺乳動物用発現ベクターに組み込まれた組換えプラスミドで形質転換することにより該被験cDNAを一過性または安定的に発現する細胞（以下「細胞B」という）と、細胞Aを該被験cDNAを含まない別の組換えプラスミドで形質転換した細胞（以下「細胞C」という）からなる群から選択される細胞を個別に培養する工程；

ii) 上記i)の細胞Bおよび細胞CまたはAにおける、(8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、(1)乃至(7)のいずれか一つに記載のDNAの3'末端に連結されているDNAにコードされているタンパク質の発現量を測定する工程；

iii) 上記ii)の測定結果を比較し、該タンパク質の発現量が細胞Bにおいて細胞CまたはAよりも増加している場合、該cDNAがコードするタンパク質が該治療または予防効果を有すると判断する工程。

(22) 下記の工程i)乃至iii)からなる、癌およびその転移の治療または予防効果を有するタンパク質をコードするcDNAを同定する方法：

i) (8)乃至(12)のいずれか一つに記載の組換えプラスミドで形質転換された宿主 50

細胞（以下「細胞 A」という）と、細胞 A を被験 c D N A が哺乳動物用発現ベクターに組み込まれた組換えプラスミドで形質転換することにより該被験 c D N A を一過性または安定的に発現する細胞（以下「細胞 B」という）と、細胞 A を該被験 c D N A を含まない別の組換えプラスミドで形質転換した細胞（以下「細胞 C」という）からなる群から選択される細胞を個別に培養する工程；

i i) 上記 i) の細胞 B および細胞 C または A における、(8) 乃至 (1 2) のいずれか一つに記載の組換えプラスミド中の、(1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の D N A の 3 ' 末端に連結されている D N A にコードされているタンパク質の発現量を測定する工程；

i i i) 上記 i i) の測定結果を比較し、該タンパク質の発現量が細胞 B において細胞 C または A よりも減少している場合、該 c D N A がコードするタンパク質が該治療または予防効果を有すると判断する工程。 10

(2 3) セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性を調節する物質を分離する方法であって、(1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の D N A に該物質を含む試料を接触させ、次いで、該 D N A に結合した該物質を分離することを特徴とする方法。

(2 4) (1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の D N A にヒト細胞の核抽出液を含む試料を接触させ、次いで、該 D N A に結合したタンパク質を分離することを特徴とする、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性調節因子の検出方法。

(2 5) 下記の工程 i) および i i) を含む、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性を調節する活性を有する物質を選抜する方法； 20

i) (1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の D N A を標識したものに、ヒト細胞の核抽出液および被験物質を加えたもの、ならびにヒト細胞の核抽出液のみを加えたものをそれぞれ調製する；

i i) 上記 i) の各混合物試料を電気泳動し、標識された D N A を含むバンドを検出し、ヒト細胞の核抽出液のみを加えた試料で見出されるバンドと被験物質を加えた試料で見出されるバンドの間で移動度を比較し、移動度が増大するものを選択する。

(2 6) 該標識が放射標識である (2 5) 記載の方法。

(2 7) 下記 a) 乃至 b) のいずれかで表される特徴を有し、セラミドキナーゼ遺伝子プロモーター活性を調節する活性を持つヌクレオチドまたはその誘導体；

a) 配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列中の、連続した少なくとも 1 0 ヌクレオチドからなる； 30

b) 配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列中の、連続した少なくとも 1 0 ヌクレオチドからなる；

に関する。

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、ヒトゲノムにおけるセラミドキナーゼ遺伝子の転写開始点と予測される部位（配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 3 9 7）を「 1」として、その 5' 末端側上流 2 3 9 6 ヌクレオチドの部位から、3' 末端側下流 1 1 9 ヌクレオチド（以下、「 - 2 3 9 6 ~ + 1 1 9」のように表記する。配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 ~ 2 5 1 5）のヌクレオチド配列からなる D N A、および「 - 1 3 1 0 ~ + 1 1 9」のヌクレオチド配列からなる D N A にルシフェラーゼをコードする D N A を連結したレポーター遺伝子をヒト H E K 2 9 3 細胞に導入し、ルシフェラーゼの産生量を測定することにより、セラミドキナーゼ遺伝子の「 - 2 3 9 6 ~ + 1 1 9」領域がプロモーター活性を有することを見出した。また本発明者らは、ルシフェラーゼ遺伝子に連結するセラミドキナーゼ遺伝子の 5' 末端側領域を「 - 1 3 1 0 ~ + 1 1 9」（配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 0 8 7 ~ 2 5 1 5）に短縮しても、同等のプロモーター活性があることも見いだした。また、プロモーター配列解析ソフトを用いて、プロモーター活性の発現により重要な領域を絞り込む予測をした結果、 - 1 1 1 0 ~ - 8 6 1（配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 2 8 6 ~ 1 5 3 5）の領域が予測された。この領域には M L T F（M a j o r l a t e t r a n s c r i p t i o n f a c t o r）の結合配列として予測される配列など 40 50

が含まれていた。本発明者らは、さらに、上記プロモーター活性を有するDNAを用いることにより、該プロモーター活性を調節する化合物をスクリーニングできることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

本発明のDNAは、哺乳動物由来の細胞においてプロモーター活性を有する限り、セラミドキナーゼ遺伝子の5'末端側上流域のいかなるヌクレオチド配列を含んでいてもよい。好適には、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるDNAを挙げることができるが、本発明はこれに限定されず、配列表の配列番号1に記載のヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む。また、より好適には、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1087～2515に示されるヌクレオチド配列からなるDNAを挙げることができ、哺乳動物由来の細胞においてプロモーター活性を有する限り、このDNAの5'末端側に任意のヌクレオチド配列が付加していても良い。好適には1乃至1086塩基長の任意のヌクレオチド配列からなるDNAが付加したものが挙げられるが、本発明はこれに限定されるものではない。

10

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明のDNAは、ヒトゲノムより作成した遺伝子ライブラリーから、例えば、ヒトセラミドキナーゼcDNAのヌクレオチド配列(Sugiyama, M. et al. J. Biol. Chem. (2002) 277, 23294-23330)の5'末端側をプローブとして利用したスクリーニングにより単離することができる。または、この配列の情報もしくはヒトゲノムプロジェクトにより公開された配列情報に基づいて、ヒトゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という)により、ライブラリーのスクリーニングの工程を経ずに直接本発明のDNAを増幅することもできる。

20

【0011】

なお、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1から2515に示されるヌクレオチド配列からなるDNAが挿入されている組換えプラスミドpGV-hcerkp2で形質転換した大腸菌、E. coli pGV-hcerkp2 SANK 70802は、2002年(平成14年)6月21日付で独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センターに国際寄託され、受託番号FERMBP-8087が付されている。したがって、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1から2515に示されるヌクレオチド配列からなるDNAは、当該大腸菌から取得することもできる。また、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1087から2515に示されるヌクレオチド配列からなるDNAは、SANK 70802が保有する組換えプラスミドpGV-hcerkp2から、PCR法を利用して取得することができる。

30

【0012】

なお、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、天然型のプロモーターDNAのヌクレオチド配列の一部を他のヌクレオチドへの置換やヌクレオチドの欠失、付加などの改変により、天然型のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有するDNAを調製することが可能である。このように天然型のヌクレオチド配列においてヌクレオチドが置換、欠失、もしくは付加したヌクレオチド配列を有し、天然型のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有するDNAもまた本発明のDNAに含まれる。ヌクレオチド配列の改変は、例えば、制限酵素あるいはDNAエキソヌクレアーゼによる欠失導入、部位特異的変異誘発法による変異導入、変異プライマーを用いたPCR法によるプロモーター配列の改変、合成変異DNAの直接導入などの方法により行うことができる。これらのうち好適なものは、配列表の配列番号1で示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1087からヌクレオチド番号2515で示されるヌクレオチド配列を含むDNAである。

40

【0013】

また、本発明のDNAとしては、配列表の配列番号1で示されるヌクレオチド配列または

50

配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1087からヌクレオチド番号2515で示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNAを含むものが挙げられる。このようにハイブリダイズし得るDNAは、プロモーター活性を有するものであればよい。このようなDNAは、配列表の配列番号1で示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1087からヌクレオチド番号2515で示されるヌクレオチド配列と、通常、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは95%以上のヌクレオチド配列の同一性を有する。このようなDNAとしては、自然界で発見される変異型DNA、人為的に改変した変異型DNA、異種生物由来の相同DNA等が含まれる。

【0014】

本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションを、 $5 \times \text{SSC}$ (0.75 M 塩化ナトリウム、 0.075 M クエン酸ナトリウム) またはこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、 37 乃至 42 の温度条件下、約12時間行い、 $5 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、 $1 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。また、さらに $0.1 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行っても良い。

【0015】

このようにして得られた本発明のDNAがプロモーター活性を有するか否かは、下記に説明するように、本発明のDNAの3'末端側下流にルシフェラーゼ等のマーカー遺伝子を連結したもの(以下「レポーター遺伝子」という)で哺乳動物細胞を形質転換し、この形質転換細胞におけるマーカー遺伝子の発現が亢進されるか否かを調べることによって確認することができる。

【0016】

以下、本発明のDNAを含んだレポーター遺伝子により哺乳動物細胞を形質転換する方法について記載する。

【0017】

この方法において、本発明のDNAの3'末端側に連結されるマーカー遺伝子にコードされるマーカータンパク質は、宿主である哺乳動物細胞が本発明の方法の一連の過程において産生し得る他のいかなるタンパク質とも区別可能なもの(好ましくは、形質転換前の哺乳動物細胞が該マーカータンパク質と同一または類似のタンパク質をコードする遺伝子を持たないようなもの)であればよい。例えば、マーカータンパク質が該細胞に対して毒性を有するようなものや、該細胞が感受性を有する抗生物質の耐性を付与するものであるような場合でも、マーカー遺伝子の発現の有無は細胞の生存率で判定することが可能である。しかしながら、本発明で用いられるマーカー遺伝子としてより好ましいものは、発現量を特異的かつ定量的に検出することができる(例えば該マーカー遺伝子にコードされるタンパク質に対する特異的抗体が取得されているような)構造遺伝子である。さらに好ましくは、外来の基質と特異的に反応することにより定量的測定が容易な代謝産物を生じるような酵素等をコードする遺伝子である。そのようなものとして、以下に挙げるようなタンパク質をコードする遺伝子を例示することができるが、本発明はそれらに限定されない：

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ：クロラムフェニコールにアセチル基を付加する。いわゆるCATアッセイ等で検出可能。プロモーターを組み込むだけでレポーターアッセイ用のベクターを調製できるベクターとしてpCAT3-Basicベクター(プロメガ社製)が市販されている；

ホタルルシフェラーゼ：ルシフェリンを代謝した際に生じる生物発光を測定することにより定量する。同じくレポーターアッセイ用のベクターとしてpGB-B2ベクター(東洋インキ製造株式会社製)が市販されている；

β -ガラクトシダーゼ：呈色反応、蛍光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしてp β gal-Basic(プロメガ社製)が市販されている；

10

20

30

40

50

分泌型アルカリホスファターゼ： 呈色反応、生物発光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとして p S E A P 2 - B a s i c (クロンテック社製) が市販されている ;

緑色蛍光タンパク質 (g r e e n - f l u o r e s c e n t p r o t e i n) : 酵素ではないが、自らが蛍光を発するので直接定量できる。同じくレポーターアッセイ用のベクターとして p E G F P - 1 (クロンテック社製) が市販されている。

