

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6345688号
(P6345688)

(45) 発行日 平成30年6月20日 (2018. 6. 20)

(24) 登録日 平成30年6月1日 (2018. 6. 1)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/47 (2006. 01)	C O 7 K 14/47
C O 7 K 14/435 (2006. 01)	C O 7 K 14/435
C O 7 K 14/46 (2006. 01)	C O 7 K 14/46
C O 7 K 14/025 (2006. 01)	C O 7 K 14/025

請求項の数 21 (全 178 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-545857 (P2015-545857)	(73) 特許権者	516127178
(86) (22) 出願日	平成25年12月5日 (2013. 12. 5)		ソラ・バイオサイエンス・エルエルシー
(65) 公表番号	特表2016-500371 (P2016-500371A)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州〇 2 1
(43) 公表日	平成28年1月12日 (2016. 1. 12)		〇 9, ボストン, ユニオン・ワーフ 2 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/073442		4
(87) 国際公開番号	W02014/089375	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成26年6月12日 (2014. 6. 12)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成27年8月3日 (2015. 8. 3)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	61/733, 743		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成24年12月5日 (2012. 12. 5)	(74) 代理人	100101373
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 竹内 茂雄
(31) 優先権主張番号	61/733, 884	(74) 代理人	100118902
(32) 優先日	平成24年12月5日 (2012. 12. 5)		弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質発現増強ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (c) からなる群から選択される、タンパク質発現増強ポリペプチド：

(a) J タンパク質の J ドメインの活性断片であって、

前記 J ドメインの活性断片が以下からなる群から選択される：

I - K - K - A - Y - R - K - L - A (配列番号 4 8)、

I - R - K - A - Y - R - K - L - S - L - T - L (配列番号 8 3)、

I - K - K - Q - Y - R - L - L - S - L - K - Y (配列番号 8 4)、

I - K - K - A - F - H - K - L - A - M - K - Y (配列番号 8 5)、

I - R - Q - A - F - K - K - L - A - L - K - L (配列番号 8 6)、

I - I - K - A - Y - R - K - L - A - L - Q - W (配列番号 8 7)、

I - A - R - A - Y - R - Q - L - A - R - R - Y (配列番号 8 8)、

I - K - R - A - Y - R - R - Q - A - L - R - Y (配列番号 8 9)、

I - K - K - S - Y - R - K - L - A - L - K - Y (配列番号 9 0) および

I - K - K - A - Y - K - R - L - A - M - K - Y (配列番号 9 1)；

(b) 式 I のアミノ酸配列を含む、J ドメインアナログポリペプチド：

(I) $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9$ (配列番号 3 2 6)：(式中、 X_1 が I、L、V、A または M であり、ジペプチド $X_2 - X_3$ が KR、KK、RK、RR、AK、AR、KA、IK、NK、KQ、RQ、RD からなる群から選択され、

10

20

X 4がA、S、T、R、Q、E、F、C、またはIであり、
X 5がYまたはFであり、
ジペプチドX 6 - X 7がKR、KK、RK、RR、RQ、FR、RL、KL、HK、L
K、QK、KVからなる群から選択され、
ジペプチドX 8 - X 9がLA、LL、AL、AA、LC、LV、QA、KA、LS、L
I、LY、およびRAからなる群から選択される)

であって、

50アミノ酸未満の長さである、前記Jドメインアナログポリペプチド；ならびに

(c) 以下からなる群から選択されるデカペプチド：

IKKAYKLALQ (配列番号49)、

IKKAYRLALQ (配列番号50)、

IKKAYRKALQ (配列番号51)、および

IKKAYRKL LQ (配列番号52)；

であって、

(i) 標的タンパク質の融合パートナーまたは(ii) 標的タンパク質結合ドメインの融合パートナーとして、標的タンパク質と共発現された場合に、目的の標的タンパク質の発現を増強する能力を有する、前記タンパク質発現増強ポリペプチド。

【請求項2】

タンパク質発現増強ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、Jドメインの活性断片である、請求項1に記載のポリペプチド：

I - K - K - A - Y - R - K - L - A (配列番号48)、

I - R - K - A - Y - R - K - L - S - L - T - L (配列番号83)、

I - K - K - Q - Y - R - L - L - S - L - K - Y (配列番号84)、

I - K - K - A - F - H - K - L - A - M - K - Y (配列番号85)、

I - R - Q - A - F - K - K - L - A - L - K - L (配列番号86)、

I - I - K - A - Y - R - K - L - A - L - Q - W (配列番号87)、

I - A - R - A - Y - R - Q - L - A - R - R - Y (配列番号88)、

I - K - R - A - Y - R - R - Q - A - L - R - Y (配列番号89)、

I - K - K - S - Y - R - K - L - A - L - K - Y (配列番号90) および

I - K - K - A - Y - K - R - L - A - M - K - Y (配列番号91)。

【請求項3】

Jドメインアナログポリペプチドが式Iのアミノ酸配列を含み：

(I) X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 (配列番号326)：

X 1がI、L、V、AまたはMであり、

ジペプチドX 2 - X 3がKR、KK、RK、RR、AK、AR、KA、IK、NK、KQ、RQ、RDからなる群から選択され、

X 4がA、S、T、R、Q、E、F、C、またはIであり、

X 5がYまたはFであり、

ジペプチドX 6 - X 7がKR、KK、RK、RR、RQ、FR、RL、KL、HK、LK、QK、KVからなる群から選択され、

ジペプチドX 8 - X 9がLA、LL、AL、AA、LC、LV、QA、KA、LS、LI、LY、およびRAからなる群から選択される、

50アミノ酸未満の長さである、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

タンパク質発現増強ポリペプチドが以下のアミノ酸配列の1つを含む、請求項1に記載のポリペプチド：

10

20

30

40

【表 1】

配列番号	アミノ酸配列
	123456789012345
配列番号 48	IKKAYRKLA
配列番号 49	IKKAYKLALQ
配列番号 50	IKKAYRLALQ
配列番号 51	IKKAYRKALQ
配列番号 52	IKKAYRKLLQ
配列番号 53	IKKYRKLA
配列番号 54	IKKAYKLA
配列番号 55	IKKAYRLA
配列番号 56	IKKAYRKA
配列番号 57	LKKAYRKLA
配列番号 58	VKKAYRKLA
配列番号 59	MKKAYRKLA
配列番号 60	AKKAYRKLA
配列番号 61	IAKAYRKLA
配列番号 62	IKAAAYRKLA
配列番号 63	IKKRYRKLA
配列番号 64	IKKSYRKLA
配列番号 65	IKKQYRKLA
配列番号 66	IKKEYRKLA
配列番号 67	IKKFYRKLA
配列番号 68	IKKCYRKLA
配列番号 69	IKKAFRKLA
配列番号 70	IKKAWRKLA
配列番号 71	IKKAYRKQA
配列番号 72	IKKAYRKMA
配列番号 73	IKKAYRKIA
配列番号 74	IKKAYRKAA
配列番号 75	IKKAYRKVA
配列番号 76	IKKAYRKRA
配列番号 77	IKKAYRKLM
配列番号 78	IKKAYRKLI
配列番号 79	IKKAYRKLV
配列番号 80	IKKAYRKLC
配列番号 81	IKKAYRKLS
配列番号 82	IKKAYRKLY
配列番号 83	IRKAYRKLSLTL
配列番号 84	IKKQYRLLSLKY
配列番号 85	IKKAFHKLAMKY
配列番号 86	IRQAFKKLALKL
配列番号 87	IIKAYRKALQW
配列番号 88	IARAYRQLARRY
配列番号 89	IKRAYRRQALRY
配列番号 90	IKKSYRKLALKY
配列番号 91	IKKAYKRLAMKY

10

20

30

40

。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の単離された核酸分子を含む核酸ベクター分子。

50

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸ベクター分子を含む宿主細胞。

【請求項 8】

タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質であって、

タンパク質発現増強ポリペプチドは以下の (a) ~ (c) からなる群から選択され：

(a) J タンパク質の J ドメインの活性断片であって、

前記 J ドメインの活性断片が以下からなる群から選択される：

I - K - K - A - Y - R - K - L - A (配列番号 48)、

I - R - K - A - Y - R - K - L - S - L - T - L (配列番号 83)、

I - K - K - Q - Y - R - L - L - S - L - K - Y (配列番号 84)、

I - K - K - A - F - H - K - L - A - M - K - Y (配列番号 85)、

I - R - Q - A - F - K - K - L - A - L - K - L (配列番号 86)、

I - I - K - A - Y - R - K - L - A - L - Q - W (配列番号 87)、

I - A - R - A - Y - R - Q - L - A - R - R - Y (配列番号 88)、

I - K - R - A - Y - R - R - Q - A - L - R - Y (配列番号 89)、

I - K - K - S - Y - R - K - L - A - L - K - Y (配列番号 90) および

I - K - K - A - Y - K - R - L - A - M - K - Y (配列番号 91)；

(b) 式 I のアミノ酸配列を含む、J ドメインアナログポリペプチド：

(I) X1 - X2 - X3 - X4 - X5 - X6 - X7 - X8 - X9 (配列番号 326)：

(式中、X1 が I、L、V、A または M であり、

ジペプチド X2 - X3 が KR、KK、RK、RR、AK、AR、KA、IK、NK、KQ、RQ、RD からなる群から選択され、

X4 が A、S、T、R、Q、E、F、C、または I であり、

X5 が Y または F であり、

ジペプチド X6 - X7 が KR、KK、RK、RR、RQ、FR、RL、KL、HK、LK、QK、KV からなる群から選択され、

ジペプチド X8 - X9 が LA、LL、AL、AA、LC、LV、QA、KA、LS、LI、LY、および RA からなる群から選択される)

であって、

50 アミノ酸未満の長さである、前記 J ドメインアナログポリペプチド； ならびに

(c) 以下からなる群から選択されるデカペプチド：

IKKAYKLALQ (配列番号 49)、

IKKAYRLALQ (配列番号 50)、

IKKAYRKALQ (配列番号 51)、および

IKKAYRKLALQ (配列番号 52)；

であって、

標的タンパク質を単独で発現させた場合の発現レベルに比べて増強されたレベルで発現される、前記融合タンパク質。

【請求項 9】

タンパク質発現増強ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、J ドメインの活性断片である、請求項 8 に記載の融合タンパク質：

I - K - K - A - Y - R - K - L - A (配列番号 48)、

I - R - K - A - Y - R - K - L - S - L - T - L (配列番号 83)、

I - K - K - Q - Y - R - L - L - S - L - K - Y (配列番号 84)、

I - K - K - A - F - H - K - L - A - M - K - Y (配列番号 85)、

I - R - Q - A - F - K - K - L - A - L - K - L (配列番号 86)、

I - I - K - A - Y - R - K - L - A - L - Q - W (配列番号 87)、

I - A - R - A - Y - R - Q - L - A - R - R - Y (配列番号 88)、

I - K - R - A - Y - R - R - Q - A - L - R - Y (配列番号 89)、

I - K - K - S - Y - R - K - L - A - L - K - Y (配列番号 90) および
I - K - K - A - Y - K - R - L - A - M - K - Y (配列番号 91)。

【請求項 10】

Jドメインアナログポリペプチドが式 I のアミノ酸配列を含み：

(I) X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 (配列番号 326)：

X 1 が I、L、V、A または M であり、

ジペプチド X 2 - X 3 が KR、KK、RK、RR、AK、AR、KA、IK、NK、KQ、
RQ、RD からなる群から選択され、

X 4 が A、S、T、R、Q、E、F、C、または I であり、

X 5 が Y または F であり、

ジペプチド X 6 - X 7 が KR、KK、RK、RR、RQ、FR、RL、KL、HK、L
K、QK、KV からなる群から選択され、

ジペプチド X 8 - X 9 が LA、LL、AL、AA、LC、LV、QA、KA、LS、L
I、LY、および RA からなる群から選択される、

50 アミノ酸未満の長さである、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

タンパク質発現増強ポリペプチドが以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、請求項 8 に記載
の融合タンパク質：

【表 2】

配列番号	アミノ酸配列
	123456789012345
配列番号 48	IKKAYRKLA
配列番号 49	IKKAYKLALQ
配列番号 50	IKKAYRLALQ
配列番号 51	IKKAYRKALQ
配列番号 52	IKKAYRKLLQ
配列番号 53	IKKYRKLA
配列番号 54	IKKAYKLA
配列番号 55	IKKAYRLA
配列番号 56	IKKAYRKA
配列番号 57	LKKAYRKLA
配列番号 58	VKKAYRKLA
配列番号 59	MKKAYRKLA
配列番号 60	AKKAYRKLA
配列番号 61	IAKAYRKLA
配列番号 62	IKAAYRKLA
配列番号 63	IKKRYRKLA
配列番号 64	IKKSYRKLA
配列番号 65	IKKQYRKLA
配列番号 66	IKKEYRKLA
配列番号 67	IKKFYRKLA
配列番号 68	IKKCYRKLA
配列番号 69	IKKAFRKLA
配列番号 70	IKKAWRKLA
配列番号 71	IKKAYRKQA
配列番号 72	IKKAYRKMA
配列番号 73	IKKAYRKIA
配列番号 74	IKKAYRKAA
配列番号 75	IKKAYRKVA
配列番号 76	IKKAYRKRA
配列番号 77	IKKAYRKLM
配列番号 78	IKKAYRKLI
配列番号 79	IKKAYRKLV
配列番号 80	IKKAYRKLC
配列番号 81	IKKAYRKLS
配列番号 82	IKKAYRKLY
配列番号 83	IRKAYRKLSLTL
配列番号 84	IKKQYRLLSLKY
配列番号 85	IKKAFHKLAMKY
配列番号 86	IRQAFKKLALKL
配列番号 87	IIKAYRKALQW
配列番号 88	IARAYRQLARRY
配列番号 89	IKRAYRRQALRY
配列番号 90	IKKSYRKALKY
配列番号 91	IKKAYKRLAMKY

10

20

30

40

。

【請求項 1 2】

請求項 8 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の単離された核酸分子を含む核酸ベクター分子。

50

【請求項 14】

請求項 13 に記載の核酸ベクター分子を含む宿主細胞。

【請求項 15】

タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質を発現させる方法であって、請求項 14 に記載の宿主細胞を融合タンパク質を発現させるために十分な条件下で培養することを含む、前記方法。

【請求項 16】

タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質を発現させる方法であって、請求項 8 に記載の融合タンパク質をコードする構造遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に形質移入することと、形質移入された該宿主細胞を該融合タンパク質の発現を生じる条件下で培養することを含む、前記方法。

10

【請求項 17】

タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質を発現させる方法であって、下記工程を含む前記方法：

- 1) 請求項 8 に記載の融合タンパク質をコードする組換え遺伝子配列を構築する工程、
- 2) 該組換え遺伝子配列を発現ベクターに挿入し、該組換え遺伝子配列が転写プロモーター配列と作動可能に連結された組換え発現ベクターを作製する工程、
- 3) 該プロモーター配列と適合する宿主細胞に該組換え発現ベクターを形質移入する工程、および
- 4) 該形質移入宿主細胞を、該融合タンパク質の発現が可能な条件下で培養する工程。

20

【請求項 18】

タンパク質機能を提供する天然の分泌タンパク質の分泌が不足している哺乳類患者細胞にタンパク質機能を回復させるための医薬の製造方法であって、タンパク質発現増強ポリペプチドを分泌タンパク質と連結させた請求項 8 に記載の融合タンパク質をコードする外因性の核酸分子を、該患者から採取した細胞に挿入することを含み、ここで該融合タンパク質が該核酸分子を挿入された該細胞内で発現されることによって、外因性核酸の非存在下では分泌が不足している天然の分泌タンパク質の機能が提供される、前記医薬の製造方法。

【請求項 19】

患者が、患者体内での天然の分泌タンパク質の分泌不足に関連した疾患を有する、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

疾患が、プリオン関連疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症（CF）、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症からなる群より選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

患者が、嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質の分泌が不足したヒト患者であり、疾患が嚢胞性線維症である、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

40

【0001】

本出願は、2012年12月5日出願の米国特許仮出願第61/733, 884号および2012年12月5日出願の米国特許仮出願第61/733, 743号に対する優先権の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は改変タンパク質の分野の発明である。具体的には、本発明はタンパク質の発現を増強するポリペプチド、および当該タンパク質発現増強ポリペプチドをコードする核酸分子を目的とする。本発明はさらに、目的のタンパク質の生成レベルを増加する方法を提供する。

50

【背景技術】

【0003】

遺伝子改変細胞の培養液中に目的のタンパク質を研究、開発、または商業用途に十分な量を容易に単離できるレベルで発現するには、多様な組換え技術と細胞培養方法を最適化する必要がある。このような技術には、所望のタンパク質分子をコードする核酸分子を単離し、組換え、所望のコード配列を適切な転写要素および翻訳要素と作動可能に連結し、改変遺伝子材料を適切な発現ベクターへ挿入し、得られた組換え発現ベクターを適合する宿主細胞へ導入し、組換え発現ベクターを含む宿主細胞を所望の組換えタンパク質の発現が可能な条件下で培養するインビトロの方法が含まれる。このような方法を適切に選択し最適化することによって、細菌宿主細胞、真菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、哺乳類宿主細胞などの多様な宿主細胞に由来する多様な組換えタンパク質の発現と使用が可能になった。

10

【0004】

組換えや細胞培養の方法には多くの進歩があったが、それでも未だ適切なタンパク質折り畳みを確実にするという課題が、有用な量の所望の組換えタンパク質を生産するための非常に幅広い努力に障害となる場合がある。すべてのタンパク質は、目的位置で適切に機能するために適切な二次元および三次元の立体構造を得なければならない。適切な立体構造によって、タンパク質は細胞または多細胞生物に対し、目的位置で（たとえば細胞質、核、細胞内構造、細胞小器官、細胞膜、または細胞外の（分泌された）位置で）目的の機能（たとえば酵素活性、シグナル伝達または構造的特徴）を確実に与えることができる。適切な構造および立体構造のための情報はタンパク質のアミノ酸配列に存在するが、全体の細胞内環境や多様な刺激、および酸化ストレス、栄養枯渇、高温といった環境ストレスによって、内因的に生じたタンパク質の適切な折り畳みすら困難になり、多くのタンパク質分子が望ましくない構造になるため目的の機能を細胞に与えることができなくなる可能性がある。適切な機能的立体構造を得られないまたは維持できないという頻繁に生じるリスクに対処するため、細胞は新生タンパク質や成熟タンパク質が適切な立体構造へと折り畳みおよび再折り畳みするよう補助する分子シャペロンとして機能するタンパク質の系を有する。70 kDa熱ショックタンパク質（本明細書中では「Hsp70」という）は多様な種の細胞内に最も広く存在するシャペロンタンパク質の種類の1つである。Hsp70の機構にはJタンパク質などの補助因子（すなわちシャペロン補助因子）タンパク質およびヌクレオチド交換因子（nucleotide exchange factor（NEF））が関与する。

20

30

【0005】

Hsp70シャペロンのタンパク質折り畳みの機構の最新モデルでは、Hsp70はATP結合状態とADP結合状態を循環する。このモデルでは、Jタンパク質が折り畳みまたは再折り畳みが必要なタンパク質（「クライアントタンパク質」という）に結合し、ATP結合状態のHsp70（Hsp70-ATP）と相互作用する。Jタンパク質とクライアントタンパク質との複合体がHsp70-ATPに結合すると、ATP加水分解が刺激され、Hsp70タンパク質ではヘリックスの蓋状の部分を開じる立体構造の変化が起こり、それによってクライアントタンパク質とHsp70-ADPとの相互作用が安定し、Jタンパク質は遊離されて別のクライアントタンパク質と自由に結合する。Hsp70-ADPに結合している間、クライアントタンパク質には適切な立体構造に折り畳みまたは再折り畳みできる環境が与えられる。次に、ヌクレオチド交換因子（NEF）がHsp70-ADPに結合し、その結果ADPが遊離されATPが結合する。次いで、クライアントタンパク質はHsp70-ATPに対する親和性が低い（Jタンパク質がない場合）遊離される。クライアントタンパク質が適切な立体構造を得られなかった場合、クライアントタンパク質にJタンパク質が再結合し、再び循環することができる。Kampinga et al., Nat. Rev., 11: 579-592 (2010)を参照のこと。このように、このモデルによれば、Jタンパク質は個々のクライアントタンパク質と結合し、Hsp70シャペロンタンパク質とも結合して橋渡しの機能をすることによってHsp70機構において重要な役割を果たしている。この橋渡しの機能によって多様なクライアントタンパク質の捕捉とHsp

40

50

70 機構への提示が容易になり、適切な立体構造への折り畳みまたは再折り畳みが促される。Hsp70 シャペロン機構がタンパク質を適切な機能的立体構造へ折り畳みまたは再折り畳みさせようとしてもできなかった場合、Hsp70 シャペロン機構は不適切に折り畳まれたタンパク質がアミノ酸の分解と再利用のために細胞のタンパク質分解系（たとえばプロテアソーム）へ移行されるのを促進することもできる。J タンパク質の重要な役割を含め、Hsp70 シャペロン機構の概説についてはKampinga et al, Nature Rev., 11: 579-592 (2010)およびVoisine et al., Neurobiol. Dis., 40: 12-20 (2010)を参照のこと。

【0006】

発現されたタンパク質はこのように、適切な立体構造を維持するためのHsp70 機構による厳しい品質管理システムのもとに置かれる。タンパク質を適切に折り畳むという課題は、多様な組換え宿主細胞内で発現される外因性の（組換えの）機能性タンパク質を有用な量で生成する場合に特に懸念される課題である。この課題は真核生物の宿主細胞でも原核生物の宿主細胞でも生じ得る。細菌宿主細胞内で発現した外因性タンパク質が適切に折り畳みできなかった場合、その外因性タンパク質の不活性な分子が有毒性の可能性のある大きな凝集体を細胞内に形成することがよくある。このような凝集体を「封入体」といい、これは、無効なタンパク質折り畳みの結果、疎水性ドメインが露出した非機能立体構造となり、それによって他の不適切に折り畳まれたタンパク質分子との結合や凝集が促進されたものと考えられている。

【0007】

タンパク質をコードする野生型遺伝子に変異すると、コードされた変異型のタンパク質がさらに細胞内で発現される可能性がある。発現されたこのような変異タンパク質は通常、野生型タンパク質の適切な機能的立体構造を得ることができず、不活性な凝集体を形成する可能性がある。このような不適切に折り畳まれた変異タンパク質種は一般的に、Hsp70 機構によってアミノ酸の分解と再利用のために細胞のタンパク質分解系へ誘導される。不適切に折り畳まれた変異タンパク質を除去しても、当然、細胞には機能性タンパク質の損失が残り、このような機能の損失の結果は細胞を衰弱させ、あるいは致命的にもなる可能性がある。実際、プリオン関連疾患（伝染性海綿状脳症）やアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、および嚢胞性線維症などの多くの疾患において、適切に折り畳まれた機能性タンパク質種の損失が実証または示唆されている。

【0008】

真核生物に見られるタンパク質のBAGファミリーのメンバーは、ヌクレオチド交換因子（NEF）であり、N末端ドメインは多様であるが、Hsp70のATPaseドメインと相互作用できるHsp70 結合性のC末端ドメイン（BAGドメイン）は保存されている。たとえばKampinga et al., Nat. Rev. Biol., 11:579-592 (2010)を参照のこと。このように、BAGタンパク質はHsp70 シャペロン機構の動員に参与するよう設計されたタンパク質に合う形態、結合ドメイン、結合特異性を有する。BAGタンパク質はNEFとしてHsp70 機構に参与できるが、多くの研究では、BAGタンパク質が細胞の増殖、休眠またはアポトーシスの促進、転写複合体の形成の調節、シグナル伝達の調節などの多様な活性を制御する調節メカニズムに主に参与する可能性があることが示唆されている。たとえば、Takayama et al., Nat.Cell. Biol., 3: E237-E241 (2001)による概説を参照のこと。近年、所望の組換えタンパク質をBAGドメインに連結した場合、得られた融合タンパク質は所望のタンパク質単独の場合よりも高いレベルで発現されることが報告されている。国際公開第2012/087835号（A2）を参照のこと。

【0009】

一般的に、細胞内でのタンパク質の発現レベルが増加する（組換え遺伝子発現系で容易に起こり得る）と、そのタンパク質が適切な機能的立体構造へ折り畳みまたは再折り畳みしないリスクも増加する。したがって、所望の外因性または内因性タンパク質の発現を増強することが絶えず望まれてきたのと同時に、細胞内で発現された外因性および内因性タンパク質の適切な折り畳みを促進する、すなわち適切な立体構造の機能性タンパク質の産

10

20

30

40

50

生を増強するための手段が必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、細胞が産生する目的の標的タンパク質の発現レベルを増強するための組成物および方法を提供する。特に、本発明は、遺伝子改変融合タンパク質に組み込むことができ、宿主細胞によって発現されるときに特定の目的の標的タンパク質の目的位置での発現レベルを増強することができるタンパク質発現増強ポリペプチドを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

ある態様では、本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドは以下の（a）～（d）からなる群から選択される：

（a）Jタンパク質から単離されたJドメイン；

（b）Jドメインから単離されたタンパク質発現増強ポリペプチド断片；

（c）Jドメインから単離されたタンパク質発現増強ポリペプチドアナログであって、該Jドメインアナログポリペプチドは式Iのアミノ酸配列を有する、タンパク質発現増強ポリペプチドアナログ：

（I）X1 - X2 - X3 - X4 - X5 - X6 - X7 - X8 - X9（配列番号47）：

（式中、X1はイソロイシン（I）、ロイシン（L）、バリン（V）、アラニン（A）、またはメチオニン（M）であり、

X2およびX3はそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、ただし一方または両方がKまたはRであり、

X4は任意のアミノ酸であるか；X1～X3が存在しX5～X9が存在する場合、X4は存在しなくてもよく、

X5はチロシン（Y）、トリプトファン（W）、またはフェニルアラニン（F）であり、X6およびX7はそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、ただし一方または両方がリジン（K）またはアルギニン（R）であるか；X6およびX7のいずれか一方がKまたはRであり、X1～X5が存在しX8およびX9が存在する場合、X6およびX7の他方は存在しなくてもよく、

X8およびX9は任意のアミノ酸であり、ただし一方または両方がロイシン（L）またはアラニン（A）であるか；X8およびX9の一方がLまたはAでありX1～X7が存在する場合、X8およびX9の他方は存在しなくてもよい）；および

（d）以下からなるデカペプチド群から選択される単離されたタンパク質発現増強ポリペプチド：

（d）以下からなるデカペプチド群から選択される単離されたタンパク質発現増強ポリペプチド：

IKKAYKLALQ（配列番号49）、

IKKAYRLALQ（配列番号50）、

IKKAYRKALQ（配列番号51）、および

IKKAYRKLALQ（配列番号52）。

【0012】

本発明に従い、タンパク質発現増強ポリペプチドによって、宿主細胞内で発現される目的の標的タンパク質の発現レベルは該タンパク質発現増強ポリペプチドが存在しない場合の目的の標的タンパク質の発現レベルに比べて増強される。本発明のポリペプチドを用いることによって、産生細胞の所望の位置（区画）に存在する所望の組換えタンパク質の量を増加させる手段が得られる。

【0013】

特定の態様では、本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドは、下記の表1-1～表1-4に示すJドメイン配列から選択されるアミノ酸配列を有する単離されたJドメインである。

【0014】

本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドは、Erджタンパク質、SV40ラージT

10

20

30

40

50

抗原、または哺乳類のシステインストリングタンパク質 α (CSP- α) から単離された J ドメインであることが好ましい。本発明にかかる、Erdj タンパク質から単離された J ドメインとしては、Erdj 1、Erdj 2、Erdj 3、Erdj 4、Erdj 5、Erdj 6、または Erdj 7 から単離された J ドメインが好ましい。Erdj 3 から単離された J ドメインが特に好ましい。

【0015】

別の態様では、本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドは J ドメインのポリペプチド断片であり、以下から選択されるアミノ酸配列を有する：

I - K - K - A - Y - R - K - L - A (配列番号 48)、
 I - R - K - A - Y - R - K - L - S - L - T - L (配列番号 83)、
 I - K - K - Q - Y - R - L - L - S - L - K - Y (配列番号 84)、
 I - K - K - A - F - H - K - L - A - M - K - Y (配列番号 85)、
 I - R - Q - A - F - K - K - L - A - L - K - L (配列番号 86)、
 I - I - K - A - Y - R - K - L - A - L - Q - W (配列番号 87)、
 I - A - R - A - Y - R - Q - L - A - R - R - Y (配列番号 88)、
 I - K - R - A - Y - R - R - Q - A - L - R - Y (配列番号 89)、
 I - K - K - S - Y - R - K - L - A - L - K - Y (配列番号 90) および
 I - K - K - A - Y - K - R - L - A - M - K - Y (配列番号 91)。

10

【0016】

別の態様では、タンパク質発現増強ポリペプチドは上記式 I のアミノ酸配列を有する J ドメインアナログポリペプチドである。特定の態様では、本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドは配列 X1 - X2 - X3 - X4 - X5 - X6 - X7 - X8 - X9 (配列番号 326) を有するポリペプチドを含み、

20

X1 は I、L、V、A または M であり、
 ジペプチド X2 ~ X3 は KR、KK、RK、RR、AK、AR、KA、IK、NK、KQ、RQ、RD からなる群から選択され、
 X4 は A、S、T、R、S、Q、E、F、C、または I であり、
 X5 は Y または F であり、
 ジペプチド X6 - X7 は KR、KK、RK、RR、RQ、FR、RL、KL、HK、LK、QK、KV からなる群から選択され、
 ジペプチド X8 - X9 は LA、LL、AL、AA、LC、LV、QA、KA、LS、LI、LY、および RA からなる群から選択される。

30

【0017】

特定の態様では、本発明の J ドメインアナログポリペプチドは以下のアミノ酸配列の 1 つを含む。

【0018】

【表 A】

配列番号	アミノ酸配列
	123456789012345
配列番号 48	IKKAYRKLA
配列番号 49	IKKAYKLALQ
配列番号 50	IKKAYRLALQ
配列番号 51	IKKAYRKALQ
配列番号 52	IKKAYRKLLQ
配列番号 53	IKKYRKLA
配列番号 54	IKKAYKLA
配列番号 55	IKKAYRLA
配列番号 56	IKKAYRKA
配列番号 57	LKKAYRKLA
配列番号 58	VKKAYRKLA
配列番号 59	MKKAYRKLA
配列番号 60	AKKAYRKLA
配列番号 61	IAKAYRKLA
配列番号 62	IKAAYRKLA
配列番号 63	IKKRYRKLA
配列番号 64	IKKSYRKLA
配列番号 65	IKKQYRKLA
配列番号 66	IKKEYRKLA
配列番号 67	IKKFYRKLA
配列番号 68	IKKCYRKLA
配列番号 69	IKKAFRKLA
配列番号 70	IKKAWRKLA
配列番号 71	IKKAYRKQA
配列番号 72	IKKAYRKMA
配列番号 73	IKKAYRKIA
配列番号 74	IKKAYRKAA
配列番号 75	IKKAYRKVA
配列番号 76	IKKAYRKRA
配列番号 77	IKKAYRKLM
配列番号 78	IKKAYRKLI
配列番号 79	IKKAYRKLV
配列番号 80	IKKAYRKLC
配列番号 81	IKKAYRKLS
配列番号 82	IKKAYRKLY
配列番号 83	IRKAYRKLSLTL
配列番号 84	IKKQYRLLSLKY
配列番号 85	IKKAFHKLAMKY
配列番号 86	IRQAFKKLALKL
配列番号 87	IIKAYRKALQW
配列番号 88	IARAYRQLARRY
配列番号 89	IKRAYRRQALRY
配列番号 90	IKKSYRKLLALKY
配列番号 91	IKKAYKRLAMKY

10

20

30

40

さらなる態様では、本発明は、タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と融合させた融合タンパク質を提供する。ここで、該タンパク質発現増強ポリペプチドである融合パートナーは、Jタンパク質のJドメイン、目的のタンパク質である融合パートナーの発現を増強する能力を有するJドメイン断片、または上記式I（配列番号47）のアミノ酸配列を有するJドメインアナログポリペプチドである。この融合タンパク質を発現させると、融合された目的の標的タンパク質の発現は、タンパク質発現増強ポリペプチドである融合パートナーを使用しない場合の目的の標的タンパク質の発現に比べて増加する。標準的方法を用いてこの融合タンパク質からタンパク質発現増強ポリペプチド部分を除去することによって、目的の標的タンパク質の回収率が増加する。

【0020】

10

本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた本発明の融合タンパク質を、あるタンパク質機能を与える天然分泌タンパク質の分泌が不足した哺乳類患者の細胞に該タンパク質機能を回復させる方法に使用してもよい。この方法は、上記タンパク質発現増強ポリペプチドを該分泌タンパク質と連結させた融合タンパク質をコードする外因性核酸分子を該哺乳類患者（ヒト、ヒト以外の霊長類、齧歯類、または家畜など）の細胞に挿入する工程を包含し、該融合タンパク質を発現させることによって、該外因性核酸が存在しない場合は該患者の細胞での分泌が不足している該天然分泌タンパク質の機能が与えられる。

【0021】

20

好ましい態様では、哺乳類患者の細胞のタンパク質機能を回復させる上記方法は、天然分泌タンパク質の分泌不足に関連する疾患を有する患者を治療するために用いられる。このような疾患としては、プリオン関連疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症（CF）、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特に好ましい態様では、タンパク質機能を回復させる方法は、嚢胞性線維症膜通過伝導率制御（CFTR）タンパク質の分泌が不足したヒト患者を治療するために用いられ、該疾患は嚢胞性線維症である。この態様では、該ヒト患者の細胞に挿入する外因性核酸分子は、上記タンパク質発現増強ポリペプチドをCFTRと連結させた融合タンパク質をコードする。該ヒト患者の細胞内で該融合タンパク質を発現させることによってCFTR機能の不足から回復させる。

【0022】

30

さらなる態様では、本発明は、タンパク質発現増強ポリペプチドを標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質を提供する。ここで該タンパク質発現増強ポリペプチド要素は、Jタンパク質のJドメイン、目的のタンパク質である融合パートナーの発現を増強する能力を有するJドメイン断片、または上記式I（配列番号47）のアミノ酸配列を有するJドメインアナログポリペプチドであり、該標的タンパク質結合ドメインは、該融合タンパク質と目的の標的タンパク質を同一の宿主細胞内で共発現させた場合に目的の標的タンパク質に結合することができるポリペプチドである。目的の標的タンパク質に結合する融合タンパク質によって、該標的タンパク質の発現レベルおよび／または適切な細胞内位置または細胞外位置にある該標的タンパク質のレベルが増強される。したがって、発現量が十分でないか適切な細胞内位置または細胞外位置に発現されていない目的の標的タンパク質の発現レベルを特定の目的で増強するために、本明細書に記載の融合タンパク質を用いることができる。本明細書に記載の融合タンパク質が有用となる状況としては、所望の量の目的の内因性タンパク質または異種性（組換え）タンパク質を細胞培養液中で発現させられない場合や、十分なレベルのタンパク質を生体内で発現させられない場合などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。生体内では、1種以上の機能性タンパク質の発現が不十分な場合、病理的状态（プリオン関連疾患（伝染性海綿状脳症）やアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症などが挙げられるが、これらに限定されるものではない）につながる。

40

【0023】

本発明の融合タンパク質が発現レベルの増強および／または所望の細胞内位置または細胞

50

胞外位置での発現の増強の標的とするタンパク質は、可溶性タンパク質、膜結合タンパク質、または分泌タンパク質であり得る。

【0024】

本発明の融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインは標的タンパク質に結合するポリペプチドである。標的結合ドメインは標的タンパク質に対し、標的タンパク質の発現レベルの増強を妨げないよう他のタンパク質を排除するために十分に特異的な結合親和性を有することが好ましい。本発明の標的結合ドメインとして使用できるポリペプチドとしては、標的タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合部分、標的免疫グロブリンに結合する免疫グロブリン特異的結合タンパク質（タンパク質A、タンパク質L、タンパク質Gなど）またはその断片、標的タンパク質のFcドメインに結合するFc結合タンパク質（タンパク質A、タンパク質Gなど）、標的タンパク質のFcドメインに結合するFc結合ペプチド、目的の標的タンパク質に結合する受容体タンパク質のリガンド結合ドメイン、標的タンパク質のタンパク質リガンド（受容体のタンパク質リガンドなど）、標的タンパク質のPDZ結合ドメインに結合するPDZタンパク質のPDZドメインなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0025】

本発明の一態様では、標的タンパク質がサイトカインである場合、本発明の融合タンパク質の標的結合ドメインは、標的サイトカインタンパク質に結合するサイトカイン受容体タンパク質のリガンド結合ドメインを含み得る。

【0026】

20

別の態様では、標的タンパク質が受容体タンパク質またはそのリガンド結合部分である場合、本発明の融合タンパク質の標的結合ドメインは、該受容体またはそのリガンド結合部分が結合するタンパク質リガンドを含み得る。好ましい態様では、標的タンパク質がサイトカイン受容体タンパク質またはそのサイトカイン結合部分である場合、該標的結合ドメインはサイトカイン受容体または当該受容体のサイトカイン結合部分が結合するサイトカインを含む。

【0027】

囊胞性線維症膜通過伝導率制御（CFTR）タンパク質などの標的タンパク質がPDZ結合ドメインを有する態様では、本発明の融合タンパク質の標的結合ドメインはPDZドメインを有する多様なタンパク質のいずれか1種に由来するPDZドメインを含み得る。好ましい態様では、標的タンパク質がPDZ結合ドメインを有する場合、本発明の融合タンパク質の標的結合ドメインは、PDZアダプタータンパク質のNHERFファミリーに属する任意のタンパク質に由来するPDZドメインを含む。NHERFファミリーに属するPDZアダプタータンパク質としては、NHERF1（NHERF、EBP50、SLC9A3R1としても知られる）、NHERF2（E3KARPまたはSLC9A3R2としても知られる）、PDZK1（CAP70またはNHERF3としても知られる）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0028】

本発明の標的タンパク質結合融合タンパク質の特定の態様では、Jタンパク質のJドメインまたはその活性な（発現を増強する）断片、または式Iのタンパク質発現増強ポリペプチドがリンカーペプチドを介してまたはリンカーペプチドを介さずに標的タンパク質結合ドメインに融合されている。本発明の標的タンパク質結合融合タンパク質にリンカーペプチドを用いる場合、リンカーは1個以上のアミノ酸であり、たとえば1～10個のアミノ酸、1～20個のアミノ酸、さらに1～50個のアミノ酸などであり得る。一般的にはリンカーは20個以下のアミノ酸であり、標的タンパク質結合ドメインとタンパク質発現増強ポリペプチドのいずれの機能についても妨害しない（かつ増強することが望ましい）ように選択または設計される。リンカーを用いる場合、リンカーは融合タンパク質の両方の要素を最適に寄与させて目的の標的タンパク質の発現および／または適切に配置のレベルが増強されるように選択されることが好ましい。標的タンパク質結合ドメインにタンパク質発現増強ポリペプチドを直接結合してもいずれかの要素の機能が許容できないほど低

40

50

下したり、あるいは標的タンパク質の発現および／または配置のレベルに所望される増強が許容できないほど低下したりしなければ、リンカーはなくてもよい。

【0029】

本発明の融合タンパク質に有用なリンカーとしては、酵素で切断可能なペプチド、すなわち酵素切断部位を挙げることができる。酵素は、たとえばエンテロキナーゼ、エンテロキナーゼの軽鎖、トロンピン、ウロキナーゼ、タバコエッチウイルス (tobacco etch virus (TEV)) プロテアーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、亜鉛依存性エンドペプチダーゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase (MMP))、セラリシン、アスタシン、アダマリシン、ディスインテグリン、ADAM、カスパーゼ、カテプシン、カルパインなどである。本明細書に記載の融合タンパク質に切断可能なリンカーを用いることは、融合タンパク質の機能を停止させるか緩やかにする、あるいは細胞内や標的タンパク質分子の集団から融合タンパク質の存在を排除するのに有利となり得る。一部の細胞は、対応するタンパク質分解性の認識部位を含む、ポリペプチドリinker分子を切断できる1種以上の細胞内プロテアーゼを有する。したがって、本発明の融合タンパク質に使用する、細胞内で発現された後に細胞内プロテアーゼによって融合タンパク質を切断できるような切断可能なリンカーを選択することができる。

10

【0030】

本発明の融合タンパク質はさらに、融合タンパク質の検出または単離を補助するエピトープタグを含んでいてもよい。本発明において有用なエピトープタグとしては、ポリヒスチジンタグ (ヘキサヒス (hexaHis) : 配列番号112など)、V5エピトープタグ、Mycエピトープタグ、Flagエピトープタグ、HA (ヒトインフルエンザ血球凝集素 (human influenza hemagglutinin)) エピトープタグが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0031】

本発明の融合タンパク質は、標的タンパク質単独の場合、すなわち融合タンパク質が存在しない場合の発現レベルに比べ、標的タンパク質の発現レベルを増強することが実証されている。本明細書に記載の方法に従えば、目的の標的タンパク質の発現レベルを少なくとも約1.5倍、また、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、25倍以上まで増加させることができる。本発明の融合タンパク質は、適切な細胞内位置または細胞外位置に存在する標的タンパク質のレベルも増強する。

30

【0032】

別の態様では、本発明は、融合タンパク質を個体与えて標的タンパク質の発現を増強するのに有用な、該融合タンパク質を含有する組成物を提供する。本発明の組成物には、融合タンパク質と医薬的に許容可能な担体とを含有する、ヒトを含む個体の疾患または障害の治療に使用するための医薬組成物も包含される。本明細書に記載の融合タンパク質を含有する医薬組成物はさらに、治療に有効な他の化合物を1種以上含有してもよい。本発明の医薬組成物に組み入れてもよい治療に有効な追加の化合物の例としては、抗生物質、抗ウイルス性化合物、抗がん性化合物、鎮静剤、刺激剤、局所麻酔剤、副腎皮質ステロイド、鎮痛剤、抗ヒスタミン剤、非ステロイド抗炎症薬 (non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID))、およびそれらの適切な組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0033】

本発明はさらに、本明細書に記載の融合タンパク質の1種によって発現が増強される目的の標的タンパク質が与えることのできる機能または特性の損失または減少を特徴とする疾患状態についてヒトまたは動物である患者を治療する方法を提供する。当該方法には、治療を必要とする患者に対し本明細書に記載の融合タンパク質を投与することが包含される。

【0034】

本発明はさらに、Jタンパク質から単離されたJドメイン、目的の標的タンパク質の発

50

現を増強する能力を有する単離されたJドメイン断片、および式I（配列番号47）のアミノ酸配列を有する単離されたJドメインアナログポリペプチドからなる群から選択される上記タンパク質発現増強ポリペプチドをコードする、単離された核酸を提供する。

【0035】

本発明はさらに、上記の単離された核酸を含む核酸ベクターを提供する。

【0036】

別の態様では、本発明は、上記の単離された核酸または核酸ベクターを含む宿主細胞を包含する。

【0037】

本発明は、本明細書に記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。本発明の融合タンパク質をコードする単離された核酸分子を挿入した組換えベクター分子も提供される。このような組換えベクター分子には、挿入した核酸を形質移入宿主細胞内で複製するためのクローニングベクターを含む組換えベクター分子や、コードされた融合タンパク質を適合する形質移入宿主細胞内で発現させるための発現ベクターが包含される。当技術分野において入手可能な多様な発現ベクターから任意の発現ベクターを本発明の融合タンパク質の生成に使用することができる。本発明の融合タンパク質を発現させるのに有用な発現ベクターの例としては、プラスミド p c D N A、pcDNA3.3 TOPO (Life Technologies, New York)、プラスミド p T T 3、プラスミド p E F - B O Sなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0038】

本発明はさらに、単離されたJドメイン、活性なJドメイン断片、または式IのJドメインアナログをコードする単離された核酸を挿入した、本発明の融合タンパク質を適合する宿主細胞内にインビトロで発現させるのに使用するための発現ベクター分子を提供する。

【0039】

本発明の発現ベクターには、植物または動物（ヒト、ヒト以外の霊長類、齧歯類、家畜などの哺乳類を含む）の損失または不足した標的タンパク質機能を回復させるための遺伝子治療において本発明の融合タンパク質を生体内で発現させるための遺伝子治療ベクターも包含される。

【0040】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドまたは本明細書に記載の融合タンパク質を発現するための発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。本発明において有用な宿主細胞としては真核生物宿主細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。好ましい真核生物宿主細胞としては、哺乳類宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真菌宿主細胞、真核藻類宿主細胞、線虫宿主細胞、原虫宿主細胞、魚類宿主細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary (CHO)) 細胞、COS細胞、Vero細胞、SP2/O細胞、NS/O骨髓腫細胞、ヒト胎児腎臓 (human embryonic kidney (HEK293)) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (baby hamster kidney (BHK)) 細胞、HeLa細胞、ヒトB細胞、CV-1/EBNA細胞、L細胞、3T3細胞、HEPG2細胞、PerC6細胞、またはMDCk細胞であることが好ましい。好ましい真菌宿主細胞としては、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ニューロスポラ (Neurospora) 属、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、ピキア (Pichia) 属、ハンゼヌラ (Hansenula) 属、シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 属、クルイベロミセス (Kluyveromyces) 属、ヤロウィア (Yarrowia) 属、カンジダ (Candida) 属が挙げられる。サッカロミセス属宿主細胞は、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 細胞であることがより好ましい。

【0041】

本発明は、Jタンパク質のJドメイン、そのタンパク質発現増強断片、または式IのJ

10

20

30

40

50

ドメインアナログを目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質を発現する方法であって、該融合タンパク質をコードする単離された核酸分子を含むベクター分子を含む宿主細胞を該融合タンパク質の産生に十分な条件下で培養することを含む、方法を提供する。

【0042】

別の態様では、本発明は、Jタンパク質のJドメイン、そのタンパク質発現増強断片、または式IのJドメインアナログを目的の標的タンパク質に連結させた上記融合タンパク質を発現する方法であって、該融合タンパク質をコードする構造遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に形質移入することと、形質移入された該宿主細胞を該融合タンパク質の発現を生じる条件下で培養することを含む、方法を提供する。

10

【0043】

本発明はさらに、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質に連結させた融合タンパク質を発現する方法であって、

- 1) 該融合タンパク質をコードする組換え遺伝子配列を構築する工程と、
- 2) 該組換え遺伝子配列を発現ベクターに挿入し、該組換え遺伝子配列が転写プロモーター配列に作動可能に連結された組換え発現ベクターを形成する工程と、
- 3) 該プロモーター配列と適合する宿主細胞に該組換え発現ベクターを形質移入する工程と、
- 4) 形質移入された該宿主細胞を、該融合タンパク質を発現可能な条件下で培養する工程とを含む方法を提供する。

20

【0044】

本発明はさらに、本明細書に記載の単離された発現増強ポリペプチドを標的タンパク質結合ドメインに連結させた融合タンパク質を発現する方法であって、該融合タンパク質をコードする単離された核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を該融合タンパク質の産生に十分な条件下で培養することを含む、方法を提供する。

【0045】

別の態様では、本発明は、宿主細胞が発現する目的の標的タンパク質の発現を増強する方法であって、上記のJタンパク質から単離されたJドメイン、目的の標的タンパク質の発現を増強する能力を有する単離されたJドメイン断片、または式I（配列番号47）のアミノ酸配列を有する単離されたJドメインアナログポリペプチドを標的タンパク質結合ドメインに連結させた融合タンパク質をコードする構造遺伝子を含む発現ベクターを該宿主細胞に形質移入することと、形質移入された該宿主細胞を該構造遺伝子がコードする該融合タンパク質と該目的の標的タンパク質の共発現を生じる条件下で培養することを含む、方法を提供する。

30

【0046】

本発明は、目的の標的タンパク質の発現を増強する方法であって、(a) Jタンパク質のJドメイン、その活性な断片、または式IのJドメインアナログを標的タンパク質結合ドメインに連結させた、該目的の標的タンパク質に結合する融合タンパク質をコードする構造遺伝子を含む発現ベクターを用いて宿主細胞を形質移入することと、(b) 形質移入した該宿主細胞を、該構造遺伝子上にコードされた該融合タンパク質の発現が生じる条件下で培養することを含む、方法を提供する。該構造遺伝子はさらに、該Jドメイン/Jドメイン断片/Jドメインアナログ要素と該標的タンパク質結合ドメイン要素とを連結するリンカーペプチドをコードする任意選択可能なセグメントを含んでもよく、エピトープタグ、酵素切断部位などをコードするセグメントを含んでもよい。該方法は、以下の工程によって有利に実行できる：

40

- 1) タンパク質発現増強ポリペプチドを標的結合ドメインに連結させた融合タンパク質をコードする組換え遺伝子配列を構築する工程と、
- 2) 該組換え遺伝子配列を発現ベクターに挿入して組換え発現ベクターを作製する工程であって、該組換え遺伝子配列は転写プロモーター配列に作動可能に連結されている、工程と、

50

3) 該プロモーター配列と適合する適切な宿主細胞を該組換え発現ベクターで形質移入する工程と、

4) 形質移入した該宿主細胞を、該融合タンパク質の発現を生じる条件下で培養する工程。

【0047】

本発明のある態様では、本発明の融合タンパク質をコードする核酸を植物またはヒト以外の動物の細胞に挿入し、融合タンパク質を発現させ、標的タンパク質の発現レベルを増強することによって、欠損した機能または所望の機能をその植物またはヒト以外の動物に与える。このような方法にはトランスジェニック植物およびヒト以外のトランスジェニック動物の作製が包含され、融合タンパク質をコードする核酸が機能性遺伝子（導入遺伝子）として永久的にゲノムに組み込まれ、該植物またはヒト以外の動物が該融合タンパク質を発現するのみならず発現可能な該導入遺伝子のコピーが子孫に伝えられる。

10

【0048】

別の態様では、本発明は、標的タンパク質の発現が不足した患者の細胞に該標的タンパク質によって与えられる機能を回復させる方法であって、本発明の融合タンパク質をコードする外因性核酸分子を該患者の細胞に挿入することを包含し、該外因性核酸分子を該細胞へ挿入した後、該融合タンパク質が発現されて該標的タンパク質の発現レベルを増強する（この増強は該内因性標的タンパク質が安定すること、適切に折り畳まれた標的タンパク質の量が増加すること、該標的タンパク質の所望の細胞区画または細胞外区画への配置が改善すること（たとえば分泌タンパク質の分泌の改善）などによるものである可能性がある）ことによって、該外因性核酸が存在しない場合には患者の細胞内で発現が不足している該標的タンパク質の機能が与えられる、方法を提供する。このような方法は、タンパク質の発現不足に関連する疾患を有する患者を治療するのに特に有用である。このような疾患としては、プリオン関連疾患（伝染性海綿状脳症）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症、 $\alpha 1$ アンチトリプシン（AAT）欠損症などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。特に好ましい態様は、該患者が嚢胞性線維症膜通過伝導率制御（CFTR）タンパク質の発現が不足したヒト患者であり、該疾患が嚢胞性線維症である、方法、または該患者が $\alpha 1$ アンチトリプシンが不足したヒト患者であり、該疾患が $\alpha 1$ アンチトリプシン（AAT）欠損症である、方法である。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0049】

【図1】図1 A～1 Cは、実施例2に記載の一連の実験を示す。実施例2では、目的の標的タンパク質（IL13R α 2受容体タンパク質）をJドメイン（Hsp40、SV40、またはCSP Jタンパク質由来）と連結させた改変配列の場合、標的タンパク質の発現レベルが同タンパク質単独の場合（IL13R α 2WT）またはBAGドメイン（BAG3、BAG4、BAG5またはBAG6タンパク質由来）との融合タンパク質として発現した場合に比べて改善したことを実証する。図1 Aは、宿主細胞の形質移入に用いる発現ベクタープラスミドに挿入される構造遺伝子の図を示す。IL13R α 2タンパク質（野生型タンパク質（「WT」））をコードするcDNAの3'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、「IL13R α 2WT」発現産物を得た。BAGドメイン融合タンパク質については、IL13R α 2をコードするcDNAを、BAGドメインをコードするセグメントとインフレームで連結させ、さらにV5エピトープタグをコードするセグメントと連結させてBAGドメイン融合タンパク質発現産物を得た。本発明のJドメイン融合タンパク質については、IL13R α 2をコードするcDNAを、Jドメインをコードするセグメントとインフレームで連結させ、さらにV5エピトープタグをコードするセグメントと連結させてJドメイン融合タンパク質発現産物を得た。図1 Bは、細胞可溶化物のウェスタンブロット（免疫ブロット）分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、形質移入細胞内で発現された標識IL13R α 2野生型（WT）タンパク質またはその融合タンパク質対照物の相対レベルを示す。Jタンパク質Hsp40、SV40またはCSPのJドメインを目的のIL13R α 2タンパク質に対する融合パー

