

(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2007-289184

(P2007-289184A)

(43) 公開日 平成19年11月8日(2007.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
<b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-100896 (P2007-100896)	(71) 出願人	899000057
(22) 出願日	平成19年4月6日(2007.4.6)		学校法人日本大学
(62) 分割の表示	特願平10-525456の分割		東京都千代田区九段南四丁目8番24号
原出願日	平成9年12月5日(1997.12.5)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	特願平8-325763		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成8年12月5日(1996.12.5)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		(72) 発明者	石渡 哲義
			東京都町田市森野4-17-9
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 I g A腎症関連遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 I g A 腎症の疾患原因の解明、治療あるいは患者の負担を軽減した診断方法を提供する。

【解決手段】 I g A 腎症患者白血球より、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた I g A 腎症に関与する D N A およびその取得方法、前記 D N A の塩基配列に基づくオリゴヌクレオチドを用いた I g A 腎症関連遺伝子の m R N A 検出方法および I g A 腎症関連遺伝子の転写及び前記 m R N A 翻訳抑制方法、並びに前記オリゴヌクレオチド含む I g A 腎症診断薬および治療薬。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 から 3 0 に示される塩基配列を有する IgA腎症関連遺伝子の DNA。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の塩基配列を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の DNA の塩基配列の 5' 末端側の 15 ~ 40 塩基もしくは翻訳開始領域にある 10 ~ 50 塩基を含むオリゴヌクレオチド。

## 【請求項 4】

請求項 1 または 2 記載の DNA と相補的な塩基配列の 5' 末端側の 15 ~ 40 塩基もしくは翻訳開始領域にある 10 ~ 50 塩基を含むオリゴヌクレオチド。

## 【請求項 5】

請求項 3 および / または 4 記載のオリゴヌクレオチドを用いて IgA腎症関連遺伝子の mRNA を検出する方法。

## 【請求項 6】

請求項 3 および / または 4 記載のオリゴヌクレオチドを含む、IgA腎症診断薬。

## 【請求項 7】

請求項 3 および / または 4 記載のオリゴヌクレオチドを用いて、IgA腎症関連遺伝子の転写および該 mRNA の翻訳を抑制する方法。

## 【請求項 8】

請求項 3 および / または 4 記載のオリゴヌクレオチドを含む、IgA腎症治療薬。

## 【請求項 9】

IgA腎症患者白血球より、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた、請求項 1 記載の DNA を含む IgA腎症関連遺伝子の取得方法。

## 【請求項 10】

配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質。

## 【請求項 11】

請求項 10 記載の蛋白質をコードする DNA。

## 【請求項 12】

配列番号 1 に示される塩基配列を有する請求項 11 記載の DNA。

## 【請求項 13】

請求項 12 記載の塩基配列を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA。

## 【請求項 14】

請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の DNA とベクターとからなる組み換えベクター

## 【請求項 15】

請求項 14 記載の組み換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

## 【請求項 16】

請求項 15 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 10 記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

## 【請求項 17】

請求項 10 記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。

## 【請求項 18】

請求項 17 記載の抗体を用いて該蛋白質を免疫学的に検出する方法。

## 【請求項 19】

請求項 17 記載の抗体を含む、IgA腎症診断薬。

## 【請求項 20】

請求項 17 記載の抗体を含む、IgA腎症治療薬。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、健常人の白血球と比較して、IgA腎症患者の白血球において発現が変動するmRNAに着目し、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた新規遺伝子の取得およびその方法に関する。また、新規蛋白質および該蛋白質に対する抗体、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質および該DNAの検出方法、ならびにIgA腎症の診断および治療に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

IgA腎症とは、腎臓の糸球体内に血液由来と考えられるIgA免疫複合体が沈着することを特徴とする慢性糸球体腎炎である。日本では原発性腎疾患の30%以上を占め、単一の腎疾患としては最も多く、そのうちの15~30%は予後不良で腎不全へ移行する。しかしながら、IgA腎症の疾患の原因はまだ不明であるため、根本的な治療法はない。また、IgA腎症の確定診断は、腎臓の一部を生検し、メサングウムにおけるIgA免疫複合体の沈着を免疫学的染色により確認する方法であるため、患者への負担は大きい。

IgA腎症の患者は約50%の症例で血中IgAの値が高いことが報告されている（非特許文献1、2）。血液中のIgAの産生はB細胞が、その産生の制御はT細胞が担っているといわれており、また、IgA患者の末梢T細胞において、サイトカインであるインターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6あるいはTGF- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$ ）の産生が健常人に比べて高いという報告（非特許文献3、4）、末梢リンパ球において、インテグリンであるVLA（very late activation）-4およびVLA-5がより強く活性化しているという報告（非特許文献5）がなされている。これらのことから、IgA腎症は免疫系の異常によりIgAの産生が過剰となり、血液中のIgA免疫複合体が糸球体に沈着し、沈着したIgA免疫複合体に対する補体系の活性化等が糸球体に影響を及ぼし障害をおこしていると考えられているが、IgA腎症の原因についてはまだわかっていない。

## 【0003】

【非特許文献1】ディジーズ・オブ・ザ・キドニー（Diseases of the Kidney）第5版（1993）

【非特許文献2】ネフロン（Nephron），29，170（1981）

【非特許文献3】クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・イムノロジー（Clinical & Experimental Immunology），103，125（1996）

