

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/082851

発行日 平成20年6月26日 (2008.6.26)

(43) 国際公開日 平成18年8月10日 (2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 65 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2007-501592 (P2007-501592)	(71) 出願人	504137912
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/301666		国立大学法人 東京大学
(22) 国際出願日	平成18年2月1日 (2006.2.1)		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(31) 優先権主張番号	特願2005-27019 (P2005-27019)	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成17年2月2日 (2005.2.2)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋
		(74) 代理人	100119253
			弁理士 金山 賢教
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 エピグリカニン関連ムチン

(57) 【要約】

【課題】

本発明はエピグリカニンに関連するムチン様糖タンパク質及び該タンパク質をコードする核酸の単離について初めて記述する。また、本発明は当該マウスタンパク質のヒト相同体の存在を初めて明らかにする。

【解決手段】

一般式：A - B_n - C - D - Eで示されるアミノ酸配列を有するムチン様糖タンパク質（ここで、Aはシグナル配列を含むN末端領域；B_nはO-グリコシル化部位を提供するセリン/スレオニンに富み約11乃至約15アミノ酸残基から成るアミノ酸配列（B）が繰り返される（n = 20 ~ 150）タンデムリピート領域；Cは潜在的酵素切断部位含有領域；Dはマウス-ヒト間で高い相同性を示す細胞膜貫通領域；及びEは細胞質内領域）が提供される。

【選択図】 図14

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたムチン様糖タンパク質であって、該タンパク質は、

(1) N末端からC末端方向に、以下の一般式(I)で示されるアミノ酸配列：



[式中、

Aは、

MRRRS S L W C W L L L Q I L L L G S G Y A (配列番号：1)又は

M K M Q K G N V L L M F G L L L H L E A A (配列番号：2)

から選択されるN末端領域であり、

10

Bは、O-グリコシル化部位を有するタンデムリピート領域のリピート単位であって、以下の配列番号3乃至5で示され：

X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - X a a₇ - X a a

₈ - X a a₉ - X a a₁₀ - X a a₁₁ - X a a₁₂ - X a a₁₃ - X a a₁₄ - X a a

₁₅ (配列番号：3)

但し、上記配列中、

X a a₁はアラニン、バリン、グルタミン酸、スレオニン、イソロイシン、プロリン、セリン、グリシン及びヒスチジンから成る群から独立に選択され、

X a a₂はセリン、イソロイシン、リジン、フェニルアラニン及びロイシンから成る群から独立に選択され、

20

X a a₃はセリン、アルギニン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₄はスレオニン、セリン、イソロイシン、リジン及びアルギニンから成る群から独立に選択され、

X a a₅はアラニン、グリシン、スレオニン及びバリンから成る群から独立に選択され、

X a a₆はセリン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₇はグリシン、アルギニン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン及びアラニンから成る群から独立に選択されるか不明アミノ酸であり、

X a a₈はセリン、スレオニン及びチロシンから成る群から独立に選択されるか不明アミノ酸であり、

30

X a a₉はスレオニン、メチオニン、セリン、バリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、リジン及びイソロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₁₀はプロリン、スレオニン、セリン及びロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₁₁はスレオニン、セリン、アスパラギン及びイソロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₁₂はプロリン、ロイシン、スレオニン、トリプトファン、アルギニン、グルタミン及びセリンから成る群から独立に選択され

X a a₁₃はスレオニン、プロリン及びグルタミン酸から成る群から独立に選択されるか又は存在せず、

40

X a a₁₄はスレオニン及びセリンから成る群から独立に選択されるか又は存在せず、及び

X a a₁₅はスレオニン、アラニン、プロリン及びアスパラギンから成る群から独立に選択されか又は存在しない；

X a a₂₁ - X a a₂₂ - S e r - X a a₂₃ - X a a₂₄ - X a a₂₅ - X a a₂

₆ - X a a₂₇ - S e r - T h r - X a a₂₈ - X a a₂₉ - X a a₃₀ - X a a₃₁ -

X a a₃₂ (配列番号：4)

但し、上記配列中、

X a a₂₁はアルギニン、メチオニン及びグリシンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₂はスレオニン及びプロリンから成る群から独立に選択され、

50

X a a₂₃ はイソロイシン、リジン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、
 X a a₂₄ はアラニン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、
 X a a₂₅ はセリン及びフェニルアラニンから成る群から独立に選択され、
 X a a₂₆ はアラニン及びバリンから成る群から独立に選択され、
 X a a₂₇ はセリン、フェニルアラニン及びロイシンから成る群から独立に選択され、
 X a a₂₈ はスレオニン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、
 X a a₂₉ はプロリン及びセリンから成る群から独立に選択され、
 X a a₃₀ はスレオニン及びアラニンから成る群から独立に選択され、
 X a a₃₁ はセリン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、及び
 X a a₃₂ はイソロイシン及びセリンから成る群から独立に選択される；又は

10

X a a₄₁ - X a a₄₂ - X a a₄₃ - X a a₄₄ - X a a₄₅ - X a a₄₆ - X a
 a₄₇ - X a a₄₈ - X a a₄₉ - X a a₅₀ - X a a₅₁ - X a a₅₂ - X a a₅₃ -
 X a a₅₄ - X a a₅₅ (配列番号：5)

但し、上記配列中、少なくとも1個以上のセリン又はスレオニンを含むことを条件とし
て、

X a a₄₁ はセリン、フェニルアラニン及びスレオニンから成る群から独立に選択され

、
X a a₄₂ はセリン、アスパラギン、ヒスチジン及びアルギニンから成る群から独立に
選択され、

X a a₄₃ はスレオニン、バリン及びセリンから成る群から独立に選択され、

20

X a a₄₄ はスレオニン、バリン、プロリン、アラニン、イソロイシン及びアスパラギ
ンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₅ はセリン及びグルタミン酸から成る群から独立に選択され、

X a a₄₆ はセリン、アスパラギン、スレオニン及びアラニンから成る群から独立に選
択され、

X a a₄₇ はグリシン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₈ はアラニン、イソロイシン、バリン、スレオニン及びセリンから成る群から
独立に選択され、

X a a₄₉ はセリン、グリシン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₅₀ はスレオニン、イソロイシン及びアラニンから成る群から独立に選択され、

30

X a a₅₁ はアラニン、バリン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₅₂ はスレオニンであるか又は存在せず、

X a a₅₃ はアスパラギン、グリシン、イソロイシン及びスレオニンから成る群から独
立に選択されるか又は存在せず、

X a a₅₄ はセリンであるか又は存在せず、及び

X a a₅₅ はグルタミン酸、グリシン及びアスパラギン酸から成る群から独立に選択さ
れか又は存在しない、

n は 20 乃至 150 の整数であり、

C は、

R T S T G S S S S L S A T H T S S S L T V S T G T H T T S N H T G T P V M E
V K P S G S L K P W E (配列番号：6) 又は

40

A L T G M H T T S H S A S T A V S E A K P G G S L V P W E (配列番号：7)

から選択される潜在的酵素切断部位含有領域であり、

D は、

I F L I T L A S V I V V M G L S A G L F I Y V (配列番号：8) 又は

I F L I T L V S V V A A V G L F A G L F F C V (配列番号：9)

から選択される細胞膜貫通領域であり、

E は、

R R Y L S L R N A A D G I F Y N S H P D P G G S A M T P G S P T C S W R R P
R T F N V V E M T R I (配列番号：10) 又は

50

R N S L S L R N T F N T A V Y H P H G L N H G L G P G P G G N H G A P H R P
R W S P N W F W R R P V S S I A M E M S G R N S G P (配列番号：11)

から選択される細胞質内領域である。]

を有するか、或いは

(2) 上記一般式(I)で示されるアミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換又は付加された配列を有することを特徴とする、前記ムチン様糖タンパク質。

【請求項2】

請求項1に記載の一般式(I)において、Aが配列番号:1であり、Bが配列番号:3及び配列番号:4から成る群から独立に選択され、Cが配列番号:6であり、Dが配列番号:8であり、Eが配列番号:10であり、及びnが100乃至150の整数である、請求項1に記載のムチン様糖タンパク質。

10

【請求項3】

Bが配列番号:12～配列番号:138から成る群から独立に選択される請求項2に記載のムチン様糖タンパク質。

【請求項4】

マウス由来である請求項3に記載のムチン様糖タンパク質。

【請求項5】

配列番号:139で示されるか、又は配列番号:139で示されるアミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換又は付加された配列を有することを特徴とする請求項3に記載のムチン様糖タンパク質。

20

【請求項6】

請求項1に記載の一般式(I)において、Aが配列番号:2であり、Bが配列番号:5であり、Cが配列番号:7であり、Dが配列番号:9であり、Eが配列番号:11であり、及びnが20乃至50の整数である、請求項1に記載のムチン様糖タンパク質。

【請求項7】

Bが配列番号:140～配列番号:170から成る群から独立に選択される請求項6に記載のムチン様糖タンパク質。

【請求項8】

ヒト由来である請求項7に記載のムチン様糖タンパク質。

30

【請求項9】

配列番号:171で示されるか、又は配列番号:171で示されるアミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換又は付加された配列を有することを特徴とする請求項7に記載のムチン様糖タンパク質。

【請求項10】

請求項1に記載のムチン様糖タンパク質をコードする核酸又は該核酸に相補的な核酸。

【請求項11】

配列番号:172で示されることを特徴とする請求項10に記載の核酸。

【請求項12】

配列番号:174で示されることを特徴とする請求項10に記載の核酸。

40

【請求項13】

宿主細胞において遺伝子の発現を指揮し得る調節配列に作動可能に結合した請求項10に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項14】

請求項13に記載の発現ベクターを含有する遺伝子組換え宿主細胞。

【請求項15】

真核生物由来である請求項14に記載の遺伝子組換え宿主細胞。

【請求項16】

請求項1に記載のムチン様糖タンパク質の製造方法であって、該方法は、請求項15に記載の宿主細胞を、該宿主細胞に導入された遺伝子の発現を許容し得る条件下で培養し、

50

該細胞において発現された組換遺伝子産物を分離することを特徴とする、前記方法。

【請求項 17】

請求項 1 に記載のムチン様糖タンパク質に対する抗体。

【請求項 18】

ヒト由来のムチン様糖タンパク質に特異的である、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

前記ムチン様糖タンパク質の細胞外ドメインに対して特異的である、請求項 17 又は 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

試料中における請求項 1 に記載のムチン様糖タンパク質発現の検出及び / 又は定量方法であって、該方法は、以下の、

10

(1) 請求項 10 に記載の核酸の全部又は一部から成るプローブを準備する工程；

(2) 前記工程 (1) のプローブと試料からの RNA 又は該 RNA の逆転写産物とを緊縮条件下でハイブリダイズさせる工程、及び

(3) 前記工程 (2) において形成されたプローブ - RNA 複合体又はプローブ - 逆転写産物複合体を検出する工程を含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項 21】

前記プローブが、請求項 10 に記載の核酸中の連続した少なくとも 20 ヌクレオチドを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

20

前記プローブが配列番号：176 で示されるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載のムチン様糖タンパク質発現の検出及び / 又は定量に用いるためのキットであって、該キットは、請求項 10 に記載の核酸の全部又は一部から成るプローブ又はプライマーを含むことを特徴とする、前記キット。

【請求項 24】

請求項 1 に記載のムチン様糖タンパク質発現の検出及び / 又は定量に用いるためのキットであって、該キットは、請求項 17 乃至 19 のいずれか一項に記載の抗体を含むことを特徴とする、前記キット。

30

【請求項 25】

細胞又は組織における請求項 1 に記載のムチン様糖タンパク質発現の *ex vivo* 検出方法であって、該方法は、当該タンパク質の細胞質内領域に特異的な抗体を用いて前記細胞または組織を免疫染色することを含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項 26】

前記組織が甲状腺癌組織である請求項 25 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規ムチン様糖タンパク質に関する。また、本発明は当該糖タンパク質をコードする核酸、当該核酸を含むベクター及び該ベクターを保有する宿主細胞、当該宿主細胞を使用した前記糖タンパク質の製造方法、該糖タンパク質に対する抗体、並びに前記糖タンパク質をコードする遺伝子発現の検出方法及び当該方法に使用するためのキットに関する。

40

【背景技術】

【0002】

ムチンは、慣用的には、上皮細胞ルーメンから分泌されるか又はそこで発現する高度に O - グリコシル化された糖タンパク質として定義されてきた。また、近年のムチン・コアポリペプチドの cDNA クローニングの結果から、ヒトにおいては 19 のメンバーから成るムチンファミリーの存在が明らかになっている。それらのムチンは、一般にセリン、ス

50

レオニン及びプロリンのアミノ酸残基を豊富に含み、高度にO-グリコシル化されたタンデムリピート領域を含んでいることも知られているが、当該領域内でのタンデムリピート単位の繰り返し数や、該単位のアミノ酸組成に関しては、そのメンバー間での多様性が報告されており、そのような多様性に起因すると思われる各種ムチンの独特な生物学的機能は、今日の生化学分野での極めて興味深い研究対象及び可能な医薬用途を提供している。

【0003】

例えば、ヒト・ムチンの一種であるMUC1の発現及びグリコシル化における変化は、ある種の腫瘍細胞の悪性進行度と相関していることが観察されている。故に当該ムチンは腫瘍に対する免疫療法のターゲットの1つとして捉えられているのみならず、該ムチンの患者血清レベルは乳癌の診断マーカーとして最も広く利用されている臨床的指標の1つである。また、MUC16についても、血清中の当該ムチンのレベルが卵巣腫瘍の指標として検査の対象となっている。その他のムチンに関する興味深い知見としては、MUC2のノックアウトマウスが幾つかの消化器官において自発性腫瘍を形成した事実から、該ムチンが腫瘍抑制効果を有しているとみなされ、また、別のムチンであるMUC6は主に胃において発現しており、これはヘリコバクター・ピロリ感染に対する保護作用を付与すると考えられている。更に、MUC1とMUC4の細胞質領域は細胞分化及び増殖の制御に関与することが判明している。

【0004】

一方で、これまでにマウスにおいてエピグリカニンと呼称されるムチン様糖タンパク質の存在が示唆されていた。このタンパク質は、透過型電子顕微鏡によるグルタルアルデヒド-四酸化オスmium固定細胞像の観察から、マウス腹水乳癌細胞株TA3-Ha細胞の表面に存在することが目視されており、該細胞の細胞質膜から外側に200乃至300nm、時として400nmほど突き出したフィラメントとして観測され得ると言われてきたが、当該タンパク質を単離したという報告はない。つまり、非特許文献1において記述されているように、当該タンパク質は全体で約50万の分子量を有し、約1300アミノ酸残基から成る1本鎖ポリペプチドで構成され且つ当該ポリペプチド鎖に500以上の糖鎖が結合していると見積もられてきた。更に該文献は、それらの糖鎖構造の解明を試み、該タンパク質における数種のO-結合型糖鎖の存在を示唆したが、該実験は、十分に分離された糖タンパク質に対してではなく、前記TA3-Ha細胞のトリプシン消化物をBio-Gel(商標) P-100カラムに付した後、その空隙容量(Viod Volume)に回収された粗精製画分に対して成されたに過ぎない。また、非特許文献2も、エピグリカニンと呼称された糖タンパク質が約50万の分子量を有し、約1300アミノ酸残基から成る1本鎖ポリペプチドで構成され且つ当該ポリペプチド鎖に500以上の糖鎖が結合しているとの推定を採用した上で、該糖鎖の結合様式が2-アセトアミド-2-デオキシガラクトース残基とセリン又はスレオニン残基との間のO-グリコシル結合を含んでいると同定したが、やはり該研究も非特許文献1と同様な粗精製画分について行われており、とりわけエピグリカニンのコア・ポリペプチド鎖についての確実な物理化学的性状を与え得る該糖タンパク質の完全な単離には言及していない。更に、非特許文献3は、別のTA3乳癌細胞株からのTA3-MMエピグリカニンと称された糖タンパク質が、約50万の分子量を有し、電子顕微鏡観察により2.5x450~500nmの伸長した悍状体として観測されたことを記載するが、ここでも当該糖タンパク質を、Bio-Gel(商標) P-100カラム等に付した際の空隙容量付近に溶出される粗精製画分として得ているのみであり、該エピグリカニンの単離及び正確な物理化学的性状を決定的には開示していない。

【0005】

上記エピグリカニンの生物学的機能における興味深い知見は、当該タンパク質を発現するTA3-Ha細胞の他家移植性と符合するであろう組織適合性抗原に対する遮蔽作用と密接に関連しているようである(非特許文献1参照)。TA3-MMエピグリカニンに関しても、それを発現するTA3-MM乳癌細胞の他家移植性が当該糖タンパク質の細胞表面での存在度に相関しているとされ、それは該糖タンパク質が細胞表面の組織適合性抗原

10

20

30

40

50

をマスキングするという仮説により説明され得るとしている（非特許文献3参照）。また、他家移植性とも関係付けられる腫瘍の悪性度と関連して、非特許文献4は、ほんの10個の細胞により約17日以内に同系マウスを死亡させ得るような上記TA3-Ha細胞を移植されたマウスの保護について記載している。該文献において、シクロフォスファミドによる先行処理をともなったエピグリカニンでの免疫によって約90%の長期延命効果（long-term survival）が観察された。関連する文献（非特許文献5）は、エピグリカニンが多数のTnエпитープ（GalNAc- α -Ser/Thr）を有することに着目して、同じく当該Tn抗原を多量に含む脱アシル化羊下顎由来のムチンによるTA3-Ha細胞からの保護を記述している。また、非特許文献6は、Tn抗原の腫瘍マーカーとしての利用について記載している（TA3-Ha細胞におけるTn及びT抗原の特異的発現については非特許文献7を参照されたい）。

10

【0006】

しかして、エピグリカニンは、組織適合性抗原との関連において組織の他家移植性を説明し、或いは腫瘍の存在及びその悪性度の指標となるとともに当該腫瘍に対する保護を提供することが知られてきた。

【0007】

しかしながら、エピグリカニンの存在を示唆する最初の報告からおよそ30年が経過しているにも拘わらず、何れの先行文献も、当該タンパク質の正確なキャラクタリゼーションを可能とするようなエピグリカニンの明確な物理化学的性状を決定的には開示しておらず、況や、当該タンパク質の単離を記述するところはない。

20

【0008】

更に、先行技術は、エピグリカニンのヒト相同体の存在について示唆すらしない。

【非特許文献1】Van den Eijnden, D. H., Evans, N. A., Codington, J. F., Reinhold, V., Silber, C., and Jeanloz, R. W. (1979) J. Biol. Chem., Vol. 254, No. 23, p. 12153 - 12159

【非特許文献2】Codington, J. F., Linsley, K. B., Jeanloz, R. W., Irimura, T., and Osawa, T. (1975) Carbohydr. Res., Vol. 40, p. 171 - 182

【非特許文献3】Codington, J. F., Cooper, A. G., Douglas, K. M., Slayter, H. S., Brown, M. C., Silber, C., and Jeanloz, R. W. (1979) JNCI, Vol. 63, No. 1, p. 153 - 161

30

【非特許文献4】Fung, P. Y. S., Madej, M., Koganty, R. R., and Longenecker, M. (1990) Cancer Res., Vol. 50, p. 4308 - 4314

【非特許文献5】Singhal, A., Fohn, M., and Hakomori, S. (1991) Cancer Res., Vol. 51, p. 1406 - 1411

【非特許文献6】Springer, G. F., Taylor, C. R., Howard, D. R., Tegtmeyer, H., Desai, P. R., Murthy, S. M., Felder, B., and Scanlon, E. F. (1985) Cancer, Vol. 55, No. 3, p. 561 - 569

40

【非特許文献7】Springer, G. F. (1984) Science, Vol. 224, p. 1198 - 1206

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明はエピグリカニンに関連するムチン様糖タンパク質及び該タンパク質をコードする核酸の単離について初めて記述する。また、本発明は当該マウスタンパク質のヒト相同体の存在を初めて明らかにする。

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

マウス腹水乳癌細胞株 T A 3 - H a 細胞から得られた本発明のムチン様糖タンパク質は約 2 0 0 0 以上のアミノ酸残基を含んでおり、当該コア・ポリペプチド鎖だけでも約 1 9 0 k D a の分子量を与える。また、更なる該タンパク質のアミノ酸配列の解析からは、それが主に 5 つのドメイン、すなわち、シグナル配列を含む N 末端領域；O - グリコシル化部位を提供するセリン/スレオニンに富み 1 2 乃至 1 5 アミノ酸残基から成るアミノ酸配列が約 1 0 0 回以上繰り返されるタンデムリピート領域；潜在的酵素切断部位含有領域；ヒト相同体との間で高いホモロジーを示す細胞膜貫通領域；及び細胞質内領域から構成されることが判明し、従って、上記タンデムリピート領域に糖鎖が付加したタンパク質全体の最大分子量は約 1 0 0 0 k D a を超えると見積もられる。

10

【0011】

してみれば、本発明のムチン様糖タンパク質に関する上記の特徴は従来技術のそれと有意に異なり、故に両者は一見して異なるタンパク質を示しているが、そうであるにも拘わらず、該タンパク質の T A 3 - H a 細胞における特徴的な発現及び膨大な O - グリコシル化部位の存在から、本発明のムチン様糖タンパク質がエピグリカニンに密接に関連すると結論するのは極めて合理的であるように思われる。つまり、上述の従来技術において、エピグリカニンは約 5 0 万の分子量を有する分子であって、約 1 3 0 0 アミノ酸残基から成り且つそこには 5 0 0 程度の糖鎖が結合していると定義されていたが、それらの研究は必ずしも単離されたエピグリカニンを対象としていなかったこと、或いは単なる電子顕微鏡像の解析に依拠していたことに由来する不確実性を含んでいたために、エピグリカニン分子の物理化学的性状に関して正確でない結論を導いたというのにはありそうなことである。

20

【0012】

しかして、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質は、その最も広義な態様において、以下の一般式 (I) で示されるアミノ酸配列：



[式中、

A は、

M R R R S S L W C W L L L Q I L L L G S G Y A (配列番号： 1) 又は

M K M Q K G N V L L M F G L L L H L E A A (配列番号： 2)

30

から選択される N 末端領域であり、

B は、O - グリコシル化部位を有するタンデムリピート領域のリピート単位であって、以下の配列番号 3 乃至 5 で示され：

X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - X a a₇ - X a a₈ - X a a₉ - X a a₁₀ - X a a₁₁ - X a a₁₂ - X a a₁₃ - X a a₁₄ - X a a₁₅ (配列番号： 3)

但し、上記配列中、

X a a₁ はアラニン、バリン、グルタミン酸、スレオニン、イソロイシン、プロリン、セリン、グリシン及びヒスチジンから成る群から独立に選択され、

X a a₂ はセリン、イソロイシン、リジン、フェニルアラニン及びロイシンから成る群から独立に選択され、

40

X a a₃ はセリン、アルギニン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₄ はスレオニン、セリン、イソロイシン、リジン及びアルギニンから成る群から独立に選択され、

X a a₅ はアラニン、グリシン、スレオニン及びバリンから成る群から独立に選択され、

X a a₆ はセリン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₇ はグリシン、アルギニン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン及びアラニンから成る群から独立に選択されるか不明アミノ酸であり、

X a a₈ はセリン、スレオニン及びチロシンから成る群から独立に選択されるか不明ア

50

ミノ酸であり、

X a a₉はスレオニン、メチオニン、セリン、バリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、リジン及びイソロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₁₀はプロリン、スレオニン、セリン及びロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₁₁はスレオニン、セリン、アスパラギン及びイソロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₁₂はプロリン、ロイシン、スレオニン、トリプトファン、アルギニン、グルタミン及びセリンから成る群から独立に選択され

X a a₁₃はスレオニン、プロリン及びグルタミン酸から成る群から独立に選択されるか又は存在せず、

X a a₁₄はスレオニン及びセリンから成る群から独立に選択されるか又は存在せず、及び

X a a₁₅はスレオニン、アラニン、プロリン及びアスパラギンから成る群から独立に選択されか又は存在しない；

X a a₂₁ - X a a₂₂ - S e r - X a a₂₃ - X a a₂₄ - X a a₂₅ - X a a₂₆ - X a a₂₇ - S e r - T h r - X a a₂₈ - X a a₂₉ - X a a₃₀ - X a a₃₁ - X a a₃₂ (配列番号： 4)

但し、上記配列中、

X a a₂₁はアルギニン、メチオニン及びグリシンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₂はスレオニン及びプロリンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₃はイソロイシン、リジン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₄はアラニン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₅はセリン及びフェニルアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₆はアラニン及びバリンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₇はセリン、フェニルアラニン及びロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₈はスレオニン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₉はプロリン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₃₀はスレオニン及びアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₃₁はセリン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、及び

X a a₃₂はイソロイシン及びセリンから成る群から独立に選択される；又は

X a a₄₁ - X a a₄₂ - X a a₄₃ - X a a₄₄ - X a a₄₅ - X a a₄₆ - X a a₄₇ - X a a₄₈ - X a a₄₉ - X a a₅₀ - X a a₅₁ - X a a₅₂ - X a a₅₃ - X a a₅₄ - X a a₅₅ (配列番号： 5)

但し、上記配列中、少なくとも一個以上のセリン又はスレオニンを含むことを条件として、

X a a₄₁はセリン、フェニルアラニン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₂はセリン、アスパラギン、ヒスチジン及びアルギニンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₃はスレオニン、バリン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₄はスレオニン、バリン、プロリン、アラニン、イソロイシン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₅はセリン及びグルタミン酸から成る群から独立に選択され、

X a a₄₆はセリン、アスパラギン、スレオニン及びアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₇はグリシン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₈はアラニン、イソロイシン、バリン、スレオニン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₉はセリン、グリシン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

$X a a_{50}$ はスレオニン、イソロイシン及びアラニンから成る群から独立に選択され、
 $X a a_{51}$ はアラニン、バリン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、
 $X a a_{52}$ はスレオニンであるか又は存在せず、
 $X a a_{53}$ はアスパラギン、グリシン、イソロイシン及びスレオニンから成る群から独立に選択されるか又は存在せず、
 $X a a_{54}$ はセリンであるか又は存在せず、及び
 $X a a_{55}$ はグルタミン酸、グリシン及びアスパラギン酸から成る群から独立に選択されか又は存在しない、
 n は 20 乃至 150 の整数であり、

C は、

R T S T G S S S S L S A T H T S S S L T V S T G T H T T S N H T G T P V M E
 V K P S G S L K P W E (配列番号：6) 又は

A L T G M H T T S H S A S T A V S E A K P G G S L V P W E (配列番号：7)
 から選択される潜在的酵素切断部位含有領域であり、

D は、

I F L I T L A S V I V V M G L S A G L F I Y V (配列番号：8) 又は

I F L I T L V S V V A A V G L F A G L F F C V (配列番号：9)

から選択される細胞膜貫通領域であり、

E は、

R R Y L S L R N A A D G I F Y N S H P D P G G S A M T P G S P T C S W R R P
 R T F N V V E M T R I (配列番号：10) 又は

R N S L S L R N T F N T A V Y H P H G L N H G L G P G P G G N H G A P H R P
 R W S P N W F W R R P V S S I A M E M S G R N S G P (配列番号：11)

から選択される細胞質内領域である。] 或いはその機能的誘導体を含むものとして定義される。

【0013】

本発明の別の態様では、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質が、マウスに由来するムチン様糖タンパク質に対応して、上記一般式(I)中、Aが配列番号：1であり、Bが配列番号：3及び配列番号：4から成る群から独立に選択され、Cが配列番号：6であり、Dが配列番号：8であり、Eが配列番号：10であり、及びnが100乃至150の整数であるものとして定義される。

【0014】

特に、上記Bは、マウスにおいて見出されるアミノ酸配列、すなわち配列番号：12乃至配列番号：138から独立に選択され得る。

H I S S T T T T S N P S S E (配列番号：12)

T K S I A T D Y E T T P T T T (配列番号：13)

I S S T A S G S T P T L T T T (配列番号：14)

A S S I A S D S K P T L T T T (配列番号：15)

A S S T A S G S M S T P T T P (配列番号：16)

A S S T A S G S T P T T T T T (配列番号：17)

A S S T A S G S T P T P T T T (配列番号：18)

A S S K A S R S V P T T (配列番号：19)

V S S T G S G S T P T P T T T (配列番号：20)

A S S T A S G S T P T L T T T (配列番号：21)

P S S T A S G S T P T P T T P (配列番号：22)

A S S T A S S S S P T P T T P (配列番号：23)

V S S T A S G S T P T P T T T (配列番号：24)

A S S K A S G S V P T T (配列番号：25)

V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号：26)

V S S T V S D S T P T P T T T (配列番号：27)

10

20

30

40

50

A S S T A S G S A P T P T T T (配列番号 : 2 8)
A S S T A S G S M P T L T T N (配列番号 : 2 9)
A S S T A S G S S P T L T T T (配列番号 : 3 0)
A S S S A S G S T P T L T T T (配列番号 : 3 1)
E S S T A S G S T P T W T T T (配列番号 : 3 2)
T S S T A S R S T P T P T T T (配列番号 : 3 3)
A S S T A S G S T P T P T T T (配列番号 : 3 4)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 3 5)
A S R R G S G S T P T L T T T (配列番号 : 3 6)
E S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 3 7)
A S S S G S G S T P T L P T T (配列番号 : 3 8)
E S S T A S G S T P T R T T T (配列番号 : 3 9)
T S S T A S R S T P T P T T T (配列番号 : 4 0)
A S S T A S G S T P T P T T T (配列番号 : 4 1)
V S S T A S G S T P T L T T T (配列番号 : 4 2)
A S R S G S G S T P T L T T T (配列番号 : 4 3)
E S S T A S G S T P T P T T T (配列番号 : 4 4)
A S S T A S G S A P N P T T T (配列番号 : 4 5)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 4 6)
A S S S G S G S T P T L T T T (配列番号 : 4 7)
E S S T A S G S T P T L T T T (配列番号 : 4 8)
A S S S A S G S M P T P T T T (配列番号 : 4 9)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 5 0)
A S S S A S G S M P T P T T T (配列番号 : 5 1)
A S S T A S G S S P T L T T T (配列番号 : 5 2)
A S S S A S G S A P N P T T T (配列番号 : 5 3)
V S S T G S X X T P T P T T T (配列番号 : 5 4)
A S S K A S G S V P T T (配列番号 : 5 5)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 5 6)
V S S T V S D S T P T P T T T (配列番号 : 5 7)
A S S T A S G S A P T P T T T (配列番号 : 5 8)
A S S T A S G S T P T L T T T (配列番号 : 5 9)
A S S S G S G S T P T L P T T (配列番号 : 6 0)
E S S T A S G S T P T R T T T (配列番号 : 6 1)
T S S T A S R S T P T P T T T (配列番号 : 6 2)
A S S T A S G S T P T P T T T (配列番号 : 6 3)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 6 4)
A S R S G S G S T P T L T T T (配列番号 : 6 5)
E S S T A S G S S P T L T T T (配列番号 : 6 6)
A S S S A S G S M P T P T T T (配列番号 : 6 7)
A S S T A S G S S P T L T T T (配列番号 : 6 8)
A S S S A S G S M P T L T T T (配列番号 : 6 9)
A S S S A S G S S P T L T T T (配列番号 : 7 0)
A S S S A S G S M P T P T T T (配列番号 : 7 1)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 7 2)
E S S T A S G S T P T W T T T (配列番号 : 7 3)
T S S T A S R S T P T P T T T (配列番号 : 7 4)
A S S T A S G S T P T P T T T (配列番号 : 7 5)
V S S T G S G S T P T L T T T (配列番号 : 7 6)
A S R S G S G S T P T L T T T (配列番号 : 7 7)

10

20

30

40

50

ESSTASGS IPTLT TA (配列番号: 78)
ASSTASGSTPTPTTT (配列番号: 79)
ASSTASGSMPTPTTT (配列番号: 80)
ASSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 81)
ASSSGSGGSTPTLT TT (配列番号: 82)
ESSTASGS IPTLT SA (配列番号: 83)
ASSSASGSMPTPTTT (配列番号: 84)
VSSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 85)
ASSSASGSMPTPTTT (配列番号: 86)
ASSTASGSSPTLT TT (配列番号: 87)
ASSSASGSA PNPTTT (配列番号: 88)
VSSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 89)
ASSSGSGGSTPTLT PT (配列番号: 90)
ESSTASGSTPTRT TT (配列番号: 91)
TSSTASRSTPTPTTT (配列番号: 92)
ASSTASGSTPTPTTT (配列番号: 93)
VSSTASGSTPTLT TT (配列番号: 94)
ASRSGSGGSTPTLT TT (配列番号: 95)
ESSTASGSTPTPTTT (配列番号: 96)
ASSTASGSA PNPTTT (配列番号: 97)
VSSTASGSTPTLT PT (配列番号: 98)
ASSSGSGGSTPTLT TT (配列番号: 99)
ESSTASGSSPTLT TT (配列番号: 100)
ASSSASGSMPTPTTT (配列番号: 101)
ASSTASGSSPTLT TT (配列番号: 102)
ASSSASGSMPTLT TT (配列番号: 103)
ASSSASGSSPTLT TT (配列番号: 104)
ASSSASGSMPTPTTT (配列番号: 105)
VSSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 106)
ESSTASGSTPTWTTT (配列番号: 107)
TSSTASRSTPTPTTT (配列番号: 108)
ASSTASGSTPTPTTT (配列番号: 109)
VSSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 110)
ASRRGSGGSTPTLT TT (配列番号: 111)
ESSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 112)
ASSSGSGGSTPTLT PT (配列番号: 113)
ESSTASGSTPTRT TT (配列番号: 114)
TSSTASRSTPTPTTT (配列番号: 115)
ASSTASGSTPTPTTT (配列番号: 116)
VSSTASGSTPTLT TT (配列番号: 117)
ASRSGSGGSTPTILT TT (配列番号: 118)
ESSTASGSTPTLT TA (配列番号: 119)
ASSSASGSTPTPTTT (配列番号: 120)
VSSTGSGGSTPTLT TT (配列番号: 121)
ASSSGSGGSTPTLT TT (配列番号: 122)
ESSTASGSTPTQT TT (配列番号: 123)
TSSTASRSTPTPTTT (配列番号: 124)
ASSTASGS IPTPTTT (配列番号: 125)
ASSIASGTTPTLT TT (配列番号: 126)
ESSTASGSSPTPTTA (配列番号: 127)

10

20

30

40

50

S S S S A S D S K P T S T T T (配列番号 : 1 2 8)
 A S S T V S D S T P T P T T N (配列番号 : 1 2 9)
 A S S S A S G S T P T Q T T T (配列番号 : 1 3 0)
 A S R S A S G S V P T L T T I (配列番号 : 1 3 1)
 A F S T A S G S T P T L T T T (配列番号 : 1 3 2)
 A S N S A S S S S P T P T T T (配列番号 : 1 3 3)
 G L S K T S A S S L S L T S T (配列番号 : 1 3 4)
 M T S I T S A S T F T P A S I (配列番号 : 1 3 5)
 R T S K A S A S T S T S A S I (配列番号 : 1 3 6)
 R T S I A F A S T S T P T T S (配列番号 : 1 3 7)
 G P S T A S V S T L N S T S I (配列番号 : 1 3 8)
 (上記配列中、Xは不確定のアミノ酸を示す。)

10

本発明の特定の実施態様は、マウス腹水乳癌細胞株 T A 3 - H a 細胞において同定され

たムチン様糖タンパク質に関し、以下のアミノ酸配列：M R R R S S L W C W L L L Q I
 L L L G S G Y A H I S S T T T S N P S S E T K S I A T D Y E T T P T T T I S S T
 A S G S T P T L T T T A S S I A S D S K P T L T T T A S S T A S G S M S T P T T
 P A S S T A S G S T P T T T T A S S T A S G S T P T P T T T A S S K A S R S V
 P T T V S S T G S G S T P T P T T T A S S T A S G S T P T L T T T P S S T A S G
 S T P T P T T P A S S T A S S S S P T P T T P V S S T A S G S T P T P T T T A S
 S K A S G S V P T T T V S S T G S G S T P T L T T T V S S T V S D S T P T P T T T
 A S S T A S G S A P T P T T T A S S T A S G S M P T L T T N A S S T A S G S S P
 T L T T T A S S S A S G S T P T L T T T E S S T A S G S T P T W T T T T S S T A
 S R S T P T P T T T A S S T A S G S T P T P T T T V S S T G S G S T P T L T T T
 A S R R G S G S T P T L T T T E S S T G S G S T P T L T T T A S S S G S G S T P
 T L P T T E S S T A S G S T P T R T T T T S S T A S R S T P T P T T T A S S T A
 S G S T P T P T T T V S S T A S G S T P T L T T T A S R S G S G S T P T L T T T
 E S S T A S G S T P T P T T T A S S T A S G S A P N P T T T V S S T G S G S T P
 T L T T T A S S S G S G S T P T L T T T E S S T A S G S T P T L T T T A S S S A
 S G S M P T P T T T V S S T G S G S T P T L T T T A S S S A S G S M P T P T T T
 A S S T A S G S S P T L T T T A S S S A S G S A P N P T T T V S S T G S X X T P
 T P T T T A S S K A S G S V P T T V S S T G S G S T P T L T T T V S S T V S D S
 T P T P T T T A S S T A S G S A P T P T T T A S S T A S G S T P T L T T T A S S
 S G S G S T P T L P T T E S S T A S G S T P T R T T T T S S T A S R S T P T P T
 T T A S S T A S G S T P T P T T T V S S T G S G S T P T L T T T A S R S G S G S
 T P T L T T T E S S T A S G S S P T L T T T A S S S A S G S M P T P T T T A S S
 T A S G S S P T L T T T A S S S A S G S M P T L T T T A S S S A S G S S P T L T
 T T A S S S A S G S M P T P T T T V S S T G S G S T P T L T T T E S S T A S G S
 T P T W T T T T S S T A S R S T P T P T T T A S S T A S G S T P T P T T T V S S
 T G S G S T P T L T T T A S R S G S G S T P T L T T T E S S T A S G S I P T L T
 T A A S S T A S G S T P T P T T T A S S T A S G S M P T P T T T A S S T G S G S
 T P T L T T T A S S S G S G S T P T L T T T E S S T A S G S I P T L T S A A S S
 S A S G S M P T P T T T V S S T G S G S T P T L T T T A S S S A S G S M P T P T
 T T A S S T A S G S S P T L T T T A S S S A S G S A P N P T T T V S S T G S G S
 T P T L T T T A S S S G S G S T P T L P T T E S S T A S G S T P T R T T T T S S
 T A S R S T P T P T T T A S S T A S G S T P T P T T T V S S T A S G S T P T L T
 T T A S R S G S G S T P T L T T T E S S T A S G S T P T P T T T A S S T A S G S
 A P N P T T T V S S T A S G S T P T L P T T A S S S G S G S T P T L T T T E S S
 T A S G S S P T L T T T A S S S A S G S M P T P T T T A S S T A S G S S P T L T
 T T A S S S A S G S M P T L T T T A S S S A S G S S P T L T T T A S S S A S G S
 M P T P T T T V S S T G S G S T P T L T T T E S S T A S G S T P T W T T T T S S

20

30

40

50

T A S R S T P T P T T T A S S T A S G S T P T P T T T V S S T G S G S T P T L T
 T T A S R R G S G S T P T L T T T E S S T G S G S T P T L T T T A S S S G S G S
 T P T L P T T E S S T A S G S T P T R T T T T S S T A S R S T P T P T T T A S S
 T A S G S T P T P T T T V S S T A S G S T P T L T T T A S R S G S G S T P I L T
 T T E S S T A S G S T P T L T T A A S S S A S G S T P T P T T T V S S T G S G S
 T P T L T T T A S S S G S G S T P T L T T T E S S T A S G S T P T Q T T T T S S
 T A S R S T P T P T T T A S S T A S G S I P T P T T T A S S I A S G T T P T L T
 T T E S S T A S G S S P T P T T A S S S S A S D S K P T S T T T A S S T V S D S
 T P T P T T N A S S S A S G S T P T Q T T T A S R S A S G S V P T L T T I A F S
 T A S G S T P T L T T T A S N S A S S S S P T P T T T G L S K T S A S S L S L T
 S T M T S I T S A S T F T P A S I R T S K A S A S T S T S A S I R T S I A F A S
 T S T P T T S G P S T A S V S T L N S T S I R T S T G S S S S L S A T H T S S S
 L T V S T G T H T T S N H T G T P V M E V K P S G S L K P W E I F L I T L A S V
 I V V M G L S A G L F I Y V R R Y L S L R N A A D G I F Y N S H P D P G G S A M
 T P G S P T C S W R R P R T F N V V E M T R I (配列番号 : 1 3 9) を有する (上記
 配列中、X は不確定のアミノ酸を示す。) 。

10

【 0 0 1 5 】

本発明は、更に、マウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のヒト相同体に関
 する。発明者等の知る限りにおいて、これまでに、エピグリカニンのヒト相同体の存在は
 示唆されることすらなかった。更に発明者等は、本発明において明らかになったマウス・
 エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の c D N A 配列を元に N C B I B l a s t に
 よってホモロジー検索を行ったが、当該マウス・エピグリカニン関連ムチンの全配列に高
 い相同性を示すヒト由来の E S T や遺伝子が全く存在しないことも明らかとなった。

20

【 0 0 1 6 】

そこで、発明者等は、本発明のマウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のう
 ちで、タンデムリピート領域以外の領域内からの種々のフラグメントに着目したホモロジ
 ー検索を試みた。その結果、驚くべきことに、当該マウス・エピグリカニン関連ムチンの
 細胞膜貫通領域のアミノ酸配列に対してのみ非常に高い相同性 (同一性 4 7 % 、陽性率 5
 5 % : プログラムのデフォルトパラメータ (マトリクス = B l o s u m 6 2 ; ギャップ存
 在コスト = 1 1 、ギャップ拡張コスト = 1) を用いた検索で、インターネットサイト h t
 t p : / / w w w . n c b i . n / m . n i h . g o v / e g i - g i n / B L A S T で
 実装可能な t B L A S T n アルゴリズムによる) を示す「理論上」の分泌タンパク質をコ
 ードする c D N A (約 2 . 5 k b) が検索された。

30

【 0 0 1 7 】

つまり、当該「理論上」の分子は、その実際の発現についてこれまでに全く確認されて
 いなかったが、(i) 当該分子においても、上記のユニークな細胞膜貫通領域の上流に、
 やはりセリン及びスレオニンに富み、故に膨大な数の O - グリコシル化部位を提供する大
 規模なタンデムリピート領域の存在が確認されたこと、(i i) この分子の遺伝子はヒト
 第 6 番目染色体の M H C 領域に存在しており、これは本発明のマウス・エピグリカニン関
 連ムチン様糖タンパク質の位置する領域と対応すること、(i i i) 後に示す実施例によ
 り、この分子が特定の腫瘍組織において特異的に発現していたことなどの事実は、当該分
 子が本発明のマウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のヒト相同体であるとい
 う結論を導くための強力な根拠と思われた。

40

【 0 0 1 8 】

なお、報告された該「理論上」の分泌タンパク質のアミノ酸配列は、本発明で実際に得
 られたものと少なくとも 3 7 アミノ酸残基において一致していなかった。

【 0 0 1 9 】

従って、本発明の別の局面では、ヒト型のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質が
 提供され、該ヒト型エピグリカニン関連ムチンは、上記一般式 (I) において、A が配列
 番号 : 2 であり、B が配列番号 : 5 であり、C が配列番号 : 7 であり、D が配列番号 : 9

50

であり、E が配列番号：11 であり、及び n が 20 乃至 50 の整数であるものとして定義され得る。

【0020】

特に、上記 B は、ヒト相同体において見出され、セリン / スレオニンに富んだ 11 乃至 15 アミノ酸残基から成るアミノ酸配列、すなわち配列番号：140 乃至配列番号：170 から独立に選択され得る。

TNSNETSTTSANTG (配列番号：140)
 SSVISSSGASTATNSG (配列番号：141)
 SSVTSSSGVSTATISG (配列番号：142)
 SSVTSSNGVSI VTNSE (配列番号：143)
 FH TTS SSGI STATNSE (配列番号：144)
 FSTASSSGISIA TNSE (配列番号：145)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：146)
 SSTPSSSGASTATNSD (配列番号：147)
 SSTTSSSGASTATNSD (配列番号：148)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：149)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：150)
 SSTASSSGASTATNSE (配列番号：151)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：152)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：153)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：154)
 SRTTSSNGAGTATNSE (配列番号：155)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：156)
 SSTPSSSGAGTATNSE (配列番号：157)
 SSTTSSSGAGTATNSE (配列番号：158)
 SSTVSSSGISTVTNSE (配列番号：159)
 SSTPSSSGASTATNSE (配列番号：160)
 SSTTSSSGASTATNSD (配列番号：161)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：162)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：163)
 SSTTSSSGASTATNSG (配列番号：164)
 SSTTSSSGTSTATNSE (配列番号：165)
 SSTVSSSGASTATTSE (配列番号：166)
 SSTTSSSGASTATNSE (配列番号：167)
 SSTVSSSGASTATNSE (配列番号：168)
 SSTTSSSGANTATNSG (配列番号：169)
 SSVTSAGSGTA (配列番号：170)

10

20

30

より特定の態様では、当該ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質は以下のアミノ酸配列：MKMQKGNVLLMFGLLLHLEAATNSNETSTTSANTG
 SSVISSSGASTATNSGSSVTSSSGVSTATISGSSVTSSNGVSI
 VTNSEFH TTS SSGI STATNSEFSTASSSGISIA TNSESSSTTS
 SGASTATNSESSSTPSSSGASTATNSDSSSTTSSSGASTATNSD
 SSTTSSSGASTATNSESSSTTSSSGASTATNSESSSTASSSGAST
 ATNSESSSTTSSSGASTATNSESSSTTSSSGASTATNSESSSTTS
 SGASTATNSESSRTTSSNGAGTATNSESSSTTSSSGASTATNSE
 SSTPSSSGAGTATNSESSSTTSSSGAGTATNSESSSTVSSSGIST
 VTNSESSSTPSSSGASTATNSESSSTTSSSGASTATNSDSSSTTS
 SGASTATNSESSSTTSSSGASTATNSESSSTTSSSGASTATNSG
 SSTTSSSGTSTATNSESSSTVSSSGASTATTSESSSTTSSSGAST
 ATNSESSSTVSSSGASTATNSESSSTTSSSGANTATNSGSSVTS

40

50

A G S G T A A L T G M H T T S H S A S T A V S E A K P G G S L V P W E I F L I T
L V S V V A A V G L F A G L F F C V R N S L S L R N T F N T A V Y H P H G L N H
G L G P G P G G N H G A P H R P R W S P N W F W R R P V S S I A M E M S G R N S
G P (配列番号 : 1 7 1) を有し、その推定される最大分子量は 2 6 0 k D a におよぶこ
とが可能であり、また、少なくとも約 5 7 k D a のコア・ポリペプチド鎖を含むことが理
解される。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の側面において、上記エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードす
る核酸 / 該核酸に対して相補的な核酸が提供される。該核酸は上記タンパク質の組換え生
産に利用することができる。或いは該核酸の全部又は一部の配列は上記タンパク質をコード
する遺伝子の発現検出に有利に利用することができる。

10

【 0 0 2 2 】

つまり、当該核酸は、以下の一般式 (I) で示されるアミノ酸配列 :



[式中、

A は、

M R R R S S L W C W L L L Q I L L L G S G Y A (配列番号 : 1) 又は

M K M Q K G N V L L M F G L L L H L E A A (配列番号 : 2)

から選択される N 末端領域であり、

B は、O- グリコシル化部位を有するタンデムリピート領域のリピート単位であって、
以下の配列番号 3 乃至 5 で示され :

20

X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - X a a₇ - X a a₈ - X a a₉ - X a a₁₀ - X a a₁₁ - X a a₁₂ - X a a₁₃ - X a a₁₄ - X a a₁₅

(配列番号 : 3)

但し、上記配列中、

X a a₁ はアラニン、バリン、グルタミン酸、スレオニン、イソロイシン、プロリン、
セリン、グリシン及びヒスチジンから成る群から独立に選択され、

X a a₂ はセリン、イソロイシン、リジン、フェニルアラニン及びロイシンから成る群
から独立に選択され、

X a a₃ はセリン、アルギニン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

30

X a a₄ はスレオニン、セリン、イソロイシン、リジン及びアルギニンから成る群から
独立に選択され、

X a a₅ はアラニン、グリシン、スレオニン及びバリンから成る群から独立に選択され

X a a₆ はセリン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₇ はグリシン、アルギニン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン及びアラニン
から成る群から独立に選択されるか不明アミノ酸であり、

X a a₈ はセリン、スレオニン及びチロシンから成る群から独立に選択されるか不明ア
ミノ酸であり、

X a a₉ はスレオニン、メチオニン、セリン、バリン、アラニン、アスパラギン、グル
タミン酸、リジン及びイソロイシンから成る群から独立に選択され、

40

X a a₁₀ はプロリン、スレオニン、セリン及びロイシンから成る群から独立に選択さ
れ、

X a a₁₁ はスレオニン、セリン、アスパラギン及びイソロイシンから成る群から独立
に選択され、

X a a₁₂ はプロリン、ロイシン、スレオニン、トリプトファン、アルギニン、グルタ
ミン及びセリンから成る群から独立に選択され

X a a₁₃ はスレオニン、プロリン及びグルタミン酸から成る群から独立に選択される
か又は存在せず、

X a a₁₄ はスレオニン及びセリンから成る群から独立に選択されるか又は存在せず、

50

及び

X a a₁₅ はスレオニン、アラニン、プロリン及びアスパラギンから成る群から独立に選択されか又は存在しない；

X a a₂₁ - X a a₂₂ - S e r - X a a₂₃ - X a a₂₄ - X a a₂₅ - X a a₂₆ - X a a₂₇ - S e r - T h r - X a a₂₈ - X a a₂₉ - X a a₃₀ - X a a₃₁ -

X a a₃₂ (配列番号： 4)

但し、上記配列中、

X a a₂₁ はアルギニン、メチオニン及びグリシンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₂ はスレオニン及びプロリンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₃ はイソロイシン、リジン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

10

X a a₂₄ はアラニン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₅ はセリン及びフェニルアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₆ はアラニン及びバリンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₇ はセリン、フェニルアラニン及びロイシンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₈ はスレオニン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₂₉ はプロリン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₃₀ はスレオニン及びアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₃₁ はセリン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、及び

X a a₃₂ はイソロイシン及びセリンから成る群から独立に選択される；又は

20

X a a₄₁ - X a a₄₂ - X a a₄₃ - X a a₄₄ - X a a₄₅ - X a a₄₆ - X a a₄₇ - X a a₄₈ - X a a₄₉ - X a a₅₀ - X a a₅₁ - X a a₅₂ - X a a₅₃ -

X a a₅₄ - X a a₅₅ (配列番号： 5)

但し、上記配列中、少なくとも一個以上のセリン又はスレオニンを含むことを条件として、

X a a₄₁ はセリン、フェニルアラニン及びスレオニンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₂ はセリン、アスパラギン、ヒスチジン及びアルギニンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₃ はスレオニン、バリン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₄ はスレオニン、バリン、プロリン、アラニン、イソロイシン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

30

X a a₄₅ はセリン及びグルタミン酸から成る群から独立に選択され、

X a a₄₆ はセリン、アスパラギン、スレオニン及びアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₇ はグリシン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₈ はアラニン、イソロイシン、バリン、スレオニン及びセリンから成る群から独立に選択され、

X a a₄₉ はセリン、グリシン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

X a a₅₀ はスレオニン、イソロイシン及びアラニンから成る群から独立に選択され、

X a a₅₁ はアラニン、バリン及びアスパラギンから成る群から独立に選択され、

40

X a a₅₂ はスレオニンであるか又は存在せず、

X a a₅₃ はアスパラギン、グリシン、イソロイシン及びスレオニンから成る群から独立に選択されるか又は存在せず、

X a a₅₄ はセリンであるか又は存在せず、及び

X a a₅₅ はグルタミン酸、グリシン及びアスパラギン酸から成る群から独立に選択されか又は存在しない、

n は 2 0 乃至 1 5 0 の整数であり、

C は、

R T S T G S S S S L S A T H T S S S L T V S T G T H T T S N H T G T P V M E
V K P S G S L K P W E (配列番号： 6) 又は

50

A L T G M H T T S H S A S T A V S E A K P G G S L V P W E (配列番号 : 7)
から選択される潜在的酵素切断部位含有領域であり、

D は、

I F L I T L A S V I V V M G L S A G L F I Y V (配列番号 : 8) 又は

I F L I T L V S V V A A V G L F A G L F F C V (配列番号 : 9)

から選択される細胞膜貫通領域であり、

E は、

R R Y L S L R N A A D G I F Y N S H P D P G G S A M T P G S P T C S W R R P
R T F N V V E M T R I (配列番号 : 10) 又は

R N S L S L R N T F N T A V Y H P H G L N H G L G P G P G G N H G A P H R P
R W S P N W F W R R P V S S I A M E M S G R N S G P (配列番号 : 11)

から選択される細胞質内領域である。] 或いはその機能的誘導体をコードするか、該コード化核酸に対して相補的である。

【 0 0 2 3 】

好適な態様としては、マウス由来のムチン様糖タンパク質に対応して、上記一般式 (I) において、A が配列番号 : 1 であり、B が配列番号 : 3 及び配列番号 : 4 から成る群から独立に選択され、C が配列番号 : 6 であり、D が配列番号 : 8 であり、E が配列番号 : 10 であり、及び n が 100 乃至 150 の整数であるムチン様糖タンパク質、又は更にそこにおいて、B が配列番号 : 12 ~ 配列番号 : 138 から成る群から独立に選択されるムチン様糖タンパク質をコードするか、該核酸に対して相補的であるものを挙げることができる。

【 0 0 2 4 】

或いは、ヒト由来のムチン様糖タンパク質に対応して、上記一般式 (I) において、A が配列番号 : 2 であり、B が配列番号 : 5 であり、C が配列番号 : 7 であり、D が配列番号 : 9 であり、E が配列番号 : 11 であり、及び n が 20 乃至 50 の整数であるムチン様糖タンパク質、又は更にそこにおいて、B が配列番号 : 140 ~ 配列番号 : 170 から成る群から独立に選択されるムチン様糖タンパク質をコードするか、該核酸に対して相補的であるものを挙げることができる。

【 0 0 2 5 】

上記核酸に関連するいっそう特定の態様において、該核酸は、配列番号 : 172 (マウス) 又は配列番号 : 174 (ヒト) に対応する。

A G A A C A A G G T G A C A C C C C A G T G C G G A G G A C A C T T A C A T C T
C A G G C A T C T G A C C G C C T C C T T C C C A G G C G C A A A G C C C T T A
G A A G A A C G G A G C T C T T G G G A G C C C A T C T T T A C C T C C T C T T
T C T C A A G A A C T C T C T A G A A C T T G G C C A C A T T T T G G G A T C C
A G G T G T C T T T G C C T G C C A G T C A C A G G G A G G C A G A G G A A G A
T G C G G A G G A G A A G C A G C C T C T G G T G C T G G C T G C T T T T G C A
G A T C C T G C T T T T A G G A A G T G G T T A T G C C C A T A T T T C C T C C
A C C A C A A C T T T C A A A T C C T T C A T C A G A A A C G A A G A G C A T A G
C C A C A G A C T A T G A A A C C A C C C C G A C C A C C A C T A T A T C T A G
C A C T G C C T C A G G A T C T A C G C C C A C C C T G A C C A C C A C T G C A
T C C A G C A T T G C C T C A G A C T C T A A G C C C A C C C T G A C C A C C A
C T G C A T C C A G C A C T G C C T C A G G A T C T A T G T C C A C C C C G A C
C A C C C C T G C A T C C A G C A C T G C C T C A G G C T C T A C A C C C A C A
A C G A C C A C C A C T G C A T C C A G C A C T G C C T C A G G A T C T A C A C
C T A C C C C G A C C A C T A C T G C A T C T A G C A A A G C C T C A A G A T C
T G T G C C C A C C A C T G T A T C C A G C A C T G G C T C A G G C T C T A C A
C C C A C T C C G A C C A C C A C T G C A T C C A G C A C T G C C T C A G G A T
C T A C G C C C A C C C T G A C C A C C A C T C C A T C C A G C A C T G C C T C
A G G A T C T A C A C C T A C C C C G A C C A C C C C T G C A T C C A G T A C T

50

CAGCACTGCGCTCAGGCTCCTCACCCACCCCTGACCACTCACT
GCATCCAGCTCTGCGCTCAGGATCTATGCCCACTGACCA
CACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGGCTCCTCACCCACCCCT
GACCACTCACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGGATCTATGCC
ACCCCGACCACTCACTGTATCCAGCACTGGCTCAGGCTCTA
CCCCCACCTGACCACTCACTGAATCCAGCACTGCGCTCAGG
CTCTACACCTACCTGGACCACTCACTACATCCAGCACTGCC
TCAAGATCTACACCCACCCCTACCACTCACTGCACTCTAGCA
CTGCGCTCAGGATCTACGCCCCACCCCGACCACTGTATC
CAGCACTGGCTCAGGCTCTACACCTACCCCTGACCACTCACT
GCATCCAGGAGTGGCTCAGGCTCTACCCCCACCCCTGACCA
CACTGAATCCAGCACTGCGCTCAGGCTCTATTCTACCCCT
GACCACTCGCTGCACTCCAGCACTGCGCTCAGGCTCTACACCC
ACCCCTACCACTCACTGCACTCTAGCACTGCGCTCAGGATCTA
TGCCCCACCCCACTCACTGCACTCCAGCACTGGATCAGG
CTCTACACCCACTCTGACCACTCACTGCACTCTAGCAGTGGC
TCAGGCTCTACCCCCACCCCTGACCACTCACTGAATCCAGCA
CTGCGCTCAGGCTCTATACCTACCCCTGACCTCCGCTGCACTC
CAGCTCTGCGCTCAGGATCTATGCCCACTCCCGACCACTCACT
GTATCCAGCACTGGCTCAGGCTCTACACCCACCCCTGACCA
CCACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGGATCTATGCCCACTCC
AACCACTCACTGCACTCCAGCACTGCGCTCAGGCTCCTCACCC
ACCCCTGACCACTCACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGGATCTG
CGCCCCAACCCGACCACTCACTGTATCCAGCACTGGCTCAGG
CTCTACACCCACCCCTGACCACTCACTGCACTCCAGCAGTGGC
TCAGGCTCTACCCCCACCCCTGCCCCACCACTGAATCCAGCA
CTGCGCTCAGGCTCTACACCTACCCGGACCACTCACTACATC
CAGCACTGCGCTCAAGATCTACACCCACTCCTACCACTCACT
GCATCTAGCACTGCGCTCAGGATCTACGCCCCACCCCGACCA
CCACTGTATCCAGCACTGCGCTCAGGCTCTACACCTACCCCT
GACCACTCACTGCACTCCAGGAGTGGCTCAGGCTCTACCCCC
ACCCCTGACCACTCACTGAATCCAGCACTGCGCTCAGGCTCTA
CACCCACCCCTACCACTCACTGCACTCTAGCACTGCGCTCAGG
ATCTGCGCCCCAACCCGACCACTCACTGTATCCAGCACTGCC
TCAGGCTCTACCCCCACCCCTGCCCCACCACTGCACTCTAGCA
GTGGCTCAGGCTCTACCCCCACCCCTGACCACTCACTGAATC
CAGCACTGCGCTCAGGCTCCTCACCCACCCCTGACCACTCACT
GCATCCAGCTCTGCGCTCAGGATCTATGCCCACTCCCGACCA
CCACTGCACTCCAGCACTGCGCTCAGGCTCCTCACCCACCCCT
GACCACTCACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGGATCTATGCC
ACCCCTGACCACTCACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGGCTCCT
CACCCACCCCTGACCACTCACTGCACTCCAGCTCTGCGCTCAGG
ATCTATGCCCACTCCCGACCACTCACTGTATCCAGCACTGGC
TCAGGCTCTACCCCCACCCCTGACCACTCACTGAATCCAGCA
CTGCGCTCAGGCTCTACACCTACCTGGACCACTCACTACATC
CAGCACTGCGCTCAAGATCTACACCCACCCCTACCACTCACT
GCATCTAGCACTGCGCTCAGGATCTACGCCCCACCCCGACCA
CCACTGTATCCAGCACTGGCTCAGGCTCTACACCTACCCCT
GACCACTCACTGCACTCCAGGCGTGGCTCAGGCTCTACCCCC
ACCCCTGACCACTCACTGAATCCAGCACTGGCTCAGGCTCTA

10

20

30

40

50

C A C C C A C C C T G A C C A C C A C T G C A T C C A G C A G T G G C T C A G G
C T C T A C C C C C A C C C T G C C C A C C A C T G A A T C C A G C A C T G C C
T C A G G C T C T A C A C C T A C C C G G A C C A C C A C T A C A T C C A G C A
C T G C C T C A A G A T C T A C A C C C A C T C C T A C C A C C A C T G C A T C
T A G C A C T G C C T C A G G A T C T A C G C C C A C C C C G A C C A C C A C T
G T A T C C A G C A C T G C C T C A G G C T C T A C A C C T A C C C T G A C C A
C C A C T G C A T C C A G G A G T G G C T C A G G C T C T A C C C C C A T C C T
G A C C A C C A C T G A A T C C A G C A C T G C C T C A G G C T C T A C A C C T
A C C C T G A C C A C C G C T G C A T C C A G C T C T G C C T C A G G A T C T A
C

10

A C C C A C C C C G A C C A C C A C T G T A T C C A G C A C T G G C T C A G G C
T C T A C A C C C A C C C T G A C C A C C A C T G C A T C C A G C A G T G G C T
C A G G C T C T A C C C C C A C C C T G A C C A C C A C T G A A T C T A G C A C
T G C C T C A G G C T C T A C A C C T A C C C A G A C C A C C A C T A C A T C C
A G C A C T G C C T C A A G A T C T A C A C C C A C T C C T A C C A C C A C T G
C A T C T A G C A C T G C C T C A G G C T C T A T A C C T A C C C C G A C C A C
A A C T G C A T C A A G C A T T G C C T C A G G T A C T A C C C C C A C C C T G
A C C A C C A C T G A A T C C A G C A C T G C C T C A G G C T C C T C A C C C A
C C C C G A C C A C T G C T T C A T C C A G C A G T G C C T C A G A C T C T A A
G C C C A C C T C G A C C A C C A C T G C A T C C A G C A C T G T C T C A G A C
T C T A C A C C C A C C C C G A C C A C C A A T G C A T C C A G C A G T G C C T
C A G G C T C T A C A C C C A C C C A G A C C A C C A C T G C A T C C A G A A G
T G C C T C A G G A T C T G T G C C C A C C C T G A C C A C C A T T G C A T T C
A G C A C T G C C T C A G G C T C T A C A C C T A C C C T G A C C A C C A C T G
C A T C C A A C T C T G C C T C C T C T T C T T C A C C C A C C C C G A C T A C
C A C T G G G C T C A G C A A G A C C T C T G C A T C T T C A C T C A G C T T G
A C C T C C A C T A T G A C C A G C A T A A C C T C T G C C T C T A C A T T C A
C C C C A G C C T C C A T T A G G A C C A G C A A A G C T T C T G C T T C T A C
A T C C A C C T C A G C C T C C A T T A G G A C C A G C A T A G C C T T T G C A
T C T A C A T C T A C C C C G A C C A C C T C T G G A C C T A G C A C A G C C T
C A G T C T C T A C A C T C A A C T C G A C C T C C A T C A G A A C C A G C A C
A G G T T C C A G C T C T A G C C T G A G T G C C A C C C A C A C T T C C T C T
A G C C T G A C A G T T T C C A C T G G A A C A C A C A C T A C C T C C A A C C
A C A C T G G G A C T C C A G T G A T G G A A G T G A A G C C C A G T G G A T C
C C T G A A G C C C T G G G A A A T C T T T C T C A T C A C C C T A G C C T C T
G T T A T C G T G G T C A T G G G A C T C T C T G C T G G G C T A T T T A T T T
A T G T G A G A A G A T A C C T G T C T C T G A G A A A T G C T G C T G A T G G
A A T A T T C T A C A A C T C C C A T C C T G A T C C T G G A G G A T C T G C T
A T G A C T C C A G G G A G C C C T A C C T G C T C C T G G A G G A G A C C A A
G A A C C T T C A A T G T C G T A G A G A T G A C A A G G A T A T A A T T A C T
T T C C A T G A A A C C C A G G A C T T C A T C C T T C T G A G G A G A C C C G
G C C G C T G C T T C T T C T G T A T G C C C C T C T A G G A G T C C C T T T C
C A G C T T T G T T C G G G T C C C T G A C A T C C C T G A C A A A G A T A C A
T G C T T C T C T T C T G T C T T T A C C A G A C A C G C G A A G G A G G A T A
A T G C A T T G T T T G G T C A T T G C A C A A A G A A A T A A A A A C A T C C
A A C A T (配列番号：172)；又は、

20

30

40

G G C T G A C C G T G C T A C A T T G C C T G G A G G A A G C C T A A G G A A C
C C A G G C A T C C A G C T G C C C A C G C C T G A G T C C A A G A T T C T T C
C C A G G A A C A C A A A C G T A G G A G A C C C A C G C T C C T G G A A G C A
C C A G C C T T T A T C T C T T C A C C T T C A A G T C C C C T T T C T C A A G

50

AATCCTCTGTTCCTTTGCCCTCTAAAGTCTTGGTACATCTA
GGACCCAGGCATCTTGCTTTCCAGCCACAAGAGACAGAT
GAAGATGCAGAAAGGAATGTTCTCCTTATGTTTGGTCTA
CTATTGCAATTTAGAAAGCTGCACAATAATCCAAATGAGACTA
GCACCTCTTGCCAACTGGAATCCAGTGATCTCCAGTGG
AGCCAGCACAGCCACCAACTCTGGGTCCAGTGATGACCTCC
AGTGGGGTTCAGCACAGCCACCAATCTCAGGGTCCAGCGTGA
CCTCCAATGGGGTTCAGCATAGTCAACCAACTCTGAGTTCCA
TACAACCTCCAGTGGGATCAGCACAGCCACCAACTCTGAG
TTCAGCACAGCGTCCAGTGGGATCAGCATAGCCACCAACT
CTGAGTCCAGCACAACTCTCAGTGGGGGCCAGCACAGCCAC
CAACTCTGAGTCCAGCACACCTCTCAGTGGGGGCCAGCAC
GCCACCAACTCTGACTCCAGCACAACTCTCAGTGGGGGCTA
GCACAGCCACCAACTCTGACTCCAGCACAACTCTCAGTGG
GGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACAACTCTCC
AGTGGGGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACAG
CCTCCAGTGGGGGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAG
CACAACTCTCAGTGGGGGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAG
TCCAGCACGACCTCCAGTGGGGGCCAGCACAGCCACCAACT
CTGAGTCCAGCACAACTCTCAGTGGGGGCCAGCACAGCCAC
CAACTCTGAGTCCAGAACGACCTCCAATGGGGGCTGGCACA
GCCACCAACTCTGAGTCCAGCACGACCTCCAGTGGGGGCCA
GCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACACCTCTCAGTGG
GGCCGGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACGACCTCTCC
AGTGGGGCCGGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACAG
TGTCCAGTGGGGATCAGCACAGTCAACCAATCTGAGTCCAG
CACACCTCTCCAGTGGGGGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAG
TCCAGTACGACCTCCAGTGGGGGCCAGCACAGCCACCAACT
CTGACTCCAGCACAACTCTCAGTGGGGGCCAGCACAGCCAC
CAACTCTGAGTCCAGCACGACCTCCAGTGGGGGCCAGCAC
GCCACCAACTCTGAGTCCAGCACAACTCTCCAGTGGGGGCCA
GCACAGCCACCAACTCTGGGTCCAGCACGACCTCCAGTGG
GACCAAGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACAGTGTCC
AGTGGGGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAGCACGA
CCTCCAGTGGGGGCCAGCACAGCCACCAACTCTGAGTCCAG
CACAGTGTCCAGTGGGGGCCAGCACTGCCACCAATCTGAG
TCCAGCACAACTCTCAGTGGGGGCCAACACAGCCACCAACT
CTGGGTCCAGTGGTGACCTCTGCAGGCTCTGGAACAGCAGC
TCTGACTGGAATGCACACAACTTCCCATAGTGCATCTACT
GCAGTGAGTGAGGCGAAGCCTGGTGGGTCCCTGGTGCCGT
GGGAATCTTCCCTCATCACCTGGTCTCGGTGTGGCGGC
CGTGGGGCTCTTTGCTGGGCTCTTCTTCTGTGTGAGAAC
AGCCTGTCCCTGAGAAACACCTTTAAACACAGCTGTCTACC
ACCTCTCATGGCCTCAACCATGGCCTTGGTCCAGGCCCTGG
AGGGAATCATGGAGCCCCCACAGGCCCAAGGTGGAGTCTT
AACTGGTTCTGGAGGAGACCAGTATCATCGATAGCCATGG
AGATGAGCGGGAGGAACAGCGGGCCCTGAGCAGCCCCGGA
AGCAAGTGCCGCAATCTTTCAGGAAGGAAGAGACCTGGGCA
CCCAAGACCTGGTTTCTTTTCATTCATCCCAGGAGACCCC
TCCCAGCTTTGTTTGAGATCCTGAAAATCTTGAAGAAGGT

10

20

30

40

50

A T T C C T C A C C T T T C T T G C C T T T A C C A G A C A C T G G A A A G A G
 A A T A C T A T A T T G C T C A T T T A G C T A A G A A A T A A A T A C A T C T
 C A T C T A A C A C A C A C G A C A A A G A G A A G C T G T G C T T G C C C C G
 G G G T G G G T A T C T A G C T C T G A G A T G A A C T C A G T T A T A G G A G
 A A A A C C T C C A T G C T G G A C T C C A T C T G G C A T T C A A A A T C T C
 C A C A G T A A A A T C C A A A G A C C T C (配列番号：174)

しかして、上記核酸を含む発現ベクター、好ましくはプラスミド又はウイルスベクターも本発明の範囲であり、当該ベクターを保有する組換宿主細胞、好ましくは真核宿主細胞も本発明において意図される。

【0026】

更に、本発明は上記エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質に対して特異的な抗体を包含する。特に、ヒト由来のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質に対する抗体が興味深く、好ましくは、当該抗体は上記エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の細胞外ドメインに対して特異的である。そのような抗体は、キットとして、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現を検出するために利用することができる。

【0027】

或いは、ヒト由来のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の細胞質内領域に特異的な抗体もまた、当該タンパク質発現細胞及び組織の免疫染色に好適に利用できることも示された。

【0028】

これに関連する本発明の更なる局面では、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の遺伝子発現を検出する方法が提供される。ここに示されたように、当該遺伝子発現の検出は、腫瘍細胞の存在やその悪性度の診断において有利に利用できる。

【0029】

特定の態様において、当該検出方法は、上記エピグリカニン関連糖タンパク質をコードする核酸/相補的核酸のヌクレオチド配列の全部又は一部、好ましくは前記核酸中の連続した20ヌクレオチドを含む配列、より好ましくは配列番号：176で示される配列をプローブ等として利用するがこれに限定されない。5' - C T T C C C A T A G T G C A T
 C T A C T G C A G T G A G T G A G G C A A A G C C T G G T G G G T C C C T G G T
 G C C G T G G G A A A T C T T C C T C A T C A C C C T G G T C T C G G T T G T G
 G C G G C C G T G G G G C T C T T T G C T G G G C T C T T C T T C T G T G T G A
 G A A A C A G C C T G T C C C T G A G A A A C A C C T T T A A C A C A G C T G T
 C T A C C A C C C T C A T G G C C T C A A C C A T G G C C T T G G T C C A G G C
 C C T G G A G G G A A T C A T G G A G C C C C C C A C A G G C C C A G G T G G A
 G T C C T A A C T G G T T C - 3' (配列番号：176)

そのような核酸の全部又は一部は、特定の腫瘍マーカーとしても有用な上記エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質遺伝子の発現を検出する方法に用いるためのキットに含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

上記のとおり、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質は、一般式：A - B_n - C - D - E (I)で示される共通配列により特徴付けられる。ここにおいて、Aはシグナル配列を含むN末端領域；B_nはO-グリコシル化部位を提供するセリン/スレオニンに富み約11乃至約15アミノ酸残基から成るアミノ酸配列(B)が繰り返される(n = 20 ~ 150)タンデムリピート領域；Cは潜在的酵素切断部位含有領域；Dはマウス-ヒト間で高い相同性を示す細胞膜貫通領域；及びEは細胞質内領域を示す。

【0031】

好ましくは、Aは配列番号：1(マウス型)又は配列番号：2(ヒト型)から選択され、Cは配列番号：6(マウス型)又は配列番号：7(ヒト型)から選択され、Dは配列番号：8(マウス型)又は配列番号：9(ヒト型)から選択され、Eは配列番号：10(マ

10

20

30

40

50

ウス型)又は配列番号: 11(ヒト型)から選択され得るが、当該各領域の特定の機能とエピグリカニン様糖タンパク質に要求されるであろう構造的な特徴に照らして、上記の何れの組み合わせも可能であることを当業者は容易に理解するであろう。

【0032】

ここで、上記Bはタンデムリピート領域(B_n)内のリピート単位に相当するが、それについては多数のO-グリコシル化部位を提供し且つ特定の間隔で繰り返されるという構造的特徴を満たささえすればよいこともまた当業者は理解するであろう。従って、該リピート単位は、セリン又はスレオニンをその配列中に有し且つ少なくとも約10以上、好ましくは約11乃至15のアミノ酸残基を含むという最低限の条件により規定され得、いっ

10

そう特定のには配列番号: 3乃至配列番号: 5により定義され得る。より好ましくは配列番号: 12~配列番号: 138(マウス型)或いは配列番号: 140~配列番号: 170(ヒト型)から選択される。

【0033】

しかしながら、ここで注目すべき点は、当該リピート単位の機能的特徴及びタンデムリピート領域全体としての生化学的作用に鑑みて、該リピート単位の前記領域内での構成及び繰り返しパターン自体を必ずしも本発明の天然型エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質と一致させなくてよく、例えば特定のリピート単位を優先して使用したり、特定のリピート単位或いはリピート単位群どうしを入れ替えたり、特定のリピート単位を他のリピート単位で完全に置換したり、或いは特定のリピート単位を削除したりすることもできる

20

ということである。従って本発明のムチン様糖タンパク質においてはそのようなリピート単位の変更、入れ替え、置換、或いは削除等を含む配列も含まれる。また、当該リピート単位の繰り返し数(n)は約20乃至約150とすることができ、好ましくは約100乃至約150(マウス型)であるか約20乃至約50(ヒト型)であり、いっそう好ましくは約120乃至約130(マウス型)であるか約25乃至約35(ヒト型)である。

【0034】

更に本発明は上記のムチン様糖タンパク質の機能的誘導体も包含する。ここで、当該機能的誘導体とは、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の生物活性に実質的に類似の生物活性(機能的又は構造的)を有する化合物である。すなわち、「機能性誘導体」という用語は、上記エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のアミノ酸配列から誘導された配列を有する任意のフラグメント、変異体、アナログ及び同族体、又は化学的誘導体を含むものとする。「フラグメント」という用語はエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の任意のポリペプチドサブセットを指すものとする。「変異体」という用語は、完全なエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質分子又はそのフラグメントに構造的、機能的及び実質的に類似の分子を指すものとする。両方の分子が実質的に類似の構造を有するか、両方の分子が類似の生物活性を有するならば、その分子は実質的に類似である。そのため、その2つの分子が実質的に類似の活性を有するならば、それらの分子の一方の構造が他方に無くとも、又は2つのアミノ酸配列が完全に同一でなくとも、それらの分子は変異体と考えられる。例えば、ロイシンをバリンに、リシンをアルギニンに、グルタミンをアスパラギンに置換してもポリペプチドの機能を変化させないこともありうる。「アナログ」という用語は、完全なエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質分子又はそのフラグメントに機能的に実質的に類似の分子を指す。

30

40

【0035】

好ましい機能的誘導体の例は、本発明の天然型エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のアミノ酸配列に対して70%以上の相同性、より好ましくは80%、特に好ましくは90%以上のアミノ酸配列相同性を示すものである。なお、ここでいうアミノ酸配列の相同性は、プログラムのデフォルトパラメータ(マトリクス=Blosum62;ギャップ存在コスト=11、ギャップ拡張コスト=1)を用いた検索で、インターネットサイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>で実装可能なBLASTPアルゴリズムによって示される陽性のパーセンテージとして定義できる。また、天然型エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のアミノ酸配列におい

50

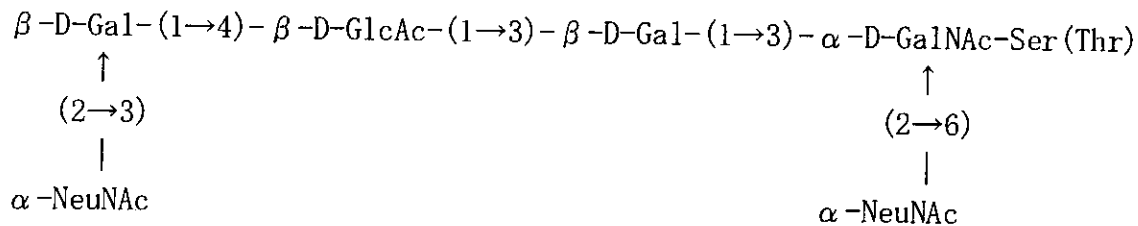
て、1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、挿入、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質も好適である。

【0036】

本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のタンデムリピート領域には、引用することによってここに援用するC o d i n g t o n , J . F . , L i n s l e y , K . B . , J e a n l o z , R . W . , I r i m u r a , T . , a n d O s a w a , T . (1 9 7 5) C a r b o h y d r . R e s . , V o l . 4 0 , p . 1 7 1 - 1 8 2において同定されたような、2 - アセトアミド - 2 - デオキシガラクトース残基とセリン又はスレオニン残基との間のO - グリコシル結合により膨大な数の糖鎖が付加し得る。当該糖鎖の構造は、引用することによってここに援用するV a n d e n E i j n d e n , D . H . , E v a n s , N . A . , C o d i n g t o n , J . F . , R e i n h o l d , V . , S i l b e r , C . , a n d J e a n l o z , R . W . (1 9 7 9) J . B i o l . C h e m . , V o l . 2 5 4 , N o . 2 3 , p . 1 2 1 5 3 - 1 2 1 5 9において詳細に述べられている。したがって、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質には、 α - D - G a l N A c - S e r (T h r)、 β - D - G a l - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - G a l N A c - S e r (T h r)、(2 G a l , 1 G l c N A c) - \alpha - D - G a l N A c - S e r (T h r)、 α - N e u N A c - (2 \rightarrow 3) - \beta - D - G a l - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - G a l N A c - S e r (T h r)、及び

【0037】

【化1】



を含む糖鎖構造が付与され得る。

【0038】

これらの情報とタンデムリピート領域のアミノ酸配列の解析から、マウス型エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質での糖鎖分子量は最大で約830kDaと見積もられ、コア・ポリペプチドと合計した該エピグリカニン関連ムチン分子全体の分子量は最大で約1020kDaと概算される。また、ヒト型エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質での解析は、付加する糖鎖の最大分子量として約200kDaを与え、それ故分子全体で約260kDaの最大値を与えるとの推定を導く。しかしながら、実際の糖鎖の結合量等は個々の細胞の状態やその培養条件等により影響を受けることが知られているので、分離された本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のゲル電気泳動解析が上記最大分子量付近からより低分子側のスミアを与え得る。そのような糖鎖組成や結合量が相違するタンパク質も本発明の範囲である。

【0039】

本発明は、エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードする核酸又は該核酸に相補的な核酸を含む。特に好ましい核酸は、配列番号：172又は配列番号：174で示される配列を包含する。ここで「核酸」の用語は、cDNA、ゲノムDNA及び合成（たとえば化学合成又は修飾）DNAやRNAを意図する。また、場合によっては、当該核酸がホースラデッシュペルオキシダーゼ等の酵素や放射性同位体、Cy3やCy5等の蛍光物質、化学発光物質等により標識されていてもよい。更に本発明の核酸分子は、ホスホロチオエート又はメチルホスホネート等の安定なDNA誘導體、2'-O-アルキルRNA等の安定なRNA誘導體、或いは他のエピグリカニン関連ムチンヌクレオチド類似物であり得、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し得る。

【0040】

特定のアミノ酸をコードする種々のコドンには余分のコドン (redundancy) が存在することが知られている。そのため本発明は同一のアミノ酸に最終的に翻訳されることになる代替コドンを含むDNA配列に関する。つまり、遺伝子コードは縮重しているので、ある特定のアミノ酸をコードするのに複数のコドンを使用でき、そのためアミノ酸配列は任意の1セットの類似のDNAオリゴヌクレオチドでコードされ得る。そのセットの唯一のメンバーだけが天然型エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質配列に同一であるが、ミスマッチのあるDNAオリゴヌクレオチドでさえ適切な緊縮条件下 (例えば、3 × SSC、68 でハイブリダイズし、2 × SSC、0.1 % SDS 及び68 で洗浄) で天然型配列にハイブリダイズでき、天然型配列をコードするDNAを同定、単離でき、従ってそのようなオリゴヌクレオチドも本発明の範囲である。

10

【0041】

本発明のDNAをDNAライブラリーから得る例としては、適当なゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションによるスクリーニング法や、抗体を用いたイムノスクリーニング法等でスクリーニングし、目的のDNAを有するクローンを増殖させ、そこから制限酵素等を用いて切り出す方法がある。ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングは、配列番号172又は配列番号：174に記載の塩基配列若しくはその一部を有するDNAを³²P等でラベルしてプローブとし、任意のcDNAライブラリーに対して、公知の方法、例えば、Maniatis T.、Molecular Cloning, a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)に従って行うことができる。イムノスクリーニング法で用いる抗体は、後述する本発明の抗体を使用することができる。本発明のDNAはまた、ゲノムDNAライブラリー若しくはcDNAライブラリーを鋳型とするPCRによっても得ることができる。PCRは、配列番号：172又は配列番号：174に記載の塩基配列をもとに、センスプライマー、アンチセンスプライマーを作成し、任意のDNAライブラリーに対し、公知の方法、例えば、Michael A. I. 等、PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications、Academic Press (1990)等を行って、本発明のDNAを得ることもできる。上記各種方法で使用するDNAライブラリーは、本発明のDNAを有するDNAライブラリーを選択して使用する。当該DNAライブラリーは、本発明のDNAを有するライブラリーであればいかなるものも使用可能であり、市販のDNAライブラリーを使用したり、本発明のDNAを有する細胞からcDNAライブラリーを作成するのに適した細胞を選び公知の方法、例えばJ. Sambrook 等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed.、Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)に従って、cDNAライブラリーを作製し、利用することができる。

20

30

【0042】

また、本明細書に開示された配列を基にホスホアミダイト法などの化学合成的手法により本発明のDNAを調製することも可能である。

40

【0043】

本発明のそのような核酸を含むベクターも本発明の範囲内に含まれる。例えば、本明細書に記載された方法で得られたクローン化エピグリカニン関連ムチンDNAは、調節配列、すなわち適切なプロモーターと他の適切な転写制御要素を含む発現ベクターへの分子クローニングにより組換え的に発現させることができ、原核宿主細胞又は真核宿主細胞に移入されて組換えエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質を産生できる。このような操作の技術はJ. Sambrook 等 (前掲) に十分に記載され、当業界で公知である。

【0044】

つまり、発現ベクターは、適切な宿主での遺伝子のクローン化コピーの転写と得られたmRNAの翻訳に必要なDNA配列を含み、このようなベクターを使用して、細菌、藍藻

50

類、植物細胞、昆虫細胞、菌類細胞、動物細胞等の種々の宿主で真核遺伝子を発現させることができる。特別に設計されたベクターは、宿主間、例えば細菌 - 酵母、細菌 - 動物細胞、細菌 - 真菌細胞、又は細菌 - 無脊椎動物細胞間でDNAのシャトリングをすることができる。

【0045】

適切に構築された発現ベクターは、宿主細胞での自律複製のための複製起点、選択マーカー、限られた数の有用な制限酵素部位、高コピー数のための可能要素、活性なプロモーターを含むべきである。プロモーターは、構造的プロモーターであるか調節プロモーターであるかに拘わらず、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ、RNA合成を開始させるDNA配列と定義される。強いプロモーターとはmRNAを高頻度で開始させるプロモーターである。また、発現ベクター中の他の調節配列としては、転写エンハンサ及びターミネータ、並びに転写抑制因子の結合、アテニエーション又はアンチアテニエーション等の既知の機構によってタンパク質の発現を調節するような他の配列が含まれる。SV40又はアデノウイルスの初期及び後期プロモーター、lac系、trp系、TAC又はTRC系、λファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、解糖系酵素（例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼ）に対するプロモーター、Pho5プロモーター、酵母α接合系プロモーター等が、その宿主細胞の性質等に応じて利用可能である。なお、発現ベクターにはクローニングベクター、改変クローニングベクター、特別に設計されたプラスミド又はウイルスがあるが、それらに限定されない。

【0046】

種々の哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物宿主細胞で本発明のエピグリカニン関連ムチンDNAを発現させることができる。また、種々の細菌の発現ベクターを使用して細菌宿主細胞でエピグリカニン関連ムチンDNAを発現させることができる。同じく、種々の菌類宿主細胞発現ベクターを使用して菌類細胞でエピグリカニン関連ムチンDNAを発現させることができ、更に、種々の昆虫細胞発現ベクターを使用して昆虫宿主細胞でエピグリカニン関連ムチンDNAを発現させることができる。発現のための様々な宿主・ベクター系が知られており、例えば、細菌宿主に対してはコリシンE1型複製開始機構を有するpBR322やpUC系ベクター、M13等のλファージ派生体、酵母細胞においては2μプラスミド、真核宿主にはSV40、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス及びサイトメガロウイルスから得られる発現制御配列からなるベクター、昆虫においてはpVL941等があげられる。

【0047】

宿主細胞としては大腸菌、シュードモナス属及びバチルス属細菌、Saccharomyces属やPichia属酵母、SF9等の昆虫細胞、CHO、COS7等の動物細胞があげられる。特に好ましい宿主は真核細胞由来、より好ましくは哺乳動物由来宿主細胞である。ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム沈澱法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いる方法等の公知方法（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年3月20日発行、羊土社、参照）があるが、いずれの方法を用いても構わない。

【0048】

また、本発明の蛋白質を他のタンパク質やタグ、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインA、ヘキサヒスチジンタグ、FLAGタグ等との融合タンパク質として発現させることも可能である。発現させた融合型は、適当なプロテアーゼ、例えばトロンピン等を用いて切り出すことが可能であり、ときとしてタンパク質の調製をより有利に行うことが可能となる。

【0049】

宿主細胞でのエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質或いはその融合タンパク質の発現の後、該タンパク質を回収して該タンパク質を精製型で得ることができる。幾つかの精製方法が利用でき、例えば、塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマ

トグラフィー、ヒドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーの種々の組合せ、又は個々の適用により、細胞溶解液及び細胞抽出液から、組換えエピグリカニン関連ムチン様糖タンパクを精製できる。

【0050】

更に、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質に特異的なポリクローナル又はモノクローナル抗体で製造した免疫親和性カラムを使用して、組換えエピグリカニン関連ムチン様糖タンパクを他の細胞タンパク質から分離できる。

【0051】

しかして、本発明はエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質に特異的な抗体も意図する。そのような抗体の製造は当業者に周知のいかなる方法に従ってもよく、例えば、まずアジュバントを含む免疫原、つまり本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質又はその部分ペプチドを免疫動物に皮下投与し、それを適当な間隔（例えば1週間）で所定の回数（例えば5回）繰り返して最終免疫後に全血を採集し、これを分離することで抗血清を得る。そのような方法は、例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.4章、John Wiley & Sons, Inc., New York等に記載されている。次いで、前記抗血清からのポリクローナル抗体の精製は、動物の免疫に用いたエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質又はその部分ペプチドをクロマトグラフィー用の樹脂、例えば、CNBr活性化セファロースやHiTrap NHS-activated（ともにAmersham Pharmacia社製）に共有結合で固相化し、該固相化樹脂に上記抗血清を供して当該抗血清中の抗体を特異的に樹脂上に吸着させ、ついで、該樹脂上に吸着した抗体を適切な緩衝液やカオトロピックイオン等を用いて溶出させて回収することでも達成できるが、これに限定されない。

【0052】

好適な免疫原は、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の膜貫通領域乃至細胞外ドメインに関連するエピトープを含有する部分ペプチドから構成し得、その場合、生成する抗体は本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の細胞外ドメインに対して特異的である。当該部分ペプチドの非限定的な例示として、マウスタンパク質のタンデムリピート領域内のSSSTPTPTTTASST（配列番号：177）、或いは膜貫通領域のすぐ外側に位置するNHTGTPVMEVKPSGS（配列番号：178）内に存在するエピトープを含むフラグメントを挙げることができるが、これに限定されない。

【0053】

また、本発明の抗体をモノクローナル抗体として得る場合は、当業者に周知の手法を用いて、上記のような本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質或いはその部分ペプチドで免疫した実験動物、好ましくはマウス・ラット・ハムスター等のげっ歯類動物の脾細胞とミエローマ細胞株等の細胞融合用のペアレントセルを融合させ、得られたハイブリドーマの中から好適なものを選択してクローン化し、次いで、その融合細胞を生体外又は生体内で培養し、この培養混合物より特異性の高いモノクローナル抗体を採取する。

【0054】

また、本発明の抗体には上記の抗体を酵素消化処理して得られるような当該抗体の抗原結合性フラグメントも含まれる。当該フラグメントの例には、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(v)フラグメント、H鎖モノマー又はダイマー、L鎖モノマー又はダイマー、1個のH鎖及び1個のL鎖からなるダイマー等が含まれる。該フラグメントは、例えばペプシンやパパイン等のプロテアーゼにより完全な抗体を消化するか、消化後、必要に応じて還元剤で処理することにより得ることができる。H鎖及びL鎖モノマーは、完全な抗体をジチオスレイトール等の還元剤で処理した後、精製した鎖状体を分離することにより得ることもできる。

【0055】

上記抗体は、検査対象者から採取した生物学的試料、例えば細胞若しくは組織又は血液等の体液中のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の検出にも有利に利用できる。すなわち、本明細書に示されるように、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質

は甲状腺腫瘍細胞や精巣腫瘍細胞において特異的に発現することが確認され、しかして、限定的ではないが、これらの腫瘍マーカーとして有用である。従って、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の存在は、それらの臓器における腫瘍の診断指標となり得る。

【0056】

当該検出のための代表的な手法の1つであるサンドウィッチアッセイを例にとれば、まず標識化された上記抗体が用意される。例えば、抗体を放射性物質、金コロイド等の着色粒子、蛍光又は化学発光標識、或いは酵素（ELISA用）で標識することができる。抗体の標識の方法としては当業者にとって周知のいかなる方法も採用することができ、例えば、J. Biochem. vol. 11、395～399頁（1979）、J. Biochem. vol. 14、41～57頁（1982）、Immunofluorescence and Related Techniques、Elsevier/North Holland Biomedical Press、215～225頁（1978）に記載の方法を利用することができる。また、サンドウィッチアッセイにおいては、上記の抗体が固体支持体に固相化されることが好ましく、固相化は、例えば、炭酸緩衝液（pH 8.6前後）に抗体を溶解し、該溶液をマイクロプレートのウェルに添加して所定時間インキュベートすることで達成できる。要すれば、上記の抗体の一方がウェル底面等の固相支持体のコーティングに用いられてキャプチャー側抗体を提供し、もう一方の抗体が放射性物質や着色粒子又は酵素で標識されて検出側抗体を提供する。キャプチャー側抗体を有するウェル内に検査対象者からの生物学的試料が添加され所定時間インキュベートされた後、該試料がウェルから取り除かれる。好適な緩衝液等によりウェル内を十分に洗浄後、検出側の抗体がウェルに添加される。所定のインキュベーションの後、ウェル内を洗浄し、キャプチャー側抗体 - 測定対象物 - 検出側抗体複合体の生成を検出する。検出は、検出側抗体に標識された標識物質の性質に依存し、放射性標識であれば放射線量が、着色粒子標識であれば発色量や吸光度が、また酵素標識（ELISA法）であれば、更に適当な基質をウェルに添加し、所定のインキュベーション後の吸光度が検出される。なお、ELISA法の例において、用いる酵素には特に制限がなく、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性フォスファターゼ等の酵素が有利に使用される。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する場合は、当該酵素の基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンジン等が利用可能である。アルカリ性フォスファターゼを使用する場合は、基質としてp-ニトロフェニル燐酸があげられる。

【0057】

検査対象者から採取した生物学的試料中のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現検出、特に腫瘍マーカーとしての当該タンパク質の発現検出に好適な別の方法では、当該試料中のmRNAの存在及び量を測定する。

【0058】

すなわち、当該検出法は、典型的にはノザンプロットティング法に対応し、まず、本発明の核酸、好ましくは配列番号:172又は配列番号:174で示される核酸の全部又は一部を基にしたプローブを準備し、当該プローブと試料からのRNAを緊縮条件下でハイブリダイズさせ、及び形成されたプローブ-RNA複合体を検出することを含む。他の典型例は、ハイブリダイズに先立って目的RNAを逆転写後にPCR増幅（RT-PCR）することを含み、或いはNASBAに代表される転写ベースの増幅を利用することを含むが、その場合は増幅産物をサザンプロットティング法に準じて検出してよい。また、RT-PCRに関して言えば、いわゆる競合RT-PCRも利用可能である。

【0059】

更に、そのような増幅の目的のためにも本発明の核酸、好適には配列番号:172又は配列番号:174で示される核酸の全部又は一部或いはそれらの相補鎖の配列に基づいて増幅用プライマーを設計し得、そのような設計は当業者において容易であろう。従って、好ましいプローブ及びプライマーは配列番号:172又は配列番号:174で示される核酸配列の連続した10個以上、より好ましくは15個以上、いっそう好ましくは20個以

上の連続したヌクレオチドを含む。いっそう好ましくは、当該プライマーが本発明のユニークな膜貫通領域を増幅し得、またプローブが当該領域を認識し得る。そのようなプローブの非限定的な例としては：CTTCCCATAGTGCACTCTACTGCAGTGA
GTGAGGCAAGCCCTGGTGGGTCCCTGGTGGCGTGGGAAT
CTTCCCTCATCACCCCTGGTCTCGGTGTGTGGCGGCCGTGGGG
CTCTTTTGCTGGGCTCTTCTTCTGTGTGAGAAACAGCCTGT
CCCTGAGAAACACCTTTAACACAGCTGTCTACCAACCTCA
TGGCCTCAACCATGGCCTTGGTCCAGGCCCTGGAGGGAAT
CATGGAGCCCCCAGGGCCAGGTGGAGTCCCTAACTGGT
TC(配列番号：176)を挙げることができる。

10

【0060】

本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質発現検出のためのキットの使用は、測定者が検査を実施する際に好都合である。当該キットには、上記配列番号：172又は配列番号：174で示される核酸の全部又は一部或いはそれらの相補鎖の配列に基づいて設計されたプローブやプライマーが含まれ得る。キットには、その他、RNAseH阻害剤や、逆転写酵素、TaqDNAポリメラーゼ等が含まれてよく、そのようなキットの構成や作製方法は当業者によく知られている。

【0061】

更に説明せずとも、これまでの説明を与えられた当業者は、本発明を十分に活用し得る。以下、説明のみの目的で実施例を与える。なお、本明細書において、特にことわりのない限り、アミノ酸配列はN末端からC末端方向に、ヌクレオチド配列は5'末端から3'末端方向に向けて記載される。

20

【実施例1】

【0062】

実施例1：マウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の同定

1-1. レクチンによる新規ムチン様糖タンパク質の存在確認

TA3-Ha細胞及びTA3-St細胞をA/Jマウス(6週齢、雌;SLC社より購入し、東京大学薬学部動物施設SPF条件下で飼育。実験には購入後1週間予備飼育したマウスを用いた。)の腹腔内或いはシャーレで培養した。なお、TA3-Ha細胞及びTA3-St細胞はBergen大学Coddington博士より御供与頂き、Myco-plasma Plus(商標)PCR Primer Setによりマイコプラズマ感染のないことを確認して使用した。具体的に、TA3-Ha細胞及びTA3-St細胞は、D/F-10% FCS培地で、37℃、5% CO₂存在下で培養した。TA3-Ha細胞は3~4日おきに回収して、新たな培地に懸濁して継代した。TA3-St細胞は3~4日おきにPBSにて洗浄後、Trp-EDTA溶液(0.05% Trypsin/0.02% EDTA-PBS)を加えてはがし、37℃、5分間インキュベートし、培養シャーレからはがし継代した。また、実験によっては、TA3-Ha細胞は、約2×10⁶個をHANKS'液に懸濁してA/Jマウスに腹腔内投与し、その1週間後に腹腔から細胞を回収した。2mlの0.15M PBSに懸濁後、6mlのMilliQ水を加え、約20秒サスペンドしすぐに2mlの3.5M NaClを加えた。この操作により赤血球を除き実験に用いた。

30

40

【0063】

次いで、このように培養した細胞に、新規ムチン様糖タンパク質が発現しているかどうかを確認した。すなわち、TA3-Ha細胞にはT抗原、Tn抗原が豊富であることが報告されていたので(例えば、非特許文献7:Springer, G.F.(1984) Science, Vol. 224, p. 1198-1206)、それぞれの糖鎖を認識するレクチンである、biotin-VVA(T抗原を認識)、biotin-PNA(Tn抗原を認識)を用いて該細胞の染色を行った。なお、測定においては、細胞0.5~1×10⁶個をFCM bufferにて洗浄後、そこにFCM bufferで希釈したbiotin-PNA(1/100:VECTOR)或いはbiotin-VVA(1/2

50

00:VECTOR)を100 μ l加え、氷冷下30分間反応させた。次いで、FCM bufferにて細胞を洗浄後、FCM bufferで100倍に希釈したFITC-streptavidin(ZYMED社製)を100 μ l加え、氷冷下30分間反応させた。更に細胞をFCM bufferにて洗浄後、再度FCM bufferに懸濁し、ナイロンメッシュを通した後、フローサイトメーターにて蛍光強度を測定した。図1に示されたように、Ha細胞にはVVAもPNAも高い結合が見られ、T抗原、Tn抗原が多数付加していることが確認できた。一方、St細胞ではどちらのレクチンの結合も見られなかった。これらのことから、Ha細胞には糖鎖が多数結合するムチンが発現しており、逆にSt細胞にはそのような分子が発現していないことが示唆された。

【0064】

10

引き続き、ウェスタンブロッティング法を用い、T抗原或いはTn抗原が付加しているタンパク質の分子量を見積もった。詳細には、Ha細胞及びSt細胞を回収し、PBSで1回洗浄後、更にdesalting buffer(Sucrose(和光純薬) 42.79g、1M Tris-HCl pH7.2 5ml、50mM CaCl₂(和光純薬) 500 μ l、0.1M PMSF(イソプロピルアルコール中) 500 μ lをMilliQ水 500ml中に含む)で2回洗浄した。0.5% NP-40(SIGMA社製)/desalting buffer中を加え、よく攪拌し4で1時間以上可溶化し、15,000rpmにて4、5分遠心して上清を細胞抽出液とした。なお、抽出液のタンパク濃度は、BCA蛋白定量試薬(Pierce社製)で測定した。

【0065】

20

得られた細胞抽出液を2-ME存在下SDS変性4%ポリアクリルアミド電気泳動してPVDF膜(Immunobilon(商標);Millipore社製)にセミドライブロッティングした。その後、2% BSA(PBS中)で該ブロッティング後の膜を一晚ブロッティングをし、0.1% Tween20及び2% BSA(PBS中)で2,000倍希釈したbiotin-PNA、biotin-VVAと2時間反応させた。反応後、PVDF膜を0.1% Tween20(PBS中)で4回洗浄後、0.1% Tween20及び2% BSA(PBS中)で5,000倍希釈したHRP-streptavidin(ZYMED社製)と1時間反応させた。更に該膜を0.1% Tween20(PBS中)で4回洗浄後、ECL Plus(商標)Western Blotting Detection kit(Amersham Bioscience社製)により発色させ、Hyper film ECL(Amersham Bioscience社製)に感光した。

30

【0066】

Ha細胞では、300kDa超の部分がPNA及びVVA(データは示さず。)によってスミアに染色された。一方でSt細胞に関しては、高分子量の部分は全く染色されなかった。これらのことから、Ha細胞にはT抗原或いはTn抗原が付加している高分子量のタンパク質が発現していることが示唆され、それはムチンであると考えられた。

【0067】

1-2. 各マウスムチンの発現確認

上記の実験により、TA3-Ha細胞にはTA3-St細胞にないムチンが発現していることが予想されたため、このムチンが新規であるかどうかを、これまでにクローニングされた各種マウスムチンのRT-PCRを行うことにより確認した。

40

【0068】

具体的に、TA3-Ha細胞及びTA3-St細胞から、ULTRASPEC RNA(商品名、BIOTECX社製)を用いてtotal RNAを抽出し、クロロフォルムでフェノールを除いた後、イソプロパノールで沈殿させ、その後MilliQ水に溶解して吸光度260nm/280nmを測定してRNA量及び純度を見積もった。次に、抽出したtotal RNAの1 μ gを鋳型とし、通常の方法により一本鎖cDNAを作製した後、各RT産物のPCRを行った。なお、この実験では、あらかじめ、内部コントロールとして β -アクチンのPCRによって見られたバンドの濃さがHa細胞とSt細胞の間

50

で同じであることを確認し、また各マウスムチンについて以下のプライマー及び条件を適用した。

【0069】

マウスβ-アクチン

センス：5' - G C T C C T C G T T G C C G G T C C A C A - 3' (配列番号：179)

アンチセンス：5' - T A G G A G C C A G A G C A G T A A T C T C C T - 3' (配列番号：180)

マウスMuc 1

センス：5' - A G G C T C C G T G G T G G T A G A A T - 3' (配列番号：181)

アンチセンス：5' - G G C A T G A A C A G A A T A C C A G A - 3' (配列番号：182)

マウスMuc 2

センス：5' - C A A T G A C A A G G T G T C C T G C C - 3' (配列番号：183)

アンチセンス：5' - G T G C T C T C C A A A C T C T C T G G - 3' (配列番号：184)

マウスMuc 3

センス：5' - C C G A T G T C A C C A C T T C T G C T G - 3' (配列番号：185)

アンチセンス：5' - G C A G A G C A A G G C G T G A T A C A G - 3' (配列番号：186)

マウスMuc 4

センス：5' - T G A T G G A A C A A C C A C C T C A C - 3' (配列番号：187)

アンチセンス：5' - G G A T G C A G G T G A G G T A T T C - 3' (配列番号：188)

マウスMuc 5 AC

センス：5' - C C A G C A C C A C C T A T A C A A C C - 3' (配列番号：189)

アンチセンス：5' - G G T G A C A G A G T C T C T C T C C - 3' (配列番号：190)

マウスMuc 9

センス：5' - C A T C C C A A G C A T C A T C C A T A C - 3' (配列番号：191)

アンチセンス：5' - G A T T C T G T C T G C A C C A A G A G C - 3' (配列番号：192)

マウスMuc 10

センス：5' - G C A A C A A C T G A C T G T T C C A A A - 3' (配列番号：193)

アンチセンス：5' - G C G A C T G A T C A G C A T T A A G G T - 3' (配列番号：194)

つまり、上記の実験では、βアクチンPCRと同様にして各反応液を調製した後、5倍希釈したテンプレートの1μlを用いて、95℃、9分で熱変性させた後、mMuc 9は95℃で30秒、50℃で30秒、72℃で1分を45～55サイクル、72℃で10分の反応を行った。mMuc 9以外のムチンは、95℃で30秒、アニーリング 1分、72℃で1分30秒を35～55サイクルで行い、アニーリングの温度はmMuc 1：56℃、mMuc 2：58℃、mMuc 3：49℃、mMuc 4：58℃、mMuc 5 AC：54℃、mMuc 9：50℃、mMuc 10：48℃で行った。反応産物のうち10μlを0.5μg/mlエチレンブロマイド含有1% SeaKem ME agaroseにて泳動し、バンドを確認した。

【0070】

結果を図2に示した。mMuc 1、mMuc 2及びmMuc 5 ACはSt細胞において

多量に発現していることが示された。またmMuc3及びmMuc10は両者において発現していなかった。一方で、mMuc4及びmMuc9についてもHa細胞において高頻度で発現していることが判明した。それにも拘わらず、これらのムチンの分子量は文献において予想されたエピグリカニンのものと異なっているなどの理由から、Ha細胞において更に別のムチン様糖タンパク質が特異的に発現していることを否定できなかった。

【0071】

1-3. サブトラクション法によるcDNA断片の取得と解読

mMuc4及びmMuc9についてのTA3-Ha細胞とTA3-St細胞の間で発現量の相違に拘わらず、仮に本発明のムチン様糖タンパク質の発現量がなお両者において更に顕著に異なるのであれば、当該発現量の差異を利用してサブトラクション法により、TA3-Ha細胞に多く発現するcDNAの断片を取得することも可能であると予想された。

10

【0072】

そこで、Ha細胞及びSt細胞からそれぞれmRNAを精製し、逆転写反応により2本鎖cDNAライブラリーを作製した。

【0073】

詳細には、TA3-Ha細胞、TA3-St細胞から、mMACS mRNA Isolation kit (第一化学社製)を用いて、mRNAを抽出した後、EtOH沈殿させ、その後MilliQ水に溶解して吸光度260nm/280nmを測定してmRNA量及び純度を見積もった。二本鎖cDNAライブラリーは、得られたmRNA 5µgを鋳型とし、Timesaver (商標) cDNA synthesis kit (Amersham Bioscience社製)を用い、Oligo dT primer からRT反応を行い、二本鎖cDNAを作製した。NICK (商標) column (Amersham Bioscience社製)によって、短いDNA断片などを除去してからEtOH沈殿させ、MilliQ水に溶解して0.5 µg/mlエチレンブロマイド含有0.7% Seakem ME agaroseにて泳動し、2kbp以上の部分と1.1~2kbpの部分に分けて切り出し、QIAEX (商標) II gel extraction kit (QIAGEN社製)によって、ゲルからcDNAを抽出した。フェノール (和光純薬) : クロロフォルム = 1 : 1で3回タンパク質を除き、さらにEtOH沈殿の後、MilliQ水に溶解して2本鎖cDNAライブラリーを得た。

20

30

【0074】

サブトラクション法の次の段階は、上記のライブラリーをSau3AIで制限酵素消化し、約100bpの2本鎖cDNA断片を作製した後、Ha細胞由来のcDNA断片の両端にアダプター/プライマーを結合させた物をテスターアンプリコン、一方でSt細胞由来のcDNA断片にはアダプター/プライマーを結合させずにドライバアンプリコンとし、それぞれ変性させ、お互いにハイブリダイズしてPCRを行う工程を含んでいた。これにより、Ha細胞に過剰に存在するcDNAだけが増幅され、スミアの中にわずかにバンドの様に濃い部分が認められた。このアンプリコンのPCRを、それぞれアダプター/プライマーを変え、3回行った。回を重ねる毎に濃縮が進み、3回の反応の後には、一本のバンドが検出された (データは示さず)。

40

【0075】

具体的には、TA3-Ha細胞及びTA3-St細胞のmRNAから合成した上記二本鎖cDNAライブラリーをそれぞれSau3AI処理し、得られた断片にTAKARA DNA Ligation Kit ver. 2 (商品名、TAKARA社製)を用いて、R Bgl 24:5' - AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA - 3' (配列番号: 195)、及びR Bgl 12:5' - GATCTGCGGTGA - 3' (配列番号: 196)をライゲーションした。

【0076】

上記ライゲーション産物をテンプレートとして30等分し、10µlの10×PCR buffer (15mM MgCl₂、10µl dNTP mix (各2mM)、60

50

pmol/ μ lのR Bgl 24、0.5 μ l AmpliTaq (商標) DNA Polymerase (Roche社製)含有)にMilliQ水を加えて100 μ lにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、72 で5分の後、95 で1分、72 で3分を20サイクル、72 で10分の反応を行った。反応産物のうち5 μ lを0.5 μ g/mlエチレンブロマイド含有3% Nusieve agarose (TAKARA社製)にて泳動し、PCR反応が成功しているかどうかを確認した。

【0077】

上記のPCR産物をフェノール：クロロフォルムで処理し、EtOH沈殿の後、TE (1mM Tris-HCl pH8.0、0.1mM EDTA)に溶解した。該PCR産物からSau3AI処理してR Bgl 24アダプターをはずし、EtOH沈殿の後TEに溶解し、3% Nusieve agaroseにて泳動し、100~1500bpの部分を切り出し、QIAEX II gel extraction kitでDNAを抽出した。抽出したDNAをフェノール：クロロフォルムで処理し、EtOH沈殿の後MilliQ水に溶解し、吸光度を測定し、DNA量を見積もった。TA3-St細胞については、これをドライバアンプリコンとし、今後のRDAに用いた。

【0078】

TA3-Ha細胞については、さらにTAKARA DNA Ligation Kit ver. 2を用いて、J Bgl 24:5' - ACCGACGTCGACTATCCATGAACA - 3' (配列番号: 197)とJ Bgl 12:5' - GATCTGTTCATG - 3' (配列番号: 198)をライゲーションし、テスターアンプリコンとした。テスターアンプリコンの100倍量のドライバアンプリコンを加え、まとめてフェノール：クロロフォルムで処理し、更にクロロフォルム処理した後、EtOH沈殿し、その後沈殿物をHybridization buffer (1M EPPS pH8.25 (SIGMA社製) 3ml及び0.5M EDTA pH8 0.6mlをMilliQ水 100mlに含む。)の12 μ lに溶解した。30 μ lのミネラルオイル (SIGMA社製)を重層し、100 で3分処理した後、あらかじめ67 にあたためていた5M NaClの1 μ lを加えて水層と攪拌した。その後67 で1晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、45 μ lの氷冷TEを加え、クロロフォルムで処理してミネラルオイルを除いた。これを10等分したものをテンプレートとし、10 μ lの10 $\times$ PCR buffer (15mM MgCl₂、10 μ l dNTP mix (各2mM)、60pmol/ μ lのJ Bgl 24、0.5 μ l AmpliTaq (商標) DNA Polymerase含有)にMilliQ水を加えて100 μ lにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、72 で5分の後、93 で1分、70 で3分を20サイクル、70 で10分の反応を行った。反応産物を10本分まとめてEtOH沈殿した後、30U mung-beanヌクレアーゼ (TAKARA社製)で37、30分間処理した。200 μ lの0.05M Tris (pH 8.9)を加え、95 で5分インキュベートした後、これを5等分したものをテンプレートとし、上記と同様にPCR反応溶液を調製し、PCR反応を行った。サイクルは30回おこなった。PCR産物のうち5 μ lを0.5 μ g/mlエチレンブロマイド含有3% Nusieve agaroseにて泳動し、DNAの濃縮が起こっているかどうかを確認した (1st round RDA後の濃縮状態: データは示さず)。PCR産物をまとめて、フェノール：クロロフォルム処理した後、EtOH沈殿し、TEに溶解した。Sau3AI処理してJ Bgl 24アダプターをはずし、EtOH沈殿の後TEに溶解し、3% Nusieve agaroseにて泳動し、100~1500bpの部分を切り出し、QIAEX II gel extraction kitでDNAを抽出した。フェノール：クロロフォルムで処理し、EtOH沈殿の後MilliQ水に溶解し、吸光度を測定し、DNA量を見積もった。1st round RDAの場合と同様に、1st round RDA産物にTAKARA DNA Ligation Kit ver. 2を用いて、N Bgl 24:5' - AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA - 3' (配列番号: 199)とN Bgl 12:5' - GATCTTCCCTCG - 3'

(配列番号：200)をライゲーションし、テスターアンプリコンとし、2nd round RDAを行った。更に、再びJ Bgl 24とJ Bgl 12を用いて、3rd round RDAを行った。3rd round RDA後は、バンドを切り出し、QIAEX II gel extraction kitを用いてDNAを抽出した。

【0079】

引き続きサブトラクション法による工程では、上記のバンドを切り出してベクター内にサブクロニングし、その中から約200クローンを拾って、その全ての塩基配列を解読した。

【0080】

つまり、3rd round RDA反応後に精製したバンドDNAをpGEM-T easy vector (商品名、Promega社製)にライゲーションし、得られたライゲーション産物5μlを大腸菌JM109 (TAKARA社製)の60μlと混合して氷上で20分インキュベートした後、42℃の湯浴に50秒つけ、その後再び氷上に2分以上戻した。これを、SOC medium (TAKARA社製)の100μlにて37℃、1時間培養後、5μlのIPTG (TAKARA社製、2g/10ml-MilliQ水、0.22μmのフィルターで濾過滅菌)と50μlのX-gal (TAKARA社製、100mg/5ml-ジメチルホルムアミド)を塗布した5μg/ml Ampicillin含有LBプレート(bacto trypton 5g、bacto yeast extract 2.5g、NaCl 5g及びbacto agar (ナカライテスク) 7gをMilliQ水500ml中に含む、高圧蒸気滅菌)2枚にまき、37℃で1晩培養した。培養後、増殖した白のシングルコロニーを爪楊枝で拾い、3mlの5μg/ml Ampicillin含有LB培地で37℃8時間以上培養した。培養後、Nucleo Spin (商標) Plasmid (MACHEREY-NAGEL社製)にてプラスミドDNAを抽出した。EcoRI (TOYOBO製)処理し、0.5μg/mlエチレンブロマイド含有1.5% Seakem ME agaroseで泳動し、インサートがあるかどうかを確認した。

【0081】

確認された上記インサートの塩基配列の解読は、ABI (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (商品名))による解析及びAloka (LI-COR DNA Sequencer 4200 (商品名))による解析に基づいた。ABIにおけるシーケンス反応はBigDye (商標) Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (PE Biosystem社製)を用いて行った。プラスミドDNAをテンプレートとし、2μlの10×PCR buffer (15mM MgCl₂、4μl Premix、3.2pmol primer含有)にMilliQ水を加えて20μlにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、96℃で10秒の後、96℃で10秒、50℃で5秒、60℃で4分を25サイクルの反応を行った。Sephadex (商標) G50 Fine DNA Grade (Pharmacia社製)を用いてゲル濾過精製し、95℃で2分熱変性させてから、塩基配列の解析を行った。

【0082】

Alokaによる解析でのシーケンス反応はThermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて行った。プラスミドDNA 300~600fmolをテンプレートとし、2μlの10×PCR buffer (15mM MgCl₂、2μl IRD800-labeled Primer (1.0pmol/μl:Aloka社製)又はIRD700-labeled Primer (1.0pmol/μl:Aloka社製)、1μl 2.5mM dNTP、2μl Thermo Sequenase (商標) DNA polymerase含有)にMilliQ水を加えて17μlにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、95℃で5分の後、95℃で3

0 秒、50 で30 秒、70 で1分を30 サイクルの反応を行った。反応終了後、Stop / Loading Buffer (Basic Fuchsin (和光純薬社製) 1.5 μ l、Bromo Phenol Blue (和光純薬社製) を少量 (0.01 %)、0.5 M EDTA 10 μ l 及び脱イオンホルムアミド (和光純薬借製) 475 μ l を Milli Q 水 500 μ l に含有) を各チューブに4 μ l ずつ加えた。95 で2 分熱変性させた後、それぞれ1.2 μ l を電気泳動用ゲル (50 % Long Ranger (商標) Gel solution 4.5 ml (Bio Whittaker Molecular Applications 社製)、10 $\times$ TBE 6 ml、Urea (和光純薬社製) 25.2 g 及び過硫酸アンモニウム (和光純薬社製) 40 mg を Milli Q 水 60 ml に含む溶液を約1 時間攪拌し、脱気した後、TEMED (ナカライテスク社製) 40 μ l を加えゲル板に流し込んだ。4 時間以上放置させてから使用した。) にアプライした。なお、上記10 $\times$ TBE は、Tris 108 g、ホウ酸 (和光純薬社製) 55 g 及び EDTA $\cdot$ 2Na 8.3 g を Milli Q 水 1 L に溶解し、高圧蒸気滅菌したものを用いた。

10

【0083】

上記で拾ったクローン中には、約100 bp で、NCBI Blast を検索してもホモロジーの高い分子がないものが存在し、これは新規の分子に由来すると考えられた (データは示さず)。この塩基配列からアミノ酸配列を予想したところ、終止コドンの入らない読み枠では、ほぼ全てのアミノ酸がセリン、スレオニン、プロリンであり、この cDNA 断片が、ムチンのタンデムリピート的一部分である可能性が示された。

20

【0084】

1-4. ノザンブロッティングによる解析

更に、上記サブトラクション法によって取得した cDNA 断片の TA3-Ha 細胞における発現が、実際に TA3-St 細胞における発現よりも高いかどうかを、ノザンブロッティングを行って検討した。

【0085】

TA3-Ha 細胞及び TA3-St 細胞の mRNA を、1 % ホルムアルデヒドアガロースゲルにて mRNA 1 μ g / lane ずつ電気泳動し、泳動後のゲルを 0.05 N NaOH で 20 分処理し、Milli Q 水ですすいだ後、20 $\times$ SSC (NaCl 175.3 g 及び Trisodium Citrate $\cdot$ 2H₂O (和光純薬) 88.2 g を Milli Q 水 1 L に含有) に 20 分間、2 回浸した。ナイロンメンブレン (PALL 社製) に 1 晩キャピラリーブロッティングし、メンブレンを 80 で 2 時間処理して RNA を固定した。

30

【0086】

次に、上記のようにナイロンメンブレン上に固定化された RNA に対して、サブトラクション法によって取得した新規配列 cDNA 断片をそれぞれプローブとして³²P ラベルして、ハイブリダイゼーションを行った。

【0087】

より詳細には、上記の pGEM-T easy vector に組み込んだプローブを用いた。つまりは、当該ベクターを含有する大腸菌を 5 μ g / ml Ampicillin 含有 5 ml の LB 培地で 37、8 時間以上培養し、該培養物から QIAGEN plasmid mini kit (商品名、QIAGEN 社製) にてプラスミド DNA を抽出し、EcoRI で該プラスミド DNA を一晩処理した後に 0.5 μ g / ml エチレンブromide 含有 2 % Seakem ME agarose で泳動し、当該ゲルからインサート部分を切り出して QIAquick gel extraction kit (QIAGEN 社製) にて該インサートの DNA を抽出し、プローブとした。ハイブリダイゼーションは、上記のメンブレンを 3 $\times$ SSC にてしめらせた後、Perfect Hybri (商標、TOYOBO 社製) の 2 ml にて 68、約 2 時間プレハイブリダイズを行った。プローブを Rediprime (商品名、Amersham pharmacia biotech 社製) により α -³²P-dCTP にてラベルした後、NICK co

40

50

l u m nで分離し、カウントを測定して 10^6 c p m / m l になるように計算し、95、10分変性させた後、68 で1晩ハイブリダイズした。翌日、 $2 \times S S C$ 0.1% SDS溶液にて68、5分洗浄を二回行い、その後カウントが高ければ、二次洗浄として、 $0.1 \times S S C$ で0.01% SDS溶液にて68、15分洗浄を二回行った。イメージングプレート(富士フィルム社製)に感光し、BAS 2000又はBAS 1800(富士フィルム社製)にて現像を行った。

【0088】

G3PDHを内部コントロールプローブとしてmRNA量の比較に用いた解析の結果、Ha細胞に高発現している配列が見出されたので、以後、この配列を元に、全長を取得することに決定し、このcDNA断片をepi1-1: C C C G C T C T G A C C A C C A C T G C A T C C A G C A C T G G C T C A A G C T C T A C C C C C A C C C C A A C C A C C A C T G C A T C T A G C A C T G C C T C A G(配列番号: 201)と名付けた。

10

【0089】

次に、当該cDNA断片が由来する分子の大きさを正確に見積もるために、mRNAをラージゲルで泳動してノザンプロットングを行った。Total RNAをマーカーとして泳動した時のribosomal RNAの位置、及びG3PDHをプローブとした時のバンドの位置を元に、epi1-1がハイブリしたmRNAの大きさを計算した。ラージゲルで泳動して分離度を高めた結果、ミニゲルではスミアだったハイブリダイゼーションパターンの一部が、バンドになるまで分離された(図3)。大きい方を8.8kb、小さい方を6kbと見積もった。

20

【0090】

1-5. race反応によるcDNAの伸長と解読

Marathon法を用いて、epi1-1から5' race及び3' race反応を行い、伸長することを試みた。

【0091】

具体的に、Marathon(商標) cDNA Amplification Kit(TOYOBO社製)を用いて、3'-marathon race及び5'-marathon raceを行った。TA3-Ha細胞から精製したmRNAからSUPERSCRIPT(商標)II Reverse Transcriptase(Invitrogen社)を用い、修飾Oligo dT primerから逆転写反応を行った。その後、二本鎖cDNAを合成し、Marathon cDNA adaptorを結合させ、このadaptor部分に結合するprimerと、遺伝子特異的primerによってPCRを行った。

30

【0092】

5'側は条件を様々に改善しても全く伸長が見られなかった。一方で、3'側はスミアの中に少し強いバンドのような部分を得られたため、その部分を切り出し、既述の方法に準じてpGEM-T easy vectorにサブクローニングし、塩基配列を解読した。このrace産物はpoly A付加シグナル及びpoly A tailを含んでおり、アミノ酸配列に変換すると、数回のタンデムリピート、疎水性アミノ酸に富んだ膜貫通部位と考えられる部分、及びその部分に続く細胞内部位を含んでおり、終止コドンも確認できた(データは示さず)。このことから、3' race産物は、TA3-Ha細胞に高発現する新規マウスムチン様糖タンパク質の3'側であると考えられ、この配列を3' race 3と名付けた。

40

【0093】

1-6. マウス遺伝子のPCR

ところで、上記マウスムチン様糖タンパク質における5'側の解明に先立ち、この糖タンパク質のcDNAだけでなく遺伝子も取得するために、A系統以外のマウスにも当該ムチン様糖タンパク質の遺伝子があるかどうかをPCRによって確認した。すなわち、これまでに、マウス・エピグリカニンはA系統のマウス由来のTA3-Ha細胞に発現してい

50

ることが報告されていたが、本発明のマウスムチン様糖タンパク質遺伝子がA系統以外のマウスにも存在することを確認することは、その未解明の5'側の解析にも有効であると考えられた。

【0094】

具体的に、A系統マウスに比べて動物実験でよく用いられ、遺伝子ライブラリーやBACクローンなどが整備されている、C57BL/6Nマウス、或いは129SVJマウスの遺伝子をテンプレートとし、epintmF: 5'-TTCTCATCACCCCTAGCCTCTG-3' (配列番号: 202) と epintmR: 5'-TATCCTCCTTCGCGTGTTCTGG-3' (配列番号: 203)、或いは epi1-5: 5'-CTGACCACTGCAATCCAGCACT-3' (配列番号: 204) と epintmR をプライマーとしてPCRを行った(図4)。TA3-Ha細胞のRT-PCRで増幅するバンドと比べ、大きい位置にバンドが得られたため、イントロンが含まれていると考え、塩基配列を読んだところ、AG/GT規則に合ったイントロンが一カ所含まれていた。

10

【0095】

1-7. 129SVJ 遺伝子ライブラリーのスクリーニングと解析

上記の遺伝子を取得するために、129SVJ 遺伝子のファージライブラリー(1FIXII-129/SVJ Mouse genomic library (STRATAGENE社))を用いて、スクリーニングを行った。

【0096】

まず、上記のファージライブラリーをプレート何枚かにまいてファージブランクをプレート全面に作製し、そこからファージを溶出して変性させPCRを行うことにより、始めのPCRスクリーニングを行った。具体的には、上記1FIXII ファージ感染用大腸菌として、XL1-Blue MRAを2×YTプレート(bacto tryptone 16g、bacto yeast extract 10g、NaCl 5g及びbacto agar 14gをMilliQ水1Lに溶解後、高圧蒸気滅菌し、直径10cmシャーレに固めて使用)にまき、37℃、1晩インキュベートした。翌日コロニーを拾い、10mlの2×YT培地(bacto tryptone 16g、bacto yeast extract 10g及びNaCl 5gをMilliQ水1Lに溶解後、高圧蒸気滅菌して使用)中に10mM MgSO₄(和光純薬)及び0.2% Maltose(和光純薬)を含む培地内で更に37℃、1晩培養した。翌日、培養物を3,000rpmで5分間遠心し、ペレット状の大腸菌体を5mlの10mM MgSO₄に懸濁し、このXL1-Blue MRA溶液を5μlとファージ溶液1μl以上をチューブ内で混合し、37℃、20分インキュベートした。その後、混合物をTop agarose(bacto tryptone 3.2g、bacto yeast extract 2g、NaCl 1g及びbacto agar 1.4gをMilliQ水1Lに溶解後、高圧蒸気滅菌)約4mlに加えて2×YTプレート上にまき、37℃で1晩培養し、ブランクを作製した。形成されたブランクからのファージの溶出は、全面にブランクが生じたプレート(約3,000個のブランクが含まれている)にSM buffer(NaCl 5.8g、MgSO₄·7H₂O 2.0g、1M Tris (pH7.5) 50ml及びbact gelatin(ナカライテスク社) 0.1gをMilliQ水1Lに溶解後、高圧蒸気滅菌して使用)5mlを加え、室温で2時間以上振とうした。Bufferをチューブに回収し、4℃で3,000rpm、5分遠心して、上清をファージ溶液とし、クロロフォルム2mlを加えて激しく攪拌して保存した。ファージDNAのPCRは、2μlの10×PCR buffer(15mM MgCl₂、2μl dNTP mix(各2mM)、1μlの5μM primer-sense、1μlの5μM primer-anti-sense、0.5μl AmpliTaq(商標) Gold(Roche社)及び1μlのテンプレート(1/10希釈後100で5分処理)を含む)にMilliQ水を加えて20μlにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用いPCR反応を行った。用いたプライマーは、epintmF、

20

30

40

50

epintmR又はepi1-5であった。epintmFとepintmRで反応を行った場合は、94、10分で熱変性させた後、94で30秒、51で30秒、72で1分を45サイクル、72で10分の反応を行った。また、epi1-5とepintmRで反応を行った場合は、94で30秒、57で30秒、72で1分を45サイクルにした。反応産物のうち10 μ lを0.5 μ g/mlエチレンブロマイド含有1% Seakem ME agaroseにて泳動し、バンドを確認した。その後も引き続き、PCRにより本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子を持つファージを含んでいることがわかったプレートから溶出したファージを新たなプレート何枚かにまいて、再びブラークをプレート全面に作製し、同様にPCRを行った。この作業を何回か行うことにより、陽性ファージを濃縮した。

10

【0097】

このようにして、ある程度濃縮したファージを用いて、ブラークハイブリダイゼーションを行った。すなわち、一つ一つのブラークが識別できる濃度で新たなプレート何枚かにまき、ナイロンメンブレンにブラークDNAをトランスファーして、サザンブロッティングを行った。また、その後も、陽性ブラークからファージクローンを回収し、新たなプレート何枚かにまいて同様にサザンブロッティングを行った。この作業を何回か行うことにより、陽性ファージのクローンを取得した。具体的には、XL1-Blue MRA溶液を5 μ lとファージ溶液をチューブ内で混合し、37で20分インキュベートした。その後、Top agarose約4mlを混合して2 $\times$ YTプレートにまき、37で1晩培養し、シングルブラークを作製した。翌日、ナイロンメンブレンフィルターBIO D YNE (商標) A TRANSFER MEMBRANE (PALL社製)を密着させてブラークを写し取り、針を3カ所さして、プレートとメンブレンを対応できるようにマークした後はがした。はがしたメンブレンをアルカリ溶液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)、中和液(0.5M Tris pH7.5、1.5M NaCl)、洗浄液(2 $\times$ SSC)で順に約10分ずつ処理し、風乾した後、80で2時間処理してファージDNAをフィルターに固定した。サザンブロッティングに用いるプローブは「1-4. ノザンブロッティングによる解析」の項に準じて作製した。メンブレンを3 $\times$ SSC 0.5% SDSa(和光純薬)溶液に65で30分浸した後、Perfect Hybri(商標) 2mlにて68、約2時間プレハイブリを行った。プローブをRediprimeにより α -³²P-dCTPにてラベルした後、NICK columnによって分離し、カウントを測定して3 $\times$ 10⁶cpm/mlになるように計算し、68で1晩ハイブリした。翌日、2 $\times$ SSC 0.1% SDS溶液にて68、5分洗浄を二回行い、その後、カウントが高ければ、二次洗浄として、0.1 $\times$ SSC 0.01% SDS溶液にて68で15分洗浄を二回行った。Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT(商標) AR(35 $\times$ 43cm:Amersham Pharmaciaより)に感光し、自動現像機にて現像した。現像したフィルムとファージを作製したプレートを対応させ、陽性ブラークを含むTop agarose部分を爪楊枝で拾い、SM buffer 100 μ l中にいれ、4で3,000rpm、5分遠心した後、上清をファージ溶液とし、クロロフォルム10 μ lを加えて混合して保存した。

20

30

40

【0098】

上記の手法により、6個の陽性ファージクローン(a~f)を取得し、それぞれのクローンを大量にまいてブラークを作製し、DNAを回収した。詳細には、それぞれのファージクローンのブラークを大量に作製した後に、SM buffer 5mlを加え、室温で2時間以上振とうしてからチューブに回収し、4で3,000rpm、5分遠心し、上清を新しいチューブに移した。さらにここに2mlクロロフォルムを加えて激しく攪拌した後、4で3,000rpm、5分遠心し、その上層をファージ溶液とした。このファージ溶液を新たなチューブに移し、QIAGEN Lambda kit(商品名、QIAGEN製)にてDNAを精製した。

【0099】

50

精製したDNAをNot I、BamH I、Hind I I I、EcoR Iでそれぞれ処理して電気泳動し、ナイロンメンブレンにブロットングしてサザンブロットングを行い、このムチンの遺伝子が実際に含まれているかどうかを確認した。具体的には、DNAを上記の各制限酵素で消化し、0.6% Seakem ME agaroseで電気泳動した。ゲルを、0.2N HCl中で10分酸処理し、MilliQ水ですすいだ後に、1.5M NaCl、0.5M NaOH中に15分間、2回浸した。続いて、3M NaCl、0.5M Tris pH7.4中に30分浸し、ナイロンメンブレンに1晩キャピラリートランスファーした。翌日、メンブレンを風乾し、80℃で2時間処理し、DNAをメンブレンに固定した。該メンブレンを上記の手順によるサザンブロットングに付した。結果を図5に示す。クローンcとfにはプローブが結合しなかったことから、ブ

10

ラークハイブリダイゼーションでブラークが結合したように見えたのは疑陽性であると判断し、以後の実験にはクローンa、b、d、eを用いた。

【0100】

これらのクローンのDNAを制限酵素処理して得たバンドのうち、サザンブロットングでプローブが結合したバンドを切り出し、QIAEX II gel extraction kitでDNAを抽出した。pBluescript II SK+ vector (Invitrogen製)をインサートの両端の制限酵素サイトに合わせて制限酵素消化した後、そこに前記のDNAをTAKARA ligation kit ver. 2 (TAKARA製)を用いてライゲーションした。ライゲーション産物と大腸菌JM109を混合し、氷上で20分インキュベートした後、42℃の湯浴に50秒つけ、その後再び氷上に2分以上戻した。これを、SOC mediumにて37℃で1時間培養後、IPTG 5μlとX-gal 50μlを塗布した5μg/ml Ampicillin含有LBプレートにまき、37℃で1晩培養した。白のシングルコロニーを爪楊枝で拾い、5μg/ml Ampicillin含有3mlのLB培地で37℃、8時間以上培養した。Nucleo Spin (商標) plasmidにてプラスミドDNAを抽出した。それぞれの制限酵素で処理し、0.5μg/mlエチレンブロマイド含有0.6% Seakem ME agaroseで泳動し、目的のインサートがあるかどうかを確認した。10kb前後のDNAがサブクロニングされているので、両端から少しずつ塩基配列を解読し、本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子が含まれているかどうかを検討した。その結果、これまでに得られているcDNA配列中に制限酵素サイトが一カ所存在するBamH I処理DNAについては、本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子を含むクローンがいくつか得られた。

20

30

【0101】

1-8. 遺伝子マッピング

取得した遺伝子クローンの配列を含め、これまでに解読できた部分配列を用いてEnsembl Genome Browserを検索したところ、このムチンの遺伝子がマウス第17番染色体のMHC領域に存在することが明らかになった。また、このムチンの遺伝子クローンの全長を含む、更に長大な遺伝子配列が登録されており、この配列を詳しく解析することにより、3' race 3配列の5'側にあたる遺伝子配列及びcDNA配列が明らかになった(図6)。5'側は約4kb以上に渡り、終止コドンが全く見られず、連続したエキソンであり、アミノ酸15残基からなるタンデムリピートが60回以上繰り返されていることがわかった。ただし、タンデムリピートの中間部分に解読されていない領域が含まれていた。取得した遺伝子クローンの長さで登録されている配列とを比較することにより、解読されていない領域は約1.5kb~2kbであると予想され、この部分は全てタンデムリピートが続いていると考えられるので、実際はタンデムリピートは100回以上繰り返されている可能性があった。タンデムリピートの上流約300bpの部分に終止コドン、及び開始コドンとなるメチオニン、更にはシグナル配列と予想される配列があるが、この部分からこの新規ムチンが翻訳されていると考え、あらかじめノザンブロットングによって見積もったmRNAの大きさと比べ小さいと考えた。そこで、この約300bpの部分でスプライスが起これと予想した。

40

50

【0102】

1 - 9 . 5'末端の探索 - 1

タンデムリピート部分よりも上流の約300bpの間でスプライスが起きており、更に上流に別のエキソンがあることを予想し、この約300bpの部分にプライマーを設計して、5' race 反応により5'末端まで伸長することを試みた。

【0103】

Race 反応のプライマーを設計する前に、この約300bpの部分が実際にcDNAとなっているかどうかをTA3-Ha細胞のRT-PCRにより確認した。具体的に、TA3-Ha細胞のtotal RNAから合成した一本鎖cDNAをテンプレートとし、また、プライマーとして以下のものを用いた。

センス：

epicDNA1: 5' - C A C C C A T G C A A T G A A T T T A A C A A A G G - 3' (配列番号: 205)

アンチセンス：

epitmR: T G G A T G C A G T G G T G G T C A G G G T G G - 3' (配列番号: 206)

epiracer1: G T G G C T A T G C T C T T C G T T T C T G A T G A A G G - 3' (配列番号: 207)

epiracer2: G T G G T G G A G G A A A T A T G G G C A T A A C C - 3' (配列番号: 208)

2μlの10×PCR buffer (15mM MgCl₂、2μl dNTP mix (各2mM)、1μlの5μM primer-sense、1μlの5μM primer-anti-sense、0.5μl AmpliTaq (商標) Gold、1μlのテンプレート (適度に希釈) を含む) にMilliQ水を加えて20μlにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用いPCR反応を行った。94 で10分で熱変性させた後、94 で30秒、59 で30秒、72 で1分を50サイクル、72 で10分の反応を行った。反応産物のうち10μlを0.5μg/mlエチレンブロマイド含有1% Seakem ME agaroseにて泳動し、バンドを確認した。結果を図7に示した。用いたプライマーによって増幅されると予想した大きさにバンドが認められた。

【0104】

続いて、RT-PCRによって確認したcDNAの部分にrace反応のプライマーを設計し、遺伝子特異的な逆転写反応及びrace反応を行った。GeneRacer (商標) kitを用いることにより、原理的には5'末端を持たないRNAは伸長しないことになっており、取得したcDNAは5'末端から始まると考えられるが、本手法によっては、当該5'末端を推定することはできなかった。

【0105】

1 - 10 . 5'末端の探索 - 2

上記のとおり、関連する技術において最も実行可能な手法の一つである5' race 反応のみによっては、本発明のマウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の5'末端を確定できないことが判明した。

【0106】

そこで、タンデムリピート領域の上流末端周辺のマウスゲノムDNA配列をNCBIから獲得し、更にこれを精査することにより、推定されるスプライシング アクセプター配列をタンデムリピート領域上流に見出した。また、この配列より上流の塩基配列を調べると、どの読み枠でも終始コドンが現れるため、この推定されるスプライシング アクセプター配列で実際にスプライスが起きていることは確かだった。そこで、この推定されるスプライシング アクセプター配列より下流で且つタンデムリピート領域より上流に、以下に示すアンチセンスプライマーを新たに2つ設計した。

【0107】

10

20

30

40

50

E p i R E V : C T G T G G C T A T G C T C T T C G T T T C T G A T G A A G G A T T T - 3 ' (配列番号 : 2 0 9) 、及び

E p i A M P : G G A T T T G A A G T T G T G G T G G A G G A A A T A T G G G C A T A A C - 3 ' (配列番号 : 2 1 0)

次いで、逆転写 P C R 法により、本発明のマウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の上流エキソンを探索した。具体的には、上記プライマーをアンチセンスに用い、センスプライマーは以下のように決定した。

【 0 1 0 8 】

タンデムリピート領域上流 1 0 k b のゲノム配列に対し、推定されるスプライシングドナーサイトをチェックした。そこから推定できるエキソン領域について、コードされるアミノ酸配列をすべての読み枠で調べ、ストップコドンがなく、ある程度の長さがある配列をエキソン候補領域とし、その中でセンスプライマーをデザインした。1 3 領域を選び出し、R T - P C R 法により c D N A が存在しているかを調べた。その結果、E p i R T 1 2 0 0 0 : 5 ' - G G A G A A G C A G C C T C T G G T G C T G G C T G C - 3 ' (配列番号 : 2 1 1) をセンスプライマーとし、且つ上記の E p i A M P をアンチセンスプライマーとして P C R を行った時のみ、目的の P C R 産物を得ることが出来た。なお、このときの P C R 反応条件は、A m p l i T a q (商標) G o l d の標準プロトコルを用いて、9 4 で 1 0 分間の後に、9 4 で 3 0 秒間 : 6 0 で 3 0 秒間 : 7 2 で 5 分間のサイクルを 3 0 回繰り返し、最後に 7 2 で 5 分間とした。

【 0 1 0 9 】

得られた P C R 産物の配列を読んでも確認でき、これによりこの遺伝子のタンデムリピート領域の上流部分に存在するエキソン・イントロンが初めて解明された。すなわち、このエキソンは上流に T A T A ボックスがあり且つメチオニンも読み枠にあったので、本発明のマウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の上流配列としては信頼に足るものであり、これが第一エキソンと十分に推定可能であった。しかし、本当にこの領域が第一エキソンであるか、また本当にこのメチオニンが翻訳開始位置であるかを確定するには、更に R A C E 法により転写開始位置を同定する必要があった。

【 0 1 1 0 】

そこで、T A 3 - H a 細胞から生成した t o t a l R N A の 4 . 4 μ g を原料に、G e n e R a c e r (商標) K i t を用いて 5 ' r e c e 反応を行い、転写開始位置の同定を試みた。この実験では、以下の 2 点以外はキット製造者の指示に従った : 1) C I P 処理の後のフェノール・クロロフォルム抽出の前に、フェノール抽出を 1 回挿入した、2) ヴォルテックスにより攪拌せよと数箇所説明書には書いてあるが、ヴォルテックスは一切行わず、チューブを上下することで攪拌した。このようにして C A P 構造を有していた R N A のみに o l i g o R N A を結合した。タンデムリピート領域に対し、逆転写用のアンチセンス プライマーを以下のとおり設計し、上記 R N A を鋳型に S U P E R S C R I P T (商標) I I I (I n v i t r o g e n 社) を用いて遺伝子特異的に逆転写した。

R T G e n e T a n d e m 1 : G C T G T C A A C G A T A C G C T A C G T A A C G G C A T G A C A G T G G A T G C A G T G G T G G T C A G G G T G G G T G T A G A G C C T G A G C C A G T G C T G G A T A C A G T G G T G G T C G G G - 3 ' (配列番号 : 2 1 2)

次いで、生成した一本鎖 c D N A に対し以下のプライマーを用いて n e s t e d P C R を行った。センスプライマーにはキットで与えられている G e n e R a c e r (商標) 5 ' P r i m e r : 5 ' - C G A C T G G A G C A C G A G G A C A C T G A - 3 ' (配列番号 : 2 1 3) 及び G e n e R a c e r (商標) 5 ' N e s t e d P r i m e r : 5 ' - G G A C A C T G A C A T G G A C T G A A G G A G T A - 3 ' (配列番号 : 2 1 4) を、アンチセンスには上記 E p i R E V 及び E p i A M P を用いた。また、反応条件は以下のとおりであった。1 回目の P C R は、センス及びアンチセンスとして、夫々、G e n

e R a c e r (商標) 5' P r i m e r 及び E p i R E V を用い、94 で10分間の後に、94 で30秒間：60 で30秒間：72 で3分間のサイクルを30回繰り返し、72 で5分間とした。2回目のPCRは、センス及びアンチセンスとして、夫々、G e n e R a c e r (商標) 5' N e s t e d P r i m e r 及び E p i A M P を利用し、94 で10分間の後に、94 で30秒間：68 で30秒間：72 で3分間のサイクルを30回繰り返し、72 で5分間のように行った。得られたPCR産物の塩基配列を解析し、転写開始位置を4種類同定した。9サンプルのうち、6サンプルは同じ位置から始まっており、この位置を転写開始位置と決定した。このエキソンは先にRT-PCRで予想した第一エキソンと同一であり、スプライシング ドナー サイトもスプライシング アクセプター 配列も同一箇所であった。

10

【0111】

また、先のスプライシング ドナー サイトでスプライシングが起きていないスプライシング バリエーションが存在するかどうかを調べるために、この5' r a c e 反応で作成したcDNAをテンプレートにして、更なるn e s t e d PCRを行った。タンデム上流のスプライシング ドナー サイトより上流に次に述べるアンチセンスプライマーを設計した。

【0112】

E p i A S 1 5 1 3 0 : 5' - A G A C C A T G A T A A G T A C C C A G G G C - 3' (配列番号：215)

センスプライマーとして、一回目はG e n e R a c e r (商標) 5' P r i m e r を二回目はG e n e R a c e r (商標) 5' N e s t e d P r i m e r を採用し、アンチセンスプライマーは両反応ともE p i A S 1 5 1 3 0 を用いた。K O D - p l u s (商標) の標準プロトコルに従い、94 で2分間に続いて、94 で15秒間：54 で30秒間：68 で5分間のサイクルを30回繰り返した後に、68 で10分間という系を両PCR反応で用いた。PCR産物の塩基配列を解析すると、確かに本発明のDNAであることが分かり、スプライシング バリエーションが確認された。このスプライシング バリエーションの第一エキソンは、先のバリエーションと同じであった。転写開始位置は先のバリエーションより61b上流であり、スプライシング ドナー サイトは先のバリエーションと同様であった。

20

【0113】

このようにして、バリエーションを含めて配列番号：172に示される配列を有する本発明のマウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質cDNAを単離できた。

30

【実施例2】

【0114】

実施例2：マウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質に対するポリクローナル抗体の調製と該抗体による該ムチンの検出及びエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のマウスによる発現分布同定

2-1. ポリクローナル抗体の作製

本発明の新規ムチン様糖タンパク質を特異的に認識する抗体を取得する目的で、上記のcDNAの配列に基づいて、タンデムリピートと考えられる配列の一部であるe p i t mペプチド：S S S T P T P T T T A S S T (配列番号：177)、及び、膜貫通領域のすぐ外側でタンデムリピートではないと考えられる部分の一部であるe p i n t mペプチド：N H T G T P V M E V K P S G S (配列番号：178)を作製し、これらに対するウサギポリクローナル抗体を作製した。

40

【0115】

具体的に、当該ペプチドは、P e p t i d e S y n t h e s i s S y s t e m (P i o n e e r 製) を用いてF - m o c 固相合成法により合成した。合成に使用したF - m o c アミノ酸は全てOH体 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社) を使用した。合成後、レジンからペプチドを外し、脱保護を行うために、合成ペプチドが結合した状態のレジンに、フェノールを0.7g、M i l l i Q 水を500µl、T F A (P E B i o

50

systemsより) 9.5 mlを加え、室温で1晩振とうした。グラスフィルターで濾過してレジンを除き、ジエチルエーテルで数回洗浄し、ペプチドを析出させた。析出したペプチドを最小量のMilliQ水に溶かした。次いで、逆相HPLC(日本分光社製)を用いてペプチドを精製した。カラムは5C18カラム(Cosmosil(商標)、ナカライテスク社製)を用い、カラム温度40、流速2 ml/minで分離を行った。Buffer A(0.05% TFA in MilliQ水)を30分かけて直線的にbuffer B{0.05% TFA in propanol:acetonitrile(PE Biosystemsより)=7:3}に50%まで置換し、その後5分間buffer Bによる溶出を行った。続いてbuffer Aにより平衡化を25分間行った。分取した画分をMALDI-TOF MS spectrum(Voyager Elite:PE Biosystems製)にて質量分析を行った。精製したペプチドを凍結乾燥し、-20に保存した。精製したペプチドはKLHと結合した。すなわち、KLH 10 mg(CALBIOCHEM社より)に2 mlの10 mM KPi buffer pH7.0(0.2 M KH₂PO₄ 39 mlと0.2 M K₂HPO₄

10

61 mlを混合)、63 µlのMBS溶液{MBS(SIGMA社)1 mg/67 µl DMF(和光純薬)}を加えて室温で30分振とうし、KLHとMBSを結合させた。反応溶液をSephadex(商標) G25(Pharmacia fine Chemicals社)によって、0.1 M KPi buffer pH6.0(0.2 M KH₂PO₄ 87.7 mlと0.2 M K₂HPO₄ 12.3 mlを混合)を用いてゲル濾過した。各フラクションの吸光度を測定して、KLH-MBSが含まれている画分を取得した。その後、上記で得たペプチドの凍結乾燥物6 mgを0.1 M Sodium Borate(和光純薬) buffer(pH9.0)の1 mlに溶解した。そこに、分取したKLH-MBSをゆっくりと攪拌しながら加え、HClでpH7.0~7.5に合わせた。そのまま室温で3時間反応させ、PBS 1 Lに対して4で1晩透析した。これをペプチド1 mgずつ分注して-20に保存した。

20

【0116】

免疫動物として使用した日本白色ウサギ(2.5 kg、雌)は、日本医科学動物資材研究所より購入し、東京大学薬学部動物施設で飼育した。実験には購入後1週間予備飼育したウサギを用いた。当該免疫動物に対し、上記KLHと共有結合させたペプチド1 mg溶液とFreund complete adjuvant(NAKARAI CHEMICALS, LTD製)を混合してエマルジョンを作製し、それを皮下投与した。免疫は2週間毎に行い、2回目以降はFreund incomplete adjuvant(NAKARAI CHEMICALS, LTD製)と混合してエマルジョンを作製し、免疫した。免疫の度にウサギ耳静脈より採血を行い、該血液を37で30分間インキュベートした後に、4で1晩静置して凝固させ、15,000 rpmで15分間遠心し、その上清を抗血清とした。上記ペプチドを抗原としたELISAによって抗体価を測定した。詳細には、96穴ELISAプレートに、抗原として0.05 M NaHCO₃(pH9.6)に溶解した20 µg/ml合成ペプチドを加え、4にて24時間以上静置した。0.05% Tween 20(PBS中)にて2回洗浄後、3% BSA(PBS中)にて室温にて2時間ブロッキングを行った。0.05% Tween 20(PBS中)にて3回洗浄後、1% BSA(PBS中)にて希釈したウサギ抗血清を加え、室温にて2時間反応させた。0.05% Tween 20(PBS中)にて3回洗浄後、1% BSA(PBS中)にて1,000倍希釈したHRP-Goat Anti Rabbit IgG抗体(ZYMED社)を二次抗体として室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20(PBS中)にて5回洗浄後、1 mMのABTS 1 µl/ml H₂O₂で発色させ、吸光度405 nmを測定した。結果を図8に示した。

30

40

【0117】

Epitopeペプチドに対する抗体価も、epitopeペプチドに対する抗体価も、免疫の回数を増加するにつれて増加したが、3回免疫を行ったところで、あまり抗体価の増加が認められなくなったため、免疫を終了した。また、抗epitopeペプチド抗体の方が

50

、抗 e p i t m 抗体に比べて抗体価が高い傾向にあった。

【 0 1 1 8 】

2・2. ポリクローナル抗体によるマウスムチン様糖タンパク質の検出

上記で作製したウサギポリクローナル抗体がペプチドに結合することは確認できた。続いて、このポリクローナル抗体をフローサイトメトリー法或いはウェスタンブロッティングで利用できるかどうかを確認した。

【 0 1 1 9 】

まず、T A 3 - H a 細胞及び T A 3 - S t 細胞をポリクローナル抗体で染色し、フローサイトメーターにて蛍光を測定した。具体的に T A 3 - H a 細胞及び T A 3 - S t 細胞 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個を、F C M b u f f e r にて洗浄後、そこに F C M b u f f e r で希釈したウサギ抗血清を $100 \mu\text{l}$ 加え、氷冷下 30 分間反応させた。F C M b u f f e r にて反応した細胞を洗浄後、今度は F C M b u f f e r で 100 倍に希釈した F I T C - g o a t a n t i r a b b i t I g G (Z Y M E D 社) を $100 \mu\text{l}$ 加え、氷冷下 30 分間反応させた。F C M b u f f e r にて細胞を洗浄後、F C M b u f f e r に懸濁し、ナイロンメッシュを通した後、フローサイトメーターにて蛍光強度を測定した。

【 0 1 2 0 】

図 9 に示したとおり、どちらの抗体も S t 細胞に対する結合と比べ、H a 細胞に対しては高い結合を示し、H a 細胞表面に発現するタンパク質を認識していることが確認された。また、抗 e p i t m 抗体の方が、抗 e p i n t m ペプチド抗体に比べて結合が低くなる傾向が認められた。

【 0 1 2 1 】

次に、H a 細胞及び S t 細胞の細胞溶解液を電気泳動して、P V D F 膜にブロッティングし、ポリクローナル抗体で染色を行った。ポリクローナル抗体で染色すると、どちらの細胞にも非特異的な結合が非常に多く認められたため、ポリクローナル抗体を粗精製してから染色を行った。詳細には、上記ウサギ抗血清の液量をはかり、50% 飽和になるように、硫酸アンモニウムを加え、4 で 60 分以上激しく攪拌した。10,000 rpm、4 で 10 分遠心し、ペレットを最小量の P B S に懸濁し、P B S 1 L に対して 4 で 4 時間透析し、更に新しい P B S 1 L に対して 4 で 1 晩透析した。硫酸沈殿後に、1 ml あたり $100 \mu\text{l}$ の S e p h a r o s e (商 標) 4 B (A m e r s h a m B i o s c i e n c e 社) を加え、4 で 2 時間以上攪拌した。13,000 rpm、4 で 1 分間遠心し、その上清を粗精製ポリクローナル抗体とし、E L I S A で活性を調べた上で、その後の実験に用いた。次いで、「1 - 1. レクチンによる新規ムチン様糖タンパク質の存在確認」の項に記載したウェスタンブロッティング法に準じ、ウェスタンブロッティングを行った。簡単に説明すると、各細胞抽出液を 2 - M E 存在下 S D S 変性 4 % 或いは 15 % ポリアクリルアミド電気泳動を行い、P V D F 膜にセミドライブロッティングした。1 % N G S - 2 % B S A (P B S 中) で一晩ブロッキングをし、0.1 % T w e e n 20 - 1 % N G S と 2 % B S A (P B S 中) で 500 倍希釈した上記粗精製ウサギ抗体と上記 P V D F 膜を 90 分反応させた。反応後の膜を 0.1 % T w e e n 20 (P B S 中) で 4 回以上洗浄後、0.1 % T w e e n 20 - 1 % N G S と 2 % B S A (P B S 中) で 2,000 倍希釈した b i o t i n - g o a t a n t i r a b b i t I g G (Z Y M E D 社) と 45 分反応させた。更に当該膜を 0.1 % T w e e n 20 (P B S 中) で 4 回以上洗浄後、0.1 % T w e e n 20 - 1 % N G S と 2 % B S A (P B S 中) で 3,000 倍希釈した H R P - s t r e p t a v i d i n と 30 分反応させた。E C L P l u s W e s t e r n D e t e c t i o n k i t により発色させ、H y p e r f i l m E C L に感光した。

【 0 1 2 2 】

図 10 に示されるとおり、特に抗 e p i n t m ペプチド抗体によつては、H a 細胞の分子量の大きい部分がスミアに染色された。これらのことから、作製した抗ペプチド抗体により、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質を検出できることが示された。

【 0 1 2 3 】

2 - 3. マウス正常組織における本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現確認

マウスの全身における本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現をノザンブロッティングによって解析した。

【 0 1 2 4 】

具体的にC57BL/6Nマウスの全身の臓器を分離し、それぞれから定法によりtotal RNAを分離した。簡単に説明すると、解剖日前日から絶食させたマウスの全身の臓器を分離し、液体窒素で凍結させた。ULTRASPEC RNAを加え、ホモジナイズしてtotal RNAを抽出した。PCIでタンパク質を除いてから、クロロフォルムでフェノールを除き、その後イソプロパノールで沈殿させ、水に溶解して吸光度260nm/280nmを測定してRNA量及び純度を見積もった。

10

【 0 1 2 5 】

次いで、上記epi1-1をプローブとして既述の実験手法に準じてノザンブロッティングを行った(図11)。多くの組織でプローブが結合し、このムチンの発現が確認されたが、特に、脾臓、盲腸、大腸、リンパ節では比較的大きい位置に強い結合が認められ、更に胸腺、心臓、肝臓、大脳、筋肉、皮膚でも比較的強い結合が見られた。一方、腎臓ではまったく結合が見られず、この分子が発現していない可能性が示された。この結果から、このムチンは消化管や気管などの上皮系組織だけでなく、免疫系の組織にも強い発現が認められ、非常に特徴的であると考えられた。

20

【 0 1 2 6 】

2 - 4. マウス癌細胞株及び、乳癌組織における本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現

次にTA3-Ha細胞以外の癌細胞に、この新規マウスムチンが発現していないかどうかを解析した。TA3-Ha細胞が乳癌細胞であることから、主に乳癌細胞にこの新規マウスムチンが発現しているのではないかと考え、様々な乳癌細胞株、及び自然発癌によって生じた乳癌組織から樹立した細胞株について検討を行った。また、C57BL/6NマウスやBalb/cマウスのような、一般的に用いられているマウス由来の上皮系癌細胞についても検討した。

【 0 1 2 7 】

30

マウス癌細胞株の培養に用いた実験動物であるICRマウス(5週齢、雌)はオリエンタル酵母より購入し、東京大学薬学部動物施設SPF条件下で飼育した。実験には購入後1週間予備飼育したマウスを用いた。培養に用いた培地は、Minimum Essential Medium(MEM:GIBCO BRL社)9.4gを1LのMilliQ水に溶解し、高圧蒸気滅菌し、無菌的に調製された3% L-glutamine 5ml、10% NaHCO₃ 10ml、0.1mM NEAA 5mlを加えて調製した。さらに非動化したFCSを最終濃度10%になるように加えて使用した(MEM-NEAA-10% FCS培地)。また、ES培地は日水製薬より購入し、最終濃度が10%になるようにFCSを加えて使用した(ES-10% FCS培地)。その他RPMI 1640-10% FCS培地及びD/F-10% FCS培地を同様に調製して用いた。実験に用いたマウス大腸癌細胞株Colon38、26細胞は、東京大学分子生物学研究所の鶴尾隆博士より御供与頂いた。マウスリンパ腫細胞株RMA細胞は、Pittsburgh大学のOlivera J. Finn博士より御供与頂いた。マウス腎癌細胞株Renca細胞は、富山医科薬科大学の済木育夫博士より御供与頂いた。マウス乳癌細胞株MM2、46、48、102細胞、Ehrlich細胞、FM3A細胞、及びFM3AR細胞、また肺扁平上皮細胞株KLN205細胞は東北大学加齢医学研究所より御供与頂いた。Mel-18+/+マウスにできた乳癌組織から樹立した細胞株MMK3~7細胞のベレットは広島大学の菅野雅元博士より御供与頂いた。これらのマウス癌細胞株の継代法に関して、Colon38、Colon26、RencaはD/F-10% FCS培地で、37℃、5% CO₂存在下で培養した。これらは3~4日おきにPBSにて洗浄

40

50

後、そこに $\text{Trp} - \text{EDTA}$ 溶液 (0.05% $\text{Trypsin} / 0.02\% \text{EDTA} - \text{PBS}$ 中) を加えて、37、5 分間インキュベートし、培養シャーレからはがし継代した。RMA、MM2、MM46、MM48 は $\text{RPMI} 1640 - 10\% \text{FCS}$ 培地で、37、5% CO_2 存在下で培養し、3~4 日おきに継代した。MM102 は $\text{RPMI} 1640 - 10\% \text{FCS}$ 培地で、37、5% CO_2 存在下で培養した。これは 3~4 日おきに PBS にて洗浄後、そこに $\text{Trp} - \text{EDTA}$ 溶液を加えて 37 で 5 分間インキュベートし、培養シャーレからはがし継代した。KLN205 は $\text{MEM} - \text{NEAA} - 10\% \text{FCS}$ 培地で、37、5% CO_2 存在下で培養し、3~4 日おきに継代した。FM3A、FM3A/R は $\text{ES} - 10\% \text{FCS}$ 培地で、37、5% CO_2 存在下で培養し、3~4 日おきに継代した。Ehrlich は、約 2×10^6 個の当該細胞を HANKS 液に懸濁して ICR マウスに腹腔内投与し、その 1 週間後に腹腔から細胞を回収した。回収した細胞を 2 ml の 0.15 M PBS に懸濁後、そこに 6 ml の MilliQ 水を加え、約 20 秒サスペンドし、すぐに 2 ml の 3.5 M NaCl を加えた。この操作により赤血球を除き以後の実験に用いた。上記マウス癌細胞株からの mRNA は、 $\mu\text{MACS mRNA Isolation kit}$ (商品名) を用いて mRNA を抽出し、それを EtOH 沈殿させ、その後沈殿物を水に溶解して吸光度 $260 \text{nm} / 280 \text{nm}$ を測定し、RNA 量及び純度をみつもることで調製した。最後に「1-4. ノザンプロットによる解析」の項に準じ、total RNA 100 μg 或いは mRNA 1 μg を電気泳動し、ノザンプロットを行った。

【0128】

結果を図 12 に示した。いくつかの乳癌細胞でプローブが結合し、このムチンの発現が確認されたが、特に、乳癌細胞株 FM3A 細胞、同じく FM3AR 細胞、また自然発癌によって生じた乳癌組織から樹立した細胞株 MMK5 細胞、MMK7 細胞では比較的強い結合が認められた。また、肺扁平上皮癌細胞である KLN205 細胞にも、非常に強い結合が見られた。しかし、TA3-Ha 細胞よりも強い発現の見られる細胞はなかった。

【実施例 3】

【0129】

実施例 3：ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の同定

3-1. RT-PCR 法によるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードする mRNA の発現解析

まず、複数のヒト細胞株から total RNA を抽出した後、RT 反応により各 total RNA に対応する cDNA を作製した。次いで、マウス・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の膜貫通領域に関連する部分を含む 3' 側配列から設計されたプライマーを用いて、上記により得られた cDNA を PCR により増幅し、該 PCR 産物をサブクローン後に配列の解析と確認を行った。これにより、各ヒト細胞株における本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードする mRNA の発現解析を行った。以下、具体的に説明する。

【0130】

(1) 細胞・継代

実験には 9 種類の細胞株、MRK-nu-1、SK-BR-3 (以上乳癌細胞株)、HepG2 (肝臓癌細胞株)、EBC-1 (肺癌細胞株)、KATOIII (胃癌細胞株)、8505C、8305C (以上甲状腺癌細胞株)、ME-180 (子宮頸癌細胞株)、U-937 (単球系リンパ腫細胞株) を用いた。各細胞は Mycoplasma Plus (商標) PCR Primer Set (Stratagene 社) によりマイコプラズマ感染の無い事を確認した。これらの内、EBC-1、8505C、8305C、ME-180 は東北大学加齢医学研究所より御供与頂いた。

【0131】

MRK-nu-1、SK-BR-3、EBC-1、KATOIII、8305C、ME-180、U-937 は $\text{RPMI} 1640 - 10\% \text{FCS}$ 培地で、HepG2 は $\text{DMEM} - \text{HG} - 10\% \text{FCS} - 500 \text{U/ml penicillin}, 1 \text{mg/ml stre}$

p t o m y c i n 培地で、8 5 0 5 C は E a g l e ' s M E M - 1 0 % F C S 培地で、3 7 °C、5 % C O₂ 存在下で培養した。MRK - n u - 1、K A T O I I I、U - 9 3 7 は 3 ~ 4 日おきに回収して、新たな培地に懸濁して継代した。SK - BR - 3、Hep G 2、EBC - 1 は 3 ~ 4 日おきに PBS にて洗浄後、Trp - EDTA 溶液 (0 . 0 5 % T r y p s i n / 0 . 0 2 % E D T A - P B S 中) を加え、3 7 °C、5 分間インキュベートし、培養シャーレからはがし継代した。8 5 0 5 C、8 3 0 5 C、ME - 1 8 0 は 3 ~ 4 日おきに PBS にて洗浄後、0 . 0 2 % E D T A - P B S 溶液を加え、3 7 °C、5 分間インキュベートし、培養シャーレからはがし継代した。

【 0 1 3 2 】

(2) t o t a l R N A の抽出と R T

10

上記 9 種の細胞から、SV Total RNA Isolation Kit (商品名、Promega 社) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA 1 μg を鋳型とし、RNase inhibitor (Ambion 社より) 存在下で SUPERSCRIPT (商標) II Reverse Transcriptase (Invitrogen 社) を用い、Oligo dT primer (Amersham Pharmacia Biotech 社) から逆転写反応を行い、そこから RNase H (TOYOBO 社) により RNA を除き、一本鎖 cDNA を作製した。

【 0 1 3 3 】

(3) P C R

20

対照のヒト・G3PDH については、2 μl の 1 0 × P C R b u f f e r (1 5 m M M g C l₂、2 μl d N T P m i x (各 2 m M)、1 μl の 5 μM p r i m e r - s e n s e、1 μl の 5 μM p r i m e r - a n t i - s e n s e、0 . 1 μl A m p l i T a q (商標) G o l d、1 μl の c D N A テンプレートを含む) に M i l l i Q 水を加えて 2 0 μl にして P C R 用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、9 5 °C で 1 分 で熱変性させた後、9 5 °C で 3 0 秒、5 8 °C で 3 0 秒、7 2 °C で 4 5 秒を 3 0 サイクル、7 2 °C で 1 0 分 の反応を行った。反応産物のうち 1 0 μl を 0 . 5 μg / m l エチレンブロマイド含有 1 . 5 % A g a r o s e S にて泳動し、バンドを確認した。

【 0 1 3 4 】

本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質については、上記 G 3 P D H P C R と同様に反応液を調製した。9 5 °C、1 0 分 で熱変性させた後、9 5 °C で 1 分、5 2 °C で 3 0 秒、7 2 °C で 1 分を 4 5 サイクル、7 2 °C で 1 0 分 の反応を行った。反応産物のうち 1 0 μl を 0 . 5 μg / m l エチレンブロマイド含有 1 . 5 % S e a k e m M E a g a r o s e にて泳動した。なお、用いた各プライマーは以下のとおりであった。

30

ヒト・G3PDH :

センス hG3PDH - F : 5 ' - G A C C C C T T C A T T G A C C T C A A C T A C - 3 ' (配列番号 : 2 1 6)

アンチセンス hG3PDH - R : 5 ' - C A G T G A T G G C A T G G A C T G T G G T - 3 ' (配列番号 : 2 1 7)

ヒト・エピグリカニン関連ムチン

40

センス hepintm - F : 5 ' - C T T C C C A T A G T G C A T C T A C T G C - 3 ' (配列番号 : 2 1 8)

アンチセンス hepintm - R : 5 ' - G A A C C A G T T A G G A C T C C A C C T G G G C C - 3 ' (配列番号 : 2 1 9)

(3) P C R 産物のシーケンス確認

上記で確認されたバンドを切り出し Q I A q u i c k g e l e x t r a c t i o n k i t (商品名、Q I A G E N 社) にて P C R 産物を回収した。回収した P C R 産物を、定法により p G E M - T e a s y (商品名、Promega 社) にサブクロニングし、ABI (ABI P R I S M (商標) 3 1 0 0 G e n e t i c A n a l y z e r) によりシーケンスを解析した。このシーケンス反応は B i g D y e (商標) T

50

erminator Cycle Sequencing v1.1 Ready Reaction (Applied Biosystems社)を用いて行った。プラスミドDNAをテンプレートとし、2 μ lの10 $\times$ PCR buffer (15 mM MgCl₂、4 μ l Premix、3.2 pmolのprimer (T7、SP6)を含む)にMilliQ水を加えて20 μ lにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、96 で1分の後、96 で10秒、50 で5秒、60 度4分を25サイクルの反応を行った。PCR反応物をSephadex (商標) G50 Fine DNA Grade (Pharmacia社)を用いてゲル濾過精製し、95 で2分熱変性させてから塩基配列の解析を行い、当該PCR産物のシーケンスを確認した。

【0135】

10

図13に示したように、乳癌細胞株や肺癌細胞株、単球系リンパ腫細胞株、そして殊に子宮頸癌細胞株において、270 bp付近に明瞭なバンドを観測した。

【0136】

(4) 正常ヒト組織での発現確認

上記PCRにより、ヒトの各種臓器由来のcDNAパネル(商品名: human Multiple Tissue cDNA panel I and II、BD Biosciences Clontech社)を用いて、正常ヒト組織での本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現についても確認した。当該cDNAパネルは、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、甲状腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸及び白血球組織から調製した標準化第一鎖cDNAを含んでいた。図15に示すとおり、当該遺伝子が肺、甲状腺及び大腸の正常組織でも発現していることが示唆された。

20

【0137】

3-2. Nested PCR法によるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードするcDNAの単離

上記において目的遺伝子を高発現していることが判明した子宮頸癌細胞株ME-180のmRNAから、当該遺伝子の3'領域に対応する特異的プライマーを用いたRT反応によりcDNAを調製し、次に得られたcDNAを鋳型とするNested PCRにより、本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードするcDNAを単離した。手順で以下のとおりであった。

30

【0138】

(1) mRNAの抽出とRT

ME-180株細胞から、 μ MACS mRNA Isolation kit (Miltenyi Biotec社製)を用いて、mRNAを抽出した。抽出したmRNA 0.35 μ gを鋳型とし、RNase inhibitor (Ambion社)存在下でSUPERSCRIPT (商標) III Reverse Transcriptase (Invitrogen社)を用い、本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の3'領域に対応するプライマー: CCTATAACTGAGTTTCATCTCAGAGC (配列番号: 220) から逆転写反応を行い、RNase H (TOYOBO社)によりRNAを除き、一本鎖cDNAを作製した。

40

【0139】

(2) Nested PCR法によるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質をコードする領域の増幅

2 μ lの10 $\times$ PCR buffer、2 μ l dNTP mix (各2 mM)、1.2 μ lの5 μ M primer-sense-1、1.2 μ l 5 μ M primer-anti-sense-1、0.5 μ l KOD-plus (商標)、0.48 μ lの25 mM MgSO₄、1 μ lのcDNAテンプレートにMilliQ水を加えて20 μ lにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、95 、5分で熱変性させた後、95 で30秒、68 で3分を25サイクル、68 で10分の反応を行った。得られたPCR産物の内10 μ lをエタノールで沈殿させ、11.3 μ l MilliQ

50

水を加えて溶解し、その全量を鋳型として2 μ lの10 $\times$ PCR buffer、2 μ l dNTP mix (各2 mM)、1.2 μ lの5 μ M primer-sense-2、1.2 μ lの5 μ M primer-anti-sense-2、0.5 μ l KOD-plus (商標)、0.8 μ lの25 mM MgSO₄を加え20 μ lにし、PCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、95、5分で熱変性させた後、95で30秒、68で3分を25サイクル、68で10分の反応を行った(nested-PCR)。反応産物の全量を0.5 μ g/mlエチレンブロマイド含有0.7% SeaKem ME agaroseにて泳動し、約2 kbp付近に確認されたバンドを切り出しQIAquick gel extraction kit (商品名、QIAGEN社)にて回収した。回収したPCR産物を、pCR4Blunt-TOPO vector (Invitrogen社)にサブクローニングし、ABI (ABI PRISM (商標) 3100 Genetic Analyzer)によりシーケンスを解析した。このシーケンス反応はBigDye (商標) Terminator Cycle Sequencing v1.1 Ready Reaction (Applied Biosystems社)を用いて行った。プラスミドDNAをテンプレートとし、2 μ lの10 $\times$ PCR buffer (15 mM MgCl₂、4 μ l Premix、3.2 pmolのprimer (T7、T3、hepiseq5-F、hepiseq3-R)を含む)にMilliQ水を加えて20 μ lにしてPCR用チューブにいれ、サーマルサイクラーを用い、96で1分の後、96で10秒、50で5秒、60で4分を25サイクルの反応を行った。Sephadex (商標) G50 Fine DNA Grade (Pharmacia社)を用いてゲル濾過精製し、95で2分間熱変性させてから、塩基配列の解析を行った。なお、上記の各プライマーは以下のとおりであった。

10

20

ヒト・エピグリカニン関連ムチン

センス-1 clonest5-1 F: 5' - AAGCCTAAGGAACCCAGGCATCCAGCTGCCACGCC - 3' (配列番号: 221)

アンチセンス-1 clonest3-1 R: 5' - GTTCATCTCAGAGCTAGATACCCACCCCGGGC - 3' (配列番号: 222)

センス-2 clonest5-2 F: 5' - CCCAGGAACACAAACGTAGGAGACCCACGCTCCTG - 3' (配列番号: 223)

アンチセンス-2 clonest3-2 R: 5' - CAGGATCTCAACAACAAGCTGGGAGGGGTCTCCTGGG - 3' (配列番号: 224)

30

シーケンス解析用プライマー

hepiseq5-F: 5' - GGTCTACTATTGCATTTAGAAAGCTGC - 3' (配列番号: 225)

hepiseq3-R: 5' - TTGTGTGCATTCAGTCAGAGC - 3' (配列番号: 226)

解析の結果、配列番号: 174に示される配列を有する本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質cDNAを単離できた。

【実施例4】

【0140】

40

実施例4: 腫瘍組織におけるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質遺伝子の特異的発現

BD Biosciences Clontech社からのCancer Profiling Array II (商品名)を用いて、本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質cDNAからの膜貫通領域セグメント(約270 bp)をもとに設計したプローブにより、ヒト正常組織及び腫瘍組織間での該遺伝子発現プロファイルを分析した。なお、このメンブレン・ベース・アレイ上には、各個体からの数種類の腫瘍組織及びそれらに対応する正常組織において発現する総mRNAを並行してスポットしてあり、それと特定のプローブのハイブリダイゼーションを観察することにより、該特定の遺伝子の特異的発現プロファイルを解析することができる。詳細は以下のとおりであった。

50

【0141】

(1) プローブの作製

pGEM-T easy vector (前出) に組み込んで増幅したプローブを用いた。すなわち、該ベクターを含有する大腸菌を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin 含有 3 ml の LB 培地で 37、8 時間以上培養した。次いで、NucleoSpin Plasmid (商品名、Macherey - Nagel 社) にて培養物からプラスミド DNA を抽出して EcoRI で 3 時間処理し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ エチレンブロマイド含有 1.5% Seakem ME agarose で泳動し、インサート部分を切り出した。QIAquick gel extraction kit (商品名、QIAGEN 社) にて目的のプローブ DNA を抽出した。

10

【0142】

該プローブのシーケンス (269 bp) は、

5' - CTTCCC ATAGTG CATCTACTGCAGTGAGTGAGGCAAA
 GCCTGGTGGGTCCCTGGTGCCGTGGGAAATCTTCTCTCATC
 ACCCTGGTCTCTCGGTGTGGCGGCCGTGGGGCTCTTTTGCTG
 GGCTCTTCTTCTGTGTGAGAAACAGCCTGTCCCTGAGAAA
 CACCTTTTAACACAGCTGTCTACCACTCTCATGGCCTCAAC
 CATGGCCTTGGTCCAGGCCCTGGAGGGAATCATGGAGCCC
 CCCACA AGGCCCAAGGTGGAGTCTTAACCTGGTTTC - 3' (配列番号
 : 176)

20

であった (下線部は、hepintm - F、R に対応する配列)。

【0143】

(2) Cancer Profiling Array II を用いた解析

Cancer Profiling Array II (BD Biosciences Clontech 社) を用いて、ハイブリダイゼーションを行った。具体的に、95 で 5 分間変性させた 1 mg sheared salmon testis DNA (SIGMA 社) を添加した Express Hyb solution (商品名、BD Biosciences Clontech 社) の 10 ml に対して 68 で 30 分以上アレイのメンブレンをプレハイブリダイゼーションした。一方、上記のプローブを Rediprime (商品名、Amersham pharmacia biotech 社) により α - ^{32}P - dCTP にてラベルした後、NICK column (商品名、Amersham pharmacia biotech 社) で分離した。分離物のカウントを測定してそれが $2 \times 10^6 \text{ cpm}/\text{ml}$ になるように調整すべく 0.15 mg sheared salmon testis DNA (SIGMA 社) と共に新たな Express Hyb solution の 5 ml に混合し、95 で 10 分変性させた後、これを上記メンブレンと 68 で 1 晩ハイブリダイゼーションした。翌日、 $2 \times \text{SSC} - 0.5\%$ SDS 溶液にて 68 で 30 分洗浄を三回行い、二次洗浄として、 $0.2 \times \text{SSC} - 0.5\%$ SDS 溶液にて 68 で 30 分洗浄を一回行った。 $2 \times \text{SSC}$ 溶液にて SDS を除いた後、イメージングプレート (富士フィルム社製) に感光し、BAS1800 (富士フィルム社製) にて現像を行った。

30

40

【0144】

図 14 に示されるように、各腫瘍組織と正常組織間の比較において、子宮体部及び子宮頸部の正常組織における発現が最も顕著であったが、そのレベルは個体間で一定していなかった。当該組織において特筆すべきことは、固体ごとの腫瘍及び正常組織のペアを比較すると、腫瘍組織において発現が顕著であるときには正常組織にける発現が低下しており、また、逆も真であった。

【0145】

殊に、甲状腺及び精巣においては腫瘍組織において常に正常組織を上回る発現が観察された。肺、胃、外陰、直腸及び皮膚に関しては数固体からの腫瘍組織或いは正常組織において発現が見られた。乳腺腫瘍組織において本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様

50

糖タンパク質の発現は観察されなかった。

【0146】

このことから、本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質は、少なくともこれら甲状腺腫瘍細胞や精巣腫瘍細胞の腫瘍マーカーとして有用であることが確認された。

【実施例5】

【0147】

実施例5：形質転換宿主細胞におけるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現

N末端側にFLAGエピトープ・タグを付加した前記ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質のコード配列を哺乳動物発現用ベクターp cDNA3.1(-)(Invitrogen社)に挿入した。また、当該コード配列を含まないプラスミドを対照とした。これらのプラスミドをATCCより入手したヒト骨髓性白血病細胞株K562にエレクトロポレーションによって導入した。ジェネティシン(G418硫酸塩; Calbiochem社)により選択した後、限界希釈法によって形質転換細胞をクローニングした。エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の当該細胞上での発現を検出するためのフローサイトメトリーは、抗FLAG-M2抗体(シグマ社)とFITC標識ヤギ抗マウスIgG1抗体(Zymed Laboratories社)を組み合わせ、Epics Coulter XL(商品名)フローサイトメーター(Beckmann Coulter社)を用いて行った。一方、当該細胞表面上のムチン様糖タンパク質特異的糖鎖エピトープ検出のために、Vector Laboratoriesからのビオチン化Vicia villosa(ビロードフジクサ)アグルチニン-B4(:VVA-B4)及び生化学工業社製のビオチン化Arachis hypogaea(ピーナッツ)アグルチニン(:PNA)をフィコエリスリン標識ストレプトアビジン(eBioscience社)と共に用いた。なお、死細胞は除外した。

【0148】

ウエスタン・ブロットのため、細胞を回収しPBSで2回洗浄した。洗浄後、細胞を10 mM Tris-HCl(pH 7.4; 0.5% Nonidet P-40、0.25 M Sucrose、0.05 mM 塩化カルシウム、2 mM EDTA及びproteinase inhibitor cocktail(1/1000希釈、シグマ社)含有)で溶解し、14,000 rpm、4、20分間遠心分離した。上清を回収して、BCA protein assays(Pierce社)で定量することにより25 µgタンパク質に相当する細胞溶解物を得た。該細胞溶解物は、緩衝液(0.25 M Tris-HCl(pH 6.8)、40% グリセロール、8% SDS、0.001% ブロムフェノールブルー)中、1%(v/v)2-メルカプトエタノールとともに煮沸し、8%ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動の後にポリビニリデン・フルオリド膜(Immobilon-P(商標)、ミリポア社)に写した。0.1% Tween 20含有PBS中の3% BSAにより該膜をブロッキングした後、3% BSA及び0.1% Tween 20含有Tris緩衝生理食塩水(50 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl)で希釈したビオチン化抗FLAG-M2抗体(シグマ社、1/1000希釈)、2.5 µg/mlのビオチン化VVA-B4、又は2.5 µg/mlのビオチン化PNAとともに室温で2時間インキュベートした。同一の条件で抗マウスIgG1抗体(Zymed社)を使用して抗体染色の陰性対照とした。3% BSA及び0.1% Tween 20含有Tris緩衝生理食塩水で1000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ・ストレプトアビジン・コンジュゲート(Zymed社)をウエスタン・ブロットで、アルカリフォスファターゼ・ストレプトアビジン・コンジュゲート(Vector社)をレクチン・ブロットで、夫々、用いて、結合を調べた。結合した抗体及びレクチンは、夫々、ECL検出キット(Amersham社)及びアルカリフォスファターゼ基質キット(Vector社)により可視化した。

【0149】

図16に示すように、前記抗FLAG抗体は本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン

様糖タンパク質で形質転換した細胞 (K 5 6 2 / M U C 2 1) にのみ結合し、対照プラスミドによる形質転換細胞 (K 5 6 2 / M o c k) には結合しなかった。このことは、当該遺伝子産物が細胞表面に遍在して発現することを示す。更に、V V A - B 4 及び P N A は対照プラスミド形質転換細胞よりも本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質で形質転換した細胞に対して顕著に結合することが判り、これは当該遺伝子による形質転換細胞の表面に多くの O - 結合型糖鎖が提示されたことを示している (図 1 6 A)。

本発明の形質転換細胞の溶解物に関する S D S - P A G E では、約 2 0 0 - 2 3 0 k D a に移動する分子に対して抗 F L A G 抗体が顕著に結合したが、対照件質転換細胞において当該結合は観察されなかった。V V A - B 4 及び P N A のレクチン・プロットでも同じ結果が得られたが、但し C o n A によるプロットでは結合が観測されなかった (図 1 6 B)。

このことは、O - 結合型糖鎖が本発明の遺伝子産物に結合することを実証する。また、少なくともこの発現系において当該遺伝子産物の見掛けの分子量はおよそ 2 3 0 k D a と見積もられ、ペプチド部分の分子量約 5 7 k D a より極めて大きなことが判明した。

10

【実施例 6】

【0150】

実施例 6：ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的抗血清を用いた細胞及び組織染色

6 - 1 . 合成ペプチドを免疫原としたヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的抗血清の作製

