

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4436563号
(P4436563)

(45) 発行日 平成22年3月24日 (2010. 3. 24)

(24) 登録日 平成22年1月8日 (2010. 1. 8)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 11 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2000-510875 (P2000-510875)	(73) 特許権者	501425625
(86) (22) 出願日	平成10年9月4日 (1998. 9. 4)		ユニ ターゲティング リサーチ エイエ
(65) 公表番号	特表2001-515725 (P2001-515725A)		ス
(43) 公表日	平成13年9月25日 (2001. 9. 25)		ノルウェー国、N-5008、ベルゲン、
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/002664		ソーメーレンスゲート 55番地
(87) 国際公開番号	W01999/013090	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成11年3月18日 (1999. 3. 18)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成17年9月1日 (2005. 9. 1)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	9718908.8		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成9年9月5日 (1997. 9. 5)	(74) 代理人	100107685
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 高橋 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質分泌の調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物細胞から正常では分泌されないタンパク質に機能的に連結している哺乳動物シグナルペプチドをコードするRNA分子であって、該シグナルペプチドが少なくとも該タンパク質の一部をそれが分泌され得るように小胞体上で合成させるものであり、該RNA分子が該タンパク質をコードする天然に生ずるRNA中に存在する対応する3'非翻訳領域と比べて3'非翻訳領域の全て又は一部に欠失、挿入又は置換を含み、それにより該RNA分子を細胞内の小胞体以外の位置に、又は遊離のポリソーム及び／又は細胞骨格結合ポリソームに向ける際における該3'非翻訳領域の効果が消失、又は対応する天然に生ずる3'非翻訳領域と比べて低下しているものであるRNA分子。

10

【請求項 2】

該シグナル配列が成長ホルモン、ミルクタンパク質又はアルブミンから選択されるシグナル配列である、請求項 1 記載のRNA分子。

【請求項 3】

哺乳動物細胞から正常では分泌されないタンパク質が、哺乳動物の細胞内タンパク質である、請求項 1 もしくは 2 に記載のRNA分子。

【請求項 4】

分泌タンパク質のmRNA由来の3'非翻訳領域を含む、請求項 1、2 もしくは 3 に記載のRNA分子。

【請求項 5】

20

転写されて請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の R N A 分子を生ずることができる D N A 分子。

【請求項 6】

ベクターの形態である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の分子。

【請求項 7】

細胞培養中又は非ヒト動物中に存在するとき、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の分子を含んでいる哺乳動物細胞。

【請求項 8】

哺乳動物細胞からタンパク質を取得する方法であって、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の分子を用いてその細胞中にタンパク質を発現させる工程、及びその細胞にそのタンパク質を分泌させる工程を含んで成る方法。

10

【請求項 9】

3' U T R に機能的に連結された哺乳動物タンパク質をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されたシグナル配列を含むベクターであって、該シグナル配列及び 3' U T R が、該ヌクレオチド配列によりコードされた哺乳動物タンパク質とは異なる分泌タンパク質の m R N A に由来するものであるベクター。

【請求項 10】

シグナル配列及び 3' U T R が同一タンパク質に由来するものである、請求項 9 記載のベクター。

【請求項 11】

20

該ヌクレオチド配列によりコードされた哺乳動物タンパク質が、正常では分泌されないものである、請求項 9 又は請求項 10 に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、哺乳動物細胞からのタンパク質の分泌に関する。

【0002】

哺乳動物細胞株は、細胞工場及びトランスジェニック動物において組換えタンパク質の商業上相当な量を製造するため、その使用が次第に増加しつつある。正常に分泌されるタンパク質がこのようにして製造されつつあるという例が非常に多くあり（ボック(Bock)ら 1982, ミシェル(Michel)ら 1985, リン(Lin)ら 1986, デブリン(Devlin)ら 1987, シャク(Shak)ら 1990)、また異種タンパク質の分泌用のベクターが多数市販されている。しかしながら、そのような系は大抵、正常には細胞内にあるタンパク質ではなく分泌性タンパク質の製造に使用されており、したがって哺乳動物の発現系における細胞内タンパク質の分泌は、バイオテクノロジーによる研究では重要性が増加している目標である（ジェームス(James)とシンプソン(Simpson), 1996)。本発明者らは、哺乳動物細胞からの細胞内タンパク質の分泌に成功したことを記載する文献（リー(Lee)ら, 1996）は一つしか知らない。しかしながら、このタンパク質（シアリルトランスフェラーゼ）は小胞体（E R）で正常に合成され、分泌の成功は m R N A の最初の指示の書き直し（転送）に依存するものではなかった。

30

【0003】

40

特異的な m R N A が細胞内の特異的な位置で翻訳されることは、よく確立されており、例えば、膜及び分泌タンパク質は、膜結合ポリソームに会合して粗面小胞体上で翻訳され（ブローベル(Blobel)とドッベルスタイン(Dobberstein), 1975)、c - m y c（ヘスキース(Hesketh)ら, 1994）、メタロチオネイン I（マホン(Mahon)ら 1995）、リボソームタンパク質及びサイクリン A（ホフランド(Hovland)ら, 1995）等のタンパク質に対する m R N A は、細胞骨格に結合したポリソームに会合して翻訳される（概説に関しては、ヘスキース 1996, ホフランドら 1996 を参照のこと）。現在、タンパク質合成装置は、少なくとも三つのポリソーム集団、すなわち、遊離ポリソーム（F P）、細胞骨格結合ポリソーム（C B P）及び膜結合ポリソーム（M B P）に区画分けされるようである。m R N A のこれらの三つの集団を、連続的な界面活性剤／塩抽出を用いて分離することができる（ベ

50

デラー(Vedeler)ら1991)。異なるシグナルがこれらのmRNAをそれらの翻訳のための部位に向ける。膜タンパク質及び分泌性タンパク質の場合、シグナルペプチドがリボソーム-mRNA複合体を小胞体に標的化することが必要であることは、十分確立されたが、一方、細胞質に局在するmRNA又は細胞骨格に会合したmRNAに関しては3'非翻訳領域にシグナルが存在するという証拠が最近示された(キスラウスキス(Kislauskis)ら1994, ヘスキースら1994, ウイルソン(Wilson)ら1995, ベイルーン(Veyrone)ら1996)。

【0004】

本発明によれば、哺乳動物細胞から正常には分泌されないタンパク質に機能的に連結している哺乳動物のシグナルペプチドをコードするRNA分子であって、該タンパク質が該哺乳動物細胞から分泌され得るように、該シグナルペプチドが該タンパク質の少なくとも一部を小胞体で合成させるものであるRNA分子を提供する。

