

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601143号  
(P4601143)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	1 O 2
C 12 N	9/10	(2006.01)	C 12 N	9/10	

請求項の数 9 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-290679 (P2000-290679)
(22) 出願日	平成12年9月25日 (2000.9.25)
(65) 公開番号	特開2002-65284 (P2002-65284A)
(43) 公開日	平成14年3月5日 (2002.3.5)
審査請求日	平成19年7月27日 (2007.7.27)
(31) 優先権主張番号	特願2000-176631 (P2000-176631)
(32) 優先日	平成12年6月13日 (2000.6.13)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
(74) 代理人	100076510 弁理士 掛樋 悠路
(74) 代理人	100086427 弁理士 小原 健志
(74) 代理人	100090066 弁理士 中川 博司
(74) 代理人	100094101 弁理士 舘 泰光
(74) 代理人	100099988 弁理士 斎藤 健治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規酵素遺伝子およびその発現産物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の ( a ) または ( b ) のポリヌクレオチド :

( a ) 配列番号 : 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

( b ) 配列番号 : 2 で示される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む遺伝子。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチド又は請求項 2 に記載の遺伝子を含む組み換え体発現ベクター。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の組み換え体発現ベクターを保有する宿主細胞。

## 【請求項 5】

請求項 3 に記載の組み換え体発現ベクターで形質転換された形質転換体。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の形質転換体を培養することにより得られる発現産物。

## 【請求項 7】

配列番号 : 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

## 【請求項 8】

10

20

請求項 6 に記載の発現産物又は請求項 7 に記載の蛋白質の酵素活性を阻害する候補化合物をスクリーニングする方法であって、

請求項 7 に記載の蛋白質又は請求項 6 に記載の発現産物に基質のみを接触させた場合と、請求項 7 に記載の蛋白質又は請求項 6 に記載の発現産物に基質および候補化合物を接触させた場合とにおける、同蛋白質または同発現産物の酵素活性を測定、比較することを特徴とするスクリーニング方法。

#### 【請求項 9】

以下の(i)～(iii)を含む、請求項 8 に記載の候補化合物のスクリーニング方法に用いられるスクリーニング用キット：

(i)測定用緩衝液、

10

(ii)配列番号：1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、および

(iii)基質としてのフルクトース-6-リン酸およびグルタミン。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、グルタミン：フルクトース-6-リン酸 アミドトランスフェラーゼ(Glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase、以下、G F A Tと略記する)の活性を有する新規な酵素の遺伝子、およびその遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有する新規な蛋白質(酵素)に関する。

##### 【0002】

20

##### 【従来の技術】

G F A Tは、生体内におけるヘキソサミン生合成経路において、律速段階であるフルクトース-6-リン酸からグルコサミン-6-リン酸への反応を触媒する重要な酵素である。近年、マクナイト(McKnight)らは、681アミノ酸配列からなる該酵素のヒト遺伝子を報告した(McKnight, G. L., et al., J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992))。その後、新たなヒトG F A T遺伝子が、ニシらによって報告されている(米国特許第5,876,713号)。

##### 【0003】

このG F A Tの活性を阻害する薬剤は、細胞内へのグルコースの取り込みを促進し、血糖値を低下させることができると考えられており、そのため糖尿病治療薬として期待されている。即ち、インスリンにより細胞内にグルコースの取り込みが促進され、取り込まれたグルコースは解糖系により代謝されエネルギー源としてのATPを蓄積するが、過剰に取り込まれた場合はグルコース代謝物であるフルクトース-6-リン酸がヘキソサミン生合成経路へ流れる。このヘキソサミン生合成経路へ流れたフルクトース-6-リン酸は、G F A Tによりグルコサミン-6-リン酸に変換される。

30

##### 【0004】

グルコサミン-6-リン酸代謝産物が糖輸送担体の膜移行を抑制し、それによって細胞内へのグルコースの取り込みが抑制されることが報告されている(FASEB J., 5, 3031-3036 (1991); Diabetologia, 38, 518-524 (1995); J. Biol. Chem., 266, 10155-10161 (1991); J. Biol. Chem., 266, 4706-4712 (1991); Endocrinology, 136, 2809-2816 (1995))。

40

##### 【0005】

糖代謝経路において、ヘキソサミン生合成経路は、グルコースの過剰取り込みに対するフィードバック機構として機能することが一つの役割として考えられており、G F A Tはその経路における律速酵素として重要であるとされている。更に、インスリンに依存しない2型糖尿病患者においては、このG F A T活性が一般的に高いことが知られており、高血糖値を示す一つの原因であるとも報告されている(Diabetes, 45, 302-307 (1996))。

##### 【0006】

G F A Tは、ヒト由来(J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992);米国特許第5,876,713号)の他、マウス由来、酵母由来および大腸菌由來のものが報告されている。これらはい

50

ずれもヒト G F A T と高い相同意を示す。しかるに、現在、糖代謝において重要な臓器である骨格筋に特異的な新規な G F A T の存在については未だ知られていない。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

G F A T 活性を示す新たな G F A T の遺伝子の単離は、ヘキソサミン生合成経路における G F A T による調節機能の解明に役立ち、また骨格筋などの臓器特異的に発現する G F A T 遺伝子の単離は、その臓器での糖代謝系機構の解明について更なる研究を可能とする。更に、これらの遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の発現物としての G F A T 蛋白質に対して阻害活性を有する特異的な候補化合物が見い出されれば、新たな作用機序を有する糖尿病疾患の予防や治療に役立つ血糖低下薬の開発が可能となる。

10

【 0 0 0 8 】

従って、本発明の課題は、かかる新たな G F A T の遺伝子、殊に骨格筋に特異的に発現する G F A T の遺伝子を単離する点にある。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題より研究を重ねた結果、ヒト骨格筋 m R N A ライブラリーから、G F A T 活性を有する蛋白質をコードする新規な塩基配列の c D N A のクローニングに成功し、ここに、ヒト骨格筋および心臓に特異的に発現する所望の遺伝子に係わる本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

20

即ち、本発明によれば、以下の要旨の発明が提供される。

(1)以下の( a )、( b )または( c )のポリヌクレオチドを含む遺伝子：

( a )配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそれらの相補鎖、

( b )配列番号：1で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも 9 8 % の相同性を持つポリヌクレオチドまたはそれらの相補鎖、

( c )上記( a )のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり且つ G F A T 活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそれらの相補鎖。

30

(2)以下の( a )または( b )のポリヌクレオチドからなる遺伝子：

( a )配列番号：2で示される塩基配列またはその相補鎖、

( b )上記( a )の塩基配列からなるポリヌクレオチドと高いストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3)配列番号：2で示される塩基配列である上記(2)に記載の遺伝子。

(4)上記(1)または(2)に記載の遺伝子を発現させて得られる遺伝子発現産物。

(5)上記(1)または(2)に記載の遺伝子を有する組換え体発現ベクター。

(6)上記(5)に記載の組換え体発現ベクターを保有する宿主細胞。

(7)上記(5)に記載の組換え体発現ベクターで形質転換された形質転換体。

(8)以下の( a )または( b )の蛋白質：

40

( a )配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

( b )上記( a )のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり且つ G F A T 活性を有する蛋白質。

(9)上記(1)または(2)に記載の遺伝子または上記(4)に記載の遺伝子発現産物を有効成分として含有する低血糖症の治療または予防用組成物。

(10)上記(8)に記載の蛋白質を有効成分として含有する低血糖症の治療または予防用組成物。

(11)上記(4)に記載の遺伝子発現産物および上記(8)に記載の蛋白質およびこれらの断片から選ばれるいずれかに結合性を有する抗体、特にモノクローナル抗体。

(12)上記(1)に記載の遺伝子または上記(4)に記載の遺伝子発現産物および上記(8)に記載

50

の蛋白質の酵素活性を阻害する候補化合物をスクリーニングする方法であって、上記(11)に記載の抗体と、候補化合物を含む被検液および標識化された請求項8に記載の蛋白質またはその部分ペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された蛋白質またはその部分ペプチドの割合を測定するか、(2)候補化合物を含む被検液と、担体上に不溶化した上記抗体および標識化された他の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定するか、或いは(3)上記(8)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドに基質を接触させた場合と、同蛋白質またはその部分ペプチドに基質および候補化合物を接触させた場合とにおける、同蛋白質またはその部分ペプチドの酵素活性を測定、比較することを特徴とするスクリーニング方法。

(13)上記(12)に記載の候補化合物のスクリーニング方法に用いられるスクリーニング用キットであって、測定用緩衝液、上記(8)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドおよび基質としてのフルクトース-6-リン酸およびグルタミンをキット成分として含有するキット。

#### 【0011】

また、本発明によれば、以下の要旨の発明も提供される。

(14)前記(4)に記載の遺伝子発現産物または(8)に記載の蛋白質(以下、これらを「G F A T 1 L 蛋白質」と総称する)或いはG F A T 1 L 蛋白質の断片(部分ペプチド)に対する抗体と、被検液および標識化されたG F A T 1 L 蛋白質またはその断片とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたG F A T 1 L 蛋白質またはその断片の割合を測定することを特徴とする被検液中のG F A T 1 L 蛋白質またはその断片の定量法。

(15)被検液と、担体上に不溶化した前記(14)に記載の抗体および標識化された別の異なるG F A T 1 L 蛋白質に対する抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG F A T 1 L 蛋白質またはその断片の定量法。

(16)G F A T 1 L 蛋白質に対する抗体(好ましくは、G F A T 1 L 蛋白質の活性を中和する活性を有するG F A T 1 L 蛋白質に対する抗体)を含有してなる医薬、特に糖尿病の治療および予防剤である医薬。

(17)G F A T 1 L 蛋白質またはその断片に基質を接触させた場合と、G F A T 1 L 蛋白質またはその断片に基質および試験化合物を接触させた場合とにおける、G F A T 1 L 蛋白質またはその断片の酵素活性を測定、比較することを特徴とする、G F A T 酵素活性を阻害する化合物のスクリーニング方法。

#### 【0012】

更に本発明によれば、以下の要旨の発明も提供される。

(18)G F A T 1 L 遺伝子のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA。

(19)G F A T 1 L 遺伝子のDNAに実質的に相補的な塩基配列が、該DNAに相補的な塩基配列の全塩基配列であるかあるいは部分塩基配列と約98%以上(好ましくは約99%以上)の相同性を有する塩基配列であるG F A T 1 L 遺伝子のアンチセンスDNA。

(20)G F A T 1 L 遺伝子のアンチセンスDNAを含有してなる医薬組成物、特に糖尿病の治療および予防剤である医薬組成物。

#### 【0013】

本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定[IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)および当該分野における慣用記号に従うものとする。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明G F A T 1 L 遺伝子およびG F A T 1 L 蛋白質につき、詳述する。

#### 【0015】

本発明蛋白質は、配列番号：1で示されるアミノ酸配列またはこれと実質的に同一のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含有することで特徴付けられる。本発明蛋白質は、例えば、ヒト細胞、特にヒト横紋筋細胞、あるいは例えばヒト組織、特に骨格筋、心臓に由来する蛋白質であることができ、また合成蛋白質であることもできる。

#### 【0016】

上記配列番号：1で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で示されるアミノ酸配列と約98%以上、好ましくは約99%以上の相同意を有するアミノ酸配列が挙げられる。該配列番号：1で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質には、前記した配列番号：1と実質的に同一のアミノ酸配列を有し且つ配列番号：1で示されるアミノ酸配列を含有する本発明蛋白質と実質的に同質のG F A T活性を有する蛋白質が含まれる。ここで実質的に同質とは、その活性が性質的に（例えば生理化学的または薬理学的に）同質であることを示す。従って、G F A T活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は当然に異なることができる。10

#### 【0017】

G F A T活性の測定は、それ自体公知の方法、例えばマーシャルらの方法(Marshall, et al., J. Biol. Chem., 266(8), 4706-4712 (1991))に準じて行なうことができる。

#### 【0018】

また、本発明蛋白質には、配列番号：1で示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し且つG F A T活性を有するものも含まれる。20

#### 【0019】

また、本発明において「G F A T活性」とは、後記実施例に示されるように、U D P - N -アセチルグルコサミンがG F A T活性を阻害することにおいて、フルクトース-6-リン酸を基質とした場合の、その阻害様式が、混合阻害様式で示されるG F A T活性をいい、上記阻害様式が拮抗阻害様式であるものとは明確に区別される。以下、本明細書においては、かかる本発明に特有の混合阻害様式を示すG F A T活性を単に「G F A T活性」と称するものとする。20

#### 【0020】

上記アミノ酸配列の欠失、置換または付加の位置は、かかる改変されたアミノ酸配列を有する蛋白質がG F A T活性を有する限り、任意であり、これら欠失、置換、付加の数も、同様にG F A T活性を有する限り任意であることができる。30

#### 【0021】

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「G F A T 1 L」と名付けられたP C R産物のD N A配列から演繹されるものを挙げることができる。その塩基配列は、配列番号：2に示されるとおりである。

#### 【0022】

該遺伝子は、配列番号：1で示される699アミノ酸配列の、骨格筋および心臓特異的蛋白質（G F A T 1 L蛋白質）をコードするものであり、全長2097塩基からなっている。

#### 【0023】

本発明G F A T 1 L遺伝子は、マクナイトらによってクローニングされたG F A T遺伝子(McKnight, G.L., et. al., J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992))の684番目と685番目の塩基の間に、54個の塩基が挿入された新規な配列を有することが確認された。40

#### 【0024】

従って、本発明遺伝子によりコードされるG F A T 1 L蛋白質のアミノ酸配列は、上記マクナイトらの報告による遺伝子から演繹されるアミノ酸配列の228番目と229番目の間に、新たな18個のアミノ酸配列が挿入されたものである。

#### 【0025】

本発明G F A T 1 L蛋白質は、G F A T活性を有し、例えば低血糖の改善薬として有用である。また本発明遺伝子のアンチセンスD N Aや本発明遺伝子の発現産物に対する抗体は50

、糖尿病疾患の治療効果が予測され、更にこれらを利用した糖尿病治療剤としての候補化合物のスクリーニングへの利用も可能である。

【0026】

本発明において遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含する趣旨であり、またその長さに何ら制限されるものではない。従って、本発明遺伝子(DNA)には、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA(センス鎖)並びに該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA(アンチセンス鎖)およびそれらの断片のいずれもが含まれる。

【0027】

10

また本発明遺伝子(DNA)は、リーダ配列、コード領域、エキソン、イントロン等を含むことができる。ポリヌクレオチドとしては、RNA、DNAを例示できる。DNAは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAを含み、特定アミノ酸配列を有するポリペプチドは、その断片、同族体、誘導体、変異体を含み得る。

【0028】

遺伝子における変異体は、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加および挿入を有する変異体等であって、これらによりコードされるポリペプチドの機能を実質的に変更しないものを意味する。

【0029】

ポリペプチドは、アレル体、ホモログ、天然の変異体で少なくとも98%、好ましくは99%相同なものを含む。

20

【0030】

また、本発明遺伝子発現産物の生物活性、即ちGFA T活性とは、フルクトース-6-リン酸からグルコサミン-6-リン酸への反応を触媒する作用として例示される。また、これはヒトまたは哺乳動物の血糖の上昇作用としても捉えることができる。なおDNAおよびポリペプチドにおける相同性は、配列分析ソフトウェア、例えばFASTAプログラムを使用した測定(ClustalV., Methods Mol.Biol., 25, 307-318 (1994))にて解析することができる。

【0031】

前記本発明遺伝子における変異体は、これによりコードされるアミノ酸置換についてサイレントまたは保存変異体を意味し、その塩基配列によってコードされるアミノ酸残基が変わらない塩基配列の変異のことを表わす。

30

【0032】

保存的なアミノ酸置換の数は以下に示されるとおりである：

元のアミノ酸残基	保存的な置換アミノ酸残基
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	AsnまたはGln
Ile	LeuまたはVal
Leu	IleまたはVal
Lys	Arg, AlnまたはGlu
Met	LeuまたはIle
Phe	Met, LeuまたはTyr
Ser	Thr

40

50

Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	TrpまたはPhe
Val	IleまたはLeu。

**【 0 0 3 3 】**

加えて、一般にシスティン残基をコードする 1 またはそれ以上のコドンは、特定のポリペプチドのジスフィド結合に影響を与えるのでシスティン残基の欠失の結果、置換することが可能である。

**【 0 0 3 4 】**

置換基を選択することによって作られる機能における実質的な変化は、上記アミノ酸のリストに記載されたものより少し保存性が劣っている：例えば、

- a) 置換基の領域におけるポリペプチドの構造背景、
- b) 標的部位のポリペプチドの電荷または疎水性、
- c) アミノ酸側鎖の大きさ(容積)。

**【 0 0 3 5 】**

蛋白の特性に最も大きな変化を生み出すと一般的に期待される置換は、以下のものである：

- a) 親水性残基、例えばセリルまたはスレオニンが疎水性残基例えば、ロイシル、イソロイシル、ファニルアラニル、ヴァリルまたはアラニイルに対して置換される、
- b) システィンまたはプロリンは、いかなる他の残基に対して置換される、
- c) 電気的陽性側鎖を有している残基、例えば、リジル、アルギニリル、ヒスタジルは電気的陰性残基、例えば、バルタアミルまたはアスパルチルによって置換されるが、
- d) 非常に大きな側鎖を有している残基、例えば、フェニルアラニンはグリシンのような側鎖を有しないものと置換できる。

**【 0 0 3 6 】**

本発明 G F A T 1 L 遺伝子およびその遺伝子産物の提供は、糖尿病の解明、把握、診断、予防および治療などに極めて有用な情報乃至手段を与える。また、本発明遺伝子は、上記の処置に利用される本発明遺伝子の発現を抑制または誘導する新規薬剤の開発の上でも好適に利用できる。更に、個体或は組織における本発明遺伝子の発現を抑制または誘導するその産物の発現の検出や、該遺伝子の変異(欠失や点変異)乃至発現異常の検出は、上記糖尿病病態の解明や診断において好適に利用できる。

**【 0 0 3 7 】**

前記改変されたアミノ酸配列をコードする本発明遺伝子は、その利用によって改変前のアミノ酸配列をコードする本発明遺伝子が検出できるものであってもよい。

**【 0 0 3 8 】**

本発明遺伝子の具体例としては、例えば配列番号：1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を有する G F A T 1 L 遺伝子を挙げることができるが、本発明遺伝子は特にこれに限定されることなく、当該 G F A T 1 L 遺伝子の相同物をも包含する。

**【 0 0 3 9 】**

ここで「G F A T 1 L 遺伝子の相同物」とは、本発明 G F A T 1 L 遺伝子(またはその遺伝子産物)と配列相同性を有し、上記構造的特徴並びに遺伝子発現パターンにおける共通性および上記したようなその生物学的機能の類似性(例えば F A S T A プログラムを使用した相同性)より、ひとつの遺伝子ファミリーと認識される一連の関連遺伝子を意味する。

**【 0 0 4 0 】**

上記アミノ酸配列の改変(変異)などは、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあるが、天然由来の遺伝子(例えば本発明 G F A T 1 L 遺伝子)に基づいて人為的に改変することもできる。本発明は、このような改変・変異の原因および手段などを問わず、上記特性を有する全ての改変遺伝子を包含する。本発明の遺伝子に

10

20

30

40

50

は、配列番号：1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子の対立遺伝子（アレル体）もまた包含される。

#### 【0041】

上記の人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス [Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987) ; 同100, 468 (1983) ; Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984) ; 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986) ]などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段 [J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967) ; 同91, 3350 (1969) ; Science, 150, 178 (1968) ; Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981) ; 同24, 245 (1983) ]およびそれらの組合せ方法などが例示できる。より具体的には、DNAの合成は、ホスホルアミダイト法またはトリエステル法による化学合成によることもでき、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置上で行うこともできる。二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖と共にアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用い相補鎖を付加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。10

#### 【0042】

本発明遺伝子の具体的態様としては、配列番号：2に示される塩基配列を有する遺伝子を例示できる。この塩基配列(コーディング領域)は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例を示している。本発明の遺伝子は、かかる特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ、選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる [Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)]。20

#### 【0043】

また、本発明遺伝子は、前記のとおり、配列番号：2に示される塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含する。

#### 【0044】

上記相同性を有する塩基配列からなるものとは、配列番号：2に示される塩基配列と少なくとも98%の同一性、好ましくは少なくとも99%の同一性を有するポリヌクレオチドおよびそれらの相補鎖ポリヌクレオチドをいう。30

#### 【0045】

かかる遺伝子としては、例えば、0.1% SDSを含む0.2×SSC中、60または0.1% SDSを含む0.1×SSC中、60の高いストリングェントな条件下で、配列番号：2に示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズする塩基配列を有する遺伝子を例示することができる。

#### 【0046】

本発明遺伝子は、本発明により開示された本発明遺伝子の具体例についての配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989) ; 続生化学実験講座「遺伝子研究法I、II、III」、日本生化学会編 (1986) など参照]。40

#### 【0047】

具体的には、本発明遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローニングを選択する手法を挙げることができる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981) ; Science, 222, 778 (1983)など]。

#### 【0048】

上記において、cDNAの起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞などが例示される。また、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。また、mRNAまたはcDNAライブラリーは市販されてもおり、本50

発明においてはそれらmRNAまたはcDNAライブラリー、例えばクローンテック社(Clontech Lab. Inc.)などより市販されている各種mRNAまたはcDNAライブラリーなどを用いることもできる。

【0049】

本発明の遺伝子をcDNAのライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAによって產生される蛋白質に対して、該蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、これらの組合せなどを例示できる。

10

【0050】

ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNAなどが一般的に使用できるが、既に取得された本発明遺伝子やその断片も良好に利用できる。また、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

【0051】

前記プローブとして用いられるヌクレオチド配列は、配列番号：2に対応する部分ヌクレオチド配列であって、54塩基の挿入配列部分の一部を少なくとも含む15個以上の連續した塩基、好ましくは20個の連續した塩基、より好ましくは30個の連續した塩基、最も好ましくは50個の連續した塩基を有するものである。或いは前記配列を有する陽性クローンそれ自身をプローブとして用いることもできる。

20

【0052】

本発明の遺伝子の取得に際しては、PCR法[Science, 230, 1350 (1985)]によるDNA/RNA增幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法[Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学、12(6), 35 (1994)]、特に5'-RACE法[M.A. Frohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998 (1988)]などの採用が好適である。

【0053】

かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従って合成できる。尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などによればよい。

30

【0054】

また、上記で得られる本発明遺伝子或いは各種DNA断片は、常法、例えばジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)]やマキサム-ギルバート法[Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)]などに従って、また簡便には市販のシークエンスキットなどを用いて、その塩基配列を決定することができる。

【0055】

このようにして得られる本発明の遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の有無を特異的に検出することができる。

40

【0056】

かかる検出は常法に従って行うことができ、例えばRT-PCR[Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., SanDiego, 21-27 (1991)]によるRNA増幅、ノーザンプロッティング解析[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、in situ RT-PCR[Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)]、in situ ハイブリダイゼーションなどを利用した細胞レベルでの測定、N A S B A法[Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350, 91-92 (1991)]

50

] およびその他の各種方法を挙げることができる。好適には、R T - P C R による検出法を挙げることができる。

#### 【 0 0 5 7 】

尚、ここでP C R 法を採用する場合に用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り、特に制限はなく、本発明遺伝子の配列情報に基いて適宜設定することができる。通常、10～35ヌクレオチド程度、好ましくは15～30ヌクレオチド程度の長さを有する本発明遺伝子の部分配列を有するものを挙げることができる。

#### 【 0 0 5 8 】

このように、本発明の遺伝子には、本発明にかかるG F A T 1 L 遺伝子を検出するための特異プライマーおよび／または特異プローブとして使用されるD N A 断片もまた含まれる。

10

#### 【 0 0 5 9 】

当該D N A 断片は、配列番号：2に示される塩基配列からなるD N A と高いストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とするD N A として規定することできる。ここで、高いストリンジェントな条件としては、プライマーまたはプローブとして用いられる通常の条件を挙げることができ、特に制限はされないが、例えば、前述するような0.1% S D S を含む0.2×S S C 中、60°の条件または0.1% S D S を含む0.1×S S C 中、60°の条件を例示することができる。

#### 【 0 0 6 0 】

本発明のG F A T 1 L 遺伝子によれば、通常の遺伝子工学的手法を用いることにより、該遺伝子産物（G F A T 1 L 蛋白）またはこれを含む蛋白質を容易に大量に、安定して製造することができる。

20

#### 【 0 0 6 1 】

従って本発明は、本発明遺伝子によってコードされるG F A T 1 L 蛋白質などの蛋白質を始め、該蛋白質の製造のための、例えば本発明遺伝子を含有するベクター、該ベクターによって形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培養して上記本発明蛋白質を製造する方法などをも提供するものである。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明蛋白質の具体的態様としては、配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するG F A T 1 L 蛋白質を挙げることができるが、本発明蛋白質には、該G F A T 1 L 蛋白質のみならず、その相同物も含まれる。該相同物としては、上記配列番号：1に示されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し且つ前記G F A T 活性を有する蛋白質を挙げることができる。ここで前記G F A T 活性とはフルクトース-6-リン酸からグルコサミン-6-リン酸への反応を触媒する作用または血糖上昇作用を例示でき且つフルクトース-6-リン酸を基質としてU D P - N -アセチルグルコサミンがG F A T に対して、混合阻害の様式を示すものを包含するものとする。

30

具体的には、前記G F A T 1 L 遺伝子の相同物（アレル体を含むG F A T 1 L 同等遺伝子）の遺伝子産物を挙げることができる。

40

#### 【 0 0 6 3 】

また、本発明G F A T 1 L 蛋白質の相同物には、配列番号：1に示されるアミノ酸配列のG F A T 1 L 蛋白質と同一活性を有する、哺乳動物、例えばヒト、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラット、ウサギなどの哺乳動物の蛋白質も含まれる。

#### 【 0 0 6 4 】

本発明の蛋白質は、本発明により提供されるG F A T 1 L 遺伝子の配列情報に基づいて、常法の遺伝子組換え技術〔例えば、Science, 224, 1431 (1984) ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985) ; Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983) など参照〕に従って調製することができる。

#### 【 0 0 6 5 】

50

該蛋白質の製造は、より詳細には、該所望の蛋白をコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換えDNA（発現ベクター）を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から回収することにより行なわれる。

#### 【0066】

上記宿主細胞としては、原核生物および真核生物のいずれも用いることができ、例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌といった一般的に用いられるものが広く挙げられ、好適には大腸菌、とりわけエシエリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12株を例示できる。また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞〔Cell, 23: 175 (1981)〕、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞およびそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77: 4216 (1980)〕などが、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞などが好適に用いられる。勿論、これらに限定される訳ではない。10

#### 【0067】

原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーターおよびSD（シャイン・アンド・ダルガーノ）塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン（例えばATG）を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13などがよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができます。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、例えばpGEX-4T（Amersham Pharmacia Biotech社）、pMAL-C2, pMAL-P2（New England Biolabs社）、pET21, pET21/lacq（Invitrogen社）、pBAD/His（Invitrogen社）等を例示できる。20

#### 【0068】

脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終了配列を保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には、例えばSV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr〔Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)〕等が例示できる。上記以外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクターの市販品としては、例えばpEGFP-N, pEGFP-C（Clontech社）、pIND（Invitrogen社）、pcDNA3.1/His（Invitrogen社）などの動物細胞用ベクターや、pFastBac HT（Gibco BRL社）、pAcGHLT（PharMingen社）、pAc5/V5-His, pMT/V5-His, pMT/Bip/V5-his（以上Invitrogen社）などの昆虫細胞用ベクターなどが挙げられる。30

#### 【0069】

また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80: 1 (1983)〕などが例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えばpPICZ（Invitrogen社）、pPICZ（Invitrogen社）などが含まれる。40

#### 【0070】

プロモーターとしても特に限定なく、エッショリヒア属菌を宿主とする場合は、例えばトリプトファン(*trp*)プロモーター、Ippプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PRプロモーターなどを好ましく利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えばpH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどを好適に利用できる。また、動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロ50

ウイルスプロモーター、S R プロモーターなどを例示できる。

【0071】

尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターも好ましく利用できる。該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(G S T)との融合蛋白として発現させるためのp G E X(Promega社)などを例示できる。

【0072】

また、成熟ポリペプチドをコードする配列が宿主細胞からのポリペプチドの発現、分泌を助けるポリヌクレオチド配列としては、分泌配列、リーダ配列が例示でき、細菌宿主に対して融合成熟ポリペプチドの精製に使用されるマーカー配列(ヘキサヒスチジン・タグ)、哺乳動物細胞の場合はヘマグルチニン(HA)・タグを例示できる。

10

【0073】

所望の組換えDNA(発現ベクター)の宿主細胞への導入法およびこれによる形質転換法としては、特に限定されず、一般的な各種方法を採用することができる。

【0074】

また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により所望のように設計した遺伝子によりコードされる本発明の目的蛋白質が、形質転換体の細胞内、細胞外または細胞膜上に発現、生産(蓄積、分泌)される。

【0075】

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

20

【0076】

かくして得られる本発明の組換え蛋白質は、所望により、その物理的性質、化学的性質などを利用した各種の分離操作〔「生化学データーブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行; Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987)など参照〕により分離、精製できる。

【0077】

該方法としては、具体的には、通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理(塩析法)、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せが例示でき、特に好ましい方法としては、本発明蛋白質に対する特異的な抗体を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグラフィーなどを例示することができる。

30

【0078】

尚、本発明蛋白質をコードする所望の遺伝子の設計に際しては、配列番号:2に示されるG F A T 1 L遺伝子の塩基配列を良好に利用することができる。該遺伝子は、所望により、各アミノ酸残基を示すコドンを適宜選択変更して利用することも可能である。

【0079】

本発明蛋白質は、また、配列番号:1に示すアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法が含まれる。

40

【0080】

かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていく所謂ステップワイズエロングーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含し、本発明蛋白質の合成は、そのいずれによってもよい。

【0081】

上記ペプチド合成に採用される縮合法も、常法に従うことができ、例えば、アジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリ

50

ルアジド)法、DCC + 添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミドなど)法、ウッドワード法などを例示できる。

【0082】

これら各方法に利用できる溶媒も、この種ペプチド縮合反応に使用されることのよく知られている一般的なものから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチルなどおよびこれらの混合溶媒などを挙げることができる。

【0083】

尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸乃至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第3級ブチルエステルなどの低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステルなどのアラルキルエステルなどとして保護することができる。

10

【0084】

また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばチロシン残基の水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第3級ブチル基などで保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に、例えばアルギニン残基のグアニジノ基は、ニトロ基、トシリル基、p-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基などの適当な保護基により保護することができる。

20

【0085】

上記保護基を有するアミノ酸、ペプチドおよび最終的に得られる本発明蛋白質におけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタансルホン酸などを用いる方法などに従って実施することができる。

【0086】

かくして得られる本発明蛋白質は、前記した各種の方法、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、向流分配法などのペプチド化学の分野で汎用される方法に従って、適宜精製を行うことができる。

30

【0087】

本発明G F A T 1 L蛋白質は、その特異抗体を作成するための免疫抗原としても好適に利用でき、この抗原を利用することにより、所望の抗血清(ポリクローナル抗体)およびモノクローナル抗体を取得することができる。

【0088】

該抗体の製造法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うことができる〔例えば、続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編(1986)など参照〕。

【0089】

かくして得られる抗体は、例えばG F A T 1 L蛋白の精製およびその免疫学的手法による測定ないしは識別などに有利に利用することができる。より具体的には、本発明遺伝子の発現が骨格筋や心臓の組織において確認されていることから、該抗体を用いて、G F A T のこれら組織中の濃度の測定に利用することができる。

40

【0090】

上記で得られた本発明G F A T 1 L蛋白質は、これを有効成分とする医薬品として医薬分野において有用である。従って、本発明は本発明G F A T 1 L蛋白質を有効成分とする医薬組成物をも提供するものである。

【0091】

本発明G F A T 1 L蛋白質の医薬としての有用性は上記したようにその糖代謝において、

50

重要とされる組織である骨格筋に特異的ポリペプチドが有するG F A T活性の促進、または低血糖改善作用の促進にあり、これらの活性を確認する方法は、例えば後記実施例に記載されているMarshallらの方法(Marshall, J. Biol. Chem., 266(8), 4706-4712 (1991))に準じて実施できる。

#### 【0092】

該方法は、G F A Tにより生成されたグルタメート(Glutamate)をさらにグルタメート脱水素酵素(Glutamate dehydrogenase:GDH)と反応させる際に、同時に補酵素であるAPADがAPADHに還元され、この還元反応に伴った吸光度の変化をG F A T活性として測定する方法である。即ち、該方法では、96穴のマイクロプレートを用い、200 μlの基質溶液(40 mM Sodium phosphate buffer, pH 7.5, 50 mM KCl, 1.25 mM EDTA, 0.3 mM APAD, 6 U/ml (GDH), 0-6 mM Glutamine, 0-6 mM Fructose-6-P (F6P))に適宜希釈したG F A T 1 Lの大腸菌溶解液の可溶性画分50 μlを加え、37℃で60分間反応させ、この時の365nmの吸光度の変化をマイクロプレートリーダーを用いる分光光度計法にて測定する。  
10

#### 【0093】

医薬組成物において有効成分とする蛋白質には、その医薬的に許容される塩もまた含まれる。かかる塩には、当業界で周知の方法により調製される、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウムなどのアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩などが含まれる。更に上記塩には、本発明蛋白質と適当な有機酸ないし無機酸との反応による酸付加塩も含まれる。代表的酸付加塩としては、例えば塩酸塩、塩化水素酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、酢酸塩、磷酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、硼酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩(トシレート)、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、スルホン酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ナプシレートなどが例示される。  
20

#### 【0094】

上記医薬組成物は、本発明蛋白質を活性成分として、その薬学的有効量を、適当な医薬担体ないし希釈剤と共に含有するものが含まれる。

#### 【0095】

上記医薬組成物(医薬製剤)に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤或は賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。  
30

#### 【0096】

特に好ましい本発明医薬製剤は、通常の蛋白製剤などに使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調製される。

#### 【0097】

上記安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミン、通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体などを例示でき、これらは単独でまたはそれぞれを組合せたり、更にこれらに界面活性剤などと組合せて使用できる。この組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。  
40

#### 【0098】

上記L-アミノ酸は、特に限定はなく例えばグリシン、システイン、グルタミン酸などのいずれでもよい。

#### 【0099】

上記糖としても特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトールなどの糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスター、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類、それらの誘導体などを使用できる。

#### 【0100】

10

20

30

40

50

界面活性剤としても特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系などを使用できる。

#### 【0101】

セルロース誘導体としても特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを使用できる。

#### 【0102】

上記糖類の添加量は、有効成分1μg当り約0.0001mg程度以上、好ましくは約0.01～10mg程度の範囲とするのが適当である。界面活性剤の添加量は、有効成分1μg当り約0.00001mg程度以上、好ましくは約0.0001～0.01mg程度の範囲とするのが適当である。ヒト血清アルブミンの添加量は、有効成分1μg当り約0.0001mg程度以上、好ましくは約0.001～0.1mg程度の範囲とするのが適当である。アミノ酸は、有効成分1μg当り約0.001～10mg程度とするのが適当である。また、セルロース誘導体の添加量は、有効成分1μg当り約0.00001mg程度以上、好ましくは約0.001～0.1mg程度の範囲とするのが適当である。

#### 【0103】

本発明医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.0001～70重量%、好ましくは約0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。

#### 【0104】

また本発明医薬製剤中には、各種添加剤、例えば緩衝剤、等張化剤、キレート剤などをも添加することができる。ここで緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、-アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）などを例示できる。等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンなどを例示できる。またキレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸などを例示できる。

#### 【0105】

本発明医薬製剤は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時水、生理的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

#### 【0106】

本発明の医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤などの固体投与形態、溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、エリキシルなどの液剤投与形態が含まれ、これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤などに分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形乃至調製することができる。

#### 【0107】

例えば、錠剤の形態に成形するに際しては、上記製剤担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、リン酸カリウムなどの賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウムなどの崩壊剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリドなどの界面活性剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸などの吸着剤、精製タル

10

20

30

40

50

ク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコールなどの滑沢剤などを使用できる。

【0108】

更に錠剤は必要に応じ通常の削皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠とすることもできる。また二重錠ないしは多層錠とすることもできる。

【0109】

丸剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノールなどの結合剤、ラミナラン、カンテンなどの崩壊剤などを使用できる。

10

【0110】

カプセル剤は、常法に従い通常本発明の有効成分を上記で例示した各種の製剤担体と混合して硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセルなどに充填して調製される。

【0111】

経口投与用液体投与形態は、慣用される不活性希釈剤、例えば水、を含む医薬的に許容される溶液、エマルジョン、懸濁液、シロップ、エリキシルなどを包含し、更に湿潤剤、乳剤、懸濁剤などの助剤を含ませることができ、これらは常法に従い調製される。

【0112】

非経口投与用の液体投与形態、例えば滅菌水性乃至非水性溶液、エマルジョン、懸濁液などへの調製に際しては、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、オリーブ油などの植物油などを使用でき、また注入可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチルなどを配合できる。これらには更に通常の溶解補助剤、緩衝剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、分散剤などを添加することもできる。

20

【0113】

滅菌は、例えばバクテリア保留フィルターを通過させる濾過操作、殺菌剤の配合、照射処理および加熱処理などにより実施できる。また、これらは使用直前に滅菌水や適当な滅菌可能媒体に溶解することのできる滅菌固体組成物形態に調製することもできる。

30

【0114】

坐剤や腔投与用製剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライドなどを使用できる。

【0115】

ペースト、クリーム、ゲルなどの軟膏剤の形態に成形するに際しては、希釈剤として、例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、オリーブ油などの植物油などを使用できる。

【0116】

40

経鼻または舌下投与用組成物は、周知の標準賦形剤を用いて、常法に従い調製することができる。

【0117】

尚、本発明薬剤中には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などや他の医薬品などを含有させることもできる。

【0118】

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤は経口投与され、注射剤は単独でまたはブドウ糖やアミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で筋肉内、皮内、皮下もしく

50

は腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与され、経膣剤は膣内投与され、経鼻剤は鼻腔内投与され、舌下剤は口腔内投与され、軟膏剤は経皮的に局所投与される。

#### 【0119】

上記医薬製剤中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。一般的には、該投与量は、通常、1日当たりヒト体重1kg当たり、約0.01 μg ~ 10mg程度、好ましくは約0.1 μg ~ 1mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1回または数回に分けて投与することができる。

#### 【0120】

上記により得られる本発明骨格筋特異的ポリペプチド、即ちG F A T 1 L蛋白質は、G F A T活性を有しており、本発明G F A T 1 L蛋白の全ポリペプチドまたはその一部は、それら自身低血糖改善剤として有用である。10

#### 【0121】

また、後記実施例に示されるように本発明遺伝子は、骨格筋や心臓の組織においてその発現が認められていることから、本発明G F A T 1 L遺伝子のアンチセンスDNAの全部または一部を包含する任意の遺伝子発現ベクターを作成し、該発現ベクターをこれら骨格筋組織において細胞内のmRNAに対して相補的配列を有するRNAを作り出し、翻訳を阻害することにより強制的にG F A T 1 L遺伝子の発現を抑制させることができ、かくして、骨格筋組織におけるヘキソサミン生合成経路においてG F A Tの活性を阻害することができ、細胞内へのグルコースの取り込みを促進させ、血糖値を低下させることができ、結果として糖代謝を改善し、糖尿病の進展の抑制または改善することができる。本発明遺伝子は、かかる抗糖尿病作用を有する遺伝子治療用組成物として、或いは遺伝子治療剤として利用できると考えられる。20

#### 【0122】

また、本発明は、G F A T 1 L遺伝子の全部または一部を含有する遺伝子治療用ベクターおよび該ベクターによりG F A T 1 L遺伝子を導入した細胞を有効成分とする医薬を提供しようとするものである。

#### 【0123】

即ち、本発明によれば、配列番号：2で示される塩基配列のアンチセンスDNA配列の全部または一部を含むG F A T 1 Lアンチセンス遺伝子を含有する遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターによりG F A T 1 Lアンチセンス遺伝子を導入した細胞、並びに該遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターによりG F A T 1 Lアンチセンス遺伝子を導入した細胞を有効成分とする遺伝子治療剤が提供される。30

#### 【0124】

また、本発明によれば、配列番号：2で示される塩基配列のアンチセンスDNA配の全部または一部を含むG F A T 1 Lアンチセンス遺伝子を含有する遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターによりG F A T 1 Lアンチセンス遺伝子を導入した細胞を糖尿病患者の骨格筋細胞または患者の筋肉組織部位に投与することによってこれら組織における糖代謝を改善し、糖尿病の進展の抑制または糖尿病患者の糖代謝の改善をすることを特徴とする糖尿病治療剤を提供することができる。40

#### 【0125】

更にまた、本発明によれば、上記G F A T 1 Lアンチセンス遺伝子を含有する遺伝子治療用導入用のウイルスベクターを有効成分として含有する医薬、特に、骨格筋における糖代謝を改善するための処置などに使用される当該医薬が提供される。

#### 【0126】

以下、かかる遺伝子治療につき詳述する。尚、以下の遺伝子治療の実施においては、特記しないかぎり、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学および免疫学の慣用的な方法を用いることができる。これらは、例えばマニアティス(Maniatis,T., et al., Molecular cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982))、サムブルック(Sambrook,J., et al., Molecular cloning:50

A laboratory manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1981))、Ausbel,F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, New York, (1992)、グローバー(Glover,D., DNA Cloning, I and II(Oxford Press)(1985))、アナンド(Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press(1992))、グスリー(Guthrie,G., et al., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, (Academic Press)(1991))およびフィンク(Fink,et al., Hum. Gene Ther., 3, 11-19(1992)に記載されている。

#### 【 0 1 2 7 】

本発明は、本発明 G F A T 1 L 遺伝子の発現する細胞において、細胞内の m R N A に対して相補的配列を持つ R N A を作り出し、翻訳を阻害し、G F A T 1 L 遺伝子の発現を抑制するためのアンチセンス医薬の提供による G F A T 活性抑制または血糖の上昇を抑制する遺伝子治療法を提供する。 10

#### 【 0 1 2 8 】

該治療法は、例えば G F A T 1 L 遺伝子を有する G F A T 発現細胞本来の m R N A と結合させるか、あるいは D N A 二重螺旋の間に入り込み三重鎖を形成させることによって、転写或いは翻訳の過程を阻害することによって、標的とする遺伝子の発現を抑制する方法である。この方法は遺伝子の m R N A と相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドを製造し、該アンチセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に供給する方法としてとらえることができる。 20

#### 【 0 1 2 9 】

かかる G F A T 1 L 遺伝子の発現機能を抑制する作用を供給すれば、受容細胞 / 標的細胞における G F A T 活性または血糖の上昇を抑制することができる。当該アンチセンス・オリゴヌクレオチドを含有するベクターまたはプラスミドを用いて染色体外に維持し、目的の細胞に導入することができる。 20

#### 【 0 1 3 0 】

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いた糖尿病の遺伝子治療によれば、レトロウイルス、アデノウイルス、A A V 由来のベクターに該アンチセンス・オリゴヌクレオチドを組み込み、これを G F A T 活性発現細胞に感染させてアンチセンス・オリゴヌクレオチドを過剰発現させることにより、所望の血糖降下効果を得ることができる。 30

#### 【 0 1 3 1 】

このように G F A T 1 L 遺伝子を有する細胞にアンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入して G F A T 1 L 蛋白の発現を抑制させる場合、当該アンチセンス・オリゴヌクレオチドは対応する G F A T 1 L 遺伝子の全長に対応するものである必要はなく、例えば該 G F A T 1 L 遺伝子の発現機能を抑制する機能と実質的に同質な機能を保持する限りにおいて、前記した改変体であっても、また特定の機能を保持した一部配列からなる遺伝子を使用することもできる。 30

#### 【 0 1 3 2 】

かかる組換えおよび染色体外維持の双方のための所望遺伝子の導入のためのベクターは、当該分野において既に知られており、本発明ではかかる既知のベクターのいずれもが使用できる。例えば、発現制御エレメントに連結した G F A T 1 L のアンチセンス・オリゴヌクレオチドのコピーを含み、かつ目的の細胞内で当該アンチセンス・オリゴヌクレオチド産物を発現できるウイルスベクターまたはプラスミドベクターを挙げることができる。かかるベクターとして、通常前述する発現用ベクターを利用することもできるが、好適には、例えば起源ベクターとして、米国特許第 5 2 5 2 4 7 9 号明細書および P C T 国際公開 W O 9 3 / 0 7 2 8 2 号明細書に開示されたベクター ( p W P - 7 A 、 p w P - 1 9 、 p W U - 1 、 p W P - 8 A 、 p W P - 2 1 および / または p R S V L など ) または p R C / C M V ( Invitrogen 社製 ) などを用いて、調製されたベクターを挙げることができる。より好ましくは、後述する各種ウイルス・ベクターである。 40

#### 【 0 1 3 3 】

なお、遺伝子導入治療において用いられるベクターに使用されるプロモーターとしては、 50

各種疾患の治療対象となる患部組織に固有のものを好適に利用することができる。

**【0134】**

その具体例としては、例えば、骨格筋に対しては、骨格筋アクチン、ミオシン重鎖、クレアチンキナーゼなどを例示できる。心臓に対しては、心房性ナトリウム利尿ホルモン、Ventricle-specific myosine軽鎖、Atrial- and ventricular-specific -myosine重鎖などを例示できる。また、肝臓に対しては、アルブミン、-フェトプロテイン、1-アンチトリプシン、トランスフェリン、トランススチレンなどを例示できる。結腸に対しては、カルボン酸アンヒドライゼ I、カルシノエンプロゲンの抗原などを例示できる。子宮および胎盤に対しては、エストロゲン、アロマターゼサイトクローム P 450、コレステロール側鎖切断 P 450、17アルファーヒドロキシラーゼ P 450などを例示できる。

10

**【0135】**

前立腺に対しては、前立腺抗原、gp91-フォックス遺伝子、前立腺特異的カリクレインなどを例示できる。乳房に対しては、erb-B2、erb-B3、-カゼイン、-ラクトグロビン、乳漿蛋白質などを例示できる。肺に対しては、活性剤蛋白質 C ウログロブリンなどを例示できる。皮膚に対しては、K-14-ケラチン、ヒトケラチン 1 または 6、ロイクリンなどを例示できる。

**【0136】**

脳に対しては、神経膠纖維質酸性蛋白質、成熟アストロサイト特異蛋白質、ミエリン塩基性蛋白質、チロシンヒドロキシラーゼなどを例示できる。膵臓に対しては、ヴィリン、グルカゴン、ラングルハンス島アミロイドポリペプチド、アミラーゼ、PAP1などを例示できる。甲状腺に対しては、チログロブリン、カルシトニンなどを例示できる。骨に対しては、1コラーゲン、オステオカルシン、骨シアログリコプロテインなどを例示できる。腎臓に対してはレニン、肝臓 / 骨 / 腎臓アルカリ性ホスフォターゼ、エリスロポエチンなどを例示できる。

20

**【0137】**

なおアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターの製造において、導入されるアンチセンス・オリゴヌクレオチド (G F A T 1 L 遺伝子配列) に対応する相補配列全部または一部) は、本発明の G F A T 1 L 遺伝子の塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。

**【0138】**

30

かかるアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入などを始めとする、細胞にDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従って行うことができる。なお、G F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドで形質転換された細胞は、それ自体単離状態で G F A T 活性または血糖の上昇を抑制するための医薬や、治療研究のためのモデル系として利用することも可能である。

**【0139】**

遺伝子治療においては、上記のアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターは、患者の対象とする組織部位に局所的にまたは全身的に注射投与することにより患者の標的細胞内に導入することができる。この際全身的投与によれば、他の部位に G F A T m R N A が発現し得るいずれの細胞にも到達させることができる。形質導入された遺伝子が各標的細胞の染色体内に恒久的に取り込まれない場合には、該投与を定期的に繰り返せばよい。

40

**【0140】**

本発明の遺伝子治療方法は、前述するアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用の材料 (アンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクター) を直接体内に投与するインビボ (in vivo) 法と、患者の体内より一旦標的とする細胞を取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞を体内に戻すエクスピボ (ex vivo) 法の両方の方法を包含する。

**【0141】**

また G F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを直接細胞内に導入し、R N A 鎮を切断する活性分子であるリボザイムによる遺伝子治療も可能である。

50

**【 0 1 4 2 】**

後述する、本発明 G F A T 1 L 遺伝子に対応する配列のアンチセンス・オリゴヌクレオチド全部もしくはその断片を含有する遺伝子導入用ベクターおよび該ベクターによりヒト G F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入された細胞を有効成分とする本発明の遺伝子治療剤は、特に糖尿病をその利用対象とするものであるが、上記の遺伝子治療（処置）は、糖尿病以外にも糖尿病性神経症、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症のような糖尿病合併症の治療、並びに遺伝子標識をも目的として行うことができる。

**【 0 1 4 3 】**

また、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入する標的細胞は、遺伝子治療（処置）の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、G F A T 発現が認められる細胞、特に骨格筋、心臓組織以外に、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞などを挙げることができる。10

**【 0 1 4 4 】**

上記遺伝子治療におけるアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入方法には、ウイルス的導入方法および非ウイルス的導入方法が含まれる。

**【 0 1 4 5 】**

ウイルス的導入方法としては、例えば、G F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドが正常細胞に発現する外来の物質であることに鑑みて、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる方法を挙げることができる。その他のウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、H I V (human immunodeficiency virus) ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V, adeno-associated virus) 、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス (H S V) ベクター、エプスタイン - バーウイルス (E B V, Epstein-Barr virus) ベクターなどがあげられる。20

**【 0 1 4 6 】**

非ウイルス的な遺伝子導入方法としては、リン酸カルシウム共沈法；D N A を封入したリポソームと予め紫外線で遺伝子を破壊した不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リポソームを作成し、細胞膜と直接融合させてD N A を細胞内に導入する膜融合リポソーム法 [Kato,K., et al., J. Biol. Chem., 266, 22071-22074 (1991)] ；プラスミドD N A を金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にD N A を導入する方法 [Yang,N.S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 87, 9568-9572 (1990)] ；プラスミドD N A を直接インビボで臓器や標的組織に注入するネイキッド (naked) D N A 法 [Wolff,J.A., et al., Science, 247, 1465-1467 (1990)] ；多重膜正電荷リポソームに包埋した遺伝子を細胞に導入するカチオニック・リポソーム法 [八木国夫, 医学のあゆみ, Vol.175, No.9, 635-637 (1995)] ；特定細胞のみに遺伝子を導入し、他の細胞に入らないようにするために、目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドをD N A と結合させてそれを投与するリガンド - D N A 複合体法 [Frindeis, et al., Trends Biotechnol., 11, 202 (1993); Miller, et al., FASEB J., 9, 190 (1995)] などを使用することができる。30

**【 0 1 4 7 】**

上記リガンド - D N A 複合体法には、例えば肝細胞が発現するアシアロ糖蛋白レセプターをターゲットとしてアシアロ糖蛋白をリガンドとして用いる方法 [Wu, et al., J.Biol.Chem., 266, 14338 (1991); Ferkol, et al., FASEB J., 7, 1081-1091 (1993)] 、標的細胞が強く発現しているトランスフェリン・レセプターを標的としてトランスフェリンをリガンドとして用いる方法 [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 87, 3410 (1990)] などが含まれる。40

**【 0 1 4 8 】**

また本発明で用いられる遺伝子導入法は、上記の如き各種の生物学的および物理学的な遺伝子導入法を適宜組合せたものであってもよい。該組合せによる方法としては、例えばあるサイズのプラスミドD N A をアデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン抱合抗体と組合わせる方法を例示できる。該方法によれば、得られる複合体がアデノウイルスベクターに結合し、かくして得られる三分子複合体を細胞に感染させることにより本發50

明アンチセンス・オリゴヌクレオチドの導入を行い得る。この方法では、アデノアイルスベクターにカップリングしたDNAが損傷される前に、効率的な結合、内在化およびエンドソーム分解が可能となる。また、前記リポソーム/DNA複合体は、直接インビボにて遺伝子導入を媒介できる。

#### 【0149】

以下、具体的な本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ウイルスベクターの作成法並びに標的細胞または標的組織へのアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入法について述べる。

#### 【0150】

レトロウイルスベクター・システムは、ウイルスベクターとヘルパー細胞（パッケージング細胞）からなっている。ここでヘルパー細胞は、レトロウイルスの構造蛋白質gag（ウイルス粒子内の構造蛋白質）、pol（逆転写酵素）、env（外被蛋白質）などの遺伝子を予め発現しているが、ウイルス粒子を生成していない細胞を言う。一方、ウイルスベクターは、パッケージングシグナルやLTR(long terminal repeats)を有しているが、ウイルス複製に必要なgag、pol、envなどの構造遺伝子を持っていない。パッケージング・シグナルはウイルス粒子のアセンブリーの際にタグとなる配列で、選択遺伝子(neo, hyg)とクローニングサイトに組込まれた所望の導入アンチセンス・オリゴヌクレオチド(GFAT1L)に対応する全アンチセンス・オリゴヌクレオチドまたはその断片)がウイルス遺伝子の代りに挿入される。ここで高力価のウイルス粒子を得るにはインサートを可能な限り短くし、パッケージングシグナルをgag遺伝子の一部を含め広くとることと、gag遺伝子のATGを残さぬようにすることが重要である。10

#### 【0151】

所望のGFAT1L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを組込んだベクターDNAをヘルパー細胞に移入することによって、ヘルパー細胞が作っているウイルス構造蛋白質によりベクターゲノムRNAがパッケージされてウイルス粒子が形成され、分泌される。組換えウイルスとしてのウイルス粒子は、標的細胞に感染した後、ウイルスゲノムRNAから逆転写されたDNAが細胞核に組み込まれ、ベクター内に挿入されたアンチセンス遺伝子が発現する。20

#### 【0152】

尚、遺伝子の導入効率を上げる方法として、フイプロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合部位と接合セグメントとを含む断片を用いる方法〔Hanenberg,H., et al., Exp. Hemat., 23, 747 (1995)〕を採用することもできる。30

#### 【0153】

上記レトロウイルスベクター・システムにおいて用いられるベクターとしては、例えばマウスの白血病ウイルスを起源とするレトロウイルス〔McLachlin, J.R., et al., Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol., 38, 91-135 (1990)〕を例示することができる。

#### 【0154】

アデノウイルスベクターを利用する方法につき詳述すれば、該アデノウイルスベクターの作成は、バークネル〔Berkner,K.L., Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992)〕、瀬戸口康弘ら〔Setoguchi,Y., et al., Blood, 84, 2946-2953 (1994)〕、鐘力江裕美ら〔実験医学, 12, 28-34 (1994)〕およびケナーら〔Ketner,G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91, 6186-6190 (1994)〕の方法に準じて行うことができる。40

#### 【0155】

例えば、非増殖性アデノウイルスベクターを作成するには、まずアデノウイルスの初期遺伝子のE1およびE3遺伝子領域を除去する。次に、目的とする所望の外来遺伝子発現単位（目的とする導入用アンチセンス・オリゴヌクレオチド、即ち本発明GFAT1L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドそのアンチセンス・オリゴヌクレオチドを転写するためのプロモーター、転写された遺伝子の安定性を賦与するポリAから構成）およびアデノウイルスゲノムDNAの一部を含むプラスミドベクターと、アデノウイルスゲノムを含むプラスミドとを、例えば293細胞に同時にトランスフェクションする。こ50

の2者間で相同性組換えを起こさせて、遺伝子発現単位とE1とを置換することにより、所望のGFA1L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを包含するベクターである非増殖性アデノウイルスベクターを作成することができる。また、コスミドベクターにアデノウイルスゲノムDNAを組み込んで、末端蛋白質を付加した3'側アデノウイルスベクターを作成することもできる。更に組換えアデノウイルスベクターの作成には、YACベクターも利用可能である。

#### 【0156】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの製造につき概略すると、AAVはアデノウイルスの培養系に混入してくる小型のウイルスとして発見された。これには、ウイルス複製にヘルパーウイルスを必要とせず宿主細胞内で自律的に増殖するパルボウイルス属と、ヘルパーウイルスを必要とするディペンドウイルス属の存在が確認されている。該AAVは宿主域が広く、種々の細胞に感染するありふれたウイルスであり、ウイルスゲノムは大きさが4680塩基の線状一本鎖DNAからなり、その両端の145塩基がITR(inverted terminal repeat)と呼ばれる特徴的な配列を持って存在している。このITRの部分が複製開始点となり、プライマーの役割をなす。更にウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組込みにも、該ITRが必須となる。また、ウイルス蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が非構造蛋白質、即ち複製や転写をつかさどる調節蛋白質のRepをコードしている。

#### 【0157】

組換えAAVの作成は、AAVが染色体DNAに組み込まれる性質を利用して行うことができ、かくして所望の遺伝子導入用ベクターが作成できる。この方法は、より詳しくは、まず野生型AAVの5'と3'の両端のITRを残し、その間に所望の導入用アンチセンス・オリゴヌクレオチド(GFA1L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)を挿入したプラスミド(AAVベクタープラスミド)を作成する。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質は、別のヘルパープラスミドにより供給させる。この両者の間には共通の塩基配列が存在しないようにし、遺伝子組換えによる野生型ウイルスが出現しないようにする必要がある。その後、両者のプラスミドを例えば293細胞へのトランسفエクションにより導入し、さらにヘルパーウイルスとしてアデノウイルス(293細胞を用いる場合は非増殖型のものでもよい)を感染させると、非増殖性の所望の組換えAAVが産生される。続いて、この組換えAAVは核内に存在するので、細胞を凍結融解して回収し、混入するアデノウイルスを56℃加熱により失活させる。更に必要に応じて塩化セシウムを用いる超遠心法により組換えAAVを分離濃縮する。上記のようにして所望の遺伝子導入用の組換えAAVを得ることができる。

#### 【0158】

EBVベクターの製造は、例えば清水らの方法に準じて行うことができる〔清水則夫ら、細胞工学、14(3), 280-287(1995)〕。

#### 【0159】

本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用EBVベクターの製造につき概略すると、EBウイルス(Epstein-Barr virus: EBV)は、1964年にエプスタイン(Epstein)らによりバーキット(Burkitt)リンパ腫由来の培養細胞より分離されたヘルペス科に属するウイルスである〔Kieff, E. and Liebowitz, D.: Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, pp.1889-1920〕。該EBVには細胞をトランスフォームする活性があるので、遺伝子導入用ベクターとするためには、このトランスフォーム活性を欠いたウイルスを調製しなければならない。これは次の如くして実施できる。

#### 【0160】

即ち、まず、所望の外来遺伝子を組み込む標的DNA近傍のEBVゲノムをクローニングする。そこに外来遺伝子のDNA断片と薬剤耐性遺伝子を組込み、組換えウイルス作製用ベクターとする。次いで適当な制限酵素により切り出された組換えウイルス作製用ベクターをEBV陽性Akata細胞にトランスフェクトする。相同組換えにより生じた組換えウイルスは抗表面免疫グロブリン処理によるウイルス産生刺激により野生型AkataE

10

20

30

40

50

B Vとともに回収できる。これを E B V 陰性 A k a t a 細胞に感染し、薬剤存在下で耐性株を選択することにより、野生型 E B V が共存しない所望の組換えウイルスのみが感染した A k a t a 細胞を得ることができる。さらに組換えウイルス感染 A k a t a 細胞にウイルス活性を誘導することにより、目的とする大量の組換えウイルスベクターを産生することができる。

#### 【 0 1 6 1 】

組換えウイルスベクターを用いることなく所望のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に導入する、非ウイルスベクターの製造は、例えば膜融合リポソームによる遺伝子導入法により実施することができる。これは膜リポソーム（脂質二重膜からなる小胞）に細胞膜への融合活性をもたせることにより、リポソームの内容物を直接細胞内に導入する方法である。10

#### 【 0 1 6 2 】

上記膜融合リポソームによるアンチセンス・オリゴヌクレオチドの導入は、例えば中西らの方法によって行うことができる〔 Nakanishi,M.,et al., Exp. Cell Res., 159, 399-499 (1985); Nakanishi,M., et al., Gene introduction into animal tissues. In Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery (ed. by Lee, V.H. et al.), Harwood Academic Publishers GmbH. Amsterdam, 1995, pp.337-349 〕。

#### 【 0 1 6 3 】

以下、該膜融合リポソームによるアンチセンス・オリゴヌクレオチドの導入法につき概略する。即ち、紫外線で遺伝子を不活性化したセンダイウイルスと所望のアンチセンス・オリゴヌクレオチドや発現蛋白質などの高分子物質を封入したリポソームを 37 度で融合させる。この膜融合リポソームは、内側にリポソーム由来の空洞を、外側にウイルス・エンベロープと同じスパイクがある疑似またイルスともよばれる構造を有している。更にショ糖密度勾配遠心法で精製後、標的とする培養細胞または組織細胞に対して膜融合リポソームを 4 度で吸着させる。次いで 37 度にするとリポソームの内容物が細胞に導入され、所望のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に導入できる。ここでリポソームとして用いられる脂質としては、50% (モル比) コレステロールとレシチンおよび陰電荷をもつ合成リン脂質で、直径 300 nm の 1 枚膜リポソームを作製して使用するのが好ましい。20

#### 【 0 1 6 4 】

また、別のリポソームを用いてアンチセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に導入する方法としては、カチオニック・リポソームによるアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入法を挙げることができる。該方法は、八木らの方法に準じて実施できる〔 Yagi,K., et al., B.B.R.C., 196, 1042-1048 (1993) 〕。この方法は、プラスミドも細胞も負に荷電していることに着目して、リポソーム膜の内外両面に正の電荷を与え、静電気によりプラスミドの取り込みを増加させ、細胞との相互作用を高めようとするものである。ここで用いられるリポソームは正荷電を有する多重膜の大きなリポソーム (multilamellar large vesicles: M L V ) が有用であるが、大きな 1 枚膜リポソーム (large unilamellar vesicles: L U V ) や小さな 1 枚膜リポソーム (small unilamellar vesicles: S U V ) を使用してプラスミドとの複合体を作製し、所望のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入することも可能である。30

#### 【 0 1 6 5 】

プラスミト包埋カチオニック M L V の調製法について概略すると、これはまず脂質 T M A G (N-(*-*trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride)、D L P C (di lauroyl phosphatidylcholine) および D O P E (dioleoyl phosphatidylethanolamine) をモル比が 1 : 2 : 2 となる割合で含むクロロホルム溶液（脂質濃度として 1mM）を調製する。次いで総量 1 μmol の脂質をスピット型試験管に入れ、ロータリーエバボレーターでクロロホルムを減圧除去して脂質薄膜を調製する。更に減圧下にクロロホルムを完全に除去し、乾燥させる。次いで 20 μg の遺伝子導入用プラスミドを含む 0.5ml のダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液 - M g , C a 含有を添加し、窒素ガス置換後、2 分間ボルテックスミ40

キサーにより攪拌して、所望のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを含有するプラスミド包埋カチオニックM L V懸濁液を得ることができる。

#### 【0166】

上記で得られたプラスミド包埋カチオニックM L Vを遺伝子治療剤として使用する一例としては、例えば発現目的アンチセンス・オリゴヌクレオチドを組み込んだ発現プラスミドを上記カチオニックM L VにDNA量として0.6μg、リポソーム脂質量として30nmolになるように包埋し、これを2μlのリン酸緩衝生理食塩液に懸濁させて患者より抽出した標的細胞または患者組織に対して隔日投与する方法が例示できる。

#### 【0167】

ところで、遺伝子治療とは「疾病の治療を目的として、遺伝子または遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与すること」と厚生省ガイドラインに定義されている。しかしながら、本発明における遺伝子治療とは、該ガイドラインの定義に加えて、前記した標的細胞にG F A T 1 L遺伝子の、G F A T 発現抑制アンチセンスDNAとして特徴付けられるアンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入することによって糖尿病を始めとする糖尿病合併症の治療のみならず、更に標識となる遺伝子または標識となる遺伝子を導入した細胞をヒト体内に導入することも含むものとする。

#### 【0168】

本発明の遺伝子治療において、所望遺伝子の標的細胞または標的組織への導入方法には、代表的には2種類の方法が含まれる。

#### 【0169】

その第1法は、目的とするアンチセンス・オリゴヌクレオチド(G F A T 1 L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)を導入された、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを患者の標的細胞または標的組織に直接感染させる遺伝子導入法である。

#### 【0170】

上記第1法の別法として、目的アンチセンス・オリゴヌクレオチド(G F A T 1 L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)を含有するウイルスベクターを感染、あるいはウイルスベクターを含有するウイルス産生細胞と共に培養し、患者由来の細胞に目的アンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入し、患者体内に移植するex vivo法も採用することができる。

#### 【0171】

第2法は、目的とする適当な動物細胞発現ベクタープラスミドDNAに組み込まれたアンチセンス・オリゴヌクレオチド(G F A T 1 L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)を直接患者の体内や、骨格筋などの標的部位に注入する遺伝子直接導入法(直接法)である。これは例えばH V Jリポソーム法、カチオニックリポソーム法、DNA直接注射法、電気穿孔法、遺伝子銃法等により実施できる。

#### 【0172】

上記実施においては、特に体外における予備試験によって、遺伝子導入法によって、実際に目的アンチセンス・オリゴヌクレオチド(G F A T 1 L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)が導入されるか否かを、予めベクター遺伝子cDNAのPCR法による検索やin situ PCR法によって確認するか、あるいは目的アンチセンス・オリゴヌクレオチド(G F A T 1 L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)の導入に基づく所望の治療効果である特異的活性の上昇または低下や、標的細胞への効果を確認することが望ましい。また、ウイルスベクターを用いる場合には、増殖性ウイルスの検索をPCR法で行うなどして、遺伝子治療に際し、これらのアンチセンス・オリゴヌクレオチド等の導入による安全性を確認することが重要であることはいうまでもない。

#### 【0173】

本発明はまた、本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターまたは目的アンチセンス・オリゴヌクレオチド(G F A T 1 L遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチド)が導入された細胞を活性成分とし、それを薬学的有効量、適当な無毒性医薬担体ないしは希釈剤と共に含有する医薬組成物または医薬製剤(遺伝子治療剤)を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0174】

本発明の医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤ないし賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

## 【0175】

本発明医薬製剤の投与単位形態としては、前記した G F A T 1 L 蛋白質抗体製剤の製剤例を同様に挙げることができ、治療目的に応じて各種の形態から適宜選択することができる。

## 【0176】

例えば、本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターを含む医薬製剤は、該ベクターをリポソームに包埋された形態あるいは所望のアンチセンス・オリゴヌクレオチドが包含されるウイルスベクターを含むウイルスによって感染された培養細胞の形態に調製される。

## 【0177】

これらは、リン酸緩衝生理食塩液（pH 7.4）、リングル液、細胞内組成液用注射剤中に配合した形態などに調製することもでき、またプロタミンなどの遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調製することもできる。

## 【0178】

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。

## 【0179】

上記医薬製剤中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。

## 【0180】

該製剤は1日に1回または数回に分けて投与することもでき、1から数週間間隔で間欠的に投与することもできる。尚、好ましくは、プロタミンなど遺伝子導入効率を高める物質またはこれを含む製剤と併用投与することができる。

## 【0181】

本発明に従う遺伝子治療を糖尿病の治療に適用する場合は、前記した種々の遺伝子治療を適宜組合せて行う（結合遺伝子治療）こともでき、前記した遺伝子治療に、従来のインスリン療法、食事療法、などを組合せて行うこともできる。さらに本発明遺伝子治療は、その安全性を含めて、N I Hのガイドラインを参考にして実施することができる〔Recombinant DNA Advisory Committee, Human Gene Therapy, 4, 365-389 (1993)〕。

## 【0182】

本発明によれば、細胞の G F A T 活性を促す G F A T 1 L 遺伝子の存在を検出するために、血液または血清のごとき生物学的試料を調製し、所望により核酸を抽出し、G F A T 1 L の感受性遺伝子が存在する否かについて分析することが可能である。また、本発明によれば細胞または組織における G F A T 活性レベル、G F A T m R N A の発現レベル、ヘキソサミン生合成経路調節機能障害への進行、または予後指標としての存在を検出するためには、ヘキソサミン生合成経路調節障害を有する生物学的な試料を調製し、G F A T 1 L 遺伝子が存在するか否か、あるいはその m R N A の量について分析できる。この方法を用いることにより細胞または組織における G F A T 活性のレベル、G F A T m R N A の発現レベル、ヘキソサミン生合成経路の調節機能障害への進行、または予後指標としての存在を検出することが可能となり、これらの診断、例えば糖尿病の診断並びに糖尿病治療効果の判定並びに予後の予測が可能となる。

## 【0183】

該検出方法は、例えは、予め G F A T 活性を有する患者サンプルから得られた G F A T 1 L 遺伝子に関する情報を基に、該 D N A 断片を作成し、G F A T 1 L 遺伝子のスクリーニ

10

20

30

40

50

ングおよび／またはその増幅に用いられるように設計される。より具体的には、例えばブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンプロット法、ノーザンプロット法などにおけるプローブとしての性質を有するもの、核酸配列をポリメラーゼで増幅するポリメラーゼ連鎖反応（P C R）により、増幅したG F A T 1 Lの全部または一部のD N A断片を得ることができるためにプローブとしての性質を有するものを作成できる。そのためにはまずG F A T 1 Lと同じ配列を持つプライマーを作成し、スクリーニング用プローブとして用い、生物学的試料（核酸試料）と反応させることにより、当該G F A T 1 L配列を有する遺伝子の存在を確認することができる。該核酸試料は、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットプロッティングで調製してもよい。

10

#### 【0184】

前記スクリーニング方法としては、特にP C R法を用いるのが感度の点から好ましく、該方法は、G F A T 1 L断片をプライマーとして用いる方法であれば特に制限されず、従来公知の方法(Science, 230, 1350-1354(1985))や新たに開発された、或いは将来使用されるP C R変法(袖 佳之、ほか編、羊土社、実験医学、増刊, 8(9)(1990); 蛋白質・核酸・酵素、臨時増刊、共立出版(株), 35(17)(1990))のいずれも利用することが可能である。

#### 【0185】

プライマーとして使用されるD N A断片は、化学合成したオリゴD N Aであり、これらオリゴD N Aの合成は自動D N A合成装置など、例えばD N A合成装置(PharmaciaLKB Gene Assembler Plus: ファルマシア社製)を使用して合成することができる。合成されるプライマー(センスプライマーまたはアンチセンスプライマー)の長さは約10～50ヌクレオチド程度が好ましく、より好ましくは15～30ヌクレオチド程度が例示できる。前記において、特に合成されるプライマーは、公知の他のG F A TのD N A配列と区別される配列を使用することが好ましい。上記スクリーニングに用いられるプローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよく、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合によって検出してもよい。適当な標識、並びにプローブおよびリガンドを標識する方法は、本発明の技術分野で知られており、ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングムまたはキナーゼ処理のような、既知の方法によって取り込ませることができる放射性標識、ビオチン、蛍光性基、化学発光基、酵素、抗体などがこれらの技術に包含される。

20

#### 【0186】

検出のために用いるP C R法としては、例えばR T - P C R法が例示されるが、当該分野で用いられる種々の変法を適応することができる。

#### 【0187】

また、本発明の測定方法は、試料中のG F A T 1 L遺伝子の検出のための試薬キットを利用することによって、簡便に実施することができる。

#### 【0188】

故に本発明は上記G F A T 1 L D N A断片を含有することを特徴とするG F A T 1 Lの検出用試薬キットが提供される。

30

#### 【0189】

該試薬キットは、少なくとも配列番号：2に示される塩基配列もしくはその相補的塩基配列の一部または全てにハイブリダイズするD N A断片を必須構成成分として含んでいればよく、他の成分として、標識剤、P C R法に必須な試薬（例えば、T a q D N Aポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、プライマーなど）が含まれていてもよい。

40

#### 【0190】

標識剤としては、放射性同位元素または蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられ、D N A断片自身が予め該標識剤でコンジュゲートされていてもよい。更に当該試薬キットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。

#### 【0191】

50

更に本発明は、前記測定方法を用いる糖代謝障害、特にヘキソサミン生合成障害の診断方法および該方法に用いる診断剤並びに診断用キットをも提供するものである。

#### 【0192】

また、前記方法を用いることにより、被検試料中から得られたG F A T 1 L配列を直接的若しくは間接的に配列決定することにより、野生型G F A T 1 Lと相同性の高い相同物である新たなG F A T 1 L遺伝子に関連する関連遺伝子を見出すことができる。

#### 【0193】

従って、本発明はかかる測定と被検試料中のG F A T 1 L DNAの配列決定により、被検試料中のヒトG F A T 1 L遺伝子に関連する関連遺伝子のスクリーニング方法をも提供するものである。

10

#### 【0194】

また、本発明の配列番号：1で示されるヒトG F A T 1 L遺伝子でコードされるポリペプチド、または該配列番号：1において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または附加されたアミノ酸配列、またはこれらの断片からポリペプチドを合成し、もしくは該ポリペプチドに対する抗体を合成することによって、野生型G F A T 1 Lおよび／または変異G F A T 1 Lの測定が可能となる。

#### 【0195】

従って、本発明は、野生型G F A T 1 Lおよび／または変異G F A T 1 Lの抗体測定法、抗原測定法を提供するものである。該測定法によってG F A T活性の程度、血糖調節障害の程度、ヘキソサミン生合成経路の機能障害の程度あるいは糖尿病の重症度、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症などの糖尿病合併症の程度を野生型G F A T 1 Lポリペプチドの変化に基づいて検出することも可能である。かかる変化は、この分野における前記慣用技術によるG F A T 1 L配列分析によつても決定できるが、更に好ましくは、抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル抗体)を用いて、G F A T 1 Lポリペプチド中の相違、またはG F A T 1 Lポリペプチドの有無を検出することができる。本発明の測定法の具体的な例示としては、G F A T 1 L抗体は、血液・血清などのヒトより採取した生体材料試料含有溶液からG F A T 1 L蛋白質を免疫沈降し、かつポリアクリルアミドゲルのウェスタン・プロットまたはイムノプロット上でG F A T 1 Lポリペプチドと反応することができる。また、G F A T 1 L抗体は免疫組織化学的技術を用いてパラフィンまたは凍結組織切片中のG F A T 1 Lポリペプチドを検出することができる。抗体産生技術および精製する技術は当該分野においてよく知られているので、これらの技術を選択することができる。

20

#### 【0196】

野生型G F A T 1 Lまたはその突然変異体を検出する方法に関連するより好ましい具体例には、モノクローナル抗体および／または、ポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素結合イムノソルベントアッセイ(E L I S A)、放射線免疫検定法(R I A)、免疫放射線検定法(I R M A)、および免疫酵素法(I E M A)が含まれる。

30

#### 【0197】

また、本発明のG F A T活性を阻害する薬剤の候補化合物をスクリーニングする方法において、例えば、G F A T 1 L遺伝子発現産物またはG F A T 1 L蛋白質(以下、G F A T 1 L蛋白質と併せて称する)またはそれらの断片に対する抗体と、候補化合物を含む被検液および標識化されたG F A T 1 L蛋白質またはG F A T 1 L蛋白質の部分ペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたG F A T 1 L蛋白質またはG F A T 1 L蛋白質の部分ペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中のG F A T 1 L蛋白質またはG F A T 1 L蛋白質の部分ペプチドを定量するスクリーニング方法も可能である。

40

#### 【0198】

また候補化合物を含む被検液と担体上に不溶化した前記抗体および標識化された別の異なるG F A T 1 L蛋白質に対する抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG F A T 1 L蛋白質またはG

50

FAT1L蛋白質の部分ペプチドの定量法も可能である。

【0199】

さらに、GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドに基質を接触させた場合とGFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドに基質および試験化合物を接触させた場合における、GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドの酵素活性を測定して、比較することによってGFACT1L蛋白質の酵素活性（例、GFACT活性）を阻害する化合物をスクリーニングすることも可能である。

【0200】

上記において、基質としては、本発明GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドの基質となり得るものであれば何れのものでもよく、通常、フルクトース-6-リン酸およびグルタミンが用いられる。フルクトース-6-リン酸としては、放射線標識（例、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>Hなど）したフルクトース-6-リン酸などを用いるのが好適である。試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0201】

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドを、スクリーニングに適した緩衝液に懸濁させてこれらの標品を調製する。緩衝液は、pH約4～10（望ましくはpH約6～8）のリン酸バッファー、トリス・塩酸バッファーなどの、本発明GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドと基質との結合を阻害しないものであればいずれでもよい。

【0202】

本発明GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドのGFACT活性は、公知の方法、例えばマーシャルらの方法（Journal of Biological Chemistry, vol. 266, No. 8, 4706-4712, (1991)）に準じて測定することができる。

【0203】

該方法は、例えば96穴のマイクロプレート上に200μlの基質溶液(400mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、50 mM 塩化カリウム、1.25 mM EDTA、0.3 mM APAD、6 U/ml (GDH)、0.6 mM グルタミン、0.6 mM フルクトース-6-リン酸 (F-6-P))に適宜希釈したGFACT1Lの大腸菌溶解質50μlを加え、37℃で60分間反応させ、この時の365nmの吸光度の変化をマイクロプレートリーダーにより測定することにより実施することができる。上記GFACT活性の測定は、GFACTにより生成されたグルタメート(Glutamate)をさらにグルタメート脱水素酵素(Glutamate dehydrogenase:GDH)と反応させ、その際同時に惹起される補酵素であるAPADがAPADHに還元される反応に伴われる吸光度の変化をGFACT活性として表わす方法である。

【0204】

また、別方法としては、例えばスミスらの方法〔Analytical Biochemistry〕, 98, 478-480 (1979)〕を挙げることができる。該方法は例えば次の如くして実施される。即ち、まず12μM フルクトース-6-リン酸、5μM グルタミンおよび0.2M リン酸バッファー(pH 8.0)からなる混合液に本発明GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部分ペプチドを添加し、得られる溶液を25℃で30分間保温する。同溶液に0.5M 塩酸を加え、98℃で2時間反応させた後、2.5% NaNO<sub>2</sub>と12.5% NH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S NH<sub>2</sub>を添加し、さらに0.25% 2-メチル-2-ベンゾチアゾロンを添加する。次に、0.5% FeCl<sub>3</sub>を加えて、その溶液を650nmで吸光度を測定し、生成されるグルコサミン-6-リン酸を定量する。

【0205】

上記各方法において、医薬候補化合物の選択方法は、例えば各試験において上記試験化合物が添加されていない場合におけるGFACT活性が上記試験化合物が添加されている場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上阻害されている場合、該試験化合物を本発明GFACT1L蛋白質またはGFACT1L蛋白質の部

10

20

30

40

50

分ペプチドのG F A T 活性を阻害する化合物として選択することができる。

【0206】

また本発明によれば、上記G F A T 活性を阻害する薬剤の候補化合物をスクリーニングするためのスクリーニング用キットが提供できる。

【0207】

本発明のスクリーニング用キットは、構成要素の一つとして、本発明のG F A T 1 L 蛋白質またはG F A T 1 L 蛋白質の部分ペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの具体例を以下に例示する。

1. スクリーニング用キットI

〔スクリーニング用試薬〕

10

1) G F A T 1 L 標品 : 50 μl 本発明のG F A T 1 L 大腸菌溶解質(G F A T 1 L 蛋白質の部分ペプチド)

2) 補酵素入測定用緩衝液 : 400 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)、50 mM 塩化カリウム、1.25 mM EDTA、0.3 mM APAD、6 U / ml (GDH)

3) 基質: 0 - 6 mM フルクトース - 6 - リン酸、0 - 6 mM グルタミン

検出は、365 nm での吸光度を測定する。

〔測定法〕 96 穴のマイクロプレート上に 200 μl の基質溶液(400 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、50 mM 塩化カリウム、1.25 mM EDTA、0.3 mM APAD、6 U/ml (GDH)、0 - 6 mM グルタミン、0 - 6 mM フルクトース - 6 - リン酸 (F-6-P))に適宜希釈したG F A T 1 L の大腸菌溶解質 50 μl を加え、37 で 60 分間反応させる。この時の 365 nm の吸光度の変化をマイクロプレートリーダーにより測定する。

2. スクリーニング用キットII

〔スクリーニング用試薬〕

1) 蛋白質標品 : 本発明のG F A T 1 L 蛋白質(G F A T 1 L 蛋白質の部分ペプチド)またはその塩

2) 測定用緩衝液 : 0.2 M リン酸バッファー (pH 8.0)

3) 基質: 12 μM フルクトース - 6 - リン酸、5 μM グルタミン

検出は、650 nm での吸光度を測定する。

〔測定法〕 12 μM フルクトース - 6 - リン酸、5 μM グルタミン、本発明のタンパク質またはその塩および0.2 M リン酸バッファー (pH 8.0) からなる反応液に試験化合物を添加した後、25 で 30 分間保温する。これに 0.5 M 塩酸を加え、98 で 2 時間加水分解する。2.5% NaNO<sub>2</sub> と 12.5% NH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S NH<sub>2</sub> を添加し、次いで 0.25% 2 - メチル - 2 - ベンゾチアゾロンを添加する。次に、0.5% FeCl<sub>3</sub> を添加した後、650 nm で吸光度を測定する。

【0208】

また本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物(例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液など)から選ばれた化合物であり、本発明のG F A T 1 L 蛋白質(G F A T 1 L 蛋白質の部分ペプチド)の酵素活性(例、G F A T 活性)を阻害する化合物である。該化合物は、新規化合物であってもよいし、公知化合物であってもよい。また、低血糖改善用候補化合物としては、本発明のG F A T 1 L 蛋白質(G F A T 1 L 蛋白質の部分ペプチド)の酵素活性(例、G F A T 活性)を促進する化合物である。

【0209】

該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属)などとの塩が例示でき、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが挙げられる。

40

50

**【 0 2 1 0 】**

本発明の G F A T 1 L 蛋白質( G F A T 1 L 蛋白質の部分ペプチドを含む、以下同じ)の酵素活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、糖尿病および糖尿病合併症などの疾患に対する治療剤または予防剤としての医薬として有用である。

**【 0 2 1 1 】**

本発明の G F A T 1 L 蛋白質の酵素活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、低血糖症及び低血糖による合併症などの疾患に対する治療剤または予防剤としての医薬として有用である。

**【 0 2 1 2 】**

また本発明によれば、より活性または安定した形態の G F A T 1 L 蛋白質の誘導体または  
10 例えば、イン・ビボ(*in vivo*)で G F A T 1 L 蛋白質の機能を高めるか、もしくは妨害する薬剤を開発するために、それらが相互作用する目的の生物学的に活性なポリペプチドまたは構造アナログ、例えば G F A T 1 L アゴニスト、G F A T 1 L アンタゴニスト、G F A T 1 L インヒビターなどを作製することが可能である。前記構造アナログは、例えば G F A T 1 L と他の蛋白質の複合体の三次元構造を X 線結晶学、コンピューター・モデリングまたはこれらの組み合わせた方法によって決定することができる。また、構造アナログの構造に関する情報は、相同性蛋白質の構造に基づく蛋白質のモデリングによって得ることも可能である。

**【 0 2 1 3 】**

また上記より活性または安定した形態の G F A T 1 L 蛋白質の誘導体を得る方法としては  
20 、例えばアラニン・スキャンによる分析方法が挙げられる。該方法はあるアミノ酸残基を Ala で置換し、ペプチドの活性に対するその影響を測定する方法でペプチドの各アミノ酸残基をこのように分析し、当該ペプチドの活性や安定性に重要な領域を決定する方法である。該方法によって、より活性な、または安定な G F A T 1 L 蛋白質の誘導体を設計することができる。

**【 0 2 1 4 】**

また機能性アッセイによって選択した標的 - 特異的抗体を単離し、次いでその結晶構造を解析することも可能である。原則として、このアプローチにより、続く薬剤の設計の基本となるファーマコア(pharmacore)を得る。機能性の薬理学的に活性な抗体に対する抗 - イディオタイプ抗体を生成させることによって、化学的または生物学的に生成したペプチドのバンクよりペプチドを同定したり単離したりすることが可能である。故に選択されたペプチドもファーマコアとして作用すると予測される。

**【 0 2 1 5 】**

かくして、改善された G F A T 1 L 活性もしくは安定性または G F A T 1 L 活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発することができる。

**【 0 2 1 6 】**

クローン化 G F A T 1 L 配列によって、十分な量の G F A T 1 L 蛋白質を入手して、X 線結晶学のような分析研究を行なうことができる。さらに、本発明の配列番号 : 1 に示されるアミノ酸配列よりなる G F A T 1 L 蛋白質の提供により、X 線結晶学に代えるかまたはこれに加えて、コンピューター・モデリング技術に適応可能である。

**【 0 2 1 7 】**

また本発明によれば、G F A T 1 L 遺伝子のノックアウト・マウスやノックイン・マウス(変異マウス)を作成することによって G F A T 1 L 遺伝子配列のどの部位が生体内で上記したような多様な G F A T 1 L 活性に影響を与えるかどうか、即ち G F A T 1 L 遺伝子産物、並びに改変 G F A T 1 L 遺伝子産物が生体内でどのような機能を有するかを確認することができる。

**【 0 2 1 8 】**

該方法は、遺伝子の相同組換えを利用して、生物の遺伝情報を意図的に修飾する技術であり、マウスの胚性幹細胞(E S 細胞)を用いた方法を例示できる(Capeccchi, M. R., Scie  
50

nce, 244, 1288-1292 (1989))。

【0219】

尚、上記変異マウスの作製方法はこの分野の当業者にとって既に通常の技術であり、この改变技術(野田哲生編、実験医学、増刊、14 (20) (1996)、羊土社)に、ヒト野性型G F A T 1 L 遺伝子および変異G F A T 1 L 遺伝子を適応して容易に変異マウスを作製し得る。従って前記技術の適応により、改善されたG F A T 1 L 活性もしくは安定性またはG F A T 1 L 活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発することができる。

【0220】

【発明の効果】 10

本発明によれば、ヒトG F A T と相同性を有する新規なヒト蛋白相同物をコードする遺伝子が提供される。

【0221】

本発明の遺伝子は糖代謝に重要な組織である骨格筋および心臓においてその発現が高く、これら組織およびその周辺組織におけるG F A T 活性または解糖系におけるヘキソサミン生合成経路を促進し、糖輸送担体の細胞膜への移行性を抑制すると考えられる。従って糖代謝における血糖調節に対して上昇的に作用することが考えられることから、本発明G F A T 1 L 遺伝子の発現量やG F A T 活性などの解析により、関連遺伝子の機能と糖代謝関連疾患との係わりについての研究に利用でき、特に低血糖または糖尿病患者への遺伝子診断並びに該遺伝子の発現産物に対する抗体やアンチセンスによる医薬用途への応用研究に用いることが可能である。 20

【0222】

また、本発明遺伝子の利用によれば、各種組織での該遺伝子の発現状況が調べられ、生体内におけるその機能を解析することが可能となる。

【0223】

また、該遺伝子によれば、該遺伝子がコードするG F A T 1 L 蛋白質を遺伝子工学的に大量に製造することができ、該蛋白質の提供によれば、G F A T 1 L 活性やG F A T 1 L 蛋白質の結合活性などの機能を調べることもできる。

【0224】

またG F A T 1 L 蛋白質は、G F A T 1 L 遺伝子およびその産物が関与する疾患(例えば、G F A T 活性または解糖系におけるヘキソサミン生合成経路の調節に関連する疾患または低血糖、血糖調節に関連する疾患など、特に低血糖症の治療、または糖尿病や糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症などの糖尿病性合併症)の病態解明や診断、治療などに有用である。 30

【0225】

本発明によれば、更にG F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子治療に有用な遺伝子導入用ベクター、該G F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドが導入された細胞および該ベクターまたは細胞を有効成分とする遺伝子治療剤、並びにその利用による遺伝子治療法などが提供される。

【0226】

本発明によれば、更に骨格筋、特に骨格筋の平滑細胞におけるG F A T m R N A の発現の抑制作用を有し、該作用による糖尿病および糖尿病合併症などの疾患および病態の処置などに使用されるG F A T 1 L 遺伝子のアンチセンス・オリゴヌクレオチドまたはG F A T 1 L に結合性を有する抗体またはその断片を有効成分とする医薬も提供することができる。 40

【0227】

また、本発明によれば、G F A T 1 L 蛋白質、G F A T 1 L 遺伝子発現産物の酵素活性を阻害する、糖尿病の治療のための候補化合物のスクリーニング方法およびスクリーニング用キットをも提供することができる。

【0228】

50

### 【実施例】

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

#### 【0229】

##### 【実施例1】

G F A T 1 L のクローニングと発現ベクターの構築

まず、マクナイトらの公知のヒト G F A T (G.L.McKnight et.al. J.Biol.Chem., 267, 25208-25212 (1992))の発現ベクターの構築のために、ヒト G F A T の c D N A 配列をもとに 4 つのプライマー P 1 ~ P 4 を合成した。之等の塩基配列は、それぞれ配列番号：3 ~ 6 に示すとおりである。

#### 【0230】

P 1 は、配列番号：2 の 34 - 66 番目のヌクレオチド配列に相当する。P 2 は、同配列番号：2 の 16 - 48 番目のヌクレオチド配列に相当する。P 3 は、同配列番号：2 の 1 - 30 番目のヌクレオチド配列に相当する。また P 4 は、同配列番号：2 の 2077 - 2097 番目のヌクレオチド配列に相当する。P 1 ~ P 3 は、それぞれフォワード・プライマーであり、大腸菌において発現効率をあげるために大腸菌のコドン利用度を考えて以下の部分に変異を与えたものである。

P 1 : 配列番号：3 の 6 , 9 , 12 , 13 , 15 , 18 番目のヌクレオチド

P 2 : 配列番号：4 の 7 , 9 , 18 , 24 , 27 , 30 , 31 , 33 番目のヌクレオチド

P 3 : 配列番号：5 の 22 , 32 , 34 番目のヌクレオチド

P 3 における配列番号：5 の 1 ~ 10 番目のヌクレオチド配列は、p E T ベクターに挿入する際に必要になる N d e I サイト (CATATG) を導入するために付加した配列である。

#### 【0231】

また、P 4 はリバース・プライマーであり、C 末アミノ酸の後に X h o I サイト (CTCGAG, 配列番号：6 の 1 ~ 11 番目のヌクレオチド配列参照) を含む配列である。該 X h o I サイトの直前には終止コドン (TAA) が挿入されるように設計された。

#### 【0232】

以下の方法で上記 4 つのプライマーを使って、N 末アミノ酸が大腸菌で合成しやすいコドンに置き換わったベクターが構築され得る。

#### 【0233】

ついで、クロントック社から購入したヒト骨格筋 m R N A をもとに、プライマー P 4 で逆転写酵素を用いて逆転写反応をおこなった。ヒト骨格筋 m R N A 2  $\mu$  g /  $\mu$  l を 100 で 5 分間で変性させた後、氷中にて急冷させた。最終的に 50 mM トリス塩酸 (pH8.3)、40 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、1 mM D T T 、0.1 mM のプライマー-4、0.1 mg B S A および 400 単位 / 2  $\mu$  l の M M L V 逆転写酵素 (ギブコBRL 社製) と脱イオン水 (D D W) を加えて 50  $\mu$  l とし、37 度 10 分間反応させた。

#### 【0234】

前記反応物 5  $\mu$  l を 100 度 5 分間で変性させた後、プライマー P 1 および P 4 にて P C R 反応を行った。P C R 反応は 5  $\mu$  l の逆転写反応物と 5  $\mu$  l の 10 × 緩衝液 (1.2 mM トリス塩酸 (pH8.0)、100 mM 塩化カリウム、60 mM 硫酸アンモニウム、1% トリトン X-100、0.1 mg / ml B S A) 、5  $\mu$  l の 2 mM d N T P s 混合物、0.4  $\mu$  M の各プライマー、1 mM の塩化マグネシウム、2.5 単位の K O D ダッシュ (dash) および D D W を加えて、総量 50  $\mu$  l とし、95、30 秒、65、2 秒、74、60 秒を 30 サイクル行い、さらに、74、5 分間反応させた。

#### 【0235】

前記で得られた 5  $\mu$  l の反応産物について同様の P C R 条件でプライマーを P 2 および P 4 に変えて P C R 反応を行なった。

#### 【0236】

さらに、その反応産物の 5  $\mu$  l について同様の P C R 条件でプライマー P 3 および P 4 にて P C R 反応を行った。

#### 【0237】

10

20

30

40

50

最終反応物は、pET23bベクター（ノバゲン：Novagen社製）にクローニングし、AB1377 DNAシークエンサー（PE-ABI社製）にてDNA配列を確認した。

【0238】

次いで最終反応物はフェノール／クロロホルム処理し、エタノール沈殿をおこない、TE緩衝液に溶かした後、制限酵素NdeIとXbaIにてDNAの両端を切断した。

【0239】

該DNA断片を制限酵素NdeIとXbaIで切断したpET23bベクターにライゲーションにより挿入した。

【0240】

かくして、塩基配列決定によって新規な配列の遺伝子を得、これを「GFACT1L遺伝子」10と命名した。

【0241】

得られた遺伝子は、そのコード領域の全長が配列番号：2で示される2097塩基からなり、該塩基配列によってコードされるアミノ酸配列は、配列番号：1に示される699アミノ酸配列からなっていた。これは該アミノ酸配列をコードするヒトcDNA（全長2097塩基）であった。

【0242】

本発明遺伝子GFACT1LがコードするGFACT1L蛋白質は、マクナイトらによってクローニングされたヒトGFACT遺伝子(McKnight, G.L., et al., J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992))の684番目と685番目の塩基の間に、54個の塩基が挿入された新規な遺伝子であることが確認された。従って、遺伝子配列でコードされる蛋白質のアミノ酸配列は、228番目と229番目の間に18個のアミノ酸配列が挿入された構造物であることが判明した。20

【0243】

以下に続く試験においては、本発明者らが単離した新規遺伝子を「GFACT1L遺伝子」と呼び、マクナイトらのヒトGFACT遺伝子を「GFACT1S遺伝子」と呼ぶ。

【0244】

【実施例2】

RT-PCR法により、各臓器でのGFACT1L遺伝子の発現パターンを、GFACT1S遺伝子のそれと対比して、検索した。30

【0245】

サンプルとしては、クローンテック社のクイッククローンcDNA (QUICK-Clone cDNA, 心臓、脳、肝臓、骨格筋、小腸、腎臓、臍臓、脂肪) を用いた。

【0246】

プライマーとしては、配列番号：7および8に示す塩基配列を合成して使用し、更にExTaq(宝酒造社)を使用した。

【0247】

PCR反応は、95 1分の後、95 、30秒、55 、30秒および72 、45秒を1サイクルとして、40サイクル繰り返した。遺伝子発現パターンの検索は、反応産物の一部を4%アガロースゲル電気泳動に供してもとめた。40

【0248】

結果を図1に示す。

【0249】

図における各レーンは次の通りである。

【0250】

Marker (マーカー) 、Heart (心臓) 、Brain (脳) 、Liver (肝臓) 、Skeletal Muscle (骨格筋) 、Kidney (腎臓) 、Pancreas (臍臓) 、Small Intestine (小腸) およびFat (脂肪)

図1より、GFACT1L遺伝子は、心臓および骨格筋に強い発現が認められ、脳でも非常に弱い発現が認められた。試験した他の臓器においては、GFACT1S遺伝子のみの発現

が認められた。

【0251】

このことから、本発明のG F A T 1 L 遺伝子の発現は、臓器特異的に制御されていることが判明した。

【0252】

【実施例3】

G F A T 1 L 組換え蛋白質の調製

ヒトG F A T 1 L 遺伝子（対比のためG F A T 1 S 遺伝子）のそれぞれをp E T 2 3 bベクター（ノバゲン社製：Novagen）に組み込み、該ベクターを用いてB L 2 1 - C o d o n P l u s (D E 3) R I L (ストラタジーン社製：Stratagene) を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリンを含むL B 培地で37℃、一晩培養した。翌日、50mLの培養液を1Lのアンピシリンを含むL B 培地に加え、さらに37℃で培養した。90分後、2mLの1Mイソプロピル - D - (-) - チオガラクトピラノシド (I P T G : 和光純薬社製) を加え、20℃で一晩培養して組換え蛋白質の発現を誘導した。

【0253】

培養液を7000r p mで5分間遠心して大腸菌を回収し、50mLの0℃に冷やしたダルベッコのP B S (-)（日本水産社製）で1回洗浄した。次に5mMジチオスレイトール (DTT)、20%グリセリンを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を、全量が40mLになるように加えて懸濁した後、超音波処理して菌体を破碎した。この破碎液を超遠心 (30,000rpm、30分、4℃) して不溶性成分を除いた。

【0254】

かくして、所望の組換え蛋白質を含む上清を得た。得られた上清は1mLづつ分注して、液体窒素で急速凍結後に-80℃に使用時まで保存した。

【0255】

【実施例4】

G F A T 1 L とG F A T 1 S の特徴的な差異の検討

1. G F A T 活性測定方法

G F A T 活性の測定は、マーシャル(Marshall)らに準じ、96穴のマイクロプレートを用いた分光光度計法にて行なった(Journal of Biological Chemistry, vol. 266, No. 8, 4706-4712, (1991))。この測定方法では、G F A T により生成されたグルタメート(Glutamate)をさらにグルタメート脱水素酵素(Glutamate dehydrogenase:GDH)と反応させ、その際同時に起こる補酵素であるA P A D がA P A D H に還元される反応に伴われる吸光度の変化をG F A T 活性として表わした。

【0256】

即ち、200μlの基質溶液(40mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、50mM塩化カリウム、1.25mM EDTA、0.3mM APAD、6U/ml (GDH)、0.6mMグルタミン、0.6mMフルクトース - 6 - リン酸 (F-6-P))に適宜希釈したG F A T 1 LあるいはG F A T 1 Sの大腸菌溶解質50μlを加え、37℃で60分間反応させた。この時の365nmの吸光度の変化をマイクロプレートリーダーにより測定した。

2. G F A T 1 L とG F A T 1 S の酵素学的相違

G F A T 1 L とG F A T 1 S の間の酵素学的な相違を検討するため、基質としてグルタミンおよびF - 6 - Pのそれぞれを用いて、Km値を求めた。Km値は、酵素の基質濃度(S)および酵素活性(反応速度(v))の値を基に作成したS / v ~ S およびv ~ v / s プロットから算出した。またその算出は、S / v ~ S のプロットではグラフのX軸とプロットして得られた直線の交点(交点 = - Km値)から、v ~ v / s プロットでは直線の傾き(傾き = - Km値)から求めた。

【0257】

さらにU D P - N - アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) がG F A T 活性を阻害することが報告されていることから (Journal of Biological Chemistry vol. 241, 1705-1712 (1966))、この阻害様式についても検討した。この阻害様式は、同様のプロッティングを行

10

20

30

40

50

ない、得られた直線の形式から求めた。

**【0258】**

その結果を図2、図3および表1に示す。

**【0259】**

図2は、F-6-Pを基質とした場合のG F A T 1 SおよびG F A T 1 LにおけるU D P - G l c N A cのG F A T活性阻害様式を示すグラフであり、縦軸は酵素の反応速度(v)を、横軸は反応速度(v)/酵素の基質濃度(s)を示す。

**【0260】**

図2の左のグラフがG F A T 1 Sの結果であり、右のグラフがG F A T 1 Lの結果を示している。各図において、(1)はU D P - G l c N A cなしの場合を、(2)はU D P - G l c N A c 30 μM添加の場合を、(3)はU D P - G l c N A c 100 μM添加の場合をそれぞれ示す。

10

**【0261】**

該図より求められたKm値は、G F A T 1 SおよびG F A T 1 Lにおいて、それぞれ90 μMおよび478 μMであり、またG F A T活性阻害様式は、それぞれ「拮抗阻害」および「混合阻害」を示すことが明らかとなった。

**【0262】**

図3は、グルタミンを基質とした場合のG F A T 1 SおよびG F A T 1 LにおけるU D P - G l c N A cのG F A T活性阻害様式を示すグラフであり、縦軸は酵素の反応速度(v)を、横軸は反応速度(v)/酵素の基質濃度(s)を示す。

20

**【0263】**

図3の左のグラフがG F A T 1 Sの結果であり、右のグラフがG F A T 1 Lの結果を示している。各図において、(1)はU D P - G l c N A cなしの場合を、(2)はU D P - G l c N A c 10 μM添加の場合を、(3)はU D P - G l c N A c 30 μM添加の場合を、また(4)はU D P - G l c N A c 100 μM添加の場合をそれぞれ示す。

**【0264】**

該図より求められたKm値は、G F A T 1 SおよびG F A T 1 Lにおいて、それぞれ822 μMおよび804 μMであり、またG F A T活性阻害様式は、それぞれ「不拮抗阻害」および「混合阻害」を示すことが明らかとなった。

**【0265】**

30

**【表1】**

		G F A T 1 S	G F A T 1 L
Km値 (μM)	F-6-P	78～118	458～478
	グルタミン	761～822	804～812
阻害様式	F-6-P	拮抗阻害	混合阻害
	グルタミン	不拮抗阻害	混合阻害

40

**【0266】**

図2、図3および表1より、G F A T 1 LおよびG F A T 1 SのKm値については、F-6-Pに対してはG F A T 1 Sが100 μM、G F A T 1 Lが500 μM程度と両者で大きな差が認められた。一方、グルタミンに対してはG F A T 1 SとG F A T 1 Lともに800 μM前後であり両者に差は認められなかった。

**【0267】**

UDP-GlcNAcの阻害様式については、F-6-Pを基質とした場合、G F A T 1 Sでは拮抗阻害、G F A T 1 Lでは非拮抗および拮抗阻害が混在した混合阻害様式を示した。また、グ

50

ルタミンを基質とした場合、G F A T 1 S では不拮抗阻害、G F A T 1 L においては不拮抗およびその他の阻害様式を含んだ混合阻害様式を示した。

#### 【 0 2 6 8 】

上記の結果から、本発明のG F A T 1 L とヒトG F A T の酵素学的な違いとして、(1) F - 6 - P に対するK m 値は本発明のG F A T 1 L がヒトG F A T より5倍程高い、および(2) UDP-GlcNAcの阻害様式が異なる、の2点が認められた。3. インスリン抵抗性におけるG F A T 1 L の関わりについての検討

G F A T がインスリン抵抗性に関与していることはイン・ビトロおよびイン・ビボ試験の両者において報告されている。しかしながら、本発明者らにより発見された新規遺伝子により、G F A T には2つのサブタイプが存在することが明らかとなったことから、G F A T 1 L とヒトG F A T (G F A T 1 S )のどちらがよりインスリン抵抗性に関与しているのかについて、以下の通り考察した。

#### 【 0 2 6 9 】

正常人では通常、インスリン刺激時には血中グルコースの約70%が骨格筋で代謝されるのに対し、2型糖尿病患者においては、特に骨格筋でグルコースの利用率が30%まで減弱しており他の臓器ではその利用率が正常人と変わらないことが報告されている(Journal of Clinical Investigation, 76 (1), 149-155(1985))。このことから、インスリン抵抗性の主要な臓器は骨格筋であると考えられる。この骨格筋ではG F A T 1 S は発現しておらず、本発明のG F A T 1 L のみが発現していることが明らかとなったことから、インスリン抵抗性には主に本発明のG F A T 1 L が関与していると考えられる。

#### 【 0 2 7 0 】

また、G F A T 1 S およびG F A T 1 L の酵素学的検討の結果より、  
 (1) F - 6 - P に対する本発明G F A T 1 L 遺伝子のK m 値は、G F A T 1 S 遺伝子のそれよりも5倍程高い、  
 (2) 細胞内のグルタミン濃度は4~5 mM 存在するため、G F A T 活性は細胞内のF - 6 - P 濃度に規定される、  
 (3) 基礎レベルにおける2型糖尿病患者の赤血球中のF - 6 - P 濃度は数十 μ M であると報告されている(Horm. Metabol. Res., 14, 233-236 (1982))、ことなどを考え合わせ、以下のようなことが推測された。

#### 【 0 2 7 1 】

即ち、この濃度のF - 6 - P からG F A T の活性状態を推測すると、G F A T 1 S ではK m 値付近であり定常的に働いているが、G F A T 1 L ではほとんど活性化されていないと考えられる。このことは図4より明らかである。

#### 【 0 2 7 2 】

図4は、上記結果より、G F A T 1 S およびG F A T 1 L の酵素反応曲線(G F A T の活性化の状態)をグラフ化したものであり、縦軸は酵素の反応速度(v)を、横軸は細胞内のF - 6 - P の濃度(μ M)を示しており、この濃度が高いほど細胞内への糖の流入量が大きいことを表わす。また、図中、太線は文献に報告されている非インスリン依存型糖尿病患者の赤血球中のF - 6 - P 濃度を示しており、太矢印はインスリン抵抗性に関与することを示している。

#### 【 0 2 7 3 】

更に、インスリン刺激時には細胞内へのグルコースの取り込みは数倍増加するが、この場合、G F A T 1 S では酵素反応がV max に達しているため、さらにグルコースが細胞内に流入してもそれ以上のG F A T の活性化は起こらないのに対し、本発明のG F A T 1 L ではグルコースの流入量が増加すればするほどG F A T が活性化され代謝物も増加し、糖輸送担体の細胞膜への移行が抑制され、血糖が上昇するものと考えられる(ただし、G F A T 1 L およびG F A T 1 S ともにV max は同程度と仮定している)。

#### 【 0 2 7 4 】

従ってG F A T 1 S に比べ本発明のG F A T 1 L がよりインスリン抵抗性に関与していると考えられる。以上のことからインスリン抵抗性に本発明のG F A T 1 L の関与が大きい

10

20

30

40

50

と結論づけられる。

【0275】

【配列表】

### SEQUENCE LISTING

〈110〉 Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.

〈120〉 New enzyme gene and expression product thereof

〈130〉 31600JP

10

〈160〉 7

〈170〉 PatentIn Ver. 2.0

〈210〉 1

〈211〉 699

〈212〉 PRT

〈213〉 Human skeletal muscle mRNA

20

〈400〉 1

Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Leu Asn Tyr His Val Pro Arg Thr Arg

1

5

10

15

Arg Glu Ile Leu Glu Thr Leu Ile Lys Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr

20

25

30

Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Gly Phe Asp Gly Gly Asn Asp Lys

35

40

45

30

Asp Trp Glu Ala Asn Ala Cys Lys Ile Gln Leu Ile Lys Lys Lys Gly

50

55

60

Lys Val Lys Ala Leu Asp Glu Glu Val His Lys Gln Gln Asp Met Asp

65

70

75

80

Leu Asp Ile Glu Phe Asp Val His Leu Gly Ile Ala His Thr Arg Trp

85

90

95

Ala Thr His Gly Glu Pro Ser Pro Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser

100

105

110

40

Asp Lys Asn Asn Glu Phe Ile Val Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn

115

120

125

Tyr Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Asp Phe Glu  
 130 135 140  
 Ser Glu Thr Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Val Lys Tyr Met Tyr  
 145 150 155 160  
 Asp Asn Arg Glu Ser Gln Asp Thr Ser Phe Thr Thr Leu Val Glu Arg  
 165 170 175  
 Val Ile Gln Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Val 10  
 180 185 190  
 His Phe Pro Gly Gln Ala Val Gly Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu  
 195 200 205  
 Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile  
 210 215 220  
 Leu Tyr Arg Thr Ala Arg Thr Gln Ile Gly Ser Lys Phe Thr Arg Trp  
 225 230 235 240 20  
 Gly Ser Gln Gly Glu Arg Gly Lys Asp Lys Lys Gly Ser Cys Asn Leu  
 245 250 255  
 Ser Arg Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe Pro Val Glu Glu Lys Ala  
 260 265 270  
 Val Glu Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Val Ile Glu His Thr  
 275 280 285  
 Asn Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Val Ala Ala Val Val Asp 30  
 290 295 300  
 Gly Arg Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg Thr Ala Gly Asp His Pro  
 305 310 315 320  
 Gly Arg Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys  
 325 330 335  
 Gly Asn Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu  
 340 345 350 40  
 Ser Val Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Asp Asp Tyr Thr

355	360	365	
Val Asn Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile Lys Glu Ile Gln Arg Cys			
370	375	380	
Arg Arg Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Gly Val			
385	390	395	400
Ala Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val			
405	410	415	10
Glu Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp			
420	425	430	
Asp Val Cys Phe Phe Leu Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu			
435	440	445	
Met Gly Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile			
450	455	460	
Thr Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val			20
465	470	475	480
His Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr			
485	490	495	
Thr Ser Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe Ala Leu Met Met Cys Asp			
500	505	510	
Asp Arg Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys Glu Ile Met Leu Gly Leu			
515	520	525	30
Lys Arg Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Met Asp Asp Glu			
530	535	540	
Ile Gln Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His Gln Lys Ser Val Leu Ile			
545	550	555	560
Met Gly Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys			
565	570	575	
Ile Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu			40
580	585	590	

Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Leu Met Pro Val Ile  
       595                 600                 605  
 Met Ile Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu  
       610                 615                 620  
 Gln Gln Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro Val Val Ile Cys Asp Lys  
       625                 630                 635                 640  
 Glu Asp Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys Arg Thr Ile Lys Val Pro  
       645                 650                 655                 10  
 His Ser Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln  
       660                 665                 670  
 Leu Leu Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe  
       675                 680                 685  
 Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu  
       690                 695                 20

<210> 2  
 <211> 2097  
 <212> DNA  
 <213> Human skeletal muscle mRNA

<220>  
 <221> CDS                                 30  
 <222> (1)..(2097)  
 <400> 2  
 atg tgt ggt ata ttt gct tac tta aac tac cat gtt cct cga acg aga   48  
 Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Leu Asn Tyr His Val Pro Arg Thr Arg  
     1                 5                 10                 15  
 cga gaa atc ctg gag acc cta atc aaa ggc ctt cag aga ctg gag tac   96  
 Arg Glu Ile Leu Glu Thr Leu Ile Lys Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr  
     20                 25                 30                 40

aga gga tat gat tct gct ggt gtg gga ttt gat gga ggc aat gat aaa 144  
 Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Gly Phe Asp Gly Gly Asn Asp Lys  
           35                  40                  45  
 gat tgg gaa gcc aat gcc tgc aaa atc cag ctt att aag aag aaa gga 192  
 Asp Trp Glu Ala Asn Ala Cys Lys Ile Gln Leu Ile Lys Lys Gly  
           50                  55                  60  
 aaa gtt aag gca ctg gat gaa gaa gtt cac aag caa caa gat atg gat 240   10  
 Lys Val Lys Ala Leu Asp Glu Glu Val His Lys Gln Gln Asp Met Asp  
   65                  70                  75                  80  
 ttg gat ata gaa ttt gat gta cac ctt gga ata gct cat acc cgt tgg 288  
 Leu Asp Ile Glu Phe Asp Val His Leu Gly Ile Ala His Thr Arg Trp  
           85                  90                  95  
 gca aca cat gga gaa ccc agt cct gtc aat agc cac ccc cag cgc tct 336  
 Ala Thr His Gly Glu Pro Ser Pro Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser   20  
           100                  105                  110  
 gat aaa aat aat gaa ttt atc gtt att cac aat gga atc atc acc aac 384  
 Asp Lys Asn Asn Glu Phe Ile Val Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn  
           115                  120                  125  
 tac aaa gac ttg aaa aag ttt ttg gaa agc aaa ggc tat gac ttc gaa 432  
 Tyr Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Asp Phe Glu  
           130                  135                  140   30  
 tct gaa aca gac aca gag aca att gcc aag ctc gtt aag tat atg tat 480  
 Ser Glu Thr Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Val Lys Tyr Met Tyr  
   145                  150                  155                  160  
 gac aat cgg gaa agt caa gat acc agc ttt act acc ttg gtg gag aga 528  
 Asp Asn Arg Glu Ser Gln Asp Thr Ser Phe Thr Thr Leu Val Glu Arg  
           165                  170                  175  
 gtt atc caa caa ttg gaa ggt gct ttt gca ctt gtg ttt aaa agt gtt 576  
 Val Ile Gln Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Val   40

180	185	190	
cat ttt ccc ggg caa gca gtt ggc aca agg cga ggt agc cct ctg ttg			624
His Phe Pro Gly Gln Ala Val Gly Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu			
195	200	205	
att ggt gta cgg agt gaa cat aaa ctt tct act gat cac att cct ata			672
Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile			
210	215	220	10
ctc tac aga aca gct agg act cag att gga tca aaa ttc aca cgg tgg			720
Leu Tyr Arg Thr Ala Arg Thr Gln Ile Gly Ser Lys Phe Thr Arg Trp			
225	230	235	240
gga tca cag gga gaa aga ggc aaa gac aag aaa gga agc tgc aat ctc			768
Gly Ser Gln Gly Glu Arg Gly Lys Asp Lys Lys Gly Ser Cys Asn Leu			
245	250	255	
tct cgt gtg gac agc aca acc tgc ctt ttc ccg gtg gaa gaa aaa gca			816
Ser Arg Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe Pro Val Glu Glu Lys Ala			
260	265	270	
gtg gag tat tac ttt gct tct gat gca agt gct gtc ata gaa cac acc			864
Val Glu Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Val Ile Glu His Thr			
275	280	285	
aat cgc gtc atc ttt ctg gaa gat gat gat gtt gca gca gta gtg gat			912
Asn Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Val Ala Ala Val Val Asp			
290	295	300	
gga cgt ctt tct atc cat cga att aaa cga act gca gga gat cac ccc			960
Gly Arg Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg Thr Ala Gly Asp His Pro			
305	310	315	320
gga cga gct gtg caa aca ctc cag atg gaa ctc cag cag atc atg aag			1008
Gly Arg Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys			
325	330	335	40
ggc aac ttc agt tca ttt atg cag aag gaa ata ttt gag cag cca gag			1056

Gly Asn Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu			
340	345	350	
tct gtc gtg aac aca atg aga gga aga gtc aac ttt gat gac tat act	1104		
Ser Val Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Asp Asp Tyr Thr			
355	360	365	
gtg aat ttg ggt ggt ttg aag gat cac ata aag gag atc cag aga tgc	1152		
Val Asn Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile Lys Glu Ile Gln Arg Cys			10
370	375	380	
cgg cgt ttg att ctt att gct tgt gga aca agt tac cat gct ggt gta	1200		
Arg Arg Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Gly Val			
385	390	395	400
gca aca cgt caa gtt ctt gag gag ctg act gag ttg cct gtg atg gtg	1248		
Ala Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val			
405	410	415	20
gaa cta gca agt gac ttc ctg gac aga aac aca cca gtc ttt cga gat	1296		
Glu Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp			
420	425	430	
gat gtt tgc ttt ttc ctt agt caa tca ggt gag aca gca gat act ttg	1344		
Asp Val Cys Phe Phe Leu Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu			
435	440	445	
atg ggt ctt cgt tac tgt aag gag aga gga gct tta act gtg ggg atc	1392		30
Met Gly Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile			
450	455	460	
aca aac aca gtt ggc agt tcc ata tca cgg gag aca gat tgt gga gtt	1440		
Thr Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val			
465	470	475	480
cat att aat gct ggt cct gag att ggt gtg gcc agt aca aag gct tat	1488		
His Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr			40
485	490	495	

acc agc cag ttt gta tcc ctt gtg atg ttt gcc ctt atg atg tgt gat	1536	
Thr Ser Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe Ala Leu Met Met Cys Asp		
500	505	510
gat cgg atc tcc atg caa gaa aga cgc aaa gag atc atg ctt gga ttg	1584	
Asp Arg Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys Glu Ile Met Leu Gly Leu		
515	520	525
aaa cgg ctg cct gat ttg att aag gaa gta ctg agc atg gat gac gaa	1632	10
Lys Arg Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Met Asp Asp Glu		
530	535	540
att cag aaa cta gca aca gaa ctt tat cat cag aag tca gtt ctg ata	1680	
Ile Gln Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His Gln Lys Ser Val Leu Ile		
545	550	555
560		
atg gga cga ggc tat cat tat gct act tgt ctt gaa ggg gca ctg aaa	1728	
Met Gly Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys		20
565	570	575
atc aaa gaa att act tat atg cac tct gaa ggc atc ctt gct ggt gaa	1776	
Ile Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu		
580	585	590
ttg aaa cat ggc cct ctg gct ttg gtg gat aaa ttg atg cct gtg atc	1824	
Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Leu Met Pro Val Ile		
595	600	605
610		
atg atc atc atg aga gat cac act tat gcc aag tgt cag aat gct ctt	1872	
Met Ile Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu		
615	620	
cag caa gtg gtt gct cgg cag ggg cgg cct gtg gta att tgt gat aag	1920	
Gln Gln Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro Val Val Ile Cys Asp Lys		
625	630	635
640		
gag gat act gag acc att aag aac aca aaa aga acg atc aag gtg ccc	1968	40
Glu Asp Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys Arg Thr Ile Lys Val Pro		

645	650	655	
cac tca gtg gac tgc ttg cag ggc att ctc agc gtg atc cct tta cag			2016
His Ser Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln			
660	665	670	
ttg ctg gct ttc cac ctt gct gtg ctg aga ggc tat gat gtt gat ttc			2064
Leu Leu Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe			
675	680	685	10
cca cgg aat ctt gcc aaa tct gtg act gta gag			2097
Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu			
690	695		
<210> 3			
<211> 33			
<212> DNA 20			
<213> Primer P1			
<400> 3			
gttccgcgta ctcgtcgta aatccctggag acc			33
<210> 4			
<211> 33			
<212> DNA 30			
<213> Primer P2			
<400> 4			
gcttaccgtga actaccacgt tccgcgtact cgt			33
<210> 5			
<211> 40			
<212> DNA 40			
<213> Primer P3			

〈400〉 5

ttttttcat atgtgtggta tccttgctta cctgaactac

40

〈210〉 6

〈211〉 32

〈212〉 DNA

〈213〉 Primer P4

10

〈400〉 6

ccctcgagtt actctacagt cacagatttg gc

32

〈210〉 7

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Primer

20

〈400〉 7

agccctctgt tgatttgtt

20

〈210〉 8

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Primer

30

〈400〉 8

tccatctgga gtgtttgcac

20

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2に従い、RT-PCR法により各臓器での本発明GFA1L遺伝子の発現パターンを求めたアガロースゲル電気泳動結果を示す図面代用写真である。

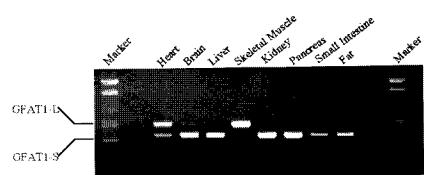
【図2】実施例4に従い、本発明GFA1Lの酵素学的性質としての、F-6-Pを基質としたときのKm値およびGFA1活性阻害様式を求めるためのグラフである。

40

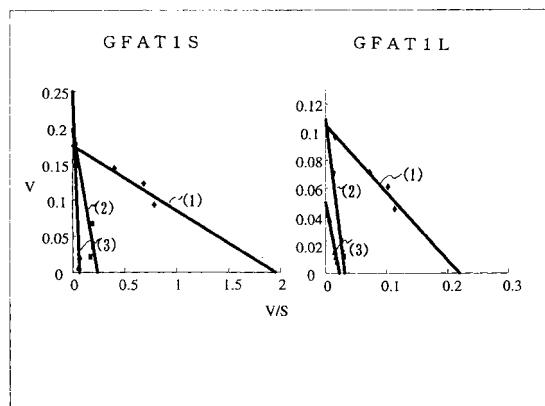
【図3】実施例4に従い、本発明GFA1Lの酵素学的性質としての、グルタミンを基質としたときのKm値およびGFA1活性阻害様式を求めるためのグラフである。

【図4】実施例4に従い、本発明GFA1Lの酵素反応曲線（GFA1の活性化の状態）を示すグラフである。

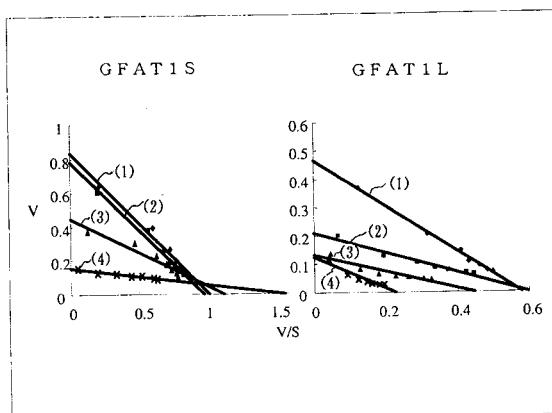
【図1】



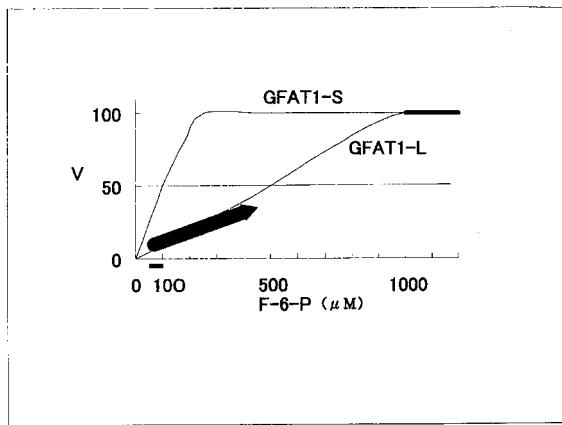
【図2】



【図3】



【図4】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q    1/48    (2006.01)	C 1 2 Q    1/48	Z
C 1 2 R    1/19    (2006.01)	C 1 2 N    1/21	
	C 1 2 R    1:19	

(74)代理人 100105821  
弁理士 藤井 淳  
(74)代理人 100099911  
弁理士 関 仁士  
(74)代理人 100108084  
弁理士 中野 瞳子  
(72)発明者 藤原 力  
徳島県鳴門市鳴門町高島字中島436  
(72)発明者 岡本 考史  
兵庫県姫路市北条宮の町227-102  
(72)発明者 新美 正史  
徳島県徳島市川内町金岡5-1-107  
(72)発明者 急式 弘之  
徳島県徳島市川内町鶴島377-1-1301  
(72)発明者 山本 恵史  
徳島県板野郡北島町鯛浜字西ノ須34-1  
(72)発明者 植山 篤則  
徳島県徳島市庄町2-44-1

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特開平10-108683 (JP, A)  
国際公開第93/021330 (WO, A1)  
国際公開第00/037617 (WO, A1)  
J.Biol.Chem., Vol.267, No.35(1992)p.25208-25212  
Genomics, Vol.57, No.2(1999)p.227-234

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

CA/REGISTRY(STN)  
PubMed  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq