

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008年11月27日 (27.11.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/143354 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 9/40 (2006.01)

市赤見台 2-2-26-208 Saitama (JP). 相川聖一 (AIKAWA, Seichi) [JP/JP]; 〒1160013 東京都荒川区西日暮里 6-2-2-16 Tokyo (JP). 相川史子 (AIKAWA, Fumiko) [JP/JP]; 〒1160013 東京都荒川区西日暮里 6-2-2-16 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/059604

(22) 国際出願日: 2008年5月19日 (19.05.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-133536 2007年5月18日 (18.05.2007) JP

(74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人東京都医学研究機構 (TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH) [JP/JP]; 〒1638001 東京都新宿区西新宿二丁目8番1号 Tokyo (JP). 株式会社アルティフ・ラボラトリーズ (Altif Laboratories Inc.) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海2丁目45 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 桜庭均 (SAKURABA, Hitoshi) [JP/JP]; 〒2701164 千葉県我孫子市つくし野 6-10-5 Chiba (JP). 田島陽一 (TAJIMA, Youichi) [JP/JP]; 〒1820014 東京都調布市柴崎 1-60-1-208 Tokyo (JP). 川島育夫 (KAWASHIMA, Ikuo) [JP/JP]; 〒3650064 埼玉県鴻巣

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR ENZYME REPLACEMENT THERAPY

(54) 発明の名称: 酵素補充療法用医薬組成物

(57) Abstract: Disclosed is a pharmaceutical composition for the treatment of Fabry disease, which has few allergic adverse side effects, has high stability in the blood (plasma), can be taken up readily by a cell in a dysfunctional organ, and utilizes a protein having an α -galactosidase activity. The pharmaceutical composition comprises, for example, a protein which acquires an α -N-galactosidase activity through the alternation of the structure of the active site in wild-type human α -acetylgalactosaminidase.(57) 要約: アレルギー性副作用がなく、血中 (血漿中) 安定性が高く、かつ障害臓器の細胞に取り込まれやすい、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質を用いた、ファブリー病治療用医薬組成物を提供する。本発明のファブリー病治療用医薬組成物は、例えば、野生型ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性部位の構造を変化させて α -ガラクトシダーゼ活性を獲得したタンパク質を含むものである。

WO 2008/143354 A1

明 細 書

酵素補充療法用医薬組成物

5 技術分野

本発明は、酵素補充療法用医薬組成物、具体的には、ファブリー病治療用医薬組成物に関する。また本発明は、当該医薬組成物に用い得る基質特異性を変換した新規高機能酵素、具体的には α -ガラクトシダーゼ活性を有する組換えタンパク質に関する。

10

背景技術

これまで根本的治療法がなかった遺伝性酵素欠損症に対して、当該酵素を遺伝子工学的に産生し、これを点滴静注等により血管内に投与する酵素補充療法が開発されつつある。また、遺伝性酵素欠損症としては、比較的発生頻度が高く、特定疾患（難病）に指定されている、ファブリー病(Fabry Disease)（遺伝性 α -ガラクトシダーゼ欠損症；ライソゾーム病又はリソソーム病と呼ばれる遺伝子疾患群のひとつである）がよく知られている（Kenneth J. Dean et al., Fabry Disease, “Practical Enzymology of the Sphingolipidoses”, U.S.A., Aln R. Liss, Inc., 1997, p.173-216 参照）。

15

20 ファブリー病とは、ヒト細胞内小器官のひとつであるリソソームに存在する酵素のうち、「 α -ガラクトシダーゼ」という酵素の活性低下もしくは欠損が原因となり、その生体内基質であるグロボトリアオシルセラミド（GL-3；セラミドトリヘキシシド(CTH)とも言う）という糖脂質が分解されずに体内（例えば、血管、皮膚、角膜、神経、腎臓、心臓等）に蓄積することによって生じる、糖
25 脂質代謝異常性疾患である。

α -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子はX染色体上にあるため、この疾患はX染色体性の遺伝型式をとる。そのため、本症では、主にヘミ接合体の男性において明確な臨床像を呈する。典型的な臨床経過をとる「古典型ファブリー病」は、約4万人の男児に1人の割合で発生すると考えられており、少年期や

青年期に、手足の痛み、低汗症、被角血管腫、角膜混濁等の症状がみられ、それが進行して、中年期以後に腎不全、心不全、脳血管障害等の全身の臓器障害を生じ、これが死因となる。また、「古典型ファブリー病」のような典型的な臨床経過をとらず、発症が遅く比較的緩やかな経過を示すものとして、「亜型

5 ファブリー病」も存在し、このタイプの患者においては、僅かながら α -ガラクトシダーゼの残存活性が認められる。亜型ファブリー病としては、例えば「心ファブリー病」が知られており、前記糖脂質の蓄積が主に心臓で生じ、それにより心臓肥大が発症して心不全や不整脈等の障害を生じる。一方、ヘテロ接合体のファブリー病女性患者では、X染色体の特性により、その臨床像としては
10 様々な形がみられ、ヘミ接合体の男性と変わらない重症のものからほとんど無症状のものまで存在し得る。しかし、最近の調査により、ヘテロ接合体のファブリー病女性患者は、高年齢になると、そのほとんどが何らかの症状を示すことが明らかになり、これらを「保因者」としてではなく「患者」として扱うべきであるとの見方もある。

15 ところで、近年、このようなファブリー病に対しても酵素補充療法が確立され、ほ乳類由来の細胞で産生した組換えヒト α -ガラクトシダーゼが、上記療法におけるファブリー病治療薬の有効成分として広く使用されている (Eng CM et al., Am J Hum Genet, 68:711-722 (2001) ; Eng CM et al., N Engl J Med, 345:9-16 (2001) ; Schiffmann R et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97:365-370
20 (2000) 参照)。

また、動物細胞以外の細胞（酵母など）を宿主として産生した組換えヒト α -ガラクトシダーゼをファブリー病の治療（酵素補充療法）に用い得るものとする方法（特開2002-369692号公報 参照）や、さらには、ヒト α -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子を障害組織の細胞に導入して発現させることで酵素の補
25 充を行う遺伝子治療的な方法（特表2002-522509号公報 参照）なども提案されている。

発明の開示

しかしながら、現行のファブリー病治療用の補充用酵素薬は、もともと酵素（ヒト α -ガラクトシダーゼ）を持たない患者に対して投与されることが多いため、投与した患者の多くにおいて治療薬中の酵素が異物として認識され、抗体が産生されてしまい、その結果、アレルギー反応を主体とする副作用が高頻度
5 に出現するという問題が生じる。このような問題は、遺伝子治療的な方法で酵素を補充する場合においても同様である。

また、補充用酵素薬は血管内に投与されるが、 α -ガラクトシダーゼ自体は血液中で不安定であるため、実際の治療においては、頻繁に投与（2週間に1回の割合）しなければならず、また1回当たりの投与量を多くする必要も生じ得る。さらに、ヒト α -ガラクトシダーゼ（ α -GAL）には、障害臓器の細胞内（詳しくは細胞内のリソソーム）に取り込まれるために必要なマンノース-6-リン酸（M6P）残基が結合し得る糖鎖（N型糖鎖）の数が少ないため、血液中から当該細胞に取り込まれ難い。特に、ファブリー病における主な障害臓器である腎臓
10 や心臓での取り込み効率が低く、腎障害や心障害に対する治療効果が十分とは言い難い。これらのことから、治療において一定量の酵素を標的細胞に取り込ませるためには、大量の酵素が必要となり、補充用酵素薬をより頻繁に、より多く投与する必要が生じる。このような治療の現状は、患者にとって、体力的な面や精神的な面、さらには経済的な面において大きな負担となり、「生活の質(Quality of Life : QOL)」に悪影響を及ぼすこととなっている。

20 そこで、本発明が解決しようとする課題は、アレルギー性副作用がなく、血中（血漿中）安定性が高く、かつ障害臓器の細胞に取り込まれやすい、 α -GAL 活性を有するタンパク質を用いた、ファブリー病治療用医薬組成物を提供することにある。また本発明は、上記 α -GAL 活性を有するタンパク質のごとき、基質特異性を変換した新規高機能酵素を提供することを目的とする。

25 本発明者は、上記課題を解決するべく鋭意検討を行った。その結果、 α -GAL とは基質特異性が異なるが全体として立体構造が酷似したタンパク質である「 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(α -NAGA)」に着目した。そして、この α -NAGA の活性部位の構造を変化させ、 α -GAL 活性を有するように基質特異性を転換して得られた新規高機能酵素（ α -NAGA 変異体）を、酵素補

充療法に用いるファブリー病治療用医薬組成物の有効成分として用いれば、上記課題を解決し得ると考えた。

しかしながら、当該分野においては、次のことが一般的に知られている。

- 1) タンパク質を構成するアミノ酸の一部を別のアミノ酸に置換すると、当該アミノ酸とその周囲に存在するアミノ酸との相互作用の状態（水素結合、疎水結合など）が変化する可能性がある。相互作用の状態が変換した場合、アミノ酸の一部が置換されたタンパク質の立体構造（3次元構造）は変化し、そのタンパク質の本来の機能（特に、酵素の場合は酵素活性）が損なわれるおそれがある。
- 2) タンパク質を構成するアミノ酸の一部を別のアミノ酸に置換することによる、上述の立体構造変化は、当該タンパク質の表面構造の変化につながる可能性がある。表面構造が変換したタンパク質を生体内に投与した場合、生体は、当該タンパク質とは異なるタンパク質（生体にとっては異物）を投与されたものと認識し、免疫反応が生じてしまう。この免疫反応は、タンパク質を医薬品として生体内に投与し使用する場合には、当該タンパク質の機能を低下させるだけでなく、アナフィラキシーを誘発する場合もあり、生命に関わる極めて大きな問題となる。

- すなわち、医薬品として生体内に投与するタンパク質は、その機能（活性）を有していることのみでなく、投与後に免疫反応を生じないように設計をする必要がある。

- 上記の理由から、 α -GAL に類似している α -NAGA につき、その活性部位のアミノ酸を α -GAL の活性部位と同様のアミノ酸に置換したとしても、置換したアミノ酸の位置及び種類によっては、当然に、 α -GAL 活性を有し、かつ立体構造上は α -NAGA であるタンパク質（ α -NAGA 変異体）を作製することができるとは言えない。

本発明者は、これらの問題を解決するために、まず、ホモロジーモデリングによる立体構造解析によるシミュレーションを行い、 α -NAGA の表面構造を維持しつつ、 α -GAL 活性を獲得することが可能なアミノ酸置換の態様を詳細に検討し、ファブリー病治療薬候補の α -NAGA 変異体のアミノ酸配列を決定

した。その上で、実際に、この α -NAGA 変異体を発現させ、 α -GAL の基質を分解する活性を持つことを確認した。さらに、この α -NAGA 変異体を、実際にファブリー病モデルマウスに投与し、 α -GAL 活性が障害組織に分布していることをも確認した。

- 5 これらの検証により、当該 α -NAGA 変異体が、初めてファブリー病治療用の医薬品として、有効に使用し得ることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- 10 (1) 野生型ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性部位の構造を変化させて α -ガラクトシダーゼ活性を獲得したタンパク質を含むことを特徴とする、ファブリー病治療用医薬組成物。

本発明の医薬組成物は、例えば、上記タンパク質が α -ガラクトシダーゼの基質特異性を有するものが挙げられる。

- 15 (2) 以下の(a)又は(b)のタンパク質を含むことを特徴とする、ファブリー病治療用医薬組成物。

(a) 下記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質。

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第188番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列

- 20 (ii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第191番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列

- 25 (iii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第188番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換され第191番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(b) 上記(a)の(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。

本発明の医薬組成物は、例えば、上記(a)のタンパク質において、上記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸若しくはアスパラギン酸であるもの、上記アラニン以外のアミノ酸がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか1つであるもの、又は、上記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ、上記アラニン以外のアミノ酸がロイシンであるものが挙げられる。

(3) 上記(1)及び(2)に記載の医薬組成物をファブリー病患者に投与することを特徴とする、ファブリー病の治療方法。

(4) 野生型ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性部位の構造を変化させて α -ガラクトシダーゼ活性を獲得したタンパク質であって、野生型ヒト α -ガラクトシダーゼ由来のシグナルペプチドを含むものである、前記タンパク質。

(5) 以下の(a)又は(b)のタンパク質。

(a) 下記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質。

(i) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において第202番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(ii) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において第205番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(iii) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において第202番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換され第205番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(b) 上記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。

本発明のタンパク質は、例えば、上記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸若しくはアスパラギン酸であるもの、上記アラニン以外のアミノ酸がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか1つであるもの、又は、上記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ、上記アラニン以外のアミノ酸がロイシンであるものが挙げられる。

(6) 上記(6)又は(7)記載のタンパク質をコードする遺伝子。

(7) 以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子。

(a) 下記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNA。

(i) 配列番号5に示される塩基配列において第604番目～第606番目の塩基が
5 セリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列

(ii) 配列番号5に示される塩基配列において第613番目～第615番目の塩基
がアラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列

(iii) 配列番号5に示される塩基配列において第604番目～第606番目の塩基
がセリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換され第613番目～第615番目
10 の塩基がアラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列

(b) 上記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNAに対し相補的な塩基配列か
らなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、
前記置換部位の塩基に対応する塩基が当該置換部位の塩基と同一であり、かつ
 α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

15 本発明の遺伝子は、例えば、上記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸若し
くはアスパラギン酸であるもの、上記アラニン以外のアミノ酸がロイシン、バ
リン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれ
るいずれか1つであるもの、又は、上記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸
であり、かつ、上記アラニン以外のアミノ酸がロイシンであるものが挙げられ
20 る。

(8) 上記(6)又は(7)記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(9) 上記(8)記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(10) 上記(9)記載の形質転換体を培養する工程と、得られる培養物から α -ガ
ラクトシダーゼ活性を有するタンパク質を採取する工程とを含む、当該タンパ
25 ク質の製造方法。

図面の簡単な説明

図1は、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAのサブユニット全体の立体構造を
表す模式図である。

図2Aは、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの活性部位の構造を表す模式図である。なお、図中に示したアミノ酸（スティック表示（基質を除く））は、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの基質に近接するアミノ酸残基の中で、 α -GALと α -NAGAに共通するアミノ酸残基の立体構造上での位置を示す。

5 図2Bは、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの活性部位の構造を表す模式図である。なお、図中に示したアミノ酸（スティック表示（基質を除く））は、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの基質に近接するアミノ酸残基の中で、 α -GALと α -NAGAとの間で異なるアミノ酸残基の立体構造上での位置を示す。

10 図2Cは、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの活性部位を構成するアミノ酸と、それぞれの基質との相互作用部位を示す概略図である。

図3は、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの各サブユニットにおけるN型糖鎖結合部位（N-glycosylation sites）の個数及び位置の比較を示す模式図である。

15 図4は、野生型 α -GAL及び野生型 α -NAGAの各サブユニットにおけるN型糖鎖結合部位（スティック表示（基質を除く））を、各サブユニットの立体構造中に示した模式図である。

図5は、(a)が、野生型 α -NAGAが自己の基質と結合する様子を示す模式図であり、(b)が、 α -NAGA変異体である α -NAGA(S188E/A191L)が α -GALの基質と結合する様子を示す模式図である。

20 図6は、野生型 α -NAGA、及び α -NAGA変異体である α -NAGA(S188E/A191L)の活性部位の構造を表す模式図である。

図7は、ファブリー病患者由来線維芽細胞内のCTH蓄積量について、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体、及び野生型 α -GALの添加による影響を示す、免疫染色の結果を表す図である。

25 図8は、 α -NAGA変異体である α -NAGA(S188E/A191L)の、各精製ステップでの試料のC.B.B.染色像を示す図である。

図9は、肝臓、腎臓及び心臓における α -GALの基質であるCTHの分析結果を示す図である。

図10は、腎臓組織の免疫染色の結果を示す図である。

図 1 1 は、心臓組織の免疫染色の結果を示す図である。

図 1 2 は、肝臓組織の免疫染色の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 5 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。

 なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願 2 0 0 7 - 1 3 3 5 3
6 号明細書の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行
10 物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

1. 本発明の概要等

(1) 用語の定義

- 15 本明細書においては、特に言及した場合を除き、以下のように用語の定義をするものとする。

 「 α -ガラクトシダーゼ」及び「 α -GAL」とは、いずれも、「ヒト α -ガラクトシダーゼ A」を意味する。

- 「 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ」及び「 α -NAGA」は、いずれも、「
20 ヒト α -ガラクトシダーゼ B」、すなわち「ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ」を意味する。

 「wt」とは、野生型 (wild type) を意味する。

 「M6P」とは、「マンノース-6-リン酸」を意味する。

- 「 α -GAL活性」とは、後述する α -GALの基質を加水分解し得る活性（後述
25 の反応式(1)参照）を意味し、 α -GALタンパク質（野生型 α -GAL）が有する活性という意味に限定されるものではない。

 「 α -NAGA活性」とは、後述する α -NAGAの基質を加水分解し得る活性（後述の反応式(2)参照）を意味し、 α -NAGAタンパク質（野生型 α -NAGA）が有する活性という意味に限定されるものではない。

「 α -GAL活性を獲得した」とは、基質結合部位において、 α -NAGAの基質との結合反応性よりも α -GALの基質との結合反応性が相対的に高くなったことを意味する。

- 5 「 α -GALの基質特異性を有する」とは、活性部位の構造（特に、基質の結合反応性に重要な役割を果たすアミノ酸残基の位置及び種類）が野生型 α -GALのそれと同じであることを意味する。

「第188番」及び「第191番」とは、野生型 α -NAGAのアミノ酸配列（配列番号2）からみた位置（当該アミノ酸配列のN末端のアミノ酸残基を第1番としてC末端側方向へ数えたときの位置）を示す。

- 10 「 α -NAGA変異体」とは、基本的には、野生型 α -NAGAの変異体を全て含む意味であり、特定の変異体（アミノ酸変異体）に限定はされるものではないが、本明細書においては、野生型 α -NAGAのアミノ酸配列（配列番号2）のうち第188番目のセリンがグルタミン酸に置換され、かつ、第191番目のアラニンがロイシンに置換された変異型タンパク質（すなわち「 α -NAGA(S188E/A191L)」と
- 15 表記される）を、 α -NAGA変異体と称して（定義づけて）、説明している場合がある。

- 「 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA」とは、通常、野生型 α -NAGAのシグナルペプチド部分（配列番号2に示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第17番目のアミノ酸からなるペプチド部分）が、野生型 α -GALのシグナルペ
- 20 チド部分（配列番号10に示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第31番目のアミノ酸からなるペプチド部分）に置換されたタンパク質を意味する。ここで、当該シグナルペプチド部分とは、一般に、タンパク質が細胞内で発現した後、細胞外に分泌された際には、既に除かれているものであるが、本発明においては、便宜上、細胞外に分泌された後のものに対しても、「 α -GALシグナルペ
- 25 チド融合 α -NAGA」と称することがある。

「 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体」及び「 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)」とは、通常、 α -NAGA変異体のシグナルペプチド部分（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第17番目のアミノ酸からなるペプチド部分）が、野生型 α -GALのシグナルペ

チド部分（配列番号10に示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第31番目のアミノ酸からなるペプチド部分）に置換されたタンパク質を意味する。ここで、当該シグナルペプチド部分とは、一般に、タンパク質が細胞内で発現した後、細胞外に分泌された際には、既に除かれているものであるが、本発明において

5 は、便宜上、細胞外に分泌された後のものに対しても、「 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体」又は「 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)」と称することがある。

(2) 配列表の説明

10 本明細書に記載の配列番号1～10に示される塩基配列及びアミノ酸配列が、どのような酵素タンパク質に関する配列であるかについて、下記表Aに示す。なお、表A中、「本体」とは、タンパク質のシグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質となる部分を意味する。また、「+」の表記は、所定のシグナルペプチド部分と本体部分とが結合したものであることを表す。

15

表A

配列番号	タンパク質
配列番号1(塩基配列), 配列番号2(アミノ酸配列)	wt α -NAGA (wt α -NAGAのシグナルペプチド + wt α -NAGAの本体)
配列番号3(塩基配列), 配列番号4(アミノ酸配列)	α -NAGA変異体(α -NAGA(S188E/A191L)) (wt α -NAGAのシグナルペプチド + α -NAGA変異体の本体)
配列番号5(塩基配列), 配列番号6(アミノ酸配列)	wt α -GALのシグナルペプチド + wt α -NAGAの本体
配列番号7(塩基配列), 配列番号8(アミノ酸配列)	wt α -GALのシグナルペプチド + α -NAGAの変異体の本体
配列番号9(塩基配列), 配列番号10(アミノ酸配列)	wt α -GAL (wt α -GALのシグナルペプチド + wt α -GALの本体)

(3) 本発明の概要

20 本発明は、ファブリー病の酵素補充療法に有効に用いることができ優れた治療効果を発揮し得るファブリー病治療用医薬組成物、及び当該医薬組成物の有

効成分として有用な新規高機能酵素としての組換えタンパク質を提供するものである。

5 現行のファブリー病治療用の補充用酵素薬は、CHO細胞やヒト繊維芽細胞などのほ乳類由来の細胞で産生した組換えヒト α -GALを使用している。しかしながら、このヒト α -GALの使用には、アレルギー性副作用、血液中での不安定性、障害臓器の細胞への取り込まれ難さなどの問題点があり、実際の治療においては患者への負担が非常に大きいものとなっているため、その改善が課題となっている。

10 本発明者は、これらの課題を解決するため、 α -GAL以外の酵素をファブリー病治療用の補充用酵素として利用することができないか検討し、 α -GALと同様にリソソーム酵素であり（すなわち細胞内での局在性が同じであり）、かつ α -GALと全体の立体構造は酷似しているが基質特異性の点では異なる、「 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(α -NAGA)」に着目した。

15 α -GALは古くは α -ガラクトシダーゼAと呼ばれ、この α -GALと生化学的性状がよく似た α -ガラクトシダーゼBと呼ばれるアイソザイムが存在すると考えられていた。この α -ガラクトシダーゼBは、 α -GALに比べて安定性が高いが、ファブリー病で体内に蓄積するグロボトリアオシルセラミド（セラミドトリヘキソシド(CTH)）を分解する能力は無いことが知られていた。その後、この α -ガラクトシダーゼBの実態は α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(α -NAGA)であることが判明した。この α -NAGAは、 α -GALをコードする遺伝子と同じ祖先遺伝子から派生したと考えられる遺伝子によりコードされている。 α -NAGAのcDNAは既にクローン化されており、17アミノ酸残基から成るシグナルペプチドを含む合計411アミノ酸残基から構成されるタンパク質をコードするものであることが分かっている。また、ヒト α -NAGAの構造は、ヒト α -GALと比較
25 して、塩基配列レベルで57.9%、アミノ酸配列レベルで52.2%の相同性を示す。さらに、ヒト α -NAGAは、ヒト α -GALと同様にホモ二量体の形で存在する酵素である。

本発明者は、以上の知見に基づいて、まず α -NAGAと α -GALの三次元構造モデルを構築し、比較を試みた。具体的には、プロテインデータバンク（PDB（

<http://www.rcsb.org/pdb/>)) に登録されているニワトリの α -NAGAの構造情報

(ID: 1KTC) を参考にしてヒト α -NAGAの三次元構造モデルを構築し、この構造と、PDBに登録されているヒト α -GALの三次元構造 (ID: 1R47) とを比較した。その結果、ヒト α -NAGAの三次元構造は、全体としても活性部位について

- 5 ても、ヒト α -GALの三次元構造と非常によく似ていることが分かった。しかしながら、活性部位に関しては、厳密には、数個のアミノ酸残基が異なるだけではあるが、これらのアミノ酸残基の中には、基質結合部位に存在し α -GAL及び α -NAGAの各々の基質特異性の違いに影響を与えている重要なアミノ酸残基が存在する。この点で、 α -GAL及び α -NAGAの活性部位には顕著といえる三次元
- 10 構造上の違いがあることが分かった。

- このように α -NAGAは、活性部位のうち基質結合部位の一部の構造において α -GALと異なっているが、その他の部分については、触媒部位も含め、構造面及び性質面のいずれにおいても α -GALと非常によく似ているという特性を有する酵素である (図 1、図 2 A 及び図 2 B 参照)。そのため、 α -NAGAの触媒反
- 15 応機構は、反応基質及び反応生成物の種類等において、 α -GALの触媒反応機構と非常に類似している。

- そこで本発明者は、前述の通り α -NAGAに着目し、この α -NAGAに遺伝子操作を加えて活性部位 (特に基質結合部位) の構造を変化させ、 α -ガラクトシダーゼ活性を有するように α -NAGAの基質特異性を転換すれば (例えば α -NAGA
- 20 の基質認識に係るアミノ酸残基のうち、鍵となるものを α -NAGAタイプから α -GALタイプのものに置換すれば)、ファブリー病の治療に用い得る新規かつ優れた高機能酵素を創出できることを見出した。

α -NAGAに着目した理由としては、さらに下記(i)~(iii)の点も挙げられる。

- (i) α -NAGAは、Schindler病及びKanzaki病の責任酵素であり (Schindler
- 25 病の場合と同じ酵素の異常によって起こる異なる臨床表現型の疾患がKanzaki病と呼ばれる)、 α -NAGAの欠損がSchindler病及びKanzaki病を発症する原因となっている。しかし、通常、ファブリー病患者であってもSchindler病やKanzaki病の発生は極めて稀であるため、ファブリー病患者のほぼ全員において α -NAGAは正常に存在すると言える。そのため、 α -NAGAの基質特異性のみを

α -GALの基質特異性に転換したものを補充用酵素薬として投与しても、野生型 α -NAGAを投与した場合と同様に、その抗原性が現れる場合は極めて少なく、アレルギー性副作用などの有害な免疫反応を誘発する可能性は実質的に無いと考えられる。

- 5 (ii) α -NAGAは α -GALと同様にホモ二量体として機能するが、一般に α -NAGAの方が二量体形成時の安定性が高い。これは、本発明者が構築した立体構造モデルからも推測され、具体的には、ヒト α -NAGAでは二量体形成時に両サブユニット間でAsp45とArg350との間に静電相互作用による結合が2ヶ所存在することが認められたが、このような結合は α -GALには認められなかった。
- 10 従って、 α -NAGAと同様に α -NAGAの変異体も、 α -GALに比べて高い血中（血漿中）安定性を有すると考えられ、酵素補充療法に非常に適している。また、当該安定性により二量体としての存在比がより多くなれば、下記(iii)の点との関係で、細胞内のリソソームへの取り込み効率もより向上することが期待される。さらに、投与前においては、酵素製剤としてその効果を長期間維持し得るとい
- 15 うメリットも考えられる。

- (iii) 酵素補充療法で使用する酵素は、障害臓器の細胞内のリソソームに酵素が取り込まれる必要があり、通常、細胞膜からリソソームへの輸送は、酵素の糖鎖部分に存在するマンノース-6-リン酸(M6P)を認識するカルシウム非要求性M6Pレセプターを介して行われる。よって、このM6P残基が結合し得る糖鎖
- 20 (N型糖鎖)を多く有する方がリソソームへの取り込み効率が高くなるため望ましい。この糖鎖の数については、 α -GALでは、X線結晶構造解析からサブユニット当たり3個(Asn139, Asn192, Asn215の3ヶ所；二量体形成時は6個)存在することが明らかになっている。これに対して、 α -NAGAでは、サブユニット当たり5個(二量体形成時は10個)存在するが(図3及び図4参照)、そ
- 25 のうち3個(Asn124, Asn177, Asn201の3ヶ所)は α -GALにおける糖鎖の位置に相当するものであり、残りの2個(Asn359とAsn385の2ヶ所)は α -NAGAに特有のものである。従って、 α -NAGAは α -GALに比べて、血液中から障害臓器の細胞内のリソソームに取り込まれる効率が高いと考えられる。

本発明者は、以上のような観点から、 α -NAGAについて、その基質結合部位を構成するアミノ酸残基群のうち、第188番目のアミノ酸（セリン(Ser)）及び第191番目のアミノ酸（アラニン(Ala)）に着目した。そして、第188番目のセリン(Ser)をグルタミン酸(Glu)に置換し、第191番目のアラニン(Ala)をロイシン

- 5 (Leu)に置換した組換え酵素（変異体酵素）の作製を試みた。次いで、この組換え酵素をファブリー病患者由来の線維芽細胞を用いて発現させて採取し、解析したところ、高い α -GAL活性が認められ、しかもこの組換え酵素の血中安定性は、野生型 α -GALに比べてはるかに高いものであった。このような基質特異性を変換した組換え酵素を用いれば、ファブリー病の酵素補充療法に有用なファ
10 ブリー病治療用医薬組成物として、現行のものより格段に優れたものを提供することができる。

2. タンパク質

- 本発明のタンパク質は、後述する本発明のファブリー病治療用医薬組成物の
15 有効成分として利用可能なタンパク質であり、具体的には、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(α -NAGA)の変異体酵素である。

詳しくは、本発明のタンパク質は、以下の(1a)のタンパク質、または(1b)のタンパク質であり、好ましくは以下の(1c)のタンパク質である。

- (1a) 野生型 α -NAGAの活性部位（特に基質結合部位）の構造を変化させることにより α -ガラクトシダーゼ(α -GAL)活性を獲得したタンパク質、好ましくは
20 α -GALの基質特異性を有するタンパク質。

(1b) シグナルペプチドを含むものである上記(1a)のタンパク質。ここで、シグナルペプチドの種類は特に限定はされず、野生型 α -NAGA由来のシグナルペプチドであってもよいし、他のタンパク質由来のものであってもよい。

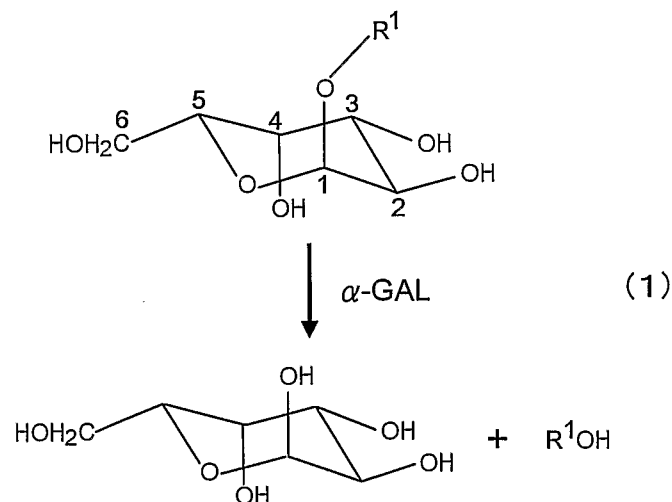
- 25 (1c) シグナルペプチドが野生型 α -GAL由来のシグナルペプチドである上記(1b)のタンパク質。

ここで、「 α -GAL活性を獲得した」とは、前述の通り、 α -NAGAの基質結合部位において、 α -NAGAの基質との結合反応性よりも α -GALの基質との結合反応性が相対的に高くなったことを意味する。従って、上述した構造変化としては、

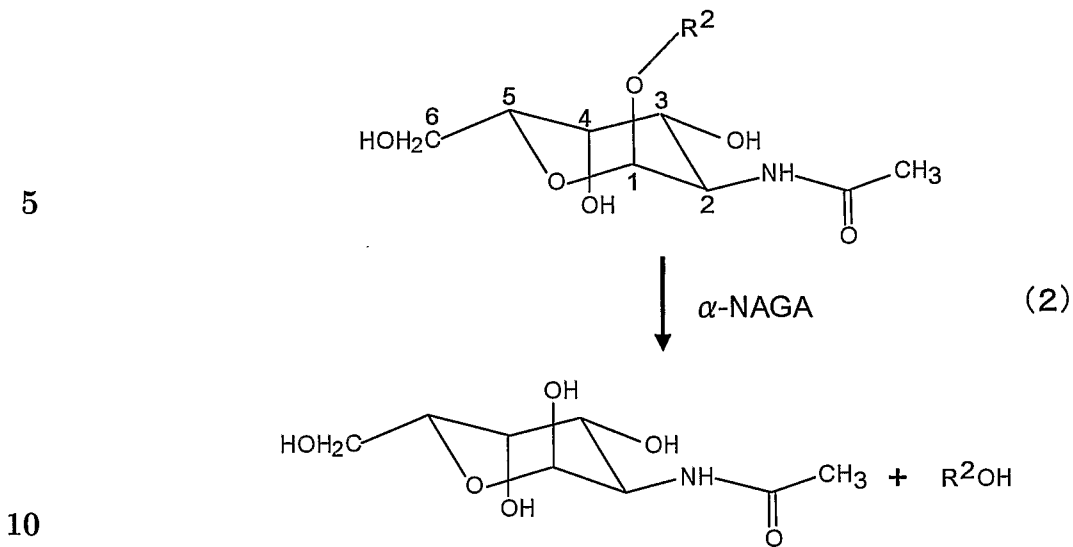
α -NAGAの基質との結合を完全に不可能にする構造変化には限定されず、本来
 α -GALの基質との結合反応性よりも α -NAGAの基質との結合反応性が相対的に
 有意に高かったのを、逆に α -GALの基質との結合反応性が有意に高くなるよう
 にする構造変化も含む。また「 α -GALの基質特異性を有する」とは、前述の通
 り、活性部位の構造（特に、基質の結合反応性に重要な役割を果たすアミノ酸
 残基の位置及び種類）が α -GALと同じであることを意味する。

本発明において、 α -GALの基質とは、非還元末端に α 結合したガラクトース
 残基を持つグロボトリアシルセラミド（セラミドトリヘキソシド(CTH)）等の
 糖脂質などの天然化合物や、4-メチルウンベリフェリル- α -D-ガラクトシドなど
 の合成化合物を意味する。また、 α -NAGAの基質とは、非還元末端に α 結合し
 たN-アセチルガラクトサミン残基を持つオリゴ糖、糖タンパク質及び糖脂質な
 どの天然化合物や、4-メチルウンベリフェリル- α -N-アセチル-D-ガラクトサミ
 ニドなどの合成化合物を意味する。

ここで、野生型 α -GALの触媒反応を下記反応式(1)に示し、野生型 α -NAGA
 の触媒反応を下記反応式(2)に示す。



〔反応式(1)中、 R^1 は、基質が天然化合物の場合は「糖複合体由来の基」を表し、基質が合成化合物の場合は「4-メチルウンベリフェリル基」を表す。〕



〔反応式(2)中、 R^2 は、基質が天然化合物の場合は「糖複合体由来の基」を表し、基質が合成化合物の場合は「4-メチルウンベリフェリル基」を表す。〕

15 本発明のタンパク質としては、例えば、以下の(2a)又は(2b)のアミノ酸配列からなり、かつ α -GAL活性を有するタンパク質が好ましく挙げられる。

(2a) 野生型 α -NAGAのアミノ酸配列における第188番目及び第191番目のアミノ酸のうちの少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列、好ましくは第188番目及び第191番目のアミノ酸がいずれも他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列。

20

(2b) 上記(2a)のアミノ酸配列のうち第188番目及び第191番目のアミノ酸を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。

なお、野生型 α -NAGA（ホモ二量体）のサブユニットのアミノ酸配列（配列番号2）及び当該配列をコードする塩基配列（配列番号1）の情報は、例えば

25 GenBankには「accession number : NM_000262」として公表されており、Swiss-Prot (<http://tw.expasy.org/uniprot/> から取得可能) には「entry name : NAGAB_HUMAN、accession number : P17050」として登録されている。また野生型 α -GAL（ホモ二量体）のサブユニットのアミノ酸配列（配列番号10）及び当該配列をコードする塩基配列（配列番号9）の情報も同様に、例えば

GenBankには「accession number : NP_000160」として公表されており、Swiss-Prot (<http://tw.expasy.org/uniprot/> から取得可能) には「entry name : AGAL_HUMAN、accession number : P06280」として登録されている。

ここで、上記「1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」としては、例えば、1 個～10 個程度、好ましくは1 個～5 個程度のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であることが好ましい。

また、上記「欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質」は、 α -GAL活性を安定して発揮し得るタンパク質であることが重要であるため、例えば、 α -GALの基質中の α -ガラクトース残基との結合性（基質結合性）及び当該基質との触媒反応性に重要と考えられる第28番目～第31番目、第77番目～第81番目、第117番目～第127番目、第150番目～第158番目、第192番目、第209番目～第220番目及び第242番目～第254番目のアミノ酸（特に、触媒部位である第156番目及び第217番目のアスパラギン酸（Asp : D））、ホモ二量体の形成に重要と考えられる第45番目のアスパラギン酸（Asp : D）及び第350番目のアルギニン（Arg : R）、並びに、N型糖鎖結合部位である第124番目、第177番目、第201番目、第359番目及び第385番目のアミノ酸（いずれもアスパラギン（Asn : N））などの全部又は一部（好ましくは全部）は、野生型 α -NAGAのアミノ酸配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。

上記他のアミノ酸としては、第188番目のアミノ酸残基に関しては、セリン（Ser : S）以外であれば特に限定はされないが、例えば、グルタミン酸（Glu : E）及びアスパラギン酸（Asp : D）等を好ましく挙げることができ、グルタミン酸がより好ましい。同様に、第191番目のアミノ酸残基に関しては、アラニン（Ala : A）以外であれば特に限定はされないが、例えば、ロイシン（Leu : L）、バリン（Val : V）、イソロイシン（Ile : I）、フェニルアラニン（Phe : F）及びメチオニン（Met : M）等を好ましく挙げることができ、ロイシンがより好ましい。中でも、上記他のアミノ酸として、第188番目のアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ、第191番目のアミノ酸がロイシンであることが特に好ましい。なお、上記置換後のアミノ酸は、他の置換されていないアミノ酸からなる構造に実質的に影響を及ぼさない

ものであることが好ましく、この点でも、第188番目のアミノ酸残基をグルタミン酸とすること、第191番目のアミノ酸残基をロイシンとすることが、特に好ましい置換態様である。

- 基質結合部位に存在する第188番目及び第191番目のアミノ酸を、それぞれ上
- 5 記のように置換することにより、次のような効果が得られる。すなわち、図5に例示するように、第188番目のアミノ酸残基に関しては、 α -NAGAの基質中のN-アセチル基（特に酸素原子）との相互作用を無くし、かつ α -GALの基質中のヒドロキシル基との結合作用を生じさせることができ、第191番目のアミノ酸残基に関しては、 α -NAGAの基質中のN-アセチル基（特にメチル基）との相互作用を無くし、かつ当該基質の結合空間（特にN-アセチル基の入り込む空間）を
- 10 制限することができる。以上の結果、上記アミノ酸置換後の組換え酵素（組換えタンパク質）は、 α -NAGAの基質との結合反応性よりも α -GALの基質との結合反応性の方が高いものとなり、 α -NAGA活性と比較して有意に高い α -GAL活性を有する酵素となり得る。少なくとも、第188番目のアミノ酸（セリン）がグルタミン酸に置換され且つ第191番目のアミノ酸（アラニン）がロイシンに置換
- 15 されたアミノ酸配列を有する組換え酵素は、上記効果が十分に得られる点で特に好ましい。

- 本発明のタンパク質はまた、以下の(3a)又は(3b)のタンパク質であることが好
- 20 ましい。

(3a) 下記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質。

- (i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第188番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列
- 25 (ii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第191番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列
- (iii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第188番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換され第191番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸

に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列

- (3b) 上記(3a)の(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質

配列番号2に示されるアミノ酸配列は、野生型 α -NAGAを構成する411個のアミノ酸からなるアミノ酸配列である。

- 上記(3a)のタンパク質は、詳しくは、この配列番号2に示されるアミノ酸配列において上記(i)～(iii)に記載のように置換されたアミノ酸配列のうち、野生型 α -NAGAのシグナルペプチドを構成する第1番目～第17番目のアミノ酸を除いた、第18番目～第411番目のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるタンパク質である。前述したように、第188番目及び第191番目のアミノ酸残基はいずれも基質結合部位を構成するアミノ酸の一つである。

- ここで、上記第18番目～第411番目のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列としては、例えば、当該第18番目～第411番目のアミノ酸配列のN末端に、各種シグナルペプチドが結合したアミノ酸配列などが好ましく挙げられる。当該シグナルペプチドとしては、障害臓器の細胞膜を通過させ得るものであればよく、限定はされないが、例えば、野生型 α -NAGA及び野生型 α -GAL等の各種リソソーム酵素のシグナルペプチド並びにプレプロトリプシン等の分泌酵素のシグナルペプチドが好ましく、より好ましくは野生型 α -NAGA及び野生型 α -GALのシグナルペプチドであり、さらに好ましくは野生型 α -GALのシグナルペプチドである。なお、野生型 α -NAGAのシグナルペプチドは、上述の通り、配列番号2に示される野生型 α -NAGAのアミノ酸配列のうち第1番目～第17番目のアミノ酸からなるペプチドであり、野生型 α -GALのシグナルペプチドは、配列番号10に示される野生型 α -GALのアミノ酸配列のうち第1番目～第31番目のアミノ酸からなるペプチドである。また、プレプロトリプシンのシグナルペプチドは、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるペプチドである。

上記(3a)のタンパク質としては、上記(i)、(ii)又は(iii)のアミノ酸配列を含むタンパク質のうち、上記(iii)のアミノ酸配列を含むタンパク質が特に好ましい。

また、上記(3a)のタンパク質としては、上記(i)及び(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸」がグルタミン酸又はアスパラギン酸である場合のタンパク質が好ましく挙げられる。同様に、上記(3a)のタンパク質としては、上記(ii)及び(iii)の記載中の「アラニン以外のアミノ酸」がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか1つである場合のタンパク質も好ましく挙げられる。

さらに、上記(3a)のタンパク質としては、上記(i)～(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸」がグルタミン酸であり、かつ、「アラニン以外のアミノ酸」がロイシンである場合のタンパク質が、特に好ましく挙げられる。当該タンパク質としては、例えば、野生型 α -NAGAのアミノ酸配列（配列番号2）のうち第188番目のセリンがグルタミン酸に置換され、かつ、第191番目のアラニンがロイシンに置換されたタンパク質（ α -NAGA(S188E/A191L)）が好ましく挙げられる（図6及び配列番号4参照）。なお、アミノ酸のアルファベット表記は、一般に、3文字（例えば「Ser」）又は1文字（例えば「S」）で表し、N末端からのアミノ酸位置を示す数字（例えば「188」）の前に表示したアルファベットは置換前のアミノ酸の1文字表記を示し、数字の後に表示したアルファベットは置換後のアミノ酸の1文字表記を示している。従って、例えば第188番目のSerをGluに置換した場合は「S188E」と表示する（以下同様）。

上記(3b)のタンパク質は、上記(3a)のタンパク質に含まれる上記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く、1個又は数個（例えば1個～10個程度、好ましくは1個～5個程度）のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ α -GAL活性を有するタンパク質であればよく、限定はされない。ここで、「前記置換部位」とは、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列を構成する394個のアミノ酸残基のうち、配列番号2に示されるアミノ酸配列における第188番目のアミノ酸の位置に対応するアミノ酸残基（但し上記(i)及び(iii)のアミノ酸配列に限る）、並びに、配列番号2に示されるアミノ酸配列における第191番目のアミノ酸の位置に対応するアミノ酸残基（但し上記(ii)及び(iii)のアミノ酸配列に限る）を意味する。より具体的には、前者のアミノ酸残基は、上記(i)及び(iii)のアミノ酸配列における第171番目のアミノ酸残基

を意味し、後者のアミノ酸残基は、上記(ii)及び(iii)のアミノ酸配列における第174番目のアミノ酸残基を意味する。

5 なお、上記(3b)のタンパク質は、 α -GAL活性を安定して発揮し得るタンパク質であることが重要である。そのため、例えば、 α -GALの基質中の α -ガラクトース残基との結合性（基質結合性）及び当該基質との触媒反応性に重要と考えられるアミノ酸残基は、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。当該アミノ酸残基としては、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列を構成するアミノ酸残基のうち、配列番号2に示されるアミノ酸配列における第28番目～第31番目、第77番目～第81番目、第117番目～第127
10 番目、第150番目～第158番目、第192番目、第209番目～第220番目及び第242番目～第254番目のアミノ酸の位置に対応するアミノ酸残基（特に、触媒部位である第156番目及び第217番目のアスパラギン酸(Asp : D)）が好ましく挙げられる。

15 同様に、ホモ二量体の形成に重要と考えられるアミノ酸残基も、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。当該アミノ酸残基としては、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列を構成するアミノ酸残基のうち、配列番号2に示されるアミノ酸配列における第45番目及び第350番目のアミノ酸の位置に対応するアミノ酸残基（具体的には、第45番目のアスパラギン酸(Asp : D)及び第350番目のアルギニン(Arg : R)）が好ましく挙げられる。

20 さらに、N型糖鎖結合部位であるアミノ酸残基も、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。当該アミノ酸残基としては、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列を構成するアミノ酸残基のうち、配列番号2に示されるアミノ酸配列における第124番目、第177番目、第201番目、第359番目及び第385番目のアミノ酸の位置に対応するアミノ酸残基（い
25 ずれもアスパラギン(Asn : N)）が好ましく挙げられる。

本発明のタンパク質はさらに、以下の(4a)又は(4b)のタンパク質であることが好ましい。

(4a) 下記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質。

(i) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において第202番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(ii) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において第205番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

- 5 (iii) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において第202番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換され第205番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(4b) 上記(i)~(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配

- 10 列を含み、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質

配列番号6に示されるアミノ酸配列は、野生型 α -NAGAを構成する411個のアミノ酸において、シグナルペプチド部分である第1番目~第17番目のアミノ酸が野生型 α -GALのシグナルペプチド部分に変換されたアミノ酸配列（計425アミノ酸）であり、いわゆる融合タンパク質である。ここで、野生型 α -GALのシ

15 グナルペプチド部分は、前述した通り、配列番号10に示される野生型 α -GALを構成するアミノ酸配列のうちの第1番目~第31番目のアミノ酸からなるペプチド部分である。

上記(4a)のタンパク質を構成するアミノ酸配列において、第188番目及び第191番目のアミノ酸残基はいずれも基質結合部位を構成するアミノ酸の一つである。

- 20 上記(4a)のタンパク質としては、上記(i)、(ii)又は(iii)のアミノ酸配列を含むタンパク質のうち、上記(iii)のアミノ酸配列を含むタンパク質が特に好ましい。

また、上記(4a)のタンパク質としては、上記(i)及び(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸」がグルタミン酸又はアスパラギン酸である場合のタンパク質が好ましく挙げられる。同様に、上記(4a)のタンパク質としては、上記(ii)及び(iii)

- 25 の記載中の「アラニン以外のアミノ酸」がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか1つである場合のタンパク質も好ましく挙げられる。

さらに、上記(4a)のタンパク質としては、上記(i)~(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸」がグルタミン酸であり、かつ、「アラニン以外のアミノ酸」が

ロイシンである場合のタンパク質が、特に好ましく挙げられる。当該タンパク質としては、例えば、配列番号6に示されるアミノ酸配列のうち第202番目のセリンがグルタミン酸に置換され、かつ、第205番目のアラニンがロイシンに置換されたタンパク質 (α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S202E/A205L)) が

5 好ましく挙げられる。

上記(4b)のタンパク質は、上記(4a)のタンパク質に含まれる上記(i)~(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く、1個又は数個

(例えば1個~10個程度、好ましくは1個~5個程度)のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ α -GAL活性を有するタンパク質

10 であればよく、限定はされない。ここで、「前記置換部位」とは、上記(i)~(iii)のアミノ酸配列を構成する425アミノ酸残基のうち、第202番目のアミノ酸残基(但し上記(i)及び(iii)のアミノ酸配列に限る)並びに第205番目のアミノ酸残基(但し上記(ii)及び(iii)のアミノ酸配列に限る)を意味する。

なお、上記(4b)のタンパク質は、 α -GAL活性を安定して発揮し得るタンパク

15 質であることが重要である。そのため、例えば、 α -GALの基質中の α -ガラクトース残基との結合性(基質結合性)及び当該基質との触媒反応性に重要と考えられるアミノ酸残基は、上記(i)~(iii)のアミノ酸配列から変異(欠失、置換又は付加)されていないものが好ましい。当該アミノ酸残基としては、上記(i)~(iii)のアミノ酸配列を構成する425アミノ酸残基のうち、第42番目~第45番目、第

20 91番目~第95番目、第131番目~第141番目、第164番目~第172番目、第206番目、第223番目~第234番目及び第256番目~第268番目のアミノ酸残基(特に、触媒部位である第170番目及び第231番目のアスパラギン酸(Asp : D))が好ましく挙げられる。

同様に、ホモ二量体の形成に重要と考えられるアミノ酸残基も、上記(i)~(iii)

25 のアミノ酸配列から変異(欠失、置換又は付加)されていないものが好ましい。当該アミノ酸残基としては、上記(i)~(iii)のアミノ酸配列を構成する425アミノ酸残基のうち、第59番目及び第364番目のアミノ酸残基(具体的には、第59番目のアスパラギン酸(Asp : D)及び第364番目のアルギニン(Arg : R))が好ましく挙げられる。

さらに、N型糖鎖結合部位であるアミノ酸残基も、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。当該アミノ酸残基としては、上記(i)～(iii)のアミノ酸配列を構成する425アミノ酸残基のうち、第138番目、第191番目、第215番目、第373番目及び第399番目のアミノ酸残基（いずれもアスパラギン(Asn : N)）が好ましく挙げられる。

以上に述べた本発明のタンパク質について、 α -GAL活性は、例えば、CHO細胞やヒト線維芽細胞等の哺乳類由来の細胞に目的タンパク質を発現させて採取し、当該タンパク質（酵素溶液）と、4-メチルウンベリフェリル- α -D-ガラクトシド（ α -D-ガラクトース及び4-メチルウンベリフェロン（蛍光基質）から得られる合成基質）とを混合して、酸性条件下で反応させた場合に、当該酵素溶液の単位量が単位時間当たりに遊離させ得る4-メチルウンベリフェロンの量を検出することにより測定することができる。

なお、 α -NAGA活性も、上記 α -GAL活性と同様に、目的タンパク質を発現させて採取し、当該タンパク質（酵素溶液）と、4-メチルウンベリフェリル- α -N-アセチル-D-ガラクトサミニド（ α -N-アセチル-D-ガラクトサミン及び4-メチルウンベリフェロン（蛍光基質）から得られる合成基質）とを混合して、酸性条件下で反応させた場合に、当該酵素溶液の単位量が単位時間当たりに遊離させ得る4-メチルウンベリフェロンの量を検出することにより測定することができる。

上記 α -GAL活性及び α -NAGA活性の測定方法において、蛍光基質の検出には、公知の各種検出方法を採用できるが、例えば、蛍光光度計等により検出する方法が好ましい。また、目的タンパク質の発現は、公知の各種発現ベクター等に組込んで細胞に導入し発現させればよい。

3. 組換え遺伝子

本発明の遺伝子は、上述した本発明のタンパク質をコードする遺伝子である。

本発明の遺伝子としては、例えば、以下の(1a)又は(1b)のDNAを含む遺伝子が好ましく挙げられる。なお、以下の(1a)及び(1b)のDNAは、いずれも本発明のタンパク質の構造遺伝子であることが好ましいが、これらDNAを含む遺伝子とし

ては、これらDNAのみからなるものであってもよいし、これらDNAを一部に含み、その他に遺伝子発現に必要な公知の塩基配列（転写プロモーター、SD配列、Kozak配列、ターミネーター等）をも含むものであってもよく、限定はされない。

(1a) 下記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNA

5 (i) 配列番号1に示される塩基配列において第562番目～第564番目の塩基「agc」がセリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列のうち、第52番目～第1,236番目の塩基からなる塩基配列

(ii) 配列番号1に示される塩基配列において第571番目～第573番目の塩基「gcc」がアラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列のう

10 ち、第52番目～第1,236番目の塩基からなる塩基配列

(iii) 配列番号1に示される塩基配列において第562番目～第564番目の塩基「agc」がセリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換され第571番目～第573番目の塩基がアラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列のうち、第52番目～第1,236番目の塩基からなる塩基配列

15 (1b) 上記(1a)の(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、前記置換部位の塩基に対応する塩基が当該置換部位の塩基と同一であり、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

20 本発明において「コード」とは、転写後のRNA配列上の3塩基連鎖（トリプレット）に限らず、DNA配列上の3塩基連鎖をも意味する。よって、DNA配列上のコードの表記は、ウラシル(U)の代わりにチミン(T)を用いて行う。

配列番号1に示される塩基配列は、野生型 α -NAGAをコードする1,236個の塩基からなる塩基配列である。

25 上記(1a)のDNAは、詳しくは、この配列番号1に示される塩基配列において上記(i)～(iii)に記載のように塩基置換がなされた塩基配列のうち、野生型 α -NAGAのシグナルペプチドをコードする第1番目～第51番目の塩基を除いた、第52番目～第1,236番目の塩基配列を含む塩基配列からなるDNAである。

ここで、上記第52番目～第1,236番目の塩基配列を含む塩基配列としては、例えば、当該第52番目～第1,236番目の塩基配列の5'側に、各種シグナルペプチド

をコードする塩基配列（ポリヌクレオチド）が結合した塩基配列が好ましく挙げられる。当該シグナルペプチドとしては、障害臓器の細胞膜を通過させ得るものであればよく、限定はされないが、例えば、野生型 α -NAGA及び野生型 α -GAL等の各種リソソーム酵素のシグナルペプチド、並びにプレプロトリプシン

- 5 (preprotrypsin) 等の分泌酵素のシグナルペプチドが好ましく、より好ましくは野生型 α -NAGA及び野生型 α -GALのシグナルペプチドであり、さらに好ましくは野生型 α -GALのシグナルペプチドである。なお、野生型 α -NAGAのシグナルペプチドをコードする塩基配列は、配列番号1に示される野生型 α -NAGAの塩基配列のうち第1番目～第51番目の塩基からなる塩基配列であり、野生型 α -
- 10 GALのシグナルペプチドをコードする塩基配列は、配列番号9に示される野生型 α -GALの塩基配列のうち第1番目～第93番目の塩基からなる塩基配列である。また、プレプロトリプシンのシグナルペプチドをコードする塩基配列は、配列番号11に示される塩基配列である。

- 15 上記(1a)のDNAとしては、上記(i)、(ii)又は(iii)の塩基配列を含むDNAのうち、上記(iii)の塩基配列を含むDNAが特に好ましい。

- また、上記(1a)のDNAとしては、上記(i)及び(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基」がグルタミン酸又はアスパラギン酸のコードンを示す塩基である場合のDNAが好ましく挙げられる。同様に、上記(1a)のDNAとしては、上記(ii)及び(iii)の記載中の「アラニン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基」がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか1つのコードンを示す塩基である場合のDNAも好ましく挙げられる。ここで、上記の各アミノ酸のコードンを示す塩基（左端の塩基を5'側の塩基とする）については、グルタミン酸のコードンを示す塩基は「gag」又は「gaa」（好ましくは「gag」）であり、アスパラギン酸のコードンを示す塩基は「gat」又は「gac」である。同様に、ロイシンのコードンを示す塩基は「ctc」
- 20 「ctt」、「cta」又は「ctg」（好ましくは「ctc」）であり、バリンのコードンを示す塩基は「ggt」、「gtc」、「gta」又は「gtg」であり、イソロイシンのコードンを示す塩基は「att」、「atc」又は「ata」であり、フェニルアラニンのコードンを示す塩基は「ttt」又は「ttc」であり、メチオニンのコードンを示す塩基

は「atg」である。なお、セリンのコードンを示す塩基としては、前記「agc」以外に「agt」があり、アラニンのコードンを示す塩基としては、前記「gcc」以外に「gct」、「gca」及び「gcg」がある。

- さらに、上記(1a)のDNAとしては、上記(i)～(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基」がグルタミン酸のコードンを示す塩基であり、かつ、
- 5 「アラニン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基」がロイシンのコードンを示す塩基である場合のDNAが、特に好ましく挙げられる。当該DNAとしては、例えば、野生型 α -NAGAの塩基配列（配列番号1）のうち第562番目～第564番目の塩基がセリンのコードンを示す塩基からグルタミン酸のコードンを示す塩基に置換され
- 10 （「agc」→「gag」）、かつ、第571番目～第573番目の塩基がアラニンのコードンを示す塩基からロイシンのコードンを示す塩基に置換された（「gcc」→「ctc」）塩基配列（配列番号3）からなるDNAが好ましく挙げられる。この例示においては、置換後の第562番目～第564番目の塩基は、グルタミン酸のコードンを示す塩基であれば上記「gag」以外の塩基であってもよいし、同様に、置換後の第
- 15 571番目～第573番目の塩基は、ロイシンのコードンを示す塩基であれば上記「ctc」以外の塩基であってもよく、限定はされない。

- 以上のような変異置換型のDNAは、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に
- 20 記載の部位特異的変位誘発法に準じて調製することができる。具体的には、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キットを用いて調製することができ、当該キットとしては、例えば、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit（ストラタジーン社製）、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製）等が好ましく挙げられる。
- 25

また、後述する実施例に記載のように、所望のアミノ酸のコードンを示す塩基となるようにミスセンス変異が導入されるように設計したPCRプライマーを用い、野生型 α -NAGAをコードする塩基配列を含むDNA等をテンプレートとして、

適当な条件下でPCRを行うことにより調製することもできる。PCRに用いるDNAポリメラーゼは、限定はされないが、正確性の高いDNAポリメラーゼであることが好ましく、例えば、Pwo DNAポリメラーゼ（ロシュ・ダイアグノステイックス）、Pfu DNAポリメラーゼ（プロメガ）、プラチナPfx DNAポリメラーゼ（インビトロジェン）、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡）、KOD-plusポリメラーゼ（東洋紡）等が好ましい。PCRの反応条件は、用いるDNAポリメラーゼの最適温度、合成するDNAの長さや種類等により適宜設定すればよいが、例えば、サイクル条件であれば「90～98℃で5～30秒（熱変性・解離）→50～65℃で5～30秒（アニーリング）→65～80℃で30～1200秒（合成・伸長）」を1サイクルとして合計20～200サイクル行う条件が好ましい。

上記(1b)のDNAは、上記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNA（すなわち上記(1a)のDNA）若しくはそれと相補的な塩基配列からなるDNA、又はこれらを断片化したものをプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーション、及びサザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法を実施し、cDNAライブラリーやゲノムライブラリーから得ることができる。ライブラリーは、公知の方法で作製されたものを利用してもよいし、市販のcDNAライブラリーやゲノムライブラリーを利用してもよく、限定はされない。

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等を適宜参照することができる。

ハイブリダイゼーション法を実施における「ストリンジेंटな条件」とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄時の条件であって、バッファーの塩濃度が15～330mM、温度が25～65℃、好ましくは塩濃度が15～150mM、温度が45～55℃の条件を意味する。具体的には、例えば80mMで50℃等の条件を挙げることができる。さらに、このような塩濃度や温度等の条件に加えて、プローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件も考慮し、上記(1b)のDNAを得るための条件を適宜設定することができる。

ハイブリダイズするDNAとしては、上記(1a)のDNAの塩基配列に対して少なくとも40%以上の相同性を有する塩基配列であることが好ましく、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上である。

- 5 また、上記(1b)のDNAは、前記置換部位の塩基に対応する塩基が当該置換部位の塩基と同一である。

- ここでいう「置換部位」とは、上記(1a)のDNAに含まれる上記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列においてなされた塩基置換の部位であり、詳しくは、当該塩基置換により生じた変更後のコドンを示す塩基（トリプレット）の部位を意味する。
- 10 具体的には、「置換部位」とは、上記(i)～(iii)の塩基配列を構成する1,185個の塩基のうち、配列番号1に示される塩基配列における第562番目～第564番目の塩基の位置に対応する塩基（但し上記(i)及び(iii)の塩基配列に限る）、並びに、配列番号1に示される塩基配列における第571番目～第573番目の塩基の位置に対応する塩基（但し上記(ii)及び(iii)の塩基配列に限る）を意味する。さらに
- 15 具体的には、前者の塩基は、上記(i)及び(iii)の塩基配列における第511番目～第513番目の塩基を意味し、後者の塩基は、上記(ii)及び(iii)の塩基配列における第520番目～第522番目の塩基を意味する。

- また「前記置換部位の塩基に対応する塩基」の「対応する塩基」とは、上記(1b)のDNAが上記(1a)のDNAに対する相補鎖とハイブリダイズした場合に、このハイブリッドにおいて、前記置換部位の塩基に対する相補塩基（トリプレット）と、位置的に対向する関係にある塩基（トリプレット）を意味する。例えば、上記(1b)のDNAの塩基配列が、上記(1a)のDNAと比較して欠失及び付加の変異が無い場合（つまり両DNAの長さ(塩基数)が同じ）であれば、上記(1b)のDNAの塩基配列における第511番目～第513番目の塩基及び／又は第520番目～
- 20 第522番目の塩基が、上記「対応する塩基」となる。

25 なお、上記(1b)のDNAは、 α -GAL活性を有するタンパク質をコードするDNAであることが重要である。そのため、例えば、 α -GALの基質中の α -ガラクトース残基との結合性（基質結合性）及び当該基質との触媒反応性に重要と考えられるアミノ酸残基のコドンを示す塩基は、上記(i)～(iii)の塩基配列から変異（欠

失、置換又は付加) されていないものが好ましい。上記(i)～(iii)の塩基配列上のそのような塩基としては、当該塩基配列のうち配列番号 1 に示される塩基配列における第82番目～第93番目(4コドン)、第229番目～第243番目(5コドン)、第349番目～第381番目(11コドン)、第448番目～第474番目(9コドン)、第574番目
5 ～第576番目(1コドン)、第625番目～第660番目(12コドン)及び第724番目～第762番目(13コドン)の塩基の位置に対応する塩基が好ましく挙げられ、中でも特に、触媒部位のアミノ酸残基のコドンを示す第466番目～第468番目及び第649番目～第651番目の塩基に対応する塩基が好ましい。

また、上記(1b)のDNAは、ホモ二量体の形成に重要と考えられるアミノ酸残
10 基のコドンを示す塩基も、上記(i)～(iii)の塩基配列から変異(欠失、置換又は付加)されていないものが好ましい。上記(i)～(iii)の塩基配列上のそのような塩基としては、当該塩基配列のうち、配列番号 1 に示される塩基配列における第133番目～第135番目及び第1,048番目～第1,050番目の塩基の位置に対応する塩基が好ましく挙げられる。

さらに、上記(1b)のDNAは、N型糖鎖結合部位であるアミノ酸残基のコドンを示す塩基も、上記(i)～(iii)の塩基配列から変異(欠失、置換又は付加)されていないものが好ましい。上記(i)～(iii)の塩基配列上のそのような塩基としては、当該塩基配列のうち、配列番号 1 に示される塩基配列における第370番目～第372番目、第529番目～第531番目、第601番目～第603番目、第1,075番目～第1,077
20 番目及び第1,153番目～第1,155番目の塩基の位置に対応する塩基が好ましく挙げられる。

上記(1b)のDNAとしては、例えば、上記(1a)のDNAと比較して、塩基配列については完全に同一ではないが、翻訳された後のアミノ酸配列については完全に同一となるような塩基配列からなるDNA(すなわち上記(1a)のDNAにサイレント変異が施されたDNA)が、特に好ましい。
25

また、本発明の遺伝子としては、以下の(2a)又は(2b)のDNAを含む遺伝子も好ましく挙げられる。以下の(2a)及び(2b)のDNAは、いずれも本発明のタンパク質の構造遺伝子であることが好ましいが、これらDNAを含む遺伝子としては、こ

れらDNAのみからなるものであってもよいし、これらDNAを一部に含み、その他に遺伝子発現に必要な公知の塩基配列（転写プロモーター、SD配列、Kozak配列、ターミネーター等）をも含むものであってもよく、限定はされない。

(2a) 下記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNA

- 5 (i) 配列番号 5 に示される塩基配列において第604番目～第606番目の塩基「agc」がセリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列
- (ii) 配列番号 5 に示される塩基配列において第613番目～第615番目の塩基「gcc」がアラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列
- (iii) 配列番号 5 に示される塩基配列において第604番目～第606番目の塩基「agc」がセリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換され第613番目～第615番目の塩基がアラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基に置換された塩基配列
- 10

(2b) 上記(2a)の(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、前記置換部位の塩基に対応する塩基が当該置換部位の塩基と同一であり、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

15

- 配列番号 5 に示される塩基配列は、野生型 α -NAGA をコードする 1,236 個の塩基配列において、シグナルペプチド部分をコードする第1番目～第51番目の塩基からなる配列が野生型 α -GAL のシグナルペプチド部分をコードする塩基配列に変換された塩基配列であり、いわゆる融合タンパク質をコードする塩基配列である。ここで、野生型 α -GAL のシグナルペプチド部分をコードする塩基配列は、前述した通り、配列番号 9 に示される野生型 α -GAL をコードする塩基配列のうち、第1番目～第93番目の塩基からなる配列である。
- 20

- 上記(2a)のDNAとしては、上記(i)、(ii)又は(iii)の塩基配列を含むDNAのうち、上記(iii)の塩基配列を含むDNAが特に好ましい。
- 25

また、上記(2a)のDNAとしては、上記(i)及び(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸のコードを示す塩基」がグルタミン酸又はアスパラギン酸のコードを示す塩基である場合のDNAが好ましく挙げられる。同様に、上記(2a)のDNAとしては、上記(ii)及び(iii)の記載中の「アラニン以外のアミノ酸のコードを示す塩基

」がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか1つのコドンを示す塩基である場合のDNAも好ましく挙げられる。ここで、上記の各アミノ酸のコドンを示す塩基については、前記(1a)のDNAに関する説明が同様に適用できる。

- 5 さらに、上記(2a)のDNAとしては、上記(i)～(iii)の記載中の「セリン以外のアミノ酸のコドンを示す塩基」がグルタミン酸のコドンを示す塩基であり、かつ、「アラニン以外のアミノ酸のコドンを示す塩基」がロイシンのコドンを示す塩基である場合のDNAが、特に好ましく挙げられる。当該DNAとしては、例えば、配列番号5に示される塩基配列のうち、第604番目～第606番目の塩基がセリン
- 10 のコドンを示す塩基からグルタミン酸のコドンを示す塩基に置換され（「agc」→「gag」）、かつ、第613番目～第615番目の塩基がアラニンのコドンを示す塩基からロイシンのコドンを示す塩基に置換された（「gcc」→「ctc」）塩基配列（配列番号7）からなるDNAが好ましく挙げられる。この例示においては、置換後の第604番目～第606番目の塩基は、グルタミン酸のコドンを示す塩基であれば上記「gag」以外の塩基であってもよいし、同様に、置換後の第613番目～
- 15 第615番目の塩基は、ロイシンのコドンを示す塩基であれば上記「ctc」以外の塩基であってもよく、限定はされない。

以上のような変異置換型のDNAの調製法などについては、前記(1a)のDNAに関する説明が同様に適用できる。

- 20 上記(2b)のDNAは、上記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNA（すなわち上記(2a)のDNA）若しくはそれと相補的な塩基配列からなるDNA、又はこれらを断片化したものをプローブとして用い、公知のハイブリダイゼーション法を実施し、cDNAライブラリーやゲノムライブラリーから得ることができる。ハイブリダイゼーション法の種類、手順及び条件、並びに各ライブラリーについては、
- 25 前記(1b)のDNAに関する説明が同様に適用できる。

ハイブリダイズするDNAとしては、上記(2a)のDNAの塩基配列に対して少なくとも40%以上の相同性を有する塩基配列であることが好ましく、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上である。

また、上記(2b)のDNAは、前記置換部位の塩基に対応する塩基が当該置換部位の塩基と同一である。

ここでいう「置換部位」とは、上記(2a)のDNAに含まれる上記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列においてなされた塩基置換の部位であり、詳しくは、当該塩基置換により生じた変更後のコドンを示す塩基（トリプレット）の部位を意味する。具体的には、「置換部位」とは、上記(i)～(iii)の塩基配列を構成する1,275個の塩基のうち、第604番目～第606番目の塩基（但し上記(i)及び(iii)の塩基配列に限る）並びに第613番目～第615番目の塩基（但し上記(ii)及び(iii)の塩基配列に限る）を意味する。

10 また「前記置換部位の塩基に対応する塩基」の「対応する塩基」とは、上記(2b)のDNAが上記(2a)のDNAに対する相補鎖とハイブリダイズした場合に、このハイブリッドにおいて、前記置換部位の塩基に対する相補塩基（トリプレット）と、位置的に対向する関係にある塩基（トリプレット）を意味する。例えば、上記(2b)のDNAの塩基配列が、上記(2a)のDNAと比較して欠失及び付加の変異が無い場合（つまり両DNAの長さ(塩基数)が同じ）であれば、上記(2b)のDNAの塩基配列における第604番目～第606番目の塩基及び／又は第613番目～第615番目の塩基が、上記「対応する塩基」となる。

20 なお、上記(2b)のDNAは、 α -GAL活性を有するタンパク質をコードするDNAであることが重要である。そのため、例えば、 α -GALの基質中の α -ガラクトース残基との結合性（基質結合性）及び当該基質との触媒反応性に重要と考えられるアミノ酸残基のコドンを示す塩基は、上記(i)～(iii)の塩基配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。上記(i)～(iii)の塩基配列上のそのような塩基としては、当該塩基配列のうち第124番目～第135番目(4コドン)、第271番目～第285番目(5コドン)、第391番目～第423番目(11コドン)、第490番目～第516番目(9コドン)、第616番目～第618番目(1コドン)、第667番目～第702番目(12コドン)及び第766番目～第804番目(13コドン)の塩基が好ましく挙げられ、中でも特に、触媒部位のアミノ酸残基のコドンを示す第508番目～第510番目及び第691番目～第693番目の塩基が好ましい。

また、上記(2b)のDNAは、ホモ二量体の形成に重要と考えられるアミノ酸残基のコドンを示す塩基も、上記(i)～(iii)の塩基配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。上記(i)～(iii)の塩基配列上のそのような塩基としては、当該塩基配列のうち第175番目～第177番目及び第1,090番目～第1,092番目の塩基が好ましく挙げられる。

さらに、上記(2b)のDNAは、N型糖鎖結合部位であるアミノ酸残基のコドンを示す塩基も、上記(i)～(iii)の塩基配列から変異（欠失、置換又は付加）されていないものが好ましい。上記(i)～(iii)の塩基配列上のそのような塩基としては、当該塩基配列のうち第412番目～第414番目、第571番目～第573番目、第643番目～第645番目、第1,117番目～第1,119番目及び第1,195番目～第1,197番目の塩基が好ましく挙げられる。

上記(2b)のDNAとしては、例えば、上記(2a)のDNAと比較して、塩基配列については完全に同一ではないが、翻訳された後のアミノ酸配列については完全に同一となるような塩基配列からなるDNA（すなわち上記(2a)のDNAにサイレント変異が施されたDNA）が、特に好ましい。

以上に述べた本発明のタンパク質をコードする遺伝子としては、翻訳後の個々のアミノ酸に対応するコドンは、特に限定はされないため、転写後、ヒト等の哺乳類において一般的に用いられているコドン（好ましくは使用頻度の高いコドン）を示すDNAを含むものであってもよいし、また、大腸菌や酵母等の微生物や、植物等において一般的に用いられているコドン（好ましくは使用頻度の高いコドン）を示すDNAを含むものであってもよい。

4. 組換えベクター及び形質転換体

本発明のタンパク質を発現させる場合、通常は、まず上述の本発明の遺伝子を発現ベクターに組込んだ組換えベクターの構築が行われる。この際、発現ベクターに組込む遺伝子には、必要に応じて、予め、上流に転写プロモーター、SD配列（宿主が原核細胞の場合）及びKozak配列（宿主が真核細胞の場合）を連結しておいてもよいし、下流にターミネーターを連結しておいてもよく、その他、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー等

を連結しておくこともできる。なお、上記転写プロモーター等の遺伝子発現に必要な各要素は、初めから当該遺伝子に含まれていてもよいし、もともと発現ベクターに含まれている場合はそれを利用してもよく、各要素の使用態様は特に限定されない。

- 5 発現ベクターに当該遺伝子を組込む方法としては、例えば、制限酵素を用いる方法や、トポイソメラーゼを用いる方法など、公知の遺伝子組換え技術を利用した各種方法が採用できる。また、発現ベクターとしては、例えば、プラスミドDNA、バクテリオファージDNA、レトロトランスポゾンDNA、レトロウイルスベクター、人工染色体DNAなど、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を保持し得るものであれば、限定はされず、使用する宿主細胞に適したベクターを適宜選択して使用することができる。

- 次いで、構築した上記組換えベクターを宿主に導入して形質転換体を得、これを培養することにより、本発明のタンパク質を発現させることができる。なお、本発明で言う「形質転換体」とは宿主に外来遺伝子が導入されたものを意味し、
15 例えば、宿主にプラスミドDNA等を導入すること（形質転換）で外来遺伝子が導入されたもの、並びに、宿主に各種ウイルス及びファージを感染させること（形質導入）で外来遺伝子が導入されたものが含まれる。

- 宿主としては、上記組換えベクターが導入された後、本発明のタンパク質を発現し得るものであれば、限定はされず、適宜選択することができるが、例えば、
20 ヒトやマウス等の各種動物細胞、各種植物細胞、細菌、酵母等の公知の宿主が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、例えば、ヒト繊維芽細胞、CHO細胞、サル細胞COS-7、Vero、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。また、Sf9細胞、Sf21細胞等の昆虫細胞を用いることもできる。

- 25 細菌を宿主とする場合、例えば、大腸菌、枯草菌等が用いられる。

酵母を宿主とする場合は、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）等が用いられる。

植物細胞を宿主とする場合は、例えば、タバコBY-2細胞等が用いられる。

形質転換体を得る方法は、限定はされず、宿主と発現ベクターとの種類の組み合わせを考慮し、適宜選択することができるが、例えば、電気穿孔法、リポフェクション法、ヒートショック法、PEG法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、並びに、DNAウイルスやRNAウイルス等の各種ウイルスを感染させる方法などが好ましく挙げられる。

得られる形質転換体においては、組換えベクターに含まれる遺伝子のコドン型は、実際に用いた宿主のコドン型と一致していてもよいし、異なってもよく、限定はされない。

10 5. タンパク質の製法

本発明のタンパク質 (α -GAL活性を有するタンパク質) は、例えば、野生型 α -NAGAの活性部位 (特に基質結合部位) の構造を、 α -GALの基質が結合できるように変化させることにより製造することができる。 α -GALの基質を結合させることができれば、野生型 α -NAGAの触媒部位による触媒作用により当該基質は加水分解され得る。

このような構造変化は、例えば、前述したように、遺伝子組換え技術により、野生型 α -NAGAの活性部位 (基質結合部位) を構成するアミノ酸配列中、(i) 第188番目のセリンをグルタミン酸又はアスパラギン酸等の他のアミノ酸に置換し、(ii) 第191番目のアラニンをロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン又はメチオニン等の他のアミノ酸に置換し、あるいは(iii) 第188番目のセリン及び第191番目のアラニンを共に上記(i),(ii)のように置換する。このようにして、置換前と置換後のアミノ酸側鎖の立体構造を変化させることで行うことができ、野生型 α -NAGAの基質特異性を変化させることができる。特に、上記構造変化は、第188番目のセリンをグルタミン酸に置換し且つ第191番目のアラニンをロイシンに置換して行うことが好ましく、これにより α -NAGAに α -GALの基質特異性を付与することができる。なお、以上の構造変化において、顕著な立体構造変化をもたらすアミノ酸置換は、第191番目のアラニンをロイシン等に置換することである。詳しくは、第191番目のアミノ酸の側鎖が、アラニンの側鎖である「-CH₃」から、ロイシンの側鎖である「-CH₂-CH(CH₃)-CH₃」等のように占有空間の大

きな側鎖に変わること、 α -NAGAの基質中のN-アセチル基が活性部位に入り込む空間が制限され、当該基質との結合性が低減し、その分 α -GALの基質との結合性が高まることとなる。

ここで、上述した本発明のタンパク質の製造方法は、構造変化前の野生型 α -NAGAとして、野生型 α -GAL由来のシグナルペプチドを含む野生型 α -NAGAを用いて行ってもよいし、あるいは、構造変化により変異型 α -NAGAを得た後、この変異型 α -NAGAに野生型 α -GAL由来のシグナルペプチドを付加する（結合させる）工程、若しくは、変異型 α -NAGAが野生型 α -NAGAのシグナルペプチドを含むものである場合はこのシグナルペプチドを野生型 α -GAL由来のシグナルペプチドに変換する工程を行ってもよく、限定はされない。

そのため、本発明のタンパク質の製造方法としては、例えば、野生型ヒト α -ガラクトシダーゼ由来のシグナルペプチドを含む野生型ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性部位の構造を、 α -ガラクトシダーゼの基質が結合できるように変化させることを特徴とする、 α -GAL活性を有するタンパク質の製造方法が好ましく挙げられる。

また、本発明のタンパク質の製造方法としては、野生型 α -NAGAの活性部位の構造を α -GALの基質が結合できるように変化させたタンパク質に野生型 α -GAL由来のシグナルペプチドを付加する（結合させる）、又は、野生型 α -NAGAの活性部位の構造を α -GALの基質が結合できるように変化させたタンパク質のシグナルペプチド部分を野生型 α -GAL由来のシグナルペプチドに変換することを特徴とする、 α -GAL活性を有するタンパク質の製造方法も好ましく挙げられる。

なお、上述したシグナルペプチド部分の変換は、野生型 α -NAGA及び野生型 α -GALについての公知の塩基配列情報及びアミノ酸配列情報を用いて、遺伝子組換え技術の常法により行うことができる。

本発明のタンパク質の製造は、具体的には、前述した形質転換体を培養する工程と、得られる培養物から α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質を採取する工程とを含む方法により実施することができる。ここで、「培養物」とは、培養上清、培養細胞、培養菌体、又は細胞若しくは菌体の破碎物のいずれをも

意味するものである。上記形質転換体の培養は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。目的のタンパク質は、上記培養物中に蓄積される。

上記培養に用いる培地としては、宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、公知の各種天然培地及び合成培地のいずれを用いてもよい。

培養中は、形質転換体に含まれる組換えベクターの脱落及び目的タンパク質をコードする遺伝子の脱落を防ぐために、選択圧をかけた状態で培養してもよい。すなわち、選択マーカーが薬剤耐性遺伝子である場合には、相当する薬剤を培地に添加することができ、選択マーカーが栄養要求性相補遺伝子である場合には、相当する栄養因子を培地から除くことができる。例えば、G418耐性遺伝子を含むベクターで形質導入したヒト線維芽細胞を培養する場合、培養中、必要に応じてG418（G418硫酸塩）を添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した形質転換体等を培養する場合は、必要に応じて、好適なインデューサー（例えば、IPTG等）を培地に添加してもよい。

形質転換体の培養条件は、目的タンパク質の生産性及び宿主の生育が妨げられない条件であれば特に限定はされず、通常、10℃～40℃、好ましくは20℃～37℃で5～100時間行う。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行うことができる。培養方法としては、固体培養、静置培養、振盪培養、通気攪拌培養などが挙げられる。

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することにより目的タンパク質を採取することができる。菌体又は細胞の破碎方法としては、フレンチプレス又はホモジナイザーによる高圧処理、超音波処理、ガラスビーズ等による磨砕処理、リゾチーム、セルラーゼ又はペクチナーゼ等を用いる酵素処理、凍結融解処理、低張液処理、ファージによる溶菌誘導処理等を利用することができる。破碎後、必要に応じて菌体又は細胞の破碎残渣（細胞抽出液不溶性画分を含む）を除くことができる。残渣を除去する方法としては、例えば、遠心分離やろ過などが挙げられ、必要に応じて、

凝集剤やろ過助剤等を使用して残渣除去効率を上げることにもできる。残渣を除去した後に得られた上清は、細胞抽出液可溶性画分であり、粗精製したタンパク質溶液とすることができる。

- 5 また、目的のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合は、菌体や細胞そのものを遠心分離、膜分離等で回収して、未破碎のまま使用することも可能である。

- 一方、目的のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離やろ過等により菌体又は細胞を除去する。その後、必要に応じて硫酸沈澱による抽出等により、培養物中から目的タンパク質を
10 採取し、さらに必要に応じて透析、各種クロマトグラフィー（ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等）を用いて単離精製することもできる。

- なお、前述のように、目的タンパク質が菌体又は細胞を用いて（菌体内又は細胞内に、あるいは菌体外又は細胞外に）生産される場合は、通常、シグナルペプチド部分が、菌体内又は細胞内の小胞体から細胞質に移動する際や、菌体外又は細胞外への分泌の際に除去され、最終的に、シグナルペプチド部分を有しない成熟タンパク質の状態で開催されることになる。しかしながら、本発明
15 においては、この態様には限定はされず、例えば、上述した小胞体から細胞質への移動や菌体外又は細胞外への分泌の際に必要なシグナルペプチド部分を2つ以上重複して（連続して）有するタンパク質を一旦発現させ、当該移動及び分泌後においてもシグナルペプチド部分を少なくとも1つは有する状態のものを回収するようにしてもよい。この場合、得られた目的タンパク質を医薬組成物等の有効成分として利用する場合は、例えば、シグナルペプチド部分を酵素等を用いて切断又は分解し、成熟タンパク質の状態にしてから利用すればよい。
20 形質転換体等を培養して得られたタンパク質の生産収率は、例えば、培養液あたり、菌体湿重量又は乾燥重量あたり、粗酵素液タンパク質あたりなどの単位で、SDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）等により確認することができる。

また、目的タンパク質の製造は、上述したような形質転換体を用いたタンパク質合成系のほか、生細胞を全く使用しない無細胞タンパク質合成系を用いて行うこともできる。

5 無細胞タンパク質合成系とは、細胞抽出液を用いて試験管等の人工容器内で目的タンパク質を合成する系である。また、使用し得る無細胞タンパク質合成系としては、DNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系も含まれる。

この場合、使用する細胞抽出液の由来は、前述の宿主細胞であることが好ましい。細胞抽出液としては、例えば真核細胞由来又は原核細胞由来の抽出液、より具体的には、CHO細胞、ウサギ網状赤血球、マウスL-細胞、HeLa細胞、小麦胚芽、出芽酵母、大腸菌などの抽出液を使用することができる。なお、これらの細胞抽出液は、濃縮又は希釈して用いてもよいし、そのままでもよく、限定はされない。

細胞抽出液は、例えば限外濾過、透析、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿等によって得ることができる。

15 このような無細胞タンパク質合成は、市販のキットを用いて行うこともできる。例えば、試薬キットPROTEIOS™（東洋紡）、TNT™ System（プロメガ）、合成装置のPG-Mate™（東洋紡）、RTS（ロシュ・ダイアグノスティクス）等が挙げられる。

20 無細胞タンパク質合成によって産生された目的のタンパク質は、前述したようにクロマトグラフィー等の手段を適宜選択して、精製することができる。

6. ファブリー病治療用医薬組成物

(i) 補充用酵素薬等としての医薬組成物

25 本発明のタンパク質は、前述したように、ファブリー病の治療に関して種々の優れた効果を発揮し得るものであり、ファブリー病治療用医薬組成物（ファブリー病治療剤）の有効成分として好適に用いることができる。すなわち、本発明は、前述した本発明のタンパク質を含有するファブリー病治療用医薬組成物を提供するものである。当該医薬組成物としては、具体的には、酵素補充療法に用い得る補充用酵素薬の形態であることが好ましい。

当該医薬組成物において有効成分となる、本発明のタンパク質は、必要に応じて各種塩や水和物等の状態で用いられてもよいし、また、治療剤としての保存安定性（特に酵素活性の維持）を考慮した適当な化学的修飾がなされた状態で用いられてもよく、特に限定はされない。

5 当該医薬組成物は、本発明のタンパク質等以外にも他の成分を含むことができる。他の成分としては、当該医薬組成物の用法（使用形態）に応じて必要とされる、製薬上許容され得る各種成分（薬学的に許容し得る各種担体等）が挙げられる。他の成分は、本発明のタンパク質等により発揮される効果が損なわれない範囲で適宜含有することができる。

10 当該医薬組成物を補充用酵素薬として用いる場合は、本発明のタンパク質の配合割合や、他の成分の種類及び配合割合は、公知の補充用酵素薬（特に、ファブリー病治療用の補充用酵素薬）の調製法に準じて適宜設定することができる。

当該医薬組成物の投与については、その用法は限定はされないが、補充用酵素薬である場合は、通常、点滴静注などの非経口用法が採用される。非経口用法等の各種用法に用い得る製剤は、薬剤製造上一般に用いられる賦形剤、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等を適宜選択して使用し、常法により調製することができる。

20 当該医薬組成物の形態は、限定はされないが、補充用酵素薬である場合は、通常、静脈内注射剤（点滴を含む）が採用され、例えば、単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態等で提供され得る。

当該医薬組成物の投与量は、一般には、製剤中の有効成分の配合割合を考慮した上で、投与対象（患者）の年齢、体重、病気の種類、病状のほか、投与経路、投与回数、投与期間等を勘案し、適宜、広範囲に設定することができる。

25 特に、当該医薬組成物が補充用酵素薬である場合は、その投与回数は、2～4週間に1回程度が好ましく、またその投与量（／1回）は、例えば、有効成分である本発明のタンパク質等（組換え酵素）を、患者の体重に対して0.1～

10mg/kg程度投与できる量であることが好ましく、より好ましくは0.1～5mg/kg程度、さらに好ましくは0.2～1mg/kg程度である。

- 5 本発明においては、有効成分となる本発明のタンパク質（組換え酵素）は、血中安定性に優れ、障害臓器の細胞への取り込み効率も高いため、従来に比べて少量の使用であっても従来と同様又はそれ以上の酵素補充効果を得ることができ、またアレルギー性副作用も極めて少ないので、患者への体力的、精神的及び経済的な負担を大いに低減することができる。

(ii) 遺伝子治療剤としての医薬組成物

- 10 本発明の遺伝子は、前述したように、ファブリー病の治療に関して種々の優れた効果を発揮し得る本発明のタンパク質をコードするものであり、ファブリー病治療用医薬組成物（ファブリー病治療薬(遺伝子治療剤)）の有効成分として用いることができる。すなわち、本発明は、前述した本発明の遺伝子を含有するファブリー病治療用医薬組成物を提供するものである。

- 15 当該医薬組成物が遺伝子治療剤に用いられる場合は、注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクター等が挙げられる。これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。なお、市販の遺伝子導入キット（例えば、製品名：アデノエクスプレス、クローンテック社製）を用いることもできる。
- 20

- また、当該医薬組成物を遺伝子治療剤に用いる場合、当該組成物をリポソーム等のリン脂質小胞体に導入し、この小胞体を投与することも可能である。本発明の遺伝子を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内又は動脈内等に投与する。ファブリー病の障害臓器に局所投与することもできる。例えば、成人に当該医薬組成物を投与する場合は、患者の体重に対し、一日あたり0.1 μ g/kg～1000mg/kg程度であることが好ましく、より好ましくは1 μ g/kg～100mg/kg程度である。
- 25

7. ファブリー病の治療方法

本発明は、上述した本発明の医薬組成物をファブリー病患者に投与すること
を特徴とする、ファブリー病の治療方法を含むものである。また本発明は、フ
5 ファブリー病を治療するための本発明の医薬組成物の使用、及び、ファブリー病
の治療のための薬剤を製造するための本発明の医薬組成物又は本発明のタンパ
ク質の使用も含むものである。

本発明の治療方法に使用する医薬組成物は、本発明のタンパク質を含む医薬
組成物（前記「6.(i)」）、又は本発明の遺伝子を含む医薬組成物（前記「6
10 .(ii)」）、あるいはこれら両医薬組成物の併用であってもよく、限定はされず、
患者の病状や副作用の有無、あるいは投与効果などを考慮し、適宜選択するこ
とができる。ここで、ファブリー病患者に投与する各医薬組成物は、前述した
補充用酵素薬や遺伝子治療剤としての使用態様で投与することが好ましい。

特に、上記併用の場合は、それぞれの医薬組成物の投与量の割合、投与回数
15 及び投与期間などを、個々の患者に合わせて適宜設定することができる。なお、
各医薬組成物等の好ましい投与方法及び投与量等については、前述の通りであ
る。

以下に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら
20 に限定されるものではない。

〔実施例1〕

＜ α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (α -NAGA)に導入する変異部位の選択＞

ヒト α -NAGAの基質特異性をヒト α -GAL様に変換した新規酵素を設計するた
め、タンパク質立体構造モデルを用いた比較検討により、ヒト α -NAGAへの変
25 異の導入部位（アミノ酸位置）を決定した。以下にその手順及び結果を具体的
に示す。

1. 使用したデータ

ヒト α -NAGA 及び ヒト α -GAL のアミノ酸配列データは、Swiss-Prot に、それぞれ下記の通り登録されているものを使用した（表 1 参照）。また、ニワトリ α -NAGA 及び ヒト α -GAL タンパク質立体構造データは、Protein Data Bank (PDB) に、それぞれ下記の通り登録されているものを使用した（表 2 参照）。

5 (1) アミノ酸配列データ

使用データベース：Swiss-Prot (<http://tw.expasy.org/uniprot/>)

表 1

	entry name	accession number
10	ヒト α -NAGA	NAGAB_HUMAN P17050
	ヒト α -GAL	AGAL_HUMAN P06280

(2) タンパク質立体構造データ

15 使用データベース：Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

表 2

	PDB ID	
20	ニワトリ α -NAGA	1KTC (下記*1参照)
	ヒト α -GAL	1R47 (下記*2参照)

*1: Garman SC et al., Structure (Camb), 2002, 10(3):425-34.

*2: Garman SC et al., J. Mol. Biol., 2004, 19:337(2):319-35.

25 2. ヒト α -NAGA の立体構造モデルの構築

ヒト α -NAGA の立体構造モデルの構築は、ニワトリ α -NAGA の立体構造に基づいて、既存の手法であるホモロジーモデリング法 (Sutcliffe MJ et al., Prot. Eng., 1987, 1, 377-84; Sutcliffe MJ et al., Prot. Eng., 1987, 1, 385-92 参照) を用いて行った。ホモロジーモデリングで使用するテンプレートの立体構造とし

て、PDBに登録されているニワトリ由来 α -NAGA（基質複合体）の立体構造を使用した。ヒト α -NAGAとニワトリ α -NAGAのアミノ酸一致度（identity）は75%であり、ホモロジーモデリング法による立体構造モデルの構築の条件（identity $\geq$ 30%）を満たす。ホモロジーモデリング法による立体構造モデルの構築は、既存のソフトウェアであるMODELLER（MODELLER CBSU Web（<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/modeller.aspx>））にアクセスすることにより利用可能）を使用して行った。さらに、ニワトリ α -NAGAに結合している基質の位置に準じて、当該基質を、構築したヒト α -NAGAの立体構造モデルにはめ込むことにより、ヒト α -NAGAの基質複合体モデルを構築した。

10

3. ヒト α -GALとヒト α -NAGAの基質特異性に寄与する立体構造の比較

ヒト α -NAGAとヒト α -GALの立体構造は類似しており、いずれも、触媒ドメイン(catalytic domain)は(β α)₈バレル構造をとる。活性部位（触媒部位及び基質結合部位）に存在する触媒作用に必要なアミノ酸残基(catalytic residue)は、(β α)₈バレル構造の各ストランドのC末端側に局在している。図1、図2 A及び図2 Bに、ヒト α -NAGAとヒト α -GALの立体構造をリボンモデル表示で示し、各構造における触媒部位及び基質結合部位のアミノ酸残基をスティック表示で示した。これら触媒部位及び基質結合部位の残基と基質との立体構造上の位置関係を比較するため、Kabschの重ね合わせ法（Kabsch W. et al., Acta Crystallogr.; 1976: A32, 827-828. ; Kabsch W. et al., Acta Crystallogr.; 1978: A34, 922-923. 参照）により、 α -NAGAと α -GALの立体構造の重ね合わせを行った。その後、ヒト α -NAGAモデルにおいて、基質に近接するアミノ酸残基を抽出することにより、基質の結合に関与するアミノ酸残基を選定した。その結果を下記表3に示す。表3の右欄にはヒト α -NAGAから選択された14アミノ酸残基を示し、左欄には当該14アミノ酸残基に位置的に相当するヒト α -GALにおけるアミノ酸を示す。

15

20

25

表 3

Human α -GAL	Human α -NAGA
Trp47	Trp33
Asp92	Asp78
Asp93	Asp79
Tyr134	Tyr119
Cys142	Cys127
Lys168	Lys154
Asp170 (*)	Asp156 (*)
Cys172	Cys158
~~Glu203~~	~~Ser188~~
~~Leu206~~	~~Ala191~~
Tyr207	Tyr192
Arg227	Arg213
Asp231 (*)	Asp217 (*)
Asp266	Asp252

(*) catalytic residue

5

これらのアミノ酸残基をヒト α -NAGA とヒト α -GAL の立体構造を重ね合わせて比較し、一致する残基と異なる残基を検出にすることにより、ヒト α -GAL とヒト α -NAGA のアミノ酸配列における共通点と相違点を明らかにした。

10 4. ヒト α -GAL とヒト α -NAGA の共通点

その結果、抽出された 14 残基中、ヒト α -NAGA の触媒部位である Asp156 及び Asp217 を含む 12 残基が、 α -NAGA と α -GAL とで一致していることがわかった。重ね合わせた立体構造でもこれらのアミノ酸残基中の原子はよく重なり合い、立体構造上の位置も酷似していることが確認された。 α -NAGA 及び α -GAL に共通するアミノ酸残基の立体構造上での位置を図 2 A に示す。また、各アミノ酸残基と基質との相互作用を図 2 C に示す。これらの残基はいずれも、水素結合又は疎水性結合により基質と関与していると推測される。なお、図 2 C では、下線を付していないアミノ酸が α -NAGA 及び α -GAL に共通するアミノ

15

酸であり、下線を付しているアミノ酸が α -NAGAと α -GALとの間で異なるアミノ酸である。

5. ヒト α -GALとヒト α -NAGAの相違点

- 5 ヒト α -GALとヒト α -NAGAとの間で異なる残基は2残基あり（図2C参照）、 α -NAGAでのSer188及びAla191に対応するアミノ酸残基が、 α -GALではそれぞれGlu203及びLeu206であった。 α -NAGAと α -GALとで異なるアミノ酸残基の立体構造上での位置を図2Bに示した。

- 10 図2Cに示すように、 α -GAL及び α -NAGAに対する各基質中の糖（6員環）の2位の炭素原子には、 α -GALでは「-OH基（ヒドロキシル基）」が、 α -NAGAでは「-NH-C(CH₃)=O基（N-アセチル基）」が、それぞれ存在する。

- 15 α -NAGAでは、Ser188の側鎖のヒドロキシル基が、基質中のN-アセチル基の酸素原子と水素結合していることが推測され、Ala191の側鎖のメチル基が、基質中のN-アセチル基のメチル基と疎水性結合していることが推測された。これらの推測から、 α -NAGAのSer188及びAla191は、基質中のN-アセチル基を認識するために重要な残基であると考えられた。

- 一方、ヒト α -GALでは、 α -NAGAとの間で異なる残基であるGlu203及びLeu206が、 α -GALの基質の認識に重要であると報告されている（Garman SC et al., J. Mol. Biol., 2004, 19;337(2):319-35.）。そして、 α -GALのGlu203の側鎖のカルボキシル基は、基質中の前記ヒドロキシル基と水素結合を形成することがX線結晶構造解析から明らかになっている。また、 α -GALのLeu206は、かさ高い側鎖を有する残基であり、 α -GALの基質結合部位の空間を一部占有する。一方、 α -GALの基質中の前記ヒドロキシル基（2位）は、かさの小さい官能基であり、例えば α -NAGAの基質中のN-アセチル基と比較すると前記ヒドロキシル基が小さいことは明らかである。従って、 α -GALと基質との結合においては、 α -GALの基質結合部位の空間の大きさは、基質中の前記ヒドロキシル基の大きさにちょうど適していると考えられる。よって、 α -GALにおいては、Glu203及びLeu206の2残基が基質特異性の高さに寄与していると考えられた。

6. 立体構造モデルによる基質特異性の検証

さらに、 α -NAGAの基質に対する相互作用、及び α -GALの基質に対する相互作用を検証するため、相互の基質を交換したモデル、すなわち (i) α -GALの基質と α -NAGAとの複合体モデル、及び (ii) α -NAGAの基質と α -GALとの複合体モデルを構築し、 α -NAGAと α -GALとの間で異なる2残基の基質に対する関与について調べた。

その結果、 α -NAGAモデル構造に α -GALの基質をはめ込んだ複合体モデルでは、 α -NAGAのSer188の側鎖は α -GALの基質の2位のヒドロキシル基とは相互作用せず、Ala191と α -GALの基質との間には隙間が生じ、ヒドロキシル基との相互作用は見られなかった。一方、 α -GALの構造に α -NAGAの基質をはめ込んだ複合体モデルでは、 α -NAGAの基質の2位のN-アセチル基は α -GALのGlu203及びLeu206と衝突することが確認され、これらの2残基の存在により、基質の結合が阻害されることが予測された。

これらの予測結果は、これまでの実験結果を支持するものであり、 α -NAGAのSer188及びAla191、並びに α -GALのGlu203及びLeu206が、 α -NAGA及び α -GALのそれぞれの基質特異性に重要であることが裏付けられた。

7. ヒト α -NAGAの基質特異性をヒト α -GAL様に変換するためのアミノ酸残基置換

以上のように、ヒト α -GALとヒト α -NAGAとでは、各基質中の糖(6員環)の2位の炭素原子に存在する官能基を認識する2残基以外は、アミノ酸配列は、触媒部位を含めて全て共通であり、基質特異性の高さに寄与するこれら2残基の置換により、触媒活性は置換前のものを維持しつつ、基質特異性のみを α -GAL及び α -NAGAの相互間で変更できる可能性が示された。ヒト α -NAGAの基質特異性を変更し、 α -NAGAに α -GAL活性を発現させるためには、これら2ヶ所のアミノ酸置換が重要である。ヒト α -NAGAのSer188をGluに置換することにより、 α -NAGAの基質のN-アセチル基との水素結合による認識をなくし、 α -GALの基質のヒドロキシル基への水素結合による相互作用を導入することができる。さらに、ヒト α -NAGAのAla191をLeuに置換することにより、 α -NAGA

の基質の結合の際にN-アセチル基が入る空間を、Leuのかさ高い側鎖により占有させ、この立体障害により当該基質の結合を阻害する。これらの効果により、 α -NAGAにおいて、本来の α -NAGAの基質への認識をなくし、 α -GALの基質への高い特異性を持たせることが可能であると予測された。

5

8. ヒト α -NAGAアミノ酸置換体モデルの評価

α -NAGA に対し、Ser188をGluに置換し、Ala191をLeuに置換した場合、周辺の立体構造に与える影響を確認するため、 α -NAGA変異体（ α -NAGA(S188E/A191L)）モデルを構築し、野生型 α -NAGAの立体構造と比較した。その結果、上記置換は周辺アミノ酸残基からなる立体構造に影響を及ぼさないことを確認した。このため、ヒト α -NAGAへこれらの変異を導入した α -NAGA変異体は、立体構造上、問題なく存在することができると推測された。

10

また、 α -NAGA変異体の構造に α -GALの基質をはめ込んだ複合体モデルを構築した結果、 α -NAGA変異体のGlu188の側鎖は、当該基質の2位のヒドロキシル基と水素結合をし得る距離に存在することが確認された（図5(b)参照）。さらに、変異体 α -NAGAの構造に α -NAGAの基質をはめ込んだ複合体モデルでは、当該基質の2位のN-アセチル基がLeu191の側鎖と立体障害を起こし、基質が結合できない構造になっていると推測された。

15

以上により、変異体 α -NAGAは、本来の α -NAGAの基質への特異性を失い、 α -GALの基質への高い特異性を獲得すること（すなわち、実質的に α -NAGA活性を失い、 α -GAL活性を獲得すること）が期待される結果となった。

20

構築した α -NAGA変異体（ α -NAGA(S188E/A191L)）の構造を図6に示す。

9. ヒト α -NAGAアミノ酸置換のその他の候補

以上に述べた基質特異性の改変は、 α -NAGAの基質への立体障害による結合阻害と、 α -GALの基質との水素結合の形成という、2つの作用によりもたらされるが、上述したアミノ酸置換について、他のアミノ酸への置換可能性の有無を検討した。

25

まず上記結合阻害作用のために、第一候補として α -GALと同じLeuへの置換を行ったが、同様の作用をもたらす置換としては、疎水性アミノ酸残基であるVal, Ile, Phe又はMetへの置換が考えられた。

また、上記水素結合の形成作用のために、第一候補として α -GALと同じGlu
5 への置換を行ったが、同様の作用をもたらす置換としては、Gluと同じくカルボキシル基を持つAspへの置換が考えられた。

10 10. 野生型ヒト α -NAGAのアミノ酸配列と改変型 α -NAGAのアミノ酸配列

野生型ヒト α -NAGAのアミノ酸配列を「配列番号2」に示し、 α -NAGA変異
10 体（ α -NAGA(S188E/A191L)）のアミノ酸配列を「配列番号4」に示した。

〔実施例2〕

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体の作製>

以下の手順により、 α -NAGA変異体である α -NAGA(S188E/A191L)に α -
15 GALのシグナルペプチドを融合した、「 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体（ α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)）」を作製した。

20 1. α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ（ α -NAGA）レトロウイルスベクターの作製

α -NAGA cDNA clone (Homo sapiens N-acetylgalactosaminidase, alpha, mRNA, Gene Bank Accession:BC000095, IMAGE:3504221)は Open biosystem
社より購入した。購入した α -NAGA cDNAをテンプレートとし、下記プライマー及びKOD-plus-ポリメラーゼ（東洋紡）を用いて、以下の反応液組成及び反応
25 条件のPCRにより、 α -NAGAのコーディングシーケンスを増幅した。

NAGA-5'プライマー :

5'-GATGCTGCTGAAGACAGTGCTCTT-3' (配列番号13)

NAGA-3'プライマー :

5'-TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3' (配列番号14)

5

<反応液組成>

	テンプレート (10 ng/ μ l) :	2 μ l
	10×バッファー :	10 μ l
	2.5mM dNTP :	10 μ l
10	25mM MgSO ₄ :	4 μ l
	KOD-plus [®] ポリメラーゼ :	2 μ l
	NAGA-5'プライマー (10 μ M) :	2 μ l
	NAGA-3'プライマー (10 μ M) :	2 μ l
	滅菌水 :	68 μ l
15	合計 :	100 μ l

<反応条件>

94℃で2分間加熱後、「熱変性・解離 : 94℃ (15sec) → アニーリング : 60℃ (30sec) → 合成・伸長 : 68℃ (90sec)」を1サイクルとして計35サイクル
20 行い、4℃で冷却した。

得られた α -NAGA DNAフラグメントを、アガロースゲル電気泳動で精製した。

T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs: NEB)で末端をリン酸化した α -NAGA DNAフラグメントと、制限酵素Hpa I (Blant end) (NEB)で切断した後にAlkaline Phosphatase, Calf Intestine (NEB)を用いて脱リン酸化したレ
25 トロウイルスベクターpCX4Neo (Tsuyoshi Akagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 100, 13567-13572 (2003)) とを、ライゲーションした。ライゲーション反応により得られた α -NAGA pCX4Neoを、DH5 α コンピテントセル (インビ

トロジェン) にトランスフォームし、アンピシリン含有LBプレートに撒いた後、アンピシリン耐性コロニーを得た。

得られたそれぞれの耐性コロニーをLB培地で懸濁し、その菌液をテンプレートとし、下記プライマー及びPCR Master mix (プロメガ社製)を用いて、以下の

5 反応液組成及び反応条件でコロニーPCRを行った。

NAGA-5'プライマー :

5'-GATGCTGCTGAAGACAGTGCTCTT-3' (配列番号13)

pCX4-3'プライマー :

10 5'-AAACCGTTGCTAGCTTAAGTT-3' (配列番号15)

<反応液組成>

	テンプレート(1コロニー/10 μ l) :	1 μ l
	PCR Master mix :	10 μ l
15	NAGA-5'プライマー (10 μ M) :	0.5 μ l
	pCX4-3'プライマー (10 μ M) :	0.5 μ l
	滅菌水 :	8 μ l
	合計 :	20 μ l

20 <反応条件>

95℃で2分間加熱後、「熱変性・解離 : 95℃ (30sec) → アニール : 55℃ (30sec) → 合成・伸長 : 72℃ (90sec)」を1サイクルとして計40サイクル行い、4℃で冷却した。

25 得られた増幅産物から、 α -NAGA DNAを正方向に組込んだクローンを選別した。具体的には、1.4 kbの増幅断片が得られた大腸菌テンプレートを、 α -NAGA DNAを正方向に組込んだクローンとして選別した。選別した α -NAGA pCX4Neoの大腸菌クローンを大量培養して、1 mg以上 (1mg/mL) の α -NAGA pCX4NeoプラスミドDNAを得た。

2. α -NAGA変異体の作製

α -NAGA変異体である α -NAGA(S188E/A191L)は、まず α -NAGA(S188E)を作製した後、これを基にして作製した。作製方法は、適宜、GeneTailor Site-

- 5 Directed Mutagenesis System (インビトロジェン) を使用説明書の記載を参照して行った。

まず、 α -NAGA pCX4Neo (100 ng) をDNA Methylase (4 U) でメチル化した。 α -NAGA(S188E)の作製は、メチル化した α -NAGA pCX4Neoをテンプレートとし、第188番目のセリン(S)をグルタミン酸(E)とするミスセンス変異

- 10 (S188E)が導入されるように設計したNAGA S188E-GT-5'プライマー(S188Eミスセンス変異を導入した箇所にアンダーライン) 及びNAGA S188E-GT-3'プライマー、並びにKOD-plus-ポリメラーゼを用いて、以下の反応液組成及び反応条件のPCRによりDNAを増幅した。

- 15 NAGA S188E-GT-5'プライマー :

5'-CCCATCGCCTTCTCCTGCGAGTGGCCAGCCTATGA-3' (配列番号16)

NAGA S188E-GT-3'プライマー :

5'-GCAGGAGAAGGCGATGGGGCGGCCTGTG-3' (配列番号17)

- 20 <反応液組成>

	テンプレート (6ng/ μ l) :	1 μ l
	10×バッファー :	5 μ l
	2.5mM dNTP :	5 μ l
	25mM MgSO ₄ :	2 μ l
25	KOD-plus-ポリメラーゼ :	1 μ l
	NAGA S188E-GT-5'プライマー(10 μ M) :	1 μ l
	NAGA S188E-GT-3'プライマー(10 μ M) :	1 μ l
	滅菌水 :	34 μ l
	合計 :	50 μ l

<反応条件>

- 94℃で2分間加熱後、「熱変性・解離：94℃（15sec）→アニーリング：60℃（30sec）→合成・伸長：68℃（8min）」を1サイクルとして計35サイクル
5 行い、4℃で冷却した。

増幅したDNAフラグメント（ α -NAGA(S188E) pCX4Neo）は、メチル化されたDNAを切断するMcrBCエンドヌクレアーゼを持つDH5a-T1 コンピテントセル（インビトロジェン）にトランスフォームした。テンプレートとした α -

- 10 NAGA pCX4Neoはメチル化されたものであるため、McrBCエンドヌクレアーゼにより切断されコロニーを形成できず、S188E変異を持つプラスミドはメチル化されていないため切断されず形成できる。形成された数個のコロニーを培養し、プラスミドDNAを抽出及び精製し、S188E変異が導入されていることを、シーケンサーを用いた公知の塩基配列決定法で確認した。

- 15 次に、 α -NAGA(S188E/A191L)の作製は、精製した α -NAGA(S188E) pCX4Neoをテンプレートとし、第191番目のアラニン(A)をロイシン(L)とするミスセンス変異(A191L)が導入されるように設計したNAGA A191L-GT-5'プライマー(A191Lミスセンス変異を導入した箇所にアンダーライン) 及びNAGA A191L-GT-3'プライマー、並びにKOD-plus-ポリメラーゼを用いて、以下の反応液組成
20 及び反応条件のPCRにより増幅して行った。

NAGA A191L-GT-5'プライマー：

5'-TTCTCCTGCGAGTGGCCACTCTATGAAGGCGGCCT-3'（配列番号18）

NAGA A191L-GT-3'プライマー：

- 25 5'-TGGCCACTCGCAGGAGAAGGCGATGGGG-3'（配列番号19）

<反応液組成>

	テンプレート (6ng/ μ l) :	1 μ l
	10×バッファー :	5 μ l
	2.5mM dNTP :	5 μ l
5	25mM MgSO ₄ :	2 μ l
	KOD-plus-ポリメラーゼ :	1 μ l
	NAGA A191L-GT-5'プライマー (10 μ M) :	1 μ l
	NAGA A191L-GT-3'プライマー (10 μ M) :	1 μ l
	滅菌水 :	34 μ l
10	合計 :	50 μ l

<反応条件>

- 94℃で2分間加熱後、「熱変性・解離：94℃（15sec）→アニーリング：60℃（30sec）→合成・伸長：68℃（8min）」を1サイクルとして計35サイクル
 15 行い、4℃で冷却した。

- 増幅したDNAフラグメント（ α -NAGA(S188E/A191L) pCX4Neo）を、DH5a-T1 コンピテントセルにトランスフォームした後、プラスミドDNAを抽出及び精製し、S188E変異に加えてA191L変異が導入されていることを、シー
 20 クエンサーを用いた公知の塩基配列決定法で確認した。

3. α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA、及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体の作製

- α -NAGA遺伝子を動物細胞に遺伝子導入した場合、培養上清中に分泌される
 25 リコンビナント α -NAGA酵素タンパク質は少量で、大部分は細胞内に存在したままであることが判明した。そこで、 α -NAGA（野生型）及び α -NAGA変異体（ α -NAGA(S188E/A191L)）を培養上清中に大量に分泌させる目的で、それらのシグナルペプチド部分（ α -NAGA由来のシグナルペプチド部分）を、培養上清中に大量に分泌されることがよく知られている α -GAL由来のシグナルペプチ

ド部分に変えた、リコンビナント α -NAGA 酵素タンパク質を作製した。

α -GAL cDNA は、公知の塩基配列情報及びクローニング方法を用いて得た。

まず、 α -GAL cDNA を鋳型にして、 α -GAL のシグナルペプチドをコードする塩基配列を GLA-5'プライマーと SigGALNAGA2-3'プライマーとを用いて、以下

5 の反応液組成及び反応条件の PCR により増幅した。ここで、SigGALNAGA2-3'プライマーは、 α -GAL のシグナルペプチドをコードする塩基配列の 3'末端部分に相同のシーケンスと、 α -NAGA をコードする塩基配列の 5'末端に相同のシーケンスとを有するプライマーである。当該 PCR により、増幅産物として、

10 α -GAL のシグナルペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 断片（以下、PCR 産物 A）を得た。

GLA-5'プライマー：

5'-ACAATGCAGCTGAGGAACCCAGAA-3'（配列番号20）

SigGALNAGA2-3' プライマー：

15 5'-GTCCAGTGCTCTAGCCCCAG-3'（配列番号21）

<反応液組成>

	テンプレート (6ng/ μ l)：	1 μ l
	10×バッファー：	5 μ l
20	2.5mM dNTP：	5 μ l
	25mM MgSO ₄ ：	2 μ l
	KOD-plus-ポリメラーゼ：	1 μ l
	GLA-5'プライマー (10 μ M)：	1 μ l
	SigGALNAGA2-3' プライマー(10 μ M)：	1 μ l
25	滅菌水：	34 μ l
	合計：	50 μ l (PCR産物 A)

<反応条件>

94℃で2分間加熱後、「熱変性・解離：94℃（15sec）→アニーリング：60℃（30sec）→合成・伸長：68℃（15 sec）」を1サイクルとして計35サイクル行い、4℃で冷却した。

5

次に、 α -NAGA及び α -NAGA(S188E/A191L)のcDNAをそれぞれ鋳型にし、そのうち α -NAGA由来のシグナルペプチド部分をコードする塩基配列を除いた塩基配列からなるcDNA領域を、SigGALNAGA2-5'プライマーとNAGA-3'プライマーとを用いて、以下の反応液組成及び反応条件のPCRにより増幅した。ここで、SigGALNAGA2-5'プライマーは、 α -GALのシグナルペプチドをコードする塩基配列の3'末端部分に相同のシーケンスと、 α -NAGAの5'末端部分に相同のシーケンスとを有するプライマーである。当該PCRにより、増幅産物として、 α -NAGA及び α -NAGA(S188E/A191L)のシグナルペプチド部分を除いた部分をコードする塩基配列を有するDNA断片（以下、PCR産物B）を得た。

15

SigGALNAGA2-5'プライマー：

5'-AGAGCACTGGACAATGGGCT-3'（配列番号22）

NAGA-3'プライマー：

5'-TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3'（配列番号23）

20

<反応液組成>

	テンプレート (6ng/ μ l) :	1 μ l
	10×バッファー :	5 μ l
	2.5mM dNTP :	5 μ l
5	25mM MgSO ₄ :	2 μ l
	KOD-plus [®] ポリメラーゼ :	1 μ l
	SigGALNAGA2-5'プライマー (10 μ M) :	1 μ l
	NAGA-3'プライマー (10 μ M) :	1 μ l
	滅菌水 :	34 μ l
10	合計 :	50 μ l (PCR産物B)

<反応条件>

- 94℃で2分間加熱後、「熱変性・解離：94℃（15sec）→アニーリング：60℃（30sec）→合成・伸長：68℃（1min20sec）」を1サイクルとして計35サイクル行い、4℃で冷却した。

最後に、上記各PCRにより得られたPCR産物A及びPCR産物Bを共に鋳型とし、GLA-5'プライマーとNAGA-3'プライマーとを用いて、以下の反応液組成及び反応条件のPCRにより増幅した。

<反応液組成>

	PCR産物 A (6ng/μl) :	1 μl
	PCR産物 B (6ng/μl) :	1 μl
	10×バッファー :	5 μl
5	2.5mM dNTP :	5 μl
	25mM MgSO ₄ :	2 μl
	KOD-plus-ポリメラーゼ :	1 μl
	GLA-5'プライマー (10 μM) :	1 μl
	NAGA-3'プライマー (10 μM) :	1 μl
10	滅菌水 :	34 μl
	合計 :	50 μl

<反応条件>

- 94℃で2分間加熱後、「熱変性・解離：94℃（15sec）→アニーリング：60℃
 15 （30sec）→合成・伸長：68℃（1min20sec）」を1サイクルとして計35サイクル行い、4℃で冷却した。

- 当該PCRにより、増幅産物として、α-GALシグナルペプチド融合α-NAGAを
 コードする塩基配列を有するDNA断片、及びα-GALシグナルペプチド融合α-
 20 NAGA(S188E/A191L)をコードする塩基配列を有するDNA断片を、それぞれ得た。得られた各DNA断片を、ローメルティングアガロースゲルによる電気泳動で分離した後、市販のDNA断片精製キットを用いて精製した。

- 次いで、上記精製後に得られた各DNA断片の末端をT4 polynucleotide kinase
 (NEB)でリン酸化したものと、制限酵素Hpa I (Blant end) (NEB)で切断後に
 25 Alkaline Phosphatase, Calf Intestine (NEB) を用いて脱リン酸化したレトロウ
 イルスベクターpCX4Neo (Tsuyoshi Akagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,
 100, 13567-13572 (2003)) とを、遺伝子組換え技術の常法によりライゲーショ
 ンした。ライゲーション反応により得られた、α-GALシグナルペプチド融合α-
 NAGA pCX4Neo、及びα-GALシグナルペプチド融合α-NAGA(S188E/A191L)

pCX4Neoを、それぞれDH5 α コンピテントセル（インビトロジェン）にトランスフォームし、アンピシリン含有LBプレートに撒いた後、アンピシリン耐性コロニーを得た。

- 得られたそれぞれの耐性コロニーをLB培地で懸濁し、その菌液をテンプレートとし、下記プライマー及びPCR Master mix（プロメガ社製）を用いて、以下の反応液組成及び反応条件でコロニーPCRを行った。

pCX4-5'プライマー：

5'-GGGTGGACCATCCTCTAGACT-3'（配列番号24）

- 10 NAGA-3'プライマー：

5'-TCACTGCTGGGACATCTCCAGGTT-3'（配列番号23）

<反応液組成>

	テンプレート(1コロニー/10 μ l)：	1 μ l
15	PCR Master mix：	10 μ l
	pCX4-5'プライマー(10 μ M)：	0.5 μ l
	NAGA-3'プライマー(10 μ M)：	0.5 μ l
	滅菌水：	8 μ l
	合計：	20 μ l

20

<反応条件>

95℃で2分間加熱後、「熱変性・解離：95℃（30sec）→アニーリング：55℃（30sec）→合成・伸長：72℃（1min20sec）」を1サイクルとして計40サイクル行い、4℃で冷却した。

25

当該PCRにより得られた増幅産物から、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)のDNA断片が正方向に組込まれたクローンをそれぞれ選別した。具体的には、1.4 kbの増幅断片が得られた大腸菌テンプレートを、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA

及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)のDNA断片が正方向に組込まれたクローンとして選別した。選別した α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA pCX4Neo 及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L) pCX4Neoの大腸菌クローンを、それぞれ大量培養して、1 mg以上 (1mg/mL) のプラスミドDNAを得た。

〔実施例 3〕

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体を発現する組換えレトロウイルスの作製 >

- 10 レトロウイルスのパッケージング細胞 (Phoenix Ampho Batch#:F-14727 Transformed Human Embryonic Kidney HEK293)は、ATCCより購入した (Coligan, J. E. et al., Curr. Protocols Immunol., Suppl. 31, 10.28.1-10.28.17 (1999))。Phoenix Ampho 細胞は、10 % 不動化済みFBSと抗生物質を加えた DMEM (高グルコース)培養液で、37°C, 5 % CO₂濃度条件下で培養した。
- 15 組換えレトロウイルスを作製するため、Phoenix Ampho細胞に、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA pCX4Neoレトロウイルスベクター、及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L) pCX4Neoレトロウイルスベクターを、それぞれトランスフェクションした。トランスフェクションは、Phoenix Ampho細胞 (5×10^5 /60 mm dish)に、1 μ gのレトロウイルスベクター、1 μ gの
- 20 pCLAMP (RK Naviaux et al., J. Virol., 70, 5701-5705 (1996))、及び18 μ lの Dofect-GT1 (トランスフェクション試薬 ; 同仁化学) 入りの2 mLのOPTI-MEM培養液 (インビトロジェン) を加えて、37°Cで4時間インキュベートし、その後通常の培地に交換して、48時間培養して行った。培養後、上清を回収し、1000 rpmで10分間遠心して、上清中に含まれる組換えレトロウイルスを分注し、
- 25 当該ウイルスを-80°Cでストックした。

〔実施例 4〕

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体を発現するCHO-K1安定発現株の樹立 >

実施例 3 で作製した α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)を発現する組換えレトロウイルスを、それぞれCHO-K1細胞に感染させ、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)の安定発現株を樹立し

5 た。具体的には、下記(i)~(v)のようにして行った。

(i) 1×10^5 個のCHO-K1細胞を60 mm dishにまき、10 % 不動化済みFBSと抗生物質を加えた α MEM培養液で、37°Cで一晩培養した。

(ii) 最終濃度2 μ g/mLになるようにポリブレン (シグマ H-9266,
10 Hexadimethrine Bromide) を培地に加え、37°Cで30分間培養した。

(iii) 培地を除きウイルス液を1 mL入れて37°Cで60分間吸着させた。

(iv) ウイルス液を除き、培地を5 mL加えて一晩培養した。

(v) G418(250 μ g/mL)を培地に加えた選択培地で培養して、G418耐性CHO-K1細胞を樹立した。なお、選択培地の交換は3日に1回の間隔で14日以上行った。また、樹立した細胞は目的のタンパク質を発現しているか、酵素活性及び
15 ウェスタンブロット法 (詳細は下記の通り) で確認した。

[ウェスタンブロット法による目的タンパク質の発現確認]

レトロウイルスを用いて樹立した α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA発現
20 CHO-K1細胞、及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)発現CHO-K1細胞が、それぞれ目的のタンパク質を発現しているかどうかを調べる
目的で、ウェスタンブロットを行った。なお、当該ウェスタンブロットで用いる抗体として、公知の抗体作製方法により得られた抗 α -NAGAポリクローナル抗体を準備した。

25 ウェスタンブロットにおけるサンプルは、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA発現CHO-K1細胞、及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)発現CHO-K1細胞の培養上清を、それぞれ使用した。
SDS-PAGEは、サンプルのタンパク質濃度を測定した後、5 μ g分のタンパク質を含むサンプルに当容量の2×SDS サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl

pH 6.8, 4 % SDS, 30 % glycerol, 0.2 % BPB)を加え、5分間煮沸した後、当該サンプルを4~20 %ゲル (PAG mini : 第一化学薬品) にアプライし、30 mAの定電流で2時間電気泳動を行った。

電気泳動後、タンパク質をPVDF膜を(Immobilon-P, MILLIPORE) に
5 トランスファーするために、ゲルをブロッキングバッファー (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM グリカン, 20 % メタノール) に20分間浸し、ブロッキングバッファーで平衡化したPVDF膜の上に置き、Hoefer TE 70 semi-dry transfer unit (アマシャムバイオサイエンス)を使用して60 mAの定電流で1時間トランスファーを行った。

10 トランスファーの終了後、膜をブロッキングバッファー (5%スキムミルク in TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl))で30分間ブロッキングした後、ブロッキングバッファーで500倍希釈した抗NAGAポリクローナル抗体 (一次抗体) を加え、4℃で一晩インキュベートした。

一次抗体とのインキュベーション後の膜は、TBSにより5分間の洗
15 浄を3回行った後、ブロッキングバッファーで5000倍希釈した抗ウサギIgG HRP標識抗体 (二次抗体 ; アマシャムバイオサイエンス) を加え、室温で1時間インキュベートした。

二次抗体とのインキュベーション後の膜は、TBSにより5分間の洗
20 浄を3回行った後、ECL発色試薬 (ナカライテスク) を加え、室温で2分間反応させた。その後、暗室内でHyperfilm™ ECLと1分間コンタクトして現像した。

以上の結果、樹立した α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA発現CHO-K1細胞、及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)発現CHO-K1細胞は、それぞれ、約45kDの野生型 α -NAGA及び α -NAGA変異体 (α -
25 NAGA(S188E/A191L)) を培養上清中に分泌していることを確認した。

[実施例5]

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体の酵素活性の遷移 >

α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)が、 α -GALの基質特異性を獲得したものであることを、以下の手順で確認した。

実施例4で樹立した α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA発現CHO-K1細胞、及び α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)発現CHO-K1細胞

- 5 の培養上清を、それぞれサンプルにして、 α -GAL活性及び α -NAGA活性の酵素活性測定を行った。酵素活性は、蛍光基質である4-メチルウンベリフェロン (4-MU) 誘導体の合成基質を用い、酵素溶液1 mLが1時間あたりに遊離させることのできる4-MU量を蛍光強度として測定した。具体的には、 α -GALの合成基質としては、4-MU- α -D-ガラクトシド (4-MU- α -GAL; Calbiochem, CA) を用い、 α -NAGAの合成基質としては、4-MU- α -N-アセチル-D-ガラクトサミニド (4-MU- α -NAGA; 生化学工業) を用いた。なお、 α -GAL活性の測定には、4-MU- α -GALに対して同時に反応する α -NAGAの阻害剤として、N-アセチル-D-ガラクトサミン (シグマ, MO) を、最終濃度117mMとなるように予め基質溶液に添加した。

- 15 培養上清 (10 μ L) に対して、5mMの4-MU- α -GALを含有するMcIlvainバッファ (クエン酸/リン酸, pH 4.6, 40 μ L) 、又は、1mMの4-MU- α -NAGAを含有するMcIlvainバッファ (クエン酸/リン酸, pH 4.7, 40 μ L) を添加し混合した後、37°Cで30分間反応させた。0.2M グリシンバッファ (pH 10.7, 950 μ L) を添加して当該反応を停止させ、遊離した4-MUの量を検出するため、
20 光分光光度計 (ARVO MX, PerkinElmer) を用いて、励起波長365nm、蛍光波長450nmで測定した。 α -GAL及び α -NAGAの酵素活性は、酵素溶液の容積および反応時間あたりの遊離させることのできる4-MU量 (nmol 4-MU/h/ml) で算出した。

- 酵素活性測定の結果、CHO-K1細胞に発現させた α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)は、培養上清中に分泌され、高い α -GAL活性を示す
25 ものであり、 α -GALの基質特異性を獲得したものであることが分かった。

以上の結果を表4に示す。

表 4

5	α -GAL酵素活性 (nmol 4-MU/h/ml)
	CHO-K1(コントロール) 0~20
	α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA 0~20
	α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L) 200~400

10 [実施例 6]

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体の血中（血漿中）安定性 >

α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)の血中（血漿中）安定性について、以下の手順で確認した。

まず、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)の酵素溶液は、
 15 実施例 4 と同様にして調製した。また、対照として、野生型 α -GALの遺伝子を F377に導入した細胞を用い、上記と同様にして酵素溶液を調製した。それぞれの酵素溶液（50 μ L）に対して健常者の血漿（50 μ L）を添加し混合した後、37℃で反応を開始し、経時的に10 μ Lずつサンプリングして α -GAL活性を測定した。酵素活性の測定は、実施例 4 と同様にして行った。酵素溶液及び血漿を
 20 混ぜた時点でサンプリングした試料の α -GAL活性を基準（100%）とし、経時的な酵素活性の低下を百分率で表した。

その結果、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)は、野生型 α -GALと比べて、血中（血漿中）における経時的な α -GAL活性保持能に優れており、高い血中安定性を有するものであった。

25

[実施例 7]

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体によるファブリー病患者由来線維芽細胞内に蓄積したセラミドトリヘキソシド(CTH)の分解 >

α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA発現CHO-K1細胞、及び α -GALシグ

ナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)発現CHO-K1細胞の培養上清を、それぞれ回収し、酵素サンプルとして使用した。ファブリー病患者由来培養線維芽細胞 (F337) に対して、1,000 nmol/h/mlの活性を有する α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)、
5 及び α -GALを培地中に加え、2日間培養を行った。培養後、以下の方法により、細胞内蓄積しているCTHを蛍光抗体染色により検出した。

まず、酵素添加により培養したファブリー病患者由来の線維芽細胞を培養後、4% パラホルムアルデヒド/PBS (pH 7.0) で1分間固定し、1% BSA/PBSを加え、室温で30分間ブロッキングしたのち、1% BSA/PBSで100倍に希釈した
10 抗-CTHモノクローナル抗体 (1次抗体) を加え、室温で1時間インキュベートした。1次抗体とのインキュベーション後、PBSにより5分間の洗浄を3回行ったのち1% BSA/PBSで1000倍に希釈したAlexa Fluor 488 Goat anti-mouse-IgG (2次抗体: インビトロジェン)を加え、室温で1時間インキュベートした。2次抗体とのインキュベーション後、PBSにより5分間の洗浄を3回行ったの
15 ち、Permafluor Mount Medium (Thermo)で封入後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡システムLSM510 (Carl Zeiss)で観察を行った。

抗体染色の結果、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)、及び α -GALを培地中に加えたファブリー病患者由来の培養線維芽細胞では、有意なCTHの減少が観察されたが、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGAでは
20 CTHの有意な減少は観察されなかった (図7)。

[実施例8]

< α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA変異体の精製技術の確立 (1) >

α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)の精製方法を確立
25 するための予備実験を行った。実施例4で得られたCHO-K1安定発現株細胞から分泌された、 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)を含む培養上清 (約6リットル) を回収し、限外ろ過 (分画分子量 30 kD: ミリポア YM30) により約170 ml(30倍)に濃縮した。その後、透析により20 mM MES (pH 6.0)バッファーに置換した。

まず、第1ステップとして、20 mM MES (pH 6.0) で平衡化した陰イオン交換 HiLoad Q Sepharose HP (26/10)カラムに酵素活性 500 μ mol/h(約 6 mg) の α -NAGA 変異体を吸着させ、20 mM MES (pH 6.0)でカラム洗浄し、さらに、150 mM NaCl/20 mM MES (pH 6.0)で洗浄した。その後、250 mM

- 5 NaCl/20 mM MES (pH 6.0)で α -NAGA 変異体を溶出し、酵素活性の高い画分を回収した。HiLoad Q Sepharose 陰イオン交換カラムの回収率は、47%程度で、Fold は 7.4 倍であった。

- 第2ステップとして、20 mM MES (pH 6.0)で平衡化した HiTrap Heparin HP カラムに、Q Sepharose HP カラムの溶出液(酵素活性 224 μ mol/h :約 3
10 mg)をアプライし、不純物をカラムに吸着させた。20 mM MES (pH 6.0)をカラムに通し、素通りしてくる α -NAGA 変異体の分画を集めた。Heparin HP カラム後の回収率は、44%で、Fold は 15.7 倍になった。

- 第3ステップとして、1 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.0)で平衡化したヘパリンカラム素通り画分 (酵素活性213 μ mol/h :約3 mg) をBio-Scale
15 CHT-2 Hydroxyapatite カラムに吸着させた。1 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.0)でカラムを洗浄後、37.5 mMリン酸カリウムバッファー (pH6.0))で溶出し、酵素活性の高い画分を集めた。Bio-Scale CHT-2 Hydroxyapatiteカラム後の回収率は18%、Foldは55倍に達した。

以上の精製過程を表5に示す。

表 5

 α -GALシグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体の精製過程

5

sample	液量 (ml)	タンパク質 濃度 (mg/ml)	specific activity (μ mol/h /ml)	specific activity (μ mol/h /mg)	Total specific activity (μ mol/h)	folding	Total タンパク質量 (mg)	recovery (%)
アミコン 濃縮・透析	168.5	5.3	2.86	0.54	482	1	893.05	100
HiLoadQ・ 透析	92	0.61	2.44	3.99	224	7.4	56.2	47
Heparin・ 透析	120	0.21	1.77	8.45	213	15.7	25.2	44
Hydroxy apatite	12.6	—	6.95	—	88	—	—	18
濃縮	2	1.10	32	29.8	65	55	2.2	14

* α -NAGA 変異体...35mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) に溶解

〔実施例 9〕

< α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体の各種臓器への取込み試験 >

- 10 市販の α -GAL 製剤 (Fabrazyme ; Genzyme 社) 1 mg/kg 又は 0.3 mg/kg と同程度の α -GAL 酵素活性を有する α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体 (粗精製 ; 実施例 8 で得られたもの) を、ファブリー病モデルマウスに、腹腔内投与 (ip 投与) 又は静脈内投与 (iv 投与) し、肝臓への取込みを調べた。なお、本実施例において、「 α -NAGA 変異体」とは、「 α -
- 15 NAGA(S188E/A191L)」を意味する。

〔方法〕

1. ファブリー病モデルマウス（ファブリー病マウスともいう。）（雄，9～13g）及び野生型マウスを用い、以下の実験群を設定した（野生型マウスは 1）
- 5 の実験群のみ）。
- 1) 非投与群(コントロール) (n=1)
 - 2) α -NAGA 変異体(Fabrazyme 1mg/kg 相当活性) ip 投与群 (n=3)
 - 3) α -NAGA 変異体(Fabrazyme 0.3mg/kg 相当活性) iv 投与群 (n=2)
- 10 2. コントロールを除き、投与から 60 分後、麻酔下で、PBS 30ml にて全身還流を行い、肝臓、心臓、腎臓を摘出した。各臓器の α -GAL 活性は常法に従い行った。

〔結果〕

- 15 それぞれの実験群における各臓器での α -GAL 活性の比較結果を表 6 に示す。

表 6

	野生型マウス		ファブリー病モデルマウス	
	非投与	非投与	α -NAGA変異体 ip	α -NAGA変異体 iv
20 肝臓	17	0.18	31	31
心臓	7.0	0.12	1.8	3.2
腎臓	11	0.38	2.7	1.3

(nmol/h/mg)

25

上記結果から分かるように、非投与群（コントロール）の肝臓における α -GAL 活性はほぼ 0 であった。これに対し、 α -NAGA 変異体 ip 投与群では、肝臓での α -GAL 活性が平均で 31 (nmol/h/mg) となり、野生型マウスの肝臓における α -GAL 活性を上回る結果となった。また、 α -NAGA 変異体 iv 投与群

においても、肝臓での α -GAL 活性が平均で 31 (nmol/h/mg) という高い値が得られた。

- 5 α -NAGA 変異体の ip 投与群と iv 投与群との肝臓への取込み能の比較については、上記の通り、31 となり同じ値となった。しかし、ip 投与群及び iv 投与群における投与量は、それぞれ、1.0mg/kg 及び 0.3mg/kg であったため、iv 投与による投与経路の方が、ip 投与による投与経路よりも有効に肝臓に取込まれることが分かった。

- 10 心臓及び腎臓における α -GAL 活性は、肝臓における α -GAL 活性に比べて低い値となり、心臓及び腎臓における α -NAGA 変異体の取り込み効率が、肝臓における取り込み効率と比べて低いことが分かった。しかしながら、通常、正常値（すなわち野生型マウスの非投与群の値）の 20% 程度の活性があれば、生体内では異常をきたさないと考えられている。そのため、上記の心臓及び腎臓における α -GAL 活性であっても、 α -NAGA 変異体の有用性が十分に示されていると考えられた。

- 15 なお、腎臓及び心臓は、ファブリー病発病時における機能不全が特に問題となる臓器の一つであり、治療薬投与の際に、血管内皮細胞と並んで、標的臓器となる組織である。また、従来の酵素補充療法用治療薬では、血管内皮細胞にはある程度の効果は示すものの、腎臓及び心臓での効果が不十分であった。そのため、上記の心臓及び腎臓において（ファブリー病モデルマウスの α -NAGA
- 20 変異体非投与群と比べて） α -GAL 活性が向上する結果が得られたことにより、 α -NAGA 変異体が、ファブリー病治療薬の有効成分として極めて優れた酵素タンパク質であることが示された。

〔実施例 10〕

- 25 < α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体の精製技術の確立 (2) >

α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体 (α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)。以下、本実施例において「 α -NAGA 変異体」と称する。) の精製を行った。

実施例 4 で得られた CHO-K1 安定発現株細胞から分泌された、 α -GAL シグナ

ルペプチド融合 α -NAGA(S188E/A191L)を含む培養上清（約20リットル）を回収し、限外ろ過（分画分子量 30 kD： ミリポア YM30）により約740 ml(27倍)に濃縮した。その後、硫酸アンモニウムを50%となるように添加し、その沈殿を遠心分離(17000rpm)により、回収した。これを 20 mM MES (pH 6.0)/900mM硫酸アンモニウムに溶解し、1,400 mlとした。

次に、この溶液を20 mM MES (pH 6.0)/900mM硫酸アンモニウムで平衡化したHiLoad Phenyl Sepharose HP (26/10)カラムに添加し、 α -NAGA変異体を吸着させた。これを、20 mM MES (pH 6.0)/900mM硫酸アンモニウム、及び、20 mM MES (pH 6.0)/500mM硫酸アンモニウムにて洗浄した後、20 mM MES (pH 6.0)/200mM硫酸アンモニウムにて α -NAGA変異体を溶出し、酵素活性の高い画分を回収した。HiLoad Phenyl Sepharose HP (26/10)カラムまでの回収率は63% 程度で、Fold（精製倍率）は12倍であった。

HiLoad Phenyl Sepharose HP (26/10)カラムクロマトグラフィーの活性画分を20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)で透析をした後、20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) で平衡化したHiLoad SP Sepharose HP (26/10)カラムに添加した。 α -NAGA変異体は、20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) 素通り画分に回収された。HiLoad SP Sepharose HP (26/10)カラムまでの活性回収率は40% 程度で、Foldは188倍であった。

この活性画分を20 mM MES (pH 6.0)で平衡化したQ Sepharose HP (26/10)カラムに添加し、 α -NAGA変異体を吸着させた。これを、20 mM MES (pH 6.0)/140 mM 塩化ナトリウム、及び、20 mM MES (pH 6.0)/190 mM 塩化ナトリウムにて洗浄した後、20 mM MES (pH 6.0)/250 mM 塩化ナトリウムにて α -NAGA変異体を溶出し、酵素活性の高い画分を回収した。HiLoad Q Sepharose HP (26/10)カラムまでの活性回収率は38% 程度で、Foldは489倍に達した。

以上の α -NAGA変異体の精製過程を、下記表7に示す。

表 7

Step	液量 (ml)	タンパク質 濃度 (mg/ml)	activity (μ mol/h/ ml)	specific activity (μ mol/h/ mg)	Total activity (mmol/h)	Fold	Total タンパク 質量 (mg)	Recovery (%)
アミコン濃縮	740	82	74	0.90	55	1	60936	100
50%硫酸沈殿	1400	20	38	1.9	53	2.1	27983	96
Phenyl- Sephadex	425	7.7	81	10	34	12	3269	63
SP-Sephadex	185	0.71	119	169	22	188	131	40
Q-Sephadex	45	1.06	465	439	21	489	48	38

また、各精製段階における試料（タンパク量として10 μ g）を定法により、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した後、これをCBB染色した結果を図8に示した。図8では、 α -NAGA変異体を示すバンドが2本認められるが（図中の矢印参照）、N-グリカナーゼで処理後のものは1本のバンドのみとなる（図示せず）。従って、前記2本のバンドに由来のタンパク質は、糖鎖の本数が異なる以外は、いずれも同一の α -NAGA変異体であると言える。

〔実施例 11〕

< α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体の各種臓器への取込み試験>

実施例 10により精製して得られた α -NAGA 変異体を、ファブリー病モデルマウス(ファブリー病マウスとも言う)に静脈内投与 (iv 投与) し、各種臓器への取り込みを調べた。

なお、本実施例において、「 α -NAGA 変異体」とは、「 α -NAGA(S188E/A191L)」を意味する。

〔方法〕

1. ファブリー病モデルマウス（雄, 25～35g）及び野生型マウスを用い、以下の1)～3)の実験群を設定した。

- 1) 野生型マウス (n=3)
- 2) ファブリー病マウス (n=3)
- 3) ファブリー病マウス α -NAGA 変異体投与群 (n=3) (投与量: 1.9 mmol/hr/kg マウス体重(Fabrazyme 1 mg/kg の活性相当量))

5

2. α -NAGA 変異体を投与した 3)群については、投与から 60 分後、麻酔下で、PBS 30ml にて全身還流を行い、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、骨格筋を摘出した。各臓器の α -GAL 活性は常法に従い行った。

10 [結果]

各臓器での α -GAL 活性の比較結果を、下記表 8 に示す。

表 8

ファブリー病マウスへの α -NAGA(S188E/A191L)単回投与1時間後における
各組織の α -ガラクトシダーゼ活性

	α -ガラクトシダーゼ活性 (nmol/h/mg protein; mean $\pm$ SD)					
	腎臓	心臓	肝臓	肺	脳	骨格筋
野生型マウス (n=3)	11 $\pm$ 2	3.5 $\pm$ 0.6	14 $\pm$ 7	28 $\pm$ 6	23 $\pm$ 4	3.8 $\pm$ 0.7
ファブリー病マウス (n=3)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
ファブリー病マウス + α -NAGA(S188E/A191L) (n=3)	24 $\pm$ 4	10 $\pm$ 2	193 $\pm$ 30	19 $\pm$ 10	<1	<1

15

上記結果から分かるように、ファブリー病マウスの各組織における α -GAL 活性は 1.0 nmol/h/mg protein 以下であった。これに対し、 α -NAGA 変異体投与群では、脳と骨格筋を除き、4 つの臓器で、ファブリー病マウスに比べて、 α -GAL 活性が増加していた。ファブリー病における主な障害臓器である腎臓と心臓では、野生型マウスの腎臓と心臓それぞれにおける α -GAL 活性を上回る結果となり、 α -NAGA 変異体の有用性が示された。

20

[実施例 1 2]

＜ α -GAL シグナルペプチド融合 α -NAGA 変異体複数回投与による各種臓器における α -GAL 活性の獲得及び蓄積物質の分解効果確認実験＞

実施例 10 により精製して得られた α -NAGA 変異体を、ファブリー病モデルマウス(ファブリー病マウスとも言う)に複数回静脈内投与 (iv 投与) した後、
5 24 時間経過後の各種臓器への取り込み及び各種臓器における蓄積物質の分解効果を調べた。

なお、本実施例において、「 α -NAGA 変異体」とは、「 α -NAGA(S188E/A191L)」を意味する。

10 [方法]

1. ファブリー病モデルマウス (雄, 15~20g) 及び野生型マウスを用い、以下の 1)~3)の実験群を設定した。なお、下記 1), 2)は、実施例 11 の 1), 2)と同様である。

- 15 1) 野生型マウス (n=3)
 2) ファブリー病マウス (n=3)
 3) ファブリー病マウス α -NAGA 変異体投与群 (n=4) (1 回あたり 1.9 mmol/hr/kg マウス体重の投与量を 24 時間毎に 4 回投与)

- 20 2. 《 α -GAL 活性の測定》 α -NAGA 変異体を投与した 3)群は、4 回目投与から 24 時間後に、麻酔下で脱血した後、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、骨格筋を摘出した。各臓器の α -GAL 活性は常法に従い行った。

3. 《基質分解効果の解析：TLC 解析》各臓器における基質分解効果は、臓
25 器に蓄積するセラミドトリヘキソシド(CTH)を測定することで判定した。摘出した肝臓、腎臓、心臓を-80℃で凍結し、各臓器の総糖脂質の抽出に用いた。凍結保存した臓器 (50mg~250mg) を水に対し 250mg/ml となるようにホモジナイズし、Svennerholm L & Fredman P の方法 (Svennerholm L, Fredman P, A procedure for the quantitative isolation of brain

gangliosides., Biochem. Biophys. Acta., 1980; 617: 97-109. 参照) に従い、溶媒組成クロロホルム：メタノール：水 = 4 : 8 : 3 の溶媒で抽出をした。遠心分離をした後、抽出液を回収した。残渣には、溶媒組成クロロホルム：メタノール：水 = 5 : 10 : 4 の溶媒にて再度抽出を行った後、遠心分離を行い、

5 抽出液を前述の抽出液と合わせた。合わせた抽出液は窒素気流下、乾固した。

CTH の分析の際には、乾固した試料を溶媒組成クロロホルム：メタノール：水=40 : 20 : 3 で臓器湿重量 1mg 当り 2 μ l で溶解した。調製した臓器抽出溶液を、CTH 標準品（ブタ赤血球性 CTH、和光純薬）と共にシリカゲル 60 HPTHL に添加し、クロロホルム：メタノール：0.22% 塩化カルシウム水溶液 = 11 : 9 : 2 の展開溶媒にて展開した。HPTLC を乾燥後、オルシノール試薬にて化学発色させた。

4. 《基質分解効果の解析：免疫組織化学的解析》各臓器における基質分解効果を、免疫組織化学的に解析した。定法（埜中征哉、臨床のための筋病理 [第 3 版増補]、日本医事新報社 参照) に従い、摘出した肝臓、腎臓、心臓をクライオスタットにより 6 μ m の薄層凍結薄切切片を作製した。さらに定法 (H. Sakuraba et al., Corrective effect of recombinant human α -galactosidase having mammalian-like-mannose-type sugar chains produced in yeast on Fabry mice., J. Human Genet., 51, 341-352, 2006. 参照) に従い、免疫組織染色を行った。凍結切片を 4% パラホルムアルデヒド/PBS (pH 7.0) で 15 分間固定し、10% Goat serum/PBS を加え、室温で 1 時間ブロッキングしたのち、10% Goat serum/PBS で 2 倍に希釈した抗-CTH モノクローナル抗体（1 次抗体）を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。1 次抗体とのインキュベーション後、0.05% Tween20/PBS(PBS-T)により 5 分間の洗浄を 3 回

20 行ったのち 10% Goat serum/PBS で 1000 倍に希釈した Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse-IgG（2 次抗体：インビトロジェン）を加え、室温で 1 時間インキュベートした。2 次抗体とのインキュベーション後、PBS-T により 5 分間の洗浄を 3 回行ったのち、Permafluor Mount Medium (Thermo)で封入後、蛍光顕微鏡システム Axiovert135 (Carl Zeiss)で観察を行った。

〔結果〕

1. 《残存活性の測定》各臓器での α -GAL 活性の比較結果を、下記表 9 に示す。

5

表 9

ファブリー病マウスへの α -NAGA(S188E/A191L)4回投与後24時間後における
各組織の α -ガラクトシダーゼ活性

	α -ガラクトシダーゼ活性 (nmol/h/mg protein; mean $\pm$ SD)					
	腎臓	心臓	肝臓	肺	脳	骨格筋
野生型マウス (n=3)	11 $\pm$ 2	3.5 $\pm$ 0.6	14 $\pm$ 7	28 $\pm$ 6	23 $\pm$ 4	3.8 $\pm$ 0.7
ファブリー病マウス (n=3)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
ファブリー病マウス + α -NAGA(S188E/A191L) (n=4)	16 $\pm$ 1	30 $\pm$ 7	380 $\pm$ 34	14 $\pm$ 7	<1	1.2 $\pm$ 0.3

α -NAGA 変異体 4 回投与群は、最終投与後 24 時間後、脳では、 α -GAL 活性が検出されなかった。一方、脳を除いた残りの臓器においては、ファブリー病マウスに比較して、多くの α -GAL 活性が残存していた。ファブリー病における主な障害臓器である腎臓と心臓では、野生型マウスの腎臓と心臓それぞれにおける α -GAL 活性を上回る結果となった。このことは、 α -NAGA 変異体は、投与直後だけでなく、数日間は主な障害臓器である腎臓と心臓に残存していることを示している。通常、正常値の 20%程度の活性があれば、生体内では異常をきたさないと考えられていることも考慮すると、 α -NAGA 変異体は一定の間隔で、投与をされても、心臓及び腎臓において十分な活性を保てることが示された。

腎臓及び心臓は、ファブリー病発病時における機能不全が特に問題となる臓器の一つであり、治療薬投与の際に、血管内皮細胞と並んで、標的臓器となる組織である。また、従来の酵素補充療法用治療薬では、血管内皮細胞にはある程度の効果は示すものの、腎臓及び心臓での効果が不十分であった。そのため、上記の心臓及び腎臓における α -GAL 活性の結果により、 α -NAGA 変異体が、ファブリー病治療薬の有効成分として極めて優れた酵素タンパク質であることが示された。

2. 《基質分解効果の解析》肝臓、腎臓、心臓における α -GALの基質である CTH の分析結果を図9に示した。なお、TLC シートを乾燥後、抗 CTH 抗体を用いた TLC 免疫染色を常法 (Kotani M et al., Generation of one set of murine monoclonal antibodies specific for globo-series glycolipids: evidence for differential distribution of the glycolipids in rat small intestine., Arch. Biochem. Biophys., 1994; 310: 89-96. 参照) に従って行い、図中の CTH のマークのバンドが CTH であることを確認した。

α -NAGA 変異体4回投与を行ったファブリー病マウスにおける肝臓、腎臓、心臓の CTH は、投与を行っていないファブリー病マウスの各臓器の CTH に比べ、いずれにおいても CTH が減少した。

3. 《基質分解効果の解析：免疫組織化学的解析》各臓器における基質分解効果を、定法により免疫組織化学的解析の結果を図10 (腎臓)、図11 (心臓) 及び図12 (肝臓) に示した。

抗体染色の結果、 α -NAGA 改変体を投与したファブリー病マウスの肝臓、腎臓、心臓では、ファブリー病マウスの臓器に比べ、CTH の減少が観察され、 α -NAGA 改変体が臓器内の CTH を分解していることが示された。

これらの結果において、ファブリー病における主な障害臓器である腎臓と心臓の CTH が減少していたことは、 α -NAGA 改変体は生体内でも十分に α -GAL の代わりに基質 CTH を分解し得ることを示しており、ファブリー病の治療や予防に有効であることを示すものであった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、アレルギー性副作用がなく、血中 (血漿中) 安定性が高く、かつ障害臓器の細胞に取り込まれやすい、 α -GAL活性を有するタンパク質 (α -NAGA変異体) を用いた、ファブリー病治療用医薬組成物を提供することができる。ここで、上記タンパク質がアレルギー性副作用の要因とならないのは、通常、ファブリー病患者であっても、健常者と同様に生体内に α -NAGAを有し

ているため、 α -NAGAと表面構造が実質的に同一である α -NAGA変異体に対してはアレルギー反応を起こさないからである。また、上記タンパク質の血中（血漿中）安定性が高いのは、本来 α -NAGAは α -GALよりも血中安定性が高く、この特性は α -NAGA変異体においても同様に発揮されるためである。さらに、

5 上記タンパク質が障害臓器の細胞に取り込まれやすいのは、もともと α -NAGAは α -GALよりもM6Pが結合し得る糖鎖を多く有しており、この構造的特徴は α -NAGA変異体においても同様であるためである。

このように、本発明の医薬組成物は、ファブリー病の治療方法の一つである酵素補充療法に有効に用いることができ、優れた治療効果を発揮し得る医薬組成物として、極めて有用なものである。

10

また本発明によれば、基質特異性を変換した新規高機能酵素としての上述した α -GAL活性を有するタンパク質（ α -NAGA変異体）のほか、当該タンパク質をコードし得る遺伝子、当該遺伝子を含む組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体、及び当該タンパク質の製造方法を提供することができる。

15

配列表フリーテキスト

配列番号 3 : 組換えDNA

配列番号 4 : 組換えタンパク質

配列番号 5 : 組換えDNA

20 配列番号 6 : 組換えタンパク質

配列番号 7 : 組換えDNA

配列番号 8 : 組換えタンパク質

配列番号 13 : 合成DNA

配列番号 14 : 合成DNA

25 配列番号 15 : 合成DNA

配列番号 16 : 合成DNA

配列番号 17 : 合成DNA

配列番号 18 : 合成DNA

配列番号 19 : 合成DNA

配列番号 2 0 : 合成DNA

配列番号 2 1 : 合成DNA

配列番号 2 2 : 合成DNA

配列番号 2 3 : 合成DNA

5 配列番号 2 4 : 合成DNA

請求の範囲

1. 野生型ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性部位の構造を変化させて α -ガラクトシダーゼ活性を獲得したタンパク質を含むことを特徴とする、
5 ファブリー病治療用医薬組成物。
2. 前記タンパク質が α -ガラクトシダーゼの基質特異性を有するものである、
請求項1記載の組成物。
3. 以下の(a)又は(b)のタンパク質を含むことを特徴とする、ファブリー病治療
用医薬組成物。
- 10 (a) 下記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質。
 - (i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第188番目のアミノ酸が
セリン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番
目のアミノ酸からなるアミノ酸配列
 - (ii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第191番目のアミノ酸が
15 アラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411
番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列
 - (iii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において第188番目のアミノ酸が
セリン以外のアミノ酸に置換され第191番目のアミノ酸がアラニン以外のアミ
ノ酸に置換されたアミノ酸配列のうち、第18番目～第411番目のアミノ酸から
20 なるアミノ酸配列
- (b) 上記(a)の(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のア
ミノ酸を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア
ミノ酸配列を含み、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。
4. 前記(a)のタンパク質は、前記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸又はア
25 スパラギン酸である、請求項3記載の組成物。
5. 前記(a)のタンパク質は、前記アラニン以外のアミノ酸がロイシン、バリン、
イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるい
ずれか1つである、請求項3又は4記載の組成物。
6. 前記(a)のタンパク質は、前記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸であり、

かつ、前記アラニン以外のアミノ酸がロイシンである、請求項 3 記載の組成物。

7. 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の組成物をファブリー病患者に投与することを特徴とする、ファブリー病の治療方法。

5 8. 野生型ヒト α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性部位の構造を変化させて α -ガラクトシダーゼ活性を獲得したタンパク質であって、野生型ヒト α -ガラクトシダーゼ由来のシグナルペプチドを含むものである、前記タンパク質。

9. 以下の(a)又は(b)のタンパク質。

(a) 下記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質。

10 (i) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において第202番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(ii) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において第205番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

15 (iii) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において第202番目のアミノ酸がセリン以外のアミノ酸に置換され第205番目のアミノ酸がアラニン以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

