

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4584525号
(P4584525)

(45) 発行日 平成22年11月24日(2010.11.24)

(24) 登録日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 1

請求項の数 21 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-572526 (P2001-572526)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月26日 (2001.3.26)
 (65) 公表番号 特表2004-500117 (P2004-500117A)
 (43) 公表日 平成16年1月8日 (2004.1.8)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2001/009664
 (87) 國際公開番号 WO2001/074837
 (87) 國際公開日 平成13年10月11日 (2001.10.11)
 審査請求日 平成19年10月24日 (2007.10.24)
 (31) 優先権主張番号 60/194,318
 (32) 優先日 平成12年4月3日 (2000.4.3)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 09/817,676
 (32) 優先日 平成13年3月26日 (2001.3.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 307010166
 第一三共株式会社
 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
 (74) 代理人 100115750
 弁理士 矢口 敏昭
 (73) 特許権者 399129308
 ジョージタウン ユニヴァーシティー
 アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー
 20057 ボックス 571246
 エヌダブリュ サーティーセヴンス アン
 ド オー ストリート
 (74) 代理人 100115750
 弁理士 矢口 敏昭
 (74) 代理人 100092716
 弁理士 中田 ▲やす▼雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類スフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォーム、そのクローニング、発現及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(ア)乃至(ウ)から選択される核酸分子；

(ア)配列表の配列番号11又は配列番号13に記載のヌクレオチド配列と90%以上同一なヌクレオチド配列からなり、且つ、スフィンゴ脂質をリン酸化する活性を有する蛋白質をコードする核酸分子、

(イ)配列表の配列番号12又は配列番号14に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする核酸分子、

(ウ)配列表の配列番号11又は配列番号13に記載のヌクレオチド配列からなる核酸分子。

10

【請求項2】

DNAである請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】

ベクター及び請求項2の核酸分子を含む組換えDNA構築物。

【請求項4】

前記ベクターが発現ベクターである請求項3記載の組換えDNA構築物。

【請求項5】

前記ベクターが原核生物ベクター、又は、真核生物ベクターである請求項3又は4記載の組換えDNA構築物。

【請求項6】

20

請求項 3 乃至 5 のいずれかに記載の組換え DNA 構築物で形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】

前記細胞が原核生物由来、又は、真核生物由来である請求項 6 の宿主細胞。

【請求項 8】

下記の (A) 又は (B) に記載のポリペプチド；

(A) 請求項 1 の核酸分子にコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(B) 配列表の配列番号 12 又は 14 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 6 又は 7 に記載の宿主細胞を、請求項 8 に記載のポリペプチドが生産される条件下で培養することを含む請求項 8 に記載のポリペプチドの生産方法。

10

【請求項 10】

請求項 8 のポリペプチドを特異的に認識する抗体。

【請求項 11】

下記の工程からなる請求項 8 に記載のポリペプチドのスフィンゴ脂質リン酸化活性を抑制または刺激する薬剤または医薬を検出する方法：

(a) 請求項 3 乃至 5 のいずれか記載の組換え DNA 構築物を細胞内に供給し、請求項 8 に記載のポリペプチドが該細胞内で生産されるようにする工程；

(b) 該細胞に少なくとも一種類の医薬または薬剤を加える工程、及び

(c) 該細胞内の脂質のスフィンゴシンキナーゼ依存性のリン酸化を測定し、測定結果を該医薬または薬剤を入れていない対照と比較することにより、該医薬または薬剤が当該リン酸化を抑制または刺激するか否かを検出し、該対照と比較して脂質のスフィンゴシンキナーゼ依存性のリン酸化が減少する場合は、抑制する医薬または薬剤であるとし、該対象と比較して脂質のスフィンゴシンキナーゼ依存性のリン酸化が増加する場合は刺激性医薬または薬剤であるとする工程。

20

【請求項 12】

下記の工程を含む、試料中の請求項 8 に記載のポリペプチドの存在を検出する方法；

(i) 試料を請求項 10 に記載の抗体と接触させる工程；及び

(ii) 当該抗体と抗原の間で形成される抗原抗体複合体が存在するかしないかを検出する工程。

【請求項 13】

30

配列表の配列番号 11 又は配列番号 13 に記載のヌクレオチド配列中の連続した 18 乃至 40 のヌクレオチドと同一又は相補的なヌクレオチド配列からなる PCR 用プライマーであるヌクレオチド。

【請求項 14】

配列表の配列番号 11 又は配列番号 13 に記載のヌクレオチド配列中の連続した 20 乃至 500 のヌクレオチドと同一、又は、相補的なヌクレオチド配列からなるプローブであるヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 13 乃至 14 に記載のヌクレオチドの内少なくとも一つのヌクレオチドと試料を接触させる工程を含むことからなる、試料中の請求項 8 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子を検出する方法。

40

【請求項 16】

方法が、ポリメラーゼ連鎖反応、ノーザンハイブリダイゼーション、又は、in situ ハイブリダイゼーションである請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 13 乃至 14 に記載のヌクレオチドの内少なくとも一つのヌクレオチド及び付随的な試薬を含むキット。

【請求項 18】

下記の工程を含む、試料中に含まれる請求項 8 に記載のポリペプチドを定量的に検出する方法；

50

(i) 試料を請求項 10 に記載の抗体と接觸させる工程; 及び

(ii) 当該抗体と抗原の間で形成される抗原抗体複合体を定量的に検出する工程。

【請求項 19】

抗原抗体複合体の検出方法が、蛍光抗体分光法、比色法、ラジオイムノアッセイ又はサンドイッチ分析である事を特徴とする請求項 12 又は 18 に記載された方法。

【請求項 20】

請求項 10 に記載の抗体及び付隨的な試薬を含む検出用キット。

【請求項 21】

抗体が、酵素標識、放射性同位体標識、非放射性同位体標識又は化学発光標識されることを特徴とする請求項 20 に記載の検出用キット。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願のクロスリファレンス)

本出願は、35 USC 119(e) の下で優先権が主張される 2000 年 4 月 3 日に提出された仮出願番号 60/194,318 の利益を請求する。

(政府の権利)

本発明は、国立衛生研究所からの許可 GM 43880、及び米国陸軍医学研究及び材料指令前立腺癌研究プログラム (V E N) からの博士号取得後奨学金 B C 961968 の下における合衆国の支援によりなされた。

合衆国政府はこの発明において一定の権利を有している。

20

(本発明の背景)

(本発明の技術分野)

本発明は哺乳類(例えば、マウス及びヒト)のスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 アイソフォーム、該アイソフォームの分子クローニング、及び該アイソフォームの使用方法に関する。

【0002】

スフィンゴシンキナーゼタイプ 1 と比較すると、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 は別個の性質を有している。

【0003】

(背景技術)

30

スフィンゴシン - 1 - ホスフェート (S P P) は、生物学的に活性なスフィンゴ脂質代謝物質であり、細胞の内部及び外部において多様な生物学的プロセスを調節する。細胞内では、細胞の増殖と生存を調節するセカンドメッセンジャーとして働き、細胞外では、G - タンパク質結合レセプターである E D G - 1 サブファミリーに対するリガンドとして作用する (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol., 65, (1999), 341-344; Goetzel, E. J., An, S. FASEB J., 12, (1998), 1589-1598)。従って、S P P は、細胞の成長及び生存を調節するセカンドメッセンジャーとしての重要な役割を果たす (Olivera, A., Spiegel, S., Nature, 365, (1993), 557- 560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S., Nature, 381, (1996), 800-803)。

40

【0004】

多くの外部刺激、特に成長及び生存因子が、スフィンゴシンから S P P を生成させる酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (S P H K) を活性化する。

【0005】

この急速に拡大しているリストには下記のものが含まれる：血小板由来の発育因子 (P D G F) (Olivera, A., Spiegel, S., Nature, 365, (1993), 557-560; Pyne, S., Chapman, J. Steele, L., and Pyne, N. J., Eur. J. Biochem., 237, (1996), 819-826; Coroneos, E., Martinez, M., McKenna, S. and Kester, M., J. Biol. Chem., 270, (1995), 23305-23309)、神経成長因子 (N G F) (Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci., 17, (1997), 50

6952-6960; Rius, R. A., Edsall, L. C., and Spiegel, S., FEBS Lett., 417, (1997), 173-176)、ビタミンD3 (Kleuser, B., Cuvillier, O., and Spiegel, S., Cancer Res., 58, (1998), 1817-1824)、ムスカリン性アセチルコリン作用薬 (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., and van Koppen, C. J., EMBO J., 17, (1998), 2830-2837)、TNF- (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., and Vadas, M. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, (1998), 14196-14201) 及び免疫グロブリンレセプターFcεR1の架橋 (Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J. P., Nature, 380, (1996), 634-636) 及びFcγR1 (Melendez, A., Floto, R. A., Gillooly, D. J., Harnett, M. M., and Allen, J. M., J. Biol. Chem., 273 (1998), 9393-9402)。 10

【0006】

細胞内のSPPはさらに、InsP3とは無関係に、細胞内の貯蔵からカルシウムを動員し (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., and van Koppen, C. J., EMBO J., 17, (1998), 2830-2837; Mattie, M., Brooker, G., and Spiegel, S., Biol. Chem., 269, (1994), 3181-3188)、増殖を促す種々のシグナル経路を誘導し (Rani, C. S., Berger, A., Wu, J., Sturgill, T. W., Beitner-Johnson, D., LeRoith, D., Varticovski, L., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 272, (1997), 10777-10783; Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzelev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., and Spiegel, S., J. Cell Biol., 142, (1998), 229-240)、アポトーシスを抑制する (Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S., Nature, 381, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci., 17, (1997), 6952-6960; Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzelev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., and Spiegel, S., J. Cell Biol., 142, (1998), 229-240)。 20

【0007】

さらに、スフィンゴシンキナーゼの拮抗阻害剤はSPPの生成を阻止し、これらの様々な刺激によって引き起こされるカルシウム輸送、細胞の増殖及び生存を選択的に阻止する (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol., 65, (1999), 341-344)。従って、スフィンゴ脂質代謝物質、セラミド及びSPPのレベルの動的な平衡と、その結果生じる相反するシグナル経路の調整が、細胞の運命を決定する重要な因子であることが示唆されている (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 2910-2916)。例えば、ストレス刺激はセラミドを増加させアポトーシスを誘導するが、生存因子はSPPH2Kを刺激してSPPレベルの増加を導き、これがアポトーシスを抑制する (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 2910-2916)。 40

【0008】

さらに、SPPH2K経路はSPPの生成を通じて、TNF-に誘導される内皮細胞の活性化の媒介に重大な影響を及ぼし (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., and Vadas, M. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, (1998), 14196-14201)、高密度リポタンパク質 (HDL) の、サイトカインに誘導される接着分子の発現を阻止する能力は、このスフィンゴ脂質レオスタットをリセットする能力と関連している (Xia, P., Gamble, J. R., Rye, K. A., Wang, L., Hii, C. S. 50

. T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A. G., Barter, P. J., and Vadas, M. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, (1998), 14196-14201)。これは、粥状動脈硬化及び関連する冠状動脈の心臓病の進展に対するHDLの保護機能にとって重要な意味合いを有する。最近のデータはさらにスフィンゴ脂質レオスターをアレルギー反応に結びつけた(Prieschl, E., E., Csonga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E., and Baumruker, T., J. Exp. Med., 190, (1999), 1-8)。

【0009】

SPPが、G-タンパク質結合性細胞表面レセプターEDG-1のリガンドであるという発見により、SPPへの関心が最近高まってきた(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., and 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., and Hla, T., Science, 279, (1998), 1552-1555)。これは、やはりSPPの特異的なレセプターである、EDG-3、-5、-6及び-8と呼ばれる他のいくつかの関連するレセプターの同定を急速に導いた(Goetzl, E. J., and An, S., FASEB J., 12, (1998), 1589-1598; Spiegel, S., and Milstein, S., Biochem. Biophys. Acta., 1484(2-3):107-16, (2000))。SPPと構造的に類似するが4位でのtrans二重結合を欠き、しかもリゾホスファチジン酸でもスフィンゴシルホスホリルコリンでもないスフィンゴシン-1-ホスフェートも、これらのレセプターに結合する(Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 274, (1999) 4626-4632)。このことは、EDG-1が、SPPと高い親和性及び特異性をもって結合するG-タンパク質結合レセプターの類に属することを示す(Goetzl, E. J. and An, S., FASEB J., 12, (1998), 1589-1598; Spiegel, S. and Milstein, S., Biochem. Biophys. Acta., 1484(2-3):107-16, (2000))。

【0010】

レセプターのEDG-1類は、主として心血管・神経系において、区別可能に発現し、様々なG-タンパク質に結合する。これにより最終的に細胞タイプ及びEDGレセプターの相対的な発現に依存する多面的反応へと繋がる種々のシグナル伝達経路を調節することができる。GPCRであるEDG-1類の生物学的機能は完全には解明されていないが、最近の研究では、SPPのEDG-1への結合が細胞の移動及び化学走性を促すこと(Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstein, S., and 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., and Garcia, J. G., J. Hematother. Stem Cell Res., 8, (1999), 627-634)、そして結果として、血管新生を調節する可能性のあること(Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstein, S., and 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., and 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., and Hla, T., Cell, 99, (1999), 301-312)が示唆されている。EDG-5は、ニューロンの分化及び発生にとって重要な、軸索突起収縮における細胞骨格の再編成に役割を果たしている可能性がある(Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 274, (1999), 4626-4632; MacLennan, A. J., Marks, L., Gaskin, A. A., and Lee, N., Neuroscience, 79, (1997), 217-224)。

【0011】

SPPの役割の厳密な評価には、その代謝を調節する酵素のクローニングを要する。最近、ネズミ腎臓SPPが明らかな均質度で精製され(Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., and Spiegel, S. J. Biol. Chem., 273, (1998), 1257-12583)、続いて最初の哺乳類SPPがクローニングされ、mSPPと命名された(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728)。これらとは別に、LCB4及びLCB5と命名された二つの遺伝子も、*Saccharomyces cerevisiae*中のSPP類をコードするとして示された(Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., and Dickson, R. C., J. Biol. Chem., 273, (1998), 19437-19442)。さらに、データベースにより、虫、植物及び哺乳動物を含む多数の広範囲な異なった生物種において、mSPPK1の同族体が確認され、またこの酵素が高度に保存された遺伝子群のうちのひとつにコードされることが示された(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728)。既知のSPPK1の推定アミノ酸配列の比較により、高度に保存されたアミノ酸の5つのブロックが明らかになった(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728)。しかしながら、いくつかの証拠は、多数の哺乳類SPPKアイソフォームがあり得ることを示唆している。

【0012】

血小板中のSPP活性はクロマトグラフィーにより、界面活性剤に対する異なる反応性及び既知のSPP阻害剤による阻害といういくつかの型に分画されうるであろうという発見は、ヒトの血小板中の多数の酵素型の存在を示す(Banno, Y., Kato, M., Hara, A., and Nazawa, Y., Biochem. J., 335, (1998), 301-304)。さらに、包括的データベースに対するホモロジー検索により、NCBIの発現配列タグ(dbEST)のいくつかがmSPPK1aの保存された領域に対してかなり高い相同意を有していることが明らかになり(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728)、実質的に差はなかった。

【0013】

USP 5,374,616は、哺乳類細胞の細胞増殖促進のための、スフィンゴシルホスホリルコリンを含有する組成物に関する。

【0014】

WO 99/61581には、マウスのスフィンゴシンSPPK1a(381アミノ酸)及びSPPK1b(388アミノ酸)をコードするDNA断片が記載されている。

(発明の開示)

本発明の目的は、哺乳類(例えばマウスまたはヒト)のスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームをコードする、単離及び精製されたDNA、及びそれによりコードされるペプチドを提供することにある。

【0015】

本発明の別の目的は、ベクター及び上記DNAを含む組換えDNA構築物、並びに該組換えDNA構築物で形質転換された宿主細胞を提供することにある。

【0016】

本発明のさらに別の目的は、該宿主細胞を培養することにより、マウス及びヒトのスフィンゴシンタイプ2アイソフォームペプチドを生産することにある。

【0017】

本発明のさらに別の目的は、スフィンゴシンキナーゼ活性を抑制または促進する薬剤または医薬を検出するための方法を提供することにある。

【0018】

本発明のさらに別の目的は、増加または減少した細胞増殖または増加または減少した細胞死に起因する疾病の治療または改善のため；並びに癌、再狭窄もしくは糖尿病性神経障害

10

20

30

40

50

のような細胞の異常な移動もしくは運動性に起因する疾病的治療または改善のために、生物学的過程を調節する方法を提供することにある。

【0019】

本発明は、また、スフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームのペプチドをコードする単離及び精製されたDNAであって、Genbank Accession No. bankit325787の配列及びGenbank Accession No. bankit325752の配列からなる群より選択される配列を含むDNAにも関する。

【0020】

本発明は、さらに下記の工程からなるスフィンゴシンキナーゼタイプ2活性を抑制または促進する薬剤または医薬を検出する方法に関する： 10

(a) 前記組換えDNA構築物を細胞内に供給し、スフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームが該細胞内で生産されるようにすること；

(b) 該細胞に少なくとも一種類の医薬または薬剤を加えること、及び

(c) 細胞内の脂質のスフィンゴシンキナーゼ依存性のリン酸化を測定し、医薬または薬剤を入れていない対照と比較することにより、該医薬または薬剤がスフィンゴシンキナーゼタイプ2活性を抑制または促進するか否かを検出すること（該対象と比較して脂質のスフィンゴシンキナーゼ依存性のリン酸化が減少する場合は、抑制する医薬または薬剤であることを示し、該対象と比較して脂質のスフィンゴシンキナーゼ依存性のリン酸化が増加する場合は促進性医薬または薬剤であることを示す）。

【0021】

上記に記載されたように、本発明はさらに、必要に応じて哺乳動物（例えばヒト）に、薬学的に有効な量の上記のようなペプチドを投与することを含む、哺乳動物において生物学的過程（例えばマイトジェネシス、アポトーシス、ニューロンの発生、化学走性、血管新生及び炎症反応）を調節する方法に関する。 20

【0022】

さらに、上記に記載されたように、本発明は、必要に応じて哺乳動物（例えばヒト）に、薬学的に有効な量の上記のようなペプチドを投与することを含む、増加した細胞死または減少した細胞増殖に起因する疾病的治療または改善のための方法に関する。

【0023】

さらに、上記のように、本発明は、必要に応じて哺乳動物（例えばヒト）に、薬学的に有効な量の上記のようなペプチドに対する抗体を投与することを含む、減少した細胞死または増加した細胞増殖に起因する疾病的治療または改善のための方法に関する。 30

【0024】

さらに、上記のように、本発明は、必要に応じて哺乳動物（例えばヒト）に、薬学的に有効な量の上記のようなペプチドに対する抗体を投与することを含む、癌、再狭窄及び糖尿病性神経障害からなる群より選択される細胞の異常な移動または運動性に起因する疾病的治療または改善のための方法に関する。

【0025】

本発明は、(a)生物学過程を調節するか、(b)増加した細胞死または減少した細胞増殖に起因する疾病を治療または改善するか、(c)減少した細胞死または増加した細胞増殖に起因する疾病を治療または改善するか、(d)細胞の異常な移動または運動性に起因する疾病（例えば癌、再狭窄及び糖尿病性神経障害）を治療または改善するための、(i)上記のような薬学的に有効な量のペプチドまたは上記のようなペプチドの抗体、並びに(iii)薬理学的に許容される担体を含む組成物に関する。 40

【0026】

本発明は、さらに、スフィンゴシンキナーゼタイプ2活性を減少させるかまたは失わせる薬剤または医薬のスクリーニング方法に関し、該方法は、該薬剤または医薬の存在下でスフィンゴシンキナーゼタイプ2酵素活性の減少を検出することを含む。

【0027】

さらに、本発明は、下記の工程を含む、試料中のスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソ 50

フォームの存在を検出する方法に関する：

(i) 試料を、スフィンゴシンキナーゼタイプ2を認識する抗体と接触させること；及び
(ii) スフィンゴシンキナーゼタイプ2とこれに特異的な抗体の間で形成される複合体
が存在するか存在しないかを検出すること。

【0028】

また、本発明は、試料をポリメラーゼ連鎖反応にかけ、スフィンゴシンキナーゼタイプ2
の存在を検出することを含む、試料中のスフィンゴシンキナーゼタイプ2を検出する方法
に関する。

【0029】

本発明は、スフィンゴシンキナーゼタイプ2 RNAまたはcDNAへのハイブリダイゼー
ション及び／またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2配列の増幅に適する、スフィンゴシン
キナーゼタイプ2 RNAまたはcDNAに特異的なプライマーまたはオリゴヌクレオチド及び
適当な付随的な試薬を含む、試料中のスフィンゴシンキナーゼタイプ2 RNA / c
DNAの検出のための診断キットに関する。

10

【0030】

スフィンゴシンキナーゼは、スフィンゴシンのリン酸化を触媒し、SPPを生じさせる。
マウスと、最近クローニングされたヒトのスフィンゴシンキナーゼ-1 (SPHK1) (Kohama, et al., J. Biol. Chem., 273, 23722-23728, (1998))に対する配列の
相同性に基づいて、本発明は別のタイプのマウス及びヒトのスフィンゴシンキナーゼ (m
SPHK2とhSPHK2) のクローニング、機能的な特徴付け及び組織分布に導かれた
。

20

【0031】

本発明のmSPHK2及びhSPHK2は、617及び618個のアミノ酸からなるタン
パク質を各々コードし、いずれもSPHK1より大きく、いずれも既にSPHK1で見つ
かっている保存領域を含んでいるが、それらの配列は中心部とアミノ末端とにおいて相当
に相違する。複数のヒト及びマウスの組織のノーザンプロット分析により、SPHK2の
mRNA発現がSPHK1のそれとは著しく異なっていて、脳、心臓、腎臓、睾丸及び肝
臓において最も高いことが明らかになった。SPHK1の発現は7日齢マウス胚において
最大となるのに対し、SPHK2の発現は11日齢の胚で初めて検出可能であり、その後
増加する。

30

【0032】

mSPHK2またはhSPHK2の発現ベクターで一時的にトランスフェクトしたヒト胚
293腎細胞において、SPHK活性の増加が認められ、その結果SPPレベルが高くな
った。明らかに、SPHK2はSPHK1とは多少異なる基質特異性を有していた。D-
エリスロスフィンガニン (ジヒドロスフィンゴシン, DHS) はSPHK2にとってD-
エリスロスフィンゴシンより良好な基質であったのに対し、DHSはSPHK1の有力な
阻害剤であった。

【0033】

より少ない程度ではあるが、SPHK2は、さらにフィトスフィンゴシン及びD, L-トレオジヒドロスフィンゴシンのリン酸化に触媒作用を及ぼした。SPHK1の拮抗阻害剤
であるDMSは驚くべきことにSPHK2の非拮抗阻害剤であった。イオン強度を高めると
SPHK1が阻害されたが、KClとNaClは著しくSPHK2活性を刺激した。さらに、Triton X-100及びBSAはSPHK1に対するそれらの影響とは対照的
に、SPHK2を阻害した。一方、ホスファチジルセリンは両方のタイプを刺激した。
ここに示すデータは、SPHK2がこの脂質リン酸化酵素の増加しているクラスに属する
新規な物質であり、種々の生物学的過程の調整、例えばマイトジェネシス、アポトーシス
、ニューロンの発生、化学走性、脈管形成、また炎症反応において重要なことを示す
。

40

(図面の簡単な説明)

発明を説明する目的で、特徴、観点及び利点を図中に示す。しかしながら、本発明は、図

50

中に表されたものに限定されないと理解されるべきである。

Fig. 1 A は、予測されたアミノ酸配列の非 C 1 u s t a 1 w アラインメントに基づいたマウスのタイプ 2 スフィンゴシンキナーゼ (m S P H K 2) とヒトのタイプ 2 スフィンゴシンキナーゼ (h S P H K 2) の予測されるアミノ酸配列を示す。同一で保存されたアミノ酸置換はそれぞれ暗灰色及び淡灰色の陰をついている。ダッシュは配列中のギャップを表わす。また、右側上の数は、m S P H K 2 のアミノ酸配列を示す。保存された領域 (C 1 ~ C 5) は、線で示されている。

Fig. 1 B は S P H K 1 と S P H K 2 の保存された領域の説明図である。m S P H K 2 の一次配列が m S P H K 1 a のそれと比較されている。

Fig. 2 A、2 B 及び 2 C は、タイプ 1 及びタイプ 2 スフィンゴシンキナーゼの組織特異的な発現を示すノーザンプロットである。 10

【0034】

Fig. 2 A 中、m S P H K 2 (上段のパネル) 及び m S P H K 1 a (中段のパネル) プローブは、末端が標識され、以下に記載されているようなマウス組織からのポリ (A) + RNA プロットにハイブリダイズした。レーン 1 : 心臓； 2 : 脳； 3 : ひ臓； 4 : 肺； 5 : 肝臓； 6 : 骨格筋； 7 : 腎臓； 8 : 精巣。 - アクチンプローブ (下段のパネル) をローディングコントロールとして用いた。

Fig. 2 B は、h S P H K 2 の組織特異的な発現を示す。レーン 1 : 脳； 2 : 心臓； 3 : 骨格筋； 4 : 結腸； 5 : 胸腺； 6 : 脾臓； 7 : 腎臓； 8 : 肝臓； 9 : 小腸； 10 : 胎盤； 11 : 肺； 12 : 白血球。 20

Fig. 2 C は、マウス胚発生中の m S P H K 1 a と m S P H K 2 の発現を示す。7 日、11 日、15 日及び 17 日のマウス胚からのポリ (A) + RNA プロットを Fig. 2 A と同様に検出した。

【0035】

Fig. 3 A 及び 3 B は組換え S P H K 2 の酵素活性を示すグラフである。

【0036】

Fig. 3 A 中、HEK 293 細胞は、一時的に空のベクターで、または m S P H K 2 または h S P H K 2 の発現ベクターでトランスフェクトされている。24 時間後に細胞質ゾル (白のバー) 及び顆粒分画 (斜線で塗られたバー) 中の S P H K 活性を測定した。それぞれ、データは平均値 \pm S. D. である。また、親細胞及びベクターでトランスフェクトされた細胞は、各々 2.6 及び 3.7 pmol / min / mg の基礎 S P H K 活性を有していた。 30

【0037】

Fig. 3 B は、S P H K 2 でトランスフェクトした後の S P P の質量レベルの変化を示す。以下に記載したように、空のベクター (白抜き) で、m S P H K 2 (左上がりの斜線) で、または h S P H K 2 (右上がりの斜線) でトランスフェクトした HEK 293 細胞中の S P P の質量レベルを測定した。データは pmol / nmol リン脂質、で表される。

【0038】

Fig. 4 A ~ 4 D は、m S P H K 2 の基質特異性を示すグラフである。 40

【0039】

Fig. 4 A は、m S P H K 2 でトランスフェクトした HEK 293 細胞の細胞質ゾル中で測定された、様々なスフィンゴシン類似体または他の脂質 (50 mM) の S P H K 依存性のリン酸化を示すグラフである。レーン : 1 : D - エリスロスフィンゴシン (D - erythro Sph)； 2 : D - エリスロジヒドロスフィンゴシン (D - erythro DHS)； 3 : D, L - threo DHS； 4 : N, N - 4 - ジメチルスフィンゴシン (DMS)； 5 : C2 - セラミド； 6 : C16 - セラミド； 7 : ジアシルグリセロール； 8 : ホスファチジルイノシトール； 9 : フィトスフィンゴシン。データは、D - erythro Sph のリン酸化度 (%) として表される。

【0040】

Fig. 4 A ~ 4 D は、N, N -ジメチルスフィンゴシンによる組換えSPHK2の非拮抗的阻害を示すグラフである。

【0041】

Fig. 4 B は、DMSによるmSPHK2の投与量依存性の阻害を示す。Fig. 4 A に示すように形質転換した後のHEK293細胞溶菌液中のSPHK活性は、DMSの濃度を増加させながら、10 (M) D - エリスロスフィンゴシンを用いて測定された。

【0042】

Fig. 4 C は、DMS阻害の反応速度解析を示す。SPHK活性は、DMSの不存在下(白抜きの円)またはこれらの10 μ M(塗りつぶした四角形)または20 μ M(塗りつぶした三角形)の存在下で、D - エリスロスフィンゴシンの濃度を変えながら測定した。

Fig. 4 D は、ラインウィーバー - バークプロットである。D - エリスロスフィンゴシンのK_mは3.4 μ Mであった。DMSのK_i値は12 μ Mであった。

【0043】

Fig. 5 A ~ 5 E は、mSPHK2に対するpH依存性及び塩の効果を示すグラフである。

【0044】

Fig. 5 A は、下記の緩衝剤を使用して調整されたpHを有するリン酸化酵素緩衝剤中で測定された、形質転換されたHEK293細胞中の細胞質ゾルのSPHK2活性を示す: 200 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5 ~ 5.5、白抜きの円); 200 mM MES (pH 6 ~ 7、塗りつぶした円); 200 mM リン酸カリウム (pH 6.5 ~ 8、白抜きの四角形); 200 mM HEPES (pH 7 ~ 7.5、塗りつぶした四角形); 200 mM Tris HCl (pH 7.5 ~ 9、白抜きの三角形); 及び 200 mM ホウ酸塩 (pH 10、塗りつぶした三角形)。

【0045】

Fig. 5 B ~ 5 E は、塩類がSPHK2を刺激するが、SPHK1を阻害することを示す。

【0046】

Fig. 5 B 及び 5 C 中、HEK293細胞溶菌液中のSPHK活性は、NaCl (白抜きの四角形) または KCl (塗りつぶした円) の非存在下または存在下で、mSPHK1 (Fig. 5 B) または mSPHK2 (Fig. 5 C) でトランスフェクトした24時間後に測定した。

【0047】

Fig. 5 D は、KClによるSPHK2活性化の反応速度解析を示す。mSPHK2活性は、D - エリスロスフィンゴシンの濃度を変えながら、KClの非存在下(白抜きの円)、50 mM KCl(白抜きの四角形)の存在下、または200 mM KCl(塗りつぶした四角形)の存在下で測定した。

【0048】

Fig. 5 E は、Fig. 5 D からのデータのラインウィーバー - バークプロットである。K_m値はKClの存在によって影響を受けなかった。V_{max}値は、0、50 及び 200 mM のKClの存在下で、各々 0.1、0.3 及び 1 (nmol/min/mg) であった。

【0049】

Fig. 6 A ~ 6 B は、SPHK1とSPHK2の活性に Triton X - 100 及びウシ血清アルブミン (BSA) が異なる効果を奏することを示すグラフである。HEK293細胞は、mSPHK1a (白抜きの円) または mSPHK2 (塗りつぶした円) で形質転換した。また、細胞溶菌液中の各々の活性は、示された濃度の Triton X - 100 (Fig. 6 A) または BSA (Fig. 6 B) の存在下で、24時間後に測定された。

【0050】

Fig. 6 C は、ホスファチジルセリンが、SPHK1とSPHK2の活性に対して同様

10

20

30

40

50

の効果を持つことを示すグラフである。HEK293細胞はmSPHK1a(円)またはmSPHK2(三角形)で形質転換した。また、細胞溶菌液中の各々の活性は、示された濃度のホスファチジルセリン(塗りつぶした記号)またはホスファチジルコリン(白抜きの記号)の存在下で24時間後に測定した。データは、添加物の非存在下で測定した対照の活性に対するパーセンテージで示した。

(発明の詳細な説明)

一つの実施態様において、本発明は、哺乳類(例えばマウス及びヒト)のスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームをコードするDNAまたはcDNAセグメントに関する。

【0051】

さらに、本発明の単離された核酸分子には、遺伝子コードの縮重によって上記のものとかなり異なった配列を含むが、哺乳類スフィンゴシンキナーゼタイプ2をコードするDNA分子を含む。当然ながら、遺伝子コード及び種特異的なコドンの優先順位は当該分野において知られている。従って、上記のように縮重の変化を生じさせること、例えばコドンの発現を特定の宿主について最適化すること(例えば、ヒトのmRNAのコドンをE.co*l*のような細菌宿主に好ましいものに変えること)は、当業者にとって汎用技術である。

【0052】

本発明の核酸分子は、mRNAのようなRNAの形態でよく、または例えばクローニングにより得られたか合成的に生産されたcDNA及びゲノムDNAを含むDNAの形態でもよい。DNAは二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖DNAまたはRNAは、“センス鎖”としても知られるコード鎖でもよく、“アンチセンス鎖”ともいわれる非コード鎖でもよい。

【0053】

「単離された」核酸分子は、生来の環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAを意味する。例えば、ベクターに含まれている組換DNA分子は、本発明の目的のために単離されたと考えられる。単離されたDNA分子の別の例としては、異種起源の宿主細胞中に保持された組換DNA分子または溶液で(部分的にまたは実質的に)精製されたDNA分子が挙げられる。単離されたRNA分子は、本発明のDNA分子のin vivoまたはin vitroのRNA転写物を含む。本発明における単離された核酸分子は、合成的に產生された分子をも含む。

【0054】

本発明はさらに、ここに記載されたヌクレオチド配列の部分または断片をコードする核酸分子に関する。断片は、Fig. 1AのmSPHK2とhSPHK2についてのヌクレオチド配列の一部であって、少なくとも10の連続するヌクレオチドの長さを有し、Fig. 1A中の各ヌクレオチド配列の第1ヌクレオチドの位置を1とした時に、任意に選択された二つの整数の一方が5'-ヌクレオチドの位置を表し、もう一方が3'ヌクレオチドの位置を表すものを含む。すなわち、少なくとも10または10と、Fig. 1AのmSPHK2またはhSPHK2の全ヌクレオチド配列の長さから1を引いた数、の間の整数の連続するヌクレオチド塩基の長さを有する断片の5'及び3'のヌクレオチドの位置のすべての組合せを含む。

【0055】

さらに、本発明は、ヌクレオチドの位置によってではなく、ヌクレオチドの大きさによって特定された断片を含むポリヌクレオチドを含む。本発明は連続するヌクレオチドにおいて、1とヌクレオチド配列全長マイナス1の間の整数から選ばれた、任意の断片サイズを有するものを含む。好ましい大きさは20乃至50のヌクレオチドを含む；50乃至300のヌクレオチドの大きさはプライマー及びプローブとして有用である。典型的な配列が由来し得る領域は、例えば、Fig. 1Aの中で示される領域C1-C5のような前記配列内の特異的なエピトープまたは領域をコードする領域を含むものであるが、これに限定されない。

10

20

30

40

50

【0056】

また別の側面として、本発明は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で上記本発明のポリヌクレオチド配列、例えばFig. 1Aに示される核酸配列またはその特定の断片を含む、とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子を提供する。「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5×SSC(150 mM NaCl、15 mMクエン酸三ナトリウム)、50 mMリノ酸ナトリウム(pH 7.6)、5×Denhardt's溶液、10%硫酸デキストラン及び20 µg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中、42°Cで一晩インキュベーションし、続いて約65°Cの0.1×SSC中でフィルタを洗浄することを意味する。

【0057】

10

本発明のポリペプチドをコードする配列またはその部分配列は、当該分野で知られている追加の機能を提供する他の配列と融合されていても良い。該他の配列の例として、マーカー配列、または融合ポリペプチドの精製を容易にするペプチド、ヘルパーT細胞刺激を提供することが知られている抗原決定基を有するペプチド、翻訳後修飾のための部位をコードするペプチド、もしくは異種起源のリーダー配列のような、所望の位置への融合タンパク質のターゲティングのためのアミノ酸配列をコードする配列等が挙げられる。

【0058】

本発明は、さらに、Fig. 1Aに示されるスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームポリペプチドの一部、類似体または誘導体をコードする本発明の核酸分子の変異体に関する。変異体は、天然のアレル変異体のように、天然に生じ得る。「アレル変異体」は、生体の染色体の与えられた座を占める遺伝子のいくつかの代替的な型の一つを意味する。自然発生でない変異体は既知の突然変異誘発技術によって生じ得る。そのような変異体は、コード領域、非コード領域またはその両方において、一つ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加によって生じさせたものを含む。コード領域の変更は、保存的なまたは保存的でないアミノ酸の置換、欠失または付加を生じさせ得る。特にこれらのうち好ましいのは、ここに示されたスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームポリペプチドまたはその部分の特性及び活性を変更しない、サイレントな置換、付加及び欠失である。この観点からも保存的な置換が好ましい。

20

【0059】

別の側面として、本発明にはFig. 1Aに示されるスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームをコードする核酸分子と少なくとも90乃至99%の同一性を有する核酸分子が含まれる。これらの核酸は、それらがスフィンゴシンキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするか否かに関係なく含まれる。「スフィンゴシンキナーゼタイプ2活性を有するポリペプチド」とは、下記のアッセイで測定されるような、本発明のスフィンゴシンキナーゼタイプ2アイソフォームの活性と類似しているが同一ではない活性を示すポリペプチドを意味する。本発明のポリペプチドの生物活性もしくは機能は、高度に構造の同一性/類似性を有する他の生体からのポリペプチドと類似しているか同一であると予想される。

30

【0060】

別の実施態様においては、本発明は、ベクター及び上記のようなDNA配列を含む組換DNA分子に関する。ベクターは、プラスミド、細菌ウィルス、コスミド、YAC、DNAベクターのような真核生物の発現ベクター、*Pichia pastoris*、またはバキュロウイルスベクター、レトロウイルスのベクターまたはアデノウイルスのベクターのようなウイルスベクター、または当該分野で知られている他のものの形態であり得る。クローニングされた遺伝子は、プロモーター配列のような一定の制御配列または誘導可能及び/または細胞タイプに特異的な配列の制御下におかれてもよい(つまり、操作可能に結合されていてもよい)。適当なプロモーターは、当該分野において通常の技術を有する者に知られている。発現構築物は、さらに転写開始、終了のための部位、及び転写された領域の翻訳のためのリボソーム結合部位を含んでいてもよい。使用するのに好ましいベクターは、いくつか例を挙げると、pCMV-SPORT2(Life Technologies社)、pc

40

50

D N A 3 (Invitrogen社) である。

【 0 0 6 1 】

宿主細胞の中への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、エレクトロポレーション、感染、及び当該分野で知られている他の方法、及びCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al. (Eds), Wiley & Sons, Inc.のような標準の実験手引書に記載されている他の方法により達成することができる。上記及び下記に引用された全ての文献は、その全体が参考文献として本明細書に組み入れられる。

【 0 0 6 2 】

別の実施態様において、本発明は、上記の組換D N A構築物により安定に形質転換されたかトランスフェクトされた宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核生物（例えば細菌）、より下等な真核生物（例えば酵母または昆虫）、より高等な真核生物（例えばラット及びヒトを含むがこれに限定されない全ての哺乳類）であり得る。 10

【 0 0 6 3 】

指定の宿主と互換性を有する適當な調節配列が使用される場合、原核生物及び真核生物宿主細胞の両方を所望のコーディング配列の発現のために使用してもよい。原核生物の宿主の中では、大腸菌が最も頻繁に使用される。原核生物のための発現調節配列は、所望によりオペレーター部分を含んでいるプロモーター及びリボソーム結合部位を含んでいる。原核生物の宿主と互換性をもつトランスファーベクターは、一般に、例えばp B R 3 2 2、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を付与するオペロンを含むプラスミド、及び抗生素耐性マーカーを付与する配列を含む様々なp U Cベクターから誘導される。これらのマーカーは選抜によって、成功した形質転換体を得るために使用され得る。一般的なクローニング方法の参考としては、例えば、Maniatis, Fritsch and Sambrook著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1982)またはD. N. Glover編「DNA Cloning, Volumes I and II」(1985)が挙げられる。 20

【 0 0 6 4 】

ヒトのS P H K 2をコードするc D N Aが挿入されたプラスミドを有する形質転換体、即ちE. coli p C R 3 . 1 - h S P H K 2 S A N K 7 0 2 0 0は、〒3 0 5 - 8 5 6 6 茨城県つくば市東1丁目1-3、工業技術院生命工学工業技術研究所に、2 0 0 0年3月29日に受託番号F E R M B P - 7 1 1 0で寄託されている。 30

【 0 0 6 5 】

本発明のD N A配列は、I g G分子、アジュバント、担体またはグルタチオンS転移酵素のようなS P H Kの精製のための助剤またはヒスチジンタグとして知られている一連のヒスチジン残基をコードする配列に操作可能な形で結合したベクター中に存在することができる。組換分子は、培養系において真核細胞、例えば哺乳類の細胞、酵母細胞をトランスフェクトするのに適當であり得る。Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces carlsbergensis及びPichia pastorisは最も一般に使用される酵母宿主であり、便利な菌宿主である。酵母ベクターのための調節配列は当該分野で知られている。発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞系は当該分野で知られており、American Type Culture Collection (ATCC)から得られる多くの不死化された細胞系を含む。いくつか例を挙げると、HEK 2 9 3細胞及びN I H 3 T 3細胞が挙げられる。適當なプロモーターも当該分野で知られており、例えばS V 4 0、ラウス肉腫ウィルス（「R S V」）、アデノウィルス（「A D V」）、ウシ乳頭腫ウィルス（「B P V」）及びサイトメガロウィルス（「C M V」）のようなウィルスのプロモーターが挙げられる。 40

【 0 0 6 6 】

哺乳類細胞は、さらにターミネーター配列及びポリA付加配列を要するかもしれない；発現を増加するエンハンサー配列が含まれていてもよく；遺伝子の増幅を引き起こす配列も望ましいかもしれない。これらの配列は当該分野で知られている。

【 0 0 6 7 】

50

20

30

40

50

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は、上記のDNA配列源として使用することができる。組換え分子が発現系の形態をとる場合、形質転換またはトランスフェクトされた細胞は、下記のタンパク質源として使用することができる。

【0068】

別の実施態様において、本発明は、GenBank/EMBLデータバンク受託番号bankit325787及びbankit325752に対応するヌクレオチド配列の使用に関する。

【0069】

上記ヌクレオチド配列から発現させたポリペプチドまたはアミノ酸配列とは、該ヌクレオチド配列によりコードされたポリペプチドと同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドか、またはその部分であって、少なくとも2個乃至5個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも8個乃至10個のアミノ酸、そしてさらに好ましくは少なくとも15個のアミノ酸を含んでいるポリペプチドであるか、または該配列によりコードされたポリペプチドで免疫学的に同定可能なポリペプチドであることができる。

10

【0070】

組換えまたは誘導ポリペプチドは、必ずしも指定の核酸配列から翻訳されなくてもよい；それは、任意の方法、例えば、化学合成または組換え発現系の発現により生成されてもよい。さらに、ポリペプチドは、例えばアジュvantのようなその抗原性を増加させる他のタンパク質またはポリペプチドに融合することができる。

20

【0071】

上記のように、本発明の方法は、上記の核酸分子またはベクターの宿主細胞への挿入及び目的のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の宿主細胞による発現によって、任意の長さの任意のポリペプチドを生産するのに適している。

【0072】

形質転換された宿主細胞を生産するための宿主細胞中への核酸分子またはベクターの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラノ媒介トランスフェクション、カチオンの脂質を媒介としたトランスフェクション、エレクトロポレーション、導入、感染または他の方法により達成することができる。そのような方法は Davisら著「Basic Methods In Molecular Biology」(1986) のような多くの標準的な実験手引書に記載されている。

30

【0073】

一度形質転換された宿主細胞が得られれば、細胞は、宿主細胞成長を支える炭素、窒素及び必須ミネラルの同化可能な源を含む任意の適当な栄養培地中で、pHと温度の任意の生理学的に許容される条件下で培養され得る。組換えポリペプチドを生産する培養条件は、宿主細胞を形質転換するために使用されるベクターのタイプによって異なる。例えば、ある発現ベクターは、組換えポリペプチドの生産のための形質発現を始めるためにある一定温度での培養、または細胞増殖培地に一定の化学薬品もしくはインデューサーの添加のような制御手順を含む。従って、ここで使用される用語「組換えポリペプチドの製造条件」は、いかなる培養条件にも限定されるものではない。上記の宿主細胞及びベクター用の適当な培地及び条件は、当該分野でよく知られている。宿主細胞中で生産された後、目的のポリペプチドはいくつかの技術によって単離することができる。宿主細胞から目的のポリペプチドを取り出すには、細胞を溶菌するか、または破壊する。この溶菌は、低張溶液に細胞を接触させることにより、リゾチームのような細胞壁を分解する酵素による処理により、超音波処理により、高圧処理により、または上記の方法の組合せにより行ってもよい。通常の技術者に知られている細菌細胞の破壊及び溶菌のための他の方法を使用してもよい。

40

【0074】

破壊に続いて、ポリペプチドは、複雑な混合物中の粒子の単離に適する任意の技術によって細胞破碎物から分離することができる。その後、ポリペプチドはよく知られた単離技術によって精製することができる。精製用の適当な技術としては、下記のものが挙げられる

50

が、これらに限定されることはない：硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、電気泳動、免疫吸着、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、イムノアフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー（L C）、高性能 L C（H P L C）、高速 L C（F P L C）、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィー。

【0075】

組換えまたは融合タンパク質は、検出可能に標識して及び非標識で、診断のツールとして、及びスフィンゴシン-1-リン酸塩を生産するための方法において使用することができ、並びに下記のように試料中の S P P 量を測定するための方法において使用することができる。さらに、組換えタンパク質は細胞死を減少させる及び/または細胞増殖を増加させる治療薬として使用することができる。形質転換された宿主細胞は、例えば、宿主タンパク質、化学的に誘導された薬剤、及び S P H K 2 の発現をダウンリギュレーションするか変更するために細胞と相互作用する他のタンパク質、またはその補因子のような、S P H K 2 の機能を抑制する医薬及び薬剤の有効性を分析するために使用することが出来る。

10

【0076】

別の実施態様では、本発明は、上記の組換えタンパク質（またはポリペプチド）に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体に関する。例えば、抗体は上記ペプチド、または少なくとも 10 個のアミノ酸、好ましくは 11 ~ 15 個のアミノ酸からなる上記ペプチドの断片に対するものであることができる。当該分野の通常の技術者は、標準の方法を用いて、本発明のタンパク質（またはポリペプチド）、またはその特徴を有する部分に対するモノクローナル及びポリクローナル抗体を作ることができる。抗体を生産するための材料及び方法は、当該分野でよく知られている（例えば、Goding著「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」第 4 章（1986）参照）。

20

【0077】

スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 の発現のレベルはいくつかのレベルで検出することができる。当該分野でよく知られている標準の方法を用いて、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 RNA の検出及び定量のための分析を、設計することができ、これには、特に、ノーザンハイブリダイゼーション分析、in situ ハイブリダイゼーション分析、及び P C R 分析が含まれる。核酸ハイブリダイゼーションの方法については、例えば、Maniatis、Fitsch 及び Sambrook 著「Molecular Cloning A Laboratory-Manual」（1982）または D. N. Glover 編「DNA Cloning」第 1 卷及び第 2 卷（1985）または Ausubel, F. M. 編「Current Protocols in Molecular Biology」（Wiley & Sons, Inc. 刊）が参考になるだろう。

30

【0078】

スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 RNA の検出のためのポリヌクレオチドプローブは、マウスの配列として受託番号、A F 0 6 8 7 4 8 及び/または A F 0 6 8 7 4 9 で登録され、入手可能な配列から設計することができる（Kohama, T., et al., J. Biol. Chem., 273:23722-23728）。例えば、試料から単離された RNA は、ニトロセルロース膜等の表面にコーティングすることができ、ノーザンハイブリダイゼーションのために調製することができる。生検試料の in situ ハイブリダイゼーションの場合は、例えば組織試料は、当該分野でよく知られた標準技術によりハイブリダイゼーション用に調製でき、特にスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 RNA を認識するポリヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができる。試料 RNA とポリヌクレオチドの間で形成されたハイブリッドの存在は、当該分野で知られた方法、いくつか例を挙げると放射化学または免疫化学的な方法により検出することができる。

40

【0079】

当該分野の技術者は、かなり長いか、対応する核酸配列に高度の末端重複を有すると考えられるアミノ酸配列の領域を包含するプローブを製造するのが望ましいことを見出すかもしれない。他の場合には、該遺伝子の異なる領域の各々に、2 セットのプローブを同時に

50

使用するのが望ましいかもしれない。使用されるプローブの正確な長さは重要ではないが、典型的なプローブ配列は 500 ヌクレオチド以下であり、さらに典型的には 250 ヌクレオチド以下であり；100 ヌクレオチド以下でもよく、75 ヌクレオチド以下でもよい。より長いプローブ配列は、関連する標的配列が識別されるのに十分な違いを備えた独特的のポリヌクレオチド領域を包含する必要があるかもしれない。この理由のため、プローブは、約 10 から約 100 ヌクレオチドまで、及びより好ましくは約 20 から約 50 のヌクレオチドまでの長さである。

【 0 0 8 0 】

スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 の D N A 配列は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) または逆転写 P C R (R T - P C R) を使用して、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 の検出に使用されるプライマーを設計するために使用することができる。プライマーは、特に、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 の存在・不存在の検出または標準と比較することによる定量の目的のため、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 R N A の逆転写によって生産されたスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 c D N A に、特異的に結合することができる。プライマーは、7 ~ 40 ヌクレオチド、好ましくは 10 ~ 35 のヌクレオチド、最も好ましくは 18 ~ 25 のヌクレオチドであり、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 配列の領域と相同であるか相補的である。

【 0 0 8 1 】

P C R または R T - P C R 反応に必要な試薬及び対照は当該分野においてよく知られている。その後、增幅産物は、例えばゲル分画、放射化学及び免疫化学の技術によって、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 配列の存在または不存在について分析され得る。この方法は、少数の細胞しか必要としないので有利である。一度スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 が検出されれば、同じ方法を用いて、正常細胞から得られた結果との比較により、該細胞がスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 を過剰発現しているか、発現が減少しているの決定をなすことができる。スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 R N A レベルの増加は、細胞増殖の増加及び細胞死の減少と関連する。

【 0 0 8 2 】

別の実施態様において、本発明は、細胞中のスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 R N A 検出用の診断キットに関する。該キットは、1 またはそれ以上の容器に入ったスフィンゴシンキナーゼポリヌクレオチドの P C R または R T - P C R によるスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 の検出用のスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 オリゴヌクレオチドプライマー、または in situ ハイブリダイゼーションもしくはノーザン解析による細胞中の、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 R N A の検出用のスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 ポリヌクレオチドを含むパッケージユニットを含み、いくつかのキットにおいては、目的の方法のために使用される種々の試薬の容器が含まれる。キットは、さらに次のアイテムの 1 つ以上を含んでいてもよい：ポリメラーゼ、緩衝剤、説明書、対照、検出用の標識物。キットは、本発明による方法を実施するために適当な比率で混合された試薬の容器を含んでもよい。試薬の容器は、本方法を実施する時に、計量工程を不要にするように単位量の試薬を含んでいるのが好ましい。

【 0 0 8 3 】

さらに別の実施態様において、本発明は、特定の生物試料中のスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 のレベルを識別し定量する方法を提供する。試料中のスフィンゴシンキナーゼタイプ 2 のレベルを識別する（または定量する）ことのできる様々な方法を、この目的のために使用することができる。

【 0 0 8 4 】

スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 を検出する診断分析法は、器官もしくは組織切片からの細胞の生検または in situ 分析法、または腫瘍または正常な組織からの細胞の吸引を含んでもよい。さらに、分析法は、器官、組織、細胞、尿、血清、または血液からの細胞抽出物、または他の体液または抽出物について行われてもよい。

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

50

生検試料を分析する場合、分析法は、分析すべき試料を天然または合成のスフィンゴシンキナーゼタイプ2リガンド、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2を認識するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2を検出することができる抗血清と接触させること、及び試料中に存在するスフィンゴシンキナーゼタイプ2と添加されたスフィンゴシンキナーゼタイプ2リガンドまたは抗体の間で形成された複合体を検出することを含むであろう。

【0086】

スフィンゴシンキナーゼタイプ2リガンドまたは基質には、天然または合成のリガンド、及び動物または植物のような天然の出所から誘導されたそれらの誘導体に加えて、例えはスフィンゴシンが含まれる。他のスフィンゴシンキナーゼタイプ2リガンドとしてはカルモデュリンが挙げられる。 10

