

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月26日 (26.04.2001)

PCT

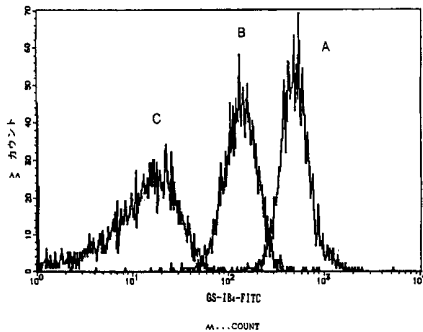
(10) 国際公開番号
WO 01/29200 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/38, 15/56, 5/10, A61L 29/14 // (C12N 9/38, C12R 1:91) 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07347 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (日本, 米国についてののみ): 村松 喬 (MURAMATSU, Takashi) [JP/JP]; 〒468-0011 愛知県名古屋市長区天白区天白町大字平針字黒石 2845の161 Aichi (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年10月20日 (20.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 小川 晴子 (OGAWA, Haruko) [JP/JP]; 〒511-0829 三重県桑名市神楽町1-10-16 Mie (JP). 村松 寿子 (MURAMATSU, Hisako) [JP/JP]; 〒468-0011 愛知県名古屋市長区天白区天白町大字平針字黒石 2845の161 Aichi (JP). 小林 孝彰 (KOBAYASHI, Takaaki) [JP/JP]; 〒468-0069 愛知県名古屋市長区天白区表山3-2415-1 2-7 Aichi (JP). 横山 逸男 (YOKOYAMA, Itsuo) [JP/JP]; 〒458-0021 愛知県名古屋市長区滝ノ水3-1202 Aichi (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平 11/300795 1999年10月22日 (22.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: DNA ENCODING ENDO- β -GALACTOSIDASE

(54) 発明の名称: エンドー β -ガラクトシダーゼをコードするDNA



(57) Abstract: A full-length cDNA is obtained by analyzing the partial amino acid sequence of purified endo- β -galactosidase C, constructing primers based thereon, effecting PCR with the use of the genomic DNA of *Clostridium perfringens* as a template to thereby obtain a fragment of cDNA encoding endo- β -galactosidase, effecting cassette PCR by using the cDNA fragment thus obtained to thereby obtain the 5'-terminal and 3'-terminal domains, and further effecting PCR with the use of primers constructed on the basis of the data acquired above.

(57) 要約:

精製されたエンドー β -ガラクトシダーゼCの部分アミノ酸配列を解析し、これに基づいてプライマーを作製し、*Clostridium perfringens*のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、エンドー β -ガラクトシダーゼをコードするcDNAの部分断片を取得し、得られた部分的cDNAを用いてカセットPCRを行い、5'側及び3'側の領域を取得し、得られた情報に基づき作製したプライマーを用いたPCRにより全長cDNAを取得する。



WO 01/29200 A1



(74) 代理人: 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒
103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコ
ヤマビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

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

明細書

エンドーβ-ガラクトシダーゼをコードするDNA

技術分野

本発明は、エンドーβ-ガラクトシダーゼをコードするDNA、当該DNAを組み込んだ組換えベクター、当該DNA又は組換えベクターで形質転換した形質転換体、及び、当該形質転換体を用いたエンドーβ-ガラクトシダーゼの製造方法に関する。

また本発明は、エンドーβ-ガラクトシダーゼを含有する臓器処理剤、及び臓器をこの処理剤によって処理して得られる臓器に関する。

背景技術

Clostridium perfringens (クロストリジウム・パーフリンジェンス) 由来のエンドーβ-ガラクトシダーゼ (以下、「エンドーβ-ガラクトシダーゼC」という) は、複合糖質の末端のGalα1→3Galβ1→4GlcNAc配列に作用してGalβ1→4GlcNAc結合を切断するが、Galα1→3 (Fucα1→2) Galβ1→4GlcNAc配列には作用しない酵素である (特公平7-87783号公報)。この酵素は分析用試薬として有用である。

この酵素は、*Clostridium perfringens*を培養して製造することができるが、この酵素をコードするDNAが得られれば、遺伝子工学的手法により更なる大量調製も可能になる。また後述するように、異種移植の際に利用できる可能性もある。

発明の開示

従って本発明の課題は、エンドーβ-ガラクトシダーゼCをコードするDNAを単離し、エンドーβ-ガラクトシダーゼCを遺伝子工学的手法によって純粋な形で安価かつ大量に提供することである。

また本発明の課題は、特に異種移植の際に有用な、エンドーβ-ガラクトシダ

ーゼCを含有する臓器処理剤を提供し、さらに、特に異種移植の際に有用な臓器を提供することである。

本発明者らは上記課題の解決のために鋭意検討を重ねた結果、エンドー β -ガラクトシダーゼCをコードするDNAを単離してその塩基配列を明らかにし、さらにこのDNAが、酵素活性を有するエンドー β -ガラクトシダーゼCを発現することを確認して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA(以下、「本発明DNA」ともいう)を提供する。

(A) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) アミノ酸配列(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつエンドー β -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。

本発明は、上記DNAにおいて、前記アミノ酸配列(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつエンドー β -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号2におけるアミノ酸番号35～845で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質である、DNAを提供する。

このようなDNAの好ましい具体例としては、下記(a)又は(b)に示すDNAが挙げられる。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号246～2780からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号246～2780からなる塩基配列に相補的な塩基配列の全部または一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンドー β -ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

さらに、上記DNAの好ましい具体例として、下記(a)又は(b)に示すDNAが挙げられる。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号348～2780からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号348～2780からなる塩基配列に相補的な塩基配列の全部または一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

また、本発明は、本発明DNAを組み込んだ組換えベクター（以下、「本発明組換えベクター」ともいう）を提供する。さらに、本発明は、本発明DNA又は本発明組換えベクターを細胞に導入することにより得られる形質転換体（以下、「本発明形質転換体」ともいう）を提供する。

さらに、本発明は、本発明形質転換体を生育させてエンド-β-ガラクトシダーゼをコードするDNAを発現させ、生成したエンド-β-ガラクトシダーゼを採取することを特徴とするエンド-β-ガラクトシダーゼの製造方法（以下、「本発明製造方法」ともいう）を提供する。

さらに本発明は、エンド-β-ガラクトシダーゼを含有する、臓器処理剤（以下、「本発明処理剤」ともいう）を提供する。本発明処理剤は、移植用臓器処理剤であることが好ましく、この処理される臓器は、α-ガラクトース抗原を発現している臓器であることが好ましい。このような移植用臓器としては、ブタの臓器であることが好ましく、ヒトに移植するための臓器であることがさらに好ましい。例えば、腎臓が好ましい例として挙げられる。

また本発明は、α-ガラクトース抗原を発現している臓器を、本発明処理剤によって処理して得られる臓器（以下、「本発明臓器」ともいう）を提供する。

また本発明は、α-ガラクトース抗原を発現している臓器を、エンド-β-ガラクトシダーゼで処理することを特徴とする、α-ガラクトース抗原による拒絶反応が抑制された移植用臓器の生産方法を提供する。

本発明において、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性とは、複合糖質の末端のGalα1→3Galβ1→4GlcNAc配列のGalβ1→4GlcNAc結合を切断する反応を触媒する活性をいう。

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明DNA

本発明DNAは、以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNAである。

(A) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) アミノ酸配列(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつエンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。

この中でも、(A)のタンパク質をコードするDNAが好ましい。

なお本明細書中において、「1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつエンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質」とは、複合糖質の末端のGalα1→3Galβ1→4GlcNAc配列に作用してGalβ1→4GlcNAc結合を切断する活性(エンド-β-ガラクトシダーゼ活性)を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいことを示す。

すなわち天然に存在するタンパク質には、それをコードするDNAの多形や変異の他、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず、変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差異があってもその機能については大きな違いが認められないタンパク質をコードするDNAも、本発明DNAに包含される。

タンパク質をコードするDNAに人為的に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することができる。例えば、ヒトインターロイキン2(IL-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリン残基に置換したタンパク質が、IL-2活性を保持することが知られている(Science, 224, 1431(1984))。また、ある種のタンパク質は、活性には必要ないペプチド領域を有していることが知られている。例えば細胞外に分泌されるタンパク質に存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型タンパク質への転換に際して除去される。このようなタンパク質は、一次構

造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するタンパク質であり、このようなタンパク質をコードするDNAも、本発明DNAに包含される。例えば配列番号2におけるアミノ酸番号35～845で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質は、アミノ酸番号1～34に相当する部分（シグナル配列に相当すると考えられる）を欠いているタンパク質であるが、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性を保持している。従って、このようなタンパク質をコードするDNAを本発明DNAに包含される。

なお、本明細書における「数個のアミノ酸」は、例えば800アミノ酸残基からなるタンパク質の場合、2～40程度、好ましくは2～20、より好ましくは2～10以下の数を示す。

エンド-β-ガラクトシダーゼ活性は、例えば後記実施例に示す通り、ブタ赤血球や血管内皮細胞(表面にGalα1→3Galβ1→4GlcNAc配列が存在している)と、Galα1→3Gal構造を特異的に認識するレクチンを利用した測定方法により測定できる。また後記実施例に示す通り、基質としてGalα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc等を用いて酵素反応を行い、その酵素反応産物を薄層クロマトグラフィー(TLC)や質量分析等によって分析することによっても、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。よって当業者であれば、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは転位を容易に選択できる。

エンド-β-ガラクトシダーゼ活性を実質的に害さない、1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位は、自然条件下でも起こりうるし、人工的にそのアミノ酸配列をコードするDNAに、そのような置換、欠失、挿入又は転位を起こすような、ヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位を導入することによって得ることができる。ヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることにより、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法(Kramer,W. and Frits,H.J.,Meth. in Enzymol., 154, 350(1987);Kunkel,T.A. et al., Meth. in Enzymol.,154,367(1987))などの方法によってもヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位を導入する

ことができる。

本発明DNAとしては具体的には、例えば配列番号1において塩基番号246～2780で表される塩基配列を含むDNAが例示され、かつ好ましい。また、本発明DNAは、コードされるタンパク質がエンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有する限り、配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号246～2780からなる塩基配列に相補的な塩基配列の全部または一部を有するDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。ここで「ストリンジেন্টな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう (Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。この「ストリンジেন্টな条件」には、通常の遺伝子のハイブリダイゼーションに用いられる条件、例えばサザンブロット、ノーザンブロット、ハイブリダイゼーションを用いたスクリーニング等に使用される条件が包含される。具体的には、例えば50%ホルムアミド、5×SSPE (20×SSPC: 3.6M塩化ナトリウム、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.7)、20mM EDTA二ナトリウム)、5×Denhardt's solution、0.1% SDSの存在下、42°Cでハイブリダイズする条件が挙げられる。

なお、配列番号2に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列をコードする限り、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

本発明には、本発明DNAに相補的なDNA又はRNAも包含される。さらに本発明DNAは、エンド-β-ガラクトシダーゼCをコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な塩基配列を有するDNA鎖またはRNA鎖からなる二本鎖であってもよい。

上記配列番号1に記載の塩基配列を有する本発明DNAは、もともと*Clostridium perfringens*由来であるが、その由来は限定されず遺伝子工学的手法や化学合成等により製造されたDNAも当然に含まれる。また本発明DNAを、ある機能を有する、又は他のタンパク質等をコードするDNAと連結させたDNAであっても、本発明DNAが保持されている限りにおいて、本発明DNAに包含される。

尚、配列番号 1 に示す塩基配列中、ヌクレオチド番号 660 の「t」は「c」であり、配列番号 1 及び 2 に示すアミノ酸配列において 139 番目のアミノ酸残基「Ser」は「Pro」である可能性がある。いずれにしても、コードされるタンパク質がエンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有する限り、本発明 DNA に包含される。

なお本発明 DNA は、以下の遺伝子工学的手法により初めて取得されたものである。

(1) 精製されたエンド-β-ガラクトシダーゼ C (特公平 7-87783 号公報参照) の部分アミノ酸配列を解析し、これに基づいて PCR プライマーを作製する。

(2) (1) で取得したプライマーを用い、*Clostridium perfringens* のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、エンド-β-ガラクトシダーゼ C をコードする cDNA の部分断片を取得する。

(3) (2) で取得した部分的 cDNA を用いてカセット PCR を行い、更に 5' 側及び 3' 側の領域を取得する。

(4) (3) で得られた情報に基づき全長 cDNA を得るためのプライマーを準備し、PCR により全長 cDNA を取得して、塩基配列を解析する。

本発明 DNA の採取原としては、エンド-β-ガラクトシダーゼ C を保持する限り特に制限されないが、具体的には、*Clostridium perfringens* ATCC 10873 が挙げられる。該菌株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (アメリカ合衆国、メリーランド 20852、ロックビル、パークローンドライブ 12301) から入手することができる。また、同菌株は、本出願人により工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-8917 の受託番号で寄託されている。

< 2 > 本発明組換えベクター、本発明形質転換体

本発明組換えベクターは、本発明 DNA をベクターに組み込むことにより得られるものである。本発明組換えベクターは、適当な細胞等に導入することができ、これにより本発明 DNA の種々の機能を発揮させることができる。

本発明 DNA を組込むベクターは、本発明 DNA を組込むことが可能な限りに

において特に限定されないが、発現ベクターが好ましい。

また本発明DNAは、直接発現させてもよく、また他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させる場合、当該他のポリペプチドをコードするDNAが予め組み込まれた発現ベクターに、本発明DNAを組み込むことが好ましい。

また本発明DNAは全長を発現させてもよく、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。所望の発現形態に応じて本発明DNAを適宜加工して、発現ベクターに組み込むことができる。

本発明DNA又は本発明組換えベクターを細胞に導入することにより、本発明形質転換体を得ることができる。本発明DNA又は本発明組換えベクターを導入できる細胞は、本発明DNA又は本発明組換えベクターの機能を発揮できる限りにおいて特に限定されず、ベクターの種類、及び目的等に応じて適宜選択することができる。例えば、大腸菌等の原核細胞や哺乳動物細胞等の真核細胞が例示される。

本発明DNAを発現ベクターに組込んで得られる本発明組換えベクターは、哺乳類動物細胞、例えばCOS-7細胞、大腸菌(E. coli BL-12細胞等)、昆虫細胞、植物細胞等、遺伝子発現に適した宿主細胞に導入することができ、かつ好ましい。

本発明DNAや本発明組換えベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法を用いることができるが、市販されている専用の試薬(例えばLIPOFECTAMINE PLUS Reagent(GibcoBRL製)等)を利用することもできる。

< 3 > 本発明製造方法

本発明製造方法は、本発明形質転換体を生育させてエンド-β-ガラクトシダーゼをコードするDNAを発現させ、生成されたエンド-β-ガラクトシダーゼを採取することを特徴とするエンド-β-ガラクトシダーゼの製造方法である。

生育の具体的方法としては培養が最も好ましいが、動植物体内で生育させたり、動植物体そのものとして生育させることもできる。

例えば、本発明形質転換体を好適な培地で培養し、本発明DNAがコードする

エンドー β -ガラクトシダーゼを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から該酵素を採取することにより、エンドー β -ガラクトシダーゼを製造することができる。

本発明に用いる宿主によっては、エンドー β -ガラクトシダーゼが細胞内に蓄積することが予想されるが、その場合には当該細胞からエンドー β -ガラクトシダーゼを採取する。また、宿主又は発現の形態によっては、エンドー β -ガラクトシダーゼは培地中に蓄積する。その場合には、エンドー β -ガラクトシダーゼは該培地から採取する。

本発明形質転換体の生育条件は、本発明DNA又は本発明組換えベクターが導入された宿主細胞が生育可能な条件（培地、培養条件等）や、発現させるポリペプチドの形態等に応じて、適宜選択することができる。例えば宿主細胞としてCOS-7細胞を用いる場合は、2%程度のウシ胎仔血清（FCS）を含有するDMEM培地を用い、37°C条件下で培養することができる。また例えば、宿主細胞として大腸菌を用いる場合は、LB培地等を主成分として適宜調製した培地を用いることができる。

また、エンドー β -ガラクトシダーゼをプロテインAとの融合ポリペプチドとして発現させ、IgGとの特異的アフィニティーを利用して精製することを企図する場合は、培地に添加するFCSから予めIgGを除去しておくことが好ましい。IgGの除去は、IgGの特異的リガンド、例えばプロテインAを担持させた担体にFCSを接触させ、固液分離して液相を回収することにより行うことができる。

エンドー β -ガラクトシダーゼの採取は、公知の酵素の抽出、精製方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。酵素の抽出方法としては、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

エンドー β -ガラクトシダーゼの精製方法としては、例えば硫酸アンモニウム（硫安）や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

精製された酵素のアミノ酸配列、作用、基質特異性等を分析し、エンドー β -ガラクトシダーゼCの物性と比較することにより、エンドー β -ガラクトシダーゼCの製造が確認できる。

なお、エンドー β -ガラクトシダーゼを他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させることにより、抽出・精製工程を容易にすることができる。例えば、本発明DNAをプロテインAとの融合ポリペプチドとして発現させると、融合ポリペプチドは培養上清中に分泌されることから抽出操作が不要になり、またプロテインAに特異的なリガンド（例えばIgG）を担持させた担体を用いることによって、ワンステップで精製することが可能となる。

本発明形質転換体を適当な条件下で生育させることにより、酵素活性を有するエンドー β -ガラクトシダーゼCが発現できることが、後述の実施例により確認された。よって本発明製造方法は、酵素活性を有するエンドー β -ガラクトシダーゼCの大量調製に利用することができる。

< 4 > 本発明処理剤、本発明臓器

本発明処理剤は、エンドー β -ガラクトシダーゼを含有する、臓器処理剤である。また本発明臓器は、 α -ガラクトース抗原を発現している臓器を、本発明処理剤によって処理して得られる臓器である。

本発明DNA及びこれから製造されるエンドー β -ガラクトシダーゼは、異種移植の際に利用できる。すなわち、Gal α 1-3Gal構造を有する糖鎖（ α -ガラクトース抗原）は、ブタの組織等には存在するがヒト組織には存在しないため、ブタ組織をヒトに移植すると拒絶反応が起きる。従って、本発明DNAにより製造されるエンドー β -ガラクトシダーゼでブタの組織を処理することによりGal α 1-3Gal構造を除去したり、ブタの細胞（ES細胞等）に本発明DNAを導入することによってGal α 1-3Gal構造を発現しないブタ（クローンブタ等）を作出する等によって、異種移植に利用できる。

以下、本発明処理剤及び本発明臓器について詳述する。

異種移植における超急性拒絶反応を司る主要な抗原は、細胞表面に存在する α -ガラクトース抗原である。 α -ガラクトース抗原は、Gal α 1-3Gal構造を有す

る抗原ある。ヒトを含む旧世界ザルでは、Gal α 1-3Gal構造が糖タンパク質や糖脂質の糖鎖末端に存在しない。そのため、この構造に対する強い自然抗体が生じている。ブタをはじめ、ほとんどの哺乳類はGal α 1-3Gal構造を持つので、例えばブタの臓器をヒトに移植すると、自然抗体が血管内皮細胞上のこの抗原に結合し、補体依存性の超急性拒絶反応が引き起こされ、血管が破壊される。

本発明処理剤は、この α -ガラクトース抗原をエンド- β -ガラクトシダーゼの作用によって、該抗原による急性拒絶反応を消失させる程度に除去することにより、超急性拒絶反応を阻止せんとするものである。

本発明処理剤中に含有されるエンド- β -ガラクトシダーゼは、 α -ガラクトース抗原(Gal α 1-3Gal構造)を除去できる酵素である限りにおいて特に限定されないが、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc構造から α -ガラクトース抗原を除去できる酵素が好ましい。このような酵素の中でも、酵素の作用効率の点、中性付近に至適pHを有する点、および低温下でも有効に作用する点等から、エンド- β -ガラクトシダーゼCが好ましい。特に、本発明DNAにより製造されるエンド- β -ガラクトシダーゼCは、好適に使用することができる。

本発明処理剤は、移植用臓器の処理に用いられることが好ましく、 α -ガラクトース抗原を発現している臓器の処理に用いられることが好ましい。また本発明処理剤によって処理された臓器は、 α -ガラクトース抗原を細胞表面に発現していない哺乳動物に移植されることが好ましい。

特に本発明処理剤によって処理される移植用臓器は、ヒトへの異種移植への適用が期待されているブタの臓器であることが好ましく、ヒトに移植するための臓器であることが特に好ましい。また臓器としては、腎臓、肝臓、心臓、肺等が例示されるが、腎臓が好ましい。

本発明処理剤の剤型は、本発明処理剤を使用する態様によって適宜選択することができる。例えば液剤、灌流用剤、用時溶解用固形剤等として製剤化することができる。

例えば本発明処理剤を液剤として提供する場合、その形態は、溶液状または凍結状のいずれであっても良い。これをボトル、薬液バッグ等の適当な容器に充填・密封し、そのまま流通させあるいは保存して使用することができる。

固形剤として提供する場合、その形態はエンドーβ-ガラクトシダーゼが安定である限り、限定されないが、例えば凍結乾燥、噴霧乾燥等をしたものが例示される。

本発明処理剤の製剤化は、公知の方法を用いることができる。また製剤化にあたり、エンドーβ-ガラクトシダーゼに悪影響を与えず、かつエンドーβ-ガラクトシダーゼ処理により得られる効果に影響を与えない限りにおいて、他の医薬活性成分や、慣用の賦形剤、安定化剤、結合剤、滑沢剤、乳化剤、浸透圧調整剤、pH調整剤、緩衝剤、等張化剤、保存剤、着色剤、崩壊剤等、通常医薬に用いられる成分を使用できる。

本発明処理剤は、臓器移植の際の超急性拒絶反応の抑制を目的として使用することができる。すなわち、本発明処理剤は、腎臓の異種移植の際の超急性拒絶反応を抑制するために用いられることが極めて好ましい。

臓器移植用に摘出された臓器を本発明処理剤で灌流したり、さらに摘出された臓器を本発明処理剤に接触させて保持・保存する等により、かかる臓器の血管内皮細胞上に存在するα-ガラクトース抗原が、エンドーβ-ガラクトシダーゼの作用によって除去されて、移植時の超急性拒絶反応を抑制することができる。

また本発明処理剤は、移植用に既に摘出された臓器のみならず、これから移植用に摘出する臓器に対しても用いることができる。例えば、これから摘出する臓器やその周辺を本発明処理剤で灌流したり満たしたりして、本発明処理剤中で臓器の摘出を行ってもよい。

本発明処理剤におけるエンドーβ-ガラクトシダーゼの配合量等は、本発明処理剤の使用方法、保存対象となる臓器の種類、大きさ、状態、保存の時間、温度等に応じて個別に決定されるべき事項であり、特に限定されないが、液剤とした状態で0.05~5ユニット/ml(約0.005mg/ml~0.5mg/ml)程度が例示される。「ユニット」の定義は後述する。特に、0.1~2ユニット/ml(約0.01mg/ml~0.2mg/ml)が好ましく、0.4~0.5ユニット/ml(0.04~0.05mg/ml)程度が極めて好ましい。

また、臓器の処理を行う時の本発明処理剤の温度も、使用方法等に応じて個別に決定することができるが、本発明処理剤が凍結せずに溶液状態を維持でき、臓器の機能を維持でき、かつエンドーβ-ガラクトシダーゼの酵素活性を維持でき

る程度の温度が好ましい。特にエンド- β -ガラクトシダーゼCは低温下でも有効に作用することから好ましく、この場合、低温、例えば4℃程度とすることが好ましい。

α -ガラクトース抗原を発現している臓器を、本発明処理剤によって処理することにより、 α -ガラクトース抗原が除去された臓器（本発明臓器）を得ることができる。ここで、「 α -ガラクトース抗原が除去された」とは、臓器に存在する全 α -ガラクトース抗原が除去される必要はなく、超急性拒絶反応が実質的に惹起されない程度に除去されていればよいことを意味する。具体的には、本発明処理剤によって α -ガラクトース抗原を発現している臓器を灌流することにより、臓器の血管内皮細胞上に存在する α -ガラクトース抗原が、実質的に除去されているものであることが好ましい。

後述の実施例でも示す通り、エンド- β -ガラクトシダーゼCで処理した腎臓には組織学的変化は見られなかったことから、本発明処理剤および本発明臓器の安全性が強く推定される。

図面の簡単な説明

図1は、エンド- β -ガラクトシダーゼC処理したブタ赤血球の蛍光活性化セルソーター（FACS）による分析結果を示す図である。

図2は、エンド- β -ガラクトシダーゼCで処理したブタ細胞への、GS-IB₄とヒト免疫グロブリンの結合性の減少を示す図である。

図3は、補体依存性の細胞傷害に対するエンド- β -ガラクトシダーゼCの効果を示す図である。

図4は、エンド- β -ガラクトシダーゼCで処理したブタ腎臓血管への、ヒト血漿中の免疫グロブリンの吸着性の減少を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

<1> エンド- β -ガラクトシダーゼCの部分アミノ酸配列の解析、PCRプラ

イマーの作製

特公平7-87783号公報、及びJ. Biol. Chem., 262, 10086-10092 (1987)に記載の方法に従い、Clostridium perfringens (ATCC10873, FERM P-8917)の培養液から、硫酸塩析、Sephadex G-200 (ファルマシア社製) カラムクロマトグラフィー、これに続くDEAE-Sephadex A-25 (ファルマシア社製) カラムクロマトグラフィーによりタンパク質を精製した。この精製タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にかけて、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーで染色した。分子量90,000に相当するバンドを切り出して、トリプシン消化後、高速液体クロマトグラフィーで消化断片を分離し、プロテイン・シーケンサーABI494A(ABI製)で各断片の部分アミノ酸配列を解析した。その結果以下の4種類のアミノ酸配列を得た。

(No.5) SEVPSQP (配列番号3)

(No.19) LSDGDLNEEN (配列番号4)

(No.42) QNSDYLDWI (配列番号5)

(No.45) DENEYVLTNVLNGLIPTTNSK (配列番号6)

これらアミノ配列に基づいて以下のPCRプライマーを作製した。

C45-S2(センスプライマー) 5'-GAYGARAAYGARTAYGT-3' (配列番号7)

C19-AS1(アンチセンスプライマー) 5'-TCYTCRTTNARRTCNCCRTC-3' (配列番号8)

< 2 > 上記プライマーを用いたPCR

これらのプライマーを用い、Clostridium perfringens (ATCC10873, FERM P-8917) から常法により抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)を行った。PCRは、94°C(3分間)での保持に続き、94°C(1分間)/45°C(1分間)/72°C(2分間)の反応を35サイクル行った。

得られた増幅産物を、塩基配列決定用クローニングベクターpGEM-T Easy Vector Systems(プロメガ社製)に連結し、ABI Prism 377 DNA シーケンサー(ABI社製)を用いて、ジデオキシ法により塩基配列を解析した。その結果、上記4種のアミノ酸配列をコードする配列を含む部分的cDNA(1946bp)が取得できた。

< 3 > 上記で取得した部分的cDNAを用いたカセットP C R

更に、得られたcDNAの5'及び3'側の領域を取得するために、5'及び3'の両側ともHindIII-cassette(タカラ酒造製;コード番号 3870)を用いて、カセットP C Rを行った。ここで用いたプライマーは以下の通りである。

(5'-プライマー)

CP-1 5'-TGATACTTGTGGTACAGTAGAATGCCCACT-3' (配列番号 9)

CP-2 5'-ATGTTTACTATTAGTAGTAGGTATTAAGCC-3' (配列番号 10)

(3'-プライマー)

CP-3 5'-AGATGGTATGCATACTAGACCTATGTTCCC-3' (配列番号 11)

CP-4 5'-AAGTTGGAGATGGTTGGGTTGGTGATGTTG-3' (配列番号 12)

カセットP C Rは、94°C(30秒間)/55°C(2分間)/72°C(1分間)の反応を30サイクル行った。

得られた産物は、上記と同様の方法で塩基配列解析し、最終的に2535bp、845アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(ORF)を明らかにした。

< 4 > 全長cDNAを得るためのプライマーの調製、P C Rによる全長cDNAの取得、塩基配列の確認

全長のcDNAは、上記< 3 >の情報に基づき作製した以下のプライマー(CP-5およびCP-6)を用い、P C Rで増幅した。P C Rは、94°C(1分間)で保持した後、94°C(30秒間)/55°C(2分間)/72°C(1分間)の反応を30サイクル行った。

CP-5 5'-GCAGCCGAATTCATGAAATTTTTCTCGAAATTCAAAAAGGTA-3' (配列番号 13)

CP-6 5'-GCGTCGCTCGAGTTATTTATTTTGTA AAAAAGTTACTTTAGC-3' (配列番号 14)

得られた産物をpGEM-T Easy Vector Systems(プロメガ社製)に連結し、プライマー(CP-3、CP-5、CP-6及び以下に示すプライマー)を用いて、塩基配列を確認した。

CP-7 5'-GGTGCAATCTATAATAGGGG-3' (配列番号 15)

CP-8 5'-CCCCTATTATAGATTGCACC-3' (配列番号 16)

C5-S1 5'-AAGTCTGAAGTACCAAGTCA-3' (配列番号 17)

CP-11 5'-GAAGTTGTTTGGAGTGACGAG-3' (配列番号 18)

M13 Forward 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (配列番号 19)

M13 Reverse 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' (配列番号 20)

5'側について、CP-1、CP-2及び下記のプライマーを用いた5'-RACEを行い、塩基配列を確認した。

C5-AS1 5'-TGACTTGGTACTTCAGACTT-3' (配列番号 21)

明らかになった塩基配列及びそれに対応するアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2にそれぞれ示す。明らかにされた本発明DNAの塩基配列は、2535bp、845アミノ酸からなるORFからなっていることが確認された。

<5>cDNAを用いた酵素の発現、酵素活性のアッセイ

(1)酵素の発現

コード領域のcDNAは、IgMシグナルペプチド及びプロテインA遺伝子が組み込まれ、SRプロモーターを有するpcDSA発現ベクター (FEBS Letters, 360, p.1-4 (1995)及びJ. Biol. Chem., 269 (2), p.1402-1409 (1994)) の、EcoRI/XhoIサイトに連結させた。得られたプラスミドは、LIPOFECT AMINE PLUS Reagent(Gibco BRL製)を用いてCOS-7細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションは、FCSを含有しないDMEM培地中で行った。

トランスフェクト後の細胞は、プロテインA セファロース CL-4B (ファルマシア製) でIgGを吸着除去したウシ胎仔血清(FCS)を2%含有する、DMEM培地中で培養した(10cmディッシュ×48枚)。3日後までの培養液を回収後、新たな培地にて5日後まで培養し、培養液を回収した。

回収した培養液(約800ml)を3000rpmで10分間遠心分離し、上清を0.8µmフィルターでろ過し、この上清液を約100mlずつIgG Sepharose 6 Fast Flow (ファルマシア製; 6.5mm×10mm)に通して、吸着画分を回収した。回収した吸着画分をCentricon 10(アミコン社製)を用いて濃縮し、-80°Cで保存した。

(2) 酵素活性のアッセイ

ブタ赤血球表面には、エンドー β -ガラクトシダーゼCの基質となるGal α 1-3Gal構造を有する糖鎖（ガラクトース抗原）が存在する。これを利用して、以下の通りエンドー β -ガラクトシダーゼC活性をアッセイした。

(i) ブタ赤血球の調製

ブタから血液を採取して、遠心分離により血球を得た。この血球を0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）を含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）で3回洗浄した。洗浄後の血球に、3mg/mlスベルイミノ酸ジメチル二塩酸塩（DMS）（0.1M Na₂CO₃、0.15M NaCl及び0.1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含有する緩衝液（pH 10.3）に溶解）を添加して、37°Cで20分間インキュベートした。

その後、0.02% EDTAを含有するPBS(-)（pH 7.4）で2回洗浄し、血球を充分懸濁させて、0.2% BSAを含有するPBS(-)で1%血球浮遊液とした。

(ii) 酵素活性のアッセイ

(i)で調製した血球（1%血球浮遊液50 μ l）をチューブに入れ、2,000rpmで1分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿（血球）に、0.2%BSAを含有するPBS(-)を100 μ l添加して血球を懸濁させ、上記(1)で発現させた酵素の溶液（1 μ l又は8 μ l）又は対照としてPBS(-)を添加した。その後、37°Cで1～2時間インキュベートした。

インキュベート後、血球を0.2% BSAを含有するPBS(-)で2回洗浄し、同緩衝液50 μ l中に再懸濁させた。この懸濁液25 μ lに、0.2% BSAを含有するPBS(-)で50倍希釈したFITC（フルオレセインイソチオシアネート）標識したGS-IB₄（シグマ社製；Gal α 1-3Gal構造に結合するレクチン；*Griffonia simplicifolia*由来）25 μ lを添加し、氷冷下で30分間インキュベートした。その後、血球を0.2% BSAを含有するPBS(-)で洗浄し、同緩衝液0.5mlで再懸濁させて、蛍光活性化セルソーター（FACS）で解析した。結果を図1に示す。

その結果、ブタ赤血球と発現酵素とを接触させると、対照（図1中のA）に比してFITC蛍光強度が減少した（図1中のB）。また、接触させる発現酵素量を増加させると、FITCの蛍光強度がさらに減少した（図1中のC）。このことは、発

現させた酵素がエンド- β -ガラクトシダーゼC活性を保持しており、ブタ赤血球表面のGal α 1-3Gal構造を有する糖鎖が切り出された結果、FITC標識したGS-IB₄のブタ赤血球表面への結合が減少したことを示している。この結果から、本発明DNAが、真に酵素活性を有するエンド- β -ガラクトシダーゼCをコードしていることが示された。また本発明DNAを用いて調製した本発明組換えベクター、本発明組換えベクターを用いて調製した本発明形質転換体、本発明形質転換体を利用した本発明製造方法が、真に実用的かつ有用なものであることが示された。さらに、エンド- β -ガラクトシダーゼで処理することにより、 α -ガラクトース抗原を除去できることが示された。

< 6 > 大腸菌を用いた酵素の大量発現、酵素活性のアッセイ、異種移植への応用

以下、特にことわらない限り、酵素反応は、20 μ gのGal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (Calbiochem)を含有する50mMリン酸緩衝液(pH7.2) 10 μ l中で行った。37°Cで30分間インキュベートし、20 μ lのエタノールを添加することにより反応を停止させた。

(1) 大腸菌を用いた組換えエンド- β -ガラクトシダーゼCの製造

前記コード領域を含むcDNAを、ペリプラズムに分泌される遺伝子産物を産生する発現ベクター pFLAG-Shift₁₂ (シグマ社)に連結させた。これにより、酵素は大腸菌(E.coli)中で、ompA遺伝子の調節のもと、ペリプラズム酵素として発現される。この組換え遺伝子でE.coli BL-12細胞を形質転換し、37°C下、50 μ g/mLのアmpiシリン、0.4%のグルコースを含有するLB培地 2L中で培養し、0.1mMのIPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)を培地に添加することにより酵素発現を誘導した。30分後、細胞を5,000xgで10分間遠心することにより回収し、室温下、300mLのTris-HCl(pH8.0)で2回洗浄し、300mLの0.5M シュークロース、30mM Tris-HCl(pH8.0)および1mMのEDTAを含有する溶液でさらに洗浄した。

遠心分離して回収した細胞を250mLの氷冷した純水に懸濁して、ペリプラズムから酵素を遊離させた。4°C下、3,500xgで10分間遠心することによって、遊離した酵素を含有する上清を回収し、J. Biol. Chem., 262, 10086-10092 (1987)

に記載の方法で、Sephadex G-200(2.7x100cm)およびDEAE-Sephadex A-25(1.0x10 cm) (いずれもファルマシア社製) を用いたカラムクロマトグラフィーにより酵素画分を精製した。精製した酵素画分は、約700 μ gのタンパク質を含有していた。以上の工程を繰り返して大量の酵素を製造した。

精製した酵素画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE; 8%ゲル)で解析した結果、見かけの分子量が95kDaである主要なバンド、およびこれに近接したマイナーなバンド(97kDa)が見出された。主要なバンド(95kDa)のN末端アミノ酸配列を分析したところ、D E N E Y V L (一文字記号: 配列番号2においてアミノ酸番号35~41に相当)であった。又配列番号2におけるアミノ酸番号1~34の部分には、シグナル配列に典型的に見出される疎水性アミノ酸のクラスターが存在している。これらのことから、配列番号2におけるアミノ酸番号1~34の部分はシグナル配列であると考えられ、主要なバンド(95kDa)はこのシグナル配列を欠くタンパク質(配列番号2におけるアミノ酸番号35~845で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質)であると考えられる。また分子量の差異から考えると、マイナーなバンド(97kDa)はシグナル配列を有するタンパク質であると考えられる。

(2) エンド- β -ガラクトシダーゼCのアッセイ

4ミリユニットのエンド- β -ガラクトシダーゼCを用いて、前記の通り酵素反応を行った。

反応を停止させた後、この反応後の溶液をDowex 50Wx2H⁻フォームおよび1x2アセテートフォームで脱塩した後、1/10量の加水分解物をSilica Gel 60 TLCプレート(メルク社)にスポットした。

このプレートをn-プロパノール:酢酸エチル:H₂O(7:2:1)で展開することにより薄層クロマトグラフィー(TLC)を行い、オルシノール-硫酸試薬をスプレーして加熱することにより(J. Neurochem., 1, p42-53(1956))、糖のスポットを出現させた。遊離した産物の量をデンストメーター(Gel Doc 1000(BIO-RAD社))で測定した。なおこのアッセイ条件下では、40%の基質が加水分解されるまでは、酵素活性は酵素量および反応時間に比例する。また「1ユニット」の酵素活性と

は、前記酵素反応の条件で1分間に1 μ モルの基質を加水分解するために必要な酵素量として定義される。

その結果、上記(1)で得られた組換え酵素は、五糖(Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)を加水分解し、TLCによって分離される2つのオリゴ糖を遊離した。

次に、これらのオリゴ糖を同定するために、エレクトロスプレー質量分析を行った。

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc(20 μ g)を、10 μ Lの30mM NaCl中、4ミリユニットの酵素で37 $^{\circ}$ Cで30分間加水分解した。20 μ Lのエタノールで酵素反応を停止させた後、反応液を17mMの酢酸アンモニウムを含有する1.5倍量の83% アセトニトリルと混合した。

質量分析は、エレクトロスプレーイオンソース(electrospray ion source)を装着した三連四重極質量分析計(Triple quadrupole mass spectrometer) API 300(Perkin Elmer Sciex Instruments)を用いて行った。サンプルは、エレクトロスプレー・イオン・ソースに、流速0.3ml/時間で直接注入した。スプレーは、4.8KVのpotential differenceによって得た。

その結果、酵素消化前の五糖を分析した結果、m/z 892.2であった。これは、五糖の分子量の理論値に23を加えた数字であり、これはNa⁻イオンの付加によるものと考えられる。酵素消化後のオリゴ糖を分析した結果、2つの顕著なピークがm/z 568.1およびm/z 365.0の位置に出現した。前者の質量はGlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcにNa⁻を加えたものに相当し、後者の質量はGal α 1-3GalにNa⁻を加えたものに相当する。

これらの結果から、クローニングされた酵素がエンド β -ガラクトシダーゼCであり、Gal β 1-4GlcNAc結合を加水分解してGal α 1-3Gal二糖を遊離することが確認された。またこの酵素の比活性は10.5ユニット/mgタンパク質であり、この酵素が強い活性を有していることが示された。なお精製した酵素のタンパク質量は、ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin)をスタンダードとして、Micro BCA protein assay reagent キット(Pierce社)を用いて決定した。

また、精製した酵素画分中の他のグリコシダーゼの夾雑を、それぞれの p-ニ

トロフェニルグリコシドを基質として用い、29.4 μ gの精製酵素とともに0.2mLの反応混合液中で37°Cで1時間、pH7.0(50mMリン酸緩衝液)およびpH6.0(50mMクエン酸-リン酸緩衝液)でインキュベートすることによって決定した。さらにプロテアーゼの夾雑は、J.Biochem., 75.p707-714(1974)に記載の方法によって、同様にpH7.0と6.0の条件下で測定した。

その結果この精製酵素画分は、プロテアーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、および β -N-アセチルグルコサミニダーゼを実質的に含有していなかった。またこの組換え酵素は至適pH7.0~8.0であり、*C. perfringens*の培養液から得られた酵素の至適pH(J.Biol.Chem., 262, p10086-10092(1987))と同様であった。さらに、この酵素の4°Cにおける酵素活性は、37°Cにおける活性の約40%であった。

(3) 異種移植に向けての応用

以下、「PBS/BSA」は、0.2% BSAを含有するPBS(-)を意味する。

(3-1) 生細胞からの α -ガラクトース抗原の除去

ブタ赤血球を、前記<5>と同様に調製した。ブタの血管内皮細胞は、Transplantation 62, p105-113(1996)に記載の方法でブタから単離した。この細胞をトリプシン-EDTA(Gibco BRL)で回収し、PBS/BSAで2回洗浄し、再度PBS/BSAに懸濁させた。上記(1)で得た組換えエンド β -ガラクトシダーゼC(7 μ LのPBS中に70ミリユニット)を血管内皮細胞(2×10^5 細胞/50 μ L)に添加し、酵素反応を37°C下で1時間行った。

酵素反応後、赤血球または内皮細胞をPBS/BSAで2回洗浄し、FITCラベルしたGS-IB₄またはヒト血清と反応させた。前者の場合、細胞を1 μ gのFITC-GS-IB₄(シグマ)を含有する50 μ LのPBS/BSAに懸濁させ、氷冷下で30分間維持した。後者の場合、洗浄した細胞を、50人の健常なボランティアから採取しプールした100 μ Lの正常ヒト血清(PBS/BSAで1:1に希釈)と共にインキュベートした。30分間氷冷下でインキュベートした後、細胞をPBS/BSAで2回洗浄し、100 μ LのFITC結合ウサギ抗ヒトIgG、IgMまたはIgA(Dako社;それぞれPBS/BSAで1:20に希釈)で30分間氷冷下でインキュベートした。FITC結合マウスモノクローナル抗ヒトIgG₁(Zymed社)、

IgG₂、IgG₃またはIgG₄(Sigma)も用いた。

染色された赤血球または内皮細胞をPBS/BSAで2回洗浄し、0.5mLのPBS/BSAに懸濁させて、FACS(FACS Calibur; Becton Dickinson)で解析した。

(3-2)補体依存性の細胞傷害性のアッセイ

ブタ血管内皮細胞を、アッセイの1日前に96ウエルの培養プレートに 1×10^4 細胞/ウエルで播いた。PBS(-)で洗浄した後、細胞を、70ミリユニットの上記(1)で得た組換えエンド- β -ガラクトシダーゼCを含有する50 μ Lのダルベッコ改変イーグル培地中で37°C、2時間インキュベートした。コントロールの細胞は酵素なしの条件下でインキュベートした。細胞を2回洗浄して、PBS(-)で希釈した25%または50%の正常ヒト血清(50 μ L)とともに37°Cで1時間インキュベートした。ヒト血清は10人の健常なボランティアから採取したものをプールして用いた。インキュベートの後、Biochem. Biophys. Res. Comm., 232, p731-736 (1997)に記載の方法により、細胞の生存を3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(Sigma社)を用いたアッセイにより決定した。各ウエルの540nmの吸光度をオートマチック・プレート・リーダー(EAR340, SLT-Labinstruments)で測定し、「補体存在下での細胞の生存」とした。それぞれのアッセイで、56°Cで30分間処理して補体を不活化した血清を用いて「補体非存在下での細胞の生存」を決定した。補体依存性の細胞傷害性は、以下の式によって算出した。実験は3回(triplicate)行った。

%細胞傷害性 =

$$\left[\frac{(\text{補体非存在下での細胞の生存} - \text{補体存在下での細胞の生存})}{\text{補体非存在下での細胞の生存}} \right] \times 100$$

以上の実験の結果を図2および図3に示す。

図2は、組換えエンド- β -ガラクトシダーゼCで処理したブタ細胞への、GS-IB₄とヒト免疫グロブリンの結合性の減少を示す図である。AおよびCは赤血球を用いた実験を、BおよびDは血管内皮細胞を用いた実験を示す。図中の太線は酵素処理後の結果を、細線は酵素処理前の結果を示す。

また図3は、補体依存性の細胞傷害性に対するエンド- β -ガラクトシダーゼCの効果を示す図である。図3中、網掛けのあるバーは酵素処理していないものの結果を、黒のバーは酵素処理したものの結果をそれぞれ示す。3回のアッセイの平均値を、標準誤差と共に示した。

組換えエンド- β -ガラクトシダーゼCで処理した後、99%以上の α -ガラクトース抗原(FITC-GS-IB₄により認識される)がブタ赤血球から除去された(図2A)。同様に、98%の α -ガラクトシルエピトープが酵素的にブタ血管内皮細胞から除去された(図2B)。酵素処理した赤血球へのIgMの結合は、無処理の細胞の25%にまで減少した(図2A)。また内皮細胞では23%以下にまで減少した(図2B)。酵素処理した内皮細胞への、ヒト血清中のIgAおよびIgGの結合は、それぞれ同様に21%および33%にまで減少した(図2B)。酵素処理した赤血球へのIgGの結合の減少は、比較的少なかった(図2A)。

さらに、ヒトIgGサブクラスに対する抗体を用いた結果、処理した細胞へのIgG₁、IgG₂、IgG₃の結合が、顕著に減少していた(図2CおよびD)。これに対しIgG₄の結合は変化しなかった。エンド- β -ガラクトシダーゼCで処理された細胞は、ヒト血清によって引き起こされる、補体依存性の細胞傷害に対する感受性が低下していた(図3)。

(3-3)ex vivoでの灌流による、ブタ腎臓血管のエンド- β -ガラクトシダーゼC処理

腎臓は、Landrace/Yorkshireで異種交配したメスブタ(オグリ畜産;体重10~12kg)から、生理食塩水およびUniversity of Wisconsin(UW)溶液(Transplantation 45,p673-676(1988))によって灌流した後に、通常の外科的手法により摘出した。右側の腎臓は、ex vivoで、45.1ユニットのエンド- β -ガラクトシダーゼCを含有する100mLの冷UW溶液を用い、重力(1×g)による流れによって2回灌流した。左側の腎臓は、酵素なしで灌流した。両方の腎臓は、灌流液中で、4℃、4時間保存した。4℃で反応させたのは、低温の方が組織の保存に好ましく、またエンド- β -ガラクトシダーゼCは低温下でも有効に作用するからである。

生検は、灌流後1時間目および4時間目の直前に行った。次いで、腎臓を、3

人の健常なボランティアから採取した100mLのヒト新鮮凍結血漿で2回灌流した。

組織学的検討のため、生検によって得たサンプルをホルマリンで固定し、ヘマトキシリン-エオシンおよび過ヨウ素酸シッフ染色により染色した。サンプルはまた、液体窒素中で直ちに凍結させ、FITC-GS-IB₄によって染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

この観察により、FITC-GS-IB₄による染色によって、血管内皮細胞の内腔に存在する α -ガラクトース抗原が、4℃、4時間の酵素反応によって実際に除去されていることが確認された。酵素処理した腎臓には、組織学的変化は見られなかった。

さらに、灌流に用いたヒト血漿を回収し、残存した免疫グロブリンのレベルを、前記のブタ赤血球を用いてFACSで解析した。

これは、in situで α -ガラクトース抗原を除去する方法によって、酵素処理した血管へのヒト血漿中の免疫グロブリンの結合が、血管内皮細胞や赤血球の場合と同様に減少するか否かを調べるためである。分離した細胞はFACSを用ることによって定量的な解析が可能であるが、インタクトな血管において結合した免疫グロブリン量を直接測定するのは容易ではない。そこで腎臓の灌流後における、ブタ赤血球への免疫グロブリンの結合活性の減少を測定することとした。ブタ間のばらつきを防ぐため、同じ個体から摘出した2つの腎臓を用いた。右側の腎臓はエンド- β -ガラクトシダーゼCで処理し、左側の腎臓は酵素を含有しない溶液で灌流した。次いで、重力下でヒト血漿(100ml)を灌流した。

灌流したヒト血漿を回収してブタ赤血球と反応させ、次いでヒト免疫グロブリンに対するFITC結合抗体と反応させた。染色した赤血球をFACSで解析した。結果を図4に示す。なお結果は、灌流前の血漿を用いた場合の平均蛍光強度を100%とした相対値で示した。

図4中の白のバーは灌流前の血漿を用いた結果を、網掛けのあるバーは酵素を含有しない溶液のみで灌流したときの結果を、黒のバーは酵素を含有する溶液で灌流したときの結果をそれぞれ示す。3回の独立した実験結果の平均値を、標準誤差と共に示した。結果は、スチューデントのT検定(Student's T-test)により解析した。図4中の*は、 $P < 0.05$ で有意であることを示す。

この結果、酵素処理した腎臓は、酵素を含まない溶液によって処理した腎臓よりもIgMの結合量が有意に少なかった。酵素処理しなかったブタ腎臓では、平均して31%のIgM結合活性がヒト血漿中に残存していた(図4)。一方、酵素処理した腎臓では、平均して64%が残存していた(図4)。この差は統計学的に有意であった。この結果は、大量のIgM結合抗原エピトープがエンド-β-ガラクトシダーゼC消化によって除去されたことを示す。

しかしながら、IgGおよびIgAの結合能は、酵素処理によってもあまり減少せず、統計学的な有意差もなかった(図4)。

産業上の利用可能性

本発明DNAにより、エンド-β-ガラクトシダーゼCを遺伝子工学的に安価かつ大量に調製することができる。

また本発明DNAを用いて調製した本発明組換えベクター、本発明組換えベクターを用いて調製した本発明形質転換体、本発明形質転換体を利用した本発明製造方法は、エンド-β-ガラクトシダーゼCの大量調製に有用である。

また本発明処理剤は、例えばブタ等の臓器に発現しているα-ガラクトース抗原を予め除去し、この臓器をヒト・サル等(α-ガラクトース抗原を発現しない)への移植に用いることにより、異種移植の際の超急性拒絶反応を抑制できることから、極めて有用である。特にこのような移植用の腎臓の処理に極めて有用である。

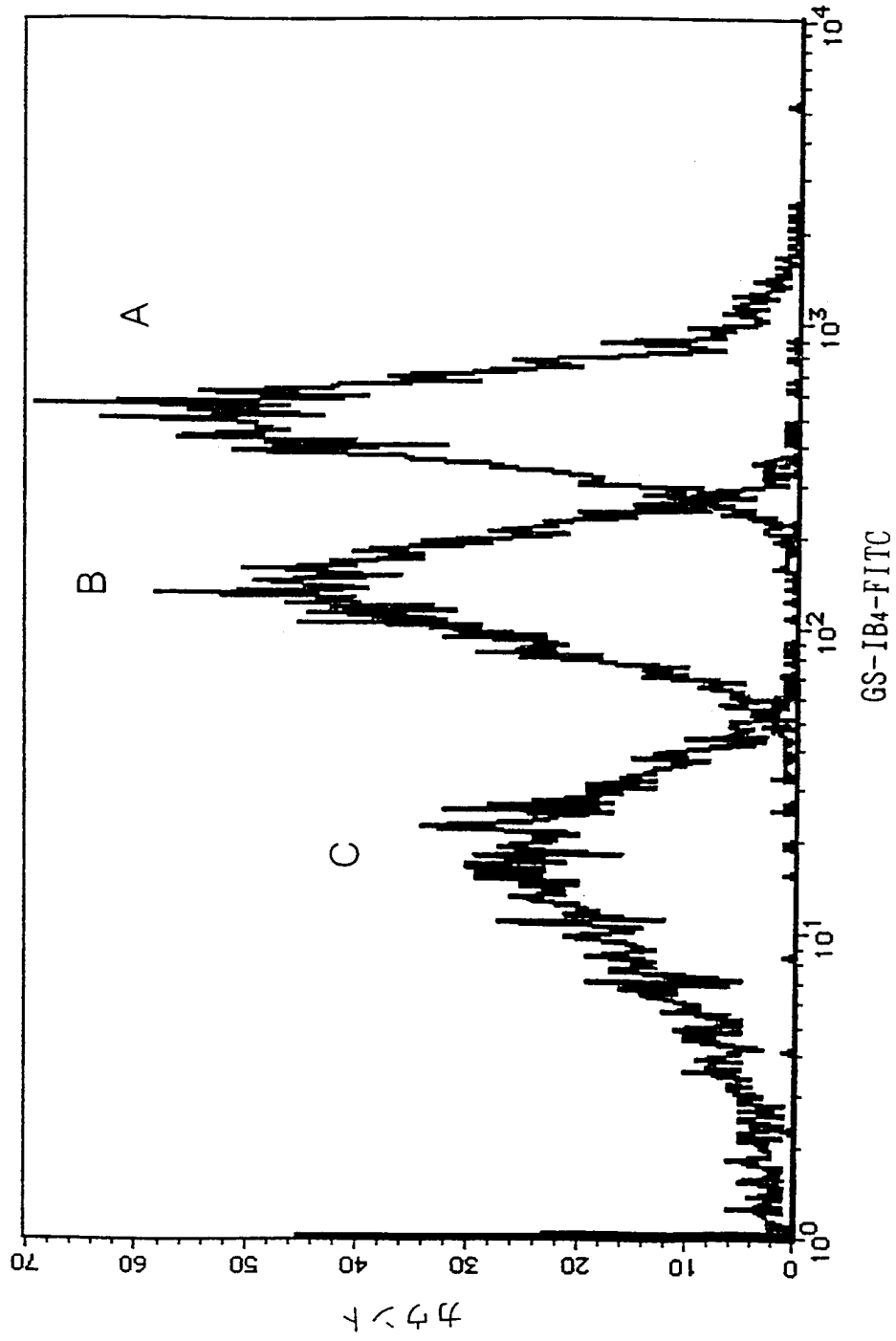
本発明処理剤で処理することによって得られる本発明臓器は、このような異種移植用の臓器として極めて有用である。

請求の範囲

1. 以下の (A) 又は (B) のタンパク質をコードする DNA。
 - (A) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。
 - (B) アミノ酸配列 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつエンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質。
2. 前記アミノ酸配列 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつエンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号 2 におけるアミノ酸番号 35~845 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質である、請求項 1 記載の DNA。
3. 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 1 記載の DNA。
 - (a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 246~2780 からなる塩基配列を含む DNA。
 - (b) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 246~2780 からなる塩基配列に相補的な塩基配列の全部または一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。
4. 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 1 記載の DNA。
 - (a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 348~2780 からなる塩基配列を含む DNA。
 - (b) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 348~2780 からなる塩基配列に相補的な塩基配列の全部または一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンド-β-ガラクトシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。
5. 請求項 1~4 のいずれか一項に記載の DNA を組み込んだ組換えベクター。
6. 請求項 1~4 のいずれか一項に記載の DNA 又は請求項 5 に記載の組換えベクターを細胞に導入することにより得られる、形質転換体。

7. 請求項6に記載の形質転換体を生育させてエンドー β -ガラクトシダーゼをコードするDNAを発現させ、生成したエンドー β -ガラクトシダーゼを採取することを特徴とするエンドー β -ガラクトシダーゼの製造方法。
8. エンドー β -ガラクトシダーゼを含有する、臓器処理剤。
9. 臓器が移植用臓器である、請求項8に記載の処理剤。
10. 移植用臓器が、 α -ガラクトース抗原を発現している臓器であることを特徴とする、請求項9に記載の処理剤。
11. 移植用臓器が、ブタの臓器であることを特徴とする、請求項10に記載の処理剤。
12. 移植用臓器が、ヒトに移植するための臓器である、請求項9～11のいずれか1項に記載の処理剤。
13. 臓器が腎臓である、8～12のいずれか1項に記載の処理剤。
14. α -ガラクトース抗原を発現している臓器を、請求項8～13のいずれか1項に記載の処理剤によって処理して得られる、 α -ガラクトース抗原が除去された臓器。
15. α -ガラクトース抗原を発現している臓器を、エンドー β -ガラクトシダーゼで処理することを特徴とする、 α -ガラクトース抗原による拒絶反応が抑制された移植用臓器の生産方法。

Fig. 1



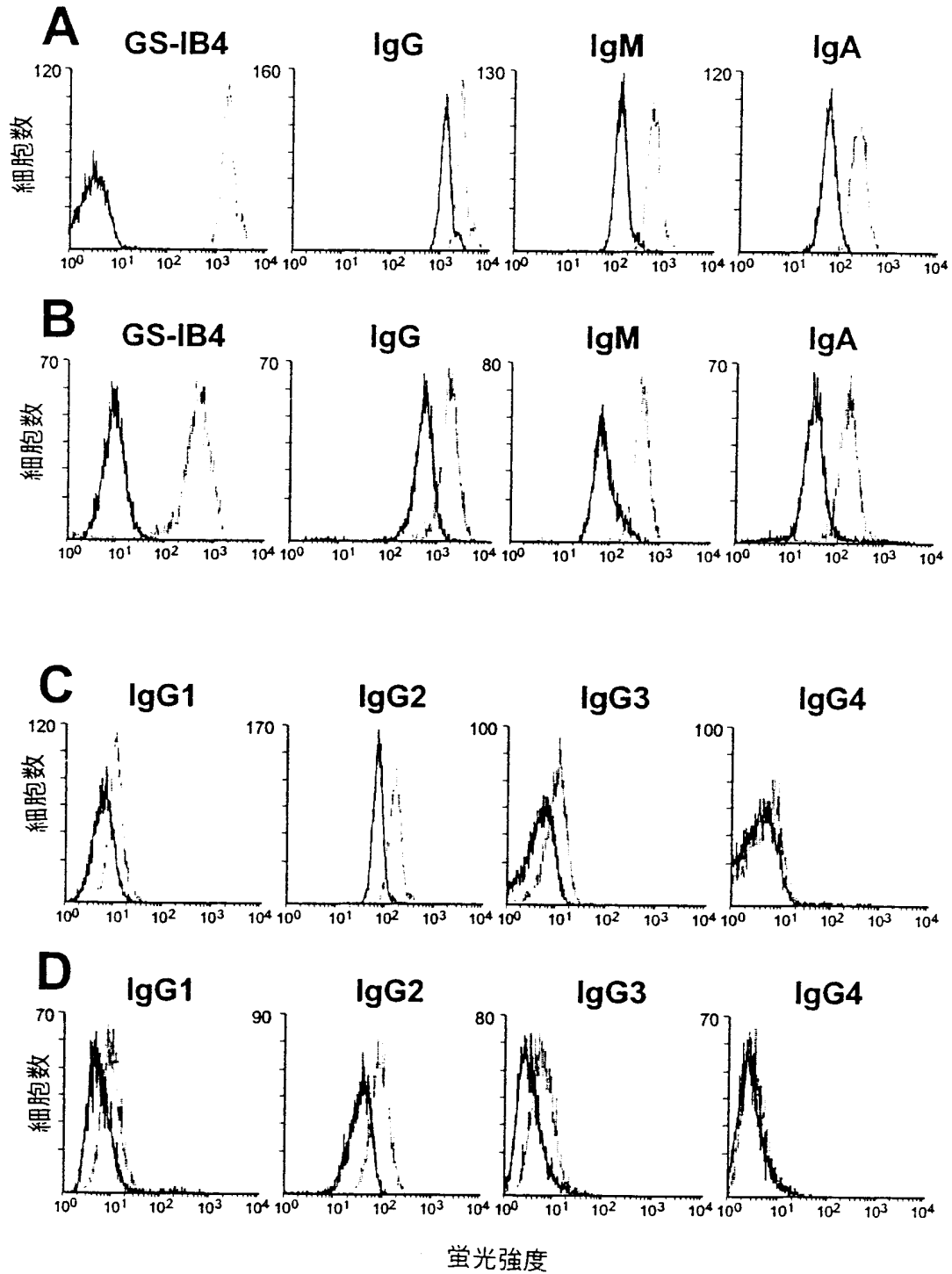


Fig. 2

3/4

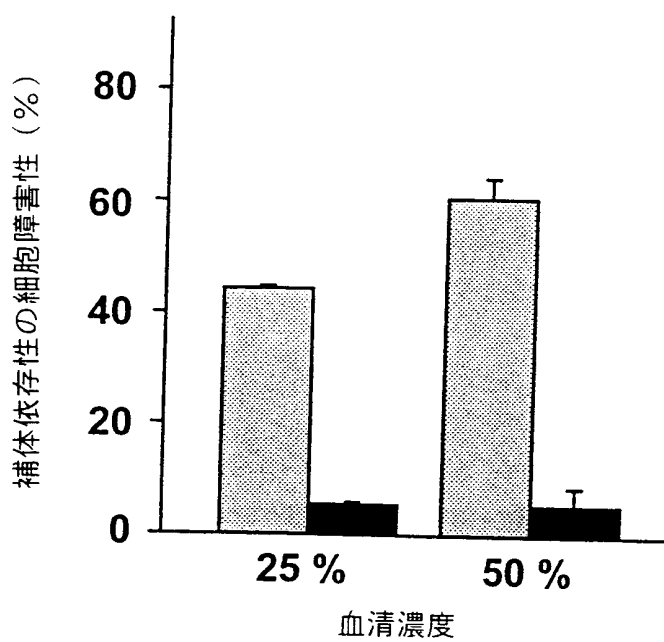


Fig. 3

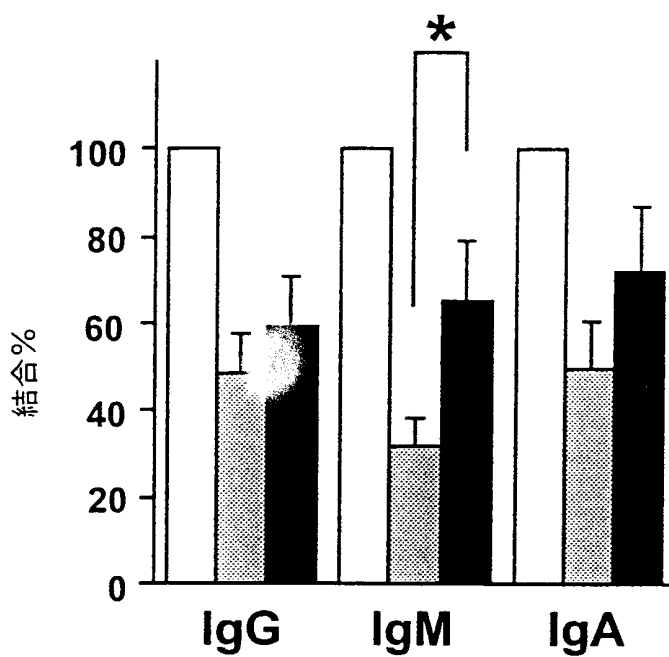


Fig. 4

1/13

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> SEIKAGAKU CORPORATION
MURAMATSU, Takashi

<120> エンドーβ-ガラクトシダーゼをコードするDNA

<130> F200008-1126

<140>

<141> 2000-10-20

<150> JP 11-300795

<151> 1999-10-22

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3013

<212> DNA

<213> Clostridium perfringens

<220>

<221> CDS

<222> (246)..(2780)

<400> 1

```

aagcttttaa atcatgccaa tgaaggaaag gaaagagtaa agttatttgg attagacaaa 60
gatggggatt ataagttgag ttacccttat gaaaaagaat ttaagggatga tgaacttatg 120
aatgtttgaa tttcaatgaa tgatgattat ttttgtaata gcggaaatga tttttcatca 180
gtacttttatt tattaagaaa aatataaatt taatatattt taataattaa aggaggaatc 240
tgtat atg aaa ttt ttc tgc aaa ttc aaa aag gta aac gta ttt ctt att 290
      Met Lys Phe Phe Ser Lys Phe Lys Lys Val Asn Val Phe Leu Ile
          1           5           10           15
tta ttt gct ttt ata ggt aca att ttc ttg agt agt ttt agt aaa tta 338
Leu Phe Ala Phe Ile Gly Thr Ile Phe Leu Ser Ser Phe Ser Lys Leu
          20           25           30
gtt tta gct gat gag aat gaa tat gta ctt aca aat gta tta aat ggc 386
Val Leu Ala Asp Glu Asn Glu Tyr Val Leu Thr Asn Val Leu Asn Gly
          35           40           45
tta ata cct act act aat agt aaa cat atg att att agt ggg cat tct 434

```


4/13

aca ggc cat gat gaa ata gat gtt tta gaa tat tta gga caa gat cct 1826
Thr Gly His Asp Glu Ile Asp Val Leu Glu Tyr Leu Gly Gln Asp Pro
515 520 525
tgg ggt gca tgg aca act aat cat ttt gga ata tta gga aaa aat aaa 1874
Trp Gly Ala Trp Thr Thr Asn His Phe Gly Ile Leu Gly Lys Asn Lys
530 535 540
gct tct aat gga att aga aat agt aat tat gag gct tgg agt caa gat 1922
Ala Ser Asn Gly Ile Arg Asn Ser Asn Tyr Glu Ala Trp Ser Gln Asp
545 550 555
ttt cat gtc ttt gaa gtt gaa tgg gat cca gaa ttt ata aaa tgg tat 1970
Phe His Val Phe Glu Val Glu Trp Asp Pro Glu Phe Ile Lys Trp Tyr
560 565 570 575
ata gat gga aag gaa gta ttt caa agt act caa gga aga gat gat ggc 2018
Ile Asp Gly Lys Glu Val Phe Gln Ser Thr Gln Gly Arg Asp Asp Gly
580 585 590
aga gat ggt atg cat act aga cct atg ttc cca ata tta gag aca caa 2066
Arg Asp Gly Met His Thr Arg Pro Met Phe Pro Ile Leu Glu Thr Gln
595 600 605
gtt gga gat ggt tgg gtt ggt gat gtt gat tat aat aag caa aat aca 2114
Val Gly Asp Gly Trp Val Gly Asp Val Asp Tyr Asn Lys Gln Asn Thr
610 615 620
aag caa aat tca gat tat tta att gat tgg ata aga gta tat caa atg 2162
Lys Gln Asn Ser Asp Tyr Leu Ile Asp Trp Ile Arg Val Tyr Gln Met
625 630 635
cct aat caa gca aat gta aaa ttt gat gat tta aga agt ctt gat aag 2210
Pro Asn Gln Ala Asn Val Lys Phe Asp Asp Leu Arg Ser Leu Asp Lys
640 645 650 655
aaa gaa aat aaa gga tat gaa gta act cct tat tct cat aca aat aat 2258
Lys Glu Asn Lys Gly Tyr Glu Val Thr Pro Tyr Ser His Thr Asn Asn
660 665 670
tta ata aaa tta tca gat gga gat tta aat gaa gaa aac aag gat aat 2306
Leu Ile Lys Leu Ser Asp Gly Asp Leu Asn Glu Glu Asn Lys Asp Asn
675 680 685
ttt tac tat ggg ggt caa cct aga tta gaa aat aat cgt ata gct gtt 2354
Phe Tyr Tyr Gly Gly Gln Pro Arg Leu Glu Asn Asn Arg Ile Ala Val
690 695 700
gga gaa aat gga ggt aga gaa tct ata att tat aat gtt act aat gtt 2402
Gly Glu Asn Gly Gly Arg Glu Ser Ile Ile Tyr Asn Val Thr Asn Val
705 710 715
aaa gat ata cat tta act act tac tat caa act att gaa gat aaa atc 2450
Lys Asp Ile His Leu Thr Thr Tyr Tyr Gln Thr Ile Glu Asp Lys Ile
720 725 730 735
aca tgg aat aga agt gca ggt gca tat gaa gga tat tca att aga tca 2498

6/13

Glu Glu Thr Gly Gly Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Lys Trp Glu Pro Val
 100 105 110
 Phe Leu Gln Tyr Asp Leu Lys Lys Ile Arg Pro Val Lys Glu Ile Lys
 115 120 125
 Ile Tyr Arg Asn Thr Tyr Asp Asn Ala Ile Ser Thr Phe Lys Asp Val
 130 135 140
 Lys Val Glu Leu Ser Thr Ser Pro Asn Phe Glu Lys Asp Asn Thr Ser
 145 150 155 160
 Val Val Phe Glu Lys Gln Asp Ile Ile Glu Ser Arg Glu Ser Lys Gly
 165 170 175
 Asn Pro Gln Ile Ile Ser Leu Asp Lys Ala Ile Asp Ala Gln Tyr Ile
 180 185 190
 Arg Ile Trp Gly Lys Gly His Tyr Ile Glu Asn Thr Asn Ser Ser Trp
 195 200 205
 Lys Gly Tyr Ser Asn Gly Asn Leu Tyr Asn Glu Ile Glu Val Met Ala
 210 215 220
 Asn Val Pro Lys Ser Glu Val Pro Ser Gln Pro Asp Asn Ile Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Asn Leu Ala Ser Gly Lys Leu Pro Tyr Val Tyr Gly Leu Glu Pro
 245 250 255
 Ser Asn Ile Glu Ala Ile Thr Asp Gly Lys Ile Asp Asp Asn Tyr Ala
 260 265 270
 Val His Asn Ser Met Gly Asn Asn Trp Leu Gln Phe Glu Tyr Lys Asn
 275 280 285
 Thr Tyr Lys Phe Asn Ser Ile Lys Phe Lys Leu Glu Pro Gly Asn Tyr
 290 295 300
 Lys Ser Val Lys Val Ala Ile Ser Asn Ser Pro Asn Asn Gly Phe Lys
 305 310 315 320
 Glu Val Phe Ser Lys Ile Asn Trp Thr Gln Asn Asn Asp Leu Glu Val
 325 330 335
 Ile Asn Leu Pro Ser Asn Thr Lys Gly Arg Tyr Ile Arg Phe Thr Ile
 340 345 350
 Asp Lys Asp Gly Lys Ser Lys Thr Lys Tyr Ser Glu Ile Glu Ile Trp
 355 360 365
 Gly Thr Gly Asn Asn Tyr Asp Glu Ser Lys Asp Glu Tyr Val Glu Pro
 370 375 380
 Gln Ser Lys Tyr Asn Glu Leu Val Trp Ser Asp Glu Phe Asn Gly Glu
 385 390 395 400
 Lys Ile Asp Glu Asn Lys Trp Thr Ile Ile Asp Gly Met Val Asn His
 405 410 415
 Gly Ala Ile Tyr Asn Arg Gly Ala Val Ser Ile Lys Lys Asp Gly Asn
 420 425 430
 Asn Ser Tyr Leu Ala Ile Asn Thr Lys Asn Phe Asn Ser Thr Glu Glu

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | 435 | | 440 | | 445 | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Ile | Lys | Ala | Val | Gly | Val | Asp | Asn | Tyr | Leu | Gly | Gln | Ser | Ile | Asn | | |
| | 450 | | | | | | 455 | | | | 460 | | | | | | |
| Lys | Gln | Lys | Val | Thr | Trp | Ser | Ser | Gly | Arg | Ile | Glu | Ser | Lys | Asn | Lys | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | |
| Tyr | Ser | Phe | Gln | Phe | Gly | Arg | Met | Ala | Val | Arg | Ala | Lys | Val | Asn | Asp | | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | | |
| Ser | Gln | Gly | Ile | Trp | Pro | Ala | Ile | Trp | Met | Leu | Ser | Gln | Asp | Glu | Thr | | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | |
| Gly | His | Asp | Glu | Ile | Asp | Val | Leu | Glu | Tyr | Leu | Gly | Gln | Asp | Pro | Trp | | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | | 525 | | | | |
| Gly | Ala | Trp | Thr | Thr | Asn | His | Phe | Gly | Ile | Leu | Gly | Lys | Asn | Lys | Ala | | |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | | |
| Ser | Asn | Gly | Ile | Arg | Asn | Ser | Asn | Tyr | Glu | Ala | Trp | Ser | Gln | Asp | Phe | | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | |
| His | Val | Phe | Glu | Val | Glu | Trp | Asp | Pro | Glu | Phe | Ile | Lys | Trp | Tyr | Ile | | |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | | |
| Asp | Gly | Lys | Glu | Val | Phe | Gln | Ser | Thr | Gln | Gly | Arg | Asp | Asp | Gly | Arg | | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | |
| Asp | Gly | Met | His | Thr | Arg | Pro | Met | Phe | Pro | Ile | Leu | Glu | Thr | Gln | Val | | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | |
| Gly | Asp | Gly | Trp | Val | Gly | Asp | Val | Asp | Tyr | Asn | Lys | Gln | Asn | Thr | Lys | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | |
| Gln | Asn | Ser | Asp | Tyr | Leu | Ile | Asp | Trp | Ile | Arg | Val | Tyr | Gln | Met | Pro | | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | |
| Asn | Gln | Ala | Asn | Val | Lys | Phe | Asp | Asp | Leu | Arg | Ser | Leu | Asp | Lys | Lys | | |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | | | |
| Glu | Asn | Lys | Gly | Tyr | Glu | Val | Thr | Pro | Tyr | Ser | His | Thr | Asn | Asn | Leu | | |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | | | |
| Ile | Lys | Leu | Ser | Asp | Gly | Asp | Leu | Asn | Glu | Glu | Asn | Lys | Asp | Asn | Phe | | |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | | | |
| Tyr | Tyr | Gly | Gly | Gln | Pro | Arg | Leu | Glu | Asn | Asn | Arg | Ile | Ala | Val | Gly | | |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | |
| Glu | Asn | Gly | Gly | Arg | Glu | Ser | Ile | Ile | Tyr | Asn | Val | Thr | Asn | Val | Lys | | |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | |
| Asp | Ile | His | Leu | Thr | Thr | Tyr | Tyr | Gln | Thr | Ile | Glu | Asp | Lys | Ile | Thr | | |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | |
| Trp | Asn | Arg | Ser | Ala | Gly | Ala | Tyr | Glu | Gly | Tyr | Ser | Ile | Arg | Ser | Ser | | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | |
| Leu | Ile | Ser | Gly | Asn | Ile | Asp | Phe | Lys | Leu | Phe | Thr | Ser | Asp | Asp | Gly | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | | 765 | | | | |
| Glu | Ile | Trp | Asn | Glu | Val | Arg | Asn | Val | Lys | Ile | Val | Asp | Asn | Phe | Val | | |
| | 770 | | | | | 775 | | | | | | 780 | | | | | |

9/13

1 5 10 15
Thr Thr Asn Ser Lys
20

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 7
gaygaraayg artaygt 17

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> UNSURE
<222> (9,5)
<223> n=a or g or c or t

<400> 8
tcyterttna rrtncertc 20

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 9
tgatacttgt ggtacagtag aatgcccact 30

<210> 10

10/13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

atgtttacta ttagtagtag gtattaagcc 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

agatggtatg catactagac ctatgttccc 30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

aagttggaga tggttgggtt ggtgatgttg 30

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

gcagecgaat tcatgaaatt tttctcgaaa ttcaaaaagg ta 42

11/13

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

gcgctcgctcg agttatztat ttgtaaaaa agttacttta gc 42

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

ggtgcaatct ataatagggg 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

cccctattat agattgcacc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

12/13

aagtctgaag taccaagtca 20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

gaacttggtt ggagtgacga g 21

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

ggaaacagct atgacatg 19

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

tgacttgga cttcagactt 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/38, C12N 15/56, C12N 5/10, A61L 29/14 // (C12N 9/38, C12R 1:91)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/38, C12N 15/56, C12N 5/10, A61L 29/14

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P.X | H. Ogawa et al., "Molecular cloning of endo-beta-galactosidase C and its application in removing alpha-galactosyl xenoantigen from blood vessels in the pig kidney," J. Biol. Chem., Vol. 275, No. 25 (June, 2000) pp.19368-19374 | 1-7 |
| A | JP, 63-52877, A (SEIKAGAKU CORPORATION), 07 March, 1988 (07.03.88) (Family: none) | 1-15 |

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

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

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 16 January, 2001 (16.01.01) | Date of mailing of the international search report 13 February, 2001 (13.02.01) |
|--|--|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
|--|--------------------|

| | |
|---------------|---------------|
| Facsimile No. | Telephone No. |
|---------------|---------------|

| <p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl⁷ C12N 9/38, C12N 15/56, C12N 5/10, A61L 29/14 // (C12N 9/38, C12R 1:91)</p> | | | | | | | | | | | |
|---|--|------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------|------|--|-----|---|--|------|
| <p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl⁷ C12N 9/38, C12N 15/56, C12N 5/10, A61L 29/14</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P. X</td> <td>H. Ogawa et al. "Molecular cloning of endo-beta-galactosidase C and its application in removing alpha-galactosyl xenoantigen from blood vessels in the pig kidney" J. Biol. Chem., 第275巻 第25号 (2000, June) p. 19368-19374</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP, 63-52877, A (生化学工業株式会社) 7. 3. 1988 (07. 03. 88) ファミリーなし</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table> | | | 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | P. X | H. Ogawa et al. "Molecular cloning of endo-beta-galactosidase C and its application in removing alpha-galactosyl xenoantigen from blood vessels in the pig kidney" J. Biol. Chem., 第275巻 第25号 (2000, June) p. 19368-19374 | 1-7 | A | JP, 63-52877, A (生化学工業株式会社) 7. 3. 1988 (07. 03. 88) ファミリーなし | 1-15 |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | | | | | | | | | |
| P. X | H. Ogawa et al. "Molecular cloning of endo-beta-galactosidase C and its application in removing alpha-galactosyl xenoantigen from blood vessels in the pig kidney" J. Biol. Chem., 第275巻 第25号 (2000, June) p. 19368-19374 | 1-7 | | | | | | | | | |
| A | JP, 63-52877, A (生化学工業株式会社) 7. 3. 1988 (07. 03. 88) ファミリーなし | 1-15 | | | | | | | | | |
| <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>国際調査を完了した日</p> <p>16. 01. 01</p> | <p>国際調査報告の発送日</p> <p>13.02.01</p> | | | | | | | | | | |
| <p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p> | <p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>加藤 浩 印</p> | <p>4 B 9050</p> | | | | | | | | | |
| <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> | | | | | | | | | | | |