【 0 0 1 8 】

培養細胞株に発現プラスミドを導入する方法としては、D E A E - デキストラン法 (L u t h m a n , H . a n d M a g n u s s o n , G . (1 9 8 3) N u c l e i c A c i d s R e s . 1 1 , 1 2 9 5 - 1 3 0 8)、リン酸カルシウム - D N A 共沈殿法 (G r a h a m , F . L . a n d v a n d e r E b , A . J . (1 9 7 3) V i r o l o g y 5 2 , 4 5 6 - 4 5 7)、電気パルス穿孔法 (N e u m a n n , E . e t a l . (1 9 8 2) E M B O J . 1 , 8 4 1 - 8 4 5)、リポフェクション法 (L o p a t a e t a l . (1 9 8 4) N u c l . A c i d s R e s . 1 2 , 5 7 0 7 - 5 7 1 7 , S u s s m a n a n d M i l m a n (1 9 8 4) M o l . C e l l . B i o l . 4 , 1 6 4 1 - 1 6 4 3) 等を挙げることができるが、これらに限定されず、本発明の属する技術分野において汎用される他の方法も採用することができる。ただし、培養細胞株がいわゆる浮遊細胞である場合は、リン酸カルシウム - D N A 共沈殿法以外の方法を用いることが好ましい。いずれの方法においても、用いる細胞に応じて、至適化されたトランスフェクション条件を用いる。

【 0 0 1 9 】

このようにして本発明の D N A を含むレポーター遺伝子をトランスフェクションした細胞を培養すると、マーカー遺伝子の転写が促進される。培養の条件としては、細胞が生存して、タンパク質の生産が可能な条件であればよいが、好ましくは、使用される細胞株に適合した培地 (ウシ胎児血清等の血清成分を添加してもよい) を使用し、4 乃至 6 % (最も好適には 5 %) の炭酸ガスを含む空気存在下、3 6 乃至 3 8 (最も好適には 3 7) で 2 乃至 3 日間 (最も好適には 2 日間) 培養する。

【 0 0 2 0 】

以下、本発明の D N A の使用方法について述べる。

1) 誘導型発現ベクターとしての利用

本発明の D N A が、ある特異的な刺激によりプロモーター活性を表すことが判明した場合、所望の遺伝子上流に本発明の D N A を挿入したベクターなどを作製して体細胞に導入し、該刺激を与えることにより、該所望の遺伝子を誘導的に発現させることができる。

2) D N A による拮抗阻害を利用した D N A のプロモーター活性調節

本発明の D N A のプロモーター活性の調節には、該プロモーター D N A のヌクレオチド配列と同一の配列、または該プロモーター D N A のヌクレオチド配列と相補的な配列、の少なくとも一部を含む D N A (その誘導体を含む。以下「部分配列」という) を用いることができる。このような部分配列を用いることにより、該部分配列自体がプロモーター活性を有するか否かを問わず、上記プロモーター D N A とこれに結合しうるタンパク質 (例えば、転写因子) との結合を拮抗阻害する方法を実施することが可能である。例えば、該部分配列が、本発明の D N A 配列上においてそのプロモーター活性を阻害するタンパク質の結合部位に相当する場合には、この方法によりプロモーター活性を促進することができ、逆にプロモーター活性を促進するタンパク質 (転写因子を含む) の結合部位に相当する場合には、プロモーター活性を阻害することができる。このような拮抗阻害に用いる部分配列 D N A は、通常少なくとも 6 ヌクレオチド以上、好ましくは 1 0 ヌクレオチド以上の鎖長を有する。また、拮抗阻害に用いるために選択される部分配列の種類としては、例えば、プロモーター上の転写因子の結合コンセンサス部位を含む配列が挙げられる。また、そうした部分配列 D N A の誘導体としては、いくつかの部分配列を連結したものや、それをアデノウイルスベクター等に組み込んで動物細胞への遺伝子導入を可能にしたもの、また

、DNAの3'末端もしくは5'末端にビオチンを連結したもの等が用いられ得る。

3) プロモーター活性を調節するタンパク質のスクリーニング

本発明のDNAのプロモーター活性の調節には、上記のような部分配列等を用いた拮抗阻害の他に、本発明のDNAのプロモーター活性を調節するタンパク質を利用する方法を用いることもできる。本発明のDNAは、そのプロモーター活性を調節するタンパク質のスクリーニングに利用することが可能である。したがって、本発明は、下記に示すような、該DNAのプロモーター活性を調節するタンパク質のスクリーニング方法に関する。そのようなタンパク質としては、直接本発明のDNAに結合してそのプロモーター活性を促進あるいは阻害するタンパク質の他に、細胞膜受容体や細胞内タンパク質に作用して間接的に本発明のDNAのプロモーター活性を促進あるいは阻害するタンパク質が含まれる。

10

【0021】

3-1) プロモーターDNAに結合するタンパク質のスクリーニング

この方法は、本発明のDNAに被験タンパク質試料を接触させ、本発明のDNAに結合するタンパク質を選択する工程を含む。このような方法としては、例えば、本発明のプロモーターDNAを用いた、これに結合するタンパク質のアフィニティー精製が挙げられる。具体的な方法の一例を示せば、本発明のプロモーターDNAをビオチン化し、ストレプトアビジンを結合した磁気ビーズに結合させてDNAアフィニティービーズを作製する。次いで、これを細胞の核抽出液とインキュベートして本発明のDNAと特異的に結合する核抽出液中のタンパク質を精製し、この構造を決定する。これにより、直接本発明のDNAと結合するタンパク質、およびDNA結合活性は持たないがサブユニットとして該タンパク質と複合体を形成し本発明のDNAに結合するタンパク質が精製できる (Gabriel sen, O. S. et al., (1989) Nucleic acid Research 17, 6253-6267, Savoy sky, E. et al., (1994) Oncogene 9, 1839-1846)。

