

(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 I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 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)	(73) 特許権者	307010166
(86) (22) 出願日	平成13年3月26日(2001.3.26)		第一三共株式会社
(65) 公表番号	特表2004-500117 (P2004-500117A)		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(43) 公表日	平成16年1月8日(2004.1.8)	(74) 代理人	100115750
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/009664		弁理士 矢口 敏昭
(87) 国際公開番号	W02001/074837	(73) 特許権者	399129308
(87) 国際公開日	平成13年10月11日(2001.10.11)		ジョージタウン ユニヴァーシティー
審査請求日	平成19年10月24日(2007.10.24)		アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー
(31) 優先権主張番号	60/194,318		20057 ボックス 571246
(32) 優先日	平成12年4月3日(2000.4.3)		エヌダブリュ サーティーセヴンス アン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ド オー ストリート
(31) 優先権主張番号	09/817,676	(74) 代理人	100115750
(32) 優先日	平成13年3月26日(2001.3.26)		弁理士 矢口 敏昭
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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。

【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】

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 1 2 又は 1 4 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 のいずれかに記載の組換え 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 1 1 又は配列番号 1 3 に記載のヌクレオチド配列中の連続した 1 8 乃至 4 0 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 1 1 又は配列番号 1 3 に記載のヌクレオチド配列中の連続した 2 0 乃至 5 0 0 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 1 3 乃至 1 4 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 1 5 に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1 3 乃至 1 4 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の特徴とする請求項 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随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てい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(VEN)からの博士号取得後奨学金BC961968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)

スフィンゴシン-1-ホスフェート(SPP)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EDG-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; Goetzl, E. J., An, S. FASEB J., 12, (1998), 1589-1598)。従って、SPP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)。

30

【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SPPを生成させる酵素であるスフィンゴシンキナーゼ(SPHK)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(PDGF)(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(NGF)(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- $\alpha$  (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Fc $\epsilon$ R1の架橋(Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J. P., *Nature*, 380, (1996), 634-636)及びFc $\gamma$ R1(Melendez, A., Floto, R. A., Gilooly, D. J., Harnett, M. M., and Allen, J. M., *J. Biol. Chem.*, 273 (1998), 9393-9402)。

#### 【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., 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)、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., 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)。

#### 【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SPHK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)。

#### 【0008】

さらに、SPHK経路はSPPの生成を通じて、TNF- $\alpha$  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)、高密度リボタンパク質(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.

10

20

30

40

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ット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 Milstien, 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., Milstien, 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., Milstien, 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】

S P P 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 S P H K 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), 12576-12583)、続いて最初の哺乳類 S P H K がクローン化され、m S P H K 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、L C B 4 及び L C B 5 と命名された二つの遺伝子も、*Saccharomyces cerevisiae* 中の S P H K 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、m S H P K 1 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 S P H K 1 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 S H P K アイソフォームがあり得ることを示唆している。

#### 【 0 0 1 2 】

血小板中の S P H K 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 S P H K 阻害剤による阻害といういくつかの型に分画されうるのであるという発見は、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、N C B I の発現配列タグ (d b E S T) のいくつかは m S P H K 1 a の保存された領域に対してかなり高い相同性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。

#### 【 0 0 1 3 】

U S P 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。

#### 【 0 0 1 4 】

W O 99/61581 には、マウスのスフィンゴシン S P H K 1 a (381 アミノ酸) 及び S P H K 1 b (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。

#### 【 0 0 1 5 】

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。

#### 【 0 0 1 6 】

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方法を提供することにある。

#### 【 0 0 1 7 】

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。

#### 【 0 0 1 8 】

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の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：

(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（例えばミトジェネシス、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。

【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の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の治療または改善のための方法に関する。

【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の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 (ii) 薬理的に許容される担体を含む組成物に関する。

【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

10

20

30

40

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  
( i i ) 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。

【 0 0 2 8 】

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。

【 0 0 2 9 】

本発明は、スフィンゴシンキナーゼタイプ 2 R N A または c D N A 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 R N A または c D N A 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 R N A / c  
D N A の検出のための診断キットに関する。

【 0 0 3 0 】

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、S P P 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 ( S P H K 1 ) (   
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  
S P H K 2 と h S P H K 2 ) 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  
。

【 0 0 3 1 】

本発明の m S P H K 2 及び h S P H K 2 は、6 1 7 及び 6 1 8 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 S P H K 1 より大きく、いずれも既に S P H K 1 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ブロット分析により、S P H K 2 の  
m R N A 発現が S P H K 1 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。S P H K 1 の発現は 7 日齢マウス胚において  
最大となるのに対し、S P H K 2 の発現は 1 1 日齢の胚で初めて検出可能であり、その後  
増加する。

【 0 0 3 2 】

m S P H K 2 または h S P H K 2 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  
2 9 3 腎細胞において、S P H K 活性の増加が認められ、その結果 S P P レベルが高くな  
った。明らかに、S P H K 2 は S P H K 1 とは多少異なる基質特異性を有していた。D -  
エリスロスフィンゴニン ( ジヒドロスフィンゴシン , D H S ) は S P H K 2 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、D H S は S P H K 1 の有力な  
阻害剤であった。

【 0 0 3 3 】

より少ない程度ではあるが、S P H K 2 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。S P H K 1 の拮抗阻害剤  
である D M S は驚くべきことに S P H K 2 の非拮抗阻害剤であった。イオン強度を高めると  
S P H K 1 が阻害されたが、K C l と N a C l は著しく S P H K 2 活性を刺激した。さら  
に、T r i t o n X - 1 0 0 及び B S A は S P H K 1 に対するそれらの影響とは対照  
的に、S P H K 2 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、S P H K 2 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、例えばミトジェネシス、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であることを示す  
。

( 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

10

20

30

40

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Clustalw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(mSPHK2)とヒトのタイプ2スフィンゴシンキナーゼ(hSPHK2)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けている。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、mSPHK2のアミノ酸配列を示す。保存された領域(C1~C5)は、線で示されている。

Fig. 1 BはSPHK1とSPHK2の保存された領域の説明図である。mSPHK2の一次配列がmSPHK1a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ブロットである。

#### 【0034】

Fig. 2 A中、mSPHK2(上段のパネル)及びmSPHK1a(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ブロットにハイブリダイズした。レーン1:心臓;2:脳;3:心臓;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、hSPHK2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。

Fig. 2 C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ブロットをFig. 2 Aと同様に検出した。

#### 【0035】

Fig. 3 A及び3 Bは組換えSPHK2の酵素活性を示すグラフである。

#### 【0036】

Fig. 3 A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37 pmol/min/mgの基礎SPHK活性を有していた。

#### 【0037】

Fig. 3 B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。

#### 【0038】

Fig. 4 A~4 Dは、mSPHK2の基質特異性を示すグラフである。

#### 【0039】

Fig. 4 A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(50 mM)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:フィツスフィンゴシン。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 S P H K 2 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 m S P H K 2 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 H E K 2 9 3 細胞溶菌液中の S P H K 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。S P H K 活性は、DMS の不存在下 (白抜きの円) またはこれらの 10  $\mu$  M (塗りつぶした四角形) または 20  $\mu$  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 - パ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  $\mu$  M であった。DMS の  $K_i$  値は 12  $\mu$  M であった。

【0043】

Fig. 5 A ~ 5 E は、m S P H K 2 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 H E K 2 9 3 細胞中の細胞質ゾルの S P H K 2 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 M E 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 H E P E S (pH 7 ~ 7 . 5、塗りつぶした四角形)；200 mM T r i s H C l (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 S P H K 2 を刺激するが、S P H K 1 を阻害することを示す。

【0046】

Fig. 5 B 及び 5 C 中、H E K 2 9 3 細胞溶菌液中の S P H K 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、m S P H K 1 (Fig. 5 B) または m S P H K 2 (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 S P H K 2 活性化の反応速度解析を示す。m S P H K 2 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 - パークプロットである。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。

【0049】

Fig. 6 A ~ 6 B は、S P H K 1 と S P H K 2 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。H E K 2 9 3 細胞は、m S P H K 1 a (白抜きの円) または m S P H K 2 (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、S P H K 1 と S P H K 2 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。H E K 2 9 3 細胞はm S P H K 1 a ( 円 ) または m S P H K 2 ( 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 2 4 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 D N A または c D N A セグメントに関する。

#### 【 0 0 5 1 】

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 D N A 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 m R N A のコドンを E . c o l i 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。

#### 【 0 0 5 2 】

本発明の核酸分子は、m R N A のような R N A 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 c D N A 及びゲノム D N A を含む D N A の形態でもよい。D N A は二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖 D N A または R N A 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。

#### 【 0 0 5 3 】

「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、D N A または R N A を意味する。例えば、ベクターに含まれている組換え D N A 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 D N A 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え D N A 分子または溶液で ( 部分的にまたは実質的に ) 精製された D N A 分子が挙げられる。単離された R N A 分子は、本発明の D N A 分子の i n v i v o または i n v i t r o の R N A 転写物を含む。本発明における単離された核酸分子は、合成的に産生された分子をも含む。

#### 【 0 0 5 4 】

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、F i g . 1 A の m S P H K 2 と h S P H K 2 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 1 0 の連続するヌクレオチドの長さを有し、F i g . 1 A 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 1 0 または 1 0 と、F i g . 1 A の m S P H K 2 または h S P H K 2 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。

#### 【 0 0 5 5 】

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 2 0 乃至 5 0 のヌクレオチドを含む ; 5 0 乃至 3 0 0 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、F i g . 1 A の中で示される領域 C 1 - C 5 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、ストリンジェ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。「ストリンジェ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(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt's溶液、10%硫酸デキストラン及び20µg/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】

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。

## 【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。

## 【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配列を含む組換え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、またはバキュロウィルスベクター、レトロウィルスのベクターまたはアデノウィルスのベクターのようなウィルスベクター、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)、p c

10

20

30

40

50

DNA 3 (Invitrogen社)である。

【0061】

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。

【0062】

別の実施態様において、本発明は、上記の組換えDNA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

【0063】

指定の宿主と互換性を有する適当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クターは、一般に、例えばpBR322、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、及び抗生物質耐性マーカーを付与する配列を含む様々なpUC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

【0064】

ヒトのSPHK2をコードするcDNAが挿入されたプラスミドを有する形質転換体、即ちE.coli pCR3.1-hSPHK2 SANK 70200は、〒305-8566 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、2000年3月29日に受託番号FERMBP-7110で寄託されている。

30

【0065】

本発明のDNA配列は、IgG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SPHK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。組換え分子は、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当であり得る。Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces carlsbergensis及びPichia pastaris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、HEK293細胞及びNIH3T3細胞が挙げられる。適当なプロモーターも当該分野で知られており、例えばSV40、ラウス肉腫ウイルス(「RSV」)、アデノウイルス(「ADV」)、ウシ乳頭腫ウイルス(「BPV」)及びサイトメガロウイルス(「CMV」)のようなウイルスのプロモーターが挙げられる。

40

【0066】

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。

【0067】

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ということができる。

【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、例えばアジュバント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。

【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デキストラン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。

【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。

【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砕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

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（LC）、高性能LC（HPLC）、高速LC（FPLC）、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る。並びに下記のように試料中のSPP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SPHK2の発現をダウンレ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、SPHK2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できる。

#### 【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）。

#### 【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の検出及び定量的ための分析を、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PCR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巻及び第2巻（1985）またはAusubel, F. M.ら編「Current Protocols in Molecular Biology」（Wiley & Sons, Inc.刊）が参考になるだろう。

#### 【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、AF068748及び/またはAF068749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。

#### 【0079】

当該分野の技術者は、かなり長い、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

10

20

30

40

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。

#### 【0080】

スフィンゴシンキナーゼタイプ2のDNA配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または逆転写PCR（RT-PCR）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 RNA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 cDNA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。

#### 【0081】

PCRまたはRT-PCR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、増幅産物は、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 RNA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。

#### 【0082】

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 RNA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PCRまたはRT-PCR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 RNA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。

#### 【0083】

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。

#### 【0084】

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。

#### 【0085】



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、例えば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の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挙げられる： $^3\text{H}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{152}\text{Eu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{21}\text{Ci}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{19}\text{F}$ 及び $^{131}\text{I}$ 。

【0090】

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

30

【0091】

適当な蛍光標識の例としては、 $^{152}\text{Eu}$ 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、シュ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。さもないと、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、診断アッセイは、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イ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、漿液性嚢胞腺癌及び粘液性嚢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、膵臓の腺癌、胆道の腺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、腺癌及びミューラ擬態の腫瘍(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、子宮腔部及び腔の癌、基底細胞癌、黒色腫及び皮膚外肢腫瘍、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、軟組織肉腫、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DL-トレオジヒドロスフィンゴシン(DHS)、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(DMS)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の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の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ボ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 $Ca^{2+}$ 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

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の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1 pg/kgから10 mg/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、またはより高い量を投与することもできる。

【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 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。

【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単位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、

10

20

30

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

S P P、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 - 3 2 P ] A T P ( 3 0 0 0 C i / m m o l ) 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 ) + R N A 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 ( m S P H K 2 ) の c D N A クローニング

E S T データベースの B L A S T サーチにより、m S P H K 1 a (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性を有するが、実質的な配列差を有するマウス E S T クローン ( G e n B a n k 受託番号 A A 8 3 9 2 3 3 ) を同定した。この E S T を使用して、2 つの異なる P C R アプローチによって、m S P H K 2 で示される S P H K 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 c D N A ライブラリー (Stratagene) からの P C R クローニングが使用された。約  $1 \times 10^6$  のファージを、20 枚の 150 mm のプレートに入れ、プラークを集め、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 P C R 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 M 1 3 リバースプライマーを用いて行なわれた。最長の P C R 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 T 3 プライマーを含む第二の P C R のための鋳型として使用した。最終 P C R 産物を、「T O P O T A」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 D N A ポリメラーゼを用いて、下記のサイクルパラメーターの P C R 増幅を行った: 94 で 30 秒、55 で 45 秒及び 70 で 2 分を 30 サイクルと、最終プライマー伸長を 72 で 5 分。

#### 【0112】

第二のアプローチにおいて、c D N A 末端の迅速な増幅用の 5' R A C E システム (ライフテクノロジー) を用いてメーカーのプロトコルに従い、5' R A C E P C R を実施した。ポリ ( A ) + R N A は Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いて、Swiss 3 T 3 繊維芽細胞から単離された。第一の c D N A 鎖は 5 m g の Swiss 3 T 3 ポリ ( A ) + R N A により、A A 8 3 9 2 3 3 の配列から設計された標的アンチセンスプライマー ( m - G S P 1、5'-AGGTAGAGGCTTCTGG (SEQ ID No. 3) ) 及び S u p e r S c r i p t I I 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて、42 50 分間で合成した。この c D N A を鋳型とし、L A T a q ポリメラーゼ (Takara) を用いて、連続二回の P C R 反応が、以下のように行なわれた: 第 1 の P C R については、5' R A C E

A b r i d g e d アンカープライマー 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG (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'-GCGATGGGTGAAAGC TGAGCTG (SEQ ID NO: 5) を用い、94 で2分に続いて、94 で2分、55 で1分、72 で2分のサイクルが30サイクル、及び72 で5分のプライマー伸長を行なった；第2のPCRについては、兄-リング温度が65 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'-GGCCACGCGTCGACT AGTAC (SEQ ID NO: 6) 及びm-GSP3、5'-AGTCTCCAGTCAGCTCTGGACC (SEQ ID NO: 7) を用いる。PCR産物はPCR2.1ヘクローニングし、配列決定した。このPCR産物をPCR3.1及びpcDNA3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 H E K 2 9 3 細胞からのポリ (A) + R N A を 5' R A C E 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-GSPI、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 E S T クローン (受託番号 A A 2 9 5 5 7 0) の配列から設計した。第一の鎖 c D N A は、5 µg の H E K 2 9 3 m R N A 及び h - G S P 1 を用いて合成した。5' R A C E A b r i d g e d アンカープライマーと h - G S P 2 を用いて行なう最初のPCR反応において、このcDNAを鋳型として用いた。その後、ネステッドPCRを、A U A P プライマーと h - G S P 3 を使用して行なった。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

ヒト胚腎細胞 (H E K 2 9 3 (ATCC CRL-1573)) 及び N I H 3 T 3 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。H E K 2 9 3 細胞をポリ L リジンをコートした6ウェルプレートに、 $6 \times 10^5$  / 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。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 B S A との複合体として調製されたスフィンゴシン及び200 mM K C l を含有するキナーゼ緩衝液中の [ g - 3 2 P ] A T P 緩衝液 (Olivera, A. と Spiegel, S. 著, Bird, I. M. 編「Methods in Molecular Biology」(1998), Vol. 105, 233-242, Humana Pres, Inc., Totowa, N.J.) の存在下で測定した。3 2 P - S P P は T L C によって分離され、前記のphosphoimagerで測定した。

実施例4： S P P 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 N a C l (1:1, v / v) 及び100 µl の3 N N a O H を添加し、相を分離することにより脂質を抽出した。S P P 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 N a C l (1:1, v / v)、及び50 µl の3 N N a O H で再抽出し、水相を合わせた。水相中のS P P 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： ノーザンブロッティング分析

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) + R N A を1レーン当

10

20

30

40

50

たり 2  $\mu$ 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 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PvuII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データベースのブ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性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アラインメントを、Fig. 1Aに示す。mSPHK2及びhSPHK2のオープ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領域中の不変の正の変化を受けたモチーフGGKGKモチーフは、SPHK2の中のGGRGL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性を有していることを明らかにした。

#### 【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の後には、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性領域がある(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、ノーザンブロットティング(Fig. 2A)によってSPHK1のそれと比較した。成体の肝臓、心臓、腎臓、睪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 2.8 kb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是るかに低い。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ので(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NIH 3T3繊維芽細胞は、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-Doolittle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SPが2.2倍及び3.3倍になるという増加をもたらした(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に対しかなり高い相同性を有するが、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K<sub>m</sub>は、3 . 4 μMでありS P H K 1について既に見出されているK<sub>m</sub>(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S P H K 1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、S P H K 2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(F i g . 4 A)。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S P H K 1によって全くリン酸化されなかったが、S P H K 2によっては、スフィンゴシンよりはるかに低い効率ではあったがかなりリン酸化された。S P H K 1と同様に、N, N - ジメチルスフィンゴシン(D M S)を含む他の脂質、C 2またはC 16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、S P H K 2(F i g . 6 A)によってリン酸化されなかった。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。

#### 【 0 1 1 6 】

D M S 及びD H S は、S P H K 1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S P P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. 13., Vanek, P. G., Coe, 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、D H S は、S P H K 2の基質であるので、その生産物であるジヒドロS P Pは、細胞表面S P P E D G - 1類レセプターへの結合及び活性化については、S P Pと同じくらい有力であり、S P H K 2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。従って、S P H K 2に対する基質ではないD M S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、D M SはS P H K 2(F i g . 4 B)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(F i g . 4 C 及び F i g . 4 D)。S P H K 2によるD M SのK<sub>i</sub>値は、S P H K 1によるK<sub>i</sub>値、4 μMよりわずかに高いため、両方のタイプのS P H Kを阻害する有用なツールとなる。

#### 【 0 1 1 7 】

m S P H K 2は、6 . 5乃至8の中性のp H範囲で最高の活性を有し、p H 7 . 5で最適の活性を有していたが(F i g . 5 A)、p H依存性はS P H K 1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p H値では著しく減少した。

#### K C l 及びN a C l の影響

ヒトの血小板におけるS P H K活性の殆どは、膜に関連し、1 M N a C l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S P H Kは細胞質ゾルの酵素とは異なる特性を有している。従って、組換えS P H K 1及びS P H K 2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。S P H K 1はN a C l及びK C lのいずれによっても著しく阻害され、200 mM(F i g . 5 B)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 l では N a C l よりはるかに有効であった。しかしながら、この濃度より 1 M 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 ( F i g . 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 K m 値は変化しないが V m a x 値は増加することを示した ( F i g . 5 D 及び F i g . 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

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 - 100 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 - 100 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 - 100 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 ( F i g . 6 A )。0.5 % T r i t o n X - 100 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。

#### 【 0 1 1 8 】

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 ( F i g . 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 - 100 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。

#### 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、並びにカルジオリピンは、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 µ g / 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で、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)。

#### 【 0 1 1 9 】

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

10

20

30

40

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)。

【 0 1 2 0 】

S P H K 1との著しい相同性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. cerevisiae*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と高い相同性を有するが、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 . 6 k D aであるのに対し、m S P H K 1 aは42 . 4 k D a)、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。

【 0 1 2 1 】

【表1】

(表1 - 1)

10

20

Sequence for GenBank 1 EMBC Bank Accession No.  
bankit325787

```

1 aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggettcca gaaccaaaga gaagtcagcc
61 tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggcctttcc cegtcctctg tctaactctc
121 tccaggggta aagggaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg
181 tgggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcgggtggc tcgcgaggga cccgggtgggc
241 tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggctct
301 gccatttaaa gttgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta
361 ggagtgcttg ggactgaacc agggatcatg cccaccacc actactgcca gtggctgcca
421 gcaactccat cctgcacggc gagtttggtt cctaccggc caacggccca cggtttgccc
481 tcaccctcac aacacaagcc ctacacatac agcgactacg cccaaagcca gaagcccgcc
541 cccagatagg tctagtctct ctggatgagg tctcgggctg tggcaccctg cagagccgta
601 gcccggagga cactgcagcc tactttctga tctacaccta cccacgtggc cgtcggggg
661 gccggcgag agctacggcg accttcgggg cggatggggc caccacttat gaggagaatc
721 gtgcagaggg ccagcgctgg gccactgccc tcacgtgtct cctccgagga gtgcctctgt
781 caggggacca ggaaatcacc cctgaattgc tgcgccgaa gccaggctg ctcatattgg
841 tcaatccctt tggggggcgg ggcctggcct ggcagcgctg tatggaccac gtgggtccaa
901 tgatctctga agctgggctg tccttcaacc tcatacagac agaacgacag aaccatgccc
961 gtgagctggg gcaggggtta agcctgagtg agtgggaagg cattgtcact gtgtctggag
1021 acgggctgct ttacgaggtg ctgaatgggc tccttgatcg gccagactgg gaggatgccg
1081 tgcggatgcc cattggtgtc ctccctgtg gatcgggcaa tgcgctagct ggggcgggtga
1141 gccatcatgg cgggtttgag cagggtgtcg gtgttgacct gttgctcaac tgcctcctc
1201 ttctctgccc tgggtggcag cactctctgg acctgctctc tgtgacgcta gcctcgggat
1261 cccgctgttt ttcttctctg tcagtggcct ggggattctt gtcagatgtg gacattcaca
1321 gtgagcgctt cagggccctg ggcagcgctc gattcacact ggggtgcagt ctaggcctgg
1381 cctcgttgca tacctaccgt ggacgcctct cctacctccc cgtaccaca gaaccagcct
1441 tgccatccc aggccacagt ctgcctcgag ccaagtcaga actagtcttg gctccagccc
1501 cagccccgcg cgcacccac tcgcctctac atcgatctgt gtctgacctg cccctgcccc
1561 ttccccagcc tgccttggtc tcccctggct cccctgagcc cctgcctgac ctgtccctca
1621 atggtggtgg tccagagctg actggagact ggggaggagc tggggatgca cctctgtccc
1681 cagacccact gctgccttca tcccccaacg ctctcaaaac agctcagctt tcacccatcg
1741 ctgaagggcc cccagaaatg ccagcatctt cggggttcct gcctcccacc cacagtgcce
1801 cagaagcctc tacctggggc ccagtggacc acctcctccc tcccctgggc tctccactgc
1861 cccaagactg ggtgacaata gagggggagt ttgtactcat gttgggcata ttgacgagcc
1921 acctctgcgc agacctgatg gcagccccac atgcacgctt tgatgatggc gttgtgcacc
1981 tgtgttgggt gcggagcggc atctcacggg ctgcacttct acgcattttt ctggccatgg
2041 agcatggaaa ccacttcagc ctgggctgcc cccatctggg ctatgctgca gcacgtgcct

```

10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

( 表 1 - 2 )

2101 tccgccttga accactcacg cctcgtggcc tgctcactgt agatggggag ttagtgaggt  
 2161 atggggccaat acaggcgcag gtgcacccag gtctcgccac gctgctcact gggcctgcag  
 2221 gtcaaaagcc acaagcctga acgagcctaa aagcatggcg agttggtgga accagcgccc  
 2281 cataggctaa gatctatcat ttacaggtag aagtggggcc cgcactcaga actgtgagga  
 2341 ggggtggagag tggctcctgac cctcagttcc cagaggacct agaggctcga ggggtggggcc  
 2401 tgcctttctt gatgtccaat gatggggcct ggaatgtatg agctagcaag gcttcttcag  
 2461 cttattgacc agccagggtt tcttcttgcc tactccggtg cctctacttg actggccaat  
 2521 cagcccttga ggggcagggt ccccagggtg gtcccagat ttgcactaat gttcctcccc  
 2581 tggccagtta gggatgggat gttctgtgtc ttgtgtgtcc ctctccctag tctaaaaagc  
 2641 aattgaaaag gtctatgcaa taaaggttgt tgcttccttc taaaaaaaaa aaaaaaaa

10

Sequence for Gen Bank 1 EMBC Bank Accession No.bankit325752

1 gccaccatgg ccccgcccc accgccaactg gctgccagca ccccgctcct ccattggcgag  
 61 tttggctcct acccagccc agggccaacgc tttgccctca cctttacatc gcaggccctg  
 121 cacatacagc ggctgcgccc caaacctgaa gccaggcccc ggggtggcct ggtcccgttg  
 181 gccgaggtct caggctgctg caccctgcga agccgcagcc cctcagactc agcggcctac  
 241 ttctgcatct acacctaccc tcggggccgg cgcggggccc ggcgcagagc cactcgcacc  
 301 ttccgggcag atggggccgc cactacgaa gagaaccgtg ccgaggccca gcgctgggccc  
 361 actgcctca cctgtctgct ccgaggactg cactgcccg gggatgggga gatcacccct  
 421 gacctgctac ctcgcccgcc ccggttgctt ctattggtca atccctttgg gggtcggggc  
 481 ctggcctggc agtgggtgtaa gaaccacgtg ctcccatga tctctgaagc tgggctgtcc  
 541 ttcaacctca tccagacaga acgacagaac cagcccggg agctgggtcca ggggctgagc  
 601 ctgagttagt gggatggcat cgtcacggtc tcgggagacg ggctgctcca tgagggtgctg  
 661 aacgggctcc tagatcgccc tgactgggag gaagctgtga agatgcctgt gggcatcctc  
 721 ccctgcggct cgggcaacgc gctggccgga gcagtgaacc agcacggggg atttgagcca  
 781 gccctgggccc tcgacctgtt gctcaactgc tcaactgttg tgtgccgggg tgggtggccac  
 841 ccaactggacc tgctctccgt gacgctggcc tcgggctccc gctgtttctc ctctctgtct  
 901 gtggcctggg gcttcgtgtc agatgtggat atccagagcg agcgttcag ggccttgggc  
 961 agtgcccgtc tcacactggg caccgtgctg ggcctcgcca cactgcacac ctaccgcgga  
 1021 cgcctctcct acctccccgc cactgtggaa cctgcctcgc ccacctctgc ccatagcctg  
 1081 cctcgtgcca agtcggagct gacctaaccc ccagacccag ccccgcccat ggccactca  
 1141 cccctgcatc gttctgtgtc tgacctgctt ctccctctgc ccagcctgc cctggcctct  
 1201 cctggctcgc cagaacctct gcccatcctg tccctcaacg gtggggggccc agagctggct  
 1261 ggggactggg gtggggctgg ggatgctccg ctgtccccgg accactgct gtcttcacct  
 1321 cctggctctc ccaaggcagc tctacactca cccgtctccg aaggggcccc cgtaattccc  
 1381 ccactcctct ggtcccaact tcccacctct gatgcccggg taggggcctc cgacctgcggc  
 1441 ccgcccagac acctgctgcc tccgctgggc acccgcctgc cccagactg gtgacgctg  
 1501 gagggggact ttgtgctcat gttggccatc tcgcccagcc acctaggcgc tgacctggtg  
 1561 gcagctccgc atgcgcgctt cgacgacggc ctgggtgcacc tgtgctgggt gcgtagcggc

20

30

40

【 0 1 2 3 】

( 表 1 - 3 )

1621 atctcgcggg ctgcgctgct ggcgccttttc ttggccatgg agcgtggtag ccacttcagc  
 1681 ctgggctgtc cgcagctggg ctacgccgag gcccgctgct tccgcctaga gccgctcaca  
 1741 ccacgcggcg tgctcacagt ggacggggag caggtggagt atgggcccgt acaggcacag  
 1801 atgcaccctg gcatcggtag actgctcact gggcctcctg gctgcccggg gggggagccc  
 1861 tgaaactaaa caagcttggg acccgccggg ggcggggcct acattccaat gggcgggagc  
 1921 ttgagctagg ggggtgtggc tggctgctag agttgtggtg gcagggggcc tggccccgtc  
 1981 tcaggattgc gtcgcctttc atgggaccag acgtgatgct ggaagggtgg cgtcgtcacg  
 2041 gttaaagaga aatgggctcg tcccgagggt agtgcctgat caatgagggc ggggcctggc  
 2101 gtctgatctg gggccgccct tacggggcag ggctcagtc tgacgcttgc cacctgctcc  
 2161 taccgggcca ggatggctga gggcgagtc tattttacgc gtcgcccaat gacaggacct  
 2221 ggaatgtact ggctggggtg ggcctcagtg agtcggccgg tcagggggcg cagcctcgcc  
 2281 ccatccactc cgggtgcctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttccccg  
 2341 gggccggcgc taggatttgc actaatgttc ctctccccgc

10

## SEQ ID NO. 14

## Amino acid sequences of human SPHK2

MAPPPPLAASTPLLHGEFGSYPARGPRFALTTLTSQALHIQRLRPKPEARPRGGLVPLAEVSGCCTLRSR  
 SPDSAAAYFCIYTYPRGRRGARRRATRTFRADGAATYEENRAEAQRWATALTCLLRGLPLPGDGEITPDL  
 LPRPPRLLLLVNPFGGRLAWQCKNHVLPIMISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSEWDGIVTVSG  
 DGLLHEVLNGLLDRPDWEEAVKMPVIGILPCGSGNALAGAVNQHGGFEPALGLDLLNCSLLLCRGGGHPL  
 DLLSVTLASGSRCSFSLVAVGFVSDVDIQSERFRALGSARFTLGTVLGLATLHTYRGRLSYLPATVEPA  
 SPTPAHSLPRAKSELTLTPDPAPMAHSPHRSVSDLPPLPQPALASPGSPEPLPILSLNGGGPELAGD  
 WGGAGDAPLSPDPLSSPPGSPKALHSPVSEGAPVIPSSGLPLPTPDARVGASTCGPPDHLPLPLGTP  
 LPPDWVTLEGDFVLMLAISPSHLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRALLRFLAMERGSHFSLG  
 CPQLGYAAARAFLRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPPGCPGREP

20

## SEQ ID NO. 12

## Amino Acid Sequence of mouse SPHK2

MAPPPPLPVAASTPILHGEFGSYPANGPRFALTTLTQALHIQRLRPKPEARPRDGLVSLDEVSGCGTLQS  
 RSPEDTAAYFCIYTYPRGRRGARRRATRTFRADGATTYEENRAEAQRWATALTCLLRGVPLSGDQEITPE  
 LLPRKPRLILLVNPFGGRLAWQRCMDHVVPIMISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSEWEGIVTVS  
 GDGLLYEVLNGLLDRPDWEDAVRMPIGVLP CGSGNALAGAVSHHGGFEQVVGVDLLNCSLLLCRGGSHPL  
 LDLLSVTLASGSRCSFSLVAVGFVSDVDIHSERFRALGSARFTLGAVLGLASLHTYRGRLSYLPATTEP  
 ALPIP GHSLPRAKSELVLAPAPAPAATHSPLHRSVSDLPPLPQPALVSPGSPEPLPDLNLNGGGPELTG  
 DWGGAGDAPLSPDPLSPNALKTAQLSPIAEGPPEMPASSGFLPPTHSAPEASTWGPVDHLPLPLGSP  
 LPQDWVTIEGEFVLMGILTSHLCADLMAAPHARFDDGVVHLCWVRSGISRALLRIFLAMEHGNHFSLG  
 CPHLGYYAARAFLRLEPLTPRGLLTVDGELVEYGPIQAQVHPGLATLLTGPAQKXQA

30

40

【 0 1 2 4 】

【 表 2 】

( 表 2 - 1 )

## 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 80/194,318

<151> 2000-04-03

<160> 15

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

30

cctgggtgca cctgggcctg tattgg

26

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

40

ccagtctttgg ggcagtggag agcc

24

【 0 1 2 5 】

( 表 2 - 2 )

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 3  
 aggtagagggc ttctgg

18

10

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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' RAGE  
 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  
 ggccacgcgt cgactagtagc gggnngggnn gggnng

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 cgaactagta

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

cccactcact caggct

16

【 0 1 2 7 】

( 表 2 - 4 )

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

gaaggacagc ccagcttcag ag

22

10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

attgaccaat agaagcaacc

20

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 2698

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (387).. (2237)

30

&lt;300&gt;

<302> Molecular cloning and functional characterization of a  
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform

&lt;303&gt; J. Biol. Chem.

&lt;304&gt; 275

&lt;305&gt; 26

&lt;306&gt; 19513-19520

&lt;308&gt; AF245448

40

&lt;400&gt; 11

【 0 1 2 8 】

( 表 2 - 5 )

aattggcac gaggaggac cgagtaaac gaggttcca gaaccaaaga gaagtcagec 60  
tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggcctttcc ccgtccctgc tctaacactc 120  
tccaggggta aagggacccg agaateagag acatgatcgg agtttgctgg acgagtcgcg 180  
tggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcggtggc tcgaggagga cccggtgggc 240  
tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggtctt 300  
gccatttaaa gttgtgatct tggaggtcgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta 360  
ggagtgccttg ggactgaacc agggtc atg gcc cca cca cca cta ctg cca gtc 413  
Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val  
1 5  
get gcc agc act cca atc ctg cac gcc 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 gcc cca cgg ttt gcc ctg acc ctg 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 gcc tgt gcc acc ctg cag agc cgt agc ccc 605  
Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro  
60 65 70  
gag gac act gca gcc tac ttc tgc atc tac acc tac cca cgt gcc cgt 653  
Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg  
75 80 85  
cga ggg gcc cgg cgc aga gct acg cgg acc ttc cgg gcg gat ggg gcc 701  
Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala

10

20

30

40

【 0 1 2 9 】

( 表 2 - 6 )

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				
etc acg tgt etc etc 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				10
125 130 135				
acc cct gaa ttg ctg ecc cgg aag ccc agg ctg etc 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				20
155 160 165				
gtg cca atg atc tct gaa gct ggg ctg tcc ttc aac etc ata cag aca	941			
Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr				
170 175 180 185				
gaa cga cag aac cat gcc cgt gag ctg gtg cag ggg tta agc ctg agt	989			
Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser				
190 195 200				
gag tgg gaa ggc att gtc act gtg tct gga gac ggg ctg ett tac gag	1037			30
Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu				
205 210 215				
gtg ctg aat ggg etc ett 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 ecc att ggt gtc etc ecc tgt gga tgg ggc aat gcg cta gct ggg	1133			
Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly				40
235 240 245				

【 0 1 3 0 】

(表 2 - 7)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【 0 1 3 1 】

( 表 2 - 8 )

395	400	405	
tcc etc aat ggt ggt ggt cca gag ctg act gga gac tgg gga gga got			1661
Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala			
410	415	420	425
ggg gat gca cct ctg tcc cca gac cca ctg ctg cct tca tcc ccc aac			1709
Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn			
	430	435	440
gct etc aaa aca gct cag ctt tca ccc atc gct gaa ggg ccc cca gaa			1757
Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu			
	445	450	455
atg cca gca tct tgg 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 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 etc 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 etc tgc gca gac ctg atg gca gcc cca			1949
Leu Gly Ile Leu Thr Ser His Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro			
	510	515	520
cat gca cgc ttt gat gat ggc gtt gtg cac ctg tgt tgg gtg cgg agc			1997
His Ala Arg Phe Asp Asp Gly Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser			
	525	530	535
ggc atc tca cgg gct gca ctt cta cgc att ttt ctg gcc atg gag cat			2045
Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His			
	540	545	550

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

(表 2 - 9)

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

egt gcc ttc cgc ctt gaa cca ctc acg cct egt 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 gegagttagt ggaaccagcg ccccatagcg taagatctat 2297

catttacagg tagaagtggg gcccgcactc agaactgtga ggagggtgga gagtggcct 2357

gacctcagt tcccagagga cctagaggct cgagggtggg gcctgccttt cttgatgtcc 2417

aatgatggg cctggaatgt atgagctagc aaggtctctt cagcttattg accagccagg 2477

gtttctcttt gcctactccg gtgcctctac ttgactggcc aatcagccct tgaggggcag 2537

gttccccag gtggtcccca gatttgcact aatgttccct cctggccag ttagggatgg 2597

gatgttctgt gtcttgtgtg tccctctccc tagtctaaaa agcaattgaa aaggtctatg 2657

caataaaggt tgttgcttcc ctctaaaaaa aaaaaaaaaa a 2698

<210> 12

<211> 617

<212> PRT

<213> Mus musculus

【 0 1 3 3 】

( 表 2 - 1 0 )

&lt;400&gt; 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

10

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

20

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

30

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

40

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

【 0 1 3 4 】

(表 2 - 1 1 )



195	200	205
Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp		
210	215	220
Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg Met Pro Ile Gly Val Leu Pro		
225	230	235 240
Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly		
245	250	255
Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu		
260	265	270
Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu		
275	280	285
Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe		
290	295	300
Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser		
305	310	315 320
Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr		
325	330	335
Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu		
340	345	350
Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu		
355	360	365
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser		
370	375	380
Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro		
385	390	395 400

【 0 1 3 5 】

(表 2 - 1 2 )

10

20

30

40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【 0 1 3 6 】

( 表 2 - 1 3 )

Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala  
670 615

<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  
<305> 28  
<306> 19513-19520  
<308> AF245447

20

<400> 13  
gccacc atg gcc ccg ccc cca ccg cca ctg gct gcc agc acc ccg etc 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 cca cgc ttt gcc 86  
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 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 gcc ctg gtc ccg ttg gcc gag gtc tca 192  
Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser

40

【 0 1 3 7 】  
( 表 2 - 1 4 )

50	55	60	
ggc tgc tgc acc ctg cga agc cgc agc ccc tca gac tca gcg gcc tac	240		
Gly Cys Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr			
65 70 75			
ttc tgc atc tac acc tac cct cgg ggc cgg cgc ggg gcc cgg cgc aga	288		
Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg			
80 85 90			10
gcc act cgc acc ttc cgg gca gat ggg gcc gcc acc tac gaa gag aac	336		
Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn			
95 100 105 110			
cgt gcc gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc ctc acc tgt ctg ctc cga	384		
Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg			
115 120 125			
gga ctg cca ctg ccc ggg gat ggg gag atc acc cct gac ctg cta cct	432		
Gly Leu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro			20
130 135 140			
cgg cgg ccc cgg ttg ctt cta ttg gtc aat ccc ttt ggg ggt cgg ggc	480		
Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly			
145 150 155			
ctg gcc tgg cag tgg tgt aag aac cac gtg ctt ccc atg atc tet gaa	528		
Leu Ala Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu			30
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			40

【 0 1 3 8 】

(表 2 - 1 5 )

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

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

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

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

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

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

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

tgc ccc acc cct gcc cat agc ctg cct cgt gcc aag tgc 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 - 1 6 )

355	380	365	
cta acc cca gac cca gcc cgg 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 Gln Pro Ala Leu Ala Ser			10
385	390	395	
cct gcc tgg cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac ggt ggg zgc	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 cgg ctg tcc	1296		
Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser			20
415	420	425	430
cgg 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 gcc ccc gta att ccc cca tcc tct ggg	1392		
His Ser Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly			
450	455	460	
etc cca ett ccc acc cct gat gcc cgg gta ggg gcc tcc acc tgc ggc	1440		30
Leu Pro Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly			
465	470	475	
cgg ccc gac cac ctg ctg cct cgg ctg ggc acc cgg 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 etc atg ttg gcc atc teg ccc	1536		
Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro			40
495	500	505	510

【 0 1 4 0 】

( 表 2 - 1 7 )

agc cac cta ggc gct gac ctg gtg gca gct cgg cat ggc 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 tgg cgg gct 1632  
 Asp Gly Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala  
 530 535 540

ggc ctg ctg cgc ett 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 cgg cag ctg ggc tac gcc ggc cgt gcc ttc cgc cta 1728  
 Leu Gly Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu  
 560 565 570

gag cgg ctg aca cca cgc ggc gtg ctg aca gtg gac ggg gag cag gtg 1778  
 Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val  
 575 580 585 590

gag tat ggg cgg 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 cgg ggg cgg gag ccc tgaactaaa 1870  
 Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro  
 610 615

caagcttggt acccgccggg ggcggggcct acattccaat ggggcgggagc ttgagctagg 1930

gggtgtggcc tggtgtctag agttgtgtg gcaggggccc tggcccgctc tcaggattgc 1990

gtctgctttc atgggaccag acgtgatgct ggaagggtggc cgtcgtcacc gttaaagaga 2050

aatgggctcg tcccgagggt agtgccgat caatgagggc ggggcctggc gtctgatctg 2110

gggcggcctc tacggggcag ggctcagtcg tgacgcttgc caccgtctcc taccgggcca 2170

【 0 1 4 1 】

( 表 2 - 1 8 )

ggatggctga gggggagtc tattttacgc gtcggccaat gacaggacct ggaatgtact 2230

ggctgggata ggcctcagtg agtcggccgg tcaggggccg cagcctggcc ccaccactc 2290

cggtgcctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttccccc zggccggcgc 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

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

115 120 125

40

【 0 1 4 2 】

( 表 2 - 1 9 )



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

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

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

10

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

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 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

30

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

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

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

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
Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val					
	370		375		380
Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly					
	385		390		395
					400
Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu					
	405		410		415
Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp					
	420		425		430
Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser					
	435		440		445
Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro					
	450		455		460
Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly Pro Pro					
	465		470		475
					480
Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val					
	485		490		495
Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro Ser His					
	500		505		510
Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly					
	515		520		525

10

20

30

40

【 0 1 4 4 】

( 表 2 - 2 1 )

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

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 388

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

30

<302> Molecular cloning and functional characterization of  
 murine sphingosine kinase

&lt;303&gt; J. Biol. Chem.

&lt;304&gt; 273

&lt;305&gt; 37

&lt;306&gt; 23722-23728

&lt;308&gt; AAC81898

&lt;400&gt; 15

40

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

Leu Pro Arg Pro Cys Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Gln Gly Gly

【 0 1 4 5 】

( 表 2 - 2 2 )

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	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 Gln 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 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	30
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 Gln Gly Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Thr Val			
210	215	220	

【 0 1 4 6 】

( 表 2 - 2 3 )

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

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

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

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 Gln 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 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

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

【 0 1 4 7 】

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

【 0 1 4 8 】

【 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

ccigggcgca ccigcgctg taatgg

26

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

<400> 2  
ccagtccttgg ggcagtgagg agcc 24

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

10

<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

10

<400> 4  
ggccacgcgt cgactagtac gggnggggn gggng

36

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

20

<400> 5  
gcatgggtg aaagctgagc tg

22

<210> 6  
<211> 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 6

ggccacgcgt cgactagtac

20

10

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

agtcctccagt cagctctgga cc

22

20

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cccactcact caggct

16

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

<400> 9  
gaaggacagc ccagcttcag ag 22

10

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

<400> 10  
atgaccaat agaagcaacc 20

20

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

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

<300>

<302> Molecular cloning and functional characterization of a  
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform

<303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 26

<306> 1951319520

<308> AF245448

<400> 11

```

aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggccttcca gaaccaaaga gaagtcagcc 60
tgaggaaagg gctgggaccc ggagccttc tggcctttcc cgtccctgc tctaacactc 120
tccaggggta aagggaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg 180
tggtgactct cggccgcac gccgaccgct tctcggtggc tcgaggagga cccggigggc 240
tggtgtcgg agcctccgaa gtacgtggaa tcaccgtctt tcaacacttg gccctggctct 300
gccatttaaa gtgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta 360
ggagtgcctt ggactgaacc agggtc atg gcc cca cca cca cta ctg cca gtg 413
Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val
1 5
gct gcc agc act cca atc ctg cac ggc gag ttt ggt tcc tac ccg gcc 461
Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala
10 15 20 25

```

10

20

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

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

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

10

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

cga ggg ggc cgg cgc aga gct acg cgg acc ttc cgg gcg gat ggg gcc 701

Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala  
   90                  95                  100                  105

20

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

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

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

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

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

10

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

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

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

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

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

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

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

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

gcc aag tca gaa cta gtc ttg gct cca gcc cca gcc ccc gcc gcc acc 1517

10

20

Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr  
 365 370 375

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

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

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

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

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

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

gcc tct acc tgg ggc cca gtg gac cac ctc ctc cct ccc ctg ggc tct 1853

10

20

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 gcgagtggg ggaaccagcg ccccataggc taagatctat 2297

catttacagg tagaagtggg gcccgcacac agaactigta ggagggtgga gagtggtcct 2357

10

gacccicagi tcccagagga cctagaggct cgagggtggg gccigccitt ctgatgtcc 2417

aatgaigggg cctggaatgi atgagctagc aaggcttctt cagcttattg accagccagg 2477

gtttcttctt gcctactccg gtgcctctac ttgactggcc aatcagccct tgaggggcag 2537

gttccccag gtggtccca gatttgcact aatgttctc ccttgccag ttagggatgg 2597

gatgttctgi gtttgtgtg tccctctccc tagtctaaaa agcaatigaa aaggctctatg 2657

20

caataaaggt tgttgcttcc ctctaaaaa 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  
 195 200 205

10

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

20

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

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

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

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

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

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

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 Gly Pro  
405 410 415

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

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

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

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

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

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

10

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

20

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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 2380

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

10

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (7)..(1860)

&lt;300&gt;

<302> Molecular cloning and functional characterization of a  
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform

&lt;303&gt; J. Biol. Chem.

&lt;304&gt; 275

&lt;305&gt; 26

&lt;306&gt; 1951319520

&lt;308&gt; AF245447

20

&lt;400&gt; 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

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

10

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

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

80

85

90

20

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

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

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

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

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

10

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

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

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

10

ctg gcc tgc ggc tcc cgc tgt ttc tcc ttc ctg tct gtg gcc tgg ggc 912

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

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

20

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

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

335	340	345	350	
tcg ccc acc cct gcc cat agc ctg cct cgt gcc aag tcg gag ctg acc				1104
Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr				
	355	360	365	
cta acc cca gac cca gcc ccg ccc atg gcc cac tca ccc ctg cat cgt				1152
Leu Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg				
	370	375	380	
tct gtg tct gac ctg cct ctt ccc ctg ccc cag cct gcc ctg gcc tct				1200
Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser				
	385	390	395	
cct gcc tcg cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac ggt ggg gcc				1248
Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly				
	400	405	410	
cca gag ctg gct ggg gac tgg ggt ggg gct ggg gat gct ccg ctg tcc				1296
Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser				
	415	420	425	430
ccg gac cca ctg ctg tct tca cct cct gcc tct ccc aag gca gct cta				1344
Pro Asp Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu				
	435	440	445	
cac tca ccc gtc tcc gaa ggg gcc ccc gta att ccc cca tcc tct ggg				1392
His Ser Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly				

10

20

450	455	460	
ctc cca ctt ccc acc cct gat gcc cgg gta ggg gcc tcc acc tgc ggc	1440		
Leu Pro Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly			
465	470	475	
ccg ccc gac cac ctg ctg cct ccg ctg ggc acc ccg ctg ccc cca gac	1488		
Pro Pro Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp			
480	485	490	
tgg gtg acg ctg gag ggg gac ttt gtg ctc atg ttg gcc atc tcg ccc	1536		
Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro			
495	500	505	510
agc cac cta ggc gct gac ctg gtg gca gct ccg cat gcg cgc ttc gac	1584		
Ser His Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp			
515	520	525	
gac ggc ctg gtg cac ctg tgc tgg gtg cgt agc ggc atc tcg cgg gct	1632		
Asp Gly Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala			
530	535	540	
gcg ctg ctg cgc ctt ttc ttg gcc atg gag cgt ggt agc cac ttc agc	1680		
Ala Leu Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser			
545	550	555	
ctg ggc tgt ccg cag ctg ggc tac gcc gcg gcc cgt gcc ttc cgc cta	1728		
Leu Gly Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu			

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  
 caagcttggc acccgccggg ggcggggcct acattccaat gggcgggagc ttgagctagg 1930  
 ggggtgggcc tggctgctag agttgtggcg gcagggggccc tggccccgtc tcaggattgc 1990  
 gctcgccttc atgggaccag acgtgatgct ggaaggctgg cgicgtcacg gttaaagaga 2050  
 aaagggtctg tcccgagggt agtgccgat caatgagggc ggggcctggc gctgatctg 2110  
 gggccgccct tacggggcag ggctcagtc tgacgttgc cacctgctcc taccggcca 2170  
 ggatggctga gggcgggagc tattttacgc gtcgccaat gacaggacct ggaatgtact 2230

10

20

ggctggggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc ccatccactc 2290

cggcgccctcc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttcccg gggccggcgc 2350

taggatttgc actaatgttc cctccccgc 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

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

20

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 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
Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala			
	275	280	285
Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val			
	290	295	300
Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala			
305	310	315	320
Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr			
	325	330	335
Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro			
	340	345	350
Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr			
	355	360	365

10

20

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
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	

10

20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 388

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

<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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Pro Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Val Asn His

10

20

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 Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val			
245	250	255	
Val Pro Glu Gln Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu Leu His Thr His			
260	265	270	

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Glu Pro  
 385

10

20

### 【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。

30

### 【 F i g . 1 】 ( F i g . 1 A )

F i g . 1 A 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けている。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。

### ( F i g . 1 B )

F i g . 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。

40

F i g . 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。

### 【 F i g . 2 】 ( F i g . 2 A )

F i g . 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 ) + R N A プロットにハイブリダイズした。レーン 1 : 心臓 ; 2 : 脳 ; 3 : 肝臓 ; 4 : 肺 ; 5 : 腎臓 ; 6 : 骨格筋 ; 7 : 腎臓 ; 8 : 精巣。 - アクチンプロブ ( 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。

### ( F i g . 2 B )

F i g . 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

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37 pmol/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SPHK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SPHK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（50 mM）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：フィツスフィンゴシン。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10 μM（塗りつぶした四角形）または20 μM（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-バークプロットである。D-エリスロスフィンゴシンのKmは3.4 μMであった。DMSのKi値は12 μM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：200 mM 酢酸ナトリウム（pH 4.5～5.5、白抜きの円）；200 mM 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 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)。

Fig . 5 B ~ 5 E は、塩類が SPHK 2 を刺激するが、SPHK 1 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、HEK 293 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、mSPHK 1 ( Fig . 5 B ) または mSPHK 2 ( Fig . 5 C ) でトランスフェクトした 24 時間後に測定した。

10

( Fig . 5 D )

Fig . 5 D は、KCl による SPHK 2 活性化の反応速度解析を示す。mSPHK 2 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 - バークプロットである。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

20

【 Fig . 6 】 ( Fig . 6 A および Fig . 6 B )

Fig . 6 A ~ 6 B は、SPHK 1 と SPHK 2 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。HEK 293 細胞は、mSPHK 1 a (白抜きの円) または mSPHK 2 (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、SPHK 1 と SPHK 2 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。HEK 293 細胞は mSPHK 1 a (円) または mSPHK 2 (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。

30

【 図 1 A - 2 】

mSPHK1	10	20	30	40	50	60
mSPHK2	10	20	30	40	50	60
mSPHK2	10	20	30	40	50	60
mSPHK1	70	80	90	100	110	120
mSPHK2	70	80	90	100	110	120
mSPHK2	70	80	90	100	110	120
mSPHK1	130	140	150	160	170	180
mSPHK2	130	140	150	160	170	180
mSPHK2	130	140	150	160	170	180
mSPHK1	190	200	210	220	230	240
mSPHK2	190	200	210	220	230	240
mSPHK2	190	200	210	220	230	240
mSPHK1	250	260	270	280	290	300
mSPHK2	250	260	270	280	290	300
mSPHK2	250	260	270	280	290	300
mSPHK1	310	320	330	340	350	360
mSPHK2	310	320	330	340	350	360
mSPHK2	310	320	330	340	350	360

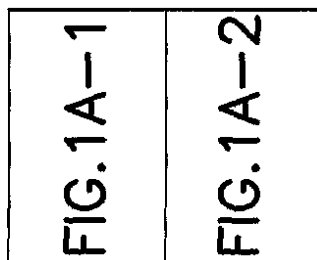
FIG. 1A-1

msSPHK1	370	380	390	400	410	420
msSPHK2	RAKSELVLTSPAPAPAHSHPLHRSVDLPLPPALVSPGSGPEPLPDL	SLNNGSGPELIG				
hSPHK2	RAKSELVLTSPAPAPAHSHPLHRSVDLPLPPALVSPGSGPEPLPDL	SLNNGSGPELIG				
msSPHK1	430	440	450	460	470	480
msSPHK2	DWGGAGDAPLSPDPLLSPPSPKAAHLSVPSEGAAPVLPSSGLPLP	THSAPEKSTWGP				
hSPHK2	DWGGAGDAPLSPDPLLSPPSPKAAHLSVPSEGAAPVLPSSGLPLP	THSAPEKSTWGP				
msSPHK1	490	500	510	520	530	540
msSPHK2	VDTHTLVPLESPSPSHMTVVPIEDGFVLVLVLLHITLSSLEAPAPMGRLG	AGVMMHLLVVRAG				
hSPHK2	VDTHTLVPLESPSPSHMTVVPIEDGFVLVLVLLHITLSSLEAPAPMGRLG	AGVMMHLLVVRAG				
msSPHK1	550	560	570	580	590	600
msSPHK2	VSRGAALLRLFLAMQTCGNHMDGPIVLLVHPVVIATLEPSRGQGVIESV	DGELMVCEAVQGG				
hSPHK2	VSRGAALLRLFLAMQTCGNHMDGPIVLLVHPVVIATLEPSRGQGVIESV	DGELMVCEAVQGG				
msSPHK1	610	620				
msSPHK2	VHPNVLWNVCGSRDAPSGRDSRRGPPPEP					
hSPHK2	VHPNVLWNVCGSRDAPSGRDSRRGPPPEP					

FIG. 1A-2

【 図 1 A 】

**FIG. 1A**



【 図 1 B 】

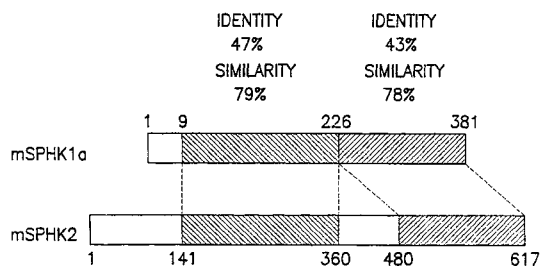
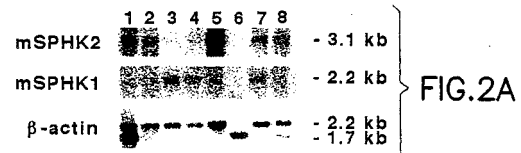
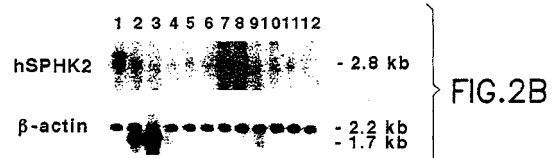


FIG. 1 B

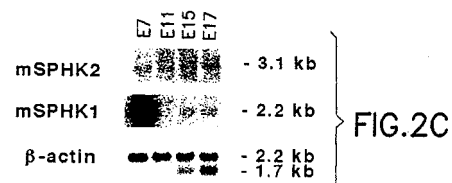
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 2 C 】



【 3 A 】

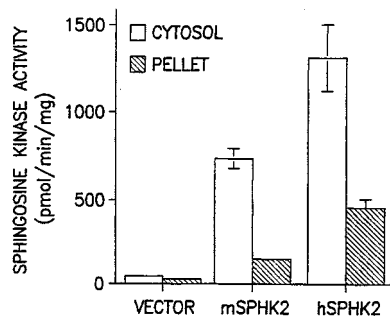


FIG.3A

【 3 B 】

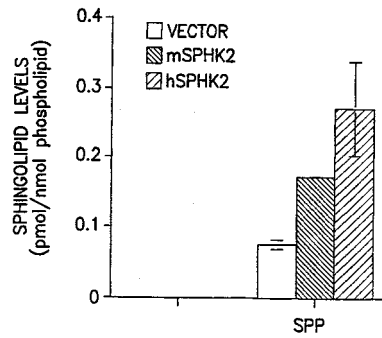


FIG.3B

【 4 A 】

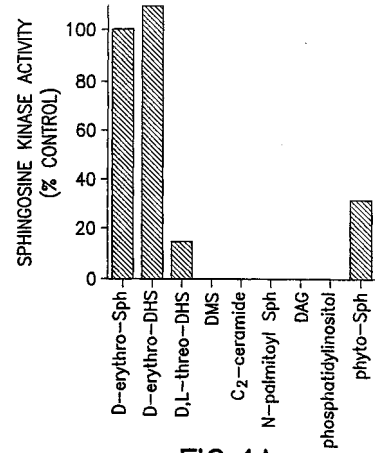


FIG.4A

【 4 B 】

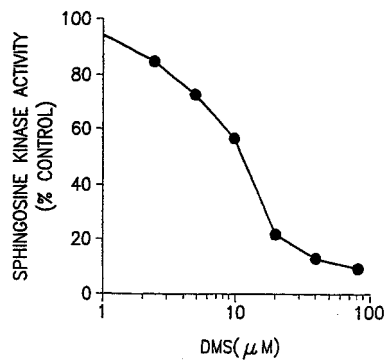


FIG.4B

【 4 D 】

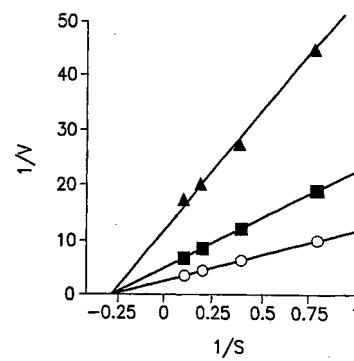


FIG.4D

【 4 C 】

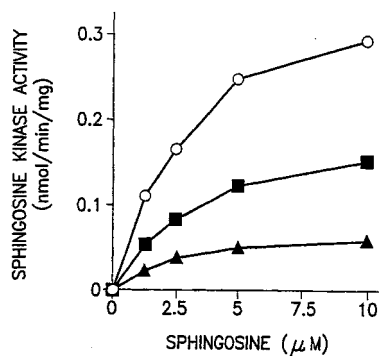


FIG.4C

【 5 A 】

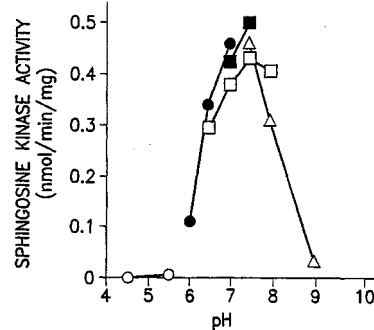
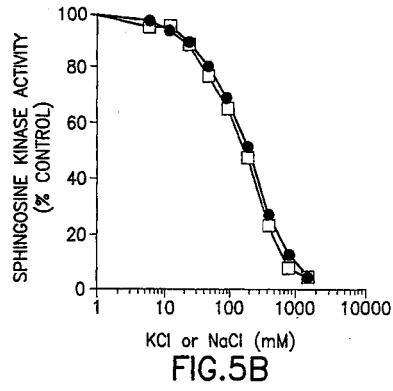


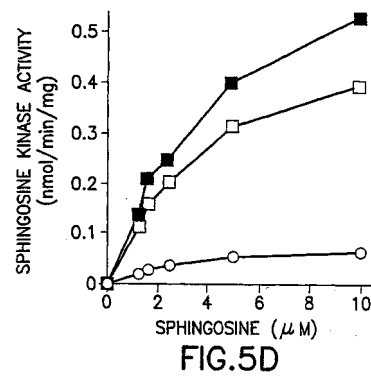
FIG.5A



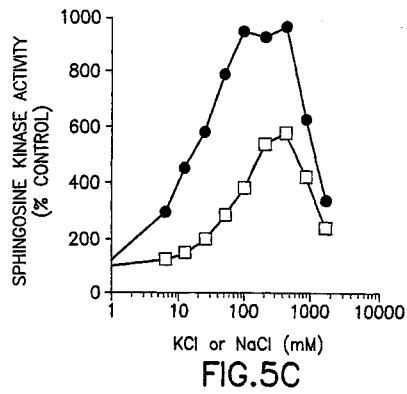
【 5 B 】



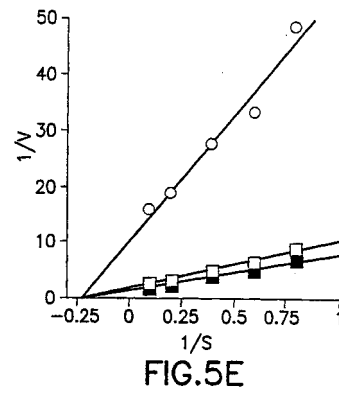
【 5 D 】



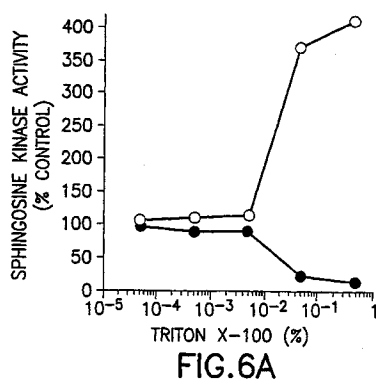
【 5 C 】



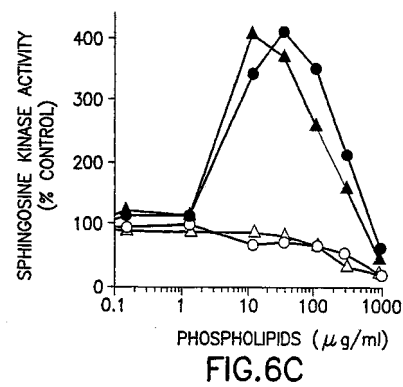
【 5 E 】



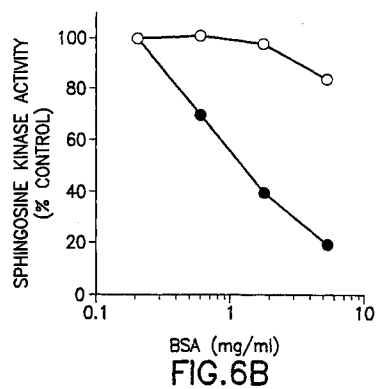
【 6 A 】



【 6 C 】



【 6 B 】



## 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 マクリーン、 リンウエイ テラス  
 6 3 4 3

(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)  
 CApus(STN)  
 MEDLINE(STN)