

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3878737号
(P3878737)

(45) 発行日 平成19年2月7日(2007.2.7)

(24) 登録日 平成18年11月10日(2006.11.10)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 14/47	(2006.01)	C 07 K 14/47	
C 07 K 14/78	(2006.01)	C 07 K 14/78	

請求項の数 5 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願平10-11281
 (22) 出願日 平成10年1月23日(1998.1.23)
 (65) 公開番号 特開平11-206377
 (43) 公開日 平成11年8月3日(1999.8.3)
 審査請求日 平成16年11月12日(2004.11.12)

特許法第30条第1項適用 生化学, 69 [7] (1997.07.25) p. 686 (講演番号3165)

(73) 特許権者 000238201
 扶桑薬品工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
 (74) 代理人 100065868
 弁理士 角田 嘉宏
 (74) 代理人 100106242
 弁理士 古川 安航
 (74) 代理人 100107940
 弁理士 岡 慎吾
 (72) 発明者 若宮 伸隆
 大阪府茨木市大池1丁目9-20
 審査官 小暮 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規コレクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号: 1 に記載の塩基配列、すなわち、

CAGCAATGAA TGGCTTGCA TCCTTGCTTC GAAGAAACCA ATTTATCCTC CTGGTACTAT
 TTCTTTGCA AATTCAAGAGT CTGGGTCTGG ATATTGATAG CCGTCCTACC GCTGAAGTCT
 GTGCCACACA CACAATTCA CCAGGACCCA AAGGAGATGA TGTTGAAAAA GGAGATCCAG
 GAGAAGAGGG AAAGCATGGC AAAGTGGGAC GCATGGGGCC GAAAGGAATT AAAGGAGAAC
 TGGGTGATAT GGGAGATCGG GGCATATTG GCAAGACTGG GCCCATTGGG AAGAAGGGTG
 ACAAAAGGGGA AAAAGGTTTG CTTGGAATAC CTGGAGAAAA AGGCAAAGCA GGTACTGTCT
 GTGATTGTGG AAGATACCGG AAATTTGTTG GACAACCTGGA TATTAGTATT GCCCGGCTCA
 AGACATCTAT GAAGTTGTC AAGAATGTGA TAGCAGGGAT TAGGGAAACT GAAGAGAAAT
 TCTACTACAT CGTGCAGGAA GAGAAGAACT ACAGGGAAAT CCTAACCCAC TGCAGGATTG
 GGGGTGGAAT GCTAGCCATG CCCAAGGGAT AAGCTGCCAA CACACTCATC GCTGACTATG
 TTGCCAAGAG TGGCTTCTTT CGGGTGTTCAT TTGGCGTGA TGACCTGAA AGGGAGGGAC
 AGTACATGTT CACAGACAAC ACTCCACTGC AGAACTATAG CAACTGGAAT GAGGGGGAAAC
 CCAGCGACCC CTATGGTCAT GAGGACTGTG TGGAGATGCT GAGCTCTGGC AGATGGAATG
 ACACAGAGTG CCATCTTACCT ATGTACTTTG TCTGTGAGTT CATCAAGAAG AAAAAGTAAC
 TTCCCTCATC CTACGTATTT GCTATTTTCC TGTGACCGTC ATTACAGTTA TTGTTATCCA
 TCCTTTTTT CCTGATTGTA CTACATTTGA TCTGAGTCAA CATACTAGA AAATGCTAAA
 CTGAGGTATG GAGCCTCCAT CATCATGCTC TTTTGTGATG ATTTCATAT TTTCACACAT

10

20

GGTATGTTAT TGACCCAATA ACTCGCCAGG TTACATGGGT CTTGAGAGAG AATTTAATT
 ACTAATTGTG CACGAGATAG TTGGTTGTCT ATATGTCAAA TGAGTTGTT TCTTGGTATT
 TGCTCTACCA TCTCTCCCTA GAGCACTCTG TGTCTATCCC AGTGGATAAT TTCCCAGTT
 ACTGGTGATG ATTAGGAAGG TTGTTGATGG TTAGGCTAAC CTGCCCTGGC CCAAAGCCAG
 ACATGTACAA GGGCTTCTG TGAGCAATGA TAAGATCTTT GAATCCAAGA TGCCCAGATG
 TTTTACCACT CACACCCTAT GGCCATGGCT ATACTTGGAA GTTCTCCTTG TTGGCACAGA
 CATAGAAATG CTTTAACCCC AAGCCTTTAT ATGGGGACT TCTAGCTTTG TGTCTTGT
 CAGACCAGT GGAATGATAA ATACTCTTT TGTGCTTCTG ATCTATCGAT TTCACTAAC
 TATACCAAGT AGGTGCTTG AACCCCTTTC TGTAGGCTCA CACCTTAATC TCAGGCCCT
 ATATAGTCAC ACTTTGATTT AAGAAAAAAGC GAGCC

10

で示される塩基配列からなり、かつコレクチンタンパク質の発現をコードする、ことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 2】

高いストリンジエンシー条件下にて、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドとハイブリダイズし、かつコレクチンタンパク質、すなわち、(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識領域(CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、および(4) システインを含むN末端領域を含むヒトコレクチンタンパク質をコードする、ことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるコレクチンタンパク質。

【請求項 4】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、すなわち、

Met-Asn-Gly-Phe-Ala-Ser-Leu-Leu-Arg-Arg-Asn-Gln-Phe-Ile-Leu-Leu-
 Val-Leu-Phe-Leu-Leu-Gln-Ile-Gln-Ser-Leu-Gly-Leu-Asp-Ile-Asp-Ser-
 Arg-Pro-Thr-Ala-Glu-Val-Cys-Ala-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Pro-
 Lys-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Glu-Glu-Gly-Lys-His-
 Gly-Lys-Val-Gly-Arg-Met-Gly-Pro-Lys-Gly-Ile-Lys-Gly-Glu-Leu-Gly-
 Asp-Met-Gly-Asp-Arg-Gly-Asn-Ile-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Lys-
 Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Glu-Lys-Gly-Leu-Leu-Gly-Ile-Pro-Gly-Glu-Lys-
 Gly-Lys-Ala-Gly-Thr-Val-Cys-Asp-Cys-Gly-Arg-Tyr-Arg-Lys-Phe-Val-
 Gly-Gln-Leu-Asp-Ile-Ser-Ile-Ala-Arg-Leu-Lys-Thr-Ser-Met-Lys-Phe-
 Val-Lys-Asn-Val-Ile-Ala-Gly-Ile-Arg-Glu-Thr-Glu-Glu-Lys-Phe-Tyr-
 Tyr-Ile-Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Asn-Tyr-Arg-Glu-Ser-Leu-Thr-His-Cys-
 Arg-Ile-Arg-Gly-Gly-Met-Leu-Ala-Met-Pro-Lys-Asp-Glu-Ala-Ala-Asn-
 Thr-Leu-Ile-Ala-Asp-Tyr-Val-Ala-Lys-Ser-Gly-Phe-Phe-Arg-Val-Phe-
 Ile-Gly-Val-Asn-Asp-Leu-Glu-Arg-Glu-Gly-Gln-Tyr-Met-Phe-Thr-Asp-
 Asn-Thr-Pro-Leu-Gln-Asn-Tyr-Ser-Asn-Trp-Asn-Glu-Gly-Glu-Pro-Ser-
 Asp-Pro-Tyr-Gly-His-Glu-Asp-Cys-Val-Glu-Met-Leu-Ser-Ser-Gly-Arg-
 Trp-Asn-Asp-Thr-Glu-Cys-His-Leu-Thr-Met-Tyr-Phe-Val-Cys-Glu-Phe-
 Ile-Lys-Lys-Lys

30

で示されるアミノ酸配列、からなることを特徴とするコレクチンタンパク質。

40

【請求項 5】

請求項 4 に記載のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識領域(CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、および(4) システインを含むN末端領域を含む、ことを特徴とするコレクチンタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体防御機構の解明に有用であり、また抗ウイルス活性などを含む生理活性を有することが期待され、医薬品用途への応用が可能であると考えられる、新規コレクチン

50

に関する。

【0002】

【従来の技術】

コレクチンは、 Ca^{2+} 要求性の糖認識領域(CRD)及びコラーゲン様領域を有するタンパク質の総称であり、細菌、ウイルスを始め様々な微生物に対する基礎免疫に関与していると考えられている。

【0003】

これまでに見出されているコレクチンとして、マンナン結合タンパク質(MBP)、サーファクタントタンパク質A(SP-A)およびサーファクタントタンパク質D(SP-D)、コングルチニンなどを挙げることができる。これらのコレクチンは、図1(a)に示すような、(1) Ca^{2+} 要求性の糖認識領域(CRD)、(2)ネック領域、(3)コラーゲン様領域、及び(4)システインを含むN末端領域の4種の特徴的な領域を含む基本構造から構成されていることが知られており〔Malhortraら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur.J.Immunol.)、22巻、1437~1445頁、1992年〕、この基本構造3個がコラーゲン様領域においてトリプルヘリックスを構成することによりサブユニットを形成し、さらにこのサブユニットが3量体、4量体、6量体等のオリゴマー構造を形成している。

10

【0004】

脊椎動物では、細胞を介する免疫応答および特異的抗体反応によるメカニズムが、病原菌、ウイルスなどの侵入に対する最大の生体防御システムと考えられている。最近になって、コングルチニン等のレクチンによる非特異的な免疫応答への関与が示唆され、例えば、母親の移行抗体や特異的防御システムが充分に発達していない小児に対し、種々の微生物の中和作用や排除に重要な役割を果たしているとの報告がなされている〔Superら、ランセット(Lancet)、2巻、1236~1239頁、1989年〕。さらに、宿主の生体防御におけるこれらレクチンの役割について、例えば、MBPの遺伝子上の変異に起因したMBPの血中濃度の低下によって、宿主が感染を受けやすくなるという研究結果が報告されている〔Sumiyaら、ランセット、337巻、1569~1570頁、1991年〕。

20

【0005】

本発明者らのグループは、以前に、コングルチニンおよびマンナン結合タンパク質が、H1およびH3タイプのインフルエンザAウイルスの感染や赤血球凝集活性を阻害することを見出した〔Wakamiyaら、グライココンジュゲイト・ジャーナル(Glycoconjugate J.)、8巻、235頁、1991年；Wakamiyaら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem.Biophys.Res.Commun.)、187巻、1270~1278頁、1992年〕。

30

【0006】

その後さらに、コングルチニンをコードするcDNAクローンを取得し、コングルチニンと種々のサーファクタントタンパク質D遺伝子との間の強い関連性も見出されている〔Suzukiら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、191巻、335~342頁、1993年〕。

【0007】

このように、コレクチンは、生体防御機構の解明における有用性及び生理活性医薬物質としての有用性などが期待される物質であるが、このファミリーに属するさらなる他分子種の存在についての報告はなされていないという現状にある。

40

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、かかる現状に鑑みてなされたものであり、特にヒトの体内で抗細菌、ウイルス活性などの生理活性を発揮することが期待される新規コレクチンを得ることを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、

50

1) 配列番号：1で示される塩基配列からなり、かつコレクチンタンパク質の発現をコードするポリヌクレオチド、

2) 高いストリンジエンシー条件下にて、1)に記載のポリヌクレオチドとハイブリダイズでき、かつコレクチンタンパク質、すなわち、(1)Ca²⁺要求性の糖認識領域(CRD)、(2)ネック領域、(3)コラーゲン様領域、および(4)システインを含むN末端領域を含む、ヒトコレクチンタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

3) 2)に記載のポリヌクレオチドによってコードされるコレクチンタンパク質、

4) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列からなるコレクチンタンパク質、ならびに

5) 4)に記載のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、(1)Ca²⁺要求性の糖認識領域(CRD)、(2)ネック領域、(3)コラーゲン様領域、および(4)システインを含むN末端領域を含む、コレクチンタンパク質をその要旨とする。また、本発明は、コレクチンに特徴的な構造を有し、従来報告されているものとは異なる新規のコレクチン遺伝子及びタンパク質を提供する。

【0010】

上記のごとき、本発明によって提供される新規コレクチン遺伝子およびタンパク質において、特に、TTTTGATGGAGGCTCCATACC(配列番号：7)およびCTGCCAACACACTCATCGCTG(配列番号：8)で示される塩基配列を有するプライマーを用いたPCR反応の増幅産物であるプローブ、すなわち、Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe(配列番号：3)で示されるコレクチンタンパク質のコンセンサス配列と高い相同意を有する遺伝子クローニングに基づいて作製されたプローブは、高いストリンジエンシー条件下でのハイブリダイゼーションによって、目的のコレクチンタンパク質をコードする2)に記載のポリヌクレオチドを取得する上で好ましい。

【0011】

また、前記ポリヌクレオチドは、好ましくはcDNAである。

【0012】

さらに、本発明のタンパク質は、ヒト由来であることが、ヒトの体内で抗細菌、ウイルス活性などを発揮できることが期待され、生理活性医薬物質としての有用性に鑑みて好ましい。従って、本発明のタンパク質は、ヒト由来のコレクチンタンパク質を企図するものであり、様々なヒト生体組織を検討したところ、有用と考えられるコレクチンタンパク質がヒト肝臓に発現されていることが示された。

【0013】

上記2)における高いストリンジエンシー条件とは、例えば、5×SSC(2.0×SSC(3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム)を4倍希釈することにより5×SSCを調製)、1%プロッキング剤(ベーリンガー・マンハイム社製)、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%SDSの溶液中で、68にて1時間プレハイブリダイゼーション；cDNAプローブ(10 ng/ml)を含む5×SSC、1%プロッキング剤、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%SDSの溶液中で、55にて16時間ハイブリダイゼーション；2×SSC/0.1%SDS溶液で5分間2回洗浄；55にて、0.5×SSC/0.1%SDS溶液で、15分間2回洗浄を行う一連の処理工程を含むハイブリダイゼーションが含まれるが、当該技術分野における知識に基づき、溶液濃度や温度、時間等の条件を適宜に変更することができる。

【0014】

また、上記5)において、(4)システインを含むN末端領域には、システインが少なくとも1つ、好ましくは1つ含まれる。

【0015】

そして、上記5)における、1または数個のアミノ酸の欠失、置換および/または付加とは、コレクチンタンパク質の親水性・疎水性、酸性・塩基性、含有基などに大幅な変化をきたさず、上記4種の領域(特に、(1)Ca²⁺要求性の糖認識領域(CRD)および(3)

10

20

30

40

50

コラーゲン様領域)の各々が有する特徴を変えることが少ない範囲でのアミノ酸の欠失、置換および/または付加を称する。これまでに報告されているコレクチンファミリーのタンパク質のアミノ酸配列とその構造に基づき、例えば(1)Ca²⁺要求性の糖認識領域(CRD)および(2)ネック領域において1~10程度、(3)コラーゲン様領域において1~100程度、好ましくは1~15、ならびに(4)システインを含むN末端領域とシグナル配列において1~20程度のアミノ酸の欠失、置換および/または付加が許容されると考えられる。

【0016】

以下に、本発明の新規コレクチンに関して、実施例に沿って詳細に説明するが、これら実施例の開示によって、本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。 10

【0017】

すなわち、ESTデータベースの検索(実施例1)、スクリーニング用プローブの作製(実施例2)、ヒト肝臓由来cDNAライブラリーのスクリーニング(実施例3)、新規コレクチンの塩基配列の決定(実施例4)、新規コレクチンのゲノミックサザン分析(実施例5)、新規コレクチンのヒトの種々の組織に対するノーザン分析(実施例6)、新規コレクチンの種々の動物種の組織についてのゲノミックサザン分析(実施例7)ならびに新規コレクチンの遺伝学的解析(実施例8)について以下に説明する。

【0018】

実施例1：ESTデータベースの検索

既知のコレクチンすなわち、MBP、SP-A及びSP-Dのアミノ酸配列(図2及び3参照、図中、相同と認められるアミノ酸残基部分に囲みを付した)を比較することにより、分子間に保存性の高い領域の検索を行った。この結果、ヒトMBPのアミノ酸配列における第220番目から246番目までの27アミノ酸(図3、白抜文字部分)に保存性が高いことが明かとなつたので、この領域に相当するコンセンサス配列をいくつか作成し、EST(Expressed Sequence Tags)データベースの検索を行った。ESTデータベースは、1996年10月11日に、67675件の配列を含むものを使用した。 20

【0019】

その結果、相同性の高いアミノ酸配列を含むデータがいくつか得られた。得られたデータのアミノ酸配列についてGenBank/ESTデータベースの検索を行い、既知または未知物質のいずれであるかを判定した結果、コンセンサス配列として、Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phen(配列番号：3)で示されるアミノ酸配列を用いたときに得られたデータの中に、相同性は高いが未知の塩基配列を含むデータ(登録番号：R29493)を得ることができた。これは、22週令のヒト胎児肝臓cDNAライブラリー由来のクローン(F1-1006D)で、5'末端側の326塩基の配列を示すデータであった。 30

【0020】

そこで、このデータのもとになるクローンを保有しているPohang Institute of Science & Technology(韓国、Pohang)のHee-Sup Shin氏に当該クローンを分譲していただいた。このクローンのインサートサイズは約600 bpで、5'末端側は配列番号：4に示される塩基配列に引き続き組み込まれ、3'末端はXholサイトでプラスミドpSK(-)(pBluescript IISK(-))に組み込まれていた。 40

【0021】

実施例2：スクリーニング用プローブの作製

上記クローンのインサートをEcoRI及びXholで切り出し、pUC18に組み込み、プライマー(ファルマシア社製、M13 Universal Primer(配列番号：5、5'-フルオレセイン-CGACGTTG TAAAACGACGGCCAGT-3')及びM13 Reverse Primer(配列番号：6、5'-フルオレセイン-CAG GAAACAGCTATGAC-3'))で塩基配列を決定した。

【0022】

この塩基配列から読取枠をコレクチンのアミノ酸配列に合わせて、そこから読み取ることができるアミノ酸配列に相当する塩基配列を抽出し、この一部分に相当するジゴキシゲニ 50

ン (DIG) ラベルcDNAプローブ用プライマー (Reverse プライマー、配列番号 : 7 及びForward プライマー、配列番号 : 8) を、アプライドバイオシステムズ社製392A DNA/RNAシンセサイザーを用いて作製した。DIGラベルは、PCR DIGプローブ合成キット (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。反応組成は以下のとおりである (クローン (F1-1 006D) のインサートをEcoRI及びXhoIで切り出した DNA断片 (4.4 ng/μl) : 12 μl (52.8 ng)、10 x緩衝液: 5 μl、25 mM MgCl₂ : 5 μl、dNTP (PCRラベリングミックス) : 2.5 μl、20 μM Reverseプライマー : 2.5 μl、20 μM Forward プライマー : 5 μl、H₂O : 18 μl、Taq ポリメラーゼ : 0.5 μl)。PCR反応は、アトー社製ザイモリアクターを用いて、92 1分、55 1分、72 2分のサイクルを35回行った。

【0023】

10

実施例3：ヒト肝臓由来cDNAライブラリーのスクリーニング

先ず、以下のようにファージcDNAライブラリーのタイトレーションを行った。mLB培地 (10 mM MgSO₄ 及び 0.2% マルトースを含むLB培地 (1 g トリプトン、0.5 g イーストエキストラクト、0.5 g NaCl/100 ml) で 37 にて 16 時間培養した *Escherichia coli* Y1090r⁻ 0.2 ml と、SM 緩衝液 (5.8 g NaCl、2 g MgSO₄ · 7H₂O、2 M Tris-HCl (pH 7.5) 25 ml、5 ml 2% ゼラチン/L) で段階希釈した cDNA ライブラリー 0.1 ml を 37 15 分インキュベートし、その後 2.5 ml の LB-TOP アガー (0.75% アガー/LB 培地) に加え均一とし、90 mm LB 培地プレート (岩城硝子社製) (1.5% アガー/LB 培地) にまいた。15 分間室温で固化させ、42 にて 5 時間インキュベーションした。各プレートのブラークを計数後、ファージのタイマーを計算により求めた。その結果、タイマーは 2.3×10^{10} pfu/ml であった。このようにタイトレーションを行った cDNA ライブラリーにつき、実施例 2 で作製したプローブを用いて以下の通りにスクリーニングを行った。

20

【0024】

mLB 培地で 37 にて 16 時間培養した *Escherichia coli* Y1090r⁻ 0.6 ml と SM 緩衝液で希釈した cDNA ライブラリー 1×10^5 pfu を、37 にて 15 分間インキュベートし、その後 7.5 ml LB-TOP アガロース (0.75% アガロース) に加えて均一とした。これを 140 mm² の LB 培地角プレート (日本製薬社製) にまいたものを 10 枚作製し、15 分間室温で固化させ、42 にて 5 時間インキュベーションした。ブラーク形成を確認後、次に、ナイロンメンブレンへの転写を行った。転写は、ナイトラン (Nytran) 13N (シュライヒャーアンドシュウェル社製 (Schleicher and Schuell Co.)) を用いて行った。12.5 cm x 9.0 cm のフィルターを蒸留水に浸けて 10 分間湿らせた後、ワットマン 3MM 紙上において余分な水分を除去し、ブラークを形成したプレート上にフィルターを置いた。2 分間放置した後、フィルターを剥がし、10 分間風乾させた。0.2 M NaOH/1.5 M NaCl により 2 分間ファージ DNA を変性させ、0.4 M Tris-HCl (pH 7.6) / 2 x SSC で 2 分間中和し、2 x SSC で 2 分間洗浄を行った。その後、GS GENE LINKER (バイオラッド社製) で紫外線照射することによりメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は以下の様に行った。フィルターを 2 x SSC で湿らせ、余分な水分をワットマン 3MM 紙で除去し、ハイブリダイゼーションバックに移しハイブリダイゼーション溶液 (5 x SSC、1% ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS) と 68 にて 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、バックからハイブリダイゼーション溶液を除き、そこへ DIG でラベルした cDNA プローブを 10 ng/ml になるように調製したハイブリダイゼーション溶液を加え、55 にて 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターは室温にて 2 x SSC/0.1% SDS 溶液で 5 分間、2 回洗浄し、55 にて、0.5 x SSC/0.1% SDS 溶液で 15 分間 2 回洗浄した。次に DIG 緩衝液 I (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH 7.5)) で 1 分間、SDS を除去し、DIG 緩衝液 II (1% ブロッキング剤、DIG 緩衝液 I) で 30 分間、フィルターのブロッキングを行った。DIG 緩衝液 I で 1 分間洗浄し、次いで DIG 緩衝液 II で 抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体 (ベーリンガー・マンハイム社製) を 5000 倍希釈した溶液を加えて、30 分間抗体反応を室温で行った後、室温で DIG 緩衝液 I で 15 分間 2 回洗浄した。DIG 緩衝液 III (100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl (pH 9.5)、50 mM MgCl₂) で 3 分間処理することにより M g²⁺ の濃度を高め、NBT/BCIP (和光純薬社製) を DIG 緩衝液 III 50

30

40

50

に加えた溶液で発色させたところ、13個の陽性クローンが得られた。これらのクローンに相当するブラークをプレートから切り出し、SM緩衝液1mlを入れたチューブに加え、10分間攪拌した後SM緩衝液で段階希釈し、この希釈液0.1mlとmLB培地で37 16時間培養したEscherichia coli Y1090r' 0.2mlを混ぜ、37 にて15分間インキュベートした。その後、混合液を2.5ml LB-TOPアガロースに加えて均一とし、90mm LB培地プレートにまいいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42 にて5時間インキュベーションし、いくつかのブラークを得、一次スクリーニングと同様にして二次スクリーニングを行った。

【0025】

実施例4：新規ヒトコレクチンの塩基配列の決定

二次スクリーニングで得られた陽性クローンのうち適切と考えられる2クローン(HLI1-3 10 M、HLI1-9)のブラークをプレートから切り出し、SM緩衝液1mlを入れたチューブに加えて攪拌した後、50μlをmLB培地で37 16時間培養したEscherichia coli Y1090r' 50μlと共にmLB培地4.95mlに加え、37 にて16時間培養した。クロロホルム1滴を加え、3分間攪拌した後、10,000 rpmで5分間遠心分離し、上清を得た。

【0026】

得られた上清を鋳型とし、TaKaRa LA PCR Kit Ver.2(宝酒造社製)を用い、PCRによりインサートDNAを増幅させた。PCRの反応組成は以下のとおりである(上清：11μl、10×LA PCR 緩衝液 II (Mg²⁺不含)：2.5μl、25mM MgCl₂：5μl、dNTPミックス：8μl、20μM gt11 Reverseプライマー(配列番号：9、5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3')：2.5μl、20μM gt11 Forwardプライマー(配列番号：10、5'-GGTGGCGACGACTCCTGG 20 AGCCCG-3')：1μl、LA Taq ポリメラーゼ：0.5μl、H₂O：全容量50μlになるように添加)。PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社製ジーンAmp PCRシステム9600を用いて、98 10秒、68 5分のサイクルを30回行った。PCR産物は、1%アガロースゲル電気泳動にて確認後、ゲルからの切り出しにより精製した。精製には、ファルマシア社製Sephaglas BandPrep Kitを用いた。

【0027】

切り出したDNA断片は、インビトロジエン社製TAクローニングキットのpCR2.1ベクターに組み込んだ。組換えたベクターは、インビトロジエン社製TAクローニングキットに含まれるTOP10F'細胞に形質転換した。形質転換体をLB培地(100μg/ml アンピシリン)で培養し、アルカリSDS法により各クローンにつき2種類(HLI1-3M-1、HLI1-3M-2、HLI1-9-1、HLI1-9-2)のプラスミドを抽出し、ファルマシア社製 オートリード・シーケンシング・キットおよびA.L.F.オートシーケンサーで塩基配列の決定を行った。プライマーはまずオートリード・シーケンシング・キット添付のM13 Universal Primer(配列番号：5)およびM13 Reverse Primer(配列番号：6)を用い、以後、明らかになった塩基配列をもとにFITC(ファルマシア社製 Fluore Prime)にてラベルした以下のプライマー(3MU0～9R3)をDNA/RNAシンセサイザーを用いて作製し、全領域の配列を決定した。

【0028】

3MU0：5'-フルオレセイン-TAATGGTAGCGACCGGCGCT-3'(配列番号：11)、
3MU1：5'-フルオレセイン-AAACCAATTATACTCCTGG-3'(配列番号：12)、
3MU2：5'-フルオレセイン-AATATTGGCAAGACTGGGCC-3'(配列番号：13)、
3MR1：5'-フルオレセイン-GATGAGTGTGTTGGCAGCAT-3'(配列番号：14)、
3MR2：5'-フルオレセイン-GTATCTTCCACAATCACAGA-3'(配列番号：15)、
3MR3：5'-フルオレセイン-TTAATTCTTCGGCCCCAT-3'(配列番号：16)、
3MR4：5'-フルオレセイン-GCAAAAGAAATAGTACCAAGG-3'(配列番号：17)、
3MR5：5'-フルオレセイン-CATATCACCCAGTTCTCCTT-3'(配列番号：18)、
9U1：5'-フルオレセイン-AGCAGGGATTAGGGAAACTG-3'(配列番号：19)、
9U3：5'-フルオレセイン-CTGTGAGCGTCATTACAGTT-3'(配列番号：20)、
9U4：5'-フルオレセイン-GGTTGTCTATATGTCAAATG-3'(配列番号：21)、
9U5：5'-フルオレセイン-TATGGCCATGGCTATACTTG-3'(配列番号：22)、
7U3：5'-フルオレセイン-ATCGCTGACTATGTTGCCAA-3'(配列番号：23)、
40
50

9R1 : 5'-フルオレセイン-CAAGTATGCCATGGCCATA-3' (配列番号: 24)、

9R2 : 5'-フルオレセイン-AACTGTAATGACGCTCACAG-3' (配列番号: 25)、

9R3 : 5'-フルオレセイン-CATTTGACATATGAACAAACC-3' (配列番号: 26)

その結果、得られたcDNAクローンは配列番号: 1に示される1295塩基を含み、831塩基のORF(転写解読枠)を有し、配列番号: 2に示される277のアミノ酸をコードしていた。

【0029】

この塩基配列決定における概略は、図4に示す通りである。図4(a)に得られたコレクチンのORFが示され、この中のG-X-Yはコラーゲン様領域を表すものである。また、図4(b)に、上記各プライマー名、シーケンサーにより読み取られた塩基配列(矢印により表される)、ならびにM13 Universal Primer(Uで表される)およびM13 Reverse Primer(Rで表される)を示す。

【0030】

図5及び6には、従来報告されている3種のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列と、本発明のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図2及び3と同様に、相同性を有するアミノ酸残基部分に囲みを付した。

【0031】

さらに、この新規コレクチンタンパク質の配列の構造的特徴について調べたところ、図7の模式図の通り、既知のコレクチン同様、(a)システインを含むN末端領域、(b)コラーゲン様領域、(c)ネック領域及び(d)糖認識領域により構成されていることが示された。

【0032】

しかしながら、GenBankデータベースでDNA及びアミノ酸についての相同性の検索を行った結果によれば、得られたタンパク質の配列は、従来見出されているコレクチンとは異なる新規のコレクチンのものであることが明らかとなった。

【0033】

実施例5：新規コレクチンのゲノミックサザン分析

実施例4において明らかにされたcDNA配列を有する新規コレクチンの遺伝子が、シングルコピー遺伝子であるかまたはマルチコピー遺伝子であるかを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を行った。

【0034】

胎盤より抽出したゲノムDNAの4μg相当量を、制限酵素のEcoRI、HindIII、BamHI、XbaIまたはSacIで消化し、0.7%アガロースゲルにて、100mAで3時間電気泳動した。泳動終了後、ナイロンメンブレン(ナイトラン13N)に転写して、分析用のメンブレンを作製した。転写は、先ず、電気泳動後のゲルを100mIの0.25N HClに10分間浸し、蒸留水で3回洗浄した後、100mIの変性液(1.5M NaCl、0.5M NaOH)に15分間2回浸し、100mIの中和液(0.5M Tris-HCl、3M NaCl(pH 6.8))に30分間浸すことによって脱プリン化、変性及び中和の処理を施し、次いでバキュームプロッティングシステム(東洋紡エンジニアリング社製、VB-30)を用いて転写した。この際、メンブレンは、2×SSCに5分間、次に20×SSCに5分間浸漬して前処理したものを用い、パッドは、20×SSCをしみこませておいたものを用いた。転写終了後、UV照射により固定処理を施した。

【0035】

サザン分析のためのハイブリダイゼーション用プローブとしては、実施例4で得られた新規コレクチンのcDNA配列のORFに相当する部分を、前記のPCR DIGプローブ合成キットを用いてDIGラベルしたDNAプローブを用いた。ハイブリダイゼーションの前に、プローブは10分間煮沸し、5分間ドライアイス/エタノールで急速凍結処理しておいた。

【0036】

先ず、転写後のメンブレンを2×SSCに5分間浸し、ExpressHyb Hybridization Solution(クローンテック社製)10mI中で68℃にて30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記凍結処理後のプローブをExpressHyb Hybridization Solutionで10ng/mlとなるように希釈し、この溶液2mIを用いて、68℃にて1時間ハイブリダイゼーションを

10

20

30

40

50

行った。

【0037】

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで室温にて5分間ずつ2回振盪し、続いて0.2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで68 ℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去するために、DIG緩衝液I (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH 7.5)) 50 mlで室温にて1分間2回洗浄し、次にDIG緩衝液II' (1.5% ブロッキング剤、DIG緩衝液I) 50 mlで室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体10 mlで30分間処理し、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液Iを50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPD (登録商標、ベーリンガー・マンハイム社製、化学発光基質) を全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム57 (ポラロイド社製) 上で感光させた。

【0038】

この結果、図8の各レーンに示されるように、各制限酵素で処理したゲノムDNAより、それぞれ1~2個のシグナルしか検出されないので、得られた新規コレクチン遺伝子がシングルコピー遺伝子であることが推測された。

【0039】

実施例6：新規コレクチンのヒトの種々の組織についてのノーザン分析

本発明の新規コレクチンのmRNAの種々の組織における発現を調べるために、ノーザンハイブリダイゼーションにより解析を行った。

【0040】

ハイブリダイゼーション用プローブとしては、得られた新規コレクチンのcDNA配列 (配列番号: 1) のORFに相当する部分を、DIG RNAラベリングキット (SP6/T7、ベーリンガー・マンハイム社製) を用いてDIGラベルしたRNAプローブを用い、また、メンブレンは、Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クローンテック社製) を用いて実施した。このメンブレンは、ヒト (a) 心臓、(b) 脳、(c) 胎盤、(d) 肺、(e) 肝臓、(f) 骨格筋、(g) 腎臓、及び (h) 脾臓から得られたポリA⁺ RNAをそれぞれ2 μgずつ、1.2% ホルムアルデヒド変性アガロースゲルで電気泳動した後、電荷が改変されたナイロンメンブレンに転写し、UV照射により固定処理を施したものである。

【0041】

以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。先ず、2 x SSCにメンブレンを5分間浸し、10 mlのハイブリダイゼーション溶液 (5 x SSC、10 x デンハーツ溶液、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)、50% ホルムアミド、0.5% SDS、0.1 mg/ml サケ精子DNA) 中で65 ℃にて3時間プレハイブリダイゼーションを行い、プローブ (10分間煮沸し、5分間ドライアイス - エタノールで急速凍結処理しておいたもの) を1 μg/mlになるようにハイブリダイゼーション溶液で希釈して、この溶液2 mlを用いて65 ℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0042】

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで室温にて5分間2回振盪し、続いて0.1 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで、68 ℃にて15分間2回、振盪しながら行った。SDSを除去するために、50 mlのDIG緩衝液Iで室温にて1分間2回洗浄し、次に50 mlのDIG緩衝液II' で、室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体を10 ml用いて30分間処理し、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液Iを50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPDを全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム612 (ポラロイド社製) 上で感光させた。

【0043】

10

20

30

40

50

この結果を図9に示すが、本発明のコレクチンの、1.2 kbp及び3.8 kbpのmRNAが、肝臓（レーンe）及び胎盤（レーンc）で発現されており、特に肝臓において多量に発現が認められ、胎盤では若干量発現していることが明らかとなった。

【0044】

実施例7：新規コレクチンの種々の動物についてのゲノミックサンサン分析

本発明のコレクチンの遺伝子が、他の動物種において保存されているか否かを明らかにするために、ゲノミックサンサン分析を実施した。

【0045】

ハイブリダイゼーション用プローブとしては、前記の新規コレクチンのcDNA配列のORFに相当する部分を、PCR DIGプローブ合成キット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いてDIGラベルしたDNAプローブを用い、メンブレンは、ZOO-BLOT（クローンテック社製）を用いて実施した。このメンブレンは、（a）ヒト（胎盤）、（b）サル（Rhesus）（腎臓）、（c）ラット（Sprague-Dawley）（腎臓）、（d）マウス（Balb/c）（腎臓）、（e）イヌ（腎臓）、（f）ウシ（腎臓）、（g）ウサギ（腎臓）及び（h）ニワトリ（肝臓）から得られたゲノムDNAをそれぞれ4μgずつ、制限酵素EcoRIで処理し、アガロースゲルで電気泳動した後に、電荷が改変されたナイロンメンブレンに転写し、UV照射により固定処理を施したものである。

【0046】

以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。先ず、2×SSCにメンブレンを5分間浸し、10mlのExpressHyb Hybridization Solution中で65℃にて30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記と同様に凍結処理されたプローブをExpressHyb Hybridization Solutionで10 ng/mlとなるように希釈し、この溶液2 mlを用いて、65℃にて1時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0047】

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2×SSC、0.1% SDS溶液20 mlで室温にて5分間2回振盪し、続いて0.2×SSC、0.1% SDS溶液20 mlで68℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去するために、DIG緩衝液Iで室温にて1分間2回洗浄し、次に50 mlのDIG緩衝液II'で、室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2% Tween 20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体を10 ml用いて30分間処理し、0.2% Tween20を含むDIG緩衝液Iを50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPDを全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム57上で感光させた。

【0048】

この結果を図10に示すが、ニワトリ（レーンh）を除くすべてのレーンにおいてシグナルが認められることから、本発明のコレクチン遺伝子は、哺乳類において保存されていることが明らかとなった。

【0049】

実施例8：新規コレクチンの遺伝学的解析

得られたコレクチンのDNA配列に基づき、既知のコレクチンとの遺伝的位置付けを明らかにするために解析を行い、遺伝的系統樹を作成した。

【0050】

解析の対象としたコレクチンは、ヒトMBP（マンナン結合タンパク質）、ヒトSP-A（サーファクタントタンパク質A）、ラットMBP-A、ラットMBP-C、ラットSP-D、マウスMBP-A、マウスMBP-C、ウサギMBP、サルMBP-A、サルMBP-C、ウシSP-D、ウシMBP、ウシコングルチニン（bKg）、ウシコレクチン43(CL43)であり、GenBankデータベースからそれぞれのアミノ酸配列を検索し、得られたデータをもとにレクチンドメインを含む領域を用いてclustalw法でマルチブル・アラインメントを作成し、それらをもとにN-J法を用い、Phyliip Version 3.57c packageプログラムを用いて遺伝的系統樹を作成した。

【0051】

10

20

30

40

50

その結果を図11に示すが、SP-D、ウシコレクチン43及びウシコングルチニンで1つのクラスターを形成し、さらにMBP及びSP-Aでそれぞれ別々にクラスターを形成していたが、本発明のコレクチン遺伝子はこれらのいずれのクラスターにも属していないことが示された。従って、本発明のコレクチンは、従来報告されているコレクチンとは遺伝的に異なるクラスターを形成するものと推測された。

【0052】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によってコレクチンに特徴的な構造を有し、従来報告されているものとは異なる新規のコレクチン遺伝子及びタンパク質が提供される。

【0053】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1595

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：ヒト肝臓

10

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：6..836

特徴を決定した方法：S

配列

CAGCA ATG AAT GGC TTT GCA TCC TTG CTT CGA AGA AAC CAA TTT ATC	47
Met Asn Gly Phe Ala Ser Leu Leu Arg Arg Asn Gln Phe Ile	20
1 5 10	
CTC CTG GTA CTA TTT CTT TTG CAA ATT CAG AGT CTG GGT CTG GAT ATT	95
Leu Leu Val Leu Phe Leu Leu Gln Ile Gln Ser Leu Gly Leu Asp Ile	
15 20 25 30	
GAT AGC CGT CCT ACC GCT GAA GTC TGT GCC ACA CAC ACA ATT TCA CCA	143
Asp Ser Arg Pro Thr Ala Glu Val Cys Ala Thr His Thr Ile Ser Pro	
35 40 45	30
GGA CCC AAA GGA GAT GAT GGT GAA AAA GGA GAT CCA GGA GAA GAG GGA	191
Gly Pro Lys Gly Asp Asp Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Glu Glu Gly	
50 55 60	
AAG CAT GGC AAA GTG GGA CGC ATG GGG CCG AAA GGA ATT AAA GGA GAA	239
Lys His Gly Lys Val Gly Arg Met Gly Pro Lys Gly Ile Lys Gly Glu	
65 70 75	
CTG GGT GAT ATG GGA GAT CGG GGC AAT ATT GGC AAG ACT GGG CCC ATT	287
Leu Gly Asp Met Gly Asp Arg Gly Asn Ile Gly Lys Thr Gly Pro Ile	40

80	85	90	
GGG AAG AAG GGT GAC AAA GGG GAA AAA GGT TTG CTT GGA ATA CCT GGA			335
Gly Lys Lys Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly Leu Leu Gly Ile Pro Gly			
95	100	105	110
GAA AAA GGC AAA GCA GGT ACT GTC TGT GAT TGT GGA AGA TAC CGG AAA			383
Glu Lys Gly Lys Ala Gly Thr Val Cys Asp Cys Gly Arg Tyr Arg Lys			
115	120	125	10
TTT GTT GGA CAA CTG GAT ATT AGT ATT GCC CGG CTC AAG ACA TCT ATG			431
Phe Val Gly Gln Leu Asp Ile Ser Ile Ala Arg Leu Lys Thr Ser Met			
130	135	140	
AAG TTT GTC AAG AAT GTG ATA GCA GGG ATT AGG GAA ACT GAA GAG AAA			479
Lys Phe Val Lys Asn Val Ile Ala Gly Ile Arg Glu Thr Glu Glu Lys			
145	150	155	
TTC TAC TAC ATC GTG CAG GAA GAG AAG AAC TAC AGG GAA TCC CTA ACC			527
Phe Tyr Tyr Ile Val Gln Glu Glu Lys Asn Tyr Arg Glu Ser Leu Thr			
160	165	170	
CAC TGC AGG ATT CGG GGT GGA ATG CTA GCC ATG CCC AAG GAT GAA GCT			575
His Cys Arg Ile Arg Gly Gly Met Leu Ala Met Pro Lys Asp Glu Ala			
175	180	185	190
GCC AAC ACA CTC ATC GCT GAC TAT GTT GCC AAG AGT GGC TTC TTT CGG			623
Ala Asn Thr Leu Ile Ala Asp Tyr Val Ala Lys Ser Gly Phe Phe Arg			
195	200	205	
GTG TTC ATT GGC GTG AAT GAC CTT GAA AGG GAG GGA CAG TAC ATG TTC			671
Val Phe Ile Gly Val Asn Asp Leu Glu Arg Glu Gly Gln Tyr Met Phe			
210	215	220	
ACA GAC AAC ACT CCA CTG CAG AAC TAT AGC AAC TGG AAT GAG GGG GAA			719
Thr Asp Asn Thr Pro Leu Gln Asn Tyr Ser Asn Trp Asn Glu Gly Glu			
225	230	235	40
CCC AGC GAC CCC TAT GGT CAT GAG GAC TGT GTG GAG ATG CTG AGC TCT			767

Pro	Ser	Asp	Pro	Tyr	Gly	His	Glu	Asp	Cys	Val	Glu	Met	Leu	Ser	Ser	
240																
245															250	
GGC	AGA	TGG	AAT	GAC	ACA	GAG	TGC	CAT	CTT	ACC	ATG	TAC	TTT	GTC	TGT	815
Gly	Arg	Trp	Asn	Asp	Thr	Glu	Cys	His	Leu	Thr	Met	Tyr	Phe	Val	Cys	
255															270	
GAG	TTC	ATC	AAG	AAG	AAA	AAG	TAAC	TTCC	CCT	CATC	CCTAC	GT	ATT	GCTATT	866	
Glu	Phe	Ile	Lys	Lys	Lys	Lys										
															10	
275																
TTCC	CTGT	GAC	CGTC	ATTACA	GTTATT	GTTA	TCCAT	CCCTT	TTTC	CCTGAT	TGTACT	ACAT			926	
TTGAT	CTGAG	TCAAC	ATAGC	TAGAAA	ATGC	TAAACT	GAGG	TATGG	AGCCT	CCATCAT	CAT				986	
GCT	CTTT	GATG	ATTT	TTTC	ATAT	TTCAC	ACAT	GGTATG	TTATT	GACCC	AATA	ACTCGC			1046	
CAGG	TTACAT	GGGT	CTTGAG	AGAGA	ATTTT	AATT	ACTAAT	TGTG	CACGAG	ATAGT	GGTT				1106	
GTCT	ATATGT	CAAAT	GAGTT	GTTCT	CTTGG	TATTG	GCTCT	ACCAT	CTCTC	CCTAG	AGCAC				1166	
TCTG	GTCTA	TCCC	AGTGG	TAATT	CCCA	GT	TTACT	GGT	GATG	ATTAGG	AAGGT	GTG			1226	
ATGG	TTAGGC	TAAC	CTGCCC	TGG	CCCAA	AG	CCAGA	CATGT	ACAAGGG	GCTT	TCTGT	GAGCA			1286	
ATG	ATAAGAT	CTTT	GAATCC	AAGAT	GCCC	GAT	TTTAC	CAGTC	CACACC	CTATGG	CCAT				1346	
GGCT	TATACTT	GGAAG	TTCTC	CTT	GTGG	CA	GACAT	AGA	AATG	CTTAA	CCCC	AAGC	CCT		1406	
TTAT	ATGGGG	GACT	TCTAGC	TTT	GTGT	GCTT	GT	TTCA	GACC	ATGTG	GAATG	ATAA	ATACTC		1466	
TTTT	GTGCT	TCTG	ATCT	CGA	TTCA	CT	AAC	ATATA	ACC	AAGT	AGGT	GC	TTT	GAAC	1526	
TTT	CTGTAGG	CTCAC	ACCTT	AAT	CTCAG	GC	CCCT	ATATAG	TCAC	ACT	TTG	ATTTA	AGAAA		1586	
	AACGGAGCC														1595	
															30	

配列番号：2

配列の長さ：277

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met	Asn	Gly	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Asn	Gln	Phe	Ile	Leu	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

40

Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Asp	Ser	
20																30
Arg	Pro	Thr	Ala	Glu	Val	Cys	Ala	Thr	His	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Pro	
35																45
Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Glu	Gly	Lys	His		
50																60
Gly	Lys	Val	Gly	Arg	Met	Gly	Pro	Lys	Gly	Ile	Lys	Gly	Glu	Leu	Gly	
65																80
Asp	Met	Gly	Asp	Arg	Gly	Asn	Ile	Gly	Lys	Thr	Gly	Pro	Ile	Gly	Lys	
85																95
Lys	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Ile	Pro	Gly	Glu	Lys	
100																110
Gly	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	Cys	Gly	Arg	Tyr	Arg	Lys	Phe	Val	
115																125
Gly	Gln	Leu	Asp	Ile	Ser	Ile	Ala	Arg	Leu	Lys	Thr	Ser	Met	Lys	Phe	
130																140
Val	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Gly	Ile	Arg	Glu	Thr	Glu	Glu	Lys	Phe	Tyr	
145																160
Tyr	Ile	Val	Gln	Glu	Glu	Lys	Asn	Tyr	Arg	Glu	Ser	Leu	Thr	His	Cys	
165																175
Arg	Ile	Arg	Gly	Gly	Met	Leu	Ala	Met	Pro	Lys	Asp	Glu	Ala	Ala	Asn	
180																190
Thr	Leu	Ile	Ala	Asp	Tyr	Val	Ala	Lys	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Val	Phe	
195																205
Ile	Gly	Val	Asn	Asp	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Thr	Asp	
210																220
Asn	Thr	Pro	Leu	Gln	Asn	Tyr	Ser	Asn	Trp	Asn	Glu	Gly	Glu	Pro	Ser	
225																240
Asp	Pro	Tyr	Gly	His	Glu	Asp	Cys	Val	Glu	Met	Leu	Ser	Ser	Gly	Arg	

245	250	255
Trp Asn Asp Thr Glu Cys His Leu Thr Met Tyr Phe Val Cys Glu Phe		
260	265	270
Ile Lys Lys Lys Lys		
275		

配列番号：3

配列の長さ：27

10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Glu Lys Cys Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Lys Trp Asn Asp Arg Asn		
5	10	15
Cys Leu Gln Ser Arg Leu Ala Ile Cys Glu Phe		
20	25	

配列番号：4

配列の長さ：14

20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

30

起源：

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

配列

GAATTCTGGCA CGAG

14

40

配列番号：5

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGT

24

10

配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

20

CAGGAAACA GCTATGAC

17

配列番号：7

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

30

配列

TTTGATGGA GGCTCCATAC C

21

配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

40

配列の種類：合成DNA

配列

CTGCCAACAC ACTCATCGCT G

21

配列番号：9

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10

配列の種類：合成DNA

配列

TTGACACCAG ACCAACTGGT AATG

配列番号：10

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTGGCGACG ACTCCTGGAG CCCG

配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

30

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TAATGGTAGC GACCGGCGCT

20

配列番号：12

配列の長さ：20

40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAACCAATT T ATACTCCTGG

20

配列番号：1 3

配列の長さ：20

10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AATATTGGCA AGACTGGGCC

20

配列番号：1 4

20

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATGAGTGTG TTGGCAGCAT

20

30

配列番号：1 5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTATCTTCCA CAATCACAGA

40

20

配列番号：16

配列の長さ：

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTAATTCCCTT TCGGCCCAT

10

20

配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

20

配列

GCAAAAGAAA TAGTACCAAGG

20

配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30

配列の種類：合成DNA

配列

CATATCACCC AGTTCTCCTT

20

配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

40

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGCAGGGATT AGGGAAACTG

20

配列番号：20

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTGTGAGCGT CATTACAGTT

20

配列番号：21

配列の長さ：20

配列の型：核酸

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTTGTCTAT ATGTCAAATG

20

配列番号：22

配列の長さ：20

30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TATGGCCATG GCTATACTTG

20

配列番号：23

40

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATCGCTGAC TATGTTGCCAA

20

配列番号：24

10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAAGTATAGC CATGGCCATA

20

20

配列番号：25

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AACTGTAATG ACGCTCACAG

20

30

配列番号：26

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATTTGACAT ATGAACAAACC

20

40

【図面の簡単な説明】

【図1】従来報告されている主なコレクチンの基本構造及びタンパク質の概観を示す図である。

【図2】従来報告されている3種のコレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部

50

分を示す図である。

【図3】図2と同様のアライメントの後半部分を示す図である。

【図4】本発明の新規コレクチンの塩基配列を決定するために使用した各プライマーの名称と、シーケンサーにより読み取られた塩基配列を示す図（b）及び得られたコレクチンのORFを示す図（a）である。

【図5】従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンのアミノ酸配列のアライメントの前半部分を示す図である。

【図6】図5と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

【図7】従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンの基本構造、すなわち、(a)システインを含むN末端領域、(b)コラーゲン様領域、(c)ネック領域及び(d)Ca²⁺要求性の糖認識領域の比較を示す模式図である。

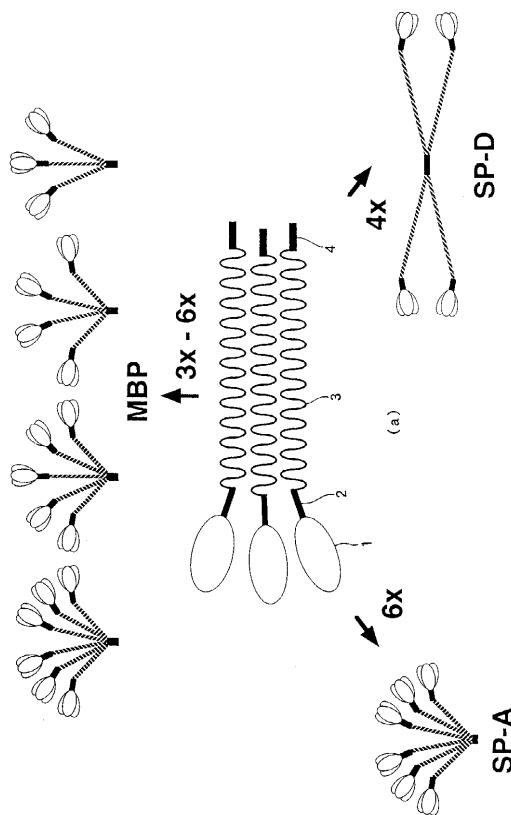
【図8】本発明の新規コレクチンのゲノミックサンプル分析の結果を示す写真である。

【図9】本発明の新規コレクチンの臓器分布を示す、ヒトの種々の組織、すなわち、(a)心臓、(b)脳、(c)胎盤、(d)肺、(e)肝臓、(f)骨格筋、(g)腎臓及び(h)膀胱に対するノーザン分析の結果を示す写真である。

【図10】本発明の新規コレクチンの種間での保存性を示す、種々の脊椎動物、すなわち、(a)ヒト、(b)サル、(c)ラット、(d)マウス、(e)イヌ、(f)ウシ、(g)ウサギ及び(h)ニワトリにおけるゲノミックサザン分析の結果を示す写真である。

【図11】種々のコレクチンの遺伝的系統樹を示す図である。

【 义 1 】



〔 四 2 〕

【図3】

【 四 4 】

【図5】

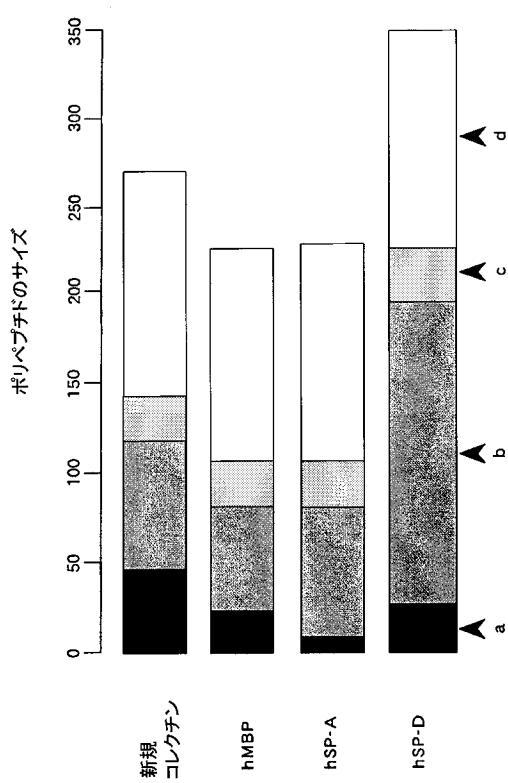
	MBP	SP-A	SP-D	新規
MBP	PLSIFPS-1 PLLPLPPL-2 MLLPLPPL-3 MLLPLPPL-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4
SP-A	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4
SP-D	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4
新規	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4	PLLPLVAVAS-1 PLLPLVAVAS-2 PLLPLVAVAS-3 PLLPLVAVAS-4

【 四 6 】

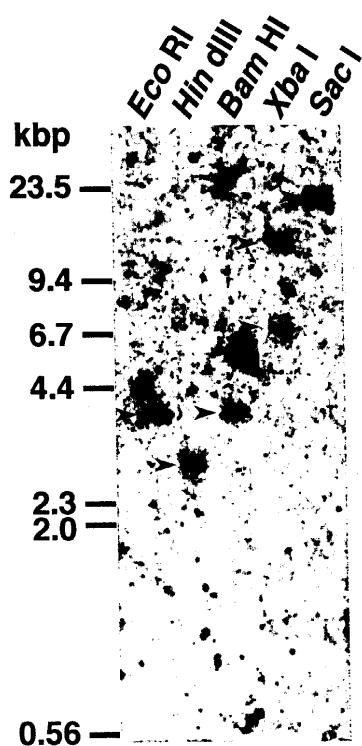
(a)

(a)

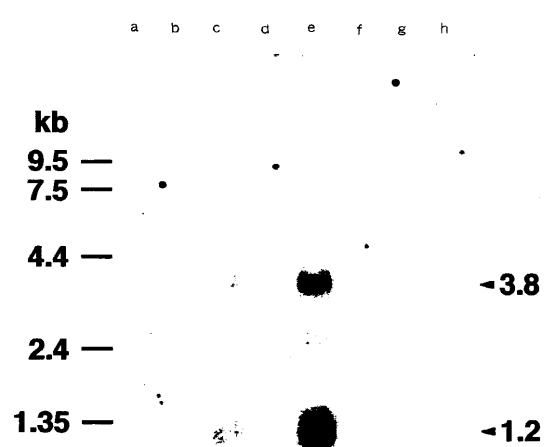
【図7】



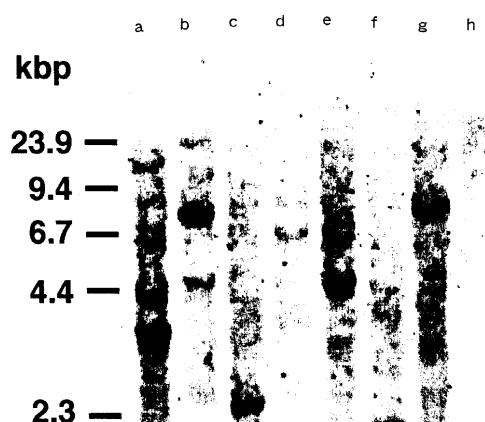
【図8】



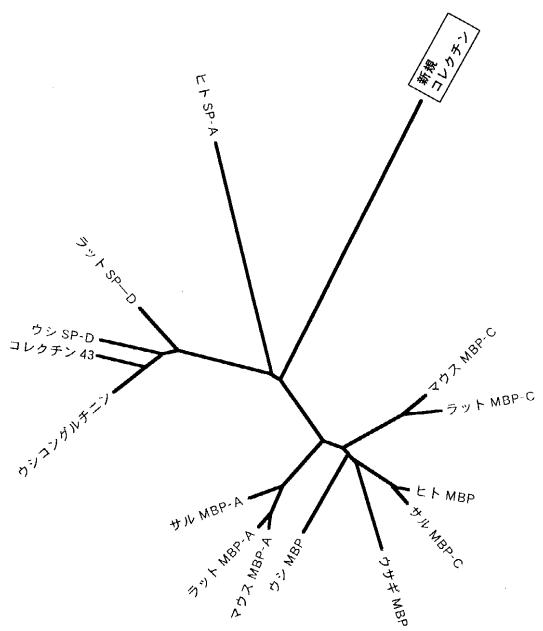
【図9】



【図10】



【図 11】



フロントページの続き

(56)参考文献 J.Biol.Chem., 261[19](1986) p.9029-9033
Biochem.Biophys.Res.Commun., 144[1](1987) p.367-374
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82[19](1985) p.6379-6383
Am.J.Physiol., 263[5 pt.1](1992) p.L546-L554

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N15/00-15/90
C07K1/00-19/00
BIOSIS/WPI (DIALOG)
SwissProt/PIR/Geneseq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq