(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4005629号

(P4005629)

(45)発行日　平成19年11月7日(2007.11.7)　(24)登録日　平成19年8月31日(2007.8.31)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 9/10	(2006.01)	C12N	9/10	
C12N 9/40	(2006.01)	C12N	9/40	
C12R 1/91	(2006.01)	C12N	9/40	
		C12R	1:91	

請求項の数 5　(全 65 頁)

(21)出願番号　特願平6-513423
(86)(22)出願日　平成5年11月30日(1993.11.30)
(65)公表番号　特表平8-503615
(43)公表日　平成8年4月23日(1996.4.23)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/011539
(87)国際公開番号　WO1994/012628
(87)国際公開日　平成6年6月9日(1994.6.9)
審査請求日　平成12年11月15日(2000.11.15)
(31)優先権主張番号　983,451
(32)優先日　平成4年11月30日(1992.11.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ザ　マウント　シナイ　スクール　オブ　メディシン　オブ　ザ　シティー　ユニバーシティー　オブ　ニューヨーク
アメリカ合衆国　１００２９　ニューヨーク州　ニューヨーク，ワン　ガスティブ　レヴィー　プレイス
(74)代理人
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人
弁理士　石井　貞次
(74)代理人
弁理士　早川　康

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的に活性なα－ガラクトシダーゼＡのクローニング及び発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

分泌された生物学的に活性な成熟リソソームタンパク質の生産方法であって、

(a)遺伝子発現を調節するヌクレオチド配列に機能しうる状態で結合されたリソソームタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む形質転換哺乳動物細胞を、該リソソームタンパク質が該哺乳動物細胞によって過剰発現される条件下で培養し、そして、該リソソームタンパク質の凝集物を形成させ、非凝集の生物学的に活性な成熟リソソームタンパク質を該哺乳動物細胞培地に選択的に分泌させ；そして

(b)該生物学的に活性な成熟リソソームタンパク質を該哺乳動物細胞培地から単離することを含む、前記方法。

【請求項２】

前記のタンパク質が生物学的に活性なα－ガラクトシダーゼＡである、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記のタンパク質が生物学的に活性なα－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼである、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記のタンパク質が生物学的に活性な酸スフィンゴミエリナーゼである、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記のα－ガラクトシダーゼＡが、マンノース-６-リン酸部分を含む、請求項２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

1. 序

本発明は、生物学的に活性なヒトα－ガラクトシダーゼ（α－ＧａｌＡ）の製造も関し、発現産物の正確な翻訳後修飾及びプロセシングを提供する真核性発現系内でのα－Ｇａｌ　Ａの遺伝子コード配列のクローニング及び発現を包含する製造に関する。

本発明は、高レベルのα－Ｇａｌ　Ａが哺乳動物発現系内で産生されたという実施例により、ここに実際に明示されている。本発明に従って製造されたα－Ｇａｌ酵素は、ファブリー病の酵素置換療法、糖結合体のα－Ｄ－ガラクトシル残基の加水分解を含む工業的工程、及び赤血球上のＢ型血液型抗原のＯ型血液型抗原への転換を含むがこれらに限定されない種々の目的に用いることができる。

2. 発明の背景

１９７０年代初め、数人の研究者が、４－ＭＵ－及び／又はρ－ＮＰ－α－Ｄ－ガラクトピラノシド中のα－ガラクトシド結合を加水分解するＡ及びＢと呼ばれる２種のα－ガラクトシダーゼアイソザイムの存在を証明した（Kint, 1971, Arch. Int. Physiol. Biochem. 79: 633-644；Beutler & Kuhl, 1972, Amer. J. Hum. Genet. 24: 237-249；Romeoら, 1972, FEBS Lett. 27: 161-166；Wood & Nadler, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 250-255；Hoら, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 256-266；Desnickら, 1973, J. Lab. Clin. Med. 81: 157-171；及びDesnickら, 1989, The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver, C.R. Beaudet, A.L. Sly, W.S. 及びValle, D.編, pp.1751-1796, McGraw Hill, New York）。組織中では、総α－ガラクトシダーゼ（α－Ｇａｌ）活性の約８０～９０％が熱不安定性のミオイノシトール阻害可能α－Ｇａｌ　Ａアイソザイムによるもので、その残りは比較的熱安定性のα－Ｇａｌ　Ｂが占めていた。これら２種の“アイソザイム”は、電気泳動、等電点電気泳動、及びイオン交換クロマトグラフィーにより分離可能であった。ノイラミニダーゼ処理後は、α－Ｇａｌ　Ａ及びＢの電気泳動移動度及びｐＩ値が類似していた（Kint, 1971, Arch. Int. Physiol. Biochem. 79: 633-644）。これは最初にこれら２種の酵素がグリコシル化が異なる同じ遺伝子の産物であることを示すものであった。精製したこの糖タンパク質酵素が、サブユニット分子量（＝４６ｋＤａ）、ホモダイマーの構造、及びアミノ酸組成を含む類似の物性を有したという発見も、それらの構造的関連性を示した（Beutler & Kuhl, 1972, J. Biol. Chem. 247: 7195-7200；Callahanら, 1973, Biochem. Med. 7: 424-431；Deanら, 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm. 77: 1411-1417；Schramら, 1977, Biochem. Biophys. Acta. 482: 138-144；Kusiakら, 1978, J. Biol. Chem. 253: 184-190；Deanら, 1979, J. Biol. Chem. 254: 10001-10005；及びBishopら, 1980, Enzyme Therapyin Genetic Disease: 2, Desnick, R.J. 編, pp. 17-32, Alan R, Liss, Inc., New York）。しかしながら、α－Ｇａｌ　Ａ又はＢに対するポリクローナル抗体が他方の酵素と交叉反応しなかったこと（Beutler & Kuhl, 1972, J. Biol. Chem. 247: 7195-7200；及びSchramら, 1977, Biochem. Biophys. Acta. 482: 138-144）；α－Ｇａｌ　Ａ活性だけがファブリー病のヘミ接合体に不足していたこと（Kint, 1971, Arch. Int. Physiol. Biochem. 79: 633-644；Beutler & Kuhl, 1972, Amer. J. Hum. Genet. 24: 237-249；Romeoら, 1972, FEBS Lett. 27: 161-166；Wood & Nadler, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 250-255；Hoら, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 256-266；Desnickら, 1973, J. Lab. Clin. Med. 81: 157-171；Desnickら, 1989, The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver, C.R. Beaudet, A.L. Sly, W.S. 及びValle, D.編, pp.1751-1796, McGraw Hill, New York；及びBeutler & Kuhl, 1972, J. Biol. Chem. 247: 7195-7200）；及びα－Ｇａｌ　Ａ及びＢの遺伝子が異なる染色体にマッピングされたこと（Desnickら, 1989, The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver, C.R. Beaudet, A.L. Sly, W.S. 及びValle, D.編, pp.1751-1796, McGraw Hill, New York；deGrootら, 1978, Hum. Genet. 44: 305-312）がその後に明らかにされ、これら酵素が遺伝的に別異であることが明確に証明された。

2.1. α－Ｇａｌ　Ａ及びファブリー病

ファブリー病、つまりα－Ｇａｌ　Ａの活性が不足していることから生じるリソソーム蓄積症では、１９６７年にこの酵素欠損症が同定された（Bradyら，1967，N. Eng. J. Med. 276: 1163）ことが、それぞれ１９６９年及び１９７０年におけるα－Ｇａｌ　Ａ置換の最初のin vitro（Dawsonら，1973，Pediat. Res. 7: 694-690m）及びin vivo（Mapesら，1970，Science 169: 987）療法の試行を導いた。これら及びその後の試行（Mapesら，1970，Science 169: 987；Desnickら，1979，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5326；及びBradyら，1973，N. Eng. J. Med. 289: 9）により、この疾患について直接酵素置換の生化学的有効性が証明された。精製した脾性及び血漿性α－Ｇａｌ　Ａを反復注射（１００，０００Ｕ／注射）して、４ヵ月間にわたってヘミ接合体に影響を与えた（Desnickら，1979，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5326）。これら研究の結果により、（ａ）脾型の血漿クリアランスは、血漿型の血漿クリアランスよりも７倍速かった（７０分に対して１０分）；（ｂ）この酵素の脾型に比べて、血漿型は際立って長い時間にわたり（１時間に対して４８時間）２５倍大きな血漿基質の消耗をもたらした；（ｃ）影響を与えた２つのヘミ接合体に対して４ヵ月間にわたって両方の型を６回静脈投与したが免疫応答の形跡がなかったことが証明され；そして（ｄ）蓄積された組織基質が、この酵素の脾型によってではなく血漿型によって消耗後に血行内に可動化したことを示す示唆的証拠が得られた。かくして、この投与酵素は、血行（蓄積の主要域）から基質を減らしただけでなく、おそらくは、前に蓄積されていた基質をその後のクリアランスのために他の貯留槽から血行中に可動化した。これら研究は、反復酵素置換により異常な糖脂質蓄積を取り除くか又は有意に低下させる可能性を示した。

しかしながら、ファブリー病における酵素置換の生化学的及び臨床的有効性は、適切な用量及び長期間の評価に十分なヒト酵素が不足しているために、証明されたことがない。

2.2. α－Ｇａｌ　Ａ酵素

α－Ｇａｌ　Ａヒト酵素は、約１０１，０００Ｄａの分子量を有する。ＳＤＳゲル電気泳動で、それは約４９，０００Ｄａの単一バンドとして移動する。これは、この酵素がホモダイマーであることを示している（Bishop & Desnick，1981，J. Biol. Chem. 256: 1307）。α－Ｇａｌ　Ａは、リン酸化されたエンドグリコシダーゼH感受性オリゴ糖を含有する５０，５００Ｄａ前駆体として合成される。この前駆体は、その合成後３～７日以内に約４６，０００Ｄａの成熟型にプロセスされる。このプロセシングの中間体は特定されていない（Lemanskyら，J. Biol. Chem. 262: 2062）。多くのリソソーム酵素と同じく、α－Ｇａｌ　Ａは、マンノース－６－ホスフェートレセプターを介してリソソームを標的にする。これは、この酵素のムコリピドーシスII細胞内及びNH_4Clで処理した線維芽細胞内での高分泌速度により証明される。

この酵素は、５～１５％のＡｓｎ結合炭水化物を含有することが示された（Ledonneら，1983，，Arch. Biophem.Biophys.224: 186）。この酵素の組織型は、～５２％の高マンノースタイプと４８％の複合体タイプのオリゴ糖を有することが示された。高マンノースタイプは、Bio-gelクロマトグラフィーで$Man_{8-9}GlcNAc$と同時溶出したが、複合体タイプのオリゴ糖は、１４及び１９～３９グルコース単位を含有する２つのカテゴリーのオリゴ糖であった。等電点電気泳動では、精製酵素の供給源（組織型対血漿型）に依存して多くの型の酵素が認められた。しかしながら、ノイラミニダーゼで処理すると単一バンドが認められ（ｐＩ＝５．１）、この不均一性がシアリル化の度合いが異なるためであることを示している（Bishop & Desnick，1981，J. Biol. Chem. 256: 1307）。α－Ｇａｌ　Ａをコードする完全長ｃＤＮＡを発現させる最初の努力は、種々の原核性発現ベクターを用いることを包含するものであった（HantzopoulosとCalhoun，1987，Gene 57: 159；Ioannou，1990，Ph.D. Thesis，City University of New York）。微生物発現が行われたが、無傷大腸菌細胞の酵素的測定法及びメリビオースを炭素源とする増殖により明らかになったところでは、ヒトタンパク質は低レベルで発現されたに過ぎなかったので細菌から精製することができなかった。これら結果は、この組換え酵素が、正常なグリコシル化及び／又は内生の細胞質若しくは周縁質プロテアーゼの欠如のために、不安定であったこと

を示している。

2.3. リソソーム酵素：生合成及び標的化

リソソーム酵素は、粗面小胞体内の膜結合ポリソーム上で合成される。各タンパク質は、疎水性アミノ末端シグナルペプチドを含有するより大きな前駆体として合成される。このペプチドは、シグナル認識粒子、つまり１１Ｓリボヌクレオタンパク質と相互作用し、それによって、小胞体膜を通ってその内腔に至る発生期のタンパク質のベクター輸送を開始する（Ericksonら，1981，J. Biol. Chem. 256: 11224；Ericksonら，1983，Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 275；Rosenfeldら，1982，J. Cell. Biol. 93: 135）。リソソーム酵素は、脂質結合中間体から発生期ポリペプチド中のコンセンサス配列Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／ＴｈｒのＡｓｎ残基への大きな前生成オリゴ糖、つまりグルコース－３、マンノース－９、Ｎ－アセチルグルコサミン－２の総括的転移により、翻訳時にグリコシル化される（Kornfeld，R. & Kornfeld，S.，1985，Annu. Rev. Biochem. 54: 631）。小胞体内では、シグナルペプチドが切り離され、そしてそのオリゴ糖鎖からの３個のグルコース残基と１個のマンノースの切り取りによりこのＡｓｎ結合オリゴ糖のプロセシングが始まる。

それらタンパク質は小胞性輸送によりゴルジ装置に移行し、そこでそれらは種々の翻訳後修飾を受け、そして具体的な仕向け先：リソソーム、分泌、原形質膜へ適切に標的するように選別される。ゴルジ体を通過する間に、分泌及び膜糖タンパク質上のオリゴ糖鎖は、シアル酸含有複合体タイプにプロセスされる。リソソーム酵素上の幾つかのオリゴ糖鎖は類似のプロセシングを受けるが、殆どのものは異なる一連の修飾を受ける。最も重要な修飾は、これら酵素をリソソームに標的させる過程で必須成分として役立つホスホマンノシル残基の獲得である（Kaplanら，1977，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2026）。この認識マーカーは、２種のゴルジ酵素の連続的作用により生成する。まず、Ｎ－アセチルグルコサミニルホスホトランスフェラーゼが、Ｎ－アセチルグルコサミン－１－ホスフェートを、ヌクレオチド糖ウリジンジホスフェート－Ｎ－アセチルグルコサミンからリソソーム酵素上の選択されたマンノース残基へ転移させて、ホスホジエステル中間体を生じさせる（Reitman & Kornfeld，1981，J. Biol. Chem. 256: 4275；Waheedら，1982，J. Biol. Chem. 257: 12322）。次いで、Ｎ－アセチルグルコサミン－１－ホスホジエステル・α－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼがＮ－アセチルグルコサミン残基を除去して、認識シグナル、つまりマンノース－６－ホスフェートを露出させるのである（Varki & Kornfeld，1981，J. Biol. Chem. 256: 9937；Waheedら，1981，J. Biol. Chem. 256: 5717）。

ホスホマンノシル残基を生成させた後、そのリソソーム酵素はゴルジ体内のマンノース－６－ホスフェート（Ｍ－６－Ｐ）レセプターに結合する。このようにして、リソソーム酵素は細胞内に止まって、分泌される運命にあるタンパク質から分離される。次いで、このリガンド－レセプター複合体は、被覆小胞からゴルジ体を出てゆき、プレリソソーム中間準備域へ送られ、そこでその区画の酸性化によりリガンドの解離が起こる（Gonzalez-Noriegaら，1980，J. Cell. Biol. 85: 839）。レセプターはゴルジ体に戻って再利用されるが、リソソーム酵素は分泌小胞内に包まれて一次リソソームを生成する。これらリソソーム酵素の約５～２０％はリソソームへ向かうことなく、役目を果たさずにおそらく分泌される。これら分泌された酵素の一部は、細胞表面上に見出されるＭ－６－Ｐレセプターにより再捕獲されて、内面に吸収されリソソームへと送られ得る（Willinghamら，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6967）。

２種のマンノース－６－ホスフェートレセプターが同定されている。２１５ｋＤａ糖タンパク質が、種々の組織から精製されている（Sahagianら，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，78: 4289；Steiner & Rome，1982，Arch. Biochem. Biophys. 214: 681）。このレセプターの結合は、二価カチオン非依存性である。二価カチオンを必要とする点で、２１５ｋＤａレセプターとは異なる第２のＭ－６－Ｐレセプターも単離されている。従って、このレセプターはカチオン依存性（Ｍ－６－$Ｐ^{CD}$）と呼ばれ、一方、２１５ｋＤａレセプターはカチオン非依存性（Ｍ－６－$Ｐ^{CI}$）と呼ばれる。Ｍ－６－$Ｐ^{CD}$レセプターは、１つのサブユニットの分子量が４６ｋＤａの３つのサブユニットを有するオリゴマーであると

考えられる。

3. 発明の要旨

本発明は、真核宿主細胞発現系内でヒトα－Ｇａｌ Ａコード配列をクローニング及び発現することにより、大量のヒトα－Ｇａｌ Ａを製造することを包含する。ここに記載する真核性発現系、特に哺乳動物宿主細胞発現系が、正確なプロセシングに、例えば、グリコシル化、シアリル化、リン酸化等に、及び活性な酵素が産生されるよう発現産物を選別するのに要求される適切な翻訳時及び翻訳後修飾を提供する。また、容易に精製できるα－ガラクトシダーゼＡ融合タンパク質の発現も記載されている。これら融合タンパク質は、α－ガラクトシダーゼＡ部分をその融合タンパク質から簡単に切り離して回収できるように工学的に作られている。

ここに記載された方法を用いれば、組換えα－Ｇａｌ Ａが工学的に作られた宿主細胞により分泌されるので、それを培地から良好な収率で回収できる。本発明に従って製造されるα－Ｇａｌ Ａは、ファブリー病の治療、Ｂ型血液型のＯ型への転換、又は糖結合体からのα－Ｄ－ガラクトシル残基の加水分解を包含するあらゆる商業的工程を含むがこれらに限定されない種々の目的に用いることができる。

更に、この発明は、正規には細胞内で標的にされるタンパク質を過剰発現させそして組換え哺乳動物細胞系から分泌させることができる方法を記載している。

3.1. 定義

ここで用いる場合、次の用語及び略号は、以下に示した意義を有するものとする。

α－ガラクトシダーゼＡ	α－Ｇａｌ Ａ
α－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼ	α－ＧａｌＮＡｃ
塩基対	ｂｐ
チャイニーズ・ハムスター卵巣	ＣＨＯ
相補的ＤＮＡ	ｃＤＮＡ
分当たりの数	ｃｐｍ
デオキシリボ核酸	ＤＮＡ
ダルベッコ修飾イーグル培地	ＤＭＥＭ
ウシ胎児血清	ＦＣＳ
キロベースペア	ｋｂ
キロダルトン	ｋＤａ
マンノース－６－ホスフェート	Ｍ－６－Ｐ
メトトレキセート	ＭＴＸ
４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ガラクトシド	４－ＭＵ－α－Ｇａｌ
４－メチル－ウンベリフェリル－α－Ｎ－アセチルガラクトサミニド	４－ＭＵ－α－ＧａｌＮＡｃ
マイクログラム	μｇ
マイクロメーター	μｍ
ナノグラム	ｎｇ
ナノメーター	ｎｍ
ヌクレオチド	ｎｔ
ｐ－ニトロフェニル－α－Ｎ－アセチルガラクトサミニド	ｐＮＰ－α－ＧａｌＮＡｃ
ポリアクリルアミドゲル電気泳動	ＰＡＧＥ
ポリメラーゼ連鎖反応	ＰＣＲ
リボ核酸	ＲＮＡ
ドデシル硫酸ナトリウム	ＳＤＳ
ユニット	Ｕ

【図面の簡単な説明】

図１Ａ－１Ｃ：全長ヒトα－Ｇａｌ ｃＤＮＡ配列。ペプチドマイクロシークエンスから

得られたＮ－ターミナル、臭化シアン（ＣＢ）分解、トリプシン（Ｔ）ペプチドアミノ酸配列を下線で示す。ｃＤＮＡから予想される配列との違いを示す。４つの仮想的なＮ－グリコシル化部位を示し、３’終始シグナルに上線を付した。

図１Ｄ－１Ｆ：ヒトα－Ｇａｌ－ＮＡｃ（α－Ｇａｌ　Ｂ）、α－Ｇａｌ、酵母Ｍｅｌ１、及びE.coli　ＭｅｌＡをコードする全長ｃＤＮＡから演繹されるアミノ酸配列のアラインメント。

コロン／同一の残鎖；点／機能的同等なアミノ酸；ボックス／α－ＧａｌＮＡｃ、α－Ｇａｌ、Ｍｅｌ１及び／またはＭｅｌＡにおける同一の残鎖。

ギャップを仮想的なアラインメントに導入した。番号を付した垂直な線はα－Ｇａｌのためのエクソン境界を示す（Bishop, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3903-3907）。

図１Ｇ：α－Ｇａｌ哺乳動物用発現ベクターp91-AGAの構築。全長ｃＤＮＡをプラスミドpcDAG126から切り出し、EcoRIリンカーの付加によってアダプター化し、続いて発現ベクターp91023（B）のEcoRI部位にクローン化した。

図２Ａ－２Ｂ：ＣＯＳ－１細胞におけるヒトα－Ｇａｌの一時発現。p91-AGA構築物を受けた細胞では、トランスフェクション後７２時間で最大活性（U/mg）に達した。プラスミドＤＮＡを受けない細胞も、逆配向にα－ＧａｌｃＤＮＡを持つp91ベクターを受け取った細胞も、Ｇａｌ活性の増加は全く観察されなかった。

図３Ａ－３Ｂ：ＣＨＯ　ＤＧ５．３．による組み換えα－Ｇａｌの分泌への血清の効果。細胞を適当な血清濃度を補ったＤＭＥＭに蒔いた（図３Ａ：細胞を10% FCSを補ったＤＭＥＭに蒔いた。集密となった後（～４日）、培地を適当な血清濃度を補った新鮮なＤＭＥＭに交換した（図３Ｂ）。

図４：中空糸バイオリアクター内での組み換えα－Ｇａｌの高レベル生産。最適な細胞成長とタンパク質分泌のためにこの系によって必要とされるウシ胎児血清の量は約１％まで減少できた。

図５：α－Ｇａｌ精製工程の各段階のＳＤＳ－ＰＡＧＥ。レー１，６　分子量マーカー；レーン２　粗精製培地；レーン３　アフィニティークロマトグラフィー；レーン４　オクチルーセファロースクロマトグラフィー；レーン５　スーパーローズ　６　クロマトグラフィー。

図６：［^{35}S］－メチオニンで標識した、対照ＤＧ４４細胞（レーン１，５）、ＤＧ５細胞（レーン２，６）、ＤＧ５．３細胞（レーン３，７）及びＤＧ１１細胞（レーン４，８）からの全細胞（レーン１～４）及び培地（レーン５～８）。

図7A-7C：組み換えα－Ｇａｌの動力学的性質。人工基質４－ＭＵ－α－Ｄ－ガラクトピラノシドに対するＫｍ（図７Ａ）。組み換えならびにヒト血漿精製酵素の等電点（図７Ｂ）。組み換え酵素の至適ｐＨ（図７Ｃ）。

図8A-8B：ヒトα－Ｇａｌを過剰生産するＣＨＯ　ＤＧ５．３細胞によるＰ－C_{12}ＳＴＨ分解。本基質による迅速な分解がＰ－C_{12}ＳＤＨの蓄積によって観察された。

図９：組み換えα－Ｇａｌによるジスルフィド架橋の獲得。ＣＨＯ　ＤＧ５．３細胞を［^{35}S］－メチオニンで標識し、示された時間追跡した。還元剤の不存在下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥはジスルフィド結合形成による第２構造の形成を示す。

図10：エンドＨ耐性オリゴ糖の獲得によって検出されるゴルジネットワークへの新たに合成されたα－Ｇａｌの到達。

図11：組み換えα－Ｇａｌの分泌率。ＣＨＯ　ＤＧ５．３細胞を［^{35}S］－メチオニンで５分間標識し、冷メチオニンで追跡した。培養培地アリコートを示された時間除去し、抗－α－Ｇａｌポリクローナル抗体で免疫沈降した。

図12：［^{35}S］－メチオニンで１時間（レーン１～３）および２４時間（レーン４）標識した、ＤＧ４４（レーン１；対照）、ＤＧ５（レーン２）、およびＤＧ５．３細胞（レーン３，４）細胞からの培養培地のＳＤＳ－ＰＡＧＥ。

図13：組み換えα－Ｇａｌ上の糖質部分の分析。ＣＨＯ　ＤＧ５．３細胞を、［^{35}S］－メチオニンで24時間標識し、培養培地を集め、組み換え酵素を免疫沈降した。アリコート

をエンドＤ（レーン２）、エンドＨ（レーン３）、エンドＦ（レーン４）、ＰＮＧａｓｅＦ（レーン５）、エンドＤおよびＨ（レーン６）、エンドＨおよびＦ（レーン７）、およびエンドＨ，ＦおよびＰＮＧａｓｅＦ（レーン８）で消化した。未処理サンプル（レーン１，９）。

図14：ＰＮＧａｓｅＦ（レーン３，４）で処理した組み換えα－Ｇａｌの細胞型（レーン１，３）および分泌型（レーン２，４）。対照（レーン１，２）。

図15：組み換えα－Ｇａｌの分泌に対するグルコシル化阻害剤の影響。

図16：ＣＨＯ　ＤＧ４４（レーン２，３）およびＤＧ５．３（レーン１，４）の^{32}P標識。α－Ｇａｌを細胞（レーン１，２）及び培地（レーン２，３）から免疫沈降した。

図17A-17D：組み換えα－ＧａｌのエンドＨ感受性オリゴ糖のＱＡＥ－セファデックスクロマトグラフィー。未処理、希釈ＨＣｌ処理、ノイラミナーゼ処理およびアルカリホスファターゼ処理オリゴ糖。

図18：Ｍ－６－Ｐレセプター上でクロマトグラフした組み換えα－ＧａｌのエンドＨ感受性オリゴ糖。

●　ピーク　－４

○　ピーク　－２

図19：Ｍ－６－Ｐレセプター上での組み換えα－Ｇａｌクロマトグラフィー。［^{35}Ｓ］－メチオニンで24時間標識したＤＧ５．３細胞およびクロマトグラフィーで回収した培地。

●　α－Ｇａｌ活性

□　全放射活性

図20A-20C：Ｍ－６－Ｐレセプター上での組み換えならびにヒトα－Ｇａｌアフィニティークロマトグラフィー。細胞を、NH_4Cl存在下、［^{35}Ｓ］－メチオニンで24時間標識し、培養培地を集めた。ＤＧ５．３分泌物（図２０Ａ）、ＭＳ９１４分泌物（図２０Ｂ）、及び２９３分泌物（図２０Ｃ）。

●　α－Ｇａｌ活性

□　全放射活性

○　溶出に用いたＭ－６－Ｐグラジエント

図21：ファブリー（Fabry）繊維芽細胞による組み換えα－Ｇａｌの取り込み。細胞を示された量のα－Ｇａｌと６時間インキュベートした。

○　α－Ｇａｌの取り込み

●　２ｍＭ　Ｍ－６－Ｐ存在下での取り込み

図22：α－Ｇａｌタンパク質Ａ融合の構築工程。融合は第9.1.節に記載された二つの別々のＰＣＲ反応物内で行った。

図23：タンパク質ＡドメインＥのヌクレオチド配列、コラーゲナーゼ切断配列および３’α－Ｇａｌ配列（23A）。α－Ｇａｌとタンパク質Ａドメインに関連するコラーゲナーゼコンセンサスを示す融合構築物の図解（23B）。

図24A-24B：α２，６－シアル酸酸基（▲－－▲）、及び非α２，６－シアリル化グリコフォーム（●－－●）を含む、組み換えヒト分泌型α－ガラクトシダーゼＡのマウスへの静脈投与後の血漿クリアランスと（上グラフ）、酸フォスファターゼ処理後のこれらのグリコフォームの血漿クリアランスとの比較。各点は、２回の別個の接種からの平均値を示す。$T_{1/2}$値は外挿によって算出した。

図25：マウスへの静脈投与後の組み換えヒト分泌型α－ＧａｌＡの異なった形の組織分布。各点は２回の別個の接種から平均値を示す。

図26：DG5.3-1000Mx CHO細胞は過剰発現したヒトα－ＧａｌＡの結晶構造を含む。単一膜で包まれた液胞（26A）内および小胞内、おそらく拡張したトランス－ゴルジ内（26B; 線，0.15μmおよび0.10μm）で結晶構造を示すDG5.3-1000Mxの細胞の電子顕微鏡写真。

