

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7667569号
(P7667569)

(45)発行日 令和7年4月23日(2025.4.23)

(24)登録日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
請求項の数 35 (全148頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-540811(P2021-540811)	(73)特許権者	510243539
(86)(22)出願日	令和2年1月15日(2020.1.15)		コーネル ユニバーシティー
(65)公表番号	特表2022-522965(P2022-522965 A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク, イサカ, パイン ツリー ロード 3 9 5, ス
(43)公表日	令和4年4月21日(2022.4.21)		イート 3 1 0, センター フォー テク
(86)国際出願番号	PCT/US2020/013752		ノロジー ライセンシング アット コー
(87)国際公開番号	WO2020/150396		ネル ユニバーシティー
(87)国際公開日	令和2年7月23日(2020.7.23)	(74)代理人	110000475
審査請求日	令和5年1月11日(2023.1.11)		弁理士法人みのり特許事務所
(31)優先権主張番号	62/792,660	(72)発明者	パージェック, マシュ
(32)優先日	平成31年1月15日(2019.1.15)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		8 8 2、ランシング、バック ロード 1
			9 4
		(72)発明者	リエジンク, ハイディ
			アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換えラブリシン、並びにそれを使用するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

反復される配列(以下、反復配列)を含む組換えラブリシンポリペプチドであって、前記反復配列が、KEPAPTTP(配列番号1)からなり、前記反復配列のみが連続して59回繰り返されている連続的な反復配列を含む、組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項2】

前記連続的な反復配列が、ヒトラブリシンN末端及びC末端由来アミノ酸配列；イヌラブリシンN末端及びC末端由来アミノ酸配列；又はウマラブリシンN末端及びC末端由来アミノ酸配列；の1つに対して、少なくとも90%の配列同一性をそれぞれ有するN末端アミノ酸配列とC末端アミノ酸配列との間に位置している、請求項1に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項3】

前記連続的な反復配列が、以下のヒトラブリシン配列：
QDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCQHYMECCPDFKRVCTAELSCCKGRCFESFERGREC
DCDAQCKKYDKCCPDYESFCAEVHNPTSPSSKKAPPPSGASQTIKSTTKRSPKPPNKKK
TKKVIESEEITEHSVSENQESSSSSSSSSSSTIRKIKSSKNSAANRELQKKLKVKDNKKNR
TKKKPTPKPPVVDEAGSGLDNGDFKVTTPDTSTTQHNVSTSPKITTAKPINPRPSLPPN

SDTSKETS LTVNKETT VETKETT TTTNKQTST DGKEKTT SAKETQSIEKTS AKDLAPT SKVL AKPTPKAETTT KGPALTTP (配列番号 75)

に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する N 末端ヒトラブリシン由来アミノ酸配列と、

以下のヒトラブリシン配列：

SEVSTPTTTKEPTTIHKSPDESTPELSAEPTPKALENSPKEPGVPTTKTPAATKPEMTTTA
KDKTTERDLRTTPETTTAAPKMTKETATTTEKTTESKITATTTQVTSTTTQDTTPFKITTL
KTTTLAPKVTTTKKTTTTEIMNKPEETAKPKDRATNSKATTPKPQKPTKAPKKPTSTKK
PKTMPRVVRKPKTTPTPRKMTSTMPELNPTSRIAEAMLQTTTRPNQTPNSKLVEVNPKE
DAGGAEGETPHMLLRPHVFMPEVTPDMDYLPRVPNQGIINPMLSDETNICNGKPV DGL
TTLRNGTLVAFRGHYFWMLSPFSPSPARRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTTFFKDS
QYWRFTNDIKDAGYPKPIFKGFGGLTGQIVAALSTAKYKNWPESVYFFKRGGSIQQYIYK
QEPVQKCPGRRPALNYPVYGETTQVRRRRRFERAIGPSQTH TIRIQYSPARLAYQDKGVLH
NEVKVSILWRGLPNVVTSAISLPNIRKPDGYDYA FSKDQYYNIDVPSRTARAITTRSGQT
LSKVWYNCP (配列番号 76)

に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する C 末端ヒトラブリシン由来アミノ酸配列との間に位置している、請求項 2 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 4】

前記連続的な反復配列が、以下のイヌラブリシン配列：

QDLPSCAGRCGEGYSRDAICNCDYNCQH YMECCPDFKKACTVELSCKGRCFESFARGREC
DCDSDCKKYGKCCPDYEDFCGRVHNPTSP PSSKTAPPSPGASQTIKSTAKRSPKAPNKKK
TKKVIESEEITEEHSVSENQESSSSSSSSS TIRKIKSSKNSAANKELKKKPKVKDNKKERTP
KKKPPPEPPVVDEAGSGLDNGDIKLTPT PDIPTTQRNKVTTSPKFTTGKPINPKPSLPPNT
DTSKETSSTPNKETTVKSKETLANKETSS KAKEKITSAKETRSAEKTPAKDFVPTTKAPVK
STPKAESTTKGPALTTP (配列番号 77)

に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する N 末端イヌラブリシン由来アミノ酸配列と、

以下のイヌラブリシン配列：

SEVTTTAKDKTTEKDIIPEITTA VPKITTQETATPTEETTTESKTSTTTQVTSTTSSKNTPK
ATTLAPKVM TATQKTTTTEETMNKPEETT AVPKDTATSTKVSTPRPRKPTKAPKKPAST
KKPNTIPKRKKPKTTPTPKMTTSTMPKLHPTSSVEAMLQTTTSPNQRPNSEIVEVNPNE
DTDAAGKKPHMFPRPPVLTPIFIPGTDILVRGSNQDI AINPMLSDETNLNCGKPV DGLTT
LRNGTMVAFRGHYFWMLSPSKPPSPPRKITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTTFFKGSQY
WRFTNDIKDAGYPKQIVKGFGGLNGRIVAALSI AKYKDRPESVYFFKRGGSVQQYTYKQE
PIKKCTGRRPAINYPVYGETTQVRRRRRFERAIGPSQTH TIRIHYSPIRVSYQDKGFLHNEV
KMSSQWRGFPNVVTSAIALPNIRKPDGYDYA FSRNQYYNIDVPSRTARVVTTTRFGRTL S
NIWYNC (配列番号 78)

に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する C 末端イヌラブリシン由来アミノ酸配列との間に位置している、請求項 2 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 5】

前記連続的な反復配列が、以下のウマラブリシン配列：

QDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCDFNCQYYMECCPDFKKVCTSEL SCKGRCFESFERGREG
DCDADCKKYGKCCSDYESFCEEVHNPTSP PSSKTAPPPPGASQTIKSTAKRSPKSNKKKTK
KVIESEEIEEHSVSENQESSSSSSSSS TIRKVKSSKNSAANRELKKKPKVKDSKKKRTPKK
KPTPEPPVIDEAGSGLDNGDFMLIPTPKIPTTQRNKVTTSPKITT VKPINPKPSLPPNSDT
SKETTSTPNKETTVETKETEITNKETSTS ANEKTTSARKSTEKTS D KDFAPASEVPAKSTP
KAETTTKGPALTTP (配列番号 79)

に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する N 末端ウマラブリシン由来アミノ酸配列と、

以下のウマラブリシン配列：

SEVSTTTTTMKPPTTPKNLAESTPEFPAEPTPKALENSPKEPAVPTTKAPEVTKPEVTTT
AKDKVTGKDIHTIPEITTAAPKITTTETATTTEETTESKVTSTIMQVTSTTTEDTTTSSKITP
KATTLAPKVMTATKTTTTQETINKLEETTAIPKDTATHSKVTTTPKPKKPTKAPRKPTSTK
KPKTPRKRPKKTTPIPPKITTTTPKSNPTTLAEAMLQTTTSPNQTPNSAMIEVNPKNED
ADAAEGEKPLVILRPHVLTPIVIPGPDFLVRGPNLGIGINPMLSDETNLNGKPV DGLTTL
RNGTLVAFRGHYFWMLRPFSPSPRRRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTFKKDSQYW
RFTNDIKDAGYPKLISKGFGGLSGKIVAALSIAITYKNRPESVYFFKRGGRIQQYIYKQEP
IRKCPGRRPAIHYSVYGEAPQIRRRRFFERAIGPSQTHIRIHYSVVRVSYQDKVPSTDFLHNE
VKVSTLWRGLPDTVTS AISLPNLRKPDGYDYAFSKDQYYNIDVPSRTARAITTRSGQTL
SKVWYNCP(配列番号 80)

10

に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する C 末端ウマラブリシン由来アミノ酸配列との間に位置している、請求項 2 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 6】

任意で MAWKTLP IYLLLLLSVFVIQQVSS(配列番号 72)である分泌シグナルをさらに含む、請求項 2 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 7】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGD(配列番号 81)である分泌シグナルをさらに含む、請求項 3 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 8】

MQWKILPIYLLLLSVFLIQVSS(配列番号 82)である分泌シグナルをさらに含む、請求項 4 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

20

【請求項 9】

MEWKILPIYLLLLSIFSIQEVSS(配列番号 74)である分泌シグナルをさらに含む、請求項 5 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 10】

哺乳動物に注射された場合、4 日を超える関節内半減期を有する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 11】

哺乳動物に注射された場合、少なくとも 15 日の関節内半減期を有する、請求項 10 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

30

【請求項 12】

哺乳動物に注射された場合、少なくとも 30 日の関節内半減期を有する、請求項 11 に記載の組換えラブリシンポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、医薬製剤、点眼剤、及びコンタクトレンズ液から選択される、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

それを必要とするヒトの治療に使用するための、請求項 14 に記載の組成物。

40

【請求項 16】

それを必要とする非ヒト哺乳動物の治療に使用するための、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

それを必要とするイヌ科又はウマ科の動物の治療に使用するための、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチドを含む、1 つ以上の哺乳動物細胞。

【請求項 19】

前記細胞が懸濁培養物中にある、請求項 18 に記載の 1 つ以上の哺乳動物細胞。

50

【請求項 20】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド及び／又は発現ベクター。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む 1 つ以上の哺乳動物細胞であって、任意で、懸濁培養物中での増殖に順応している、1 つ以上の哺乳動物細胞。

【請求項 22】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を含む懸濁培養物。

【請求項 23】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチドを作製する方法であって、細胞が前記組換えラブリシンポリペプチドを発現するように、前記組換えラブリシンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、生体外で哺乳動物細胞に導入することを含む、方法。

【請求項 24】

前記哺乳動物細胞から前記組換えラブリシンポリペプチドを単離することをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組換えラブリシンポリペプチドを含む組成物で、完全に又は部分的に被覆された無生物物品。

【請求項 26】

前記無生物物品が、コンタクトレンズを包含する、請求項 25 に記載の無生物物品。

【請求項 27】

滑膜関節、腱鞘、又は滑液包の障害の治療を必要とする個体の治療に使用するための、請求項 13～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 28】

滑膜関節に導入されるものである、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

眼の障害の治療を必要とする個体の治療に使用するための、請求項 13～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 30】

個体の眼に導入されるものである、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

粘膜表面の障害の治療を必要とする個体の治療に使用するための、請求項 13～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 32】

粘膜表面と接触させられるものである、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

前記組換えラブリシンポリペプチドをコードする配列が配列番号 67 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 20 に記載の組換えラブリシンポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 34】

前記組換えラブリシンポリペプチドをコードする配列が、前記反復配列のみを連続して 59 回コードする配列を含む、請求項 33 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 35】

組換えラブリシンポリペプチドを作製する方法であって、細胞が組換えラブリシンポリペプチドを発現するように、組換えラブリシンポリペプチドをコードする請求項 34 に記載のポリヌクレオチドを、生体外で哺乳動物細胞に導入することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

10

20

30

40

50

【0001】

本出願は2019年1月15日に出願された米国仮特許出願第62/792,660号の優先権を主張し、その全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された認可番号1DP2GM119133-01及び1U54CA210184-01の下、政府の支援を受けてなされたものである。政府は、本発明に所定の権利を有する。

【技術分野】

【0003】

本開示は、改善された糖タンパク質、ならびにそれに関連する組成物及び方法を提供する。

10

【背景技術】

【0004】

ラブリシンは、哺乳類の生体構造のいくつかの場所に見られるグリコシル化タンパク質である。例えば、ラブリシンは、滑液中及び軟骨の表面上に存在する。ラブリシンは、関節の潤滑及び正しい関節環境の維持において重要な役割を有する。

【0005】

組換え型ラブリシンの提供が以前から試みられてきたが、広範な環境において使用され得る新規のラブリシン及びラブリシン様糖タンパク質に対する継続的かつ満たされていない需要が残っている。本開示は、この需要に関連する。

20

【発明の概要】

【0006】

本開示は、改変糖タンパク質に関する組成物及び方法を提供する。本開示の態様は、改変されたラブリシン、改変されたラブリシンを含有する医薬組成物、改変されたラブリシンをコードするcDNA及び発現ベクター、改変されたラブリシンを発現する真核細胞、ならびに種々の目的のための改変ラブリシン及びそれらを含む組成物の使用方法に関する。この方法は、ヒト又は非ヒト哺乳動物内で、表面又は流体の改善された潤滑が所望される種々の状態の予防及び/又は治療のためのこのような薬剤の使用を包含する。本開示はまた、様々な無生物物体の表面に潤滑を提供するために組成物を使用することを含む。

【0007】

30

特定の実施形態では、改変ラブリシンは、それらの天然に産生された対応物と比較して、特定のアミノ酸配列の多数のタンデム反復の変化、及び/又は改変ラブリシンのアミノ酸配列の1つ以上の変化を含む。複数の実施形態において、改変ラブリシンは、ヒト、ウマ、又はイヌラブリシンに由来するアミノ酸配列を含むが、このような配列の以前に提供された組換えバージョンと比較して、異なる機能的特性を有する。一実施形態では、改変ラブリシンは、4日を越える増大した半減期(哺乳動物に注射された場合の関節内半減期など)を有する。複数の実施形態において、改変ラブリシンは、15日を越える、又は少なくとも30日の関節内半減期を示す。複数の実施形態において、改変ラブリシンは、未改変のラブリシンと比較して、改変されたグリコシル化パターンを有する。

【0008】

40

複数の実施形態において、改変ラブリシンは、近接している反復配列を含み、この配列は、KEPAPTTTP(配列番号1)、KEPAPTP(配列番号9)、及びKEPAPTTTP(配列番号10)の1つ又は組み合わせである。複数の実施形態において、反復配列は、10~120回連続して反復される。非限定的な実施形態では、反復配列は59回繰り返される。

【0009】

複数の実施形態において、改変ラブリシンは、ヒト又は非ヒト哺乳動物によって産生されるラブリシンの誘導体であるアミノ酸配列を含む。複数の実施形態において、連続する反復配列は、ヒト、ウマ、又はイヌのラブリシン配列と少なくとも90%同一であるラブリシンアミノ酸配列によって、それらのN末端セグメント及びC末端セグメントに隣接する。

【0010】

50

複数の実施形態において、改変ラブリシンは、追加の構成(例えば、ヒト、又は非ヒト哺乳動物、又は他の適切な供給源からの追加の分泌シグナル)を含む。

【図面の簡単な説明】

【0011】

本開示の図及び表は、以下に記載されるように、4つの部分(第I部、第II部、第III部及び第IV部)に分割される。

【0012】

第I部の図

【図1】配列特異的ムチンのための組み合わせ遺伝子コード化ライブラリー

(a) 組み合わせ配列特異的ムチンの概略図。(b) 概略図は、完全なムチン構築物のための、交換可能なバイオブリック及び隣接制限酵素部位を示す。(c) ムチンタンデムリピート骨格のためのcDNAの設計及び作製のためのワークフロー。(d) ライブラリー中のコドンがスクランブルされたムチン骨格の要約。野生型Muc1配列は、配列番号8である。Muc1シングル変異体(Muc1_S)は、配列番号5である。Muc1ダブル変異体(Muc1_D)は、配列番号6である。Muc1トリプル変異体(Muc1_T)は、配列番号7である。合成1(Syn1)は、DAATPAPであり、配列番号2である。合成2(Syn2)は、配列番号3である。合成3(Syn3)は、配列番号4である。ラブリシンコンセンサス配列(Syn4)は、配列番号1である。

【0013】

【図2】配列特異的ムチン発現の構築及び確認

(a) GFPレポーターを有するコドン最適化Muc1変異体の構成要素及び特徴
(a) のアミノ酸配列は、配列番号8である。(b) ポリペプチド骨格の予測分子量。(c) Tn抗原、コア1、コア2糖鎖の生合成、及び、その検出に関連するレクチンの特異性。(d) 野生型及びCore-1 β 3-T特異的分子シャペロン(COSMC)ノックアウトMCF10A細胞における、天然Muc1発現とグリコシル化のウェスタンブロット解析。MCF10A細胞を、天然Muc1で安定にトランスフェクトした。表面シアル酸を、溶解物収集の前に、過ヨウ素酸標識によりAFDye 568で標識した。ブロットを、MUC1 TR(CD227 HPMV)Ab-FITC、及びPNA-CF640又はビオチン化VVA(二次: NeutrAvidin-Dylight 650)を用いて複数の色で染色した。(e) 一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞の抽出物における、天然及びコドンスクランブルMuc1のウェスタンブロット分析。(f) 一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞発現の免疫蛍光画像は、示された構築物を表し、PNAレクチン(左)、抗Muc1抗体(中央左)、GFP(中央右)及びHoescht核染色(右)(スケールバー10 μ m)でプローブされた。(g) 一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞の抽出物における、さまざまなサイズのムチンのPNAレクチンブロット分析(左)と強度プロファイル(右)。

【0014】

【図3】Muc1ポリマー骨格調節O-グリカン成熟における、グリコシル化部位の頻度の操作

(a) 分泌Muc1、及び21のタンデムリピートをもつ各遺伝子操作変異体の構成要素及び特徴。(b) 分泌ムチン変異体のタンデムリピート配列及びポリペプチド骨格の分子量。シングル、ダブル、及びトリプル・グリコシル化変異体(sMuc1S、sMuc1D、及びsMuc1T)は、反復(リピート)当たりそれぞれ1、2又は3つの、セリン/トレオニン(S/T)からアラニンへの置換を有する。sMuc1変異体(21リピート)の下の配列は、上から下に、配列番号8、配列番号5、配列番号6及び配列番号7である。(c) 抗SUMOstar抗体及びPNA、s-WGA及びVVAレクチン(3つの独立した実験の)でプローブしたFreeStyle™293-F細胞培養培地からの、アフィニティー精製組換え分泌ムチンの代表的ウェスタンブロット分析。レクチンブロットを、PNA-Alexa Fluor 568、s-WGA-FITC、及びビオチン化VVA(二次: NeutrAvidin-Dylight 650)を用いて複数の色で共染色した。(d) (c) のブロットの代表的な蛍光強度電気泳動図。(e) 表記のムチンについての、PNA-VVAシグナル(上)及びs-WGA-VVAシグナル(下側)のレシオメトリック強度分析、及びポリマー骨格におけるS/Tグリコシル化部位のそれらの対応する頻度。レシオメトリック蛍光強度を、各

10

20

30

40

50

レーンに沿って定量し、野生型Muc1タンデムリピートを有する分泌ムチン(sMuc1)からのシグナルに対して正規化した；データは、少なくとも3つの独立した実験からの平均及びSEMとして提示された。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ (f) 左：HEK293T細胞培養液からの、野生型Muc1タンデムリピートを有する分泌ムチン(sMuc1)及びトリプル変異体(sMuc1T)からのパーメチル化(permethylylated)グリカンアルジトールの試料について登録されたMALDI-TOF質量スペクトル。イオンシグナルは、ナトリウム付加物として検出された分子イオンの相対質量(m/z)に関して、及びそれぞれのコア構造の帰属(コア1については赤色、コア2については黒色)によって注釈を付された。右：分泌ムチンで検出されたO-結合型グリカンの模式図。

【0015】

【図4】 デザイナームチンドメインは、グリコシル化への配列特異的影響を明らかにする
図4に示す配列は、KEPAPTTP(配列番号1)、DAATPAP(配列番号2)、DAATPAPP(配列番号3)、及びPASTSAPG(配列番号4)である。(a) デザイナームチンの構成要素と特徴。(b) ムチンポリペプチド骨格の予測分子量。(c) 抗GFP抗体でプローブされた、又はPNA及びVVAレクチンで共染色された、一過性トランスフェクトHEK293T細胞の抽出物中の、示された構築物の代表的なウェスタンブロット分析(3つの独立した実験からの)。(d) 示された構築物(3つの独立した実験からの)についての(c)におけるウェスタンブロットの代表的な蛍光強度電気泳動図。破線は、PNAブロットにおいて見られるグリコフォームのピークを示す。網掛けのボックスは、見かけ分子量が最も高い及び2番目に高い抗GFPブロット上のバンド間の領域を示す。(e) 表記のムチンについてのVVA染色に対するPNAのレシオメトリック強度分析、ならびにポリマー骨格におけるセリン及びトレオニングリコシル化部位の対応する頻度。蛍光強度を、二重プローブレクチンブロットの各レーンに沿って定量し、PNA：VVA比を、KEPAPTTP(配列番号1)×20ムチンの比に正規化した；データは、3つの独立した実験からの平均及びSEMとして提示された。(f) 表記のムチン骨格サイズを40から80のタンデムリピートに倍増したPNA：VVA比における倍率変化；データは、3つの独立した実験からの平均及びSEMとして提示された。

$*p<0.05$

【0016】

【図5】 細胞質側末端エンジニアリングによるムチングリコシル化の調整

(a) 合成21-アミノ酸膜貫通アンカー(TM21)と改変細胞質モチーフを有する細胞表面ムチンの構成要素と特徴；天然CTは、Muc1から適応した天然の細胞質側末端(細胞質尾部)を指す。(b) 過ヨウ素酸酸化によるシアル酸付加O-グリカン及びPNAによるコア-I構造を検出するための、一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞に由来する、表記のムチンアイソフォームのレクチンブロット分析；ブロットは、3つの独立した実験の代表である。(c) シアリダーゼ処理前後の、表記のムチンアイソフォームのPNA-レクチンブロット分析；ブロットは3つの独立した実験の代表である。(d) 上：一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞から免疫沈降した、表記のムチンアイソフォームの代表的なMAA及びPNAレクチンブロット分析(4つの独立した実験から)。下：コア1グリカンシグナルに対するシアル酸のレシオメトリック強度(MAA：PNA)；データは、4つの独立した実験からの平均及びSEMとして提示される。

$*P<0.05$

【0017】

【図6】 天然反復(native_Muc1)-対-コドンスクランブルMuc1 cDNA(Muc1_42)を有するレンチウイルスで編集したMCF10A細胞のウェスタンブロット分析

【0018】

【図7】 調整可能なサイズを有するムチン

図7に示す配列は、PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA(配列番号8)である。(a) GFPレポーター、天然Muc1膜貫通アンカー、及びコドンスクランブルMuc1タンデムリピートを有するムチン構築物の構成要素及び特徴。(b) (a)に例示され、PNA、抗Muc1抗体、及びHoechst核染色で同時染色されたGFP標識Muc1構築物を発現する、一過性にトラン

10

20

30

40

50

スフェクトされたHEK293T細胞の代表的な免疫蛍光画像(3つの独立した実験からの)(スケールバー10 μm)。(c) 合成21アミノ酸膜貫通アンカー(TM21)及びコドンス克蘭ブルMuc1リピートを有するムチン構築物の構成要素及び特徴。(d) (c) に示すムチンポリペプチド骨格の予測分子量。(e) 一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞の抽出物から(c) に示され、PNAレクチン又は抗Muc1抗体でプローブされたTM21構築物の代表的なウェスタンブロット分析(3つの独立した実験の)。(f) 発現されたHEK293Tの代表的な位相差画像は、3つの独立した実験からの(c) における構築物を示した(スケールバー100 μm)。

【0019】

〔図8〕 抗-6x His抗体及びVVAレクチンでプローブしたFreeStyleTM293-F細胞培養培地からのアフィニティー精製組換え分泌ムチンのウェスタンブロット画像

【0020】

〔図9〕 Muc1タンデムリピート配列に由来する細胞表面ムチン変異体

図9において、mMUC1変異体(21リピート)の下に示される配列は、上から下に、PDT RPAPGSTAPPAHGVTS(配列番号8)、PDTRPAPGATAPPAHGVTS(配列番号5)、PDTRPAPGATAPPAHGVTA(配列番号6)、及びPDARPAPGATAPPAHGVTA(配列番号7)である。(a) 21の天然又は改変Muc1リピート、GFPレポーター及び天然Muc1膜貫通アンカーで構築されたムチンの構成要素及び特徴。(b) 天然Muc1(mMuc1)、又は1つ、2つ、あるいは3つのセリン/トレオニンからアラニンへの置換を有する改変変異体(mMuc1S、mMuc1D、又はmMuc1T)のタンデムリピート及び予測される骨格分子量。(c) 一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞の抽出物からの(a) において示された構築物の代表的なウェスタンブロット及びレクチンブロット分析。これらは、抗GFP抗体でプローブされ、又はPNA、VVA及びs-WGAレクチンで共染色された(3つの独立した実験から)。(d) 21の天然又は改変Muc1リピート及び合成21アミノ酸膜貫通アンカー(TM21)で構築されたムチンの構成要素及び特徴。(e) (d) において示された構築物を発現し、PNAレクチン及びHoechst核染色で同時染色された、一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞の代表的な免疫蛍光画像(3つの独立した実験から)(スケールバー10 μm)。

【0021】

〔図10〕 Cellular O-Glycome Reporter/Amplification(CORA)によって報告されたムチン型O-グリカンのMALDI-TOF_MSスペクトル

HEK293T細胞を、表記の合成ムチン構築物又は偽(mock)ビヒクルで一過性にトランスフェクトした。スペクトルは、m/z=550におけるマトリクスピークに対して正規化した。

【0022】

〔図11〕 デザイナータンデムリピートで構築したムチン

図11に示される配列は、DAATPAP(配列番号2)、DAATPAPP(配列番号3)、及びPPASTSAPG(配列番号4)である。(a) デザイナータンデムリピート、GFPレポーター及び天然Muc1膜貫通アンカーを有するムチン構築物の構成要素及び特徴。(b) 示されたGFPタグ化構築物を発現し、PNAレクチン及びHoescht核染色で同時染色された、一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞の代表的な免疫蛍光画像(3つの独立した実験からの)(スケールバー10 μm)。

【0023】

第II部の図

〔図12〕 バイオポリマー被覆細胞株のエンジニアリング

トランスポゾンに基づく方法を用いて、ドキシサイクリン誘導性プロモーターの下に、操作されたバイオポリマーをコードするDNAを安定に組み込んだ。

A: バイオポリマーでコーティングされた細胞株を作製するために使用されるオールインワン・ベクターの概略図であって、主要要素を示す。細胞ゲノムへの取り込みのために、ベクターは、テトラサイクリン応答エレメント(tetO)、最小CMVプロモーター、Muc1シグナル配列(Muc1 N末端)、バイオポリマーのタンデムリピート(PDTRPAPGSTAPPAHG

10

20

30

40

50

VTSA(配列番号8)の0、21、又は42反復)、Muc1の膜貫通ドメイン(Muc1 TM)、バイシストロン性緑色蛍光タンパク質レポーター(IRES GFP)、EF-1 α プロモーター、リバーステトラサイクリントランスアクトベーター(rtTA)、及び第二のバイシストロン性ネオマイシン耐性カセット(IRES NeoR)を含む。これらの要素はすべて、ゲノムへのトランスポゾン介在性の取り込みに必要な5'及び3'逆方向末端反復配列(ITR)に挟まれていた。細菌におけるベクターの複製及び産生については、アンピシリン耐性カセット(AmpR)及び複製起点(ori)も存在した。B：細胞によって発現され、細胞表面に局在化された膜結合バイオポリマーの概略図。

C：それぞれの長さ(nm)により、Mucin-0、Mucin-135、及びMucin-270と命名された改変バイオポリマーの細胞外ドメインの相対サイズの模式図。これらのタンパク質の予測分子量は、それぞれ42kDa、81kDa、及び120kDaであった。

【0024】

〔図13〕 バイオポリマーコーティングの検証

バイオポリマーコーティングの発現及び細胞表面局在化を、新規な、操作された293-F細胞株について検証した。

A：安定な懸濁液の代表的な共焦点顕微鏡画像は、ヒト胚性腎臓293(293-F)細胞株-野生型(w.t.)、又はムチン-0、ムチン-135、又はムチン-270バイオポリマーを安定に発現する-に順応した。画像は、細胞膜(青色で示される、CF633コムギ胚芽凝集素：WGA)、ムチン-135及びムチン-270バイオポリマーに共有結合したO-グリカン(赤色で示される、CF568ピーナッツ凝集素：PNA)、及びムチン-0、ムチン-135及びムチン-270バイオポリマーとともにプラスミドに共発現する緑色蛍光蛋白質(緑色で示される、GFP)を示す。

B：w.t.細胞と比較したバイオポリマー発現細胞株の多分散集団を示す代表的なフローサイトメトリーヒストグラム。y軸は、GFP陽性細胞の集団分布を示すようにスケールされる。ヒストグラム当たり50,000未満の細胞。

C：各細胞株についてGFP陽性である細胞のパーセントの定量。図2Bの灰色線より上にGFPシグナルを有する細胞をGFP陽性とみなした。平均及びS.D.は、>5万細胞/サンプル、n=4で示される。

D：生成された安定な細胞株それぞれについての全細胞溶解物の代表的な免疫プロット(左)、及びレクチンプロット(右)：w.t.細胞と比較(n=3)。

E：トリパンブルー排除を用いた血球計数によって決定された生細胞濃度、n=3。

F：t=0時間で発現誘導した後のムチン-270細胞のGFPシグナル(フローサイトメトリーにより測定、n=3、>15,000細胞/サンプル)。

G：非トランスフェクト細胞(Mock)、一過性にトランスフェクトしたw.t.細胞(Transient)、又はムチン-270遺伝子をゲノムに組み込んだ細胞から抽出したDNA由来のムチン-270遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物を示すアガロースゲルを、ゲンタマイシン選択後2カ月(2 mo.)又は12日(12 d)培養した。星印は、ムチン-270 PCR産物の予測分子量を示す。#1及び#2は生物学的複製である。

平均値及びS.D.を示す。ns：有意ではない。

【0025】

〔図14〕 バイオポリマーコーティングは細胞凝集を減少させた

ムチン-135及びムチン-270サイズの遺伝的にコードされたバイオポリマーコーティングは、懸濁細胞培養における細胞凝集を減少させる。

A：w.t.及びバイオポリマー細胞株についての代表的な位相差画像。画像は、誘導後72時間で $3.8 \pm 0.7 \times 10^6$ 細胞/mLの濃縮で増殖させた細胞についてのものである。

B：図3Aに示される位相差画像からの種々のクラスターサイズにおける細胞の画分の定量化：3つの生物学的複製サンプル、2つの技術的複製サンプル、サンプルごとに分析された3つの画像、サンプル(材料及び方法の項において、複製に関するさらなる考察)。中心線は中央値を示し、ボックスの境界は、Rソフトウェアによって決定される25及び75のパーセンタイルを示し、ウィスカーは、25及び75のパーセンタイルからの四分位数間の範囲の1.5倍に広がり、異常値は点によって表され、クロスはサンプル平均を表す。

C：図3 Aに示される位相差画像から、様々なサイズのクラスター内にある細胞の画分の定量化。平均値とS.D.を示す。

D：図3 Aに示される位相差画像から取得された細胞分布について計算された距離に対するRipley's K関数。平均及びS.E.M.を示す。図3 Bに記載される複製。

ns：有意ではない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.005$ 。

【0026】

【図15】ムチン-270は、高カルシウム培養培地中の減少を凝集させた

ムチン-270細胞株は、高度に凝集する条件下で、市販の抗凝集溶液を凌ぐ。

A：2mM CaCl_2 (+ Ca^{2+})を含む培地で成長したムチン-270とw.t.培養物の画像。ムチン-270発現は、市販の抗凝集試薬(+抗凝集)と比較しても、細胞凝集を有意に減少させる。

B：無処理対照培養物(null)、市販の抗凝集剤を添加したもの(+抗凝集)、2mM CaCl_2 を添加したもの(+ Ca^{2+})、又は抗凝集剤及び2mM CaCl_2 の両方を添加した(+抗凝集+ Ca^{2+})について、懸濁液中のw.t.細胞又はムチン-270発現細胞の濃度を定量。統計的比較は、各細胞株についてのnull条件に対するものである。平均及びS.D.を示し、 $n=3$ である。

ns：有意ではない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.005$ 。

【0027】

【図16】バイオポリマーコーティングは、せん断応力に対する耐性を増強した

安定に組み込まれたバイオポリマーの発現は、せん断応力から細胞を保護する。

A：細胞をせん断するための実験装置の概略図。簡単に述べると、生/死細胞染色を用いてフローサイトメトリーによって分析する前に、1kgの一定の加重力下で500 μm テフロン(登録商標)管に流すことによって細胞をせん断した。

B：w.t.及びバイオポリマー細胞株について細胞をせん断した後の死細胞の画分の定量。平均及びS.E.M.を示し、各集団について>5万細胞測定、 $n=6$ 。

ns：有意ではない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.005$ 。

【0028】

【図17】バイオポリマー被覆細胞は、トランスフェクトされることができる

トランスフェクションは、細胞質赤色蛍光タンパク質(RFP)を用いたトランスフェクションによって、バイオポリマー被覆細胞株について決定された。

A：細胞質RFPで一過性にトランスフェクトされたw.t.及びバイオポリマー被覆細胞についての細胞数の定量。トランスフェクトされた細胞の数は、複製トランスフェクション間の可変トランスフェクション効率を説明するために、実験当たりトランスフェクトされたw.t.細胞の数に対して正規化された。各集団について>5万個の細胞を測定した、 $n=3$ 。

B：代表的なフローサイトメトリーヒストグラムは、トランスフェクトされた細胞集団間の発現の分布を示す。0付近を中心とする灰色の線の左側のピークは各細胞株についての非トランスフェクト集団を表し、これは、非トランスフェクトw.t.細胞(w.t.-null)の重複ヒストグラムによってさらに検証される。

C：Bからの陽性トランスフェクト細胞についてのRFPの幾何平均の定量化。平均及びS.D.を示す。

ns：有意ではない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.005$ 。

【0029】

【図18】ムチン-270細胞は、比較可能なレベルの組換えタンパク質発現を生じた

分泌型RFPを一過性にトランスフェクトしたw.t.又はムチン-270発現培養物の培地上清からの分泌された、組換えRFPの定量、 $n=3$ 。平均値とS.D.を示す。

ns：有意ではない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.005$ 。

【0030】

【図19】24時間前に得られた図14に付随する追加データ

A：図3 Aに示される位相差画像からの種々のクラスターサイズの細胞の画分の定量化。全てのパネルについて、細胞を $3.2 \pm 0.7 \times 10^6$ 細胞/mLで48時間増殖させる。中心線は中央値を示し、ボックスの境界は、Rソフトウェアによって決定される25及び75のパーセンタイルを示し、ウィスカーは25及び75のパーセンタイルからの四分位数間範囲の1.5倍

10

20

30

40

50

に広がり、異常値は点によって表され、クロスはサンプル平均を表す。

B：図3Aに示される位相差画像からの、様々なサイズのクラスター内にある細胞の画分の定量化。平均値とS.D.を示す。

C：図3Aに示される位相差画像から取得された細胞分布について計算された、距離に対するRipley's K関数。平均及びS.E.M.を示す、図3Bに記載される複製、 $n=3$ 。

ns：有意ではない； $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $***p<0.005$ 。

【0031】

第III部の図

【図20】同義ラブリシン(SynLubricin)の設計及び合成

A) 合成、コドンスクランブルムチンの設計及び生産戦略の概要。コドンスクランブリングにより反復DNA配列を最小限にするための全体的最適化を通して、続いて宿主細胞系において頻繁に使用されないコドン再割り当てする第二の最適化を通して、所望のタンパク質産物のDNA配列を最適化した。B) SynLubricinは、PRG4の天然ヒトN末端及びC末端に隣接するKEPAPTPP(配列番号1)の59個の完全反復から構築した。分泌及び精製のために、IgKシグナル配列及びSumoStarタグをSynLubricinに融合させた。SynLubricinはまた、天然タンパク質の2つのソマトメジンBドメイン(SMB1及び2)ならびに2つのヘモペキシンドメインを保持する。C) ヒトPRG4アイソフォームA(PRG4A)及びSynLubricinのタンデムリピートをコードするヌクレオチドの反復スコアの計算値。D) ヒトPRG4及びSynLubricinのアミノ酸配列のアラインメント。アラインメント中のPRG4A配列は、配列番号66のアミノ酸347～853である。アラインメント中のSynLub配列は、配列番号68のアミノ酸347～818である。

E) テトラサイクリン誘導性プロモーター、目的のcDNAのための多重クローニング部位(MCS)、バイシストロン性GFPレポーター(IRES2 CopGFP)、rtTA-M2テトラサイクリン・トランスアクチベーター及びネオマイシン耐性遺伝子のための第二の発現カセットを示すベクターマップ。

【0032】

【図21】SynLubricinを高レベルで産生する安定なポリクローナル細胞集団を単離するための選別ストラテジー

A) 高レベルのSynLubricinを発現する安定な細胞集団の単離のためのストラテジー。B) 293-F培地上清のウェスタンブロットは、選別されていない細胞集団及び2回選別された($2\times$)細胞集団におけるSynLubricinの相対産生を示す；1及び2が、2つの独立した実験からのサンプルを示し；抗PRG4(MABT401)及びSUMO抗体でプローブされた。C) Bの抗PRG4ウェスタンブロットからのシグナルの相対強度の定量。D) SynLubricinを発現する未選別及び2回選別293-F細胞の位相差及び蛍光顕微鏡写真。

【0033】

【図22】組み込まれたSynLubricin cDNAは、細胞ゲノムにおいて安定である

野生型及び安定に組み込まれた293-F細胞(2ヶ月間連続培養した)のゲノムDNA抽出物中のSynLubricinコード領域のPCR増幅。陽性対照として、SynLubricinプラスミド及びSynLubricinを一過性にトランスフェクトした293-F細胞からのDNA抽出物(一過性)のPCR増幅を示す。全長SynLubricinの予想サイズを星印で示す。

【0034】

【図23】SynLubricin産生の最適化

A) 対照細胞、及びヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるバルプロ酸(VPA；3.5mM)の非存在下又は存在下で、表示された日数の間、 $1\mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリンで誘導された選別293-F細胞の培地中での、経時的なSynLubricinの相対的産生を示すウェスタンブロット。B) A)に示されるブロットについてのシグナルの相対強度の定量化；C) 0日目に、3.5mM VPAを含む又は含まない $1\mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリンを用いて誘導された、選別293-F細胞におけるグルコース消費についての時間経過。平均値及び標準偏差を示す、 $n=3$ 。D) 非産生対照細胞(Mock)、SynLubricin cDNAを一過性にトランスフェクトされた細胞(Transient)、及び $1\mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリン及び3.5mM VPAで3日間誘導された選

別293-F細胞の2つの連続する1-Lバッチ培養物(Batch #1及びバッチ#2)から採取された培地中のラブリシンを示すウェスタンブロット；ウマの滑液(ESF)を対照として負荷した。E) 0日目に1 μ g/mLドキシサイクリンで誘導後、示された時点で収集された、安定に発現する293-F細胞から産生されたSynLubricinの代表的なウェスタンブロット。F) Bに表されるウェスタンブロット複製の定量、n=3

ns：有意ではない。

【0035】

【図24】陰イオン交換クロマトグラフィーによるSynLubricinの精製

A) Sliver染色及びB) ウェスタンブロットは、広い範囲のNaCl濃度(レーン上に示される濃度：mM)にわたってQ Sepharose(登録商標)樹脂から連続的に溶出されるSynLubrcinを示した。C) Sliver染色及びD) ウェスタンブロットは、回収したSynLubricin培地上清(M)、10倍希釈したSynLubricin培地上清(S)、野生型293-F馴化培地(C)、フロースルー(FT-1x)、10倍濃縮フロースルー(FT-10x)、及び示された塩濃度(mMで上記に示す)で溶出した画分を示す。

【0036】

【図25】軟骨外植片の潤滑は、SynLubricinの機能を明らかにする

生理食塩水(PBS)、ウシ滑液、又はSynLubricinに浸漬したNaCl抽出軟骨外植片の摩擦係数。潤滑分析の前に、SynLubricinをDEAEセファロースで精製し、洗浄せずに、又はストリンジェントな500mM NaClで洗浄した後に溶出した。

平均及びS.D.が、独立した測定値の表示とともに示される。

p<0.001、*p<0.0001；NA：統計学的検定は、試料サイズのため適用できない。

【0037】

【図26】SynLubricinの一過性発現は、接着細胞形態を変化させた

A) 偽トランスフェクトした、又はバイシストロン性SynLubricin IRES copGFPのcDNAでトランスフェクトした293-T細胞の形態。示される画像は、位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真との併合オーバーレイである。高レベルのcopGFPレポーターを発現する細胞付近の細胞-細胞接着の阻害が注目される。B) ウマ滑液(ESF)及び偽トランスフェクト及びSynLubricinトランスフェクト細胞からの培地上清のウェスタンブロット：PRG4タンデムリピートに対するMABT401抗体でプローブ。

【0038】

【図27】トランスポゾンに基づく新しい遺伝子デリバリーベクターの検証

フローサイトメトリーの結果、mCherry2とcopGFPレポーターのレベルの相関が示された。

【0039】

【図28】図28に示される配列は、PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA(非改変Muc1反復)(配列番号8)である。Muc1へのコドンスクランブル戦略の適用

A) コドンスクランブル型タンデムリピート配列を有するSynMuc1の模式図。B) ヒトMuc1及びSynMuc1のタンデムリピートをコードするヌクレオチドの反復スコアを算出。C) SynMuc1 cDNAでトランスフェクトした293-F細胞(+cDNA)又は非トランスフェクト細胞(M)からの培地上清のウェスタンブロット、Hisアフィニティー精製からのNi-NTA樹脂フロー(FT)、及びMuc1抗体でプローブした溶出タンパク質(溶出)。D) CのPNA-レクチンブロット。E) SUMO抗体でプローブしたCのウェスタンブロット

【0040】

【図29】SynLubricinは、固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)樹脂に対して低い親和性を有する

A) 培地上清及びIMAC精製フロースルー、洗浄液、Fe³⁺及びNi²⁺負荷ニトロ三酢酸(NTA)樹脂からの溶出画分のウェスタンブロット。示されたNaCl濃度で溶出を行った。シアロ酸の多価Fe³⁺への非特異的結合は観察されなかった。B) フロースルー、洗浄液、及び非荷電NTA樹脂からの溶出画分のウェスタンブロット。

【0041】

[図30] インビボでのSynLubricinの保持を示す画像

画像は、0日目(注射)、2週間、及び7週間目の局在化したSynLubricinを示す。グラフは、約40日間にわたる2匹のラットの半減期を示す。グラフは、成体雄Sprague-Dawleyラットの左膝に注射したヒトSynLubricinのクリアランス動態を示す(n=2)。精製ヒトSynLubricinを、スルホ-Cy7.5近赤外蛍光色素で蛍光標識し、20 μ LのSynLubricin-Cy7.5を、膝蓋腱アプローチを介して健常左膝に注射した。左膝からの全ラブリシン蛍光をIVIS Spectrum全動物イメージングシステムで画像化し、定量し、全放射効率として報告した。データを二指数減衰モデルに当てはめ、アルファとベータの減衰定数を計算した。半減期は、ベータ減衰定数で割った $\ln(2)$ として報告される。

10

【0042】

[図31] ヒトSynLubricinから放出されたO-グリカンのMALDI-MSスペクトル及び算出された相対パーセンテージを示すグラフ及びチャート。

【0043】

[図32] 生理食塩水(PBS)又は示された濃度のSynLubricin中に浸漬したNaCl抽出軟骨外植片の摩擦係数。これらの実験のために、SynLubricinを陽イオン交換クロマトグラフィーにより293-F培地上清から精製した。

【0044】

第IV部の図

[図33] グリコカリックスポリマーは、膜突出を誘導する

20

(A) この研究を通して構築され使用された、遺伝的にコードされたバイオポリマーを示す概略図及び表である。この遺伝子ライブラリーは、中心ポリペプチドコア、セリン(S)及びトレオニン(T)残基に連結された糖側鎖、ならびに膜貫通アンカーを含む、天然及び合成ムチンをコードした。(B) 上皮細胞における膜管密度の定量は、ムチンポリマーが野生型(コントロール)細胞と比較して劇的な管形成を誘導することを示す。分析した細胞の数を、各条件についてx軸上に示す。この図及び他の図のボックスのノッチは、95%信頼区間を示す。(C) 走査型電子顕微鏡(SEM)画像は、表記のバイオポリマーを発現する細胞の膜形態を示す。(D) (左)タンデムリピート(TR)の数によって示される、様々な長さのMuc1 GFP- Δ CTポリマーの模式図。(右)フローサイトメトリーのデータは、表記のムチンの類似した細胞表面発現レベルを示す(GFP結合ナノボディを使用)。n=3、>4万細胞/集団。(E) (D)に記載の細胞の代表的なSEM画像。(F) (左)低密度の膜固定ポドカリキシン(Podxl)、低密度のヒト血清アルブミン(Low HSA)、又は高密度のHSA(High HAS)を有する巨大単層ベシクル(GUV)上の相対タンパク質表面密度の定量(n=10~20)。全てのGUVは、タンパク質固定のために10モル%のNi-NTA-脂質を用いて処方された。(中央)管が有る又は無い場合の、GUVの画分の定量化；nは、各タンパク質について分析されたGUVの数である。(右)GUVの代表的な共焦点画像。

30

***p<0.001(事後スチューデント両側t検定)。

【0045】

[図34] 組織滑膜細胞の膜形態は、グリコカリックスによって調節される

40

(A) 切除馬滑膜組織の実験的ワークフロー。(B) ヒアルロン酸シンターゼ3(HAS3)の代表的なSEM画像；これは、ヒアルロン酸(HA)を消化するためのヒアルロニダーゼ(HyA)処理の30分後に、一次滑膜細胞が膜細管の収縮を示すことを表す。(C) 定量は、細管密度がHAの存在に依存することを示した。(D) 代表的な滑膜細胞の核(DAPI)、表面固定HA(ヒアルロン酸結合蛋白質、HABP)、及び組織コラーゲン(第二高調波発生、SHG)を示す新たに切除した滑膜組織の画像。z軸に沿った深さは、カラーバーに従ってコード化される。滑膜組織表面から突出するHA富化膜延長部に注目。右下のパネルは、観察された組織滑膜細胞の模式表示を示す。(E) 膜細管は、新たに切除した馬の滑膜組織の滑膜細胞上に見られる(SEM)。滑膜細胞頭部は、滑膜組織から突出しておりオレンジに疑似カラーされている。HAを消化するHyA処理の結果、滑膜細胞の細管が急速に退縮した(右)。

***p<0.001(事後スチューデント両側t検定)。

50

【0046】

【図35】グリコカリックスのポリマーブラシモデル及び好ましい膜形状の生成

(A) 膜曲げのポリマーモデルは、細胞グリコカリックスによって誘発される自発的な膜湾曲の提案を示す。低密度ポリマーは非相互作用性であり、「マッシュルーム」様レジームにおいてコンパクトな構造をとる。「ブラシ」様レジームにおいて、ポリマーは重なり合い(ポリマー間の平均間隔Dは、旋回半径 R_G の2倍未満)、互いを避けるように伸び、ポリマーブラシの高さ(H)を増加させる。エントロピー圧力は、ポリーマッシュルーム及びブラシによる膜曲率生成の基礎である。(B) 膨張顕微鏡法(ExM)によるポリマー伸長の可視化のための、ポリマードメインに隣接するSUMO及びGFPタグを有するMuc1構築物。ポリマー伸長-対-ポリマー蛍光強度(表面密度の比例尺度)は、示されたスケール関係を示す。点、正方形、及び三角形は、3つのサンプルからの測定値を示す。赤い線は、全てのデータ点を通る線形回帰を示す。(C) Muc1ポリーマッシュルーム及びポリマーブラシによる自然曲率発生 of 理論的予測。青：推定マッシュルーム様レジーム(mush.)；ピンク：推定ブラシ様レジーム(brush)。ここでの計算モデルは、長さ15nm(Kuhn長)のモノマーセグメントを有する長さ270nmのムチンを考慮する。これらのパラメーターは、天然Muc1-42TRの実験的特徴付けに基づき、以下に示す実験との比較のために選択した。(D) (左)半径=250nmの小胞に対するムチン濃度の関数としての要求圧力(Pa)の理論的予測。挿入物はマッシュルーム-ブラシ移行付近で圧力最小値を示した。(右)膜細管を維持するための、ムチン濃度の関数としての必要な点力(pN)の理論的予測。

10

【0047】

【図36】好ましい膜形状は、細胞表面バイオポリマー濃度に依存する

(A) 蛍光活性化細胞選別(FACS)を用いて、細胞を、様々なレベルの細胞表面ムチン(Muc1-42TR-GFP Δ CT)を有する集団に選別するための戦略。

(B) 表記のムチン表面密度を有する選別された細胞集団の膜形態学的特徴の移行を示す代表的なSEM画像。ムチン密度は、理論的グラフ(図3D)上の示された点に一致するように選択された。(C) マッシュルーム様レジームで測定した小胞構造の平均半径と、ブラシ様レジームで測定したチューブ構造。(D) 表記の平均ムチン表面密度を有する選別された細胞集団における、膜小胞の観測密度。有意性は、マッシュルーム様レジームとブラシ様レジームとの間(*), 又は最も低いブラシ様密度と他の全てのブラシムチン密度との間(+)で決定した。(E) 表記の平均ムチン表面密度を有する選別された細胞集団における、膜管の観測密度。(D)で定義される記号。(F) (図3D、右)からの逆予測力-対-(E)からの観測された管密度は、線形関係及び0.97のピアソン相関係数を示す。

20

30

ボックスプロットのx軸に測定回数を表示。エラーバーは95%信頼区間を示す。

ns-有意ではない；*/+ $p < 0.05$ ；**/+ $p < 0.01$ ；***/+++ $p < 0.001$ (事後スチューデント両側t検定)。

【0048】

【図37】グリコカリックスを介した膜の不安定性と細胞外小胞の生合成。(A) Muc1-42TR Δ CTを発現し、ムチンについてPNA(ピーナッツ凝集素)で、アクチンについてファロイジンで染色された上皮細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像、 $n=3$ 、(B) (A)からの蛍光強度線トレース(PNA画像、赤線)。ファロイジンとPNA染色のそれぞれの最大強度に対して値を正規化する。(C) DMSO(ビヒクル)で処理した後の、又は10 μ Mラトランクリン-A(+LatA)で処理してアクチン集合体を破壊した後の、Muc1-42TR Δ CT発現細胞における細管の平均直径。(D) Muc1-42TR Δ CTを発現するビヒクル処理細胞又はLatA処理細胞における細管の代表的なSEM画像。(E) (左)アクチンコアがグリコカリックスブラシによって誘導される自発的な膜湾曲に抵抗する、提案モデルの模式図。アクチン解重合の際に、膜細管は不安定化され、最小エネルギー表面を表す種々の真珠構造及び/又は薄い管(右側に示す)に弛緩すると予測される。これらの予測の模式図は、Muc1-42TR Δ CTを発現する細胞の代表的な擬似着色SEM画像と並べて示される。(F) 真珠及び小胞化した膜の不安定性(左)が破壊され、微小胞(マイクロベシクル)の脱落(右)をもたらす、提案メカニズムの模式図。(G) 野生型(コントロール)及びMuc1-42TR Δ CT発現細胞の細胞外ベ

40

50

シクルの平均濃度及びサイズ分布を示す代表的なヒストグラム、及び (H) DMSO(ビヒクル)又はラトランクリンA(+LatA)で処理したMuc1-42TRΔCT細胞を示す代表的なヒストグラム。粒子濃度は、各グラフの最大ピークに対して正規化される。シャドー部分は95%信頼区間を示す；それぞれ、n=5、5、4、7。(I) Muc1-42TRΔCTを発現する細胞から収集したベシクルの代表的な極低温透過型電子顕微鏡(cryo-TEM)画像。赤いボックスは、右側に示される疑似着色された関心領域を示す。

***p<0.001(事後両側スチューデントt検定)

【0049】

〔図38〕 遺伝的にコードされたムチンの検証

(A)の配列は、上から下へ、PDTRPAPGSTAPPAHGVTS(A配列番号8)、及びPPASTSAPG(配列番号4)である。

(A) 遺伝的にコードされた糖タンパク質の模式図。ムチン-1(Muc1)は、PDTRPAPGSTAPPAHGVTS(A配列番号8)の42反復を含み、ポドカリキシン(S/T-Rich)は、O-グリコシル化のためのセリン-及びトレオニン-リッチ領域を有する。操作された糖タンパク質は、天然の膜貫通ドメイン(TM)を保持する一方、又は合成21-アミノ酸膜貫通アンカー(TM21)と交換される一方、天然の細胞質側末端シグナル伝達ドメイン(ΔCT)を欠いている。合理的に設計されたムチン(Rational GFP-ΔCT)は、蛍光マーカ(GFP)に融合されたPPASTSAPG(配列番号4)の80反復、ならびに天然の細胞質側末端シグナル伝達ドメインを有さない天然のストーク及びTMを含む。(B) 代表的な共焦点顕微鏡画像は、野生型(コントロール)細胞と比較して、種々の改変された糖タンパク質によって誘導された膜管状化を示す。細胞表面をレクチンWGA(コムギ胚芽凝集素)で可視化する。レクチンPNA(ピーナッツ凝集素)によるムチン染色により、MCF10A細胞上の糖タンパク質O-グリコシル化及び表面局在が確認される。n=3。(C) 処置0.5又は1時間後のAlexa Fluor 488標識トランスフェリン(488 TNF)のエンドサイトーシスの定量。フローサイトメトリーで実施した定量、バックグラウンド減算で報告されるシグナル中央値、>1万個細胞/集団、n=6、エラーバーは、S.D。(D) 処置0.5時間後の、エンドサイトーシスされた488 TNFの代表的な共焦点顕微鏡画像。(E) 上皮細胞において発現されたポリマーサイズを示すウェスタンブロット、緑色蛍光タンパク質(GFP)タグに対する抗体を用いて分析、n=2。(F) 表記のムチンサイズについての、管密度の定量。分析した細胞の数を、各条件についてx軸上に示す。ボックスのノッチは95%信頼区間を示す。統計的比較は42TRに対するものである。

ns：有意ではない，*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001(事後スチューデント両側t検定)

【0050】

〔図39〕 ヒアルロン酸は細胞表面に局在し、細胞表面突起を誘導する

(A) (左)膜貫通タンパク質ヒアルロン酸シンターゼ3(HAS3)によって押し出されたヒアルロン酸(HA)の模式図。(右)野生型(Cont.)、及びヒアルロン酸シンターゼ3(HAS3)発現ヒト乳腺上皮細胞(MECs, MCF10A)の溶解物中のHAのプロット。発現されたHAは、MDa値域の巨大線状ポリマーであることに注目。(B) MECによって培地中に分泌されたHAをELISAで定量し、試料中の細胞数とコントロール細胞のHA分泌で正規化した(n=3)。(C) 野生型(コントロール)又は安定的にHAS3を発現するヒトMECの代表的な共焦点顕微鏡画像。細胞をHoescht(核)及びAlexa Fluor 568ヒアルロン酸結合タンパク質(HABP)で染色する。(D) 代表的なSEM画像は、HAS3発現ヒトMECにおいて高度に伸長した膜細管を示す(左)。同じ細胞上の領域の拡大表示(右)。

**p<0.01(事後スチューデント両側t検定)

【0051】

〔図40〕 ムチンは、モデル脂質膜の管状化を引き起こす

(A) Ni-NTA脂質の割合を増加させた、Bodipy-PC標識DOPC巨大単層ベシクル(GUV)の代表的共焦点画像。組換えAlexa Fluor 568標識ポドカリキシン(Podxl)は、ポリヒスチジンタグを介してGUVと結合する。スケールバーは、各BODIPY-PC画像において5μmである。(B) (左)異なるNi-NTA脂質レベルでの、Alexa Fluor 568標識-ヒト血清アル

ブミン(HSA)又はPodxlの、GUV上での蛍光強度(相対表面密度)の定量、 $n=10\sim20$ 。ムチン表面密度と同様のHSA表面密度(Low HSA)及び数倍高いHSA表面密度(High HSA)を用いて、タンパク質密集効果を制御した。(右)各組換えタンパク質(Low HSA、High HSA、及びPodxl)についての異なるNi-NTA脂質レベルでの、管を有するGUVの画分の定量化、エラーバーは標準偏差であり、1~3回の実験にわたって $n=20\sim90$ GUVである。(C) 細管形成高HSAを有するGUVについてのAlexa Fluor 568-HSAの代表的な共焦点画像。

【0052】

【図41】 個々のムチン及びムチン集合体の物理的特徴付けのためのサポート情報

(A) 10x-ヒスチジンタグに融合された組換えMuc1 42タンデムリピート(Muc1-42TR)ポリマーの模式図。(B) 組換えMuc1-42TR産生(Media+Muc1-42TR 10xHis)、タンパク質のNi-NTA樹脂結合(Flowthrough)、非特異的タンパク質の洗浄液(Wash)、及び精製組換えMuc1-42TRポリマー(Elution)のウェスタンブロット検証。試料を抗Muc1及び抗His抗体ならびにPNA(ピーナッツ凝集素)でプローブし、O-連結グリカンを結合させる。(C) Bに示された試料についてのSYPRO Rubyタンパク質ゲル染色。(D) 示された相対ムチン表面密度に対する上皮微絨毛直径の定量。ボックスのノッチは95%信頼区間を示す。(E) (左)膨張顕微鏡法(ExM)によるポリマー伸長の可視化のために、ポリマー領域に隣接するSUMO及びGFPタグを有するムチン構築物(Muc1-42TR)。(右)ExM試料ワークフロー。まず、試料を染色し、固定する。次いで、タンパク質は、重合してゲルを形成するモノマーに化学的に連結(固定)される。次に、タンパク質を消化し、ゲルを元のサイズの4倍に膨張させる。

ns: 有意ではない。

【0053】

【図42】 グリコカリックスにおける分子間相互作用による曲率生成についてのさらなるポリマーブラシ理論予測

(A) ブラシ様レジームにおける、バイオポリマー表面密度の関数としての予測ブラシ厚みのグラフ。ブラシの厚みは、バイオポリマー濃度のべき法則としておおよそを計る。(B) バイオポリマー密度の関数としてのエネルギー的寄与を示すプロット。マッシュルーム様レジームではポリマーは弾性エネルギーのみを有するが、伸長されたブラシでは、排除体積及び静電相互作用が、バイオポリマーの自由エネルギーに寄与する。(C) プロットは、バイオポリマー密度及び分子長で生成された自然曲率の変化を示す。(D) バイオポリマー密度及びKuhn長さの関数としての自然曲率の傾向を示すグラフ。持続長さの2倍に等しいKuhn長さは、ポリマー曲げ剛性に正比例し、明細書中でモノマーセグメントの長さと呼ばれる。(A-D)のプロットはlog-log形式である。(A)及び(B)のプロットは、バイオポリマーの長さ $l=270\text{nm}$ 、及びモノマーセグメントの長さ $l_\alpha=15\text{nm}$ を使用する。プロット(C)は、15nmのポリマーモノマーセグメントサイズを使用し、そして(D)は、270nmのバイオポリマー長さを使用する。(E) 高密度でのバイオポリマー長さに対する自然曲率の依存性を予測した。このグラフは、 $50000\#/\mu\text{m}^2$ 密度で充填された、 $l_\alpha=15\text{nm}$ のポリマーを使用する。

【0054】

【図43】 蛍光活性化選別及びMuc1表面密度の定量

(A) 異なるMuc1表面密度での定量実験のための拡張ワークフロー。(B) Alexa Fluor 647標識ナノボディのSDS-Page較正。(C) ナノボディ希釈系列(Bに示す)からの蛍光シグナルの集積密度のlog値と、負荷された分子の数のlog値との間の検量線。線形回帰フィットと R^2 が表示される。(D) (C)に示す線形回帰フィットの残差。(E) 蛍光活性化細胞選別(FACS)ヒストグラムは、ナノボディ蛍光シグナル及びこれらの実験のために収集された集団「a」~「e」を示す。(F) 基質から非酵素的に脱離され、次いでSEM画像化のために再付着された野生型細胞(分離コントロール)、及び基質から非酵素的に脱離され、FACSを通して収集され、次いで再付着された細胞(FACSコントロール)の代表的な走査型電子顕微鏡(SEM)画像。これらの画像は、FACS収集の方法が、Muc1-42TRΔCT発現で観察された膜形状(図2Fに示される)に影響を与えなかったことを示している。(G) 細胞

の収集及び溶解後の、各細胞集団、a～eにおける蛍光ナノボディーシグナルのSDS-PAGE分析。(H)(G)に示す蛍光画像からの集積密度シグナル、(C)の検量線に基づいて計算された分子数、及び各集団(E)についてFACSで収集された細胞の数に基づく、タンパク質ゲル(G)に負荷された細胞の数、を記載する表。(I) FACSからのナノボディー平均シグナルのlogと、各集団について計算された分子数との間の検量線。試料当たりの分子数を、負荷した細胞数及び細胞当たりのおおよその面積によって正規化した。線形回帰フィットと R^2 値が示される。(J)(I)に示される線形回帰フィットの残差。

【0055】

【図44】管状膜の形状は、繊維状のアクチンコアを含み、微絨毛に似ている

(A) Muc1-42TR Δ CTを発現する上皮細胞の代表的な共焦点顕微鏡像は、抗-微小管及びAlexa Fluor 568-標識二次抗体による間接的微小管染色を示す。ムチンをAlexa Fluor 647 PNA(ピーナッツ凝集素)で標識する。下の行は合成画像からの関心領域(黄色のボックス)を示す。 $n=3$ 。(B)(A)からの蛍光強度線トレース(下段、黄色の線)である。値は、それぞれの最大強度について正規化される。(C) Muc1-42TR Δ CTを発現する上皮細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像は、Alexa Fluor 568ファロイジンによるアクチン染色を示す。ムチンをAlexa Fluor 647 PNAで標識する。下の行は合成画像からの関心領域を示し(黄色のボックス)、 $n=3$ である。(図5A、B)についてこのデータを繰り返し、詳述する。(D)(C)からの蛍光強度線トレース(下段、黄色線)。値は、それぞれの最大強度について正規化される。(E) 10 μ Mのラトランクリン-A(LatA)で1時間処理した野生型(コントロール)又はMuc1-42TR Δ CT細胞の中央平面の代表的な共焦点顕微鏡画像、 $n=3$ 。(F) LatA処理Muc1-42TR Δ CT細胞の代表的なSEM画像。

【発明を実施するための形態】

【0056】

反対のことが指定されない限り、本明細書を通して与えられるすべての最大の数値限定は、すべてのより低い数値限定を、あたかもそのようなより低い数値限定が本明細書に明示的に記載されているかのように、含むことが意図される。本明細書を通して与えられるあらゆる最小の数値限定は、より高い数値限定を、あたかもそのようなより高い数値限定が本明細書で明示的に記載されているかのように、すべて含む。本明細書を通じて与えられるあらゆる数値範囲は、あたかもそのようなより狭い数値範囲がすべて本明細書で明示的に記載されているかのように、そのようなより広い数値範囲内に入るあらゆるより狭い数値範囲を含む。

【0057】

本開示は、本明細書中に記載されるすべてのアミノ酸配列、ならびにアミノ酸配列をコードするすべてのポリヌクレオチド配列(cDNA配列及びmRNA配列を含むがこれらに限定されない)を含む。相補的配列、及び逆相補的配列も含まれる。このようなヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、本開示に包含される。

【0058】

本開示は一般に、改善された糖タンパク質、多様な用途における使用のための前記タンパク質を含む組成物、ならびに糖タンパク質を作製及び使用する方法に関する。ある実施形態において、糖タンパク質は、ムチン及び/又はラブリシンである。

【0059】

本開示は、本明細書に記載のタンパク質を発現する細胞及び細胞培養物を含む。特定の実施形態では、本開示は、細胞の凝集、集合などの減少により、様々なタンパク質のいずれかを産生するために改善された細胞培養物を含む。

【0060】

複数の実施形態において、本開示のタンパク質を発現するために使用される細胞は、真核細胞である。特定の実施形態では、前記細胞は、昆虫細胞及び哺乳動物細胞を含むがこれらに限定されない真核細胞である。ある実施形態では、哺乳動物細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞ではないが、ある場合にはCHO細胞を使用することができる。ある実施形態では、細胞は哺乳動物の上皮細胞である。ある実施形態では、細胞はヒト細

10

20

30

40

50

胞であり、したがって、例えば、ヒト生物製剤を産生するのに、非ヒト哺乳動物細胞よりも良好に適している。ある実施形態では、細胞はヒト293細胞である。ある実施形態において、293細胞は293細胞に由来し、SV40ラージT抗原を安定に発現する。ある実施形態では、細胞は、懸濁培養での増殖に適合したヒト293細胞である。ある実施形態では、細胞は、様々なベンダーから市販されているヒト293-F細胞である。

【0061】

治療アプローチなどの特定のアプローチにおいて、本開示は本明細書中に記載される糖タンパク質の1つ以上を発現するために、異種、又は個体から得られた細胞を改変することを包含する。従って、ある実施形態において、ヒト又は非ヒト細胞は、例えば、ムチン又はムチン様タンパク質の欠陥、又はその産生を補正するために改変され得る。ある実施形態において、本開示に従って改変された細胞は、全能性、多能性、小能性幹細胞、又は複能性幹細胞である。ある実施形態では、細胞は造血細胞である。ある実施形態では、細胞は軟骨細胞である。ある実施形態では、細胞は、間葉幹細胞又は髄間質細胞である。ある実施形態では、細胞は滑膜細胞である。ある実施形態では、細胞は軟骨形成前駆細胞である。ある実施形態では、細胞は、II型コラーゲン及び/又は軟骨特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)などの軟骨特異的遺伝子産物を内因的に産生する。ある実施形態において、細胞は、上皮細胞又はその前駆体であるか、又は杯細胞である。ある実施形態では、細胞は免疫細胞であり、T細胞、例えばCD4+及びCD8+T細胞、ならびに樹状細胞を含むが、必ずしもこれらに限定されない。細胞は、任意の確立された技術(ウイルス発現ベクターの使用を含むがこれに限定されない)に従って、又は染色体編集によって(例えば、任意の適切なCRISPRベースの遺伝子編集アプローチによって)、改変され得る。改変細胞は、それを必要とする個体に投与することができる。ある実施形態では、本開示の改変されたタンパク質の1つ以上を発現するように作製されたトランスジェニック非ヒト動物を産生し、広範囲の生物学的機能、障害及び状態を研究するために使用することができる。

【0062】

ある実施形態では、本明細書中に記載される任意の糖タンパク質は、融合タンパク質中に存在し得る。融合タンパク質は組換え的に産生され、そして単一の連続するポリペプチド中に、異なるタンパク質のセグメントを含む。ある実施形態において、本明細書中に記載される融合タンパク質は、糖タンパク質又はそのセグメント、及び特に限定されない第二のタンパク質又はセグメントを含む。ある実施形態において、第二のタンパク質は検出可能なシグナルを生成し、したがって、例えば、蛍光タンパク質を含む。

【0063】

特定の実施形態では、本開示の組成物及び方法は、タンデムリピート配列などの反復アミノ酸配列を有する組換え産生タンパク質を含む。ある実施形態では、タンデムリピート配列がそれらの天然に存在する配列に対して改変され、反復の数は天然に存在するタンパク質における反復の数に対して変更されていてもよい。別個の反復の組合せは、本明細書中に記載されるポリペプチドに含まれ得る。

【0064】

ある実施形態では、本開示は、本明細書に記載の1つ以上のタンパク質をコードする本明細書に記載の発現ベクター(コドン最適化発現ベクターであってもよい)を、適切な細胞/細胞培養物に導入すること、タンパク質の発現を可能にすること、及び細胞からタンパク質を回収することを含む。ある実施形態では、細胞培養物中の細胞は、任意の適切な発現ベクターを使用して、本明細書中に記載される少なくとも1つのタンパク質を発現するように改変される。

【0065】

発現ベクターは、細胞の染色体に組み込まれてもよく、又はエピジェネティック・エレメントとして永久的又は一時的に維持されてもよい。発現ベクターは、構成的又は誘導可能な様式でタンパク質(単数又は複数)を発現するように構成され得る。1つの非限定的な実施形態において、トランスポゾンに基づく発現ベクターが使用されてもよく、又はレン

10

20

30

40

50

チウイルス発現系が使用されてもよい。ある非限定的な実施形態において、レンチウイルス系は、本明細書中に記載されるタンパク質を発現するためのツールとして除外され得る。ある実施形態において、本明細書に記載される任意のタンパク質は、シグナル配列を含んでも含まなくてもよい。ある実施形態において、本明細書中に記載されるタンパク質の1つ以上をコードするcDNAのようなポリヌクレオチドは、改変された細胞を産生するために、1つ以上の染色体にランダムに組み込まれる。ある実施形態において、cDNAのゲノムへの無作為化転位が使用される。

【0066】

ある実施形態において、コドン最適化発現ベクターは、閾値数の改変コドンを含み、改変コドンは、特定のコドンによってコードされるアミノ酸を変化させない。従って、最適化されたコドンは例えば、揺らぎ塩基の変化を含み得る。ある実施形態では、少なくとも1つのコドンが変化し、1つのコドンから、特定のタンパク質中の各アミノ酸をコードするすべてのコドンに変化することができる。ある実施形態では、コドン最適化cDNAは、DNAプロセッシング(複製、転写、逆転写、及び反復ヌクレオチド配列に関する他のヌクレオチドプロセッシング操作(cDNA及びmRNAの欠失又は増幅をしばしばもたらす)の間の翻訳スリップを含むが、必ずしもこれに限定されるものではない)の間のヌクレオチド配列の安定性を改善するために、cDNA配列の反復性を減少させる。ある実施形態において、関連のある細胞型における所定の使用頻度閾値未満のコドンは、より高い使用頻度を有するコドンで置換される。例えば、一実施形態では、ヒト細胞において、10%以下の使用頻度を有するコドンを、置換することができる。

【0067】

複数の実施形態において、ムチン/ラブリシタンパク質、又は改善された産生が所望され得るタンパク質は、1つ以上の精製タグ(Hisタグを含むがこれに限定されない)を含むがこれに限定されない、任意の適切なアプローチを使用して、回収のために改変することができる。一実施形態において、Hisタグは、nヒスチジン残基の直線状の配列である(nは、典型的には6~10である)。Hisタグは、ニッケル又はコバルトイオンに特異的に結合することによって精製を達成し、ニッケル又はコバルトイオンは例えば、任意の適切なビーズのような基質に結合され得る。Hisタグ又は他の適当な精製タグは、タンパク質のN末端、タンパク質のC末端、又はタンパク質の内部に配置することができる。ある実施形態において、FLAGタグ、又はFLAGオクタペプチド、又はFLAGエピトープが、本開示のタンパク質に含まれ得る。適切なFLAG配列は、当該分野で公知である。ある実施形態では、His-SUMOタグなどの低分子ユビキチン様修飾因子(SUMO)タグを含めることができる。ある実施形態では、タンパク質同定、分離、精製などのために、プロテアーゼ切断部位を含めることができる。タンパク質は、任意の所望の純度まで精製することができる。

【0068】

非限定的な実施形態において、本開示のタンパク質に含まれるタンデムリピートは、以下のアミノ酸セグメントのいずれか1つ又はいずれかの組合せを含む：KEPAPTTP(配列番号1)、KEPAPTTP(配列番号9)及びKEPAPTTTP(配列番号10)あるいはそれらの組み合わせ。

【0069】

ある実施形態において、2~120個の反復が、本開示のタンパク質に含まれる。非限定的な実施形態において、10、21、40、42、59又は80個の反復が含まれる。反復配列は、ポリペプチド内で完全に連続していてもよい。ある実施形態において、本明細書中に記載される任意のアミノ酸配列は、より長いタンデムリピートのセグメントであってもよく、したがって、そのN末端又はC末端にさらなるアミノ酸配列を有し得る。ある実施形態において、本明細書中に記載されるタンデムリピートのアミノ酸配列は、7~80個のアミノ酸を含むか、又はそれからなる。ある実施形態において、本明細書に記載されるタンデムリピートは、約135nm又は270nmの推定長さを示す。ある実施形態において、反復は完全反復であり、これは、同一の配列がタンパク質中で反復されることを意味し、天然に存在する特定のタンデムリピートとは異なる。

【0070】

ある実施形態では、本開示は、実施例の第I部～第IV部に開示されるすべてのcDNA及びアミノ酸配列、ならびに本明細書に記載されるその変異体を含む。時々、そのような代表的な配列は、便宜上、「バイオリック(biobrick)」と称される。非限定的な実施形態において、本開示は、糖タンパク質などのポリペプチド、ならびに糖タンパク質をコードするコドン最適化発現ベクター(これらは、本明細書において、SynMuc1及びSynLubricin、Syn1_40、Syn1_80、Syn2_40、Syn2_80、Syn3_40と記載される)、ならびに以下にさらに記載されるような非ヒト哺乳動物での使用のための他の構築物を提供する。

【0071】

これらの配列のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれる。ある実施形態において、タンパク質は、内因性タンパク質と比較して、変異を含む。「内因性」タンパク質は、通常、未改変遺伝子によってコードされるタンパク質である。同様に、内因性遺伝子又は他のポリヌクレオチドは、組換え、遺伝子編集、又は他のアプローチなどによって改変されていないDNA配列を含む。以下にさらに記載されるように、変異は、アミノ酸の挿入、欠失、及び変化を含み得、そしてまた、内因性配列と比較して、追加の反復配列、又はより少ない反復配列を含みうる。

【0072】

ある実施形態において、タンデムリピートアミノ酸配列は、そのN末端、そのC末端、又はN末端及びC末端の両方で、糖タンパク質に導入される。1つの例示的な実施形態において、ラブリシン様分子は、ヒトラブリシン又は非ヒト哺乳動物由来のラブリシンの天然のN末端及びC末端と、KEPAPTTTP(配列番号1)、KEPAPTP(配列番号9)及びKEPAPTTTP(配列番号10)の反復との融合を介して産生される。ある実施形態において、非ヒト哺乳動物は、イヌ又はウマ又はネコ科の動物である。改変ラブリシンに組み込まれるウマ及びイヌ由来のラブリシンの代表的なアミノ酸配列を、以下にさらに記載する。ある実施形態において、10～120個の反復が含まれる。ある実施形態において、59個の反復が含まれる。ある実施形態において、反復配列又は他の配列は、配列によって、又はリンカー配列によって(例えば、1～3アミノ酸)互いに分離されてもよい。

【0073】

ある実施形態において、以下に記載される連続的な反復配列が、N末端アミノ酸配列とC末端アミノセグメント(ヒト、イヌ、又はウマ配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する)との間に位置する組換えラブリシンポリペプチドが、提供される。したがって、本開示は、フランキング配列を含む記載されたタンデムリピートを含む。フランキング配列は、ヒトラブリシンN末端及びC末端由来アミノ酸配列；イヌラブリシンN末端及びC末端由来アミノ酸配列；又はウマラブリシンN末端及びC末端由来アミノ酸配列を含み得る。

【0074】

1つの非限定的な実施形態では、連続的な反復配列が、以下のヒトラブリシン配列と少なくとも90%の配列同一性を有するN末端ヒトラブリシン由来配列と、以下のヒトラブリシン配列と少なくとも90%の配列同一性を有するC末端ヒトラブリシン由来アミノ酸配列との間に位置する：

N末端ヒトラブリシン配列：

QDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCQHYMECCPDFKRVCTAELSCKGRCFESFERGREG
DCDAQCKKYDKCCPDYESFCAEVHNPTSPSSSKKAPPPSGASQTIKSTTKRSPKPPNKKK
TKKVIESEEITEEHSVSENQESSSSSSSSSSSTIRKIKSSKNSAANRELQKKLKVKDNKKNR
TKKKPTPKPPVVDEAGSLDNGDFKVTTPDTSTTQHNVSTSPKITTAKPINPRPSLPPN
SDTSKETSLTVNKETTIVETKETTNTNKQTSTDGKEKTTSAKETQSIEKTSKDLAPTSTKVL
AKPTPKAETTTKGPAITTP(配列番号75)

C末端ヒトラブリシン配列：

SEVSTPTTTKEPTTIHKSPDESTPELSAETPKALENSPKEPGVPTTKTPAATKPEMTTTA
KDKTTERDLRTTPETTTAAPKMTKETATTTEKTTESKITATTTQVTSTTTQDTTPFKITTL

10

20

30

40

50

KTTTLAPKVTTTCKTITTTEIMNKPEETAKPKDRATNSKATTPKPQKPTKAPKKPTSTKK
PKTMPRVVRKPKTTPTPRKMTSTMPELNPTSRIAAMLQTTTRPNQTPNSKLVVNPKSE
DAGGAEGETPHMLLRPHVFMPEVTPDMDYLPRVPNQGIINPMLSDETNICNGKPV DGL
TTLRNGTLVAFRGHYFWMLSPFSPSPARRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTF FFKDS
QYWRFTNDIKDAGYPKPIFKGFGGLTGQIVAALSTAKYKNWPESVYFFKRGGS IQQYIYK
QEPVQKCPGRRPALNYPVYGETTQVRRRRRFERAIGPSQTH TIRIQYSPARLAYQDKGVLH
NEVKVSILWRGLPNVVTSAISLPNIRKPDGYDYA FSKDQYYNIDVPSRTARA ITTRSGQT
LSKVWYNCP(配列番号 7 6)

【0075】

ある実施形態において、非ヒト動物における連続反復に隣接するラブリシン配列は、アミノ酸変化を含むことができ、これは、非限定的な実施形態において、以下の配列のN又はC末端における天然配列と比較して、3～7のアミノ酸変化である。

【0076】

ある実施形態では、連続的な反復配列は、以下の配列と少なくとも90%の配列同一性を有するN末端イヌ由来ラブリシン配列と、以下のイヌラブリシン配列と少なくとも90%の配列同一性を有するC末端イヌラブリシン由来アミノ酸配列との間に位置する。

N末端イヌラブリシン配列：

QDLPS CAGRCGEGYSRDAICNCDYNCQH YMECCPDFKKACTVELSCKGRCFESFARGREC
DCDS DCKKYGKCCPDYEDFCGRVHNPTSP PSSKTAPPSPGASQTIKSTAKRSPKAPNKKK
TKKV IESEEITEEHSVSENQESSSSSSSSS STIRKIKSSKNSAANKELKKKPKVKDNKKERTP
KKKPP PEPPVVDEAGSGLDNGDIKLTPT PDIPTTQRNKVTTSPKFTTGKPINPKPSLPPNT
DTSKET SSTPNKETTVKSKETLANKETSS KAKEKITSAKETRSAEKTPAKDFVPTTKAPVK
STPKA ESTTKGPALTTP(配列番号 7 7)(ここで、例えば、7つのC末端アミノ酸は、天然
のイヌ配列から変化してもよい(SPAPTTP：配列番号 8 3))

C末端イヌラブリシン配列：

SEVTTTAKDKTTEKDIIPEITTA VPKITTQETATPTEETTETSKTSTTTQVTSTTSSKNTPK
ATT LAPKVM TATQKTTTTEETMNKPEETTAVPKDTATSTKVSTPRPRKPTKAPKKPAST
KKPN TIPKRKKPKTTPTPPKMTTSTMPKLHPTSSVEAMLQTTTSPNQRPNSEIVEVNPN E
DTDAAGKKPHMFPRPPVLTPIFIPGTDILVRGSNQDI AINPMLSDETNL CNGKPV DGLTT
LRNGT MVAFRGHYFWMLSPSKPPSPPRKITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTF FFKGSQY
WRFTNDIKDAGYPKQIVKGFGGLNGRIVAALSI AKYKDRPESVYFFKRGGSVQQYTYKQE
PIKKCTGRRPAINYPVYGETTQVRRRRRFERAIGPSQTH TIRIHYSPIRVSYQDKGFLHNEV
KMSSQ WRGFPNVVTSAIALPNIRKPDGYDYA FSRNQYYNIDVPSRTARVVTTTRFGRTLS
NIWYNC(配列番号 7 8)(ここで、例えば、3つのN末端アミノ酸は、対応するイヌ配列に
対して変化している(PEM))。

【0077】

ある実施形態において、連続的な反復配列は、以下のウマラブリシン配列と少なくとも90%の配列同一性を有するN末端ウマ由来ラブリシン配列と、以下のウマラブリシン配列と少なくとも90%の配列同一性を有するC末端ウマラブリシン由来アミノ酸配列との間に位置する。

N末端ウマラブリシン配列：

QDLSS CAGRCGEGYSRDATCNCD FNCQYYMECCPDFKKVCTSEL SCKGRCFESFERGREG
DCDADCKKYGKCCSDYESFCEEVHNPTSP PSSKTAPPPPGASQTIKSTAKRSPKSNKKKTK
KVIESEEIEEHSVSENQESSSSSSSSS STIRKVKSSKNSAANRELKKKPKVKDSKKKRTPKK
KPTPEPPVIDEAGSGLDNGDFMLIPTPKIPTTQRNKVTTSPKITT VKPINPKPSLPPNSDT
SKETTSTPNKETTVETKETEITNKETSTS ANEKTTSARKSTEKTS D KDFAPASEVPAKSTP
KAETTTKGPALTTP(配列番号 7 9)(ここで、例えば、7つのC末端アミノ酸は、天然ウマ
配列とは異なってもよい(SPSLTT：配列番号 8 4))；

C末端ウマラブリシン配列：

SEVSTTTTTMKPPTTPKNLAESTPEFPAEPTPKALENSPK E PAVPTTKAPEVTKPEVTTT

10

20

30

40

50

AKDKVTGKDIHTIPEITTAAPKITTETATTTEEKTTESKVTSTIMQVTSTTTEDTTTSSKITP
KATTLAPKVMATATKTTTTQETINKLEETTAIPKDTATHSKVTTTPKPKKPTKAPRKPTSTK
KPKTPRKRKPKTTPIPPKITTPTTPKSNPTTLAEAMLQTTTSPNQTPNSAMIEVNPKNED
ADAAEGEKPLVILRPHVLTPIVIPGPDFLVRGPNLGIGINPMLSDETNLNCGKPV DGLTTL
RNGTLVAFRGHYFWMLRPFSPSPRRRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTFFFKDSQYW
RFTNDIKDAGYPKLISKGFGLSGKIVAALSIAITYKNRPESVYFFKRGGRIGQYIYKQEP
KCPGRRPAIHYSVYGEAPQIRRRRFFERAIGPSQTHITIRIHYSVVRVSYQDKVPSTDFLHNE
VKVSTLWRGLPDTVTSALSPNLRKPDGYDYAFSKDQYYNIDVPSRTARAITTRSGQTL
SKVWYNCP(配列番号80)(ここで、例えば、3つのN末端アミノ酸は、天然ウマ配列とは異なってもよい(SEA))。

10

【0078】

ある実施形態において、本明細書に記載される組換え産生タンパク質は、本明細書に記載されるタンデムリピート配列のいずれか1つ又は組合せのタンデムリピートを有する変異体を含み、この変異体は、そのような配列の改変を含む。変異体をコードする発現ベクターが含まれる。ある実施形態において、改変は、本明細書中に明確に記載される連続するアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列と、90.0~99.9%(その間の数の全ての範囲から第一小数点までを含む)の間のアミノ酸同一性を有するアミノ酸セグメントを含む。ある実施形態では、本開示の組換え産生タンパク質に含まれるタンデムリピートは、本明細書に記載されるアミノ酸配列に対して90、95、97、98、99又は99.5%のアミノ酸配列同一性を有する(それらの全長にわたって)。組換えタンパク質は、そのポリヌクレオチドを導入する前にはそのタンパク質のコード配列を含まなかった細胞に導入されたポリヌクレオチドから発現されたタンパク質である。組換えcDNA配列についても同様である。

20

【0079】

当技術分野で知られているように、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列の同一性パーセントを決定するには、最適な比較目的のために、配列を整列させる(例えば、間隙を導入することができる)。次いで、対応するヌクレオチド又はアミノ酸位置におけるヌクレオチド又はアミノ酸を、比較する。第一の配列中の位置が、第二の配列中の対応する位置と同じヌクレオチド又はアミノ酸によって占められる場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一位置の数の関数である(すなわち、%同一性=(同一である位置の数/位置の総数)×100)

30

【0080】

特定の実施形態では、本明細書に記載のタンデムリピート変異体は、1、2、3、4、又は5個のアミノ酸の変化を含む。ある実施形態において、アミノ酸は、欠失、付加、又は変更させることができる。ある実施形態において、変更されるアミノ酸は、セリン、トレオニンであり、又はセリン残基及びトレオニン残基の組合せが変更される。ある実施形態では、約1~50%のセリン及び/又はトレオニン残基が変更される。ある実施形態において、天然タンパク質配列中に存在するセリン又はトレオニン残基は、アラニン又は別のアミノ酸に変更される。ある実施形態において、本開示のタンパク質は、天然の(非改変及び/又は内因性タンパク質)中に存在するアミノ酸をより少なく含むか、又は全く含まない。ある実施形態において、天然タンパク質は、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、及び/又はセリンの1つ又は任意の組合せを含み、これらは、本開示の代表的なタンパク質から組換え的に操作され得る。

40

【0081】

ある実施形態において、本開示のタンパク質に導入されるアミノ酸変化は、変化したグリコシル化パターンをもたらす。従って、ある実施形態において、本開示は、制御可能なグリコシル化パターンを有する組換えタンパク質の産生を提供する。ある実施形態において、本開示のタンパク質上に存在するO結合オリゴ糖の数は、改変される。ある実施形態において、グリコシル化パターンは、対照(対応するグリコシル化部位が変化していないタンパク質など)と比べて変化している。ある実施形態では、タンパク質及び/又はタンパク質を発現する細胞の1つ以上の特性が、変化する。ある実施形態において、タンパク質/ア

50

ミノ酸に対するオリゴ糖の化学量論は例えば、本開示の糖タンパク質において変化する。ある実施形態において、本開示のタンパク質は、適切な対照とは異なるグリコシド残基の重量パーセントを有する。ある実施形態において、本開示のタンパク質は、動的摩擦係数などの潤滑パラメータを示す。ある実施形態では、摩擦係数は、軟骨摩擦試験における軟骨などの任意の適切なアプローチを使用して決定することができる。ある実施形態において、本開示のタンパク質は、適切な対照とは異なる潤滑パラメータを示す。

【0082】

ある実施形態において、本明細書に記載される組換え産生タンパク質は、コア1 O-グリカン構造、Gal β 1-3GalNAc、及び/又はGal β 1-3GalNAcのコア1誘導体の量、及び/又はその中の末端置換シアル酸の量について、対照に対する変化を含み、又はGalNAc(N-アセチルガラクトサミン)単糖類グリコシル化の変化を含む。ある実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、コア2 O-グリカン、GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc、及び/又はGlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAcのコア2誘導体を含むことができ、これらはすべてのコア1、コア2、コア3、コア4、コア5、コア6、コア7、及びコア8 O-グリカン構造の少なくとも5パーセントを含む。ある実施形態において、このようなタンパク質は、本明細書にさらに記載されるようにして培養されるヒト細胞によって産生される。

【0083】

ある実施形態において、本開示のタンパク質は、単量体、二量体、多量体、及びそれらの組合せの形態であり得る。ある実施形態において、単量体/二量体の比、比率、及び/又は濃度は、適切な対照と比較して変化している。

【0084】

ある実施形態において、本明細書中に記載されるタンパク質のセグメントは、任意の適切な連結アミノ酸(リンカーアミノ酸)によって分離され得る。ある実施形態において、リンカーは、1~20個(包括的であり、これらの間のすべての整数及び整数の範囲を含む)のアミノ酸を含むことができる。一般に、リンカーは、グリシン、セリン、又はセリンとグリシンから構成される。ある実施形態において、連結アミノ酸は、タンデムリピートに干渉しない。ある実施形態において、グリコシル化突然変異体の分泌形態が提供される。

【0085】

ある実施形態において、改変されたラブリシンは、細胞質ドメイン及び膜貫通ドメインの一方又は両方を欠く。ある実施形態において、本開示のラブリシンは、例えば改変タンパク質を産生するために使用するための分泌シグナルを含む。多くの適切な分泌シグナルのアミノ酸配列は当技術分野で公知であり、この実施形態で使用することができる。一実施形態では、ヒト分泌配列は、MAWKTLPIYLLLLLSVFVIQQVSS(配列番号72)を含むか、又はそれからなる。一実施形態では、イヌ分泌シグナルは、MQWKILPIYLLLLLSVFLLIQVVS(配列番号73)を含むか、又はそれからなる。1つの実施形態において、ウマ分泌シグナルは、MEWKILPIYLLLLLSIFSIQEVSS(配列番号74)を含むか、又はそれからなり、あるいは本明細書中にさらに記載される別の配列(N末端アミノ酸及びC末端アミノ酸の変化を含む)を含むか、又はそれからなる。ある実施形態において、天然の分泌シグナルは、免疫グロブリンのセグメント(例えば、ヒト又はマウス又は別の哺乳動物由来のIgG κ 軽鎖配列)で置換される。ある実施形態において、分泌配列は、IL-2、CD33、ヒトIgG2 H、キモトリプシノーゲン、トリプシノーゲン、Gaussia luc、インフルエンザ血球凝集素、ヒトインスリン、又はカイコフィブロイン(Silkworm Fibroin)のいずれかからの分泌配列を含む。

【0086】

ある実施形態において、本開示のポリペプチドは、例えば、別の部分に結合された1つ以上の修飾アミノ酸を有し得る。ある実施形態において、本開示のポリペプチドは、それらが他の部分に容易に結合され得るように、少なくとも1つのアジド基に結合される(例えば、アジドでO-グリカンを修飾することによるなど、クリック化学を使用して)。ある実施形態において、本開示のポリペプチドは、環化されるか、又はステーブル留めされる。

【0087】

ある実施形態において、本明細書に記載されるタンデムリピート配列は、任意の糖タンパク質に組み込まれる。ある実施形態において、糖タンパク質は、任意のムチン又はラブリシンタンパク質である。ある実施形態において、糖タンパク質は、当技術分野においてラブリシンとも呼ばれるプロテオグリカン4であり、これには、ヒトにおいてPRG4遺伝子によってコードされるタンパク質が含まれる。非限定的に、本開示は、以下にさらに記載されるように、SynMuc1と呼ばれる改変ムチンを提供する。別の非限定的な実施形態において、改変ラブリシンは、以下にさらに記載されるように、SynLubricinとして提供される。

【0088】

1つの実施形態において、タンパク質の産生は、本明細書の改変細胞を使用して増加され、ここで、細胞は、細胞培養容器(任意の細胞培養皿、及びバイオリアクターを含むがこれらに限定されない)中に存在する。ある実施形態では、本開示による改変された細胞は、バイオリアクター中で使用されて、任意の所望のタンパク質、又はそれらの組み合わせを産生する。非限定的な実施形態では、バイオリアクターには、懸濁細胞バイオリアクターが含まれる。ある実施形態において、バイオリアクターは、1~25,000リットル(包括的であり、これらの間の全ての数、及び数からなる範囲を含む)の体積を有する。

【0089】

ある実施形態において、cDNAライブラリーが提供される。ある実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるcDNAライブラリーを提供すること、及び記載されるcDNAの1つ又は組合せを選択すること、又はcDNA及び/又はcDNAをコードする発現ベクターを細胞に導入することによって、細胞を改変することを含む。選択は、任意の特定のタンパク質及び細胞発現系に基づいて、タンパク質を産生する際の使用のような、細胞について意図される使用又は実際の使用に基づいて行われてもよい。タンパク質をコードするキットも含まれる。

【0090】

ある実施形態において、本明細書に記載される1つ以上のタンパク質は、他の1つ又は複数の剤(生分解性ポリマー、ナノ粒子、ペクチン、アルギン酸塩、ポリ(アクリル酸)の架橋誘導体、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖類、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、レクチン、レオロジー調整剤、可塑剤、コンドロイチン、グルコサミン、及び/又は任意のヒアルロン酸など)と組み合わせることができる。

【0091】

例えば、抗接着剤が有益であり得る疾患の予防及び/又は治療における使用のために、本明細書に記載の組成物は、公知の技術に従って、標準的な薬学的に許容されるキャリアと混合することによって調製される従来の剤形で投与することができる。薬学的に許容されるキャリアのいくつかの例は、以下に見出され得る：Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005) 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins(その開示は、本明細書中に参考として組み込まれる)。ある実施形態において、本明細書中に記載されるタンパク質を含む薬学的組成物及び他の組成物は、液体、錠剤、粉末、スプレー、軟膏、ヒドロゲル、及びエアゾールとして提供され得る。

【0092】

ある実施形態では本開示の1つ以上のタンパク質を含む医薬組成物は、任意の適切な経路を使用して個体に投与されることができ、これには局所的、経口的、及び非経口的、ならびに以下にさらに記載されるような投与を含むが、必ずしもこれらに限定されない。例えば、タンパク質は、静脈内投与、滑膜関節又は他の滑膜構造物(腱鞘、滑液包)への直接注射、腹腔内投与、心膜嚢への直接注射、胸膜腔への直接注射、皮下投与(subdermally/subcutaneously)、又は皮膚、粘膜、もしくは眼への直接塗布によって投与することができる。

【0093】

ある実施形態では、本開示は、本明細書に記載の1つ以上のポリペプチド、及び/又はそ

10

20

30

40

50

のようなポリペプチドを含む組成物の有効量を投与することを含む。有効量は、医薬製剤方法、投与方法、患者の年齢、体重、性別、投与時間、投与経路、及び当業者に明らかである他の因子によって変化する。組成物は、1度に、又は一連の投与によって投与することができる。ある実施形態において、本開示は、単一用量、又は複数用量を含む。非限定的な例において、関節又は類似の構造の予防及び/又は治療における使用のために、ポリペプチドの適切な濃度は、250ug/mL~2mg/mL(包括的であり、これらの間の数値のすべての範囲、及びすべてのミリグラム、マイクログラムの範囲を含む)の範囲である。ある実施形態において、約1~3mLが、哺乳動物の関節への適用のために使用される。投薬頻度は、個別基準で調節することができる。本開示の予想外の半減期を有するポリペプチドを考慮すると、適切な投薬頻度は、3~6週間に1回である。

10

【0094】

ある実施形態において、本開示は、哺乳動物における眼の疾患、障害又は状態を治療するための方法、組成物、及びデバイスを含む。ある実施形態において、本明細書中に記載されるような細胞によって産生されるタンパク質は、当業者に公知の任意の方法又はデバイスを使用して、眼の疾患又は状態の治療のために使用される。ある実施形態において、タンパク質を含む組成物は、前房内、硝子体内、結膜下、テノン下、網膜下、又は角膜表面への局所適用のために使用される。タンパク質は、当業者に周知の技術を使用して、眼に直接送達され得る(例えば、局所用点眼剤又は軟膏；結膜嚢中、又は強膜に隣接して又は眼内に移植される徐放性デバイス)。本明細書に記載されるタンパク質は、眼内挿入物又は移植デバイスにおいて処方され得ることがさらに意図される。

20

【0095】

ある実施形態において、本明細書に記載される1つ以上のタンパク質を含む医薬は、網膜に対する1つ以上の疾患又は損傷を含む眼障害(加齢黄斑変性症(AMD)、網膜色素変性症(RP)、及び糖尿病性網膜症(DR)を含む)を治療するために使用される。ある実施形態では、個体は、乾燥した萎縮性(非滲出性)の加齢黄斑変性を有し、これは、萎縮及びドルーゼンを含む網膜色素上皮変化に関連する黄斑の進行性加齢変性として定義され、治療が制限される成人における視力喪失の一般的な原因である。ある実施形態において、前記障害は、角膜に対する1つ以上の疾患又は損傷を含む。ある実施形態では、個体は、緑内障(原発性、二次性及び/又は先天性緑内障を含み得る)を有する。

【0096】

ある実施形態において、本開示のタンパク質は、点眼剤の形態で提供され得る。ある実施形態では、点眼薬は、ステロイド、抗ヒスタミン薬、交感神経作動薬、 β 受容体遮断薬、副交感神経作動薬、副交感神経遮断薬、プロスタグランジン、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、抗生物質、抗真菌薬、又は局所麻酔薬のいずれか1つ以上を含む。特定の実施形態では、点眼剤は、任意のドライアイ状態で使用するためのものである。ある実施形態において、点眼剤は、眼の潤滑に使用するためのものである(コンタクトレンズ着用者を含むが、必ずしもそれに限定されない)。ある実施形態において、組成物は、潤滑点眼剤として提供される。ある実施形態において、潤滑点眼剤は人工涙液を含む。ある実施形態において、点眼剤は、薬剤を含まなくてもよく、したがって、潤滑/涙代用組成物としてののみ機能する。他の実施形態において、点眼剤は、眼アレルギー反応の治療のためであってもよく、したがって、抗ヒスタミン剤及び/又は血管収縮剤も含み得る。ある実施形態において、点眼製剤は、250ug/mL~2mg/mL(包括的であり、それらの間の数値のすべての範囲、及びすべてのミリグラム、マイクログラムの範囲を含む)を含む。このような濃度は、片方の眼につき約0.05~0.01mLで1~2滴/眼などの典型的な点眼薬容量で使うことができる。

40

【0097】

ある実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質を含む組成物は、コンタクトレンズと組み合わせて使用され得る。ある実施形態において、タンパク質は、コンタクトレンズ溶液中で使用される。従って、本明細書に記載されるタンパク質は、任意の適切なコンタクトレンズ溶液成分と混合されてもよく、この成分として、生理食塩水、穏やかな

50

研磨剤、界面活性剤、抗真菌剤及び抗菌剤(従来の抗微生物剤を含むが、これらに限定されない)、又は過酸化水素もしくはホウ酸、ならびに防腐剤、例えば、アスコルビン酸又はエデト酸二ナトリウムなどが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。本明細書に記載される1つ以上のタンパク質を含む溶液中で提供されるコンタクトレンズは、本開示の範囲内に含まれる。

【0098】

ある実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質を含む組成物は、粘膜内層を対象とすることができる。粘膜内層には、例えば、上気道及び下気道、眼、頬腔、鼻、直腸、膣、泌尿生殖路、歯周ポケット、腸及び結腸が含まれる。特定の実施形態において、組成物は、経口吸入のために使用され得る。ある実施形態において、経口吸入には、経鼻適用が含まれ、したがって、経鼻スプレー、点鼻薬、及び鼻軟膏を含み得る。ある実施形態において、経口吸入は、気管支スプレー及び吸入器を含み得る。ある実施形態において、タンパク質は、咽あめ、チューインガム、マウスウォッシュ又は含嗽剤、座薬、又はタンポンの使用を介して粘膜に到達させることができる。

【0099】

ある実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質を含む組成物は、外科的抗接着剤(内臓を潤滑化し、腹腔内外科手術手順/処置の間の術後腸及び内臓癒着を予防するための腹腔内潤滑剤；肺を潤滑化し、胸腔内外科手術手順/処置の間の術後胸膜癒着を予防するための胸膜内潤滑剤；心臓表面を潤滑化し、心臓外科手術手順/処置の間の術後心膜癒着を予防するための心膜内潤滑剤)として使用される。関節鏡、腱鞘鏡、又は滑液嚢鏡手術後の術後滑液補充として、潤滑を維持し、癒着又はパンプス形成を予防する。ある実施形態において、組成物は、本明細書に記載される任意の哺乳動物における関節敗血症/感染を治療するために使用される。特定の実施形態では、組成物は、創傷治療、創傷感染の治療、及び全身性敗血症の治療と併せて使用することができる。

【0100】

ある実施形態において、本明細書に記載される改変ラブリシンを含む組成物が投与される非ヒト哺乳動物は、本明細書に記載される障害の1つ又は組合せを必要とする状態である。さらに、ウマ科動物は、ウマ科動物が特に感受性である障害の1つ又は組合せの治療を必要とする状態であってもよい。非限定的な一実施形態では、ウマ科動物は、離断性骨軟骨炎(OCD: osteochondritis dissecans)の治療を必要とする状態である。他の一般的なウマ科動物(イヌ科及びネコ科の動物に拡張することができる)の実施形態は、関節内骨折、骨軟骨断片化、半月板損傷、軟骨損傷、滑膜炎、関節敗血症、及び外傷後変形性関節症(PTOA)の治療を含む。他の実施形態は、腱及び靱帯の損傷を治療することを含む(以下のものを含むが、これらに限定されない: 浅指屈筋及び深指屈筋腱炎/腱障害、提靱帯靱帯炎/靱帯病、腱滑膜炎及び舟状骨滑液包炎(navicular bursitis))。ウマ科動物の眼の実施形態には、角膜潰瘍、デスメ膜瘤、及び真菌性角膜炎/角膜症が含まれる。非限定的な実施形態では、イヌ科動物は、頭蓋十字靱帯(RCCL)の破裂(ヒトにおける前十字靱帯損傷に類似)、肘異形成、股関節異形成、腱炎/靱帯炎、眼科用途(乾性角結膜炎(KCS)、免疫介在性角膜症を含む)、及び無痛性潰瘍の治療を必要とする状態である。

【0101】

ある実施形態において、改変ラブリシンなどの改変されたタンパク質を含む組成物は、治療又は予防目的のために、ヒト及び非ヒト動物に投与されてもよい。ある実施形態において、改変ラブリシンは、運動競技において又は動物労働中に生じる傾向がある損傷の重篤度を予防又は制限するために、イヌ科、ネコ科又はウマ科動物に投与される。例えば、組成物は、ウマ科動物に投与されて、馬術競技の間、又は警察のための仕事又は牧場等における労働の間、関節/軟骨損傷を予防又は制限することができる。典型的な馬術競技は、口デオ、馬場馬術、障害飛越、跳躍、ポロ、競馬、及び、関節損傷並びに関連する損傷の危険性が高いことが当業者に明らかである他の多くのイベントを含む。さらに、本開示の組成物は、獣医病院及び診療所、動物救助施設、ならびに動物園などにおいて、様々な他の非ヒト哺乳動物を治療するために有用であると考えられる。ある実施形態において、本

開示の組成物は、鳥類動物の予防及び/又は治療のために使用される。

【0102】

ある実施形態において、製品は、本明細書に記載されるタンパク質のいずれかを含む組成物でコーティング及び/又は含浸されてもよい。ある実施形態では、製品は、任意の多孔性又は非多孔性表面上にコーティングされる。ある実施形態では、製品は、医療デバイスを含み、これには、外科用デバイス、歯科用又は整形外科用デバイス、縫合糸、カテーテル、挿管デバイス、麻酔送達デバイス、ドレッシング材、包帯などが含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。ある実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質は、抗接着性が所望される細胞培養デバイス(細胞培養プレート、マルチウェルプレート、バイオリアクター、及び任意の他の表面を含むが、必ずしもこれらに限定されない)をコーティングするために使用される。

10

【0103】

別の態様では、本開示は、栄養補助食品、健康補助食品、食品成分などのサプリメント製品を含む。サプリメント製品は、例えば、液体、カプセル、錠剤、ソフトゲル、粉末などの形態で提供することができる。

【0104】

ある実施形態において、本明細書中に記載される1つ以上のタンパク質を含む薬学的及び/又は栄養補助食品は、容器(例えば、滅菌され得る任意の適切な密閉容器又は密閉可能な容器)に入れた状態で提供される。ある実施形態では、製品は印刷物を含む。印刷物は、添付文書、ラベルとして、又は包装の構成要素として提供され得る。印刷物は、ポリペプチドを含む組成物が、本明細書中に記載されるような任意の疾患、障害、又は状態を治療するために、又は任意の目的のための抗接着効果を生じるために使用されるべきであることを示す。1つの実施形態において、本明細書中に記載されるポリペプチドは、関節の状態を治療するためのサプリメントとして使用され、あるいは、関節/靱帯修復施術と組み合わせて使用され、前記関節の状態には、関節痛、関節炎(変形性関節症、関節リウマチを含むが、必ずしもこれらに限定されない)、関節、半月板又は軟骨への損傷、例えば、スポーツ損傷が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。したがって、個体の健康又は幸福を改善する目的で本明細書に記載の組成物を投与することは、本開示の範囲内に含まれる。ある実施形態において、本開示の組成物は、関節及び/又は滑液に直接注射され得る。ある実施形態では、組成物は、滑膜関節、腱鞘、又は滑液包を含むがこれらに限定されない任意の滑膜構造に直接又は間接的に投与される。ある実施形態では、本開示の組成物は、腱、靱帯、又は滑液包の損傷、外傷、又は感染後に、腱、腱鞘、靱帯、又は滑液包に直接注射するために使用することもできる。ある実施形態において、組成物は、中皮表面と接触し得る：例えば、組成物は、腹部又は心膜表面と接触するように投与され、そのような表面の1つ以上に関連する障害を予防及び/又は治療する。

20

30

【0105】

本開示は、4つの部分に分割された、本開示の例示として提供される以下の非限定的な実施例を参照することによって、より良く理解される。以下の実施例は、本開示の実施形態をより完全に例示するために提示されるが、本開示の広範な範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本開示の参考文献リストは、任意の特定の引用された参考文献が、特許性の材料であることを示すものではない。

40

【0106】

[実施例]

第I部

本開示のこの第I部は、制御可能なグリコシル化パターンを有する配列特異的ムチンの非限定的かつ代表的な例、ならびにそのデータ及び考察を提供する。

【0107】

特に、この第I部は、調整可能なグリコシル化パターンを有するカスタマイズされたムチン糖タンパク質をコードするための設計ガイドラインが、本開示以前にはほとんど存在していなかったことの理解に関連している。したがって、第I部は、ムチンリーダータグ

50

、膜アンカー、細胞質モチーフ、及び光学レポーター、ならびにコドン最適化天然ムチンリピート、及び、合成ムチンのための新しい合理的に設計されたドメインについて、交換可能なDNAブリックのライブラリーを提供する。400を超える可能なcDNA組合せのうち、この第I部では、それぞれが独特の化学的、構造的、及び光学的特性を有する50を超えるムチンのライブラリーを提供する。このライブラリーは、本開示の一部を形成する、ムチンの設計及び操作のための一般的なガイドラインを開発するために適用される。驚くべきことに、コア1及びコア2グリカン構造への未成熟 α -GalNAc Tn-抗原の伸長は、ムチン骨格に沿ったO-グリコシル化部位の頻度に強く依存することが発見された。この開示から当業者に明らかなように、グリカン構造のシアリル化(シアル酸付加)は、ムチン細胞質側末端上のリサイクルモチーフを介して容易に調整される。ムチンポリペプチド骨格の全長が、グリコシル化に対して予想外の効果を有し得ることもまた実証される。いかなる特定の理論に束縛されることも意図しないが、本明細書に提示されるムチン部分の一覧は、記載された新規ムチンを製造するための設計ガイドラインと共に、グリコカリックス研究及びムチンベースのバイオテクノロジーに広く適用され得ることが予想される。

【0108】

第I部のイントロダクション

細胞表面ムチンは、高密度の糖側鎖を有する構造化されていないポリペプチド骨格によって定義される、膜固定バイオポリマーのファミリーである(1)。歴史的には、細胞表面を保護し、病的な細胞沈着に抵抗する単純な構造分子と見なされてきたが(2)、細胞表面ムチンは現在、細胞の生命を調節する際に、より高度な役割を有することが認識されている。細胞グリコカリックスでは、ムチン集合体が、細胞間の及びその外界との接着及び連絡を媒介する生理活性グリカンエピトープを提示する。例えば、ムチンシアル酸は、微小環境におけるナチュラルキラー細胞及び他の細胞型上のSIGLEC受容体の連結を介して、免疫細胞機能を調節し得る(3)。ムチンはまた、受容体の活性化とシグナル伝達応答の時空間的動態を物理的に調節することができる(4)。細胞表面上の受容体の拡散と活性化を制御するために、及び、微小環境から細胞表面への可溶性因子の通過を制御するふるい分け効果を持つために、グリコカリックス中のムチンの密集が提案されている(5)。

【0109】

ムチンの重要な特徴は、ムチンの分子構造が、ポリペプチド骨格に沿って付加されたグリカン側鎖の種類と頻度を調節することによって動的に変化できることである。例えば、ムチン骨格の伸長及び剛性を制御するために、グリカンの電荷、サイズ、及び配置が提案されている(6、7)。グリコシル化は、分化や形質転換を含む細胞状態の移行に伴って劇的に変化することが多い(8、9)。このように、ムチンの化学的及び物理的性質の両方が、細胞状態と密接に結びついており、ムチンが細胞接着、コミュニケーション、及びシグナル伝達において果たすことができる多様な調節的役割に寄与している。しかし、正確な骨格配列とグリコシル化パターンが、個々のムチンの機能とグリコカリックスにおけるムチンの集団的挙動にどのように寄与しているかはほとんど未解決である。

【0110】

このような理解の進展に対する主要な障壁の1つは、ムチンの分子構造の正確な編集のためのツールの欠如であった。糖転移酵素を標的とする遺伝学的アプローチは、ムチンのグリコシル化を変化させるのに非常に効果的であるが(10)、これらのアプローチは典型的には広範なクラスの糖タンパク質に影響を与え、細胞の挙動について観察された影響が、特定のムチンを正確に指摘することを困難、又は不可能にする。遺伝的アプローチの限界を克服するために、細胞膜アンカーを有する生体模倣ムチンポリマーのライブラリーが、グリコカリックス編集のために開発された(6、11)。ムチン機能のいくつかの機構の詳細を解明することに非常に成功しているが、合成ポリマーは典型的には数時間から数日で細胞表面から除去され、培地補充を通して連続的に補充されなければならない(12、13)。したがって、特にインビボでの、より長い期間にわたる挙動の研究は、合成ムチン模倣物ではほぼアクセス不可能である。

【0111】

合成化学的アプローチの重要な特徴(定義された骨格化学、目的に合わせたグリカン構造、及び正確なグリカン配置)を、ゲノムコーディングの能力及び長期安定性と組み合わせるムチンエンジニアリング及びグリコカリックス編集のための戦略は、本開示以前にはまだ開発されていなかった。カスタム遺伝子合成の進歩は、これまでにないスピードと低コストにて、構築すべきcDNA配列の開発をサポートする。しかし、カスタム遺伝子合成は、ほとんどのムチンに特徴的な高度反復DNA配列には、容易に適用できない。反復遺伝子配列は、カスタム遺伝子合成においてDNAフラグメントアセンブリを妨害し、且つ、プライマーのミスペアリングのために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を介して増幅することが困難である(14、15)。

【0112】

この第I部で述べるように、解決策は、コドンの重複性を利用して、コドンの反復性が最小の同義遺伝子配列を構築することであり、エラスチン様タンパク質にうまく適用されてきたアプローチである(16、17)。

【0113】

この第I部では、コドンの重複性をうまく利用して、細胞内で配列特異的ムチンを合成するためのcDNAを設計し、遺伝的にコードし、作製する効率的な戦略を開発する。ここに記載されているムチン部分のコンビナトリアルライブラリーは、調整可能なサイズ、側鎖間隔、及びグリカントタイプを(グリコカリックス編集のために)有するムチンバイオポリマーの容易な構築を可能にする。

【0114】

第I部-結果

配列特異的ムチンのためのコンビナトリアル遺伝的コードライブラリーの模式図

第I部の結果は、コンビナトリアルムチンcDNA構築のためのモジュール式バイオロジー-バイ-パーツ(biology-by-parts)アプローチを実証する。ムチンコード配列中の各機能モチーフは、制限酵素部位に挟まれていたため、ムチンリーダー配列、タンデムリピート、光学レポーター、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインに対する特有のcDNA「bricks」を容易に交換して、改変された機能性ムチンを構築することができた(図1a、b)。cDNAパーツカタログは、ムチンバイオポリマーについての13個の独特なタンデムリピートを含み、これらはサイズ、骨格化学、ならびにセリン及びトレオニン(S/T)グリコシル化部位の頻度が異なる(図1d)。ムチンポリマードメインのcDNAは、コドン最適化後のカスタム遺伝子合成によって作製した(図1c)。最適化のために、コドンの重複性を利用して、最小のコドン反復で所望のポリペプチドをコードする同義遺伝子配列を見出した。「コドンスクランブル」cDNA配列は、商業的ベンダーによって提供される標準的なカスタム遺伝子合成サービスによって合成された。

【0115】

ムチンポリマー骨格を形成するタンデムリピートを、天然ムチンから適合させたか、又は新たに設計した(図1d)。反復PDTRPAPGSTAPPAHGVTS(配列番号8)及びKEPAPTTP(配列番号1)は、それぞれ天然のMuc1及びプロテオグリカン4(ラブリシン)と類似している。ムチンO-グリコシル化部位(PPASTSAPG)(配列番号4)の統計解析、又はO-GalNAc移動効率(DAATPAP(配列番号2)及びDAATPAPP)²⁰の解析に基づいて、3つの反復を設計した。ベースのMuc1反復をアラニン置換によりさらに改変して、S/T潜在的グリコシル化部位の頻度が変化したMuc1様タンデムリピートを作製した(Muc1_21S, D, T)。ライブラリー全体にわたり、ムチン骨格中のS/T部位の割合は10%から33%まで変化した(図1d)。

【0116】

配列特異的ムチンの表面発現の構築及び検証

コドンスクランブル化同義ムチンcDNAの発現を、天然ムチン反復cDNAと比較し、タンパク質産物のグリコシル化を評価した。天然及び同義のMuc1タンデムリピートのcDNAを、シグナル/リーダー配列、膜アンカー、及びGFPレポーターと融合させた(図2a)。各構築物をHEK293Tで一過性に発現させた。レクチンプロットングによりムチンのグリコ

10

20

30

40

50

シル化パターンを解析した。プロットをピーナッツ凝集素(PNA)でプローブして、コア1グリカンを検出し、ナヨクサフジレクチン(VVA)で非伸長Tn抗原(α -GalNAc)を検出し、及びMuc1 mAb(クローンHMPV)で、MUC1タンデムリピートペプチドコア(Muc1 TR)²¹をプローブした。また、プロット上のMuc1シアル酸を、穏やかな過ヨウ素酸酸化により標識し、シアル酸上にアルデヒドを生成し、続いてヒドロキシルアミン-AF568プローブを用いてアニリン触媒オキシムライゼーション(PAL)を行った²²。発現したムチンを検出するために、ウェスタンブロットによってGFPレポーターもプローブした。レクチンPNA及びVVAの使用を検証するために(図2c)、MCF10Aを過剰発現する天然Muc1におけるコア1 β 3-T特異的分子シャペロン(COSMC)をノックアウトして、一次O-連結GalNAcの伸長を阻害した²³。野生型及びノックアウト細胞における、過剰発現天然Muc1(native_Muc1)のグリコシル化パターンを比較した。COSMCノックアウト細胞におけるムチンは、より低いPNA反応性を有したが、VVA結合は劇的に増加し、これはおそらくグリカン伸長の消失に起因する(図2d)。結果は、PNAが、伸長されたコア1グリカンの良好な指標であり得ること、及びVVAがムチン上の非伸長Tn抗原のための良好な指標であり得ることを確認した。

【0117】

天然及びコドン-スクランブルムチンに関するウェスタンブロット分析は、コドン-スクランブル化同義Muc1反復(Muc1_42 GFP)が、天然の反復Muc1リピート(native_Muc1 GFP)に匹敵する分子量及びグリコシル化パターンを有することを確認した(図2e)。ムチンは、Muc1 TR抗体を有するSDS-PAGE中でほぼ連続的な塗抹標本(smear)として泳動し、グリコフォームの不均一な混合物を示した(図2e; Muc1 TR)。約470、210、及び170kDaの見かけ分子量を有する優勢なグリコフォームが、GFPプロット上の各発現構築物について観察された(図2e; GFP)。VVA染色は、上側バンドと下側バンドとの間の塗抹領域で強かったが、PNA及びシアル酸シグナルは、塗抹標本の上部の460kDaバンド付近で最も強かった(図2e)。これらの結果に基づき、460kDaバンドは完全にグリコシル化されたMuc1であり、塗抹標本は非伸長O-グリカン構造を含むMuc1グリコフォームの不均一混合物であると結論付けた。GFPプロット上のより低いバンドも、Muc1 TRプロット上で観察されたが、レクチン又はシアル酸プローブでは観察されず、これらのバンドが、グリコシル化不十分な完全長Muc1である可能性が高いことを示した。天然及びコドンスクランブルMuc1の両方が、細胞表面に首尾よく輸送され、細胞のグリコカリックスに組み込まれた(図2f)。

【0118】

コドン-スクランブルムチンcDNAの1つの利点は、いくつかのDNAプロセッシング操作の間、ヌクレオチド配列の安定性を改善する可能性であった。反復ヌクレオチド配列の複製、転写、逆転写及び他のヌクレオチドプロセッシング操作中の翻訳スリップは、しばしば、cDNA及びmRNAの欠失又は増幅を生じる²⁴。ウイルス送達及び逆転写後に細胞ゲノムに組み込まれたcDNAの忠実度を評価するレンチウイルス安定性アッセイを実施した。天然の、最適化されていないMuc1 cDNAをウイルス的に形質導入された細胞において、Muc1糖タンパク質産物は予想されるよりも有意に低い分子量を有し、cDNAが切断されていることを示した。天然のMuc1 cDNAを一過性にトランスフェクトした細胞、又はコドンスクランブルMuc1 cDNAでウイルス改変した細胞は、予想されたサイズの糖タンパク質を産生した(図6)。レンチウイルスアッセイは、ゲノム安定性の直接的な試験ではなかったが、結果は、非反復的ムチン配列が、少なくともいくつかのタイプのヌクレオチドプロセッシング操作の間中、より安定であることを示した。

【0119】

天然ムチンのタンデムリピートは、ヒトにおいてしばしば多型性であり、個体間でムチンサイズの変動をもたらす²⁵、Muc1の短い対立遺伝子は、胃癌と関連することが示されている²⁶。この天然の変動から着想を得て、我々の手法をさらに検証するために、可変数のタンデムリピートを有する一連の同義ムチンを設計及び構築した(x42、x21、x10、x0; 図2a)。多型cDNAは細胞表面でよく発現し、グリコシル化の大きさ及び程度において

10

20

30

40

50

、予想される相違点を示した。以前の報告²⁷に基づいて予想されたように、より大きなムチンは、上皮細胞を基質から取り除くのに実質的に十分なグリコカリックスを形成した。

【0120】

ムチンポリマー骨格中の潜在的グリコシル化部位をアラニンで置換すると、O-グリカン成熟が調節される

次に、グリコシル化パターンが変化した(グリカン伸長の相違点を含む)ムチンを、ムチン骨格のS/T部位を変異させることでコードできるかどうかを検証した。我々の全体的な戦略は、各リピートにおける5つの潜在的なグリコシル化部位のうちの1つ、2つ、又は3つにおいてS/Tがアラニンに置換された分泌型Muc1タンデムリピートを作製することであった(図3 a, b)。分泌されたムチンが、次いで、レクチンブロッキング及び質量分析を用いたその後のグリカン分析のために、細胞培養培地から収集できることを想定した。

【0121】

それぞれ21のリピートを有する所望のMuc1変異体のcDNAを、コドンスクランブリングによって最適化し、カスタム遺伝子合成によって作製した。シングル(Muc1_21S)、ダブル(Muc1_21D)、及びトリプル(Muc1_21T)グリコシル化変異体はそれぞれ、合計で21、42、及び63個のS/Tからアラニンへの置換を有し、潜在的なグリコシル化頻度が20%、15%、及び10%変化した。IgKシグナルペプチド及び6x-His-SUMOStarタグを、野生型Muc1リピート又は3つの変異リピートの21コピーに融合させた(図3 a)。膜貫通タンパク質アンカーは含まれていなかったため、IgKシグナルペプチドが、組換えムチンタンパク質の分泌を指示すると考えられた。

【0122】

分泌されたムチンをHEK293細胞の培地上清から回収し、ウェスタンブロット及びレクチンブロットによって分析した。野生型及びグリコシル化変異体は、未改変ペプチド骨格の理論分子量よりもかなり高い見かけ分子量を有していた(図3 b, c 及び 8)。潜在的なグリコシル化部位変異体は、SDS-PAGEにおいてより速く移動し、これは、それらがより少ないグリカン鎖を有すること、又はそれらのグリカンがより短く、したがって、それらの電気泳動移動度に対する妨害がより少ないことを示す(図3 c)。

【0123】

S/Tの置換が、O-グリカン成熟を調整することを見出した。分泌されたMuc1糖タンパク質をブロットし、Tn抗原についてはVVA、コア1グリカンについてはPNA、及びコア2、3、4、及び6グリカンの構築ブロックであるGlcNAcについてはs-WGAでプローブした(図3 c)。単一の同時染色ブロットの各レーンに沿ってグリカンプローブの蛍光強度を記録することによって電気泳動図を構築した(図3 d)。コア1(PNA)及びGlcNAc含有(s-WGA)グリカンは、最も高い見かけ分子量を有するムチングリコフォーム中に豊富であった。より低い見かけ分子量のグリコフォームは、豊富なVVA反応性グリカン、ならびに最小のコア1及びGlcNAc含有グリカンを含有した。段階的アラニン置換は明らかに、より多くの非伸長のVVA反応性グリカン及びより少ない伸長したコア1及びGlcNAcを含有するグリカンを有するムチンに向かって、グリコフォーム分布をシフトさせた(図3 d, e)。驚くべきことに、1つのセリンの置換(sMuc1S)でさえ、グリコシル化パターンを劇的に変化させ、より非完全に伸長したグリコフォームの生成をもたらした(図3 c, d)。

【0124】

我々のレクチン分析を検証し、ムチン上の特定グリカン構造をカタログ化するために、質量分析を行って、野生型ムチンリピート(sMuc1)、及びリピートあたり3つのS/Tアラニン変異(sMuc1T)を有する変異体上のO-グリカンをプロファイルした。両方のサンプルにおいて類似のコア1及びコア2グリカンを同定した(図3 f)。しかし、伸長グリカンのシグナルは、三重変異体(sMuc1T)と比較して野生型ムチン(sMuc1)ではるかに強く、我々のレクチンブロットと一致した。また、グリコシル化変異体cDNAを膜貫通型アンカーに融合させて、細胞表面発現させたところ、グリコシル化部位変異体でも同様のグリカン伸長抑制傾向が観察された(図9 c)。ムチン構築物の過剰発現が、グリカン伸長のためのグリコトランスフェラーゼの機能性に影響を与えないことを保証するために、全細胞O-glyc

10

20

30

40

50

omeタンパク質を含まないプロファイリングを可能にする手法であるCellular O-glycome Reporter/Amplification(CORA)を用いた²⁸。類似のCore 1及びCore 2グリカン構造が、野生型及びMuc1を過剰発現するHEK293T細胞の両方で検出され、Tシンターゼ、及びムチン伸長に関与する他の糖転移酵素の活性が、ムチン過剰発現によって阻害されないことを示した(図10)。全体として、これらのデータは、細胞表面及び分泌ムチンの両方におけるグリカンの伸長が、ポリマー骨格に沿ったアラニン置換に感受性であることを実証した。

【0125】

デザイナームチンドメインは、グリコシル化に対する配列特異的効果を明らかにする

次に、グリコカリックスを編集するために、新しいタイプの配列特異的ムチンが生成できるかどうかを試験した。同時進行の目標は、ムチングリコシル化パターンに対する、特定の骨格特徴(グリコシル化部位頻度及びプロリン数を含む)の影響をさらに調査することであった。GFPレポーターを有する細胞表面ムチンcDNAを、分泌ヒトプロテオグリカン4と類似性を有する我々の3つのデザイナームチンリピート-DAATPAP(配列番号2)、DAATPAPP(配列番号3)、及びPPASTSAPG及びKEPAPTTP(配列番号1)-のために構築した(図4a)。3つのデザイナームチンリピートは、インビトロで得られた結果に基づいて完全にグリコシル化されると予想された²⁰。骨格は、グリコシル化部位(S/T)の頻度が12~33%で変化した。また、DAATPAP(配列番号2)及びDAATPAPP(配列番号3)ムチンの伸長変種を、タンデムリピートのPCR-増幅により作成し、元のcDNAと再アセンブリさせてリピート数を80に倍増した。すべてのムチンはよく発現し、細胞表面に適切に輸送され、O-グリカンで広範囲に装飾された(図4c及び図10b)。

【0126】

レクチンプロットングによってムチンのグリコシル化パターンを分析した。抗GFPプロット上の各ムチンについて複数のバンドが見られ、細胞上及び細胞内のムチングリコフォームの複雑な分布が明らかになった(図4c)。高度にグリコシル化されたムチンは、高いPNA及びVVA反応性によって示されるように、典型的には、抗GFPプロット上の一番目及び二番目に高い分子量のバンド間の塗抹標本として泳動した(図4c、d)。これらの領域の視覚化を補助するために、電気泳動図上で灰色に陰影を付けた(図4d)。最大分子量のグリコフォームは、コア1グリカンで強く装飾されていた(図4d；PNAを参照のこと)。非伸長O-グリカンに富んだグリコフォームは見かけ分子量が不均一であり、コア1装飾ムチンのすぐ下の塗抹標本で泳動した(図4d；VVAとPNAを比較)。

【0127】

次に、O-グリコシル化部位の頻度が、O-グリカンの成熟と伸長に影響を及ぼすかどうかを評価した。我々のレクチンプロット上の集積されたPNA及びVVAシグナルのレシオメトリック分析により、我々の合成ムチン間の相対的なコア1-対-Tn抗原比を定量した(図4e)。20又は40のリピートを有するムチンに関し、より高いS/T含有量を有するムチン骨格において、Tn抗原と比べてコア1構造の顕著な増加が観察された。しかしながら、レクチンプロット上のより顕著なスメアリング、ならびに電気泳動図上のPNA及びVVAピークの増加した幅によって示されるように、グリコフォーム分布は、より高いS/T含量を有する骨格についてより広がった(図4c、d)。

【0128】

また、プロリンは、ムチン骨格との糖転移酵素相互作用を促進することが以前に報告されているため⁷、プロリン含量がムチン骨格のグリコシル化に影響を及ぼす可能性があるかどうかも考察した。タンデムリピートあたり1つプロリンのみが異なるDAATPAP(配列番号2)及びDAATPAPP(配列番号3)ムチンのグリコシル化を比較した。それぞれリピート40コピーを有するムチンについては、未伸長Tn-抗原に対するCore 1グリカンの比率は、2つのムチン間で有意差がなかった(図4e)。しかし、リピート数80コピーのムチンについては、リピートあたり余分な1プロリンを有するムチンにおいて、相対的なCore 1グリカン含量が有意に低かった(図4f)。これらの結果は、プロリン含量が、ムチン骨格の全体的なサイズに依存する様式でグリコシル化に影響し得ることを示唆した。

【0129】

細胞質側末端エンジニアリングによるムチングリコシル化の調整

O-グリカンのシアリル化は、細胞表面ムチンのエンドサイトーシス後のエンドソーム及びトランスゴルジネットワークにおいて、少なくとも部分的に起こっている²⁹。ムチンのグリコシル化を変化させる可能性のある手段として、エンドサイトーシスと輸送を利用するために、異なったエンドサイトーシスと輸送シグナルをもつムチン細胞質側末端のcDNA「bricks」をつくり出した。我々は、Muc1細胞質ドメインが、クラスリン媒介エンドサイトーシスをシグナル伝達することができ、一方、膜貫通及び細胞質ドメインの境目にあるMuc1配列 CQCRRK(配列番号11)は、Muc1の細胞膜へのリサイクルバックをシグナル伝達することを示した³⁰。ムチンを細胞質側末端なしに³¹、又は我々のライブラリー中の2つの異なった細胞質側末端とともに細胞膜に固定することができる合成21アミノ酸膜貫通アンカー(TM21)を採用した。第一の細胞質側末端は、ムチンリサイクルを指示する単純なCQCモチーフであった。第二は、より効率的なエンドサイトーシスを指示するために、CQCモチーフ、ならびにさらなるモチーフ、YHPM及びYTNPを含む天然のMuc1細胞質側末端をベースとした³²。

10

【0130】

我々はそれらの機能性を試験するために、細胞質側末端を有する又は有さないTM21アンカーを、10のタンデムリピート(Muc1_10)を有するコドンスクランブルMuc1に融合した(図5a)。すべてのムチンcDNAが、HEK293Tに一過性にトランスフェクトされた。細胞表面のシアル酸をPALで標識した。レクチンブロットでは、PALシアル酸シグナルは約171kDaで最も強く、強いPNAシグナルと重なり、PNA反応性アイソフォームもシアル酸豊富であったことを示唆した(図5b)。確認のために、レクチンブロット分析の前に、細胞溶解物をシアリダーゼで処理し、PNA染色パターンを分析して、負に帯電したシアル酸の除去による電気泳動移動度のシフトを検出した。細胞質側末端モチーフにかかわらず、ムチン中のPNA反応性バンドはシアリダーゼ処理後により高く、より広く、すべての構築物中の優性PNA反応性アイソフォームがシアル酸付加されたことを示した(図5c)。

20

【0131】

シアリル化(シアル酸付加)されたアイソフォームをさらに分析するために、PNAを有するコア-1リッチ・ムチングリコフォームをプルダウンし、次いで(α -2,3)結合でシアル酸とよく結合するイヌエンジュレクチン(MAA)でプローブした³³。驚くべきことに、171kDa付近でMAAシグナルは観察されなかったが、MAAに反応性である超高分子量グリコフォームに注目した(図5d上部)。MAA反応性の超高分子量グリコフォームは、リサイクルモチーフによって促進された。CQCモチーフの包含は、TM21アンカーのみと比較してMAA/PNA比の2倍の増加をもたらし、Muc1に基づくより長い細胞質側末端が、MAA/PNA比を3倍増加させることを見出した(図5d下部)。

30

【0132】

材料及び方法抗体と試薬

以下の抗体を使用した：抗ヒトMUC1(CD227)(クローンHMPV；555925、BD Biosciences)、マウス抗-アクチン(クローンC4；47778、Santa Cruz)、ニワトリ抗SUMO/SUMOSTar(AB7002、LifeSensors)、マウス6xHis(552565、BD Biosciences)、マウス抗-チューブリン(クローンB-7；5286、Santa Cruz)、マウス抗GFP(クローン4B10；2955、Cell Signaling Technology)、m-IgG 結合タンパク質-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP；516102、Santa Cruz)、ヤギ抗-マウスIgG(Alexa FluorTM647抱合型、A-21235；Alexa FluorTM488抱合型、A-11001；Alexa FluorTM568抱合型(A-11004；ThermoFisher)；及びヤギ抗-ニワトリIgY(Alexa Fluor 488TM抱合型(A-11039、ThermoFisher)。使用したレクチンは、非抱合型Arachis hypogaeaレクチン/ピーナッツ凝集素(PNA；L0881、Sigma)、ビオチン抱合型PNA(B-1075、Vector Laboratories)、ビオチン抱合型イヌエンジュレクチン(MAA；BA-7801、EY Lab)、フルオレセイン標識サクシニルコムギ胚芽凝集素(s-WGA；FL-1021S、Vector Lab)、及びビオチン抱合

40

50

型ナヨクサフジレクチン(VVL、VVA；B-1235、Vector Lab)であった。使用した蛍光染料は：Alexa Fluor™647 NHSエステル(A20006、Invitrogen)、Alexa Fluor™568 NHSエステル(A20003、Invitrogen)及びAFDye 568ヒドロキシルアミンであった。ビオチン化レクチンを、ExtrAvidin-ペルオキシダーゼ(E2886)又はNeutrAvidinプロテイン(Dylight 650抱合型；84607, ThermoFisher)を使用して検出した。テトラサイクリン誘導システムについては、ドキシサイクリンを誘導に使用した(204734、Santa Cruz)。ストレプトアビジン・セファロース(登録商標)ビーズ(3419、Cell Signaling Technology)を免疫沈降アッセイに使用した。細胞溶解緩衝液(9803)及びLumiGLO(登録商標)試薬及び過酸化水素(7003)は、Cell Signaling Technologyから入手した。サンプルブロッキングのための正常ヤギ血清(S-1000)は、Vector Labから入手した。FreeStyle™293-F細胞トランスフェクションには、ポリエチレンイミン(PEI)(25kDa線状PEI、23966、Polysciences)を使用した。

【0133】

MUC1タンデムリピートドメインの遺伝子設計及びアセンブリ

細胞質テール欠失ヒトMuc1(Muc1 dCT)のcDNA、及び合成膜ドメインTM21とのMuc1タンデムリピート融合(Muc1 TM21)を作製し、以前に記載されているように²⁷、ピューロマイシン耐性カセットを有するテトラサイクリン誘導性ピギーバック発現ベクター(pPB tetOn Puro)にクローニングした。また、BamHI及びEcoRI制限酵素部位を用いて、Muc1 TM21のcDNAをpcDNA3.1ベクターに挿入した。pPB Muc1 mOxGFP dCT TetOn Puroの生成のために、まずmOxGFPのcDNA(Addgene #68070)を以下のプライマーで増幅した：

5'-GGCAGCTCAGCTATGGTGTCCAAGGGCGAGGAGCTGT-3' (配列番号12)(順方向)、及び5'-GGCAGCTGAGCCCTTATACAGCTCGTCCATGCCGTGAGT-3' (逆方向)(配列番号13)。

次いで、PCR産物をpJET1.2にクローニングし、pPB Muc1 dCT TetOn PuroのBlnI部位に非方向的にサブクローニングした。分泌ムチン(sMuc1)のcDNAを作製するために、IgKシグナルペプチドと6x-His-SUMOSTarタグ(6x His Sumostar Muc1)を含む合成オリゴを、カスタム遺伝子合成(General Biosystems)により作成し、ネオマイシン耐性カセットを有するテトラサイクリン誘導性ピギーバック発現ベクター(pPB tetOn Neo)にクローニングした。レンチウイルスベクターpLV puro Muc1 dCTは、以前に報告⁴されたのと同様に作製した。

【0134】

変異体及び合理的に設計されたムチンタンデムリピート配列のcDNAを、コドン最適化に続くカスタム遺伝子合成によって生成した。所望のムチンリピートについての最小反復遺伝子配列は、Codon Scrambler(chilkotilab.pratt.duke.edu/codon-scrambler)¹⁸を用いて見出した。より使用頻度が高い無作為に選択した同義コドンを、ヒトにおける使用頻度が10%未満のコドンと交換することにより、スクランブルDNA配列を、ヒトのコドンバイアスのために調節した。次いで、所望のタンデムリピートのための合成オリゴを、カスタム遺伝子合成(General Biosystems and Genscript)によって合成し、BamHI及びBsu36I制限部位を使用するpPB Muc1 mOxGFP dCT TetOn Puro、BsrGI及びBsu36I制限酵素部位を使用するpcDNA3.1 Muc1 TM21、又はBsrGI及びBsu36I制限酵素部位を使用するPB 6x His Sumostar Muc1のいずれかにおいて、Muc1タンデムリピートの代わりにクローニングした(cDNA配列については裏付け情報を参照のこと)。42コドン最適化タンデムリピートpLV Muc1_42 dCT構築物を有するMuc1 dCTのためのレンチウイルスベクターを作製するために、コドン最適化リピートのための合成cDNAを、BamHI及びBsu36I制限酵素部位を用いてpLV puro Muc1 dCTに挿入した。0タンデムリピートを有するMuc1構築物を、pcDNA3.1 Muc1_10 TM21におけるタンデムリピートの欠失を通して、5'-TGGAGGAGCCTCAGGCATACTTTATTG-3' (順方向)(配列番号14)、及び5'-CCACCGCCGACCGAGGTGACATCCTG-3' (逆方向)(配列番号15)プライマーを用いてQ5部位特異的変異誘発により作成した。

10

20

30

40

50

【0135】

リサイクリングモチーフCQCRRK(配列番号11) pcDNA3.1 Muc1_10 TM21 CQCをもつcDNAを、5'-CCGAAAGTAGGAATTCGGGCCCCGTTTAAACCCGC-3'(順方向)(配列番号16)及び5'-CGGCACTGACATCTAGAGTACCACAACAAAGCCAGGC-3'(逆方向)(配列番号17)プライマーを用いたQ5部位特異的変異誘発を通して、pcDNA3.1 Muc1_10 TM21から生成した。天然CTのcDNAを、pcDNA3.1 Muc1_10 TM21 CQCのXbaI及びEcoRI部位にサブクローニングした。

【0136】

伸長合成タンデムリピートのPCR及びGolden Gate Assembly

pcDNA3.1中のDAATPAP(配列番号2)とDAATPAPP(配列番号3)ムチンcDNAの40個のタンデムリピートは、Golden Gate Assemblyを用いて80個のリピーサイズに倍加された。タンデムリピート及び完全ムチンベクターのための2対のカスタムプライマーを、BsmBI認識部位にユニークな4bpオーバーハングを付着させるように設計し、それにより、40タンデムリピート及び完全ムチン発現ベクターのPCR産物が、Golden Gate Assembly反応において連結してタンデムリピート数を増幅するようにした(表S2)。Golden Gate Assembly反応は、以前に報告⁴⁷されたのと同様に行われた。

【0137】

細胞株、培養及びトランスフェクション

ATCCから、MCF10Aヒト乳房上皮細胞及びHEK293T SV40形質転換ヒト胚性腎臓細胞を得た。MCF10A細胞を、5%ウマ血清(ThermoFisher)、20ng/mLのEGF(PeproTech)、10µg/mLのインスリン(Sigma)、500ng/mLのヒドロコルチゾン(Sigma)、及び100ng/mLのコレラ毒素(Sigma)を補充したDMEM/F12培地(ThermoFisher)中で培養した。HEK293T細胞を、10%ウシ胎仔血清(ThermoFisher)を補充したDMEM(ThermoFisher)中で培養した。細胞は37°C、5%CO₂、90%相対湿度(RH)で維持した。FreeStyleTM293-F細胞を、FreeStyleTM293発現培地(ThermoFisher)中の懸濁液で培養した。懸濁培養物は、37°C、8%CO₂、90%RHのオービタル(orbital)シェーカー中で維持した。レンチウイルス形質導入は、テトラサイクリントランスアクチベーター、rtTA-M2、及びネオマイシン耐性遺伝子の発現のための安定に組み込まれた遺伝子カセットを有するMCF10A細胞において、以前に報告されたように行われた⁴⁸。HEK293T細胞は標準プロトコルに従い、リン酸カルシウム方法で一過性にトランスフェクトされた。FreeStyleTM293-F細胞を、以前に記載されたように⁴⁹、PEIで一過性にトランスフェクトした。MCF10A Muc1 dCT細胞におけるCOSMCのCRISPR/Cas9媒介ノックアウトを、以前に報告⁵⁰されたのと同様に生成した。

【0138】

ウェスタンブロット法

HEK293T細胞を55,000細胞/cm²で蒔き、リン酸カルシウムで24~36時間トランスフェクトした後、細胞溶解緩衝液で溶解した。MCF10A細胞を2万細胞/cm²で蒔き、0.2µg/mLドキシサイクリンで24時間誘導した後、細胞溶解緩衝液で溶解した。溶解物をNuPAGE 3~8%又は7%トリス-アセートゲル上で分離し、PVDF膜に移した。一次抗体を1:1000に希釈し、フルオロフォア結合又はビオチン化レクチンを5%BSA TBST中で2µg/mLに希釈し、4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体、ExtrAvidin-HRP又はNeutra-vidin-Dylight 650を、5%BSA TBST中で1:2000又は1µg/mLに希釈し、室温で1時間インキュベートした。プロットを、ChemIDoc MPイメージングシステム(Bio-Rad)上で画像化するか、又はLumiGLO(登録商標)試薬及び過酸化水素中で現像した後に画像化した。集積プロット強度は、ImageJのFIJI分布を用いて定量化した^{51,52}。データ間の差の統計的有意性は、反復測定による一元配置ANOVA又は両側t検定を用いて計算した。

【0139】

細胞表面シアル酸の過ヨウ素酸標識

HEK293T細胞を、トランスフェクションの36時間後に収集した。細胞を、Ca²⁺及びMg²⁺を含む冷DPBSで洗浄し、続いて、DPBS中の1mM過ヨウ素酸ナトリウム(Sigma)で1

10

20

30

40

50

0分間インキュベートした。過ヨウ素酸塩を、冷DPBS中の1mMグリセロールによってクエンチし、冷DPBSで洗浄した。試料を、滅菌濾過DPBS+5%FBS pH 6.7中、10mMアニリン(Sigma)の存在下で、25 μ MのAFDye-568-ヒドロキシルアミン(Fluoroprobes)により、暗所、4°C、30分間にて、穏やかに攪拌しながら染色した。

【0140】

免疫沈降

HEK293T細胞を55,000細胞/cm²で蒔き、リン酸カルシウム法で24~36時間トランスフェクトした後、細胞溶解緩衝液で溶解した。溶解物を、125 μ g/mLのビオチン化レクチンPNAと共に、4°Cで、穏やかに一晚振盪しながらインキュベートした。ストレプトアビジン・セファロース(登録商標)ビーズを、製造業者の説明書に従って細胞溶解物に添加し、そして懸濁液を4°Cで3時間インキュベートした。ビーズを溶解緩衝液で2回洗浄し、次いで4×LDSローディングバッファーに再懸濁した。その後、再懸濁液をウェスタンブロットにより分析した。

【0141】

HEK293Tのシアリダーゼ処理

遺伝子導入の24時間後に、HEK293T細胞を回収し、シアリダーゼ緩衝液⁵³中で、37°Cで30分間、Arthrobacter ureafaciensシアリダーゼ(Roche、10mU、100 μ l最終容量)と共にインキュベートした後、細胞溶解緩衝液で溶解した。

【0142】

免疫蛍光法

HEK293T細胞を45,000細胞/cm²で蒔き、リン酸カルシウムを用いて24時間トランスフェクトした後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。抗体を、PBS中の5%正常ヤギ血清中で1:100に希釈し、4°Cで一晩インキュベートした。そしてレクチンを、PBS中の5%正常ヤギ血清中で2 μ g/mLに希釈し、室温で2時間インキュベートした。試料を、40x水浸対物レンズ(NA 1.1)を用いてZeiss LSM倒立880共焦点顕微鏡で画像化した。

【0143】

分泌ムチンタンパク質の発現、精製

16.25 μ gのpPB 6x His Sumostar Muc1 DNAを、10cmの培養皿でHEK293T細胞に48時間トランスフェクトした。30 μ gのpPB 6x His Sumostar Muc1 DNAを、20mL FreeStyle™ 293-F細胞培養物に4日間トランスフェクトした。培養培地を回収し、2000 rpm・5分間の遠心分離によって清澄化した。清澄化した培養培地をNi-NTAアガロース(Qiagen)に結合させ(4°Cで一晩)、洗浄し(20mMリン酸ナトリウムpH 8.0、0.5M塩化ナトリウム(NaCl)、20mMイミダゾール)、イミダゾール(20mMリン酸ナトリウムpH 8.0、0.5M NaCl、250mMイミダゾール)で溶出した。溶出した試料を、Amicon Ultra-4遠心フィルター(10kDaカットオフ)でPBS中に透析濾過し、次いでZeba™ スピン脱塩カラム(7K MWCO)を用いて脱塩した。無塩タンパク溶液を凍結乾燥し、-80°Cで保存した。

【0144】

分泌ムチン蛋白質のO-グリカンプロファイリング

全ての試薬は特に言及しない限り、Sigmaから購入した。精製ムチンタンパク質(それぞれ600 μ g)を、100°Cで5分間加熱することによって変性させた。続いて、変性タンパク質を、50mM水酸化ナトリウム(NaOH)溶液500 μ L中の水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)19mgで、45°Cにて18時間処理した⁵⁴。試料を冷却し、10%酢酸で中和し、Dowex H+樹脂カラムに通し、窒素流下でホウ酸塩を除去して凍結乾燥した。グリカンは、以前に報告された方法⁵⁵を用いたマスマスペクトロメトリーによる構造的な特性評価のために、過メチル化された。簡単に述べると、乾燥した溶出液をジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、ヨウ化メチル及びNaOH-DMSO塩基(DMSO及び50%w/w NaOH溶液を混合することによって調製された)を使用することによってメチル化した。反応物を水でクエンチし、反応混合物を塩化メチレンで抽出し、乾燥させた。過メチル化グリカンをメタノールに溶解し、 α -ジヒドロキシ安息香酸(DHBA、50%v/vメタノール：水の混合物中、20mg/mL)マトリクスで結晶化させた。試料中に存在するグリカンの分析は、AB SCIEX TOF/TOF 580

O(Applied Biosystem MDS Analytical Technologies)質量分析計を使用して、MALDI-TOF/TOF-MSによって陽イオンモードで行った。試料からの過メチル化グリカン、さらなる構造確認のために、HCD及びCID断片化オプションを有するESIプローブを通してOrbitrap Fusion Tribrid質量分析計に注入した。グリカンのMS1及びMS2スペクトルを、単純な前駆体スキャンによって高分解能で取得し、それぞれのイオンを、さらなるMS/MSスキャンのために手動で選択した。グリカン構造の割り当ては、断片化パターン及び一般的な生合成経路に基づいて、手動で、及びGlycoworkbenchソフトウェアを使用することによって行った。

【0145】

細胞性O-グリコム(Glycome)レポーター/増幅(CORA)

注記した場合を除き、全ての化学物質は、Millipore Sigmaから購入した。溶媒はHPLCグレード以上であり、0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を、全てのクロマトグラフィー工程に含めた。ベンジル2-アセトアミド-2-デオキシ- α -D-ガラクトピラノシド(BnGalNAc)を、無水ピリジン中の33%(v/v)無水酢酸のモル過剰にて、65°Cで1時間加熱することによって、過アセチル化した。生成物をspeedvac(Thermo Scientific SPD1010)で乾燥させ、さらに精製することなく使用した。過アセチル化をLC-MSによって確認した(Agilent 1100 Series LC及びG1956B MS、m/z計算値：438.18、実測値：438.10[M+H]⁺)。

【0146】

以前に報告²⁸されたのと同様にCORAを実施した。簡単に述べると、50万個のHEK293T細胞を6cm培養皿に蒔き、上述のようにトランスフェクトした。トランスフェクション後、培養物を、50 μ Mの過アセチル化BnGalNAcを補充した完全培地中でインキュベートした。48時間後、培地を吸引し、はがれた細胞及びデブリを遠心分離によって除去した。次いで、上清を濾過し(Millipore Amicon Ultra 4、10kDa MWCO)、重カクロマトグラフィー(Waters Sep-Pak C18 3cc)によってベンジルグリカンを集めた。溶出液を、過メチル化2の前にSpeedVacによって乾燥した。DMSO中の水酸化ナトリウムスラリーを新たに調製し、200 μ Lを各乾燥試料に添加し、続いて100 μ Lのヨウ化メチル(ACROS)を添加した。試料を10分間連続的に混合し、次いで600 μ Lの脱イオン水を添加することによって反応を停止させた。過メチル化ベンジルグリカン、200 μ Lのクロロホルムで抽出することによって回収し、次いで、800 μ Lの脱イオン水で4回洗浄した。試料をC18重カクロマトグラフィー(Waters Sep-Pak C18 1cc)によってさらに精製し、SpeedVacによって乾燥した。乾燥試料を50%メタノールに溶解し、50%アセトニトリル中の10mg/mLの2,5-ジヒドロ安息香酸のマトリクスで1:1(v/v)スポットした。ベンジルグリカン、MicroFlex MALDI-TOF-MS(Bruker)を用いて陽イオンモードで分析した。2つの外部標準、過メチル化マルトテトラオース(Cayman Chemical、m/z計算値：885.43、実測値：885.65[M+Na]⁺)及びマルトヘプタオース(Cayman Chemical、m/z計算値：1497.73、実測値：1497.90[M+Na]⁺)を含めて、機器の性能及び較正を確認した。ベンジルグリカン組成を、既知の構造のナトリウム付加物の予測質量に基づいて帰属させた([M+Na]⁺)。データはMnova(Mestrelab Research)を用いて分析し、Prism8(GraphPad)で提示するために整えた。

【0147】

第I部の議論

ムチンのO-グリコシル化は、その物理的及び生化学的特性、ひいてはそれらの生物学的機能を決定する。この第I部は、ムチン生体高分子を編集するための遺伝的にコードされたシステムを提供し、上記で議論される他の重要な有用性の中でもとりわけ、グリコカリックスのエンジニアリングのためのツールとして使用できる。ムチングリコシル化に影響を及ぼすことが知られている因子には、糖転移酵素及びその基質の細胞レパートリー^{1,34}、ポリペプチド骨格上のO-グリコシル化部位の頻度^{35,36}、O-グリコシル化部位周辺の一次ペプチド配列³⁷⁻³⁹、及び糖タンパク質の輸送が含まれる^{32,40,41}。この第I部では、ムチン骨格配列及び細胞質側末端中のシグナル及びモチーフを改変して、物理的特徴、骨格化学、及びグリコシル化パターンが異なるムチンをコードする。

【0148】

コドン縮重を用いて、最小の反復でムチンcDNAを設計することにより、13の代表的でユニークなムチン反復の構築のためにカスタム遺伝子合成を適用することができ、その各々は、細胞表面固定及び輸送の制御のための他の機能的ドメインと容易に組み合わせることができた。試験された全ての反復配列は、失敗なしに首尾よく製造された。したがって、本開示は、本明細書に記載される他の構築物を作製するために、記載される設計戦略を使用することを含む。モジュール様式でこれらのcDNAを他の機能性cDNA「bricks」と組み合わせることによって、本開示の利点の下、改変された構造及び機能性のムチンが、公知の分子技術(Gibson Assembly、Golden Gate Assembly、及び他の現代のDNAアセンブリアプローチを含む)を用いて容易に構築され得る。

10

【0149】

この第I部における観察は、Tn抗原からコア1/2グリカンへのO-グリカンの伸長が、ポリマー骨格に沿ったアラニン置換によって妨げられることであった。その効果が膜関連ムチンと分泌ムチンの両方で観察されたことを考えると、エンドサイトーシスと輸送の変化は、グリカン成熟の相違点の主な原因ではない可能性が高い。ムチンの過剰発現が、T-シクターゼや初期のO-グリカン伸長に関与する他の糖転移酵素の機能性に及ぼす潜在的な影響によっても、グリコシル化の相違点は説明されない可能性が高い。細胞性O-Glycomeリポーター/増幅分析に示されているように、類似のコア1又はコア2グリカン構造が、ムチン過剰表現型と野生型のHEK293Tの両方で観察された(図10)。

20

【0150】

この第I部におけるO-グリコシル化の分析は、レクチンブロットに部分的に基づいていた。対照を用いて、主なレクチンベースの分析を検証した。グリカン伸長を抑止するためのCOSMCのノックアウトは、PNA結合の減少及びVVA染色の上昇をもたらし、それぞれコア10-グリカン及びTn-抗原を検出するためのこれらのレクチンの適切性を示唆する(図2d)。精製ムチンに関するO-グリコミックス分析はまた、ムチン上に存在するグリカン構造の種類に関するレクチン分析に基づく結論を確認した(図3f)。

【0151】

グリコエンジニアリングのためにムチン細胞質側末端を改変した。シアリダーゼ処理後の電気泳動移動度のシフトに基づき、リサイクリングモチーフは、ムチンシアリル化に必要でないと結論付けた。しかしながら、リサイクルモチーフの含有は、MAAレクチンと反応する超高分子量ムチングリコフォームの生成を促進した。ムチン細胞質側末端を交換することは、出現グリコフォームを少なくとも部分的に操作するための実行可能な戦略であると考えられる。

30

【0152】

表S1：ムチンcDNA配列の反復性解析

天然及びコドンスクランブルcDNAの反復解析を、タンデムリピートファインダーアルゴリズム¹を用いて行った。問い合わせ配列と検出されたタンデムリピートとの間の一致は、ヌクレオチド配列の一致については+2、ミスマッチ及びインデルについては-7のアラインメントスコアを割り当てることによって重み付けした。高いアラインメントスコアは、リピートの高レベルの反復性を示す。

40

【0153】

【表 1】

天然_Muc1

インデックス	周期 サイズ	コピー 数	コンセンサス サイズ	一致 パーセント	インデル パーセント	スコア
6-2577	60	42.9	60	99	0	4982

Muc1_42

インデックス	周期 サイズ	コピー 数	コンセンサス サイズ	一致 パーセント	インデル パーセント	スコア
146-468	60	5.4	60	75	3	220
146-468	120	2.7	120	80	2	328
149-513	120	3.0	120	79	5	294
728-897	60	2.8	60	80	1	171
746-984	60	4.0	60	75	4	169
1013-1233	60	3.7	60	77	0	208
794-1200	120	3.4	120	75	4	273
1205-1347	60	2.4	59	74	8	135
1097-1530	180	2.4	180	77	2	379
1304-1521	60	3.6	59	76	2	175
1514-1714	60	3.3	60	78	0	204
1709-1965	120	2.1	120	80	1	273
1781-2067	60	4.8	60	71	5	177
1733-2067	120	2.8	120	77	1	269
2150-2406	60	4.3	60	73	3	140
2222-2439	120	1.8	120	79	2	258

表の説明：

- ・配列の開始に対するリピートのインデックス
- ・リピートの周期サイズ
- ・コンセンサスパターンと整合するコピーの数
- ・コンセンサスパターンの大きさ(周期サイズとはわずかに異なることがある)
- ・全体としての隣接コピー間の一致パーセンテージ。
- ・全体としての隣接するコピー間のインデルのパーセンテージ。
- ・アラインメントスコア。

参照：

(1) Benson, G. Tandem Repeats Finder: A Program to Analyze DNA Sequences. Nucleic Acids Res 1999, 27 (2), 573-580.

【0154】

【表 2】

表 S 2 : Golden Gateアセンブリプライマー

名称	配列	配列番号
pcDNA3.1 Syn1 FWD	AGGTAGCGTCTCGTCCCGCCTCAGGCATACTTTATTG	18
pcDNA3.1 Syn1 REV	AGGTAGCGTCTCGTCGGGAGCAGGGGTAGCG	19
Syn1 FWD	AGGTAGCGTCTCGCCGATGCAGCTACTCCAGCTCCGGACGCC	20
Syn1 REV	AGGTAGCGTCTCGGGGAGCAGGGGTAGCG	21
pcDNA3.1 Syn2 FWD	CTTCTGCGTCTCGTCCCGCCTCAGGCATACTTTATTGGCGA	22
pcDNA3.1 Syn2 REV	CTTCTGCGTCTCGTCGGGAGGAGCTGGTGTAGCCGCG	23
Syn2 FWD	CTTCTGCGTCTCCCGATGCAGCTACCCCGGCTCCACCC	24
Syn2 REV	CTTCTGCGTCTCCGGGAGGAGCTGGTGTAGCCGCG	25

10

20

第 I 部に記載の cDNA「Biobricks」の要約

リーダータグ

【 0 1 5 5 】

1. Native-FLAG

アミノ酸配列:

MTPGTQSPFFLLLLLVLT VVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAD
YKDDDDLY(配列番号 2 6)

cDNA 配列:

GGATCCATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCCTC
ACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCAGGT
GGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTAC
TGAGAAGAATGCTGATTACAAGGATGACGACGACCTGTACA(配列番号 2 7)

30

2. His-SUMO

アミノ酸配列:

METDTLLLWVLLLVPGSTGDGHHHHHHGSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPE
THINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFARQKGEMDSLTFLYDGIIEIQAD
QAPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGSGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEK
NADYKDDDDLY(配列番号 2 8)

cDNA 配列:

GGATCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCT
CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGGTCATCACCATCATCATCACGGGTC
CCTGCAGGACTCAGAAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCA
GAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTC
AGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGG
AAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAACGTTCTTG
TACGACGGTATTGAAATTCAAGCTGATCAGGCCCTGAAGATTTGGACAT
GGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGAGGTGGCT
CCGGCTCCGGTCATGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCG
GCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGATTA
CAAGGATGACGACGACCTGTACA(配列番号 2 9)

40

50

【0156】

直下に提示される代表的なポリマー骨格セグメント配列において、反復配列は以下の配列によって進行する：

LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVT SV (配列番号 30)

関連のある反復配列が、関連のある配列番号で示され、各括弧内に示されるその反復の数は、下付きで示され、この下付きは反復の数を示す。各配列の上に記載されている英数字からなる名称は、配列そのものではなく、配列の名称である。

【0157】

ポリマー骨格

10

1. コドンスクランブル化 Muc1 x42 (Muc1_42)
2. アミノ酸配列：
3. LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA]₄₂ASG(配列番号 30 [配列番号 8]₄₂ASG

20

30

40

50

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAG
CCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACCTCTGGCCCCGGCC
ACGGAACCAGCTTCAGGTTCACTGCCACCTGGGGACAGGATGTCACCTCGGTCC
CGGATACGCGACCCGCCCCAGGGTCAACAGCGCCCCCAGCCACGGCGTTACAT
CTGCACCTGACACTAGACCTGCGCCAGGATCAACAGCTCCACCGGCTCACGGGGT
CACCAGTGCCCCGACACTCGACCAGCTCCGGGGTCTACCGCTCCCCCGGCTCAT
GGTGTCACTAGCGCGCCTGACACACGCCCCGGCACCAGGGAGTACGGCCCCCTCTG
CGCACGGCGTAACTTCAGCCCCAGATACTCGACCTGCTCCGGGGCTCAACAGCCCC
GCCTGCACATGGAGTTACATCAGCCCCTGATACTAGACCGGCTCCAGGTTCAACT
GCTCCGCCAGCACATGGTGTAACGTCTGCGCCCGATACTCGCCCAGCACCTGGGT
CCACAGCTCCCCCTGCGCATGGAGTAACATCAGCACCTGATACCAGACCTGCCCC
GGGCAGCACTGCACCCCCAGCACATGGCGTAACATCAGCACCAAGATACTCGCCC
CGTCTCTGGTTCCACGGCTCCCCCGCGCATGGCGTTACTTCAGCTCCAGATACA
CGGCCGGCACCCGGCAGTACGGCTCCACCCGCACATGGAGTAACGAGTGCTCCG
GACACTCGGCCTGCTCCAGGAAGTACCGCACCTCCGGGCCATGGCGTGACAAGTG
CTCCCGACACCAGACCAGCGCCTGGTTCAACAGCACCGCCAGCTCATGGTGTAAC
CTCAGCTCCCGATACTAGACCCGCGCCAGGTTCCACCGCTCCACCTGCACACGGG
GTGACGAGCGCACCTGATACGCGCCCCGGCACCGGGAAGCACAGCGCCTCCCGCT
CACGGAGTCACTAGCGCCCCGGATAACAAGACCCGCACCTGGATCTACAGCTCCTC
CAGCTCACGGCGTCACGAGTGCACCCGATACACGACCGGGCCCCAGGCTCTACAG
CCCCACCAGCACATGGAGTCAAGAGTGCACCTGATACTAGGCCCCGCTCCGGGTTC
CACAGCACCTCCTGCACATGGTGTTACATCCGCTCCTGATACGAGACCCGCTCCA
GGCTCTACTGCCCCACCGGCACACGGCGTGACCAGTGCTCCAGATAACCCGGCCAG
CTCCTGGGAGTACTGCGCCTCCAGCTCATGGCGTCACTAGTGACCTGATACAAG
ACCAGCCCCCGTTCCACTGCTCCACAGCCCATGGTGTAACAAGTGACCCGGAC
ACAAGGCCAGCCCCTGGTAGTACTGCTCCTCCTGCTCACGGTGTTACTAGTGCTC
CTGACACCAGACCTGCCCCTGGAAGTACTGCACCGCCTGCTCATGGAGTCACATC
AGTCCGGATACTCGGCCGGCTCCGGGATCAACCGCTCCTCCGGCTCATGGAGTA
ACCTCCGCACCGGATACTAGGCCTGCACCGGGGAGTACAGCACCACTGCTCATG
GTGTGACTAGCGCTCCTGACACTCGCCCCGCTCCCGGTAGCACTGCCCCCCTGC
ACATGGGGTGACTTCAGCTCCTGATACTCGGCCTGCACCCGGAAGCACAGCCCCC
CCAGCTCATGGGGTCACAAGCGTCCAGATACTAGGCCAGCGCCGGGAAGTACA
GCCCCCTCCAGCGCACGGTGTAACCTCCGCGCCAGACACACGCCCTGCTCCCGGAT
CAACGGCACCTCCAGCACACGGTGACGTCCGCACCCGACACAAGACCGGCAC
CTGGTTCTACTGCACCTCCCGCGCACGGAGTTACTTCAGCACCAAGATACAAGACC
TGCTCCTGGCTCAACTGCCCCCTCCGGCGCATGGTGTAACCTAGTGCGCCTGATACA
CGCCCAGCACCGGGTAGTACGGCACCAACAGCTCATGGAGTTACGTCAGCTCCAG
ATACGCGCCCTGCACCAGGCAGTACAGCTCCGCCGGCCACGGAGTAACTAGCG
CACCAGATAACAGGCCAGCACCCGGTAGTACCGCGCCTCCTGCCCATGGAGTAAC
TTCCGCCCCCGATACCCGACCTGCACCTGGCAGTACCGCCCCCTCCCGCCACGGG
GTAACCAAGTGACACCAGACACGCGGCCCCGACCAAGGATCTACTGCTCCCCCAGCGC
ATGGGGTAACTTCTGCACCAGATACGAGGCCTGCCCCAGGTAGTACAGCGCCACC
TGCCACGGTGTCACCTCCGCTCCTGATACAAGGCCTGCGCCTGGATCAACTGCA
CCACCGGCGCACGGGGTTACAAGTGCCCCCTGACACGAGACCAGCACCAAGTTCT
ACGGCGCCTCCGGCACATGGAGTGACTAGTGCCCCAGACACTAGGCCGGCTCCTG
GATCAACCGCACCAACCGCTCATGGAGTGACATCAGCGCCAGATACTAGACCAG
CTCCCGGGTCAACTGCGCCGCCCCCGCATGGGGTTACTTCTGCTCCAGACACTCG
CCCAGCCCCAGGATCAACGGCTCCTCCCGCACACGGAGTGACCTCTGCTCCTGAT
ACCAGGCCAGCTCCAGGGTCTACAGCACCCCTGCTCATGGGGTAACATCTGCCG
CCTCAGG(配列番号 5 0)

10

20

30

40

【 0 1 5 8 】

50

4. コドンスクランブル化 Muc1 x21 (Muc1_21)

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA]₂₁ASG(配列番号 3 0)[配列番号 8]₂₁ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTCCCAGACACTCGGCCTGCACCGGGATCAACCGCCCCA
CCGGCTCATGGTGTAAGTGTGCGCCTGATACCAGACCAGCACCAGGGAG
TACTGCACCTCCTGCTCATGGGGTTACTAGTGCCCCCGATACGCGACCTGC
TCCTGGAAGCACAGCACCGCCGGCTCACGGCGTAACGAGTGCTCCTGACA
CAAGGCCCGCTCCAGGGTCAACTGCACCACCTGCACACGGAGTGACATCA
GCGCCAGATACGAGACCTGCACCAGGAAGTACAGCGCCGCCAGCCCACG
GAGTAACTTCAGCCCCGGACACTAGGCCAGCACCTGGTTCAACGGCGCCT
CCAGCCCATGGAGTAACATCCGCTCCCGATACTCGTCCTGCTCCGGGTTC
ACAGTCTCTCCCGCACATGGGGTGACTAGTGCTCCAGATACTCGCCAGC
ACCCGGTAGTACCGCTCCTCCTGCACATGGCGTCACTAGTGACCAGACA
CGCGTCCGGCTCCTGGGTCTACAGTCCACCAGCTCACGGAGTTACCACT
GCACCTGACACTAGACCTGCGCCCGGTTTCGACGGCTCCGCCCCGCCATGG
GGTAACGTCTGCGCCGGATACACGCCCTGCACCTGGATCTACCGCACCTC
CGGCCCATGGTGTCACGAGCGCACCTGATACGAGGCCTGCTCCAGGTAGT
ACTGCTCCCCCGCTCATGGAGTTACTAGCGCTCCTGATACTCGACCGGCA
CCTGGCAGCACTGCTCCTCCAGCACATGGTGTTACATCGGCTCCAGACAC
ACGTCCCGCGCCAGGATCGACTGCTCCACCCGCTCACGGGGTCCACATCTG
CACCCGATACACGGCCAGCTCCCGGTTCCACTGCCCCGCCTGCCCATGGC
GTTACTTCGGCACCAAGATACCCGACCCGCACCAGGCAGTACAGCACCTCC
AGCGCATGGTGTGACAAGCGCCCCTGATACACGACCAGCTCCAGGCTCAA
CAGCACCACCAGCACACGGTGTAACCTCAGTCCGGATACCCGTCCAGCT
CCTGGTAGTACAGCCCCCTCCTGCGCACGGAGTCACAAGTGCTCCCGACAC
AAGACCAGCCCCAGGTTCTACTGCGCCACCTGCTCACGGTGTTACCTCTGC
CCCAGATACAAGACCTGCCCTGGCTCTACGGCACCCCCGGCACATGGAG
TCACTTCCGCACCGGATACTAGACCAGCGCCTGGGAGTACGGCCCCCCCCA
GCTCATGGCGTGACTTCTGCTGCCTCAGG(配列番号 5 1)

10

20

30

【 0 1 5 9 】

40

50

5. コドンスクランブル化 **Muc1 x10(Muc1_10)**

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMVTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA]₁₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 8]₁₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTT CAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTACCTCGGTCCCAGATACAAGACCGGCCCCAGGATCTACGGCTCCT
CCGGCTCATGGAGTCACTTCTGCTCCAGACACAAGGCCCGCGCCGGGTTC
TACAGCACCGCCTGCTCATGGTGT TACTAGCGCACCCGATACGAGACCTG
CTCCGGGATCAACGGCACCTCCTGCCCCACGGGGTAACATCTGCACCGGAC
ACTCGCCCTGCGCCCCGGTTCAACCGCTCCACCCGCACACGGAGTGACAAG
CGCTCCTGACACTAGACCAGCACCAAGGTTCTACAGCCCCACCAGCCCATG
GAGTTACCAGTGCACCAGATACTAGGCCAGCTCCAGGTAGTACTGCACCC
CCAGCTCATGGGGTTACATCAGCTCCCGACACGCGACCAGCTCCTGGAAG
CACTGCCCTCCAGCTCACGGTGTGACCTCAGCACCTGATACACGCCCTGC
ACCTGGTCTACTGCTCCCCCGCTCATGGCGTAACTAGTGCCCCGGATAC
TCGACCCGCCCTGGTTCCACAGCTCCGCCAGCACATGGTGTAACAAGTG
CTCCTGATACCCGACCAGCGCCTGGAAGTACCGCACCACTGCACATGGA
GTAAC TTCAGCCGCCTCAGG(配列番号 5 2)

10

20

【 0 1 6 0 】

6. コドンスクランブル化 **Muc1 x0 (Muc1_0)**

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMVTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSVGGGGGASG(配列番号 3 1)

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTT CAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTACCTCGGTCTGGCGGTGGTGGAGGAGCCTCAGG(配列番号 9 9)

30

【 0 1 6 1 】

40

50

7. コドンスクランブル化 **Muc1** シングルグリコシル化変異体 **x21 (Muc1_21S)**

アミノ酸配列:

8. LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVT
SV[PDTRPAPGATAPPAHGV TSA]₂₁ASG(配列番号 3 0)[配列番号 5]₂₁ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTACCTCGGTCCCAGATACCAGACCTGCGCCTGGAGCCACAGCTCCT
CCTGCCCCATGGCGTCACAAGTGCCCCTGACACACGCCAGCTCCCGGGGC
TACAGCCCCACCTGCACATGGTGTTACTAGTGACACCAGACACCAGACCGG
CTCCGGGAGCCACGGCACCCCCCGCTCATGGTGTCCTTCCGCACCGGAT
ACGAGGCCAGCACCTGGGGCCACTGCGCCGCCGGCACATGGGGTGACTAG
TGCGCCAGATACTCGCCCTGCTCCAGGGGCTACTGCCCCCTCCAGCTCATGG
CGTAACCTCAGCGCCTGATACCCGACCAGCGCCAGGTGCCACTGCACCGC
CAGCCCATGGGGTCACTAGTGCTCCTGACACTAGACCTGCACCTGGAGCT
ACAGCACCTCCAGCGCATGGTG TGACAAGCGCCCCAGACACGAGACCAGC
CCCCGGTGCCACCGCTCCTCCCGCACATGGAGTTACTAGCGCTCCGGACA
CAAGACCGGCACCAGGTGCGACTGCACCACCGGCTCATGGAGTAACTTCA
GCACCAGATACACGGCCTGCTCCCGGCGCTACAGCTCCACCAGCACATGG
CGTTACCTCCGCACCTGACACGAGGGCCCGCTCCAGGAGCCACTGCTCCCC
CTGCACACGGTGTTACGTCAGCTCCAGATACGCGGCCAGCTCCGGGGCGCA
ACAGCTCCCCCGGCTCACGGTGTAACCAGTGCTCCCGACACAAGGCCTGC
ACCCGGAGCAACCGCACCTCCGGGCCATGGTGTAACAAGTGACCTGATA
CTAGGCCCCGCGCCTGGTGCTACTGCTCCACCTGCTCACGGCGTGACATCAG
CCCCTGATACGAGACCTGCCCCAGGGGCAACTGCACCTCCTGCTCATGGG
GTAAGTAGTGCCCCCGATACAAGACCAGCACCGGGAGCGACCGCCCCCCC
AGCACACGGAGTAACGAGCGCACCCGATACTCGACCTGCACCAGGAGCG
ACGGCTCCACCCGCTCACGGAGTCACGAGTGCTCCAGACACTCGACCTGC
TCCTGGCGCGACAGCACACCAGCTCACGGGGTTACTAGTGCTCCTGATA
CACGACCCGCACCAGGGGCGACTGCTCCTCCAGCCCACGGAGTTACATCT
GCCCCGGATACAAGGCCAGCACCCGGTGCAACTGCTCCGCCCCGCCATGG
AGTCACAAGTGCTCCGGATACTAGACCAGCTCCTGGGGCTACGGCGCCTC
CTGCGCACGGAGTGACTTCTGCTGCCTCAGG

10

20

30

【 0 1 6 2 】

40

50

9. コドンスクランブル化 **Muc1** ダブルグリコシル化変異体 **x21 (Muc1_21D)**

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMSTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[PDTRPAPGATAPPAHGVTA A]₂₁ASG(配列番号 3 0)[配列番号 6]₂₁ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCACTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTCCCAGACACGCGACCCGCACCAGGCGCGACTGCTCCT
CCTGCGCATGGTGTAACAGCGGCCCTGATACGAGGCCAGCCCCTGGAGC
CACCGCACCTCCAGCACACGGAGTGACTGCAGCTCCCGATACTAGACCCG
CGCCAGGAGCAACAGCTCCTCCAGCTCATGGTGTGACGGCCGCCCCAGAT
ACCAGACCTGCCCCAGGGGCGACAGCACCCCCGCTCACGGCGTAACTGC
AGCCCCGGATACGAGACCAGCTCCTGGGGCCACTGCACCTCCGGCTCATG
GGGTAAACAGCTGCCCCCGATACCCGACCTGCACCCGGAGCTACAGCGCCG
CCTGCACACGGTGTAACCGCAGCTCCGGATACTAGACCTGCGCCTGGAGC
AACGGCGCCTCCTGCACATGGGGTTACTGCTGCGCCAGATACAAGGCCTG
CCCCTGGTGCAACAGCACCTCCTGCTCATGGCGTGACAGCTGCACCAGAC
ACAAGACCAGCGCCAGGTGCTACTGCACCACCTGCTCACGGGGTAACTGC
TGCTCCAGATACTCGCCCTGCACCGGGAGCGACGGCTCCACCAGCTCACG
GAGTAACGGCAGCACCTGACACTAGGCCGGCTCCGGGAGCTACGGCACCG
CCCGCACATGGCGTCACTGCGGCTCCTGACACACGACCAGCACCCGGTGC
CACAGCTCCGCCAGCACATGGTGTTACGGCTGCTCCCGACACGAGACCCG
CTCCTGGAGCTACTGCTCCCCCGGCTCACGGTGTTACTGCAGCGCCTGATA
CACGCCCAGCACCCGGGGGCTACAGCACCAACAGCCCATGGGGTCACAGCA
GCTCCAGACACTCGGCCAGCCCCAGGTGCAACTGCTCCACCCGCCCATGG
TGTCACTGCTGCACCTGATACCAGGCCGGCACCAAGAGCCACGGCCCCGC
CGGCACATGGAGTGACCGCGGCACCCGATACAAGACCTGCTCCGGGCGCT
ACAGCCCCCCCCAGCCCACGGAGTCACCGCTGCTCCTGATACTCGACCGGC
ACCTGGTGCTACAGCTCCACCGGCCCATGGCGTTACAGCAGCACCAAGATA
CGAGGCCCGCTCCAGGTGCGACCGCTCCTCCCGCTCATGGAGTAACAGCC
GCTCCGGACACTAGACCGGCTCCCGGCGCAACTGCGCCCCCTGCCCATGG
AGTTACTGCCGCACCGGATACACGCCCTGCCCCGGGAGCAACTGCCCTC
CAGCGCACGGAGTTACAGCTGCTGCCTCAGG(配列番号 5 3)

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

10. コドンスクランブル化 Muc1 トリプルグリコシル化変異体 x21 (Muc1_21T)

アミノ酸配列:

11. LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDV
TSV[PDARPA PGATAPPAHGV TAA]₂₁ASG(配列番号 3 0)[配列番号 7]₂₁ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCACTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTCCCAGATGCAAGGCCTGCCCCGGGAGCGACAGCACCA
CCAGCACATGGAGTGACGGCCGCCCCAGACGCTCGACCGGCACCAGGAG
CAACTGCTCCTCCCGCACATGGGGTCACTGCGGCCCCCTGATGCGAGGCCG
GCACCTGGAGCTACTGCTCCACCGGCCCATGGTGTCAGTGCAGCCCCGGA
TGCTAGACCGGCTCCGGGCGCAACTGCGCCGCCAGCCCATGGAGTACTG
CTGCGCCAGATGCGCGGCCTGCCCCAGGTGCTACAGCCCCCCTGCCCCAT
GGCGTAACAGCTGCCCCCGATGCTCGCCCTGCACCGGGAGCAACGGCGCC
TCCAGCGCACGGAGTAACGGCAGCACCAAGATGCTCGGCCAGCACCGGGG
GCTACAGCTCCACCTGCTCACGGTGTAAGTGCAGCGCCTGATGCACGACC
AGCCCCCTGGAGCAACAGCTCCGCCTGCACACGGAGTGACTGCTGCACCTG
ATGCTAGGCCAGCCCCAGGGGCGACTGCACCTCCAGCACACGGTGTTACA
GCTGCTCCAGACGCACGCCCAGCACCCGGTGCCACAGCTCCTCCTGCGCA
TGGTGTTGACAGCTGCACCAGACGCCCCGACCCGCGCCAGGAGCCACGGCTC
CACCAGCTCACGGCGTGACCGCGGCTCCTGACGCTAGGCCAGCTCCTGGA
GCCACCGCTCCTCCAGCTCATGGCGTTACAGCAGCTCCCGACGCAAGACC
CGCTCCTGGGGCCACTGCTCCCCCGCTCACGGGGTAACAGCCGCTCCGG
ATGCAAGACCTGCCCCCTGGTGCTACTGCACCAACCCGCCCATGGGGTACT
GCAGCTCCGGACGCTAGACCTGCTCCGGGAGCTACAGCGCCCCCAGCCCA
CGGAGTCACAGCAGCACCTGACGCGAGACCAGCGCCAGGTGCAACTGCCC
CTCCTGCACATGGTGTTACTGCCGCACCGGATGCCAGACCTGCACCCGGA
GCTACGGCCCCCGCCGGCTCATGGGGTAAGTGCCTGCTCCTGATGCCCGACC
CGCTCCAGGCGCGACCGCACCTCCTGCTCATGGAGTAACAGCGGCACCCG
ATGCACGGCCGGCTCCCGGCGCTACAGCACCTCCGGCACATGGCGTCACC
GCAGCTCCAGATGCCAGGCCCGCACCAAGGTGCGACGGCACCGCCCGCTCA
TGGTGTAACCGCTGCTCCCGATGCGAGACCTGCGCCTGGTGCAACAGCAC
CCCCGGCTCACGGAGTTACGGCTGCTGCCTCAGG(配列番号 5 4)

10

20

30

【 0 1 6 4 】

40

50

12. ラブリシンコンセンサス, KEPAPTTP x20 (Syn4_20)

アミノ酸配列:

13. LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQ
DVTSV[KEPAPTTP]₂₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 1]₂₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCACTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTCAAGGAACCTGCACCTACAACCCCGAAGGAGCCCGCA
CCGACCACCCCAAAAGAACCTGCGCCGACAACTCCAAAGGAGCCAGCTCC
AACGACGCCAAAGGAACCAGCACCTACGACCCCAAGGAACCCGCCCG
ACGACTCCGAAGGAGCCTGCACCAACAACCTCCTAAAGAACCAGCGCCTAC
TACGCCTAAAGAACCTGCTCCTACTACACCAAAAGAGCCAGCACCCACGA
CACCGAAAGAACCTGCCCCTACTACCCCTAAAGAACCCGCTCCTACCACA
CCAAAGGAACCGGCTCCCACTACTCCCAAAAGAACCAGCCCCAACTACACC
TAAAGAACCGGCCCCCACCCTCCTAAAGAGCCGGCGCCAACTACTCCAA
AAGAACCAGCTCCTACAACCTCCCAAGGAGCCGGCACCTACTACTCCGAAA
GAGCCCGCGCCCAACAACCCCAAGAGCCTGCTCCGACTACTCCTGCCTC
AGG(配列番号 5 5)

10

20

【 0 1 6 5 】

14. 合成 1, DAATPAP x40 (Syn1_40)

アミノ酸配列:

- LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[DAATPAP]₄₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 2]₄₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCACTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTTCGATGCAGCTACTCCAGCTCCGGACGCCGCAACACCC
GCTCCAGACGCCGCCACCCAGCTCCAGATGCTGCTACACCTGCACCTGA
TGCCGCAACTCCCGCGCCGGATGCCGCGACTCCAGCACCGGACGCTGCGA
CGCCAGCCCCCTGATGCTGCAACACCGGCTCCTGATGCTGCGACTCCTGCGC
CAGATGCAGCTACACCAGCCCCGGATGCTGCAACGCCTGCTCCTGACGCA
GCTACTCCGGCCCCCGACGCTGCTACCCCGGCGCCTGATGCTGCTACTCCC
GCTCCTGATGCGGCCACTCCAGCCCCAGACGCAAGCCAGCCCCCGA
TGCTGCTACGCCTGCACCCGACGCGGCCACACCTGCGCCGGACGCAGCGA
CACCTGCCCCTGACGCTGCCACGCCCGCACCTGATGCAGCTACGCCAGCT
CCCGATGCGGCAACACCTGCTCCAGATGCCGCCACTCCTGCTCCGGATGC
GGCGACACCAGCGCCTGACGCCGCTACGCCGGCACCTGATGCTGCCACTC
CGGCTCCAGATGCAGCGACCCAGCGCCAGACGCGGCAACTCCAGCGCCC
GATGCAGCTACCCAGCACACAGATGCTGCAACCCCTGCACCGGATGCAGC
AACGCCAGCACCTGACGCGGCTACTCCTGCACCAGATGCAGCAACTCCTG
CCCCGGACGCGGCGACTCCCGCACCAGACGCTGCAACTCCGGCACACGAT
GCGGCTACCCCGCTCCCGACGCAGCCACTCCCGCCCCAGATGCAGCCAC
ACCAGCTCCTGATGCAGCAACACCAGCACCCGATGCCGCTACCCCTGCTC
CCGCCTCAGG(配列番号 5 6)

30

40

50

【 0 1 6 6 】

15. 合成 1, DAATPAP x80 (Syn1_80)

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[DAATPAP]₈₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 2]₈₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCACTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTACACCTCGGTGATGCAGCTACTCCAGCTCCGGACGCCGCAACACCC
GCTCCAGACGCCGCCACCCAGCTCCAGATGCTGCTACACCTGCACCTGA
TGCCGCAACTCCCGCGCCGGATGCCGCGACTCCAGCACCGGACGCTGCGA
CGCCAGCCCCCTGATGCTGCAACACCGGCTCCTGATGCTGCGACTCCTGCGC
CAGATGCAGCTACACCAGCCCCGGATGCTGCAACGCCTGCTCCTGACGCA
GCTACTCCGGCCCCCGACGCTGCTACCCCGGCGCCTGATGCTGCTACTCCC
GCTCCTGATGCGGCCACTCCAGCCCCAGACGCAGCAACCCAGCCCCCGA
TGCTGCTACGCCTGCACCCGACGCGGCCACACCTGCGCCGGACGCAGCGA
CACCTGCCCCCTGACGCTGCCACGCCCGCACCTGATGCAGCTACGCCAGCT
CCCGATGCGGCAACACCTGCTCCAGATGCCGCCACTCCTGCTCCGGATGC
GGCGACACCAGCGCCTGACGCCGCTACGCCGGCACCTGATGCTGCCACTC
CGGCTCCAGATGCAGCGACCCAGCGCCAGACGCGGCAACTCCAGCGCCC
GATGCAGCTACCCAGCACAGATGCTGCAACCCCTGCACCGGATGCAGC
AACGCCAGCACCTGACGCGGCTACTCCTGCACCAGATGCAGCAACTCCTG
CCCCGGACGCGGCGACTCCCGCACCAAGACGCTGCAACTCCGGCACCAAGAT
GCGGCTACCCCCGCTCCCGACGCAGCCACTCCCGCCCCAGATGCAGCCAC
ACCAGCTCCTGATGCAGCAACACCAGCACCCGATGCCGCTACCCCTGCTC
CCGATGCAGCTACTCCAGCTCCGGACGCCGCAACACCCGCTCCAGACGCC
GCCACCCAGCTCCAGATGCTGCTACACCTGCACCTGATGCCGCAACTCCC
GCGCCGGATGCCGCGACTCCAGCACCGGACGCTGCGACGCCAGCCCCCTGA
TGCTGCAACACCGGCTCCTGATGCTGCGACTCCTGCGCCAGATGCAGCTA
CACCAGCCCCGGATGCTGCAACGCCTGCTCCTGACGCAGCTACTCCGGCC
CCCGACGCTGCTACCCCGGCGCCTGATGCTGCTACTCCCGCTCCTGATGCG
GCCACTCCAGCCCCAGACGCAGCAACCCAGCCCCCGATGCTGCTACGCC
TGACCCCGACGCGGCCACACCTGCGCCGGACGCAGCGACACCTGCCCCCTG
ACGCTGCCACGCCCGCACCTGATGCAGCTACGCCAGCTCCCGATGCGGCA
ACACCTGCTCCAGATGCCGCCACTCCTGCTCCGGATGCGGCGACACCAGC
GCCTGACGCCGCTACGCCGGCACCTGATGCTGCCACTCCGGCTCCAGATG
CAGCGACCCAGCGCCAGACGCGGCAACTCCAGCGCCCGATGCAGCTACC
CCAGCACCAAGATGCTGCAACCCCTGCACCGGATGCAGCAACGCCAGCACC
TGACGCGGCTACTCCTGCACCAGATGCAGCAACTCCTGCCCCGACGCGG
CGACTCCCGCACCAAGACGCTGCAACTCCGGCACCAAGATGCGGCTACCCCC
GCTCCCGACGCAGCCACTCCCGCCCCAGATGCAGCCACACCAGCTCCTGA
TGCAGCAACACCAGCACCCGATGCCGCTACCCCTGCTCCCGCCTCAGG(配
列番号 5 7)

10

20

30

40

【 0 1 6 7 】

16. 合成 2, DAATPAPP x40 (Syn2_40)

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[DAATPAPP]₄₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 3]₄₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTCGATGCAGCTACCCCGGCTCCACCCGATGCGGCAACA
CCAGCCCCCTCCCGATGCAGCAACACCTGCTCCCCCGATGCTGCTACCCCT
GCTCCGCTGATGCTGCAACTCCAGCTCCGCCCCGATGCCGCTACACCTGCC
CCCCCTGACGCCGCCACGCCCGCTCCTCCGGATGCTGCAACCCCAGCACC
CCCAGACGCCGCTACCCCAGCTCCACCAGATGCTGCTACACCCGCACCAC
CTGATGCCGCAACACCGGCGCCTCCTGATGCTGCTACTCCAGCCCCACCTG
ATGCAGCAACTCCTGCGCCACCAGACGCTGCCACACCTGCACCACCAGAT
GCAGCCACACCAGCACCGCCAGACGCAGCAACGCCGGCTCCGCCAGATGC
AGCGACACCAGCGCCACCTGACGCAGCGACTCCAGCACCACCGGATGCGG
CTACCCCCGCTCCGCCGGACGCGGCGACTCCTGCCCTCCTGACGCGGCA
ACTCCGGCCCCCTCCAGATGCGGCGACCCCAGCCCCGCCGGATGCCGCGAC
TCCGGCTCCCCCGGACGCTGCAACACCCGCTCCACCTGATGCTGCCACTCC
CGCGCTCCAGATGCTGCAACGCCAGCTCCCCCTGATGCTGCGACGCCTG
CTCCTCCAGATGCAGCTACACCGGCTCCTCCTGATGCAGCTACGCCTGCAC
CGCCTGACGCTGCTACGCCAGCACCTCCCGACGCAGCCACTCCTGCACCTC
CTGATGCGGCCACTCCAGCGCCCCCGGATGCAGCTACTCCTGCTCCACCG
GACGCCGCAACTCCCGCCCCCTCCGGACGCAGCTACTCCCGCTCCCCCAGA
TGCAGCAACCCCTGCACCCCCCGACGCGGCCACCCCTGCCCCACCAGATG
CCGCCACTCCGGCACCACCCGACGCTGCGACTCCCGCACCTCCAGACGCG
GCTACACCAGCTCCTCCCGCCTCAGG(配列番号 5 8)

10

20

【 0 1 6 8 】

30

40

50

17. 合成 2, DAATPAPP x80 (Syn2_80)

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[DAATPAPP]₈₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 3]₈₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACAGCTTCAGGTTCACTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTTCGATGCAGCTACCCCGGCTCCACCCGATGCGGCAACA
CCAGCCCCCTCCCGATGCAGCAACACCTGCTCCCCCGATGCTGCTACCCCT
GCTCCGCCTGATGCTGCAACTCCAGCTCCGCCCCGATGCCGCTACACCTGCC
CCCCCTGACGCCGCCACGCCGCTCCTCCGGATGCTGCAACCCCAGCACC
CCCAGACGCCGCTACCCAGCTCCACCAGATGCTGCTACACCCGCACCAC
CTGATGCCGCAACACCGGCGCCTCCTGATGCTGCTACTCCAGCCCCACCTG
ATGCAGCAACTCCTGCGCCACCAGACGCTGCCACACCTGCACCACCAGAT
GCAGCCACACCAGACCCGCCAGACGCAACGCCGGCTCCGCCAGATGC
AGCGACACCAGCGCCACCTGACGCAGCGACTCCAGCACCACCGGATGCGG
CTACCCCCGCTCCGCCGGACGCGGCGACTCCTGCCCTCCTGACGCGGCA
ACTCCGGCCCCCTCCAGATGCGGCGACCCCAGCCCCGCCGGATGCCGCGAC
TCCGGCTCCCCCGGACGCTGCAACACCCGCTCCACCTGATGCTGCCACTCC
CGCGCCTCCAGATGCTGCAACGCCAGCTCCCCCTGATGCTGCGACGCCTG
CTCCTCCAGATGCAGCTACACCGGCTCCTCCTGATGCAGCTACGCCTGCAC
CGCCTGACGCTGCTACGCCAGCACCTCCCGACGCAGCCACTCCTGCACCTC
CTGATGCGGCCACTCCAGCGCCCCCGGATGCAGCTACTCCTGCTCCACCG
GACGCCGCAACTCCCGCCCCCTCCGGACGCAGCTACTCCCGCTCCCCCAGA
TGCAGCAACCCCTGCACCCCCCGACGCGGCCACCCCTGCCCCACCAGATG
CCGCCACTCCGGCACCACCCGACGCTGCGACTCCCGCACCTCCAGACGCG
GCTACACCAGCTCCTCCCGATGCAGCTACCCCGGCTCCACCCGATGCGGC
AACACCAGCCCCCTCCCGATGCAGCAACACCTGCTCCCCCGATGCTGCTA
CCCCTGCTCCGCCTGATGCTGCAACTCCAGCTCCGCCCCGATGCCGCTACAC
CTGCCCCCCCCTGACGCCGCCACGCCGCTCCTCCGGATGCTGCAACCCCAG
CACCCCCAGACGCCGCTACCCAGCTCCACCAGATGCTGCTACACCCGCA
CCACCTGATGCCGCAACACCGGCGCCTCCTGATGCTGCTACTCCAGCCCCA
CCTGATGCAGCAACTCCTGCGCCACCAGACGCTGCCACACCTGCACCACC
AGATGCAGCCACACCAGCACCGCCAGACGCAGCAACGCCGGCTCCGCCA
GATGCAGCGACACCAGCGCCACCTGACGCAGCGACTCCAGCACCACCGGA
TGCGGCTACCCCCGCTCCGCCGGACGCGGCGACTCCTGCCCTCCTGACGC
GGCAACTCCGGCCCCCTCCAGATGCGGCGACCCCAGCCCCGCCGGATGCCG
CGACTCCGGCTCCCCCGGACGCTGCAACACCCGCTCCACCTGATGCTGCC
ACTCCCGCGCCTCCAGATGCTGCAACGCCAGCTCCCCCTGATGCTGCGAC
GCCTGCTCCTCCAGATGCAGCTACACCGGCTCCTCCTGATGCAGCTACGCC
TGCACCGCCTGACGCTGCTACGCCAGCACCTCCCGACGCAGCCACTCCTG
CACCTCCTGATGCGGCCACTCCAGCGCCCCCGGATGCAGCTACTCCTGCTC
CACCGGACGCCGCAACTCCCGCCCCCTCCGGACGCAGCTACTCCCGCTCCC
CCAGATGCAGCAACCCCTGCACCCCCCGACGCGGCCACCCCTGCCCCACC
AGATGCCGCCACTCCGGCACCACCCGACGCTGCGACTCCCGCACCTCCAG
ACGCGGCTACACCAGCTCCTCCCGCCTCAGG(配列番号 5 9)

10

20

30

40

【 0 1 6 9 】

18. 合成 3, PPASTSAPG x40 (Syn3_40)

アミノ酸配列:

LYMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD
VTSV[PPASTSAPG]₄₀ASG(配列番号 3 0)[配列番号 4]₄₀ASG

cDNA 配列:

TGTACATGGACATGGTCGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGC
CACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCT
GGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGG
ATGTCACCTCGGTCCCACCTGCATCTACCAGTGCCCCGGGTCCACCTGCCT
CTACTAGCGCCCCAGGACCTCCGGCAAGTACATCAGCGCCAGGACCCCCT
GCTTCCACTAGTGCACCCGGTCCCCCGGCATCTACGTCTGCCCCTGGCCCA
CCTGCTTCAACTTCAGCACCAGGACCACCCGCAAGCACATCAGCCCCAGG
CCCTCCCGCCTCTACAAGCGCTCCGGGGCCTCCGGCCTCTACCTCAGCTCC
AGGCCACACAGCCAGCACTTCAGCCCCTGGTCCACCCGCTTCAACCTCAG
CACCCGGACCTCCTGCCTCAACTTCCGCTCCCGGTCCACCAGCTAGTACCT
CTGCTCCGGGGCCCTCCGGCGAGCACGTCAGCACCGGGACCACCTGCGAGT
ACAAGTGCACCTGGCCCCGCCGCTAGCACAAGTGCCCCCGGTCTCCAGC
ATCCACTAGTGCACCAGGGCCTCCAGCCAGCACTAGTGCGCCGGGTCCCC
CCGCGAGTACGTCAGCTCCGGGACCTCCAGCTTCTACATCTGCTCCTGGGC
CCCCTGCATCAACTAGTGCCCCTGGACCACCGGCTAGTACGTCAGCTCCTG
GTCCCCCTGCCAGTACTAGCGCTCCAGGGCCACCAGCAAGTACGAGCGCA
CCAGGCCCCCAGCCTCTACGAGTGCACCGGGTCTCCTGCAAGTACCTCC
GCTCCAGGTCTCTCCGGCTTCAACGTCCGCACCTGGACCTCCCGCGTCCACA
TCAGCTCCCGGCCCTCCAGCGAGTACTTCTGCTCCCGGACCACCAGCGTCC
ACATCTGCGCCTGGTCTCTCCCGCTAGTACCTCTGCACCTGGTCCGCCGGCC
AGTACAAGTGCTCCCGGGCCTCCCGCATCAACATCTGCACCAGGTCCACC
GGCGTCTACTAGTGCCCCAGGTCCCCCAGCTTCAACATCAGCACCTGGGC
CGCCTGCTAGTACATCCGCTCCTGGACCCCCAGCAAGTACTTCCGCCCTG
GGCCTCCTGCTTCTACTTCAGCTCCTGGCCCTCCTGCGTCAACTAGTGCTC
CAGGACCGCCAGCTAGTACTTCCGCGCCCGGTGCCTCAGG(配列番号 6 0)

10

20

30

【 0 1 7 0 】

40

50

光学レポーター

1. mOxGFP

アミノ酸配列:

SGSASGSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT
LKFISTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVSFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQE
RTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHSH
NVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY
LSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKGSA(配列番号 3 1)

10

cDNA 配列:

CCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTATGGTGTCCAAGGGCGAGGAGCTG
TTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
CCACAAGTTCTCCGTGCGGGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCAACGGC
AAGCTGACCCTGAAGTTCATCAGCACCAACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTG
GCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGAGCTTCTCCCGCTA
CCCCGACCACATGAAGCGCCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCCGAAG
GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTCCTTCAAGGACGACGGCACCTACAAG
ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA
GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
CTGGAGTACAACCTCAACTCCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACGTGGAGGAC
GGCTCCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGA
CGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGTCCACCCAGTCCAAGCT
GTCCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTTCTGGAATTCG
TGACCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTATAAGGGCTC
AGC(配列番号 6 1)

20

【 0 1 7 1 】

30

40

50

膜アンカー

1. Native TM

アミノ酸配列:

SASTLVHNGTSARATTTTPASKSTPFSSIPSHHSDTP TTLASHSTKTDASSTHHSSV
PPLTSSNHSTSPQLSTGVSF FFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQRDISEMFL
QIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASR
YNLTISDVSVDVPPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLI ALAVC
QCRRK*(配列番号 3 2)

10

cDNA 配列:

GCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACAACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACA
ACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATCCCAGCCACCACTCTGAT
ACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCAC
TCACCATAGCTCGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCC
CCAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGTCTTTTCACATTTCAAAC
CTCCAGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAG
CTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTTGAGATTTATAAACAAGGGGG
TTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACA
ATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCACGACGTGGAGA
CACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACG
ATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCT
GGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGT
TCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGC
CGCCGAAAGTAGGGAATTC(配列番号 6 2)

20

【 0 1 7 2 】

2. 合成 TM TM21

アミノ酸配列:

ASGILYWRNPTESDSIVLAIHVPSLLLLLCLALLWYMRRRSM*(配列番号 4 9)

30

cDNA 配列:

CCTCAGGCATACTTTATTGGCGAAACCCAACGGAAAGTGATAGCATCGTT
TTGGCAATTATCGTCCCCAGTCTGCTCCTCTTGCTCTGCCTGGCTTTGTTGT
GGTACATGCGCCGACGAAGTATGTAGGAATTC(配列番号 6 3)

【 0 1 7 3 】

40

細胞質モチーフ

1. Native CT

アミノ酸配列:

SRCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDSPYEKVS

AGNGGSSLSYTNPAVAAASANL*(配列番号 3 3)

cDNA 配列:

TCTAGATGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCC
AGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCC
ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAG
GTTTCTGCAGGTAA_tGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTG
GCAGCCGCTTCTGCCAACTTGTAGGAATTC(配列番号 6 4)

10

2. CQC

アミノ酸配列:

SRCQCRRK*(配列番号 3 4)

cDNA 配列:

TCTAGATGTCAGTGCCGCCGAAAGTAGGAATTC(配列番号 6 5)

20

【 0 1 7 4 】

30

40

50

構築物のリスト

膜結合性ムチン

1. pcDNA3.1+_Muc1_0_TM21
2. pcDNA3.1+_Muc1_10_TM21
3. pcDNA3.1+_Muc1_21_TM21
4. pcDNA3.1+_Muc1_42_TM21
5. pcDNA3.1+_Muc1_21S_TM21
6. pcDNA3.1+_Muc1_21D_TM21
7. pcDNA3.1+_Muc1_21T_TM21
8. pcDNA3.1+_Muc1_10_TM21_CT
9. pcDNA3.1+_Muc1_10_TM21_CQC
10. pcDNA3.1+_Muc1_10_dCT
11. pcDNA3.1+_Muc1_10_FL
12. pcDNA3.1+_Muc1_Syn4_20_TM21
13. pcDNA3.1+_Muc1_Syn1_40_TM21
14. pcDNA3.1+_Muc1_Syn2_40_TM21
15. pcDNA3.1+_Muc1_Syn3_40_TM21
16. pcDNA3.1+_Muc1_Syn1_80_TM21
17. pcDNA3.1+_Muc1_Syn2_80_TM21
18. pPB_Tet_Muc1_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
19. pPB_Tet_Muc1_42_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
20. pPB_Tet_Muc1_21_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
21. pPB_Tet_Muc1_10_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
22. pPB_Tet_Muc1_0_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
23. pPB_Tet_Muc1_21D_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
24. pPB_Tet_Muc1_21T_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR
25. pLV_puro_teton_Muc1_42_dCT
26. pLV_puro_teton_Muc1_dCT
27. pPB_Muc1_mOxGFP_dCT_Blpl
28. pPB_Muc1_42_mOxGFP_dCT_Blpl
29. pPB_Muc1_21_mOxGFP_dCT_Blpl
30. pPB_Muc1_10_mOxGFP_dCT_Blpl
31. pPB_Muc1_0_mOxGFP_dCT_Blpl
32. pPB_Muc1_21S_mOxGFP_dCT_Blpl
33. pPB_Muc1_21D_mOxGFP_dCT_Blpl
34. pPB_Muc1_21T_mOxGFP_dCT_Blpl
35. pPB_Muc1_Syn4_20_mOxGFP_dCT_Blpl
36. pPB_Muc1_Syn1_40_mOxGFP_dCT_Blpl
37. pPB_Muc1_Syn2_40_mOxGFP_dCT_Blpl
38. pPB_Muc1_Syn3_40_mOxGFP_dCT_Blpl
39. pPB_Muc1_Syn1_80_mOxGFP_dCT_Blpl
40. pPB_Muc1_Syn2_80_mOxGFP_dCT_Blpl

【 0 1 7 5 】

分泌型ムチン

41. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_42_rtTAsM2_IRES_NeoR
42. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21T_rtTAsM2_IRES_NeoR
43. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21D_rtTAsM2_IRES_NeoR
44. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21S_rtTAsM2_IRES_NeoR
45. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21_rtTAsM2_IRES_NeoR
46. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_0_rtTAsM2_IRES_NeoR
47. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn1_40_rtTAsM2_IRES_NeoR
48. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn2_40_rtTAsM2_IRES_NeoR
49. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn3_40_rtTAsM2_IRES_NeoR
50. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn1_80_rtTAsM2_IRES_NeoR
51. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn2_80_rtTAsM2_IRES_NeoR

10

【0176】

以下の配列は本明細書中にさらに記載されるように、ムチン及びラブリシン構築物についての代表的なアミノ酸配列であり、そのために、N末端シグナル配列、タンデムリピートドメイン、蛍光光学レポーター(これらの配列のうちの特定のものにおける緑色蛍光(GFP))、膜貫通ドメインから細胞質側末端ドメインを含む、全配列が挙げられる。実施形態において、改変ラブリシンは、膜貫通ドメイン、細胞質側末端ドメイン、及び光学レポーターを省略する。上述のように、GFP配列は、省略されうるか、又は、任意の他のアミノ酸配列(他の検出可能なタンパク質の配列、又は第二のポリペプチドの配列を含むがこれらに限定されない)によって、置換され得ることが認識される。各配列の上に記載されている英数字からなる名称は、配列そのものではなく、配列の名称である。

20

【0177】

30

40

50

1. PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA_42*Muc1_42_mOxGFP_dCT_Blpl*

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL YMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
QDVTSPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP
PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP
GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD
TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA
HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP
PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP
GSTAPPAHGV TSAASGSASGSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRG
EGEGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQSFSRYPDHMKRHDFFKS
AMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL
EYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLL
PDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDMVLLEFVTAAGITHGMDELYKGSASTLVHNGT
SARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPPTLASHSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQ
LSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNI
KFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNL TISDVSVSDVPFPF
SAQSGAGVPGWGIALLLVLCVLVALAIVYLI ALAVCQCRRK*(配列番号 3 5)

10

20

【 0 1 7 8 】

30

40

50

2. PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA_21

Muc1_21_mOxGFP_dCT_BlpI

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL YMDMVA VSM TSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
QDVTSVPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP
PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP
GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD
TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV TSAASGSASGSAMVSKGEEL
FTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWPTLVT
TLTYGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEG
DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNV
EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITHGMDELYKGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHS
TKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYYQ
ELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSV VVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQ
YKTEAASRYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLI
ALAVCQCRRK*(配列番号 3 6)

10

20

【 0 1 7 9 】

3. PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA_10

Muc1_10_TM21_CT

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL YMDMVA VSM TSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
QDVTSVPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV TSAASGILYWRNP TESDSIV
LAIIVPSLLLLLCLALLWYSRCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYH THGR
YVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAAASANL*(配列番号 3 7)

30

【 0 1 8 0 】

40

50

4. PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA_0

Muc1_0_mOxGFP_dCT_Blpl

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL YMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
QDVTSVGGGGGASGSASGSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEG
EGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSA
MPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLE
YNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLP
DNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYKGSASTLVHNGTS
ARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQL
STGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKF
RPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNL TISDVSVSDVPFPFSA
QSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLI ALAVCQCRRK*(配列番号 3 8)

10

【0181】

5. PDTRPAPGATAPPAHGV TSA_21

Muc1_21S_mOxGFP_dCT_Blpl

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL YMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
QDVTSVPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGA
TAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTR
PAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTS
APDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPA
HGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGA
TAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTR
PAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGVTS
APDTRPAPGATAPPAHGVTSAPDTRPAPGATAPPAHGV TSAASGSASGSAMVSK
GEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWP
TLVTTLT YGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSA MPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIR
HNVEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLE
FVTAAGITHGMDELYKGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLA
SHSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTD
YYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKF RPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQ
FNQYKTEAASRYNL TISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAI
VYLI ALAVCQCRRK*(配列番号 3 9)

20

30

【0182】

40

50

6. PDTRPAPGATAPPAHGVTA_A_21*Muc1_21D_mOxGFP_dCT_BlpI*

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL_YMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVTLPATEPASGSAATWG
QDVTSVPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPG
ATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPD
TRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHG
VTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGAT
APPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTR
PAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGV
AAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAP
PAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAAPDTRPAPGATAPPAHGVTAASGSAS
GSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLKFISTTG
KLPVPWPTLVTTLT_YGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGT
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHN_VYITADKQKNG
IKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH_YLSTQSKLSKDPNEKR
DHMVLLFVTAAGITHGMD_ELYKGSASTLVHNGTSARATTT_PASKSTPFSIPSHH
SDTP_TTLASHSTKTDASSTHHSSVPLTSSNHSTSPQLSTGV_SFFFLSFHISNLQFNS
SLED_PSTD_YYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTI
NVHDVETQFNQYKTEAASRYNL_TISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVL_V
CVLVALAIVYLIALAVCQCRRK*(配列番号 4 0)

10

20

[0 1 8 3]**7. PDARPA_PGATAPPAHGVTA_A_21***Muc1_21T_mOxGFP_dCT_BlpI*

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDL_YMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVTLPATEPASGSAATWG
QDVTSVPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PG
ATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPD
ARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHG
VTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGAT
APPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDAR
PA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGV
AAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAP
PAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAAPDARPA_PGATAPPAHGVTAASGSAS
GSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLKFISTTG
KLPVPWPTLVTTLT_YGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGT
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHN_VYITADKQKNG
IKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH_YLSTQSKLSKDPNEKR
DHMVLLFVTAAGITHGMD_ELYKGSASTLVHNGTSARATTT_PASKSTPFSIPSHH
SDTP_TTLASHSTKTDASSTHHSSVPLTSSNHSTSPQLSTGV_SFFFLSFHISNLQFNS
SLED_PSTD_YYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTI
NVHDVETQFNQYKTEAASRYNL_TISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVL_V
CVLVALAIVYLIALAVCQCRRK*(配列番号 4 1)

30

40

[0 1 8 4]

50

10

20

30

40

10. DAATPAP_80 (Syn1_80)

Muc1_Syn1_80_mOxGFP_dCT_BlpI

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
 DDDDL YMDMVA VSM TSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
 QDVT SVDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PA
 PDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 ATPAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 DAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 APDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 TPAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 AAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 PDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 ATPAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPASGSASGSAMVSKGEELFTGVVPILVELD
 GDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LK FISTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQSFSRY
 PDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGID
 FKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSGVQLADHYQ
 QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELY
 KGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSV
 PPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYYQELQRDISEMFLQI
 YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLT
 ISDVSVS DVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCRRK*(
 配列番号 4 4)

10

20

【0187】

11. DAATPAPP_40 (Syn2_40)

Muc1_Syn1_40_mOxGFP_dCT_BlpI

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
 DDDDL YMDMVA VSM TSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
 QDVT SVDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 AAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 DAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 PDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 PPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 APPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT PAPDAAT
 ASGSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LK FIST
 TGKLPVPWPTLVTTLYGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDD
 GTYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQK
 NGIKANFKIRHNVEDGSGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNE
 KRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPS
 HHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSV PPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQF
 NSSLED PSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREG
 TINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVS DVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLV
 LVCVLVALAIVYLIALAVCQCRRK*(配列番号 4 5)

30

40

【0188】

50

12. **DAATPAPP_80 (Syn2_80)***Muc1_Syn1_40_mOxGFP_dCT_Blpl*

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
 DDDDLVMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
 QDVT SVDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPD
 AATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPP
 DAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPP
 PDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAP
 PDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATP
 APPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAAT
 PAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAA
 TPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDA
 ATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPD
 AATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPP
 DAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAP
 PDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPDAATPAPPASGSASGSAMVSKG
 EELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWPT
 LVTTLT YGVQSFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVK
 FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIRH
 NVEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLEF
 VTAAGITHGMDELYKGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLAS
 HSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDY
 YQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSV VVQLTLAFREGTINVHDVETQF
 NQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGAGV PGWGIALLVLCVLVALAIV
 YLIALAVCQCRRK*(配列番号 4 6)

10

20

【 0 1 8 9 】

13. **PPASTSAPG_40 (Syn3_40)***Muc1_Syn1_40_mOxGFP_dCT_Blpl*

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
 DDDDLVMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
 QDVT SVPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTS
 APGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGP
 PASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPAST
 SAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPG
 PPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPAS
 TSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAP
 GPPASTSAPGPPASTSAPGASGSASGSAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHK
 FSVRGE GEGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQSFSRYPDHMKRH
 DFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL
 GHKLEYNFN SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDG SVQLADHYQQNTPIGDG
 PVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYKGSASTLV
 HNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNH
 STSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDY YQELQRDISEMFLQIYKQGGFL
 GLSNIKFRPGSV VVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVD
 VPPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCRRK*(配列番号 4
 7)

30

40

【 0 1 9 0 】

50

14. PPASTSAPG_80 (Syn3_80)

Muc1_Syn1_40_mOxGFP_dCT_Blpl

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNADYK
DDDDLMDMVAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWG
QDVTSVPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTS
APGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPG
PASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPAST
SAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPG
PPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPAS
TSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAP
GPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPA
STSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSA
PGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPP
ASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTS
APGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGP
PASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPAST
SAPGPPASTSAPGPPASTSAPGPPASTSAPGASGSASGSAMVSKGEELFTGVVPILV
ELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LKFISTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQSF
SRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIEL
KGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVIYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDG SVQLAD
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMD
ELYKGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHH
SSVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDY YQELQRDISEMF
LQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY
NLTISDVSVDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCR
RK(配列番号 4 8)

10

20

【 0 1 9 1 】

30

40

50

第 I 部で使用した構築物のリスト

膜結合性ムチン

52. pcDNA3.1+_Muc1_0_TM21	
53. pcDNA3.1+_Muc1_10_TM21	
54. pcDNA3.1+_Muc1_21_TM21	
55. pcDNA3.1+_Muc1_42_TM21	
56. pcDNA3.1+_Muc1_21S_TM21	
57. pcDNA3.1+_Muc1_21D_TM21	
58. pcDNA3.1+_Muc1_21T_TM21	10
59. pcDNA3.1+_Muc1_10_TM21_CT	
60. pcDNA3.1+_Muc1_10_TM21_CQC	
61. pcDNA3.1+_Muc1_10_dCT	
62. pcDNA3.1+_Muc1_10_FL	
63. pcDNA3.1+_Muc1_Syn4_20_TM21	
64. pcDNA3.1+_Muc1_Syn1_40_TM21	
65. pcDNA3.1+_Muc1_Syn2_40_TM21	
66. pcDNA3.1+_Muc1_Syn3_40_TM21	
67. pcDNA3.1+_Muc1_Syn1_80_TM21	
68. pcDNA3.1+_Muc1_Syn2_80_TM21	
69. pcDNA3.1+_Muc1_Syn3_80_TM21	20
70. pPB_Tet_Muc1_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
71. pPB_Tet_Muc1_42_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
72. pPB_Tet_Muc1_21_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
73. pPB_Tet_Muc1_10_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
74. pPB_Tet_Muc1_0_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
75. pPB_Tet_Muc1_21D_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
76. pPB_Tet_Muc1_21T_TM21_IRES2_copGFP_rtTAsM2_IRES_NeoR	
77. pLV_puro_teton_Muc1_42_dCT	
78. pLV_puro_teton_Muc1_dCT	
79. pPB_Muc1_mOxGFP_dCT_Blpl	
80. pPB_Muc1_42_mOxGFP_dCT_Blpl	
81. pPB_Muc1_21_mOxGFP_dCT_Blpl	30
82. pPB_Muc1_10_mOxGFP_dCT_Blpl	
83. pPB_Muc1_0_mOxGFP_dCT_Blpl	
84. pPB_Muc1_21S_mOxGFP_dCT_Blpl	
85. pPB_Muc1_21D_mOxGFP_dCT_Blpl	
86. pPB_Muc1_21T_mOxGFP_dCT_Blpl	
87. pPB_Muc1_Syn4_20_mOxGFP_dCT_Blpl	
88. pPB_Muc1_Syn1_40_mOxGFP_dCT_Blpl	
89. pPB_Muc1_Syn2_40_mOxGFP_dCT_Blpl	
90. pPB_Muc1_Syn3_40_mOxGFP_dCT_Blpl	
91. pPB_Muc1_Syn1_80_mOxGFP_dCT_Blpl	
92. pPB_Muc1_Syn2_80_mOxGFP_dCT_Blpl	40

【 0 1 9 2 】

分泌型ムチン

- 93. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_42_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 94. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21T_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 95. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21D_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 96. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21S_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 97. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_21_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 98. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_0_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 99. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn1_40_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 100. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn2_40_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 101. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn3_40_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 102. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn1_80_rtTAsM2_IRES_NeoR
- 103. pPB_Tet_SumoStar_Muc1_Syn2_80_rtTAsM2_IRES_NeoR

10

【0193】

第I部で引用された参考文献-本開示のいずれかの部分に列挙された参考文献は、いずれの参考文献も特許性にとって重要であることを示すものではない。

参考文献

- (1) Brockhausen, I.; Schachter, H.; Stanley, P. O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- (2) Lichtenberger, L. M. The Hydrophobic Barrier Properties of Gastrointestinal Mucus. *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, *57* (1), 565–583.//doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003025.
- (3) Hudak, J. E.; Canham, S. M.; Bertozzi, C. R. Glycocalyx Engineering Reveals a Siglec-Based Mechanism for NK Cell Immuno-evasion. *Nature Chemical Biology* **2014**, *10* (1), 69–75.//doi.org/10.1038/nchembio.1388.
- (4) Paszek, M. J.; DuFort, C. C.; Rossier, O.; Bainer, R.; Mouw, J. K.; Godula, K.; Hudak, J. E.; Lakins, J. N.; Wijekoon, A. C.; Cassereau, L.; et al. The Cancer Glycocalyx Mechanically Primes Integrin-Mediated Growth and Survival. *Nature* **2014**, *511* (7509), 319–325.//doi.org/10.1038/nature13535.
- (5) Polefka, T. G.; Garrick, R. A.; Redwood, W. R.; Swislocki, N. I.; Chinard, F. P. Solute-Excluded Volumes near the Novikoff Cell Surface. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1984**, *247* (5), C350–C356.//doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.5.C350.
- (6) Kramer, J. R.; Onoa, B.; Bustamante, C.; Bertozzi, C. R. Chemically Tunable Mucin Chimeras Assembled on Living Cells. *PNAS* **2015**, *112* (41), 12574–12579.//doi.org/10.1073/pnas.1516127112.
- (7) Coltart, D. M.; Royyuru, A. K.; Williams, L. J.; Glunz, P. W.; Sames, D.; Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Chen, X.-T.; Danishefsky, S. J.; Live, D. H. Principles of Mucin Architecture: Structural Studies on Synthetic Glycopeptides Bearing Clustered Mono-, Di-, Tri-, and Hexasaccharide Glycodomains. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (33), 9833–9844.//doi.org/10.1021/ja020208f.
- (8) Dennis, J. W.; Granovsky, M.; Warren, C. E. Protein Glycosylation in Development and Disease. *BioEssays* **1999**, *21* (5), 412–421.//doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199905)21:5<412::AID-BIES8>3.0.CO;2-5.

20

30

40

50

【 0 1 9 4 】

- (9) Reis, C. A.; Osorio, H.; Silva, L.; Gomes, C.; David, L. Alterations in Glycosylation as Biomarkers for Cancer Detection. *Journal of Clinical Pathology* **2010**, *63* (4), 322–329.//doi.org/10.1136/jcp.2009.071035.
- (10) Steentoft, C.; Vakhrushev, S. Y.; Vester-Christensen, M. B.; Schjoldager, K. T.-B. G.; Kong, Y.; Bennett, E. P.; Mandel, U.; Wandall, H.; Levery, S. B.; Clausen, H. Mining the O-Glycoproteome Using Zinc-Finger Nuclease–Glycoengineered SimpleCell Lines. *Nature Methods* **2011**, *8* (11), 977–982.//doi.org/10.1038/nmeth.1731.
- (11) Julien, S.; Adriaenssens, E.; Ottenberg, K.; Furlan, A.; Courtand, G.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Hanisch, F.-G.; Delannoy, P.; Le Bourhis, X. ST6GalNAc I Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Greatly Modifies Their O-Glycosylation Pattern and Enhances Their Tumourigenicity. *Glycobiology* **2006**, *16* (1), 54–64.//doi.org/10.1093/glycob/cwj033. 10
- (12) Pérez-Garay, M.; Arteta, B.; Pagès, L.; Llorens, R. de; Bolòs, C. de; Vidal-Vanaclocha, F.; Peracaula, R. A2,3-Sialyltransferase ST3Gal III Modulates Pancreatic Cancer Cell Motility and Adhesion In Vitro and Enhances Its Metastatic Potential In Vivo. *PLOS ONE* **2010**, *5* (9), e12524.//doi.org/10.1371/journal.pone.0012524.
- (13) Parthasarathy, R.; Rabuka, D.; Bertozzi, C. R.; Groves, J. T. Molecular Orientation of Membrane-Anchored Mucin Glycoprotein Mimics. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (42), 12133–12135.//doi.org/10.1021/jp072136q.
- (14) Rabuka, D.; Forstner, M. B.; Groves, J. T.; Bertozzi, C. R. Noncovalent Cell Surface Engineering: Incorporation of Bioactive Synthetic Glycopolymers into Cellular Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (18), 5947–5953.//doi.org/10.1021/ja710644g. 20
- (15) Woods, E. C.; Yee, N. A.; Shen, J.; Bertozzi, C. R. Glycocalyx Engineering with a Recycling Glycopolymer That Increases Cell Survival In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (52), 15782–15788.//doi.org/10.1002/anie.201508783.
- (16) Brakenhoff, R. H.; Schoenmakers, J. G.; Lubsen, N. H. Chimeric CDNA Clones: A Novel PCR Artifact. *Nucleic Acids Res* **1991**, *19* (8), 1949.
- (17) Meyerhans, A.; Vartanian, J.-P.; Wain-Hobson, S. DNA Recombination during PCR. *Nucleic Acids Res* **1990**, *18* (7), 1687–1691.//doi.org/10.1093/nar/18.7.1687.
- (18) Tang, N. C.; Chilkoti, A. Combinatorial Codon Scrambling Enables Scalable Gene Synthesis and Amplification of Repetitive Proteins. *Nat Mater* **2016**, *15* (4), 419–424.//doi.org/10.1038/nmat4521. 30
- (19) Ferrari, F. A.; Cappello, J. Biosynthesis of Protein Polymers. In *Protein-Based Materials; Bioengineering of Materials*; Birkhäuser Boston, 1997; pp 37–60.//doi.org/10.1007/978-1-4612-4094-5_2.
- (20) Yoshida, A.; Suzuki, M.; Ikenaga, H.; Takeuchi, M. Discovery of the Shortest Sequence Motif for High Level Mucin-Type O-Glycosylation. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (27), 16884–16888.//doi.org/10.1074/jbc.272.27.16884.
- (21) Pei-Xiang, X.; Prenzoska, J.; McKenzie, I. F. C. Epitope Mapping of Anti-Breast and Anti-Ovarian Mucin Monoclonal Antibodies. *Molecular Immunology* **1992**, *29* (5), 641–650.//doi.org/10.1016/0161-5890(92)90201-8. 40

【 0 1 9 5 】

- (22) Zeng, Y.; Ramya, T. N. C.; Dirksen, A.; Dawson, P. E.; Paulson, J. C. High-Efficiency Labeling of Sialylated Glycoproteins on Living Cells. *Nature Methods* **2009**, *6* (3), 207–209.//doi.org/10.1038/nmeth.1305.
- (23) Wang, Y.; Ju, T.; Ding, X.; Xia, B.; Wang, W.; Xia, L.; He, M.; Cummings, R. D. Cosmc Is an Essential Chaperone for Correct Protein O-Glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107* (20), 9228–9233.//doi.org/10.1073/pnas.0914004107.
- (24) Bzymek, M.; Lovett, S. T. Instability of Repetitive DNA Sequences: The Role of Replication in Multiple Mechanisms. *PNAS* **2001**, *98* (15), 8319–8325.//doi.org/10.1073/pnas.111008398. 10
- (25) Swallow, D. M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Corney, G.; Taylor-Papadimitriou, J.; Bramwell, M. E. The Human Tumour-Associated Epithelial Mucins Are Coded by an Expressed Hypervariable Gene Locus PUM. *Nature* **1987**, *328* (6125), 82–84.//doi.org/10.1038/328082a0.
- (26) Carvalho, F.; Seruca, R.; David, L.; Amorim, A.; Seixas, M.; Bennett, E.; Clausen, H.; Sobrinho-Simoes, M. MUC1 Gene Polymorphism and Gastric Cancer—an Epidemiological Study. *Glycoconj J* **1997**, *14* (1), 107–111.//doi.org/10.1023/A:1018573201347.
- (27) Shurer, C. R.; Colville, M. J.; Gupta, V. K.; Head, S. E.; Kai, F.; Lakins, J. N.; Paszek, M. J. Genetically Encoded Toolbox for Glycocalyx Engineering: Tunable Control of Cell Adhesion, Survival, and Cancer Cell Behaviors. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**.//doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00037. 20
- (28) Cellular O-Glycome Reporter/Amplification to explore O-glycans of living cells | Nature Methods//www.nature.com/articles/nmeth.3675 (accessed Jun 1, 2019).
- (29) Litvinov, S. V.; Hilken, J. The Epithelial Sialomucin, Episialin, Is Sialylated during Recycling. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (28), 21364–21371.
- (30) Kinlough, C. L.; McMahan, R. J.; Poland, P. A.; Bruns, J. B.; Harkleroad, K. L.; Strempel, R. J.; Kashlan, O. B.; Weixel, K. M.; Weisz, O. A.; Hughey, R. P. Recycling of MUC1 Is Dependent on Its Palmitoylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (17), 12112–12122.//doi.org/10.1074/jbc.M512996200.
- (31) Mercanti, V.; Marchetti, A.; Lelong, E.; Perez, F.; Orci, L.; Cosson, P. Transmembrane Domains Control Exclusion of Membrane Proteins from Clathrin-Coated Pits. *J Cell Sci* **2010**, *123* (19), 3329–3335.//doi.org/10.1242/jcs.073031. 30
- (32) Kinlough, C. L.; Poland, P. A.; Bruns, J. B.; Harkleroad, K. L.; Hughey, R. P. MUC1 Membrane Trafficking Is Modulated by Multiple Interactions. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (51), 53071–53077.//doi.org/10.1074/jbc.M409360200.
- (33) Geisler, C.; Jarvis, D. L. Letter to the Glyco-Forum: Effective Glycoanalysis with Maackia Amurensis Lectins Requires a Clear Understanding of Their Binding Specificities. *Glycobiology* **2011**, *21* (8), 988–993.//doi.org/10.1093/glycob/cwr080.
- (34) Brockhausen, I.; Yang, J.-M.; Burchell, J.; Whitehouse, C.; Taylor-Papadimitriou, J. Mechanisms Underlying Aberrant Glycosylation of MUC1 Mucin in Breast Cancer Cells. *European Journal of Biochemistry* **1995**, *233* (2), 607–617.//doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.607_2.x. 40

[0 1 9 6]

- (35) Gerken, T. A.; Gilmore, M.; Zhang, J. Determination of the Site-Specific Oligosaccharide Distribution of the O-Glycans Attached to the Porcine Submaxillary Mucin Tandem Repeat FURTHER EVIDENCE FOR THE MODULATION OF O-GLYCAN SIDE CHAIN STRUCTURES BY PEPTIDE SEQUENCE. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (10), 7736–7751.//doi.org/10.1074/jbc.M111690200.
- (36) Gerken, T. A. Kinetic Modeling Confirms the Biosynthesis of Mucin Core 1 (β -Gal(1–3) α -GalNAc-O-Ser/Thr) O-Glycan Structures Are Modulated by Neighboring Glycosylation Effects. *Biochemistry* **2004**, 43 (14), 4137–4142.//doi.org/10.1021/bi036306a.
- (37) Clausen, H.; Bennett, E. P. A Family of UDP-GalNAc: Polypeptide N-Acetylglucosaminyl-Transferases Control the Initiation of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *Glycobiology* **1996**, 6 (6), 635–646.//doi.org/10.1093/glycob/6.6.635.
- (38) Granovsky, M.; Bielfeldt, T.; Peters, S.; Paulsen, H.; Meldal, M.; Brockhausen, J.; Brockhausen, I. UDPgalactose:Glycoprotein-N-Acetyl-d-Galactosamine 3- β -d-Galactosyltransferase Activity Synthesizing O-Glycan Core 1 Is Controlled by the Amino Acid Sequence and Glycosylation of Glycopeptide Substrates. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 221 (3), 1039–1046.//doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18822.x.
- (39) Brockhausen, I.; Dowler, T.; Paulsen, H. Site Directed Processing: Role of Amino Acid Sequences and Glycosylation of Acceptor Glycopeptides in the Assembly of Extended Mucin Type O-Glycan Core 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2009**, 1790 (10), 1244–1257.//doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.020.
- (40) Huang, K. M.; Snider, M. D. Glycoprotein Recycling to the Galactosyltransferase Compartment of the Golgi Complex. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (13), 9302–9310.
- (41) Engelmann, K.; Kinlough, C. L.; Müller, S.; Razawi, H.; Baldus, S. E.; Hughey, R. P.; Hanisch, F.-G. Transmembrane and Secreted MUC1 Probes Show Trafficking-Dependent Changes in O-Glycan Core Profiles. *Glycobiology* **2005**, 15 (11), 1111–1124.//doi.org/10.1093/glycob/cwi099.
- (42) Elhammer, A. P.; Poorman, R. A.; Brown, E.; Maggiora, L. L.; Hoogerheide, J. G.; Kézdy, F. J. The Specificity of UDP-GalNAc:Polypeptide N-Acetylglucosaminyltransferase as Inferred from a Database of in Vivo Substrates and from the in Vitro Glycosylation of Proteins and Peptides. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (14), 10029–10038.
- (43) Hema Thanka Christlet, T.; Veluraja, K. Database Analysis of O-Glycosylation Sites in Proteins. *Biophysical Journal* **2001**, 80 (2), 952–960.//doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76074-2.
- (44) Gerken, T. A.; Owens, C. L.; Pasumarthy, M. Site-Specific Core 1 O-Glycosylation Pattern of the Porcine Submaxillary Gland Mucin Tandem Repeat EVIDENCE FOR THE MODULATION OF GLYCAN LENGTH BY PEPTIDE SEQUENCE. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (41), 26580–26588.//doi.org/10.1074/jbc.273.41.26580.
- (45) Sihlbom, C.; van Dijk Härd, I.; Lidell, M. E.; Noll, T.; Hansson, G. C.; Bäckström, M. Localization of O-Glycans in MUC1 Glycoproteins Using Electron-Capture Dissociation Fragmentation Mass Spectrometry. *Glycobiology* **2009**, 19 (4), 375–381.//doi.org/10.1093/glycob/cwn144.

【 0 1 9 7 】

- (46) Nicholls, J. M.; Bourne, A. J.; Chen, H.; Guan, Y.; Peiris, J. M. Sialic Acid Receptor Detection in the Human Respiratory Tract: Evidence for Widespread Distribution of Potential Binding Sites for Human and Avian Influenza Viruses. *Respir Res* **2007**, 8 (1), 73.//doi.org/10.1186/1465-9921-8-73.
- (47) Lee, M. E.; DeLoache, W. C.; Cervantes, B.; Dueber, J. E. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth. Biol.* **2015**, 4 (9), 975–986.//doi.org/10.1021/sb500366v.
- (48) Paszek, M. J.; DuFort, C. C.; Rubashkin, M. G.; Davidson, M. W.; Thorn, K. S.; Liphardt, J. T.; Weaver, V. M. Scanning Angle Interference Microscopy Reveals Cell Dynamics at the Nanoscale. *Nat Meth* **2012**, 9 (8), 825–827.//doi.org/10.1038/nmeth.2077.
- (49) Subedi, G. P.; Johnson, R. W.; Moniz, H. A.; Moremen, K. W.; Barb, A. High Yield Expression of Recombinant Human Proteins with the Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension. *J Vis Exp* **2015**, No. 106.//doi.org/10.3791/53568.
- (50) Shurer, C. R.; Kuo, J. C.-H.; Roberts, L. M.; Gandhi, J. G.; Colville, M. J.; Enoki, T. A.; Pan, H.; Su, J.; Noble, J. M.; Hollander, M. J.; et al. Physical Principles of Membrane Shape Regulation by the Glycocalyx. *Cell* **2019**, 177 (7), 1757–1770.e21.//doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.017.
- (51) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods* **2012**, 9 (7), 676–682.//doi.org/10.1038/nmeth.2019.
- (52) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis//www.nature.com/articles/nmeth.2089 (accessed Oct 31, 2018).//doi.org/10.1038/nmeth.2089.
- (53) Reichner, J. S.; Whiteheart, S. W.; Hart, G. W. Intracellular Trafficking of Cell Surface Sialoglycoconjugates. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (31), 16316–16326.
- (54) Fukuda, M. Beta-Elimination for Release of O-GalNAc-Linked Oligosaccharides from Glycoproteins and Glycopeptides. *Curr Protoc Mol Biol* **2001**, Chapter 17, Unit17.15B.//doi.org/10.1002/0471142727.mb1715bs31.
- (55) Shajahan, A.; Heiss, C.; Ishihara, M.; Azadi, P. Glycomic and Glycoproteomic Analysis of Glycoproteins-a Tutorial. *Anal Bioanal Chem* **2017**, 409 (19), 4483–4505.//doi.org/10.1007/s00216-017-0406-7.

【 0 1 9 8 】

第II部

本開示のこの第II部は、細胞産生系の保護及び凝集の減少のためのムチンコーティング技術を例示する。

【 0 1 9 9 】

この第II部に関連して、複雑な翻訳後修飾を有する生物学的製剤に対する増大する要求を満たすために、改善された収率及び生産信頼性を有する宿主細胞生産系の最適化が望まれる。本開示の前に、懸濁液-適応哺乳動物細胞の凝集は、バイオリアクターの細胞密度及び体積当たりの収率を制限し得る重大な問題のままであった。この第II部は、細胞表面上の抗-接着及び保護コーティングの合成を指示する遺伝的コード技術を提供する。操作されたムチンドメインを合成膜貫通アンカーに融合させることにより、新しい細胞表面コーティングを遺伝的にコードする。適切な発現系と組み合わせることにより、ムチンコーティング技術は、細胞凝集を強く緩和し、且つ懸濁液中の細胞を流体せん断応力から保護する

ために、厚みがあり、高度に水和されたバリアのアセンブリを指向する。コーティング技術は、懸濁液適応ヒト293-F細胞上で実証され、これは、極端な細胞凝集を誘導する培地においてさえ凝集に抵抗し、市販の凝集防止剤よりも改善された性能を示す。安定なバイオポリマーコーティングは、細胞増殖速度、cDNAによる一過性トランスフェクション効率、又は組換えタンパク質発現に対して有害な効果を示さない。全体として、本明細書中に記載されるムチンコーティング技術及び操作された細胞株は、バイオリアクター中の懸濁細胞の単細胞増殖及び生存率を改善する能力を示す。

【0200】

この第II部、ならびに本開示の他の部分は、生物学的界面での接着及びファウリング(fouling)を低減するために利用される、当技術分野でムチンと呼ばれるバイオポリマーに関する。ムチンは、セリン及びトレオニン残基に富むアミノ酸配列を特徴とし、O-連結ペンダントグリカン構造で翻訳後修飾される(Thornton, Rousseau, & McGuckin, 2008)。ムチンのボトルブラシ分子構造は、多様な目的(抗ファウリングコーティング、潤滑、及び細胞相互作用の調節を含む)のために生物学的システムによって使用される抗接着特性を付与する(Jay & Waller, 2014; Kuo, Gandhi, Zia, & Paszek, 2018; Paszek et al., 2014)。ムチンファミリーメンバーのうち、ムチン-1(Muc1)は、インテグリン-及びカドヘリン-媒介細胞相互作用を妨害し得る抗接着タンパク質として認識される(Klinken, Dekker, Buller, & Einerhand, 1995; Wesseling, Valk, & Hilkens, 1996; Wesseling, van der Valk, Vos, Sonnenberg, & Hilkens, 1995)。Muc1の抗接着特性は、細胞表面への輸送中に強くO-グリコシル化されるその大きな外部ドメインによって付与される。グリカンの中性及び陰イオン性糖残基は、水と配位して、細胞表面上に高度に水和したバリアを形成することができる(Gendler & Spicer, 1995)。

【0201】

この第II部では、新規なムチンcDNA、及びそれらによってコードされるムチンが記載され、ヒト細胞宿主産生系の凝集を減少させるための遺伝的コード技術を生み出すために使用される。特に、本明細書に記載のムチン技術は、例えば、宿主細胞産生系の抗接着コーティングとして使用するために、改善され、試験され、洗練される。非限定的な実証として、安定な抗接着コーティングを有する新しい293-F細胞株を開発し、増殖速度、細胞凝集、せん断応力に対する抵抗性、及びプラスミドDNAでのトランスフェクション効率に関してそれらの性能を評価する。

【0202】

材料及び方法

抗体と試薬

以下の抗体を使用した：ヒトCD227(555925、BD Biosciences)(Muc1)、 β -アクチン(sc-4778、Santa Cruz)、ヤギ抗-マウスIgG-HRP(sc-2005、Santa Cruz)。使用したレクチンは、ビオチン化ピーナッツ凝集素(PNA; B-1075、Vector Laboratories)、CF568 PNA(29061、Biotium)、CF640R PNA(29063、Biotium)、CF633コムギ胚芽凝集素(WGA; 29024、Biotium)であった。ビオチン化レクチンを、ExtrAvidin-ペルオキシダーゼ(E2886、Sigma)を用いて検出した。トランスアクチベーター細胞株を誘導するために、ドキシサイクリンを使用した(sc-204734、Santa Cruz)。ゲンタマイシン選択のために、G418を使用した(10131035、Thermo Fisher)。

【0203】

構築物

組込まれた、共発現逆テトラサイクリントランスアクチベーター遺伝子(pPB tet rtTA NeoR)を有するテトラサイクリン誘導性、トランスポゾンに基づくPiggybac発現ベクターを、安定な系列生成のために使用した。脳心筋炎ウイルスの配列内リボソーム進入部位(IRES)、続いて蛍光タンパク質copGFPを、NotI及びXbaI部位に挿入することによって、pPB tet rtTA NeoRプラスミドを改変した(pPB tet IRES GFP rtTA NeoR)。アミノ酸配列 PDTRPAPGSTAPPAHGVTS(配列番号8)の21又は42のタンデムリピート(TR)を含む合成cDNAを、コドンスクランブラー(Tang & Chilkoti, 2016)でコドン最適化し、

カスタム遺伝子合成(General Biosystems)により作成し、pcDNA3.1 Muc1 TM21に、天然のタンデムリピートの代わりにクローニングした一以前に(Paszek et al., 2014; Shurer et al., 2017)に記載されている一BamHI及び Bsu36I制限酵素部位を使用。次いで、操作された21又は42のタンデムリピートを含むMuc1遺伝子を、BamHI及びEcoRI部位を用いて、pPB tet IRES GFP rtTA NeoRプラスミド中にクローン化して、それぞれ、Mucin-270及びMucin-135バイオポリマー細胞株を作製するために使用される、Muc1 42TR TM21 pPB tet IRES GFP rtTA NeoR、及び、Muc1 21TR TM21 pPB tet IRES GFP rtTA NeoRプラスミドを生成した。ムチン-0細胞株を産生するために、天然のMuc1タンデムリピートをpcDNA3.1 Muc1 TM21から欠失させた(5'-TGGAGGAGCCTCAGGC ATACTTTATTG-3' (配列番号14 順方向)、及び、5'-CCACCGCCGACCGAGGTGACATC CTG-3' (配列番号15 逆方向)プライマーによるQ5部位特異的変異誘発によって)。次に0TRを有するMuc1遺伝子を、pcDNA3.1 Muc1 0TR TM21から切断し、BamHIa及びEcoRI部位を介してpPB tet IRES GFP rtTA NeoRプラスミドにクローニングした。プラスミドpLV puro mRuby2を、細胞質赤色蛍光タンパク質(RFP)を用いた一過性トランスフェクション実験に使用した。分泌RFP実験のために、SS-mScarlet-I pPB tet IRES GFP rtTA NeoRプラスミドを使用した。このプラスミドを構築するために、BamHI-HF及びEcoRI-HFを用いて骨格を線状化した。リンカー(4つのグリシン、続いてセリン)によってmScarlet-Iに融合されたMuc1シグナル配列(MTPGTQSPFFLLLLTVLTVVTGS(配列番号26))をコードするdsDNAオリゴを、Integrated DNA Technologiesから注文した。このフラグメントを、NEB HiFi Assemblyにより線状化骨格に挿入した。

【0204】

細胞株と培養

FreeStyle 293-F細胞は、Thermo Fisher Scientificから入手した。細胞を、Eppendorf New Brunswick s41iインキュベーター中の、Erlenmeyerフラスコ中で、製造業者のガイドラインに従って培養し、維持した。細胞を、FreeStyle 293発現培地(Thermo)中で、120rpm、37℃にて、 0.5×10^6 と 3×10^6 細胞/mlの間で、8%CO₂で維持した。以前に報告されたように(Durocher et al., 2002)、ポリエチレンジアミン(PEI)を用いてトランスフェクションを行った。遺伝子的にコードされた安定な細胞株を、上記のpPB tet IRES GFP rtTA NeoRプラスミドと過活性トランスポザゼプラスミドとの同時トランスフェクションによって作製し(Shurer et al., 2017)、続いて、750 µg/mLのゲンタマイシンで2週間選択した。細胞増殖を、トリパンブルー排除を用いて血球計数器で細胞計数することによって定量した。

【0205】

共焦点顕微鏡

試料を収集し、200rcfで5分間ペレット化し、4%パラホルムアルデヒド中で10分間、室温で固定した。試料をPBSで3回洗浄した。細胞を、O-グリカンについては1:1000 CF568 PNAで、PBS中の細胞膜については1:1000 CF633 WGAで、室温で30分間標識した。試料をPBSで3回洗浄し、63x水浸対物レンズを用いてZeiss LSM800で画像化した。

【0206】

フローサイトメトリー分析

特に断らない限り、全ての試料は生細胞を用いて測定した。細胞を懸濁培養物から回収し、200rcfで5分間ペレット化し、0.5%BSA PBSに再懸濁した。試料を0.22 µmフィルターキャップを通して濾過し、BD FACS Aria Fusionで分析した。ドキシサイクリン時間経過については、1 µg/mLのドキシサイクリンで細胞を誘導した。培養物からの細胞試料を、示された時点で採取し、200rcfで5分間ペレット化し、4%パラホルムアルデヒドで、10分間室温で固定した。試料をPBSで3回すすぎ、フローサイトメトリー解析まで4℃で保存した。全てのフローサイトメトリーデータの分析は、FlowJoソフトウェアを用いて行った。

【0207】

免疫プロット及びレクチンプロット分析

細胞を 0.5×10^6 細胞/mLで接種し、一晚(16~18時間)増殖させる。次いで、バイオポリマー発現を $1 \mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリンで誘導し、細胞をドキシサイクリンとともにさらに48時間増殖させた。48時間後、それぞれの細胞株について試料を採取し、200rcfで5分間ペレット化した後、上清を分離し、RIPA溶解緩衝液(Abcam)に再懸濁し、試料を30秒間ボルテックスし、 98°C で10分間加温することによって細胞ペレットを溶解した。溶解物を液体窒素上で凍結し、 -80°C で保存した。溶解物をNupage 3~8%トリス-アセテートゲル(Invitrogen)上で分離し、PVDF膜に移した。膜を3%BSA TBSTで2時間ブロックした。一次抗体を1:1000に希釈し、レクチンを3%BSA TBSTで $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈し、膜上で 4°C にて一晚インキュベートした。二次抗体又はExtrAvidinを、3%BSA TBSTで1:2000に希釈し、室温で2時間インキュベートした。プロットをClarity ECL(BioRad)基質中で現像し、ChemiDoc(BioRad)ドキュメンテーションシステム上で画像化した。

10

【0208】

トランスフェクトされた293F細胞におけるムチン-270導入遺伝子のPCR増幅

293Fゲノム中に安定に組み込まれたムチン-270cDNAの増幅又は欠失を試験するために、抽出されたゲノムDNAを鋳型として使用して、Q5 Hot start高忠実度DNAポリメラーゼ(New England Biolabs Inc, Ipswich, MA)を用いてPCR増幅を行った。ゲノムDNAをGeneJETゲノムDNA精製キット(Thermo Scientific, Waltham, MA)で抽出した。全部で60ngのゲノムDNAをPCR増幅に使用した。プライマー：ムチン-270 FWD 5'-ATGACACCGGGCACCCAGTC-3' (配列番号85)、及びムチン-270 REV 5'-CTACATACTTCGTCGGCGCATGTAC-3' (配列番号86)。アンプリコンのサイズは2994bpである。

20

【0209】

細胞凝集分析

細胞を 0.75×10^6 細胞/mLで接種し、一晚(16~18時間)増殖させた後に $1 \mu\text{g/mL}$ のドキシサイクリンで誘導した。次いで、細胞を、 $1 \mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリンの存在下でさらに48又は72時間、高細胞密度まで増殖させた。細胞密度は、培養物の試料を採取し、大きな塊を解離するために十分に混合し、血球計数器及びトリパンプルー排除で生細胞を計数することによって定量した。画像化のため、試料を、大きな凝集塊の解離を減少させるために広口径ピペットチップで採取し、そして2Dでの画像化のために、PBS中で約 6.75×10^4 細胞/ cm^2 に希釈した。位相差画像は、10x対物レンズを有するOlympus IX81顕微鏡で取得した。画像処理にはFijiを用いた(Schindelin et al., 2012)。2つの独立した試料を収集し、技術的複製として調製し、技術的複製当たり3つの関心領域を画像化した。3つの生物学的複製を行った。従前の刊行物から適合されたカスタム分析ソフトウェアを使用して、自動画像分析を行った(Shurer et al., 2017)。簡単に述べると、分析ソフトウェアは、各円形物体の中心を位置付けた。次いで、各細胞の中心の座標を使用して、MATLABにおけるRipleyのK関数を計算した。単一細胞のパーセントは、 $19 \mu\text{m}$ 以内にいかなる隣接細胞も有さない細胞の総数を計数し、画像中の細胞の総数で割ることによって計算した。同様に、様々なクラスターサイズの細胞のパーセントを、 $19 \mu\text{m}$ 以内の隣接細胞の数に基づいて細胞をクラスターにビンングすることによって計算した。

30

【0210】

カルシウム誘導細胞凝集に対する耐性を評価するために、培養物を 0.5×10^6 細胞/mLで接種し、一晚(16~18時間)増殖させた後、 $1 \mu\text{g/mL}$ のドキシサイクリンで誘導した。48時間後、細胞を 4×10^6 細胞/mLで再懸濁した。次いで、培養培地に、 2mM CaCl_2 、又は1:300抗凝集剤(Thermo Fisher, 0010057AE)、又はその両方を補充した。培養物をガラス試験管に移すことによって、処理の24時間後に細胞懸濁液の静止画像及びビデオを取得した。懸濁液中の細胞の濃度は、最も大きな凝集体を20秒間懸濁液から沈降させた後、各培養物から試料を二重に収集することによって決定した。細胞濃度は、血球計及びトリパンプルーを用いて測定した。

40

【0211】

せん断応力実験

細胞を 0.5×10^6 細胞/mLで接種し、一晚(16~18時間)増殖させ、 $1 \mu\text{g/mL}$ ドキシサイ

50

クリンで48時間誘導した。1.02mmのシリコンチューブの6.5インチに接続された16ゲージ針を有する5mL注射器を使用して、注射器に重力をかけ、1kgの質量によって生成された一定の力で500 μ mの狭窄部(テフロンチューブ)を通して流すことによって、細胞懸濁液をせん断した。試料を狭窄部に5回通した。次に細胞を1 μ g/mLのCF640R PNAで、15分間4°Cにて染色した。細胞を0.5%BSA PBSで3回洗浄し、次いでエチジウムホモダイマー-1(死細胞染色、Thermo Fisher, L3224)で染色した。3つの生物学的複製を行い、各生物学的複製について2つの技術的複製を行った。死細胞パーセントは、BD FACS Aria Fusionで、死細胞染色を取り込んだ細胞の画分を測定することによって決定した。せん断を行わない対照試料を用いて、各細胞株についてバックグラウンド細胞死を差し引いた。ムチン-135及びムチン-270細胞株については、PNA陽性細胞のみを分析のために考慮した。データ分析は、FlowJoソフトウェアを用いて行った。

10

【0212】

トランスフェクション実験

細胞を 0.5×10^6 細胞/mLで接種し、一晚(16~18時間)増殖させ、1 μ g/mLドキシサイクリンで48時間誘導した。次いで、細胞を、1 μ g/mLドキシサイクリンを含む新鮮な培地中で 2×10^6 細胞/mLに希釈し、 10^6 細胞あたり1 μ gのDNAでトランスフェクトした。翌日(トランスフェクションの16~18時間後)、細胞を、1 μ g/mLドキシサイクリンを含む新鮮な培地で1:1に希釈した。トランスフェクション効率を測定するために、細胞をpLV puro mRuby2プラスミドでトランスフェクトし、トランスフェクション効率をフローサイトメトリーによって計算した(トランスフェクションの72時間後にRFPを発現する細胞の画分として)。組換えRFPの産生及び分泌のために、細胞に、SS-mScarlet-I pPB tet IRES GFP rtTA NeoRをトランスフェクトした。24時間後、培地上清中の分泌RFP蛍光を、Tecan M1000 Proプレートリーダーを用いて定量した。

20

【0213】

統計解析

統計的有意性は、Prism(GraphPad)を用いて、通常の一方向ANOVA又はスチューデントt検定(両側)により、適切に決定した。全てのグラフは、Rで生成されたボックスプロットを除いて、Prism(Graphpad)で作成された。

【0214】

結果

30

293-F細胞株の表面に発現された、遺伝的にコードされたバイオポリマー

この第II部は、細胞表面への固定のための膜貫通ドメインを有するMuc1様バイオポリマーをコードするcDNAの作製を実証する。バイオポリマードメインは、PDTRPAPGSTAPP AHGVTSA(配列番号8)の0~42の完全なリピートを有する無構造蛋白質骨格から成り、小胞体とゴルジ装置のO-グリコシル化機構により認識され、細胞表面に輸送されながら高度にグリコシル化された。各バイオポリマーは、天然Muc1シグナル配列によって細胞外空間を標的とした。バイオポリマーを21アミノ酸膜貫通ドメインで細胞膜に固定した(Mercanti et al., 2010; C. R. Shurer et al., 2017)。Muc1の天然自己触媒ドメイン(Levitin et al., 2005)を、操作された21アミノ酸膜貫通ドメインで置換することにより、細胞表面からの外部ドメインの脱落のリスクを軽減した。また、記載されている操作された構築物は、ムチンによる生化学的又は物理的刺激の不注意な伝達を避けるために、細胞質側末端を欠いていた。

40

【0215】

293-F細胞株の遺伝子改変は、選択及びテトラサイクリン誘導性発現に必要な要素をすべて含む「オールインワンプラスミド」で非ウイルス的に行われた(図12A)。ベクターは、バイオポリマーコーティングの発現のためのテトラサイクリン応答性プロモーター、及び逆テトラサイクリントランスアクチベーター(rtTA-M2)及びネオマイシン耐性遺伝子の構成的発現のためのさらなるカセットを含んだ(Gossen, Bender, Muller, al, & Freundlieb, 1995)。ムチンcDNAの転写の目視確認のために、バイシストロン性緑色蛍光蛋白質(GFP)レポーターも含めた。バイオポリマーのcDNAは、トランスポゾン媒介組み込み

50

により、ランダムな位置でゲノムに安定に組み込まれた(X. Li et al., 2013; Wilson, Coates, & George, 2007; Woodard & Wilson, 2015)。このアプローチは、バイオ製造において深刻な安全性の問題を提起する、任意のウイルス技術の使用を回避した(Dumont et al., 2016)。我々は、改変された細胞の表面が、ムチンバイオポリマーの密な誘導性層でコーティングされると予測した(図 1 2 B)。

【0216】

293-F細胞凝集に対するそれらの効果について、3つの異なる代表的なバイオポリマーサイズを試験した。0、21、42タンデムリピートを有するムチン様遺伝子を構築した。21及び42のリピートを有するポリマーの輪郭長さは、それぞれ135nm及び270nmであると予測された。したがって、我々は、バイオポリマーの相対的長さに基づいて、バイオポリマー ムチン-0、ムチン-135、及びムチン-270を指定した(図 1 2 C)。ムチン-0構築物は、大きなグリコシル化バイオポリマードメインを欠いているため、バイオポリマーの膜貫通アンカーの発現に関連する任意の効果に関して、対照として役立った。

【0217】

細胞表面へのバイオポリマーの発現と局在化を確認した。蛍光顕微鏡観察は、バイシストロン性GFPシグナルによりレポートされたcDNAの発現、及びムチン-135とムチン-270半合成遺伝子を発現する細胞膜上のO-グリカンの存在を示した(図 1 3 A)。バイオポリマー発現レベルの大きな分布を観察した。特定の理論に拘束されることを意図しないが、これはゲノムへのcDNAのランダムな転位に起因する(図 2 B)。広い分布にもかかわらず、細胞集団の大部分は、GFPレポーターによって示されるように、cDNAを安定に組み込んだ(図 1 3 A～C)。バイオポリマーの発現及びサイズを、ウェスタンブロットによってさらに検証した(図 1 3 D)。ムチン-135及びムチン-270の両方を、天然のMuc1タンデムリピートに対する抗体でプローブすることができた(図 1 3 D、左側)。野生型(w.t.)細胞は、検出可能なレベルの内因性Muc1発現を有さず、有意なO-結合ムチン様グリコシル化を有さなかった(図 1 3 D)。ムチン-135及びムチン-270は、発現されると、強くグリコシル化された。これは、抗-Muc1抗体(図 1 3 D、左側；それぞれ、ムチン-135及びムチン-270についての予測分子量81kDa及び120kDa)でプローブした場合に、タンパク質配列分子量を超えて検出されるタンパク質バンドによって示される。O-グリコシル化は、O-結合グリカン(Muc1上に見出されるものなど)に特異的に結合するPNAを伴うバイオポリマーの検出によってさらに実証される(図 1 3 D、右側)。

【0218】

細胞増殖速度における有意差は、我々のバイオポリマー被覆細胞株のいずれについても観察されなかった(図 1 3 E)。我々は、我々のバイオポリマーのさらなるタンパク質負荷が、親293-F細胞の急速な増殖速度に悪影響を及ぼさなかったと結論付けた。安定な細胞株のために、ドキシサイクリンの添加により遺伝子転写を開始し、ドキシサイクリンの中止により転写を停止する、十分に特性化された逆テトラサイクリン誘導性プロモーター(Gossen et al., 1995)を用いた。この細胞株は、ドキシサイクリンによる誘導に対して、予測された通りに応答し、ムチンコーティングの発現に対する一時的な制御を実証した(図 1 3 F)。

【0219】

ムチンのような高度に反復性のcDNAは、細胞ゲノムにおいて増幅及び欠失の頻度が高いことが報告されている(Gemayel, Vincens, Legendre, & Verstrepen, 2010; Oren et al., 2016)。我々のムチン-135及びムチン-270構築物のcDNAは、それらの反復性を最小限にするようにコドン最適化された。我々は、宿主細胞ゲノムに組み込まれた場合、最適化されたcDNAが安定であることを見出した。特に、安定に組み込まれたムチン-270(我々のバイオポリマーcDNAのうち、最大かつ最も反復性である)の顕著な増幅又は欠失は、細胞培養の2ヶ月後にも観察されなかった(図 1 3 G)。

【0220】

バイオポリマーコーティングは細胞凝集を減少させた

安定な集団を確立した後、我々は、バイオポリマーコーティングが、懸濁細胞培養物中

10

20

30

40

50

の細胞凝集を減少させることができるかどうかを分析した。細胞株の位相差画像は定性的に、ムチン-135及びムチン-270株よりも、w.t.及びムチン-0細胞株において、より多くの細胞凝集体を示した(図14A)。試料中の単一細胞の画分の定量は、w.t.細胞と比較して、ムチン-135及びムチン-270コーティングについて、単一細胞のパーセントが増加することを示したが、ムチン-0株はw.t.細胞と比較して相違点を示さなかった(図12B、図19A)。これに対応して、w.t.及びムチン-0被覆細胞株は、ムチン-135又はムチン-270細胞株よりも、2つ以上の細胞のクラスターを形成する可能性はるかに高かった(図14C、19B)。

【0221】

ムチン-135又はムチン-270を用いて操作した我々の293-F株の位相差画像の検査は、細胞の大部分が、検出可能なより高次の凝集体をほとんど有さず、シングル又はダブルであることを明らかにした(図14B)。より高次の凝集体が存在しないため、Mucin-135及びムチン-270試料中のダブルの細胞は、活発に分裂している細胞、又は、細胞質分裂後にまだ完全に解離していない細胞であり得ると、本発明者らは推論した。また、ダブル細胞の出現は、互いに近すぎて懸濁液からランダムに沈降して、我々の顕微鏡上に形成された画像の2D平面で解像できない単一細胞から生じている可能性がある。このように懸濁液からランダムに沈降し得る単一細胞の頻度の近似値を求めるために、無作為に配置された重心のシミュレートされたデータセットを作成し、クラスター分析を行った。平均すると、シミュレートされた重心は、66%の確率でシングル細胞としてカウントされる。比較すると、ムチン-270細胞の57%がシングル細胞であった(図14B)。

【0222】

細胞クラスターの程度を定量化するために、RipleyのK関数(任意の所与の粒子の所与の距離内で、隣接粒子が見出される頻度をカウントする空間分布統計量)を使用して、画像中の細胞の空間分布を分析した。この統計的ツールを用いて、我々は、ムチン-135及びムチン-270バイオポリマーが、w.t.及びムチン-0細胞株と比較して、減少したクラスター化を示すことを観察した(図14D、19C)。

【0223】

ムチン-270コーティングは、市販の抗凝集剤より優れていた

我々は、ムチン-270バイオポリマーコーティングが、極端な凝集促進条件においてさえ細胞凝集を減少させることができることを見出した。懸濁液適応細胞株は、カドヘリンの結合を促進することが知られている高カルシウム濃度などの特定の培地条件下で、有意に凝集することが以前に報告されている(Dee et al., 1997; Han et al., 2006b; Kim, Tai, Mok, Mosser, & Schuman, 2011; Meissner et al., 2001; Peshwa et al., 1993; Sjaastad & Nelson, 1997; Tolbert et al., 1980; Yamamoto et al., 2000; Zanghi et al., 2000)。高カルシウム条件下(2mM CaCl_2)で培養した場合、ムチン-270バイオポリマー被覆細胞は、w.t.細胞よりも定性的に凝集が少なかった(図15A)。特に、ムチン-270バイオポリマーコーティングを有する培養物は、凝集促進条件においてそれらの濁度を保持したが、未改変細胞は、裸眼で容易に見える大きなクラスターに集合した(図15A)。ムチン-270被覆細胞は、カルシウム処理時に、懸濁液中の細胞濃度のわずかな減少のみを示すが、w.t.細胞は懸濁液中に残存する細胞を本質的に有さない(図15B)。

【0224】

さらに、ムチン-270コーティングは、高度に凝集する条件において、市販の凝集防止剤よりも優れている。高カルシウム条件下では、抗凝集剤は、細胞凝集を軽減する識別可能な効力を有さなかった(図15A)。ムチン-270被覆細胞への市販の抗凝集剤の添加は、我々のアッセイにおいて、凝集に対するそれらの抵抗性をさらに増強しなかった(図15B)。合わせて、これらの結果は、ここに提示されている遺伝的にコードされたバイオポリマーコーティングが、懸濁液中の細胞凝集を減少させる能力を実証した。

【0225】

バイオポリマーコーティングは、せん断応力に対する抵抗性を提供した

せん断応力に対する懸濁液適応哺乳動物細胞の感受性は、典型的なバイオリアクターに

における混合及び物質移動の速度に制限を課す(Hu, Berdugo, & Chalmers, 2011)。高細胞密度で操作される大容量バイオリアクターは、物質移動の制限を克服するために、混合の増大を必要とする(Hu et al., 2011)。従って、せん断に対する細胞の感受性は、バイオリアクターの生産性に別の限界を課す。せん断応力に対する管上皮細胞の保護は、ムチンの生理学的機能であるので、我々は、さらなる利益として、我々のバイオポリマーコーティングがせん断応力から細胞を保護するかどうかを考慮した。これを試験するために、懸濁細胞を、狭い狭窄部を通過させることによってせん断し、次いで、培養液への再導入後の生存率を分析した(図 16 A)。長さ7.6cm・直径500 μ mのテフロンチューブを通して、懸濁細胞の流れを駆動する一定かつ制御された圧力を発生させるために、1kgの質量を垂直に配向されたシリンジにかけた。細胞死を、生/死細胞染色を用いてフローサイトメトリーにより分析した。我々は、ムチン-135及びムチン-270バイオポリマー被覆細胞株が、w.t.細胞株及びムチン-0細胞株の両方と比較して、せん断後に有意に大きな生存率を有することを見出し(図 16 B)、これは、ムチンコーティングがバイオリアクターにおいてより高い混合速度を可能にし得ることを示唆した。

【0226】

バイオポリマー被覆細胞株は、一過性にトランスフェクトされることができ、比較可能なレベルの組換えタンパク質を産生した

組換えタンパク質産生のための細胞の一過性形質移入の使用は、近年、新規医薬品を産生するための安定な細胞株の選択及び単離に関連する長い開発時間を回避するために関心を集めている(Derouazi et al., 2004; Durocher et al., 2002; Swiech et al., 2011)。細胞表面上のムコ多糖コーティングのポテンシャル障壁効果を考慮して、ここで提示しているバイオポリマーの発現が、細胞株のトランスフェクション効率に影響を及ぼすかどうかを試験した。試験するために、細胞質赤色蛍光蛋白質の発現のためのプラスミドを、細胞株に一過性にトランスフェクトした。我々は、w.t.細胞と比較して、ムチン-0、ムチン-135、又はムチン-270細胞株のトランスフェクション効率における統計的有意差を観察しなかった(図 17 A)。単一細胞分析は、遺伝子操作した細胞集団及び親細胞集団について、組換え蛋白質産生の分布が同様であることを明らかにした(図 17 B)。さらに、トランスフェクトされた細胞のRFPシグナルに有意差はなく、これは、異なる細胞株における一過性トランスフェクトによるタンパク質の発現が同等であることを示している(図 17 C)。また、分泌組換え蛋白質の産生に対する遺伝子操作細胞の性能を試験した。非限定的な例として、シグナルペプチドを蛍光タンパク質(mScarlet-I)に融合させ、そして一過性にトランスフェクトされた培養物からの培地上清中の分泌タンパク質の産生を測定した。ムチン-270被覆細胞は、w.t.細胞と同量の分泌組換えタンパク質を産生した(図 18)。したがって、記載されたバイオポリマーコーティングは、293-F細胞系のトランスフェクション効率及び高いタンパク質産生速度に悪影響を及ぼさなかった。

【0227】

第II部の考察

この第II部は、他の特徴の中でもとりわけ、確立された細胞株が、抗接着のための改変ムチンバイオポリマーを発現するように遺伝的に改変できることを実証する。これらのバイオポリマーの発現は、それらの速い増殖速度(図 12 E)及び高いトランスフェクション効率(図 15 A, B)を含む、293-F細胞の望ましい特徴に負の影響を与えない。さらに、バイオポリマーの発現は、望ましくない細胞凝集を有意に減少させ(図 14、図 15、図 19)、剪断力に対する細胞の抵抗性を増大させる(図 6)。ムチン-135コーティング及びより厚いムチン-270コーティングは、ヘッド・ツー・ヘッド試験において同様に実施され、本明細書に記載される用途に同等によく適していると予想される。

【0228】

記載されたバイオポリマーコーティングは、バイオリアクター製法での生産のために典型的に使用される無血清培地製剤中で、細胞凝集を有意に減少させる。特に、コーティングは、細胞凝集を最小限にするように設計された培地製剤(例えば、Invitrogen Freestyle 293-F培地)においてさえ、凝集をさらに減少させ得る。本開示は、細胞凝集の問題のた

めに歴史的に回避されてきた培地製剤における、細胞凝集上のバイオポリマー発現を含む。例えば、非常に効率的な一過性形質移入は、DNA-リン酸カルシウム沈殿を用いて長い間行われてきた(Jordan & Wurm, 2004)。しかしながら、必要とされる高いカルシウム濃度では、293-F細胞は大きな細胞凝集塊を形成することが知られている(Meissner et al., 2001; Peshwa et al., 1993)。この第II部の結果(図15)に基づく、ムチン-135又はムチン-270コーティングの使用は、一過性にトランスフェクトされた培養物からの改善されたタンパク質産生のためのこのような条件において、細胞凝集を有意に減少させる。

【0229】

本開示は、操作されたムチン及びそれらの調節された発現のさらなる最適化によって達成できる、記載されたムチンコーティングのさらなる改善を含む。特に、高度にグリコシル化されたムチン様蛋白質の過剰生産は、細胞のグリコシル化機構及びグリカンのヌクレオチド糖構成単位に関して、組換え糖タンパク質と競合する可能性がある。操作されたムチンの細胞表面からの脱落は、タンパク質分解性切断部位を欠く膜アンカーの記載された選択によって緩和される。

【0230】

本明細書中に記載されるムチンのアプローチは、バイオリアクター中で凝集する傾向がある懸濁液-適合懸濁系のための溶液として使用できる。しかし、細胞を保護し、凝集に強く抵抗するこれらの組成物の能力はまた、CHO細胞のような現在のバイオ製造プラットフォーム(非理想的なリアクター条件下で、又は非最適な培地製剤中でなお凝集し得る)の利益になると認識される。バイオ製造は、非ヒト糖結合体及び他の抗原性エピトープのリスクを軽減する次世代生産プラットフォームのために、CHO系の先に目を向けるため、懸濁液中での増殖への適応は、ヒト、霊長類、及び多くの他の哺乳動物細胞系にとって、依然として重要で時間のかかる挑戦である(Amaral et al., 2016; Rodrigues et al., 2013)。ここで提供される組成物は、細胞生存率を促進し、凝集を最小限にすることによって、懸濁液適応に対する重大な障壁のいくつかを克服するのに役立つことが期待できる。

【0231】

まとめると、この第II部は、懸濁液中での細胞の改善された単一増殖のためのムチンコーティング技術を提示する。このシステムは、細胞凝集を軽減することに大いに成功した。

【0232】

References

- Amaral, R. L. F. do, Bomfim, A. de S., Abreu-Neto, M. S. de, Picanço-Castro, V., Russo, E. M. de S., Covas, D. T., & Swiech, K. (2016). Approaches for recombinant human factor IX production in serum-free suspension cultures. *Biotechnology Letters*, 38(3), 385–394.//doi.org/10.1007/s10529-015-1991-1
- Carter, P. J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, 317(9), 1261–1269.//doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.013
- Casademunt, E., Martinelle, K., Jernberg, M., Winge, S., Tiemeyer, M., Biesert, L., ... Schröder, C. (2012). The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *European Journal of Haematology*, 89(2), 165–176.//doi.org/10.1111/j.1600-0609.2012.01804.x
- Dee, K. U., Shuler, M. L., & Wood, H. A. (1997). Inducing single-cell suspension of BTI-TN5B1-4 insect cells: I. The use of sulfated polyanions to prevent cell aggregation and enhance recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(3), 191–205.//doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<191::AID-BIT1>3.0.CO;2-A

【 0 2 3 3 】

10

20

30

40

50

- Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M., & Wurm, F. M. (2004). Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 537–545.//doi.org/10.1002/bit.20161
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122.//doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*, 30(2), e9. 10
- Gemayel, R., Vincens, M. D., Legendre, M., & Verstrepen, K. J. (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual Review of Genetics*, 44, 445–477.//doi.org/10.1146/annurev-genet-072610-155046
- Gendler, S. J., & Spicer, A. P. (1995). Epithelial Mucin Genes. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 607–634.//doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003135
- Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., & Varki, A. (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 28, 147–175. 20
- Gossen, M., Bender, G., Muller, G., al, et, & Freundlieb, S. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268(5218), 1766.
- Han, Y., Liu, X.-M., Liu, H., Li, S.-C., Wu, B.-C., Ye, L.-L., ... Chen, Z.-L. (2006a). Cultivation of Recombinant Chinese hamster ovary cells grown as suspended aggregates in stirred vessels. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(5), 430–435.//doi.org/10.1263/jbb.102.430
- Han, Y., Liu, X.-M., Liu, H., Li, S.-C., Wu, B.-C., Ye, L.-L., ... Chen, Z.-L. (2006b). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(5), 430–435.//doi.org/10.1263/jbb.102.430 30
- Hu, W., Berdugo, C., & Chalmers, J. J. (2011). The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: current understanding. *Cytotechnology*, 63(5), 445–460.//doi.org/10.1007/s10616-011-9368-3
- Jay, G. D., & Waller, K. A. (2014). The biology of Lubricin: Near frictionless joint motion. *Matrix Biology*, 39, 17–24.//doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.008
- Jordan, M., & Wurm, F. (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods*, 33(2), 136–143.//doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.011 40

【 0 2 3 4 】

- Kim, S. A., Tai, C.-Y., Mok, L.-P., Mosser, E. A., & Schuman, E. M. (2011). Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell–cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(24), 9857–9862.//doi.org/10.1073/pnas.1019003108
- Klinken, B. J. V., Dekker, J., Buller, H. A., & Einerhand, A. W. (1995). Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269(5), G613–G627.
- Kuo, J. C.-H., Gandhi, J. G., Zia, R. N., & Paszek, M. J. (2018). Physical biology of the cancer cell glycocalyx. *Nature Physics*, 14(7), 658–669.//doi.org/10.1038/s41567-018-0186-9 10
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21–39.//doi.org/10.1038/nrd2399
- Levitin, F., Stern, O., Weiss, M., Gil-Henn, C., Ziv, R., Prokocimer, Z., ... Wreschner, D. H. (2005). The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33374–33386.//doi.org/10.1074/jbc.M506047200 20
- Li, L., Qin, J., Feng, Q., Tang, H., Liu, R., Xu, L., & Chen, Z. (2011). Heparin Promotes Suspension Adaptation Process of CHO–TS28 Cells by Eliminating Cell Aggregation. *Molecular Biotechnology*, 47(1), 9–17.//doi.org/10.1007/s12033-010-9306-1
- Li, X., Burnight, E. R., Cooney, A. L., Malani, N., Brady, T., Sander, J. D., ... Craig, N. L. (2013). piggyBac transposase tools for genome engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), E2279–E2287.//doi.org/10.1073/pnas.1305987110
- Liu, M., & Goudar, C. T. (2013). Gene expression profiling for mechanistic understanding of cellular aggregation in mammalian cell perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 483–490.//doi.org/10.1002/bit.24730 30
- Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K., & Wurm, F. M. (2001). Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(2), 197–203.
- Mercanti, V., Marchetti, A., Lelong, E., Perez, F., Orci, L., & Cosson, P. (2010). Transmembrane domains control exclusion of membrane proteins from clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, 123(19), 3329–3335.//doi.org/10.1242/jcs.073031 40

【 0 2 3 5 】

- Oren, M., Barela Hudgell, M. A., D'Allura, B., Agronin, J., Gross, A., Podini, D., & Smith, L. C. (2016). Short tandem repeats, segmental duplications, gene deletion, and genomic instability in a rapidly diversified immune gene family. *BMC Genomics*, 17.//doi.org/10.1186/s12864-016-3241-x
- Park, J. H., Lim, M. S., Woo, J. R., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2016). The molecular weight and concentration of dextran sulfate affect cell growth and antibody production in CHO cell cultures. *Biotechnology Progress*, 32(5), 1113–1122.//doi.org/10.1002/btpr.2287 10
- Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J. K., Godula, K., ... Weaver, V. M. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature*, 511(7509), 319–325.//doi.org/10.1038/nature13535
- Peshwa, M. V., Kyung, Y.-S., McClure, D. B., & Hu, W.-S. (1993). Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: Effect of calcium concentration of spatial distribution of viability. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(2), 179–187.//doi.org/10.1002/bit.260410203
- Rodrigues, M. E., Costa, A. R., Henriques, M., Cunnah, P., Melton, D. W., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2013). Advances and Drawbacks of the Adaptation to Serum-Free Culture of CHO-K1 Cells for Monoclonal Antibody Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1279–1291.//doi.org/10.1007/s12010-012-0068-z 20
- Sandberg, H., Kannicht, C., Stenlund, P., Dadaian, M., Oswaldsson, U., Cordula, C., & Walter, O. (2012). Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII. *Thrombosis Research*, 130(5), 808–817.//doi.org/10.1016/j.thromres.2012.08.311
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.//doi.org/10.1038/nmeth.2019 30
- Shukla, A. A., & Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 253–261.//doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.02.001
- Shurer, C. R., Colville, M. J., Gupta, V. K., Head, S. E., Kai, F., Lakins, J. N., & Paszek, M. J. (2017). Genetically Encoded Toolbox for Glycocalyx Engineering: Tunable Control of Cell Adhesion, Survival, and Cancer Cell Behaviors. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.//doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00037 40

【 0 2 3 6 】

- Sjaastad, M. D., & Nelson, W. J. (1997). Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 19(1), 47–55.//doi.org/10.1002/bies.950190109
- Swiech, K., Kamen, A., Ansorge, S., Durocher, Y., Picanço-Castro, V., Russo-Carbolante, E. M., ... Covas, D. T. (2011). Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. *BMC Biotechnology*, 11, 114.//doi.org/10.1186/1472-6750-11-114 10
- Tang, N. C., & Chilkoti, A. (2016). Combinatorial codon scrambling enables scalable gene synthesis and amplification of repetitive proteins. *Nature Materials*, 15(4), 419–424.//doi.org/10.1038/nmat4521
- Thornton, D. J., Rousseau, K., & McGuckin, M. A. (2008). Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 459–486.//doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702
- Tolbert, W. R., Hitt, M. M., & Feder, J. (1980). Cell aggregate suspension culture for large-scale production of biomolecules. *In Vitro*, 16(6), 486–490.//doi.org/10.1007/BF02626461 20
- Tsao, Y. S., Condon, R., Schaefer, E., Lio, P., & Liu, Z. (2001). Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells. *Cytotechnology*, 37(3), 189–198.//doi.org/10.1023/A:1020555310558
- Vink, T., Oudshoorn-Dickmann, M., Roza, M., Reitsma, J.-J., & de Jong, R. N. (2014). A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods*, 65(1), 5–10.//doi.org/10.1016/j.jymeth.2013.07.018
- Wesseling, J., Valk, S. W. van der, & Hilken, J. (1996). A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Molecular Biology of the Cell*, 7(4), 565–577.//doi.org/10.1091/mbc.7.4.565 30
- Wesseling, J., van der Valk, S. W., Vos, H. L., Sonnenberg, A., & Hilken, J. (1995). Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *The Journal of Cell Biology*, 129(1), 255–265.
- Wilson, M. H., Coates, C. J., & George, A. L. (2007). PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(1), 139–145.//doi.org/10.1038/sj.mt.6300028 40

【 0 2 3 7 】

- Woodard, L. E., & Wilson, M. H. (2015). piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 525–533.//doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.009
- Wurm, F., & Bernard, A. (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 156–159.//doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80027-5
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398.//doi.org/10.1038/nbt1026
- Yamamoto, S., Matsuda, H., Takahashi, T., Xing, X.-H., Tanji, Y., & Unno, H. (2000). Aggregate formation of rCHO cells and its maintenance in repeated batch culture in the absence of cell adhesion materials. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 534–538.//doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80052-3
- Zanghi, J. A., Renner, W. A., Bailey, J. E., & Fussenegger, M. (2000). The Growth Factor Inhibitor Suramin Reduces Apoptosis and Cell Aggregation in Protein-Free CHO Cell Batch Cultures. *Biotechnology Progress*, 16(3), 319–325.//doi.org/10.1021/bp0000353
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1158–1170.//doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022

【 0 2 3 8 】

第III部

この第III部は、ヒト細胞におけるコドンスランブルラブリシン及びムチンの安定な組換え産生、ならびにヒト、ウマ及びイヌ配列に由来する改変ラブリシンの特徴付けに対する代表的かつ非限定的なアプローチを提供する。この第III部は、最小のヌクレオチド反復で所望のポリペプチドをコードするためのコドンの重複性の利用を実証する。コドンスランブル戦略は、商業的に興味深い2つの代表的なムチン(ラブリシン及びMuc1)のための同義遺伝子、すなわち「synDNA」を生成するために適用された。懸濁液適応ヒト293-F細胞における安定な長期組換え産生は、本明細書において時に「SynLubricin」と呼ばれる同義ラブリシンcDNAに関して実証された。最適条件下で、293-F亜集団は、200mg/L培地を超える組換えSynLubricinを産生し、連続培養した2ヶ月にわたって安定であった。機能性試験は、組換えラブリシンが細胞接着を効果的に阻害し、軟骨外植片を滑らかにすることができることを確認した。同時に、この第III部は特に、哺乳動物宿主産生系におけるcDNA設計及び安定なムチン産生のための実行可能なワークフローを提供する。

【 0 2 3 9 】

第III部 イントロダクション

前述の記載から認識されるように、ムチンは、膜結合糖タンパク質又は分泌糖タンパク質であり、可変数のタンデムリピート(O-グリコシル化のためのそれらの密にクラスター化された部位を特徴とする)を含んでいる(Hang & Bertozzi, 2005)。この広範なグリコシル化は、ムチンに顕著な物理的特性を付与するボトルブラシ分子構造を生じる(Kuo, Gandhi, Zia, & Paszek, 2018)。生物学的界面におけるムチンは、水分子と協調して、繊細な細胞構造又は組織構造を保護し、生物付着を阻止し、そして病的な細胞沈着に抵抗する水和層を形成し得る(Hattrup & Gendler, 2008)。例えば、Muc1及びMuc16のような膜貫通ムチンは眼球の表面上に密に移植され、ここで、それらは、水和を維持し、摩擦に抵抗し、そして高分子に対する選択的バリアを提供する(Gipson, Spurr-Michaud, Tisdal

e, & Menon, 2014; Mauris & Argueso, 2012)。同様に、プロテオグリカン4(PRG4)、又はラブリシンと呼ばれる分泌型ムチン様糖タンパク質は、細胞及び組織界面(関節軟骨及び眼表面を含む)に結合でき、低い摩擦潤滑、及び病的細胞沈着や生物付着からの保護を可能にする(Rhee et al., 2005; Schmidt, Sullivan, Knop, & et al., 2013)。

【0240】

ムチン発現及びグリコシル化の変化は、癌及び炎症性腸疾患から眼疾患に至るまで、様々な病理学的状態で観察される(Dhanisha, Guruvayoorappan, Drishya, & Abeesh, 2018)。機能的ラブリシン合成を妨げる遺伝子変異を有する患者は、パンヌス形成及び関節潤滑障害の結果として、早期発症多発性関節症を含む、CACP(Camptodactyly-Arthropathy-Coxa Vara-Pericarditis)症候群の症状を示す(Bahabri et al., 1998; Marcelino et al., 1999)。滑液ラブリシン濃度の低下は、前十字靱帯損傷、変形性関節症、関節リウマチ患者でも認められている(Elsaid et al., 2008; Kosinska et al., 2015)。そのため、変形性関節症及びリウマチ性疾患のための注射用治療剤としての(Le Graverand-Gastineau, 2010)、ならびに慢性ドライアイ及び外因性潤滑剤の適用を必要とする他の状態のための局所治療剤(Schmidt et al., 2013)としての、組換えラブリシン及び他のムチンの開発に大きな関心が寄せられていた。

【0241】

この商業的関心にもかかわらず、Muc1、ラブリシン、及び多数のタンデムリピートを含む他のムチンの組換え産生は困難であることが証明されている。切断型Muc1(天然のタンデムリピートの約1/3を有する)のために、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の非常に生産的なクローンが単離されているが、完全長組換えMuc1のためのクローンを単離する同様の試みは失敗している(Backstrom et al., 2003)。同様に、完全な76~78の天然タンデムリピートを有する組換えラブリシンのための安定なクローンは、この糖タンパク質を低レベルで産生したが(Jones et al., 2007)、タンデムリピートの1/3のみを含む改変組換えラブリシンタンパク質構築物(LUB:1)は、大規模産生により適していた(Flannery et al., 2009)。より最近になって、懸濁液適応CHO細胞において発現される全長組換えヒトラブリシンの産生が報告され、ドライアイ疾患を治療するための、又はコンタクトレンズを水和するための眼の潤滑剤としての可能性が実証されている(Samsom et al., 2014)。完全長ラブリシンについて組換え生産がどのように達成されたかの正確な詳細は独占されたままであり、本出願又は特許の出願時に、大規模ラブリシン生産のための公開された戦略は、利用可能な状態ではないと考えられる。

【0242】

高レベルでムチンを産生する困難さの根底にある正確な生物学は、依然として不明である。しかし、ムチンタンデムリピート配列のcDNAに共通するような長い反復DNA配列は、細胞ゲノム中では比較的不安定である(Pearson, Edamura, & Cleary, 2005)。ほとんどすべてのDNAプロセッシング段階の忠実度は、反復配列に関連する翻訳スリップやその他のエラーによって損なわれる可能性がある(Lopez Castel, Cleary, & Pearson, 2010)。その結果、反復配列は、非反復領域の点突然変異よりも最大10万倍も高頻度で、その単位ヌクレオチド配列の付加や欠失によって突然変異を起こし得る(Oren et al., 2016)。ヒト及び哺乳類におけるMuc1及び他のムチンのタンデムリピート数の変動は、これらのゲノムcDNAが、突然変異のホットスポットであるという進化論的議論を提供する(Gemayel, Vincens, Legendre, & Verstrepen, 2010)。細菌における外因性Muc1 cDNAの組換え及び切断も報告されており、宿主微生物細胞におけるこれらの反復配列に対する高いレベルの不安定性も示唆されている(Backstrom et al., 2003)。

【0243】

カスタム遺伝子合成(CGS)の進歩により、長cDNAの迅速かつ費用効果の高い合成が可能になった現在(Kosuri & Church, 2014)、ムチンの改善されたゲノム安定性を提供するための新しいアプローチが、本明細書中で提供され、且つ特定の実施形態において、コドンの重複性を利用して、反復性は少ないないが、同じ所望のポリペプチドをコードする同義遺伝子配列を同定及び使用する。このようなコドン最適化アルゴリズムが開発され、エ

ラスチン様タンパク質及びいくつかの他の反復タンパク質ドメインにうまく適用されている(Tang & Chilkoti, 2016)。しかし、本開示以前には、最適化された合成cDNAは、商業的に興味深い大きなムチンの生体製造のために設計され、合成され、試験されていなかったと考えられる。

【0244】

また、本開示以前には、ムチンを含むほとんどの生物学的製剤は、それらの急速な増殖、懸濁培養への適応性、及びグリコシル化及び他の重要な翻訳後修飾の能力のために、CHO細胞中で産生されてきた。しかし、CHO細胞は、ヒトにおいて有害な免疫学的反応を誘発すると現在疑われているグリカンエピトープを生成し得る(Butler & Spearman, 2014)。すなわち、CHO及び他の非霊長類細胞の $\alpha 1,3$ -ガラクトシルトランスフェラーゼは、 $\alpha 1,3$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を失ったヒト、類人猿、その他の旧世界ザルに免疫原性を示す可能性のあるGal $\alpha 1,3$ -Gal残基をもつグリカンを生産する(Bosques et al., 2010; Brooks, 2004)。CHO細胞は、Neu5Gc(末端シアル酸であり、ほとんどの哺乳類細胞で一般的であるが、ヒトや霊長類では失われている)(Ghaderi, Zhang, Hurtado-Ziola, & Varki, 2012)も産生し得る。これらのグリカンは、組換えムチン(質量で75%以上の炭水化物からなることがあり、しばしば高度にシアリル化されている)にとって、特に重要である(Estrella, Whitelock, Packer, & Karlsson, 2010)。ヒト細胞における糖タンパク質の組換え産生は、Gal $\alpha 1,3$ -Gal及びNeu5Gc残基のリスクを回避し得るが、本開示の以前に、ヒト細胞宿主産生系における大規模ムチン産生の成功した試みは報告されていないと考えられる。

【0245】

従って、本開示は、他の局面に加えて、コドンスクランブリングによるcDNA最適化が、ムチン及びムチン様糖タンパク質の安定な組換え産生を達成するための有効な戦略であり、そしてこの戦略が、懸濁液適合ヒト293-F細胞において実行可能であることを実証する。特に、米国食品医薬品局(FDA)は最近、293-F細胞で生産されたいくつかの生物学的製剤を承認し、特殊な治療薬を製造するためのCHO及び他の非ヒトシステムの実行可能な代替として細胞プラットフォームを確立した(Dumont, Euwart, Mei, Estes, & Kshirsagar, 2016)。本開示において、コドンスクランブルによるアプローチは、Muc1及びラブリシンについて実証され、機能的な全長組換えラブリシンの安定な生産を達成するために、生産戦略がさらに開発される。当業者は、本開示の利益により、ここに記載されているアプローチが、他のムチン及びムチン様タンパク質の安定かつロバストな発現のために使用できることを認識するであろう。

【0246】

第II部 結果

同義ラブリシンのcDNAの設計・合成

組換えムチン産生のためのアプローチとして、最小コドン反復内で合成ムチンcDNAを設計するために、コドンスクランブル化及び最適化戦略を適用した(図20A)。グローバルコドン最適化アルゴリズムを適用して、所望のムチンタンデムリピートをコードする最小反復遺伝子配列を見出した(Tang & Chilkoti, 2016)。293-Fのようなヒト宿主系における生産のための配列を調整するために、続いて最適化を行い、ヒトにおける10%未満の使用頻度で任意のコドンを置換した(図20A)。我々は、最適化されたムチンcDNAが、CGSのための迅速かつ低コストのサービスを通して合成できると想定した(Kosuri & Church, 2014; Tang & Chilkoti, 2016)。

【0247】

まず、約59のタンデムリピートを有するヒトラブリシンについて、このアプローチを試験した(KXPXPTTX(配列番号87)のコンセンサス配列を有し、KEPAPTTP(配列番号1)が最も頻繁な反復配列である)。我々の合成ラブリシンのために、KEPAPTTP(配列番号1)コンセンサス配列の59個の完全反復のために、コドンをもっと最適化した(図20B)。完全反復配列のタンパク質配列は、天然のヒトPRG4反復配列(図20C)と約88%の類似性を有していた。合成タンデムリピートは、ヒトPRG4の天然N末端及びC末端をコードするさら

なる配列に隣接した。これらの配列には、ラブリシンの天然ソマトメジン及びヘモペキシンのドメインが含まれていた。我々はまた、タンパク質の分泌及び精製を補助するために、IgKリーダー配列、6xヒスチジンタグ、及びN末端SumoStarタグを含めた(図20B)。我々は、コドンをも最適化したcDNAによってコードされる新しい半合成遺伝子を、「同義ラブリシン」又は「SynLubricin」と命名した。

【0248】

SynLubricinをコードするヌクレオチドは、天然のPRG4よりも有意に反復性が低かった。タンデムリピートを検出する整列アルゴリズムを用いてヌクレオチド配列を解析し、反復の頻度、及び、同定したコンセンサスが、問い合わせ配列のヌクレオチドとどの程度密接に一致するかに基づいて、反復の程度をスコア化した(Benson, 1999)。検出された反復を、Smith-Watermanスタイルの局所的アラインメントによって、問い合わせ配列と整列させ、そして全体的な反復性を、各ヌクレオチドが一致した場合は+2を、ミスマッチ又はインデルの場合は-7を割り当てることによってスコア付けした(Benson, 1999)。従って、より高いスコアは、より多くのヌクレオチド反復を示した。SynLubricinのタンデムリピートは、168という中程度のスコアを有したが、天然のPRG4反復配列は、1001というはるかに高い反復スコアを有した。本開示はそのような配列を包含し、ここで、ポリヌクレオチドの全体的な反復スコアは、適切な対照と比較される。

【0249】

我々はまた、SynLubricinタンデムリピートのアミノ酸を、ヒトPRG4アイソフォームAの59タンデムリピートに整列させた(図20D)。我々はSynLubricinの完全反復配列及びヒトPRG4-Aの天然反復配列が、アラニン、グルタミン酸、リジン、及びトレオニンの同様の組成を有するが、プロリン含量は、SynLubricin反復配列においてわずかに高いことに注目した(37% vs 30.5%; 第III部の表S1)。我々はまた、天然反復配列が、少量のアスパラギン(0.2%)、アスパラギン酸(0.4%)、グリシン(0.8%)、イソロイシン(0.2%)、ロイシン(1.4%)及びセリン(2.6%)(SynLubricinには含まれていない)を含有することにも注目した(第III部の補足表1)。従って、異なるコード配列に加えて、SynLubricinのアミノ酸配列は、ヒトPRG4のアミノ酸配列とは異なる。

【0250】

SynLubricin遺伝子におけるヌクレオチドの低反復は、利用可能な技術を用いて所望のcDNAの合成を可能にした。また、市販のベンダーを介して天然のヒトラブリシン/PRG4配列のcDNAを得た。しかしながら、その後、天然PRG4 cDNA配列を哺乳動物発現ベクターにクローニングし、この産物を哺乳動物細胞で組換え発現させる我々の試みは失敗した。その結果、我々は、完全長の天然cDNAを用いたラブリシンの組換え産生におけるさらなる努力を中止した。

【0251】

一過性にトランスフェクトした哺乳類細胞でSynLubricinを生産する努力は成功した。SynLubricin cDNAをバイシストロン性copGFPレポーターに融合させ、接着性ヒト胚性腎293-T細胞に一過性にトランスフェクトした。SynLubricin遺伝子のタンパク質産物は、所望に応じて高度にグリコシル化され、我々が予測した抗接着特性を示した。トランスフェクトされた細胞は、単層中の細胞間の大きなギャップを維持した(特に、可視copGFP蛍光が、バイシストロン性mRNA(26A)の高い発現レベルを報告した位置で)(図26A)。我々は、これらの観察が、天然のラブリシンの公知の抗接着機能性と一致したことに注目した(Rhee et al., 2005)。対照的に、偽トランスフェクト細胞は、培養物中で高度にコンフルエントな単層に成長した(図26A)。SynLubricinでトランスフェクトした培養物からの培地上清のウェスタンブロットは、約460kDaの高分子量タンパク質を明らかにし、これは、我々がウマ滑液中で検出した天然のラブリシンとサイズが類似していた(図26B)。SynLubricinのペプチド骨格の予想分子量は145kDaであり、SynLubricinが大幅にグリコシル化されたことを示した。

【0252】

次に、293-F懸濁培養における合成ムチンの安定な産生のための戦略を開発した。一実

施形態において、我々は、ムチンの「オールインワン」誘導性発現のために非ウイルス性トランスポゾンベクターを作製した。ベクターは、所望の遺伝子の誘導性発現のためのテトラサイクリン応答性プロモーター、及びバイシストロン性GFPレポーターを含んでいた。ベクターはまた、rtTA-M2テトラサイクリントランスアクチベーターの発現のためのEF1 α プロモーター及び選択のためのバイシストロン性ネオマイシン耐性遺伝子のコントロール下にある第二のカセットを含んでいた(図20E)。発現系の性能を試験するために、mCherry2をベクターにクローニングし、標準的なプロトコルに従って陽イオン性ポリエチレンジイミン(PEI)凝縮物で293-F細胞をトランスフェクトした(Boussif et al., 1995; de los Milagros Bassani Molinas, Beer, Hesse, Wirth, & Wagner, 2014; Sonawane, Szoka Jr., & Verkman, 2003)。選択の2週間後に、安定な細胞集団を単離し、mCherry2産生をフローサイトメトリーにより検証した。フローサイトメトリー分析に基づいて、安定な細胞が高レベルのmCherry2を産生すること、及びcopGFPレポーターの蛍光読み出しが、一般に、組換えタンパク質産生の良好な指標であることを見出した(図27)。

【0253】

同義Muc1のcDNAの設計と合成

ムチン型cDNAについて記載された戦略が、一般化可能であり、他のムチンに適用できるかどうかを試験した。我々は、角膜及び他の上皮表面の水和及び保護において重要であるムチンMuc1を選択した(Mantelli & Argueso, 2008)。我々は、Muc1の天然のタンデムリピートが多型性であり、42個の完全反復がヒトにおいて最も頻繁であることに注目した(Nath & Mukherjee, 2014)。我々は、コドン最適化戦略を適用して、42個の完全Muc1反復(PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA(配列番号8))のためのcDNAを設計した。最適化された配列を、ヒトMuc1の天然N末端のコドンに融合させた。SynLubricinと同様に、IgKリーダー配列、6xヒスチジンタグ、及びSumoStarタグも添加した(図28A)。天然のヒトMuc1タンデムリピートのヌクレオチドコード配列について、4997の非常に高い反復スコアが算出された。繰り返しスコアは、我々がSynMuc1と呼ぶ我々の合成cDNAにおいて220に減少した(図28B)。

【0254】

SynMuc1のための最適化されたコード配列は、標準的なCGSサービスを通して合成されたが、天然のMuc1 cDNAの極めて反復的な配列を合成するための努力は、商業的なベンダーによって実施することができなかった。カスタム合成したSynMuc1 cDNAを293-F細胞にトランスフェクトした。組換えタンパク質を、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)を介して培地上清から精製し、天然ヒトタンデムリピートに対する抗体を用いたウェスタンブロットによって検出した(図28C)。組換えムチンは、コア-1、ムチン型二糖類に特異的なレクチンであるピーナッツ凝集素(PNA)でプローブした場合の強いシグナルによって示されるように、広くO-グリコシル化された(図28D)。

【0255】

精製の間、我々は、著しいパーセンテージのムチンが、IMAC樹脂に結合できず、フロースルー中で検出されたことに気付いた(図28C、D)。ウェスタンブロットは、フロースルー画分及び溶出画分中の組換えタンパク質上の6x-ヒスチジンSumoStar精製タグの存在を確認し、このことは、N末端及び精製タグは存在したものの、固定化IMAC陽イオンには接近不可能であったことを示唆する(例えば、タグがムチンバイオポリマーのランダムコイル中に埋め込まれた場合のように)(図28E)。目的は、組換えSynMuc1の産生を実証することであり、その精製の最適化ではなかったので、代替的なクロマトグラフィーアプローチは探求しなかった。

【0256】

組換えSynLubricinの安定な宿主産生

トランスポゾン系を用いて、SynLubricin産生への適用を試験した(図21A)。意外にも我々は、G418での選択後、ドキシサイクリン誘導後に、高いcopGFPレポーターレベルを示した細胞が比較的少ないことを見出した(図21B)。この問題を克服するために、我々は、高レベルでSynLubricinを発現する細胞の亜集団を単離するために、copGFPレポ

10

20

30

40

50

ーターを使用する二ラウンド選別戦略を適用した。安定な細胞を増殖させ、上位5%copGFP発現細胞を選別し、次いで上位10%発現細胞を増殖させ、選別した(二度目)。我々は、この選別戦略が、SynLubricin産生を15倍改善し、グリコシル化タンパク質産物の分子量には影響を与えないことを見出した(図21B、C)。選別された細胞集団は、ドキシサイクリンでの誘導後にcopGFPレポーターの顕著に高いレベルを示し、これは、より高い遺伝子発現レベルを有するポリクローナル集団の単離に成功したことを示した。

【0257】

我々の安定な293-F細胞に組み込まれたSynLubricin遺伝子のcDNA安定性を確認するために、ゲノムDNAを、2ヶ月間の連続培養後に、改変293-F細胞から抽出した。次いで、SynLubricin cDNAを、SynLubricinに特異的なプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅した(図22)。増幅された遺伝子は全長ラブリシンについて予想されたように、約4kbの長さであり、オリジナルのSynLubricinプラスミドを鋳型として用いて得られ、同様に増幅された遺伝子、又は一過性にトランスフェクトされた細胞から抽出されたDNAとはサイズが区別できなかった(図22)。2か月間の培養後でさえ、ポリクローナル細胞集団は、SynLubricin遺伝子適用又は欠失の徴候を示さず、高レベルのゲノム安定性を示した(図22)。

【0258】

SynLubricin生産の最適化

293-F細胞においていくつかの組換えタンパク質の産生を劇的に増加させることが以前に示されているヒストンデアセチラーゼ阻害剤(バルプロ酸(VPA))の添加により、SynLubricin産生能を改善できるかどうかを解析した(Backliwal et al., 2008)。我々の選別した細胞集団を、3.5mM VPAの存在下又は非存在下でドキシサイクリンを用いて誘導し、そして培地上清を、バッチ培養物から後日サンプリングした。タンパク質産物の分子量は類似しており、VPAがタンパク質産物のグリコシル化の総程度にあまり影響しなかったことを示唆した(図23A)。興味深いことに、組換えタンパク質レベルは、VPA無しの培養では誘導後約2~3日でピークに達し、その後急速に低下した(図23B)。VPA処理培養物では、培地中のSynLubricinレベルは、時間が経過しても有意に低下しなかった。ウェスタンブロット上でラブリシンの顕著な分解産物が見られなかったため、VPAを含まない培養物における組換えタンパク質の減少についての考えられる説明として、タンパク質分解を除外した(図23A)。代わりに我々は、293-F培養物が、減少した栄養利用性の条件下で、組換えタンパク質を消費し得る可能性を考慮した。この可能性と整合して、組換えタンパク質レベルの低下は、VPAを含まない培養におけるグルコースの枯渇と一致することが観察された(図23C)。グルコース消費の急激な減少によって示されるように、代謝活性は、VPA処理培養物で3日後に大部分停止した(図23C)。このように、VPAは、293-F細胞代謝を遅らせることにより、バッチ培養における組換えタンパク質の損失を防止する可能性がある。

【0259】

次に、バッチ方式で運転される1リットルバイオリアクターに生産をスケールアップし、VPAを添加した2つの独立的な生産運転を行った。各生産運転から、一過性にトランスフェクトされた培養物から単離された組換えタンパク質、及び馬の滑液から検出された天然ラブリシンの双方と、分子量が同等である豊富な組換えタンパク質が得られた(図23D)。標準として精製ウシラブリシンを使用するELISAは、我々の安定な293-F株を用いたバッチ運転において約200mg/LのSynLubricinを報告した。安定な細胞集団の50%未満が、バッチバイオリアクターにおいてcopGFPレポーターの強力な発現を示し、生産性の増加が、産生細胞株のクローン増殖で達成され得ることを示唆した(図23D)。我々は、我々のELISAに基づく定量化の限界が、SynLubricinレベルを過大又は過小評価しうるウシ標準の使用である可能性に注目した。

【0260】

我々は、栄養素の枯渇を回避するための定期的な培地交換で、安定なタンパク質産生が達成され得るかどうかを試験した。馴化培地を、VPAの非存在下で10日間連続して維持し

10

20

30

40

50

たドキシサイクリン誘導培養物から得た。バッチ培養物中の培地を48時間毎に交換して、栄養を補充し、代謝老廃物を除去した。生菌数も48時間毎に 1×10^6 細胞/mLに減少させた。SynLubricin産生レベルは、培養10日間安定であり、SynLubricin分子量は一定であり、グリコシル化も安定であることを示した(図23E)。SynLubricin生産は、時間とともにわずかに減少する可能性があると思われるが、タンパク質収率に有意差はない(図23F)。

【0261】

SynLubricinは、機能性生体潤滑剤である

組換えSynLubricinを、陰イオン交換又は陽イオン交換クロマトグラフィーのいずれかを用いて、馴化293-F培地上清から効果的に精製した。陰イオン交換クロマトグラフィーは、DEAE-セファロース(登録商標)を使用することからQセファロース(登録商標)を使用することへのわずかな改変を伴うものの、ウマ滑液から天然ラブリシンを単離するための我々の以前に報告された戦略に従った(Reesink et al., 2016)。陽イオン交換精製による精製は、50mMのリン酸緩衝液、100mMのNaCl、pH 6.8の移動相、及び50mMのリン酸緩衝液(pH 6.8)中の0.1~1M NaClの直線溶出勾配を有するPOROSTMXS樹脂のカラム(ThermoFisher)にて首尾よく達成された。我々はまた、天然のラブリシンを精製するためにIMACを試みたが、組換えSynLubricinはIMAC樹脂に対する親和性が乏しかった(図29)。SynMuc1に関して、我々は、N末端ヒスチジンタグがSynLubricinタンデムリピートの大きなランダムコイルに埋もれる可能性があるとして推論し、IMACアプローチを放棄した。対照的に、SynLubricinは、陰イオン交換樹脂に強く結合し、約350mM~1.5Mの範囲の高塩濃度にわたって連続的に溶出された(図24A、B)。SynLubricinの連続溶出は、組換えSynLubricinのO-グリカン中の陰イオン性シアル酸の頻度の変化によって説明される可能性が高かった(Estrella et al., 2010)。我々は、約500mM NaClのストリンジェントな洗浄工程が、銀染色によって検出可能なほとんどのタンパク質汚染物質を除去し得ることを見出したが、いくつかのSynLubricinはこの高塩洗浄で必然的に失われた(図24C、D)。

【0262】

我々の組換えSynLubricinの機能性を保証するために、軟骨を滑らかにし、摩擦を減らすその能力を試験した。組換えSynLubricinを、ほとんどのタンパク質汚染物質を除去するために、ストリンジェントな500mM NaCl洗浄工程を使用する陰イオン交換クロマトグラフィーを介して精製した(図24D)。精製後、SynLubricinを生理食塩水中で透析し、生理学的濃度に希釈した。特注の直線往復摩擦計を用いて、天然のラブリシン境界層が抽出されたウシ関節軟骨外植片で、潤滑を試験した(Jones et al., 2007)。生理食塩水対照と比較して、我々は、SynLubricin含有溶液、ならびに対照滑液が、軟骨外植片の境界摩擦を有意に減少させることを見出した(図25；それぞれ、 $p < 0.001$ 及び 0.0001)。

【0263】

また、陰イオン交換カラムを500mM NaClでストリンジェントに洗浄することなく精製した少量の第二のSynLubricin試料を試験した。注目すべきことに、よりストリンジェントに洗浄されたSynLubricin調製物について測定された摩擦係数のいずれよりも、このSynLubricin調製物の軟骨摩擦係数のほうが、著しく低かった(図25)。洗浄されていないSynLubricin調製物についての低い試料体積は、有意義な統計的比較のために十分な独立した測定値を得ることを妨げた(図25)。しかしながら、当業者には明らかであろう技術を用いた精製条件のさらなる最適化は、この考察の利益を考慮すると、改善された生物潤滑性能を有する組換えラブリシン分画を生成すると期待される。例えば、より少なく負に帯電したラブリシン画分(より低い塩濃度(350~500mM NaCl)で溶出する)は、独立して作用するか、又はより多く負に帯電したラブリシン画分と相乗的に作用するかのいずれかによって、軟骨に関する生体潤滑に重要である。あるいは、500mM NaCl洗浄で排除される混入物質が、軟骨潤滑においてラブリシンと相乗的に作用し得る。

【0264】

この第III部の実施例は、より大規模なムチンバイオ製造へのアプローチを提供する。M

uc1とラブリシン両方の新しい半合成遺伝子の設計と合成の成功は、非常に安定なラブリシン発現細胞集団の単離における我々の成功と相まって、このアプローチが、長い反復ドメインを有する組換えムチンに広く適用できる可能性があることを示している。免疫原性Gal α 1,3-Gal及びNeu5Gcエピトープのリスクを回避するヒト細胞系における組換え産生の成功を実証する。我々のSynLubricin遺伝子の組換え産物が、細胞接着に抵抗し(図26A)、そして生物学的表面(例えば、軟骨)を滑らかにする能力において機能的であることを見出した(図25)。従って、SynLubricinは、変形性関節症のための注射剤から慢性ドライアイのための局所治療に及ぶ多様な用途に適していると予想される。さらに、CGSの速度及び低コストが与えられれば、本明細書に記載されるアプローチは、新しい又は改変された機能ドメインを有する、ラピッドプロトタイプデザイナームチンに適用されることが期待できる。

10

【0265】

上記に加えて、我々は、種々の特性についてSynLubricinを試験した。

図30に示すように、SynLubricinは、in vivoで顕著かつ予想外の半減期を示す。図30に示す結果は、以下のようにして得られた。特に、SynLubricinは、哺乳動物に注射した場合、天然のラブリシンについて以前に測定された値である4日をはるかに超える関節内半減期を示した(例えば、Hurtig, et al.(2つのコンパートメント薬物動態モデルは、Yucatan mini pigにおけるACL切断後のrhprg4の関節内送達及び保持を示す)、J Orthop Res. Feb;37(2):386-396. doi: 10.1002/jor.24191. Epub 2018 Dec 17を参照)。したがって、実施形態では、本開示の組換えタンパク質は、4日を超える半減期を示し、少なくとも約30日まで、又はそれより長く持続しうる。実施形態において、半減期は、最大50日、あるいは少なくとも50日、又はそれ以上である。

20

【0266】

図30に示す結果は、次のようにして得られた。すべての動物プロトコルは、コーネル大学動物実験委員会(Cornell University Institutional Animal Care and Use Committee: Protocol #2017-0084)の承認を受けた。10~12週齢の雄Sprague-Dawleyラットを、Harlan Sprague-Dawley, Inc(ENVIGO)から購入し、午前6時から始まる標準的な12時間の明/暗サイクル下で、ペアで収容した。動物がケージ内で自由に動けるようにし、バックグラウンド蛍光を最小限にするためにアルファルファなしで製剤化された市販の食餌(ENVIGO Teklad #2918)を与え、水道水を自由に飲めるようにした。到着時に最低3日間順応させた後、動物を耳へのノッチによって識別し、秤量した。イソフルラン麻酔(2.5%イソフルランを含む1~1.5L/分のO₂)下で、ひげ用トリマーを用いてそれぞれのラットの腹側及び側面側から毛を剃った。滅菌ポビドンヨード及び70%エチルアルコール皮膚調製後、27gの針及び0.5mL注射器(Becton Dickinson)を使用する膝蓋腱アプローチを介して、Dulbeccoリン酸緩衝生理食塩水(dPBS)中の20 μ LのSynLubricin-Cy7.5、又は20 μ Lのデキストラン500kD-Cy7.5を、膝を90°の角度で屈曲させて左膝に注射した。エチルアルコールを注射した後、残留ポビドンヨウ素を除去した。バックグラウンド蛍光算出用の内部対照として使用することができるよう、右膝には注射を行わなかった。

30

【0267】

それぞれのラットを、注射後0、6及び12時間ならびに1、2、3、5、7、14、21、28日目、最高56日目に、IVISスペクトル全動物イメージングシステム(PerkinElmerTM)を用いてイメージングした。自動露光時間及び2秒露光時間の両方が得られた。動物をイソフルラン麻酔(2.5%イソフルランを含む1~1.5L/分のO₂)で麻酔し、画像化の直前に週間隔で毛を剃った(注射後7日目に開始)。2匹の動物に20 μ LのSynLubricin-Cy7.5を注射し、4匹の動物に追加対照として20 μ Lのデキストラン500kD-Cy7.5を注射した。データを二指数減衰モデルに当てはめ、アルファとベータの減衰定数を計算した。約45日のラブリシンの半減期は、ln(2)を β 減衰定数で割ったものとして報告される。対照的に、デキストランはラットの膝から迅速に除去された。

40

【0268】

50

図3 1に示すように、293-F細胞で産生されるSynLubricinは、コアI及びコアIIグリカンの混合物を含む。グリカンの分析は、MALDI-TOF/TOF-MSによる陽イオンモードで行い、グリカン構造の帰属は、Glycoworkbenchソフトウェアを用いて手動で行った。特に、コアIIグリカンは、検出されたコアO-グリカンの20.3%を構成した。O-グリカン構造の29%以上がシアリル化されていた。

【0269】

SynLubricin濃度に対する軟骨-on-軟骨摩擦の依存性を決定するために、追加のトライボロジー分析を行った。図3 2に示すように、少量のSynLubricin(PBS中100 µg/mL)は、PBSのみの対照と比較して、軟骨についての摩擦係数(スライド速度=0.1mm/s)を効果的に低下させる。全てのデータは、新生児ウシ後膝関節の大腿顆から採取した円筒形軟骨外植片(6mm直径×2mm厚)を用いて、特注の直線往復摩擦計を用いて得られた。1.5M NaCl中での30分間のインキュベーション、続いて試験前のPBS中での1時間の平衡化工程を使用して、内因性軟骨結合ラブリシンを外植片から抽出した。これらの研究のためのSynLubricinを、POROSTMXS(ThermoFisher)樹脂を有する陽イオン交換クロマトグラフィーを使用して、馴化293-F培地から精製した。

【0270】

材料及び方法

抗体と試薬

以下の抗体を使用した：マウス抗ヒトCD227(555925, BD Biosciences)(Muc1)、マウス抗ヒトラブリシン(MABT401, EMD Millipore)、ヤギ抗マウスIgG-HRP(sc-2005, Santa Cruz)、マウス抗SUMO(4G11E9, GenScript)。使用したレクチンは、ビオチン化ピーナッツ凝集素(PNA; B-1075, Vector Laboratories)であった。ExtrAvidin-Peroxidase(E2886, Sigma)を用いてビオチン化レクチンを検出した。トランスアクチベーター細胞株を誘導するために、ドキシサイクリンを用いた(sc-204734, Santa Cruz)。ネオマイシン選択のために、G418を使用した(10131035, Thermo Fisher)。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としてバルプロ酸(VPA)を用いた(Sigma P4543-100G)。

【0271】

構築物

組込まれた、共発現逆テトラサイクリントランスアクチベーター遺伝子(pPB tet rtTA NeoR)を有するテトラサイクリン誘導性トランスポゾンベースPiggybac発現ベクターを、安定な系列生成のために使用した。pPB tet rtTA NeoRプラスミドを、脳筋炎ウイルスの配列内リボソーム侵入部位(IRES)、続いてプラスミドのNotI及びXbaI部位への蛍光タンパク質copGFPの挿入によって改変した(pPB tet IRES copGFP rtTA NeoR)。KEPA PTPP(配列番号1)の59の完全反復配列、天然のN-及びC-末端ドメイン、及びN-末端SumoStarタグ(lifesensors)を有するラブリシン類似体の合成cDNAを、カスタム遺伝子合成(General Biosystems)により生成し、BamHI及びEcoRI制限酵素部位を用いてpPB tet IRES copGFP rtTA NeoRの多重クローニング部位にクローニングした。同様に、PDTRP APGSTAPPAHGV TSA(配列番号8)の42の完全反復配列、及びSumoStarタグを有する天然ヒトMuc1 N-末端を有する可溶性のコドンスクランブルMuc1のcDNAを、pcDNA3プラスミドにおけるカスタム遺伝子合成によって生成した。mCherry2 IRES2 copGFP発現プラスミドの構築のために、mCherry2 cDNAを、pmCherry2 N1のEcoRI及びNotI消化によって単離し、EcoRI及びNotI消化pPB tet IRES copGFP rtTA NeoRベクターにクローニングして、pPB tet mCherry2 IRES copGFP rtTA NeoRを作製した。

【0272】

細胞株と培養

FreeStyle 293-F(293-F)細胞は、Thermo Fisher Scientificから入手した。細胞を、製造業者のガイドラインに従って、100mlのWheaton Celstirガラススピナーフラスコ中で培養し、維持した。細胞は、FreeStyle 293発現培地(Thermo)において、120rpm・37℃にて 0.5×10^6 と 3×10^6 細胞/mlの間、及び8%CO₂で維持した。以前に報告されているように(Durocher, Perret, & Kamen, 2002)、ポリエチレンイミン(PEI)を用い

て293-Fトランスフェクションを行った。安定な細胞株を、上記のpPB tet IRES copP G FrtTA NeoRプラスミドと、過活性トランスポザーゼプラスミドとの同時トランスフェクションによって作製し(Shurer et al., 2018)、続いて、750 µg/mLのG418を用いて2週間選択した。SV40 large T抗原(293-T; ATCC)で形質転換したヒト胚性腎細胞を、10%ウシ胎児血清及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充した高グルコースDMEM中で維持した。293-T細胞を、標準的なリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルによって、トランスフェクトした。細胞増殖を、トリパンブルー排除を用いて血球計数器で細胞計数することによって定量した。

【0273】

細胞選別とSynLubricin製造

SynLubricin IRES copGFP又はSynLubricin IRES mNeonGreenを安定に取り込んだ293-F細胞を増殖させ、1 µg/mLのドキシサイクリンを用いて 1×10^6 細胞/mLで24時間誘導した。GFP発現細胞の上位5%を、FACS Aria Fusion(BD Biosciences)で、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって収集した。必要に応じて、細胞を2度目の選別をかけ、GFP発現細胞の上位10%を収集した。SynLubricin産生のために、細胞を1LのProCultureガラススピナーラスコ(Corning)に移し、1 µg/mLドキシサイクリン及び3.5mM VPAを用いて 2×10^6 細胞/mLで誘導した。VPAの存在下又は非存在下でのラブリシン生産速度及びグルコース消費速度の測定のために、100mlのWheaton Celstirガラススピナーラスコ中で、ラブリシンの小規模生産も行った。グルコースレベルを、GlucCellグルコースモニタリングシステム(CESCO BioProducts)を用いて記録した。

【0274】

免疫ブロット及びレクチンブロット分析

培養上清又は精製試料中のタンパク質を、NuPAGE 3~8%トリス-アセテートゲル(Invitrogen)で分離し、PVDF膜に移した。膜を3%BSA TBSTで2時間ブロックした。一次抗体を1:1000に希釈し、レクチンを3%BSA TBSTで1 µg/mLに希釈し、膜上で4℃にて一晩インキュベートした。二次抗体又はExtrAvidinを、3%BSA TBSTで1:2000に希釈し、室温で2時間インキュベートした。ブロットをClarity ECL(BioRad)基質中で現像し、ChemiDoc(BioRad)文書化システム上で画像化した。画像処理にはFijiを用いた(Schindelin et al., 2012)。

【0275】

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)

カスタムしたサンドイッチELISAを使用して、以前の記載と同様に、SynLubricinの濃度を評価した。96ウェルプレート(Costar)を、50mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.5)中の10 µg/mLピーナッツ凝集素(Sigma)と共に4℃で一晩インキュベートした。プレートを3%BSA PBSで室温にて1時間ブロックした。FPLC精製ウシ滑液ラブリシンの連続希釈物を標準として使用した。試料をDPBS中で1:200に希釈し、室温にて1時間負荷し、続いてPBS+0.1%Tween20中で3回洗浄した。使用される一次抗体(Millipore MABT401)は、SynLubricinの反復配列と約90%の配列類似性を有するヒト及びウシラブリシンの天然PRG4タンデムリピートに結合する。一次抗体及び二次抗体(Millipore AP126P)を、それぞれ1:5000及び1:2000に希釈し、それぞれ室温で1時間インキュベートし、抗体インキュベーションの間及び二次抗体インキュベーションの後に、PBS-Tで3回洗浄した。ELISAを、室温で、1-Step Ultra TMB(ThermoFisher)を用いて9~12分間、又はロイヤルブルーが現れるまで展開し、この時点で、2NのH₂SO₄を用いて反応を停止させた。吸光度を、Tecan Spark(登録商標)3Mマイクロプレートリーダー上で540nmバックグラウンド減算を用いて450nmで測定し、4パラメーターMarquardtフィットを有するMagellanソフトウェアを用いて濃度を計算した。

【0276】

組換えSynMuc1の精製

293-F細胞を、先に記載したPEIプロトコルを使用して、一過性にトランスフェクトした。24時間後、培地上清を回収した。培地上清を20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl(

10

20

30

40

50

pH 7.4)で1:4に希釈し、100 μ LのNiセファロースエクセルレジン(17371201, GE)と共に4°Cで一晩インキュベートした。試料のフロースルーを、Gravity Column(29922, Thermo)を用いて回収した。樹脂を、5mLの20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、5mMイミダゾール、pH 7.4で洗浄した。SynMuc1を、5mLの20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、500mMイミダゾール、pH 7.4で溶出した。SynMuc1を、Zeba Spin脱塩カラム(87766, Thermo)を使用してPBS中に脱塩した。

【0277】

組換えSynLubricinの精製

SynLubricinを、Qセファロース(登録商標)樹脂(GE)又はPOROSTMXS(ThermoFisher)樹脂を用いる高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)によって、SynLubricin IRES copGFP又はSynLubricin IRES mNeonGreen陽性293-F細胞培養上清から精製した。陰イオン交換のために、上清を50mM Tri-HCl緩衝液(pH 7.5)で1:10に希釈し、カラムに充填した。カラムを50mM Tris-HCl、525mM NaCl、pH 7.5で洗浄した。精製したSynLubricinを、50mM Tris-HCl、1M NaCl、pH 7.5で溶出することによって収集した。精製したSynLubricinを、Tube-O-Dialyzer(G-Biosciences)を用いて4°Cにて一晩、PBS中で透析した。最終精製生成物を、SpeedVac(低設定)で濃縮することによって得た。陽イオン交換のために、SynLubricin IRES mNeonGreen陽性293-F懸濁細胞培養物からの上清を、最初に、0.8 μ m孔径セルロースアセテートフィルター(Sartorius)に通し、続いて、脱塩し、高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)によって捕捉した。脱塩操作は、50mMリン酸緩衝液、100mM NaCl(pH 6.8)の移動相を有するSephadex G-25(GE)微細樹脂上で行った。捕捉操作のために、脱塩した試料を、POROSTMXS(ThermoFisher)樹脂のカラムに注入し、50mMリン酸緩衝液(pH 6.8)中の0.1~1M NaClの直線勾配で溶出した。SynLubricinは、0.46~0.64 M NaClの間で溶出された画分中で同定され、これらの画分をプールし、さらに精製することなく使用した。

【0278】

SynLubricinのグリカンの特性解析

全ての試薬は特に言及しない限り、Sigmaから購入した。組換えSynLubricinを、100°Cで5分間加熱することによって変性させた。その後、変性したタンパク質を、500 μ Lの50mM水酸化ナトリウム(NaOH)溶液中の19mgの水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)で、45°Cにて18時間処理した。試料を冷却し、10%酢酸で中和し、Dowex H+樹脂カラムに通し、窒素流下でホウ酸塩を除去して凍結乾燥した。グリカンを、以前に報告された方法を使用する質量分析による構造的特徴付けのために、過メチル化した。簡単に述べると、乾燥した溶出液をジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、ヨウ化メチル及びNaOH-DMSO塩基(DMSO及び50%w/w NaOH溶液を混合することによって調製された)を使用することによってメチル化した。反応物を水でクエンチし、反応混合物を塩化メチレンで抽出し、乾燥した。過メチル化グリカンをメタノールに溶解し、 α -ジヒドロキシ安息香酸(DHBA、50%v/vメタノール:水中 20mg/mL)マトリクスで結晶化させた。試料中に存在するグリカンの分析は、AB SCIEX TOF/TOF 5800(Applied Biosystem MDS Analytical Technologies)質量分析計を使用して、MALDI-TOF/TOF-MSによって陽イオンモードで行った。試料からの過メチル化グリカンを、さらなる構造確認のために、HCD及びCID断片化オプションを有するESIプローブを通してOrbitrap Fusion Tribrid質量分析計に注入した。グリカンのMS1及びMS2スペクトルを、単純な前駆体スキャンによって高分解能で取得し、それぞれのイオンを、さらなるMS/MSスキャンのために手動で選択した。グリカン構造の帰属は、断片化パターン及び一般的な生合成経路に基づいて、手動で、及びGlycoworkbenchソフトウェアを使用することによって行った。

【0279】

トライボロジー

境界潤滑剤としてのSynLubricinの性能を、以前に記載されているように特注の直線往復摩擦計を用いて評価した(Gleghorn & Bonassar, 2008)。簡単に述べると、円筒形軟骨外植片(直径6mm×厚さ2mm)を、新生児ウシ後膝関節の大腿顆から採取した。内因性

軟骨結合ラブリシンを、1.5 M NaCl中での30分間のインキュベーション、続いてPBS中での1時間の平衡化工程を使用して抽出した。外植片を、PBS、SynLubricin、又はウシ滑液のいずれかにおいて、15～20分間インキュベートした後、それぞれの流体の1mL浴中にて、摩擦計に負荷した。外植片を、ガラスの対向面に対して約30%の歪みまで圧縮し、1時間かけて減圧させた。平衡正常荷重に達した後、対向面を3サイクル、0.3mm/sの速度で直線的に往復運動させた。同時に二軸荷重が、正常荷重とせん断荷重を記録した。前進・後進方向の両方について、各速度にて、平均せん断力として摩擦係数を計算した(平衡正常荷重でスライディングを割る)。

【0280】

統計解析

統計学的有意性は、Prism(GraphPad)を使用して、適切に、一方向ANOVA又はスチューデントt検定(両側)によって決定した。潤滑データについては、全ての潤滑剤にわたる平均摩擦係数を比較するために、Tukeyの事後検定で、一方向ANOVAを行った。全てのグラフは、Prism(GraphPad, La Jolla, CA)で作成した。

第III部の補足表1：ヒトPRG4アイソフォームA及びSynLubricinのタンデムリピートにおけるアミノ酸組成。

ヒトPRG4A反復配列 アミノ酸組成			SynLubricin反復配列 アミノ酸組成		
Ala (A)	58	11.4%	Ala (A)	59	12.5%
Arg (R)	0	0.0%	Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	1	0.2%	Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	2	0.4%	Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%	Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%	Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	48	9.4%	Glu (E)	59	12.5%
Gly (G)	4	0.8%	Gly (G)	0	0.0%
His (H)	0	0.0%	His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	0.2%	Ile (I)	0	0.0%
Leu (L)	7	1.4%	Leu (L)	0	0.0%
Lys (K)	69	13.6%	Lys (K)	59	12.5%
Met (M)	0	0.0%	Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%	Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	155	30.5%	Pro (P)	177	37.5%
Ser (S)	13	2.6%	Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	150	29.5%	Thr (T)	118	25.0%
Trp (W)	0	0.0%	Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%	Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	0	0.0%	Val (V)	0	0.0%

【0281】

以下の配列は、ヒトSynLubricin、イヌSynLubricin、及びウマSynLubricinである。イタリック体は分泌シグナルを表す。太字のヌクレオチドは、リーダーとSynLubricin配列との間のGS。

10

20

30

40

50

DNA:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTG
GTGACGGCTCCCAGGACCTGTCTAGCTGTGCCGGAAGATGTGGCGAGGGCTACA
GCAGAGATGCCACCTGTAACCTGCGACTACAACTGCCAGCACTACATGGAATGCT
GCCCCGACTTCAAGAGAGTGTGCACAGCCGAGCTGAGCTGCAAGGGCAGATGCT
TCGAGTCCTTCGAGAGGGGCAGAGAGTGCATTGCGACGCCAGTGCAAGAAAT
ACGACAAGTGCTGCCCTGACTACGAGAGCTTCTGTGCCGAGGTGCACAACCCCA
CATCTCCACCTAGCAGCAAGAAGGCCCTCCACCTTCTGGCGCCTCTCAGACAAT
CAAGAGCACCACCAAGCGGAGCCCCAAGCCTCCTAACAAGAAAAAGACCAAGA
AAGTGATCGAGAGCGAGGAAATCACCGAGGAACACAGCGTGTCCGAGAATCAA
GAGAGCAGCTCCAGCAGCAGCTCCTCCAGCTCTAGCTCCACCATCCGGAAGATC
AAGTCCAGCAAGAACAGCGCCGCCAACAGAGAGCTGCAGAAAAAGCTGAAAGT
GAAGGACAACAAGAAGAACCGGACCAAGAAGAAGCCACACCTAAGCCTCCAG
TGGTGGATGAGGCTGGCAGCGGACTGGACAACGGCGACTTCAAAGTGACCACAC
CTGACACCAGCACCACACAGCACAACAAGGTGTCCACCTCTCCTAAGATCACCA
CCGCCAAGCCTATCAACCCAGACCTAGCCTGCCTCCAAACAGCGACACCTCCAA
AGAAACCAGCCTGACCGTGAACAAAGAGACAACCGTCGAGACAAAAGAGACTA
CCACCACCAACAAGCAGACTAGTACCGACGGCAAAGAGAAAAACCACCAGCGCC
AAAGAGACTCAGAGCATGAAAAGACCTCCGCCAAGGATCTGGCCCCCTACCTCT
AAGGTGCTGGCCAAGCCAACACCAAAAGGCCGAGACAACCACAAAGGGCCCTGCT
CTGACAACCCCTAAGGAGCCAGCACCCACAACGCCGAAGGAACCAGCGCCACG
ACCCCTAAAGAACCAGCTCCTACAACGCCCAAGGAACCGGCGCCAACAACGCCT
AAGGAACCGGCACCAACAACACCCAAAGAGCCCGCCCCACTACTCCTAAAGAA
CCGGCTCCAACTACACCGAAGGAACCTGCCCGACAACCCCAAAGGAACCAGCC
CCTACAACCCCTAAAGAGCCAGCGCCAACCACGCCCAAAGAACCTGCGCCGACT
ACCCCGAAAGAGCCGGCACCCACTACGCCCAAAGAGCCGGCCCCCACAACCCCG
AAGGAACCGGCTCCGACGACACCAAGGAGCCTGCGCCCACTACACCCAAGGAG
CCTGCACCAACCACTCCCAAGGAGCCAGCTCCCACAACACCAAGGAACCCGCG
CCCACCACGCCAAAAGAGCCAGCACCTACAACACCTAAGGAACCTGCTCCAACC
ACCCCAAAGGAGCCCGCACCTACGACTCCCAAGGAACCCGCTCCAACGACGCCT
AAGGAGCCGGCACCTACCACTCCAAAGGAGCCAGCCCCGACTACTCCGAAGGAG
CCTGCCCCAACTACTCCCAAAGAGCCAGCCCCCAGACTCCTAAGGAACCAGCA
CCAACGACACCGAAAGAACCCGCTCCACGACGCCGAAAGAACCTGCCCTACG
ACACCCAAAGAACCAGCCCCAACAACTCCTAAAGAGCCGGCTCCCACTACCCCT
AAGGAGCCAGCGCCTACGACCCCAAAGAGCCTGCACCGACAACGCCAAAGGA
ACCTGCACCCACCACCCCTAAGGAACCCGCACCAACTACCCCAAAGAACCTGC
ACCTACTACTCCAAAGGAACCGGCCCTACCACCCCAAAGAACCTGCGCCAAC
TACGCCGAAAGAGCCCGCGCCAACGACTCCGAAAGAACCAGCGCCGACAACCTCC
AAAAGAGCCCGCTCCGACCACACCGAAAGAGCCTGCTCCCACCACACCAAAAGA
ACCAGACCCGACCACTCCTAAGGAGCCTGCTCCTACTACGCCTAAAGAACCTGCT
CCGACTACACCTAAAGAACCCGCGCCTACCACGCCTAAAGAGCCTGCGCCTACA
ACTCCCAAAGAACCCGCACCGACTACGCCAAAAGAACCGGCCCAACGACCCCG
AAAGAACCGGCACCGACGACTCCAAAAGAACCCGCCCAACCACACCTAAAGAG
CCCGCACCCACGACACCTAAGGAGCCCGCTCCTACCACACCCAAGGAACCAGCT
CCAACAACCCCAAAGAGCCTGCCCCACCACTCCGAAGGAACCCGCCCCCTACT
ACACCAAAGAGCCGGCGCCTACTACCCCAAAGAACCGGCGCCCACTCCG
AAAGAGCCAGCTCCGACAACACCGAGCGAAGTGTCTACCCCTACAACCACCAAA
GAGCCAACCACCATCCACAAGAGCCCCGACGAGTCTACACCTGAGCTGTCTGCC
GAGCCTACTCCTAAGGCTCTGGAAAACAGCCCCAAAGAACCCGGGGTGCCACC
ACAAAACACCAGCCGCCACAAAGCCCCGAGATGACCACCACAGCCAAGGACAA

10

20

30

40

50

GACCACCGAGCGGGACCTGAGAACAACCCCTGAAACCACAACCGCCGCTCCAAA
GATGACAAAAGAAACCGCCACAACCACCGAGAAAACAACCGAGAGCAAGATCA
CCGCCACCACAACACAAGTGACCTCCACCACCACTCAGGACACCACACCTTTCAA
GATCACAACCCCTCAAGACCACTACACTGGCCCCAAAAGTGACGACCACAAAGAA
AACCATCACCACGACCGAGATCATGAACAAGCCCCGAGGAAACCGCTAAGCCCCA
GGACAGGGGCCACCAACAGCAAGGCCACCACACCAAAGCCACAGAAGCCTACAA
AGGCCCCCTAAGAAGCCAACCAGCACAAAAAGCCCAAGACCATGCCTAGAGTGC
GGAAGCCTAAGACAACCCCAACACCTCGGAAGATGACCAGCACTATGCCCCGAGC
TGAACCCACCTCTAGAATCGCCGAAGCCATGCTGCAGACCACCACTAGACCCA
ATCAGACCCCTAACAGCAAGCTGGTGGAAGTGAACCCCAAGTCCGAAGATGCCG
GCGGAGCTGAAGGCGAGACACCTCATATGCTGCTGAGGCCCCACGTGTTTCATGC
CCGAAGTGACCCCTGACATGGACTACCTGCCAAGAGTGCCCAACCAGGGCATCA
TCATCAACCCTATGCTGAGCGACGAGACAAACATCTGCAACGGCAAGCCCGTGG
ACGGCCTGACCACACTGAGAAATGGAACCCCTGGTGGCTTTCCGGGGCCACTACTT
TTGGATGCTGAGCCCTTTCAGCCCTCCATCTCCTGCCAGACGGATCACAGAAGTG
TGGGGCATCCCTTCTCCAATCGACACCGTGTTACCCCGGTGCAACTGCGAGGGCA
AGACATTCTTCTTCAAGGACAGCCAGTATTGGCGGTTACCAACGACATCAAGGA
CGCCGGCTATCCCAAGCCAATCTTCAAAGGCTTCGGAGGCCTGACCGGCCAGATT
GTGGCTGCTCTGTCTACCGCCAAGTACAAGAAGTGGCCCGAGAGCGTGTACTTCT
TTAAGAGAGGGCGGCTCCATCCAGCAGTACATCTACAAGCAAGAGCCCGTGCAGA
AGTGCCCCGGAAGAAGGCCAGCTCTGAATTACCCCGTGTACGGCGAGACTACCC
AAGTGCGGAGAAGAAGATTCGAGAGAGCCATCGGACCCAGCCAGACACACACC
ATCAGAATCCAGTACAGCCCCGCCAGACTGGCCTACCAGGATAAGGGCGTGCTG
CACAACGAAGTGAAAGTGTCCATCCTGTGGCGGGGACTGCCCAATGTGGTCACA
AGCGCCATCAGCCTGCCTAACATCAGAAAGCCCGACGGCTACGACTACTACGCC
TTTAGCAAGGACCAGTACTACAACATCGACGTGCCCAGCAGAACCGCCAGAGCC
ATCACAACAAGATCCGGCCAGACACTGAGCAAAGTGTGGTACAACCTGTCCTTGA(
配列番号 6 7)

10

20

【 0 2 8 2 】

30

40

50

アミノ酸:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSGDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCQDYNQHYMECC
PDFKRVCTAELSCKGRGCFESFERGRECDCAQCKKYDKCCPDYESFCAEVHNPTSP
SSKKAPPPSGASQTIKSTTKRSPKPPNKKKTKKVIESEEITEEHSVSENQESSSSSSSSSS
SSTIRKIKSSKNSAANRELQKKLKVKDNKKNRKTKKPTPKPPVVDEAGSGLDNGDFK
VTTTPTSTTQHNVSTSPKITTAKPINRPSLPPNSDTSKETSLTVNKETTVETKETTTT
NKQTSTDGKEKTTSKAKETQSIEKTSKDLAPTSTKVLAKPTPKAETTTKGPALTTPKEP
APTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPT
PKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEP
APTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPT
PKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEP
APTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPT
PKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEP
APTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPT
PKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPKEPAPTTPSEVSTPTTTKEP
TTIHKSPDESTPELSAETPKALENSPKEPGVPTTKTPAATKPEMTTTAKDKTTERDLR
TTPETTTAAPKMTKETATTTEKTTESKITATTTQVTSTTTQDTPFKITTLKTTTLAPK
VTTTCKTITTTEIMNKPEETAKPKDRATNSKATTPKPQKPTKAPKKPTSTKKPKTMPR
VRKPKTTPTPRKMTSTMPELNPTSRIAEAMLQTTTRPNQTPNSKLVEVNPKSEDAGG
AEGETPHMLLRPHVFMPEVTPDMDYLPRVPNQGIINPMLSDETNICNGKPVDGLTTL
RNGTLVAFRGHYFWMLSPFSPSPARRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTFFFKDSQ
YWRFTNDIKDAGYPKPIFKGFGGLTGQIVAALSTAKYKNWPESVYFFKRGGSIQQYI
YKQEPVQKCPGRRPALNYPVYGETTQVRRRRFERAIGPSQHTIRIQYSPARLAYQD
KGVLEHNEVKVSILWRGLPNVVTSAISLPNIRKPDGYDYAFSKDQYYNIDVPSRTAR
AITTRSGQTLKVVWYNCP(配列番号 6 8)

10

20

【 0 2 8 3 】

30

40

50

イヌ SynLubricin

イタリック体＝イヌ分泌ペプチド配列

DNA:

atgcaatggaagatttccccatatacttgttgcgtcagtgatttctcatccaacaagtagtagcaagatctcccttcttgcag
gcaggtgtggagaaggctatagtcgggatcgatttgaattgtgattataactccaacattacatggagtgtgtccggactttaagaa
agcatgtacggtcgagctcagttgtaaagggcgctgtttcgaatttctgctagaggccgagaatgtgactgcgacagtactgcaaaa
agtacggaagtgttgcagattacgaggacttttgcgggagagtacacaacctacttcaccaccttctccaaaactgcaccacctt
ccccggggcctctcagacaattaagtcaacggccaacgctcaccgaaggtccgaacaaaaaagactaagaaggtaatagag
agttaggaaatcaccgaggagcactctgtgtcagaaaaccaagaaagtcttcatcatcaagctcttctcatccactattcgcaaaataa
agtcatctaagaactctgcggcgataaagagcttaaaaagaagccaaaagtaaaggataataaaaaggagcgaacaccgaagaaa
aagccaccacctgaacccccgtagttgatgagcggggtcaggcttgacaatggagacattaattgacaccacgctgacatt
cctacgactcaacgaataaggttactacaagtcaccaattcaccagagtaagcccatcaacccaaaacctagtctccaccgaaca
ccgatacgtcaaggagagctcatccactcccaacaaggaaacaactgtcaaaagtaaagagacacttgtaacaaggaaaccagc
agttaaagcgaaggagaaaattacgtctgtaaaagagactcggtctcggagaagacccccagcgaaggactttgtgcctacgacgaa
agccccgtgcaaatctactccgaaggcggaagcactactAAGGGCCCTGCTCTGACAACCCCTAaggagcca
gcaccacaacgcccgaaggaaaccagcggccacgaccttaagaaccagctctacaacgccaaggaaaccggcgccaacaac
gcctaaggaaaccggcaccacaacacccaagagccccccccactactcctaagaaccggctccaactacaccgaaggaaacct
gccccgacaaccccaaggaaaccagccccctacaacccctaaagagccagcggcaaccacgcccagaagaaacctgcccgcgactacc
ccgaaagagcggcaccactacgccaagagccggccccacacccccgaaggaaaccggctccgacgacaccaaaggagc
ctgcccactacaccaagagcctgaccaaacctcccaaggagccagctcccacaacaccaaggaaccggcgcccacca
cgccaaaagagccagcacctacaacacctaaggaaacctgtccaaccaccccaaggagcccgacactacgactcccaaggaaacc
cgctccaacgacgcctaaggagccggcacttaccactcaaaaggagccagccccgactactcgaaggagcctgcccactact
cccaagagccagccccacgactcctaaggaaaccagaccaacgacaccgaagaaccgctcccacgacgcgaaagaacct
gccccactgacacccaagaaccagcccaacaactcctaaggagccggctcccactaccctaaaggagccagcgctactgacccc
caaaagagcctgcaccgacaacgccaaggaacctgcaccaccaccctaaaggaaaccgacccaactaccccaaaagaacctg
cacctactactccaaggaaaccggccccctaccaccccaaggaaacctgcgccaactacgccgaagagccccgcgccaacgactcc
gaaagaaccagcggcgaactcctaaaagagcccgctccgaccacaccgaaagagcctgctcccaccacaccaaagaaccagc
accgaccactcctaaggagcctgctcctactacgacctaaagaacctgctccgactacactaaagaaccggcgctaccacgcttaa
agagcctgcccctacaactcccaagaaccggcaccgactacgcaaaagaaccggcccccaacgaccccgaaagaaccggcacc
gacgactccaaaagaaccggcccccaaccacacctaaggagcccgacccacgacacctaaggagcccgctcctaccacacccaa
ggaaccagctccaacaacccccaaagagcctgccccaccactcgaaggaaaccggccctactacacaaaagagccggcgct
actaccccaaaagaaccggcgcccacaactccgaaagagccagctccgacaacaccgAGCGAAGTGACAacgacggc
taaagataaaacgaccgagaagacataattccagagattaccactgtgttccaagatcacactcaagaaactgtacgccaacc
gaggagacgactacggaatctaagacctaacctacgacccaagtacttctactactagtagcaaaaacactccaaaagccacgacc
ctcgcgcccaaggtgatgacagcaacacaaaaaacacgactactgaagagaccatgaacaagcccgaagagacgacggcagtg
cctaagatactgcaacatcaacgaagtaagcaccggcgaccccgaaagccaaccaagcaccaaagaaacccgcaagtacaa
agaaacccaacacgatccctaaacgaaaaaaacaaaaactacactaccccgccaaagatgactacgagcactatgcttaacctcc
atcctacctctcctgtgaggaatgctgcaactacaacgtcccccaatcaacgacctaattctgagatagtagaggtcaacccaac
gaggatagcgacggcgtggaagaaaccccatatgttcccgacactcctgtttgacccccatatttaccctggaaccgacattctt
gtcggggggtccaatcaagatattgccataatccatgtcttcgacgagacaatctctgtaattggaacctgtcagcgattgac
aacctccgaaatggtactatgtgtggttcggcgccatttctggtgagtccttccaaacccccgagtcctccccggaagatt
acagaggtttgggcatccctctccatagataccgtttttacgcatgcaattgtgagggtaaaacattcttcaagggcagtcagt
actggcgattcactaacgacatcaaggacgcaggtaccccaaacagatcgtcaagggttcggaggttgaatggtcgaattgtcgc
tgccctgtctatagctaagtacaagcaccggccagagctgtctatttttcaagcgcgcggtcagtgcaacaataacttacaagca
agagccgataaaaaaatgtacaggcgccggcgccgatttaactaccctgtatatggtgagactacacaagtggcgccgagacgctt
tgagaggcgatagcccttctcagacgcataccatccggatatactactccctattcggttagctaccaggacaagggtttcttgc
acaatgaagtaaaaaatgtccagtcattggagaggtttcccgaaactgtttacctcagcaattgcgctgcctaacatcaggaagcctgat
ggttacgactattacgctttctcgaatcaattataacattgatgttccctcccgactgccagagttgtgactacaagatttgacga
accctctccaatatatgtgtacaattgcccctag(配列番号 6 9)

【 0 2 8 4 】

10

20

30

40

50

アミノ酸:

MQWKILPIYLLLLSVFLIQQVSSQDLPSGAGRCGEGYSRDAICNCDYNCQHMECCPDF
KKACTVELSCKGRCFESFARGRECDSDCKKYGKCCPDYEDFCGRVHNPTSPPSSK
TAPPSPGASQTIKSTAKRSPKAPNKKKTKKVIESEEITEEHSVSENQESSSSSSSSSSTIR
KIKSSKNSAANKELKKKPKVKDNKKERTPKKKPPPEPPVVDEAGSGLDNGDIKLTPT
PDIPTTQRNKVTTSPKF TTGKPINPKPSLPPNTDTSKETSSTPNKETT VKSKETLANKET
SSKAKEKITSAKETRSAEKTPAKDFVPTTKAPVKSTPKAESTTKGPALTTPKEPAPTTTP
KEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPA
PTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTP
KEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPA
PTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTP
KEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPA
PTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTP
KEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPA
PTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPSEVTTTAKDKTTEKDII
PEITTA VPKITTQETATPTEETTTESKTSTTTQVTSTTSSKNTPKATTLAPKVMATQK
TTTTEETMKNKPEETTA VPKDTATSTKVSTPRPRKPTKAPKKPASTKKPNTIPKRKKPK
TTTPPKMTTSTMPKLHPTSSVEAMLQTTTSPNQRPNSEIVEVNPNEDTDAAGKKPH
MFPRPPVL TPIFIPGTDILVRGSNQDIAINPMLSDETNL CNGK PVDGLTTLRNGTMVAF
RGHYFWMLSPSKPPSPPRKITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTFFFKGSQYWRFTNDI
KDAGYPKQIVKGFGGLNGRIVAALSIAKYKDRPESVYFFKRGGSVQQYTYKQEPIKK
CTGRRPAINYPVYGETTQVRRRRRFERAIGPSQTH TIRIHYSPIRVSYQDKGFLHNEVK
MSSQWRGFPNVVTS AIALPNIRKPDGYDY YAFSRNQYYNIDVPSRTARVVTTTRFGRT
LSNIWYNCP(配列番号 7 0)

10

20

【 0 2 8 5 】

30

40

50

(1) ウマ SynLubricin

赤 = ウマ分泌ペプチド配列

DNA:

atggagtggaataatcctgctatttacctctctgtgtgctgagtatatttccatccaggaggttcaagccaagacctttctagtgcgctggcgg
 tgtggggagggatactctcgggatgcgacttgcaactgcgatttttaattgtcaatactacatggaatgttgcgactttaagaaagtctgtacatctg
 aattgtcttgaagggcgtgttctcgagagtttcgaaagggggcgagaatgcgattgcgactgtaagaaatagcgaagtgttctcagatt
 atgaaagcttctgcgaggaagtcataatcctacgtctccggcaggttcaagacagctccccgcctccaggggccagccagactatcaagagta
 cagctaaacgggtcaccaagtcataaagaaaaaactaaaaagtatcgagagtgaaagatcatagaagaacacagtggtccgagaatcag
 gagtcatcttccagcttagctcaagttcatctaccatccgcaagggttaagtctagcaaaaactcagcagcgaacagagaactcaaaaagaagccta
 aggtcaaggattctaaaaaaacgaaccccgaaaaaaaaccgacgcctgagccaccagtcatacagaggccgggagtggtttggataacg
 gagacttcatgttgattccaccccgaattccaaccacgcaagaataaggtgacgacatcaccaagattacaacggtaaaaccaattaacc
 caagccttcccttctcccaattccgacacgtcaaaagagaccactgacacctaataaagaaactacggtcgagaccaagagaccgagatca
 caaacaaggagacttctacaagcgccaatgaaaagactacgagcgccagggaagtagacagaaaaatccgacaaaattttgctccggccag
 cgaagtacctgcaaaaagtacccctaaggctgaaaccaccacaaggggccctgctctgacaacccctaaggagccagcaccacacgcccga
 ggaaccagcgccacgaccctaagaaccagctctacaacgccaagggaaccggcgccaacaacgctaagggaaccggcaccaacaaca
 ccaaaagagcccgccccactactctaaagaaccggctccaactacaccgaagggaacctgccccgacaaccccaagggaaccagcccctaca
 acccctaagagccagcgccaaccacgcccagaacacctgcgccgactaccccgaaagagccggcaccactacgcccagaagagccggccc
 ccacaacccgaaggaaaccggctccgacgacaccaaggagcctgcgccactacaccaaggagcctgcaccaaccactccaaggagcc
 agtctccacaacaccaagggaacccgcgcccaccacgccaagaagagccagcactacaacacctaagggaacctgctccaaccaccccaagg
 agcccgacactacgactcccaagggaacccgctccaacgacgcttaaggagccggcactaccactccaaggagccagccccgactactccg
 agggagcctgccccactactcccaagagccagccccacgactcctaagggaaccagcaccaacgacaccgaaagaacccgctcccacgacg
 ccgaaagaacctgccccacgacaccaaaagaaccagccccacaactcctaaggagccggctcccactacccttaaggagccagcgctacg
 acccaaaaagagcctgcaccgacaacgccaagggaacctgcaccaccacccctaagggaacccgcaccaactaccccaaaagaaacctgcact
 actactccaaaggaaacccgccccctaccaccccaaggaaacctgcgccaactacgcccgaagagcccgcccaacgactccgaaagaaccagc
 gccgacaactccaaaagagcccgctccgaccacaccgaaagagcctgctccaccacaccaaaagaaccagcaccgaccactcctaaggagc
 ctgctctactacgctaagaacctgctccgactacacctaagaacccgcgctaccacgctaagagcctgctcctacaactccaaaagaa
 cccgcaccgactacgcaaaaagaacccggcccaacgaccccgaaagaaccggcaccgacgactccaaaagaacccgccccaacacaccta
 aagagcccgacccacgacacctaaggagcccgctctaccacaccaaggaaccagctccaacaaccccaaaagagcctgccccaccact
 ccgaaggaaacccgccccctactacacaaaaagagccggcgctactaccccaaaagaaccggcgcccaactccgaaagagccagctccgac
 aacaccgagcggaagtgtctaccacgacgactaccatgaacctccgacgacacccaaaaatcttctgaaagcaccagagctccacgagg
 ccaacacccaaagcactggagaactacccaaagaaccggctgtaccgactacgaaggccctgaagtaaccaaacagaaagtcacaacaacc
 gctaaagacaaggttacgggaaaggtatctacacgattcccgagatactacagcggcacctaaagataacgaccgaaacggccacgacaactg
 aagagaaaacaacggaaagtgtatgaccgcaacaaaaactaccacaacacaggaacgataaacaagctggaggagacgacggctattcc
 agcaacgacattggcaccgaaagtgtatgaccgcaacaaaaactaccacaacacaggaacgataaacaagctggaggagacgacggctattcc
 taaggatacggcgacgacagcaaaagtgtactacgccaaggccgaagaagccgaccaaaagcgctcgaaagccgacatccacaagaacccg
 aaaacggcgcaagcgcaaaccaagacaacaccgattccccgaaaatcaccacccgaccactcctaaaaagtaacctacgacttttggcgg
 aagccatgctcagactacaacttcacctaaccagactcctaattccgctatgatagaggtcaaccgaaaaacgaggacgggacgctgcggaa
 ggggaaaagccgctcgtgatacttcgaccacacgctctactccaatcgctacacgggtccggactttctgtccggtccaaacttgggaatcg
 gaattaaccccatgcttagcgacgagacgaacttgtgtaacggttaaccagtgtagcgactaccacccctgagaatggaactctcgtggcttca
 gggggccactatttctgtagtctccgaccatttagtccccgagtcggccgaggagaatcaccgaggtatgggggattccctctctattgataccgct
 ttactcgtgcaactcgagggaagacattttcttcaaggactcacagatttggcgattcacaacgacataaaggatgctggataccctaaattg
 attagcaagggtttgggggcttagtggaacaaatcggtggcgcttttcaatagcaacgtacaagaacaggccagagagcgtttatttttaagcg
 agggggggcgaatacgaatacatctacaagcaagaaccataagaaagtgtccaggagcggcaccagctatacattatcagtttacggagagg
 ctctcagattcgaggagaaggttgaacgggcataggccgtctcagacgcacaccatccgattcactactccccgtacgctatcatacc
 aagacaaagtccgtccactgactttctccacaacgaggtcaagtaagcaccctgtggcgggacttccagacaccgttacatccgcatctccct
 tcctaacttgcggaaccagacgggatacactattatgcttttcaaaagaccaatattataattgacgtcccagccgaactgctcgcgaataact
 accggaagtggccagacattgagtaagggtctgtataactgtccctag(配列番号 7 1)

10

20

30

40

【 0 2 8 6 】

50

アミノ酸:

MEWKILPIYLLLLLSIFSIQEVSSQDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCDFNCQYYMECCPDF
KKVCTSELSCKGRCFESFERGRECDADCKKYGKCCSDYESFCEEVHNPTSPSSK
TAPPPPGASQTIKSTAKRSPKSNKKKTKKVIESEEIIIEHSVSENQESSSSSSSSSTIRK
VKSSKNSAANRELKKKPKVKDSKKKRTPKKKPTPEPPVIDEAGSGLDNGDFMLIPTP
KIPTTQRNKVTTSPKITTVKPINPKPSLPPNSDTSKETTSTPNKETTVEKETEITNKETS
TSANEKTTTSARKSTKTSKDFAPASEVPAKSTPKAETTTKGPALTTPKEAPTTTPKE
PAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKE
TPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKE
PAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTT
TPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKE
PAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTT
TPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKE
PAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTT
TPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPKEAPTTTPSEVSTTTTTMKPPTTPKN
LAESTPEFPAEPTPKALENSPKPAVPTTKAPEVTKPEVTTAKDKVTGKDIHTIPEITT
AAPKITTTETATTTTEKTTESKVTSTIMQVTSTTEDTTTSSKITPKATTLAPKVMATKT
TTTQETINKLEETTAIPKDTATHSKVTTPKPKKPTKAPRKPTSTKKPKTPRKRKPKTTP
IPPKITTPTPKSNPTTLAEAMLQTTTSPNQTPNSAMIEVNPKNEDADAAEGEKPLVIL
RPHVLTPIVIPGPDFLVRGPNLGIGINPMLSDETNLNCGKPVDGLTTLRNGTLVAFRG
HYFWMLRPFSPSPRRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTFFFKDSQYWRFTNDIKDA
GYPKLISKGFGGLSGKIVAALSIATYKNRPESVYFFKRGGRQQYIYKQEPKRCPGRR
PAIHYSVYGEAPQIRRRRFERAIGPSQTHIRIHYSVVRVSYQDKVPSTDFLHNEVKVS
TLWRGLPDTVTSAILPNLRKPDGYDYAFSKDQYYNIDVPSRTARAITTRSGQTLK
VWYNCP(配列番号 9 8)

10

20

【 0 2 8 7 】

30

40

50

REFERENCES

- Backliwal, G., Hildinger, M., Kuettel, I., Delegrange, F., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2008). Valproic acid: a viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 101(1), 182–189.//doi.org/10.1002/bit.21882
- Backstrom, M., Link, T., Olson, F. J., Karlsson, H., Graham, R., Picco, G., ... Hansson, G. C. (2003). Recombinant MUC1 mucin with a breast cancer-like O-glycosylation produced in large amounts in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem J*, 376(Pt 3), 677–686.//doi.org/10.1042/bj20031130
- Bahabri, S. A., Suwairi, W. M., Laxer, R. M., Polinkovsky, A., Dalaan, A. A., & Warman, M. L. (1998). The camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome: Clinical features and genetic mapping to human chromosome 1. *Arthritis & Rheumatism*, 41(4), 730–735.//doi.org/10.1002/1529-0131(199804)41:4<730::AID-ART22>3.0.CO;2-Y
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 573–580.//doi.org/10.1093/nar/27.2.573
- Bosques, C. J., Collins, B. E., Meador, J. W., Sarvaiya, H., Murphy, J. L., DelloRusso, G., ... Venkataraman, G. (2010). Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins. *Nature Biotechnology*, 28(11), 1153–1156.//doi.org/10.1038/nbt1110-1153
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7297–7301.//doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297

【 0 2 8 8 】

- Brooks, S. A. (2004). Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use. *Molecular Biotechnology*, 28(3), 241–255.//doi.org/10.1385/MB:28:3:241
- Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 107–112.//doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.010
- de los Milagros Bassani Molinas, M., Beer, C., Hesse, F., Wirth, M., & Wagner, R. (2014). Optimizing the transient transfection process of HEK-293 suspension cells for protein production by nucleotide ratio monitoring. *Cytotechnology*, 66(3), 493–514.//doi.org/10.1007/s10616-013-9601-3 10
- Dhanisha, S. S., Guruvayoorappan, C., Drishya, S., & Abeesh, P. (2018). Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 122, 98–122.//doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.12.006
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6), 1110–1122.//doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266 20
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*, 30(2), E9.
- Elsaid, K. A., Fleming, B. C., Oksendahl, H. L., Machan, J. T., Fadale, P. D., Hulstyn, M. J., ... Jay, G. D. (2008). Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis & Rheumatism*, 58(6), 1707–1715.//doi.org/10.1002/art.23495
- Estrella, R. P., Whitelock, J. M., Packer, N. H., & Karlsson, N. G. (2010). The glycosylation of human synovial lubricin: implications for its role in inflammation. *Biochemical Journal*, 429(2), 359–367.//doi.org/10.1042/bj20100360 30
- Flannery, C. R., Zollner, R., Corcoran, C., Jones, A. R., Root, A., Rivera-Bermudez, M. A., ... Glasson, S. S. (2009). Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. *Arthritis Rheum*, 60(3), 840–847.//doi.org/10.1002/art.24304
- Gemayel, R., Vinces, M. D., Legendre, M., & Verstrepen, K. J. (2010). Variable Tandem Repeats Accelerate Evolution of Coding and Regulatory Sequences. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 445–477.//doi.org/10.1146/annurev-genet-072610-155046 40

[0 2 8 9]

- Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., & Varki, A. (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 28, 147–175.//doi.org/10.5661/bger-28-147
- Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., & Menon, B. B. (2014). Comparison of the Transmembrane Mucins MUC1 and MUC16 in Epithelial Barrier Function. *PLOS ONE*, 9(6), e100393.//doi.org/10.1371/journal.pone.0100393
- Gleghorn, J. P., & Bonassar, L. J. (2008). Lubrication mode analysis of articular cartilage using Stribeck surfaces. *J Biomech*, 41(9), 1910–1918.//doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.043 10
- Hang, H. C., & Bertozzi, C. R. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5021–5034.//doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.085
- Hattrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 431–457.//doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659
- Jones, A. R. C., Gleghorn, J. P., Hughes, C. E., Fitz, L. J., Zollner, R., Wainwright, S. D., ... Flannery, C. R. (2007). Binding and localization of recombinant lubricin to articular cartilage surfaces. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(3), 283–292.//doi.org/doi:10.1002/jor.20325 20
- Kosinska, M. K., Ludwig, T. E., Liebisch, G., Zhang, R., Siebert, H.-C., Wilhelm, J., ... Steinmeyer, J. (2015). Articular Joint Lubricants during Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Display Altered Levels and Molecular Species. *PLOS ONE*, 10(5), e0125192.//doi.org/10.1371/journal.pone.0125192
- Kosuri, S., & Church, G. M. (2014). Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nature Methods*, 11, 499.//doi.org/10.1038/nmeth.2918 30
- Kuo, J. C.-H., Gandhi, J. G., Zia, R. N., & Paszek, M. J. (2018). Physical biology of the cancer cell glycocalyx. *Nature Physics*, 14(7), 658–669.//doi.org/10.1038/s41567-018-0186-9
- Le Graverand-Gastineau, M. P. (2010). Disease modifying osteoarthritis drugs: facing development challenges and choosing molecular targets. *Curr Drug Targets*, 11(5), 528–535.//doi.org/10.2174/138945010791011893
- López Castel, A., Cleary, J. D., & Pearson, C. E. (2010). Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 165.//doi.org/10.1038/nrm2854 40

【 0 2 9 0 】

- Mantelli, F., & Argüeso, P. (2008). Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(5), 477–483.//doi.org/10.1097/ACI.0b013e32830e6b04
- Marcelino, J., Carpten, J. D., Suwairi, W. M., Gutierrez, O. M., Schwartz, S., Robbins, C., ... Warman, M. L. (1999). CACP, encoding a secreted proteoglycan, is mutated in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Nature Genetics*, 23, 319.//doi.org/10.1038/15496 10
- Mauris, J., & Argüeso, P. (2012). Mucins and Galectin-3 in Ocular Surface Health and Disease. In *Galectins and Disease Implications for Targeted Therapeutics* (Vol. 1115, pp. 409–414). American Chemical Society.//doi.org/10.1021/bk-2012-1115.ch025
- Nath, S., & Mukherjee, P. (2014). Muc1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6), 332–342.//doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.007
- Oren, M., Barela Hudgell, M. A., D'Allura, B., Agronin, J., Gross, A., Podini, D., & Smith, L. C. (2016). Short tandem repeats, segmental duplications, gene deletion, and genomic instability in a rapidly diversified immune gene family. *BMC Genomics*, 17, 900.//doi.org/10.1186/s12864-016-3241-x 20
- Pearson, C. E., Edamura, K. N., & Cleary, J. D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, 6, 729.//doi.org/10.1038/nrg1689
- Reesink, H. L., Bonnevie, E. D., Liu, S., Shurer, C. R., Hollander, M. J., Bonassar, L. J., & Nixon, A. J. (2016). Galectin-3 Binds to Lubricin and Reinforces the Lubricating Boundary Layer of Articular Cartilage. *Scientific Reports*, 6, 25463.//doi.org/10.1038/srep25463
- Rhee, D. K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., Smits, P., Lefebvre, V., ... Carpten, J. D. (2005). The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*, 115(3), 622–631.//doi.org/10.1172/jci22263 30
- Sansom, M. L., Morrison, S., Masala, N., Sullivan, B. D., Sullivan, D. A., Sheardown, H., & Schmidt, T. A. (2014). Characterization of full-length recombinant human Proteoglycan 4 as an ocular surface boundary lubricant. *Experimental Eye Research*, 127, 14–19.//doi.org/10.1016/j.exer.2014.06.015
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*.//doi.org/10.1038/nmeth.2019 40

[0 2 9 1]

- Schmidt, T. A., Sullivan, D. A., Knop, E., & et al. (2013). Transcription, translation, and function of lubricin, a boundary lubricant, at the ocular surface. *JAMA Ophthalmology*, 131(6), 766–776.//doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.2385
- Shurer, C. R., Colville, M. J., Gupta, V. K., Head, S. E., Kai, F., Lakins, J. N., & Paszek, M. J. (2018). Genetically Encoded Toolbox for Glycocalyx Engineering: Tunable Control of Cell Adhesion, Survival, and Cancer Cell Behaviors. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(2), 388–399.//doi.org/10.1021/acsbmaterials.7b00037
- Sonawane, N. D., Szoka Jr., F. C., & Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 278(45), 44826–44831.//doi.org/10.1074/jbc.M308643200
- Tang, N. C., & Chilkoti, A. (2016). Combinatorial codon scrambling enables scalable gene synthesis and amplification of repetitive proteins. *Nature Materials*, 15(4), 419–424.//doi.org/10.1038/nmat4521

10

【 0 2 9 2 】

20

第IV部

この第IV部は、とりわけ、グリコカリックスによる膜形状調節の物理的原理の説明を提供する。

この第IV部に関連して、細胞は、局所環境と相互作用するために、それらの細胞膜を高度に湾曲した形態に曲げることが知られているが、どのようにして形状生成が調節されるかは、完全には解明されていない。この第IV部では、細胞内部における形状生成過程と、細胞表面グリコカリックスの外部組織・組成との間の幅広い相乗作用について述べる。グリコカリックス内のムチンバイオポリマー及び長鎖多糖類は、細胞表面からの球状及び指状の伸長の突出に有利又は不利であるエントロピー力を生成し得る。グリコカリックスのポリマーブラシモデルは、膜形態に対するポリマーサイズ及び細胞表面密度の効果をうまく予測する。特定のグリコカリックス組成はまた、細胞膜の不安定性を誘導して、よりエキゾチックな波状及び真珠状の膜構造を生成し、そして細胞外小胞の分泌を駆動し得る。まとめると、この第IV部に示される結果は、湾曲膜の特徴(細胞間及び細胞外マトリクスとの多様な連絡様式において役立つ)を調節するグリコカリックスの基本的な役割を提案する。

30

【 0 2 9 3 】

第IV部 イントロダクション

細胞膜の管状及び球状の伸長は、ヒトの発達及び日常の細胞機能において、重要な役割を果たす。湾曲した膜突起は、分泌、吸収、及び受容体を介した情報伝達のために、細胞表面積を増加させることがこれまで認識されてきたが、現代の研究は、はるかに多様な機能性に関する説得力のある例を提供してきた(Marshall, 2012)。例えば、適応免疫系のT細胞は、高密度の管状微絨毛を生成して抗原提示細胞と結合し、このような構造は、遺伝子操作免疫細胞療法による腫瘍細胞の認識にも同様に重要である(D' Aloia et al., 2018; Jung et al., 2016)。膜突起はまた、広い範囲にわたって、そして組織中の正確な三次元位置で、細胞間の伝達を可能にする。発達の間、サイトネーム(cytoneme)と呼ばれる長く薄い膜突起は、「セNDER(sender)」細胞から特定の「レシーバー」細胞へのモルフォゲンの送達を、最大で40ミクロン先まで特定する(Bischoff et al., 2013; Kornberg and Roy, 2014)。幹細胞、免疫細胞、及び多くの他の細胞型はまた、それらの細胞膜を曲げて、球形の微小胞にし、これは、直接的に脱落し、そして長距離にわたって巨大分子の積み荷を送達できることが知られている(Tricarico et al., 2017)。さらに、湾

40

50

曲した膜特徴は、移動及びメカノトランスダクションを含む物理的細胞挙動において遍在する。例えば、小疱(ブレブ)と呼ばれる球状の膜膨張は、原始生殖細胞、腫瘍細胞、及び他の細胞型によって、突起のため及び遊走の間の組織マトリクスとの摩擦的結合のために生成される(Paluch and Raz, 2013)。

【0294】

膜形状生成過程の調節解除は、疾患進行に直接寄与し得る。注目すべき例として、侵襲性腫瘍細胞はしばしば、血管系における接着及びローリングのために、多数の微絨毛を伸長させる(Kramer and Nicolson, 1979; Liu et al., 2018)。侵襲性の腫瘍細胞も、アメーバ様遊走のために小疱を突出することができる(Bergert et al., 2015; Friedl and Wolf, 2010)。微小胞は、しばしば異常に高い速度で腫瘍細胞の細胞膜から出芽する(Antonyak et al., 2011; Becker et al., 2016)。これらの粒子によって運ばれる積荷(カーゴ)は、現在、間質における他の細胞型の再プログラミング、及びコロニー形成のための遠隔転移ニッチの調製を含む、多様な調節的役割を有することが認識されている(Becker et al., 2016)。

【0295】

細胞骨格力学に由来する力は、細胞表面上の多様な球状及び管状構造のための膜湾曲を生じると仮定される。重合する細胞骨格フィラメントは微絨毛、繊毛、フィロポディア(filopodia)及び他の指状突起の伸長のために、細胞膜に沿った別個の点で押し出されると推定される(Footer et al., 2007; Gupton and Gertler, 2007; Peskin et al., 1993)。細胞骨格の収縮は、小疱形成の間の膜の球状膨張のための静水圧を生成する(Charras et al., 2005)。細胞膜のサブ領域を微小胞に曲げる物理的動態は、まだよくわかっていない。しかし、アクチン細胞骨格がその生合成に関与しているという報告がある(Tricarico et al., 2017)。

【0296】

細胞表面グリコカリックスは、膜形状調節の標準モデルでは注目されないが、正常及び疾患状態の両方で、グリコカリックス組成と細胞表面形態との間に相関が多かった。正常な細胞生理機能では、ムチンとよばれるポリペプチドと糖の共重合体が、上皮の微絨毛(Hattrup and Gendler, 2008; Kesavan et al., 2009; Kesimer et al., 2013)、繊毛(Buttton et al., 2012)、フィロポディア(Bennett et al., 2001)の表面に高密度で固定されていることが多い；一方、ヒアルロン酸重合体は、卵母細胞と中皮の微絨毛を密に覆っている(Evanko et al., 2007; Makabe Sayoko et al., 2006)；及び、シアル酸とヒアルロン酸の長い鎖は、ニューロン軸索の高度に湾曲した表面を修飾している(Fowke et al., 2017; van den Pol and Kim, 1993; Zhang et al., 1992)。T細胞及び樹状細胞は、活性化又は成熟時に細胞表面ムチンを発現し、これはしばしば膜管形成及び微絨毛生成の劇的な変化と一致する(Agrawal et al., 1998; Cloosen et al., 2004; Jung et al., 2016; Pilon et al., 2009)。侵襲性腫瘍細胞はしばしば、それらの細胞表面上に多量のムチン及びヒアルロナンを産生し(Kufe, 2009; Turley et al., 2016)、そしてこれらのポリマーの発現は、広範な微絨毛のようなそれらの独特の膜特徴に逸話的に関連付けられている(Polefka et al., 1984)。ムチンとヒアルロン酸のポリマーは、高レベルの微小胞を分泌することが知られている腸細胞、反応性星状細胞、樹状細胞、腫瘍細胞の表面にも密に並んでいる(Cloosen et al., 2004, 2004; Gangoda et al.; McConnell et al., 2009; Paszek et al., 2014; Pelaseyed et al.; Tricarico et al., 2017)。これらの相関の遍在性は、グリコカリックスポリマー組成と原形質膜形態との間の因果関係の可能性を示唆するが、作用の特定のメカニズムは描写されていない。本開示は、この作用メカニズムの理解に寄与する。

【0297】

ムチン及び長鎖多糖類は、長いポリマー鎖又はループが細胞表面から伸びると予想されるような方法で、膜に固定されている(Hattrup and Gendler, 2008; Lee et al., 1993)。集団は、ブラシと呼ばれるポリマー物理学においてよく研究されている構造に似ており、ポリマーは一端が表面にグラフトされている(Chen et al., 2017)。密に密集したブラ

シにおける立体相互作用が、各ポリマーが探索できる分子配置の数を制限し、それによってエントロピーの減少を通して系の自由エネルギーを増加させることが、ポリマーブラシ理論によって長い間認識されてきた(de Gennes, 1980)。気体圧力の熱力学的基礎と同様に、分子密集に関連するエントロピーペナルティは、理論的には膜のような可撓性表面を変形させるのに十分な圧力を生成することができる(Hiergeist and Lipowsky, 1996; Lipowsky, 1995)。

【0298】

結果

グリコカリックスポリマー及び膜形態：

この第IV部では、グリコカリックスポリマーが、特定の膜形態の形成に有利に働くエントロピー曲げ力を生成するかどうかを分析した。この推論として、我々は、新生膜構造がグリコカリックスの合理的な操作によって調整され得るかどうかを試験した。

【0299】

これを試験するために、我々は、様々なサイズ、骨格配列、及び膜固定の天然、半合成、及び合理的に設計されたムチンポリマーについて、遺伝的にコードされたライブラリーを構築した(図33A及び36A)。各構築物は、O-グリコシル化のための高密度のセリン及びトレオニン部位を有する非構造化ポリペプチド骨格からなるムチンポリマードメインをコードした。細胞中で発現させる場合、ムチンドメインをO-結合糖側鎖で翻訳後修飾して、ムチンを定義するボトルブラシ分子構造を形成した(図38A、B)。

【0300】

ライブラリー中のポリマードメインは、ムチン-1の42の天然タンデムリピート(TR)(Muc1-42TR)、ポドカリキシンのセリン及びトレオニンリッチポリマードメイン(Podxl; S/T-Rich)、及びムチンO-グリコシル化配列のコンセンサス PPAST SAPGAに基づく80の完全反復のタンデム融合によって合理的に設計及び構築した新規合成ムチン(Rational)を含んでいた(図33A及び図38A)。それぞれのポリマー領域を、細胞質側末端を欠失させた天然のMuc1膜貫通アンカー(Δ CT)、又は21アミノ酸合成膜貫通アンカー(TM21)、又は画像化のための膜近位緑色蛍光タンパク質を有する天然のムチンアンカー(GFP- Δ CT)に融合させた(図33A及び図38A)。

【0301】

上皮細胞表面上で発現され、高レベルに集合する場合、我々のライブラリー中の各ムチンポリマーは、走査型電子顕微鏡(SEM)によって観察されるように、細胞膜の劇的な管状化を誘発した(図33B、C及び図38B)。いかなる特定の理論にも束縛されることを意図するものではないが、我々は、この管状化が細胞膜へのポリマー固定の一般的な結果であり、特異的なバイオポリマー配列又は膜貫通アンカーを必要としないと結論付けた。特に、Muc1-42TR Δ CTは、細胞質側末端を除いて天然のムチン-1と同一であり、これは、我々の合理的に設計されたポリマーに加えて、天然のグリコカリックス成分が、細胞膜形態に影響を及ぼすことができることを示している。ムチン発現は、エンドサイトーシスに有意な影響を及ぼさず、脂質リサイクリング、及び、形態学的変化の一次機構として膜張力の調節と相反していた(図38C、D)。

【0302】

ポリマーが中程度から高密度で細胞表面上に発現されるならば、管状化現象は、ムチンポリマードメインの長さに比較的非感受性であった。0、10、又は42個のMuc1反復のためのcDNAを、GFPタグ化膜貫通アンカーと融合させて、それぞれ0、65、及び270nmの予想される輪郭長さを有する細胞表面ムチンをコードした(図33D及び図38E)。構築物を発現する細胞株を、細胞表面GFPをプローブしたナノボディを用いて、類似のムチン表面密度を有する集団に選別した(図33D)。可撓性ポリマードメインは効率的な膜管状化に必要であり、10-及び42-TRムチンは、それらのサイズ差にもかかわらず、同等のレベルの膜管状化を誘導した(図33E及び図38F)。同様の広がり面積の細胞を比較して、膜表面張力の変化及び細胞広がりに関連する他の効果が、形態学的相違点を説明し得る可能性を除外した(図33E)。

【0303】

ムチンと同様に、大型で線状の多糖における豊富なグリコカリックスも、細胞膜形態の劇的な変化の引き金となり得ることを見出した。特に、ヒアルロン酸シンターゼ3(HAS3)発現は、細胞表面上の高分子量ヒアルロン酸(HA)ポリマーの密度を増加させ、他者による以前の観察(Koistinen et al., 2015)と一致して、多くの指状の膜延長部の突起をもたらした(図36A~D)。まとめると、これらの結果は、多様なグリコカリックスポリマーのタイプとサイズが、細胞形態学的状態に影響する可能性を示唆した。

【0304】

次に、グリコカリックスバイオポリマーが、細胞内機構とは無関係に、モデル膜に自発的湾曲を誘導できるかどうかを試験した。巨大単層ベシクル(GUV)の表面に固定されると、Podx1のS/Tリッチポリマードメインが、球状及び管状膜構造の自発的生成を誘発することを見出した(図33F及び図37A、B)。細管はまた、非常に高い密度の折り畳まれたタンパク質、ヒト血清アルブミン(HSA)にて観察され、折り畳まれた又は内因性に無秩序なタンパク質の広範な密集が、GUVにおける自発的膜湾曲を誘発し得るという以前の知見(Stachowiak et al., 2010)と一致した(図33F及び図37B、C)。しかし、自発的な管状化を誘導するために必要な表面密度は、HSAと比較して、Podxlムチンでは有意に低かった(図33F及び図37B)。

【0305】

生体内における特殊化した細胞：

in vitroでのこれらの観察に動機付けられて、我々は、グリコカリックスポリマーが、in vivoで特殊化した細胞型の形態を形成する際に役割を果たし得るかどうかを検討した。これらの分泌細胞が関節潤滑のために大量のHAを産生することが知られており、従って、それらの表面上に高密度のHAポリマーを示すことが期待されるので、滑膜細胞を評価することにした。我々は、ウマ手関節から滑膜組織を単離し(図34A)、HAS3を発現する一次滑膜細胞は高度に管状化しているが、HAを分解するヒアルロニダーゼ(HyA)で処理すると、膜細管が急速に不安定化・消失することを見出した(図34B、C)。また、新たに抽出し、ex vivoで短時間(<1時間)培養した組織における滑膜細胞の形態を評価した。天然の滑膜組織の滑膜細胞は、高度に管状化し、組織マトリクスから突出したHAに富む頭部を示した(図34D、E)。HyAのex vivoによる組織の短時間処理は、滑膜細胞細管の劇的な退縮をもたらし、in vivoでの膜突起の維持におけるグリコカリックスの役割を示唆した(図34E)。

【0306】

ポリマーブラシのフレームワーク：

ポリマーブラシ理論のフレームワークを通して、観察された膜形状とその頻度が合理化できるかどうかを考察した。我々は、2つの限界レジームが、末端グラフトポリマーのポリマー物理学において古典的に記載されていることに注目した：「マッシュルूम」様レジーム(ここで、低いグラフト密度のポリマーは互いに限定された相互作用を有する)、及び「ブラシ」様レジーム(ここで、密集したポリマーは、互いに立体的に及び静電的に相互作用して、より大きな圧力をアンカー表面に及ぼし得る)(Milner, 1991)(図38A)。ムチンについて、我々は、ポリマー間の平均距離が、溶液中でのそれらの旋回半径の約2倍である表面密度で、マッシュルूम様からブラシ様レジームへの移行が起こると想した(図38A)。

【0307】

個々のムチンの旋回半径及び柔軟性を測定するために、膜貫通アンカーの代わりに末端精製タグを有する組換えMuc1-42TRを作製した(図41A~C)。多角光散乱に連結されたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-MALS)は、生理学的緩衝液中のムチン旋回半径について32nm±0.4%を報告した。推定された約270nmのMuc1-42TR輪郭長さに基づいて、いかなる特定の理論にも束縛されることを意図することなく、我々は、ムチンが約7.5nmの持続的な長さを有すると結論付け、溶液中の半可撓性ポリマーについて予想される拡張ランダムコイル構成を採用した。

【0308】

次に、ポリマーブラシ理論が、細胞表面上のムチン集合体の物理的挙動を説明できるかどうかを試験した。我々は、ムチンが次第に密集するにつれて、ムチンが予測可能な様式で伸びて広がるかどうかを試験したが、これはポリマーブラシに関する影響力の大きい理論において、Alexander及びGennesによって最初に記載された特徴的な物理的挙動である(Alexander, 1977; Milner, 1991)。我々は、微絨毛に似たアクチン含有細管でムチン伸長を評価することを選択したが、その理由はこれらの構造の曲率が高度に均一であり、ムチン表面密度とは本質的に無関係であったからである(図41D)。このように、古典的な理論と直接比較するために、細管表面を固定された半径の剛質円筒に近づけることができた。ムチンポリマードメインに隣接する相補的エピトープタグを有するMuc1-42TRのcDNAを構築した。細胞発現に続いて、コードされたタグをフルオロフォア結合プローブで標識し、膨張顕微鏡法(ExM)と呼ばれる超解像光学技術を用いて微絨毛断面上で解像した(図35B及び図41E)。我々は、ムチン伸長が、 0.48 ± 0.10 の指数で、蛍光強度、ゆえに表面密度に対して指数関数的依存性を有すること、又はそれらにより「スケーリングされる」ことを見出した(図35B)。この値は、生理的塩濃度で剛質円筒表面上にグラフトされた高分子電解質について、 $0.33 \sim 0.5$ の理論的に導き出されたべき法則指数とよく比較された(Zhulina and Borisov, 1996)。

【0309】

細胞膜上に集合したムチンリッチグリコカリックスの物理的挙動を記述するために、ポリマーブラシモデルを作成した。ムチンブラシによって寄与されるエントロピー圧力は、ポリマー密度で強くスケーリングされ、ポリマー鎖長で弱くスケーリングされる自発的な膜湾曲を生成した(Hiergeist and Lipowsky, 1996)(図35C及び図42)。ポリマー長への弱い依存性は、10及び42反復を有するムチンが、それらのサイズが4倍違うにもかかわらず、細胞表面形態に同等の影響を及ぼすという知見と一致した(図33E及び38F)。これらの2つのムチンについて、我々のブラシモデルは、自発的な膜湾曲の誘導においてわずか $\sim 20\%$ の相違点を予測した(図42)。

【0310】

好ましい膜形状：

ポリマーモデルが細胞表面からの指状及び球状突起の頻度を説明できるかどうかを試験した。我々は、突起を伸長又は維持するために高い細胞内力が必要とされる場合には、特定の膜特徴の突起が好ましくなく、これらの力の要求が最小である場合には好ましいと推論した。誘導された自然湾曲を有する膜についての標準的なHelfrich自由エネルギー関数を最小化して、球状膜小泡を維持するために必要とされる平衡細胞質ゾル圧力、及び膜細管を維持するために必要とされる点力を計算した(図36D)。実験的比較のために、ムチン細胞表面密度の関数として細胞膜特徴のタイプ、サイズ、及び頻度を評価した。Muc1-42TR GFPを発現する細胞を、抗GFPナノボディで標識し、様々なムチン表面レベルの集団に分類した(図36A)。各集団における平均ムチン表面密度を、ナノボディ標準曲線を用いた補間によるSDS-PAGEによって推定した(図43)。選別された集団における分子表面密度は、 $180 \sim 50,000$ ムチン/ μm^2 の範囲であった。参考までに、溶液中の組換えMuc1-42TRの測定旋回半径に基づいて、マッシュルームからブラシへの移行が約250 ムチン/ μm^2 で起こると予想した。

【0311】

最初に、膜小泡を評価した。Muc1-42TRについて測定した物理的パラメータを用いて、典型的な半径250nmの小泡を維持するために必要な圧力は、マッシュルーム-ブラシ移行付近の中程度のムチン密度において最小であると予測した(図35D)。意外なモデル予測は、必要とされる維持圧力がより高いムチン密度で急激に上昇し、細胞の収縮機構の既知の限界を超える圧力に、迅速に到達することであった(Charras et al., 2008)。したがって、理論は、高密度グリコカリックスによって小泡形成が抑制されることを示唆した(図35D)。我々の実験的観察は、これらの予測と良好な定性的一致を示した。推定されたマッシュルーム-ブラシ移行付近のムチン密度を有する細胞は、 260 ± 100 nmの平均半径を

有する有意な数の大きな小疱様形態を示した(図3 6 B~D; $180 \mu\text{m}^2$)。ブラシ様レジームへクロスオーバーすると、小疱頻度は急激に減少し、必要な小疱維持圧力の二次上昇のモデル予測と一致した(図3 6 B、D)。

【0312】

グリコカリックスポリマーモデルは、細管突出のムチン密度への大きく異なる依存性を予測した。伸長された細管を維持するために必要とされる予測点力は、ムチンの密度が高くなると漸進的に減少し、鋭い遷移を示さなかった(図3 5 D)。従って、我々の選別細胞集団において観察された細胞表面細管の頻度は、細胞が非常に高いムチン密度にて管で完全に飽和されるまで、マッシュルーム及びブラシ様レジームを通してムチン密度の増加と共に着実に増加した(図3 5 B~E)。特に、理論は、これらの高密度では細管延伸に必要な力が、単一の細胞骨格フィラメントの重合力($\sim 1\text{pN}$)に匹敵することを予測した(Footer et al., 2007)。実験的に測定されたムチン密度に基づいて、我々は、細管を維持するために必要とされる理論的な点力 f を推定した。注目すべきことに、実験的に観測された管頻度は、理論的な点力とほぼ完全な逆相関を有していた(図3 6 F)。管密度と $1/f$ との間の関係を記述するPearsonの相関係数は、0.97であった。

【0313】

ポリマーモデルはまた、高いムチン表面密度によって生成された自発的曲率が、細胞表面上で観察された指状突起の曲率を超えることを予測した。我々は、我々の細胞上の管状膜突起が、典型的にフィラメント状アクチン(F-アクチン)コアを含み、微小管を含まないことに注目した(図3 7 A、B、図4 4 A~D)。薬剤ラトランクリンA(LatA)によるF-アクチンアセンブリの破壊は、約30nmの細管直径の減少をもたらした(図3 7 C、D及び図4 4 E、F)、ムチン誘発自然湾曲が、安定なアクチン充填突起の湾曲を超えたことを示した。LatA処理細胞の我々の測定値は、SEM試料調製全体を通して保存することが困難であった非常に薄く繊細な膜細管を排除した可能性が高いことに留意すべきである。それにもかかわらず、これらの結果は、グリコカリックスによって生成される自発的湾曲が、約100~200nmの特徴的な直径を有する細い指状突起(微小管、繊毛、フィロポディア、軸索、及びサイトネームなど)の湾曲要求を満たすか、又は超えることができることを明確に示した。

【0314】

膜不安定性と細胞外小胞生成：

次に、グリコカリックスの作用を介して、他の機能的膜形状を生成できるかどうかを考察した。我々は、自発的湾曲の漸進的増加が、膜小胞の膜不安定性と形態学的変化の引き金となることが知られていることに注目した(Campelo and Hernandez-Machado, 2007; Tsafrir et al., 2001)。したがって、生理学的にムチンの自然湾曲に抵抗するF-アクチンコアが破壊された場合、膜不安定性が生じる可能性があるかと推論した。実際、我々のモデルは、 $\sim 400 \mu\text{m}^2$ 又はそれ以上であれば、細管の不安定さを駆動するのに充分であることを示唆している。従って、我々は、LatA処理が、膜不安定性の特徴である真珠状及び波状構造の形成を誘発したことを観察した(図3 7 D)。

【0315】

Deuling、Helfrichなどは、体積-対-面積比「 λ 」を有する膜細管における不安定性を理論的に考慮して、特定の自発的曲率「 C_0 」について、膜曲げエネルギーが、以下の3つの「Delaunay」形状のうちの1つの採用によって消失することを見出した； $C_0=1/2\lambda$ での円筒形状(形状1)、 $1/2\lambda < C_0 < 2/3\lambda$ でのスムーズに変化する一連のアンデュロイド(unduloid)形状(形状2)、 $C_0=2/3\lambda$ での一連の等サイズの真珠形状(形状3)(Campelo and Hernandez-Machado, 2007; Tsafrir et al., 2001)。 $2/3\lambda$ を超える自然曲率について、体積及び表面積の制約を満たす最低エネルギー形状は、過剰体積を保持するのに必要な1つ以上の大きな真珠を有する好ましい曲率の小さな真珠のセット(形状4)、及びサイズの勾配を有する真珠のセット(形状5)を含むことが見出された(Campelo and Hernandez-Machado, 2007; Tsafrir et al., 2001)。我々は、最小エネルギー表面、形状1~5が、外因性処置なしで中程度から高レベルのムチンを発現する細胞上に形成されるか

どうかを評価し、そして各予想形状の一般的な例を見出した(図37E)。これらの形状の観察は、膜不安定性がグリコカリックスの特定の組成によって駆動され得るという説得力のある議論を提供した。

【0316】

我々は注目すべきことに、膜の真珠化が、細胞膜からの細胞外小胞の直接分泌への中間段階であることを発見した(図37F)。対照と比較して、Muc1-42TR発現細胞からの馴化培地は、約100nm~400nmのサイズにわたる粒子を非常に高濃度で含み(図5G)、これは微小胞(マイクロベシクル)に特有である(Pol et al., 2016)。粒子生成は、表面突起をサポートするF-アクチンコアを破壊し、細胞膜を局所的に不安定化するためのLatA処理によってさらに増強された(図37H)。低温透過型電子顕微鏡(cryo-TEM)により、分泌された粒子が実際に膜小胞であり、それらの表面上に、はっきりとしたグリコカリックス超微細構造がグラフトされていることを確認した(図37I)。これらの観察は、腸細胞及び他のムチン発現細胞における、微絨毛からの小胞生成に関する従前の報告と一致する(McConnell et al., 2009)。しかし、いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、我々の結果は、微小胞形成に関する可能性のある3段階メカニズムを示唆する：(1) 細胞骨格フィラメントが、グリコカリックス依存性に、細胞膜から長く細い突起を伸ばして安定化するのに役立つ、(2) 細胞骨格コアの分解に続いて、グリコカリックスによって強い自発的湾曲が、細管の膜不安定性を誘導する、(3) 膜の真珠形状がくびり切れて、小胞を放出する(図37E、F)。

【0317】

考察

この第IV部で紹介した記述は、エントロピー機構(それを通じてグリコカリックスが多様な細胞膜の形状や突起の好ましさに強く影響する)を暗示する。グリコカリックスによって調節される形態学的変化は、原則として、吸収や分泌から、細胞間の情報伝達、シグナル伝達、運動性に至るまで、膜のプロセスに広い影響を及ぼす可能性がある(Lange, 2011; Paluch and Raz, 2013; Sauvanet et al., 2015; Schmick and Bastiaens, 2014)。グリコシル化が劇的に、及び、細胞の運命の遷移と提携して変化すること(Buck et al., 1971; Freeze, 2013; Satomaa et al., 2009)、及びグリコカリックスポリマーを構築するためのモノマーのプールが、特定の代謝プログラムと密接に関連していることを考えると(Dennis et al., 2009; Koistinen et al., 2015; Ying et al., 2012)、この第IV部は、グリコカリックスが、物理的形態を特定の細胞状態に関連付ける導管として役立ち得るという興味深い可能性を提起する。

【0318】

膜形状調節を理解するための現代のフレームワークは、主としてグリコカリックスの物理的記述を欠いている。しかしながら、グリコカリックス中の長鎖バイオポリマーは、湾曲した膜特徴及び細胞表面オルガネラの表面に固定されていることがほぼ普遍的に見出されている(Bennett et al., 2001; Button et al., 2012; Evanko et al., 2007; Fowke et al., 2017; Hatstrup and Gendler, 2008; Kesavan et al., 2009; Kesimer et al., 2013; Makabe Sayoko et al., 2006; van den Pol and Kim, 1993; Zhang et al., 1992)。この第IV部の結果は、少なくとも第一の近似として、ポリマー物理学の原理及び理論が、グリコカリックスによる膜形状生成の物理的調節を理解するために採用され得ることを示唆する。末端固定されたポリマーマッシュルーム及びポリマーブラシのモデルは、グリコカリックスの単純な物理的表現である。実際のグリコカリックス構造は、架橋、絡み合い、及び分子不均一性の追加の階層を含むことができる(Tammi et al., 2002)。しかしながら、グリコカリックスの比較的単純なモデルを用いて推定されるように、膜伸長のための力要件と、これらの伸長について実験的に観察された頻度との間のほぼ完全な逆の関係は、グリコカリックスの物理的挙動の少なくともいくつかは、ポリマーネットワークモデルを用いて捕捉され得ることを主張する。実際、我々は、ポリマーブラシのためにGennesらが開発した古典的なスケーリング法則(Gennes, 1979; Zhulina and Borisov, 1996)に従って、グリコカリックスポリマー伸長が、細胞表面密度と相関することを

見出した。

【0319】

グリコカリックス及び細胞内の形状生成プロセスが、膜突出を制御するために空間及び時間においてどのように協調するかは、完全には解明されていない。特に、GTPaseのRhoファミリーは、細胞骨格動態及び細胞表面形態の主要調節因子である(Hall, 1998)。この第IV部の記載は、膜の屈曲に対する障壁を調節することによって、グリコカリックスが、特定のタイプの球形状又は管形状(Rho GTPaseによる調節を受ける)への膨張のために膜を刺激することを示唆する。この統合された見解は、正常な細胞表面形態の攪乱が、細胞内形状生成プロセス、グリコカリックスポリマーのアセンブリ、又はその両方の調節解除によって達成され得ることを示唆する。例えば、Rho GTPaseシグナル伝達、細胞骨格の動態、及びグリコカリックスアセンブリの調節解除は全て、がん細胞の共通の特徴であり(Paszek et al., 2014; Pinho and Reis, 2015; Porter et al., 2016; Yamaguchi and Condeelis, 2007)、それぞれ、転移性がん細胞の致死性に寄与する独特の細胞表面動態に寄与している可能性がある。

10

【0320】

固定されたポリマーによる表面の曲げは、一般的な物理的現象である。従って、グリコカリックスによる膜形状調節は、全ての細胞型に関連する普遍的な特徴であり得る。今後の努力によって、繊毛、軸索、サイトネーム、微絨毛など、特定の膜オルガネラやシグナル伝達構造の発生におけるグリコカリックスの物理的機能が解明されるかもしれない。それにもかかわらず、この第IV部の記述は、細胞膜の細胞内面と細胞外面の両方にかかる力の考察を含む、より全体的な膜形状調節のモデルを支持している。

20

【0321】

方法

抗体及び試薬

以下の抗体を使用した：FITC-ヒトCD227(Muc1)(559774, BD Biosciences)、ヒトCD227(555925, BD Biosciences)(Muc1)、Alexa Flour 488ヒトポドカリキシン(222328, R&D Systems)、アクチン(sc1615, Santa Cruz)、GFP(4B10, 2955S, Cell Signaling)、6xHis(9000012, BD Biosciences)、ヤギ抗-マウスIgG-HRP(sc-2005, Santa Cruz)、マウス抗-ヤギIgG-HRP(sc-2354, Santa Cruz)

レクチンは以下のものを使用した：ビオチン化ピーナッツ凝集素(PNA; B-1075, Vector Laboratories)、CF568 PNA(29061, Biotium)、CF640R PNA(29063, Biotium)、CF633コムギ胚芽凝集素(WGA; 29024, Biotium)

30

ビオチン化レクチンは、ExtrAvidin-Peroxidase(E2886, Sigma)を使用して検出した。ヒアルロン酸は、蛍光標識により、又はビオチン化ウシ鼻ヒアルロン酸結合タンパク質(HABP; Millipore)を用いてプロット中でプローブした。ビオチン-HABPは、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(HRP-streptavidin; R&D Systems)で検出した。HA ELISAのために、DuoSet Hyaluronanキットを、R&D Systemsから入手した。アクチン脱重合は、ラトランクリンA(LatA; 76343-93-6; Cayman Chemicals)による処理を通じて誘発した。

【0322】

40

巨大単層ベシクル(GUV)の形成のために、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-((N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノニ酢酸)スクシニル)のニッケル塩(DOGS-NTA-Ni)を、Avanti Polar Lipidsから購入した；2-(4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-ペンタノイル)-1-ヘキサデカノイル-sn-グリセロ-2-ホスホコリン(Bodipy-PC)は、Invitrogenから購入した。His標識組換えヒトポドカリキシン(Ser23-Arg427;受入番号AAB61574.1)は、R&D Systemsから購入した；ヒト-タグ化ヒト血清アルブミン(受入番号 NP_000468)は、ACROBiosystemsから購入した。

【0323】

GFP結合タンパク質(ナノボディ)は、Chromotekから入手した。Alexa Fluor 488、A

50

lexa Fluor 568、及びAlexa Fluor 647のNHS-エステルは、Invitrogenから入手した。走査型電子顕微鏡(SEM)のための、電子顕微鏡グレードの16%パラホルムアルデヒド、10%グルタルアルデヒド、及び2%OsO₄は、Electron Microscopy Sciencesから入手した。

【0324】

クローニング及び構築物

42タンデムリピートを有する細胞質尾部欠失ヒトMuc1(Muc1-42TRΔCT)、TM21合成膜ドメインとのMuc1-42TRポリマードメイン融合物(Muc1-42TR TM21)、細胞質尾部欠失ヒトポドカリキシン(S/T-RichΔCT)のためのcDNAを作製し、テトラサイクリン誘導性PiggyBac発現ベクター(pPB TetOn Puro)又は哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に、既報のようにクローニングした(Paszek et al., 2014; Shurer et al.)。レンチウイルスベクターpLV Hygro TetOn HAS3を作製するために、ヒトHAS3(受入: NP_005320)のcDNAを、R&D Systemsから入手し、PCR法により増幅した: 使用した順方向プライマー; 5'-GGCACCTCGAGGATGCCGGTGCAGCTGACGACA-3' (配列番号88)、及び逆方向プライマー; 5'-GGCAGAATTCTTACACCTCAGCAAAAGCCAAGCT-3' (配列番号89)。PCR産物を製造業者のプロトコルに従ってpJET1.2(Thermo Fisher)にクローニングし、pLV Hygro TetOnのAbaI及びEcoRI部位にサブクローニングした(Paszek et al., 2012)。様々な数のタンデムリピートを有するpPB Muc1 GFP ΔCT TetOn Puroの生成のために、mOxGFP(Addgene #68070; ここではmOxGFPをGFPと称する)のcDNAをプライマーで増幅した: 5'-GGCAGCTCAGCTATGGTGTCCAAGGGCGAGGAGCTGT-3' ((配列番号90)順方向)、及び、5'-GGCAGCTGAGCCCTTATACAGCTCGTCCATGCCGTGAGT-3' ((配列番号91)逆方向)。PCR産物をpJET1.2にクローニングし、pPB Muc1-42TRΔCT TetOn PuroのBlnI部位に非方向的にサブクローニングした。10及び42の天然タンデムリピート(PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA(配列番号8))を有する構築物について、所望の反復単位のための合成cDNAを、カスタム遺伝子合成(General Biosystems)を通して生成し、そしてBamHI及びBsu36I制限酵素部位を使用して、pPB Muc1 GFP ΔCT TetOn Puro中のタンデムリピートの代わりにクローニングした。5'-TGGAGGAGCCTCAGGCATACTTTATTG-3' ((配列番号92)順方向)、及び、5'-CCACCGCCGACCGAGGTGACATCCTG-3' ((配列番号93)逆方向)プライマーを用いたQ5部位特異的変異誘発を通してMuc1タンデムリピートを欠失させ、pPB Muc1 0TR GFP ΔCT TetOn Puroを作製した。Muc1-42TR GFP ΔCTのN末端にSumoStarタグを付加するために、IgGカップリーダー配列、SumoStarタグ、及びMuc1 N末端をコードするcDNAを、カスタム遺伝子合成(General Biosystems)を通して生成し、BamHI及びBsrGI制限酵素部位を用いてpPB Muc1 GFP TetOn Puro中のMuc1 N末端の代わりに挿入した。ムチンポリマードメインの組換え産生のために、Muc1からの42タンデムリピートを、N末端S6タグ(GDSLWLLRLLN)及びC末端10x-ヒスチジン精製タグに融合させて、Muc1-42TR 10X Hisを作製した。S6タグを挿入するために、pPB Muc1-42TRΔCT TetOn PuroからのMuc1 N末端をBamHIとBglII部位との間の含むpcDNA3.1プラスミドにQ5部位特異的変異誘発を行った; 5'-GTTGCGACTGCTTAACGGACAGATCTCGATGGTGAGC-3' ((配列番号94)順方向)、及び5'-AGCCAGCTCAGGGAATCCCCAGCATTCTTCTCAGTAGAG-3' ((配列番号95)逆方向)を使用。続いて、S6タグはこれらの部位で切断され、pPB Muc1-42TRΔCT TetOn Puro中のMuc1-42TRΔCT N末端に置換された。オリゴ、5'-TCAGGCCACCACCACCATCACCATCATCACCATTAGGG-3' (配列番号96)、及び3'-CCGGTGGTGGTGGTAGTGGTAGTAGTGGTGGTAATCCCTTAA-5' (配列番号97)をアニーリングし、Bsu36I及びEcoRI制限酵素部位を用いてpPB Muc1-42TRΔCT TetOn Puro中のMuc1-42TRΔCTのC末端の代わりに挿入することによって、10x-ヒスチジンタグを付加した。

【0325】

細胞株及び培養

MCF10A及びHEK293T細胞をATCCから入手した。MCF10A細胞を、5%ウマ血清、20ng/mL EGF、10μg/mLインスリン、500ng/mLヒドロコルチゾン、100ng/mLコレ

ラ毒素及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM/F12培地中で培養した。HE K293T細胞を、10%ウシ胎児血清及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM 高グルコース中で培養した。ウマ滑膜細胞を、40mM HEPES、4mM L-グルタミン、110mg/Lピルビン酸ナトリウム、10%ウシ胎児血清及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充した低グルコース(1.0g/L)DMEM培地中で培養した。3~4日ごとに滑膜細胞の継代培養を行った。すべての接着細胞は、37℃、5%CO₂、及び90%RHで維持した。懸濁液適合293F細胞をThermo Fisherから入手し(R79007)、製造者のプロトコルに従って、37℃、8%CO₂、120rpm、及び80%RHにて、スピナーフラスコ中のFreestyle 293F発現培地(Thermo Fisher, 12338018)中で維持した。既報のように(Paszek et al., 2012)、pLV rtTA-NeoR遺伝子を用いたレンチウイルス形質導入により、安定なMCF10A、一次ウマ滑膜細胞、及び293F細胞(rtTA-M2テトラサイクリントランスアクチベーターを発現する)を作製した。ムチン発現細胞株の調製のために、ITR隣接発現カセットを有するプラスミド(すなわち、PiggyBacベクター)を、PiggyBac高活性トランスポザーゼと同時トランスフェクトし(Nucleofection Kit V(Lonza)又はFreeStyle Max試薬(Thermo Fisher)を製造業者のプロトコルに従って使用)、そして1 µg/mlのピューロマイシン又は200 µg/mlのハイグロマイシンで選択した。

【0326】

ウマ滑膜組織切除及び一次滑膜細胞単離

一次ウマ滑膜細胞を、一歳のウマ(Equus caballus)の肩関節、後膝関節、手根関節、足根関節及び蹴爪関節から得た。線維芽細胞様B型滑膜細胞(滑膜細胞)を単離するために、滑膜組織を、0.015%DNase I(Roche, Indianapolis, IN)を補充した0.15%コラゲナーゼ(Worthington Biochemical, Lakewood, NJ)で、Ham's F12培地中37℃で3時間消化し、続いて、濾過し、250x gで10分間遠心分離した(Saxer et al., 2001で既報のように)。

【0327】

新たに切除した滑膜組織を、1U/mLヒアルロニダーゼ(Sigma)を含む又は含まないHam's F12培地中で30分間インキュベートして固定するか、又はPBS中の4%パラホルムアルデヒド及び1%グルタルアルデヒドで直ちに24時間固定した。次いで、組織を、SEMのために処理するか、又は氷上で20分間、0.1mg/mLのNaBH₄で還元し、共焦点画像化のためにさらに処理した。

【0328】

走査電子顕微鏡(SEM)及び分析

すべての試料を、PBS中の4%パラホルムアルデヒド及び1%グルタルアルデヒドで24時間固定し、dH₂O中の1%四酸化オスミウムで45分間、後固定し、洗浄し、続いて25%、50%、70%、95%、100%のエタノール中で段階的に脱水した後、臨界点乾燥機(CPD 030, Bal-Tec)中で乾燥した。試料を、Desk Vスパッタシステム(Denton Vacuum)により金-パラジウム被覆し、電界放出型走査電子顕微鏡(Mira3 FE-SEM, Tescan、あるいはFE-SEM LEO 1550, Carl Zeiss Inc.)で画像化した。アクチン解重合研究のために、固定の前に、細胞を10 µMのLatAで60分間処理した(示されている場合)。

【0329】

細胞の管密度、直径、及び長さをImageJ Fijiで分析した(Schindelin et al., 2012)。面積当たりの管密度の定量化のために、~2 µm×2 µmの関心領域を描き、包囲された管を手動で計数した。管直径は、その中間点で管断面を通してひずみ線を引いて測定した。ImageJ線分ツールを用いて、目視検査によって識別して、画像面にほぼ平行に延びる管について管長さを測定した。

【0330】

細胞及び組織の共焦点顕微鏡検査

細胞を5,000細胞/cm²で蒔き、続いて0.2 µg/mLのドキシサイクリンで24時間誘導した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。抗体を5%正常ヤギ血清PBSで1:200に希釈し、4℃で一晩インキュベートした。レクチンを5%正常ヤギ血清PBSで1 µg/mLに希釈

10

20

30

40

50

し、室温で2時間インキュベートした。細胞及び組織のヒアルロン酸染色のために、HABPを、PBS中の0.5%正常ヤギ血清で0.125 µg/mlに希釈し、そして試料を24時間インキュベートした。細胞試料を、40x水浸対物レンズ(NA 1.1)を用いてZeiss LSM倒立880共焦点顕微鏡で画像化した。HABPに加えてNaBH₄処理した組織を、1 µg/mLヘキストで10分間染色し、40x水浸対物レンズを有するZeiss 880直立共焦点顕微鏡で画像化した。染色されていない組織コラーゲンを、ノンデスキャン検出器を用いて第二高調波発生で可視化した。

【0331】

免疫及びレクチンブロット解析

細胞を2万細胞/cm²で蒔き、0.2 µg/mLドキシサイクリンで24時間誘導した後、Tris-Triton溶解緩衝液(Abcam)で溶解した。溶解物を、Nupage 4~12%のBis-Tris又は3~8%のTris-Acetateゲル(Thermo Fisher)上で分離し、PVDF膜に移した。一次抗体を1:1000に希釈し、レクチンを3%BSA TBSTで1 µg/mLに希釈し、室温で4時間又は4℃で一晩インキュベートした。二次抗体又はExtrAvidinを、3%BSA TBSTで1:2000に希釈し、室温で2時間インキュベートした。ブロットをClarity ECL(BioRad)基質中で現像し、ChemiDoc(BioRad)文書化システムで画像化し、ImageJ Fijiで定量した(Schindelin et al., 2012)。

【0332】

フローサイトメトリー

細胞を2万細胞/cm²で蒔き、24時間増殖させた。次に、細胞を0.2 µg/mLのドキシサイクリンで24時間誘導した。接着細胞を、PBS中の1mM EGTAと共に37℃で20分間インキュベートすることによって非酵素的に剥離し、存在する場合には浮遊細胞の集団に添加した。抗体を1:200に希釈し、レクチンを0.5%BSA PBSで1 µg/mLに希釈し、4℃で30分間細胞と共にインキュベートした。BD Accuri C6フローサイトメーターを分析に使用した。

【0333】

HA合成及び分子サイズの分析

対照及びレンチウイルス形質導入MCF10A及び一次ウマ滑膜細胞を蒔き、0.2 µg/mLのドキシサイクリンで24時間誘導した。細胞培養培地中に分泌されたHAの総レベルを、 DuoSet Hyaluronan ELISAキットを介して、製造業者のプロトコルに従って測定した。簡単に述べると、96ウェルマイクロプレートを組み換えヒトアグリカンでコーティングした。細胞培養培地中のHAを、コーティングされたアグリカンによって捕捉し、ビオチン-HABP/HRP-ストレプトアビジンで検出した。HA濃度は、*S. pyogenes* HA標準(R&D Systems)を用いて測定した。ゲル電気泳動のためにポリアクリルアミドの代わりにアガロースを使用した。本質的に既報のように(Yuan et al., 2013)、電気泳動及びブロット分析によってHA分子量を解析した。簡単に述べると、HAを含有する細胞培養培地を、TBE緩衝液中の0.6%アガロースゲルにロードした。電気泳動後、試料をHyBond N+膜に移した(GE Healthcare)。HAをビオチン-HABP(0.1%BSA-PBS中0.125 µg/ml、1時間)でプローブし、続いてHRP-ストレプトアビジン(0.1%BSA-PBS中0.025 µg/ml、1時間)で検出した。ブロットをECL基質(Amresco)中で現像し、ChemiDoc(BioRad)文書化システムで画像化し、ImageJ Fijiで定量した(Schindelin et al., 2012)。

【0334】

ムチン旋回半径の分析

42のタンデムリピートを有するMuc1ポリマードメイン(S6 Muc1-42TR 10xHis)を、懸濁液適合Freestyle 293F細胞中で組換え的に産生した。安定な293F細胞株を、上記のpPB Muc1-42TR 10xHis Puro TetOn Puroベクターを用いて調製した。Muc1バイオポリマーの産生を、Freestyle 293F培地で30mLの懸濁培養物中の1 µg/mLドキシサイクリンで誘導した。誘導培地を24時間後に回収し、標準的なプロトコルに従って、HisPur Ni-NTA樹脂(Thermo Fisher)で精製した。簡単に述べると、1mL総容積のNi-NTA樹脂を、平衡化緩衝液(20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH=7.4)でリンスした。平衡

10

20

30

40

50

化した樹脂を、10mLの採取した293F培地(30mLの平衡化緩衝液で希釈)と共に、4℃で一晩インキュベートした。5mMイミダゾールを含む平衡化緩衝液中でビーズを洗浄し、500mMイミダゾールを含む平衡化緩衝液中に溶出した。溶出したタンパク質をPBSに対して透析し、SDS-PAGEによって分析した。ゲルを、タンパク質のサイズ及び純度を確認するために、製造業者の説明書に従ってSypro Ruby(Thermo Fisher)で染色した。ゲルをブロットし、Muc1及びHis抗体でプローブして、ムチン同一性及びPNAレクチンを確認して、ムチンO-グリコシル化を確認した。精製組換えMuc1をPBSに対して透析し、イミダゾールを除去した。

【0335】

組換えMuc1ポリマードメインの旋回半径を、多角光散乱に連結されたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-MALS)で測定した。精製タンパク質(5 µg/µLの濃度を有する40 µLのMuc1)を、MALS緩衝液(20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH 7.4)中で平衡化したSuperdex 200 Increase 10/300カラム(GE Healthcare)を使用してSECに供した。SECを静的18角光散乱検出器(DAWN HELEOS-II)と屈折率検出器(Optilab T-rEX, Wyatt Technology)に連結した。0.7mL/分の流速で1秒ごとにデータを収集した。ASTRA VIを用いてデータ分析を行い、試料のモル質量、質量分布(多分散性)、及び旋回半径(32.0nm±0.4%)を得た。光散乱検出器の正規化及びデータ品質管理のために、モノマーBSA(Sigma)を使用した。

【0336】

ムチン長さ及び細胞表面密度の変化

ムチン長さ：0、10、又は42のタンデムリピートを有するMuc1 mOxGFPを発現するMCF10Aを、BD FAC Aria IIで、類似レベルのGFPによって選別した。これらの選別された系統から安定な集団を作製した。細胞を、1万細胞/cm²で16~18時間、8mmカバースリップ上にプレーティングし、次いで、0.2 µg/mLのドキシサイクリンで24時間誘導し、そしてSEM解析のために固定した。

【0337】

ムチン細胞表面密度

約2nm(15kDa)のサイズ及びGFPに対してピコモル濃度の親和性を有するナノボディを、ChromoTechから入手し、製造業者のプロトコルに従ってNHS-Alexa Fluor 647で標識した。42のタンデムリピートを有するMuc1 mOxGFPを発現するMCF10A細胞を、氷上で20分間、5 µg/ml 647-ナノボディ中で標識して、細胞表面ムチンのみを標識した。細胞を、SEMのために、ポリ-L-リジン処理した8mmカバースリップ上に選別し(5,000~1万細胞/cm²)、37℃で4時間接着させ、SEM画像化のために固定した。あるいは、細胞を1.7mLのエッペンドルフ管に選別し、100 µLの0.5%BSA PBSに再懸濁し、SDS-PAGEによるムチン表面密度の推定のために100 µLの2×RIPA溶解緩衝液で溶解した。溶解した試料を、既知の分子濃度のAlexa Fluor 647ナノボディ標準物質と同時に泳動した。溶解試料及び標準物質中のナノボディ蛍光を、Typhoon 9400イメージングシステム(GE Healthcare)で画像化した。各試料又は標準物質中の全蛍光を、ImageJ Fijiで定量した(Schindelin et al., 2012)。標準曲線は、ナノボディ標準からの蛍光を、それらの既知の濃度に関連付けることによって構築した。各溶解物中の標識ムチンの数を、標準曲線に基づいて推定した。ムチン表面密度は、ムチンの総数を、各試料中の既知の細胞数と、それらの平均表面積5,000 µm²(20 µmの平均半径及び懸濁液中の球形野生型細胞に基づく)とで割ることによって推定した。標準曲線を、面積当たりのムチンの数、及びFACS収集集団からの既知の平均蛍光シグナルに基づいて構築した。次いで、この標準曲線を適用して、収集された集団の面積当たりのムチンの数を計算した。

【0338】

巨大単層ベシクル

調製 巨大単層ベシクル(GUV)を、既報のように(Angelova and Dimitrov, 1986)、エレクトロフォーメーションによって調製した。簡単に述べると、クロロホルムに溶解した脂質及び染料を、ITO(インジウム-スズ-酸化物)でコーティングしたスライドガラス上に広

10

20

30

40

50

げた。スライドを真空下に2時間置き、すべての微量の有機溶媒を除去した。55℃にて、120mMスクロース中で脂質膜を水和し膨潤させた。1.4V(ピーク間)及び12Hzの振動電位を3時間印加することによりGUVを電鍍した(Busch et al., 2015)。GUV組成物を、DOPC、及びDOGS-Ni-NTA脂質のモル分率を増加させて(5、10、15、及び20モル%)調製した。1/2500の色素/脂質比で脂質を標識するために、Bodipy-PCを使用した。組換えHis標識ポドカリキシン、及びヒト血清アルブミン(HSA)を、NHS-Alexa Fluor 568と結合させ、標識の程度を製造業者のプロトコルに従って定量した。GUVを、20mM HEPES、50mM NaCl、pH=7.4(120 mOsm)中で希釈し、次いで、標識されたポドカリキシン($\sim 2 \mu\text{M}$)又はHSA(0.125又は0.375 μM)と、イメージング前に少なくとも20分間混合した(GUV/タンパク質=1/1体積)。

10

【0339】

画像化及び分析 60x水浸対物レンズ(NA 1.2)を用いて、Nikon C2plus共焦点顕微鏡でGUVを画像化した。脂質(Bodipy-PC)及びタンパク質(Alexa Fluor 568)を、それぞれ波長 $\lambda=488$ 及び561nmでの励起によって画像化した。ImageJ FijiのGUVを横切る5つの異なるラインスキャンを取ることによって、色素蛍光強度を測定した(Schindelin et al., 2012)。各線の強度プロファイルを、Mathematica 10.3を用いて解析した。ここでは、強度ピークの積分を計算し、GUVあたり5つの異なる線について平均化した。

【0340】

膨張顕微鏡

膨張顕微鏡法(ExM)は、既報のように実施され(Tillberg et al., 2016)、蛍光色素及びタンパク質を固定、ゲル化、消化及び膨張する工程を含み、色素保持及び分離を達成した。簡単に説明すると、固定し、染色した細胞を、PBS中の0.1mg/mlのアクリロイル-X、SE(6-(アクリロイル)アミノ)ヘキササン酸、スクシンイミジルエステル(ThermoFisher)で、室温にて16時間固定し、さらに2回洗浄し、ゲル化のための過硫酸アンモニウム0.2%(w/w)開始剤及びテトラメチルエチレンジアミン0.2%(w/w)促進剤と混合したモノマー溶液(1×PBS、2M NaCl、8.625%(w/w)アクリル酸ナトリウム、2.5%(w/w)アクリルアミド、0.15%(w/w)N, N'-メチレンビスアクリルアミド)中で、37℃にて1時間インキュベートした。消化のために、ゲル化した試料を、6ウェルのガラス底プレート(Cellvis)に穏やかに移し、Proteinase K(New England Biolabs)で、8単位/mLの消化緩衝液(50mM Tris(pH 8)、1mM EDTA、0.5% Triton X-100、1M NaCl)にて、室温で16時間処理した。膨張のために、消化されたジェルを1時間、過剰量のddH₂Oで洗浄した。これを、膨張がプラトーに達するまで4～6回繰り返した。Airyscanモードで40x水浸対物レンズ(NA 1.1)を使用してZeiss LSM倒立880共焦点顕微鏡で、試料を画像化し、解像度を最適化した。

20

30

【0341】

細胞外小胞の単離

細胞を適切な皿に1万細胞/cm²で蒔いた。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のドキシサイクリンで18時間誘導した後、細胞をPBSで2回リンスし、次いで1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のドキシサイクリン処理で、さらに6時間血清欠乏状態にした。血清欠乏細胞からの馴化培地を、600×g・5分間の2回の連続遠心分離により、細胞破片をペレット化することによって清澄化した。

40

【0342】

ナノ粒子追跡分析

清澄化培地中の細胞外小胞を、Malvern NS300 NanoSightを用いて分析した。画像化は、試料当たり5回のキャプチャーで60秒間行った。粒子分析はMalvern Nanoparticle Tracking Analysisソフトウェアを用いて行った。

【0343】

プランジ凍結透化

清澄化された培地から3～5 μl の試料を、 $\sim 2 \mu\text{m}$ の孔サイズを有する有孔炭素被覆200メッシュ銅グリッド(Quantifoil Micro Tools, Jena, Germany)上にピペットで移した。グリッドを裏側からプロットし、特注の透化装置(MPI, Martinsried, Germany)を用

50

いて液体窒素温度に冷却した液体エタン/プロパン混合物中に直ちに浸漬した。ブランチ凍結したグリッドを、使用するまで液体窒素中の密封冷凍ボックスに保存した。

【0344】

極低温透過型電子顕微鏡

エネルギーフィルターモードで300 kVで作動するTitan Themis(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)にて、極低温透過型電子顕微鏡(cryo-TEM)観察を行った。これは、電界放出銃、及び3838x3710画素Gatan K2 Summit直接検出器カメラ(Gatan, Pleasanton, CA)を装備し、計数・用量分画モードで動作する。画像を-1 μm ~3 μm の間の焦点ずれで収集した。画像を2でビニングし、0.72~1.1nmのピクセルサイズを得た。

【0345】

統計

統計はGraphpad Prismで計算した。一方向ANOVA及び事後両側スチューデントt検定を、図の凡例によって示されるように、必要に応じて使用した。ボックスプロットについては、中心線は中央値を示し、ボックス限界はRソフトウェアによって決定される25番目及び75番目のパーセンタイルを示し、ウィスカーは25番目及び75番目のパーセンタイルからの四分位数間範囲の1.5倍に広がり、ノッチは(示されている場合)、95%信頼区間を示す。

【0346】

参考文献

10

20

30

40

50

- Agrawal, B., Krantz, M.J., Parker, J., and Longenecker, B.M. (1998). Expression of MUC1 Mucin on Activated Human T Cells: Implications for a Role of MUC1 in Normal Immune Regulation. *Cancer Res.* 58, 4079–4081.
- Alexander, S. (1977). Adsorption of chain molecules with a polar head a scaling description. *J. Phys.* 38, 983–987.
- Angelova, M.I., and Dimitrov, D.S. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81, 303–311. 10
- Antonyak, M.A., Li, B., Boroughs, L.K., Johnson, J.L., Druso, J.E., Bryant, K.L., Holowka, D.A., and Cerione, R.A. (2011). Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4852–4857.
- Becker, A., Thakur, B.K., Weiss, J.M., Kim, H.S., Peinado, H., and Lyden, D. (2016). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* 30, 836–848.
- Bennett, R., Järvelä, T., Engelhardt, P., Kostamovaara, L., Sparks, P., Carpén, O., Turunen, O., and Vaheri, A. (2001). Mucin MUC1 is seen in cell surface protrusions together with ezrin in immunoelectron tomography and is concentrated at tips of filopodial protrusions in MCF-7 breast carcinoma cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 49, 67–77. 20
- Bergert, M., Erzberger, A., Desai, R.A., Aspalter, I.M., Oates, A.C., Charras, G., Salbreux, G., and Paluch, E.K. (2015). Force transmission during adhesion-independent migration. *Nat. Cell Biol.* 17, 524–529.
- Bischoff, M., Gradilla, A.-C., Seijo, I., Andrés, G., Rodríguez-Navas, C., González-Méndez, L., and Guerrero, I. (2013). Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nat. Cell Biol.* 15, 1269–1281. 30
- Buck, C.A., Glick, M.C., and Warren, L. (1971). Glycopeptides from the surface of control and virus-transformed cells. *Science* 172, 169–171.
- Busch, D.J., Houser, J.R., Hayden, C.C., Sherman, M.B., Lafer, E.M., and Stachowiak, J.C. (2015). Intrinsically disordered proteins drive membrane curvature. *Nat. Commun.* 6, 7875.
- Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., and Rubinstein, M. (2012). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* 337, 937–941. 40

【 0 3 4 7 】

- Campelo, F., and Hernández-Machado, A. (2007). Model for Curvature-Driven Pearling Instability in Membranes. *Phys. Rev. Lett.* *99*, 088101.
- Charras, G.T., Yarrow, J.C., Horton, M.A., Mahadevan, L., and Mitchison, T.J. (2005). Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* *435*, 365–369.
- Charras, G.T., Coughlin, M., Mitchison, T.J., and Mahadevan, L. (2008). Life and Times of a Cellular Bleb. *Biophys. J.* *94*, 1836–1853.
- Chen, W.-L., Cordero, R., Tran, H., and Ober, C.K. (2017). 50th Anniversary Perspective: Polymer Brushes: Novel Surfaces for Future Materials. *Macromolecules* *50*, 4089–4113. 10
- Cloosen, S., Thio, M., Vanclée, A., Leeuwen, V., M, E.B., Senden-Gijsbers, B.L.M.G., Oving, E.B.H., Germeraad, W.T.V., and Bos, G.M.J. (2004). Mucin-1 is expressed on dendritic cells, both *in vitro* and *in vivo*. *Int. Immunol.* *16*, 1561–1571.
- D'Aloia, M.M., Zizzari, I.G., Sacchetti, B., Pierelli, L., and Alimandi, M. (2018). CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis.* *9*, 282.
- Dennis, J.W., Nabi, I.R., and Demetriou, M. (2009). Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell* *139*, 1229–1241.
- Evanko, S.P., Tammi, M.I., Tammi, R.H., and Wight, T.N. (2007). Hyaluronan-Dependent Pericellular Matrix. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *59*, 1351–1365. 20
- Footer, M.J., Kerssemakers, J.W.J., Theriot, J.A., and Dogterom, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 2181–2186.
- Fowke, T.M., Karunasinghe, R.N., Bai, J.-Z., Jordan, S., Gunn, A.J., and Dean, J.M. (2017). Hyaluronan synthesis by developing cortical neurons *in vitro*. *Sci. Rep.* *7*, 44135.
- Freeze, H.H. (2013). Understanding Human Glycosylation Disorders: Biochemistry Leads the Charge. *J. Biol. Chem.* *288*, 6936–6945. 30
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* *188*, 11–19.
- Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., and Mathivanan, S. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic? *PROTEOMICS* *15*, 260–271.
- Gennes, P.-G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics* (Ithaca, NY: Cornell University Press).
- de Gennes, P. (1980). Conformations of polymers attached to an interface. *Macromolecules* *13*, 1069–1075. 40

- Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007, re5.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509–514.
- Hatrup, C.L., and Gendler, S.J. (2008). Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 431–457.
- Hiergeist, C., and Lipowsky, R. (1996). Elastic Properties of Polymer-Decorated Membranes. *J. Phys. II* 6, 1465–1481. 10
- Jung, Y., Riven, I., Feigelson, S.W., Kartvelishvili, E., Tohya, K., Miyasaka, M., Alon, R., and Haran, G. (2016). Three-dimensional localization of T-cell receptors in relation to microvilli using a combination of superresolution microscopies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E5916–E5924.
- Kesavan, G., Sand, F.W., Greiner, T.U., Johansson, J.K., Kobberup, S., Wu, X., Brakebusch, C., and Semb, H. (2009). Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell* 139, 791–801.
- Kesimer, M., Ehre, C., Burns, K.A., Davis, C.W., Sheehan, J.K., and Pickles, R.J. (2013). Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol.* 6, 379–392. 20
- Koistinen, V., Kärnä, R., Koistinen, A., Arjonen, A., Tammi, M., and Rilla, K. (2015). Cell protrusions induced by hyaluronan synthase 3 (HAS3) resemble mesothelial microvilli and share cytoskeletal features of filopodia. *Exp. Cell Res.* 337, 179–191.
- Kornberg, T.B., and Roy, S. (2014). Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development* 141, 729–736.
- Kramer, R.H., and Nicolson, G.L. (1979). Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: a model for metastatic invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5704–5708. 30
- Kufe, D.W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, nrc2761.
- Lange, K. (2011). Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J. Cell. Physiol.* 226, 896–927.
- Lee, G.M., Johnstone, B., Jacobson, K., and Caterson, B. (1993). The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells. *J. Cell Biol.* 123, 1899–1907.
- Lipowsky, R. (1995). Bending of Membranes by Anchored Polymers. *EPL Europhys. Lett.* 30, 197. 40

[0 3 4 9]

- Liu, T.-L., Upadhyayula, S., Milkie, D.E., Singh, V., Wang, K., Swinburne, I.A., Mosaliganti, K.R., Collins, Z.M., Hiscock, T.W., Shea, J., et al. (2018). Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science* 360, eaaq1392.
- Makabe Sayoko, Naguro Tomonori, and Stallone Tiziana (2006). Oocyte–follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc. Res. Tech.* 69, 436–449. 10
- Marshall, W.F. (2012). Organelle Size Control Systems: From Cell Geometry to Organelle-Directed Medicine. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 34, 721–724.
- McConnell, R.E., Higginbotham, J.N., Shifrin, D.A., Tabb, D.L., Coffey, R.J., and Tyska, M.J. (2009). The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J. Cell Biol.* 185, 1285–1298.
- Milner, S.T. (1991). Polymer brushes. *Science* 251, 905–914.
- Paluch, E.K., and Raz, E. (2013). The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 582–590. 20
- Paszek, M.J., DuFort, C.C., Rubashkin, M.G., Davidson, M.W., Thorn, K.S., Liphardt, J.T., and Weaver, V.M. (2012). Scanning angle interference microscopy reveals cell dynamics at the nanoscale. *Nat. Methods* 9, 825–827.
- Paszek, M.J., DuFort, C.C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J.K., Godula, K., Hudak, J.E., Lakins, J.N., Wijekoon, A.C., Cassereau, L., et al. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* 511, 319–325.
- Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., Post, S. van der, Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Nyström, E.E.L., et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* 260, 8–20. 30
- Peskin, C.S., Odell, G.M., and Oster, G.F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys. J.* 65, 316–324.
- Pilon, C., Levast, B., Meurens, F., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Salmon, H., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., and Baron, C. (2009). CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Mol. Immunol.* 46, 437–447. 40

【 0 3 5 0 】

- Pinho, S.S., and Reis, C.A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* 15, 540–555.
- Pol, E. van der, Böing, A.N., Gool, E.L., and Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* 14, 48–56.
- van den Pol, A.N., and Kim, W.T. (1993). NILE/L1 and NCAM-polysialic acid expression on growing axons of isolated neurons. *J. Comp. Neurol.* 332, 237–257.
- Polefka, T.G., Garrick, R.A., Redwood, W.R., Swislocki, N.I., and Chinard, F.P. (1984). Solute-excluded volumes near the Novikoff cell surface. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 247, C350–C356.
- Porter, A.P., Papaioannou, A., and Malliri, A. (2016). Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* 7, 123–138.
- Satomaa, T., Heiskanen, A., Mikkola, M., Olsson, C., Blomqvist, M., Tiittanen, M., Jaatinen, T., Aitio, O., Olonen, A., Helin, J., et al. (2009). The N-glycome of human embryonic stem cells. *BMC Cell Biol.* 10, 42.
- Sauvanet, C., Wayt, J., Pelaseyed, T., and Bretscher, A. (2015). Structure, Regulation, and Functional Diversity of Microvilli on the Apical Domain of Epithelial Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 593–621.
- Saxer, R.A., Bent, S.J., Brower-Toland, B.D., Mi, Z., Robbins, P.D., Evans, C.H., and Nixon, A.J. (2001). Gene mediated insulin-like growth factor-I delivery to the synovium. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 19, 759–767.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schmick, M., and Bastiaens, P.I.H. (2014). The Interdependence of Membrane Shape and Cellular Signal Processing. *Cell* 156, 1132–1138.
- Shurer, C., Colville, M., Gupta, V., Head, S., Kai, F., Lakins, J., and Paszek, M. A Genetically Encoded Toolbox for Glycocalyx Engineering: Tunable Control of Cell Adhesion, Survival, and Cancer Cell Behaviors. *ACS Biomater. Sci. Eng.*
- Stachowiak, J.C., Hayden, C.C., and Sasaki, D.Y. (2010). Steric confinement of proteins on lipid membranes can drive curvature and tubulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7781–7786.
- Tammi, M.I., Day, A.J., and Turley, E.A. (2002). Hyaluronan and Homeostasis: A Balancing Act. *J. Biol. Chem.* 277, 4581–4584.

[0 3 5 1]

- Tillberg, P.W., Chen, F., Piatkevich, K.D., Zhao, Y., Yu, C.-C. (Jay), English, B.P., Gao, L., Martorell, A., Suk, H.-J., Yoshida, F., et al. (2016). Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nat. Biotechnol.* 34, 987–992.
- Tricarico, C., Clancy, J., and D’Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* 8, 220–232.
- Tsafrir, I., Sagi, D., Arzi, T., Guedeau-Boudeville, M.-A., Frette, V., Kandel, D., and Stavans, J. (2001). Pearling Instabilities of Membrane Tubes with Anchored Polymers. *Phys. Rev. Lett.* 86, 1138–1141.
- Turley, E.A., Wood, D.K., and McCarthy, J.B. (2016). Carcinoma Cell Hyaluronan as a “Portable” Cancerized Prometastatic Microenvironment. *Cancer Res.* 76, 2507–2512.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1773, 642–652.
- Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell* 149, 656–670.
- Yuan, H., Tank, M., Alsofyani, A., Shah, N., Talati, N., LoBello, J.C., Kim, J.R., Oonuki, Y., de la Motte, C.A., and Cowman, M.K. (2013). Molecular mass dependence of hyaluronan detection by sandwich ELISA-like assay and membrane blotting using biotinylated hyaluronan binding protein. *Glycobiology* 23, 1270–1280.
- Zhang, H., Miller, R.H., and Rutishauser, U. (1992). Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 3107–3114.
- Zhulina, E.B., and Borisov, O.V. (1996). Polyelectrolytes Grafted to Curved Surfaces. *Macromolecules* 29, 2618–2626.

【 0 3 5 2 】

第IV部 補足情報

理論的考察

グリコカリックスポリマーのブラシモデル

いかなる特定の理論にも拘束されることを意図しないが、本開示は、グリコカリックス中のバイオポリマーが、どのようにして膜湾曲のためのエントロピー駆動力を生成することができるかを説明するためのモデルを提供する。このモデルは、一端が細胞膜に固定された長鎖ポリマーを考慮する。グリコカリックス中の長鎖ポリマーの一般的な例としては、ムチン及びヒアルロン酸(HA)が挙げられ、本明細書ではそれらを特にモデル化する。モデル化フレームワークは、ポリシアル酸及び他のグリコサミノグリカンを含む、他のタイプのグリコカリックスポリマーに同様に適用することができる。ヒアルロン酸は、グルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンの繰り返し単位からなる半可撓性の線状多糖である。

ムチンは、中心のポリペプチド骨格及び骨格に沿って密にクラスター化されたグリカン側鎖からなる、より複雑なボトルブラシ構造を有する。それらの構造は複雑であるが、ボトルブラシポリマーは、側鎖と類似したモノマーサイズを有する有効な線状ポリマーとしてモデル化することができる(Paturej et al., 2016)。したがって、我々は、我々のモデルにおける全てのグリコカリックスポリマーを、線形であるか、又は事実上線形であると考ええる。

【0353】

グリコカリックス中のバイオポリマーは、膜貫通アンカー、膜内在性タンパク質への共有結合、及び特定の膜貫通受容体への非共有結合を含む、いくつかの方法で細胞表面に固定される。細胞表面ムチンは、単一の膜貫通ドメインによって、それらのカルボキシ末端のすぐ近くに固定される。ヒアルロン酸は、細胞表面上の特定の膜貫通受容体を介して細胞表面に固定される。ヒアルロン酸は、ポリマー骨格に沿った複数の点で固定されることが可能であるが、簡素化するために、我々は全てのグリコカリックスポリマーが、末端に単一の膜アンカーを有すると考える。

【0354】

細胞表面はまた、多くのタイプの内在性及び表在性膜タンパク質で装飾されている。これらの分子はまた、2Dガス圧と同様に、細胞膜上のエントロピー圧力に寄与し得る。膜に対するグリコカリックスポリマーの効果を特定するために、我々は、他の細胞表面タンパク質からの可能性のある寄与、ならびに細胞内力を含めなかった。しかしながら、このモデルは、システムエネルギーへのこれらの追加の寄与を含むように拡張することができた。

【0355】

バイオポリマーは、同じポリマー上のモノマー間、ならびに隣接する分子上のモノマー間の立体的相互作用を説明する体積を除外している(de Gennes, 1980)。グルクロン酸及びシアル酸などの酸性糖上の大きな負電荷は、分子内及び分子間の静電相互作用を引き起こす(Israels et al., 1994)。最後に、ポリマー及びブラシは、分子の伸長を捕捉する弾性エネルギーによるエントロピー寄与を有する(de Gennes, 1980)。変形可能な脂質膜に埋め込まれると、このポリマーグリコカリックスのエネルギー及び膜のエネルギーは、最小限に抑えられて、平衡配置をもたらすことができる(Lipowsky, 1995; Stachowiak et al., 2012)。したがって、以下の本モデルでは、表面曲率を記述するために、グリコカリックス及びその下にある膜のエネルギー最小化を行った。

【0356】

表面密度に依存して、表面に繋がれたポリマーは、2つの特定の物理的挙動様式(すなわちマッシュルーム及びブラシ)を示す。Flory半径は、ポリマー全体のおおよそのサイズを測定し、以下の式で示され、

$$R_F \approx l_a N_a^\nu = l^\nu l_a^{1-\nu}$$

式中、 N_a はポリマー中のモノマーの数であり、 l_a は各モノマー又は有効モノマーのサイズであり、 l はポリマー鎖の完全に伸びた長さであり、 ν はFlory指数と呼ばれる。

水のような良好な溶媒中の親水性バイオポリマーについては、

$$\nu \cong 0.6$$

分子間の間隔がポリマーFlory半径よりも大きいような低密度では(すなわち、 $C_G < 1/(R_F)^2$ 、ここで C_G はバイオポリマー濃度)、バイオポリマーは隣接相互作用とは無関係に好ましい立体配座をとる。このレジームでは、フレキシブル分子は、マッシュルーム様構造を示すまでコイル状になることができる。他方、高い表面濃度では、分子間の間隔がFlory半径よりも小さい場合、分子間相互作用が支配的となり、バイオポリマーをブラシ様構造に引き伸ばすことができる。ポリマー層の伸長又は厚さ、貯蔵エネルギー、及び生成された膜の曲率は、以下に記載されるように、これらのレジームにおいて異なるスケーリング則を示す。

【0357】

マッシュルーム様レジームでは、平坦な不浸透性表面へのバイオポリマーの付着が、到達可能な分子コンホメーションの数を減少させ、表面に浸透するポリマー形状を切断する。不浸透性グラフト化表面を湾曲させることにより、許容される配置をわずかに増加させ、ポリマーのエントロピーを増加させることができる。したがって、変形可能な膜に繋がれた可撓性バイオポリマーは、Lipowskyによって記載されているように、湾曲を生成することができる(Lipowsky, 1995)。しかしながら、膜の曲率に起因する追加のエントロピーは小さく、その結果、ポリマーマッシュルームによって生成される曲率も、ポリマーブラシにおける分子間相互作用によって引き起こされる変形と比較して小さい。このマッシュルーム様レジームでは、湾曲した膜に繋がれた各マッシュルームポリマーのエントロピー寄与による自由エネルギーは、以下ようになる：

$$F_{mushroom} = -TS_{mushroom} \sim -k_B T \frac{2\pi R_{mushroom}}{R}, \quad (1)$$

ここで、基準構成は平坦な表面に繋がれたポリマーであり、 $S_{mushroom}$ は対応するエントロピー寄与であり、 $R_{mushroom}$ はマッシュルーム形状のバイオポリマーのFlory半径であり、 R はその下にある膜の曲率半径である。マッシュルーム様レジームでは、球形膜構造の形成を考察した。湾曲した膜の曲げエネルギーは、以下ようになる：

$$F_{membrane} = \frac{\kappa}{2C_G R^2}, \quad (2)$$

ここで、 κ は膜二重層の曲げ剛性であり、 C_G はバイオポリマーの表面密度であり、 $1/C_G$ は各ポリマーが利用可能な面積である。曲率半径 R に関して、総エネルギー、 $F_{total} = F_{mushroom} + F_{membrane}$ を最小化すると、 R について、次のようなスケーリング法則が得られる：

$$\partial F_{total} / \partial R = 0 \text{ として、}$$

$$R \sim \frac{\kappa}{k_B T} \frac{1}{2\pi C_G l_a N_a^\nu}, \quad (3)$$

ここで、 l_a はモノマーセグメントのサイズであり、 N_a はポリマー分子中のそのようなモノマーの数である。

【0358】

隣接するポリマー分子が互いに相互作用するような高い表面密度では、グラフト化ポリマーはブラシ様構造を示す(de Gennes, 1980)。このレジームでは、膜からの管状構造の形成を考慮し、細胞表面に対する分子間密集効果によって生成される細管湾曲を予測した。エネルギー最小化アプローチは、平衡曲率とブラシ伸長を以下のように解明する。半径 R をもつ細管の場合、細管の長さ当たりのグリコカリックスのエネルギーは、弾性成分、排除体積、及び静電成分を含む(Borisov and Zhulina, 2002; Bracha et al., 2013; Zhulina et al., 2006)：

$$F_{brush} = F_{elastic} + F_{excluded\ volume} + F_{electrostatic}, \quad (4)$$

$$F_{brush} = k_B T \int_R^{R+H} \left[\frac{3}{2l_a^2 c_p s} + \left(w + \frac{\alpha_b^2}{2\Phi_{ion}} \right) c_p^2 s \right] dr, \quad (5)$$

10

ここで、Rは細管の半径であり、Hはグリコカリックスブラシの厚さであり、 l_a はバイオポリマーを形成するモノマーセグメントのサイズであり、 c_p はモノマー濃度であり、 s はポリマー当たりの面積である。細管表面では、ポリマー当たりの面積、 $s(r=R)$ が、バイオポリマー表面密度 C_G に、 $s(r=R)=1/C_G$ として関連する。 w はモノマーセグメントの排除体積であり、 α_b はモノマーのイオン化の程度であり、 Φ_{ion} はバルク溶液中のイオン濃度であり、 r は動径座標である。

【0359】

Zhulinaら(Zhulina et al., 2006)は、 c_p のための式を提供する。モノマーの長さ及び直径が同様であると仮定すると(Paturej et al., 2016)、モノマーセグメントは、1に近いアスペクト比を有する円筒であると考えられる。管状構造に曲げられた下層膜の長さ当たりのエネルギーは、次の通りである(Helfrich, 2014)：

20

$$F_{membrane} = \frac{\pi\kappa}{R}, \quad (6)$$

ここで、 κ は膜曲げ弾性率である。したがって、細管長さ当たりの総エネルギーは次のとおりである：

$$F_{total} = F_{brush} + F_{membrane} = k_B T \int_R^{R+H} \left[\frac{3}{2l_a^2 c_p s} + \left(w + \frac{\alpha_b^2}{2\Phi_{ion}} \right) c_p^2 s \right] dr + \frac{\pi\kappa}{R}. \quad (7)$$

30

細管半径に関して全エネルギーを最小化することは($dF_{total}/dR=0$)、グリコカリックス及び細胞膜の特性(バイオポリマーの表面密度を含む)に対する自然曲率の依存性を明らかにする。

【0360】

ムチンの例として、天然Muc1に対するこの理論の含意を考察する。ボトルブラシバイオポリマーを、サイズ $l_{a,eff}$ の有効モノマー N_a に粗視化する(Paturej et al., 2016)。本研究では、Muc1の旋回半径、 R_G を32nmとであると評価する。ヒトHEp-2上皮細胞から精製されたMuc1の電子顕微鏡写真に基づいて、延伸された全体長さ、 l が270nmであると推定する(Bramwell et al., 1986)。旋回半径は、以下のようにFlory半径に関連付けられる：

40

$$R_G \approx \frac{1}{\sqrt{6}} R_F = \frac{1}{\sqrt{6}} l^\nu l_{a,eff}^{1-\nu}$$

$R_G=32\text{nm}$ 、 $l=270\text{nm}$ 、及び $\nu=0.6$ の推定値を用いて、 $N_a=18$ の有効モノマーセグメント(それぞれ $l_{a,eff}=15\text{nm}$ のサイズを有する)によって記述されるムチンを推定する。我々は、この有効モノマーサイズが、ムチン側鎖サイズの推定(5~10nm)に基づく予想と良

50

好に一致することに注目する(Kesimer et al., 2013; McMaster et al., 1999)。ムチン上のシアル酸は、20アミノ酸のタンデムリピート当たり約 $5e^-$ の荷電密度に寄与すると仮定する。我々の仮定は、ほとんどのムチンO-グリコシル化部位が、シアリル化グリカンで占められているに基づいている(Backstrom et al., 2003; Muller et al., 1999)。

【0361】

ムチンのマッシュルーム様レジームのスケーリング則は、低いバイオポリマー密度のための小さな自然曲率を予測する(図35C)。予測された自然曲率は、低表面密度のムチン(図36Bに示されるように、 $180 \mu\text{m}^2$)を発現する細胞において観察される小疱様突起の曲率に匹敵する。バイオポリマーがブラシを形成するより高い密度について、上記の対応するモデルは、細胞上の細管において観察されるものと類似又はより大きい曲率の生成を予測する(図36B、 $52000 \mu\text{m}^2$)。このような細管の曲率は、バイオポリマー密度と共に指数関数的に増加すると予測される。特に、 $250\#/\mu\text{m}^2$ のバイオポリマー密度について予測されたマッシュルーム様レジームとブラシ様レジームとの間の継続的な移行は、小疱様から管状への細胞表面形態の変化を伴う(図36B、D、E)。

【0362】

同様に、HA分子は、線状ポリマー鎖に非常に類似している。例えば、1 MDaのHA分子は、延伸された場合に $2.5 \mu\text{m}$ の長さを有し、約10nmの長さの250モノマー単位の鎖としてモデル化することができる(Cleland Robert L., 2004; Hayashi et al., 1995)。ポリマー理論は、このようなポリマーが約 $1 \mu\text{m}$ の大きなFlory半径を有すると予測し、これはMuc1のそれよりも1桁以上大きい。したがって、HAは、Muc1よりも、はるかに大きな細胞表面上の有効体積及び物理的存在を有することが期待される。結果として、HAにおけるより強い分子内及び分子間相互作用は、膜を曲げる際に、Muc1よりも有意に効果的ではなくである。さらに、かなり低い表面密度のHAは、Muc1が密集した表面と同じ膜曲率を生じると予想される。

【0363】

HAの特定の例についても数値計算を行った。Brachaらの、DNA(線状高分子電解質でもある)へのアプローチを採用して、我々は、ポリマーブラシ理論スケーリング法則の適用を可能にするために、ヒアルロン酸を、長さ l_a 及び直径 d の円筒形セグメント N_a に粗視化する(Bracha et al., 2013)。バイオポリマーのKuhn長さ(l_a)は、持続長さ及び長さスケール(分子が真っすぐな場合の)の2倍である。ヒアルロン酸は、糖環モノマーの本質的に大きなサイズ、及びグリコシド結合の周りの妨げられた回転から生じる局所的な剛性のために、半剛性である(Day and Sheehan, 2001)。持続長の測定値は、5~9nmの範囲である。ヒアルロン酸鎖の直径は約0.6nmである(Cowman et al., 2005)。本研究では、ヒアルロン酸シンターゼ3(HAS3)によって産生されるヒアルロン酸の分子量を、約3 MDaと測定した。この大きなサイズは、1nmの二糖サイズを前提とすると、約 $10 \mu\text{m}$ の完全延伸長さに相当する。

【0364】

細胞表面小疱及び管のための力の必要条件

細胞表面上の小疱と管の相対頻度を予測するために、細胞膜のエネルギー計算を行った。グリコポリマーの密集圧力は、細胞膜の自然な湾曲を効果的に増加させる。従って、我々は、グリコカリックスの密集効果をひとまとめにして、自発的な膜湾曲 c_0 にする。

【0365】

細胞膜(例えば、アクチン重合)を押し出す細胞内力は、円筒管を生成し得る(Weichsel and Geissler, 2016)。ここでは、力 f によって生成される長さ L 及び半径 R_{tube} の管を考察する。他方、細胞の内側と外側との間の静水圧差 p は、半径 R_{bleb} の球状の小疱(bleb)を形成することができる(Charras and Paluch, 2008)。これらの構成における膜のエネルギーは、曲げエネルギー、表面張力、及び圧力 p 又は力 f からの寄与を含む(Derenyi et al., 2002; Helfrich, 2014; Seifert et al., 1991)：

10

20

30

40

50

$$F = \int_A \frac{\kappa}{2} (c_1 + c_2 - c_0)^2 dA + \sigma A - pV - fL, \quad (8)$$

ここで、 κ は膜の曲げ剛性であり、 c_1 及び c_2 は主曲率であり、 c_0 は膜の自然曲率であり (バイオポリマーの密集圧力によって生成される)、 A は膜の面積であり、 σ は膜の表面張力である。管については、 $p=0$ 、 $f \neq 0$ 、及び L は管の長さであり、一方、小疱については、 $f=0$ 、 $p \neq 0$ 、 V は小疱体積である。

【0366】

半径 R_{tube} の円筒形の管は、 $c_1=0$ 及び $c_2=1/R_{tube}$ を有し、エネルギーを単純化する

$$F_{tube} = \left[\frac{\kappa}{2} \left(\frac{1}{R_{tube}} - c_0 \right)^2 + \sigma \right] 2\pi R_{tube} L - fL. \quad (9)$$

【0367】

非常に細いネックを有する球状の小疱の場合は、小疱のエネルギーに上限を与える。半径 R_{bleb} を持つ小疱については、 $c_1=c_2=1/R_{bleb}$ であり、

$$F_{bleb} = \left[\frac{\kappa}{2} \left(\frac{2}{R_{bleb}} - c_0 \right)^2 + \sigma \right] 4\pi R_{bleb}^2 - \frac{4\pi R_{bleb}^3}{3} p. \quad (10)$$

である。

【0368】

平衡状態では、これらのエネルギーは、小疱及び管の半径に関して最小化される (Derenyi et al., 2002)。また、管エネルギーは定常状態での管の長さ L に関して最小化される (Derenyi et al., 2002)。すなわち、平衡状態では、

$$\frac{\partial F_{tube}}{\partial R_{tube}} = 0, \quad \frac{\partial F_{tube}}{\partial L} = 0, \quad (11)$$

及び

$$\frac{\partial F_{bleb}}{\partial R_{bleb}} = 0 \quad (12)$$

管のための平衡方程式(式11)は、以下の式を暗示する：

$$R_{tube} = \frac{1}{\sqrt{c_0^2 + 2\sigma/\kappa}}, \quad (13)$$

及び

$$f = 2\pi\kappa \left(\sqrt{c_0^2 + 2\sigma/\kappa} - c_0 \right) \quad (14)$$

10

20

30

40

50

【0369】

これらの平衡計算は、管半径が、脂質二重層の機械的特性、及び自発的曲率によって完全に支配されることを予測する。これらの計算では、管を広げるアクチンフィラメントの構造的サポートは説明できない。

【0370】

小胞エネルギー最小化(式12)は、所与のサイズの小胞に対する圧力要求をもたらす：

$$p = \frac{2\sigma}{R_{bleb}} - \frac{c_0\kappa}{R_{bleb}} \left(\frac{2}{R_{bleb}} - c_0 \right) \quad (15) \quad 10$$

式13～15は、バイオポリマーによって生成される自然曲率を有する管又は小胞を維持するために必要とされる力又は圧力に関する。図35Cは、バイオポリマー濃度に対する自然曲率の依存性を詳述する。したがって、バイオポリマー濃度に対する力及び圧力要件をグラフ化する(図35D)。アクチン重合から典型的に観察される力及び静水圧との比較は、バイオポリマー密度の関数としての管及び小胞の相対密度を説明する。

【0371】

参考文献

- Bäckström, M., Link, T., Olson, F.J., Karlsson, H., Graham, R., Picco, G., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Noll, T., and Hansson, G.C. (2003). Recombinant MUC1 mucin with a breast cancer-like O-glycosylation produced in large amounts in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem. J.* 376, 677–686. 20
- Borisov, O.V., and Zhulina, E.B. (2002). Effect of Salt on Self-Assembly in Charged Block Copolymer Micelles. *Macromolecules* 35, 4472–4480.
- Bracha, D., Karzbrun, E., Shemer, G., Pincus, P.A., and Bar-Ziv, R.H. (2013). Entropy-driven collective interactions in DNA brushes on a biochip. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4534–4538. 30
- Bramwell, M.E., Wiseman, G., and Shotton, D.M. (1986). Electron-microscopic studies of the CA antigen, epitectin. *J. Cell Sci.* 86, 249–261.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 730–736.

【0372】

40

- Cleland Robert L. (2004). Viscometry and sedimentation equilibrium of partially hydrolyzed hyaluronate: Comparison with theoretical models of wormlike chains. *Biopolymers* 23, 647–666.
- Cowman, M.K., Spagnoli, C., Kudasheva, D., Li, M., Dyal, A., Kanai, S., and Balazs, E.A. (2005). Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 88, 590–602.
- Day, A.J., and Sheehan, J.K. (2001). Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 617–622. 10
- Derényi, I., Jülicher, F., and Prost, J. (2002). Formation and interaction of membrane tubes. *Phys. Rev. Lett.* 88, 238101.
- de Gennes, P. (1980). Conformations of polymers attached to an interface. *Macromolecules* 1069–1075.
- Hayashi, K., Tsutsumi, K., Nakajima, F., Norisuye, T., and Teramoto, A. (1995). Chain-stiffness and excluded-volume effects in solutions of sodium hyaluronate at high ionic strength. *Macromolecules* 28, 3824–3830.
- Helfrich, W. (2014). Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments. *Z. Für Naturforschung C* 28, 693–703. 20
- Israels, R., Leermakers, F.A.M., Fleer, G.J., and Zhulina, E.B. (1994). Charged Polymeric Brushes: Structure and Scaling Relations. *Macromolecules* 27, 3249–3261.
- Kesimer, M., Ehre, C., Burns, K.A., Davis, C.W., Sheehan, J.K., and Pickles, R.J. (2013). Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol.* 6, 379–392.
- Lipowsky, R. (1995). Bending of Membranes by Anchored Polymers. *EPL Europhys. Lett.* 30, 197.
- McMaster, T.J., Berry, M., Corfield, A.P., and Miles, M.J. (1999). Atomic force microscopy of the submolecular architecture of hydrated ocular mucins. *Biophys. J.* 77, 533–541. 30
- Müller, S., Alving, K., Peter-Katalinic, J., Zachara, N., Gooley, A.A., and Hanisch, F.G. (1999). High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18165–18172.
- Paturej, J., Sheiko, S.S., Panyukov, S., and Rubinstein, M. (2016). Molecular structure of bottlebrush polymers in melts. *Sci. Adv.* 2, e1601478.
- Seifert, U., Berndl, K., and Lipowsky, R. (1991). Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous- curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A* 44, 1182–1202. 40

【 0 3 7 3 】

- Stachowiak, J.C., Schmid, E.M., Ryan, C.J., Ann, H.S., Sasaki, D.Y., Sherman, M.B., Geissler, P.L., Fletcher, D.A., and Hayden, C.C. (2012). Membrane bending by protein-protein crowding. *Nat. Cell Biol.* *14*, 944–949.
- Weichsel, J., and Geissler, P.L. (2016). The More the Tubular: Dynamic Bundling of Actin Filaments for Membrane Tube Formation. *PLOS Comput. Biol.* *12*, e1004982.
- Zhulina, E.B., Birshtein, T.M., and Borisov, O.V. (2006). Curved polymer and polyelectrolyte brushes beyond the Daoud-Cotton model. *Eur. Phys. J. E* *20*, 243–256.

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

Part I Figures

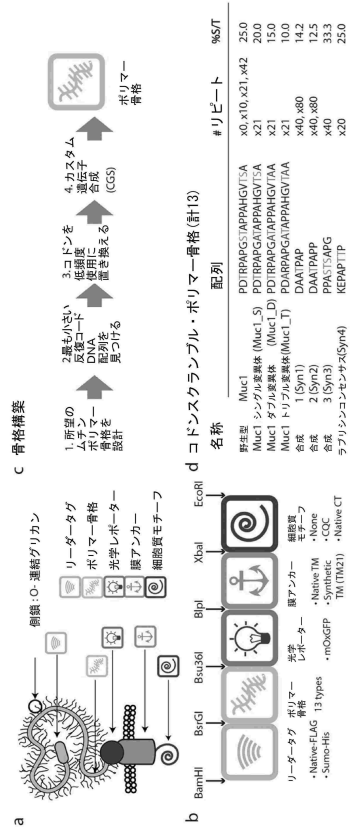


Figure 1

【図 2】

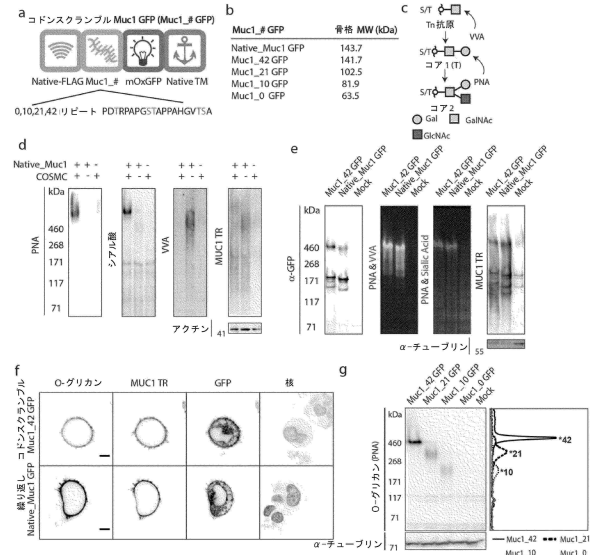


Figure 2

【図 3】

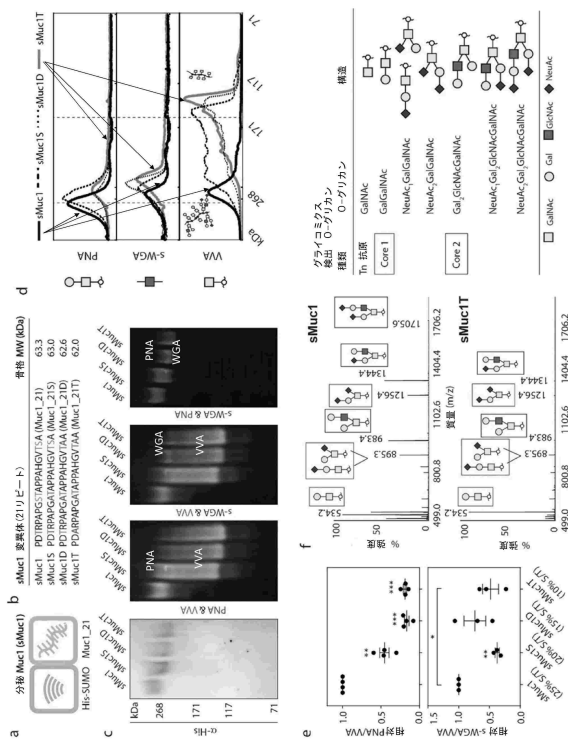


Figure 3

【図 4】

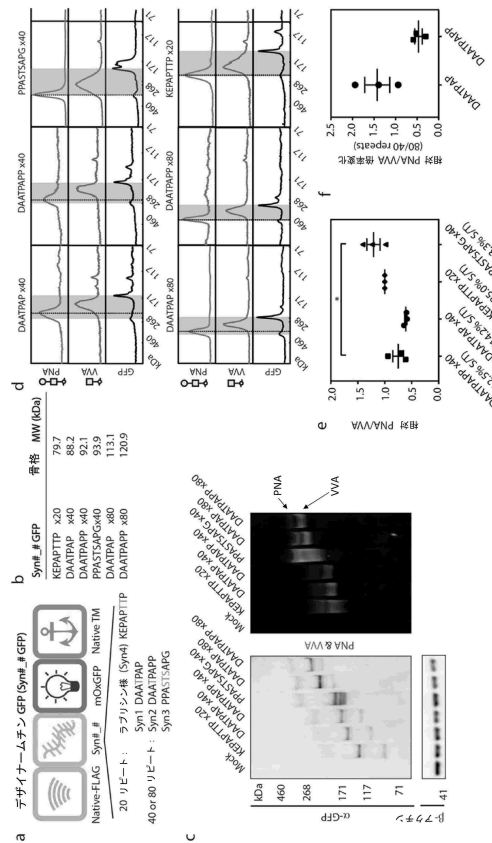


Figure 4

【図 5】

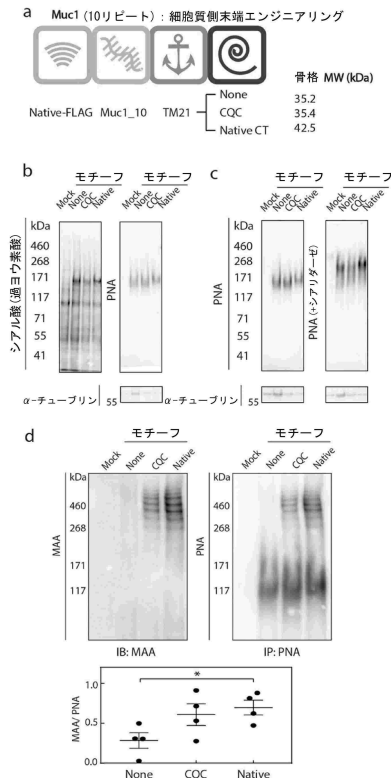


Figure 5

【図 6】

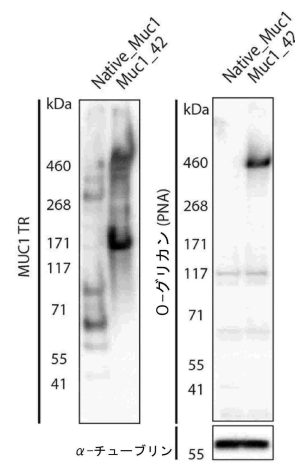


Figure 6

【図 7】

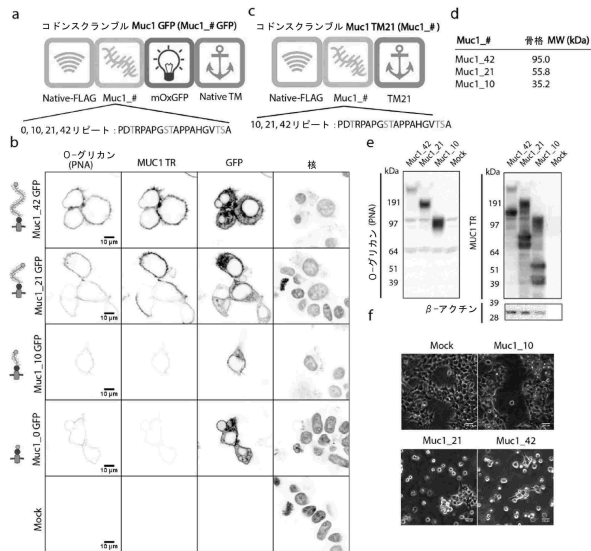


Figure 7

【図 8】

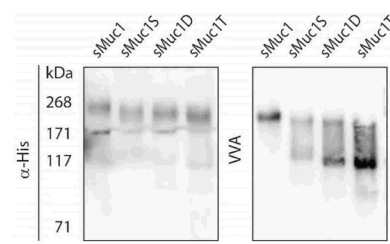


Figure 8

10

20

30

40

50

【図 9】

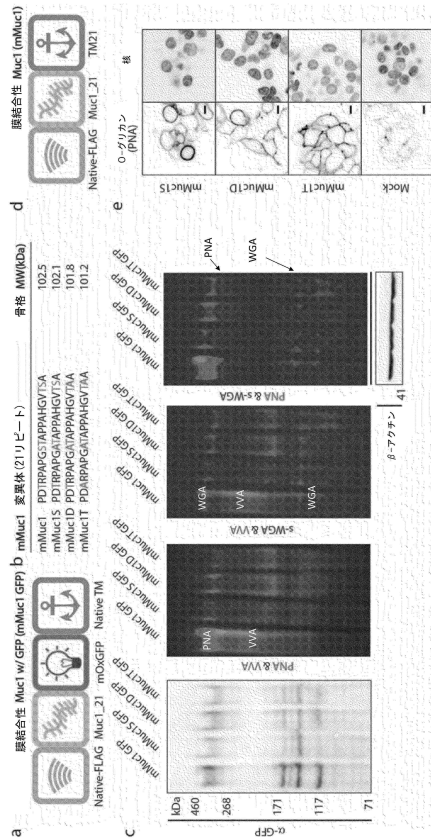


Figure 9

【図 10】

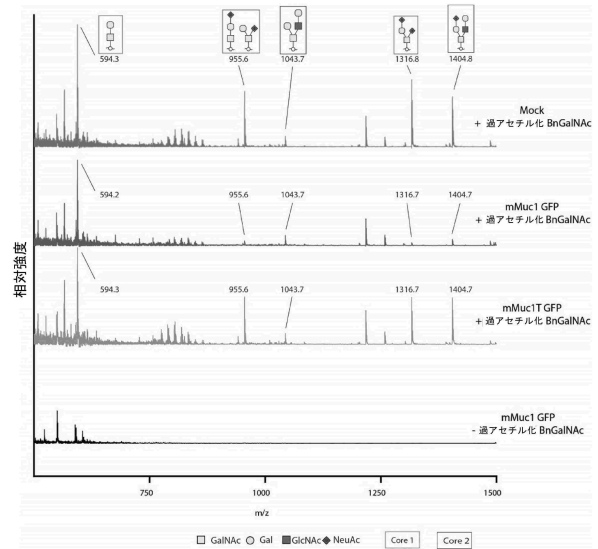


Figure 10

【図 11】

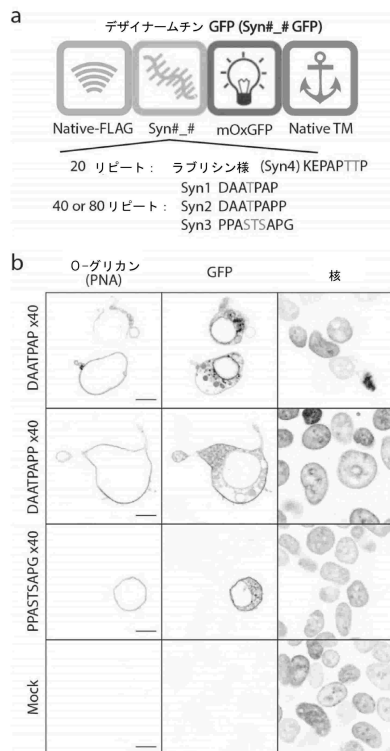


Figure 11

【図 12】

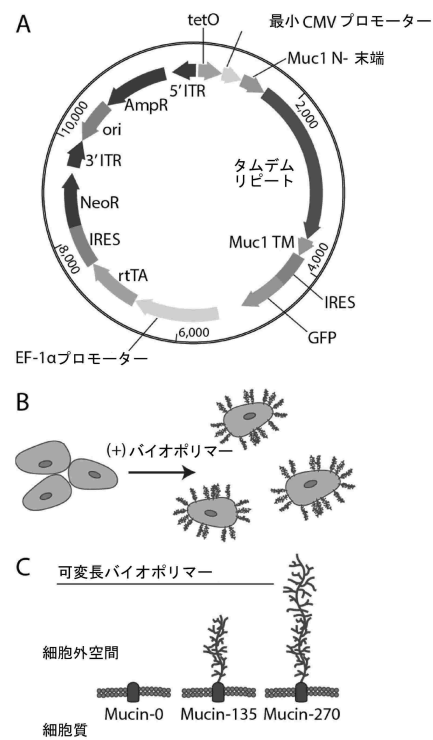


Figure 12

10

20

30

40

50

【図 13】

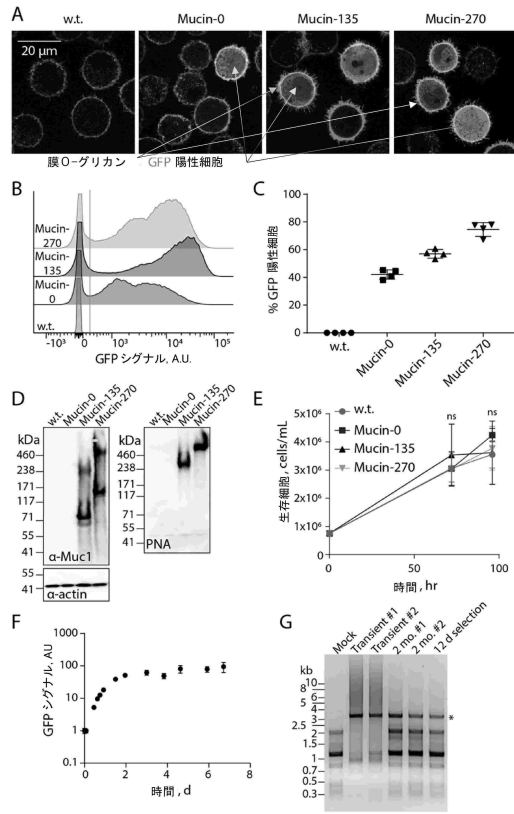


Figure 13

【図 14】

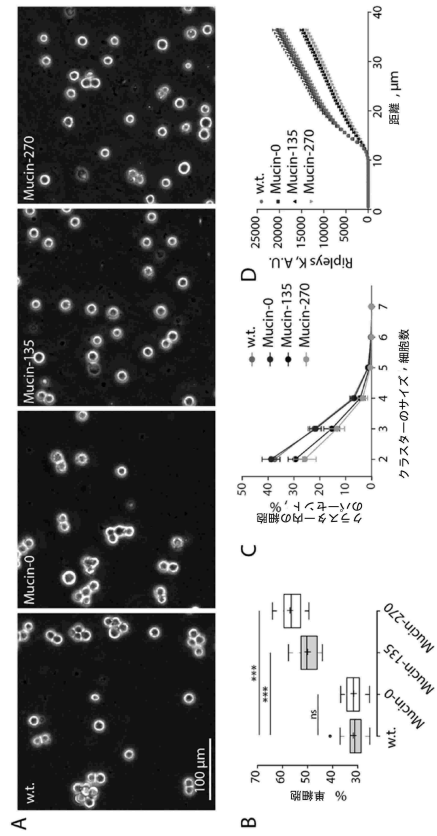


Figure 14

【図 15】

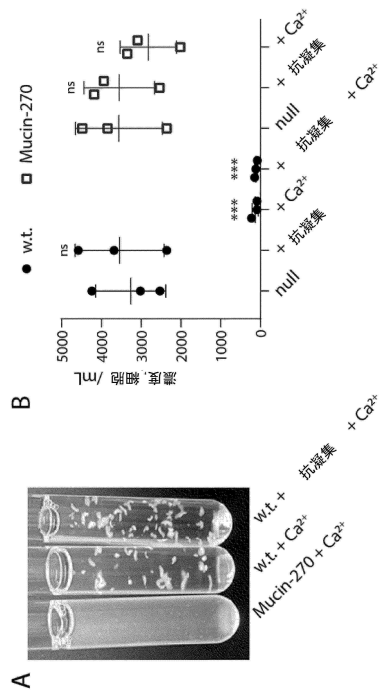


Figure 15

【図 16】

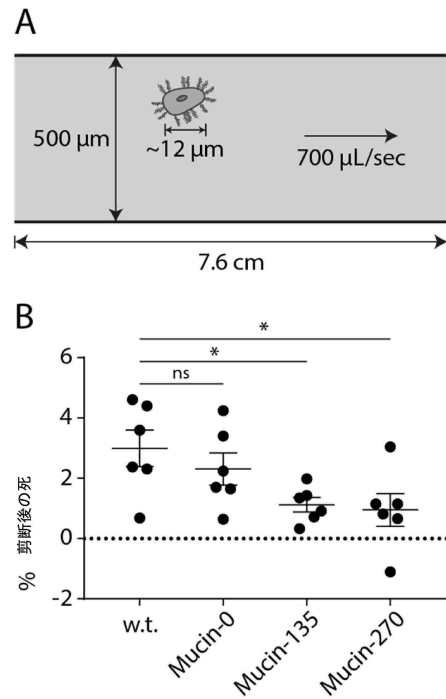


Figure 16

10

20

30

40

50

【図 17】

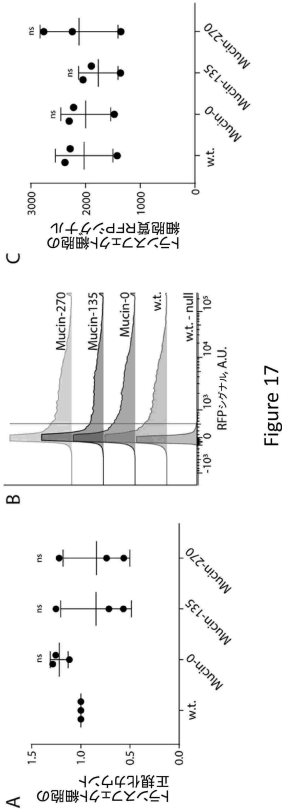


Figure 17

【図 18】

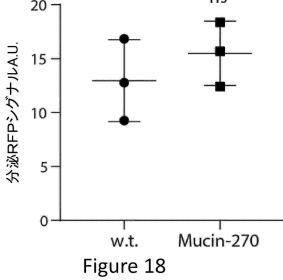


Figure 18

【図 19】

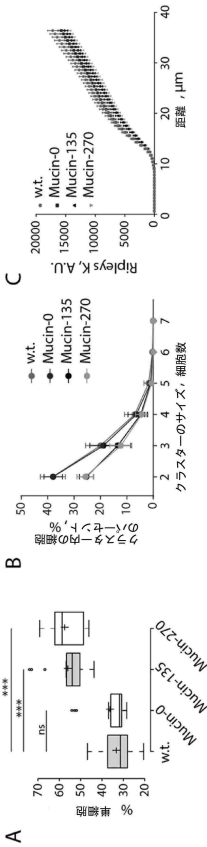


Figure 19

【図 20 A B C D】

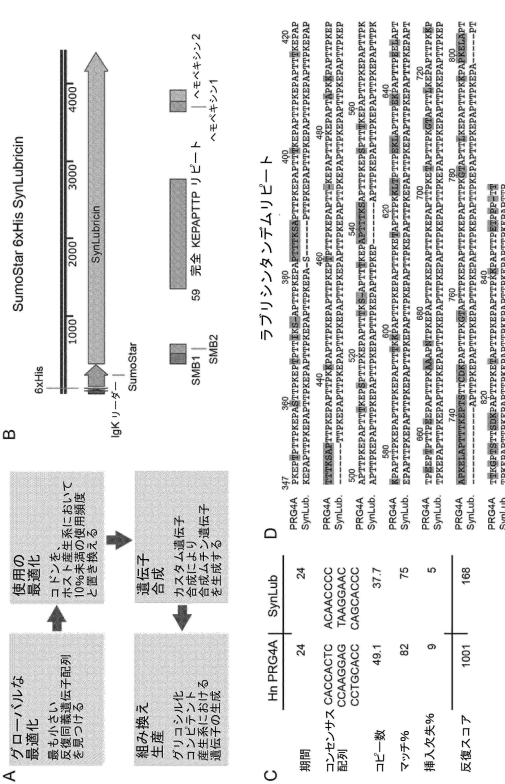
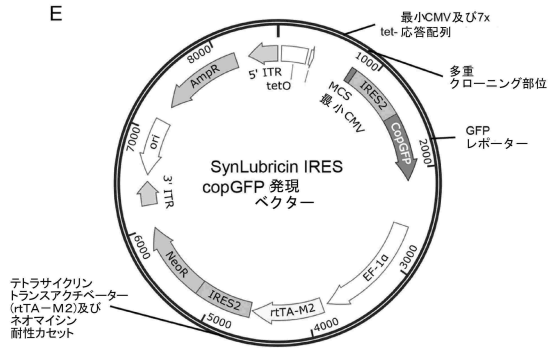


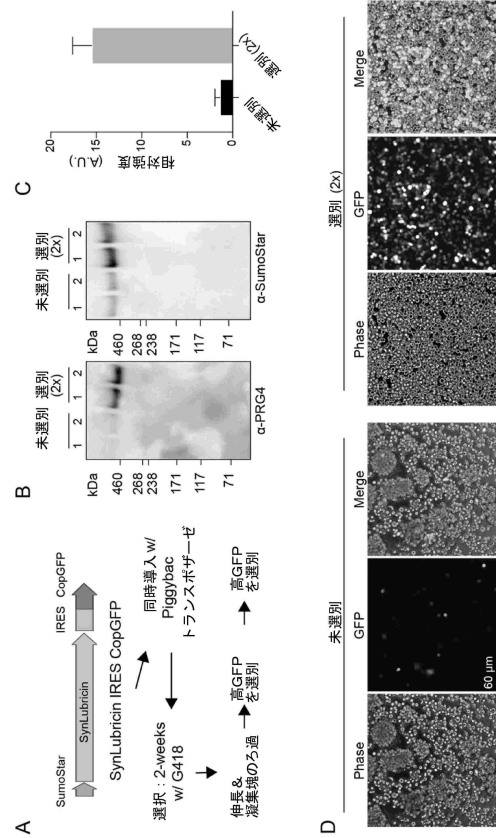
Figure 20

Part III Figures

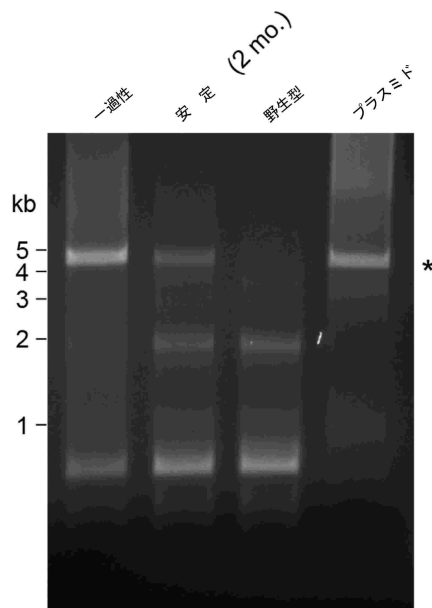
【図 20 E】



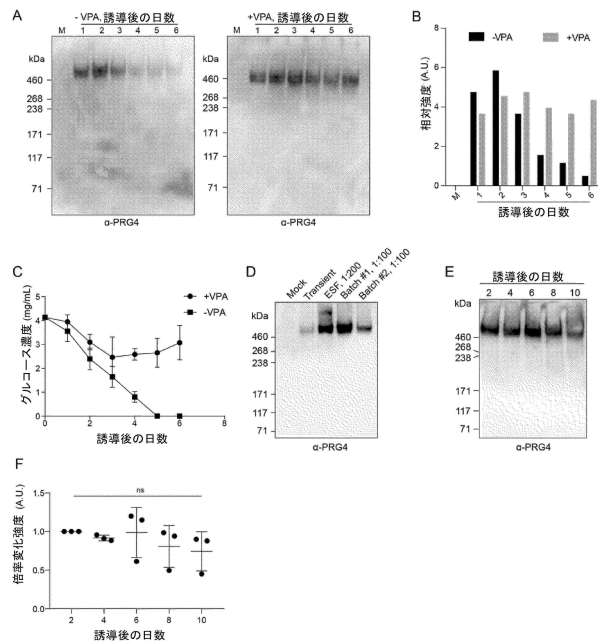
【図 21】



【図 22】



【図 23】



10

20

30

40

50

【図 2 4】

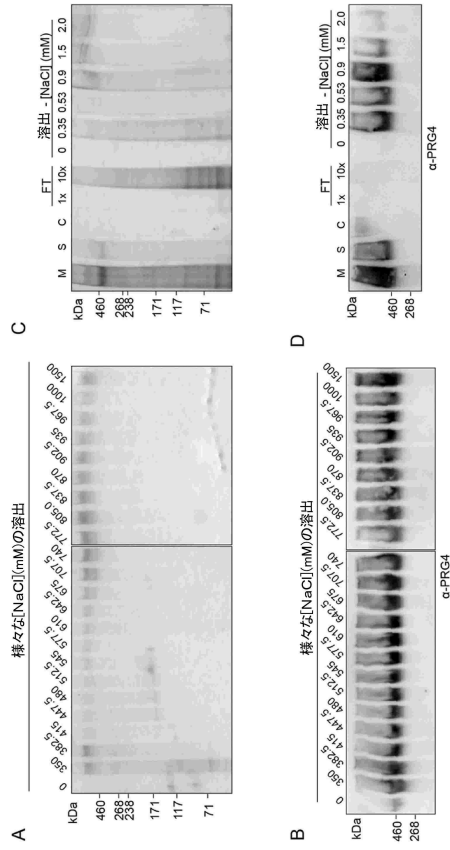


Figure 24

【図 2 5】

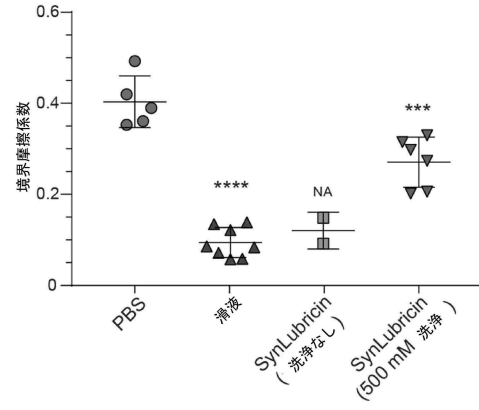


Figure 25

【図 2 6】

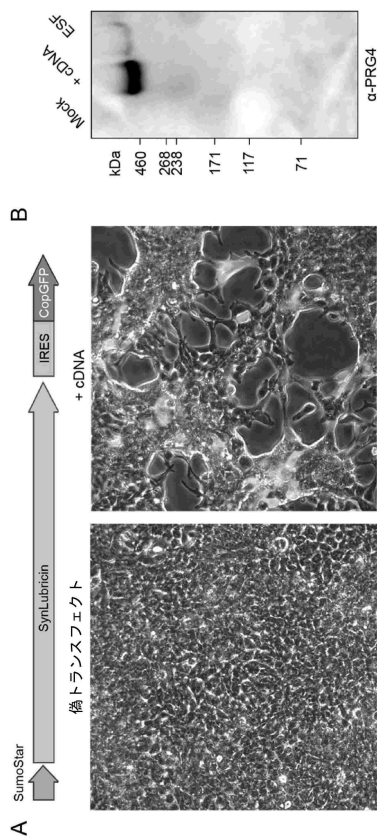


Figure 26

【図 2 7】

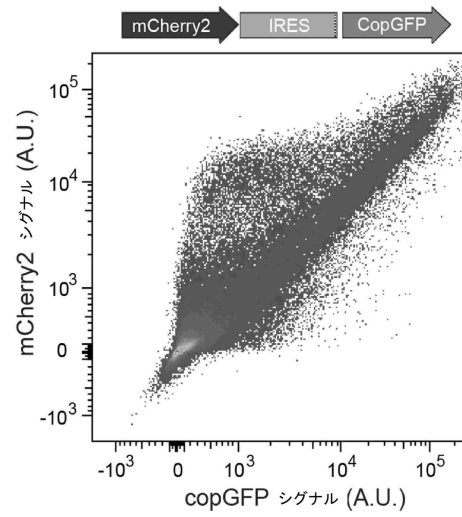


Figure 27

10

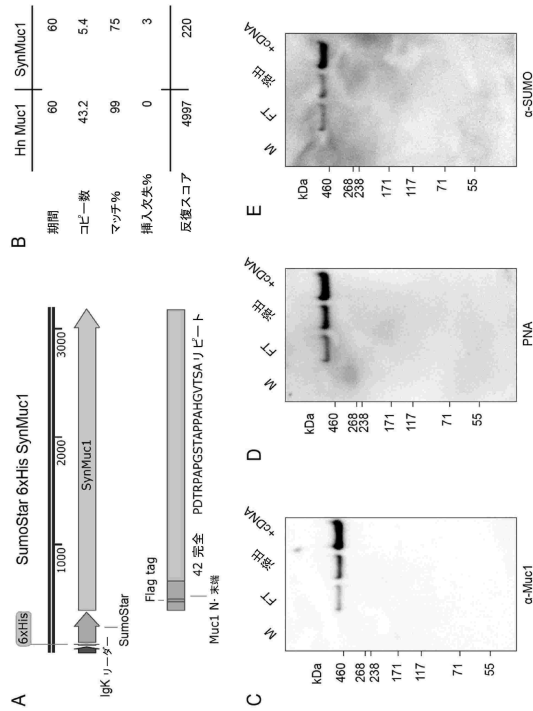
20

30

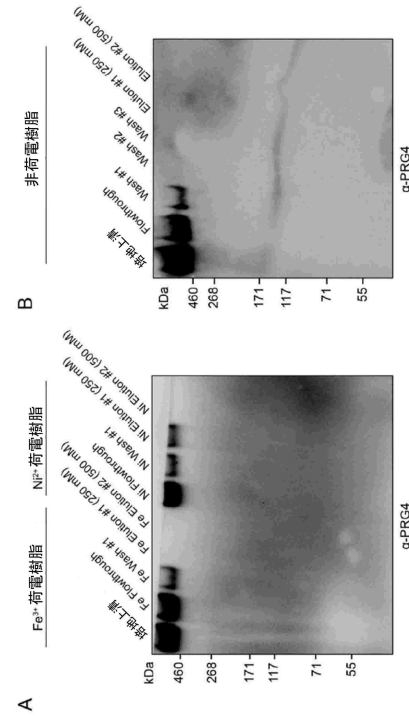
40

50

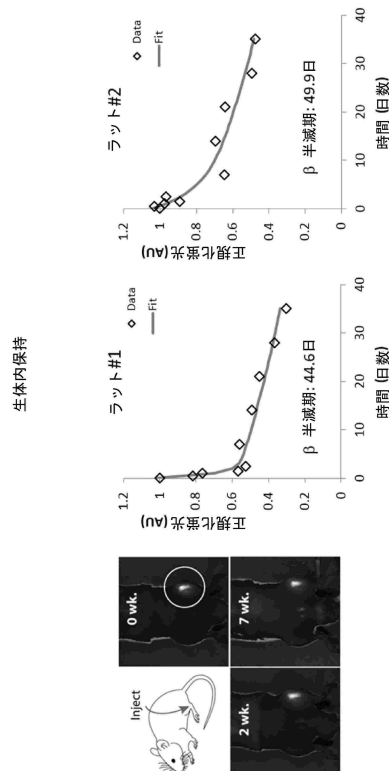
【図 28】



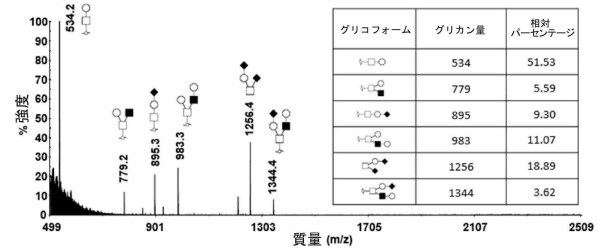
【図 29】



【図 30】



【図 31】



10

20

30

40

50

【図 36】

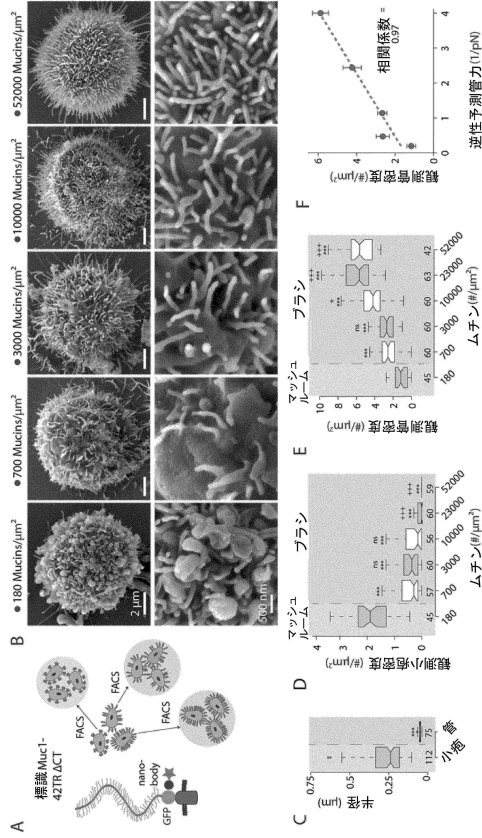


Figure 36

【図 37】

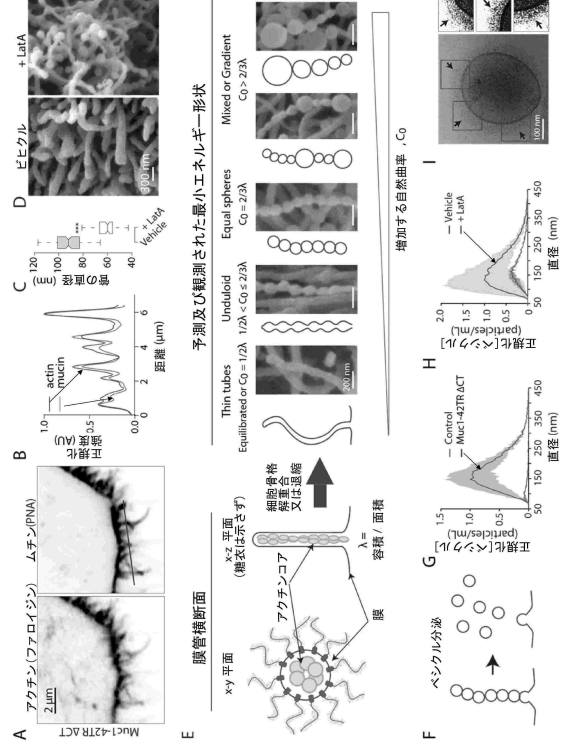
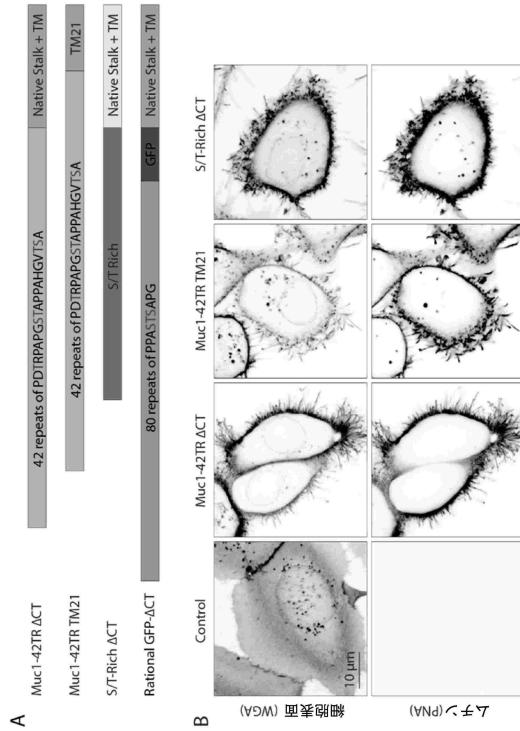


Figure 37

【図 38 A B】



【図 38 C D E F】

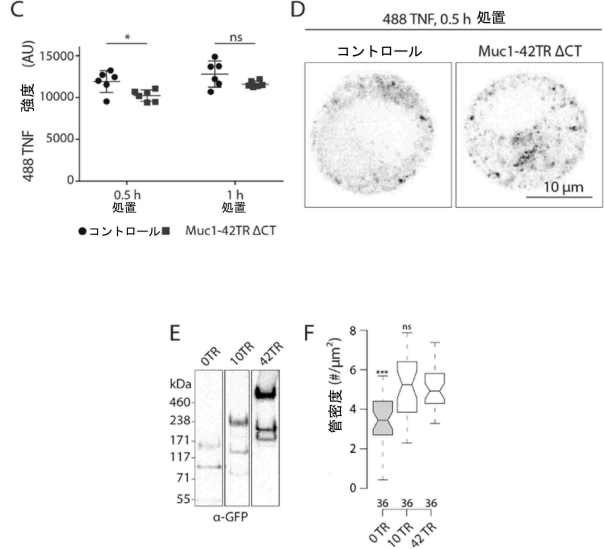


Figure 38

Figure 38 (continued)

10

20

30

40

50

【図 39】

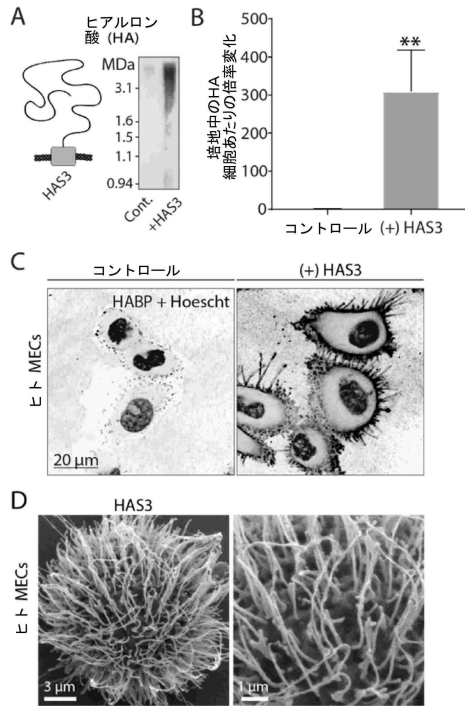


Figure 39

【図 40】

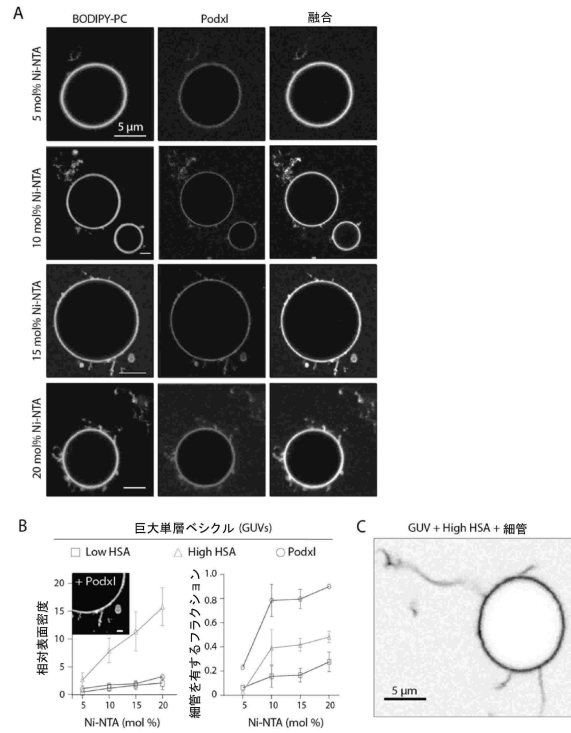


Figure 40

【図 41】

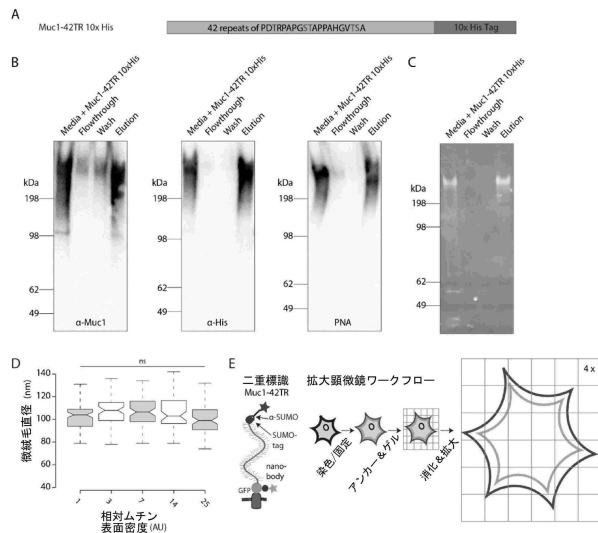


Figure 41

【図 42】

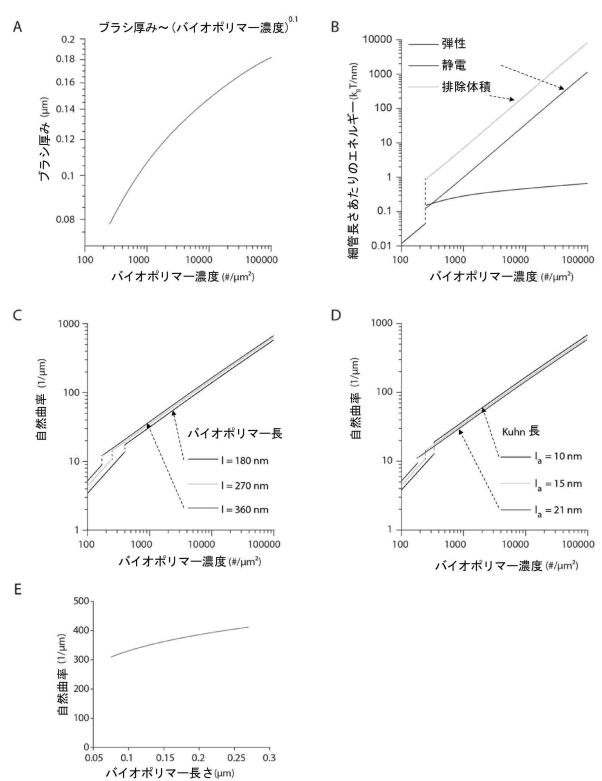


Figure 42

10

20

30

40

50

【図 4 3】

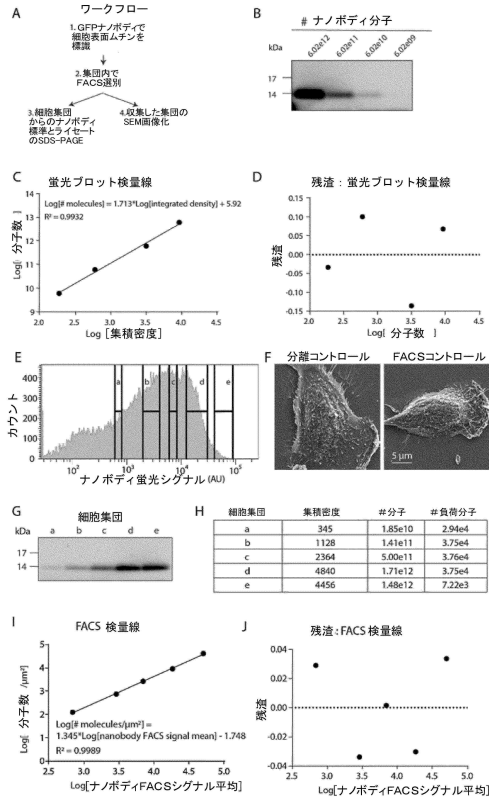


Figure 43

【図 4 4】

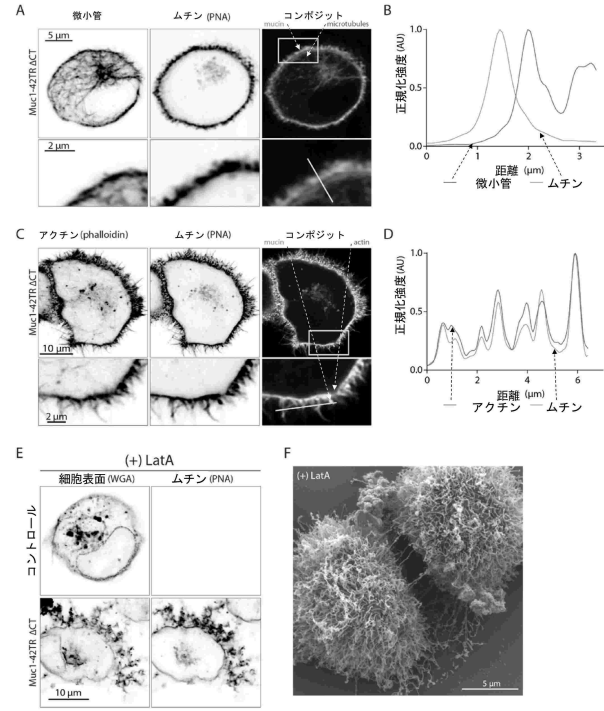


Figure 44

【配列表】

0007667569000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/12 Z N A
C 1 2 N 15/63 Z

882、ランシング、バック ロード 194

審査官 坂井田 京

(56)参考文献

特表2007-502122 (JP, A)
国際公開第2011/019963 (WO, A2)
米国特許出願公開第2017/0198263 (US, A1)
国際公開第2017/165674 (WO, A1)
国際公開第2018/006005 (WO, A1)
特表2018-515534 (JP, A)
特表2018-505867 (JP, A)
特表2011-520812 (JP, A)
特表2011-519949 (JP, A)
Equus caballus (Horse), UniProtKB, F6VTD3, 2011年07月27日, 2023年11月28日検索,
インターネット, <https://rest.uniprot.org/unisave/F6VTD3?format=txt&versions=1>
PRG4 isoform 6, EMBL, 2018年03月28日, PRG4 isoform 6 {ECO:0000313 | EMBL:PNJ53
749.1}, A0A2J8V8A7, [online], UniProtKB. 2018年3月28日掲載, 2023年11月22日検索, イン
ターネット, <https://rest.uniprot.org/unisave/A0A2J8V8A7?format=txt&versions=1>
David K. Rhee et al., The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhi
bits synovial cell overgrowth, The Journal of Clinical Investigation, 2005年03月, Vol.11
5, No.3, p.622-631
quus caballus (Horse), UniProtKB, F6VTD3, 2011年07月27日, 2023年11月28日検索,
インターネット, <https://rest.uniprot.org/unisave/F6VTD3?format=txt&versions=1>

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90
C 0 7 K 1/00-19/00
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq