

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3824632号
(P3824632)

(45) 発行日 平成18年9月20日(2006.9.20)

(24) 登録日 平成18年7月7日(2006.7.7)

(51) Int. Cl.		F I	
AO1K 67/027	(2006.01)	AO1K 67/027	
CO7K 1/14	(2006.01)	CO7K 1/14	
CO7K 14/47	(2006.01)	CO7K 14/47	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N 1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N 1/19	

請求項の数 15 (全 16 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願平4-511080</p> <p>(86) (22) 出願日 平成4年6月12日(1992.6.12)</p> <p>(65) 公表番号 特表平6-508515</p> <p>(43) 公表日 平成6年9月29日(1994.9.29)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/FR1992/000533</p> <p>(87) 国際公開番号 W01992/022644</p> <p>(87) 国際公開日 平成4年12月23日(1992.12.23)</p> <p>審査請求日 平成11年6月2日(1999.6.2)</p> <p>審判番号 不服2002-1615(P2002-1615/J1)</p> <p>審判請求日 平成14年2月4日(2002.2.4)</p> <p>(31) 優先権主張番号 91/07179</p> <p>(32) 優先日 平成3年6月12日(1991.6.12)</p> <p>(33) 優先権主張国 フランス(FR)</p>	<p>(73) 特許権者 500470471 アンステイテュ ナショナル ドラ ルシェルシュ アグロノミク フランス国パリ、リュ、ド、リュニベルシ テ、145</p> <p>(74) 代理人 100064285 弁理士 佐藤 一雄</p> <p>(74) 代理人 100094640 弁理士 紺野 昭男</p> <p>(72) 発明者 ウードピンス、ルイーマリー フランス国ビュック、リュ、デュ、アラ、 9ピス</p> <p>(72) 発明者 ドビノワ、ユーブ フランス国ジフーシュールーイベット、リ ユ、ジューバトンヌ、73テール 最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック哺乳類の乳汁中への所望なタンパク質の産生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

雌マウスの乳汁中への、成熟した形態または融合した形態での目的異種タンパク質の製造方法であって、

前記雌マウスを飼育し、

乳汁を回収して、そこから前記タンパク質を回収して必要ならば単離することを含んでなり、

前記雌マウスは、そのゲノム中に目的のタンパク質をコードするDNAが組み込まれてなるトランスジェニックマウスであって、該目的のタンパク質をコードするDNAが、第1図に示されるウサギWAPプロモータ領域の3'末端から少なくとも6.3Kbの長さを有するフラグメントの制御下にあることを特徴とする、方法。

【請求項2】

WAPプロモーターのDNAが、第1図に示されるHindIIIとBamHI部位の間の6.3Kb配列を含むものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項3】

前記目的の異種タンパク質をコードするDNAが、第1図に示されるプロモータ領域の3'末端から17Kbの長さのフラグメントの制御下にある、請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

【請求項4】

WAPプロモーターのDNAが、第1図に示されているHindIIIとEcoRIとの

間の17Kbの配列を含むものである、請求の範囲第3項に記載の方法。

【請求項5】

前記目的のタンパク質をコードするDNAの5'末端側に、第1図に示されるプロモータ領域が存在する、請求の範囲第1～4項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

異種タンパク質をコードするDNAに対応するDNAにおいて、イニシエーターのATGコドンが欠失している、請求の範囲第1～5項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記雌マウスの乳汁から目的のタンパク質を回収するために、

- a) 乳腺を回収し、
- b) この乳腺を、温度0℃で2時間～18時間インキュベートし、
- c) 乳腺から自然に滲出した乳汁を回収し、
- d) この乳汁から目的のタンパク質を単離して、前記の精製したタンパク質を得る、請求の範囲第1～6項のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項8】

異種タンパク質をコードするDNAが、ヒト成長ホルモンをコードするDNAである、請求の範囲第1～7項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

異種タンパク質が、
成長因子、
インターロイキン、
刺激因子、
キナーゼ、
凝固因子、
-抗トリプシン、
ヒルジン

20

から選択される、請求の範囲第1～8項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

タンパク質が、
エリスロポエチン
G-CSF、
-抗トリプシン

30

ウロキナーゼ、
VILII因子

から選択される、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項11】

目的のタンパク質をコードするDNAが、VILII因子遺伝子の最初のイントロン、およびその後にあるヒトVILII-I因子のcDNAからなるものである、請求の範囲第10項に記載の方法。

【請求項12】

ゲノム中に目的の異種タンパク質をコードするDNAを含み、それが第1図に示されるウサギWAPプロモータ領域の3'末端から少なくとも6.3Kbの長さを有するフラグメントによって制御されるものである、真核細胞。

40

【請求項13】

雌マウスの乳房の主要上皮細胞である、請求の範囲第12項に記載の真核細胞。

【請求項14】

請求の範囲第12および13項のいずれか一項に記載の細胞を含んでなる、トランスジェニックマウス。

【請求項15】

第1図に示されるウサギWAPプロモータ領域の3'末端から少なくとも6.3Kbの長

50

さを有するフラグメントの制御下にある、目的のタンパク質をコードする少なくとも1種類の異種遺伝子を含んでなる、DNA。

【発明の詳細な説明】

本発明は、トランスジェニック動物の乳汁への所望なタンパク質の調製法に関する。本発明はそのような動物を得ることを可能にする構築物、得られた動物、並びに異種タンパク質を発現させる構を含む細胞にも関する。

生物学上、治療上または産業上望まれる、天然にはわずかな量でしかまたは精製が難しい形態でしか産生されないタンパク質を得る目的で、いくつかの方法が検討されてきた。

これにより、細菌または酵母のような微生物による遺伝子組換え技術を使用してタンパク質を産生することが可能となった。しかしながら、大部分のタンパク質では、合成後にある種の反応基の化学修飾、グリコシル化などの成熟段階が必要である。原核細胞は、この成熟を行い、したがって不活性タンパク質および/または高い抗原性を有するタンパク質を産生するのに十分な量の酵素を含有していない。

それ故、真核細胞中でこれらのタンパク質を合成し、適当な酵素的転換を行うようにするのが好ましい。しかしながら、組織細胞を大規模に培養するには、多くの技術的および経済的問題が存在する。

それ故、もう一つの方法は、トランスジェニック動物を用い、イン・ビボで細胞によってこれらのタンパク質を産生させることからなっている。用いる系には、回収が容易なタンパク質を多量に産生させることができることが望まれる。それ故、組換えタンパク質がトランスジェニック動物の乳腺で産生され、乳汁中に排出されることが有利である。これは実に容易に採集することのできる体液であり、その複雑さも比較的限られており、タンパク質分解活性も低く、加えて、組換えタンパク質の成熟工程も確実に行われることになると思われる(グリコシル化、リン酸化、分裂等)。

このようにして、マウスまたは雌ヒツジの乳腺で、別種の乳汁タンパク質または通常は乳汁中に存在しないタンパク質を合成することができるようになった(文献1~15)。

しかしながら、このようにして産生されるタンパク質の濃度は極端に変化する可能性がある。これは、それ自体が動物毎に変化する導入遺伝子(transgene)の組み込み過程によって、トランスジェニック動物毎に異なってしまうことによる。遺伝子構築物の性質もまた重要であり、乳汁タンパク質遺伝子の発現を調製する要素は多数あり、遺伝子のプロモーター領域および転写部分の各種の地点に位置すると考えられる。ヒツジの κ -ラクトグロブリン、ラットWAPおよびラット α -カゼインのプロモーターによって、これらのタンパク質をトランスジェニックマウスで合成させることができる。しかしながら、その濃度は、系統的には κ -ラクトグロブリンの場合のみ高い。同様に、 α -ラクトグロブリンプロモーターはヒト α - α_1 -抗トリプシンの合成を指示し、これはトランスジェニックマウスの乳汁中で乳汁1ml当たり7mgの値に達する。この α - α_1 -カゼインプロモーターによりヒトウロキナーゼを合成することができるが、今日まで使用されてきたラット α -カゼインおよびウサギ α -カゼイン遺伝子のプロモーターの活性は限定されたものである。マウスWAP遺伝子のプロモーターは、トランスジェニックマウスの乳汁中に分泌される数種類の異種タンパク質(プラスミノゲン活性化因子、CD4)の合成を指示する。しかしながら、このプロモーターによって得られるタンパク質の量は比較的少ない。

更に、プロモーターが外来遺伝子との会合によってその特異性が修飾されることも起り得る。この方法で、Guenzburg等(Molecular Endocrinology 1991年)は、トランスジェニック動物において、マウスWAPプロモーターに依存する組み換えDNAを用い成長ホルモンの分泌物を得ているが、成長ホルモンはこの場合にはBergmanのグリア細胞中に小脳でも産生される。このような現象が、毒性および動物の早熟死をもたらすこともある。

本発明は、うさぎWAP遺伝子のプロモーターの特に興味深い現象に基くものである。実際に、ウサギWAP(「乳清の酸性タンパク質」)は、比較的豊富に存在するウサギの乳汁タンパク質(乳汁1ml当たり15mg)であり、ウサギは大規模に使用することのできるトランスジェニック動物と考えることができる。

10

20

30

40

50

本発明は、雌哺乳動物の乳汁中で目的の異種タンパク質を成熟した形態または融合した形態で調製する方法であって、この方法は、

雌哺乳動物を飼育し、

乳汁を回収し、そこからタンパク質を回収し、必要ならば分離することからなる方法であって、

前記雌哺乳動物は、そのゲノム中に、ウサギWAPタンパク質を発現させる要素中に存在しかつ完全なWAPプロモーターの3'末端かせ少なくとも3Kbの長さを有するフラグメント上に位置している少なくとも一つの配列の制御下にある、目的のタンパク質をコードする配列が組み込まれてなるトランスジェニック動物であることを特徴とする方法に関する。

10

好ましくは、本発明は、目的のタンパク質の発現を制御する配列が、WAPプロモーター3'末端から3Kbと6.3Kbとの間のフラグメント上に位置する発現要素をも含んでいる方法に関する。

トランスジェニック動物の生産は既知であり、前記の報告中に同様の構築物について広汎に説明されているが、

G u n z b u r g ら、

H e n n i g h a u s e n ら、B u r d o n ら、R e d d y らの文献並びに特許WO9005188号明細書にも記載されている。

遺伝子導入の方法についての詳細な説明は詳しく繰り返し述べることはしないが、前記の文書を本明細書の開示の一部として引用する。

20

「目的の異種タンパク質」とは、天然にはウサギWAPプロモーターによって制御されないタンパク質を本質的に指すものとする。

本発明の方法では、使用する雌哺乳動物は好ましくはウサギであるが、これらの構築物は他の哺乳類、例えばマウスでも有効である。

得られた乳汁は目的のタンパク質を含んでおり、これは単離することができ、あるいは次にそれが成熟した形態であるか融合した形態であるかによって、必要ならば化学的または酵素的な開裂を行わせることができる。

用いるDNA構築物は、1細胞から8細胞段階までの受精卵へマイクロインジェクションによって導入した後、前記に説明する基準に適合する動物、すなわちトランスジェニックであって乳汁中で前記のタンパク質を発現する動物を選択するのが好ましい。

30

細菌性のクロラムフェニコールアセチル転移酵素(CAT)のレポーター遺伝子上にグラフトされたWAP遺伝子のプロモーター領域は、2種類の極めて重要な乳汁分泌ホルモンであるプロラクチンおよび糖質コルチコイドに感受性である要素を含む。これらのホルモンは、ハイブリッド遺伝子をウサギ乳房の主要上皮細胞(primary epithelial cell)にトランスフェクションすると、CAT遺伝子の発現に強い刺激を与える。このホルモン応答は、使用するプロモーターの長さによって変化する。それ故、ウサギWAP遺伝子のプロモーターは、今日まで使用されてきたマウスおよびラットのWAP遺伝子のプロモーターよりも遥かに効果的である。

特に、本発明による方法では、ウサギWAP遺伝子の完全プロモーターに対応する配列またはプロモーターの機能を保持する同等の配列を目的のタンパク質をコードする配列の5'末端に先行させることができる。この場合には、総てのWAP遺伝子および前記の遺伝子または同等の配列のWAPプロモーターを使用することも可能である。本出願明細書に添付されている第5図は、前記のウサギWAP遺伝子を表わしているものである。

40

「同等の配列」とは、好ましくはWAPプロモーターの3'末端から少なくとも3Kbの長さを有し、特に完全なウサギWAPプロモーターの3'末端から少なくとも6.3Kbの長さを有するフラグメント上に位置し、とりわけHindIIIおよびBamHI部位(第1図)の間に位置する、発現要素を含むものを表わすと理解される。

このプロモーターは、HindIIIおよびEcoRI部位の間の17Kbの配列、または、このフラグメント上に位置する発現要素を含む配列を含むことができる。本発明の構

50

築物に必須の要素は、プロモーターの3'末端から17.6Kbの長さを有するフラグメント上に位置する。

この長いプロモーターは、これに結び付いている外来遺伝子の発現を更に促進する要素を提供し、またはこれらをゲノムに導入された遺伝子の挿入部位と更に独立させることによって、一層規則的に高く発現させることができる。

6.3Kbの短いプロモーターは、乳汁産生ホルモンという、17Kbの長いプロモーターによって得られるものと實際上同一のホルモンに応答し、遺伝子が非常に高レベルでベクター中においてそれと関連しているタンパク質の合成を指示することができる。

本発明は、前記で定義した構築物であってウサギWAPタンパク質遺伝子に対応する配列においてイニシエーターAUGコドンが欠失しているものにも関する。

この修飾は特に、部位特異的突然変異誘発によって得ることができる。

目的のタンパク質をコードする配列がWAP遺伝子の総てまたは一部の配列と融合した形態であるときには、このタンパク質のATG配列をなくすことができる。

従って、ウサギWAPタンパク質は、この種類の構築物を用いて例えばトランスジェニックマウスで発現させることができる。

イニシエーターのAUGコドンを喪失しているいてもよいウサギWAPタンパク質遺伝子を含むこの種類の構築物においては、目的のタンパク質に対する遺伝子またはcDNAを、実施例から明らかになるように、異なる部位に配置して、異なるレベルおよび種類の構築物を生じさせることができる。

本発明の別の態様によれば、雌哺乳動物の産生する乳汁およびこれに含まれるタンパク質を回収する方法であって、前記の雌哺乳動物の乳汁から目的のタンパク質を回収するため、

- a) 乳腺を回収し、
- b) この乳腺を、約0°Cの温度で2時間～18時間インキュベートし、
- c) 乳腺から自然に滲出した乳汁を回収し、
- d) 目的のタンパク質を乳汁から単離して、前記の精製したタンパク質を得ることを特徴とする方法が提供される。

この方法は、異種タンパク質の産生の枠組で、WAPタンパク質遺伝子とそのゲノムフラグメントに組み込んだトランスジェニック動物を用いて開発したが、これは乳汁から単離することが所望な任意のタンパク質の精製に応用することができる。

これは、反芻動物以外の哺乳類の通常の採乳方法と比較すると、その採集量に関しては、とりわけマウスのような小動物ではかなり有利であることを示している(24)。回収した乳汁の組成は、自然に産生した乳汁の組成と同じである。また、この方法では、乳腺を水中で輸送することによって、生産場所で得られた生成物を精製および処理の場所へと容易に運搬することができる。

本発明の異種タンパク質の調製法では、その変法のいずれによっても、多種類のタンパク質を得ることが可能である。これらのタンパク質の中で、下記のもものが特記される：

- 成長因子、
- インターロイキン、
- 刺激因子、
- キナーゼ、
- 凝固因子、
 - 抗トリプシン、
- ヒルジン
- 特に、
- エリスロポエチン、
- G-CSF、
 - 抗トリプシン、
- ウロキナーゼ、
- VIII因子。

10

20

30

40

50

下記の構築物を挙げることができる：

- W A P - ヒト α_1 - 抗トリプシン構築物 (A r g 3 5 8 類似体) : M e t h 3 5 8 の代わりに A r g 3 5 8 を有するヒトの全 α_1 - 抗トリプシン遺伝子 (Courtney, Bull. Inst. Pasteur, (1988), 86, 85-94) を、 W A P - G H 構築物をモデルとして、未翻訳の 5' P 配列の H i n d I I I 部位のウサギ W A P 遺伝子の長いプロモーター (1 7 . 6 K b) に融合した。数種類のラインのマウスが、ヒト遺伝子を乳汁 1 m l 当たり 5 m g の濃度で発現する。

- W A P - ヒトエリスロポエチン構築物： ヒトの全エリスロポエチン遺伝子 (Semenza 等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, (1989), 86, 2301-2305) をウサギ W A P 遺伝子のプロモーター (6 . 3 K b および 1 7 . 6 K b) に融合した。

- W A P - ヒト V I I I - I I 因子構築物： ヒトの V I I I - I I 因子の c D N A (B 領域から欠失したもの [Meulienら、Prot.Engin, (1988), 2, 301-306]) であって V I I I 因子遺伝子の最初のイントロンがその前にあり、ポリアデニル化配列を欠いたものを、部位特異的突然変異誘発によって導入された H i n d I I I 部位であって天然の A U G より前にウサギの全 W A P 遺伝子の内側に導入する。

本発明による構築物によって全く予期しない結果を得ることができ、特にヒトおよびウシ成長ホルモン遺伝子と結合した W A P の 6 . 3 k b プロモーターが、トランスジェニックマウス乳汁中でこれらのタンパク質の合成を、極めて高い濃度 (1 - 2 1 m g / m l) で指示できることのできるものである。

トランスジェニックマウスの乳汁に含まれる h G H は、構造的に完全である。この h G H は、その生物学的活性も保存していた (その成長ホルモン活性ではなく、プロラクチン活性により評価) 。生物学的試験では、ホルモン濃度は 1 0 m g / m l であり、この値は放射免疫学的試験および電気泳動法により得た値と一致している。

それ故、ウサギ W A P 遺伝子のプロモーターは、今日まで用いられてきたマウスおよびラットの W A P 遺伝子のプロモーターより遥かに効果的である。

下記の第 1 表は、出版物 2 から 1 5 の結果をまとめたものであり、従って先行技術で公表された利点と比較して本発明による構築物を用いて得られる利点を明らかにしている。

10

20

第1表: トランスジェニック動物の乳汁中で発現した様々な組換えタンパク質の概要

使用プロモーター	コードしたタンパク質	使用動物	乳汁中でタンパク質を 発現する動物数	乳汁中のタンパク質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ウシ α -カゼイン	ヒトウロキナーゼ	マウス	3匹中1	1000
ウサギ β -カゼイン	ヒトインターロイキン-2	ウサギ	4匹中4	0.001~0.01
ヒツジ β -ラクト グロブリン	ヒト凝固因子IX	雌ヒツジ	2匹中2	0.01
ヒツジ β -ラクト グロブリン	ヒト α_1 -抗トリプシン	雌ヒツジ	2匹中2	5
マウスWAP	ヒトcD4 [sic]	マウス	13匹中7	6~7000
マウスWAP	ヒトtPA	マウス	7匹中5	0.4
マウスWAP	タンパク質PS2	マウス	6匹中4	0.08~50
マウスWAP	ヒトGH	マウス	1匹中1	1.5
ウサギ短WAP	ヒトGH	マウス	8匹中8	1000
ウサギ短WAP	ウシGH	マウス	6匹中6	5~21,000
ウサギ長WAP	ウシGH	マウス	8匹中8	1200~16,700
ウサギ長WAP	ウシGH	マウス	4匹中4	87~6900

必須の前提の1つは、ウサギのDNAフラグメント(6.3Kb)が、そのマウスおよびラットの相同染色体(2.6Kbおよび0.9Kb)よりも遅かに長かったということにあると考えることができる。必須の制御要素は、使用したマウスおよびラットDNAフラ

グメントでは欠落している場合がある。

本発明はまた、本発明によるトランスジェニック動物を得ることができる構築物にも関する。

本発明は、とりわけDNA配列およびベクターであって本発明の方法の実施を可能にするもの、特に、ウサギWAPタンパク質を発現させる要素中に存在しかつ完全なWAPプロモーターの3'末端から少なくとも3Kbの長さを有するフラグメント上に位置している少なくとも一つの配列の制御下にある、目的のタンパク質をコードする少なくとも一つの異種遺伝子を含んでなるDNA配列に関する。

本発明は、本発明による方法に使用することのできるトランスジェニック動物、および、本発明による構築物を含む形質転換細胞にも関する。

10

対象となる動物は様々なものがあげられるが、ウサギは豊富な組換えタンパク質を得るのに用いることができると考えられる動物である。毎日最大100mlまでの乳汁を採集することができる。この乳汁は、タンパク質に富む(反芻動物の乳汁より遥かに豊富である)。大型のトランスジェニック動物よりもウサギを得る方が、一層容易で廉価である。また、ウサギWAP遺伝子のプロモーターは、ウサギの組換えタンパク質合成を指示する上で最善のものと考えられる。

本発明の他の特徴および利点、[sic]は、下記の図を参照しながら下記の実施例を読むことにより明らかになる。

第1図 ウサギWAP遺伝子地図。

第2a図 プラスミドpW₃構築物の概略図。

20

第2b図 プラスミドp-ポリIII-Iのポリリンカー。

第3図 プラスミドpJ₄構築物の概略図。

第4図 構築物pW₃およびpJ₄を有するトランスジェニックマウスラインにおけるヒトおよびウシ成長ホルモンの産生。

第5図 ウサギWAP遺伝子配列。

第6図 イン・ビボで使用した様々な構築物の概略図。

第7図 CATレポーター遺伝子および可変長さのプロモーターWAPを含む構築物の概略図。

第8図 第7図に記載した構築物の効率。

実施例1: プラスミドpW₃の構築物

30

最初にプラスミドp26Cを調製する。

プラスミドp26Cは、WAP遺伝子BamH₁-HindIII配列(第1図の6.3Kbフラグメント)を(BamH₁[sic]およびHindIII部位の間の)P-ポリIII-Iベクターのポリリンカーに導入することによって得た。

このクローニングの際に、BamH₁[sic]部位は欠失され、ベクターp26Cに存在するClaI部位と交換された(第2図)。それ故、ベクターp26Cは6.3KbWAPプロモーターの依存下で配置された外来遺伝子を受け入れることのできるプラスミドである。外来遺伝子の導入は、例えばポリリンカーのSalI部位で行うことができる(第2図)。この全プロモーターおよび外来遺伝子を含む挿入物は、プラスミドのポリリンカーp-ポリIII-Iの末端にある2つのNotI部位で切断した後プラスミドから単離することができる。

40

プラスミドp26Cから得られるプラスミドpW₃(第2図による)は、ウサギWAP遺伝子のプロモーター(6.3Kb)およびヒト成長ホルモン遺伝子(hGH)を含む。このトランスジェニックマウスを得るために使用するフラグメントは、2つのNotI部位の間にある。

HindIII部位を部位特異的突然変異誘発によって遺伝子のリーダーシーケンスに導入して、クローニング部位として働くようにした。

実施例2: プラスミドpJ₄の構築物

プラスミドp26から得られるプラスミドpJ₄(第3図による)は、ウサギWAP遺伝子のプロモーター(6.3Kb)およびウシ成長ホルモン遺伝子(bGE)を含む。トラ

50

ンスジェニックマウスを得るのに用いたフラグメントは、2つのNot I部位の間にある。

プラスミドp26を含むE. coli株は、1991年6月12日に寄託番号I-1116で、パスツール研究所のCollection Nationale de Culture de Microorganismes、25Rue du Docteur Roux、75724PARIS CEDEX15に寄託された。

実施例3： トランスジェニックマウスの産生

pW₃ およびpJ₄ フラグメントを用いてトランスジェニック動物を得た。トランスジェニックマウスは、従来手法であるマイクロインジェクション (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985), 82, 4438-4442) によって得た。500コピーの遺伝子を含む2-p1を、マウス胎児の雄性前核に注入した。この構築物は、ベクターp-ポリIIII-Iで調製した (Lathe et al., Gene(1987), 57, k193-201)。組換え遺伝子を含むこのベクターのNot I - Not Iフラグメントをマイクロインジェクションした。次に胎児をホルモン調製した養母の雌性卵管に移した。操作した胎児の約10%から幼若マウスが生まれ、操作した胎児の2-5%からトランスジェニック幼若マウスが生まれた。導入遺伝子の存在は、マウスの尾から抽出したDNAからのサザンブロッティングの手法によって確認した。動物の血液および乳汁中の成長ホルモンの濃度は、特異的な放射免疫的試験によって評価した。

10

hGHの生物学的活性は、乳汁をウサギの細胞または乳房の組織片の培地に加えることによって評価した。乳汁中のhGH含有量は、mRNAおよびタンパク質の測定によって評価した。カゼイン遺伝子の発現を引き起こした。

20

実施例4： 構築物pW₃ およびpJ₄ を組み込んだトランスジェニックマウスの乳汁中のヒトまたはウシ成長ホルモンの産生

ホルモン濃度は、特異的な放射免疫学的試験によって測定した。

トランスジェニックマウスの乳汁におけるhGHの同定は、下記の手段で行う。マウス乳汁を150,000gで1時間遠心分離してカゼインミセルを沈澱させる。この上清(ウェル当たり1μl)を回収し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって、コントロールのヒト成長ホルモンおよびコントロール乳汁の存在下で検討した。この結果を第4図に示す。

構築物pW₃ を組み込んだ動物は、乳汁1ml当たり10mg程度のhGH濃度となり、1ml当たり21mlに達する場合もある。

30

構築物pJ₄ を組み込んだ動物は、乳汁1ml当たり5ml程度から17mg/mlまでのbGHを産生する。

本発明による方法では、1.5mlの乳汁/マウス乳腺の収穫が可能になる(乳腺を氷中に入れることによる)。それ故、3~5mlの濃度で外来タンパク質を発現する200匹の授乳マウスは、粗タンパク質1gを提供する。

実施例5： 遺伝子構築物

トランスジェニック動物の乳汁で組換えタンパク質を発現するのに使用する遺伝子構築物は、いずれの場合にもウサギWAP遺伝子の調節領域であるBamH¹ - HindIIIフラグメント(6.3Kb)またはEcoRI - HindIIIフラグメント(17.6Kb)を含む。プラスミドWAP - hGH、WAP - bGH、WAP - - ATおよびWAP - EPOは、それぞれ、ヒト成長ホルモン(hGH)、ウシ成長ホルモン(bGH)、Arg358で変異させたヒト₁ - 抗トリプシンおよびヒトエリスロポエチンの全遺伝子(リーダー配列、エキソン、イントロンおよび複製終結因子)を含む。これらの構築物において、遺伝子はHindIII部位でWAP遺伝子の調節領域と関連されていた。この構築物WAP - FVIIII - IIIは、ヒトVIIII因子のcDNAを、ヒトVIIII因子遺伝子のイントロンが前にあるIIIの形態で含む。このイントロン - cDNA集合体を、ウサギの全WAP遺伝子(第6図)のHindIII部位に導入した。

40

実施例6： インビトロにおけるウサギWAP遺伝子の制御領域の活性の同定

WAP遺伝子の転写開始部位の上流に位置する領域の種々の長さのものを、レポーター遺伝子(CAT遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)と結合した(

50

第7図)。これらの構築物は、ラットの尾のコラーゲンIゲル上で培養した乳房の上皮細胞に、リポフェクチンを用いたトランスフェクションによって導入した。次にこの細胞を、ホルモン(インシュリン、コルチゾール、プロラクチン)の存在下で3日間保持した。次いで、この酵素を細胞抽出物中で測定した。1806bpまたはそれ未満の調節領域しか含まない構築物は、CAT遺伝子を発現させない。3000bpを含む構築物には弱い活性があるが、6300および17,600bpを含む構築物は、ホルモンの存在下で明らかに発現する。プロラクチンは単独では、CAT遺伝子上では弱い有意な誘導作用を有する。インスリンおよびとりわけコルチゾールは、単独では不活性であるが、プロラクチンの作用を増幅する。遺伝子のホルモンに対する感受性は、細胞の内在WAP遺伝子の感受性と全く同じである。それ故、-3000-1806bpおよび-6300-3000bp領域は、WAP遺伝子を強力に発現させるのに必須の制御要素を含む(第8図)。17,600-6,300bpフラグメントは、インビトロでは追加の刺激を与えることはないが、これがトランスジェニック動物中でインビトロにおけるこのような作用を有するというものを除外するものではない。これらの実験により、インビトロでのWAP遺伝子の制御領域の活性を、細胞のトランスフェクションによって初めて明らかにした。

10

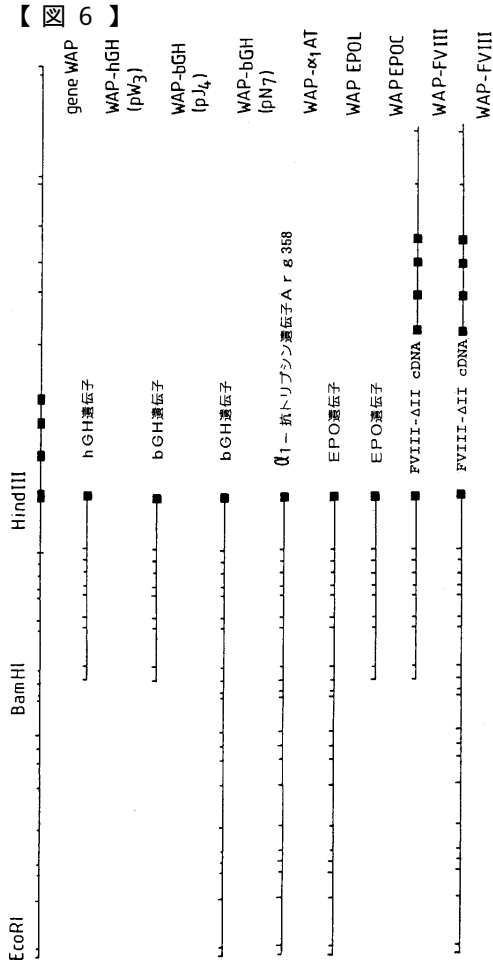
参考文献

1. VAN BRUNT J. *Biotechnology* (1988) 6, 1149-1154
2. SIMONS J.P. et al. *Nature* (1987) 328, 530-532
3. SIMONS J.P. et al. *Biotechnology* (1988) 6, 179-183
4. CLARK A.J. *Biotechnology* (1989) 7, 487-492
5. ARCHIBALD A.L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87, 5178-5182 .
6. HARRIS et al. *J. Reprod. Fert.* (1990) 88, 707-715
7. GORDON K. et al. *Biotechnology* (1987) 5, 1183-1187 10
8. PITTIUS C.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5874-5878
9. PITTIUS C.W. et al. *Mol. Endocr.* (1988) 2, 1027-1032
10. YU S.H. et al. *Mol. Biol. Med.* (1989) 6, 255-261
11. LEE K.F. *Nucleic Acids Res.* (1989) 16, 1027-1040
12. MEADE H. *Biotechnology* (1990) 8, 443-446
13. BUHLER T.A. *Biotechnology* (1990) 8, 140-143
14. VILOTTE J.L. *Em. J. Biochem.* (1989) 186, 43-48 20
15. BAYNA E.M. et al. *Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 2977-2985
16. LEE K.F. et al. *Mol. Cell Biol.* (1989) 9, 560-565
17. GRABOWSKI H. et al. (submitted for publication)
18. DEVINOY E. et al. *Nucleic Acids Res.* (1988) 16, 11814
19. THEPOT D. et al. *Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 3641
20. GUNZBURG W.H. et al. *Molecular Endocrinology* (1991). 30
A mammary-specific Promoter Directs Expression of Growth Hormone not only to the Mammary Gland, but also to Bergman Glia cells in Transgenic Mice.
21. HENNIGHAUSEN L. *Protein Expression and Purification* (1990) 1, 3-8
22. BURDON T. et al. Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development: Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation 40
23. REDDY B.V. et al. Human Growth Hormone Expression in Transgenic Mouse Milk, abstract in *Transgenes, Development and Disease*. p.212
24. MASCHIO A. et al. (1991) *Biochem. J.* 275 454-467

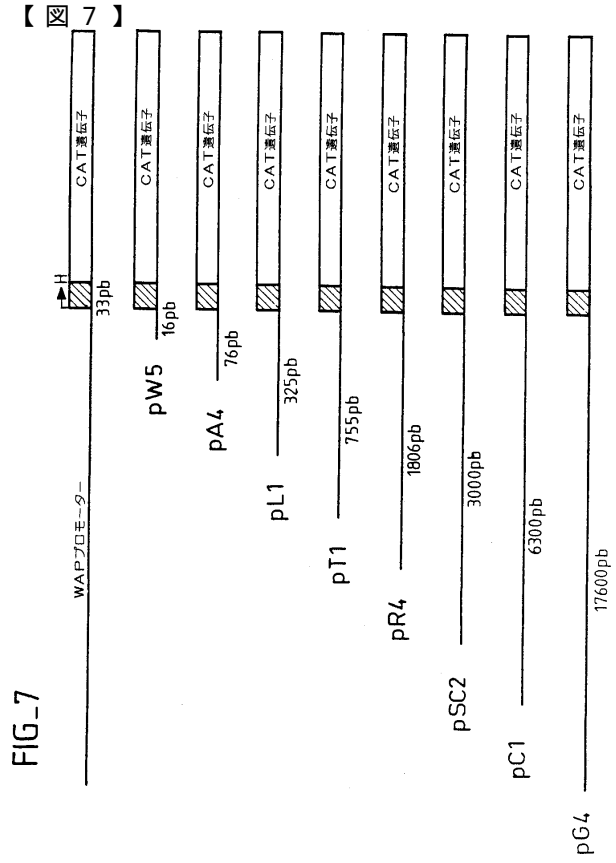
図面の説明

第6図

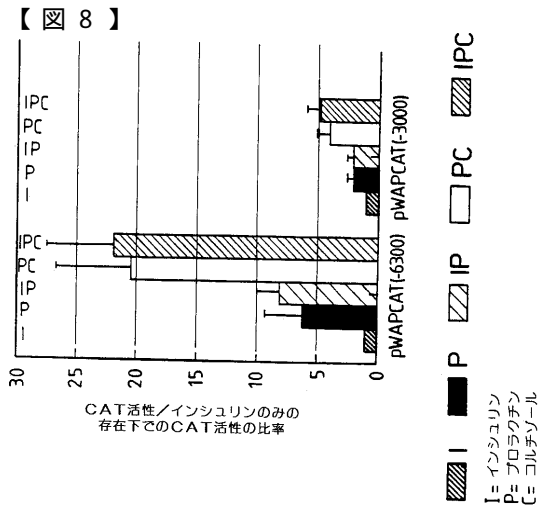
トランスジェニック動物の乳汁に含まれる組換えタンパク質を発現させるのに用いた構築物。



FIG_6



FIG_7



FIG_8

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72) 発明者 テポ, ドミニク
フランス国リブリ - ガルガン、アレ、デ、ボスケ、19

合議体

審判長 佐伯 裕子

審判官 阪野 誠司

審判官 種村 慈樹

(56) 参考文献 Yu S.H., et al., Mol. Biol. Med. (1989), Vol. 6, p.
255 - 61
Devinoy E., et al., Nucleic Acids Research (1
988), Vol. 16 (16), p. 8180

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01K 67/027