26CおよびＤ：１０ｎｍコロイダル金粒子（それぞれ0.31μm snf 0.19μm）を有するヒトα－ＧａｌＡの免疫電子顕微鏡による局在化。

26E：親dfhr DG44細胞（線，１．１１μm）の電子顕微鏡写真；dfhr DG44細胞内（線，０．５μm）でのゴルジ複合体（アレー）を示す差し込み図。

図27A-27C：精製した分泌α－ＧａｌＡの凝集が酵素濃度及びｐＨ依存的である。
27A: ｐＨの低下に伴うα－ＧａｌＡ（10mg/ml）の濃度。インキュベートした酵素の約12％がトランス－ゴルジネットワーク（ＴＧＮ）の推定されるｐＨであるpH6.0で沈殿したことに留意されたい。
27B: ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）の不存在下、ｐＨ５．０（●）及びｐＨ７．０（□）での分泌α－Ｇａｌの濃度増加に伴う濁度。タンパク質濃度増加に伴う非特異的沈殿に対する対照として、分泌α－ＧａｌＡ（１ｍｇ／ｍｌ）を濃度を増加させつつＢＳＡ（０．１～１０ｍｇ／ｍｌ）とｐＨ５．０で混合した（△）。
27C: ｐＨの低下に伴ってインキュベートした、精製した分泌α－ＧａｌＡ（１０ｍｇ／ｍｌ）およびＢＳＡ（２ｍｇ／ｍｌ）からの上清ならびにペレット画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ。
可溶性および沈殿ＢＳＡの濃度は本質的に変化しないのに対し、α－ＧａｌＡがｐＨを下げると沈殿したことに留意されたい。
図28：ＣＨＯ細胞で過剰発現したヒトα－ＧａｌＡの選択的分泌のための凝集－分泌モデル。ヒトα－ＧａｌＡまたは通常はリソソームを標的とするリソソーム酵素のＣＨＯ細胞内での高レベルな過剰発現は、それらの凝集と、その結果それらのＭ６ＰＲシグナルの接近不能のために、選択的な分泌となる。酵素はＴＧＮに到達するまで通常の翻訳後プロセシングを受ける。これに対し、過剰発現した酵素はタンパク質－タンパク質相互作用を受け、ＴＧＮの低ｐＨのためにより可溶性が小さく、より大きい粒状凝集物を形成する。ＴＧＮは過剰発現酵素で拡がる。そのＭ６Ｐが接近不能の凝集物の殆どがデフォルトによって構成的な分泌経路を介してエキソサイトーシスされるのに対し、幾つかの凝集物と暴露されたＭ６Ｐシグナルを有する可溶性酵素はリソソームに行く。分泌されるように決められた酵素凝集物内のチロシンがスルホトランスフェラーゼに利用されないので、減少した硫酸化が起こりうる。該モデルは通常は特異的オルガネラを標的とする他の過剰発現蛋白の選択的分泌を説明する。

５．発明の詳細な説明

本発明は生物学的に活性なヒトα－Ｇａｌ　Ａの産生に関し、この酵素のヌクレオチドコード配列のクローン化および真核細胞発現系における発現を含む。ここに記述され例証される、精製された生物学的に活性なこの酵素の上首尾な発現と産生は、多くの理由により特に重要である。例えば、α－Ｇａｌ　Ａをコードする全長ｃＤＮＡを種々の原核細胞発現ベクターを用いて発現しようとする過去の努力は、無傷な微生物宿主細胞の酵素アッセイおよび炭素源としてのメリビオースを用いての増殖によって実証されるこの酵素の発現をもたらした。しかし、ヒトα－Ｇａｌ　Ａは低レベルでしか発現されず、また細菌から精製することは不可能であった。これらの結果は、微生物系において発現されるこの組換え酵素が、正常なグリコシル化の欠如および／または内因性の細胞質または細胞周辺プロテアーゼの存在により不安定であったことを示している。
この酵素を真核細胞発現系において発現しようとする努力は、複数の異なる理由により同様に困難であった。α－Ｇａｌ　Ａは「ハウスキーピング」遺伝子によってコードされるリソソーム酵素である。一次翻訳産物は高度に修飾されてプロセシングされ、適切な宿主細胞によってのみ適切に実施されるシグナル配列の開裂、グリコシル化、リン酸化およびシアリル化（sialylation）を含む完全な一連のイベントを要求する。さらに、発現産物はリソソーム（これは細胞内に留まる）に行くことが決まっているため、ここに記述する方法が適切にプロセシングされた、生物学的に活性な分子の分泌を可能とすることは非常に驚くべきことである。
本発明によって産生される生物学的に活性なα－Ｇａｌ　Ａは様々な用途を有する。おそらくその最も重要なものは、リソソーム蓄積障害、つまりファブリー病のための酵素置換療法における使用であろう。例えば、ファブリー病由来の培養繊維芽細胞における代謝欠陥は、外因性α－Ｇａｌ　Ａを培養培地に添加することによってin vitroで矯正できる。さらに、限定されたヒトにおける試みが、循環基質を血管堆積に先立って減少させるという酵素置換の生化学的効果を実証した。しかし、本発明の以前には、生物学的に活性な、

精製された大量のヒトα－Ｇａｌ　Ａは、置換療法に使用できるほど産生されなかったのである。本発明によって産生されるα－Ｇａｌ　Ａは、多数の工業的用途を有する。例えば、ここに記述されるα－Ｄ－ガラクトシル糖結合体の加水分解、血液型ＢのＯ型への変換、等をふくむ任意の過程に使用される。

本発明は、単に記述の目的上、以下の節に分けられる。すなわち、（ａ）α－Ｇａｌ　Ａのコード配列；（ｂ）上記酵素をコードする配列の発現を引き出す発現ベクターの構築；（Ｃ）生物学的に活性な遺伝子産物の発現のため、転写一次産物を複製し、翻訳し、かつ適切にプロセシングすることのできる適切な宿主細胞のトランスフェクション；および（ｄ）そのようにして産生された酵素の同定および／または精製である。生物学的に活性な酵素を高レベルで発現する形質転換細胞が一旦同定されると、本発明の実施は生物学的に活性なα－Ｇａｌ　Ａの産生および精製におけるそのクローンの発展および使用を含む。

本発明は、ここにα－Ｇａｌ　ＡのｃＤＮＡが哺乳動物発現系においてクローン化され発現される例を使って説明される。生物学的活性を損なうことなく収量を改善し、精製を単純化するｃＤＮＡコード配列の修飾もまた記述される。さらに、容易に精製することができる上記酵素のシアリル化およびアシアリル化グリコフォームの発現を可能とする宿主細胞の修飾も記述される。本発明はα－Ｇａｌ　Ａについて記述されているが、ここに説明される方法および修飾は、他の分泌タンパク質、および特に他のリソソーム酵素（α－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼおよび酸スフィンゴミエリナーゼを含むがこれらだけに限定されない）の発現に類似的に適用できる。

本発明の様々な側面が、以下の分節およびその後の実施例において詳細に記述される。

５．１．α－Ｇａｌ　Ａコード配列

α－Ｇａｌ　Ａのヌクレオチドコード配列および推定されるアミノ酸配列を図１Ａ－１Ｃに示す。このヌクレオチド配列、またはその断片あるいは機能的等価物は、適切な宿主細胞において上記酵素産物、またはその機能的に活性なペプチドあるいは機能的等価物の発現を引き出す組換えＤＮＡ分子を作成するのに使用できる。

ヌクレオチドコード配列の縮重により、図１Ａ－１Ｃに示されたものと実質的に同一なアミノ酸配列をコードする他のＤＮＡ配列を、本発明の実施においてα－Ｇａｌ　Ａのクローン化および発現のために使用することができる。このような変更は、同一の、または機能的に等価な遺伝子産物をコードする配列をもたらす、異なるヌクレオチド残基の除去、付加または置換を含む。遺伝子産物が、表に現れない変化に帰着し、したがって生物学的に活性な産物を産生する、アミノ酸の欠失、付加または置換を配列内に有することもありうる。このようなアミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、両親媒性の類似、および／または結晶学的データに基づいてなされる。例えば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリジンおよびアルギニンが含まれ、類似した親水性値をもつ非荷電の極性ヘッド基（polar head group）を有するアミノ酸には以下のものが含まれる：すなわち、ロイシン、イソロイシン、バリン；グリシン、アラニン；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；フェニルアラニン、チロシンである。

α－Ｇａｌ　Ａのコード配列は、この酵素のコード配列を含有する遺伝子操作された微生物または細胞系（例えば、ここに記述されている寄託された具体例）より好都合に得ることができる。または、これら酵素のゲノム配列またはｃＤＮＡコード配列を、ヒトゲノムまたはｃＤＮＡライブラリーより得ることができる。ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリーは、ヒト細胞源より作成したＤＮＡ断片から調製できる。α－Ｇａｌ　Ａをコードする断片は、そのようなライブラリーを図１Ａ－１Ｃに示した配列の任意の部分に実質的に相補的なヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングすることによって同定できる。実際、ポリメラーゼチェーンリアクション法によって作成された複数の配列を連結して、全長配列を形成することが可能である。コード配列の部分は利用可能であるが、発現のためには全長クローン、すなわちα－Ｇａｌ　Ａの全コード領域を含有するクローンが好ましいであろう。または、図１Ａ－１Ｃに示されるコード配列は、発現レベルを増大させるため、および／または精製を容易にするために使用しうる配列を付加することによ

り変更可能である。例えば、ここに記述する実施態様に示すように、α－Ｇａｌ Ａコード配列は、ブドウ球菌プロテインＡに続くコラゲナーゼ開裂部位をコードするヌクレオチド配列を付加することにより修飾された。このキメラ遺伝子構築体の発現は、α－Ｇａｌ Ａ－コラゲナーゼ基質－－プロテインＡからなる融合タンパク質をもたらした。この融合タンパク質は、プロテインＡ部分に結合するＩｇＧカラムを使用して容易に精製された。非融合α－Ｇａｌ Ａは、α－Ｇａｌ Ａをカラムに結合したプロテインＡ部分から切り離すコラゲナーゼを用いた処理により、カラムより放出された。容易に精製され、また生物学的に活性な形態で放出され得るα－Ｇａｌ Ａの産生のために、他の酵素開裂基質および結合タンパク質も、同様な構築体として遺伝子工学的に作成することができる。

ＤＮＡの単離、適切な制限断片の作成、クローンおよびライブラリーの構築、および組換え体のスクリーニングのために、当業者には周知の技法を使用することができる。このような技法の検討には、例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1-18章を参照されたい。

本発明の別の態様において、当分野の技術で周知の化学的方法を用いて、α－Ｇａｌ Ａのコード配列を全部または部分的に合成することが可能であろう。例えば、Caruthersら、1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7:215-233; CreaおよびHorn, 1980, Nuc. Acids Res. 9(10):2331; MatteucchiおよびCarruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21:719;ならびにChowおよびKempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9(12):2807-2817参照。

または、図１Ａ－１Ｃに示されるアミノ酸配列を全部または部分的に合成する化学的方法を用いて、タンパク質自体を作成することも可能であろう。例えば、ペプチドは固相法により合成し、樹脂から取り出し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製することができる（例えば、Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y., pp. 50-60参照）。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定により確認できる（例えば、Edman分解法; Creighton, 1983, Proteins Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y., pp. 34-49参照）。

ヒトα－Ｇａｌ Ａは、ホモ二量体糖タンパク質である。全長α－Ｇａｌ Ａ ｃＤＮＡは、３９８アミノ酸からなる成熟したサブユニットを予示する。そのアミノ酸配列は、ヒトα－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼ（α－Ｇａｌ Ｂ）と約５０％の全般的相同性を有する。コンピュータ化されたデータベースを用いた相同性検索は、酵母Mel１およびE. coli Mel Aアミノ酸配列と相同的な短い領域を明らかにした（図１Ｄ－１Ｆ参照）。これらの保存された領域は、酵素のコンホメーション、安定、サブユニット結合、および／または触媒作用にとって重要であるらしい。したがって、このような保存された領域は変更しないことが好ましい。しかし、コード配列におけるある種の修飾は有利となりうる。例えば、４つのＮ－結合グリコシル化コンセンサス配列は選択的に除去し、それによってこの酵素のグリコシル化を変更し、リン酸化、シアリル化、硫酸化、等に影響を与えることが可能であろう。このように修飾された酵素は、ファブリー病患者に注射された時、変更されたクリアランス特性および標的化（targeting）をもつ可能性がある。

オリゴ糖修飾は、効果的な酵素療法のためのα－Ｇａｌ Ａの標的化させるのに有用でありうる。このような修飾のいくつかの例が下記により詳細に記述される。以前の研究が、α－Ｇａｌ Ａの血漿グリコフォーム（これは脾臓グリコフォームよりも高度にシアリル化されている）は、ファブリー病患者由来の毒性蓄積循環基質の減少により有効であることを実証した(Desnickら、1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5326-5330）。この酵素の精製された脾臓および血漿グリコフォームの性状決定研究は、それらのオリゴ糖部分にのみ相違を示した（Desnickら、1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5326-5330）。したがって、この組換え酵素にファブリー病の効果的な治療を目標とさせる努力は、Ｎ－グリコシル化部位の修飾によって増強されうる。

また、ヌクレオチド配列の５’末端非翻訳およびコード領域は、α－Ｇａｌ Ａ ｍＲＮＡの翻訳効率を改善するために変更することができるだろう。例えば、α－Ｇａｌ Ａ ｃＤＮＡの位置＋４におけるシトシンのグアノシンへの置換は、α－Ｇａｌ Ａ ｍＲＮ

Ａの翻訳効率を５～１０倍改善できるだろう（Kozak, 1987, J. Mol. Biol. 196:947-950）。
さらに、Ｘ線結晶学データに基づいて、タンパク質の安定性を改善するために配列変更を試みることが可能であろう。例えば、適当な位置にジスルフィド架橋を導入する、および／またはタンパク質の不安定を引き起こすことが予測されるアミノ酸を除去または置換する、等である。これらは、より活性な、または安定なタンパク質、またはより大量の酵素タンパク質を産生するため、または酵素の触媒特異性を変化させるためにα－Ｇａｌ　Ａ酵素中に遺伝子操作して組み入れることのできる修飾の例にすぎない。
５．２．組換えα－Ｇａｌ　Ａの産生
生物学的に活性なα－Ｇａｌ　Ａを発現するため、上記第５．１節に記述されているこの酵素のコード配列、機能的等価物、または修飾された配列は適切な真核細胞発現ベクターに挿入される。すなわち、適切なプロセシング（シグナル開裂、グリコシル化、リン酸化、シアリル化、およびタンパク質選別）のための細胞機械およびエレメントを有する適切な真核宿主細胞における、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクターに挿入される。適切に折り畳まれプロセシングされた生物学的に活性な酵素の発現には、哺乳動物宿主細胞発現系が好ましい。ヒトに投与した時に、このような発現産物は適切な組織標的設定を示すべきで、有害な免疫学的反応は何ら示してはならない。
５．２．１．発現ベクターの構築、およびトランスフェクタント（transfectant）の調製
α－Ｇａｌ　Ａコード配列および適切な転写／翻訳調節シグナルを含有する発現ベクターの構築には、当業者に周知の方法を用いることができる。これらの方法には、in vitro組換え／遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatisら、1982, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 12章に記述されている技法を参照されたい。
種々の宿主－発現ベクター系がα－Ｇａｌ　Ａコード配列を発現するのに使用できる。原核細胞系は操作の容易さおよび低コストの大規模化という顕著な利点を提供するが、α－Ｇａｌ　Ａの発現におけるそれらの主要な欠点は、発現された哺乳動物タンパク質の適切な翻訳後修飾を欠くことである。真核細胞系、好ましくは哺乳動物発現系は、適切な修飾が起こるのを可能とする。転写一次産物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化、リン酸化、および有利にはその分泌のための細胞機械を有する真核細胞を、α－Ｇａｌ　Ａ発現のための宿主細胞として使用すべきである。哺乳動物細胞系が好ましい。このような宿主細胞系には、ＣＨＯ、ＶＥＲＯ、ＢＨＫ、ＨｅＬａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、－２９３、ＷＩ３８等が含まれるが、これらだけに限定されない。または、転写一次産物の任意プロセシングおよび／または遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび／または分泌に要求される細胞機械の全部ではないが一部を有する真核宿主細胞を、宿主細胞のプロセシング能力を増強するように修飾することも可能である。例えば、宿主細胞が以前はできなかったプロセシング機能を遂行するペプチド産物をコードする組換えヌクレオチド配列を、宿主細胞系に遺伝子工学的に組み入れることができる。このような配列は、宿主細胞中に興味のある遺伝子と共に同時トランスフェクトしてもよいし、または上記興味のある遺伝子をコードする組換え構築体に含有させてもよい。または、この配列を含有する細胞系を作成し、次にそれを興味のある遺伝子でトランスフェクトしてもよい。
選択した宿主細胞におけるα－Ｇａｌ　Ａの発現を引き出すため、適切な真核細胞発現ベクターを使用しなければならない。例えば、ＳＶ４０に関するベクターの設計のためには、少なくとも２つの基本的アプローチに従いうる。第１は、ＳＶ４０の初期プロモーター領域を興味のある遺伝子で置換することで、第２は後期領域を置換することである（Hammarskjoldら、1986, Gene 43:41）。初期および後期領域置換ベクターは、初期または後期領域を欠く適切なＳＶ４０突然変異体によってin vitroで補完する（complemente）こともできる。このような補完性（complementation）は、感染性キャプシド内にパッケージされた、α－Ｇａｌ　Ａ遺伝子を含有する組換え体を産生するであろう。次に、許容細胞系を感染させ、組換えタンパク質を産生させることができる。ＳＶ４０に基づくベクターは、一過性の発現研究にも使用できる。最良の結果はそれらがＣＯＳ（ＣＶ－１、つまり

ＳＶ４０の根源）細胞、すなわち染色体に組み込まれた複製起点を欠くＳＶ４０ゲノムの単一コピーを含有するＣＶ－１の誘導体（グリーンモンキー腎細胞）に導入されたときに得られる。これらの細胞は活発に大型Ｔ抗原（ＳＶ４０）を合成し、したがってＳＶ４０の複製起点を有する任意のプラスミドから複製を開始する。

ＳＶ４０に加え、ほとんどすべての分子的にクローン化されたウイルスまたはレトロウイルスが、クローニングまたは発現ビヒクル（vehicle）として使用可能である。多数のレトロウイルス（トリおよびマウスの）、アデノウイルス、ワクシニアウイルス（Cochranら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:19）およびポリオーマウイルスに基づくウイルスベクターが、発現に使用できる。他のクローン化ウイルス、例えばＪＣ（Howleyら、1980, J. Virol 36: 878）、ＢＫおよびヒトパピローマウイルス（Heilmanら、1980, Ｊ. Virol 36: 395）が真核細胞発現ベクターとして使用される可能性を提供する。例えば、アデノウイルス発現ベクターを使用する場合は、α－Ｇａｌ　Ａコード配列はアデノウイルスの転写/翻訳調節複合体、例えば後期プロモーターおよび３分節リーダー配列に連結することができる。次に、このキメラ遺伝子をin vitroまたはin vivo組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、Ｅ１またはＥ３領域）への挿入は、感染した宿主中で生育可能であり、かつヒトα－Ｇａｌ　Ａを発現することができる組換えウイルスをもたらすであろう（LoganおよびShenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3655-3659）。または、ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーターを使用することもできる。（例えば、Mackettら、1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419; Mackettら、1984, Ｊ. Virol. 49:857-864; Panicaliら、1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:4927-4931参照）。特に興味があるのはウシパピローマウイルスに基づくベクターである（Sarverら、1981, Mol. Cell. Biol. 1:486）。これらのベクターは、染色体外エレメントとして複製する能力を有する。このＤＮＡをマウス細胞に導入すると間もなく、プラスミドは細胞あたり１００から２００コピーに複製する。挿入されたｃＤＮＡの転写は、宿主染色体へのプラスミドの組み込みを必要とせず、高レベルの発現を生ずる。これらのベクターは、プラスミド中に選択マーカー、例えばｎｅｏ遺伝子等を含むことによって安定した発現に使用されうる。高レベルの発現は、メタロチオネインＩＩＡプロモーター、熱ショックプロモーター、等の誘導性プロモーターの使用によっても達成できる。

組換えタンパク質の長期間にわたる高収率産生のためには、安定した発現が望ましい。例えば、外来ＤＮＡの導入に続いて、遺伝子操作した細胞を１～２日間、富化した培地中で増殖させ、その後選択培地に替えてもよい。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、等）および選択マーカーによって制御されるα－Ｇａｌ　ＡまたはＤＮＡによって宿主細胞を形質転換することができる。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをその染色体に安定に組み入れ、フォーカス（細胞増殖巣）を形成するまで増殖することを可能とする。次にこのフォーカスをクローン化し、細胞系へと発展させることができる。以下のものを含むが、それらだけに限定されない多数の選択系を使用することができる。すなわち、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子（Wiglerら、1977, Cell 11:223）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（SzybalskaおよびSzybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Lowyら、1989, Cell 22:817）を、それぞれｔｋ、ｈｇｐｒｔまたはａｐｒｔ細胞に採用することができる。また、代謝拮抗物質耐性を、メトトレキセートへの耐性を付与するｄｈｆｒ遺伝子（Wiglerら、1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527）；マイコフェノール酸への耐性を付与するｇｐｔ遺伝子（MulliganおよびBerg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2072）；アミノグリコシドＧ－４１８への耐性を付与するｎｅｏ遺伝子（Colberre-Gerapinら、1981, Ｊ. Mol. Biol. 150:1）；ハイグロマイシンへの耐性を付与するｈｙｇｒｏ遺伝子（Santerreら、1984, Gene 30:147）の選択の基礎として使用

できる。最近、さらなる選択遺伝子が記述された。それらは、細胞にトリプトファンの代わりにインドールを利用可能とするｔｒｐＢ遺伝子；細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用可能とするｈｉｓＤ遺伝子（HartmanおよびMulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8047）；オルニチン脱炭素酵素インヒビターである２－（ジフルオロメチル）－ＤＬ－オルニチン（ＤＦＭＯ）への耐性を付与するＯＤＣ（オルニチン脱炭素酵素）遺伝子［McConlogue L., 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor laboratory（編）］である。

α-Gal A酵素を発現するために使用しうる他の真核発現系は、α-Gal Aコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母；α-Gal Aコード配列を含む組換えウィルス発現ベクター（例えば、バキュロウィルス）で感染させた昆虫細胞系；または、組換えウィルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウィルスCaMV、タバコモザイクウィルスTMV）で感染させた、もしくは、α-Gal Aコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系である。

酵母においては、構成性あるいは誘導性プロモーターを含む多くのベクターを使用しうる。検討のために以下を参照されたい。分子生物学における現在のプロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13; Grant et al., 1987, 酵素学の方法における、酵母用発現および分泌ベクター（Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology）, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp.516-544; Glover, 1986, DNAクローニング（DNA Cloning), Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3；およびBitter, 1987, 酵素学の方法における、酵母の異種遺伝子発現（Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology）, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684；ならびに、酵母サッカロミセス属の分子生物学（The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces）, 1982, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II. 酵母における相補性アッセイのために、酵母２μサークル（２μ circle）の存在により酵母中で自律的に複製する酵母エピソームプラスミド（YEp）にα-Gal AのcDNAをクローニングしてもよい。このcDNAは、ADHやLEU2のような構成性酵母プロモーターまたはGALのような誘導性プロモーターのいずれかの後方にクローニングしてよい（Cloning in Yeast, Chpt. 3, R. Rothstein In: DNA Cloning Vol.11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.）。構築物は、同族α-Gal A mRNAの5'および3'非翻訳領域、あるいは、酵母遺伝子に対応するものを含んでもよい。YEpプラスミドは高い効率で形質転換し、非常に安定である。あるいはまた、酵母染色体への外来DNA配列の組込みを促進するベクターを使用してもよい。

植物発現ベクターを用いる場合には、多くのプロモーターのいかなるものによってもα-Gal Aコード配列の発現を行ってもよい。例えば、CaMVの35S RNAや19S RNAプロモーター（Brisson et al., 1984, Nature 310:511-514）のようなウィルスプロモーター、またはTMVのコートタンパク質プロモーター（Takamatsu et al., 1987, EMBO J. 6:307-311）を使用してもよいし、あるいは、RUBISCOの小サブユニット（Coruzzi et al., 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie et al., 1984, Science 224:838-843）のような植物プロモーターや、例えばダイズhsp17.5-Eやhsp17.3-B（Gurley et al., 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565）のような熱ショックプロモーターを使用してもよい。Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウィルスベクターを用いて、直接DNA形質転換、マイクロインジェクション、電気穿孔法等により、これらの構築物を植物細胞に導入することができる。そのような技術の検討のために、例えば、Weissbach & Weissbach, 1988, 植物分子生物学の方法（Methods for Plant Molecular Biology）, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463およびGrieson & Corey, 1988, 植物分子生物学（Plant Molecular Biology）, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9を参照されたい。

α-Gal Aを発現するために使用できるもうひとつの別の発現系は昆虫系である。そのような系のひとつにおいて、外来遺伝子を発現するためのベクターとしてAutographa califor

nica核多角体病ウィルス（AcNPV）が使用される。このウィルスは、Spodoptera frugiperda細胞中で増殖する。α-Gal A配列をウィルスの非必須領域（例えば、多角体遺伝子）中にクローニングして、AcNPVプロモーター（例えば、多角体プロモーター）の制御下に置いてもよい。前記コード配列の挿入を成功させることにより、多角体遺伝子が不活性化され、非閉塞性組換えウィルス（すなわち、多角体遺伝子によりコードされたタンパク様コートを欠くウィルス）が生産されることとなる。その後、これらの組換えウィルスを用いて、挿入された遺伝子が発現されるSpodoptera frugiperda細胞を感染する。（例えば、Smith et al., 1983, J. Viol. 46:584; Smith, 米国特許第4,215,051号を参照されたい。）

5.2.2. α-Gal A産物を発現するトランスフェクタントまたは形質転換体の同定

少なくとも４つの一般的なアプローチ：(a)DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション；(b)“マーカー”遺伝子機能の存在あるいは不存在；(c)宿主細胞におけるα-Gal A mRNA転写物の発現により測定されるような転写レベルの評価；および(d)免疫検定または生物学的活性により測定されるような遺伝子産物の検出により、α-Gal Aコード配列を含み、生物学的に活性な遺伝子産物を発現する宿主細胞を同定しうる。

第１のアプローチにおいて、発現ベクターに挿入されたα-Gal Aコード配列の存在は、実質的に図１Ａ～１Ｃに示されるようなα-Gal Aコード配列、またはその部分もしくは誘導体に相同なヌクレオチド配列を含むプローブを用いるDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションにより検出できる。

第２のアプローチにおいては、組換え発現ベクター／宿主系は、ある種の“マーカー”遺伝子機能（例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、メトトレキセートに対する耐性、形質転換表現型、バキュロウィルスにおける閉塞体形成（occlusion body formation）等）の存在あるいは不存在に基づいて同定し、選択することができる。例えば、α-Gal Aコード配列が、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入されると、そのマーカー遺伝子機能の不存在により、α-Gal Aコード配列を含む組換え体を同定することができる。あるいはまた、α-Gal Aコード配列の発現を制御するために使用した同じあるいは異なるプロモーターの制御下に、マーカー遺伝子をα-Gal A配列と前後して配置することもできる。誘導または選択に応答するマーカーの発現は、α-Gal Aコード配列の発現を示す。

第３のアプローチにおいて、α-Gal Aコード配列に対する転写活性をハイブリダイゼーションアッセイにより評価することができる。例えば、RNAを単離し、実質的に図１Ａ～１Ｃに示されるようなα-Gal Aコード配列またはその特定部分に相同なプローブを用いるノーザンブロットにより分析できる。あるいはまた、宿主細胞の全核酸を抽出して、そのようなプローブへのハイブリダイゼーションを検定してもよい。

第４のアプローチにおいては、-Gal Aタンパク質産物の発現を免疫学的に、例えば、ウェスタンブロット、放射線免疫沈降、酵素結合免疫検定のような免疫検定等により評価することができる。しかしながら、発現系の成功の基本的な試験は、生物学的に活性なα-Gal A遺伝子産物の検出を伴うものである。宿主細胞が遺伝子産物を分泌する場合には、培養トランスフェクタント宿主細胞から得られる細胞不含の培地のα-Gal A活性を検定すればよい。遺伝子産物が分泌されない場合には、細胞溶解産物のそのような活性を検定すればよい。いずれの場合にも、以下のような、但しこれらに限定されない多くのアッセイを用いてα-Gal A活性を検出することができる。(a)４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ガラクトピラノシド（Desnick et al., 1973, J. Lab. Clin. Invest. 81:157）のような合成蛍光体あるいは色原体α－Ｄ－ガラクトシドを使用するアッセイ；(b)トリチウム標識グロボトリアオシルセラミド（globotriaosyl ceramide）やピレン－ドデカノイル－スフィンゴシン－トリヘキソシド（Bishop and Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256:1307）のような放射線標識または蛍光標識した天然の基質を使用するアッセイ；および(c)X-α-galを使用するアッセイ。

5.2.3. α-Gal A遺伝子産物の精製

ひとたび高レベルの生物学的に活性なα-Gal Aを産生するクローンが同定されると、その

クローンを増殖させ、当業界で周知の技術を用いて精製しうる大量の酵素を生産するために使用することができる。そのような技術としては、イムノアフィニティー精製、高性能液体クロマトグラフィーを含むクロマトグラフィー法などを挙げることができるが、これらに限定されない。酵素が培養細胞により分泌される場合には、培養培地からα-Gal Aを容易に回収しうる。

以下に記載する実施例において実証されるように、α-GalNH_2-C_{12}-Sepharoseでのアフィニティークロマトグラフィー、次いでOctyl Sepharoseでの疎水性クロマトグラフィーおよび100cm Superose 6カラムでのゲル濾過によって、粗培地から組換えα-Gal Aを精製した。この組換え酵素は、ゲル濾過工程の後に本質的に均質であり、SDS-PAGEにより評価したところ98%以上の純度であった。

ヒト組換えα-Gal AをCHO細胞系であるDG5.3（これは、この組換え酵素の大半を分泌することが示された。）の培地から均質となるまで精製した。このクローンからの培養培地をα-Gal Aについて高い純度で純化し、血清不含の培地を使用したときには、全細胞外タンパク質の95%以上を構成した。かくして、たった３つのクロマトグラフィー工程において均質となるまで精製することができた。1/2グラム以上の酵素を３か月で生産し、この一部から、実験室規模の設備のみを用いて280mgを80%の収率で精製した。注目すべきことに、この組換え酵素は、以前に精製したヒト酵素（Bishop, et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta. 525: 399; Bishop and Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256:1307）に等しい比活性を持つ完全な酵素活性を有していた。この組換え酵素は、天然の基質であるグロボトリアオシルセラミドの類似体を認識し、効果的に切断することができた。

切断可能な融合タンパク質をコードするようにα-Gal Aコード配列を操作する場合、アフィニティー精製技術を用いてα-Gal Aを容易に精製しうる。以下に記載する実施例において、α-Gal Aのカルボキシ末端とプロテインＡとの間にコラゲナーゼ切断認識コンセンサス配列を操作した。得られた融合タンパク質は、プロテインＡ部分を結合したIgGカラムを用いて容易に精製された。非融合のα-Gal Aは、コラゲナーゼでの処理により、カラムから容易に離れた。

特に、オーバーラップ伸長法（overlap extension method）（Ho, et al., 1989, Gene 77: 51; Kadowaki, et al., 1989, Gene 76: 161）を用いて、全長α-Gal A cDNAを黄色ブドウ球菌のプロテインＡドメインＥに融合した。電気穿孔法によるトランスフェクションの後、COS-1細胞抽出物におけるα-Gal A活性は６～７倍増加した。さらに、トランスフェクトされた細胞は、培養培地中にかなりの量の融合タンパク質（400U/ml）を分泌した。分泌された融合タンパク質は単一のIgGアフィニティー精製工程により容易に精製された。これら２つのポリペプチド間へのコラゲナーゼ切断認識コンセンサス配列の操作により融合タンパク質の切断が促進され、その結果、精製されたヒトα-Gal AポリペプチドをプロテインＡドメインから第２のIgG精製工程により容易に分離することができた。融合構築物がα-Gal A活性を保持していたという事実は興味深いことであり、このことは、おそらく、カルボキシ末端がプロテインＡドメインの追加の５６残基に結合したとしても、この酵素ポリペプチドが活性なホモ二量体の立体配置を形成したことを示している。α-Gal A構築物でトランスフェクトされたCOS-1細胞は同様のレベルの発現、ならびに、細胞と培地間の分布を呈するので、プロテインＡドメインは、このリソソーム酵素の折り畳みまたは適当なプロセシングのいずれかを妨げないようである。さらに、二量体化したα-Gal Aポリペプチドの存在は、プロテインＡドメインのIgGアフィニティーカラムへの結合を阻害しなかった。α-Gal AとプロテインＡポリペプチド間への４残基コラゲナーゼ切断認識配列の挿入は、各ペプチド上にたった２つのコラーゲン残基を残す融合タンパク質の切断を可能にした。

ポリメラーゼ連鎖反応を用いるcDNAの構築、トランスフェクションおよび発現したタンパク質の精製は容易であるので、酵素の物理的および動力学的性質の特性付けをするための少量だが、十分な量のα-Gal Aの単離が可能となる。部位指定突然変異誘発または天然の変異体配列を用いれば、この系は、このタンパク質の機能に対する変化した一次構造の効果を測定するための合理的なアプローチを提供する。また、アミノ末端の前でカルボキシ

末端の後のプロテインＡドメインＥとの融合構築物を操作して、どの融合構築物が、少なくとも、とにかく、タンパク質の生物学的機能およびIgGを結合する能力を妨げるか評価しうる。
本発明のこの側面を用いて、α-Gal A配列と、精製のために使用できるであろう結合パートナー（例えば、それに対するイムノアフィニティーカラムを製造することができる抗原）を持つ第２のペプチドまたはタンパク質との間で、いかなる切断部位または酵素切断基質を操作してもよい。
5.2.4. 組換え酵素の特性付け
ここに記載した哺乳類発現系（例えば、CHO発現系）中で生産されたこの精製組換え酵素は、ヒト血漿から精製された酵素（Bishop, et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta. 525: 399; Bishop and Desnick, 1981, J. Biol. Chem., 256:1307）と本質的に同一の分子量、至適pH、kmおよび等電点値を有していた。この酵素の糖質部分の分析により、α-Gal Aポリペプチドにおける３つのオリゴ糖鎖の存在が明らかになった。これらの鎖は、エンドグリコシダーゼおよびQAE Sephadex試験により証明されるように、複合体、ハイブリッドおよび高マンノース型の混合物であった。たいへん重要なことに、この組換え酵素は、また、末端のシアル酸部分を有する（Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256:1307）点でα-Gal Aの自然血漿型に類似していた。上記した限られた分析的試行において、この酵素の血漿型は、脾臓型のものよりも循環$GbOse_3Cer$を分解（degrade）するのに効果的であることが示された。縦って、この組換え酵素または修飾組換え酵素（その糖質鎖またはアミノ酸配列の修飾を含むが、これらに限定されない。）は、ファブリー病の酵素置換治療のために最も適した型でありうる。確かに、ファブリーおよび正常繊維芽細胞による組換えα-Gal Aの飽和しうる取り込みは、ここで実施例において実証され、２mMのマンノース－６－リン酸により特異的に阻害されることが示される。
さらに、ここに記載するCHO発現系は、リソソーム生合成および糖加水分解プロセシングの細胞生物学の研究を大いに約束するものである。光鏡検法により、リソソーム膜の増殖を示唆し、リソソーム生合成の分析の可能性を示すDG5.3 CHO細胞における高度に空胞化した細胞質が明らかとなった。以前の研究により、この組換え酵素は非常に速く合成され、その合成後５～１０分で小胞体から出て、４５～６０分後には分泌されることが示された。組換えα-Gal A生合成のこのような速い動力学により、リソソーム酵素生合成を含む興味ある研究が可能となり、現在まで、ウィルス系に匹敵するだけの方法論を提供する。実際上、組換えα-Gal Aは非常に速く合成されるので、３分間の一回の放射性パルスで、これらの研究のために十分な酵素を標識するに足る。過剰生産された組換えα-Gal Aのみの、他のリソソーム酵素にはない予期せぬ特異的分泌は、Rothmanらにより記載された“遺伝子投与量依存性分泌”（Stevens et al., 1986, J. Cell Biol. 102:1551; Rothman et al., 1986, Proc. Natl, Acad. Sci. USA 83:3248）に類似しているようであり、この系において何が評価できるのかという興味ある質問を持ちかける。
5.2.5. ファブリー病の酵素治療用の修飾グリコフォームの組換えα-Gal A
マウスにおける組換えα-Gal Aのクリアランス動力学および組織分布を評価するための初期の実験により、50%が肝臓を標的とし、残りの酵素は多くの他の組織に分布され、これには腎臓、心臓および皮膚を有意に標的とすることが含まれることが明らかとなった。この分布は、マウスにおけるヒトα-Gal Aの血漿型について以前に観察されたものと類似しているが、この酵素を変化した組織標的化のために修飾することが適当であるかもしれない。組織標的化を増強するための組換えα-Gal Aの修飾は、複合体、および、この組換え酵素に共有結合した高マンノース糖質部分の選択的脱グリコシル化を含む。特に、本発明は、シアリル化およびアシアリル化したグリコフォーム（両者とも、容易に精製しうる。（以下のセクション９を参照されたい。））の前記酵素の発現を可能にする宿主細胞の修飾を含む。例えば、CHO細胞を使用してα-Gal Aを発現する場合、シアリル化したグリコフォームのα-Gal Aを発現するために、欠けた機能をCHO細胞に与えるシアリルトランスフェラーゼ遺伝子構築物でCHO細胞を同時トランスフェクトしてもよい。
あるいはまた、ファブリー病の治療に使用するための種々のグリコフォームを引き続いて

脱グリコシル化してもよい。そのような修飾は、ゴーシェ病の治療の際にβ－グルコセレブロシダーゼをマクロファージに効果的に標的化するのに重要であることが示された（Barton, N.W., et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1913）。この場合、胎盤誘導β－グルコセレブロシダーゼは、順次、ノイラミニダーゼ、β－ガラクトシダーゼおよびＮ－β－アセチルグルコサミニダーゼで処理されて、これらの細胞のマンノースレセプターによる取り込みのための末端マンノース残基が露出するようにした（Stahl, et al., in The Molecular Basis of Lysosomal Disorders, Barranger, J.A. and Brady, R.O. eds., 1984, Academic Press, NY pp. 209-218）。

本発明の範囲に含まれるヒト組換え体α-Gal Aに対する改変としては、限定するものではないが、特異的な標的化及び種々の細胞型による取り込みのための、末端ガラクトースを露出するためのノイラミニダーゼによる連続的な脱グリコシル化；N-β-アセチルグルコサミニル残基を露出するためのβ-ガラクトシダーゼ処理；及びマンノース残基を露出するためのN-β-アセチルグルコサミニダーゼ処理が挙げられる。連続的に脱グリコシル化された組換え体α-Gal Aグリコフォーム（glycoform)は、マウス及びサルの静脈投与の後の放射活性標識グリコフォームのそれぞれのクリアランス動力学及び組織分布を測定することにより分析できる。

組換え体α-Gal Aの脱グリコシル化は、いくつかの方法により行うことができる。使用できる外来グリコシダーゼによる連続的な処理の一般的方法は、実質的に前に記載したものである（Murray, G. J., 1987, Meth. Enzymol, 149:25）。例としては、末端シアル酸残基はアガロースに共有結合したノイラミニダーゼによる処理により除去することができ、例えばアガロースに結合したVI型ノイラミニダーゼ（SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO）を40U/gで使用して100mgのα-Gal Aを、８単位のコンジュゲート化ノイラミニダーゼでpH5.0、37℃で４時間処理することができる。コンジュゲート化ノイラミニダーゼは遠心分離により除去することができる。同様に、ストレプトコッカス・ニューモニアエから精製したβ－ガラクトシダーゼ（100mgのα-Gal A当たり３単位）を末端ガラクトシダーゼ残基を除去するのに使用できる。また、ナタマメN-β-アセチルグルコサミニダーゼ（SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO）も使用することができ、例えば3 x 10^6単位を組換え体α-Gal Aのアリコート100mgのそれぞれと37℃で４時間混合することができる。それぞれの段階において、前記組換え体酵素は、α－ガラクトシルアミン-Sepharoseアフィニティカラムで急速に精製して脱グリコシル化酵素及び遊離の炭水化物を含まないものとすることができる。

血漿クリアランス動力学及び組織分布測定を含む、種々のグリコフォームのインビボにおける結果の分析のために、組換え体α-Gal Aを改変前に標識することができる。例えば、組換え体α-Gal Aは、CHO DG5.3細胞系中、50μCi/ml［^{35}S］メチオニン（>1000Ci/mmole）の存在下での24時間の増殖により放射活性標識できる。分泌された放射活性酵素は先に記載したα-ガラクトシルアミン-Sepharoseアフィニティクロマトグラフィーにより回収された培地から精製できる。これらの細胞により分泌された放射活性標識タンパクの100%は実質的にα-Gal Aであり、これは次に前記グリコフォームの連続的な生成に使用することができる。

5.3 組換え体α-Gal Aの使用

本発明により得られた精製生成物は、リソソーム貯蔵障害、ファブリー病を有する患者における酵素置換治療に有利に使用することができる。あるいは、本発明により得られた精製生成物は、種々の方法においてインビトロでα-D-ガラクト-グリココンジュゲートを改変するのに使用でき、例えば血液型B赤血球を血液型Oに変換することに使用でき、糖の変換、例えばラフィノースのシュクロースへの、あるいはメリビオースのガラクトース及びグルコースへの変換を必要とする産業上の方法等に使用することができる。これらについては以下の項にさらに詳細に記載する。

5.3.1 ファブリー病におけるα-Gal A酵素治療

代謝の先天的欠陥の中で、リソソーム貯蔵障害を有する患者の研究によりリソソームの器官の生物学及びそのヒドロラーゼ、その生合成及びプロセシング（Rosenfeld, et al., 1

982, J. Cell Biol. 93: 135; Lemansky, et al., 1984, J. Biol. Chem. 259: 10129）、そのリソソームへの輸送のメカニズム（Neufeld, et al., 1975, Ann. Rev. Biochem. 44: 357; Sly et al., 1982, J. Cell Biochem. 18:67; Kornfeld, S., 1986, J. Clin. Invest. 77: 1）、及びそのコファクター要求性（Verheijen, et al., 1985. Eur. J. Biochem. 149: 315; d'Azzo, et al., 1982, Eur. J. Biochem. 149: 315; Mehl, et al., 1964, Physiol. Chem. 339: 260; Conzelman, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3979）の基本的理解が得られた。30を越えるリソソーム貯蔵障害のうち、ファブリー病は、本明細書に記載した組換え体DNA法を適用してモデルシステムで種々の治療方法を評価及び使用し、酵素構造及び機能における部位特異的変化の効果を関連付けるのに理想的な候補である。この疾患には中枢神経系は関与せず、従って血液脳関門が酵素置換治療に障害を与えることはない。いくつかのリソソーム酵素は例えばβ－ヘキソサミニダーゼAのように異なるサブユニットを有する（Mahuran, et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1602）のに対し、欠陥酵素α-Gal Aはホモダイマーである（Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307）。従って、単一の遺伝子産物のみが得られるはずである。ファブリー病からの培養された繊維芽細胞の代謝欠陥は、培養培地への外来酵素の添加によりインビトロで修正された（Cline, et al., 1986, DNA 5: 37）。また、ファブリー病を有する非典型的な変異種が同定されたが、これらの雄は臨床的には無症候であり、前記疾患の主要な病的発現からそれらを保護するのに十分な残留α-Gal A活性（３～10%）を有している（Lemansky, et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:2062; Clarke,et al., 1971, N.Engl. J. Med. 284: 233; Romeo, et al., 1975, Biochem. Genet. 13: 615; Bishop, et al., 1981, Am. J. Hum. Genet. 71: 217A; Bach, et al., 1982, Clin. Genet. 21: 59;及びKobayashi, et al., 1985, J. Neurol. Sci. 67: 179）。さらに上記したように、限られたものであるがヒトの試験により、血管析出ならびに免疫合併症の不存在に先立って循環する基質を消滅させる、酵素置換の生化学的有効性が示された（Brady, et al., 1973, N. Engl. J. Med. 289: 9; Desnick, et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5326; Bishop, et al., 1981, Enzyme Therapy XX: In: Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases, Callahan, J.W. and Lowden, J.A., (eds.), Raven Press, New York, pp. 381; Desnick, et al., 1980, Enzyme Therapy XVII: In: Enzyme Therapy in Genetic Disease: 2, Desnick, R.J. (ed.), Alan, R. Liss, Inc., New York, pp. 393）。

これらの研究においては、α-Gal A酵素の脾臓及び血漿イソフォームの両方を静脈注射した。脾臓アイソザイムの循環半減期は約10分であり、血漿アイソザイムのそれは約70分であった。脾臓アイソザイムのそれぞれの投与の後、蓄積した循環基質の濃度の減少は15分以内に最大になった。これに対し、血漿アイソザイムの注射により、循環基質のレベルは36～72時間に渡って徐々に減少した。組換え体α-Gal Aの分泌形態は前記血漿アイソザイムと同様なものであるようなので、組換え体酵素の分泌形態は、循環基質レベルの長期間の消滅及び制御に有効であり得る。

上記の臨床試験で投与された部分的に精製した血漿及び脾臓アイソザイムの投与量は2000U/kg体重であり、即ち１μg/kgの純粋な酵素の投与に等価な投与量であった。この投与量が循環基質のレベルを下げるのに有効であることが判ったので、組換え体酵素の同様な投与量は同様な効果を有するであろう。しかし、組換え体酵素は0.1μg/kg～約10mg/kg、及び好ましくは約0.1mg/kg～約２mg/kgの範囲の投与量で投与できる。本発明による組換え体酵素の大きな量を製造する能力により、有意により大きい投与量の治療効果を評価することができるであろう。

5.3.2 α-Gal Aのインビトロでの使用

α-Gal Aは、末端α－ガラクトシド結合を有する種々のオリゴ糖、糖タンパク、糖ペプチド及び糖脂質に対する活性を有するガラクトシルヒドロラーゼである。従って、この酵素はこれらのα－ガラクトグリココンジュゲートをインビトロで改変するのに使用できる。例えば、本発明の組換え体α-Gal Aは種々の所望される改変に使用することができ、そのような改変としては、限定するものではないが、（a）血液型B赤血球の血液型O抗原を発

現する細胞への変換（Harpaz, et al., 1977, Eur. J. Biochem. 77:419-426）;及び（b）スタキオース（stacchyose）のラフィノースへの加水分解、ラフィノースから二糖シュクロースへの加水分解、あるいはメリビオースのガラクトース及びグルコースへの加水分解（Silman, et al., 1980, Biotechnol. Bioeng. 22:533）が挙げられる。このような加水分解は、酵母製造のための基質としての糖蜜の分解におけるような産業上の用途を有する（Liljestrom-Suominen, et al., 1988, Appl. Environ. Micro. 54:245-249）。

6. 例： 哺乳類細胞系による生物活性型α-ガラクトシダーゼAの過剰発現と特異的発現

以下のサブセクションでヒト組換えα-Gal Aの大量生産を記載する。ヒトα-Gal Aをコードする全長cDNAを、増幅可能なジヒドロ葉酸リダクターゼ（DHFR）cDNA前の発現ベクターp91023（B）に挿入した。cDNA構築物（p91-AGA）の機能的完全性は、約150U/mgの4-MU-α-D-ガラクトピラノシド活性の内在量に対するCOS-1細胞; 650U/mg（nmol/時）中の活性型酵素の過渡的発現により確認された。p91-AGA構築物は電気穿孔法によりDG44 dhfr CHO細胞中に導入した。ヌクレオチドを欠いている培地での陽性コロニー選択の結果、300～2,000U/mgの範囲量の活性型酵素を発現するクローンが単離された。DHFR cDNAとα-Gal A cDNAを共に増幅するためにメトトレキセート（MTX、0.02～1.3μM）の濃度を高めて培養した選択サブクローンは5,000～25,000U/mgの細胞内レベルのα-Gal A活性を発現した。注目すべきは、高い細胞内レベルのα-Gal Aを発現したサブクローンDG44.5は、産生された全組換え酵素の80%以上を分泌したことである。500μMのMTX濃度で、１０^{7}個の細胞が一日あたり約15,000U/培養培地mlを分泌した。注目すべきは、β-ヘキソサミニダーゼ、α-マンノシダーゼ、β-ガラクトシダーゼおよびβ-グルコロニダーゼ等の内在性CHOリソソーム酵素は分泌されず、この分泌はα-Gal Aに特異的であり、マンノース-６-リン酸受容体媒介経路の飽和によるものではないことを示した。中空の繊維バイオリアクターを用いて、１日１リットルあたり５mgまでの組換えα-Gal A酵素が産生された。多様な物理的と反応速度的性質の特性付けのために、この分泌α-Gal Aをアフィニティークロマトグラフィーで精製した。組換えα-Gal Aは、ヒト血漿から精製された酵素に似たpI、電気泳動移動度およびKm値を有していた。さらに、^{32}Ｐ標識による研究で、リソソームの形と分泌された形の両方で、おそらくそれらのオリゴ糖部分でリン酸化されていることが明らかとなった。現在の研究は、この組換え酵素のさらに別の反応速度的および物理的性質、オリゴ糖部分および結晶構造の特性付けに向けられている。さらに、大量の可溶性活性型酵素が手に入るようになったことで、ファブリー病を有する半接合体での臨床試験前に動物系で酵素置換の評価が可能となるであろう。

6.1. 材料と方法

6.1.1. 材料

制限エンドヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼＩのクレノウ断片、T4ポリメラーゼおよびT4リガーゼはNew England Biolabsから入手し、αおよびγ-^{32}[P]dNTP（3000Ci/モル）およびα^{35}[S]dATP（100Ci/モル）はAmershamから入手した。COS-1細胞系はATCC（Rockville, MD）から購入した。CHO DG44 dhfr細胞系は記載がある（Urlaug, et al., 1986, Somat. Cell Genet. 12:555-566）。

6.1.2. 発現ベクターp91-AGAの構築

全長α-Gal A cDNAを含有するプラスミドpcDAG126(Bishop, et al., 1988, Lipid Storage Disorders, Salvaryre, R., Douste-Blazy, L. Gatt, S. Eds. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 809 to 822）をBam HIとPst Iにより消化し、1.45kb挿入断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。次に、このcDNAをプラスミドpGEM-4のBam HI部位とPst Ｉ部位に強制サブクローン化して、pGEM-AGA126を得た。次に、このプラスミドをHind IIIで消化し、クレノウを用いて末端を満たし、Eco RIリンカーに連結させた。Eco RIによる消化後、1.45kb断片を上記のように精製し、哺乳動物の発現ベクターp91023（B）のEco RI部位にクローン化し（Wong et al., 1985, Science 228:810）、p91-AGAを得た（図1G）。

6.1.3. 細胞培養、エレクトロトランスフェクションおよび遺伝子増幅

COS-1とDG44 CHO細胞は、10%ウシ胎児血清（FCS）と抗生物質を含有するダルベッコの改

良イーグル培地（DMEM）に５％ CO_2で37℃に維持した。DG44(dhfr)細胞は0.05mMヒポキサンチンと0.008mMチミジンを培地に添加することにより維持した。トランスフェクション後、組換えCHO系を、10%の透析FCSを加えたDMEMでMTXの非存在下または存在下に培養した。

電気穿孔法のために、細胞をトリプシン処理し、室温で10分間800 X gで遠心した。このペレットを10% FCS血清を加えたDMEMで一回洗浄し、氷冷電気穿孔用緩衝液（リン酸緩衝スクロース；272mMスクロース、７mMリン酸ナトリウム、pH7.4、１mM $MgCl_2$を含む）で２回洗浄した。次に、細胞をリン酸緩衝スクロースに約0.65～1.0 X 10^7個/mlの濃度まで再び懸濁した。この細胞懸濁液(0.8ml)を0.4cmギャップキュベット（Bio-Rad）に入れ、5-20μgのプラスミドDNAを加え、氷上に10分間保った。キュベットを「ジーンパルサー」室（Bio-Rad）に置き、各細胞系についての最適設定として、COS-1細胞については300Vで、CHO DG44（dhfr）細胞については400Vで25μFにて一回パルスを与えた。パルスを受けた細胞を含有するキュベットを10分間氷上に置き、次にその細胞をキュベットから取り出して、10% FCSを加えた15mlのDMEMに入れた。

過渡的発現のために、COS-1細胞を72時間目に集め、直ぐにアッセイにかけた。安定的な発現のために、トランスフェクトさせたDG44細胞を48時間培養し、トリプシン化により培養皿から取り出し、10%の透析FCSを加えたDMEMに1:15の比率で再度塗布した。培地は４日ごとに取り換えた。２週間の培養後に細胞増殖巣は目で確認でき、個々のクローンをクローニング用リングで単離した。最大量のα-Gal Aを発現するクローンはひとまとめにして、メトトレキセート（MTX）濃度を0.02、0.08、1.3、20、40、80、250および500μMに高めた濃度で段階的な成長による増幅に供した。

6.1.4. 酵素とタンパク質のアッセイ

酵素アッセイのために、100mm培養皿中の細胞を５mlのリン酸緩衝溶液（PBS）で２回洗浄し、ゴム製ポリスマンを用いてかき取って12mlのコニカルチューブに入れた。800 X gで10分間遠心した後、細胞を１mlの25mM $NaPO_4$緩衝液（pH6.0）に再度懸濁し、次にブランソンカップソニケーターを用いて70%の出力で15秒間の超音波処理を３回行なって破壊した。この超音波処理物を10,000 X gで15分間４℃で遠心し、上清を分離して、これを直ぐにアッセイにかけた。もしくは、迅速なスクリーニングのために、細胞を上記のように洗浄し、１mlの溶解用緩衝液（150mM NaCl、１mM EDTA、１% NP-40および0.2mM PMSFを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5）を皿に加えた。溶解した細胞を４℃で30分間インキュベートし、溶解物を集めて1.5mlチューブに移し、マイクロ遠心機で遠心し、次にその上清をアッセイのために取り出した。

細胞溶解物中および培地中の各α-Gal A活性は、５mM 4-メチルウンベリ-フェリル-α-D-ガラクトピラノシド（4MU-α-Gal）をこれまでに記載されたように（Bishop, et al., 1980, Enzyme Therapy in Genetic Diseases: 2. Desnick, R. J. (Ed.). Alan R. Liss, Inc. New York, p. 17）用いて測定した。簡略に述べると、５mMの4MU-α-Galの保存溶液を超音波槽に入れた0.1Mクエン酸/0.2Mリン酸緩衝液（pH4.6）中に調製した。10～50μlの細胞抽出物と150μlの前記保存基質溶液を含有する反応混合物を37℃で10～30分間インキュベートした。反応は、2.3mlの0.1Mエチレンジアミンの添加により停止させた。その蛍光はTurnerモデル111蛍光測定機を用いて決定した。活性の１単位は、１ナノモルの基質を１時間あたりに加水分解する酵素の量である。α-マンノシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-ヘキソサミニダーゼ、β-グルクロニダーゼおよび酸性ホスファターゼの各活性は適当な4-メチルウンベリフェリル基質を用いて測定した。タンパク質濃度は、フルオレスカミン法（Bohlen, et al., 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155: 213）のBishopらによる改良法（Bishop, et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta 524: 109）を用いて測定した。

6.2. 結果

6.2.1. COS-1細胞によるヒトα-Gal Aの発現

全長ヒトα-Gal A cDNAを発現ベクターp91023（B）（Wong, et al., 1985, Science 228: 810）にクローン化し、p91-AGAと命名されたこの構築物を電気穿孔法によりCOS-1細胞中

