

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3819540号  
(P3819540)

(45) 発行日 平成18年9月13日(2006.9.13)

(24) 登録日 平成18年6月23日(2006.6.23)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/82 (2006.01)	C 1 2 N 9/82	
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

請求項の数 3 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-160625	(73) 特許権者	000155908
(22) 出願日	平成9年6月4日(1997.6.4)		株式会社林原生物化学研究所
(65) 公開番号	特開平10-57080		岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(43) 公開日	平成10年3月3日(1998.3.3)	(72) 発明者	有尾 武司
審査請求日	平成15年5月29日(2003.5.29)		岡山県岡山市大福1223番地の85
(31) 優先権主張番号	特願平8-168172	(72) 発明者	谷合 まどか
(32) 優先日	平成8年6月7日(1996.6.7)		岡山県岡山市三野2丁目12番44号
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	山本 康三
			岡山県岡山市平井3丁目880番3号
		(72) 発明者	栗本 雅司
			岡山県岡山市学南町2丁目7番25号
		審査官	植原 克典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表における配列番号6乃至9のいずれかに示すアミノ酸配列を含んでなるL-アスパラギナーゼ活性を有するヒトL-アスパラギナーゼ変異体ポリペプチド、又は、当該活性を実質的に喪失させることなく、当該変異体ポリペプチドのアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸に置換したヒトL-アスパラギナーゼ変異体ポリペプチド。

【請求項2】

請求項1に記載のポリペプチドを有効成分として含んでなる感受性疾患剤。

【請求項3】

悪性腫瘍、白血病又はリンパ腫治療剤としての請求項2に記載の感受性疾患剤。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明はL-アスパラギナーゼ活性を有する新規なポリペプチド、詳細には、L-アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

L-アスパラギナーゼ(EC3.5.1.1)は、L-アスパラギンを加水分解してL-アスパラギン酸とアンモニアを生ずる反応を触媒する酵素である。L-アスパラギナーゼの抗腫瘍剤としての研究は、ジェー・ジー・キッズが『ジャーナル・オブ・エクスペリメ

20

ンタル・メディスン』、第98巻、565乃至582頁(1953年)において、モルモットの血清にリンパ腫に対する抗腫瘍作用が認められることを報告したことに端を発する。その後、ジェー・ディー・ブルームは『ネイチャー』、第191巻、1114乃至1115頁(1961年)において、この抗腫瘍作用の実体がL-アスパラギナーゼであることを明らかにした。現在、その作用機作は次のように説明されている。即ち、急性リンパ性白血病細胞等の腫瘍細胞は、L-アスパラギンシンターゼを欠損しているため、生体内のL-アスパラギンが必須栄養素となることから、生体内にL-アスパラギンが不足するか存在しない条件下では増殖できないので、生き続けることができない。ところがL-アスパラギンは正常細胞にとっては必須栄養素ではないので、悪性腫瘍患者においては、L-アスパラギナーゼにより生体内のL-アスパラギンを加水分解すれば、腫瘍細胞のみを選択的に死滅させ、悪性腫瘍を治療することができるというものである。以来、L-アスパラギナーゼの抗腫瘍剤としての実用化を目指して精力的な研究が続けられ、その結果、現在では、大腸菌由来のL-アスパラギナーゼは白血病及びリンパ腫の治療剤として用いられるようになった。

10

#### 【0003】

しかしながら、大腸菌由来のL-アスパラギナーゼは、人体からみれば、所詮、異種蛋白質であり、これを配合使用する従来の治療剤は、患者に投与すると、アナフィラキシーショック、蕁麻疹、浮腫、喘鳴、呼吸困難などの過敏反応を始めとする深刻な副作用を頻発させることとなった。斯くして、従来の治療剤は用量及び投与頻度を大幅に制限せざるを得ない状況にあり、そのため、斯かる副作用を軽減乃至解消するための提案が幾つかなされてきた。

20

#### 【0004】

その第一は、特開昭54-119082号公報に見られるように、2-O-置換ポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-S-トリアジンにより大腸菌由来のL-アスパラギナーゼにおけるアミノ基の65%以上を封鎖し、L-アスパラギナーゼそのものを化学的に修飾しようというものである。第二は、特開平4-320684号公報又は特開昭55-19018号公報に見られるように、ある種のヒト細胞株の培養物又は人尿から、ヒトのL-アスパラギナーゼを採取しようというものである。第一の提案には、大量に入手の容易な大腸菌のL-アスパラギナーゼを利用できる利点はあるものの、修飾反応の制御が困難なうえに、副作用を完全に解消するまでには到らないという問題がある。第二の提案によるヒトのL-アスパラギナーゼは、大腸菌が産生するものと違って、患者に投与しても抗体を産生し難い利点はあるものの、特開平4-320684号公報に開示されたヒト細胞はL-アスパラギナーゼ産生能が充分高いとは言えず、L-アスパラギナーゼを量産しようとする、細胞を大量に培養しなければならない問題があり、また特開昭55-19018号公報で開示された方法においても、工業的規模で継続して新鮮な人尿を得ることが困難であるという問題がある。

30

#### 【0005】

ところで、昨今の組換えDNA技術の進歩には目覚ましいものがある。今日では、目的とするポリペプチドをコードするDNAを単離することができれば、そのDNAと自律複製可能なベクターから組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、所望量のポリペプチドが容易に取得できるようになった。しかしながら今日に至るまで、L-アスパラギナーゼをコードする哺乳類由来のDNAは未だ単離されておらず、当然のことながら、組換えDNA技術により、哺乳類由来のL-アスパラギナーゼが製造されてもいない。

40

#### 【0006】

斯かる状況に鑑み、斯界においては、一刻も早く活性なL-アスパラギナーゼをコードする哺乳類由来のDNAが単離され、その単離されたDNAに組換えDNA技術を適用することにより、L-アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドを大量生産する技術の確立が待ち望まれている。

50

## 【 0 0 0 7 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

この発明の第一の課題は、L - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドを提供することにある。

## 【 0 0 0 8 】

この発明の第二の課題は、斯かるポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

## 【 0 0 0 9 】

この発明の第三の課題は、斯かるポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる組換えDNAを提供することにある。

10

## 【 0 0 1 0 】

この発明の第四の課題は、斯かる組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を提供することにある。

## 【 0 0 1 1 】

この発明の第五の課題は、斯かる形質転換体を用いる上記ポリペプチドの製造法を提供することにある。

## 【 0 0 1 2 】

この発明の第六の課題は、斯かるポリペプチドを有効成分として含んでなる感受性疾患剤を提供することにある。

## 【 0 0 1 3 】

20

## 【 課題を解決するための手段 】

この発明は、上記第一の課題をL - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドにより解決するものである。

## 【 0 0 1 4 】

またこの発明は、上記第二の課題をL - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

## 【 0 0 1 5 】

またこの発明は、上記第三の課題をL - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる組換えDNAにより解決するものである。

30

## 【 0 0 1 6 】

またこの発明は、上記第四の課題を、L - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドをコードするDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

## 【 0 0 1 7 】

またこの発明は、上記第五の課題を、L - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドをコードするDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決するものである。

## 【 0 0 1 8 】

40

またこの発明は、上記第六の課題を、L - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドを有効成分として含んでなる感受性疾患剤により解決するものである。

## 【 0 0 1 9 】

## 【 作用 】

哺乳類由来のこの発明のポリペプチドは、L - アスパラギンに作用し、L - アスパラギン酸とアンモニアを生成する。

## 【 0 0 2 0 】

この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、この組換えDNAを、通常当該ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を発現す

50

る。

【0021】

この発明の複製可能な組換えDNAは、通常、当該ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を発現する。

【0022】

この発明の形質転換体は、培養すると、当該ポリペプチドの産生を発現する。

【0023】

この発明の製造方法に従ってこの形質転換体を培養すれば、所望量のポリペプチドが容易に得られる。

10

【0024】

この発明の感受性疾患剤は、ヒトに投与すると重篤な副作用なく、顕著な治療・予防効果を発揮する。

【0025】

本発明者は、L-アスパラギナーゼをコードするモルモット及びヒト由来のDNAを世界で初めて単離し、その塩基配列を解明するのに成功した。すなわち、モルモット由来のDNAは、配列表における配列番号15に示す塩基配列を、また、ヒト由来のDNAは、配列表における配列番号16に示す塩基配列を有していることを明らかにした。この知見は、同じ出願人による特開平8-214885号公報に開示されている。本発明はこれら知見に基づくものであって、L-アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチド

20

【0026】

【発明の実施の形態】

この発明のポリペプチドは、それが哺乳類に由来するものであって、かつ、L-アスパラギナーゼ活性を有する限りその出所・由来は問わない。この発明のポリペプチドは哺乳類由来の遺伝子を発現させることにより得ることができ、通常、配列表における配列番号1、2及び3に示すアミノ酸配列を含んでいる。ただし、その配列番号3に示すアミノ酸配列において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸はグルタミン又はアルギニンを表すものとする。個々のポリペプチドとしては、例えば、配列表における配列番号4乃至9に示すいずれかのアミノ酸配列のポリペプチドが挙げられる。ただし、斯界の技術水準に鑑み、その配列番号4乃至9に示すアミノ酸配列に対して、L-アスパラギナーゼ活性を実質的に喪失させることなく、そのアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することは比較的容易である。一方、同じDNAに由来するポリペプチドであっても、それを導入する際に用いるベクターの種類や、それを導入する宿主の種類又はそのDNAを含む形質転換体の培養に使用する培地の成分・組成や培養温度・pHなどによっては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾や精製の過程で、所期の活性は保持しているものの、N末端及び/又はC末端におけるアミノ酸が1個又は2個以上欠失するか、N末端及び/又はC末端に1個又は2個以上のアミノ酸が付加したり、産生したポリペプチドに糖鎖の付加が生じることがある。斯かる状況に鑑み、配列表における配列番号4乃至9に示すいずれかのアミノ酸配列をそっくりそのまま有するポリペプチドは言うに及ばず、L-アスパラギナーゼ活性を有する限り、それらの相同体も、当然この発明に包含される。なお、この発明のポリペプチドは、通常多量体の形態、望ましくは、4量体の形態をとるときにL-アスパラギナーゼ活性を有する。

30

40

【0027】

この発明のポリペプチドは、通常、組換えDNA技術により製造される。すなわち、この発明のポリペプチドは、通常、それをコードするDNAを含む形質転換体を培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取することにより製造することができる。斯かる形質転換体は、例えば、配列表における配列番号10乃至15に示すいずれかの塩基配列を含んでいる組換えDNAを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお上記の塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩

50

基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えても良い。また、DNAの宿主中での当該ポリペプチドの産生を促すために、当該ポリペプチド又はその相同体をコードする塩基配列における、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは云うまでもない。さらには、当該ポリペプチド又はその相同体をコードする塩基配列における塩基の5末端及び/又は3末端に1個又は2個以上のアミノ酸をコードする配列及び/又はアミノ酸をコードしない配列を付加し得ることも云うまでもない。

#### 【0028】

この発明のポリペプチドをコードするDNAは、その発現産物たるポリペプチドがL-アスパラギナーゼ活性を有している限り、それが天然から得られたものであっても、人為的に合成されたものであってもかまわないし、また天然から得られたものと配列の一致する野生型DNAであっても、野生型DNAに対するDNA相同体であっても構わない。この発明のポリペプチドをコードするDNAの天然の給源としては、例えば、モルモットの肝臓が挙げられ、そこからは常法により、例えば、配列番号15に示す塩基配列を含んでいる野生型DNAが得られる。すなわち、同じ出願人による特開平8-214885号公報に開示されているように、先ず、モルモット肝臓より精製したポリ(A)付加RNAを材料として、常法によりcDNAライブラリーを作製する。ここに、モルモット血清より精製したL-アスパラギナーゼの部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ブランクハイブリダイゼーション法を適用し、この発明のポリペプチドをコードするDNAを含むファージクローンを採取する。斯くして得られたファージクローンを通常一般の方法により処理すれば、当該DNAが得られる。また、配列表における配列番号15に基づいてDNAを化学合成することも可能である。野生型DNAに対する相同体の例としては、例えば、配列表における配列番号10乃至14に示す塩基配列を含む個々のDNAが挙げられる。配列表における配列番号10に示す塩基配列を含むDNAは、配列表における配列番号15に示す、上述のようにして得られる野生型DNAに、斯界において慣用の方法、例えば、PCR法や点突然変異導入法を、配列表における配列番号10の塩基配列に基づいて適用することにより得ることができる。配列表における配列番号11乃至14に示す塩基配列を含むDNAは、いずれも以下のようにして得ることができる。すなわち、先ず、同じ出願人による特開平8-214885号公報に開示されたような、ヒト肝臓cDNAライブラリーのスクリーニング等により、配列表における配列番号16に示す塩基配列を含む野生型DNAを得る。そして次に、この野生型DNAに、斯界において慣用のPCR法や点突然変異導入法などを、配列表における配列番号11乃至14の塩基配列に基づき適用すればよい。また、配列表における配列番号10乃至14に示す塩基配列に基づいてDNAを化学合成することも可能である。

#### 【0029】

斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、例えば、pKK223-3、pGEX-2T、pRL-、pBTrp2 DNA、pUB110、YEp13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121、pCDM8、pBPV、BCMGsneo等のプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌等の原核細胞で発現させるにはpKK223-3、pGEX-2T、pRL-、pBTrp2 DNAおよびpUB110が、また酵母或いは動植物由来の細胞すなわち、真核細胞で発現させるにはYEp13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121、pCDM8、pBPV及びBCMGsneoが好適である。

#### 【0030】

斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、例えば、先ず、自律複製可能なベクターを制限酵素により切断する。次にPCR法を応用して、この発明のDNAの5末端及び3末端に、先にベクターの切断に用いたのと同じ制限酵素切断部位を導入し二本鎖とした後、同制限酵素で切断する。次に、該ベクターと該DNA断片の混合液に、DNAリガーゼを作用させて連結す

10

20

30

40

50

る。斯くして得られた組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0031】

この発明による組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母、植物細胞、動物細胞を始めとする適宜の宿主に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、例えば、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方宿主が枯草菌の場合には、例えば、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。また宿主が動物細胞の場合には、例えば、DEAE-デキストラン法やエレクトロポレーション法によればよい。形質転換体をクローニングするには、ハイブリダイゼーション法を適用するか、培地で培養し、L-アスパラギナーゼを産生するものを選択すればよい。

10

【0032】

斯くして得られる形質転換体は、培地で培養すると、菌体内外又は細胞内外に当該ポリペプチドを産生する。培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラルさらには必要に応じてアミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、ここの炭素源としては、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また窒素源としては、例えばアンモニア乃至アンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる培地に接種し、栄養培地を温度25乃至65、pH5乃至8に保ちつつ、通気攪拌などによる好氣的条件下で約1乃至10日間培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物は、感受性疾患剤としてそのまま使用可能なこともあるが、通常は、例えば、使用に先立ち必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体又は細胞を破碎した後、濾過、遠心分離などにより当該ポリペプチドを菌体破碎物又は細胞破碎物から分離し、精製する。又例えば、培養物から菌体又は細胞を濾過、遠心分離などにより除去した培養上清を回収し、精製する。精製には、菌体又は細胞破碎物由来の不溶性成分を除去した上澄液や、培養上清に、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、等電点電気泳動及びゲル電気泳動などの、蛋白質を精製するための斯界における通常一般の方法が採用でき、必要に応じて、これら方法を適宜組み合わせればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製したポリペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。

20

30

【0033】

以下、実験例に基づき説明するが、ここで用いられる方法は斯界において慣用のものであり、例えば、ジェイ・サムブルックら、『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』（1989年）、コールド・スプリング・ハーバー発行や、松村正実、『ラボマニュアル遺伝子工学』（1988年）、丸善発行などにも詳述されている。

【0034】

【実験例1】

モルモット及びヒト由来の野生型DNAの発現

【0035】

【実験例1-1】

モルモット由来の野生型DNAの発現

40

【0036】

【実験例1-1(a)】

モルモット由来の野生型DNAの調製

モルモット由来のL-アスパラギナーゼをコードする野生型DNAは、同じ出願人による特開平8-214885号公報に開示された方法に準じて調製した。このDNAは、配列表における配列番号15に示す塩基配列を有していた。以後、その配列番号15に示す塩基配列において、ポリペプチドをコードする領域すなわち、当該塩基配列における第20乃至第1714の塩基よりなる配列を有するDNAを『GPA/WT DNA』と呼ぶ。また、GPA/WT DNAの発現産物たる、配列表における配列番号15に並記したア

50

ミノ酸配列を有するポリペプチドを、以後『モルモット野生型L-アスパラギナーゼ』と呼ぶ。なお、配列表における配列番号17には、GPA/WT DNAの塩基配列とともに、そのコードするアミノ酸配列が併記されている。

【0037】

【実験例1-1(b)】

組換えDNAの調製

0.5ml容反応管に10×PCR緩衝液を10μl、25mM dNTPミックスを1μl、鋳型として、実験例1-1(a)で得たモルモット由来のL-アスパラギナーゼをコードする野生型DNAを1ngとり、配列表の配列番号15に並記したアミノ酸配列におけるN末端及びC末端付近の配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして適量加え、滅菌蒸留水で99.5μlとした後、2.5単位/μlアンプリタックDNAポリメラーゼを0.5μl加えた。センスプライマーは、配列が5'-AATCTCGAGCCACCATGGCGCGCGCATCA-3'であり、配列表における配列番号15に併記したアミノ酸配列のN末端をコードする部分の上流に、エム・コザックが『ニュークレイック・アシッド・リサーチ』、第15巻、8125乃至8148頁(1987年)に示した動物細胞における共通配列を付加し、さらにその上流に制限酵素Xho I切断部位を付加したものである。アンチセンスプライマーは、配列が5'-CTGCGGCCGCTTATCAGATGGCAGGCGGCGCAC-3'であり、配列表における配列番号15に併記したアミノ酸配列のC末端をコードする部分の下流に2個の終始コドン(20)を付加し、さらにその下流に制限酵素Not I切断部位を付加した配列に相補的な配列のものである。常法により、上記混合物を94で1分間、55で1分間、72で3分間の順序でインキュベートするサイクルを40回繰り返すことによりPCRを行いDNAを増幅させ、GPA/WT DNAを含むDNAを得た。このDNAを制限酵素Xho I及びNot Iで切断することにより得られる約1.7kbpのDNA断片を25ngとり、これに予め制限酵素Xho I及びNot Iで切断しておいたインビトロジェン社製プラスミドベクター『pCDM8』を10ngを加え、さらに宝酒造製ライゲーション・キット・バージョン2の溶液Iを先のDNA混合溶液と同容量加えた後、16で2時間インキュベートして、複製可能な組換えDNA『pCGPA/WT』を得た。

【0038】

組換えDNA pCGPA/WTをコンピテントセル法によりインビトロジェン社製大腸菌MC1061/P3株に導入し、得られた形質転換体を20μg/mlのアンピシリン及び10μg/mlのテトラサイクリンを含むLプロス培地(pH7.2)に接種し、37で18時間振とう培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアリカリ-SDS法を適用して組換えDNA pCGPA/WTを抽出した。蛍光光度計を使用する自動シーケンサにより分析したところpCGPA/WTは、その3'末端に終止コドンが連結されたGPA/WT DNAを含んでおり、またGPA/WT DNAは、CMVプロモーター下流に5'末端から3'末端方向に連結されていることが確認された。

【0039】

実験例1及び後述する実験例2でのDNAの発現には、いずれもサル腎臓由来の細胞株であるCOS-1細胞(ATCC CRL-1650)を宿主とした系を用いた。この系は一過性発現系であるため、形質転換体内では導入されたDNAが安定して、すなわち数日を超えて保持されず、形質転換体を用いて繰り返し目的とするペプチドを産生できないという欠点がある。しかし、該細胞に先述のプラスミドベクター『pCDM8』のようなSV40ウイルス複製起点を有するベクターを導入した場合には、その細胞あたりのコピー数が一次的に10<sup>5</sup>個程度に上昇することが知られており、このために目的とするDNAの発現産物の解析が極めて容易であるという利点がある。

【0040】

【実験例1-1(c)】

組換えDNAのCOS-1細胞への導入と発現

10

20

30

40

50

実施例 1 - 1 ( b ) で調製した組換え DNA pCGPA / WT を、フレデリック・エム・オースベルらが『カレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー』( 1987 年)、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インク発行、チャプター 9 . 2 . 1 乃至 9 . 2 . 3 及び、チャプター 9 . 2 . 5 乃至 9 . 2 . 6 で紹介している DEAE - デキストラン法に準じて COS - 1 細胞に導入し、発現させた。詳細には、先ず口径 3 . 5 cm のベクトン・ディッキンソン・ラブウェア製 6 穴マルチウエルプレート『3046』の 1 穴に 2 . 5 ml の 10 % ( v / v ) 牛胎児血清を含む DME 培地を入れ、 $1.8 \times 10^5$  個の COS - 1 細胞を接種し、5 % ( v / v ) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 °C で培養した。翌日、培養上清をアスピレーターで除去し、50 mM トリス - 塩酸 ( pH 7 . 4 ) を含む DME 培地で細胞を洗浄後、2 . 8 µg / ml の pCGPA / WT、50 mM の トリス - 塩酸 ( pH 7 . 4 )、0 . 4 mg / ml の DEAE - デキストラン、0 . 1 mM のクロロキンを含む DME 培地を、1 穴あたり 2 . 5 ml ずつ加え、5 % ( v / v ) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 °C で 4 時間静置した。その後上清を除去し 10 ( v / v ) % DMSO を含む 10 mM リン酸食塩緩衝液 ( 以後 PBS という ) を 1 穴あたり 2 . 5 ml 添加して室温で 2 分間静置し、上清を除去して 50 mM トリス - 塩酸 ( pH 7 . 4 ) を含む DME 培地で細胞を洗浄し、2 . 5 ml のコスモバイオ社製 COS 培地を加え、5 % ( v / v ) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 °C で 3 日間培養し、目的 DNA を発現させた。なお、対照区としてプラスミドベクター pCDM8 を用いてこれと同一の実験をも行った。

10

**【0041】**

20

3 日間培養した後の、先述の培養器を - 80 °C で静置して凍結させた後、室温で融解させる操作を 3 回繰り返して細胞を破碎させた。その後全培養物を遠沈管に移し取り、遠心分離により不溶性成分を沈澱として除去し、全可溶性画分を得た。そしてこれを膜濃縮し、1 穴由来の全可溶性画分を 0 . 5 ml に調整して、以降の分析に用いた。

**【0042】****【実験例 1 - 1 ( d )】****L - アスパラギナーゼ活性の測定**

L - アスパラギナーゼ活性は、次のようにして測定した活性値 ( 単位 ) で表示した。すなわち、1 . 5 ml 反応管に被検試料を 50 µl ずつ分注する一方、L - アスパラギン酸を 1 . 4 mg / ml になるように 50 mM リン酸緩衝液 ( pH 7 . 0 ) に溶解し、溶液を 1 反応管あたり 200 µl ずつ加え反応混合液とした。同反応管を 37 °C で 0、1、2、4、6 及び 16 時間静置した後、反応混合液中の L - アスパラギン酸をアミノ酸分析機により測定した。これと並行して、1 . 0、0 . 5 又は 0 . 25 単位 / ml に希釈した大腸菌由来の L - アスパラギナーゼ標品を用いる系を設け、37 °C で 0 及び 1 時間静置した後、L - アスパラギン酸測定結果から求めた L - アスパラギン酸の増加量に基づき検量線を作成した。被検試料の系で測定された L - アスパラギン酸の増加量をこの検量線に内挿し、被検試料の活性値を推定した。活性の低い被検試料は反応時間を 2 時間以上にのばした系での測定結果から活性値を推定した。なお、L - アスパラギナーゼ 1 単位は、上記条件下で反応させたとき、1 分間に L - アスパラギンからアンモニアを 1 µmol 遊離する量と定義した。

30

40

**【0043】**

実験例 1 - 1 ( c ) で得た全可溶性画分それぞれにこの処理を施し、 $3.6 \times 10^5$  個の COS - 1 細胞由来の全可溶性画分中に検出された L - アスパラギナーゼ活性の総量として表示した。その結果、モルモット野生型 L - アスパラギナーゼの活性は 0 . 083 単位であった。対照区では、検出されなかった。

**【0044】****【実験例 1 - 1 ( e )】****ウエスタン・ブロッティング**

先ず以下の方法により、抗 L - アスパラギナーゼ抗体を調製した。すなわち、常法に従って化学合成した、Gly - Ser - Gly - Asn - Gly - Pro - Thr - Lys -

50



Pro - Asp - Leu - Leu - Gln - Glu - Leu - Arg - Cys により表される配列のオリゴペプチドのC末端にキーホール・リンペット・ヘモシアニンを結合させ、精製した後、常法に従いウサギに免疫した。2週間間隔で6回免疫した後、全採血し50% (w/v) 硫酸塩析にて精製し、抗L - アスパラギナーゼ・ウサギ抗血清を得た。次に、ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて、実験例1 - 1 (c) で得た、全可溶性画分のうち0.2 ml を、還元剤存在下で12.5% (w/v) SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以後SDS - PAGEという)に供し、泳動された全ポリペプチドをSDS - ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜に転写した後、先の抗L - アスパラギナーゼ・ウサギ抗血清を用いて、エイチ・トーピンが『プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー』、第76巻、4350乃至4354頁(1979年)に報告した方法に準じてウエスタン・ブロットィングを行った。発色はアルカリフォスファターゼ発色系によった。対照と比較して、試料で特異的に染色されたバンドを確認するとともに、染色されたバンドを分子量マーカーと比較してL - アスパラギナーゼのサブユニットあたりの分子量を求めた。用いた分子量マーカーは、ウシ血清アルブミン(67 kDa)、オボアルブミン(45 kDa)、大豆トリプシンインヒビター(20.1 kDa)及び - ラクトアルブミン(14.4 kDa)であり、これらはアミドブラックにて染色した。実験例1 - 1 (c) で得た全可溶性画分は明瞭なバンドは示さなかった。

【0045】

【実験例1 - 1 (f)】

ゲル濾過による分子量の測定

次に実験例1 - 1 (c) で得た、COS - 1細胞由来の全可溶性画分のうち2 ml を、PBSで平衡化したファルマシア製『ハイロード・スーパーデックス・200・カラム』(内径16 mm x 60 cm)を用いてゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供し、溶出フラクションのL - アスパラギナーゼ活性を調べることにより、モルモット野生型L - アスパラギナーゼのネイティブな分子量を調べた。分子量マーカーとして、チログロブリン(669 kDa)、フェリチン(440 kDa)、カタラーゼ(232 kDa)、アルドラーゼ(158 kDa)、ウシ血清アルブミン(67 kDa)及びオボアルブミン(43 kDa)を用いた。その結果、溶出画分のL - アスパラギナーゼ活性のピークは分子量約300 kDaに相当する位置に認められた。

【0046】

ウエスタン・ブロットィングでは明瞭なバンドを示さなかったため、モルモット野生型L - アスパラギナーゼの解離した状態での分子量は測定できなかった。そのネイティブな状態での分子量は、ゲル濾過の結果から、約300 kDaと見積もられた。これに対して、モルモット血清L - アスパラギナーゼを精製し、ネイティブな状態での分子量をゲル濾過により分子量を求めると、約190 kDaと見積もられる。因みに、SDS - PAGEにより解離した状態での分子量を求めると約43 kDaと見積もられる。一方、同じ出願人による特開平8 - 214885号公報に開示されたモルモット血清L - アスパラギナーゼの3個の部分アミノ酸配列は、モルモット野生型L - アスパラギナーゼのアミノ酸配列における、第10乃至第236のアミノ酸残基よりなる領域内に認められる。また、イー・ハームズらが『フェブス・レター』、第285巻、55乃至58頁(1991年)で大腸菌由来のL - アスパラギナーゼ等を用いた実験結果から提唱した、L - アスパラギナーゼ活性に必須な2つの共通配列すなわち、配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列は、モルモット野生型L - アスパラギナーゼのアミノ酸配列上ではそれぞれ、第16乃至第19のアミノ酸残基及び第114乃至第118のアミノ酸残基よりなる配列と一致する。これらのことと実験例1 - 1に示した結果から本発明者は、モルモット野生型L - アスパラギナーゼにとって、当該アミノ酸配列における第1乃至第400のアミノ酸残基又はその前後のアミノ酸残基よりなる部分が、その活性発現に必須であろうと推測した。そこで、実験例2 - 1ではモルモット由来のL - アスパラギナーゼ相同体であるC末端欠

10

20

30

40

50

失変異体の活性を調べるべく、モルモット由来のDNA相同体の発現産物の性質・性状について試験する。

【0047】

【実験例1-2】

ヒト由来の野生型DNAの発現

ヒト由来のL-アスパラギナーゼをコードする野生型DNAは、同じ出願人による特開平8-214885号公報に開示された方法に準じて調製した。このDNAは配列表における配列番号16に示す塩基配列を有していた。以後、その配列番号16に示す塩基配列においてポリペプチドをコードする領域すなわち、当該塩基配列における第93乃至第1811の塩基よりなる配列を有するDNAを『HA/WT DNA』と呼ぶ。また、HA/WT DNAの発現産物たる配列番号16に並記したアミノ酸配列を有するポリペプチドを、以後『ヒト野生型L-アスパラギナーゼ』と呼ぶこともある。なお、配列表における配列番号18には、HA/WT DNAの塩基配列とともに、そのコードするアミノ酸配列が併記されている。

10

【0048】

鋳型、センスプライマー及びアンチセンスプライマー以外は実験例1-1(b)と同一の条件でPCRを行った。鋳型は、この実験例1-2で得たヒト由来のL-アスパラギナーゼをコードする野生型DNA、センスプライマーは配列が5'-AATCTCGAGCCACCATGGCGCGCGCGGTG-3'であるオリゴヌクレオチド、アンチセンスプライマーは配列が5'-CTGCGGCGCTTATCAGACACCAAGGCAGCAC-3'であるオリゴヌクレオチドであった。この結果増幅されたDNAを引き続き実験例1-1(b)と同じ方法で処理し、組換えDNA『pCHA/WT』を調製した。同様に配列を確認した後、COS-1細胞に導入し、発現させて、実験例1-1と同様に分析した。

20

【0049】

モルモット野生型L-アスパラギナーゼとは対照的に、ヒト野生型L-アスパラギナーゼは、本実験系においては活性が検出できなかった。この原因のひとつとして、例えば、ヒト野生型L-アスパラギナーゼはモルモット野生型L-アスパラギナーゼに比べ、比活性が低いことが考えられた。そこで、次の実験例2-2においては、ヒト由来のDNA相同体の発現産物の性質・性状について試験する。

30

【0050】

【実験例2】

モルモット及びヒト由来のDNA相同体の発現

【0051】

【実験例2-1】

モルモット由来のDNA相同体の発現

モルモット由来の野生型DNAの、特定の位置の塩基配列が終止コドンに置換されたDNA相同体を次のように調製した。すなわち、配列表の配列番号17に示す塩基配列における、第1090乃至第1092の塩基よりなる配列を終止コドンに置換したDNA、及び第1012乃至第1014の塩基よりなる配列を終止コドンに置換したDNAを、PCR法を適用して調製した。アンチセンスプライマーの配列以外は、全て実験例1-1(b)と同一の条件でPCRを行った。それぞれのDNA調製のために使用したアンチセンスプライマーの配列は、5'-CTGCGGCGCTTATCATGCGGTGGGCAGTGT-3'及び5'-CTGCGGCGCTTATCAGCCCAACACGTAGGA-3'であった。この結果増幅されたDNAを引き続き実験例1-1(b)と同様に処理し、組換えDNA『pCGPA/D364stp』及び『pCGPA/L338stp』を調製した。同様に配列を確認したところ、pCGPA/D364stp及びpCGPA/L338stpは、それぞれモルモット野生型L-アスパラギナーゼにおける、第1乃至第363のアミノ酸残基及び第1乃至第337のアミノ酸残基よりなる配列をコードするDNAと、それぞれの3'末端側に介在配列なく存在する終止コドンを含むもので

40

50

った。以後これらのポリペプチドをコードする部分のDNAを、それぞれ『GPA/D364stp DNA』及び『GPA/L338stp DNA』と呼ぶ。GPA/D364stp DNA及びGPA/L338stp DNAはCMVプロモーター下流に、5末端から3末端方向に連結されていた。以後これらのDNAの発現産物を『モルモットL-アスパラギナーゼ相同体』と呼ぶこともある。

【0052】

これら組換えDNAを、実験例1-1に従ってCOS-1細胞に導入した後、同様に試験した。対照区として、実験例1-1(b)で調製した組換えDNA pCGPA/WT及びpCDM8を同様に処理し試験した。結果を表1に示す。

【0053】

【表1】

導入した組換えDNA	L-アスパラギナーゼ活性(単位)	分子量 *2 (kDa)	分子量 *3 (kDa)
pCGPA/WT	0.083	—	約300
pCGPA/D364stp	0.228	約40	約140
pCGPA/L338stp	ND *1	約35	—
pCDM8	ND *1	—	—

註 \*1) 活性は検出されなかった。

註 \*2) ウェスタン・ブロッティングから求めた値。

註 \*3) ゲル濾過から求めた値。

【0054】

表1に示したように、上記のモルモットに由来する野生型DNA及びその相同体のうち、GPA/WT DNA及びGPA/D364stp DNAの発現産物では活性が認められたが、GPA/L338stp DNA発現産物では活性は検出されなかった。このことは、モルモット由来のL-アスパラギナーゼが十分な活性を示すためには、野生型L-アスパラギナーゼのアミノ酸配列上、第1乃至第363のアミノ酸残基よりなる領域があれば十分であることを示唆している。この第1乃至第363のアミノ酸残基よりなる配列は、配列表における配列番号4に示したものである。これをコードするDNAの塩基配列は、配列表における配列番号10に示したものである。またモルモット野生型L-アスパラギナーゼのアミノ酸配列は、配列表における配列番号5に示されている。

【0055】

【実験例2-2】

ヒト由来のDNA相同体の発現

ヒト由来の野生型DNAの特定の位置の塩基配列を終止コドン又は他のアミノ酸に対するコドンに置換したDNA相同体を調製した。まず、配列表の配列番号18に示す塩基配列における第1096乃至第1098の塩基よりなる配列を終止コドンに置換したDNA相同体を、PCR法を適用して調製した。すなわち、鋳型、センスプライマー及びアンチセンスプライマー以外は、全て実験例1-1(b)と同一の条件でPCRを行った。鋳型は

10

20

30

40

50

、実験例 1 - 2 で得たヒト由来の L - アスパラギナーゼをコードする野生型 DNA、センスプライマーは配列が 5' - A A T C T C G A G C C A C C A T G G C G C G C G C G G T G - 3' であるオリゴヌクレオチド、アンチセンスプライマーは配列が、5' - C T G C G G C C G C T C A T T A C A C C G A G G G T G G C G T - 3' であるオリゴヌクレオチドであった。この結果増幅された DNA を実験例 1 - 1 に従って処理し、組換え DNA 『pCHA / E366stp』を調製し、配列を確認した。pCHA / E366stp は、配列表の配列番号 16 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至第 365 のアミノ酸残基よりなる配列をコードする DNA と、その 3' 末端に介在配列なく存在する終止コドンを含むものであった。以後このコード部分の DNA を 『HA / E366stp DNA』と呼ぶ。HA / E366stp DNA は、CMV プロモーターの下流に 5' 末端から 3' 末端方向に連結されていた。

#### 【0056】

DNA の特定の位置のコドンを他のアミノ酸に対するコドンへ置換するには、ロバート・エム・ホートンらが『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、アカデミック・プレス発行、第 217 巻、270 乃至 279 頁 (1993 年) で紹介しているオーバーラップ・エクステンション法に従って行った。その概要を図 1 に示すと共に以下に説明する。第 1、変異を導入すべき位置の塩基を、目的とする別の塩基に置換した互いに相補な変異プライマー A 及び変異プライマー S を調製する。ここで、変異プライマー A はアンチセンス鎖であり、変異プライマー S はセンス鎖である。他方、目的とする DNA の全域を増幅し得るプライマーのセット、すなわち、5' 末端プライマー及び 3' 末端プライマーを調製する。ここで 5' 末端プライマーはセンス鎖であり、3' 末端プライマーはアンチセンス鎖である。第 2、基の塩基配列の DNA を鋳型として、先の 5' 末端プライマーと変異プライマー A を用いて通常の PCR を行う。これと並行して、同じ DNA を鋳型として、先の 3' 末端プライマーと変異プライマー S を用いて通常の PCR を行う (第 1 段 PCR)。第 3、第 1 段 PCR により増幅した 2 つの DNA、第 1 段 PCR で使用した 5' 末端プライマー及び 3' 末端プライマーを、同一の反応管で混合し、PCR を行う (第 2 段 PCR)。第 1 段 PCR で増幅された 2 つの DNA 断片は、鋳型兼プライマーとして変異が導入された DNA の生成に用いられ、5' 末端プライマー及び 3' 末端プライマーは変異が導入された DNA 増幅のためのプライマーとして用いられる。この方法により、7 とおりの塩基置換を導入した DNA すなわち、7 種の DNA 相同体を調製した。7 とおりの塩基置換の内容と、それに伴うアミノ酸配列の変化の内容を表 2 にまとめて示した。この 7 種の DNA 相同体の調製に用いた、鋳型 DNA と変異プライマー A 及び変異プライマー S の配列を表 3 にまとめて示した。一方、7 個の DNA 相同体の調製に用いた、5' 末端プライマー及び 3' 末端プライマーはそれぞれ、この実験例 2 - 2 で先に示した pCHA / E366stp の調製時に用いたセンスプライマー及びアンチセンスプライマーと同一である。

#### 【0057】

#### 【表 2】

DNA相同体の名称	組換えDNAの名称	塩基の置換（上段）及びそれに伴うアミノ酸の置換（下段）*
HA/MUT1 DNA	pCHA/MUT1	C894G, A902G, G952A, G953A, G1096T H298Q, Q301R, G318N, E366stp
HA/MUT2 DNA	pCHA/MUT2	C894G, A902G, G1096T H298Q, Q301R, E366stp
HA/MUT3 DNA	pCHA/MUT3	C894G, G952A, G953A, G1096T H298Q, G318N, E366stp
HA/MUT4 DNA	pCHA/MUT4	A902G, G952A, G953A, G1096T Q301R, G318N, E366stp
HA/MUT5 DNA	pCHA/MUT5	C894G, G1096T H298Q, E366stp
HA/MUT6 DNA	pCHA/MUT6	A902G, G1096T Q301R, E366stp
HA/MUT7 DNA	pCHA/MUT7	G952A, G953A, G1096T G318N, E366stp

註\*) それぞれの上段の数字は、配列表の配列番号18に示す塩基の番号を示している。数字の左及び右のアルファベットは、それぞれ、置換前及び置換後の塩基を表している。

それぞれの下段の数字は、配列表の配列番号18に示すアミノ酸の番号を示している。数字の左及び右のアルファベットは、それぞれ、塩基の置換前及び置換後のDNAによりコードされるアミノ酸を表している。

これらの塩基の置換により得られたDNA相同体と、これらDNA相同体を含む組換えDNAの名称を併せて示した。

【 0 0 5 8 】

【 表 3 】

得られるDNA 相同体の名称	鋳型として用いたDNA *1	変異プライマーA (MA) 及び 変異プライマーS (MS) の配列*2
HA/MUT1 DNA	pCHA/MUT7	MA) HA/MUT2調製時のMAと同一 MS) HA/MUT2調製時のMSと同一
HA/MUT2 DNA	pCHA/E366stp	MA) 5'-CCCC <u>C</u> GGAGGCAGTGGGT-3' MS) 5'-ACCCAGTGCCTCC <u>G</u> GGG-3'
HA/MUT3 DNA	pCHA/MUT7	MA) HA/MUT5調製時のMAと同一 MS) HA/MUT5調製時のMSと同一
HA/MUT4 DNA	pCHA/MUT7	MA) HA/MUT6調製時のMAと同一 MS) HA/MUT6調製時のMSと同一
HA/MUT5 DNA	pCHA/E366stp	MA) 5'-CCCCTGGAGGCAGTGGGT-3' MS) 5'-ACCCAGTGCCTCCAGGGG-3'
HA/MUT6 DNA	pCHA/E366stp	MA) 5'-CCCC <u>C</u> GGAGGCAGTGGGT-3' MS) 5'-ACCCACTGCCTCC <u>G</u> GGG-3'
HA/MUT7 DNA	pCHA/E366stp	MA) 5'-GACGTTGGCTCCCGCCAT-3' MS) 5'-ATGGCGGGAGCCA <u>A</u> CGTC-3'

註\*1) 鋳型に用いたいずれのDNAも、実験例2-2で得たものである。

註\*2) 表3の中で下線を付して示した塩基は、野生型DNAに対して置換された塩基であることを表している。

#### 【0059】

ここで得たヒト由来のDNA相同体を実験例1-1に従って処理し、組換えDNA『pCHA/MUT1』、『pCHA/MUT2』、『pCHA/MUT3』、『pCHA/MUT4』、『pCHA/MUT5』、『pCHA/MUT6』及び『pCHA/MUT7』を得た。以後、この実験例2-2で得た、以上のDNA相同体の発現産物を、『ヒトL-アスパラギナーゼ相同体』と呼ぶこともある。同様に配列を確認した後、COS-1細胞へ導入し発現させ、試験した。対照区として、実験例1-2で得たpCHA/WT及びpCDM8を同様に処理・試験した。また、この実験例2-2では各発現産物の量的な比較のための参考としてウエスタン・ブロッティングで検出されたバンドのシグナル強度を、デンシトメトリーにより数値化した。以上の結果を表4に示した。

#### 【0060】

【表4】

導入した 組換えDNA	L-アスパラギ ナーゼ活性(単位)*1	分子量*2 (kDa)	発現量*3	分子量*4
pCHA/WT	ND	—	—	—
pCHA/E366stp	ND	約40	2.3	—
pCHA/MUT1	0.021	約40	0.4	約140
pCHA/MUT2	0.031	約40	0.9	約140
pCHA/MUT3	0.009	約40	0.1	約140
pCHA/MUT4	ND	約40	0.1	—
pCHA/MUT5	0.006	約40	0.2	約140
pCHA/MUT6	ND	約40	1.9	—
pCHA/MUT7	ND	約40	0.2	—
pCDM8	ND	—	—	—

註\*1) NDは活性が検出されなかったことを示している。

註\*2) ウェスタン・ブロッティングから求めた値。

註\*3) ウェスタン・ブロッティングで認められたバンドのシグナル強度をデンシトメトリーにより数値化した値。

註\*4) ゲル濾過から求めた値。

## 【0061】

表4の結果は、ヒト由来のL-アスパラギナーゼは野生型でも、その相同体の一つであるC末端欠失変異体(HA/E366stp DNA発現産物)でもモルモット由来のそれらに比べ、比活性が低いことを示唆している。また、これに対し、ヒト由来の野生型L-アスパラギナーゼ本来のアミノ酸配列の内のいくつかを他のアミノ酸に置換した点突然変異体の中には、検出され得る程度に比活性が上昇するものがあることをも示している。発現産物が少なくとも検出され得る程度の活性を示すことが確認された、ヒト由来のDNA相同体HA/MUT1 DNA、HA/MUT2 DNA、HA/MUT3 DNA及びHA/MUT5 DNAは、それぞれ配列表における配列番号11、12、13及び14に示す塩基配列を有すものであり、そのコードするポリペプチドは、それぞれ配列表における配列番号6、7、8及び9に示すアミノ酸配列を有すものである。

## 【0062】

以上の実験結果から、哺乳類に由来するポリペプチドが、少なくとも実験例1及び2で用いた発現系・活性測定系で検出され得る程度のL-アスパラギナーゼ活性を示すためには

10

20

30

40

50

、従来公知の、配列表における配列番号 1 及び 2 に示すアミノ酸配列の他に、例えば、同じく配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有する必要があることを見出した(ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸はグルタミン又はアルギニンを表すものとする)。因みに、モルモット野生型 L - アスパラギナーゼは、そのアミノ酸配列上第 298 乃至第 302 の残基よりなる部分にこの配列を有している。配列表における配列番号 1 乃至 3 に示すアミノ酸配列を全て有するポリペプチドとしては、例えば、モルモットに由来する、配列表における配列番号 4 及び 5 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドと、ヒトに由来する配列表における配列番号 6 乃至 9 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

#### 【0063】

以上の知見に基づき、本発明者は L - アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドを発明するに至った。以下実施例に基づきこの発明を説明するが、ここで選択した方法はいずれも斯界において慣用のものである。当然ながら、この発明を実施するための方法は、これらに限定されるわけではない。

#### 【0064】

##### 【実施例 A - 1】

L - アスパラギナーゼ活性を有するモルモット由来の野生型ポリペプチド

#### 【0065】

##### 【実施例 A - 1 ( a )】

形質転換体の調製

0.5 ml 容反応管に 10 × PCR 緩衝液を 10 μl、25 mM dNTP ミックスを 1 μl、鋳型として、実験例 1 - 1 で得た組換え DNA pCGPA / WT を 1 ng とり、GPA / WT DNA の 5' 末端及び 3' 末端の配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをセンスプライマー又はアンチセンスプライマーとして適量加え、滅菌蒸留水で 99.5 μl とした後、2.5 単位 / μl アンプリタック DNA ポリメラーゼを 0.5 μl 加えた。センスプライマーは、配列が 5' - GCGAATTCATGGCGCGCGCATCA - 3' であり、GPA / WT DNA の 5' 末端の上流に制限酵素 EcoRI 切断部位を付加したものである。アンチセンスプライマーは、配列が 5' - GCAAGCTTTCAGATGGCAGGCGGCAC - 3' であり、GPA / WT DNA の 3' 末端の下流に終始コドン(ATG)を付加し、さらにその下流に制限酵素 HindIII 切断部位を付加した配列に相補的な配列のものである。常法により、上記混合物を 94 °C で 1 分間、55 °C で 1 分間、72 °C で 3 分間の順序でインキュベートするサイクルを 40 回繰り返すことにより PCR を行い、DNA を増幅させた。この DNA を制限酵素 EcoRI 及び HindIII で切断することにより約 1.7 kbp の EcoRI - HindIII 断片を得た。この DNA 断片を 25 ng とり、これに予め制限酵素 EcoRI 及び HindIII で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223 - 3』を 10 ng を加え、さらに宝酒造製ライゲーションキット・バージョン 2 の溶液 I を先の DNA 混合溶液と同体積加えた後、16 °C で 2 時間インキュベートすることにより、複製可能な組換え DNA 『pKGP A / WT』を得た。

#### 【0066】

組換え DNA pKGP A / WT をコンピテントセル法によりファルマシア製大腸菌 JM105 株に導入し、ここで得られる形質転換体『J - GPA / WT』を 50 μg / ml のアンピシリンを含む L プロス培地 (pH 7.2) に接種し、37 °C で 18 時間振とう培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ - SDS 法を適用して組換え DNA pKGP A / WT を抽出した。蛍光光度計を使用する自動シーケンサで分析することにより、この pKGP A / WT においては、図 2 に示すごとく配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の GPA / WT DNA がタクプロモーターの下流に 5' 末端から 3' 末端方向に連結されているのが確認された。また、GPA / WT DNA の 3' 末端側には、介在配列なく終止コドンが存在していることも確認された。

#### 【0067】

10

20

30

40

50



## 【実施例 A - 1 ( b )】

## ポリペプチドの製造

形質転換体 J - G P A / W T を  $50 \mu\text{g} / \text{ml}$  のアンピシリンを含む L プロス培地 (  $\text{pH} 7.2$  ) に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 18 時間振とう培養した。次に  $30 \text{ l}$  容ジャーファーマンタに新鮮な L プロス培地を  $18 \text{ l}$  とり、先に培養しておいた種培養物を  $1\%$  (  $\text{v} / \text{v}$  ) の割合で接種し、 $37^\circ\text{C}$  で通気攪拌培養した。培養物の一部を厚さ  $1 \text{ cm}$  のキュベットにとり、波長  $650 \text{ nm}$  における吸光度を測定しつつ培養し、吸光度が約  $1.5$  に達した時点で IPTG を終濃度  $0.1 \text{ mM}$  となるように添加し、さらに 5 時間培養した。その後、遠心分離により培養物から回収される菌体を、 $139 \text{ mM}$  塩化ナトリウム、 $7 \text{ mM}$  リン酸水素二ナトリウム及び  $3 \text{ mM}$  リン酸二水素ナトリウムを含む混液 (  $\text{pH} 7.2$  ) に懸濁し常法により超音波処理して菌体を破碎し、菌体破碎物を遠心分離して上清を回収した。

10

## 【0068】

この上清に氷冷下で硫酸アンモニウムを  $50\%$  (  $\text{w} / \text{v}$  ) まで加え、均一に溶解し、暫時静置し遠心分離後、沈澱を採取した。この沈澱を  $20 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 (  $\text{pH} 8.0$  ) に溶解させ、同緩衝液に透析後、同緩衝液で平衡化したファルマシア製『キュー・セファロス・エフ・エフ・カラム』に負荷し、同緩衝液で十分に洗浄後、 $0$  から  $0.5 \text{ M}$  の塩化ナトリウムの濃度勾配下、 $20 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 (  $\text{pH} 8.0$  ) を通液した。塩化ナトリウム濃度が  $0.1$  乃至  $0.3 \text{ M}$  付近で溶出した画分を採取し、膜濃縮しながら  $10 \text{ mM}$  リン酸ナトリウム緩衝液 (  $\text{pH} 7.5$  ) に溶媒交換した。同緩衝液で平衡化したシグマ製『L - アスパラギン・アガロース』に負荷し、同緩衝液で洗浄後  $0.5 \text{ M}$  塩化ナトリウムを含む  $10 \text{ mM}$  リン酸ナトリウム緩衝液 (  $\text{pH} 7.5$  ) で溶出させた。溶出画分を膜濃縮し、 $10\%$  (  $\text{v} / \text{v}$  ) グリセリンを含むトリス塩酸 - 塩緩衝液 (  $\text{pH} 8.0$  ) で平衡化したファルマシア製『ハイロード・スーパーデックス・ $200$ ・カラム』に負荷し、約  $300 \text{ kDa}$  付近の溶出画分を採取したところ、純度  $90\%$  以上の精製ポリペプチドが、培養液あたり約  $0.1 \text{ mg} / \text{ml}$  の収量で得られた。

20

## 【0069】

## 【実施例 A - 1 ( c )】

## 理化学的性質

精製ポリペプチドを次のように分析し、その理化学的性質を明らかにした。精製ポリペプチドのネイティブな分子量は、実験例 1 - 1 ( e ) に準じてゲル濾過により求めた。その結果、溶出画分の L - アスパラギナーゼ活性のピークは分子量約  $300 \text{ kDa}$  に相当する位置に認められた。精製ポリペプチドの、解離した状態での分子量は、実験例 1 - 1 ( e ) 中に示した SDS - PAGE により求めた。その結果、分子量  $50 \pm 10 \text{ kDa}$  の位置に、主たるバンドが認められた。この結果は、精製ポリペプチドは、ネイティブな状態では多量体を形成していることを示している。2 種類の手法の測定誤差及び、大腸菌を始めとする哺乳類以外の従来公知の L - アスパラギナーゼのネイティブな状態での形態が全て 4 量体であることを考慮に入れると、この結果は精製ポリペプチドが 4 量体を形成していることを示していると考えられる。またこの精製ポリペプチドを、実験例 1 - 1 ( d ) に示した方法に供した結果、L - アスパラギナーゼ活性を有していることが確認された。

30

## 【0070】

40

## 【実施例 A - 2】

L - アスパラギナーゼ活性を有するモルモット由来の野生型ポリペプチド

## 【0071】

## 【実施例 A - 2 ( a )】

## 形質転換体の調製

概要を図 3 に示す。先ず始めに、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの配列以外は、全て実施例 A - 1 ( a ) と同一の条件で PCR を行った。センスプライマーの配列は、 $5' - \text{GTGAATTCGGAGGTTTCAGATGGCGCGCGCATCA} - 3'$  であり、アンチセンスプライマーの配列は、 $5' - \text{CTGCGGCGCCGCTCAGATGGCAGGCGGCAC} - 3'$  であった。ここで増幅された DNA を制限酵素 Eco

50

RI及びNot Iで切断し、約1.7kbpのEcoRI-NotI断片を得た。このDNA断片70ngと、予め制限酵素XhoI及びNotIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pBPV』50ng及び、リンカーとして次の塩基配列よりなる4種のオリゴヌクレオチドを、それぞれ25ngずつ混合した。第1のオリゴヌクレオチドの配列は、5'-TCGAGCCACCATGAAGTGTTCGTGGGTATT-3'、第2のそれは、5'-TTCCTTCCTGATGGCCGTAGTGAACAGGAGTG-3'、第3のそれは、5'-AATTCACCTCCTGTCACTACGGCCATCAGGA-3'であり、第4のそれは、5'-AGAAAATAACCCACGAACACTTCAATGGTGGC-3'である。なおリンカーとして用いたオリゴヌクレオチドは、いずれも常法に従い合成後、ファルマシア製T4ポリヌクレオチド・キナーゼを作用させた後、エタノール沈澱により精製したものをを用いた。このDNA混合溶液に、等容の宝酒造製ライゲーション・キット・バージョン2の溶液Iを加え、16°Cで2時間保持することにより複製可能な組換えDNA『pBIGPA/WT』を得た。

10

#### 【0072】

組換えDNA pBIGPA/WTをコンピテントセル法により大腸菌HB101株に導入し、得られる形質転換体を50µg/mlのアンピシリンを含むLプロス培地(pH7.2)に接種し、37°Cで18時間振とう培養した。培養物を遠心分離して菌体を回収し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNA pBIGPA/WTを抽出した。自動シーケンサで配列を分析すると、このpBIGPA/WTは図4に示すような構造をしていることが確認された。すなわち、モロニー・マウス肉腫ウイルスのロング・ターミナル・リピート由来のエンハンサー(Emsv)とマウス・メタロチオネインI遺伝子由来のプロモーター(Pmti)からなる転写調節域の下流に、ディー・エフ・スターンが『サイエンス』、第235巻、321乃至324頁(1987年)で紹介しているイムノグロブリンの分泌シグナル配列を含むペプチド部分をコードするDNA、IgsecDNAが連結されており、さらにその下流に同じ読み枠で、GPA/WT DNAが5'末端から3'末端方向に連結されていた。また、GPA/WT DNAの3'末端には介在配列なく終止コドンが存在していることも確認した。

20

#### 【0073】

この組換えDNA pBIGPA/WTを、ライフ・テクノロジーズ製リポフェクチン試薬を用い、添付のプロトコールに従って、マウス由来細胞株C127(ATCC CRL-1616)に導入した。該組換えDNAが導入された形質転換体は、第一段階として、増殖の制御能力の喪失すなわちフォーカス形成能によって選択した。第二段階として、フォーカスを含む近傍の細胞を滅菌濾紙にて回収し、目的とする形質転換体を通常の限界希釈法により、L-アスパラギナーゼ活性の産生能に基づき単細胞化した。斯くして形質転換体『C-GPA/WT』を得た。

30

#### 【0074】

##### 【実施例A-2(b)】

##### ポリペプチドの製造

形質転換体C-GPA/WTを、先ず種培養として2.5mlの10%(v/v)ウシ胎児血清を含むDME培地を添加した口径3.5cmのベクトン・ディッキンソン・ラブウェア製6穴マルチウエルプレート『3046』の1穴に接種し、コンフルエントにまで培養した。ここから細胞をトリプシン処理することにより剥離させ、その一部を種細胞として、同培地を添加した別の新たな6穴プラスチックプレートの6穴に接種し培養した。同様の操作を順次培養器を拡張させながら繰り返し、細胞数を増加させて、150cm<sup>2</sup>培養フラスコ50本を用いて、該形質転換体を通常の連続培養に供した。最終的に培養上清100lを回収し、実施例A-1(b)の菌体破砕物の上清の処理方法と同様に、硫酸アンモニウム沈澱、沈澱溶解液のキュー・セファロース・エフエフ・カラムを用いたクロマトグラフィー、その溶出画分のL-アスパラギン・アガロースを用いたクロマトグラフィー及びその溶出画分のハイロード・スーパーデックス・200・カラムを用いたクロマ

40

50

トグラフィーの順で処理した。その結果、純度90%以上の精製ポリペプチドが、培養液あたり約1  $\mu$ g/mlの収量で得られた。

【0075】

【実施例A-2(c)】

理化学的性質

得られた精製ポリペプチドの理化学的性質を、実施例A-1(c)と同様に調べると、実施例A-1(b)で得た精製ポリペプチドと同等の性質を示すものであることが確認された。

【0076】

【実施例A-3】

L-アスパラギナーゼ活性を有するヒト及びモルモット由来のポリペプチド相同体

【0077】

【実施例A-3(a)】

形質転換体の調製

鋳型、センスプライマー及びアンチセンスプライマー以外は実施例A-1(a)に示した方法と同一条件でPCRを行い、得られたDNAを実施例A-1(a)と同様に処理することにより組換えDNA『pKGP A/D364stp』、『pKHA/MUT1』、『pKHA/MUT2』、『pKHA/MUT3』及び『pKHA/MUT5』を得た。それぞれの組換えDNAの調製のために用いた鋳型DNAの名称、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの塩基配列を表5にまとめて示す。実施例A-1(a)と同様に塩基配列を分析し、これらの組換えDNAの構造を確認した。これらの組換えDNAの構造は、図5乃至9に示している。

【0078】

【表5】

10

20

得られる組換え DNA の名称	鋳型として用いた DNA *1	センスプライマー (S) 及びアンチセンスプライマー (AS) の配列 *2
pKGPA/D364stp	pCGPA/D364stp	(S) 5' -GCGAATTCATGGCGCGCGCATCA-3' (AS) 5' -GCAAGCTTTCATGCCGTGGGCAGTGT-3'
pKHA/MUT1	pCHA/MUT1	(S) 5' -GCGAATTCATGGCGCGCGGGTG-3' (AS) 5' -GCAAGCTTTCACACCGAGGGTGGCGT-3'
pKHA/MUT2	pCHA/MUT2	(S) pKHA/MUT1 調製時と同一 (AS) pKHA/MUT1 調製時と同一
pKHA/MUT3	pCHA/MUT3	(S) pKHA/MUT1 調製時と同一 (AS) pKHA/MUT1 調製時と同一
pKHA/MUT5	pCHA/MUT5	(S) pKHA/MUT1 調製時と同一 (AS) pKHA/MUT1 調製時と同一

10

20

註\*1) pCGPA/D364stpは実験例2-1で得られたものであり、それ以外のDNAは実験例2-2で得られたものである。

註\*2) センスプライマーの配列中下線を付して示した部分は、L-アスパラギナーゼをコードするDNAの5'末端部分であることを表している。アンチセンスプライマーの配列中下線を付して示した部分は、L-アスパラギナーゼをコードするDNAの3'末端部分に相補的であることを表している。ここでいうL-アスパラギナーゼとは、モルモット又はヒト由来のL-アスパラギナーゼ相同体のことである。

30

#### 【0079】

ここで得た、組換えDNAを同様に実施例A-1(a)に従って処理し、形質転換体『J-GPA/D364stp』、『J-HA/MUT1』、『J-HA/MUT2』、『J-HA/MUT3』及び『J-HA/MUT5』を得た。

40

#### 【0080】

##### 【実施例A-3(b)】

##### ポリペプチドの製造

これら5種類の形質転換体を実施例A-1(b)と同様に培養、菌体の破碎、菌体破碎物の硫酸アンモニウム沈澱、沈澱溶解液のキュー・セファロース・エフエフ・カラムを用いたクロマトグラフィー、及びその溶出画分のL-アスパラギン・アガロースを用いたクロマトグラフィーの順で処理した。この結果得られた溶出画分は実施例A-1(b)と同様

50

に膜濃縮した後、ハイロード・スーパーデックス・200・カラムを用いたクロマトグラフィに供し、約140 kDa付近の溶出画分を採取したところ、いずれも純度90%以上の精製ポリペプチドが培養液あたり約0.1 mg/mlの収量で得られた。これらの精製ポリペプチドを実施例A-1(c)の方法により分析し、理化学的性質を明らかにした。実施例A-1で得た結果とあわせて表6に示した。

【0081】

【表6】

精製ポリペプチド を産生した形質転換体	分子量 *1 (kDa)	分子量 *2 (kDa)	L-アスパラギ ナーゼ活性 *3
J-GPA/WT	約300	約50±10	+
J-GPA/D364stp	約140	約40	+
J-HA/MUT1	約140	約40	+
J-HA/MUT2	約140	約40	+
J-HA/MUT3	約140	約40	+
J-HA/MUT5	約140	約40	+

註\*1) ゲル濾過から求めた値。

註\*2) SDS-PAGEから求めた値。

註\*3) +は活性が検出されたことを示している。

【0082】

表6に示す結果は、大腸菌を宿主として発現させ精製された、それぞれの野生型ポリペプチド或いはポリペプチド相同体は、いずれもL-アスパラギナーゼ活性を示すことが分かる。またこれらのポリペプチドは4量体を形成していることが示されている。

【0083】

【実施例A-4】

L-アスパラギナーゼ活性を有するヒト及びモルモット由来のポリペプチド相同体

【0084】

【実施例A-4(a)】

形質転換体の調製

鋳型、センスプライマー又はアンチセンスプライマー以外は実施例A-1(a)に示した方法と同一条件でPCRを行った。得られたDNAを実施例A-2(a)で用いたのと同じリンカーを用い、同一の条件で連結することにより、組換えDNA『pBIGGPA/D364stp』、『pBIGHA/MUT1』、『pBIGHA/MUT2』、『pBIGHA/MUT3』及び『pBIGHA/MUT5』を得た。それぞれの組換えDNAの調製のためのPCRに用いた鋳型DNAの名称、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの塩基配列を表7にまとめて示す。実施例A-1(a)と同様に塩基配列を分

10

20

30

40

50

析し、これらの組換えDNAの構造を確認した。これらの組換えDNAの構造は、図10乃至14に示している。

【0085】

【表7】

得られる組換えDNAの名称	鋳型として用いたDNA *1	センスプライマー (S) 及びアンチセンスプライマー (AS) の配列 *2
pBIgGPA/D364stp	pCGPA/D364stp	S) 5' -GTGAATTCGGAGGTT <u>CAGATGGCGCGCGCA</u> TCA-3' AS) 5' -CTGCGGCCGCTCATG <u>CCGTGGGCAGTG</u> -3'
pBIgHA/MUT1	pCHA/MUT1	S) 5' -GTGAATTCGGAGGTT <u>CAGATGGCGCGCGCG</u> GTG-3' AS) 5' -CTGCGGCCGCTCAC <u>ACCGAGGGTGGCG</u> -3'
pBIgHA/MUT2	pCHA/MUT2	S) pBIgHA/MUT1調製時と同一 AS) pBIgHA/MUT1調製時と同一
pBIgHA/MUT3	pCHA/MUT3	S) pBIgHA/MUT1調製時と同一 AS) pBIgHA/MUT1調製時と同一
pBIgHA/MUT5	pCHA/MUT5	S) pBIgHA/MUT1調製時と同一 AS) pBIgHA/MUT1調製時と同一

註\*1) pCGPA/D364stpは実験例2-1で得られたものであり、それ以外のDNAは実験例2-2で得られたものである。

註\*2) センスプライマーの配列中下線を付して示した部分は、L-アスパラギナーゼをコードするDNAの5'末端部分であることを表している。アンチセンスプライマーの配列中下線を付して示した部分は、L-アスパラギナーゼをコードするDNAの3'末端部分に相補的であることを表している。ここでいうL-アスパラギナーゼとは、モルモット又はヒト由来のL-アスパラギナーゼ相同体のことである。

【0086】

ここで得た、組換えDNAを同様に実施例A-2(a)と同様に処理することにより、それぞれ形質転換体『C-GPA/D364stp』、『C-HA/MUT1』、『C-HA/MUT2』、『C-HA/MUT3』及び『C-HA/MUT5』を得た。

【0087】

【実施例A-4(b)】

## ポリペプチドの製造

## 【0088】

これら5種類の形質転換体を実施例A-2(b)と同様に培養し、培養上清を実施例A-1(b)の菌体破碎の処理方法と同様に硫酸アンモニウム沈澱、沈澱溶解液のキュー・セファロース・エフ・エフ・カラムを用いたクロマトグラフィー及びその溶出画分のL-アスパラギン・アガロース・ゲルを用いたクロマトグラフィーの順で処理した。この結果得られた溶出画分は実施例A-1(b)と同様に膜濃縮した後、ハイロード・スーパーデックス・200・カラムを用いたクロマトグラフィーに供し、約140kDa付近の溶出画分を採取したところ、純度90%以上の精製ポリペプチドが培養液あたり約1 $\mu$ g/mlの収量で得られた。これらの精製ポリペプチドを実施例A-1(c)の方法により分析し、

10

## 【0089】

## 【表8】

精製ポリペプチド を産生した形質転換体	分子量 *1 (kDa)	分子量 *2 (kDa)	L-アスパラギ ナーゼ活性 *3
C-GPA/WT	約300	約50 $\pm$ 10	+
C-GPA/D364stp	約140	約40	+
C-HA/MUT1	約140	約40	+
C-HA/MUT2	約140	約40	+
C-HA/MUT3	約140	約40	+
C-HA/MUT5	約140	約40	+

20

註\*1) ゲル濾過から求めた値。

註\*2) SDS-PAGEから求めた値。

30

註\*3) +は活性が検出されたことを示している。

40

## 【0090】

表8に示す結果は、動物細胞を宿主として発現させ精製された、それぞれの野生型ポリペプチド或いは、ポリペプチド相同体は、いずれもL-アスパラギナーゼ活性を示すことが分かる。またこれらのポリペプチドは4量体を形成していることが示される。

## 【0091】

以上実施例Aに示すごとく、この発明のポリペプチドは、いずれもL-アスパラギナーゼ活性を示す。したがって、この発明の感受性疾患剤は、ヒトに投与すると、体内のL-アスパラギンを加水分解し、L-アスパラギナーゼ感受性疾患の治療・予防に効果を発揮す

50

る。この発明でいう感受性疾患とは、L-アスパラギン依存性腫瘍細胞の存在に起因する疾患全般を意味するものとし、具体的には、例えば、急性白血病・急性転化した慢性白血病・T細胞白血病等の白血病、非ホジキン病・ホジキン病等の悪性リンパ腫を挙げることができる。斯くしてこの発明の感受性疾患剤は、上記のごとき感受性疾患を治療・予防するための抗腫瘍剤としての用途を有することとなる。剤型並びに感受性疾患の種類及び性状にもよるが、この発明の感受性疾患剤は、通常、液状、ペースト状又は固状に調製され、当該ポリペプチドを0.000001乃至100% (w/w)、望ましくは、0.00001乃至100% (w/w) 含んでいる。

#### 【0092】

この発明の感受性疾患剤は当該ポリペプチド単独の形態はもとより、当該ポリペプチドとそれ以外の生理的に許容される、例えば、基剤、賦形剤、可溶剤、緩衝剤、安定剤、さらには必要に応じて、他の生理活性物質乃至は他の薬剤のうちから選ばれる1種又は2種以上との組成物としての形態をも包含する。基剤、賦形剤、可溶剤、緩衝剤及び安定剤としては具体的には、例えば、日本医薬品添加剤協会編集、『医薬品添加物辞典』(1994年)、薬事日報社発行や、日本医薬品添加剤協会編集、『医薬品添加物辞典追補 1995』(1995年)、薬事日報社発行などに記載のものが挙げられる。他の生理活性物質乃至他の薬剤としては具体的には、例えば、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、GM-CSF、カルボコン、シクロフォスファミド、アクリルピシン、チオテパ、ブスルファン、アンシタピン、シタラピン、フルオロウラシル、テトラヒドロフリルフルオロウラシル、メトトレキサート、アクチノマイシンD、クロモマイシンA3、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ブレオマイシン、メルカプトプリン、プレドニゾロン、マイトマイシンC、ピンクリスチン、ピンプラスチン、金コロイド、クレスチン、ピシバニール、レンチナン及び丸山ワクチンなどが挙げられる。

#### 【0093】

さらに、この発明の感受性疾患剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、当該ポリペプチドを、例えば、1回当たりの用量又はその正数倍(4倍まで)若しくはその約数(1/40まで)に相当する量を含んでおり、投薬に適する物理的に分離した一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬形態の薬剤としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、点眼剤、点鼻剤、座剤などが挙げられる。

#### 【0094】

この発明の感受性疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与しても、いずれの場合にも、感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にもよるが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当たり約0.1 $\mu$ g乃至500mg/回、望ましくは約0.1乃至100mg/回のポリペプチドを1乃至4回/日又は1乃至7回/週の用量で1日乃至1年間にわたって経口投与するか、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。また、この発明の感受性疾患剤のその他の一形態としては、例えば、遺伝子治療を応用した形態が挙げられる。つまり、この発明のポリペプチドをコードするDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を投与し、この発明のポリペプチドを感受性疾患患者の生体内で産生させることにより、上記の投与形態と同等の効果を発揮する。なお、遺伝子治療を実施するための一般的手順は、例えば、島田隆、斎藤泉、小澤敬也編集、『実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ 遺伝子治療の基礎技術』(1996年)、羊土社発行に詳述されている。

#### 【0095】

次に、実験例3に基づき、この発明のポリペプチドの生物活性について、実験例4に基づき、この発明のポリペプチドの安全性について説明する。

#### 【0096】

#### 【実験例3】

生物活性

10

20

30

40

50



## 【0097】

## 【実験例3-1】

イン・ピトロにおける抗腫瘍細胞効果

## 【0098】

ヒト組織球リンパ腫細胞株U937(ATCC No. CRL-1593)及びヒトリンパ芽球由来細胞株Molt4(ATCC No. CRL-1582)を、10%(v/v)ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で予め継代培養しておいた。対数増殖期にあるそれぞれの細胞培養系から、細胞を遠心分離により回収し、同培地で $2 \times 10^5$ 個/mlの細胞濃度に調整し、該細胞懸濁液をベクトン・ディッキンソン・ラブウェア製24穴マルチウエルプレート『3047』プレートに、1穴あたり1mlで合計13穴に接種した。ここに実施例A-1乃至A-4で調製した12種類の精製ポリペプチドのPBSによる希釈液をそれぞれ添加し、5%(v/v)CO<sub>2</sub>インキュベーター内で、37℃で72時間培養した。各精製ポリペプチドの終濃度は、L-アスパラギナーゼ活性として1単位/mlであった。対照区として、PBSを等容添加して同じく培養する系を設けた。培養後細胞を回収し、トリパン・ブルーにより死細胞を染色して、精製ポリペプチド添加系の細胞生存率を対照区と比較した。その結果、いずれの精製ポリペプチドを添加した系も、細胞生存率は対照区と比較して有意に低い値を示した。このことは、実施例A-1乃至A-4で得られた精製ポリペプチドは、いずれもU937及びMolt4に対する細胞障害性を有することを示している。

10

## 【0099】

## 【実験例3-2】

イン・ピボにおける抗腫瘍細胞効果

## 【0100】

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターに登録されているマウスリンパ腫細胞株C3HEDを、常法により $1 \times 10^7$ 個/匹で8日ごとにその脇腹に皮下注射することによって継代移植されているC3Hマウスをモデルマウスとして用いた。該細胞の移植後4日目から7日目までの毎日、該モデルマウスに実施例A-1乃至A-4で得られた精製ポリペプチドを、400単位/匹で、静脈注射にて投与した。移植後4及び8日目の腫瘍の大きさを肉眼で観察した。なお精製ポリペプチドは、0.15Mの塩化ナトリウム溶液で希釈した後、ミリポア製の孔径0.45µmのメンブランフィルターで濾過した後に投与した。対照区として、0.15M塩化ナトリウム溶液を同様に処理した系を設けた。その結果、対照区では腫瘍の明らかな肥大が認められたのに対し、精製ポリペプチドを投与した系では腫瘍の明らかな退縮又は消失が認められた。このことは、実施例A-1乃至A-4で調製される精製ポリペプチドが、いずれもモデルマウスの腫瘍を治癒する能力があることを示している。

20

30

## 【0101】

## 【実験例4】

急性毒性試験

実施例A-1乃至A-4で調製された精製ポリペプチドをそれぞれ別個に、常法にしたがって8週齢のマウスに経皮、経口あるいは腹腔内に注射投与した。その結果、これらの精製ポリペプチドのLD50は、いずれの投与経路による場合も約100mg/kg以上であった。このことは、この発明のポリペプチドがヒトへの投与を前提とする医薬品として安全であることを裏付けている。

40

## 【0102】

以下、この発明の感受性疾患剤につき実施例を挙げて説明する。

## 【0103】

## 【実施例B】

感受性疾患剤

## 【0104】

## 【実施例B-1】

50

## 液剤

安定剤として1% (w/v) のヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に実施例 A - 1 乃至 A - 4 で得た精製ポリペプチドをそれぞれ別個に 0.1 mg/ml となるように溶解させ、常法に従った精密濾過により滅菌して液剤を得た。

## 【0105】

いずれの製品も安定性に優れ、悪性腫瘍、急性白血病、悪性リンパ腫、慢性白血病の急性転化、T細胞白血病を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤、及び点鼻剤として有用である。

## 【0106】

## 【実施例 B - 2】

## 液剤

安定剤として1% (w/v) のグリセリンを含む生理食塩水に実施例 A - 1 乃至 A - 4 で得た精製ポリペプチドをそれぞれ別個に 0.1 mg/ml となるように溶解させ、常法に従った精密濾過により滅菌して液剤を得た。

## 【0107】

いずれの製品も安定性に優れた、悪性腫瘍、急性白血病、悪性リンパ腫、慢性白血病の急性転化、T細胞白血病を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤、及び点鼻剤として有用である。

## 【0108】

## 【実施例 B - 3】

## 乾燥注射剤

安定剤として、1% (w/v) の精製ゼラチンを含む生理食塩水に実施例 A - 1 乃至 A - 4 で得た精製ポリペプチドをそれぞれ別個に 50 mg/ml となるように溶解させ、常法に従った精密濾過により滅菌して、バイアル瓶に 1 ml ずつ分注し、凍結乾燥後密栓した。

## 【0109】

いずれの製品も安定性に優れ、悪性腫瘍、急性白血病、悪性リンパ腫、慢性白血病の急性転化、T細胞白血病を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

## 【0110】

## 【実施例 B - 4】

## 軟膏剤

滅菌蒸留水に和光純薬工業製カルボキシビニルポリマー『ハイビスワコー104』と高純度トレハロースをそれぞれ濃度 1.4% (w/w) 及び 2.0% (w/w) になるように溶解させ、実施例 A - 1 乃至 A - 4 で得た精製ポリペプチドをそれぞれ別個に均一に混合後、pH 7.2 に調整して 1 g 当たり該ポリペプチドを約 10 mg 含むペースト状物を得た。

## 【0111】

いずれの製品も延展性と安定性に優れ、悪性腫瘍、急性白血病、悪性リンパ腫、慢性白血病の急性転化、T細胞白血病を含む感受性疾患を治療・予防するための軟膏として有用である。

## 【0112】

## 【実施例 B - 5】

## 錠剤

林原製無水結晶 - マルトース粉末『ファイントース』に実施例 A - 1 乃至 A - 4 で得た精製ポリペプチドと細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られる混合物を打錠機により打錠して製品 1 錠 (約 200 mg) 当たり該ポリペプチド及びルミンをそれぞれ約 5 mg 含む錠剤を得た。

## 【0113】

いずれの製品も摂取性と安定性に優れ、さらに細胞賦活作用も有し、悪性腫瘍、急性白血

10

20

30

40

50

病、悪性リンパ腫、慢性白血病の急性転化、T細胞白血病を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【0114】

【発明の効果】

この発明は、L-アスパラギナーゼ活性を有する哺乳類由来のポリペプチドの発見に基づくものである。この発明のポリペプチドは、いずれもアミノ酸配列まで解明されている物質であり、安定したL-アスパラギンを加水分解する活性を有する。これにより、この発明のポリペプチドは、L-アスパラギン依存性腫瘍細胞に起因する各種の疾患に対する治療剤・予防剤として威力を発揮する。

【0115】

この発明のポリペプチドは哺乳類由来であることから、ヒトに対する抗原性が低く、多量投与或いは継続投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して患者の感受性に関して厳密な管理をしなくとも、所望の効果を発揮できる利点がある。

【0116】

かくも有用なるこの発明のポリペプチドは、これをコードするこの発明のDNAを利用することにより、所望量を容易に製造することができる。

【0117】

この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であるといえる。

【0118】

【配列表】

**配列番号：1**

**配列の長さ：4**

**配列の型：アミノ酸**

**トポロジー：直鎖状**

**配列の種類：ペプチド**

**配列**

Thr Gly Gly Thr

1

【0119】

**配列番号：2**

**配列の長さ：5**

**配列の型：アミノ酸**

**トポロジー：直鎖状**

**配列の種類：ペプチド**

**配列**

His Gly Thr Asp Thr

1

5

【0120】

10

20

30

40

配列番号：3

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Cys Leu Xaa Gly

1

5

【 0 1 2 1 】



	180		185		190	
Lys Phe Glu Ala Phe Cys Ser Pro Asn Leu Ser Pro Leu Ala Thr Val						
	195		200		205	
Gly Ala Asp Val Thr Ile Ala Trp Asp Leu Val Arg Lys Val Asn Trp						
	210		215		220	
Lys Asp Pro Leu Val Val His Ser Asn Met Glu His Asp Val Ala Leu						
225		230		235		240
Leu Arg Leu Tyr Pro Gly Ile Pro Ala Ser Leu Val Arg Ala Phe Leu						
	245		250		255	
Gln Pro Pro Leu Lys Gly Val Val Leu Glu Thr Phe Gly Ser Gly Asn						
	260		265		270	
Gly Pro Ser Lys Pro Asp Leu Leu Gln Glu Leu Arg Ala Ala Ala Gln						
	275		280		285	
Arg Gly Leu Ile Met Val Asn Cys Ser Gln Cys Leu Arg Gly Ser Val						
290		295		300		
Thr Pro Gly Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Gly Ala Asn Ile Val Ser Gly						
305		310		315		320
Leu Asp Met Thr Ser Glu Ala Ala Leu Ala Lys Leu Ser Tyr Val Leu						
	325		330		335	
Gly Leu Pro Glu Leu Ser Leu Glu Arg Arg Gln Glu Leu Leu Ala Lys						
	340		345		350	
Asp Leu Arg Gly Glu Met Thr Leu Pro Thr Ala						
	355		360		363	

10

20

30

【 0 1 2 2 】







Ala Leu Met Glu Leu Gly Ser Asp Leu Arg Leu Lys Asp Ser Asn Gly  
                   420                                  425                                  430  
 Gln Thr Leu Leu His Val Ala Ala Arg Asn Gly Arg Asp Gly Val Val  
                   435                                  440                                  445  
 Thr Met Leu Leu His Arg Gly Met Asp Val Asn Ala Arg Asp Arg Asp  
                   450                                  455                                  460  
 Gly Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ala Val Gln Gly Arg His Arg Glu Cys  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Ile Arg Leu Leu Arg Lys Ala Gly Ala Cys Leu Ser Pro Gln Asp Leu  
                                   485                                  490                                  495  
 Lys Asp Ala Gly Thr Glu Leu Cys Arg Leu Ala Ser Arg Ala Asp Met  
                   500                                  505                                  510  
 Glu Gly Leu Gln Ala Trp Gly Gln Ala Gly Ala Asp Leu Gln Gln Pro  
                   515                                  520                                  525  
 Gly Tyr Asp Gly Arg Ser Ala Leu Cys Val Ala Glu Ala Ala Gly Asn  
                   530                                  535                                  540  
 Gln Glu Val Leu Ala Leu Leu Arg Asn Leu Ala Leu Val Gly Pro Glu  
 545                                  550                                  555                                  560  
 Val Pro Pro Ala Ile  
                                   565

10

20

【 0 1 2 3 】

30



	180		185		190	
Arg Phe Ala	Ala Phe Cys	Ser Pro Asn	Leu Leu Pro	Leu Ala Thr	Val	
	195		200		205	
Gly Ala Asp	Ile Thr Ile	Asn Arg Glu	Leu Val Arg	Lys Val Asp	Gly	
	210		215		220	
Lys Ala Gly	Leu Val Val	His Ser Ser	Met Glu Gln	Asp Val Gly	Leu	
225		230		235	240	10
Leu Arg Leu	Tyr Pro Gly	Ile Pro Ala	Ala Leu Val	Arg Ala Phe	Leu	
	245		250		255	
Gln Pro Pro	Leu Lys Gly	Val Val Met	Glu Thr Phe	Gly Ser Gly	Asn	
	260		265		270	
Gly Pro Thr	Lys Pro Asp	Leu Leu Gln	Glu Leu Arg	Val Ala Thr	Glu	
	275		280		285	
Arg Gly Leu	Val Ile Val	Asn Cys Thr	Gln Cys Leu	Arg Gly Ala	Val	20
	290		295		300	
Thr Thr Asp	Tyr Ala Ala	Gly Met Ala	Met Ala Gly	Ala Asn Val	Ile	
305		310		315	320	
Ser Gly Phe	Asp Met Thr	Ser Glu Ala	Ala Leu Ala	Lys Leu Ser	Tyr	
	325		330		335	
Val Leu Gly	Gln Pro Gly	Leu Ser Leu	Asp Val Arg	Lys Glu Leu	Leu	
	340		345		350	30
Thr Lys Asp	Leu Arg Gly	Glu Met Thr	Pro Pro Ser	Val		
	355		360		365	

【 0 1 2 4 】







	180		185		190	
Arg Phe Ala	Ala Phe Cys Ser Pro	Asn Leu Leu Pro	Leu Ala Thr	Val		
	195		200		205	
Gly Ala Asp	Ile Thr Ile Asn Arg	Glu Leu Val Arg	Lys Val Asp	Gly		
	210		215		220	
Lys Ala Gly	Leu Val Val His Ser	Ser Met Glu Gln	Asp Val Gly	Leu		
225		230		235		240
Leu Arg Leu	Tyr Pro Gly Ile Pro	Ala Ala Leu Val	Arg Ala Phe	Leu		
	245		250		255	
Gln Pro Pro	Leu Lys Gly Val Val	Met Glu Thr Phe	Gly Ser Gly	Asn		
	260		265		270	
Gly Pro Thr	Lys Pro Asp Leu Leu	Gln Glu Leu Arg	Val Ala Thr	Glu		
	275		280		285	
Arg Gly Leu	Val Ile Val Asn Cys	Thr Gln Cys Leu	Gln Gly Ala	Val		
	290		295		300	
Thr Thr Asp	Tyr Ala Ala Gly Met	Ala Met Ala Gly	Ala Asn Val	Ile		
305		310		315		320
Ser Gly Phe	Asp Met Thr Ser Glu	Ala Ala Leu Ala	Lys Leu Ser	Tyr		
	325		330		335	
Val Leu Gly	Gln Pro Gly Leu Ser	Leu Asp Val Arg	Lys Glu Leu	Leu		
	340		345		350	
Thr Lys Asp	Leu Arg Gly Glu Met	Thr Pro Pro Ser	Val			
	355		360		365	

10

20

30

【 0 1 2 6 】







配列番号 : 10

配列の長さ : 1089

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGGCGCGCG	CATCAGGCTC	CGAGAGGCAC	CTGCTGCTCA	TCTACACTGG	CGGCACTTTG	60	
GGCATGCAGA	GCAAGGGCGG	GGTGCTCGTC	CCCGGCCAG	GCCTGGTCAC	TCTGCTGCGG	120	10
ACCCTGCCCA	TGTTCCATGA	CAAGGAGTTC	GCCCAGGCC	AGGGCCTCCC	TGACCATGCT	180	
CTGGCGCTGC	CCCCTGCCAG	CCACGGCCCC	AGGGTCTCT	ACACGGTGCT	GGAGTGCCAG	240	
CCCCTCTTGG	ATTCCAGCGA	CATGACCATC	GATGATTGGA	TTCGCATAGC	CAAGATCATA	300	
GAGAGGCACT	ATGAGCAGTA	CCAAGGCTTT	GTGGTTATCC	ACGGCACCGA	CACCATGGCC	360	
TTTGGGGCCT	CCATGCTGTC	CTTCATGCTG	GAAAACCTGC	ACAAACCAGT	CATCCTCACT	420	
GGCGCCAGG	TGCCAATCCG	TGTGCTGTGG	AATGACGCC	GGGAAAACCT	GCTGGGGGCG	480	
TTGCTTGTGG	CCGGCCAATA	CATCATCCCT	GAGGTCTGCC	TGTTTATGAA	CAGTCAGCTG	540	20
TTTCGGGGAA	ACCGGGTAAC	CAAGGTGGAC	TCCAGAAGT	TTGAGGCCTT	CTGCTCCCCC	600	
AATCTGTCCC	CACTAGCCAC	TGTGGGCGCG	GATGTCACAA	TTGCCTGGGA	CCTGGTGCGC	660	
AAGGTCAACT	GGAAGGACCC	GCTGGTGGTG	CACAGCAACA	TGGAGCACGA	CGTGGCACTG	720	
CTGCGCCTCT	ACCCTGGCAT	CCCGGCCTCC	CTGGTCCGGG	CATTCCTGCA	GCCCCGCTC	780	
AAGGGCGTGG	TCCTGGAGAC	CTTCGGCTCT	GGCAACGGGC	CGAGCAAGCC	CGACCTGCTG	840	
CAGGAGTTGC	GGGCCGCGGC	CCAGCGCGGC	CTCATCATGG	TCAACTGCAG	CCAGTGCTTG	900	
CGGGGTCTG	TGACCCCGGG	CTATGCCACG	AGCTTGGCGG	GCGCCAACAT	CGTGTCCGGC	960	30
TTAGACATGA	CCTCAGAGGC	CGCGCTGGCT	AAGCTGTCTT	ACGTGTTGGG	CCTGCCGGAG	1020	
CTGAGCCTGG	AGCGCAGGCA	GGAGCTGCTG	GCCAAGGATC	TTCGCGGGGA	AATGACACTG	1080	
CCCACGGCA						1089	

【 0 1 2 8 】

配列番号 : 11

配列の長さ : 1095

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGGCGCGCG	CGGTGGGGCC	CGAGCGGAGG	CTGCTGGCCG	TCTACACCGG	CGGCACCATT	60	
GGCATGCGGA	GTGAGCTCGG	CGTGCTTGTG	CCCGGGACGG	GCCTGGCTGC	CATCCTGAGG	120	10
ACACTGCCCA	TGTTCCATGA	CGAGGAGCAC	GCCCGAGCCC	GCGGCCTCTC	TGAGGACACC	180	
CTGGTGCTAC	CCCCGGACAG	CCGCAACCAG	AGGATCCTCT	ACACCGTGCT	GGAGTGCCAG	240	
CCCCTCTTCG	ACTCCAGTGA	CATGACCATC	GCTGAGTGGG	TTCGCGTTGC	CCAGACCATC	300	
AAGAGGCACT	ACGAGCAGTA	CCACGGCTTT	GTGGTCATCC	ACGGCACCGA	CACCATGGCC	360	
TTTGCTGCCT	CGATGCTGTC	CTTCATGCTG	GAGAACCTGC	AGAAGACTGT	CATCCTCACT	420	
GGGGCCCAGG	TGCCCATCCA	TGCCCTGTGG	AGCGACGGCC	GTGAGAACCT	GCTGGGGGCA	480	
CTGCTCATGG	CTGGCCAGTA	TGTGATCCCA	GAGGTCTGCC	TTTTCTTCCA	GAATCAGCTG	540	20
TTTCGGGGCA	ACCGGGCAAC	CAAGGTAGAC	GCTCGGAGGT	TGCAGCTTT	CTGCTCCCCG	600	
AACCTGCTGC	CTCTGGCCAC	AGTGGGTGCT	GACATCACAA	TCAACAGGGA	GCTGGTGCGG	660	
AAGGTGGACG	GGAAGGCTGG	GCTGGTGGTG	CACAGCAGCA	TGGAGCAGGA	CGTGGGCCTG	720	
CTGCGCCTCT	ACCCTGGGAT	CCCTGCCGCC	CTGGTTCGGG	CCTTCTTGCA	GCCTCCCCTG	780	
AAGGGCGTGG	TCATGGAGAC	CTTCGGTTCA	GGGAACGGAC	CCACCAAGCC	CGACCTGCTG	840	
CAGGAGCTGC	GGGTGGCCAC	CGAGCGCGGC	CTGGTCATCG	TCAACTGTAC	CCAGTGCCCTC	900	
CGGGGGGCTG	TGACCACAGA	CTATGCAGCT	GGCATGGCCA	TGGCGGGAGC	CAACGTCATC	960	30
TCAGGCTTCG	ACATGACATC	GGAGCCGCC	CTGGCCAAGC	TATCGTATGT	GCTGGGCCAG	1020	
CCAGGGCTGA	GCCTGGATGT	CAGGAAGGAG	CTGCTGACCA	AGGACCTTCG	GGGGGAGATG	1080	
ACGCCACCCT	CGGTG					1095	

【 0 1 2 9 】

配列番号 : 12

配列の長さ : 1095

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGGCGCGCG	CGGTGGGGCC	CGAGCGGAGG	CTGCTGGCCG	TCTACACCGG	CGGCACCATT	60	
GGCATGCGGA	GTGAGCTCGG	CGTGCTTGTG	CCCGGGACGG	GCCTGGCTGC	CATCCTGAGG	120	10
ACACTGCCCA	TGTTCCATGA	CGAGGAGCAC	GCCCGAGCCC	GCGGCCTCTC	TGAGGACACC	180	
CTGGTGCTAC	CCCCGGACAG	CCGCAACCAG	AGGATCCTCT	ACACCGTGCT	GGAGTGCCAG	240	
CCCCTCTTCG	ACTCCAGTGA	CATGACCATC	GCTGAGTGGG	TTCGCGTTGC	CCAGACCATC	300	
AAGAGGCACT	ACGAGCAGTA	CCACGGCTTT	GTGGTCATCC	ACGGCACCGA	CACCATGGCC	360	
TTTGCTGCCT	CGATGCTGTC	CTTCATGCTG	GAGAACCTGC	AGAAGACTGT	CATCCTCACT	420	
GGGGCCCAGG	TGCCCATCCA	TGCCCTGTGG	AGCGACGGCC	GTGAGAACCT	GCTGGGGGCA	480	
CTGCTCATGG	CTGGCCAGTA	TGTGATCCCA	GAGGTCTGCC	TTTTCTTCCA	GAATCAGCTG	540	20
TTTCGGGGCA	ACCGGGCAAC	CAAGGTAGAC	GCTCGGAGGT	TGCAGCTTTT	CTGCTCCCCG	600	
AACCTGCTGC	CTCTGGCCAC	AGTGGGTGCT	GACATCACAA	TCAACAGGGA	GCTGGTGCGG	660	
AAGGTGGACG	GGAAGGCTGG	GCTGGTGGTG	CACAGCAGCA	TGGAGCAGGA	CGTGGGCCTG	720	
CTGCGCCTCT	ACCCTGGGAT	CCCTGCCGCC	CTGGTTCGGG	CCTTCTTGCA	GCCTCCCCTG	780	
AAGGGCGTGG	TCATGGAGAC	CTTCGGTTCA	GGGAACGGAC	CCACCAAGCC	CGACCTGCTG	840	
CAGGAGCTGC	GGGTGGCCAC	CGAGCGCGGC	CTGGTCATCG	TCAACTGTAC	CCAGTGCCCTC	900	
CGGGGGGCTG	TGACCACAGA	CTATGCAGCT	GGCATGGCCA	TGGCGGGAGC	CGGCGTCATC	960	30
TCAGGCTTCG	ACATGACATC	GGAGCCGCC	CTGGCCAAGC	TATCGTATGT	GCTGGGCCAG	1020	
CCAGGGCTGA	GCCTGGATGT	CAGGAAGGAG	CTGCTGACCA	AGGACCTTCG	GGGGGAGATG	1080	
ACGCCACCCT	CGGTG					1095	

【 0 1 3 0 】

配列番号 : 13

配列の長さ : 1095

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGGCGCGCG	CGGTGGGGCC	CGAGCGGAGG	CTGCTGGCCG	TCTACACCGG	CGGCACCATT	60	
GGCATGCGGA	GTGAGCTCGG	CGTGCTTGTG	CCCGGGACGG	GCCTGGCTGC	CATCCTGAGG	120	10
ACACTGCCCA	TGTTCCATGA	CGAGGAGCAC	GCCCGAGCCC	GCGGCCTCTC	TGAGGACACC	180	
CTGGTGCTAC	CCCCGGACAG	CCGCAACCAG	AGGATCCTCT	ACACCGTGCT	GGAGTGCCAG	240	
CCCCTCTTCG	ACTCCAGTGA	CATGACCATC	GCTGAGTGGG	TTCGCGTTGC	CCAGACCATC	300	
AAGAGGCACT	ACGAGCAGTA	CCACGGCTTT	GTGGTCATCC	ACGGCACCGA	CACCATGGCC	360	
TTTGCTGCCT	CGATGCTGTC	CTTCATGCTG	GAGAACCTGC	AGAAGACTGT	CATCCTCACT	420	
GGGGCCCAGG	TGCCCATCCA	TGCCCTGTGG	AGCGACGGCC	GTGAGAACCT	GCTGGGGGCA	480	
CTGCTCATGG	CTGGCCAGTA	TGTGATCCCA	GAGGTCTGCC	TTTTCTTCCA	GAATCAGCTG	540	20
TTTCGGGGCA	ACCGGGCAAC	CAAGGTAGAC	GCTCGGAGGT	TGCAGCTTT	CTGCTCCCCG	600	
AACCTGCTGC	CTCTGGCCAC	AGTGGGTGCT	GACATCACAA	TCAACAGGGA	GCTGGTGCGG	660	
AAGGTGGACG	GGAAGGCTGG	GCTGGTGGTG	CACAGCAGCA	TGGAGCAGGA	CGTGGGCCTG	720	
CTGCGCCTCT	ACCCTGGGAT	CCCTGCCGCC	CTGGTTCGGG	CCTTCTTGCA	GCCTCCCCTG	780	
AAGGGCGTGG	TCATGGAGAC	CTTCGGTTCA	GGGAACGGAC	CCACCAAGCC	CGACCTGCTG	840	
CAGGAGCTGC	GGGTGGCCAC	CGAGCGCGGC	CTGGTCATCG	TCAACTGTAC	CCAGTGCCCTC	900	
CAGGGGGCTG	TGACCACAGA	CTATGCAGCT	GGCATGGCCA	TGGCGGGAGC	CAACGTCATC	960	30
TCAGGCTTCG	ACATGACATC	GGAGCCGCC	CTGGCCAAGC	TATCGTATGT	GCTGGGCCAG	1020	
CCAGGGCTGA	GCCTGGATGT	CAGGAAGGAG	CTGCTGACCA	AGGACCTTCG	GGGGGAGATG	1080	
ACGCCACCCT	CGGTG					1095	

【 0 1 3 1 】

配列番号 : 14

配列の長さ : 1095

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGGCGCGCG	CGGTGGGGCC	CGAGCGGAGG	CTGCTGGCCG	TCTACACCGG	CGGCACCATT	60	
GGCATGCGGA	GTGAGCTCGG	CGTGCTTGTG	CCCGGGACGG	GCCTGGCTGC	CATCCTGAGG	120	10
ACACTGCCCA	TGTTCCATGA	CGAGGAGCAC	GCCCGAGCCC	GCGGCCTCTC	TGAGGACACC	180	
CTGGTGCTAC	CCCCGGACAG	CCGCAACCAG	AGGATCCTCT	ACACCGTGCT	GGAGTGCCAG	240	
CCCCTCTTCG	ACTCCAGTGA	CATGACCATC	GCTGAGTGGG	TTCGCGTTGC	CCAGACCATC	300	
AAGAGGCACT	ACGAGCAGTA	CCACGGCTTT	GTGGTCATCC	ACGGCACCGA	CACCATGGCC	360	
TTTGCTGCCT	CGATGCTGTC	CTTCATGCTG	GAGAACCTGC	AGAAGACTGT	CATCCTCACT	420	
GGGGCCCAGG	TGCCCATCCA	TGCCCTGTGG	AGCGACGGCC	GTGAGAACCT	GCTGGGGGCA	480	
CTGCTCATGG	CTGGCCAGTA	TGTGATCCCA	GAGGTCTGCC	TTTTCTTCCA	GAATCAGCTG	540	20
TTTCGGGGCA	ACCGGGCAAC	CAAGGTAGAC	GCTCGGAGGT	TGCAGCTTT	CTGCTCCCCG	600	
AACCTGCTGC	CTCTGGCCAC	AGTGGGTGCT	GACATCACAA	TCAACAGGGA	GCTGGTGCGG	660	
AAGGTGGACG	GGAAGGCTGG	GCTGGTGGTG	CACAGCAGCA	TGGAGCAGGA	CGTGGGCCTG	720	
CTGCGCCTCT	ACCCTGGGAT	CCCTGCCGCC	CTGGTTCGGG	CCTTCTTGCA	GCCTCCCCTG	780	
AAGGGCGTGG	TCATGGAGAC	CTTCGGTTCA	GGGAACGGAC	CCACCAAGCC	CGACCTGCTG	840	
CAGGAGCTGC	GGGTGGCCAC	CGAGCGCGGC	CTGGTCATCG	TCAACTGTAC	CCAGTGCCCTC	900	
CAGGGGGCTG	TGACCACAGA	CTATGCAGCT	GGCATGGCCA	TGGCGGGAGC	CGGCGTCATC	960	30
TCAGGCTTCG	ACATGACATC	GGAGCCGCC	CTGGCCAAGC	TATCGTATGT	GCTGGGCCAG	1020	
CCAGGGCTGA	GCCTGGATGT	CAGGAAGGAG	CTGCTGACCA	AGGACCTTCG	GGGGGAGATG	1080	
ACGCCACCCT	CGGTG					1095	

【 0 1 3 2 】

配列番号 : 15

配列の長さ : 1928

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

10

アンチセンス : No

起源

生物名 : モルモット

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴

特徴を表す記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..19

20

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 20..1714

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : 3' UTR

存在位置 : 1715..1928

特徴を決定した方法 : S

30

配列

GAGTGGCTTA GCCGCAGGC ATG GCG CGC GCA TCA GGC TCC GAG AGG CAC 49

Met Ala Arg Ala Ser Gly Ser Glu Arg His

1

5

10

CTG CTG CTC ATC TAC ACT GGC GGC ACT TTG GGC ATG CAG AGC AAG GGC 97

Leu Leu Leu Ile Tyr Thr Gly Gly Thr Leu Gly Met Gln Ser Lys Gly

15

20

25

40

GGG GTG CTC GTC CCC GGC CCA GGC CTG GTC ACT CTG CTG CGG ACC CTG 145





ACC AAG GTG GAC TCC CAG AAG TTT GAG GCC TTC TGC TCC CCC AAT CTG	625	
Thr Lys Val Asp Ser Gln Lys Phe Glu Ala Phe Cys Ser Pro Asn Leu		
190	195	200
TCC CCA CTA GCC ACT GTG GGC GCG GAT GTC ACA ATT GCC TGG GAC CTG	673	
Ser Pro Leu Ala Thr Val Gly Ala Asp Val Thr Ile Ala Trp Asp Leu		
205	210	215
GTG CGC AAG GTC AAC TGG AAG GAC CCG CTG GTG GTG CAC AGC AAC ATG	721	10
Val Arg Lys Val Asn Trp Lys Asp Pro Leu Val Val His Ser Asn Met		
220	225	230
GAG CAC GAC GTG GCA CTG CTG CGC CTC TAC CCT GGC ATC CCG GCC TCC	769	
Glu His Asp Val Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Pro Gly Ile Pro Ala Ser		
235	240	245
CTG GTC CGG GCA TTC CTG CAG CCC CCG CTC AAG GGC GTG GTC CTG GAG	817	
Leu Val Arg Ala Phe Leu Gln Pro Pro Leu Lys Gly Val Val Leu Glu		20
255	260	265
ACC TTC GGC TCT GGC AAC GGG CCG AGC AAG CCC GAC CTG CTG CAG GAG	865	
Thr Phe Gly Ser Gly Asn Gly Pro Ser Lys Pro Asp Leu Leu Gln Glu		
270	275	280
TTG CGG GCC GCG GCC CAG CGC GGC CTC ATC ATG GTC AAC TGC AGC CAG	913	
Leu Arg Ala Ala Ala Gln Arg Gly Leu Ile Met Val Asn Cys Ser Gln		
285	290	295
TGC CTG CGG GGG TCT GTG ACC CCG GGC TAT GCC ACG AGC TTG GCG GGC	961	
Cys Leu Arg Gly Ser Val Thr Pro Gly Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Gly		
300	305	310
GCC AAC ATC GTG TCC GGC TTA GAC ATG ACC TCA GAG GCC GCG CTG GCT	1009	
Ala Asn Ile Val Ser Gly Leu Asp Met Thr Ser Glu Ala Ala Leu Ala		
315	320	325
AAG CTG TCC TAC GTG TTG GGC CTG CCG GAG CTG AGC CTG GAG CGC AGG	1057	40
Lys Leu Ser Tyr Val Leu Gly Leu Pro Glu Leu Ser Leu Glu Arg Arg		

	335	340	345	
CAG GAG CTG CTG GCC AAG GAT CTT CGC GGG GAA ATG ACA CTG CCC ACG				1105
Gln Glu Leu Leu Ala Lys Asp Leu Arg Gly Glu Met Thr Leu Pro Thr				
	350	355	360	
GCA GAC CTG CAC CAG TCC TCT CCG CCG GGC AGC ACA CTG GGG CAA GGT				1153
Ala Asp Leu His Gln Ser Ser Pro Pro Gly Ser Thr Leu Gly Gln Gly				
	365	370	375	10
GTC GCC CGG CTC TTT AGT CTG TTC GGT TGC CAG GAG GAA GAT TCG GTG				1201
Val Ala Arg Leu Phe Ser Leu Phe Gly Cys Gln Glu Glu Asp Ser Val				
	380	385	390	
CAG GAC GCC GTG ATG CCC AGC CTG GCC CTG GCC TTG GCC CAT GCT GGT				1249
Gln Asp Ala Val Met Pro Ser Leu Ala Leu Ala Leu Ala His Ala Gly				
	395	400	405	410
GAA CTC GAG GCT CTG CAG GCA CTT ATG GAG CTG GGC AGT GAC CTG CGC				1297
Glu Leu Glu Ala Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu Gly Ser Asp Leu Arg				20
	415	420	425	
CTA AAG GAC TCT AAT GGC CAA ACC CTG TTG CAT GTG GCT GCT CGG AAT				1345
Leu Lys Asp Ser Asn Gly Gln Thr Leu Leu His Val Ala Ala Arg Asn				
	430	435	440	
GGG CGT GAT GGC GTG GTC ACC ATG CTG CTG CAC AGA GGC ATG GAT GTC				1393
Gly Arg Asp Gly Val Val Thr Met Leu Leu His Arg Gly Met Asp Val				30
	445	450	455	
AAT GCC CGA GAC CGA GAC GGC CTC AGC CCA CTG CTG TTG GCT GTA CAG				1441
Asn Ala Arg Asp Arg Asp Gly Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ala Val Gln				
	460	465	470	
GGC AGG CAT CGG GAA TGC ATC AGG CTG CTG CGG AAG GCT GGG GCC TGC				1489
Gly Arg His Arg Glu Cys Ile Arg Leu Leu Arg Lys Ala Gly Ala Cys				
	475	480	485	490
CTG TCC CCC CAG GAC CTG AAG GAT GCA GGG ACC GAG CTG TGC AGG CTG				1537
				40



配列番号 : 16

配列の長さ : 2096

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイポテセィカル配列 : No

10

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..92

20

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 93..1811

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : 3' UTR

存在位置 : 1812..2096

特徴を決定した方法 : S

30

配列

CGCCCCGGGC CTCCTCCGCG CAGTCCCTGA GTCCCGCAGG CCCTGCGTCC CCGCTGCACA 60

CCCCCGTCCA CTCCCGTGGT CCCCAGTCCG GC ATG GCG CGC GCG GTG GGG CCC 113

Met Ala Arg Ala Val Gly Pro

1

5

GAG CGG AGG CTG CTG GCC GTC TAC ACC GGC GGC ACC ATT GGC ATG CGG 161

Glu Arg Arg Leu Leu Ala Val Tyr Thr Gly Gly Thr Ile Gly Met Arg

40

10

15

20

AGT GAG CTC GGC GTG CTT GTG CCC GGG ACG GGC CTG GCT GCC ATC CTG	209	
Ser Glu Leu Gly Val Leu Val Pro Gly Thr Gly Leu Ala Ala Ile Leu		
25 30 35		
AGG ACA CTG CCC ATG TTC CAT GAC GAG GAG CAC GCC CGA GCC CGC GGC	257	
Arg Thr Leu Pro Met Phe His Asp Glu Glu His Ala Arg Ala Arg Gly		
40 45 50 55		
CTC TCT GAG GAC ACC CTG GTG CTA CCC CCG GAC AGC CGC AAC CAG AGG	305	10
Leu Ser Glu Asp Thr Leu Val Leu Pro Pro Asp Ser Arg Asn Gln Arg		
60 65 70		
ATC CTC TAC ACC GTG CTG GAG TGC CAG CCC CTC TTC GAC TCC AGT GAC	353	
Ile Leu Tyr Thr Val Leu Glu Cys Gln Pro Leu Phe Asp Ser Ser Asp		
75 80 85		
ATG ACC ATC GCT GAG TGG GTT CGC GTT GCC CAG ACC ATC AAG AGG CAC	401	
Met Thr Ile Ala Glu Trp Val Arg Val Ala Gln Thr Ile Lys Arg His		20
90 95 100		
TAC GAG CAG TAC CAC GGC TTT GTG GTC ATC CAC GGC ACC GAC ACC ATG	449	
Tyr Glu Gln Tyr His Gly Phe Val Val Ile His Gly Thr Asp Thr Met		
105 110 115		
GCC TTT GCT GCC TCG ATG CTG TCC TTC ATG CTG GAG AAC CTG CAG AAG	497	
Ala Phe Ala Ala Ser Met Leu Ser Phe Met Leu Glu Asn Leu Gln Lys		
120 125 130 135		30
ACT GTC ATC CTC ACT GGG GCC CAG GTG CCC ATC CAT GCC CTG TGG AGC	545	
Thr Val Ile Leu Thr Gly Ala Gln Val Pro Ile His Ala Leu Trp Ser		
140 145 150		
GAC GGC CGT GAG AAC CTG CTG GGG GCA CTG CTC ATG GCT GGC CAG TAT	593	
Asp Gly Arg Glu Asn Leu Leu Gly Ala Leu Leu Met Ala Gly Gln Tyr		
155 160 165		
GTG ATC CCA GAG GTC TGC CTT TTC TTC CAG AAT CAG CTG TTT CGG GGC	641	40
Val Ile Pro Glu Val Cys Leu Phe Phe Gln Asn Gln Leu Phe Arg Gly		

170	175	180		
AAC CGG GCA ACC AAG GTA GAC GCT CGG AGG TTC GCA GCT TTC TGC TCC			689	
Asn Arg Ala Thr Lys Val Asp Ala Arg Arg Phe Ala Ala Phe Cys Ser				
185	190	195		
CCG AAC CTG CTG CCT CTG GCC ACA GTG GGT GCT GAC ATC ACA ATC AAC			737	
Pro Asn Leu Leu Pro Leu Ala Thr Val Gly Ala Asp Ile Thr Ile Asn				
200	205	210	215	10
AGG GAG CTG GTG CGG AAG GTG GAC GGG AAG GCT GGG CTG GTG GTG CAC			785	
Arg Glu Leu Val Arg Lys Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Val Val His				
220	225	230		
AGC AGC ATG GAG CAG GAC GTG GGC CTG CTG CGC CTC TAC CCT GGG ATC			833	
Ser Ser Met Glu Gln Asp Val Gly Leu Leu Arg Leu Tyr Pro Gly Ile				
235	240	245		
CCT GCC GCC CTG GTT CGG GCC TTC TTG CAG CCT CCC CTG AAG GGC GTG			881	20
Pro Ala Ala Leu Val Arg Ala Phe Leu Gln Pro Pro Leu Lys Gly Val				
250	255	260		
GTC ATG GAG ACC TTC GGT TCA GGG AAC GGA CCC ACC AAG CCC GAC CTG			929	
Val Met Glu Thr Phe Gly Ser Gly Asn Gly Pro Thr Lys Pro Asp Leu				
265	270	275		
CTG CAG GAG CTG CGG GTG GCC ACC GAG CGC GGC CTG GTC ATC GTC AAC			977	
Leu Gln Glu Leu Arg Val Ala Thr Glu Arg Gly Leu Val Ile Val Asn				30
280	285	290	295	
TGT ACC CAC TGC CTC CAG GGG GCT GTG ACC ACA GAC TAT GCA GCT GGC			1025	
Cys Thr His Cys Leu Gln Gly Ala Val Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Gly				
300	305	310		
ATG GCC ATG GCG GGA GCC GGC GTC ATC TCA GGC TTC GAC ATG ACA TCG			1073	
Met Ala Met Ala Gly Ala Gly Val Ile Ser Gly Phe Asp Met Thr Ser				
315	320	325		40
GAG GCC GCC CTG GCC AAG CTA TCG TAT GTG CTG GGC CAG CCA GGG CTG			1121	

Glu Ala Ala Leu Ala Lys Leu Ser Tyr Val Leu Gly Gln Pro Gly Leu	
330	335
AGC CTG GAT GTC AGG AAG GAG CTG CTG ACC AAG GAC CTT CGG GGG GAG	1169
Ser Leu Asp Val Arg Lys Glu Leu Leu Thr Lys Asp Leu Arg Gly Glu	
345	350
ATG ACG CCA CCC TCG GTG GAA GAG CGC CGG CCC TCA CTG CAG GGC AAC	1217
Met Thr Pro Pro Ser Val Glu Glu Arg Arg Pro Ser Leu Gln Gly Asn	10
360	365
ACG CTG GGC GGT GGG GTC TCC TGG CTC CTC AGT CTG AGC GGC AGC CAG	1265
Thr Leu Gly Gly Gly Val Ser Trp Leu Leu Ser Leu Ser Gly Ser Gln	
380	385
GAG GCA GAT GCC CTG CGG AAT GCC CTG GTG CCC AGC CTG GCC TGT GCT	1313
Glu Ala Asp Ala Leu Arg Asn Ala Leu Val Pro Ser Leu Ala Cys Ala	20
395	400
GCT GCC CAC GCC GGT GAC GTG GAG GCG CTG CAG GCG CTT GTG GAG CTG	1361
Ala Ala His Ala Gly Asp Val Glu Ala Leu Gln Ala Leu Val Glu Leu	
410	415
GGC AGT GAC CTG GGC CTG GTG GAC TTT AAC GGC CAA ACC CCA CTG CAC	1409
Gly Ser Asp Leu Gly Leu Val Asp Phe Asn Gly Gln Thr Pro Leu His	
425	430
GCG GCC GCC CGG GGA GGC CAC ACA GAG GCA GTC ACC ATG CTG CTG CAG	1457
Ala Ala Ala Arg Gly Gly His Thr Glu Ala Val Thr Met Leu Leu Gln	30
440	445
AGA GGT GTG GAC GTG AAC ACC CGG GAC ACG GAT GGC TTC AGC CCG CTG	1505
Arg Gly Val Asp Val Asn Thr Arg Asp Thr Asp Gly Phe Ser Pro Leu	
460	465
CTG CTG GCC GTG CGG GGC AGG CAT CCG GGT GTC ATT GGG TTG CTG CGG	1553
Leu Leu Ala Val Arg Gly Arg His Pro Gly Val Ile Gly Leu Leu Arg	40
475	480
	485

GAA GCC GGG GCC TCC CTG TCC ACC CAG GAG CTG GAG GAA GCA GGG ACG	1601		
Glu Ala Gly Ala Ser Leu Ser Thr Gln Glu Leu Glu Glu Ala Gly Thr			
490	495	500	
GAG CTG TGC AGG CTG GCA TAC AGG GCC GAC CTC GAA GGC CTG CAG GTG	1649		
Glu Leu Cys Arg Leu Ala Tyr Arg Ala Asp Leu Glu Gly Leu Gln Val			
505	510	515	
TGG TGG CAG GCA GGG GCT GAC CTG GGG CAG CCG GGC TAT GAC GGG CAC	1697	10	
Trp Trp Gln Ala Gly Ala Asp Leu Gly Gln Pro Gly Tyr Asp Gly His			
520	525	530	535
AGC GCC CTG CAC GTC GCA GAG GCA GCC GGG AAC CTG GCA GTG GTG GCC	1745		
Ser Ala Leu His Val Ala Glu Ala Ala Gly Asn Leu Ala Val Val Ala			
540	545	550	
TTT CTA CAG AGC CTG GAG GGT GCG GTT GGT GCC CAG GCC CCA TGC CCA	1793		
Phe Leu Gln Ser Leu Glu Gly Ala Val Gly Ala Gln Ala Pro Cys Pro		20	
555	560	565	
GAA GTG CTG CCT GGT GTC TAACCTGAAG GCGTCCTGCT GCAGTATAAG	1841		
Glu Val Leu Pro Gly Val			
570			
CCATTCCTTC CTCCCATGAC CTGCTGGAGG GGTCTCAGGC ATGACCCAC TGCTGGGGCT	1901		
GCTTCCCAGC CTGCTCTCAT GTAAAGCCTG AAGGCCTTTG TTGGGCAGGA CGGCAATAAA	1961		
GTCTCTGACA TCCCCTCACC AGGTCTGTAC AGCCTGGCTC TGAGAGGCTC TGTCTGGGTC	2021	30	
CGGGACTGTG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	2081		
AAAAAAAAAA AAAAA	2096		

【 0 1 3 4 】



配列番号 : 17

配列の長さ : 1695

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

10

アンチセンス : No

起源

生物名 : モルモット

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..1695

20

配列

ATG GCG CGC GCA TCA GGC TCC GAG AGG CAC CTG CTG CTC ATC TAC ACT 48

Met Ala Arg Ala Ser Gly Ser Glu Arg His Leu Leu Leu Ile Tyr Thr

1 5 10 15

GGC GGC ACT TTG GGC ATG CAG AGC AAG GGC GGG GTG CTC GTC CCC GGC 96

Gly Gly Thr Leu Gly Met Gln Ser Lys Gly Gly Val Leu Val Pro Gly

20 25 30

30

CCA GGC CTG GTC ACT CTG CTG CGG ACC CTG CCC ATG TTC CAT GAC AAG 144

Pro Gly Leu Val Thr Leu Leu Arg Thr Leu Pro Met Phe His Asp Lys

35 40 45

GAG TTC GCC CAG GCC CAG GGC CTC CCT GAC CAT GCT CTG GCG CTG CCC 192

Glu Phe Ala Gln Ala Gln Gly Leu Pro Asp His Ala Leu Ala Leu Pro

50 55 60

CCT GCC AGC CAC GGC CCC AGG GTC CTC TAC ACG GTG CTG GAG TGC CAG 240

Pro Ala Ser His Gly Pro Arg Val Leu Tyr Thr Val Leu Glu Cys Gln

40

65	70	75	80	
CCC CTC TTG GAT TCC AGC GAC ATG ACC ATC GAT GAT TGG ATT CGC ATA				288
Pro Leu Leu Asp Ser Ser Asp Met Thr Ile Asp Asp Trp Ile Arg Ile				
	85	90	95	
GCC AAG ATC ATA GAG AGG CAC TAT GAG CAG TAC CAA GGC TTT GTG GTT				336
Ala Lys Ile Ile Glu Arg His Tyr Glu Gln Tyr Gln Gly Phe Val Val				
	100	105	110	10
ATC CAC GGC ACC GAC ACC ATG GCC TTT GGG GCC TCC ATG CTG TCC TTC				384
Ile His Gly Thr Asp Thr Met Ala Phe Gly Ala Ser Met Leu Ser Phe				
	115	120	125	
ATG CTG GAA AAC CTG CAC AAA CCA GTC ATC CTC ACT GGC GCC CAG GTG				432
Met Leu Glu Asn Leu His Lys Pro Val Ile Leu Thr Gly Ala Gln Val				
	130	135	140	
CCA ATC CGT GTG CTG TGG AAT GAC GCC CGG GAA AAC CTG CTG GGG GCG				480
Pro Ile Arg Val Leu Trp Asn Asp Ala Arg Glu Asn Leu Leu Gly Ala				20
	145	150	155	160
TTG CTT GTG GCC GGC CAA TAC ATC ATC CCT GAG GTC TGC CTG TTT ATG				528
Leu Leu Val Ala Gly Gln Tyr Ile Ile Pro Glu Val Cys Leu Phe Met				
	165	170	175	
AAC AGT CAG CTG TTT CGG GGA AAC CGG GTA ACC AAG GTG GAC TCC CAG				576
Asn Ser Gln Leu Phe Arg Gly Asn Arg Val Thr Lys Val Asp Ser Gln				30
	180	185	190	
AAG TTT GAG GCC TTC TGC TCC CCC AAT CTG TCC CCA CTA GCC ACT GTG				624
Lys Phe Glu Ala Phe Cys Ser Pro Asn Leu Ser Pro Leu Ala Thr Val				
	195	200	205	
GGC GCG GAT GTC ACA ATT GCC TGG GAC CTG GTG CGC AAG GTC AAC TGG				672
Gly Ala Asp Val Thr Ile Ala Trp Asp Leu Val Arg Lys Val Asn Trp				
	210	215	220	40
AAG GAC CCG CTG GTG GTG CAC AGC AAC ATG GAG CAC GAC GTG GCA CTG				720

Lys Asp Pro Leu Val Val His Ser Asn Met Glu His Asp Val Ala Leu	
225	230
CTG CGC CTC TAC CCT GGC ATC CCG GCC TCC CTG GTC CGG GCA TTC CTG	768
Leu Arg Leu Tyr Pro Gly Ile Pro Ala Ser Leu Val Arg Ala Phe Leu	
	245
CAG CCC CCG CTC AAG GGC GTG GTC CTG GAG ACC TTC GGC TCT GGC AAC	816
Gln Pro Pro Leu Lys Gly Val Val Leu Glu Thr Phe Gly Ser Gly Asn	10
	260
GGG CCG AGC AAG CCC GAC CTG CTG CAG GAG TTG CGG GCC GCG GCC CAG	864
Gly Pro Ser Lys Pro Asp Leu Leu Gln Glu Leu Arg Ala Ala Ala Gln	
	275
CGC GGC CTC ATC ATG GTC AAC TGC AGC CAG TGC CTG CGG GGG TCT GTG	912
Arg Gly Leu Ile Met Val Asn Cys Ser Gln Cys Leu Arg Gly Ser Val	
	290
ACC CCG GGC TAT GCC ACG AGC TTG GCG GGC GCC AAC ATC GTG TCC GGC	960
Thr Pro Gly Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Gly Ala Asn Ile Val Ser Gly	
305	310
TTA GAC ATG ACC TCA GAG GCC GCG CTG GCT AAG CTG TCC TAC GTG TTG	1008
Leu Asp Met Thr Ser Glu Ala Ala Leu Ala Lys Leu Ser Tyr Val Leu	
	325
GGC CTG CCG GAG CTG AGC CTG GAG CGC AGG CAG GAG CTG CTG GCC AAG	1056
Gly Leu Pro Glu Leu Ser Leu Glu Arg Arg Gln Glu Leu Leu Ala Lys	30
	340
GAT CTT CGC GGG GAA ATG ACA CTG CCC ACG GCA GAC CTG CAC CAG TCC	1104
Asp Leu Arg Gly Glu Met Thr Leu Pro Thr Ala Asp Leu His Gln Ser	
	355
TCT CCG CCG GGC AGC ACA CTG GGG CAA GGT GTC GCC CGG CTC TTT AGT	1152
Ser Pro Pro Gly Ser Thr Leu Gly Gln Gly Val Ala Arg Leu Phe Ser	40
	370
	375
	380

CTG TTC GGT TGC CAG GAG GAA GAT TCG GTG CAG GAC GCC GTG ATG CCC	1200	
Leu Phe Gly Cys Gln Glu Glu Asp Ser Val Gln Asp Ala Val Met Pro		
385	390	395
AGC CTG GCC CTG GCC TTG GCC CAT GCT GGT GAA CTC GAG GCT CTG CAG	1248	
Ser Leu Ala Leu Ala Leu Ala His Ala Gly Glu Leu Glu Ala Leu Gln		
	405	410
GCA CTT ATG GAG CTG GGC AGT GAC CTG CGC CTA AAG GAC TCT AAT GGC	1296	10
Ala Leu Met Glu Leu Gly Ser Asp Leu Arg Leu Lys Asp Ser Asn Gly		
	420	425
CAA ACC CTG TTG CAT GTG GCT GCT CGG AAT GGG CGT GAT GGC GTG GTC	1344	
Gln Thr Leu Leu His Val Ala Ala Arg Asn Gly Arg Asp Gly Val Val		
	435	440
ACC ATG CTG CTG CAC AGA GGC ATG GAT GTC AAT GCC CGA GAC CGA GAC	1392	
Thr Met Leu Leu His Arg Gly Met Asp Val Asn Ala Arg Asp Arg Asp		20
	450	455
GGC CTC AGC CCA CTG CTG TTG GCT GTA CAG GGC AGG CAT CGG GAA TGC	1440	
Gly Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ala Val Gln Gly Arg His Arg Glu Cys		
	465	470
ATC AGG CTG CTG CGG AAG GCT GGG GCC TGC CTG TCC CCC CAG GAC CTG	1488	
Ile Arg Leu Leu Arg Lys Ala Gly Ala Cys Leu Ser Pro Gln Asp Leu		
	485	490
AAG GAT GCA GGG ACC GAG CTG TGC AGG CTG GCA TCC AGG GCT GAC ATG	1536	
Lys Asp Ala Gly Thr Glu Leu Cys Arg Leu Ala Ser Arg Ala Asp Met		
	500	505
GAA GGC CTG CAG GCA TGG GGG CAG GCT GGG GCC GAC CTG CAG CAG CCG	1584	
Glu Gly Leu Gln Ala Trp Gly Gln Ala Gly Ala Asp Leu Gln Gln Pro		
	515	520
GGC TAT GAT GGG CGC AGC GCT CTG TGT GTC GCA GAA GCA GCC GGG AAC	1632	40
Gly Tyr Asp Gly Arg Ser Ala Leu Cys Val Ala Glu Ala Ala Gly Asn		

530	535	540	
CAG GAG GTG CTG GCC CTT CTG CGG AAC CTG GCA CTT GTA GGC CCG GAA			1680
Gln Glu Val Leu Ala Leu Leu Arg Asn Leu Ala Leu Val Gly Pro Glu			
545	550	555	560
GTG CCG CCT GCC ATC			1695
Val Pro Pro Ala Ile			
	565		

10

【 0 1 3 5 】

配列番号 : 18

配列の長さ : 1719

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイポテセィカル配列 : No

10

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..1719

20

特徴を決定した方法 : S

配列

ATG GCG CGC GCG GTG GGG CCC GAG CGG AGG CTG CTG GCC GTC TAC ACC 48

Met Ala Arg Ala Val Gly Pro Glu Arg Arg Leu Leu Ala Val Tyr Thr

1 5 10 15

GGC GGC ACC ATT GGC ATG CGG AGT GAG CTC GGC GTG CTT GTG CCC GGG 96

Gly Gly Thr Ile Gly Met Arg Ser Glu Leu Gly Val Leu Val Pro Gly

20 25 30

30

ACG GGC CTG GCT GCC ATC CTG AGG ACA CTG CCC ATG TTC CAT GAC GAG 144

Thr Gly Leu Ala Ala Ile Leu Arg Thr Leu Pro Met Phe His Asp Glu

35 40 45

GAG CAC GCC CGA GCC CGC GGC CTC TCT GAG GAC ACC CTG GTG CTA CCC 192

Glu His Ala Arg Ala Arg Gly Leu Ser Glu Asp Thr Leu Val Leu Pro

50 55 60

40

CCG GAC AGC CGC AAC CAG AGG ATC CTC TAC ACC GTG CTG GAG TGC CAG 240

Pro	Asp	Ser	Arg	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Tyr	Thr	Val	Leu	Glu	Cys	Gln				
65					70					75					80				
CCC	CTC	TTC	GAC	TCC	AGT	GAC	ATG	ACC	ATC	GCT	GAG	TGG	GTT	CGC	GTT	288			
Pro	Leu	Phe	Asp	Ser	Ser	Asp	Met	Thr	Ile	Ala	Glu	Trp	Val	Arg	Val				
				85					90					95					
GCC	CAG	ACC	ATC	AAG	AGG	CAC	TAC	GAG	CAG	TAC	CAC	GGC	TTT	GTG	GTC	336			
Ala	Gln	Thr	Ile	Lys	Arg	His	Tyr	Glu	Gln	Tyr	His	Gly	Phe	Val	Val				10
			100					105					110						
ATC	CAC	GGC	ACC	GAC	ACC	ATG	GCC	TTT	GCT	GCC	TCG	ATG	CTG	TCC	TTC	384			
Ile	His	Gly	Thr	Asp	Thr	Met	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Met	Leu	Ser	Phe				
		115				120						125							
ATG	CTG	GAG	AAC	CTG	CAG	AAG	ACT	GTC	ATC	CTC	ACT	GGG	GCC	CAG	GTG	432			
Met	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Lys	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Gly	Ala	Gln	Val				20
	130					135					140								
CCC	ATC	CAT	GCC	CTG	TGG	AGC	GAC	GGC	CGT	GAG	AAC	CTG	CTG	GGG	GCA	480			
Pro	Ile	His	Ala	Leu	Trp	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala				
145					150					155					160				
CTG	CTC	ATG	GCT	GGC	CAG	TAT	GTG	ATC	CCA	GAG	GTC	TGC	CTT	TTC	TTC	528			
Leu	Leu	Met	Ala	Gly	Gln	Tyr	Val	Ile	Pro	Glu	Val	Cys	Leu	Phe	Phe				
				165					170					175					
CAG	AAT	CAG	CTG	TTT	CGG	GGC	AAC	CGG	GCA	ACC	AAG	GTA	GAC	GCT	CGG	576			30
Gln	Asn	Gln	Leu	Phe	Arg	Gly	Asn	Arg	Ala	Thr	Lys	Val	Asp	Ala	Arg				
				180					185					190					
AGG	TTC	GCA	GCT	TTC	TGC	TCC	CCG	AAC	CTG	CTG	CCT	CTG	GCC	ACA	GTG	624			
Arg	Phe	Ala	Ala	Phe	Cys	Ser	Pro	Asn	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Val				
				195				200						205					
GGT	GCT	GAC	ATC	ACA	ATC	AAC	AGG	GAG	CTG	GTG	CGG	AAG	GTG	GAC	GGG	672			
Gly	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Asn	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Val	Asp	Gly				40
				210				215						220					

AAG GCT GGG CTG GTG GTG CAC AGC AGC ATG GAG CAG GAC GTG GGC CTG	720	
Lys Ala Gly Leu Val Val His Ser Ser Met Glu Gln Asp Val Gly Leu		
225	230	235
240		
CTG CGC CTC TAC CCT GGG ATC CCT GCC GCC CTG GTT CGG GCC TTC TTG	768	
Leu Arg Leu Tyr Pro Gly Ile Pro Ala Ala Leu Val Arg Ala Phe Leu		
245	250	255
CAG CCT CCC CTG AAG GGC GTG GTC ATG GAG ACC TTC GGT TCA GGG AAC	816	10
Gln Pro Pro Leu Lys Gly Val Val Met Glu Thr Phe Gly Ser Gly Asn		
260	265	270
GGA CCC ACC AAG CCC GAC CTG CTG CAG GAG CTG CGG GTG GCC ACC GAG	864	
Gly Pro Thr Lys Pro Asp Leu Leu Gln Glu Leu Arg Val Ala Thr Glu		
275	280	285
CGC GGC CTG GTC ATC GTC AAC TGT ACC CAC TGC CTC CAG GGG GCT GTG	912	
Arg Gly Leu Val Ile Val Asn Cys Thr His Cys Leu Gln Gly Ala Val		20
290	295	300
ACC ACA GAC TAT GCA GCT GGC ATG GCC ATG GCG GGA GCC GGC GTC ATC	960	
Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Gly Met Ala Met Ala Gly Ala Gly Val Ile		
305	310	315
TCA GGC TTC GAC ATG ACA TCG GAG GCC GCC CTG GCC AAG CTA TCG TAT	1008	
Ser Gly Phe Asp Met Thr Ser Glu Ala Ala Leu Ala Lys Leu Ser Tyr		
325	330	335
GTG CTG GGC CAG CCA GGG CTG AGC CTG GAT GTC AGG AAG GAG CTG CTG	1056	
Val Leu Gly Gln Pro Gly Leu Ser Leu Asp Val Arg Lys Glu Leu Leu		
340	345	350
ACC AAG GAC CTT CGG GGG GAG ATG ACG CCA CCC TCG GTG GAA GAG CGC	1104	
Thr Lys Asp Leu Arg Gly Glu Met Thr Pro Pro Ser Val Glu Glu Arg		
355	360	365
CGG CCC TCA CTG CAG GGC AAC ACG CTG GGC GGT GGG GTC TCC TGG CTC	1152	40
Arg Pro Ser Leu Gln Gly Asn Thr Leu Gly Gly Gly Val Ser Trp Leu		



370	375	380	
CTC AGT CTG AGC GGC AGC CAG GAG GCA GAT GCC CTG CGG AAT GCC CTG			1200
Leu Ser Leu Ser Gly Ser Gln Glu Ala Asp Ala Leu Arg Asn Ala Leu			
385	390	395	400
GTG CCC AGC CTG GCC TGT GCT GCT GCC CAC GCC GGT GAC GTG GAG GCG			1248
Val Pro Ser Leu Ala Cys Ala Ala Ala His Ala Gly Asp Val Glu Ala			
	405	410	415
CTG CAG GCG CTT GTG GAG CTG GGC AGT GAC CTG GGC CTG GTG GAC TTT			1296
Leu Gln Ala Leu Val Glu Leu Gly Ser Asp Leu Gly Leu Val Asp Phe			
	420	425	430
AAC GGC CAA ACC CCA CTG CAC GCG GCC GCC CGG GGA GGC CAC ACA GAG			1344
Asn Gly Gln Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Arg Gly Gly His Thr Glu			
	435	440	445
GCA GTC ACC ATG CTG CTG CAG AGA GGT GTG GAC GTG AAC ACC CGG GAC			1392
Ala Val Thr Met Leu Leu Gln Arg Gly Val Asp Val Asn Thr Arg Asp			
	450	455	460
ACG GAT GGC TTC AGC CCG CTG CTG CTG GCC GTG CGG GGC AGG CAT CCG			1440
Thr Asp Gly Phe Ser Pro Leu Leu Leu Ala Val Arg Gly Arg His Pro			
465	470	475	480
GGT GTC ATT GGG TTG CTG CGG GAA GCC GGG GCC TCC CTG TCC ACC CAG			1488
Gly Val Ile Gly Leu Leu Arg Glu Ala Gly Ala Ser Leu Ser Thr Gln			
	485	490	495
GAG CTG GAG GAA GCA GGG ACG GAG CTG TGC AGG CTG GCA TAC AGG GCC			1536
Glu Leu Glu Glu Ala Gly Thr Glu Leu Cys Arg Leu Ala Tyr Arg Ala			
	500	505	510
GAC CTC GAA GGC CTG CAG GTG TGG TGG CAG GCA GGG GCT GAC CTG GGG			1584
Asp Leu Glu Gly Leu Gln Val Trp Trp Gln Ala Gly Ala Asp Leu Gly			
	515	520	525
CAG CCG GGC TAT GAC GGG CAC AGC GCC CTG CAC GTC GCA GAG GCA GCC			1632

10

20

30

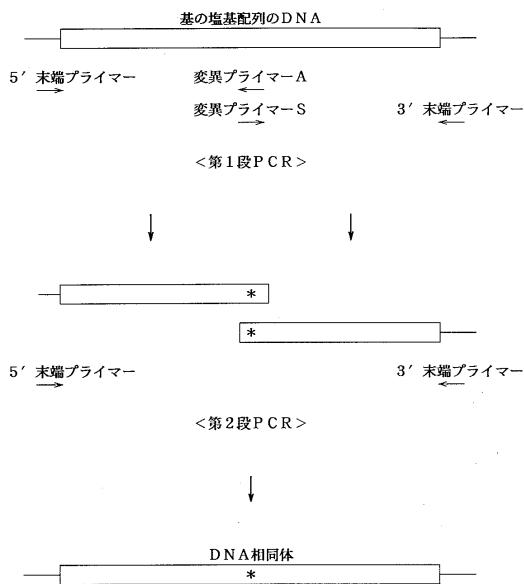
40



pBR322ori  
 Igsec  
 分をコードするDNA (Igsec DNA)  
 Emsv  
 リピート由来のエンハンサー  
 Pmti  
 Poly(A)  
 BPVI

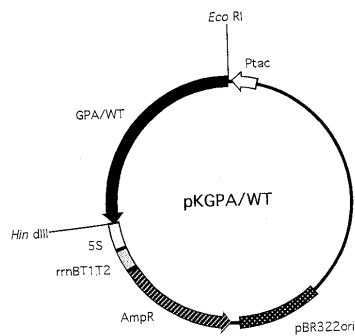
大腸菌における複製開始点  
 イムノグロブリンの分泌シグナル配列を含むペプチド部  
 モロニー・マウス肉腫ウイルスのロング・ターミナル・  
 マウス・メタロチオネイン I 遺伝子由来のプロモーター  
 SV40由来のポリ(A)付加シグナル  
 ウシパピローマ・ウイルスのゲノム

【図1】

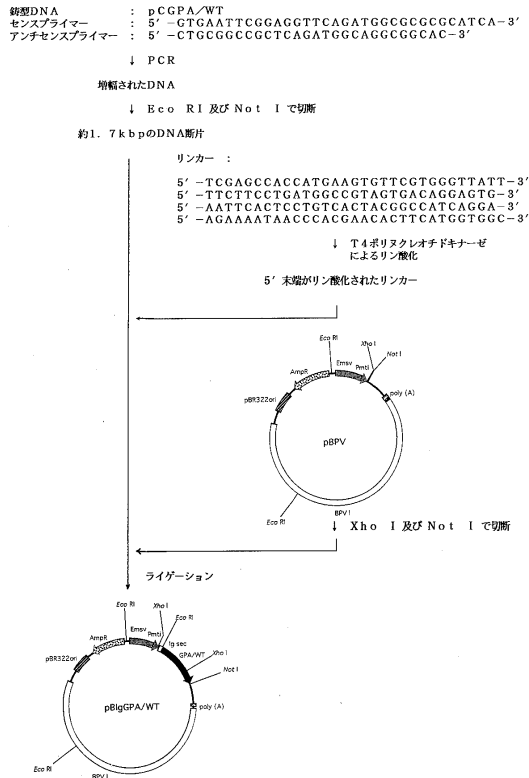


註) \* : 塩基置換が導入された部位  
 [ ] : ポリペプチドをコードする部分

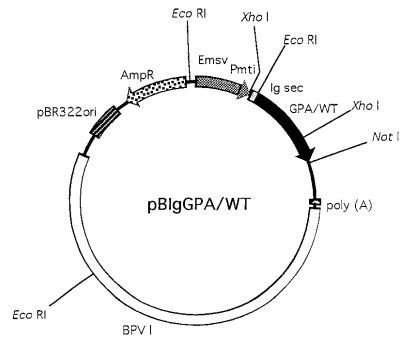
【図2】



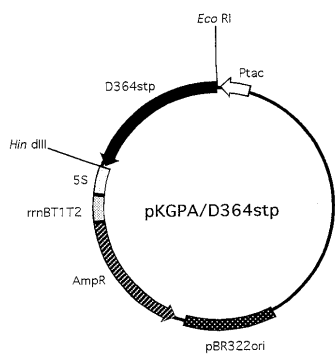
【 図 3 】



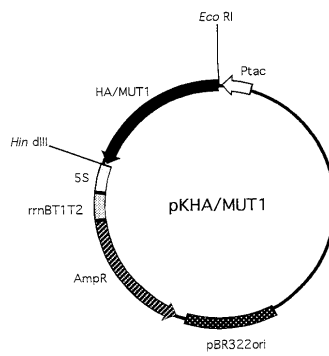
【 図 4 】



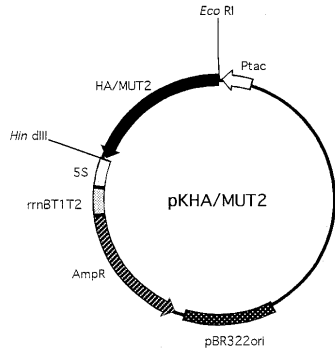
【 図 5 】



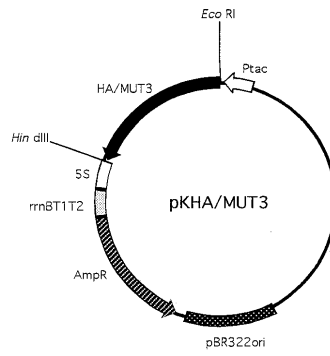
【 図 6 】



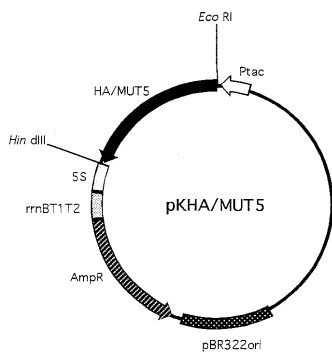
【 図 7 】



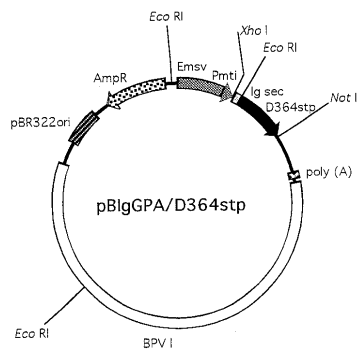
【 図 8 】



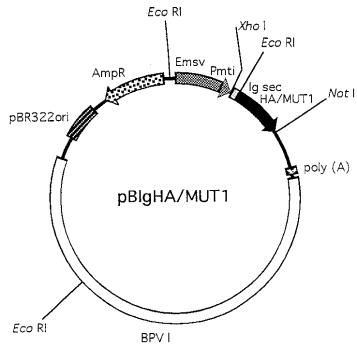
【 図 9 】



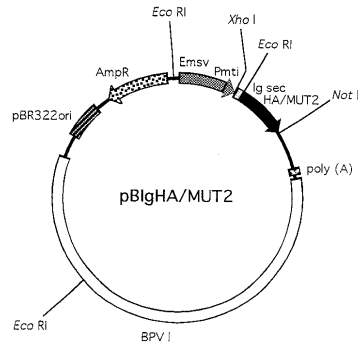
【 図 10 】



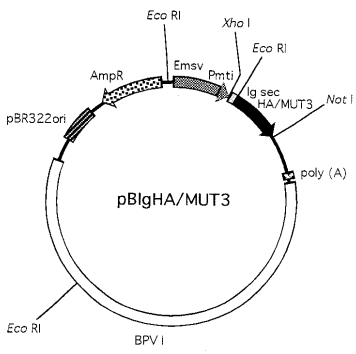
【 図 1 1 】



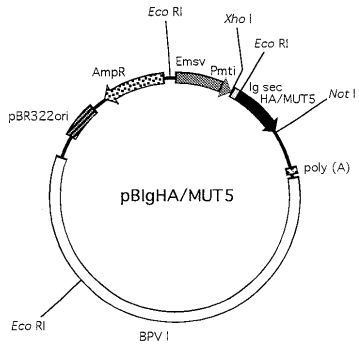
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
A 6 1 P 35/02 (2006.01) A 6 1 P 35/02

(56) 参考文献 特開昭 5 5 - 0 1 9 0 1 8 ( J P , A )  
特開平 0 4 - 3 2 0 6 8 4 ( J P , A )  
特許第 3 7 2 1 2 1 0 ( J P , B 2 )  
J. Biol. Chem. , 1 9 7 0 年 , Vol. 245(11) , p. 2797-2801  
社団法人日本生化学会 編集 , 核酸 I I I - 組換え DNA 技術 - , 東京化学同人 , 1 9 9 2 年 , p . 4

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N 15/00-15/90  
JSTPlus(JDream2)  
PubMed  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/Geneseq