(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. 7
C12N 15/54

(11) 공개번호 특2002 - 0093017
(43) 공개일자 2002년12월12일

---

(21) 출원번호 10 - 2002 - 7013149
(22) 출원일자 2002년10월01일
번역문 제출일자 2002년10월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/09664
(86) 국제출원출원일자 2001년03월26일
(87) 국제공개번호 WO 2001/74837
(87) 국제공개일자 2001년10월11일

---

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 안티구아바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 - 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨, 콜롬비아,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 60/194,318 2000년04월03일 미국(US)
09/817,676 2001년03월26일 미국(US)

(71) 출원인
상꾜 가부시키가이샤
일본 도쿄 쥬오꾸 니혼바시 혼쵸 3죠메 5방 1고
조지타운 유니버시티
미합중국 워싱턴 디시 20057 엔.더블유.오 스트리트 37번가

(72) 발명자
스피겔사라
미국22101버지니아주맥린린웨이테라스6343
고하마다까후미
일본도꾜도기요세시모또마찌1 - 4 - 5 - 614

(74) 대리인 특허법인코리아나

심사청구 : 없음

---

(54) 포유동물 스핑고신 키나제 유형 2 이성체, 이의 클로닝,발현 및 사용 방법

요약

마우스 및 인간 스핑고신 키나제 유형 2 이성체를 코딩하는 핵산, 스핑고신 활성을 저해 또는 촉진하는 작용제 또는 약물의 검출 방법, 및 이같은 핵산에 의해 코딩되는 펩티드 또는 이러한 펩티드에 대한 항체를 함유하는 치료제.

대표도

도 1A-1

명세서

관련 출원에 대한 전후 참조

본 출원은 2000년 4월 3일 출원된 가출원 일련 번호 60/194,318 호를 35 USC 119(e) 하에 우선권으로 청구한다.

정부의 권리

본 발명은 미국 국립보건연구원으로부터의 보조금 GM 43880 및 미합중국 육군 의학 연구 및 자재 사령부, 전립선암 연구 프로그램 (VEN)으로부터의 박사후 장학기금 BC961968 하에 미합중국 정부의 지지를 받아 발명되었다. 미합중국 정부는 본 발명에 대한 일부 권리를 갖는다.

기술분야

본 발명은 포유동물 (예컨대 마우스 및 인간) 스핑고신 키나제 유형 2 이성체, 이같은 이성체의 분자 클로닝 및 이같은 이성체의 사용 방법에 관한 것이다. 스핑고신 키나제 유형 2는 스핑고신 키나제 유형 1과 비교하여 독특한 특징을 갖는다.

배경기술

스핑고신-1-포스페이트 (SPP)는 세포 내부에서 증식 및 생존을 조절하는 제 2 메신저로서 및 세포 외부에서 EDG-1 서브패밀리의 G-단백질-커플링 수용체에 대한 리간드로서 작용하여 다양한 생물학적 프로세스를 조절하는 생활성 스핑고지질 대사물이다 (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol. ,65, (1999), 341-344; Goetzl, E.J., An, S. FASEB J.,12, (1998), 1589-1598). 따라서, SPP는 세포 성장 및 생존을 조절하는 제 2 메신저로서 중요한 역할을 한다 (Olivera, A., Spiegel, S., Nature ,365, (1993), 557-560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., 및 Spiegel, S., Nature ,381, (1996), 800-803).

많은 외부 자극, 특히 성장 및 생존 인자들은 스핑고신으로부터 SPP를 형성시키는 효소인 스핑고신 키나제 (" SPHK")를 활성화시킨다. 이러한 급속 성장 리스트에는 혈소판-유래 성장 인자 (" PDGF") (Olivera, A., Spiegel, S., Nature,365, (1993), 557-560; Pyne, S., Chapman, J. Steele, L., 및 Pyne, N.J., Eur. J. Biochem. ,237, (1996), 819-826; Coroneos, E., Martinez, M., McKenna, S. 및 Kester, M., J. Biol. Chem. ,270, (1995), 23305-23309), 신경 성장 인자 (" NGF") (Edsall, L. C., Pirianov, G. G., 및 Spiegel, S., J. Neurosci. ,17, (1997), 6952-6960; Rius, R.A., Edsall, L.C., 및 Spiegel, S., FEBS Lett.,417, (1997), 173-176), 비타민 D3 (Kleuser, B., Cuvillier, O., 및 Spiegel, S., Cancer Res. ,58, (1998) 1817-1824), 무스카린계 아세틸콜린 작동물질 (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., 및 van Koppen, C.J., EMBO J.,17, (1998), 2830-2837), TNF-a (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J., 및 Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,95, (1998), 14196-14201), 및 면역글로불린 수용체 FceR1 (Choi, O. H., Kim, J.-H., 및 Kinet, J.-P., Nature ,380, (1996), 634-636) 및 FcgR1 (Melendez, A., Floto, R. A., Gillooly, D. J., Harnett, M. M., 및 Allen, J.M., J. Biol. Chem. ,273(1998), 9393-9402)의 가교물이 포함된다.

이어서, 세포내 SPP는 InsP3에 독립적으로 내부 저장소로부터 칼슘을 가동화시키고 (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., 및 van Koppen, C.J., EMBO J.,17, (1998), 2830-2837; Mattie, M., Brooker, G, 및 Spiegel, S., Biol. Chem. ,269, (1994), 3181-3188), 뿐만 아니라 다양한 시그날링 경로를 유도하여 증식 (Rani, C.S., Berger, A., Wu, J., Sturgill, T. W., Beitner-Johnson, D., LeRoith, D., Varticovski, L., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,272, (1997), 10777-10783; Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R, Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., 및 Spiegel, S., J. Cell Biol. ,142, (1998), 229-240) 및 세포자멸사의 억제 (Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., 및 Spiegel, S., Nature ,381, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G., 및 Spiegel, S, J. Neurosci. ,17, (1997), 6952-6960; Van Brocklyn, J.R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., 및 Spiegel S., J. Cell Biol. ,142, (1998), 229-240)에 이르게 한다.

또한, 스핑고신 키나제의 경쟁적 저해제는 SPP의 형성을 차단하고 이러한 각종 자극에 의해 유도되는 칼슘 가동화, 세포 증식 및 생존을 선택적으로 저해한다 (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol. ,65, (1999), 341-344). 따라서, 스핑고지질 대사물, 세라마이드 및 SPP의 수준 간의 동적인 균형, 및 결과적인 대항 시그날링 경로의 조절이 세포의 운명을 결정하는 중요한 인자라는 것이 제안되었다 (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem.,273, (1998), 2910-2916). 예를 들어, 스트레스 자극은 세라마이드 수준을 증가시켜 세포자멸사에 이르게 하는 반면, 생존 인자는 SPHK를 자극하여 SPP 수준이 증가되도록 하고, 이는 세포자멸사를 억제한다 (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 2910-2916).

또한, SPP의 생성을 통하는 SPHK 경로는 TNF-a-유도 내피 세포 활성화의 매개에 결정적으로 수반되고 (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J., 및 Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,95, (1998), 14196-14201), 사이토카인-유도 부착 분자 발현을 저해하는 고밀도 지단배질 (HDL)의 능력은 이러한 스핑고지질 가감저항기를 재조정하는 이의 능력과 상호관련된다 (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J., 및 Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,95, (1998), 14196-14201). 이것은 아테롬성 동맥경화증 및 관련된 관상동맥 심질환의 발생에 반하는 HDL의 보호적 기능에 대한 중요한 의미를 갖는다. 최근의 데이타는 스핑고지질 가감저항기를 알레르기성 반응에 또한 연관시킨다 (Prieschl, E., E., Csonga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E., 및 Baumruker, T., J. Exp. Med. ,190, (1999), 1-8).

SPP가 G-단백질-커플링 세포 표면 수용체 EDG-1의 리간드라는 발견과 함께 SPP에 대한 관심이 최근 가속화되고 있다 (Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S, Hla, T., 및 Spiegel, S., J. Cell Biol. ,142, (1998), 229-240; Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., 및 Hla, T., Science ,279, (1998), 1552-1555). 이것은 EDG-3, -5, -6, 및 -8로 명명된 여러 다른 관련 수용체의 급속한 동정에 이르렀고, 이들은 또한 특이적 SPP 수용체이다 (Goetzl, E. J., 및 An, S., FASEB J.,12, (1998), 1589-1598; Spiegel, S., 및 Milstein, S., Biochem. Biophys. Acta. , 1484(2-3):107-16, (2000)). 구조적으로 SPP와 유사하고 4-위치에서의 트랜스 이중 결합만이 없지만, 라이소포스파티딘산 또는 스핑고실포스포릴콜린이 아닌 스핑가닌-1-포스페이트 또한 이러한 수용체에 결합하여 (Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,274, (1999) 4626-4632), EDG-1이 SPP에 높은 친화성 및 특이성으로 결합하는 G-단백질-커플링 수용체의 패밀리에 속한다는 것을 입증한다 (Goetzl, E. J. 및 An, S., FASEB J.,12, (1998), 1589-1598; Spiegel, S. 및 Milstien, S., Biochem. Biophys. Acta. , 1484(2-3):107-16, (2000)).

EDG-1 패밀리의 수용체는 주로 심혈관 및 신경계에서 특이적으로 발현되고, 다양한 G-단백질에 커플링되어, 세포 유형에 따른 다면성 반응 및 EDG 수용체의 관련 발현에서 절정에 달하는 다양한 시그날 변환 경로를 조절할 수 있다. EDG-1 패밀리의 GPCR의 생물학적 기능은 완전히 이해되지 않았지만, 최근의 연구는 SPP의 EDG-1에의 결합이 이동 및 주화성을 자극하고 (Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., 및 Spiegel, S. J. Biol. Chem. ,274, (1999), 35343-35350; English, D., Kovala, A. T., Welch, Z., Harvey, K. A., Siddiqui, R. A., Brindley, D. N., 및 Garcia, J. G., J. Hematother. Stem Cell Res. ,8, (1999), 627-634), 그 결과 혈관신생을 조절할 수 있음을 제안하였다 (Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., 및 Spiegel, S. J. Biol. Chem. ,274, (1999), 35343-35350; Lee, O. H., Kim, Y. M., Lee, Y. M., Moon, E. J., Lee, D. J., Kim, J. H., Kim, K. W., 및 Kwon, Y. G., Biochem. Biophys. Res. Commun. ,264, (1999) 743-750; Lee, M. J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellini, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, Sha'afi, R. I., 및 Hla, T., Cell,99, (1999), 301-312). EDG-5는 신경돌기 수축 동안 세포골격 재구성에서 기능할 수 있고, 이는 신경 분화 및 발생에 중요하다 (Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,274, (1999), 4626-4632; MacLennan, A. J., Marks, L., Gaskin, A. A., 및 Lee, N., Neuroscience ,79, (1997), 217-224).

SPP의 역할의 결정적인 평가는 이의 대사를 조절하는 효소의 클로닝을 필요로 한다. 최근, 래트 신장 SPHK가 명백한 균질성으로 정제되었고 (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 12576-12583), 이어서 mSPHK1으로 칭해지는 첫번째 포유동물 SPHK (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 23722-23728)가 클로닝되었다. 독립적으로, LCB4 및 LCB5으로 불리는 두 개의 유전자가 또한 사카로미세스 세레비지아에 (Saccharomyces cerevisiae)에서의 SPHK를 코딩하는 것으로 나타났다 (Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., 및 Dickson, R. C., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 19437-19442). 또한, 데이타베이스에서 mSPHK1이 벌레, 식물 및 포유동물을 포함하여 수많은 광범위한 이종 생물에서 상동성임이 동정되었고, 이는 효소가 고도로 보존된 유전자 패밀리의 원에 의해 코딩됨을 입증한다 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S.,J. Biol. Chem. ,273, (1998), 23722-23728). 공지된 SPHK1의 예상 아미노산 서열의 비교는 고도로 보존된 아미노산의 5 블록을 나타냈다 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 23722-23728). 그러나, 여러 라인의 증거는 다중 포유동물 SPHK 이성체가 존재할 것임을 나타낸다.

혈소판에서의 SPHK 활성이 공지된 SPHK 저해제에 의한 저해 및 세제에 대한 반응이 상이한 여러 형태로 크로마토그래피적으로 분획화될 수 있다는 발견은 인간 혈소판에서의 다중 효소 형태의 존재를 가리킨다 (Banno, Y., Kato, M., Hara, A., 및 Nozawa, Y., Biochem. J. ,335, (1998), 301-304). 또한, 포괄적인 중복되지 않은 데이타베이스에 대한 상동성 연구는 NCBI에서의 여러 발현된 서열 택 (dbEST)이 mSPHK1a의 보존된 도메인에 대해 상당한 상동성을 갖지만 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 23722-23728), 실질적인 서열 차이를 가짐을 나타냈다.

USP 5,374,616은 포유동물 세포의 세포성 증식을 촉진하기 위한 스핑고실포스포릴콜린을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

WO 99/61581에는 마우스 스핑고신 SPHK1a (381 아미노산) 및 SPHK1b (388 아미노산)을 코딩하는 DNA 단편이 기술되어 있다.

발명의 개요발명의 개요

본 발명의 목표는 포유동물 (예컨대 마우스 또는 인간) 스핑고신 키나제 유형 2 이성체를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA, 및 이로부터 코딩되는 펩티드를 제공하는 것이다.

본 발명의 추가적인 목표는 벡터 및 상기 기술된 DNA를 함유하는 재조합 DNA 구축물, 및 이같은 재조합 DNA 구축물로 형질전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

본 발명의 추가적인 목표는 이같은 숙주 세포의 배양에 의한 마우스 및 인간 스핑고신 유형 2 이성체 펩티드의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 부가적인 목표는 스핑고신 키나제 활성을 저해 또는 촉진하는 작용제 또는 약물의 검출 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목표는 생물학적 프로세스의 조절; 증가 또는 감소된 세포 증식 또는 증가 또는 감소된 세포 사멸로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선; 및 세포의 비정상적인 이동 또는 운동성으로부터 기인하는 질환 예컨대 암, 재발협착증 또는 당뇨병성 신경장해의 치료 또는 개선을 위한 방법을 제공하는 것이다.

또한 본 발명은 스핑고신 키나제 유형 2 이성체의 펩티드를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA로, Genbank 등록번호 bankit325787의 서열 및 Genbank 등록번호 bankit325752의 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 함유하는 DNA에 관한 것이다.

본 발명은 또한 하기를 포함하는, 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 저해 또는 촉진하는 작용제 또는 약물의 검출 방법에 관한 것이다:

(a) 상기 기술된 바와 같은 재조합 DNA 구축물을 스핑고신 키나제 유형 2 이성체가 세포 내에서 생산되도록 세포 내로 제공함;

(b) 하나 이상의 작용제 또는 약물을 세포에 첨가함, 및

(c) 세포 내 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화를 측정하고, 수득된 측정치를 약물 또는 작용제를 제공하지 않은 대조군과 비교하여 약물 또는 작용제가 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 저해 또는 촉진하는지 여부를 검출함 (대조군과 비교하여 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화의 양에서의 감소는 저해성 약물 또는 작용제를 의미하고, 대조군과 비교하여 세포 내 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화의 양에서의 증가는 자극성 약물 또는 작용제를 의미함).

상기 기술된 바와 같이, 본 발명은 또한 증가된 세포 사멸 또는 감소된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물 (예컨대 인간)에게 약학적 유효량의 상기 기술된 바와 같은 펩티드를 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

또한 상기 기술된 바와 같이, 본 발명은 또한 감소된 세포 사멸 또는 증가된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물 (예컨대 인간)에게 약학적 유효량의 상기 기술된 바와 같은 펩티드에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

부가적으로 상기 기술된 바와 같이, 본 발명은 또한 암, 재발협착증 및 당뇨병성 신경장해로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포의 비정상적인 이동 또는 운동성으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물 (예컨대 인간)에게 약학적 유효량의 상기 기술된 바와 같은 펩티드에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

또한 본 발명은 (a) 생물학적 프로세스의 조절, (b) 증가된 세포 사멸 또는 감소된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선, (c) 감소된 세포 사멸 또는 증가된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선, 또는 (d) 세포의 비정상적인 이동 또는 운동성으로부터 기인하는 질환 (예컨대 암, 재발협착증 또는 당뇨병성 신경장해)의 치료 또는 개선을 위한 조성물로, (i) 약학적 유효량의 상기 기술된 바와 같은 펩티드 또는 상기 기술된 바와 같은 펩티드에 대한 항체, 및 (ii) 약학적으로 허용가능한 캐리어를 함유하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명에는 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 감소 또는 제거시키는 작용제 또는 약물의 스크리닝 방법으로, 작용제 또는 약물의 존재 하에 스핑고신 키나제 유형 2 효소 활성에서의 감소를 검출하는 것을 포함하는 방법이 또한 포함된다.

또한, 본 발명은 하기를 포함하는, 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2 이성체의 존재의 검출 방법에 관한 것이다:

(i) 샘플을 스핑고신 키나제 유형 2를 인식하는 항체와 접촉시킴; 및

(ii) 스핑고신 키나제 유형 2와 이에 대해 특이적인 항체 간에 형성된 복합체의 존재 또는 부재를 검출함.

본 발명은 또한 샘플을 중합효소 연쇄 반응시키고 스핑고신 키나제 유형 2의 존재에 대해 검출하는 것을 포함하는, 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2의 검출 방법에 관한 것이다.

부가적으로 본 발명은 스핑고신 키나제 유형 2 RNA 또는 cDNA에의 혼성화 및/또는 스핑고신 키나제 유형 2 서열의 증폭에 적절한 스핑고신 키나제 유형 2 RNA 또는 cDNA에 대해 특이적인 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드 및 적절한 보조 시약을 함유하는, 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2 RNA/cDNA 검출을 위한 진단 키트에 관한 것이다.

스핑고신 키나제는 스핑고신의 인산화를 촉매하여 SPP를 산출시킨다. 최근에 클로닝된 마우스 및 인간 스핑고신 키나제-1 (SPHK1)의 서열 상동성을 기초로 (Kohama 등, J. Biol. Chem. ,273, 23722-23728, (1998)), 본 발명은 제2 유형 마우스 및 인간 스핑고신 키나제 (mSPHK2 및 hSPHK2)의 클로닝, 기능적 특징화 및 조직 분포에 관한 것이다.

본 발명의 mSPHK2 및 hSPHK2는 각각 617 및 618 아미노산의 단백질을 코딩하고, 모두 SPHK1보다 크며, 모두 SPHK1에서 앞서 발견된 보존된 도메인을 함유하지만, 이들의 서열은 중심 및 아미노 말단에서 상당히 다르다. 다중 인간 및 마우스 조직의 노던 블롯 분석은 SPHK2 mRNA 발현이 SPHK1의 것과 현저히 다르고, 뇌, 심장, 신장, 정소 및 간에서 가장 높음을 나타냈다. SPHK1 발현은 마우스 배아 7일에 가장 높은 반면, SPHK2 발현은 배아 11일에 단지 검출가능한 정도이고, 그후 증가한다.

mSPHK2 또는 hSPHK2 발현 벡터로 일시적으로 형질감염된 인간 배아 293 신장 세포는 SPHK 활성이 현저히 증가하여 그 결과 SPP 수준이 상승하였다. 특히, SPHK2는 SPHK1과는 다소 상이한 기질 특이성을 가졌다. D-에리트로-스핑가닌 (디히드로스핑고신, DHS)은 SPHK2에 대하여 D-에리트로-스핑고신보다 양호한 기질인 반면, DHS는 SPHK1의 강력한 저해제였다.

또한 SPHK2는 비록 더 적은 정도이긴 하지만 파이토스핑고신 및 D,L-트레오-디히드로스핑고신의 인산화를 촉매하였다. SPHK1의 경쟁적 저해제인 DMS는 놀랍게도 SPHK2의 비-경쟁적 저해제였다. 증가하는 이온 강도가 SPHK1을 저해하였으나, KCl 및 NaCl은 SPHK2 활성을 현저히 자극하였다. 또한, 트리톤 X-100 및 BSA는 SPHK1에 대한 효과와 반대로 SPHK2를 저해하였지만, 포스파티딜세린은 양 유형을 자극하였다. 이러한 데이타는 SPHK2가 지질 키나제의 이러한 성장 클래스의 신규한 원이고, 유사분열생식, 세포자멸사, 신경 발생, 주화성, 혈관신생, 및 염증성 반응이 포함되는 다양한 생물학적 프로세스의 조절에 중요하다는 것을 가리킨다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 설명을 목적으로, 특징, 양상 및 장점을 도면에 나타낸다. 그러나, 본 발명이 도면에 묘사된 것에 제한되지 않는 것으로 이해하여야 한다.

도 1A는 (" mSPHK2") 및 인간 스핑고신 키나제 2 (" hSPHK2")의 추측 아미노산 서열의 비-ClustalW 정렬을 기초로 한 마우스 및 인간 유형 2 스핑고신 키나제의 추측 아미노산 서열을 나타낸다. 동일한 아미노산 서열 치환 및 보존된 아미노산 서열 치환은 각각 진한색 및 흐린 회색이다. 대시는 서열 내의 갭을 나타내고, 우측의 숫자는 mSPHK2의 아미노산 서열을 가리킨다. 보존된 도메인 (C1 내지 C5)은 선으로 표시된다.

도 1B는 SPHK1 및 SPHK2의 보존된 영역의 개략도이다. mSPHK2의 1차 서열이 mSPHK1a의 것과 비교된다.

도 2A, 2B 및 2C는 유형 1 및 유형 2 스핑고신 키나제의 조직 특이적 발현을 나타내는 노던 블롯이다.

도 2A에서, mSPHK2 (상부 패널) 및 mSPHK1a (중간 패널) 프로브가 말단 라벨링되어, 하기 기술되는 마우스 조직으로부터의 폴리(A)+RNA 블롯에 혼성화되었다. 레인: 1, 심장; 2, 뇌; 3, 지라; 4, 폐; 5, 간; 6, 골격근; 7, 신장; 8, 정소. β-액틴 프로브를 로딩 컨트롤로 사용하였다.

도 2B는 hSPHK2의 조직 특이적 발현을 나타낸다. 레인 1, 뇌; 2, 심장; 3, 골격근; 4, 결장; 5, 흉선; 6, 지라; 7, 신장; 8, 간; 9, 소장; 10, 태반; 11, 폐; 12, 백혈구.

도 2C는 마우스 배아 발생 동안 mSPHK1a 및 mSPHK2의 발현을 나타낸다. 7일, 11일, 15일 및 17일 마우스 배아로부터의 폴리(A)+RNA 블롯을 도 2A에서와 같이 프로브하였다.

도 3A 및 3B는 재조합 SPHK2의 효소 활성을 나타내는 그래프이다.

도 3A에서, HEK 293 세포를 빈 벡터 또는 mSPHK2 또는 hSPHK2 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 24 시간 후, SPHK 활성을 사이토졸 (□) 및 입상 분획 (▨)에서 측정하였다. 데이타는 평균 ±S.D.이다. 모세포 및 벡터-형질감염 세포는 각각 26 및 37 pmol/분/㎎의 기본 SPHK 활성을 가졌다.

도 3B는 SPHK2로의 형질감염 후 SPP의 질량 수준에서의 변화를 나타낸다. 빈 벡터 (□) 또는 mSPHK2 (▨) 또는 hSPHK2 (▧)로 형질감염된 HEK293 세포 내의 SPP의 질량 수준을 하기 기술되는 바와 같이 측정하였다. 데이타는 pmol/nmol 인지질로 표현된다.

도 4A 내지 4D는 mSPHK2의 기질 특이성을 나타내는 그래프이다.

도 4A는 mSPHK2로 형질감염된 HEK293 세포로부터의 사이토졸에서 측정된 각종 스핑고신 유사체 또는 기타 지질 (50 mM)의 SPHK-의존적 인산화를 나타내는 그래프이다. 레인: 1, D-에리트로-스핑고신 (" D-에리트로-Sph"); 2, D-에리트로-디히드로스핑고신 (" D-에리트로-DHS"); 3, D,L-트레오-DHS; 4, N,N-디메틸스핑고신 (" DMS"); 5, C2-세라마이드; 6, C16-세라마이드; 7, 디아실글리세롤; 8, 포스파티딜이노시톨; 9, 파이토스핑고신. 데이타는 D-에리트로-Sph의 인산화 백분율로 표시된다.

도 4A 내지 4D는 N,N-디메틸스핑고신에 의한 재조합 SPHK2의 비경쟁적 저해를 나타내는 그래프이다.

도 4B는 DMS에 의한 mSPHK2의 용량-의존적 저해를 나타낸다. 도 4A에서와 같은 형질감염 후 HEK293 세포 용해물 내의 SPHK 활성을 증가하는 농도의 DMS의 존재 하에 10 μM D-에리트로-스핑고신으로 측정하였다.

도 4C는 DMS 저해의 키네틱 분석을 나타낸다. SPHK 활성을 DMS 부재 (○) 또는 10 μM DMS (■) 또는 20 μM DMS (▲)의 존재 하에 변화 농도의 D-에리트로-스핑고신으로 측정하였다.

도 4D는 라인웨버-부르크 (Lineweaver-Burk) 플롯을 나타낸다. D-에리트로-스핑고신에 대한 Km은 3.4 μM였다. DMS에 대한 Ki 값는 12 μM였다.

도 5A 내지 5E는 mSPHK2에 대한 pH 의존성 및 염 효과를 나타내는 그래프이다.

도 5A는 하기 완충액을 사용하여 조절된 pH를 갖는 키나제 완충액에서 측정된 형질감염된 HEK293 세포 내의 사이토졸 SPHK2 활성을 나타낸다: 200 mM 아세트산나트륨 (pH 4.5-5.5, ○); 200 mM MES (pH 6-7, ●); 200 mM 인산칼륨 (pH 6.5-8, □); 200 mM HEPES (pH 7-7.5, ■); 200 mM 트리스-HCl (pH 7.5-9, △); 및 200 mM 보레이트 (pH 10, ▲).

도 5B 내지 5E는 염이 SPHK2를 자극하지만, SPHK1을 저해함을 나타낸다.

도 5B 및 5C에서, HEK293 세포 용해물 내의 SPHK 활성을 mSPHK1 (도 5B) 또는 mSPHK2 (도 5C)로의 형질감염 24 시간 후 증가하는 농도의 NaCl (□) 또는 KCl (●)의 존재 하에 측정하였다.

도 5D는 KCl에 의한 SPHK2 활성화의 키네틱 분석을 나타낸다. mSPHK2 활성을 다양한 농도의 D-에리트로-스핑고신으로 KCl 부재 (○), 또는 50 mM KCl (□) 또는 200 mM KCl (■)의 존재 하에 측정하였다.

도 5E는 도 5D로부터의 데이타의 라인웨버-부르크 플롯을 나타낸다. Km 값은 KCl의 존재에 영향을 받지 않았다. Vmax 값은 0, 50 및 200 mM KCl의 존재 하에 각각 0.1, 0.3 및 1 (nmol/분/㎎)이었다.

도 6A 내지 6B는 트리톤 X-100 및 소 혈청 알부민 (" BSA")이 SPHK1 및 SPHK2의 활성에 대해 상이한 효과를 갖는다는 것을 나타내는 그래프이다. HEK293 세포를 mSPHK1a (○) 또는 mSPHK2 (●)로 형질감염시키고, 세포 용해물 내의 각각의 활성을 24 시간 후 표시된 농도의 트리톤 X-100 (도 6A) 또는 BSA (도 6B)의 존재 하에 측정하였다.

도 6C는 포스파티딜세린이 SPHK1 및 SPHK2의 활성에 대해 유사한 효과를 갖는다는 것을 나타내는 그래프이다. HEK293 세포를 mSPHK1a (원) 또는 mSPHK2 (삼각형)로 형질감염시키고, 세포 용해물 내의 각각의 활성을 24 시간 후 표시된 농도의 포스파티딜세린 (속이 빈 기호) 또는 포스파티딜콜린 (속이 채워진 기호)의 존재 하에 측정하였다. 데이타는 어떠한 첨가물도 없이 측정된 대조군 활성의 백분율로서 나타낸다.

발명의 상세한 설명

한 구현예에서, 본 발명은 포유동물 (예컨대 마우스 및 인간) 스핑고신 키나제 유형 2 이성체를 코딩하는 DNA 또는 cDNA 분절에 관한 것이다.

또한, 본 발명의 단리된 핵산 분자에는 상기 기술된 것들과 실질적으로 상이한 서열을 함유하지만 유전 코드의 축퇴성으로 인해 여전히 포유동물 스핑고신 키나제 유형 2 이성체를 코딩하는 DNA 분자가 포함된다. 물론, 유전 코드 및 종-특이적 코돈 선호성은 당업계에 주지되어 있다. 따라서, 상기 기술된 축퇴성 변종을 생성시켜, 예를 들어, 특정 숙주에 대해 코돈 발현을 최적화시키는 것 (예를 들어, 인간 mRNA 내의 코돈을 대장균과 같은 박테리아 숙주에 바람직한 것으로 변화시킴)은 당업자에게 일상적일 것이다.

본 발명의 핵산 분자는 RNA, 예컨대 mRNA의 형태, 또는, 예를 들어, 클로닝에 의해 수득되거나 합성적으로 제조된 cDNA 및 게놈 DNA가 포함되는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 단일 가닥 DNA 또는 RNA는 " 센스 가닥" 으로도 공지된 코딩 가닥이거나, 또는 " 안티센스 가닥" 으로도 알려진 비코딩 가닥일 수 있다.

" 단리된" 핵산 분자는 이의 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 벡터 내에 함유된 재조합 DNA 분자는 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 간주된다. 단리된 DNA 분자의 추가적인 예로는 이종형 숙주 세포 내에 유지된 재조합 DNA 분자 또는 용액 내의 정제된 (부분적으로 또는 실질적으로) DNA 분자가 포함된다. 단리된 RNA 분자에는 본 발명의 DNA 분자의 생체내 또는 생체외 RNA 전사물이 포함된다. 본 발명에 따른 단리된 핵산 분자에는 합성적으로 제조된 이같은 분자가 또한 포함된다.

본 발명은 추가로 본원에 기술된 뉴클레오티드 서열의 일부 또는 단편을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 단편에는 임의의 두 정수 (하나는 5' 뉴클레오티드 위치를 5 나타내고 두번째 것은 3' 뉴클레오티드 위치를 나타냄)로부터 선택된 길이 10 이상의 연속 뉴클레오티드인 mSPHK2 및 hSPHK2에 대한 도 1A의 뉴클레오티드 서열의 일부가 포함되고, 여기서 도 1A의 각각의 뉴클레오티드 서열에 대한 첫번째 뉴클레오티드가 위치 1이다. 즉, 길이 10 이상의 연속 뉴클레오티드 염기이거나 10과 도 1A의 mSPHK2 또는 hSPHK2의 전체 뉴클레오티드 서열의 길이 마이너스 1 사이의 임의의 정수인 단편인 5' 및 3' 뉴클레오티드 위치의 모든 조합.

또한, 본 발명에는 뉴클레오티드 위치보다는 뉴클레오티드의 크기로 특정되는 단편을 함유하는 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 본 발명에는 1과 전체 뉴클레오티드 서열의 길이 마이너스 1 사이의 정수로부터 선택되는 연속적인 뉴클레오티드의 임의의 단편 크기가 포함된다. 바람직한 크기로는 20 내지 50 뉴클레오티드가 포함되고; 50 내지 300 뉴클레오티드의 크기가 프라이머 및 프로브로서 유용하다. 전형적인 서열이 유래될 수 있는 영역에는, 제한되지는 않지만, 예를 들어, 상기 서열 내의 특이적 에피토프 또는 도메인, 예컨대 도 1A에 나타난 도메인 C1-C5을 코딩하는 영역이 포함된다.

또다른 양상에서, 본 발명은 엄격한 혼성화 조건 하에 상기 기술된 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 30, 예를 들어, 도 1A에 나타난 핵산 서열 또는 이의 단편에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. " 엄격한 조건" 은 50 % 35 포름아미드, 5×SSC (150 mM NaCl, 15 mM 트리소듐 시트레이트), 50 MM 인산나트륨 (pH 7.6), 5×덴하르트 용액, 10 % 덱스트란 술페이트 및 20 g/㎖ 변성 전단 연어 정자 DNA를 함유하는 용액 내에서 42 ℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션시킨 후 0.1×SSC에서 약 65 ℃에서 필터를 세정하는 것을 의미한다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 서열 또는 이의 일부는 당업계에 공지된 부가적인 기능을 제공하는 기타 서열 예컨대 마커 서열, 또는 융합 폴리펩티드의 정제를 유리하게 하는 펩티드, 헬퍼 T-세포 자극을 제공하는 것으로 공지된 항원성 결정소를 갖는 펩티드, 번역후 개질을 위한 부위를 코딩하는 펩티드, 또는 융합 단백질을 원하는 위치로 표적화하는 아미노산 서열, 예를 들어 이종형 리더 서열을 코딩하는 서열에 융합될 수 있다.

본 발명은 추가로 도 1A에 나타난 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 폴리펩티드의 일부, 유사체 또는 유도체를 코딩하는, 본 발명의 핵산 분자의 변이체에 관한 것이다. 변이체는 천연 대립유전자 변이체와 같이 천연적으로 발생할 수 있다. " 대립유전자 변이체" 는 생물 염색체의 소정의 유전자좌를 차지하는 유전자의 여러 대안적인 형태 중 하나를 의미한다. 비 - 천연발생 변이체는 공지된 돌연변이유발 기술에 의해 제조될 수 있다. 이같은 변이체에는 코딩 또는 비코딩 영역 또는 이들 모두 내의 하나 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 치환, 결실 또는 부가에 의해 제조되는 것들이 포함된다. 코딩 영역에서의 교체는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 일으킬 수 있다. 이중 특히 바람직한 것은 본원에서 개시된 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 폴리펩티드 또는 이의 일부의 성질 및 활성을 변화시키지 않는 사일런트 치환, 부가 및 결실이다. 이와 관련하여 보존적 치환이 또한 바람직하다.

도 1A에 나타난 스핑고신 키나제 유형 2 이성체를 코딩하는 핵산 분자와 적어도 90 - 99 % 동일한 핵산 분자는 본 발명의 또다른 양상이다. 이러한 핵산은 스핑고신 키나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는지 여부와 상관없이 포함된다. " 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 갖는 폴리펩티드" 는, 하기 기술되는 분석에서 측정시, 본 발명의 스핑고신 키나제 유형 2 이성체의 활성과 유사하지만 동일하지는 않은 활성을 나타내는 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명의 폴리펩티드의 생물학적 활성 또는 기능은 고도의 구조적 동일성/유사성을 공유하는 다른 생물로부터의 폴리펩티드와 유사 또는 동일할 것으로 예상된다.

또다른 구현예에서, 본 발명은 상기 기술된 DNA 서열 및 벡터를 함유하는 재조합 DNA 분자에 관한 것이다. 벡터는 플라스미드, 파지, 코스미드, YAC, 진핵생물 발현 벡터 예컨대 DNA 벡터, 피키아 파스토리스 (Pichia pastoris), 또는 바이러스 벡터 예컨대 바쿨로바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터, 및 당업계에 공지된 기타의 것들의 형태를 취할 수 있다. 클로닝된 유전자는 특정 제어 서열 예컨대 프로모터 서열, 또는 유도가능성 및/또는 세포 유형 - 특이적일 수 있는 서열의 제어 하에 놓일 수 있다 (즉, 작동적으로 연결됨). 적절한 프로머터는 당업자에게 공지되어 있다. 발현 구축물은 전사 개시, 종결을 위한 부위, 및 전사된 영역 내에, 번역을 위한 리보좀 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 사용하기에 바람직한 벡터로는 일부를 지명하면 pCMV - SPORT2 (Life Technologies, Inc.), pc DNA3 (Invitrogeni)가 포함된다.

구축물의 숙주 세포 내로의 도입은 인산칼슘 형질감염, 전기천공, 감염, 및 당업계에 공지되고 [Current Protocols in Molecular Biology , Ausubel, F. M. 등 (편저), Wiley & Sons, Inc.]와 같은 표준 실험 매뉴얼에 기술된 기타 방법에 의해 실행될 수 있다. 본원에서 상기 및 하기에 인용된 모든 문헌은 전체적으로 참고로 본원에 반영된다.

추가적인 구현예에서, 본 발명은 상기 기술된 재조합 DNA 구축물로 안전하게 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵생물 (예를 들어, 박테리아), 저급 진핵생물 (예를 들어, 효모 또는 곤충) 또는 고급 진핵생물 (예를 들어, 래트 및 인간을 포함하지만 이에 한정되지는 않은 모든 포유동물)의 세포일 수 있다.

지정된 숙주와 상용성인 적절한 제어 서열이 사용되는 경우, 원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포 모두를 원하는 코딩 서열의 발현을 위해 사용할 수 있다. 원핵생물 숙주 중에서, 대장균이 가장 빈번하게 사용된다. 원핵생물용 발현 제어 서열로는 오퍼레이터 부분을 임의로 함유하는 프로모터, 및 리보좀 결합 부위가 포함된다. 원핵생물 숙주와 상용성인 트랜스퍼 벡터는, 예를 들어, pBR322, 앰피실린 및 테트라사이클린 내성을 부여하는 오페론을 함유하는 플라스미드, 및 항생 내성 마커를 부여하는 서열을 또한 함유하는 다양한 pUC 벡터로부터 일반적으로 유래된다. 이러한 마커를 사용하여 성공적인 형질전환체를 선별하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 일반적인 클로닝 방법에 대해 [Maniatis, Fitsch 및 Sambrook,Molecular, Cloning: A Laboratory Manual , (1982)] 또는 DNA Cloning , Volumes I 및 II (D. N. Glover 편저, 1985) 참조.

인간 SPHK2를 코딩하는 cDNA가 삽입된 플라스미드를 갖는 형질전환체, 즉 대장균 pCR3.1 - hSPHK2 SANK 70200은 일본 305 - 8566 이바라기껭 쓰꾸바시 히가시 1 - 초메 1 - 3, 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소에 2000년 3월 29일 등록번호 FERM BP - 7110으로 기탁되었다.

IgG 분자, 보강제, 캐리어, 또는 SPHK의 정제를 보조하는 작용제, 예컨대 글로타티온 S-트랜스페라제, 또는 히스티린 택으로로 공지된 일련의 히스티린 잔기를 코딩하는 서열에 작동적으로 연결된 벡터 내에 DNA 서열이 존재할 수 있다. 재조합 분자는 배양 시스템 내의 진핵생물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포 및 효모를 형질감염시키는데 적절할 수 있다. 사카로미세스 세레비지아에, 사카로미세스 칼스베르게니스 (Saccharomyces carlsbergensis), 및 피키아 파스토리스가 가장 통상적으로 사용되는 효모 숙주이고, 편리한 진균류 숙주이다. 효모 벡터에 대한 제어 서열은 당업계에 공지되어 있다. 발현용 숙주가 당업계에 공지되어 있으므로 포유동물 세포주가 입수가능하고, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection: ATCC)로부터 입수가능한 다수의 불멸 세포주, 예컨대 HEK293 세포, 및 NIH 3T3 세포가 일부를 지명하자면 포함된다. 적절한 프로모터 또한 당업계에 공지되어 있고, SV40, 라우스 사르코마 (Rous sarcoma) 바이러스 (" RSV"), 아데노바이러스 (" ADV"), 소 유두종 바이러스 (" BPV"), 및 사이토메칼로바이러스 (" CMV")로부터의 프로모터와 같은 바이러스 프로모터가 포함된다.

포유동물 세포는 또한 터미네이터 서열 및 폴리A 부가 서열을 필요로 할 수 있다: 발현을 증가시키는 인핸서 서열 또한 포함될 수 있고, 유전자의 증폭을 야기하는 서열 또한 바람직할 수 있다. 이러한 서열은 당업계에 공지되어 있다.

형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 상기 기술된 DNA 서열의 공급원으로 사용될 수 있다. 재조합 분자가 발현 시스템의 형태를 취하하면, 형질전환 또는 형질감염된 세포는 상기 기술됨 단백질의 공급원으로 사용될 수 있다.

또다른 구현예에서, 본 발명은 Genbank/EMBL Data Bank 등록번호 bankit325787 및 bankit325752에 상응하는 뉴클레오티드 서열의 사용에 관한 것이다.

상기 논의된 뉴클레오티드 서열로부터 발현되는 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 서열로부터 코딩되는 폴리펩티드의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 또는 적어도 2 내지 5의 아미노산, 더욱 바람직하게는 적어도 8 내지 10 아미노산, 더더욱 바람직하게는 적어도 15의 아미노산을 함유하거나, 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 면역학적으로 동일한 폴리펩티드를 의미한다.

재조합 또는 유래된 폴리펩티드는 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역되지는 않는다; 예를 들어, 화학적 합성, 또는 재조합 발현 시스템의 발현이 포함되는 임의의 방식으로 생성될 수 있다. 또한, 폴리펩티드는 이의 항원성을 증가시키는 다른 단백질 또는 폴리펩티드, 예컨대 보강제에 융합될 수 있다.

상기 주지된 바와 같이, 본 발명의 방법은, 상기 기술된 핵산 분자 또는 벡터의 숙주 세포 내로의 삽입 및 숙주 세포에 의한 당해 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현을 통한, 임의 길이의 임의의 폴리펩티드의 생산에 적절하다. 핵산 분자 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하여 형질전환된 숙주 세포를 생성시키는 것은 칼슘 포스페이트 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질-매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 기타 방법에 의해 실행될 수 있다. 이같은 방법은 다수의 표준 실험 매뉴얼, 예컨대 [Davis 등, Basic Methods In Molecular Biology , (1986)]에 기술되어 있다.

일단 형질전환된 숙주 세포가 수득되면, 세포를 임의의 생리학적으로 상용성인 조건의 pH 및 온도 하에, 숙주 세포 성장을 지지하는 탄소, 질소 및 필수 물질의 동화될 수 있는 원을 함유하는 임의의 적절한 영양 배지에서 배양할 수 있다. 재조합 폴리펩티드-생산 배양 조건은 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용된 벡터의 유형에 따라 변할 것이다. 예를 들어, 특정 발현 벡터는, 유전자 발현을 개시하여 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위해, 특정 온도에서의 세포 성장, 또는 특징 화학물질 또는 유도제의 세포 성장 배지로의 첨가를 필요로 하는 조절 영역을 함유한다. 따라서, 본원에서 사용된 용어 " 재조합 폴리펩티드-생산 조건" 은 임의의 한 세트의 배양 조건에 한정되는 것을 의미하지 않는다. 상기 기술된 숙주 세포 및 벡터에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 주지되어 있다. 숙주 세포에서의 이의 제조에 이어서, 당해 폴리펩티드를 여러 기술에 의해 단리할 수 있다. 당해 폴리펩티드를 숙주 세포로부터 유리시키기 위해, 세포를 용해시키거나 파열시킨다. 이러한 용해는 세포를 저장액과 접촉시킴, 세포 벽-분열 효소 예컨대 라이소자임으로의 처리, 초음파처리, 고압 처리, 또는 상기 방법들의 조합에 의해 달성될 수 있다. 당업자에게 공지된 박테리아 세포 분열 및 용해의 다른 방법을 또한 사용할 수 있다.

분열 후, 폴리펩티드를 복합 혼합물 내의 입자의 분리에 적절한 임의의 기술에 의해 세포 잔해물로부터 분리할 수 있다. 이어서 폴리페비드를 주지된 단리 기술에 의해 정제할 수 있다. 적절한 정제 기술에는, 제한되지는 않지만, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 전기영동, 면역흡착, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 면역친화 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피 (LC), 고성능 LC 크로마토그래피 (HPLC), 고속 성능 크로마토그래피 (FPLC), 히드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피가 포함된다.

재조합 또는 융합 단백질을 진단 도구로서 및 검출될 수 있게 라벨링 및 라벨링되지 않은 스핑고신-1-포스페이트의 제조 방법에서, 및 하기 기술되는 샘플 내 SPP 수준의 측정 방법에서 사용할 수 있다. 또한, 재조합 단백질을 세포 사멸을 감소시키고/시키거나 세포 증식을 증가시키는 치료제로서 사용할 수 있다. 형질전환된 숙주 세포는 SPHK2 기능을 저해하는 약물 또는 작용제, 예컨대 세포와 상호작용하여 SPHK2의 발현을 하향 조절 또는 변화시킬 수 있는 숙주 단백질 또는 화학적으로 유래된 작용제 또는 기타 단백질, 또는 이의 공동인자의 유효성을 분석하는데 사용할 수 있다.

또다른 구현예에서, 본 발명은 상기 기술된 재조합 단백질 (또는 폴리펩티드)에 대해 특이적인 모노클로날 또는 폴리클로날 항체에 관한 것이다. 예를 들어, 상기 기술된 펩티드에 대해, 또는 적어도 10 아미노산, 바람직하게는 11 내지 15 아미노산의 이의 일부에 대해 항체가 생성될 수 있다. 표준 방법론을 사용하는 당업자는 본 발명의 단백질 (또는 폴리펩티드)에 대한 모노클로날 및 폴리클로날 항체 또는 이의 독특한 일부를 생성시킬 수 있을 것이다. 항체 제조를 위한 물질 및 방법은 당업계에 주지되어 있다 (예를 들어, [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Chapter 4, 1986] 참조).

스핑고신 키나제 유형 2의 발현 수준은 여러 수준으로 검출될 수 있다. 당업계에 주지된 표준 방법론을 사용하여, 스핑고신 키나제 유형 2 RNA의 검출 및 정량을 위한 분석을 고안할 수 있고, 특히 노던 혼성화 분석, 원위치 혼성화 분석, 및 PCR 분석이 포함된다. 예를 들어, 핵산 혼성화 방법의 일반적인 설명에 대해서는 [Maniatis, Fitsch 및 Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (1982)] 또는 [DNA Cloning, Volumes I 및 II (D. N. Glover 편저. 1985)], 또는 [Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. 등, (편저), Wiley & Sons, Inc.] 참조.

스핑고신 키나제 유형 2 RNA의 검출을 위한 폴리뉴클레오티드 프로브는 마우스 서열에 대한 등록번호 AF068748 및/또는 AR068749에서 입수가능한 서열로부터 고안할 수 있다 (Kohama, T., 등, J. Biol. Chem., 273:23722-23728). 예를 들어, 샘플로부터 단리된 RNA를 니트로셀룰로스 막과 같은 표면에 코팅시키고 노던 혼성화에 대해 준비시킬 수 있다. 생체검사 샘플의 원위치 혼성화의 경우에, 예를 들어, 당업계에 공지된 표준 방법에 의한 혼성화에 대해 조직 샘플을 준비시키고, 스핑고신 키나제 유형 2 RNA를 특이적으로 인식하는 폴리뉴클레오티드 서열과 혼성화시킬 수 있다. 샘플 RNA와 폴리뉴클레오티드 간에 형성된 하이브리드의 존재는 일부를 지명하자면 방사화학 또는 면역화학과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 검출할 수 있다.

당업자는 상당히 길고/길거나 상응하는 핵산 서열 내에 고도의 중복성을 갖는 아미노산 서열의 영역을 포함하는 프로브를 제조하는 것이 바람직할 것이라는 것을 발견할 것이다. 또다른 경우, 각각 유전자의 상이한 영역에 대한 두 셋트의 프로브를 동시에 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 사용되는 임의의 프로브의 정확한 길이는 중요하지 않지만, 전형적인 프로브 서열은 500 뉴클로오티드 이하, 더욱 전형적으로는 250 뉴클레오티드 이하이다; 이들은 100 뉴클레오티드 이하일 수 있고, 또한 길이가 75 뉴클레오티드 이하일 수 있다. 더 긴 프로브 서열은 관련된 표적 서열이 구분되도록 하기에 충분한 차이로 독특한 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하기 위해 필요할 수 있다. 이러한 이유로, 프로브는 바람직하게는 약 10 내지 약 100 뉴클레오티드 길이이고, 더욱 바람직하게는 약 20 내지 약 50 뉴클레오티드이다.

스핑고신 키나제 유형 2의 DNA 서열은 중합효소 연쇄반응 (PCR) 또는 역전사 PCR (RT-PCR)을 사용하는 스핑고신 키나제 유형 2의 검출에서 사용하기 위한 프라이머를 고안하는데 사용될 수 있다. 표준과 비교하여 스핑고신 키나제 유형 2의 존재, 부재를 검출하거나 이의 양을 정량하기 위한 목적으로, 프라이머가 스핑고신 키나제 유형 2 RNA의 역전사에 의해 생산된 스핑고신 키나제 유형 2 cDNA에 특이적으로 결합할 수 있다. 프라이머는 스핑고신 키나제 유형 2 서열의 영역과 상동성 또는 상보성인 7 내지 40 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 35 뉴클레오티드, 가장 바람직하게는 18 내지 25 뉴클레오티드 범위의 임의의 길이일 수 있다.

PCR 또는 RT-PCR을 위해 필요한 시약 및 컨트롤은 당업계에 주지되어 있다. 이어서 증폭된 생성물을 스핑고신 키나제 유형 2 서열의 존재 또는 부재에 대하여, 예를 들어, 겔 분획화, 방사 화학 및 면역화학 기술에 의해 분석할 수 있다. 소수의 세포만을 필요로 하기 때문에 이러한 방법은 유리하다. 일단 스핑고신 키나제 유형 2가 검출되면, 세포가 스핑고신 키나제 유형 2를 과발현 또는 저발현하는지 여부를 동일한 방법을 사용하여 정상 세포로부터 수득된 결과와 비교하여 결정할 수 있다. 증가된 스핑고신 키나제 유형 2 RNA 수준은 증가된 세포 증식 및 감소된 세포 사멸과 상호관련된다.

또다른 구현예에서, 본 발명은 세포 내 스핑고신 키나제 유형 2 RNA의 검출을 위한 진단 키트에 관한 것이다. 키트는 PCR 또는 RT-PCR에 의한 스핑고신 키나제 유형 2의 검출을 위한 스핑고신 키나제 유형 2 올리고뉴클레오티드 프라이머 또는 원위치 혼성화 또는 노던 분석에 의한 세포 내의 스핑고신 키나제 유형 2 RNA의 검출을 위한 스핑고신 키나제 유형 2 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 컨테이너 팩키지 단위를 함유하고, 일부 키트에서는 방법에서 사용되는 각종 시약의 컨테이너를 포함하는 것이 바람직하다. 키트는 또한 하나 이상의 하기 아이템을 함유할 수 있다: 중합 효소, 완충액, 설명서, 컨트롤, 검출 라벨. 키트에는 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위해 적절한 비율로 함께 혼합된 시약의 컨테이너가 포함될 수 있다. 시약 컨테이너는 바람직하게는 단위량으로 시약을 함유하여, 본 방법을 수행할 때 측정 단계를 제거시킨다.

추가적인 구현예에서, 본 발명은 특정 생물학적 샘플 내에 존재하는 스핑고신 키나제 유형 2의 수준을 동정 및 정량하는 방법을 제공한다. 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2의 수준을 동정 (또는 정량)할 수 있는 임의의 다양한 방법을 이러한 목적을 위해 사용할 수 있다.

스핑고신 키나제 유형 2를 검출하기 위한 진단 분석은 장기 또는 조직 부분으로부터의 세포의 원위치 분석 또는 생체검사, 뿐만 아니라 종양 또는 정상 조직으로부터의 세포의 흡인을 포함할 수 있다. 또한, 분석은 장기, 조직, 세포, 소변, 또는 혈청 또는 혈액 또는 임의의 기타 체액 또는 추출물로부터의 세포성 추출물에 대해 수행될 수 있다.

생체검사를 분석하는 경우, 분석은 분석될 샘플을 천연 또는 합성의 스핑고신 키나제 유형 2 리간드, 또는 스핑고신 키나제 유형 2를 인식하는 폴리클로로날 또는 모노클로로날 항체, 또는 스핑고신 키나제 유형 2를 검출할 수 있는 항혈청과 접촉시키고, 샘플 내에 존재하는 스핑고신 키나제 유형 2와 첨가된 스핑고신 키나제 유형 2 리간드 또는 항체 간에 형성된 복합체를 검출하는 것을 포함할 것이다.

스핑고신 키나제 유형 2 리간드 또는 기질에는, 동물 또는 식물 추출물과 같은 천연원으로부터 유래될 수 있는 천연 또는 합성 클래스의 리간드 및 이들의 유도체에 더하여, 예를 들어, 스핑고신이 포함된다. 기타 스핑고신 키나제 유형 2 리간드에는 칼모둘린이 포함된다.

스핑고신 키나제 유형 2 리간드 또는 항-스핑고신 키나제 유형 2 항체, 또는 스핑고신 키나제 유형 2를 검출할 수 있는 리간드 또는 항체의 단편을 증가된 세포 증식과 관련된 질환, 예컨대 암, 또는 감소된 세포 사멸과 관련된 질환의 진단 및 예후에서 사용하기 위한 임의의 다양한 라벨 및 라벨링 방법을 사용하여 라벨링할 수 있다. 본 발명에서 사용될

수 있는 라벨 유형의 예로는, 제한되지는 않지만, 효소 라벨, 방사성 동위원소 라벨, 비방사성 동위원소 라벨, 및 화학발광 라벨이 포함된다.

적절한 효소 라벨의 예로는 말레이트 탈수소효소, 스타파일로코칼 뉴클레아제, 델타-5-스테로이드 이소머라제, 효모-알콜 탈수소효소, 알파-글리세롤 포스페이트 탈수소효소, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 페록시다제, 알칼리성 포스파타제, 아스파라기나제, 글루소스 산화효소, 베타-갈락토시다제, 리보누클레아제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스-6-포스페이트 히드로게나제, 글루코아밀라제, 아세틸콜린 에스테라제 등이 포함된다.

적절한 방사성 동위원소 라벨에는^{3}H, ^{111}In, ^{125}I, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, ^{57}To, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{152}Eu, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{21}Ci, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{47}Sc, ^{109}Pd, ^{11}C, ^{19}F 및^{131}I가 포함된다.

적절한 비-방사성 동위원소 라벨에는^{157}Gd, ^{55}Mn, ^{162}Dy, ^{52}Tr 및^{46}Fe가 포함된다.

적절한 형광 라벨에는^{152}Eu 라벨, 플루오레세인 라벨, 이소티오시아네이트 I 라벨, 로다민 라벨, 파이코에리트린 라벨, 파이코시아닌 라벨, 알로파이코시아닌 라벨 및 플루오레스카민 라벨이 포함된다.

화학발광 라벨에는 발광 라벨, 동위원소발광 라벨, 방향족 아크리디늄 에스테르 라벨, 이미다졸 라벨, 아크리디늄 염 라벨, 옥살레이트 에스테르 라벨, 루시페린 라벨 및 루시페라제 라벨이 포함된다.

당업자는 본 발명에 따라 사용될 수 있는 기타 적절한 라벨을 알 것이다. 이러한 라벨을 리간드 및 항체 또는 이들의 단편에 결합시키는 것은 당업자에게 통상적으로 공지된 표준 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 전형적인 기술은 [Kennedy, J. H., 등, (1976), Clin. Chem. Acta. ,70, 1-31], 및 [Schurs, A. H. W. M., 등, (1977), Clin. Chem. Acta. , 81, 1-40]에 기술되어 있다. 후자에 언급된 커플링 기술은 글루타르알데히드 방법, 페리오데이트 방법, 달레미드 방법 등이다.

본 발명의 항체 (또는 항체의 단편)의 검출은 캐리어의 사용에 의해 개선될 수 있다. 주지된 캐리어에는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 덱스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 개질 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스, 및 자철광이 포함된다. 캐리어의 성질은 본 발명의 목적에 대해 어느 정도 해결가능하거나 또는 불가능할 수 있다. 지지 물질은, 커플링된 분자가 스핑고신 키나제 유형 2에 결합할 수 있는 한, 실질적으로 임의의 가능한 구조적 형상을 가질 수 있다. 따라서, 지지체 형상은 비드에서와 같이 구형이거나, 시험관의 내부 표면 또는 막대기의 외부 표면에서와 같이 원통형일 수 있다. 대안적으로, 표면은 시트 또는 테스트 스트립과 같이 평평할 수 있다. 당업자는 모노클로날 항체를 결합시키기 위한 다수의 기타 적절한 캐리어를 알거나, 일상적인 실험을 사용하여 이를 확인할 수 있을 것이다.

상기 논의된 스핑고신 키나제 유형 2의 리간드 또는 항체, 또는 항체 또는 리간드의 단편을 사용하여 스핑고신 키나제 유형 2의 존재를 정량적으로 또는 정성적으로 검출할 수 있다. 이같은 검출은 당업자에게 공지된 임의의 다양한 면역분석법 예컨대 방사면역검정, 면역측정 분석 등을 사용하여 달성할 수 있다. 당업계에 주지된 표준 방법론을 사용하여, 표면 (즉, 고체 지지체), 예를 들어 미량역가 플레이트 또는 막 (예를 들어, 니트로셀룰로스 막) 상에 스핑고신 키나제 유형 2 또는 스핑고신 키나제 유형 2의 일부에 특이적인 항체를 코팅하고 이를 스핑고신 키나제 유형 2 관련 질환을 가질 것으로 예상되는 사람으로부터의 샘플과 접촉시킴에 의해 진단 분석을 구축할 수 있다. 샘플 내의 스핑고신 키나제 유형 2와 이에 대해 특이적인 항체 간에 형성된 생성된 복합체의 존재는 당업계에 통상적인 임의의 공지된 검출 방법, 예컨대 형광 항체 분광학 또는 비색계에 의해 검출할 수 있다. 방사면역 분석의 바람직한 설명은 본원에 참조로 반영된 [Laboratory Techniques and Biochemistry ,Molecular Biology , Work, T.S., 등, North Holland Publishing Company, N.Y. (1978)]에서 발견할 수 있다. 샌드위치 분석은 [Wide, Radioimmune Assay Method , Kirkham 및 Hunter 편저, E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970]의 199-206 면에 기술되어 있다..

본 발명의 진단 방법은 폐의 암종, 예컨대 소세포암, 대세포암, 편평상피암, 및 선암, 위암, 전립선 선암, 난소선암 예컨

대 장액 난선육종 및 점소양 난선육종, 난소 생식세포 종양, 고환암, 및 생식세포 종양, 췌장 선암, 담즙 선암, 간세포암, 신장세포 선암, 선암 및 윌러 종양 (암육종)이 포함되는 자궁내막, 자궁경막, 및 질의 암종 예컨대 선암 및 편평상피암, 기저세포암, 흑색종, 및 피부부속물 종양, 식도암, 편평상피암 및 선암이 포함되는 비인두 및 인두의 암종, 침샘 암종, 신경교, 뉴론 및 뇌막 기원의 종양이 포함되는 뇌 및 중추신경계 종양, 말초신경의 종양, 연조직 육종 및 골 및 연골의 육종이 포함되는 암으로 고생하는 환자에서 증식 및 전이 잠재성의 전조가 된다. 증가된 수준의 스핑고신 키나제 유형 2, RNA 또는 스핑고신 키나제 유형 2 단백질을 발현하는 이러한 종양의 세포들은 증식이 증가되고 세포 사멸이 감소된다.

단백질을 사용하여 스핑고신 키나제 유형 2 활성의 저해제를 동정할 수 있다. 효소 분석을 사용하여, 스핑고신 키나제 유형 2 효소 활성의 감소 또는 제거를 일으키는 천연 및 합성 작용제 및 약물을 발견할 수 있다. 스핑고신 키나제 유형 2 활성에서의 감소가 검출되기만 하면, 저해제의 작용 메카니즘의 이해가 필요하지는 않다. 저해제에는 효소의 기질(들) 또는 공동인자(들)을 결합 또는 격리시키거나, 효소 자체를, 예를 들어 작용제 또는 약물이 효소에 비가역적으로 결합하여 직접적으로, 또는 예를 들어 스핑고신 키나제 유형 2 기질을 결합시키는 작용제의 도입에 의해 간접적으로 저해하는 작용제 또는 약물이 포함될 수 있다. 본 발명에 관련된 작용제 또는 약물은 스핑고신 키나제 유형 2 활성의 부분적인 또는 완전한 저해를 초래할 수 있다.

스핑고신 키나제 유형 2의 저해제로는 DL-트레오-디히드로스핑고신 (DHS), 및 [Edsall, L. C. 등, (1998), Biochemistry ,37, 12892-12898]에 기술된 더욱 최근에 발견된 저해제 N,N-디메틸스핑고신 (" DMS")이 포함된다. 스핑고신 키나제 유형 2의 저해제는 암, 아테롬성 동맥경화증, 신경변성 장애, 즉 졸중 및 알츠하이머 질환과 같은 질환의 치료 또는 개선에서 사용될 수 있다.

스핑고신 키나제 유형 2의 수준을 감소시키거나 (즉, 인간 또는 동물에서) 또는 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 감소 또는 저해시키는 작용제를 상승된 수준의 스핑고신 키나제 유형 2와 관련된 임의의 질환 또는 증가된 세포 증식과 관련된 질환 예컨대 암의 치료에 사용할 수 있다. 스핑고신 키나제 유형 2의 수준에서의 증가는 종양 세포 내의 스핑고신 키나제 유형 2의 수준이 정상 세포 내의 스핑고신 키나제 유형 2의 수준의 약 2 내지 3 배, 정상 세포 내의 스핑고신 키나제 유형 2의 양의 약 10 내지 100 배일 때 결정된다. 스핑고신 키나제 유형 2 RNA를 감소시키는 작용제에는, 제한되지는 않지만, 스핑고신 키나제 유형 2 RNA를 소화할 수 있는 하나 이상의 리보자임, 또는 스핑고신 키나제 유형 2의 번역이 저해 또는 감소되어 그 결과 스핑고신 키나제 유형 2 수준이 감소되도록 스핑고신 키나제 유형 2 RNA에 혼성화할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 DNA로서, 바이러스 엔벨로프 수용체 단백질을 함유하는 프로테오리포좀에 포획된 DNA로서 (Kanoda, Y. 등, (1989), Science ,5, 243, 375) 또는 안티 센스 DNA 또는 RNA가 만들어지도록 표적 세포에서 발현될 수 있는 벡터의 일부로서 투여될 수 있다. 특정 세포 유형에서 발현되는 벡터는, 예를 들어, 유선에 대해 당업계에 공지되어 있다. 유선에서의 유전자 발현의 통상적인 제어의 예에 대해서는 [Furth, J. Mammary Gland Biol. Neopl. ,2, (1997), 373] 참조.

대안적으로, DNA는 캐리어와 함께 주입될 수 있다. 캐리어는 단백질 예컨대 사이토카인, 예를 들어, 인터류킨 또는 폴리라이신-당단백질 캐리어일 수 있다. 이같은 캐리어 단백질 및 벡터 및 이들의 사용 방법은 당업계에 공지되어 있다. 또한, DNA는 작은 금 비드 상에 코팅될 수 있고 이같은 비드를, 예를 들어, 유전자 총으로 피부 내로 도입할 수 있다 (Ulmer, T. B. 등, Science ,259, (1993), 1745).

대안적으로, 항체, 스핑고신 키나제 유형 2를 감소 또는 저해시킬 수 있는, 즉 스핑고신 키나제 유형 2의 발현, 생산 또는 활성을 감소 또는 저해시킬 수 있는 화합물, 예컨대 길항물질은 단리 및 실질적으로 정제된 단백질로서, 또는 스핑고신 키나제 유형 2 감소 또는 저해제가 생산되도록 표적 세포 내에서 발현될 수 있는 발현 벡터의 일부로서 제공될 수 있다. 또한, 공동인자 예컨대 각종 이온, 즉 Ca 또는 효소의 안정성에 영향을 미치는 인자를 투여하여 스핑고신 키나제 유형 2의 발현 및 기능을 조절할 수 있다. 이러한 제형물은 표준 경로에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로, 국소, 경피, 복막내, 경구, 직장 또는 비경구 (예를 들어, 정맥내, 피하, 또는 근육내) 경로에 의해 투여할 수 있다. 또한, 스핑고신 키나제 유형 2 저해 화합물이 천천히 전신적으로 방출되도록, 약물 배달이 바람직한 곳 부근에, 예를 들어, 종양 부위에서 이식되는 생분해성 중합체 내로 스핑고신 키나제 유형 2 저해 화합물을 혼입시킬 수 있다. 생분해성 중합체 및 이들의 사용은, 예를 들어, [Brem 등, J. Neurosurg. ,74, (1991), 441 - 446]에 상세히 기술되어 있다. 이러한 화합물들은 스핑고신 키나제 유형 2의 저해를 실행시키기에 충분한 양으로 수용 대상에게 제공되도록 의도된다. 유사하게, 스핑고신 키나제 유형 2의 발현, 생산, 안정성 또는 기능에 부정적으로 영향을 미칠 수 있는 작용제가 스핑고신 키나제 유형 2의 저해를 실행시키기에 충분한 양으로 수용 대상에게 제공되도록 의도된다. 작용제의 투여량, 투여 경로 등이 이같은 반응에 영향을 미치는데 충분하다면, 양이 스핑고신 키나제 유형 2의 저해 또는 유도를 " 실행시키기" 에 충분한 것으로 말해진다.

세포 증식에서의 스핑고신 키나제 유형 2의 기능과 일치하여, 스핑고신 키나제 유형 2의 수준을 자극하는 작용제, 예컨대 SPHK2의 작동물질은 SPHK2의 감소, 또는 SPHK2가 이같은 증식을 증가시킬 수 있는 세포 증식의 감소와 관련된 임의의 질환, 예를 들어 발육 지연의 치료에 사용될 수 있다.

스핑고신 키나제 유형 2의 발현 또는 기능을 조절하는 작용제를 수용 환자에게 제공하는 것에서, 투여되는 작용제의 투여량은 환자의 연령, 체중, 신장, 성별, 일반적인 의학 상태, 이전의 의학 기록 등과 같은 인자에 따라 변할 것이다. 일반적으로, 수용자에게 약 1 pg/kg 내지 10 mg/kg (환자의 체중) 범위 내의 작용제 투여량으로 제공하는 것이 바람직하지만, 더 낮거나 높은 투여량을 투여할 수 있다.

조성물의 투여를 환자가 허용할 수 있으면 조성물이 " 약학적으로 허용가능" 한 것으로 말한다. 이같은 작용제를, 투여량이 생리학적으로 의미가 있으면, " 치료적 유효량" 으로 투여된다고 말한다. 작용제는 이의 존재로 수용 환자의 생리에서 변화를 검출할 수 있으면 생리학적으로 의미가 있다. 본 발명의 화합물은 약학적으로 유용한 조성물을 제조하기 위한 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있어, 이러한 물질 또는 이의 기능적 유도체가 약학적으로 허용가능한 캐리어 담체와 부가혼합물로 배합된다. 다른 인간 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민을 포함하는 적절한 담체 및 이들의 제형은, 예를 들어, [Remington' sPharmaceutical Sciences , 16판., Osol, A. 편저, Mack Easton PA. (1980)]에 기술되어 있다. 효과적인 투여에 적절한 약학적으로 허용가능한 조성물을 형성시키기 위해, 이같은 조성물은 유효량의 상기 기술된 화합물을 적절한 양의 캐리어 담체와 함께 함유한다.

부가적인 약학적 방법을 사용하여 작용 기간을 제어할 수 있다. 제어 방출 제제는 화합물과 복합체화되거나 화합물을 흡수하는 중합체의 사용을 통해 달성될 수 있다. 제어 배달은 적절한 거대분자 (예를 들어, 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리비닐, 피롤리돈, 에틸렌비닐아세테이트, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 또는 프로타민 술페이트) 및 거대분자의 농도뿐만 아니라 방출을 제어하기 위한 혼입 방법을 선택함으로써 수행될 수 있다. 제어 방출 제제에 의해 작용 기간을 제어하는 또다른 가능한 방법은 본 발명의 화합물을 중합체성 물질, 예컨대 폴리에스테르, 폴리아미노산, 히드로겔, 폴리(락트산) 또는 에틸렌 비닐아세테이트 공중합체의 입자 내로 혼입시키는 것이다. 대안적으로, 이러한 작용제를 중합체성 입자 내로 혼입시키는 것 대신에, 이러한 물질을, 예를 들어, 젤라틴 - 마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트)마이크로캡슐 각각에 대해 히드록시메틸셀룰로스의 계면 중합에 의해 예를 들어 제조된 마이크로캡슐에, 또는 콜로이드성 약물 배달 시스템, 예를 들어, 리포좀, 알부민 미소구체, 마이크로에멀션, 나노입자 및 나노캡슐 또는 마크로에멀션에 포획시킬 수 있다. 이같은 기술은 [Remington' s Pharmaceutical Sciences (1980)]에 기재되어 있다.

본 발명은 상기 기술된 진단 또는 치료 방법에서 사용하기 위한 키트를 또한 제공한다. 본 발명의 이러한 양상에 따른 키트는 하나 이상의 컨테이너, 예컨대 바이알, 튜브, 앰플, 병 등을 함유할 수 있고, 이들은 하나 이상의 본 발명의 조성물을 함유할 수 있다.

본 발명의 키트는 하나 이상의 본 발명의 화합물 또는 조성물, 및 하나 이상의 부형제, 희석제 또는 보조제를 함유할 수 있다.

지금까지 본 발명의 상세히 설명하였고, 이는 하기 실시예를 참조로 더욱 명백히 이해될 것이지만, 하기 실시예는 설명만을 목적으로 본원에 포함되며 본 발명의 범주를 제한하려는 것은 아니다.

하기 물질 및 방법을 하기 기술되는 실시예에서 사용하였다.

실시예

물질

SPP, 스핑고신, 및 N,N-디메틸스핑고신은 Biomol Research Laboratory Inc. (Plymouth Meeting, PA)에서 구입하였다. 모든 다른 지질은 Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL)에서 구입하였다. [g-32P]ATP (3000 Ci/mmol)는 Amersham (Arlington Heights, IL)에서 구입하였다. 폴리-L-라이신 및 콜라겐은 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN)에서 구입하였다. 제한 효소는 New England Biolabs (Beverly, MA)로부터 수득하였다. 다중 마우스 성체 조직의 폴리(A)+RNA 블롯은 Clontech (Palo Alto, CA)에서 구입하였다. " Lipofectamin PLUS" 및 " Lipofectamine" 은 Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)에서 구입하였다.

실시예 1: 마우스 스핑고신 키나제 유형 2 (mSPHK2)의 cDNA 클로닝

EST 데이타베이스의 BLAST 서치로 mSPHK1a의 보존된 도메인 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. 및 Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*,273, (1998), 23721-23728)과 상당한 상동성을 갖지만, 실질적인 서열 차이를 갖는 마우스 EST 클론 (GenBank 등록번호 AA839233)을 동정하였다. 이러한 EST를 사용하여, mSPHK2로 표시되는 SPHK2의 제 2 이성체를 두 개의 상이한 PCR 접근법에 의해 클로닝하였다.

첫번째 접근법에서, 마우스 cDNA 라이브러리 (Stratagene)로부터의 PCR 클로닝 방법을 사용하였다. 약 1 ×10^5파지를 20 개의 150 mm 플레이트에 플레이팅하고, 플라크를 수집하고, 표준 절차를 사용하여 플라스미드를 단리하였다 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G., 및 Struhl, K., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (1987)). 최초 PCR 반응을 서열 특이적 프라이머 (M-3-1, 5'-CCTGGGTGCACCTGCGCCTGTATTGG (서열목록 번호 1)) 및 M13 역프라이머로 수행하였다. 가장 긴 PCR 생성물을 겔 정제하여, 서열 특이적 안티센스 프라이머 (M-3-2, 5'-CCAGTCTTGGGGCAGTGGAGAGCC-3' (서열목록 번호 2)) 및 T3 프라이머를 함유하는 제 2 PCR에 대한 주형으로 사용하였다. 최종 PCR 생성물을 " TOPO TA" 클로닝 키트 (Invitrogen)를 사용하여 서브클로닝한 후, 서열분석하였다. 백금 고적합도 DNA 중합효소 (Life Technologies)를 하기 사이클링 파라메터로 PCR 증폭에 사용하였다: 94 ℃에서 30 초, 55 ℃에서 45 초, 및 70 ℃에서 2분을 30 사이클, 최종 프라이머 확장은 72 ℃에서 5분.

제 2 접근법에서, 5'RACE PCR을 제조자의 설명에 따라 cDNA 말단의 급속 증폭을 위한 5'RACE System (Life Technologies)으로 수행하였다. 폴리(A)+RNA를 Swiss 3T3 섬유아세포로부터 Quick Prep mRNA 정제 키트 (Pharmacia)를 사용하여 단리하였다. 제 1 가닥 cDNA를 AA839233의 서열로부터 고안된 표적 안티센스 프라이머 (m-GSP1, 5'-AGGTAGAGGCTTCTGG (서열번호 3)) 및 SuperScript II 역전사효소 (Life Technologies)를 사용하여 5 ㎎의 Swiss 3T3 폴리(A)+RNA로 42 ℃에서 50 분 동안 합성하였다. 주형으로서의 이러한 cDNA 및 LA Taq 중합효소 (TaKaRa)를 사용하는 두 연속적인 PCR 반응을 하기와 같이 수행하였다: 제 1 PCR은 5'RACE Abridged Anchor 프라이머 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG (서열번호 4) 및 표적 특이적 안티센스 프라이머 m-GSP2, 5'-GCGATGGGTGAAAGCTGAGCTG (서열번호 5)로 94 ℃에서 2분 후, 94 ℃에서 1 분, 55 ℃에서 1 분, 72 ℃에서 2 분을 30 사이클, 그리고 72 ℃에서 5 분 동안 프라이머 확장; 제 2 PCR은 Abridged Universal Amplification 프라이머 (AUAP), 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC (서열번호 6) 및 m-GSP3, 5'-AGTCTCCAGTCAGCTCTGGACC (서열번호 7)로, 어닐링 온도가 65 ℃인 것을 제외하고는 동일한 조건을 사용. PCR 생성물을 pCR2.1 내로 클로닝하여 서열분석하였다. PCR 생성물을 pCR3.1 및 pcDNA 3 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다.

실시예 2: 인간 스핑고신 키나제-2 (hSPHK2)의 cDNA 클로닝

HEK293 세포로부터의 폴리(A)+RNA를 5'RACE 반응에 사용하였다. 표적 특이적 안티센스 프라이머 (h-GSP1, 5'-CCCACTCACTCAGGCT (서열번호 8); h-GSP2, 5'-GAAGGACAGCCCAGCTTCAGAG (서열번호 9); 및 h-GSP3, 5'-ATTGACCAATAGAAGCAACC (서열번호 10))를 인간 EST 클론 (등록번호 AA295570)의 서열에 따라 고안하였다. 제 1 가닥 cDNA를 5 ㎍의 HEK293 mRNA 및 h-GSP1으로 합성하였다. 이러한 cDNA를 5'RACE Abridged Anchor Primer 및 h-GSP2를 사용하는 첫번째 PCR 반응에서 주형으로 사용하였다. 이어서, 네스트 PCR을 AUAP 프라이머 및 h-GSP3을 사용하여 수행하였다. 생성된 PCR 생성물을 상기 기술된 바와 같이 클로닝 및 서열분석하였다.

실시예 3: SPHK2의 과발현 및 활성

인간 배아 신장 세포 (HEK293, ATCC CRL-1573) 및 NIH 3T3 섬유아세포 (ATCC CRL-1658)를 [Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., 및 Spiegel, S., J. Cell Biol. ,147, (1999), 545-558]에 기술된 바와 같이 배양하였다. HEK293 세포를 폴리-L-라이신이 코팅된 6웰 플레이트에 6×10^{5}/웰로 파종하였다. 24 시간 후, 세포를 웰당 1 ㎍의 벡터 단독 또는 스핑고신 키나제 구축물을 함유하는 벡터 및 6 ㎕의 " Lipofectamine PLUS" 시약 플러스 4 ㎕의 " Lipofectamine" 시약으로 형질감염시켰다. 형질감염 1 내지 3일 후, 세포를 수확하고, [Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 23722-23728]에 기술된 바와 같이 동결-해동에 의해 용해시켰다. 일부 실험에서, 세포 용해물을 100,000 ×g에서 60 분 동안 원심분리에 의해 사이토졸 및 막 분획으로 분획화시켰다. SPHK 활성을, 달리 지시되지 않으면, 200 mM KCl을 함유하는, 키나제 완충액 내의 [g-32P]ATP (Olivera, A. 및 Spiegel, S. Methods in Molecular Biology , (Bird, I.M. 편저), (1998), Vol. 105, 233-242, Humana Pres, Inc., Totowa, N.J.), 및 4 ㎎/㎖ BSA와의 복합체로서 제조된 스핑고신의 존재 하에 결정하였다. 32P-SPP를 TLC에 의해 분리하고, 상기 기술된 바와 같은 포스포이미저로 정량하였다.

실시예 4: SPP의 지질 추출 및 측정

세포를 PBS로 세정하고 2.5 ㎕ 진한 HCl을 함유하는 1 ㎖의 메탄올 내에 스크랩하였다. 2 ㎖의 클로로포름/1M NaCl (1:1, v/v) 및 100 ㎕ 3N NaOH를 첨가하여 지질을 추출하고, 상을 분리시켰다. SPP를 함유하고 스핑고신, 세라마이드 및 대부분의 인지질이 없는 염기성 수성 상을 실리콘화 유리관에 옮겼다. 유기 상을 1 ㎖ 메탄올/1M NaCl (1:1, v/v) 플러스 50 ㎕ 3N NaCl로 재추출하고, 수성 분획을 합쳤다. 수성 상 내의 SPP 및 유기상 내의 전체 인지질의 질량을 [Edsall, L. C., Pirianov, G. G., 및 Spiegel, S., J. Neurosci. ,17, (1997) 6952-6960; Edsall, L. C.], 및 [Spiegel, S., Anal. Biochem. ,272, (1999) 80-86)]에 기술된 대로 정확히 측정하였다.

실시예 5: 노던 블롯 분석

다중 성체 마우스 및 인간 조직 및 마우스 배아로부터의 레인 당 2 ㎍의 폴리(A)+RNA를 함유하는 폴리(A)+RNA 블롯을 Clontech에서 구입하였다. 겔 정제 및 [a-32P]dCTP로의 라벨링 후, 블롯을 마우스 EST AA389187의 1.2 kb 단편 (mSPHK1 프로브), pCR3.1-mSPHK2의 1.5 kb EcoRI 단편, 또는 pCR3.1-hSPHK1의 0.3 kb PvuII 단편과 혼성화시켰다. 65 ℃에서 하룻밤 동안 " ExpressHyb" 완충액 (Clontech) 내에서의 혼성화를 제조자의 프로토콜레 따라 수행하였다. 블롯을 로딩 대조군으로서의 b-액틴 (Clontech)과 다시 프로브화시켰다. Molecular Dynamics Phosphoimager를 사용하여 밴드를 정량하였다.

결과

유형 2 스핑고신 키나제의 클로닝

EST 데이타베이스의 BLAST 서치로 최근에 클로닝된 mSPHK1a 서열과 상당한 상동성을 나타내는 여러 EST를 동정하였다. 특이적 프라이머를 이러한 EST의 서열로부터 고안하여, 마우스 뇌 cDNA 라이브러리로부터의 PCR 클로닝 및 5'RACE PCR의 접근법에 의해 새로운 유형의 마우스 및 인간 스핑고신 키나제 (mSPHK2 및 hSPHK2로 명명)를 클로닝하는데 사용하였다.

mSPHK2 및 hSPHK2의 아미노산 서열의 ClustalW 정렬을 도 1A에 나타낸다. mSPHK2 및 hSPHK2의 오픈 리딩 프레임은 83 % 동일성 및 90 % 유사성으로 각각 617 및 618 아미노산을 코딩한다. SPHK1에서 앞서 동정된 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 23722-23728), 5 개의 고도로 보존된 영역 (C1 내지 C5) 또한 양 유형의 2 키나제에 존재한다. 흥미롭게도, SPHK1의 C1 도메인 내의 불변의 GGKGK 양전하-하전 모티브가 SPHK2에서는 GGRGL로 변화되어, 이것이 이전에 제안된 바와 같은 ATP 결합 부위의 일부가 아닐 수 있음을 제안한다 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 23722-23728). 모티브 서치는 mSPHK2 및 hSPHK2의 보존된 C1 도메인 바로 직전에 시작되는 영역 (아미노산 147 내지 284)이 또한 디아실글리세롤 키나제 촉매 부위에 대한 상동성을 갖는다는 것을 또한 나타냈다.

SPHK1과 비교하여, 양 SPHK2는 236 개의 추가적인 아미노산을 함유하는 더 긴 단백질을 코딩한다 (도 1B). 또한, 이들의 서열은 중심 및 아미노 말단에서 SPHK1과 상당히 다르다. 그러나, mSPHK2의 아미노산 140 후, 유형 1 및 유형 2 SPHK의 서열은 유사성 정도가 크다. 도메인 C1 내지 C4를 포함하는 이러한 서열 (mSPHK1에 대해 아미노산 9 내지 226; mSPHK2에 대해 아미노산 141 내지 360)은 47 % 동일성 및 79 % 유사성을 갖는다 (도 1B). 단백질의 C 말단 부분에는, C5 도메인을 포함하는 큰 상동성 영역이 mSPHK1에 대해 아미노산 227 내지 381 및 mSPHK2에 대해 480 내지 617에 또한 존재하며, 43 % 동일성 및 78 % 유사성을 갖는다 (도 1B). 이러한 도메인 내의 차이는 SPHK2가 단순한 유전자 중복 이벤트로서 발생하지 않았음을 제안한다.

스핑고신 키나제 유형 2의 조직 분포

성체 마우스에서의 SPHK2 mRNA 발현의 조직 분포를 노던 블롯에 의해 SPHK1과 비교하였다 (도 2A). 성체 간, 심장, 신장, 정소 및 뇌를 포함하여 대부분의 조직에서, 우세한 3.1 kb SPHK2 mRNA 종이 검출되었고, 이는 편재(遍在)성 발현을 가리킨다. 그러나, 발현 수준은 현저히 변동성이고, 성체 간 및 심장에서 최고이지만 골격근 및 지라에서는 거의 검출되지 않았다 (도 2A). 반면에, mSPHK1의 발현 패턴은 상당히 상이하여, 성체 폐, 지라 및 간에서 mRNA가 가장 높이 발현되었지만, 간에서의 발현은 mSPHK2와 같이 우세하지 않았다. mSPHK1 및 mSPHK2 모두 배아 발생 동안 일시적으로 및 구분적으로 발현되었다. mSPHK1는 마우스 배아 7일 (E7)에 높게 발현되었고, E11 후 극적으로 감소하였다 (도 2B). 반면에, E7에, mSPHK2 발현은 mSPHK1보다 훨씬 낮았고, E17까지 점진적으로 증가하였다. hSPHK2 2.8 kb mRNA 전사물은 성체 신장, 간 및 뇌에서 주로 발현되었고, 다른 조직에서는 발현이 훨씬 낮았다 (도 2C). 흥미롭게도, 인간 신장에서의 SPHK2 발현은 매우 높고 마우스에서는 비교적 훨씬 낮은 반면, 간에서는 반대 패턴이었다.

재조합 스핑고신 키나제 유형 2의 활성

mSPHK2 및 hSPHK2가 진정한 SPHK를 코딩하는지를 연구하기 위해, HEK293 세포를 상응하는 cDNA를 함유하는 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 이전의 연구들이 SPHK가 가용성 및 막-결합 형태 모두로 세포에서 존재할 수 있다고 지적하였으므로 (Olivera, A., 및 Spiegel, S., Nature ,365, (1993) 557-560; Banno, Y., Kato, M., Hara, A., 및 Nozawa, Y., Biochem. J. ,335, (1998) 301-304; Buehrer, B. M., 및 Bell, R. M., J. Biol. Chem. ,267, 3154-3159; Oivera, A. Rosenthal, J., 및 Spiegel, S., Anal. Biochem. ,223, (1994) 306-312; Ghosh, T. K., Bian, J., 및 Gill, D. L., J. Biol. Chem. ,269, (1994), 22628-22635), 재조합 SPHK2 활성을 형질감염된 세포의 사이토졸 및 막 분획 모두에서 측정하였다. [Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 23722-23728]에 앞서 기술되었듯이, 미처리된 또는 벡터로 형질감염된 HEK 293 세포는 낮은 수준의 SPHK 활성을 갖는다 (도 3A). mSPHK2 및 hSPHK2로의 형질감염 24 시간 후, 생체외 SPHK 활성이 각각 20 및 35 배 증가하였고, 이후 감소하였다 (도 3A). 반면에, mSPHK1로 형질감염된 세포로부터의 SPHK 활성은 훨씬 더 높아, 형질감염 24 시간 후 기본 수준보다 610 배 높았고, 이러한 수준에서 적어도 3일 동안 유지되었다 (데이타는 나타내지 않음). HEK293 세포에서와 같이, mSPHK1으로의 NIH 3T3 섬유아세포의 형질감염은 mSPHK2으로보다 훨씬 높은 SPHK 활성을 나타냈다. 형질감염되지 않은 세포와 유사하게, mSPHK1으로 형질감염된 세포에서의 대부분의 SPHK 활성이 사이토졸성이라는 것이 앞서 발견되었다 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 23722-23728). 유사하게, 카이트-둘리틀 수치요법 플롯에서는 소수성 막-통과 도메인의 존재가 제안되지 않았지만, mSPHK2 또는 hSPHK2로 형질감염된 세포에서, 각각 17% 및 26%의 SPHK 활성이 막-결합된 것이었다 (도 3B).

또한 mSPHK2 및 hSPHK2로의 HEK 293 세포의 형질감염으로 SPHK에 의해 형성되는 생성물인 SPP가 각각 2.2 및 3.3 배 증가하였고 (도 3C), 이는 수준에서의 배 증가와 생체외 효소 활성의 상관관계의 결핍을 나타내는 mSPHK1a로의 형질감염 후 스핑고지질 대사물 수준의 이전의 연구와 일치하였다 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 23722-23728; Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., 및 Spiegel, S., J. Cell Biol. ,147, (1999), 545-558).

재조합 mSPHK2의 특징

기질 특이성

SPHK2가 SPHK1에 고도로 상동성이지만, 실질적인 서열 차이가 있다. 따라서, 이들의 효소적 성질을 비교하는 것이 흥미롭다. 전형적인 미하엘리스-멘텐 (Michaelis-Menten) 키네틱이 재조합 SPHK2에 대해 관찰되었다 (데이타는 나타내지 않음). 기질로서의 D-에리트로-스핑고신에 대한 Km은 3.4 μM로, SPHK1에 대해 이전에 발견된 Km (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 12576-12583)과 거의 동일하였다. 천연 발생 D-에리트로-스핑고신 이성체가 SPHK1에 대한 가장 양호한 기질이었지만 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. ,273, (1998) 23722-23728), SPHK2에 대해서는 D-에리트로-디히드로스핑고신이 D-에리트로-스핑고신보다 양호한 기질이다 (도 4A). 또한, D,L-트레오-디히드로스핑고신 및 파이토스핑고신은 SPHK1에 의해서는 전혀 인산화되지 않았지만, SPHK2에 의해서는 스핑고신보다는 훨씬 덜 효율적이기는 하나 상당히 인산화되었다. SPHK1처럼, N,N-디메틸스핑고신 (DMS), C2- 또는 C6- 세라마이드, 디아실글리세롤, 및 포스파티딜이노시톨을 포함하는 다른 지질은 SPHK2에 의해 인산화되지 않았고 (도 6A), 이는 스핑고이드 염기에 대한 높은 특이성을 제시한다.

DMS 및 DHS는 SPHK1의 강력한 경쟁적 저해제인 것으로 앞서 나타났고 (Edsall, L. C., Van Brocklyn, J. R., Cuvillier, O., Kleuser, B., 및 Spiegel, S., Biochemistry ,37, (1998), 12892-12898), 다양한 생리적 자극으로 인한 세포내 SPP 수준에서의 증가를 차단하기 위해 사용되어 왔다 (Olivera, A., 및 Spiegel, S., Nature ,365, (1993), 557-560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coo, O. A., Gutkind, S., 및 Spiegel, S., Nature,381, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G., 및 Spiegel, S., J. Neurosci ,17, (1997), 6952-6960; Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., 및 van Koppen, C. J., EMBO J.,17, 2830-2837; Choi, O, H., Kim, J.-H., 및 Kinet, J.-P.,Nature ,380, (1996), 634-636; Melendez, A., Floto, R. A., Gillooly, D. J., Harnett, M. M., 및 Allen, J. M., J. Biol. Chem. ,273, 9393-9402; Machwate, M., Rodan, S. B., Rodan, G. A., 및 Harada, S. I., Mol. Pharmacol.,54, (1998), 70-77). 그러나, DHS는 SPHK2에 대한 기질이고 생성물인 디히드로SPP는 세포 표면 SPP EDG-1 패밀리 수용체에 결합하여 활성화시키는데 SPP만큼 강력하므로, 이는 SPHK2의 역할을 연구하기 위한 도구로 사용할 수 없다. 따라서, 기질이 아닌 DMS의 SPHK2에 대한 저해 잠재력을 특징화하는 것이 중요하였다. 놀랍게도, DMS가 또한 SPHK2의 강력한 저해제이지만 (도 4B), 비-경쟁적 방식으로 작용한다는 것이 발견되었다 (도 4C 및 도 4D). SPHK2로의 DMS에 대한 Ki는 12 μM로, SPHK1으로의 4 μM의 Ki보다 약간 더 높아, DMS를 양 유형의 SPHK을 저해하기 위한 도구로서 유용하게 한다.

mSPHK2는 6.5 내지 8의 중성 pH 범위에서 가장 높은 활성을 갖고 최적 활성은 pH 7.5에서였고 (도 5A), pH 의존성은 SPHK1과 유사하였다 (데이타는 나타내지 않음). 활성은 이러한 범위 이하의 pH 값에서 급격히 감소하였다.

KCl 및 NaCl의 효과

인간 혈소판에서의 대부분의 SPHK 활성은 막-결합된 것이고 1 M NaCl로 추출가능하다 (Banno, Y., Kato, M., Hara, A. 및 Nozawa, Y., Biochem. J. ,335, (1998), 301-304). 또한, 혈소판으로부터의 염으로 추출가능한 SPHK는 사이토졸 효소와 상이한 성질을 갖는다. 따라서, 재조합 SPHK1 및 SPHK2에 대한 높은 염농도의 효과를 결정하는 것이 흥미롭다. 흥미롭게도, 높은 이온 강도가 이들의 활성에 대해 완전히 반대의 효과를 갖는다는 것이 발견되었다. SPHK1은 200 mM의 농도에서 각각 50 % 저해를 야기하는 NaCl 및 KCl에 의해 현저히 저해되었다 (도 5B). 반면에, SPHK2 활성은 증가하는 염 농도에 의해 급격히 자극되어, 400 mM의 농도에서 최대 효과였고, KCl은 NaCl보다 훨씬 더 효과적이었다. 그러나, 이러한 농도 초과에서, 1 M 염에서도 상승된 대로임에도 불구하고 SPHK2 활성은 급격히 감소하였다 (도 5C). 따라서, SPHK1 및 SPHK2의 활성은 이온 강도의 변화에 대해 완전히 반대되는 반응을 갖는다. 높은 농도의 염의 존재 및 부재 하에서의 mSPHK2의 키네틱 분석은 스핑고신에 대한 Km은 변하지 않았지만 Vmax는 증가하였음을 나타냈다 (도 5D 및 도 5E). 이러한 관찰의 생리학적 중요성은 아직 결정되지 않았지만, 상이한 세포이하 국재성에 관련될 것이다.

기질 제시

스핑고지질은 매우 친지질성이므로, 생체외 SPHK 분석에서, 스핑고신은 일반적으로 트리톤 X-100과의 미셀 형태로 또는 BSA와의 복합체로서 제시된다 (Olivera, A., Rosenthal, J., 및 Spiegel, S., J. Cell. Biochem. ,60, (1996), 529-537; Olivera, A., Barlow, K. D., 및 Spiegel, S., Methods Enzymol ,311, (2000), 215-223). 또한, 트리톤 X-100과 같은 세제는 래트 뇌 추출물 내의 SPHK (Buehrer, B. M., 및 Bell, R. M., J. Biol. Chem. ,267, (1992), 3154-3159) 및 래트 신장으로부터의 효소 (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem.,273, (1998), 12576-12583)의 활성을 자극하는 것으로 나타났고, 래트 신장 SPHK의 안정성이 특정 세제의 존재 하에 증가한다는 것이 앞서 발견되었다 (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem.,273, (1998), 12576-12583). 그러나, SPHK1 및 SPHK2의 활성에 대한 증가하는 농도의 트리톤 X-100의 효과를 비교할 때, 일부 뜻밖의 결과가 발견되었다. 0.005 % 미만의 세포 농도는 효과를 갖지 않았지만, 더 높은 농도에서, SPHK2 활성은 저해되었고 SPHK1 활성은 현저히 증가하였다 (도 6A). 0.5 %의 트리톤 X-100의 농도에서, SPHK1 활성은 4 배 이상 증가한 반면 SPHK2는 거의 완전히 저해되었다.

흥미롭게도, 스핑고신-BSA 복합체, 즉 0.2 ㎎/㎖ BSA를 기질로 하는 일반적인 SPHK 분석 조건으로부터 BSA 농도를 증가시키는 것은 SPHK1 활성에 영향을 미치지 않으면서 SPHK2 활성의 농도-의존적 저해를 야기하였다 (도 6B).

따라서, 세포 내 또는 조직 추출물 내의 SPHK 활성을 측정할 때, 활성에 대한 트리톤 X-100 및 BSA의 상이한 효과가 두 유형의 SPHK의 상대적인 발현에 따라 상이한 결과를 산출시킬 수 있으므로 기질 제시 방법 (혼합 미셀 또는 BSA 복합체 내인지)은 주의깊게 최적화되어야 한다.

인지질의 효과

산성 인지질, 특히 포스파티질세린, 및 포스파티딘산 및 포스파티딜이노시톨, 및 카르디올리핀 (더 적은 정도)은 Swiss 3TS 섬유아세포 용해물 내의 SPHK 활성에서 용량-의존적 증가를 야기하는 반면, 중성 인지질은 효과를 갖지 않는다 (Olivera, A., Rosenthal, J., 및 Spiegel, S., J. Cell. Biochem. ,60, (1996), 529-537). 이와 일치하여, 재조합 SPHK1 및 SPHK2는 포스파티딜세린에 의해 자극되었다; 이들 모두의 활성은 40 ㎍/㎖의 농도에서 최대로 증가하였고 (도 6C), 용량-의존적 방식으로 더 높은 농도에 의해 저해되었다. 포스파티딜세린의 이러한 효과는 포스파티딜콜린을 포함하는 다른 인지질은 효소 활성에 대해 효과를 갖지 않으므로 특이적인 것으로 나타났다. 반면에, 인간 혈소판 내의 세가지 주요 형태의 SPHK의 활성은 포스파티딜세린에 의해 영향을 받지 않았다 (Banno, Y., Kato, M., Hara, A, 및 Nozawa, Y., Biochem. J. ,335, (1998), 301-304).

포스파티딜세린이 SPHK의 효소 활성을 증강시키는 메카니즘은 아직 이해되지 않았다. 한가지 가능성은 기질인 스핑고신을 더 잘 제시하는 독특한 막-구조화 성질을 포스파티딜세린이 갖는 것이다. 두번째 가능성은 세린 헤드그룹의 구조를 특이적으로 인식하는 결정소를 SPHK가 함유하고 이러한 결정소가 SPHK와 막의 상호작용 시에만 노출될 수 있는 것이다. 이와 관련하여, 포스파티딜세린에 대한 단백질 키나제 C의 주목할만한 특이성에 대한 분자적 기초는 더 많은 토론의 주제였다. 그러나, 최근의 데이타는 막구조가 아니라 지질 구조가 포스파티딜세린에 의한 단백질 키나제 C의 조절에서 주요 결정소임을 나타낸다 (Johnson, J. E., Zimmerman, M. L., Daleke, D. L., 및 Newton, A. C., Biochemistry ,37, (1998), 12020-12025).

SPHK1에 대한 상당한 상동성을 갖는 데이타베이스 내의 다중 EST의 존재뿐만 아닐 상이한 SPHK를 코딩하는 사카로미세스 세레비지아에 내의 여러 유전자의 동정 (Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., 및 Dickson, R. C., J. Biol. Chem. ,273, (1998), 19437-19442)은 다수의 중요한 SPHK 유전자 패밀리가 있을 있음을 제안하였다. SPHK2가 SPHK1에 대해, 특히 유형 1 SPHK에서 동정된 앞서 동정된 보존된 도메인 내에서 고도의 상동성을 갖지만 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., 및 Spiegel, S., J. Biol. Chem. , 273, (1998), 23722-23728), SPHK2가 훨씬 더 크고 (SPHK1 및 SPHK2에 대해 각각 65.2 및 65.6 kDa 대 mSPHK1a에 대해 42.4 kDa), 부가적인 236 아미노산을 함유한다. 또한, 이의 상이한 조직 발현, 일시적인 발생 발현, 세포 국재성, 및 증가하는 이온 강도 및 세제에 대한 키네틱 성질은 SPHK1과 완전히 다르고, 이는 SPHK2가 아마 상이한 기능을 갖고 세포 성장 및 생존의 조절에서 탁월한 기능을 하는 것으로 공지된 SPHK1과 상이한 방식으로 SPP의 수준을 조절함을 제시한다. 따라서, 유형 2 SPHK는 SPP에 기인하는 수많은 생물학적 반응의 일부, 예컨대 혈관신생 및 알레르기 반응의 조절에 수반되는 것으로 간주된다.

Genbank 1 EMBC 뱅크 등록번호 bankit325787에 대한 서열

```
1 aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcttcca gaaccaaaga gaagtcagcc
61 tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggcctttcc ccgtccctgc tctaacactc
121 tccaggggta aagggaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg
181 tggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcggtggc tcgcggagga cccggtgggc
241 tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggctct
301 gccatttaaa gttgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta
361 ggagtgcttg ggactgaacc agggtcatgg ccccaccacc actactgcca gtggctgcca
421 gcactccaat cctgcacggc gagtttggtt cctacccggc caacggccca cggtttgccc
481 tcaccctcac aacacaagcc ctacacatac agcgactacg cccaaagcca gaagcccggc
541 cccgagatgg tctagtctct ctggatgagg tctcgggctg tggcaccctg cagagccgta
601 gccccgagga cactgcagcc tacttctgca tctacaccta cccacgtggc cgtcgagggg
661 gccggcgcag agctacgcgg accttccggg cggatggggc caccacttat gaggagaatc
721 gtgcagaggc ccagcgctgg gccactgccc tcacgtgtct cctccgagga gtgcctctgt
781 caggggacca ggaaatcacc cctgaattgc tgccccggaa gcccaggctg ctcatattgg
841 tcaatccctt tggggggcgg ggcctggcct ggcagcgctg tatggaccac gtggtgccaa
901 tgatctctga agctgggctg tccttcaacc tcatacagac agaacgacag aaccatgccc
961 gtgagctggt gcaggggtta agcctgagtg agtgggaagg cattgtcact gtgtctggag
1021 acgggctgct ttacgaggtg ctgaatgggc tccttgatcg gccagactgg gaggatgccg
1081 tgcggatgcc cattggtgtc ctcccctgtg gatcgggcaa tgcgctagct ggggcggtga
1141 gccatcatgg cgggtttgag caggttgtcg gtgttgacct gttgctcaac tgctcgcttc
1201 ttctctgccg tggtggcagc catcctctgg acttgctctc tgtgacgcta gcctcgggat
1261 cccgctgttt ttccttcctg tcagtggcct ggggattctt gtcagatgtg gacattcaca
1321 gtgagcgctt cagggccctg ggcagcgctc gattcacact gggtgcagtg ctaggcctgg
1381 cctcgttgca tacctaccgt ggacgcctct cctacctccc cgctaccaca gaaccagcct
1441 tgcccatccc aggccacagt ctgcctcgag ccaagtcaga actagtcttg gctccagccc
1501 cagcccccgc cgccacccac tcgcctctac atcgatctgt gtctgacctg cccctgcccc
1561 ttccccagcc tgccttggtc tcccctggct cccctgagcc cctgcctgac ctgtccctca
1621 atggtggtgg tccagagctg actggagact ggggaggagc tggggatgca cctctgtccc
1681 cagacccact gctgccttca tcccccaacg ctctcaaaac agctcagctt tcacccatcg
1741 ctgaagggcc cccagaaatg ccagcatctt cggggttcct gcctcccacc cacagtgccc
1801 cagaagcctc tacctggggc ccagtggacc acctcctccc tcccctgggc tctccactgc
1861 cccaagactg ggtgacaata gagggggagt ttgtactcat gttgggcatc ttgacgagcc
1921 acctctgcgc agacctgatg gcagccccac atgcacgctt tgatgatggc gttgtgcacc
1981 tgtgttgggt gcggagcggc atctcacggg ctgcacttct acgcattttt ctggccatgg
2041 agcatggaaa ccacttcagc ctgggctgcc cccatctggg ctatgctgca gcacgtgcct

2101 tccgccttga accactcacg cctcgtggcc tgctcactgt agatggggag ttagtggagt
2161 atgggccaat acaggcgcag gtgcacccag gtctcgccac gctgctcact gggcctgcag
2221 gtcaaaagcc acaagcctga acgagcctaa aagcatggcg agttggtgga accagcgccc
2281 cataggctaa gatctatcat ttacaggtag aagtggggcc cgcactcaga actgtgagga
2341 gggtggagag tggtcctgac cctcagttcc cagaggacct agaggctcga gggtggggcc
2401 tgcctttctt gatgtccaat gatggggcct ggaatgtatg agctagcaag gcttcttcag
2461 cttattgacc agccagggtt tcttcttgcc tactccggtg cctctacttg actggccaat
2521 cagcccttga ggggcaggtt cccccaggtg gtccccagat ttgcactaat gttcctcccc
2581 tggccagtta gggatgggat gttctgtgtc ttgtgtgtcc ctctccctag tctaaaaagc
2641 aattgaaaag gtctatgcaa taaaggttgt tgcttccctc taaaaaaaaa aaaaaaa
```

Genbank 1 EMBC 뱅크 등록번호 bankit325752에 대한 서열

```
1 gccaccatgg ccccgccccc accgccactg gctgccagca ccccgctcct ccatggcgag
61 tttggctcct acccagcccg aggcccacgc tttgccctca cccttacatc gcaggccctg
121 cacatacagc ggctgcgccc caaacctgaa gccaggcccc ggggtggcct ggtcccgttg
181 gccgaggtct caggctgctg caccctgcga agccgcagcc cctcagactc agcggcctac
241 ttctgcatct acacctaccc tcggggccgg cgcggggccc ggcgcagagc cactcgcacc
301 ttccgggcag atggggccgc cacctacgaa gagaaccgtg ccgaggccca gcgctgggcc
361 actgccctca cctgtctgct ccgaggactg ccactgcccg gggatgggga gatcacccct
421 gacctgctac ctcggccgcc ccggttgctt ctattggtca atccctttgg gggtcggggc
481 ctggcctggc agtggtgtaa gaaccacgtg cttcccatga tctctgaagc tgggctgtcc
541 ttcaacctca tccagacaga acgacagaac cacgcccggg agctggtcca ggggctgagc
601 ctgagtgagt gggatggcat cgtcacggtc tcgggagacg ggctgctcca tgaggtgctg
661 aacgggctcc tagatcgccc tgactgggag gaagctgtga agatgcctgt gggcatcctc
721 ccctgcggct cgggcaacgc gctggccgga gcagtgaacc agcacggggg atttgagcca
781 gccctgggcc tcgacctgtt gctcaactgc tcactgttgc tgtgccgggg tggtggccac
841 ccactggacc tgctctccgt gacgctggcc tcgggctccc gctgtttctc cttcctgtct
901 gtggcctggg gcttcgtgtc agatgtggat atccagagcg agcgcttcag ggccttgggc
961 agtgcccgct tcacactggg cacggtgctg ggcctcgcca cactgcacac ctaccgcgga
1021 cgcctctcct acctccccgc cactgtggaa cctgcctcgc ccacccctgc ccatagcctg
1081 cctcgtgcca agtcggagct gaccctaacc ccagacccag ccccgcccat ggcccactca
1141 cccctgcatc gttctgtgtc tgacctgcct cttcccctgc cccagcctgc cctggcctct
1201 cctggctcgc cagaacccct gcccatcctg tccctcaacg gtgggggccc agagctggct
1261 ggggactggg gtggggctgg ggatgctccg ctgtccccgg acccactgct gtcttcacct
1321 cctggctctc ccaaggcagc tctacactca cccgtctccg aaggggcccc cgtaattccc
1381 ccatcctctg ggctcccact tcccacccct gatgcccggg taggggcctc cgacctgcgg
1441 ccgcccgacc acctgctgcc tccgctgggc accccgctgc ccccagactg gtgacgctg
1501 gagggggact ttgtgctcat gttggccatc tcgcccagcc acctaggcgc tgacctggtg
1561 gcagctccgc atgcgcgctt cgacgacggc ctggtgcacc tgtgctgggt gcgtagcggc
```

```
1621 atctcgcggg ctgcgctgct gcgccttttc ttggccatgg agcgtggtag ccacttcagc
1681 ctgggctgtc cgcagctggg ctacgccgcg gcccgtgcct tccgcctaga gccgctcaca
1741 ccacgcggcg tgctcacagt ggacggggag caggtggagt atgggccgct acaggcacag
1801 atgcaccctg gcatcggtac actgctcact gggcctcctg gctgcccggg gcgggagccc
1861 tgaaactaaa caagcttggt acccgccggg ggcggggcct acattccaat ggggcggagc
1921 ttgagctagg gggtgtggcc tggctgctag agttgtggtg gcaggggccc tggccccgtc
1981 tcaggattgc gctcgctttc atgggaccag acgtgatgct ggaaggtggg cgtcgtcacg
2041 gttaaagaga aatgggctcg tcccgagggt agtgcctgat caatgagggc ggggcctggc
2101 gtctgatctg gggccgccct tacggggcag ggctcagtcc tgacgcttgc cacctgctcc
2161 taccccggcca ggatggctga gggcggagtc tattttacgc gtcgcccaat gacaggacct
2221 ggaatgtact ggctggggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc
2281 ccatccactc cggtgcctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttccccg
2341 gggccggcgc taggatttgc actaatgttc ctctccccgc
```

서열번호 14

인간 SPHK2의 아미노산 서열

```
MAPPPPPLAASTPLLHGEFGSYPARGPRFALTLTSQALHIQRLRPKPEARPRGGLVPLAEVSGCCTLRSR
SPSDSAAYFCIYTYPRGRRGARRRATRTFRADGAATYEENRAEAQRWATALTCLLRGLPLPGDGEITPDL
LPRPPRLLLLVNPFGGRGLAWQWCKNHVLPMISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSEWDGIVTVSG
DGLLHEVLNGLLDRPDWEEAVKMPVGILPCGSGNALAGAVNQHGGFEPALGLDLLLNCSLLLCRGGGHPL
DLLSVTLASGSRCFSFLSVAWGFVSDVDIQSERFRALGSARFTLGTVLGLATLHTYRGRLSYLPATVEPA
SPTPAHSLPRAKSELTLTPDPAPPMAHSPLHRSVSDLPLPLPQPALASPGSPEPLPILSLNGGGPELAGD
WGGAGDAPLSPDPLLSSPPGSPKAALHSPVSEGAPVIPPSSGLPLPTPDARVGASTCGPPDHLLPPLGTP
LPPDWVTLEGDFVLMLAISPSHLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRAALLRLFLAMERGSHFSLG
CPQLGYAAARAFRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPPGCPGREP
```

서열번호 12

마우스 SPHK2의 아미노산 서열

MAPPPLLPVAASTPILHGEFGSYPANGPRFALTLTTQALHIQRLRPKPEARPRDGLVSLDEVSGCGTLQS
RSPEDTAAYFCIYTYPRGRRGGRRRATRTFRADGATTYEENRAEAQRWATALTCLLRGVPLSGDQEITPE
LLPRKPRLLILVNPFGGRGLAWQRCMDHVVPMISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSEWEGIVTVS
GDGLLYEVLNGLLDRPDWEDAVRMPIGVLPCGSGNALAGAVSHHGGFEQVVGVDLLLNCSLLLCRGGSHE
LDLLSVTLASGSRCFSFLSVAWGFLSDVDIHSERFRALGSARFTLGAVLGLASLHTYRGRLSYLPATTEE
ALPIPGHSLPRAKSELVLAPAPAPAATHSPLHRSVSDLPLPLPQPALVSPGSPEPLPDLSLNGGGPELTG
DWGGAGDAPLSPDPLLPSSPNALKTAQLSPIAEGPPEMPASSGFLPPTHSAPEASTWGPVDHLLPPLGSE
LPQDWVTIEGEFVLMLGILTSHLCADLMAAPHARFDDGVVHLCWVRSGISRAALLRIFLAMEHGNHFSLG
CPHLGYAAARAFRLEPLTPRGLLTVDGELVEYGPIQAQVHPGLATLLTGPAGQKPQA

【서열목록】

```
<110> SANKYO COMPANY, LIMITED
      GEORGETOWN UNIVERSITY

<120> Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoforms, Cloning,
      Expression and Methods of Use Thereof

<130> 00170PCT/HG

<140>
<141>

<150> US 60/194,318
<151> 2000-04-03

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 1
cctgggtgca cctgcgcctg tattgg                                    26


<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
ccagtcttgg ggcagtggag agcc                                      24


<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
aggtagaggc ttctgg                                               16


<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5'RACE
Abridged Anchor Primer

<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(25)
<223> i

<220>
<221> modified_base
<222> (29)..(30)
<223> i

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> i

<400> 4
ggccacgcgt cgactagtac gggnngggnn gggnng 36

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 5
gcgatgggtg aaagctgagc tg 22

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Abridged
Universal Amplification Primer

<400> 6
ggccacgcgt cgactagtac 20

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 7

agtctccagt cagctctgga cc 22

<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cccactcact caggct 16

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gaaggacagc ccagcttcag ag 22

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
attgaccaat agaagcaacc 20

<210> 11
<211> 2698
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (387)..(2237)

<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of a
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
<303> J. Biol. Chem.
<304> 275
<305> 26
<306> 19513-19520
<308> AF245448

<400> 11
aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcttcca gaaccaaaga gaagtcagcc 60

tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggcctttcc ccgtccctgc tctaacactc 120

```
tccaggggta aagggaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg 180

tggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcggtggc tcgcggagga cccggtgggc 240

tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggctct 300

gccatttaaa gttgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta 360

ggagtgcttg ggactgaacc agggtc atg gcc cca cca cca cta ctg cca gtg  413
                             Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val
                              1               5

gct gcc agc act cca atc ctg cac ggc gag ttt ggt tcc tac ccg gcc   461
Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala
 10                  15                  20                  25

aac ggc cca cgg ttt gcc ctc acc ctc aca aca caa gcc cta cac ata   509
Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile
                 30                  35                  40

cag cga cta cgc cca aag cca gaa gcc cgg ccc cga gat ggt cta gtc   557
Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val
             45                  50                  55

tct ctg gat gag gtc tcg ggc tgt ggc acc ctg cag agc cgt agc ccc   605
Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro
         60                  65                  70

gag gac act gca gcc tac ttc tgc atc tac acc tac cca cgt ggc cgt   653
Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg
     75                  80                  85

cga ggg ggc cgg cgc aga gct acg cgg acc ttc cgg gcg gat ggg gcc   701
Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala
 90                  95                 100                 105

acc act tat gag gag aat cgt gca gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc   749
Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala
                110                 115                 120

ctc acg tgt ctc ctc cga gga gtg cct ctg tca ggg gac cag gaa atc   797
Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile
            125                 130                 135

acc cct gaa ttg ctg ccc cgg aag ccc agg ctg ctc ata ttg gtc aat   845
Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn
        140                 145                 150

ccc ttt ggg ggg cgg ggc ctg gcc tgg cag cgc tgt atg gac cac gtg   893
Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val
    155                 160                 165
```

```
gtg cca atg atc tct gaa gct ggg ctg tcc ttc aac ctc ata cag aca     941
Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr
170                 175                 180                 185

gaa cga cag aac cat gcc cgt gag ctg gtg cag ggg tta agc ctg agt     989
Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser
                190                 195                 200

gag tgg gaa ggc att gtc act gtg tct gga gac ggg ctg ctt tac gag     1037
Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu
            205                 210                 215

gtg ctg aat ggg ctc ctt gat cgg cca gac tgg gag gat gcc gtg cgg     1085
Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg
        220                 225                 230

atg ccc att ggt gtc ctc ccc tgt gga tcg ggc aat gcg cta gct ggg     1133
Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly
    235                 240                 245

gcg gtg agc cat cat ggc ggg ttt gag cag gtt gtc ggt gtt gac ctg     1181
Ala Val Ser His His Gly Gly Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu
250                 255                 260                 265

ttg ctc aac tgc tcg ctt ctt ctc tgc cgt ggt ggc agc cat cct ctg     1229
Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu
                270                 275                 280

gac ttg ctc tct gtg acg cta gcc tcg gga tcc cgc tgt ttt tcc ttc     1277
Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe
            285                 290                 295

ctg tca gtg gcc tgg gga ttc ttg tca gat gtg gac att cac agt gag     1325
Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu
        300                 305                 310

cgc ttc agg gcc ctg ggc agc gct cga ttc aca ctg ggt gca gtg cta     1373
Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu
    315                 320                 325

ggc ctg gcc tcg ttg cat acc tac cgt gga cgc ctc tcc tac ctc ccc     1421
Gly Leu Ala Ser Leu His Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro
330                 335                 340                 345

gct acc aca gaa cca gcc ttg ccc atc cca ggc cac agt ctg cct cga     1469
Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg
                350                 355                 360

gcc aag tca gaa cta gtc ttg gct cca gcc cca gcc ccc gcc gcc acc     1517
Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr
            365                 370                 375
```

```
cac tcg cct cta cat cga tct gtg tct gac ctg ccc ctg ccc ctt ccc    1565
His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro
        380                 385                 390

cag cct gcc ttg gtc tcc cct ggc tcc cct gag ccc ctg cct gac ctg    1613
Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu
    395                 400                 405

tcc ctc aat ggt ggt ggt cca gag ctg act gga gac tgg gga gga gct    1661
Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala
410                 415                 420                 425

ggg gat gca cct ctg tcc cca gac cca ctg ctg cct tca tcc ccc aac    1709
Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn
                430                 435                 440

gct ctc aaa aca gct cag ctt tca ccc atc gct gaa ggg ccc cca gaa    1757
Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu
            445                 450                 455

atg cca gca tct tcg ggg ttc ctg cct ccc acc cac agt gcc cca gaa    1805
Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu
        460                 465                 470

gcc tct acc tgg ggc cca gtg gac cac ctc ctc cct ccc ctg ggc tct    1853
Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser
    475                 480                 485

cca ctg ccc caa gac tgg gtg aca ata gag ggg gag ttt gta ctc atg    1901
Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met
490                 495                 500                 505

ttg ggc atc ttg acg agc cac ctc tgc gca gac ctg atg gca gcc cca    1949
Leu Gly Ile Leu Thr Ser His Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro
                510                 515                 520

cat gca cgc ttt gat gat ggc gtt gtg cac ctg tgt tgg gtg cgg agc    1997
His Ala Arg Phe Asp Asp Gly Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser
            525                 530                 535

ggc atc tca cgg gct gca ctt cta cgc att ttt ctg gcc atg gag cat    2045
Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His
        540                 545                 550

gga aac cac ttc agc ctg ggc tgc ccc cat ctg ggc tat gct gca gca    2093
Gly Asn His Phe Ser Leu Gly Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala
    555                 560                 565

cgt gcc ttc cgc ctt gaa cca ctc acg cct cgt ggc ctg ctc act gta    2141
Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val
570                 575                 580                 585
```

```
gat ggg gag tta gtg gag tat ggg cca ata cag gcg cag gtg cac cca   2189
Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro
                590                 595                 600

ggt ctc gcc acg ctg ctc act ggg cct gca ggt caa aag cca caa gcc   2237
Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
            605                 610                 615

tgaacgagcc taaaagcatg gcgagttggt ggaaccagcg ccccataggc taagatctat 2297

catttacagg tagaagtggg gcccgcactc agaactgtga ggagggtgga gagtggtcct 2357

gaccctcagt tcccagagga cctagaggct cgagggtggg gcctgccttt cttgatgtcc 2417

aatgatgggg cctggaatgt atgagctagc aaggcttctt cagcttattg accagccagg 2477

gtttcttctt gcctactccg gtgcctctac ttgactggcc aatcagccct tgaggggcag 2537

gttcccccag gtggtcccca gatttgcact aatgttcctc ccctggccag ttagggatgg 2597

gatgttctgt gtcttgtgtg tccctctccc tagtctaaaa agcaattgaa aaggtctatg 2657

caataaaggt tgttgcttcc ctctaaaaaa aaaaaaaaaa a                     2698


<210> 12
<211> 617
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu
  1               5                  10                  15

His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu
             20                  25                  30

Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro
         35                  40                  45

Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly
     50                  55                  60

Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe
 65                  70                  75                  80

Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala
                 85                  90                  95

Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg
            100                 105                 110
```

```
Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly
        115                 120                 125

Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg
        130                 135                 140

Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu
145                 150                 155                 160

Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val Val Pro Met Ile Ser Glu Ala
                165                 170                 175

Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg
            180                 185                 190

Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr
        195                 200                 205

Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp
    210                 215                 220

Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg Met Pro Ile Gly Val Leu Pro
225                 230                 235                 240

Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly
                245                 250                 255

Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu
        275                 280                 285

Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe
    290                 295                 300

Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser
305                 310                 315                 320

Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr
                325                 330                 335

Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu
        355                 360                 365

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser
    370                 375                 380
```

Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro
385 390 395 400

Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro
405 410 415

Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro
420 425 430

Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu
435 440 445

Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe
450 455 460

Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val
465 470 475 480

Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val
485 490 495

Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met Leu Gly Ile Leu Thr Ser His
500 505 510

Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
515 520 525

Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
530 535 540

Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His Gly Asn His Phe Ser Leu Gly
545 550 555 560

Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr
580 585 590

Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr
595 600 605

Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
610 615

<210> 13
<211> 2380
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS
<222> (7)..(1860)

<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of a
      novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
<303> J. Biol. Chem.
<304> 275
<305> 26
<306> 19513-19520
<308> AF245447

<400> 13

```
gccacc atg gcc ccg ccc cca ccg cca ctg gct gcc agc acc ccg ctc     48
       Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu
         1               5                  10

ctc cat ggc gag ttt ggc tcc tac cca gcc cga ggc cca cgc ttt gcc    96
Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala
 15                  20                  25                  30

ctc acc ctt aca tcg cag gcc ctg cac ata cag cgg ctg cgc ccc aaa   144
Leu Thr Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys
                 35                  40                  45

cct gaa gcc agg ccc cgg ggt ggc ctg gtc ccg ttg gcc gag gtc tca   192
Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser
             50                  55                  60

ggc tgc tgc acc ctg cga agc cgc agc ccc tca gac tca gcg gcc tac   240
Gly Cys Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr
         65                  70                  75

ttc tgc atc tac acc tac cct cgg ggc cgg cgc ggg gcc cgg cgc aga   288
Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg
     80                  85                  90

gcc act cgc acc ttc cgg gca gat ggg gcc gcc acc tac gaa gag aac   336
Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn
 95                 100                 105                 110

cgt gcc gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc ctc acc tgt ctg ctc cga   384
Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg
                115                 120                 125

gga ctg cca ctg ccc ggg gat ggg gag atc acc cct gac ctg cta cct   432
Gly Leu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro
            130                 135                 140

cgg ccg ccc cgg ttg ctt cta ttg gtc aat ccc ttt ggg ggt cgg ggc   480
Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly
        145                 150                 155
```

```
ctg gcc tgg cag tgg tgt aag aac cac gtg ctt ccc atg atc tct gaa   528
Leu Ala Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu
    160                 165                 170

gct ggg ctg tcc ttc aac ctc atc cag aca gaa cga cag aac cac gcc   576
Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala
175                 180                 185                 190

cgg gag ctg gtc cag ggg ctg agc ctg agt gag tgg gat ggc atc gtc   624
Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val
                195                 200                 205

acg gtc tcg gga gac ggg ctg ctc cat gag gtg ctg aac ggg ctc cta   672
Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu
            210                 215                 220

gat cgc cct gac tgg gag gaa gct gtg aag atg cct gtg ggc atc ctc   720
Asp Arg Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu
        225                 230                 235

ccc tgc ggc tcg ggc aac gcg ctg gcc gga gca gtg aac cag cac ggg   768
Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly
    240                 245                 250

gga ttt gag cca gcc ctg ggc ctc gac ctg ttg ctc aac tgc tca ctg   816
Gly Phe Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu
255                 260                 265                 270

ttg ctg tgc cgg ggt ggt ggc cac cca ctg gac ctg ctc tcc gtg acg   864
Leu Leu Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr
                275                 280                 285

ctg gcc tcg ggc tcc cgc tgt ttc tcc ttc ctg tct gtg gcc tgg ggc   912
Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly
            290                 295                 300

ttc gtg tca gat gtg gat atc cag agc gag cgc ttc agg gcc ttg ggc   960
Phe Val Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly
        305                 310                 315

agt gcc cgc ttc aca ctg ggc acg gtg ctg ggc ctc gcc aca ctg cac   1008
Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His
    320                 325                 330

acc tac cgc gga cgc ctc tcc tac ctc ccc gcc act gtg gaa cct gcc   1056
Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala
335                 340                 345                 350

tcg ccc acc cct gcc cat agc ctg cct cgt gcc aag tcg gag ctg acc   1104
Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr
                355                 360                 365
```

```
cta acc cca gac cca gcc ccg ccc atg gcc cac tca ccc ctg cat cgt    1152
Leu Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg
            370                 375                 380

tct gtg tct gac ctg cct ctt ccc ctg ccc cag cct gcc ctg gcc tct    1200
Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser
        385                 390                 395

cct ggc tcg cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac ggt ggg ggc    1248
Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly
    400                 405                 410

cca gag ctg gct ggg gac tgg ggt ggg gct ggg gat gct ccg ctg tcc    1296
Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser
415                 420                 425                 430

ccg gac cca ctg ctg tct tca cct cct ggc tct ccc aag gca gct cta    1344
Pro Asp Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu
                435                 440                 445

cac tca ccc gtc tcc gaa ggg gcc ccc gta att ccc cca tcc tct ggg    1392
His Ser Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly
            450                 455                 460

ctc cca ctt ccc acc cct gat gcc cgg gta ggg gcc tcc acc tgc ggc    1440
Leu Pro Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly
        465                 470                 475

ccg ccc gac cac ctg ctg cct ccg ctg ggc acc ccg ctg ccc cca gac    1488
Pro Pro Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp
    480                 485                 490

tgg gtg acg ctg gag ggg gac ttt gtg ctc atg ttg gcc atc tcg ccc    1536
Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro
495                 500                 505                 510

agc cac cta ggc gct gac ctg gtg gca gct ccg cat gcg cgc ttc gac    1584
Ser His Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp
                515                 520                 525

gac ggc ctg gtg cac ctg tgc tgg gtg cgt agc ggc atc tcg cgg gct    1632
Asp Gly Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala
            530                 535                 540

gcg ctg ctg cgc ctt ttc ttg gcc atg gag cgt ggt agc cac ttc agc    1680
Ala Leu Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser
        545                 550                 555

ctg ggc tgt ccg cag ctg ggc tac gcc gcg gcc cgt gcc ttc cgc cta    1728
Leu Gly Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu
    560                 565                 570
```

```
gag ccg ctc aca cca cgc ggc gtg ctc aca gtg gac ggg gag cag gtg     1776
Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val
575                 580                 585                 590

gag tat ggg ccg cta cag gca cag atg cac cct ggc atc ggt aca ctg     1824
Glu Tyr Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu
                595                 600                 605

ctc act ggg cct cct ggc tgc ccg ggg cgg gag ccc tgaaactaaa          1870
Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
                610                 615

caagcttggt acccgccggg ggcggggcct acattccaat ggggcggagc ttgagctagg 1930

gggtgtggcc tggctgctag agttgtggtg gcaggggccc tggccccgtc tcaggattgc 1990

gctcgctttc atgggaccag acgtgatgct ggaaggtggg cgtcgtcacg gttaaagaga 2050

aatgggctcg tcccgagggt agtgcctgat caatgagggc ggggcctggc gtctgatctg 2110

gggccgccct tacggggcag ggctcagtcc tgacgcttgc cacctgctcc tacccggcca 2170

ggatggctga gggcggagtc tattttacgc gtcgcccaat gacaggacct ggaatgtact 2230

ggctggggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc ccatccactc 2290

cggtgcctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttccccg gggccggcgc 2350

taggatttgc actaatgttc ctctccccgc                                  2380


<210> 14
<211> 618
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu Leu His
  1               5                  10                  15

Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr
                 20                  25                  30

Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu
             35                  40                  45

Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser Gly Cys
         50                  55                  60

Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Cys
 65                  70                  75                  80
```

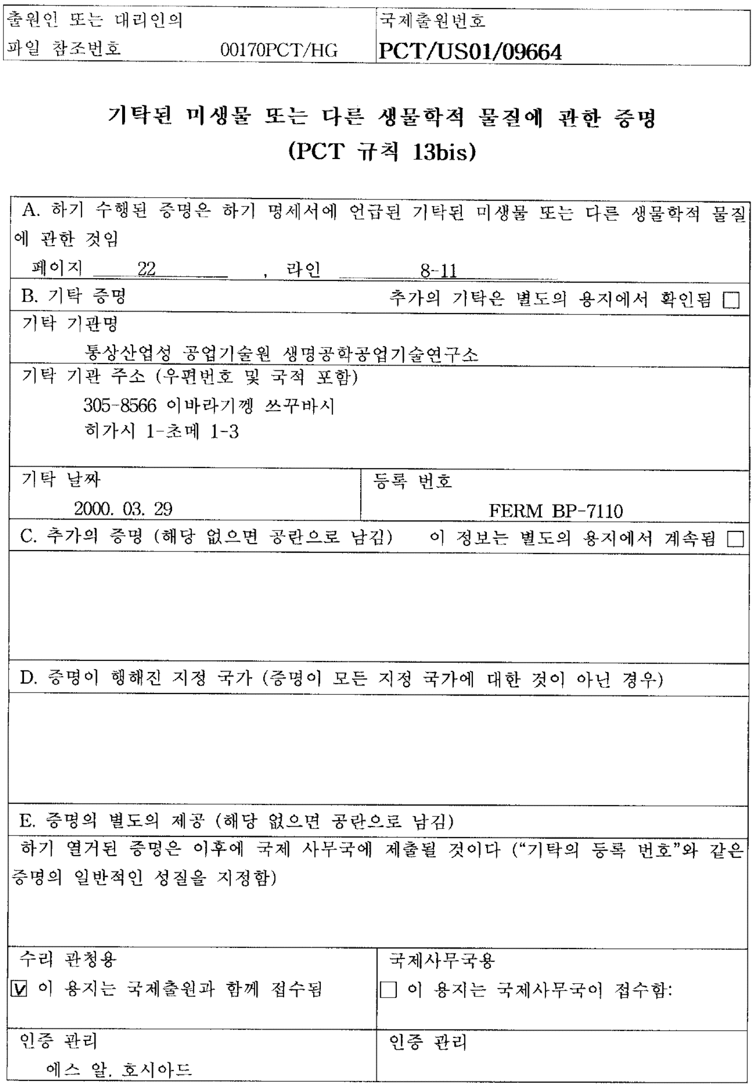
```
Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg Ala Thr
                85                  90                  95

Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala
            100                 105                 110

Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Leu
        115                 120                 125

Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro Arg Pro
    130                 135                 140

Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160

Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly
                165                 170                 175

Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu
            180                 185                 190

Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val Thr Val
        195                 200                 205

Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg
    210                 215                 220

Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu Pro Cys
225                 230                 235                 240

Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly Gly Phe
                245                 250                 255

Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
            260                 265                 270

Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala
        275                 280                 285

Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val
    290                 295                 300

Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
305                 310                 315                 320

Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr
                325                 330                 335

Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro
            340                 345                 350
```

```
Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr
        355                 360                 365

Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val
    370                 375                 380

Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly
385                 390                 395                 400

Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu
                405                 410                 415

Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp
            420                 425                 430

Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser
        435                 440                 445

Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro
    450                 455                 460

Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly Pro Pro
465                 470                 475                 480

Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val
                485                 490                 495

Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro Ser His
            500                 505                 510

Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
        515                 520                 525

Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
    530                 535                 540

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser Leu Gly
545                 550                 555                 560

Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
                565                 570                 575

Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val Glu Tyr
            580                 585                 590

Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu Leu Thr
        595                 600                 605

Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
    610                 615
```

```
<210> 15
<211> 388
<212> PRT
<213> Mus musculus

<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of
      murine sphingosine kinase
<303> J. Biol. Chem.
<304> 273
<305> 37
<306> 23722-23728
<308> AAC61698

<400> 15
Met Trp Trp Cys Cys Val Leu Phe Val Val Glu Cys Pro Arg Gly Leu
 1               5                  10                  15

Leu Pro Arg Pro Cys Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Gln Gly Gly
            20                  25                  30

Lys Gly Lys Ala Leu Gln Leu Phe Gln Ser Arg Val Gln Pro Phe Leu
        35                  40                  45

Glu Glu Ala Glu Ile Thr Phe Lys Leu Ile Leu Thr Glu Arg Lys Asn
    50                  55                  60

His Ala Arg Glu Leu Val Cys Ala Glu Glu Leu Gly His Trp Asp Ala
65                  70                  75                  80

Leu Ala Val Met Ser Gly Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly
                85                  90                  95

Leu Met Glu Arg Pro Asp Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Cys
            100                 105                 110

Ser Leu Pro Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Val Asn His
        115                 120                 125

Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Ile Asn Cys
    130                 135                 140

Thr Leu Leu Leu Cys Arg Arg Arg Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser
145                 150                 155                 160

Leu His Thr Ala Ser Gly Leu Arg Leu Tyr Ser Val Leu Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Trp Gly Phe Val Ala Asp Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg
            180                 185                 190

Leu Gly Glu Ile Arg Phe Thr Val Gly Thr Phe Phe Arg Leu Ala Ser
```

```
        195                 200                 205

Leu Arg Ile Tyr Gln Gly Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Thr Val
    210                 215                 220

Ala Ser Lys Arg Pro Ala Ser Thr Leu Val Gln Lys Gly Pro Val Asp
225                 230                 235                 240

Thr His Leu Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val
                245                 250                 255

Val Pro Glu Gln Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu Leu His Thr His
            260                 265                 270

Leu Ser Ser Glu Leu Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Glu Ala Gly
        275                 280                 285

Val Met His Leu Phe Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Ala Leu
    290                 295                 300

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Gln Lys Gly Lys His Met Glu Leu Asp
305                 310                 315                 320

Cys Pro Tyr Leu Val His Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro
                325                 330                 335

Arg Ser Gln Arg Gly Val Phe Ser Val Asp Gly Glu Leu Met Val Cys
            340                 345                 350

Glu Ala Val Gln Gly Gln Val His Pro Asn Tyr Leu Trp Met Val Cys
        355                 360                 365

Gly Ser Arg Asp Ala Pro Ser Gly Arg Asp Ser Arg Arg Gly Pro Pro
    370                 375                 380

Pro Glu Glu Pro
385
```

본 명세서가 설명의 목적으로만 제시되고 제한이 아니라는 것과 각종 변형 및 변화가 본 발명의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것이 명백할 것이다.



출원인 또는 대리인의 파일 참조번호 00170PCT/HG	국제출원번호 PCT/US01/09664

기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에 관한 증명

(PCT 규칙 13bis)

A. 하기 수행된 증명은 하기 명세서에 언급된 기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에 관한 것임

페이지 22 , 라인 8-11

B. 기탁 증명 추가의 기탁은 별도의 용지에서 확인됨 □

기탁 기관명

통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소

기탁 기관 주소 (우편번호 및 국적 포함)

305-8566 이바라기껭 쓰꾸바시
히가시 1-초메 1-3

기탁 날짜 2000. 03. 29	등록 번호 FERM BP-7110

C. 추가의 증명 (해당 없으면 공란으로 남김) 이 정보는 별도의 용지에서 계속됨 □

D. 증명이 행해진 지정 국가 (증명이 모든 지정 국가에 대한 것이 아닌 경우)

E. 증명의 별도의 제공 (해당 없으면 공란으로 남김)

하기 열거된 증명은 이후에 국제 사무국에 제출될 것이다 ("기탁의 등록 번호"와 같은 증명의 일반적인 성질을 지정함)

수리 관청용 ☑ 이 용지는 국제출원과 함께 접수됨	국제사무국용 □ 이 용지는 국제사무국이 접수함:
인증 관리 에스 알. 호시아드	인증 관리

(57) 청구의 범위

청구항 1.

포유동물 스핑고신 키나제 유형 2 이성체를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 마우스 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 DNA를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 인간 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 DNA를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA.

청구항 4.

제 2 항에 있어서, 617 아미노산의 펩티드를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA.

청구항 5.

제 3 항에 있어서, 618 아미노산의 펩티드를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA.

청구항 6.

제 4 항의 DNA에 의해 코딩되는 펩티드.

청구항 7.

제 5 항의 DNA에 의해 코딩되는 펩티드.

청구항 8.

서열목록 번호 14로 본질적으로 구성되는 인간 SPHK2의 아미노산 서열.

청구항 9.

서열목록 번호 12로 본질적으로 구성되는 마누스 SPHK2의 아미노산 서열.

청구항 10.

스핑고신 키나제 유형 2 이성체의 펩티드를 코딩하는 단리 및 정제된 DNA로, Genbank 등록번호 bankit325787의 서열 및 Genbank 등록번호 bankit325752의 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 함유하는 DNA.

청구항 11.

하기를 함유하는 재조합 DNA 구축물:

(a) 벡터 및

(b) 제 2 항의 DNA.

청구항 12.

하기를 함유하는 재조합 DNA 구축물:

(a) 벡터 및

(b) 제 3 항의 DNA.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 상기 벡터가 발현 벡터인 재조합 DNA 구축물.

청구항 14.

제 11 항에 있어서, 상기 벡터가 원핵생물 벡터인 재조합 DNA 구축물.

청구항 15.

제 11 항에 있어서, 상기 벡터가 진핵생물 벡터인 재조합 DNA 구축물.

청구항 16.

제 12 항에 있어서, 상기 벡터가 발현 벡터인 재조합 DNA 구축물.

청구항 17.

제 12 항에 있어서, 상기 벡터가 원핵생물 벡터인 재조합 DNA 구축물.

청구항 18.

제 12 항에 있어서, 상기 벡터가 진핵생물 벡터인 재조합 DNA 구축물.

청구항 19.

제 11 항에 따른 재조합 DNA 구축물로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 20.

제 19 항에 있어서, 상기 세포가 원핵생물 세포인 숙주 세포.

청구항 21.

제 19 항에 있어서, 상기 세포가 진핵생물 세포인 숙주 세포.

청구항 22.

제 12 항에 따른 재조합 DNA 구축물로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 상기 세포가 원핵생물 세포인 숙주 세포.

청구항 24.

제 22 항에 있어서, 상기 세포가 진핵생물 세포인 숙주 세포.

청구항 25.

단리된 마우스 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 DNA가 발현되고 이에 의해 마우스 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 펩티드가 생산되도록 하는 조건 하에 제 19 항에 따른 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 마우스 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 펩티드의 제조 방법.

청구항 26.

단리된 인간 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 DNA가 발현되고 이에 의해 인간 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 펩티드가 생산되도록 하는 조건 하에 제 22 항에 따른 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 인간 스핑고신 키나제 유형 2 이성체 펩티드의 제조 방법.

청구항 27.

하기를 포함하는, 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 저해 또는 촉진하는 작용제 또는 약물의 검출 방법:

(a) 제 11 항에 따른 재조합 DNA 구축물을 스핑고신 키나제 유형 2 이성체가 세포 내에서 생산되도록 세포 내로 제공함;

(b) 하나 이상의 작용제 또는 약물을 상기 세포에 첨가함, 및

(c) 상기 세포 내 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화를 측정하고, 수득된 측정치를 상기 약물 또는 작용제를 제공하지 않은 대조군과 비교하여 상기 약물 또는 작용제가 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 저해 또는 촉진하는지 여부를 검출함 (대조군과 비교하여 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화의 양에서의 감소는 저해성 약물 또는 작용제를 의미하고, 대조군과 비교하여 상기 세포 내 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화의 양에서의 증가는 자극성 약물 또는 작용제를 의미함).

청구항 28.

하기를 포함하는, 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 저해 또는 촉진하는 작용제 또는 약물의 검출 방법:

(a) 제 12 항에 따른 재조합 DNA 구축물을 스핑고신 키나제 유형 2 이성체가 세포 내에서 생산되도록 세포 내로 제공함;

(b) 하나 이상의 작용제 또는 약물을 상기 세포에 첨가함, 및

(c) 상기 세포 내 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화를 측정하고, 수득된 측정치를 상기 약물 또는 작용제를 제공하지 않은 대조군과 비교하여 상기 약물 또는 작용제가 스핑고신 키나제 유형 2 활성을 저해 또는 촉진하는지 여부를 검출함 (대조군과 비교하여 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화의 양에서의 감소는 저해성 약물 또는 작용제를 의미하고, 대조군과 비교하여 상기 세포 내 지질의 스핑고신 키나제-의존적 인산화의 양에서의 증가는 자극성 약물 또는 작용제를 의미함).

청구항 29.

제 27 항에 따른 방법에 의해 검출된 작용제 또는 약물.

청구항 30.

제 28 항에 따른 방법에 의해 검출된 작용제 또는 약물.

청구항 31.

포유동물에서의 생물학적 프로세스의 조절 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 6 항에 따른 펩티드를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 32.

포유동물에서의 생물학적 프로세스의 조절 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 7 항에 따른 펩티드를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 33.

제 31 항에 있어서, 생물학적 프로세스가 유사분열생식, 세포자멸사, 신경 발생, 주화성, 혈관신생, 및 염증성 반응으로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 34.

제 31 항에 있어서, 생물학적 프로세스가 혈관신생인 방법.

청구항 35.

제 32 항에 있어서, 생물학적 프로세스가 유사분열생식, 세포자멸사, 신경 발생, 주화성, 혈관신생, 및 염증성 반응으로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 36.

제 32 항에 있어서, 생물학적 프로세스가 혈관신생인 방법.

청구항 37.

증가된 세포 사멸 또는 감소된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 6 항에 따른 펩티드를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 38.

증가된 세포 사멸 또는 감소된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 7 항에 따른 펩티드를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39.

감소된 세포 사멸 또는 증가된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 6 항에 따른 펩티드에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 40.

감소된 세포 사멸 또는 증가된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 7 항에 따른 펩티드에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 41.

암, 재발협착증 및 당뇨병성 신경장해로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포의 비정상적인 이동 또는 운동성으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 6 항에 따른 펩티드에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 42.

암, 재발협착증 및 당뇨병성 신경장해로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포의 비정상적인 이동 또는 운동성으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선 방법으로, 이를 필요로 하는 포유동물에게 약학적 유효량의 제 7 항에 따른 펩티드에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 43.

제 41 항에 있어서, 질환이 암인 방법.

청구항 44.

제 42 항에 있어서, 질환이 암인 방법.

청구항 45.

증가된 세포 사멸 또는 감소된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선을 위한 조성물로, 약학적 유효량의 제 6 항에 따른 펩티드, 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 함유하는 조성물.

청구항 46.

증가된 세포 사멸 또는 감소된 세포 증식으로부터 기인하는 질환의 치료 또는 개선을 위한 조성물로, 약학적 유효량의 제 7 항에 따른 펩티드, 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 함유하는 조성물.

청구항 47.

스핑고신 키나제 유형 2 활성을 감소 또는 제거시키는 작용제 또는 약물의 스크리닝 방법으로, 상기 작용제 또는 약물의 존재 하에 스핑고신 키나제 유형 2 효소 활성에서의 감소를 검출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 48.

하기를 포함하는, 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2 이성체의 존재의 검출 방법:

(i) 샘플을 스핑고신 키나제 유형 2를 인식하는 항체와 접촉시킴; 및

(ii) 스핑고신 키나제 유형 2와 이에 대해 특이적인 항체 간에 형성된 복합체의 존재 또는 부재를 검출함.

청구항 49.

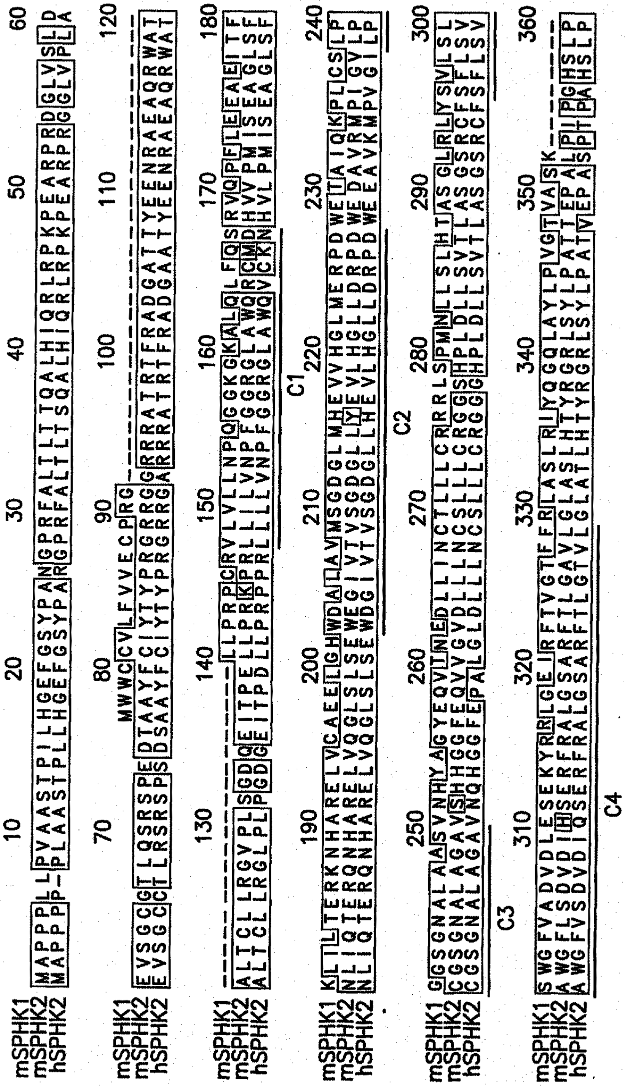
샘플을 중합효소 연쇄 반응시키고 스핑고신 키나제 유형 2의 존재에 대해 검출하는 것을 포함하는, 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2의 검출 방법.

청구항 50.

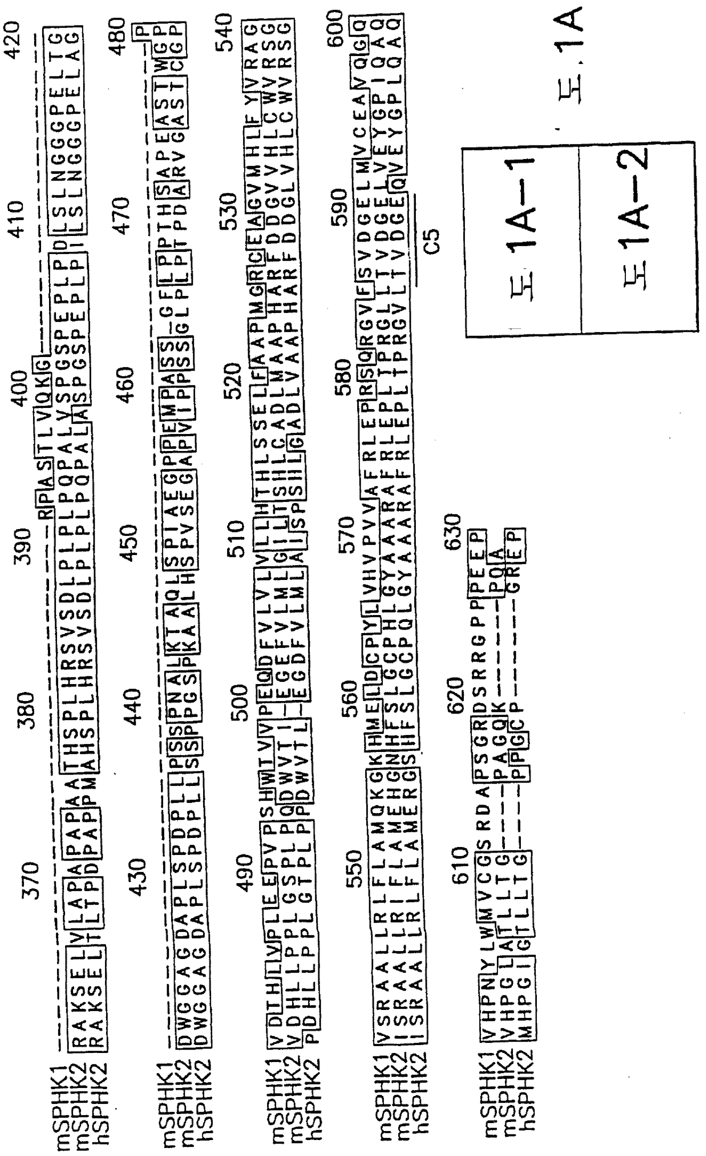
스핑고신 키나제 유형 2 RNA 또는 cDNA에의 혼성화 및/또는 스핑고신 키나제 유형 2 서열의 증폭에 적절한 스핑고신 키나제 유형 2 RNA 또는 cDNA에 대해 특이적인 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드 및 적절한 보조 시약을 함유하는, 샘플 내 스핑고신 키나제 유형 2 RNA/cDNA의 검출을 위한 진단 키트.

도면

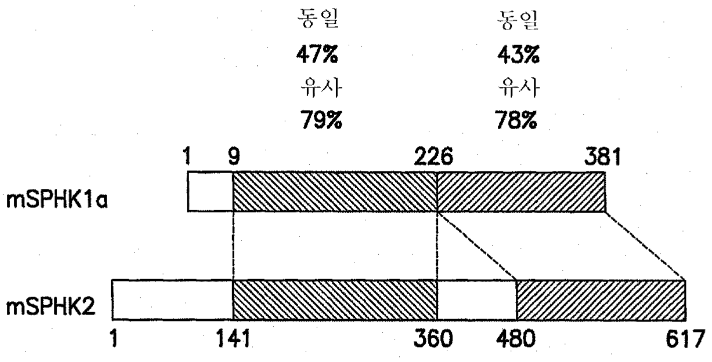
도면 1A-1



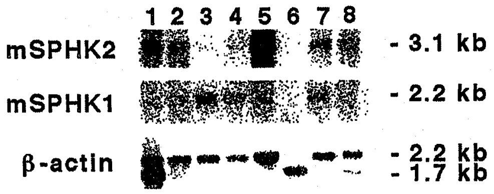
도면 1A-2


mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
C5
도 1A-1
도 1A-2
도.1A

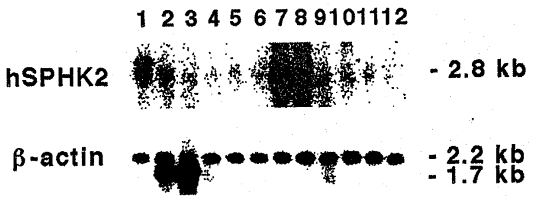
도면 1B



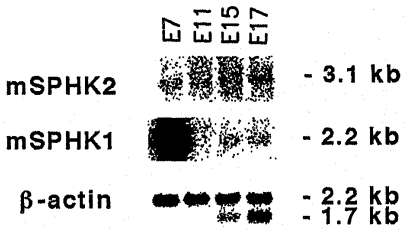
도면 2A



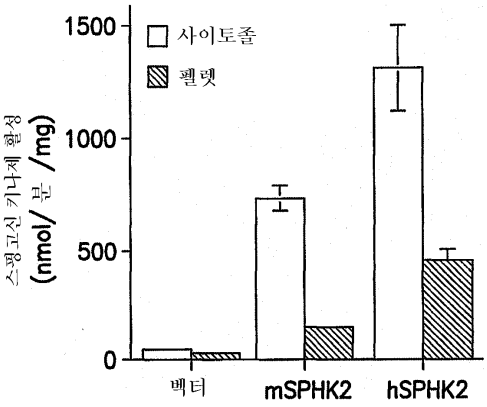
도면 2B



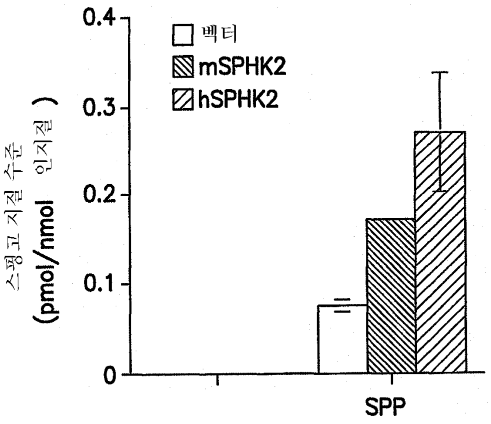
도면 2C



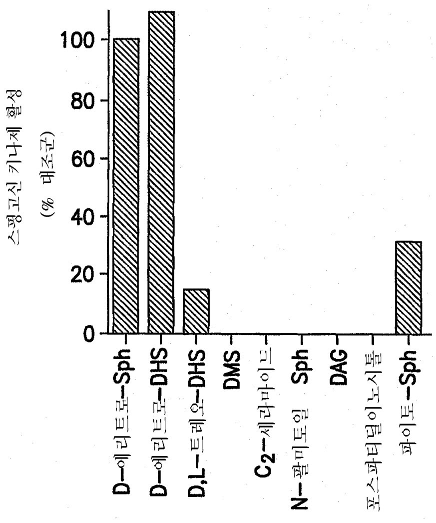
도면 3A


1500
1000
500
0
□ 사이토졸
▧ 펠렛
스핑고신 키나제 활성
(nmol/ 분 /mg)
벡터
mSPHK2
hSPHK2

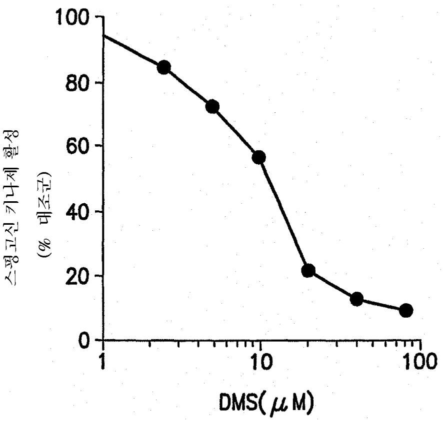
도면 3B


0.4
0.3
0.2
0.1
0
□ 벡터
▧ mSPHK2
▨ hSPHK2
스핑고 지질 수준
(pmol/nmol 인지질)
SPP

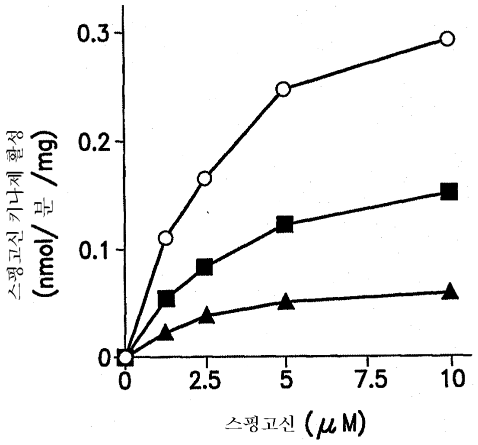
도면 4A


스핑고신 키나제 활성
(% 대조군)
100
80
60
40
20
0
D-에리트로-Sph
D-에리트로-DHS
D,L-트레오-DHS
DMS
C_2-세라마이드
N-팔미토일 Sph
DAG
포스파티딜이노시톨
파이토-Sph

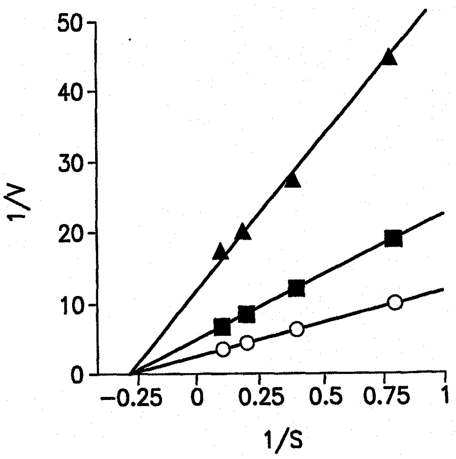
도면 4B


스핑고신 키나제 활성
(% 대조군)
100
80
60
40
20
0
1
10
100
DMS(μM)

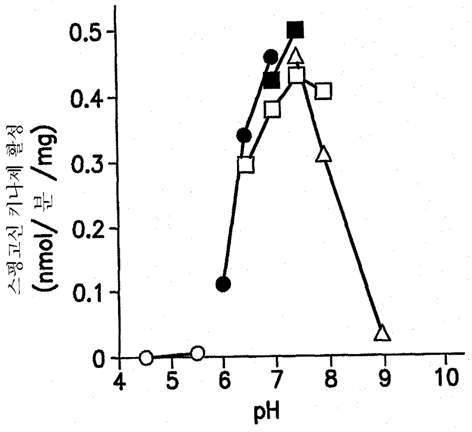
도면 4C


스핑고신 키나제 활성
(nmol/분 /mg)
0.3
0.2
0.1
0
0
2.5
5
7.5
10
스핑고신 (μM)

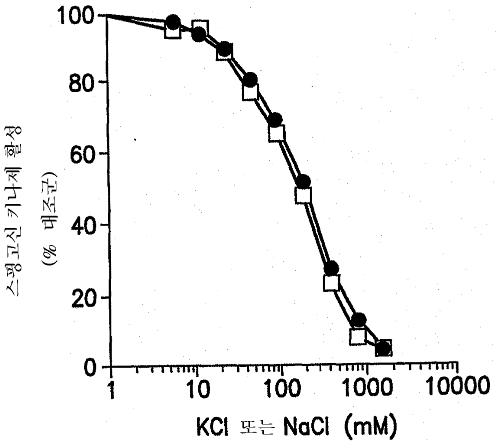
도면 4D


1/V
50
40
30
20
10
0
−0.25
0
0.25
0.5
0.75
1
1/S

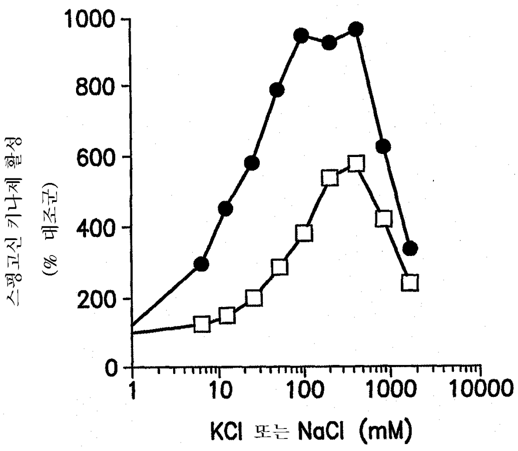
도면 5A


스핑고신 키나제 활성
(nmol/분/mg)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
4
5
6
7
8
9
10
pH

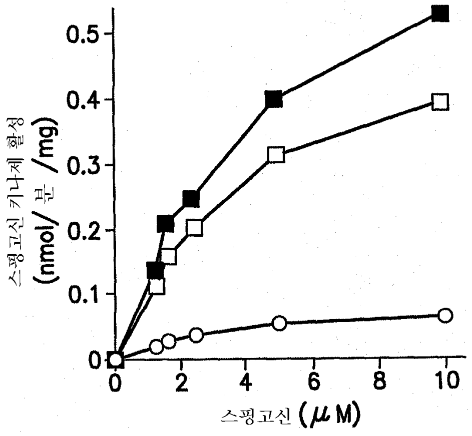
도면 5B


스핑고신 키나제 활성
(% 대조군)
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
KCl 또는 NaCl (mM)

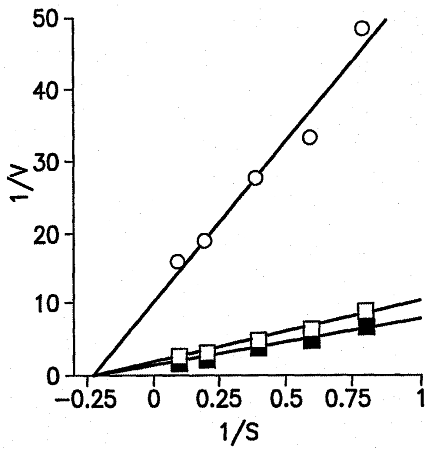
도면 5C


1000
800
600
400
200
0
스핑고신 키나제 활성
(% 대조군)
1
10
100
1000
10000
KCl 또는 NaCl (mM)

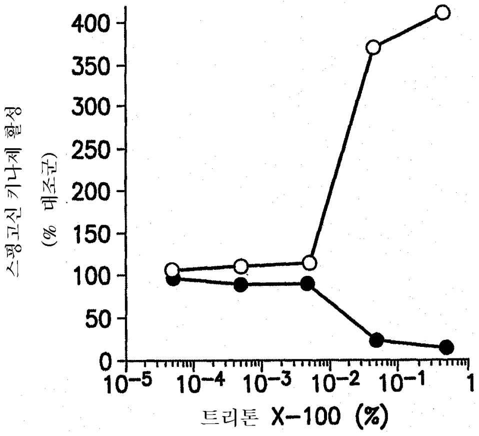
도면 5D


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
스핑고신 키나제 활성
(nmol/분/mg)
0
2
4
6
8
10
스핑고신 (μM)

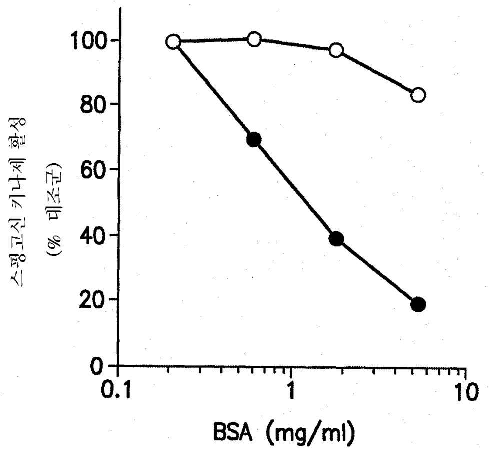
도면 5E


50
40
30
20
10
0
1/V
−0.25
0
0.25
0.5
0.75
1
1/S

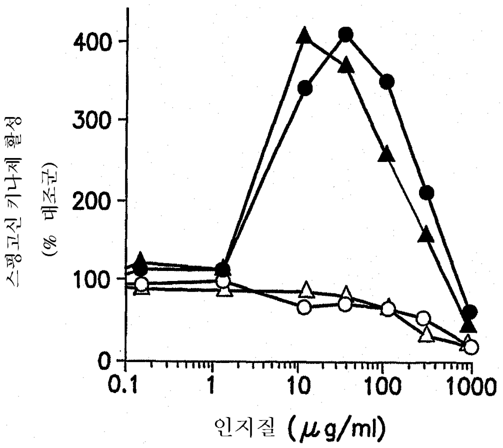
도면 6A


400
350
300
250
200
150
100
50
0
스핑고신 키나제 활성
(% 대조군)
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
1
트리톤 X-100 (%)

도면 6B



도면 6C



<110> SANKYO COMPANY, LIMITED
      GEORGETOWN UNIVERSITY
<120> Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoforms, Cloning,
      Expression and Methods of Use Thereof
<130> 00170PCT/HG
<140>
<141>
<150> US 60/194,318
<151> 2000-04-03
<160> 15
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1

```
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 1
cctgggtgca cctgcgcctg tattgg                                    26
<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 2
ccagtcttgg ggcagtggag agcc                                      24
<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 3
aggtagaggc ttctgg                                               16
<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5'RACE
      Abridged Anchor Primer
<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(25)
<223> i
<220>
<221> modified_base
<222> (29)..(30)
<223> i
<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> i
<400> 4
ggccacgcgt cgactagtac gggnngggnn gggnng                         36
<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 5
gcgatgggtg aaagctgagc tg                                        22
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Abridged
```

```
      Universal Amplification Primer
<400> 6
ggccacgcgt cgactagtac                                       20
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 7
agtctccagt cagctctgga cc                                    22
<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 8
cccactcact caggct                                           16
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9
gaaggacagc ccagcttcag ag                                    22
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
attgaccaat agaagcaacc                                       20
<210> 11
<211> 2698
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (387)..(2237)
<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of a
      novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
<303> J. Biol. Chem.
<304> 275
<305> 26
<306> 19513-19520
<308> AF245448
<400> 11
aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcttcca gaaccaaaga gaagtcagcc 60
tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggcctttcc ccgtccctgc tctaacactc 120
tccaggggta aagggaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg 180
tggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcggtggc tcgcggagga cccggtgggc 240
tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggctct 300
gccatttaaa gttgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta 360
ggagtgcttg ggactgaacc agggtc atg gcc cca cca cca cta ctg cca gtg  413
```

```
                             Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val
                               1               5
gct gcc agc act cca atc ctg cac ggc gag ttt ggt tcc tac ccg gcc   461
Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala
 10                  15                  20                  25
aac ggc cca cgg ttt gcc ctc acc ctc aca aca caa gcc cta cac ata   509
Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile
                 30                  35                  40
cag cga cta cgc cca aag cca gaa gcc cgg ccc cga gat ggt cta gtc   557
Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val
             45                  50                  55
tct ctg gat gag gtc tcg ggc tgt ggc acc ctg cag agc cgt agc ccc   605
Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro
         60                  65                  70
gag gac act gca gcc tac ttc tgc atc tac acc tac cca cgt ggc cgt   653
Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg
     75                  80                  85
cga ggg ggc cgg cgc aga gct acg cgg acc ttc cgg gcg gat ggg gcc   701
Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala
 90                  95                 100                 105
acc act tat gag gag aat cgt gca gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc   749
Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala
                110                 115                 120
ctc acg tgt ctc ctc cga gga gtg cct ctg tca ggg gac cag gaa atc   797
Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile
            125                 130                 135
acc cct gaa ttg ctg ccc cgg aag ccc agg ctg ctc ata ttg gtc aat   845
Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn
        140                 145                 150
ccc ttt ggg ggg cgg ggc ctg gcc tgg cag cgc tgt atg gac cac gtg   893
Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val
    155                 160                 165
gtg cca atg atc tct gaa gct ggg ctg tcc ttc aac ctc ata cag aca   941
Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr
170                 175                 180                 185
gaa cga cag aac cat gcc cgt gag ctg gtg cag ggg tta agc ctg agt   989
Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser
                190                 195                 200
gag tgg gaa ggc att gtc act gtg tct gga gac ggg ctg ctt tac gag   1037
Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu
            205                 210                 215
gtg ctg aat ggg ctc ctt gat cgg cca gac tgg gag gat gcc gtg cgg   1085
Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg
        220                 225                 230
atg ccc att ggt gtc ctc ccc tgt gga tcg ggc aat gcg cta gct ggg   1133
Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly
    235                 240                 245
gcg gtg agc cat cat ggc ggg ttt gag cag gtt gtc ggt gtt gac ctg   1181
Ala Val Ser His His Gly Gly Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu
250                 255                 260                 265
```

```
ttg ctc aac tgc tcg ctt ctt ctc tgc cgt ggt ggc agc cat cct ctg   1229
Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu
                270                 275                 280
gac ttg ctc tct gtg acg cta gcc tcg gga tcc cgc tgt ttt tcc ttc   1277
Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe
            285                 290                 295
ctg tca gtg gcc tgg gga ttc ttg tca gat gtg gac att cac agt gag   1325
Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu
        300                 305                 310
cgc ttc agg gcc ctg ggc agc gct cga ttc aca ctg ggt gca gtg cta   1373
Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu
    315                 320                 325
ggc ctg gcc tcg ttg cat acc tac cgt gga cgc ctc tcc tac ctc ccc   1421
Gly Leu Ala Ser Leu His Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro
330                 335                 340                 345
gct acc aca gaa cca gcc ttg ccc atc cca ggc cac agt ctg cct cga   1469
Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg
                350                 355                 360
gcc aag tca gaa cta gtc ttg gct cca gcc cca gcc ccc gcc gcc acc   1517
Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr
            365                 370                 375
cac tcg cct cta cat cga tct gtg tct gac ctg ccc ctg ccc ctt ccc   1565
His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro
        380                 385                 390
cag cct gcc ttg gtc tcc cct ggc tcc cct gag ccc ctg cct gac ctg   1613
Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu
    395                 400                 405
tcc ctc aat ggt ggt ggt cca gag ctg act gga gac tgg gga gga gct   1661
Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala
410                 415                 420                 425
ggg gat gca cct ctg tcc cca gac cca ctg ctg cct tca tcc ccc aac   1709
Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn
                430                 435                 440
gct ctc aaa aca gct cag ctt tca ccc atc gct gaa ggg ccc cca gaa   1757
Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu
            445                 450                 455
atg cca gca tct tcg ggg ttc ctg cct ccc acc cac agt gcc cca gaa   1805
Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu
        460                 465                 470
gcc tct acc tgg ggc cca gtg gac cac ctc ctc cct ccc ctg ggc tct   1853
Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser
    475                 480                 485
cca ctg ccc caa gac tgg gtg aca ata gag ggg gag ttt gta ctc atg   1901
Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met
490                 495                 500                 505
ttg ggc atc ttg acg agc cac ctc tgc gca gac ctg atg gca gcc cca   1949
Leu Gly Ile Leu Thr Ser His Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro
                510                 515                 520
cat gca cgc ttt gat gat ggc gtt gtg cac ctg tgt tgg gtg cgg agc   1997
His Ala Arg Phe Asp Asp Gly Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser
```

```
            525                 530                 535
ggc atc tca cgg gct gca ctt cta cgc att ttt ctg gcc atg gag cat   2045
Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His
        540                 545                 550
gga aac cac ttc agc ctg ggc tgc ccc cat ctg ggc tat gct gca gca   2093
Gly Asn His Phe Ser Leu Gly Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala
    555                 560                 565
cgt gcc ttc cgc ctt gaa cca ctc acg cct cgt ggc ctg ctc act gta   2141
Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val
570                 575                 580                 585
gat ggg gag tta gtg gag tat ggg cca ata cag gcg cag gtg cac cca   2189
Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro
                590                 595                 600
ggt ctc gcc acg ctg ctc act ggg cct gca ggt caa aag cca caa gcc   2237
Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
            605                 610                 615
tgaacgagcc taaaagcatg gcgagttggt ggaaccagcg ccccataggc taagatctat 2297
catttacagg tagaagtggg gcccgcactc agaactgtga ggagggtgga gagtggtcct 2357
gaccctcagt tcccagagga cctagaggct cgagggtggg gcctgccttt cttgatgtcc 2417
aatgatgggg cctggaatgt atgagctagc aaggcttctt cagcttattg accagccagg 2477
gtttcttctt gcctactccg gtgcctctac ttgactggcc aatcagccct tgaggggcag 2537
gttcccccag gtggtcccca gatttgcact aatgttcctc ccctggccag ttagggatgg 2597
gatgttctgt gtcttgtgtg tccctctccc tagtctaaaa agcaattgaa aaggtctatg 2657
caataaaggt tgttgcttcc ctctaaaaaa aaaaaaaaaa a                     2698
<210> 12
<211> 617
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 12
Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu
  1               5                  10                  15
His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu
             20                  25                  30
Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro
         35                  40                  45
Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly
     50                  55                  60
Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe
 65                  70                  75                  80
Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala
                 85                  90                  95
Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg
            100                 105                 110
Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly
        115                 120                 125
Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg
    130                 135                 140
Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu
145                 150                 155                 160
Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val Val Pro Met Ile Ser Glu Ala
```

```
                165                 170                 175
Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg
            180                 185                 190
Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr
        195                 200                 205
Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp
    210                 215                 220
Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg Met Pro Ile Gly Val Leu Pro
225                 230                 235                 240
Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly
                245                 250                 255
Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu
            260                 265                 270
Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu
        275                 280                 285
Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe
    290                 295                 300
Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser
305                 310                 315                 320
Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr
                325                 330                 335
Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu
            340                 345                 350
Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu
        355                 360                 365
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser
    370                 375                 380
Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro
385                 390                 395                 400
Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro
                405                 410                 415
Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro
            420                 425                 430
Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu
        435                 440                 445
Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe
    450                 455                 460
Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val
465                 470                 475                 480
Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val
                485                 490                 495
Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met Leu Gly Ile Leu Thr Ser His
            500                 505                 510
Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
        515                 520                 525
Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
    530                 535                 540
Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His Gly Asn His Phe Ser Leu Gly
545                 550                 555                 560
Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
```

```
                565                 570                 575
Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr
            580                 585                 590
Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr
        595                 600                 605
Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
    610                 615
<210> 13
<211> 2380
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1860)
<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of a
      novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
<303> J. Biol. Chem.
<304> 275
<305> 26
<306> 19513-19520
<308> AF245447
<400> 13
gccacc atg gcc ccg ccc cca ccg cca ctg gct gcc agc acc ccg ctc    48
       Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu
         1               5                  10
ctc cat ggc gag ttt ggc tcc tac cca gcc cga ggc cca cgc ttt gcc   96
Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala
 15                  20                   25                  30
ctc acc ctt aca tcg cag gcc ctg cac ata cag cgg ctg cgc ccc aaa   144
Leu Thr Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys
                 35                  40                  45
cct gaa gcc agg ccc cgg ggt ggc ctg gtc ccg ttg gcc gag gtc tca   192
Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser
             50                  55                  60
ggc tgc tgc acc ctg cga agc cgc agc ccc tca gac tca gcg gcc tac   240
Gly Cys Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr
         65                  70                  75
ttc tgc atc tac acc tac cct cgg ggc cgg cgc ggg gcc cgg cgc aga   288
Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg
     80                  85                  90
gcc act cgc acc ttc cgg gca gat ggg gcc gcc acc tac gaa gag aac   336
Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn
 95                 100                 105                 110
cgt gcc gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc ctc acc tgt ctg ctc cga   384
Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg
                115                 120                 125
gga ctg cca ctg ccc ggg gat ggg gag atc acc cct gac ctg cta cct   432
Gly Leu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro
            130                 135                 140
```

```
cgg ccg ccc cgg ttg ctt cta ttg gtc aat ccc ttt ggg ggt cgg ggc   480
Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly
        145                 150                 155
ctg gcc tgg cag tgg tgt aag aac cac gtg ctt ccc atg atc tct gaa   528
Leu Ala Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu
    160                 165                 170
gct ggg ctg tcc ttc aac ctc atc cag aca gaa cga cag aac cac gcc   576
Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala
175                 180                 185                 190
cgg gag ctg gtc cag ggg ctg agc ctg agt gag tgg gat ggc atc gtc   624
Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val
                195                 200                 205
acg gtc tcg gga gac ggg ctg ctc cat gag gtg ctg aac ggg ctc cta   672
Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu
            210                 215                 220
gat cgc cct gac tgg gag gaa gct gtg aag atg cct gtg ggc atc ctc   720
Asp Arg Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu
        225                 230                 235
ccc tgc ggc tcg ggc aac gcg ctg gcc gga gca gtg aac cag cac ggg   768
Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly
    240                 245                 250
gga ttt gag cca gcc ctg ggc ctc gac ctg ttg ctc aac tgc tca ctg   816
Gly Phe Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu
255                 260               265                 270
ttg ctg tgc cgg ggt ggt ggc cac cca ctg gac ctg ctc tcc gtg acg   864
Leu Leu Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr
                275                 280                 285
ctg gcc tcg ggc tcc cgc tgt ttc tcc ttc ctg tct gtg gcc tgg ggc   912
Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly
            290                 295                 300
ttc gtg tca gat gtg gat atc cag agc gag cgc ttc agg gcc ttg ggc   960
Phe Val Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly
        305                 310                 315
agt gcc cgc ttc aca ctg ggc acg gtg ctg ggc ctc gcc aca ctg cac   1008
Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His
    320                 325                 330
acc tac cgc gga cgc ctc tcc tac ctc ccc gcc act gtg gaa cct gcc   1056
Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala
335                 340                 345                 350
tcg ccc acc cct gcc cat agc ctg cct cgt gcc aag tcg gag ctg acc   1104
Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr
                355                 360                 365
cta acc cca gac cca gcc ccg ccc atg gcc cac tca ccc ctg cat cgt   1152
Leu Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg
            370                 375                 380
tct gtg tct gac ctg cct ctt ccc ctg ccc cag cct gcc ctg gcc tct   1200
Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser
        385                 390                 395
cct ggc tcg cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac ggt ggg ggc   1248
Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly
```

```
    400                 405                 410
cca gag ctg gct ggg gac tgg ggt ggg gct ggg gat gct ccg ctg tcc   1296
Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser
415                 420                 425                 430
ccg gac cca ctg ctg tct tca cct cct ggc tct ccc aag gca gct cta   1344
Pro Asp Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu
                435                 440                 445
cac tca ccc gtc tcc gaa ggg gcc ccc gta att ccc cca tcc tct ggg   1392
His Ser Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly
            450                 455                 460
ctc cca ctt ccc acc cct gat gcc cgg gta ggg gcc tcc acc tgc ggc   1440
Leu Pro Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly
        465                 470                 475
ccg ccc gac cac ctg ctg cct ccg ctg ggc acc ccg ctg ccc cca gac   1488
Pro Pro Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp
    480                 485                 490
tgg gtg acg ctg gag ggg gac ttt gtg ctc atg ttg gcc atc tcg ccc   1536
Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro
495                 500                 505                 510
agc cac cta ggc gct gac ctg gtg gca gct ccg cat gcg cgc ttc gac   1584
Ser His Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp
                515                 520                 525
gac ggc ctg gtg cac ctg tgc tgg gtg cgt agc ggc atc tcg cgg gct   1632
Asp Gly Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala
            530                 535                 540
gcg ctg ctg cgc ctt ttc ttg gcc atg gag cgt ggt agc cac ttc agc   1680
Ala Leu Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser
        545                 550                 555
ctg ggc tgt ccg cag ctg ggc tac gcc gcg gcc cgt gcc ttc cgc cta   1728
Leu Gly Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu
    560                 565                 570
gag ccg ctc aca cca cgc ggc gtg ctc aca gtg gac ggg gag cag gtg   1776
Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val
575                 580                 585                 590
gag tat ggg ccg cta cag gca cag atg cac cct ggc atc ggt aca ctg   1824
Glu Tyr Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu
                595                 600                 605
ctc act ggg cct cct ggc tgc ccg ggg cgg gag ccc tgaaactaaa        1870
Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
            610                 615
caagcttggt acccgccggg ggcggggcct acattccaat ggggcggagc ttgagctagg 1930
gggtgtggcc tggctgctag agttgtggtg gcaggggccc tggccccgtc tcaggattgc 1990
gctcgctttc atgggaccag acgtgatgct ggaaggtggg cgtcgtcacg gttaaagaga 2050
aatgggctcg tcccgagggt agtgcctgat caatgagggc ggggcctggc gtctgatctg 2110
gggccgccct tacggggcag ggctcagtcc tgacgcttgc cacctgctcc tacccggcca 2170
ggatggctga gggcggagtc tattttacgc gtcgcccaat gacaggacct ggaatgtact 2230
ggctggggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc ccatccactc 2290
cggtgcctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttccccg gggccggcgc 2350
taggatttgc actaatgttc ctctccccgc                                  2380
<210> 14
```

```
<211> 618
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu Leu His
  1               5                  10                  15
Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr
             20                  25                  30
Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu
         35                  40                  45
Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser Gly Cys
     50                  55                  60
Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Cys
 65                  70                  75                  80
Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg Ala Thr
                 85                  90                  95
Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala
            100                 105                 110
Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Leu
        115                 120                 125
Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro Arg Pro
    130                 135                 140
Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly
                165                 170                 175
Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu
            180                 185                 190
Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val Thr Val
        195                 200                 205
Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg
    210                 215                 220
Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu Pro Cys
225                 230                 235                 240
Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly Gly Phe
                245                 250                 255
Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
            260                 265                 270
Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala
        275                 280                 285
Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val
    290                 295                 300
Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
305                 310                 315                 320
Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr
                325                 330                 335
Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro
            340                 345                 350
Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr
        355                 360                 365
```

```
Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val
    370                 375                 380
Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly
385                 390                 395                 400
Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu
                405                 410                 415
Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp
            420                 425                 430
Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser
        435                 440                 445
Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro
    450                 455                 460
Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly Pro Pro
465                 470                 475                 480
Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val
                485                 490                 495
Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro Ser His
            500                 505                 510
Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
        515                 520                 525
Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
    530                 535                 540
Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser Leu Gly
545                 550                 555                 560
Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
                565                 570                 575
Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val Glu Tyr
            580                 585                 590
Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu Leu Thr
        595                 600                 605
Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
    610                 615
<210> 15
<211> 388
<212> PRT
<213> Mus musculus
<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of
      murine sphingosine kinase
<303> J. Biol. Chem.
<304> 273
<305> 37
<306> 23722-23728
<308> AAC61698
<400> 15
Met Trp Trp Cys Cys Val Leu Phe Val Val Glu Cys Pro Arg Gly Leu
  1               5                  10                  15
Leu Pro Arg Pro Cys Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Gln Gly Gly
             20                  25                  30
Lys Gly Lys Ala Leu Gln Leu Phe Gln Ser Arg Val Gln Pro Phe Leu
```

```
         35                  40                  45
Glu Glu Ala Glu Ile Thr Phe Lys Leu Ile Leu Thr Glu Arg Lys Asn
     50                  55                  60
His Ala Arg Glu Leu Val Cys Ala Glu Glu Leu Gly His Trp Asp Ala
 65                  70                  75                  80
Leu Ala Val Met Ser Gly Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly
                 85                  90                  95
Leu Met Glu Arg Pro Asp Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Cys
            100                 105                 110
Ser Leu Pro Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Val Asn His
        115                 120                 125
Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Ile Asn Cys
    130                 135                 140
Thr Leu Leu Leu Cys Arg Arg Arg Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser
145                 150                 155                 160
Leu His Thr Ala Ser Gly Leu Arg Leu Tyr Ser Val Leu Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Trp Gly Phe Val Ala Asp Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg
            180                 185                 190
Leu Gly Glu Ile Arg Phe Thr Val Gly Thr Phe Phe Arg Leu Ala Ser
        195                 200                 205
Leu Arg Ile Tyr Gln Gly Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Thr Val
    210                 215                 220
Ala Ser Lys Arg Pro Ala Ser Thr Leu Val Gln Lys Gly Pro Val Asp
225                 230                 235                 240
Thr His Leu Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val
                245                 250                 255
Val Pro Glu Gln Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu Leu His Thr His
            260                 265                 270
Leu Ser Ser Glu Leu Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Glu Ala Gly
        275                 280                 285
Val Met His Leu Phe Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Ala Leu
    290                 295                 300
Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Gln Lys Gly Lys His Met Glu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Cys Pro Tyr Leu Val His Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro
                325                 330                 335
Arg Ser Gln Arg Gly Val Phe Ser Val Asp Gly Glu Leu Met Val Cys
            340                 345                 350
Glu Ala Val Gln Gly Gln Val His Pro Asn Tyr Leu Trp Met Val Cys
        355                 360                 365
Gly Ser Arg Asp Ala Pro Ser Gly Arg Asp Ser Arg Arg Gly Pro Pro
    370                 375                 380
Pro Glu Glu Pro
385
```