に導入した。増加レベルのα-Gal A活性がトランスフェクションの24、48および72時間後に検出され（図2A）、p91-AGA構築物の機能的完全性を示した。トランスフェクションの72時間後にα-Gal A活性は約４倍増加した一方で、α-Gal A cDNAをアンチセンスの向きで含有するp91023（B）ベクターでトランスフェクトされた細胞中にも、DNAを受容しなかった細胞中にもα-Gal A活性の増加は観察されなかった。さらに、リソソーム酵素のコントロールとして測定されたβ-ガラクトシダーゼ量は変化しなかった（図2B）。

6.2.2. DHFR CHO細胞によるα-Gal Aのトランスフェクションと増幅

ヒトα-Gal Aを安定に発現する組換えクローンは、p91-AGA構築物をDG44 dhfr CHO細胞中にエレクトロトランスフェクションおよび増加MTX濃度での選択による組込みベクターDNAの増幅により得られた。ヌクレオシドを欠いた培地での初期の培養の結果、α-Gal Aを100～1,800U/mgタンパク質の量で発現する100個以上のクローンが同定された（表I）。最大のα-Gal A量を有するクローンは0.02～0.08μMのMTXの存在下で培養され、組込みp91-AGA DNAを増幅した。代表的な増幅クローン中の細胞内α-Gal A量は0.02μMのMTXで２～６倍まで増加し、さらに0.08μMのMTXで増幅されたときに10倍まで増加したことを表IIは示している。

表I

p91-AGA による電気穿孔法後のDG 44(dhfr)CHO細胞* の細胞内α-ガラクトシダーゼA 活性

クローン	α-Gal A活性 (U/mg タンパク質)
親DG44:	497
トランスフェクトされたもの:	
4	493
5	1,243
7	108
8	524
9	1,155
11	1,115
20	624
24	1,864
46	720
52	180

* 10 %の透析FCS を加えたDMEMで培養した細胞

表II

メトトレキセート中の初期増幅後のp91-AGA でトランスフェクトされたDG 44(dhfr)CHO細胞の細胞内α- ガラクトシダーゼA 活性

クローン	α-Gal A活性 (U/mg)
0.02 μM MTX:	
5	4,990
9	2,900
11	3,170
46.1	1,230
46.5	4,570
46.12	4,100
0.08 μM MTX:	
5.3	23,400
5.7	7,950
5.9	14,680
5.11	3,070
9.1	10,290
9.4	7,950
9.6	3,860

6.2.3. 高レベル発現クローンはヒトα-Gal Aを分泌する

0.08μMのMTXの存在下で増幅された陽性クローンの中で、クローン5.3は最大の細胞内α-Gal A量を有していたため（表II）、これを選択してさらに増幅した。1.3μMのMTXの存在下で培養したとき、クローンDG5.3の生育培地中のGal A活性は、2,500U/mlである（つまりトランスフェクトされていない親DG44細胞（50～100U/ml）中レベルよりも25倍高い）と測定された。高めた濃度のMTXの存在下での培養の結果、細胞内分泌α-Gal A活性の上昇がもたらされた（表III）。興味深いことに、産生された全α-Gal Aの80%以上が分泌され、高められたMTX濃度での生育は、分泌された酵素のパーセントを増加させ続けた。表IIIに示されたデータは、細胞が、示されたMTX濃度の存在下で増幅され、MTXの非存在下（選択圧下での生育中よりも低い細胞内活性の原因となる）で３週間生育させた後にそれらのα-Gal A活性を検定した後に得られたものであることに注意されたい（Pallavicini, et al., 1990, Mol. Cell Biol. 10: 401; Kaufman, R. J., 1990, Meth. Enzymol, 185: 537; Kaufman, R. J., 1990, Meth. Enzymol, 185: 487）。

表III

メトトレキセート中での段階的増幅後のp91-AGA でトランスフェクトされたCHO 系DG5.3 における細胞内および分泌されたα- ガラクトシダーゼA 活性。データはメトトレキセートの非存在下に3 週間の培養後のクローンに関して得た。

メトトレキセート濃度 (μM)	CHO 細胞 (U/mg)	培地* (U/ml)
非トランスフェクトDG44:	250	100
トランスフェクトp91AGA5-3:		
0.00	375	150
0.02	550	265
0.08	600	560
1.3	2,560	2,090
20	6,270	6,530
40	5,795	6,855
80	6,365	8,750
250	5,720	9,945
500	12,560	18,140

* 各メトトレキセート濃度について１０^{7} 個の細胞と10 ml の培地

6.2.4. 過剰発現されたリソソーム酵素の特異的分泌

α-Gal Aの分泌がリソソーム標的に対するレセプターの飽和によるものかどうかを決定するために、クローンDG5.3の培養培地に他のリソソーム酵素が存在するかどうかを調べた。

表IVに示されているように、７種の代表的なリソソーム酵素の活性は増加しないか、またはDG44親細胞系の培地のものよりも低く、α-Gal AのDG5.3分泌は特異的であることを示した。

この分泌がクローンDG5.3に対して特異的であるかどうかを決定するために、α-Gal Aを分泌しない（すなわち、培地中の活性は120U/mlであった）別のクローンであるDG9を、高

めた濃度のMTX（すなわち、0.02～20μM MTX）で段階的な培養に供した。20μM MTXの増幅後、クローンDG9は9,400U/mgの細胞内レベルと7,900U/mlの分泌レベルのα-Gal A活性を有していた（すなわち、産生された全α-Gal A活性の89%が分泌された）。

表IV

トランスフェクトされたCHO 細胞の培養培地中に分泌されたリソソーム酵素活性

	CHO 細胞系	
	DG44*	5～3$_{250}$*
リソソーム酵素	コントロール	α-Gal A
α- ガラクトシダーゼA	56	16,900
α- アラビノシダーゼ	2.4	0.9
α- フコシダーゼ	341	358
β- ガラクトシダーゼ	35.2	8.9
β- ガウクロニダーゼ	90.0	53.7
β- ヘキソサミニダーゼ	2,290	2,090
α- マンノシダーゼ	147	82.8
酸性ホスファターゼ	30.6	6.1

* 二つの独立した実験での3 決定値の平均

50mMのブチレートによる組換えCHO細胞の処理は、CHO細胞中の安定に組込まれたp91023（B）ベクターの転写を特異的に増加させることが示されているので（Dorner, et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 20602; Andrews & Adamson, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 5461）、増幅されなかった別のトランスフェクトされたクローンのDG11を５mMのブチレートの存在下で生育させた（表V）。α-Gal A活性の細胞内レベルは、259U/mgから687U/mgまで増加した。注目すべきは、ブチレートの存在下で、増加したα-Gal A活性は培地中に分泌され(103～675U/ml）、分泌は遺伝子コピー数が増加したとき（またはより正確にはα-Gal AのmRNAの安定状態が向上したとき）起こることが示唆された。５mM M-6-P（細胞表面レセプターによる分泌酵素の再捕捉を防止する）とともにブチレート誘導細胞をインキュベートすることはα-Gal Aの分泌量の著しい増加をもたらさなかった。

表V

CHO DG11中のα-Gal A分泌に対するブチレートの効果

	α-Gal A活性	
クローン	細胞	培地
	(U/mg)	(U/ml)
コントロール	259	102.6
ブチレート	687	675
ブチレート＋ 5 mM M-6-P	604	700

6.2.5. 分泌に対する血清濃度の効果

生育培地の血清濃度が組換えα-Gal A分泌のレベルに効果を持つかどうかを決定するために、クローンDG5.3を100mmの培養皿に１皿あたり５ X １０^{6}個の細胞密度で、０%～10%の透析FCSの存在下に５日間培養した。2.5%～10%血清を用いて培養した細胞中ではα-Gal A分泌に対する明らかな効果はなかった（図3A～3B）。０%と１%の血清中で培養したDG5.3細胞による分泌の減少レベルはこれら細胞の不十分な生育を反映したものであろう。

6.2.6. バイオリアクターによる生産

大量の組換えヒトα-Gal Aの生産のため、500μMのMTXの存在下に培養したクローンDG5.3（ＤＧ５．３$_{500}$）の１０^{8}個の細胞を用いて中空繊維バイオリアクターに接種した。図４に示されているように、α-Gal Aの産生量は１日あたり約10,000U/mlまで増加した。この量は約３ヵ月間一定であった。さらに、バイオリアクター中でこれらの細胞により必要とされる血清濃度は、α-Gal A産生をひどく減少させることなく１%まで段階的に減少した（図4）。このバイオリアクターの90日間の一回の操作の結果、培養培地中に分泌された350mgを超える活性型組換えα-Gal Aが得られた。

6.3. 考察

ヒトα-Gal Aに関して、翻訳後修飾は安定性と活性に不可欠であるように思われ、これは大腸菌で発現された非グリコシル化酵素が不安定であり迅速に分解されるということから証拠付けられている（Hantzopoulos & Calhoun, 1987, Gene 57: 159）。さらに潜在的な４つのN-グリコシル化部位を有するα-Gal Aサブユニットはリソソーム輸送のために炭水化物修飾とリン酸化を受ける（Lemansky, et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 2062）。血漿と組織から精製されたα-Gal Aのこれまでの特性付けにより、異なる炭水化物組成が同定され、血漿の糖型はさらに多いシアル酸残基を有していた（Bishop, et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta 524: 109; Bishop, et al., 1980, Birth Defects 16:1; p. 17; Bishop and Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256:1307）。さらに、酵素治療の臨床試験では、組織由来の形のものに比較して、血漿の糖型は循環に長く保持され、ファブリー病の患者に静脈内投与した後に循環する蓄積基質を激減させるのにさらに効果的であることが明らかとなった（Desnick, et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5326）。従って、CHO細胞によるヒトα-Gal Aの増幅発現を、天然の組成がガラクトシル残基とシアル酸残基を有するこの組換え酵素の発現のために選択した（Ledonne, et al., 1983, Arch. Biochem. Biophys. 224:186）。

これが、うまく過剰発現された最初のヒトリソソームヒドロラーゼであるが、予期されない発見は産生された酵素の80%以上の分泌であった。これは、（a）マンノース-6-リン酸受容体経路の飽和；（b）重要なグリコシル化部位を変える変異；（c）レセプター結合のためにマンノース-6-リン酸部分を露出させることの機能停止；または（d）マンノース-6-リン酸受容体に対する組換えα-Gal Aの非常に低い親和性といった異なる機構から生じ

得たものである（Reitman & Kornfeld, 1981, J. Biol Chem. 256: 11977; Lang, et al., 1984, J. Biol. Chem. 259: 14663；およびGueze, et al., 1985, J. Cell. Biol. 101: 2253；概説については、Kornfeld & Mellman, 1989, Ann. Rev. Cell. Biol. 5: 483を参照）。α-Gal Aの分泌がレセプター仲介経路の飽和によった場合、他の内在性リソソーム酵素も分泌されることが期待されたであろう。しかし、分泌されたCHOヒドロラーゼ量は変化しなかったか、または減少した（表IV）。ベクターの構築と組込み中に導入されたα-Gal AのcDNAの起こり得る変異を排除するために（Calos, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015）、組込みベクターDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅した。10個のサブクローンが両方の方向で完全に配列決定され、いかなる変異も同定されなかった。精製組換えタンパク質の比較研究（以下に記載）で、マンノース-6-リン酸部分が酵素上に存在することと、酵素が固定化マンノース-6-リン酸受容体に十分に結合していることが示された。さらに、利用された発現系中のこのタンパク質の分泌はα-Gal Aに依存しないことを証明するために、別のリソソームヒドロラーゼのα-N-アセチルガラクトサミニダーゼをコードするcDNAをp91023（B）に挿入し、これをCHO細胞中で増幅した。α-Gal Aで観察されたことと類似して、α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ（α-GalNAc）の高い発現物である細胞も培地中に組換え酵素を分泌した。

分泌酵素上の機能的マンノース-6-リン酸部分の存在は、恐らく異なる機構がその分泌の原因であることを意味している。実際、多くの他の分泌タンパク質はマンノース-6-リン酸を含有することが示された。これらのタンパク質のいくつかにはリソソームタンパク質があるが、他のものの存在は明らかではない。これらのタンパク質として、増殖しているマウス胎盤細胞系から分泌されるプロリフェリン（Lee & Nathans, 1988, J. Biol. Chem. 263:3521）、A-431細胞の表皮増殖因子レセプター（Todderud & Carpenter, 1988, J. Biol. Chem. 263:17893）、トランスフォーミング成長因子β1（Purchio, et al., 1988, J. Biol. Chem. 263: 14211）、ブタの子宮内膜から大量に分泌される鉄含有酸性ホスファターゼであるウテロフェリン（Baumbach, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2985）およびマウスNIH 3T3繊維芽細胞から分泌されるマウスリソソームシステインプロテアーゼであるカテプシンL（MEP）（Sahagian & Gottesman, 1982, J. Biol. Chem. 257: 11145）がある。興味深いのは、キルシュタインウイルスによるNIH 3T3細胞の形質転換はMEPの合成の25倍の増加をもたらして、この酵素を、機能的マンノース-6-リン酸部分が含有されていても選択的に分泌させる（Sahagian & Gottesman, 1982, J. Biol. Chem. 257: 11145）。最近、MEPの選択的分泌に関する機構が同定され、それはマンノース-6-リン酸受容体に対するMEPの固有の低親和性をともなっている（Dong, et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 7377）。

酵母中の酵母液胞カルボキシペプチダーゼYの血漿支配の過剰発現は、前駆体の形として分泌される正常グリコシル化タンパク質の50%以上をもたらす（Stevens, et al., 1986, J. Cell. Biol. 102: 1551）。同様な発見が酵母プロテイナーゼA遺伝子について観察された（Rothman, et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3248）。いくつかの研究によれば、前駆体糖タンパク質は、分泌経路により認識されるN末端の前ペプチド内に置かれた細胞下の局在シグナルを有することで、リソソーム様液胞への輸送を排除していることが示唆されている。これらの酵母遺伝子の分泌は遺伝子量に依存し、同様な現象がCHO細胞でのヒトα-Gal Aの発現に関して観察されていることが注目される。さらに、酵母酵素の前駆体形が分泌されていたことが興味深い。α-Gal Aの血漿形は、さらに多くシアル化され分泌され、ヒト尿中のリソソーム酵素は前駆体形であることが示された（Oude-Elferink, et al., 1984, Eur. J. Biochem. 139: 489）。しかし、DG44.5により発現された組換えα-Gal AのN末端配列決定で、そのアミノ末端はヒト肺から精製されたα-Gal Aのものと同じであることが明らかになった（Bishop, et al., 1986, Proc. Natl. Acad. USA 83:4859）。従って、ヒトリソソームヒドロラーゼの高レベル発現の結果、前駆体を修飾することができないために、および／または細胞下の局在仕組みが過剰発現糖タンパク質の細胞内輸送をはかることができないためにそれらヒドロラーゼの分泌が引き起こされることがあり得る。しかし、これは再び他のリソソーム酵素の分泌をもたらすであろう

。他のリソソーム酵素は培養培地では検出されないために、α-Gal Aの分泌は細胞下の局在仕組みの成分の飽和から生じることはあまりありそうにもない。
組換えα-Gal Aの分泌された形と細胞内の形との間のアミノ酸、炭水化物または他の差異（例えば硫酸化）を決定することに向けられたさらに別の研究は、ヒトα-Gal Aの置き違えと選択的分泌を基礎付ける機構への洞察を提供するかも知れない。さらに、この観察の一般性を評価する努力には他のヒトリソソーム酵素の過剰発現を含むべきである。大量の組換えヒトα-Gal AがCHO細胞により分泌されることにより、組換え酵素の便利な生産が可能となる。下記のセクション８で組換え酵素の精製法とその物理的および反応速度的性質（ファブリー繊維芽細胞によるレセプター仲介の取込等）の特性付けを記載する。

7. 例：組換えα-ガラクトシダーゼAの精製、特性付けおよびプロセシング

以下のサブセクションでは増幅可能な真核発現ベクターのp91023（B）中にクローン化され、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で過剰発現されたヒトα-ガラクトシダーゼAの精製を記載する。この組換え酵素タンパク質は培養培地中に選択的に分泌され、200mg以上がα-ガラクトシルアミン-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィー等のファーストプロテインリキッドクロマトグラフィー法により均一に精製された。この精製された分泌酵素は、それぞれ約110kDaと57kDaの天然のサブユニット分子量を有するホモ２量体糖タンパク質であった。組換え酵素は3.7のpI、4.6の至適pH、4-メチルウンベリフェリル-α-D-ガラクトピラノシドに対して1.9mMのkmを有していた。それは、酵素産生CHO細胞のリソソームに対してアポリポタンパク質Eとともに標的にされる天然のグリコスフィンゴ脂質基質の蛍光標識類似体であるピレン-ドデカノイル-スフィンゴシル-トリヘキソシドを迅速に加水分解した。パルスを追う研究では、３分以内にジスルフィドで定められた二次構造を取った組換え酵素が５分までにゴルジ内に存在し、ここでエンドH抵抗性となり、45～60分までに培地に分泌された。細胞内の形と分泌された形の両者がリン酸化されていた。分泌された酵素サブユニットは細胞内サブユニットよりもわずかに大きかった。しかし、エンドグリコシダーゼ処理後、両サブユニットはSDS-PAGEで同じ移動を示し、この二つの形のものはオリゴ糖部分が異なることを示した。放射能標識の分泌酵素を多様なエンドグリコシダーゼで処理することで、三種類のN結合オリゴ糖鎖、二種類の高マンノースタイプ（エンドH感受性）および一種類の複合体タイプが明らかとなり、後者のものはエンドHとF感受性であった。エンドH放出オリゴ糖の分析は、一つが固定化マンノース-6-リン酸受容体に特異的に結合した二つのリン酸残基を有し、他のものはシアル酸を含有するハイブリッド構造物であることを明らかにした。これらの物理的および反応速度的性質および組換え分泌酵素上の複合物タイプのオリゴ糖鎖の存在は、ヒト血漿から精製された天然酵素のものと類似していた。α-Gal Aの分泌形は、２mMのマンノース-6-リン酸の存在下にブロックされた飽和可能なプロセスにより培養ファブリー繊維芽細胞によって吸収され、結合とインターナリゼーションがマンノース-6-リン酸受容体により仲介されることを示した。固定化受容体に対する組換え分泌酵素の結合的特徴とNH4Cl処理のヒト繊維芽細胞により分泌されるα-Gal Aの結合的特徴は同一であった。血漿から単離された天然酵素に構造が類似する、本発明による大量の可溶性活性型組換えα-Gal Aの産生により、天然酵素形との比較およびファブリー病での酵素置換の臨床的評価が可能となるであろう。

7.1. 材料と方法

7.1.1. 材料

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼH（エンドH）、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼD（エンドD）、エンドグリコシダーゼF（エンドF）およびペプチド：N-グリコシダーゼF（PNGase F)はBoeringer Mannheim（Indianapolis, IN）から入手した。[^{35}S]-メチオニン（>1,000Ci/mmol）、D-[2,6-^{3}H]-マンノース（60Ci/mmol）、^{32}P-リン（10mCi/ml）およびアンプリファイ（Amplify）はAmersham（Arlington Heights, IL）から入手した。パンソルビンはCalbiochem（San Diego, CA）から入手した。4-MUグリコシドはGenzyme（Cambridge, MA）から入手した。フロイントアジュバント、スフィンゴミエリン（脳由来）およびフェニルメチルスルフォニルフルオライド（PMSF）はSigma（St. Louis

, MO）から入手した。QAEセファデックス、セファデックスG-25、オクチルセファロースおよびスーパーローズ６はPharmacia-KLB（Piscataway, NJ）から入手した。TLCシリカプレート（cat. 5626）はEM Science（Gibbstown, NJ）から購入した。COS-1細胞系はATCCから入手した。すべての組織培養試薬はGibco（Grand Island, NY）から入手した。Siti Verse Iシンチレーションカクテルは Fisher（Pittsburgh, PA）から購入した。固定化マンノース-6-リン酸受容体はワシントン大学（St. Louise, MO）のDr. Stuart Kornfeldから得られた。プレン-ドデカノイル-スフィンゴシル-トリヘキソシド（P-C_{12}STH）はヘブライ大学（Israel）のDr. Shimon Gattから入手した。アポリポタンパク質EはBTG社（Nessziona, Israel）から入手した。

7.1.2. 細胞培養

10%ウシ胎児血清（FCS）と抗生物質を含有するダルベッコの改良イーグル培地（DMEM）に５% CO_2で37℃に細胞を維持した。HT（ヒポキサンチン、チミジン、Sigma）を加えたDMEMでDG44系を培養する一方で、組換えCHO系DG5.3は10%の透析FCSを加えたDMEMを受けさせた（Kaufman, et al., 1988, J. Biol. Chem. 263: 6352）。

7.1.3. 組換えGal-Aの精製

組換えCHO培養培地を集め（20リットル）、10,000ダルトンの排除分子量を有するペリコンカセット接線流濃縮器（Millipore, MA）を用いて500mlまで濃縮した。濃縮液のpHは10NのHClで4.7～5.0に調節し、次にRC-5冷却遠心機を用いて10分間10,000 X gで遠心して清澄にした。

すべてのクロマトグラフィーステップはFPLC装置（Pharmacia）により自動化され、室温で行なわれた。約100mlの培地濃縮物（約20mgのα-Gal A酵素タンパク質）を、緩衝液A（0.1Mクエン酸／リン酸緩衝液、pH4.7、0.15M NaCl）で前もって平衡化させておいたα-Gal Aアフィニティーカラム（α-GalNH_2-セファロース; 2.5 X 8cm）（Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307）にアプライした。このカラムを溶出液中のタンパク濃度がアプライする前に戻るまで緩衝液A（約200ml）で洗浄し、150mlの緩衝液B（0.1Mのクエン酸／リン酸緩衝液、pH6.0、0.15M NaCl、70.4mMガラクトース）で溶出させた。溶出液を集めて、正の窒素圧下に30,000ダルトンの排除分子量を有する限外濾過セル（Amicon）を用いて約20mlまで濃縮した。等量の緩衝液C（25mM Bis-Tris, pH6.0, 3M（NH_4）$_2SO_4$）と混合し、10,000 X gで遠心し、活性の40%までを含有するペレットを緩衝液Aに再溶解し、等量の緩衝液Cと混合し、上記のように遠心した。一緒にした上清を緩衝液D（25mM Bis-Tris, pH6.0, 1.5M（NH4）2SO4）で前もって平衡化させたオクチル－セファロースカラム（1.5 X 18cm）にアプライした。このカラムを上記のように溶出タンパク質濃度がアプライする前のレベルに戻るまで洗浄し（約100ml）、このカラムを緩衝液E（5mMリン酸ナトリウム、pH6.0、50%エチレングリコール）で溶出させた。オクチル－セファロースの３溶出物の生成物は全部で約75mlであり、アミコン濃縮器を用いて２mlまで濃縮した。緩衝液F（25mMリン酸ナトリウム、pH6.5、0.1M NaCl）で平衡化させたスーパーローズ６カラム（20～40μm, Pharmacia, 1.6 X 100cm）にこの濃縮物を最終的にアプライした。α-Gal Aピークを集めて（約20ml）、上記のように濃縮し、緩衝液F中に４℃で保存した。

7.1.4.酵素及びタンパク質アッセイ

4-メチルウンベリフェリル-α-D--ガラクトピラノシド（4-MU-α-Gal）を用いて、（Bishop, et al., 1980, In Enzyme Therapy in Genetic Diseases: 2. Desnick, R. J. （Ed.）. Alan R. Liss, Inc. New York, p.17）に記載されたようにしてα-Gal Aをアッセイした。要約すれば、５mM 4-MUのストック溶液を、超音波槽内で可溶化した0.1Mクエン酸－リン酸緩衝液（pH4.6）中に調製した。10～50μlの酵素調製物又は細胞抽出物及び150μlの基質を含む反応混合物を、37℃で10～30分インキュベートした。反応を、2.33mlの0.1Mエチレンジアミンを添加することにより停止させた。活性の１単位は、１時間あたり１nmolの基質を加水分解する酵素の量である。

エンドH、エンドD、エンドF及びPNGase Fの消化を（Tarentino, et al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32: 111）に記載されたように行った。消化する前に試料を0.2～0.5%のSDSに希釈した。全ての反応用量は50μlであった。１滴のトルエンを各反応チューブに加え、

細菌の増殖を防止した。要約すれば、エンドH消化（５mU/反応）は、37℃で一晩、５mMクエン酸ナトリウム（pH5.5）及び0.2mM PMSF中で行った。エンドD消化（10mU/反応）は、37℃で一晩、0.2Mクエン酸リン酸緩衝液（pH6.0）及び0.2mM PMSF中で行った。エンドF消化（50mU/反応）は、30℃で一晩、0.17M酢酸ナトリウム（pH6.0）、1.6%のNP-40及び0.2mM PMSF中で行った。PNGase F消化（100mU/反応）は、30℃で一晩、0.17Mリン酸カリウム（pH8.6）、1.6%のNP-40、0.2mM PMSF中で行った。

タンパク質濃度は、Bishopらにより改変された（Bishop et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta 524: 109）フルオレサミン法（Bohlen, et al., 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155: 213）によって測定した。

7.1.5. IN VIVO天然基質アッセイ

このアッセイのため、30nmoleの$P\text{-}C_{12}$STH及び70nmoleのスフィンゴミエリンをクロロホルム：メタノール溶液（１：１）中に混合し、窒素下で蒸発させ、そしてSpeed-Vac（Savant）中で乾燥した。ペレットを２mlの生理食塩水に再懸濁し、Heat Systems Ultrasonics社のMicrosonソニケーター（sonicator）を用いて、40%の出力で３～５分超音波処理し、そして１時間室温で静置した。

アポリポタンパク質Ｅ（80μg）を添加し、その混合物を室温で更に15分インキュベートした。リポソームを組換えCHO細胞の培養培地に添加し、CO_2インキュベーター中で、37℃で１～４時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理によって培養皿から回収し、10%ウシ胎児血清を補ったDMEM中で１回、生理食塩水で２回洗浄した。細胞ペレットをクロロホルム－メタノール中に再懸濁し、60℃で10分加熱し、そして600×ｇで10分遠心した。上清を窒素下で除き、ペレットを100μｌのクロロホルム：メタノール中に再懸濁した。試料をシリカゲル薄層クロマトグラフィーのプレートにスポットし、クロロホルム：メタノール：水（90：10：１）中で45分、次いでクロロホルム：メタノール：水（75：25：４）中で30分クロマトグラフィーにかけた。生成物をUV光（330nm）のもとで可視化させ、こすり取ることによりプレートからはぎ取り、クロロホルム：メタノール中に再懸濁し、そしてFarrand分光蛍光計（343nm励起、378nm放出）中でそれらの蛍光発光を計量した。

7.1.6.ポリクローナル抗体

以下のようにして調整したフロイント完全アジュバント中の精製脾臓のα-Gal A 150μｌを、ニュージーランドホワイトウサギ（２kg）に注射した：150μgのα-Gal Aをガラスシリンジ内の0.5mlのPBSに添加し、ステンレススチール21ゲージ針を用いて、PBS/α-Gal A溶液をフロイント完全アジュバントとともに別のガラスシリンジ中に均一なエマルジョンが得られるまで混合した。かかるエマルジョンを８か所の異なる皮下部位（背）及び１か所の筋内部位（腿）に注射した。初回注射から２月後、上記のようにフロイント不完全アジュバント内のα-Gal Aの50μgを用いて、ウサギに追加免疫した。追加免疫後８及び12日目に、血清を耳静脈から回収した。標準ELISAアッセイを用いて力価をチェックした（Johnstone & Thorpe, 1982, Immunochemistry in Practice. Balckwell Scientific Publications, Oxford）。その後の追加免疫は、約２か月ごとに行い、その10日後に採血した。典型的な採血は、30～40mlの血液の収量であった。

7.1.7.SDS-PAGE及びオートラジオグラフィー

ポリアクリルアミドゲル電気泳動を10%アクリルアミドを含む1.5mm厚のスラブ内でLaemmliに記載されたようにして（Laemmli, U.K., 1970, Nature 227: 680）、適切な場合には還元条件のもとで行った。ゲルを10%酢酸及び20%メタノール中で30分固定し、次いで、攪拌しながらAmplify中に30分浸漬した。ゲルを90分減圧乾燥し（Hoffer）、コダックX Omat ARに４～72時間露出した。

7.1.8.等電点及び最適ｐＨの測定

Yang及びLangerによって本質的に記載されているように（Yang & Langer, 1987, Biotechniques 5: 1138）、QAEセファデックスを用いて等電点を測定した。最適pHは、25mMリン酸ナトリウム緩衝液中、37℃で測定した。

7.1.9.マンノース-6-リン酸受容体アフィニティークロマトグラフィー及びＱＡＥセファデックスクロマトグラフィー

アフィゲル（Affigel）-10に結合した215kDaのマンノース-6-リン酸受容体（M-6-P受容体）は、パックされたゲルの0.4mg/mlの濃度であった。結合緩衝液（50mMイミダゾール（pH 7.0），150mM NaCl，0.05%Triton X-100，5mM β-グリセロールリン酸ナトリウム，0.02%アジ化ナトリウム）中の試料を、流速0.3ml/分で1.5×0.8cmのカラムにアプライした。試料の添加（５ml）に続き、カラムを５mlの結合緩衝液で洗浄し、結合緩衝液中のマンノース-6-リン酸の非線形勾配（０～５mM）で溶出した。この指数関数的勾配（Dong，et al.，1990，J. Biol. Chem. 265: 4210）を、直径2.5cm及び直径１cmの２つの小室からなる装置により形成した。画分を回収し（0.5ml）、10μlのアリコートを、α-Gal A活性については4-MU-α-Galを用いて、放射活性については10mlのSinti Verse Iシンチレーションカクテルを用いてアッセイした。

３×0.8cmのカラム中のQAEセファデックスクロマトグラフィーを（Varki & Kornfeld，1983，J. Biol. Chem. 258: 2808; Varki & Kornfeld，1980，J. Biol. Chem. 255: 10847）に記載されたように行った。要約すれば、エンドHを用いた消化の後、遊離オリゴ糖（[^{3}H]-マンノースで標識）を、セファデックスG-25の18×0.8cmカラムで単離及び脱塩した。試料をQAEセファデックスカラムにアプライし、０、20、40、80、100、120、140、160、200、400及び1,000mM NaClを含む２mM Tris（pH8.0）の連続的な５mlのアリコートで溶出した。いくつかのそれらの負電荷（０mM NaClで０電荷、20mM NaClで１、70mM NaClで２、100mM NaClで３、及び140mM NaClで４）に従って、オリゴ糖が溶出した。

7.1.10. [^{35}S]-メチオニン、[^{3}H]-マンノース及び[^{32}P]-リンを用いた細胞の標識

100mm皿中の集密培養物を５mlのメチオニン不含のDMEMで１回洗浄した。この培地（５ml）の新鮮なアリコートを各皿にまき、培養物を37℃インキュベーター中で30分インキュベートした。培地を皿から除き、10%の透析したFCS及び50～100μCiの[^{35}S]-メチオニンを補ったメチオニン不含DMEM（１ml）の新鮮なアリコートを添加した。細胞を37℃で３～５分インキュベートし、放射活性培地を除き、FCSを加えたDMEMで２回洗浄した。２mMメチオニンを含むFCSを加えたDMEMの５ml中で、表示された時間について細胞を追跡した。一晩の標識については、透析したFCS、グルタミン、抗生物質、10mM NH_4Cl及び200μCiの[^{35}S]-メチオニンを補ったメチオニン不含のDMEM５mlを培地に加えた。

[^{3}H]-マンノースの標識については、培養物を補充されたDMEM中で上記のように生育させた。細胞を５mlの低グルコースDMEMで洗浄し、培地の新鮮なアリコートを添加した。[^{3}H]-マンノース（250μCi；窒素下で乾燥させ、DMEM中に再度懸濁した）を添加し、細胞を37℃インキュベーター中で24時間インキュベートした。

^{32}P標識については、培養物を10%の透析したFCSを補ったリン酸不含のDMEMに交換した。[^{32}P]-オルトリン酸（１mCi）を添加した後、培養物を37℃，CO_2インキュベーター中で24時間インキュベートした。

7.1.11. 細胞溶解及び免疫沈降

100mmの培養皿で生育した細胞を５mlのリン酸緩衝溶液（PBS）で２回洗浄し、ゴム製のポリスマン（policeman）及び10mlのPBSを用いて12mlの円錐形のチューブにかき集めた。2,500rpmで10分遠心した後、細胞を１mlの25mM $NaPO_4$（pH6.0）に再懸濁し、Bransonカップソニケーター中で15秒の破裂を３回行った。遠心（10,000×gで４℃で15分）により細胞の残骸を除去した。これとは別に、細胞を上記のように洗浄し、１mlの溶解緩衝液（50mMリン酸ナトリウム（pH6.5）、150mM NaCl、１mM EDTA、１% NP-40、0.2mM PMSF）を皿に添加した。培養皿を４℃で30分インキュベートし、細胞を1.5mlのマイクロ遠心チューブに移した。細胞残骸を上記のようにして除去した。

免疫沈降は、（Sambrook，et al.，1989，Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 18.42-18.46）に記載されたようにして行った。要約すれば、0.5mlの細胞溶解物又は培養培地を1.5mlのマイクロ遠心チューブ中に入れ、50μlの予め免疫したウサギ血清を添加した。その混合物を穏やかに攪拌しながら４℃で１時間インキュベートした。50μlのパンソルビン（Pansorbin）を添加し、インキュベーションを30分続けた。その混合物を10,000×gで５分遠心分離することにより不純物を除去し、100μlの抗α-Gal Aポリクローナル抗体を添加し、穏やかに前後にゆすりながらイ

ンキュベーションを４℃で１時間続けた。パンソルビン（100μl）を添加し、上記のようにしてインキュベーションを30分続けた。三次のS. aureus細胞－抗体－抗原複合体を上記のようにして遠心分離によって回収した。上清を廃棄し、ペレットを、0.5M NaClを補ったNET緩衝液（50mMリン酸ナトリウム（pH6.5）、150mM NaCl、１mM EDTA、１% NP-40、0.25%ゼラチン）中、0.1% SDSを補ったNET緩衝液中及びTN緩衝液（10mM Tris（pH7.5）、0.1% NP-40）中で連続的に洗浄した。免疫沈降したタンパク質を、２% SDS、100mM DTT（DTTは二次構造の形態を伴う実験については使用しなかった）の存在下、100℃で５分間加熱することにより変性させた。S. aureus細胞を、室温で10,000×g、５分間遠心分離することにより除去した。

７．２．結果

7.2.1.精製

細胞のバイオリアクター中で生成された組換えα-Gal Aを、α-GalNH_2-C_{12}-セファロースでのアフィニティークロマトグラフィー（Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307）、続いてオクチルセファロースでの疎水クロマトグラフィー及び100cmのスーパーロース６カラムでのゲルろ過によって、上記のように粗製培地から精製した。表VIは、20mgロットの組換えα-Gal Aの典型的な精製及び精製の各段階での酵素の特異的活性を示す。組換え酵素は、ゲルろ過段階後では本質的に均一であり、SDS-PAGEによる判定で＞98%純粋であった（図５）。ウシ血清アルブミンの微小混入は、さらにブルー－セファロース（Travis, et al., 1976, Biochem. J. 157: 301）のカラムでのゲルろ過段階によって除去され、SDS-PAGEで20μgのα-Gal Aを泳動することにより99%以上も純粋であると判定された酵素調製の結果を得た。

表VI

組換えα-Gal AのFPLC精製

20 mgのα-Gal Aを用いて開始した典型的な精製の進行

段階	U ×10^3	U×10^3	精製倍率	収率（%）
培地	39,750	5	1	100
α-Gal NH_2-	36,500	680	136	91
オクチル セファロース	31,750	3,400	680	79
スーパーロース6	30,800	4,150	830	78

組換えα-Gal Aの精製が血清不含培地中のCHO細胞の増殖によって促進されるだろうということは、全細胞及び分泌タンパク質の代謝標識によって立証された。図５に見られる結果と対照的に、放射標識されたα-Gal Aは、高発現系であるDG5.3の培地中に見られる、本質的に唯一のタンパク質であった（図６）。

7.2.2.物理速度論的性質

組換えα-Gal Aは、SDS-PAGEに基づき、約57Kdの分子量のサブユニットを持つことが分かった（図５）。人工基質である4-MU-α-D--ガラクトピラノシドに対するKmは1.9mMであり（図7A）、最適pH及び等電点はそれぞれ4.6及び3.7であった（図7B及び7C）。

組換え酵素が、その天然の基質を認識及び加水分解するかどうかを測定するために、蛍光標識したα-Gal Aの基質である$P-C_{12}STH$及びアポリポタンパク質E（リソソームのターゲッティングのための）を含むリポソームを、α-Gal Aを過発現しているCHO細胞（クローンDG5.3）とともにインキュベートした。図8A～8Bに示されるように、組換えのリソソームα-Gal Aは、基質を$P-C_{12}SDH$（ジヘキソシド）に急速に加水分解した。$P-C_{12}STH$の急速な加水分解は、組換えα-Gal Aがこの天然基質の類似体を認識し、極めて効率良くそれを加水分解することができることを示す。また、この基質はリソソームを標的にしているので、細胞結合組換えα-Gal Aは、この位置を正確に標的としなければならない。これらの結果は、CHO細胞により生成及び分泌された組換えα-Gal Aが、ヒト血漿から精製された酵素と本質的に同一であることを示す（表VII）。

表VII

ヒト組織から精製した組換えα-ガラクトシダーゼA

の性質の比較

性質	α-Gal A 脾臓	血漿	組換え
MW- サブユニット,(KDa)	53	57	57
最適pH	4.5	4.6	4.6
等電点, PI	4.3	3.7	3.7
Km (4-MU-α-D-Gal), mM	2.5	1.9	1.9
リン酸化 (M-6-P)	+	?	+
天然基質加水分解 (GL-3)	+	+	+

7.2.3.組換えα-Gal Aの分泌のプロセシング及び割合

小胞体を横切る発生期のポリペプチドは、翻訳とともに又はそれらの合成が完了した直後に二次構造の形態を呈する（Gething, et al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32: 185）。α-Gal Aを[^{32}S]-メチオニンで３分間標識し、表示された時間について非標識メチオニンとともに追跡した。免疫沈降α-Gal AをSDS-PAGEで可視化した。追跡の間形成し、二次構造の形態を示すかもしれないジスルフィド架橋を維持するため、試料をDTTなしで調製した。ジスルフィド結合及び二次構造を破壊するためDTTの存在下で60の微小な試料のアリコートを煮沸することにより、対照（＋DTT）を調製した。追跡の０分（標識３分後）では、既にこの酵素の移動度に変化が生じ、このことは形態の変化が、翻訳とともに又は合成終了直後に起こっていることを示唆する（図９）。

ゴルジネットワークへの新規ポリペプチドの到達は、エンドH抵抗性オリゴ糖の獲得によって検出された（Gething, et al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32: 185）。放射標識α-Gal A（３つの微小パルス）を、上記のように非放射標識メチオニンを用いて追跡し、免疫沈降した。次いで、免疫沈降物をエンドHで処理し、SDS-PAGE上で可視化させた。追跡の２～７分の間に、α-Gal Aの最初のエンドH-抵抗性の形態を検出でき、その合成後約５～

10分にゴルジでの組換え酵素の到達を示す（図10）。エンドH感受性の形態の大多数は、60分の追跡により抵抗性となった。
この酵素は、ゴルジネットワークを横断し、追跡の45～60分で分泌される（図11）。[S^{32}]-メチオニン標識細胞からの全培地の解析は、組換えCHO細胞による分泌タンパク質の＞95%がα-Gal Aであることを表した（図12）。

7.2.4. 組換えα-Gal Aによる炭水化物部分の解析

ｃＤＮＡ配列によって予測されたα-Galサブユニット内に、４つのN-グリコシル化コンセンサス配列（Asn-X-Ser/Thr）がある。第４番目の部位は、X部位にプロリン残基を含むので、恐らく利用されないであろう。組換えα-Gal AをエンドH、エンドF、エンドD及びPNGase Fで消化した。PNGase Fを用いた消化は、SDS-PAGEでの移動度においてα-Gal Aの半分の^{TM}7 kDaを引き起こした（図13）。分子量におけるこの変化は、３つのN-結合炭水化物部分の除去に帰するものとし得る。エンドH、エンドF及びPNGase Fのカクテルを用いた組換え酵素の消化によって、更なる分子量の減少を何らもたらさなかった。これは、酵素の全てが３つのN-結合炭水化物部分を含むことを示唆する。
高マンノースコアペンタ糖の低Manα1-3枝に対して厳密な特異性を有するグリコシダーゼであるエンドD（Tarentino, et al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32: 111）は、α-Gal Aの移動度には効果を持たなかった。これは、組換え酵素はこのタイプのオリゴ糖を含まないことを示す（図13）。エンドH及びエンドFはともに４kDのシフトをもたらし、これは、この酵素による３つのオリゴ糖の２つが高マンノース型であることを示す（Varki & Kornfeld, 1980, J. Biol. Chem. 225: 10847）。
興味深いことに、細胞内α-Gal AはPNGaseに対して完全に感受性である一方、分泌酵素の半数は、PNGaseに対して部分的に抵抗性であった（図14）。この抵抗性は、エンドHとエンドFとの共処理によって除去され（図13）、PNGase Fの選択的阻害、又はPNGase F消化に対する組換え分泌酵素の比率のいずれかの分子的性質を決定するためには、エンドH及びエンドFを別々に用いた更なる研究が必要である。
組換え酵素が３つのオリゴ糖を含み、その２つが高マンノース型であることを測定することにより、グリコシル化の阻害効果を調査した（Furhmann, et al., 1985, Biochim. Biophys. Acta 825: 95）。組換えα-Gal Aのプロセシング及び分泌は、オリゴ糖のプロセシングの選択的阻害によって影響されない。デオキシノジリマイシン（グルコシダーゼＩ及びIIの阻害剤）、デオキシマンノジリマイシン（マンノシダーゼＩの阻害剤）、及びスワインソニン（swainsonine）（マンノシダーゼIIの阻害剤）の存在下では、α-Gal Aの分泌率は対照と同様に維持している（図15）。しかしながら、ツニカマイシン（オリゴ糖添加の阻害剤）は、α-Gal Aの分泌量を80%阻害する（図15）。ツニカマイシン処理培地からの分泌酵素は、Con Aセファロースカラムに結合することができた。これは、この酵素が部分的にグリコシル化され、恐らく、ツニカマイシンによるグリコシル化の不完全な阻害によるものであろうということを示す。これらの結果は、試験されたプロセシングイベントではなくオリゴ糖添加が組換え酵素の成熟及び分泌に必要であることを示す。

7.2.5.リン酸化

組換えα-Gal Aは高マンノース部分を含んだため、その組換え酵素はM-6-Pを含むことができ、そして受容体媒介取り込みについて有能であった。クローンDG5.3からの細胞を[^{32}P]-オルトリン酸で12時間代謝標識し、次いでその細胞抽出物及び培地を免疫沈降にかけてSDS-PAGEで可視化した。図16に示すように、細胞結合及び分泌α-Gal Aは、両方とも、恐らく上記in vitroの実験により示唆されたそれらの炭水化物部分でリン酸化された。

7.2.6. エンドH感受性オリゴ糖の解析

エンドHを用いて免疫沈降[^{3}H]-マンノース標識α-Gal Aを処理することにより、高マンノースオリゴ糖を回収した。これらのオリゴ糖をQAEセファデックスでのクロマトグラフィーにより解析した（Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808;及び、Varki & Kornfeld, 1980, J. Biol. Chem. 255: 10847）。これらオリゴ糖の２つの主要な型を検出し、一つの型は２つの負電荷を持ち、一つは４つの負電荷を持つ（図17A）。この負電荷はホスホジエステル部分（-1）、ホスホモノエステル部分（-2）又はシアル酸（-1）に

よって寄与され得る。希釈HClでのこれら糖の処置により、いずれのピークのプロフィールをもシフトしなかった。これは、これら糖にはホスホジエステルがないことを示す（図17B）（Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808）。ノイラミニダーゼで処理すると、０及び-1負電荷での２つの新しいピークをもたらすシフトを引き起こす（図17C）。従って、-2ピークの電荷はシアル酸、おそらく２つの部分によって寄与される。ノイラミニダーゼ処理後の-1ピークの結果は、おそらく酵素による-2ピークの部分的消化によるものであろう。アルカリホスファターゼでこれらオリゴ糖を処理すると、-4ピークから０負電荷へのシフトを引き起こす（図17D）。-2ピークでは何ら効果はなく、これは、-4ピークの電荷が２つのホスホモノエステル結合により寄与され、一方、-2ピークは何らこのような結合を含まないことを示す。従って、これらの結果から、エンドHは、組換えα-Gal Aから２つのタイプの高マンノースオリゴ糖を放出し、一つはシアル酸を含み（恐らく、ハイブリッドオリゴ糖）、もう一つは２つのホスホモノエステル結合（思うに、マンノース-6-リン酸として）を含むことが明白である。

これらの結果を更に確認するため、ピーク-2及び-4を不動化したマンノース-6-リン酸受容体カラムでクロマトグラフィーにかけた（図18）。ピーク-4は受容体と弱く相互作用したが、カラムに結合し、溶出に際してマンノース－６－リン酸の添加を必要とした。極めて弱い相互作用が受容体カラムと－２ピークとの間で観察され、これらハイブリッドオリゴ糖の部分がＭ－６－Ｐを含むかもしれないことを示唆する。

高マンノースオリゴ糖のM-6-P受容体との弱い相互作用は、タンパク質コアの欠如により説明し得る（Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808）。DG5.3細胞を[^{35}S]-メチオニンで標識し、その分泌を不動化マンノース－６－リン酸受容体のカラムでクロマトグラフィーにかけた。顕著なことに、カラムに強く結合した組換え酵素は、５mMのＭ－６－Ｐの添加により特異的に溶出した（図19）。

7.2.7. α-Gal Aとマンノース-6-リン酸受容体との相互作用

組換えα-Gal Aがマンノース-6-リン酸部分を含んでいることが示されたので、これが正常なヒトα-Gal Aでも真実であるかどうかを確かめることが重要であった。CHOタンパク質をNH_4Clの存在下で[^{35}S]-メチオニンを用いて標識し、新たに合成されたリソソーム酵素（Dean, et al., 1984, Biochem. J. 217: 27）を定量的に分泌させた。培地を集め、固定化マンノース-6-リン酸受容体のカラムのクロマトグラフィーにかけた。カラムを上記のマンノース-6-リン酸の勾配で溶出した。この溶出実験によりリソソーム酵素を高および低親和性受容体結合配位子に分離できる（Dong & Sahagian, 1990, J. Biol Chem. 265: 4210）。

組換え酵素は、高親和性形態を示すM-6-P濃度でリソソーム酵素のバルク（bulk）と共に溶出した（図20A）。同様の実験をMS914細胞（正常ヒト二倍体繊維芽細胞）（図20B）および293細胞（ヒトアデノウイルス形質転換胚性腎細胞）（図20C）の分泌物を用いて実施した。同様のM-6-P勾配を適用すると、ヒトα-Gal Aもリソソーム酵素のバルクと共に溶出し、これは組換え酵素がM-6-P受容体に対して、正常ヒト酵素の親和性と同様の親和性を示すことを示唆している。

7.2.8. ファブリー繊維芽細胞での組換えα-Gal Aの受容体仲介取り込み

ファブリー繊維芽細胞を種々の量の組換え酵素と６時間インキュベートした（図21）。取り込み培地にM-6-P ２mMを添加すると酵素取り込みが飽和に達し、そして特異的に阻害されたが、これは取り込みが細胞表面のM-6-P受容体を介していることを示唆している。

8. 実施例：哺乳類の細胞により発現されたα-Gal Aタンパク質A融合

以下のサブセクションには、ヒトα-ガラクトシダーゼA cDNAとCOS-1細胞により発現され、そしてIgGアフィニティークロマトグラフィーにより明らかに均質に精製されたブドウ球菌タンパク質A IgG結合ドメインEの融合構築物が記載されている。融合構築物をPCR技術を使用して処理し、α-Gal Aとタンパク質Aドメイン E配列の間に16ヌクレオチドコラゲナーゼ切断認識配列（recognition sequence）を挿入した。さらに、終止コドンをα-Gal cDNAから欠失させ、ドメインE配列の末端に挿入した。COS-1細胞による融合構築物の一時的な発現により、α-Gal A活性が内在的レベルより6-7倍に増加し、培地中に有意に分

泌された（4,000ユニット；nmol/時間）。培地からの融合タンパク質をIgGセファロースクロマトグラフィーにかけ均質に精製した。コラゲナーゼ処理後、遊離のα-Gal AをIgGクロマトグラフィーによりタンパク質Aペプチドから分離した。この方法により分泌されたα-Gal A融合タンパク質の85%以上が活性なグリコシル化ホモダイマータンパク質として精製された。この方法は正常および突然変異体タンパク質の発現法および迅速な精製法として有用であろう。さらに、多量の分泌組換え酵素が生産でき、そして迅速かつ効果的に精製できるためにこの構築物をCHO DG44細胞に挿入した。

8.1. 材料と方法

8.1.1. 材料

制限酵素、Taqポリメラーゼ、T4リガーゼおよびpGemプラスミドはプロメガ社（Promega）（ウイスコンシン州マディソン）から入手した。ベクターpRIT5およびIgG-セファロースはファルマシア社（ニュージャージー州ピスカットウェイ）から購入した。シークエナーゼ配列決定キット（sequenase sequencing kit）はユナイテッドステートバイオケミカルコーポレーション（オハイオ州クリーブランド）から入手した。コラゲナーゼはシグマ社（ミズリー州セント・ルイス）から入手した。オリゴヌクレオチドはアプライドバイオシステムDNA合成機モデル380Bを使用して合成した。

8.1.2. 細胞培養およびトランスフェクション

COS-1細胞はATCC（メリーランド州ロックビル）から入手した。細胞を子牛胎児血清10%および抗生物質を添加したダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）中で標準技術により培養した。

指数増殖COS-1細胞（5×10^6細胞/T75 フラスコ）をトリプシン処理してプラスチック壁からはがし、3,000×gで遠心分離して集め、その後、氷冷エレクトロポレーション緩衝液（リン酸緩衝スクロース；272mMスクロース、７mMリン酸ナトリウム、pH7.4、１mM $MgCl_2$含有）で一回洗浄した。3,000×gで遠心分離後、細胞をエレクトロポレーション緩衝液0.8mlに再懸濁し、そして0.4cmのすきまのエレクトロポレーションキュベットに入れた。プラスミドDNA 10-15μgを添加し細胞を氷上で５分保持した。細胞の入っているキュベットを遺伝子パルスエレクトロポレーション器具（バイオ－ラド）に入れ、そして細胞に350V、25μFでパルスをかけた。細胞をさらに10分氷上で保持し、その後増殖培地10mlが入っている100mm培養皿に入れた。

8.1.3. PCR、DNA配列決定およびベクター構築

融合構築物を最近述べられたPCR技術（Ho, et al., 1989, Gene 77:51; Kadawaki, et al., 1989, Gene 76:161）を使用して合成した。手短に言えば、全長α-Gal A cDNAをpGEMプラスミドにサブクローン化し、そして生じたpG6-AGAプラスミドを、終止コドンを欠失するようにデザインされたプライマーを用いたα-Gal A配列のPCR増幅に使用し、cDNAの３’末端にコラゲナーゼ切断コンセンサス配列を加え、５’末端にEco RI認識配列を含ませた（図22）。センスプライマーは

5'- CCGAATTCATGCTGTCCGGTCACCGTG-3'

であり、アンチセンスプライマーは

5'-CGCCGGACCAGCCGGAAGTAAGTCTTTTAATG-3'

であった。タンパク質AドメインE（Nilsson, et al., 1985, EMBO J. 4:1075）を同様に５’オリゴヌクレオチドのコラゲナーゼコンセンサス配列を用いて増幅した；センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドはそれぞれ

5'- CCGGCTGGTCCGGCGCAACACGATGAAGCT-3'

および 5'- GGCCGAATTCCGGGATCCTTATTTTGGAGCTTGAGA-3'

であった。α-Gal Aおよびタンパク質Aポリメラーゼ連鎖（PCR）反応の1323ntおよび201nt生成物を0.8%アガロースゲルにかけゲル精製し、融合ポリメラーゼ連鎖反応のために混合した。α-Gal A反応からのセンスプライマーとタンパク質A反応からのアンチセンスプライマーを最終融合反応に使用した。この反応の生成物をEco RIを用いて消化し、Eco RI消化プラスミドpGEM4Zに連結した。タンパク質AドメインEおよび、リンカーとα-Gal Aお

よびタンパク質A間の接合部をサンガーのジデオキシヌクレオチド鎖終結配列決定法（Hanahan & Meselson, 1985, Mthods Enzymol. 100:333）で確証した。その後、確証した融合配列をEco RIで消化し、そして真核生物の発現ベクターp91023（B）にサブクローン化した。

8.2. 結果

8.2.1. α-Gal Aータンパク質A（AGA-PA）融合の構築

図22は、αーGal Aータンパク質AドメインE融合配列の構築に用いた戦略を示す。完全長のαーGal A cDNA（1323nt）及びタンパク質AドメインE配列（201nt）を別々に増幅させ、次いで5'-αーGal A cDNAセンスプライマー（P1）及び3'タンパク質Aアンチセンスプライマー（P4）を用いる第二のPCR増幅（図22）により融合した。プライマーは、（a）αーGal A TAA終止コドンを除去し；（b）αーGal Aとタンパク質A cDNA配列の間にPro Ala Gly Proをコードする16ntのコラゲナーゼ開裂コンセンサス認識配列を挿入し；（c）タンパク質AドメインEの3'末端にTAA終止コドンを導入するために設計された。この構築物が完全であることは、タンパク質Aドメイン、リンカー及びαーGal A cDNAの3'を配列決定することにより確認された（図23）。

8.2.2. COS-1細胞におけるpAGA-PAの発現

pAGA-PA構築物によるトランスフェクションの72時間後、細胞抽出物及び使用済み培地において4MU αーGal活性の最高レベルを検出した（表VIII）。

表VIII

COS-1細胞におけるAGA-PA構築物の一時的発現。トランスフェクション後、内在性α－Gal A 活性の７倍の増加が観察された。また培地においてはα－Gal A の増加も観察された。

	α－Gal A 活性*	
COS-1細胞	細胞	培地
	(U/mg)	(U/ml)
対照	210	0
トランスフェクトしたもの	1,300	400

* 基質として4MU-α-Gal を用いて検定した。

COS-1細胞における内在性αーGal A活性210U/mgに対して、トランスフェクトした細胞は1300U/mg発現した。感染していないCOS-1細胞の使用済み培地においてはαーGal A活性は検出されなかったが、トランスフェクションの72時間後には、培地中に活性400単位が分泌された。

8.2.3. αーGal Aのアフィニティー精製

COS-1細胞の100mm培養皿１個から、トランスフェクションの72時間後に使用済み培地を採集し、IgG-セファロースカラムにアプライした。試料のアプライ（通り抜け（flow-through））中、又は緩衝液による洗浄中には、最小のα－Gal A活性がカラムを通過した（表IX）。しかしながら、結合したα－Gal A融合タンパク質の95%以上が0.5M酢酸（溶出緩衝液）の添加により溶出された。

表IX

トランスフェクトした COS-1細胞の培地からのα－Gal A タンパク質A融合産物のIgG セファロースクロマトグラフィー

精製ステップ	α－Gal A 活性* (U/ml)
培地	4,400
通り抜け	10
緩衝液による洗浄	0
溶出**	4,200

* 「方法」において記載したように、培地10mlをカラムにアプライし、洗浄し、溶出した。α－Gal A 活性は、基質として4MU-α-Gal を用いて検定した。

** 0.5M HAc、pH 3.4

8.2.4. AGA-PA融合タンパク質からのタンパク質Aドメインの放出

アフィニティー精製した融合タンパク質をコラゲナーゼで１時間処理し、その反応生成物についてIgGアフィニティーカラムで再度クロマトグラフィーを行った（表X）。タンパク質AドメインEは速やかにIgGカラムに結合したが、ヒトα－Gal Aは通り抜け画分中に溶出した。アプライした活性の約90%が溶出した。精製された酵素の比活性に基づき、この手順により90%純化された酵素が生じたと判断した。