【非特許文献4】キドニー・インターナショナル（Kidney International），46，862（1994）

【非特許文献5】ネフロロジー、ダイアリシス、トランスプランテーション（Nephrology，Dialysis，Transplantation），10，1342（1995）

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

IgA腎症の疾患原因の解明、治療あるいは患者の負担を軽減した診断が望まれている。本発明は、IgA腎症に関与する新規DNAおよびその取得方法を提供すること、また、IgA腎症に関与する新規蛋白質および該蛋白質に対する抗体、該蛋白質をコードするDNA、ならびにそれらを用いた治療薬および診断薬を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本発明は、配列番号1から31に記載の塩基配列を有するIgA腎症関連遺伝子のDNA、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAに関する。本発明のDNAおよび該DNAと相補的な塩基配列の部分断片に基づくオリゴヌクレオチドを用いてIgA腎症関連遺伝子のmRNAを検出する方法、それらのオリゴヌクレオチドを含む、IgA腎症診断薬に関する。本発明のDNAおよび該DNAと相補的な塩基配列の部分断片に基づくオリゴヌクレオチド

ドを用いて、IgA腎症関連遺伝子の転写および該mRNAの翻訳を抑制する方法、それらのオリゴヌクレオチドを含む、IgA腎症治療薬に関する。また本発明は、IgA腎症患者白血球より、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いたIgA腎症関連遺伝子の取得方法に関する。

【0006】

また、本発明は、配列番号32に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、ならびに本発明の蛋白質をコードするDNA、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA、またはこれらの塩基配列を有するDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAに関する。また本発明は、該DNAとベクターとからなる組み換えベクター、該組み換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、および該形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から蛋白質を採取することを特徴とする製造方法に関する。また、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、該抗体を用いて該蛋白質を免疫学的に認識する方法、該抗体を含むIgA腎症診断薬ならびに該抗体を含むIgA腎症治療薬に関する。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明では、新規遺伝子を取得するために、IgA腎症患者および健常人の白血球におけるmRNAの発現量の差異に注目したディファレンシャル・ディスプレイ法 [ FEBS レターズ (FEBS Letters) 351, 231(1994) ] を用いている。ディファレンシャル・ディスプレイ法とは、発現様式を指標に新規遺伝子をクローニングする方法である。すなわち、細胞から抽出した全RNAあるいはmRNAに対し、各種プライマーを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 反応を行い、健常人の白血球に比べIgA腎症患者の白血球で、その発現量が顕著に増加あるいは減少する新規な遺伝子のcDNA増幅断片を取得する方法である。以下にその方法について述べる。

20

IgA腎症患者および健常人の白血球から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法 [ Methods in Enzymol., 154, 3(1987) ]、AGPC法 [ 実験医学 9, 1937, (1991) ] またはRNA回収用キットRNAeasy (QIAGEN社) などがあげられる。

【0008】

また全RNAからポリ(A)<sup>+</sup>RNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [ モレキュラー・クロ - ニング : ア・ラボラトリー・マニュアル (第2版) ] などがあげられる。また、IgA腎症患者の白血球および健常人の白血球からmRNAを調製するキットとしては、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット (Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン社製)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット (Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア社製) などがあげられる。

30

続いて、IgA腎症患者の白血球および健常人の白血球から抽出したRNAから、アンカープライマーを用いてcDNAを合成し、続いて、該cDNAに対して5'末端を蛍光標識したアンカープライマーと任意プライマーとを用いてPCR反応を行う。アンカープライマーとは、チミンを除く、アデニン、グアニンあるいはシトシンのオリゴヌクレオチドを、mRNAの3'末端ポリA配列に会合するオリゴdT配列の3'末端に付加したプライマーである。任意プライマーとは、多種類のcDNAの配列に対して増幅し、かつ一度の反応で多数のcDNA増幅断片を得ることができるオリゴヌクレオチドのことであり、オリゴヌクレオチドの長さとしては、10mer程度が好ましい。

40

【0009】

PCR反応後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、フルオロイメジャーで蛍光を検出する。そして、IgA腎症患者および健常人の白血球由来のcDNA増幅断片の泳動パターンを比較し、発現増幅が変動しているcDNA断片をゲルから回収し、該cDNA増幅断片をベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法 [ Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463(1977) ] 等によって分析することにより、該DNAの

50

塩基配列を決定することができる。

DNA断片を組み込むベクターとしては、pDIRECT [ヌクレック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research) 18, 6069(1990)]、pCR-Script Amp SK(+)[ストラタジーン社製、ストラテジーズ(Strategies), 5, 6264(1992)]、pT7Blue(ノバジーン社製)、pCR II [インビトロジェン社製、バイオテクノロジー(Biotechnology), 9, 657(1991)]、pCR-TRAP(ジーンハンター社製)およびpNoTA<sub>T7</sub>(5プライム 3プライム社製)などがあげられる。

塩基配列の分析は、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNAシーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)等を用いて行うことができる。

#### 【0010】

本発明のDNAとしては、配列番号1から31に示される塩基配列からなるDNAもしくは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA配列などがあげられる。

配列番号1から31に示される塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、該蛋白質の本来有する活性を失わない範囲内で、置換、欠失、挿入あるいは付加などの変異が一カ所以上導入されたDNAで、配列番号1から31に示される塩基配列を有するDNAまたはその断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法[モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版[サンプルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊]、以下、モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル第2版と記す]により得られるDNAを示す。

#### 【0011】

本発明のDNAの塩基配列に基づくオリゴヌクレオチドを用いてIgA腎症に關与するmRNAを検出する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning, A laboratory manual Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]、PCR法[PCRプロトコールズ(PCR Protocols),アカデミック・プレス(Academic Press)(1990)]などがあげられる。特に、RT(Room Temperature)-PCR法は、簡便であり、IgA腎症の診断に利用することができる。具体的には、ヒトから採血し、白血球を回収し、そこから単離したRNAを、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素を用いてcDNAに変換した後、検出したmRNAに対応する一組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応を行い、増幅断片を検出する方法である。

#### 【0012】

オリゴヌクレオチドプライマーとしては、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、5'末端側の塩基配列に相当するセンスプライマーおよび3'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマーがあげられる。ただし、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてチミジンとなる。

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度( $T_m$ )および塩基数が極端に変わることのないオリゴヌクレオチドを用いるのが好ましい。塩基数としては、15~40merが好ましい。

上述のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅させる塩基配列部分としては、mRNAのいかなる塩基配列領域でもよいが、塩基配列の長さが50bpから2kbpであり、反復配列あるいはGC(グアニン・シトシン)塩基に富む配列を含まぬ塩基配列領域が好ましい。

#### 【0013】

また、同様にアンチセンスRNA/DNA[化学46, 681(1991)、バイオテクノロジー(Biotechnology)9, 358(1992)]を用いて、DNAの転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することによりIgA腎症の治療に利用することもできる。

アンチセンスRNA/DNA技術を用いて該蛋白質の生産を抑制するには、本発明の該蛋白質をコードするDNAの一部の塩基配列、好ましくは翻訳開始領域にある10~50塩基の塩基配列を基にしてオリゴヌクレオチドを設計・調製し、生体内に投与することににより可能で

10

20

30

40

50

ある。合成オリゴヌクレオチドの塩基配列としては、本発明の該蛋白質をコードするDNAのアンチセンス鎖の塩基配列の一部と一致するもの、あるいは該蛋白質の活性発現を抑制する活性を失わない範囲内で改変したものを利用できる。オリゴヌクレオチドとしてはDNA、RNAまたはその誘導体たとえばメチル体やフォスフォロチオエート体を用いることができる。

#### 【0014】

前述した方法で得られたcDNA断片からDNA全長を得るには、前述したcDNA増幅断片をプローブとして、各種cDNAライブラリーよりハイブリダイゼーションによりスクリーニングして得ることができる。以下に、cDNAライブラリーの作製法について述べる。

cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（第2版）やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1～34等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング（Super Script<sup>TM</sup> Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning、ライフテクノロジー社製）やザップ-cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン（Stratagene）社製]を用いる方法などがあげられる。さらに、cDNAライブラリーを市販している場合もあり、本発明における、ギブコBRL社製のヒト白血球cDNAライブラリーなどcDNAライブラリーそのものの市販品もある。

#### 【0015】

cDNAライブラリーの作製の際の、細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies) 5, 58(1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) 17, 9494(1989)]、zap II (ストラタジーン社製)、gt10、gt11 [DNAクローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), Vol. 1, 49(1985)]、Lambda BlueMid (クローンテック社製)、ExCell、pT7T3 18U (ファルマシア社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280(1983)] およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103(1985)] 等が用いられる。ベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては、該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。たとえばXL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81(1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440(1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778(1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1(1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118(1966)] およびJM105 [ジーン (Gene), 38, 275(1985)] 等が用いられる。

#### 【0016】

また、cDNAライブラリーを作製せずに、cDNAを合成後両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と増幅断片の塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) および3'-RACE [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・USA (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 85, 8998(1988)] によっても得ることができる。また塩基配列に基づいたPCR法、あるいはDNA合成機で化学合成する方法によっても得られることもできる。cDNAライブラリーからのcDNAクローンの選択としては、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版] により選択することができる。また、プライマーを調製し、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAあるいはmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) 法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (第2版)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1～34] によりcDNAを調製することもできる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 7 】

上記方法により選択されたcDNAクローンを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript KS(+) (ストラタジーン社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463(1977)]等によって分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。塩基配列の分析は、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNAシーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)等を用いて行うことができる。

得られた塩基配列の新規性の確認は、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースにより行う。

上記方法によって得られたDNAとしては、例えば配列番号1で示される塩基配列を有するDNAもしくは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがあげられる。また、該塩基配列より推定されるアミノ酸配列を有する蛋白質としては、配列番号32記載のアミノ酸を有する蛋白質が含まれる。

10

## 【 0 0 1 8 】

新規蛋白質をコードするDNAの調製および発現は、モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(第2版)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、サプリメント1~34(Supplement 1~34)[アウスベル(Ausubel)、ブレント(Brent)、キングストン(Kingston)、ムーア(Moore)、セイドマン(Seidman)、スミス(Smith)、スツール(Struhl)編集、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウエイリー・インターサイエンス(Green Publishing Associates and Wiley-Interscience)発行、1987-1996年版、以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1~34と記す]等に記載された方法によって、行なうことができる。

20

すなわち、前述した方法により得られた全長DNAを適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を発現する形質転換体を得ることができる。

## 【 0 0 1 9 】

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)、バチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)、バチルス・アミロリクエファシネス(Bacillus amyloliquefaciens)、ブレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム(Brevibacterium lactofermentum)、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)、マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム(Microbacterium ammoniaphilum)等のエシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等の微生物が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クリュイペロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス(Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス(Schwanniomyces alluvius)等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵母細胞であるSf9、Sf21[バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、オレリー(Oreilly)、ミラー(Miller)、ルーコウ(Luckow)著、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W.H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、1992年版(以下、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアルと記す)]、Trichoplusia niの卵細胞であり、ファーマンジェン(Pharmingen)社からHigh5として市販されているTn5等が例示される。

30

40

## 【 0 0 2 0 】

50

本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主細胞として用いる場合には、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましい。

発現ベクターとしては、例えば、pKYP10 (特開昭 58-110600)、pLSA1 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.), 53, 277, (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306, (1985)] 等が用いられる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、T7 lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーターなどの、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。P trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x 2)、tacプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等を用いてもよい。

リボゾーム結合配列としては、シャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列 (以下、SD配列と略記する) と開始コドンの間を適当な距離 (例えば、6 ~ 18塩基) に調節して用いることが好ましい。

#### 【0021】

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの塩基配列が宿主細胞での発現に最適なコドンとなるように、必要に応じて塩基を置換して用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110-2114 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YcP50 (ATCC37419) 等が用いられる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよいが、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF 1プロモーター、CUP 1プロモーター等があげられる。

#### 【0022】

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)] 等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pAMoERC3Sc、pcDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pcDNA I / Amp、pcDNA I (いずれもフナコシ社製) 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

#### 【0023】

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1-34、バキュロウイルス・イクスプレッシ

ョン・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等が用いられる。

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

#### 【0024】

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

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

#### 【0025】

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、糖蜜、デンプン、デンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、りん酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩またはその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体またはその消化物等が用いられる。

無機物としては、りん酸第一カリウム、りん酸第二カリウム、りん酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

#### 【0026】

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

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

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

#### 【0027】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35～37℃で3～7日間行

10

20

30

40

50

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

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーマンゲン (Pharmingen) 社製]、Sf900IISFM [ライフテクノロジーズ (Life Technologies) 社製]、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製] 等が用いられる。培養は、25~30 で1~4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0028】

本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合または細胞内に不溶体を形成した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

10

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、タンパク質の立体構造を形成せしめることができる。

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

20

#### 【0029】

また、本発明の蛋白質は配列番号32記載のアミノ酸配列に基づいた、化学合成法によっても製造することができる。

また、本発明の蛋白質、あるいは配列番号32記載のアミノ酸配列に基づいて化学合成した本発明の蛋白質の一部であるペプチドを抗原として免疫することにより、抗体を製造することができる。すなわち免疫した動物の脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を採取することにより本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体を製造することができる。また、免疫した動物の免疫血清を採取することにより本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を製造することができる。これらの抗体はIgA腎症の診断や治療に利用することができる。

30

以下、本発明の実施例を示す。

#### 【実施例1】

#### 【0030】

< IgA 腎症患者および健常人の白血球のディファレンシャル・ディスプレイ >

(1) IgA腎症患者および健常人の白血球からの全RNAの取得

IgA腎症の患者5名および健常人5名各々から20ml採血し、1000単位/mlヘパリンナトリウム溶液 (清水製薬社製) 500  $\mu$ l を添加して凝固を抑制後、遠心チューブに移し、室温で3,300rpm、15分間遠心後、白血球画分として中間層のパフィーコートを用いた遠心チューブに移した。AGPC法 [実験医学9, 1937, (1991)] により全RNAを取得した。

40

#### 【0031】

(2) IgA腎症患者および健常人の白血球全RNAを用いた蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ

それぞれの全RNA2.5  $\mu$ gについて蒸留水を全体が9  $\mu$ lになるように添加し、5'末端をフルオレセインイソチオシアネート (以下、FITCと称す) で蛍光標識したアンカープライマー (サワディー社製 50  $\mu$ M) 1  $\mu$ l を加えて70 で5分間加熱後、すぐ氷冷した。蛍光標識アンカープライマーとしては以下に示す3種類の配列 (FAH:5'-FITC-GT<sub>15</sub>A-3'、FGH:5'-FITC-GT<sub>15</sub>G-3'、FCH:5'-FITC-GT<sub>15</sub>C-3') のうちの1種類ずつ反応に用いるので、1サン

50

ブルの全RNAについて計3組の反応を行った。5×逆転写酵素反作用緩衝液〔250mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)-HCl(pH8.3)、375mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>〕4 μl、100mMジチオスレイトール(DTT) 2 μl、10mM dNTP(dATP、dGTP、dTTPおよびdCTP) 1 μl、蒸留水 1 μl、逆転写酵素SUPERSCRIPT II RNase H Reverse Transcriptase(BRL社製) 1 μl(200単位)を添加して混合し、室温で10分間静置後、42℃で50分間反応させてcDNAを合成し、90℃5分間加熱して反応を停止させた。この反応液にTE緩衝液〔10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)(pH8.0)〕40 μlを添加した。

#### 【0032】

続いて、合成した各々のcDNA 1 μlに、蒸留水14.7 μl、10×PCR用緩衝液〔100mM Tris-HCl(pH8.8)、500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、1%トライトンX-100〕2 μl、2.5mM dNTP 0.8 μl、50 μM蛍光標識アンカープライマー(FAH、FGH、FGHのうちcDNA合成時に用いたのと同じ種類のもの) 0.3 μl、10 μM任意プライマー(オペロン社製) 1 μl、DNAポリメラーゼGene Taq(ニッポンジーン社製、5単位/μl) 0.2 μlを添加し、サーマルサイクラーにセットした。94℃で3分間、40℃で5分間、72℃で5分間反応させた後、95℃で15秒間、40℃で2分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして27サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させてPCRを行った。蛍光標識アンカープライマーとしては前述した3種類のうちから1種類、任意プライマーとしては、オペロン社製のOPD-1~20、OPE-1~20およびOPV-1~20の60種類のうちから1種類を組み合わせて反応を行うため、合計180組、さらに蛍光標識アンカープライマーFGHと任意プライマーOPB-2(オペロン社製)の反応も行うため、1つの全RNAについて合計で181組の反応を行っている。

#### 【0033】

各々のPCR反応液 4 μlに電気泳動サンプル用溶液(95%ホルムアミド、0.1%キシレンシアノール、0.1%ブロムフェノールブルー) 3 μlを添加し、95℃で2分間加熱後すぐ氷冷し、6%アクリルアミドゲル、1500V、2.5時間で電気泳動を行った。電気泳動用緩衝液としては89mM Tris、89mMホウ酸、2 mM EDTAを用いた。

フルオロイメージャー(モレキュラー・ダイナミックス社製)を用いて電気泳動後のゲルの蛍光を測定することにより、PCRで増幅した断片を検出し、比較した。健常人5例に比較して、IgA腎症患者の白血球5例で共通して顕著に増加あるいは減少したバンドを記録した。

再度、別のIgA腎症患者3例と健常人3例から全く同様に全RNAを取得し、同様にディファレンシャル・ディスプレイを行い、2度のディファレンシャル・ディスプレイでともに増加あるいは減少がみられた197バンドをゲルから切り出した。

#### 【0034】

切り出したゲルの約1/4に蒸留水38 μl、10×PCR用緩衝液 5 μl、2.5mM dNTP 4 μl、アンカープライマー(蛍光標識なし:サワディー社製 34 μM) 0.6 μl、10 μM任意プライマー 2 μl、DNAポリメラーゼGene Taq 0.5 μlを添加し、94℃で3分間加熱後、95℃で15秒間、40℃で2分間、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとして30サイクル反応を行い、最後に72℃で5分間反応させてPCRを行った。アンカープライマーおよび任意プライマーの組み合わせについては、最初に行ったディファレンシャル・ディスプレイ法と同様のものを用いた。反応後の液をフェノール-クロロホルム(1:1)抽出し、さらにクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)抽出後、エタノール沈殿をした。これを精製するため1.5%低融点アガロースゲル〔シーブランクGTG(SEAPLAQUE GTG:FMCバイオプロダクツ社製)〕で電気泳動してエチジウムブロマイド染色をし、増幅断片を切り出した。これを65℃で15分間加熱してアガロースを融解させ、フェノール-クロロホルム抽出し、さらにクロロホルム-イソアミルアルコール抽出後エタノール沈殿をし、10 μlのTE緩衝液に溶解させた。

#### 【0035】

増幅断片 1 μlとPCR断片クローニング用ベクターpT7BlueT-Vector(ノバジェン社製) 1 μlを混合し、DNAライゲーションキットver.1(宝酒造社製)を用いて、キットの指示

に従い、プラスミドに増幅断片を組み込んだ。大腸菌DH5 (ギブコBRL社製)を形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。該形質転換株コロニーを蒸留水20 $\mu$ lに懸濁し、10 $\times$ PCR用緩衝液2.5 $\mu$ l、2.5mM dNTP 2 $\mu$ l、34 $\mu$ Mアンカープライマー0.3 $\mu$ l、10 $\mu$ M任意プライマー1 $\mu$ l、DNAポリメラーゼGene Taq 0.5 $\mu$ lを添加し、増幅断片の再増幅と同じ条件でPCRを行って電気泳動をし、最初のディファレンシャル・ディスプレイ時と同じ長さの断片が増幅することから、該プラスミドに増幅断片が組み込まれたことを確認した。

【0036】

増幅断片の塩基配列はDNAシーケンサー(パーキンエルマー社製)を用いて決定した。塩基配列決定に用いた試薬および方法についてはパーキンエルマー社のダイプライマーサイクルシーケンシング(Dye primer cycle sequencing)キットを使用し、キットの指示に従った。ここで得られた塩基配列中にある制限酵素部位で、もとのディファレンシャル・ディスプレイ時の反応物を切断して電気泳動し、切り出した増幅断片に相当するバンドが確かに切断されて泳動位置が変化することを確認した。得られた塩基配列を塩基配列データベースGenBankと比較し、一致する塩基配列がデータベース中の既存の塩基配列にはないもの、データベースの塩基配列の中でexpressed sequence tagとのみ一致するものを66クローン選択した。

10

【実施例2】

【0037】

< RT-PCRによるmRNAの発現の特異性の検出 >

実施例1で得られたIgA腎症患者5例および健常者5例の白血球からの全RNA 2 $\mu$ gに対して一本鎖cDNA合成キットSuperscript preamplification system(BRL社製)を用いて、キットに付属のオリゴdTプライマーにより一本鎖cDNAを合成した。具体的試薬および方法は、キットに付属のプロトコールに従った。反応後の溶液21 $\mu$ lに蒸留水399 $\mu$ lを添加して全体を420 $\mu$ lにし、そのうちの10 $\mu$ lを用いて、RT-PCRにより各増幅断片に対応するmRNAの発現量を検出した。すなわち、白血球一本鎖cDNA 10 $\mu$ lに蒸留水15.8 $\mu$ l、10 $\times$ PCR用緩衝液4 $\mu$ l、2.5mM dNTP 3.2 $\mu$ l、DMSO 2 $\mu$ l、10 $\mu$ M遺伝子特異的5'末端側センスプライマー2 $\mu$ l、10 $\mu$ M遺伝子特異的3'側アンチセンスプライマー2 $\mu$ l、1単位/ $\mu$ lに希釈したDNAポリメラーゼGene Taq 2 $\mu$ lを添加し、97 $^{\circ}$ C 5分間加熱し、氷中で5分間冷却した後、94 $^{\circ}$ C で30秒間、65 $^{\circ}$ C で1分間、72 $^{\circ}$ C で2分間からなる工程を1サイクルとして24~35サイクルのPCR反応を行った。2%アガロースゲル電気泳動後、0.01%サイバグリーン(宝酒造社製)で染色し、増幅した断片の量をフルオロイメジャーで定量し、mRNAの相対発現量とした。

20

30

【0038】

mRNAの量を校正するために、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G3PDH)遺伝子について、下記の特異的プライマー:

5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGC-3' (配列番号95)

5'-TTCACCACCTTCTTGATGTCATCATA-3' (配列番号96)

を用いて同様の反応を行い、各遺伝子のmRNAの発現量をG3PDH mRNAの発現量に対する比で校正した後、IgA腎症患者5例の平均値と健常者5例の平均値を比較し、その値に差のある遺伝子31クローンについてIgA腎症患者で発現量が変化している遺伝子として選択した。表1-1および表1-2に、選択された遺伝子についてまとめた。

40

【0039】

【表 1 - 1】

配列表 の番号	遺伝子	増幅プライマー <sup>1)</sup>	bp <sup>2)</sup>	発現 変動 <sup>3)</sup>	RT-PCR プライマー <sup>4)</sup>	RT-PCR cycle 数
1	INP377-A	FGH/OPD-1	256	5.0	55,56	28
2	INM063-7	FGH/OPB-2	155	12.5	33,34	28
3	INP303-A	FAH/OPD-5	305	9.9	35,36	28
4	INM315-10	FAH/OPD-9	278	2.8	37,38	35
5	INP319-3	FAH/OPD-10	135	14.4	39,40	28
6	INP324-A	FAH/OPD-12	197	19.9	41,42	28
7	INP332-A	FAH/OPD-16	137	16.6	43,44	28
8	INM335-3	FAH/OPD-17	274	4.2	45,46	28
9	INM336-A	FAH/OPD-17	171	0.14	47,48	28
10	INM351-10	FCH/OPD-4	161	1.8	49,50	28
11	INP356-4	FCH/OPD-7	323	18.5	51,52	35
12	INP364-A	FCH/OPD-12	138	3.8	53,54	28
13	INP379-A	FGH/OPD-2	244	8.6	57,58	35
14	INP380-A	FGH/OPD-2	135	15.7	59,60	35
15	INP401-A	FGH/OPD-20	258	16.7	61,62	24
16	INP403-A	FAH/OPE-3	219	2.3	63,64	28
17	INP407-A	FAH/OPE-5	191	9.1	65,66	28
18	INM408-A	FAH/OPE-5	148	0.65	67,68	28
19	INP410-5	FAH/OPE-6	306	2.0	69,70	28
20	INM419-14	FAH/OPE-11	357	0.064	71,72	35

10

20

30

【 0 0 4 0 】

【表 1 - 2】

21	INP429-A	FGH/OPE-7	219	2.4	73,74	28
22	INP431-A	FGH/OPE-8	251	13.1	75,76	24
23	INP438-A	FGH/OPE-11	233	5.4	77,78	24
24	INP444-A	FGH/OPE-15	176	3.3	79,80	24
25	INP451-2	FCH/OPE-4	241	14.0	81,82	32
26	INP458-A	FCH/OPE-11	217	9.2	83,84	28
27	INP463-A	FCH/OPE-19	232	18.2	85,86	35
28	INP470-A	FCH/OPV-4	228	5.8	87,88	28
29	INP482-A	FCH/OPV-10	298	9.9	89,90	28
30	INP485-6	FCH/OPV-17	291	8.5	91,92	28
31	GTINP332A -21 <sup>5)</sup>	-	869	4.6	93,94	24

1) デフェレンシャル・ディスプレイ時に用いたアンカープライマーと任意プライマーの組み合わせを示した。

2) GTINP332A-21 以外はデフェレンシャル・ディスプレイ時の増幅断片の長さを示した。

3) 発現変動は Ig A腎症の患者5例のmRNAの発現量の平均値/健常人5例のmRNAの発現量の平均値の値を示した。

4) RT-PCRのプライマーは配列表の番号を示した。

5) GTINP332A-21 は、デフェレンシャル・ディスプレイでその増幅断片が得られた遺伝子ではなく、実施例3と同様にして、INP332-A の全長のcDNAクローンをヒト白血球cDNAライブラリーから取得を試みた際に、形質転換株から得られたcDNAクローンである。そのcDNAの塩基配列の一部を実施例4と同様にして決定したところ INP332-A の塩基配列とは異なる新規遺伝子のcDNAクローンであり、その塩基配列に基づいて実施例2で行った RT-PCR の結果は、Ig A腎症の患者白血球で健常人と比較してmRNAの発現が上昇していることがわかったため、この表にいった。

## 【 0 0 4 1 】

これらの遺伝子についてのプライマーと、検体白血球のmRNA由来cDNAとを、RT-PCR法により反応させて、遺伝子増幅を観察することで、IgA腎症の診断が可能となる。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 4 2 】

< INP377-A cDNAのクローン化 >

( 1 ) INP377-A cDNAクローンの単離

ベクターにpCMV-SPORT ( ギブコBRL社 ) を用いたヒト白血球cDNAライブラリー ( ギブコBRL社製 ) から、ジーントラッパーcDNAポジティブセレクションシステム ( GENE TRAPPER cDNA Positive Selection System ギブコBRL社製 ) を用いて、INP377-A cDNA クローンを

10

20

30

40

50

取得した。すなわち、cDNAライブラリーをGene II蛋白とエクソヌクレアーゼIIIを用いて、一本鎖にした後、INP377-A遺伝子と対応するビオチン化した相補的なオリゴヌクレオチド（実施例2で用いた5'側センスプライマーを用いた）をプローブとしてハイブリダイズさせ、さらにストレプトアビジン付加したマグネティックビーズでプローブを結合させて単離させた。ハイブリダイズしていた一本鎖cDNAクローンをプローブからはずした後、DNAポリメラーゼによって二本鎖にして大腸菌を形質転換することにより、INP377-A cDNAクローンをアンピシリン耐性株として出現させた。具体的試薬および方法はキットに付加するプロトコールにしたがった。それぞれの形質転換株コロニーを蒸留水18 $\mu$ lに懸濁し、10 $\times$ PCR用緩衝液2.5 $\mu$ l、2.5mM dNTP 2 $\mu$ l、10 $\mu$ M遺伝子特異的5'側センスプライマー1 $\mu$ l、10 $\mu$ M遺伝子特異的3'側アンチセンスプライマー1 $\mu$ l、DNAポリメラーゼGene Taq 0.5 $\mu$ lを添加し、RT-PCRと同じ条件でPCRを行って電気泳動をし、プライマーの位置から推定される約200bpのINP377-A cDNA断片が増幅する形質転換株をINP377-A cDNAクローンとして単離した。

10

## 【0043】

このクローンから公知の方法（モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版）に従ってプラスミドDNAを単離し、このプラスミドをpGTINP377A-46Cと名付けた。またプラスミドDNAを制限酵素Sal I およびNot I（ともに宝酒造社製）で消化後、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、cDNAのサイズは約3 kbであった。

## 【0044】

## (2) INP377-A cDNAの塩基配列の決定

20

pGTINP377A-46C中のINP377-A cDNAの塩基配列をパーキンエルマー社の377DNAシーケンサーを用いて決定した。塩基配列決定のための具体的試薬および方法はパーキンエルマー社のダイプライマーサイクルシーケンシングFSレディリアクション(Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction)キットを使用し、キットの指示に従った。得られた塩基配列を配列番号1に示した。この塩基配列には143アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が存在した。377-AのcDNAの塩基配列をデータベースと比較したところ、N末の137アミノ酸に相当する部分は、ショウジョウバエのガン抑制遺伝子Sxlと同性をもつヒトの遺伝子LUCA15のN末137アミノ酸に相当する部分と一致するが、その後には、全く同性のない塩基配列が続き、ディファレンシャル・ディスプレイで得られた配列は、この全く同性のない塩基配列中に存在することがわかった。

30

## 【産業上の利用可能性】

## 【0045】

本発明により得られる新規遺伝子を用いることによりIgA腎症の治療や診断が可能である。

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0046】

配列番号1：二本鎖；トポロジー：直鎖状；cDNA；起源：白血球

配列番号2：二本鎖；トポロジー：直鎖状；cDNA；起源：白血球

配列番号3：二本鎖；トポロジー：直鎖状；cDNA；起源：白血球

配列番号3：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：53～58）

40

配列番号4：二本鎖；トポロジー：直鎖状；cDNA；起源：白血球

配列番号4：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：29）

配列番号4：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：32）

配列番号4：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：35）

配列番号5～8：二本鎖；トポロジー：直鎖状；cDNA；起源：白血球

配列番号9：二本鎖；トポロジー：直鎖状；cDNA；起源：白血球

配列番号9：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：72）

配列番号9：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：127）

配列番号9：nはa、c、g又はtを表す（存在位置：150）

## 【0047】

50

配列番号 10 ~ 12 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 13 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 13 : n は a、c、g 又は t を表す (存在位置 : 227)  
配列番号 13 : n は a、c、g 又は t を表す (存在位置 : 237)  
配列番号 14 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 15 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 15 : n は a、c、g 又は t を表す (存在位置 : 39 ~ 41)  
配列番号 16 ~ 28 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 29 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 29 : n は a、c、g 又は t を表す (存在位置 : 44)  
配列番号 30 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 31 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球  
配列番号 32 : トポロジ- : 直鎖状 ; 起源 : 白血球  
配列番号 33 ~ 94 : 合成 DNA  
配列番号 33 ~ 94 : 一本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状  
配列番号 95 : 合成 DNA  
配列番号 96 : 合成 DNA  
配列番号 97 : 二本鎖 ; トポロジ- : 直鎖状 ; cDNA ; 起源 : 白血球

10

【配列表】

2007289184000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	
<b>A 6 1 K 31/711 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/711	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	D
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
	G 0 1 N 33/53	D

(72)発明者 桜田 幹子  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 2、サンディエゴ、フィオレテラス 5 2 2 0  
2 1 3

(72)発明者 西村 彩子  
東京都世田谷区宮坂 1 - 1 8 - 1 1

(72)発明者 中川 智  
東京都町田市中町 3 - 9 - 9

(72)発明者 西 達也  
東京都大田区東嶺町 3 9 - 1 5

(72)発明者 久我 哲郎  
東京都町田市中町 3 - 9 - 1 3

(72)発明者 澤田 滋正  
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 武井 正美  
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 DA06 EA04  
4B063 QA19 QQ53 QR32 QR62 QS16 QS34 QX02  
4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA13 MA65 NA14 ZA812 ZC202  
4C085 AA13 AA14 BB31 CC02 CC22 CC23 DD62  
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZC20  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 CA44 DA75 EA26 EA50  
FA74

专利名称(译)	IgA肾病相关基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007289184A</a>	公开(公告)日	2007-11-08
申请号	JP2007100896	申请日	2007-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人日本大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人日本大学		
[标]发明人	石渡 哲義 桜田 幹子 西村 彩子 中川 智 西 達也 久我 哲郎 澤田 滋正 武井 正美		
发明人	石渡 哲義 桜田 幹子 西村 彩子 中川 智 西 達也 久我 哲郎 澤田 滋正 武井 正美		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 A61K48/00 A61P43/00 A61P13/12 A61K31/711 A61K39/395 G01N33/53 C12N15/12 G01N33/68		
CPC分类号	A61K48/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P43/00 C07K14/47 C12Q1/6809 G01N33/6893		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12P21/02.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12Q1/68.A A61K48/00 A61P43/00.111 A61P13/12 A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.D C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 C12Q1/6809.C C12Q1/6809.Z G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA65 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZC202 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA44 4H045/DA75 4H045/EA26 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
优先权	1996325763 1996-12-05 JP		
其他公开文献	JP4447620B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种诊断方法，以阐明IgA肾病的原因，进行治疗或减轻患者的负担。 解决方案：从IgA肾病患者的白细胞中，使用差示显示法和涉及该方法的IgA肾病涉及的DNA及其获得方法，并使用基于DNA核苷酸序列的寡核苷酸对IgA肾病相关基因进行mRNA检测。 一种方法，一种抑制IgA肾病相关基因的转录和mRNA翻译的方法，以及一种包含该寡核苷酸的IgA肾病诊断剂和治疗剂。 [选择图]无

配列表 の番号	遺伝子	増幅プライマー <sup>1)</sup>	bp <sup>2)</sup>	発現 変動 <sup>3)</sup>	RT-PCR プライマー <sup>4)</sup>	RT-PCR cycle 数
1	INP377-A	FGH/OPD-1	256	5.0	55,56	28
2	INM063-7	FGH/OPB-2	155	12.5	33,34	28
3	INP303-A	FAH/OPD-5	305	9.9	35,36	28
4	INM315-10	FAH/OPD-9	278	2.8	37,38	35
5	INP319-3	FAH/OPD-10	135	14.4	39,40	28
6	INP324-A	FAH/OPD-12	197	19.9	41,42	28
7	INP332-A	FAH/OPD-16	137	16.6	43,44	28
8	INM335-3	FAH/OPD-17	274	4.2	45,46	28
9	INM336-A	FAH/OPD-17	171	0.14	47,48	28
10	INM351-10	FCH/OPD-4	161	1.8	49,50	28
11	INP356-4	FCH/OPD-7	323	18.5	51,52	35
12	INP364-A	FCH/OPD-12	138	3.8	53,54	28
13	INP379-A	FGH/OPD-2	244	8.6	57,58	35
14	INP380-A	FGH/OPD-2	135	15.7	59,60	35
15	INP401-A	FGH/OPD-20	258	16.7	61,62	24
16	INP403-A	FAH/OPE-3	219	2.3	63,64	28
17	INP407-A	FAH/OPE-5	191	9.1	65,66	28
18	INM408-A	FAH/OPE-5	148	0.65	67,68	28
19	INP410-5	FAH/OPE-6	306	2.0	69,70	28
20	INM419-14	FAH/OPE-11	357	0.064	71,72	35