(1) 合成ペプチドの作製

本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の細胞質内領域に位置する部分配列 17 アミノ酸残基 (配列番号：171 のアミノ酸配列の第 580 - 596 位から成る 17 アミノ酸残基) の N 末にシステインを付加した合成ペプチドを作成した。該ペプチド合成は、Peptide Synthesis System (Pioneer 社) を用いて F - m o c 固層合成法により行った。合成に使用した F - m o c アミノ酸は、全て OH 体 (Applied Biosystems 社) をそれぞれ 0.4 mmol 使用した。合成後、ペプチド脱離試薬 (0.7 g phenol、0.3 ml thioanisole、0.2 ml ethanedithiol、9.5 ml trifluoroacetic acid) と共にレジン室温で 2 時間反応させてペプチドを外し、脱保護を行った。グラスフィルターで濾過してレジンを除き、ジエチルエーテルで数回洗浄し、ペプチドを析出させた。析出したペプチドを最小量の Milli Q (商標) 水に溶かした。

20

30

【0151】

(2) 精製

逆層 HPLC (日本分光社製) を用いて上記合成ペプチドを精製した。カラムは 5 C 18 カラム (Cosmosil (商標)、ナカライテスク社) を用い、カラム温度 40、流速 2 ml/min で分離を行った。4 mg の精製前合成ペプチドをカラムにアプライ後、Jasco PU-1580 ポンプ (商品名、日本分光社) を用いて溶媒 A (0.05% TFA / Milli Q (商標) 水) を 30 分かけて溶媒 A : 溶媒 B (0.05% TFA / プロパノール) : アセトニトリル (PE Biosystems 社) = 50% : 35% : 15% に置換し、その後 35 分かけて溶媒 B : 溶媒 C = 70 : 30 に段階的に置換しながら溶出を行った。その後、5 分間同組成で溶出後、続いて溶媒 A により平衡化を 15 分間行った。分取した画分を MALDI - TOF MS spectrum (Voyager Elite (商品名)、PE Biosystems 社) にて質量分析を行い、目的の画分を回収した。精製したペプチドを凍結乾燥し、-20 に保存した。

40

【0152】

(3) キャリアータンパク質との共有結合

K L H 20 mg (Calbiochem 社) を 1 ml の 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、同緩衝液に対して一晚透析を行った。透析した溶液に MBS 溶液 (5 mg MBS (SIGMA 社) / 17 ml DMF (和光純薬社)) を加えて室温で 30 分振とうし、K L H と MBS を結合させた。反応溶液を econo - pa

50

c G D 1 0 カラム (商品名、 B i o - R a d 社) によって、 0 . 0 5 M リン酸緩衝液 (p H 6 . 0) を用いてゲル濾過した。各フラクションの吸光度を測定して、 K L H - M B S が含まれている画分を取得した。上記の凍結乾燥した合成ペプチド 1 m g を 0 . 6 m l の 0 . 0 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2) に溶解し、そこに前記で分取した K L H - M B S をゆっくりと攪拌しながら加え、 H C l で p H 7 . 0 ~ 7 . 5 に合わせた。そのまま室温で 3 時間反応させ、該反応液を P B S (1 L) に対して 4 で 1 晩透析した。これを分注し、 - 2 0 に保存した。 B S A に対しても、同様に共有結合体を作成した。

【 0 1 5 3 】

(4) 免疫と血清採取

日本白色ウサギ (2 ~ 2 . 5 k g 、 雌) は日本医科学動物資材研究所より購入し、東京大学薬学部動物施設で飼育した。実験には購入後 1 週間予備飼育したウサギを用いた。 K L H と共有結合させたペプチド 0 . 2 m g 分の溶液と F r e u n d c o m p l e t e a d j u v a n t (N A K A R A I C H E M I C A L S 社) を混合してエマルジョンを作製し、ウサギに皮下投与した。免疫は 2 週間毎に行い、 2 回目以降の追加免疫は F r e u n d i n c o m p l e t e a d j u v a n t と K L H と共有結合させたペプチド 0 . 1 m g 分の溶液を混合してエマルジョンを作製し、免疫した。追加免疫一週間後、ウサギ耳静脈より採血をおこなった。 3 7 で 1 時間インキュベートした後に、 4 で 1 晩静置して血液凝固させ、 1 5 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心し、その上清を血清とした。

【 0 1 5 4 】

(5) E L I S A 法による抗体価の測定

9 6 穴 E L I S A プレートに、抗原として 0 . 0 5 M N a H C O ₃ (p H 9 . 6) に溶解した 1 0 m g / m l の B S A 結合合成ペプチド及び 2 0 m g / m l の K L H と 2 0 m g / m l の B S A をそれぞれ加え、 4 にて一晩静置した。 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S 中) にて 3 回洗浄後、 3 % B S A (P B S 中) にて室温にて 2 時間ブロッキングを行った。 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S 中) にて 3 回洗浄後、 1 % B S A (P B S 中) で希釈した上記のウサギ血清を加え、室温にて 2 時間反応させた。 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S 中) にて 3 回洗浄後、 1 % B S A (P B S 中) にて 1 0 0 0 倍希釈した H R P - G o a t A n t i R a b b i t I g G 抗体 (Z y m e d 社) を二次抗体として室温で 1 時間反応させた。 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S 中) にて 5 回洗浄後、 1 m M A B T S の 1 μ l / m l H ₂O₂ 溶液で発色させ、吸光度 4 0 5 / 4 9 2 n m を測定した。

【 0 1 5 5 】

6 - 2 . ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的抗血清を用いた細胞染色

ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質強発現細胞株 (K 5 6 2 / M U C 2 1) の 1×10^4 c e l l を、 5 0 μ l の F C S と共にスライドガラスに固定化された c y t o f u n n e l d o u b l e (商品名、 T h e r m o 社) に加え、 C y t o s p i n 3 (商品名、 T h e r m o 社) を用いて p o l y - L - l y s i n e h y d r o b r o m i d e 1 m g / m l (和光純薬) を塗布したスライドガラス上に貼り付けた。 1 時間以上室温で風乾後、アセトンで 1 0 分間固定・透過処理し再び風乾した。細胞の周りを p a p p e n (商品名、大同産業社) で囲んでから、 P B S に 5 分間浸し、膨潤させた。 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液 1 0 0 μ l を加え、室温で 3 0 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体として、 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液にて 5 0 0 0 倍に希釈した前記ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的ウサギ血清 1 0 0 μ l を加え、 4 で 1 晩反応させた。 P B S で 5 分間、 3 回洗浄した後、二次抗体として、 A P - g o a t a n t i r a b b i t I g G (H + L) (Z y m e d 社) を 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液で 1 0 0 倍希釈した溶液 1 0 0 μ l で、室温 3 0 分間反応させた。 P B S で 5 分間、 1 回 ; T B S で 5 分間、 2 回洗浄した後、切片に H i s t M a r k R E D (K i r k e g a a d & P e r r y L a b o r a t o r i e s I n c . 製) 1 0 0 μ l で 1 0 分間反応させた。 P B S に浸し酵素

10

20

30

40

50

反応停止後、Aqua Poly Mount (Poly Science 社) で封入した。対照細胞は K 5 6 2 / Mock を用いた。

【 0 1 5 6 】

結果を図 1 7 に示す。本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的ウサギ血清により当該糖タンパク質を発現する細胞が特異的に染色された。

【 0 1 5 7 】

6 - 3 . ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的抗血清を用いた組織染色

(1) 検体サンプル

東京大学医学部付属病院病理部より借用した甲状腺乳頭癌のパラフィン包埋ブロックを検体サンプルとした。

(2) 切片作製

ミクロトームで 5 μ m の切片を作製し、MAS コートスライドガラス (マツナミガラス社) 上に接着させた。組織切片は 1 晩、3 7 ° で乾燥させてから染色に使用した。

(3)

脱パラフィン操作のため、キシレンに 1 0 分間、3 回、1 0 0 % エタノールに 2 分、2 回、1 0 0 % 、9 0 % 、8 0 % 及び 7 0 % のエタノールにそれぞれ 2 分、1 回浸した後、1 0 分以上水洗した。抗原の賦活化のため、電子レンジで沸騰させた 1 0 m M クエン酸ナトリウム緩衝液 (p H 6 . 0) に 1 5 分間浸し、その後 2 0 分間室温で放冷した。P B S で 5 分間、3 回洗浄した後、内在性のペルオキシダーゼを不活化するため、1 % H₂O₂ (m i l l i - Q (商標) 水中) に 3 0 分間浸した。P B S で 5 分間、3 回洗浄した後、細胞の周りを p a p p e n (大同産業社) で囲み、a v i d i n / b i o t i n b l o c k i n g k i t (V e c t o r 社) の a v i d i n D s o l u t i o n 4 d r o p s / m l を加えた 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液 5 0 0 m l を加え、室温で 3 0 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体として、a v i d i n / b i o t i n b l o c k i n g k i t (V e c t o r 社) の b i o t i n s o l u t i o n 4 d r o p s / m l を加えた 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液にて 2 0 0 0 倍に希釈したウサギ血清 3 0 0 μ l を加え、4 ° で 1 晩反応させた。P B S で 5 分間、3 回洗浄した後、二次抗体として、b i o t i n - g o a t a n t i r a b b i t I g G (H + L) (Z y m e d 社) を 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液で 2 0 0 倍希釈した溶液 3 0 0 μ l で、室温 3 0 分間反応させた。P B S で 5 分間、3 回洗浄した後、三次抗体として、Z y M a x T M s t r e p t a v i d i n - H R P c o n j u g a t e (Z y m e d 社) を 2 % N G S 及び 3 % B S A の P B S 溶液で 1 0 0 倍希釈した溶液 3 0 0 μ l で、室温 3 0 分間反応させた。P B S で 5 分間、4 回洗浄した後、A E C - S u b s t r a t e C h r o m o g e n K i t (Z y m e d 社) の 2 0 0 μ l で 5 分間程反応させた。P B S で 5 分間、1 回洗浄した後、M a y e r ' s H e m a t o x y l i n (武藤純化学社) で室温 2 分間核染色を行い、1 0 分以上水洗した。Aqua Poly Mount (Poly Science 社) で封入した。結果を図 1 8 に示した。

【産業上の利用可能性】

【 0 1 5 8 】

本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質は、組織適合性抗原との関連において組織の他家移植性を説明し、或いは腫瘍の存在及びその悪性度の指標となるとともに当該腫瘍に対する保護を提供し得るので、そのような用途において診断及び医薬産業において有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 9 】

【図 1】T A 3 - H a 細胞及び T A 3 - S t 細胞の表面糖鎖の確認を示す。T A 3 - H a 細胞及び T A 3 - S t 細胞を P N A 及び V V A で、夫々、染色しフローサイトメーターで蛍光を検出した。

10

20

30

40

50

【図2】T A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞における各種ムチンの発現を示す。T A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞からt o t a l R N Aを抽出し、R T - P C Rにより該細胞での各種ムチンの発現の有無を確認した。

【図3】T A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞における本発明のムチン様糖タンパク質の発現を示す。T A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞からm R N Aを抽出し、ノザンブロットティング法により本発明のムチン様糖タンパク質の発現の有無を確認した。a：ミニゲルでの泳動。b：ラージゲルでの泳動。

【図4】マウスD N AのP C Rによる本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子の検出を示す。C 5 7 B L / 6 Nマウス及び1 2 9 S V Jマウスの尾から、夫々、D N Aを抽出し、P C Rによって本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子を増幅した。

10

【図5】ファージクローンのD N Aのサザンブロットティングによる本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子の検出を示す。ブランクハイブリダイゼーション法により取得したファージクローン(a ~ f)のD N Aを抽出し、各種制限酵素で処理後、サザンブロットティング法により本発明のムチン様糖タンパク質遺伝子を検出した。

【図6】クローニングした本発明のマウス・ムチン様糖タンパク質の構造を示す。

【図7】T A 3 - H a細胞における本発明のムチン様糖タンパク質の発現を示す。T A 3 - H a細胞からt o t a l R N Aを抽出し、R T - P C Rにより本発明のムチン様糖タンパク質のc D N Aを確認した。

【図8】被免疫ウサギ血清中の抗e p i t m抗体及び抗e p i n t m抗体の検出を示す。e p i t mペプチド或いはe p i n t mペプチドで数回免疫したウサギ血清中の特異的抗体を、当該ペプチドを抗原としたE L I S Aにて検出した。塗りつぶした菱形及び円は免疫後の、空白の菱形及び円は免疫前の血清からの結果を示す。

20

【図9】抗e p i t m及び抗e p i n t mポリクローナル抗体によるT A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞のフローサイトメトリー分析結果を示す。T A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞を各ポリクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリーで蛍光を検出した。

【図10】抗e p i t m及び抗e p i n t mポリクローナル抗体によるT A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞のウエスタンブロットティングを示す。T A 3 - H a細胞及びT A 3 - S t細胞からの各細胞抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロットティング法により、ポリクローナル抗体で染色を行った。

30

【図11】C 5 7 B L / 6 Nマウスの組織における本発明のムチン様糖タンパク質の発現を示す。C 5 7 B L / 6 Nマウスの各組織からt o t a l R N Aを抽出し、ノザンブロットティング法により本発明のムチン様糖タンパク質の発現の有無を確認した。

【図12】マウス癌細胞株における本発明のムチン様糖タンパク質の発現を示す。各マウス癌細胞株からm R N Aを抽出し、ノザンブロットティング法により本発明のムチン様糖タンパク質の発現の有無を確認した。

【図13】9種類のヒト細胞株における本発明のヒト・ムチン様糖タンパク質の発現を示す。各ヒト細胞株からt o t a l R N Aを抽出し、R T - P C Rにより本発明のヒト・ムチン様糖タンパク質の発現の有無を確認した。

【図14】ヒトの正常及び腫瘍組織における本発明のヒト・ムチン様糖タンパク質の発現解析結果を示す。各臓器において、Nは正常組織、Tは腫瘍組織を示す。

40

【図15】正常ヒト組織における本発明のエピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現を示す。上段が本発明遺伝子のためのプローブ、下段はG 3 p d hプローブによる。

【図16】形質転換宿主細胞におけるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質の発現を示す。A：フローサイトメトリー解析結果（縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度）。B：ウエスタン及びレクチン・プロット解析結果（数値はk D a）。A n t i - F L A G m A b：抗F L A G - M 2抗体。V V A - B 4：V i c i a v i l l o s aアグルチニン - B 4。P N A：A r a c h i s h y p o g a e aアグルチニン。K 5 6 2 / M U C 2 1 (M U C 2 1)：本発明のヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質で形質転換した細胞。K 5 6 2 / M o c k (M o c k)：対照プラスミドによる形質転換細胞。

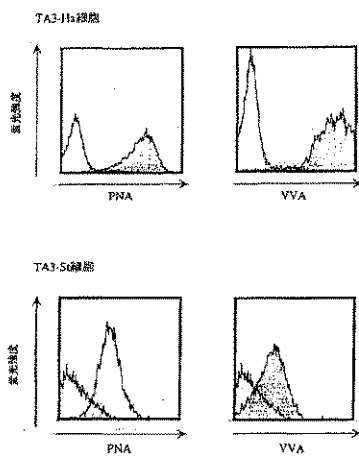
50

【図 17】ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質強発現細胞株における特異的抗体染色を示す。A：免疫前のウサギ血清による陰性対照細胞（K562/Mock）の染色結果。B：免疫前のウサギ血清によるヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質強発現細胞株（K562/MUC21）の染色結果。C：ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的ウサギ抗血清による陰性対照細胞の染色結果。D：ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的ウサギ抗血清による強発現細胞株の染色結果。発現が検出された部位のうち、代表的なものを矢印で示した。

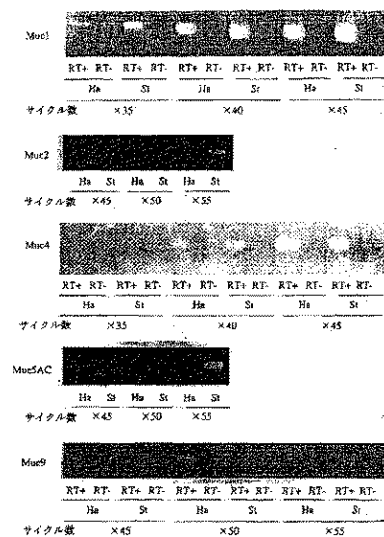
【図 18】甲状腺乳頭癌における特異的抗体染色を示す。A：免疫前のウサギ血清による当該組織の染色結果。B：ヒト・エピグリカニン関連ムチン様糖タンパク質特異的ウサギ抗血清による当該組織の染色結果。発現が検出された部位のうち、代表的なものを矢印で示した。

10

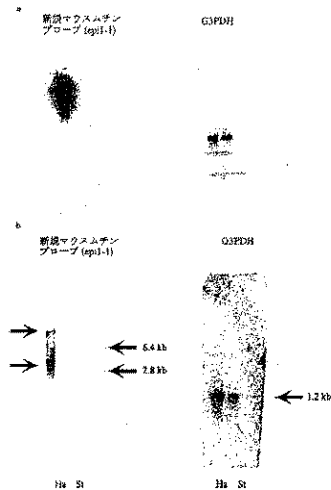
【図 1】



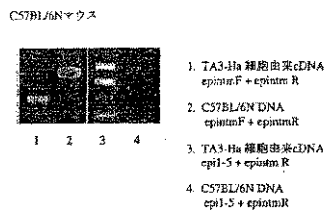
【図 2】



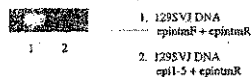
【図 3】



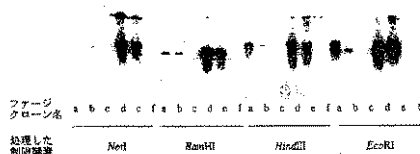
【図 4】



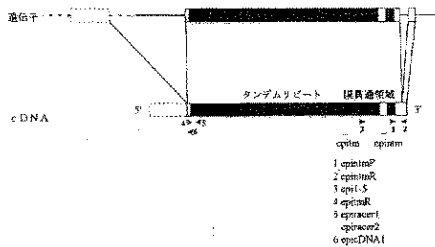
129SV1マウス



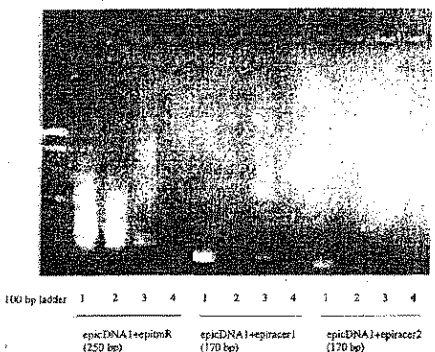
【図 5】



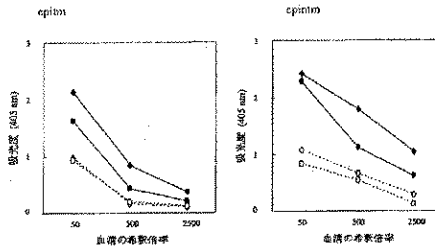
【図 6】



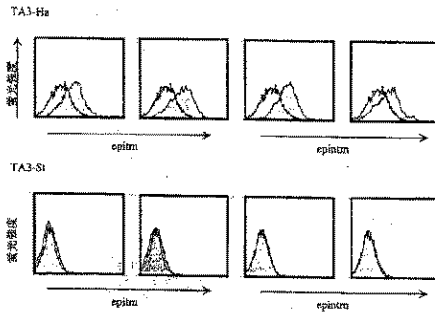
【図 7】



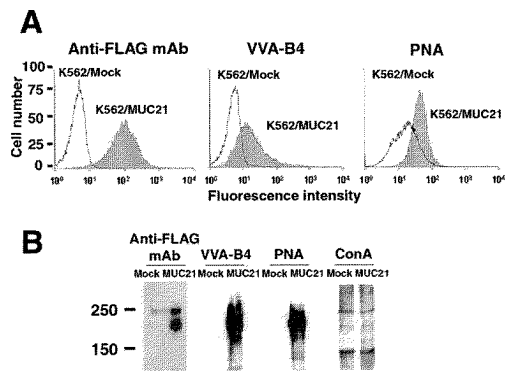
【図 8】



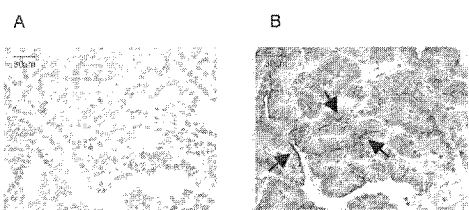
【図 9】



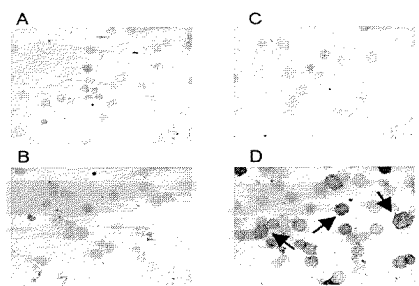
【 図 1 6 】



【 図 1 8 】



【 図 1 7 】



【 配 列 表 】

2006082851000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/301666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01), C07K14/47(2006.01), C07K16/18(2006.01),
C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N5/10(2006.01),
C12Q1/68(2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09(2006.01), C07K14/47(2006.01), C07K16/18(2006.01),
C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N5/10(2006.01),
C12Q1/68(2006.01)

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

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

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS/WPIDS (STN),
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-520810 A (Genentech, Inc.), 15 July, 2004 (15.07.04), Full text & WO 2002/016602 A	1-26
A	JP 2004-520811 A (Genentech, Inc.), 15 July, 2004 (15.07.04), Full text & WO 2002/016611 A	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 February, 2006 (20.02.06)

Date of mailing of the international search report
28 February, 2006 (28.02.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/301666

<Subject of search>

The mucin-like glycoproteins and nucleic acids as claimed in claims 1 to 26 involve various compounds over extremely broad scopes and complete search can be hardly made on all of them. On the other hand, it appears that only very small parts of the mucin-like glycoproteins and nucleic acids as described above are supported by the description in the meaning within Patent Cooperation Treaty Article 6 and disclosed therein in the meaning within Patent Cooperation Treaty Article 5.

Therefore, claims 1 to 26 and the description do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

Concerning the inventions according to claims 1 to 26, therefore, prior art documents were searched for in the international search report based on the compounds that are specifically cited in the description within a scope of reasonable burden.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/301666										
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), C12N1/15 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)												
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), C12N1/15 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)												
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの												
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq												
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>JP 2004-520810 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2004.07.15, 文献全体 & WO 2002/016602 A</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2004-520811 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2004.07.15, 文献全体 & WO 2002/016611 A</td> <td>1-26</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	A	JP 2004-520810 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2004.07.15, 文献全体 & WO 2002/016602 A	1-26	A	JP 2004-520811 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2004.07.15, 文献全体 & WO 2002/016611 A	1-26
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
A	JP 2004-520810 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2004.07.15, 文献全体 & WO 2002/016602 A	1-26										
A	JP 2004-520811 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2004.07.15, 文献全体 & WO 2002/016611 A	1-26										
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。												
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献												
国際調査を完了した日 20.02.2006		国際調査報告の発送日 28.02.2006										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内藤 伸一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/301666

<調査の対象について>

請求の範囲1-26に記載されたムチン様糖タンパク質や核酸は、極めて広範囲かつ多彩な化合物を包含し、そのすべてについて、完全な調査を行うことは困難である。一方、特許協力条約第6条の意味において明細書に裏付けられ、また、特許協力条約第5条の意味において明細書に開示されているものは、上記ムチン様糖タンパク質や核酸の中のごく僅かな部分に過ぎない。

したがって、請求の範囲1-26及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では、請求の範囲1-26の発明については、明細書に具体的に記載された化合物に基づいて、合理的な負担の範囲内で、先行技術文献調査を行った。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C		4 H 0 4 5		
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18					
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A				
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	V				
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P				
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	B				
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21					

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),
EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,
BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,
CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L
R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY
,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 入村 達郎
東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 伝田 香里
東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 鎌田 実香
東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 井口 淳裕
東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 伊藤 佑一
東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 小川 利久
東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BB14 BB21 BB22 BB24 BB50 BB51 CB02 DA36

FA18 FB03 FB11 FB16 GC12
4B024 AA11 BA43 CA03 CA04 CA09 EA04 GA11 HA12
4B063 QA18 QQ42 QQ53 QR55 QR62 QR82 QS25
4B064 AG26 CA19 CA20 CC24 DA13
4B065 AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA53 DA75 DA86 EA50 FA72 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項(実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	与Epiglycanin相关的粘蛋白		
公开(公告)号	JPWO2006082851A1	公开(公告)日	2008-06-26
申请号	JP2007501592	申请日	2006-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	东京大学		
[标]发明人	入村達郎 伝田香里 鎌田実香 井口淳裕 伊藤佑一 小川利久		
发明人	入村 達郎 伝田 香里 鎌田 実香 井口 淳裕 伊藤 佑一 小川 利久		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/574 C12N1/21		
CPC分类号	C07K14/4727		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K16/18 C12Q1/68. A G01N33/53.V G01N33/48.P G01N33/574.B C12N1/21		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BB14 2G045/BB21 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA18 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/FB16 2G045/GC12 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	2005027019 2005-02-02 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 本发明首次描述了与表聚糖相关的粘蛋白样糖蛋白和编码该蛋白的核酸的分离。 本发明还首次揭示了小鼠蛋白质的人同源物的存在。 [解决方案] 一种粘蛋白样糖蛋白，具有由以下通式表示的氨基酸序列：A-Bn-CDE（其中A是包含信号序列的N端区域；Bn是富含丝氨酸/苏氨酸的大约11个氨基酸，可提供O-糖基化位点）。串联重复区域（n = 20至150），其中重复了由大约15个氨基酸残基组成的氨基酸序列（B）；C是包含潜在酶切位点的区域；D是在小鼠和人之间显示出高度同源性的细胞膜 穿透区域；E是胞浆内区域）。[选择图]图14

【 図 2 】