(b) 上記(i)～(iii)のいずれかのアミノ酸配列において前記置換部位のアミノ酸を除く 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。

20 10. 前記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸である、請求項 9 記載のタンパク質。

11. 前記アラニン以外のアミノ酸がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか 1 つである、請求項 9 又は 10 記載のタンパク質。

25 12. 前記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ、前記アラニン以外のアミノ酸がロイシンである、請求項 9 記載のタンパク質。

13. 請求項 8～12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

14. 以下の(a)又は(b)のDNAを含む遺伝子。

(a) 下記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNA。

(i) 配列番号 5 に示される塩基配列において第604番目～第606番目の塩基がセリン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基に置換された塩基配列

(ii) 配列番号 5 に示される塩基配列において第613番目～第615番目の塩基がアラニン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基に置換された塩基配列

5 (iii) 配列番号 5 に示される塩基配列において第604番目～第606番目の塩基がセリン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基に置換され第613番目～第615番目の塩基がアラニン以外のアミノ酸のコードンを示す塩基に置換された塩基配列

10 (b) 上記(i)～(iii)のいずれかの塩基配列を含むDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、前記置換部位の塩基に対応する塩基が当該置換部位の塩基と同一であり、かつ α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

1 5. 前記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸である、請求項 1 4 記載の遺伝子。

15 1 6. 前記アラニン以外のアミノ酸がロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン及びメチオニンからなる群より選ばれるいずれか 1 つである、請求項 1 4 又は 1 5 記載の遺伝子。

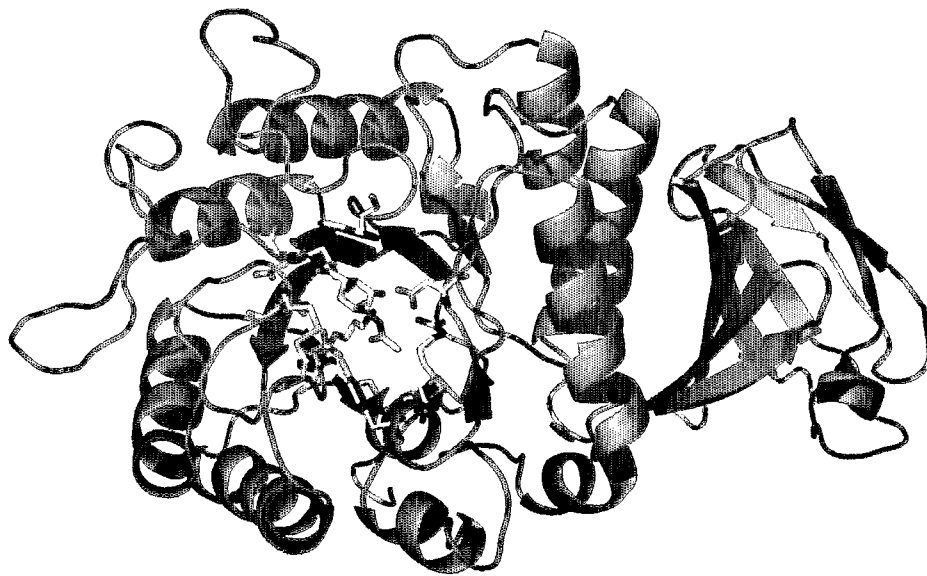
1 7. 前記セリン以外のアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ、前記アラニン以外のアミノ酸がロイシンである、請求項 1 4 記載の遺伝子。

20 1 8. 請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

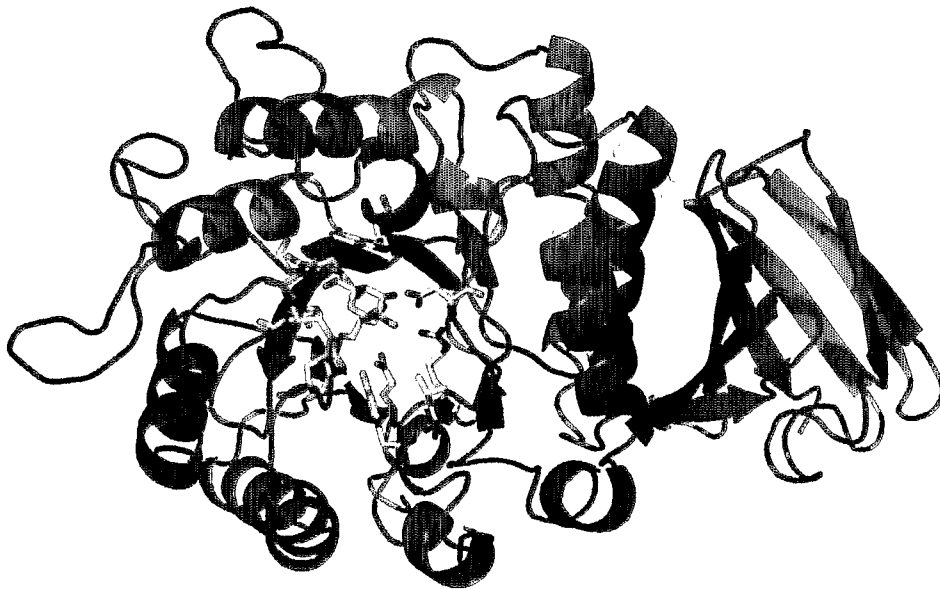
1 9. 請求項 1 8 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

2 0. 請求項 1 9 記載の形質転換体を培養する工程と、得られる培養物から α -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質を採取する工程とを含む、当該タンパク質の製造方法。

図 1



wt α -NAGA
(基質複合体)



wt α -GAL
(基質複合体)

図 2 A



wt α -NAGA
(基質複合体)



wt α -GAL
(基質複合体)

図 2 B

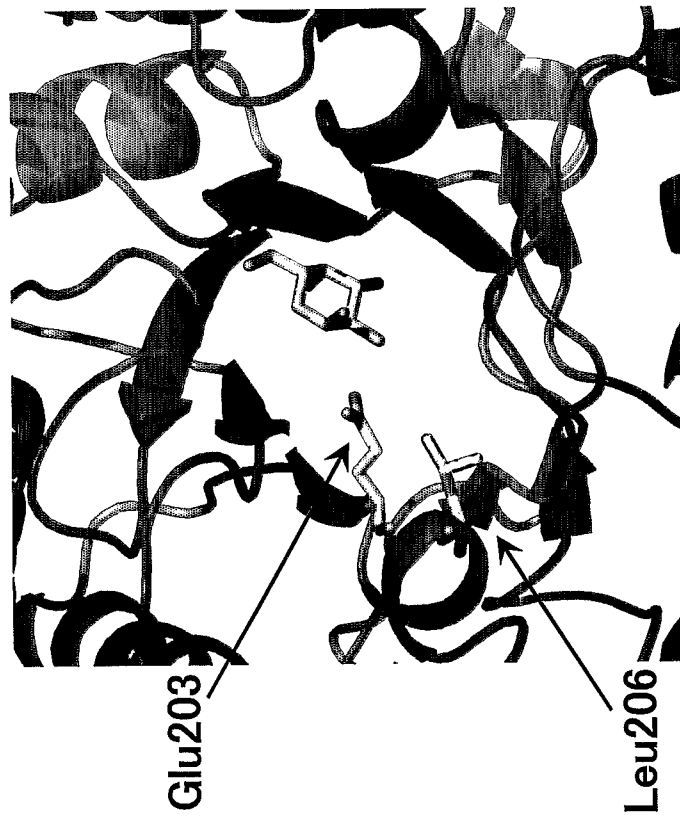
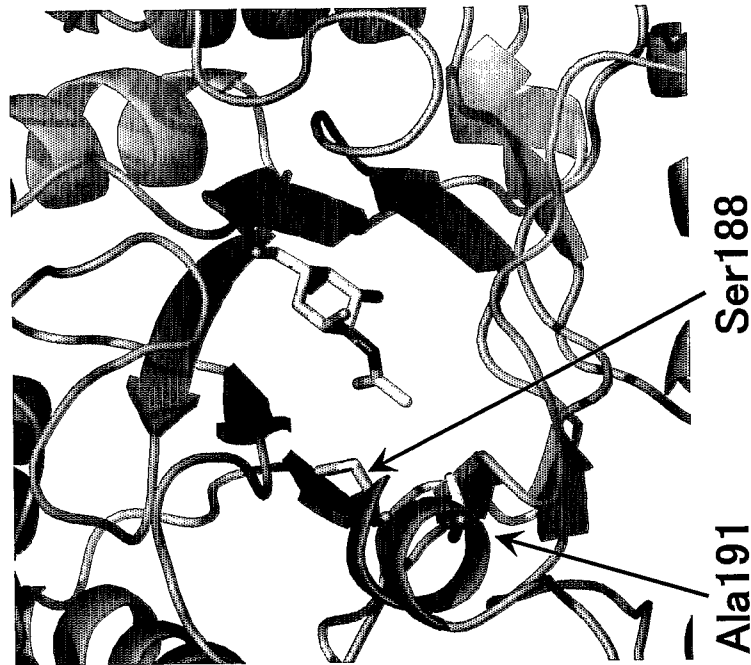
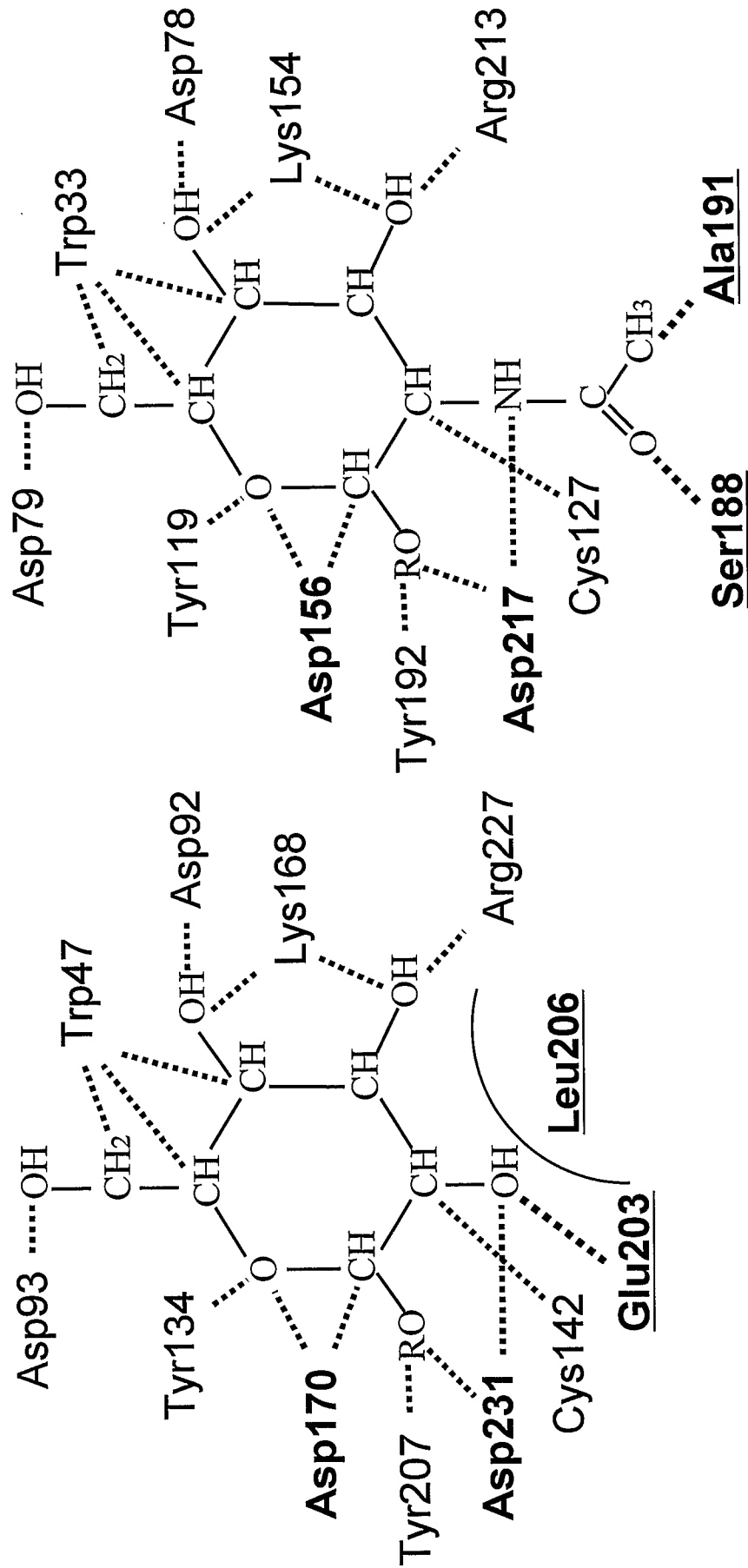


図 2 C



wt α -GAL
(基質複合体)

wt α -NAGA
(基質複合体)

図 3

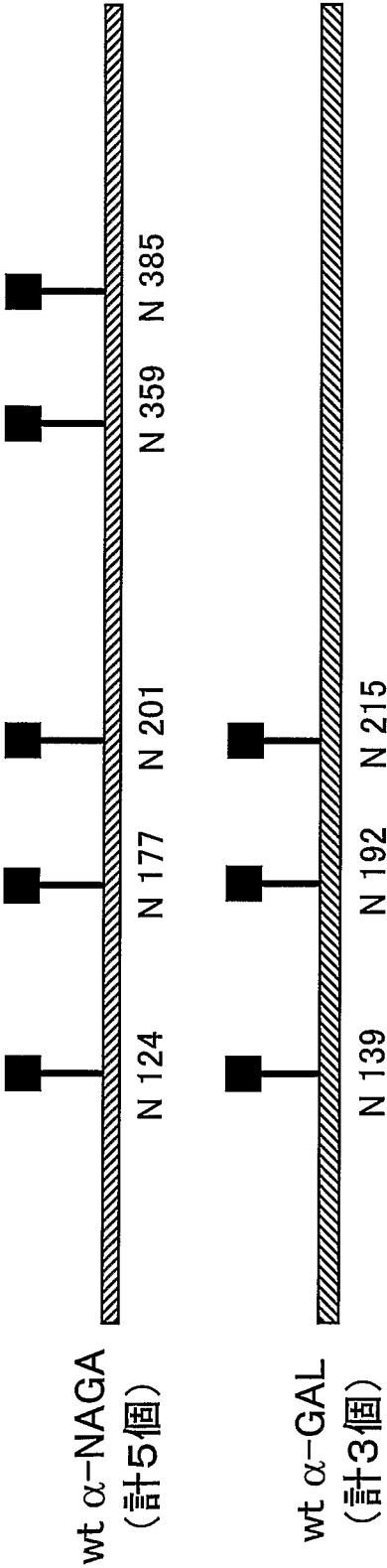


図 4

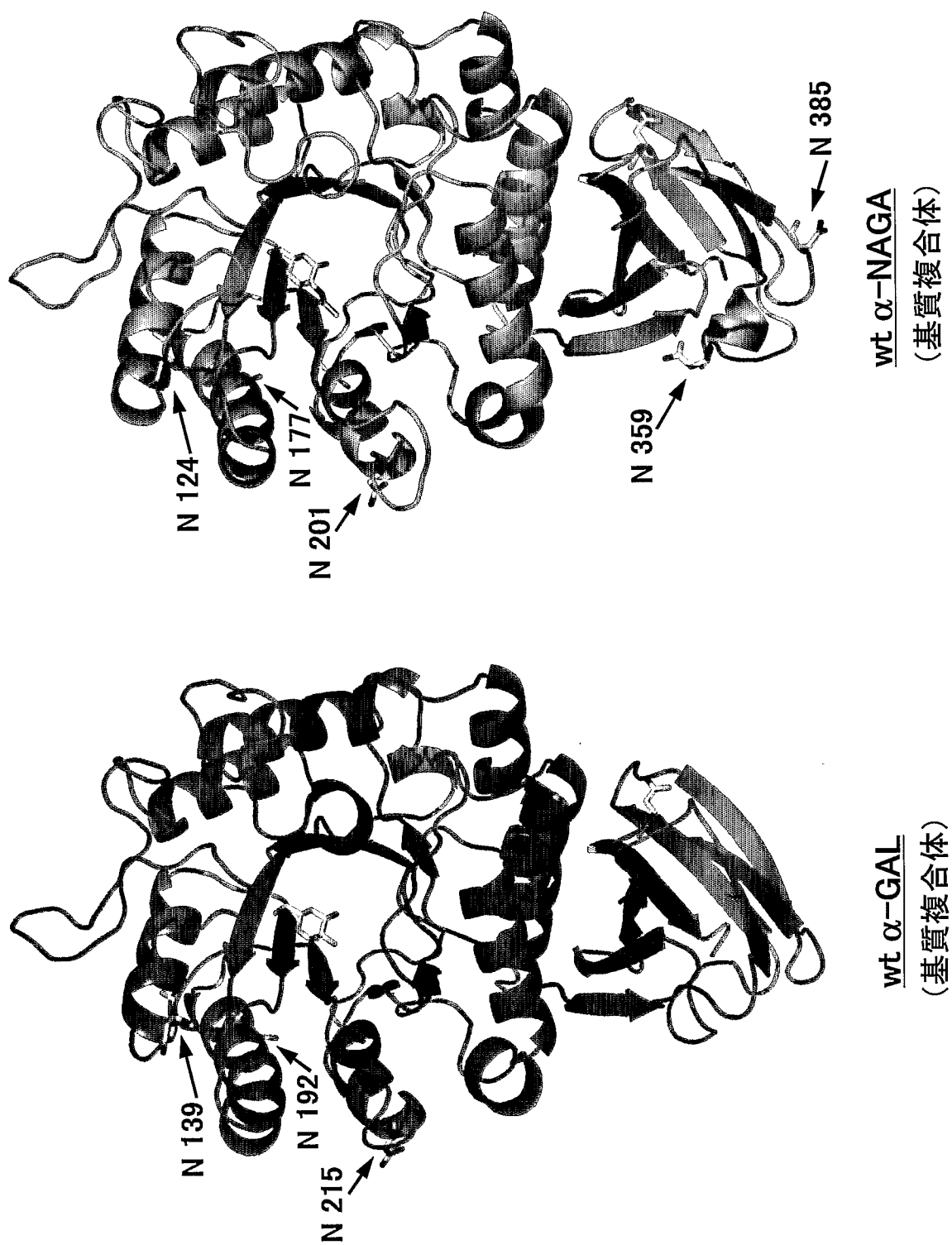


図 5

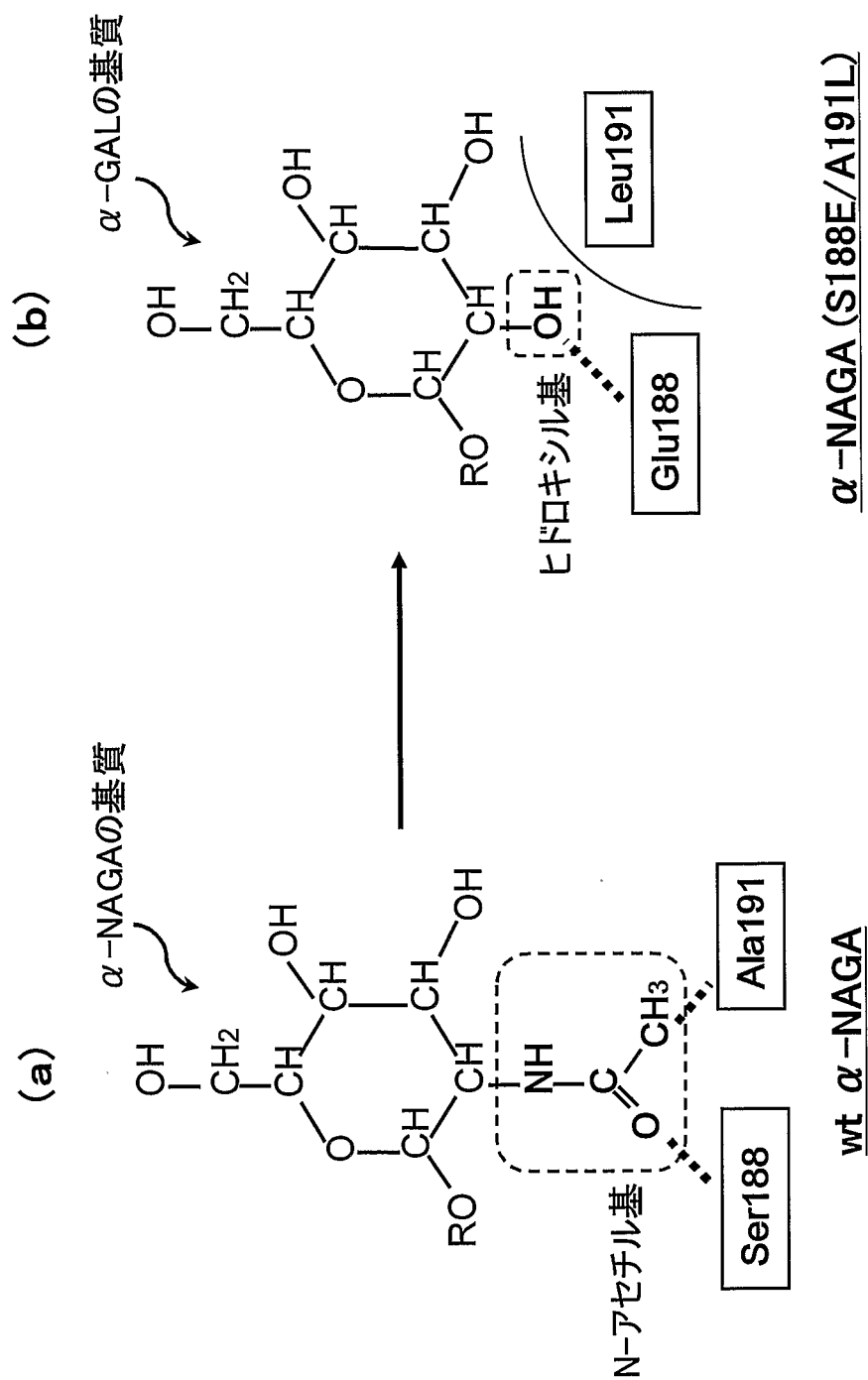


図 6

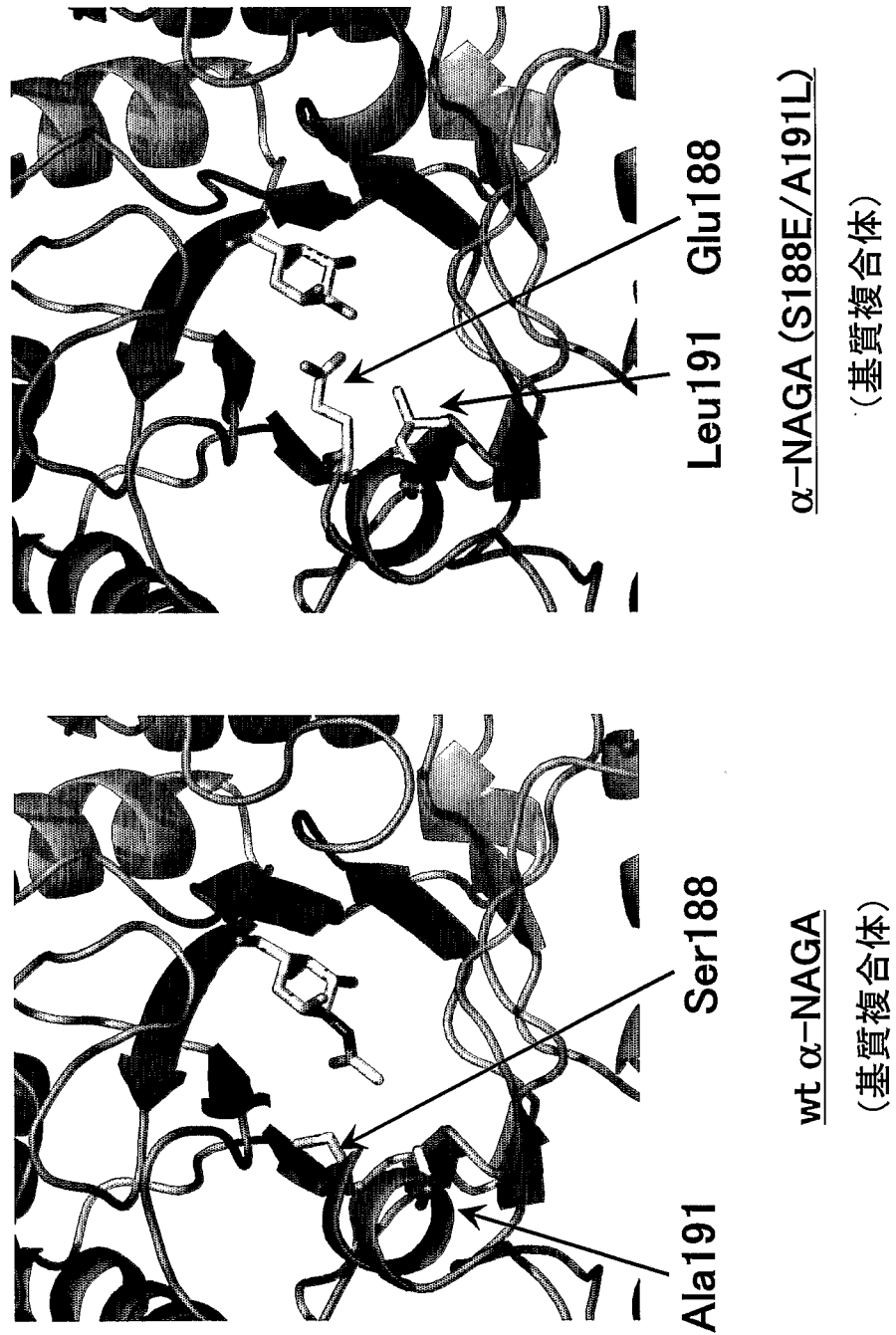
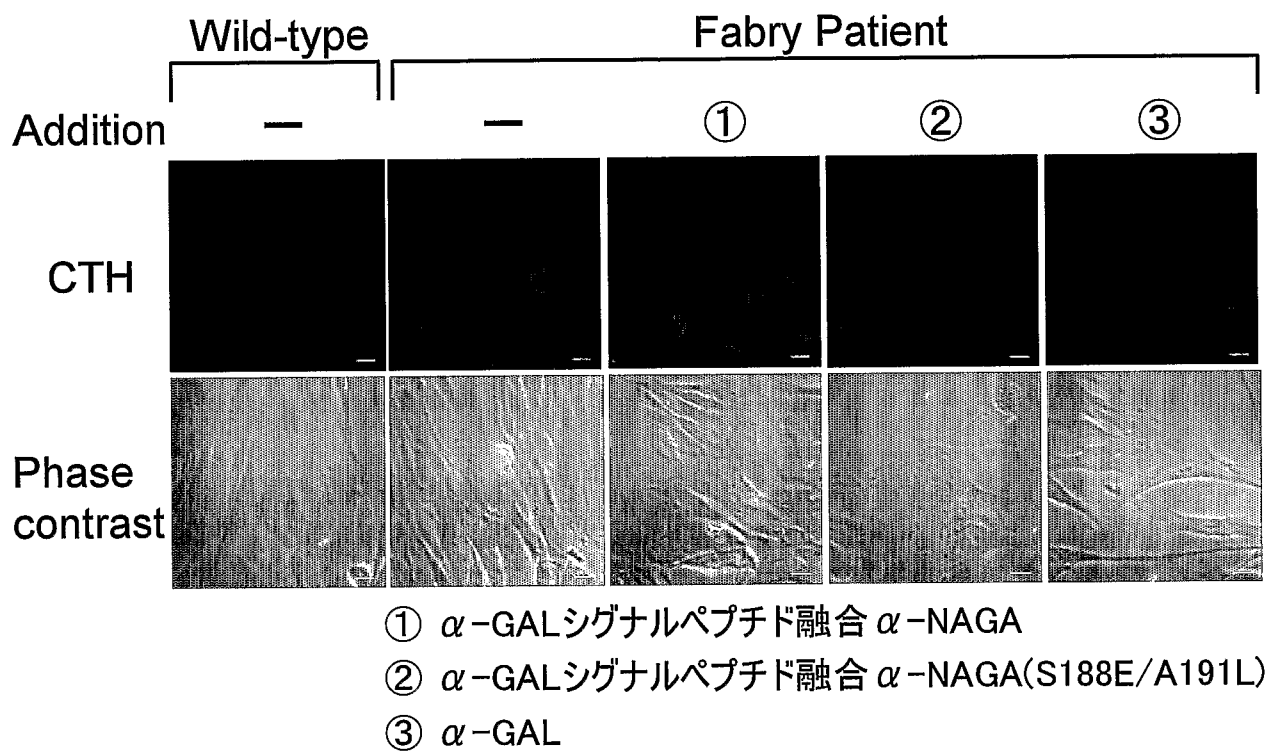


図 7



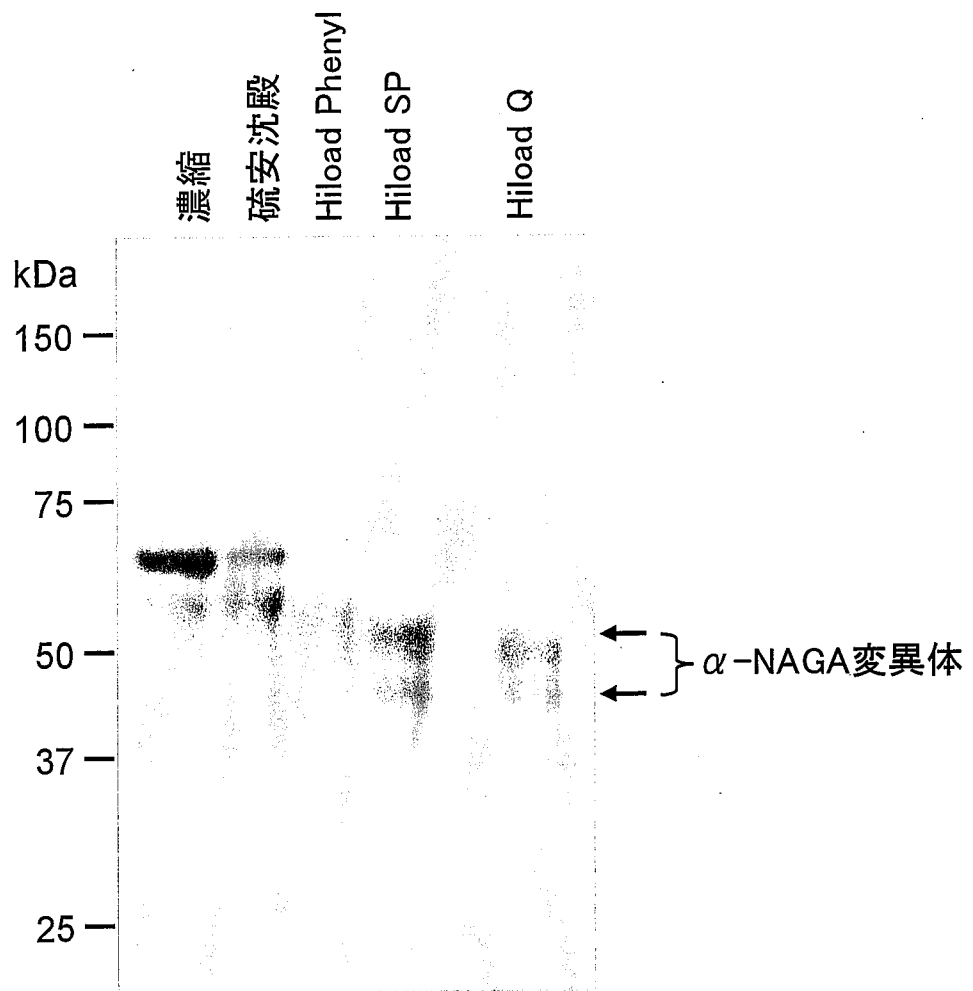


図 9

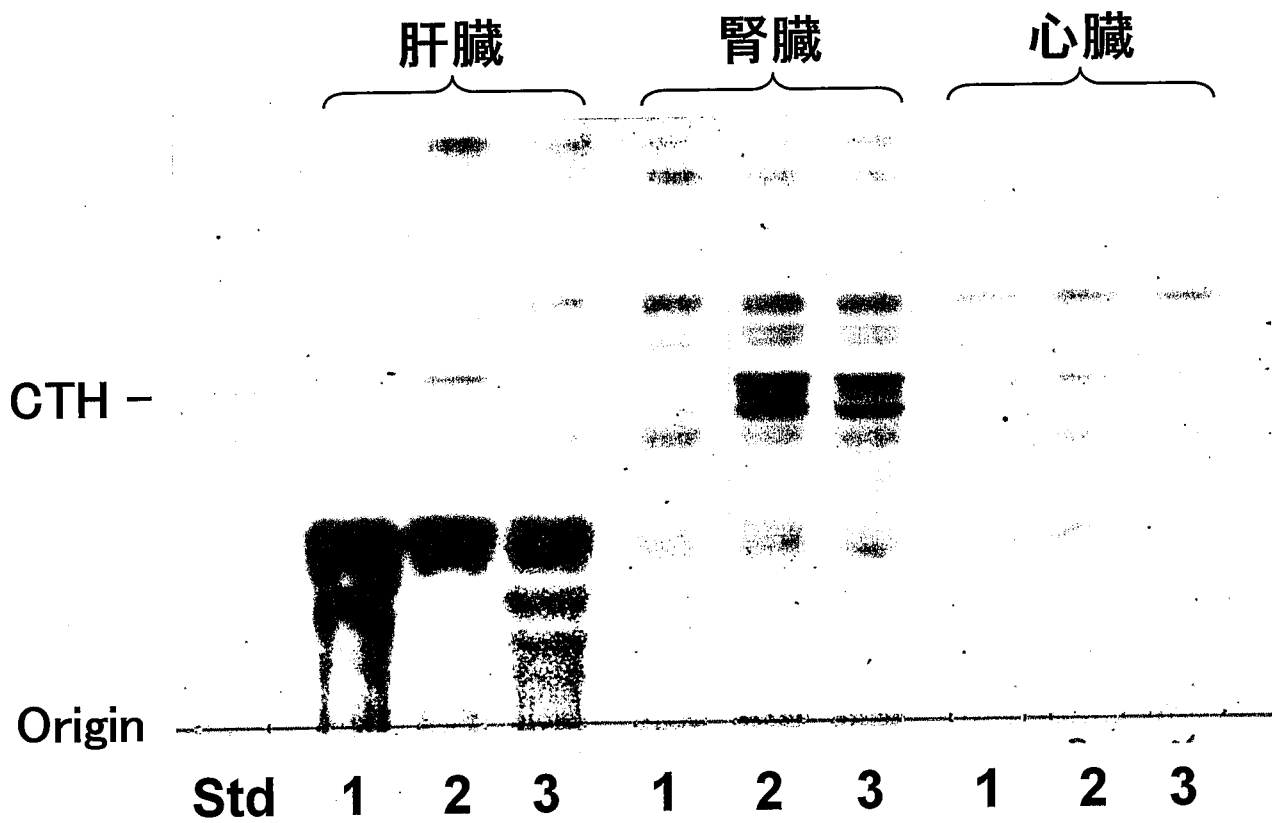


図 10

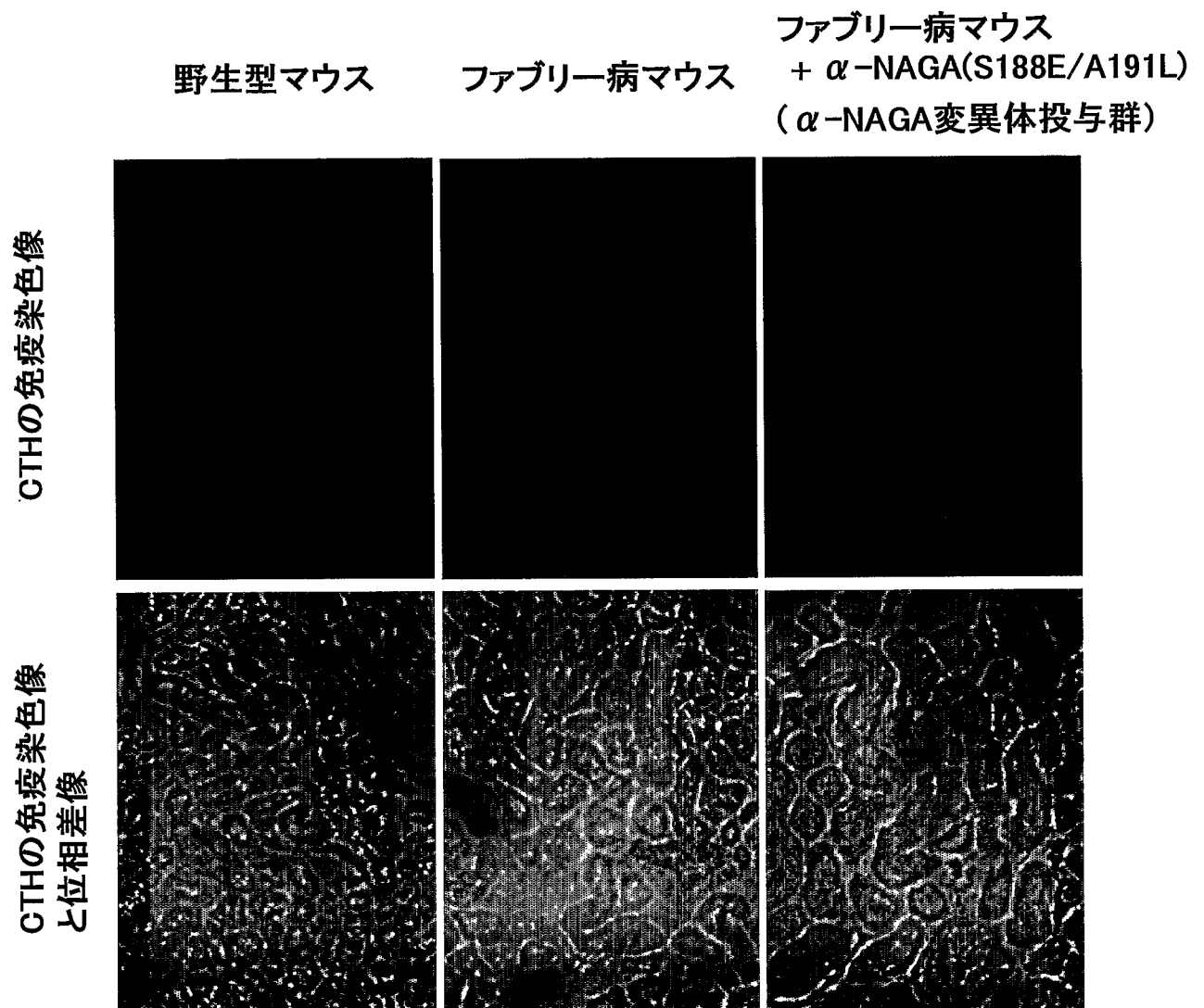


図 1 1

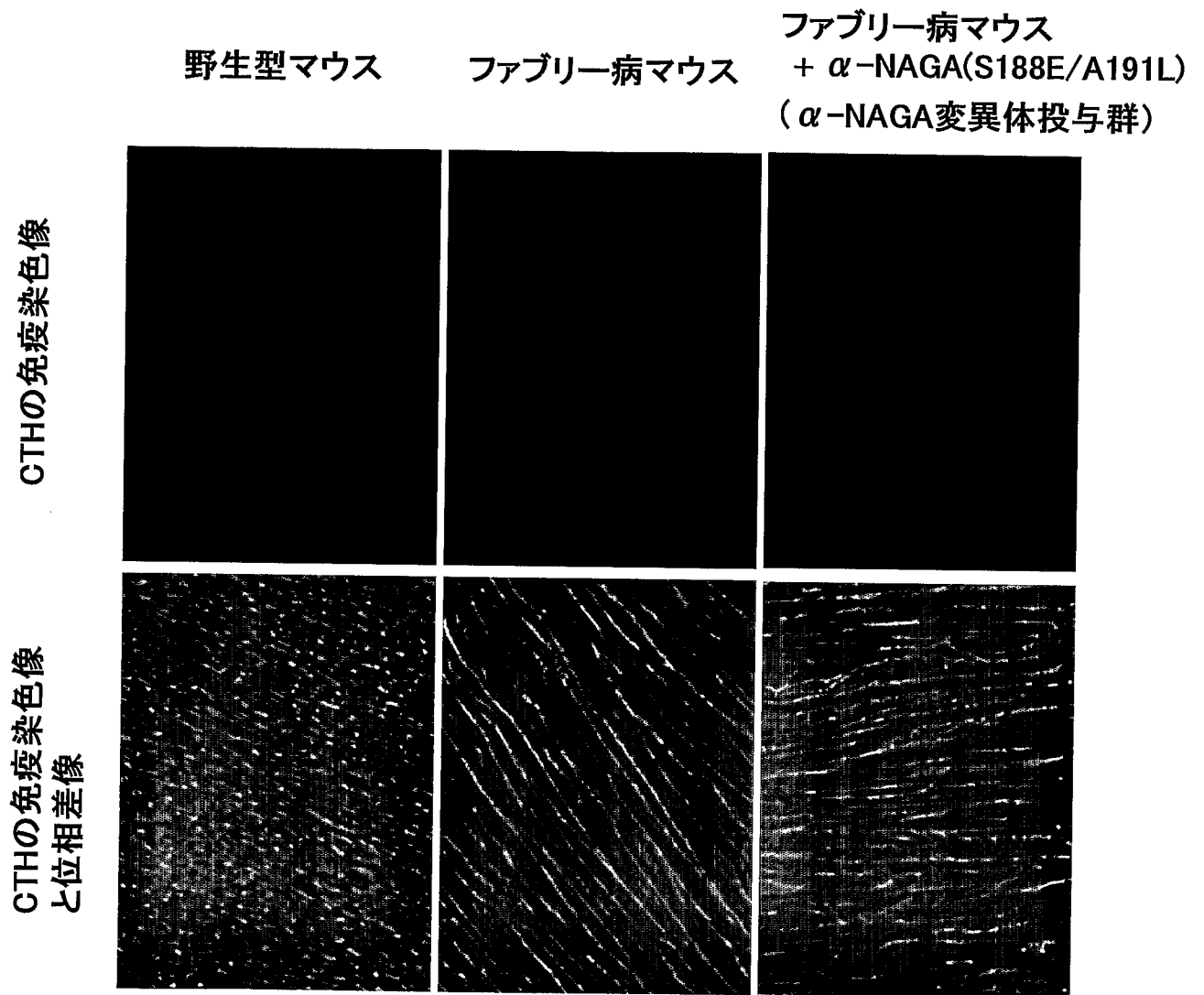
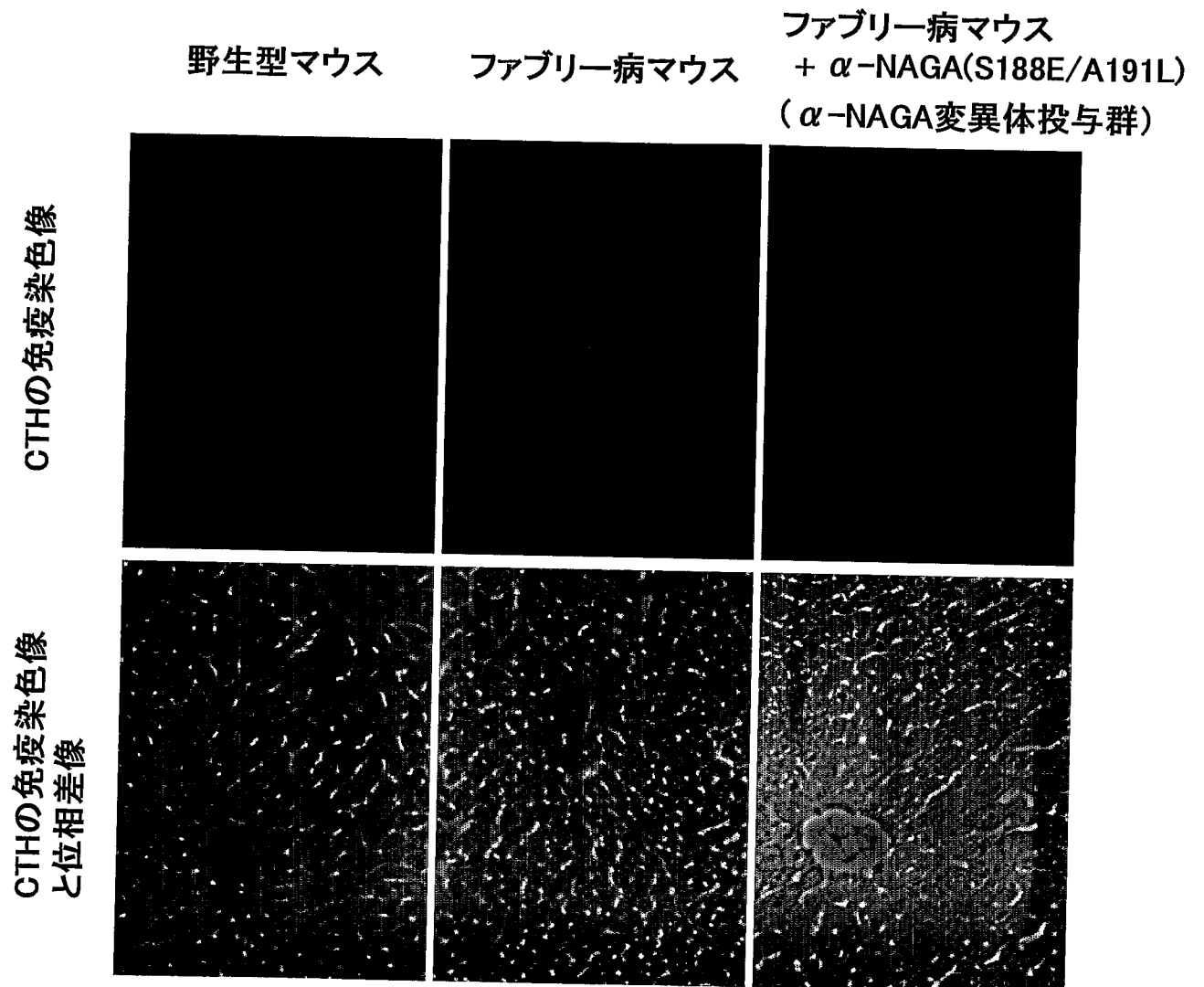


図 1 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059604

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/40(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K38/43, A61K48/00, A61P3/00, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/40 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2007/058381 A1 (Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research), 24 May, 2007 (24.05.07), (Family: none)	1-6, 8-20
Y	GARMAN S.C., et al, 'The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase.' J. Mol. Biol., Vol.337, No.2, (2004), p.319-335	1-6, 8-20
Y	GARMAN S.C., et al, 'The 1.9 A structure of alpha-N-acetylgalactosaminidase: molecular basis of glycosidase deficiency diseases.' Structure, Vol.10, No.3, (2002), p.425-434	1-6, 8-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 August, 2008 (18.08.08)		Date of mailing of the international search report 02 September, 2008 (02.09.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059604

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARMAN S.C., et al, ' Structural basis of Fabry disease.' Mol. Genet. Metab., Vol.77, No.1-2, (2002), p.3-11	1-6,8-20
Y	WO 1998/011206 A2 (Transkaryotic Therapies, INC.), 19 March, 1998 (19.03.98), & JP 2001-504324 A & EP 0935651 B1	1-6,8-20
Y	SCHIFFMANN R., et al, 'Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.97, No.1, (2000), p.365-370	1-6,8-20
Y	WANG A.M., et al, ' Structural organization and complete sequence of the human alpha-N-acetyl-galactosaminidase gene: homology with the alpha-galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene. ' Genomics, Vol.10, No.1, (1991), p.133-142	1-6,8-20
A	SAKURABA H., et al, ' Structural and immunocytochemical studies on alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease).' J. Hum. Genet., Vol.49, No.1, (2004), p.1-8	1-6,8-20
A	YASUDA M., et al, 'Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele.' Hum. Mutat., Vol.22, No.6, (2003), p.486-492	1-6,8-20
A	KANEKURA T., et al, ' Three dimensional structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase (alpha-NAGA) in alpha-NAGA deficiency (Kanzaki disease): different gene mutations cause peculiar structural changes in alpha-NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes.' J. Dermatol. Sci., Vol.37, No.1, (2005), p.15-20	1-6,8-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059604

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention of claim 7 pertains to "a method for treatment of Fabry disease"
and therefore relates to the treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/43(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/40(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））			
Int.Cl. C12N15/09, A61K38/43, A61K48/00, A61P3/00, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/40			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 8 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 8 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 8 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）			
BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN), GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq, UniProt / Geneseq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
PX	WO 2007/058381 A1 （財団法人東京都医学研究機構） 2007.05.24 （ファミリー無し）	1-6, 8-20	
Y	GARMAN S.C., et al, "The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase." J. Mol. Biol., Vol.337, No.2, (2004), p.319-335	1-6, 8-20	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 1 8 . 0 8 . 2 0 0 8		国際調査報告の発送日 0 2 . 0 9 . 2 0 0 8	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 齊 藤 真 由 美 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 8 9 3 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	GARMAN S.C.,et al, ' The 1.9 A structure of alpha-N-acetylgalactosaminidase: molecular basis of glycosidase deficiency diseases.' Structure, Vol.10, No.3, (2002), p.425-434	1-6, 8-20
Y	GARMAN S.C.,et al, ' Structural basis of Fabry disease.' Mol. Genet. Metab., Vol.77, No.1-2, (2002), p.3-11	1-6, 8-20
Y	WO 1998/011206 A2 (Transkaryotic Therapies, INC.) 1998.03.19 & JP 2001-504324 A & EP 0935651 B1	1-6, 8-20
Y	SCHIFFMANN R., et al, 'Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.97, No.1, (2000), p.365-370	1-6, 8-20
Y	WANG A.M., et al, ' Structural organization and complete sequence of the human alpha-N-acetylgalactosaminidase gene: homology with the alpha-galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene. ' Genomics, Vol.10, No.1, (1991), p.133-142	1-6, 8-20
A	SAKURABA H.,et al, ' Structural and immunocytochemical studies on alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease).' J. Hum. Genet., Vol.49, No.1, (2004), p.1-8	1-6, 8-20
A	YASUDA M.,et al, 'Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele.' Hum. Mutat., Vol.22, No.6, (2003), p.486-492	1-6, 8-20

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KANEKURA T.,et al, ' Three dimensional structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase (alpha-NAGA) in alpha-NAGA deficiency (Kanzaki disease): different gene mutations cause peculiar structural changes in alpha-NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes.' J. Dermatol. Sci., Vol.37, No.1, (2005), p.15-20	1-6, 8-20

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、特許請求の範囲 7 に係る発明は「ファブリー病の治療方法」であり、人の身体の治療による処置に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。