10

【0005】

理論に束縛されることなく、該シグナルペプチドが最初に提供され、次いで、mRNAの翻訳が停止するか又は速度を下げて、このシグナルペプチドをシグナル認識粒子に結合させ、そしてmRNAと会合したリボソームを小胞体に向けさせるものと思われる。次いで、翻訳が再開するか又は速度を上げて、残りのタンパク質が翻訳されるようにする。

【0006】

本明細書において「タンパク質」という用語は、ペプチド結合により連結されたアミノ酸を含有する部分を含むように広い意味で用いられる。したがって、「タンパク質」は、ペプチド及びポリペプチドを含む。

20

【0007】

本発明は、広範に適用可能である。原理的には、哺乳動物細胞から分泌されるタンパク質と正常に連結している天然に生ずるいかなる哺乳動物シグナルペプチドの配列も、本発明で使用するための哺乳動物シグナルペプチドをコードする適当なRNA分子を設計するために使用することができる。

【0008】

また、そのようなタンパク質を分泌させるために使用可能なそのような天然に生ずるシグナルペプチドの改変体を使用してもよく、そしてそれは本発明の目的にとって、「哺乳動物シグナルペプチド」という用語の範疇内にあると考えられる。そのような改変体は、天然に生ずる哺乳動物シグナルペプチド配列と少なくとも50%のアミノ酸配列の同一性を有することが好ましい。配列の同一性の程度は少なくとも75%であることがより好ましい。少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性が最も好ましい。本発明のための配列同一性は、ウイスコンシンシーケンス・アナリシス・パッケージ(Wisconsin Sequence Analysis Package) GCG 8.0の「BESTFIT」プログラムを用いることにより決定することができる。

30

【0009】

好ましいシグナルペプチド配列は、ラットアルブミン(データベース寄託番号J00698)、ウシ成長ホルモン、ラクトアルブミン及び他のミルクタンパク質を含む。

【0010】

当業者は、利用可能なデータベース配列又は刊行物から多くのタンパク質のシグナル配列を確認することができる。これらの配列が発表されていない場合でさえも、例えば、配列ホモロジー研究を用いて、候補のアミノ酸配列と既知のシグナル配列のアミノ酸配列とを比較することができる。

40

【0011】

本発明の好ましい態様においては、RNA分子は、小胞体以外の細胞内の位置に又は遊離の及び／又は細胞骨格に結合したポリソームにこの分子を向けうる配列を含まないか、又は含むとしても、それは小胞体以外の細胞内の位置に又は遊離の及び／又は細胞骨格に結合したポリソームに分子を向ける際には、(対応する天然に生ずる配列と比べて)その有効性を低下させるように改変された形状でそのような配列を含んでいる。

50

【0012】

本発明のこの好ましい態様においては、小胞体にタンパク質を向けるシグナル配列と、小胞体以外の細胞内の位置に又は遊離の及び／又は細胞骨格に結合したポリソームにタンパク質をコードするRNAを向けるRNA配列との間の競合の可能性を回避することができ、あるいは少なくとも小胞体に向けられるタンパク質の確率を増加させるように変化させることができる。

【0013】

これは、哺乳動物細胞から正常には分泌されないタンパク質をコードする天然のRNAに存在する対応領域と比べて3'非翻訳(UTR)領域の全部又は一部に欠失、挿入又は置換を有するRNA分子を提供することにより達成できる。特定の細胞内位置に又は遊離の若しくは細胞骨格に結合したポリソームに向けられたRNA分子の3'UTR領域に存在するシグナルは、そのようなmRNAのそれらへの局在化を少なくともある程度まで制御すると信じられており、そしてそのような領域中の突然変異は、そのシグナルを不活性化することができる。RNA分子の3'UTR領域中のシグナルは、前記mRNA分子の3'UTR領域内の配列の欠失又は突然変異並びにレポーター遺伝子への連結及び培養中の哺乳動物細胞へのトランスフェクション後のハイブリダイゼーション試験によるmRNA分布の検出による局在可能性の測定により同定することができる。

10

【0014】

転写して前記RNA分子を提供することができるDNA分子もまた本発明の範疇にある。必須ではないが、それらは、ベクターの形(例えば、プラスミド、ファージ又はコスミド)で提供されてもよい。

20

【0015】

前記のDNA又はRNA分子を含有する哺乳動物細胞もまた本発明の範疇にある。哺乳動物細胞は、細胞培養又は非ヒト動物中に存在してもよい。本明細書において使用される「細胞培養」という用語は、動物には存在せず、適当な条件下でタンパク質を発現させるために使用されうる一以上の細胞を意味する。通常、そのような細胞は、緩衝化された条件下で適当な生育培地中に維持されるであろう。細胞培養は、哺乳動物繊維芽細胞の培養、CHO、BHK又は骨髓腫の細胞培養であってもよい。非ヒト動物は、トランスジェニック動物であってもよい。(「トランスジェニック動物」という用語は、核転移された動物を含む。)トランスジェニック動物は、そのミルク中に異質タンパク質を分泌してもよい。

30

【0016】

また、本発明は、本発明の核酸分子を用いてタンパク質を発現する工程及び哺乳動物細胞にタンパク質を分泌させる工程を含む哺乳動物細胞からタンパク質を得る方法をも含む。次いで、前記タンパク質を、既知の精製技術により精製することができる。

【0017】

哺乳動物細胞から正常には分泌されないタンパク質に連結した哺乳動物シグナル配列を含有するキメラタンパク質は、本発明の別の側面である。そのようなタンパク質は、本発明のRNA分子を翻訳することにより製造することができる。

【0018】

本発明の他の側面に加えて、本発明は前記核酸分子にハイブリダイズする核酸分子を提供する。これらは、プローブ、プライマー又は発現等を変化させるのに使用されるアンチセンス分子等として有用である。

40

【0019】

そのようなハイブリダイズする核酸分子は、少なくとも10ヌクレオチド長が望ましく、少なくとも25又は少なくとも50ヌクレオチド長が好ましい。それらは、厳格なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることができる。厳格なハイブリダイゼーション条件の一例は、試みられたハイブリダイゼーションが約0.9モルの塩溶液を用いて約35℃～約65℃の温度で行なわれる場合である。しかしながら、当業者は、プローブ長、塩基の組成、存在するイオンの型等のような変数を考慮に入れるためにパラメーター

50

を適当に変化させることができる。

【0020】

本発明は、ほとんど天然に生ずる哺乳動物シグナルペプチド又はその改変体を参照しながら上述したけれども、その最も広い範疇では、哺乳動物細胞で機能することができる全てのシグナルペプチドを使用することができる。これらは、天然又は非天然に生ずるものであってもよい。それらは、原核生物（大腸菌等）には天然に生じないものが好ましい（必須ではないが）。

