

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5544164号
(P5544164)

(45) 発行日 平成26年7月9日(2014.7.9)

(24) 登録日 平成26年5月16日(2014.5.16)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 19/18 (2006.01)

C 1 2 P 19/18

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

請求項の数 4 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2009-508064 (P2009-508064)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月1日(2007.5.1)
 (65) 公表番号 特表2009-535042 (P2009-535042A)
 (43) 公表日 平成21年10月1日(2009.10.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2007/000745
 (87) 国際公開番号 W02007/124596
 (87) 国際公開日 平成19年11月8日(2007.11.8)
 審査請求日 平成22年4月28日(2010.4.28)
 (31) 優先権主張番号 60/797,132
 (32) 優先日 平成18年5月2日(2006.5.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507067319
 ナショナル リサーチ カウンセル オブ
 カナダ
 カナダ国 オンタリオ州 オタワ モント
 リオール ロード ルーム イージー 1
 2 ビルディング エム-58
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74) 代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 由来の α -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (C g t D)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、ガラクトシル化生成物糖類 (galactosylated product saccharide) を產生する方法：

- (a) アクセプター基質と、ガラクトース部分を含むドナー基質と、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも90%の同一性を有する単離されたまたは組換えられた α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドとを接触させる工程；ならびに
 (b) ガラクトース部分をアクセプター糖類へと移動させ、それによってガラクトシル化生成物糖類を產生する、工程。

【請求項 2】

α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドが、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

商業的生産規模で実施される、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

関連出願の相互参照

本出願は、2006年5月2日に出願された米国仮特許出願第60/797132号の恩典を主張するものであり、これは全目的について参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、 α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (CgtD) ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸、および該ポリペプチドを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

糖質は現在、多くの細胞間認識事象において、特に、炎症におけるセレクトインを介した病原性の白血球-内皮細胞相互作用の際の哺乳動物細胞への細菌およびウイルスの付着において、大変重要であることが認識されている (Varki (1993) *Glycobiology* 3: 97-130 (非特許文献1))。さらに、細菌中に見出されるシアル酸付加複合糖質 (Preston et al. (1996) *Crit. Rev. Microbiol.* 22:139-180 (非特許文献2); Reuter et al. (1996) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 377:325-342 (非特許文献3)) は、宿主の免疫応答を回避するために、哺乳動物糖脂質中に見出されるオリゴ糖を模倣していると考えられている (Moran et al. (1996) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16:105-115 (非特許文献4))。リポ多糖 (LPS) の糖類 (saccharide) 部分による宿主構造の分子擬態は、多様な粘膜病原体の病原因子と考えられているが、これは、宿主の免疫応答を回避するためにこの戦略を使用している (Moran et al. (1996) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 105-115 (非特許文献4); Moran et al. (1996) *J. Endotoxin Res.* 3: 521-531 (非特許文献5))。

【0004】

これらおよびその他のプロセスに関与するオリゴ糖構造は潜在的な治療剤であるが、従来の化学的手法によってこれを製造するには時間およびコストがかかる。特定のオリゴ糖構造産生のための特に有望な経路とは、これらをインビボにおいて作製する酵素、すなわちグリコシルトランスフェラーゼの使用を介したものである。そのような酵素を、オリゴ糖のインビトロ合成のための位置選択的かつ立体選択的な触媒として用いることができる (Ichikawa et al. (1992) *Anal. Biochem.* 202: 215-238 (非特許文献6))。

【0005】

オリゴ糖の大規模な酵素的合成は、必要なグリコシルトランスフェラーゼの十分量が入手できるかどうかによって左右される。しかし、オリゴ糖構造の調製において使用するために十分な量のグリコシルトランスフェラーゼの産生には、問題がある。真核宿主における発現を含む多くの哺乳動物グリコシルトランスフェラーゼの発現が達成されているが、これは、高価な組織培養培地を必要とするが程々のタンパク質収量しか得られない (Kleene et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 160-167 (非特許文献7); Williams et al. (1995) *Glycoconjugate J.* 12: 755-761 (非特許文献8))。哺乳動物グリコシルトランスフェラーゼに関して大腸菌 (*E. coli*) での発現が達成されたが、これらの試みでは主に不溶型の酵素が産生され、そこから活性酵素を大量に回収することは困難であった (Aoki et al. (1990) *EMBO. J.* 9:3171-3178 (非特許文献9); Nishiu et al. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (9): 1750-1752 (非特許文献10))。さらに、その生成物の生物活性のために、哺乳動物シアリルトランスフェラーゼは一般に、正確なグリカン構造を生じるための特定の組織、細胞区画、および/または発生段階において作用する。商業的に価値のあるオリゴ糖の酵素的合成において使用可能でありかつ大量に産生可能であるグリコシルトランスフェラーゼの同定は、したがって、これらの技術の開発において有用でありうる。本発明は、これらおよびその他の需要を満たすものである。

【0006】

【非特許文献1】Varki (1993) *Glycobiology* 3: 97-130

【非特許文献2】Preston et al. (1996) *Crit. Rev. Microbiol.* 22:139-180

【非特許文献3】Reuter et al. (1996) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 377:325-342

10

20

30

40

50

- 【非特許文献4】Moran et al. (1996) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 16:105-115
 【非特許文献5】Moran et al. (1996) J. Endotoxin Res. 3: 521-531
 【非特許文献6】Ichikawa et al. (1992) Anal. Biochem. 202: 215-238
 【非特許文献7】Kleene et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 160-167
 【非特許文献8】Williams et al. (1995) Glycoconjugate J. 12: 755-761
 【非特許文献9】Aoki et al. (1990) EMBO. J. 9:3171-3178
 【非特許文献10】Nishiu et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. 59 (9): 1750-1752

【発明の開示】

【0007】

10

発明の簡単な概要

一局面において、本発明は、以下の工程によってガラクトシル化生成物糖類 (galactosylated product saccharide) を産生する方法を提供する：アクセプター基質と、ガラクトース部分を含むドナー基質と、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも80%の同一性を有する単離されたまたは組換えられた α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドとを接触させる工程；ならびに、ガラクトース部分をアクセプター糖類へと移動させ、それによってガラクトシル化生成物糖類を産生する工程。一態様において、 α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも90%または95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の態様において、 α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む。さらなる態様において、本方法は、商業的生産規模で実施される。別の態様において、本発明は、ガラクトシル化生成物糖類を単離する工程を含む。

20

【0008】

別の局面において、本発明は、ガラクトース部分をドナー基質からアクセプター基質へ移動させかつSEQ ID NO: 2に対して少なくとも80%、90%、95%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、単離されたまたは組換えられた α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドを含む、反応混合物を提供する。

【0009】

別の局面において、本発明は、 α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。一態様において、単離された核酸は、SEQ ID NO: 1に対して少なくとも90%または95%の同一性を有する核酸配列を含む。別の態様において、単離された核酸は、SEQ ID NO: 1の核酸配列を含む。

30

【0010】

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO: 1に対して少なくとも80%、90%、または95%の同一性を有する核酸配列を含む発現ベクターを提供する。また本発明は、該発現ベクターを含む宿主細胞も含み、かつ、 α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドの発現に適した条件下で該宿主細胞を増殖させることによって α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドを作製するための方法も含む。

[1] 以下の工程を含む、ガラクトシル化生成物糖類 (galactosylated product saccharide) を産生する方法：

40

(a) アクセプター基質と、ガラクトース部分を含むドナー基質と、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも80%の同一性を有する単離されたまたは組換えられた α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドとを接触させる工程；ならびに

(b) ガラクトース部分をアクセプター糖類へと移動させ、それによってガラクトシル化生成物糖類を産生する、工程。

[2] α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドが、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、[1]記載の方法。

[3] α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドが、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、[1]記載の方法。

[4] α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸

50

配列を含む、[1]記載の方法。

[5] 商業的生産規模で実施される、[1]記載の方法。

[6] 単離されたまたは組換えられた α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドを含む反応混合物であって、該 α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドが、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつガラクトース部分をドナー基質からアクセプター基質へと移動させる、反応混合物。

[7] α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドが、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、[6]記載の反応混合物。

[8] α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドが、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、[6]記載の反応混合物。

[9] α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む、[6]記載の反応混合物。

[10] SEQ ID NO: 1に対して少なくとも80%の同一性を有する核酸配列を含む、[6]記載の α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチドをコードする単離された核酸。

[11] SEQ ID NO: 1に対して少なくとも90%の同一性を有する核酸配列を含む、[10]記載の単離された核酸。

[12] SEQ ID NO: 1に対して少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む、[10]記載の単離された核酸。

[13] SEQ ID NO: 1の核酸配列を含む、[10]記載の単離された核酸。

[14] [10]記載の核酸配列を含む、発現ベクター。

[15] [14]記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【0011】

発明の詳細な説明

I. 概説

リポオリゴ糖 (LOS) 生合成遺伝子座は、該遺伝子座の比較ゲノム解析に関するプロジェクトの一環として、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) の様々な株において配列決定されている。例えば、Gilbert, et al., J. Biol. Chem. 275:3896-3906 (2000); Gilbert, et al., J. Biol. Chem. 277:327-337 (2002); および Gilbert, et al., in *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. (Horizon Bioscience, Editors: J.M. Ketley and M. E. Konkel), Chapter 11 (2005)を参照されたい。いくつかのコードされたタンパク質の機能が、実験により決定されている。C. ジェジュニ (*C. jejuni*) LI087は、LIOR (熱不安定性) 血清型別システムの血清型株である。LI087 LOS遺伝子座 (クラス「D」、GenBankアクセッション番号AF400669) の構成は、これまでに特徴決定された大部分のC. ジェジュニLOS遺伝子座 (クラス「A」、「B」、および「C」、Gilbert et al. 2002) とは異なる。例えば、C. ジェジュニLI087由来のLOS遺伝子座では、シアル酸生合成におよびガングリオシドを模倣するLOS外側コア (outer core) の発現に関与する遺伝子のクラスターが欠損している。C. ジェジュニLI087 LOS遺伝子座は、10個のオープンリーディングフレーム (ORF) を含む。配列相同性検索によって、これらのORFのうち4個 (1番目、2番目、3番目、および10番目のORF) は内側コアすなわちリピドAの生合成に関与することが示された。残り6個のオープンリーディングフレームによってコードされるタンパク質の機能を、配列情報に基づいて推測することはできなかった。

【0012】

CgtDタンパク質の機能は実験により決定されており、本発明は、CgtD遺伝子産物が α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有することを初めて実証する。また該酵素は、ガラクトースをドナーから、アクセプター分子としてのLacNAc (Gal- β -1,4-GlcNAc) 誘導体またはLac (Gal- β -1,4-Glc) 誘導体のいずれかへと移動させることもできる。

【0013】

II. 定義

本明細書において以下の略語を用いる：

10

20

30

40

50

Ara = アラビノシル ;
Fru = フルクトシル ;
Fuc = フコシル ;
Gal = ガラクトシル ;
GalNAc = N-アセチルガラクトサミニル ;
Glc = グルコシル ;
GlcNAc = N-アセチルグルコサミニル ;
Man = マンノシル ; および
NeuAc = シアリル(N-アセチルノイラミニル)。

【 0 0 1 4 】

グリコシルトランスフェラーゼ、例えばCgtDポリペプチドに対する「アクセプター基質」または「アクセプター糖類」とは、特定のグリコシルトランスフェラーゼに対するアクセプターとして作用できるオリゴ糖部分である。対応するグリコシルトランスフェラーゼおよび糖ドナー基質、ならびにその他の必要な反応混合物成分とアクセプター基質とを接触させて、反応混合物を十分な期間インキュベーションした場合、グリコシルトランスフェラーゼは、糖ドナー基質からアクセプター基質へと糖残基を移動させる。様々な種類の特定のグリコシルトランスフェラーゼに対して、アクセプター基質を変更することができる。したがって「アクセプター基質」という用語は、本文中、特定の用途に関する関心対象の特定のグリコシルトランスフェラーゼに対して用いられる。例えばC. ジェジュニLI087由来のCgtDなどの α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、および追加のグリコシルトランスフェラーゼに対するアクセプター基質が、本明細書において記載される。好ましい態様において、CgtDアクセプター基質は末端ガラクトース残基を有する。CgtDアクセプター基質には、例えば、ラクトースまたはIacNAc、または、ラクトースもしくはIacNAc部分を含むオリゴ糖、糖タンパク質、糖脂質、もしくは糖ペプチドが含まれる。

【 0 0 1 5 】

グリコシルトランスフェラーゼに対する「ドナー基質」とは、活性化ヌクレオチド糖である。そのような活性化糖は一般に、該糖のウリジン-リン酸誘導体、グアノシン-リン酸誘導体、およびシチジン-リン酸誘導体（それぞれUMP、GMP、およびCMP）からなるか、または、該糖のウリジン-リン酸誘導体、グアノシン-リン酸誘導体、およびシチジン-リン酸誘導体（それぞれUDP、GDP、およびCDP）からなり、ここで、ヌクレオシド-リン酸またはニリン酸は脱離基としてはたらく。例えば、フコシルトランスフェラーゼに対するドナー基質はGDP-フコースである。CgtEタンパク質に対するドナー基質には、例えばUDP-GalNAcまたはUDP-Galが含まれる。例えばシアリルトランスフェラーゼに対するドナー基質は、所望のシアリ酸を含む活性化糖ヌクレオチドである。CgtDに対するドナー基質はUDP-Galである。例えば、NeuAcの場合には、活性化糖はCMP-NeuAcである。細菌系、植物系、および真菌系は、他の活性化ヌクレオチド糖を使用できる場合もある。

【 0 0 1 6 】

オリゴ糖は、それが還元末端において実際に還元糖であるかどうかにかかわらず、還元末端および非還元末端を有すると考えられている。本明細書においてオリゴ糖は、公認の命名法に従い、左側に非還元末端を、右側に還元末端を有するとして記載する。本明細書記載のオリゴ糖は全て、非還元糖類の名称または略称（例えばGal）に続いて、グリコシド結合の構造（ α または β ）、環結合（ring bond）、結合に関与する還元糖類の環位置、および次に、還元糖類の名称または略称（例えばGlcNAc）で記載される。2つの糖の間の結合は、例えば2,3、2->3、または(2,3)として表現されうる。各糖類は、ピラノースまたはフラノースである。

【 0 0 1 7 】

本明細書で使用する「ガラクトース部分」とは、ガラクトースを含むかガラクトースから誘導可能な分子を指す。ガラクトース部分とは通常、単糖類、例えばガラクトースである。

【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する「ガラクトシル化生成物糖類」とは、ガラクトース部分を含む、糖脂質または糖タンパク質と共役しているまたは共役していないオリゴ糖、多糖、または糖質部分、例えば生体分子を指す。例えばガラクトースなどの任意の上記のガラクトース部分を用いることができる。好ましい態様において、CgtDが移動させるガラクトース部分はガラクトースである。

【0019】

一部の態様において、ガラクトシル化生成物糖類を産生するための追加のグリコシルトランスフェラーゼの作用によって、その他の糖部分、例えばフコース、シアル酸、グルコース、GalNAc、またはGlcNAcもアクセプター基質に付加される。一部の態様において、アクセプター基質はガラクトース部分を含み、CgtDタンパク質は追加のガラクトース部分を付加するために使用されて、これによってガラクトシル化生成物糖類が作製される。

10

【0020】

「シアル酸」または「シアル酸部分」という用語は、9炭素カルボキシ化糖のファミリーの任意のメンバーを指す。シアル酸ファミリーの最も一般的なメンバーは、N-アセチル-ノイラミン酸(2-ケト-5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノヌロピラノス-1-オン酸)(Neu5Ac、NeuAc、またはNANAと略称されることが多い)である。該ファミリーの第二のメンバーは、NeuAcのN-アセチル基がヒドロキシ化された、N-グリコリル-ノイラミン酸(Neu5GcまたはNeuGc)である。第三のシアル酸ファミリーメンバーは、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸(KDN)である(Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990))。同じく、9-O-C₁-C₆アシル-Neu5Ac、例えば9-O-ラクチル-Neu5Acまたは9-O-アセチル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Ac、および9-アジド-9-デオキシ-Neu5Acなどの9-置換シアル酸も含まれる。シアル酸ファミリーの概説については、例えば、Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992))を参照されたい。シアル化手順におけるシアル酸化合物の合成および使用は、1992年10月1日に公開された国際公開公報第92/16640号に開示されている。

20

【0021】

本出願において必要とされる命名法および一般的な実験手順の大部分は、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989中に見出すことができる。以下、本明細書においてこのマニュアルは「Sambrook et al」と称する。

30

【0022】

「C. ジェジュニLI087由来のCgtD」、「CgtD」、または、「C. ジェジュニLI087由来のCgtD」もしくは「CgtD」をコードする核酸という用語は、核酸およびポリペプチドの多型変異体、対立遺伝子、突然変異体、および種間ホモログを指し、これらは、(1) C. ジェジュニLI087由来のCgtD核酸(C. ジェジュニLI087由来のCgtD核酸配列に関しては、例えばSEQ ID NO: 1を参照されたい)がコードするアミノ酸配列に対して、またはC. ジェジュニLI087由来のCgtDタンパク質(C. ジェジュニLI087由来のCgtDタンパク質配列に関しては、例えばSEQ ID NO: 2を参照されたい)のアミノ酸配列に対して、好ましくは少なくとも約25アミノ酸、50アミノ酸、100アミノ酸、200アミノ酸、500アミノ酸、1000アミノ酸、またはそれ以上の領域にわたって、少なくとも60%のアミノ酸配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、好ましくは91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%もしくはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有し；(2) C. ジェジュニLI087由来のCgtタンパク質およびその保存的に改変された変異体のアミノ酸配列を含む免疫原に対する抗体、例えばポリクローナル抗体に結合し；(3) C. ジェジュニLI087由来のCgtタンパク質およびその保存的に改変された変異体をコードする核酸配列に対応するアンチセンス鎖に対し、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で特異的にハイブリダイズし；(4) C. ジェジュニLI087由来のCgtD核酸、例えばSEQ ID NO: 1、または触媒ドメインをコードする核酸に対して、好ましくは少なくとも約25ヌ

40

50

クレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、500ヌクレオチド、1000ヌクレオチド、またはそれ以上の領域にわたって、少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列を有する。好ましくは、触媒ドメインは、SEQ ID NO: 2のC. ジェジュニLI087由来のCgtD触媒ドメインに対し、少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸同一性を有する。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列は典型的に、カンピロバクター、ヘモフィルス (Haemophilus)、およびパストレラ (Pasteurella) を非限定的に含む細菌に由来する。本発明の核酸およびタンパク質は、天然分子または組換え分子の両方を含む。C. ジェジュニLI087由来のCgtDタンパク質は典型的に α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有するが、これは、本明細書に記載のように適切なドナー基質およびアクセプター基質を用いて、当業者に公知の方法により分析することができる。好ましい態様には、例えばSEQ ID NO: 2の全長CgtDタンパク質、または、例えばSEQ ID NO: 2の全長CgtDタンパク質をコードする核酸が含まれる。

【0023】

「商業規模」とは、単一反応でのガラクトシル化生成物のグラム規模の産生を指す。好ましい態様において、商業規模とは、約50、75、80、90、100、125、150、175、または200グラムを上回るガラクトシル化生成物産生を指す。

【0024】

本明細書において使用される「切断型CgtDポリペプチド」または文法上の変形は、該切断型CgtDポリペプチドが酵素活性を保持する限りにおいて、天然の野生型CgtDポリペプチドに対して少なくとも1つのアミノ酸残基を除去するよう操作された、CgtDポリペプチドを指す。

【0025】

「保存的に改変された変異体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された変異体とは、同一または本質的に同一なアミノ酸配列をコードする核酸を指し、あるいは、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、本質的に同一な配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。従って、コドンによってアラニンと規定されているあらゆる位置において、コドンは、コードされるポリペプチドを変化させることなく、記載された対応するコドンのいずれにも変更可能である。このような核酸変異は「サイレント変異」であり、これは、保存的に改変された変異の一種である。ポリペプチドをコードしている本明細書中の核酸配列は全て、該核酸の全ての可能なサイレント変異も表している。機能的に同一な分子を得るために核酸中の各コドン（通常はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常はトリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く）を改変できることを、当業者は認識するであろう。したがって、発現産物に関して記載された各配列には、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が内在するが、実際のプローブ配列に関して記載された各配列には内在しない。

【0026】

アミノ酸配列に関しては、コードされる配列中の単一のアミノ酸または少ないパーセンテージのアミノ酸を変更する、付加する、または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の配列に対する個々の置換、欠失、または付加が「保存的に改変された変異体」であり、その変化によってアミノ酸と化学的に類似したアミノ酸との置換がもたらされることを、当業者は認識するであろう。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である。そのような保存的に改変された変異体は、本発明の多型変異体、種間ホモログ、および対立遺伝子を除外するわけではなく、これらに補足されるものである。

【0027】

当業者は、タンパク質の機能に影響することなくタンパク質中の多くのアミノ酸を互い

10

20

30

40

50

に置換できること、すなわち、開示されたCgtDタンパク質などのタンパク質の保存的に改変された変異体の基本原理が保存的置換であることを認識する。不完全ではあるが、保存的アミノ酸置換の一覧を以下に示す。以下の8群はそれぞれ、互いに対して保存的置換となるアミノ酸を含む：(1) アラニン (A)、グリシン (G)；(2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；(3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；(4) アルギニン (R)、リシン (K)；(5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、アラニン (A)；(6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；(7) セリン (S)、スレオニン (T)、システイン (C)；および (8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照のこと)。

【0028】

本発明の細胞および方法は、一般的にはドナー基質からアクセプター分子へとガラクトース部分を移動させることによる、ガラクトシル化生成物の産生に有用である。また本発明の細胞および方法は、一般的にはドナー基質からアクセプター分子へと追加の単糖類またはスルフェート基を移動させることによる、追加の糖残基を含むガラクトシル化生成物である糖の産生にも有用である。付加は概して、糖脂質または糖タンパク質、例えば生体分子の表面におけるオリゴ糖、多糖 (例えばヘパリン、カラゲナンなど)、または糖質部分の非還元末端で起こる。本明細書で定義される生体分子は、糖質、オリゴ糖、ペプチド (例えば糖ペプチド)、タンパク質 (例えば糖タンパク質)、および脂質 (例えば糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、およびガングリオシド) などの生物学的に重要な分子を非限定的に含む。

【0029】

本発明の組換えタンパク質は、一方の末端における (該タンパク質の精製または同定を容易にする) 分子「精製タグ」との融合タンパク質として構築および発現されうる。グリコシル化反応の際に関心対象のタンパク質を固定化するために、そのようなタグを用いることもできる。適切なタグには、抗体によって特異的に認識されるタンパク質配列である「エピトープタグ」が含まれる。エピトープタグは一般に、容易に入手可能な抗体を使用して融合タンパク質を明確に検出または単離できるようにするために、該融合タンパク質内に組み込まれる。「FLAGタグ」は一般的に用いられるエピトープタグであり、これはモノクローナル抗FLAG抗体によって特異的に認識され、配列AspTyrLysAspAspAspLys (SEQ ID NO: 6) またはその実質的に同一な変異体からなる。その他の適切なタグが当業者に周知であり、これには例えば、ニッケルイオンやコバルトイオンなどの金属イオンに結合するヘキサヒスチジン (SEQ ID NO: 7) ペプチドなどのアフィニティータグ、またはmycタグが含まれる。精製タグを含むタンパク質は、該精製タグと結合する結合パートナー、例えば、該精製タグに対する抗体、ニッケルもしくはコバルトイオンまたは樹脂、および、アミロース、マルトース、またはシクロデキストリンを用いて精製することができる。精製タグにはまた、マルトース結合ドメインおよびデンブリン結合ドメインも含まれる。マルトース結合ドメインタンパク質の精製は、当業者に公知である。デンブリン結合ドメインは国際公開公報第99/15636号に記載されており、これは参照によって本明細書に組み入れられている。βシクロデキストリン (BCD) 誘導体化樹脂を用いた、デンブリン結合ドメインを含む融合タンパク質のアフィニティー精製は、2005年2月17日に公開された国際公開公報第2005/014779号に記載されており、その全文は参照によって本明細書に組み入れられている。

【0030】

「核酸」という用語は、一本鎖形態または二本鎖形態どちらかのデオキシリボヌクレオチドポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーを指し、特に限定されない限り、天然ヌクレオチドと類似の様式で核酸にハイブリダイズする天然ヌクレオチドの既知のアナログを包含する。特記しない限り、特定の核酸配列とはその相補配列を含む。「核酸」、「核酸配列」、および「ポリヌクレオチド」という用語は本明細書で互換的に用いられる。

【0031】

「機能的に連結される」という用語は、核酸発現制御配列 (プロモーター、シグナル配

10

20

30

40

50

列、または転写因子結合部位のアレイなど)と第二の核酸配列との機能的な連鎖を指し、ここで、発現制御配列は、第二の配列に対応する核酸の転写および/または翻訳に影響を与える。

【0032】

細胞に関連して使用する場合の「組換え」という用語は、細胞が、異種核酸を複製するか、または、異種核酸にコードされるペプチドもしくはタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、該細胞の天然(非組換え)型では見出されない遺伝子を含むことができる。また組換え細胞は、人為的手段によって改変され該細胞に再導入された、該細胞の天然型で見出される遺伝子を含むこともできる。この用語はまた、細胞から核酸を取り出すことなく改変された、該細胞に内在する核酸を含む細胞も包含するが、そのような改変には、遺伝子置換、部位特異的変異、および関連技術によって得られるものが含まれる。

10

【0033】

「組換え核酸」とは、人為的に構築された(例えば、2つの天然または合成の核酸断片の連結によって形成された)核酸を指す。またこの用語は、人為的に構築された核酸の複製または転写によって産生された核酸にも適用される。「組換えポリペプチド」は、組換え核酸(すなわち、細胞が本来有さない核酸、またはその天然形態から改変された核酸)の転写に続く、得られた転写産物の翻訳によって発現される。

【0034】

本明細書において用いる「異種ポリヌクレオチド」または「異種核酸」とは、特定の宿主細胞とは異なる供給源に起因するもの、または、同じ供給源由来の場合はその元の形態から改変されたものである。したがって、原核宿主細胞内の異種グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子には、特定の宿主細胞に対して内因性であるが改変されているグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれる。例えば、DNAを制限酵素で処理して、プロモーターに機能的に連結されることが可能なDNA断片を作製することによって、異種配列の改変を行うことができる。また、部位特異的突然変異誘発などの技術も、異種配列の改変に有用である。

20

【0035】

「部分配列」とは、核酸またはアミノ酸のより長い配列(例えばポリペプチド)の一部をそれぞれ含む、核酸またはアミノ酸の配列を指す。

【0036】

「組換え発現カセット」または単に「発現カセット」とは、そのような配列に互換的な宿主中の構造遺伝子の発現に影響を与えることができる核酸エレメントを有する、組換式的または合成的に作製された核酸構築物である。発現カセットには、少なくともプロモーターが、および任意で転写終結シグナルが含まれる。通常、組換え発現カセットには、転写されるべき核酸(例えば、所望のポリペプチドをコードする核酸)およびプロモーターが含まれる。本明細書に記載のように、発現の実施に必要なまたはそれに役立つさらなる要素を用いてもよい。例えば発現カセットは、宿主細胞からの発現タンパク質の分泌を指示するシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含むこともできる。転写終結シグナル、エンハンサー、および、遺伝子発現に影響するその他の核酸配列も、発現カセットに含めることができる。

30

40

【0037】

本発明の「融合CgtDポリペプチド」または「融合ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチド」とは、CgtDまたは α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼの触媒ドメインを含むポリペプチドである。融合ポリペプチドは、糖ヌクレオチド(例えばUDP-ガラクトース)の合成、および、糖ヌクレオチドからアクセプター分子への糖残基の移動を触媒することができる。典型的には、融合ポリペプチドの触媒ドメインは、グリコシルトランスフェラーゼの触媒ドメインおよび該触媒ドメインが由来する融合タンパク質と、少なくとも実質的に同一である。一部の態様において、CgtDポリペプチドと、エピメラーゼ、例えばUDP-グルコース4'エピメラーゼのポリペプチドとが融合して、単一のポリペプチドを形成する。ガラクトシルトランスフェラーゼ/UDP-グルコース4'エピメラーゼの例としては、

50

例えば、全目的に関して参照により本明細書に組入れられる国際公開公報第1999/031224号を参照されたい。

【0038】

本明細書で記載する「アクセサリー（accessory）酵素」とは、例えばグリコシルトランスフェラーゼ反応のための基質またはその他の反応物を形成する反応を触媒することに関与する酵素である。アクセサリー酵素は例えば、グリコシルトランスフェラーゼによって糖ドナー部分として使用されるヌクレオチド糖の形成を触媒することができる。またアクセサリー酵素は、ヌクレオチド糖の形成に必要なヌクレオチド三リン酸の産生において、またはヌクレオチド糖に組み込まれる糖の産生において使用される酵素であってもよい。アクセサリー酵素の一例は、UDP-グルコース4'エピメラーゼ、例えば*S.サーモフィルス*（*thermophilus*）由来のGalE（アクセッション番号M30175）である。

10

【0039】

「触媒ドメイン」とは、酵素によって通常実施される酵素反応を触媒するのに十分な該酵素の部分を指す。例えば、CgtDポリペプチドの触媒ドメインには、糖ドナーからアクセプター糖類へとガラクトース部分を移動させるのに十分なCgtDの部分が含まれる。触媒ドメインは、酵素全体、その部分配列を含むことができ、あるいは、天然において見出されるように該酵素または部分配列に付着していない追加のアミノ酸配列を含むことができる。

【0040】

「単離された」という用語は、酵素の作用を妨害する成分を実質的にも本質的にも含まない物質を指す。本発明の細胞、糖類、核酸、およびポリペプチドに関して、「単離された」という用語は、その天然状態で見出されるようにある物質に通常は付随する成分を実質的にも本質的にも含まない、該物質を指す。典型的には、本発明の単離された糖類、タンパク質、または核酸は、銀染色ゲル上のバンド強度またはその他の純度定量法により測定される、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%の純度を有し、通常は少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の純度を有する。純度または均質性は、タンパク質試料または核酸試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動に続く染色による可視化などの、当技術分野で周知のいくつかの手段によって示すことができる。特定の目的のためには高分解能が必要であり、HPLCまたは類似の精製手段が利用される。オリゴヌクレオチドまたはその他のガラクトシル化生成物に関しては、例えば薄層クロマトグラフィー、HPLC、または質量分析法を用いて純度を決定することができる。

20

30

【0041】

2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチドの配列の文脈における「同一である」または%「同一性」という用語は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いたまたは目視検査による測定で、最大限一致するよう比較および整列化した場合に、同一であるか、または、特定の割合のアミノ酸残基またはヌクレオチドが同一である、2つまたはそれ以上の配列または部分配列を指す。

【0042】

2つの核酸またはポリペプチドの文脈において「実質的に同一である」という用語は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いたまたは目視検査による測定で、最大限一致するよう比較および整列化した場合に、少なくとも60%、好ましくは80%または85%、最も好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のヌクレオチド同一性またはアミノ酸残基同一性を有する、2つまたはそれ以上の配列または部分配列を指す。好ましくは、少なくとも約50残基長の配列の領域にわたって、より好ましくは少なくとも約100残基の領域にわたって実質的に同一性が存在し、最も好ましくは、配列は、少なくとも約150残基にわたって実質的に同一である。最も好ましい態様において、配列は、コード領域の全長にわたって実質的に同一である。

40

【0043】

配列比較については、典型的には1つの配列を参照配列とし、それに対して試験配列を

50

比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピューターに入力し、必要であれば部分配列座標 (subsequence coordinate) を指定して、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。配列比較アルゴリズムはその後、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性 (%) を計算する。

【 0 0 4 4 】

例えばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性整列化アルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実施 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESFIT、FASTA、およびTFASTA) により、または視覚的観察 (概説として、Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supplement) (Ausubel)を参照されたい) により、比較のための最適な配列整列化を実施することができる。

【 0 0 4 5 】

配列同一性 (%) および配列類似性 (%) の決定に適したアルゴリズムの例は、BLAST およびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410およびAltschuel et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (www.ncbi.nlm.nih.gov/) を通じて公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列内の同じ長さのワードと整列化させた場合に一定の正の値の閾値スコアTに一致するかまたは満たすかのいずれかである、問い合わせ配列における長さWの短いワードを同定することによって、高スコア配列ペア(HSP)を初めに同定する工程を必要とする。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul et al., 前記)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するための種として役立つ。その後、累積アラインメントスコアが増加し得る限り、ワードヒットは各配列に沿って両方向に伸長する。ヌクレオチド配列に関しては、パラメータM (適合残基のペアに対する報酬スコア; 常に>0) およびN (不適合残基に対するペナルティスコア; 常に<0) を用いて、累積スコアを計算する。アミノ酸配列に関しては、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアを計算する。各方向へのワードヒットの伸長は以下の場合に停止する: 累積アラインメントスコアがその最大到達値から量Xだけ低下する場合; 1つまたは複数のネガティブスコアリング残基アラインメントの蓄積によって、累積スコアがゼロ以下になる場合; あるいは、いずれかの配列が末端に達する場合。BLASTアルゴリズムパラメータであるW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、デフォルトとして、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列用のBLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長 (W) 3、期待値 (E) 10、BLOSUM62スコアリングマトリックスを用いる (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)を参照されたい)。

【 0 0 4 6 】

配列同一性 (%) の計算に加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2配列間の類似性の統計学的解析も実施する (例えば、Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)を参照されたい)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の尺度の1つは最小合計確率 (P(N)) であり、これは、2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間の適合が偶然に起こる確率の指標を提供するものである。例えば、参照核酸と試験核酸の比較における最小合計確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合に、該核酸は参照配列と類似であるとみなされる。

【 0 0 4 7 】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる指標とは、後述のように、第一の核酸によりコードされるポリペプチドが第二の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるということである。このように、例えば2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、ポリペプチドは通常、第二のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標とは、後述のように、2つの分子がストリンジントな条件下で互いにハイブリダイズするということである。

【0048】

「特異的にハイブリダイズする」という句は、特定のヌクレオチド配列が複合混合物（例えば、細胞の全）DNAまたはRNA中に存在する場合に、該配列に対してのみ分子がストリンジントな条件下で結合、二重鎖形成、またはハイブリダイズすることを意味する。

【0049】

「ストリンジントな条件」という用語は、プローブがその標的部分配列とはハイブリダイズするが他の配列とはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジントな条件は配列依存的であり、別の環境下では異なると考えられる。配列が長くなればなるほど、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジントな条件とは、規定のイオン強度およびpHにおける特定配列の熱融点（ T_m ）より約5℃低くなるように選択される。 T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列とハイブリダイズする（規定のイオン強度、pH、および核酸濃度の下で）温度である。（標的配列は一般的に過剰量で存在するため、 T_m では、プローブの50%が平衡状態で占有される。）典型的には、ストリンジントな条件とは、pH7.0～8.3において塩濃度が Na^+ イオン濃度約1.0 M未満であり、典型的には Na^+ イオン（または他の塩）濃度約0.01 M～1.0 Mであり、かつ温度が、短いプローブ（例えば10～50ヌクレオチド）に対しては少なくとも約30℃、長いプローブ（例えば50ヌクレオチドより長い）に対しては少なくとも約60℃であるという条件である。またストリンジントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によって達成することもできる。高ストリンジントなアニーリング温度は、プライマー長および特異性に依じて約50℃～約65℃の範囲にわたってもよいが、高ストリンジントなPCR増幅のためには約62℃の温度が典型的である。高ストリンジントおよび低ストリンジントな増幅の両方のための典型的なサイクル条件には、90～95℃の変性段階（30～120秒間）、アニーリング段階（30～120秒間持続させる）、および約72℃の伸長段階（1～2分間）が含まれる。低ストリンジントおよび高ストリンジントな増幅反応に関するプロトコールおよびガイドラインは、例えばInnis, et al. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, N.Y.において入手可能である。

【0050】

抗体に関する場合の「～に特異的に結合する」または「～に対して特異的免疫反応性を有する」という用語は、タンパク質、糖類、および他の生体物質の異種集団の存在下におけるタンパク質または他の抗原の存在の決定因子となる結合反応を指す。このように、指定されたイムノアッセイ条件下において、特定の抗体は特定のタンパク質に優先的に結合し、試料中に存在する他のタンパク質に対しては有意な量で結合しない。そのような条件下における抗原への特異的結合には、特定の抗原に対するその特異性について選択された抗体が必要である。特定の抗原に対して特異的免疫反応性を有する抗体を選択するために、様々なイムノアッセイ形式を用いることができる。例えば、抗原に対して特異的免疫反応性を有するモノクローナル抗体を選択するために、固相ELISAイムノアッセイが慣用的に使用される。特異的免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイ形式および条件の説明については、Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照されたい。

【0051】

「抗体」とは、抗原に特異的に結合しかつそれを認識する、免疫グロブリン遺伝子またはその断片に由来するフレームワーク領域を含むポリペプチドを指す。認められている免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、および μ 定常領域遺伝子、ならびに

10

20

30

40

50

種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。好ましい態様において、CgtDタンパク質に特異的に結合する抗体が産生される。軽鎖は κ または λ のいずれかに分類される。重鎖は γ 、 μ 、 α 、 δ 、または ϵ に分類され、これらが次に、免疫グロブリンクラスであるIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEをそれぞれ定義する。典型的には、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性および親和性において最も重要であると考えられる。

【0052】

例示的な免疫グロブリン（抗体）の構造単位には、四量体が含まれる。各四量体は、ポリペプチド鎖の同一の対2つから構成され、各対は、一つの「軽」鎖（約25 kD）および一つの「重」鎖（約50 kD～70 kD）を有する。各鎖のN末端は、主に抗原認識に關与する約100～110アミノ酸またはそれ以上の可変領域を定義する。可変軽鎖（ V_L ）および可変重鎖（ V_H ）という用語は、それぞれ、これら軽鎖および重鎖を指す。

【0053】

抗体は例えば、無傷の免疫グロブリンとして、または、様々なペプチダーゼによる消化によって生じた、いくつかの十分に特徴決定された断片として存在する。したがって、例えばペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合より下で抗体を消化して、それ自身がジスルフィド結合により V_H - C_H1 に連結された軽鎖であるFabの二量体である $F(ab)'_2$ を産生する。 $F(ab)'_2$ は、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を切断するための穏やかな条件下で還元されうり、それによって、 $F(ab)'_2$ 二量体がFab'単量体へと変換される。Fab'単量体とは本質的に、ヒンジ領域の部分をも有するFabである（Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993) を参照されたい）。完全な抗体の消化の観点から様々な抗体断片が定義されているが、化学的にまたは組換えDNA方法論を使用することによりそのような断片を新たに合成してもよいことを、当業者は認識するであろう。従って、本明細書において用いられる抗体という用語は、抗体全体の改変により産生される抗体断片、または組換えDNA方法論を用いて新たに合成される抗体断片（例えば、一本鎖Fv）、またはファージディスプレイライブラリを用いて同定される抗体断片（例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)を参照）も含む。

【0054】

例えば組換え抗体、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体などの抗体の調製に関しては、当技術分野で公知の多くの技術を使用することができる（例えば、Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); およびGoding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986)を参照されたい）。関心対象の抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を細胞からクローニングすることが可能であり、例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマからクローニングして、組換えモノクローナル抗体を産生するために使用することができる。また、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子ライブラリも、ハイブリドーマまたは形質細胞から作製することができる。重鎖および軽鎖遺伝子産物の無作為な組み合わせにより、異なる抗原特異性を有する抗体の大規模なプールが作製される（例えば、Kuby, Immunology (3rd ed. 1997)を参照されたい）。一本鎖抗体または組換え抗体の産生技術（米国特許第4,946,778号および米国特許第4,816,567号）を、本発明のポリペプチドに対する抗体を産生するために適合化させることができる。また、ヒト化抗体またはヒト抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは、他の哺乳動物などの他の生物を使用してもよい（例えば、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)；Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994)；Morrison, Nature 368:812-13 (1994)；Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996)；およびLonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参照されたい）。あるいは、抗体および、選択された抗原に特異的に結合するへ

テロメリックな (heteromeric) Fab断片を同定するために、ファージディスプレイ技術を使用することができる (例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)を参照されたい)。また抗体を二重特異性にもすることもでき、すなわち、2つの異なる抗原を認識させることができる (例えば、国際公開公報第93/08829号、Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991); および Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)を参照されたい)。抗体は、ヘテロ接合体、例えば2つの共有結合抗体であっても、または免疫毒素であってもよい (例えば、米国特許第4,676,980号、国際公開公報第91/00360号; 同第92/200373号; およびEP 03089を参照されたい)。

【0055】

一態様において、抗体は、「エフェクター」部分に接合する。エフェクター部分とは、診断アッセイにおいて使用するための放射性標識または蛍光標識などの標識部分を含む、任意の数の分子でありうる。

【0056】

タンパク質またはペプチドに言及する場合、抗体に「特異的に (または選択的に) 結合する」あるいは「～に対して特異的 (または選択的) 免疫反応性を有する」という句は、多くの場合タンパク質および他の生体物質の不均一集団における、該タンパク質の存在の決定因子となる結合反応を指す。したがって、指定されたイムノアッセイ条件下において、特定の抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10倍～100倍を上回って、特定のタンパク質に結合する。そのような条件下における抗体への特異的結合には、特定のタンパク質に対するその特異性について選択された抗体が必要である。例えば、CgtDタンパク質、その多型変異体、対立遺伝子、オルソログ、および、保存的改変変異体、またはスプライス変異体、あるいはその一部に対するポリクローナル抗体は、CgtDタンパク質に対して特異的免疫反応性を有するが他のタンパク質に対しては有さないポリクローナル抗体のみを得るために選択される。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を除くことによって達成されうる。特定のタンパク質に対して特異的免疫反応性を有する抗体を選択するために、様々なイムノアッセイ形式を用いることができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質に対して特異的免疫反応性を有する抗体を選択するために慣用的に使用される (特異的免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイ形式および条件の説明については、例えば、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988) を参照されたい)。

【0057】

「抗原」とは、抗体が認識および結合する分子、例えばペプチド、糖質、有機分子、または、糖脂質および糖タンパク質などのより複雑な分子である。抗体結合の標的となる抗原の部分が抗原決定基であり、単一の抗原決定基に対応する小さな官能基はハプテンと呼ばれる。

【0058】

「標識」とは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的な手段により検出可能な組成物である。有用な標識には、例えば、 ^{32}P 、 ^{125}I 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素 (例えばELISAにおいて一般に使用される酵素)、ビオチン、ジゴキシゲニン、または、その抗血清またはモノクローナル抗体が入手可能なハプテンおよびタンパク質 (例えば放射標識をペプチドに組み込むことによって、例えばSEQ ID NO: 2のポリペプチドを検出可能にすることができ、これを用いて該ペプチドに対して特異的反応性を有する抗体を検出することができる) が含まれる。

【0059】

「イムノアッセイ」という用語は、抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。イムノアッセイは、抗原を単離、標的化、および/または定量するために特定の抗体の特異的結合特性を使用することを特徴とする。

【0060】

「担体分子」という用語は、T細胞によって認識される抗原決定基を含む免疫原性分子

10

20

30

40

50

を意味する。担体分子はタンパク質であってもよく、脂質であってもよい。ポリペプチド免疫原性を付与するために、担体タンパク質をポリペプチドに接合する。担体タンパク質には、キーホールリンベットヘモシアニン、カプトガニヘモシアニン、およびウシ血清アルブミンが含まれる。

【0061】

「アジュバント」という用語は、抗原に対する免疫応答を非特異的に増幅する物質を意味する。アジュバントには、完全または不完全フロイントアジュバント；Titermax Gold アジュバント；水酸化アルミニウム（alum）；および細菌LPSが含まれる。

【0062】

「接触させる」という用語は、本明細書において以下と互換的に使用される：組み合わせる、添加する、混合する、通す、インキュベーションする、流すなど。

【0063】

III. CgtDポリペプチド

本発明のCgtDポリペプチドには、SEQ ID NO: 2と同一であるかまたはSEQ ID NO: 2に対して特定の%同一性を有するアミノ酸配列が含まれる。CgtDポリペプチドとは α -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素であり、UDP-ガラクトースから末端ガラクトースを含むオリゴ糖へとガラクトースを移動させる機能的活性を有する。

【0064】

CgtDタンパク質に関連するタンパク質をコードする核酸は、他のC. ジェジュニ株、例えばATCC 43429およびATC43430においても同定された。これらのタンパク質のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 3およびSEQ ID NO: 4に見出される。ATCC 43429とATC43430のアミノ酸配列は同一であり、LIO87 CgtDタンパク質に対して58%の同一性を有する。関連タンパク質のアラインメントを、図2に示す。現在まで、ATCC 43429およびATC43430由来のCgtDポリペプチドに対する活性は同定されていない。

【0065】

Clustal Wプログラムを用いて、図2のアラインメントを作成した。図中にはコンセンサス配列が含まれる。同一の、保存的な、および半保存的なアミノ酸残基を、図に示す。無印の残基は、明確な保存性のない領域または残基を表す。

【0066】

Clustal Wまたは当業者に公知の類似プログラムにより作成したアラインメントを用いて、同一の、保存的な、または半保存的な残基を同定することができ、CgtD活性に対して有害であり得るアミノ酸残基変更を予想および回避するためにこれらを使用することができる。またそのようなアライメントを用いて、タンパク質活性に影響を与えることなく変更されうる可能性が最も高いアミノ酸残基を同定することもできる。本明細書においてまたはClustal Wウェブサイトで同定された保存的残基を選択することにより、あるいは、図2などの添付図面における対応するアミノ酸の一つに対する改変を選択することにより、必要に応じて、アミノ酸の変更を行うことができる。

【0067】

IV. CgtDポリペプチドをコードする核酸の単離

CgtDポリペプチドをコードする核酸には、上述のCgtDポリペプチド、例えばSEQ ID NO: 2をコードする核酸、および、該配列の保存的改変変異体が含まれる。本発明のCgtDポリペプチドは、ドナー基質からアクセプター基質へのガラクトース部分の移動を触媒する。

【0068】

本明細書に開示された情報に基づくさらなるCgtDポリペプチドをコードする核酸、およびそのような核酸を入手する方法は、当業者に公知である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写増幅システム（TAS）、または自立配列複製システム（SSR）などのインビトロ法によって、適切な核酸（例えばcDNA、ゲノム、または部分配列（プローブ））をクローニングまたは増幅することができる。多種多様なクローニングおよびインビトロ増幅の方法論が、当業者には周知である。これらの技術および、多くのクローニング演習によって当業者を導くのに十分な教示の例は、以下に記載されている：

Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook et al.); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel); Cashion et al., 米国特許第5,017,478号; およびCarr, 欧州特許第0,246,864号。

【 0 0 6 9 】

CgtDポリペプチドをコードするDNAまたはその部分配列は、例えばクローニングおよび制限酵素による適切な配列の制限消化を含む上述の適切な方法のいずれかによって調製することができる。好ましい一態様において、CgtDポリペプチドをコードする核酸は、慣用のクローニング法によって単離される。例えばSEQ ID NO: 1において提供されるCgtDポリペプチドのヌクレオチド配列を用いて、(例えばサザンブロットまたはノーザンブロットにおいて、)ゲノムDNA試料中のCgtDポリペプチドをコードする遺伝子に、あるいは全RNA試料中のCgtDポリペプチドをコードするmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブを提供することができる。一旦CgtDポリペプチドをコードする標的核酸が同定されたら、当業者に公知の標準的方法によってこれを単離することができる(例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; Berger and Kimmel (1987) Methods in Enzymology, Vol. 152: Guide to Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc.; またはAusubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New Yorkを参照されたい)。さらに、単離された核酸を制限酵素で切断して、全長CgtDポリペプチドをコードする核酸、または、例えばCgtDポリペプチドの触媒ドメインの少なくとも部分配列をコードする部分配列を含む、その部分配列を作製することができる。例えばCgtDタンパク質をコードする核酸を作製するために、その後、CgtDポリペプチドまたはその部分配列をコードするこれらの制限酵素断片をライゲーションすることができる。

【 0 0 7 0 】

CgtDポリペプチドをコードする核酸またはその部分配列は、発現産物を分析することによって特徴決定することができる。発現タンパク質の物理的、化学的、または免疫学的特性の検出に基づく分析を用いることができる。例えば、クローニングされたCgtD核酸にコードされるタンパク質がドナー基質からアクセプター基質へのガラクトース部分の移動を触媒することができる能力によって、該核酸を同定することができる。一つの方法において、反応産物を検出するためにキャピラリー電気泳動を用いる。この高感受性の分析は、Wakarchuk et al. (1996) J. Biol. Chem. 271 (45): 28271-276に記載のようにフルオレセインで標識された糖類または二糖類のアミノフェニル誘導体のいずれかの使用を必要とする。CgtD活性を分析するために、Lac-FCHASEを基質として用いることができる。キャピラリー電気泳動を用いてその他のグリコシルトランスフェラーゼの反応産物を検出することができる。例えば、ナイセリア(Neisseria) lgtC酵素を分析するためにFCHASE-AP-LacまたはFCHASE-AP-Galのいずれかを用いることができるが、一方ナイセリア lgtB酵素に関しては、FCHASE-AP-GlcNAc (Wakarchuk、上記)が適切な試薬である。 α 2,8-シアリルトランスフェラーゼを分析するために、基質としてGM3-FCHASEを用いる。例えば米国特許第6,503,744号を参照されたく、これは参照により本明細書に組み入れられる。オリゴ糖反応生成物を検出するためのその他の方法には薄層クロマトグラフィーおよびGC/MSが含まれ、これらは、参照により本明細書に組み入れられた米国特許第6,503,744号に開示されている。

【 0 0 7 1 】

また、CgtDポリペプチドをコードする核酸またはその部分配列を化学合成することもできる。適切な方法には、Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99のホストトリ

10

20

30

40

50

エステル法 ; Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151のホスホジエステル法 ; Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862のジエチルホスホラミダイト法 ; および、米国特許第4,458,066号の固体支持体法が含まれる。化学合成によって、一本鎖オリゴヌクレオチドが産生される。これを、相補配列とのハイブリダイゼーションによって、または、鋳型として上記一本鎖を用いたDNAポリメラーゼによる重合によって、二本鎖DNAへと変換することができる。DNAの化学合成は約100塩基の配列に制限されることが多いが、より短い配列をライゲーションすることによってより長い配列が得られることを、当業者は認識している。

【 0 0 7 2 】

CgtDポリペプチドをコードする核酸またはその部分配列を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) などのDNA増幅法を用いてクローニングすることができる。したがって、例えば、1つの制限酵素部位 (例えばNdeI) を含むセンスプライマーおよび別の制限酵素部位 (例えばHindIII) を含むアンチセンスプライマーを用いて、核酸配列または部分配列をPCR増幅する。これによって、所望のCgtDポリペプチドまたは部分配列をコードしかつ末端制限酵素部位を有する核酸が作製される。その後この核酸を、第二の分子をコードする核酸を含有しかつ対応する適切な制限酵素部位を有するベクター内に、容易にライゲーションすることができる。当業者は、GenBankまたはその他の情報源より提供される配列情報を用いて、適切なPCRプライマーを決定することができる。また、適切な制限酵素部位を、CgtDタンパク質またはそのタンパク質部分配列をコードする核酸に、部位特異的突然変異誘発によって付加することもできる。CgtDタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分配列を含むプラスミドは、適切な制限エンドヌクレアーゼで切断され、その後、標準的方法によって増幅および/または発現のための適切なベクターへとライゲーションされる。インピット増幅法を通じて当業者を導くのに十分な技術の例は、以下に認められる : Berger、Sambrook、およびAusubel、ならびにMullis et al., (1987) 米国特許第4,683,202号 ; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990) C &EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem., 35: 1826; Landegren et al., (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu and Wallace (1989) Gene 4: 560; およびBarringer et al. (1990) Gene 89: 117.

【 0 0 7 3 】

細菌CgtDタンパク質をコードするいくつかの核酸を、本明細書に開示したCgtD核酸の配列に基づくPCRプライマーを用いて増幅することができる。CgtDタンパク質をコードする核酸を増幅するために使用できるPCRプライマーの例には、以下のプライマー対が含まれる。

CJ-636プライマー (SEQ ID NO:8)

TAAAAGGCTACATATGACTGAAATTTCAAGTTTTTGG

(NdeI部位を下線で示す)

CJ-639プライマー (SEQ ID NO: 9)

GGCAAGATGATTGTCGACTTAGGCATTGTTTTTC

(SalI部位を下線で示す)

【 0 0 7 4 】

一部の細菌においては、特定の染色体遺伝子座、例えばC. ジェジュニのLOS遺伝子座を増幅し、次に、該遺伝子座において典型的に見出されるCgtD核酸を同定することによって、CgtDタンパク質をコードする核酸を単離することができる (例えば米国特許第6,503,744号を参照されたい)。CgtDタンパク質をコードする核酸を含むLOS遺伝子座を増幅するために使用できるPCRプライマーの例には、以下のプライマー対が含まれる。

CJ42: ヘプトシルTアーゼ (heptosylTase) -II内のプライマー (SEQ ID NO: 10)

5' GC CAT TAC CGT ATC GCC TAA CCA GG 3' 25 mer

CJ43: ヘプトシルTアーゼ-I内のプライマー (SEQ ID NO: 11)

5' AAA GAA TAC GAA TTT GCT AAA GAG G 3' 25 mer

【0075】

特定の核酸から発現された組換えCgtDポリペプチドのその他の物理特性を公知のCgtDポリペプチドの特性と比較して、アクセプター基質特異性および/または触媒活性の決定因子であるCgtDポリペプチドの適切な配列またはドメインを同定する別の方法を提供することができる。あるいは、推定CgtDポリペプチドまたは組換えCgtDポリペプチドを変異させることができ、かつ、グリコシルトランスフェラーゼとしてのその役割または特定の配列もしくはドメインの役割が、変異していない、天然の、または対照のCgtDポリペプチドにより通常産生される糖質の構造における変動を検出することによって確立された。CgtDポリペプチドをコードする核酸を操作するための分子生物学的技術、例えばPCRによって、本発明のCgtDポリペプチドの変異または改変が促進されうることを、当業者は認識するであろう。

10

【0076】

本明細書に記載のように、ポリペプチドを変異させるか改変するための標準的方法を用いることによって、ならびに、そのようなアクセプター基質活性および/または触媒活性などの活性についてこれらを試験することによって、新たに同定されたCgtDポリペプチドの機能的ドメインを同定することができる。様々なCgtDポリペプチドの機能的ドメインを用いて、CgtDポリペプチドおよび1つまたは複数のCgtDポリペプチドの機能的ドメインをコードする核酸を構築することができる。その後、望ましいアクセプター基質または触媒活性について、これらの多 (multi-) CgtD融合タンパク質を試験することができる。

20

【0077】

CgtDタンパク質をコードする核酸をクローニングするための例示的なアプローチにおいて、クローニングされたCgtDポリペプチドの公知の核酸またはアミノ酸の配列を整列化および比較し、様々なCgtDポリペプチドの間の配列同一性の量を決定する。この情報を用いて、関心対象のCgtDタンパク質の間の配列同一性の量に基づき、CgtD活性、例えばアクセプター基質活性および/または触媒活性を付与または調節するタンパク質ドメインを同定および選択することができる。例えば、関心対象のCgtDタンパク質の間の配列同一性を有するドメイン、および、公知の活性と関連するドメインを用いて、該ドメインを含有しかつ該ドメインに関連する活性 (例えば、アクセプター基質特異性および/または触媒活性) を有するCgtDタンパク質を構築することができる。

30

【0078】

V. 宿主細胞におけるCgtDポリペプチドの発現

大腸菌 (*E. coli*)、その他の細菌宿主、および酵母を含む様々な宿主細胞中で、本発明のCgtDタンパク質を発現させることができる。宿主細胞は、例えば酵母細胞、細菌細胞、または糸状菌細胞などの微生物細胞であることが好ましい。適切な宿主細胞の例には、中でも、例えば、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属 (例えば *A. vinelandii*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、エシェリキア (*Escherichia*) 属 (例えば大腸菌)、バチルス (*Bacillus*)、シュードモナス、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ (*Salmonella*)、セラチア (*Serratia*)、シゲラ (*Shigella*)、根粒菌 (*Rhizobia*)、ビトレオシラ (*Vitreoscilla*)、パラコッカス (*Paracoccus*)、およびクレブシエラ (*Klebsiella*) 属が含まれる。細胞は、以下を含む複数の属のいずれかに由来しうる：サッカロミセス (*Saccharomyces*) (例えば *S. cerevisiae*)、カンジダ (*Candida*) (例えば *C. utilis*)、*C. parapsilosis*、*C. krusei*、*C. versatilis*、*C. lipolytica*、*C. zeylanoides*、*C. guilliermondii*、*C. albicans*)、および *C. fumicola*、*Pichia* (例えば *P. farinosa*) および *P. ohmeri*)、トルロプシス (*Torulopsis*) (例えば *T. candida*)、*T. sphaerica*、*T. xylinus*、*T. famata*)

40

50

、およびT. ベルサチリス (*versatilis*)、デバリオミセス (*Debaryomyces*) (例えばD. サブグロボス (*subglobosus*)、D. カンタレリイ (*cantarellii*)、D. グロボス (*globosus*)、D. ハンセニイ (*hansenii*)、およびD. ジャポニクス (*japonicus*)、チゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) (例えばZ. ルキシイ (*rouxii*) およびZ. バイリー (*bailii*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) (例えばK. マルキシアヌス (*marxianus*)、ハンセヌラ (*Hansenula*) (例えばH. アノマラ (*anomala*) およびH. ジャジニー (*jadinii*)、ならびにブレタノミセス (*Brettanomyces*) (例えばB. ランビカス (*lambicus*) およびB. アノマラス (*anomalus*)。有用な細菌の例には、これらに限定されるわけではないが、エシェリキア、エンテロバクター (*Enterobacter*)、アゾトバクター、エルウィニア、クレブシエラ、バチルス、シュードモナス、プロテウス、およびサルモネラが含まれる。

10

【0079】

一旦CgtDポリペプチドが宿主細胞中で発現されたら、これを用いてガラクトシル化生成物を産生することができる。例えば、標準的なタンパク質精製技術を用いてCgtDポリペプチドを単離することができ、かつこれを、ガラクトシル化生成物を作製するための本明細書に記載のインビトロ反応において使用することができる。また、透過処理済みの (permeabilized) 宿主細胞と同じく、部分的に精製されたCgtDポリペプチドも、ガラクトシル化生成物を作製するためのインビトロ反応において用いることができる。また、ガラクトシル化生成物を産生するためのインビボ系 (例えば発酵産生) において、宿主細胞を使用することもできる。

20

【0080】

典型的には、CgtDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、所望の宿主細胞中で機能するプロモーターの制御下に置く。具体的な用途に応じて、極めて多種多様なプロモーターが周知であり、本発明の発現ベクター中で使用可能である。通常は、プロモーターが活性となるべき細胞によって、プロモーターが選択される。リボソーム結合部位、転写終結部位などのその他の発現制御配列もまた、任意で含まれる。1つまたは複数のこれらの制御配列を含む構築物を「発現カセット」と称する。したがって本発明は、所望の宿主細胞における高レベル発現のための融合タンパク質をコードする核酸が組み込まれた発現カセットを提供する。

【0081】

30

特定の宿主細胞における使用に適した発現制御配列は、該細胞中で発現する遺伝子のクローニングによって得られることが多い。通常使用される原核制御配列は、本明細書において、リボソーム結合部位配列と共に (任意でオペレーターを有する) 転写開始用プロモーターを含むと定義されており、 β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトース (*lac*) プロモーター系 (Change et al., *Nature* (1977) 198: 1056)、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* (1980) 8: 4057)、*tac* プロモーター (DeBoer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1983) 80:21-25)、ならびに、 λ 由来P_L プロモーターおよびN遺伝子リボソーム結合部位 (Shimatake et al., *Nature* (1981) 292: 128) などの、通常使用されるプロモーターを含む。具体的なプロモーター系は本発明にとっては重要でなく、原核生物中で機能する任意の利用可能なプロモーターを用いることができる。

40

【0082】

大腸菌以外の原核細胞におけるCgtDタンパク質の発現のためには、特定の原核生物種において機能するプロモーターが必要である。そのようなプロモーターは該種からクローニングされた遺伝子より入手可能であり、あるいは、異種プロモーターが使用可能である。例えば、ハイブリッド*trp-lac*プロモーターは、大腸菌に加えてバチルス中でも機能する。

【0083】

リボソーム結合部位 (RBS) は、本発明の発現カセット中に都合よく含まれる。例えば大腸菌中のRBSは、開始コドンから3~11ヌクレオチド上流に位置する3~9ヌクレオチド長

50

のヌクレオチド配列からなる (Shine and Dalgarno, Nature (1975) 254: 34; Steitz, In Biological regulation and development: Gene expression (ed. R.F. Goldberger), vol. 1, p. 349, 1979, Plenum Publishing, NY)。

【 0 0 8 4 】

酵母におけるCgtDタンパク質の発現のために都合のよいプロモーターには、GAL1-10 (Johnson and Davies (1984) Mol. Cell. Biol. 4:1440-1448)、ADH2 (Russell et al (1983) J. Biol. Chem. 258:2674-2682)、PHO5 (EMBO J. (1982) 6:675-680)、およびMF α (Herskowitz and Oshima (1982) in The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (eds. Strathern, Jones, and Broach) Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 181-209) が含まれる。酵母における使用に適した別のプロモーターは、Cousens et al., Gene 61 :265-275 (1987)に記載のADH2/GAPDHハイブリッドプロモーターである。例えば、真菌アスペルギルス (*Aspergillus*) の株 (McKnight et al., 米国特許第4,935,349号) などの糸状菌に関して、有用なプロモーターの例には、ADH3プロモーター (McKnight et al., EMBO J. 4: 2093-2099 (1985)) およびtpiAプロモーターなどのアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) 糖分解遺伝子由来のプロモーターが含まれる。適切なターミネーターの例は、ADH3ターミネーターである (McKnight et al.)。

【 0 0 8 5 】

本発明において、構成的なプロモーターまたは調節された (regulated) プロモーターのいずれかを用いることができる。融合タンパク質の発現が誘導される前に宿主細胞が高密度に増殖できるので、調節されたプロモーターが有利であり得る。異種タンパク質の高レベル発現は、場合によっては細胞増殖を遅延させる。誘導性 (inducible) プロモーターとは、例えば温度、pH、無気条件または有気条件、光、転写因子、および化学物質などの環境因子または発達因子によってその発現レベルが改変可能である遺伝子の発現を導く、プロモーターである。そのようなプロモーターを本明細書において「誘導性」プロモーターと称し、これによって、グリコシルトランスフェラーゼまたはヌクレオチド糖合成に関与する酵素の発現のタイミングを制御することが可能になる。大腸菌およびその他の細菌宿主細胞に関して、誘導性プロモーターは当業者に公知である。これらには例えば、lacプロモーター、バクテリオファージ λ P_Lプロモーター、ハイブリッドtrp-lacプロモーター (Amann et al. (1983) Gene 25: 167; de Boer et al. (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80: 21)、およびバクテリオファージT7プロモーター (Studier et al. (1986) J. Mol. Biol.; Tabor et al. (1985) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82: 1074-8) が含まれる。これらのプロモーターおよびその使用は、Sambrook et al., 上記で考察されている。原核生物における発現のために好ましい特定の誘導性プロモーターは、ガラクトース代謝に関与する酵素をコードする遺伝子より得られたプロモーター成分 (例えば、UDPガラクトース4-エピメラーゼ遺伝子 (galE) 由来のプロモーター) に連結したtacプロモーター成分を含む、二重 (dual) プロモーターである。二重tac-galプロモーターは、国際公開公報第98/20111号に記載されている。

【 0 0 8 6 】

遺伝子発現制御シグナルに機能的に連結された関心対象のポリヌクレオチドを含む構築物であって、該シグナルが適切な宿主細胞中に配置された場合に該ポリヌクレオチドの発現を駆動する構築物を、「発現カセット」と称する。本発明の融合タンパク質をコードする発現カセットは、宿主細胞への導入用の発現ベクター内に配置されることが多い。ベクターは典型的に、発現カセットに加えて、1つまたは複数の選択された宿主細胞中でベクターが独立に複製を行うことを可能にする核酸配列を含む。一般にこの配列は、宿主染色体DNAとは独立してベクターが複製を行うことを可能にする配列であり、複製起点または自立複製配列を含む。そのような配列は、様々な細菌について周知である。例えば、プラスミドpBR322由来の複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適している。あるいは、宿主細胞ゲノム補体 (complement) に一体化させ、細胞がDNA複製を受ける際に複製させることによって、ベクターを複製することができる。細菌細胞における酵素の発現のために好ま

しい発現ベクターはpTGKであり、これは、二重tac-galプロモーターを含み、国際公開公報第98/20111号に記載されている。

【 0 0 8 7 】

ポリヌクレオチド構築物の構築には一般に、細菌中で複製可能なベクターの使用が必要である。細菌からのプラスミド精製に関しては、おびただしい数のキットが市販されている（例えば、EasyPrepJ、FlexiPrepJ、どちらもPharmacia Biotech製；StrataCleanJ、Stratagene製；およびQIAexpress Expression System、Qiagenを参照されたい）。その後、単離および精製されたプラスミドを、その他のプラスミドを産生するようにさらに操作することができ、かつ細胞のトランスフェクションのために使用することができる。ストレプトミセス（*Streptomyces*）またはバチルスにおけるクローニングも可能である。

10

【 0 0 8 8 】

選択マーカー（selectable marker）は、本発明のポリヌクレオチドを発現させるために用いる発現ベクター中に組み込まれることが多い。これらの遺伝子は、選択的培養培地中で増殖する形質転換宿主細胞の生存または増殖に必要な、タンパク質などの遺伝子産物をコードすることができる。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されていない宿主細胞は、上記培養培地中で生存しないと考えられる。典型的な選択遺伝子は、アンピシリン、ネオマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコール、もしくはテトラサイクリンなどの抗生物質またはその他の毒素に対する耐性を付与するタンパク質をコードする。あるいは選択マーカーは、栄養要求性の欠乏を補完するか複合培地からは入手できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしてもよく、たとえばバチルスについてはD-アラニラセマーゼをコードする遺伝子である。ベクターは、例えば大腸菌において、または宿主細胞に導入される前にベクターが複製されるその他の細胞において機能的である選択マーカー1つを有することが多い。いくつかの選択マーカーは当業者に公知であり、例えばSambrook et al.、上記に記載されている。

20

【 0 0 8 9 】

上記で列挙した成分の1つまたは複数を含む適切なベクターの構築には、上記で引用した参考文献に記載の標準的なライゲーション技術が用いられる。単離されたプラスミドまたはDNA断片は、切断され、調整され、かつ、必要なプラスミドの作製に望ましい形態で再ライゲーションされる。構築されたプラスミド中の正しい配列を確認するために、制限エンドヌクレアーゼ消化などの標準的技術によって、および/または公知の方法による配列決定によって、プラスミドを解析することができる。これらの末端を得るための分子クローニング技術は、当技術分野で公知である。組換え核酸の構築に適した多種多様なクローニングおよびインビトロ増幅法は、当業者に周知である。これらの技術および多くのクローニング実習によって当業者を導くのに十分な教示の例は、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); およびCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1998 Supplement) (Ausubel)に見出される。

30

【 0 0 9 0 】

本発明の発現ベクター構築のための出発材料としての使用に適した様々な一般的ベクターが、当技術分野で周知である。細菌におけるクローニングに関して、一般的なベクターには、pBLUESCRIPT（商標）などのpBR322由来ベクター、およびλファージ由来ベクターが含まれる。酵母において、ベクターは、酵母組込みプラスミド（例えばYIp5）および酵母複製プラスミド（YRpシリーズのプラスミド）およびpGPD-2を含む。哺乳動物細胞における発現は、pSV2、pBC12BI、およびp91023を含む一般に入手可能な様々なプラスミド、ならびに、溶解（lytic）ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、およびバキュロウイルス）、エピソームウイルスベクター（例えばウシパピローマウイルス）、およびレトロウイルスベクター（例えばマウスレトロウイルス）を用いて達成できる。

40

50

【0091】

選択した宿主細胞中に発現ベクターを導入するための方法は特に重要ではなく、そのような方法は当業者に公知である。例えば、塩化カルシウム形質転換によって大腸菌などの原核細胞中に、および、リン酸カルシウム処置またはエレクトロポレーションによって真核細胞中に、発現ベクターを導入することができる。その他の形質転換法もまた適している。

【0092】

翻訳カップリングを用いて、発現を増幅してもよい。この戦略では、翻訳系固有の高発現遺伝子に由来する上流の短いオープンリーディングフレーム（プロモーターの下流に配置する）、および、終結コドンによる数アミノ酸コドンの後に続くリボソーム結合部位が用いられる。終結コドンの直前は第二のリボソーム結合部位であり、終結コドンの後ろは翻訳開始のための開始コドンである。この系によってRNA中の二次構造が解消され、効率的な翻訳開始が可能になる。Squires, et. al. (1988), J. Biol. Chem. 263: 16297-16302を参照されたい。

【0093】

CgtDポリペプチドを細胞内で発現させることができ、または、細胞から分泌させることができる。細胞内発現は高収量につながることが多い。必要ならば、再折りたたみ工程の実施により、可溶性で活性な融合タンパク質の量を増大させてもよい（例えば、Sambrook et al., 上記; Marston et al., Bio/Technology (1984) 2: 800; Schoner et al., Bio/Technology (1985) 3: 151を参照されたい）。CgtDポリペプチドが細胞から周辺質または細胞外培地のいずれかへと分泌される態様においては、DNA配列を、切断可能なシグナルペプチド配列と連結する。シグナル配列は、細胞膜を介した融合タンパク質の移行を導く。大腸菌中での使用に適した、プロモーター-シグナル配列単位を含むベクターの例はpTA1529であり、これは、大腸菌phoAプロモーターおよびシグナル配列を有する（例えば、Sambrook et al., 上記; Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82: 7212; T almadge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 3988; Takahara et al., J. Biol. Chem. (1985) 260: 2670を参照されたい）。別の態様においては、精製、分泌、または安定性を促進するために、例えばプロテインAまたはウシ血清アルブミン（BSA）の部分配列とCgtDタンパク質とを融合させる。

【0094】

また、本発明のCgtDポリペプチドを、その他の細菌タンパク質に更に連結することもできる。正常な原核制御配列は転写および翻訳を指示するので、このアプローチにより高収量が得られることが多い。大腸菌においては、異種タンパク質を発現させるためにlacZ融合物を用いることが多い。pUR、pEX、およびpMRI00シリーズなどの適切なベクターは容易に入手可能である（例えばSambrook et al., 前記を参照されたい）。特定の用途に関しては、精製後にグリコシルトランスフェラーゼ由来でなくかつ/またはアクセサリ酵素由来であるアミノ酸を融合タンパク質から切断することが望ましい。臭化シアン、プロテアーゼ、または第X_a因子による切断を含む当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって、これを達成することができる（例えば、Sambrook et al., 上記; Itakura et al., Science (1977) 198: 1056; Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76: 106; Nagai et al., Nature (1984) 309: 810; Sung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 561を参照されたい）。融合タンパク質の所望の切断箇所に対する遺伝子内となるように、切断部位を操作することができる。

【0095】

複数の転写カセットを単一の発現ベクター内に配置することによって、または、クローニング戦略において使用される各発現ベクターに対して異なる選択マーカールを利用することによって、2つ以上の組換えタンパク質を単一の宿主細胞中で発現させてもよい。

【0096】

そのN末端の完全性が維持されている大腸菌由来の組換えタンパク質を得るための適切な系は、Miller et al. Biotechnology 7:698-704 (1989)に記載されている。この系にお

10

20

30

40

50

いて、関心対象の遺伝子は、ペプチダーゼ切断部位を含む酵母ユビキチン遺伝子の最初の76残基へのC末端融合物として産生される。2つの部分の接合部における切断により、無傷の真性N末端残基を有するタンパク質の産生が起こる。

【0097】

VI. CgtDポリペプチドの精製

本発明のCgtDタンパク質を、例えば、細胞内タンパク質として、または細胞から分泌されるタンパク質として発現させることができ、かつこれは本発明の方法においてこの形態で使用可能である。例えば、発現された細胞内CgtDポリペプチドまたは分泌CgtDポリペプチドを含む粗製細胞抽出物を、本発明の方法において使用することができる。

【0098】

あるいは、硫酸塩析、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当技術分野の標準的手順により、CgtDポリペプチドを精製することができる（概説として、R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照されたい）。少なくとも約70、75、80、85、90%の均一性を有する実質的に純粋な組成物が好ましく、92、95、98~99%またはそれ以上の均一性が最も好ましい。また、例えば抗体産生のための免疫原として、精製タンパク質を使用してもよい。

【0099】

本発明のCgtDポリペプチドの精製を容易にするために、該タンパク質をコードする核酸は、アフィニティー結合試薬を利用することのできるエピトープまたは「タグ」、すなわち精製タグ用のコード配列を含むこともできる。適切なエピトープの例には、mycおよびV-5レポーター遺伝子が含まれ；これらのエピトープを有する融合タンパク質の組換え体産生に有用な発現ベクターが市販されている（例えば、Invitrogen (Carlsbad CA) ベクターであるpcDNA3.1/Myc-HisおよびpcDNA3.1/V5-Hisは、哺乳動物細胞中での発現に適している）。本発明のCgtDポリペプチドにタグを付着させるために適したさらなる発現ベクターおよび対応する検出系は当業者に公知であり、いくつかは市販されている（例えば、FLAG[®] (Kodak, Rochester NY)）。別の適切なタグの例はポリヒスチジン配列であり、これは金属キレートアフィニティリガンドに結合することができる。隣接する6個のヒスチジン (SEQ ID NO: 7) が典型的には使用されるが、7個以上も5個以下も利用可能である。ポリヒスチジンタグに対する結合部分としてはたらくことができる適切な金属キレートアフィニティリガンドには、ニトリロ三酢酸 (NTA) が含まれる (Hochuli, E. (1990) "Purification of recombinant proteins with metal chelating adsorbents" In Genetic Engineering: Principles and Methods, J.K. Setlow, Ed., Plenum Press, NY; Qiagen (Santa Clarita, CA)より販売)。その他の精製タグまたはエピトープタグには、例えば、AU1、AU5、DDDDK (SEQ ID NO: 12) (EC5)、Eタグ、E2タグ、Glu-Glu、6残基ペプチド、ポリオーマ中間Tタンパク質に由来するEYMPME (SEQ ID NO: 13)、HA、HSV、IRS、KT3、Sタグ、S1タグ、T7タグ、V5タグ、VSV-G、 β -ガラクトシダーゼ、Gal4、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ルシフェラーゼ、プロテインC、プロテインA、セルロース結合タンパク質、GST (グルタチオンS-トランスフェラーゼ)、step-タグ、Nus-S、PPI-ase、Pfg 27、カルモジュリン結合タンパク質、dsb Aおよびその断片、ならびにグランザイムBが含まれる。エピトープ配列に特異的に結合するエピトープペプチドおよび抗体は、例えばCovance Research Products, Inc.; Bethyl Laboratories, Inc.; Abcam Ltd.; およびNovus Biologicals, Incより市販されている。

【0100】

また、精製タグにはマルトース結合ドメインおよびデンブリン結合ドメインも含まれる。精製タグを含むタンパク質は、該精製タグと結合する結合パートナー、例えば、該精製タグに対する抗体、ニッケルイオンもしくはコバルトイオンまたは樹脂、および、アミロース、マルトース、またはシクロデキストリンを用いて精製することができる。精製タグには、デンブリン結合ドメイン、大腸菌チオレドキシンドメイン（ベクターおよび抗体は例え

10

20

30

40

50

ばSanta Cruz Biotechnology, Inc.およびAlpha Diagnostic International, Inc.より市販されている)、およびSUMOタンパク質(ベクターおよび抗体は例えばLife Sensors Inc.より市販されている)のカルボキシ末端側の半分も含まれる。大腸菌由来のマルトース結合ドメインおよびA. ニガー(niger)のアミラーゼ由来のSBD(デンブun結合ドメイン)などのデンブun結合ドメインは、国際公開公報第99/15636号に記載され、これは参照により本明細書に組み入れられる。 β シクロデキストリン(BCD)誘導体化樹脂を用いた、デンブun結合ドメインを含む融合タンパク質のアフィニティー精製は、2005年2月17日に公開された国際公開公報第2005/014779号に記載されており、その全文が参照によって本明細書に組み入れられている。一部の態様において、CgtDポリペプチドは精製タグまたはエピトープタグを2つ以上含む。

10

【0101】

タグとしての使用に適したその他のハプテンは当業者に公知であり、例えば、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR)に記載されている。例えば、ジニトロフェノール(DNP)、ジゴキシゲニン、バルビツレート(例えば米国特許第5,414,085号を参照されたい)、およびいくつかの種類のフルオロフォアはこれらの化合物の誘導体であるので、ハプテンとして有用である。ハプテンおよびその他の部分をタンパク質およびその他の分子に連結するためのキットが市販されている。例えば、ハプテンがチオールを含む場合、SMCCなどのヘテロニ官能性リンカーを用いて、捕捉試薬上に存在するリシン残基にタグを付着させることができる。

【0102】

20

その生物活性を減少させることなくCgtDポリペプチドの触媒ドメインまたは機能ドメインを改変できることを、当業者は認識するであろう。融合タンパク質への触媒ドメインのクローニング、発現、または組み込みを促進するために、いくつかの改変をおこなってもよい。そのような改変は当業者には周知であり、例えばこれには、例えば開始部位を提供するためにアミノ末端に付加されたメチオニンを提供するための触媒ドメインをコードするポリヌクレオチドのいずれかの末端へのコドンの添加、あるいは、好都合に配置された制限酵素部位または終結コドンまたは精製配列を作製するためにいずれかの末端に配置されたさらなるアミノ酸(例えばポリHis)が含まれる。

【0103】

VII. 融合CgtDタンパク質

30

一部の態様において、本発明の組換え細胞は、所望のガラクトシル化オリゴ糖の合成に関与する酵素活性を2つ以上有する融合タンパク質を発現する。融合ポリペプチドを、例えばUDP-GalNAc 4'エピメラーゼまたはUDP-グルコース4'エピメラーゼなどのアクセサリ酵素に連結されたCgtDポリペプチドで構成することができる。また融合タンパク質は、触媒ドメインを用いて、または酵素のその他の切断を用いて作製することもできる。例えば、CgtDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、例えばUDP-GalNAc 4'エピメラーゼまたはUDP-グルコース4'エピメラーゼをコードするポリヌクレオチドとをインフレームで連結することができる。得られた融合タンパク質はその後、活性化ガラクトース分子の合成だけでなく、アクセプター分子へのガラクトース部分の移動も触媒することができる。融合タンパク質は、1つの発現可能なヌクレオチド配列に連結された2つまたはそれ以上のガラクトースサイクル酵素であり得る。本発明の融合CgtDポリペプチドは容易に設計可能であり、かつ、当業者に周知の様々な組換えDNA技術を用いて製造可能である。例示的な融合タンパク質はPCT特許出願PCT/CA98/01180号に記載されており、これは1999年6月24日に国際公開公報第99/31224号として公開され、ナイセリア由来の α 2,3-シアルルトランスフェラーゼと融合したナイセリア由来のCMP-シアル酸合成酵素を開示している。一部の態様において、2つ以上の融合CgtDポリペプチドが細胞中で発現される。また融合タンパク質は、本明細書に記載の精製タグまたはエピトープタグも含むことができる。

40

【0104】

VIII. ドナー基質およびアクセプター基質

CgtDポリペプチドによって使用される適切なドナー基質には、例えばUDP-Galが含まれ

50

る。Guo et al., Applied Biochem. and Biotech. 68: 1-20 (1997)。

【0105】

典型的にアクセプター基質は、 $\alpha 1,4$ 結合によるガラクトース残基の付加のために末端ラクトースまたはLacNAc誘導体を含む。適切なアクセプターの例には、 $\beta 1,4$ 結合によってGlcNAcまたはGlcと連結した末端Gal、あるいは、GlcNAcまたはGalNAcのいずれかと $\beta 1,3$ 結合した末端Galが含まれる。適切なアクセプターには、例えば、ラクトースおよびLacNAc、ならびに、当業者によって決定可能なその他のアクセプターが含まれる。ガラクトース部分が付着する末端残基は、それ自身も、例えばH、糖類、オリゴ糖、または、少なくとも1つの糖質原子を有するアグリコン基に付着することができる。一部の態様において、アクセプター残基は、例えば、ペプチド、タンパク質、脂質、またはプロテオグリカンに付着したオリゴ糖の一部である。

10

【0106】

本発明のCgtDポリペプチドおよび方法によって使用される適切なアクセプター基質には多糖およびオリゴ糖が含まれるが、これらに限定されるわけではない。また本明細書に記載のCgtDポリペプチドは、好都合な出発材料から所望の生成物を産生するための多酵素系においても使用することができる。

【0107】

本発明のCgtDポリペプチドおよび方法によって使用される適切なアクセプター基質には、本発明の方法によって改変可能なタンパク質、脂質、ペプチド、糖タンパク質、糖脂質、糖ペプチド、ガングリオシド、およびその他の生物学的構造（例えば細胞全体）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。これらのアクセプター基質は典型的に、上述の多糖またはオリゴ糖分子を含むと考えられる。本発明の方法により改変することができる例示的な構造には、当業者に公知の細胞上の糖脂質、糖タンパク質、および糖質構造のいくつかが含まれる。

20

【0108】

本発明は、所望のオリゴ糖部分を有するオリゴ糖、糖タンパク質、および糖脂質を産生する能力に関して選択されたCgtDポリペプチドを提供する。同様に、存在するならば、所望の活性化糖基質に基づいて、または生成物であるオリゴ糖において見出される糖に基づいて、アクセサリ酵素が選択される。

【0109】

糖タンパク質の合成に関して、様々な量の関心対象のCgtDポリペプチド（例えば0.01～100 mU/mgタンパク質）と、該関心対象のCgtDタンパク質によるグリコシル化のための潜在的アクセプター部位を有するオリゴ糖に連結された糖タンパク質（例えば1～10 mg/ml）とを反応させることにより、適切なCgtDポリペプチドを容易に同定することができる。本発明の組換えCgtDタンパク質が所望のアクセプター部位において糖残基を付加できる能力を比較し、所望の特性（例えば、アクセプター基質選択性または触媒活性）を有するCgtDポリペプチドを選択する。

30

【0110】

一般に、所望のガラクトシル化オリゴ糖部分を有するオリゴ糖、糖タンパク質、および糖脂質の酵素的合成の有効性を、組換え的に産生された本発明のCgtDポリペプチドの使用によって増大させることができる。組換え技術は、オリゴ糖、糖タンパク質、および糖脂質の大規模なインピット口改変に必要な組換えCgtDポリペプチドの大量産生を可能にする。

40

【0111】

一部の態様において、本発明のCgtDポリペプチドおよび方法による使用に適したオリゴ糖、糖タンパク質、および糖脂質は、グリコシル化反応の際に固体支持体上に固定化された糖タンパク質および糖脂質でありうる。「固体支持体」という用語には、半固体支持体も包含される。好ましくは、グリコシル化反応完了後に各糖タンパク質または糖脂質を放出できるように、標的糖タンパク質または糖脂質を可逆的に固定化する。多くの適切なマトリクスが、当業者には公知である。例えばイオン交換を用いて、グリコシル化反応が進行する一方で糖タンパク質または糖脂質を適切な樹脂上に一時的に固定化することができ

50

る。親和性に基づく固定化に関しては、関心対象の糖タンパク質または糖脂質に特異的に結合するリガンドを用いることもできる。例えば、糖タンパク質に特異的に結合する抗体が適している。また、関心対象の糖タンパク質自体が抗体であるかその断片を含む場合、アフィニティー樹脂としてプロテインAまたはGを使用することができる。関心対象の糖タンパク質または糖脂質に特異的に結合する色素およびその他の分子も、適している。

【0112】

好ましくは、アクセプター糖類が全長糖タンパク質の切断型である場合、これは、全長糖タンパク質の生物学的に活性な部分配列を含むことが好ましい。生物学的に活性な部分配列の例には、酵素活性部位、受容体結合部位、リガンド結合部位、抗体の相補性決定領域、および抗原の抗原性領域が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0113】

IX. ガラクトシル化生成物の産生

インビトロ反応混合物中でまたはインビボ反応によって、例えばCgtDポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む組換え微生物の発酵性増殖によってガラクトシル化生成物を作製するために、CgtDポリペプチドを用いることができる。

【0114】

A. インビトロ反応

インビトロ反応混合物中でガラクトシル化生成物を作製するために、CgtDポリペプチドを用いることができる。インビトロ反応混合物は、CgtDポリペプチド、部分精製CgtDポリペプチド、または精製CgtDポリペプチド、ならびに、ドナー基質、アクセプター基質、および適切な反応緩衝液を含む、透過処理済みの微生物を含みうる。インビトロ反応に関しては、CgtDポリペプチドなどの組換えグリコシルトランスフェラーゼタンパク質、アクセプター基質、ドナー基質、およびその他の反応混合物成分を、水性反応培地中での混合によって組み合わせる。所望のガラクトシル化生成物に応じて、追加のグリコシルトランスフェラーゼをCgtDポリペプチドと組み合わせて用いることができる。培地は一般に、約5 ~ 約8.5のpH値を有する。培地の選択は、培地がpH値を所望のレベルで維持できる能力に基づく。したがって、一部の態様において、培地は約7.5のpH値まで緩衝されている。緩衝液を使用しない場合、使用される特定のガラクトシルトランスフェラーゼに応じて、培地のpHを約5 ~ 8.5に維持するべきである。CgtDポリペプチドについては、pH範囲を約7.0 ~ 8.0に維持することが好ましい。シアリルトランスフェラーゼについては、約5.5 ~ 約8.0の範囲が好ましい。

20

30

【0115】

酵素の量または濃度は活性単位で表すが、これは触媒作用の初速度の基準となる。1活性単位は、所与の温度（典型的には37 °C）およびpH値（典型的には7.5）において、1分間あたり生成物1 μmolの形成を触媒する。したがって、10単位の酵素とは、温度37 °C およびpH値7.5において1分間で基質10 μmolが生成物10 μmolに変換されるという触媒量の酵素である。

【0116】

反応混合物は、二価の金属カチオン（ Mg^{2+} 、 Mn^{2+} ）を含みうる。反応培地はまた、必要に応じて、可溶化界面活性剤（例えば、TritonまたはSDS）およびメタノールまたはエタノールなどの有機溶媒を含んでもよい。酵素は、溶液中で遊離させて利用することができる、または、ポリマーなどの支持体に結合させることができる。したがって、反応混合物は当初は実質的に均一であるが、いくつかの沈殿物が反応の間に形成されうる。

40

【0117】

上記プロセスを実施する温度は、凍結温度のすぐ上から感受性の高い酵素の大部分が変性する温度までの範囲でありうる。該温度範囲は好ましくは約0 °C ~ 約45 °C であり、より好ましくは約20 °C ~ 約37 °C である。

【0118】

このように形成された反応混合物は、グリコシル化されるべき生体分子に付着したオリゴ糖基上に存在する所望のオリゴ糖決定基を所望の高収量で得るのに十分な期間の間、維

50

持される。大規模調製に関しては、約0.5～240時間の間、より典型的には約1～36時間の間、反応を進行させることが多い。

【0119】

グリコシルトランスフェラーゼサイクルの一部として、1回または複数回のグリコシルトランスフェラーゼ反応を実施する。グリコシルトランスフェラーゼサイクルの好ましい条件および説明が記載されている。いくつかのグリコシルトランスフェラーゼサイクル（例えば、シアリルトランスフェラーゼサイクル、ガラクトシルトランスフェラーゼサイクル、およびフコシルトランスフェラーゼサイクル）が、米国特許第5,374,541号および国際公開公報9425615 Aに記載されている。その他のグリコシルトランスフェラーゼサイクルは、以下に記載されている：Ichikawa et al. J. Am. Chem. Soc. 114:9283 (1992)、Wong et al. J. Org. Chem. 57: 4343 (1992)、DeLuca, et al., J. Am. Chem. Soc. 117: 5869-5870 (1995)、およびIchikawa et al. In Carbohydrates and Carbohydrate Polymers. Yaltami, ed. (ATL Press, 1993)。

【0120】

上記のグリコシルトランスフェラーゼサイクルに関して、プロセス中で使用される様々な反応物の濃度または量は、温度およびpH値などの反応条件を含む数多くの要素、ならびにグリコシル化されるべきアクセプター糖類の選択および量に依存する。グリコシル化プロセスによって触媒量の酵素の存在下での活性化ヌクレオチドの再生、活性化されたドナー糖、および産生されたPPiの捕捉が可能になるので、該プロセスは上述の化学量論的基質の濃度または量によって制限される。本発明の方法に従って使用できる反応物の濃度の上限は、そのような反応物の溶解度によって決定される。

【0121】

好ましくは、アクセプターが使い果たされるまでグリコシル化が進行するように、活性化ヌクレオチド、リン酸ドナー、ドナー糖、および酵素の濃度を選択する。シアリルトランスフェラーゼの文脈ではあるが、後述される考察は、その他のグリコシルトランスフェラーゼサイクルにも一般に適応可能である。

【0122】

それぞれの酵素は、触媒量で存在する。特定の酵素の触媒量は、該酵素の基質の濃度によって、ならびに、温度、時間、およびpH値などの反応条件によって変動する。予め選択した基質濃度および反応条件下での所与の酵素に関する触媒量を決定するための手段は、当業者に周知である。

【0123】

B. インビボ反応

インビボ反応によって、例えばCgtDポリペプチドを含む組換え微生物の発酵性増殖によってガラクトシル化生成物を作製するために、CgtDポリペプチドを用いることができる。組換え微生物の発酵性増殖は、アクセプター基質、例えばラクトースまたはLacNAc、および、ドナー基質またはドナー基質の前駆体、例えばガラクトースを含む培地の存在下で起こりうる。例えば、Priem et al., Glycobiology 12:235-240 (2002)を参照されたい。微生物によってアクセプター基質およびドナー基質またはドナー基質の前駆体が吸収され、生細胞中で、アクセプター基質へのドナー基質の付加が起こる。例えば糖輸送タンパク質を発現させることによって、アクセプター基質の取り込みを促進するように微生物を改変することができる。例えば、アクセプター糖類がラクトースである場合、LacYパーミアーゼを発現する大腸菌細胞を使用することができる。アクセプター糖類の分解を低減するため、または、ドナー糖類もしくはドナー糖類の前駆体の産生を増大するために、その他の方法を用いることができる。一部の態様においては、宿主微生物の操作によってガラクトシル化生成物の産生が増大する。例えば大腸菌において、例えばCMP-シアレート合成酵素を欠いた宿主株（NanA-）を用いることによって、シアラ酸の分解を最小限にすることができる。（一部の菌株において、CMP-シアレート合成酵素が分解酵素であることが分かっている。）同じく大腸菌において、ラクトースが例えばアクセプター糖類であるかまたはガラクトシル化生成物合成における中間体である場合、LacZ-である宿主細胞を用い

ることによってラクトース分解を最小限にすることができる。

【0124】

C. ガラクトシル化生成物の特徴決定および単離

例えば所望の生成物の産生が起こっていることを判定することによって、または、アクセプター基質などの基質が枯渇していることを判定することによって、ガラクトシル化生成物の産生をモニターすることができる。例えばペーパーもしくはTLCプレートを用いるクロマトグラフィーなどの技術を用いて、または例えばMALDI-TOF質量分析法などの質量分析法により、または核磁気共鳴分光法によりオリゴ糖などのガラクトシル化生成物を同定できることを、当業者は認識するであろう。ガラクトシル化生成物の同定法は当業者に公知であり、例えば、米国特許第6,699,705号において（これは本明細書において全目的

10

【0125】

CgtDポリペプチドを用いて産生される生成物は、精製せずに使用することができる。しかし、ガラクトシル化糖類の回収のために、標準的な周知の技術、例えば薄層もしくは厚層クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、または膜ろ過を用いることができる。同じく、例えば、同一出願人によるAU特許第735695号に記載のナノろ過膜または逆浸透膜を利用した膜ろ過を用いることができる。さらなる例として、タンパク質を除去するために、膜の分子量カットオフが約1000～約10,000ダルトンである膜ろ過を用いることができる。別の例として、塩を除去するために、その後ナノろ過または逆浸透を用いることができる。ナノフィルター膜は逆浸透膜の一種であり、これは、一価の塩は通過させるが、使用する膜に応じて約200～約1000ダルトンを上回る多価塩および非荷電溶質は保持する。したがって例えば、本発明の組成物および方法によって産生されるオリゴ糖は膜内部で保持されうり、混入塩は通過すると考えられる。糖タンパク質ガラクトシル化生成物は、本明細書に記載のものを含む標準的なタンパク質精製技術を用いて単離または精製することが可能である。

20

【0126】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形「1つの」、「ある」、および「その」は、特に文脈により明確に指示されない限り、複数の指示対象も含むことに留意されたい。したがって例えば、「1つの核酸」という言及には複数のそのような核酸が含まれ、「そのポリペプチド」という言及には1つまたは複数のポリペプチドおよび当業者に公知のその同等物に対する言及が含まれ、その他も同様である。

30

【0127】

本明細書において論じられた刊行物は、本出願の出願日以前のその開示についてのみが提供されるものである。本明細書におけるいかなる記載も、先行発明により本発明がそのような刊行物に先行する権利を有さないことの承認として解釈されるべきでない。さらに、提供された公開日は実際の公開の日付と異なることがあり、これは個別に確認する必要がある。全ての引用は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0128】

40

実施例

実施例1：C. ジェジュニLI087由来のCgtDのクローニング、発現、および特徴決定

C. ジェジュニLI087由来の8番目のORF (SEQ ID NO: 1) をクローニングし、大腸菌 (*Escherichia coli*) 内で発現させた。ドナーとしてUDP-Glc、UDP-GlcNAc、UDP-Gal、およびUDP-GalNAc、ならびにアクセプターとしてGlc、Gal、Lac、LacNAc、およびGal- α -1,4-Lacの蛍光誘導体を用いて、SEQ ID NO: 2のタンパク質を過剰発現する大腸菌に由来する抽出物を分析した。8番目のORF (SEQ ID NO: 2) のタンパク質生成物は、ドナーとしてUDP-Gal、およびアクセプターとしてLacNAc (Gal- β -1,4-GlcNAc) またはLac (Gal- β -1,4-Glc) 誘導体のいずれかに対して活性であった。SEQ ID NO: 2をCgtD (カンピロバクターグリコシルトランスフェラーゼ; D) と命名し、さらなる特徴決定をおこなった。

50

【 0 1 2 9 】

実施例2：CgtD活性のさらなる特徴決定

CgtDの酵素活性につき更なる特徴決定をおこなうために、C. ジェジュニLI087由来のCgtDをコードする遺伝子を、大腸菌マルトース結合 (MalE) タンパク質とのC末端融合物としてのpCWori+中にクローニングした (構築物CJL-99)。CJL-99を大腸菌AD202中にエレクトロポレーションした。CgtDはMalE融合物として十分に発現した (約150単位/リットル)。実施例1において最適と判定されたドナーおよびアクセプターに対して、活性を評価した。活性はpH7~8において最適であった。二価カチオンの封入によって、活性が増大した。いくつかの二価カチオンは他のものよりもより有益であり、例えばMnCl₂はMgCl₂よりも約15%高い活性をもたらした。

10

【 0 1 3 0 】

実施例3 - CgtDの位置特異性および立体特異性

精製MalE-CgtD (CJL-99) を用いて、CgtDの位置特異性および立体特異性を測定した。 α Gal-1,4- β Gal-1,4- β GlcNAc-p-ニトロフェニル19 mgを合成した。図1に示す同種核二次元COSYおよびTOCSYスペクトルの使用によって、¹H NMR共鳴を三糖類化合物に割り当てた。これらの割り当てを用いて、隣接炭素が直接結合したプロトン原子の化学シフトに相關する¹H-¹³C HSQCスペクトル中のクロスピークを同定した (図2)。¹H-¹³C HMBCパルス配列を用いてグリコシド結合を介した残基間結合性が確立できるので、三糖類化合物のHMBCスペクトルを獲得して糖残基間の共有結合を確立した。これらのデータにより、CgtDが、 α 1→4結合によって二糖類前駆体上のGalへとGal残基を移動させることが確認された。HMBCスペクトルと一致して、 β GalのC4位における炭素共鳴は、単糖類の価と比べて低磁場シフトを示した。このシフトは、隣接 β Gal残基とのグリコシド結合の質的指標となる。

20

【 0 1 3 1 】

実施例4 - CgtDホモログについてのBLAST配列検索

C. ジェジュニLI087由来のCgtD (SEQ ID NO: 2) を用いたBLASTP検索では、C. ジェジュニ以外の生物由来の有意なホモログは全く見出されなかった。2種類のC. ジェジュニ株 (ATCC 43429およびATC43430) はCgtDのホモログ (SEQ ID NO: 3およびSEQ ID NO: 4) を有し、これらは互いに同一でありかつC. ジェジュニLI087由来のCgtDと58%同一性を有する (図3)。現在まで、ATCC 43429およびATC43430由来のCgtDポリペプチドに対する活性は同定されていない。

30

【 0 1 3 2 】

Clustal Wプログラムを用いて、図3のアラインメントを作成した。以下の記号を用いた：「*」アラインメント中の全配列が同一の残基を有する；「:」保存的置換が存在する；および、「.」半保存的置換が存在する。例えばwww.ebi.ac.uk/clustalw/#を参照されたい。上記ウェブサイトでは、以下の群内のアミノ酸を互換的であると指定することによって、保存的置換を定義している：A、V、F、P、M、I、L、およびW；DおよびE；R、H、およびK；ならびに、S、T、Y、H、C、N、G、およびQ。最下部の配列は、プログラムにより作成されたコンセンサス配列である。

【 0 1 3 3 】

上記の発明は、理解を明確にするために説明および例示を用いてある程度詳細に記載されているが、本発明の開示に鑑みて、添付の特許請求の範囲の趣旨や範囲から逸脱することなく特定の変更および改変を加えることが可能であることは、当業者であれば容易に理解できよう。

40

【 0 1 3 4 】

非公式配列表

SEQ ID NO: 1

GenBank AF400669 8番目のORFのDNA配列

C. ジェジュニLI087由来のCgtD DNA配列

>AF400669-ORF08

ATGACTGAAATTTCAAGTTTTTGGTATACTCCTAAAGGCTATAAGGGTATAGGTTTAAATGGAAATTCCTTACGATT
AAATCTTGGCTTGATCATGGGTATAAATTCATCTATATACTTATAATTTAGAAGATAAAATTTTTTAAATTC
CAAGAGCTGTTTGATAATTTTATACTTAAAGATGCAATGAAATCATACCTTTTGAAGAATATTTTAGCGATGAT
AGGGGAGCTGGAGTAGCTGCTTTTTTCTAGATTTTTTCTAGGTTTAAATCTACTTTATCTCAGGGGGGGGGTATGGGTG
GATCTTGATATGGTGTGTTTAAACCATTATGATTATGATAAAAAAGAATATATTTTTTCTAAGGAAATTGATAAT
GATCTAAGCAAAGCTAGAATCACAACTTCACTCCTTAAATTTCCAAAACAAAGTGAATTTGGAAAATTAAATATA
GATGAAGCAAAAAAGATTGTTGATGATAACAAAATAATTCCTTGGGGTATTATAGGTCCTTGGTTTTTAGCTAAA
TGGGTAAAGAATATGATTTAGAAAAACATGCTCTAGACTATAAAGATACTTGTCAAATTTCTTGTGGTAATACT
AGAGATTTTATAGATAAAAAAATTTTCGATAAAAAACAGACTTTGTTTGCATTTATTTCTGAAATGTGGAAAATT
TATAAATGAATAAAAAATCATTTTTATAAATCATGCATTTATGGATTTTACTTCAAAGCACAAATATCCTTGAT
TTATGCTCTTAAATTAAATTATAATCTTAGTTTTTGCATAAACATTATGATAAATTCCTTCCTTTTATTAATATA
AAAAATAAAATAAGATTTTATTTTCGCCACCCAAAAAAGATTTTAAAGAAAAACAATGCCTAA

10

SEQ ID NO: 2

GenBank AF400669 8番目のORF

C. ジェジュニLI087由来のCgtDタンパク質配列: NCBIタンパク質データベースにおいてAA
M90647

>AAM90647

MTEISSFWYTPRGYKGIGLMEILTIKSWLDHGYKFHLYTYNLEDKIFLKFQELFDNFILKDANEIIPFEEYFSDD
RGAGVAAFSDFFRNLNLYLGGVWVDLDMVCLNHYDYDKKEYIFSKEIDNDLSKARITTSLLKFPKQSEFGKLI
DEAKKIVDDNKIIPWGIIGPWFLAKWVKEYDLEKHALDYKDTQCISGNTDRDFIDKKIFDKNRLCLHLFSEMWKI
YKMNKNHFYKSCIYGFLLQKHNILDLCLKNYNLSFCCKHYDKFLPFINIKNIRFYFRHPKKIFKKNNA

IBS-NRCにより寄託された相同タンパク質配列

SEQ ID NO: 3

20

NCBIタンパク質データベースAAK73187 (C. ジェジュニATCC 43429)

>AAK73187

MKQEISSFWYTPRGYKGIGLMELLSIKSFIDNGYKFILYTYNLDKIFKKLDELFDDEFELKDANEIVSFKNYFRD
DRGSGVAAFSDYFRYNLLYLKKKKRGGVWVDLDMICLNIDLNEEYIFTQEVEDDNKKSRIITTSFLKFSRYSDFG
KNLIQEAKEIINKRKKISWGVIGPWFLADHVKKCGLENFVWDYKRTCQIPWCNVKIFLDNTSIDISQPFLLHSE
MWRLNNMEKNTFHQMGVYGQLLKKHEIEKLYNQINTCLKTSMLDNIAFLTKFFIKKL

SEQ ID NO: 4

NCBIタンパク質データベースAAK85423 (C. ジェジュニATCC 43430)

>AAK85423

MKQEISSFWYTPRGYKGIGLMELLSIKSFIDNGYKFILYTYNLDKIFKKLDELFDDEFELKDANEIVSFKNYFRD
DRGSGVAAFSDYFRYNLLYLKKKKRGGVWVDLDMICLNIDLNEEYIFTQEVEDDNKKSRIITTSFLKFSRYSDFG
KNLIQEAKEIINKRKKISWGVIGPWFLADHVKKCGLENFVWDYKRTCQIPWCNVKIFLDNTSIDISQPFLLHSE
MWRLNNMEKNTFHQMGVYGQLLKKHEIEKLYNQINTCLKTSMLDNIAFLTKFFIKKL

30

【図面の簡単な説明】

【0135】

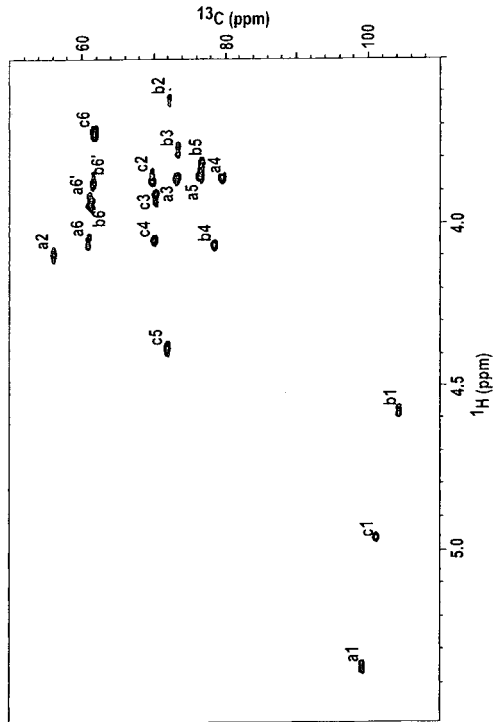
【図1】 α Gal-1,4- β Gal-1,4- β GlcNAc-p-ニトロフェニルの ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを提供する。クロスピークは、図2の文字標記および数字標記にしたがって標識されている(すなわち、aは β GlcNAc、bは β Gal、cは α Gal)。a4およびb4の炭素共鳴は、単糖類におけるその値と比べて低磁場であるシフトを示しており、これはグリコシド結合へのその関与と一致している。

【図2】 α Gal-1,4- β Gal-1,4- β GlcNAc-p-ニトロフェニルの ^1H および ^{13}C 化学シフト^aを提供する。

40

【図3】ClustalWプログラムを用いた、3つの全長型CgtD(それぞれSEQ ID NO: 3、4、および2)のアラインメントを提供する。最下部の配列はコンセンサス配列である(SEQ ID NO: 5)。以下の記号を用いている:「*」は、アラインメント中の全配列において該列の残基またはヌクレオチドが同一であることを意味し;「:」は、Clustalウェブサイトにおいて定義されている保存的置換が観察されたことを意味し;かつ、「.」は、半保存的置換が観察されたことを意味する。例えば、www.ebi.ac.uk/clustalw/を参照されたい。

【図 1】



【図 2】

糖基	化学シフト (ppm)													
	H1	C1	H2	C2	H3	C3	H4	C4	H5	C5	H6	C6		
β GlcNAc (a)	5.36	99.2	4.09	55.8	3.86	72.9	3.86	79.2	3.85	76.1	4.05 3.94	60.6 60.9		
β Gal(1-4) (b)	4.58	104.1	3.61	71.8	3.77	73.0	4.06	78.1	3.82	76.3	3.94 3.88	61.2		
α Gal(1-4) (c)	4.97	101.1	3.86	69.5	3.92	69.9	4.05	69.7	4.38	71.7	3.73	61.4		

a 化学シフトは、 ^1H および ^{13}C の次元にそれぞれ2.23および31.1 ppmで現れる内部アセトン標準のメチル基を基準としている。

【図 3】

	10	20	30	40	50	60
AAK73187	MKQEI	SSFWY	TPRGY	KGIGL	MELL	SIKSF
AAK85423	MKQEI	SSFWY	TPRGY	KGIGL	MELL	SIKSF
AAK90647	-MTEI	SSFWY	TPRGY	KGIGL	MELL	SIKSF
プライマーコンセンサス	MKQEI	SSFWY	TPRGY	KGIGL	MELL	SIKSF
	70	80	90	100	110	120
AAK73187	KDANE	IVSF	KNYFR	DDRG	SGVAA	FSDF
AAK85423	KDANE	IVSF	KNYFR	DDRG	SGVAA	FSDF
AAK90647	KDANE	IVSF	KNYFR	DDRG	SGVAA	FSDF
プライマーコンセンサス	KDANE	IVSF	KNYFR	DDRG	SGVAA	FSDF
	130	140	150	160	170	180
AAK73187	EYIFT	QEVDE	DNKSR	ITTS	FLKFS	RYSD
AAK85423	EYIFT	QEVDE	DNKSR	ITTS	FLKFS	RYSD
AAK90647	EYIFT	QEVDE	DNKSR	ITTS	FLKFS	RYSD
プライマーコンセンサス	EYIFT	QEVDE	DNKSR	ITTS	FLKFS	RYSD
	190	200	210	220	230	240
AAK73187	HVKK	CGLEN	FVWDY	KRTQ	IPWC	NVKI
AAK85423	HVKK	CGLEN	FVWDY	KRTQ	IPWC	NVKI
AAK90647	HVKK	CGLEN	FVWDY	KRTQ	IPWC	NVKI
プライマーコンセンサス	HVKK	CGLEN	FVWDY	KRTQ	IPWC	NVKI
	250	260	270	280	290	300
AAK73187	MGVY	QGLKK	HEIEK	LYNQ	INTCL	KTS
AAK85423	MGVY	QGLKK	HEIEK	LYNQ	INTCL	KTS
AAK90647	SCYI	GFLQ	KHNI	LDLCL	KLAYN	LSF
プライマーコンセンサス	MGVY	QGLKK	HEIEK	LYNQ	INTCL	KTS

アラインメントデータ:
アラインメント長: 300
同一性 (*): 160個は53.33%

【配列表】

0005544164000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (72)発明者 ギルバート マイケル
カナダ国 ケベック州 ガティノー サクレ-クール 116-101
- (72)発明者 ワカーシュク ワレン
カナダ国 オンタリオ州 オタワ リドー テラス #918-200
- (72)発明者 ホーリストン スコット
カナダ国 オンタリオ州 オタワ パクストン レーン 54

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 特表2004-524033(JP,A)
Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. AF400669, 2002年, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/22086352?sat=13&satkey=167169>
J Biol Chem., 2000年, Vol.275, p.3896-3906
J Biol Chem., 2002年, Vol.277, p.327-337

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00
C12N 9/10
C12P 19/18
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)
WPIDS(STN)