40

50

トナーとして採用した結果、野生型 I L 1 3 R α 2 タンパク質 (W T) またはその B A G タンパク質 B A G 3、B A G 4、B A G 5、B A G 6 の B A G ドメインとの融合タンパク質対照物のいずれと比較してもタンパク質発現レベルが有意に高くなったことがわかる。形質移入に成功したと形質移入体が作動可能であることがわかるように、形質移入体はすべて緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein (G F P)) を発現するレポータープラスミドと共に形質移入した。図 1 B の下図を参照のこと。図 1 C は、図 1 B の免疫ブロットにおける化学発光シグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図 1 C の棒グラフは、分泌された 3 種類すべての I L 1 3 R α 2 - J ドメイン融合タンパク質の発現レベルが 4 種類のいずれの I L 1 3 R α 2 - B A G ドメイン融合タンパク質または野生型 I L 1 3 R α 2 タンパク質の発現レベルと比較しても (I L 1 3 α 2 W T の発現量を 1 0 0 % とする) 有意に高いことを明確に示している。

【図 2】図 2 A および 2 B は実施例 2 に記載の実験の結果を示す。この実験では、I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質の切断型 (truncated form (「T F」)) (リガンド結合ドメインを含む I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質の細胞外部分) を J ドメインと連結させた改変配列 (J - I L 1 3 R α 2 T F) の場合に切断型受容体タンパク質単独 (I L 1 3 R α 2 T F) の場合と比較してみられる、目的の標的分泌タンパク質の発現レベルの改善について試験した。図 2 A は、宿主細胞の形質移入に用いる発現ベクタープラスミドに挿入される構造遺伝子構築物の図を示す。I L 1 3 R α 2 T F をコードする c D N A の 3 ' 末端に V 5 エピトープタグをコードするセグメントを付加し、I L 1 3 R α 2 T F 発現産物を得た。I L 1 3 R α 2 T F をコードする c D N A の 3 ' 末端に V 5 エピトープタグをコードするセグメントを付加し、5 ' 末端に J ドメイン (J タンパク質 E r d j 3 由来) をコードするセグメントを連結させて本発明の J ドメイン融合タンパク質発現産物 (J - I L 1 3 R α 2 T F) を得た。図 2 B はウェスタンブロットの化学発光シグナルの X 線フィルム画像であり、細胞 (細胞可溶化物) 内で発現され培地 (培養液) へ分泌された、V 5 エピトープタグで標識した I L 1 3 R α 2 T F タンパク質とその J ドメイン融合タンパク質対照物の相対レベルを示す。J ドメインを目的の I L 1 3 R α 2 T F タンパク質に対する融合パートナーとして採用した結果、J ドメインを含まない I L 1 3 R α 2 T F タンパク質と比較してタンパク質発現レベルが有意に高くなったことがわかる。形質移入に成功したと形質移入体が作動可能であることがわかるように、形質移入体はすべて緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein (G F P)) を発現するレポータープラスミドと共に形質移入した。図 2 B の下図を参照のこと。疑似培養液には、「空の」ベクター、すなわちいずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた。

【図 3】図 3 A および 3 B は実施例 2 に記載の実験の結果を示す。この実験では、切断型受容体タンパク質 (I L 1 3 R α 2 T F)、B A G ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質 (B A G - I L 1 3 R α 2 T F)、J ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質 (J - I L 1 3 R α 2 T F) を発現するための発現ベクターを用いて形質移入した宿主細胞が培地に分泌したタンパク質の相対発現レベルを比較した。図 3 A は、形質移入細胞が培地に分泌した I L 1 3 R α 2 T F、B A G ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質、J ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質のドットブロット分析における化学発光シグナルの X 線フィルム画像を示す。すべてのタンパク質に、抗 V 5 抗体で免疫検出できるように V 5 エピトープを担持させた。図 3 B は、図 3 A の化学発光シグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図 3 B の棒グラフは、分泌された J ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質 (棒グラフ 4) の発現レベルが、I L 1 3 R α 2 T F (棒グラフ 2) と B A G ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質 (棒グラフ 3) のいずれと比較しても有意に高かったことを明確に示している。疑似培養液 (棒グラフ 1) には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた。

【図 4】図 4 A ~ 4 C は、実施例 2 に記載の実験の結果を示す。この実験では、α 1 A T を J ドメイン融合パートナーと連結 (融合) させた改変配列の場合に同タンパク質単独の

場合またはBAGドメインとの融合物として発現された場合と比較してみられる、分泌される $\alpha 1$ アンチトリプシン($\alpha 1$ AT)の発現レベルの改善について試験した。図4Aは、宿主細胞の形質移入に用いる発現ベクタープラスミドに挿入される構造遺伝子構築物の図を示す。 $\alpha 1$ ATをコードするcDNAの3'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、 $\alpha 1$ AT発現産物を得た。 $\alpha 1$ ATをコードするcDNAを、BAGドメインをコードするセグメントとインフレーションで連結し、さらにV5エピトープタグをコードするセグメントと連結し、BAGドメイン融合タンパク質($\alpha 1$ AT-BAG)発現産物を得た。 $\alpha 1$ ATをコードするcDNAを、Jドメインをコードするセグメントとインフレーションで連結し、さらにV5エピトープタグをコードするセグメントと連結し、本発明のJドメイン融合タンパク質($\alpha 1$ AT-J)発現産物を得た。図4Bは、培地へ分泌された $\alpha 1$ ATタンパク質または分泌されたその融合タンパク質対照物の相対発現レベルを示す、ドットプロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像を示す。Jドメインを目的の $\alpha 1$ ATタンパク質に対する融合パートナーとして採用した($\alpha 1$ AT-J)結果、分泌タンパク質($\alpha 1$ AT-J)の発現レベルが、 $\alpha 1$ ATタンパク質単独の場合またはそのBAGドメイン融合対照物($\alpha 1$ AT-BAG)の場合と比較して有意に高くなったことがわかる。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた。図4Cは、図4Bの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図4Cの棒グラフは、分泌された $\alpha 1$ AT-J融合タンパク質(棒グラフ4)の発現レベルが、(融合していない) $\alpha 1$ AT(棒グラフ2)タンパク質とBAGドメイン- $\alpha 1$ AT融合タンパク質(棒グラフ3)のいずれと比較しても有意に高かったことを明確に示している。

【図5】図5A~5Cは、実施例2に記載の実験の結果を示す。この実験では、分泌された切断型のTNF- α 受容体1(TNFR1TF)タンパク質をJドメイン融合パートナーと連結させた改変配列の場合、TNFR1TFの発現レベルが同タンパク質単独の場合(TNFR1TF)と比較して改善することを実証する。図5Aは、宿主細胞の形質移入に用いる発現ベクタープラスミドに挿入される構造遺伝子構築物の図を示す。TNFR1TFをコードするcDNAの3'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、TNFR1TF発現産物を得た。TNFR1TFをコードするcDNAを、Jドメインをコードするセグメントとインフレーションで連結させ、さらにV5エピトープタグをコードするセグメントと連結させ、本発明のJドメイン融合タンパク質発現産物を得た。図5Bは、培地に分泌されたTNFR1TFおよびTNFR1TF-Jドメイン融合タンパク質の相対レベルを示す、ドットプロットの化学発光シグナルのX線フィルム画像である。Jドメインを目的のTNFR1TFタンパク質に対する融合パートナーとして採用した(TNFR1TF-J)結果、(融合していない)TNFR1TFタンパク質よりも分泌タンパク質の発現が有意に高くなったことがわかる。図5Cは図5Bのドットプロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図5Cの棒グラフは、分泌されたTNFR1TF-Jドメイン融合タンパク質(棒グラフ3)の発現レベルがTNFR1TF(棒グラフ2)に比べて有意に高いことを明確に示している。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現する構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた。

【図6】図6A~6C-3は、実施例2に記載の一連の実験の結果を示す。この実験では、3種の目的の標的タンパク質のそれぞれをJドメイン融合パートナーと連結させた改変配列の場合、目的の標的Fc融合タンパク質の発現レベルが改善することを実証する。図6Aはこの実施例に使用した構造遺伝子構築物の図を示す。Fc融合タンパク質を得るため、目的のタンパク質(TNFR1TF、IL13Ra2TFまたは $\alpha 1$ AT)のそれぞれをコードするcDNAの3'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、さらに免疫グロブリンFc領域の定常ドメインをコードするセグメント(「Fc」と連結させた。Jドメインを融合するために、JドメインをコードするcDNAを、目的のタンパク質のそれぞれをコードするcDNAとV5エピトープタグをコードするセグメ

ントとの間にインフレーションで連結させた。図6Aを参照のこと。図6B-1~6B-3は、形質移入細胞の培養液の培地中に分泌されたタンパク質のドットブロット分析を示す。各Fc融合タンパク質(TNFR1-V5-Fc、IL13Ra2TF-Fcおよびα1AT-Fc)を、図6B-1~6B-3の各図の中央レーンのドットブロットに示す培地で発現させた。このFc融合タンパク質の発現レベルは目的の各タンパク質単独(すなわちFcドメインと融合していない場合(データは示さず))の場合よりも高かった。図6B-1~6B-3の各図の右レーンのドットブロットに示すように、Fc融合タンパク質に含まれる目的のタンパク質のセグメントにJドメインを連結させたいずれの場合にも、有意に高い発現レベルが観察された。図6B-1~6B-3のドットブロットの化学発光シグナルを濃度分析した結果が図6C-1~6C-3中の対応する図に示されており、図6C-1~6C-3の各図の棒グラフ2(目的のタンパク質-Fc融合タンパク質)と棒グラフ3(目的のタンパク質-Jドメイン-Fc融合タンパク質)とを比較すれば、Jドメイン融合タンパク質の発現レベルが有意に高いことが明らかに明白である。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現させるための構造遺伝子も含まない発現ベクターで形質移入した細胞を入れた。

【図7】図7Aおよび7Bは、実施例2に記載の実験の結果を示す。この実験では、細胞質p53タンパク質をJドメイン融合パートナーと連結(融合)させた改変配列の場合、p53タンパク質単独の場合と比較してp53タンパク質の発現レベルが改善することを実証する。図7Aは、この実験に用いた構築物の図を示す。p53をコードするcDNAの5'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、p53発現産物を得た。p53をコードするcDNAの5'末端を、SV40 Jタンパク質のJドメインをコードするセグメントとインフレーションで連結させ、さらにその5'末端とV5エピトープタグをコードするセグメントとを連結させ、本発明のJドメイン融合タンパク質(J-p53)発現産物を得た。図7Bは、細胞可溶化物のウェスタンブロットの化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、細胞内での標識p53タンパク質とそのJドメイン融合タンパク質対照物(J-p53)の相対発現レベルを示す。Jドメインを目的のp53タンパク質に対する融合パートナーとして採用した(J-p53)結果、形質移入細胞内での発現レベルが、Jドメインを含まないp53タンパク質(p53)を形質移入細胞内で発現させた場合と比較して有意に高くなったことがわかる。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現する構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた。

【図8】図8Aおよび8Bは実施例2に記載の一連の実験の結果を示す。この実験では、2種の目的の標的タンパク質、すなわち野生型CFTRタンパク質および対応するCFTRΔ508F変異タンパク質(508位のフェニルアラニン残基を欠失させた結果、CFTRΔ508F変異タンパク質は不完全に折り畳まれ、急速に分解した)の各タンパク質をドメイン融合パートナーと連結(融合)させた改変配列の場合、各タンパク質単独の場合またはBAGドメインとの融合タンパク質として発現された場合と比べて発現レベルが改善することを実証する。図8Aは、宿主細胞の形質移入に用いる発現ベクタープラスミドに挿入する構築物の図を示す。目的の各タンパク質、すなわち野生型CFTRタンパク質(CFTR WT)またはCFTRΔ508F変異タンパク質(Δ508F)をコードするcDNAの5'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加した。BAGドメイン融合タンパク質を得るため、BAGドメインをコードするcDNAを、目的の各タンパク質をコードするcDNAとV5エピトープタグをコードする5'セグメントとの間にインフレーションで連結させた。本発明のJドメイン融合タンパク質発現産物を得るため、SV40のJドメインをコードするcDNAを、目的の各タンパク質をコードするcDNAとV5エピトープタグをコードする5'セグメントとの間にインフレーションで連結させ、Jドメイン融合タンパク質発現産物を得た。図8Aを参照のこと。図8Bは、細胞可溶化物のウェスタンブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、細胞内での目的の標識タンパク質(CFTR WTおよびCFTRΔ508F)、BAGドメイン融合タンパク質(BAG-CFTR WTおよびBAG-CFTRΔ508F)、Jドメイン融合タンパク質(J-CFTR WTおよびJ-CFTRΔ508F)の相対発現レベルを示す。JドメインをC

FTR WTおよびC F T R Δ 5 0 8 Fタンパク質に対する融合パートナーとして採用した結果、形質移入細胞内での発現レベルが、（融合していない）CFTR WTおよび変異C F T R Δ 5 0 8 Fタンパク質またはそのB A Gドメイン融合対照物の発現レベルと比較して有意に高くなったことがわかる。形質移入が成功したことで形質移入体が作動可能であることがわかるように、形質移入体はすべて緑色蛍光タンパク質（G F P）を発現するレポータープラスミドと共に形質移入された（図8 Bの下図）。

【図9】図9 Aは、目的の標的タンパク質の発現を増強するための非改変配列の一般的スキームの図を示す。この非改変配列では、実施例4に記載のように、本発明の融合タンパク質を共発現させることによって目的の標的タンパク質の発現が増強される。このスキームでは、本発明の融合タンパク質はタンパク質発現増強ポリペプチド（protein expression enhancing polypeptide（P E E P））ドメインを標的タンパク質結合ドメインと連結させたものであり、標的タンパク質結合ドメインが目的の標的タンパク質に結合することによって標的タンパク質がP E E Pドメインに近づくため、適切な細胞内位置または細胞外位置の標的タンパク質の発現レベルが増加する。図9 Bは、発現ベクタープラスミドに挿入される、I L 1 3 R α 2 T F融合タンパク質（標的タンパク質）をコードする構造遺伝子の図である。下記の実施例4に記載のように、この発現ベクタープラスミドを用いて宿主細胞を形質移入した。I L 1 3 R α 2の細胞外I L 1 3リガンド結合ドメインを含む切断型I L 1 3 R α 2受容体タンパク質（I L 1 3 R α 2 T F）をコードするc D N Aの3'末端にV 5エピトープタグをコードするセグメントを付加した。図9 Cは、実施例4に記載の、図9 BのV 5タグで標識したI L 1 3 R α 2 T F標的タンパク質の発現を増強する本発明の融合タンパク質を発現するための構築物の図を示す。Erdj3 Jタンパク質のJドメイン（タンパク質発現増強ポリペプチドドメイン）をコードするc D N Aを、I L 1 3タンパク質（標的タンパク質結合ドメイン）をコードするセグメントと連結させ、I L 1 3標的タンパク質結合ドメインをコードするセグメントの3'末端にF l a gエピトープタグをコードするセグメントを連結させた。

【図10】図10は、切断型I L 1 3 R α 2受容体タンパク質（I L 1 3 R α 2 T F）を発現する形質移入細胞の培地および細胞可溶化物のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり（上図が培地、中央図が細胞可溶化物である）、実施例4に記載されるように、I L 1 3 R α 2 T Fを単独で発現させた場合（左から2番目のレーン）、そのI L 1 3リガンドと共発現させた場合（I L 1 3のみ、左から3番目のレーン）、非改変配列で本発明のJドメイン - I L 1 3融合タンパク質と共発現させた場合（J - I L 1 3、左から4番目のレーン）を示す。適切に折り畳まれたI L 1 3 R α 2 T Fタンパク質（標的タンパク質）は形質移入細胞から分泌されると予想される。I L 1 3 R α 2 T Fタンパク質をJドメイン - I L 1 3融合タンパク質と共発現させることによって、分泌されたI L 1 3 R α 2 T Fタンパク質の発現レベルが、I L 1 3 R α 2 T Fタンパク質を単独で発現させた場合（上図の左から2番目のレーン）またはI L 1 3 R α 2 T Fタンパク質をそのI L 1 3リガンドと共発現させた場合（上図の左から3番目のレーン）と比較して有意に増強されたことがわかる（上図の左から4番目のレーン）。さらに、I L 1 3 R α 2 T Fタンパク質をJドメイン - I L 1 3融合タンパク質と共発現させた結果、細胞内のI L 1 3 R α 2 T Fタンパク質の発現レベル（中央図の左から4番目のレーン）が、I L 1 3 R α 2 T Fタンパク質を単独で発現させた場合（中央図の左から2番目のレーン）またはI L 1 3 R α 2 T Fタンパク質をそのI L 1 3リガンドと共発現させた場合（中央図の左から3番目のレーン）の発現レベルと比較して有意に増強された。形質移入に成功したことで形質移入体が作動可能であることがわかるように、形質移入体はすべて緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein（G F P））を発現するレポータープラスミドと共に形質移入した。図10の下図を参照のこと。疑似培養液には、「空の」ベクター、すなわちいずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（I L 1 3 R α 2 T Fタンパク質なし、共発現なし；プロットの左から1番目のレーンの「なし」）が、空のベクターによる形質移入体もG F Pベクターと共に形質移入し、図10の下図でG F Pの発現が検出されたこと

10

20

30

40

50

から、同時形質移入に成功したことがわかる。

【図11】図11Aおよび11Bは、下記の実施例5に記載の実験のために宿主細胞の形質移入に用いる発現ベクタープラスミドに挿入される、タンパク質をコードする核酸構築物の概略図を示す。図11Aは、目的のタンパク質をコードするcDNAの3'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、さらに免疫グロブリンFcドメインの定常ドメインをコードするセグメントと連結させた、Fc融合タンパク質（標的タンパク質）をコードするDNA構築物の図を示す。下記の実施例5については、Fc融合タンパク質標的は切断型IL13R α 2受容体タンパク質（IL13R α 2TF）を含むものにした。IL13R α 2TFをV5エピトープタグと連結させ、さらにFcドメインと連結させて所望のIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質を得た。図11Bは、タンパク質発現増強ポリペプチド（protein expression enhancing polypeptide（PEEP））ドメイン（Jタンパク質のJドメインなど）を標的タンパク質結合ドメイン（Fcドメイン）に結合することが知られているタンパク質Aなどと連結させた、本発明の融合タンパク質をコードするDNA構築物を示す。さらにこの構築物の3'末端にFlagエピトープタグをコードするセグメントを付加し、標準の抗Flag抗体を用いて容易に認識や単離ができるようにした。

10

【図12】図12A～12Dは、実施例5に記載の実験の結果を示す。この実験では、IL13R α 2TF-Fc融合タンパク質（標的タンパク質）をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させる非改変配列の場合、IL13R α 2TF-Fc融合タンパク質の発現が有意に増強されるが、標的タンパク質をタンパク質Aのみと共発現させた場合には有意な増強が見られないことを実証する。図12Aは、IL13R α 2TF-Fc融合タンパク質（標的タンパク質）を発現する形質移入細胞の培地のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、実施例5に記載されるように、IL13R α 2TF-Fc融合タンパク質を単独で発現させた場合（レーン2、なし）、タンパク質Aのみと共発現させた場合（レーン3、タンパク質Aのみ）、Erdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（レーン4、J-タンパク質A）、Erdj5 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（レーン5、J2-タンパク質A）を示す。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（左から1番目のレーン）。IL13R α 2TF-Fc融合標的タンパク質をいずれかのJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた結果、培地に分泌されたIL13R α 2TF-Fc融合標的タンパク質の発現レベル（左から4番目と5番目のレーン）が、IL13R α 2TF-Fc融合標的タンパク質を単独で発現する形質細胞内での発現レベル（左から2番目のレーン）またはIL13R α 2TF-Fc融合標的タンパク質と融合していないタンパク質Aとを共発現する形質移入細胞内での発現レベル（左から3番目のレーン）と比較して有意に高くなったことがわかる。図12Bは、図12Aの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図12Bの棒グラフ1～5は図12Aのレーン1～5のシグナルと対応している。図12Bの棒グラフは、IL13R α 2TF-Fc標的タンパク質をいずれかのJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた（棒グラフ4および5）ことによって、分泌されたIL13R α 2TF-Fcの発現レベルが、IL13R α 2TF-Fcを単独で発現させた場合（棒グラフ2）またはIL13R α 2TF-Fcを（融合していない）タンパク質Aのみと共発現させた場合（棒グラフ3）と比較して有意に増強されたことを明確に示している。図12Cは、IL13R α 2TF（Fcドメインなし）タンパク質を発現する形質移入細胞の培地のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、実施例5に記載のように、IL13R α 2TF（Fcドメインは含まない）タンパク質を単独で発現させた場合（レーン1、なし）、Erdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（レーン2、J-タンパク質A）、タンパク質Aのみと共発現させた場合（レーン3、タンパク質Aのみ）を示す。この結果は、分泌されたIL13R α 2TFタンパク質の発現が見られた場合でもほとんど観察されなかったことを示しており、図1

20

30

40

50

2 Aおよび図1 2 Bで分泌されたI L 1 3 R α 2 T F - F c融合標的タンパク質レベルの増強がJドメイン-タンパク質A融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインがI L 1 3 R α 2 T F - F c標的タンパク質のF cドメインに対して有する特異性に依存していた場合に得られる結果として予想されていたとおりである。図1 2 Dは、図1 2 Cの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。このように、I L 1 3 R α 2 T Fタンパク質をJドメイン-タンパク質A融合が認識しなかった（標的結合ドメインの対象となるF cリガンド（タンパク質A）がないため）という点で図1 2 Cおよび図1 2 Dは対照実験結果となる。したがって、結果が示すように、Jドメイン（タンパク質発現増強ポリペプチドドメイン）がもたらした可能性のあった発現レベルの増強はI L 1 3 R α 2 T Fを対象としたものではなかった。

【図1 3】図1 3 A-1~1 3 C-2は、下記の実施例6に記載の一連の実験の結果を示す。実施例6では、3種の異なるF c融合標的タンパク質の発現レベルが、対応する本発明の融合タンパク質と共発現させた場合に有意に増強されることを実証する。図1 3 A-1は、培地に分泌されたI L 1 3 R α 2 T F - F c融合タンパク質（標的タンパク質）の発現に関する、培地のウェスタンブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、実施例5に記載の実験と同様、下記の実施例6. 1に記載のように、I L 1 3 R α 2 T F - F c融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の培地（左から1番目のレーン）、およびI L 1 3 R α 2 T F - F c融合タンパク質とJドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（左から2番目のレーン）を示す。図1 3 A-2は、図1 3 A-1の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図1 3 A-2の棒グラフ1および2（左から順に）は図1 3 A-1のレーン1および2（左から順に）のシグナルと対応している。結果は、本発明のJドメイン-タンパク質A融合タンパク質を共発現させたことによって、培地に分泌されたI L 1 3 R α 2 T F - F c標的タンパク質の発現レベルが、Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質がない場合の標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に（8倍）増強されたことを示している。この結果は実施例5および図1 2に記載の結果と合致する。

図1 3 B-1は、培地に分泌されたT N F R 1 T F - F c融合タンパク質（標的タンパク質）の発現に関するウェスタンブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、下記の実施例6. 2に記載のように、T N F R 1 T F - F c融合標的タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の培地（左から1番目のレーン）、およびT N F R 1 T F - F c融合タンパク質とJドメイン-タンパク質A融合物とを共発現する形質移入細胞の培地（左から2番目のレーン）を示す。図1 3 B-2は、図1 3 B-1の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図1 3 B-2の棒グラフ1および2（左から順に）は図1 3 B-1のレーン1および2（左から順に）のシグナルと対応する。結果は、Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質を共発現させることによって、培地に分泌されたT N F R 1 T F - F c標的タンパク質の発現レベルが、Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質がない場合の標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に（6倍）増強されたことを示している。図1 3 C-1は、培地に分泌された α 1アンチトリプシン（ α 1 A T） - F c融合タンパク質（標的タンパク質）の発現に関するウェスタンブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、下記の実施例6. 3に記載のように、 α 1アンチトリプシン（ α 1 A T） - F c融合標的タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の培地（左から1番目のレーン）、および α 1 A T - F c融合標的タンパク質とJドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（左から2番目のレーン）を示す。図1 3 C-2は、図1 3 C-1の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図1 3 C-2の棒グラフ1および2（左から順に）は図1 3 C-1のレーン1および2（左から順に）のシグナルと対応している。結果は、Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質を共発現させることによって、培地に分泌された α 1 A T - F c融合標的タンパク質の発現レベルが、Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質がない場合の標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に（3倍）増強されたことを示している。

【図14】図14Aおよび14Bは、下記の実施例7に記載の一連の実験の結果を示す。実施例7では、非改変配列の場合にみられる、分泌されるヒト化抗IL8 IgG1抗体の発現レベルの増強について試験する。図14Aは、培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）の発現に関するドットプロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞（レーン2）、抗IL8抗体とタンパク質Aとを共発現する形質移入細胞（レーン3、タンパク質Aのみ）、抗IL8抗体と本発明のErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞（レーン4、J-タンパク質A）、抗IL8抗体とタンパク質Lとを共発現する形質移入細胞（レーン5、タンパク質Lのみ）、抗IL8抗体と本発明のErdj3 Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞（レーン6、J-タンパク質L）、抗IL8抗体とそのIL8リガンドを共発現する形質移入細胞（レーン7、IL8）、本発明のErdj3 Jドメイン-IL8リガンド融合タンパク質を共発現する形質移入細胞（レーン8、J-IL8）、Erdj3 J-タンパク質A融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン9、J-タンパク質A）、Erdj3 Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン10、J-タンパク質L）、Erdj3 Jドメイン-IL8リガンド融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン11、J-IL8）の培地を示す。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（レーン1、抗IL8抗体なし）。培地での抗IL8抗体の発現について、抗ヒトIgG抗体（「anti-huIgG Ab」）を用いたドットプロット分析で分析した（カタログ番号AP112P、Millipore社）。形質移入細胞内で抗IL8抗体をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（レーン4）、Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質と共発現させた場合（レーン6）、またはJドメイン-IL8融合タンパク質と共発現させた場合（レーン8）、培地に分泌された抗IL8抗体の発現レベルが、抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞（レーン2）、タンパク質Aのみと共発現する形質移入細胞（レーン3、タンパク質Aのみ）、タンパク質Lのみと共発現する形質移入細胞（レーン5、タンパク質Lのみ）、またはIL8リガンドタンパク質のみと共発現する形質移入細胞（レーン7）で発現された抗体のレベルと比較して有意に増強されたことがわかる。Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン9、J-タンパク質A）、Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン10、J-タンパク質L）、またはJドメイン-IL8融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン11、J-IL8）の培地ではシグナルが検出されなかった。このことは、3種すべての融合タンパク質が、共発現された抗IL8抗体標的タンパク質を特異的に標的としてその発現を増強したことを示す。図14Bは、図14Aの各レーンの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図14Bの棒グラフの番号は図14Aのレーン番号と対応している。この一連の実験の結果は、標的である抗IL8抗体を、タンパク質発現増強ポリペプチド（ここではErdj3 Jドメイン）を標的タンパク質結合ドメイン（ここではタンパク質A、タンパク質L、またはIL8）と連結させた本発明の融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗IL8抗体の発現が、融合していない標的タンパク質結合ドメインタンパク質のみ（タンパク質Gのみ、タンパク質Lのみ、またはIL8のみ）と共発現させた場合と比較して有意に増強されたことを明確に示している。

【図15】図15Aおよび15Bは、下記の実施例8に記載の結果を示す。この結果は、商業価値のある確立された細胞株で既に安定に産生されている標的タンパク質の発現のレベルを増強するために本発明の融合タンパク質を用いることができることを実証する。図15Aは、培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）の発現に関する、ドットプロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、抗IL8抗体を単独で発現するCHO-DP12細胞株の細胞（受託番号CRL-12444、American Type Culture Collection（バージニア州、マナナス））（レーン2）、および抗IL8抗体とErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞（レーン3、J

- タンパク質 A) の場合を示す。培地での抗 I L 8 抗体の発現について、抗ヒト I g G 抗体 (「anti-huIgG Ab」) を用いたドットブロット分析で分析した。抗体を J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質と共発現させたことによって、培地に分泌された抗体の発現レベル (レーン 3) が、J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質がない場合に発現された抗体のレベル (レーン 2、なし) と比較して有意に増強されたことがわかる。レーン 1 は対照である (培地のみ)。図 1 5 A のレーンのドットブロットの化学発光シグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図 1 5 B の各棒グラフに示す。結果は、抗体を J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質と共発現させた結果、分泌された抗体の発現 (棒グラフ 3) が有意に増強され、抗体を J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質の非存在下で発現させた場合に得られた発現レベル (棒グラフ 2) の約 4 ~ 5 倍に発現レベルが増強されたことを示している。この結果は、確立された産生細胞株で既に安定に発現されている標的タンパク質の産生レベルを有意に増強するために本発明の融合タンパク質を採用できることを示す。

【図 1 6】図 1 6 A および 1 6 B は、下記の実施例 9. 1 に記載の一連の実験の結果を示す。実施例 9. 1 では、J タンパク質の J ドメイン (タンパク質発現増強ポリペプチドドメインとして) を多様なタンパク質のいずれかと連結させた様々な融合タンパク質について試験した。ここでは、多様な J ドメイン融合タンパク質とその他のタンパク質を、形質移入 H E K 2 9 3 細胞の培地に分泌される I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質 (標的タンパク質) の発現レベルに対する増強能力について試験し比較した。図 1 6 A は、以下の細胞の培養液から採取したサンプルのウェスタンブロット分析における化学発光シグナルの X 線フィルム画像を示す：I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質 (標的タンパク質) を単独で発現する形質移入細胞 (レーン 1)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 2)；I L 1 3 R α 2 T F - F c とタンパク質 A のみを共発現する形質移入細胞 (レーン 3、タンパク質 A のみ)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - タンパク質 G 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 4)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - h F c R 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 5、J - h F c R)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - v F c R 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 6、J - v F c R)、I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - g I 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 7、J - g I)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - g E 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 8、J - g E)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - g I 融合タンパク質および J ドメイン - g E 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 9、J - g I + J - g E)。図 1 6 A のウェスタンブロットの化学発光シグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図 1 6 B の各棒グラフに示す。詳細については下記の実施例 9. 1 を参照のこと。

【図 1 7】図 1 7 A - 1 ~ 1 7 B は、下記の実施例 9. 2 に記載の一連の実験の結果を示す。実施例 9. 2 では、J タンパク質の J ドメイン (タンパク質発現増強ポリペプチドドメインとして) を 6 種の F c 結合ペプチド (F c B P 1 ~ F c B P 6) のそれぞれと連結させた、F c ドメインを有するタンパク質の発現レベルを増強するのに用いるための多様な融合タンパク質を試験した。F c 結合ペプチドのアミノ酸配列を図 1 7 A - 2 に示す (配列番号 2 4 0 ~ 2 4 5)。図 1 7 A - 1 は、以下の細胞の培養液から採取したサンプルのウェスタンブロット分析における化学発光シグナルの X 線フィルム画像を示す：I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質 (標的タンパク質) を単独で発現する形質移入細胞 (レーン 1 および 3)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 2、J - タンパク質 A)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - F c B P 1 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 4、J - F c B P 1)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - F c B P 2 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 5、J - F c B P 2)；I L 1 3 R α 2 T F - F c と J ドメイン - F c B P 3 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン 6、J

- FcBP3) ; IL13Rα2TF-FcとJドメイン-FcBP4融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン7、J-FcBP4) ; IL13Rα2TF-FcとJドメイン-FcBP5融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン8、J-FcBP5) ; IL13Rα2TF-FcとJドメイン-FcBP6融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン9、J-FcBP6) ; IL13Rα2TF-FcとJドメイン-タンパク質G融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (レーン10、J-タンパク質G)。図17A-1に示すように、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質を6種のJドメイン-ペプチド融合タンパク質のそれぞれとHEK293形質移入体で共発現させることによって、分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現レベル (レーン4~9) が、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質を単独で発現させた場合の発現レベル (レーン1および3) と比較して有意に増強された。さらに、比較のために、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合 (レーン2) またはJドメイン-タンパク質G融合タンパク質と共発現させた場合 (レーン10) に分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現にもたらされる効果についても実験した。図17A-1に示すとおり、実施例5 (図12Aおよび12B)、6.1 (図13A-1および13A-2)、9.1 (図16Aおよび16B) でも見られたように、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合 (レーン2) またはJドメイン-タンパク質G融合タンパク質と共発現させた場合 (レーン10) に、分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルが有意に増強された。図17A-1のウェスタンブロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図17Bの各棒グラフに示す。

【図18】図18は、ドットプロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、実施例10に記載の3種のポリペプチドを非改変配列で用いた場合の標的タンパク質発現増強活性の相対レベルの例を示す。「3 (Jドメイン)」、「3-45」、「3-72」と命名したポリペプチド (以下の表58-1~表58-3を参照のこと) に対し、ドットプロットに示す発現レベル、すなわち、高活性 (HA)、活性 (A)、非活性 (NA) と決定した。各ポリペプチドをタンパク質Aと連結させて融合タンパク質を作製し、V5タグで標識したIL13Rα2-Fc標的タンパク質と形質移入細胞内で共発現させた。培地で発現されたV5タグで標識したIL13Rα2-Fc標的タンパク質の発現レベルを、抗V5抗体を用いたドットプロットで測定した。ドットプロットは、以下の形質移入細胞の培地で発現されたV5タグで標識したIL13Rα2-Fc標的タンパク質の発現量を示す：標的タンパク質を単独で発現する形質移入細胞 (左から2番目のレーン) ; 標的タンパク質とポリペプチド3-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (左から3番目のレーン) ; 標的タンパク質とポリペプチド3-45-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (左から4番目のレーン) ; 標的タンパク質とポリペプチド3-72-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞 (左から5番目のレーン)。非改変配列のポリペプチドの標的タンパク質発現増強活性が高い場合 (HA) をドットプロットのレーン3 (左から) に示す発現レベルで表す。ポリペプチドの標的タンパク質発現増強活性が陰性対照と比較して改善された場合 (A) をドットプロットのレーン4 (左から) に示す発現レベルで表す。ポリペプチドに標的タンパク質発現増強活性がない場合 (NA) をドットプロットのレーン5 (左から) に示す。ドットプロットのレーン1 (左から) は、標的タンパク質もいずれのポリペプチド-Fc融合タンパク質も発現しない細胞を入れた疑似培養液の培地では標的タンパク質が発現されなかったことを示している。

【図19】図19は、Erdj3のJドメインのアミノ酸配列比較表であり、全長のJドメインからN末端欠失変異体およびC末端欠失変異体として作製した実施例11に記載の一連のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。Jドメインのαヘリックスとループドメインを括弧で示し、各ポリペプチドの番号、長さ (アミノ酸残基)、タンパク質発現増強活性 (HA、NA)、配列番号も示す。 (標的タンパク質発現増強活性が高い場合 (HA)、

10

20

30

40

50

活性が改善された場合（A）、活性がない場合（NA）の説明については図18および実施例10を参照のこと。）比較表に示すように、ポリペプチド3と命名したJドメインは61アミノ酸の長さであり、非改変配列で標的タンパク質に対し高い発現増強活性（HA）を有する。

【図20】図20Aおよび20Bは、実施例12に記載の一連の実験の結果を示す。実施例12では、改変配列で用いた2種類のポリペプチドの標的タンパク質発現増強活性を比較する。図20Aは、細胞の形質移入に用いる発現ベクターに挿入される核酸構築物の図を示す。IL13R α 2TF構築物は、細胞外IL13結合ドメインを含む切断型IL13R α 2のC末端にV5エピトープタグを融合した融合ポリペプチドをコードする。IL13R α 2TF-BSC1構築物は、切断型IL13R α 2をBSC1配列（ポリペプチド3-29、IKKAYRKLA（配列番号48））と融合してC末端にV5エピトープタグを融合した融合ポリペプチドをコードする。IL13R α 2TF-BSC1MT構築物は、切断型IL13R α 2をBSC1MT配列（ポリペプチド3-55、IAQAYRKLA（配列番号298））と融合してC末端にV5エピトープタグを融合したものをコードする。図20Aの下部に示すように、ポリペプチド3-55のアミノ酸配列は2か所でポリペプチド3-29のアミノ酸配列と異なる。IL13R α 2TF構築物を含むベクターを用いて形質移入した細胞を対照とした（BSC1またはBSC1MTポリペプチドとの融合なし）。図20Bは、抗V5抗体を用いたドットブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、IL13R α 2TFタンパク質を発現する形質移入細胞の培地、IL13R α 2TF-BSC1タンパク質を発現する形質移入細胞の培地、IL13R α 2TF-BSC1MTタンパク質を発現する形質移入細胞の培地を示す。図20Bのレーン2（左から）は、対照細胞の培地では非常に低いレベルのIL13R α 2TF融合タンパク質しか検出されなかったことを示している。図20Bのレーン3（左から）は、IL13R α 2TF-BSC1構築物を含むベクターを用いて形質移入した細胞の培地で有意なレベルのIL13R α 2TF-BSC1融合タンパク質が発現されたことを示している。図20Bのレーン4（左から）は、IL13R α 2TF-BSC1MT構築物を含むベクターを用いて形質移入した細胞の培地では非常に低いレベルのIL13R α 2TF-BSC1MT融合タンパク質しか検出されなかったことを示している。結果は、改変配列の場合にポリペプチド3-29が標的タンパク質発現増強「活性が高い」のに対し、ポリペプチド3-55は改変配列の場合に標的タンパク質発現増強「活性がない」と考えられることを示している。

【図21】図21は、実施例13に記載のように、HEK293細胞内で非改変配列のBSC1-タンパク質Aと共発現させた場合のIL13R α 2TF-Fc標的タンパク質のIL13結合活性を示す棒グラフである。実施例13に記載のように、BSC1-タンパク質A融合タンパク質は、ポリペプチド3-29（IKKAYRKLA（配列番号48））をタンパク質Aと連結させた融合タンパク質である。IL13結合活性の測定に用いた試験はサンドイッチELISA（enzyme-linked immune solvent assay）法である。この方法では、IL13がIL13R α 2TF-Fcタンパク質に捕捉されるとヒトIL13の検出量が減少する。図21の棒グラフ1（左から）は、IL13R α 2TF-Fc融合タンパク質もBSC1-タンパク質A融合タンパク質も発現しない対照細胞の培養液の培地ではIL13結合活性が見られなかったことを示す。図21の棒グラフ2（中央）は、IL13R α 2TF-Fcタンパク質のみを発現する細胞の培養液の培地では低レベルのIL13結合活性が少し検出されたことを示している。対照的に、図21の棒グラフ3（右端）に示すように、IL13R α 2TF-FcとBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する細胞の培地では、有意なレベルのヒトIL13結合活性が見られた。結果は、非改変配列でより高いレベルで培地に発現されたIL13R α 2TF-Fc標的タンパク質がIL13結合活性を保持していたことを示している。

【図22】図22Aおよび22Bは、実施例14に記載の実験の結果を示す。実施例14では、第VII因子（Factor VII（FVII））-Fc融合タンパク質（標的タンパク質）をポリペプチド3-29（IKKAYRKLA（配列番号48））をタンパク質Gと連

結させたB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質と非改変配列で共発現させた場合、培地に分泌されるF V I I - F c融合タンパク質の発現レベルが有意に増強されることを実証する。図2 2 Aは、培地に分泌されたF V I I - F c融合タンパク質の発現に関するウェスタンブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像（上図）であり、F V I I - F c融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の場合（レーン2）およびF V I I - F c融合タンパク質とB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（レーン3）を示す。レーン1は発現しない細胞培地を対照として示す。細胞可溶化物中のB S C 1 - タンパク質G（中央図）と分泌されたB S C 1 - タンパク質G（下図）を、抗F l a g抗体を用いてそれぞれ検出した。図2 2 Bは、図2 2 Aの上図の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図2 2 Bの棒グラフ1～3は、図2 2 Aの上図のレーン1～3のシグナルと対応している。結果は、F V I I - F c標的タンパク質とB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質とを共発現させることによって、培地に分泌されたF V I I - F c標的タンパク質の発現レベルが、B S C 1 - タンパク質G融合タンパク質の非存在下で発現させた場合の標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強されたことを示している。さらに、B S C 1 - タンパク質G融合タンパク質は分泌されず細胞内に残っていた。細胞可溶化物中のB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質の発現量（図2 2 Aの中央図）と培地での発現量（図2 2 Aの下図）を比較のこと。

【図2 3】図2 3 Aおよび2 3 Bは、実施例1 5に記載の実験の結果を示す。この実験では、ポリペプチド3 - 2 9（I K K A Y R K L A（配列番号4 8））をタンパク質Aと連結させたB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質の存在下で第I X因子（Factor I X（F I X））- F c融合（F I X - F c）標的タンパク質の発現レベルが改善することを実証する。図2 3 Aは、培地に分泌されたF I X - F c融合タンパク質の発現に関するウェスタンブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、F I X - F c融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の場合（列2）およびF I X - F c融合タンパク質とB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（列3）を示す。列1は発現しない細胞培地を対照として示す。図2 3 Bは、図2 3 Aの上図の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図2 3 Bの棒グラフ1～3は図2 3 Aの列1～3のシグナルと対応する。結果は、F I X - F c標的タンパク質とB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質とを共発現させることによって、培地に分泌されたF I X - F c標的タンパク質の発現レベルが、B S C 1 - タンパク質A融合タンパク質がない場合の標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強されたことを示している。

【図2 4】図2 4は、実施例1 6に記載の一連の実験の結果を示す。実施例1 6では、第V I I I因子（Factor V I I I（F V I I I））- F c融合タンパク質（F V I I I - F c）をポリペプチド3 - 2 9（I K K A Y R K L A（配列番号4 8））をタンパク質Gと連結させたB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質と非改変配列で共発現させた場合、F V I I I - F cの発現レベルが有意に増強されることを実証する。F V I I I - F c融合タンパク質（標的タンパク質）とB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質とを共発現する形質移入H E K 2 9 3細胞またはF V I I I - F c融合タンパク質を単独で発現する細胞の培養液から培地を回収し、F V I I I活性をE L I S A法（V i s u L i z e（商標）F V I I I抗原キット、Affinity Biologicals Inc.）で分析した。空のベクターを形質移入した細胞培地を陰性対照とした（左から1番目の棒グラフ）。左から2番目の棒グラフは、F V I I I - F c標的タンパク質を単独で発現する細胞の培地ではF V I I Iが検出されなかったことを示している。左から3番目の棒グラフは、F V I I I - F c標的タンパク質とB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質とを共発現する細胞の培地に有意なレベルのF V I I I - F c標的タンパク質が分泌されたことを示している。ヒト血清を陽性対照として用いた（左から4番目の棒グラフ）。結果は、F V I I I - F c標的タンパク質とB S C 1 - タンパク質G融合タンパク質とを共発現させることによって、培地に分泌されたF V I I I - F c標的タンパク質の発現レベルが、B S C 1 - タンパク質G融合タン

パク質がない場合の標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強されたことを示している。

【図25】図25A～25Cは、実施例17に記載の実験の結果を示す。この実験では、抗IL8抗体（標的タンパク質）を3-29ポリペプチド（IKKAYRKLA（配列番号48））をタンパク質Aと連結させたBSC1-タンパク質Aと非改変配列で共発現させた場合、培地に分泌される抗IL8抗体の発現レベルが改善することを実証する。図25Aは、培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）の発現に関するドットブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞の場合（列2）、および抗IL8抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する細胞の場合（列3、BSC1-タンパク質A）を示す。培地での抗IL8抗体の発現について、抗ヒトIgG抗体を用いたドットブロット分析で分析した。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（抗IL8抗体なし、列1）。形質移入細胞内で抗IL8抗体をBSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させたことによって、培地に分泌された抗IL8抗体発現レベル（列3）が、抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞で発現された抗体のレベル（列2）と比較して有意に増強されたことがわかる。図25Bは、図25Aの各列の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図25Bの棒グラフの番号は図25Aの列番号と対応している。この一連の実験の結果は、標的抗IL8抗体をBSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗IL8抗体の発現が、BSC1-タンパク質A融合タンパク質がない場合の抗体の発現レベルと比較して有意に増強されたことを明確に示している。図25Cは、発現された抗IL8抗体（標的タンパク質）のIL8結合活性をELISA法で検出した結果の棒グラフを示す。精製した組換えヒトIL8を96穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ2）または抗IL8抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ3、BSC1-タンパク質A）。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（棒グラフ1、抗IL8抗体なし）。この一連の実験の結果は、より高レベルで発現され培地に分泌された抗IL8抗体がヒトIL8結合活性を保持することを明確に示しており、分泌された抗体が適切な立体構造を有することを示す。

【図26】図26A～26Cは、実施例18に記載の一連の実験の結果を示す。実施例18では、抗VEGF抗体であるベバシズマブを3-29ポリペプチド（IKKAYRKLA（配列番号48））をタンパク質Aと連結させたBSC1-タンパク質Aと共発現させた場合、発現レベルが有意に増強することを実証する。図26Aは、培地に分泌された抗VEGF抗体の発現に関するドットブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、抗VEGF抗体を単独で発現する形質移入細胞の場合（列2）または抗VEGF抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（列3）を示す。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（抗VEGF抗体なし、列1）。培地での抗VEGF抗体の発現について、抗ヒトIgG抗体を用いたドットブロット分析で分析した。形質移入細胞内で抗VEGF抗体をBSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させたこと（列3）によって、培地に分泌された抗VEGF抗体の発現レベルが、抗VEGF抗体を単独で発現する形質移入細胞で発現された抗体のレベル（列2）と比較して有意に増強されたことがわかる。図26Bは、図26Aの各列の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図26Bの棒グラフの番号は図26Aの列番号と対応している。結果は、抗VEGF抗体をBSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗VEGF抗体の発現が、単独で発現した場合の抗体のレベルと比較して有意に増強されたことを明確に示している。図26Cは、形質移入細胞の培地で発現された抗VEGF抗体のVEGF結合をE

L I S A法で検出した結果を示す。精製した組換えヒトV E G F - Aを96穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗V E G F抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：抗V E G F抗体を単独で発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ2）；または抗V E G F抗体と本発明のB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ3）。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（抗V E G F抗体なし、棒グラフ1）。この一連の実験の結果は、より高レベルで発現され培地に分泌された抗V E G F抗体がヒトV E G F - A結合活性を保持することを明確に示しており、分泌された抗体が適切な立体構造を有することを示す。

【図27】図27A～27Cは、実施例19に記載の一連の実験の結果を示す。実施例19では、3 - 29ポリペプチド（I K K A Y R K L A（配列番号48））をタンパク質Aと連結させたB S C 1 - タンパク質Aと共発現させた場合、治療用抗T N F α抗体であるアダリムマブ（H u m i r a（登録商標）、A b b v i e社）の発現レベルが有意に増強されることを実証する。図27Aは、培地に分泌された抗T N F α抗体の発現に関するドットプロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、抗T N F α抗体を単独で発現する形質移入細胞の場合（列2）および抗T N F α抗体とB S C 1 - タンパク質A融合物とを共発現する形質移入細胞の場合（列3）を示す。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（列1、抗T N F α抗体なし）。培地での抗T N F α抗体の発現について、抗ヒトI g G抗体を用いたドットプロット分析で分析した。形質移入細胞内で抗T N F α抗体をB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質と共発現させたことによって、培地に分泌された抗T N F α抗体の発現レベル（最下列）が、抗T N F α抗体を単独で発現する形質移入細胞で発現された抗体のレベル（中央）と比較して有意に増強されたことがわかる。図27Bは、図27Aの各列の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図27Bの棒グラフの番号は図27Aの列番号と対応している。この一連の実験の結果は、抗T N F α抗体（標的タンパク質）をB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗T N F α抗体の発現が有意に増強されたことを明確に示している。図27Cは、形質移入細胞の培地で発現された抗T N F α抗体のT N F α結合活性をE L I S A法で検出した結果を示す。精製した組換えヒトT N F αを96穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗T N F α抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：抗T N F α抗体を単独で発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ2）；または抗T N F α抗体とB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ3）。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（棒グラフ1）。この一連の実験の結果は、より高レベルで発現され培地に分泌された抗T N F α抗体がヒトT N F α結合活性を保持することを明確に示しており、分泌された抗体が適切な立体構造を有することを示す。

【図28】図28A～28Cは、実施例20に記載の結果を示す。この結果は、商業価値のある確立された細胞株で既に安定に産生されているタンパク質の発現レベルを、3 - 29ポリペプチド（I K K A Y R K L A（配列番号48））をタンパク質Aと連結させたB S C 1 - タンパク質A融合物と共発現させた場合に増強することができることを実証する。図28Aは、培地に分泌された抗I L 8抗体（標的タンパク質）の発現に関するドットプロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、抗I L 8抗体を単独で発現するC H O - D P 1 2細胞株の細胞（受託番号C R L - 1 2 4 4 4 4、American Type Culture Collection（バージニア州、マナナス））の場合（列2）、および抗I L 8抗体とB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（列3）を示す。抗体をB S C 1 - タンパク質A融合タンパク質と共発現させたことによって、培地に分泌された抗体の発現のレベル（列3）が、B S C 1 - タンパク質A融合タンパク質の非存在下で発現された抗体のレベル（列2）と比較して有意に増強されたことがわかる。列1は対照である（培地のみ）。図28Aの各列のドットプロットの化学発光シグナルをNI

10

20

30

40

50

H ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を、図28Bの各棒グラフに示す。結果は、抗体をBSC1-タンパク質A融合分子と共発現させた結果（棒グラフ3）、分泌された抗体の発現が有意に増強され、抗体をBSC1-タンパク質A融合分子の非存在下で発現させた場合に得られた発現レベル（棒グラフ2）の約4～5倍に発現レベルが増強されたことを示している。図28Cは、形質移入細胞の培地で発現された抗IL8抗体のIL8結合活性をELISA法で検出した結果を示す。精製した組換えヒトIL8を96穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：安定に抗IL8抗体を発現する細胞の培地（棒グラフ2）；または抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する細胞の培地（棒グラフ3）。培地を陰性対照として用いた（棒グラフ1、IL8結合活性なし）。この一連の実験の結果は、より高レベルで発現され培地に分泌された抗IL8抗体がヒトIL8結合活性を保持することを明確に示しており、分泌された抗体が適切な立体構造を有することを示す。

【図29】図29は、実施例21に記載した実験の結果を示す。これらの結果からは、適切な立体構造に折り畳まれない変異タンパク質を原因とする疾患の治療に本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドを使用できることがわかる。図29Aは、野生型 $\alpha 1$ アンチトリプシン（AAT）またはZ変異を有する変異型 $\alpha 1$ アンチトリプシン（AATZ（AATコドン342のGluをLysで置換したもの）をヒトIgGのFcドメインと連結させた融合タンパク質を、3-29ポリペプチド（IKKAYRKLA（配列番号48））をタンパク質Aと連結させたBSC1-タンパク質Aと共発現させた場合と共発現させなかった場合の、各融合タンパク質の発現量に関するウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像を示す。図29の上図は、以下の形質移入細胞の培地内のFc融合タンパク質の発現量を示す：AAT-Fc融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（左から2番目のレーン）；AATZ-Fc融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（左から3番目のレーン）；AATZ-Fc融合タンパク質とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞（左から4番目のレーン）。レーン1は、発現しない細胞培地を対照として示す。明らかに、AATZ-Fc融合タンパク質を単独で発現する細胞の培地にはAATZ-Fc融合タンパク質が分泌されていなかった（左から3番目のレーン）。図29の中央図（細胞可溶化物）に示すように、AATZ-Fc融合タンパク質を単独で発現する細胞についてはAATZ-Fc融合タンパク質が細胞内に残っており（左から3番目のレーン）、融合していないAATZタンパク質について知られているように、小胞体に留まっていたと推定される。対照的に、図29の上図（培地）のレーン4（左から）に示すように、AATZ-Fc融合タンパク質とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現させた結果、培地に分泌されたAATZ-Fc融合タンパク質のレベルが有意に増強された。さらに、図29の中央図（細胞可溶化物）のレーン4（左から）に示すように、細胞には実質的にはAATZ-Fc融合タンパク質が残っていなかった。抗チューブリン抗体を用いて同じ膜にブロッティングし、図29に示す負荷対照（下図）とした。結果は、BSC1-タンパク質A融合タンパク質の非存在下で発現させた場合の標的タンパク質の発現レベルではAATZ-Fcが実質的には細胞内に残っていなかったのに比べて、BSC1-タンパク質A融合タンパク質を共発現させたことによって培地に分泌されたAATZ-Fc標的タンパク質のレベルが有意に増強されたことを示している。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本発明は、目的の標的タンパク質の発現レベルを増強するための新規なポリペプチドのファミリーを提供する。本発明は、宿主細胞内で目的の標的タンパク質を2種類の配列のいずれかの配列で以下のタンパク質発現増強ポリペプチドと共発現させた場合、適切な細胞内位置または細胞外位置に有意に高いレベルで発現できるという発見に基づく。タンパク質発現増強ポリペプチドは、以下を含む：

Jタンパク質から単離されたJドメイン；

Jドメインのタンパク質発現増強ポリペプチド断片；または

以下の式を有するタンパク質発現増強Jドメインアナログポリペプチド：

式：X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9（配列番号47）

（式中、X 1はイソロイシン（I）、ロイシン（L）、バリン（V）、アラニン（A）、またはメチオニン（M）であり、

X 2およびX 3はそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、ただし少なくとも一方リジン（K）またはアルギニン（R）であり、

X 4は任意のアミノ酸であるか；X 1～X 3が存在しX 5～X 9が存在する場合、X 4は存在しなくてもよく、

X 5はチロシン（Y）、トリプトファン（W）、またはフェニルアラニン（F）であり、

X 6およびX 7はそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、ただし少なくとも一方がリジン（K）またはアルギニン（R）であるか；X 6およびX 7のいずれか一方がKまたはRであり、X 1～X 5が存在しX 8およびX 9が存在する場合、X 6およびX 7の他方は存在しなくてもよく、

X 8およびX 9は任意のアミノ酸であり、ただし少なくとも一方がロイシン（L）またはアラニン（A）であるか；X 8およびX 9の一方がLまたはAでありX 1～X 7が存在する場合、X 8およびX 9の他方は存在しなくてもよい）。

【0051】

本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドは、2種類の配列のいずれの配列でも、宿主細胞による目的の標的タンパク質の発現を増強するために採用できる。「改変」配列の場合、融合タンパク質はタンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた（融合した）融合タンパク質である。したがって、この融合タンパク質は目的の標的タンパク質の機能を代わりに果たす「改変された」標的タンパク質であり、改変されていない標的タンパク質を単独で発現させた場合の発現レベルよりも高いレベルで宿主細胞に発現される。「非改変」配列では、融合タンパク質は、本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドを通常の「改変されていない」目的の標的タンパク質に親和性を有し結合する標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質である。この融合タンパク質と目的の標的タンパク質とを宿主細胞内で共発現させることによって、改変されていない標的タンパク質の発現は、本発明の標的タンパク質結合融合タンパク質がない場合の発現レベルに比べて増強される。本発明に従って、改変配列または非改変配列の場合のタンパク質発現レベルの増強には、それぞれ、改変された目的の標的タンパク質または改変されていない目的の標的タンパク質がその目的の標的タンパク質の適切な位置（細胞内または細胞外）で発現されることが含まれる。

【0052】

したがって、本発明は、所望の量の目的の内因性タンパク質または異種性（組換え）タンパク質を細胞内で発現できない場合に技術的解決策を提供する。本発明はさらに、十分なレベルの機能性タンパク質を生体内で発現できない個体の疾患または障害を治療するための組成物および方法を提供する。生体内では、タンパク質またはその機能的な型の発現が不十分な場合、病理的状态につながる。不適切に折り畳まれたタンパク質種が実証または示唆されている疾患の例としては、プリオン関連疾患（伝染性海綿状脳症）やアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症（cystic fibrosis（CF））が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0053】

より明確に本発明を説明するために、以下の解説と用語の定義が適用される。

【0054】

本明細書中に特に定義しない限り、本発明に関連して使用する科学技術用語は、当業者が一般的に理解する意味を有するものとする。用語の意味と範囲は明確であるべきであるが、何らかの潜在的多義性があった場合、いかなる辞書または本明細書外の定義よりも本明細書に示す定義が優先される。さらに、文脈上他の意味に解釈する必要がある場合を除いて、単数形の用語は複数形を包含し、複数形の用語は単数形を包含するものとする。本

願では、特に指定しない限り、「または」という語を用いた場合は「および／または」を意味する。さらに、「含む (including)」という語を用いた場合、「～を含む (includes)」や「～が含まれる (included)」などの他の形の場合と同様、限定的ではない。

【0055】

一般的に、本明細書に記載のタンパク質化学や核酸化学（組換え核酸やポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction (PCR)) の方法を含む）、細胞や組織の培養、分子生物学、遺伝学、微生物学、生化学、プロテオミクス、薬理学、薬科学に関連して用いる用語やこれらに関する技術は、一般的に当技術分野において周知であり一般に使用されるものである。本発明の方法および技術は、当技術分野の従来の方法に従い、また、当技術分野で入手可能な様々な一般的参考文献や詳細な参考文献に記載されたとおりに一般に実施される。分析および精製の技術は、実験技術の説明書や製造者による仕様書など、当技術分野で入手可能な手順書に従い、当技術分野で一般に遂行されているとおりに、または本明細書に記載したとおりに実施される。

10

【0056】

特に指定しない限り、「約」という用語をある量、数または値と組み合わせて用いた場合、その組み合わせは記載された量、数、または値のみでなく、その量、数、または値±10%を表す。例として、「約40%」という表現は「40%」と「36%～44%（36%と44%を含む）」の両方を示す。

【0057】

20

「目的の標的タンパク質」、「標的タンパク質」または「目的のタンパク質」とは、意図される細胞内（細胞内部および膜結合部位を含む）または細胞外の（分泌された）位置での発現レベルを増強することが必要であるか望まれるような任意のタンパク質を意味する。

【0058】

「単離された分子」（たとえば「単離されたタンパク質」または「単離された核酸」）の「単離された」とは、その分子の起源または由来に基づいて、天然の状態ではその分子に付随していて本来は結合していた成分と結合していない分子、同一種に由来するその他の種類の分子を実質的に含まない分子、異種に由来する細胞によって発現される分子、または自然界に存在しない分子を意味する。このように、化学合成したタンパク質分子や核酸分子、あるいはその分子の天然の起源である細胞とは別の細胞系で合成したタンパク質分子または核酸分子は、その分子に本来は結合している成分から「単離される」。タンパク質または核酸分子はさらに、当技術分野において周知のタンパク質精製技術または核酸精製技術を用いて単離することによって、本来は結合している成分を実質的に含まない状態にすることができる。

30

【0059】

本明細書中、「ベクター」とは、核酸分子であり、その核酸分子と連結された別の核酸を輸送することができる。ベクターの一種は「プラスミド」である。「プラスミド」とは環状の二本鎖核酸（一般的にはDNA）のループであり、そのループに別の核酸セグメントを挿入することができる。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、別のDNAセグメントをウイルスゲノムに挿入することができる。ある種のベクターは、導入先の宿主細胞内で自己複製できる（たとえば、細菌由来複製開始点を有する細菌ベクターやエピソード哺乳類ベクター）。その他のベクター（たとえば非エピソード哺乳類ベクター）は、宿主細胞へ導入すると宿主細胞のゲノムに組み込まれることができ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、あるベクターは、作動可能に連結している遺伝子の発現を指示することができる。本明細書では、そのようなベクターを「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）という。一般的に、組換えDNA技術に有用な発現ベクターは、プラスミド形態であることが多い。プラスミドは最も一般的に使用されるベクター形態であるため、本明細書では、「プラスミド」と「ベクター」を同義的に使用できるが、本発明は、ウイルスベクター（たとえば、複製欠損レトロウイルス、レンチウイルス

40

50

ス由来ベクター、アデノウイルス由来ウイルス) など、同等または匹敵する機能を果たすその他の形態の発現ベクターも含むものとする。

【0060】

「作動可能に連結された」とは、記載された複数の成分が、意図された形で機能できるような位置関係に並べられていることを意味する。コード配列と「作動可能に連結された」制御配列は、制御配列に適合する条件でコード配列が発現するように連結されている。

「作動可能に連結された」配列には、目的の遺伝子に隣接した発現制御配列と、トランスで、すなわち離れて目的の遺伝子を制御する働きをする発現制御配列とが含まれる。「発現制御配列」とは、その配列と連結されたコード配列の発現やプロセシングに作用するために必要なポリヌクレオチド配列である。発現制御配列としては、適切な転写開始配列、転写終結配列、プロモーター配列、およびエンハンサー配列；スプライシングシグナルやポリアデニル化シグナルなどの効率的なRNAプロセシングシグナル；細胞質mRNAを安定させる配列；翻訳効率を増強する配列（たとえばコザックコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を高める配列；望ましい場合にはタンパク質の分泌を増強する配列などが挙げられる。このような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なる。原核生物の場合、このような制御配列としては一般的にプロモーター配列、リボソーム結合部位配列、および転写終結配列が挙げられ、真核生物の場合は、このような制御配列としては一般的にプロモーター配列および転写終結配列が挙げられる。「制御配列」という用語は、発現およびプロセシングに必須である構成要素を包含することが意図され、リーダー配列や融合パートナー配列など、存在すれば有利である追加的な構成要素も包含し得る。特に指定しない限り、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターに挿入することについて本明細書に説明または記載したときは、挿入された核酸分子を含む発現ベクターを適合する宿主細胞または適合する生物の細胞へ導入した際にコードされた融合タンパク質の発現に必要な機能性プロモーターやその他の転写制御要素および翻訳制御要素と、挿入された核酸とがベクター内で作動可能に連結されていることを意味する。

【0061】

本明細書中、「組換え」という用語は、形容詞的に用いた場合、単離された核酸（一般的にはDNA）の操作および宿主細胞の形質移入、または非内因性核酸を導入して内因性核酸を操作し代替物を発現させることによって得られた、人工的に改変または操作された核酸、外因性核酸を形質移入した宿主細胞、または人工的に発現されたポリペプチドを表す。「組換え」は、具体的には遺伝子工学技術を用いてインビトロで構築したDNA分子を包含する用語であり、分子、構築物、ベクター、細胞、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたはポリヌクレオチドを説明するために形容詞的に用いた場合、具体的には、それぞれの単離されていない本来の位置（たとえば細胞内、組織内、または臓器内の位置）に天然に存在する（「内因性の」）分子、構築物、ベクター、細胞、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、およびポリヌクレオチドについては包含しない。

【0062】

本明細書中、「組換え宿主細胞」（または本文中では単に「宿主細胞」ともいう）とは、中に外因性核酸が導入された細胞を指すことが意図される。なお、この用語は、特定の対象細胞を指すのみではなく、その細胞の子孫も指すことが意図されているものである。子孫細胞では変異または環境的影響による何らかの改変が生じ得るため、子孫細胞は実際には親細胞と同一でない可能性があるが、本明細書で使用する場合は、「宿主細胞」という用語の範囲に子孫細胞も包含する。本発明の多様な側面で有用な宿主細胞は原核生物細胞および真核生物細胞が挙げられる。好ましい原核生物宿主細胞としては、大腸菌 (*Escherichia coli*) などの多様な細菌細胞が挙げられる。本発明に関連する核酸またはコードされたポリペプチドに関する一部の操作、構築、発現、または複製は、原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞を用いて行うことができるが、本明細書に記載の改変配列の場合も非改変配列の場合も、目的の標的タンパク質の発現を増強するために好ましい宿主細胞は真核生物宿主細胞である。好ましい真核生物宿主細胞としては、哺乳類宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真菌宿主細胞、真核藻類宿主細胞、線虫宿主細胞、原虫宿主細胞

胞、魚類宿主細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary (CHO)) 細胞、COS細胞、Vero細胞、SP2/O細胞、NS/O 骨髓腫細胞、ヒト胎児腎臓 (human embryonic kidney (HEK293)) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (baby hamster kidney (BHK)) 細胞、HeLa細胞、ヒトB細胞、CV-1/EbNA細胞、L細胞、3T3細胞、HEPG2細胞、PerC6細胞、またはMDC K細胞であることが好ましい。好ましい真菌宿主細胞としては、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ニューロスポラ (*Neurospora*) 属、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、ヤロウィア (*Yarrowia*) 属、カンジダ (*Candida*) 属が挙げられる。特に好ましいサッカロミセス属宿主細胞は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞である。特に好ましい昆虫宿主細胞は Sf9 細胞である。

【0063】

用語「異種性の」と「外因性の」は同義であり、ある宿主細胞に含まれるか発現される分子で、その宿主細胞が本来産生しない任意の分子（たとえばタンパク質、ポリペプチド、核酸）を説明するために形容詞的に広く用いられる。したがって、「異種性の」および「外因性の」には先に定義した「組換え」という用語が包含される。

【0064】

当技術分野において公知であり本明細書で使用される「トランスジェニック生物」は、導入遺伝子を含む細胞を有する生物を意味する。ここで、当該生物（またはその祖先）に導入された導入遺伝子は、その生物では天然に発現されないポリペプチドまたは目的の機能を生物に与えるための正常または適切なレベルでは天然に発現されないポリペプチドを発現する。「導入遺伝子」は、トランスジェニック生物を発生させる元の細胞のゲノムに安定かつ作動可能に組み込まれる核酸構築物であり、コードされた遺伝子産物がトランスジェニック生物の1種以上の細胞型または組織で発現されるよう指示する。

【0065】

用語「疾患」と「障害」は同義的に用いられ、当技術分野で許容される医学的基準と実務に従って認識される病理的状态を示す。

【0066】

本明細書中、「有効量」とは治療に関する量であり、疾患または当該疾患の1つ以上の症状の重症度および／または持続期間の軽減や短縮または改善のため；有害または病理的な状態の進行を予防するため；病理的状态を退行させるため；病理的状态に関連する1つ以上の症状の再発、発症、発病または進行を予防するため；障害を検知するため；あるいは治療（別の予防薬または治療薬の投与など）による予防効果または治療効果の増強または改善のために十分な量を意味する。

【0067】

本明細書中、「生物サンプル」としては、生物の生体または死体から採取した任意の量の物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。このような生物としては、ヒト、ヒト以外の霊長類、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギ、反芻動物、およびその他の動物が挙げられるがこれらに限定されるものではない。このような生物サンプルの物質としては、血液、血清、血漿、尿、唾液、痰、粘液、滑液、乳汁、精液、細胞、臓器（たとえば心臓、脾臓、肺、腎臓、乳房、脳、眼、舌、胃、膵臓、腸、胆嚢、生殖器、虫垂）、組織（たとえば骨、軟骨、筋肉、皮膚）、骨髓、リンパ節を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0068】

指定された1つ以上の構成要素または工程を「含む」として本明細書に記載された組成物または方法は非制限的であり、指定された構成要素または工程が必須であるが他の構成要素または工程をその組成物または方法の範囲内で追加することができることを意味する。冗長を避けるため、指定された1つ以上の構成要素または工程を「含む」として記載さ

れた任意の組成物または方法は、指定された同一の構成要素または工程から「実質的になる」、さらに限定された対応の組成物または方法も示し、その組成物または方法が、指定された必須の構成要素または工程を含み、その組成物または方法の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響しない追加的な構成要素または工程をさらに含んでもよいという意味であることも理解される。指定された1つ以上の構成要素または工程「を含む」、または「から実質的になる」と本明細書に記載された任意の組成物または方法は、指定された構成要素または工程「からなり」、指定されていない他のいかなる構成要素または工程も含まない、さらに限定された制限的な対応の組成物または方法も示すということも理解される。

【0069】

本明細書中、「Jドメインアナログ」とは、式I（配列番号47）のアミノ酸配列を含む標的タンパク質発現増強ポリペプチド（protein expression enhancing polypeptide、すなわちPEEP）を意味する。このようなポリペプチドは、標的タンパク質配列に組み込んで改変標的タンパク質を形成する場合、またはこれを用いてタンパク質発現増強ポリペプチドと標的タンパク質結合ドメインの融合タンパク質を構築した場合、目的の標的タンパク質の発現の増加に作用するために有用である。

【0070】

「Jドメイン活性断片」または「Jドメインの活性断片」とは、Jタンパク質のJドメインに含まれる断片であり、本明細書に記載の2種類の融合タンパク質（PEEPと標的タンパク質との融合物またはPEEPと標的タンパク質結合ドメインとの融合物）に使用した場合に標的タンパク質の発現レベルを増強する能力を保持する断片を意味する。以下の実施例は、Jドメイン活性断片がJドメインのうち α ヘリックスIIのC末端側の端にある領域を共通して保持することを示す。Jドメインに含まれるさらに大きな部分も活性を有し得るが、 α ヘリックスIIのC末端側の9個のアミノ酸の全部または一部を取り除くと、タンパク質発現増強活性は必ず失われる。

【0071】

本明細書に開示する任意の組成物または方法では、指定された任意の必須の構成要素または工程を、それらに対する公知であるか開示されている均等物で置き換えてもよい。

【0072】

特に指定しない限り、また、方法に含まれる特定の工程よりも先に別の工程を実行する必要があるのではない限り、組成物または方法は、列挙された構成要素または工程のいかなる特定の順序によっても限定されない。

【0073】

「～からなる群から選択される」または「～のいずれか」（または同等の表現）の構成要素または工程は、後に続いて列挙されたうちの1つ以上の構成要素または工程を指し、列挙された構成要素または工程のうち任意の2つ以上の組み合わせも包含されることも理解される。

【0074】

本発明において有用なJドメイン

多様なJタンパク質のJドメインが決定されている。たとえばKampinga et al., Nat. Rev., 11: 579-592 (2010); Hennessy et al., Protein Science, 14:1697-1709 (2005)を参照のこと。本発明の融合タンパク質を調製するのに有用なJドメインは、Jタンパク質ファミリーに属するいずれかのタンパク質のJドメインを定義する重要な特徴を有する（改変配列の場合も非改変配列の場合も）。したがって、本発明において有用な単離されたJドメインは、4つの α ヘリックス（I、II、III、IV）を特徴とし、通常は高度に保存されたヒスチジン、プロリン、アスパラギン酸からなるトリペプチド配列（「HPDモチーフ」という）をヘリックスIIとIIIとの間に有する、Jタンパク質のポリペプチドドメインを含む。一般的には、Jタンパク質のJドメインは50～70アミノ酸の長さであり、JドメインがHsp70-ATPシャペロンタンパク質と相互作用（結合）する部位は、ヘリックスII内から始まりHPDモチーフを含む領域であると考えられている。代表的なJドメインとしては、Erdjタンパク質のJドメイン（たとえばE

10

20

30

40

50

R d j 3 または E R d j 5 の J ドメイン)、S V 4 0 ラージ T 抗原の J ドメイン、および哺乳類のシステインストリングタンパク質 (C S P - α) の J ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの J ドメインや、本発明の融合タンパク質に用いることのできる他の J ドメインのアミノ酸配列を表 1 - 1 ~ 表 1 - 4 に示す。

表 1 - 1 ~ 表 1 - 4 . 代表的な単離された J ドメインのアミノ酸配列

【 0 0 7 5 】

【表 1 - 1】

J ドメインの単離元 J タンパク質	配列 番号	J ドメインのアミノ酸配列 123456789012345678901234567890
ヒト Hsp40 (NP_006136; 熱ショックタンパク質 40)	1	KDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYH PDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRK
ヒト ErdJ1 (NM_022365; DnaJC1, HTJ1, MTJ1 , DnaJ ホモログサブファミリーc メ ンバー1 タンパク質, DNAJL1)	2	LNFYQFLGVQQDASSADIRKAYRKLSTLH PDKNKDENAETQFRQLVAIYEVLKDDER
ヒト ErdJ2 (NM_001017975; HFM1, SEC63 ド メイン含有タンパク質 1, MER3, hHFM1)	3	YNPYEVLNLDPGATVAEIKKQYRLLSLKYH PDKGGDEVFMFMRIAKAYAALTDEES
ヒト ErdJ3 (NM_016306; DNAJB11, DnaJ (Hsp40) ホモログサブファミリ ーB メンバー 11, ERj3p, HEDJ, ERj3, ABBP2, 小 胞体関連 DNAJ タンパク質 3)	4	RDFYKILGVPRASISIKDIKKAYRKLALQLH PDRNPDDPQAQEKFDLGAAYEVLSDSEK
ヒト ErdJ4 (NM_012328; DNAJB9, 毛細血管分 化遺伝子 1 タンパク質, MDG1, 内皮 Mdg1)	5	KSYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAMKYH PDKNKSPDAEAKFREIAEAYETLSDANR
ヒト ErdJ5 (NM_018981; DNAJC10, 小胞体タン パク質 ERdj5, JPD1, J ドメイン含 有タンパク質ジスルフィドイソメラ ーゼ様タンパク質, DnaJ (Hsp40) ホ モログサブファミリーc メンバー 10, hMTHr タンパク質)	6	QDFYSLLGVSKTASSREIRQAFKKLALKLH PDKNPNPNNAHGDFLKINRAYEVLKDEDL
ヒト ErdJ6 (NM_006260; DNAJC3, DnaJ (Hsp4 0) ホモログサブファミリーc メンバ ー3 タンパク質, タンパク質キナー ゼ, インターフェロン誘導二本鎖 RNA 依存性阻害タンパク質, P58IPK タンパク質, PRKRI, 58kDa 細胞性阻 害タンパク質, タンパク質キナーゼ阻 害因子 p58)	7	RDYYKILGVKRNAAKKQETIKAYRKLALQWH PDNFQNEEEKKKAEEKKFIDIAAAKEVLSDP EM
ヒト CSP (NP_079495; システインストリング タンパク質 α , CSP- α タンパク 質, DNAJC5 タンパク質, システイン ストリングタンパク 質, DnaJ (Hsp40) ホモログサブファ ミリーc メンバー5 タンパク質, CSP タンパク質)	8	ESLYHVLGLDKNATSDDIKKSYRKLALKYH PDKNPDNPEAADKFKEINNAHAILTATK

【表 1 - 2】

J ドメインの単離元 J タンパク質	配列 番号	J ドメインのアミノ酸配列 123456789012345678901234567890
SV40 ラージ T 抗原 (YP_003708382; ラージ T 抗原 T-ag [シミアンウイルス 40])	9	LQLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKKCKE FHPDKGGDEEKMKKMNTLYKKMEDGVK
DnaJ	10	QDYIEILGVSKTAEEREIKKAYKRLAMKYH PDRNQGDKEAEAKFKEIKEAYEVLTDTSQK
ヒト dnaJ ホモログサブファミリーC メンバー8	11	NPFEVLQIDPEVTDEEIKKRFRQLSILVHP DKNQDDADRAQKAFAVDKAYKLLLDQEQK KRALDVIQ
ヒト dnaJ ホモログサブファミリーC メンバー5B	12	EALYEILGLHKGASNEEIKKTYRKLALKHH PDKNPDDPAATEKFKEINNAHAILTDISK
ヒト dnaJ ホモログサブファミリーC メンバー14	13	LNPFHVLGVEATASDVELKKAYRQLAVMVH PDKNHHPRAEAEAFKVLRAAWDIVSNAEK
ヒト dnaJ ホモログサブファミリーC メンバー25 前駆体	14	RDCYEVLGVSRSAGKAEIARAYRQLARRYH PDRYRPQPGDEGPGRTQPQSAEEAFLLVATA YETLKDEET
ヒト dnaJ ホモログサブファミリーB メンバー2 イソ型 a	15	ASYIEILDVPRASADDIKKAYRRKALQWH PDKNPDNKEFAEKKFKEVAEAYEVLSDKHK
ヒト dnaJ ホモログサブファミリーB メンバー2 イソ型 b	16	ASYIEILDVPRASADDIKKAYRRKALQWH PDKNPDNKEFAEKKFKEVAEAYEVLSDKHK
A 鎖、 Bc008182 タンパク質のヒト Dnaj 様ドメインの nmr 構造	17	TTYDVLGVKPNATQEELKKAYRKLALKYH PDKNPNEGKFKQISQAYEVLSDAKK
A 鎖、 Hsj1a の J ドメインの溶液構造	18	ASYIEILDVPRASADDIKKAYRRKALQWH PDKNPDNKEFAEKKFKEVAEAYEVLSDKHK
A 鎖、 ヒト ras 関連タンパク質 Rap1 由来 の Dnaj 様ドメインの溶液構造	19	KDSWMLGVKPGASRDEVNKAYRKLAVLLH PDKCVAPGSEDAFKAVVNARTALLKNIK
A 鎖、 ヒトタンパク質 Hcg3 (仮説タンパ ク質 Tmp_locus_21) の Dnaj ドメ インの溶液構造、	20	VDYIEVLVPRQASSEAIKKAYRKLALKWH PDKNPENKEEAERRFKQVAEAYEVLSDAKK
A 鎖、 ヒト Tid1 タンパク質 (Dnaj ホモ ログ) の J ドメインの溶液構造	21	GDYYQILGVPRNASQKEIKKAYYQLAKKYH PDTNKDDPKAKEKFSQLAEAYEVLSDVEK
A 鎖、 ヒト Dnaj サブファミリーB メンバ ー9 の J ドメインの溶液構造	22	GSYYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAMKYH PDKNKSPDAEAKFREIAEAYETLSDANR
A 鎖、 ヒト Dnaj サブファミリーB メンバ ー12 の J ドメインの溶液構造	23	GDYIEILGVSRGASDEDLKKAYRRLALKFH PDKNHAPGATEAFKAIGTAYAVLSNPEK

【表 1 - 3】

J ドメインの単離元 J タンパク質	配列 番号	J ドメインのアミノ酸配列 123456789012345678901234567890
A 鎖、 ヒト Hsp40 (HDJ-1)、nmr	24	KDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYH PDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRK
A 鎖、 ヒトのウィリアムズ症候群染色体領域 18 タンパク質の溶液構造の Dnaj ドメイン	25	TALYDLLGVPSTATQAQIKAAYYRQCFLYH PDRNSGSAEAAERFTRISQAYVVLGSATL
A 鎖、Dnaj ホモログサブファミリー B メンバー 8 の J ドメインの溶液構造	26	ANYYEVLGVQASASPEDIKKAYRKLALRWH PDKNPDNKEEAEEKFKLVSEAYEVLSDSKK
A 鎖、Dnaj ホモログサブファミリー -C メンバー 12 の J ドメインの溶液 構造	27	EDYYTLLGCDELSSVEQILAEFKVRALECH PDKHPENPKAVETFQKLQKAKEILTNEES
A 鎖、ヒト Kiaa0730 タンパク質の Dnaj ドメイン	28	SILKEVTSVVEQAWKLPESERKKIIRRLYL KWHPDKNPENHDIANEVFKHLQNEINR
ヒト dnaJ ホモログサブファミリー-B メンバー 6 イソ型 a	29	VDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWH PDKNPENKEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKK
ヒト dnaJ ホモログサブファミリー-B メンバー 6 イソ型 b	30	VDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWH PDKNPENKEEAERKFKQVAEAYEVLSDAKK
ヒト dnaJ ホモログサブファミリー-B メンバー 9 前駆体	31	KSYYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAMKYH PDKNKSPDAEAKFREIAEAYETLSDANR
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーC メンバー 8 イソ型 CRA_c	32	LNPFEVLQIDPEVTDEEIKKRFRQLSILVH PDKNQDDADRAQKAFAVDKAYKLLLDQEQ
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーC メンバー 13 イソ型 CRA_b	33	DDAYEVLNLPQGQGPHEDESKIRKAYFRLAQ KYHPDKNPEGRDMFEKVNKAYEFLCTKSA
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーC メンバー 19 イソ型 CRA_e	34	REAALILGVSPPTANKGKIRDAHRRIMLLNH PDKGK
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーC メンバー 5 イソ型 CRA_b	35	ESLYHVLGLDKNATSDDIKKSYRKLALKYH PDKNPDNPEAADKFKEINNAHAILTDATK
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーC メンバー 4 イソ型 CRA_f	36	STYYELLGVHPGASTEVEVKRAFFSKSKELH PDRDPGNPSLHSRVELSEAYRVLREQS
ヒト CSL 型 Zn フィンガー含有タン パク質 3 イソ型 CRA_c	37	KDWYSILGADPSANISDLKQKYQKLILMYH PDKQSTDVPAGTVEECVQKFIEIDQAWKIL GNEET
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーC メンバー 17 イソ型 CRA_a	38	MDLYALLGIEEKAADKEVKKAYRQKALSCH PDKNPDNPRAAELFHQLSQALEVLTDAAA
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブフ ァミリーB メンバー 9 イソ型 CRA_a	39	KSYYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAMKYH PDKNKSPDAEAKFREIAEGASVPAASSF

【表 1 - 4】

J ドメインの単離元 J タンパク質	配列 番号	J ドメインのアミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブファミリーC メンバー4 イソ型 CRA_g	40	STYYELLGVHPGASTE EVKRAFFSKSKELHPDRDPGNPSLHSR FVELSEAYRVLSREQS
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブファミリーC メンバー4 イソ型 CRA_a	41	STYYELLGVHPGASTE EVKRAFFSKSKELHPDRDPGNPSLHSR FVELSEAYRVLSREQS
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブファミリーC メンバー11 イソ型 CRA_c	42	EDYYSLLNVRREASSEELKAAYRR LCMLYHPDKHRDPELKSQAERLFNLVHQAYEVLSDPQT
ヒト CSL 型 Zn フィンガー含有タンパク質 3 イソ型 CRA_b	43	KDWYSILGADPSANISDLKQKYQKLILMYHPDKQSTDVPAGTVEECVQKFIEIDQAWKILGNEET
ヒト J 型シャペロン補助因子 HSC20 イソ型 CRA_c	44	RDYFSLMDCNRSFRVDTAKLQHRYQQLQRLVHPDFFSQRSQTEKDFSEKHSTLVNDAYKTLLAPLS
ヒト hCG1994888 イソ型 CRA_d	45	RDCYEV LGVSR SAGKAEIARAYRQLARRYHPDRYRPQPGDEGPGRTPQSAEEAFLLVATAYETLKDEET
ヒト DnaJ (Hsp40) ホモログサブファミリーA メンバー1 イソ型 CRA_a	46	TTYVDVLGVKPNATQEELKKAYRKLALKYHPDKNPNEGEKVKMLYISSQ

タンパク質発現増強活性を有する J ドメイン断片および J ドメインアナログ

アミノ末端およびカルボキシ末端の欠失解析を含む配列解析を用いてさらに J ドメインを研究した結果、J ドメインのうち比較的小さな部分のみがタンパク質発現増強活性の提供に必要であることが明らかになった。解析の結果、意外にも本発明のタンパク質発現増強活性は J ドメイン内から単離されたわずか 9 ～ 10 個のアミノ酸からなるポリペプチド断片によって提供できることが決定された。以下の実施例 10 および 11 を参照のこと。単離された J ドメインと同様にこのような J ドメインポリペプチド断片も、本明細書に記載された目的の細胞内（細胞内部および膜結合部位）または細胞外の（分泌された）位置での目的の標的タンパク質の発現を増強するための方法および組成物に使用できる。個々の J ドメインポリペプチド断片のアミノ酸配列はすべて同一ではないが、本明細書に記載の改変配列でも非改変配列でもタンパク質発現増強活性を提供するという点の他、いくらかの配列相同性と構造的特徴を共有し得る。

【0079】

上記 J ドメインポリペプチド断片の欠失変異および置換変異についてさらに解析した結果、標的タンパク質発現増強活性を有する新規な J ドメインアナログポリペプチドのファミリーの構造式を定義するための基準が得られた。このアナログポリペプチドファミリーのメンバーは 8 個～9 個のアミノ酸を有し、このファミリーには J ドメインの最新のライブラリーでも現在まで同定されていない数個の J ドメインポリペプチド断片とポリペプチドが含まれる。実施例 11 を参照のこと。

【0080】

J ドメインポリペプチド断片および J ドメインアナログポリペプチドのサイズは完全な（全長の）J ドメインより小さいため、目的の標的タンパク質の発現を増強するために改変配列および非改変配列で構築し発現できる本発明の融合タンパク質のサイズも小さくなる。したがって、それに応じて、このような融合タンパク質をコードする組換え核酸分子

のサイズも、完全なJドメインを含む融合タンパク質をコードする核酸分子より小さくすることができる。本発明のJドメインポリペプチド断片およびJドメインアナログポリペプチドのサイズが比較的小さいことは、タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結（融合）させて（連結させていない）目的の標的タンパク質の代わりに患者の体内で発現させるか患者に投与する改変（融合）標的タンパク質とした、改変配列の融合タンパク質の免疫原性を低下させるうえで特に有益となり得る。融合タンパク質の免疫原性が低くなればなるほど、融合タンパク質に対する免疫反応によって融合タンパク質が急速に消失したり阻害されたりすることなく、融合タンパク質の有益な特性または効果を患者に提供するべく患者の体内に残留できる可能性が高くなる。

【0081】

タンパク質発現増強ポリペプチドを含む融合タンパク質

本発明によれば、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドは、宿主細胞での発現を改善する必要がある目的の標的タンパク質の発現を増強する融合タンパク質の成分として使用される。タンパク質発現増強ポリペプチドは、目的の標的タンパク質の発現を増強するために2種類の配列のいずれかの配列で使用される。2種類の配列とは、発現された目的の標的タンパク質の一次構造（アミノ酸配列）のことである。

【0082】

タンパク質の発現を増強するための「改変」配列では、タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させて融合タンパク質、すなわち「改変された」目的の標的タンパク質を作製する。この融合タンパク質は、タンパク質発現増強ポリペプチドの非存在下では発現が不十分な改変されていない標的タンパク質の発現レベルと比較して発現レベルが増強される。このように、改変配列の融合タンパク質は目的の標的タンパク質の改変体であり、発現が不十分な非改変標的タンパク質に代わるものとして発現され採用される。

【0083】

タンパク質の発現を増強するための「非改変」配列では、目的の標的タンパク質がタンパク質発現増強ポリペプチドと融合されていないという意味で目的の標的タンパク質の一次構造は変わらない（「改変されない」）。本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドを、目的の標的タンパク質に親和性を有し結合する標的タンパク質結合ドメインと連結する。この融合タンパク質と、改変されていない目的の標的タンパク質とを宿主細胞内で共発現させると、目的の標的タンパク質の発現レベルは標的タンパク質結合融合タンパク質がない場合の発現レベルに比べて増強される。

【0084】

非改変配列では目的の標的タンパク質の一次構造（アミノ酸配列）は変わらない（連結して融合タンパク質となっていない）ため、多くの用途に関して、タンパク質の発現を増強するための非改変配列は改変配列よりも好ましい可能性がある。しかし、以下に説明するように、改変配列の融合タンパク質を操作して、同融合タンパク質に含まれるタンパク質発現増強ポリペプチド成分が容易に切断されて標的タンパク質の元のアミノ酸配列を有する標的タンパク質成分が遊離されるようにし、融合タンパク質からは他に残余アミノ酸が全く生じないかわずかし生じないようにすることも可能である。特定の用途については、改変されていない標的タンパク質よりもこのような融合タンパク質が適切である場合がある。

【0085】

融合タンパク質はいずれの配列の場合も直接合成（たとえば固相ペプチド合成、液相合成など）によって合成できるが、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction（PCR））技術などの標準的な組換え核酸技術を細胞培養方法または遺伝子導入方法と組み合わせて、ほとんどの場合はより経済的に本明細書に記載の融合タンパク質を製造できると考えられる。

【0086】

本発明の融合タンパク質を発現させるための組換えDNA、オリゴヌクレオチドの合成

10

20

30

40

50

、細胞の形質移入（たとえば電気穿孔法、リポソーム媒介形質移入法、形質転換法などであるがこれらに限定されるものではない）、細胞および組織の培養の方法には標準の技術を使用できる。酵素反応および精製の技術は、当技術分野で一般に遂行されるとおり、製造者による仕様書に記載のとおり、または本明細書に記載のとおりに実施することができる。上記の技術および方法は、当技術分野で周知の従来の方法に従い、また、本明細書全体で引用し記載する様々な一般的参考文献や詳細な参考文献に記載のとおりに一般的に実施できる。たとえば、Sambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition（分子クローニング：実験の手引き、第2版）（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989）およびAusubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学の最新手順書）（John Wiley & Sons, New York, 2012）を参照のこと。これらの文献の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0087】

先に述べたように、「改変された」および「改変されていない」という用語は、目的の標的タンパク質がタンパク質発現増強ポリペプチドと連結されているかを示す。なお、改変配列および非改変配列の一部の態様では、1つ以上の追加のドメインを融合タンパク質または目的の標的タンパク質と連結させることが有益となり得る。たとえば、任意の周知のエピトープタグペプチド（エピトープタグ）をタンパク質に組み込むことによって、発現されたタンパク質の検出および／または精製を容易にすることができる。このようなエピトープタグとしては、V5エピトープタグ（GKPIPNPLLGLDST（配列番号110））、Flagエピトープタグ（DYKDDDDK（配列番号111））、ヘキサヒスチジンエピトープタグ（HHHHHH（配列番号112））、血球凝集素エピトープタグ（YPYDVPDYA（配列番号113））、c-mycエピトープタグ（EQKLISEEDL（配列番号114））、VSV-Gエピトープタグ（YTDIEMNRLGK（配列番号115））、HSVエピトープタグ（QPELAPEDPED（配列番号116））が挙げられるがこれらに限定されるものではない。以下に説明するように、リンカーを用いてタンパク質をこのようなエピトープタグと連結させることも可能である。リンカーはタンパク質分解酵素で切断することによってタンパク質から除去（または実質的に除去）できる。

20

【0088】

リンカー

当技術分野で公知の方法によって、任意のドメインを本発明の融合タンパク質に含まれる別のドメインと連結させることができる。たとえば、本発明の改変配列では、融合タンパク質はタンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させたものである。したがって、発現される融合タンパク質は改変された標的タンパク質であり、発現が不十分な融合されていない目的の標的タンパク質の代わりに用いることができる。タンパク質発現増強ポリペプチドは目的の標的タンパク質と直接連結させてもよく、リンカー分子を介して間接的に連結させてもよい。本発明の非改変配列では、融合タンパク質は、タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質に親和性を有し結合する標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質である。この融合タンパク質を目的の標的タンパク質と共発現させることによって、改変されていない（融合されていない）目的の標的タンパク質の発現レベルは融合タンパク質がない場合の発現レベルに比べて増強される。タンパク質発現増強ポリペプチドは標的タンパク質結合ドメインと直接連結させてもよく、リンカー分子を介して間接的に連結させてもよい。改変配列の場合でも非改変配列の場合でも、その他のドメインを融合タンパク質または融合していないタンパク質と連結させることによって1つ以上の追加的特徴を与えることも可能である。たとえば、エピトープタグを融合タンパク質または融合していないタンパク質と連結させることによって、タグで標識したタンパク質の検出または精製を容易にすることができる。

30

40

【0089】

アミノ酸レベルでは、リンカーは1個以上のアミノ酸であり、たとえば1～10個のア

50

ミノ酸、1～20個のアミノ酸、さらに1～50個のアミノ酸などであり得る。一般的には、タンパク質発現増強ポリペプチドと目的の標的タンパク質との連結（改変配列の場合）または標的タンパク質結合ドメインとの連結（非改変配列の場合）について21個以上のアミノ酸であるリンカーを用いる必要はない。タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質または標的タンパク質結合ドメインと直接的に連結させても、目的のタンパク質または標的タンパク質結合ドメインの有する必要な生化学的特性および機能的特性が有意に減少するとは思われないためである（データは示さず）。

【0090】

本発明の融合タンパク質を作製するための1つ以上のリンカーは、当業者の知識の範囲内で選択される。たとえばArai et al., Protein Eng., 14(8): 529-532 (2001); Crasto et al., Protein Eng., 13(5): 309-314 (2000); George et al., Protein Eng., 15(11): 871-879 (2003); Robinson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 5929-5934 (1998)を参照のこと。タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質または標的タンパク質結合ドメインと連結させるために特定のリンカーを用いることについて一般的に考慮すべき点としては、ある機能性ドメインを別の機能性ドメインと連結させて作製するその他の融合タンパク質の作製の際に考慮すべき点が挙げられる。たとえば、改変された機能性結合タンパク質を作製するために免疫グロブリンの可変ドメインおよび／または定常ドメインを多様な形式で連結する際に考慮するような点が挙げられる。タンパク質発現増強ポリペプチドと連結された目的の標的タンパク質または標的タンパク質結合ドメインの折り畳みをリンカーが妨げてはならないことは明らかである。融合タンパク質にリンカーを用いる場合、リンカーはタンパク質発現増強ポリペプチドを最適に寄与させて改変配列の融合タンパク質または非改変配列の（融合していない）目的の標的タンパク質の発現または産生のレベルが増強されるように選択される。目的の標的タンパク質または標的タンパク質結合ドメインにタンパク質発現増強ポリペプチドを直接結合しても所望の発現レベルの増強が得られる場合には、リンカーはなくてもよい。本発明の融合タンパク質に存在するリンカー分子は、発現ベクターのクローニング部位またはその周辺の核酸のセグメントに存在するヌクレオチド配列によってコードされる1個以上のアミノ酸を含み得る。この発現ベクターには、タンパク質ドメイン（たとえばタンパク質発現増強ポリペプチド、目的のタンパク質、標的タンパク質結合ドメイン）または融合タンパク質全体をコードする核酸セグメントをインフレームで挿入する。

【0091】

リンカー分子は、特に4アミノ酸以上の長さのものは、目的のタンパク質が適切な立体構造に折り畳まれるのを可能にする柔軟性を有することが好ましい。当分野では機能性ドメインを連結するための比較的柔軟な様々なリンカーが知られている。リンカーは、エプトープタグなどの1つ以上の追加的ドメインを本発明の融合タンパク質のタンパク質発現増強ポリペプチドまたは目的のタンパク質と連結させるのに用いることもできる。本発明の融合タンパク質の作製に用いることができるリンカーとしては以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない：D I A A A（配列番号117）；D I A A A L E（配列番号118）；G T G S E F（配列番号119）；A S；T V A；A S T K（配列番号120）；G G G S G G S G G S G G（配列番号121）；D I G G G S G G S G G S G G A A A（配列番号122）；A K T T P K L E E G E F S E A R（配列番号123）；A K T T P K L E E G E F S E A R V（配列番号124）；A K T T P K L G G（配列番号125）；S A K T T P K L G G（配列番号126）；S A K T T P（配列番号127）；R A D A A P（配列番号128）；R A D A A P T V S（配列番号129）；R A D A A A G G P G S（配列番号130）；R A D A A A A（G₄S）₄（配列番号131）；S A K T T P K L E E G E F S E A R V（配列番号132）；A D A A P（配列番号133）；A D A A P T V S I F P P（配列番号134）；T V A A P（配列番号135）；T V A A P S V F I F P P（配列番号136）；Q P K A A P（配列番号137）；Q P K A A P S V T L F P P（配列番号138）；A K T T P P（配列番号139）；A K T T P P S V T P L A P（配列番号140）；A K T T A P（配列番号141）；A K T

TAPSVYPLAP（配列番号142）；ASTKGP（配列番号143）；ASTKGP SVFPLAP（配列番号144）；GGGGSGGGSGGGGS（配列番号145）；GENKVEYAPALMAIS（配列番号146）；GPAKELTPLKEAKVS（配列番号147）；GHEAAAVMQVQYPAS（配列番号148）；GGGGGGGP（配列番号149）；GGGGGGGGP（配列番号150）；PAPNLLGGP（配列番号151）；PNLLGGP（配列番号152）；GGGGGGGP（配列番号153）；PAPELLGGP（配列番号154）；PTISPAPNLLGGP（配列番号155）；TVAADDDDKSVFIVPP（配列番号156）；TVDDDDK AAP（配列番号157）；LVPRGSAAP（配列番号158）；ASTKGP SV（配列番号159）；ASTKGP SVFP（配列番号160）；TVAA PSV（配列番号161）；TVAA PSVFI（配列番号162）など。

10

【0092】

一部の態様では、融合タンパク質は1種以上のプロテアーゼによって切断できる1つ以上のリンカーを含んでもよい。このようなリンカーは、認識配列またはその付近でタンパク質を切断するべくプロテアーゼに認識されるアミノ酸配列を有する。1つ以上の切断可能なリンカー分子を融合タンパク質に組み込むことによって、発現された融合タンパク質から1つ以上のドメインを除去するという選択肢が得られる。たとえば、一部の用途または製法では、目的のタンパク質と連結されたポリペプチド発現増強ポリペプチドの除去（たとえば潜在的な免疫原性を低下させるため）、および／または発現された融合タンパク質を容易に検出または精製できるように融合タンパク質に組み込んであったエピトープタグの除去が望ましい場合があるが、この例に限定されるものではない。別の例では、融合タンパク質が分泌された場合、切断可能なリンカーによって目的のタンパク質と連結されているポリペプチド発現増強ポリペプチド（またはその他のドメイン）を、その融合タンパク質が発現されている培養液に適切なプロテアーゼを直接添加することによって除去することができる。あるいは、切断可能なリンカーによって連結されたタンパク質発現増強ポリペプチド（またはその他のドメイン）を、融合タンパク質を培養液から精製するための1つ以上の工程を実施した後で除去してもよい。

20

【0093】

状況によっては、タンパク質と連結されたドメインまたはエピトープタグを除去することが有用となり得る。このことは、たとえば、追加的ドメインまたはタグを含むタンパク質を、そのタンパク質のリンカーを切断できるプロテアーゼの発現が制御されている細胞内で発現させることによって遂行できる。たとえば、適切なプロテアーゼを発現するための組換え遺伝子を細胞に組み込むことが挙げられる。この組換え遺伝子はプロモーターによって制御され、プロモーターは、細胞が融合タンパク質を発現した後に培養液に対して与えることのできる誘因（たとえば温度変化）や作用（イオン変化）によって制御できる。原核生物細胞または真核生物細胞の遺伝子発現を制御するための多様なプロモーターが当技術分野で利用可能である。また、ある細胞は、対応する切断部位を含むリンカー分子を切断することができる1種以上のプロテアーゼを発現する。宿主細胞が発現できるプロテアーゼを使用することがその宿主細胞によって発現された融合タンパク質に含まれるリンカーを切断するのに有用となり得るかどうかは、当業者の技術の範囲内で決定される。また、プロテアーゼで切断可能なリンカーを介して追加的ドメインまたはタグと連結されたタンパク質を含む、培地や細胞可溶化物などのサンプルに適切なプロテアーゼを添加することも可能である。

30

40

【0094】

あるタンパク質またはタンパク質ドメインを別のものと連結させるための、タンパク質分解切断部位を含む多様なリンカー分子が当技術分野で公知であり利用可能である。このようなリンカーとしては、以下の例のうち1種以上が挙げられるが、これに限定されるものではない（アスタリスク（*）はタンパク質分解切断部位を示す）：DYKDDDDK*（配列番号163）；ASDDDDK*GGP（配列番号164）；ALVPR*GSGP（配列番号165）；ASTDDDDK*SVFPLAP（配列番号166）；TV

50

ALVPR*GSVFIFPP (配列番号167); ASTLVPR*GSVFPLAP (配列番号168); TVAADDDK*SVFIVPP (配列番号169); ASTDDDK*SVFPLAP (配列番号170); LEVLFQ*GP (配列番号171); TVAALEVLFFQ*GPAP (配列番号172); ASTLEVLFFQ*GPLAP (配列番号173); PAPLEVLFFQ*GP (配列番号174); TAENLYFQ*GAP (配列番号175); AENLYFQ*GA (配列番号176); PGPFGR*SAGGP (配列番号177); PGPFGR*SAGG (配列番号178); PQRGR*SAG (配列番号179); PHYGR*SGG (配列番号180); GPFGR*SAGP (配列番号181); GDDDDK*GGP (配列番号182); AGDDDDK*GGP (配列番号183); GGDDDDK*GGP (配列番号184); ENLYFQ*G (配列番号185); ENLYFQ*S (配列番号186) など。

10

【0095】

本発明のタンパク質に採用した切断可能なリンカーを切断するために使用できる多様なタンパク質分解酵素が当技術分野で知られている。目的の標的タンパク質を含む融合タンパク質に含まれる切断可能なリンカーを切断するために選択されるプロテアーゼが、目的の標的タンパク質またはリンカーの切断後も保持されることが所望される他のドメインまで切断してはならないことは明らかである。融合タンパク質に含まれるリンカーの中の部位で融合タンパク質を切断するのに使用できるタンパク質分解酵素としては、エンテロキナーゼ、第Xa因子、トロンビン、PreScission、タバコエッチウイルス (tobacco etch virus (TEV)) プロテアーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator (tPA))、亜鉛依存性エンドペプチダーゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase (MMP))、セラリシン、アスタシン、アダマリシン、ディスインテグリン、ADAM、カスパーゼ、カテプシン、カルパインなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0096】

融合タンパク質をコードする核酸

目的の標的タンパク質の発現を増強するために改変配列または非改変配列で使用される融合タンパク質をコードする核酸 (一般的にはDNA) 分子は、当技術分野で利用可能な標準の方法を用いて構築される。タンパク質の検出および/または精製を容易にするために用いる標準的なエピトープタグのような1つ以上の追加のドメインをタンパク質に組み込むこともできる。所望の融合タンパク質をコードする核酸分子を、その融合タンパク質を発現するための組換え構造遺伝子を複製させるために、当技術分野で入手可能な多様なクローニングベクターのうち任意のベクターに挿入することができる。融合タンパク質を発現させるため、その融合タンパク質をコードする核酸分子を、当技術分野で入手可能な多様なクローニングベクターのうち任意のベクターに挿入することができる。次いで、融合タンパク質をコードする挿入された核酸を含む発現ベクターを、発現ベクターから融合タンパク質を発現させることのできる適合宿主細胞に導入する。非改変配列については、宿主細胞が目的の標的タンパク質を発現するための機能性遺伝子を有さない場合、ベクターは改変されていない目的の標的タンパク質をコードする機能性構造遺伝子のコピーも含み得る。

30

40

【0097】

本発明の発現ベクターは、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドをコードする核酸セグメントと、タンパク質発現増強ポリペプチドのコード配列の5'末端または3'末端に位置する1つ以上のクローニング部位 (たとえば特有の制限酵素部位) とを有する発現ベクター分子を含む。このクローニング部位には融合タンパク質の別のドメインをコードする核酸分子を挿入できる。改変配列の場合、目的の標的タンパク質をコードする核酸を挿入して所望の融合タンパク質 (改変された標的タンパク質) を作製できる。これに対し、非改変配列の場合、標的タンパク質結合ドメインをコードする核酸を挿入して、改変されていない目的の標的タンパク質に結合しその発現を増強することが可能な融合タンパク質を作製できる。発現ベクターは複数のクローニング部位を有していてもよい。

50

複数のクローニング部位によって、1つ以上のその他の所望のドメイン（たとえばエプープライムタグ、Fc領域など）をコードする1つ以上の追加的核酸セグメントを挿入して所望の融合タンパク質を構築および発現させることが可能になる。所望の融合物をコードする最終的な核酸融合構築物は、発現ベクターのプロモーターと作動可能に連結される。ベクター分子へのクローニング部位の設計や、所望のタンパク質をコードする挿入された核酸セグメントを適合する宿主細胞内でタンパク質を発現させるのに必要なプロモーターやその他のシグナルと作動可能に連結することについては、当分野の技術の範囲内で行うことができる。

【0098】

本発明の融合タンパク質をコードする核酸構築物の構築に関し、本明細書中の記載では、様々な核酸分子を連結させて完全に構築された核酸構築物を発現ベクターへ挿入するまでの特定の段階的順序を示唆する場合があるが、所望の融合タンパク質をコードする核酸構築物を作製するために核酸分子のセグメントを連結する正確な順序は当業者の判断、技術、経験の範囲内で決められることが理解され認識される。また、最初にすべてのセグメントを連結させ、融合タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターへの挿入前に作製することは可能であるが、場合によっては、1つ以上のドメインをコードする核酸セグメントが発現ベクター内に既に適切に存在しているため、発現ベクター内に既に存在しているそのセグメントに隣接するように1つ以上の核酸セグメントを挿入することによって本発明の所望の融合タンパク質を発現させるための作動可能に連結された構造遺伝子を発現ベクター内で構築するのが実用的である。

【0099】

本発明の融合タンパク質をコードする発現ベクターは、特定の発現ベクターから融合タンパク質を発現させるのに適合する多様な宿主細胞のうち任意の宿主細胞に形質移入することができる。本発明の融合タンパク質をコードする組換え構造遺伝子の構築方法の一部の工程は、原核生物細胞でも真核生物細胞でも行うことができるが、本発明の融合タンパク質の発現を増強するために好ましい宿主細胞は真核生物細胞である。本発明において有用な真核生物宿主細胞としては、哺乳類宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真菌宿主細胞、真核藻類宿主細胞、線虫宿主細胞、原虫宿主細胞、魚類宿主細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の融合タンパク質を発現させるのに有用な哺乳類宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（Chinese Hamster Ovary (CHO)）細胞、COS細胞、Vero細胞、SP2/O細胞、NS/O骨髓腫細胞、ヒト胎児腎臓（human embryonic kidney (HEK293)）細胞、ベビーハムスター腎臓（baby hamster kidney (BHK)）細胞、HeLa細胞、ヒトB細胞、CV-1/EBNA細胞、L細胞、3T3細胞、HEPG2細胞、PerC6細胞、MDCK細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のJドメイン融合タンパク質を発現するのに有用な真菌宿主細胞としては、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、ニューロスポラ（*Neurospora*）属、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属、ピキア（*Pichia*）属、ハンゼヌラ（*Hansenula*）属、シゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）属、クルイベロミセス（*Kluyveromyces*）属、ヤロウィア（*Yarrowia*）属、カンジダ（*Candida*）属が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特に好ましいサッカロミセス属宿主細胞は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）細胞である。

【0100】

本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子は、当技術分野で利用可能な方法を用いて、その融合タンパク質を容易に精製できるレベルで発現させるために植物またはヒト以外の動物の細胞に導入することができ、あるいは遺伝子治療として、発現された融合タンパク質に含まれる目的のタンパク質が提供する機能による利益をもたらすために、植物、ヒト、またはヒト以外の動物の細胞に導入することができる。このような方法を用いて、融合タンパク質をコードする導入核酸（導入遺伝子）によってコードされる融合タンパク質を発現するトランスジェニック植物またはトランスジェニック動物を提供することがで

きる。植物およびヒト以外の動物の場合、そのトランスジェニック生物の子孫もその融合タンパク質を発現できるように、タンパク質をコードする発現可能な核酸を生殖系列に組み込むための技術が利用可能である。植物またはヒト以外の動物の細胞に核酸を導入するには多様なベクターおよび方法が利用可能であり、ネイキッドDNAを細胞内に注射する方法、弾道を利用する導入（たとえば遺伝子銃を用いる）、リボソーム、ウイルス由来ベクター分子などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0101】

本発明によるヒト患者を治療するための遺伝子治療には、本明細書に記載の改変配列または非改変配列の発現増強ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする組換え遺伝子を採用できる。このような遺伝子治療は、不適切に折り畳まれたタンパク質種が原因で機能の損失または実質的な損失が生じたために臨床的に認識された病理的状态が起こるような疾患には特に有用である。不適切に折り畳まれたタンパク質種が機能の損失につながっていることが実証または示唆された疾患の例としては、プリオン関連疾患（伝染性海綿状脳症）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、嚢胞性線維症（cystic fibrosis (CF)） $\alpha 1$ アンチトリプシン（AAT）欠損症などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0102】

本発明の改変配列を採用する遺伝子治療では、タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質をコードする組換え遺伝子を構築する。この組換え遺伝子をベクターに挿入し、それをヒト患者の体細胞のゲノムに組み込む。たい

ていの場合、組換えベクターがすべての体細胞のゲノムに取り込まれて組み込まれる必要はなく、特定の疾患に関連する可能性のある細胞の亜集団に組み込まればよい。ヒト患者の体細胞で、組み込まれた組換え遺伝子から発現された融合タンパク質は、欠けているか、失われていたか、あるいは低下して患者の体内で臨床的に認識された疾患を引き起こす目的の内因性標的タンパク質の機能を回復させることによって疾患を治療する。

20

【0103】

本発明の非改変配列を採用する遺伝子治療では、タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質に親和性を有し結合する標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質をコードする組換え遺伝子を構築する。この組換え遺伝子をベクターに挿入し、それをヒト患者の体細胞のゲノムに組み込む。ここでも、たい

ていの場合、組換えベクターがすべての体細胞のゲノムに取り込まれて組み込まれる必要はなく、特定の疾患に関連する可能性のある細胞の亜集団に組み込まればよい。ヒト患者の細胞内で組み込まれた遺伝子から融合タンパク質が発現されることによって、目的の内因性標的タンパク質の発現が増強され、タンパク質はその標的タンパク質によって与えられる必要な機能を細胞にもたすため、臨床的に認識された疾患を防ぐことができる。目的の内因性標的タンパク質を発現するための内因性遺伝子が機能しないか欠失した場合、目的の標的タンパク質をコードする組換え遺伝子も構築し、融合タンパク質と共発現させるためにベクターに挿入してヒト患者のゲノムに組み込まなければならない。

30

【0104】

ヒト患者の体細胞への核酸分子の導入には、多様なベクター、薬剤、方法のうち任意のものを使用することができ、改変ウイルス（たとえば改変アデノウイルス、改変レンチウイルス）、ウイルス随伴ウイルス（たとえばアデノウイルス随伴ウイルス）、ネイキッドDNA（ネイキッドプラスミドDNAなど）、DNAを高密度で内封したナノ粒子、リボソーム（たとえば様々な陽イオン性脂質を用いる）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0105】

タンパク質発現増強ポリペプチドと目的の標的タンパク質とを含む本発明の改変配列の融合タンパク質

本発明の改変配列の融合タンパク質は、タンパク質発現増強ポリペプチド（PEEP（本明細書に記載の単離されたJドメイン、Jドメイン活性ポリペプチド断片、およびJド

50

メインアナログポリペプチドが包含される))を目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質である。タンパク質発現増強ポリペプチドは目的の標的タンパク質のアミノ(N)末端またはカルボキシ(C)末端に連結させることが好ましい。タンパク質発現増強ポリペプチドは、目的のタンパク質との間にリンカー、酵素切断部位、エピトープタグなどの1つ以上の介在ポリペプチド配列を挟んで目的のタンパク質と離れていてもよい。タンパク質発現増強ポリペプチドを目的の標的タンパク質に挿入することは可能であるが、実務上の問題として、そのためにはより複雑な組換えDNA操作が必要であり、目的の標的タンパク質の適切な折り畳み、所望の機能またはその他の特性を妨げる可能性が高いため、一般的にはあまり好まれない。本発明の改変配列の融合タンパク質を作製するのに用いることのできる目的の標的タンパク質は、所望の特性を有する任意のタンパク質またはポリペプチドであり、細胞内位置に通常は存在している可溶性タンパク質、膜結合タンパク質(膜貫通タンパク質など)、分泌タンパク質、遺伝子改変した非天然タンパク質が含まれる。遺伝子改変した非天然タンパク質としては、天然の膜結合タンパク質の組換え可溶型タンパク質、たとえば膜貫通タンパク質(たとえばインテグリン、補体調節タンパク質)の細胞外ドメインを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。改変配列の融合タンパク質の標的タンパク質成分として用いることのできる改変した非天然タンパク質の別の例は、組換え可溶受容体分子を含む組換え融合タンパク質であり、このような融合タンパク質では細胞表面受容体の細胞外結合ドメインが免疫グロブリンFcドメインまたは免疫グロブリン骨格に融合されている。このような非天然の融合タンパク質としてはエタネルセプトを挙げることができるが、これに限定されるものではない。エタネルセプトではp75ヒトTNF α 受容体分子の細胞外ドメインがIgG1免疫グロブリンのヒンジおよびFcドメインと連結されている。本発明の改変配列の融合タンパク質に目的の標的タンパク質として用いることのできるその他のタンパク質としては、抗体およびその抗原結合部分、サイトカイン、ペプチドホルモン、酵素(たとえばトロンビン、ラクターゼ、プロテアーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼなど)、形態形成タンパク質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0106】

タンパク質発現増強ポリペプチドと標的タンパク質結合ドメインとを含む本発明の非改変配列の融合タンパク質

タンパク質発現増強ポリペプチド(本明細書に記載の単離されたJドメイン、Jドメイン活性ポリペプチド断片およびJドメインアナログポリペプチドが包含される)は、目的位置での目的の標的タンパク質の発現を増強するために非改変配列で使用することもできる。本発明の非改変配列では、融合タンパク質はタンパク質発現増強ポリペプチドを標的タンパク質に親和性を有し結合する標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質である。したがって、本発明の非改変配列では、目的の標的タンパク質は融合タンパク質の成分ではないため、その一次構造(アミノ酸配列)は変化しない。特定の機序に拘束されるものではないが、融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインに目的の標的タンパク質が結合すると目的の標的タンパク質がタンパク質発現増強ポリペプチド(同じく融合タンパク質に含まれる)と比較的接近するため、目的の細胞内位置または細胞外位置での標的タンパク質の発現レベルが、融合タンパク質が存在しない場合の発現レベルに比べて増強されると考えられる。タンパク質の折り畳み、区画化または分泌に関与する、シャペロンタンパク質またはその他の翻訳後の細胞機構の動員が増加することがこのことと関係しているかもしれないし、あるいは細胞内の分解経路からの回避が改善することが関係しているかもしれない。所望の細胞内位置または細胞外位置で見られる発現タンパク質が有意に増加することからこの効果が証明される。

【0107】

非改変配列に有用な標的タンパク質結合ドメイン

本発明の非改変配列の融合タンパク質は、適切な細胞内位置または細胞外位置での発現の増強が所望される目的の標的タンパク質に結合する標的タンパク質結合ドメインを含む。本発明の標的タンパク質結合性融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインには、標

的タンパク質に結合することが知られている任意のタンパク質またはその結合ドメインを用いてよい。標的タンパク質に対するタンパク質またはその結合ドメインの結合親和特異性が高いほど、目的の標的タンパク質に対して所望された発現レベルの増強をその他のタンパク質が妨げる可能性は低くなる。

【0108】

標的タンパク質結合ドメインの例としては、天然の抗体および遺伝子改変抗体から単離された抗原結合部位および抗原結合断片が挙げられる。ここで、抗体の抗原結合部位または抗原結合断片は、発現の増強が所望される標的タンパク質に結合する。これに関して、目的の標的タンパク質に結合する抗体および抗原結合断片は当技術分野で利用可能な標準の技術を用いて容易に産生することができる。本発明の非改変配列の融合タンパク質に含
10
まれる標的タンパク質結合ドメインの由来として使用できる多様な遺伝子改変抗体の形態が当技術分野で公知である。このような形態としては、F a b断片、F (a b ')₂断片、単鎖F v (s c F v)抗体、単一ドメイン抗体 (d A b)が挙げられるがこれらに限定されるものではない。たとえば、Marvin et al., *Acta Pharmacol. Sin.*, 26(6): 649-658 (2005); Kufer et al, *Trends Biotechnol.*, 22(5): 238-244 (2004); Kontermann, *Acta Pharmacol. Sin.*, 26(1): 1-9 (2005); およびChan et al., *Nat. Rev*, 10: 301-316 (2010)による、当技術分野で利用できる多様な機能性遺伝子改変抗体の結合性形態についての概説を参照のこと。

【0109】

本発明では、標的タンパク質を対象とする抗原結合ドメインを単一ポリペプチドの形で有する抗体分子または断片が特に有用である。このようなポリペプチドは標準的なインビトロのDNA技術を用いて容易にタンパク質発現増強ポリペプチドと連結させ、本発明の融合タンパク質を作製することができるためである。たとえば単鎖F v抗体 (s c F v)では、抗原結合部位のV HドメインおよびV Lドメインが連結されて単一ポリペプチドをなしている。抗原結合部位全体を単一の重鎖可変ドメイン内に有する単一ドメイン抗体 (d A b)から単鎖抗原結合部位を得ることもできる。たとえば、Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989); Muyldermans et al., *ProteinEng.*, 7: 1129-1135 (1994); Vu et al., *Mol. Immunol.*, 34: 1121-1131 (1997); Muyldermans et al., *Trends Biochem. Sci.*, 26: 230-235 (2001); Nguyen et al., *Immunogenetics*, 54: 39-47 (2002)を参照の
20
30
こと。

【0110】

免疫グロブリンF cドメインを有する標的タンパク質に関して、上記のように、標的タンパク質結合ドメインには抗体または抗体の抗原 (F cドメイン) 結合断片を用いることができる。抗体またはその抗原結合ドメインの代わりに、F cドメインに特異的に結合することが知られている多様な非免疫グロブリンタンパク質および非免疫グロブリンポリペプチドのうち任意のものをを用いてもよい。F c結合ドメインを有するタンパク質としては、タンパク質A、タンパク質G、単純ヘルペスウイルス1型 (herpes simplex virus type 1 (H S V - 1)) のg Eタンパク質などが挙げられるがこれらに限定されるものではない。また、F cドメインに結合する多数の合成ペプチドが同定されている。たとえば、DeLano et al., *Science*, 287:1279-1283 (2000)およびYang et al., *J. Peptide Res.*,
40
66(Suppl. 1): 120-137 (2006)を参照のこと。以下の実施例に示すように、このようなF c結合性のタンパク質およびペプチドはF cドメインを含む目的の標的タンパク質を対象とした本発明の融合タンパク質の標的結合ドメインとして容易に採用される。

【0111】

目的の標的タンパク質があるタンパク質リガンドに結合する受容体またはその機能部分である場合、そのタンパク質リガンドを本発明の融合タンパク質の標的結合ドメインとして用いることができる。受容体の機能部分としては、膜結合受容体のうちリガンドに結合する機能性ドメインを含む細胞外ドメインが挙げられるがこれに限定されるものではない。一般的に、リガンドに結合する機能性ドメインを含むこのような細胞外部分は受容体の膜貫通ドメインと細胞質ドメインを除いた部分であるため、「切断型受容体」と呼ばれる
50

。本発明によれば、このような切断型受容体分子の発現は、受容体のタンパク質リガンドを含む本発明の融合タンパク質と共発現させることによって増強できる。したがって、以下の実施例に示すようなある種のサイトカインポリペプチド（たとえばIL8、IL13など）などの単一ポリペプチドであるリガンドタンパク質が本発明の改変配列の融合タンパク質の標的結合ドメインとして使用するのに特に適している。標的となる受容体タンパク質またはそのリガンド結合部分に結合させるために融合タンパク質に用いることができるその他のタンパク質リガンドとしては、ポリペプチド補助受容体、ポリペプチド補助抑制因子、ポリペプチド補助因子が挙げられる。

【0112】

標的タンパク質が公知の受容体分子が結合するタンパク質リガンド（たとえばサイトカイン）である場合、本発明の非改変配列の融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインは、同族の受容体か、標的タンパク質に結合する受容体の細胞外リガンド結合部分を含み得る。

【0113】

標的タンパク質の発現を増強するための融合パートナーとしてBAGドメインが当該技術分野で提案されている。多様なBAGタンパク質のBAGドメインが特定されている。たとえばTakayama et al., Nat.Cell Biol., 3: E237-E241(2001)を参照のこと。BAGドメインには、BAGタンパク質ファミリーに属する任意のタンパク質のBAGドメインを定義する重要な特徴がある。つまり、BAGドメインはBAGタンパク質のポリペプチドドメインからなり、一般的には85～124アミノ酸の長さであり、Hsp70シャペロンタンパク質のATPaseドメインに結合し、 α ヘリックス（I、II、III、IV）の逆平行配置が3か所あることを特徴とする。ここで、ヘリックスIIIとIVはHsp70シャペロンタンパク質のATPaseドメインと相互作用する。近年、所望の組換えタンパク質をBAGドメインと連結させて得られた融合タンパク質はそのタンパク質単独の発現レベルよりも高いレベルで発現されることが報告された。国際公開第2012/087835号（A2）を参照のこと。

【0114】

以下の実施例によると、非改変配列で採用されたBAGドメインでは目的の標的タンパク質の発現レベル有意な増強は得られなかった。対照的に、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドは改変配列でも非改変配列でも有意に目的の標的タンパク質の発現レベルを増強する。以下の実施例に示すように、タンパク質発現増強ポリペプチド（単離されたJドメイン、Jドメイン活性断片またはJドメインアナログポリペプチドなど（たとえば本明細書に記載の式Iのものまたはそれと同種の特定の10～12アミノ酸のもの）を目的の標的タンパク質と連結させた融合タンパク質（本発明の改変配列の場合）は、対照細胞（融合タンパク質なし）での発現レベルよりも有意に高いレベルで発現された。その他の試験から、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドを標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質（非改変配列の場合）は、改変されていない目的の標的タンパク質の発現レベルを、この融合タンパク質もBAGドメインを標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質もない場合（対照）と比較して有意に増強するのに有効であることがわかった。したがって、本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドは、改変配列および非改変配列で目的の標的タンパク質の発現を増強するのに用いるための新規なポリペプチドのファミリーを提供する。

【0115】

嚢胞性線維症を治療するための遺伝子治療法

嚢胞性線維症（CF）とは、嚢胞性線維症膜通過伝導率制御（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator（CFTR））タンパク質、cAMP調節性塩素イオンチャネルおよびチャネル調節因子をコードする遺伝子の変異を原因とする常染色体劣性遺伝疾患である。CFTRの508位のフェニルアラニン残基の欠失（ $\Delta 508F$ ）が、CFTRタンパク質の立体構造を変化させる最も一般的な変異である。この変異が起きると、CFTRタンパク質は小胞体（endoplasmic reticulum（ER））の品質システムによ

10

20

30

40

50

って急速に分解される。野生型C F T Rタンパク質機能の一部を回復させることさえできればC F患者に有益な治療を提供できるというのが一般的な統一見解である。そのため、C F T Rを用いた多数の遺伝子治療試験が試みられてきたが、C F T Rを発現させるための遺伝子の送達为非効率的事であることや、媒介物(たとえばウイルスベクター)に対する免疫原性が理由で未だに成功していない。野生型C F T Rの適切なタンパク質折り畳みは難しいことが知られていることから、C F T Rタンパク質のタンパク質折り畳みが改善できれば非常に有用であろう。

【0116】

20年以上前にC F T R遺伝子が同定され単離されて以来、嚢胞性線維症(C F)を治療するための遺伝子治療について20件以上の臨床試験が実施されてきた。Davies et al., Proc. Am. Thor. Soc., 7: 408-414(2010)に記載の嚢胞性線維症の遺伝子治療に関する概説を参照のこと。このような臨床試験によって、嚢胞性線維症膜通過伝導率制御(C F T R)タンパク質の補充についての概念実証は既に確立されたが、ヒト患者の細胞内で補充C F T Rタンパク質の有効な発現レベルを維持できるようにすることが、C Fを治療するための有効な遺伝子治療の開発における根強い課題のひとつとして残っている。野生型C F T Rタンパク質は不安定なことでよく知られるタンパク質である。C F患者の90%以上は、変異型C F T Rの遺伝子(C F T R Δ 508 F)のコピーを少なくとも1つ有する。この変異型C F T Rは、508位のフェニルアラニン残基が欠失しているために細胞内で急速に分解される非常に不安定なタンパク質である。このことから、C F患者のC F T R機能の改善または回復につながるようなC F治療のための融合遺伝子治療法が示唆される。このような遺伝子治療は、本発明の改変配列または非改変配列の融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0117】

以下の実施例に示すように、野生型C F T Rタンパク質またはC F T R Δ 508 Fタンパク質を改変配列でタンパク質発現増強ポリペプチド(Jドメインなど)と融合した融合タンパク質は、いずれの融合していないタンパク質よりも有意に高いレベルで発現された。このことから、C F患者のC F T R機能の改善または回復につながるようなC F治療のためのJドメイン融合遺伝子治療法が示唆される。したがって、本発明の改変配列は新規な形態の遺伝子治療を提供する。この遺伝子治療では有意に高いレベルで発現される融合タンパク質を使用するため、多様な疾患に関連する、欠けているか失われた機能を過去の治療法よりも有効に補充または回復する。

【0118】

非改変配列については、融合タンパク質はタンパク質発現増強ポリペプチドを野生型C F T Rタンパク質またはC F T R Δ 508 Fタンパク質に結合する結合ドメインと連結させた融合タンパク質である。多数のタンパク質がC F T Rのカルボキシ末端の高度に保存されたPDZ結合領域と結合するPDZドメインを有することが知られている。本発明の非改変配列の融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインとして使用するPDZドメインの由来として用いることができるタンパク質としては、PDZアダプタータンパク質のNHERFファミリーに属する任意のタンパク質が挙げられるが、これに限定されるものではない。NHERFファミリーに属するPDZアダプタータンパク質としては、NHERF1(NHERF、EBP50、SLC9A3R1としても知られる)、NHERF2(E3KARPまたはSLC9A3R2としても知られる)、PDZK1(CAP70またはNHERF3としても知られる)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。たとえば、Haggie et al., J. Biol. Chem., 279(7): 5494-5500 (2004); Guggino, W. B., Proc. Am. Thorac. Soc., 1: 28-32 (2004); およびSingh et al., J. Clin. Investig., 119(3): 540-550 (2009)を参照のこと。このように、PDZタンパク質のPDZドメインは、C F T R Δ 508 Fおよび野生型C F T Rタンパク質のいずれか一方または両方を標的とするよう設計された融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインとして、本発明の遺伝子治療に特に有用となり得る。

【0119】

したがって、本発明は新規な形態の遺伝子治療を提供する。この遺伝子治療では、不安定な内因性タンパク質（不安定なC F T R Δ 5 0 8 Fなど）の発現レベルおよび／または所望の異種性タンパク質（野生型C F T Rなど）の発現レベルを有意に増強する融合タンパク質が提供されるため、多様な疾患に関連する、欠けているか失われた機能をより有効に補充または回復する。

【0120】

本発明のさらなる態様と特徴は、以下に示す実施例から明らかであるが、この実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0121】

10

実施例1. 改変配列を用いた目的の標的タンパク質の発現を増強するための組成物および方法

本明細書に記載のタンパク質発現増強ポリペプチドと連結した目的の標的タンパク質を発現するための発現ベクタープラスミドを構築した。この融合タンパク質は、標準のエピトープタグとさらに連結させてもよい。エピトープタグは、それに対応する抗タグ抗体と標準の免疫ブロット分析によって容易に認識または単離できるように、通常はタンパク質構築物のカルボキシ（C）末端またはアミノ（N）末端に結合させる。

【0122】

多様な制限酵素部位を含むヌクレオチド配列を有するDNAリンカー分子を、以下の配列を有する2種類の一本鎖DNA分子をアニーリングすることによって作製した（配列は5'末端から3'末端方向に記載する）：

20

AGCTTTGGTACCGGATCCGAATTTCGATATCGCGGCCCGCTCTCTCGAGTCTTAGAGGGCC（配列番号187）；および
CTCTAGACTCGAGAGCGGCCCGCGATATCGAATTTCGGATCCGGTACCA（配列番号188）。

【0123】

次いで、アニーリングしたリンカー分子を、HindIIIおよびApaIで消化したプラスミドp c DNA 3（カタログ番号V790-20、Invitrogen）に挿入し、プラスミドp c DNA 'を得た。

【0124】

30

V5エピトープタグ（GKPIPNPLLLGLDST（配列番号47））またはFlagエピトープタグ（DYKDDDDK（配列番号111））をコードするDNA分子をプラスミドp c DNA 'に挿入した。V5エピトープタグのN末端にメチオニンを付加した配列に対するコード配列、すなわち：

ATGGGTAAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCTCTCGGTCTCGATTCTACG（配列番号189）を有する二本鎖DNA分子を、XhoIおよびXbaIで消化したp c DNA 'に挿入し、プラスミドV5（C）- p c DNA 'を得た。また、HindIIIおよびKpnIで消化したp c DNA 'に挿入し、プラスミドV5（N）- p c DNA 'を得た。

【0125】

40

Flagエピトープタグに対するコード配列、すなわち：

GATTACAAGGATGACGATGACAAAG（配列番号190）を有するDNA分子を、XhoIおよびXbaIで消化したプラスミドp c DNA 'に挿入し、プラスミドFlag（N）- p c DNA 'を得た。

【0126】

DNA分子の作製

ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction（PCR））、遺伝子合成、または相補的DNA分子のアニーリングによって、タンパク質配列をコードするDNA分子を標準的な手順で得た。免疫グロブリンFc領域のアミノ酸配列をコードするDNA分子を標準のオリゴヌクレオチド合成によって作製した。グリシンとセリンからなるリンカー配

50

列 G G G S G G S G G S G G (配列番号 1 2 1) をコードする DNA 配列 G G A G G C G G A A G T G G T G G G A G C G G T G G A A G C G G A G G C (配列番号 1 9 1) を有する DNA 分子を、標準の方法で合成した相補一本鎖をアニーリングすることによって作製した。

【0127】

Jドメイン融合タンパク質を発現する発現ベクタープラスミドの作製

C末端にV5タグを付加した I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質 (図 1 A 参照) を発現させるため、I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質をコードする DNA 分子を、H i n d I I I および K p n I で消化したプラスミド V 5 (C) - p c D N A ' に挿入した。

【0128】

Jドメインまたは B A G ドメインを I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質の N 末端に結合させた融合タンパク質 (図 3 A 参照) を発現させるため、シグナル配列を欠失させた切断型 I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質を、N o t I および X h o I で消化したプラスミド V 5 (C) - p c D N A ' に挿入した。

【0129】

V5タグで標識した切断型 T N R 1 受容体タンパク質 (図 5 A 参照) を発現させるため、切断型 (細胞外ドメインのみ) T N R 1 受容体タンパク質をコードする DNA 分子を、H i n d I I I および K p n I で消化したプラスミド V 5 (C) - p c D N A ' に挿入した。

【0130】

V5タグで標識した α 1 アンチトリプシン (「α 1 A T」) (図 4 A 参照) を発現させるため、α 1 アンチトリプシンをコードする DNA 分子を、H i n d I I I および K p n I で消化したプラスミド V 5 (C) - p c D N A ' に挿入した。

【0131】

N末端にV5タグを付加した p 5 3 タンパク質 (図 7 A 参照) を発現させるため、p 5 3 タンパク質をコードする DNA 分子を、N o t I および X h o I で消化したプラスミド V 5 (N) - p c D N A ' に挿入した。

【0132】

Vタグで標識した C F T R と V5タグで標識した変異 C F T R Δ 5 0 8 F (図 8 A 参照) を発現させるため、C F T R タンパク質または C F T R Δ 5 0 8 F タンパク質をコードする DNA 分子を、N o t I および X h o I で消化したプラスミド V 5 (N) - p c D N A ' に挿入した。

【0133】

目的のタンパク質を Jドメインと融合した融合タンパク質を発現させるため、Jドメインをコードする DNA 分子をプラスミド V 5 (C) - p c D N A ' の E c o R I 部位またはプラスミド V 5 (N) - p c D N A ' の E c o R V にサブクローニングし、それぞれプラスミドベクター J - V 5 (C) - p c D N A ' または V 5 (N) - J - p c D N A ' を得た。融合タンパク質は、H s p 4 0、S V 4 0、C S P の Jドメインを用いて作製した。

【0134】

目的のタンパク質を B A G ドメインと融合した融合タンパク質を発現させるため、B A G ドメインをコードする DNA 分子をプラスミド V 5 (C) - p c D N A ' の E c o R I 部位にサブクローニングしてプラスミドベクター B A G - V 5 (C) - p c D N A ' を得た。また、同じ DNA 分子をプラスミド V 5 (N) - p c D N A ' の E c o R V 部位にサブクローニングし、V 5 (N) - B A G - p c D N A ' を得た。融合タンパク質は、以下に示すように、B A G 3 ドメイン、B A G 4 ドメイン、B A G 5 ドメイン、B A G 6 ドメインを用いて作製した。

【0135】

次に、I L 1 3 R α 2、T N F R 1、α 1 A T、p 5 3、または C F T R (野生型または Δ 5 0 8 F 変異型) をコードする DNA 分子を、上記の 1 個以上の発現ベクターに Jド

10

20

30

40

50

メイン（場合によってはBAGドメイン）配列とインフレーションで挿入し、融合タンパク質を発現させた。この融合タンパク質はさらに、コードされたタンパク質を認識しやすくするため、N末端またはC末端にV5エピトープタグを有している。

【0136】

HEK293細胞でのタンパク質の発現と検出

多様なタンパク質構築物をコードする発現ベクタープラスミドを、X-tremeGENE HP形質移入試薬（カタログ番号06365752001、Roche）を用いてHEK293細胞に形質移入した。以下の実施例に示すように、形質移入の効率を確認するため、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する別のプラスミドを、本発明の融合タンパク質をコードする各発現ベクタープラスミドと共に形質移入した。形質移入細胞の培養液を2日間インキュベートし、培地および／または細胞可溶化物の発現タンパク質について、ドットブロット分析またはウェスタンブロット分析を用いて分析した。分析の前に、培養液のサンプルを遠心分離し、細胞片を除去した。細胞可溶化物を得るため、2mMのPMSEFを含有する溶解緩衝液（10mM Tris-HCl、pH8.0、150mM NaCl、10mM EDTA、2%SDS）に細胞を溶解した。超音波処理を短時間行った後、サンプルの発現タンパク質について、ドットブロット分析またはウェスタン免疫ブロット分析を用いて分析した。ウェスタンブロット分析のため、サンプルをSDS-サンプルの緩衝液中で煮沸し、ポリアクリルアミド電気泳動に供し、続いて、分離されたタンパク質バンドを膜（PVDF膜）に転写した。

【0137】

形質移入の内部管理としてのGFPの発現を、抗GFP抗体を用いて検出した。ドットブロットおよびウェスタンブロットで得られた発現タンパク質を化学発光シグナルで検出した。ブロットの吸着物を、タンパク質が担持していた特定のエピトープタグ（たとえばV5タグまたはFLAGタグ）に結合する一次抗体と短時間反応させた。未反応の一次抗体を洗浄で除去した後、酵素と連結した二次抗体（たとえばセイヨウワサビペルオキシダーゼと連結した抗IgG抗体）を、吸着物と結合した一次抗体分子と反応させた。洗浄後、製造業者の化学発光試薬を添加した。ブロットで得られた化学発光シグナルをX線画像に記録した。記載のある場合は、化学発光シグナルの画像を濃度計で走査し、NIH ImageJ画像処理プログラムを用いて分析した。

【0138】

タンパク質の活性に関する分析

本明細書に記載のJドメイン融合タンパク質の作製に用いた目的のタンパク質の活性を検出するには、標準的な分析を利用できる。

【0139】

IL13R α 2結合機能に関する結合分析は、"Identification of distinct roles for a dileucine and a tyrosine internalization motif in the interleukin (IL)-13 binding component IL13 receptor alpha 2 chain (インターロイキン (IL) 13結合成分IL13受容体 α 2鎖のジロイシン内部移行モチーフとチロシン内部移行モチーフの異なる役割の認識)"J. Biol. Chem., 276(27): 25114-25120(2001)に記載されている。

【0140】

TNFR結合機能に関する結合分析は、"Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor: Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity (組換え55kDa腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体: TNF α およびTNF β に対する結合とTNF活性阻害に関する化学量論)"J. Biol. Chem., 266(27): 18324-18329 (1991)に記載されている。

【0141】

α 1アンチトリプシン (α 1AT) 活性の分析は、"Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes (α 1アンチトリプシンとプロテアーゼの複合体形成は単球のリポ多糖、インターロイキン1 β および腫瘍壊死因子 α に誘導される)"Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157(1): 246-255(1998)に記載されている。

【0142】

p53 活性の分析は、"Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 activity in cell death and viral replication (インフルエンザウイルス感染は p53 活性を高める：細胞死とウイルス複製における p53 活性の役割)", J. Virol., 79(14): 8802-8811 (2005)に記載されている。

【0143】

CFTR 活性の分析は、"Pharmacology of CFTR chloride channel activity (CFTR 塩素イオンチャネル活性の薬理作用)", Physiol. Rev., 79(1 Suppl.): S109-S144 (1999)に記載されている。

【0144】

10

実施例 2. 改変配列の標的タンパク質の発現増強

図1Aは、C末端にV5エピトープを付加した全長のIL13R α 2タンパク質(「IL13R α 2WT」)を発現させるための構築物と、IL13R α 2をBAGまたはJドメインと融合しC末端にV5エピトープを付加した融合タンパク質を発現させるための構築物の全体図を示す。

【0145】

V5タグで標識したIL13R α 2WTタンパク質は、全長のIL13R α 2タンパク質のアミノ酸配列のC末端にV5エピトープタグを連結させ、そのC末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する12個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。V5タグで標識したIL13R α 2WTのアミノ酸配列を下の表に示す。

20

表2. V5タグで標識したIL13R α 2WTタンパク質のアミノ酸配列

【0146】

【表 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT ドメイン (全長)	配列番号 192	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGI PETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIYKADGQNI GCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKW SIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTY PKMIPEFFCDTGTGSEFDIAA ALEGKPIPNPLLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2FL	配列番号 192 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGI PETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIYKADGQNI GCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKW SIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTY PKMIPEFFCDT
リンカー	配列番号 192 の第 381-393 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 192 の第 394-407 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末端残基	配列番号 192 の第 408-419 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT - BAG3 ドメイン融合タンパク質は、アミノ (N) 末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこに BAG3 タンパク質の BAG ドメインを連結させ、さらに V5 エピトープタグを連結させ、その C 末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する 12 個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2WT - BAG3 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 3. IL13R α 2WT - BAG3 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

【0147】

10

20

30

40

【表 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT-BAG3 融合タンパク質	配列番号 193	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPEKTVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDGWIWSEWSDKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPEFFCDTGTGSEFHPGV LKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGKKTDKKYL MIEEYLTKEALLALDSVDPEGRADVRRQARRD GVRKVQTILEKLEQKAIDIAAALEGKPIP NPLLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2WT ドメイ ン (全長)	配列番号 193 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPEKTVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDGWIWSEWSDKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPEFFCDT
リンカー	配列番号 193 の第 381-386 残基	GTGSEF
BAG ドメイン (BAG3 由来)	配列番号 193 の第 387-468 残基	HPGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGKKT DKKYL MIEEYLTKEALLALDSVDPEGRADV RRQARRD GVRKVQTILEKLEQKAID
リンカー	配列番号 193 の第 469-475 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 193 の第 476-489 残基	GKPIP NPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 193 の第 490-501 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT-BAG4 ドメイン融合タンパク質は、アミノ (N) 末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこに BAG4 タンパク質の BAG ドメインを連結させ、さらに V5 エピトープタグを連結させ、その C 末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する 12 個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2WT-BAG4 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

【0148】

表 4. IL13R α 2WT-BAG4 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【0149】

【表4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT- BAG4 ドメイン融合 タンパク質	配列番号 194	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYYNLFYWYEGLDH ALQCVDIYIKADGQNIQCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIEFFCDTGTGSEFESTP PSIKKIIHVLEKVQYLEQEVEEFVVGKTKDK AYWLLLEMLTKELLELDVETGGQDSVRQA RKEAVCKIQAILEKLEKKGLDIAAALEGKP IPNPLLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2WT (全長)	配列番号 194 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYYNLFYWYEGLDH ALQCVDIYIKADGQNIQCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIEFFCDT
リンカー	配列番号 194 の第 381-386 残基	GTGSEF
BAG ドメイン (BAG4 由来)	残基配列番号 194 の第 387-470 残基	ESTPPSIKKIIHVLEKVQYLEQEVEEFVVGK KTDKAYWLLLEMLTKELLELDVETGGQDS VRQARKEAVCKIQAILEKLEKKGL
リンカー	配列番号 194 の第 471-477 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 194 の第 478-491 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 194 の第 492-503 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT - BAG5 ドメイン融合タンパク質は、アミノ (N) 末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこに BAG5 タンパク質の BAG ドメインを連結させ、さらに V5 エピトープタグを連結させ、その C 末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する 12 個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2WT - BAG5 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表5. IL13R α 2WT - BAG5 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

【0150】

10

20

30

40

50

【表 5】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT- BAG5 ドメイン 融合タンパク質	配列番号 195	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKKTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPEFFCDTGTGSEFEHPS HKAVERNVLGNLSEIQGEVLSFDGNRTDKNY IRLEELLTKQLLALDAVDPOGEEKCKAARK QAVRLAQNILSYLDLKSDEIDIAAALEGKPI PNPLLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2WT (全長)	配列番号 195 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKKTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPEFFCDT
リンカー	配列番号 195 の第 381-386 残基	GTGSEF
BAG ドメイン (BAG5 由来)	配列番号 195 の第 387-469 残基	EHPSHKAVRNVLGNLSEIQGEVLSFDGNRT DKNYIRLEELLTKQLLALDAVDPOGEEKCK AARKQAVRLAQNILSYLDLKSDE
リンカー	配列番号 195 の第 470-476 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 195 の第 477-490 残基	GKPIPNPLLGLDST
C末端残基	配列番号 195 の第 491-502 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT - BAG6 ドメイン融合タンパク質は、アミノ (N) 末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこに BAG6 タンパク質の BAG ドメインを連結させ、さらに V5 エピトープタグを連結させ、その C 末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する 12 個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2WT - BAG6 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 6. IL13R α 2WT - BAG6 ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

【0151】

10

20

30

40

50

【表 6】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT-BAG6 ドメイン融合タンパ ク質	配列番号 196	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNI GCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNI VKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKW SIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWS DKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTY PKMIPEFFCDTGTGSEFMPAK RRKTMQGE GPQLLLSEAVSRAAKAAGARPL TSPELSRDLEAPEVQESYRQQLRSDIQKR LQEDPNYSPQRFPNAQRAFADDDPDIAAALE GKPIPNPLLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2WT (全長)	配列番号 196 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNI GCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNI VKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKW SIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWS DKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTY PKMIPEFFCDT
リンカー	配列番号 196 の第 381-386 残基	GTGSEF
BAG ドメイン (BAG6 由来)	配列番号 196 の第 387-473 残基	MPAKRRKTMQGE GPQLLLSEAVSRAAKAAG ARPLTSPELSRDLEAPEVQESYRQQLRSD IQRLQEDPNYSPQRFPNAQRAFADDDP
リンカー	配列番号 196 の第 474-480 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 196 の第 481-494 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 196 の第 495-506 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT-Hsp40 Jドメイン融合タンパク質は、アミノ(N)末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこに Hsp40 タンパク質の Jドメインを連結させ、さらに V5 エピトープタグを連結させ、その C末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する 12 個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2WT-Hsp40 Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 7. IL13R α 2WT-Hsp40 Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

【0152】

10

20

30

40

50

【表 7】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT-Hsp40 J ドメイン融合タン パク質	配列番号 197	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRKVNICYSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPFEFFCDTGTGSEFMGKD YYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPD KNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIF DRYDIAAALEGGKPIPNPLLGLDSTSRGPYS IVSPKC
IL13R α 2WT ドメイ ン (全長)	配列番号 197 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRKVNICYSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPFEFFCDT
リンカー	配列番号 197 の第 381-386 残基	GTGSEF
Hsp40 J ドメイン	配列番号 197 の第 387-453 残基	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALR YHPDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRK REIFDRY
リンカー	配列番号 197 の第 454-460 残基	DIAAALE
V5 エピトープ	配列番号 197 の第 461-474 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 197 の第 475-486 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT-SV40 Jドメイン融合タンパク質は、アミノ (N) 末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこにSV40 Jタンパク質のJドメインを連結させ、さらにV5 エピトープタグを連結させ、そのC末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する12個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2-SV40 Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 8. IL13R α 2WT-SV40 Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【0153】

【表8】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT-SV40 J ドメイン融合タンパ ク質	配列番号 198	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRKVNICYSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPFEFFCDTGTGSEFMCKV LNREESLQMLDLLGLERSAWGNIPLMRKAY LKKCKEFHPDKGGDEEKMCKMNTLYKKMED GVKYAHQPDFGGFWDADIAAALEGKPIPNP LLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2WT ドメイ ン (全長)	配列番号 198 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRKVNICYSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPFEFFCDT
リンカー	配列番号 198 の第 381-386 残基	GTGSEF
SV40 J ドメイン	配列番号 198 の第 387-466 残基	MDKVLNREESLQMLDLLGLERSAWGNIPLM RKAYLKKCKEFHPDKGGDEEKMCKMNTLYK KMEDGVKYAHQPDFGGFWDADIAAALE
リンカー	配列番号 198 の第 467-473 残基	
V5 エピトープ	配列番号 198 の第 474-487 残基	GKPIPNPLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 198 の第 488-499 残基	SRGPYSIVSPKC

V5 タグで標識した IL13R α 2WT - CSP Jドメイン融合タンパク質は、アミノ (N) 末端側が全長の IL13R α 2 タンパク質のアミノ酸配列であり、そこに CSP タンパク質の Jドメインを連結させ、さらに V5 エピトープタグを連結させ、その C末端側にさらに発現ベクターのクローニング部位に由来する 12 個のアミノ酸残基を連結させたアミノ酸配列を有する。IL13R α 2WT - CSP Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

10

20

30

40

50

表 9. IL13R α 2WT - CSP Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列
 【0154】
 【表 9】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
IL13R α 2WT-CSP J ドメイン融合タンパ ク質	配列番号 199	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNGKIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIQCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIWKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRKVNIIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKKTLLRFLWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIEFFCDTGTGSEFMADQ RQRSLSTSGESLYHVLGLDKNATSDDIKKS YRKLALKYHPDKNPDNPEAADKFKEINNAH AILTDATKRNIYDKYGSGLYVDIAAALEG KPIPNPLLGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2 ドメイン	配列番号 199 の第 1-380 残基	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNGKIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIQCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIWKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRKVNIIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKKTLLRFLWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIEFFCDT
リンカー	配列番号 199 の第 381-386 の残基	GTGSEF
CSP J ドメイン	配列番号 199 の第 387-472 残基	MADQRQRSLSTSGESLYHVLGLDKNATSDDI IKKSYRKLALKYHPDKNPDNPEAADKFKEI NNAHAILTDATKRNIYDKYGSGLYV
リンカー	配列番号 199 の第 473-479 残基	DIAAALE
V5 エピトープタグ	配列番号 199 の第 480-493 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 199 の第 494-505 残基	SRGPYSIVSPKC

上記の発現ベクターを用いて、形質移入HEK293細胞でのIL13R α 2 - V5の発現レベルを、BAGドメインまたはJドメインを含む多様なIL13R α 2融合タンパク質の発現レベルと比較した。細胞内での多様な融合タンパク質の発現レベルを図1Bのウェスタンブロットに示す。第1列は等量の細胞可溶化物タンパク質を泳動したゲルのレーンである。第2列は形質移入の内部管理としてのGFPの発現を示す。図1Bの第1列に示すように、V5タグで標識したIL13R α 2については微かなバンドしか検出され

10

20

30

40

50

なかった。このバンドを野生型 (WT) IL13R α 2 タンパク質の発現を表すのに用いた。バンドは発現が不十分であったことを示している。IL13R α 2 と BAG ドメイン (BAG3、BAG4、BAG5、BAG6) とを含む融合タンパク質は、それよりもわずかに高いレベルで発現された。対照的に、IL13R α 2 といずれかの J ドメインとを含む融合タンパク質はすべて、V5 タグで標識した IL13R α 2 または IL13R α 2 と BAG ドメインとを含む融合タンパク質よりも著しく高いレベルで発現された。図 1B のシグナルを濃度測定分析した結果を図 1C に示す。IL13R α 2 といずれかの J ドメインとを含む融合タンパク質は、V5 エピトープタグで標識した IL13R α 2 の発現量 (100% とする) の 25 倍のレベルで発現された。図 1C の棒グラフを参照のこと。

【0155】

10

切断型 IL13R α 2 の発現と分泌

IL13R α 2 は、インターロイキン - 13 (interleukin - 13 (IL13)) に結合しアレルギー性炎症を媒介する膜受容体タンパク質である。IL13 が膜結合受容体である IL13R α 2 受容体と結合すると、炎症反応を誘発するシグナルが細胞質へ伝達される。このような反応は喘息の場合には特に有害である。発現された膜結合性 IL13R α 2 分子の一部分は細胞表面で切断され、可溶性の切断型 IL13R α 2 (IL13R α 2 TF) を細胞外空間へ遊離する。切断型 IL13R α 2 は IL13 結合能を保持しているが、全長の膜結合性タンパク質に見られる膜貫通領域および細胞質領域がないため、シグナルを細胞に送ることはできない。このため、切断型 IL13R α 2 は炎症反応を誘発するシグナルを細胞へ伝達することなく IL13 分子に結合することによって喘息を治療するために阻受容体として採用されてきた。このような治療用途のため、遺伝子改変した切断型 IL13R α 2 が哺乳類細胞で発現され、その培養液をもとに分泌タンパク質として精製されてきた。しかし、切断型 IL13R α 2 は発現や分泌が難しいため、生成が非効率的である。

20

【0156】

J ドメインが有する、可溶性の切断型 IL13R α 2 (IL13R α 2 TF) の発現を増強する能力を試験した。J ドメインを切断型 IL13R α 2 と結合させることによってこの分泌タンパク質の発現が増強されるかを確認するために、IL13R α 2 TF または IL13R α 2 TF の N 末端に Erdj3 タンパク質の J ドメインを融合した融合タンパク質を発現するプラスミドを構築した。タンパク質は、認識しやすいように V5 エピトープをさらに有するタンパク質とした。図 2A の構築物の図を参照のこと。

30

【0157】

この実験に使用した、V5 タグで標識した IL13R α 2 TF のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 10. V5 タグで標識した IL13R α 2 TF 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0158】

【表 10】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
IL13R α 2TF タンパク質	配列番号 200	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNGKIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQONIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQKC WEGEDLSKKGTGSEFDIAAALEGKPIPNPL LGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2TF	配列番号 200 の第 1-339 残基	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNGKIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQONIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQKC WEGEDLSKK
リンカー	配列番号 200 の第 340-352 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 200 の第 353-366 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 200 の第 367-378 残基	SRGPYSIVSPKC

J タンパク質 Erdj3 の J ドメインを N 末端側に有し、成熟した（すなわちシグナル配列を含まない）切断型 IL13R α 2（IL13R α 2TF）と、V5 エピトープタグとを有する J ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

【0159】

表 11. V5 タグで標識した Erdj3 J ドメイン-IL13R α 2TF タンパク質のアミノ酸配列

【0160】

10

20

30

40

【表 1 1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Erdj3 J ドメイン- IL13Rα2TF 融合タ ンパク質	配列番号 201	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAEKQFQDLGAAYEVLSDSEKRDIAAASD TEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPL SLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITK NLHYKDGFDLNGKIEAKIHTLLPWQCTNGS EVQSSWAETTYWISPGIPETKVQDMDCVY YNWQYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEG LDHALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDY KDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNI PLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPA RCFDYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKT TNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWS KQCWEGEDLSKKLEGKPIPNPLLGLDSTSR GPYSIVSPKC
Erdj3 J ドメイン	配列番号 201 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAEKQFQDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 201 の第 84-88 残基	DIAAA
IL13Rα2TF (N 末端が成熟)	配列番号 201 の第 89-402 残基	SDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQP PLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTII TKNLHYKDGFDLNGKIEAKIHTLLPWQCTN GSEVQSSWAETTYWISPGIPETKVQDMDC VYYNWQYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWY EGLDHALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEAS DYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNI VKPLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPI PARCFDYEIEIREDDTTLVTATVENETYTL KTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEW SDKQCWEGEDLSKK
リンカー	配列番号 201 の第 403-404 残基	LE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 201 の第 405-418 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 201 の第 419-430 残基	SRGPYSIVSPKC

シグナル配列と、BAG3のBAGドメインと、成熟した（すなわちシグナル配列を含
まない）切断型IL13Rα2（IL13Rα2TF）と、V5エピトープタグとを含む

BAGドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 1 2 . V 5 タグで標識したBAGドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質のアミ
ノ酸配列

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

【表 1 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
BAG ドメイン- IL13R α 2TF 融合タ ンパク質	配列番号 202	MGVKVLFALICTIAVAEAGTGSEFHPGV LKV EAILEKVQGLEQAVDNFEGKKTDKKYLMI EYLTKEALLALDSVDPEGRADVRQARRD GVRKVQTILEKLEQKAIDDIAAASDTEIK VNPPQDFEIVDPGYLG YLYLQWQPPLSL DHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIIT KNLHYKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCT NGSEVQSSWAETTYWISPQGI PETKVQD MDCVYYNWQYLLCSWKPGIGVLLDTN YNLFYWYEGLDHALQCV DYIKADGQNI GCRFPYLEASDYKDFYICVNGSSENKPI RSSYFTFQLQNI VKPLPPVYLTFTR ESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYEIEI REDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQ LCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWSDKQ CWEGEDLSKKLEGKPIPNPLGLDSTSR GPYSIVSPKC
シグナル配列	配列番号 202 の第 1-17 残基	MGVKVLFALICTIAVAE
リンカー	配列番号 202 の第 18-23 残基	GTGSEF
BAG ドメイン (BAG3 由来)	配列番号 202 の第 24-105 残基	HPGV LKVEAILEKVQGLEQAVDNFEG KKTDKKYLMI EYLTKEALLALDSVD PEGRADVRQARRD GVRKVQTILEKLE QKAID
リンカー	配列番号 202 の第 106-110 残基	DIAAA
IL13R α 2TF (N 末端が成熟)	配列番号 202 の第 111-424 残基	SDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLG YLYL QWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIG SETWKTIIITKNLHYKDGFDLNKGIE AKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTY WISPQGI PETKVQDMDCVYYNWQY LLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEG LDHALQCV DYIKADGQNI GCRFPY LEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSY FTFQLQNI VKPLPPVYLTFTR ESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYE IEIREDDTTLVTATVENETYTLKTT NETRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIW SEWSDKQCWEGEDLSKK
リンカー	配列番号 202 の第 425-426 残基	LE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 202 の第 427-440 残基	GKPIPNPLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 202 の第 441-452 残基	SRGPYSIVSPKC

発現プラスミドをHEK293細胞に形質移入した。IL13R α 2TFまたはIL13R α 2TF-Jドメイン融合タンパク質の発現について、形質移入細胞を2日間培養した培養液から得た細胞可溶化物と培地のサンプルを、抗V5抗体を用いた免疫ブロッティングによって分析した。図2Bに示すように、IL13R α 2TFタンパク質の発現は細胞可溶化物ではわずかに検出された(レーン2)が、培地では全く検出されなかった。対照的に、IL13R α 2TF-Jドメイン融合タンパク質の発現レベルは細胞内(細胞可溶化物サンプル)でも培地に分泌された発現レベルとしても著しく高かった。図2Bを参

10

20

30

40

50

照のこと。Jドメインを切断型 I L 1 3 R α 2 の C 末端に結合させた場合にも同様の効果が見られた（データは示さず）。

【0162】

分泌タンパク質をさらに定量化するために、ドットブロット免疫測定法を用いた別の実験を実施した。I L 1 3 R α 2 T F、B A G ドメインと融合した I L 1 3 R α 2 T F (B A G - I L 1 3 R α T F)、または J ドメインと融合した I L 1 3 R α 2 T F (J - I L 1 3 R α T F) を発現する発現ベクタープラスミドを用いて H E K 2 9 3 細胞を形質移入した。形質移入細胞を 2 日間培養し、分泌タンパク質について、細胞培地のサンプルを、ドットブロット免疫測定法を用いて分析した。結果を図 3 A および 3 B に示す。図 3 A は、培地に分泌された、V 5 タグで標識したタンパク質の化学発光シグナルの X 線フィルム画像を示す。図 3 A に示すように、B A G ドメインを I L 1 3 R α 2 T F と連結させた融合タンパク質（レーン 3）では、融合していない I L 1 3 R α 2 T F（レーン 2）と比較してわずかに分泌タンパク質のレベルが増強された可能性があるが、J ドメインを I L 1 3 R α 2 T F と連結させた融合タンパク質（レーン 3）では、融合していない I L 1 3 R α 2 T F（レーン 2）または B A G ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質（レーン 3）に比べて、分泌タンパク質のレベルが有意に増強された。図 3 A のドットブロットのシグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図 3 B に示す。図 3 B の棒グラフは、分泌された J ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質（棒グラフ 4）の発現レベルが、I L 1 3 R α 2 T F（棒グラフ 2）と B A G ドメイン - I L 1 3 R α 2 T F 融合タンパク質（棒グラフ 3）のいずれと比較しても有意に高かったことを明確に示している。J ドメイン融合物を用いた結果、形質転換細胞が分泌した I L 1 3 R α 2 T F の量は、I L 1 3 R α 2 T F タンパク質を単独で発現するよう形質転換した細胞による発現レベルと比較して約 3.5 倍に増加した。

【0163】

ヒト細胞での改変配列の J ドメイン - α 1 アンチトリプシン融合タンパク質

α 1 アンチトリプシン (α 1 A T) タンパク質は肝臓から分泌され血管内を循環する。α 1 A T の機能は組織（特に肺組織）を過剰なプロテアーゼから保護することである。α 1 アンチトリプシン欠損症と呼ばれる疾患では、プロテアーゼによって肺が損傷される。α 1 アンチトリプシン欠損症の患者は、肺気腫、喘息、および／または慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease (C O P D)) を発症する可能性がある。現在、α 1 A T（ヒト血清から精製される）が α 1 アンチトリプシン欠損症の患者の治療に用いられているが、この治療は高価であり、ヒト血清治療を受ける患者にはヒト血清中に存在する病原体に感染する危険性がある。

【0164】

治療に有効な所望のタンパク質の発現レベルおよび分泌レベルを増強するための有望な戦略として、J ドメインを α 1 アンチトリプシン (α 1 A T) と融合することによる効果を形質移入細胞内で試験した。図 4 A に示すように、V 5 タグで標識した α 1 A T、V 5 タグで標識した α 1 A T - B A G ドメイン融合タンパク質、V 5 タグで標識した α 1 A T - J ドメイン融合タンパク質をコードする D N A 構築物をそれぞれ作製した。

【0165】

V 5 タグで標識した α 1 A T タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。
表 1 3. V 5 タグで標識した α 1 A T タンパク質のアミノ酸配列

【0166】

【表 1 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
α1AT タンパク質	配列番号 203	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTS SHDQDHPTFNKITPNLAEFAFS LYRQLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTL NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRD TVFALVN YIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVF SNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGT GSEFDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSRGPY SIVSPKC
α1AT	配列番号 203 の第 1-418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTS SHDQDHPTFNKITPNLAEFAFS LYRQLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTL NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRD TVFALVN YIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVF SNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
リンカー	配列番号 203 の第 419-431 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 203 の第 432-445 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 203 の第 446-457 残基	SRGPYSIVSPKC

α1ATとBAG3のBAGドメインとV5エピトープタグとを含むBAGドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 1 4. α1AT - BAG 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0167】

10

20

30

40

【表 1 4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列	
		1234567890	1234567890
α1AT-BAG ドメイン 融合タンパク質	配列番号 204	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDQDHTFNKITPNLAFAFS LYRQLAHQSNSTNIFFSVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDVFALVN YIFFKGKWERPFVVKDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTIDLKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGT GSEFHGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEG KKTDKKYLMIEEYLTKEALLDSDVDEGRA DVRQARRDGVVRKVQTILEKLEQKAIDIAA ALEGKPIPNPLGLDSTSRGPYSIVSPKC	
α1AT	配列番号 204 の第 1-418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDQDHTFNKITPNLAFAFS LYRQLAHQSNSTNIFFSVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDVFALVN YIFFKGKWERPFVVKDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTIDLKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK	
リンカー	配列番号 204 の第 419-424 残基	GTGSEF	
BAG ドメイン (BAG3 由来)	配列番号 204 の第 425-506 残基	HPGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGKKTD KKYLMIEEYLTKEALLDSDVDEGRADVRQ ARRDGVVRKVQTILEKLEQKAID	
リンカー	配列番号 204 の第 507-513 残基	DIAAALE	
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 204 の第 514-527 残基	GKPIPNPLGLDST	
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 204 の第 528-539 残基	SRGPYSIVSPKC	

α1ATとErdj3 JドメインとV5エピトープタグとを含むJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 1 5. α1AT - Jドメインタンパク質のアミノ酸配列

【0168】

【表 15】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
α1AT-Erdj3 Jドメイン融合タンパク質	配列番号 205	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFASF LYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDVFALVN YIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYL NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQL GITKVSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGT GSEFGRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKL ALQLHPDRNPDDPQAQEKFDLGAAYEVLSD SEKRDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSRGP YSIVSPKC
α1AT	配列番号 205 の第 1-418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFASF LYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDVFALVN YIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYL NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQL GITKVSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
リンカー	配列番号 205 の第 419-424 残基	GTGSEF
Erdj3 Jドメイン	配列番号 205 の第 425-485 残基	GRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKLALQL HPDRNPDDPQAQEKFDLGAAYEVLSDSEK R
リンカー	配列番号 205 の第 486-492 残基	DIAAALE
v5 エピトープドメイン	配列番号 205 の第 493-506 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末端残基	配列番号 205 の第 507-518 残基	SRGPYSIVSPKC

上記の3種類の組換えα1ATタンパク質構築物をコードする発現ベクタープラスミドをそれぞれHEK293細胞に形質移入した。形質移入細胞を2日間培養した培養液から培地を回収し、培地に分泌された組換えα1ATタンパク質のレベルをドットブロット免疫測定法によって決定した。図4Bは、ドットブロット分析の化学発光シグナルのX線フィルム画像を示す。培地に分泌された融合していないα1AT（レーン2）およびα1AT-BAGドメイン融合タンパク質（レーン3）は検出可能な量であったが、分泌されたα1AT-Jドメイン融合タンパク質（レーン3）の発現レベルはさらに高かった。図4

BのドットプロットのシグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図4Cに示す。図4Cの棒グラフは、分泌された $\alpha 1 A T - J$ ドメイン融合タンパク質（棒グラフ4）の発現レベルが、 $\alpha 1 A T$ （棒グラフ2）タンパク質と $\alpha 1 A T - B A G$ ドメイン融合タンパク質（棒グラフ3）のいずれの発現レベルと比較しても有意に高かったことを明確に示している。Jドメイン融合物を用いた結果、形質転換細胞が分泌したIL13R $\alpha 2$ TFの量は、 $\alpha 1 A T$ を単独で発現するよう形質転換した細胞または $\alpha 1 A T - B A G$ 融合タンパク質を発現するよう形質転換した細胞による発現レベルと比較して1.5倍を超えた。

【0169】

改変配列の切断型TNFR1タンパク質

治療に有効な融合タンパク質を設計するための形態の1つでは、所望の標的分子に特異的に結合する結合ドメインを免疫グロブリンのFc領域と連結させたものを組み合わせ、それによって融合タンパク質の生体内半減期を延長する。この種類の薬物の一例は、多くの自己免疫疾患に関与する重要な免疫系タンパク質である腫瘍壊死因子（TNF α ）に結合してその作用を阻害するエタネルセプト（分子標的治療薬の一つ）である。たとえば、エタネルセプトでは切断型の腫瘍壊死因子 α 受容体（TNFR1TF）が免疫グロブリンのFcドメインと連結されている。エタネルセプトのTNFR1TF部分が薬物標的（TNF α ）に対する特異性を付与し、Fcドメインが生体内での薬物の安定性と送達可能性を加えると考えられている。しかし、Fcドメインは一部の疾患の治療計画には望ましくないかもしれない何らかのエフェクター機能を有することも知られている。

【0170】

受容体を利用した所望の分子の発現レベルと分泌レベルを増強するための有望な戦略として、Jドメインを切断型受容体分子と融合することによる効果について試験した。このようなJドメイン融合タンパク質は、免疫グロブリンのFcドメインと連結させた切断型受容体分子を含むこれまでの薬物設計に対する有望な選択肢となる可能性がある。Jドメインを含む場合と含まない場合の切断型腫瘍壊死因子受容体（TNFR1TF）の発現について、発現ベクタープラスミドTNFR1TF-V5-pcDNA'およびTNFR1TF-Jドメイン-V5-pcDNA'を用いて試験した。抗V5抗体を用いて容易に検出できるように、いずれのタンパク質にも発現ベクターによってV5エピトープタグを付加した。図5Aの構築物の図を参照のこと。

【0171】

V5タグで標識したTNFR1TFのアミノ酸配列を下の表に示す。

表16. V5タグで標識したTNFR1TFタンパク質のアミノ酸配列

【0172】

10

20

30

【表 16】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
TNFR1TF タンパク質	配列番号 206	MGLSTVPDLLLLPLVLLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYLNDCPGPGQDTDCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT TGTGSEFDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSR GPYSIVSPKC
TNFR1TF	配列番号 206 の第 1-211 残基	MGLSTVPDLLLLPLVLLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYLNDCPGPGQDTDCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT T
リンカー	配列番号 206 の第 212-224 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 206 の第 225-238 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 206 の第 239-250 残基	SRGPYSIVSPKC

10

20

TNFR1TFとErdj3 JドメインとV5 エピトープタグとを含むJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 17. V5 タグで標識したTNFR1TF - Erdj3 Jドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列

【0173】

30

【表 17】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
TNFR1TF-J ドメイン融合タンパク質	配列番号 207	MGLSTVPDLLLLPLVLELLLVGIYPSGVIGL VPHLGDRKRDVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYNDCPGPGQDTDCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT TGTGSEFGRDFYKILGVPRASIKDIKKAY RKLALQLHPDRNPDDPQAQEKFDLGAAYE VLSDSEKRDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTS RGPYSIVSPKC
TNFR1TF	配列番号 207 の第 1-211 残基	MGLSTVPDLLLLPLVLELLLVGIYPSGVIGL VPHLGDRKRDVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYNDCPGPGQDTDCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT T
リンカー	配列番号 207 の第 212-217 残基	GTGSEF
Erdj3 J ドメイン	配列番号 207 の第 218-278 残基	GRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKLALQL HPDRNPDDPQAQEKFDLGAAYEVLSDSEK R
リンカー	配列番号 207 の第 279-285 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 207 の第 286-299 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末端残基	配列番号 207 の第 300-311 残基	SRGPYSIVSPKC

発現プラスミドをHEK293細胞に形質移入した。TNFR1TFまたはTNFR1TF-Jドメイン融合タンパク質の発現について、形質移入細胞を2日間培養した培養液から得た細胞可溶化物と培地のサンプルを、抗V5抗体を用いた免疫ブロッティングによって分析した。図5Bのドットプロットに示すように、TNFR1TFは培地で少し検出された(レーン2)が、培地で検出されたTNFR1TF-Jドメイン融合タンパク質のレベルはそれよりも有意に高かった(レーン3)。図5BのドットプロットのシグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図5Cに示す。明らかに、分泌されたTNFR1TF-Jドメイン融合タンパク質(棒グラフ3)の発現レベルが(融合していない)TNFR1TFタンパク質(棒グラフ2)の発現レベルに比べて有意に高く、すなわち、TNFR1TF単独のレベルの約6倍であった。

【0174】

改変配列のFc融合タンパク質の分泌

分泌された切断型TNFR1の発現レベルがJドメインを結合させることによって増強された(図5Bおよび図5C)ことを示す以上の結果からみて、免疫グロブリンのFcドメインと融合したTNFR1TF-Fc融合タンパク質などの目的のタンパク質の発現がJドメインによって増強されるかを調べることは興味深い。このようなFc融合分子は、薬物であるエタネルセプト(ENBREL(登録商標)として市販されている)を例とする

薬物形態の種類である。エタネルセプトは重症の関節リウマチ、多関節型若年性特発性関節炎（juvenile idiopathic arthritis（J I A））、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、尋常性乾癬などの多くの自己免疫疾患の治療用に認可されているTNF1TF-Fc融合タンパク質である。

【0175】

この試験のために、目的のタンパク質（TNFR1TF、IL13R α 2TFまたは α 1AT）のそれぞれをコードするcDNAの3'末端にV5エピトープタグをコードするセグメントを付加し、さらに免疫グロブリンFc領域の定常ドメインをコードするセグメント（「Fc」）と連結させた。Jドメインを融合するために、JドメインをコードするcDNAを、目的のタンパク質のそれぞれをコードするcDNAとV5エピトープタグをコードするセグメントとの間にインフレイムで連結させた。図6Aの構築物の図を参照のこと。対応する発現ベクタープラスミドをHEK293細胞に形質移入した。分泌されたタンパク質について、培地をドットブロット分析によって分析した。

10

【0176】

TNFR1TF-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表18. V5タグで標識したTNFR1TF-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列

【0177】

【表 18】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
TNFR1TF Fc 融合タンパク質	配列番号 208	MGLSTVPDLLLPLVLLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDRKRDVCPQGKYIHPQNNISICT KCHKGTLYNDCPGPGQDTDCRECEGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT TGTGSEFDIAAALE GKPIPNPLLGLDSTSR PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCL VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TNFR1TF	配列番号 208 の第 1-211 残基	MGLSTVPDLLLPLVLLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDRKRDVCPQGKYIHPQNNISICT KCHKGTLYNDCPGPGQDTDCRECEGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT T
リンカー	配列番号 208 の第 212-224 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 208 の第 225-238 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 208 の第 239-240 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 208 の第 241-471 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCL VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

TNFR1TF - Jドメイン - Fc 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。
表 19. V5 タグで標識した TNFR1TF - Erdj3 Jドメイン - Fc タンパク質のアミノ酸配列

【0178】

10

20

30

40

【表 19】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
TNFR1TF-J ドメイン Fc 融合タンパク質	配列番号 209	MGLSTVPDLLLPLVLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDRDKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT TGTGSEFGRDFYKILGVPRASAIKDIKKAY RKLALQLHPDRNPDDPQAQEFQDLGAAYE VLSDSEKRDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTS RPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TNFR1TF	配列番号 209 の第 1-211 残基	MGLSTVPDLLLPLVLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDRDKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT T
リンカー	配列番号 209 の第 212-217 残基	GTGSEF
Erdj3 J ドメイン	配列番号 209 の第 218-278 残基	GRDFYKILGVPRASAIKDIKKAYRKLALQL HPDRNPDDPQAQEFQDLGAAYEVLSDSEK R
リンカー	配列番号 209 の第 279-285 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 209 の第 286-299 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 209 の第 300-301 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 209 の第 302-532 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP VLDSDGSSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。
 表 20. V 5 タグで標識した I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質のアミノ酸配列
 【 0 1 7 9 】

【表 20】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
IL13R α 2TF-Fc 融合 タンパク質	配列番号 210	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQONIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKGTGSEFDIAAALEGKPIPNPL LGLDSTSRPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IL13R α 2TF	配列番号 210 の第 1-339 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQONIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKK
リンカー	配列番号 210 の第 340-352 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 210 の第 353-366 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 210 の第 367-368 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 210 の第 369-599 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IL13R α 2TF-Jドメイン-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 21. V5 タグで標識した IL13R α 2TF-Erdj3 Jドメイン-Fc タンパク質のアミノ酸配列

【0180】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
IL13R α 2TF-J ドメイン-Fc 融合タンパク質	配列番号 211	123456789012345678901234567890 MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNGGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIYKADGQONIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIWKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKKGTGSEFGRDFYKILGVPRAS IKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQEF QDLGAAYEVLSDSEKRDIAAALEGKPIPNP LLGLDSTSRPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVTLHQLDNLNGKEYCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
IL13R α 2TF	配列番号 211 の第 1-339 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNGGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIYKADGQONIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIWKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKK
リンカー	配列番号 211 の第 340-345 残基	GTGSEF
Erdj3 J ドメイン	配列番号 211 の第 346-406 残基	GRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKLALQLH PDRNPDDPQAQEFQDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 211 の第 407-413 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 211 の第 414-427 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 211 の第 428-429 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 211 の第 430-660 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVVSHPEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

α 1AT - Fc 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

10

20

30

40

50

表 2 2 . V 5 タグで標識した α 1 A T - F c タンパク質のアミノ酸配列
【 0 1 8 1 】

【表 2 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
α1AT タンパク質- Fc 融合タンパク質	配列番号 212	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDQDHPTFNKITPNLAFAFS LYRQLAHQSNSTNIFFSFVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQQLQTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYL NATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTLDKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFFVFLMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQKGT GSEFDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSRPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
α1AT	配列番号 212 の第 1-418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDQDHPTFNKITPNLAFAFS LYRQLAHQSNSTNIFFSFVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQQLQTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYL NATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTLDKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFFVFLMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK
リンカー	配列番号 212 の第 419-431 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 212 の第 432-445 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 212 の第 446-447 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 212 の第 448-678 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

α1AT - Jドメイン - Fc 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

10

20

30

40

50

表 2 3 . V 5 タグで標識した α 1 A T - Erdj3 J ドメイン - F c タンパク質のアミノ酸配
列

【 0 1 8 2 】

【表 2 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
α1AT-J ドメイン-Fc 融合タンパク質	配列番号 213	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHTDQDHPTFNKITPNLAEFASF LYRQLAHQSNSTNIFFSVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGT GSEFGRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKL ALQLHPDRNPDDPQAQEFQDLGAAEVLSD SEKRDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSRPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
α1AT	配列番号 213 の第 1- 418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHTDQDHPTFNKITPNLAEFASF LYRQLAHQSNSTNIFFSVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGF QELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
リンカー	配列番号 213 の第 419-424 残基	GTGSEF
Erdj3 J ドメイン	配列番号 213 の第 425-485 残基	GRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPD RNPDDPQAQEFQDLGAAEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 213 の第 486-492 残基	DIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 213 の第 493-506 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 213 の第 507-508 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 213 の第 509-739 残基	PKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1 A T - F c) を、図 6 B の各図の中央レーンのドットプロットに示す培地で発現させた。この F c 融合タンパク質の発現レベルは目的の各タンパク質単独（すなわち F c ドメインと融合していない場合（データは示さず））の場合よりも高かった。図 6 B の各図の右レーンのドットプロットに示すように、F c 融合タンパク質に含まれる目的のタンパク質のセグメントに J ドメインを連結させたいずれの場合にも、有意に高い発現レベルが観察された。図 6 B のドットプロットの化学発光シグナルを濃度分析した結果が図 6 C 中の対応する図に示されており、J ドメイン融合タンパク質の発現レベルが有意に高いことが明らかに明白である。

【0183】

ヒト細胞での改変配列の p 5 3 タンパク質の発現増強

10

I L 1 3 R α 2、T N F R、α 1 A T のようなタンパク質は、小胞体（endoplasmic reticulum（E R））で合成され、細胞膜へ送達されるか、細胞から分泌される。J ドメインの存在が細胞質タンパク質の発現に対して与える効果を測定するために、p 5 3 タンパク質と J ドメインとの融合物の発現について試験した。p 5 3 タンパク質はゲノム安定性において中心的役割を果たす転写因子である。がん患者の過半数は p 5 3 を含む経路に何らかの異常を有している。このため、がん患者の体内で p 5 3 を大量に発現させることが、がん治療として試みられてきた。

【0184】

p 5 3 をコードする c D N A を発現プラスミド V 5（N） - p c D N A ' に挿入し、N 末端に V 5 エピトープタグを有する p 5 3 タンパク質を発現するプラスミド V 5（N） - p 5 3 - p c D N A ' を得た。p 5 3 - J ドメイン融合タンパク質を発現させるため、S V 4 0 ラージ T 抗原の J ドメインをコードする c D N A を、次いで V 5（N） - p 5 3 - p c D N A ' ベクターの V 5 コード領域と p 5 3 コード領域との間に挿入した。図 7 A の構築物の図を参照のこと。

20

【0185】

V 5 タグで標識した p 5 3 タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 2 4. V 5 タグで標識した p 5 3 タンパク質のアミノ酸配列

【0186】

【表 2 4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
p53 タンパク質	配列番号 214	MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFDIAAAMEEP QSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPL LPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAP RMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLS SSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTC TYSPLNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPG TRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSD SDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTRFH SVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNMCSNSSCMG GMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRV CACPGRRDRRTEENLRKKGEPHHELPPGST KRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRG RERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRA HSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSDA AALESRGPYSIVSPKC
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 214 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 214 の第 16-26 残基	GTGSEFDIAAA
p53	配列番号 214 の第 27-422 残基	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPLNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTRFHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNMCSNSSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRRDRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSDAAA
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 214 の第 423-436 残基	LESRGPYSIVSPKC

V5 エピトープタグとSV40 Jドメインと p53 タンパク質とを含むJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 2 5. V5 タグで標識したSV40 Jドメイン - p53 融合タンパク質のアミノ酸配列
【0187】

10

20

30

40

【表 2 5】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
p53-SV40 J ドメイン 融合タンパク質	配列番号 215	MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFMDKVLNREE SLQLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKKCK EFHPDKGGDEEKMKKMNTLYKKMEDGVKYA HQPDFGGFWDADIAAAMEEPQSDPSVEPPL SQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDL LSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPVVA PAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQ GSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKM CQLAKTCVPQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYK QSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHL IRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPE VGSDCTTIHYNMCMNSSCMGGMNRRPILTI ITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRT EEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSS SPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFREL NEALELKDAQAGKEPGGSAHSSHLKSKKG QSTSRHKKLMFKTEGPDSDAAALESRGPYS IVSPKC
V5 エピトープドメイン	配列番号 215 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 215 の第 16-21 残基	GTGSEF
SV40 J ドメイン	配列番号 215 の第 22-101 残基	MDKVLNREESLQLMDLLGLERSAWGNIPLM RKAYLKKCKEFHPDKGGDEEKMKKMNTLYK KMEDGVKYAHQPDFGGFWDA
リンカー	配列番号 215 の第 102-106 残基	DIAAA
p53	配列番号 215 の第 107-502 残基	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPEN VLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP DEAPRMPEAAPVAPAPAAPTPAAPAPAPS WPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCVPQLWVDST PPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHE RCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDR NFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNMCMNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSF EVRVCACPRDRRTEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTL QIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPG GSAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGP DSDAAA
リンカー	配列番号 215 の第 503-516 残基	LESRGPYSIVSPKC

プラスミド V5 (N) - p53 - pcDNA' と V5 (N) - J - p53 - pcDNA' を MCF 細胞に形質移入し、2 日間インキュベートした。溶解緩衝液に細胞を溶解し、抗 V5 抗体を用いたウェスタン免疫ブロット分析によってタンパク質を検出した。図 7 B に示すように、p53 - J ドメイン融合タンパク質の発現レベル (レーン 3) は、J ドメインがない場合の p53 タンパク質の発現レベルよりも有意に高かった。したがって、結果は、J ドメインとの融合によって膜結合タンパク質と分泌タンパク質に加えて細胞質タンパク質も増加させることができることを示している。

【0188】

ヒト細胞での改変配列のCFTRの発現

嚢胞性線維症（CF）は、嚢胞性線維症膜通過伝導率制御（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator（CFTR））タンパク質、cAMP調節性塩素イオンチャンネルおよびチャンネル調節因子をコードする遺伝子の変異を原因とする常染色体劣性遺伝疾患である。CFTRの508位のフェニルアラニン残基の欠失（ $\Delta 508F$ ）が、CFTRタンパク質の立体構造を変化させる最も一般的な変異である。この変異が起きると、CFTRタンパク質はERの品質システムによって急速に分解される。野生型CFTRタンパク質機能の一部を回復させることさえできればCF患者に有益な治療を提供できるというのが一般的な統一見解である。そのため、CFTRを用いた多数の遺伝子治療試験が試みられてきたが、CFTRを発現させるための遺伝子の送達が非効率的であることや、媒介物（たとえばウイルスベクター）に対する免疫原性が理由で未だに成功していない。野生型CFTRの適切なタンパク質折り畳みは難しいことが知られていることから、CFTRタンパク質のタンパク質折り畳みが改善できれば非常に有用であろう。

10

【0189】

cftr遺伝子またはそのPhe₅₀₈欠失変異体（cftr $\Delta 508F$ ）をプラスミドV5（N）-pcDNA'に挿入した。BAG3タンパク質のBAGドメインをコードするDNAまたはJタンパク質Hsp40のJドメインをコードするDNAを、プラスミドのV5コード配列とcftrコード配列との間に挿入し、N末端にV5エピトープタグを連結させた野生型CFTRまたは変異型CFTR（ $\Delta 508F$ ）タンパク質、あるいはN末端にBAGドメインまたはJドメインを融合しさらにN末端にV5エピトープタグを融合させた野生型または変異型CFTRタンパク質を発現するプラスミドを得た。この実験に用いた多様な構築物の図を図8Aに示す。

20

【0190】

V5タグで標識した野生型CFTR（CFTR WT）のアミノ酸配列を下の表に示す。
表26-1～表26-2. V5タグで標識したCFTRタンパク質のアミノ酸配列

【0191】

【表 26-1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
V5 タグで標識した CFTR タンパク質	配列番号 216	123456789012345678901234567890 MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFDIAAAMQRS PLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLEL SDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWRELASK KNPKLINALRRCCFFWRFMFYGIFLYLGEVT KAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLG IGLCLLFIVRTLHHPAIFGLHHIGMQMRI AMFSLIYKKTLLSSRVLDKISIGQLVSL SNNLNKFDGLALAHFVWIAPLQVALLMGL IWELLQASAFGLGLIVLALFQAGLGRMM MKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKA YCWEAMEKMIENLRQTELKLTRKAAYVRY FNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILR KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDS LGAINKIQDFLQKQYKTYNLTTEVVM ENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNRKTSNG DDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIERGQLL AVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGIKH SGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDE YRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGE GITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSP FGYLDVLTEKEIFESCCKLMANKTRILVT SKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSLEQ NLQPDFSSKLMGCDSDQFSAERRNSILTE TLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQGTGEFG EKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQMNGI EEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISV ISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNNQGNH RKTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSRRLSQ ETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVT TWNTYLRITVHKSLIFVLIWCLVIFLAEV AASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNNSYA VIITSTSSYYVFYIYVGVAADTLAMGFFRG LPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQAPMSTL NTLKAGGILNRFSKDIAILDLLPLTIFDF IQLLLIVIGAIAVVAVLQPYIFVATVPVIV AFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTH LVTSLKGLWTLRAFGRQPYFETLFHKALNL HTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFFI TFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQ WAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMPTEGK PTKSTKPYKNGQLSKVMIENSHVKKDDIW PSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSI SPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTE GEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKV IFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGL RSVIEQFPKLDVFLVDGGCVLSHGKQLM CLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPVITYQII RRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQQL VIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPS DRVKLFPHRNSSCKSKPQIAALKEETEE VQDTRL

【表 26-2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
V5 エピトープドメイン	配列番号 216 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 216 の第 16-26 残基	GTGSEFDIAAA
CFTR	配列番号 216 の第 27-1506 残基	MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQ RLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYL GEVTKAVQPLLLGRIIASYPDNKEERSIA IYLGIGLCLLFIVRTLHLHPAIFGLHHIGM QMRIAMFSLIYKKTLLSSRVLDKISIGQL VSLLSNNLNKFDLGLALAHFVWIAPLQVAL LMGLIWELLQASAFGLGLIIVLALFQAGL GRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQ SVKAYCWEEAMEKMIENLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKG IILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT WYDSLGAINKIQDFLQKQEKLEYNLTTT EVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNRK TSNGDDSLFFSNFSLGTPVLKDNFKIER GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEG KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGV SYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIV LGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYL LDSPFGYLDVLTKEIFESCCKLMANKTR ILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGT SELQNLQPDFSSKLMGCDSDQFSAERRNS ILTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQKT GEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLO MNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILP RISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNOG QNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTLDIYSR RLSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESI PAVTTWNTYLRYITVHKSLIFVLIWCLVIF LAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRN NSYAVIITSTSSYYVFYIYGVADTLLAMG FFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSLVQAP MSTLNTLKAGGILNRFSKDIAILDLLPLT IFDFIQLLLVIGAIIVAVLQPYIFVATV PVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSP IFTHLVTSKGLWTLRAFGRQPYFETLFHK ALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIF FIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIM STLQWAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMP TEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIENSHVKK DDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILNI SFSISPGQVRVGLLGRGTSGSKSTLLSAFLRL LNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIP QKVFIISGTFRKNDPQEWSQDEIWKVAD EVGLRSVIEQFPGLDFVLVDGGCVLSHGH KQLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPVT YQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLEC QQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQA ISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEE TEEVQDTRL

V5 タグで標識した BAG - CFTR (野生型) タンパク質のアミノ酸配列を下の表に

10

20

30

40

50

示す。

表 2 7 - 1 ~ 表 2 7 - 2 . V 5 タグで標識した B A G ドメイン - C F T R タンパク質のアミノ酸配列

【 0 1 9 3 】

【表 27-1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
V5 タグで標識した BAG ドメイン-CFTR 融合タンパク質	配列番号 217	123456789012345678901234567890 MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFHPGVLKVEA ILEKVQGLEQAVDNFEGKKTDDKYLMIIEY LTKEALLALDSVDPEGRADVRQARRDGVRKV QTILEKLEQKAIDDIAAAMQRSPLEKASVV SKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPS VDSADNLSEKLEREWDRELASKKNPKLINA LRRCFWRFMFYGFILYLGEVTKAVQPLLL GRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFI VRTLLHHPAIFGLHHIGMQMRIAAMFSLIYK KTLKLSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFD EGLALAHFVWIAPLQVALIMGLIWELLQAS AFCGLGFLIVLALFQAGLGRMMMKYRDQRA GKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEWEAME KMENLRQTELKLTRKAAYVRYFNSSAFFF SGFFVFLSVLPYALIKGIILRKIFTTISF CIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQ DFLQKQEQYKTLEYNLTTEVVMENVTAFFE EGFGELFEKAKQNNNNRKTNSGDDSLFFSN FSLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGA GKTSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCS QFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIK ACQLEEDISKFAEKDNIVLGECCITLSCGGQ RARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLT EKEIFESCVCCKLMANKTRILVTSKMEHLKK ADKILILHEGSSYFYGTFSSELQNLQPDFSS KLMGCDSDQFSAERRNSILTETLHRFSLE GDAPVSWTETKKQSFQGTGEFGEKRKNSIL NPINSIRKFSIVQKTPLQMNIEEDSDEPL ERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQ ARRRQSVLNLMTHSVQGNHRKTTASTR KVSLAPQANLTELDIIYSRRLSQETGLEISE EINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLRY ITVHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLW LLGNTPLQDKGNSTHSRNNSYAVIITSTSS YYVFYIYVGADTLAMGFFRGLPLVHTLI TVSKILHHKMLHSLVQAPMSTLNLKAGGI LNRFSKDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVI GAIAVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAY FLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSLKGL WTLRAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLY LSTLRWFQMRIEMIFVIFFIATVFISILTT GEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWAVNSSID VDSLMRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPY KNGQLSKVMIENSHVKKDDIWPSGGQMTV KDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGL LGRTGSGKSTLLSAFLRLNTEGEIQIDGV SWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIISGTFRK NLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFP GKLDFVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLS KAKILLLDEPSAHLDPVTYQIIRRTLKQAF ADCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVR QYDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFPH RNSSKCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 217 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 217 の第 16-21 残基	GTGSEF

【表 27-2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
BAG ドメイン (BAG3 由来)	配列番号 217 の第 22-103 残基	HPGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGKKTDK KYLMIIEEYLTKEALLALDSVDPEGRADVRRQAR RDGVRKVQTILEKLEQKAID
リンカー	配列番号 217 の第 104-108 残基	DIAAA
CFTR	配列番号 217 の第 109-1588 残基	MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKGYRQ RLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR LASKKNPKLINALRRCFWRFMFYGIFLYL GEVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIA IYLGIGLCLLFIVRTLHLHPAIFGLHHIGM QMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISIGQL VSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVAL LMGLIWELLQASAFGLGLIVLALFQAGL GRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMENIQ SVKAYCWEEAMEKMIENLRQTELKLTRKAA YVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKG IILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT WYDSLGAINKIQDFLQKQEQYKLTLEYNLT EVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNMNRK TSNGDDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIER GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEG KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGV SYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIV LGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYL LDSPPFGYLDVLTKEKIFESCVCKLMANKTR ILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTF SELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNS ILTETLHRFSLEGDAPVSWTETTKQSFQQT GEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQ MNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILP RISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNOG QNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSR RLSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESI PAVTTWNTYLRYITVHKSLIFVLIWCLVIF LAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRN NSYAVIITSTSSYYVFYIYVGVAADTLLAMG FFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSLVQAP MSTLNTLKAGGILNRFKDIAILDDLLPLT IFDFIQLLLIVIGAI AVVAVLQPYIFVATV PVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSP IFTHLVTSKGLWTLRAFGROPYFETLPHK ALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIF FIAVTFISILTTEGEGRGVGIILTLAMNIM STLQWAVNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMP TEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKK DDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENI SFSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRL LNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIP QKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVAD EVGLRSVIEQFPFKLDFVLVDGGCVLSHGH KQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVT YQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLEC QQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQA ISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEE TEEEVQDTRL

10

20

30

40

融合物のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 2 8 - 1 ~ 表 2 8 - 2 . V 5 タグで標識したSV40 Jドメイン - C F T Rタンパク質のアミノ酸配列

【 0 1 9 5 】

【表 28-1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
V5 タグで標識した SV40 Jドメイン- CFTR 融合タンパク質	配列番号 218	123456789012345678901234567890 MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFMDKVLNREE SLQLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKKCK EFHPDKGGDEEKMKMNTLYKKMEDGVKYA HQPDFGGFWADIAAAMQRS PLEKASVVS LFFSWTRPILRKGYRQRLSDIYQIPSV SADNLSEKLEREWRELASKKNPKLINLR RCFFWRFMFYGIFLYLGEVTKAVQPLLLGR IIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVR TLLLHPAIFGLHHIGMQMRIAMFSLIYKKT LKLSSRVLDKISIGQLVSLSSNNLNKFDEG LALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAF CGLGFLIVLALFQAGLGRMMMKYRDQRAGK ISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEWEAMEKM IENLRQTELKLTRKAAYVRYFNSSAFFFSG FFVVFSLVLPYALIKGIILRKIFTTISFCI VLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDF LQKQEYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEG FGELFEKAKQNNNNRKTSGDDSLFFSNFS LLGTPVLKIDNFKIERGQLLAVAGSTGAGK TSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQF SWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKAC QLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLGGQRA RISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLT EIFESCVCCKLMANKTRILVTSKMEHLKKAD KILILHEGSSYFYGTSELQNLQPDFSSKL MGCDSDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGD APVSWTETKKQSFQKTGEFGEKRKNSILNP INSIRKFSIVQKTPLQMNIEEDSDEPLER RLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQAR RRQSVLNLMTSHSVNQGNIRKTTASTRKV SLAPQANLTELDIYSRRLSQETGLEISEEI NEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLRYIT VHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLLWLL GNTPLQDKGNSTHSRNNSYAVIITSTSSYY VFYIYVGVAADTLLAMGFFRGLPLVHTLITV SKILHHKMLHSLVQAPMSTLNTLKAGGILN RFSKDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVIGA IAVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFL QTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSLKGLWT LRAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLS TLRWFQMRIEMIFVIFFIAVTFISILTGE GEGRVGIILTAMNIMSTLQWAVNSSIDVD SLMRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKN GQLSKVMIIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKD LTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGLLG RTGSGKSTLLSAFLRLNTEGEIQIDGVSW DSITLQQRKAFGVIPQKVFI FSGTFRKNL DPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFP LDFVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKA KILLLDEPSAHLDPVTYQIIIRRTLKQAFAD CTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQY DSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFPHRN SSKCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 218 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 218 の第 16-21 残基	GTGSEF

【表 28-2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
V40 ドメイン	配列番号 218 の第 22-101 残基	MDKVLNREESLQLMDLLGLERSAWGNIPLMR KAYLKKCKEFHPDKGGDEEKMKKMNTLYKKM EDGVKYAHQPDFGGFWDA
リンカー	配列番号 218 の第 102-106 残基	DIAAA
CFTR	配列番号 218 の第 107-1586 残基	MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQ RLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDRE LASKKNPKLINALARCFWRFMFYGIFLYL GEVTKAVQPLLLGRIIASYPDNKEERSIA IYLGIGLCLLFIVRTLLLHPAIFGLHHIGM QMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISIGQL VSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVAL LMGLIWELLQASAFGLGLFIVLALFQAGL GRMMMKYRQDRAGKISERLVITSEMIENIQ SVKAYCWEEAMEKMIENLRQTELKLTRKAA YVRYFNSSAFFFSGGFVVFLSVLPYALIKG IILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT WYDSLGAINKIQDFLQKQEKLEYNLTTT EVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRK TSNGDDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIER GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEG KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGV SYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIV LGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYL LDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCKLMANKTR ILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTF SELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNS ILTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQQT GEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQ MNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILP RISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNOG QNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSR RLSQETGLEISEEINEEDLKECFFDDMESI PAVTTWNTYLRITVHKSLIFVLIWCLVIF LAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRN NSYAVIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMG FFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQAP MSTLNTLKAGGILNRFKDIAILDDLPLT IFDFIQLLLIVIGAIAVVAVLQPYIFVATV PVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSP IFTHLVTSKGLWTLRAFGROPYFETLFHK ALNLHTANWFLYLSLTLRWFQMRIEMIFVIF FIAVTFISILTTEGEGRSGIILTLAMNIM STLQWAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMP TEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKK DDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENI SFSISPGQRVGLLGRGTSGKSTLLSAFLRL LNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIP QKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVAD EVGLRSVIEQFPGLDFVLVDGGCVLSHG KQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVT YQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLEC QQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQA ISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEE TEEEVQDTRL

V5 タグで標識した CFTR (Δ508F) タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す

10

20

30

40

50

。
表 2 9 - 1 ~ 表 2 9 - 2 . V 5 タグで標識した C F T R (Δ 5 0 8 F) タンパク質のアミノ酸配列
【 0 1 9 7 】

【表 29-1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した CFTR (Δ508F) タンパ ク質	配列番号 219	MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFDIAAAMQRS PLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLLEL SDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDRELASK KNPKLINALARRCFFWRFMFYGIFLYLGEVT KAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLG IGLCLLFIVRTLHLHPAIFGLHHIGMQMRI AMFSLIYKKTLLKSSRVLDKISIGQLVSL SNNLNKFDGLALAHFVWIAPLQVALLMGL IWELLQASAFGLGLFIVLALFQAGLGRMM MKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKA YCWEEMAEKMIENLRQTELKLRKAAYVRY FNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILR KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQWYDS LGAINKIQDFLQKQEQYKTLBYNLTTEVVM ENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRKTSG DDSLFFSNFSLGLTPVLKDINFKIERGQLL AVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGKIKH SGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIGVSYDEY RYRSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGEGG ITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPF GYLDVLTEKEIFESCVCKLMANKTRILVTS KMEHLKKADKILILHEGSSYPYGTFSSELQN LQPDFSSKLMGCDSDQFSAERRNSILTET LHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQGTGEFGE KRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQMNIE EDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVI STGPTLQARRRQSVLNLMTSHVNQGGNIHR KTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSRRLSQE TGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTT WNTYLRYYTVHKSILFVLIWCLVIFLAEVA ASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNNSYAV IITSTSSYYVPYIYVGVADTLAMGFFRGL PLVHTLITVSKILHHKMLHSLVQAPMSTLN TLKAGGILNRFSDIAILDLLPLTIFDFI QLLLIVIGAIAVVAVLQPYIFVATVPVIVA FIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHL VTSKGLWTLRAFGRQPYFETLFHKALNLH TANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFFIIVT FISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQW AVNSSIDVDLSMRSVSRVFKFIDMPTEGKP TKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKKDDIWP SGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSIS PGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRLNTEG EIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVFI FSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLR SVIEQFPGLDFVLVDGGCVLSHGKQLMC LARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVTYQIIR RTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECCQFLV IEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPSD RVKLFPHRNSKCKSKPQIAALKEETEEV QDTRL
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 219 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 219 の第 16-26 残基	GTGSEFDIAAA

【表 29-2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列		
		1234567890	1234567890	1234567890
CFTR (Δ508F)	配列番号 219 の第 27-1505 残基	MQRSPLEKASVVS	KLFFSWTRPILRKGYRQ	
		RLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR	LASKKNPKLINALRRCCFFWRFMFYGIFLYL	
		GEVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIA	IYLGIGLCLLFIVRTLHHPAIFGLHHIGM	10
		QMRIAMFSLIYKTKLSSRVLDKISIGQL	VSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVAL	
		LMGLIWELLQASAF	CGLGFLIVLALFQAGL	
		GRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQ	SVKAYCWEEAMEKMIENLRQTELKLTRKAA	
		YVRYFNSSAFFFS	GFFVFLSVLPYALIKG	
		IILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT	WYDSLGAINKIQDFLQKQEYKLEYNLTTT	
		EVVMENVTAFWEEG	FGELFEKAKQNNNNRK	
		TSNGDDSLFFSNFSL	LGTPLVDINFKIER	
		GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEG	KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIGVS	
		YDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVL	GEGGITLGGQRARISLARAVYKDADLYLL	20
		DSPFGYLDVLT	KEIFESCCKLMANKTRI	
		LVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFS	ELQNLQPDFSSKLMGCDSDQFSAERRNSI	
		LTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQKQ	TEGFEKRNKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQM	
		NGIEEDSDEPLERRRLSLVPDSEQGEAILPR	ISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNOGQ	
		NIHRKTTASTRKVSLAPQANLT	ELDIYSRR	
		LSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIP	AVTTWNTYLRITVHKSLIFVLIWCLVIFL	
		AEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNN	SYAVIITSTSSYYVFYIYVGVA	30
		TLLAMGF	FRGLPLVHTLITVSKILHHKMLH	
		SVLQAPM	STLNTLKAGGILNRF	
		SKDIAILDLLPLTI	FDFIQLLLIVIGAI	
		AVVAVLQPYIFVATVP	VIVAFIMLRAYFLQTS	
		SQQLKQLESEGRSPI	FTHLVTSKGLWTLRA	
		FGRPYFETLFHKA	LNLHTANWFLYLSTLRWFQ	
		MRIEMIFVIF	IAVTFISILTTGEGEGRVGI	
		ILTLAMNIMS	TLQWAVNSSIDVDSL	
		MRSVSRVFKFIDMPT	EGKPTKSTKPYKNGQLSKVM	
		IENSHVKKD	DIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGG	
		NAILNIS	FSISPGQVRVGLLGR	
		TGSGKSTLLSAFLRL	LLNTEGEIQIDGVSWDSITLQ	
		QWRKAFGVIPQ	KVFIFSGTFRKNLDPYEQ	
		WSDQEIWKVADE	VGLRSVIEQFP	40
		KGKLDVLDGGCVLSHG	HKQLMCLARSVLSKAKIL	
		LLDEPSAHLDPVTY	QIIRRTLKQAFADCTVIL	
		CEHRIEAMLECQ	QFLVIEENKVRQYDSIQ	
		KLLNERSLFRQAI	SPSDRVKLFPHRNSSKCKSKP	
		QIAALKEET	EEEVQDTRL	

V5タグで標識したBAGドメイン-CFTR(Δ508F)融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表30-1～表30-2. V5タグで標識したBAGドメイン-CFTR(Δ508F)融合タンパク質のアミノ酸配列

【0199】

【表30-1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した BAG ドメイン- CFTR (Δ508F) 融合タ ンパク質	配列番号 220	MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFHPGVLKVEA ILEKVQGLEQAVDNFEGKKTDDKKYLMIEEY LTKELLALDSVDPEGRADVQARRDGVRRKV QTILEKLEQKAIDDDIAAAMQSRSPLEKASVV SKLFFSWTRPILRKGYRQRLLELSDIYQIPS VDSADNLSEKLEREWDRLEASKKNPKLINA LRRCCFFWRFMFYGIFLYLGEVTKAVQPLLL GRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFI VRTLLHHPAIFGLHHIGMQMRIAMFSLIYK KTLKLSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFD EGLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQAS AFCGLGFLIVLALFQAGLGRMMMKYRDQRA GKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEAME KMIENLRQTELKLTRKAAYVRYFNSSAFFF SGFFVVFVLSVLPYALIKGIILRKIFTTISF CIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQ DFLQKQEKYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFFE EGFGELEFEKAKQNNNNRKTSSNGDDSLFFSN FSLLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGA GKTSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCS QFSWIMPGTIKENIIGVSYDEYRYSVIKA CQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSSGGQR ARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTE KEIFESCVCCKLMANKTRILVTSKMEHLKKA DKILILHEGSSYFYGTTFSELQNLQPDFSSK LMGCDSDQFSAERRNSILTETLHRFSLEG DAPVSWTETKKQSFQKTGEFGEKRNKNSILN PINSIRKFSIVQKTPLQMNGIEEDSDEPLE RRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQA RRRQSVLNLMTHSVNOGQNIHRKTTASTRK VSLAPQANLTELDIIYSRRLSQETGLEISEE INEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLYRI TVHKSILIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWL LGNTPLQDKGNSTHSRNNSYAVIITSTSSY YVFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLIT VSKILHHKMLHSLVLAQPMSTLNTLKAGGIL NRFSKDIAILDLLPLTIFDFIQLLLLIVIG AIAVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYF LQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSKGLW TLRAFGROPYFETLFHKALNLHTANWFLYL STLRWFQMRIEMIFVIFFIAVTFISILTTG EGEGRVGIILTLAMNIMSTLQAVNSSIDV DSLMRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYK NGQLSKVMIIENSHVKKDDIWPSSGGQMTVK DLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGLL GRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVS WDSITLQQRKAFGVIPQKVFIKSGTFRKN LDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPF KLDFVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSK AKILLLEPSAHLDPVYQIIRRTLKQAF DCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQ YDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFPHR NSSKCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 220 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST

10

20

30

40

50

【0200】

【表30-2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
BAG ドメイン (BAG3 由来)	配列番号 220 の第 22-103 残基	HPGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGKKTDK KYLMIIEEYLTKEALLDSVDPEGRADVQRAR RDGVRKVQQTILEKLEQKAID
リンカー	残基 104-108 of 配列番号 220	DIAAA
CFTR (Δ508F)	配列番号 220 の第 109-1587 残基	MQRSPLEKASVVSCLFFSWTRPILRKGYRQ RLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYL GEVTKAVQPLLLGRIIASYPDNKEERSIA IYLGIGLCLLFIVRTLHLHPAIFGLHHIGM QMRIAMFSLIYKKTLLSSRVLDKISIGQL VSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVAL LMGLIWELLQASAFCLGLFIVLALFQAGL GRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQ SVKAYCWEEMAEKMIENLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKG IILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT WYDSLGAINKIQDFLQKQEKTYLNTTTT EVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRK TSNGDDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIER GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEG KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIGVS YDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVL GEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLL DSPFGYLDVLTKEIFESCCKLMANKTRI LVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFS ELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSI LTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQQTG EFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLOM NGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPR ISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNGGQ NIHRKTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSRR LSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIP AVTTWNTYLRITVHKSLIFVLIWCLVIFL AEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNN SYAVIITSTSSYYVFYIYVGVDTLAMGF FRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSLVQAPM STLNTLKAGGILNRFKDIAILDDLPLTI FDFIQLLLIVIGAIAVVAVLQPYIFVATVP VIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPI FTHLVTSKGLWTLRAFGRPYFETLFHKA LNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIF IAVTFISILTTEGEGRVIILTLAMNIMS TLQWAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMPT EGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKKD DIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILNIS FSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRL NTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQ KVFI FSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADE VGLRSVIEQFPGLDFVLVDGGCVLSHGK QLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPVTY QIIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQ QFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAI SPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEET EEEVQDTRL

10

20

30

40

50

V5 タグで標識した J ドメイン - C F T R (Δ 5 0 8 F) 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 3 1 - 1 ~ 表 3 1 - 2 . V 5 タグで標識した SV40 J ドメイン - C F T R (Δ 5 0 8 F) 融合タンパク質のアミノ酸配列

【 0 2 0 1 】

【表 3 1 - 1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
V5 タグで標識した SV40 J ドメイン- CFTR (Δ508F) 融合タンパク質融合タ ンパク質	配列番号 221	123456789012345678901234567890 MGKPIPNPLLGLDSTGTGSEFMDKVLNREE SLQLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKKCK EFHPDKGGDEEKMKMNTLYKKMEDGVKYA HQPDPFGGFWDADIAAAMQRSPLEKASVVS LFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSV SADNLSEKLEREWDRELASKKNPKLINLR RCFFWRFRMFYGFILYLG EVT KAVQPLLGR IIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVR TLLHHPAIFGLHHIGMQMRIAMFSLIYKKT LKLSSRVLDKISIGQLVSLSSNNLNKFDEG LALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAF CGLGFLIVLALFQAGLGRMMMKYRDQRAGK ISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEWEAMEKM IENLRQTELKLTRKAAYVRYFNSSAFFFSG FFVVFLSVLPYALIKGIILRKIFTTISFCI VLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDF LQKQEQYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEG FGELFEKAKQNNNNRKTSSNGDDSLFFSNFS LLGTPVLKDI NF KIERGQLLAVAGSTGAGK TSLLMVMIGELEPSEGKIKHSGRISFCSQF SWIMPGTIKENIIGVSYDEYRYSVIKACQ LEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLGGQRRAR ISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTKEKE IFESCVCCKLMANKTRILVTSKMEHLKKADK ILILHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLM GCDSFDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDA PVSWTETKKQSFQTGEFGEKRKNSILNPI NSIRKFSIVQKTPLQMGIEEDSDEPLERR LSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARR RQSVLNLMTHSVNGQNIHRKTTASTRKVS LAPQANLTLDIYSRRLSQETGLEISEEIN EEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLRYYTV HKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLG NTPLODKGNSTHSRNNSYAVIITSTSSYYV FYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVS KILHHKMLHSLVQAPMSTLNTLKAGGIILNR FSKDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVIGAI AVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQ TSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSKGLWTL RAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLST LRWFQMRIEMIFVIFFIAVTFISILTTGEG EGRVGIIITLAMNIMSTLQWAVNSSIDVDS LMRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNG QLSKVMIIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDL TAKYTEGGNAILNENISFSISPGQRVGLLGR TGSGKSTLLSAFLRLNTEGEIQIDGVSWD SITLQQWRKAFGVIPQKVFI FSGTFRKNLD PYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGKL DFVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAK ILLLDEPSAHLDPVTYQII RRTLKQAFADC TVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQYD SIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFPHRNS SKCKSKFQIAALKEETEEVQDTRL
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 221 の第 1-15 残基	MGKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 221 の第 16-21 残基	GTGSEF

【表 3 1 - 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
SV40 J ドメイン	配列番号 221 の第 22-101 残基	MDKVLNREESLQLMDLLGLERSAWGNIPLMR KAYLKKCKEFHPDKGGDEEKMKKMNTLYKKM EDGVKYAHQPDFGGFWDA
リンカー	配列番号 221 の第 102-106 残基	DIAAA
CFTR (Δ508F)	配列番号 221 の第 107-1585 残基	MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKGYRQ RLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDRE LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYL GEVTKAVQPLLLGR IIASYPDNKEERSIA IYLGIGLC LLFIVRTL LHPAIFGLHHIGM QMRIAMFSLIYKTKLSSRVLDKISIGQL VSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVAL LMGLIWELLQASAF CGLGFLIVLALFQAGL GRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQ SVKAYCWEEAMEKMIENLRQTELKLTRKAA YVRYFNSSAFFFS GFFVFLSVLPYALIKG IILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT WYDSLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTT EVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRK TSNGDDSLFFSNFSL LGTPVLKDINFKIER GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEG KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIGVS YDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVL GEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLL DSPFGYLDVLT EKEIFESCVC KLMANKTRI LVT SKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFS ELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERNRSI LTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQQTG EFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQM NGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPR ISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNGGQ NIHRKTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSRR LSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIP AVTTWNTYLR YITVHKSLIFVLIWCLVIFL AEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNN SYAVIITSTSSYYVFYIYGVADTLLAMGF FRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQAPM STLNTLKAGGILNRFSKDIAILD DDLPLTI FDFIQLLLIVIGAI AVVAVLQPYIFVATVP VIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPI FTHLVTS LKGLWTLRAFGRPYFETLFHKA LNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFF IAVTFISILT TGEGEGRVGIILTLAMNIMS TLQWAVNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPT EGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKKD DIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENIS FSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRL NTEGEIQIDGVS WDSITLQQWRKAFGVIPQ KVFI FSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADE VGLRSVIEQFPGLDFVLVDGGCVLSHGK QLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVTY QIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQ QFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAI SPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEET EEEVQDTRL

10

20

30

40

胞に形質移入した。形質移入細胞を2日間培養した培養液から得た細胞可溶化物のサンプルを、抗V5抗体を用いた免疫ブロッティングによって分析した。図8Bに示すように、野生型CFTRタンパク質も変異型CFTR ($\Delta 508F$) タンパク質も形質移入細胞内で十分に発現されなかった。いずれかのタンパク質とBAG3ドメインとの融合物 (BAG-CFTR WT、BAG-CFTR $\Delta 508F$) は、発現をいくらか増強した。対照的に、Jドメインとの融合物 (J-CFTR WT、J-CFTR $\Delta 508F$) は、野生型および変異型タンパク質の両方の発現レベルを有意に増強した。図8Bを参照のこと。

【0203】

結果から得た結論

上記の実験の結果は、Jドメインと融合することによって治療に有用なタンパク質などの目的のタンパク質の発現レベルが有意に増強されることを明確に示している。

10

【0204】

実施例3. 非改変配列を用いた目的の標的タンパク質の発現を増強するための組成物および方法

特定のタンパク質 (標的タンパク質) の発現を増強するための融合タンパク質を発現させるための発現ベクタープラスミドを構築した。以下に記載するように、融合タンパク質は通常、対応する抗タグ抗体および標準の免疫プロット (ドットプロット、ウェスタンブロットなど) 分析を用いて容易に認識または単離するため、標準のエピトープタグと連結させた。

【0205】

20

異種性DNA分子をクローニングするための多様な制限酵素部位を含むヌクレオチド配列を有するDNAリンカー分子を、以下の配列を有する2種類の一本鎖DNA分子をアニーリングすることによって作製した (配列は5'末端から3'末端方向に記載する) :
AGCTTGGGTACCGGATCCGAATTTCGATATCGCGGCCCGCTCTCGAGTCTAGAGGGCC (配列番号187) ; および
CTCTAGACTCGAGAGCGGCCCGCGATATCGAATTTCGGATCCGGTACCA (配列番号188) 。

【0206】

次いで、アニーリングしたリンカー分子を、HindIIIおよびApaIで消化したプラスミドpcDNA3 (カタログ番号V790-20、Invitrogen) のCMVプロモーターの下流に挿入し、哺乳類宿主細胞に使用するための発現ベクタープラスミドpcDNA'を得た。

30

【0207】

V5エピトープタグ (GKPIPNPLLGLDST (配列番号110)) またはFlagエピトープタグ (DYKDDDDK (配列番号111)) をコードするDNA分子を合成し、HindIIIおよびKpnIで消化したプラスミドpcDNA'に挿入した。V5エピトープタグのN末端にメチオニンを付加した配列に対するコード配列、すなわち :

ATGGGTAAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG (配列番号189) を有する二本鎖DNA分子を、XhoIおよびXbaIで消化したpcDNA'に挿入し、プラスミドV5-pcDNA'を得た。

40

【0208】

Flagエピトープタグに対するコード配列、すなわち :

GATTACAAGGATGACGATGACAAG (配列番号190) を有するDNA分子を、XhoIおよびXbaIで消化したプラスミドpcDNA'に挿入し、プラスミドFlag-pcDNA'を得た。

【0209】

IL13R α 2受容体タンパク質を発現させるため、IL13R α 2受容体タンパク質をコードするDNA分子を、HindIIIおよびKpnIで消化したプラスミドV5-pcDNA'に挿入した。

50

【0210】

TNR1受容体タンパク質を発現させるため、TNR1受容体タンパク質をコードするDNA分子を、HindIIIおよびKpnIで消化したプラスミドV5-pcDNA'に挿入した。

【0211】

α1アンチトリプシン(「α1AT」)を発現させるため、α1アンチトリプシンをコードするDNA分子を、HindIIIおよびKpnIで消化したプラスミドV5-pcDNA'に挿入した。

【0212】

ヒトIgG1分子のFc領域ポリペプチドをコードするDNA分子を合成し、XbaIおよびApaIで消化したV5-pcDNA'に挿入した。

10

【0213】

特に指定しない限り、特定のタンパク質発現増強ポリペプチドをコードするDNA分子を、EcoRIおよびEcoRVで消化したプラスミドFlag-pcDNA'にクローニングし、Erdj3 Jタンパク質のJドメインをコードするDNAセグメントを挿入した。また、同じDNA分子をKpnIおよびBamHIで消化したプラスミドFlag-pcDNA'にクローニングし、Erdj5 Jタンパク質のJドメインをコードするDNAセグメントを挿入してプラスミド(Jドメイン)-Flag-pcDNA'を得た。ここで、「(Jドメイン)」とは、以下の実施例に明記するタンパク質発現増強ポリペプチドを指す。

20

【0214】

特に指定しない限り、以下の実施例にある標的タンパク質に対応する標的結合ドメインをコードする各DNA分子を、NotIおよびXhoIで消化したプラスミドFlag-pcDNA'に挿入した。

【0215】

HEK293細胞での標的タンパク質の発現と検出

多様なタンパク質構築物をコードする発現ベクタープラスミドを、X-tremeGENE HP形質移入試薬(カタログ番号06365752001、Roche)を用いてHEK293細胞に形質移入した。以下の実施例に示すように、形質移入の効率を確認するため、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する別のプラスミドを、本発明の融合タンパク質をコードする各発現ベクタープラスミドと共に形質移入した。形質移入細胞の培養液を2日間インキュベートし、細胞を2mMのPMSEFを含有する溶解緩衝液(10mM Tris-HCl、pH8.0、150mM NaCl、10mM EDTA、2%SDS)に溶解した。超音波処理を短時間行った後、サンプルの発現タンパク質について、ドットブロット分析またはウェスタン免疫ブロット分析を用いて分析した。ウェスタンブロット分析のため、サンプルをSDS-サンプルの緩衝液中で煮沸し、ポリアクリルアミド電気泳動に供し、続いて、分離されたタンパク質バンドを膜(PVDF膜)に転写した。形質移入の内部管理としてのGFPの発現を、抗GFP抗体を用いて検出した。

30

【0216】

ドットブロットおよびウェスタンブロットで得られた発現タンパク質を化学発光シグナルで検出した。ブロットの吸着物を、タンパク質が担持していた特定のエピトープタグ(たとえばV5タグまたはFlagタグ)に結合する一次抗体と短時間反応させた。未反応の一次抗体を洗浄で除去した後、酵素と連結した二次抗体(たとえばセイヨウワサビペルオキシダーゼと連結した抗IgG抗体)を、吸着物と結合した一次抗体分子と反応させた。洗浄後、製造業者の化学発光試薬を添加した。ブロットで得られた化学発光シグナルをX線画像に記録した。記載のある場合は、化学発光シグナルの画像を濃度計で走査し、NIH ImageJ画像処理プログラムを用いて分析した。

40

【0217】

ヒト化抗IL8抗体を発現する細胞(CHO DP-12クローン、クローン番号1933;カタログ番号CRL-12444)とプラスミドp6G425V11N35A.chosD

50

(カタログ番号 209552) は American Type Culture Collection (バージニア州、マナナス) から購入した。

【0218】

実施例 4. 非改変配列を用いた場合の分泌される IL13R α 2TF タンパク質の発現増強

IL13 受容体である IL13R α 2 は、インターロイキン 13 (IL13) に結合してアレルギー性炎症を媒介する膜タンパク質である。IL13R α 2 受容体タンパク質はタンパク質折り畳みが難しいため、哺乳動物細胞では不安定なタンパク質であることが知られている (Genetic Engineering & Biotechnology News, 28(5)(2008))。発現された IL13R α 2 タンパク質の一部は細胞表面で消化されて細胞外空間に排出される。この切断型 IL13R α 2 (「IL13R α 2TF」ともいう) になっても IL13 結合能は有しているが、全長 IL13R α 2 タンパク質の膜貫通領域および細胞質領域がないため、細胞にシグナルを伝達することはできない。このため、切断型 IL13R α 2 は、炎症反応を誘発するシグナルを細胞に伝達することなく IL13 分子を結合することによって喘息を治療するための一種の囹受容体として使用されてきた (Zhang, et al., J. Biol. Chem., 272(14): 9474-80 (1997))。遺伝子改変した切断型 IL13R α 2 が細菌で発現されたが、そのタンパク質は凝集して封入体となり、そこからタンパク質が精製された (Tang et al., Molec. Immunol. 39:719-727(2003))。しかし、形質移入細胞による IL13R α 2TF タンパク質の発現に対する制限の 1 つは、適切な機能性立体構造への折り畳みの効率の悪さが原因だと考えられてきたことがわかっている。タンパク質は、適切な立体構造に折り畳みできない場合、アミノ酸の分解と除去のためにプロテアソームへ誘導される。したがって、形質移入細胞内で IL13R α 2TF 分子を産生するには、タンパク質の発現と分泌という制限が伴うことが認識されている (Lee et al., Cell Technol. for Cell Products, 29-39 (2007))。

【0219】

この実験では、目的の標的タンパク質を本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドと融合することによって改変した実施例 1～3 に記載の「改変」配列に代わる配列を用いて、IL13R α 2TF タンパク質のレベルと分泌の増強を試験した。「非改変」配列では、目的の標的タンパク質は本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドと融合されていないという点で「改変されていない」。その代わりに、標的タンパク質は、タンパク質発現増強ポリペプチドを標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質と共発現される。図 9A は、目的の標的タンパク質の発現を増強するためのこの非改変配列の概略図を示す。このスキームによれば、目的の標的タンパク質に融合タンパク質の標的タンパク質結合ドメインが結合する。融合タンパク質はタンパク質発現増強ポリペプチドドメインも含む。標的タンパク質が融合タンパク質に結合することによって標的タンパク質がタンパク質発現増強ポリペプチドドメインに近づくため、目的の標的タンパク質の発現が増強されると推定される。

【0220】

図 9B は、IL13R α 2TF タンパク質をコードする cDNA の 3' 末端に V5 エピトープタグをコードする核酸を付加した核酸構築物の図を示す。図 9C は本発明の融合タンパク質を発現させるための核酸構築物の図を示す。この実験では、本発明の融合タンパク質は、タンパク質発現増強ポリペプチドとしての Erdj3 J タンパク質の J ドメインを標的結合ドメインとしての IL13 タンパク質と連結させた融合タンパク質とした。

【0221】

V5 タグで標識した IL13R α 2TF タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。
表 32. V5 タグで標識した IL13R α 2TF タンパク質のアミノ酸配列

【0222】

【表 3 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した IL13R α 2TF タンパ ク質	配列番号 222	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLH YKDGFDLNGGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKGTGSEFDIAAALEGKPIPNPL LGLDSTSRGPYSIVSPKC
IL13R α 2TF	配列番号 222 の第 1-339 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLH YKDGFDLNGGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPTKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKK
リンカー	配列番号 222 の第 340-352 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 222 の第 353-366 残基	GKPIPNPLLGLDST
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 222 の第 367-378 残基	SRGPYSIVSPKC

下の表に示すように、この実験に使用した I L 1 3 タンパク質のアミノ酸配列には F l a g エピトープタグとシグナル配列が含まれ、さらにタンパク質の発現に用いた発現ベクターに由来する 1 3 個のアミノ酸残基が C 末端側に付加された配列であった。

表 3 3. F l a g タグで標識した I L 1 3 タンパク質のアミノ酸配列

【 0 2 2 3 】

【表 3 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した IL13 タンパク質	配列番号 223	MGVKVLFALICIAVAEAGTGSEFDIAAALT CLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQN QKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLIN VSGCSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFSSL HVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGQFN LEGDYKDDDDKGSRGYPYSIVSPKC
シグナル配列	配列番号 223 の第 1-17 残基	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー	配列番号 223 の第 18-28 残基	GTGSEFDIAAA
IL13	配列番号 223 の第 29-150 残基	LTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNIT QNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES INVSGCSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFS SLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGQ FN
リンカー	配列番号 223 の第 151-153 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 223 の第 154-161 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 223 の第 162-174 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、Jドメイン-IL13融合タンパク質のアミノ酸配列にはFlag エピトープタグが含まれていた。

表 3 4. Flag タグで標識したErdj3 Jドメイン - IL13 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0 2 2 4】

30

【表 3 4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した J ドメイン-IL13 融 合タンパク質	配列番号 224	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAALTCLGGFASPGVPVPPSTALR ELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTA GMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMISGFC PHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLL HLKKLFREGQFNLEGDYKDDDDKSGRGPYS IVSPKC
Erdj3 J ドメイン	配列番号 224 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 224 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGGAAA
IL13	配列番号 224 の第 101-222 残基	LTCLGGFASPGVPVPPSTALRELIEELVNIT QNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKTQRMISGFCPHKVSAGQFS SLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGQ FN
リンカー	配列番号 224 の第 223-225 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 224 の第 226-233 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 224 の第 234-246 残基	SGRGPYSIVSPKC

HEK293細胞を、V5タグで標識されたIL13R α 2TFを発現させるための発
現ベクターとJドメイン-IL13融合タンパク質を発現させるための発現ベクターとを
用いて同時形質移入した。形質移入細胞を2日間培養し、細胞可溶化物および細胞培地の
サンプルを回収し、V5タグで標識したIL13R α 2TFの分泌を検出するために抗V
5抗体を用いたウェスタンブロット（免疫ブロット）分析によって分析した。図10に示
すように、IL13R α 2TFタンパク質を単独で発現させるための発現ベクターで形質
移入した細胞は、細胞内では少量のタンパク質を発現した（中央図、左から2番目のレー
ン）が、培地ではIL13R α 2TFタンパク質が見られた場合でもほとんど検出されな
かった（上図、左から2番目のレーン）。IL13R α 2TFタンパク質とそのIL13
タンパク質リガンドとを共発現させた結果、形質移入細胞内（中央図、左から3番目のレー
ン）および培地内（上図、左から3番目のレーン）では検出可能なレベルのIL13R
 α 2TFタンパク質が発現された。この結果は、IL13R α 2TFとそのIL13リガ
ンドとを共発現させることによってIL13R α 2TFの分泌が改善されるという先の報
告とも一致する（Lee et al., Cell Technol. for Cell Products, 29-39（2007））。
しかし、IL13R α 2TFを本発明のJドメイン-IL13融合タンパク質と共発現さ
せたところ、細胞内でのIL13R α 2TFの発現レベルがさらに増強され（中央図、左
から4番目のレーン）、分泌されたIL13R α 2TFタンパク質の発現レベルは、IL
13R α 2TFを単独で発現させた場合（上図、左から2番目のレーン）またはIL13
R α 2TFとIL13リガンドとを共発現させた場合（上図、左から3番目のレーン）と
比較して著しく増加した（上図、左から4番目のレーン）。結果は、本発明のJドメイン
-IL13融合タンパク質と共発現させることによってIL13R α 2TFタンパク質の
安定性も分泌も改善されたことを示している。

【0225】

実施例5. 非改変配列を用いた場合に見られる分泌される I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質の発現増強

先に述べたとおり、切断型 I L 1 3 R α 2 (I L 1 3 R α 2 T F) は I L 1 3 R α 2 受容体タンパク質のうち I L 1 3 リガンドに結合する機能性ドメインを含む細胞外ドメインを含む。しかし、I L 1 3 R α 2 T F の生成もタンパク質の発現および分泌が難しいため非効率的である。治療的に重要なタンパク質、特に受容体タンパク質のより安定な形態を生成するために採用されてきた戦略の1つは、目的のタンパク質の機能性部分の全部または一部を免疫グロブリンの F c ドメインの定常ドメインと連結させた融合タンパク質を製することである。このような F c 融合タンパク質形態は、治療に重要な所望の活性が得られ、F c ドメインによって生体内での血清半減期が長くなり投薬頻度も減るような、役立つ可能性のある薬物群を設計するために用いられてきた。このような F c 融合タンパク質では、「目的のタンパク質」ドメイン（たとえば受容体タンパク質の細胞外のリガンド結合ドメイン）は所望の機能的特性（たとえばリガンド結合性）を保持する。

10

【0226】

この実験では、F c 融合タンパク質を本発明の非改変配列の融合タンパク質と共発現した場合にみられる F c 融合タンパク質（標的タンパク質）発現レベルに対する効果について調べた。I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質を F c 融合タンパク質薬物の代表例として用いた。I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質はさらに、抗 V 5 エピトープ抗体を用いて容易に認識できるように I L 1 3 R α 2 T F （「目的のタンパク質」）ドメインと F c ドメインとの間に V 5 エピトープタグを有するタンパク質とした。図 1 1 A の I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質を発現させるための DNA 構築物の図を参照のこと。この実験について、本発明の融合タンパク質の例は、タンパク質発現増強ポリペプチドドメインとしての J タンパク質の J ドメインを免疫グロブリンの F c ドメインに結合する標的結合ドメインとしてのタンパク質 A と連結させたタンパク質である。図 1 1 B を参照のこと。

20

【0227】

この実験に使用した、V 5 タグで標識した I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 3 5. V 5 タグで標識した I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質のアミノ酸配列

30

【0228】

【表 3 5】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した IL13R α 2TF-Fc 融合 タンパク質	配列番号 225	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIICRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWISPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKKGTGSEFDIAAALEGKPIPNPL LGLDSTSRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IL13R α 2TF	配列番号 225 の第 1-339 残基	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDIKADGQNIICRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWISPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQC WEGEDLSKK
リンカー	配列番号 225 の第 340-352 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 225 の第 353-366 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 225 の第 367-368 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 225 の第 369-599 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

この実験の一側面では、タンパク質A分子と共発現させた場合のIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルについて試験した。標準の抗Flag抗体を用いて容易に認識できるように、タンパク質A分子をFlagエピトープタグで標識した。Flagタグで標識したタンパク質Aのアミノ酸配列を下の表に示す。

表 3 6. Flagタグで標識したタンパク質Aのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【0229】

【表36】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識したタンパク質A	配列番号 226	MGVKVLFALICIAVAEAGTGSEFDIAAAD NKFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQ SLKDDPSQSANVLGEAKKLND SQAPKLEGD YKDDDDKGSRGYPYSIVSPKC
シグナル配列	配列番号 226 の第 1-17 残基	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー	配列番号 226 の第 18-28 残基	GTGSEFDIAAA
タンパク質 A	配列番号 226 の第 29-86 残基	ADNKFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGF IQSLKDDPSQSANVLGEAKKLND SQAPK
リンカー	配列番号 226 の第 87-89 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 226 の第 90-97 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 226 の第 98-110 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質の発現を増強するための融合タンパク質の一例では、E r d j 3 タンパク質のJドメインをタンパク質Aと連結させ、タンパク質AドメインのC末端にF l a g エピトープタグを連結させた。図11BのDNA構築物の図を参照のこと。Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表37. F l a g タグで標識したErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質のアミノ酸配列

【0230】

【表 3 7】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-タンパク質 A 融合タンパク質	配列番号 227	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAADNKFNKEQQNAFYEILNMP NLNEEQRNQFIQSLKDDPSQSANVLGEAKK LND SQAPKLEGDYKDDDDKSGRGPYSIVSP KC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 227 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 227 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGSGGAAA
タンパク質 A	配列番号 227 の第 101-158 残基	ADNKFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNQFI QSLKDDPSQSANVLGEAKKLND SQAPK
リンカー	配列番号 227 の第 159-161 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 227 の第 162-169 残基	DYKDDDDK
ベクター由来の C 末 端残基	配列番号 227 の第 170-182 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質の発現を増強するための融合タンパク質の別の例では、E r d j 5 タンパク質の J ドメインをタンパク質 A と連結させ、タンパク質 A ドメインの C 末端に F l a g エピトープタグを連結させた。図 1 1 B の D N A 構築物の図を参照のこと。F l a g タグで標識した Erdj5 J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 3 8 . F l a g タグで標識した Erdj5 J ドメイン - タンパク質 A 融合タンパク質のアミノ酸配列

30

【 0 2 3 1 】

【表 3 8】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj5 Jドメイン-タンパク質 A 融合タンパク質	配列番号 228	MGVWLNKDDYIRD LKRIILCFLIVYMAILV GTDQDFYSL LGVSKTASSREIRQAFKKLAL KLHPDKNPNPNNAHGDFL KINRAYEVLKDE DGSEFDIGGGSGGSGGSGGAAAADNKFNKE QQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDP SQSANVLGEAKKLND SQAPKLEGDYKDDDD KSGRGPYSIVSPKC
Jドメイン (Erdj5 由来)	配列番号 228 の第 1-91 残基	MGVWLNKDDYIRD LKRIILCFLIVYMAILV GTDQDFYSL LGVSKTASSREIRQAFKKLAL KLHPDKNPNPNNAHGDFL KINRAYEVLKDE D
リンカー	配列番号 228 の第 92-112 残基	GSEFDIGGGSGGSGGSGGAAA
タンパク質 A	配列番号 228 の第 113-170 残基	ADNKFNKEQQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGF IQSLKDDPSQSANVLGEAKKLND SQAPK
リンカー	配列番号 228 の第 171-173 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 228 の第 174-181 残基	DYKDDDDK
ベクター由来の C 末 端残基	配列番号 228 の第 182-194 残基	GSGRGPYSIVSPKC

HEK293細胞を発現ベクタープラスミドで形質移入し、IL13R α 2TF-Fc融合タンパク質を単独で発現させた場合、タンパク質Aと共発現させた場合（「タンパク質Aのみ」）、Erdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（「J-タンパク質A」）、Erdj5 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（「J2-タンパク質A」）の、培地でのIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルを比較した。形質移入細胞を2日間培養し、細胞培地のサンプルを回収し、V5タグで標識したIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質の分泌を検出するために、抗V5抗体を用いたウェスタンブロット（免疫ブロット）分析によって分析した。図12Aは、培地のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像を示す。図12Aのレーン1は、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクター（空のベクター）を用いて形質移入した細胞を含む「疑似」培養液の培地である。単独で発現させた場合（レーン2）、多少のIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質が培地で検出された。図12Aのレーン3に示すように、タンパク質Aと共発現させた場合（タンパク質Aのみ）、培地に分泌されたIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質のレベルの有意な増強は得られなかった。しかし、いずれかのJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって培地に分泌されたIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルは有意に増強された（図12Aのレーン4およびレーン5）。重要なことに、IL13R α 2TF-Fcをタンパク質Aのみと共発現させてもIL13R α 2TF-Fcの分泌には影響しなかった（レーン3）という事実から、以下のことがわかる：（1）分泌されるIL13R α 2TF-Fcの発現レベルを増強するにはJドメイン-タンパク質A融合タンパク質のJドメインが必須である；（2）分泌されるIL13R α 2TF-Fc標的タンパク質の発現レベルを増強するための標的特異性を得るにはJドメイン-タンパク質A融合タンパク質のタンパク質Aドメインが必須である。

【0232】

図12Aのレーンの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測

定分析した結果を図12Bの各棒グラフに示す。図12Bの棒グラフは、IL13R α 2TF-FcをいずれかのJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた（棒グラフ4および5）ことによって、分泌されたIL13R α 2TF-Fcの発現レベルが、IL13R α 2TF-Fcを単独で発現させた場合（棒グラフ2）またはIL13R α 2TF-Fcをタンパク質Aのみと共発現させた場合（棒グラフ3）と比較して有意に増強されたことを明確に示している。

【0233】

図12Aおよび図12Bの分泌されたIL13R α 2TF-Fcタンパク質の発現レベルの増強がJドメイン-タンパク質A融合タンパク質の標的結合ドメインがFcドメインに対して有する特異性に依存していることは、図12Cに示す結果によって裏付けられている。図12Cにある培地のウェスタンブロット分析に示すように、形質移入細胞がIL13R α 2TFタンパク質を単独で発現した場合（レーン1）、IL13R α 2TFタンパク質をJ-タンパク質A融合タンパク質と共発現した場合（レーン2）、IL13R α 2TFタンパク質をタンパク質Aのみと共発現した場合（タンパク質Aのみ、レーン3）には、いずれも培地に分泌されたIL13R α 2TF（Fcドメインは含まない）の有意な発現は検出されなかった。図12Cのレーンに示す化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図12Dの各棒グラフに示す。

10

【0234】

実施例6. 非改変配列を用いた場合の別のFc融合タンパク質の分泌の発現増強

20

数種類の異なるFc融合タンパク質の増強について本発明のJドメイン-タンパク質A融合タンパク質の有効性を試験し比較するために、一連の実験を実施した。形質移入細胞の培養液から採取した培地のウェスタンブロット分析の結果を図13に示す。

【0235】

実施例6. 1. 分泌されるIL13R α 2TF-Fc融合タンパク質の発現増強

上記の実施例5の結果と一致して、形質移入細胞内でIL13R α 2TF-Fcタンパク質をErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、培地に分泌されたIL13R α 2TF-Fcタンパク質の発現レベル（図13A-1のレーン2参照）が、IL13R α 2TF-Fcタンパク質を単独で発現する形質移入細胞に見られたレベル（図13A-1のレーン1参照）と比較して有意に増強された。分泌されたIL13R α 2TF-Fcタンパク質の発現レベルが有意に増強したことは、図13A-1の化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した図13A-2の各棒グラフに示す結果からも明らかである。

30

【0236】

実施例6. 2. 分泌されるTNFR1TF-Fc融合タンパク質の発現増強

腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）は、TNF- α 受容体（TNFR1）に結合して炎症反応を誘発する主要なサイトカインである。この炎症反応は、関節リウマチ、クローン病、乾癬などの多くの自己免疫疾患に関与する。切断型TNF- α 受容体（TNFR1TF）タンパク質は、TNF- α に結合することによってTNF- α の活性を阻害するための阻害受容体として用いられる。エタネルセプト（ENBREL（登録商標）として市販されている（Amgen））は、切断型TNFRをFcドメインと融合した（TNFR1TF-Fc）TNF- α 阻害薬である。その分子のうちTNFR1TFドメインが所望のTNF- α 結合特異性を付与し、免疫グロブリンFcドメインが患者の体内を循環する薬物の生体内安定性を加えると考えられている。

40

【0237】

この実験に用いたTNFR1TF-Fc融合標的タンパク質は、さらにTNFR1ドメインとFcドメインとの間にV5エピトープタグを有するタンパク質とした。この実験に用いたTNFR1TF-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表39. TNFR1TF-Fcタンパク質のアミノ酸配列

50

【0238】

【表39】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した TNFR1TF タンパク質	配列番号 229	MGLSTVPDLLLPLVLLLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDRKRDVCPQGKYIHPQNNISICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT TGTGSEFDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSR PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TNFR1TF	配列番号 229 の第 1-211 残基	MGLSTVPDLLLPLVLLLELLVGIYPSGVIGL VPHLGDRKRDVCPQGKYIHPQNNISICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFT ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGT T
リンカー	配列番号 229 の第 212-224 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 229 の第 225-238 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 229 の第 239-240 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 229 の第 241-471 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図13B-1は、培地のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像であり、TNFR1TF-Fc融合標的タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の培地（レーン1）、またはTNFR1TF-Fc融合タンパク質と上記のErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（レーン2）を示す。結果は、TNFR1TF-Fc融合タンパク質とErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞内で分泌されたTNFR1TF-Fc融合タンパク質の発現レベルが、Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質の非存在下で発現されたTNFR1TF-Fc融合タンパク質のレベルと比較して有意に増強されたことを示している。分泌されたTNFR1TF-Fc融合タンパク質の発現レベルが有意に増強したことは、図13B-1のレーンのシグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃

10

20

30

40

50

度測定分析した図 1 3 B - 2 の各棒グラフに示す結果からも明らかである。

【0239】

実施例 6. 3. 分泌される $\alpha 1$ A T - F c 融合タンパク質の発現増強

$\alpha 1$ アンチトリプシンタンパク質 ($\alpha 1$ A T) は肝臓で分泌されて循環器系へ移動する。 $\alpha 1$ A T の機能は組織 (特に肺組織) を過剰なプロテアーゼ活性から保護することである。 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症の患者の肺組織はプロテアーゼによって重度の損傷を受ける可能性がある。このような患者は、肺気腫、喘息、および／または慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease (C O P D)) を発症する可能性がある。現在、 $\alpha 1$ A T (ヒト血清から精製される) が $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症の患者の治療に用いられているが、この治療は高価であり、精製した $\alpha 1$ A T を受ける患者にはヒト血清中に存在する病原体に感染する危険性がある。

10

【0240】

この実験に用いた標的 $\alpha 1$ A T - F c 融合タンパク質はさらに、 $\alpha 1$ A T ドメインと F c ドメインとの間に V 5 エピトープタグを有するタンパク質とした。この実験に用いた $\alpha 1$ A T - F c 融合タンパク質 ($\alpha 1$ A T - F c) のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 4 0. V 5 タグで標識した $\alpha 1$ A T - F c 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0241】

【表 40】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した α1AT-Fc 融合タンパ ク質	配列番号 230	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDQDHTFNKITPNLAEFASF LYRQLAHQSNSTNIFFSVPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEFTVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGT GSEFDIAAALEGKPIPNPLLGLDSTSRPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
α1AT	配列番号 230 の第 1-418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDQDHTFNKITPNLAEFASF LYRQLAHQSNSTNIFFSVPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGF QELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEFTVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSAVHKA VLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
リンカー	配列番号 230 の第 419-431 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 230 の第 432-445 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 230 の第 446-447 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 230 の第 448-678 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ルム画像であり、 $\alpha 1 A T - F c$ 融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の培地（レーン 1）または $\alpha 1 A T - F c$ 融合タンパク質と上記の Erdj3 J ドメイン-タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（レーン 2）を示す。結果は、分泌された $\alpha 1 A T - F c$ 融合タンパク質のレベル（レーン 2）が、J ドメイン-タンパク質 A 融合タンパク質の非存在下で発現された $\alpha 1 A T - F c$ 融合タンパク質のレベル（レーン 1）と比較して有意に増強されたことを示している。分泌された $\alpha 1 A T - F c$ 融合タンパク質の発現レベルが有意に増強したことは、図 1 3 C 1 のレーンのシグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した図 1 3 C 2 の各棒グラフに示す結果からも明らかである。

10

【0242】

実施例 7. 非改変配列を用いた場合の分泌される I g G 1 抗体分子の発現増強

上記の試験から、J ドメイン-タンパク質 A 融合タンパク質を共発現させることによって F c 融合タンパク質の発現および分泌が有意に増強されたことがわかった。タンパク質 A は、免疫グロブリンの F c 領域に結合する公知のタンパク質の 1 つである。この試験では、免疫グロブリンドメインに結合することが知られている他のタンパク質を J タンパク質の J ドメインと融合することによって、分泌される標的抗体の発現レベルを増強することが可能かを調べた。

【0243】

この試験では、ヒト化 I g G 1 抗 I L 8 抗体を標的抗体タンパク質として用いた。以下に説明するように、多様な J ドメイン融合タンパク質の存在下と非存在下で分泌された抗 I L 8 抗体の発現レベルを調べた。

20

【0244】

この実験の一側面では、免疫グロブリン F c ドメインに結合することが知られているタンパク質 A 分子と共発現させた場合の抗 I L 8 抗体の発現レベルを調べた。タンパク質 A 分子は、上記の実施例 5 に記載の F l a g タグで標識したタンパク質 A を用いた。

【0245】

この実験の別の側面では、抗体の軽鎖に結合することが知られているタンパク質 L 分子と共発現させた場合の抗 I L 8 抗体の発現レベルを調べた。タンパク質 A 分子について先に述べたとおり、この実験に使用したタンパク質 L 分子を、標準の抗 F l a g 抗体を用いて容易に認識できるように F l a g エピトープタグで標識した。F l a g タグで標識したタンパク質 L のアミノ酸配列を下の表に示す。

30

表 4 1. F l a g タグで標識したタンパク質 L のアミノ酸配列

【0246】

【表 4 1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識し たタンパク質 L タンパク質	配列番号 231	MGVKVLFALICIAVAEAGTGSEFDIAAAVT IKANLIFADGKTQTAEFKGTFEEATAEAYR YADLLAKENGEYTDLEDGGYTINIKFAKE TPETPEEPKEELEGDYKDDDDKGSRGPYSI VSPKC
シグナル配列	配列番号 231 の第 1-17 残基	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー	配列番号 231 の第 18-28 残基	GTGSEFDIAAA
タンパク質 L	配列番号 231 の第 29-101 残基	VTIKANLIFADGKTQTAEFKGTFEEATAEA YRYADLLAKENGEYTDLEDGGYTINIKFA KETPETPEEPKEE
リンカー	配列番号 231 の第 102-104 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 231 の第 105-112 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 231 の第 113-125 残基	GSRGPYSIIVSPKC

10

20

下の表に示すように、Erjd3 Jドメイン - タンパク質 L 融合タンパク質のアミノ酸配列には F l a g エピトープタグが含まれていた。

表 4 2. F l a g タグで標識したErjd3 Jドメイン - タンパク質 L 融合タンパク質のアミノ酸配列

【 0 2 4 7 】

【表 4 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-タンパク質 L 融合タンパク質	配列番号 232	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAVTIKANLIFADGKTQTAEFK GTFEEATAEAYRYADLLAKENGEYTADLED GGYTINIKFAKETPETPEEPKEELEGDYKD DDDKGSRGPYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 232 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 232 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGGAAA
タンパク質 L	配列番号 232 の第 101-173 残基	VTIKANLIFADGKTQTAEFKGTFEEATAEA YRYADLLAKENGEYTADLEDGGYTINIKFA KETPETPEEPKEE
リンカー	配列番号 232 の第 174-176 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 232 の第 177-184 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 232 の第 185-197 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、この実験で用いた I L 8 タンパク質のアミノ酸配列は、F l a g エピトープタグとシグナル配列を含み、さらにタンパク質の発現に用いた発現ベクターに由来する 13 個のアミノ酸残基が C 末端側に付加した配列であった。

表 4 3. F l a g タグで標識した I L 8 タンパク質のアミノ酸配列

【0 2 4 8】

【表 4 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識し た IL8 タンパク質	配列番号 233	MGVKVLFALICIAVAEAGTGSEFDIAAASA KELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGP HCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWVQRVV EKFLKRAENSLEGDYKDDDDKGSRGYPYSIV SPKC
シグナル配列	配列番号 233 の第 1-17 残基	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー	配列番号 233 の第 18-28 残基	GTGSEFDIAAA
IL8	配列番号 233 の第 29-100 残基	SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIES GPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWVQR VVEKFLKRAENS
リンカー	配列番号 233 の第 101-103 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 233 の第 104-111 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 233 の第 112-124 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、Erdj3 Jドメイン - I L 8 融合タンパク質のアミノ酸配列は F l a g エピトープタグを含んでいた。

表 4 4. F l a g タグで標識したErdj3 Jドメイン - I L 8 融合タンパク質のアミノ酸配列

【 0 2 4 9 】

【表 4 4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-IL8 融合タンパク質	配列番号 234	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGSGSGGAAASAKELRCQCIKTYSKPFHPK FIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELC LDPKENWVQRVVEKFLKRAENSLEGDYKDD DDKSGRGPYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 234 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 234 の第 84-100 残基	DI GGGSGSGSGSGG AAA
IL8	配列番号 234 の第 101-172 残基	SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIES GPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKENWVQR VVEKFLKRAENS
リンカー	配列番号 234 の第 173-175 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 234 の第 176-183 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 234 の第 184-196 残基	GSRGYPYSIVSPKC

10

20

HEK293細胞を発現プラスミドで形質移入し、以下の形質移入細胞を得た：抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞；抗IL8抗体とタンパク質Aとを共発現する形質移入細胞（タンパク質Aのみ）；抗IL8抗体と本発明のErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞（J-タンパク質A）；抗IL8抗体とタンパク質Lとを共発現する形質移入細胞（タンパク質Lのみ）；抗IL8抗体と本発明のErdj3 Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞（J-タンパク質L）；抗IL8抗体とそのIL8リガンドを共発現する形質移入細胞（IL8）；本発明のErdj3 Jドメイン-IL8リガンド融合タンパク質を共発現する形質移入細胞（J-IL8）；Erdj3 J-タンパク質A融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（J-タンパク質A）；本発明のErdj3 Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（J-タンパク質L）；および本発明のErdj3 Jドメイン-IL8リガンド融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（J-IL8）。培地での抗IL8抗体の発現を、抗ヒトIgG（抗hIgG抗体、カタログ番号AP112P、Millipore）抗体を用いたドットブロット分析によって分析した。

30

【0250】

40

図14Aの培地のドットブロットに示すように、形質移入細胞内で抗IL8抗体をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合（レーン4）、Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質と共発現させた場合（レーン6）、またはJドメイン-IL8融合タンパク質と共発現させた場合（レーン8）、培地に分泌された抗IL8抗体の発現レベルが、抗IL8抗体を単独で発現する形質移入細胞（レーン2）、タンパク質Aのみと共発現する形質移入細胞（レーン3、タンパク質Aのみ）、タンパク質Lのみと共発現する形質移入細胞（レーン5、タンパク質Lのみ）、またはIL8リガンドタンパク質のみと共発現する形質移入細胞（レーン7）で発現された抗体のレベルと比較して有意に増強されたことがわかる。Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン9、J-タンパク質A）、Jドメイン-タンパク質L融合タンパク質を

50

単独で発現する形質移入細胞（レーン10、J-タンパク質L）、またはJドメイン-I L 8融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞（レーン10、J-I L 8）の培地ではシグナルが検出されなかった。このことは、3種すべての融合タンパク質が、共発現された抗I L 8抗体標的のタンパク質を特異的に標的としてその発現を増強したことを示す。

【0251】

図14AのレーンのシグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図14Bの各棒グラフに示す。この一連の実験の結果は、標的である抗I L 8抗体を、タンパク質発現増強ポリペプチド（ここではErdj3 Jドメイン）を標的タンパク質結合ドメイン（ここではタンパク質A、タンパク質L、またはI L 8）と連結させた本発明の融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗I L 8抗体の発現が、融合していない標的タンパク質結合ドメインタンパク質のみ（タンパク質Gのみ、タンパク質Lのみ、またはI L 8のみ）と共発現させた場合と比較して有意に増強されたことを明確に示している。

【0252】

実施例8．非改変配列を用いた場合のCHO-DP12産生細胞株で確立されている発現に対する増強

この試験では、商業価値のある確立された産生細胞株で既に安定に産生されている標的タンパク質の発現のレベルを改善するために本発明の融合タンパク質を用いることができるかを調べる。この実験には、American Type Culture Collection（受託番号CRL-12444、American Type Culture Collection（バージニア州、マナナス））から入手した、ヒト化抗IL8 IgG1抗体を安定に発現するCHO-DP12細胞株を、抗I L 8抗体を発現させるための発現ベクタープラスミド（受託番号209552、ATCC（バージニア州、マナナス））と共に使用した。本発明の融合タンパク質としては、上記のErdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質を使用した。CHO-DP12産生細胞株の細胞を、Erdj3 Jドメイン-タンパク質A融合タンパク質をコードする構造遺伝子を作動可能に連結させた発現ベクターで形質移入した。形質移入の効率は、CHO-DP12細胞ではHEK293細胞ほど高くはなかった。しかし、図15Aのドットプロット分析に示すように、ヒト化抗体をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、培地に分泌された抗体の発現レベル（レーン3）はJドメイン-タンパク質A融合タンパク質の非存在下で発現された抗体の発現レベル（レーン2、なし）と比較して有意に増強された。

【0253】

図15Aのレーンのドットプロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図15Bの各棒グラフに示す。結果は、抗体をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた結果、分泌された抗体の発現（棒グラフ3）が有意に増強され、抗体をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質の非存在下で発現させた場合に得られた発現レベル（棒グラフ2）の約4～5倍に発現レベルが増強されたことを示している。

【0254】

この結果は、確立された産生細胞株で既に安定に発現されているタンパク質の産生レベルを有意に増強するために本発明の融合タンパク質を採用できることを示す。

【0255】

実施例9．分泌されるFc含有分子の発現を増強するためのその他の非改変配列の融合タンパク質

実施例9．1．別のタンパク質種に由来するFc結合ドメインを含む融合タンパク質

本実施例では、Jドメイン（タンパク質発現増強ポリペプチドドメインとして）を抗体分子のFc領域に結合することが報告されている多様なポリペプチドのいずれかと連結させた様々な融合タンパク質について試験する一連の実験を示す。多様なJドメイン融合タンパク質を、形質移入HEK293細胞の培地に分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルに対する増強能力について、上記実施例5に記載のとおり試験

し比較した。

【0256】

本実施例に使用した本発明のJ-タンパク質A融合タンパク質は、上記実施例5に記載のErdj3-タンパク質A融合タンパク質である。

【0257】

本明細書に記載の実験で使用した別の融合タンパク質では、Erdj3 Jタンパク質のJドメインを、ある種の免疫グロブリンのFcドメインに結合することが知られているタンパク質Gと連結させた。実施例5および図11BでJ-タンパク質A融合タンパク質について示したように、Flagエピトープタグをタンパク質GドメインのC末端に連結させた。Flagタグで標識した本発明のJドメイン-タンパク質G融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表45. Flagタグで標識したErdj3 Jドメイン-タンパク質G融合タンパク質のアミノ酸配列

【0258】

【表45】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flagタグで標識したErdj3 Jドメイン-タンパク質G融合タンパク質	配列番号 235	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAATYKLVINGKTLKGETTTEAV DAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKT FTVTEKPEVIDASELTPAVTLEGDYKDDDD KSGRGPYSIVSPKC
Jドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 235 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 235 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGGAAA
タンパク質 G	配列番号 235 の第 101-170 残基	TYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFK QYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVI DASELTPAVT
リンカー	配列番号 235 の第 171-173 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 235 の第 174-181 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 235 の第 182-194 残基	GSGRGPYSIVSPKC

本明細書に記載の実験で使用した別の融合タンパク質では、Erdj3 Jタンパク質のJドメインを、ある種の免疫グロブリンのFcドメインに結合する受容体であるヒトFc受容体(hFcR)タンパク質と連結させた。実施例5および図11BでJ-タンパク質A融合タンパク質について示したように、FlagエピトープタグをhFcRドメインのC末端に連結させた。Flagタグで標識したJドメイン-hFcR融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表46. Flagタグで標識したErdj3 Jドメイン-hFcR融合タンパク質のアミノ酸配列

【0259】

【表 4 6】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 Jドメイン-hFcR 融合タンパク質	配列番号 236	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAVITLQPPWVSFQEETVTL HCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYR ITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIH RGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKL VYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTKTNIS HNGTYHCSGMGKLEGDYKDDDDKSGRGPYS IVSPKC
Jドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 236 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 236 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGSGGAAA
hFcR	配列番号 236 の第 101-252 残基	AVITLQPPWVSFQEETVTLHCEVLHLPGS SSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSG EYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSS RVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNG KAFKFFHWNSNLTKTNISHNGTYHCSGM GK
リンカー	配列番号 236 の第 253-255 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 236 の第 256-263 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 236 の第 264-276 残基	GSRGPYSIVSPKC

本明細書に記載の実験で使用した別の融合タンパク質では、Erdj3 Jタンパク質のJドメインを、ある種の免疫グロブリンのFcドメインに結合する受容体であるアカゲザル (Macaca mulatta) ラジノウイルスFc受容体 (vFcR) タンパク質と連結させた。実施例5および図11BでJ-タンパク質A融合タンパク質について示したように、Flag エピトープタグをvFcRドメインのC末端に連結させた。Flagタグで標識したJドメイン-vFcR融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表47. Flagタグで標識したErdj3 Jドメイン-vFcR融合タンパク質のアミノ酸配列

【0260】

【表 4 7】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-vFcR タンパク質	配列番号 237	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG GSGSGGAAAAKLTSVPTWCPPHPGDTYLL TCRGTSTARDQRSTQWFRNNTLMRGSNFY RLVSVTPNATISDRYACQTKTTTRSNNIDF RVSSSRLTLQERCSSYGYTYANNTRVLR CYSGGNVTLRNVVFHLNGTAVINGTTTNIHTF VLTEKTGGTYFCSAFLEGDYKDDDDKGSRG PYSIVSPKC
Erdj3 J ドメイン	配列番号 237 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 237 の第 84-100 残基	DI GGGSGGSGGSGG AAA
vFcR	配列番号 237 の第 101-255 残基	AKLTSVPTWCPPHPGDTYLLTCRGTSTARD QRSTQWFRNNTLMRGSNFYGRVSVTPNAT ISDRYACQTKTTTRSNNIDFRVSSSRLTLQ ERCSSYGYTYANNTRVLRCSGGNVTLRNV VFHLNGTAVINGTTTNIHTFVLTEKTGGTY FCSAF
リンカー	配列番号 237 の第 256-258 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 237 の第 259-266 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 237 の第 267-279 残基	GSRGPYSIVSPKC

本明細書に記載の実験で使用した別の融合タンパク質では、Erdj3 Jタンパク質のJドメインを、有意なFc結合活性を有さない単純ヘルペスウイルス1型のgIタンパク質と連結させた。実施例5および図11BでJ-タンパク質A融合タンパク質について示したように、FlagエピトープタグをgIドメインのC末端に連結させた。Flagタグで標識したJドメイン-gI融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 4 8. Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン - g I 融合タンパク質のアミノ酸配列
【0261】

10

20

30

【表 4 8】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-gI タンパク質	配列番号 238	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGSG SGSGSGGAAALVVRGPTVSLVSNFVDAGA LGPDGVVEEDLLILGELRFVGDQVPHTTYY DGVVELWHYPMGHKCPRVVHVVTVTACPRR PAVAFALCRATDSTHSPAYPTLELNLAQQP LLRVRRA TRDYAGVYVLRVWVG DAPNASLF VLGMAIAAEGTLAYNGSAHGSCDPKLLPYS APRLAPASVYQPAPNPASTPSTTIPAPQAS TTPFPTGDPKPKQLEGDYKDDDDKSGRGPYS IVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 238 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 238 の第 84-100 残基	DIGGSGSGSGSGGAAA
gI	配列番号 238 の第 101-312 残基	LVVRGPTVSLVSNFVDAGALGPDGVVEED LLILGELRFVGDQVPHTTYYDGVVELWHYP MGHKCPRVVHVVTVTACPRRPAVAFALCRA TDSTHSPAYPTLELNLAQQP LLRVRRA TRD YAGVYVLRVWVG DAPNASLFVLGMAIAAEG TLAYNGSAHGSCDPKLLPYSAPRLAPASVY QPAPNPASTPSTTIPAPQASTTTPFPTGDPK PQ
リンカー	配列番号 238 の第 313-315 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 238 の第 316-323 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 238 の第 324-336 残基	GSRGPYSIVSPKC

本明細書に記載の実験で使用了別の融合タンパク質では、Erdj3 J タンパク質の J ドメインを、免疫グロブリンの F c ドメインに対し比較的弱い親和性を有する単純ヘルペスウイルス 1 型の g E タンパク質と連結させた。実施例 5 および図 11 B で J - タンパク質 A 融合タンパク質について示したように、F l a g エピトープタグを g E ドメインの C 末端に連結させた。F l a g タグで標識した J ドメイン - g E 融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 4 9. F l a g タグで標識した Erdj3 J ドメイン - g E 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0 2 6 2】

10

20

30

40

【表 4 9】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-gE 融合タンパク質	配列番号 239	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASAIKDIKKAYRKALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAGTPKTSWRRVSVGEDVSLLP APGPTGRGPTQKLLWAVEPLDGCGLHPSW VSLMPPKQVPETVVDAAACMRAPVPLAMAYA PPAPSATGGLRTDFVWQERAAVNRSLVIH GVRETDGLYTLVSGDIKDPARQVASVVLV VQPAPVPTPPPTPADYDEDDNDEGEDES LAGTPASGTPRLPPPPAPPRSWPSAPEVSHVR GVTVRMETPEAILFSPGETFSTNVSIIHAIA HDDQTYSDMVWLRFDVPTSCAEMRIYES CLYHPQLPECLSPADAPCAASTWTSRLAVRS YAGCSRTNPPPRCSAEAHMEFPVGLAWQAA SVNLEFRDASPQHSGLYLCVVYVNDHIHAW GHITISTAAQYRNAVVEQPLPQRGADLAE EGDYKDDDDKSGRGPYSIVSPKC
Erdj3 J ドメイン	配列番号 239 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASAIKDIKKAYRKALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 239 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGSGGAAA
gE	配列番号 239 の第 101-479 残基	GTPKTSWRRVSVGEDVSLLPAPGPTGRGPT QKLLWAVEPLDGCGLHPSWVSLMPPKQVP ETVVDAAACMRAPVPLAMAYAPPAPSATGGL RTDFVWQERAAVNRSLVIHGVRETDGLY TLVSGDIKDPARQVASVVLVQPAPVPTPP PTPADYDEDDNDEGEDES LAGTPASGTPRLPPPPAPPRSWPSAPEVSHVR GVTVRMETPEAILFSPGETFSTNVSIIHAIA HDDQTYSDMVWLRFDVPTSCAEMRIYES CLYHPQLPECLSPADAPCAASTWTSRLAVRS YAGCSRTNPPPRCSAEAHMEFPVGLAWQAAS VNLEFRDASPQHSGLYLCVVYVNDHIHAW GHITISTAAQYRNAVVEQPLPQRGADLAE
リンカー	配列番号 239 の第 480-482 残基	LEG
Flag エピトープドメイン	配列番号 239 の第 483-490 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末端残基	配列番号 239 の第 491-503 残基	GSRGPYSIVSPKC

HEK293細胞を発現ベクタープラスミドで形質移入し、以下の場合の培地でのIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルを比較した：IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質を単独で発現させた場合；Jドメイン-タンパク質Aと共発現させた場合（上記実施例5に記載）；タンパク質Aと共発現させた場合（実施例5に記載の「タンパク質Aのみ」）；Jドメイン-タンパク質G融合タンパク質と共発現させた場合（J-タンパク質G）；JドメインをヒトFc受容体タンパク質と連結させたJドメイン融合タンパク質と共発現させた場合（「J-hFcR」）；JドメインをウイルスFc受容体タンパク質と連結させたJドメイン融合タンパク質（「J-vFcR」）と共発現させた場合；Jドメインをヘルペス単純ヘルペスウイルス1型のgIタンパク質と連結させたJド

メイン融合タンパク質と共発現させた場合（「J - g I」）；Jドメインを単純ヘルペスウイルス1型のg Eタンパク質と連結させたJドメイン融合タンパク質と共発現させた場合（「J - g E」）；およびJ - g IとJ - g E両方と共発現させた場合（「J - g I + J - g E」）。形質移入細胞を2日間培養し、細胞培地のサンプルを回収し、V5タグで標識したIL13Rα2TFの分泌を検出するために抗V5抗体を用いたウェスタンブロット（免疫ブロット）分析によって分析した。

【0263】

図16Aは、形質移入細胞の培養液から得た培地のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像を示す。図16Aのレーン1は、IL13Rα2TF - Fc融合タンパク質を単独で発現させる発現ベクターで形質移入した細胞の培養液から得た培地である。単独で発現させた場合、少量のIL13Rα2TF - Fc融合タンパク質が培地で検出された（図16Aのレーン1）。実施例5と図12Aに示した結果について先に述べたとおり、タンパク質Aのみと共発現させた場合も少量のIL13Rα2TF - Fcタンパク質が検出された（図16Aのレーン3）。同じく実施例5および図12Aに先に示したとおり、IL13Rα2TF - Fc融合タンパク質をJドメイン - タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、培地に分泌されたIL13Rα2TF - Fc融合タンパク質の発現レベルが、IL13Rα2TFを単独で発現させた場合の発現レベル（図16Aのレーン1）またはIL13Rα2TF - Fcをタンパク質Aのみと共発現させた場合（図16Aのレーン3）と比較して有意に増強された（図16Aのレーン2）。IL13Rα2TF - Fcタンパク質をJドメイン - タンパク質G融合タンパク質と共発現させた場合にも、分泌されたIL13Rα2TF - Fcタンパク質の発現レベル（図16Aのレーン4）が、IL13Rα2TFを単独で発現させた場合の発現レベル（図16Aのレーン1）またはIL13Rα2TF - Fcをタンパク質Aのみと共発現させた場合の発現レベル（図16Aのレーン3）と比較して有意に増強された。

【0264】

単純ヘルペスウイルス1型に由来するウイルスタンパク質g Iおよびg Eは、ヘテロ二量体を形成することが知られている。ここで、g Eタンパク質は抗体分子への結合が弱い。また、g Eタンパク質単独では抗体分子への結合が弱い、g I単独では抗体分子に結合しない。これらの従来知見に一致して、IL13Rα2TF - Fc融合タンパク質をJドメイン - g I融合タンパク質と共発現させた結果（図16Aのレーン7）、分泌されたIL13Rα2TF - Fcの発現レベルは比較的低く、IL13Rα2TF - Fcを単独で発現する細胞に見られた発現レベル（図16Aのレーン1）と類似していた。対照的に、IL13Rα2TF - Fc融合タンパク質をJドメイン - g E融合タンパク質と共発現させることによって、分泌されたIL13Rα2TF - Fcの発現レベルが有意に増強された（図16Aのレーン8）。IL13Rα2TF - Fcの分泌レベルについて、IL13Rα2TF - FcをJ - g I融合タンパク質およびJ - g E融合タンパク質と共発現させた場合にも類似の増強が見られた（図16Aのレーン9）。このことは、J - g I融合タンパク質は分泌されるIL13Rα2TF - Fcの発現レベルを有意に増強しないことを示し、これはg Iタンパク質がFcドメインに結合しないという従来知見に一致している。

【0265】

ヒトFc結合受容体（hFcR）とアカゲザル（*Macaca mulatta*）ラジノウイルスのFc結合受容体（vFcR）は、抗体分子のFc領域に結合する、十分に特徴的な受容体である。これらのFcR分子を含むJドメイン融合物を作製し、IL13Rα2TF - Fc融合タンパク質に対する発現増強能力について試験した。図16Aに示すように、IL13Rα2TF - Fcタンパク質をJドメイン - hFcR融合タンパク質またはJドメイン - vFcR融合タンパク質と共発現させた結果、分泌されるIL13Rα2TF - Fcの発現を増強できなかった（図16Aのレーン5およびレーン6）うえ、実際にはIL13Rα2TF - Fcタンパク質を単独で発現する細胞に見られた低レベルの分泌タンパク質（図16Aのレーン1）の発現さえも抑制したようであった。このように基準の分泌量す

らも明らかに抑制したことについて、考えられる説明としては、これらの実験に使用した J ドメイン - F c R 融合タンパク質が小胞体 (E R) で捕捉されたという可能性がある。F c 領域を有するタンパク質を標的としてその発現を増強するための F c R 領域を含む機能的な構築物を見出すには、さらなる研究が必要である。

【0266】

図16Aのウェスタンブロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図16Bの各棒グラフに示す。

【0267】

実施例9. 2. 非改変配列で標的タンパク質の発現を増強するのに使用するための F c 標的ペプチド含有融合タンパク質

免疫グロブリン分子の F c ドメインに結合する多様なペプチドが知られている。この実験では、J ドメイン (タンパク質発現増強ポリペプチドとして) を数種類の代表的な F c 結合性ペプチドのそれぞれ (標的結合ドメインとして) と連結させた、F c ドメインを有するタンパク質の発現レベルを増強するのに用いるための多様な融合タンパク質を試験した。融合タンパク質を構築するのに用いた6種類のペプチドを下の表に示す。

表50. F c ドメインに結合する代表的なペプチドのアミノ酸配列

【0268】

【表50】

ペプチド名	アミノ酸配列	参考文献
FcBP1	DCAWHLGELVWCT (配列番号 240)	DeLano et al., <i>Science</i> , 287: 1279-1283 (2000)
FcBP2	HWRGWV (配列番号 241)	Yang et al., <i>J. Peptide Res.</i> , 66(Suppl. 1): 120-137 (2006)
FcBP3	HVHYYW (配列番号 242)	Yang et al., <i>J. Peptide Res.</i> , 66(Suppl. 1): 120-137 (2006)
FcBP4	YYWLHH (配列番号 243)	Yang et al., <i>J. Peptide Res.</i> , 66(Suppl. 1): 120-137 (2006)
FcBP5	HVHYY (配列番号 244)	Yang et al., <i>J. Peptide Res.</i> , 66(Suppl. 1): 120-137 (2006)
FcBP6	YYWL (配列番号 245)	Yang et al., <i>J. Peptide Res.</i> , 66(Suppl. 1): 120-137 (2006)

J ドメイン (E r d j 3 タンパク質由来) を上記6種類のペプチドのそれぞれと連結させた J ドメイン融合タンパク質を発現させるための発現ベクタープラスミドを作製した。F c ドメインを有する代表的な標的タンパク質として I L 1 3 R α 2 T F - F c 融合タンパク質を用いた。

【0269】

下の表に示すように、この実験に使用した、Erdj3 J タンパク質の J ドメインを F c B P 1 ペプチドと連結させた J ドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列は、F l a g エピトープタグを有し、さらにこのタンパク質を発現させるのに使用した発現ベクターに由来する13個のアミノ酸残基がC末端に付加された配列であった。

表51. F l a g タグで標識したErdj3 J ドメイン - F c B P 1 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0270】

【表 5 1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-FcBP1 融合タンパク質	配列番号 246	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFQDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGSGSGGAAADCAWHLGELVWCTLEGDYKD DDDKGSRGPYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 246 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFQDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 246 の第 84-100 残基	DIGGGSGSGSGSGGAAA
FcBP1	配列番号 246 の第 101-113 残基	DCAWHLGELVWCT
リンカー	配列番号 246 の第 114-116 残基	LEG
Flag エピトープドメイン	配列番号 246 の第 117-124 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末端残基	配列番号 246 の第 125-137 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、この実験に使用した、Erdj3 Jタンパク質のJドメインをFcBP2ペプチドと連結させたJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列は、Flagエピトープタグを有し、さらにこのタンパク質を発現させるのに使用した発現ベクターに由来する13個のアミノ酸残基をC末端に付加された配列であった。

表 5 2. Flag タグで標識したErdj3 Jドメイン - FcBP2 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0271】

【表 5 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-FcBP2 融合タンパク質	配列番号 247	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAHWRGWVLEGDYKDDDDKGS RGPYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 247 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 247 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGGAAA
FcBP2	配列番号 247 の第 101-106 残基	HWRGWV
リンカー	配列番号 247 の第 107-109 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 247 の第 110-117 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 247 の第 118-130 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、この実験に使用した、Erdj3 Jタンパク質のJドメインをFcBP3ペプチドと連結させたJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列は、Flagエピトープタグを有し、さらにこのタンパク質を発現させるのに使用した発現ベクターに由来する13個のアミノ酸残基をC末端に付加された配列であった。

表 5 3. Flag タグで標識したErdj3 Jドメイン - FcBP3 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0272】

30

【表 5 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
Flag タグで標識し た Erdj3 J ドメイ ン-FcBP3 融合タン パク質	配列番号 248	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAHVHYWLEGDYKDDDDKGS GPYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 248 の第 残基 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 248 の第 84-100 残基	DI GGGSGGGSGGG AAA
FcBP3	配列番号 248 の第 101-106 残基	HVHYW
リンカー	配列番号 248 の第 107-109 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 248 の第 110-117 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 248 の第 118-130 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、この実験に使用した、Erdj3 Jタンパク質のJドメインをFcBP4ペプチドと連結させたJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列は、Flagエピトープタグを有し、さらにこのタンパク質を発現させるのに使用した発現ベクターに由来する13個のアミノ酸残基をC末端に付加された配列であった。

表 5 4. Flag タグで標識したErdj3 Jドメイン - FcBP4 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0273】

【表 5 4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-FcBP4 融合タンパク質	配列番号 249	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFQDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAYWLHHLEGDYKDDDDKGSR GPYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 249 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFQDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 249 の第 84-100 残基	DIGGGSGGGSGGGGAAA
FcBP4	配列番号 249 の第 101-106 残基	YYWLHH
リンカー	配列番号 249 の第 107-109 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 249 の第 110-117 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 249 の第 118-130 残基	GSRGYPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、この実験に使用した、Erdj3 Jタンパク質のJドメインをFcBP5ペプチドと連結させたJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列は、Flagエピトープタグを有し、さらにこのタンパク質を発現させるのに使用した発現ベクターに由来する13個のアミノ酸残基をC末端に付加された配列であった。

表 5 5. Flag タグで標識したErdj3 Jドメイン - FcBP5 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0274】

30

【表 5 5】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-FcBP5 融合タンパク質	配列番号 250	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG SGGGSGGAAAHVHYYLEGDYKDDDDKGSRG PYSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 250 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 250 の第 84-100 残基	DI GGGSGGGSGGG AAA
FcBP5	配列番号 250 の第 101-105 残基	HVHY
リンカー	配列番号 250 の第 106-108 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 250 の第 109-116 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 250 の第 117-129 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

下の表に示すように、この実験に使用した、Erdj3 Jタンパク質のJドメインをFcBP6ペプチドと連結させたJドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列は、Flagエピトープタグを有し、さらにこのタンパク質を発現させるのに使用した発現ベクターに由来する13個のアミノ酸残基をC末端に付加された配列であった。

表 5 6. Flag タグで標識したErdj3 Jドメイン - FcBP6 融合タンパク質のアミノ酸配列

【0275】

【表 5 6】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
Flag タグで標識した Erdj3 J ドメイン-FcBP6 融合タンパク質	配列番号 251	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKRDIGGGSG GSGGSGGAAAYWLLEGDYKDDDDKGSRG YSIVSPKC
J ドメイン (Erdj3 由来)	配列番号 251 の第 1-83 残基	MAPQNLSTFCLLLLYLIGAVIAGRDFYKIL GVPRSASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDD PQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR
リンカー	配列番号 251 の第 84-100 残基	DIGGGSGGSGGSGGAAA
FcBP6	配列番号 251 の第 101-104 残基	YYWL
リンカー	配列番号 251 の第 105-107 残基	LEG
Flag エピトープド メイン	配列番号 251 の第 108-115 残基	DYKDDDDK
ベクター由来のC末 端残基	配列番号 251 の第 116-128 残基	GSRGPYSIVSPKC

10

20

形質移入細胞を2日間培養し、細胞培地のサンプルを回収し、V5タグで標識したIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の分泌を検出するために抗V5抗体を用いたウェスタンブロット分析によって分析した。図17Aは、培地のウェスタンブロット分析における化学発光シグナルのX線フィルム画像を示す。図17Aに示すように、HEK293形質移入細胞内でIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質を6種類のJドメイン-ペプチド融合タンパク質のそれぞれと共発現させることによって、分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現レベル(レーン4~9)が、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質を単独で発現させた場合の発現レベル(レーン1および3)と比較して有意に増強された。さらに、比較のために、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合(レーン2)またはJドメイン-タンパク質G融合タンパク質と共発現させた場合(レーン10)に分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現にもたらされる効果についても実験した。図17Aに示すように、IL13Rα2TF-Fc融合タンパク質をJドメイン-タンパク質A融合タンパク質(レーン2)またはJドメイン-タンパク質G融合タンパク質(レーン10)と共発現させることによって、分泌されたIL13Rα2TF-Fc融合タンパク質の発現レベルが有意に増強された。

30

【0276】

図17Aのウェスタンブロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図17Bの各棒グラフに示す。

40

【0277】

実験結果から得た結論

上記の実験の結果は、目的の標的タンパク質と、タンパク質発現増強ポリペプチドドメインを標的タンパク質に結合する標的タンパク質結合ドメインと連結させた融合タンパク質とを共発現させることによって、標的タンパク質の適切な細胞内位置または細胞外位置での発現レベルが、融合タンパク質の非存在下での標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強されることを示している。

【0278】

実施例10. タンパク質発現増強ポリペプチドに必要な最小限の配列

50

非改変配列または改変配列で用いた場合に目的の標的タンパク質の発現レベルを増強するのに有効な必要最小限のアミノ酸を決定するためにさらに分析を行った。

【0279】

現存するJドメイン配列のライブラリーについて、BLASTを用いた配列相同性分析を行い、Jドメインがタンパク質の発現レベルを増強することのできる類似の最小の「コア」配列を共有しているかを決定した。分析から、Er dj 3タンパク質のJドメインが他のJタンパク質のJドメインの特徴を有していたことがわかった。Er dj 3のJドメインは既に改変配列と非改変配列いずれにおいてもタンパク質発現の増強に有効であることが知られているため（上記の実施例を参照のこと）、これをタンパク質発現増強活性を保持する最小限のポリペプチド配列が特定できるかを決定するためのさらなる欠失および置換変異分析の対象に選んだ。

10

【0280】

この試験では、改変IL13R α 2TF-V5-Fcタンパク質を目的の標的タンパク質とし、これに対する発現の増強についてEr dj 3のJドメインの多様な欠失変異体および置換変異体を評価した。この改変タンパク質は、V5エピトープタグをIL13R α 2TFポリペプチドとFcドメインとの間に有し、抗V5抗体を用いて容易に検出できるようにした。Er dj 3のJドメインの全長または多様な変異ポリペプチドを、改変IL13R α 2-Fc標的タンパク質のFcドメインに結合する（したがって標的タンパク質結合ドメインの働きをする）タンパク質Aと連結させた融合タンパク質を構築した。したがって、変異ポリペプチドのそれぞれについて、試験に用いた対応する融合タンパク質の一般式は以下のとおりである：

20

シグナル配列ーリンカー1ー（Jドメイン、断片またはJドメインアナログポリペプチド配列）ーリンカー2ータンパク質Aーリンカー3ーFlagエピトープタグ。

【0281】

これらの融合タンパク質のドメインのアミノ酸配列を、挿入されたJドメイン、Jドメイン断片、またはJドメインアナログの配列を除き、下の表に示す。

表57. Flagタグで標識した試験タンパク質A融合物のアミノ酸構造

【0282】

【表57】

30

タンパク質の領域	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
シグナル配列	配列番号251	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー1	配列番号252	GTGSGEF
Jドメイン、断片またはアナログの配列		(多様なポリペプチド配列)
リンカー 2	配列番号122	DIGGGSGGSGGSGGAAA
タンパク質 A	配列番号254	ADNKFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGF IQSLKDDPSQSANVLGEAKKLNDSQAPK
リンカー 3	配列番号255	LEG
Flag エピトープタグ	配列番号111	DYKDDDDK

40

各融合タンパク質のタンパク質発現増強活性を、検出可能な抗V5抗体を用いたドットブロット分析によって決定した。IL13R α 2-V5-Fc標的タンパク質を、各変異ポリペプチド配列を含む融合タンパク質の存在下または非存在下で発現させ、細胞培地を回収して短時間回転させて細胞片を除去した。サンプルをニトロセルロース膜にブロットし、乾燥させた膜を免疫ブロット分析用に処理した。タンパク質発現増強活性を試験した欠失体ポリペプチドおよび置換体ポリペプチドを、免疫ブロットによって決定したタンパク質発現増強活性と共に下の表に示す。

表58-1～表58-3. タンパク質発現増強活性について試験したポリペプチドのアミ

50

ノ酸配列
【0283】

【表 58-1】

ポリペプチ ド番号	配列番号	ポリペプチドのアミノ酸配列	活性*
		123456789012345678901234567890	
3	配列番号 256	GRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKLALQL HPDRNPDDPQAQEKFDLGAAYEVLSDSEK R	HA
3-1	配列番号 257	ILGVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNP DDPQAQEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA
3-2	配列番号 258	SASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQ EKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA
3-3	配列番号 259	GRDFYKILGVPRASIKDIKKAYRKLALQL HPDRNPDDPQAQEKFDLG	HA
3-4	配列番号 260	ILGVPRASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNP DDPQAQEKFDLG	HA
3-5	配列番号 261	SASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQ EKFDLG	HA
3-6	配列番号 262	KAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQEKFDLG	NA
3-7	配列番号 263	KAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQEKFDLGA AYEVLSDSEKR	NA
3-8	配列番号 264	LQLHPDRNPDDPQAQEKFDLG	NA
3-9	配列番号 265	LQLHPDRNPDDPQAQEKFDLGAAYEVLSD SEKR	NA
3-10	配列番号 266	IKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQEK FDLG	HA
3-11	配列番号 267	SASIKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQ E	HA
3-12	配列番号 268	SASIKDIKKAYRKLALQLHP	HA
3-13	配列番号 269	IKDIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQ	HA
3-14	配列番号 270	IKDIKKAYRKLALQLHPDRN	HA
3-15	配列番号 271	DIKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAQ	HA
3-16	配列番号 272	IKDIKKAYRKLALQLHPD	HA
3-17	配列番号 273	IKDIKKAYRKLALQL	HA
3-18	配列番号 274	DIKKAYRKLALQL	HA
3-19	配列番号 275	DIKKAYRKLALQ	HA
3-20	配列番号 276	DIKKAYRKLAL	HA
3-21	配列番号 277	DIKKAYRKLA	HA
3-22	配列番号 278	DIKKAYRKL	NA
3-23	配列番号 279	DIKKAYRK	NA
3-24	配列番号 280	DIKKAYR	NA
3-25	配列番号 281	IKKAYRKLALQL	HA
3-26	配列番号 282	KKAYRKLALQL	NA
3-27	配列番号 283	IKKAYRKLALQ	HA
3-28	配列番号 284	IKKAYRKLAL	HA
3-29	配列番号 48	IKKAYRKLA	HA
3-30	配列番号 285	IKKAYRKL	A
3-31	配列番号 286	KKAYRKLALQ	NA
3-32	配列番号 287	KKAYRKLAL	NA
3-33	配列番号 288	KKAYRKLA	NA
3-34	配列番号 289	KAYRKLALQ	NA
3-35	配列番号 290	IKKAYRK	NA

【表 5 8 - 2】

ポリペプチ ド番号	配列番号	ポリペプチドのアミノ酸配列	活性*
		123456789012345678901234567890	
3-36	配列番号 291	IKKAYR	NA
3-37	配列番号 292	IKAYRKLALQ	NA
3-38	配列番号 293	IKKYRKLALQ	A
3-39	配列番号 294	IKKARKLALQ	NA
3-40	配列番号 49	IKKAYKLALQ	HA
3-41	配列番号 50	IKKAYRLALQ	HA
3-42	配列番号 51	IKKAYRKALQ	HA
3-43	配列番号 52	IKKAYRKLLQ	HA
3-44	配列番号 295	IKAYRKLA	NA
3-45	配列番号 53	IKKYRKLA	A
3-46	配列番号 54	IKKAYKLA	A
3-47	配列番号 55	IKKAYRLA	A
3-48	配列番号 56	IKKAYRKA	A
3-49	配列番号 57	LKKAYRKLA	HA
3-50	配列番号 58	VKKAYRKLA	HA
3-51	配列番号 59	MKKAYRKLA	HA
3-52	配列番号 60	AKKAYRKLA	HA
3-53	配列番号 296	SKKAYRKLA	NA
3-54	配列番号 297	FKKAYRKLA	NA
3-55	配列番号 298	IAQAYRKLA	NA
3-56	配列番号 299	ILAAAYRKLA	NA
3-57	配列番号 61	IAKAYRKLA	A
3-58	配列番号 62	IKAAAYRKLA	A
3-59	配列番号 63	IKKRYRKLA	HA
3-60	配列番号 64	IKKSYRKLA	A
3-61	配列番号 65	IKKQYRKLA	A
3-62	配列番号 66	IKKEYRKLA	A
3-63	配列番号 67	IKKFYRKLA	A
3-64	配列番号 68	IKKCYRKLA	A
3-65	配列番号 69	IKKAFRKLA	HA
3-66	配列番号 300	IKKAHRKLA	NA
3-67	配列番号 301	IKKAIRKLA	NA
3-68	配列番号 70	IKKAWRKLA	HA
3-69	配列番号 302	IKKAARKLA	NA
3-70	配列番号 303	IKKASRKLA	NA
3-71	配列番号 304	IKKAYHQLA	NA
3-72	配列番号 305	IKKAYYQLA	NA
3-73	配列番号 306	IKKAYFSLA	NA
3-74	配列番号 307	IKKAYRKQS	NA
3-75	配列番号 308	IKKAYRKQC	NA
3-76	配列番号 309	IKKAYRKDI	NA
3-77	配列番号 71	IKKAYRKQA	HA
3-78	配列番号 72	IKKAYRKMA	HA
3-79	配列番号 73	IKKAYRKIA	A
3-80	配列番号 74	IKKAYRKAA	A

【表 5 8 - 3】

ポリペプチド番号	配列番号	ポリペプチドのアミノ酸配列	活性*
		123456789012345678901234567890	
3-81	配列番号 75	IKKAYRKVA	A
3-82	配列番号 76	IKKAYRKRA	A
3-83	配列番号 77	IKKAYRKL M	HA
3-84	配列番号 78	IKKAYRKLI	HA
3-85	配列番号 79	IKKAYRKL V	HA
3-86	配列番号 80	IKKAYRKL C	A
3-87	配列番号 81	IKKAYRKL S	HA
3-88	配列番号 82	IKKAYRKL Y	A
3-89	配列番号 83	IRKAYRKL S L T L	A
3-90	配列番号 84	IKKQYRL L S L K Y	A
3-91	配列番号 85	IKKAFHKLAMKY	HA
3-92	配列番号 86	IRQAFKKLALKL	A
3-93	配列番号 87	IIKAYRKLALQW	A
3-94	配列番号 88	IARAYRQLARRY	HA
3-95	配列番号 89	IKRAYRRQALRY	HA
3-96	配列番号 90	IKKS Y RKLALKY	HA
3-97	配列番号 91	IKKAYKRLAMKY	HA
3-98	配列番号 310	MRKAYLKKC	NA
3-99	配列番号 311	ILAEFKVRAL	NA

* HA = 高活性（陰性対照（融合タンパク質を含まない）と比較して、Erdj3 タンパク質の全長 J ドメインを用いた場合と同程度にタンパク質発現増強活性が有意に増強された場合を指す； A = 陰性対照（融合タンパク質を含まない）と比較して、タンパク質発現増強活性が改善した場合（タンパク質の産生レベルは一般的には Erdj3 の全長 J ドメインを用いた場合よりも低い）； NA = 陰性対照と比較して活性がない場合

上の表に示すように、各変異ポリペプチドを、I L 1 3 R α 2 - V 5 - F c 標的タンパク質と共発現させた場合の発現増強活性について評価した。発現レベルを、高活性（「HA」）、活性（「A」）、または非活性（「NA」）に分類した。これらの発現レベルの例を図 1 8 の免疫ブロットに示す。融合タンパク質がない場合の I L 1 3 R α 2 - V 5 - F c 標的タンパク質の発現レベルを「非活性」とした。図 1 8 のレーン 2（左から）を参照のこと。上の表 5 8 - 1 でポリペプチド 3 と表記した E r d j 3 の完全な J ドメインをタンパク質 A と連結させた融合タンパク質を共発現させると、分泌された I L 1 3 R α 2 - V 5 - F c 標的タンパク質の発現レベルは著しく増強された。図 1 8 の左から 3 番目のレーンを参照のこと。この発現増強レベルを「高活性」とした。図 1 8 のレーン 4 に示すように、内部に欠失を有する変異体ポリペプチド 3 - 4 5 をタンパク質 A と連結させた融合タンパク質を共発現させると、分泌された I L 1 3 R α 2 - V 5 - F c 標的タンパク質の発現レベルは対照（融合タンパク質なし、図 1 8 のレーン 2）と比較して明らかに有意に増強されたが、その発現レベルは図 1 8 のレーン 3 に示す高活性よりはいくらか低かった。この発現増強のレベルを「活性」とした。対照的に、図 1 8 のレーン 5 に示すように、最小限のポリペプチド配列の置換変異体である 3 - 7 2 をタンパク質 A と連結させた融合タンパク質を共発現させると、図 1 8 のレーン 2 の対照について検出された発現レベルと同程度の発現レベルであった。これを「非活性」とした。

【0 2 8 6】

この分析の結果は、E r d j 3 の J ドメインに含まれるポリペプチド断片 3 - 2 9 が高いタンパク質発現増強活性をもたらす最小限のポリペプチド配列（I K K A Y R K L A；配列番号 4 8）を有することを示している。ポリペプチド 3 - 2 9 配列は J ドメインの α

ヘリックス I I に位置するが、隣接する（C末端側）ループドメインの残基を全く含まない。

【0287】

Jドメイン断片3-29配列の多様な変異体を作製し、タンパク質発現増強活性を評価した。変異配列は上の表に示した。ポリペプチド3-44～3-88を参照のこと。

【0288】

他のJタンパク質のJドメインについても、Erdj3のJドメインに含まれる3-29ポリペプチドと同様の位置に含まれるポリペプチド配列について評価した。これらの配列は上の表に3-89～3-99として示した。これらのポリペプチドのほとんどが、分泌されるIL13Ra2-V5-Fc標的タンパク質の発現増強の分析で完全な活性または部分的な活性を示した。しかし、これらのうち3-98および3-99の2つのポリペプチドは、ポリペプチド3-29とは大きく異なるアミノ酸配列を有し、これらのポリペプチドにはタンパク質発現増強活性もなかった。

【0289】

実施例11. 新規なタンパク質発現増強ポリペプチドのファミリーを定義する構造式

以下はポリペプチド配列の変異データの分析の概要である。この分析によって、Erdj3のJドメインのうちタンパク質発現増強活性をもたらす最小限のポリペプチド断片配列（ポリペプチド3-29；配列番号48）に加え、以下に示す新規なタンパク質発現増強ポリペプチドのファミリーを定義する構造式も見出すことができた。

【0290】

図19は、Erdj3のJドメインと、一連の欠失変異ポリペプチドのアミノ酸配列の比較表を示す。各ポリペプチドを用いて上記のFlagタグで標識したタンパク質A融合タンパク質を構成した非改変配列によって決定した、各ポリペプチドのタンパク質発現増強活性も示す。Flagタグで標識した各タンパク質A融合物とIL13Ra2-V5-Fc標的タンパク質とを共発現する細胞の培地に分泌されたIL13Ra2-V5-Fc標的タンパク質の発現レベルを、上記のように抗V5抗体を用いた免疫ブロットによって決定した。

【0291】

図19に示す欠失変異ポリペプチド3-6、3-7、3-8、3-9はすべてタンパク質発現増強する活性がなく（非活性）、 α ヘリックスI Iのアミノ酸配列が活性に必須であることを示している。図19の欠失変異ポリペプチド3-15および3-17は高活性を保持しており、配列DIKKAYRKLLALQL（配列番号274）が高いタンパク質発現増強活性をもたらすのに十分であることを示している。続いて、このポリペプチドを下の表に示すようにさらに変異分析した。

表59. 変異ポリペプチドのアミノ酸配列およびタンパク質発現増強活性

【0292】

10

20

30

【表 5 9】

PP No.	aa	配列	配列番号	活性
3-18	13	DIKKAYRKLALQL	274	HA
3-19	12	DIKKAYRKLALQ	275	HA
3-20	11	DIKKAYRKLAL	276	HA
3-21	10	DIKKAYRKLA	277	HA
3-22	9	DIKKAYRKL	278	NA
3-23	8	DIKKAYRK	279	NA
3-24	7	DIKKAYR	280	NA
3-25	12	IKKAYRKLALQL	281	HA
3-26	11	KKAYRKLALQL	282	NA
3-27	11	IKKAYRKLALQ	283	HA
3-28	10	IKKAYRKLAL	284	HA
3-29	9	IKKAYRKLA	48	HA
3-30	8	IKKAYRKL	285	A
3-31	10	KKAYRKLALQ	286	NA
3-32	9	KKAYRKLAL	287	NA
3-33	8	KKAYRKLA	288	NA
3-34	9	KAYRKLALQ	289	NA
3-35	7	IKKAYRK	290	NA
3-36	6	IKKAYR	291	NA

最後のアミノ酸が必須である

最初のアミノ酸が必須である

← 特定された最小配列

先に述べたように、ポリペプチド 3 - 2 1 の活性（高活性、HA）とポリペプチド 3 - 2 2 の活性（非活性、NA）との違いから、C 末端のロイシン（L）残基がタンパク質発現増強活性に必須であることがわかった。同様に、ポリペプチド 3 - 2 5 の活性とポリペプチド 3 - 2 6 の活性との違いから、N 末端のイソロイシン（I）が活性に必須であることがわかった。既に述べたように、ポリペプチド 3 - 2 9 は E r d j 3 の J ドメインが完全なタンパク質発現増強活性をもたらすための最小限のポリペプチド配列を定義する。

【0 2 9 3】

以上の結果に加え、以下に概要を示す追加の分析によって、本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドに必須の共通アミノ酸配列を特定するに至った。

【0 2 9 4】

タンパク質発現増強活性を提供するために必須のアミノ酸配列を特定するために、3 - 2 9 配列の各アミノ酸を欠失させ、I L 1 3 R α 2 - V 5 - F c 標的タンパク質を上記の非改変配列で用いてポリペプチドのタンパク質発現増強活性を試験した。

【0 2 9 5】

E r d j 3 の J ドメインのポリペプチド断片の最小配列をもとに、ポリペプチド 3 - 2 9 配列（I K K A Y R K L A；配列番号 4 8）について 9 個のアミノ酸のそれぞれについて以下の変異分析を行った。

（a）3 - 2 9：I K K A Y R K L A（配列番号 4 8）（1 位について、下の解析要約（1）を参照）

（b）3 - 4 4：I K A Y R K L A（配列番号 2 9 5）（非活性；3 位について、下の解析要約（2）を参照）

（c）3 - 4 5：I K K Y R K L A（配列番号 5 3）（活性；4 位について、下の解析要約（3）を参照）

（d）3 - 3 9：I K K A R K L A（配列番号 2 9 4）（非活性；5 位について、下の解析要約（4）を参照）

（e）3 - 4 6：I K K A Y K L A（配列番号 5 4）（活性；6 位について、下の解析要約（5）を参照）

（f）3 - 4 7：I K K A Y R L A（配列番号 5 5）（活性；7 位について、下の解析要約（5）

を参照)

(g) 3 - 4 8 : IKKAYRKA (配列番号 5 6) (活性; 8 位について、下の解析要約 (6) を参照)

(h) 3 - 2 9 : IKKAYRKLA (配列番号 4 8) (高活性; 9 位について、下の解析要約 (6) を参照)

解析要約

(1) IKKAYRKLA (配列番号 4 8)

1 位のアミノ酸が活性に必須である。

J タンパク質メンバー (4 7 種類の J タンパク質) 間で 1 位のアミノ酸を比較した結果、1 位のアミノ酸の割合は以下のとおりであった:

I (3 4 例)、L (6 例)、V (4 例)、M (1 例)、A (1 例)、R (1 例)。

これらのアミノ酸は、A r g (R) を除いてすべて非極性側鎖基を有する。

その他の J タンパク質メンバーに由来する以下の構築物を作製し試験した:

3 - 4 9 : LKKAYRKLA (配列番号 5 7)、高活性

3 - 5 0 : VKKAYRKLA (配列番号 5 8)、高活性

3 - 5 1 : MKKAYRKLA (配列番号 5 9)、高活性

3 - 5 2 : AKKAYRKLA (配列番号 6 0)、高活性

3 - 5 3 : SKKAYRKLA (配列番号 2 9 6)、非活性

3 - 5 4 : FKKAYRKLA (配列番号 2 9 7)、非活性。

したがって、1 位は非極性アミノ酸側鎖基を有するアミノ酸すなわち I、L、V、A、M であることが好ましい。

(2) IK AYRKLA (配列番号 2 9 5)、非活性

このことから 2 つの可能性が示唆される:

a) この位置には 2 個のアミノ酸が必要である。

3 - 5 5 : IAQAYRKLA (配列番号 2 9 8)、非活性

3 - 5 6 : ILAAYRKLA (配列番号 2 9 9)、非活性

何らかの特定のアミノ酸が必要であることが示されている。

b) リジンが 2 個必要であるか、1 個で十分である。

これらの 2 つの位置について J タンパク質メンバー (4 7 種類の J タンパク質) 間で比較したところ、これらの 2 つの位置は以下の割合によっても示されるように、よく保存されていることがわかった:

KK (2 6 例)、KR (5 例)、RK (3 例)、AR (3 例)、KA (2 例)、KQ (2 例)、KL (1 例)、IK (1 例)、NK (1 例)、RQ (1 例)、RD (1 例)、LA (1 例)。

これらは 1 例を除いて、すべて塩基性アミノ酸側鎖を有するアミノ酸を少なくとも 1 個含む。

そこで、以下の置換変異体を作製し試験した:

3 - 5 7 : IAKAYRKLA (配列番号 6 1)、活性

3 - 5 8 : IKAAYRKLA (配列番号 6 2)、活性。

したがって、2 位と 3 位のうち少なくとも一方のアミノ酸が塩基性アミノ酸 K または R であると結論づけられる。

(3) IKK_YRKLA (配列番号 5 3)、活性

この結果は、この位置には何らかのアミノ酸が存在する方が良いが必須ではないことを示している。

この位置について J タンパク質メンバー (4 7 種類の J タンパク質) 間で比較したところ、以下の割合にも示されるように、この位置もよく保存されている:

A (3 6 例)、K (2 例)、R (2 例)、S (2 例)、Q (2 例)、T (1 例)、I (1 例)、E (1 例)。

以下のポリペプチドを構築し試験した:

3 - 5 9 : IKKRYRKLA (配列番号 6 3); 塩基性アミノ酸、高活性

- 3 - 6 0 : IKKSYRKLA (配列番号 6 4) ; 極性無電荷アミノ酸、活性
 3 - 6 1 : IKKQYRKLA (配列番号 6 5) ; 極性無電荷アミノ酸、活性
 3 - 6 2 : IKKEYRKLA (配列番号 6 6) ; 酸性アミノ酸、活性
 3 - 6 3 : IKKFYRKLA (配列番号 6 7) ; 芳香族アミノ酸、活性
 3 - 6 4 : IKKCYRKLA (配列番号 6 8) ; 極性無電荷アミノ酸、活性。

以上の置換変異体から、4 位を欠失させても活性は保持されるため、4 位は 2 0 種類の天然アミノ酸のいずれであってもよいことが結論づけられる。

(4) IKKA_RKLA (配列番号 3 1 2) ; 非活性

この結果は、5 位のアミノ酸が必須であることを示す。

この部分を J タンパク質メンバー (4 7 種類のタンパク質) 間で比較したところ、アミノ酸の分布は以下のとおりであった :

Y (3 4 例)、F (1 0 例)、H (2 例)、I (1 例)。

そこで、以下のポリペプチドを作製し試験した :

- 3 - 6 5 : IKKAFRKLA (配列番号 6 9) : 芳香族アミノ酸、高活性
 3 - 6 6 : IKKAHRKLA (配列番号 3 0 0) : 正電荷アミノ酸、非活性
 3 - 6 7 : IKKAIRKLA (配列番号 3 0 1) : 非極性アミノ酸、非活性
 3 - 6 8 : IKKAWRKLA (配列番号 7 0) : 芳香族 アミノ酸、高活性
 3 - 6 9 : IKKAARKLA (配列番号 3 0 2) : 非極性アミノ酸、非活性
 3 - 7 0 : IKKASRKLA (配列番号 3 0 3) : 非極性アミノ酸、非活性。

したがって、5 位のアミノ酸は芳香族アミノ酸すなわち Y、F または W である。

(5)

IKKAY_KLA (配列番号 3 1 3) 、活性

IKKAYR_LA (配列番号 3 1 4) 、活性

この位置を J タンパク質メンバー (4 7 種類の J タンパク質) 間で比較したところ、少なくとも一方のアミノ酸が塩基性アミノ酸である例は 4 7 例中 4 3 例であった (両方が塩基性アミノ酸である例は 2 3 例、一方が塩基性アミノ酸である例は 2 0 例)。

以下の変異ポリペプチドは 6 位と 7 位の 2 個のアミノ酸が置換されている :

- 3 - 7 1 : IKKAYHQLA (配列番号 3 0 4) 、非活性
 3 - 7 2 : IKKAYYQLA (配列番号 3 0 5) 、非活性
 3 - 7 3 : IKKAYFSLA (配列番号 3 0 6) 、非活性。

したがって、6 位と 7 位のアミノ酸のうち少なくとも一方は塩基性アミノ酸 K または R である。

(6)

IKKAYRK_A (配列番号 5 6) 、活性

IKKAYRK_L (配列番号 3 1 5) 、活性

これらの位置について J タンパク質メンバー (4 7 種類の J タンパク質メンバー) 間で比較したところ、両方が L および A である例は 4 7 例中 2 5 例であり、そのすべての例で L - A であった。これらの位置のアミノ酸のうち少なくとも一方が L または A である例は 1 4 例、L でも A でもない例は 8 例であった。

2 個のアミノ酸を置換して以下の変異ポリペプチドを作製し、活性を試験した :

- 3 - 7 4 : IKKAYRKQS (配列番号 3 0 7) 、非活性
 3 - 7 5 : IKKAYRKQC (配列番号 3 0 8) 、非活性
 3 - 7 6 : IKKAYRKDI (配列番号 3 0 9) 、非活性。

以下の変異ポリペプチドは、記載のとおり 8 位が置換されている :

- 3 - 7 7 : IKKAYRKQA (配列番号 7 1) : 極性アミノ酸、高活性
 3 - 7 8 : IKKAYRKMA (配列番号 7 2) : 非極性アミノ酸、高活性
 3 - 7 9 : IKKAYRKIA (配列番号 7 3) : 非極性アミノ酸、活性
 3 - 8 0 : IKKAYRKAA (配列番号 7 4) : 非極性アミノ酸、活性
 3 - 8 1 : IKKAYRKVA (配列番号 7 5) : 非極性アミノ酸、活性
 3 - 8 2 : IKKAYRKRA (配列番号 7 6) : 塩基性アミノ酸、活性。

【0296】

以下の変異ポリペプチドは、記載のとおり9位が置換されている：

- 3 - 8 3 : IKKAYRKLM (配列番号77) : 非極性アミノ酸、高活性
- 3 - 8 4 : IKKAYRKLI (配列番号78) : 非極性アミノ酸、高活性
- 3 - 8 5 : IKKAYRKLIV (配列番号79) : 非極性アミノ酸、高活性
- 3 - 8 6 : IKKAYRKLIC (配列番号80) : 極性無電荷アミノ酸、活性
- 3 - 8 7 : IKKAYRKLS (配列番号81) : 極性無電荷アミノ酸、高活性
- 3 - 8 8 : IKKAYRKLY (配列番号82) : 芳香族アミノ酸、活性。

その他の変異ポリペプチドの結果は以下のとおりである：

- 3 - 4 2 : IKKAYRKALQ (配列番号51) : LとAの置換、高活性
- 3 - 4 3 : IKKAYRKLQ (配列番号52) : 両方ともL、高活性

したがって、X8とX9のアミノ酸のうち少なくとも一方はLまたはAである。

【0297】

これらの試験から、単離されたタンパク質発現増強Jドメインアナログポリペプチドは以下の式を有することが結論づけられる：

X1 - X2 - X3 - X4 - X5 - X6 - X7 - X8 - X9 (配列番号47)：

(式中、X1はイソロイシン(I)、ロイシン(L)、バリン(V)、アラニン(A)、またはメチオニン(M)であり、

X2およびX3はそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、ただし一方または両方がリジン(K)またはアルギニン(R)であり、

X4は任意のアミノ酸であるか；X1～X3が存在しX5～X9が存在する場合、X4は存在しなくてもよく、

X5はチロシン(Y)、トリプトファン(W)、またはフェニルアラニン(F)であり、X6およびX7はそれぞれ独立して任意のアミノ酸であり、ただし一方または両方がリジン(K)またはアルギニン(R)であるか；X6およびX7のいずれか一方がKまたはRであり、X1～X5が存在しX8およびX9が存在する場合、X6およびX7の他方は存在しなくてもよく、

X8およびX9は任意のアミノ酸であり、ただし一方または両方がロイシン(L)またはアラニン(A)であるか；X8およびX9の一方がLまたはAでありX1～X7が存在する場合、X8およびX9の他方は存在しなくてもよい)。

【0298】

上記の式は、その他のJタンパク質に由来する以下のポリペプチド断片の配列にも当てはまり、これらのポリペプチドはすべて活性を有する：

- 3 - 8 9 : IRKAYRKLSTL (配列番号83) E r d j 1、活性
- 3 - 9 0 : IKKQYRLSLKY (配列番号84) E r d j 2、活性
- 3 - 9 1 : IKKAFHKLAMKY (配列番号85) E r d j 4、高活性
- 3 - 9 2 : IRQAFKKLALKL (配列番号86) E r d j 5、活性
- 3 - 9 3 : IIKAYRKLALQW (配列番号87) E r d j 6、活性
- 3 - 9 4 : IARAYRQLARRY (配列番号88) E r d j 7、高活性
- 3 - 9 5 : IKRAYRRQALRY (配列番号89) H s p 4 0、高活性
- 3 - 9 6 : IKKSYRKLALKY (配列番号90) C S P、高活性
- 3 - 9 7 : IKKAYRKLAMKY (配列番号91) D n a J、高活性

その他のJタンパク質に由来する以下の配列は、上記の式とは一致せず、これらのポリペプチドはタンパク質発現増強活性を有していない：

- 3 - 9 8 : MRKAYLKKC (配列番号310) SV40 Jタンパク質、非活性
- 3 - 9 9 : ILAEFKVRAL (配列番号311) D n a j ホモログサブファミリーCメンバー12、非活性。

【0299】

以上に要約した分析と結果から、上記の式がタンパク質発現増強活性をもたらす新規なポリペプチドのファミリーを定義することがわかる。

実施例 12. Jドメインの最小ポリペプチドによる改変配列での標的タンパク質発現増強

【 0 3 0 1 】

10

【 0 3 0 2 】

【表 6 0】

40

第2の融合タンパク質は、目的の標的タンパク質としてのIL13R α 2TFを、BSC1ポリペプチドの変異型「IL13R α 2TF-BSC1MT」と連結させたタンパク質である。下の表に示すように、IL13R α 2TF-BSC1MTは、BSC1ポリペプチドの2位と3位をK-KからA-Qに変異させたポリペプチドである。BSC1MTポリペプチドは3-55とした。

表61. V5タグで標識したIL13R α 2TF-BSC1MT融合タンパク質のアミノ酸配列

【0303】

【表61】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
IL13R α 2TF-BSC1MT タンパク質	配列番号 317	123456789012345678901234567890 MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKKGTGSEFIAQAYRKLADIGGGS GGSGSGGAAALEGKPIPNNPLLGLDST
IL13R α 2TF	配列番号 317 の第 1-339 残基	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEI KVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLD HFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLH YKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQ SSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNW QYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDH ALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDF YICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLP PVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNE TRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQC WEGEDLSKK
リンカー	配列番号 317 の第 340-345 残基	GTGSEF
BSC1MT	配列番号 317 の第 346-354 残基	IAQAYRKL
リンカー	配列番号 317 の第 355-373 残基	DIGGSGSGSGSGGAAALE
V5 エピトープドメイン	配列番号 317 の第 374-387 残基	GKPIPNNPLLGLDST

IL13R α 2TFタンパク質（標的タンパク質のみ）、IL13R α 2TF-BSC1タンパク質、およびIL13R α 2TF-BSC1MTタンパク質の概略図を図20Aに示す。IL13R α 2TF（対照）、IL13R α 2TF-BSC1、またはIL13R α 2TF-BSC1MTをコードする組換え遺伝子を含むベクターで細胞を形質移入し、上記のように別の培養液中で培養した。上記のように、各培養液から採取した培地を、抗V5抗体を用いた免疫プロットによってタンパク質の存在について分析した。

【0304】

図20Bに示すように、対照細胞の培養液から得た培地では比較的わずかな量のIL13R α 2TFタンパク質が検出された。図20Bのレーン2を参照のこと。対照的に、IL13R α 2TF-BSC1融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターで形質移入した細胞の培地では有意に高いレベルのIL13R α 2TF-BSC1融合タンパク質が検出された。図20Bのレーン3を参照のこと。培地で検出されたIL13R α 2TF-BSC1融合タンパク質の量は、IL13R α 2TF-BSC1MT融合タンパク質をコードするベクターで形質移入した細胞の培地で検出されたタンパク質のレベルと比較しても有意に高かった。後者のタンパク質の発現レベルは、対照細胞で検出されたIL13R α 2TFタンパク質とほぼ同程度の低いレベルであった。図20Bのレーン4を参照のこと。結果は、BSC1ポリペプチド(IKKAYRKLA; 配列番号48)が本発明の

10

【0305】

実施例13. BSC1-タンパク質A融合タンパク質による非改変配列のIL13R α 2TF-V5-Fc標的タンパク質の発現増強

上記のIL13R α 2TF-V5-Fc標的タンパク質の発現を増強するためにBSC1-タンパク質A融合タンパク質を非改変配列で用いることができるかを決定するため、上記Er dj 3のJドメインの最小ポリペプチド断片であるBSC1ポリペプチド(IKKAYRKLA; 配列番号48)を用いて、下の表に示すBSC1-タンパク質A融合タンパク質を構成した。

20

表62. Flagタグで標識したBSC1-タンパク質A融合タンパク質のアミノ酸配列

【0306】

【表62】

タンパク質のドメイン	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flagタグで標識したBSC1-タンパク質A融合物	配列番号318	MGVKVLFALICIAVAEAGTGSGEFIKKAYRKLADIGGGSGGSGGGSGGAAAAADNKFNKEQQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAKKLND SQAPKLEGDYKDDDDK
シグナル配列	配列番号318の第1-17残基	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー1	配列番号318の第18-24残基	GTGSGEF
BSC1ポリペプチド	配列番号318の第25-33残基	IKKAYRKLA
リンカー2	配列番号318の第34-50残基	DIGGGSGGSGGSGGAAAA
タンパク質A	配列番号318の第51-108残基	ADNKFNKEQQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAKKLND SQAPK
リンカー3	配列番号318の第109-111残基	LEG
Flag エピトープタグ	配列番号318の第112-119残基	DYKDDDDK

30

40

IL13R α 2TF-V5-Fc標的タンパク質をBSC1-タンパク質A融合タンパク質の存在下と非存在下で、HEK293細胞内で発現させた。培養液を2日間培養し、培地を回収して遠心分離し、細胞片を除去した。IL13R α 2TF-V5-Fc標的タンパク質の発現は、標的タンパク質とBSC1-タンパク質A融合タンパク質を共発現する細胞の培地ではBSC1-タンパク質A融合タンパク質の非存在下での標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強された(データは示さず)。

【0307】

50

培地で発現された I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質が I L 1 3 結合活性を保持しているか確認するため、下記の結合分析を行った。いずれのタンパク質も発現しなかった細胞（対照）、I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質のみを発現した細胞、I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現した細胞の培養液から得た培地のサンプルに組換えヒト I L 1 3 を添加した。サンプルを I L 1 3 と共に 2 時間インキュベートした。このサンプルを用いて I L 1 3 検出分析を行った（R a y B i o（登録商標）ヒト I L 1 3 E L I S A キット；E L H - I L 1 3 - 0 0 1）。この分析では、ヒト I L 1 3 が I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質に捕捉されるとヒト I L 1 3 の検出量が減少する。図 2 1 B に示すように、いずれのタンパク質も発現しない細胞の培養液から得た培地は、明らかに I L 1 3 に結合せず、このことは吸光度の高さからもわかる（図 2 1 のレーン 1）。I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質のみを発現する細胞の培養液から得た培地ではわずかに I L 1 3 と結合した（レーン 2）が、I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する細胞の培養液から得た培地には有意に高い量の I L 1 3 が結合した（レーン 3）。結果は、I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質がより高レベルで発現された培地により多くのヒト I L 1 3 が結合したことを明確に示している。したがって、より高レベルで培地に発現された I L 1 3 R α 2 T F - V 5 - F c 標的タンパク質は I L 1 3 結合活性を保持していた。

10

【0308】

実施例 1 4. B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質による非改変配列での第 V I I 因子 - V 5 - F c 標的タンパク質の発現増強

20

第 V I I 因子（F V I I）は外因性凝固経路のセリンエステラーゼであり、様々な出血性合併症の治療に広く利用されている。Hedner, Semin. Hematol., 43(suppl 1): S105-S107 (2006)を参照のこと。F V I I と組織因子（tissue factor（T F））との複合体は、リン脂質とカルシウムの存在下で第 X 因子と活性化させ第 X a 因子にする。

【0309】

B S C 1 ポリペプチドを用いて B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質を構成し、この融合タンパク質が非改変配列で F V I I - V 5 - F c 標的タンパク質を増強するのに有効であるかを確認した。

【0310】

30

V 5 タグで標識した F V I I - F c 標的タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 6 3. V 5 タグで標識した F V I I - F c 標的タンパク質のアミノ酸配列

【0311】

【表 6 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した FVII-Fc 標的タンパク質	配列番号 319	MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAGGVAKASGG ETRDMPWKPGPHRVFVTQEEAHGVLHRRRR ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLI CVNENGCGEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGVSCPTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQ GRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGG TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGE HDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVP GTTN HDIALRLHQP VVLT DHVVPLCLPERTFSE RTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVL NVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYM FCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTG IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKL MRSEPRPGVLLRAPFPLEGKPIPNPLLGLD STSRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
FVII	配列番号 319 の第 1-466 残基	MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAGGVAKASGG ETRDMPWKPGPHRVFVTQEEAHGVLHRRRR ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLI CVNENGCGEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGVSCPTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQ GRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGG TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGE HDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVP GTTN HDIALRLHQP VVLT DHVVPLCLPERTFSE RTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVL NVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYM FCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTG IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKL MRSEPRPGVLLRAPFP
リンカー 1	配列番号 319 の第 467-468 残基	LE
V5 エピトープドメイン	配列番号 319 の第 469-482 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー 2	配列番号 319 の第 483-484 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 319 の第 485-715 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

表に示す。

表 6 4. F l a g タグで標識した B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質のアミノ酸配列
【 0 3 1 2 】
【表 6 4】

タンパク質のドメイン	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
Flagタグで標識したBSC1- タンパク質G 融合物	配列番号320	MGVKVLFALICIAVAEAGTGSGEFIKKAYR KLADIGGGSGGSGGSGGAAAATYKLVINGK TLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVD GEWTYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAV TLEGDYKDDDDK
シグナル配列	配列番号320 の 第 1-17 残基	MGVKVLFALICIAVAEA
リンカー1	配列番号320 の 第 18-24 残基	GTGSGEF
BSC1 ポリペプチド	配列番号320 の 第 25-33 残基	IKKAYRKLA
リンカー2	配列番号320 の 第 34-50 残基	DIGGGSGGSGGSGGAAA
タンパク質G	配列番号320 の 第 51-121 残基	TYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFK QYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEKPEVI DASELTPAVT
リンカー3	配列番号320 の 第 122-124 残基	LEG
Flag エピトープタグ	配列番号320 の 第 126-132 残基	DYKDDDDK

いずれのタンパク質も発現しない細胞、F V I I - F c 標的タンパク質のみを発現する細胞、および F V I I - F c 標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質とを共発現する細胞の培地および細胞可溶化物での F V I I - F c 標的タンパク質の発現レベルを、抗 F l a g 抗体を用いた免疫ブロット分析によって測定した。結果を図 2 2 A に示す。図 2 2 A の上図に示すように、培地に分泌された F V I I - F c 標的タンパク質の発現レベルは、F V I I - F c 標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質とを共発現する細胞の培地（レーン 2）では、F V I I - F c 標的タンパク質を単独で発現する細胞の培地（レーン 3）に比べて有意に高かった。図 2 2 A の中央図は抗 F l a g 抗体を用いた細胞可溶化物の免疫ブロットである。免疫ブロットは、B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質が、F V I I - F c 標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質とを発現する細胞で発現されたことを示している。図 2 2 A の下図に示すように、F V I I - F c 標的タンパク質の培地へは有意な量の B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質は分泌されなかった（レーン 3 参照）。

【 0 3 1 3 】

図 2 2 B は図 2 2 A の上図の免疫ブロットに示す培地での F V I I - F c 標的タンパク質の発現に関するシグナルの濃度測定分析の棒グラフを示す。図 2 2 B の棒グラフ 1 ～ 3 は、図 2 2 A の上図の免疫ブロットのレーン 1 ～ 3 のシグナルと対応している。

【 0 3 1 4 】

結果は、B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質と F V I I - F c 標的タンパク質とを共発現させることによって、培地に分泌された標的タンパク質の発現レベルが、B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質の非存在下での標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強されたことを示している。

【 0 3 1 5 】

実施例 1 5. B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質による非改変配列での第 I X 因子

- V 5 - F c 標的タンパク質の発現増強

第 I X 因子は血友病 B の治療に広く利用されており、その F c 融合タンパク質 (F I X - F c) は現在、治験中であり (第 I I I 相) 、良好な結果が得られている (効果の持続) 。

【 0 3 1 6 】

この実験では、上記の B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質による、非改変配列での F I X - F C 標的タンパク質の発現レベルに対する効果を決定する。

【 0 3 1 7 】

V 5 タグで標識した F I X - F c 標的タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 6 5 . V 5 タグで標識した F I X - F c 標的タンパク質のアミノ酸配列

10

【 0 3 1 8 】

【表 6 5】

タンパク質の領域 (N末端からC末端方 向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した FIX-Fc 融合分子	配列番号 321	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTV FLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL ERECMEEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQ YVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP FGFEGKNCELDVTCNINKGRCEQFCKNSAD NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR VSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVE TGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRNVIIRII PHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSY VTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVF HKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTI YNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVE GTSFLTGLISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRV VNWIKEKTKLTLEGKPIPNPLLGLDSTSRP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
FIX	配列番号 321 の第 1-461 残基	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTV FLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL ERECMEEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQ YVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP FGFEGKNCELDVTCNINKGRCEQFCKNSAD NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR VSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVE TGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRNVIIRII PHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSY VTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVF HKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTI YNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVE GTSFLTGLISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRV VNWIKEKTKLT
リンカー1	配列番号 321 の第 462-463 残基	LE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 321 の第 464-477 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー2	配列番号 321 の第 478-479 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 321 の第 480-710 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図 2 3 A は、培地に分泌された F I X - F c 標的タンパク質の発現を示し、F I X - F

10

20

30

40

50

c 融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の場合（レーン 2）および F I X - F c 融合タンパク質と B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（レーン 3）を示す。図 2 3 A のレーン 1 は、発現しない細胞の培地を対照として示す。図 2 3 A のレーン 2 に示すように、F I X - F c 標的タンパク質を単独で発現する細胞によって少量の F I X - F c 標的タンパク質が分泌されている。しかし、図 2 3 A のレーン 3 に明らかに示されるように、F I X - F c 標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを発現する細胞では培地に分泌された標的タンパク質の発現レベルは有意に増強されている。図 2 3 B は、図 2 3 A の免疫ブロットにおけるシグナルの濃度測定分析の棒グラフを示す。図 2 3 B の棒グラフ 1 ～ 3 は図 2 3 A のレーン 1 ～ 3 のシグナルと対応する。

10

【0319】

結果は、B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質と F I X - F c 標的タンパク質とを共発現させることによって、培地に分泌された標的タンパク質の発現レベルが、B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質がない場合のレベルと比較して有意に増強されたことを明確に示している。

【0320】

実施例 16. B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質による非改変配列での第 V I I I 因子 - V 5 - F c 標的タンパク質の発現増強

第 F V I I I 因子の生物学的重要性は、血友病 A について実証されている。血友病 A は主に男性に起こる先天性の出血障害であり、X 染色体関連性の第 F V I I I 因子欠損が原因である。標準の治療には、止血に必要な欠けている F V I I I の補充が含まれる。血友病 A 患者の体内での F V I I I 活性の半減期を延長する F V I I I - F c 融合タンパク質が開発された (Powell et al., Blood, 119(13): 3031-3037 (2012))。融合タンパク質は 2013 年に米国食品医薬品局 (United States Food and Drug Administration) に承認された (E L O C T A T E (商標) (Biogen Idec))。

20

【0321】

この実験では、上記の B S C 1 - タンパク質 G 融合タンパク質による、非改変配列の場合の、V 5 タグで標識した F V I I I - F c 標的タンパク質の発現レベルに対する効果を調べた。V 5 タグで標識した F V I I I - F c 標的タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

30

表 6 6 - 1 ～ 表 6 6 - 4. V 5 タグで標識した F V I I I - F c 標的タンパク質のアミノ酸配列

【0322】

【表 6 6 - 1】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した FVIII-Fc 融合分子	配列番号 322	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVE LSWDYMQSDLGELPVDARFFPRVPKSPFN TSVVYKKTLEVEFTDHLFNIAPRPPWMGL LGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP GSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQT LHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRD AASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNH RQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCH ISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNE EAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLA PDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGP TKSDPRCLTRYSSFNMERDLASGLIGPL LICYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDE NRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDLQSLVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVEDTLTLF PFSGETVFMSEMPGLWILGCHNSDFRNRG MTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLL SKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI PENDIEKTDWFHARTPMPKIQNVSSDDL MLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDPS PGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHSMDVFTF ESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPV HYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDKLLLESGLMNSQESSWGKNVSSSTESGR LFKKGKRAHGPAALLTKDNALFKVSIKLTN KTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN ILESDETFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRL NHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQN PDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSG QGSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLEKKNKV VGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNLDN LHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVL PQIHTVTGTFKNFMKNLFLSTRQNVESYD GAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTAHFSK GEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNT SQQNFVTQSKRALKQFRLPLEETELEKRI IVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKE KGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPPLPIA KVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASY RKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLE MTGDQREVGSGLGTSATNSVTYKKVENTVLP KPDLPKTSKGVELLPKVHIYQKDLFPPTETS NGSPGHLDLVEGSLQGTGAIKWNEANRP GKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHY GTQIPKEEWKSQEKSPKTAFAKKKDTILSL

【表 6 6 - 2】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890 NACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGR TERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEE IDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSF QKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNR AQSGSVPQFKKVVFQFTDGSFTQPLYRGE LNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASR PYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVVKPNE TKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDV DLEKDVHSGSLIGPLLCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETCKSWYFTENMERNCR PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGH VFTVRKKBEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKK WQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFN PPIIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMGCDL NSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFA TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQ VDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFL ISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFT PVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRM EVLGCEAQDLYLEGKPIPNPLLGLDSTSRP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
FVIII	配列番号 322 の第 1-2351 残基	MQIELSTCFFLCCLRFCFSATRRYYLGAVE LSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSF PFN TSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAKPRPPWML LGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP GSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQT LHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRD AASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNH RQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCH ISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNE EAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIFI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLA PDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGD TLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGP TKSDPRCLTRYYSFVNMRDLASGLIGPL LICYESVDQRGNQIMSDKRNILFSVFDE NRSWYLTENIQRFLENPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLF

【表 6 6 - 3】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
		PFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRG MTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLL SKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTI PENDIEKTDPFWAHRTMPKIQNVSSDLL MLLRQSPTPHGLSLSDLQBAKYETFSDDP PGAIDSNNLSLSEMTFRPQLHHSGDMVFTF ESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSPMPV HYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDKSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGR LFKKGKRAHGPALLTKDNALFKVVISLLKTN KTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN ILESDETFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRL NHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQN PDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSG QGPSPKQLVSLGPEKSVQGNFLSEKNKV VGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNLDN LHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVL POIHTVTGTFKNFMKNLFLSTRQNVESYD GAYAPVLQDFRSLNDSTNRKKHTAHFSKK GEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNT SQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRI IVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKE KGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIA KVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASY RKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAITLLE MTGDQREVGSGLTSATNSVTYKKVENTVLP KPDLPKTSKGVELLPKVHIYQKDLFPTETS NGSPGHLDLVEGSLQGTGAIKWNEANRP GKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHY GTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKKDTILSL NACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGR TERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEE IDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSF QKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRN AQSGSVPPQFKKVVFQFTDGSFTQPLYRGE LNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASR PYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKPNE TKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDV DLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETFSWYFTENMERNCR PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGH VFTVRKKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKK WQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FN PPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDL NSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFA TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQ VDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFL ISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFT PVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRM EVLGCEAQDLY

10

20

30

40

【表 6 6 - 4】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
リンカー	配列番号 322 の第 2352-2353 残基	LE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 322 の第 2354-2367 残基	GKPIPNPLLGLDST
リンカー	配列番号 322 の第 2368-2369 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 322 の第 2370-2600 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP VLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

この実験では、BSC1 - タンパク質G融合タンパク質の存在下と非存在下でのFVII - Fc 標的タンパク質の発現レベルを調べた。いずれのタンパク質も発現しない細胞 (HEK293) の培養液から得た培地と、FVII - Fc 標的タンパク質のみを発現する細胞の培養液から得た培地と、BSC1 - タンパク質G融合タンパク質とFVII - Fc 標的タンパク質とを共発現する細胞の培養液から得た培地を、市販の酵素結合免疫分析 (ELISA) (Visulize (商標) FVII 抗原キット (Affinity Biologics Inc.)) によってFVIIについて分析した。450nmでの吸光度の棒グラフとして結果を図24に示す。空のベクターで形質移入したタンパク質を発現しない細胞培地を陰性対照とした (図24の左から1番目の棒グラフ)。ヒト血清を陽性対照として用いた (図24の右側の左から4番目の棒グラフ)。結果は、BSC1 - タンパク質G融合タンパク質とFVII - Fc 標的タンパク質とを共発現させることによって、培地に分泌されたFVII - Fc 標的タンパク質の発現レベル (図24の左から3番目の棒グラフ) が、BSC1 - タンパク質G融合タンパク質がない場合の標的タンパク質の発現レベル (図24の左から2番目の棒グラフ) と比較して有意に増強されたことを示している。

20

30

【0326】

実施例17. BSC1 - タンパク質A融合タンパク質による非改変配列での抗IL8抗体標的タンパク質の発現増強

この実験では、上記のBSC1 - タンパク質A融合タンパク質を非改変配列で用いてHEK293形質移入細胞での抗IL8抗体標的タンパク質の発現レベルを改善できるかを調べた。

【0327】

培地での抗IL8抗体の発現を、抗IgG抗体を用いた免疫ブロットによって測定した。図25Aの免疫ブロットに示すように、抗IL8抗体標的タンパク質をBSC1 - タンパク質A融合タンパク質と共発現させることによって、培地に分泌された抗体の発現レベル (図25Aの下部、第3列) が、抗体を単独で発現する細胞で発現された抗体のレベル (図25Aの中央、第2列) と比較して有意に増強された。図25Aの第1列は、いずれのタンパク質も発現しない対照細胞を含む疑似培養液から得た培地には抗体が分泌されなかったことを示す。

40

【0328】

図25Aの列に示すドットブロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を図25Bの各棒グラフに示す。図25Bの棒グラフの番号は図25Aの列番号と対応している。この一連の実験の結果は、抗IL8抗体標的タ

50

ンパク質を、B S C 1 ポリペプチドをタンパク質 A（標的タンパク質結合ドメイン）と連結させた本発明の融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗 I L 8 抗体の発現が有意に増強されたことを明確に示している。

【0329】

図 25C は、E L I S A 分析の結果を示す。精製した組換えヒト I L 8 を 96 穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗 I L 8 抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：抗 I L 8 抗体を単独で発現する形質移入細胞の培地（レーン 2）；および抗 I L 8 抗体標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する細胞の培地（レーン 3、B S C 1 - タンパク質 A）。疑似培養液には、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた（レーン 1、抗 I L 8 抗体なし）。結果は、B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質と共発現された場合により高レベルで発現され分泌された抗 I L 8 抗体がヒト I L 8 結合活性を保持していたことを明確に示している。

10

【0330】

実施例 18. B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質による非改変配列での治療用抗 V E G F 抗体（ベバシズマブ）標的タンパク質の発現増強

この実験では、上記の B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質を非改変配列で用いて治療用抗体の発現レベルを改善できるかを調べた。

【0331】

ベバシズマブ（A v a s t i n（登録商標）、G e n e n t e c h / R o c h e）は、血管内皮増殖因子 A（V E G F - A）を阻害することによって血管新生を阻害するヒト化モノクローナル抗体である。2010 年のベバシズマブの売上高は 70 億ドル近く、他のどの抗体医薬をも上回った。ベバシズマブを標準の治療に加えることによって、乳がん患者および肺がん患者の寿命を数か月延長することができ、米国での現在の費用は年間約 100,000 ドルである。

20

【0332】

ベバシズマブの軽鎖および重鎖のアミノ酸配列を下の表に示す。

表 67. ベバシズマブの軽鎖および重鎖のアミノ酸配列

【0333】

【表 6 7】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
軽鎖	配列番号 323	MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTTITCSASQDISNYLNWYQQKPG KAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
重鎖	配列番号 327	MGWSLIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFS LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPH YYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NRYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

抗 V E G F 抗体ベバシズマブ（標的タンパク質）をヒト細胞内で、B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質の存在下と非存在下で発現させた。疑似培養液には、いずれのタンパク質も発現しない細胞を入れた。細胞培養液から採取した培地のサンプルを、抗ヒト I g G 抗体を用いた免疫ブロット分析で抗体について分析した。

30

【 0 3 3 4 】

図 2 6 A は、培地に分泌されたベバシズマブ（抗 V E G F 抗体）の発現に関するドットブロット分析を示し、ベバシズマブを単独で発現する形質移入細胞の場合（中央列）およびベバシズマブと B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（下列）を示す。図 2 6 A の上列は、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない対照細胞を含む疑似培養液の培地には抗体が分泌されなかったことを示している。結果は、ベバシズマブ標的タンパク質と B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質とを形質移入細胞内で共発現させることによって、培地に分泌されたベバシズマブの発現レベルが、ベバシズマブを単独で発現する細胞の培養液の培地に分泌された抗体のレベルと比較して有意に増強されたことを示している。

40

【 0 3 3 5 】

図 2 6 B は、図 2 6 A の各列のドットブロットの化学発光シグナルを NIH ImageJ 画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図 2 6 B の棒グラフの番号は図 2 6 A の列番号と対応している。この一連の実験の結果は、抗 V E G F 抗体標的タンパク質を B S C 1 - タンパク質 A 融合タンパク質と共発現させることによって、培地に分泌された抗 V E G F 抗体の発現レベルが有意に増強されたことを明確に示している。

【 0 3 3 6 】

図 2 6 C は、培地での抗 V E G F 結合活性を E L I S A 法で検出した結果を示す。精製した組換えヒト V E G F - A を 9 6 穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌されたベバシ

50

ズマブ（抗VEGF抗体標的タンパク質）を加えてインキュベートした：抗VEGF抗体を単独で発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ2）；または抗VEGF抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ3）。図26Cの棒グラフ1は、いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた疑似培養液の培地には有意なVEGF結合活性がなかったことを示している。結果は、BSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合により高レベルで発現され分泌された抗VEGF抗体がヒトVEGF-A結合活性を保持することを明確に示している。

【0337】

実施例19. BSC1-タンパク質A融合タンパク質による非改変配列での治療用抗TNF α 抗体（アダリムマブ）標的タンパク質の発現増強

この実験では、上記のBSC1-タンパク質A融合タンパク質を非改変配列で用いて治療用TNF α 抗体（アダリムマブ；Humira（登録商標）、AbbVie）の発現レベルを改善できるかを調べた。

表68. アダリムマブの軽鎖および重鎖のアミノ酸配列

【0338】

【表68】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列
		123456789012345678901234567890
軽鎖	配列番号 324	MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRSSQGIRNYLHWYQQKPG KAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
重鎖	配列番号 328	MGWSLIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGL VQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図27Aは、培地に分泌された抗TNF α 抗体（標的タンパク質）の発現に関するドットブロット分析を示し、TNF α 抗体を単独で発現する形質移入細胞の場合（中央列）および抗TNF α 抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（図27Aの下列）を示す。いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターで形質移入した細胞を含む疑似培養液の培地では抗TNF α 抗体は検出されなかった（図27Aの上列）。培地での抗TNF α 抗体の発現について、抗ヒトIgG抗体を用いたドットブロット分析で分析した。形質移入細胞内で抗TNF α 抗体をBSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた（最下列）ことによって、培地に

分泌された抗TNF α 抗体の発現レベルが、抗TNF α 抗体を単独で発現する形質移入細胞で発現された抗体のレベル（中央列）と比較して有意に増強されたことがわかる。

【0339】

図27Bは、図27Aの各列のドットプロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図27Bの棒グラフの番号は図27Aの列番号と対応している。この一連の実験の結果は、抗TNF α 抗体標的タンパク質を、BSC1ポリペプチドを標的結合ドメイン（タンパク質A）と連結させた融合タンパク質と共発現させることによって、分泌された抗TNF α 抗体の発現レベルが有意に増強されたことを明確に示している。

10

【0340】

図27Cは、発現された抗TNF α 抗体のTNF α 結合活性をELISA法で検出した結果を示す。精製した組換えヒトTNF α を96穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗TNF α 抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：抗TNF α 抗体を単独で発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ2）；または抗TNF α 抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の培地（棒グラフ3）。いずれのタンパク質を発現するための構造遺伝子も含まない発現ベクターを用いて形質移入した細胞を入れた疑似培養液の培地では、TNF α 結合活性は検出されなかった（棒グラフ1）。この一連の実験の結果は、BSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合により高レベルで発現され分泌された抗TNF α 抗体がヒトTNF α 結合活性を保持していたことを明確に示している。

20

【0341】

実施例20. BSC1-タンパク質A融合タンパク質を非改変配列で用いた場合のCHO-D12細胞株で確立されている抗IL8抗体の発現に対する増強

この実験では、上記の実施例8と同様の設計で、商業価値のある確立されたCHO-DP12細胞株(American Type Culture Collection受託番号CRL-124444、American Type Culture Collection（バージニア州、マナナス）)で既に安定に産生されている抗IL8抗体の発現レベルを、BSC1-タンパク質A融合タンパク質によって増強することができるかを調べた。

【0342】

図28Aは、培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）の発現に関する免疫ドットプロット分析を示し、抗IL8抗体を単独で発現するCHO-DP12細胞株の細胞の場合（中央列2）、および抗IL8抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現する形質移入細胞の場合（最下列3）を示す。抗体をBSC1-タンパク質A融合分子と共発現させたことによって、培地に分泌された抗体の発現のレベル（最下列3）が、BSC1-タンパク質A融合分子の非存在下で発現された抗体のレベル（列2）と比較して有意に増強されたことがわかる。培地のみでは抗体は検出されなかった（図28Aの上列1）。

30

【0343】

図28Bは、図28Aの各列のドットプロットの化学発光シグナルをNIH ImageJ画像処理プログラムを用いて濃度測定分析した結果を示す。図28Bの各棒グラフの番号は、図28Aの各列の番号と一致している。結果は、抗体をBSC1-タンパク質A融合分子と共発現させた結果（棒グラフ3）、分泌された抗体の発現が有意に増強され、抗体をBSC1-タンパク質A融合分子の非存在下で発現させた場合に得られた発現レベル（棒グラフ2）の約4～5倍に発現レベルが増強されたことを示している。

40

【0344】

図28Cは、IL8結合性をELISA法で分析した結果を示す。精製した組換えヒトIL8を96穴プレートに塗布し、以下の培地に分泌された抗IL8抗体（標的タンパク質）を加えてインキュベートした：安定に抗IL8抗体を単独で発現する細胞の培地（棒グラフ2）；または抗IL8抗体とBSC1-タンパク質A融合タンパク質とを共発現す

50

る細胞の培地（棒グラフ3）。細胞培地を陰性対照として用いた（棒グラフ1、抗IL8抗体なし）。この一連の実験の結果は、BSC1-タンパク質A融合タンパク質と共発現させた場合により高レベルで発現され分泌された抗IL8抗体がIL8結合活性を保持していたことを明確に示している。

【0345】

結果は、BSC1-タンパク質A融合タンパク質を非改変配列で用いることによって、商業価値のある確立された産生細胞株で既に安定に発現されている標的タンパク質の産生レベルを有意に増強することができることを示している。

【0346】

実施例21. 分泌される $\alpha 1$ アンチトリプシンZタンパク質の発現増強

10

この実験は、本発明によるタンパク質発現の増強が、重要なタンパク質の立体構造が不適切であるために起こる疾患を治療するのに有効であることを示す。

【0347】

$\alpha 1$ アンチトリプシン(AAT)欠損症は、男女とも罹患する常染色体遺伝疾患である。AATは主に肝臓で産生される52kDaのセリンプロテアーゼ阻害因子である。AAT欠損症に関連するプロテアーゼ阻害因子1(PI)遺伝子の染色体14について90種以上の遺伝子変異体が同定されている。AAT欠損症の理由として最も一般的なものはZ変異体であり、1つの塩基対が置換され、コドン342のGluをLysに変える(Glu342Lys)。Z変異を有する変異型AATタンパク質(AATZタンパク質)のセリンプロテアーゼ活性は野生型AATタンパク質の約80%である。また、AATZタンパク質は折り畳みによる正常な立体構造を確立することができないため、小胞体(ER)内で蓄積し凝集体となる。凝集したAATZが肝細胞に蓄積すると、肝毒性や肝硬変を引き起こす。

20

【0348】

この実験では、標的タンパク質は改変AAT-Fc融合タンパク質とV5タグで標識した改変 $\alpha 1$ AATZ-Fc融合タンパク質とした。AAT-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列は、上記の実施例4.3に記載のものと同様である。AATZ-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列を下の表に示す。

表69. V5タグで標識した $\alpha 1$ AATZ-Fc標的タンパク質のアミノ酸配列

【0349】

30

【表 6 9】

タンパク質の領域 (N末端からC末端 方向に記載)	配列番号	アミノ酸配列 123456789012345678901234567890
V5 タグで標識した α1AATZ-Fc 融合分 子	配列番号 325	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAFAFSL LYRQLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGF QELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGFLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTLDKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKAVHKA VLTIDKKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGT GSEFDIAAALEGGKPIPNPLGLDSTSRPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
α1AATZ	配列番号 325 の第 1-418 残基	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGD AAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAFAFSL LYRQLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSL GTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGF QELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGFLFLSEGLKL VDKFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQ INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVN YIFFKGKWERPFVEKDTTEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTLDKSVLGQL GITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKAVHKA VLTIDKKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF NKPFFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
リンカー 1	配列番号 325 の第 419-431 残基	GTGSEFDIAAALE
V5 エピトープドメイ ン	配列番号 325 の第 432-445 残基	GKPIPNPLGLDST
リンカー 2	配列番号 325 の第 446-447 残基	SR
Fc ドメイン	配列番号 325 の第 448-678 残基	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSV VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図 29 A は、V5 タグで標識した AAT - Fc 融合タンパク質と AATZ - Fc 融合タ

ンパク質の発現を検出するために行った抗V5抗体を用いたウェスタンブロット分析における化学シグナルの画像を示す。図29Aの上図のレーン1は、発現のない細胞培地を対照として示す。上図のレーン2は、AAT-Fcを単独で発現する細胞の培地を示す。野生型AATタンパク質について予測されるように、AAT-Fc融合物が培地に分泌された。図29Aの上図のレーン3は、AATZ-Fc融合タンパク質を単独で発現する形質移入細胞の培養液の培地には、AATZ-Fcタンパク質が分泌された場合でもほとんど分泌されなかったことを示している。小胞体に留まることが知られているAATZタンパク質について予測されるように、AATZ-Fc融合タンパク質はAATZ-Fcタンパク質を単独で発現する細胞の細胞可溶化物で検出された。中央図のレーン3を参照のこと（細胞可溶化物）。意外にも、図29Aの上図のレーン4に示すように、AATZ-Fc 10
タンパク質とBSC1-タンパク質A融合タンパク質を共発現させた結果、培地に分泌されたAATZ-Fcタンパク質の発現レベルが著しく増加した。さらに、細胞可溶化物では、AATZ-Fc融合タンパク質が検出されたとしてもほとんど見られなかった（図29Aの中央図、レーン4）。抗チューブリン抗体を用いて同じ膜にブロッティングし、負荷対照とした。

【0350】

結果は、BSC1-タンパク質A融合タンパク質を共発現させることによって、培地に分泌されたAATZ-Fc標的タンパク質の発現レベルが、BSC1-Fcタンパク質A融合タンパク質の非存在下での標的タンパク質の発現レベルと比較して有意に増強されたことを明確に示している。さらに、細胞可溶化物では検出されたとしてもほとんどAAT 20
Z-Fcタンパク質が見られず、このことはAATZ-Fcタンパク質が小胞体に留まっていなかったことを示す。したがって、これらのデータから、AATZ結合ドメインと本発明のタンパク質発現増強ポリペプチドとを含む融合タンパク質を提供する遺伝子治療が、個体の細胞から分泌されたAATZタンパク質の発現を増強し、AATZが小胞体に留まることによる肝毒性を除去または低減し、必要なレベルの細胞外AATセリンプロテアーゼ活性を個体に回復させることによってZ変異に起因するAAT欠損症の個体を治療するのに有効であることが初めて示唆される。

【0351】

以上の本文に引用したすべての特許、出願、および公報の内容は参照により本明細書に組み込まれる。 30

【0352】

本発明の開示または以下の特許請求の範囲から逸脱しない範囲で、本明細書に記載した本発明のその他の変更および態様が当業者に明らかである。

【図 1】



図1A

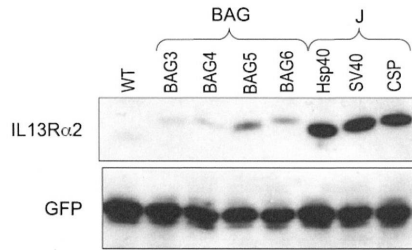


図1B

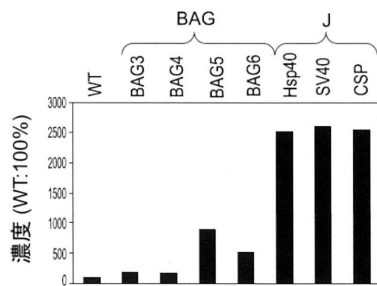
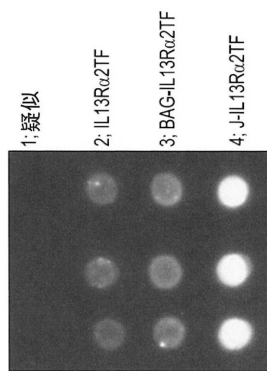


図1C

【図 3】



分泌されたIL13R α 2
(切断型)

図3A

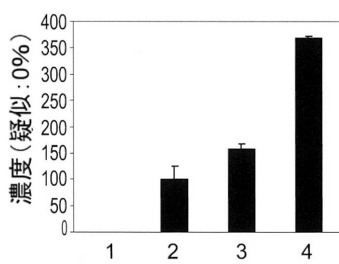


図3B

【図 2】



図2A

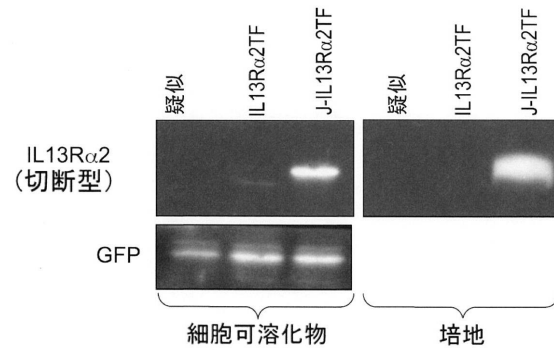


図2B

【図 4】

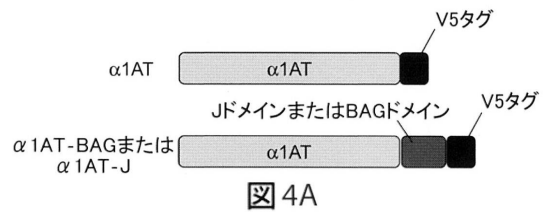


図4A

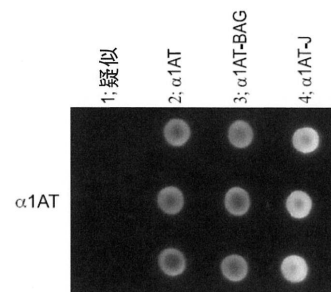


図4B

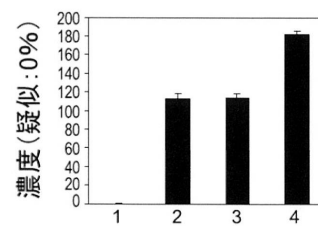
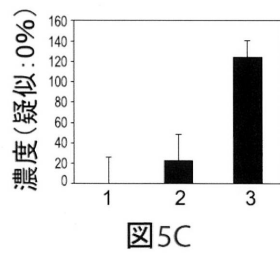
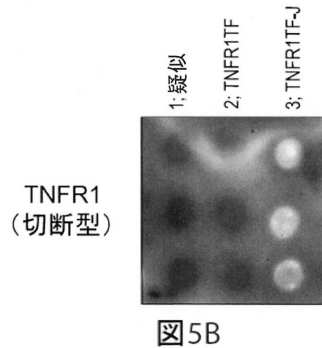
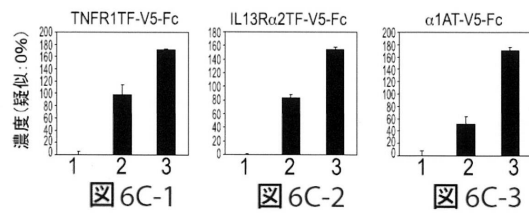
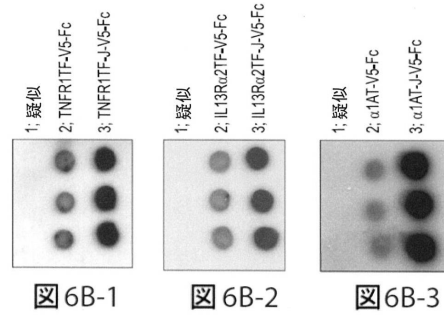
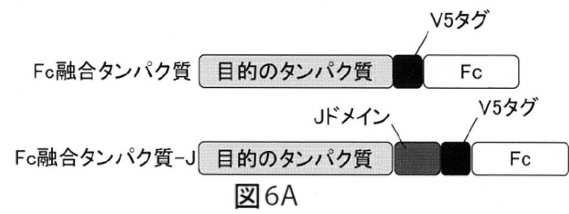


図4C

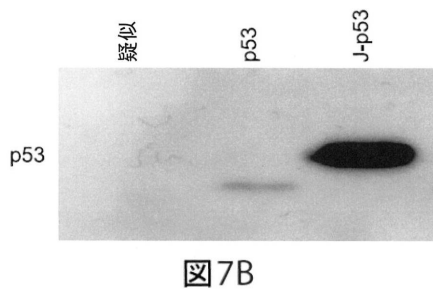
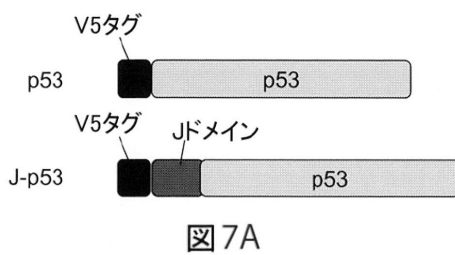
【図 5】



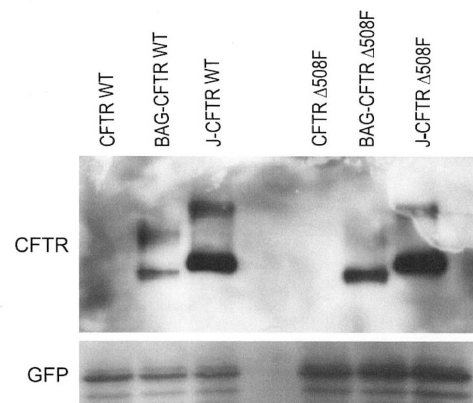
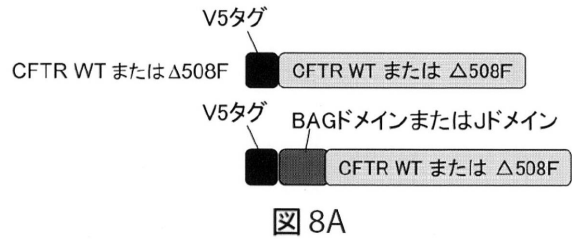
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】

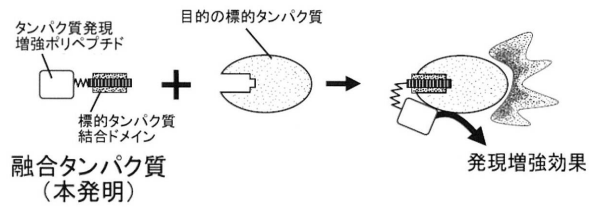


図 9A

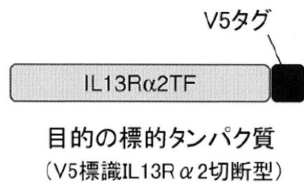


図 9B

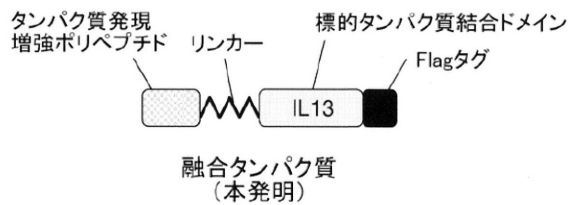


図 9C

【図 11】

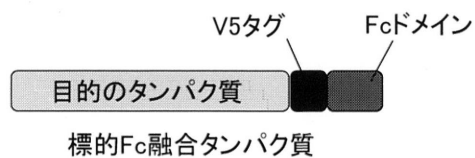


図11A

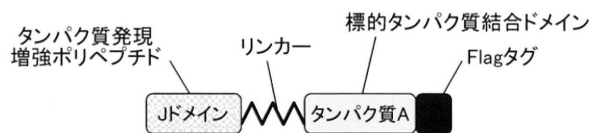
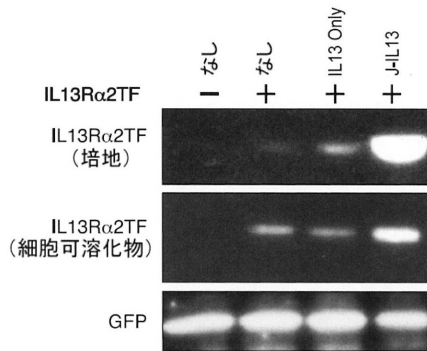


図11B

【図 10】



【図 12】

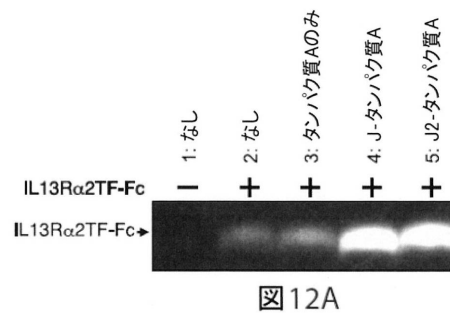


図 12A

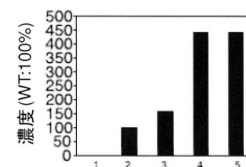


図 12B

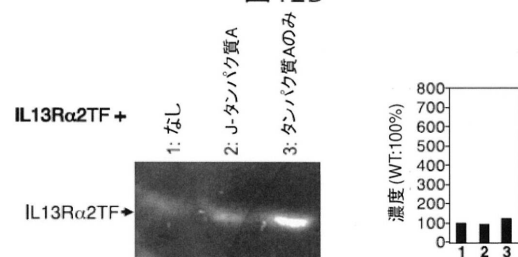


図 12C

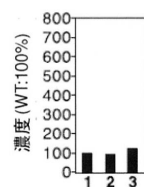
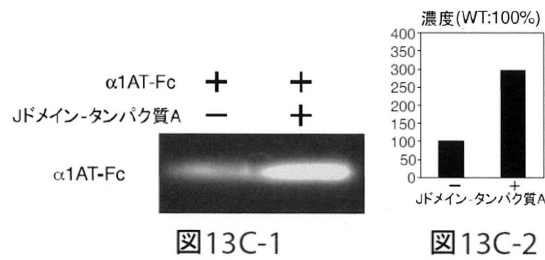
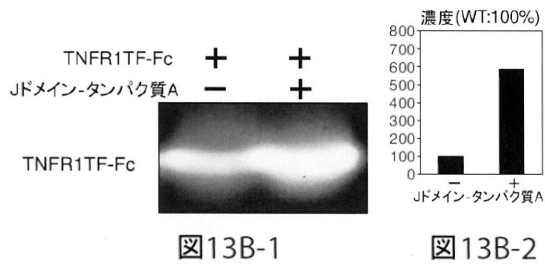
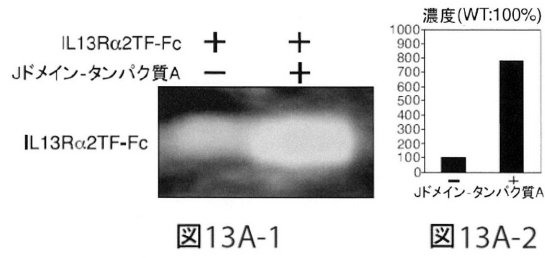
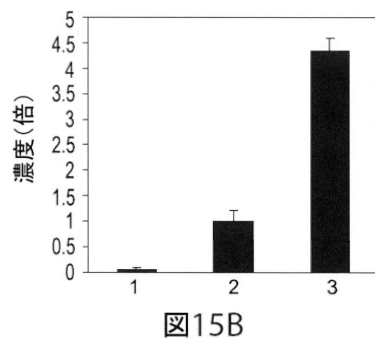
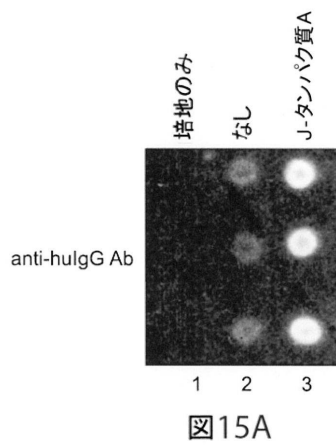


図 12D

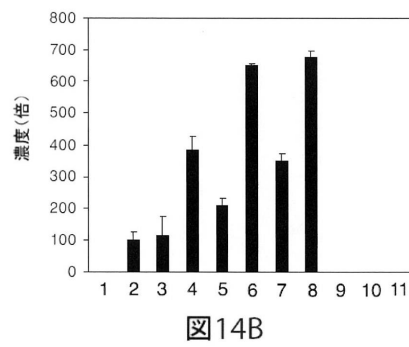
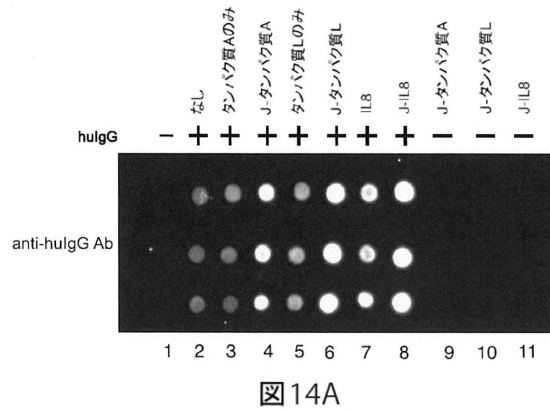
【図 1 3】



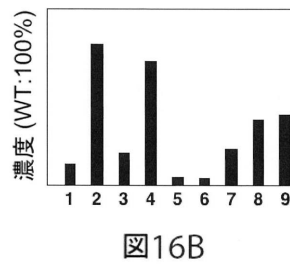
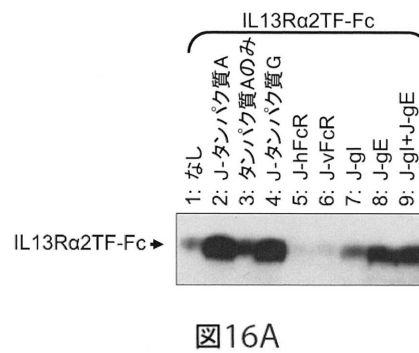
【図 1 5】



【図 1 4】



【図 1 6】



【図 17】

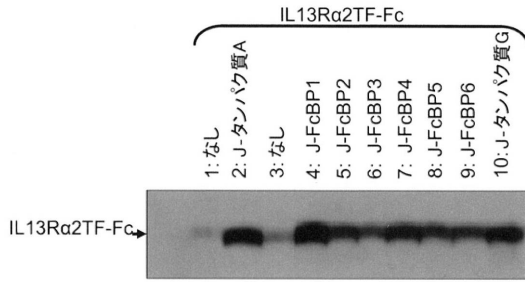


図17A-1

FcBP1: DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:240)
 FcBP2: HWRGWV (SEQ ID NO:241)
 FcBP3: HVHYYW (SEQ ID NO:242)
 FcBP4: YYWLHH (SEQ ID NO:243)
 FcBP5: HVHYY (SEQ ID NO:244)
 FcBP6: YYWL (SEQ ID NO:245)

図17A-2

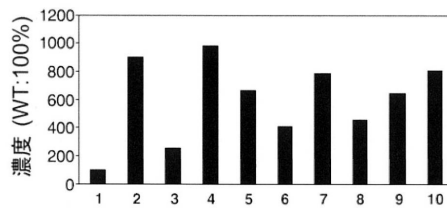


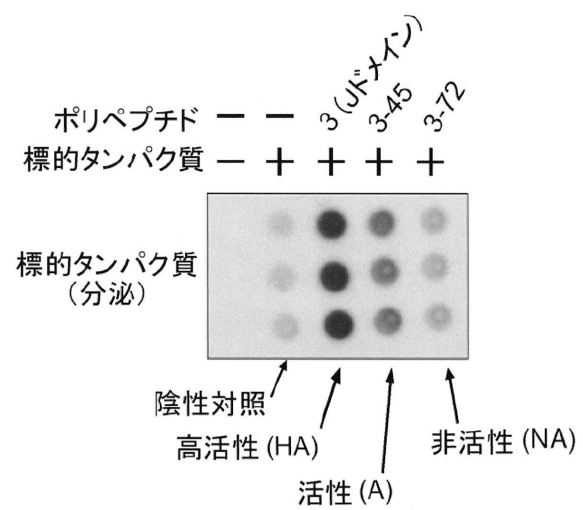
図17B

【図 19】

ポリペプチド番号	長さ (アミノ酸)	アミノ酸配列	活性	配列番号
3	61	GRDFYKILGVPRASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	92
3-1	55	ILGVPRASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	93
3-2	49	SASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	94
3-3	49	GRDFYKILGVPRASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	95
3-4	43	ILGVPRASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	96
3-5	37	SASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	97
3-6	29	KAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	98
3-7	41	KAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	99
3-8	22	ILQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	100
3-9	34	ILQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	101
3-10	31	IKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	102
3-11	31	SASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	103
3-12	23	SASIKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	104
3-13	28	IKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	105
3-14	26	IKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	106
3-15	26	IKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	107
3-16	18	IKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	108
3-17	15	IKDKKAYRKLALQLHPDRNPDDPQAEKFDLGAAYEVLSDSEKR	HA	109

HA = 高活性
NA = 非活性

【図 18】



【図 20】

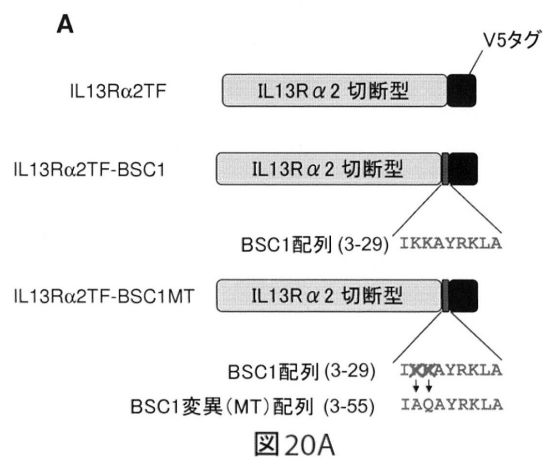


図20A

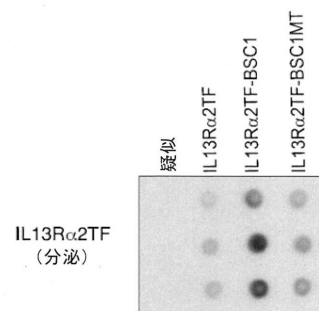
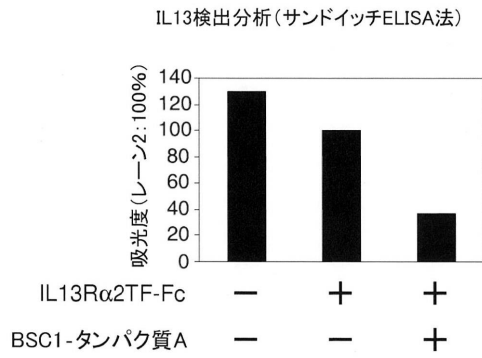


図20B

【図 2 1】



【図 2 2】

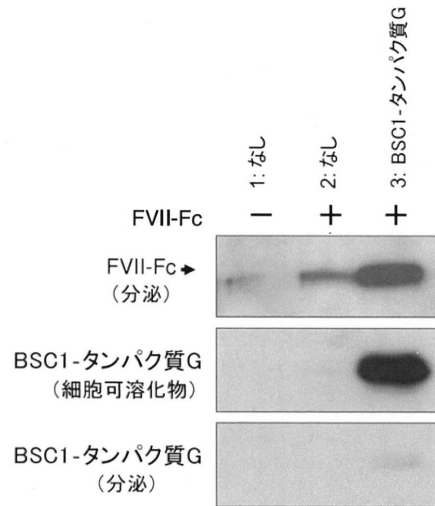


図 22A

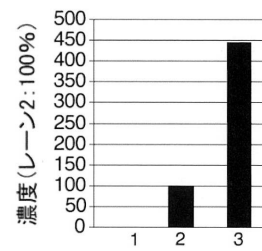


図 22B

【図 2 3】

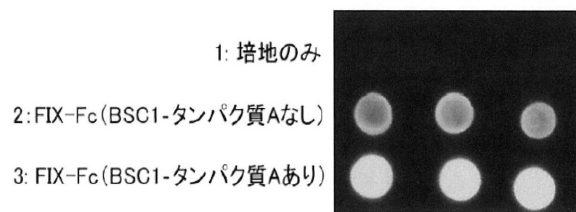


図 23A

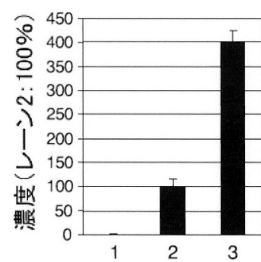
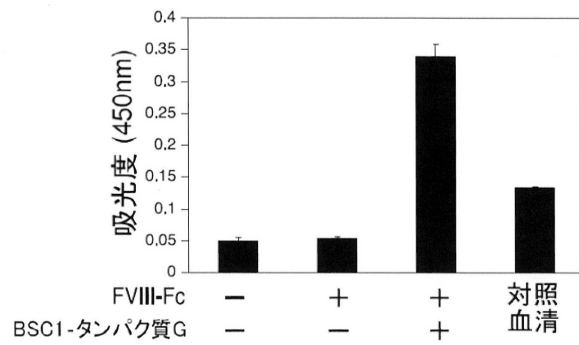


図 23B

【図 2 4】



【図 2 5】

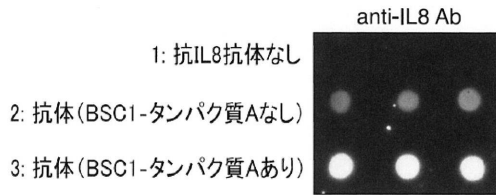


図 25A

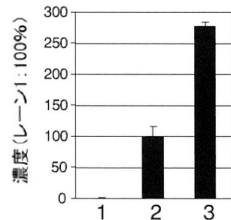


図 25B

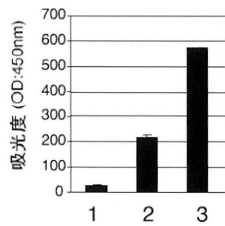


図 25C

【図 2 6】

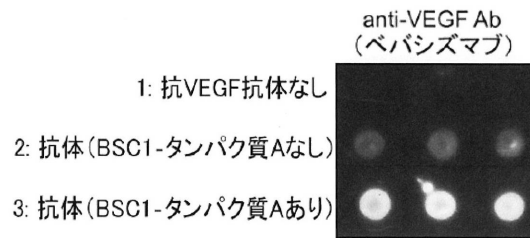


図 26A

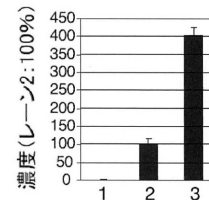


図 26B

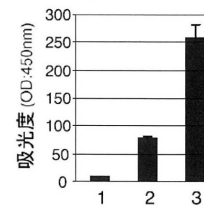


図 26C

【図 2 7】

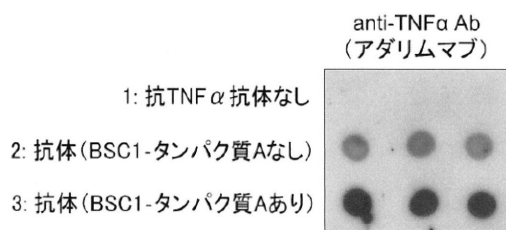


図 27A

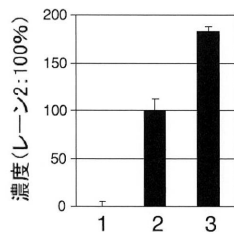


図 27B

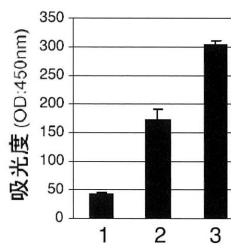


図 27C

【図 2 8】

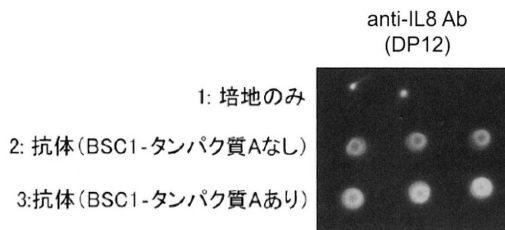


図 28A

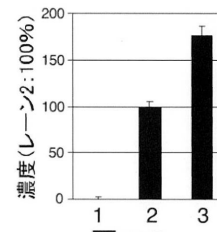


図 28B

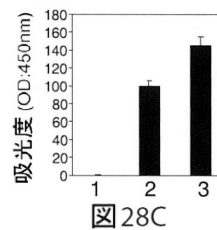
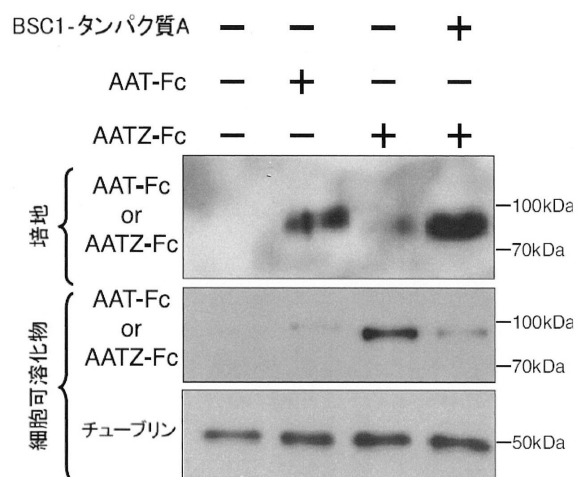


図 28C

【図 2 9】



【配列表】

0006345688000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	

- (72)発明者 菱谷 彰徳
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02478, ベルモント, リズリー・ロード 14
- (72)発明者 古屋 圭三
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02467, チェスナット・ヒル, ボナード・ロード 234
- (72)発明者 ラステッリ, ルカ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02061, ノーウェル, ローレルウッド・ドライブ 11

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 国際公開第00/020606 (WO, A1)
特表2010-526544 (JP, A)
特表2008-543323 (JP, A)
特開2008-161185 (JP, A)
IMMUNOLOGICAL REVIEWS, 2004年, vol. 199, no. 1, PAGE 54 - 67
Abstracts of Papers, 236th ACS National Meeting, Philadelphia, PA, United States, 2008年, [abstract] Chemical Abstracts [online], Accession No.2008:950319

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 14/47
CAplus/REGISTRY (STN)