20

【0022】

3-2) プロモーター活性を指標にしたタンパク質のスクリーニング

この方法は、レポーター遺伝子を保持する細胞に被験DNAを導入し、マーカー遺伝子の発現を調節する発現産物を選択する工程を含む。このような方法には、例えば、酵母や動物細胞を用いたone-hybrid法が含まれる。具体的には、本発明のDNAとマーカー遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を細胞に安定に導入し、次いでこれに遺伝子ライブラリーを導入して、レポーター遺伝子の発現促進あるいは発現阻害を示すようなクローンを選択し、本発明のDNAに結合するタンパク質を選択する。この方法により、直接本発明のDNAと結合するタンパク質の他に、細胞内の内在性タンパク質に作用して間接的に本発明のDNAのプロモーター活性を調節するタンパク質を得ることができる。なお、酵母のone-hybrid法 (Li, J. J. and Herskowitz, I., (1993) Science 262, 1870-1873, Wang, M. M. and Reed, R. R., (1993) Nature 364, 121-126) など、「Matchmaker system (クロンテック社)」等がキットとして発売されている。

30

【0023】

さらに他の一つの態様は、本発明のDNAを含むレポーター遺伝子を保持する細胞に被験試料を接触させ、マーカー遺伝子の発現を調節するタンパク質を選択する工程を含む。具体的な方法の一例としては、本発明のDNAとマーカー遺伝子が挿入されたレポーター遺伝子を安定に導入した細胞と、被験試料 (例えば、遺伝子ライブラリーを導入した細胞の培養上清) とをインキュベートして、マーカー遺伝子の発現促進あるいは発現阻害を示すようなタンパク質を選択する。この方法では、細胞膜受容体などを介して間接的に本発明のDNAのプロモーター活性に影響を与えるタンパク質が得られる。

40

4) プロモーター活性を調節するタンパク質をコードするcDNAのスクリーニング方法
本発明のDNAを用いて、そのプロモーター活性を調節するタンパク質をコードするDNAを直接単離することも可能である。本発明は、また、本発明のDNAのプロモーター活

50

性を調節するタンパク質をコードする cDNA のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法の一つの態様は、本発明の DNA に被験 DNA の発現産物を接触させ、本発明の DNA に結合するタンパク質をコードする cDNA を選択する工程を含む。このような方法には、例えば、サウスウエスタン法が含まれる。具体的には、遺伝子ライブラリーを導入した大腸菌で各タンパク質を発現させ、これらをフィルター膜に転写した後、本発明の DNA をプローブとして直接プロットし、該 DNA プローブと結合するタンパク質を発現するクローンを選択して、これをコードする遺伝子を単離する。この方法により本発明の DNA に結合する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を得ることができる（実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ「転写因子研究法」（株）羊土社刊、177 - 188 頁参照）。

10

【0024】

他の一つの態様は、本発明の DNA を含むレポーター遺伝子を保持する細胞に被験 cDNA を導入し、マーカー遺伝子の発現を調節する発現産物をコードする cDNA を選択する工程を含む。このような方法には、例えば、上記した酵母や動物細胞を用いた one - hybrid 法が含まれる。

【0025】

すなわち、本発明の DNA とマーカー遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を哺乳動物由来の培養細胞に安定に導入した細胞（以下「細胞 A」という）に、さらに該細胞に哺乳動物細胞用発現ベクターに被験 cDNA が挿入された組換えプラスミドを導入した細胞（以下「細胞 B」という）を培養する。比較対照としては、細胞 A をそのまま培養するか、あるいは、細胞 A に被験 cDNA を含まない哺乳動物細胞用発現ベクターや、被験 cDNA を含んでいてもそれが発現しない組換えプラスミドを導入した細胞（以下「細胞 C」という）を培養する。細胞 B と、細胞 A または細胞 C との間で、マーカー遺伝子の発現量を比較し、マーカー遺伝子の発現を促進するかまたは阻害するような cDNA クローンを選択する。この方法では、本発明の DNA と直接結合するタンパク質をコードする cDNA だけでなく、細胞内の内在性タンパク質に作用して間接的に本発明の DNA のプロモーター活性を調節するタンパク質をコードする cDNA も得ることができる。

20

【0026】

さらに他の一つの態様は、本発明の DNA を含むレポーター遺伝子を保持する細胞に被験 cDNA の発現産物を接触させ、マーカー遺伝子の発現を調節する発現産物をコードする cDNA を選択する工程を含む。具体的な方法の一例を示せば、本発明の DNA とマーカー遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を安定に導入した細胞と、被験 cDNA の発現産物（例えば、cDNA ライブラリーを導入した細胞の培養上清）とをインキュベートして、マーカー遺伝子の発現促進あるいは発現阻害を示すようなタンパク質あるいはそれをコードする cDNA を単離する。この方法により細胞膜受容体などを介して間接的に本発明の DNA のプロモーター活性に作用するタンパク質をコードする cDNA を得ることができる。

30

5) プロモーター活性を調節する化合物のスクリーニング

本発明の DNA を用いて、そのプロモーター活性を調節する化合物のスクリーニングを行うことも可能である。すなわち本発明は、下記に示すような、該 DNA のプロモーター活性を調節する化合物のスクリーニング方法に関する。

40

【0027】

5-1) プロモーターとタンパク質との結合を指標としたスクリーニング

この方法は、被験化合物の存在下で本発明の DNA と被験試料とを接触させ、本発明の DNA と被験試料中のタンパク質との結合を促進または阻害する化合物を選択する工程を含む。具体的には例えば、細胞の核抽出液を、本発明の DNA を検出可能な標識を付したプローブと結合させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、核抽出液中のタンパク質と本発明の DNA との複合体のバンドをゲルシフト法により検出する（実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ「転写因子研究法」（株）羊土社刊、107 - 112 頁参照）という方法が挙げられる。検出可能な標識としては、放射性同位元素標識、蛍光色素標識、ビ

