(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2005 年2 月24 日 (24.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/017155 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/11, 15/00, 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/53, C12P 21/02, 21/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/008956

(22) 国際出願日: 2004 年6 月18 日 (18.06.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2003-174010	2003 年6 月18 日 (18.06.2003)	JP
特願2003-174006	2003 年6 月18 日 (18.06.2003)	JP
特願2003-282081	2003 年7 月29 日 (29.07.2003)	JP
特願2003-282102	2003 年7 月29 日 (29.07.2003)	JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土屋 政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 飯島 成幸 (IIJIMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 周郷 泉 (SUGO, Izumi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 関森 泰男 (SEKIMORI, Yasuo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 上野 健寿 (UENO, Kenju) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 羽生 清 (HABU, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2005/017155 A1

(54) Title: FUCOSE TRANSPORTER

(54) 発明の名称: フコーストランスポーター

(57) Abstract: It is intended to provide a gene encoding fucose transporter; a fucose transporter polypeptide; a method of screening a compound binding to the fucose transporter and a compound inhibiting the fucose-transporting activity; a cell suffering from the inhibition of fucose transporter function; and a cell suffering from the inhibition of fucose transporter expression. It is also intended to provide a method of producing a recombinant protein characterized by comprising lessening fucose contained in Golgi bodies in a host cell; a method of inhibiting the attachment of fucose to a protein characterized by comprising, in the production of a recombinant protein with the use of a host cell, lessening fucose contained in Golgi bodies in the host cell; a method of elevating the cytotoxic activity of an antibody characterized by comprising constructing the antibody in a cell in which fucose contained in Golgi bodies is lessened; and a cell having Golgi bodies in which fucose contained therein is lessened.

[続葉有]

(57) 要約:

本発明は、フコーストランスポーターをコードする遺伝子、フコーストランスポーターポリペプチド、フコーストランスポーターに結合する化合物及びフコース輸送活性を阻害する化合物のスクリーニング方法、フコーストランスポーター機能が阻害された細胞、並びにフコーストランスポーター発現が阻害された細胞が提供され、さらに組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質の製造方法、宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときに宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質へのフコースの付加阻害方法、ゴルジ体内に存在するフコースが減少した細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性を増加させる方法、及びゴルジ体内に存在するフコースが減少しているゴルジ体を有する細胞である。

明細書

フコーストランスポーター

技術分野

本発明は、フコーストランスポーターポリペプチド、フコーストランスポーターポリペプチドをコードするDNA、フコーストランスポーター機能が阻害された細胞、およびフコーストランスポーターに結合する化合物もしくはフコース輸送活性を阻害する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明は、さらにフコーストランスポーターの機能が阻害された細胞を用いた組換えタンパク質、特に抗体の作製方法に関する。

背景技術

抗体は、ADCC（抗体依存性細胞障害）活性やCDC（補体依存性細胞障害）活性により抗腫瘍効果を発揮しうる。抗体は糖鎖が結合した糖タンパク質であり、抗体の細胞障害活性の強さは抗体に結合する糖鎖の種類および量により変化しうることが知られている。特に、抗体と結合したフコースの量が細胞障害活性の強さに強く関わっていることが報告されている（Shields et al., J Biol Chem., 277(30), 26733-26740, 2002）。さらに、細胞障害活性が増強された抗体を得るために抗体産生の際に糖鎖へのフコースの結合を触媒する酵素を発現させないように操作し、フコースを有しない組換え抗体を作製する方法が報告されている（国際公開公報　WO00/61739号公報）。

発明の開示

本発明は、細胞内においてフコースの輸送に関与しているフコーストランスポーター遺伝子またはポリペプチドを単離することを目的とし、さらにフコーストランスポーターの機能が阻害されている外来タンパク質産生用の細胞を得ることを目的とする。さらに、本発明は、フコーストランスポーターの機能を阻害し得る化合物を単離することを目的とする。さらに本発明は、容易かつ確実にフコー

スの結合が消失または低下した組換えタンパク質を製造する方法の提供を目的とする。特にフコースの結合が消失または低下し、細胞障害活性が増強された抗体を製造する方法の提供を目的とする。本発明は、さらにこのようなタンパク質を産生するための宿主細胞を提供することを目的とする。

抗体産生細胞中で抗体にフコースが結合する機構として、細胞内に取り込まれたフコースにGDPが結合し、その後GDP-フコースがゴルジ体中に取り込まれゴルジ体中でGDP-フコースのフコースがタンパク質に糖鎖として付加されているN-アセチルグルコサミンに転移することが知られている。具体的には、抗体分子のFc領域には、N-グリコシド結合糖鎖が結合する部位が２箇所あり、N-グリコシド結合糖鎖のN-アセチルグルコサミン部分にフコースが結合する（Pate L. Smith et al. J.Cell Biol. 2002, 158, 801-815）。発明者等は、この機構について検討し、GDP-フコースがゴルジ体に取り込まれるのを阻害できれば、タンパク質にフコースが結合するのを抑制できると予測し、GDP-フコースをゴルジ体中に取り込む物質について鋭意検討を行い、該物質をフコーストランスポーターとして単離し、さらにフコーストランスポーターの機能が阻害されている細胞を組換えタンパク質製造のための宿主として用いることにより、フコースが結合せず細胞障害活性が増強された抗体が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明において、抗体へのフコースの付加を阻害するとは、製造される抗体全てがフコースが付加されていないことは必要ではなく、抗体組成物中のフコースが付加されているタンパク質の割合が減少していればよい。

以下、本発明を詳細に説明する。

[１] 以下の(a)又は(b)の組換えポリペプチドまたはその断片、

(a) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ(a)のポリペプチドと機能的に同等であるポリペプチド

[２] 以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA、

(a) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が

欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ(a)のポリペプチドと機能的に同等であるポリペプチド

[3] 以下の(c)又は(d)のDNAを含むDNA、

(c) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号1の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ(c)のDNAがコードするポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNA

[4] [2]または[3]のDNAの断片または[2]または[3]のDNAに相補的なDNAの断片であって、少なくとも15ヌクレオチドからなるDNA断片、

[5] [2]または[3]のDNAを含有する組換えベクター、

[6] [5]の組換えベクターを含む形質転換体、

[7] [6]の形質転換体を培養し、得られる培養形質転換体またはその培養上清からポリペプチドを回収することを含む、[1]のポリペプチドの製造方法、

[8] [1]のポリペプチドに結合する抗体、

[9] [1]に記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および

(c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

[10] [9]の方法により単離し得る、[1]のポリペプチドに結合する化合物、

[11] [1]に記載のポリペプチドのGDP-フコース輸送活性を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチドに被検試料とGDP-フコースを接触させる工程、

(b) 該ポリペプチドのGDP-フコース取り込み能を検出する工程、および

(c) ポリペプチドのGDP-フコース輸送活性を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、

[12] [11]の方法により単離し得る、[1]のポリペプチドのGDP-フコース輸送活性を阻害する化合物、

[１３] ゴルジ体内に存在するフコースが減少しているゴルジ体を有する細胞、

[１４] フコース輸送能が低下または欠損している細胞、

[１５] ゴルジ体へのフコース取り込み活性が低下または欠損している細胞、

[１６] フコーストランスポーターに結合する化合物またはフコース輸送活性を阻害する化合物で処理されている[１３]から[１５]のいずれかの細胞、

[１７] フコーストランスポーターの発現が人為的に抑制されている細胞、

[１８] フコーストランスポーターの発現がRNAiを用いて抑制されている[１７]の細胞、

[１９] フコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞、

[２０] 動物細胞である[１３]から[１９]のいずれかの細胞、

[２１] 動物がチャイニーズハムスター細胞である、[２０]の細胞、

[２２] 動物細胞がCHO細胞である[２０]の細胞、

[２３] 遺伝子の破壊がジーンターゲティングベクターを用いた相同組換えにより行われる、[１９]から[２２]のいずれかの細胞、

[２４] フコーストランスポーターをコードする遺伝子をターゲットとしたターゲティングベクター、

[２５] フコーストランスポーターがチャイニーズハムスターフコーストランスポーターである[２４]のターゲティングベクター、

[２６] 組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質の製造方法、

[２７] 組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるゴルジ体内へのフコースの取り込みを阻害することを特徴とするタンパク質の製造方法、

[２８] 組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるフコーストランスポーターを介したフコースの取り込みを阻害することを特徴とするタンパク質の製造方法、

[２９] 組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とするタンパク質の製造方法、

[３０] 組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるフコーストランスポーターの発現を人為的に抑制することによりフコーストランスポータ

ーの機能を阻害することを特徴とする[２６]から[２９]のいずれかのタンパク質製造方法、

[３１] フコーストランスポーターの発現がRNAiを用いて抑制される[３０]のタンパク質製造方法、

[３２] 組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるフコーストランスポーターをコードする遺伝子を欠損することによりフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とする[２６]から[３０]のいずれかのタンパク質製造方法、

[３３] タンパク質が抗体である[２６]から[３２]のいずれかの製造方法、

[３４] フコースが付加されていないタンパク質を製造することを特徴とする[２６]から[３３]のいずれかの製造方法、

[３５] 宿主細胞がCHO細胞である[２６]から[３４]のいずれかの製造方法、

[３６] 宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときに宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質へのフコースの付加阻害方法、

[３７] 宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときに宿主細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とするタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[３８] 宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときにフコーストランスポーターの発現を人為的に抑制することを特徴とする[３６]または[３７]のタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[３９] フコーストランスポーターの発現がRNAiを用いて抑制される[３８]のタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[４０] 宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときにフコーストランスポーターをコードする遺伝子を欠損することを特徴とする[３６]から[３８]のいずれかのタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[４１] 宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときにフコーストランスポーターを介したフコースの取り込みを阻害することを特徴とするタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[４２] タンパク質が抗体である[３６]から[４１]のいずれかのタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[４３] 宿主細胞がCHO細胞である[３６]から[４２]のいずれかのタンパク質へのフコース付加阻害方法、

[４４] ゴルジ体内に存在するフコースが減少した細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性を増加させる方法、

[４５] 宿主細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害した細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法、

[４６] フコーストランスポーターの発現を人為的に抑制している細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法、

[４７] フコーストランスポーターをコードする遺伝子が欠損している細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法、

[４８] ゴルジ体内へのフコースの取り込みを阻害して抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法、ならびに

[４９] 宿主細胞がCHO細胞である[４４]から[４８]のいずれかの抗体の細胞障害活性増加方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2003-174006号、2003-174010号、2003-282081号、2003-282102号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１は、ヒトおよびマウスGDPフコーストランスポーターcDNAの配列とこれらの共通配列からCHO由来のGDPフコーストランスポーターcDNA取得のためにデザインしたプローブ作成用PCRプライマーの配列を示す図である。

図２は、クローニングにより得られたCHO細胞由来のGDP-フコーストランスポーターcDNA配列を示した（小文字はベクター由来クローニング部位を示す）図である。GDP-フコーストランスポーターゲノムDNA取得に用いたプローブ作成用PCRプライマーの配列を合わせて示した。

図３は、クローニングにより得られたGDPフコーストランスポーター遺伝子の制限酵素地図を示す図であり、下線部はエクソン・イントロン境界部分の配列（小文字：イントロン）を示す。

図４は、CHO由来GDPフコーストランスポーター遺伝子配列を示す図である。

図５は、SiRNAを用いたトランスポーター遺伝子阻害の結果を示す図である。

図６は、ターゲッティング（KO2）ベクターの構造とPCRスクリーニングの概略を示す図である。

図７は、PCRスクリーニングの結果を示す写真である。

図８は、野生型染色体、及びノックアウト型染色体の制限酵素地図を示す図である。

図９は、サザンブロット法の結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、チャイニーズハムスター(CH)フコーストランスポーターを提供する。

チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）は、現在、抗体などのタンパク質製造の際の宿主細胞として広く用いられているので、本発明のチャイニーズハムスターフコーストランスポーターは特に有用である。

本発明は、また、CHフコーストランスポーター遺伝子と機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを包含する。このようなDNAには、例えば、CHフコーストランスポーターポリペプチドの変異体、アレル、バリアント、ホモログ等をコードするDNAが含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが、CHフコーストランスポーターポリペプチドと同等の生物学的機能を有することを指す。

本発明において、CHフコーストランスポーターと同等の生物学的機能とは、フコース輸送活性をいい、好ましくはCHO細胞におけるフコース輸送活性をいう。

あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100,

468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367 、Kunkel, TA(1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492 、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、CHフコーストランスポーターポリペプチドのアミノ酸に適宜変異を導入することにより、該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製することができる。

また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、CHフコーストランスポーターポリペプチドのアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列からなり、該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドもまた本発明に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内、特に好ましくは3アミノ酸以内であると考えられる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ離（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。

あるアミノ酸配列に対する１又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666 、Zoller, M. J. &Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500 、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433 、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413）。

CHフコーストランスポーターポリペプチドのアミノ酸配列に複数個のアミノ酸

残基が付加されたポリペプチドには、これらポリペプチドを含む融合ポリペプチドが含まれる。融合ポリペプチドは、これらポリペプチドと他のポリペプチドとが融合したものであり、このような融合ポリペプチドも本発明に含まれる。融合ポリペプチドを作製するには、例えば、CHOフコーストランスポーターポリペプチドをコードするDNAと他のポリペプチドをコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよい。本発明のポリペプチドとの融合に付される他のポリペプチドは、特に限定されないが、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis（ヒスチジン）残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素（HA）、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag 、α-tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。さらに、本発明のポリペプチドとの融合に付される他のポリペプチドとして、例えば、GST（グルタチオンーSートランスフェラーゼ）、HA（インフルエンザ凝集素）、イムノグロブリン定常領域、βーガラクトシダーゼ、MBP（マルトース結合蛋白質）等が挙げられる。これらのポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードする遺伝子は市販されており、市販されているこれらポリペプチドをコードするDNAを本発明のポリペプチドをコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合ポリペプチドを調製することができる。

また、あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術（Sambrook,J et al., Molecular Cloning 2nded., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者においては、CHフコーストランスポーターポリペプチドをコードするDNA配列もしくはその一部を利用して、これと相同性の高いDNAを単離すること、さらに、該DNAからCHフコーストランスポーターポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを単離することは、周知の技術である。

本発明には、CHフコーストランスポーターポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、CHフコーストランスポーターポリ

ペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAが含まれる。このようなDNAとしては、例えば、ヒトおよび他の哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ウシなど）由来のホモログなどが挙げられる。

CHフコーストランスポーターポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC 、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、0.1×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

また、CHフコーストランスポーターポリペプチドをコードするDNAの配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用して、CHフコーストランスポーターポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードする、CHフコーストランスポーターポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドは、通常、CHフコーストランスポーターポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のポリペプチドには、CHフコーストランスポーターポリペプチドと機能的に同等であり、かつ該ポリペプチドのアミノ酸配列と高い相同性を有するポリペプチドも含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、70%以上の同一性、好ましくは80%以上の同一性、さらに好ましくは92%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。

また、塩基配列レベルにおいて、通常、70%以上の同一性、好ましくは80%以

上の同一性、さらに好ましくは90％以上の同一性、さらに好ましくは95％以上の同一性を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschulによるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)。

本発明のDNAは、例えば、後述する本発明のポリペプチドのin vivoやin vitroにおける生産に利用される。本発明のDNAは、本発明のポリペプチドをコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のポリペプチドをコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のポリペプチドを発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えば、文献（Sambrook, J.et al., Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成した後、本発明のDNAの配列に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のポリペプチドをコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳

領域を決定でき、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のポリペプチドを発現する細胞、組織、臓器から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) 、AGPC法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia社) 等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) に従い、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucelic Acids Research (1981) 9, r43-74) 。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA、TGA、又は

TAG）の挿入等が挙げられる。

本発明は、上記本発明のDNAがコードするポリペプチドを提供する。本発明のポリペプチドは、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたポリペプチドが、CHフコーストランスポーターポリペプチドと同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明のポリペプチドを原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来のポリペプチドのアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明のポリペプチドはこのようなポリペプチドも包含する。

本発明のポリペプチドは、当業者に公知の方法により、組み換えポリペプチドとして、また天然のポリペプチドとして調製することが可能である。組み換えポリペプチドであれば、本発明のポリペプチドをコードするDNAを、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、本発明のポリペプチドをグルタチオン S-トランスフェラーゼ蛋白質との融合ポリペプチドとして、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えポリペプチドとして宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換えポリペプチドはグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。融合ポリペプチドの精製後、必要に応じて融合ポリペプチドのうち、目的のポリペプチド以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

天然のポリペプチドであれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のポリペプチドを発現している組織や細胞（例えば、精巣）の抽出物に対し、後述する本発明のポリペプチドに結合する抗体が結合したアフィニティーカラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明は、また、本発明のポリペプチドの部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドに対する抗体の作製、本発明のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニングなどに利用し得る。

本発明の部分ペプチドは、免疫原とする場合には、通常、少なくとも7アミノ酸以上、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明のポリペプチドの競合阻害剤として用いる場合には、少なくとも100アミノ酸以上、好ましくは200アミノ酸以上、さらに好ましくは300アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のポリペプチドを適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

本発明は、また、本発明のDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターは、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、本発明のポリペプチドを発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5α、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の薬剤により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。

ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持っている必要があり、さらに、宿主をJM109、DH5α、HB101、XL1-Blueなどの大腸

菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043 ）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（ファルマシア社製）、「QIAexpress system」（キアゲン社製）で用いられるpQE、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379 ）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外の微生物も本発明のポリペプチドを製造するための宿主として用いることができ、この場合、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、例えば哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製）や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」（ギブコBRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら, Nature (1979) 277, 108）、MMLV-LTRプロモーター、EF1αプロモーター（Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための

遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌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（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えばpAdexlcw）やレトロウイルスベクター(例えばpZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning，5.61-5.63）。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明のポリペプチドの製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitro およびin vivo の産生系がある。

in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220）やCHO K-1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275）を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポーレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス（Saccharomyces）属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、糸状菌、例えば、アスペルギルス（Aspergillus）属、例えば、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌（E. coli）、例えば、JM109、DH5α、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞をin vitroで培養することによりポリペプチドが得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6～8

であるのが好ましい。培養は、通常、約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、in vivoでポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とするDNAを、ヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のポリペプチドを得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のポリペプチドをコードするDNAを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる（Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594）。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするポリペプチドをコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる（Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138）。

このような方法により得られた本発明のポリペプチドは、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なポリペプチドとして精製することができる。ポリペプチドの分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればポリペプチドを分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたポリペプチドも包含する。

なお、ポリペプチドを精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

本発明は、また、本発明のポリペプチドと結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、抗体の由来は限定されず、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体、ヒト抗体など、どのような抗体を用いてよい。さらに遺伝子組み換えによるキメラ抗体やヒト化抗体なども本発明の抗体に含まれる。

本発明において、感作抗原として使用されるポリペプチドは、完全な蛋白質であってもよいし、また、蛋白質の部分ペプチドであってもよい。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、蛋白質のアミノ基（N）末端断片やカルボキシ（C）末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に反

応する抗体を意味する。

本発明のポリペプチド又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のポリペプチド又はその断片を公知の方法で得て、これらを感作抗原として用いればよい。また、ポリペプチドを発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のポリペプチドを感作抗原として使用してもよい。短いペプチドは、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリア蛋白質と適宜結合させて抗原とすることが好ましい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応

じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のポリペプチドをカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のポリペプチドのみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでポリペプチド、ポリペプチド発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、ポリペプチドへの結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチ

ドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの精製、検出に用いられる他、本発明のポリペプチドのアゴニストやアンタゴニストの候補になる。

ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等を適宜用いることができる。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K.et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856.）。また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO

93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

さらに、本発明の抗体は、本発明のポリペプチドに結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')2、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)、Diabodyなどが挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。Diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント（例えば、scFv等）（以下、Diabodyを構成するフラグメント）を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む(P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、WO93/11161号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et

al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al,. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常のポリペプチドで使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)等により行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の

測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA)、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のポリペプチドを添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。ポリペプチドとしてポリペプチドの断片、例えばそのC末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のポリペプチドが含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該ポリペプチドとの免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のポリペプチドの検出又は測定方法を実施することができる。本発明のポリペプチドの検出又は測定方法は、ポリペプチドを特異的に検出又は測定することができるため、ポリペプチドを用いた種々の実験等に有用である。

本発明はまた、CHフコーストランスポーターポリペプチドをコードするDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

本発明で用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、もしくは二本鎖以上でもよい。

ヌクレオチドはDNAであっても、RNAであってもよく、また、DNAとRNAが混合していてもよい。

このような核酸には、本発明のポリペプチドをコードするDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、該DNAの発現を検出するためのプローブやプライマー、DNAチップの作製などに用いることが可能である。

また、本発明のポリペプチドの発現を制御するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、またはこれらをコードするDNA等）が含まれる。本発明のポリペプチドの発現を阻害する場合、その標的部位は特に限定されず、タンパク質コード領域や5'非翻訳領域などを標的とすることが可能である。本発明のポリペプチドの発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CHO細胞においてゴルジ体内へのフコースの輸送を阻害し、抗体へのフコースの付加を阻害することができるので、高細胞障害活性を持った抗体の作製などに有用である。

プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的とし、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号１の塩基配列中又はその相補配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号１の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。ハイブリダイズの具体的な条件は、例えば上述の条件を挙げることができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、DNAまたはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号１に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、１又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在し

ているものも含まれる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のポリペプチドの産生細胞に作用して、該ポリペプチドをコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明のポリペプチドの発現を抑制することにより、結果的に本発明のポリペプチドの作用を抑制する効果を有する。

オリゴヌクレオチドとしてRNAを用いる場合、一般的にはRNA干渉（RNA interfearenece：RNAi）と呼ばれる。RNAiは、二本鎖RNA(dsRNA)を細胞内に導入した際に、そのRNA配列に対応する細胞内のmRNAが特異的に分解され、蛋白質として発現されなくなる現象をいう。RNAiの場合、通常、二本鎖RNAが用いられるが、特に限定されず、例えば、自己相補的な一本鎖RNA中で形成される二本鎖を用いることも可能である。二本鎖を形成する領域は、全ての領域において二本鎖を形成していてもよいし、一部の領域（例えば両末端又は片方の末端など）が一本鎖等になっていてもよい。RNAiに用いられるオリゴRNAは、その長さは限定されない。本発明のオリゴRNAの長さとしては、例えば、5～1000塩基（二本鎖の場合には、5～1000bp）であり、好ましくは10～100塩基（二本鎖の場合には、10～100bp）であり、さらに好ましくは15～25塩基（二本鎖の場合には、15～25bp）であり、特に好ましくは19～23塩基（二本鎖の場合には、19～23bp）である。

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。この方法は、本発明のポリペプチドとこれに結合する化合物を含むと予想される被検試料とを接触せしめ、該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出し、そして本発明のポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する、ことを含む。

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドのフコース輸送活性、特にGDP-フコース輸送活性を阻害する物質のスクリーニング方法を提供する。この方法は、本発明のポリペプチドと被検試料とを接触せしめ、本発明のポリペプチドのフコース輸送活性を検出し、そして本発明のポリペプチドのフコース輸送活性を阻害する化合物を選択することを含む。

スクリーニングに用いられる本発明のポリペプチドは組換えポリペプチドであ

っても、天然由来のポリペプチドであってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製ポリペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のポリペプチドは、例えば、精製したポリペプチドとして、可溶型ポリペプチドとして、担体に結合させた形態として、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被検試料に接触させることができる。

本発明のポリペプチドを用いて、これに結合するポリペプチドをスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-

2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643(1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。

特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を本発明のポリペプチドのN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合ポリペプチドとして本発明のポリペプチドを発現させることができる。用いるエピトープ－抗体系としては市販されているものを利用することができる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。マルチクローニングサイトを介して、β－ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質（GFP）などとの融合ポリペプチドを発現することができるベクターが市販されている。

融合ポリペプチドにすることにより本発明のポリペプチドの性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合ポリペプチドを調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン（His-tag）、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質（VSV-GP）、T7 gene10蛋白質（T7-tag）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質（HSV-tag）、E-tag（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のポリペプチドに結合するポリペプチドのスクリーニングのためのエピトープ－抗体系として利用できる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のポリペプチド、それと結合能を有するポリペプチド、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のポリペプチドに対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のポリペプチドに対する抗体は、例えば、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を適当な大腸菌発現

ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたポリペプチドを精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明のポリペプチドの部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウスIgG 抗体であれば、Protein A SepharoseやProtein G Sepharoseを用いて沈降させることができる。また、本発明のポリペプチドを、例えば、GSTなどのエピトープとの融合ポリペプチドとして調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のポリペプチドの抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献（Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies, pp. 511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)）記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降されたポリペプチドの解析にはSDS-PAGEが一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでポリペプチドの分子量により結合していたポリペプチドを解析することができる。また、この際、一般的には本発明のポリペプチドに結合したポリペプチドは、クマシー染色や銀染色といったポリペプチドの通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である^{35}S-メチオニンや^{35}S-システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のポリペプチドを標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。ポリペプチドの分子量が判明すれば直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のポリペプチドを精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明のポリペプチドを用いて、該ポリペプチドに結合するポリペプチドを単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法（Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90）を用いて行うことができる。すなわち、本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される細胞、組織、臓器(例えば、精巣）よりファージベクター（λgt11, ZAPなど）を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたポリペプチドを固定し、精製して標識した本発明のポ

リペプチドと上記フィルターとを反応させ、本発明のポリペプチドと結合したポリペプチドを発現するプラークを標識により検出すればよい。本発明のポリペプチドを標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のポリペプチド又は本発明のポリペプチドに融合したポリペプチド（例えばGSTなど）に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた2-ハイブリッドシステム（Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292、Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」,「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」,「MATCHMAKER One-Hybrid System」（いずれもクロンテック社製）、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（ストラタジーン社製））を用いて行う方法が挙げられる。

2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する（酵母細胞内で本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドが発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするポリペプチドを得ることができる。これにより本発明のポリペプチドに結合するポリペプチドまたはその遺伝子を調製することが可能である。

2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1（Plasminogen activator inhibitor type1）遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。２ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の

他、哺乳動物細胞などを使って行うこともできる。

本発明のポリペプチドと結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のポリペプチドをアフィニティーカラムの担体に固定し、ここに本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のポリペプチドに結合したポリペプチドを調製することができる。

得られたポリペプチドは、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該ポリペプチドをコードするDNAを得ることができる。

また、ポリペプチドに限らず、本発明のポリペプチドに結合する化合物（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のポリペプチドに結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS;Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64、Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13、Hogan JC Jr.,Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9）が当業者に公知である。

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、本発明のポリペプチドと被検化合物との間の相互作用を微量のポリペプチドを用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いるこ

とにより本発明のポリペプチドと被検化合物との結合を評価することが可能である。

本発明のポリペプチドのフコース輸送活性を阻害する物質のスクリーニング方法は当業者に公知の方法で行うことが可能である。例えば、本発明のポリペプチドを膜上（細胞膜、ゴルジ体膜、ウイルス膜、など）に発現させ、蛍光物質などで標識したフコースと、被験物質を接触させ、取り込まれたフコースの量を測定することにより、本発明のポリペプチドのフコース輸送活性を阻害する物質のスクリーニングを行うことが可能である。

本発明のスクリーニングにより単離しうる化合物は、本発明のポリペプチドの活性を調節するための候補となり、細胞障害活性の高い抗体の作製への応用が考えられる。

本発明においてフコーストランスポーターとはフコース輸送活性を有するポリペプチドのことをいい、例えば、フコーストランスポーターが細胞膜上に発現している場合には通常、フコースを細胞内に取り込み、フコーストランスポーターがゴルジ膜上に発現している場合には通常、フコースをゴルジ体内に取り込む。本発明においては好ましいフコーストランスポーターはチャイニーズハムスターフコーストランスポーターであり、より好ましくは配列番号２に記載されたアミノ酸配列を有するフコーストランスポーターである。配列番号１にはチャイニーズハムスターフコーストランスポーター遺伝子の塩基配列を示す。

ゴルジ体内に存在するフコースを減少させる方法は特に限定されず、どのような方法で行ってもよいが、例えば、ゴルジ体内に取り込まれるフコースの量を減少させる方法を挙げることができる。

ゴルジ体は主にゴルジ膜上に存在するフコーストランスポーターを介して、フコースをゴルジ体内に取り込んでいることから、該フコーストランスポーターの機能を阻害することにより、ゴルジ体内へのフコースの取り込みを阻害することができ、ゴルジ体内に取り込まれるフコースの量を減少させることが可能である。

細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害するとは、フコーストランスポーターのフコース輸送活性を低下または消滅させることをいう。

細胞のフコーストランスポーターの機能の阻害はどのような方法で行われても

よく、当業者に公知の方法で行うことが可能である。具体的な方法としては、フコーストランスポーターの発現を阻害する等してフコーストランスポーター自体の数を減少させる方法や、フコーストランスポーターに対するアンタゴニストを用いる等してフコーストランスポーターの輸送能を低下させる方法等を挙げることができる。

フコーストランスポーターの発現阻害は、正常な輸送能を有するフコーストランスポーターの数が減少する限り、特に制限はされず、例えば、ゲノムに含まれるフコーストランスポーター遺伝子の除去、mRNAへの転写の過程を阻害、mRNAの分解、タンパク質への翻訳の過程を阻害、などにより阻害することが可能である。フコーストランスポーター遺伝子の発現を阻害する為の具体的な方法としては、例えば、フコーストランスポーターを標的としたターゲティングベクターなどを用いてフコーストランスポーターをコードする遺伝子を欠失（ノックアウト）する方法や、フコーストランスポーターをコードする遺伝子に対するアンチセンスDNAやRNA干渉（RNAi）を用いる方法などを挙げることができる。フコーストランスポーターを阻害された細胞は、いずれの方法を用いてフコーストランスポーター機能阻害した細胞でよいが、医薬品等の生産に用いる場合、好ましくは染色体の安定性の高い細胞としてCre-loxpを用いない細胞が好ましい（Schumidt E.E. et al., PNAS 97, 13702-13707 (Feb 2001)。

本発明の製造方法により作製されるタンパク質はどのようなタンパク質でもよいが、通常、糖タンパク質であり、好ましくは抗体である。

本発明の方法により作製する抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、ヒト抗体等や、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等を適宜用いることができる。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、再構成

（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR;complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K.et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856.）。また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を基に適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

また、抗体は抗原に結合することができれば、抗体断片等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。例えば、抗体断片としては、Fab、$F(ab')_2$、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)、Diabodyなどが挙げられる。このような抗体断片を得るには、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., MethodsEnzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。Diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント（例えば、scFv等）（以下、Diabodyを構成するフラグメント）を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む(P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、WO93/11161号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al,. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。又、抗体に放射性同位元素、化学療法剤、細菌由来トキシン等の細胞傷害性物質などを結合することも可能であり、特に放射性標識抗体は有用である。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

組み換えポリペプチドの製造方法は、当業者に知られている公知の方法で行うことが可能である。一般的にはポリペプチドをコードするDNAを、適当な発現ベ

クターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、タンパク質をグルタチオン S-トランスフェラーゼ蛋白質との融合ポリペプチドとして、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えポリペプチドとして宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換えポリペプチドはグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。融合ポリペプチドの精製後、必要に応じて融合ポリペプチドのうち、目的のポリペプチド以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

本発明の製造方法において製造されるタンパク質としては、結合したフコースにより細胞傷害活性が影響を受ける抗体が好ましい。

抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて抗体を産生させる方法は当業者によく知られている（例えば、Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

さらに、本発明は外来のタンパク質を産生し得る宿主細胞であって、外来タンパク質にフコースが付加されない細胞を包含する。

このような細胞は細胞内、例えば、ゴルジ体内に存在するフコースを減少させた細胞である。ゴルジ体内に存在するフコースを減少させる方法は特に限定されず、どのような方法で行ってもよいが、例えば、ゴルジ体内に取り込まれるフコースの量を減少させる方法を挙げることができる。ゴルジ体は主にゴルジ膜上に存在するフコーストランスポーターを介して、フコースをゴルジ体内に取り込んでいることから、該フコーストランスポーターの機能を阻害することにより、ゴルジ体内へのフコースの取り込みを阻害することができ、ゴルジ体内に取り込まれるフコースの量を減少させることが可能である。

細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害するとは、フコーストランスポーターのフコース輸送活性を低下または消滅させることをいう。

細胞のフコーストランスポーターの機能の阻害はどのような方法で行われてもよく、当業者に公知の方法で行うことが可能である。具体的な方法としては、フコーストランスポーターの発現を阻害する等してフコーストランスポーター自体の数を減少させる方法や、フコーストランスポーターに対するアンタゴニストを用いる等してフコーストランスポーターの輸送能を低下させる方法等を挙げることができる。

フコーストランスポーターの発現阻害は、正常な輸送能を有するフコーストランスポーターの数が減少する限り、特に制限はされず、例えば、ゲノムに含まれるフコーストランスポーター遺伝子の除去、mRNAへの転写の過程を阻害、mRNAの分解、タンパク質への翻訳の過程を阻害、などにより阻害することが可能である。フコーストランスポーター遺伝子の発現を阻害する為の具体的な方法としては、例えば、フコーストランスポーターを標的としたターゲティングベクターなどを用いてフコーストランスポーターをコードする遺伝子を欠失（ノックアウト）する方法や、フコーストランスポーターをコードする遺伝子に対するアンチセンスDNAやRNA干渉（RNAi）を用いる方法などを挙げることができ、これらの方法は後述する。

このような、フコーストランスポーターの機能が阻害された細胞を宿主細胞として外来タンパク質を発現させることにより、フコースの結合していないタンパク質を得ることができる。ここで、外来のタンパク質とはその細胞自体に由来しないタンパク質をいう。宿主細胞には特に制限はなく、例えば、組換えタンパク質を発現させた際に該タンパク質に糖が付加される細胞等を用いることができる。より具体的には種々の動物細胞などを用いることができ、好ましくはCHO細胞である。本発明においては特にフコーストランスポーター遺伝子がノックアウトされたCHO細胞を好適に使用することができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細

胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、例えば、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) などを例示することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。

上記の外来のタンパク質を産生し得る宿主細胞であって、フコーストランスポーターの機能が阻害されている細胞に産生させようとする抗体等の外来タンパク質をコードする遺伝子を組込んだ発現ベクターを組込めば、フコースの結合していないタンパク質を得ることができる。ベクターとしては、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製)や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」（ギブコBRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）等が挙げられるが、宿主細胞をCHO細胞とする場合には哺乳動物由来のベクターを使用することが好ましい。

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とする場合には、通常、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら, Nature (1979) 277, 108）、MMLV-LTRプロモーター、EF1αプロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っており、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセー

ト（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌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（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

細胞の培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6～8であるのが好ましい。培養は、通常、約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

本発明の宿主細胞により作製されるタンパク質はどのようなタンパク質でもよいが、通常、糖タンパク質であり、好ましくは抗体である。

本発明の方法により作製する抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、ヒト抗体等や、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等を適宜用いることができる。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。抗体については既に上述されている。

フコーストランスポーターの発現が阻害されている細胞として、フコーストランスポーターをコードする遺伝子を破壊した細胞が挙げられる。「遺伝子の破壊」とは、遺伝子の塩基配列に部分的な欠失、置換、挿入、付加等を行い、該遺

伝子の発現を抑制することをいう。遺伝子の発現が完全に抑制されている場合だけでなく、部分的に抑制されている場合も本発明の「遺伝子の破壊」に含まれる。「遺伝子の欠損（ノックアウト）」および「遺伝子の不活性化」も「遺伝子の破壊」と同等の意味として用いられる。さらに、ジーンターゲティングを用いた相同組換えにより遺伝子が破壊された細胞を遺伝子がノックアウトされた細胞という。フコーストランスポーターをコードする遺伝子を破壊した細胞は、フコーストランスポーターの発現が人為的に抑制されている細胞の１つである。フコーストランスポーターをコードする遺伝子を破壊した細胞は、ゴルジ体内に存在するフコースの量がフコーストランスポーター遺伝子が破壊されていない細胞に比べ有意に減少している細胞、細胞内におけるフコース輸送能が低下または欠損している細胞、細胞内のゴルジ体へのフコース取込み活性が低下または欠損している細胞である。ゴルジ体中のフコースの量は細胞よりゴルジ体を単離し糖を抽出し、抗原抗体反応、糖とレクチンの結合反応、液体クロマトグラフィー、電気泳動等により測定することができる。また、細胞内におけるフコース輸送能および細胞内のゴルジ体へのフコース取込み活性は例えば、蛍光物質やラジオアイソトープ等で標識したフコースを用いて測定することができる。

遺伝子の破壊は、例えば、相同組換え法により行うことが可能である。

相同組換え法は、染色体上の遺伝子と外来DNAとの間で相同的遺伝子組換えによって目的の遺伝子だけを任意に改変する方法をいい、タンパク質をコードする配列を分断する目的で、その遺伝子のエクソンに別のDNA配列を挿入する。ジーンターゲティングベクターを持つ細胞を同定しやすくするため、遺伝子を分断する配列には一般にバクテリア由来のネオマイシン耐性遺伝子のような選択マーカーを用いる。本明細書に記載のフコーストランスポーター遺伝子の配列情報を基にターゲティングベクターを設計・作製し、該ターゲティングベクターを用いて破壊しようとするフコーストランスポーター遺伝子を相同組換えすればよい。例えば、置換型ベクターは、導入する変異の5'および3'側に連結された相同領域、ポジティブセレクション用のマーカー、相同領域の外側でベクターを直鎖状化するための制限酵素部位、相同領域の外側に配置されたネガティブセレクション用のマーカー、変異検出用の制限酵素切断部位等を含むことができる。ターゲティ

ングベクターは、山村研一ら編　トランスジェニック動物　共立出版株式会社1997年３月1日、相沢慎一　ジーンターゲティング　ES細胞を用いた変異マウスの作製　バイオマニュアルシリーズ８　羊土社　1995、Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Hoarbor Laboratory Press (1944)、Joyner, A.L., Gene Targeting, A Practical Approach Series, IRL Press (1993)、松村正實ら編　実験医学別冊　新遺伝子工学ハンドブック（改定第３版）　羊土社　1999　等に記載の方法に従って作製することができる。ターゲティングベクターは挿入型および置換型のどちらを用いてもよい。また、Cre-lox系を用いたターゲティングにより組換えを起こさせることもできる。Cre-lox系を用いたターゲティングは、例えば特表平11-503015号公報に記載の方法に従って行うことができる。相同組換えを起こした相同組換え体の選別方法としては、ポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択等の公知の選択方法を用いればよい。相同組換え体の同定は、PCR法でもサザンブロッティング法のいずれの方法をも用いることができる。

また、その他、フコーストランスポーターの発現が阻害されている細胞の作製方法としては、例えば、アンチセンス法、リボザイム法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法、RNAi法、RDO法、TFO法、フコーストランスポーター遺伝子をノックアウトした哺乳動物から株化細胞を得る方法、等を挙げることができる。

アンチセンス法は、本発明のフコーストランスポーター遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドにより細胞におけるフコーストランスポーターの翻訳を阻害する方法である。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号１の塩基配列中又はその相補配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、通常、配列番号１の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみな

らず、DNAまたはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号１に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、１又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在しているものも含まれる。ハイブリダイズの具体的な条件は、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1％SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC 、0.1％SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1％SDSの条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの産生細胞に作用して、該ポリペプチドをコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明のポリペプチドの発現を抑制することにより、結果的に本発明のポリペプチドの作用を抑制する効果を有する。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換する事も可能である。

リボザイム法は、核酸を切断する活性を有するRNAを用いて細胞中でフコーストランスポーター遺伝子のmRNAを切断し、発現されないようにする方法である。リボザイムは、基質RNAに相補的な認識部位と、ループ状の酵素活性部位、およびこの酵素活性部位に付随するステムII領域とからなっており、認識部位を本発明のフコーストランスポーター遺伝子の一部と相補的になるように設計すればよい。前記アンチセンス法と同様にリボザイムを発現し得る適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換すればよい。

リボザイム法は、細胞工学, 12, 239 (1993)、BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999)、Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 96, 1886 (1999)の記載に従って行うことができる。アンチセンス法またはリボザイム法によりフコーストランスポーターが産生されなくなった細胞のスクリーニングは、フコーストランスポーターの活性を指標に行ってもよいし、ウエスタンブロッティングやノーザンブロッティングによりフコーストランスポーター遺伝子の転写、発現を指標にして行うこともできる。

また、レトロウイルスを用いてフコーストランスポーター遺伝子を破壊することができる。宿主細胞にレトロウイルスを感染させて導入してから、フコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞をスクリーニングすることにより、フコーストランスポーター活性を有しない細胞を得ることができる。細胞のスクリーニングは、フコーストランスポーターの活性を指標に行ってもよいし、ウエスタンブロティングやノーザンブロッティングによりフコーストランスポーター遺伝子の転写、発現を指標にスクリーニングしてもよい。

また、同様にトランスポゾンを用いてフコーストランスポーター遺伝子を破壊し、該遺伝子が破壊された細胞をスクリーニングにより得て抗体の産生に用いてもよい。トランスポゾンのシステムはNatureGent,, 25, 35, (2000)等に記載の方法に従って構築すればよい。

さらに、RNA干渉（RNA interfearenece：RNAi）を用いても本発明のフコーストランスポーターの発現が阻害された細胞を得ることもできる。RNAiは、二本鎖RNA(dsRNA)を細胞内に導入した際に、そのRNA配列に対応する細胞内のmRNAが特異的に分解され、蛋白質として発現されなくなる現象をいう。RNAiの場合、通常、二本鎖RNAが用いられるが、特に限定されず、例えば、自己相補的な一本鎖RNA中で形成される二本鎖を用いることも可能である。二本鎖を形成する領域は、全ての領域において二本鎖を形成していてもよいし、一部の領域（例えば両末端又は片方の末端など）が一本鎖等になっていてもよい。RNAiに用いられるオリゴRNAは、その長さは限定されない。本発明のオリゴRNAの長さとしては、例えば、5～1000塩基（二本鎖の場合には、5～1000bp）であり、好ましくは10～100塩基（二本鎖の場合には、10～100bp）であり、さらに好ましくは15～25塩基（二本鎖の

場合には、15～25bp）であり、特に好ましくは19～23塩基（二本鎖の場合には、19～23bp）である。

上述のようにRNAi法は、ある遺伝子と相同な、センスRNAとアンチセンスRNAからなる二本鎖RNA(double-strand RNA；dsRNA)が、その遺伝子の転写産物(mRNA)の相同部分を破壊する、という現象を利用した方法である。用いるフコーストランスポーター遺伝子の全長配列に対応する二本鎖RNAを用いてもよいし、一部の配列に対応する短い（例えば、21～23b）dsRNA(small interfering RNA；siRNA)を用いてもよい。二本鎖RNAは、直接細胞に取り込ませてもよいし、二本鎖RNAを産生するベクターを作製し、宿主細胞に導入し細胞内で二本鎖RNAを産生させてもよい。例えば、本発明のフコーストランスポーターをコードするDNAの全部または一部を逆向き反復配列となるようにベクターに組込み該ベクターを宿主細胞に導入すればよい。RNAi法は、Nature, 391, 806, (1998)、Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, 95, 15502 (1998)、Nature, 395, 854, (1998)、Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, 96, 5049, (1999)、Cell, 95, 1017, (1998)、Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, 96, 1451, (1999)、Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, 95, 13959, (1998)、Nature Cell Biol., 2, 70, (2000)等の記載に従って行うことができる。RNAi法によりフコーストランスポーターが産生されなくなった細胞のスクリーニングは、フコーストランスポーターの活性を指標に行ってもよいし、ウエスタンブロッティングやノーザンブロッティングによりフコーストランスポーター遺伝子の転写、発現を指標にして行うこともできる。

さらに、RDO法、TFO法によっても本発明のフコーストランスポーターを破壊することができる。RDO(Chimeric RNA-DNA oligonucleotide)は、DNA鎖とRNA鎖が結合した二本鎖であり、GCクランプとTループを有することを特徴とし、フコーストランスポーター遺伝子に対応したRDOを用いることによりフコーストランスポーター遺伝子に変異を導入することができ、遺伝子を破壊することができる。RDOの構築は、Science, 273, 1386, (1996)、Nature Medicine, 4, 285, (1998)、Hepatology, 25, 1462, (1997)、Gene Therapy, 5, 1960, (1999)、J. Mol. Med., 75, 829, (1997)、Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, 96, 8774, (1999)、Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, 96, 8768, (1999)、Nuc. Acids. Res., 27, 1323,

(1999)、Invest,Dematol., 111, 1172, (1998)、Nature Biotech., 16, 1343, (1998)、Nature Biotech., 18, 43, (2000)、Nature Biotech., 18, 555, (2000)、J.Mol.Med., 80, 620, (2002)等の記載に従い行なうことができる。三重鎖形成性オリゴヌクレオチド(TFO)は、二本鎖のゲノムのDNAにおける特異的部位に結合できるDNAの短い一本鎖のDNAセグメントであり、結合部位において変異を誘発できる。TFOの構築は、J.Mol.Med., 80, 620, (2002)等の記載に従って行なうことができる。

さらに、本発明のフコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞は、細胞にランダムに変異を導入しても得ることができる。ランダムに変異を導入する方法として、マーカーの入った遺伝子破壊ベクターを細胞のゲノムにランダムに導入してフコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞をスクリーニングする方法と、ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)等の化学変異原でランダムな変異を導入してフコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞をスクリーニングする方法が挙げられる。フコーストランスポーターが産生されなくなった細胞のスクリーニングは、フコーストランスポーターの活性を指標に行ってもよいし、ウエスタンブロッティングやノーザンブロッティングによりフコーストランスポーター遺伝子の転写、発現を指標にして行うこともできる。

さらに本発明のフコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞は、フコーストランスポーター遺伝子をノックアウトした動物から得ることができる。フコーストランスポーター遺伝子をノックアウトした動物は、ES細胞のフコーストランスポーターを前記方法で破壊し、該ES細胞から例えば、WO02/33054号公報に記載の方法で作出することができる。この際用いる動物としては、限定されないがヤギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、マウス、ハムスター、ラット等が挙げられる。フコーストランスポーター遺伝子をノックアウトした動物から株化細胞を作製することにより、フコーストランスポーター遺伝子を有しない株化細胞を得ることができる。

フコーストランスポーターの輸送能が低下または消失した細胞は種々の方法で得ることができるが、例えばフコーストランスポーターに結合し、細胞質からゴルジ体中へのフコースの輸送を阻害する化合物、すなわちフコーストランスポー

ターに対するアンタゴニスト、を用いてフコーストランスポーターの機能を阻害することにより得ることができる。本発明はそのような化合物により細胞のフコーストランスポーター機能を阻害する方法、およびそのような化合物によりフコーストランスポーター機能が阻害された細胞をも含む。フコーストランスポーター機能が阻害された細胞は、ゴルジ体内に存在するフコースの量がフコーストランスポーター機能が阻害されていない細胞に比べ有意に減少している細胞である。さらに、フコーストランスポーター機能が阻害された細胞はゴルジ膜におけるフコース輸送能が低下または欠損した細胞であり、また細胞内のゴルジ体へのフコース取込み活性が低下または欠損している細胞である。フコーストランスポーター機能を阻害する化合物として上述のスクリーニング方法により単離される化合物やフコーストランスポーター活性に結合する抗体が挙げられる。該化合物は、組換えタンパク質を産生させる宿主細胞の培地に添加すればよい。また、該化合物がタンパク質の場合は、該タンパク質をコードするDNAを導入した適当な発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該タンパク質を宿主細胞中で発現産生させればよい。

本発明のフコーストランスポーター遺伝子が破壊又はフコーストランスポーターの輸送活性が阻害された宿主細胞で外来の組換えタンパク質を産生させた場合、細胞中のフコースがゴルジ体中にトランスポートされないためタンパク質にフコースが付加されない。フコーストランスポーター遺伝子が破壊された宿主細胞で産生した組換えタンパク質は、フコーストランスポーター遺伝子が破壊されていない宿主細胞で産生した組換えタンパク質に比較して結合しているフコース量が有意に少なく、好ましくは検出できない。外来タンパク質が抗体の場合、抗体１分子の２つのH鎖のFc領域に存在する２箇所の糖鎖結合部位に結合したN-グリコシド結合糖鎖にフコースが結合していないものが得られる。このようなフコースが結合していない抗体は細胞傷害活性が増強されている。細胞への抗体遺伝子の組込みは通常の遺伝子工学的手法により行なうことができる。なお、本発明の細胞を用いて、抗体へのフコースの付加が阻害された抗体を製造する場合、製造される抗体全てがフコースが付加されていないことは必要ではなく、抗体組成物中のフコースが付加されているタンパク質の割合が減少していればよい。

さらに、本発明は、フコーストランスポーター遺伝子の発現が阻害された動物（ヒトを除く）も包含する。このような動物を用いることによりin vivoで組換えポリペプチドを産生することができる。フコーストランスポーター遺伝子の発現が阻害された動物としては、上述のフコーストランスポーターノックアウト動物を挙げることができる。上述のように特定の遺伝子がノックアウトされたノックアウト動物の作製は既によく知られた技術であり、当業者は適宜フコーストランスポーター遺伝子ノックアウト動物を作製することが可能である。又、フコーストランスポーターに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現する遺伝子を動物に導入する等して、フコーストランスポーター遺伝子の発現が阻害された動物を作製することが可能である。

これらの動物に目的とするタンパク質をコードするDNAを導入し、動物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物などを包含する。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。

例えば、目的とするDNAを、ヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のポリペプチドを得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

これにより得られたポリペプチドは、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なポリペプチドとして精製することができる。ポリペプチドの分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結

晶等を適宜選択、組み合わせればポリペプチドを分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

なお、ポリペプチドを精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

本発明の製造方法により製造される抗体のH鎖又はL鎖をコードする遺伝子は既知の配列を用いることも可能であり、又、当業者に公知の方法で取得することも可能である。例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから抗体をコードする遺伝子をクローニングして取得することも可能であるし、抗体ライブラリから取得することも可能である。ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。得られたハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成し、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結することによりH鎖又はL鎖をコードする遺伝子を得ることができる。免疫の際の感作抗原としては特に限定されないが、例えば、目的の受容体の全長タンパク質や、部分ペプチド（例えば、細胞外領域）などを用いることができる。抗原の調製は、当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、バキュロウイルスを用いた方法（例えば、WO98/46777など）などに準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、た

とえば、ミルステインらの方法（Kohler, G., and Milstein, C., Methods Enzymol. 1981, 73, 3-46.）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

抗体ライブラリについては既に多くの抗体ライブラリが公知になっており、又、抗体ライブラリの作製方法も公知であるので、当業者は適宜抗体ライブラリを入手することが可能である。

上述のように発現、産生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されている公知の方法により精製することができる。例えば、プロテインAカラムなどのアフィニティーカラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

抗体の抗原結合活性(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

本発明の細胞を用いて産生させたタンパク質の糖鎖構造の解析は、２次元糖鎖マップ法（Anal.Biochem,, 171, 73, (1988)、生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法　高橋禮子編　学会出版センター　(1989)）等に記載の方法により行うことができる。さらに、糖鎖をMALDI-TOF-MS等の質量分析により解析することもできる。

フコーストランスポーターに結合し、細胞質からゴルジ体中へのフコースの輸送を阻害する化合物は以下の方法でスクリーニングすることができる。すなわち、フコーストランスポーターとこれに結合する化合物を含むと予想される被検試料とを接触せしめ、該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出することにより、フコーストランスポーターに結合する活性を有する化合物を選択することができる。

さらに、フコーストランスポーターと被検試料とを接触せしめ、フコーストラ

ンスポーターのフコース輸送活性を検出することにより、フコーストランスポーターのフコース輸送活性を阻害する化合物を選択することができる。

スクリーニングに用いられる本発明のポリペプチドは組換えポリペプチドであっても、天然由来のポリペプチドであってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製ポリペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のポリペプチドは、例えば、精製したポリペプチドとして、可溶型ポリペプチドとして、担体に結合させた形態として、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被検試料に接触させることができる。

本発明のポリペプチドを用いて、これに結合するポリペプチドをスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643(1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。

特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を本発明のポリペプチドのN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合ポリペプチドとして本発明のポリペプチドを発現させることができる。用いるエピトープ－抗体系としては市販されているものを利用することができる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。マルチクローニングサイトを介して、β－ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質（GFP）などとの融合ポリペプチドを発現することができるベクターが市販されている。

融合ポリペプチドにすることにより本発明のポリペプチドの性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合ポリペプチドを調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン（His-tag）、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質（VSV-GP）、T7 gene10蛋白質（T7-tag）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質（HSV-tag）、E-tag（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のポリペプチドに結合するポリペプチドのスクリーニングのためのエピトープ－抗体系として利用できる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のポリペプチド、それと結合能を有するポリペプチド、および抗体からなる。

上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のポリペプチドに対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のポリペプチドに対する抗体は、例えば、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたポリペプチドを精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明のポリペプチドの部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウスIgG 抗体であれば、Protein A SepharoseやProtein G Sepharoseを用いて沈降させることができる。また、本発明のポリペプチドを、例えば、GSTなどのエピトープとの融合ポリペプチドとして調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のポリペプチドの抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献（Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies, pp. 511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)）記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降されたポリペプチドの解析にはSDS-PAGEが一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでポリペプチドの分子量により結合していたポリペプチドを解析することができる。また、この際、一般的には本発明のポリペプチドに結合したポリペプチドは、クマシー染色や銀染色といったポリペプチドの通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である^{35}S-メチオニンや^{35}S-システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のポリペプチドを標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。ポリペプチドの分子量が判明すれば直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のポリペプチドを精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明のポリペプチドを用いて、該ポリペプチドに結合するポリペプチドを単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法（Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90）を用いて行うことができる。すなわち、本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが

予想される細胞、組織、臓器(例えば、精巣)よりファージベクター(λgt11, ZAPなど)を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたポリペプチドを固定し、精製して標識した本発明のポリペプチドと上記フィルターとを反応させ、本発明のポリペプチドと結合したポリペプチドを発現するプラークを標識により検出すればよい。本発明のポリペプチドを標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のポリペプチド又は本発明のポリペプチドに融合したポリペプチド(例えばGSTなど)に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた2-ハイブリッドシステム(Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292、Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」,「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」,「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもクロンテック社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(ストラタジーン社製))を用いて行う方法が挙げられる。

2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する(酵母細胞内で本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドが発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするポリペプチドを得ることができる。これにより本発明のポリペプチドに結合するポリペプチドまたはその遺伝子を調製することが可能である。

2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例え

ば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。２ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞などを使って行うこともできる。

本発明のポリペプチドと結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のポリペプチドをアフィニティーカラムの担体に固定し、ここに本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のポリペプチドに結合したポリペプチドを調製することができる。

得られたポリペプチドは、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該ポリペプチドをコードするDNAを得ることができる。

また、ポリペプチドに限らず、本発明のポリペプチドに結合する化合物（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のポリペプチドに結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法 (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS;Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64、Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13、Hogan JC Jr.,Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、本発明のポリペプチドと被検化合物との

間の相互作用を微量のポリペプチドを用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本発明のポリペプチドと被検化合物との結合を評価することが可能である。

本発明のポリペプチドのフコース輸送活性を阻害する物質のスクリーニング方法は当業者に公知の方法で行うことが可能である。例えば、本発明のポリペプチドを膜上（細胞膜、ゴルジ体膜、ウイルス膜、など）に発現させ、蛍光物質などで標識したフコースと、被験物質を接触させ、取り込まれたフコースの量を測定することにより、本発明のポリペプチドのフコース輸送活性を阻害する物質のスクリーニングを行うことが可能である。

本発明のスクリーニングにより単離しうる化合物は、本発明のポリペプチドの活性を調節するための候補となり、細胞障害活性の高い抗体の作製への応用が考えられる。

抗体の細胞障害活性

本発明の方法で製造される抗体は細胞障害活性が増加した抗体である。

本発明における細胞障害活性としては、例えば抗体依存性細胞介在性細胞障害(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC)活性、補体依存性細胞障害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性などを挙げることができる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞障害活性を意味し、ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFcγ受容体保有細胞（免疫細胞等）がFcγ受容体を介して結合し、標的細胞に障害を与える活性を意味する。

抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley &Sons, Inc., (1993)等）。

具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製を行う。

（1） エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI1640培地(GIBCO社製)中で脾臓細胞を分離する。10%ウシ胎児血清(FBS、HyClone社製)を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を5×10^6/mlに調製し、エフェクター細胞を調製する。

(2)補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement(CEDARLANE社製)を10% FBS含有培地(GIBCO社製)にて10倍希釈し、補体溶液を調製する。

(3)標的細胞の調製

膵臓癌細胞株(AsPC-1、Capan-2等)を0.2mCiの^{51}Cr-sodium chromate(Amersham Pharmacia Biotech社製)とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37℃にて1時間培養することにより放射性標識する。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を2×10^5/mlに調製して、標的細胞を調製する。

次いで、ADCC活性、又はCDC活性の測定を行う。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート(Beckton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗体を50μlずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞100μlを加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または10μg/mlとする。培養後、100μlの上清を回収し、ガンマカウンター(COBRAIIAUTO-GMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製)で放射活性を測定する。細胞障害活性(%)は(A-C)/(B-C)×100により求めることができる。Aは各試料における放射活性(cpm)、Bは1% NP-40(半井社製)を加えた試料における放射活性(cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性(cpm)を示す。

一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗PepT抗体を50μlずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、補体溶液100μlを加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または3μg/mlとする。培養後、100μlの上清を回収し、ガンマカウンターで放射活性を測定する。細胞障害活性はADCC活性の測定と同様にして求めることができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例１〕チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株からのGDP-フコーストランスポーター遺伝子断片の取得

ヒト（accession#AF326199）およびマウス（accession#AK050311）GDP-フコーストランスポーターcDNA配列はNCBIデータベースより入手した。GENETYX-SV/RCで解析し、ヒトとマウスでホモロジーの高い配列（第１図）部分を用いてプライマーをデザインし、CHO細胞株DXB11よりRNA抽出キット(TAKARA : catrimox 14 RNA isolation kit) を用いて抽出したpolyA+ RNAを鋳型にRT-PCRキット（TOYOBO：RT-PCRHigh）にてRT-PCRを行った。得られた断片はpBluescriptSK+にサブクローニングし、配列を確認した後、適当な制限酵素で切り出し、ライブラリースクリーニングのためのプローブとして用いた。

〔実施例２〕 GDP-フコーストランスポーター全長cDNAのクローニング

実施例１で得られたGDP-フコーストランスポーター断片をRandam Prime labeling system (Amersham社)を用いて、α32P dCTPでラベルした。CHO細胞由来cDNAライブラリーはCHO-K1株由来のもの（LambdaZAP-CMV XR Library: Stratagene社）を使用し、スクリーニングは基本的にマニュアルに従った。すなわち、一次スクリーニングでは、10^6のファージを10枚のプレートに大腸菌（XL-1-Blue MRF'）に感染後、ソフトアガーと共に撒き、得られたプラークをナイロン膜（Hybond NX: Amersham）に移した。膜は定法によりアルカリ・中和処理し、UV固定後、上記プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。得られた陽性クローンについて、二次、三次スクリーニングを行い、最終的に9つの単一化された陽性クローンを得た。各クローンはヘルパーファージ（ExAsist interference-resistant helper phage: Stratagene社）と共に大腸菌（XLOLR）に感染させ、プラスミド（pCMV-Script EX）として回収し、配列を調べた（第２図）。マウスとヒトトランスポーター遺伝子の配列の比較を第１図に示した。CHO細胞由来の配列と比較するとヒトの配列との相同性は85.3%、マウスの配列と

は91.5%であった。

〔実施例３〕 GDP-フコーストランスポーターゲノムDNAのクローニング

5'、3'側それぞれの遺伝子断片をプローブにする目的で、実施例１で得たGDP-フコーストランスポーター断片を鋳型にプライマーをデザインし、PCRにて5'側、3'側それぞれの断片を得た。プライマーは、実施例１で用いたRT-PCR用プライマーと、マウスゲノムから予想されたエキソン１、２に相当する配列を得ることが出来るようなプライマーの組み合わせ(第３図)をデザインした。CHO細胞由来ゲノムDNAライブラリー（CHO-K1株由来Lambda FIX II Library: Stratagene社）を用い、実施例２に示した方法で、5'、3'プローブのラベルとスクリーニングを行い、最終的に11の陽性クローンを得た。このうち７つのクローンについて大腸菌(XL-1 Blue MRA)に感染させ、100 mLの液体培養からファージを回収し、QIAGEN Lambdaキット（QIAGEN社）を用いてファージDNAを回収した。回収したファージDNAを適当な制限酵素で消化し、サザンブロットハイブリダイゼーションで独立したクローンの選別とマッピングを行った。

〔実施例４〕 CHO-K1細胞のGDP-フコーストランスポーターゲノムDNA配列の決定

実施例３で得られたCHOゲノム遺伝子を含むDNAを各種制限酵素で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動後、定法に従い、実施例２で得たGDP-フコーストランスポーターcDNAの5'側および3'側断片をプローブとしたサザンブロッティングにより制限酵素地図を作成した(第３図)。それぞれにハイブリダイズするバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社)を用い、添付マニュアルにしたがって回収した。回収したDNA断片はpBluescriptSK+に、Rapid DNA ligation kit (Roche社)を用いて連結し、大腸菌DH5α株(東洋紡社)に導入した。得られた組換え大腸菌からプラスミドを回収し、ABI3100 Genetic Analyzerで解析を行った(第４図、配列番号１)。

〔実施例５〕 RNAiを用いたCHO細胞でのGDP-フコーストランスポーターの発現

抑制

DG44細胞 $5x10^5$ cellsを5mLの10%FCS(Moregate社)、200 μmol/L Geneticin(Invitrogen社)、200nmol/L MTXを含んだIMDM培地(Invitrogen社)に懸濁してファルコン25cm²培養ボトルに播いた。２４時間後にGDP-fucose transporterに対する合成siRNA（センス鎖UAA CCU CUG CCU CAA GUA CdTdT（配列番号３）及びアンチセンス鎖GUA CUU GAG GCA GAG GUU AdTdT（配列番号４））（B-Bridge社）をlipofectamine2000(Invitrogen社)を用いて2～500nMトランスフェクションした。トランスフェクション後４８時間で細胞を回収した。細胞からSV total RNA isolation system(Promega社)を用いてRNAを抽出してRT-PCR反応をTaqMan PCR Corereagent kit及びTaqMqan Reverse transcription reagents(Applied Biosystems社)を用いて行いPRISM7700(Applied Biosystems社)によりGDP-fucose transporterの発現を定量化した。その結果、mRNAレベルではGDP-fucose transporter遺伝子発現が抑制されていた。

図５に結果を示す。図５に示すグラフはPBSをトランスフェクション後４８時間のGDP-fucose transporter遺伝子発現を１００とした相対的な値である。

〔実施例６〕　CHO細胞におけるフコーストランスポーター遺伝子の破壊

ターゲッティングベクターの構築

pKJ2ベクター（Popo H, Biochemical Genetics vol.28, p299-308, 1990）よりマウスpgk-1遺伝子のプロモーターをEcoR I-Pst Iによって切り出し、pBluescript(STRATAGENE社)のEcoR I-Pst Iサイトにクローニングしてp BSK-pgk-1を作製した。Hygromycin耐性遺伝子（Hyg^r）はpcDNA3.1/Hygro（インビトロジェン社）よりHyg5-AVとHyg3-BHのプライマーでPCRすることによって、Hyg^rの5'側にEco T22Iサイトと Kozak配列を付加し、SV40 polyA付加シグナルまでの領域を含む3'側にはBamH Iサイトを付加してHyg^rを抜き出した。

フォワードプライマー

Hyg5-AV　5'-ATG CAT GCC ACC ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC-3'（配列番号５）

リバースプライマー

Hyg3-BH 5'-GGA TCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT C-3'（配列番号６）

このHyg^r（Eco T22I-BamH I）フラグメントをpBSK-PGKのPst I-BamH Iサイトに挿入し、pBSK-pgk-1-Hyg^{r}を作製した。フコーストランスポーターのターゲッティングベクター（以下、KO2ベクターと称する）はpMC1DT-Aベクター（Yagi T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 87, p9918-9922, 1990）にフコーストランスポーターの5'側（配列番号１の No. 2780のSma IからNo. 4232のBamH I）、3'側（No. 4284からNo. 10934のSac Iまで）、及びpgk-1- Hyg^{r}フラグメントを各々挿入することで構築した（図６）。KO2ベクターはNot Iで切断して細胞に導入した。KO2ベクターによって、フコーストランスポーターは開始コドンを含むエクソン１の46塩基対を欠損することになり、機能を失うものと考えられる。

CHO細胞への導入

CHO-S-SFMII HT-（インビトロジェン社、cat 12052-098）にHT Supplement(100X)（インビトロジェン社 cat. 11067-030）とペニシリンストレプトマイシン（インビトロジェン社 cat. 15140-122）をCHO-S-SFMII HT-の容量に対して、それぞれ1/100 量を加えた。これを培養用の培地（以下、SFMII (+)と称する）としてCHO細胞DXB11株を継代し、さらに遺伝子導入後の細胞の培養もこのSFMII(+)で行った。8 X 10^6個のCHO細胞を0.8mLのダルベッコリン酸緩衝液(以下、PBSと略す。インビトロジェン社 cat 14190-144)に懸濁した。細胞懸濁液に30μgのターゲッティングベクター（KO2ベクター）を加え、Gene Pulser Cuvette(4mm)（バイオラッド社 cat. 1652088）に細胞懸濁液を移した。氷上で10分間放置した後に、GENE-PULSER II（バイオラッド社code No. 340BR）で1.5kV, 25μFDの条件で、エレクトロポレーション法によりベクターを細胞に導入した。ベクターを導入後、細胞を200mlのSFMII(+)培地に懸濁して20枚の96穴平底プレート（IWAKI社 cat. 1860-096）に100μl/ウェルで細胞を播きこんだ。プレートをCO_2インキュベータ内で、24時間、37℃で培養した後、ハイグロマイ

シンB（インビトロジェン社 cat. 10687-010）による選抜を開始した。ハイグロマイシンBは300μg/mlになるようにSFMII(+)に溶解し、100μl/ウェル添加した。

相同組み換え体はPCR法によってスクリーニングした。スクリーニングで用いるCHO細胞は96穴平底プレートで培養し、培養上清除去後に細胞溶解用の緩衝液を50μl/ウェル加えて55℃、2時間インキュベーションし、続いて95℃、15分加熱することで、プロティナーゼ Kを失活させてPCRの鋳型とした。細胞溶解用の緩衝液は、1ウェルあたり10 X LA 緩衝液II(TaKaRa社 LA Taqに添付) 5μl、10% NP-40 （ロッシュ社 cat. 1 332 473） 2.5μl、プロティナーゼ K (20mg/ml、TaKaRa社 cat. 9033) 4μl、及び蒸留水（ナカライテスク社 cat. 36421-35） 38.5μlで構成されている。PCR反応混合物は上記のPCRサンプル1μl、10 X LA緩衝液5μl、$MgCl_2$ (25mM) 5μl、dNTP(2.5mM) 5μl、プライマー（各10μM) 2μl、LA Taq(5 IU/μl cat.RR002B) 0.5μl、及び蒸留水 29.5μl(全50μl)とした。また、PCRの条件は、95℃にて1分間の前加熱、95℃にて30秒間、及び70℃にて3分間の増幅サイクル40サイクル、並びに70℃にて7分の複加熱とした。

プライマーは以下の通りで、相同組み換えを起こしたCHO細胞のサンプルでは、約2.0kbのバンドが増幅される。プライマーはTP-F4がKO2ベクターの外で5'側のフコーストランスポーターのゲノム領域に配置し、THygro-R1はKO2ベクター内のハイグロマイシン耐性遺伝子内に配置した。

フォワードプライマー

TP-F4 5'-GGA ATG CAG CTT CCT CAA GGG ACT CGC-3' （配列番号７）

リバースプライマー

THygro-F1 5'-GCA CTC GTC CGA GGG CAA AGG AAT AGC-3' （配列番号８）

解析したCHO細胞の数は537個であり、そのうち相同組み換え体と考えられる細

胞は17個であった（この時の相同組み換え効率は約3.2%）。

図７はスクリーニングのPCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動したときのデータを示している。○のついたサンプルで2.0kbのバンドが出現したことから、これらのクローンが相同組み換え体と考えられた。そこで、2.0kbのバンドをゲルから切り出し、Mag Extractor（東洋紡社、cat.NPK-601）で精製した。精製したPCR産物の200ngをTP-F4、及びTHygro-F1でダイレクトシーケンスを行い、PCR産物が相同組み換えを起こしたときに生じる塩基配列であることを確認し、相同組み換え体であると判断した。

さらに、サザンブロット法によっても確認を行った。24穴プレートで培養した細胞を回収し、定法に従ってゲノムDNAを調整し、サザンブロットを行った。配列番号１の No.2,113-No.2,500 の領域から、以下の二種類のプライマーを用いてPCR法により387bpのプローブを調整し、これをサザンブロット法による確認に用いた。ゲノムDNAはBgl II、もしくはEcoR Iで切断した。

フォワードプライマー

Bgl-F：5'- TGT GCT GGG AAT TGA ACC CAG GAC -3'　（配列番号９）

リバースプライマー

Bgl-R：5'- CTA CTT GTC TGT GCT TTC TTC C -3'　（配列番号１０）

Bgl IIによる切断によって、元々のフコーストランスポーターの染色体からは約3.0kb、ノックアウトされた染色体からは約5.0kbのバンドがそれぞれ出現する。また、EcoR Iによる切断によって、元々のフコーストランスポーター染色体からは約8.7kb、ノックアウトされた染色体からは約4.5kbのバンドがそれぞれ出現する（図８）。図９は実際にサザンブロットを行ったときのデータを示したものである。

配列表フリーテキスト

配列番号３および４：合成ＲＮＡ

産業上の利用可能性

本発明により、フコーストランスポーターポリペプチドおよびフコーストランスポーター遺伝子が得られる。また、フコーストランスポーター遺伝子が破壊された組換えタンパク質産生細胞が得られ、該細胞で組換えタンパク質を産生させた場合、フコースの付加が低下または消失した組換えタンパク質が製造できる。特にタンパク質が抗体の場合、フコースの付加が低下または消失することにより細胞障害活性が増強され、抗腫瘍作用をもった抗体医薬として有用である。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

請求の範囲

1． 以下の(a)又は(b)の組換えポリペプチドまたはその断片。

(a) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ(a)のポリペプチドと機能的に同等であるポリペプチド

2． 以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA。

(a) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号２で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ(a)のポリペプチドと機能的に同等であるポリペプチド

3． 以下の(c)又は(d)のDNAを含むDNA。

(c) 配列番号１で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号１の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ(c)のDNAがコードするポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNA

4． 請求項２または３に記載のDNAの断片または請求項２または３に記載のDNAに相補的なDNAの断片であって、少なくとも15ヌクレオチドからなるDNA断片。

5． 請求項２または３に記載のDNAを含有する組換えベクター。

6． 請求項５に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

7． 請求項６に記載の形質転換体を培養し、得られる培養形質転換体またはその培養上清からポリペプチドを回収することを含む、請求項１に記載のポリペプチドの製造方法。

8． 請求項１に記載のポリペプチドに結合する抗体。

9． 請求項１に記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

（ａ）該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、

（ｂ）該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および

（ｃ）該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方

法。

１０．　請求項９に記載の方法により単離し得る、請求項１に記載のポリペプチドに結合する化合物。

１１．　請求項１に記載のポリペプチドのGDP-フコース輸送活性を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

（ａ）該ポリペプチドに被検試料とGDP-フコースを接触させる工程、

（ｂ）該ポリペプチドのGDP-フコース取り込み能を検出する工程、および

（ｃ）ポリペプチドのGDP-フコース輸送活性を阻害する化合物を選択する工程、

を含む方法。

１２．　請求項１１に記載の方法により単離し得る、請求項１に記載のポリペプチドのGDP-フコース輸送活性を阻害する化合物。

１３．　ゴルジ体内に存在するフコースが減少しているゴルジ体を有する細胞。

１４．　フコース輸送能が低下または欠損している細胞。

１５．　ゴルジ体へのフコース取り込み活性が低下または欠損している細胞。

１６．　フコーストランスポーターに結合する化合物またはフコース輸送活性を阻害する化合物で処理されている請求項１３から１５のいずれか１項に記載の細胞。

１７．　フコーストランスポーターの発現が人為的に抑制されている細胞。

１８．　フコーストランスポーターの発現がRNAiを用いて抑制されている請求項１７記載の細胞。

１９．　フコーストランスポーター遺伝子が破壊された細胞。

２０．　動物細胞である請求項１３から１９のいずれか１項に記載の細胞。

２１．　動物がチャイニーズハムスター細胞である、請求項２０記載の細胞。

２２．　動物細胞がCHO細胞である請求項２０記載の細胞。

２３．　遺伝子の破壊がジーンターゲティングベクターを用いた相同組換えにより行われる、請求項１９から２２のいずれか１項に記載の細胞。

２４．　フコーストランスポーターをコードする遺伝子をターゲットとしたターゲティングベクター。

２５．　フコーストランスポーターがチャイニーズハムスターフコーストランス

ポーターである請求項２４記載のターゲティングベクター。

２６．　組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質の製造方法。

２７．　組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるゴルジ体内へのフコースの取り込みを阻害することを特徴とするタンパク質の製造方法。

２８．　組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるフコーストランスポーターを介したフコースの取り込みを阻害することを特徴とするタンパク質の製造方法。

２９．　組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とするタンパク質の製造方法。

３０．　組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるフコーストランスポーターの発現を人為的に抑制することによりフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とする請求項２６から２９のいずれか１項に記載のタンパク質製造方法。

３１．　フコーストランスポーターの発現がRNAiを用いて抑制される請求項３０記載のタンパク質製造方法。

３２．　組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞におけるフコーストランスポーターをコードする遺伝子を欠損することによりフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とする請求項２６から３０のいずれか１項に記載のタンパク質製造方法。

３３．　タンパク質が抗体である請求項２６から３２のいずれか１項に記載の製造方法。

３４．　フコースが付加されていないタンパク質を製造することを特徴とする請求項２６から３３のいずれか１項に記載の製造方法。

３５．　宿主細胞がCHO細胞である請求項２６から３４のいずれか１項に記載の製造方法。

３６．　宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときに宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質へのフコースの付加阻害方法。

３７．　宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときに宿主細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害することを特徴とするタンパク質へのフコース付加阻害方法。

３８．　宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときにフコーストランスポーターの発現を人為的に抑制することを特徴とする請求項３６または３７に記載のタンパク質へのフコース付加阻害方法。

３９．　フコーストランスポーターの発現がRNAiを用いて抑制される請求項３８記載のタンパク質へのフコース付加阻害方法。

４０．　宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときにフコーストランスポーターをコードする遺伝子を欠損することを特徴とする請求項３６から３８のいずれか１項に記載のタンパク質へのフコース付加阻害方法。

４１．　宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときにフコーストランスポーターを介したフコースの取り込みを阻害することを特徴とするタンパク質へのフコース付加阻害方法。

４２．　タンパク質が抗体である請求項３６から４１のいずれか１項に記載のタンパク質へのフコース付加阻害方法。

４３．　宿主細胞がCHO細胞である請求項３６から４２のいずれか１項に記載のタンパク質へのフコース付加阻害方法。

４４．　ゴルジ体内に存在するフコースが減少した細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性を増加させる方法。

４５．　宿主細胞のフコーストランスポーターの機能を阻害した細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法。

４６．　フコーストランスポーターの発現を人為的に抑制している細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法。

４７．　フコーストランスポーターをコードする遺伝子が欠損している細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法。

４８．　ゴルジ体内へのフコースの取り込みを阻害して抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性増加方法。

４９．　宿主細胞がCHO細胞である請求項４４から４８のいずれか１項に記載の

抗体の細胞障害活性増加方法。

図１－１

```
h-transporterORF    1:ATGAATAGGGCCCCTCTGAAGCGGTCCAGGATCCTGCACATGGCGCTGACCGGGGCCTCA 60
m-transpoterORF     1:-------------------------------------ATGGCGCTGACTGGAGTCTCT 21
                                                           *********** ** * ***

h-transporterORF   61:GACCCCTCTGCAGAGGCAGAGGCCAACGGGGAGAAGCCCTTTCTGCTGCGGGCATTGCAG 120
m-transpoterORF    22:GCTGTCTCCGAGGAGTCAGAGAGCGGGAACA---AGCCATTTCTGCTCCGGGCTCTGCAG 78
                      *    *** *  *** *****  *          **** ******** *****  *****

h-transporterORF  121:ATCGCGCTGGTGGTCTCCCTCTACTGGGTCACCTCCATCTCCATGGTGTTCCTTAATAAG 180
m-transpoterORF    79:ATCGCGCTGGTGGTCTCTCTCTACTGGGTCACCTCCATTTCCATGGTATTCCTCAACAAG 138
                      ***************** ******************** ******** ***** ** ***

h-transporterORF  181:TACCTGCTGGACAGCCCCTCCCTGCGGCTGGACACCCCCATCTTCGTCACCTTCTACCAG 240
m-transpoterORF   139:TACCTGCTGGACAGCCCCTCCCTGCAGCTGGATACCCCCATTTTTGTCACCTTCTACCAA 198
                      ************************* ****** ******** ** **************

h-transporterORF  241:TGCCTGGTGACCACGCTGCTGTGCAAAGGCCTCAGCGCTCTGGCCGCCTGCTGCCCTGGT 300
m-transpoterORF   199:TGCCTGGTGACCTCACTGCTGTGCAAGGGCCTCAGCACTCTGGCCACCTGCTGCCCCGGC 258
                      ************ * *********** ********* ******** ********** **

h-transporterORF  301:GCCGTGGACTTCCCCAGCTTGCGCCTGGACCTCAGGGTGGCCCGCAGCGTCCTGCCCCTG 360
m-transpoterORF   259:ATGGTAGACTTCCCCACCCTAAACCTGGACCTCAAGGTGGCCCGAAGTGTGCTGCCGCTG 318
                        ** ********** * *   *********** ********* ** ** ***** ***

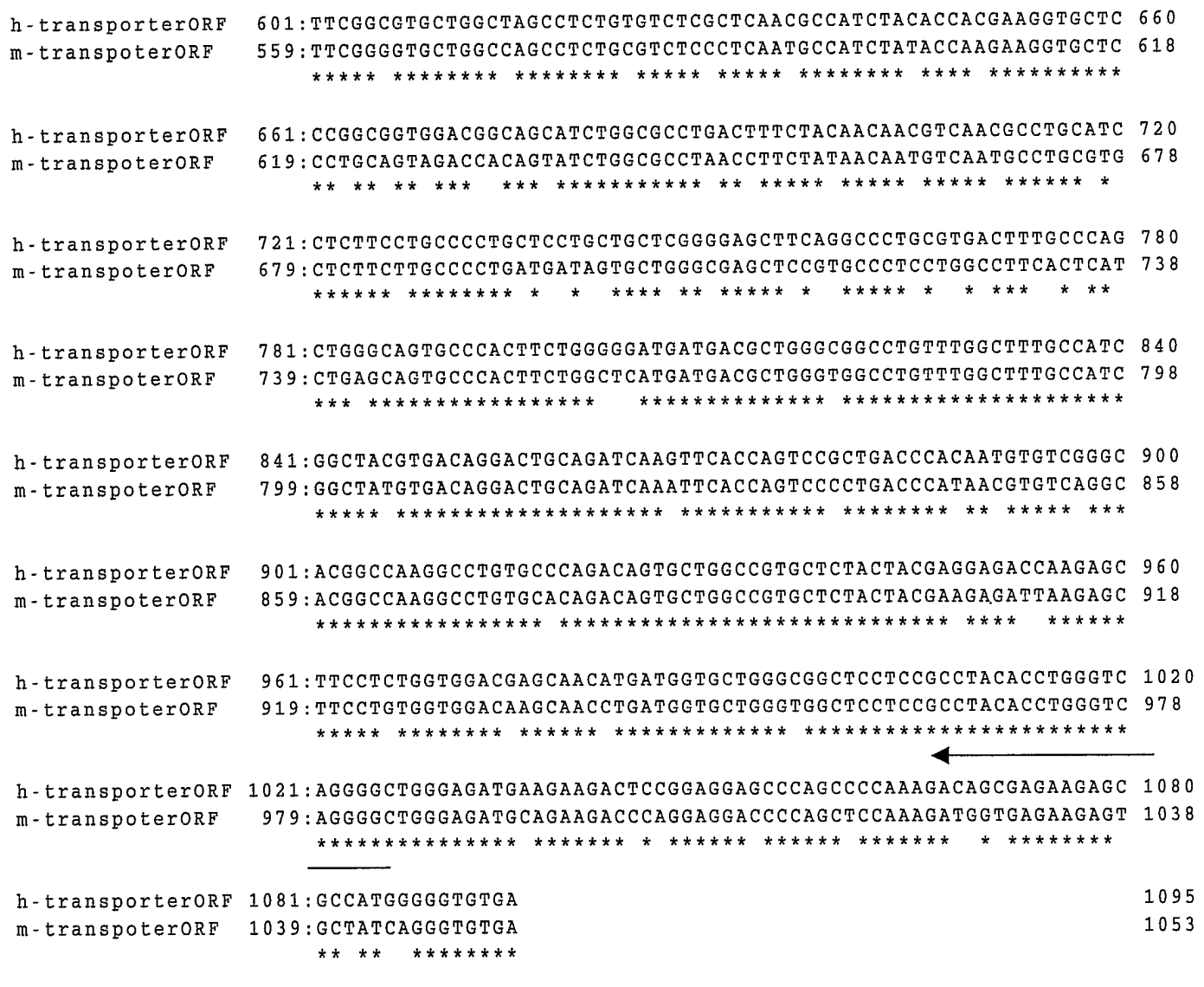
h-transporterORF  361:TCGGTGGTCTTCATCGGCATGATCACCTTCAATAACCTCTGCCTCAAGTACGTCGGTGTG 420
m-transpoterORF   319:TCAGTGGTCTTTATCGGCATGATAACCTTCAATAACCTCTGCCTCAAGTACGTAGGGGTG 378
                      ** ******** *********** ***************************** ** ***

h-transporterORF  421:GCCTTCTACAATGTGGGCCGCTCACTCACCACCGTCTTCAACGTGCTGCTCTCCTACCTG 480
m-transpoterORF   379:CCCTTCTACAACGTGGGACGCTCGCTCACCACCGTGTTCAACGTTCTTCTCTCCTACCTG 438
                       ********** ***** ***** *********** ******** ** ************

h-transporterORF  481:CTGCTCAAGCAGACCACCTCCTTCTATGCCCTGCTCACCTGCGGTATCATCATCGGGGGC 540
m-transpoterORF   439:CTGCTCAAACAGACCACTTCCTTCTATGCCCTGCTCACCTGCGGCGTCATCATTGGTGGT 498
                      ******** ******** *************************  ******* ** **

h-transporterORF  541:TTCTGGCTTGGTGTGGACCAGGAGGGGGCAGAAGGCACCCTGTCGTGGCTGGGCACCGTC 600
m-transpoterORF   499:TTCTGGCTGGGTATAGACCAAGAAGGAGCTGAGGGAACCTTGTCCCTGACGGGCACCATC 558
```

図１－２



RT-PCR用　フォワードプライマー: TGCAGATCGCGCTGGTGGTCTC
リバースプライマー: GCCCCTGACCCAGGTGTAGGC

図2

gattcggcacgaggCGCTCCGCTTCCCACGCGGTCCCCGACCTGTTCTTTCCTCCTCCACCCTGCCCTTCTGTCCCTCTCCCTTCCTTTC
TCCCCTCGACTCGTCCCTATTAGGCAACAGCCCCTGTGGTCCAGCCGGCCATGGCTGTCAAGGCTCACACCCTTAGCTAGGCCCCTTCTC
CCTTCCCTGGGTCTTGTCTCATGACCCCCTGCCCCGCCCGGGAGCGAGCGCGATGTGGAGCAGTGCCTCTGGCAAGCAGAACTTCACCCA
AGCCATGTGACAATTGAAGGCTGTACCCCCCAGACCCTAACATCTTGGAGCCCTGTAGACCAGGGAGTGCTTCTGGCCGTGGGGTGACCT
AGCTCTTCTACCACCATGAACAGGGCCCCTCTGAAGCGGTCCAGGATCCTGCGCATGGCGCTGACTGGAGGCTCCACTGCCTCTGAGGAG
GCAGATGAAGACAGCAGGAACAAGCCGTTTCTGCTGCGGGCGCTGCAGATCGCGCTGGTCGTCTCTCTCTACTGGGTCACCTCCATCTCC
ATGGTATTCCTCAACAAGTACCTGCTGGACAGCCCCTCCCTGCAGCTGGATACCCCTATCTTCGTCACTTTCTACCAATGCCTGGTGACC
TCTCTGCTGTGCAAGGGCCTCAGCACTCTGGCCACCTGCTGCCCTGGCACCGTTGACTTCCCCACCCTGAACCTGGACCTTAAGGTGGCC
CGCAGCGTGCTGCCACTGTCGGTAGTCTTCATTGGCATGATAAGTTTCAATAACCTCTGCCTCAAGTACGTAGGGGTGGCCTTCTACAAC
GTGGGGCGCTCGCTCACCACCGTGTTCAATGTGCTTCTGTCCTACCTGCTGCTCAAACAGACCACTTCCTTCTATGCCCTGCTCACATGT
GGCATCATCATTGGTGGTTTCTGGCTGGGTATAGACCAAGAGGGAGCTGAGGGCACCCTGTCCCTCATAGGCACCATCTTCGGGGTGCTG
GCCAGCCTCTGCGTCTCCCTCAATGCCATCTATACCAAGAAGGTGCTCCCAGCAGTGGACAACAGCATCTGGCGCCTAACCTTCTATAAC
AATGTCAATGCCTGTGTGCTCTTCTTGCCCCTGATGGTTCTGCTGGGTGAGCTCCGTGCCCTCCTTGACTTTGCTCATCTGTACAGTGCC
CACTTCTGGCTCATGATGACGCTGGGTGGCCTCTTCGGCTTTGCCATTGGCTATGTGACAGGACTGCAGATCAAATTCACCAGTCCCCTG
ACCCACAATGTATCAGGCACAGCCAAGGCCTGTGCGCAGACAGTGCTGGCCGTGCTCTACTATGAAGAGACTAAGAGCTTCCTGTGGTGG
ACAAGCAACCTGATGGTGCTGGGTGGCTCCTCAGCCTATACCTGGGTCAGGGGCTGGGAGATGCAGAAGACCCAAGAGGACCCCAGCTCC
AAAGAGGGTGAGAAGAGTGCTATTGGGGTGTGAGCTTCTTCAGGGACCTGGGACTGAACCCAAGTGGGGCCTACACAGCACTGAAGGCTT
CCCATGGAGCTAGCCAGTGTGGCCCTGAGCAATACTGTTTACATCCTCCTTGGAATATGATCTAAGAGGAGCCAGGGTCTTTCCTGGTAA
TGTCAGAAAGCTGCCAAATCTCCTGTCTGCCCCATCTTGTTTTGGGAAAACCCTACCAGGAATGGCACCCCTACCTGCCTCCTCCTAGAG
CCTGTCTACCTCCATATCATCTCTGGGGTTGGGACCAGCTGCAGCCTTAAGGGGCTGGATTGATGAAGTGATGTCTTCTACACAAGGGAG
ATGGGTTGTGATCCCACTAATTGAAGGGATTTGGGTGACCCCACACCTCTGGGATCCAGGGCAGGTAGAGTAGTAGCTTAGGTGCTATTA
ACATCAGGAACACCTCAGCCTGCCTTTGAAGGGAAGTGGGAGCTTGGCCAAGGGAGGAAATGGCCATTCTGCCCTCTTCAGTGTGGATGA
GTATGGCAGACCTGTTCATGGCAGCTGCACCCTGGGGTGGCTGATAAGAAAACATTCACCTCTGCATTTCATATTTGCAGCTCTAGAACG
GGGGAGAGCCACACATCTTTTACGGGTTAAGTAGGGTGATGAGCTCCTCCGCAGTCCCTAACCCCAGTTTTACCTGCCTGGCTTCCCTTG
GCCCAGCTACCTAGCTGTACTCCCTTTCTGTACTCTTCTCTTCTCCGTCATGGCCTCCCCCAACACCTCCATCTGCAGGCAGGAAGTGGA
GTCCACTTGTAACCTCTGTTCCCATGACAGAGCCCTTTGAATACCTGAACCCCTCATGACAGTAAGAGACATTTATGTTCTCTGGGGCTG
GGGCTGAAGGAGCCCACTGGTTCTCACTTAGCCTATCTGGCTCCTGTCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAactcgag

Probe用　5'側

フォワードプライマー : TGCAGATCGCGCTGGTGGTCTC

リバースプライマー : GCTCCTTCTTGGTCTATACC

3'側

フォワードプライマー : AGACCACTTCCTTCTATGCC

リバースプライマー : GCCCCTGACCCAGGTGTAGGC

図3

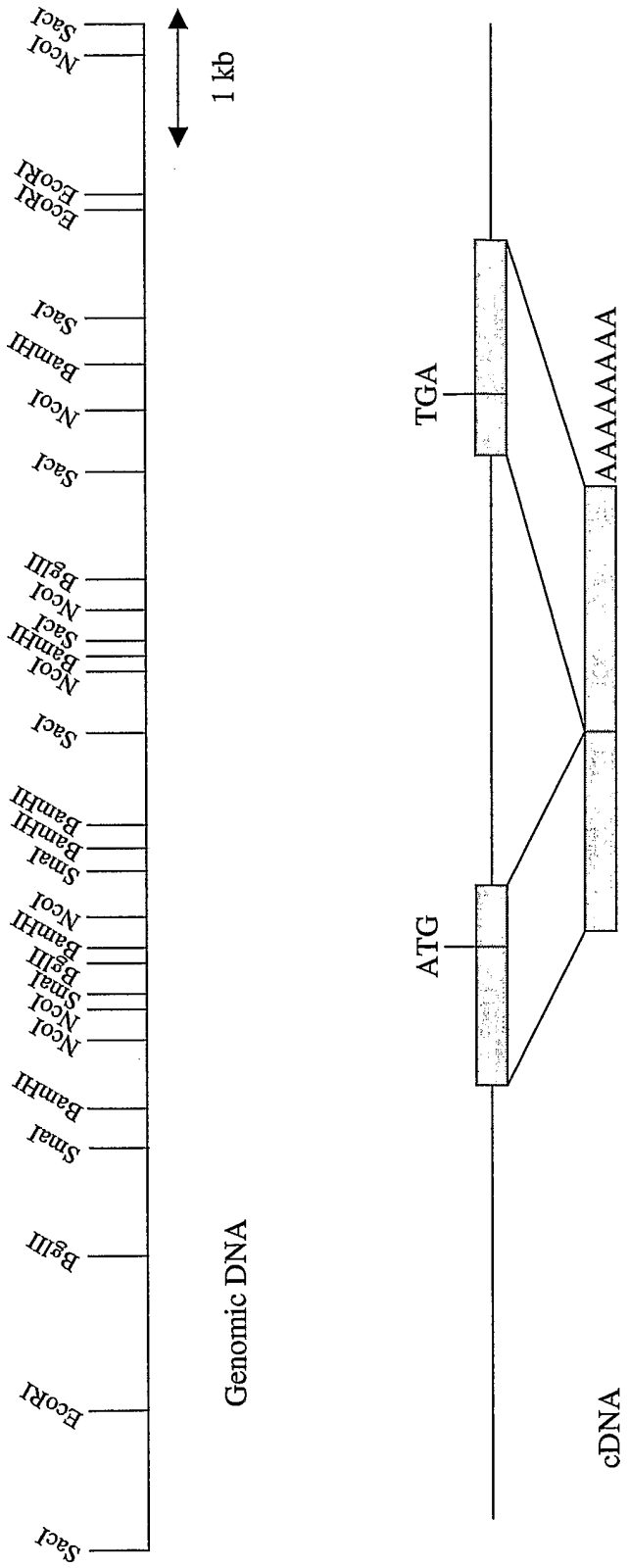

SacI
NcoI
1 kb
EcoRI
EcoRI
SacI
BamHI
NcoI
SacI
BglII
NcoI
SacI
BamHI
NcoI
SacI
BamHI
BamHI
SmaI
NcoI
BamHI
BglII
SmaI
NcoI
NcoI
BamHI
SmaI
BglII
EcoRI
SacI
Genomic DNA
TGA
AAAAAAAA
ATG
cDNA

図4－1

GAGCTCAATTAACCCTCACTAAAGGGAGTCGACTCGATCCTTTACAGAAAACTTGCAAACCCTCTTGGAGTAGTATCTGACACAAGTA
TCAGCAAAATGCAAACTTCTCCCCATCCCCAGAAAACCATTATAAAAACCCCCATATCTTATGCCCAACTGTAGTGATATATTATTTATGATTTATTAAA
ACTTGCTTAAGGATTCAGAAAGCAAAGTCAGCCTTAAGCTATAGAGACCAGGCAGTCAGTGGTGGTACACACACCTTTAATCCCAGGACTCAGGATTAAGA
AGTAGACGGACCTCTGTTAGTTCAAGTCTACCATTACCTACACAAGAGTGAAGAGTAACCGATCTCATGCCTTTGATCCCAGCAGCTGGGATCATGTGCA
TTCAATCCCAGCATTCGGGAGTTATATAAGACAGGAGCAAGGTCTCAGAGCTGGCATTCATTCTCCAGCCACACATTGAGGATAGGAAAACATTGAAGTGT
CAGGATGCTGAGGAGAGGCAGCAGTTTGAGGTTTGGTAGAACCAGGATCACCTTTTGGTCTGAGGTAGAGTAAGAACTGTGGCTGGCTGCTTTGCTTTT
CTGATCTTCAGCTTGAAGCTTGAACTCCAATATTTGTCTCTGGGTCTATTATTATCATGTTACACCTAACTTTAAAGCTGATTTACGCAAGACAGTTGTAG
GTGGACCTTTCTTTCCTGCCCACCAGTTCCCAAATAACTGACACGGAGACTCAATATTAATTATAAATGATTGGTTAATAGCTCAGTCTTGTTACTGGCTA
ACTCTTACATTTTAAATTAACTCATTCCATCCCTTTACTTGCTGCCATGTGGTTCATGGCTTGTTCAAGTCCTGCTTCTCTGTCTCGGCTGGTGATGCC
TCTGGTTCTGCCCTTTATCCCAGAATTCTCCTAGTCTGGCTCCTCCTGCCCAGCTATAGGCCAGTCAGCTGTTTATTAACCAATGAGAATAATACATATTTA
TAGTGTACAAAGATTGCTCCTCAACACCCAATTTTTTATGTGCAACCTGAGAATCTGGACTCATTGCCCTCATGCTTGCAGAGGCGGCACCCTTACCCAC
TAAGCCACCTTTCTAGCCCTGTTGCTTTTGTTTTTGAGACAGGTTCCACTATGTAGCCCAGGCTGGCCTCAAACTGACCATTCTCCTGCCTAAACCTCCC
GAACACTGGAATTATAGTCAAGGCCTACCTGCCCTGGCATTTTCACACTTTTATTTCCTGGCTGAGTCCATTGACTTTACACTCATCAAGGTTGAACCAGT
TGGAGTTTAATTACAGTGCCAATCGCACTGAATCCCACATAATCAACAACTTCAAGGAAGCAAAAAACCAGTTTTTCCTGAAGATCAATGTCAGCTTG
CCTGATTCAGAATAGACCCCCGAAAAAAGGCAAATGCTTGATAACCAATTTCTTCTTATTGTTCAATCCCCTGCTGTGTGTAAGCTCCTGAGAAAGG
ACAGTAAGGGGACATTCATGATCAGAGAAAGAGCCCCAACTCCCCCCCCAGCCCCACCCTGTCCACAGTCTGTTGGTTTGGTTTCCCCCTGGCT
GACACCCAGAAATCACAACATAATCACCTAGGTCACTGTAACAAGTTCCTTTCTGGAAAATGCTACAAATGATATTGGTAACATGAGTAATGAATGTG
CCTGGAGTCCAACTCCCTTGTGACCCAGCAATGTTTTCCGTGGGTGCTCCCTTCCCCAGCTGCAGGCCTGACATGTACCTTAAAAAGCCTCCCCTGGAGG
ACAGAATTTTGTGGGTACTATAGTGTTCTCACAAATACTTCCCCTAATACCCTTACTTAGTTACCATAAATAACATGCAGCCCCTGGTGAGGCACACAGG
GCTCCAATGTACAGCTTCTCAGACACTGCAGGAACCTTCCTCTCCTAATGCAGCTGGTCTCTTCAGGCTGGAACCCATACCACTCCAATC
CTAGTGTGGAGTAGAGCTGTCTACGAAAACCAGCAGATCTATAGCTAAATGTGTTTCAATTTTATGCTTTGACAAATTGTACTGACCCCCACCCCCACCCC
TTCCCCCTTGCTGTGCTGGGAATTGAACCCAGGACCTTGTGCATGCCAGGCAAGTACTCTAACACTGAGCTATAGCCCCAATCTTTCATCCAAGTCTCTA
TGTGTGCCCACACTCGCTTTTTATTTTGAGACAAAAGGTTCTTATTTTGCCTTGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAACTT
TTGACCTTCCTACCTCAGCTGAGACTACAAGTCTTTTACCATCAGGCCCGGCTGATGGTAAAATAGTTTGAAATACACATCATCTTAA
TGGTCAACCACACAATTTCCGAAATGTTGCTGGGGCAAACCTGTCCGCCCCAACATTGGTGCTAGGAAGAAAGCACAGACAAGTAGCCC
TCCCAGCTCAGGAGTAAAAGACCTGGAGGGGGTGGCCCACTTCGGTCAAGTTCACGGGATGGGGGTACCCTCCTCCAGTAGTGGTGGTATTTGGC
AGTTCCTCCACCGACGCCCTCTGGAAGCACCTGCTTGGACCCGCAAAGCCAGGAATGCAGCTTCCTCAAGGGACTCGCCAGCGAGGGTAACAGGACAG
AGGCGTCCCAAGAGGGCTGGGGCGGAAGGGGGAAGACAGGGTCGGCCTTCTAGATAGGGCAAAGGGCCTTCTGGCTGTGTTCCGGGGTAACCGCCCCAC
CACGCCTGGAGCCCGACGTGGCGAGCGATGGGGACAGCGAGGAAGTCGTACTGGGGAGGGCCGCGTAGCAGATGCAGCCGAGGGCGGCGCTGCC
AGGTACACCCGAGGGCACCGCGGGGGTGAGCGCCAGGTCCCTCCAGAGCCGAGTCCGGCGGACCGACGGTACGTTCTGGAATG
GGAAGGGATCCGGGACACCGAATTGCTGCATTGAGGGGCTCAGAGGTTCTGATGTGGGAGTCCAGAAAGGGTTTTATCTACCGGAGGTGATGTGACTTC
CGGCCTCTGGAAGTGCTGTTGAGTCTCTGGGACCTTGGGTCCTCTCGACTAGGTTTGGAAGGGGTGAGGGTAGGGAGAAAGGAGAGGACTGC
AGCAATGTCTTCCCGAACGACCTGGGTTCGGGAGGGGTCGAAGGACAAGGGGCTGTTGTGGGGGGGTCTTCAGACGCGGAGGGGTGGTATTCTATTTTCT
GGGAAGATGGTGTCGATGCACTTGACCAAGTCTAGTCGATCTAGAAGAGGCTAGGGGAACACAGACAGTGAGAGAGGATGGTGGAGGGAGTGGCAGAACC
CTTCCAGAAACTGGGAGAGGCTCTAGCACCTGCAACCCCTTCCCTGGCCTCCGGGGAGTCCCAGAAGAGGGCAGGACCATGGACACAGGTGCATTCGTG
CCGGCGCGCTCCGGCCTGGCGAAGGTGCGCGCTCTTGGAGGCCGCGCGCCCGGAGAGCTGGCCCTTTAAGGCTACCCGGAGGC
GTGTCAGGAAATGCGCCCTGAGCCCGCCCTCCCGGAACGCGGCCCGAGACCTGGCAAGCTAGCACTCGGAACTAGCACTCGGCTCGCGGCCTC

図 4 − 2

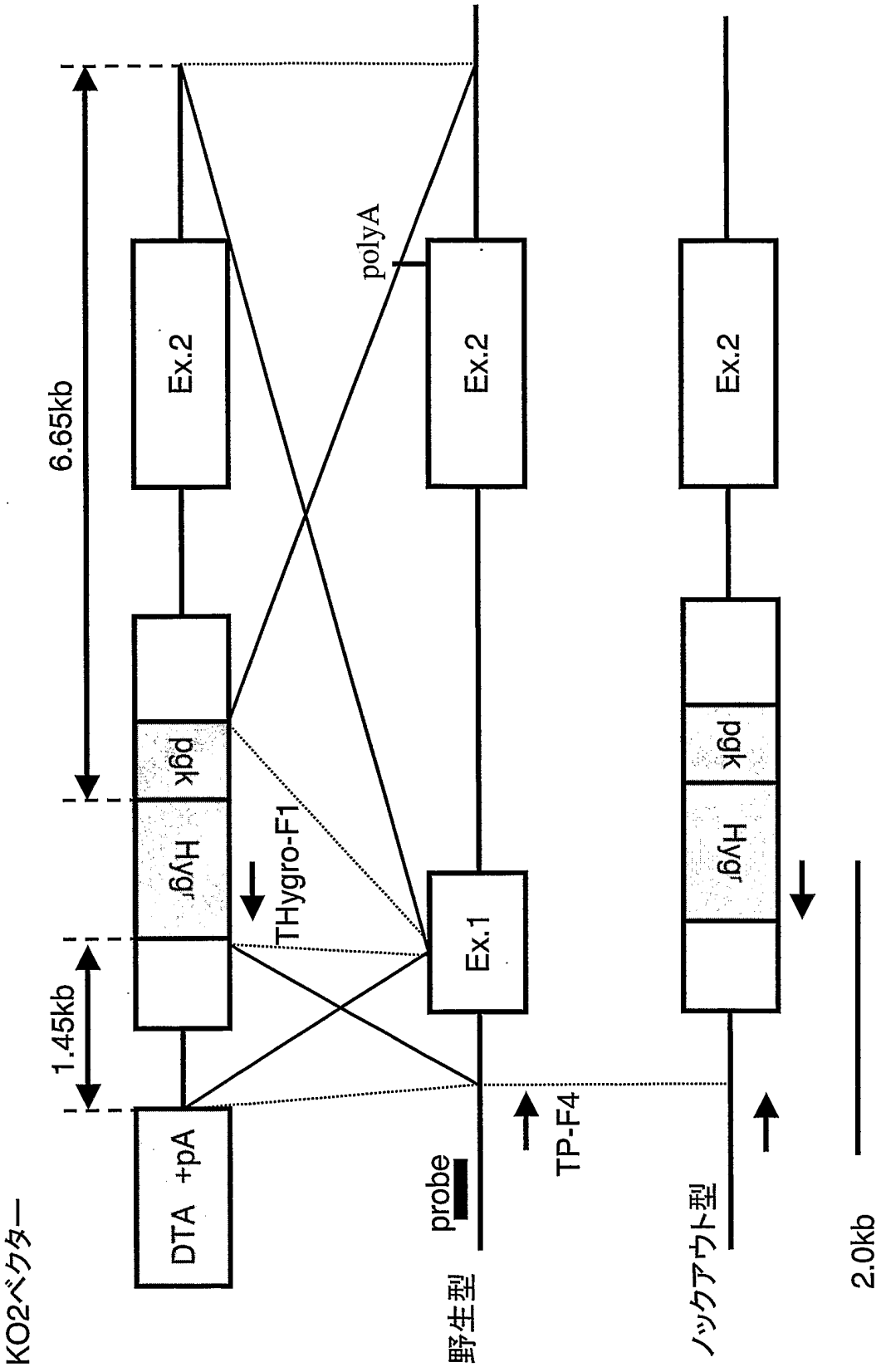
GGTGAGGCCTTGCGCCCGCCATGCCTCTGTCATTGCCCCTCGGGCCGCCTCCCTGAACCTCCGTGACCGCCCTGCAGTCCTCCCTCCCCCCCTTCGACTCG
GCGGGCGCTTCCGGGCGCTCCCGCAGCCCGCCCTCCACGTAGCCCACACCTCCCTCTCGGCGCTCCGCTTCCCACGCGGTCCCCGACCTGTTCTTTCCTCC
TCCACCCTGCCCTTCTGTCCCTCTCCTTCCCTCGACTCGTCCCTATTAGGCAACAGCCCCTGTGGTCCAGCCGGCCATGGCTGTCAAGGCTCA
CACCCTTAGCTAGGCCCCTTCTCCCTTCCCTCGCCCCGGGAGCGAGCGCGATGTGGAGCAGTGCCTCTGGCAAGC
AGAACTTCACCCAAGCCATGTGACAATTGAAGGCTGTACCCCCAGACCCTAACATCTTGGAGCCCTGTAGACCAGGGAGTGCTTCTGGCCGTGGGGTGA
CCTAGCTCTTCTACCACCATGAACAGGGCCCCTCTGAAGCGGTCCAGGATCCTGGCATGGCGCTGAGTGCTCCACTGCCTCTGAGGAGGCAGAT
GAAGACAGCAGGAACAAGCCGTTTCTGCTGCGGCGCTGCAGATCGCGCTGGTCGTCTCTCTCTACTGGTCACCTCCATCTCCATGGTATTCCTCAACA
AGTACCTGCTGGACAGCCCCTCCCTGCAGCTGGATACCCCTATCTTCGTCACTTTCTACCAATGCCTGGTGACCTCTCTGCTGTGCAAGGGCCTCAGCACT
CTGGCCACCTGCTGCCCTGGCACCGTTGACTTCCCCCACCCTGAACCTGGACCTTAAGGTGGCCCGCAGCGTGCTGCCACTGTCGGTAGTCTTCATTGGCA
TGATAAGTTTCAATAACCTCTGCCTCAAGTACGTAGGGGTGGCCTTCTACAACGTGGGGCGCTCGCTCACCACCGTGTTCAATGTGCTTCTGTCCTACCT
GCTGCTCAAACAGACCACTTCCTTCTATGCCCTGCTCACATGTGGCATCATCATTGGTGAGTGGGGCCCGGGGGCTGTGGGAGCAGGATGGGCATCGAA
CTGAAGCCCTAAAGGTCAACACTGTAGGTACCTTTACTTCTGTCCCAGGTCCCTTGCATCAGCAGTTACAGGAAGAGCCCTGTAGAAAACAAATAACT
TCCTTATGGTCATTCAACAAGTTAGGGACCCAGCCAGGGTGAAAATAATGTTAGCAGCAAAGATGGCTCTCGCCACTTGCATGATTAAAA
TGTGCCAGGTACTCAGATCTAAGCATTGGATCCACATTAACTCAACTAATCCCTATTACAAGGTAAAATATATCCGAATTTTACAGAGGGAAAACCAAG
GCACAGAGAGGCTAAGTAGCTTGACCAGGATCACACAGCTAATAAATCACTGACATAGCTGGGATTTAAACATAAGCAGTTACCTCCATAGATCACACTA
TGACCACCATGCCACTGTTCCTCTCAAGAGTTCCAGGATCCTGTCTCTTTAAAGAGGACAACACATCTGACATTGCTACCTTGAGGTAA
CATTTGAAATAGTGGGTAGACATATGTTTTTAAGTTTTATTCTTACTTTTTATGTGTGTTTGGGGGCCACCACAGTGTATGGGTGGAGATAAGGGG
ACAACTTAAGAATTGGTCCTTTCTCCCACCACATGGGTCTGAGGTCTGAACTCAGGTCATCAGGATTGGCACAAATCCCCTTACCCACTGAGCCATTTC
ACTGGTCCAATATATGTGTGCTTTTAAGAGGCTTTAACTATTTTCCCAGATGTGAATCTCCTGCTGATCATTATCCCCTTTACCCGGAAGCCCTCTGGGA
GGTGCCATCCCTGTGGTCGTCTGCATACAAATGGGGAAACTGCAACTCAGAGAAACAAGGCTACTTGCCAGGGCCCCACAAGTAAGATAGGCTGGGAT
GCCATCCCAGACTGGCCACACTCCCTGGCCTGTGCTTCAAGCCAGTTTACTTTGTTCCTGCCCATTGCAGTCAAACACAATAACT
ACAGGCCAAAAGTGCTTTTAAATTAAAGTCAGATGAACTTTTAAACATCCAGAGCTCCTCAACTGCAGGAGTTACAACCTGATTCTCTGCAACCATCTTTGC
AGTGCCCGGTAGTCATATGTAGCTAGAGGCTCTTGGCTAGGACAGCATGTGTTAGGAAACATCTGGCCCTGAGATCATTGAATTGAGTGACTGCTGGGT
GACAAAGACCAAGGCATCCGTTCCCTGAGAGTCCTGGGCAAGCAGCAATGTGACCTTCATTTGTACCTACTCAGGTTCTTTATCTGTCCTGTTTGACCTA
CTTAGTCTCCTCTGGTGTCTCAGAGGCCCAGGCTGGGTACTCTGGATGTCAGGATCAGGCCAATGCGCACATCTGCCCTAGAAATGTCCCCCTGGTTGAG
CAGCTCCTGAATCCATCGGTAAAGGGTCTGGACCAGGGAGGAGTCAGATAAAAAGCTGACACAGCACTGGGGGACTCCATGGGGAACTCCCACCTGCCCC
CACACATCCATCCTAAGAGAACTGGTATTCCTTGTTTCCTCTTTGTCCTACAAGGCACCCTGGGATCCCACTTCAGTCTCCCAGGGTTAGAG
GGCATGAGCCTCCTTGTGGGGAATTTAGATGCAAGAAGGTACAGTCACTAGAGAACCTGAGCTCAGATCCCGAAGTAACCTGATAGTGAGG
CAGCTGAGAACCGCAGCAGCCTGCCTGAGTGGCTGAACTCTGCGGCCTCCGGAACTGGCCCCAACTGTTGGGTCTCCTCTTCCTTCCTCCTGTGAGGGAG
GGCCCATCTCTGATAAGTGCTGTGGGGACTCTAGAGTAGGGAGGAGGAGCAATCTAAGCAGGCCTTACTGAGAAGTCCTTGCTGGCATGTGGCTGC
CTGAGGAGTACAGACTGGGAACACCCATTTGAATGAGTAAGGTTTTTCCTGAAGGCCATGGGGAGCCACGGAGGAAAATCATTTTAGTTACAAGACAA
AGAGTAGATTGGGTTAACATGGGAGCAAGGACATGGCCCCAATTTTCATAGATGAAGGAAATTGGAACTCAGAGAGGTTAAGTAACTTCTCCCAAATAG
CTCAGCTTCAAAATCACAGAACAGTCAGAGTCTAGATCTCTCTGATGCCTGTGATGGTCCCTGCCATTCCATGTTGCTGATCCCTGTGGCATCAGTAAGCC
TCTACCTTGTGGGAATGCAGGATCTAAATGAAGAGAGGAAGTGCTGGCCCCATGCTGTGGTCTGGAAAGCTATGCAGGCTCTTTGAGCAGAGAGTGACC
CACAAGTGAATAGAGTCCTATGAGACTCAAAGCAACATCCACCCTTAAGCAGCTCTAACCAAATGCTCACACTGAGGGAGCCAAAGCCAAGTTAGAGT
CCTGTGCTTGCCCAAGGTCACTTTGCCTGGCCCTCCTCCTATAGCCCTCATTACAGTGATTACAATTATAATTAGAGAGGTA
ACAGGGCCACACTGTCCTTACACATTCCCCTGCTAGATTGTAGCTGGGAGAGGGGGAGTGGGGAGGGAAGATGCAGATTT

図4－3

TCATTCTGGGCTCTACTCCCTCAGCCATTTTTTGGTGTGGGAGTTAGACTTTGGATATGTTGATGAGGTAAGGGCCACAGAACAGTCTGAACTGTGG
TATCAGAATCCTGTCCCTCTCCCTCTCCTCCTCTCACCTTGTCACTCCTCTGTCTGCTACAGGTGGTTTCTGGCTGGGTATAGACCAAGAGGGA
GCTGAGGGCACCCTGTCCCTCATAGGCACCATCTTCGGGGTGCTGGCCAGCCTCTGCGTCTCCCTCAATGCCATCTATACCAAGAAGGTGCTCCCAGCAG
TGGACAACAGCATcTGGCGCCTAACCTTCTATAACAATGTCAATGCCTGTGTGCTCTTCTTGCCCCTGATGGTTCTGCTGGGTGAGCTCCGTGCCCTCCTT
GACTTTGCTCATCTGTACAGTGCCCACTTCTGGCTCATGATGACGCTGGGTGGCCTCTTCGGCTTTGCCATTGGCTATGTTGACAGGATCAAATT
CACCAGTCCCCCTGACCCACAATGTATCAGGCACAGCCAAGGCCTGTGCGCAGACAGTGCTGGCCGTGCTCTACTATGAAGAGACTAAGAGCTTCCTGTG
GTGGACAAGCAACCTGATGGTGCTGGGTGGCTCCTCAGCCTATACCTGGGTCAGGGGCTGGGAGATGCAGAAGACCCAAGAGGACCCCAGCTCCAAAG
AGGGTGAGAAGAGTGCTATTGGGGTGTGAGCTTCTTCAGGGACCTGGGACTGAACCCAAGTGGGGCCTACACAGCACTGAAGGCTTCCCATGGAGCTA
GCCAGTGTGGCCCTGAGCAATACTGTTTACATCCTCCTTGGAATATGATCTAAGAGGAGCCAGGGTCTTTCCTGGTAATGTCAGAAAGCTGCCAAATCTC
CTGTCTGCCCCATCTTGTTTTGGGAAAACCCTACCAGGAATGGCACCCCTACCTGCCTCCTCCTAGAGCCTGTCTACCTCCATATCATCTCTGGGGTTGGG
ACCAGCTGCAGCCTTAAGGGGCTGGATTGATGAAGTGATGTCTTCTACACAAGGGAGATGGGTTGTGATCCCACTAATTGAAGGGATTTGGGTGACCCC
ACACCTCTGGGATCCAGGGCAGGTAGAGTAGTTAGCTTAGGTGCTATTAACATCAGGAACACCTCAGCCTGCCTTTGAAGGGAAGTGGGAAGCTTGGCCAA
GGGAGGAAATGGCCATTCTGCCCTCTTCAGTGTGGATGAGTATGGCAGACCTGTTCATGGCAGCTGCACCCTGGGGTGGCTGATAAGAAAACATTCACC
TCTGCATTTCATATTTGCAGCTCTAGAACGGGGGAGAGCCACACATCTTTTACGGGTTAAGTAGGGTGATGAGCTCCCTCCGCAGTCCCTAACCCCAGCTT
TACCTGCCTGGCTTCCCTTGGCCCAGCTACCTAGCTGTACTCCCTTTCTGTACTCTTCTCTTCCGTCATGGCCTCCCCCAACACCTCCATCTGCAGGCAG
GAAGTGGAGTCCACTTGTAACCTCTGTTCCCATGACAGAGCCCTTTGAATACCTGAACCCCTCATGACAGTAAGAGACATTTATGTTCTCTGGGGCTGGG
GCTGAAGGAGCCCACTGGTTCTCACTTAGCCTATCTGGCTCCTGTCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATAAACCAAGTTACTAAGAACAG
AAGTTGGTTTATAACGTTCTGGGGCAGCAAAGCCCAGATGAAGGGACCCATCGACCCTCTCTGTCCATATCCTCATGCTGCAGAAGTACAGGCAAGCTC
CTTTAAGCCTCATATAGGAACACTAGCCTCACTCATGAGGGTTTTACTCCATGACCTGTCAACCTCAAAGCCTTCAACATGAGGACTCCAACGTAAATTT
GGGGACAGAAGCACTCAGACCATACCCCAGCACCACCCTCCTAACCTCAGGGTAGCTGTCATTCTCCTCTCTTGGGCCTTTAGAACCCCCC
ATTTCCTTGGGGTAATGTCTGATGTTTTTGTCCCTGTCATAAAAAAGATGGAGAGACTGTGTGTCCAGCCTTTGATTCCTACAATCCCAGGTTCTAA
TGAAGTTTTGTGGGGCCTGATGCCCTGAGTTGTATGTGATTTTAATAATAAAAAAGCAAGATACAGCATGTGTGTGGACTGAGTGAGGGCCACACAGGGATCT
AAAAGCCAAGTGTGAGGGGACCCAGCTACAGCAGGCAGCATCCTGAGCCTGGAATCTCTTCCAGGACAAGAATTCTCCATATACCTACTCTACTCTGGGGA
GTAGGTGGCCAGAGTTCAAGCTTCCCTTAGTACCAACTACCACTGGCTGTGCTCTTACTGAAGGCAGACATGGCACTGAGTGCTGTCCATCTGTCACTCA
TCTCCACAGCCATTCCTAATGTGTGGGGTGGGAGCCATCACCAAACCCCATTTTCAGATAAGGACACAGGCTCAGAGAGGCTTGTGTGGAGAAAAGTAG
CAGCAGAATTCAGAGAGCTGGGTCTCCTGCAGCACCTTGGACTGCCAGCAGTGCTTGTCACACAGCACATACTCAAAGAATGCCAGCCCCCT
CAGCCTAGAGTGCCTGGCCTTTCTTTCAGATGAGGAAGAGGGTCAAAGCTGTTAGCTTGCCCACCACATACATGACCAACAGCTTGAGGGA
GGGAGGATTACTGTGGCTCCCAGCCTGAGAGGTGGGACACCCAAATGTATTAGGTCCTTGAATTCAGTCACTCCTACCAGA
ATGCTGGGGAATGGGGATGCCAAAGGCAAAGGAGCTTTCTAAGGTGTGGTGTAAGATAGGCATTTCTCTGCTTCCATGTACACCTGTGAGCAGAGTAGG
AAGGCCCTGTGGAGAATATATCCCACAAACCAGTAGCCcTTCCTGGCAGTGGGTGAATACTGCCACCCTATACCCCTATGCAAGGCCAGTAGAACCACC
CAACCCACAACATCTAGAGAAATTACAGGTCATCTTAAGCCTCTAAATTGTGGAGAAACTCGACATGCGCACGATTCCTAACCTGCTAGCCTAGGGTGC
GGGGTGGATAATTTAAGGAAACTGGGGGTTTCTTATAGAATCGGAGGCTCCATGAAGTCACCCTGACAAGAGGTCAGCAATAGCCAGCAGTGGCTA
CTCCTAAGCCTCCAGACAGAGCACCCTGTGAATGTACCTTATTCTCACATCTGGGTGTCTATAGGTGTGACTGGGTCAGATGTGTCACCCAGGCCATTGCAA
TGGGCCCTTAGCCCCATGGGGTGTTGGGATAGCAGCCAAGCAGCTCCCATGCTGAGATACTGCCTGCAGTAGACTGATGGATAAGAAAACAAGGCCCA
AAATGTTTTTCTTTCCAGACTTGATCTTTCTTTGTTCAAAAATGCTGTTTTCCCTAAACTTGCCCAAACCCATTGTTTTGCAGTTGAGGAAAATAAGGCAT
AGAAAGATTAAAGGAAGTTTCTGAGGTTACAGAGCAAAGTACTGGCTTCACCTGAAATAGACAGGTGTGCCCTGATCCTGATTTGAGCTC

図5

図 6


KO2ベクター
6.65kb
1.45kb
DTA +pA
pgk
Hygr
Ex.2
polyA
THygro-F1
Ex.1
probe
TP-F4
野生型
ノックアウト型
2.0kb

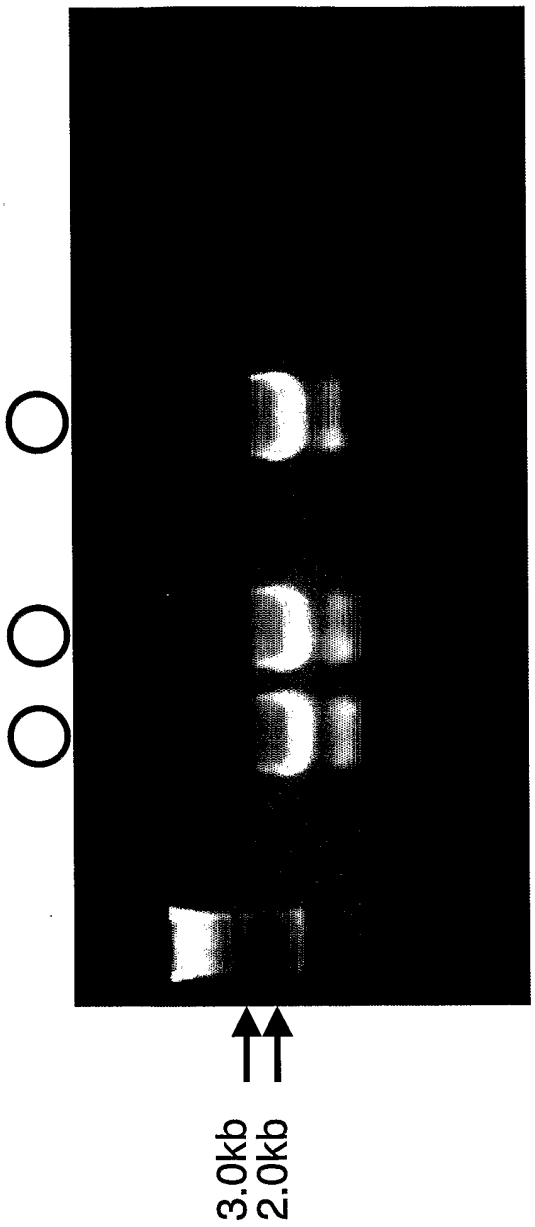


図 7

図 8

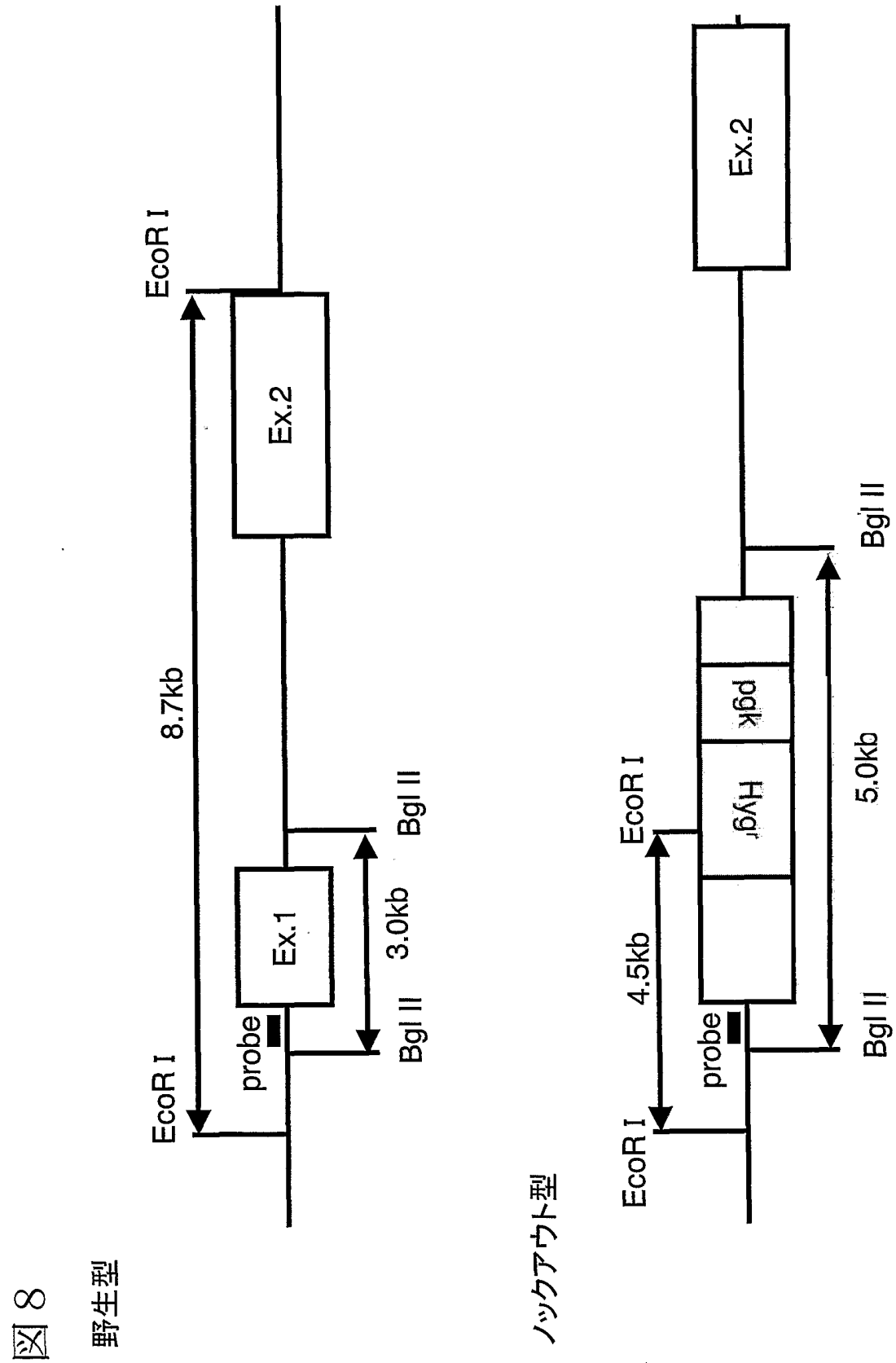
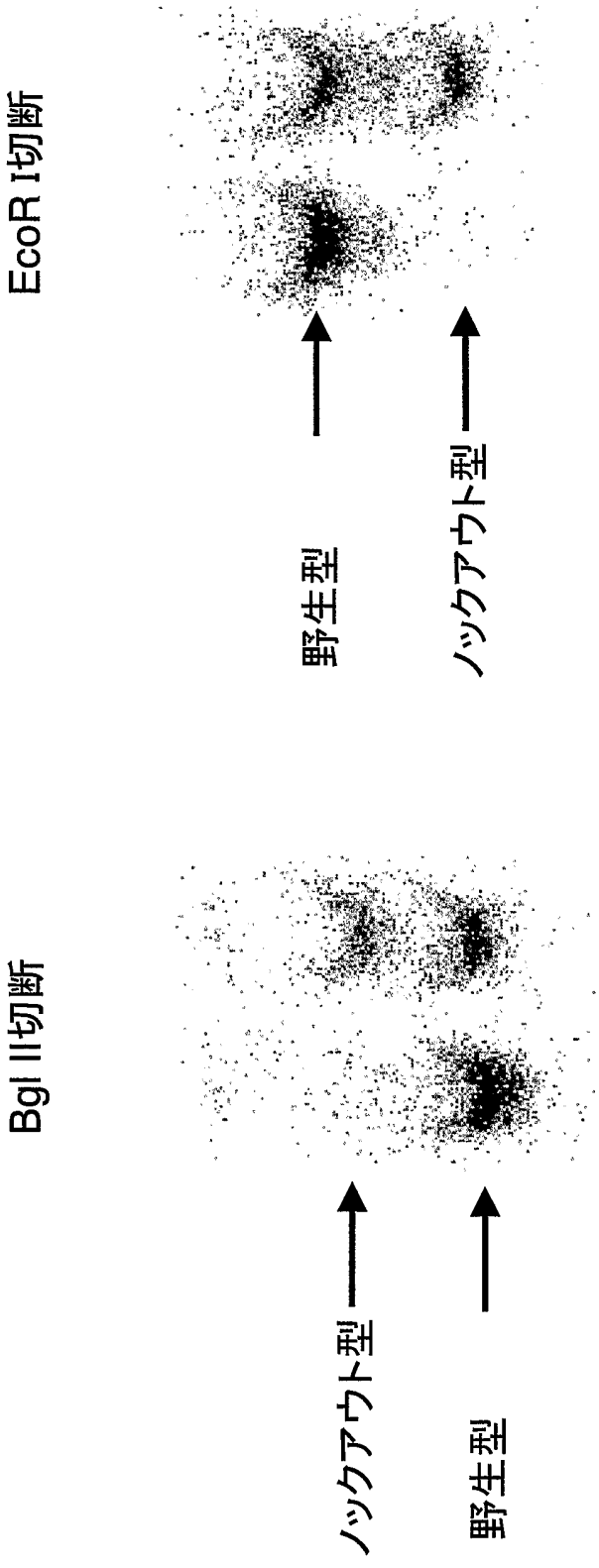

野生型
EcoR I
Ex.2
8.7kb
Ex.1
probe
EcoR I
Bgl II
3.0kb
Bgl II
ノックアウト型
Ex.2
Bgl II
pgk
Hygr
EcoR I
4.5kb
5.0kb
probe
Bgl II
EcoR I

図9



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> A fucose transporter

<130> PH-2205-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003/174006

<151> 2003-06-18

<150> JP 2003/174010

<151> 2003-06-18

<150> JP 2003/282081

<151> 2003-07-29

<150> JP 2003/282102

<151> 2003-07-29

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8160

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 1

cccggggtaa ccgccccacc acgcctggag cccgacgtgg cgagcgatgg ggacagcgag 60
caggaagtcg tactggggag ggccgcgtag cagatgcagc cgagggcggc gctgccaggt 120
acacccgagg gcaccgcggg ggtgagcgcc aggtccctga accagccagg cctccagagc 180
cgagtccggc ggaccgacgg tacgttctgg aatgggaagg gatccgggac accgaattgc 240
tgcattgagg ggctcagagg ttctgatgtg ggagtccaga aagggtttta tctaccggag 300
gtgatgtgac ttccggcctc tggaagtgct gttggagtct ctgggacctt gggtcctctc 360
gactaggttt ggaaggggtg aaataggggt agggagaaag gagaggactg cagcaatgtc 420
ttcccgaacg acctgggttc gggaggggtc gaaggacaag gggctgttgt ggggggtctt 480
cagacgcgga ggggtggtat tctattttct gggaagatgg tgtcgatgca cttgaccaag 540
tctagtcgat ctgaagaggc taggggaaca gacagtgaga gaggatggtg gagggagtgg 600
cagaaccctt ccagaaactg ggagaggctc tagcacctgc aaccccttcc ctggcctccg 660
gggagtccca gaagagggca ggaccatgga cacaggtgca ttcgtgccgg cgcgctccgg 720
cctggcgaag gtgcgcgctc ttggaggccg cgggagggcc agacgcgcgc ccggagagct 780
ggcccttaa ggctacccgg aggcgtgtca ggaaatgcgc cctgagcccg cccctcccgg 840
aacgcggccc gagacctggc aagctgagac ggaactcgga actagcactc ggctcgcggc 900
ctcggtgagg ccttgcgccc gccatgcctc tgtcattgcc cctcgggccg cctccctgaa 960
cctccgtgac cgccctgcag tcctccctcc ccccttcga ctcggcgggc gcttccgggc 1020
gctcccgcag cccgccctcc acgtagccca cacctccctc tcggcgctcc gcttcccacg 1080
cggtccccga cctgttcttt cctcctccac cctgcccttc tgtccctctc ccttcctttc 1140
tcccctcgac tcgtccctat taggcaacag cccctgtggt ccagccggcc atggctgtca 1200
aggctcacac ccttagctag gcccccttctc ccttccctgg gtcttgtctc atgacccccct 1260
gccccgcccg ggagcgagcg cgatgtggag cagtgcctct ggcaagcaga acttcaccca 1320
agccatgtga caattgaagg ctgtaccccc agaccctaac atcttggagc cctgtagacc 1380
agggagtgct tctggccgtg gggtgaccta gctcttctac caccatgaac agggcccctc 1440
tgaagcggtc caggatcctg cgcatggcgc tgactggagg ctccactgcc tctgaggagg 1500
cagatgaaga cagcaggaac aagccgtttc tgctgcgggc gctgcagatc gcgctggtcg 1560
tctctctcta ctgggtcacc tccatctcca tggtattcct caacaagtac ctgctggaca 1620

gcccctccct gcagctggat acccctatct tcgtcacttt ctaccaatgc ctggtgacct 1680
ctctgctgtg caagggcctc agcactctgg ccacctgctg ccctggcacc gttgacttcc 1740
ccaccctgaa cctggacctt aaggtggccc gcagcgtgct gccactgtcg gtagtcttca 1800
ttggcatgat aagtttcaat aacctctgcc tcaagtacgt aggggtggcc ttctacaacg 1860
tggggcgctc gctcaccacc gtgttcaatg tgcttctgtc ctacctgctg ctcaaacaga 1920
ccacttcctt ctatgccctg ctcacatgtg gcatcatcat tggtgagtgg ggcccggggg 1980
ctgtgggagc aggatgggca tcgaactgaa gccctaaagg tcaacactgt aggtaccttt 2040
acttactgtc ccaggtccct tgcatcagca gttacaggaa gagccctgta gaaaacaaat 2100
aacttcctta tggtcattca acaagttagg gacccagcca gggtgaaaat aatgttagca 2160
gcaactacag caaagatggc tctcgccact tgcatgatta aaatgtgcca ggtactcaga 2220
tctaagcatt ggatccacat taactcaact aatccctatt acaaggtaaa atatatccga 2280
attttacaga gggaaaacca aggcacagag aggctaagta gcttgaccag gatcacacag 2340
ctaataatca ctgacatagc tgggatttaa acataagcag ttacctccat agatcacact 2400
atgaccacca tgccactgtt ccttctcaag agttccagga tcctgtctgt ccagttctct 2460
ttaaagagga caacacatct gacattgcta ccttgaggta acatttgaaa tagtgggtag 2520
acatatgttt taagttttat tcttactttt tatgtgtgtg tgtttggggg gccaccacag 2580
tgtatgggtg gagataaggg gacaacttaa gaattggtcc tttctcccac cacatgggtg 2640
ctgaggtctg aactcaggtc atcaggattg gcacaaatcc ctttacccac tgagccattt 2700
cactggtcca atatatgtgt gcttttaaga ggctttaact attttcccag atgtgaatgt 2760
cctgctgatc attatcccct tttacccgga agccctctgg gaggtgccat ccctgtggtc 2820
gtctgcatac aaatggggaa actgcaactc agagaaacaa ggctacttgc cagggcccca 2880
caagtaagat aggctgggat gccatcccag actggccaca ctccctggcc tgtgcttcaa 2940
gccagtttac tttgttcctg cccattggaa gttagcatgt tgcagtcaaa cacaataact 3000
acaggccaaa agtgctttta aattaaagtc agatgaactt ttaaacatcc agagctcctc 3060
aactgcagga gttacaacct gattctgcaa ccatctttgc agtgcccggt agtcatatgt 3120
agctagaggc tcttggctag gacagcatgt gttaggaaac atctggccct gagatcattg 3180
aattgagtga ctgctgggtg acaaagacca aggcatccgt tccctgagag tcctgggcaa 3240
gcagcaatgt gaccttcatt tgtacctact caggttcttt atctgtcctg tttgacctac 3300
ttagtctcct ctggtgtctc agaggcccag gctgggtact ctggatgtca ggatcaggcc 3360
aatgcgcaca tctgccctag aaatgtcccc ctggttgagc agctcctgaa tccatcggta 3420

aagggtctgg accagggagg agtcagataa aaagctgaca gcactggggg actccatggg 3480
gaactcccac ctgcccccac acatccatcc taagagaact ggtattcctt gtttcctctt 3540
tgtcctacaa ggcaccctgg gatcccactt cagtctccca gccttgccag ggttagaggg 3600
catgagcctc cttgtgggga atttagatgc aagaaggtac agtcactaga gaacctgagc 3660
tcagatcccc aaagtaacca gtacctgata gtgaggcagc tgagaaccgc agcagcctgc 3720
ctgagtggct gaactctgcg gcctccggaa ctggccccaa ctgttgggtc tcctcttcct 3780
tcctcctgtg agggagggcc catctctgat aagtgctgtg gggactctag agtagggagg 3840
aggaggagca atctaagcag gccttactga gaagtccttg ctggcatgtg gctgcctgag 3900
gagtacagac tgggaacacc catttgaatg agtaaggttt ttcctgaagg ccatggggag 3960
ccacggagga aaatcatttt agttacaaga caaagagtag attggttaac atgggagcaa 4020
ggacatggcc ccaattttca tagatgaagg aaattggaac tcagagaggt taagtaactt 4080
ctcccaaata gctcagcttc aaaatcacag aacagtcaga gtctagatct ctctgatgcc 4140
tgtgatggtc ctgccattcc atgttgctga tccctgtggc atcagtaagc ctctaccttg 4200
tgggaatgca ggatctaaat gaagagagga agtgctggcc ccatgctgtg gtctggaaag 4260
ctatgcaggc tctttgagca gagagtgacc cacaagtgaa tagagtccta tgagactcaa 4320
agcaacatcc acccttaagc agctctaacc aaatgctcac actgagggag ccaaagccaa 4380
gttagagtcc tgtgcttgcc caaggtcact ttgcctggcc ctcctcctat agcacccgtg 4440
ttatcttata gccctcatta cagtgattac aattataatt agagaggtaa cagggccaca 4500
ctgtccttac acattcccct gctagattgt agctgggaga gggggagatg taggtggctg 4560
ggggagtggg agggaagatg cagattttca ttctgggctc tactccctca gccatttttt 4620
ggtgtgggag ttagactttg gatatgttga tgatgaggta agggccacag aacagtctga 4680
actgtggtat cagaatcctg tccctctccc tctctcctca tccctcttca ccttgtcact 4740
cctctgtctg ctacaggtgg tttctggctg ggtatagacc aagagggagc tgagggcacc 4800
ctgtccctca taggcaccat cttcggggtg ctggccagcc tctgcgtctc cctcaatgcc 4860
atctatacca agaaggtgct cccagcagtg gacaacagca tgtggcgcct aaccttctat 4920
aacaatgtca atgcctgtgt gctcttcttg cccctgatgg ttctgctggg tgagctccgt 4980
gccctccttg actttgctca tctgtacagt gcccacttct ggctcatgat gacgctgggt 5040
ggcctcttcg gctttgccat tggctatgtg acaggactgc agatcaaatt caccagtccc 5100
ctgacccaca atgtatcagg cacagccaag gcctgtgcgc agacagtgct ggccgtgctc 5160
tactatgaag agactaagag cttcctgtgg tggacaagca acctgatggt gctgggtggc 5220

tcctcagcct atacctgggt caggggctgg gagatgcaga agacccaaga ggaccccagc 5280
tccaaagagg gtgagaagag tgctattggg gtgtgagctt cttcagggac ctgggactga 5340
acccaagtgg ggcctacaca gcactgaagg cttcccatgg agctagccag tgtggccctg 5400
agcaatactg tttacatcct ccttggaata tgatctaaga ggagccaggg tctttcctgg 5460
taatgtcaga aagctgccaa atctcctgtc tgccccatct tgttttggga aaaccctacc 5520
aggaatggca cccctacctg cctcctccta gagcctgtct acctccatat catctctggg 5580
gttgggacca gctgcagcct taaggggctg gattgatgaa gtgatgtctt ctacacaagg 5640
gagatgggtt gtgatcccac taattgaagg gatttgggtg accccacacc tctgggatcc 5700
agggcaggta gagtagtagc ttaggtgcta ttaacatcag gaacacctca gcctgccttt 5760
gaagggaagt gggagcttgg ccaagggagg aaatggccat tctgccctct tcagtgtgga 5820
tgagtatggc agacctgttc atggcagctg caccctgggg tggctgataa gaaaacattc 5880
acctctgcat ttcatatttg cagctctaga acgggggaga gccacacatc ttttacgggt 5940
taagtagggt gatgagctcc tccgcagtcc ctaaccccag ctttacctgc ctggcttccc 6000
ttggcccagc tacctagctg tactcccttt ctgtactctt ctcttctccg tcatggcctc 6060
ccccaacacc tccatctgca ggcaggaagt ggagtccact tgtaacctct gttcccatga 6120
cagagccctt tgaatacctg aacccctcat gacagtaaga gacatttatg ttctctgggg 6180
ctggggctga aggagcccac tggttctcac ttagcctatc tggctcctgt cacaaaaaaa 6240
aaaaaagaaa aaaaaaaagc ataaaccaag ttactaagaa cagaagttgg tttataacgt 6300
tctggggcag caaagcccag atgaagggac ccatcgaccc tctctgtcca tatcctcatg 6360
ctgcagaagt acaggcaagc tcctttaagc ctcatatagg aacactagcc tcactcatga 6420
gggttttact ccatgacctg tcaacctcaa agccttcaac atgaggactc caacgtaaat 6480
ttggggacag aagcactcag accatacccc agcaccacac cctcctaacc tcagggtagc 6540
tgtcattctc ctagtctcct ctcttgggcc tttagaaccc ccatttcctt ggggtaatgt 6600
ctgatgtttt tgtccctgtc ataaaaagat ggagagactg tgtccagcct ttgattccta 6660
cttcctacaa tcccaggttc taatgaagtt tgtggggcct gatgccctga gttgtatgtg 6720
atttaataat aaaaaagcaa gatacagcat gtgtgtggac tgagtgaggg ccacagggat 6780
ctaaaagcca agtgtgaggg gacccagcta cagcaggcag catcctgagc ctggaatctc 6840
ttcaggacaa gaattctcca tatacctacc tactctgggg agtaggtggc cagagttcaa 6900
gcttcccttа gtaccaacta ccactggctg tgctcttact gaaggcagac atggcactga 6960
gtgctgtcca tctgtcactc atctccacag ccattcctaa tgtgtggggt gggagccatc 7020

accaaacccc attttcagat aaggacacag gctcagagag gcttgtgtgg agaaaagtag 7080
cagcagaatt cagagagctg ggtctcctgc agcaccttgg actgccagca gccacagtgc 7140
ttgtcacaca gcacatactc aaaagaatgc cagccccctc agcctagagt gcctggcctt 7200
tctttcagat gaggaagagg gtcaaagctg ttagcttgcc caccatatga ccacatacat 7260
gaccaacagc ttgagggagg gaggattact gtggctccca gcctgagagg tgggacaccc 7320
aaatgtatta ggtccttgaa tcagggctga ccttgtgatt cagtcactcc taccagaatg 7380
ctggggaatg gggatgccaa aggcaaagga ggctttctaa ggtgtggtgt aagataggca 7440
tttctgcttc catgtacacc tgtgagcaga gtaggaaggc cctgtggaga atatatccca 7500
caaaccagta gcctttcctg gcagtgggtg aatactgcca ccctataccc ctatgcaagg 7560
ccagtagaac cacccaaccc acaacatcta gagaaattac aggtcatctt aagcctctaa 7620
attgtggaga aactcgacat gcgcacgatt cctaacctgc tagcctaggg tgcggggtgg 7680
ataatttaag gaaactgggg tttcttatag aatcggaggc tccatgaagt caccctgaca 7740
agaggtcagc aatagccagc agcagtggct actcctaagc ctccagacag agcaccctgt 7800
gaatgtacct tattctcaca tctgggtgtc tataggtgtg actgggtcag atgtcaccca 7860
ggccattgca atgggccctt agccccatgg ggtgttggga tagcagccaa gcagctccca 7920
tgctgagata ctgcctgcag tagactgatg gataagaaaa caaggcccaa aatgttttct 7980
ttccagactt gatctttctt tgttcaaaaa tgctgttttc ccttaaactt gcccaaaccc 8040
attgttttgc agttgaggaa aataaggcat agaaagatta aaggaagttt ctgaggttac 8100
agagcaaagt actggcttca cctgaaatag acaggtgtgc cctgatcctg atttgagctc 8160

<210> 2
<211> 352
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 2
Met Ala Leu Thr Gly Gly Ser Thr Ala Ser Glu Glu Ala Asp Glu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val
20 25 30

Val Ser Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys
35 40 45

Tyr Leu Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val
50 55 60

Thr Phe Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser
65 70 75 80

Thr Leu Ala Thr Cys Cys Pro Gly Thr Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn
85 90 95

Leu Asp Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe
100 105 110

Ile Gly Met Ile Ser Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val
115 120 125

Ala Phe Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu
130 135 140

Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu
145 150 155 160

Thr Cys Gly Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu
165 170 175

Gly Ala Glu Gly Thr Leu Ser Leu Ile Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu
180 185 190

Ala Ser Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu
195 200 205

Pro Ala Val Asp Asn Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val
210 215 220

Asn Ala Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Glu Leu
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Asp Phe Ala His Leu Tyr Ser Ala His Phe Trp Leu
245 250 255

Met Met Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr
260 265 270

Gly Leu Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly
275 280 285

Thr Ala Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu
290 295 300

Glu Thr Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly
305 310 315 320

Gly Ser Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr
325 330 335

Gln Glu Asp Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val
340 345 350

<210> 3
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic RNA

<400> 3
uaaccucugc cucaaguaca gc 22

<210> 4
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic RNA

<400> 4
guacuugagg cagagguua 19

<210> 5
<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

atgcatgcca ccatgaaaaa gcctgaactc acc 33

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

ggatcccagg ctttacactt tatgcttc 28

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

ggaatgcagc ttcctcaagg gactcgc 27

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8
gcactcgtcc gagggcaaag gaatagc 27

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9
tgtgctggga attgaaccca ggac 24

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

ctacttgtct gtgctttctt cc 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/008956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/11, C12N15/00, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/53, C12P21/02, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/00-90, C12N5/00-9/99, C12Q1/00-70, G01N33/00-98, C12P21/00-08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 00/056891 A2 (INCYTE PHARM. INC.), 28 September, 2000 (28.09.00), & JP 2003-525025 A & EP 1210419 A2 & US 2003/0068311 A1	1-10/11-49
X/A	WO 01/053312 A1 (HYSEQ INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), & JP 2004-515206 A & EP 1242443 A1 & US 2002/0197679 A1	1-10-11-49
X/A 3	EP 1074617 A2 (HELIX RES. INST.), 07 February, 2001 (07.02.01), & JP 2002-171977 A & JP 2002-191363 A & US 2003/0017480 A1 & US 2003/0082776 A & US 2003/0157569 A1	1-10/11-49

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 September, 2004 (21.09.04)	07 December, 2004 (07.12.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/008956

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	EP 1130094 A2 (HELIX RES. INST.), 05 September, 2001 (05.09.01), & JP 2002-017375 A	1-8/9-49
P,X	WO 03/85102 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 16 October, 2003 (16.10.03), & US 4748116 A	1-49
P,X/P,Y	WO 03/85118 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 16 October, 2003 (16.10.03), & US 4748116 A	1-8/9-49

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP2004／008956

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl ⁷ C12N 15/11, C12N 15/00, C12N 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/53, C12P 21/02, C12P 21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl ⁷ C12N 15/00～90, C12N 5/00～9/99, C12Q 1/00～70, G01N 33/00～98, C12P 21/00～08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X／A	WO 00/056891 A2 (INCYTE PHARM. INC.) 2000.09.28 & JP 2003-525025 A & EP 1210419 A2 & US 2003/0068311 A1	1-10/ 11-49
X／A	WO 01/053312 A1 (HYSEQ INC.) 2001.07.26 & JP 2004-515206 A & EP 1242443 A1 & US 2002/0197679 A1	1-10/ 11-49

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
21. 09. 2004	07.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4B	8931
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	齊藤 真由美		
	電話番号 03－3581－1101 内線 3448		

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X／A 3	EP 1074617 A2 (HELIX RES. INST.) 2001.02.07 & JP 2002-171977 A & JP 2002-191363 A & US 2003/0017480 A1 & US 2003/0082776 A & US 2003/0157569 A1	1-10/ 11-49
X／A	EP 1130094 A2 (HELIX RES. INST.) 2001.09.05 & JP 2002-017375 A	1-8／9-49
PX	WO 03/85102 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK.) 2003.10.16 & US 4748116 A	1－49
PX/PY	WO 03/85118 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK.) 2003.10.16 & US 4748116 A	1-8／9-49

第Ⅳ欄　要約（第１ページの５の続き）

本発明は、フコーストランスポーターをコードする遺伝子、フコーストランスポーターポリペプチド、フコーストランスポーターに結合する化合物及びフコース輸送活性を阻害する化合物のスクリーニング方法、フコーストランスポーター機能が阻害された細胞、並びにフコーストランスポーター発現が阻害された細胞が提供され、さらに組換えタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質の製造方法、宿主細胞を用いて組換えタンパク質を製造するときに宿主細胞のゴルジ体内に存在するフコースを減少させることを特徴とするタンパク質へのフコースの付加阻害方法、ゴルジ体内に存在するフコースが減少した細胞で抗体を作製することを特徴とする抗体の細胞障害活性を増加させる方法、及びゴルジ体内に存在するフコースが減少しているゴルジ体を有する細胞である。