

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4441118号
(P4441118)

(45) 発行日 平成22年3月31日 (2010. 3. 31)

(24) 登録日 平成22年1月15日 (2010. 1. 15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

A O 1 K 67/027 (2006. 01)

A O 1 K 67/027

請求項の数 19 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-566415 (P2000-566415)
 (86) (22) 出願日 平成11年8月24日 (1999. 8. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP1999/004552
 (87) 国際公開番号 W02000/011161
 (87) 国際公開日 平成12年3月2日 (2000. 3. 2)
 審査請求日 平成18年6月22日 (2006. 6. 22)
 (31) 優先権主張番号 特願平10-237611
 (32) 優先日 平成10年8月24日 (1998. 8. 24)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000238201
 扶桑薬品工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 〇
 号
 (74) 代理人 100065868
 弁理士 角田 嘉宏
 (74) 代理人 100106242
 弁理士 古川 安航
 (72) 発明者 若宮 伸隆
 大阪府茨木市大池 1 丁目 9 - 2 〇
 審査官 富士 良宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規コレクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第229位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第739位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第226位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第730位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 3 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第211位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第685位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請

10

20

求項 5 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第206位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第670位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 7 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第102位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第358位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 9 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 11】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第91位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第325位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 11 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第9位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第79位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 13 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 15】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の第1位～第547位のアミノ酸からなり、かつ糖鎖に対してカルシウムイオン (Ca^{2+}) 特異的に結合する、ことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号：1 に記載の塩基配列の第55位～第1695位のヌクレオチドからなり、かつ請求項 15 に記載のポリペプチドをコードする、ことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 2、4、6、8、10、12、14 および 16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のベクターを発現可能に含む宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドからなり、かつコレクチン関連分子種をスクリーニングするためのプローブ。

【発明の詳細な説明】

〔技術分野〕

本発明は、生体防御機構の解明に有用であり、また抗ウイルス活性などを含む生理活性を有することが期待され、医薬品用途への応用が可能であると考えられる、新規コレクチンに関する。

10

20

30

40

50

〔背景技術〕

コレクチンは、 Ca^{2+} 要求性の糖認識構造様領域（CRD）及びコラーゲン様領域を有するタンパク質の総称であり、細菌、ウイルスを始め様々な微生物に対する基礎免疫に関与していると考えられている。

これまでに見出されているコレクチンとして、マンナン結合タンパク質（MBP）、サーファクタントタンパク質A（SP-A）およびサーファクタントタンパク質D（SP-D）、コングルチニンなどを挙げることができる。これらのコレクチンは、図1（a）に示すような、（1） Ca^{2+} 要求性の糖認識構造様領域（CRD）、及び（2）コラーゲン様領域の特徴的な領域を含む基本構造から構成されていることが知られており〔Malh
o r t r a ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（E u r . J . I m m u
n o l .）、22巻、1437～1445頁、1992年〕、この基本構造3個がコラー
ゲン様領域においてトリプルヘリックスを構成することによりサブユニットを形成し、さら
にこのサブユニットが3量体、4量体、6量体等のオリゴマー構造を形成している。

脊椎動物では、細胞を介する免疫応答および特異的抗体反応によるメカニズムが、病原菌、ウイルスなどの侵入に対する最大の生体防御システムと考えられている。最近になって、コングルチニン等のレクチンによる非特異的な免疫応答への関与が示唆され、例えば、母親の移行抗体や特異的防御システムが十分に発達していない小児に対し、種々の微生物の中和作用や排除に重要な役割を果たしているとの報告がなされている〔S u p e r r
a、ランセット（L a n c e t）、2巻、1236～1239頁、1989年〕。さらに、宿主の生体防御におけるこれらレクチンの役割について、例えば、MBPの遺伝子上の変異
に起因したMBPの血中濃度の低下によって、宿主が感染を受けやすくなるという研究結果が報告されている〔S u m i y a ら、ランセット、337巻、1569～1570頁、
1991年〕。

本発明者らのグループは、以前に、コングルチニンおよびマンナン結合タンパク質が、H1およびH3タイプのインフルエンザAウイルスの感染や赤血球凝集活性を阻害することを見出した〔W a k a m i y a ら、グライココンジュゲイト・ジャーナル（G l y c o c
o n j u g a t e J .）、8巻、235頁、1991年；W a k a m i y a ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（B i o c h e
m . B i o p h y s . R e s . C o m m .）、187巻、1270～1278頁、1992年〕。

その後さらに、コングルチニンをコードするcDNAクローンを取得し、コングルチニンと種々のサーファクタントタンパク質D遺伝子との間の強い関連性も見出されている〔S u z u k i ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、191巻、335～342頁、1993年〕。

このように、コレクチンは、生体防御機構の解明における有用性及び生理活性医薬物質としての有用性などが期待される物質であり、このファミリーに属する新規分子種の発見は、感染症の治療の他種2々の医療分野、そして生物学の分野にも寄与するところ大である。

〔発明の開示〕

本発明は、かかる現状に鑑みてなされたものであり、特にヒトの体内で抗細菌、抗ウイルス活性などの生理活性を発揮することが期待される新規コレクチンを得ることを目的とするものである。

すなわち、本発明は、

〔1〕配列番号：2の第206～547位で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

〔2〕配列番号：2の第229～547位で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

〔3〕配列番号：1の第670～1695位で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、

〔4〕配列番号：1の第739～1695位で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド

、
[5] 配列番号：4及び配列番号：5で示される塩基配列を有するプライマーを用いて行ったPCR反応の増幅産物であるプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、且つコレクチンをコードするポリヌクレオチド、

[6] [1]乃至[5]に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズでき、該ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が、(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識構造様領域(CRD)、及び(2)コラーゲン様領域を含む、ヒトコレクチンであるポリヌクレオチド、

[7] [3]乃至[6]に記載のポリヌクレオチドによってコードされる新規コレクチン

10

、
[8] 配列番号：2の第206～547位で示されるアミノ酸配列を含む新規コレクチン

、
[9] 配列番号：2の第229～547位で示されるアミノ酸配列を含む新規コレクチン

、
[10] [7]乃至[9]のいずれかに記載の新規コレクチンのアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識構造様領域(CRD)、及び(2)コラーゲン様領域を含む、新規コレクチンをその要旨とし、コレクチンに特徴的な構造を有し、従来報告されているものとは異なる新規のコレクチン遺伝子及びタンパク質を提供するものである。

20

〔発明を実施するための最良の形態〕

如上の本発明において、前記ポリヌクレオチド[1]～[6]は、好ましくはcDNAである。

上記[2]に示されるポリヌクレオチドは、少なくとも配列番号：2の第229～547位で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むが、第一メチオニン残基の上流に、さらなる塩基配列、例えば、配列番号：2の第226～228位もしくは第211～228位、または配列番号：2の第102～228位、第91～228位、第9～228位、第1～228位などのアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含みうるものである。

また、上記[4]に示されるポリヌクレオチドは、塩基配列の5'上流に配列番号：1の第730～738位もしくは第685～738位、または第358～738位、第325～738位、第79～738位、第55～738位もしくは第1～738位で示される塩基配列をさらに含みうる。

30

さらに、上記[3]または[4]に示されるポリヌクレオチドはの3'下流には、配列番号：1の第1696～2024位で示される塩基配列をさらに含みうる。

なお、本発明の上記タンパク質[7]～[10]はヒト由来であることが、ヒトの体内で抗細菌、ウイルス活性などを発揮できることが期待され、生理活性医薬物質としての有用性に鑑みて好ましい。従って、本発明のタンパク質は、ヒト由来の新規コレクチンを企図するものであり、様々なヒト生体組織を検討したところ、有用と考えられる新規コレクチンがヒト胎盤等に発現されていることが示された。

40

そして、上記[9]に示される新規コレクチンは、少なくとも配列番号：2の第229～547位で示されるアミノ酸配列を含むものであるが、その第一メチオニン残基の上流に、例えば、配列番号：2の第226～228位もしくは第211～228位、または配列番号：2の第102～228位、第91～228位、第9～228位、第1～228位などのアミノ酸配列をさらに含みうるものである。

上記[5]または[6]におけるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、例えば、5xSSC(20xSSC(3M NaCl、0.3Mクエン酸ナトリウム)を4倍希釈することにより5xSSCを調製)、1%ブロッキング剤(ベーリンガー・マンハイム社製)、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%SDSの溶液中で、68℃にて1時間プレハイブリダイゼーション；cDNAプローブ(10ng/ml)を

50

含む5 x S S C、1 %ブロッキング剤、0. 1 %N-ラウロイルサルコシン、0. 0 2 % S D Sの溶液中で、5 5℃にて1 6時間ハイブリダイゼーション：2 x S S C / 0. 1 % S D S溶液で5分間2回洗浄；5 5℃にて、0. 5 x S S C / 0. 1 % S D S溶液で1 5分間2回洗浄を行う一連の処理工程を含むハイブリダイゼーションが含まれるが、当該技術分野における知識に基づき、溶液濃度や温度、時間等の条件を適宜に変更することができる。

そして、上記[10]における、1または複数のアミノ酸の欠失、置換及び／または付加とは、新規コレクチンの親水性・疎水性、酸性・塩基性、含有基などに大幅な変化をきたさず、(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識構造様領域(CRD)及び(2) コラーゲン様領域の有する各々の特徴を変えることが少ない範囲でのアミノ酸の欠失、置換及び／または付加を称する。これまでに報告されているコレクチンファミリーのタンパク質のアミノ酸配列とその構造に基づき、例えば(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識構造様領域(CRD)において1～10程度、(2) コラーゲン様領域において1～100程度、好ましくは1～15のアミノ酸の欠失、置換及び／または付加が許容され则认为られる。

本発明はまた、上記のポリヌクレオチドを、新規コレクチンの発現を許容するように含むベクターを提供する。

このポリヌクレオチドが挿入されるベクターは、プラスミド、 λ ファージ、コスミド等のようなレプリコンに、上記新規コレクチンにかかるポリヌクレオチドを組み込んで、新規コレクチンが複製・発現されるようにしたものを言う。例えば、コスミドよりもさらに長いDNA断片をクローニングできるベクターとして、P1ファージ、F因子および酵母の人工染色体YAC等がある。また、 λ ファージには置換型ベクターおよび挿入型ベクターが含まれ、これらは導入する遺伝子の長さに応じて適宜選択することができる。また、例えば動物細胞発現可能なベクターとして公知のものに、SV40系ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、ヘルペスウィルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、レトロウイルスベクター等がある。市販されているものとしては、pUC19、pTV118N(寶酒造社製)、pUEX2(アマシャム製)、pGEX-4T、pKK233-2(ファルマシア社製)、pMAM-neo(クロンテック社製)、pGL2(プロメガ社製)、pDNA3.1+(インビトロジェン社製)等が挙げられる。かかるベクターの構築方法は、特に限定されるものではなく常法により制限酵素、リガーゼ等を利用して行うことができる。

上記ベクターが形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞として細菌、特に大腸菌を使用する場合には、ベクターは普通少なくともプロモーター領域(プロモーター、オペレーター及びシャインダルガーノ配列を含む)、開始コドン、新規コレクチンをコードする塩基配列、終始コドン、ターミネーター領域等から構成される。酵母または動物細胞を宿主として用いる場合、ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、シグナルペプチド、新規コレクチンをコードする塩基配列及び終始コドンを含むことが好ましい。また、エンハンサー配列、新規コレクチンの5'-及び3'-非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアダニレーション部位及び選択マーカーをベクターに挿入することもできる。

本発明のベクターに組み込まれるプロモーターとしては、従来よりよく知られているSV40(Simian Virus 40)、SR α 、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、アクチンプロモーター、ウイルス性LTR(Long Terminal Repeat)、例えばHTLV-1 LTR、HIV-LTR、ラウス肉芽種ウイルスLTR、単純ヘルペスチロシンキナーゼウイルスプロモーター等の強力なプロモーター、弱いプロモーターに関わらず使用できる。

真核細胞において、線維芽細胞、神経細胞、血液細胞および実質細胞等の正常細胞から、癌細胞に至る多くの細胞種に発現を期待する場合、一般的なプロモーターとしては、サイトメガロウィルス、チミジンキナーゼ(TK)、 β -アクチンおよびSV40初期遺伝子プロモーター等が挙げられる。エンハンサーは通常、プロモーター配列とセットになっているのでそのまま利用することができる。

また、遺伝子を導入し発現させる細胞および組織が特定されている場合には、細胞に特異的なプロモーターを選択することができる。さらに、これらプロモーターをホモあるいはヘテロに組合せることにより、高発現が期待でき、安定に新規コレクチンが得られるという効果が奏される場合がある。

一方、原核細胞において使用されるプロモーターとして、PBAD、PL、trc、T7、SP6、T3、lac等がある。

主として、これらの原核細胞由来の細胞内で新規コレクチンを高発現させることができるプロモーターは宿主に適合する限り、本発明のプロモーターとして適宜選択して用いることができる。また、遺伝子を導入し発現させる細胞および組織が特定されている場合には細胞に特異的なプロモーターを選択することができる。さらに、これらプロモーターをホモあるいはヘテロに組合せることにより、さらに高発現が期待でき、安定に新規コレクチンが得られるという効果が奏される場合がある。

一方、酵母において使用されるプロモーターとしては、GAL1、AOX1、CUP1、PGK等がある。

上記ベクターに組み込み、目的とするベクターのみを回収するための選択マーカーとしては、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下DHFRと略す）遺伝子（メトトレキサート耐性遺伝子）、neo遺伝子（G418耐性遺伝子）等が挙げられ、例えば、DHFR遺伝子が欠損しているCHO細胞を用いて、DHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。また、メトトレキサートの濃度を上げて培養し、耐性細胞を選択することにより遺伝子を細胞内で発現させ、さらに高発現の細胞株を得ることもできる。

本発明は、この様に構築されたベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、例えば、動物細胞、昆虫細胞および微生物細胞（大腸菌、枯草菌、酵母等）で、新規コレクチンを発現することができる宿主細胞も企図するものである。

本発明の宿主細胞たる動物細胞としては、ヒト由来の細胞が挙げられるが特に限定されるものでない。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞等がある。また、微生物細胞としては、例えば大腸菌および枯草菌等の細菌類ならびにサッカロマイセス・セレビシエおよび麦酒酵母等の酵母類等が含まれる。

また本発明によって、上記ポリヌクレオチドまたはその断片を含む、新規コレクチン関連分子種をスクリーニングするためのプローブが提供される。新規コレクチン関連分子種とは、図1に示したような特徴的な構造を有し、図10に示す既知コレクチンに包含されない新規コレクチンの分子種を言う。本発明のプローブを用いて、種々の生物の組織細胞等から得た遺伝子との間のハイブリッド形成能を調べ、比較的ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる遺伝子を探索することによって目的とする新規コレクチン関連分子種をコードする遺伝子をスクリーニングし、これを発現することにより新規コレクチン関連分子種を取得することが可能となる。上記ポリペプチドの断片のうち、糖認識構造様領域を含む配列番号：1の第1291～1698位の配列のうち少なくとも連続10塩基以上、好ましくは連続20塩基以上の塩基配列からなるもの、またはコラーゲン様領域を含む配列番号：1の第796～1236位の配列のうち少なくとも連続10塩基以上、好ましくは連続20塩基以上の塩基配列からなるものが、特異性の点からプローブを構成するポリヌクレオチドとして有用である。

本発明はまた、本発明によって得られた新規コレクチン及び／または由来分子を認識する抗体を提供する。本明細書で言う由来分子とは、新規コレクチンと同様の特徴を有する断片（例えば、糖鎖認識部位及び／またはコラーゲン領域を含む断片）、新規コレクチンの前駆体及びそれらをコードする核酸配列及び／またはその相補的な核酸配列とストリンジェントな条件下にてハイブリダイズすることができる核酸によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド等が含まれる。

新規コレクチン及び／または由来分子に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体、ペプチド抗体) または抗血清は、本発明の新規コレクチン及び／または由来分子あるいはそれらを含む融合タンパク質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。すなわち、本発明の新規コレクチン及び／もしくは由来分子またはそれらを含む融合タンパク質を抗原として、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウス及びラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistar及びSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6及びICR系マウス等が好ましく用いられる。

10

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

20

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1細胞等が挙げられるが、好ましくはSP2/0細胞が用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。新規コレクチン及び／または由来分子に対する抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、新規コレクチン抗原を直接または担体と共に吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗新規コレクチン抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識した新規コレクチンを加え、固相に結合した抗新規コレクチンモノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

30

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

40

50

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をE L I S Aプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、B S A（ウシ血清アルブミン）、M S A（マウス血清アルブミン）、O V A（オボアルブミン）、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。P B S（リン酸緩衝性生理食塩水）等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

10

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェル当たり1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能を高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、F A C S（蛍光標示式細胞分取器）及びシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する（J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982）ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のF C S（胎児ウシ血清）を含む細胞培養用培地（I M D M、D M E M、R P M I 1 6 4 0及びM E M等）を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

20

本発明によるモノクローナル抗体は、新規コレクチン及び／または由来分子に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものを選択することができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、新規コレクチン及び／または由来分子のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明における新規コレクチン及び／または由来分子特異的なモノクローナル抗体といえる。新規コレクチン及び／または由来分子に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、新規コレクチンファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

30

40

新規コレクチン及び／または由来分子に対するモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばD E A E（ジエチルアミノエチル）セファロース等）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加す

50

る。その他、グリシン、 α -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニン及びヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 β -プロピオニラクトン及び無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類及びキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免役したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～50割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバンドを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免役された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

また、新規コレクチン及び／または由来分子とその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質を免疫原として用いることによって抗体を調製することができる。係る融合タンパク質を構成する、その他のタンパク質またはポリペプチド断片として、特にGST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）が好適であるが、他にも、ポリヒスチジン（好ましくは6個のヒスチジン）、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、プロテインA等を用いてもよい。

尚、ポリヒスチジンを用いた場合、遺伝子組換え法にて発現させた融合タンパク質を単離精製するためには、ニッケルキレート樹脂への吸着を利用することができ、pH変動の他、EDTAまたはイミダゾール物質を添加することによって当該樹脂から解離することができる。CBPを用いた場合、発現させた融合タンパク質はカルモジュリンアフィニティー樹脂を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後EGTAを加えることにより当該樹脂から解離することができる。また、プロテインAを用いた場合、発現させた融合タンパク質はIgGセファロース（例えば、IgGセファロース6FF）カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後pH変動によって当該樹脂から解離することができる。

さらに前記融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド断片の別の例として、Xpress、Thioredoxin、c-myc、V5及びHA/c-myc等を挙げることができ、これらをエピトープとして認識することができる抗体を用いて、目的とする新規コレクチンとの融合タンパク質を発現した後に抗原-抗体アフィニティークラムにより単離・精製することができる。

このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を取得する場合、抗体のスクリーニングには新規コレクチンを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

好ましい免疫原であるGSTと新規コレクチン及び／または由来分子を含む融合タンパク質は、GST遺伝子のコード領域ならびに新規コレクチン及び／または由来分子のコード

10

20

30

40

50

領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌または動物細胞を培養し、その培養液及び／または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへのアフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出方法は公知の方法によって行うことができる。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を、得ることができる。

このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を調製する方法において、抗体のスクリーニングには新規コレクチン及び／または由来分子を用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

10

新規コレクチン及び／または由来分子に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、新規コレクチンに関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。なお、抗体を特にヒトに投与することが意図される場合、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体等のヒトに対して免疫原性を有さないあるいは極力抑えた抗体を用いるのが好ましい。マウスモノクローナル抗体をヒトの体内に投与すると、ヒトにとっては異種タンパクであるので種々の副作用が起こる危険性がある。そこで、ヒトモノクローナル抗体が望ましいが、融合効率が悪くまた抗体産生が安定なハイブリドーマを得ることは難しかった。しかし、現在技術は進歩しヒトモノクローナル抗体またはキメラ抗体を作製することが可能となっている。

20

キメラ抗体とはマウス抗体とヒト抗体のキメラ分子をいう。ヒトに任意の抗原を免疫して抗体を製造することは倫理上不可能である。ゆえに、マウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（V領域）を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体定常部（C領域）遺伝子と結合してキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子を宿主細胞で発現させれば、ヒト・マウス・モノクローナル抗体が産生できる。キメラ抗体はヒトに対する抗原性が少ないため、ヒト体内に投与する治療用や画像診断用モノクローナル抗体等として利用できる。公知のキメラ抗体の関連技術として、特開平05-304989号、特開平04-330295号、WO9106649、特開昭63-036786号、特公平06-98021号に記載の発明等がある。

しかし、最近キメラ抗体よりも有用であるといわれるヒト化抗体が開発された。ヒト化抗体とは抗体分子の抗原結合部位（CDR：Complementary determining region、相補性決定領域）の遺伝子配列のみをヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトリング）し、抗体分子のCDRを除いた全分子をヒト化した抗体である。本抗体はヒト・マウス・キメラ抗体より、マウスの抗体部分が少ないため、抗原性が少なく安全性が高いと言われている。我が国では現在、成人性T細胞白血病に対するヒト化抗体の臨床試験が行われている。ヒト化抗体の製造方法及びその関連技術については、米国Genentech社（WO9222653、WO9845332、WO9404679、WO9837200、WO9404679）及び英国Celltech社（WO9429451、WO9429351、WO9413805、WO9306231、WO9201059、WO9116927、WO9116928、WO9109967、WO8901974、WO8901783）等の特許出願がある。

30

ヒトモノクローナル抗体の作製方法には細胞融合法以外にも、エプスタイン・バー（Epstein-Barr）ウィルス（EBV）で形質転換する方法、さらにはその形質転換した細胞を親細胞と融合させる方法、遺伝子工学を利用しキメラ抗体、ヒト化抗体を作製する方法などがある。キメラ抗体とは異種の動物の免疫グロブリン遺伝子断片をつなげて作製された抗体であり、ヒト化抗体とはマウスなどにヒトにとって異種の抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部（CDR）以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置換した抗体をいう。ヒトモノクローナル抗体作製用の親細胞は、ヒト／マウスのヘテロミエローマであるSHM-D 33株（ATCC CRL 1668）またはRF-S 1株を用いるとマウスの親細胞と同等の高い融合効率が得られる。これらの親細胞を用

40

50

いて得られたハイブリドーマはフィーダー細胞なしでクローニングが可能であり、IgGタイプの抗体を比較的安定にしかも大量に産生することができる。親細胞の培養には、15% FCSを加えたERDF培地を用い、その他の操作はマウスの場合と同様である。また、IgGタイプのヒトモノクローナル抗体を作製するには抗原で十分に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。

十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合には *in vitro* で抗原感作を行うこともできる。上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

さらに本発明によって提供されるのは、新規コレクチン関連分子種または新規コレクチン及び／もしくは由来分子を取得するための方法であって、上記の抗体を使用してタンパク質のスクリーニングを行い、新規コレクチン関連分子種、または新規コレクチン及び／もしくは由来分子をスクリーニングを得る工程を含むことを特徴とする方法である。この方法では、種々の生物の体液、組織細胞等に含まれる新規コレクチン関連分子種、または新規コレクチン及び／もしくは由来分子を単離・取得すべく、上記の抗体を使用して免疫反応性を有するタンパク質をスクリーニングする。かかるスクリーニングにおいて、cDNAライブラリーの発現スクリーニングが好適に利用される。

本発明のさらなる特徴において、新規コレクチン及び／または由来分子の定量方法であって、上記抗体を使用して、被検試料中に含まれる新規コレクチン及び／または由来分子の免疫学的な結合性に基づき、測定を行うことを特徴とする定量方法が提供される。

この方法において新規コレクチン及び／または由来分子の量を測定するために、前記抗体をイムノブロットング、免疫沈降またはELISA等において使用するとよく、特にELISA法を行うことが至便であり好ましい。そして、例えば不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とにより新規コレクチン及び／または由来分子を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化新規コレクチン及び／または由来分子と検体中の新規コレクチン及び／または由来分子を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中の新規コレクチン及び／または由来分子を測定する競合法を利用して検体中の新規コレクチン及び／または由来分子を測定するとよい。

サンドイッチ法による新規コレクチン及び／または由来分子の測定においては、まず、試料中の固定化抗体と新規コレクチン及び／または由来分子とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加する2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体及び新規コレクチン及び／または由来分子を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

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

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

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質及び金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β

10

20

30

40

50

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

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液としてH₂O₂を用い、発色剤として2, 2'ーアジノージー[3ーエチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5ーアミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4ーアミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'ーテトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に β ーDーガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセインーギー(β ーDーガラクトピラノシド)、4ーメチルウンベリフェニル β ーDーガラクトピラノシド等を使用することができる。

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

上記定量方法における測定対象試料は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、新規コレクチン及び／または由来分子を含む試料あるいはその前駆体を含む試料であれば限定されない。

さらに本発明は、新規コレクチン及び／または由来分子を定量するためのキットであって、上記抗体を含み、この抗体を用いたELISA法によって被検試料中に含まれる新規コレクチン及び／または由来分子の量が測定されることを特徴とするキットを提供する。このキットには抗体のほか、上記のような定量に必要な試薬類が含まれる。

本発明はまた、新規コレクチン及び／または由来分子を生産するための方法であって、上記抗体を用いて新規コレクチン及び／または由来分子を単離する工程を含む方法を提供する。かかる方法において新規コレクチン及び／または由来分子を単離するために、前記抗体を結合させた担体に試料を接触させて抗原ー抗体間の特異的な相互作用を許容し、次いで担体を洗浄した後、結合された目的タンパク質を溶出する工程を含む、カラム法、バッチ法等によるアフィニティークロマトグラフィー及び／または免疫沈降が実施されるとよ

10

20

30

40

50

い。

この方法における試料は、例えば、ヒト由来の胎盤、脾臓等より調製して得られたものでも、また、前記した本発明の新規コレクチンをコードするポリヌクレオチドから発現させることによって調製したものでもよいが、安定に試料を供給可能であるので、発現産物が好適に用いられ、かかる発現工程を含む方法が本発明において企図される。

また、本発明でさらに企図されるのは、新規コレクチン及び／または由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査とは、例えば、標識抗体を用いた i n s i t u 免疫組織染色などの技術が採用され、新規コレクチン及び／または由来分子を検出するものである。

さらには、本発明により、上記本発明のポリヌクレオチドを含む組換え遺伝子が安定して染色体に導入され、且つ新規コレクチンを発現することができることを特徴とするトランスジェニック非ヒト動物が提供される。さらに提供されるのは、本発明の新規コレクチンの相同体を含む非ヒト動物において、該相同体をコードする遺伝子の発現を修飾するように（例えば、発現を阻止、促進、あるいは所定条件のみで発現するように）遺伝子導入がなされたことを特徴とするトランスジェニック非ヒト動物である。この非ヒト動物において遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加及び／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができる（例えば、Lesley, S. A. et al., Promega Notes Magazine, 46, 6-10, 1994; Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol., 154, 367-382, 1987; Sayers, J. R. et al., Biotechniques, 13, 592-596, 1992; Ito W., et al., Gene, 102, 67-70, 1991; Cormack, B., Current Protocols in Molecular Biology, 8.5.1-8.5.9, 1987)。ここで遺伝子としては、cDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。

これら本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、新規コレクチン及び／または由来分子の機能あるいは発現調節の研究、新規コレクチン及び／または由来分子が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

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

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

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

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で

10

20

30

40

50

精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M, Lavitrano et al, Cell, 57, 717, 1989)。あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の FLP リコンビナーゼ系等による in vivo における部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

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

まず、発現制御に関わるプロモーター、新規コレクチンをコードする塩基配列、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス (5~6 週齢)、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

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

さらに本発明によって、上記本発明の新規コレクチンの相同体を含む非ヒト動物において、該相同体の発現を阻止するように該相同体をコードする遺伝子が改変されて得られることを特徴とするノックアウト非ヒト動物を提供する。

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

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している 2 つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別には PCR を使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いる PCR 反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法及びそれらの変法を用いて容易に選択することができる (Capecci, Science, 244 巻、1288~1292 頁 (1989) 等を参照されたい)

10

20

30

40

50

以下に、本発明の新規コレクチンに関して、実施例に沿って詳細に説明するが、これら実施例の開示によって、本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。

すなわち、ESTデータベースの検索（実施例1）、スクリーニング用プローブの作製（実施例2）、ヒト胎盤由来cDNAライブラリーのスクリーニング（実施例3）、新規コレクチンの塩基配列の決定（実施例4）、新規コレクチンのゲノミックサザン分析（実施例5）、新規コレクチンのヒトの種々の組織に対するノーザン分析（実施例6）、新規コレクチンの種々の動物種の組織についてのゲノミックサザン分析（実施例7）ならびに新規コレクチンの遺伝学的解析（実施例8）、新規コレクチンに対するモノクローナル抗体の調製（実施例9）、抗マウス抗ヒト新規コレクチン抗体を用いたELISA法（実施例10）、ヒトに対する免疫原性を低下させた抗体の調製（実施例11）、新規コレクチンの発現ベクターpNOW1-hCL-P1の構築（実施例12）、新規コレクチンを発現するクローンの選択（実施例13）、トランスジェニックマウスの作製（実施例14）及びノックアウトマウスの作製（実施例15）について以下に説明する。

実施例1：ESTデータベースの検索

既知のコレクチンすなわち、ヒトMBP、ヒトSP-A及びヒトSP-Dのアミノ酸配列（図2及び3参照、図中、相同と認められるアミノ酸残基部分に囲みを付した）を比較することにより、分子間に保存性の高い領域の検索を行った。この結果、ヒトMBPのアミノ酸配列における第220番目から246番目までの27アミノ酸（図3、白抜文字部分、配列番号：6）に保存性が高いことが明かとなったので、この領域に相当するコンセンサス配列をいくつか作成し、EST（Expressed Sequence Tags）データベースの検索を行った。ESTデータベースは、1996年10月11に、676750件の配列を含むものを使用した。

その結果、上記27アミノ酸の配列と相同性の高いアミノ酸配列を含むデータがいくつか得られた。得られたデータのアミノ酸配列についてGenBank／ESTデータベースの検索を行い、既知または未知物質のいずれであるかを判定した結果、コンセンサス配列として、

G l u - L y s - C y s - V a l - G l u - M e t - T y r - T h r - A s p - G l y -
L y s - T r p - A s n - A s p - A r g - A s n - C y s - L e u - G l n - S e r -
A r g - L e u - A l a - I l e - C y s - G l u - P h e（配列番号：3）で示される
アミノ酸配列を用いて検索したときに得られたデータの中に、相同性は高いが未知の塩基
配列を含む2種のデータ（登録番号：W72977及びR74387）を得ることができた。これらは、それぞれ、胎盤由来及び胎児心臓由来であり、新規コレクチンの塩基配列の一部を示すクローンであった。

そこで、このうち、胎児心臓由来のクローン（I. M. A. G. E. Consortium Clone ID 34472）をATCC（American Type Culture Collection）より購入して、以下の新規コレクチン取得のためのスクリーニング用プローブ作製に利用した。

実施例2：スクリーニング用プローブの作製

上記クローンのインサートDNAの塩基配列を、プライマー（ファルマシア社製、M13 Universal Primer（配列番号：7、5'-フルオレセイン-cgacgttgtaaaacgacggccagt-3'）及びM13 Reverse Primer（配列番号：8、5'-フルオレセイン-caggaaacagctatgac-3'））で決定した。

この塩基配列から読取枠をコレクチンのアミノ酸配列に合わせて、そこから読み取ることができるアミノ酸配列に相当する塩基配列を抽出し、この一部分に相当するジゴキシゲン（DIG）ラベルcDNAプローブ用プライマー（Reverseプライマー、caatcttgatgagaaggatg（配列番号：4）及びForwardプライマー、acgaggggctggatgggacat（配列番号：5）を、アプライドバイオシステムズ社製392A DNA／RNAシンセサイザーを用いて作製した。DIGラベルは、PCR DIGプローブ合成キット（ベリンガー・マンハイム社製）を用いて行

った。反応組成は以下のとおりである（プラスミドDNA（クローンW72977、50 ng/μl）：2 μl（100 ng）、10x緩衝液：5 μl、25 mM MgCl₂：5 μl、dNTP（PCRラベリングミックス）：5 μl、20 μM Reverseプライマー：2.5 μl、20 μM Forwardプライマー：5 μl、H₂O：28 μl、Taqポリメラーゼ：0.5 μl）。PCR反応は、アトー社製ザイモリアクターを用いて、92℃1分、55℃1分、72℃2分のサイクルを35回行った。

実施例3：ヒト胎盤由来cDNAライブラリーのスクリーニング

先ず、以下のようにヒト胎盤由来ファージcDNAライブラリーのタイトレーションを行った。mLB培地（10 mM MgSO₄及び0.2%マルトースを含むLB培地（1 gトリプトン、0.5 gイーストエキストラクト、0.5 g NaCl/100 ml）で37℃にて16時間培養したEscherichia coli Y1090r⁻ 0.2 mlと、SM緩衝液（5.8 g NaCl、2 g MgSO₄・7H₂O、2 M Tris-HCl（pH 7.5）25 ml、5 ml 2%ゼラチン/L）で段階希釈したcDNAライブラリー0.1 mlを37℃15分インキュベートし、その後2.5 mlのLB-TOPアガロース（0.75%アガロース/LB培地）に加え均一とし、90 mmφ LB培地プレート（岩城硝子社製）（1.5%アガー/LB培地）にまいた。15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションした。各プレートのプラークを計数後、ファージのタイターを計算により求めた。その結果、タイターは2.1 × 10¹⁰ pfu/mlであった。このようにタイトレーションを行ったcDNAライブラリーにつき、実施例2で作製したプローブを用いて以下の通りにスクリーニングを行った。

mLB培地で37℃にて16時間培養したEscherichia coli Y1090r⁻ 0.6 mlとSM緩衝液で希釈したcDNAライブラリー1 × 10⁵ pfuを、37℃にて15分間インキュベートし、その後7.5 ml LB-TOP アガロース（0.75%アガロース）に加えて均一とした。これを140 mm²のLB培地角プレート（日水製薬社製）にまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションした。プラーク形成を確認後、次に、ナイロンメンブレンへの転写を行った。転写は、ナイトラン（Nyttran）13 N（シュライヒャーアンドシュウェル社製（Schleicher and Schuell Co.））を用いて行った。12.50 cm × 9.0 cmのフィルターを蒸留水に浸けて10分間湿らせた後、ワットマン3 MM紙上において余分な水分を除去し、プラークを形成したプレート上にフィルターを置いた。2分間放置した後、フィルターを剥がし、10分間風乾させた。0.2 M NaOH/1.5 M NaClにより2分間ファージDNAを変性させ、0.4 M Tris-HCl（pH 7.6）/2x SSCで2分間中和し、2x SSCで2分間洗浄を行った。その後、GS GENE LINKER（バイオラッド社製）で紫外線照射することによりファージDNAをメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は以下の様に行った。フィルターを2x SSCで湿らせ、余分な水分をワットマン3 MM紙で除去し、ハイブリダイゼーションバックに移しハイブリダイゼーション溶液（5x SSC、1%ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS）と68℃にて1時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、バックからハイブリダイゼーション溶液を除き、そこへDIGでラベルしたcDNAプローブを10 ng/mlになるように調製したハイブリダイゼーション溶液を加え、55℃にて16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターは室温にて2x SSC/0.1% SDS溶液で5分間、2回洗浄し、55℃にて、0.5x SSC/0.1% SDS溶液で15分間2回洗浄した。次にDIG緩衝液I（100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl（pH 7.5））で1分間、SDSを除去し、DIG緩衝液II（1%ブロッキング剤、DIG緩衝液I）で30分間、フィルターのブロッキングを行った。DIG緩衝液Iで1分間洗浄し、次いでDIG緩衝液IIで抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体（ベーリンガー・マンハイム社製）を5000倍希釈した溶液を加えて、30分間抗体反応を室温で行った後、室温でDIG緩衝液Iで15分間2回洗浄した。DIG緩衝液III（100 mM Tris-HCl、100 mM NaC

10

20

30

40

50

l (pH 9.5)、50 mM MgCl₂) で3分間処理することによりMg²⁺の濃度を高め、NBT/BCIP (和光純薬社製) をDIG緩衝液IIIに加えた溶液で発色させたところ、10個の陽性クローンが得られた。これらのクローンに相当するプラークをプレートから切り出し、SM緩衝液1 mlを入れたチューブに加え、10分間攪拌した後SM緩衝液で段階希釈し、この希釈液0.1 mlとMLB培地で37℃16時間培養した *Escherichia coli* Y1090r⁻ 0.2 mlを混ぜ、37℃にて15分間インキュベートした。その後、混合液を2.5 ml LB-TOPアガロースに加えて均一とし、90 mmφ LB培地プレートにまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションし、いくつかのプラークを得、一次スクリーニングと同様にして二次スクリーニングを行った。

10

実施例4：新規ヒトコレクチンの塩基配列の決定

二次スクリーニングで得られた陽性クローンのうち適切と考えられるクローンのプラークをプレートから切り出し、蒸留水200 μlを入れたチューブに加えて30分間室温で攪拌した後、15,000 rpmで5分間遠心分離し、上清を得た。

得られた上清を鋳型とし、TaKaRa LA PCR Kit ver. 2 (宝酒造社製) を用い、PCRによりインサートDNAを増幅させた。PCRの反応組成は以下のとおりである (上清：27 μl、10x LA PCR緩衝液II (Mg²⁺ 不含)：5 μl、25 mM MgCl₂：5 μl、dNTPミックス：8 μl、20 μM λgt11 Reverseプライマー (配列番号：9、5'-tttgacaccagaccactggtaatg-3')：2.5 μl、20 μM λgt11 Forwardプライマー (配列番号：10、5'-ggtggcgacgactcctggagcccg-3')：2.5 μl、LA Taqポリメラーゼ：0.5 μl、H₂O：全容量50 μlになるように添加)。PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社製ジーンAmp PCRシステム9600を用いて、98℃20秒、68℃5分のサイクルを30回行った。PCR産物は、1%アガロースゲル電気泳動にて確認後、ゲルからの切り出しにより精製した。精製には、ファルマシア社製Sephaglas BandPrep Kitを用いた。

20

切り出したDNA断片は、インビトロジェン社製TAクローニングキットのpCR2.1ベクターに組み込んだ。組換えたベクターは、インビトロジェン社製TAクローニングキットに含まれるTOP10F'細胞に形質転換した。形質転換体をLB培地 (100 μg/mlアンピシリン) で培養し、アルカリSDS法により各クローンにつき3種類のプラスミドDNAを抽出した。

30

得られたDNAを適当と考えられる制限酵素で切断し、各DNA断片をpUC18ベクターに組み込み、XL1-Blue cellに形質転換した。形質転換体をLB培地 (100 μg/mlアンピシリン) で培養し、アルカリSDS法によりプラスミドを抽出した。CL-P1-2-1からは、EcoR I-Hind IIIフラグメント、Hind III-EcoR Iフラグメントを含むプラスミド、CL-P1-3-4からは、EcoR I-BamH Iフラグメント、BamH I-Sma Iフラグメント、Sma I-Hind IIIフラグメント、Kpn I-Sau3A Iフラグメント、Sau3A I-EcoR Iフラグメント、EcoR I-Kpn Iフラグメント、EcoR I-Sma Iフラグメントを含むプラスミド、CL-P1-3-7からは、EcoR I-BamH Iフラグメント、BamH I-Sma Iフラグメント、Sma I-Hind IIIフラグメント、Kpn I-Sau3A Iフラグメント、Sau3A I-EcoR Iフラグメント、EcoR I-Kpn Iフラグメント、Kpn I-EcoR Iフラグメントを含むプラスミドを得た。プライマーはAutoRead Sequencing Kit (ファルマシア社製) 添付のM13 Universal Primer (配列番号：7)、M13 Reverse Primer (配列番号：8) 及びFITC (ファルマシア社製FluorePrime) にてラベルした以下のプライマーをDNA/RNAシンセサイザーを用いて作成し、ファルマシア社製オートリード・シーケンシング・キット及びA. L. F. オートシーケンサーで全領域の塩基

40

50

配列を決定した。

HPP 1: 5'-フルオレセイン-cgtgaaaatgaatggaagtgg-3'
(配列番号: 11)、

HPP 2: 5'-フルオレセイン-ttttatccattgctgttcctc-3'
(配列番号: 12)、

HPP 3: 5'-フルオレセイン-ctggcagtcctccgaggtccag-3'
(配列番号: 13)、

HPP 5: 5'-フルオレセイン-gctggtccccccggagagcgt-3'
(配列番号: 14)

以上実施した塩基配列決定における概略は、図4に示す通りである。

図4(a)に、得られた新規コレクチンのORFが示され、この中のG-X-Yはカラーゲン様領域を表すものである。また、図4(b)に、上記各プライマー名、シーケンサーにより読み取られた塩基配列(矢印により表される)ならびにM13 Universal Primer(Uで表される)及びM13 Reverse Primer(Rで表される)を示す。

さらにCap site cDNAを用いて、この配列の転写開始点を含む5'末端領域の塩基配列を決定した。

Cap Site cDNA, Human Liver (NIPPON GENE社製)により、添付の1RC2 Primer(5'-caaggtacgccacagcgtatg-3'(配列番号: 15))及びApplied Biosystems社製392A DNA/RNAシンセサイザーにより合成したTGP1 Primer(5'-tcttcagtttccctaataccc-3'(配列番号: 16))を用いて第1回PCRを行った。反応混液は、総液量50 μ lにて、LA PCR Buffer II(Mg²⁺不含)、2.5mM MgCl₂、それぞれ200 μ MのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP(以上宝酒造社製)を1 μ l: Cap Site cDNA Human Liver, 0.5 μ M 1RC2 Primer(以上NIPPON GENE社製)、ならびに0.5 μ M TGP1 Primerを含むものとした。PCRは、熱変性95℃にて20秒、アニーリング60℃にて20秒、伸長反応72℃にて20秒を35サイクル、また繰り返し反応前に熱変性95℃にて5分、最後に伸長反応72℃にて10分を含むプログラムで行った。第1回PCR終了後、nested PCRを行った。第1回PCR産物1 μ lを鋳型とし、プライマーは添付の2RC2 Primer(5'-gtacgccacagcgtatgatgc-3'(配列番号: 17))及び合成TGP2 Primer(5'-cattcttgacaaacttcataag-3'(配列番号: 18))(TGP1 Primerと同様にして合成したもの)を用い、第1回PCRと同様の反応組成、プログラム(但し、サイクル数は25サイクル)で行った。以上のPCR反応は宝酒造社製TaKaRa PCR Thermal Cycler 480により行った。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動により確認後、バンドをゲルより切り出し、-80℃, 10min. 凍結し、15000rpm, 10min. 遠心分離後、上清をエタノール沈澱することにより精製した。

精製したDNA断片は、Novagen社製pT7Blue Vectorに組み込み、このベクターをコンピテントセルXL1-Blue細胞に形質転換した。形質転換体をLB培地(100 μ g/mlアンピシリン)で培養し、アルカリSDS法によりプラスミドを抽出し、Pharmacia社製AutoRead Sequencing Kit及びA. L. F. DNA Sequencerで塩基配列の決定を行った。プライマーはAutoRead Sequencing Kit添付のM13 Universal Primer(配列番号: 7)及びM13 Reverse Primer(配列番号: 8)を用いた。

この結果、実施例3で取得された新規コレクチンのcDNAクローンは、2024塩基を含み、1026塩基のORF(転写解読枠)を有し(配列番号: 1参照)、配列番号: 2に示される342のアミノ酸をコードしていることが確認できた。

次いで、GenBankデータベースでDNA及びアミノ酸についての相同性の検索を行った結果、得られたアミノ酸配列は、従来見出されているコレクチンのいずれとも異なる新規タンパク質の配列であることが明らかとなった。

また、従来報告されている3種のコレクチンのアミノ酸配列と、本発明の新規コレクチンのアミノ酸配列を比較した。そのアラインメントを図5及び6に示す。図2及び3と同様に、相同性を有するアミノ酸残基部分に囲みを付した。このアラインメントにより、得られた新規タンパク質は既知コレクチンと相同性を有し、コレクチンファミリーに属していることが示される。

実施例5：新規コレクチンのゲノミックサザン分析

実施例4において明らかにされたcDNA配列を有する新規コレクチンの遺伝子が、シングルコピー遺伝子であるかまたはマルチコピー遺伝子であるかを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を行った。

ヒト血液由来のヒトゲノムDNA（プロメガ社製）の4 μ g相当量を、制限酵素の（1）EcoR I、（2）Xba I、（3）Hind III、（4）Pst I、（5）Bgl IIまたは（6）BamH Iで消化し、0.8%アガロースゲルにて、100mAで3時間電気泳動した。泳動終了後、ナイロンメンブレン（ナイトラン13N）に転写して、分析用のメンブレンを作製した。転写は、先ず、電気泳動後のゲルを100mlの0.25N HClに10分間浸し、蒸留水で3回洗浄した後、100mlの変性液（1.5M NaCl、0.5M NaOH）に15分間2回浸し、100mlの中和液（0.5M Tris-HCl、3M NaCl（pH6.8））に30分間浸すことによって脱プリン化、変性及び中和の処理を施し、次いでバキュームブロッティングシステム（東洋紡エンジニアリング社製、VB-30）を用いて転写した。この際、メンブレンは、2xSSCに5分間、次に20xSSCに5分間浸漬して前処理したものを用い、パッドは、20xSSCをしみこませておいたものを用いた。転写終了後、UV照射により固定処理を施した。

サザン分析のためのハイブリダイゼーション用プローブとしては、実施例4で得られた新規コレクチンのcDNA配列のORFの一部を、プライマー：

5'-gaagacaagtccttcaactccttg-3'（配列番号：19）及び
5'-ctcttgagtcctgtgaggccgatac-3'（配列番号：20）と、前記のPCR DIGプローブ合成キットを用いてDIGラベルしたDNAプローブ：

gaagacaagtccttcacatcttggttttcataaacactagagaggaaacagcaatggataaaa aaacagatggtagggagaga gagccactggatcgggcctcacagactcagag（配列番号：21）を用いた。ハイブリダイゼーションの前に、プローブは10分間煮沸し、5分間ドライアイス／エタノールで急速凍結処理しておいた。

先ず、転写後のメンブレンを2xSSCに5分間浸し、ExpressHyb Hybridization Solution（クローンテック社製）10ml中で65℃にて30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記凍結処理後のプローブをExpressHyb Hybridization Solutionで10ng/mlとなるように希釈し、この溶液2mlを用いて、65℃にて1時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2xSSC、0.1%SDS溶液20mlで室温にて5分間ずつ2回振盪し、続いて0.2xSSC、0.1%SDS溶液20mlで65℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去するために、DIG緩衝液I（100mM Tris-HCl、150mM NaCl（pH7.5））50mlで室温にて1分間2回洗浄し、次にDIG緩衝液II'（1.5%ブロッキング剤、DIG緩衝液I）50mlで室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2%Tween 20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体10mlで30分間処理し、0.2%Tween 20を含むDIG緩衝液Iを50ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10mlの

10

20

30

40

50

D I G緩衝液 I I I に室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、D I G緩衝液 I I I で100倍に希釈しておいたC S P D（登録商標、ベーリンガー・マンハイム社製、化学発光基質）を全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルムT 6 1 2（ポラロイド社製）上で感光させた。

この結果、図7の各レーンに示されるように、各制限酵素で処理したゲノムDNAより、それぞれ1～2個のシグナルしか検出されないので、得られた新規コレクチン遺伝子がシングルコピー遺伝子であることが推測された。

実施例6：新規コレクチンのヒトの組織における発現分布解析

本発明の新規コレクチンのmRNAの種々の組織における発現を調べるため、R T - P C Rにより解析を行った。

種々の組織由来のRNA（（1）脳、（2）心臓、（3）腎臓、（4）脾臓、（5）肝臓、（6）小腸、（7）筋組織、（8）精巣、（9）胎盤、または（10）大腸（O r i G e n e T e c h n o l o g i e s, I n c. 製））を鋳型とし、RNA L A P C R K i t（AMV）V e r. 1. 1（宝酒造社製）を用いてR T - P C Rを実施した。まず以下の反応組成で逆転写反応を行った。5mM M g C l ₂、1x RNA PCR B u f f e r、1mM d N T P M i x t u r e、1U/μl R N a s eインヒビター、0. 25U/μl逆転写酵素、0. 125μM O l i g o d T - A d a p t o r P r i m e r、RNA 1μgを含み、全量20μlになるようにR N a s e不含の蒸留水で調節した。同時に逆転写酵素を含まない反応組成も調製して、ネガティブコントロールとした。上記反応液を0. 2mlチューブに入れ、T a K a R a P C R T h e r m a l C y c l e r P E R S O N A L（宝酒造社製）で42℃で30分間、99℃で5分間、5℃で5分間の1サイクルでP C Rを行った。得られたP C R産物を用いて、続いて以下の反応組成でL A P C Rを行った。2. 5mM M g C l ₂、1x L A P C R B u f f e r I I（M g ²⁺ 不含）、2U T a K a R a L A T a q, 得られた新規コレクチンのcDNA配列のネック領域から糖認識構造様領域を増幅できるようなプライマー2種類（R T - P C R P r i m e r U: 5' - g t g c c c c t g g c c c t g c a g a a t g - 3'（配列番号：22）、R T - P C R P r i m e r R: 5' - g c a t a t c a c c c t g g g g a a c a t t t t a g - 3'（配列番号：23））を0. 2μM加え、全量80μlになるように滅菌蒸留水で調節した。P C Rは、94℃で2分間を1サイクル、94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で1分30秒間を50サイクル行った。反応生成物を1%アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド溶液（0. 1μg/ml）で染色を行い、トランスイルミネーターで泳動パターンを確認し、発現組織を同定した。

また各組織での発現量を比較するために、各組織でβ-アクチン遺伝子の一部分を増幅させるR T - P C Rを行い、RNAの補正を行った。方法は上記同様、逆転写反応、P C R反応を行い、上記と同様に1%アガロースゲル電気泳動を用いて判定を行った。逆転写反応の組成は、5mM M g C l ₂、1x RNA PCR B u f f e r、1mM d N T P M i x t u r e、1U/μl R N a s eインヒビター、0. 25U/μl逆転写酵素、2. 5μMランダム9 m e r、RNA 10ngを含み、全量60μlになるようにR N a s e不含の蒸留水で調節した。P C Rは30℃で10分間、42℃で15分間、99℃で5分間、5℃で5分間の1サイクルを行った。得られたP C R産物を用いて、続いて以下の反応組成でP C R反応を行った。2. 5mM M g C l ₂、1x L A P C R B u f f e r I I（M g ²⁺ 不含）、2U T a K a R a L A T a q, 0. 25μM ヒトβ-アクチン・センスプライマー5' - c a a g a g a t g g c c a c g g c t g c t - 3'（配列番号：24）、0. 25μMヒトβ-アクチン・アンチセンスプライマー5' - t c c t t c t g c a t c c t g t c g g c a - 3'（配列番号：25））を加え、全量40μlになるように滅菌蒸留水で調節した。P C Rは94℃で15秒間、68℃で30秒間を30サイクル行った。

この結果を図8に示すが、本発明の新規コレクチンのmRNAが、胎盤（レーン9）、脾臓（レーン4）、腎臓（レーン3）で発現していることが明らかとなった。特に胎盤での

10

20

30

40

50

発現が高いことが明らかである。

実施例 7：新規コレクチンの種々の動物についてのゲノミックサザン分析

本発明の新規コレクチンの遺伝子が、他の動物種において保存されているか否かを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を実施した。

ハイブリダイゼーション用プローブとしては、前記の新規コレクチンの cDNA 配列の ORF に相当する部分を、PCR DIG プローブ合成キット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて DIG ラベルした DNA プローブを用い、メンブレンは、（１）ヒト（プロメガ社製）、（２）サル（クローンテック社製）、（３）ラット（プロメガ社製）、（４）マウス（プロメガ社製）、（５）イヌ（クローンテック社製）、（６）ウシ（プロメガ社製）、（７）ウサギ（クローンテック社製）及び（８）ニワトリ（プロメガ社製）のゲノム DNA をそれぞれ 5 µg ずつ、制限酵素 EcoR I で処理し、アガロースゲルで電気泳動した後に、ナイトラン 13 N メンブレンに転写し、UV 照射により固定処理を施したものをを用いた。

以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。まず、2 x SSC にメンブレンを 5 分間浸し、10 ml の Express Hybridization Solution 中で 65 °C にて 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記と同様に凍結処理されたプローブを Express Hybridization Solution で 10 ng/ml となるように希釈し、この溶液 2 ml を用いて、65 °C にて 1 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1 % SDS 溶液 20 ml で室温にて 5 分間 2 回振盪し、続いて 0.2 x SSC、0.1 % SDS 溶液 20 ml で 68 °C にて 15 分間ずつ 2 回振盪しながら行った。SDS を除去するために、DIG 緩衝液 I で室温にて 1 分間 2 回洗浄し、次に 50 ml の DIG 緩衝液 II' で、室温にて 1 時間ブロッキングを行った。次いで、0.2 % Tween 20 を含む DIG 緩衝液 I で 5000 倍に希釈しておいた抗 DIG アルカリホスファターゼ標識抗体を 10 ml 用いて 30 分間処理し、0.2 % Tween 20 を含む DIG 緩衝液 I を 50 ml 用い室温にて 20 分間、振盪しながら洗浄を 2 回行った。10 ml の DIG 緩衝液 III に室温にて 3 分間 2 回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG 緩衝液 III で 100 倍に希釈しておいた CSPD を全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム T6 12 上で感光させた。

この結果を図 9 に示すが、ニワトリ（レーン 8）を除くすべての動物種において明瞭なシグナルが認められることから、本発明の新規コレクチン遺伝子は、哺乳類において保存されていることが明らかとなった。

実施例 8：新規コレクチンの遺伝学的解析

得られた新規コレクチンの DNA 配列に基づき、既知のコレクチンとの遺伝的位置付けを明らかにするために解析を行い、遺伝的系統樹を作成した。

解析の対象としたコレクチンは、図 10 に示す各種コレクチンファミリーのタンパク質（図中、CL-L1 は本発明者らが最近単離したヒト肝臓由来のコレクチンを示す（特願平 10-11281 号明細書参照））であり、GenBank データベースからそれぞれのアミノ酸配列を検索して得られたデータをもとにレクチンドメインを含む領域を用いて clustalw 法でマルチプル・アラインメントを作成し、それらをもとに N-J 法（neighbor-joining 法）を用い、Phylip Version 3.57c package プログラムを用いて遺伝的系統樹を作成した。

その結果を図 10 に示すが、SP-D、ウシ CL-43 及びウシコングルチニンで 1 つのクラスターを形成し、さらに MBP 及び SP-A でそれぞれ別々にクラスターを形成していたが、本発明の新規コレクチン遺伝子は CL-L1 と同様これらのいずれのクラスターにも属していないことが示された。また、本発明の新規コレクチンは CL-L1 と異なる、従来報告されているコレクチンとは遺伝的に別のクラスターを形成するものと推測された。

実施例 9：新規コレクチンに対するモノクローナル抗体の調製

新規コレクチン $100\mu\text{g}$ をPBS(−)(カルシウムイオン及びマグネシウムイオン不含のPBS) $100\mu\text{l}$ に溶解したものと完全フロイントアジュバンド $100\mu\text{l}$ を混合し、エマルジョンを作成し、BALB/cマウス(雌性、8週齢)2匹の腹腔内に注射する。3週間後、同様に2回目の免疫を行う。但し、完全フロイントアジュバンドのかわりに不完全フロイントアジュバンドを用いる。さらに2週間後、血清を採取し抗体価を測定する。一番抗体価の高いマウスを選び、一週間後、2回目と同様に最終免疫を行う。最終免疫の5日後、脾臓を採取し、細胞浮遊液を調製する。細胞融合は、骨髓腫細胞NS-1細胞 2×10^7 個と調製した脾細胞 1×10^8 個を混合して行う。混液を $1,600\text{rpm}$ 、6分間室温で遠心後、上清を除去し、残った細胞をほぐしたところにポリエチレングリコニル(PEG)を 1ml 、1分間をかけて添加し、室温で1分間攪拌する。その後、あらかじめ 37°C で保温しておいた基本培地(イスコフ培地、 15% FCS、 2mM L-グルタミン溶液、 0.05mM 2-メルカプトエタノール) 1ml を1分間かけて滴下しながら軽く混ぜる。この操作をもう一度繰り返した後、今度は 8ml を3分間かけて同様の操作を行う。その後、 $1,000\text{rpm}$ 、5分間、室温で遠心することによりPEGを除去する。ペレットをほぐし、そこへ 5×10^6 個/ ml の胸腺細胞浮遊液(ハイブリドーマ形成率を高めるフィーダー細胞として使用、HATを含むハイブリドーマ増殖培地に浮遊させたもの) 100ml を加えて浮遊液を作製する。この浮遊液を96穴プレートに 0.1ml ずつまきこみ、 CO_2 インキュベーターにて、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で培養を行う。

10

ハイブリドーマの選択は以下のようにして行う。培養開始1日後、各ウェルにHAT培地(HATを含むハイブリドーマ増殖培地) $150\mu\text{l}$ を添加した後、引き続き、2日間培養する。2日後培地の $150\mu\text{l}$ を除去し、そこへHAT培地 $150\mu\text{l}$ を添加して培地交換を行い、さらに3日および7日培養後も、同様に培地交換を行う。その4日後、培養上清 $100\mu\text{l}$ を採取し新規コレクチンに対する抗体価を測定してスクリーニングを行う。次に、抗体陽性細胞をパスツールピペットを用いて、96穴プレートから24穴マルチプレートに移す。この時、各ウェルにあらかじめHT培地(ヒポキサンチン及びチミジンを含むハイブリドーマ増殖用培地) 0.5ml を添加しておく。3日間培養後、培地を一部採取し、抗体価を再測定した結果、抗体陽性と判断できる細胞をクローニングおよび凍結保存する。クローニングは陽性細胞を胸腺細胞浮遊液で限界希釈して1個/ ml に調製し、96穴マルチプレートに 0.2ml ずつまきこむ。10日間培養後、1ウェルに1個だけコロニーを形成しているものの抗体価を測定し、高い抗体価が示されたもの2個を選択する。この2コロニーについて再クローニングを行う。方法は1回目のクローニングと同様の方法で行う。抗体陽性細胞は続いて培養拡大を行う。まず、24穴マルチプレートに移した後、3日間培養後、 25cm^2 フラスコに移し、さらに3日後、 225cm^2 フラスコに移して培養をさらに3日間続け、培養上清を回収することによってモノクローナル抗体を調製する。

20

30

また、腹水からのモノクローナル抗体の製造は、クローニング済みのハイブリドーマを 1×10^7 個/ ml に調製し、マウス1匹当たり 1ml を腹腔内に注射することにより行う。1週間後、腹部の肥大したマウスをエーテルで麻酔し、腹水を採取する。血清分離剤入り凝固促進型遠心管に移し、室温30分間放置後、 $3,000\text{rpm}$ 、5分間遠心する。上部の腹水を回収、さらに硫酸塩析で精製して抗体を得る。

40

実施例10：抗マウス抗ヒト新規コレクチン抗体を用いたELISA法

抗マウス抗ヒト新規コレクチン抗体をコーティングバッファー(50mM 炭酸-炭酸水素バッファー、 $\text{pH}9.6$)で $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、この抗体液を96穴ELISAプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注する。その後、 4°C で一晩インキュベートする。洗浄液(TBS/T液(25mM Tris-HCl, 0.14M NaCl, 5mM KCl, 0.05% Tween 20, $\text{pH}7.4$)) $300\mu\text{l}$ で3回洗浄する。以下の洗浄は同様にして行う。 5% スキムミルク/TBS/T液 $300\mu\text{l}$ を分注し、 37°C 、1時間静置する。洗浄後、被験試料および新規コレクチン標準品を $100\mu\text{l}$ 分注し、 37°C にて1時間静置する。このとき被験試料は適当に希釈を行い、標準品は $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ を

50

最高濃度とし2倍連続希釈列を用いる。洗浄後、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ビオチン化抗ウサギ抗ヒト新規コレクチン抗体 $100\mu\text{l}$ を分注し、 37°C 、1時間静置する。洗浄後、ビオチンストレプトアビジン液 $100\mu\text{l}$ を分注し、 37°C 、30分間静置する。さらに洗浄後、3, 3', 5'-テトラメチルベンチジン溶液 $100\mu\text{l}$ を分注し、30分間室温にて放置後、 1N リン酸 $100\mu\text{l}$ を添加することにより、反応を停止し、波長 450nm で吸光度を測定を行う。

この方法を用いて標準品により検量線を作成し、新規コレクチンを定量する。

実施例11：ヒトに対する免疫原性を低下させた抗体の調製

まず、実施例9に記載の方法で得られたマウスハイブリドーマからmRNAを調製し、ファージベクターを用いたcDNAライブラリーを作製、cDNAクローニングを行う。定常領域cDNAをプローブとしたマウス抗体cDNAクローニングし、制限酵素を用いて挿入されたcDNAの解析を行い、抗体cDNAの塩基配列の決定する。

次に、キメラ抗体を発現させ、クローニングした抗体遺伝子における変異の有無などを抗体結合活性から確認し、また、発現させたヒト化抗体の結合活性を検討するときのポジティブコントロールとして使用する。キメラ抗体を発現する際には、ヒト抗体H鎖、L鎖の定常領域遺伝子が一つのベクター上にクローニングされているカセットタイプの発現ベクターを用いる。キメラ抗体の結合活性を確認し、クローニングしたマウス抗体遺伝子に間違いがないと判断できたところで、ヒト化抗体遺伝子の構築を行う。キメラ抗体作製法とは異なり、ヒト化抗体の場合は構築する遺伝子の設計を行わなければならない。決定されたマウスの抗体可変領域遺伝子の塩基配列をもとに、データベースを利用して相対性の高いヒト抗体可変領域のアミノ酸配列を検索する。CDR配列を除いて70～80%の相対性を有するものを見だし、このように選択したヒト抗体可変領域からCDR配列を除いた領域（フレームワーク領域）にマウス抗体CDR配列を移植して、蛋白構造解析ソフトにより分子モデリングを行う。モデリングにより抗原と結合するH鎖、L鎖上の合計6個のCDRが三次元構造上最もオリジナルのマウスモノクローナル抗体のものに近くなるように、ヒトフレームワーク領域の配列をH鎖、L鎖それぞれ数アミノ酸ずつをマウス型に戻す。この場合、マウス型に戻す数が少なければ少ないほど、よりヒト抗体に近い抗体が得られるので理想的である。このような分子モデリングでは、一つのモデルから出発したヒト化抗体がマウスモノクローナル抗体に等しい活性を100%再現できる確立は低い

ため10種類以上のバージョンのヒト化抗体遺伝子を設計、発現して活性を比べる。遺伝子設計終了後、実際に遺伝子の構築を行う。ヒト化抗体H、L鎖の定常領域遺伝子を含むカセットタイプの発現ベクターにクローニングし、COS細胞などを用いて一過性発現を行い培養上清の抗体活性をELISA法を用いて確認する。活性の強かった数種類を選択して、それぞれ恒常発現用の発現ベクターとCOS細胞などの宿主細胞を用いて恒常発現する細胞を確立し、培養上清から精製抗体を調製する。

実施例12：新規コレクチンの発現ベクターpNOW1-hCL-P1の構築

まず、配列番号：1に示す新規コレクチンの開始コドンから終止コドンまでを、aagga a a a a a g c g g c c g c a t g c a a c a a g a t t t g a t g a g gの塩基配列（配列番号：26）からなるプライマーと、g c t c t a g a t t a t a a t g c a g a t g a c a g t a cの塩基配列（配列番号：27）からなるプライマーを用いて、ザイモリアクター（アトー社製）で増幅させる。

得られた新規コレクチンのcDNAを制限酵素Not IとXba Iで消化して、新規コレクチンのcDNAの670～1698bpに対応するcDNA部分（配列番号：1参照）を得、これを挿入体とする。

次に、発現ベクターpNOW/CMV-A（特開平10-179169号明細書参照）を、制限酵素Not IとXba Iで消化して、サイトメガロウイルスプロモーター（pCMV）の下流、すなわち、P_{CMV}（サイトメガロウイルス初期主要抗原プロモーター）とBGPポリA（ウシ成長ホルモンポリアデニレーションシグナル）の間に、前述の挿入体をDNAライゲーションキット（宝酒造製）を用いて挿入する。このようにして得られた発現ベクターをプラスミドpNOW1-hCL-P1（hCL-P1：新規コレクチンを

コードする塩基配列)と命名し、その構造の模式図を第11図に示す。

実施例13：新規コレクチンを発現するクローンの選択

(1) ジヒドロ葉酸還元酵素欠損 (dhfr⁻) のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞への発現ベクター pNOW1-hCL-P1 の導入

ウシ胎児血清 (FCS、GIBCO社) を10%添加した (ヒポキサンチン、チミジンを含まない) Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM、GIBCO社) を調製し、これにDHFR遺伝子が欠損した (dhfr⁻) DG44 CHO細胞株を、 1×10^5 細胞/ml になるように混合し、これを直径60 mmのディッシュに播種し、37℃で、5%炭酸ガス (CO₂) の条件下で、24時間培養する。培養上清を廃棄し、その代わりに別途予め、5 μg のDNA (発現ベクター pNOW1-hCL-P1) をリポフェクチン溶液 (DOTAP Liposomal Transfection Reagent; ベーリンガーマンハイム社製) に混合して得た溶液100 μlを含む10%FCS添加IMDMを加えて6 mlとし、さらにヒポキサンチン (終濃度10 nM) (GIBCO社製) とチミジン (終濃度100 nM) (GIBCO社製) を加え、16時間培養し、dhfr⁻ の宿主CHO細胞への発現ベクター pNOW1-hCL-P1 の導入を行う。その後、培養上清を廃棄し、10%FCS、ヒポキサンチン、チミジン添加IMDMの6 mlを加え、さらに24時間培養を行う。

(2) ネオマイシン (G418) 耐性CHO細胞の取得

発現ベクター pNOW1-hCL-P1 が導入された細胞を24時間培養した後、これをトリプシン処理してディッシュより回収し、細胞数を計測した後、 1×10^5 細胞/ml になるように400 μg/ml の濃度のネオマイシン (G418) を含む10%FCS添加IMDMで細胞を懸濁したものを、0.1 ml/ウェルの量で96ウェルのマイクロプレート10枚に播種 (分注) する。37℃で、5%炭酸ガス (CO₂) の条件下培養し、2週間後の生存細胞をG418耐性細胞 (クローン) として取得する。

これらG418耐性クローンを、hCL-P1の産生性について確認する。hCL-P1の産生が確認されたクローンの中からいくつかを選択し、各クローンを、25 cm² のカルチャーフラスコに播種する。細胞が密集するまで (およそ 3×10^6 細胞/25 cm² カルチャーフラスコ) 培養を行う。それぞれのカルチャーフラスコの培養上清を廃棄し、前出のものと同じ組成の10%FCS添加IMDMを2 ml加え、4日間培養し、その培養上清を回収する。回収した培養上清中のhCL-P1 (rhCL-P1: 組換えヒト新規コレクチン) の産生量を測定する。なお、hCL-P1の産生量は、対照として下記鈴木らの方法を用いて大腸菌で発現させたhCL-P1、コレクチンの糖認識領域 (CRD) とネック領域 (同様の方法を用いて大腸菌で発現させたもの) に対する抗ウサギポリクローナル抗体およびhCL-P1 (定量対象) を用いて、鈴木らの方法 (Y. Suzuki, et al., "Characterization of Recombinant Bovine Conglutinin Expressed in a Mammalian Cell", Biochem. Biophys. Res. Commun., 238, pp. 856-863 (1997)) に準じて定量する。

(3) メトトレキセート耐性のCHO細胞の取得

上記実施例13 (2) で得られるhCL-P1産生クローンをさらに継代培養して安定化させた後、低濃度のメトトレキセート (MTX) を培地に加えて遺伝子増幅を行う。

まず、5 nM MTX、400 μg/ml のG418を加えた10%透析済FCS (JRHBioサイエンス社製) 添加IMDMに、選択した各細胞クローンを混合し、0.1 ml/ウェルの量を96ウェルのマイクロプレート10枚に播種 (分注) する。37℃で、5%炭酸ガス (CO₂) の条件下で培養を行い、2週間後の生存細胞を5 nM MTX耐性細胞 (クローン) として取得する。

これら5 nM MTX耐性のクローンを、hCL-P1産生性について確認する。hCL-P1の産生が確認されたクローンの中からいくつかのクローンを任意に選択し、それぞれを25 cm² のカルチャーフラスコに播種し、細胞が密集するまで2週間培養する。培養上清を廃棄し、前出のものと同じ組成の10%FCS添加IMDM (5 nM MTX、

400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418を加えたもの)を2ml加え、4日間培養し、その培養上清を回収し、hCL-P1の産生レベルを確認する。なお、hCL-P1の産生量の定量は、実施例10に記載のELISA法に準じて行う。

実施例14：トランスジェニックマウスの作製

コレクチンは基礎免疫に重要な役割を担っていると考えられている。また、本発明の新規コレクチンは従来のコレクチンとは遺伝的に別のクラスターを形成するものと考えられるので、免疫に関する新たな知見を得、また当該新規コレクチンの作用機序を解明する上で重要なツールを提供するために、この新規コレクチンのトランスジェニック非ヒト動物を作製する。

本発明のヒト由来の新規コレクチンをマウスで発現させることのできるプラスミドを構築する。まず、ニワトリ β -アクチンプロモーターとその上流にサイトメガロウィルスエンハンサーを有する哺乳動物発現ベクター(Niwa, H. et al, ; Gene, 108, 193-200, 1991)より2.3kb断片をSal I/Pst I消化により切り出し、これをクローニングベクターpBluescript(Stratagene社製)のSal I/Pst I部位へ挿入し、pBsCAG-2ベクターを構築する。この2.3kb断片中には、上記エンハンサー/プロモーターおよびウサギ β -グロビン遺伝子の一部(第2イントロン、第3エクソン、3'非翻訳領域)が含まれている。hCL-P1のcDNA(配列番号:1の第670~1698位)を上記第3エクソンのEcoRI部位に挿入し、トランスジェニックマウス発現用プラスミドp β A/hCL-P1を構築する。

次に、アルカリ-SDS法により大量のプラスミドp β A/hCL-P1を準備し、CsCl平衡密度勾配超遠心法により精製を行う。p β A/hCL-P1をSal I/Bam HI消化した遺伝子を単離し、ベクター部分を切り離す。その後、アガロースゲル電気泳動によりベクターDNA断片と分離し、導入DNA断片をゲルから切り出し、GeneClean II Kitを用いてDNA断片を精製する。エタノール沈殿の後、インジェクション用DNA溶解液(10mM Tris-HCl (pH7.5), 0.25mM EDTA)に溶解し、15,000rpm(20,000 $\times$ g)、5分間の遠心後、上清を回収する。分光光度計で吸光度を測定してDNA濃度を計算し、500DNA分子/p1になるように調製し、マウス第一細胞期胚へのDNA導入まで、50mlずつ分注して-20℃に保存する。

次にDNAを注入するためのマウス受精卵を調製する。まず、受精卵採取用雌性マウスを過排卵誘起を施すため、妊馬血清性性腺刺激ホルモンおよびヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを48時間間隔で5IU/bodyを腹腔内に投与し、雄性マウスと同居させる。膣栓が形成されているマウスの腹腔を開き、卵管を取り出しBWW-Hepes培地(NaCl 102.2mM、KCl 4.78mM、KH₂PO₄ 1.19mM、CaCl₂ 1.17mM、MgSO₄ 1.19mM、NaHCO₃ 4.76mM、Hepes 15mM、乳酸ナトリウム25mM、ピルビン酸ナトリウム0.25mM、グルコース5.56mM、BSA 4mg/ml、EDTA 0.1mM及びフェノールレッド0.00025%含有)で洗浄した後、300mg/mlのヒアルロニダーゼを含むBWW-Hepes培地に入れる。実体顕微鏡下に卵管膨大部を時計用ピンセットで引き裂き、受精卵を培地中に取り出した後、受精卵をガラスピペットで拾い上げ、BWW-Hepes培地で5回洗浄する。その後、受精卵をミネラルオイルで覆われたBWW培地のドロップの中に入れ、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養する。

引き続き、受精卵前核へのDNA注入を行う。60mmのシャーレにBWW-Hepes培地とDNA溶液(500DNA分子/p1)のドロップを作り、その上をミネラルオイルで覆った後、インジェクションピペットとホールディングピペットをそれぞれのインジェクターに取り付け、BWW-Hepes培地の上のドロップに受精卵を入れる。インジェクションピペットにDNA溶液を吸引し、ごくわずかに陽圧になるようにインジェクターを調節し、先端から持続的にDNA溶液を流出させておく。インジェクションピペット側に雄性前核がくるようにホールディングピペットで卵を吸引し、対物レンズの倍率を40

倍にして前核に焦点を合わせた後、インジェクションピペットの先端が前核と同じ平面にくるように調節する。

その後、インジェクションピペットの先端を前核の中に突き刺し、DNA溶液を注入する。核の膨化を確認した後、ピペットをすばやく抜き取り、インジェクションした卵は下のドロップに移動させ、未処理の卵と混ざらないように操作する。一度に約30個の卵をインジェクションし、その後BWW培地のドロップに移して、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養する。

培養後、受精卵の卵管への移植を行う。ネンブータル注射液を希釈液で10倍に希釈し（終濃度5mg/ml）、体重1gあたり0.01ml腹腔内に投与して偽妊娠マウスに麻酔をかける。約30個の卵をできるだけ少量の培地（0.5～1.0ml）とともに吸い上げておいたトランスファーピペットを用いて、卵管開口部に注入する。卵巣と卵管を体内に戻して切り口を縫合する。その後飼育を続けて、およそ19日後に出産する仔を得る。

トランスジェニックマウスのスクリーニングはドットプロットハイブリダイゼーションにより以下のようにして行う。得られた仔は生後4週間で離乳させ、尾部の先端部分約1cmを麻酔下で切断し、1.5mlのエッペンドルフチューブに入れる。0.5mg/mlのプロティナーゼKを含むSTE buffer（50mM Tris-HCl, 100mM EDTA（pH7.5）、0.5%（w/v）SDS）を0.5ml加え、55℃のインキュベーター中で一晩振盪する。尾部溶解液のうち100mlを新しいチューブに取り、TE飽和フェノール200mlとTE buffer 110mlを加え、ボルテックスミキサーに5分間かけた後、15,000rpm（20,000xg）、5分間、室温で遠心する。得られた水層200mlを新しいチューブに取り、フェノール/クロロホルムを200ml加えて5分間ボルテックスミキサーにかけた後、15,000rpm（20,000xg）、5分間、室温で遠心する。上清を新しいチューブに取り、3M酢酸ナトリウム20mlとエタノール500mlを加え、DNAの糸状沈殿物が目視可能となるまで十分混合するように振り、15,000rpm（20,000xg）、5分間、4℃で遠心する。上清を除いて70%エタノールで洗浄の後、5分間乾燥させ、DNA沈殿物を100mlの2M NaCl、0.1M NaOH溶液に溶解する。沸騰水浴中で5分間加温後、氷水中で急冷し、DNAを変性させる。96穴マニホールドをセットし、DNAをナイロンメンブレン上にスポットし、メンブレンを風乾した後、80℃、2時間加熱する。導入したDNAのうちマウス由来の配列を含まない部分をプローブに用いて、通常の方法でハイブリダイゼーションを行う。この結果、シグナルが確認できたものの個体をトランスジェニックマウスとして同定する。

このようにして受精卵に遺伝子注入操作を行うと、受精卵のうち約9割が生存し続ける。この生存卵全てを1匹当たり25個程度となるようレシピエントに移植してレシピエントが妊娠するようにし、妊娠およそ19日目生まれる仔を得る。これらの仔の遺伝子解析を行って導入遺伝子の存在を確認する。さらに、これらのトランスジェニックマウスよりF1マウスを得、トランスジーンの伝達性を調べる。

実施例15：ノックアウトマウスの作製

まず、C57BL/6J系マウス由来のES細胞において本発明の新規コレクチンマウス相同体をコードする目的遺伝子の一部のエクソン部分に、選択マーカー遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子を組み込んで、ターゲッティング用DNAの構築を行う。次にこのDNAのES細胞へのエレクトロポレーションを以下のように実施する。対数増殖期のES細胞（90mmシャーレ1枚）を新鮮なES培地（20%FCS、1mMピルビン酸溶液、0.1mM非必須アミノ酸溶液及び1mM 2-メルカプトエタノールを含む80%DMEM培地）に交換して4時間さらに培養し、培地を除去後、PBS（-）でよく洗浄した後、0.1%トリプシン溶液0.5mlで3分間処理する。培地を1ml加えて単細胞に分散させ、600rpm、4℃、5分間遠心し、上澄みを捨て、PBS（-）5mlに懸濁し、細胞数を測定する。再度、600rpm、4℃、5分間遠心し、上澄みを捨て、 1.1×10^7 細胞/mlになるようにPBS（-）に懸濁する。 1.1×10^7 細胞

／m l の懸濁液うち 0.9 m l をキュベットへ移し、1 μ g / μ l の DNA 溶液（ターゲットティング用）25 μ l（25 μ g）をキュベットに加えて、室温で、5 分間静置する。ジーンパルサーを用いて、500 μ F、230 V の条件で、エレクトロポレーションを行い、5 分間放直後、ES 培地（-G418）に懸濁し、フィーダー細胞が敷かれているシャーレ（90 mm）4 枚に 1 / 4 ずつ播く。ニレクトロポレーション後、24 時間培養したら、150 μ g / m l G418（活性型）含有 ES 培地に交換し、その後毎日、培地交換を行う。7 日後に以下のとおりにクローニングを行う。

コロニーの出現した 90 mm シャーレより培地を除去し、PBS（-）を 10 m l 分注する。実体顕微鏡の下で形態が良好なコロニーをチップで 1 つずつ搔取し、吸い上げ、それぞれのコロニーは、あらかじめ 0.1 % トリプシン溶液 70 μ l が入れられた 96 穴プレートへ移す。そのまま 37 $^{\circ}$ C に 4 ~ 5 分間放置し、トリプシン処理を行い、8 連ピペットマンを用いて十分にピペッティング後、あらかじめ 75 μ g / m l G418 含有 ES 培地を 0.8 m l 入れた 24 穴プレート（フィーダー細胞付き）の 4 穴へ播く。24 時間培養後、75 μ g / m l G418 含有 ES 培地と交換する。3 日後、対数増殖期になったクローンに、0.1 % トリプシン 100 μ l を加え、ES 培地を 100 μ l 加えてピペッティング後、丸底 96 穴プレートへ移す。48 クローンのすべてを処理したら、培養用に 20 μ l とり、残り 180 μ l は PCR 用に用いる。

PCR 用のクローンを 96 穴プレートごと 1200 r p m, 4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した後、培地を除去し、PBS（-）で 3 回洗浄する。8 連ピペットマンを用いて溶解用溶液（100 mM Tris-HCl（pH 8.0）、10 mM EDTA、0.2 %（w / v）SDS、100 mM NaCl、100 μ g / m l プロティナーゼ K）100 μ l を加え、55 $^{\circ}$ C、1 時間プロティナーゼ K 処理を行う。テープでプレートの回りに封をして、さらに 95 $^{\circ}$ C、15 分間保温してプロティナーゼ K を完全に失活させる。4 $^{\circ}$ C にて 5 分間冷却し、2 ~ 3 μ l を PCR 用サンプルとして採取し、第 1 回目のスクリーニングに用いる（残りは -20 $^{\circ}$ C で保存する）。サンプルは 4 クローンを 1 グループとしてセンスプライマー：atgcaacaagatttgatgagg（配列番号：28）及びアンチセンスプライマー：ccctaccggtagaatttgacc（配列番号：29）を用いた PCR を行い、電気泳動法によって目的遺伝子を確認することにより陽性グループの同定を行う。-20 $^{\circ}$ C で保存しておいた残りのサンプルのうち、陽性グループに属する各クローンについて、同様に PCR を行い、陽性クローンを同定する。次に培養用クローンのスクリーニングを行う。培養用のクローン 20 μ l を、24 穴プレート（フィーダー細胞付き）の 4 穴 / 列へ播き、全部が埋まったら CO₂ インキュベーターへ入れて培養し、最終的に 1 クローンを 3 穴に分けて 6 穴プレート（フィーダー細胞付き）に植え継ぐ。

遺伝子を導入した ES 細胞塊を下記のとおり調製したマウスの 2.5 日胚（8 細胞期胚）2 個で挟み込むサンドイッチ法により生殖系列キメラマウスの作成を行う。

2.5 日胚の調製は、以下の様に行う。2.5 日胚 ES 細胞の接着の 6 日前に 5 IU の PMSG（妊馬血清性腺刺激ホルモン）を採卵用の C57BL / 6 J 系雌性マウスの腹腔内に投与する。4 日前さらに 5 IU の hCG（ヒト絨毛性腺刺激ホルモン）を腹腔内に投与し、雄と交配させる。3 日前、膣栓により交尾を確認し、自然発情している偽妊娠用雌マウスを精管結紮雄マウスと交配させる。膣栓により交尾を確認し、偽妊娠マウスとする。接着当日採卵用雌マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、卵管および子宮を摘出する。卵管と子宮を BWW-Hepes 培地で環流し、2.5 日胚（8 細胞期胚および桑実胚）を採取し、胚を BWW 培地のドロップに移し、CO₂ インキュベーター（5 % CO₂, 37 $^{\circ}$ C）中で培養する。採卵し 2.5 日胚を酸性タイロイド液のドロップ（200 μ l）に移し、1 ~ 2 分間静置し、透明帯が溶解したらすぐに BWW-Hepes 培地で 6 回洗浄して ES 細胞との接着に使用する。

ES 細胞の調製は以下のようにして行う。接着当日、フィーダー細胞上に培養している ES 細胞を PBS（-）で 2 回洗浄し、0.05 % トリプシン液を 2 分間作用させ、数十細胞の塊となるようにシャーレから剥取する。ES 培地（-G418）を加え、トリプシンを不活化し、遠心後、ES 培地に懸濁する。0.1 % ゼラチンを被覆したシャーレに播き

10

20

30

40

50

、15分間CO₂インキュベーター中に静置する。シャーレに接着しなかった細胞を集め、これを集合キメラ作製に使用する。

2. 5日胚とES細胞の接着は、以下のようにして行う。まず、細菌培養用のシャーレの底にニードルで小さな穴を開ける。穴を20μlのBWW培地のドロップで覆い、さらにミネラルオイルでカバーする。CO₂インキュベーターに入れ、培地をこの条件に平衡化しておき、実体顕微鏡下に良好な形状を有する、10～20個からなるES細胞塊を選別する。先に作製した穴の中に、ES細胞塊を1つずつ入れる。透明帯を除去しておいた2. 5日胚を2個ずつ穴の中に入れ、ES細胞塊と接着させる。CO₂インキュベーターで一晩培養し、2個分の大きさからなる1つの胚盤胞を得る。

次に、3. 5日胚を子宮へ移植する。偽妊娠マウス（交尾後2. 5日）の腹腔内にネプタール注射液を投与し（体重1g当たり50μg）、麻酔をかける。麻酔のかかったマウスの後背部を開き、脂肪塊を摘んで子宮を引き出す。一晩培養してできた胚盤胞もしくは桑実胚を、10～15個ずつ少量の培地（0. 5～1. 0μl）とともにピペットで吸いあげ、実体顕微鏡下で、注射針で子宮壁の卵管に近い部分に穴を開け、その穴にピペットを挿入して、胚を子宮内に移植する。子宮を体内に戻して切り口を縫合し、およそ18日後に出産する仔を得る。

生殖系列への伝達を確認後、ヘテロ同士のマウスをかけ合わせるによりホモ化し、目的とする本発明の新規コレクチンの相同体を発現しないノックアウトマウスを得る。

〔産業上の利用可能性〕

以上説明したように本発明によって、抗菌性、抗ウイルス活性が確認されているコレクチンに特徴的な構造を有し、従来報告されているものとは異なる新規コレクチン及びそれをコードする遺伝子が提供される。

本発明によって得られる配列情報は、生体防御機構の解明に有用であり、また新規コレクチンが有する生物学的活性を利用した医薬、実験用途のツールを提供することができる。例えば、この新規コレクチンを発現できるベクター、このベクターを発現可能に含む宿主細胞、新規コレクチンに対する抗体の他、新規コレクチン関連分子種をスクリーニングするためのプローブが提供される。

さらに、新規コレクチン及び／または由来分子の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物として有用なトランスジェニック非ヒト動物、ノックアウト非ヒト動物が本発明によって提供される。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Novel Collectin

<130> 99P147W0

10

<150> JP 10-237611

<151> 1998-08-24

<160> 29

<210> 1

20

<211> 2024

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (670)..(1695)

30

<400> 1

gtcacgaatc tgcagcaaga taccagcgtg ctccagggca atctgcagaa ccaaattgtat	60
tctcataatg tggatcatcat gaacctcaac aacctgaacc tgacccaggt gcagcagagg	120
aacctcatca cgaatctgca gcggtctgtg gatgacacaa gccaggctat ccagcgaatc	180
aagaacgact ttcaaaatct gcagcaggtt tttcttcaag ccaagaagga cacggattgg	240
ctgaaggaga aagtgcagag cttgcagacg ctggctgcca acaactctgc gttggccaaa	300
gccacaacg acaccttgga ggatatgaac agccagctca actcattcac aggtcagatg	360

40

gagaacatca ccactatctc tcaagccaac gagcagaacc tgaaagacct gcaggactta	420	
cacaaagatg cagagaatag aacagccatc aagtccaacc aactggagga acgcttccag	480	
ctctttgaga cggatatigt gaacatcatt agcaatatca gttacacagc ccaccacctg	540	
cggacgctga ccagcaatct aaatgaagtc aggaccactt gcacagatac ccttaccaaa	600	
cacacagatg atctgacctc ctggaataat accctggcca acatccgttt ggattctgtt	660	
tctctcagg atg caa caa gat ttg atg agg tcg agg tta gac act gaa gta	711	
Met Gln Gln Asp Leu Met Arg Ser Arg Leu Asp Thr Glu Val		10
1 5 10		
gcc aac tta tca gtg att atg gaa gaa atg aag cta gta gac tcc aag	759	
Ala Asn Leu Ser Val Ile Met Glu Glu Met Lys Leu Val Asp Ser Lys		
15 20 25 30		
cat ggt cag ctc atc aag aat ttt aca ata cta caa ggt cca ccg ggc	807	
His Gly Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro Pro Gly		
35 40 45		20
ccc agg ggt cca aga ggt gac aga gga tcc cag gga ccc cct ggc cca	855	
Pro Arg Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro Gly Pro		
50 55 60		
act ggc aac aag gga cag aaa gga gag aag ggg gag cct gga cca cct	903	
Thr Gly Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Pro Pro		
65 70 75		
ggc cct gcg ggt gag aga ggc cca att gga cca gct ggt ccc ccc gga	951	
Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Pro Ile Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly		30
80 85 90		
gag cgt ggc ggc aaa gga tct aaa ggc tcc cag ggc ccc aaa ggc tcc	999	
Glu Arg Gly Gly Lys Gly Ser Lys Gly Ser Gln Gly Pro Lys Gly Ser		
95 100 105 110		
cgt ggt tcc cct ggg aag ccc ggc cct cag ggc ccc agt ggg gac cca	1047	
Arg Gly Ser Pro Gly Lys Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Asp Pro		40
115 120 125		

ggc ccc ccg ggc cca cca ggc aaa gag gga ctc ccc ggc cct cag ggc	1095	
Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Glu Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly		
130 135 140		
cct cct ggc ttc cag gga ctt cag ggc acc gtt ggg gag cct ggg gtg	1143	
Pro Pro Gly Phe Gln Gly Leu Gln Gly Thr Val Gly Glu Pro Gly Val		
145 150 155		
cct gga cct cgg gga ctg cca ggc ttg cct ggg gta cca ggc atg cca	1191	10
Pro Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Gly Met Pro		
160 165 170		
ggc ccc aag ggc ccc ccc ggc cct cct ggc cca tca gga gcg gtg gtg	1239	
Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Ala Val Val		
175 180 185 190		
ccc ctg gcc ctg cag aat gag cca acc ccg gca ccg gag gac aat ggc	1287	
Pro Leu Ala Leu Gln Asn Glu Pro Thr Pro Ala Pro Glu Asp Asn Gly		20
195 200 205		
tgc ccg cct cac tgg aag aac ttc aca gac aaa tgc tac tat ttt tca	1335	
Cys Pro Pro His Trp Lys Asn Phe Thr Asp Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser		
210 215 220		
gtt gag aaa gaa att ttt gag gat gca aag ctt ttc tgt gaa gac aag	1383	
Val Glu Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala Lys Leu Phe Cys Glu Asp Lys		
225 230 235		
tct tca cat ctt gtt ttc ata aac act aga gag gaa cag caa tgg ata	1431	30
Ser Ser His Leu Val Phe Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln Gln Trp Ile		
240 245 250		
aaa aaa cag atg gta ggg aga gag agc cac tgg atc ggc ctc aca gac	1479	
Lys Lys Gln Met Val Gly Arg Glu Ser His Trp Ile Gly Leu Thr Asp		
255 260 265 270		
tca gag cgt gaa aat gaa tgg aag tgg ctg gat ggg aca tct cca gac	1527	40
Ser Glu Arg Glu Asn Glu Trp Lys Trp Leu Asp Gly Thr Ser Pro Asp		

275	280	285		
tac aaa aat tgg aaa gct gga cag ccg gat aac tgg ggt cat ggc cat			1575	
Tyr Lys Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro Asp Asn Trp Gly His Gly His				
290	295	300		
ggg cca gga gaa gac tgt gct ggg ttg att tat gct ggg cag tgg aac			1623	
Gly Pro Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Gln Trp Asn				
305	310	315		10
gat ttc caa tgt gaa gac gtc aat aac ttc att tgc gaa aaa gac agg			1671	
Asp Phe Gln Cys Glu Asp Val Asn Asn Phe Ile Cys Glu Lys Asp Arg				
320	325	330		
gag aca gta ctg tca tct gca tta taacggactg tgatgggac acatgagcaa			1725	
Glu Thr Val Leu Ser Ser Ala Leu				
335	340			
attttcagct ctcaaaggca aaggacactc ctttctaatt gcatcacctt ctcacacgat			1785	20
tgaaaaaaaaa aaaagcactg aaaaccaatt actgaaaaaaaa aattgacagc tagtggtttt			1845	
taccatccgt cattacccaa agacttggga actaaaatgt tccccagggt gatatgctga			1905	
ttttcatigt gcacatggac tgaatcacat agattctcct ccgtcagtaa ccgtgcgatt			1965	
atacaaatta tgtcttccaa agtatggaac actccaatca gaaaaagggt atcatcccg			2024	
<210> 2				
<211> 547				
<212> PRT				
<213> Homo Sapiens				
<220>				
<223> Deduced Amino Acid Sequence of Novel Collectin from Nucleotide Sequence.				
<400> 2				

10

20

30

40

Met	Tyr	Ser	His	Asn	Val	Val	Ile	Met	Asn	Leu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu				
1					5				10					15					
Thr	Gln	Val	Gln	Gln	Arg	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	Leu	Gln	Arg	Ser	Val				
			20					25					30						
Asp	Asp	Thr	Ser	Gln	Ala	Ile	Gln	Arg	Ile	Lys	Asn	Asp	Phe	Gln	Asn				
		35					40					45							
Leu	Gln	Gln	Val	Phe	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Thr	Asp	Trp	Leu	Lys			10	
	50					55				60									
Glu	Lys	Val	Gln	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Ala	Ala	Asn	Asn	Ser	Ala	Leu				
65					70				75					80					
Ala	Lys	Ala	Asn	Asn	Asp	Thr	Leu	Glu	Asp	Met	Asn	Ser	Gln	Leu	Asn				
			85					90					95						
Ser	Phe	Thr	Gly	Gln	Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Ile	Ser	Gln	Ala	Asn			20	
		100						105					110						
Glu	Gln	Asn	Leu	Lys	Asp	Leu	Gln	Asp	Leu	His	Lys	Asp	Ala	Glu	Asn				
		115					120					125							
Arg	Thr	Ala	Ile	Lys	Phe	Asn	Gln	Leu	Glu	Glu	Arg	Phe	Gln	Leu	Phe				
	130					135					140								
Glu	Thr	Asp	Ile	Val	Asn	Ile	Ile	Ser	Asn	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ala	His			30	
145				150				155					160						
His	Leu	Arg	Thr	Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Asn	Glu	Val	Arg	Thr	Thr	Cys				
			165					170					175						
Thr	Asp	Thr	Leu	Thr	Lys	His	Thr	Asp	Asp	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Asn				
		180						185					190						
Thr	Leu	Ala	Asn	Ile	Arg	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Arg	Met	Gln	Gln				
		195				200						205						40	
Asp	Leu	Met	Arg	Ser	Arg	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Val				
	210					215					220								
Ile	Met	Glu	Glu	Met	Lys	Leu	Val	Asp	Ser	Lys	His	Gly	Gln	Leu	Ile				

225	230	235	240	
Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro Arg				
	245	250	255	
Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Asn Lys Gly				
	260	265	270	
Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu				10
	275	280	285	
Arg Gly Pro Ile Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Gly Lys				
	290	295	300	
Gly Ser Lys Gly Ser Gln Gly Pro Lys Gly Ser Arg Gly Ser Pro Gly				
305	310	315	320	
Lys Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Pro				
	325	330	335	20
Pro Gly Lys Glu Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Phe Gln				
	340	345	350	
Gly Leu Gln Gly Thr Val Gly Glu Pro Gly Val Pro Gly Pro Arg Gly				
	355	360	365	
Leu Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Gly Met Pro Gly Pro Lys Gly Pro				
	370	375	380	30
Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Ala Val Val Pro Leu Ala Leu Gln				
385	390	395	400	
Asn Glu Pro Thr Pro Ala Pro Glu Asp Asn Gly Cys Pro Pro His Trp				
	405	410	415	
Lys Asn Phe Thr Asp Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Val Glu Lys Glu Ile				
	420	425	430	
Phe Glu Asp Ala Lys Leu Phe Cys Glu Asp Lys Ser Ser His Leu Val				40
	435	440	445	
Phe Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln Gln Trp Ile Lys Lys Gln Met Val				
	450	455	460	

Gly Arg Glu Ser His Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser Glu Arg Glu Asn
 465 470 475 480
 Glu Trp Lys Trp Leu Asp Gly Thr Ser Pro Asp Tyr Lys Asn Trp Lys
 485 490 495
 Ala Gly Gln Pro Asp Asn Trp Gly His Gly His Gly Pro Gly Glu Asp
 500 505 510
 Cys Ala Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Gln Trp Asn Asp Phe Gln Cys Glu
 515 520 525
 Asp Val Asn Asn Phe Ile Cys Glu Lys Asp Arg Glu Thr Val Leu Ser
 530 535 540
 Ser Ala Leu
 545

10

<210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Modified Consensus Sequence of collectins Hybridizable with Novel
 Collectin.

30

<400> 3
 Glu Lys Cys Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Lys Trp Asn Asp Arg Asn
 1 5 10 15
 Cys Leu Gln Ser Arg Leu Ala Ile Cys Glu Phe
 20 25

40

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Reverse Primer for Screening a Novel Collectin.

10

<400> 4

caatctgatg agaaggtgat g

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Sequence of a Forward Primer for Screening a Novel Collectin.

<400> 5

acgaggggct ggatgggaca t

21

30

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence of three collectins which were reported
heretofore.

40

<400> 6

Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro

1

5

10

15

Cys Ser Thr Ser His Leu Ala Val Cys Glu Phe

20

25

<210> 7

10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Universal Primer Sequence for Sequencing.

20

<400> 7

cgacgttgta aaacgacggc cagt

24

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> M13 Reverse Primer Sequence for Sequencing.

<400> 8

caggaaaca gctatgac

17

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a λ gt11 Reverse Primer for Sequencing.

10

<400> 9

ttgacaccag accaactggt aatg

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Sequence of a λ gt11 Forward Primer for Sequencing.

<400> 10

ggtggcgacg actcctggag cccg

24

30

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Primer for Screening a Novel Collectin.

40

<400> 11

cgtgaaaatg aatggaagtg g

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Sequence of a Primer for Screening a Novel Collectin.

<400> 12

ttttatccat tgctgttct c

21

20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Primer for Sequencing a Novel Collectin.

30

<400> 13

ctggcagtcc ccgaggtcca g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Primer for Sequencing a Novel Collectin.

<400> 14

gctgggtcccc ccggagagcg t

21

10

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Sequence of a 1RC2 Primer for Cap Site Sequencing.

<400> 15

caaggtacgc cacagcgat g

21

<210> 16

<211> 20

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic TGPI Primer for Cap Site Sequencing.

<400> 16

tcttcagttt ccctaattccc

20

40

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a 2RC2 Primer for Cap Site Sequencing.

10

<400> 17

gtacgccaca gcgtatgatg c

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Sequence of a Synthetic TGP2 Primer for Cap Site Sequencing.

<400> 18

cattcttgac aaacttcata g

21

30

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Primer for Screening a Novel Collectin.

<400> 19

gaagacaagt cttcaactct tg

22

<210> 20

<211> 22

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Primer for Screening a Novel Collectin.

<400> 20

ctctgagtct gtgaggccga tc

22

20

<210> 21

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Sequence of a Probe for Screening a Novel Collectin.

<400> 21

gaagacaagt cttcacatct tgttttcata aacactagag aggaacagca atggataaaa

60

aaacagatgg tagggagaga gagccactgg atcggcctca cagactcaga g

111

<210> 22

40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Forward Primer for Screening a Novel Collectin.

10

<400> 22

gtgcccctgg ccctgcagaa tg

22

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Sequence of a Reverse Primer for Screening a Novel Collectin.

<400> 23

gcatatcacc ctggggaaca ttttag

26

30

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Sense Primer for Screening β -Actin.

<400> 24		
caagagatgg ccacggctgc t	21	
<210> 25		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Sequence of an Antisense Primer for Screening β -Actin.		
<400> 25		
tccttctgca tctgtcggc a	21	
		20
<210> 26		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Sequence of a Sense Primer for Amplifying the Novel Collectin.		30
<400> 26		
aaggaaaaaa gcggccgcat gcaacaagat ttgatgagg	39	
<210> 27		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40

<220>

<223> Sequence of a Reverse Primer for Amplifying the Novel Collectin.

<400> 27

gctctagatt ataatgcaga tgacagtag

29

<210> 28

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Sense Primer for Amplifying the Nockout Gene.

20

<400> 28

atgcaacaag atttgatgag g

21

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Sequence of a Sense Primer for Amplifying the Nockout Gene.

<400> 29

cctacccggt agaattgacc

20

【図面の簡単な説明】

40

第1図は、従来報告されている主なコレクチンの基本構造及びタンパク質の概観を示す図である。

第2図は、従来報告されている3種のコレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

第3図は、第2図と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

第4図(b)は、本発明の新規コレクチンの塩基配列を決定するために使用した各プライマーの名称と、シーケンサーにより読み取られた塩基配列を示す図であり、第4図(a)は、得られた新規コレクチンのORFを示す図である。

第5図は、従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

50

第 6 図は、第 5 図と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

第7図は、本発明の新規コレクチンのゲノミックサザン分析の結果を示す図である。各レーンで使用された制限酵素は、(1) E c o R I、(2) X b a I、(3) H i n d I I I、(4) P s t I、(5) B g l I I及び(6) B a m H Iである。

第 8 図は、本発明の新規コレクチンの臓器分布を示す、ヒトの種々の組織、すなわち、1) 脳、(2) 心臓、(3) 腎臓、(4) 脾臓、(5) 肝臓、(6) 小腸、(7) 筋組織、(8) 精巣、(9) 胎盤、または(10) 大腸における mRNA の発現分布の分析結果を示す図である。

第9図は、本発明の新規コレクチンの種間での保存性を示す、種々の脊椎動物、すなわち、(1) ヒト、(2) サル、(3) ラット、(4) マウス、(5) イヌ、(6) ウシ、(7) ウサギ及び(8) ニワトリにおけるゲノミックサザン分析の結果を示す図である。

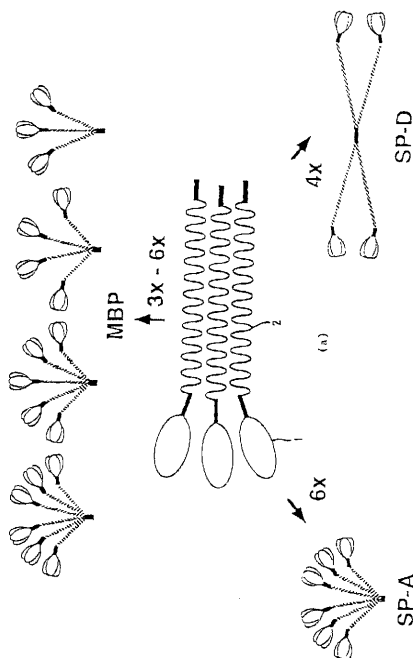
第10図は、種々のコレクチンの遺伝的系統樹を示す図である。

第 11 図は、本発明の新規コレクチンを発現するベクターの構造を示す模式図である。

10

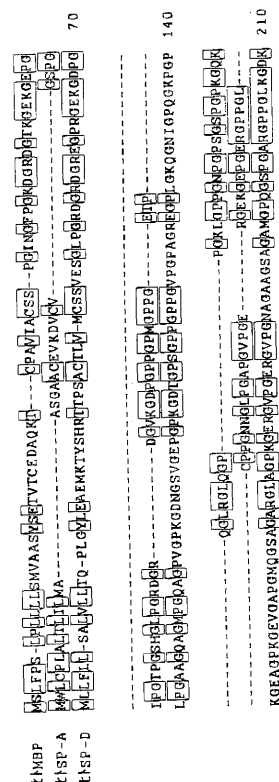
【図 1】

第 1 圖



【図 2】

第2圖



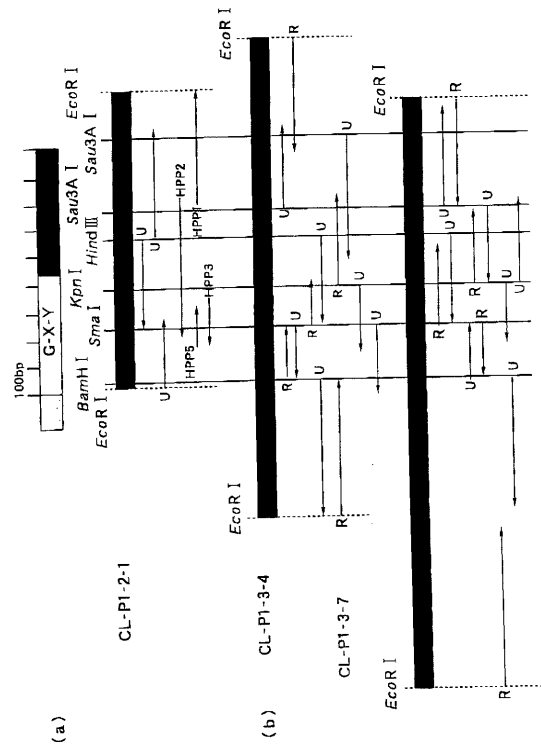
【図 3】
第 3 図

[illegible]

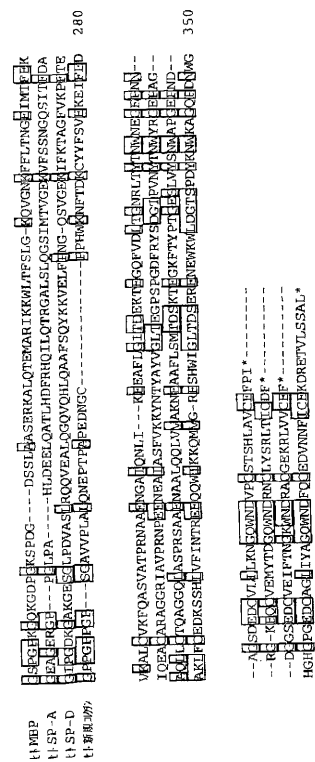
【図 5】
第 5 図

[illegible]

【図 4】
第 4 図

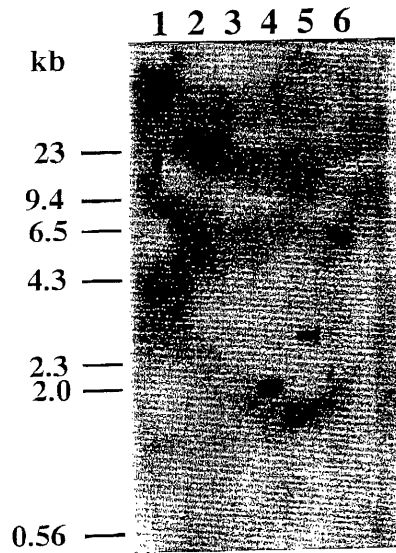


【図 6】
第 6 図



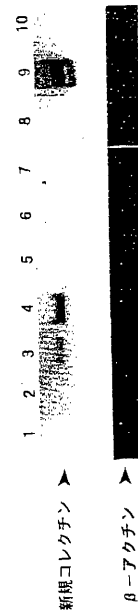
【図 7】

第 7 図



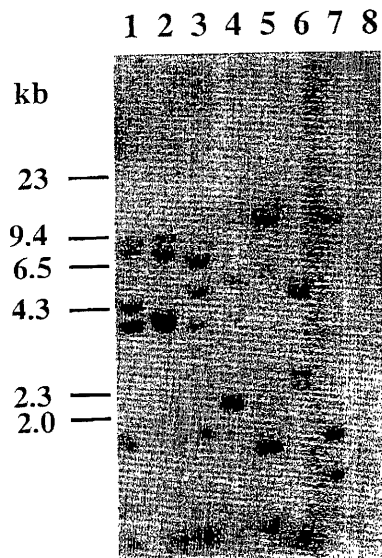
【図 8】

第 8 図



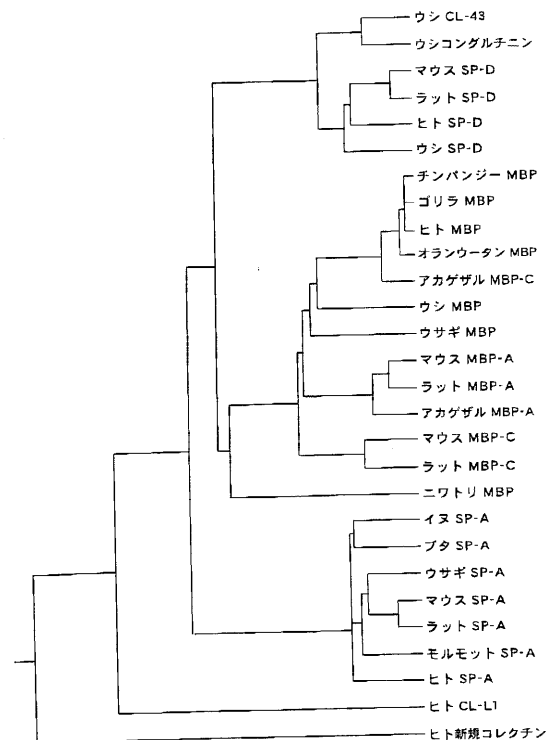
【図 9】

第 9 図



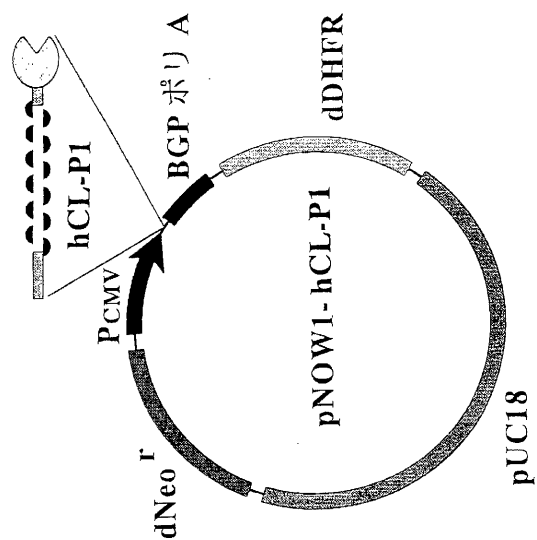
【図 10】

第 10 図



【図 11】

第 11 図



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 0 7 K 14/435

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 D

C 1 2 R 1/91 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 R 1:91

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 R 1:91

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00856580 (EP, A1)

HOPPE H-J ET AL, "COLLECTINS - SOLUBLE PROTEINS CONTAINING COLLAGENOUS REGIONS AND LECTIN DOMAINS - AND THEIR ROLES IN INNATE IMMUNITY", PROTEIN SCIENCE, 英国, 1994年, vol. 3, pages 1143-1158

LAURSEN S B ET AL, "Cloning and sequencing of a cDNA encoding chicken mannan-binding lectin (MBL) and comparison with mammalian analogues.", IMMUNOLOGY, 1998年 3月, vol. 93, no. 3

DRIEKAMER K, "TWO DISTINCT CLASSES OF CARBOHYDRATE-RECOGNITION DOMAINS IN ANIMAL LECTINS", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 米国, 1988年, vol. 263, no. 20, pages 9557-9560

OHTANI KATSUKI ET AL, "Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1)", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1999年, vol. 274, no. 19, pages 13681-13689

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

BIOSIS(DIALOG)

WPI(DIALOG)