

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4551041号
(P4551041)

(45) 発行日 平成22年9月22日 (2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日 (2010.7.16)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

C 1 2 P 19/04 (2006.01)

C 1 2 P 19/04 Z

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 Z

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 N

請求項の数 13 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-506840 (P2001-506840)

(86) (22) 出願日 平成12年6月29日 (2000.6.29)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2000/004304

(87) 国際公開番号 W02001/000848

(87) 国際公開日 平成13年1月4日 (2001.1.4)

審査請求日 平成19年3月23日 (2007.3.23)

(31) 優先権主張番号 特願平11-183437

(32) 優先日 平成11年6月29日 (1999.6.29)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(31) 優先権主張番号 特願2000-74757 (P2000-74757)

(32) 優先日 平成12年3月16日 (2000.3.16)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

微生物の受託番号 FERM BP-6694

微生物の受託番号 FERM BP-6695

微生物の受託番号 FERM BP-6696

(73) 特許権者 000001029

協和発酵キリン株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72) 発明者 佐々木 克敏

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗

酵工業株式会社 東京研究所内

(72) 発明者 白石 紀彦

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗

酵工業株式会社 東京研究所内

(72) 発明者 夏目 歩

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗

酵工業株式会社 東京研究所内

(72) 発明者 山田 陽史

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗

酵工業株式会社 東京研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有用ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の (a) および (b) からなる群より選ばれる β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを用いることを特徴とする、糖鎖合成方法。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

【請求項2】

請求項1記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを用いることを特徴とする、糖鎖合成方法。

【請求項3】

ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に β 1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項1または2記載の糖鎖合成方法。

【請求項4】

 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) N-アセチラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) またはラクトース (Gal β 1-4Glc)、ii) N-アセチラクトサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびiii) N-アセチラクトサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の非還元末端に

存在するガラクトース残基に、 β 1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項1～3のいずれか1項に記載の糖鎖合成方法。

【請求項5】

請求項1または2記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc)、Gal β 1-3GlcNAcまたはラクトース (Gal β 1-4Glc)、 ii) N-アセチルラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、 およびiii) N-アセチルラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

10

(c) ウリジン-5'-ニリン酸N-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトース残基に β 1,3結合でN-アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項6】

請求項1または2記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc構造を有する糖、GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc構造を有する糖、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc構造を有する糖、(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4GlcNAc構造を有しnが1以上である糖、および (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4Glc構造を有しnが1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

20

【請求項7】

形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、請求項6記載の製造法。

【請求項8】

請求項1または2記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc構造を有する糖、GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc構造を有する糖、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc構造を有する糖、(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4GlcNAc構造を有しnが1以上である糖、および (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4Glc構造を有しnが1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

30

【請求項9】

請求項1または2記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc構造を有する糖、GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc構造を有する糖、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc構造を有する糖、(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4GlcNAc構造を有しnが1以上である糖、および (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4Glc構造を有しnが1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

40

【請求項10】

複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項5～9のいずれか1項に記載の製造法。

【請求項11】

生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項8記載の製造法。

50

【請求項 1 2】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 1 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体またはレクチンを用い、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

10

技術分野

本発明は、 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドを有効成分として含有する糖鎖合成剤、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含有する炎症、癌または癌転移検出剤、該 DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する形質転換体、該形質転換体を利用した該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドを用いた糖鎖または複合糖質の製造法、該形質転換体を利用した糖鎖または複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする DNA より得られるオリゴヌクレオチドを用いた炎症、癌または癌転移の検出法、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いた免疫組織染色法、該抗体を含有する免疫組織染色剤、炎症、癌または癌転移の診断薬、該ポリペプチドの $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法、該遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法、該遺伝子の転写を司るプロモーター DNA、該プロモーター DNA による転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法、これらのスクリーニング法により得られる化合物、および該遺伝子を欠損または変異させたノックアウト動物等に関する。

20

背景技術

糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係していると考えられている〔Fukuda, M., Cell Surface Carbohydrates and Cell Development, CRC press, Boca Raton, FL (1992)、Glycobiology, 3, 97 (1993)〕。

30

糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

Gal $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素は、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に $\beta 1, 3$ -結合で N-アセチルグルコサミンを転移する活性を有する酵素で、GlcNAc $\beta 1-3$ Gal 構造を有する糖鎖の合成に関与する。GlcNAc $\beta 1-3$ Gal 構造を有する糖鎖は、糖タンパク質の N-グリコシド結合型糖鎖や O-グリコシド結合型糖鎖中に存在するほか、ネオラクト系やラクト系の糖脂質の糖鎖中やオリゴ糖中にも存在する。

Gal $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素に関しては、これまでに部分精製の報告がある〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 42, 77 (1989)〕。また、これまでに 2 種の Gal $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子がクローン化されている〔Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 14294 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 406 (1999)〕。さらに別の Gal $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素が存在するかどうかについては明らかになっていない。

40

GlcNAc $\beta 1-3$ Gal 構造を有する糖鎖は非常にたくさん存在することから、Gal $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素に関しては、受容基質特異性や発現組

50

織が異なる複数の酵素が存在し、それぞれ別の機能を担っている可能性が高いと考えられる。従って、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、受容基質特異性や発現分布を調べ、生物学的機能や疾患との関係を明らかにすることは重要な課題である。

ヒトの乳中にはラクト-N-ネオテトラオース (Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc) やラクト-N-テトラオース (Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc)、あるいはそれらを母核とする構造を有する様々なオリゴ糖が存在することが知られている〔Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)〕。該オリゴ糖は共通してGlcNAc β 1-3 Gal構造を有している。また、該オリゴ糖の中にはポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を有するオリゴ糖も含まれる。これらのオリゴ糖には、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防ぐ働きや、毒素を中和する働きがあると考えられている。また、善玉の腸内細菌であるビフィズス菌の増殖を促す活性もある。

ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖、あるいはそれらが含まれたミルクを効率よく生産することができれば、産業上非常に有用と思われる。ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖の合成に関与するGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、上記オリゴ糖の効率的な合成に使用可能と考えられるが、該酵素は明らかになっていない。

多数存在するGlcNAc β 1-3 Gal構造を有する糖鎖の中で、特にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖は、多くの機能性糖鎖（セレクトリンリガンド糖鎖、微生物やウイルスの受容体糖鎖、SSEA-1糖鎖、癌関連糖鎖など）の骨格糖鎖となっており、胚発生、細胞分化、あるいは炎症や癌などの疾患と深く関わっている。

それぞれの場面で機能しているポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成に関与するGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なる可能性があるため、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、受容基質特異性や発現分布などからそれぞれの酵素の機能を推定することは重要な課題である。

ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖は、GlcNAc β 1, 4-ガラクトース転移酵素とGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が交互に働くことにより合成される。 β 1, 4-ガラクトース転移酵素に関しては、これまでに4種類の酵素 (β 4 Gal-T1、 β 4 Gal-T2、 β 4 Gal-T3、 β 4 Gal-T4) の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている〔J. Biol. Chem. 272, 31979 (1997)、J. Biol. Chem. 273, 29331 (1997)〕。

従って、GlcNAc β 1, 4-ガラクトース転移酵素とGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を用いて、*in vitro*でポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を合成することができる。また、GlcNAc β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子とGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を細胞中で共発現することにより、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖あるいは該糖鎖が付加した複合糖質を生産することができる。

GlcNAc β 1, 4-ガラクトース転移酵素はほとんどの細胞で発現しているため、Gal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子単独を細胞中で発現することによっても、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖あるいは該糖鎖が付加した糖質を生産することができる。

癌細胞では、対応する正常細胞に比較して、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を多く発現することが知られている〔J. Biol. Chem., 259, 10834 (1984)、J. Biol. Chem., 261, 10772 (1986)、J. Biol. Chem., 266, 1772 (1991)、J. Biol. Chem., 267, 5700 (1992)〕。

シアリルルイスx糖鎖を有するポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖は、セレクトリンのA

10

20

30

40

50

ンタゴニストとして、抗炎症効果あるいは癌転移抑制効果を有する医薬品となることが期待される。

これらのオリゴ糖のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖部分の合成には、部分精製された β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が利用されたが、この酵素の供給が律速となり、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を多量に合成することは難しい〔*Glycobiology*, 7, 453 (1997)〕。

一方、化学合成によってもポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を合成可能であるが、その合成は非常に煩雑なステップを必要とする〔*Tetrahedron Letter*, 24, 5223 (1997)〕。

以上のことより、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の効率良い合成法が求められている。これまでにクローン化された2種のGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や該酵素遺伝子を利用することもできるが、目的に応じて基質特異性や機能の異なる別のGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や該酵素遺伝子を用いた方が効率がよい場合があると考えられる。

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖はタンパク質の安定化に寄与している〔*J. Biol. Chem.*, 265, 20476 (1990)〕ことから、任意のタンパク質に人為的にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を付加することにより、タンパク質を安定化できると考えられる。また、血中タンパク質の腎臓からのクリアランス速度は、タンパク質の実効分子量が大きいほど遅くなることから、任意のタンパク質に人為的にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を付加し、実効分子量を増加させることにより、腎臓からのクリアランス速度を低下させ、血中安定性を増加させることができると考えられる。さらに、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を付加することにより、任意のタンパク質を特定の細胞にターゲティングできる可能性もある。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成能を増加させた例としては、以下に示した例があげられる。

F9細胞をレチノイン酸で処理した場合や、Swiss 3T3細胞をTGF- β で処理した場合に、細胞の膜結合糖タンパク質の糖鎖にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付加することが示されている〔*J. Biol. Chem.*, 268, 1242 (1993)、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1221, 330 (1994)〕。NIH3T3細胞にN-rasプロトオンコジーンを発現させると、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する β 1, 4-ガラクトース転移酵素と β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性が増加し、膜タンパク質のN-結合型糖鎖中のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖量が増加することが示されている〔*J. Biol. Chem.*, 266, 21674 (1991)〕。

T細胞株EL-4中でコア2 β 1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を発現させると、細胞表面の膜タンパク質であるCD43、CD45、またはCD44の分子量が増加する〔*J. Biol. Chem.*, 271, 18732 (1996)〕。これは、コア2 β 1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素により合成された糖鎖が、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素のよい基質となるためと考えられる。

また、HL-60細胞を27℃で培養すると、lamp-1またはlamp-2に付加するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の量が増加することが知られている〔*J. Biol. Chem.*, 266, 23185 (1991)〕。

しかし、組換え糖タンパク質の生産に適した宿主細胞（例えばNamalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、CHO細胞など）において、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の付加された組換え糖蛋白質を効率よく生産させることに関してはこれまでに報告されていない。従って、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の付加された組換え糖蛋白質を効率よく生産することのできる方法の開発は、産業上重要な課題である。

炎症反応と癌転移の機構を考慮すると、白血球や癌細胞上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制することによって、炎症反応を抑制したり癌転移を防止できることが期待される。白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関

10

20

30

40

50

与しているGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、該遺伝子の発現を抑制することにより、白血球や癌細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制できる可能性がある。

また、白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、該遺伝子の発現量を調べたり、該遺伝子がコードするタンパク質の発現量を調べることにより、炎症性疾患や癌の悪性度を診断できる可能性がある。

特定の白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なることが考えられるため、これまでにクローン化された酵素とは異なる酵素をクローン化して調べる必要がある。細胞や組織の抽出液を酵素源とした酵素学的解析では、複数のGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を発現している細胞や組織において発現しているGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の各々を特定すること、ならびにそれらのGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の各々についての酵素学的特性を明らかにすることはできない。

特定のGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の発現を検出するためには、特異的抗体を用いた免疫的検出法か、遺伝子の塩基配列に基づいた検出法（例えばノーザンハイブリダイゼーション法やPCR法）を用いる必要がある。従って、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、発現を比較する必要がある。

発明の開示

本発明の課題は、新規なGal β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、および、タンパク質の改善法、炎症性疾患や癌の悪性度の診断法を提供することにある。

本発明は、以下の(1)～(62)に関する。

(1) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)からなる群より選ばれるポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドを有効成分として含有する、糖鎖合成剤。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(e) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(g) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(2) ポリペプチドが、上記(1)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドである、上記(1)の糖鎖合成剤。

(3) ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性が、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性である、上記(1)または(2)の糖鎖合成剤。

(4) 以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群より選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(5) 配列番号4記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチド。

(6) 以下の(a)または(b)のポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチド。

10

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1記載のアミノ酸配列の1番目から33番目のアミノ酸配列を含まないポリペプチド。

(b) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含まないポリペプチド。

(7) ポリペプチドが、上記(6)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチド。

(8) ポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成に関与する活性が、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性である、上記(4)～(7)いずれか1つに記載のポリペプチド。

20

(9) ポリペプチドの β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に β 1, 3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である上記(8)のポリペプチド。

(10) β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) N-アセチルラクタサミン(Gal β 1-4GlcNAc)またはラクトース(Gal β 1-4Glc)、ii) N-アセチルラクタサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびiii) N-アセチルラクタサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の非還元末端に存在するガラクトース残基に、 β 1, 3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である上記(8)または(9)のポリペプチド。

30

(11) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)からなる群より選ばれるポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成に関与する活性を有する糖転移酵素。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

40

(e) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(g) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(12) ポリペプチドが、上記(11)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクタサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドである、上記(11)の糖転移酵素。

50

(13) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNA。

(14) 配列番号7または8記載の塩基配列を有するDNA。

(15) 配列番号8記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(16) 上記(13)～(15)いずれか1つのDNAを含有する、炎症、癌または癌転移検出剤。

(17) 上記(13)～(15)いずれか1つのDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(18) 組換え体DNAが、プラスミドpAMo-G4-2、pAMo-G7、pAMoF2-G4、pVL1393-F2G4、pBS-G4-2およびpT7B-G7からなる群より選ばれるプラスミドである、上記(17)の組換え体DNA。

(19) 上記(17)または(18)の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(20) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群から選ばれる形質転換体である、上記(19)の形質転換体。

(21) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(20)の形質転換体。

(22) Escherichia coli MM294/pBS-G3 (FERM BP-6694)、Escherichia coli MM294/pBS-G4 (FERM BP-6695)、およびEscherichia coli MM294/pT7B-G7 (FERM BP-6696)。

(23) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞からなる群から選ばれる動物細胞である、上記(20)の形質転換体。

(24) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巢細胞、Trichoplusia niの卵巢細胞およびカイコの卵巢細胞からなる群から選ばれる昆虫細胞である、上記(20)の形質転換体。

(25) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(26) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、上記(25)の製造法。

(27) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(28) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(27)の製造法。

(29) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(30) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(31) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

10

20

30

40

50

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン ($\text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$)、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ または ラクトース ($\text{Gal} \beta 1-4 \text{Glc}$)、ii) N-アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ または ラクトース 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、および iii) N-アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ または ラクトース 構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-二リン酸N-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトース残基に $\beta 1, 3$ 結合でN-アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

10

(32) 上記(31)の方法により得られるN-アセチルグルコサミンが付与された反応産物を受容基質として用い、

(a) 該受容基質、

(b) $\text{GlcNAc} \beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素、および

(c) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基に $\beta 1, 4$ 結合でガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質の製造法。

(33) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

20

(a) 該酵素源、

(b) $\text{GlcNAc} \beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素、

(c) i) N-アセチルラクトサミン ($\text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$)、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ または ラクトース ($\text{Gal} \beta 1-4 \text{Glc}$)、ii) N-アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ または ラクトース 構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii) N-アセチルラクトサミン、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ または ラクトース 構造を非還元末端に有する複合糖質、および iv) 上記(31)または(32)の方法により得られる反応産物からなる群より選ばれる受容基質、

(d) ウリジン-5'-二リン酸N-アセチルラクトサミン、および

(e) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付与された該糖鎖または複合糖質の製造法。

30

(34) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、 $\text{GlcNAc} \beta 1-3 \text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc} \beta 1-3 \text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc} \beta 1-3 \text{Gal} \beta 1-4 \text{Glc}$ 構造を有する糖、($\text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc} \beta 1-3$)_n $\text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$ 構造を有しnが1以上である糖、および($\text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc} \beta 1-3$)_n $\text{Gal} \beta 1-4 \text{Glc}$ 構造を有しnが1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

40

(35) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞である、上記(34)の製造法。

(36) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、 $\text{GlcNAc} \beta 1-3 \text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc} \beta 1-3 \text{Gal} \beta 1-3 \text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、G

50

1 c N A c β 1 - 3 G a l β 1 - 4 G l c 構造を有する糖、(G a l β 1 - 4 G l c N A c β 1 - 3)_n G a l β 1 - 4 G l c N A c 構造を有し n が 1 以上である糖、および (G a l β 1 - 4 G l c N A c β 1 - 3)_n G a l β 1 - 4 G l c 構造を有し n が 1 以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

(3 7) 上記 (1) または (2) の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードする D N A をベクターに組み込んで得られる組換え体 D N A を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、 G l c N A c β 1 - 3 G a l β 1 - 4 G l c N A c 構造を有する糖、 G l c N A c β 1 - 3 G a l β 1 - 3 G l c N A c 構造を有する糖、 G l c N A c β 1 - 3 G a l β 1 - 4 G l c 構造を有する糖、(G a l β 1 - 4 G l c N A c β 1 - 3)_n G a l β 1 - 4 G l c N A c 構造を有し n が 1 以上である糖、および (G a l β 1 - 4 G l c N A c β 1 - 3)_n G a l β 1 - 4 G l c 構造を有し n が 1 以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

10

(3 8) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リボ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、上記 (3 1) ~ (3 7) のいずれか 1 つに記載の製造法。

(3 9) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記 (3 6) の製造法。

20

(4 0) 上記 (1 3) ~ (1 5) いずれか 1 つの D N A を用い、ハイブリダイゼーション法により、配列番号 1 ~ 4 いずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(4 1) 配列番号 8 記載の塩基配列を有する D N A の連続した 6 ~ 6 0 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(4 2) オリゴヌクレオチドの誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N 3 ' - P 5 ' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C - 5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (p h e n o x a z i n e - m o d i f i e d c y t o s i n e) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2 ' - O - プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2 ' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、上記 (4 1) のオリゴヌクレオチド。

30

40

(4 3) 上記 (4) ~ (1 0) のいずれか 1 つに記載のポリペプチドをコードする D N A の有する塩基配列の連続した 6 ~ 6 0 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、上記 (4) ~ (1 0) のいずれか 1 つに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(4 4) 上記 (4 0) または (4 3) の方法を用いた、炎症、癌または癌転移の検出法。

(4 5) 上記 (1 3) ~ (1 5) いずれか 1 つの D N A の有する塩基配列の連続した 6

50

～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドを用い、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(46) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(47) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを認識する抗体。

(48) 上記(48)の抗体を用いる、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

10

(49) 上記(47)の抗体を用い、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

(50) 上記(47)の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

(51) 上記(47)の抗体を含有する、炎症、癌または癌転移の診断薬。

(52) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

(53) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を認識する抗体またはレクチンを用い、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

20

(54) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(47)の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(55) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(56) プロモーターDNAが、白血球細胞、小腸細胞、大腸細胞、膵臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、膵癌細胞および胃癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(55)のプロモーターDNA。

30

(57) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、上記(55)または(56)のプロモーターDNA。

(58) 上記(55)～(57)のいずれか1つに記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被検試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物の含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(59) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、上記(58)のスクリーニング法。

40

(60) 上記(52)～(54)、(58)および(59)のいずれか1つに記載のスクリーニング法により得られる化合物。

(61) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト非ヒト動物。

(62) ノックアウト非ヒト動物がマウスである、上記(61)のノックアウト非ヒト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) GlcNAc $\beta 1$, 3-ガラクトース転移酵素($\beta 3$ Gal-T1)のホモログ蛋

50

白質をコードするDNAの取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造
 β 3Gal-T1 (別名WM1)はGal β 1-3GlcNAc構造の合成に参与するGlcNAc β 1, 3-ガラクトース転移酵素である〔特開平6-181759〕。遺伝子データベースから、Blast〔Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)〕、FrameSearch法〔Compugen社製〕等のプログラムを利用して、本酵素遺伝子と同一性のある遺伝子または本酵素とアミノ酸レベルで同一性を有する蛋白質をコードする可能性のある遺伝子を検索する。データベースとしてはGenBank等の公的なデータベースを利用することもできるし、私的なデータベースも利用できる。各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型にして、該当する配列に特異的なプライマーを用いてポリメ
 ラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略記する)〔Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す) およびPCR Protocols Academic Press (1990)〕を行うことにより、該当する配列を有するDNAの存在を検出することができる。また、同様にして該当する配列を有するDNA断片を取得することができる。

10

得られたDNA断片が不完全長の場合は、以下のようにしてその全長cDNAを得ることができる。

20

上記で取得したDNA断片をプローブとして、該DNAが存在することが確認された臓器または細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、全長cDNAを取得することができる。

また、該DNAが存在することが確認された一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、5' RACE法と3' RACE法を行うことにより、該当する配列を有するcDNAの5'末端側の断片と3'末端側の断片を取得することができる。両断片を連結することにより、全長cDNAを取得できる。

各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAは、常法または市販されているキットに従って調製することができる。一例を以下に示す。

各種臓器または各種細胞から酸グアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法〔Anal. Biochem. 162, 156 (1987)〕により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI (Life Technologies社製)で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPTTM Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社)により一本鎖cDNAを合成する。一本鎖cDNAとしては、例えばヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-MCから上記の方法で作製した一本鎖cDNAをあげることができる。

30

cDNAライブラリーは常法により作製することができる。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング〔SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; GIBCOBRL社製〕やザップーcDNA・シンセシス・キット〔ZAP-cDNA Synthesis Kit, STRATAGENE社製〕を用いる方法等があげられる。各種臓器または各種細胞由来のcDNAライブラリーは、市販され

40

50

ているものを購入することによっても入手できる。

cDNAライブラリーを作製するための、クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express〔STRATAGENE社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBlue II SK (+)〔Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)〕、λzap II (STRATAGENE社製)、λgt10〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、λTriplex (Clontech社製)、λExCell (Pharmacia社製)、pT7T318U (Pharmacia社製)、pcD2〔Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、pUC18〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)〕、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)〕等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'〔STRATAGENE社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、Escherichia coli C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、Escherichia coli Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli Y1090〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli NM522〔J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)〕、Escherichia coli K802〔J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)〕、Escherichia coli JM105〔Gene, 38, 275 (1985)〕、Escherichia coli SOLR^TM Strain〔STRATAGENE社より市販〕およびEscherichia coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版)等が用いられる。

cDNAライブラリーとして、例えば以下のようにして作製したcDNAライブラリーをあげることができる。

ヒト胃粘膜のpoly (A) + RNAよりcDNA合成システム (cDNA Synthesis System, GIBCO BRL社製) を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalI adaptor (Super Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製) を付加した後、クローニングベクターλZAP II (λZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit, STRATAGENE社製) のEcoRI部位に挿入し、STRATAGENE社Gigapack III Gold Packaging Extractを用いてin vitro packagingを行うことにより、cDNAライブラリーを作製する。また、市販のcDNAライブラリーを購入して使用することもできる。

データベース検索で明らかになった候補遺伝子の塩基配列を基に、該遺伝子に特異的なプライマーを設計し、上記のようにして取得した一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行う。増幅断片が得られた際には、該断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。サブクローニングは、増幅DNA断片をそのまま、あるいは制限酵素やDNAポリメラーゼで処理後、常法によりベクターに組み込むことにより行うことができる。ベクターとしては、pBlue SK (-)、pBlue II SK (+) (いずれもSTRATAGENE社製)、pDIRECT〔Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)〕、pCR-Amp SK (+)〔Stratagene社製、Strategies, 5, 6264 (1992)〕、pT7 Blue〔Novagen社製〕、pCR II〔Invitrogen社製、Biotechnology, 9, 657 (1991)〕、pCR-TRAP〔Genehunter社製〕、pNoTAT₇ (5'→3'社製)などをあげることができる。

サブクローン化されたPCR増幅断片の塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が取得されたか確認する。塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463（1977）〕あるいは373A・DNAシーケンサー〔PERKIN ELMER社製〕等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

上記で作製したcDNAライブラリーに対して、該DNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーション（モレキュラー・クローニング 第2版）を行うことにより、β3Gal-T1とアミノ酸レベルで相同性を有する蛋白質をコードする可能性のあるcDNAを取得することができる。プローブとしては、該DNA断片をアイソトープあるいはジゴキシゲニン（digoxigenin）標識したものを使用することができる。

10

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463（1977）〕あるいは373A・DNAシーケンサー〔PERKIN ELMER社製〕等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1、2、3または4で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号5、6、7または8で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。配列番号5のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G3、pBS-G3をあげることができる。配列番号6のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G4、pBS-G4をあげることができる。配列番号7のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G4-2、pBS-G4-2をあげることができる。配列番号8のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G7、pT7B-G7をあげることができる。

20

また、上記方法で取得した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を選択することにより、配列番号1、2、3または4記載のアミノ酸配列と比較して、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的のDNAを取得することができる。例えば、他種（マウス、ラット、ウシ、サルなど）由来のcDNAライブラリーに対してスクリーニングを行うことにより、目的のDNAを取得することができる。

30

該ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記で取得したDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l塩化ナトリウム、15mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons（1987-1997）（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University（1995）等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403（1990）〕やFASTA〔Methods in Enzymology, 183, 63-98（1990）〕等を用いて計算したときに、上記で取得したDNAと少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましく

40

50

は80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

該1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的のDNAの取得は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、公知のポリペプチドとならない範囲に限定され、1個から数十個、特に1個から数個のアミノ酸であることが好ましい。また、本発明のポリペプチドが β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するためには、BLASTやFASTA等を用いて計算したときに、例えば配列番号1記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

10

決定された新規糖転移酵素ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても目的のDNAを調製することができる。DNAの化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したPERKIN ELMER社製のDNA合成機model 392等を用いて行うことができる。

20

また、後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、PCRを行うことによっても、目的とするDNAを調製することができる。

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法により、あるいは該DNAの塩基配列情報よりDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

30

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号5、6、7または8で表される塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることのない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には配列番号9から20等々に示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

40

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド

50

誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

(2) 取得DNAのコードするポリペプチドの活性測定

上記のようにして取得したDNAを発現ベクターに組み込んで発現プラスミドを構築する。該プラスミドを適当な動物細胞に導入後、各種の糖鎖（ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖、シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖）に特異的に結合する抗体やレクチンを用いたフルオレッセンス・アクティベータッド・セル・ソーター（Fluorescence Activated Cell Sorter；以下、FACSと略記する）解析により、該DNAが該糖鎖の合成に関与するかどうかを調べることができる。

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで動物細胞で発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、pCDNA1/Amp、pCDNA1、pCDM8（いずれもフナコシ社より市販）、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pREP4（Invitrogen社製）、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAMo、pAMoA〔J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)〕、別名pAMoPRSA（特開平05-336963）〕、pAS3-3（特開平2-227075）等を用いることができる。

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等の方法をあげることができる。

動物細胞としては、ヒトの細胞であるNamalwa細胞、Namalwa細胞のサブラインであるNamalwa KJM-1細胞、293細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637（特開昭63-299）をあげることができ、好ましくは、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞をあげることができる。

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

該培養により得られた形質転換細胞を、各種の糖鎖（ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖、シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖）に特異的に結合する抗体やレクチンを用いて蛍光染色した後、FACSを用いて解析する。コントロールプラスミドを導入した形質転換細胞と比較して、ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖量が増加していれば、該DNAのコードする新規ポリペプチドは、ポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖の合成に関与するβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していると考えられる。一方、シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖量が増加していれば

、該DNAのコードする新規ポリペプチドは、シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖の合成に関与する β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有していると考えることができる。

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体やレクチンとしては、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体としては抗i抗体、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するレクチンとしてはpokeweed mitogen (PWMと略す)、Lycopersicon esculentum (tomato) agglutinin (LEAと略す)、Datura stramonium agglutinin (DSAと略す)を用いることができる〔J. Biol. Chem. , 282, 8179 (1987)、J. Biol. Chem. , 259, 6253 (1984)、J. Biol. Chem. , 262, 1602 (1987)、Carbohydr. Res. , 120, 187 (1983)、Carbohydr. Res. , 120, 283-292 (1983)、Glycoconjugate J. 7, 323 (1990)〕。

抗シアリルルイスa糖鎖抗体または抗シアリルルイスc糖鎖抗体としては、シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖と反応する抗体であれば、いかなるものでも用いることができ、例えば、抗シアリルルイスa糖鎖抗体である19-9 (Fujirebio社製)やKM231 (Kyowa Medex社製)、あるいは抗シアリルルイスc糖鎖抗体であるDU-PAN-2 (Kyowa Medex社製)をあげることができる。

また、上記形質転換細胞の細胞抽出液を用いて、公知の測定法〔J. Biol. Chem. , 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem. , 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem. , 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol. , 42, 77 (1989)〕に準じて β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定することができる。コントロールプラスミドを導入した形質転換細胞に比較して、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加していれば、該DNAのコードする新規ポリペプチドは、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していると考えることができる。

また、本発明のポリペプチドの β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定法〔J. Biol. Chem. 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem. 262, 15649 (1987)、Arch. Biochem. Biophys. 270, 630 (1989)、Arch. Biochem. Biophys. 274, 14 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem. 273, 58 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499 (1999)〕に準じて測定することができる。

以上のようにして、取得した新規cDNAのコードする新規ポリペプチドの活性を明らかにすることができる。

(3) 新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素ポリペプチドの製造

上記の方法により得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1~38 (Current Protocols in Molecular Biology)等に記載された方法等を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を

用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組み込みが可能で、新規 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれも Boehringer Mannheim 社より市販）、pSE280（Invitrogen 社製）、pGEMEX-1（Promega 社製）、pQE-8（QIAGEN 社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBlue II SK(-) (STRATAGENE 社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pKK233-2（Pharmacia 社製）、pGEX（Pharmacia 社製）、pETシステム（Novagen 社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen 社）、pMAL-c2（New England Biolabs 社）等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（P_{trp}）、lacプロモーター（P_{lac}）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター（P_{trp} x2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No. 49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21 (DE3)、Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS、Escherichia coli HMS174 (DE3)、Escherichia coli HMS174 (DE3) pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Ba

10

20

30

40

50

cillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acid Res., 16, 6127 (1988)〕、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCP50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MFα1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8、pAGE107、pREP4、pAGE103、pAMo、pAMoA、pAS3-3等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス(Moloney Murine Leukemia Virus)のロング・ターミナル・リピート・プロモーター(Long Terminal Repeat Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRαプロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞またはNamalwa K

10

20

30

40

50

JM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト大腸癌細胞株等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NSO等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293、293等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38 (Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111（すべてInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh5、BTI-TN-5B1-4（Invitrogen社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法〔組織培養, 20 (1

10

20

30

40

50

994)、組織培養、21(1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45(1997)]に準じてポリペプチドを生産することができる。

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)(特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133(1990)、特開昭60-251887]、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体(トランスジェニック植物)を造成することもできる。

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法[American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S(1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S(1996)、Bio/Technology, 9, 830(1991)]に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

10

20

30

40

50

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

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微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5% CO₂ 存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [PharMingen社製]、Sf-900 II SFM培地 (GIBCO BRL社製)、ExCell 400、ExCell 405 [いずれもJRH Biosciences社製]、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養条件としては、pH 6～7、培養温度25～30℃がよく、培養時間は、通常1～5日間である。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、β1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発現させることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプII型の膜タンパク質のトポロジーを有し、N末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半のC末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N

10

20

30

40

50

末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

本発明の新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素において、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の 9 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 19 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 12 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなり、配列番号 2 および 3 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の 11 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 21 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 12 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなり、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の 29 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 20 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 12 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなると予想することができる。

10

幹領域は、他の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や β 1, 3-ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や β 1, 3-ガラクトース転移酵素の幹領域に関する知見〔本願明細書実施例 4、特開平 6-181759〕を基に推定した。従って、配列番号 1 の 41 番目から 397 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 2 および 3 の 45 番目から 372 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号 4 の 62 番目から 378 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは触媒領域を含むと考えられる。

20

上記のポリペプチド全長または β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する領域（触媒領域）を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテイン A、プロテイン A の IgG 結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテイン G、マルトース結合タンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、S ペプチド、DNA 結合タンパク質ドメイン、Tac 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAG ペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔実験医学、13, 469 (1995)〕。

30

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)〕、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平 05-336963、WO 94/23021 等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

40

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

具体的には、触媒部位を含むと考えられるアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドの C 末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。

精製・検出用のタグとしては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテイン A、プロテイン A の I

50

g G結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ (A r g)、ポリ (G l u)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンSートランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (H i s - t a g)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、T a c抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、F L A Gペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)〕。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (D E A E) -セファロース、D I A I O N H P A - 7 5 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - S e p h a r o s e F F (P h a r m a c i a社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

また、通常の糖転移酵素の精製方法〔Methods in Enzymology, 83, 458〕に準じて精製できる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔実験医学, 13, 469 (1995)〕。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、WO94/23021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをF L A Gペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗F L A G抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

また、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162、J. Biochem., 110, 166 (1991)〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて本発明のβ1, 3-N-アセチルグル

10

20

30

40

50

コサミン転移酵素を生産することができる。

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、PERKIN ELMER社、Pharmacia Biotech社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

本発明の新規ポリペプチドの $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性は、公知の測定法〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 42, 77 (1989)〕に準じて測定することができる。

本発明のポリペプチドの $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定法〔J. Biol. Chem., 258, 9893 (1983)、J. Biol. Chem., 262, 15649 (1987)、Arch. Biochem. Biophys., 270, 630 (1989)、Arch. Biochem. Biophys., 274, 14 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem., 273, 58 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 433 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem., 274, 12499 (1999)〕に準じて測定することができる。

(4) N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造

上記(3)で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にN-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することにより、該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造としては、GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc構造、GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-3$ GlcNAc構造、GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc構造、(Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$)_nGal $\beta 1-4$ GlcNAc構造〔n ≥ 1 〕、または(Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$)_nGal $\beta 1-4$ Glc構造〔n ≥ 1 〕等をあげることができる。

培養は上記(3)に準じて行うことができる。

上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質（例えば医薬用組換え糖タンパク質）を、糖鎖を合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質にN-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

また、上記(3)で取得した動物個体または植物個体を用い、上記(3)の方法に準じて、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。上記(3)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基またはガラクトース単糖に、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合で付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

10

即ち、ガラクトース単糖、ガラクトース残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはガラクトース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、上記(3)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびUDP-GlcNAcを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトースまたはガラクトース残基に $\beta 1, 3$ 結合でN-アセチルグルコサミンが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

酵素源は、ラクトーN-ネオテトラオース(lacto-N-neotetraose, Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc)を基質として、37℃で1分間に1 μ モルのGlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glcを生成することのできる活性を1単位(U)として、0.1mU/l~10,000U/lであり、好ましくは1mU/l~1,000U/lの濃度で用いる。

20

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。また、上記(2)記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記(2)記載の非ヒトトランスジェニック動物より得られたミルクを水性媒体として用いることもできる。水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

30

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン(例えばナイミンS-215、日本油脂社製)などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド(例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製)などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン(例えば三級アミンFB、日本油脂社製)などの三級アミン類など、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1, 3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1~50g/lの濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1~50ml/lの濃度で用いられる。

40

UDP-GlcNAcとしては、市販品その他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。該UDP-GlcNAcは0.1~500mmol/lの濃度で用いることができる。

上記において、ガラクトース残基を非還元末端に有するオリゴ糖としては、Gal $\beta 1-4$ Glc、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$)GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc、Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$)GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$)Glc、Gal $\beta 1-4$ G

50

$1\text{cNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、またはこれらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有するオリゴ糖などをあげることができる。ガラクトース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質としては、上記オリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖を含有する複合糖質、あるいはアシアロ複合型N結合型糖鎖を含有する複合糖質などをあげることができる。

10

受容基質は $0.01\sim 500\text{mmol/l}$ の濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じて MnCl_2 等の無機塩、 β -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

20

生成反応は水性媒体中、 $\text{pH}5\sim 10$ 、好ましくは $\text{pH}6\sim 8$ 、 $20\sim 50^\circ\text{C}$ の条件で $1\sim 96$ 時間行う。

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編、続生化学実験講座、第4巻、複合糖質研究法I、II、東京化学同人、(1986年)、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修、グリコバイオロジー実験プロトコル、秀潤社、(1996年)〕。

(5) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等への利用
 本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー、50, 322 (1992)、化学、46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学、16, 1463 (1997)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕を用いた炎症や癌転移の抑制等の疾病の治療に用いることができる。

30

また、ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クロニング第2版)、PCR法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕、Real Time PCR法〔実験医学(増刊)、15, 46 (1997)〕を用いて本発明のDNAの発現量を測定することにより、炎症や癌の診断が可能である。特に、定量的PCR法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)〕やReal Time PCR法は定量性に優れている。例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

40

即ち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を定量することができる。

50

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社（1993）〕を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。従って、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されているヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

10

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。

例えば、ヒト白血球細胞、ヒト大腸癌細胞あるいはヒト膵臓癌細胞で、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。

糖転移酵素遺伝子には多型や変異が存在することが知られている。例えば、ABO式血液型の決定に関与する糖転移酵素に関しては、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより以下の3種の酵素が生成される。

A型抗原の合成に関与する $\alpha 1, 3-N$ -アセチルガラクトサミン転移酵素、B型抗原の合成に関与する $\alpha 1, 3$ -ガラクトース転移酵素、およびO(H)型糖鎖の生成に関与する活性を持たない酵素〔Nature, 345, 229-233 (1990)〕。

20

またルイス式血液型の決定に関与する $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素(Fuc-TII)の場合も、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより、活性が低下または消失した酵素が生成することが知られている〔J. Biol. Chem. 269, 29271 (1994)、Blood, 82, 2915 (1993)、J. Biol. Chem. 269, 20987 (1994)、J. Biol. Chem. 272, 21994 (1997)〕。

Fuc-TII遺伝子の多型は、大腸癌における癌関連糖鎖抗原であるシアリルルイスa糖鎖の発現と密接な関係があることが知られている〔Cancer Res. 56, 330 (1996)、Cancer Res. 58, 512 (1998)〕。

従って、Fuc-TIIの多型を調べることにより、病気の診断や予後の予測を行うことができると考えられる。

30

本発明の新規 $\beta 1, 3-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素はポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与することから、白血球におけるシアリルルイスx糖鎖や、癌細胞における癌関連糖鎖（シアリルルイスx糖鎖、シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ダイメリック・ルイスa糖鎖）の合成に関与すると考えられる。従って、本遺伝子の発現量や多型を調べることにより、炎症、癌または癌転移の診断、あるいは癌の予後の予測が可能と考えられる。

また、本遺伝子の多型と、本遺伝子が発現している臓器における疾患との関連を調べることにより、他の疾患の診断にも利用できる。

本遺伝子の多型解析は、本遺伝子の遺伝子配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンブロット法、ダイレクトシーケンシング法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子多型を解析することができる〔臨床検査, 42, 1507 (1998)、臨床検査, 42, 1565 (1998)〕。

40

(6) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(3)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。

50

抗原としてペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 (1976)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(ii) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (以下、P3-U1と略す)〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14 (SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653 (653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8 (X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。

これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} mol/l)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g/ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%)を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g/ml}$)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水 1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5～10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール1000 (PEG-1000) 2g、

MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を 0.2 ~ 1 ml 添加し、更に 1 ~ 2 分間毎に MEM 培地 1 ~ 2 ml を数回添加する。添加後、MEM 培地を加えて全量が 50 ml になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} mol/l)、チミジン (1.5×10^{-5} mol/l) およびアミノプテリン (4×10^{-7} mol/l) を加えた培地〕100 ml 中に懸濁する。

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに 100 μ l / 穴ずつ分注し、5% CO₂ インキュベーター中、37℃で 7 ~ 14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返し〔1 回目は、HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する〕した 8 ~ 10 週令のマウスまたはヌードマウスに、(c) で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 5 ~ 20 $\times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10 ~ 21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280 nm での吸光度より算出する。

(7) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを検出することができる。具体的にはマイクロタイタープレートを用いる ELISA 法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

(b) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現する細胞の免疫組織染色に利用できる。

(c) 本発明の抗体は、炎症や癌の診断に利用することができる。

(8) スクリーニング法への応用

本発明の新規 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素ポリペプチドは、各種細胞において、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成に関与することから、該ポリペプチドの $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成量を増加または低下させ

10

20

30

40

50

ることが可能である。

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を制御することが可能である。

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖上に存在するシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖は、セレクトインのリガンドとなることが知られていることから、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を抑制する化合物は、抗炎症や癌転移抑制に有用と考えられる。一方、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成量を増加させる化合物は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成やポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が付加した複合糖質の生産に有用と考えられる。

10

該化合物は、以下(a)～(e)に示す方法により取得可能である。

(a) 上記(3)で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド(精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清)を酵素として用い、被験試料の存在下、公知の方法〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 42, 77 (1989)〕を用いて β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定し、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

20

(b) 本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記(3)で記載した形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の量を、該糖鎖を認識する抗体(抗i抗体、抗I抗体)やレクチン(LEA、PWM、DSA)を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

上記抗体やレクチンを用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。また、FACSを用いて測定することもできる。

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(5)で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

30

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする遺伝子転写産物の量を、上記(4)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

40

(e) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(3)記載の動物細胞に、上記(2)および(3)に記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得する。該形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編, 新細胞工学実験プロトコル, 秀潤(1993), Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

50

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン・フルオレッセント・プロテイン (GFP) 遺伝子等をあげることができる。

(9) ノックアウト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞 (embryonic stem cell) において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987) 等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、Nature, 350, 6315, 243 (1991)〕。

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞 (blastocyst) への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体 (ノックアウト動物) を得ることができる。

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモーターを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 7, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335, (1997)〕が知られている。

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。

従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。発明を実施するための最良の形態

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、特に断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された公知の方法を用いた。

実施例1 GlcNAc β 1, 3-ガラクトース転移酵素 (β 3 Gal-T1) のホモログ蛋白質をコードする可能性のある候補遺伝子の検索

β 3 Gal-T1 (別名WM1) はGal β 1-3 GlcNAc構造の合成に関与する β 1, 3-ガラクトース転移酵素である〔特開平6-181759〕。遺伝子データベースから、Blast〔J. Mol. Biol. 215, (1990)〕およびFrame Search法〔CompuGen社製〕のプログラムを利用して、本酵素遺伝子と同一性のある遺伝子または本酵素とアミノ酸レベルで同一性を有する蛋白質をコードする可能性のある遺伝子を検索した結果、複数のEST (expressed sequence tag) 配列を見出した。それらは配列上3種に分類されたことから、3種の候補遺伝子が存在すると考えられた。各候補遺伝子をそれぞれG3、G4、G7と命名した。遺伝子

データベースとしては、GenBankのデータベースと特許配列データベースであるGENESEQ (Derwent社)を利用した。

上記3種の配列に特異的なプライマーセットを設計し、候補遺伝子断片のクローン化を試みた。プライマーセットとしては、F-3-5とR-3-5、F-4-5とR-4-5、およびF-7-5aとR-7-3aを使用した。各プライマーの配列は配列番号9~14に示した。

実施例2 候補遺伝子G3のクローン化

(1) 候補遺伝子G3のcDNA断片のクローン化

候補遺伝子G3に特異的なプライマー (F-3-5とR-3-5: 配列は配列番号9、10に示す) を作製し、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNA、あるいは各種cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、該当する配列を有するcDNAの存在について検討した。その結果、白血球のcDNAライブラリー (Clontech社製) または胃粘膜cDNAライブラリーを鋳型とした時に約600bpのDNA断片が増幅された。具体的な方法を以下に示す。

白血球cDNAライブラリー (ファージライブラリー: Clontech社製) を約4万種の独立クローン毎にプール分けした後、各プールのファージ (約 1×10^7 個) を鋳型としてPCRを行った。99℃で10分間熱処理したファージ (約 1×10^7 個) を含む反応溶液49.5 μ l [10mmol/l Tris-HCl (pH8.3)、50mmol/l KCl、1.5mmol/l $MgCl_2$ 、0.2mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μ mol/l 遺伝子特異的プライマー] を97℃で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase (Takara社製) を加え、94℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。

ヒト胃粘膜cDNAライブラリーは以下のように作製した。ヒト胃粘膜のpoly (A) + RNAよりcDNA合成システム (cDNA Synthesis System, GIBCO BRL社製) を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalI adaptor (Super Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製) を付加した後、クローニングベクター λ ZAP II (λ ZAP II/EcoRI/CIA Cloning Kit、STRATAGENE社製) のEcoRI部位に挿入し、STRATAGENE社GigaPack III Gold Packaging Extractを用いてin vitro packagingを行うことにより、cDNAライブラリーを作製した。

該胃粘膜cDNAライブラリー (ファージライブラリー) を約5万種の独立クローン毎にプール分けした後、各プールのファージ (約 1×10^7 個) を鋳型としてPCRを行った。方法は上記で述べた方法と同じ。

白血球cDNAライブラリーから増幅された約600bpのDNA断片をT-ベクターであるpT7Blue (Novagen社製) に組み込み、プラスミドpT7B-G3FRを造成した。pT7B-G3FRが含むcDNA断片の全塩基配列を決定した結果、該cDNA断片の配列が実施例1で見出されたEST配列の1種と一致することが確認された。塩基配列の決定には、LICOR社のDNAシーケンサー (DNA sequencer model 4000L)、PERKIN ELMER社のDNAシーケンサー377、ならびに各シーケンサー用の反応キットを使用した。

(2) 候補遺伝子G3の完全長cDNAのクローン化

G3の完全長cDNAを取得するために、PCR DIG probe synthesis kit (Boehringer Mannheim社製) を用いて、ジゴキシゲン標識プローブの作製を行った。1 μ gのpT7B-G3FRと各0.2 μ mol/lのプライマー (F-3-5とR-3-5) を含む反応溶液39 μ lを97℃で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase 1ユニット (Takara社製) を加え、94℃で1分間、65℃で1分

間、72℃で1時間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。反応液の組成はキット添付の説明書に従った。

上記(1)で増幅が見られた該胃粘膜cDNAライブラリーのプール(約5万独立クローン)について、ジゴキシゲニン標識プローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。

ブランク由来のDNAをトランスファーしたフィルターを、5倍濃度のSSPE〔1倍濃度のSSPEの組成は、180mmol/l 塩化ナトリウム、10mmol/l リン酸二水素ナトリウム、1mmol/l エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)よりなる(pH7.4)〕、5倍濃度のデンハルト溶液〔1倍濃度のデンハルト溶液の組成は、0.02%(W/V) ウシ血清アルブミン、0.02%(W/V) フィコール400、0.02%(W/V) ポリビニルピロリドンよりなる〕、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、20μg/ml サケ精子DNAよりなる緩衝液(以下ハイブリダイゼーション用緩衝液と呼ぶ)25mlに浸し、65℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った。

次いで、該フィルターを上記で作製したジゴキシゲニン標識プローブ5μlを含むハイブリダイゼーション用緩衝液10mlに浸し、65℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。

その後、フィルターを、2倍濃度のSSPE、0.1%SDSよりなる緩衝液中で65℃、10分間浸漬する条件で2回、1倍濃度のSSPE、0.1%SDSからなる緩衝液中で65℃、15分間浸漬する条件で1回、0.2xSSPE、0.1%SDSからなる緩衝液中で65℃、10分間浸漬する条件で2回洗浄した。

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする1個の独立したクローンが得られた。Qiagen社製のキット(QIAGEN Lambda System)を用いて、該クローンからファージDNAを調製した。該ファージDNAをXbaIとSalIで切断し、約1.9kbのXbaI-SalI断片を、pBlue II SK(+)のXbaI-SalI間にサブクローニングした。このようにして造成したプラスミドをpBS-G3と呼ぶ。

(3) プラスミドpBS-G3中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定

上記(2)で得られたpBS-G3が含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。

pBlue II SK(+)中の配列に特異的なプライマー(M13-20 PrimerおよびReverse primer)を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー(dNA sequencer model 4000L)と反応キット(SequitheRM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc:ARBROWN社)、またはPERKIN ELMER社のDNAシーケンサー377と反応キット(ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:Applied Biosystems社)を使用した。pBS-G3が含むcDNAの全塩基配列(1912bp)を配列番号5に示した。

該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する397アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドをG3ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号1に示す。

該ポリペプチドはこれまでにクローン化された5種のヒトβ1, 3-ガラクトース転移酵素(β3Gal-T1、β3Gal-T2、β3Gal-T3、β3Gal-T4、β3Gal-T5)とアミノ酸レベルで19%~24%の相同性を示した〔特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58(1998)、J. Biol. Chem

10

20

30

40

50

. 273, 433 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499 (1999)〕。

相同性解析は、配列解析ソフト G E N E T Y X - M A C 10.1 の S e a r c h H o m o l o g y を用いて行った。

また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒト $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 ($\beta 3 G n T$) とアミノ酸レベルで約 15% の相同性を示し [P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 96, 406 (1999)]、N 末端の 9 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 19 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 12 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなると考えられた。

また、相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見 [特開平 6-181759] を基に、幹領域は少なくとも 12 アミノ酸からなると予想された。従って、41 番目から 397 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

これらの結果および後述する実施例 8 の結果より該ポリペプチドは新規な $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であると考えられた。

配列番号 5 の塩基配列は、W O 98/44112 で公開された配列とほぼ一致していた。

また該配列がコードするポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 1) は、W O 98/44112 で公開された配列と一致していた。

しかし、該公開特許では該ポリペプチドを分泌タンパク質と予想しているが、実際はタイプ II 型の膜タンパク質であり、明らかに間違っている。また、該公開特許では他のタンパク質へのホモロジーから、該ポリペプチドを骨格筋由来成長因子スーパーファミリーに属する C a r d i a c a n d p a n c r e a t i c p r o t e i n と予想しているが、実際の活性については何ら明らかにしていない。該特許においては、該ポリペプチドを大腸菌、昆虫細胞、動物細胞で生産させる一般的な手法について記載されているが、実際にポリペプチドを発現させたデータは記載されていない。該ポリペプチドが $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることを明らかにし、糖鎖合成への有用性を示したのは今回が最初である。

p B S - G 3 を含む大腸菌である E s c h e r i c h i a c o l i M M 294/p B S - G 3 は、平成 11 年 4 月 7 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 郵便番号 305-8566) に F E R M B P - 6694 として寄託されている。

実施例 3 候補遺伝子 G 4 のクローン化

(1) 候補遺伝子 G 4 の c D N A 断片のクローン化

候補遺伝子 G 4 に特異的なプライマー (F-4-5 と R-4-5 : 配列は配列番号 11、12 に示す) を作製し、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖 c D N A、あるいは各種 c D N A ライブラリーを鋳型として P C R を行い、該当する配列を有する c D N A の存在について検討した。その結果、胃粘膜 c D N A ライブラリーを鋳型とした時に約 200 b p の D N A 断片が増幅された。具体的な方法は、プライマーを変更した以外は実施例 1 で記載した方法と同じである。