表X

α－Gal A-タンパク質融合物のコラゲナーゼによる処理。この処理により IgGカラムの結合は69％から11％に減少した。

ステップ	回収されたα－Gal A 活性* の％ コラゲナーゼ** －	＋
通り抜け	31	89
溶出	69	11

* 基質として4MU-α-Gal を用いて検定した；計4,200 単位のα－Gal A 活性がアプライされた。

** コレゲナーゼを用いて25℃で１時間処理した。

９．実施例：α－２，６－シアリルトランスフェラーゼによる組換ヒトα－ＧａｌＡグリコシレーションの生体内変異

ここに示された実施例は、ヒトα－ＧａｌＡ酵素の天然の糖結合形態に一層良く似た形態で組換えヒトα－ＧａｌＡ酵素を生産させるための方法に関する。詳しく述べれば、生産されたα－ＧａｌＡタンパク質がシアリル化されるようにα－２，６－シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を含有させたＣＨＯ細胞株においてヒトα－ＧａｌＡが生産される。下記に示す結果によれば、かかる細胞株を用いて生産された生物学的に活性なα－ＧａｌＡ酵素はより広い組織内分布を示すことがわかるが、これはこの組換えα－ＧａｌＡの治療学的価値を向上させ得るものである。

９．１．材料および方法

９．１．１．α－２，６－シアリルトランスフェラーゼ発現ベクターｐＳＴ２６の構築

β－ガラクトシド－α－２，６－シアリルトランスフェラーゼ（Ｇａｌ－α２，６ＳＴ；Weinstein等，1987，J. Biol. Chem. 262: 17735）の完全なアミノ酸配列をコードする１．６ｋｂのラットＣＤＮＡ（ＳＴ３）をスミス・クライン・アンド・フレンチ・ラボラトリーズ（Smith, Kline and French Laboratories）からの寄贈品である哺乳類発現ベクターｐＲＬＤＮのＢａｍＨＩ部位にサブクローン化することにより、ｐＳＴ２６と呼ばれるベクターを得た。電気穿孔法により、この構築物をヒトα－ガラクトシダーゼＡの高度過剰発現体であるＣＨＯ細胞株ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ中に導入した。５００μｇ／ｍｌのＧ４１８を含有する培地中において増殖させることにより、ｐＳＴ２６のｎｅｏ遺伝子の発現に関してクローンを選択した。クローニングリングを用いて陽性のクローンを個別に分離し、次いで各々を全分泌組換えヒトα－ガラクトシダーゼＡの発現に関して分析した。更にまた、リー（Lee）等（1989，J. Biol. Chem. 264:13848-13855）によって記載されたようなＳＮＡセファロースカラム上におけるニワトコ（Sambucus nigra）凝集素（

ＳＮＡ）クロマトグラフィーにより、α－２，６－シアル酸残基を含有する分泌組換えヒトα－ガラクトシダーゼＡの割合を決定した。

９．１．２．ＳＮＡ－レクチン蛍光顕微鏡検査

蛍光顕微鏡検査のためには、１２ｍｍのカバーガラス上において陽性のＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６クローンを増殖させ、次いで前記（Lee等，1989，Ｊ．Biol．Chem．264:13848-13855）のごとくにしてフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）で標識したＳＮＡで染色した。簡単に述べれば、リン酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．０）中に２％のパラホルムアルデヒドおよび０．１％のグルタルアルデヒドを溶解して成る新鮮な溶液によって細胞を固定し、次いでＰＢＳ中の５０ｍＭ－NH_4Clを用いて２３℃で３０分間にわたりブロッキングを行った。ＰＢＳ中に２５ｍｇ／ｍｌの濃度で存在するＦＩＴＣ－ＳＮＡと共に、細胞を２３℃で３０分間にわたりインキュベートした。ＰＢＳ中で洗った後、１００ｍＭトリス（ｐＨ８．５）中に１５％のビノール（vinol）２０５ポリビニルアルコール、３３％のグリセロールおよび０．１％のアジ化ナトリウムを溶解して成る溶液を用いてカバーガラスを封入した。ツァイス・フォトマート（Zeiss Photomat）III蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察すると共に、コダック・ゴールド（Kodak Gold）カラーフィルム（ＡＳＡ２５）を用いて写真撮影した。

９．１．３．α－２，６－シアル酸残基を有する放射性同位体標識ヒトα－ＧａｌＡおよびそれを有しない放射性同位体標識ヒトα－ＧａｌＡの精製

１０％の透析ウシ胎児血清〔ジブコ（GIBCO）社、グランドアイランド、ニューヨーク州〕および５００μＣｉの［^{35}S］－メチオニンを含有する１２５ｍｌのＤＭＥＭを入れた１リットルの回転瓶（細胞数約５×10^8個）内において、ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ親細胞およびＤＧ５．３－ＳＴ２６．１変異細胞を増殖させた。放射性培地は３日間にわたって毎日交換し、また各々の細胞株からの使用済み培地は回収してプールした後に攪拌細胞濃縮器〔アミコン（Amicon）社、ベバリー、マサチューセッツ州〕を用いて濃縮した。ＤＧ５．３－１０００ＭｘおよびＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６．１細胞株からそれぞれ分泌された約２ｍｇ（４×10^6Ｕ）の組換え酵素を、酵素１Ｕ当り１００ｃｐｍの比活性に達するまで個別に精製した。精製された放射性同位体標識済みの分泌組換えα－ガラクトシダーゼＡ製剤（各０．５ｍｇ）を５単位の酸性ホスファターゼ〔シグマ（Sigma）社〕で個別に処理し、そして脱リン酸化された形態もまた静脈内注射のために使用した。

９．１．４．組換えα－ＧａｌＡの生体内半減期および組織内分布

血漿内半減期測定のため、各々の放射性同位体標識α－ＧａｌＡ形態を２匹の雌ＣＤＩマウスの尾静脈に注射した。１０～２０分間にわたり、各々の動物の洞静脈叢から所定の間隔で放血した。血液試料をＩＥＣマイクロヘマトクリット（Microhematocrit）遠心機で遠心分離し、そして５０μｌの血漿を計数用の水性シンチレーション液〔アクアゾル（AquaSol）、ＮＥＮ社、ボストン、マサチューセッツ州〕に添加した。様々な酵素形態の組織内分布を評価するためには、各々の酵素について２匹のマウスを酵素注射から４時間後に断頭して殺し、そして所定の組織を取出した。様々な組織中の放射能を測定し、そして組織湿量１グラム当りの値で表した。各々の値は２つの独立した実験の平均値である。

９．２．結果

９．２．１．ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ株ＣＨＯ細胞中へのｐＳＴ２６の導入およびＧ４１８選択クローンにおけるα－２，６－シアリルトランスフェラーゼ活性の証明

電気穿孔法によってＤＧ５．３－１０００Ｍｘ株ＣＨＯ細胞中にｐＳＴ２６プラスミドを導入した後、抗生物質Ｇ４１８に対して耐性を示す形質転換細胞を選択した。耐性細胞のプールから１０個の個別クローンを単離し、そして以後の研究のために増殖させた。これらのクローンはＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６．１～ＳＴ２６．１０と呼ばれた。これらの細胞中におけるα－２，６－シアリルトランスフェラーゼ活性の存在の証拠として、各々の細胞株をＦＩＴＣ－ＳＮＡで染色し、次いで位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡によって検査した。１０のＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６細胞株はいずれも蛍光レクチンによって明確に染色されたが、これは各種の細胞膜糖タンパク質が発現されたα－２

，６－シアリルトランスフェラーゼに対する受容体として役立つことを示している。それに対し、ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ親細胞はＦＩＴＣ－レクチンによって染色されなかった。

９．２．２．α－２，６－シアリル化された組換えヒト分泌α－ＧａｌＡの特性決定

１００ｍｍのペトリ皿を使用しながら、１０のＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６細胞株の各々およびＤＧ５．３－１０００Ｍｘ親細胞を同じ細胞密度で増殖させた。各々細胞株に関し、全培養細胞のタンパク質１ｍｇ当りの分泌ヒトα－ＧａｌＡの活性を測定した。ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６細胞株は、親細胞株によって分泌されたα－ＧａｌＡ（１６０００Ｕ／ｍｇ、表ＸＩ）の２８～１００％を分泌した。

α－２，６－シアル酸残基を含有する分泌組換えヒトα－ＧａｌＡの割合を決定するため、分泌された酵素を固定化ＳＮＡカラム上においてクロマトグラフィーにかけ、そして結合された酵素を０．４Ｍラクトースで溶出した。表ＸＩに示されるごとく、個々のクローンはレクチンカラムに対して特異的に結合しかつそれから溶出された酵素活性の５５～１００％を有していた。特に、ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ．１は最大量の組換えα－ＧａｌＡを生産したのであって、その酵素形態のほぼ全部がシアリル化されており、そして固定化ＳＮＡカラムに結合した。それに対し、ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ親細胞によって分泌された組換えα－ＧａｌＡは、α－２，６－シアル酸に特異的なレクチンに対して（たとえあっても）僅かしか結合しなかった（表ＸＩ）。

表ＸＩ

ヒトα－２，６－シアリル化α－ガラクトシダーゼＡを分泌するＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６ＣＨＯ細胞株

クローン／サブクローン	ＳＮＡ－レクチンに結合した分泌α－Ｇａｌの百分率	Ｇａｌの分泌量（％ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ＊）
ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ	５	１００
ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ－ＳＴ２６サブクローン：		
１	１００	１００
２	９９	７６
３	９３	７２
４	７９	７０
５	７４	６４
６	７３	８５
７	７２	８５
８	５５	８４
９	５１	８１
１０	２８	７９

＊　活性は細胞タンパク質１ｍｇ当りの単位数で表されている。ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ細胞株は約１６０００Ｕ／ｍｇを分泌した。

９．２．３．マウスにおけるα－２，６－シアリル化ヒトα－Ｇａｌの血漿内半減期お

よび組織内分布
α－２，６－シアリル化された組換えヒトα－ＧａｌＡの生体内クリアランスがα－２，６－シアリル化されない酵素の場合と異なるかどうかを判定するため、各々の形態の酵素をマウスに注射し、そしてそれらの循環半減期を測定した。図２４Ａに示されるごとく、α－２，６－シアル酸部分の存在は循環中における酵素の半減期を１４分からほぼ３０分に増加させた。更にまた、α－２，６－シアリル化された組換え酵素およびα－２，６－シアリル化されない組換え酵素を酸性ホスファターゼで処理したところ、生体内におけるα－２，６－シアリル化されない酵素の血漿内半減期（$T_{1/2}$）は（１４分から２４分に）増加した。それに対し、α－２，６－シアリル化された酵素をホスファターゼで処理した場合の血漿内半減期は同じレベル（約２８分）に留まった（図２４Ｂ）。
図２５に示されるごとく、様々な形態の分泌組換えヒトα－ＧａｌＡ上におけるα－２，６－シアル酸部分および／またはリン酸残基の有無はマウスへの静脈内投与後におけるそれらの組織内分布に顕著な影響を及ぼした。α－２，６－シアリル化されたα－ＧａｌＡは、α－２，６－シアリル化されない酵素に比べ、注射後に肺、腎臓および心臓からより高い割合で回収された。それに対し、脾臓から回収されたα－２，６－シアリル化酵素はより少なかった。興味深いことには、α－２，６－シアリル化された酵素を酸性ホスファターゼで処理した場合には、変異酵素は肝臓および脾臓（恐らくはそれらの細網内皮細胞）に再分配された（図２５）。α－２，６－シアリル化されない酵素を酸性ホスファターゼで処理した場合には、肺および心臓からの回収量は酸性ホスファターゼで処理しない酵素よりも顕著に多かったのに対し、腎臓からの回収量は少なかった（図２５）。

１０．実施例：ヒトリソソームタンパク質の過剰発現によるそれらの細胞内凝集、リソソーム内結晶化および選択的分泌
ここに示された実施例は、本来は細胞内に目標を有する特定のタンパク質を組換えにより分泌状態で発現させるための方法に関する。この方法は本発明に固有の特徴を成すものであって、α－ＧａｌＡの過剰発現に際して初めて見出されたものである。数種の組換えリソソーム酵素を用いて得られた結果によれば、ＣＨＯ細胞におけるこれらのタンパク質の過剰発現は恐らくそれらの凝集をもたらすことがわかる。かかる凝集の結果、本来ならば細胞内小胞（この場合にはリソソーム）に送られるタンパク質が分泌されることになる。この意外な分泌特性により、生産された組みタンパク質の容易な精製が可能となるのである。

１０．１．材料および方法
１０．１．１．リソソーム酵素の過剰生産用のプラスミドの構築
α－ＧａｌＡ発現用構築物であるｐ９１－ＡＧＡの構築は前記（第６．１．２節）の通りである。なお、ヒトα－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼおよび酸性スフィンゴミエリナーゼに関する類似の発現用構築物（それぞれｐ９１－ＡＧＢおよびｐ９１－ＡＳＭと呼ばれる）並びにＣＯＳ－１細胞におけるそれらの一過性発現は、文献中に記載されている（Wang等，1990，Ｊ．Biol．Chem．265:21859-21866; Schuchman等，1991，Ｊ．Biol．Chem．266:8535-8539）。
１０．１．２．細胞培養、エレクトロトランスフェクションおよび遺伝子増幅
前記（第６．１．３節）のごとくにしてＣＨＯ細胞を増殖させかつ維持した。同様に、前記（第６．１．３節）のごとくにして電気穿孔法を実施した。
以前の論文（Dorner等，1989，Ｊ．Biol．Chem．264:20602-20607）に記載されたようにしてα－ＧａｌＡ発現ＣＨＯ細胞の酪酸塩による刺激を実施した。簡単に述べれば、１００ｍｍのペトリ皿に細胞を接種し、そして１０％のｄＦＣＳを追加した１０ｍｌのＤＭＥＭ中において２日間にわたり増殖させた。培地を除去し、そして１０％のｄＦＣＳを追加した１０ｍｌのＤＭＥＭに５ｍＭの酪酸ナトリウムを添加して成る培地で置換した。CO_2インキュベーター内において細胞を３７℃で１６時間にわたりインキュベートした後、細胞および培養液を回収し、そしてα－ＧａｌＡ活性を測定した。
１０．１．３．超微細構造および免疫標識の研究
１００ｍｍのペトリ皿中においてＤＧ５．３－１０００Ｍｘ細胞を集密状態にまで増殖さ

せた。トリプシン処理（０．２５％トリプシン、ＥＤＴＡ）の後、リン酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ）中で細胞を２回洗い、次いで室温下において１５００ｇで５分間にわたりペレット化した。次に、ＰＢＳ中に３％のグルタルアルデヒドを溶解して成る溶液を用いて細胞を１時間にわたり固定し、次いでＰＢＳ緩衝１％OsO_4を用いて室温で３０分間にわたり固定した。その後、試料をエタノールで段階的に脱水し、プロピレンオキシドを浸透させ、そしてエンベッド（Embed）８１２〔エレクトロン・マイクロスコーピー・サイエンシズ（Electron Microscropy Sciences）社、フォートワシントン、ペンシルヴェニア州〕中に包埋した。代表的な領域から１μｍの切片を切り出した。超薄切片を作製した後、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、そして電子顕微鏡（ＪＥＭ１００ＣＸ、ジェオルＵＳＡ（Jeol USA）社、ピーバディ、マサチューセッツ州）で観察した。

免疫検出のためには、上記のごとくにして切片を作製した。包埋後、フォームバール（Formvar）〔フォームバール・サイエンティフィック（Formvar Scientific）社、マリエッタ、オハイオ州〕で被覆されたニッケルグリッド上に取付け、非特異的結合を阻止するためにヤギ血清のＰＢＳ溶液と共に３７℃で３０分間にわたりインキュベートし、ＰＢＳで６回洗い、次いでアフィニティー精製を施したウサギ抗α－ＧａｌＡ抗体と共に１時間にわたりインキュベートした。切片を上記のごとくにして十分に洗い、次いでプロテインＡと結合した１０ｎｍの金粒子〔アマシャム社（Amersham Corp.）、アーリントン、イリノイ州〕と共に３７℃で１時間にわたりインキュベートした。ＰＢＳで洗った後、ＰＢＳ中に３％のグルタルアルデヒドを溶解して成る溶液を用いて切片を室温で１５分間にわたり固定し、再びＰＢＳで洗い、次いで電子顕微鏡下で調べた。

１０．１．４．ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィー

１０％のアクリルアミドを含有する厚さ１．５ｍｍのスラブゲルを使用しながら、レムリ（Laemmli）[1970, Nature（London）277:680-685]によって記載されたような還元条件下でＰＡＧＥゲル電気泳動を行った。１０％酢酸および２０％メタノール中においてゲルを固定し、次いで撹拌しながらアンプリファイ（Amplify）〔アマシャム社（Amersham Corp.）〕中に３０分間にわたり浸漬した。９０分間にわたってゲルを真空乾燥し〔ホッファー・サイエンティフィック・インストルメンツ（Hoffer Scientific Instruments）社、サンフランシスコ、カリフォルニア州〕、次いでコダックＸオマートＡＲ（Kodak X Omat AR）フィルム〔イーストマン・コダック社（Eastman Kodak Co.）〕を用いて４～２４時間にわたりオートラジオグラフィーを行った。

１０．１．５．α－ＧａｌＡ凝集の試験管内研究

様々な酵素および水素イオン濃度における不溶性α－ＧａｌＡ凝集物の生成の可能性を調べた。精製された分泌α－ＧａｌＡの保存溶液〔１０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．０）中において１６ｍｇ／ｍｌ〕を使用しながら、適当なアリコートをホウケイ酸ガラス製の試験管に入れ、そして蒸留水で全量を２００μｌに調整した。このようにして、１００μｌの適当な緩衝液〔０．５Ｍ－２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸、ｐＨ５．０、５．５、６．０、６．５または７．０〕を添加した場合、特定のｐＨ値において最終のα－ＧａｌＡ濃度（０．１～１０ｍｇ／ｍｌ）が得られるようにした。室温で１０分間にわたりインキュベートした後、光路長１ｃｍのセルを使用しながら分光光度計〔スペクトロニック（Spectronic）１２０１、ミルトン・ロイ社（Milton Roy Co.）、ロチェスター、ニューヨーク州〕で６５０ｎｍのＯＤを測定することによって各溶液の濁度を求めた。対照として、１ｍｇ／ｍｌの精製された分泌α－ＧａｌＡを増加する濃度（０．１～１０ｍｇ／ｍｌ）のＢＳＡと混合し、そして各溶液の濁度を求めた。また、α－ＧａｌＡ（１０ｍｇ／ｍｌ）およびＢＳＡ（２ｍｇ／ｍｌ）の溶液に関し、７．０から５．０までｐＨを低下させながら同様な実験を行った。上記のごときインキュベーションおよび遠心分離の後、上澄みおよびペレットについてＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った。

１０．１．６．酵素およびタンパク質の定量

５ｍＭの４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ガラクトピラノシド（４ＭＵ－α－Ｇａｌ）〔ジェンザイム社（Genzyme Corp.）、ケンブリッジ、マサチューセッツ州〕を使用しながら、以前の論文（Bisho and Desnik, 1981, J. Biol. Chem. 256:1307-13196）に

記載されたごとくにして細胞溶解物および培養液中におけるα－ＧａｌＡ活性を測定した。簡単に述べれば、０．１Ｍクエン酸塩／０．２Ｍリン酸塩緩衝液（ｐＨ４．６）を使用しながら、超音波浴中において５ｍＭ－４ＭＵ－α－Ｇａｌの保存溶液を調製した。１０～５０μｌの細胞抽出液および１５０μｌの基質保存溶液を含有する反応混合物を３７℃で１０～３０分間にわたりインキュベートした。２．３ｍｌの０．１Ｍエチレンジアミンの添加によって反応を停止させた後、レイショ２・システム・フルオロメーター（Ratio-2 System Fluorometer）〔オプティカル・テクノロジー・デバイシズ（Optical Technology Devices）社、エルムスフォード、ニューヨーク州〕を用いて蛍光を測定した。１Ｕの活性は、１時間当り１ナノモルの基質を加水分解する酵素量を意味する。α－マンノシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－ヘキソサミニダーゼ、β－グルクロニダーゼ、酸性ホスファターゼおよびα－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼの活性は、対応する４－メチルウンベリフェリル基質を用いて測定した。酸性スフィンゴミエリナーゼの活性は、ガル（Gal）等（1975, N. Eng. J. Med. 293:632-636）の方法に従って測定した。タンパク質濃度は、フルオレサミン法（Bohlen等, 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155:213-220）のビショップ（Bishop）等（1978, Biochem. Biophys. Acta 524:109-120）による変法によって測定した。

１０．２　結果

１０．２．１　過剰発現の結果、ヒトα－ＧａｌＡを含有する結晶構造が、膜で包まれた小胞中で生じる

安定的に増幅されたＤＧ５．３－１０００Ｍｘ細胞の超微細構造を調べたところ、秩序正しい三角形の格子を有する０．２５－１．５μｍの結晶体が、細胞質じゅうの膜で包まれた小胞中に多数認められた（図２６Ａならびに２６Ｂ）。これらの結晶構造中の反復は、約２０ｎｍであった。これらの結晶構造は、リソソーム（図２８Ａ）、ならびにＴＧＮが拡がったもの思われる小胞（図２８Ｂ）に特に多く見られた（Hand and Oliver, 1984, J. Histochem. Cytochem. 42: 403-442; Griffith and Simons, 1986, Science 234: 438-443; McCracken, 1991, in Intracellular Traficking of Proteins, Steer and Hanover, eds., Cambridge University Press, New York pp. 461-485）。なお、親細胞であるＤＧ４４ではゴルジ複合体が容易に特定されたのに対し（図２６Ｅ、差し込み図）、これらの細胞では通常のゴルジ構造が観察されなかった。ＤＧ５．３－１０００Ｍｘ細胞をオスミウム－グルタルアルデヒドで固定した切片を、アフィニティー精製したウサギの抗ヒトα－ＧａｌＡ抗体とともにインキュベートし、次に、タンパク質Ａに結合した金とともにインキュベートしたところ、これらの結晶構造が、金粒子によって特異的に染色された（図２６Ｃおよび２６Ｄ）。切片の固定をオスミウム－グルタルアルデヒド中で行ったにもかかわらず、結晶構造が金で免疫学的に標識されたことから、これらの結晶構造が、仮に単独ではないにせよ、主にヒトの酵素から構成されていることが示唆された。

結晶構造が、α－ＧａｌＡの発現レベルがもっと低いクローンにも存在しているのかどうかを調べるために、クローンＤＧ５．３－ＯＭｘ、－１．３Ｍｘ、－２５０Ｍｘ、ならびに－１０００Ｍｘを密集するまで成育させ、電子顕微鏡で調べた。α－ＧａｌＡの発現の増大とともに、ＴＧＮは拡がっていたものの、ＤＧ５．３－１０００Ｍｘクローンのみが、リソソーム中に結晶アレーを有していた。同様にして、クローンＤＧ５．３－１．３Ｍｘを５ｍＭの酪酸ナトリウムで１８時間にわたって刺激し、α－ＧａｌＡのｃＤＮＡを含む組み込みベクターの転写を増大させ、超微細構造を調べた。未処理のクローンと比べると、酪酸塩処理を行ったクローンでは、密な物質を含む多くの膜結合構造を有する拡がったオルガネラが存在していた。こうした結果から、結晶の形成は、α－ＧａｌＡの濃度に依存性であることが示唆された。さらに、結晶の形成がα－ＧａｌＡに特異的なのかどうかをしらべるために、α－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼを過剰発現するクローンＡＧＢ１４．８－１０００Ｍｘを調べた。結晶アレーは観察されなかったものの、ＤＧ５．３－１．３Ｍｘクローンの場合とよく似た拡がった構造が多数見られ、組換え型α－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼが、結晶の形成に必要な臨界レベルまで達していないことが示唆された。

１０．２．２　α－ＧａｌＡならびにα－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼは、高濃度かつ低ｐＨで凝集する

α－ＧａｌＡが過剰発現された結果、ＴＧＮ中で、Ｍ６ＰＲおよび／またはスルホトランスフェラーゼに結合しない、あるいは非効率的に結合される可溶性で粒状の凝集体が形成されると推測されたので、α－ＧａｌＡの可能な凝集を、インビトロで、酵素濃度ならびに水素イオン濃度を変化させて調べた。図２７Ａに示すように、ｐＨ５．０では、α－ＧａｌＡの沈殿量は約３０％（＞２Ｘ１０^{6}Ｕ）にものぼった。ＴＧＮのｐＨであると推定されるｐＨ６．０では（Griffith and Simons, 1986, Science 234: 438-443）、酵素の約１２％が、１５，０００ｘｇで遠心分離が可能な粒状の凝集体を形成した。図２７Ｂには、０．１－１０ｍｇ／ｍｌのα－ＧａｌＡを含有するｐＨ５．０あるいはｐＨ７．０の溶液の凝集の尺度としての濁度が（Halper and Stere, 1977, Arch. Biochem. Biophys. 184: 529-534）、酵素濃度の関数として増大することが示されている。また、１ｍｇ／ｍｌのα－ＧａｌＡ溶液の濁度は、ｐＨ５．０でアルブミンを存在させ、このアルブミンの濃度を０．１ｍｇ／ｍｌから１０ｍｇ／ｍｌまで増大させても、本質的に影響を受けなかった（図２７Ｂ、対照）。最後に、各種の水素イオン濃度でインキュベートしたα－ＧａｌＡ（１０ｍｇ／ｍｌ）およびウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（２ｍｇ／ｍｌ）を含有する溶液からの上清およびペレット分画の電気泳動を行ったところ、ＢＳＡはこのｐＨ範囲では沈殿しなかったので、ｐＨの低下にともなって生じるα－ＧａｌＡの沈殿の増大というのは酵素特異的なものであることが明らかとなった（図２７Ｃ）。

１０．３　考察

「凝集－分泌」モデルを提案して、過剰生産された、リソソームに送り込まれるタンパク質の典型例であるヒトα－ＧａｌＡの経路変更について説明する。図２８に描かれているように、過剰生産された酵素は、通常、合成され、プロセシングされてから、トランスゴルジネットワークに到達する。この構造で、過剰生産された酵素は蓄積され、酸性度のはるかに高い環境（約ｐＨ６．０）におかれることとなり、その結果、タンパク質－タンパク質相互作用が増大して、可溶性で粒状のα－ＧａｌＡ凝集体が生成される。こうした凝集の結果、酵素のＭ６Ｐ部分が、ＭＧＰＲとの結合に際して、接近不能あるいは接近困難となる。ＭＧＰ部分が接近不能である凝集体は、デフォルトによって、構成的な分泌経路に変更される（Helms et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 20, 027-20, 032）。

したがって、リソソームに送り込まれるタンパク質の過剰生産に対する細胞の応答は、接近可能なＭＧＰ残基を有するタンパク質はリソソームまで輸送し、過剰生産され、凝集していると想定されるタンパク質の大半は、構成的な分泌経路の方に経路変更するというものである。大量の組換え型ヒトα－ＧａｌＡがＣＨＯ細胞によって分泌されるという事実によって、結晶学の研究に用いたり、ファブリー病の患者の酵素置き換え療法を試行したりするに際して、組換え型の酵素をさらに大規模に製造し、容易に精製することが可能となる。また、過剰生産性α－ＧａｌＡＣＨＯ細胞の増幅系によって、生合成、翻訳後修飾、ならびにこの典型的なリソソーム酵素のリソソームへの送り込みや選択的分泌を司っているメカニズムを効率的に調べるにあたっての独特な実験動物系が提供され、哺乳動物細胞におけるタンパク質の輸送ならびに選別の性状に関するさらなる洞察がもたらされることも明らかである。

このように、リソソームや他の小胞に送り込まれる種々のタンパク質をＣＨＯ細胞中で過剰発現できれば、構造解析および/または治療の目的で大量のタンパク質を生産する好都合な方法が得られることとなり、また、タンパク質の生合成および選別について調べるにあたっての有用なアプローチが得られることとなる。

１１．微生物の寄託

表に示すプラスミドを有する下記の大腸菌の系統は、イリノイ州、ペオリア（Peoria）の農業研究菌株保存機関（Agricultural Research Culture Collection, NRRL）に寄託してあり、これらの系統は、下記の受託番号を付されている。

宿主細胞	系統	プラスミド	受託番号
大腸菌	ｋ１２	ｐ９１．ＡＧＡ	Ｂ　１８７２２
大腸菌	ｋ１２	ｐＡＧＡ－ＰＡ	Ｂ　１８７２３

寄託を行った実施態様は、本発明の個別の観点を例示するために示したものであり、これらと機能的に同等な任意の微生物あるいは構築物も本発明の範囲内であるので、本発明の範囲は、寄託を行った微生物によって限定されるものではない。実際、当業者には、以上の記載ならびに添付図面から、本明細書に示し、記載した実施態様以外にも、さまざまな本発明の変更例が明らかとなるはずである。そうした変更例も、添付の請求の範囲の範囲内であると考えるものである。

配列表

配列番号：１

配列の長さ：1393

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：61..1350

配列

```
AGGTTAATCT TAAAAGCCCA GGTTACCCGC GGAAATTTAT GCTGTCCGGT CACCGTGACA     60

ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA CTA CAT CTG GGC TGC GCG CTT GCG CTT       108
Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
  1               5                  10                  15
```

```
CGC TTC CTG GCC CTC GTT TCC TGG GAC ATC CCT GGG GCT AGA GCA CTG        156
Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
            20                  25                  30

GAC AAT GGA TTG GCA AGG ACG CCT ACC ATG GGC TGG CTG CAC TGG GAG        204
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
        35                  40                  45

CGC TTC ATG TGC AAC CTT GAC TGC CAG GAA GAG CCA GAT TCC TGC ATC        252
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
    50                  55                  60

AGT GAG AAG CTC TTC ATG GAG ATG GCA GAG CTC ATG GTC TCA GAA GGC        300
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
65                  70                  75                  80

TGG AAG GAT GCA GGT TAT GAG TAC CTC TGC ATT GAT GAC TGT TGG ATG        348
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
                85                  90                  95

GCT CCC CAA AGA GAT TCA GAA GGC AGA CTT CAG GCA GAC CCT CAG CGC        396
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
            100                 105                 110

TTT CCT CAT GGG ATT CGC CAG CTA GCT AAT TAT GTT CAC AGC AAA GGA        444
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
        115                 120                 125

CTG AAG CTA GGG ATT TAT GCA GAT GTT GGA AAT AAA ACC TGC GCA GGC        492
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
    130                 135                 140

TTC CCT GGG AGT TTT GGA TAC TAC GAC ATT GAT GCC CAG ACC TTT GCT        540
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
145                 150                 155                 160

GAC TGG GGA GTA GAT CTG CTA AAA TTT GAT GGT TGT TAC TGT GAC AGT        588
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
                165                 170                 175

TTG GAA AAT TTG GCA GAT GGT TAT AAG CAC ATG TCC TTG GCC CTG AAT        636
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
            180                 185                 190

AGG ACT GGC AGA AGC ATT GTG TAC TCC TGT GAG TGG CCT CTT TAT ATG        684
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
        195                 200                 205

TGG CCC TTT CAA AAG CCC AAT TAT ACA GAA ATC CGA CAG TAC TGC AAT        732
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
    210                 215                 220

CAC TGG CGA AAT TTT GCT GAC ATT GAT GAT TCC TGG AAA AGT ATA AAG        780
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
225                 230                 235                 240

AGT ATC TTG GAC TGG ACA TCT TTT AAC CAG GAG AGA ATT GTT GAT GTT        828
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
                245                 250                 255

GCT GGA CCA GGG GGT TGG AAT GAC CCA GAT ATG TTA GTG ATT GGC AAC        876
Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
            260                 265                 270

TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG CAA GTA ACT CAG ATG GCC CTC TGG GCT        924
Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
        275                 280                 285
```

```
ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC ATG TCT AAT GAC CTC CGA CAC ATC AGC        972
Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
    290                 295                 300

CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT CAG GAT AAG GAC GTA ATT GCC ATC AAT       1020
Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305                 310                 315                 320

CAG GAC CCC TTG GGC AAG CAA GGG TAC CAG CTT AGA CAG GGA GAC AAC       1068
Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
                325                 330                 335

TTT GAA GTG TGG GAA CGA CCT CTC TCA GGC TTA GCC TGG GCT GTA GCT       1116
Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
            340                 345                 350

ATG ATA AAC CGG CAG GAG ATT GGT GGA CCT CGC TCT TAT ACC ATC GCA       1164
Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
        355                 360                 365

GTT GCT TCC CTG GGT AAA GGA GTG GCC TGT AAT CCT GCC TGC TTC ATC       1212
Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
    370                 375                 380

ACA CAG CTC CTC CCT GTG AAA AGG AAG CTA GGG TTC TAT GAA TGG ACT       1260
Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385                 390                 395                 400

TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGC ACT GTT TTG CTT CAG       1308
Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
                405                 410                 415

CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT TAAAAAAAAA        1357
Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
            420                 425                 430

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA                              1393
```

配列番号：2
配列の長さ：429
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

```
Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
  1               5                  10                  15

Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
            20                  25                  30

Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
        35                  40                  45

Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
    50                  55                  60

Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
65                  70                  75                  80

Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
                85                  90                  95
```

```
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
            100                 105                 110

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
        115                 120                 125

Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
    130                 135                 140

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
145                 150                 155                 160

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
                165                 170                 175

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
            180                 185                 190

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
        195                 200                 205

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
    210                 215                 220

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
225                 230                 235                 240

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
                245                 250                 255

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
            260                 265                 270

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
        275                 280                 285

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
    290                 295                 300

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305                 310                 315                 320

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
                325                 330                 335

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
            340                 345                 350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
        355                 360                 365

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
    370                 375                 380

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385                 390                 395                 400

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
                405                 410                 415

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
            420                 425
```

配列番号：3
配列の長さ：411
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：タンパク質

配列

Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
1 5 10 15

Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
20 25 30

Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn
35 40 45

Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln
50 55 60

Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys
65 70 75 80

Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys
85 90 95

Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu
100 105 110

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met
115 120 125

Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr
130 135 140

Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser
145 150 155 160

Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu
165 170 175

Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr
180 185 190

Glu Gly Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile
195 200 205

Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser
210 215 220

Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln
225 230 235 240

Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
245 250 255

Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Arg Ser Arg Ala Gln Met Ala
260 265 270

Leu Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg
275 280 285

Thr Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile
290 295 300

```
Lys Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Ile His Lys Glu
305                 310                 315                 320

Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
                325                 330                 335

Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
            340                 345                 350

Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
        355                 360                 365

Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
    370                 375                 380

Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
                405                 410
```

配列番号：４
配列の長さ：404
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：タンパク質
配列

```
Met Phe Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Cys Ile Ser Leu Lys Gly Val
1               5                   10                  15

Phe Gly Ser Tyr Asn Gly Leu Gly Leu Thr Pro Gln Met Gly Trp Asp
            20                  25                  30

Asn Trp Asn Thr Phe Ala Cys Asp Val Ser Glu Gln Leu Leu Leu Asp
        35                  40                  45

Thr Ala Asp Arg Ile Ser Asp Leu Gly Leu Lys Asp Met Gly Tyr Lys
    50                  55                  60

Tyr Ile Ile Leu Asp Asp Cys Trp Ser Ser Gly Arg Asp Ser Asp Gly
65                  70                  75                  80

Phe Leu Val Ala Asp Glu Gln Lys Phe Pro Asn Gly Met Gly His Val
                85                  90                  95

Ala Asp His Leu His Asn Asn Ser Phe Leu Phe Gly Met Tyr Ser Ser
            100                 105                 110

Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Ala Gly Tyr Pro Gly Ser Leu Gly Arg Glu
        115                 120                 125

Glu Glu Asp Ala Gln Phe Phe Ala Asn Asn Arg Val Asp Tyr Leu Lys
    130                 135                 140

Tyr Asp Asn Cys Tyr Asn Lys Gly Gln Phe Gly Thr Pro Glu Ser Tyr
145                 150                 155                 160

Arg Lys Met Ser Asp Ala Leu Asn Lys Thr Gly Arg Pro Ile Phe Tyr
                165                 170                 175
```

Ser Cys Asn Trp Gly Leu Tyr Gly Ser Gly Ile Ala Asn Ser Trp Arg
180 185 190

Met Ser Gly Asp Val Thr Ala Glu Phe Thr Arg Pro Asp Ser Cys Pro
195 200 205

Asp Gly Tyr Tyr Ala Gly Phe Ser Ile Met Asn Ile Leu Asn Lys Ala
210 215 220

Ala Pro Met Gly Gln Asn Ala Gly Val Gly Gly Trp Asn Asp Leu Asp
225 230 235 240

Asn Leu Glu Val Gly Val Gly Asn Leu Thr Asp Asp Glu Glu Lys Ala
245 250 255

His Phe Ser Met Trp Ala Met Val Lys Ser Pro Leu Ile Ile Gly Ala
260 265 270

Asn Val Asn Asn Leu Lys Ala Ser Ser Tyr Ser Ile Tyr Ser Gln Ala
275 280 285

Ser Val Ile Ala Ile Asn Gln Asp Ser Asn Gly Ile Pro Ala Arg Val
290 295 300

Ser Asp Thr Asp Glu Tyr Gly Glu Ile Trp Ser Gly Pro Leu Asp Asn
305 310 315 320

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

Met Asn Thr Thr Leu Glu Ile Asp Ser Leu Gly Lys Lys Leu Thr Ser
340 345 350

Thr Asp Asp Leu Trp Ala Asn Arg Val Thr Ala Ser Ile Gly Arg Lys
355 360 365

Thr Gly Leu Tyr Glu Tyr Lys Asp Gly Leu Lys Asn Arg Leu Gly Gln
370 375 380

Lys Gly Ser Leu Ile Leu Asn Val Pro Ala His Ile Ala Phe Arg Leu
385 390 395 400

Arg Pro Ser Ser

配列番号：5
配列の長さ：12
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：ペプチド
配列
Glu Gln Thr Ile Ala Asp Thr Leu Gly Pro Gly Gly
1 5 10

配列番号：6
配列の長さ：10
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：ペプチド
配列
Pro Ser Val Ile Tyr Gly Asn Val Arg Asn
1 5 10

配列番号：7
配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：ペプチド
配列

```
Glu Val Ala Cys Leu Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln Pro
1               5                  10
```

配列番号：８
配列の長さ：297
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：DNA (genomic)
配列の特徴
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..279
配列

```
GAA TGG ACT TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGA ACT GTT          48
Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val
  1               5                  10                  15

TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT          96
Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
            20                  25                  30

CCG GCT GGT CCG GCG CAA CAC GAT GAA GCT CAA CAA AAT GCT TTT TAT         144
Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
        35                  40                  45

CAA GTC TTA AAT ATG CCT AAC TTA AAT GCT GAT CAA CGC AAT GGT TTT         192
Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
    50                  55                  60

ATC CAA AGC CTT AAA GAT GAT CCA AGC CAA AGT GCT AAC GTT TTA GGT         240
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
65                  70                  75                  80

GAA GCT CAA AAA CTT AAT GAC TCT CAA GCT CCA AAA TAAGGATCCC              286
Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
                85                  90

GGAATTCGGC C                                                           297
```

配列番号：９
配列の長さ：92
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val
1 5 10 15

Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
20 25 30

Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
35 40 45

Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
50 55 60

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
65 70 75 80

Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
85 90

配列番号：10
配列の長さ：27
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：DNA (genomic)
配列
CCGAATTCAT GCTGTCCGGT CACCGTG 27

配列番号：11
配列の長さ：32
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：DNA (genomic)
配列
CGCCGGACCA GCCGGAAGTA AGTCTTTTAA TG 32

配列番号：12
配列の長さ：30
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：DNA (genomic)
配列
CCGGCTGGTC CGGCGCAACA CGATGAAGCT 30

配列番号：13
配列の長さ：36
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：DNA (genomic)
配列
GGCCGAATTC CGGGATCCTT ATTTTGGAGC TTGAGA 36

【図１Ａ】

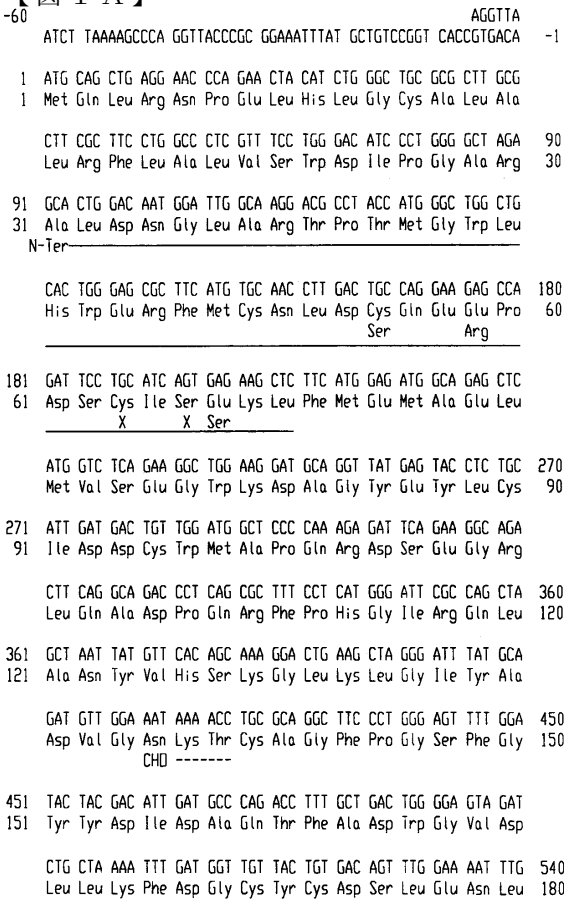


FIG.1A

【図１Ｂ】

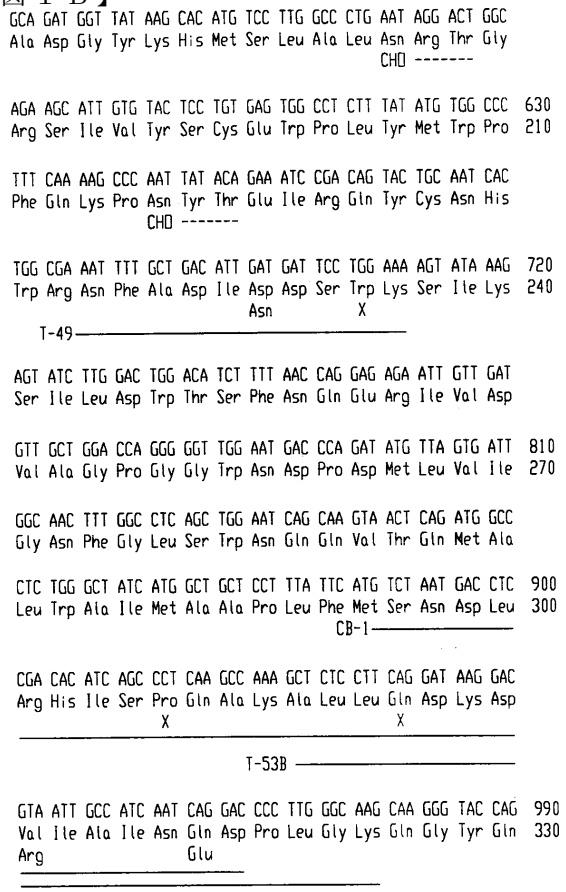


FIG.1B

【図１Ｃ】

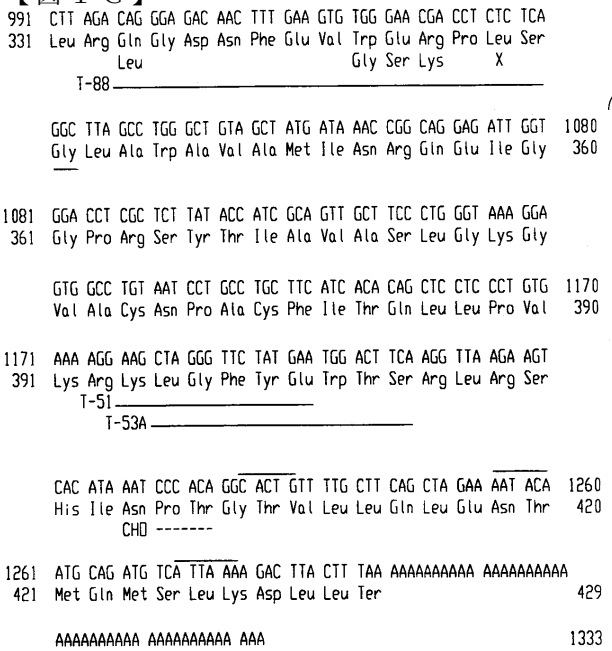


FIG.1C

【図１Ｄ】

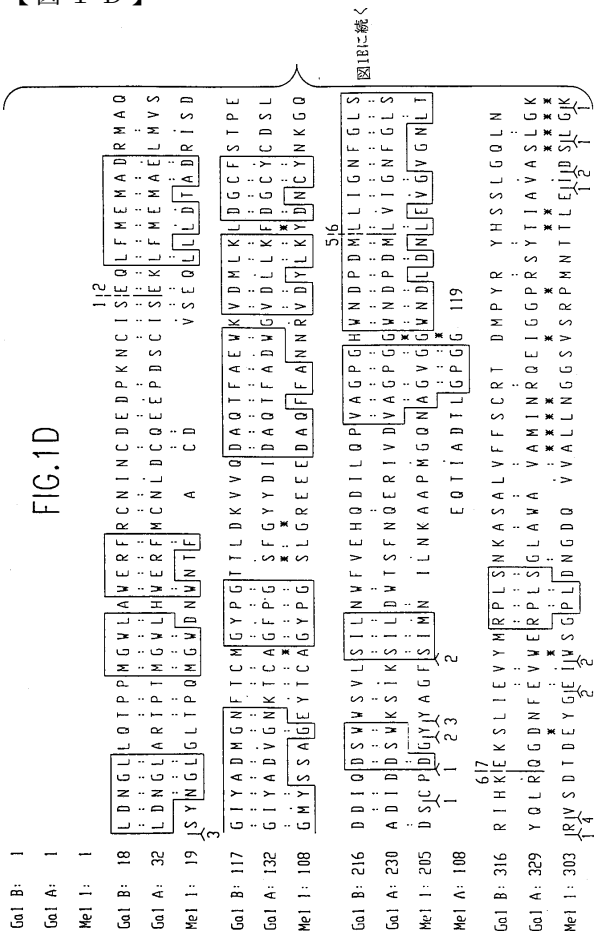


FIG.1D

【図１Ｅ】

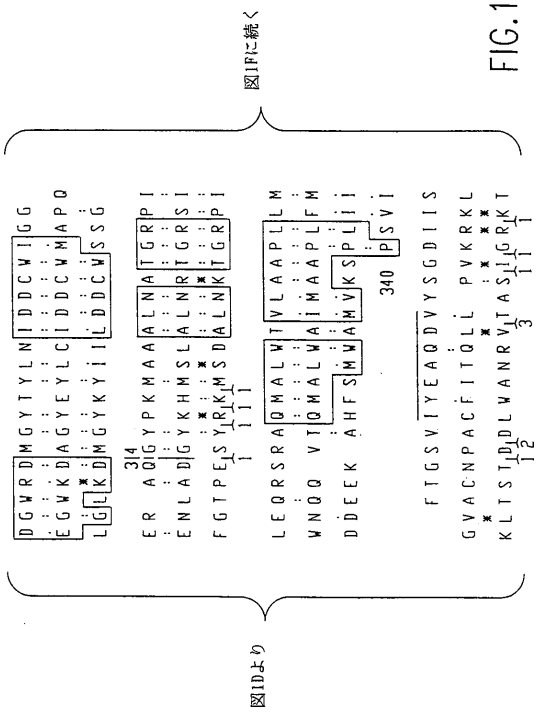


FIG.1E

【図１Ｆ】

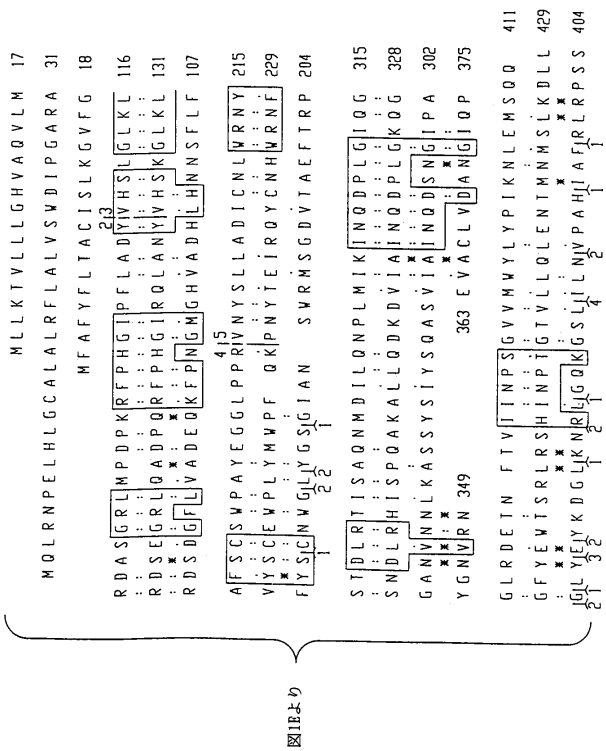


FIG.1F

【図１Ｇ】

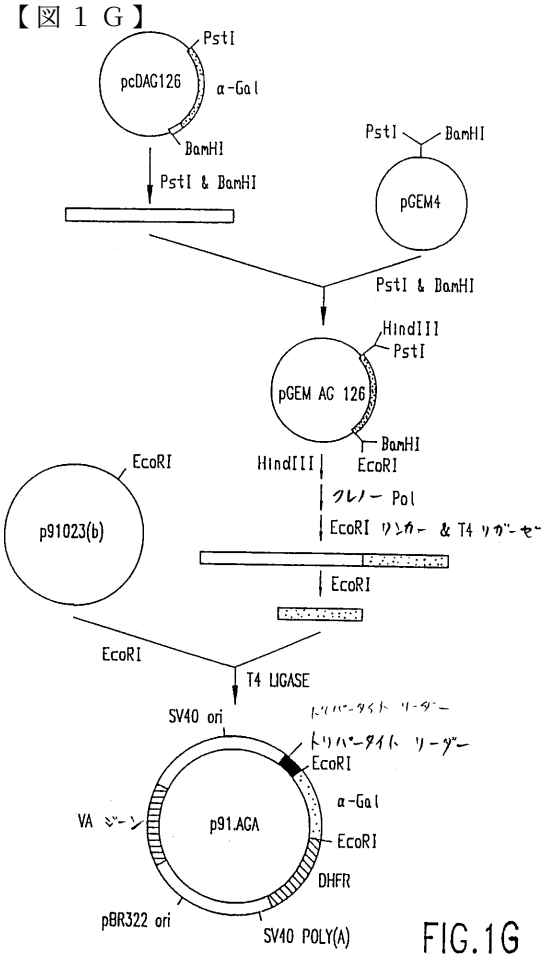


FIG.1G

【図２Ａ】

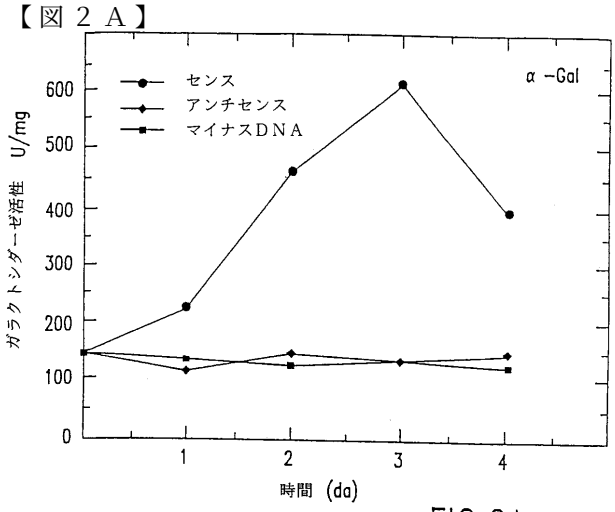


FIG.2A

【図２Ｂ】

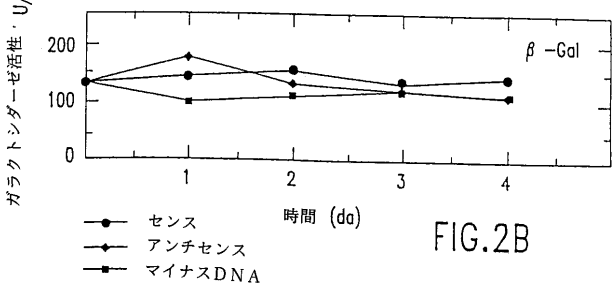


FIG.2B

【図３Ａ】

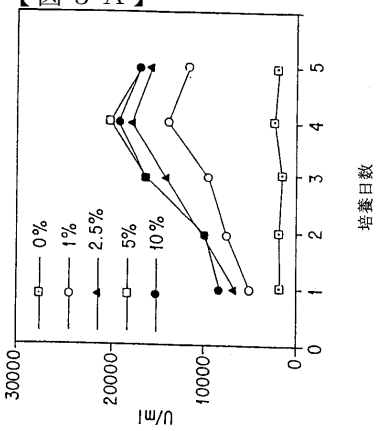


FIG. 3A

【図３Ｂ】

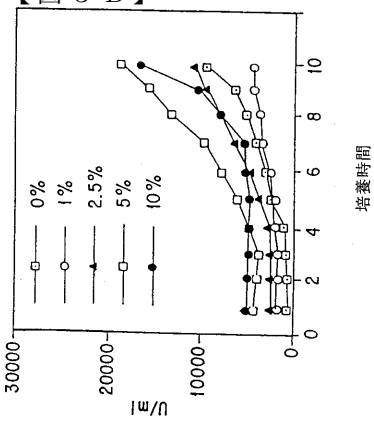


FIG. 3B

【図４】

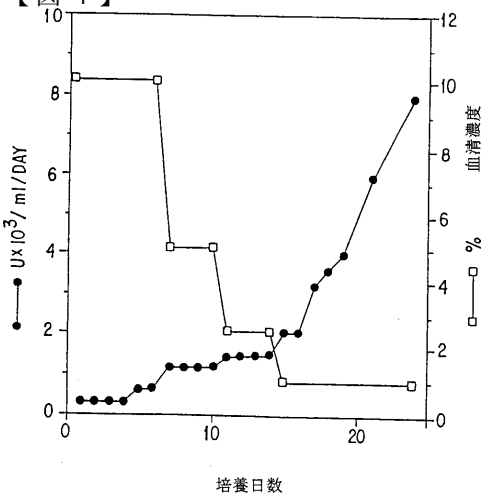


FIG. 4

【図５】

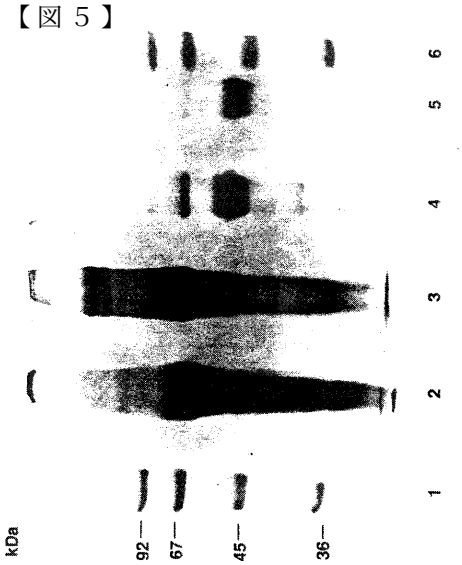


FIG. 5

【図６】

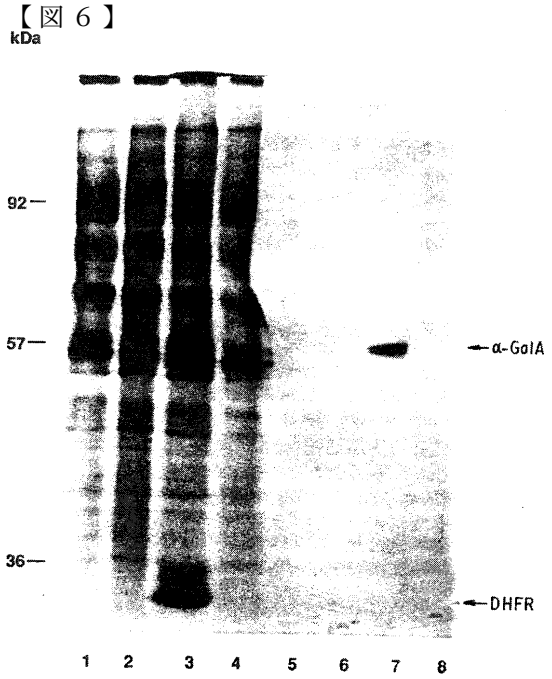


FIG. 6

【図７Ａ】

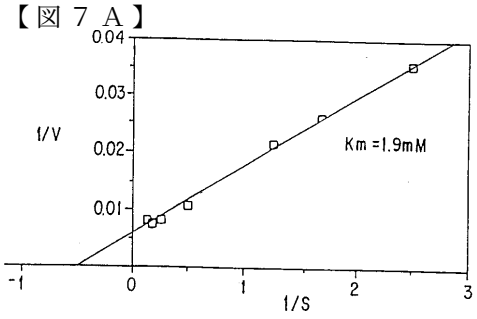


FIG.7A

【図７Ｂ】

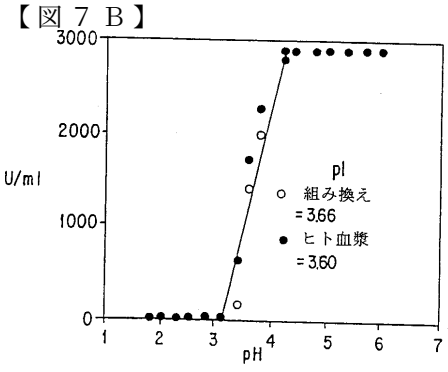


FIG.7B

【図７Ｃ】

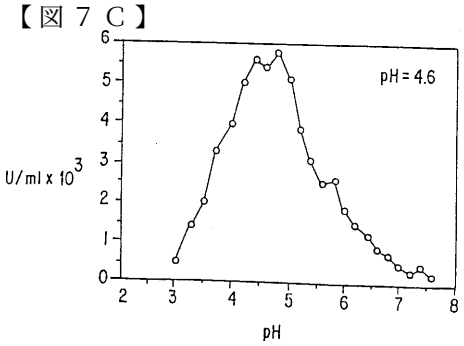
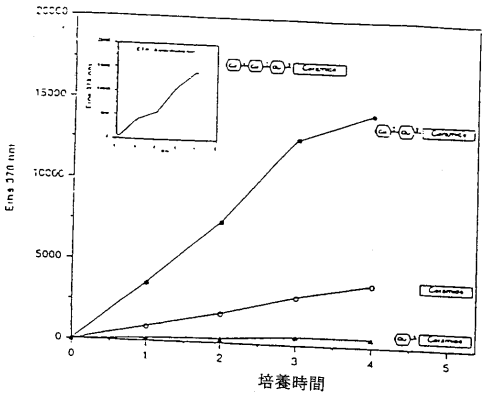
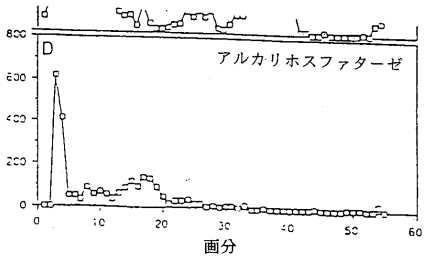


FIG.7C

【図８】

FIG. 8





【図９】

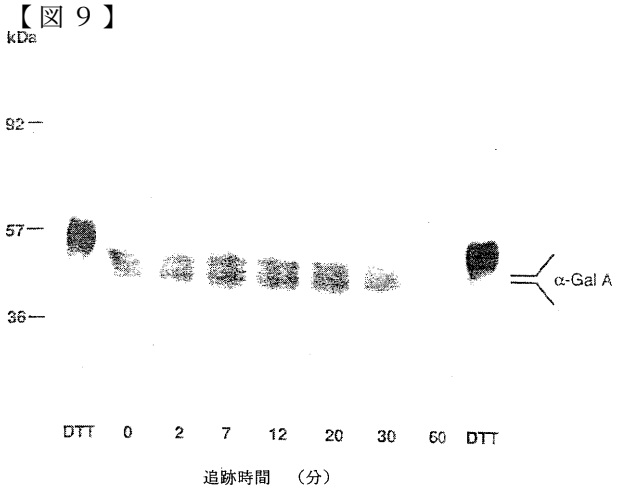


FIG. 9

【図１０】

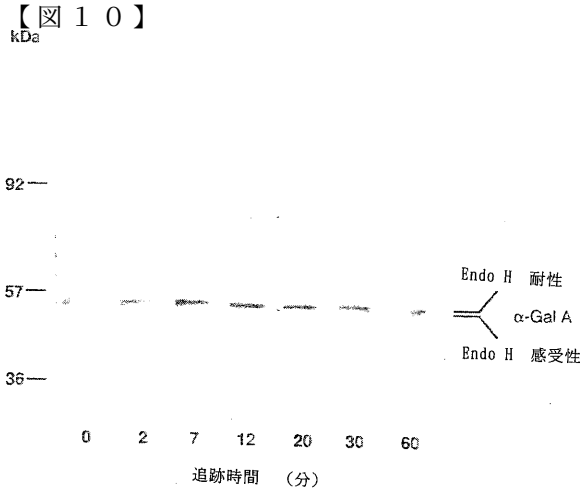


FIG. 10

【図１１】

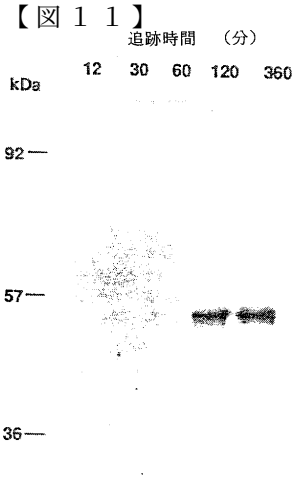


FIG. 11

【図１２】

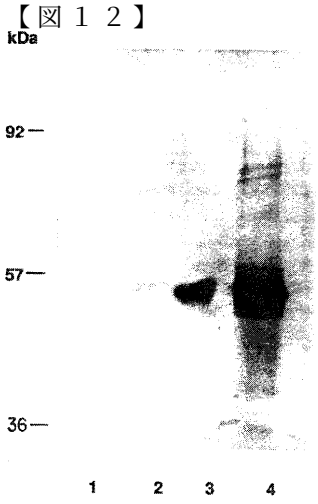
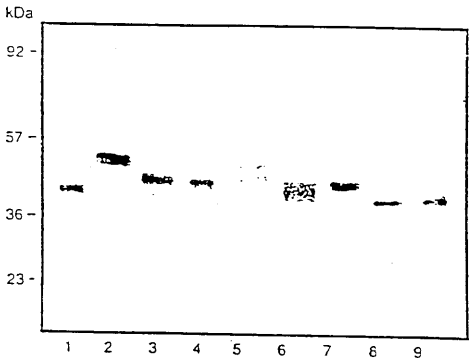


FIG. 12

【図１３】

FIG. 13



【図１４】

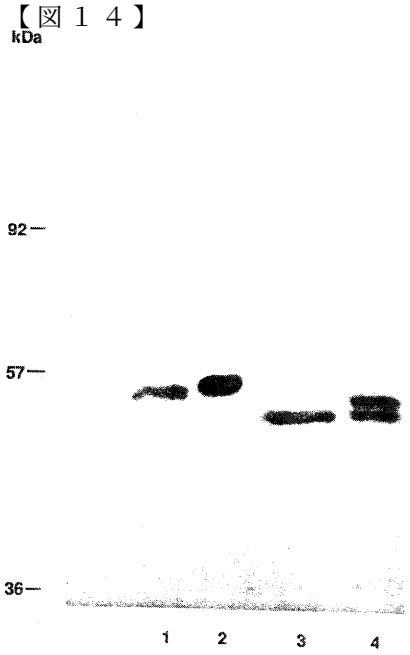


FIG. 14

【図１５】

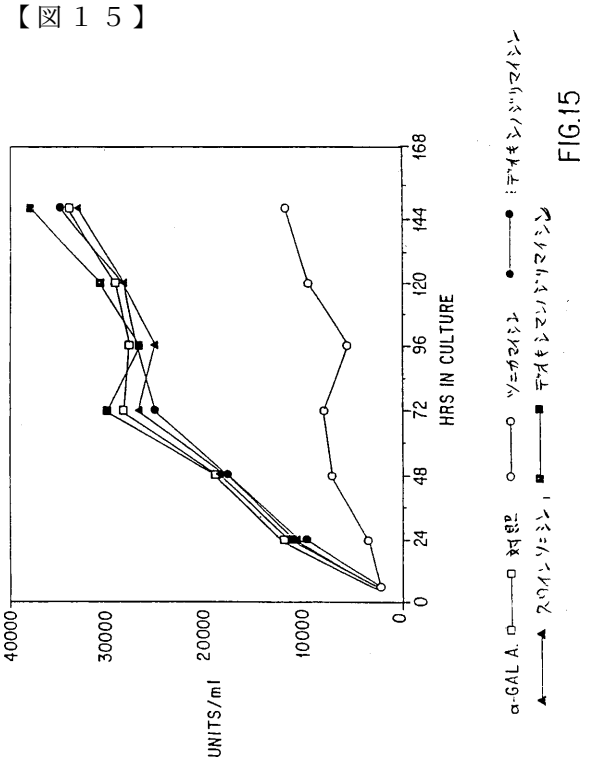


FIG.15

【図１６】

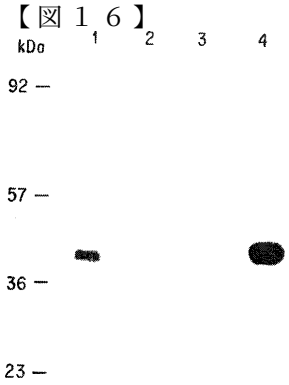


FIG. 16

【図１７Ａ】

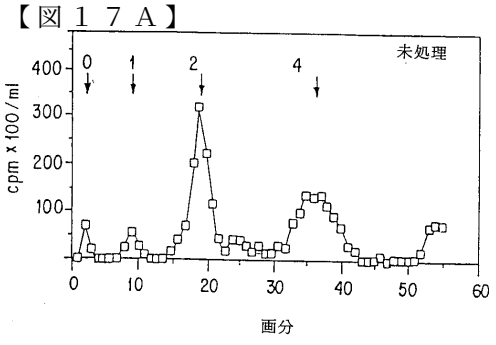


FIG. 17A

【図１７Ｂ】

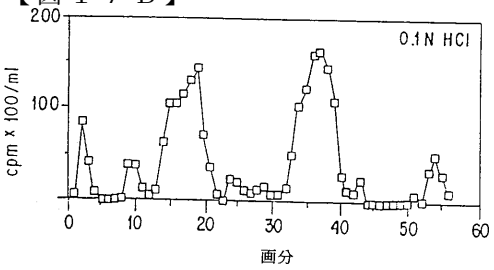


FIG.17B

【図１７Ｃ】

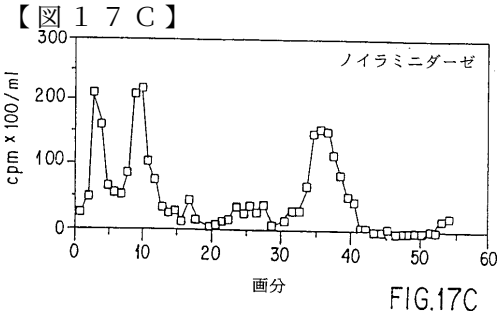


FIG.17C

【図１７Ｄ】

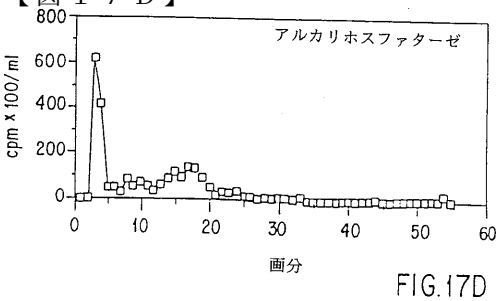


FIG.17D

【図１８】

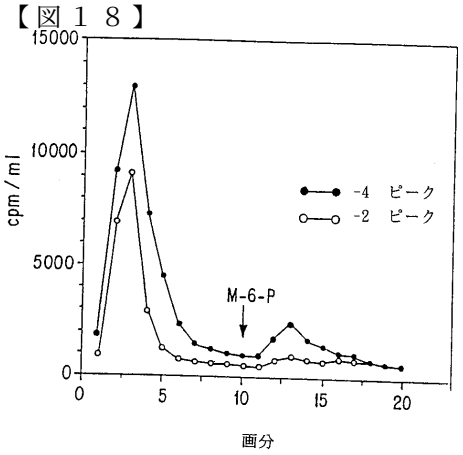


FIG.18

【図１９】

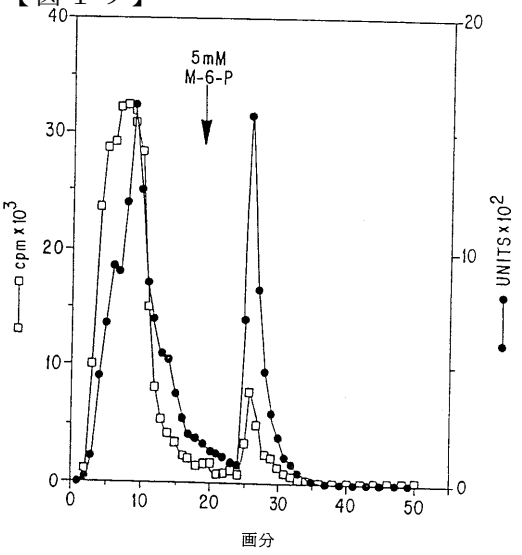


FIG.19

【図２０Ａ】

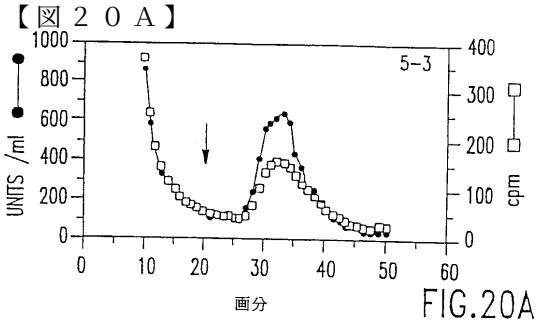


FIG.20A

【図２０Ｂ】

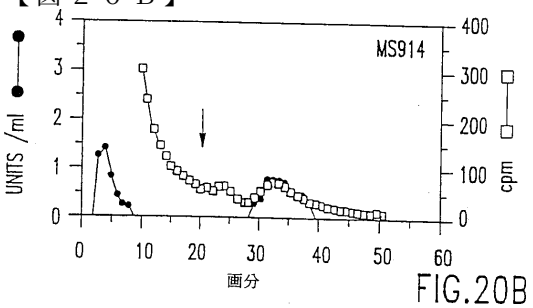


FIG.20B

【図２０Ｃ】

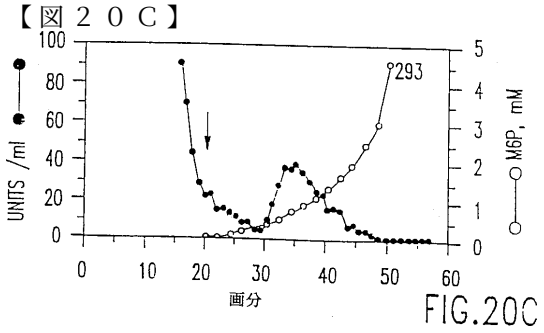


FIG.20C

【図２１】

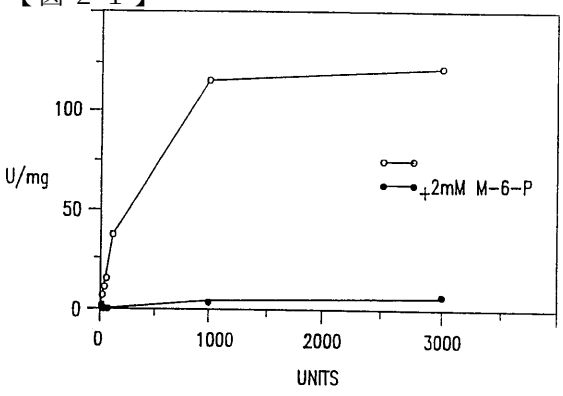


FIG.21

【図２２】

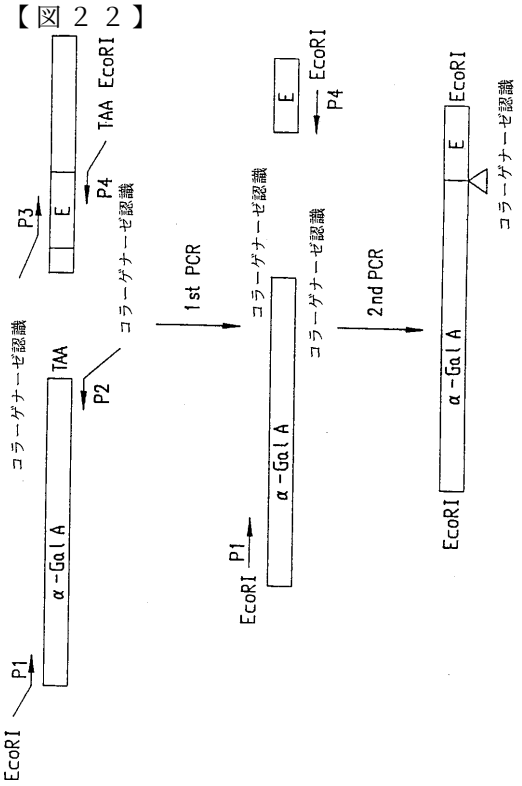


FIG.22

【図２３】

```
1191  GAA TGG ACT TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGA ACT
 398  Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr

1226  GTT TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC
 413  Val Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp

                Collagenase cleavage

1271  TTA CTT CCG GCT GGT CCG GCG CAA CAC GAT GAA GCT CAA CAA AAT
 428  Leu Leu Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn

      α-Gal A                    IgG Binding domain E

1316  GCT TTT TAT CAA GTC TTA AAT ATG CCT AAC TTA AAT GCT GAT CAA
 443  Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln

1371  CGC AAT GGT TTT ATC CAA AGC CTT AAA GAT GAT CCA AGC CAA AGT
 458  Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser

1416  GCT AAC GTT TTA GGT GAA GCT CAA AAA CTT AAT GAC TCT CAA GCT
 473  Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala

                    Bam HI  Eco RI
1501  CCA AAA TAA GGATCCCGGAATTCGGCC
 488  Pro Lys Ter
```

FIG.23

【図２４Ａ】

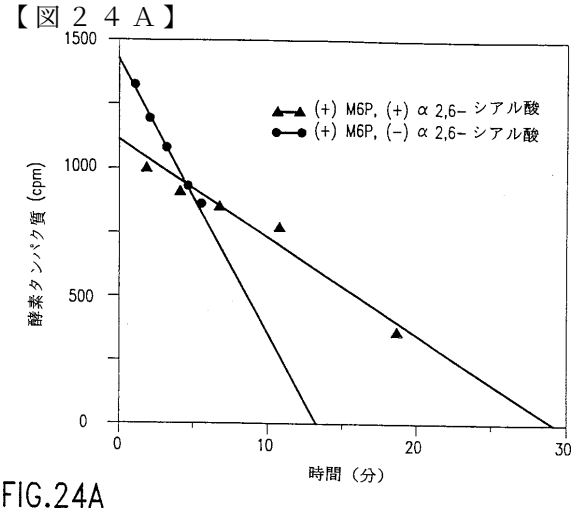


FIG.24A

【図２４Ｂ】

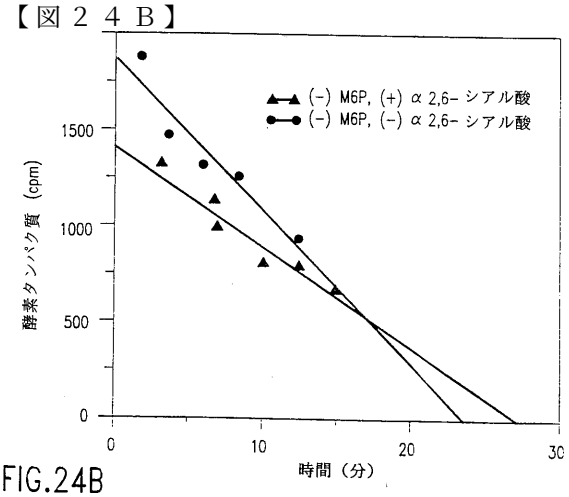


FIG.24B

【図２５】

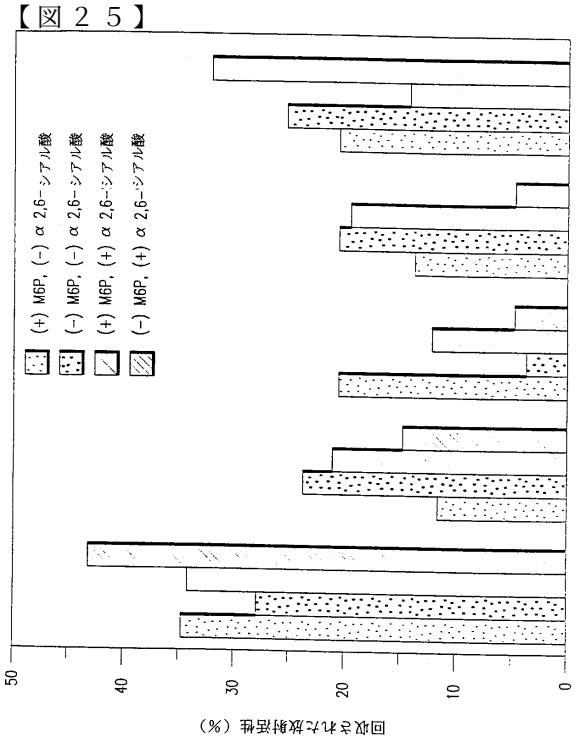


FIG.25

【図２６Ａ】

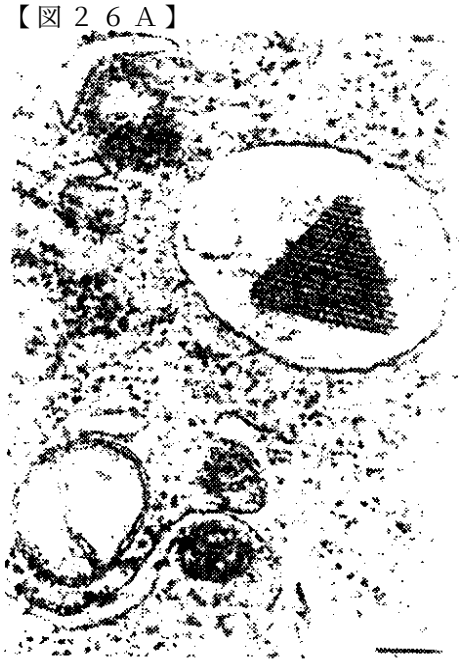


FIG.26A

【図２６Ｂ】



FIG.26B

【図２６Ｃ】



FIG.26C

【図２６Ｄ】



FIG. 26D

【図２６Ｅ】



FIG. 26E

【図２７Ａ】

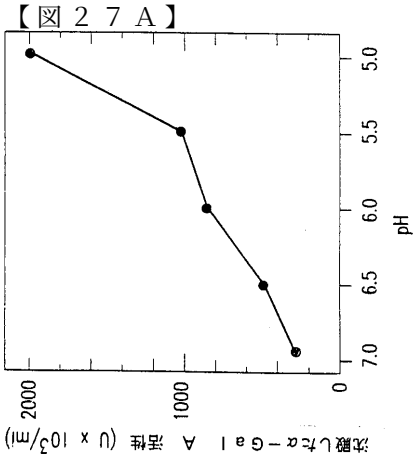


FIG.27A

【図２７Ｂ】

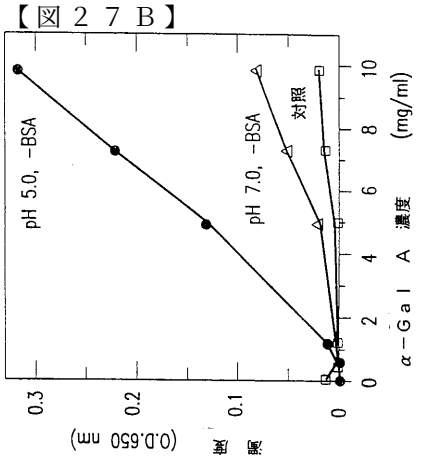


FIG.27B

【図２７Ｃ】

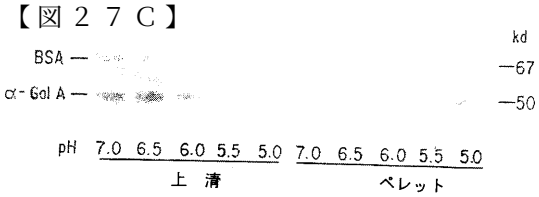


FIG. 27C

【図２８】

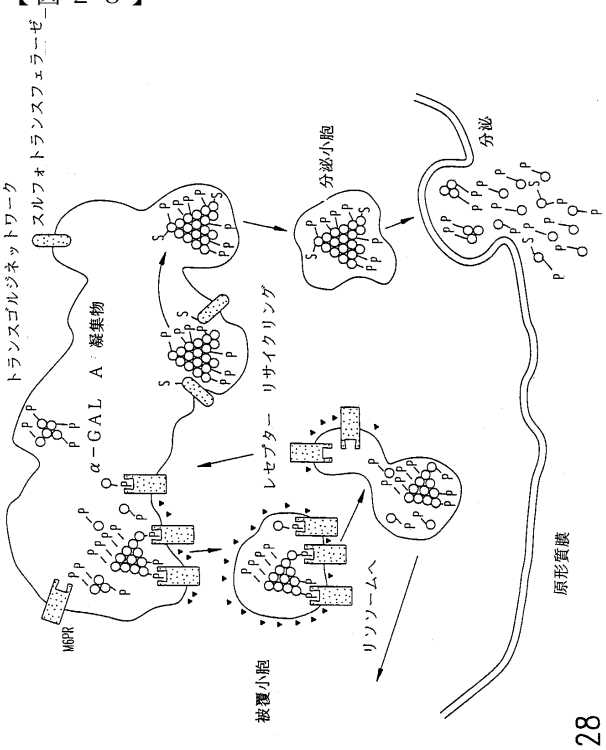


FIG.28

フロントページの続き

(72)発明者 デスニック，ロバート ジェイ.
アメリカ合衆国 １００１４ ニューヨーク州 ニューヨーク，ウエスト ４ティーエイチ ストリート ３２９番地
(72)発明者 ビショップ，デイビッド エフ.
アメリカ合衆国 １０１２８ ニューヨーク州 ニューヨーク，アパートメント １７―イー，イースト ９６ティーエイチ ストリート ３０６番地
(72)発明者 イオアノー，イアニス エイ.
アメリカ合衆国 １０１２８ ニューヨーク州 ニューヨーク，アパートメント ９―アイ，イースト ９６ティーエイチ ストリート ３０６番地

審査官 新留 豊

(56)参考文献 国際公開第９０／０１１３５３（WO，Ａ１）
国際公開第９２／００７９３６（WO，Ａ１）
国際公開第９１／００６６３５（WO，Ａ１）
J. Biol. Chem.，１９９１年 5月 5日，Vol.266，No.13，pp.8531-8539
J. Biol. Chem.，１９８９年，Vol.264，No.20，pp.12009-12015
Endcrinology，１９９２年 7月，Vol.131，No.1，pp.318-326
J. Cell Biol.，１９９１年，Vol.114，No.6，pp.1125-1133
J. Cell Biol.，１９８９年，Vol.109，pp.35-50
Science，１９８５年，Vol.230，pp.25-32
J. Biol. Chem.，１９８９年１２月 5日，Vol.264，No.34，pp.20602-20607

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
C12N 9/10
C12N 9/40
PubMed