【0087】

スフィンゴシンキナーゼタイプ2リガンドもしくは抗スフィンゴシンキナーゼタイプ2抗体、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2を検出することができるリガンド及び抗体の断片は、癌のような細胞増殖の増加または細胞死の減少に関連した疾病的診断及び予後における使用のために、様々な標識及び標識方法を使用して標識することができる。本発明において使用することができる標識の例としては、酵素標識、放射性同位体標識、非放射性同位体標識及び化学発光標識が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0088】

適当な酵素標識の例として下記のものが挙げられる：リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ状球菌核酸分解酵素、デルタ-5-ステロイド異性化酵素、酵母アルコール脱水素酵素、アルファアグリセリンリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸塩異性化酵素、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸塩ヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等。 20

【0089】

適当な放射性同位体の標識の例として下記のものが挙げられる： ^3H 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{57}Mn 、 ^{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 及び ^{131}I 。 30

【0090】

適当な非放射性の同位体標識の例としては、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Tr 及び ^{46}Fe が挙げられている。

【0091】

適当な蛍光標識の例としては、 ^{152}Eu 標識、フルオレセイン標識、イソチオシアネートI標識、ローダミン標識、フィコエリトリン標識、フィコシアニン標識、アロフィコシアニン標識及びフルオレサミン標識が挙げられる。

【0092】

化学発光の標識の例としては、ルミナール標識、イソルミナール標識、芳香性アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩標識、シウ酸塩エステル標識、ルシフェリン標識及びルシフェラーゼ標識が挙げられる。 40

【0093】

当該分野における通常の技術者は、本発明により使用され得る他の適当な標識を知っているであろう。これらの標識のリガンド及び抗体またはその断片への結合は、当該分野における通常の技術者によく知られた標準の技術を使用して行うことができる。典型的な技術は、Kennedy, J. H. et al., (1976), Clin. Chem. Acta., 70, 1-31、及びSchurs, A. H. W. M., et al., (1977), Clin. Chem. Acta., 81, 1-40に記載されている。後者の中で言及されているカップリング技術は、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸塩法、ダレミド(dalemid)法等である。

【0094】

本発明の抗体(または抗体の断片)の検出は、担体の使用により改良してもよい。よく知ら 50

れている担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及びマグネタイトが挙げられる。本発明の目的のために、担体の性質はある程度まで可溶性か、または不溶性であり得る。結合させた分子がスフィンゴシンキナーゼタイプ2に結合することができる限り、支持体は事実上いかなる可能な構造をもとり得る。従って、支持体の構造は、ビーズのような球状、または試験管の内面のような管状、または棒の外表面のような円筒状であり得る。さもなければ、表面はシートまたは試験片のように水平でもよい。当該分野における通常の技術者は、モノクローナル抗体を結合するのに適当な他の多くの担体を知っているか、またはルーチンの実験によって確認することができるであろう。

10

【0095】

上記のスフィンゴシンキナーゼタイプ2のリガンドまたは抗体、または抗体もしくはリガンドの断片は、定量的にまたは定性的にスフィンゴシンキナーゼタイプ2の存在を検出するのに使用され得る。そのような検出はラジオイムノアッセイ、イムノメトリックアッセイ (immunometric assay) のような当該分野における通常の技術者に知られている様々な免疫定量法のうちのどれを使用して行ってもよい。当該分野においてよく知られている標準の方法を用いると、診断アッセーは、表面(即ち固体担体)、例えば微量滴定プレートまたは薄膜(例えばニトロセルロース膜))に、スフィンゴシンキナーゼタイプ2またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2の断片に特異的な抗体をコーティングし、そしてこれをスフィンゴシンキナーゼタイプ2を有するおそれのある被験者からの試料と接触させることにより行うことができる。試料中のスフィンゴシンキナーゼタイプ2とこれに特異的な抗体の間で形成された複合体の存在は、蛍光抗体分光法または比色法のような当該分野において共通の既知の検査法のいずれかにより検出することができる。ラジオイムノアッセーについての良い記載は、Work, T. S.ら著「Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology」(1978) (North Holland Publishing Company, N.Y.刊) に見られ、本明細書に参考文献として組み入れられる。サンドイッチ分析は、Wide著、Kirkham 及び Hunter 編「Radioimmune Assay Method」(1970) (E.&S. Livingstone Edinburgh) の199~206頁に記載されている。

20

【0096】

本発明の診断方法は、小細胞癌、大細胞癌、扁平上皮癌及び腺癌のような肺癌、胃癌、前立腺の腺癌、漿液性囊胞腺癌及び粘液性囊胞腺癌のような卵巣癌、卵巣の胚細胞腫瘍、睾丸癌及び胚細胞腫瘍、臍臓の腺癌、胆道の腺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、腺癌及びミュラー擬態の腫瘍(癌肉腫)を含む子宮内膜癌腫、腺癌及び扁平上皮癌のような子宮頸内膜、子宮底部及び腔の癌、基底細胞癌、黒色腫及び皮膚外胚腫瘍、食道の癌腫、扁平上皮癌及び腺癌を含む鼻咽腔及び口腔咽頭の癌、唾液腺癌、神経膠、ニューロン、髄膜起源の腫瘍を含む脳及び中枢神経系腫瘍、末梢神経の腫瘍、軟繊維肉腫、及び硬骨と軟骨の肉腫の癌を含む癌に罹患している患者における増殖及び転移の可能性を予測するものである。スフィンゴシンキナーゼタイプ2 RNAまたはスフィンゴシンキナーゼタイプ2タンパク質を増加したレベルで発現するこれらの腫瘍細胞は増殖を増加させ、細胞死を減少させた。

30

【0097】

該タンパク質は、スフィンゴシンキナーゼタイプ2活性の阻害剤を識別するために使用することができる。酵素分析を用いれば、スフィンゴシンキナーゼタイプ2酵素活性の減少または消失をもたらす天然の及び合成の薬剤及び医薬を発見することができる。スフィンゴシンキナーゼタイプ2の活性の減少が検出される限り、阻害剤の作用機構についての知識は必要ではない。阻害剤は、酵素基質または補因子を結合または単離させるか、または酵素自体を、直接的に、例えば薬剤または医薬の酵素への不可逆結合により、または間接的に、例えばスフィンゴシンキナーゼタイプ2基質と結合する薬剤を導入することにより、阻害する薬剤または医薬を含み得る。本発明に関する薬剤または医薬は、スフィンゴシンキナーゼタイプ2活性の部分的または完全な阻害し得る。

40

【0098】

50

スフィンゴシンキナーゼタイプ2の阻害剤にはD L - トレオジヒドロスフィンゴシン (D H S)、及びより最近に発見されたEdsall, L. C. et al., (1998), *Biochemistry*, 37, 12892-12898に記載されている阻害剤、N, N - ジメチルスフィンゴシン (D M S)が含まれる。スフィンゴシンキナーゼタイプ2の阻害剤は、癌、粥状動脈硬化、神経組織変性の病気、即ち卒中、アルツハイマー病のような疾病的治療または改善に使用されてもよい。

【0099】

スフィンゴシンキナーゼタイプ2 (即ち、ヒトまたは動物中の) のレベルを減少させるか、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2活性を減少または抑制する薬剤は、スフィンゴシンキナーゼタイプ2の増加したレベルに関連するあらゆる疾病または癌のような増加した細胞増殖に関連する疾病的治療に使用してもよい。腫瘍細胞中のスフィンゴシンキナーゼタイプ2のレベルが、正常細胞のスフィンゴシンキナーゼタイプ2のレベルの約2~3倍である場合、最大約10~100倍である場合、スフィンゴシンキナーゼタイプ2のレベルが増加していると判断される。スフィンゴシンキナーゼタイプ2 RNAを減少させる薬剤には下記のものが含まれるが、これに限定されることはない：スフィンゴシンキナーゼタイプ2 RNAを消化することのできる1つまたはそれ以上のリボザイム、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2の翻訳を阻止または減少させてスフィンゴシンキナーゼタイプ2のレベルを減少させるようにスフィンゴシンキナーゼタイプ2 RNAにハイブリダイズすることができるアンチセンスオリゴヌクレオチド。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドはDNAとして、ウイルスエンベロープレセプタータンパク質を含むプロテオリポソームにトラップされたDNAとして(Kanoda, Y. et al., (1989), *Science*, 5, 243, 375)、またはアンチセンスDNAまたはRNAが生成するように標的細胞で発現しうるベクターの一部として投与され得る。特定の細胞タイプ中で、例えば乳腺で発現されるベクターは、当該分野で知られている。乳腺中の遺伝子発現の条件の制御の例については、Furth, J. *Mammary Gland Biol. Neopl.*, 2, (1997), 373参照。

【0100】

さもなければ、DNAは担体と共に注射することができる。担体はインターロイキンに代表されるサイトカインのようなタンパク質、ポリリシン-糖タンパク質担体であってもよい。そのような担体タンパク質及びベクター及びこれらの使用方法は当該分野で知られている。さらに、DNAを小さな金のビーズにコーティングし、該ビーズを例えば遺伝子ガンを用いて肌に注射することもできる(Ulmer, T. B. et al., *Science*, 259, (1993), 1745)。

【0101】

また別の態様として、抗体、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2を減少または阻止できる化合物、即ち、スフィンゴシンキナーゼタイプ2の発現、生産または活性を減少または阻止できる化合物、例えばアンタゴニストは、単離され、実質的に精製されたタンパク質として、またはスフィンゴシンキナーゼタイプ2減少または阻害剤が生産されるように標的細胞中で発現することができる発現ベクターの一部として提供されてもよい。さらに、様々なイオンのような補因子、即ちCa²⁺または酵素の安定性に影響する因子をスフィンゴシンキナーゼタイプ2の発現及び機能を調整するために投与することができる。これらの製剤は標準的な経路で投与することができる。一般に、配合剤は、局所、経皮、腹腔内、経口、直腸、非経口投与(例えば、静脈内、皮下、筋肉内)経路で投与され得る。スフィンゴシンキナーゼタイプ2阻害化合物がゆっくり全身に放出されるように、スフィンゴシンキナーゼタイプ2阻害化合物を、ドラッグデリバリーが望まれる部位の近く、例えば腫瘍部位に埋め込まれる生分解性高分子に組み込んでもよい。生分解性高分子及びそれらの使用は、例えばBrem et al., *J. Neurosurg.*, 74, (1991), 441-446に詳細に記載されている。これらの化合物は、スフィンゴシンキナーゼタイプ2の阻害を達成するのに十分な量で受容者に提供されるように意図される。同様に、スフィンゴシンキナーゼタイプ2の発現、生産、安定性または機能に負の影響を及ぼすことができる薬剤は、スフィンゴシンキナーゼタイプ2の阻害を達成するのに十分な量で受容者に提供されるように

10

20

30

40

50

意図される。量は、薬剤の量、投与経路等がそのような反応に影響を及ぼすのに十分であれば、スフィンゴシンキナーゼタイプ2の阻害または誘導を「達成する」のに十分であるというべきである。

【0102】

細胞増殖におけるスフィンゴシンキナーゼタイプ2の機能に鑑みれば、SPHK2のアゴニストのようなスフィンゴシンキナーゼタイプ2のレベルを刺激する薬剤は、SPHK2の減少または細胞増殖の減少に関連するあらゆる疾病的治療に使用されてもよい。この場合、SPHK2はそのような増殖、例えば発達遅延を増加させることができる。

【0103】

受容者としての患者にスフィンゴシンキナーゼタイプ2の発現または機能を調節する薬剤を与える場合、投与される薬剤の投与量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な病状、病歴などのような要因に依存して変わるであろう。一般に、受容者には約1pg/kgから10mg/kg(患者の体重)の範囲の薬剤を投与するのが望ましいが、それより低いか、またはより高い量を投与することもできる。

10

【0104】

組成物は受容者としての患者がその投与を許容することができる場合に、「薬理学的に許容され得る」と言える。投与された量が生理学的に有意義な場合、そのような薬剤は「治療上有効な量」で投与されたと言える。その存在が、受容者としての患者に生理学的に検出できる変化をもたらす場合、その薬剤は生理学的に有意義である。本発明の化合物は、公知の方法により製剤化され、医薬として有用な組成物に調製される。これにより、これらの材料またはその機能的な誘導体は、薬理学的に許容され得る担体媒体と混合物として混合される。適当な媒体及びその製剤としては、他のヒトタンパク質(例えばヒト血清アルブミン)が例えばOsol, A.ら編「Remington's Pharmaceutical Sciences」第16版

20

Mack Easton PA. (1980)に記載されている。有効な投与に適した薬学的に許容され得る組成物を形成するために、それらの組成物は、適当な量の担体媒体と共に有効な量の上記化合物を含むであろう。

【0105】

作用期間を制御するために、別の製剤法を用いてもよい。放出制御製剤は、ポリマーを化合物と組み合わせるか、または吸収させることにより達成してもよい。制御されたデリバリーは、適当な高分子(例えばポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたは硫酸プロタミン)、高分子の濃度及び放出の持続を制御するための混入法を選択することにより実施することができる。放出制御製剤により作用期間を制御する別の可能な方法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ(乳酸)またはエチレン酢酸ビニルコポリマーのような高分子材料の粒子に、本発明の化合物を組み込むことである。さもなければ、これらの薬剤をポリマー粒子に組込む代わりに、例えば界面重合法により製造されたマイクロカプセル、例えばゼラチンマイクロカプセル用のヒドロキシメチルセルロース、及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイドの薬物送達システム、例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノパーティクル及びナノカプセルに、またはマクロエマルジョンに捕捉することも可能である。そのような技術は「Remington's Pharmaceutical Sciences」(1980)に開示されている。

30

【0106】

本発明は、さらに、上記診断治療方法に使用するためのキットを提供する。本発明によるキットは、本発明の組成物を一種類またはそれ以上含んでいる1個またはそれ以上のバイアル、チューブ、アンプル、ボトル等の容器を含んでいてもよい。

【0107】

本発明のキットは、1種類またはそれ以上の本発明の化合物または組成物、及び1種類またはそれ以上の賦形剤、希釈剤またはアジュバントを含んでいてもよい。

【0108】

ここまで詳細に本発明を記載してきたが、同じことは、下記の実施例への言及によって、

40

50

より明白に理解されるであろう。ただし、これらは説明の目的のためにのみ含まれており、本発明を限定する意図ではない。

【0109】

下記の材料及び方法が、以下に記載された実施例において使用された。

【0110】

(実施例)

材料

SPP、スフィンゴシン及びN、N-ジメチルスフィンゴシンはBiomol Research Laboratory Inc. (plymous Meeting, PA) から入手した。他のすべての脂質はAvanti Polar Lipids (Birmingham, AL) から購入された。[g - 32P] ATP (3000 Ci / mmol) は、Amersham (Arlington Heights, IL) から購入された。ポリ L リジン及びコラーゲンはBoehringer Mannheim (Indianapolis, IN) から得られた。制限酵素はNew England Biolabs (Beverly, MA) から得られた。多数のマウス成体組織のポリ (A) + RNA プロットはClontech (Palo Alto, CA) から購入された。「Lipofectamine PLUS」及び「Lipofectamine」は、Life Technologies. Inc. (Gaithersburg, MD) から購入された。

実施例1：マウススフィンゴシンキナーゼタイプ2 (mSPHK2) のcDNAクローニング

ESTデータベースのBLASTサーチにより、mSPHK1a (Kohama, T., Oliveira, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23721-23728) の保存された領域にかなり高い相同意を有するが、実質的な配列差を有するマウスESTクローニング (GenBank受託番号AA839233) を同定した。このESTを使用して、2つの異なるPCRアプローチによって、mSPHK2で示されるSPHKの第二のアイソフォームがクローニングされた。

【0111】

第一のアプローチでは、マウスcDNAライブラリー (Stratagene) からのPCRクローニングが使用された。約 1×10^6 のファージを、20枚の150mmのプレートに入れ、ブラークを集め、そしてプラスミドを標準の方法を用いて単離した (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G., and Struhl, K., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (1987))。最初のPCR反応は配列特異的なプライマー (M-3-1、5'-CCTGGGTGCACCTGCGCCTGTATTGG (SEQ ID NO: 1)) 及びM13リバースプライマーを用いて行なわれた。最長のPCR産物をゲル精製し、配列特異的なアンチセンスのプライマー (M-3-2、5'-CCAGTCTTGGGGCAGTGGAGAGCC-3' (SEQ ID NO: 2)) 及びT3プライマーを含む第二のPCRのための錆型として使用した。最終PCR産物を、「TOPOT TA」クローニングキット (Invitrogen) を用いてサブクローニングし、その後、配列決定をした。プラチナハイファイDNAポリメラーゼを用いて、下記のサイクルパラメーターのPCR增幅を行った：94度30秒、55度45秒及び70度2分を30サイクルと、最終プライマー伸長を72度5分。

【0112】

第二のアプローチにおいて、cDNA末端の迅速な增幅用の5'RACEシステム (ライフテクノロジーズ) を用いてメーカーのプロトコルに従い、5'RACE PCRを実施した。ポリ (A) + RNAはQuick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いて、Swiss 3T3 細胞から単離された。第一のcDNA鎖は5mgのSwiss 3T3ポリ (A) + RNAにより、AA839233の配列から設計された標的アンチセンスプライマー (m-GSP1、5'-AGGTAGAGGCTTCTGG (SEQ ID No. 3)) 及びSuperscript II 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて、42-50分間で合成した。このcDNAを錆型とし、LA Taqポリメラーゼ (Takara) を用いて、連続二回のPCR反応が、以下のように行なわれた：第1のPCRについては、5'RACE

A b r i d g e d アンカープライマー-5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG (SEQ ID NO: 4) 及び標的特異的アンチセンスプライマー-m - G S P 2、5'-GCGATGGGTGAAAGCTGAGCTG (SEQ ID NO: 5) を用い、94 度で2分に続いて、94 度で2分、55 度で1分、72 度で2分のサイクルが30サイクル、及び72 度で5分のプライマー伸長を行なつた；第2のPCRについては、兄-リング温度が65 度であること以外は同じ条件を用いて、Abridged Universal Amplification Primer (A U A P)、5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC (SEQ ID NO: 6) 及びm-GSP3, 5'-AGTCTCCAGTCAGCTCTGGACC (SEQ ID NO: 7) を用いる。PCR 産物はPCR 2.1へクローニングし、配列決定した。このPCR 産物をPCR 3.1及びpcDNA 3発現ベクターにサブクローニングした。

実施例2：ヒトスフィンゴシンキナーゼ-2 (h S P H K 2) のcDNA クローニング 10
HEK 293 細胞からのポリ(A)+RNA を5'RACE 反応のために使用
した。標的特異的アンチセンスプライマー(h-GSP1、5'-CCCACTCACTCAGGCT(SEQ ID NO:8)) ; h-GSP2、5'-GAAGGACAGCCCAGCTTCAGAG(SEQ ID NO:9) 及びh-GSP3、5'-ATTGACCAATAGAA GCAACC(SEQ ID NO:10) を、ヒトのEST クローン(受託番号AA 295570)の配列から設計した。第一の鎖cDNA は、5 μg のHEK 293 mRNA 及びh-GSP1 を用いて合成した。5'RACE A b r i d g e d アンカープライマーとh-GSP2 を用いて行なう最初のPCR 反応において、このcDNA を鑄型として用いた。その後、ネステッドPCR を、A U A P プライマーとh-GSP3 を使用して行なつた。得られたPCR 産物を上記のようにクローニングし、配列決定した。

実施例3：S P H K 2 の過剰発現及び活性 20
ヒト胚腎細胞(HEK 293 (ATCC CRL-1573)) 及びNIH 3T3 繊維芽細胞(ATCC CRL-1658)をOlivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cuvillier, O ., Poulton, S., and Spiegel, S., J. Cell Biol., 147, (1999), 545-558 に記載されたように培養した。HEK 293 細胞をポリ-L リジンをコートした6 ウェルプレートに、6 × 10⁵ / ウェルで接種した。24 時間後、細胞を、1 ウェルあたり1 μg の単一ベクター単独またはスフィンゴシンキナーゼ構築物を含むベクター及び6 μl のLipofectamine PLUS試薬及び4 μl のLipofectamine試薬を加え、トランスフェクトした。トランスフェクションの1 ~ 3 日後に、細胞を、Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728 に記載されているような凍結融解により収穫し溶解した。 30 いくつかの実験においては、細胞溶菌液を60 分間100,000 × g の遠心分離によって細胞質ゾルと細胞膜に分画した。S P H K 活性は、特記しない限り、4 mg / ml のBSA との複合体として調製されたスフィンゴシン及び200 mM KCl を含有するキナーゼ緩衝液中の [g - 32P] ATP 緩衝液 (Olivera, A. と Spiegel, S. 著、Bird, I.M. 編「Methods in Molecular Biology」(1998) , Vol. 105, 233-242, Human Press, Inc., Totowa, N.J.) の存在下で測定した。32P-SPP はTLC によって分離され、前記のphosphoimager で測定した。

実施例4：SPP の脂質抽出及び測定
細胞をPBS で洗浄し、2.5 μl の濃塩酸を含む1 ml のメタノールで掻き取った。2 ml のクロロホルム / 1 M NaCl (1:1, v / v) 及び100 μl の3 N NaOH を添加し、相を分離することにより脂質を抽出した。SPP を含み、スフィンゴシン、セラミド及び大部分のリン脂質を含まない塩基性水相をシリコーン化されたガラス管に移した。有機相は1 ml のメタノール / 1 M NaCl (1:1, v / v) 、及び50 μl の3 N NaOH で再抽出し、水相を合わせた。水相中のSPP の質量測定、及び有機相中のリン脂質の合計量は、Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci., 17, (1997) 6952-6960 及び Edsall, L. C., and Spiegel, S., Anal. Biochem., 272, (1999) 80-86) に記載されているように正確に測定された。

実施例5：ノーザンプロットティング分析
複数のマウス成体及びヒトの組織及びマウス胎児からのポリ(A)+RNA を1レーン当 50

たり 2 μ g 含むポリ (A) + RNA プロットは、Clontech から購入した。プロットを、ゲル精製及び [32P]dCTP による標識化の後、1.2 kb の PSTI 断片のマウス EST A A389187 (mSPHK1 プローブ)、1.5 kb の pCR3.1 - mSPHK2 の EcoRI 断片または 0.3 kb の pCR3.1 - hSPHK1 の Pvull 断片とハイブリダイズさせた。65 で一晩の ExpressHyb 緩衝液 (Clontech) 中でのハイブリダイゼーションを、メーカーのプロトコルに従って行った。プロットを、ローディングコントロールとしての b-アクチン (Clontech) で再プローブした。バンドの量を Molecular Dynamics Phosphoimager を用いて測定した。

結果

タイプ 2 スフィンゴシンキナーゼのクローニング

EST データベースのプラストサーチにより、いくつかの EST が最近クローニングされた mSPHK1a 配列とかなり高い相同意を有することがわかった。プライマーを、これらの EST の配列から設計し、マウス脳 cDNA ライブラリーからのクローニング及び 5' - RACE PCR のアプローチにより、新しいマウス及びヒトスフィンゴシンキナーゼ (mSPHK2 と hSPHK2 と命名された) のクローニングのために使用した。

【0113】

mSPHK2 及び hSPHK2 のアミノ酸配列の ClustalW アライメントを、Fig. 1 A に示す。mSPHK2 及び hSPHK2 のオーブンリーディングフレームは、83% の同一性及び 90% の類似性を有し、各々 617 及び 618 アミノ酸のポリペプチドをコードする。既に SPHK1s で確認されている高度に保存された 5 つの領域 (C1 : C5) (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728) もタイプ 2 キナーゼの両方に存在した。興味深いことに、SPHK1 の C1 領域中の不变の正の変化を受けたモチーフ G G K G K モチーフは、SPHK2 の中の G G R G L に変わっており、これにより、これが以前に提案されたような ATP 結合部位の一部ではないことが提案される (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728)。モチーフ探索により、さらに、mSPHK2 及び hSPHK2 の保存された C1 領域 (アミノ酸 147 ~ 284) のすぐ前の領域で始まる領域が、ジアシルグリセロールキナーゼ触媒部位と相同意を有していることを明らかになった。

【0114】

SPHK1 と比較して、SPHK2 はいずれも、236 の追加のアミノ酸 (Fig. 1B) を含むはるかに大きなタンパク質をコードする。さらに、それらの配列は中心部及びアミノ末端では SPHK1 とかなり異なっている。しかしながら、mSPHK2 のアミノ酸 140 の後は、タイプ 1 及びタイプ 2 の SPHK の配列は、かなり類似性を有している。領域 C1 ~ C4 を含むこれらの配列 (mSPHK1 のアミノ酸 9 ~ 226、mSPHK2 の 141 ~ 360) は、47% の同一性及び 79% の類似性 (Fig. 1B) を有している。該タンパク質の C 末端部分、mSPHK1 についてはアミノ酸 227 ~ 381、mSPHK2 については 480 ~ 617 には、43% の同一性と 78% の類似性を有する大きな相同意領域がある (Fig. 1B)。これらの領域の相違は、SPHK2 が単純な遺伝子重複として生じているのではないであろうことを示唆している。

スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 の組織分布

マウス成体中の SPHK2 mRNA 発現の組織分布を、ノーザンプロットティング (Fig. 2A) によって SPHK1 のそれと比較した。成体の肝臓、心臓、腎臓、睾丸及び脳を含むほとんどの組織では、優勢な 3.1 kb の SPHK2 mRNA 種が検出され、これは遍在した発現を示している。しかしながら、発現のレベルは著しく変化しており、成体の肝臓及び心臓において最も高く、骨格筋及び脾臓 (Fig. 2A) においてはかろうじて検出できる程度であった。対照的に、mSPHK1 の発現パターンは全く異なっており、肝臓中の発現は mSPHK2 のように優勢ではなく、成人の肺、脾臓及び肝臓で最も高い mRNA の発現が見られた。mSPHK1 及び mSPHK2 は両方とも、胚発生中に一

10

20

30

40

50

時的に差別的に発現した。mSPHK1は、7日齢のマウス胚(E7)で高度に発現し、E11の後(Fig. 2B)に劇的に減少した。対照的に、E7では、mSPHK2発現がmSPHK1よりはるかに低く、E17まで徐々に増加した。hSPHK2 2.8k bのmRNA転写物は、成体の腎臓、肝臓及び脳中で主として発現し、他の組織(Fig. 2C)では、発現性は遙かに低い。興味深いことに、ヒトの腎臓中におけるSPHK2の発現は非常に高く、マウスにおいては比較的はるかに低い。一方、肝臓については反対のパターンとなった。

組換えスフィンゴシンキナーゼタイプ2の活性

mSPHK2とhSPHK2が本当にSPHKをコードしているかどうかを調べるために、HEK293細胞を、対応するcDNAを含む発現ベクターで一時的にトランスフェクトした。SPHKが可溶で且つ細胞膜結合型で細胞に存在し得ることは従来の研究で示されている(Olivera, A., and Spiegel, S., *Nature*, 365, (1993) 557-560;

Banno, Y., Kato, M., Hara, A., and Nozawa, Y., *Biochem. J.*, 335, (1998) 301-304; Buehrer, B. M., and Bell, R. M., *J. Biol. Chem.*, 267, 3154-3159; Olivera, A. Rosenthal, J., and Spiegel, S., *Anal. Biochem.*, 223, (1994) 306-312; Ghash, T. K., Bian, J., and Gill, D. L., *J. Biol. Chem.*, 269, (1994), 22628-22635)、組換えSPHK2の活性はトランスフェクトした細胞の細胞質ゾル及び細胞膜分画の両方で測定した。以前にKohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, 273, (1998) 23722-23728に記載されているように、未処理または

ベクター処理されたHEK293細胞は、低レベルのSPHK活性を有している(Fig. 3A)。mSPHK2及びhSPHK2でトランスフェクションした24時間後に、in vitroのSPHK活性は各々20倍及び35倍に増加し、その後減少した(Fig. 3A)。これとは対照的に、mSPHK1でトランスフェクトした細胞のSPHK活性ははるかに高く、トランスフェクションの24時間後の基礎レベルの610倍以上であり、このレベルが少なくとも3日間続いた(図示せず)。HEK293細胞と同様、mSPHK1でトランスフェクションしたNIH3T3纖維芽細胞は、mSPHK2でトランスフェクションしたものよりもはるかに高いSPHK活性となった。トランスフェクションしていない細胞と同様に、mSPHK1でトランスフェクトした細胞のSPHK活性の大部分は細胞質ゾルにあることが既に見出されている(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, 273, (1998) 23722-23728)。

Kyte-Daolittleヒドロパシー・プロットは、疎水性膜スパン(membrane-spanning)領域の存在を示唆しなかったが、mSPHK2またはhSPHK2でトランスフェクトした細胞においても、同様にSPHK活性は膜関連であり、各々17%及び26%であった(Fig. 3B)。

【0115】

mSPHK2とhSPHK2によるHEK293細胞のトランスフェクションも、SPHKにより生成する産物であるSPPが2.2倍及び3.3倍になるという増加をもたらし(Fig. 3C)、これはmSPHK1aによるトランスフェクション後のスフィンゴ脂質代謝物質レベルに関する従来の研究に合致しており、レベルの増加とin vitro酵素活性との相関関係の欠如を示している。(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, 273, (1998) 23722-23728; Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., and Spiegel, S., *J. Cell Biol.*, 147, (1999) 545-558)。

組換えmSPHK2の性質

基質特異性

SPHK2は、SPHK1に対しおかに高い相同意を有するが、実質的な配列差がある。従って、それらの酵素の特性を比較する意義があった。典型的なミカエリスメンテン型反応速度論を、組換えSPHK2について考察した(データは示していない)。基質とし

10

20

30

40

50

てのD-エリスロスフィンゴシンについてのKmは、3.4 μMでありSPHK1について既に見出されているKm(Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 12576-12583)と殆ど同一である。天然に生じたD-エリスロスフィンゴシン異性体はSPHK1の最良の基質であったが(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., rickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728)、D-エリスロジヒドロスフィンゴシンは、SPHK2についてはD-エリスロスフィンゴシンよりも良い基質であった(Fig. 4A)。さらに、D、L-トレオジヒドロスフィンゴシン及びフィトスフィンゴシンはSPHK1によって全くリン酸化されなかつたが、SPHK2によつては、スフィンゴシンよりははるかに低い効率ではあったがかなりリン酸化された。SPHK1と同様に、N,N-ジメチルスフィンゴシン(DMS)を含む他の脂質、C2またはC16セラミド、ジアシルグリセロール及びホスファチジルイノシトールは、SPHK2(Fig. 6A)によってリン酸化されなかつた。これはスフィンゴイド塩基に対する高い特異性を示唆する。

【0116】

DMS及びDHSは、SPHK1の有力な拮抗阻害剤であることが既に示されており(Edsall, L. C., Van Brocklyn, J. R., Cuvillier, O., Kleuser, B., and Spiegel, S., Biochemistry, 37, (1998))、また様々な生理学的刺激に起因する細胞内のSPPレベルの増加を止めるために使用されている(Olivera, A., and Spiegel, S., Nature, 365, (1993), 557-560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, S., Vanek, P. G., Coo, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S., Nature, 381, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and 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., and van Koppen, C. J., EMBO J., 17, 2830-2837; Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J.-P., Nature, 380, (1996), 634-636; Melendez, A., Floto, R. A., Gillooly, D. J., Harnett, M. M., and Allen, J. M., J. Biol. Chem., 273, 9393-9402; Machwate, M., Rodan, S. B., Radan, G. A., and Harada, S. I., Mol. Pharmacol., 54, (1998), 70-77)。しかしながら、DHSは、SPHK2の基質であるので、その生産物であるジヒドロSPPは、細胞表面SPP-EDG-1類レセプターへの結合及び活性化については、SPPと同じくらい有力であり、SPHK2の役割を調べるためのツールとして使用することはできない。従つて、SPHK2に対する基質ではないDMSの抑制の可能性を特徴づけることは重要であった。驚くべきことに、さらに、DMSはSPHK2(Fig. 4B)の有力な阻害剤であるが、非競合的な方法で作用していることがわかった(Fig. 4C及びFig. 4D)。SPHK2によるDMSのKi値は、SPHK1によるKi値、4 μMよりわずかに高いため、両方のタイプのSPHKを阻害する有用なツールとなる。

【0117】

SPHK2は、6.5乃至8の中性のpH範囲で最高の活性を有し、pH7.5で最適の活性を有していたが(Fig. 5A)、pH依存性はSPHK1のものと似ていた(データは示さない)。活性は、この範囲より下または上のpH値では著しく減少した。

KCl及びNaClの影響

ヒトの血小板におけるSPHK活性の殆どは、膜に関連し、1M NaClにより抽出可能である(Banno, Y., Kato, M., Hara, A. and Nozawa, Y., Biochem. J., 335, (1998), 301-304)。さらに、塩により抽出可能なSPHKは細胞質ゾルの酵素とは異なる特性を有している。従つて、組換えSPHK1及びSPHK2に対する高い塩濃度の影響を調べるのは興味深いことである。興味深いことに、高いイオン強度は、それらの活性について完全に反対の効果を有していた。SPHK1はNaCl及びKClのいずれによっても著しく阻害され、200mM(Fig. 5B)の濃度で、各々50%の阻

害を引き起こした。これとは対照的に、S P H K 2 活性は、塩濃度を増加させることにより劇的に刺激され、400 mMの濃度で最大の結果が得られた。またK C 1ではN a C 1よりはるかに有効であった。しかしながら、この濃度より1M分でも塩濃度が高いとS P H K 2 活性は急激に減少した(Fig. 5 C)。従って、S P H K 1とS P H K 2の活性は、イオン強度の変化については完全に反対の応答をした。高濃度の塩の存在または不存在におけるm S P H K 2 のカイネティックアッセイは、スフィンゴシンのKm値は変化しないがVmax値は増加することを示した(Fig. 5 D及びFig. 5 E)。これらの観察の生理学上の重要性は、これから決定されるべきであるが、それは異なる細胞下の局在化と関係があると考えられる。

基質の提供

10

スフィンゴ脂質は非常に脂肪親和性が強いので、in vitro S P H K 分析においては、スフィンゴシンは通常T r i t o n X - 1 0 0 によるミセル型で存在するか、またはB S Aとの複合体として存在する(Olivera, A., Rosenthal, J., and Spiegel, S., J. Cell. Biochem., 60, (1996), 529-537; Olivera, A., Barlow, K. D., and Spiegel, S., Methods Enzymol., 311, (2000), 215-223)。さらに、T r i t o n X - 1 0 0 のような界面活性剤がラット脳抽出物におけるS P H K 活性(Buehrer, B. M., and Bell, R. M., J. Biol. Chem., 267, (1992), 3154-3159)及びラットの腎臓からの酵素の活性(Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 12576-12583)を刺激することが示されており、ラットの腎臓のS P H K の安定性がある種の界面活性剤の存在で増加することが既に見出されている(Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 12576-12583)。しかしながら、S P H K 1及びS P H K 2の活性に対するT r i t o n X - 1 0 0 の濃度増加の影響を比較した場合、いくつかの予測しない結果が見出された。0.005%未満の界面活性剤の濃度はなんの効果も有しなかったが、それより高い濃度ではS P H K 2 は抑制され、S P H K 1活性は著しく増加させられた(Fig. 6 A)。0.5%T r i t o n X - 1 0 0 濃度では、S P H K 1活性は4倍以上増加したが、S P H K 2 はほぼ完全に抑制された。

20

【0118】

興味深いことに、基質としてスフィンゴシンB S A 複合体を用いる通常のS P H K 分析条件からB S A 濃度を増加させること、即ち、0.2 mg / ml のB S A は、S P H K 1活性(Fig. 6 B)には影響を与えずに、S P H K 2 活性に濃度依存の阻害を引き起こした。従って、細胞または組織抽出物中のS P H K 活性を測定する場合、基質調製方法は、混合ミセルかB S A 複合体かにより、注意深く最適化しなければならない。T r i t o n X - 1 0 0 とB S A の効果が異なると、二つのタイプのS P H K の関連する発現に依存して異なる結果を生じるからである。

30

リン脂質の効果

酸性リン脂質、特にホスファチジルセリン、及びホスファチジン酸及びホスファチジルイノシトール、並びにカルジョリピンは、少ないながら、S w i s s 3 T 3 線維芽細胞溶菌液中のS P H K 活性の増加を用量依存的に誘導するが、中性のリン脂質はなんの効果も生じなかった。(Olivera, A., Rosenthal, J., and Spiegel, S., J. Cell. Biochem., 60, (1996), 529-537)。一致したのは、組換えS P H K 1及びS P H K 2がホスファチジルセリンによって刺激されたこと；両者の活性が40 μg / ml の濃度で4倍に増加して最大となり、それより高い濃度では投与量依存的に阻害されたことである。他のリン脂質、例えばホスファチジルコリンはこの酵素活性には何ら影響も与えないの、ホスファチジルセリンのこれらの効果は特異的と考えられる。これとは対照的に、ヒトの血小板中のS P H K の3つの主なタイプの活性は、ホスファチジルセリンによる影響を受けない(Banno, Y., Kato, M., Hara, A, and Nozawa, Y., Biochem. J., 335, (1998), 301-304)。

40

【0119】

ホスファチジルセリンがS P H K の酵素活性を増強するメカニズムはまだ解明されていな

50

い。一つの可能性は、ホスファチジルセリンが、よりよく基質であるスフィンゴシンを提供するユニークな膜構築性を有するということである。別の可能性は、S P H K がセリンヘッドグループの構造を特異的に認識する決定群を含み、これらの決定群が、膜を有するS P H K の相互作用によってのみ露出されるようになるからであるかもしれないということである。この点では、ホスファチジルセリンに対するプロテインキナーゼCの著しい特異性についての分子的機序は、非常に討論の価値がある。しかしながら、最近のデータにより、脂質構造及び非膜構造がホスファチジルセリンによるタンパク質キナーゼCの調整の主な決定群であることが示された(Johnsan, J. E., Zimmerman, M. L., Daleke, D. L., and Newton, A. C., *Biochemistry*, 37, (1998), 12020- 12025)。

【0120】

10

S P H K 1との著しい相同意を有するデータベース中の多数のE S T の存在、並びにS.ce revisiae中の異なるS P H K をコードするいくつかの遺伝子の同定(Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., and Dickson, R. C., *J. Biol. Chem.*, 273, (1998), 19437-19442)は、大きくて重要なS P H K 遺伝子ファミリーが存在することを示唆している。S P H K 2は、特にタイプ1のS P H K s で既に確認されている保存領域(Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, 273, (1998), 23722-23728)において、S P H K 1と高い相同意を有するが、さらに大きく(S P H K 1及びS P H K 2は各々65.2及び65.6kDaであるのに対し、m S P H K 1 aは42.4kDa)、さらに236個の付加的なアミノ酸を含む。さらに、その異なる組織発現、一時的に増加する発現、細胞の局在化、及びイオン強度及び界面活性剤に応じた動力学的特性は、S P H K 1とは完全に異なり、細胞の成長及び生存を調節するという重要な役割を果たすことが知られているS P H K 1とは異なる機能を有し、異なる方法でS P P レベルを調節すると考えられる。従って、タイプ2のS P H K は、血管新生やアレルギー反応のようなS P P に起因する多くの生物学的反応のうち、いくつかの調整に関係すると考えられる。

【0121】

20

【表1】

(表1-1)

Sequence for GenBank 1 EMBC Bank Accession No.
bankit325787

1 aattccggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcttcca gaaccaaaga gaagtcagcc
61 tgaggaaagg gctggaccc ggagcctc tgccttcc cctccctgc tctaacactc
121 tccagggta aagggacgg agaatacagag acatgatgg agttgtctgg acgagtcgc
181 tggtgactct ctggccgcac gcccggct tctcggtggc tggggagga cccgggtggc
241 tgggtgtcg agccctccgaa gtagctggaa tcaacacttgc tcaacacttgc
301 gccatttaaa gttgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaaggc caagagccta
361 ggagtgttg ggactgaacc agggcatgg cccaccacc actactgcca gtggctgcca
421 gcactccaat cctgcacggc gagttgggtt cctaccggc caacggccca cgggttggcc
481 tcaccctcac aacacaagcc ctacacatac agcgactacg cccaaagcca gaagccggc
541 cccgagatgg tctagtctct ctggatgagg tctcggtctg tggcacccctg cagagccgt
601 gccccgagga cactgcagcc tacttctgca tctacacata cccacgtggc cgtcgagggg
661 gccggcgcag agctacgcgg accttccggg cggatggggc caccacttat gaggagaatc
721 gtgcagggc ccagcgctgg gcaactgccc tcacgtgtct cttccggagga gtgcctctgt
781 caggggacca ggaaatcacc cctgaattgc tggccggaa gcccaggctg ctcatattgg
841 tcaatccctt tggggggcgg ggcctggct ggcagegctg tatggaccac gtgggtgcca
901 tcatctctga agctgggtg tcattcaacc tcatacagac agaacgacag aaccatgccc
961 gtgagctggc gcaggggtta agcctgagtg agtgggaagg cattgtcaact gtgtctggag
1021 acgggctgtt ttacgggttg ctgaatggc tccttgatcg gccagactgg gaggatgccc
1081 tggatgccc cattgggtgc ctccctgtg gatggggca tgcgttagct gggggcggta
1141 gccatcatgg cgggttttag caggttgcgt gtgtgacact gtgtcaac tgctcgcttc
1201 ttctctgccc tggtggcagc catcctctgg acttgccttc tgtgacgcta gcctcggt
1261 cccgctgttt tccttcctg tcagtgccct ggggattttt gtcagatgtg gacattcaca
1321 gtgagcgctt cagggccctg ggccagcgcc gattcacact ggggtgcgtg ctaggcctgg
1381 ctcgttgcataccatccgt ggacgcctt cctacccccc cgctaccaca gaaccagcc
1441 tggccatcccc agggccacagt ctgcctcgag ccaagtcaga actagtcttgc
1501 cagccccccgc cgccacccac tcgcctctac atcgatctgt gtctgacccctg cccctggccc
1561 ttccccagcc tgcctggc tccctggct cccctgagcc cctgcctgac ctgtccctca
1621 atgggtgtgg tccagagctg actggagact gggggaggac tggggatgca cctctgtccc
1681 cagacccact gtcgcctca tcccccacg ctctcaaaac agtcgtacgtt tcacccatcg
1741 ctgaaggggcc cccagaaaatg ccagcatctt cggggttctt gcctccacc cacagtggcc
1801 cagaaggcctc tacctggggc ccagtggacc acctccccc tccctggc tctccactgc
1861 cccaaagactg ggtgacaata gagggggagttt gtttactcat gttgggcattc ttgacgagcc
1921 acctctgcgc agacctgatg gcagcccccac atgcacgctt tgatgtggc gttgtgcacc
1981 tgggtttgggtt gggggcggc atctcacggg ctgcacttct acgcattttt ctggccatgg
2041 agcatggaaa ccacttcagc ctggggctgca cccatctggg ctatgtgcacgcgtgcct

【 0 1 2 2 】
(表 1 - 2)

2101 tccgccttga accactcactg cctcggtggcc tgctcactgt agatggggag ttagtggagt
 2161 atgggc当地 acaggcgcag gtgcacccag gtctcgccac gctgctcaact gggcctgcag
 2221 gtcaaaaagcc acaaggcttga acgagcctaa aagcatggcg agttggtgga accagcgccc
 2281 cataggctaa gatctatcat ttacaggttag aagtggggcc cgcactcaga actgtgagga
 2341 ggggtggagag tggtcctgac cctcagttcc cagaggacct agaggctcga ggggtggggcc
 2401 tgcctttctt gatgtccaaat gatggggctt ggaatgtatg agctagcaag gcttcttcag
 2461 cttattgacc agccagggtt tcttcttgcct tactccggtg cctctacttg actggccaaat
 2521 cagcccttga ggggcagggtt ccccccagggtg gtccccagat ttgcactaat gttcctcccc
 2581 tggccagtttta gggatggat gttctgtgtc ttgtgtgtcc ctctccctag tctaaaaaagc
 2641 aattgaaaaaag gtctatgcaaa taaagggtgt tgctccctc taaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

10

Sequence for Gen Bank 1 EMBC Bank Accession No.bankit325752

1 gccaccatgg ccccccccccc accggccactg gctgccagca ccccgcttcc ccatggcgag
 61 tttggcttcc acccagccccg aggcccacgc tttggccctca cccttacatc gcaggccctg
 121 cacatacagc ggctgcggcc caaaacctgaa gccaggcccc ggggtggccct ggtccccgttg
 181 gccgaggtct caggctgctg caccctgcga agccgcagcc cctcagactc agcggcttac
 241 ttctgcatct acacccatccc tcggggccgg cgccggggccc ggcgcagagc cactcgacc
 301 ttccggccag atggggccgc cacctacgaa gagaaccgtg ccgaggcccc ggcgcgtggcc
 361 actgcctca cctgtctgtc ccgaggactg ccactgcccc gggatggggaa gatcaccatc
 421 gacctgctac ctcggccgccc ccgggttgctt ctattggtca atccctttgg gggtcggggc
 481 ctggccctggc agtgggttaa gaaccacgtg ctccccatga tctctgaagc tgggctgtcc
 541 ttcaacctca tccagacaga acgacagaac cacgcggggg agctggtcca ggggctgagc
 601 ctgagtgagt gggatggcat cgtcacggtc tcgggagacg ggctgttcca tgaggtgctg
 661 aacgggctcc tagatcgccc tgactggag gaagctgtga agatgcctgt gggcatccctc
 721 ccctggggct cgggcaacgc gctggccggc gcagtgaacc agcacggggg atttgagcca
 781 gcccctggcc tcgaccgtt gctcaactgc tcactgttgc tggccggggg tggggccac
 841 ccactggacc tgcctccgt gacgctggcc tcgggatccc gctgttttcc ctccctgtct
 901 gttccctggg gcttcgtgtc agatgtggat atccagagcg agcgcttcag ggccttggc
 961 agtggcccgat tcacactggg cccgggtgtc ggcctcgccca cactgcacac ctaccgcgg
 1021 cgccttcctt acctccccgc cactgtggaa cctgcctcgc ccacccctgc ccatagccgt
 1081 cctcgtgcca agtggagct gacccctaaacc ccagacccag ccccgcccat ggccactca
 1141 cccctgcattt gttctgtgtc tgacccgtt cttccctcgc cccagctgc cctggccctt
 1201 cctggctcgc cagaacccct gcccattctg tccctcaacg gtggggccca agagctggct
 1261 ggggactggg gtggggctgg gatgtcccg ctgtccccgg accccactgtc gtcttcaccc
 1321 cctggctctc ccaaggcage tctacactca cccgtctccg aagggggcccc cgtaattccc
 1381 ccacccctctg ggctccact tccccccct gatgcggggg tagggccctc cgacccgcggc
 1441 cccggccgacc acctgctgcc tccgctgggg accccctgc ccccgactg gtgacgctg
 1501 gagggggact ttgtgttcat gttggccatc tggccagcc acctaggcgc tgacccgttg
 1561 gcaagctccgc atgcgcgcgtt cgacgacggc ctgggtgcacc tggctgggtt ggcgtacggc

20

30

40

【 0 1 2 3 】

(表 1 - 3)

1621 atctcgccgg ctgcgtgtc ggcgttttc ttggccatgg agcgtggtag ccacttcagc
 1681 ctgggctgtc cgcaagctggg ctacgcccgcg gcccgtgcct tccgcctaga gccgctcaca
 1741 ccacgcggcg tgctcacagt ggacggggag cagggtggagt atggggcgc acaggcacag
 1801 atgcaccctg gcatcggtac actgctcact gggcctcctg gctgcccggg gcggggagccc
 1861 taaaactaaa caagcttggt accccggggg ggccggggcct acattccaaat gggggggagc
 1921 ttgagctagg ggggtggcc tggctgttag agttgtggtg gcagggggcc tggccccgtc
 1981 tcaggattgc gctcgcttgc atgggaccag acgtgatgct ggaaggtggg cgtcgtaacg
 2041 gttaaagaga aatgggctcg tcccgagggt agtgctgtat caatgaggc gggggctggc
 2101 gtctgatctg gggccgcct tacggggcag ggctcagttcc tgacgcttgc cacctgtcc
 2161 taccggcca ggatggctga gggcgagtc tatttacgc gtcgcccataat gacaggacct
 2221 ggaatgtact ggctgggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc
 2281 ccatccactc cgggtccctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttccccg
 2341 gggccggcgc taggatttgc actaatgttc ctctccccgc

10

SEQ ID NO. 14

Amino acid sequences of human SPHK2

MAPPPPLAASPTPLHGEFGSYPARGPRFALTTSQALHIQRLRPKPEARPRGLVPLAEVSGCCTLRSR
 SPSDSAAYFCIYTYPGRGRRARRATRTFRADGAATYEENRAEAQRWATALTCLLRGLPLPGDGEITPDL
 LPRPPRLLLLVNPFGGRGLAWQWCKNHVLPМИSEAGLSFNLIQTERQNHARELVOQLSLSEWDGIVTVSG
 20 DGLLHEVLNGLLDRPDWEEAVKMPVGILPCGSGNALAGAVNQHGGFEPALGLDLLLNCSSLRGGHPL
 DLLSVTLASGSRCFSFLSVAWGFVSDVDIQSERFRALGSARFTLGTVLGLATLHTYRGRRLSYLPATVEPA
 SPTPAHSLPRAKSELTLPDPAPPMAHSPPLHRSVSDLPLPQPALASPGSPEPLPILSLNGGGPELAGD
 WGGAGDAPLSPDPLLSSPPGSPKAALHSPVSEGAPVIPPSSGLPLPTPDARVGASTCGPFDHLLPPLGTP
 LPPDWVTLLEGDFVLMIAISPShLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRAALLRLFLAMERGSHFSLG
 CPQLGYAAARAFRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPAGCPGREG

20

SEQ ID NO. 12

Amino Acid Sequence of mouse SPHK2

MAPPLLPVAASPTPILHGEFGSYPANGPRFALTLTQALHIQRLRPKPEARPRDGLVSLDEVSGCGTLQS
 30 RSPEDTAAFCIYTYPGRGRRARRATRTFRADGATTYEENRAEAQRWATALTCLLRGVPLSGDQEITPE
 LLPRKPRLLILVNPFGGRGLAWQRCMDHVVPMISEAGLSFNLIQTERQNHARELVOQLSLSEWEGLIVTVS
 GDGLLYEVLNGLLDRPDWEDAVRMPIGVLPCGSGNALAGAVSHHGGFEQVVGVDLLLNCSSLRGGSHP
 LDLLSVTLASGSRCFSFLSVAWGFLSDVDIHSERFRALGSARFTLGAVLGLASLHTYRGRRLSYLPATTEP
 ALPIPQHSLPRAKSELVLAAPAPAPAATHSPLHRSVSDLPLPQPALVSPGSPEPLPDLSLNGGGPELTG
 DWGGAGDAPLSPDPLLSSPNALKTAQLSPIAEGPPPEMPASSGFLPPTHSAPEASTWGPVDHLLPPLGSP
 LPQDWVTLIEGEFVLMGLGILTSHLCADLMAAPHARFDDGVVHLCWVRSGISRAALLRIFLAMEHGNHFSLG
 CPHLGYAAARAFRLEPLTPRGLLTVGDGELEYGPLQIAQVHPGLATLLTGPAGQKPQA

30

【 0 1 2 4 】

【表2】

(表2 - 1)

40

SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED
GEORGETOWN UNIVERSITY

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

10

<130> 00170PCT/HG

<140>

<141>

<150> US 60/194,318

<151> 2000-04-03

<160> 15

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 1

cctgggtgca cctgcgcgtg tattgg

30

26

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 2

ccagtcttgg ggcaagtggag agcc

40

24

【 0 1 2 5 】

(表 2 - 2)

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

<400> 3
aggttagaggc ttctgg

16

10

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

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

20

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

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

30

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

<400> 4
ggccacacgt cgactagtaa gggnnnnnnn gggnnn

36

40

<210> 5

【 0 1 2 6 】
(表 2 - 3)

<211> 22

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 5

gcgatgggtg aaagctgagc tg

22

10

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

20

<400> 6

ggccacgcgt cgactagta

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

30

<400> 7

agtctccagt cagctctgga cc

22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 8

cccaactcaact caggct

16

【 0 1 2 7 】

(表 2 - 4)

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

gaaggacage ccagcttcag ag

22

10

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

attgaccaat agaagcaacc

20

20

<210> 11

<211> 2698

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(2237)

30

<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

40

<400> 11

【 0 1 2 8 】

(表 2 - 5)

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 Gin 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 Gin Glu Ile				10
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 ctg				893
Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala Trp Gin Arg Cys Met Asp His Val				
155		160		165
gtg cca atg atc tat gaa gct ggg ctg tcc aac ctc ata cag aca				941
Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gin Thr				
170		175		180
gaa cga cag aac cat gcc cgt gag ctg gtg cag ggg tta aac ctg agt				989
Glu Arg Gin Asn His Ala Arg Glu Leu Val Gin Gly Leu Ser Leu Ser				
190		195		200
gag tgg gaa ggc att gtc act gtg tat gga gac ggg ctg ett 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 ttt ggt gga tgg ggc aat ggg cta gct ggg				1133
Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly				
235		240		245

[0 1 3 0]
(表 2 - 7)

gct gtc aac cat cat ggc ggg ttt gag cag gtt gtc ggt gtt gac ctg 1181
 Ala Val Ser His His Gly Gly Phe Glu Gin Val Val Gly Val Asp Leu
 250 255 260 265

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

10
 gac ttg ctc tct gtc aeg cta gcc tag gga tcc aac 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

20
 aac ttc agg gcc ctg ggc aac gct ega ttc aca ctg gat 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 tcc ttg cat acc tac egt 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

30
 gct acc aca gaa cca gcc ttg ecc atc cca ggc cac agt ctg cct ega 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 acc 1517
 Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr
 365 370 375

40
 eac tag ect eta cat ega tct gtg tct gac ctg ccc ctg ccc ett ecc 1565
 His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro
 380 385 390

cag ect gcc ttg gtc tcc cct ggc tcc cct gag ccc ctg ect gac ctg 1613
 Gin Pro Ala Leu Val Ser Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu

395	400	405	
tcc etc sat ggt ggt cca gag ctg act gga gac tgg gga gga gct			1661
Ser Leu Asn 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	10
get ctc aaa aca gct cag ctt tca ccc ate get gaa ggg ccc cca gaa			1757
Ala Leu Lys Thr Ala Gin Leu Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu			
445	450	455	
atg cca gca tct tag 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	20
gcc tct acc tgg ggc cca gtc gac cac etc etc 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 Gin Asp Trp Val Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met			
490	495	500	505
ttg ggc atc ttg acg agc eac 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 gce atg gag cat			2045
Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His			
540	545	550	40

【 0 1 3 2 】
(表 2 - 9)

gga aac cac ttc aac ctc 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

cggt gcc ttc cgc ctt gaa cca ctc aca 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

10

gat ggg gag ttg gag tat ggg cca ata cag ggc cag gtg ccc cca 2189
 Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr Gly Pro Ile Gin Ala Gin Val His Pro
 590 595 600

ggc ctc gcc aca ctc act ggg cct gca ggt ccc aag cca ccc gca 2237
 Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr Gly Pro Ala Gly Gin Lys Pro Gin Ala
 605 610 615

tgaacgagcc taaaagccatg gagatgtgtt ggaaccacccg ccccataggg taagatatat 2297

20

catttacagg tagaagtggg gcccccaactc agaactgtga ggagggtggg gactggatct 2357

gaccctcagt tcccaagaggg cccatggatgtt cgggggtggg gctgccttt cttgtatgtcc 2417

aatgtatgggg cctggatgtt atgatgttgc aatgggtttttt cagttttttt accagccagg 2477

gtttctttttt gctactccg gtgcctttaac ttgactggcc aatcagccct tgagggcag 2537

gttccccccag gtgggtccccca gatggactt aatgttactt ccctggccag ttagggatgg 2597

30

gatgttctgt gtcttgcgttcc tccctctccc tagttaaaa agcaattggaa aaggtctatg 2657

caataaaagggt tgggtttcc ctctaaaaaa aaaaaaaaaa a 2698

<210> 12

<211> 617

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

【 0 1 3 3 】

(表 2 - 10)

<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 Gin Ala Leu His Ile Gin Arg Leu Arg Pro Lys Pro

35

40

45

10

Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly

50

55

60

Cys Gly Thr Leu Gin 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 Arg Arg Arg Ala

85

90

95

20

Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg

100

105

110

Ala Glu Ala Gin Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly

115

120

125

Val Pro Leu Ser Gly Asp. Gin Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg

130

135

140

30

Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu

145

150

155

160

Ala Trp Gin Arg Cys Met Asp His Val Val Pro Met Ile Ser Glu Ala

165

170

175

Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gin Thr Glu Arg Gin Asn His Ala Arg

180

185

190

40

Glu Leu Val Gin Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr

【 0 1 3 4 】

(表2 - 11)

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

10
 Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly
 245 250 255

Phe Glu Gin 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

20
 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

30
 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

40
 Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gin Pro Ala Leu Val Ser Pro
 385 390 395 400

【 0 1 3 5 】
 (表 2 - 12)

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 Gin 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 Gin 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 Gin Ala Gin Val His Pro Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr
 595 600 605

Gly Pro Ala Gly Gin Lys Pro Gin Ala

610

615

<210> 13

<211> 2380

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<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

20

<305> 28

<306> 19513-19520

<308> AF245447

<400> 13

gceacc atg gcc ccc ccc cca ccg cca ctg gct gcc aac acc ccg ctc 48
Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu

1 5 10

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

30

etc acc ctt aca tcg cag gcc ctg cac ata cag egg ctg cgc ccc aac 144
Leu Thr Leu Thr Ser Gin Ala Leu His Ile Gin Arg Leu Arg Pro Lys
35 40 45cct gaa gcc agg ccc egg ggt ggc ctg gtc ccc ttg gcc gag gtc tca 192
Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser

40

[0 1 3 7]

(表2-14)

50	55	60	
ggc tgc tgc acc ctg cga agc cgc age 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 egg cgc aga 288			
Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg			
80	85	90	10
gcc act cgc acc ttc egg gca gat ggg 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
tgt gcc gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc ctc acc tac tgg 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 ccc 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 ccc ccc cgg ttg ctt cta ttg gtc aat ccc ttt ggg ggt egg ggc 480			
Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly			
145	150	155	
ctg gcc tgg cag tgg tgt aag aac cac gtc 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	
gtt 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	
			40

[0 1 3 8]
(表 2 - 15)

acg gtc tcc 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

10
 ccc tgc ggc tcc ggc aac ggc ctg gcc gga gca gtg aac cag ctc ggg 768
 Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gin 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 tcc cgg ggt ggt ggc ccc ctg gac ctg ctc tcc gtg aeg 864
 Leu Leu Cys Arg Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr
 275 280 285

ctg gcc tcc ggc tcc ccc tgt ttc tcc 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 aeg gag ccc ttc agg gcc ttg ggc 960
 Phe Val Ser Asp Val Asp Ile Gin Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly
 305 310 315

30
 aat gcc ccc ttc aca ctg ggc aeg gtg ctg ggc ctc gcc aca ctg ccc 1008
 Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His
 320 325 330

acc tac cgc gga ccc 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

40
 tcc ccc acc cct gcc cat aac ctg cct cgt gcc aag tcc gag ctg acc 1104
 Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr

[0 1 3 9]
 (表2 - 16)

355	380	365	
cta acc cca gac cca gcc 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 ett ccc ctg ccc cag cct gcc ctg gcc tet			1200
Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gin Pro Ala Leu Ala Ser			
385	390	395	10
ect ggc tcc 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 ccc ctg tcc			1296
Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser			
415	420	425	20
ccg gac cca ctg ctg tct tca cct cct ggc tct ccc aag gca gct eta			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 gca 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	
etc 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	30
ccg ccc gac cac ctg ctg cct ccc ctg ggc acc ccc 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 tcc ccc			1536
Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro			
495	500	505	40
510			

【 0 1 4 0 】
(表 2 - 17)

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

10

gcg ctg ctg cgc ctt ttc ttg gcc atg gag cgt ggt agc eac 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 tae gcc ggc ggc cgt gcc ttc cgc cta 1728
Leu Gly Cys Pro Gin 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 1778
 Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gin Val
 575 580 585 590

20

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 tgaaaactaaa 1870
Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro .
610 615

30

caagcttgtt acccgccggg ggccggggct acatccaaat gggccggagc ttgagctagg 1930

gggtgtggcc tggctgttag agttgtggtg gcagggggcc tggccccgtc tcaggattgc 1990

gtctcgccatggaccaag acgtgatgct ggaagggtgg cgtcgtcact gttaaagaga 2050

aatgggctcg tcccgaggtt agtgcctgat caatgaggc gggcctggc gtctgatctg 2110

40

consent, transmission, extraction, transmission, extraction, transmission, 2179

【 0 1 4 1 】
(表 2 - 1 8)

ggatggctga gggeggagtc tattttacgc gtcggccat gacaggacct ggaatgtact 2230

ggctggggtt ggcttcgttg agtcggccgg tcaggcccg cagcttcgtcc ccatccactc 2290

cggtgcctcc atttagctgg ccaatcagec caggagggc aggttccccg gggccggcgc 2350

taggatttgc actaatgttc ctctccccgc 2380

10

<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

20

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

30

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

40

Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Leu

115 120 125

【 0 1 4 2 】

(表 2 - 19)

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

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

Trp Gin Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly
 165 170 175 10

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

Leu Val Gin 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 20

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 Gin His Gly Gly Phe
 245 250 255

Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
 260 265 270 30

Cys Arg 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 Gin Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
 305 310 315 320 40

Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr

【 0 1 4 3 】
 (表 2 - 2 0)

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

10
 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 Gin 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

20
 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

30
 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

40
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
 515 520 525

【 0 1 4 4 】
 (表 2 - 21)

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 Gin 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 Gin Val Glu Tyr
 580 585 590

Gly Pro Leu Gin Ala Gin 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> AAC81898

<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 Gin Gly Gly

【 0 1 4 5 】
 (表 2 - 2 2)

20

25

30

Lys Gly Lys Ala Leu Gin Leu Phe Gin Ser Arg Val Gin 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

10

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 Gin Lys Pro Leu Cys
 100 105 110

20

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

Tyr Ala Gly Tyr Glu Gin 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

30

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

40

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

Ala Ser Lys Arg Pro Ala Ser Thr Leu Val Gin 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 Gin Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu His Thr His
 260 265 270

10

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 Gin Lys Gly Lys His Met Glu Leu Asp
 305 310 315 320

20

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

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

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

30

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

Pro Glu Glu Pro
 385

【0147】

本明細書は、説明のために提供されるのであって、限定のためのものではなく、本発明の範囲を逸脱することなく種々の修正及び変更をなし得ることが認識されるであろう。 40

【0148】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 SANKYO COMPANY, LIMITED
GEORGETOWN UNIVERSITY

〈120〉 Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoforms, Cloning,
Expression and Methods of Use Thereof

〈130〉 00170PCT/HG

10

〈140〉

〈141〉

〈150〉 US 60/194,318

〈151〉 20000403

〈160〉 15

〈170〉 PatentIn Ver. 2.0

20

〈210〉 1

〈211〉 26

〈212〉 DNA

〈213〉 *Mus musculus*

〈400〉 1

cctgggtggca cctgcgcctg tattgg

26

⟨210⟩ 2
⟨211⟩ 24
⟨212⟩ DNA
⟨213⟩ *Mus musculus*

⟨400⟩ 2
ccagtcttgg ggcagtgagg agcc 24

⟨210⟩ 3 10
⟨211⟩ 16
⟨212⟩ DNA
⟨213⟩ *Mus musculus*

⟨400⟩ 3
aggtagaggc ttctgg 16

⟨210⟩ 4
⟨211⟩ 36 20
⟨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 cgactagta c gggnnngggnn gggnnng
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 cgactagtagac 20

10

⟨210⟩ 7

⟨211⟩ 22

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ *Mus musculus*

⟨400⟩ 7

agtctccagt cagctctggcc 22

20

⟨210⟩ 8

⟨211⟩ 16

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ *Homo sapiens*

⟨400⟩ 8

cccaactcaact 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⟩

10

20

〈302〉 Molecular cloning and functional characterization of a
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
〈303〉 J. Biol. Chem.
〈304〉 275
〈305〉 26

〈306〉 1951319520

〈308〉 AF245448

〈400〉 11

aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcttcca gaaccaaaga gaagtcagcc 60

10

tgagggaaagg gctgggaccc ggagcccttc tggccttcc ccgtccctgc tctaacaactc 120

tccagggta aagggaccgg agaatacgag acaatgatcg agcttgcgtt acgagtcgc 180

tggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcggtggc tcgcggagga cccgggtggc 240

tgtgtgtcgg agccctccgaa gtatcgaa tcaccgttt tcaacacttgc 300

20

gccatttaaa gttgtatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagggctt 360

ggagtgccttgc ggacttgcacc agggtc atg gcc 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 10
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 Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala 20
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 10
 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 20

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

gct	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	ctc	tgc	cgt	ggt	ggc	agc	cat	cct	ctg	1229		
Leu	Leu	Asn	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Arg	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		10
			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	gtc	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	20
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 Ala Thr
 365 370 375

cac tcg cct cta cat cga tct gtg tct gac ctg ccc ctt ccc 1565
 His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp 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 10

tcc ctc aat ggt ggt ggt cca gag ctg act gga gac tgg gga gga gct 1661
 Ser Leu Asn 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 20
 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

10

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

20

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 gcgagtttgtt ggaaccagcg ccccataggc taagatctat 2297

catttacagg tagaagtggg gcccgcactc agaactgtga ggagggtgga gagttggctt 2357

10

gaccctcagt tcccagagga cctagaggct cgaggggtggg gcctgccttt ctgtatgtcc 2417

aatgtatgggg cctggaatgt atgagctagc aaggcttctt cagcttattt accagccagg 2477

gtttcttctt gcctactccg gtgcctctac ttgactggcc aatcagccct tgagggcag 2537

gttcccccag gtgggtccca gatttgcact aatgttccctt ccctggccag tttagggatgg 2597

gatgttctgt gtcttgcgtg tccctctccc tagtctaaaa agcaattgaa aaggctatg 2657

20

caataaaaggt ttttgcctcc 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

10

20

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 10
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 20
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

10

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

20

Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn 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 10
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 20
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*

10

⟨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

20

⟨305⟩ 26

⟨306⟩ 1951319520

⟨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		10
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 acc 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	20
gcc act cgc acc ttc cgg gca gat ggg 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 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	10
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		20
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 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 10
 Leu Leu Cys Arg 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 20
 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	
				1104
tcg ccc acc cct gcc cat agc ctg cct cgt gcc aag tcg gag ctg acc				Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr
355	360	365		
				1152
cta acc cca gac cca gcc ccg ccc atg gcc cac tca ccc ctg cat cgt				Leu Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg
370	375	380		10
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		
				1248
cct ggc tcg cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac ggt ggg ggc				Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly
400	405	410		
				1296
cca gag ctg gct ggg gac tgg ggt ggg gct ggg gat gct ccg ctg tcc				Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser
415	420	425	430	20
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		
				1392
cac tca ccc gtc tcc gaa ggg gcc ccc gta att ccc cca tcc tct ggg				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 Arg Ala Phe Arg Leu			

10

20

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

caagcttgtt acccgccggg ggcggggcct acattccaat gggccggagc ttgagctagg 1930

gggtgtggcc tggctgctag agtttgtggtg gcaggggccc tggcccccgtc tcaggattgc 1990

gctcgcttc atgggaccag acgtgatgct ggaagggtggg cgtcgtaacg gttaaagaga 2050

aatgggcctcg tcccgagggt agtgccctgat caatgagggc gggccctggc gtctgatctg 2110

ggccgcctt tacggggcag ggctcagtcc tgacgcttgc caccgtctcc taccggcca 2170

ggatggctga gggcggagtc tattttacgc gtcgcccata gacaggacct ggaatgtact 2230

10

20

ggctgggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc ccatccactc 2290

cggtgccctcc atttagctgg ccaatcagcc caggagggc aggttccccc gggccggcgc 2350

taggatttgc actaatgttc ctctccccgc 2380

10

⟨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

20

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 10

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

Pro Arg 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 20

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

10

Cys Arg 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

20

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

10

20

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

10

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

20

⟨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〉 2372223728

〈308〉 AAC61698

〈400〉 15

Met Trp Trp Cys Cys Val Leu Phe Val Val Glu Cys Pro Arg Gly Leu

1 5 10 15

10

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

20

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

10

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

20

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 Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val
245 250 255

Val Pro Glu Gln Asp Phe 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

【図面の簡単な説明】

発明を説明する目的で、特徴、観点及び利点を図中に示す。しかしながら、本発明は、図中に表されたものに限定されないと理解されるべきである。

【Fig. 1】 (Fig. 1A)

Fig. 1A は、予測されたアミノ酸配列の非 C l u s t a l w アラインメントに基づいたマウスのタイプ 2 スフィンゴシンキナーゼ (m S P H K 2) とヒトのタイプ 2 スフィンゴシンキナーゼ (h S P H K 2) の予測されるアミノ酸配列を示す。同一で保存されたアミノ酸置換はそれぞれ暗灰色及び淡灰色の陰をついている。ダッシュは配列中のギャップを表わす。また、右側上の数は、m S P H K 2 のアミノ酸配列を示す。保存された領域 (C 1 ~ C 5) は、線で示されている。

(Fig. 1B)

Fig. 1B は S P H K 1 と S P H K 2 の保存された領域の説明図である。m S P H K 2 の一次配列が m S P H K 1 a のそれと比較されている。

Fig. 2 A、2 B 及び 2 C は、タイプ 1 及びタイプ 2 スフィンゴシンキナーゼの組織特異的な発現を示すノーザンプロットである。

【Fig. 2】 (Fig. 2A)

Fig. 2 A 中、m S P H K 2 (上段のパネル) 及び m S P H K 1 a (中段のパネル) プローブは、末端が標識され、以下に記載されているようなマウス組織からのポリ (A) + RNA プロットにハイブリダイズした。レーン 1 : 心臓；2 : 脳；3 : ひ臓；4 : 肺；5 : 肝臓；6 : 骨格筋；7 : 腎臓；8 : 精巣。 - アクチンプローブ (下段のパネル) をローディングコントロールとして用いた。

(Fig. 2B)

Fig. 2 B は、h S P H K 2 の組織特異的な発現を示す。レーン 1 : 脳；2 : 心臓；3

10

20

30

40

50

：骨格筋；4：結腸；5：胸腺；6：脾臓；7：腎臓；8：肝臓；9：小腸；10：胎盤；11：肺；12：白血球。

【Fig. 2C】Fig. 2Cは、マウス胚発生中のmSPHK1aとmSPHK2の発現を示す。7日、11日、15日及び17日のマウス胚からのポリ(A)+RNAプロットをFig. 2Aと同様に検出した。

【Fig. 3】Fig. 3A及び3Bは組換えSPHK2の酵素活性を示すグラフである。

(Fig. 3A)

Fig. 3A中、HEK293細胞は、一時的に空のベクターで、またはmSPHK2またはhSPHK2の発現ベクターでトランスフェクトされている。24時間後に細胞質ゾル(白のバー)及び顆粒分画(斜線で塗られたバー)中のSPHK活性を測定した。それぞれ、データは平均値±S.D.である。また、親細胞及びベクターでトランスフェクトされた細胞は、各々26及び37pmol/min/mgの基礎SPHK活性を有していた。

(Fig. 3B)

Fig. 3Bは、SPHK2でトランスフェクトした後のSPPの質量レベルの変化を示す。以下に記載したように、空のベクター(白抜き)で、mSPHK2(左上がりの斜線)で、またはhSPHK2(右上がりの斜線)でトランスフェクトしたHEK293細胞中のSPPの質量レベルを測定した。データはpmol/nmolリン脂質、で表される。

【Fig. 4】Fig. 4A~4Dは、mSPHK2の基質特異性を示すグラフである。

(Fig. 4A)

Fig. 4Aは、mSPHK2でトランスフェクトしたHEK293細胞の細胞質ゾル中で測定された、様々なスフィンゴシン類似体または他の脂質(50mM)のSPHK依存性のリン酸化を示すグラフである。レーン：1：D-エリスロスフィンゴシン(D-erythro Sph)；2：D-エリスロジヒドロスフィンゴシン(D-erythro DHS)；3：D,L-threo DHS；4：N,N-4-ジメチルスフィンゴシン(DMS)；5：C2-セラミド；6：C16-セラミド；7：ジアシルグリセロール；8：ホスファチジルイノシトール；9：フィトスフィンゴシン。データは、D-erythro Sphのリン酸化度(%)として表される。

Fig. 4B~4Dは、N,N-ジメチルスフィンゴシンによる組換えSPHK2の非拮抗的阻害を示すグラフである。

(Fig. 4B)

Fig. 4Bは、DMSによるmSPHK2の投与量依存性の阻害を示す。Fig. 4Aに示すように形質転換した後のHEK293細胞溶菌液中のSPHK活性は、DMSの濃度を増加させながら、10(M)D-エリスロスフィンゴシンを用いて測定された。

(Fig. 4C)

Fig. 4Cは、DMS阻害の反応速度解析を示す。SPHK活性は、DMSの不存在下(白抜きの円)またはこれらの10μM(塗りつぶした四角形)または20μM(塗りつぶした三角形)の存在下で、D-エリスロスフィンゴシンの濃度を変えながら測定した。

(Fig. 4D)

Fig. 4Dは、ラインウィーバー-バーカプロットである。D-エリスロスフィンゴシンのKmは3.4μMであった。DMSのKi値は12μMであった。

【Fig. 5】Fig. 5A~5Eは、mSPHK2に対するpH依存性及び塩の効果を示すグラフである。

(Fig. 5A)

Fig. 5Aは、下記の緩衝剤を使用して調整されたpHを有するリン酸化酵素緩衝剤中で測定された、形質転換されたHEK293細胞中の細胞質ゾルのSPHK2活性を示す：200mM 酢酸ナトリウム(pH 4.5~5.5、白抜きの円)；200mM ME

10

20

30

40

50

S (pH 6 ~ 7、塗りつぶした円) ; 200 mM リン酸カリウム (pH 6.5 ~ 8、白抜きの四角形) ; 200 mM HEPES (pH 7 ~ 7.5、塗りつぶした四角形) ; 200 mM Tris HC1 (pH 7.5 ~ 9、白抜きの三角形) ; 及び 200 mM ホウ酸塩 (pH 10、塗りつぶした三角形)。

Fig. 5 B ~ 5 E は、塩類が SPHK2 を刺激するが、SPHK1 を阻害することを示す。

(Fig. 5 B および Fig. 5 C)

Fig. 5 B 及び 5 C 中、HEK293 細胞溶菌液中の SPHK 活性は、NaCl (白抜きの四角形) または KCl (塗りつぶした円) の非存在下または存在下で、mSPHK1 (Fig. 5 B) または mSPHK2 (Fig. 5 C) でトランスフェクトした 24 時間後に測定した。

(Fig. 5 D)

Fig. 5 D は、KCl による SPHK2 活性化の反応速度解析を示す。mSPHK2 活性は、D-エリスロスフィンゴシンの濃度を変えながら、KCl の非存在下 (白抜きの円) 、50 mM KCl (白抜きの四角形) の存在下、または 200 mM KCl (塗りつぶした四角形) の存在下で測定した。

(Fig. 5 E)

Fig. 5 E は、Fig. 5 D からのデータのラインウィーバー-バーカプロットである。Km 値は KCl の存在によって影響を受けなかった。Vmax 値は、0、50 及び 200 mM の KCl の存在下で、各々 0.1、0.3 及び 1 (nmol/min/mg) であった。

【Fig. 6】 (Fig. 6 A および Fig. 6 B)

Fig. 6 A ~ 6 B は、SPHK1 と SPHK2 の活性に Triton X-100 及びウシ血清アルブミン (BSA) が異なる効果を奏することを示すグラフである。HEK293 細胞は、mSPHK1a (白抜きの円) または mSPHK2 (塗りつぶした円) で形質転換した。また、細胞溶菌液中の各々の活性は、示された濃度の Triton X-100 (Fig. 6 A) または BSA (Fig. 6 B) の存在下で、24 時間後に測定された。

(Fig. 6 C)

Fig. 6 C は、ホスファチジルセリンが、SPHK1 と SPHK2 の活性に対して同様の効果を持つことを示すグラフである。HEK293 細胞は mSPHK1a (円) または mSPHK2 (三角形) で形質転換した。また、細胞溶菌液中の各々の活性は、示された濃度のホスファチジルセリン (塗りつぶした記号) またはホスファチジルコリン (白抜きの記号) の存在下で 24 時間後に測定した。データは、添加物の非存在下で測定した対照の活性に対するパーセンテージで示した。

【図 1 A - 1】

【図 1 A】

FIG.1A-1

FIG.1A-2

Sequence alignment of mSPHK1, mSPHK2, and hSPHK2. The alignment shows the amino acid sequence for each protein, with mSPHK1 and mSPHK2 sharing a high degree of similarity (79% identity, 83% similarity) and both being highly similar to hSPHK2 (47% identity, 78% similarity). The alignment is divided into four regions: C1 (residues 1-180), C2 (residues 181-300), C3 (residues 301-360), and C4 (residues 361-617). The alignment highlights conserved regions and differences between the proteins.

FIG.1A-1

【図 1 A - 2】

【図 1 A】

FIG.1A-2

Sequence alignment of mSPHK1, mSPHK2, and hSPHK2. The alignment shows the amino acid sequence for each protein, with mSPHK1 and mSPHK2 sharing a high degree of similarity (79% identity, 83% similarity) and both being highly similar to hSPHK2 (47% identity, 78% similarity). The alignment is divided into four regions: C1 (residues 1-180), C2 (residues 181-300), C3 (residues 301-360), and C4 (residues 361-617). The alignment highlights conserved regions and differences between the proteins.

mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2

370 380 390 400 410 420

mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2

430 440 450 460 470 480

mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2

490 500 510 520 530 540

mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2

550 560 570 580 590 600

mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2

610 620 630

mSPHK1
mSPHK2
hSPHK2

630

C5

FIG.1A-1

【図 2 A】

mSPHK2
mSPHK1
 β -actin

1 2 3 4 5 6 7 8 - 3.1 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 - 2.2 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 - 2.2 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 - 1.7 kb

FIG.2A

【図 2 B】

hSPHK2
 β -actin

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 2.8 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 2.2 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 1.7 kb

FIG.2B

【図 2 C】

mSPHK2
mSPHK1
 β -actin

E7
E11
E15
E17

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 3.1 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 2.2 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 2.2 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 - 1.7 kb

FIG.2C

【図 1 B】

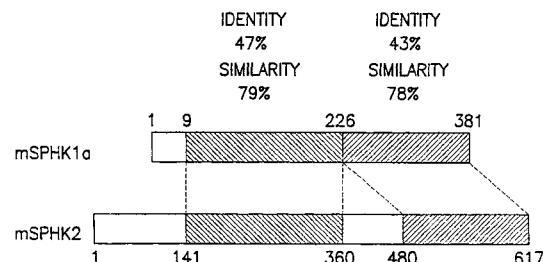


FIG.1B

【図3A】

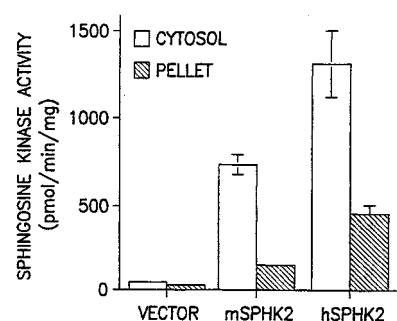


FIG.3A

【図3B】

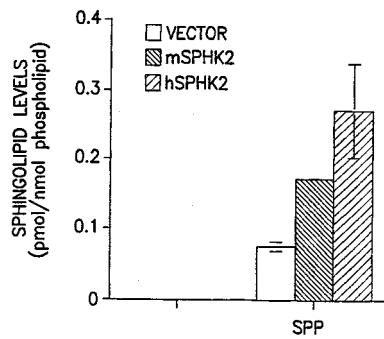


FIG.3B

【図4A】

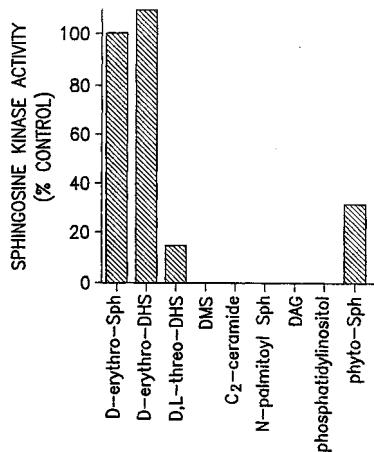


FIG.4A

【図4B】

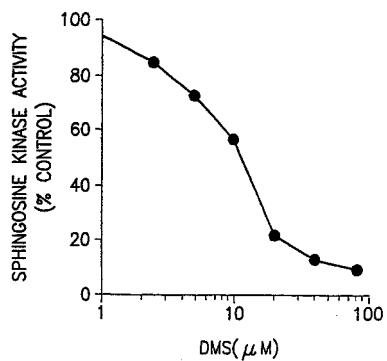


FIG.4B

【図4D】

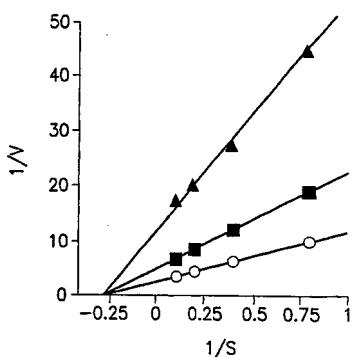


FIG.4D

【図4C】

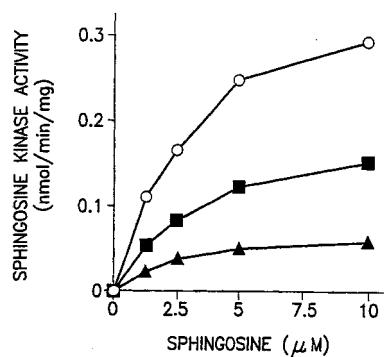


FIG.4C

【図5A】

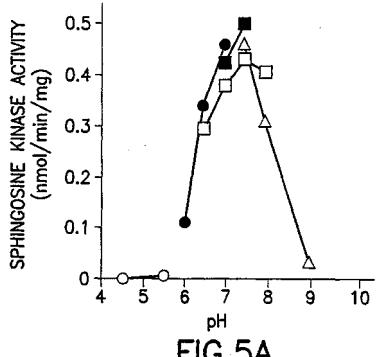


FIG.5A

【図 5 B】

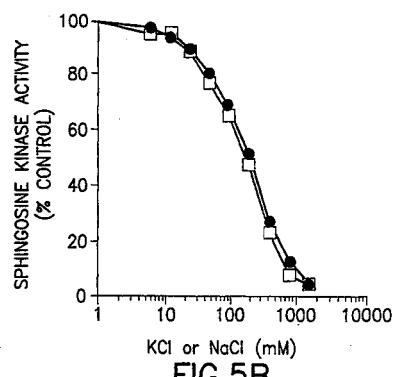


FIG.5B

【図 5 D】

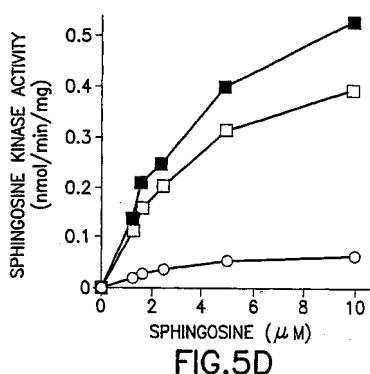


FIG.5D

【図 5 C】

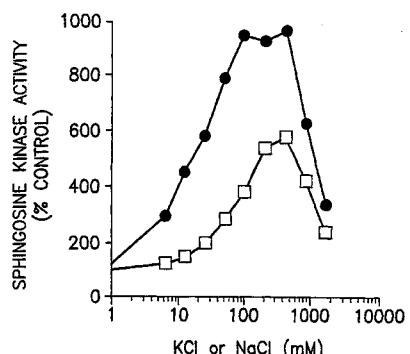


FIG.5C

【図 5 E】

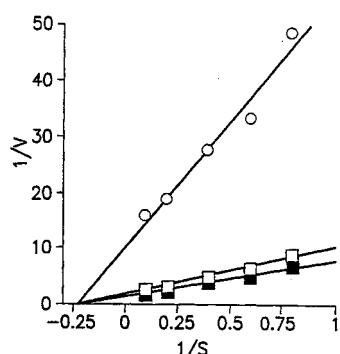


FIG.5E

【図 6 A】

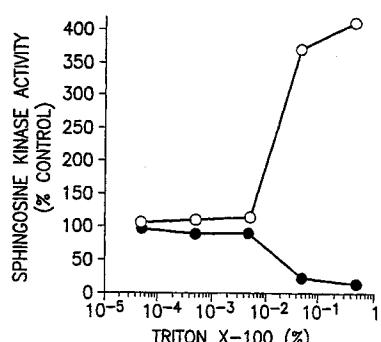


FIG.6A

【図 6 C】

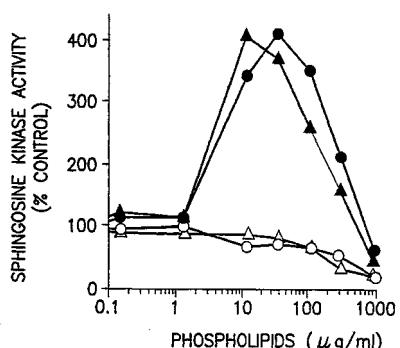


FIG.6C

【図 6 B】

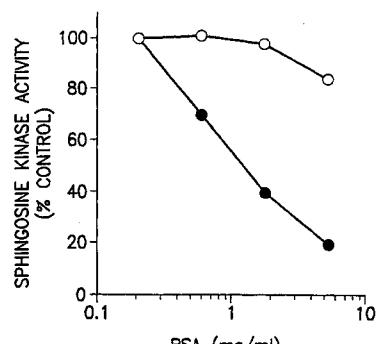


FIG.6B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K	16/40	
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/573	(2006.01)	G 0 1 N	33/573	A
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 1
			A 6 1 P	43/00	1 0 5
			A 6 1 P	43/00	1 1 1

(72)発明者 サラ シュピ - ゲル

アメリカ合衆国 ヴァ - ジニア州 2 2 1 0 1
6 3 4 3 マクリーン、 リンウェイ テラス

(72)発明者 古濱 孝文

日本国東京都清瀬市元町1 - 4 - 5 - 6 1 4

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 J.B.C., 1998, 273(37), p.23722-23728

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90
 C12N 9/00-9/99
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 PubMed
 WPI
 BIOSIS(STN)
 CAplus(STN)
 MEDLINE(STN)