増幅された約 200 b p の D N A 断片を T-ベクターである p T 7 B l u e (N o v a g e n 社製) に組み込み、プラスミド p T 7 B - G 4 F R を造成した。p T 7 B - G 4 F R が含む c D N A 断片の全塩基配列を決定した結果、該 c D N A 断片の配列が実施例 1 で見出された E S T 配列の 1 種と一致することが確認された。塩基配列の決定には、L I - C O R 社の D N A シークエンサー (d N A s e q u e n c e r m o d e l 4000 L)、P E R K I N E L M E R 社の D N A シークエンサー 377、ならびに各シークエンサー用の反応キットを使用した。

(2) 候補遺伝子 G 4 の完全長 c D N A のクローン化

G 4 の完全長 c D N A を取得するために、P C R D I G p r o b e s y n t h e s i s k i t (B o e h r i n g e r M a n n h e i m 社製) を用いて、ジゴキシゲニ

10

20

30

40

50

ン標識プローブの作製を行った。1 μ g の pT7B-G4FR と各 0.2 μ mol/l のプライマー (F-4-5 と R-4-5) を含む反応溶液 39 μ l を 97 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱後、氷上で 5 分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase 1 ユニット (TaKaRa 社製) を加え、94 $^{\circ}$ C で 1 分間、65 $^{\circ}$ C で 1 分間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして、30 サイクルの反応を行った。反応液の組成はキット添付の説明書に従った。

上記 (1) で増幅が見られた該胃粘膜 cDNA ライブラリーのプール (約 5 万独立クローン) について、ジゴキシゲニン標識プローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。

ブランク由来の DNA をトランスファーしたフィルターを、ハイブリダイゼーション用緩衝液 25 ml に浸し、65 $^{\circ}$ C で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、該フィルターを上記で作製したジゴキシゲニン標識プローブ 5 μ l を含むハイブリダイゼーション用緩衝液 10 ml に浸し、65 $^{\circ}$ C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを、2 倍濃度の SSPE、0.1% SDS よりなる緩衝液中で 65 $^{\circ}$ C、10 分間浸漬する条件で 2 回、1 倍濃度の SSPE、0.1% SDS からなる緩衝液中で 65 $^{\circ}$ C、15 分間浸漬する条件で 1 回、0.2x SSPE、0.1% SDS からなる緩衝液中で 65 $^{\circ}$ C、10 分間浸漬する条件で 2 回洗浄した。

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする 1 個の独立したクローンが得られた。Stratagene 社のマニュアルに従って in vivo excision を行い、該クローンよりプラスミド pBS-G4-2 を回収した。

同様にしてヒト胎盤 cDNA ライブラリーを作製し、該ライブラリーよりプラスミド pBS-G4 を取得した。

(3) プラスミド pBS-G4 および pBS-G4-2 中に挿入されている cDNA の塩基配列の決定

上記 (2) で得られた pBS-G4 および pBS-G4-2 が含む cDNA の全塩基配列を、以下の方法で決定した。

pBlue SK (-) 中の配列に特異的なプライマー (M13 -20 Primer および Reverse primer) を用いて、該 cDNA の 5' 側および 3' 側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成 DNA を調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該 cDNA の全塩基配列を決定した。

塩基配列の決定には、LI-COR 社の DNA シークエンサー (DNA sequencer model 4000L) と反応キット (SequitheRM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc: AR BROWN 社)、または PERKIN ELMER 社の DNA シークエンサー 377 と反応キット (ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: Applied Biosystems 社) を使用した。

pBS-G4 が含む cDNA の全塩基配列 (2205 bp) を配列番号 6 に示した。該 cDNA は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する 372 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドを G4 ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

pBS-G4-2 が含む cDNA の全塩基配列 (2180 bp) を配列番号 7 に示した。該 cDNA は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する 372 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドを G4-2 ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号 3 に示す。

pBS-G4 が含む cDNA を G4 cDNA、pBS-G4-2 が含む cDNA を G4-2 cDNA と呼ぶ。

G4 cDNA と G4-2 cDNA とでは、5' 非翻訳領域の塩基配列が異なっていた他、複数の塩基の置換が見られた (図 1 ~ 4 参照)。翻訳領域中では、G4 cDNA の 11

10

20

30

40

50

11番目の塩基はアデニンであるが、G4-2 cDNAではこれに相当する塩基はグアニンに置換していた。その結果、G4ポリペプチドでは328番目のアミノ酸がHisであるのに対し、G4-2ポリペプチドでは、328番目のアミノ酸がArgに置換している。

G4 cDNAとG4-2 cDNAで5'非翻訳領域の塩基配列が異なっていることは、胎盤と胃では異なるプロモーターが働いていることを示唆している。それ以外の塩基置換は、個人差、体細胞変異あるいは逆転写酵素のエラーに由来すると推定される。下記の実施例で示すように、G4 cDNAとG4-2 cDNAのコードするタンパク質は、いずれもβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していた。

G4およびG4-2ポリペプチドは、これまでにクローン化された5種のヒトβ1, 3-ガラクトース転移酵素(β3Gal-T1、β3Gal-T2、β3Gal-T3、β3Gal-T4、β3Gal-T5)とアミノ酸レベルで22%~26%の相同性を示した〔特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499 (1999)〕。相同性解析は、配列解析ソフトGENETYX-MAC 10.1のSearch Homologyを用いて行った。

また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒトβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(β3GnT)とアミノ酸レベルで17.5%の相同性を示した。〔Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 406 (1999)〕。該ポリペプチドのN末端の11アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く21アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも12アミノ酸からなると予想された。従って、45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以上の結果および後述する実施例8, 9, 10および12の結果から、該ポリペプチドは新規なβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であると考えられた。

配列番号6または7の塩基配列は、WO98/44112で公開された配列とほぼ一致していた。また、配列番号6のコードするポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号2)は、WO98/21328で公開された配列と一致していた。しかし、該公開特許では該ポリペプチドがタイプII型の膜タンパク質であると記載しているのみで、該ポリペプチドの実際の活性については何ら明らかにしていない。該ポリペプチドがβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることを明らかにし、糖鎖合成への有用性を示したのは今回が最初である。

pBS-G4-2を含む大腸菌であるEscherichia coli MM294/pBS-G4は、平成11年4月7日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 郵便番号305-8566)にFERM BP-6695として寄託されている。

実施例4 候補遺伝子G7のクローン化

(1) 候補遺伝子G7のcDNA断片のクローン化

候補遺伝子G7に特異的なプライマー(F-7-5aとR-7-3a:配列は配列番号13、14に示す)を作製し、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNA、あるいは各種cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、該当する配列を有するcDNAの存在について検討した。その結果、ヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-MC由来の一本鎖cDNAを鋳型とした時に約1.3kbのDNA断片が増幅された。具体的な方法を以下に示す。

SK-N-MCはAmerican Type Culture Collection (ATCC)より入手した。SK-N-MC細胞から常法〔Biochemistry,

10

20

30

40

50

18, 5294 (1977)] に従って全RNAを調製した。5 μ gの全RNAから、キット (SUPERSCRIPTTM Preamplification System; BRL社製) を用いて一本鎖cDNAを合成した。反応は21 μ lで行い、反応後の溶液を水で50倍希釈し、使用するまで-80℃で保管した。

上記一本鎖cDNA 10 μ lを含む反応溶液40 μ l [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3)、50 mmol/l KCl、1.5 mmol/l MgCl₂、0.2 mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μ mol/l 遺伝子特異的プライマー] を97℃で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase 1ユニット (TaKaRa社製) を加え、94℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。

増幅された約1.3 kbのDNA断片をTベクターであるpT7Blue (Novagen社製) に組み込み、プラスミドpT7B-G7を造成した。

(2) プラスミドpT7B-G7中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定 上記(2)で得られたpT7B-G7が含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。pT7Blue中の配列に特異的なプライマー (M13-20 PrimerおよびReverse primer) を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー (DNA sequencer model 4000L) と反応キット (SequitheRM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc: ARBROWN社)、またはPERKIN ELMER社のDNAシーケンサー377と反応キット (ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: Applied Biosystems社) を使用した。

pT7B-G7が含むcDNAの全塩基配列 (1296 bp) を配列番号8に示した。該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する378アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドをG7ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号4に示す。

G7ポリペプチドはこれまでにクローン化された5種のヒト β 1, 3-ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-T1、 β 3Gal-T2、 β 3Gal-T3、 β 3Gal-T4、 β 3Gal-T5) とアミノ酸レベルで22%~25%の相同性を示した [特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499 (1999)]。

相同性解析は、配列解析ソフトGENETYX-MAC 10.1のSearch Homologyを用いて行った。

また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒト β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (β 3GnT) とアミノ酸レベルで14.8%の相同性を示し [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 406 (1999)]、N末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見 [特開平6-181759] を基に、幹領域は少なくとも12アミノ酸からなると予想された。従って、62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以上の結果および後述する実施例8の結果から、該ポリペプチドは新規な β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であると考えられた。

pT7B-G7を含む大腸菌である Escherichia coli MM294/pT7B-G7は、平成11年4月7日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 郵便番号305-8566）にFERM BP-6696として寄託されている。

実施例5 アミノ酸配列上の相同性解析

G3、G4-2およびG7ポリペプチドのアミノ酸配列、既知のヒトβ1,3-ガラクトース転移酵素（β3Gal-T1、β3Gal-T2、β3Gal-T3、β3Gal-T4、β3Gal-T5）のアミノ酸配列、ならびに既知のヒトβ1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（β3GnT）のアミノ酸配列を用いて、デンドログラムを作成した（図5参照）。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program ([ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/](http://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/))を用いて作成した。その結果、G3、G4-2およびG7ポリペプチドは、1つのサブグループを形成していることが判明した。G3ポリペプチドは、G4-2およびG7ポリペプチドとそれぞれ39.6%および44.5%の相同性を示した。G4-2ポリペプチドは、G7ポリペプチドと42.5%の相同性を示した。

10

実施例6 動物細胞用発現プラスミドの造成

実施例2~4で取得したG3、G4、G4-2およびG7cDNAがコードする各ポリペプチドを動物細胞で発現させるために、各cDNAを発現ベクターpAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc（特開平05-336963）〕に組み込み、発現プラスミドの造成を行った。

20

(1) G3ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G3の造成（図6参照）

pBS-G3を制限酵素XbaIとSalIで切断後、DNAポリメラーゼ・クレノー断片により平滑末端に変換した。その後、SfiIリンカー（配列番号15、16）を付与し、1.9kbのSfiI断片を取得した。一方、pAMoをSfiIとBamHIで切断後、8.7kbのSfiI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G3を造成した。

SfiIリンカー（配列番号15、16）の合成とリン酸化は、常法に従って行った（特開平05-336963）。

30

(2) G4ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G4の造成（図7参照）

pBS-G4-2を制限酵素HindIIIとBstEIIで切断後、0.4kbのHindIII-BstEII断片を取得した。また、pT7B-G4secを制限酵素BstEIIとNotIで切断後、0.9kbのBstEII-NotI断片を取得した。pT7B-G4secは後述する実施例9の(1)で示した方法で造成した。一方、pAMoをHindIIIとNotIで切断後、8.7kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G4を造成した。

(3) G4-2ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G4-2の造成（図8参照）

40

pBS-G4-2を制限酵素HindIIIとBstEIIで切断後、0.4kbのHindIII-BstEII断片を取得した。また、pBS-G4-2を制限酵素BstEIIとNotIで切断後、1.5kbのBstEII-NotI断片を取得した。一方、pAMoをHindIIIとNotIで切断後、8.7kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G4-2を造成した。

(4) G7ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G7の造成（図9参照）

pT7B-G7を制限酵素SmaIとHincIIで切断後、SfiIリンカー（配列番

50

号15、16)を付与し、1.3kbのSfiI断片を取得した。一方、pAMoをSfiIとBamHIで切断後、8.7kbのSfiI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G7を造成した。

実施例7 G3、G4、G4-2、G7の各ポリペプチドを発現するプラスミドを導入したヒト培養細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成

(1) 安定形質転換株の取得

コントロールプラスミド(pAMo)および実施例6で造成した各発現プラスミド(pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2、pAMo-G7)を、それぞれ1μg/μlになるように10mmol/l トリス-HCl (pH8.0)および1mmol/l EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム)からなる緩衝液(以下、TE緩衝液と略記する)に溶解した後、エレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)]によりNamalwa KJM-1細胞[Cytotechnology, 1, 151(1988)]に導入し、形質転換細胞を得た。1.6×10⁶細胞あたり4μgのプラスミドを導入した後、8mlのRPMI1640・ITPSG培地[7.5%NaHCO₃を1/40量、200mmol/l L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000units/ml ペニシリン、5000μg/ml ストレプトマイシン)を0.5%、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルフォニック・アシッド(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES)(10mmol/l)、インシュリン(3μg/ml)、トランスフェリン(5μg/ml)、ピルビン酸ナトリウム(5mmol/l)、亜セレン酸ナトリウム(125nmol/l)、ガラクトース(1mg/ml)を添加したRPMI1640培地(日水製薬社製)]に懸濁し、CO₂インキュベーターで37℃で24時間培養した。その後、G418(GIBCO社製)を0.5mg/mlになるように添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.5mg/mlのG418を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(2) 各形質転換細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量の測定

該形質転換細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体やレクチンを用いた蛍光染色後、FACSを用いて解析することができる。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体としては抗i抗体(Den)を使用できる。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するレクチンとしてはLEA、PWM、およびDSAを使用できる。

以下、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するレクチン(LEA、PWM)を用いた具体例を示す。

上記形質転換細胞(各5×10⁶個)を、20mUのClostridium perfringensのノイラミニダーゼ(neuraminidase、SIGMA社製 N2133)を含む100μlのPBS(8g/l NaCl、0.2g/l KCl、1.15g/l Na₂HPO₄(無水)、0.2g/l KH₂PO₄)に懸濁して、37℃で1時間反応することにより、形質転換細胞のシアリダーゼ処理を行った
上記細胞(約1×10⁶個)をマイクロチューブ(1.5ml:Eppendorf社製)にとり、遠心分離(550×g、7分間)により細胞を集めた。

該細胞を0.9mlの0.1%のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液PBS(A-PBS:8g/l NaCl、0.2g/l KCl、1.15g/l Na₂HPO₄(無水)、0.2g/l KH₂PO₄、0.1%アジ化ナトリウム)で洗浄した後、該洗浄細胞に、A-PBSで10μg/mlに希釈したFITC標識LEA(EY laboratories社製)またはA-PBSで100μg/mlに希釈したFITC標識PWM(EY laboratories社製)を20μl加えて懸濁し、4℃で1時間反応させた。

反応後、細胞を0.9mlのA-PBSで1回洗浄した後、0.6mlのA-PBSに懸

10

20

30

40

50

濁し、FACSCaliber (Becton Dickinson Immunocytometry Systems USA社製)を用いてFACS (フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター) 解析を行なった。また対照実験として、レクチンの代わりにA-PBSを用いて同様の解析を行なった。

pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2またはpAMo-G7を導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞に比べて、LEAへの反応性が増加していた(図10)。また、pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2またはpAMo-G7を導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞と比較して、PWMへの反応性が増加していた(図10)。

これらの結果は、G3、G4、G4-2あるいはG7のcDNAをNamalwa KJM-1細胞で発現させることにより、細胞表面の糖タンパク質あるいは糖脂質の糖鎖上にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が新たに合成されていることを意味している。

また、G3、G4、G4-2あるいはG7のcDNAを発現させた細胞から分泌される糖タンパク質やオリゴ糖の糖鎖にも、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が新たに合成されることを示している。従って、G3、G4、G4-2あるいはG7のcDNAを発現させた細胞を宿主として有用な糖タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖タンパク質にポリ-N-アセチルラクトサミンを含有する糖鎖を付与することが可能である。

一方、上記形質転換細胞に対して、シアリルルイス_c糖鎖に対する抗体であるDU-PAN-2を用いて蛍光染色を行った時には抗体の反応性は変化しなかった。方法は常法〔J. Biol. Chem., 274, 12499 (1999)〕に従った。

実施例8 G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドを発現するプラスミドを導入したヒト培養細胞における β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記実施例7で取得した、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドを発現するプラスミドを導入した安定形質転換細胞の細胞抽出液を用いて、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を調べた。

上記形質転換細胞(約 2×10^7 個)をマイクロチューブ(1.5ml: Eppendorf社製)にとり、遠心分離(550 $\times$ g、7分間)により細胞を集めた。該細胞を0.9mlのPBSで洗浄した後、該洗浄細胞を20mmol/l HEPES (pH7.2)、1% TririonX-100からなる溶液(100 μ l)に懸濁し、超音波破碎機(Bioruptor; Cosmo Bio社製)を用いて細胞を破碎した。4 $^{\circ}$ Cで1時間放置した後、遠心分離(550 $\times$ g、7分間)により上清を取得した。該上清を酵素サンプルとした。該酵素サンプルを用いて、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。

ピリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法〔特開平6-181759、特開平06-823021、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)〕に準じて行った。

具体的には、30 μ lのアッセイ溶液〔200mmol/l MOPS (pH7.5)、50mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20mmol/l MnCl₂、0.3% TririonX-100、50 μ Mピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液10 μ l〕中で37 $^{\circ}$ C、16時間反応後、生産物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により検出した。

基質としては、アミノピリジンで蛍光標識したラクト-N-ネオテトラオース(Lactose-N-neotetraose, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、LNnTと略記する)を使用した。

LNnTはOxford Glycosystems社から購入した。オリゴ糖の蛍光標識は、常法〔Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)〕に従って行った。

UDP-GlcNAc (糖供与体)を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLCで解析し、UDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出

10

20

30

40

50

現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で5分間処理後、10,000×gで5分間遠心分離して上清を取得し、その一部(5μl)をHPLCに供した。

HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム(4.6×300mm;東ソー)を使用し、溶出液として0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.0)を用い、溶出温度50℃、流速0.5ml/分の条件で行った。

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920(日本分光)を用いて行った(励起波長320nm、放射波長400nm)。生成物の同定は、スタンダード糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。スタンダード糖鎖としては、アミノピリジル化したGlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcを使用した。

10

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトースをスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

コントロールプラスミド(pAMo)および各発現プラスミド(pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2、pAMo-G7)を導入した安定形質転換細胞の細胞抽出液を用いて活性測定を行った結果、生産物(GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc)に転換された基質(LNnT)の割合は、コントロールプラスミドを導入した細胞では1.8%であったのに対し、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、順に2.7%、2.8%、2.8%、2.3%に増加していた。すなわち、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、コントロールプラスミドを導入した細胞に比較して、β1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加していることが判明した。

20

以上の結果から、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドは、新規なβ1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることが証明された。この結果は、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドを用いて、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、N-アセチルグルコサミンがβ1,3結合で付加した糖鎖を合成可能なことを示している。

実施例9 Namalwa KJM-1細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型β1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)の分泌生産

30

(1) FLAGペプチド融合型分泌ベクターpAMoF2の造成

FLAGペプチド(配列番号17)を任意のタンパク質のN末端に付加した形で分泌発現するための分泌ベクターpAMoF2の造成を行った。免疫グロブリンκのシグナル配列およびFLAGペプチドをコードするDNAは、6種の合成DNAを用いて作製した。

pAMoをHindIIIとAsp718で切断することにより、約8.7kbのHindIII-Asp718断片を取得した。HindIII切断部位とAsp718切断部位を連結するためのリンカーとして以下の6種のDNA[IgK-1(配列番号18)、IgK-2(配列番号19)、IgK-3(配列番号20)、IgK-4(配列番号21)、IgK-5(配列番号22)、IgK-6(配列番号23)]を合成した。なお、これらのDNAによって構築されるリンカー中にはPmaCI、StuI、SnaBIの各制限酵素切断部位が組み込まれている。6種のDNAはそれぞれApplied Biosystems社380A・DNA合成機を用いて合成した。合成したDNAは、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(TaKaRa社製、以下同じ)を用いてリン酸化した後に使用した。

40

上記で取得した6種のリン酸化合成DNAと約8.7kbのHindIII-Asp718断片を結合することにより、プラスミドpAMoF2を構築した。

(2) プラスミドpAMoF2-i52Sの造成

PCR用のプライマーとして、配列番号24で示されるDNA(以下、C12-7と呼ぶ)および配列番号25で示されるDNA(以下、C12-9と呼ぶ)を合成した(サワディ・テクノロジーから購入することも可能)。

50

C12-7にはBamHIサイトがC12-9にはNotIサイトが導入されるようにデザインされている。

PCRは、TaKaRa社製のキット (GeneAmp™ DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaq™ Recombinant Taq DNA Polymerase) を用いて行った。反応液の調製はキットの方法に従って行い、DNAサーマルサイクラー (PERKIN ELMER Cetus DNA Thermal Cycler; TaKaRa社販売) を用いて、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間の反応を10サイクル行った後、さらに72℃で7分間反応させた。鋳型としてはプラスミドpAMo-i [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 14294 (1997)] を10ng使用した。該PCRにより、約1.1kbのDNA断片を取得した。

約1.1kbのPCR増幅DNA断とT-ベクターpT7Blue (Novagen社製) を結合することにより、プラスミドpT7B-i52S No. 3を構築した。

次いでプラスミドpAMoF2-i52Sの造成を行った。

pAMoF2をStuIとBanIIIで切断し、約7.2kbのStuI-BanIII断片を取得した。pAMoをBanIIIとNotIで切断し、約1.7kbのBanIII-NotI断片を取得した。pT7B-i52S No. 3をBamHIで切断後、大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片を用いてBamHI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変え、引き続きNotIで切断することにより、約1.1kbのBamHI (平滑末端)-NotI断片を取得した。

上記で得た、約7.2kbのStuI-BanIII断片、約1.7kbのBanIII-NotI断片および約1.1kbのBamHI (平滑末端)-NotI断片を結合し、プラスミドpAMoF2-i52Sを構築した。

(3) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの分泌発現用プラスミドpAMoF2-G4の造成 (図11参照)

クローン化したβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) は、その一次配列から、N末端の11アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く21アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。

そこで、G4ポリペプチドのN末端の11アミノ酸からなる細胞質領域、21アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部 (5アミノ酸) を除去し、該除去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAGペプチドを付加することによりG4ポリペプチドの分泌発現を試みた。

まず、G4ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域 [配列番号2の38番目のグルタミン酸から372番目のチロシンまで] をコードするDNA領域をPCRを用いて調製し、T-ベクターであるpT7Blue (Novagen社製) に組み込むことにより、プラスミドpT7B-G4secを造成した。以下具体的方法を記す。

PCR用のプライマーとして、G4-SFとG4-SR (各配列を配列番号26、27に示す) を合成した (サワディー・テクノロジーから購入することも可能)。

PCRは、TaKaRa社製のキット (GeneAmp™ DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaq™ Recombinant Taq DNA Polymerase) を用いて行った。反応液の調製はキットの方法に従って行い、DNAサーマルサイクラー (PERKIN ELMER Cetus DNA Thermal Cycler; TaKaRa社販売) を用いて、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間の反応を10サイクル行った後、さらに72℃で7分間反応させた。鋳型としては、上記実施例3で造成したプラスミドpBS-G4を20ng使用した。

該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.0kbのDNA断片を回収した。該DNA断片をT-ベクターpT7Blue (Novagen社製) に組み込むことにより、pT7B-G4sec (No. 13) を造成した。

pT7B-G4sec (No. 13) 中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

G4-SFにはBamHIサイトが、G4-SRにはNotIサイトが導入されるようにデザインされているため、pT7B-G4sec (No. 13) を制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、PCR増幅断片部分を切り出すことができる。pT7B-G4sec (No. 13) を制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、G4ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号2の38番目のグルタミン酸から372番目のチロシンまで〕をコードする1.0kbのBamHI-NotI断片を取得した。一方、プラスミドpAMOF2-i52Sを制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、8.9kbのBamHI-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pAMOF2-G4を造成した(図11)。

10

(4) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドのNamalwa KJM-1細胞での分泌生産

コントロールプラスミドpAMOF2および上記で造成したG4ポリペプチドのFLAGペプチド融合型分泌発現プラスミドpAMOF2-G4をキアジェン(Qiagen社製のプラスミド調製キット(／plasmid／maxi kit; 商標番号41031))を用いて調製した。

調製取得したプラスミドはエタノール沈殿の後、1μg/μlになるようにTE緩衝液に溶解した。

実施例7に記載した方法を用いて、各プラスミドをそれぞれNamalwa KJM-1細胞に導入し、安定形質転換体を取得した。

20

取得した形質転換体を、G418を0.5mg/ml、牛胎児血清を2%含むRPMI 1640培地30mlに5×10⁴細胞/mlになるように懸濁し、CO₂インキュベーターで37℃、10日間培養した。

培養後、160×g、10分間および1500×g、10分間の条件で遠心分離することにより細胞を除き、上清を回収した。該培養上清は、-80℃で保存することが可能で、使用時に解凍して用いることができる。

プラスミドpAMOF2-G4のコードするβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、FLAGペプチドとの融合タンパク質として分泌発現されるので、抗FLAG M1アフィニティーゲル(Anti-FLAG M1 Affinity Gel; Cosmo Bio社)を用いて、容易に精製が可能である。

30

上記で取得した培養上清にアジ化ナトリウム、塩化ナトリウム、および塩化カルシウムを、それぞれ最終濃度0.1%、150mmol/l、および2mmol/lになるように添加した後、抗FLAG M1アフィニティーゲル(Anti-FLAG M1 Affinity Gel; Cosmo Bio社)を30μl添加し、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。攪拌後、160×gで10分間、遠心分離することにより抗FLAG M1アフィニティーゲルを回収し、該ゲルを50mmol/l トリス-塩酸(pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、1mmol/l 塩化カルシウムを含む緩衝液1mlで2回洗浄した。

洗浄後、該ゲルに50mmol/l トリス-塩酸(pH7.4)、150mmol/l

40

塩化ナトリウム、2mmol/l EDTAを含む緩衝液30μlを添加し、4℃で30分間処理することにより、ゲルに吸着したタンパク質を溶出した。その後、160×gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。該ゲルに再度50mmol/l トリス-塩酸(pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、2mmol/l EDTAを含む緩衝液30μlを添加し、4℃で10分間処理した後、160×gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。その後、上記の操作を再度行い、合計3回溶出操作を行った。該溶出液には、最終濃度が4mmol/lになるように1mol/l 塩化カルシウムを添加した。

(5) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドのβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

50

上記(4)で調製した溶出液15 μ lを用いて、N a m a l w a K J M-1細胞で分泌発現させたF L A Gペプチド融合型G 4ポリペプチドの β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は上記実施例8の方法を用いた。その結果、p A M o F 2-G 4を導入したN a m a l w a K J M-1細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は0.51%であった。一方、ベクターであるp A M o F 2を導入したN a m a l w a K J M-1細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には、活性は全く検出されなかった。

以上の結果より、N a m a l w a K J M-1細胞で分泌発現させたF L A Gペプチド融合型G 4ポリペプチドは β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G 4)をF L A Gペプチドとの融合タンパク質として動物細胞で分泌生産可能なこと、また生産された融合タンパク質は抗F L A G M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることを示している。また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

実施例10 昆虫細胞を宿主としたF L A Gペプチド融合型 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G 4)の分泌生産

実施例8で示したF L A Gペプチド融合型G 4ポリペプチドの昆虫細胞での分泌発現を行った。

(1) F L A Gペプチド融合型G 4ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現するための組換えウィルスの作製

目的タンパク質をコードするDNAをトランスファーベクターと呼ばれる特殊なプラスミドに組み込む工程(工程1)と、工程1で作製した目的DNAを組み込んだトランスファーベクターと野生型ウィルスとを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組換えウィルスを取得する工程(工程2)の2工程で、組換えウィルスを作製した。該工程は、PharMingen社製バキュロゴールドスターターキット(製品番号PM-21001K)を用い、該キットのマニュアルに従い以下の手順で行った。

(工程1) F L A Gペプチド融合分泌型G 4ポリペプチドをコードするDNAのトランスファーベクターへの組み込み(図12)

トランスファーベクターpV L 1 3 9 3 (PharMingen社製)のB a m H IサイトとN o t Iサイトの間に、実施例9で示したF L A Gペプチド融合分泌型G 4ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだプラスミドpV L 1 3 9 3-F 2 G 4の造成を行った。

実施例9で作製したp A M o F 2-G 4を制限酵素H i n d I I IとN o t Iで切断し、1.05kbのH i n d I I I-N o t I断片を得た。

pV L 1 3 9 3由来を制限酵素B a m H IとB s t P Iで切断し、3.2kbのB a m H I-B s t P I断片を得た。

pV L 1 3 9 3由来を制限酵素N o t IとB s t P Iで切断し、6.4kbのN o t I-B s t P I断片を得た。

B a m H IサイトとH i n d I I Iサイトを連結するためのリンカーとして配列番号28、29に示すDNAを合成し、T 4 p o l y n u c l e o t i d e k i n a s eを用いて5'末端のリン酸化を行った。

上記3断片とリンカーを結合することにより、pV L 1 3 9 3-F 2 G 4を造成した(図12)。

(工程2) 組換えウィルスの作製

T N M-F H インセクトメディウム(PharMingen社製)を用いて培養した昆虫細胞S f 9 (PharMingen社製)に、線状バキュロウィルスDNA〔バキュロゴールド・バキュロウィルスDNA(B a c u l o G o l d b a c u l o v i r u s D N A)、PharMingen社製〕および上記プラスミドpV L 1 3 9 3-F 2 G 4をリポフェクション法〔蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)〕により導入すること

10

20

30

40

50

により、以下のようにして組換えバキュロウィルスを作製した。

1～5 μ g の pVL1393-F2G4 および 15 ng の線状バキュロウィルス DNA を 12 μ l の蒸留水に溶解後、リポフェクチン (GIBCO BRL 社製) 6 μ l (6 μ g) と蒸留水 6 μ l とを混和したものを添加し、室温で 15 分間放置した。

約 2×10^6 個の Sf9 細胞を 2 ml の Sf900-III 培地 (GIBCO BRL 社製) に懸濁し、直径 35 mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた後、pVL1393-F2G4、線状バキュロウィルス DNA、およびリポフェクチンの混和溶液全量を添加し、27℃で3日間培養した。

該培養液より、組換えウィルスを含む培養上清 1 ml を採取した。

該培養上清を取得したシャーレには、TNM-FH インセクトメディウムを新たに 1 ml 加え、更に 27℃で4日間培養した。培養後、同様にして組換えウィルスを含む培養上清を更に 1.5 ml 取得した。

(2) 組み換えウィルス溶液の取得

約 8×10^6 個の Sf9 細胞を 5 ml の EX-CELL 400 培地 (JRH 社製) に懸濁し、25 cm^2 フラスコ (GREINER 社製) に入れ、室温で 30 分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに 1 ml の EX-CELL 400 培地と上記 (1) で取得した組換えウィルスを含む培養上清 1 ml を添加した。

添加後、室温で 1 時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウィルスとを十分に接触させた後、TNM-FH インセクトメディウムを 4 ml 加え、27℃で4日間培養した。

該培養液を 1500 $\times$ g で 10 分間遠心分離することにより、組換えウィルスの感染した Sf9 細胞および組換えウィルス溶液 5.5 ml を得た。

約 2×10^7 個の Sf9 細胞を 15 ml の EX-CELL 400 培地に懸濁し、75 cm^2 フラスコ (GREINER 社製) に入れ、室温で 30 分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに 5 ml の EX-CELL 400 培地と上記で取得した組み換えウィルス溶液 1 ml を添加した。

添加後、室温で 1 時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウィルスとを十分に接触させた後、TNM-FH インセクトメディウムを 10 ml 加え、27℃で4日間培養した。

該培養液を 1500 $\times$ g で 10 分間遠心分離することにより、組換えウィルスが感染した Sf9 細胞および組み換えウィルス溶液 15 ml を得た。

該組み換えウィルス溶液のウィルスの力価は以下の方法で算定することができる [PharMingen 社製バキュロゴールドスターターキット・マニュアル]。

約 6×10^6 個の Sf9 細胞を 4 ml の EX-CELL 400 培地に懸濁し、直径 60 mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 30 分間放置して細胞をシャーレに付着させた後、上清を除き、該シャーレに EX-CELL 400 培地 400 μ l および EX-CELL 400 培地で 10^{-4} または 10^{-5} に希釈した上記組み換えウィルス溶液 100 μ l を添加する。

添加後、該シャーレを室温で 1 時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウィルスとを十分に接触させる。

接触後、シャーレより培地を除去し、該シャーレに、2% 低融点アガロース [アガープレート・アガロース (Agar plaque Agarose); PharMingen 社製] を含む 2 ml の EX-CELL 400 培地 (42℃に保温) と、2 ml の TNM-FH インセクトメディウム (42℃に保温) の混合液を流し込み、室温で 15 分間放置する。

放置後、乾燥を防ぐために該シャーレにビニルテープをまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27℃で5日間培養する。

培養後、該シャーレに 0.01% ニュートラルレッドを含む PBS 緩衝液 1 ml を加え、更に 1 日培養した後、出現したプラークの数を数える。

(3) FLAG ペプチド融合型 G4 ポリペプチドの分泌生産と精製

プラスミド pVL1393-F2G4 由来の組換えウィルスのコードする G4 ポリペプチドは、FLAG ペプチドとの融合タンパク質として分泌発現されるので、抗 FLAG M

10

20

30

40

50

1 アフィニティーゲル (Ant i - F L A G M1 A f f i n i t y G e l ; C o s m o B i o) を用いて、容易に精製が可能である。

約 2×10^7 個の S f 2 1 細胞を 15 ml の E X - C E L L 4 0 0 培地に懸濁し、75 cm² フラスコ (G R E I N E R 社製) に入れ、室温で 30 分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに 4 ml の E X - C E L L 4 0 0 培地と上記 (2) で取得した組み換えウィルス溶液 1 ml を添加した。

添加後、室温で 1 時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウィルスを十分に接触させた後、T N M - F H インセクトメディウムを 10 ml 加え、27℃で 4 日間培養した。該培養液を 1500 × g で 10 分間遠心分離することにより、分泌型 G 4 を含むと思われる培養上清を 15 ml を得た。

10

上記で取得した培養上清 30 ml にアジ化ナトリウム、塩化ナトリウム、および塩化カルシウムを、それぞれ最終濃度 0.1%、150 mmol/l、および 2 mmol/l になるように添加した後、抗 F L A G M1 アフィニティーゲル (Ant i - F L A G M1 A f f i n i t y G e l ; C o s m o B i o 社) を 30 μl 添加し、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。

攪拌後、160 × g で 10 分間、遠心分離することにより抗 F L A G M1 アフィニティーゲルを回収し、該ゲルを 50 mmol/l トリスー塩酸 (pH 7.4)、150 mmol/l 塩化ナトリウム、1 mmol/l 塩化カルシウムを含む緩衝液 1 ml で 2 回洗浄した。

洗浄後、該ゲルに 50 mmol/l トリスー塩酸 (pH 7.4)、150 mmol/l 塩化ナトリウム、2 mmol/l E D T A を含む緩衝液 80 μl を添加し、4℃で 30 分間処理することにより、ゲルに吸着したタンパク質を溶出した。その後、160 × g で 10 分間遠心分離することにより上清を取得した。該ゲルに再度 50 mmol/l トリスー塩酸 (pH 7.4)、150 mmol/l 塩化ナトリウム、2 mmol/l E D T A を含む緩衝液 80 μl を添加し、4℃で 10 分間処理した後、160 × g で 10 分間遠心分離することにより上清を取得した。その後、上記の操作を再度行い、合計 3 回溶出操作を行った。該溶出液には、最終濃度が 4 mmol/l になるように 1 mol/l 塩化カルシウムを添加した。

20

このようにして調製した溶出液の 15 μl を用いて S D S - P A G E を行った後、クーマジ・ブリリアント・ブルーを用いて染色を行った (図 13)。

30

p V L 1 3 9 3 - F 2 G 4 由来の組換えウィルスを感染させた S f 2 1 の培養上清から調製した溶出液を使用した際には、43~48 kD のブロードなバンドが確認された。一方、ベクターである p V L 1 3 9 3 由来の組換えウィルスを感染させた S f 2 1 の培養上清から調製した溶出液を使用した際には、該バンドは検出されなかった。

以上の結果より、F L A G ペプチド融合型 G 4 ポリペプチドが培養上清中に分泌生産され、抗 F L A G M1 アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

(4) F L A G ペプチド融合型 G 4 ポリペプチドの β 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記 (3) で調製した溶出液 15 μl を用いて、昆虫細胞で分泌生産させた F L A G ペプチド融合型 G 4 ポリペプチドの β 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は上記実施例 8 の方法を用いた。その結果、p V L 1 3 9 3 - F 2 G 4 を導入した昆虫細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には、β 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、12.1%であった。

40

溶出前のレジンをを用いた場合も β 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、21.0%であった。この結果は、レジんに酵素を吸着した状態でも、糖鎖合成が可能なことを示している。

一方、ベクターである p V L 1 3 9 3 を導入した昆虫細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には活性は検出されなかった。

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させた F L A G ペプチド融合型 G 4 ポリペプチドは

50

β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 4) を FLAG ペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能なこと、また生産された融合タンパク質は抗 FLAG M1 アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることを示している。また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

以上の結果から、Namalwa KJM-1 細胞で生産させた場合に比較して、昆虫細胞で生産させた場合は、生産量が高いことが明らかになった。

実施例 11 分泌型 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (分泌型 G 4) の基質特異性の検討

上記実施例 10 で分泌生産した FLAG ペプチド融合型 G 4 ポリペプチドを用いて、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 4) の基質特異性の検討を行った。 10

(1) アミノピリジル化オリゴ糖を基質とした解析

活性測定法は、上記実施例 8 で示した方法を用いた。具体的には、30 μ l のアッセイ溶液 [200 mmol/l MOPS (pH 7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA 社)、20 mmol/l MnCl₂、50 μ mol/l ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記溶出液 15 μ l] 中で 37℃、14.5 時間反応後、生産物を HPLC により検出した。基質としては、LNnT、ラクトー N-テトラオース (Lactose, Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc; 以下 LNT と略記する)、ラクトー N-フコペンタオース II (Lactose, Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc; 以下 LNFP-II と略記する)、ラクトー N-フコペンタオース III (Lactose, Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc; 以下 LNFP-III と略記する)、ラクトー N-フコペンタオース V (Lactose, Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc; 以下 LNFP-V と略記する)、およびラクトー N-ダイフコヘキサオース II (Lactose, Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc; 以下 LNDFH-II と略記する) [いずれも Oxford Glycosystems 社製] を、アミノピリジンで蛍光標識したものを使用した。基質の蛍光標識は、常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って行った。 20 30

それぞれの基質について、UDP-GlcNAc (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPLC で解析し UDP-GlcNAc を含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で 5 分間処理後、10,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離して上清を取得し、その一部 (5 μ l) を HPLC に供した。

HPLC は、TSK-gel ODS-80Ts カラム (4.6 $\times$ 300 mm; 東ソー) を使用し、溶出液として 0.02 mol/l 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) を用い、溶出温度 50℃、流速 0.5 ml/分の条件で行った。

生成物の検出・定量は、蛍光スペクトルフォトメーター FP-920 (日本分光) を用いて行った (励起波長 320 nm、放射波長 400 nm)。 40

LNnT を基質とした時の活性を 100% とした時の相対活性を第 1 表に示した。LNnT を基質とした時の基質の生産物への転換効率は 12.9% であった。 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 4) は、LNnT に加えて、LNT や LNFP-V も良い基質とすることが判明した。既知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、LNnT は良い基質とするが、LNT はほとんど基質としないことが知られている [J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 406 (1999)]。従って、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 4) は、既知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。 50

大腸癌組織や大腸癌細胞株においては、dimeric Lewis a糖鎖抗原〔Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc〕を有する癌関連糖鎖が発現することが知られており、例えばGal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-3 Glc-Cerという構造を有する糖脂質が存在することが明らかになっている〔J. Biol. Chem., 266, 8439-8446 (1991)〕。β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) は、Gal β 1-3 GlcNAc構造の末端のガラクトース残基にも効率よくN-アセチルグルコサミンを転移できることから、上記dimeric Lewis a糖鎖の骨格糖鎖の合成には、既知のβ 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素ではなく、β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) が関与していると考えられる。下記の実施例13の(3)で詳細に述べるように、G4転写物は、大腸癌細胞株で高発現している。

第1表

アミノピリジル化オリゴ糖を基質としたβ 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNFP-III	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	4.7
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	84.5
LNFP-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNFP-V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	65.1
LNDFH-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	0

(2) 無標識オリゴ糖を基質とした解析

糖転移酵素反応は以下のようにして行った。40 μ lのアッセイ溶液〔50 mmol/l MOPS (pH 7.5)、5 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、5 mmol/l MnCl₂、10 mmol/l糖鎖基質、上記溶出液10 μ l〕中で37℃、16時間反応した。次いで、100℃で5分間処理後、10,000×gで20分間遠心分離して上清を取得し、その一部をHPAE/PAD (High Performance Anion Pulsed Amperometric Detection; DIONEX社)を用いて解析した。具体的方法は常法〔Anal. Biochem., 189, 151 (1990)、J. Biol. Chem., 273, 433 (1998)〕に準じて行った。

基質としては、以下の無標識のオリゴ糖を用いた：ラクトース (Lactose, Gal β 1-4Glc)、N-アセチルラクトサミン (N-Acetyl lactosamine, Gal β 1-4GlcNAc；以下LacNAcと略記することがある)、LNnT、LNT、ラクト-N-ネオヘキサース (Lacto-N-neohexaose, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc；以下LNnHと略記する)。

それぞれの基質について、UDP-GlcNAc (糖供与体)を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPAE/PADを用いて解析、UDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。生成物の同定は、スタンダード糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。スタンダード糖鎖としては、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを使用した。

LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第2表に示した。

LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は1.7%であった。β 1, 3-N

ーアセチルグルコサミン転移酵素 (G4) は、LNnTに加えて、LNT、LNnHやGal β 1-4Glcも良い基質とすることが判明した。一方、Gal β 1-4GlcNAcは基質としなかった。既知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、Gal β 1-4GlcもGal β 1-4GlcNAcも良い基質とされている〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 406 (1999)〕。従って、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) は、既知の酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。

第2表

無標識オリゴ糖を基質とした β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) の基質特異性

10

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	114
LNnH	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	45
Lactose	Gal β 1-4Glc	235
LacNAc	Gal β 1-4GlcNAc	0

20

一方、GlcNAcおよびGlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを受容基質として、分泌型G4の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を測定した結果、活性は検出されなかった。

糖転移酵素反応は以下のようにして行った。40 μ lのアッセイ溶液〔50mmol/l MOPS (pH7.5)、5mmol/l UDP-Gal (SIGMA社)、5mmol/l MnCl₂、10mmol/l 糖鎖基質、上記溶出液10 μ l〕中で37℃、16時間反応した。次いで、100℃で5分間処理後、10,000 $\times$ gで20分間遠心分離して上清を取得し、その一部をHPAE/PAD (High Performance Anion Pulsed Amperometric Detection; DIONEX社)を用いて解析した。具体的方法は常法〔Anal. Biochem., 189, 151 (1990)、J. Biol. Chem., 273, 433 (1998)〕に準じて行った。

30

実施例12 分泌型 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (分泌型G4)を用いたポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成

実施例10で分泌生産したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドと β 1, 4-ガラクトース転移酵素を用いて、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成を行った。

(1) 2段階反応

LNnTに実施例10で分泌生産したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドを作用させることにより、LNnTの非還元末端のガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンが β 1, 3結合で付加した糖鎖 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)を合成した。次いで、該糖鎖にウシミルクより精製した β 1, 4-ガラクトース転移酵素 (SIGMA社製)を作用させることにより、該糖鎖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基にガラクトースが β 1, 4結合で付加した糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)を合成した。同様にして、LNTを基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを合成した。また、LNFP-V〔Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc〕を基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glcを合成した。具体的な反応は以下のように行った。

40

50

30 μ l の反応溶液〔200 mmol/l MOPS (pH 7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20 mmol/l $MnCl_2$ 、50 μ mol/l ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記溶出液15 μ l〕中で37℃、14.5時間反応した。基質としては、LNnT、LNTまたはLNFP-Vを使用した。実施例11記載の方法と同様にして、生産物の生成をHPLCにより確認後、 β 1,4-ガラクトース転移酵素(20 mU)とUDP-Gal(20 mmol/l)を添加し、37℃、14.5時間反応した。生産物の生成はHPLCにより確認した。

(2) one-pot 反応

LNnTに実施例10で分泌生産したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドとウシミルクより精製した β 1,4-ガラクトース転移酵素(SIGMA社製)を同時に作用させることにより、該糖鎖の非還元末端にN-アセチルラクタサミンが付加した糖鎖(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)を合成した。同様に、LNTを基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを合成した。また、LNFP-V〔Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc〕を基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glcを合成した。具体的な反応は以下のように行った。

30 μ l の反応溶液〔200 mmol/l MOPS (pH 7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20 mmol/l UDP-Gal (SIGMA社)、20 mmol/l $MnCl_2$ 、50 μ mol/l ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記溶出液10 μ l、 β 1,4-ガラクトース転移酵素20 mU〕中で37℃、14.5時間反応した。基質としては、LNnT、LNTまたはLNFP-Vを使用した。生産物の生成はHPLCにより確認した。

実施例13 G3、G4、G7の各遺伝子の転写産物の各種細胞における発現量の検討
G3、G4(G4-2)、G7の各遺伝子の転写産物の定量は、常法〔PCR Protocols, Academic Press(1990)〕に従って半定量的PCR法により行った。また、どの細胞でも同程度発現していると考えられる β -アクチンの転写産物の定量も同時に行い、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。

β -アクチン転写産物の定量は、常法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 2725(1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759〕に従って定量的PCR法により行った。

(1) 各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAの合成

細胞株としては、大腸癌細胞株(WiDR、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1)、肺癌細胞株(QG90、HLC-1、PC9)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、前立腺癌細胞株PC-3、胃癌細胞株KATOIII、T細胞株(Jurkat、CCRF-CEM、HSB-2、PEER、Molt-3、Molt-4、HUT78、HPB-ALL)、B細胞株(Namalwa KJM-1、Daudi、Wa、CCRF-SB、Jiyoye、RPMI1788、RPMI8226、HO328-8、BALL-1、KOPN-K、IM-9)、メラノーマ細胞株WM266-4、顆粒球/単球系細胞株(THP-1、HL-60、U-937)、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MCを用いた。QG90、HPB-ALL、Wa、SW1116およびJurkatは愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。HO328-8は九州大学農学部食糧化学より入手した。KOPN-Kは埼玉中央病院より入手した。KATO IIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。CCRF-SB、RPMI8226は大日本製薬より入手した。BALL-1、PEER、Molt-4、Daudi、IM-9、KY821はJCRCBより入手した。それ以外の細胞は、ATCCより入手した。

phytohemagglutinin-P(PHA-P)および12-O-tetra

decanoylphorbol 13-acetate (TPA) で刺激した Jurkat 細胞の調製は以下のようにして行った。10% FCS を含む RPMI 1640 培地を用いて、 4×10^5 細胞/ml でシードした Jurkat 細胞に、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の PHA-P および $50 \text{ ng}/\text{ml}$ の TPA を添加し、3 時間、12 時間、または 24 時間培養後、細胞を回収した。

また、健康な成人の末梢血よりナイコメッド・ファーマ (Nycomed Pharma) 社製のキットである Polymorphprep TM を用いて多形核白血球と単核球を分離取得した。取得した単核球は常法 [J. Immunol., 130, 706 (1983)] に従ってさらに単球およびリンパ球に分離して取得した。

各細胞の全 RNA は常法 [Biochemistry, 18, 5294 (1977)] に従って調製した。全 RNA から一本鎖 cDNA の合成はキット (SUPERTM Pre amplification System; BRL 社製) を用いて行った。細胞株については $5 \mu\text{g}$ の全 RNA から、血球細胞については、 $1 \mu\text{g}$ の全 RNA から一本鎖 cDNA を合成し、それぞれ水で 50 倍および 10 倍希釈して PCR の鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ (dT) プライマーまたはランダムプライマーを用いた。SK-N-MC、SK-N-SH、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1、Capan-1、Capan-2 に関しては、ランダムプライマーを使用した。それ以外はオリゴ (dT) プライマーを使用した。

また、ヒト各種臓器由来の mRNA (Clontech 社製) から同様にして一本鎖 cDNA を合成した。 $1 \mu\text{g}$ の mRNA から一本鎖 cDNA を合成し、水で 240 倍希釈して PCR の鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ (dT) プライマーを用いた。mRNA としては、以下の 35 種の臓器由来の mRNA を使用した。

1 副腎、2 脳、3 尾状核、4 海馬、5 黒質、6 視床、7 腎、8 膵臓、9 脳下垂体、10 小腸、11 骨髄、12 扁桃腺、13 小脳、14 脳梁、15 胎児脳、16 胎児腎、17 胎児肝臓、18 胎児肺、19 心臓、20 肝臓、21 肺、22 リンパ節、23 乳腺、24 胎盤、25 前立腺、26 唾液腺、27 骨格筋、28 脊髄、29 脾臓、30 胃、31 精巣、32 胸腺、33 甲状腺、34 気管、35 子宮。

(2) 定量的 PCR 用のスタンダードおよび内部コントロールの調製

pBS-G3、pBS-G4-2、pT7B-G7 を、cDNA 部分を切り出す制限酵素で切断して直鎖状 DNA に変換した後、定量用のスタンダードとして用いた。各プラスミドが完全に切断された事を確認後、酵母のトランスファー RNA を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。具体的には、pBS-G3 は Not I と Sal I で、pBS-G4-2 は Not I で、pT7B-G7 は Hinc II と Sma I で切断した。

また、pUC119-ACT および pUC119-ACTd を cDNA 部分を切り出す制限酵素 (Hind III と Asp 718) で切断して直鎖状 DNA に変換した後、それぞれ β -アクトチンの転写産物定量用のスタンダードおよび内部コントロールとして用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平 06-181759]。各プラスミドが完全に切断された事を確認後、酵母のトランスファー RNA を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

(3) PCR 法を用いた G3、G4、G7 の各遺伝子の転写産物の定量

上記 (1) で調製した各種細胞および細胞株由来の一本鎖 cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR 用のプライマーとしては G3 転写物検出用には F-3-5 と R-3-5 を、G4 転写物検出用には F-4-5 と R-4-5 を、G7 転写物検出用には F-7-3a (配列番号 30) と R-7-3a を使用した。また、上記 (2) で作製したスタンダードを鋳型として同様に PCR を行うことにより検量線を作製した。

PCR 反応は、Nippon Gene 社製の Recombinant Taq DNA Polymerase (Gene Taq) と添付の $10 \times$ Gene Taq Universal Buffer および $2.5 \text{ mmol}/\text{l}$ dNTP Mixture を用いて、説明書に従って行った。反応は $20 \mu\text{l}$ で行い、その際、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) を最終濃度が 5% になるように加えた。

Taq DNAポリメラーゼ以外を加えた反応液(19 μ l)をMJ RESEARCH社のサーマル・サイクラー(DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cycler)を用いて、97℃で3分間処理した後、水中で急冷した。次いで、該反応液に5分の1に希釈したTaq DNAポリメラーゼを1 μ lを加えた後、MJ RESEARCH社のサーマル・サイクラーを用いて、94℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で2分間の反応を26~30サイクル行った。該反応液の一部(7 μ l)をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain(Molecular Probes社)で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメージャー(FluorImager SI; Molecular Dynamics社製)で解析することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

10

β -アクチンの転写産物の定量については既報[J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759]と同様に行った。

G3転写産物は、発現量は少ないながら調べた35種全てのヒト臓器で発現していた(図14)。また、ヒトの各種血球細胞株、ならびにヒト抹消血から調製した多型核白血球、単球、リンパ球においても発現がみられた(図15)。

G4転写産物は、(1)に示した35種のヒト臓器の中では、気管、胎盤および胃のみで少量発現していた(図16)。ヒトの各種血球細胞株、ならびにヒト抹消血から調製した多型核白血球およびリンパ球においては発現がみられなかった(図17)。

20

一方、大腸癌細胞株(WiDR、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1)、肺癌細胞株(QG90、HLC-1、PC9)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、および胃癌細胞株KATOIIIにおいては、比較的多量の発現がみられた(図18)。一例として、以下に定量結果を示す。WiDR、QG90、PC-3、HLC-1、PC9、KATOIII、SK-N-MC、SK-N-SH、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1、Capan-1、Capan-2におけるG4転写物の発現量を、 β -アクチン転写物の発現量に対する割合(%)で示した値は、順に0.49、0.29、0.069、0.34、0.35、0.94、0.027、0.0037、0.10、4.6、0.95、0.85、0.67、0.92である。

30

G7転写産物は、(1)に示した35種のヒト臓器の中では、脳、尾状核、海馬、腎、扁桃、小脳、および胎児脳で少量発現していた(図19)。ヒト抹消血から調製した多型核白血球、単球およびリンパ球においてはほとんど発現がみられなかった(図20)。T細胞株においてはJurkatとHPB-ALLでのみ少量の発現が見られ、B細胞株においては発現は見られなかった(図20)。

一方、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MCおよび前立腺癌細胞株PC-3においては比較的多量の発現がみられた。大腸癌細胞株(Colo205、SW1116、LS180)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)においては少量の発現が見られた。以上の結果から、G3、G4、G7の各遺伝子の発現分布は異なることが明らかになった。従って、G3、G4、G7の3種の遺伝子は、いずれも β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をコードしているが、各遺伝子は異なる組織で異なる機能を担っていると考えられる。

40

白血球においては、G3転写物の発現量が多いことから、白血球におけるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成にはG3が関与していることが示唆された。従って、G3転写物やG3ポリペプチドの発現量を調べることにより、炎症の診断ができる可能性がある。また、G3遺伝子の発現を抑制したり、G3ポリペプチドの活性を阻害することにより炎症を抑制できる可能性もある。

また、乳腺においてはG3転写物が発現していることから、人乳中に含まれるLNnTやラLNnTなどのGlcNAc β 1-3Gal構造を有するオリゴ糖の合成には、G3が関与している可能性がある。

50

G 4 転写物に関しては、大腸癌、膵臓癌、胃癌由来の細胞株で発現量が増加していることから、G 4 転写物やG 4 ポリペプチドの発現量を調べることにより、癌の診断ができる可能性がある。また、G 4 遺伝子の発現を抑制したり、G 4 ポリペプチドの活性を阻害することにより、癌細胞の転移を抑制できる可能性もある。

G 7 転写物に関しても、神経芽細胞腫、前立腺癌、大腸癌、膵臓癌由来の細胞株で発現量が増加していることから、G 7 転写物やG 7 ポリペプチドの発現量を調べることにより、癌の診断ができる可能性がある。また、G 7 遺伝子の発現を抑制したり、G 7 ポリペプチドの活性を阻害することにより、癌細胞の転移を抑制できる可能性もある。

また、これまでにクローン化された2種の $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の各種細胞や組織における発現分布は、今回取得した3種の新規 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G 3、G 4、G 7)とは異なることから、今回取得した3種の新規 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、既知の酵素とは異なる機能を有していると考えられる。

実施例 1 4 昆虫細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G 3)の分泌生産

上記実施例 1 0 と同様にして、FLAGペプチド融合型G 3 ポリペプチドの昆虫細胞での分泌発現を行った。

(1) プラスミド pVL1393-F2G3 の造成

G 3 ポリペプチドは、その一次配列から、N末端の9アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。そこで、G 3 ポリペプチドのN末端の9アミノ酸からなる細胞質領域、19アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部(2アミノ酸)を除去し、該除去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAGペプチドを付加することによりG 3 ポリペプチドの分泌発現を試みた。

まず、G 3 ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号1の31番目のセリンから397番目のシステインまで〕をコードするDNA領域をPCRを用いて調製し、pCR-BLUNTベクター(Invitrogen社製)に組み込むことにより、プラスミドpBLUNT-G3を造成した。以下具体的方法を記す。

PCR用のプライマーとして、配列番号31で示されるDNA(以下、G3-1と呼ぶ)および配列番号32で示されるDNA(以下、G3-2と呼ぶ)を合成した。G3-1にはBamHIサイトがG3-2にはNotIサイトが導入されるようにデザインされている。

PCR反応はTakara社製Pyrobest DNA Polymeraseと添付の10×Pyrobest Bufferおよび2.5mmol/l dNTP Mixtureを用いて、説明書に従って行った。DNAサーマルサイクラー(PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler; Takara社製)を用いて、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間の反応を16サイクル行った後、さらに72℃で10分間反応させた。鋳型としては上記実施例2で造成したプラスミドpBS-G3を20ng使用した。該PCRにより、約1.1kbのDNA断片を取得した。該DNA断片をpCR-BLUNTベクターに組み込むことにより、プラスミドpBLUNT-G3を造成した。pBLUNT-G3中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

pBLUNT-G3を制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、G3ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号1の31番目のセリンから397番目のシステインまで〕をコードする1.1kbのBamHI-NotI断片を取得した。pVL1393を制限酵素NotIとBstPIで切断し、6.4kbのNotI-BstPI断片を取得した。実施例10で造成したpVL1393-F2G4を制限酵素BamHIとBstPIで切断し、3.3kbのBamHI-BstPI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、pVL1393-F2G3を造成した。

(2) 組換えウィルスの作製

F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現させるための組換えウィルスの作製を行った。昆虫細胞 S f 9 に、線状バキュロウィルス D N A と上記 (1) で作成したプラスミド p V L 1 3 9 3 - F 2 G 3 をリポフェクション法により導入することにより、組換えバキュロウィルスを作製した。方法は、上記実施例 1 0 に記載の方法を用いた。

(3) F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドの分泌生産と精製

上記 (2) で作製した組換えウィルスを用いて、F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドを昆虫細胞で分泌生産させた。次いで、該ポリペプチドを含有する培養上清から該ポリペプチドを精製した。方法は、上記実施例 1 0 に記載の方法を用いた。

精製サンプルの 1 5 μ l を用いて S D S - P A G E を行った後、クーマジ・ブリリアント・ブルーを用いて染色を行った (図 2 1) 。 p V L 1 3 9 3 - F 2 G 3 由来の組換えウィルスを感染させた S f 2 1 の培養上清から精製したサンプルを使用した際には、5 1 ~ 5 6 k D のバンドが確認された。各バンドの分子量の違いは付加する糖鎖の数や大きさの違いに由来すると考えられる。G 3 ポリペプチドには、N 結合型糖鎖の付加が可能な部位が 5 個所存在している。一方、ベクターである p V L 1 3 9 3 由来の組換えウィルスを感染させた S F 2 1 の培養上清から同様に精製したサンプルを使用した際には、該バンドは検出されなかった。

以上の結果より、F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドが昆虫細胞の培養上清中に分泌生産され、抗 F L A G M 1 アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

(4) F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドの β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記 (3) で調製した精製サンプル 1 5 μ l を用いて、F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドの β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は上記実施例 8 の方法を用いた。その結果、 β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、1 0 0 % であった。一方、ベクターである p V L 1 3 9 3 由来の組換えウィルスを感染させた S F 2 1 の培養上清から同様に精製したサンプルを使用した際には、活性は検出されなかった。

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させた F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドは β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) を F L A G ペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能であり、また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

実施例 1 5 分泌型 β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 (分泌型 G 3) の基質特異性の検討

実施例 1 4 で精製した F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドを用いて、 β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) の基質特異性の検討を行った。

(1) ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした解析

上記実施例 1 1 の (1) で示した方法を用いて、F L A G ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は 3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間行った。

ピリジルアミノ化 L N n T を基質とした時の活性を 1 0 0 % とした時の相対活性を第 3 表に示した。L N n T を基質とした時の基質の生産物への転換効率は 8 2 . 5 % であった。

β 1 , 3 - N - アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、L N n T は良い基質とするが、L N T はほとんど基質としないことが判明した。一方、L N T 中のグルコース残基にフコースが α 1 , 3 結合で付加したオリゴ糖である L N F P - V は、G 3 の比較的よい基質となることが明らかとなった。L N n T 中の非還元末端から 2 番目に存在する G l c N A c 残基にフコースが α 1 , 3 結合で付加したオリゴ糖である L N F P - I I I は、G 3 の基質にならないことも明らかになった。また、L N T 中の非還元末端から 2 番目に存在する G l c N A c 残基にフコースが α 1 , 4 結合で付加したオリゴ糖である L N F P - I I

やL N D F H-I Iは、G 3の基質にならないことも明らかになった。

第1表、第3表および後述の第5表を比較することにより、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、本発明で取得した他の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 4、G 7) とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも判明した。

第3表

ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNFP-III	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	3.7
LNFP-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNFP-V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	30.8
LNDFH-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	0

10

(2) 無標識オリゴ糖を基質とした解析

実施例11の(2)で示した方法を用いて、F L A Gペプチド融合型G 3ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は37℃で2時間行った。

LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第4表に示した。LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は4.6%であった。 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、4糖のLNnTに加えて、2糖のLactose、および6糖のLNnHも良い基質とすることが判明した。以上のことから、G 3はポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を効率よく合成できると考えられる。LNnT、Lactose、LNnHに対する活性と比較すると活性は低いが、G 3はLacNAcおよびLNTも基質とした。既知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、LactoseよりもLacNAcを良い基質とすることが知られている〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 406 (1999)〕。従って、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、既知の酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。一例として、クローン化された β 3GnTの基質特異性 (文献値) を第4表に合わせて示す〔Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 406 (1999)〕。

20

30

第2表、第4表および後述の第6表との比較からも、実施例14の結果同様、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、本発明で取得した他の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 4、G 7) とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも確認された。

第4表

無標識オリゴ糖を基質とした β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) の基質特異性

40

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)	
		G 3	β 3GnT
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100	100
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	27	6
LNnH	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	132	
Lactose	Gal β 1-4Glc	128	67.1
LacNAc	Gal β 1-4GlcNAc	21	95.5

一方、GlcNAcおよびGlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを受容基質として

50

、分泌型G3の $\beta 1$, 3-ガラクトース転移酵素活性を測定した際には、活性は検出されなかった。従って、G3は $\beta 1$, 3-ガラクトース転移酵素活性は有していないことが明らかになった。方法は実施例11の(2)に記載の方法を用いた。

実施例16 分泌型 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(分泌型G3)を用いたポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成

実施例14で精製したFLAGペプチド融合型G3ポリペプチドと $\beta 1$, 4-ガラクトース転移酵素を用いて、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成を行った。

(1) one-pot 反応

上記実施例12の(2)で示した方法を用いて、LNnTに、上記実施例14で精製したFLAGペプチド融合型G3ポリペプチドとウシミルクより精製した $\beta 1$, 4-ガラクトース転移酵素(SIGMA社製)を同時に作用させることにより、LNnTの非還元末端に、N-アセチラクトサミンが付加した糖鎖($\text{Gal } \beta 1-4 \text{ GlcNAc } \beta 1-3 \text{ Gal } \beta 1-4 \text{ GlcNAc } \beta 1-3 \text{ Gal } \beta 1-4 \text{ Glc}$)、およびLNnTの非還元末端にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖($\text{Gal } \beta 1-4 \text{ GlcNAc } \beta 1-3$) $_n$ ($n \geq 2$)が付加した糖鎖を合成した。

具体的な反応は以下のように行った。

30 μl の反応溶液〔200mmol/l MOPS (pH7.5)、20mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社製)、50mmol/l UDP-Gal (SIGMA社製)、20mmol/l MnCl_2 、50 $\mu\text{mol/l}$ プリジルアミノ化糖鎖基質、実施例14で精製したG3ポリペプチド10 μl 、 $\beta 1$, 4-ガラクトース転移酵素20mU〕中で37℃、5時間反応した。基質としては、プリジルアミノ化したLNnTを使用し、生産物の生成はHPLCにより確認した。

方法は、上記実施例11の(1)で示した方法に従った。

その結果、プリジルアミノ化したLNnTの非還元末端に($\text{Gal } \beta 1-4 \text{ GlcNAc } \beta 1-3$) $_n$ ($n=1, 2, 3$ または4)が付加した糖鎖が合成された。従って、G3ポリペプチドと $\beta 1$, 4-ガラクトース転移酵素を用いたone-pot反応により、効率よくポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を合成可能なことが明らかとなった。酵素量、基質量、反応時間を増加させることにより、さらに長いポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成も可能と考えられる。

実施例17 昆虫細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型 $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G7)の分泌生産

実施例10と同様にして、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドの昆虫細胞での分泌発現を行った。

(1) プラスミドpVL1393-F2G7の造成

ポリペプチドG7は、その一次配列から、N末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。そこで、G7ポリペプチドのN末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、20アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部(6アミノ酸)を除去し、該除去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAGペプチドを付加することによりG7ポリペプチドの分泌発現を試みた。

まず、G7ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号4の56番目のアラニンから378番目のアルギニンまで〕をコードするDNA領域をPCRを用いて調製し、pCR-B1untベクターに組み込むことにより、プラスミドpB1unt-G7を造成した。以下具体的方法を記す。

PCR用のプライマーとして、配列番号33で示されるDNA(以下、G7S-1と呼ぶ)および配列番号34で示されるDNA(以下、G7S-2と呼ぶ)を合成した。

G7S-1にはBg1IIサイトがG7S-2にはNotIサイトが導入されるようにデザインされている。

PCR反応はTaKaRa社製Pyrobest DNA Polymeraseと添付

10

20

30

40

50

の10×Pyrobest Bufferおよび2.5mmol/l dNTP Mixtureを用いて、説明書に従って行った。DNAサーマルサイクラー（PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler；TaKaRa社販売）を用いて、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間の反応を16サイクル行った後、さらに72℃で10分間反応させた。鋳型としては上記実施例4で造成したプラスミドpT7B-G7を20ng使用した。該PCRにより、約1.0kbのDNA断片を取得した。該DNA断片をpCR-Bluntベクターに組み込むことにより、プラスミドpBlunt-G7を造成した。pBlunt-G7中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

pBlunt-G7を制限酵素Bgl I IとNot Iで切断することにより、G7ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号4の56番目のアラニンから378番目のアルギニンまで〕をコードする1.0kbのBgl I I-Not I断片を取得した。pVL1393を制限酵素Not IとBst P Iで切断し、6.4kbのNot I-Bst P I断片を取得した。実施例10で造成したpVL1393-F2G4を制限酵素BamH IとBst P Iで切断した、3.3kbのBamH I-Bst P I断片を取得した。上記3断片を結合することにより、pVL1393-F2G7を造成した。

（2）組換えウィルスの作製

FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現させるための組換えウィルスの作製を行った。昆虫細胞Sf9に、線状バキュロウィルスDNAと上記（1）で造成したプラスミドpVL1393-F2G7をリポフェクション法により導入することにより、組換えバキュロウィルスを作製した。方法は、上記実施例10に記載の方法を用いた。

（3）FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドの分泌生産と精製

上記（2）で作製した組換えウィルスを用いて、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドを昆虫細胞で分泌生産させた。次いで、該ポリペプチドを含有する培養上清から該ポリペプチドを精製した。方法は、実施例10に記載の方法を用いた。

精製サンプルの15μlを用いてSDS-PAGEを行った後、クーマジ・ブリリアント・ブルーを用いて染色を行った（図22）。pVL1393-F2G7由来の組換えウィルスを感染させたSf21の培養上清から精製したサンプルを使用した際には、40～42kD付近にG7ポリペプチドと推定されるバンドが確認された。各バンドの分子量の違いは付加する糖鎖の数や大きさの違いに由来すると考えられる。G7ポリペプチドには、N結合型糖鎖の付加が可能な部位が3箇所存在している。

以上の結果より、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドが昆虫細胞の培養上清中に分泌生産され、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

（4）FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドのβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記（3）で調製した精製サンプル15μlを用いて、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドのβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は上記実施例8の方法を用いた。その結果、β1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、2.1%であった。一方、ベクターであるpVL1393由来の組換えウィルスを感染させたSf21の培養上清から同様に精製したサンプルを使用した際には、活性は検出されなかった。

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させたFLAGペプチド融合型G7ポリペプチドはβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、β1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（G7）をFLAGペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能であり、また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

実施例18 分泌型β1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（分泌型G7）の基質特異性の検討

10

20

30

40

50

実施例 17 で精製した F L A G ペプチド融合型 G 7 ポリペプチドを用いて、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) の基質特異性の検討を行った。

(1) ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした解析

実施例 11 の (1) で示した方法を用いて、F L A G ペプチド融合型 G 7 ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は 37℃ で 16 時間行った。

ピリジルアミノ化 L N n T を基質とした時の活性を 100% とした時の相対活性を第 5 表に示した。L N n T を基質とした時の基質の生産物への転換効率は 3.76% であった。

β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) は、非還元末端に I I 型糖鎖 (G a l β 1-4 G l c N A c) を有する L N n T は良い基質とするが、非還元末端に I 型糖鎖 (G a l β 1-3 G l c N A c) を有する L N T や L N F P-V はほとんど基質としないことが判明した。また、L N n T 中の非還元末端から 2 番目に存在する G l c N A c 残基にフコースが α 1, 3 結合で付加したオリゴ糖である L N F P-I I I は、G 7 の基質になりにくいことも明らかになった。L N T 中の非還元末端から 2 番目に存在する G l c N A c 残基にフコースが α 1, 4 結合で付加したオリゴ糖である L N F P-I I や L N D F H-I I は、G 7 の基質にならないことも明らかになった。以上のことから、G 7 は非還元末端に未修飾の I I 型糖鎖を有する糖鎖を良い基質とすると考えられた。

第 1 表、第 3 表および第 5 表を比較することにより、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) は、本発明で取得した他の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3、G 4) とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも判明した。

第 5 表

ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
L N n T	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNFP-III	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	7.4
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	7.6
LNFP-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNFP-V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	8.1
LNDFH-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	0

(2) 無標識オリゴ糖を基質とした解析

上記実施例 11 の (2) で示した方法を用いて、F L A G ペプチド融合型 G 7 ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は 37℃ で 15.5 時間行った。

L N n T を基質とした時の活性を 100% とした時の相対活性を第 6 表に示した。

L N n T を基質とした時の基質の生産物への転換効率は 3.07% であった。 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) は、4 糖の L N n T を最もよい基質とした。

G 7 は 2 糖の L a c t o s e も比較的よい基質としたが、6 糖の L N n H はほとんど基質としなかった。G 7 は 2 糖の L a c N A c も基質としたが、L a c t o s e に比較すると活性は低かった。一方、G 7 は L N T を基質としなかった。

以上のことから、G 7 は 6 糖までのポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成は可能だが、8 糖以上のポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を合成する活性は非常に弱いと考えられた。既知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、L a c t o s e よりも L a c N A c を良い基質とすることが知られている [J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 406 (1999)]。従って、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) は、既知の酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。一例として、クローン化された β 3 G n T の基質特異性 (文献値) を第 6 表に合わせて示す [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 406 (1999)]。

第 2 表、第 4 表および第 6 表を比較することにより、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミ

ン転移酵素（G 3）は、本発明で取得した他のβ 1，3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（G 4、G 7）とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも判明した。

第6表

無標識オリゴ糖を基質としたβ 1，3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（G 7）の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)	
		G 7	β 3 G n T
LNT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100	100
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0	6
LNT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0.05	
Lactose	Gal β 1-4Glc	32.6	67.1
LacNAc	Gal β 1-4GlcNAc	8.5	95.5

一方、G l c N A c および G l c N A c β 1-3 G a l β 1-4 G l c を受容基質として、分泌型 G 7 の β 1，3-ガラクトース転移酵素活性を測定した際には、活性は検出されなかった。従って、G 7 は β 1，3-ガラクトース転移酵素活性は有していないことが明らかになった。方法は実施例 11 の（2）に記載の方法を用いた。

実施例 19 G 3、G 4、G 7 の各遺伝子転写産物の各種癌組織における発現量の検討
各種癌組織と該癌組織周辺の正常組織における、G 3、G 4、G 7 の各遺伝子転写産物の発現量の検討を行った。方法は文献〔International Journal of Cancer, 83, 70 (1999)、Glycobiology, 9, 607 (1999)、Laboratory Investigation, 78, 797 (1998)〕に従った。

（1）各種正常組織および癌組織由来の一本鎖 c D N A の合成
大腸癌（10 例）、胃癌（7 例）、および肺癌（6 例）の患者から、癌組織と癌組織周辺の正常組織を採取した。上記の各組織から、acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 法を用いて全 RNA は調製し、該全 RNA を鋳型として一本鎖 c D N A の合成を行った。キット（SUPERSCRIPT Preamplification System; G I B C O 社製）を用いて、5 μ g の全 RNA から一本鎖 c D N A を合成し、各々水で 50 倍希釈して P C R の鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ（d T）プライマーを用いた。

（2）スタンダードおよび内部コントロールの調製
p B S-G 3、p B S-G 4-2、p T 7 B-G 7 を用いて、スタンダードおよび内部コントロールの造成を行った〔下記（a）～（f）参照〕。
β-アクチン転写産物の定量においては、p U C 119-A C T および p U C 119-A C T d を c D N A 部分を切り出す制限酵素（H i n d I I I と A s p 718）で切断して直鎖状 D N A に変換した後、それぞれスタンダードおよび内部コントロールとして用いた〔J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平 06-181759〕。各プラスミドが完全に切断された事を確認後、酵母のトランスファー RNA を 1 μ g / m l で含む水で段階的に希釈して使用した。

（a）G 3 転写産物定量用スタンダードの調製
p B S-G 3 を制限酵素 B g l I I で切断し、4.5 k b の B g l I I 断片を取得した。該断片を結合することにより、p B S-G 3 S を造成した。p B S-G 3 S を制限酵素 X b a I と A c c I で切断し、G 3 c D N A 部分を直鎖状 D N A としたものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー RNA を 1 μ g / m l で含む水で段階的に希釈して使用した。

（b）G 3 転写産物定量用内部コントロールの調製
上記（a）で造成した p B S-G 3 S において、G 3 c D N A 中の E c o 81 I - P f I M I 間 229 b p を欠失させることにより p B S-G 3 S d を作製した。p B S-G 3 S

を制限酵素 E c o 8 1 I と P f I M I で切断し、4.3 kb の E c o 8 1 I - P f I M I 断片を取得した。該断片を結合することにより、p B S - G 3 S d を造成した。p B S - G 3 S d を制限酵素 X b a I と A c c I で切断し、G 3 c D N A 部分を直鎖状 D N A としたものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー R N A を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

(c) G 4 転写産物定量用スタンダードの調製

実施例 3 で取得した p B S - G 4 - 2 を制限酵素 X b a I と C l a I で切断し、G 4 c D N A 部分を直鎖状 D N A としたものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー R N A を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で

10

(d) G 4 転写産物定量用内部コントロールの調製

実施例 3 で取得した p B S - G 4 - 2 において、G 4 c D N A 中の B s t E I I - P m I I 間 180 bp を欠失させることにより p B S - G 4 - 2 d を作製した。p B S - G 4 - 2 を制限酵素 B s t E I I と P m I I で切断し、4.9 kb の B s t E I I - P m I I 断片を取得した。該断片を結合することにより、p B S - G 4 - 2 d を造成した。p B S - G 4 - 2 d を X b a I と C l a I で切断し、G 4 c D N A 部分を直鎖状 D N A としたものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー R N A を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

(e) G 7 転写産物定量用スタンダードの調製

実施例 4 で取得した p T 7 B - G 7 を制限酵素 T t h 1 1 1 I と N a r I で切断し、G 4 c D N A 部分を直鎖状 D N A としたものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー R N A を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

20

(f) G 7 転写産物定量用内部コントロールの調製

実施例 4 で取得した p T 7 B - G 7 において、G 7 c D N A 中の T t h 1 1 1 I - N a r I I 間 208 bp を欠失させることにより p T 7 B - G 7 d を作製した。p T 7 B - G 7 を制限酵素 T t h 1 1 1 I と N a r I で切断し、4.0 kb の T t h 1 1 1 I - N a r I I 断片を取得した。該断片を結合することにより、p T 7 B - G 7 d を造成した。p T 7 B - G 7 d を H i n c I I と S m a I で切断し、G 7 c D N A 部分を直鎖状 D N A としたものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファー R N A を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

30

(3) 定量的 P C R 法を用いた G 3、G 4、G 7 の各遺伝子の転写産物の定量

(1) で調製した正常組織および癌組織由来の一本鎖 c D N A を鋳型として P C R を行った。P C R 用プライマーとしては、G 3 転写物検出用には C B 4 8 9 (配列番号 35) と C B 4 9 0 (配列番号 36) を、G 4 転写物検出用には C B 4 9 5 (配列番号 37) と C B 5 2 3 (配列番号 38) を、G 7 転写物検出用には C B 4 9 3 (配列番号 39) と C B 5 2 5 (配列番号 40) を使用した。。また、(2) で作製したスタンダードと内部コントロールを鋳型として同様に P C R を行うことにより検量線を作製した。

上記各組織由来の c D N A 10 μl および内部コントロール用プラスミド 10 μl (10 f g) を含む 50 μl の反応溶液 [10 m m o l / l T r i s - H C l (p H 8.3)、50 m m o l / l K C l 1.5 m m o l / l M g C l ₂、0.2 m m o l / l d N T P、0.001 % (w / v) ゼラチン、0.2 $\mu\text{mol} / \text{l}$ 遺伝子特異的プライマー] で、DNA ポリメラーゼ A m p l i T a q G o l d TM (P E R K I N E L M E R 社製) を用いて P C R を行った。

40

P C R は、以下の条件で行った。

G 3 転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル行った。

G 4 転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル行った。

50

G 7 転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、44サイクル行った。

β-アクチン転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、24サイクル行った。

PCR後の溶液のうち10μlを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、写真をNIHイメージシステムによりスキャニングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードおよび内部コントロールの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

細胞由来の一本鎖cDNAのかわりに上記(a)、(c)、(e)で調製したスタンダードを1.25fg、2.5fg、5fg、10fg、20fg、40fg用いてPCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

10

上記G3転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G3転写産物およびG3のスタンダードからは647bpのDNA断片が、G3の内部コントロールからは418bpのDNA断片が増幅する。

上記G4転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G4転写産物およびG4のスタンダードからは498bpのDNA断片が、G4の内部コントロールからは318bpのDNA断片が増幅する。

上記G7転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G7転写産物およびG7のスタンダードからは619bpのDNA断片が、G7の内部コントロールからは411bpのDNA断片が増幅する。

20

上記検量線と各組織由来cDNAでの断片の増幅量から、各組織でのcDNA量を計算し、転写産物量とした。なお、β-アクチンは各組織で普遍的に発現している遺伝子と考えられるため、どの組織においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各組織におけるβ-アクチン転写物の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるため、各遺伝子の発現量を比較する際にはβ-アクチン転写物の発現量も考慮した。

大腸癌患者(10例)の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の量を、β-アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第7表に示した。

30

大腸癌患者の癌組織とその周辺の正常組織では、ほとんどの場合G3およびG4転写物の発現がみられたが、癌組織と正常組織における発現量に相関はみられなかった。一方、G7転写物は癌組織および正常組織いずれにおいてもほとんど発現していなかった。発現量(相対値)が1以下の場合、ほとんど発現していないととらえることができる。

第7表

サンプル名	患者No.	組織	転写産物量		
			G3	G4	G7
10N	10	正常	35	27	0.51
10T	10	癌	5.6	5.1	0.20
11N	11	正常	2.3	5.1	0.17
11T	11	癌	4.4	7.4	0.12
13N	13	正常	7.8	5.3	0.055
13T	13	癌	6.0	0.070	0.01>
15N	15	正常	0.01>	0.01>	0.01>
15T	15	癌	5.4	5.0	0.01>
17N	17	正常	3.9	5.1	0.085
17T	17	癌	4.4	24	1.5
18N	18	正常	6.9	35	0.086
18T	18	癌	3.3	5.6	0.01>
19N	19	正常	7.4	6.3	0.01>
19T	19	癌	3.8	6.4	0.16
22N	22	正常	3.6	4.0	0.01>
22T	22	癌	8.6	5.0	0.01>
23N	23	正常	3.5	4.9	0.01>
23T	23	癌	4.6	5.2	0.057
24N	24	正常	4.9	7.3	0.14
24T	24	癌	3.4	6.2	0.090

胃癌患者（7例）の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第8表に示した。

胃癌患者の癌組織とその周辺の正常組織では、ほとんどの場合G3およびG4転写物の発現がみられたが、癌組織と正常組織における発現量に相関はみられなかった。一方、G7転写物は癌組織および正常組織いずれにおいてもほとんど発現していなかった。

第8表

サンプル名	患者No.	組織	転写産物量		
			G3	G4	G7
MK2N	MK2	正常	56	120	0.01>
MK2T	MK2	癌	8.5	12	0.26
MK4N	MK4	正常	3.2	14	0.067
MK4T	MK4	癌	4.3	4.8	0.038
MK5N	MK5	正常	0.01>	4.5	0.059
MK5T	MK5	癌	4.6	6.0	0.26
MK6N	MK6	正常	6.0	8.0	0.01>
MK6T	MK6	癌	8.6	8.6	0.077
MK7N	MK7	正常	12	12	0.01>
MK7T	MK7	癌	18	17	0.15
MK10N	MK10	正常	7.3	5.5	0.01>
MK10T	MK10	癌	5.8	4.0	0.18
MK12N	MK12	正常	4.8	12	0.01>
MK12T	MK12	癌	17	13	0.01>

肺癌患者（6例）の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第9表に示した。

肺癌患者の癌組織とその周辺の正常組織では、全ての場合でG3転写物の発現がみられたが、癌組織と正常組織における発現量に相関はみられなかった。G7転写物は癌組織および正常組織いずれにおいてもほとんど発現していなかった。G4転写物に関しては、正常組織ではほとんど発現がみられなかったのに対し、6例中5例の癌組織において明らかな発現がみられた。これは、癌化に伴ってG4転写産物が発現することを示唆している。

第9表

サンプル名	患者No.	組織	転写産物量		
			G3	G4	G7
LC11N	LC11	正常	45	0.01>	0.37
LC11T	LC11	癌	4.2	1.5	0.082
LC12N	LC12	正常	7.9	0.01>	0.059
LC12T	LC12	癌	12	3.4	0.14
LC15N	LC15	正常	8.6	0.01>	0.077
LC15T	LC15	癌	16	4.8	0.33
LC20N	LC20	正常	27	0.20	0.25
LC20T	LC20	癌	19	2.9	0.66
LC23N	LC23	正常	3.2	0.01>	0.01>
LC23T	LC23	癌	3.9	0.01>	0.12
LC25N	LC25	正常	17	0.056	0.15
LC25T	LC25	癌	5.3	2.2	0.16

そこで、さらに肺癌患者16例についても同様の解析を行った。上記6例の結果と合せ、肺癌患者(22例)の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の発現量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として第10表に示した。

肺癌の分類ごとに整理して発現量を示した。

肺癌患者(22例)の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物量。 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として示した。

第10表

患者No.	肺癌の分類	G 4 転写産物量	
		正常組織	癌組織
LC2	Adenocarcinoma	0.01>	0.94
LC9	Adenocarcinoma	0.10	2.2
LC11	Adenocarcinoma	0.01>	1.2
LC12	Adenocarcinoma	0.01>	2.3
LC13	Adenocarcinoma	0.01>	9.8
LC15	Adenocarcinoma	0.14	2.9
LC17	Adenocarcinoma	0.21	2.0
LC21	Adenocarcinoma	0.01>	6.4
LC24	Adenocarcinoma	0.01>	0.01>
LC25	Adenocarcinoma	0.01>	1.4
LC26	Adenocarcinoma	0.01>	1.7
LC28	Adenocarcinoma	0.33	2.6
LC8	Adenocarcinoma(mod)	0.01>	5.8
LC14	Adenocarcinoma(mod)	1.0	7.6
LC10	Adenocarcinoma(well)	0.01>	1.5
LC18	Adenocarcinoma(well)	0.01>	2.5
LC3	Squamous cell carcinoma	0.018	0.56
LC6	Squamous cell carcinoma	0.01>	0.21
LC16	Squamous cell carcinoma	0.027	3.4
LC20	Squamous cell carcinoma	0.53	2.6
LC23	Mesothelioma	0.21	0.14
LC27	small cell carcinoma	0.01>	0.11

発現量（相対値）が1以上のものを発現しているとする、正常組織でG 4 転写物が発現していたのは全22例中1例で、この場合の発現量も1と低い。一方、癌組織でG 4 転写物が発現していたのは全22例中17例である。また、正常組織でG 4 転写物の発現がみられた1例（表中のLC14）においても、癌組織での発現量は7.6と、癌化に伴って明らかに増加していた。Adenocarcinomaだけをみると、全15例中14例（図中のLC24以外）においては、癌化に伴いG 4 転写産物の発現量が増加していることがわかる。Squamous cell carcinomaにおいては、4例中2例で癌化とG 4 転写産物の発現量に相関がみられた。

以上の結果は、肺癌（特にAdenocarcinoma）においては、癌化に伴ってG 4 転写産物が発現することを示している。正常組織でG 4 転写物の発現がみられた1例（図中のLC14）においては、正常組織に癌組織が混じっていた可能性も考えられる。G 4 遺伝子は、正常の肺組織でほとんど発現しておらず、癌化に伴ってはじめて発現してくる遺伝子であると考えられる。従って、肺組織におけるG 4 遺伝子やG 4 蛋白質の発現量を調べることにより、肺癌の診断が可能と考えられる。

産業上の利用可能性

本発明は、 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたGlcNAc $\beta 1-3$ Gal構造を有する糖鎖、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたGlcNAc $\beta 1-3$ Gal構造を有する糖鎖、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる物質のスクリーニング法、該DNA

あるいは該抗体を用いた炎症や癌（大腸癌、膵臓癌、胃癌など）の診断法、該DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する $\beta 1$, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる物質を用いた炎症や癌（大腸癌、膵臓癌、胃癌など）の治療法を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号8－G7cDNAの塩基配列

配列番号9－人工配列の説明：合成DNA

配列番号10－人工配列の説明：合成DNA

配列番号11－人工配列の説明：合成DNA

配列番号12－人工配列の説明：合成DNA

10

配列番号13－人工配列の説明：合成DNA

配列番号14－人工配列の説明：合成DNA

配列番号15－人工配列の説明：合成DNA

配列番号16－人工配列の説明：合成DNA

配列番号17－人工配列の説明：FLAGペプチドのアミノ酸配列

配列番号18－人工配列の説明：合成DNA

配列番号19－人工配列の説明：合成DNA

配列番号20－人工配列の説明：合成DNA

配列番号21－人工配列の説明：合成DNA

配列番号22－人工配列の説明：合成DNA

20

配列番号23－人工配列の説明：合成DNA

配列番号24－人工配列の説明：合成DNA

配列番号25－人工配列の説明：合成DNA

配列番号26－人工配列の説明：合成DNA

配列番号27－人工配列の説明：合成DNA

配列番号28－人工配列の説明：合成DNA

配列番号29－人工配列の説明：合成DNA

配列番号30－人工配列の説明：合成DNA

配列番号31－人工配列の説明：合成DNA

配列番号32－人工配列の説明：合成DNA

30

配列番号33－人工配列の説明：合成DNA

配列番号34－人工配列の説明：合成DNA

配列番号35－人工配列の説明：合成DNA

配列番号36－人工配列の説明：合成DNA

配列番号37－人工配列の説明：合成DNA

配列番号38－人工配列の説明：合成DNA

配列番号39－人工配列の説明：合成DNA

配列番号40－人工配列の説明：合成DNA

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel Polypeptides

<130> 11216W01

10

<150> JP 99/183437

<151> 1999-06-29

<150> JP 2000/74757

<151> 2000-03-16

20

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

30

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Val Gly Arg Arg Arg Ile Lys Leu Leu Gly Ile Leu Met Met

40

1

5

10

15

Ala Asn Val Phe Ile Tyr Phe Ile Met Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser

1	5	10	15	
Ala Asn Val Phe Ile Tyr Phe Ile Met Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser				
	20	25	30	
Gln Glu Lys Asn Gly Lys Gly Glu Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe				
	35	40	45	10
Trp Lys Ile Ser Thr Pro Pro Glu Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu				
	50	55	60	
Lys Leu Asn Arg Gln Tyr Asn Pro Ile Leu Ser Met Leu Thr Asn Gln				
	65	70	75	20
Thr Gly Glu Ala Gly Arg Leu Ser Asn Ile Ser His Leu Asn Tyr Cys				
	85	90	95	
Glu Pro Asp Leu Arg Val Thr Ser Val Val Thr Gly Phe Asn Asn Leu				
	100	105	110	30
Pro Asp Arg Phe Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr				
	115	120	125	
Ser Leu Leu Ile Asp Gln Pro Asp Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu				
	130	135	140	40
Leu Leu Ala Ile Lys Ser Leu Thr Pro His Phe Ala Arg Arg Gln Ala				

145	150	155	160	
Ile Arg Glu Ser Trp Gly Gln Glu Ser Asn Ala Gly Asn Gln Thr Val				
	165	170	175	
Val Arg Val Phe Leu Leu Gly Gln Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro				10
	180	185	190	
Asp Leu Ser Asp Met Leu Lys Phe Glu Ser Glu Lys His Gln Asp Ile				
	195	200	205	
Leu Met Trp Asn Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu				20
	210	215	220	
Val Leu Phe Leu Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asp Thr Glu Phe				
225	230	235	240	
Val Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu				30
	245	250	255	
Asn Tyr Leu Asn Ser Leu Ser Lys Thr Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile				
	260	265	270	
Gly Asp Val Ile His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys				40
	275	280	285	
Tyr Tyr Ile Pro Glu Val Val Tyr Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Tyr Ala				

290	295	300	
Gly Gly Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Gly His Leu Ala Leu Arg Leu Tyr			
305	310	315	320
His Ile Thr Asp Gln Val His Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr			10
	325	330	335
Gly Met Cys Leu Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly			
	340	345	350
Phe Arg Thr Phe Asp Ile Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Ile Cys Ser			20
	355	360	365
Tyr Val Asp Leu Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile			
	370	375	380
Asp Ile Trp Ser Gln Leu Gln Ser Ala His Leu Lys Cys			30
385	390	395	
<210> 2			
<211> 372			
<212> PRT			40
<213> Homo sapiens			
<400> 2			

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala

1

5

10

15

Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro

20

25

30

Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala

35

40

45

Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn

50

55

60

Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val

65

70

75

80

Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln

85

90

95

Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val

100

105

110

Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg

115

120

125

Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu

130

135

140

Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn

145 150 155 160

Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp

165 170 175

Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe

180 185 190

Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn

195 200 205

Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu

210 215 220

Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln

225 230 235 240

Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu

245 250 255

Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly

260 265 270

Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His

275 280 285

10

20

30

40

Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu

290

295

300

Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser

305

310

315

320

Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln His Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe

325

330

335

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu

340

345

350

Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln

355

360

365

Thr Gln Ile Tyr

370

<210> 3

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala

1

5

10

15

Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro

20

25

30

Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala

35

40

45

Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn

50

55

60

Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val

65

70

75

80

Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln

85

90

95

Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val

100

105

110

Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg

115

120

125

Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu

130

135

140

Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn

145

150

155

160

10

20

30

40

Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp

165

170

175

Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe

180

185

190

Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn

195

200

205

Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu

210

215

220

Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln

225

230

235

240

Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu

245

250

255

Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly

260

265

270

Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His

275

280

285

Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu

290

295

300

Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser
305 310 315 320

Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe
325 330 335

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu
340 345 350

Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln
355 360 365

Thr Gln Ile Tyr
370

<210> 4

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Pro Pro Gln Pro Ser Ala Ala His Gln Gly Arg Gly Gly Arg
1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Pro Lys Gly Pro Ala Met Leu Cys Arg Leu Cys Trp
20 25 30

Leu Val Ser Tyr Ser Leu Ala Val Leu Leu Leu Gly Cys Leu Leu Phe

35

40

45

Leu Arg Lys Ala Ala Lys Pro Ala Gly Asp Pro Thr Ala His Gln Pro

50

55

60

Phe Trp Ala Pro Pro Thr Pro Arg His Ser Arg Cys Pro Pro Asn His

65

70

75

80

Thr Val Ser Ser Ala Ser Leu Ser Leu Pro Ser Arg His Arg Leu Phe

85

90

95

Leu Thr Tyr Arg His Cys Arg Asn Phe Ser Ile Leu Leu Glu Pro Ser

100

105

110

Gly Cys Ser Lys Asp Thr Phe Leu Leu Leu Ala Ile Lys Ser Gln Pro

115

120

125

Gly His Val Glu Arg Arg Ala Ala Ile Arg Ser Thr Trp Gly Arg Val

130

135

140

Gly Gly Trp Ala Arg Gly Arg Gln Leu Lys Leu Val Phe Leu Leu Gly

145

150

155

160

Val Ala Gly Ser Ala Pro Pro Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Ser Arg

165

170

175

Glu Phe Asp Asp Ile Leu Gln Trp Asp Phe Thr Glu Asp Phe Phe Asn

180

185

190

Leu Thr Leu Lys Glu Leu His Leu Gln Arg Trp Val Val Ala Ala Cys

195

200

205

Pro Gln Ala His Phe Met Leu Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val His

210

215

220

Val Pro Asn Val Leu Glu Phe Leu Asp Gly Trp Asp Pro Ala Gln Asp

225

230

235

240

Leu Leu Val Gly Asp Val Ile Arg Gln Ala Leu Pro Asn Arg Asn Thr

245

250

255

Lys Val Lys Tyr Phe Ile Pro Pro Ser Met Tyr Arg Ala Thr His Tyr

260

265

270

Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Tyr Val Met Ser Arg Ala Thr Val

275

280

285

Arg Arg Leu Gln Ala Ile Met Glu Asp Ala Glu Leu Phe Pro Ile Asp

290

295

300

Asp Val Phe Val Gly Met Cys Leu Arg Arg Leu Gly Leu Ser Pro Met

305

310

315

320

10

20

30

40

His His Ala Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Arg Arg Pro Leu Asp Pro
 325 330 335

Leu Asp Pro Cys Leu Tyr Arg Gly Leu Leu Leu Val His Arg Leu Ser
 340 345 350

Pro Leu Glu Met Trp Thr Met Trp Ala Leu Val Thr Asp Glu Gly Leu
 355 360 365

Lys Cys Ala Ala Gly Pro Ile Pro Gln Arg
 370 375

<210> 5

<211> 1912

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggcgccggca gcgtcagcag cggcaacaag tgccggagta gcagagccaa gccggagcag 60

tccctgccgc cgacaccgcc gggccgcccg tccggggcgc cgcgcattga gcgtgagctg 120

cggcggtcgc cgggctgagc cgcgcggagc gccgggacgt ggatgtggcc gcgatctccc 180

gcccttgccc ccgccccgcc gagctggagc tgctcccgga caagatatga gaa atg 236

Met

1

agt gtt gga cgt cga aga ata aag ttg ttg ggt atc ctg atg atg gca 284

Ser Val Gly Arg Arg Arg Ile Lys Leu Leu Gly Ile Leu Met Met Ala

5

10

15

aat gtc ttc att tat ttt att atg gaa gtc tcc aaa agc agt agc caa 332

Asn Val Phe Ile Tyr Phe Ile Met Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser Gln

20

25

30

10

gaa aaa aat gga aaa ggg gaa gta ata ata ccc aaa gag aag ttc tgg 380

Glu Lys Asn Gly Lys Gly Glu Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe Trp

35

40

45

aag ata tct acc cct ccc gag gca tac tgg aac cga gag caa gag aag 428

Lys Ile Ser Thr Pro Pro Glu Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu Lys

50

55

60

65

20

ctg aac cgg cag tac aac ccc atc ctg agc atg ctg acc aac cag acg 476

Leu Asn Arg Gln Tyr Asn Pro Ile Leu Ser Met Leu Thr Asn Gln Thr

70

75

80

30

ggg gag gcg ggc agg ctc tcc aat ata agc cat ctg aac tac tgc gaa 524

Gly Glu Ala Gly Arg Leu Ser Asn Ile Ser His Leu Asn Tyr Cys Glu

85

90

95

cct gac ctg agg gtc acg tcg gtg gtt acg ggt ttt aac aac ttg ccg 572

Pro Asp Leu Arg Val Thr Ser Val Val Thr Gly Phe Asn Asn Leu Pro

40

100	105	110	
gac aga ttt aaa gac ttt ctg ctg tat ttg aga tgc cgc aat tat tca			620
Asp Arg Phe Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr Ser			
115	120	125	
ctg ctt ata gat cag ccg gat aag tgt gca aag aaa cct ttc ttg ttg			668
Leu Leu Ile Asp Gln Pro Asp Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu Leu			
130	135	140	145
ctg gcg att aag tcc ctc act cca cat ttt gcc aga agg caa gca atc			716
Leu Ala Ile Lys Ser Leu Thr Pro His Phe Ala Arg Arg Gln Ala Ile			
	150	155	160
cgg gaa tcc tgg ggc caa gaa agc aac gca ggg aac caa acg gtg gtg			764
Arg Glu Ser Trp Gly Gln Glu Ser Asn Ala Gly Asn Gln Thr Val Val			
165	170	175	
cga gtc ttc ctg ctg ggc cag aca ccc cca gag gac aac cac ccc gac			812
Arg Val Phe Leu Leu Gly Gln Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro Asp			
180	185	190	
ctt tca gat atg ctg aaa ttt gag agt gag aag cac caa gac att ctt			860
Leu Ser Asp Met Leu Lys Phe Glu Ser Glu Lys His Gln Asp Ile Leu			
195	200	205	
atg tgg aac tac aga gac act ttc ttc aac ttg tct ctg aag gaa gtg			908

10

20

30

40

Met Trp Asn Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu Val

210 215 220 225

ctg ttt ctc agg tgg gta agt act tcc tgc cca gac act gag ttt gtt 956

Leu Phe Leu Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asp Thr Glu Phe Val

230 235 240

10

ttc aag ggc gat gac gat gtt ttt gtg aac acc cat cac atc ctg aat 1004

Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu Asn

245 250 255

tac ttg aat agt tta tcc aag acc aaa gcc aaa gat ctc ttc ata ggt 1052

Tyr Leu Asn Ser Leu Ser Lys Thr Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile Gly

260 265 270

20

gat gtg atc cac aat gct gga cct cat cgg gat aag aag ctg aag tac 1100

Asp Val Ile His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys Tyr

275 280 285

tac atc cca gaa gtt gtt tac tct ggc ctc tac cca ccc tat gca ggg 1148

Tyr Ile Pro Glu Val Val Tyr Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly

290 295 300 305

30

gga ggg ggg ttc ctc tac tcc ggc cac ctg gcc ctg agg ctg tac cat 1196

Gly Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Gly His Leu Ala Leu Arg Leu Tyr His

310 315 320

atc act gac cag gtc cat ctc tac ccc att gat gac gtt tat act gga 1244

Ile Thr Asp Gln Val His Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr Gly

325

330

335

atg tgc ctt cag aaa ctc ggc ctc gtt cca gag aaa cac aaa ggc ttc 1292

Met Cys Leu Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly Phe

340

345

350

10

agg aca ttt gat atc gag gag aaa aac aaa aat aac atc tgc tcc tat 1340

Arg Thr Phe Asp Ile Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Ile Cys Ser Tyr

355

360

365

gta gat ctg atg tta gta cat agt aga aaa cct caa gag atg att gat 1388

Val Asp Leu Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile Asp

370

375

380

385

20

att tgg tct cag ttg cag agt gct cat tta aaa tgc taaaatagat 1434

Ile Trp Ser Gln Leu Gln Ser Ala His Leu Lys Cys

390

395

30

acaaactcaa ttttgcatag aaaggtgtat ttggaatagt tcccatgttg tgttctcaca 1494

ttagagtaat ttctatatta aacctgaaa attgccttta tgagtatac ccatttgagg 1554

gcctctaaac ccttcaattt ggtactcacg tgaagaggga aagcggaaga tggtaatttt 1614

tttttatgga tgatatggca ggatgattgg ttctgatctt accggctagt ggatcattttt 1674

40

aaaaaacttg taccctctta tctgaaatec tgtttctgga atttgccat ttttaagtga 1734

tttgtttgcc ctcttctata atattcctac tteccataat aatgactga ttatttgta 1794

ttcaggtatt tataaaccta ttggtacaa agactttgtt aaactttatc cagtggtttt 1854

cgtgaaatgg aattatgttt atttttatgg gatttggga aattttaaat tgtctaga 1912

10

<210> 6

<211> 2205

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

20

ggccaggaac ccgcaaggcg ctgcttggtc atctccagcc acggggagct cattccctag 60

cagcgggcca gacccaagga gccgccagg aggtcctca ggccgacccc agaccctggc 120

tgccagg atg aag tat ctc egg cac egg egg ccc aat gcc acc ctc att 170

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile

30

1

5

10

ctg gcc atc ggc get ttc acc ctc ctc ctc ttc agt ctg cta gtg tca 218

Leu Ala Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser

15

20

25

30

cca ccc acc tgc aag gtc cag gag cag cca ccg gcg atc ccc gag gcc 266

Pro Pro Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala

35

40

45

ctg gcc tgg ccc act cca ccc acc cgc cca gcc ccg gcc ccg tgc cat 314

Leu Ala Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His

50

55

60

10

gcc aac acc tct atg gtc acc cac ccg gac ttc gcc acg cag ccg cag 362

Ala Asn Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln

65

70

75

20

cac gtt cag aac ttc etc ctg tac aga cac tgc cgc cac ttt ccc ctg 410

His Val Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu

80

85

90

ctg cag gac gtg ccc ccc tct aag tgc gcg cag ccg gtc ttc ctg ctg 458

Leu Gln Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu

95

100

105

110

30

ctg gtg atc aag tcc tcc cct agc aac tat gtg cgc cgc gag ctg ctg 506

Leu Val Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu

115

120

125

40

cgg cgc acg tgg ggc cgc gag cgc aag gta cgg ggt ttg cag ctg cgc 554

Arg Arg Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg

130

135

140

ctc ctc ttc ctg gtg ggc aca gcc tcc aac ccg cac gag gcc cgc aag 602

Leu Leu Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys

145

150

155

gtc aac cgg ctg ctg gag ctg gag gca cag act cac gga gac atc ctg 650

Val Asn Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu

160

165

170

10

cag tgg gac ttc cac gac tcc ttc ttc aac ctc acg ctc aag cag gtc 698

Gln Trp Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val

175

180

185

190

20

ctg ttc tta cag tgg cag gag aca agg tgc gcc aac gcc agc ttc gtg 746

Leu Phe Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val

195

200

205

ctc aac ggg gat gat gac gtc ttt gca cac aca gac aac atg gtc ttc 794

Leu Asn Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe

210

215

220

30

tac ctg cag gac cat gac cct ggc cgc cac ctc ttc gtg ggg caa ctg 842

Tyr Leu Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu

225

230

235

40

atc caa aac gtg ggc ccc atc cgg gct ttt tgg agc aag tac tat gtg 890

Ile Gln Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val

240	245	250		
cca gag gtg gtg act cag aat gag cgg tac cca ccc tat tgt ggg ggt	938			
Pro Glu Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly				
255	260	265	270	
ggt ggc ttc ttg ctg tcc cgc ttc acg gcc gct gcc ctg cgc cgt gct	986			10
Gly Gly Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala				
275	280	285		
gcc cat gtc ttg gac atc ttc ccc att gat gat gtc ttc ctg ggt atg	1034			
Ala His Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met				
290	295	300		20
tgt ctg gag ctt gag gga ctg aag cct gcc tcc cac agc ggc atc cgc	1082			
Cys Leu Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg				
305	310	315		
acg tct ggc gtg cgg gct cca teg caa cac ctg tcc tcc ttt gac ccc	1130			
Thr Ser Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln His Leu Ser Ser Phe Asp Pro				30
320	325	330		
tgc ttc tac cga gac ctg ctg ctg gtg cac cgc ttc cta cct tat gag	1178			
Cys Phe Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu				
335	340	345	350	
atg ctg ctc atg tgg gat gcg ctg aac cag ccc aac ctc acc tgc ggc	1226			40

Met Leu Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly

355

360

365

aat cag aca cag atc tac tgagtcagca tcagggtccc cagcctctgg 1274

Asn Gln Thr Gln Ile Tyr

370

10

gctcctgttt ccagaggaag gggcgacacc ttcctcccag gaagctgaga cctttgtggt 1334

ctgagcataa gggagtgcc a ggaagggtt gaggtttgat gagtgaatat tctggctggc 1394

gaactcctac acatccttca aaacccacct ggtactgttc cagcatcttc cctggatggc 1454

tggaggaact ccagaaaata tgcattctt ttttgtggct gctaattgca gaagtgcctg 1514

20

tgctagagtt ccaactgtgg atgcatcctt cccgtttgag tcaaagtctt acttccctgc 1574

tctcacctac tcacagacgg gatgctaagc agtgcacctg cagtggttta atggcagata 1634

agctccgtct gcagttccag gccagccaga aactcctgtg tccacataga gctgacgtga 1694

30

gaaatatctt tcagcccagg agagaggggt cctgatctta accctttcct gggctctcaga 1754

caactcagaa ggttgggggg ataccagaga ggtgggtggaa taggaccgcc cctccttac 1814

ttgtgggate aaatgctgta atggtggagg tgtgggcaga ggaggaggc aagtgtcttt 1874

gaaagttgtg agagctcaga gtttctgggg tectcattag gagccccat ccctgtgttc 1934

cccaagaatt cagagaacag cactggggct ggaatgatct ttaatgggcc caaggccaac 1994

aggcatatgc ctcaactactg cctggagaag ggagagattc aggtcctcca gcagcctccc 2054

tcaccagta tgttttacag attacggggg gaccgggtga gccagtgacc ccctgcagcc 2114

10

cccagcttca ggcctcagtg tctgccagtc aagcttcaca ggcatgtga tggggcagcc 2174

ttggggaata taaaattttg tgaagacttg g 2205

<210> 7

<211> 2180

20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgcgagctga gaggagcagg tagaggggca gaggcgggac tgcgtcttg gggagccgcc 60

caggagctc ctcagccga cccagaccc tggctggcca gg atg aag tat ctc 114

30

Met Lys Tyr Leu

1

cgg cac cgg cgg ccc aat gcc acc ctc att ctg gcc atc ggc get ttc 162

Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala Ile Gly Ala Phe

5

10

15

20

40

acc ctc ctc ctc ttc agt ctg cta gtg tca cca ccc acc tgc aag gtc 210

Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro Thr Cys Lys Val

25

30

35

cag gag cag cca ccg gcg atc ccc gag gcc ctg gcc tgg ccc act cca 258

Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala Trp Pro Thr Pro

40

45

50

10

ccc acc cgc cca gcc ccg gcc ccg tgc cat gcc aac acc tct atg gtc 306

Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn Thr Ser Met Val

55

60

65

20

acc cac ccg gac ttc gcc acg cag ccg cag cac gtt cag aac ttc ctc 354

Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val Gln Asn Phe Leu

70

75

80

ctg tac aga cac tgc cgc cac ttt ccc ctg ctg cag gac gtg ccc ccc 402

Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln Asp Val Pro Pro

85

90

95

100

30

tct aag tgc gcg cag ccg gtc ttc ctg ctg ctg gtg atc aag tcc tcc 450

Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val Ile Lys Ser Ser

105

110

115

40

cct agc aac tat gtg cgc cgc gag ctg ctg cgg cgc acg tgg ggc cgc 498

Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg Thr Trp Gly Arg

120

125

130

gag cgc aag gta cgg ggt ttg cag ctg cgc ctc ctc ttc ctg gtg ggc 546

Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu Phe Leu Val Gly

135

140

145

aca gcc tcc aac ccg cac gag gcc cgc aag gtc aac cgg ctg ctg gag 594

Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn Arg Leu Leu Glu

150

155

160

10

ctg gag gca cag act cac gga gac atc ctg cag tgg gac ttc cac gac 642

Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp Asp Phe His Asp

165

170

175

180

20

tcc ttc ttc aac ctc acg ctc aag cag gtc ctg ttc tta cag tgg cag 690

Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe Leu Gln Trp Gln

185

190

195

gag aca agg tgc gcc aac gcc agc ttc gtg ctc aac ggg gat gat gac 738

Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn Gly Asp Asp Asp

200

205

210

30

gtc ttt gca cac aca gac aac atg gtc ttc tac ctg cag gac cat gac 786

Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu Gln Asp His Asp

215

220

225

40

cct ggc cgc cac ctc ttc gtg ggg caa ctg atc caa aac gtg ggc ccc 834

Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln Asn Val Gly Pro

230

235

240

atc cgg gct ttt tgg agc aag tac tat gtg cca gag gtg gtg act cag 882

Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu Val Val Thr Gln

245

250

255

260

10

aat gag cgg tac cca ccc tat tgt ggg ggt ggt ggc ttc ttg ctg tcc 930

Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Phe Leu Leu Ser

265

270

275

cgc ttc acg gcc gct gcc ctg cgc cgt gct gcc cat gtc ttg gac atc 978

Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His Val Leu Asp Ile

280

285

290

20

ttc ccc att gat gat gtc ttc ctg ggt atg tgt ctg gag ctt gag gga 1026

Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Leu Glu Gly

295

300

305

ctg aag cct gcc tcc cac agc ggc atc cgc acg tct ggc gtg cgg gct 1074

Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser Gly Val Arg Ala

310

315

320

30

cca tcg caa cgc ctg tcc tcc ttt gac ccc tgc ttc tac cga gac ctg 1122

Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe Tyr Arg Asp Leu

325

330

335

340

ctg ctg gtg cac cgc ttc cta cct tat gag atg ctg ctc atg tgg gat 1170
 Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu Leu Met Trp Asp
 345 350 355

gcg ctg aac cag ccc aac ctc acc tgc ggc aat cag aca cag atc tac 1218
 Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln Thr Gln Ile Tyr
 360 365 370

tgagtcagca tcagggtccc cagcctctgg gctcctgttt ccataggaag gggcgacacc 1278

ttctctccag gaagctgaga cttttgtggt ctgagcataa gggagtgccca gggaaggttt 1338

gaggtttgat gagtgaatat tctggctggc gaactcctac acatccttca aaacccacct 1398

ggtactgttc cagcatcttc cctggatggc tggaggaact ccagaaaata tccatcttct 1458

ttttgtggct gctaattggca gaagtgcctg tgctagagtt ccaactgtgg atgcatccgt 1518

cccgtttgag tcaaagtctt acttccctgc tctcacctac tcacagacgg gatgctaagc 1578

agtgcacctg cagtggttta atggcagata agtccgtct gcagttccag gccagccaga 1638

aactcctgtg tccacataga gctgacgtga gaaatatctt tcagcccagg agagaggggt 1698

cctgatctta accctttcct gggctcaga caactcagaa ggttgggggg ataccagaga 1758

ggtggtggaa taggaccgcc cctccttac ttgtgggata aaatgctgta atggtggagg 1818

10

20

30

40

tgtgggcaga ggagggaggc aagtgtcctt tgaaagttgt gagagctcag agtttctggg 1878

gtctcatta ggagccccc tccctgtgtt cccaagaat tcagagaaca gcaactggggc 1938

tggaatgac tttaatgggc ccaaggccaa caggcataatg cctcactact gcctggagaa 1998

gggagagatt caggtectcc agcagcctcc ctcaccagat atgttttaca gattacgggg 2058

10

ggaccgggtg agccagtac cccctgtagc cccagcttc aggcctcagt gtctgccagt 2118

caagcttcac aggcattgtg atggggcagc cttggggaat ataaaatttt gtgaagactt 2178

gg 2180

20

<210> 8

<211> 1296

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

30

cacagcctga gactcatctc gcttegaccc egcgccgcc gccgccgcc ggcacctga 60

gcacggagac agtctccagc tgcggttc atg ctt cct ccc cag cct tct gca 112

Met Leu Pro Pro Gln Pro Ser Ala

1

gcc cac cag gga agg ggc ggt agg agt ggc ctt tta cca aag gga ccg 160

Ala His Gln Gly Arg Gly Gly Arg Ser Gly Leu Leu Pro Lys Gly Pro

10

15

20

gcg atg ctc tgc agg ctg tgc tgg ctg gtc tcg tac agc ttg gct gtg 208

Ala Met Leu Cys Arg Leu Cys Trp Leu Val Ser Tyr Ser Leu Ala Val

10

25

30

35

40

ctg ttg ctc ggc tgc ctg ctc ttc ctg agg aag gcg gcc aag ccc gca 256

Leu Leu Leu Gly Cys Leu Leu Phe Leu Arg Lys Ala Ala Lys Pro Ala

45

50

55

20

gga gac ccc acg gcc cac cag cct ttc tgg gct ccc cca aca ccc cgt 304

Gly Asp Pro Thr Ala His Gln Pro Phe Trp Ala Pro Pro Thr Pro Arg

60

65

70

cac agc egg tgt cca ccc aac cac aca gtg tet agc gcc tet ctg tcc 352

His Ser Arg Cys Pro Pro Asn His Thr Val Ser Ser Ala Ser Leu Ser

30

75

80

85

ctg cct agc cgt cac cgt ctc ttc ttg acc tat cgt cac tgc cga aat 400

Leu Pro Ser Arg His Arg Leu Phe Leu Thr Tyr Arg His Cys Arg Asn

90

95

100

40

ttc tet atc ttg ctg gag cct tca ggc tgt tcc aag gat acc ttc ttg 448

Phe Ser Ile Leu Leu Glu Pro Ser Gly Cys Ser Lys Asp Thr Phe Leu

105	110	115	120	
ctc ctg gcc atc aag tca cag cct ggt cac gtg gag cga cgt gcg gct	496			
Leu Leu Ala Ile Lys Ser Gln Pro Gly His Val Glu Arg Arg Ala Ala				
125	130	135		
atc cgc agc acg tgg ggc agg gtg ggg gga tgg gct agg ggc cgg cag	544			10
Ile Arg Ser Thr Trp Gly Arg Val Gly Gly Trp Ala Arg Gly Arg Gln				
140	145	150		
ctg aag ctg gtg ttc ctc cta ggg gtg gca gga tcc gct ccc cca gcc	592			
Leu Lys Leu Val Phe Leu Leu Gly Val Ala Gly Ser Ala Pro Pro Ala				20
155	160	165		
cag ctg ctg gcc tat gag agt agg gag ttt gat gac atc ctc cag tgg	640			
Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Ser Arg Glu Phe Asp Asp Ile Leu Gln Trp				
170	175	180		
gac ttc act gag gac ttc ttc aac ctg acg ctc aag gag ctg cac ctg	688			30
Asp Phe Thr Glu Asp Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Leu His Leu				
185	190	195	200	
cag cgc tgg gtg gtg gct gcc tgc ccc cag gcc cat ttc atg cta aag	736			
Gln Arg Trp Val Val Ala Ala Cys Pro Gln Ala His Phe Met Leu Lys				40
205	210	215		
gga gat gac gat gtc ttt gtc cac gtc ccc aac gtg tta gag ttc ctg	784			

Gly Asp Asp Asp Val Phe Val His Val Pro Asn Val Leu Glu Phe Leu

220

225

230

gat ggc tgg gac cca gcc cag gac ctc ctg gtg gga gat gtc atc cgc 832

Asp Gly Trp Asp Pro Ala Gln Asp Leu Leu Val Gly Asp Val Ile Arg

235

240

245

10

caa gcc ctg ccc aac agg aac act aag gtc aaa tac ttc atc cca ccc 880

Gln Ala Leu Pro Asn Arg Asn Thr Lys Val Lys Tyr Phe Ile Pro Pro

250

255

260

tca atg tac agg gcc acc cac tac cca ccc tat gct ggt ggg gga gga 928

Ser Met Tyr Arg Ala Thr His Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly

265

270

275

280

20

tat gtc atg tcc aga gcc aca gtg cgg cgc ctc cag gct atc atg gaa 976

Tyr Val Met Ser Arg Ala Thr Val Arg Arg Leu Gln Ala Ile Met Glu

285

290

295

gat gct gaa ctc ttc ccc att gat gat gtc ttt gtg ggt atg tgc ctg 1024

Asp Ala Glu Leu Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Val Gly Met Cys Leu

300

305

310

30

agg agg ctg ggg ctg agc cct atg cac cat gct ggc ttc aag aca ttt 1072

Arg Arg Leu Gly Leu Ser Pro Met His His Ala Gly Phe Lys Thr Phe

315

320

325

gga atc egg egg ccc ctg gac ccc tta gac ccc tgc ctg tat agg ggg 1120

Gly Ile Arg Arg Pro Leu Asp Pro Leu Asp Pro Cys Leu Tyr Arg Gly

330

335

340

ctc ctg ctg gtt cac cgc ctc agc ccc ctc gag atg tgg acc atg tgg 1168

Leu Leu Leu Val His Arg Leu Ser Pro Leu Glu Met Trp Thr Met Trp

345

350

355

360

10

gca ctg gtg aca gat gag ggg ctc aag tgt gca gct ggc ccc ata ccc 1216

Ala Leu Val Thr Asp Glu Gly Leu Lys Cys Ala Ala Gly Pro Ile Pro

365

370

375

cag cgc tgaagggtgg gttgggcaac agcctgagag tggactcagt gttgattetc 1272

Gln Arg

20

tatcgtgatg cgaaattgat gcct

1296

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

40

cggacagat ttaaagactt tctgc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

gtagaggcca gagtaaaca cttct

25

20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

cgtggggcaa ctgatccaaa acg

23

40

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

acccaggaag acatcatcaa tggg

24

10

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

cacagcctga gactcatctc gct

23

30

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

aggcatcaat ttgcatacac gatag

25

<210> 15

<211> 11

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

ctttagagca c

20

11

<210> 16

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

ctctaaag

8

40

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:commercially
available amino acid sequence

10

<400> 17

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 18

20

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

30

<400> 18

agcttgccgc caccatgcat tttcaagtgc agattttca

39

<210> 19

40

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

gcttcctgct aatcagtgcc tcagtcataa tgtcacgtg 39

10

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

gagattacaa ggacgacgat gacaaggcct acgtag 36

30

<210> 21

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

gaagctgaaa atctgcactt gaaaatgcat ggtggcggca

40

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

atctccacgt gacattatga ctgaggcact gattagcag

39

20

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

gtacctacgt aggccttgtc atcgtegtcc ttgta

35

40

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

cgcggtatcct ccccacggtc cgtggaccag

30

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

atagtttagc ggccgcggaa gggctcagca gcgtcg

36

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

10

20

30

40

<400> 26

cgaggatccg agcagccacc ggcgatccc

29

<210> 27

<211> 41

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 27

20

gtcgctatgc ggccgctcag tagatctgtg tctgattgcc g

41

<210> 28

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 28

gatcatcgcg aga

13

40

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

10

<400> 29

agcttctcgc gat

13

<210> 30

<211> 24

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

30

<400> 30

gcccaacagg aacactaagg tcaa

24

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 31

cacggatcca gccaaagaaaa aaatggaaaa gggga 35

<210> 32

<211> 44 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 32 20

atccgatagc ggccgcttag cattttaaat gagcactctg caac 44

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 33

ataagatctg caggagaccc cacggcccac c 31

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

10

<400> 34

atagttatgc ggccgcctca ggctgttgcc caaccac

38

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 35

gagaagttct ggaagatct tacc

24

30

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 36

ctattcaagt aattcaggat gtga 24

10

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 37

gtgccatgcc aacacctcta tggt 24

<210> 38

30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

40

<400> 38

tctgcaggat agaagaccat gttg 24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 39

gtctctctcttgacctatcgtcact

24

<210> 40

20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

30

<400> 40

agttcagcat cttccatgat agcc

24

【図面の簡単な説明】

第1図：第1図は、G4cDNAの1～477番目までの塩基配列とG4-2cDNAの1～451番目までの塩基配列を比較した図である。

第2図：第2図は、G4cDNAの478～1077番目までの塩基配列とG4-2cDNAの452～1051番目までの塩基配列を比較した図である。

40

第3図：第3図は、G4cDNAの1078～1677番目までの塩基配列とG4-2cDNAの1052～1651番目までの塩基配列を比較した図である。

第4図：第4図は、G4cDNAの1678～2205番目までの塩基配列とG4-2cDNAの1652～2180番目までの塩基配列を比較した図である。

第5図：第5図は、G3、G4、G4-2およびG7ポリペプチド、既知のβ1, 3-ガラクトース転移酵素（β3Gal-T1、β3Gal-T2、β3Gal-T3、β3Gal-T4、β3Gal-T5）、ならびに既知のβ1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（β3GnT）のアミノ酸配列を比較したデンドログラムである。相同性がみられた領域のアミノ酸配列のみを用いて比較している。すなわち、細胞質領域、膜結合領域

50

、および幹領域と思われる部分は除いて比較している。

第6図：第6図は、プラスミド pAMo-G3 の造成工程を示す図である。

第7図：第7図は、プラスミド pAMo-G4 の造成工程を示す図である。

第8図：第8図は、プラスミド pAMo-G4-2 の造成工程を示す図である。

第9図：第9図は、プラスミド pAMo-G7 の造成工程を示す図である。

第10図：第10図は、発現プラスミド (pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2 または pAMo-G7) およびコントロールプラスミド pAMo をそれぞれ Na malwa KJM-1 細胞に導入し、LEA レクチン (太線)、PWM レクチン (太線) または A-PBS (細線) を用いた間接蛍光抗体染色の後、FACS を用いて解析した結果である。

10

第11図：第11図は、プラスミド pAMo-F2-G4 の造成工程を示す図である。

第12図：第12図は、プラスミド pVL1393-F2G4 の造成工程を示す図である。

第13図：第13図は、プラスミド pVL1393-F2G4 由来の組換えウイルスが感染した Sf21 細胞の培養上清から、抗FLAG-M1 アフィニティーゲルを用いて FLAG ペプチド融合分泌型 G4 を精製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果を示した図である (レーン2)。コントロールとして、プラスミド pVL1393 由来の組換えウイルスが感染した Sf21 細胞の培養上清から同様にサンプルを調製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した (レーン1)。矢印は、生産された分泌型 G4 ポリペプチドの位置を示している。

20

第14図：第14図は、PCR 法を用いて、35 種のヒト臓器における G3 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 26 である。矢印は目的の増幅断片 (564 bp) の位置を示している。

第15図：第15図は、PCR 法を用いて、ヒトの各種血球細胞株、ヒト多型核白血球 (PMN)、ヒト単球およびヒトリンパ球における G3 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 28 である。矢印は目的の増幅断片 (564 bp) の位置を示している。

第16図：第16図は、PCR 法を用いて、35 種のヒト臓器における G4 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 26 である。矢印は目的の増幅断片 (202 bp) の位置を示している。

30

第17図：第17図は、PCR 法を用いて、ヒトの各種血球細胞株、ヒト多型核白血球 (PMN)、ヒト単球およびヒトリンパ球における G4 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 28 である。矢印は目的の増幅断片 (202 bp) の位置を示している。PMN およびリンパ球でみられるバンドは目的のバンドではない。

第18図：第18図は、PCR 法を用いて、ヒトの各種癌細胞株における G4 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 27 である。矢印は目的の増幅断片 (202 bp) の位置を示している。

第19図：第19図は、PCR 法を用いて、35 種のヒト臓器における G7 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 26 である。矢印は目的の増幅断片 (456 bp) の位置を示している。

40

第20図：第20図は、PCR 法を用いて、ヒトの各種血球細胞株、ヒト多型核白血球 (PMN)、ヒト単球およびヒトリンパ球における G7 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 28 である。矢印は目的の増幅断片 (456 bp) の位置を示している。

第21図：第21図は、プラスミド pVL1393-F2G3 由来の組換えウイルスが感染した Sf21 細胞の培養上清から、抗FLAG-M1 アフィニティーゲルを用いて FLAG ペプチド融合分泌型 G3 を精製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果を示した図である (レーン2)。コントロールとして、プラスミド pVL1393 由来の組換えウイルスが感染した Sf21 細胞の培養上清から同様にサンプルを調製し

50

、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した（レーン1）。矢印は、生産された分泌型G3ポリペプチドの位置を示している。

第22図：第22図は、プラスミドpVL1393-F2G7由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から、抗FLAG M1アフィニティゲルを用いてFLAGペプチド融合分泌型G7を精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果を示した図である（レーン2）。コントロールとして、プラスミドpVL1393由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から同様にしてサンプルを調製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した（レーン1）。矢印は、生産された分泌型G7ポリペプチドであると予測される位置を示している。

符号の説明

b p :	塩基対 (base pairs)	10
k b :	キロ塩基対 (kilobase pairs)	
G 4 1 8 / K m :	トランスポゾン 5 (Tn 5) 由来 G 4 1 8、カナマイシン耐性遺伝子	
A p :	p B R 3 2 2 由来アンピシリン耐性遺伝子	
T c :	p B R 3 2 2 由来テトラサイクリン耐性遺伝子	
P 1 :	p B R 3 2 2 由来 P 1 プロモーター	
P t k :	ヘルpes・シンプレックス・ウイルス (Herpes simplex virus ; HSV) チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子プロモーター	20
S p . B G :	ラビット β グロビン遺伝子スプライシングシグナル	
A . B G :	ラビット β グロビン遺伝子ポリ A 付加シグナル	
A . S E :	シミアン・ウィルス (simian virus) 4 0 (SV 4 0) 初期遺伝子ポリ A 付加シグナル	
A . A t k :	ヘルpes・シンプレックス・ウイルス (Herpes simplex virus ; HSV) チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子のポリ A 付加シグナル	
P m o :	モロニー・マウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート (long terminal repeat : LTR) プロモーター	30
E B N A - 1 :	エプシュタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) の E B N A - 1 遺伝子	
o r i P :	エプシュタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) の複製開始点	
S :	免疫グロブリン κ のシグナルペプチドをコードする遺伝子部分	
F :	FLAG ペプチドをコードする遺伝子部分	
G 3 :	本発明で取得した β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 3 をコードする DNA (全長または部分長)	
G 4 :	本発明で取得した β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 4 または β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 4-2 をコードする DNA (全長または部分長)	40
G 7 :	本発明で取得した β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 7 をコードする DNA (全長または部分長)	

【図 1】

1st Nucleotide Sequence
File Name : G4 cDNA.
Sequence Size : 2205

2nd Nucleotide Sequence
File Name : G4-2 cDNA
Sequence Size : 2180

```

1' GGCCAGGAACCCGCAAGGCGCTGCTTGTATCTCCAGCCACGGGAGGCTATTCCCTAG
          * * * * *
1"          CGCGAGCTGAGAGGAGCAGGTAGAGGGGACG

61' CAGCGGGCCAG---ACCCAAGGAGCGCGCCAGGAGGCTCCTCAGGCGGACCCAGACOCCT
      * * * * *
32" AGGCGGAGCTGCTGCTCTGGGGAGCCGCCAGGAGGCTCCTCAGGCGGACCCAGACOCCT

118' GGCTGGCCAGGATGAAGTATCTCGGGACCGGGGCCAATGCCACCTCATTCTGGCCA
      * * * * *
92" GGCTGGCCAGGATGAAGTATCTCGGGACCGGGGCCAATGCCACCTCATTCTGGCCA

178' TGGGCGCTTACCCCTCCTCTTCACTGTCTAGTGTACACCCACCTGCAAGGTCC
      * * * * *
152" TGGGCGCTTACCCCTCCTCTTCACTGTCTAGTGTACACCCACCTGCAAGGTCC

238' AGGAGCAGCCACCGGCGATCCCGAGGCGCTGGGCTGGCCACTCCACCCACCGGCCAG
      * * * * *
212" AGGAGCAGCCACCGGCGATCCCGAGGCGCTGGGCTGGCCACTCCACCCACCGGCCAG

298' CCGCGGCGCGCTGCCATGCCAACACCTCTATGGTACCCACCGGACTTGCCACGCAGC
      * * * * *
272" CCGCGGCGCGCTGCCATGCCAACACCTCTATGGTACCCACCGGACTTGCCACGCAGC

358' CGCAGCAGCTTCAGAACTTCTCTGTACAGACTGCCGCACTTCCCTGCTGCAGG
      * * * * *
332" CGCAGCAGCTTCAGAACTTCTCTGTACAGACTGCCGCACTTCCCTGCTGCAGG

418' ACGTGCCCCCTCTAAGTGGCGCAGCGGCTTCTCTGCTGCTGATCAAGTCTCTCC
      * * * * *
392" ACGTGCCCCCTCTAAGTGGCGCAGCGGCTTCTCTGCTGCTGATCAAGTCTCTCC

```

第1図

【図 2】

```

478' CTAGCAACTATGTGCGCGGAGCTGTGCGGCGCAGCTGGGCGCGGAGCGCAAGGTAC
      * * * * *
452" CTAGCAACTATGTGCGCGGAGCTGTGCGGCGCAGCTGGGCGCGGAGCGCAAGGTAC

538' GGGGTTTGAGCTGCGCCTCCTCTTCTGCTGGGCACAGCTCCAACCCGACGAGGCC
      * * * * *
512" GGGGTTTGAGCTGCGCCTCCTCTTCTGCTGGGCACAGCTCCAACCCGACGAGGCC

598' GCAAGGTCAACCGCTGCTGGAGCTGGAGGCACAGACTCAGGAGACATCTCGAGTGGG
      * * * * *
572" GCAAGGTCAACCGCTGCTGGAGCTGGAGGCACAGACTCAGGAGACATCTCGAGTGGG

658' ACTTCAGCAGCTCCTTCTTCAACCTCAGGCTCAAGCAGGTCTGTCTTACAGTGGCAGG
      * * * * *
632" ACTTCAGCAGCTCCTTCTTCAACCTCAGGCTCAAGCAGGTCTGTCTTACAGTGGCAGG

718' AGACAAGGTGGCCAAACCGCAGCTTGTGCTCAACGGGATGATGAGCTCTTGCACACA
      * * * * *
692" AGACAAGGTGGCCAAACCGCAGCTTGTGCTCAACGGGATGATGAGCTCTTGCACACA

778' CAGACAACATGGTCTTCTACCTGACGAGACCATGACCTGGCCGCCACCTCTTCTGGGGC
      * * * * *
752" CAGACAACATGGTCTTCTACCTGACGAGACCATGACCTGGCCGCCACCTCTTCTGGGGC

838' AACTGATCCAAAACGTGGGCCCATCCGGGCTTTTGGAGCAAGTACTATGTGCCAGAGG
      * * * * *
812" AACTGATCCAAAACGTGGGCCCATCCGGGCTTTTGGAGCAAGTACTATGTGCCAGAGG

898' TGGTACTCAGAATGAGCGGTACCCACCTTATTGGGGTGGTGGCTTCTTGTGCTCC
      * * * * *
872" TGGTACTCAGAATGAGCGGTACCCACCTTATTGGGGTGGTGGCTTCTTGTGCTCC

958' GCTTCACGGCGCTGCCCTGCGCGTGTGCCATGTCTGGACATCTTCCCATTTGATG
      * * * * *
932" GCTTCACGGCGCTGCCCTGCGCGTGTGCCATGTCTTGGACATCTTCCCATTTGATG

1018' ATGCTTCTCTGGTATGTGTCTGGAAGCTTGAAGGACTGAAGCTGCCTCCACAGCGGCA
      * * * * *
992" ATGCTTCTCTGGTATGTGTCTGGAAGCTTGAAGGACTGAAGCTGCCTCCACAGCGGCA

```

第2図

【図 3】

```

1078' TCGCAGCTGTGGCTGCGGGCTCCATGGAAACACCTGTCTCTTTGACCCCTGCTTCT
      * * * * *
1052" TCGCAGCTGTGGCTGCGGGCTCCATGGAAACACCTGTCTCTTTGACCCCTGCTTCT

1138' ACGAGACCTGCTGCTGGTGACCGCTTCTACCTTATGAGATGCTGCTATGTGGGATG
      * * * * *
1112" ACGAGACCTGCTGCTGGTGACCGCTTCTACCTTATGAGATGCTGCTATGTGGGATG

1198' CGCTGAACCCGCAACCTCAGCTGCGGCAATCAGACACAGATCTACTGAGTCAGCATCA
      * * * * *
1172" CGCTGAACCCGCAACCTCAGCTGCGGCAATCAGACACAGATCTACTGAGTCAGCATCA

1258' GGGTCCCGAGCCTCTGGGCTCCTGTTTCCAGAGGAAGGGGACACCTTCTCCAGGAA
      * * * * *
1232" GGGTCCCGAGCCTCTGGGCTCCTGTTTCCAGAGGAAGGGGACACCTTCTCCAGGAA

1318' GCTGAGACCTTTTGGTCTGAGCATAAGGAGTGCCAGGGAAGGTTTGAGGTTTGTAGAG
      * * * * *
1292" GCTGAGACCTTTTGGTCTGAGCATAAGGAGTGCCAGGGAAGGTTTGAGGTTTGTAGAG

1378' TGAATATTCTGGCTGGCAACTCTACACATCTTCAAACCCACCTGGTACTGTTCCAG
      * * * * *
1352" TGAATATTCTGGCTGGCAACTCTACACATCTTCAAACCCACCTGGTACTGTTCCAG

1438' CATCTTCCCTGGATGGCTGGAGAACTCCAGAAAATATGCATCTTCTTTTGGGCTGCT
      * * * * *
1412" CATCTTCCCTGGATGGCTGGAGAACTCCAGAAAATATGCATCTTCTTTTGGGCTGCT

1498' AATGGCAGAAAGTGCCTGTCTAGAGTTCCAAGTGGATGCATCCGTCCTGTTGAGTCA
      * * * * *
1472" AATGGCAGAAAGTGCCTGTCTAGAGTTCCAAGTGGATGCATCCGTCCTGTTGAGTCA

1558' AAGTCTTACTTCCCTGCTCTACCTACTCAGACAGGGATGCTAAGCAGTGACCTGCAG
      * * * * *
1532" AAGTCTTACTTCCCTGCTCTACCTACTCAGACAGGGATGCTAAGCAGTGACCTGCAG

1618' TGCTTTAATGGCAGATAAGCTCCGCTGTCAGTTCCAGGCCAGCCAGAACTCCTGTGTC
      * * * * *
1592" TGCTTTAATGGCAGATAAGCTCCGCTGTCAGTTCCAGGCCAGCCAGAACTCCTGTGTC

```

第3図

【図 4】

```

1678' ACATAGAGCTGACGTGAGAAATATCTTTACGCCAGGAGAGAGGGGCTCTGATCTTAACC
      * * * * *
1652" ACATAGAGCTGACGTGAGAAATATCTTTACGCCAGGAGAGAGGGGCTCTGATCTTAACC

1738' CTCTCTGGGCTCAGACAACTCAGAGGTTGGGGGATACCAGAGAGGTTGGGAATAG
      * * * * *
1712" CTCTCTGGGCTCAGACAACTCAGAGGTTGGGGGATACCAGAGAGGTTGGGAATAG

1798' GACCGCCCCCTCTTACTTGTGGGATCAAACTGCTGAATGCTGAGGTGTGGGAGAGGA
      * * * * *
1772" GACCGCCCCCTCTTACTTGTGGGATCAAACTGCTGAATGCTGAGGTGTGGGAGAGGA

1858' GGGAGGCAAGTGT-CTTTGAAAGTTGTGAGAGCTCAGAGTTTCTGGGCTCCTATTAGGA
      * * * * *
1832" GGGAGGCAAGTGTCTTTGAAAGTTGTGAGAGCTCAGAGTTTCTGGGCTCCTATTAGGA

1917' GCGCCCATCCCTGTGTTCCTCAAGAAATTCAGAGAACACACTGGGGCTGGAATGATCTTT
      * * * * *
1892" GCGCCCATCCCTGTGTTCCTCAAGAAATTCAGAGAACACACTGGGGCTGGAATGATCTTT

1977' AATGGGCCCCAAGGCCAACAGGCATATGCCCTCACTACTGCTGGAGAAGGAGAGATTGAG
      * * * * *
1952" AATGGGCCCCAAGGCCAACAGGCATATGCCCTCACTACTGCTGGAGAAGGAGAGATTGAG

2037' GTCTCCAGCAGCTCCTCCTACCCAGATGTTTACAGATTACGGGGGACCGGGTGAGC
      * * * * *
2012" GTCTCCAGCAGCTCCTCCTACCCAGATGTTTACAGATTACGGGGGACCGGGTGAGC

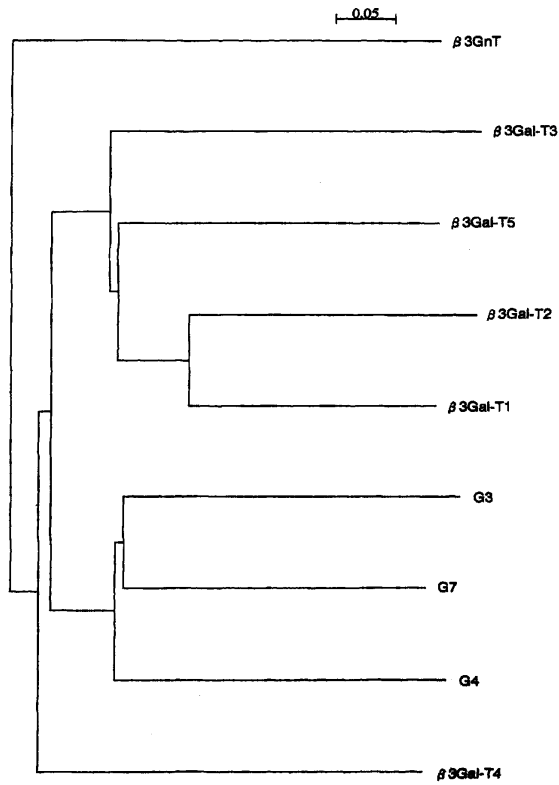
2097' CAGTGACCCCTGCAGCCCCAGCTTACGGCTCAGTGTCTGCCAGTCAAGCTTACAGG
      * * * * *
2072" CAGTGACCCCTGTAGCCCCAGCTTACGGCTCAGTGTCTGCCAGTCAAGCTTACAGG

2157' CATTGTGATGGGCGAGCTTGGGGAATATAAAATTTTGTGAAGACTTGG
      * * * * *
2132" CATTGTGATGGGCGAGCTTGGGGAATATAAAATTTTGTGAAGACTTGG

```

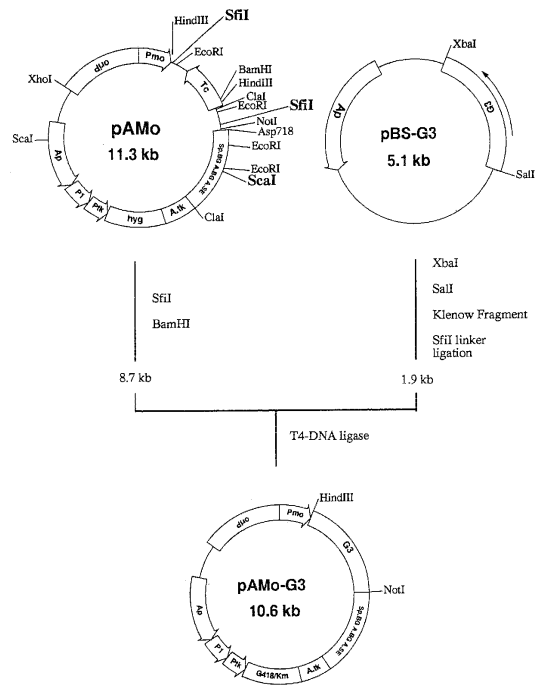
第4図

【図 5】



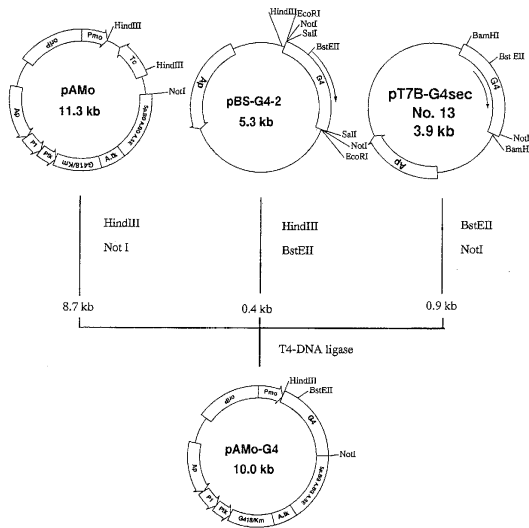
第5図

【図 6】



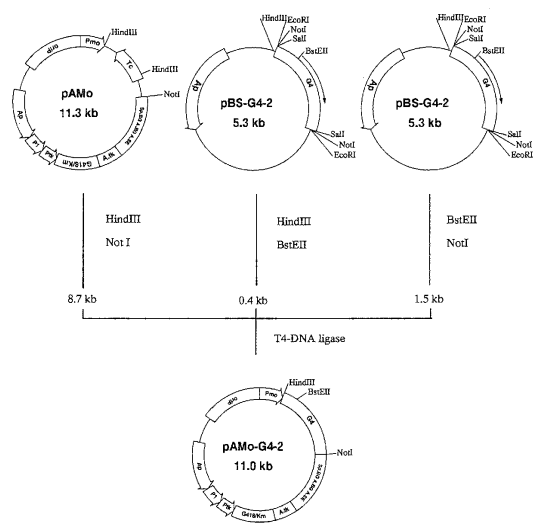
第6図

【図 7】



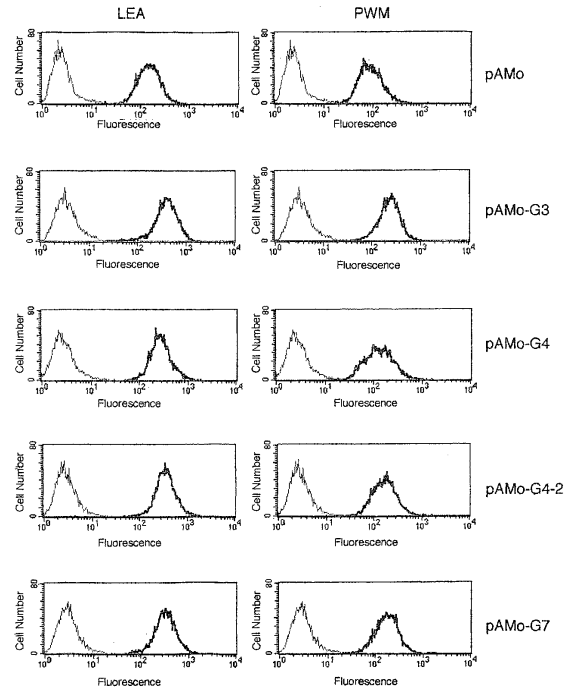
第7図

【図 8】



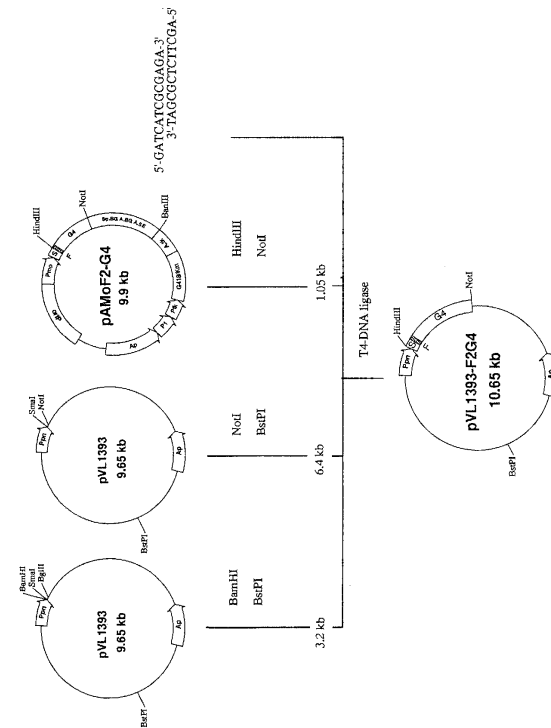
第8図

【図 10】



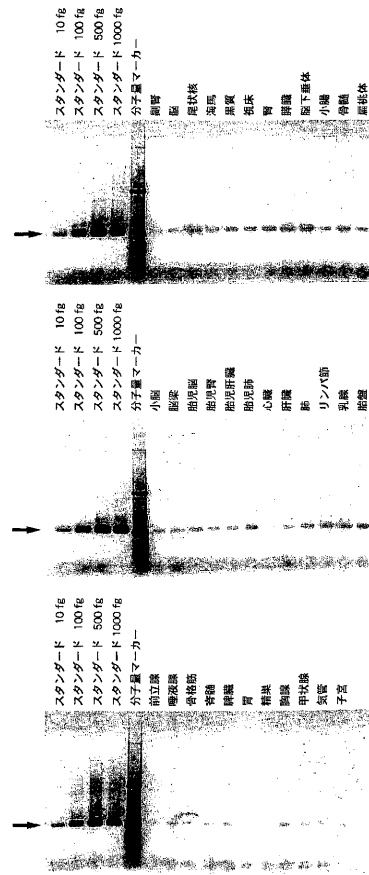
第10図

【图 1 2】



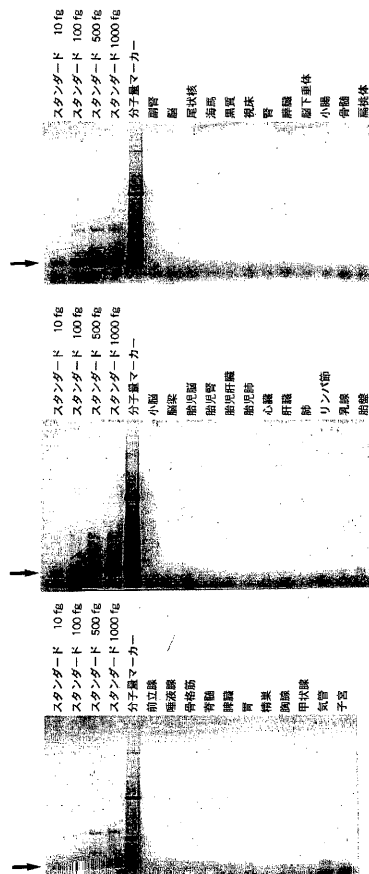
第12図

【図 14】



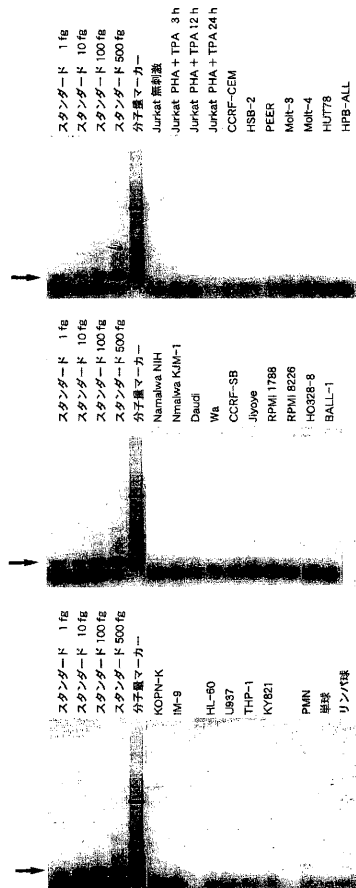
第13図

【図 16】



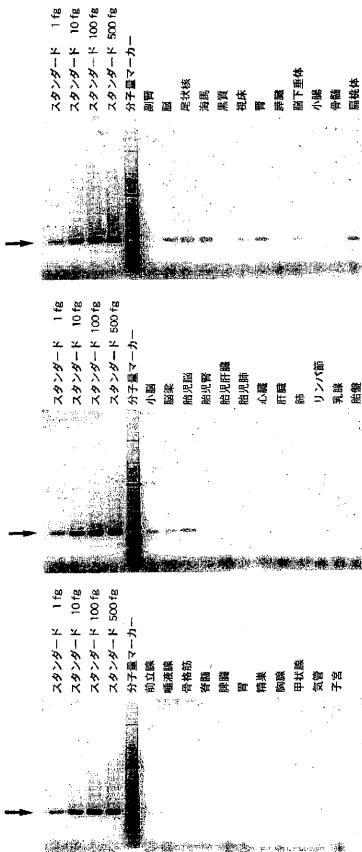
第16図

【図 17】



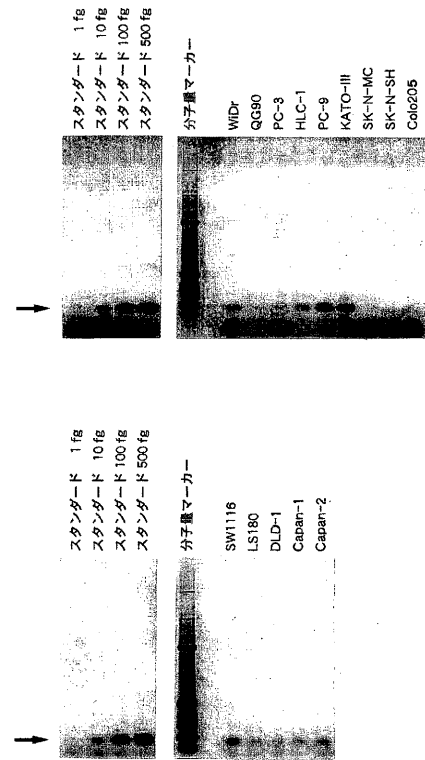
第17図

【図 19】



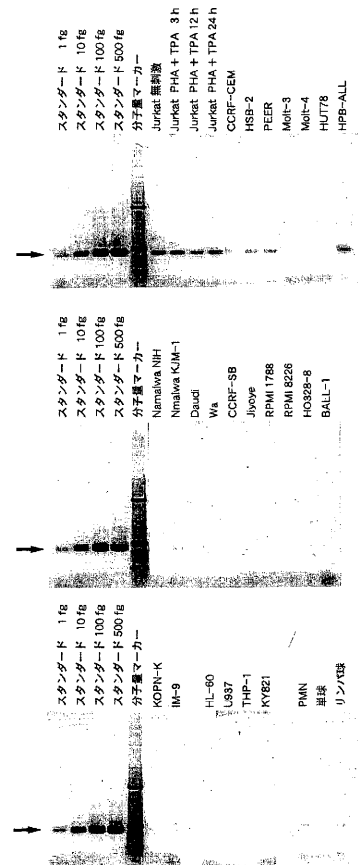
第19図

【図 18】



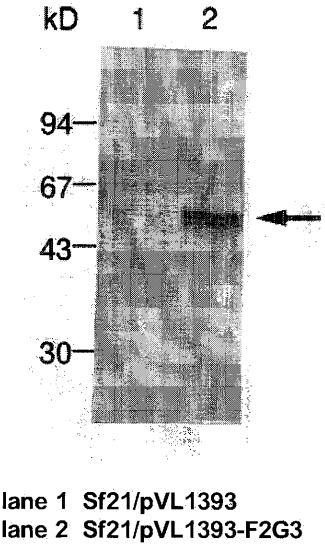
第18図

【図 20】



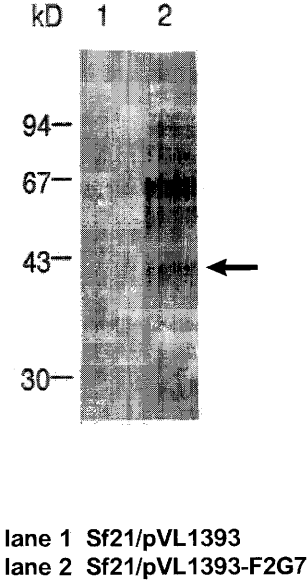
第20図

【図 2 1】



第21図

【図 2 2】



第22図

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00

前置審査

(72)発明者 中川 智
東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
(72)発明者 関根 進
東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 4 4 1 1 2 (WO, A 1)