50

オチン標識等を挙げることができるが、好適には放射性同位元素標識である。DNAプロ-
ローブ添加の際、被験化合物も添加し、核抽出液中のタンパク質と本発明のDNAとの複-
合体のバンドの形成を促進あるいは阻害する化合物を選択する。この方法では、直接本発明
のDNAに作用する化合物および本発明のDNAに結合するタンパク質に作用する化合物
が得られる。例えば、本発明のDNAに結合するタンパク質が生体内で本発明のDNAの
プロモーター活性を阻害するような場合、このタンパク質と本発明のDNAとの結合を阻
害するような化合物は、本発明のDNAのプロモーター活性を促進できると考えられる。
なお、本発明のDNAに結合するタンパク質が既に単離されていれば、細胞の核抽出液に
代えて、該タンパク質の組み換えタンパク質を利用することも可能である。

【0028】

10

5-2) プロモーター活性を指標としたスクリーニング

この方法は、本発明のDNAを含むレポーター遺伝子を保持する細胞に被験化合物を接触
させ、マーカー遺伝子の発現を調節する化合物を選択する工程を含む。このような方法に
は、例えば、上記した酵母や動物細胞を用いたone-hybrid法が含まれる。

【0029】

すなわち、本発明のDNAとマーカー遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を哺乳動物由来
の培養細胞に導入した細胞をマーカー遺伝子が発現可能な条件で培養する。培養するにあ
たって、培地中に任意の被験物質を添加した条件および添加しない条件を設定し、培養後
マーカー遺伝子の発現量を測定し、被験物質の添加によりマーカー遺伝子の発現量に変化
が生じるか否かを検定する。この方法では、直接、間接的に本発明のDNAのプロモーター
活性を調節する化合物が得られる。

20

【0030】

このような系において、本発明のDNAを含むレポーター遺伝子を導入した際のマーカー
遺伝子の発現誘導を促進するような被験物質は、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免
疫疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常および動脈硬化の治
療または予防薬として有用な物質として選択され、また、該マーカー遺伝子の発現を抑制
するような被験物質は、癌およびその転移の治療または予防薬として有用な物質として選
択される。

【0031】

なお、本発明のDNAのプロモーター活性を調節するタンパク質が同定された場合には、
被験化合物の存在下で該タンパク質（またはその誘導体）と本発明のDNAとを接触させ
、該タンパク質（またはその誘導体）と本発明のDNAとの結合を促進または阻害する化
合物を選択して、本発明のDNAのプロモーター活性を調節する化合物をスクリーニング
することが可能である。具体的には、例えば、本発明のDNAに結合するタンパク質（D
NA結合ドメインのみでもよい）とグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパ
ク質を精製して、抗グルタチオンS-トランスフェラーゼ抗体で覆ったマイクロプレート
に結合させた後、ピチオン化した本発明のDNAをこのタンパク質と接触させ、該タンパ
ク質と本発明DNAとの結合をストレプトアビジン化アルカリホスファターゼで検出する
。本発明のDNA添加の際、被験化合物も添加し、該タンパク質と本発明のDNAとの結
合を促進あるいは阻害する化合物を選択する。この方法では、直接本発明のDNAに作用
する化合物および本発明のDNAに結合するタンパク質に作用する化合物が得られる。例
えば、本発明のDNAに結合するタンパク質が生体内で本発明のDNAのプロモーター活
性を阻害する場合、このタンパク質と本発明のDNAとの結合を阻害するような化合物は
本発明のDNAのプロモーター活性を促進できると考えられる。

30

40

【0032】

【実施例】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるも
のではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限
り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Samb
rook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T.

50

著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊)に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には、特に明示がない限りは該市販品の指示書に従って使用した。

実施例1. ヒトセラミドキナーゼ遺伝子プロモーター領域の解析

1) ヒトセラミドキナーゼ5'側上流域の検索

既知のヒトセラミドキナーゼ配列を基に、NCBIのヒトゲノムDNAのデータベースよりヒトセラミドキナーゼの5'側末端上流域を含む配列(GenBankTM accession number NT011523)を見出した。解析の結果、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むDNAが目的のプロモーターDNAとして選択された。ヒトセラミドキナーゼをコードする遺伝子の転写開始点(エクソン1の5'末端境界部位)はGenBankデータベースに登録されているヒトセラミドキナーゼの配列であるAB079066を参照して決定した。すなわち、AB079066のヌクレオチド配列のうち、ベクター部分を除いた最初のヌクレオチドを転写開始点と判断し、その位置を「1」と定義した。このようにして、ヒトセラミドキナーゼ遺伝子の転写開始点より上流の5'末端側2396bpから転写開始点の下流の3'末端側119bpまでの領域に相当するヌクレオチド配列からなるDNAを同定した。

10

【0033】

2) コンピュータープログラムによるプロモーター領域の予測

1)で同定したDNA配列をもとに、プロモーター配列予測プログラム(PROMOTER SCAN Prestidge, D. S. (1995) JMB 249, 923-32)を用いて解析した。その結果、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1286から1535の領域がプロモーター領域として予測された。この領域の中には、MLTF(major late transcription factor)の結合領域として予測される配列などが含まれている。

20

実施例2. ルシフェラーゼ発現プラスミドベクターの構築

1) プラスミドpGV-hcERP1およびpGV-hcERP2の構築実施例1の結果を基に、ヒトセラミドキナーゼをコードする遺伝子の5'末端側上流域のcDNAを有するレポータープラスミドを構築した。5'末端側上流域を特異的に増幅するために、下記のオリゴヌクレオチドプライマー:

5'-TCCAGTGCTGTGCCCAAGAGTCATGG-3' (CKp-1、配列表の配列番号2);

30

5'-ATCTCCGCCCGCCGGGCTCGTCCGC-3' (CKp-2、配列表の配列番号3); および

5'-ATCCACATTTCGCCAGGCCCTCAGAGC-3' (CKp-3、配列表の配列番号4);

を合成した。

【0034】

次いで、市販ヒトゲノムDNAを鋳型として、LA PCRキット・バージョン2.1(宝酒造(株)社製)を用いて、1回目のPCR反応を行なった。すなわち、ヒトゲノムDNA(クロンテック社製)5μlとプライマーセットCKp-1とCKp-2、およびCKp-2とCKp-3各0.4μM、ならびにdATP、dGTP、dCTP、dTTP各400μM、2.5mM塩化マグネシウムを含む1×LA PCR GC I緩衝液、0.05単位のLA Taq DNAポリメラーゼ(以上キットに添付)からなる50μlの反応液を調製した。この反応液を94で2分間加熱した後、94で30秒、68で30秒、72で4分の温度サイクルで30サイクル繰り返してから、72で10分保温した(タカラ PCR サーマルサイクラー MP(宝酒造(株)社製)を使用。以下において同じ)。PCR産物をゲルよりQIAquickゲルエクストラクションキット(キアゲン社製)を用いて回収し、T/Aクローニング法(Clark, J. M. et al. (1988) Nucleic Acid Res. 16, 9677-9686)によりpCR2.1ベクター(オリジナルTA クローニングキット

40

50

(インビトロゲン社製)に添付)に連結し、大腸菌 INVαF' 株(キットに添付)に導入した。陽性のクローンにつき、挿入された cDNA の全ヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド鎖終結法により解析し、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 から配列番号 2515 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA が挿入されたプラスミドを pCR2.1-hcerkp2、1087~2515 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA が挿入されたプラスミドを pCR2.1-hcerkp1 と命名した。pCR2.1-hcerkp2 を制限酵素 Xba I と Hind III で消化し、挿入 cDNA を含む約 2.5 kbp の断片を単離した。一方、ルシフェラーゼ発現ベクター pGV-B2 (東洋インキ製造株式会社製)を制限酵素 Nhe I と Hind III で消化し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。上記 2.5 kbp 断片および pGV-B2 ベクターを T4 DNA リガーゼ(宝酒造(株)社製)を用いた反応により連結し、大腸菌 JM109 株に導入した。得られた形質転換株よりプラスミド DNA pGV-hcerkp2 を抽出し、挿入されている cDNA の全ヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド鎖終結法により確認した。同様に、pCR2.1-hcerkp1 より Sac I と Nhe I で挿入 cDNA 約 1.5 kbp を単離し、Sac I と Nhe I で消化した pGV-B2 に連結し、プラスミド DNA pGV-hcerkp1 を得た。

10

【0035】

なお、このルシフェラーゼ発現ベクター pGV-hcerkp2 を保持する形質転換大腸菌株 E.coli pGV-hcerkp2 SANK 70802 は、2002 年(平成 14 年)6 月 21 日付けで産業技術総合研究所、特許生物寄託センターに国際寄託され、受託番号、FERM BP-8087 が付された。

20

【0036】

ルシフェラーゼ発現ベクター pGV-B2 (東洋インキ製造株式会社製)DNA でも同様にして大腸菌 JM109 のコンピテント細胞(宝酒造(株)社製)を形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを培養し、DNA を回収し精製した。このプラスミド DNA をネガティブコントロールとして使用した。

【0037】

2) プラスミド pGV-hcerkp1 の構築

pGV-hcerkp1 は、pGV-hcerkp2 を用いて作成することもできる。形質転換大腸菌株 E.coli pGV-hcerkp2 SANK 70802 (FERM BP-8087) から抽出した組換えプラスミド pGV-hcerkp2 を鋳型とし、CKp-2 と CKp-3 をプライマーとして、LA PCR キット・バージョン 2.1 (宝酒造(株)社製)を用いて PCR 反応を行なう。すなわち、pGV-hcerkp2 1 ng とプライマー CKp-2 と CKp-3 各 0.4 μM、ならびに dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 400 μM、2.5 mM 塩化マグネシウムを含む 1 × LA PCR GC I 緩衝液、0.05 単位の LA Taq DNA ポリメラーゼ(以上キットに添付)からなる 50 μl の反応液を調製する。この反応液を 94 で 2 分間加熱した後、94 で 30 秒、68 で 30 秒、72 で 4 分の温度サイクルで 30 サイクル繰り返してから、72 で 10 分保温する(タカラ PCR サーマルサイクラー MP (宝酒造(株)社製)を使用。以下において同じ)。PCR 産物をゲルより QIA クイックゲルエクストラクションキット(キアゲン社製)を用いて回収し、T/A クローニング法(Clark, J. M. et al. (1988) Nucleic Acid Res. 16, 9677-9686)により pCR2.1 ベクター(オリジナル T/A クローニングキット(インビトロゲン社製)に添付)に連結し、大腸菌 INVαF' 株(キットに添付)に導入する。陽性のクローンにつき、挿入された cDNA の全ヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド鎖終結法により解析し、1087~2515 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA が挿入されたプラスミドが pCR2.1-hcerkp1 である。pCR2.1-hcerkp1 より Sac I と Nhe I で挿入 cDNA 約 1.5 kbp を単離し、Sac I と Nhe I で消化した pGV-B2 に連結し、プラスミド DNA pGV-hcerkp1 を作製することが出来る。

30

40

50

実施例 3 . プロモーター活性

実施例 2 で単離した DNA のプロモーター活性について評価するため、レポーターアッセイを実施した。すなわち、実施例 2 で構築したプロモーター DNA を含んだホタルルシフェラーゼ発現プラスミド (p G V - h c e r k p 1 および p G V - h c e r k p 2) およびプロモーター DNA を含まないホタルルシフェラーゼ発現プラスミド p G V - B 2 のそれぞれを、ヒト胎児腎由来細胞株 H E K 2 9 3 にトランスフェクションして、各プラスミドをトランスフェクションした細胞の細胞抽出液中のホタルルシフェラーゼ活性を測定し、その結果を比較した。なお、細胞へのトランスフェクション効率についての各プラスミド間の実験ロット差を補正するための内部標準として、ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド p R L - T K (東洋インキ製造株式会社製) を用いた。まず、ヒト胚子腎臓細胞 H E K 2 9 3 に、リポフェクタミン プラス (ライフテクノロジー社製) を用いて、添付のプロトコールにしたがって、トランスフェクションした。すなわち、1 ウェルあたり 6×10^5 個の H E K 2 9 3 細胞に、 $0.93 \mu\text{g}$ の被験プラスミド (p G V - B 2 、 p G V - h c e r k p 1 または p G V - h c e r k p 2) と $0.07 \mu\text{g}$ の p R L - T K DNA を混合して、トランスフェクションした。37 で 2 日間培養した後、培地を除去して $1000 \mu\text{l}$ / ウェルの細胞溶解剤 (P L D - 30 (東洋インキ製造株式会社製)) に溶解して、細胞抽出液を調製した。次に、その細胞抽出液を 100 倍希釈し、その希釈溶液 $20 \mu\text{l}$ を用いて、デュアル - ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイ・システム (東洋インキ製造株式会社製) を添付のプロトコールに従って用いることにより、ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した (ルミナス C T - 9000 D 、 ダイアマトロン社製を使用) 。実験結果については、内部標準のウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正したホタルルシフェラーゼ活性として表した。

【 0038 】

その結果、p G V - h c e r k p 1 を導入した H E K 2 9 3 細胞では、p G V - B 2 を導入した細胞に比べて約 27 倍、p G V - h c e r k p 2 では 24 倍のルシフェラーゼ活性が観察されたことから、p G V - h c e r k p 1 および p G V - h c e r k p 2 に組み込まれた配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなる DNA にはプロモーターとしての活性が存在することが明らかとなった。以上の結果より、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 ~ 2515 に示される DNA、すなわちヒトセラミドキナーゼ遺伝子の 5' 末端側上流 - 2396 ~ + 119 に相当する領域にプロモーター活性が存在することが明らかとなった。また、5' 末端側上流を短縮した - 1310 ~ + 119 に相当する領域でも同等のプロモーター活性が存在することも示された。

ルシフェラーゼ相対活性*

p G V - B 2	1
p G V - h c e r k p 1	27.3
p G V - h c e r k p 2	23.6

ルシフェラーゼ相対活性* : ホタルルシフェラーゼ活性 / ウミシイタケルシフェラーゼ活性 (内部標準) を計算し、コントロールベクター (p G V - B 2) を 1 として算出した。本実施例の方法において、例えば p G V - h c e r k p 1 および p G V - h c e r k p 2 で形質転換した H E K 2 9 3 細胞を被験物質存在下で培養したときのルシフェラーゼ活性を測定することにより、本発明の DNA のプロモーター活性を阻害する物質の試験を行うことができる。このプロモーター活性を阻害する物質は、神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、H I V、2 型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常、動脈硬化、癌およびその転移の治療または予防薬となりうる。

【 0039 】

【発明の効果】

上記のごとく、本発明により、プロモーター活性を有する新規DNAが提供された。本発明のDNAは、セラミドキナーゼの発現量を促進または抑制する物質を試験するための方法に用いることができるので、新しい作用機作を有する神経性疾患、炎症、感染症、血栓症、免疫疾患、HIV、2型糖尿病、肥満、敗血症、心疾患、脂質代謝異常、動脈硬化、癌およびその転移の治療または予防薬の開発に有用である。

【0040】

【配列表フリーテキスト】

配列番号2： PCRプライマー CKp - 1

配列番号3： PCRプライマー CKp - 2

配列番号4： PCRプライマー CKp - 3

【0041】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> Ceramide Kinase Gene Promoter DNA

10

<130> 2002098JT

<140>

<141>

<160> 4

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2515

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

tccagtgctg tgcccagagt catggccctg gcccacaca gggcctgacc cccacccaac 60
ccctctccca tgcaactcaa ctgcaggatg tgcattctt ggaaacctgg gcttcgtgac 120
atcacccigt ctccctgagc atgagcatgg ggccctgcag tggccaggcc cctccccagc 180
ccatcctagg actacaggtc cctgggtct gctcaggctg ccataacaaa atatcacgga 240
ciggaiggct tcaacaacag caatctgtcg tctcccatga acagtiggca gaggctggaa 300
gtctgaggtc aagggtcaag cccacagggt tggcctcctg gaggtcactc tcttttgttg 360
ccccctccca tggccacccc tgtgtacaca cgctcgggg gtctgtgtgt gttcacgttt 420

40

cctcttcttt tttttttgag atggagtttc gctctcgtca cccaggctgg agtgcaatgg 480
 cgcaatctca gctcacctgg gtccaagcaa ttctectgcc tcagcttccg gagtagctgg 540
 gattcaggag cgcaccactg caccagcta atttttgtat ttttagtaga gacagggttt 600
 caccaatgtg accaggatgg tctccaatgc ctgacttcag gtgatccacc cgccttcagcc 660
 tcccaaagtg ctgggattac aggtgtgagc cacagagccc ggtcaacatt tctcttcttt 720
 gtaaggacgc gctggatgag ggcccacct aacagcctca ttgaatctcc tgtgtgtttt 780
 gtaactgatg ttgctgtctc ccccaacgga gctccttcgg ggccctaagca ctctgtagtc 840
 gtctctgggc cccacctct ggctgcagga ttttaagcca aggcgtgcag ccgggggaca 900
 gcaacgtgaa tacgccggga ggggcacggg gagcctaagc acagggaggc ccagggaagg 960
 ggtccccagt agggacgctg gtgctctcgg gcccctgccc atgccacct tgcctgcca 1020
 cctcttctgc atgcagcggc acctctctgc cactggcatg agcttttctt tccaagtaag 1080
 ttccagatcc acatttccca ggcttcagag cggcagctga gggaggagg aggctgggca 1140
 ggctctgctg ctgcacacc cactgtgtgc cagatcagg tactgctgc taggactctg 1200
 actgggcccc cgggtggctgc aggactgtcc tggggccttc actgcatggc ctgaacaggg 1260
 gctgggctcc caggaggaa tgattcatgg ctgggtccc ccctatagac aagacagtca 1320
 caaggagctg gcagggttaag acctgtatat gctgccacct ggtgccaggc acagcagcaa 1380
 ggccacgtgg acctagcca cctcacctct gcctgcagca gcagggtgg gtaggggagc 1440
 cgaggggagg ggcaggcctc agacctcagt gtcacatcca ggcagtgtca gtgtgagcct 1500
 aggctctgcc acactggagc cctgtgtctt tgggcaagt acttaacctc tgtgagcaca 1560
 gtcttcactg ataaatcagg gagggatgtg ccttcgaac caggttgtgg ctgcttctta 1620
 tggggctgtg ttaagcactg cggacgcaga gactggagct tgcattgaagg cgcacggcgt 1680
 gctctgaagg cagggttga gtccctgcag gctgggtgatt ccttcagctg tggggtcaag 1740
 gaggccttcc tggggaggcg gtgaattggg gccacaggg ccgtgtctct ccaagtctgg 1800
 ggcccaggct ccggttctta gggccagctc gggggcggct gctcagctgt ctgctctgtg 1860
 gcttcaggcc ccagagcagt tcaaagggcc agcgccccg cccctaaaa agacctccgc 1920
 ctctgaaaag ccttacctgc ctgtcggggc ccagctgcag gccccctccc aggccgacag 1980
 gacgccagga tcgtagaggg caccgcccgc ccaaggtcac gtcgcccgtg gcgccccat 2040
 ccaggccccgc cccccgccgc gccgatcgc caggactgcg ttccacgcc gcccgaccc 2100
 cgctgaacc gagggccgc cggaaggcg cactgagtc cgccggccg cgggagcgcc 2160

10

20

30

40

```

agattcagca cccggcacc cccggagaag agaggagaga aaggcagccg cctcccggcc 2220
ccagcgccct ggccctcgcc agcccccacc cggcccccct ctcctccctc ttctcccttt 2280
ctcgggtccc cccgtctct cctggctccc ggcccccctt ctaccacgc ctcctcctcg 2340
ccccgcccc gcccgcccc tcgcgggtcc ccgcccggcg cgtacggggt gacgcagcgc 2400
cgccctccgc cgcccgccgc ccgcccggcg ggccactgca ggggcccgtc acggctccggc 2460
gccccctggc gtccgcgcgc ccccagcctg gcggacgagc ccggcggcgg agatg      2515

```

10

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

CKp-1

20

<400> 2

tccagtgcctg tgcccagagt catgg

25

30

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

CKp-2

40

<400> 3

atctccgccg ccgggctcgt ccgc

24

<210> 4

<211> 25

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

CKp-3

20

<400> 4

atccacattt cccaggcctc agagc

25

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 古濱 孝文

東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB20 CB01 DA13 DA36 FB01 FB02 FB12
 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 DA06 FA02 FA10 GA11 HA03 HA11
 HA20
 4B063 QA18 QA20 QQ91 QR01 QR32 QS24 QS28 QS38 QX01 QX07
 4B065 AA26X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

专利名称(译)	神经酰胺酶基因启动子DNA		
公开(公告)号	JP2004081147A	公开(公告)日	2004-03-18
申请号	JP2002249220	申请日	2002-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	杉浦雅子 古濱孝文		
发明人	杉浦 雅子 古濱 孝文		
IPC分类号	G01N33/50 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA20 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ91 4B063/QR01 4B063/QR32 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS38 4B063/QX01 4B063/QX07 4B065/AA26X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	矢口俊明		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种筛选物质的方法，该物质指定了参与神经酰胺酶基因转录调控的启动子区域并调节启动子的活性。 解决方案：以下a)至c)中任何一项所述的DNA：a)由序列表中SEQ ID NO：1所示核苷酸序列组成的DNA；b)在严格条件下与与序列表的SEQ ID NO：1所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列组成的DNA杂交的DNA，并且在哺乳动物来源的细胞中具有启动子活性；c)与上述a)中所述的DNA具有95%或更多核苷酸序列同一性并且在哺乳动物来源的细胞中具有启动子活性的DNA。 [选择图]无。

		(P2)	
		(43) 公開日 平成16年3月18日	
(S1) Int. Cl. 7	FI	テーマコード	
C12N 15/09	C12N 15/00 ZNAA	2G045	
C12N 1/15	C12N 1/15	4B024	
C12N 1/19	C12N 1/19	4B063	
C12N 1/21	C12N 1/21	4B065	
C12N 5/10	C12Q 1/02		
		審査請求 未請求	請求項の数 27 O L (全 24 頁) 4
(21) 出願番号	特願2002-249220 (P2002-249220)	(71) 出願人	000001856
(22) 出願日	平成14年8月28日 (2002. 8. 28)		三共株式会社
		(74) 代理人	100081400
			弁理士 大野 彰夫
		(74) 代理人	100092716
			弁理士 中田 ▲やす▼雄
		(74) 代理人	100115750
			弁理士 矢口 敬昭
		(74) 代理人	100119622
			弁理士 金原 玲子
		(72) 発明者	杉浦 雅子
			東京都品川区広町1丁目2番5