【0021】

本発明を、添付の図面のみを参照しながら実施例により記述する。

【0022】

図1は、材料と方法に記載された構築物の概略図を示す。親ベクターは、p c D N A 3である。黒塗り四角は、ウサギベーターグロビンの天然の5' U T Rを表す。S Sは、ラットアルブミンシグナル配列である。

【0023】

図2は、トランスフェクトした細胞から単離したポリソーム由来の全RNAのノーザンハイブリダイゼーションを示す。すべてのレーンは、10 μ gのRNAを負荷した。このフィルターをウサギベーターグロビン c D N Aプローブとハイブリダイズし、H y p e r f i l m-M Pを用いて-70℃で3日間のオートラジオグラフィすることにより特異的なバンドが検出された。Fは遊離のポリソーム、Cは細胞骨格結合ポリソーム、Mは膜結合ポリソームである。

【0024】

図3は、トランスフェクトした細胞におけるグロビンmRNAの分布を定量的に示す。結果は、キャンベラ・パッカー・インスタントイメージャーを用いる直接の放射能画像化から得られた単位18 S r R N A当たりの任意単位のmRNAで表す。各実験に対し、遊離のポリソーム中の生成量を100として生成値を規格化した。結果は、平均± S . E . M . (n = 4)である。グループを、スチューデント「t」検定を用いて比較した。すなわち、膜結合ポリソーム中の転写物の生成量は、両側検定を用いてG G細胞とS S G G細胞との間で(p = 0 . 0 1)、及びG M細胞とS S G M細胞との間で有意の相違があり(p < 0 . 0 5)そして片側検定を用いてS S G M細胞とS S G G細胞との間で有意の相違があった。

【0025】

図4は、転写物のmRNA安定性を示す。細胞を70%コンフルエンスまで生育させ、転写をアクチノマイシンDで阻害した。RNAを各時点で抽出し、次いで、ノーザンブロットティングで分析した。キャンベラ・パッカー・インスタントイメージャーを用いる直接の放射能画像化により定量を行なった。結果は、平均± S . E . M . であり、最初の生成量のパーセントとして現す。

G GとS S G G (n = 6)

【0026】

図5は、トランスフェクトしたL t k⁻細胞のポリソームプロファイルを示す。可溶性の界面活性剤／塩抽出した物質を、15%～40%スクロース勾配に重層し、200000 × gで1時間遠心分離した。フローセルを用いる260 nmでの吸光度を測定することにより、ポリソームプロファイルを測定した。

【0027】

図6は、S S G Aのノーザンハイブリダイゼーション及び定量を示す。

図6 A : p c K S S G AでトランスフェクトしたL t k⁻細胞のノーザンハイブリダイゼーション。すべてのレーンは、20 μ gのRNAを負荷した。フィルターをウサギベーターグロビン c D N Aプローブでハイブリダイズした。

図6 B : mRNAの生成量の定量。

結果は、直接の放射能画像化から得られた単位18 S r R N A当たりの任意単位のmRNAで表し、各実験に対し遊離のポリソーム中の生成量を100として生成量を取ることに

10

20

30

40

50

より規格化した。結果は、平均±S. E. M. (n = 3) である。

【0028】

実施例

三段階を含むアプローチ：ウサギベーターグロビン 5' 非翻訳領域及びレポーター遺伝子としてのコーディング配列に連結した、アルブミンシグナルペプチド配列及び異なる 3' 非翻訳領域 (3' UTR) 配列を有する一連のベクターを構築すること、これらの構築物を安定なトランスフェクションにより細胞に導入すること、次に、mRNA の細胞下位置並びにその安定性及び翻訳効率を決定すること。

【0029】

材料と方法

細菌及び細胞培養：標準的な手法により、プラスミドをクローニングして増殖させた。CHO・K1 細胞は、ハムの F12 培地で生育させ、マウスの繊維芽細胞株である Ltk⁺ 細胞は、ダルベッコの最小イーグル培地で生育させた。10% ウシ胎仔血清で培地を補足し、5% CO₂ の雰囲気下で生育させた。細胞は、分画用に 90mm のペトリ皿で及びトランスフェクション用に 35mm のペトリ皿で増殖させた。

【0030】

ベクターの構築：すべての構築物 (図 1) は、表 1 に記載されたプライマーを用いた PCR クローニングによりウサギベーターグロビンコーディング配列から誘導し、そして全てが天然のグロビン 5' UTR を含んでいた。各構築物は、ABI 373A シーケンサー及びサイクルシーケンスを用いる配列決定により確認した。天然の 5' 及び 3' UTR を持つウサギベーターグロビンを発現するプラスミドである pcKGG の構築は、以前に記載された (マホン (Mahon) ら, 1997)。pcKGM は、マウス c-myc の 3' UTR を持つグロビンを発現し、以下のように作製された。グロビンをコードする領域の一部及び c-myc の 3' UTR の全体を、プライマー KP4 及び KP5 並びに鋳型としてプラスミド MP13 を用いる PCR により増幅した (ベイルン (Veyrone) ら 1996)。この KP4 はグロビンをコードする領域で BamHI 部位を維持し、KP5 は c-myc のポリ A シグナルの下流に XbaI 部位を創出する。1ng の鋳型、1.5mM の MgCl₂ 中 20pmol の各プライマー及び 4 ユニットの Taq ポリメラーゼ (パーキン・エルマー) を用いて、反応は、94℃ 1 分間、55℃ 1 分間及び 72℃ 2 分間のサイクルで行った。断片及び pcKGG を BamHI と KpnI で消化し、標準的方法を用いて連結した (サンブルック (Sambrook) ら 1989)。

【0031】

シグナル配列構築物の作製には、AUG コドンにおける適当な制限部位の創出が必要であった。これは、プライマー KP6 及び KP7 を用いる PCR により達成された。この KP6 が 731 位で pcDNA の配列に適合し、KP7 が AUG 及び読み取り枠を維持しながら NdeI 部位を創出する。鋳型は pcKGG であり、反応は前記した条件を用いた。反応産物を精製し、次いで、5µg を、プライマー KP8 (BamHI 部位を含むグロビンコーディング領域中の配列をカバーする)、鋳型として 1µg の pcKGG 及び前記したサイクルを用いる PCR メガプライムに使用した。得られた断片を pBlue-script の KpnI と BamHI 部位にサブクローニングし、pBS-Nde を作製した。

【0032】

シグナル配列は、ラットアルブミンシグナル配列 (SS1 及び SS2) に対応する合成オリゴヌクレオチドをアニーリングさせることにより提供された。挿入物を pBS-Nde の NdeI 部位に連結させ、pBS-SS を作製した。次いで、5' UTR、アルブミンシグナル配列及びグロビンコーディング領域をカバーする pBS-SS から BamHI 部位までの KpnI - BamHI 断片を、適当に消化した pcKGG 及び pcKGM に連結し、pcKSSGG 及び pcKSSGM を作製した。

【0033】

アルブミン 3' UTR を、制限酵素によりラットアルブミン遺伝子から取り出し、制限されたグロビンベクターを Vent ポリメラーゼで処理した後、平滑末端化連結によりこの

10

20

30

40

50

アルブミン 3' UTR を導入した。p c K S S G A は、p c K S S G G 及び p c K S S G M について記述されたように構築した。

【0034】

トランスフェクション：トランスフェクションは、製造業者の指示に従い、L i p o f e c t A M I N E（登録商標）（ギブコ）で行なった。細胞を、 5×10^5 細胞／皿の密度で 35 mm のペトリ皿にサブ培養し、70～80%コンフルエンスまで生育させた。この細胞を、無血清培地中 $1 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA 及び $6 \sim 10 \mu\text{l}$ の L i p o f e c t A M I N E で重層した。5 時間後に、血清を 10% の最終濃度まで添加した。24 時間目にこの培地を完全培地と交換し、72 時間目に $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G 4 1 8 での選択を開始した。一旦安定にトランスフェクトした後は、細胞は $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G 4 1 8 中で維持された。この細胞株を、トランスフェクトした構築物に合わせて命名し、例えば、p c K G G でトランスフェクトした細胞は G G と称する。

10

【0035】

細胞分画：L t k -細胞を 70%コンフルエンスまで生育させ、ラバーポリースマンを用いて集め、連続的な界面活性剤／塩抽出手法により分画した（ベデラーら，1991；ヘスキースら，1994）。ポリソームを、40%スクロースの 15 ml クッションを通す 32, 000 g での 17 時間遠心分離により、モノソーム及びより軽いリボ核タンパク質粒子から分離した（ホフランドら，1995）。

【0036】

RNA 抽出及び RNA ゲル電気泳動：チョムクジンスキー (Chomczynski) とサッチ (Sacchi) (1987) の酸／グアニジニウム／フェノール／クロホルム法により、全 RNA を抽出し、その標品を A 260/A 280 により評価した。次いで、RNA を、変性 2.2 M のホルムアルデヒド、1.2% アガロースゲルによる電気泳動により分離し（サンプルック (Sambrook) ら 1989）、毛細管ブロッティングによりナイロン膜（ジーンスクリーン、NEN デュポン社）に転写した。RNA を UV 光により膜に固定し、乾燥させて保存した。

20

【0037】

ノーザンハイブリダイゼーション及び DNA プローブ：膜を、42℃で最小限 6 時間、50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、0.2%ウシ血清アルブミン、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィコール、0.1%ピロリン酸ナトリウム、1%SDS 及び 50 mM トリス塩酸、pH 7.5 中 $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ の変性サケ精子 DNA でプレハイブリダイズした。ベーターグロビン cDNA プローブは前に記述された（ベイルン (Veyrune) ら 1996)。c-myc プローブは、ネズミ遺伝子の 3 つのエキシソンの cDNA であり（ヘスキースら，1994）、コール (M. Cole) 博士（プリンストン大学、ニュージャージー 米国）から恵与され、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プローブは、ヒト cDNA（アメリカンティッシュカルチャーコレクション、寄託番号 57090）由来の 0.78 kb の Pst I-Xba I 断片であり、そして 18S・rRNA プローブは、フルトン (R. Fulton) 博士、ビートソン研究所、グラスゴーから入手した cDNA 由来の 1.4 kb BamHI 断片であった。20～30 ng のプローブを、ランダムプライミング（メガプライム・キット、アマシャム・インターナショナル、英国製）により ^{32}P -dCTP で標識化した。標識化したプローブをプレハイブリダイゼーション混合物に添加し、42℃で一晩ハイブリダイズさせた。フィルターを $2 \times \text{SSC}$ 中、室温で簡単に洗浄して、ハイブリダイゼーション混合物を除いた。65℃での洗浄は、以下のようにプローブ特異的であった、すなわち、グロビンは $1 \times \text{SSC}$ 、0.5%SDS、30 分を 2 回、c-myc は $0.5 \times \text{SSC}$ 、1%SDS、1 時間を 2 回、GAPDH は $1 \times \text{SSC}$ 、1%SDS、1 時間を 2 回、18S は $0.2 \times \text{SSC}$ 、1%SDS であった。0.1%SSC 中の最終の簡単な洗浄により SDS を除去した。特異的なハイブリダイゼーションを検出し、キャンベラ・パッカー・インスタントイメージャーで定量した。特異的に結合したプローブの量を、非特異的結合に対して補正し、そのデータを、18S・rRNA プローブへのハイブリダイゼーションにより測定された rRNA の単位当たりで表した。再精査する前に、フィルターを 0.1%SDS 中 10 分間 95℃まで加熱

30

40

50

することによりきれいにした。

【0038】

mRNAの安定性： mRNAの安定性は、転写の阻害後2～12時間の期間にわたる生成量を測定することにより決定した。細胞を70%コンフルエンスまで生育させ、アクチノマイシンドの添加(5 µg/ml)により転写を阻害した。RNAを前記のように抽出した。

【0039】

ポリソームプロファイル及び翻訳効率： 細胞を70%コンフルエンスまで生育させ、ラバーポリースマンを用いて培地中にはがし、次いで、4℃、2000rpmで5分間ペレット化した。細胞をDEPC・PBSで洗浄し、前述のようにペレット化した。その細胞を10mMのTEA(トリエタノールアミン)pH7.6、130mMのKCl、5mMのMgCl₂、0.5mMのCaCl₂、0.25mMスクロースに0.5%デオキシコール酸塩及び0.5%トリトンX100を補足した溶液に再懸濁し、氷上で10分間インキュベートした。その核を、4℃、3000rpmで10分間の遠心分離によりペレット化した。0.3mlの上清を7mlの15%～40%スクロース勾配に重層し、200,000×gで1時間遠心分離し、次いで、ツァイスPM・2A分光光度計に載せW+W記録計に連結したフロースルーセルを用いる260nmでの吸光度を測定することによりモニターした。フローセルからの流出液を集め、各勾配を三つの画分、すなわち、ポリソーム、モノソーム及び残りのもの(非翻訳物質)に分割した。ポリソームは、32000×gで17時間の遠心分離によりペレット化し、RNAをペレットから抽出した。モノソームRNAはイソプロパノールと酢酸アンモニウムで沈澱させ、次いで、前に記述したように抽出した。

【0040】

結果

アルブミンシグナル配列によるグロビンmRNAの転送： 最初に、ウサギベーターグロビン5'UTRと天然の3'UTR又はc-myc3'UTRのいずれかを有するコーディング領域に、それぞれアルブミンシグナル配列を加えるか又は加えないかに基づいて四つのプラスミドを構築した。これらの構築物をLtkー繊維芽細胞に導入して、安定なトランスフェクトした細胞株を確立した。トランスフェクトした遺伝子の発現は、グロビン転写物を検出するためのノーザンハイブリダイゼーションにより評価して四つの遺伝子すべてが発現していることがわかった。本発明者らは、70%コンフルエンスでグロビン発現の最高のレベルを見出し(データは示さず)、その後のすべての実験は、その段階の生育で行なった。

【0041】

界面活性剤/塩による分画は、FP、CBP及びMBP間の転写物の区画化を研究するために行なった。各細胞株を分画し、ポリソームをペレット化し、次いで、RNAをそのペレットから抽出し、グロビン転写物の生成量についてノーザンハイブリダイゼーションにより分析した。図2に示すように、対照細胞株(GG)では、グロビン転写物は遊離のポリソームに大部分見出された。対照的に、アルブミンシグナル配列を有するグロビン転写物を発現する細胞(SSGG)においては、この転写物は、MBP/ERに多く見出された。また、SSGM転写物も、MBP/ER画分中に最高の生成量で見出された。

【0042】

18S・rRNAプローブでフィルターを再精査すると、RNA負荷に関する補正及び単位RNA当たりのハイブリダイゼーションデータの定量化が可能になった。FP、CB及びMBPにおけるグロビン転写物の生成量は、それぞれ、GG細胞において2.5±0.4、2.9±1.0及び2.1±0.9(少なくとも4回の別々の実験からの平均±s.e.m.、結合した18Sプローブのc.p.m.当たりの結合したグロビンプローブのc.p.m.の任意の単位として表す)であり、SSGG細胞において0.9±0.2、1.3±0.2及び2.5±0.8であった。これらの実験において最も重要なパラメーターであったのは、全体の発現レベルではなく相対的な転写物の分布であったので、これ

らのデータを次に、F P画分での生成量と比較して図3に示すように表した。これらのデータから、アルブミンシグナル配列の付加がグロビンmRNAをERに転送することが確認される ($p = 0.01$)。

【0043】

GM細胞において、F P、C B P及びM B Pにおけるグロビン転写物の生成量は、それぞれ、 2.6 ± 0.7 、 2.8 ± 0.9 及び 1.6 ± 0.5 （少なくとも4回の別々の実験からの平均 $\pm$ s. e. m.、結合したグロビンプロブのc. p. m.の任意の単位として表す）であり、S S GM細胞においては、生成量の分布は、それぞれ、 2.5 ± 1.1 、 2.3 ± 0.8 及び 3.0 ± 1.4 であった。F Pにおけるものに比した生成量として表されたこれらのデータの分析から、GM転写物は以前（ヘスキースら、1994）に見出されたようにほとんどC B Pに存在するが、対照的に、S S GM転写物はC B P及びM B Pで同様の相対的な生成量で見出される（図3）ことが示された。M B Pにおけるグロビン転写物の生成量は、GM細胞よりもS S GM細胞において有意に多く、ERに転写物を転送するシグナル配列の能力を再び示す。しかしながら、GM細胞と比したS S GM細胞におけるM B Pの生成量の増加は、G G細胞と比したS S G G細胞における生成量の増加よりも有意に少なかった ($p < 0.05$)。こうして、このシグナル配列は、付着したc-myc 3' UTRを有するグロビンコーディング領域及び5' UTRを転送するものの、c-myc 3' UTRとこのシグナル配列の両方の存在は、転送が起こる程度を低下させた。これは、ER局在化シグナル（シグナルペプチド）と細胞骨格局在化シグナル（c-myc 3' UTR；ベイルンら、1996）との間に競合が存在することを示唆する。

【0044】

シグナル配列の付加はmRNAの安定性及び翻訳効率に何の影響も有さない： 5' シグナルの操作がグロビンnRNAの安定性を変えた可能性が理論的には存在したので、本発明者らは、キメラ転写物の安定性を測定した。各細胞株を70%コンフルエンスまで生育させ、次いで、アクチノマイシンDで処理してさらなる転写を阻害した。RNAの生成量は、ノーザンブロッティングにより測定した。グロビンは高度に安定なメッセージであるので（アビブ(Aviv)ら、1976）、G G及びS S G G転写物の生成量は12時間の期間にわたって測定した。図4に示すように、追加のアルブミンシグナル配列は、グロビンmRNAの安定性を有意に変化させなかった。同様に、GM、S S GM細胞株の分析から、c-myc 3' UTRを有するグロビン転写物へのシグナル配列の付加は、nRNAを不安定化させなかった（データは示さず）。フィルターの再精査から、GAPDH nRNAが検出され、転写が四つの細胞株すべてにおいて阻害されたことが示された（データは示さず）。

【0045】

mRNAの安定性におけるシグナル配列の効果： 5' 及び3' シグナルの操作がグロビンmRNAの安定性を変化させた可能性が理論的には存在したので、本発明者らは、追加したシグナル配列のmRNA安定性に対する安定効果を決定した。細胞を70%コンフルエンスまで生育させ、次いで、アクチノマイシンDで処理してさらなる転写を阻害した。RNAの生成量は、ノーザンブロッティングにより測定した。グロビンは高度に安定なメッセージであるので（アビブ(Aviv)ら、1976）、G G及びS S G G転写物の生成量は、12時間の期間にわたって測定した。図4に示すように、アルブミンシグナル配列の付加は、グロビンmRNAの安定性を有意に変化させなかった。GAPDH mRNAを検出するためのフィルターの再精査（データは示さず）は、転写が両方の細胞株で阻害されたことを示した。

【0046】

翻訳の効率： 外来性遺伝子内のシグナルの操作が翻訳全般に影響を与えたのかそれとも特定の改変された遺伝子の翻訳に影響を与えたのかを決定するために、四つの細胞株のタンパク質合成装置をポリソームプロファイル分析に付した。細胞を塩と界面活性剤で溶解し、可溶性物質を15%～40%スクロース勾配に重層した。ポリソームプロファイルを記録した。図5に示す。ポリソーム/モノソーム比を表2に示す。ポリソームプロフィー

ルは四つの細胞株全てにおいて非常に類似しており、活性なポリソームに存在するリボソームの割合は類似していた。ピークの高さが異なるのは、勾配に重層したRNAの全量の相違を表す。したがって、4つの構築物でのトランスフェクションは、タンパク質合成全体に影響しなかった。スクロース勾配由来のポリソーム及びモノソーム画分におけるグロビン転写物の割合の分析（表3）から、シグナル配列の付加が転写物の翻訳を有意に変化させないことが示される。

【0047】

アルブミン3' UTRの影響： 図3における結果は、5' ターゲッティングシグナルと3' ターゲッティングシグナルとの間に競合が存在することを示唆したが、本発明者らは、観察された効果がグロビンコーディング配列と、そのシグナル伝達の役割を果たすシグナル配列を抑制するc-myc 3' UTRとの間の何らかの形の相互作用によるものであることを懸念した。この疑問を解決するために、本発明者らは、異なる3' UTR、すなわち、アルブミン遺伝子由来の3' UTRを有するさらなるベクター、すなわち、ラットアルブミンmRNAの3' UTRとラットアルブミンシグナル配列の両方を有するグロビンコーディング領域（SSGA）を構築した。このプラスミドをLtk細胞にトランスフェクトし、安定な細胞株を確立した。SSGA細胞を、前記したように分画して分析した。図6に示すように、その結果は、アルブミン3' UTRとシグナル配列の両方を含むSSGA転写物がMBP/小胞体画分に優勢に回収されたことを示す。このことは、グロビン転写物のERへの転送を阻止するには外来性の3' UTRの導入それ自体では十分でないことを示す。グロビンコーディング配列がラットアルブミン3' UTRに連結するがシグナル配列を持たないさらなるベクター（GA）を作製したが、不幸にも、本発明者らはこの遺伝子を発現するトランスフェクト細胞を検出することができなかったので、さらなる分析は不可能であった。

【0048】

討論

本発明の結果は、DNA組換え技術とトランスフェクションとの組合せにより、グロビンmRNAが小胞体に標的化し直される細胞株を作成することが可能であることを示す。こうして、Ltk繊維芽細胞では、天然のグロビン3' UTRを有するグロビンにラットアルブミンシグナル配列を付加することにより、そのmRNAは膜結合型ポリソームに転送された。これは、安定な細胞株において、遊離のポリソームからERへのmRNAの転送の最初の証明である。ヒストンmRNAのMBPへの部分的な転送は、大腸菌シグナル配列を用いて哺乳動物細胞（ヒラ）で以前に証明されている（ザンベッティ(Zambetti)ら 1987)。また、リー(Le)と共同研究者(1996)らは、IgMシグナルペプチドを用いてCOS-7細胞から活性なシアリルトランスフェラーゼを分泌させたが、この場合、天然のシアリルトランスフェラーゼはERで合成される。しかしながら、これらの場合のいずれにおいても、トランスフェクションが一過性であったことは重要である。

【0049】

遊離のポリソーム上で翻訳されるmRNAに加えて、相当の割合のmRNAが細胞骨格に会合したポリソームで翻訳される（ヘスキース, 1996）。mRNAの細胞骨格への標的化は、3' UTRのシグナルによるものであることが示された（ヘスキースら, 1994; バイルーンら, 1996; マホンら, 1997)。図3に示すように、シグナルペプチドに加えて、細胞骨格標的化シグナルが転写物の3' UTR中に存在するときは、膜結合ポリソームへの移行が減少する。これは、アルブミン由来の異なる「外来性」3' UTRのグロビンへの付加（SSGA; 図6）がシグナル配列による転送を低下させなかったことから、「外来性」3' UTRの非特異的効果により生じたものではないように思われる。したがって、このデータは、ハイブリッド転写物がシグナル配列と3' UTR局在化シグナルの両方を含む場合、5' シグナルと3' シグナルとの間に競合が存在することを示す。こうして、c-myc 3' UTR局在化シグナルは、シグナル配列を介するmRNAの区画分けを妨害するように見える。

【0050】

これらのデータは、バイオテクノロジーに重要な関係を有する。第一に、これらのデータは、細胞内タンパク質をコードするmRNAがERに転送される安定な細胞株を形成させることが可能であることを証明する。第二に、これらのデータは、そのようなmRNAが3'UTR局在化シグナルを含むときは、そのようなシグナルは効率的な転送を達成するために除去されなければならないことを示す。

【0051】

アルブミン3'UTRでの本発明の結果により示されるように(図6)、特にシグナル配列と同じ遺伝子が用いられるとき、分泌タンパク質のmRNA由来の3'UTRを含むベクターを用いることが最も適当でありうる。このようにして、所望のコーディング領域を、5'UTR/シグナル配列と分泌されるタンパク質のmRNA由来の3'UTRとの間に挿入し、シグナル競合の問題を根絶できる。

10

【0052】

そのような改変遺伝子が市販目的に使用されるべきものである場合、理想的にはシグナルの改変は、いかなる主要な程度にもmRNAの安定性と翻訳の効率を減少させるべきでない。図4と5におけるデータは、グロビンへのシグナル配列の付加がmRNAの安定性と翻訳の効率に何の効果も持たなかったことを示す。したがって、標的化のし直しは、mRNAの安定性及び翻訳の維持と両立させることができる。レポーターとしてルシフェラーゼを用いて、本発明者らは、アルブミンシグナル配列によるmRNAの標的化のし直しが、ER中で免疫学的に認識可能なタンパク質の合成を伴うことを示した。

20

【0053】

結論として、本発明の結果は、安定性と翻訳を維持しながらmRNAのERへの標的化のし直しが可能であることを示す。

【0054】

参考文献

アビブ、バローチ、バストスとレビー(Aviv, H., Valloch, V., Bastos, R., and Levy, S.)、(1976) 培養赤白血病フィーンド細胞におけるグロビンmRNAの生合成と安定性。Cell 8 495-503

ブローベルとドッベルスタイン(Blobel, G. and Dobberstein, B.)、(1975) 膜を横切るタンパク質の移動。I。ネズミミエローマ細胞の膜結合性リボソーム上の、タンパク質分解が進行している及び進行していない、発生期の免疫グロブリン軽鎖の存在。J. Cell Biol. 67, 835-851。

30

ボック、ウイロン、ベアー、ローン(Bock, S.C., Wion, K.L., Vehar, G.A., Lawn, R.M.)、(1982) ヒトアンチトロンビンIIIのcDNAのクローニングと発現。Nuc. Acids Res. 10, 8113-8125。

【0055】

ボニユー、ピカゼック、マルティ、カニー、ブランチャード、フォート、ジーンター(Bonnieu, A., Piechaczyk, M., Marty, L., Cuny, M., Blanchard, J.-M., Fort, P., Jeanteur, P.)、(1988) c-mycのmRNAターンオーバーの配列決定：3'及び5'非コーディング領域の影響。Oncogene Res. 3, 155-166。

ボニユー、ロー、マルティ、ジーンター、ピカゼック(Bonnieu, A., Roux, P., Marty, L., Jeanteur, P., Piechaczyk, M.)、(1990) マウスc-mycRNAの急激な分解によって、AUUUAMモチーフは重要ではない。Oncogene 5, 1585-1588。

40

チョムクジンスキーとサッチ(Chomczynski, P. and Sacchi, N.)、(1987) グアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム抽出によるRNAの単一工程単離方法。Anal. Biochem. 162, 156-159。

【0056】

デブリン、デブリン、ミュンボ、リリー、レイド、ワレン(Devlin, J.J., Delvlin, P.E., Myumbo, K., Lilly, M.B., Rado, T.A. Warren, M.K.)、(1987) ヒト細胞系による顆粒球コロニー刺激因子の発現。J. Leuk. Biol. 41, 302-306。

ガルシア、ゴールドスタイン、パサク、アンダーソン、ブラウン(Garcia, C.K., Goldste

50

in, J.L., Pathak, R.K., Anderson, R.G.W., Brown, M.S.), (1994) 乳酸塩、ピルビン酸塩及びその他のモノカルボン塩の膜輸送の分子的特性解析：コリ回路の言外の意味。Cell 76, 865-873。

ヘスキース、カンパベル、ピカゼック、ブランチャード(Hesketh, J., Campbell, G., Piechaczyk, M., Blanchard, J-M.), (1994) c-myc 非翻訳領域による、細胞骨格結合性ポリソームへの c-myc 及び β -グロビン配列の標的化。Biochem. J. 198, 143-148。

【0057】

ヘスキース(Hesketh, J.E.), (1996) 細胞内における高分子の振り分け。Biochem. Soc. Trans. 24, 521-527。 10

ホフランド、カンパベル、プライム、ヘスキース(Hovland, R., Campbell, G., Pryme, I., Hesketh, J.), (1995) サイクリンA、c-myc 並びにリボソームタンパク質L4及びS6のmRNAは、He p G 2細胞中の細胞骨格結合性ポリソームと関連性がある。Biochem. J. 310, 193-196。

ホフランド、ヘスキース、プライム(Hovland, R., Hesketh, J.E., Pryme, I.F.), (1996) タンパク質合成の区分化：細胞骨格の重要性及びmRNA標的化での役割。Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 1089-1105。

【0058】

ジェームズとシンプソン(James, J., and Simpson, B.K.), (1996) 食物加工における酵素の適用。Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36, 437-463。 20

キスラウスキス、ズー、シンガー(Kislauskis, E.H., Zhu, S., Singer, R.H.), (1994) β -アクチンのメッセンジャーRNAの細胞内局在化の原因となる配列も、細胞表現型に影響を与える。J. Cell Biol. 127, 441-451。

リー、キム、ツジ(Lee, Y-C., Kim, C-H., Tsuji, S.), (1996) 哺乳動物細胞における細胞外分泌に効果的な発現ベクター。Mol. Cells 6. 552-556。

【0059】

リン、リン、ライ、ブラウン、イグリー、スマリング、フォックス、チェン、カストロ、サグス(Lin, F-K., Lin, C-H., Lai, P-H., Browne, J.K., Egrie, J.C., Smalling, R., Fox, J.M., Chen, K.K., Castro, M., Suggs, S.), (1986) サルのエリスロポエチン遺伝子：クローニング、発現及びヒトのエリスロポエチン遺伝子との比較。Gene 44. 201-209。 30

マホン、ビーティ、グローバー、ヘスキース(Mahon, P., Beattie, J., Glover, L.A., Hesketh, J.), (1995) ラットの肝臓ガン(H4)細胞におけるメタロチオネインのアイソフォームmRNAの局在性。FEBS Letters 373, 76-80。

ミシェル、ソブチャク、マルピース、チオライス、ストリーク(Michel, M-L., Sobczak, E., Malpiece, Y., Tiollais, P., Streeck, R.E.), (1985) 増幅された、B型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子のチャイニーズハムスター卵巣細胞における発現。Bio/Technology 3, 561-566。

【0060】

プライム、パートリッジ、ヨハンセン、ヨルダー、タウラー、ヘスキース(Pryme, I.F., Partridge, K., Johannessen, A.J., Jodar, D., Tauler, A., Hesketh, J.E.), (1996) タンパク質合成機構の、遊離性ポリソーム、細胞骨格結合性ポリソーム及び膜結合性ポリソームへの振り分け。Genetic Engineer and Biotechnologist [need correct abbreviation] 16, 137-144。 40

サンブルック、フリティッシュ、マニアティス(Sambrook, J., Fritisch, E.F., Maniatis, T.), (1989) モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル(第二版)。Cold Spring Harbor Laboratory Press。

シャク、カポン、ヘルミス、マースタス、ベイカー(Shak, S., Capon, D.J., Hellmiss, R., Marsters, S.A., Baker, C.L.), (1990) 組み換えヒトDNアーゼIは嚢胞性繊維症患者の痰の粘度を下げる。Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 9188-9192。 50

【0061】

ベデラー、プライム、ヘスキース(Vedeler, A., Pryme, I.F., Hesketh, J.E.)、(1991)

引用されたK r e b II及び3 T 3細胞における、遊離性ポリソーム、細胞骨格ポリソーム及び膜結合性ポリソームの特性解析。Mol. Cell Bioch. 100, 183-193。

ベイルーン、カンパベル、ワイズマン、ブランチャード、ヘスキース(Veyrune, J-L., Campbell, G.P., Wiseman, J., Blanchard, J-M., Hesketh, J.E.)、(1996) c-mycのmRNAの3'非翻訳領域の局在化シグナルは、c-mycのmRNA配列及びβ-グロビンレポーター配列を、核周辺の細胞質及び細胞骨格結合性ポリソームに標的化させる。J. Cell Sciense 109, 1185-1194。

ウィルソン、ブリンドル、フルトン(Wilson, I.A., Brindle, K.M., Fulton, A.M.)、(1995) 筋原細胞のクリエーティングキナーゼのMアイソフォーム及びBアイソフォームのmRNAの特異な局在化。Biochem. J. 308, 599-605。

【0062】

ザンベッティ、スタインとスタイン(Zambetti, G., Stein, G., and Stein, J.)、(1987)

ヒーラ細胞における、キメラヒトヒストン融合mRNAの膜結合性ポリソームへの標的化。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2683-7。

【0063】

【表1】

P C R用のオリゴデオキシヌクレオチド

KP4-GAC AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC TTC

KP5-AAA AGA AAA Ctc TaG aTG GCC CAA TTG TAT

KP6-GGA CTT TCC AAA ATC TCG TAA CAA CTC CGC

KP7-CTG GAC AGA TGC ACc atA TGG TCT GTT TTG

KP8-GAA GTT CTC AGG ATC CAC GTG CAG CTT GTC

表1. 本文中に記載の種々の発現ベクターのクローニングの際に用いられるオリゴ体(oligos)。小文字の文字は、制限部位を新たに生じさせるために必要な変化を示す。

【0064】

【表2】

10

20

30

40

	ポリソーム	モノソーム
GG	56.5% ± 3.0	43.5% ± 3.0
SSGG	53.9% ± 1.7	46.1% ± 1.7
GM	51.7% ± 0.4	48.3% ± 0.4
SSGM	51.7% ± 1.1	48.3% ± 1.1

10

表 2. ポリソーム及びモノソーム中のリボソームの分布。リボソームの分布百分率は、ショ糖密度勾配遠心分離によって分離されたポリソーム及びモノソーム中に存在する A_{260} 吸収性成分の量から算出した。平均 ± S. E. M. で結果を示す (GG及びSSGGについては $n = 6$ 、GM及びSSGMについては $n = 9$)。

20

【 0 0 6 5 】

【表 3】

	ポリソーム	モノソーム
GG	32.3%	67.7%
SSGG	42.1%	57.9%
GM	57.8%	42.2%
SSGM	48.5%	51.5%

30

表 3. ポリソーム及びモノソーム中のグロビンの転写物の分布。ショ糖密度勾配から回収された (概略を図 5 に示す。) ポリソーム及びモノソーム画分から RNA を抽出し、そしてノーザンブロッティングによりグロビン mRNA の生成量について分析した。

40

【図 1】

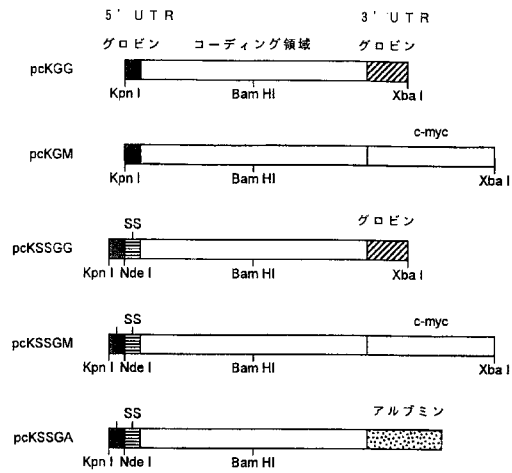


FIG. 1

【図 2】

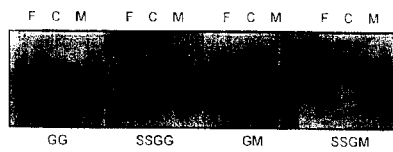


FIG. 2

【図 3】

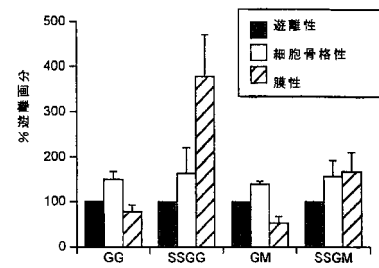


FIG. 3

【図 4】

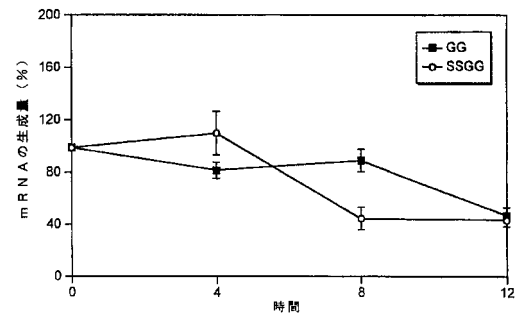


FIG. 4

【図 5】

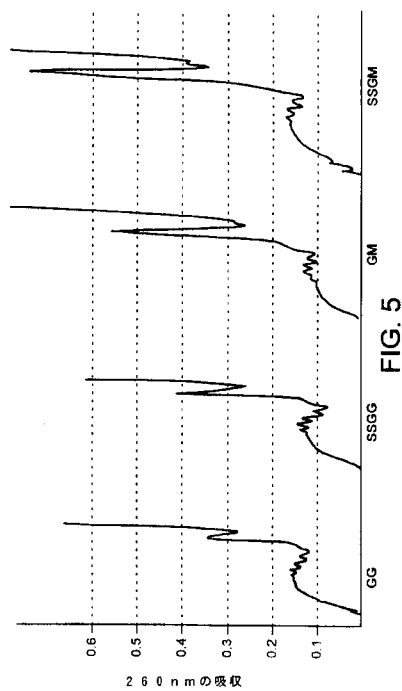


FIG. 5

【図 6】

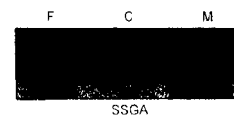


FIG. 6A

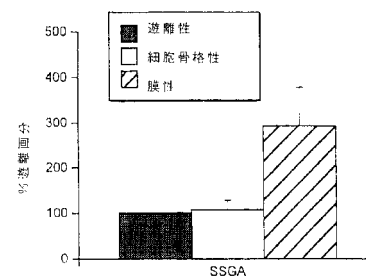


FIG. 6B

フロントページの続き

(72)発明者 アルバート タウラー

スペイン国、バルセロナ、08028、エイヴィ・ダイアゴナル、643番地、ユニベルジタート
ド バルセロナ、ファカルタート ド ファルマシア、ディーアイヴィ・IV、デパートメント
ド ビオキミカ イ ビオロギカ モレキュラー

(72)発明者 イアン フレイザー プライム

ノルウェー国、エヌオウー5009 ベルゲン、アルスタットバイエン 19番地、ユニバーシテ
ィ オブ ベルゲン、デパートメント オブ バイオケミストリー アンド モレキュラー バイ
オロジー

(72)発明者 ジョン エドワード ヘスキース

イギリス国、エヌイー17アールユー、ニューカースル、キングズ ロード、ユニバーシテ
ィ オブ ニューカースル、デパートメント オブ ニュートリショナル アンド バイオロジカル
サイエンシーズ

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993年10月, vol.90, no.19, p.8957-8961

Biochem. Mol. Biol. Int., 1997年 7月, vol.42, no.4, p.825-832

J. Cell. Sci., 1996年 6月, vol.109, no.6, p.1185-1194

Cell Biol. Int., 1997年 4月, vol.21, no.4, p.243-248

Int. J. Biochem. Cell Biol., 1997年 7月, vol.29, no.7, p.1013-1020

Biochim. Biophys. Acta., 1997年 9月, vol.1358, no.2, p.153-162

Endocrinology, 1996年 7月, vol.137, no.7, p.2766-2773

Biochem. Soc. Trans., 1996年 5月, vol.24, no.2, p.521-527

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 19/00

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed