

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2001 - 352983**

(P2001 - 352983A)

(43)公開日 平成13年12月25日(2001.12.25)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (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		C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 3
16/18		C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 21数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 109452(P2000 - 109452)

(22)出願日 平成12年4月11日(2000.4.11)

(71)出願人 000238201

扶桑薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

(72)発明者 山本 格

新潟県新潟市小針1丁目34 - 2

(72)発明者 畠山 悟

新潟県新潟市太平4丁目10番地7 コンフォ-ト21 A棟102号

(74)代理人 100065868

弁理士 角田 嘉宏 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ヒトアクアポリン

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 腸管における水分または低分子物質の調節機能の解明、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患等の発症機構の解明、診断、予防及び治療法、並びにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できる新規アクアポリンを提供する。

【解決手段】 特定の配列からなるアミノ酸264個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質とその誘導体及び断片、ならびにこれをコードする塩基配列。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸264個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの誘導体および断片。

【請求項2】 配列番号1の塩基番号43～834に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項3】 請求項2に記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項4】 請求項2に記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項5】 請求項4に記載の形質転換細胞を培養し、産生されたタンパク質を採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質の製造法。

【請求項6】 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項5に記載の製造法。

【請求項7】 i A Q P 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項8】 i A Q P 遺伝子の機能を欠損させたノックアウト非ヒト動物。

【請求項9】 請求項1に記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

【請求項10】 ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項9記載の抗体。

【請求項11】 請求項9または10に記載の抗体と請求項1に記載のタンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、該タンパク質またはその断片を測定する方法。

【請求項12】 請求項1に記載のタンパク質の機能を刺激するアゴニスト。

【請求項13】 請求項1に記載のタンパク質の機能を阻害するアンタゴニスト。

【請求項14】 請求項1に記載のタンパク質、請求項2に記載の塩基配列、または請求項4に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とする、薬物のスクリーニング方法。

【請求項15】 請求項14に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は単離されたヒトの新規アクアポリン(本明細書において「hiAQP」と称する)遺伝子およびタンパク質、それらの相同体、変異体、修飾体および多形性変種(これらを「誘導体」と総称する)、それらの断片(以下、それら全てを「hiAQP s」と称する)ならびにそれらの検出に関する。本発明はまた、hiAQP sを含む医薬用、診断用、研究用組成物、それらの製造方法および使用に関する。更に本発明は、hiAQP s タンパク質のアゴニストおよびアンタゴニスト、hiAQP s を用いた薬物のスクリーニング方法に関する。更に本発明は、hiAQP s 遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞、hiAQP s タンパク質に対する抗体および該抗体を産生する細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】1992年にPrestonらは、赤血球膜に多量に存在するCHIP28(Channel like membrane intrinsic protein of 28kDa)のcDNAをクローニングし、該タンパク質をアフリカツメガエルの卵に発現させ、CHIP28が特異的に水分子を透過させる水チャンネルであることを証明した(Preston, G. M. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 11110, 1991; Preston, G. M. et al.; Science, 256, 385, 1992)。その後、類似タンパク質が次々と同定され、遺伝子ファミリーが存在していることが明らかとなった。これらの水チャンネルは構造的、機能的に類似しているため、アクアポリン(以下、AQPと称する)ファミリーと呼ばれている(Agre, P. et al.; Am. J. Physiol., 265, 1993)。また、AQPは水のみならず、各種低分子物質(例えば、グリセロール、尿素)をも通過させることが知られている(Silberstein, C. et al.; Braz. J. Med. Biol. Res., 32(10), 1303-1313, 1999)。AQPはMIP(Major intrinsic protein)ファミリーと呼ばれる膜タンパク質の一群に属している。MIP/AQPファミリーのタンパク質は細胞膜を6回貫通する膜タンパク質である。さらに、アスパラギン(N)、プロリン(P)、アラニン(A)の3つのアミノ酸が連なったNPAボックス配列が2回保存されている。

【0003】哺乳類においては、現在までに少なくとも10種のアクアポリンがクローニングされている。AQPは全身の至る所にmRNAの発現が認められている(Kenichi, I. et al.; Clin. Exp. Nephrol., 1(4), 247-257, 1997)。例えば、AQP0(Chandy, G. et al.; J. Memb. Biol., 159, 29-39, 1997)は眼のレンズファイバー細胞、AQP1(Preston, G. M. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 11110-11114, 1991)は赤血球、毛細血管内皮細胞、脳脈絡膜上皮細胞、角膜内皮細胞、紅彩、毛様体、レンズ上皮細胞、気管(支)上皮細胞、肺胞上皮細胞、近位尿管上皮細胞、ヘンレ下降脚上皮細胞、胆嚢上皮細胞、汗腺上皮細胞等、AQP2(Fush

imi, K. et al. ; Nature, 361, 549-552, 1993) は集合管上皮細胞、AQP3 (Ishibashi, K. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6269-6273, 1994) は集合管上皮細胞、結膜上皮細胞、大腸吸収上皮細胞、気管上皮細胞、胃上皮細胞、小腸吸収上皮細胞、髄膜等、AQP4 (Hasagawa, H. et al. ; J. Biol. Chem., 269, 5497-5500, 1997) は集合管上皮細胞、グリア細胞、脳室上皮細胞、胃壁側細胞、気管支上皮細胞、網膜、紅彩、毛様体上皮細胞等、AQP5 (J. Biol. Chem., 270, 1908-1912, 1995) は唾液腺上皮細胞、涙液腺上皮細胞、角膜上皮細胞、肺上皮細胞等、AQP6 (Ma, T. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 197, 654-659, 1993) は腎、AQP7 (Ishibashi, K. et al. ; J. Biol. Chem., 272, 20782-20786, 1997) は近位尿細管上皮細胞、精子、心臓、脂肪細胞、骨格筋、AQP8 (Ishibashi, K. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 237, 714-718, 1997, Koyama, K. et al. ; J. Biol. Chem., 272, 30329-30333, 1997) は精子、肝細胞、膵臓、大腸吸収上皮細胞、唾液腺上皮細胞等、AQP9 (Ishibashi, K. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 244, 268-274, 1998) は白血球、肝臓、肺、脾臓等に発現している。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】消化管には1日に約2Lの水分が入る一方、1日に約7～8Lの水分が消化液として分泌されている。しかし、大腸を経て糞便と共に体外へ排泄される水分は約0.1Lにすぎず、消化管で水分の大部分(99%)が吸収されている。ヒトは高張性の食事をして低調性の食事をして、例えば十二指腸・上部空腸等内の浸透圧に応じて水分が腸管壁を出入りし、腸管内部の浸透圧を等張に保っている。消化管は水分・栄養分等を吸収する器官であると同時に、消化液・酸の中和のための液体等を分泌する器官でもあるにも拘わらず、消化管における水チャンネルの関与については殆ど研究されていなかった。ゆえに、本発明者らは消化管における新規アクアポリンのクローニングを試み、hiAQPのクローニングに成功した。

【0005】従って本発明は、hiAQP遺伝子およびタンパク質、腸管における水分または低分子物質の調節機構の解明、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患の発症機構の解明、さらにhiAQPに基づく各種疾患の診断、予防及び治療法、並びにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できるものを提供することを目的とする。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、(1)配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸264個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番

号1～264に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの誘導体および断片、(2)配列番号1の塩基番号43～834に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～264に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、(3)

(2)に記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター、(4)(2)に記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞、(5)(4)に記載の形質転換細胞を培養し、産生されたタンパク質を採取することを特徴とする(1)記載のタンパク質の製造法、(6)細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、(5)に記載の製造法、(7)hiAQP遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、(8)hiAQP遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス、(9)

(1)に記載のタンパク質またはその断片に対する抗体、(10)ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である(9)記載の抗体、(11)(9)または(10)に記載の抗体と(1)に記載のタンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、該タンパク質またはその断片を測定する方法、(12)(1)に記載のタンパク質の機能を刺激するアゴニスト、(13)(1)に記載のタンパク質の機能を阻害するアンタゴニスト、(14)(1)に記載のタンパク質、(2)に記載の塩基配列、または(4)に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とする薬物のスクリーニング方法、(15)(14)に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物、を提供するものである。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】本発明者らは、ヒト新規AQPのクローニングに成功した。配列番号2に示す新規AQP(以下、hiAQPと称する)アミノ酸配列中には、NPAボックス配列が2カ所存在していた(アミノ酸番号82～84、214～216)。また、hiAQPは他のアクアポリンファミリーと同様の3次構造を形成し、N末端およびC末端共に細胞内に存在していると予想される。また、前記特徴を有するhiAQPは4量体を形成していると考えられる。配列番号2に示すhiAQP(アミノ酸番号1～264)のアミノ酸配列は、アミノ酸264個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数792個から成る。このタンパク質をコードする塩基配列を配列番号1に示した。

【0008】本明細書において使用するhiAQP遺伝子とは、特記しない限り、配列番号1に示す塩基配列、それらの相同体、変異体、修飾体および多形性変種、並びにそれらの断片を含むものとする。また、本明細書に

において使用する h i A Q P タンパク質とは、特記しない限り、配列番号 2 に示すアミノ酸配列（ポリペプチド）、それらの相同体、変異体、修飾体および多形性変種、それらの断片を含むものとする。これらは天然または人工的に作製されたものを問わず、本発明には前記記載の全てが包含される。

【0009】また、本発明には、実質的に配列番号 2 に示すアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列、および実質的に配列番号 2 に示すアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含まれる。さらに、これら 10 のアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明に含まれる。配列番号 2 に示すアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質と同等の性質を有する範囲内で、1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入等の改変を有するアミノ酸配列をいう。これら改変体は天然または人工的製物を問わない。ここで同等の性質とは、水分子を透過性させる機能に代表される水チャンネルとしての活性、機能等を有すること、そして類似の 3 次構造のコンフォメーションをとることなどを称する。 20

【0010】さらに、本発明には、配列番号 1 に記載の塩基配列またはその断片を含む塩基配列、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列に相補的な塩基配列（以下、特定配列と称する）とストリンジентな条件下ハイブリダイズすることができる塩基配列も含まれる。さらに、本発明の塩基配列には、DNA のみならず RNA も含まれる。本発明におけるストリンジентな条件とは、例えば、5 × S S C、5 % デンハート溶液（0 . 1 % B S A、0 . 1 % F i c o l l 4 0 0、0 . 1 % 30 P V P）、0 . 5 % S D S および 2 0 μ g / m l 変性サケ精子 DNA を含有する溶液中で、3 7 にて一夜インキュベートし、ついで室温にて 0 . 1 % S D S を含有する 2 × S S C で洗浄する条件である。S S C の代わりに適宜 S S P E を使用してもよい。この様にして得られた塩基配列は、少なくとも特定配列と 5 0 % 以上のホモロジーを有すると考えられる。特定配列とストリンジентな条件下ハイブリダイズすることができる塩基配列によってコードされるタンパク質は、h i A Q P タンパク質と同等の性質を持つものが多いと考えられ、h i 40 A Q P タンパク質と同等の性質を有する限り、該タンパク質も本発明に含まれる。上記方法によって、ヒト以外の動物、例えばマウス、ラット等のホモログ（i A Q P）を取得することができ、これらタンパク質も本発明に含まれる。

【0011】本明細書中で使用する相同体とは、相同性（ホモロジー）が高い塩基配列またはアミノ酸配列であり、ホモロジーが少なくとも 5 0 % 以上、好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上のものをいう。配列中に欠失や挿入が存在する場合には、ギャップ結合を 50

許した相同性検索を行うと良い。例えば、マルチプル・アライメント（商品名：SODHO、富士通）の手法を用いて検索することができる。また、相同性検索のアルゴリズムには、最も厳密な Smith-Waterman アルゴリズムを用いることができる。その他、FASTA や BLAST 等のデータベースをインターネットを通じて利用することができる。

【0012】本明細書中で使用する変異体とは、例えば、対立遺伝子（アレル）、Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 等を挙げることができる。また、塩基配列の変異はコドンの縮重の範囲内で変化したものも本発明の塩基配列に含まれる。塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができ、こうして得られた人工的遺伝子変異体も本発明の塩基配列に含まれる。また、コドンの縮重の範囲を超えた場合であっても、変異したコドンによって翻訳された変異アミノ酸が、正常アミノ酸と類似の性質であることが好ましい。例えば、脂肪族アミノ酸であるアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン間での変異、中性アミノ酸であるグリシン、アラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、プロリン、トリプトファン、アスパラギンおよびグルタミン間での変異、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸間での変異、塩基性アミノ酸であるアルギニン、リジンおよびヒスチジン間での変異、水酸基を有するセリンおよびトレオニン間での変異、芳香環を有するフェニルアラニンおよびチロシン間での変異等、アミノ酸の性質・機能・特性等が類似のものであるのが好ましい。これら人工的または天然に変異したタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。人工的には、PCR 法を用いて遺伝子に部位特異的変異を起こすことができ、その他公知の方法を用いて任意の場所に変異を起こさせることができる。

【0013】本明細書中で使用する修飾体とは、例えば、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ミリストイル化、グリコシル化、水酸化、リン酸化、硫酸化、ホルミル化、メチル化、ポリエチレングリコール化、脂質結合、ヌクレオチド結合、金属結合（カルシウム付加体等）、他のタンパク質（アルブミン等）との融合体、二量体等の改変を通常の技術を用いて施すことができる。例えば、グリコシル化は宿主を大腸菌として発現させた場合には起こらないため、グリコシル化を企図する場合には、真核細胞に発現すると良い。昆虫細胞も哺乳細胞と同様に翻訳後にグリコシル化を行うため好適な宿主細胞として使用することができる。

【0014】本明細書中で使用する多型性変種とは、例えば、染色体 DNA の構造や形態の差異により生じる多

型性、ある遺伝子が対立遺伝子に変化したために生じる多型性等をいう。一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な水チャンネルとしての機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。

【0015】本明細書中で使用する断片とは、例えば、上述したhiAQPが有するアミノ酸配列中の任意の断片を意味し、例えば、細胞外ドメイン、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、疎水性ドメイン、親水性ドメイン、NPAボックスを含有する断片等を挙げる事ができ、またこれら断片を融合させた断片を挙げる事ができる。

#### 【0016】hiAQP遺伝子取得方法

本発明のhiAQP遺伝子はいかなる方法で得られるものであっても良い。例えば、本発明のhiAQPをコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法(Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979)等を用いることができる。全RNAからのポリ(A)<sup>+</sup>RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはhiAQPのアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し(Mol. Cell Biol., 2, 161, 1982、Mol. Cell Biol., 3, 280, 1983、Gene, 25, 263, 1983)、この様にして得られたcDNA鎖を、例えばE.coli RNaseH、E.coli DNA polymerase 1、E.coli DNA ligaseで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターに組み込み、大腸菌等を形質転換して、あるいはインビトロパッケージングを施した後、大腸菌等にトランスフェクトすることによりcDNAライブラリーを作製することができる。

【0017】ここで用いることができるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特

に制限されなく、ファージベクターについても宿主内で増殖できるものであれば特に制限されない。クローニング用ベクターとして、例えば、pBR322、pUC19、gt10、gt11等が挙げられる。また、免疫学的スクリーニングに供する場合には、宿主内でhiAQP遺伝子を発現させることができるプロモーターを有するベクターであることが好ましい。

【0018】プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、Maniatisらの方法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)等を参考にすることができる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、Hyunhらの方法(DNA cloning, a practical approach, 1, 49, 1985)等を参考にすることができる。

【0019】上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)がある。インビトロパッケージングは、市販のキット(Stratagene社製、Amersham社製)を用いることによって簡便に行うことができる。

【0020】上記方法によって作製されたcDNAライブラリーから、hiAQPタンパク質をコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング方法を組み合わせて行うことができる。例えば、<sup>32</sup>Pで標識したプローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961, 1975)、ブランクハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2, 108, 1989)により目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングすることができる。また、PCR法によりクローンを選択することもできる。さらに、cDNAを発現しうるベクターを用いてcDNAライブラリーを作製した場合には、hiAQPを認識する抗体を用いることにより目的のクローンを選択することができる。

【0021】また、hiAQP遺伝子を発現する細胞よりhiAQP遺伝子を単離する際には、例えば、該発現細胞をSDSまたはプロテナーゼKを用いて溶解し、フェノール処理を行う。不用のRNAは、リボヌクレアーゼにより消化して、得られるDNAを制限酵素により消化し、こうして生じるDNA断片をファージまたはコスミドで増幅してライブラリーを作製する。その後、目的のクローンを選択し、hiAQP遺伝子を取得することができる。

【0022】この様にして得られたDNAの塩基配列はマキサム・ギルバート法(Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 74, 560, 1977)またはサンガー法(Proc. Natl. Ac

ad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) によって決定することができる。hiAQP遺伝子は、上記得られたクローンから制限酵素等によって切り出すことにより得ることができる。

【0023】hiAQP塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hiAQP発現細胞ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、hiAQP塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法(Mattencchi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981)等の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

#### 【0024】発現ベクターの作製方法

本発明はまた、hiAQP塩基配列を含むことを特徴とするベクターも提供する。ベクターは例えば、hiAQPタンパク質を発現することができるものであれば特に制限されないが、プラスミドベクター、RNAベクター、DNAベクター、ウィルスベクター、ファージベクター等を用いることができる。具体的には、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptII、pBS、Phage script、pSG、pSV2CATもしくはPharmacia社製のpGEX、pUC18/19、pBPV、pSVK3、pSVL等が挙げられる。

【0025】発現ベクターにライゲーションしたhiAQPのcDNA配列は、プロモーターに機能的に連結させる。プロモーターは例えば、ファージPLプロモーター、E.coli lac、trp、tacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、T7およびT3プロモーター、レトロウィルスLTRプロモーターが挙げられる。特に、真核細胞に使用するプロモーターとしては、CMVプロモーター、HSVプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、レトロウィルスLTRプロモーター、RSVプロモーター、メタロチオネインプロモーターがある。また、発現ベクターは、形質転換した宿主を選択可能にすべきマーカーおよびエンハンサーを含有しても良い。マーカーには、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子等がある。エンハンサーには、SV40エンハンサー、サイトメガロウィルス初期エンハンサープロモーター、アデノウィルスエンハンサー等がある。

#### 【0026】形質転換細胞の作製方法

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中のhiAQPタンパク質を発現することが可能な全ての細胞(微生物を含む)が挙げられる。

【0027】本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、アフリカツメガエルの卵母細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、Sf9、Sf21、High FiveTM(登録商標)細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。これら宿主への導入は上記した方法を用いることができる。特に基礎的研究に使用する細胞としては、AQPファミリーの遺伝子が発現していないことが知られている、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いるのが好ましい。

【0028】本発明のhiAQP発現細胞は、消化管の水分調節に関わるhiAQP機能の解析に用いることができる。また、本発明の細胞は腸管における水分または低分子物質の調節機能低下に基づく各種疾患の治療・予防剤等の開発過程において有用な薬物のスクリーニングに用いることができる。また、糖鎖のあるhiAQPタンパク質の製造に用いることができる。

#### 【0029】タンパク質取得方法

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhiAQPを採取する、hiAQPの製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

【0030】本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする塩基配列により発現されたタンパク質のN末端側またはC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質が含まれる。発現したタンパク質の精製を容易にする目的で、細胞外分泌シグナルを有する融合タンパク質として発現させても良い。タンパク質の発現は、例えば、組換え発現後のアフリカツメガエルの卵母細胞の膜成分をSDS-PAGEを用いて分離した後、hiAQPのC末端側ペプチドを免疫原として得られるウサギ抗血清を用いたウェスタンブロット法により確認することができる。また、卵母細胞を固定し、hiAQPに対する抗体に蛍光標識を付し

た免疫蛍光法によっても確認することができる。また、タンパク質は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織、形質転換細胞等のタンパク質産生原料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法等の塩析、セファデックス等によるゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法および高速液体クロマトグラフィー法、免疫沈降法等の公知の精製方法を用いて得ることができる。

#### 【0031】遺伝子利用方法

配列番号1に記載の塩基配列に基づいて、hiAQP遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいはPCRの様な塩基の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。また、hiAQPタンパク質をコードする遺伝子変異の検出およびSNPの検出等にも用いることができ、hiAQP遺伝子変異によって生ずる疾患の診断に用いることができる。例えば、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患等の診断に利用できるものと予想される。また、hiAQP遺伝子を生体内に導入し発現させることによる遺伝子治療にも有用である。

【0032】さらに、本発明が提供するhiAQPのcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhiAQP遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 92, 3561, 1995)等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

#### 【0033】タンパク質利用方法

本発明のhiAQPタンパク質は、腸管における水分または低分子物質の調節機構の解明、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患等の発症機構の解明、さらにhiAQPに基づく疾患の診断、予防及び治療法、並びにそ

れらのための試薬や医薬の開発に利用できる可能性がある。また、hiAQPsに対する抗体を作製する際の抗原として用いることができる。さらに、以下に詳説するアゴニストまたはアンタゴニスト等、例えば腸管での水チャンネル機能に影響を及ぼすという点で有用であると考えられる薬物のスクリーニング方法にも利用できる。

#### 【0034】アゴニストおよびアンタゴニスト

本発明は、また、本発明のhiAQPの機能を刺激するアゴニストにも関する。本発明は、また、本発明のhiAQPの機能を阻害するアンタゴニストにも関する。特開平11-279194号には、アクアポリン分子自身のアミノ酸配列の一部を含むペプチドが、アクアポリン開口作用を有していることを示しており、本発明のアゴニストまたはアンタゴニストにはhiAQP自身のアミノ酸配列の一部を含むペプチドであってもよい。ペプチドは固相法、液相法、遺伝子工学的手法、酵素処理等の公知の技術を用いて合成でき、HPLC等を用いて精製することができる。

【0035】例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞にAQPのmRNAを注入すると、水の透過性を上昇させることが知られている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91,6269-6273, 1994、Science, 256, 385-387, 1992)。そこで、hiAQPの全長をコードするcRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、hiAQPタンパク質を発現させる。その後、低張な培養液中に卵母細胞を移し、hiAQPを注入していない対照群の卵母細胞体積と比較することにより水の透過性を求めることができる。

【0036】アゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングは、例えば、上記hiAQPタンパク質発現細胞に候補阻害剤とhiAQPに対する抗体を作用させる競合的実験系を用いることができ、hiAQPに対する抗体の結合割合から候補阻害剤をスクリーニングすることができる。その他、自体公知の方法によりアゴニストまたはアンタゴニストの同定、単離を行うことができる。また、アンタゴニストにはhiAQP遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸も含まれる。

#### 【0037】トランスジェニック非ヒト動物

本発明は、iAQP遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、iAQP遺伝子とは、iAQPをコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、iAQPの機能あるいは発現調節の研究、iAQPが関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

【0038】本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位(エンハンサー、プ

ロモーター、イントロン等)の一部に欠失、置換、付加および/または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

【0039】トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞(ES細胞)を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

【0040】本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、iAQPの機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

【0041】トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法(マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号)、胚性幹細胞(ES細胞)を使用する方法などがある。その他、レトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

【0042】精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である(M. Lavit-ranoetら、Cell, 57, 717, 1989)。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウイルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

【0043】マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

【0044】まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリAシグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左

右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量に変化することが判明しているため、予めポリAシグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス(5~6週齢)、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

【0045】効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物(偽妊娠雌マウス等)を用意し、一匹に対して約10~15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときにのみ活性化されるマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンを発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロットングを行ってもよい。

#### 【0046】ノックアウトマウス

本発明のノックアウトマウスは、iAQP遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス(キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう)と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

【0047】相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚

幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

#### 【0048】抗体の作製方法

本発明はまた、h i A Q Pまたはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。h i A Q Pまたはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のh i A Q Pまたはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。特に、h i A Q Pの機能を制御できる抗体は抗体含有医薬品として有用である。

【0049】本発明のh i A Q Pまたはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、好ましくはマウスおよびラットが用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

【0050】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化h i A Q Pと抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495, 1975)やその変法(J. Immunol. Methods, 39, 285, 1980; Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981; Nature, 285, 446, 1980)に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

【0051】骨髄腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用い

られる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗h i A Q P抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、h i A Q P抗原を直接または担体と共に吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗h i A Q P抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したh i A Q Pを加え、固相に結合した抗h i A Q Pモノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

【0052】抗h i A Q Pモノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗h i A Q P抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ(RIA)法、酵素免疫測定法(ELISA)法、FIA(蛍光イムノアッセイ)法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

【0053】ELISA法によるスクリーニングは以下の方法に準じて行うことができる。免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を

用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化するので、スクリーニングが可能となる。

【0054】クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェル当たり1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能を高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で増殖させる(J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982)ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0~20%のFCS(胎児ウシ血清)を含む細胞培養用培地(IMDM, DMEM, RPMI 1640およびMEM等)を用いて行うことができる。動物の腹腔内で増殖させる場合は、細胞融合に使用した骨髄腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1~2週間後腹腔内に骨髄腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

【0055】本発明によるモノクローナル抗体は、hiAQPに特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとして行うことができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも5以上のアミノ酸残基、望ましくは7~20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも5アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるhiAQP特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2および4に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、hiAQPに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することが

できる。

【0056】抗hiAQPモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体(例えばDEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05~2%の濃度で添加する。その他、グリシン、L-アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、D-プロピオノラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

【0057】本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(タンパク質抗原)自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノク

ローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

#### 【0058】抗体の利用方法

h i A Q P またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、h i A Q P を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明の h i A Q P またはその断片との免疫学的な結合に基づき、h i A Q P またはその断片を測定することができる。具体的にこれらの抗体を用いて h i A Q P またはその断片を測定する 10 方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とにより h i A Q P またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化 h i A Q P と検体中の h i A Q P またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中の h i A Q P またはその断片を測定する競合法を利用して検体中の h i A Q P またはその断片を測定する方法が挙げられる。

【0059】サンドイッチ法による h i A Q P またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体と h i A Q P またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体 - h i A Q P 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体および h i A Q P またはその断片を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

【0060】測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0061】抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N - スクシニイミジル - 4 - ( N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレートおよび N - スクシニイミジル - 2 - マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシサクシニミドエステル法、N - サクシミジル - 3 - ( 2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる 2 種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対 50

する第 3 の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

【0062】標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$  - D - ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ - 5 - ステロイドイソメラーゼ、 $\beta$  - グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては  $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができる。過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

【0063】標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用い、発色剤として 2, 2' - アジノ - ジ - [ 3 - エチルベンズチアゾリンスルホン酸 ] アンモニウム塩 ( A B T S )、5 - アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4 - アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素に  $\alpha$  - D - ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン - ジ - (  $\alpha$  - D - ガラクトピラノシド)、4 - メチルウンベリフェニル -  $\alpha$  - D - ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

【0064】架橋剤としては、N, N' - オルトフェニレンジマレイミド、4 - ( N - マレイミドメチル) シク

ロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばFab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

【0065】測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液等の体液、各種細胞、組織、糞便等、hiAQPを含む試料であれば限定されない。

#### 【0066】ヒト化抗体の作製方法

ヒトに任意の抗原を免疫して抗体を製造することは倫理上不可能である。また、マウスモノクローナル抗体をヒトの体内に投与すると、ヒトにとっては異種タンパクであるので種々の副作用が起こる危険性がある。そこで、ヒトに抗体を投与する場合にはヒトに対し抗原性を低くした抗体が好ましい。

【0067】ヒトモノクローナル抗体の作製方法には細胞融合法以外にも、エプスタイン・パール(Epstein-Barr)ウイルス(EBV)で形質転換する方法、さらにはその形質転換した細胞を親細胞と融合させる方法、遺伝子工学を利用しキメラ抗体、ヒト化抗体を作製する方法などがある。キメラ抗体とは異種の動物の免疫グロブリン遺伝子断片をつなげて作製された抗体であり、ヒト化抗体とはマウスなどにヒトにとって異種の抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部(CDR)以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置換した抗体をいう。

【0068】キメラ抗体の作製方法として、まずマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部(V領域)を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体定常部(C領域)遺伝子と結合してキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子を宿主細胞で発現させれば、ヒト・マウス・モノクローナル抗体が産生できる。キメラ抗体はヒトに対する抗原性が少ないため、ヒト体内に投与する治療用や画像診断用モノクローナル抗体等として利用できる。公知のキメラ抗体の関連技術として、特開平05-304989号、特開平04-330295号、W09106649、特開昭63-036786号、特公平06-98021号等がある。

【0069】また、最近キメラ抗体よりも有用であるといわれるヒト化抗体が開発された。ヒト化抗体とは抗体

分子の抗原結合部位(CDR: Complementary determining region、相補性決定領域)の遺伝子配列のみをヒト抗体遺伝子に移植(CDRグラフィング)し、抗体分子のCDRを除いた全分子をヒト化した抗体である。本抗体はヒト・マウス・キメラ抗体より、マウスの抗体部分が少ないため、抗原性が少なく安全性が高いと言われている。ヒトモノクローナル抗体作製の親細胞は、ヒト/マウスのヘテロミエロームであるSHM-D 33株(ATCC CRL 1668)またはRF-S1株を用いるとマウスの親細胞と同等の高い融合効率を得られる。これらの親細胞を用いて得られたハイブリドーマはフィーダー細胞なしでクローニングが可能であり、IgGタイプの抗体を比較的安定にしかも大量に産生することができる。親細胞の培養には、15% FCSを加えたERDF培地を用い、その他の操作はマウスの場合と同様である。また、IgGタイプのヒトモノクローナル抗体を作製するには抗原で十分に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合にはin vitroで抗原感作を行うこともできる。我が国では現在、成人性T細胞白血病に対するヒト化抗体の臨床試験が行われている。ヒト化抗体の製造方法およびその関連技術については、米国Genentech社(W09222653、W09845332、W09404679、W09837200、W09404679、)および英国Celltech社(W09429451、W09429351、W09413805、W09306231、W09201059、W09116927、W09116928、W09109967、W08901974、W08901783)等が特許出願している。

【0070】上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

#### 【0071】組成物

hiAQPポリヌクレオチドまたはタンパク質は、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患等の診断、予防および治療法、並びにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できる可能性がある。また、これら公知の医薬との併用または配合もできる。

【0072】本発明の医薬組成物はhiAQPポリヌクレオチドおよびタンパク質、hiAQPタンパク質の機能を刺激する物質(アゴニスト)または阻害する物質(アンタゴニスト)、hiAQPタンパク質に対する抗体等の物質(以下、これらを総じてhiAQP関連物質と称す)等が含まれる。hiAQP関連物質は、そのままあるいは水に希釈する等の各種処理を施して使用することができるが、医薬品、医薬部外品等に配合して使用することができる。この場合、該物質の配合量は製品に応じて適宜選択されるところではあるが、通常全身投与製剤の場合には、0.001~50重量%、特に0.01~10重量%とすることができ、0.001%より少ないと満足する作用が認められない可能性があり、また、50%を越えると製品そのものの安定性や香味等の

特性が損なわれる可能性がある。

【0073】投与経路は経口投与および静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与等が適宜選択できる。

【0074】本発明のhiAQP関連物質は塩として製剤中に含有されていてもよい。薬剤学的に許容される塩としては、例えば無機塩基、有機塩基等の塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩等が挙げられる。無機塩基としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム、アンモニウム等が挙げられる。有機塩基としては、例えば、エタノールアミン等の第一級アミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン等の第二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミン等の第三級アミン等が挙げられる。無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられる。有機酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シユウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられる。塩基性アミノ酸としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等が挙げられる。酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

【0075】経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤およびシロップ剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、パッカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。

【0076】前記示した剤型について、公知のドラッグデリバリーシステム(DDS)の技術を採用することができる。本明細書に言うDDS製剤とは、除法化製剤、局所適用製剤(トローチ、パッカル錠、舌下錠等)、薬物放出制御製剤、腸溶性製剤および胃溶性製剤等、投与経路、バイオアベイラビリティ、副作用等を勘案した上で、最適の製剤形態にした製剤を言う。

【0077】DDSの構成要素には基本的に薬物、薬物放出モジュール、おおいおよび治療プログラムから成り、各々の構成要素について、特に放出を停止させた時に速やかに血中濃度が低下する半減期の短い薬物が好ましく、投与部位の生体組織と反応しないおおいが好まし

く、さらに、設定された期間において最良の薬物濃度を維持する治療プログラムを有するのが好ましい。薬物放出モジュールは基本的に薬物貯蔵庫、放出制御部、エネルギー源および放出孔または放出表面を有している。これら基本的構成要素は全て揃っている必要はなく、適宜追加あるいは削除等を行い、最良の形態を選択することができる。

【0078】DDSに使用できる材料としては、高分子、シクロデキストリン誘導体、レシチン等がある。高分子には不溶性高分子(シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、エチルセルロース、セルロースアセテート等)、水溶性高分子およびヒドロキシルゲル形成高分子(ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート架橋体、ポリアクリル架橋体、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、水溶性セルロース誘導体、架橋ポロキサマー、キチン、キトサン等)、徐溶解性高分子(エチルセルロース、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステル等)、胃溶性高分子(ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースナトリウム、マクロゴール、ポリビニルピロリドン、メタアクリル酸ジメチルアミノエチル・メタアクリル酸メチルコポリマー等)、腸溶性高分子(ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、アクリル酸系ポリマー等)、生分解性高分子(熱凝固または架橋アルブミン、架橋ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、ポリシアノアクリレート、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリヒドロキシ酢酸、ポリカプロラクトン等)があり、剤型によって適宜選択することができる。

【0079】特に、シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルは薬物の放出制御に使用でき、セルロースアセテートは浸透圧ポンプの材料として使用でき、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロースは徐放性製剤の膜素材として使用でき、ポリアクリル架橋体は粘膜付着剤として使用できる。

【0080】また、製剤中にはその剤形(経口投与剤、注射剤、座剤等の公知の剤形)に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤等の添加剤を加えて製造することができる。

【0081】それぞれ具体例を挙げて例示するが、これらに特に限定されるものではない。

〔溶剤〕精製水、注射用水、生理食塩水、ラッカセイ

油、エタノール、グリセリン  
 〔賦形剤〕デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトール、〔コーティング剤〕白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロースおよび上記した高分子  
 〔基剤〕ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤  
 〔結合剤〕デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴム等の天然高分子化合物、ポリビニルピロリドン等の合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ  
 〔滑沢剤〕ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、コムギデンプン、マクロゴール、水素添加植物油、シヨ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール  
 〔崩壊剤〕デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロース  
 〔溶解補助剤〕シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール  
 〔懸濁化剤〕アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤  
 〔粘稠剤〕カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム  
 〔乳化剤〕アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチン  
 〔安定剤〕亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質  
 〔緩衝剤〕リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸  
 〔等張化剤〕塩化ナトリウム、ブドウ糖  
 〔無痛化剤〕塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコール  
 〔保存剤〕安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロプタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサール  
 〔矯味剤〕白糖、サッカリン、カンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリン  
 〔芳香剤〕トウヒチンキ、ローズ油  
 〔着色剤〕水溶性食用色素、レーキ色素。

#### 【0082】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がこれら実施例により限定的に理解

されるべきでないことはもちろんである。

#### 【0083】サブクローニング

ヒト小腸cDNAライブラリー（TAKARA社製）を鋳型にして、センス鎖（1回目）：SYG GBG SHC ACH TSA ACC C（配列番号3）、センス鎖（2回目）：CTG GAT CCA AC C CDG CNG TSW CHB TDG C（配列番号4）、アンチセンス鎖（1および2回目）：TGA ATT CGG DCC MAR RKM NC R RGC（配列番号5）のプライマーを用いてセミヌステッドPCRを施行し、それをサブクローニングした。1回目のPCRの反応液組成は、鋳型を5 $\mu$ L、10 $\times$ PCRバッファーを5 $\mu$ L、dNTPを5 $\mu$ L、Taqを0.5 $\mu$ L、上記1回目のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを各100pmolを加え、全量で50 $\mu$ Lとした。PCR条件は、94 $^{\circ}$ C、1分、50 $^{\circ}$ C、1分、72 $^{\circ}$ C、1分を1サイクルとし、30サイクル行った。2回目のPCRの反応液組成は、1回目のPCR産物を5 $\mu$ L、10 $\times$ PCRバッファーを5 $\mu$ L、dNTPを5 $\mu$ L、Taqを0.5 $\mu$ L、上記2回目のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを各100pmolを加え、全量で50 $\mu$ Lとした。PCR条件は1回目と同様に施行した。2回目のPCRで得られたPCR産物（約400塩基対）をEcoR1/BamH1で制限酵素処理したpGEM3Zベクター（Promega社）にライゲーションした。その後、エレクトロポレーション法で大腸菌MC1061株を形質転換し、LB（Amp $^r$ ）プレート（100 $\mu$ g/mLのアンピシリンを含有）に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミドを抽出し、蛍光シーケンサー（ABI社）を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列につきGenBankで相同性を調べ、新規のクローン、hiAQPを明らかにした。

#### 【0084】アンチセンスRNAプローブの作製

サブクローニングにて得られたhiAQPのDNA断片（配列番号1に示す塩基番号304~691）をインサートに含むpGEM3Zベクター（Promega社）を、制限酵素BamH1を用いてプラスミドDNAの直線化を行った。その後、フェノール抽出、エタノール沈殿をし、0.1 $\mu$ g/ $\mu$ LとなるようにDNAを精製水に溶解し、鋳型DNAを作製した。

【0085】次に、10 $\times$ 転写バッファー2 $\mu$ L、100mM DTT 2 $\mu$ L、RNasin（登録商標）40U、ATP、GTP、CTP（各2.5mM）混合液4 $\mu$ L、240 $\mu$ M UTP 1 $\mu$ L、鋳型DNA（0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L）4 $\mu$ L、 $\gamma$ -32P-UTP（10~20 $\mu$ Ci/ $\mu$ L）2 $\mu$ L、RNAポリメラーゼ（15~20U/ $\mu$ L）1 $\mu$ Lを全量20 $\mu$ Lとなるよう精製水で調製し、37 $^{\circ}$ C、60分間反応させた。25UのDNase（RNaseフリー）を加え、37 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、鋳型DNAを消化させた。フェノール/CIAA、CIAA抽出し、酢酸アンモニウムを加えてエタノール沈殿を行った。その後、20 $\mu$ Lのハイブリダイゼーションバッファーに溶解し、-20 $^{\circ}$ Cで保存し、アン

チセンスRNAプローブを作製した。RNaseプロテクションアッセイでは<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションでは<sup>35</sup>Sでラベルしたプローブを作製した。

#### 【0086】コロニーリフト

ヒト小腸cDNAライブラリー(組換菌体型)(TAKARA社)を径1.4cmのLB(Amp<sup>+</sup>)プレート数枚に、1枚当たり1×10<sup>5</sup>cfuとなるように播き培養した。コロニーをナイロンメンブレンに写しとり、常法通り<sup>32</sup>PでラベルしたアンチセンスRNAプローブとハイブリダイゼーションを施行した。陽性のコロニーを1個分離することができた。

#### 【0087】シーケンス

コロニーリフトにて分離されたクローンから常法通りにプラスミドを抽出した。そのプラスミド内の既知の配列よりプライマーを作製し、蛍光シーケンサー(ABI社)を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。新たに解読できた塩基配列をもとに、次々に新しくプライマーを作製しシーケンスを行った。その結果、5'-UTRおよびポリAを含む*hiAQP*のcDNAの全長(約2.3Kb)を決定した(配列番号1)。

#### 【0088】RNaseプロテクションアッセイ

組織の全RNAと、<sup>32</sup>PラベルしたアンチセンスRNAプローブを用いてRNaseプロテクションアッセイ(Koyama, Y et al.; J. Biol. Chem., 272, 30329-30333, 1997; Yamamoto, T. et al.; Am. J. Physiol., 272, F198-F204, 1997; Melton, D. A. et al.; Nucl. Acids Res., 12, 7035-7056, 1984; Kreig, P. A. et al.; Methods in Enzymology, 155, 397-415, 1987; Sambrook, J. et al.; Molecular cloning, A laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press, 1989)を行った。アンチセンスRNAプローブは、バクテリオファージのT7プロモーターとRNAポリメラーゼを用いた*in vitro*転写系を利用した。

【0089】各組織RNAサンプル0.5μgをエタノールに沈殿させドライアップを行った。また、上記<sup>32</sup>PでラベルしたアンチセンスRNAプローブも真空乾燥機でドライアップを行い、30μLのハイブリダイゼーションバッファーに溶解させた。これらを混合し、85℃、5分間加熱、変性後、45℃で12時間アニールさせた。その後冷却し、終濃度40μg/mL RNaseA、2μg/mL RNaseT1に調製したRNase 300μLを加え、30分間反応させた。10% SDS 10μL、プロテナーゼK 5μLを添加し、37℃、30分反応させRNaseを失活させた。次に、100μLのフェノール/CIAAを加え抽出後、30μgのtRNAと300μLの100%エタノールを加えてエタノール沈殿を行い、ドライアップし5μLのサンプル泳動用バッファーに溶解させた。

【0090】95℃、5分間熱処理後、6%の変性ポリ

アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*hiAQP*のmRNAは十二指腸と空腸のみに認められた(図1)。レーン1:食道、レーン2:胃、レーン3:十二指腸、レーン4:空腸、レーン5:回腸、レーン6:虫垂、レーン7:大腸、レーン8:直腸、レーン9:肝臓、レーン10:胆のう、レーン11:大脳、レーン12:唾液腺、レーン13:肺、レーン14:心臓、レーン15:腎臓、レーン16:精巣、レーン17:胎盤。

#### 【0091】*in situ* ハイブリダイゼーション

空腸の凍結切片と<sup>35</sup>Sでラベルした上記アンチセンスRNAプローブを用いた*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。すなわち、空腸の凍結切片は、室温下乾燥させ、4%パラホルム溶液、PBSにて固定し、PBSを用いて洗浄した。その後、プロテナーゼK 5μg/mL、500mM NaClを含む10mM Tris-HClで10分間処理し、組織を調製した。組織切片にプローブを含んだハイブリダイゼーションバッファーをかけ、55℃、一晚反応させた。その後、4×SSCにて洗浄し、2×SSC、10mM β-メルカプトエタノール、1mM EDTAで室温下、10分間×2回洗浄した。その後RNase A 20μg/mLを含む500mM NaCl、10mM Tris-HClで37℃、30分間処理した。次に、0.1×SSC、1mM EDTA、10mM β-メルカプトエタノールで55℃、4時間、続いて0.5×SSCで室温下、10分間×2回洗浄した。最後に、エタノールを用いて脱水し、オートラジオグラフィーに供した。その結果、*hiAQP*のmRNAは吸収上皮細胞、特に絨毛先端部の吸収上皮細胞にシグナルが認められた。

#### 【0092】アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた機能的発現解析

*hiAQP*が有する水の透過性を調べるために、AQPファミリーが発現していないことが知られているアフリカツメガエルの卵母細胞を用い、Science, 256,385-387, 1992、およびProc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6269-6273の方法に準じて行った。また、アフリカツメガエルの卵母細胞はProc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6585-6589, 1985に準じて行った。

【0093】*hiAQP* cDNA (5'-UTRおよびポリAを含む)含有プラスミドをNotIで制限酵素処理し、直線化を行った。これを鋳型として、常法通りにCapped cRNAを作製した。

【0094】雌性アフリカツメガエルを麻酔し、ステージ5または6の卵母細胞を単離した。単離した卵母細胞をmodified Barth's buffer(以下、mBBと称す)(15mM Tris-HCl、88mM NaCl、1mM KCl、2.4mM NaHCO<sub>3</sub>、0.33mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、0.41mM CaCl<sub>2</sub>、0.82mM MgSO<sub>4</sub>、ペニシリン+ストレプトマイシン 10μg/mL、pH=7.6)に浮遊させた。次に、

タイプIIコラゲナーゼ2mg/mLで瀟胞細胞を除去し、洗淨後、12時間培養し、実験用卵母細胞を調製した。調製した卵母細胞にhiAQPのcRNA10ngを50nLの精製水に溶解し(コントロールは50nLの精製水のみ)滅菌したガラス製マイクロピペットを用いてマイクロインジェクションした。20、200mOsmのmBBで48時間インキュベーションした後、70mOsmのmBBに卵母細胞を移し、そのサイズの変化をビデオマイクロコピー(顕微鏡:OLYMPUS(SZH10)、CCDカメラ:Ikegami(FCD-10)にてモニターした。

【0095】低浸透圧へ移す前の体積(Vo)と低浸透圧へ移して2分後の体積(V)を計測した。V/Voを計算し、水透過性の増加の程度を比較した。

式

$$V/Vo = (A/Ao)^{3/2}$$

Ao: 低浸透圧へ移す前の面積

A: 低浸透圧へ移して2分後の面積

(Science, 256, 358-387, 1992)

その結果、水の透過性は有意に上昇した(図2参照)。\*

\*尚、ポジティブコントロールとして、ヒトAQP8(Genbank Accession No. AF067797)のcRNAをインジェクションした卵母細胞も同様に計測した。

【0096】

【発明の効果】本発明のhiAQPタンパク質は、アクアポリンファミリーに共通の構造を有しており、それらに特有の機能を有している。従って、腸管における水分または低分子物質の調節機能の解明、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患等の発症機構の解明、さらにhiAQPに基づく各種疾患の診断、予防及び治療法、並びにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できるものである。

【図面の簡単な説明】

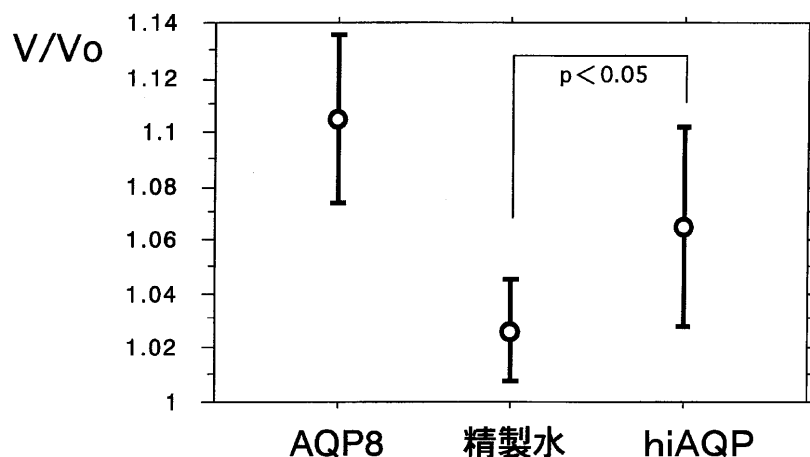
【図1】本発明の新規ヒトアクアポリン(hiAQP)のmRNAの組織特異的発現を表す、プロテクションアッセイによって得られた泳動パターンを示す図である。

【図2】hiAQPが有する水透過性の機能をアフリカツメガエル卵母細胞を用いて調べた結果を示すグラフである。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成13年9月4日(2001.9.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正内容】

【0096】

【発明の効果】本発明のhiAQPタンパク質は、アク

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Novel Human Aquaporin

<130> 2000PA0161

<160> 5

<210> 1

<211> 2306

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (43)...(834)

<400> 1

cccgggagag ggagcagtga atagcaatag ggtg

tttcca cc atg gtc ttc act 54

Met Val Phe T

hr

1

cag gcc ccg gct gaa atc atg ggc cac ctc

cgg ata cgc agc ctc ctg 102

Gln Ala Pro Ala Glu Ile Met Gly His Leu

Arg Ile Arg Ser Leu Leu

5

10

15

20

アポリンファミリーに共通の構造を有しており、それらに特有の機能を有している。従って、腸管における水分または低分子物質の調節機能の解明、炎症性腸疾患などの下痢をきたす各種疾患等の発症機構の解明、さらにhiAQPに基づく各種疾患の診断、予防及び治療法、並びにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できるものである。

【配列表】

	25	30	35
ctc acc caa gga gct gtg gcc cag gct gtc			
acc agt gga gaa acc aaa	198		
Leu Thr Gln Gly Ala Val Ala Gln Ala Val			
Thr Ser Gly Glu Thr Lys			
	40	45	50
ggc aac ttc ttc acc atg ttt ctg gct ggc			
tct ctg gcc gtt acg ata	246		
Gly Asn Phe Phe Thr Met Phe Leu Ala Gly			
Ser Leu Ala Val Thr Ile			
	55	60	65
gcc atc tac gtg ggt ggt aac gtc tca ggg			
gcc cac ctg aat cca gcc	294		
Ala Ile Tyr Val Gly Gly Asn Val Ser Gly			
Ala His Leu Asn Pro Ala			
	70	75	80
ttc tcc ctg gcc atg tgc atc gtt gga cgc			
ctc ccc tgg gtc aag ctc	342		
Phe Ser Leu Ala Met Cys Ile Val Gly Arg			
Leu Pro Trp Val Lys Leu			
85	90	95	10
0			
ccc att tac atc ttg gtg cag ttg ctg tct			
gct ttc tgt gct tgc gga	390		
Pro Ile Tyr Ile Leu Val Gln Leu Leu Ser			
Ala Phe Cys Ala Ser Gly			
	105	110	115
gcc acc tat gtt ctc tac cat gat gcc cta			
cag aac tat aca ggt ggg	438		
Ala Thr Tyr Val Leu Tyr His Asp Ala Leu			
Gln Asn Tyr Thr Gly Gly			
	120	125	130
aac ctg aca gtg act ggc ccc aag gag aca			
gcc tcc att ttt gcc acc	486		
Asn Leu Thr Val Thr Gly Pro Lys Glu Thr			
Ala Ser Ile Phe Ala Thr			
	135	140	145
tat cct gcc ccc tat ctg tcc ctg aac aat			
ggc ttc ctg gat cag gtt	534		
Tyr Pro Ala Pro Tyr Leu Ser Leu Asn Asn			
Gly Phe Leu Asp Gln Val			
	150	155	160
ctg ggc acc ggg atg ctg att gtg ggg ctc			
ttg gcc atc ctg gac aga	582		
Leu Gly Thr Gly Met Leu Ile Val Gly Leu			
Leu Ala Ile Leu Asp Arg			
165	170	175	1
80			
cgg aac aag gga gtc cct gcg ggt ctg gag			
cct gtg gtg gtg ggg atg	630		
Arg Asn Lys Gly Val Pro Ala Gly Leu Glu			
Pro Val Val Val Gly Met			
	185	190	195

aaggctaagg gagtcactcc tgataccttc ccac  
tgtcct tcttttgag tgctggaat 1234  
ggctggtggt gggcgctgt ggtggcccct ctgg  
tggggg ccactgttg cacagccact 1294  
taccagctgt tggggctct gcaccaccct gagg  
gcccag agccagctca ggatctggtg 1354  
tctgctcaac acaaagcctc agagttggaa actc  
ctgcct cagctcagat gctggagtgt 1414  
aagctatgat taggacaacc ctcaattcac tcat  
ggaccc tggagccagc cactgacccc 1474  
gcctggaac aacagtcatt ctctctttt gttt  
atgtgc cagaacctgg gaggcttctc 1534  
tgtttatctg tttggcatcc ctctccta aact  
aagaag gatcctggac agggagaagt 1594  
ggaggaggat aaggtaccag gactcaggct tctc  
atcccc tcctcccgca aagcggtttt 1654  
ctgaccctca gggcctctcg gaatgtagt gctc  
gaggta accgctagag ggtgcgacc 1714  
tggatgctgg atggggacgg ctgcgggcat ctgc  
agggtg gagggggcca ccatccagtg 1774  
tagggcacia ccctggggac tgcctccat agcc  
tgtccc gactgccgac tcctagctct 1834  
catgcctcg ggcctccca cctcaccct ctcg  
gggatg cctcccaag agggtagtta 1894  
ggggtgggga agccgcctcc accaggggg cgtg  
gtgggg gcggaggga ggagggcggc 1954  
ggggcacaga gacagagagc aaggctgtga aact  
gaggca ccgttcctag acatctcgg 2014  
gctgtgtcgt tcattcaagg agagttgaga taca  
gtgaaa tgagccagg cgaggaggga 2074  
gggtgaagga acggagggcg ggcggctccg agga  
gcgaaa gtcgggctga gggcaacctg 2134  
gcgccaggga aaattctggt tattcaccac ttct  
acagct ctctgccgc tcctgcaga 2194  
ggatgctcgt ttgcagaga aggcagtgt cctc  
tattcc ctcttccga attaaaata 2254  
ccccctcaga gcgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa  
aaaaaa aaaaaaaaaa aa 2306

<210> 2

<211> 264

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> MPA Box, Consensus Aquapo

rin Sequence

<222> (82)...(84)

<220>

<221> NPA Box, Consensus Aquapo

rin Sequence

<222> (214)...(216)

<400> 2

Met Val Phe Thr Gln Ala Pro Ala Glu Ile

Met Gly His Leu Arg Ile

Leu Asp Gln Val Leu Gly Thr Gly Met Leu  
 Ile Val Gly Leu Leu Ala  
 165 170 175

Ile Leu Asp Arg Arg Asn Lys Gly Val Pro  
 Ala Gly Leu Glu Pro Val  
 180 185 190

Val Val Gly Met Leu Ile Leu Ala Leu Gly  
 Leu Ser Met Gly Ala Asn  
 195 200 205

Cys Gly Ile Pro Leu Asn Pro Ala Arg Asp  
 Leu Gly Pro Arg Leu Phe  
 210 215 220

Thr Tyr Val Ala Gly Trp Gly Pro Glu Val  
 Phe Arg Trp Glu Thr Asp  
 225 230 235 2

40

Ser Pro Gly Ala Gly Leu His Ser Pro Ser  
 Ser Ala Lys Gly Ser Val  
 245 250 255

Pro Gly Ser Thr Ala Leu Cys Leu  
 260

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed Oligonucleotide

of Sense Strand of the First PCR prime  
r f

or Screening hiAQP.

&lt;400&gt; 3

syggbgshca chtsaacc

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed Oligonucleotide

of Sense Strand of the Second PCR prim  
er

for Screening hiAQP.

【手続補正2】 &lt;400&gt; 4

【補正方法】変更

【補正対象書類名】図面 atccaa cccdcngts wchbtdgc

【補正内容】

【補正対象項目名】図2 &lt;210&gt; 5

【図2】

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

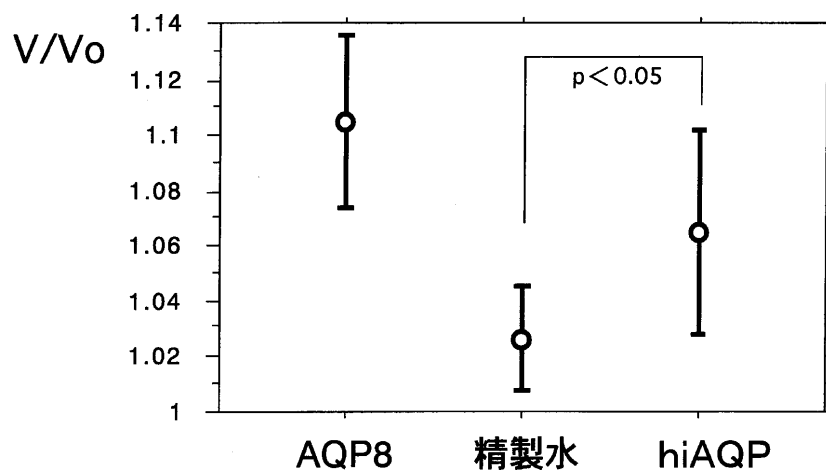
&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed Oligonucleotide

of Antisense Strand of the First and S  
eco

nd PCR primer for Screening hiAQP.



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)	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 P	21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q	1/02	
	21/08	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50		33/577	B
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/577		5/00	B

F タ-ム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BB20 CB01  
 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14  
 DA36 DA77 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09  
 CA20 DA02 DA06 EA04 GA12  
 HA13 HA14  
 4B063 QA05 QQ21 QQ41 QQ61 QQ89  
 QR74 QR75 QR77 QR80 QS38  
 QS39 QX01 QX10  
 4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19  
 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA26X AA90X AA93Y BA01  
 BA04 BB01 BC01 BD50 CA24  
 CA44 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50  
 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	新的人类水通道蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001352983A</a>	公开(公告)日	2001-12-25
申请号	JP2000109452	申请日	2000-04-11
申请(专利权)人(译)	扶桑制药工业有限公司		
[标]发明人	山本格 畠山悟		
发明人	山本格 畠山悟		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA12 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR74 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS38 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX10 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/BA01 4B065/BA04 4B065/BB01 4B065/BC01 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
其他公开文献	JP2001352983A5 JP4542222B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题: 阐明水或低分子量物质在肠道中的调节功能, 阐明引起腹泻的各种疾病(如炎症肠病)的发病机制, 进行诊断, 预防和治疗, 并为此提供试剂和药物。提供可用于开发的新水通道蛋白。A1一种蛋白质, 其具有由264个氨基酸组成的氨基酸序列, 该264个氨基酸由特定序列, 其衍生物或片段以及编码该蛋白质的碱基序列组成。

