

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3785602号
(P3785602)

(45) 発行日 平成18年6月14日(2006.6.14)

(24) 登録日 平成18年3月31日(2006.3.31)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 D
C 1 2 N 9/20 (2006.01)	C 1 2 N 9/20

請求項の数 9 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平8-86022
 (22) 出願日 平成8年3月15日(1996.3.15)
 (65) 公開番号 特開平9-248190
 (43) 公開日 平成9年9月22日(1997.9.22)
 審査請求日 平成15年3月12日(2003.3.12)

特許法第30条第1項適用 平成7年7月25日 社団法人日本生化学会発行の「生化学 Vol. 67, No. 7」に発表

(73) 特許権者 596048411
 東城 博雅
 兵庫県西宮市甲陽園山王町1-88-305
 (72) 発明者 東城 博雅
 兵庫県西宮市甲陽園山王町1-88-305
 (72) 発明者 長谷川 明
 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社 総合研究所内

審査官 上條 肇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規ホスホリパーゼ及びそれをコードするDNA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を共に有し、配列番号：1に示すアミノ酸配列中少なくとも第367位のアミノ酸Lysから第712位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾されているアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項2】

配列番号：1の第367位のアミノ酸Lysから第712位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾されているアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の蛋白質。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項4】

配列番号：1に記載の塩基配列を有するDNAと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性の両方を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項5】

請求項4に記載のDNAによりコードされている蛋白質。

【請求項6】

請求項3又は4に記載のDNAを含んで成るベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターにより形質転換された宿主。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の宿主を培養し、そして培養物から、ホスホリパーゼ B 活性及びリパーゼ活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする、ホスホリパーゼ蛋白質の製造方法。

【請求項 9】

同程度の高いホスホリパーゼ A₂ とリパーゼ比活性を示し、小腸、精巣（精子）、食道に特異的に発現する請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

10

【発明の属する技術分野】

本発明は新規なホスホリパーゼ、該ホスホリパーゼをコードする遺伝子系、及び該ホスホリパーゼの製造方法に関する。本発明のホスホリパーゼはホスホリパーゼ活性及びリパーゼ活性を併せ持ち、臍臓ホスホリパーゼ補充療法剤、ホスホリパーゼ B / リパーゼ測定用試薬等として有用である。

【0002】**【従来の技術】**

ホスホリパーゼはリン脂質を加水分解する酵素の総称であり、リン脂質（グリセロールリン脂質）は、グリセロールの末端及び中央のヒドロキシル基に脂肪酸がエステル結合しており、他方の末端のヒドロキシル基にリン酸基を介してコリン、エタノールアミン等が結合している化合物である。グリセロールリン脂質中のグリセロール基の $s_n - 1$ 位の脂肪酸エステル結合を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼ A₁ と称し、グリセロール基の $s_n - 2$ 位の脂肪酸エステル基を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼ A₂ と称し、また、ホスホリパーゼ A₁ 活性及びホスホリパーゼ A₂ 活性を併有するホスホリパーゼをホスホリパーゼ B と称する。

20

【0003】

また、リン脂質中の末端又は中央の脂肪酸アシル基の内一方が除去されたリン脂質をリゾリン脂質と称し、リゾリン脂質に作用して残っている脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素も、分解生成物が前記ホスホリパーゼ B の場合と同じであるため、ホスホリパーゼ B に含められる。他方、リン脂質のグリセロール基とリン酸基との間のエステル結合を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼ C と称し、リン酸基とコリンやエタノールアミン等との間の結合を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼ D と称する。他方、脂肪酸のグリセリンエステルのアシル基を加水分解する酵素をリパーゼと称する。従来、ホスホリパーゼ B 活性とリパーゼ活性とを併有する酵素は知られていない。

30

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

従って、本発明は、ホスホリパーゼ B 活性とリパーゼ活性とを併有する新規な酵素を提供しようとするものである。

【0005】**【課題を解決するための手段】**

40

従って本発明は、ホスホリパーゼ B 活性及びリパーゼ活性を共に有し、配列番号：1 に示すアミノ酸配列中の少なくとも第 367 位のアミノ酸 Lys から第 712 位のアミノ酸 Asn までのアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して 1 個又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾されているアミノ酸配列を有する蛋白質、並びに配列番号：1 に示す塩基配列とハイブリダイズすることができる DNA によりコードされており、且つホスホリパーゼ B 活性及びリパーゼ活性を併有する蛋白質を提供する。

【0006】

本発明はさらに、上記の蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含んで成る組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。

本発明はまた、上記の宿主を培養し、該培養物から、ホスホリパーゼ B 活性及びリパーゼ

50

活性を併有する酵素を採取することを特徴とする該酵素の製造方法に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

酵素蛋白質

本発明の酵素は、単一の酵素としてホスホリパーゼ活性（リゾホスホリパーゼ活性を含めて）及びリパーゼ活性を有する多機能酵素である。例えば、ラットの小腸から精製した酵素は、ラット小腸膜分画から自己消化によって可溶化され、SDS-PAGEにより測定した分子量は非還元条件下で約35 kDaであり、還元条件下では14 kDa及び21 kDaの2本のバンドとして示される。ラットの近位回腸からのcDNAによりコードされている蛋白質は配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから1443位のアミノ酸Glnまでのアミノ酸配列を有する。

10

【0008】

この蛋白質は、図1に示すように、そのN-末端に、1位のMetから第30位のGlyまでのアミノ酸配列を有するシグナルペプチドを有し、C-末端に1421位のLeuから第1443位のTrpまでのアミノ酸配列を有する膜結合ドメインを有し、これらの間に4個の反復配列、すなわち第43位のLeuから第352位のAsnまでの第一反復配列、第367位のLysから第712位のAsnまでの第二反復配列、第714位のGlyから第1059位のAsnまでの第三反復配列、及び第1070位のAsnから第1408位のGlnまでの第四反復配列が存在し、この内図4に示すごとく、第二反復配列にホスホリパーゼB活性、リゾホスホリパーゼ活性及びリパーゼ活性が存在する。

20

【0009】

従って本発明の酵素蛋白質は、配列番号：1に示すアミノ酸配列の内、少なくとも第二反復配列に相当する第367位のLysから712位のAsnまでのアミノ酸配列を有し、このアミノ酸配列のN-末端及び/又はC-末端に更なるアミノ酸又はアミノ酸配列が付加されていてもよい。一般に、天然型酵素のアミノ酸配列中で少数のアミノ酸を変更しても本来の酵素活性が維持されることが知られている。

【0010】

従って、本発明の酵素は、上記のアミノ酸配列において1個～数個、例えば10個以下のアミノ酸が付加、欠失及び/又は他のアミノ酸による置換によって修飾されたアミノ酸配列を有していてもよい。本発明はさらに、配列番号：1に示す塩基配列を有するDNAと所定のストリンジェンシー条件下、例えば65℃、16時間（5×SSPE、0.5% SDS、1×Dendardt溶液、20 µg/mlサケ精子DNA）においてハイブリダイズするDNAによりコードされており、且つホスホリパーゼB活性（リゾホスホリパーゼ活性を含む）とリパーゼ活性とを併有する酵素をも包含する。

30

【0011】

遺伝子系

本発明はさらに、本発明の酵素をコードしており、該酵素の製造のために有用な遺伝子系すなわち、前記の種々のアミノ酸配列をコードするDNA、該DNAを含んで成る組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明のDNAの塩基配列は、前記の種々のアミノ酸配列をコードするものであればよいが、一例として、配列番号：1に示すコード領域の塩基配列又はその一部分から成るものが挙げられる。

40

【0012】

このDNAは、適当なcDNAライブラリーから選択されたcDNA、またはゲノミックDNAライブラリーから選択されたDNAであってもよい。cDNAやゲノミックDNAの選択は、例えば、本発明の酵素の部分アミノ酸配列に基いて設計されたDNAプローブを用いて行うことができ、あるいはそのようにして設計されたDNAをプライマーとして用いてPCR法により増幅してもよい。

【0013】

また、修飾されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAは、前記のDNAライブ

50

ラリーのスクリーニング又はPCR法により得た、生来の塩基配列を有するDNAを基礎にして、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば、修飾を導入したい部位を含むDNA断片を、上記により得られたcDNA又はゲノミックDNAの制限酵素消化により得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特定変異誘発又はPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得、これを、目的とする酵素の他の部分をコードするDNAに連結すればよい。

【0014】

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを、所望の制限酵素により切断し、得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合には、不足部分を合成DNAを連結することにより補えばよい。

10

【0015】

本発明はまた、前記のDNAを含んで成る組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。宿主としては、原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては、細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、等常用の宿主を用いることができる。

【0016】

真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母又は糸状菌が使用できる。酵母としては、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、ペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物等が挙げられる。さらに、動物細胞又は植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、又はカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

20

【0017】

本発明の発現ベクターは、それらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーター及びターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばlac, T7, trp等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばADHI, PHO5等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えば、グルコアミラーゼ遺伝子、-アミラーゼ遺伝子等のプロモーターが使用される。また、動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40、単純ヘルペス、チミジンキナーゼ (TK)、プロモーター等が使用される。

30

【0018】

発現ベクターの作製は、制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換も、常法に従って行うことができる。本発明はまた、ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を併有する前記蛋白質の製造方法に関する。前記の発現ベクターにより形質転換された宿主を培養又は飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする蛋白質を回収、精製することができる。本発明の酵素はまた、それを含有する組織又は器官、例えばラット小腸から上記のようにして回収、精製することもできる。

40

本発明の酵素は、例えば膵臓リパーゼ補充療法剤、小腸疾患の診断薬としてのホスホリパーゼ/リパーゼ測定系の試薬等として有用である。

【0019】

【実施例】

50

次に、本願発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例 1 . ホスホリパーゼ B / リパーゼの精製

ラット小腸刷子縁膜からのホスホリパーゼ B / リパーゼの精製を以下のように行なった。ペントバルビタール麻酔下に切除したラット小腸を - 3 5 で約 2 カ月間保存すると、その間にホスホリパーゼ B / リパーゼは限定分解により刷子縁膜から可溶化された。

【 0 0 2 0 】

可溶化酵素を Q A E - トヨパール、フェニルセファロース、Q A E - トヨパール、ヒドロキシアパタイト、C o n A - セファロース及びコスモゲル Q A の各クロマトグラフィーを用いて、約 8 2 0 0 倍に精製した。精製標品は非還元条件の S D S - 電気泳動において 3 5 kDa の位置に単一バンドとして泳動され、このバンドに一致してホスホリパーゼ A₂ 活

10

【 0 0 2 1 】

一方、還元条件の S D S - 電気泳動では 3 5 kDa のバンドは消失し、代りに 2 1 kDa と 1 4 kDa の二本のバンドが見られたが酵素活性は検出できなかった。本酵素の至適 pH は、ホスホリパーゼ A₂ 活性、リゾホスホリパーゼ活性及びリパーゼ活性ともに 9 付近であった。1 - アルキル - ホスファチジルコリン、ジアシル - ホスファチジルコリン及びジアシル - ホスファチジルエタノールアミンに対する反応性は、デオキシコール酸との混合ミセルを基質とした場合、大差はなかった。ジラジルリン脂質リポソームに対する反応性は低い

20

【 0 0 2 2 】

実施例 2 . ホスホリパーゼ B / リパーゼの部分アミノ酸配列の決定

精製された酵素を還元カルボキシメチル化し、逆相 H P L C で分離して 1 4 kDa と 2 1 kDa の二種類のポリペプチド鎖を得た。それぞれの N 末端からのアミノ酸配列をシーケンサーで決定した。その結果、1 4 kDa のポリペプチド及び 2 1 kDa のポリペプチドからそれぞれ次のアミノ酸配列が得られた。

(1) Glu Gly Thr Lys Phe Thr Cys Pro Asp Lys Asp Pro Ser Asp Ser Ile Pro (配列番号 : 2)

30

(2) Phe Ser Pro Gln Thr Phe Thr Asp Asn Ile Lys Thr Ala Leu Asp Ile Leu His Ala Glu Val Pro Arg Ala Phe Val Asn Met Val Ser (配列番号 : 3)

【 0 0 2 3 】

上記のアミノ酸配列中 9 個又は 1 0 個のアミノ酸に基いて下記のプライマー K F 及び Q T を設計し、常法に従って合成した。なお、プライマー K F の 5' - 末端の 8 塩基は人為的に付加した B a m H I 認識配列である。

プライマー K F : ccgatccAA(A/G)TT(C/T)ACITG(C/T)CCIGA(C/T)AA(A/G)GA(C/T)CC (配列番号 : 4)

40

プライマー Q T : GCIGT(C/T)TTIAT(A/G)TT(A/G)TCIGT(A/G)AANGT(C/T)TG (配列番号 5)

【 0 0 2 4 】

実施例 3 . c D N A のクローニング

実施例 2 において合成したプライマーを用いてラット c D N A ライブラリーを用いて、D N A 断片をクローニングした。ラット c D N A ライブラリーは次のようにして作製した。常法により回腸から抽出した 1 μ g の R N A を鋳型として、2 0 0 U の逆転写酵素 (S u p e r S c r i p t R T) により c D N A を合成した。1 / 2 量の合成 c D N A と上記プライマー K F とプライマー Q T (各 1 0 0 p m o l) を用い P C R 法によりホスホリパー

50

ゼ B ノリパーゼ c D N A 断片を増巾した。P C R 1 サイクルの条件は、9 4 、4 0 秒 ; 5 4 、1 分 ; 7 2 、1 分であり、これを 3 0 サイクル行なった。

【 0 0 2 5 】

増幅産物は、5 % ポリアクリルアミドゲル上単一バンド (5 4 0 b p) であったため、p C R I I プラスミドベクターに直接挿入した。こうして、5 4 0 b p の D N A 断片を得た。この断片は、ホスホリパーゼ B ノリパーゼの一部をコードしており、全長をコードしていないので、この c D N A 断片をプローブとして、ラット近位回腸から、M O S E l o x クローニングベクター (A m e r s h a m) を用いて、c D N A ライブラリーを作製した。この c D N A ライブラリーは、次の様にして作製した。

【 0 0 2 6 】

ラット回腸から精製したポリ (A) ⁺ R N A 6 μ g を用いて、常法により 2 本鎖 c D N A を合成した。c D N A の両端を平滑化後 E c o R I アダプターを付加し、5 0 0 b p より長い c D N A をスパンカラムにより集めた。この c D N A を M O S E l o x の E c o R I 部位に挿入した。このベクターを用い常法により i n v i t r o パッケージング反応を行なってライブラリーを完成させた。

【 0 0 2 7 】

スクリーニングのためのハイブリダイゼーションは次の様にして行なった。上記の 5 4 0 b p c D N A を ³²P でラベルした。ラベル化プローブ (5 × 1 0 ⁷ c p m) を 1 0 0 m l の 5 × S S P E 、0 . 5 % S D S 、1 × D e n h a r d t 溶液、2 0 μ g / m l 変性サケ精子 D N A を含む緩衝液中で 6 5 1 6 時間ナイロンフィルター上のレプリカと反応させた。未反応のプローブは、6 5 0 . 2 × S S P E 、0 . 1 % S D S 中で洗浄した。

【 0 0 2 8 】

こうして、1 9 個の陽性クローンを得、その 1 つを p M O S - R I P L B と称し、その全塩基配列をサンガー法により決定した。その結果を配列番号 : 1 に示す。この D N A は、全長 4 6 1 3 b p の c D N A であり、1 4 5 0 個のアミノ酸から成るアミノ酸配列をコードする 1 個のオープンリーディングフレーム (O R F) を含有し、その N - 末端には約 3 0 残基のシグナル配列を含んでいた。このアミノ酸配列において、成熟蛋白質部分は 4 回の相同な繰り返し配列と、C - 末端側の疎水性の膜結合部位とから構成されていた。この構成を図 1 に模式的に示す。

なお、配列番号 : 1 において、プライマー K F は第 3 7 1 位から第 3 7 9 位までのアミノ酸に対応し、プライマー Q T は第 5 3 2 位のアミノ酸から第 5 4 1 位のアミノ酸までに対応した。

【 0 0 2 9 】

実施例 4 . 酵素活性部位の決定

図 1 に示す全長蛋白質のどの部分に酵素活性があるかを明らかにするため図 2 に示すように、全長蛋白質の発現プラスミド p S V L - R I P L B に加えて、膜結合ドメインのみを除去した蛋白質 (配列番号 : 1 中、第 1 位の M e t から第 1 4 0 8 位の G l n までのアミノ酸配列を有する) をコードする発現プラスミド p S V L - C 、シグナルペプチドと第一反復配列とで構成される蛋白質 (配列番号 : 1 中、第 1 位の M e t から第 3 5 7 位の G l n までのアミノ酸配列を有する) をコードする発現プラスミド p S V L - # 1 、

【 0 0 3 0 】

シグナルペプチドと第二反復配列とから構成される蛋白質 (配列番号 : 1 中、第 1 位の M e t から第 4 0 位の P h e までのアミノ酸配列と、第 3 6 6 位の M e t から第 7 1 2 位の A s n までのアミノ酸配列を有する) をコードする発現プラスミド p S V L - # 2 、シグナルペプチドと第三反復配列とから構成される蛋白質 (配列番号 : 1 中、第 1 位の M e t から第 4 0 位の P h e までのアミノ酸配列と、第 7 1 2 位の A s n から第 1 0 5 9 位の A s n までのアミノ酸配列を有する) をコードする発現プラスミド p S V L - # 3 、及びシグナルペプチドと第四反復配列とから構成される蛋白質 (第 1 位の M e t から第 4 0 位の P h e までのアミノ酸配列と、第 1 0 6 8 位の I l e から第 1 4 0 8 位の G l n までのアミノ酸配列とを有する) をコードする発現プラスミド p S V L - # 4 を、次の様にして作

10

20

30

40

50

製した。なお、この作製過程を図3及び4に示す。

【0031】

pMOS-RIPLBをBamHIで切断して、cDNAをアガロース電気泳動で回収し、発現用ベクターpSVLのBamHI部位に挿入した。このベクターをpSVL-RIPLBと名づけた。シグナル配列部分をそれぞれの反復配列cDNAに連結するため、まず、第1位Metから第40位PheまでをコードするcDNAとその3'末端にNheI, DraI、ストップコドン、BamHIの順序のクローニングサイトを連結したDNA断片をPCR法により合成した。この際、プライマーとしてU18とNrevを用い、鋳型としてpSVL-RIPLBを用いた。

【0032】

このcDNA断片をpMOSblueに挿入し、pMOS-headと名付けた。次にpMOS-headをApaIとBamHIで切断したcDNA断片と、pSVL-RIPLBを同様に切断したプラスミッド側断片を回収し、お互いにつなぎ合わせてpSVL-headを作成した。pSVL-headには、NheI, DraI, MluI, BamHIのクローニングサイトが存在するので、これを利用してpSVL-#1, pSVL-#2, pSVL-#3, pSVL-#4, pSVL-Cを作成した。

【0033】

(1) pSVL-#1の作成：pSVL-RIPLBからApaIとPvuIIで切り出したcDNA断片と、pSVL-headからApaIとDraIで切断したプラスミッド側断片を連結して、pSVL-#1を作成した。

(2) pSVL-#2, -#3, -#4の作成：5'末端にNheI配列のあるセンス方向のプライマー(F2, F3, F4)と5'末端にMluIとストップコドンのあるアンチセンス方向のプライマー(R2, R3, R4)、鋳型としてpSVL-RIPLBを用いてPCR法により第2、第3および第4反復配列部分cDNAを合成した。これらのPCR産物を、pSVL-headをNheIとMluIで切断したプラスミッド側断片にクローニングして、pSVL-#2, -#3および-#4を作成した。

(3) pSVL-Cの作成：pSVL-RIPLBをBamHIで切断して作成したプラスミッド側断片にpSVL-#4のBamHI断片を挿入してpSVL-Cを作成した。

【0034】

実施例5．蛋白質の発現

実施例4に記載した各プラスミッドを用いて常法に従ってCOS細胞を形質転換した後、形質転換されたCOS細胞をダルベコ・改変イーグル培地中で37℃にて72時間培養し培養上清を採取後、細胞を剥離し、600μlのHEPES緩衝生食水に浮遊させた。細胞浮遊液を30秒2回超音波破碎し、1000g10分間4℃で遠心して上清を回収した。さらに上清を4℃で100,000g、45分間遠心し上清と沈殿に分離した。沈殿画分はHEPES生食200μlに分散させた。

【0035】

以上のようにサンプルを調製し、酵素活性(ホスホリパーゼA₂活性、リゾホスホリパーゼ活性、及びリパーゼ活性)を次のようにして測定した。

酵素活性は、基質(1mM)としてホスホリパーゼA₂反応には、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン(POPC)、リパーゼ反応にはトリオレオイルグリセロール(TOG)、リゾホスホリパーゼ反応には、1-パルミトイル-グリセロホスホコリン(LPC)を用い、0.1M Tris-HCl(pH8.5)、0.1M NaCl、胆汁酸(ホスホリパーゼA₂反応では6mMコール酸、リパーゼ反応では、6mMデオキシコール酸、リゾホスホリパーゼ反応では無添加)、10mMEDTAを含む溶液50μl中37℃で測定した。

反応はDole試薬(n-ヘプタン/2-プロパノール/2NH₄SO₄、10:40:1v/v)200μlを加え停止し、さらにn-ヘプタン120μl、水70μl、内部標準物質マルガリン酸5nmolを加え、反応産物の脂肪酸をn-ヘプタン層に抽出した。抽

10

20

30

40

50

出した脂肪酸を9-アントリルジアゾメタンで誘導体化後、逆相HPLC(98%アセトニトリル/2% H_2O 、アイソクラティック溶出)で分離、定量した。検出は、254nmのUV吸収を用いて行った。

【0036】

その結果、図5に示すように、いずれの酵素活性も、全長蛋白質(プラスミドpSVL-RIPLBから発現)及び第二反復配列(及びシグナル配列)から成る蛋白質(プラスミドpSV-#2から発現)において認められ、酵素活性部位が第二反復配列中に存在することが確認された。

さらに、前記の試料をイムノブロットング法により分析し、また前記培養細胞中のRNAについてノーザンブロットング法による分析を行った。

10

【0037】

イムノブロットング：試料として、pSVL-RIPLBで形質転換された細胞の場合は膜画分、それ以外のベクターを導入した細胞の場合には、培養上清を用いた。10%SDS-ポリアクリルアミドゲル各レーンに20 μg の蛋白質量をのせた。泳動後PVDf膜にブロットした。1次抗体として、ホスホリパーゼB/リパーゼの第450~1450番目のアミノ酸配列に対応する蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体を用い、2次抗体としてペルオキシダーゼラベル化抗ウサギIgG抗体を用いた。コニカイムノステインHRPキットにより発色させた。

【0038】

ノーザンブロットング：培養細胞から酸グアニジニウム-チオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法により全RNA画分を調製(各レーンに30 μg の全DNAをのせた。>した。³²Pラベル化全長RIPLB cDNAをプローブとして5 \times SSPE、5 \times Denhardt溶液、0.5%SDS、20 $\mu g/ml$ 精子DNA溶液中、42、16時間ハイブリダイズさせた。洗浄は65で行なった。その結果を図6に示す。

20

【0039】

発現ベクターpSVL-C, pSVL-#1, pSVL-#2, pSVL-#3, pSVL-#4を導入したCOS細胞では、それぞれのcDNAに対応する大きさのmRNAが発現していたが、cDNAを含まないpSVLのみを導入した細胞では本酵素のmRNAの発現は見られなかった。pSVL-RIPLB導入細胞では膜分画に200kDaの酵素が検出されたが(C-末端疎水性領域を欠くpSVL-C導入細胞では培養上清に酵素が検出された。この結果、C-末端疎水性ドメインが膜結合に関与することが明らかとなった。また、第2、第4反復配列に対応する酵素は、培養上清に検出されたが第1、第3反復配列に対応する酵素は検出できなかった。本実験に用いた抗体の反応性が各々の反復配列部分で異なっていることが示唆される。

30

【0040】

実施例6. ホスホリパーゼB/リパーゼの生体内分布

ホスホリパーゼB/リパーゼ酵素の生体内分布を調べるため、ラットの小腸、脳、肺、食道、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣及び卵巣からRNAを抽出し、前記のcDNAをプローブとして用いて、ノーザンブロット法により、ホスホリパーゼB/リパーゼ酵素をコードする遺伝子の分布を観察した。その結果、図7に示すように、小腸のほかに、食道及び精巣にも、小腸からのmRNAと同じ長さであり、且つプローブcDNAとハイブリダイズするmRNAが存在することが明らかとなり、本酵素が消化以外の役割を担っている可能性が示された。

40

また、十二指腸、空腸、回腸(上部)及び回腸(下部)の粘膜、並びに食道の粘膜及び筋肉からの抽出したRNAの結果を図8に示す。

【0041】

ホスホリパーゼB/リパーゼは、小腸口側よりも肛門側の回腸とりわけ上部回腸粘膜に豊富に存在していた。したがって、食物中の脂質は、まず、小腸上部の管腔内で膵臓から分泌されたりパーゼやホスホリパーゼA₂の作用で分解され、その後、回腸の本酵素により経末消化を受けることが示唆された。食道上皮は、小腸上皮と異なり刷子縁を持たない偏

50

平上皮細胞から成るので本酵素の分布を上皮と固有筋層に分けて検討した。食道においても本酵素は上皮細胞に存在していた。

【 0 0 4 2 】

【配列表】

配列番号： 1

配列の長さ： 4613bp

配列の型： 核酸

鎖の型： 二本鎖

トポロジ： 直鎖状

配列の種類： cDNA

10

起原

生物名： ラット

直接の起原： プラスミド pSVL-RIPLB

特徴

アミノ酸配列 1...30 シグナル

アミノ酸配列 43...352 第一反復配列

アミノ酸配列 367...712 第二反復配列

アミノ酸配列 714...1059 第三反復配列

アミノ酸配列 1070...1408 第四反復配列

アミノ酸配列 1421...1443 膜結合ドメイン

20

配列

TACTCAGAGG TCCCAGACAC CTGCAAGACT GAGGG ATG GAG TCA TGG CCA GGC 53

Met Glu Ser Trp Pro Gly

1

5

GTT TCC CTG GTG GGA CTG CTG CTG CTG CTA CTG CTG GGA CAA GGG CCC 101

Val Ser Leu Val Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Gln Gly Pro

10

15

20

30

TCC CAA ATC CAC GGC TCT TCT GGA GAA AAC ACA TCG CAG CCC CAG CAA 149

Ser Gln Ile His Gly Ser Ser Gly Glu Asn Thr Ser Gln Pro Gln Gln

25

30

35

【 0 0 4 3 】

GTG TTT CGG ACC CTG AAG AAT TTT TCA TTC CCT TGC AAG CCA AAG AAG	197	
Val Phe Arg Thr Leu Lys Asn Phe Ser Phe Pro Cys Lys Pro Lys Lys		
40 45 50		
TTA GAA CTG AGT GTG CTT TCT AAG TCA GTT CAC TCT CTG AGA CCC TCA	245	
Leu Glu Leu Ser Val Leu Ser Lys Ser Val His Ser Leu Arg Pro Ser		
55 60 65 70		
GAC ATT AAA CTC GTG GCA GCC ATC GGC AAC CTA GAA ACT CCT CCA GCC	293	10
Asp Ile Lys Leu Val Ala Ala Ile Gly Asn Leu Glu Thr Pro Pro Ala		
75 80 85		
CCT GGC TCA GGC GTG GTC AAC ATG GAG AAA CCT CAA AGC CTC GAG AGC	341	
Pro Gly Ser Gly Val Val Asn Met Glu Lys Pro Gln Ser Leu Glu Ser		
90 95 100		
GAA CTA CAG AAT GTG TGC ATA GGA ATC ATG ACA GCC CTT TCA GAT ATC	389	
Glu Leu Gln Asn Val Cys Ile Gly Ile Met Thr Ala Leu Ser Asp Ile		20
105 110 115		
ATC AGA CAT TTC AAC CCT TCT GTT CTG ATG CCC ACG TGT TCT CCT GGG	437	
Ile Arg His Phe Asn Pro Ser Val Leu Met Pro Thr Cys Ser Pro Gly		
120 125 130		
AAG GGT ACT GCA GGC CAC ACT ACT ATT GCC GAA GAC TTG TGG ATT CAG	485	
Lys Gly Thr Ala Gly His Thr Thr Ile Ala Glu Asp Leu Trp Ile Gln		
135 140 145 150		30
GCT AAA GAG CTG GTG AGG CAT CTG AAA GAC AAC CCG GAA CTT GAT TTT	533	
Ala Lys Glu Leu Val Arg His Leu Lys Asp Asn Pro Glu Leu Asp Phe		
155 160 165		
GAG AAG GAC TGG AAA CTC ATC ACT GTG CTC TTC AGT AAC ACA AGC CAG	581	
Glu Lys Asp Trp Lys Leu Ile Thr Val Leu Phe Ser Asn Thr Ser Gln		
170 175 180		

TGC CAC CTG TGT TCC TCT GAT CAG CAG AAA AGG CAC TTG ATG AAG CAC	629	
Cys His Leu Cys Ser Ser Asp Gln Gln Lys Arg His Leu Met Lys His		
185 190 195		
ATG GAG ATG CTG TCA GGG GTG CTG GAT TAC CTG CAT CGT GAG GTC CCC	677	
Met Glu Met Leu Ser Gly Val Leu Asp Tyr Leu His Arg Glu Val Pro		
200 205 210		
AGA GCG TTT GTG AAT TTG GTG GAT CTC TCT GAG GTT TTG ACC ATG GCT	725	10
Arg Ala Phe Val Asn Leu Val Asp Leu Ser Glu Val Leu Thr Met Ala		
215 220 225 230		
CAG CAG CAT CAA GAG ACT GGT TTC AGC CCT GCA CCA GAG ATT TGC AAA	773	
Gln Gln His Gln Glu Thr Gly Phe Ser Pro Ala Pro Glu Ile Cys Lys		
235 240 245		
TGC TCA GAG GAA ATA ACG AAG TTA TCC AAG GCT GTC ATG CAG TGG TCC	821	
Cys Ser Glu Glu Ile Thr Lys Leu Ser Lys Ala Val Met Gln Trp Ser		20
250 255 260		
TAT CAG GAA GCC TGG GAA GAT CTC CTG GCC TCC AGC AAG TTC AAT AAG	869	
Tyr Gln Glu Ala Trp Glu Asp Leu Leu Ala Ser Ser Lys Phe Asn Lys		
265 270 275		
CAT GAG ACC TTC GCT GTG GTT TTC CAG TCT TTC TTC TCT GAG GTA GAA	917	
His Glu Thr Phe Ala Val Val Phe Gln Ser Phe Phe Ser Glu Val Glu		
280 285 290		30
CTA CCC TTG GAG AGG CCC TCG CCC CAG GAT TCC ACC ACG CTC GCC CTC	965	
Leu Pro Leu Glu Arg Pro Ser Pro Gln Asp Ser Thr Thr Leu Ala Leu		
295 300 305 310		
AGG ATC TGG AAT AGC ATG ATG GAA CCA GTG GGT CGA AAG GAT GGG ACA	1013	
Arg Ile Trp Asn Ser Met Met Glu Pro Val Gly Arg Lys Asp Gly Thr		
315 320 325		

CTC AAT GAA GCA GAG AGA AAA ACA ATG AAA TGT CCC TCT CAG GAG AGC 1061
 Leu Asn Glu Ala Glu Arg Lys Thr Met Lys Cys Pro Ser Gln Glu Ser
 330 335 340
 CCC TAT CTG TTC ACC TAC AGA AAT AGC AAC TAC CAG GCC AGA CAG CTG 1109
 Pro Tyr Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Ser Asn Tyr Gln Ala Arg Gln Leu
 345 350 355
 AAA CCC ATA GGA AAG TTT CAG ATG AAA GAA GGA ACA AAA TTC ACC TGT 1157
 Lys Pro Ile Gly Lys Phe Gln Met Lys Glu Gly Thr Lys Phe Thr Cys
 360 365 370
 CCT GAC AAA GAC CCC TCG GAC TCC ATC CCC ACA ACA GTT CAC AGG CTG 1205
 Pro Asp Lys Asp Pro Ser Asp Ser Ile Pro Thr Thr Val His Arg Leu
 375 380 385 390
 AGG CCG GCT GAC ATC AAG GTC ATC GGA GCC ATG GGT GAC TCG CTC ACG 1253
 Arg Pro Ala Asp Ile Lys Val Ile Gly Ala Met Gly Asp Ser Leu Thr
 395 400 405
 GCA GGC AAC GGG GCA GGG TCC AGC CCT GGG AAT GTC TTG GAT GTC TTA 1301
 Ala Gly Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro Gly Asn Val Leu Asp Val Leu
 410 415 420
 ACT CAA TAC CGA GGC CTG TCG TGG AGT GTG GGC GGA GAT GAG ACC ATC 1349
 Thr Gln Tyr Arg Gly Leu Ser Trp Ser Val Gly Gly Asp Glu Thr Ile
 425 430 435
 GAG ACC GTG ACC ACC CTA GCC AAC ATC CTC CGG GAA TTC AAC CCC TCC 1397
 Glu Thr Val Thr Thr Leu Ala Asn Ile Leu Arg Glu Phe Asn Pro Ser
 440 445 450
 TTG AAG GGC TTC TCT GTT GGC ACT GGG AAA GAA AAC ACT CCC CGA GCA 1445
 Leu Lys Gly Phe Ser Val Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Pro Arg Ala
 455 460 465 470

10

20

30

40

TCC TTC AAC CAG GCC GTA GCA GGA GCC AAA TCT GAT GGC TTA GCT GCC 1493
 Ser Phe Asn Gln Ala Val Ala Gly Ala Lys Ser Asp Gly Leu Ala Ala
 475 480 485
 CAG GCC AAA AAG CTG GTG AGC CTG ATG AAG GAT GAC AAG ACA ATA AAC 1541
 Gln Ala Lys Lys Leu Val Ser Leu Met Lys Asp Asp Lys Thr Ile Asn
 490 495 500
 TTT CAG GAA GAC TGG AAG ATA ATC ACT GTG TTT ATA GGA GGC AAC GAC 1589
 Phe Gln Glu Asp Trp Lys Ile Ile Thr Val Phe Ile Gly Gly Asn Asp
 505 510 515
 CTC TGT GGC TCC TGC AAT AAC CTG GCT CGC TTT TCT CCC CAA ACC TTC 1637
 Leu Cys Gly Ser Cys Asn Asn Leu Ala Arg Phe Ser Pro Gln Thr Phe
 520 525 530
 ACA GAC AAC ATC AAG ACG GCC CTG GAC ATC CTC CAT GCA GAG GTT CCC 1685
 Thr Asp Asn Ile Lys Thr Ala Leu Asp Ile Leu His Ala Glu Val Pro
 535 540 545 550
 CGG GCC TTT GTG AAC ATG GTC TCG GTG ATT GAG ATC ACC CCC TTG AGA 1733
 Arg Ala Phe Val Asn Met Val Ser Val Ile Glu Ile Thr Pro Leu Arg
 555 560 565
 GAA CTG TTC AAT GAA CCT AAA GTC AGC TGC CCA CGG ATG ATC CTC AGG 1781
 Glu Leu Phe Asn Glu Pro Lys Val Ser Cys Pro Arg Met Ile Leu Arg
 570 575 580
 AGC CTG TGT CCT TGT GTC TTG AAC CTT GGT GAG AAC TCA GCA GAA CTT 1829
 Ser Leu Cys Pro Cys Val Leu Asn Leu Gly Glu Asn Ser Ala Glu Leu
 585 590 595
 GCC CAA CTT GTG GAA AGG AAC AGG CAG TAT CAG GAA GAA ACT GGA AAA 1877
 Ala Gln Leu Val Glu Arg Asn Arg Gln Tyr Gln Glu Glu Thr Gly Lys
 600 605 610

10

20

30

40

CTG ATT GAG AGT GGC CGA TAC GAC ACC AGG GAT GAC TTC ACC GTG GTC 1925
 Leu Ile Glu Ser Gly Arg Tyr Asp Thr Arg Asp Asp Phe Thr Val Val
 615 620 625 630
 CTC CAG CCC ATG TTT GAA AAT GTC GTC ATG CCA CGG ACC CTG GAG GGC 1973
 Leu Gln Pro Met Phe Glu Asn Val Val Met Pro Arg Thr Leu Glu Gly
 635 640 645
 TTG CCC GAC AGC TCT TTC TTT GCC CCT GAC TGT TTC CAC TTC AAT GTC 2021
 Leu Pro Asp Ser Ser Phe Phe Ala Pro Asp Cys Phe His Phe Asn Val
 650 655 660
 AAG ACT CAC GCT CGC TCA GCC ATC GCC CTC TGG AAG AAC ATG CTA GAA 2069
 Lys Thr His Ala Arg Ser Ala Ile Ala Leu Trp Lys Asn Met Leu Glu
 665 670 675
 CCT GTG GGC CGC AAG ACA AGA CAT CAG AAT TTT GAA ATC AAG GTC CCT 2117
 Pro Val Gly Arg Lys Thr Arg His Gln Asn Phe Glu Ile Lys Val Pro
 680 685 690
 ATC ATG TGT CCA AAC CAG ACC TCA CCG TTT CTG AGC ACC ACC AAG AAC 2165
 Ile Met Cys Pro Asn Gln Thr Ser Pro Phe Leu Ser Thr Thr Lys Asn
 695 700 705 710
 AGC AAC CTG GGA CAT GGA ACT TCG ATG TCT TGT GAG GAG AAA GCC CCC 2213
 Ser Asn Leu Gly His Gly Thr Ser Met Ser Cys Glu Glu Lys Ala Pro
 715 720 725
 TCT GCC TCA CCA CCA ACC TCA GTG CAT ACC CTG AGA CCT GCA GAC ATC 2261
 Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Val His Thr Leu Arg Pro Ala Asp Ile
 730 735 740
 CAA GTT GTG GCA GCT CTG GGA GAC TCT GTG ACT GCT GGC AAT GGA ATC 2309
 Gln Val Val Ala Ala Leu Gly Asp Ser Val Thr Ala Gly Asn Gly Ile
 745 750 755

10

20

30

40

AGC TCC CAA GAA GGT GAT CTC GCT GAT GTT ACC ACA CAG TAT CGA GGA 2357
 Ser Ser Gln Glu Gly Asp Leu Ala Asp Val Thr Thr Gln Tyr Arg Gly
 760 765 770
 CTG TCC TAC AGT GCT GGT GGG GAC AAG TTC CTG GAG AAT GTG ACC ACC 2405
 Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Gly Asp Lys Phe Leu Glu Asn Val Thr Thr
 775 780 785 790
 TTG CCC AAC ATC CTC CGG GAA TTT AAT GGA AAT CTC ACA GGC TAC TCA 2453
 Leu Pro Asn Ile Leu Arg Glu Phe Asn Gly Asn Leu Thr Gly Tyr Ser
 795 800 805
 GTC GGA ACC GGT GAC GTC AAC TCT GCA AGC GCG TTC CTT AAC CAG GCT 2501
 Val Gly Thr Gly Asp Val Asn Ser Ala Ser Ala Phe Leu Asn Gln Ala
 810 815 820
 GTC CCT GGG GCA AAG GCT GAG AAC CTT GCA AGT CAA GTC CAG ACT CTG 2549
 Val Pro Gly Ala Lys Ala Glu Asn Leu Ala Ser Gln Val Gln Thr Leu
 825 830 835
 ATT CAG AAG ATG AAG AAT GAC ACC AGA GTG AAC TTT CAC CAA GAC TGG 2597
 Ile Gln Lys Met Lys Asn Asp Thr Arg Val Asn Phe His Gln Asp Trp
 840 845 850
 AAG GTC ATC ACT GTG ATG ATT GGG GCC AGC GAC TTG TGT GAC TTC TGC 2645
 Lys Val Ile Thr Val Met Ile Gly Ala Ser Asp Leu Cys Asp Phe Cys
 855 860 865 870
 AAG GAT TCG AAT CGT TAC TCT GCA GCC AAT TTT TCT GAC CAT CTC CGC 2693
 Lys Asp Ser Asn Arg Tyr Ser Ala Ala Asn Phe Ser Asp His Leu Arg
 875 880 885
 AAT GCC TTG GAC ATC CTG CAT AAG GAG GTA CCC AGA GCC CTG GTC AAC 2741
 Asn Ala Leu Asp Ile Leu His Lys Glu Val Pro Arg Ala Leu Val Asn
 890 895 900

10

20

30

40

CTT GTG GAC TTC ATG AAC CCC AGT ATC ATT CGG CAA GTG TTC CTG AAG 2789	
Leu Val Asp Phe Met Asn Pro Ser Ile Ile Arg Gln Val Phe Leu Lys	
905 910 915	
AAC CCA GAC AAG TGC CCT GTG AAT CAG ACC AGT GTC CTG TGC AAC TGT 2837	
Asn Pro Asp Lys Cys Pro Val Asn Gln Thr Ser Val Leu Cys Asn Cys	
920 925 930	
GTT CTG ACC CCA GGG GAG GAT TCC CAT GAG CTG GCA AGG TTG GAG GCC 2885	10
Val Leu Thr Pro Gly Glu Asp Ser His Glu Leu Ala Arg Leu Glu Ala	
935 940 945 950	
TTC ACC AAA TCC TAC CAG AGT AGC ATG CTT CAA CTG GTT GAG TCA GGC 2933	
Phe Thr Lys Ser Tyr Gln Ser Ser Met Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly	
955 960 965	
CGC TAC GAC ACC CGG GAG GAT TTC TCT GTG GTA CTG CAG CCC TTT CTC 2981	
Arg Tyr Asp Thr Arg Glu Asp Phe Ser Val Val Leu Gln Pro Phe Leu	20
970 975 980	
TTC AAC ATC AGG CTC CCC ATC CTA GAG AAT GGG AAT CCA GAT ACA TCC 3029	
Phe Asn Ile Arg Leu Pro Ile Leu Glu Asn Gly Asn Pro Asp Thr Ser	
985 990 995	
TTC TTT GCC CCA GAC TGC ATC CTC CTA AGC CAG AAG TTC CAC ACT CAG 3077	
Phe Phe Ala Pro Asp Cys Ile Leu Leu Ser Gln Lys Phe His Thr Gln	
1000 1005 1010	30
CTC GCG AGA GCC CTT TGG GCC AAT ATG CTT GAA CCC CTG GGA AAG AAA 3125	
Leu Ala Arg Ala Leu Trp Ala Asn Met Leu Glu Pro Leu Gly Lys Lys	
1015 1020 1025 1030	
ATG GAT ACT TTG GAC CCG AAA GAA CTC ATA GCT TTG GCC TGC CCC ACC 3173	
Met Asp Thr Leu Asp Pro Lys Glu Leu Ile Ala Leu Ala Cys Pro Thr	
1035 1040 1045	

【 0 0 5 0 】

AAG GAC AAG CCC TTC CTG AGA ACC TTC CGG AAC AGT AAC TAC ACG TAC 3221	
Lys Asp Lys Pro Phe Leu Arg Thr Phe Arg Asn Ser Asn Tyr Thr Tyr	
1050 1055 1060	
CCT ATC AAG CCA GCC ATT GAG AAT TGG GGC AGT GAC TTC CTG TGC ACA 3269	
Pro Ile Lys Pro Ala Ile Glu Asn Trp Gly Ser Asp Phe Leu Cys Thr	
1065 1070 1075	
GAG CAG AGT CCT TCC AGC AAG GTA CCC ACC TCA GTT CAT GAG CTC CGA 3317	10
Glu Gln Ser Pro Ser Ser Lys Val Pro Thr Ser Val His Glu Leu Arg	
1080 1085 1090	
CCA TCA GAC ATC AAG GTG GTG GCA GCA ATG GGT GAC TTT CTG ACG ACA 3365	
Pro Ser Asp Ile Lys Val Val Ala Ala Met Gly Asp Phe Leu Thr Thr	
1095 1100 1105 1110	
GCC ACC GGA GCT CGA CCA AGT GAG TCC AGC AGT CTA GAC ACC CCC TGG 3413	
Ala Thr Gly Ala Arg Pro Ser Glu Ser Ser Ser Leu Asp Thr Pro Trp	20
1115 1120 1125	
AGG GGG CTG TCT TGG AGC ATT GGA GGA GAT GGA ACG TTG GAG ACC CAT 3461	
Arg Gly Leu Ser Trp Ser Ile Gly Gly Asp Gly Thr Leu Glu Thr His	
1130 1135 1140	
ACC ACA CTG CCC AAC ATC CTG AAG AAG TTC AAC CCT TCC ATC CTT GGA 3509	
Thr Thr Leu Pro Asn Ile Leu Lys Lys Phe Asn Pro Ser Ile Leu Gly	
1145 1150 1155	30
TTC TCC ACC GGT ACC CTG GAG AAC ACG GCA GGA TTA AAT GTG GCA GAA 3557	
Phe Ser Thr Gly Thr Leu Glu Asn Thr Ala Gly Leu Asn Val Ala Glu	
1160 1165 1170	
GAA GGC GCC AGA GCT CAG GAC ATG CCG GCC CAG GCT CAG GCC CTG GTG 3605	
Glu Gly Ala Arg Ala Gln Asp Met Pro Ala Gln Ala Gln Ala Leu Val	
1175 1180 1185 1190	

AAG AAG ATG AAA AGC ACC CCT ACA ATC AAC ATA CAG GAA GAC TGG AAG 3653	
Lys Lys Met Lys Ser Thr Pro Thr Ile Asn Ile Gln Glu Asp Trp Lys	
1195 1200 1205	
CTG ATT ACA CTC CTC ATC GGG AAC AAC GAC CTG TGT CTT TAC TGT GAG 3701	
Leu Ile Thr Leu Leu Ile Gly Asn Asn Asp Leu Cys Leu Tyr Cys Glu	
1210 1215 1220	
GAT CCG GAG AAC TAC TCA ACC AGG GAG TAT GTC AAG TAC ATC CAG CAT 3749	10
Asp Pro Glu Asn Tyr Ser Thr Arg Glu Tyr Val Lys Tyr Ile Gln His	
1225 1230 1235	
GCC TTG GAC ATC TTC TAT GAG GAG CTT CCC AGG GTT TTC ATC AAC GTG 3797	
Ala Leu Asp Ile Phe Tyr Glu Glu Leu Pro Arg Val Phe Ile Asn Val	
1240 1245 1250	
GTG GAA GTC ATG GAG CTG TCC GGT CTG CTC CAC GAC CAG GGC GGG AAA 3845	
Val Glu Val Met Glu Leu Ser Gly Leu Leu His Asp Gln Gly Gly Lys	20
1255 1260 1265 1270	
TGT GCC ATG CCG TTG GCT GTC CAG AAA AAC TGC AGT TGC CTT AAA CGC 3893	
Cys Ala Met Pro Leu Ala Val Gln Lys Asn Cys Ser Cys Leu Lys Arg	
1275 1280 1285	
TCT CAA AAC CTC ATG GCA ATG CAG GAG CTG AAG AAA GTC AAC GGG AAC 3941	
Ser Gln Asn Leu Met Ala Met Gln Glu Leu Lys Lys Val Asn Gly Asn	
1290 1295 1300	30
CTC CAG AGT GCC CTC TCG GAG CTC TCC TAC TGG CAT CGG TAC ATG CAG 3989	
Leu Gln Ser Ala Leu Ser Glu Leu Ser Tyr Trp His Arg Tyr Met Gln	
1305 1310 1315	
CGT GAG GAC TTT GCA GTC ACT GTC CAG CCT TTC TTC CGG AAT ACC TTT 4037	
Arg Glu Asp Phe Ala Val Thr Val Gln Pro Phe Phe Arg Asn Thr Phe	
1320 1325 1330	

GTC CCA CTG GAT GAG CGT GGG GGC CTC GAC CTC ACT TTC TTC TCT GAA	4085		
Val Pro Leu Asp Glu Arg Gly Gly Leu Asp Leu Thr Phe Phe Ser Glu			
1335	1340	1345	1350
GAC TGT TTC CAC TTC TCA GTC CGT GGG CAT GCT GAG ATG GCC ATT GCC	4133		
Asp Cys Phe His Phe Ser Val Arg Gly His Ala Glu Met Ala Ile Ala			
1355	1360	1365	
CTC TGG AAC AAC ATG CTG GAA CCA GTG GGC AAG AAG ACA ACC TCC AAT	4181		10
Leu Trp Asn Asn Met Leu Glu Pro Val Gly Lys Lys Thr Thr Ser Asn			
1370	1375	1380	
AAC TTC ACA TAC AAC CGG ACC AAA CTC AAG TGT CCC TCG CCT GAA AAC	4229		
Asn Phe Thr Tyr Asn Arg Thr Lys Leu Lys Cys Pro Ser Pro Glu Asn			
1385	1390	1395	
CCT TTC CTC TAC ACT GTC CGG AAC AGT CAG ATT CTT CTA GAC AAG GCT	4277		
Pro Phe Leu Tyr Thr Val Arg Asn Ser Gln Ile Leu Leu Asp Lys Ala			20
1400	1405	1410	
AAA GAA AAC TCC AAT ACA CTC TAC TGG GCA GTG CCA GTG GCT GCA GTA	4325		
Lys Glu Asn Ser Asn Thr Leu Tyr Trp Ala Val Pro Val Ala Ala Val			
1415	1420	1425	1430
GGT GGC CTG GTA GTT GGC ATC CTT GGA ATG ATG TTG TGG AGA ACT GTG	4373		
Gly Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Gly Met Met Leu Trp Arg Thr Val			
1435	1440	1445	30
AGA CTC GTC CAA TAG AA GGAGGAGGAG ACTTTTCCAA ATACAAGTGT	4420		
Arg Leu Val Gln ***			
1450			
GGACCTTGAG TTGACCCAGG GATGCTGTTT CAGAGGAGAA GCTCAGAGAT	4470		
TGACCCTTGG TACCAGACAG CAATTACGTA ATCTCAGGGA TGGGGACTGC	4520		
GTGCCTTTCT CTCTTGGGAG TTCACCATCT TCTTTTGGAA AGATAAATAA	4570		
GAAAGAGTGG CTACATCAGT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA	4613		40

【 0 0 5 3 】

配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク

配列

Glu Gly Thr Lys Phe Thr Cys Pro Asp Lys Asp Pro Ser Asp Ser Ile

1

5

10

15

Pro

【 0 0 5 4 】

配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

10

トポロジ：直鎖状

配列の種類：タンパク

配列

Phe Ser Pro Gln Thr Phe Thr Asp Asn Ile Lys Thr Ala Leu Asp Ile

1

5

10

15

Leu His Ala Glu Val Pro Arg Ala Phe Val Asn Met Val Ser

20

25

30

20

【 0 0 5 5 】

配列番号：4

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CCGGATCCAA RTTYACITGY CCIGAYAARG AYCC

34

【 0 0 5 6 】

配列番号：5

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

GCIGTYTTIA TRTTRTCIGT RAANGTYTG

29

【図面の簡単な説明】

40

【図1】図1は、本発明のホスホリパーゼBノリパーゼ酵素の全長構造を示す模式図である。

【図2】図2は、実施例4において作製した各種発現プラスミドの挿入部の構造を示す模式図である。

【図3】図3は、実施例4における各種発現プラスミドの作製の工程を示す図である。

【図4】図4は、実施例4における各種発現プラスミドの作製の工程を示す図である。

【図5】図5は、各種発現プラスミドにより発現されたタンパク質の酵素活性を示すグラフである。

【図6】図6は、各種発現プラスミドにより発現された蛋白質のイムノプロット図、及び各種発現プラスミドにより形質転換された動物細胞宿主において転写されたmRNAのノ

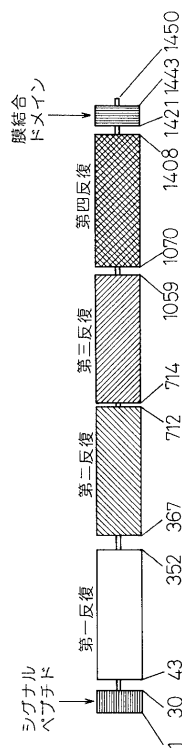
50

ーザンプロット図であり、電気泳動の結果を表わす図面代用写真である。

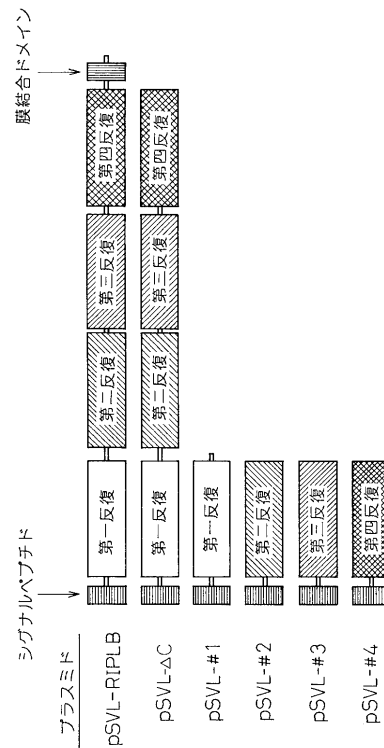
【図 7】ラットの種々の組織又は器官から抽出された RNA を、ホスホリパーゼ B ノリパーゼをコードする cDNA をプローブとして検出した結果を示すノーザンプロット図であり、電気泳動の結果を示す図面代用写真である。

【図 8】図 8 は、種々の腸粘膜及び食道の組織から抽出した RNA を図 6 と同様にして検出した結果を示すノーザンプロット図であり、電気泳動の結果を示す図面代用写真である。

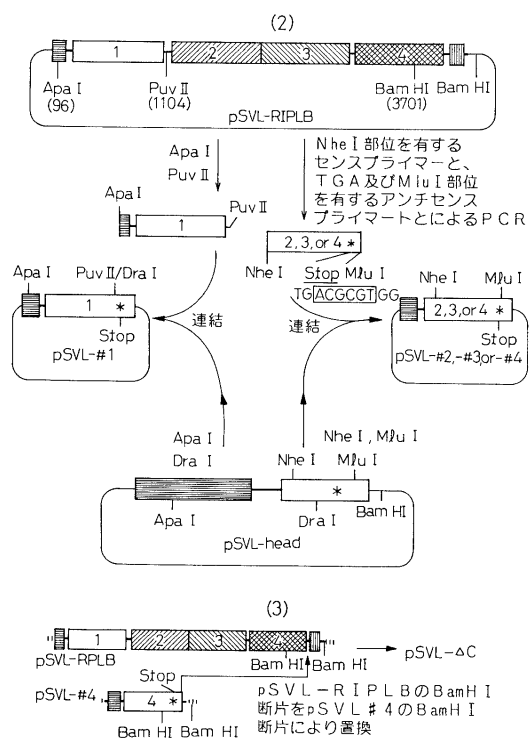
【図 1】



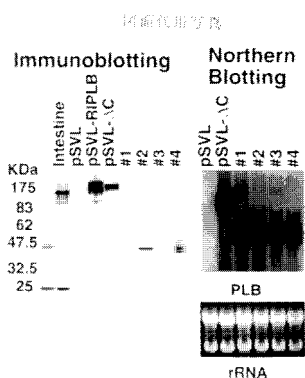
【図 2】



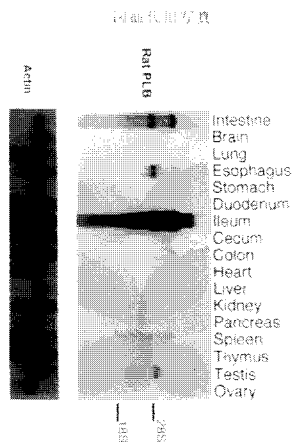
【 图 4 】



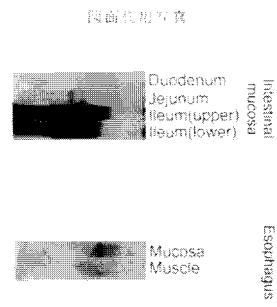
【 図 6 】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(56)参考文献 Journal of Biological Chemistry, 米国, 1992年, Vol. 267(19), p. 13418-13424
Journal of Biological Chemistry, 米国, 1993年, Vol. 268(17), p. 12901-12911

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/55
C12N 9/16-9/20
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JOIS)