明　細　書

発明の名称 ： タンパク質の製造方法

技術分野

[0001] 本出願は、組換え細胞における外来性遺伝子からのタンパク質の発現を亢進するための、組換え細胞、並びにその様な細胞を利用した発明に関する。より具体的には、p180タンパク質の発現、および／またはSF3b4タンパク質の発現がともに亢進された細胞、またはその様な特徴を有する細胞を利用した、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能を亢進し、その結果としてタンパク質を製造する方法を提供することに関する。上記特徴を有する細胞を利用した、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能を亢進し、その結果としてタンパク質を製造する方法においては、目的物であるタンパク質発現のためのベクター中でcis-エレメントを利用することもまた、特徴とする。

背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術を応用したバイオテクノロジー医薬品は、近年、とくに抗体医薬品市場が急速に拡大するなか、その医療費への負荷も危惧されるようになっており、従来よりも効率的にタンパク質生産を行うことができ、そしてコストのより低いバイオテクノロジー医薬品の製造技術の開発が常に求められている。

[0003] 遺伝子組換え技術を利用したタンパク質生産のための宿主としては、これまで、動物細胞、酵母、大腸菌などが利用されている。大腸菌などは、目的物としてのタンパク質を低コストで生産することが可能であるが、糖鎖修飾等の翻訳後修飾を行うことができず、糖タンパク質の生産には不向きである。また、大腸菌では生産したタンパク質を含む封入体を作りやすい性質があり、目的物としてのタンパク質の取得には、合成後にさらに可溶化プロセスが必要となり、作業負荷が高いという欠点が存在する。

[0004] 特に、抗体等の糖タンパク質の場合、付加された糖鎖が、目的物としての

タンパク質の水溶性、プロテアーゼに対する抵抗性、組織標的性、さらにはその生物活性にも影響するため、高等真核生物である動物細胞を用いた生産技術が必要とされ、近年その技術は大きく進歩した。そのような状況のもと、現在の抗体医薬品の多くはChinese Hamster Ovary (CHO) 細胞で生産されているが、その製造プロセスの最適化は依然として重要な課題である。

[0005] 哺乳動物細胞を含む真核生物細胞から細胞外へ分泌されるタンパク質は、内膜で仕切られた細胞内小器官である小胞体において合成される。小胞体は、RNA-タンパク質の巨大複合体からなるタンパク質合成装置であるリボソームを表面に持つ粗面小胞体と、リボソームの無い滑面小胞体の2種に大別されるが、粗面小胞体の詳しい形成機構は明らかではない。

[0006] 生体内には、特定のタンパク質の分泌に専門的に従事する分泌専門細胞（professional secretory cells）が存在し、それらの細胞においては粗面小胞体が著しく発達しており、高効率のタンパク質生産を可能にしていると考えられる。例としてはコラーゲンを分泌する線維芽細胞、消化酵素群を分泌する膵臓線房外分泌細胞などが、そのような分泌専門細胞に該当する。これらの分泌専門細胞と比較して、現在遺伝子工学的タンパク質生産に多く利用されているCHO細胞、HEK293細胞等の粗面小胞体は非常に少量であり、分泌活性が低いという問題がある。

[0007] 遺伝子組換え技術を利用してバイオテクノロジー医薬品を生産する際には、目的物であるタンパク質の遺伝子は発現ベクター中で高い転写活性を示すプロモーターの制御化にあり、そのmRNAは高レベルで発現していると予想される。しかし、そのような状況下に置いても、mRNAレベルとタンパク質発現量そのものとが相関しない場合もしばしばあり、その一因として小胞体膜上での翻訳効率の低さを挙げる事が出来る。

[0008] 即ち、現在これらの遺伝子工学的タンパク質生産に多く利用されている細胞においても、mRNAを小胞体膜上での翻訳装置に対して利用しやすい形で提供できれば、線維芽細胞の場合と同様に、タンパク質合成能を一段と増強できる余地が残されていると考えられることを意味している。

[0009] コラーゲンを恒常的に分泌している線維芽細胞では、コラーゲンタンパク質をコードするmRNAは常時高レベルに発現しており、その大部分が分泌タンパク質の生合成の場である小胞体膜上に検出されることが知られている（非特許文献１）。しかし、コラーゲン合成を活性化させるためにはそのmRNAが小胞体上に存在するだけでは不十分であって、翻訳効率の高いポリソームを形成させることが必要となる。

[0010] 発明者らのこれまでの解析により、コラーゲン遺伝子などの一部のタンパク質のmRNAには、タンパク質合成装置であるリボソームが複数付着したポリソームが形成されやすい性質を備えることが明らかとなっている（特許文献１、非特許文献２）。これらより、遺伝子組換え技術を利用してバイオテクノロジー医薬品を生産する際に、目的タンパク質をコードする遺伝子転写産物が高レベルで発現しているのに関わらず、そのタンパク質合成／分泌量が低い問題が生じるのは、利用されている細胞においてmRNAが小胞体膜上での翻訳装置に利用しやすい形で提供できていない可能性が推測された。

先行技術文献

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ueno, T., et al., (2010). J Biol Chem 285(39), 29941-50.
非特許文献2：Ueno, T., et al., (2012). Regulation of polysome assembly on the endoplasmic reticulum by a coiled-coil protein, p180. Nucleic Acids Res.

特許文献

[0012] 特許文献1：特願2011-227462

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 小胞体におけるタンパク質合成において小胞体へのmRNAの局在化（ポリソーム形成）が必須である。さらに高効率なタンパク質合成にはmRNAに多数のリボソームの付着したポリソーム形成の促進が非常に効果的であると考えら

れていたが、p180タンパク質のポリソーム形成の促進機能の機構は明らかではなかった。

課題を解決するための手段

[0014] 本出願の発明者らは、詳細な解析を進めた結果、p180タンパク質のポリソーム形成促進機能の責任領域であるcoiled-coilドメイン（非特許文献2）と特異的に相互作用し、mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質、スプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タンパク質を新たに見出した。そして、SF3b4タンパク質とp180タンパク質の両方を高発現する細胞を作出したところ、その様な特徴を有する細胞において、mRNAの小胞体上への局在化が著しく上昇し、培養細胞の分泌機能を上昇させる事が可能となることを明らかにした。その結果、本願発明を完成するにいたった。

[0015] 本発明の発明者らは、細胞において、p180タンパク質の全長またはその部分の発現、そしてmRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現、が亢進された、細胞内での目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が亢進された組換え細胞を提供することができることを示した。

[0016] 本発明の発明者らはまた、本発明の第2の態様において、p180タンパク質の全長またはその部分の発現を亢進させ、そしてmRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現を亢進させた組換え細胞において、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換するかまたは目的物としてのタンパク質の産生量を増加させることにより、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能を亢進し、その結果としてタンパク質を製造する方法を提供することができることを示した。

[0017] 本発明においては、このような特徴的な組換え細胞を提供し、あるいはそのような特徴的な組換え細胞を利用して、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能を亢進するすることにより、上述した課題を解決することができることを示した。

[0018] [1] 細胞において、p180タンパク質の全長またはその部分の発現、mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現、またはこれらの両方の

発現がともに亢進された、細胞内での目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が亢進された組換え細胞。

[2] p180タンパク質が、

(a) ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

(b) ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

(c) ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) と少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

(d) ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、および

(e) ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) と相補的なヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

からなる群から選択される、[1] に記載の組換え細胞。

[3] p180タンパク質が哺乳動物由来のものである、[1] または [2] に記載の組換え細胞。

[4] 哺乳動物のp180タンパク質の全長またはその部分が、ヒトp180タン

パク質（SEQ ID NO: 2）、マウスp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_077243）、ラットp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_230637）、チャイニーズハムスターp180タンパク質（GenBank Accession No. XM_003496471）、イヌp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_001003179）、ウマp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001915027）、サルp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_002798281）、チンパンジーp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_514527）、ブタp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926148）、またはそれらの部分である、［3］に記載の組換え細胞。

［5］ p180タンパク質の部分が、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、623～737番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、738～944番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、945～1540番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、から選択される、［1］～［4］のいずれか1項に記載の組換え細胞。

［6］ mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質が、スプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タンパク質の全長またはその部分（SEQ ID NO: 4の全長アミノ酸配列424 AA；RRM1であるSEQ ID NO: 4の13～91 AA；.RRM2であるSEQ ID NO: 4の100、からなる群から選択される、［1］～［5］のいずれか1項に記載の組換え細胞。

［7］ SF3b4タンパク質が、

（i）ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 4）と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（ii）ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 4）において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（iii）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（iv）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（v）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と相補的なヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

からなる群から選択される、［6］のいずれか1項に記載の組換え細胞。

［8］ SF3b4タンパク質が哺乳動物由来のものである、［6］または［7］に記載の組換え細胞。

［9］ 哺乳動物のSF3b4タンパク質の全長またはその部分が、ヒトSF3b4タンパク質（SEQ ID NO: 4）、マウスSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_694693.1）、ラットSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001011951.1）、チャイニーズハムスターSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_003498680.1）、イヌSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_540295.3）、ウマSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001488649.2）、サルSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001097793.1）、チンパンジーSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_513768.2）、ブタSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926524.1）、またはそれらの部分である、［8］に記載の組換え細胞。

［10］ 目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換するかまたは目的物として

のタンパク質の産生量を増加させることにより亢進された、［1］～［9］のいずれか1項に記載の組換え細胞。

［11］ 受託番号NITE BP-01753（CHO 3D5）、受託番号NITE BP-1535（CHO YA7）、または受領番号NITE ABP-01811（CHO 1B2）により表される、細胞株。

［12］ p180タンパク質の全長またはその部分の発現を亢進させ、mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現を亢進させ、またはこれらのタンパク質両方の発現を亢進させた組換え細胞において、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換するかまたは目的物としてのタンパク質の産生量を増加させることによる、目的物としてのタンパク質を製造する方法。

［13］ p180タンパク質が哺乳動物由来のものである、［12］に記載の方法。

［14］ 哺乳動物のp180タンパク質の全長またはその部分が、ヒトp180タンパク質（SEQ ID NO: 2）、マウスp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_077243）、ラットp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_230637）、チャイニーズハムスターp180タンパク質（GenBank Accession No. XM_003496471）、イヌp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_001003179）、ウマp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001915027）、サルp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_002798281）、チンパンジーp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_514527）、ブタp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926148）、またはそれらの部分である、［13］に記載の方法。

［15］ 哺乳動物のp180タンパク質の部分が、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域を含む部分、623～737番アミノ酸からなる領域を含む部分、738～944番アミノ酸からなる領域を含む部分、945～1540番アミノ酸からなる領域を含む部分、から選択される、［13］または［14］に記載の方法。

[16] mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質が、スプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タンパク質の全長またはその部分（SEQ ID NO: 4の全長アミノ酸配列424 AA；RRM1であるSEQ ID NO: 4の13～91 AA；.RRM2であるSEQ ID NO: 4の100、からなる群から選択される、[12]～[15]のいずれか1項に記載の方法。

[17] SF3b4タンパク質が哺乳動物由来のものである、[16]に記載の方法。

[18] 哺乳動物のSF3b4タンパク質の全長またはその部分が、ヒトSF3b4タンパク質（SEQ ID NO: 4）、マウスSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_694693.1）、ラットSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001011951.1）、チャイニーズハムスターSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_003498680.1）、イヌSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_540295.3）、ウマSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001488649.2）、サルSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001097793.1）、チンパンジーSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_513768.2）、ブタSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926524.1）、またはそれらの部分である、[17]に記載の方法。

[19] 組換え細胞が、受託番号NITE BP-01753（CHO 3D5）、受託番号NITE BP-1535（CHO YA7）、または受領番号NITE ABP-01811（CHO 1B2）により表される細胞株である、[12]～[18]のいずれか1項に記載の方法。

[20] 目的物としてのタンパク質が、糖タンパク質である、[12]～[19]のいずれか1項に記載の方法。

[21] 目的物としてのタンパク質が、コラーゲン、フィブロネクチンまたは抗体である、[20]に記載の方法。

[22] 目的物としてのタンパク質を発現するための発現ユニット中、プロモータの下流でかつ目的物としてのタンパク質をコードするDNAのヌクレオチド配列の開始コドンの上流に、RNA結合タンパク質が認識／結合（あるいは相互作用）するcis-エレメントを挿入することにより、発現系細胞内におけ

る目的物としてのタンパク質の発現量を増大させる方法。

[23] cis-エレメントが、RNA認識モチーフ（RRM）型RNA結合タンパク質が認識／結合（あるいは相互作用）するものである、[22]に記載の方法。

[24] cis-エレメントが、SF3b4タンパク質のRNA認識モチーフ（RRM）が認識／結合（あるいは相互作用）するものである、[23]に記載の方法。

[25] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、1または数個の9mer～12merの配列モチーフGAN_1-$(X)_n$-ACN_2（n=3～6）（N_1およびN_2は独立してA、T、C、Gのいずれのヌクレオチドであってもよい））を含むものである、[22]～[24]のいずれかに記載の方法。

[26] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、1または数個の9mer～12merの配列モチーフ（GAG-$(X)_n$-ACV（n=3～6）（VはAまたはGまたはCを示す）、SEQ ID NO: 17～20）を含むものである、[25]に記載の方法。

[27] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、タイプIコラーゲン遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、フィブロネクチン遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、マトリックスメタロプロテアーゼ14（MMP14）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、プロリル4-ヒドラキシラーゼA2（P4HA2）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、プロリル4-ヒドラキシラーゼA1（P4HA1）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、からなる群から選択される配列である、[22]～[26]のいずれか1項に記載の方法。

[28] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、SEQ ID NO: 5の全長またはSEQ ID NO: 7の全長の他、SEQ ID NO: 5のうち1～102番ヌクレオチド、1～78番ヌクレオチド、1～60番ヌクレオチド、61～126番ヌクレオチド、16～57番ヌクレオチド、79～126番ヌクレオチド、103～126番ヌクレオチド、58～78番ヌクレオチド、51～78番ヌクレオチド、1～27番ヌクレオチド、70～78番ヌクレオチドからなる群から選択されるいずれかの配列である[22]～[27]のいずれか1項に記載の方法。

[29] 発現系細胞が、無傷の宿主細胞、p180タンパク質の全長またはそ

の部分の発現が亢進された細胞、SF3b4タンパク質の全長またはその部分の発現が亢進された細胞、またはこれらの両方の発現がともに亢進された細胞である、［22］～［28］のいずれか1項に記載の方法。

［30］ SF3ｂ4を機能阻害または発現抑制することにより、コラーゲン合成を抑制し、異常コラーゲンによる肺胞上皮、線維症の重症化を防止するための医薬組成物。

発明の効果

[0019] p180タンパク質の全長またはその部分の発現、および／またはmRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質（例えば、SF3b4タンパク質の全長またはその部分）の発現、が亢進された本発明の組換え細胞を利用して、目的物としてのタンパク質をコードするDNAを形質転換すると、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が、飛躍的に増加し、目的物としてのタンパク質を効率的に製造することが明らかになった。さらに、cis-エレメントを発現ユニット内に付加すると、タンパク質発現増強効果のあるSF3b4タンパク質を小胞体膜上へ局在化、およびポリソーム中mRNAを重量化シフトさせることが可能となり、これを介して細胞の分泌能を増強可能であることが示された。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1は、実施例1において調製した各細胞（CHO細胞、CHO 3D5細胞、CHO 5g細胞、そしてCHO YA7細胞）に関して、細胞内におけるp180タンパク質の発現とmRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質であるSF3b4タンパク質の発現とをウェスタンブロットにより調べた結果を示す図である。

[図2]図2は、実施例1において調製した各細胞に対して、分泌マーカーであるヒト胎盤由来分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）の発現プラスミドを外来性に導入した場合の、SEAPタンパク質の発現の結果を比較して示した図である。

[図3]図3は、実施例1において調製した各細胞に対して、分泌マーカーであるヒト胎盤由来分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）の発現プラスミドを外

来性に導入した場合の、SEAP mRNAの膜画分への局在化の程度を比較して示した図である。

[図4]図4は、cis-エレメントを含む発現ベクターのインサート部分の概略図（A）ならびにcis-エレメントの分泌活性化能を評価した結果（BおよびC）を示す図である。

[図5]図5は、コラーゲンを発現させた場合のタンパク質の分泌活性の変化を示す図である。

[図6]図6は、cis-エレメントを挿入することにより、抗体の分泌活性化が生じることを示す図である。

[図7]図7は、kozak配列とcis-エレメント#1の分泌活性化に対する効果をCHO細胞およびCHO YA7細胞を用いて比較した図である。

[図8]図8は、cis-エレメント#1、cis-エレメント#2、cis-エレメント#3、およびcis-エレメント#4を使用して、cis-エレメントの構造とタンパク質発現増強作用との関連性を示した図である。

[図9]図9は、cis-エレメント内のモチーフの一例が、GAG-(X)n-ACN_2（n＝3～6）であること（A）、および各エレメントのSEAP分泌活性を評価する図であること（B）を示す図である。

[図10]図10は、モチーフGAN_1-$(X)_n$-ACN_2のヌクレオチドにおける、置換、欠失、挿入による、そのモチーフの活性への影響を調べた図である。

[図11]図11は、SF3b4の発現抑制に伴いコラーゲンの産生が顕著に抑制されることを示す図である。

[図12]図12は、cis-エレメントを含まない場合と比較して、cis-エレメントを含む場合に、ポリソーム画分中のCOL1A1 cDNAの重量が高密度側にシフトすることを示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明の発明者らは、本発明の第1の態様において、細胞において、p180タンパク質の全長またはその部分の発現および／またはスプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タンパク質の全長またはその部分の発現、がともに

亢進された、細胞内での目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が亢進された組換え細胞を提供することができることを示した。

[0022] 本発明のこの態様において、p180タンパク質の全長または部分および／またはSF3b4タンパク質の全長またはその部分を両方とも細胞中で発現させることにより、その細胞内の小胞体膜上での目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子の発現産物であるmRNAが関与するポリソーム形成を促進することができる。ここで、ポリソームは、細胞内の小胞体膜上に存在する複数のリボソームに対して、1分子のmRNAが結合したもののことをいう。このようなポリソーム形成の促進の結果として、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能を亢進し、その結果としてタンパク質を製造することができる。

[0023] 本発明の上述した組換え細胞は、細胞において、p180タンパク質、特に哺乳動物のp180タンパク質、の全長またはその部分の発現が亢進されていることを第一の特徴としている。p180タンパク質とは、必須の小胞体膜タンパク質であり、そして分泌組織中で多く発現されており、ポリソーム形成を促進することができるタンパク質である。

[0024] ここで、p180タンパク質のアミノ酸配列を、ヒトのp180タンパク質（GenBank Accession No. AB287347）と比較した場合、マウスのp180タンパク質は87％の類似性、ラットのp180タンパク質は87％の類似性、チャイニーズハムスターのp180タンパク質は88％の類似性、イヌのp180タンパク質は91％の類似性、ウマのp180タンパク質は89％の類似性、サルのp180タンパク質は91～92％の類似性、チンパンジーのp180タンパク質は98％の類似性、ブタのp180タンパク質は86％の類似性を、それぞれ有することが知られており、哺乳動物のp180タンパク質はすべて、アミノ酸類似性で84％以上の範囲内に、それ以外の生物のp180タンパク質にまで範囲を広げてもアミノ酸類似性で76％以上の範囲内に、含まれることが報告されている。

[0025]

[表1-1]

表1:ヒトp180と比較した場合の、様々な種のp180の配列相同性

生物種		分類	タンパク質類似性(%):vsヒト	遺伝子同一性(%):vsヒト	Gene ID
Pan paniscus	チンパンジー	哺乳類	98	98	XM_003810595
Mus musculus	マウス	哺乳類	87	75	NM_024281
Bos mutus	ヤク	哺乳類	88	78	XM_005904566
Bos taurus	ウシ	哺乳類	87	74	XM_003582930
Canis familiaris	イヌ	哺乳類	91	84	NM_001003179
Monodelphis domestica	オポッサム	哺乳類	83	68	XM_001382073
Pongo abelii	オランウータン	哺乳類	92	85	XM_003779288
Macaca mulatta	サル	哺乳類	91	85	XM_001086541
Macaca fascicularis	サル	哺乳類	92	85	XM_005568285
Cricetulus griseus	チャイニーズハムスター	哺乳類	88	78	XM_003496471
Jaculus jaculus	齧歯類	哺乳類	86	76	XM_004668728
Otolemur garnettii	ガラゴ	哺乳類	90	79	XM_003801321
Spermophilus tridecemlineatus	ジリス	哺乳類	88	78	XM_005320449
Myotis brandtii	コウモリ	哺乳類	88	79	XM_005860586
Rattus norvegicus	ラット	哺乳類	87	75	XM_230637
Mustela putorius furo	フェレット	哺乳類	88	78	XM_004754183
Microtus ochrogaster	ハタネズミ	哺乳類	87	74	XM_005365517
Octodon degus	齧歯類	哺乳類	85	74	XM_004635679
Ochotona princeps	ナキウサギ	哺乳類	87	74	XM_004585968
Heterocephalus glaber	ラット	哺乳類	86	75	XM_004909847
Callithrix jacchus	マーモセット	哺乳類	84	69	XM_002806762
Papio anubis	ヒヒ	哺乳類	91	83	XM_003905099
Gorilla gorilla gorilla	ゴリラ	哺乳類	93	88	XM_004061840
Saimiri boliviensis boliviensis	サル	哺乳類	92	84	XM_003933177
Odobenus rosmarus divergens	セイウチ	哺乳類	87	76	XM_004412293
Orcinus orca	クジラ	哺乳類	87	76	XM_004270397
Myotis lucifugus	コウモリ	哺乳類	88	76	XM_006087977

[0026]

[表1-2]

Equus caballus	ウマ	哺乳類	89	82	XM_005604466
Ceratotherium simum simum	サイ	哺乳類	90	81	XM_004433726
Dasypus novemcinctus	アルマジロ	哺乳類	88	77	XM_004472392
Felis catus	ネコ	哺乳類	90	81	XM_003983802
Sus scrofa	ブタ	哺乳類	86	74	XM_005672713
Trichechus manatus latirostris	マナティ	哺乳類	88	77	XM_004376447
Condylura cristata	モグラ	哺乳類	89	78	XM_004687152
Pantholops hodgsonii	レイヨウ	哺乳類	87	77	XM_005985103
Chinchilla lanigera	チンチラ	哺乳類	86	73	XM_005380908
Echinops telfairi	テンレック	哺乳類	88	75	XM_004697814
Ovis aries	ヒツジ	哺乳類	84	73	XM_004014691
Chrysemys picta bellii	カメ類	は虫類	82	63	XM_005287452
Geospiza fortis	鳥類	鳥類	82	66	XM_005426202
Zonotrichia albicollis	鳥類	鳥類	82	66	XM_005488513
Pseudopodoces humilis	鳥類	鳥類	81	64	XM_005523241
Taeniopygia guttata	フィンチ	鳥類	82	65	XM_002196328
Gallus gallus	ヤケイ	鳥類	82	64	NM_001257346
Ficedula albicollis	ヒタキ	鳥類	81	65	XM_005042941
Alligator sinensis	アリゲータ	は虫類	81	62	XM_006030436
Pelodiscus sinensis	カメ類	は虫類	80	61	XM_006118575
Sarcophilus harrisii	タスマニアデビル	哺乳類	81	62	XM_003758168
Melopsittacus undulatus	セキセイインコ	鳥類	81	63	XM_005152037
Latimeria chalumnae	シーラカンス	肉鰭亜綱	81	59	XM_005992924
Capra hircus	ヤギ	哺乳類	80	62	XM_005688109
Xenopus tropicalis	カエル	両生類	78	55	BC074706
Xenopus laevis	カエル	両生類	78	55	NM_001089623
Mesocricetus auratus	ハムスター	哺乳類	80	57	XM_005068495
Danio rerio	ゼブラフィッシュ	条鰭亜綱	76	50	AY398408
Perca flavescens	イエローパーチ	条鰭亜綱	78	58	HQ206468

したがって、本発明において「p180タンパク質」という場合、

(a) ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

(b) ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) において

、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

（c）ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）と少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

（d）ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

（e）ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）と相補的なヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

のことをいう。

[0027] この態様の（a）において、アミノ酸配列同一性に関して、「ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 2）と少なくとも70%の配列同一性を有する」という場合、配列同一性の%値は、70%～100%のあいだのいずれの値を選択してもよく、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%などの配列同一性の%値を選択することができる。

[0028] この態様の（b）において、「1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加」という場合、欠失、置換、または付加されるアミノ酸数は1～10個程度までのことを意味し、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個のアミノ酸の数を選択することができる。

[0029] この態様の（c）において、「ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）と少なくとも70%の配列同一性を有する」という場合、配列同一性の%値は、70%～100%のあいだのいずれの値を選択してもよく、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%などの配列同一性の%値を選択することができる。

[0030] この態様の（d）において、「1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加」という場合、欠失、置換、または付加されるヌクレオチド数は1～10個程度までのことを意味し、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個のアミノ酸の数を選択することができる。なお、このような「1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加」されることにより、終止コドンが導入されずに、目的とする機能を有するタンパク質が規定できることは前提である。

[0031] この態様の（e）において、「ストリンジェントな条件下」という場合、例えば、遺伝子のヌクレオチド配列の長さに基づき、一般の技術を有する当業者により、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology Vol.1 (John Wiley and Sons, Inc.) やMolecular Cloning 2nd edition (Sambrook et al. (1989)) に記載されているように、5×SSC、5×Denhardt’s solution、1%SDS、25℃ないし68℃で、数時間から一晩などのハイブリダイゼーション条件を挙げることができる。この場合、ハイブリダイゼーションの温度としては、より好ましくは45℃ないし68℃（ホルムアミド無し）または30℃ないし42℃（50%ホルムアミド）を挙げることができる。洗浄の条件としては、例えば0.2×SSCで45℃ないし68℃が挙げられる。ホルムアミド濃度、塩濃度および温度などのハイブリダイゼーション条件を適宜設定することにより、ある一定の同一性以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子をクローニングできることは当業者に周知であり、このようにしてクローニングされた核酸分子は全て

本発明の範囲の中に含まれる。

[0032] ヒトp180タンパク質の全長は、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり（GenBank Accession No. AB287347）、このタンパク質は、SEQ ID NO: 1に示されるヌクレオチド配列によりコードされる（GenBank Accession No.AB287347）。このほか、上述したマウスのp180タンパク質は、GenBank Accession No. NP_077243により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、ラットのp180タンパク質は、GenBank Accession No. XP_230637により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、チャイニーズハムスターのp180タンパク質は、GenBank Accession No. XM_003496471により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、イヌのp180タンパク質は、GenBank Accession No. NP_001003179により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、ウマのp180タンパク質は、GenBank Accession No. XP_001915027により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、サルのp180タンパク質は、GenBank Accession No. XP_002798281により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、チンパンジーのp180タンパク質は、GenBank Accession No. XP_514527により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、ブタのp180タンパク質は、GenBank Accession No. XP_001926148により示されるヌクレオチド配列によりコードされる。

[0033] 例えば、p180タンパク質としてヒトのp180タンパク質を使用する場合、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域、623～737番アミノ酸からなる領域、738～944番アミノ酸からなる領域、、945～1540番アミノ酸からなる領域のいずれかを含む部分を発現させることにより、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進することができる（特許文献1）。

[0034] したがって、本発明において、「p180タンパク質の部分」という場合、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、623～737番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、738～94

4番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、945～1540番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分などの部分のことを意味する。このような部分を含むものは、ポリソーム形成を促進する能力を示すことができる。ヒトに関して、このようにして規定されるp180タンパク質の部分としては、上述したSEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域、623～737番アミノ酸からなる領域、738～944番アミノ酸からなる領域、945～1540番アミノ酸からなる領域を含む部分、などを含む部分そのものの他、ヒトp180タンパク質のN末端膜貫通ドメインのC末端側に隣接するMTB-2ドメイン、またはリボソーム-結合リピートドメインを含む高度に塩基性のN-末端領域、高度に塩基性のタンデムリピートドメイン、または微小管結合および束形成ドメイン（MTB-1ドメイン）、などが一例として含まれる（特許文献1）。

[0035] 前述したように、他の哺乳動物のp180タンパク質の部分を使用する場合も、ヒトのp180タンパク質のアミノ酸配列とその他の哺乳動物のp180タンパク質のアミノ酸配列が、全体的に、高度に保存されていることから、前述した（a）～（e）に示されるタンパク質のアミノ酸配列のうち、対応する部分または領域を含む断片のアミノ酸配列もまた、「p180タンパク質の部分」として使用することができる。

[0036] 本発明の上述した組換え細胞は、細胞において、mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現が亢進されていることを第二の特徴としている。この様なmRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質としては、SF3b4タンパク質、特に哺乳動物のSF3b4タンパク質の全長またはその部分（例えば、SEQ ID NO: 4の全長アミノ酸配列424 AA；RRM1であるSEQ ID NO: 4の13～91 AA；.RRM2であるSEQ ID NO: 4の100～179 AA；.
C-末端域である180～424 AA.）、等が含まれる。

[0037] この内、SF3b4タンパク質は、通常は核内においてのみ検出されるタンパク質であるが、コラーゲンを活発に分泌している線維芽細胞では、その大部分は核内に検出されるものの、さらに詳細に検討したところ、細胞質内の小胞

体を含む膜分画にSF3b4タンパク質が一部存在することが明らかになった。SF3b4タンパク質（SAP49/SF3b49ともいう）は、そのアミノ末端側にRNA認識モチーフ（RRM）を2つ含むことよりRNA認識モチーフ（RRM）型のRNA結合タンパク質（RBP）ファミリーに分類され、カルボキシ末端側には機能未知なプロリンリッチドメインを有する物質である。正常なスプライシング反応過程には、これら2つのRNA認識モチーフ（RRM）（RRM1、RRM2）の両者がともに必要であり、これらは酵母においても高度に保存され、重要な機能ドメインであると推測されている。また、SF3b4タンパク質は、SF3b複合体の他の構成タンパク質であるSAP145タンパク質とも結合し、この結合にもSF3b4タンパク質の2つのRNA認識モチーフ（RRM）（RRM1、RRM2）が両者とも必要であることが示されている（Champion-Arnaud & Reed, 1994）。即ち、SF3b4タンパク質のRRMドメインは、RNA認識に必要であるばかりでなく、タンパク質－タンパク質間の相互作用にも機能していると考えられる。

[0038] ここで、SF3b4タンパク質のアミノ酸配列を比較すると、ヒトSF3b4タンパク質と比較した場合、哺乳動物の調べられた全ての哺乳動物種において100%の類似性を示し、その他の種においても、酵母のSF3b4タンパク質は40～54%の類似性、昆虫のSF3b4タンパク質は63～81%の類似性、をそれぞれ有することが知られており、あらゆる生物において非常に保存的なタンパク質であることが報告されている。

[0039]

[表2-1]

表2:ヒトSF3b4と比較した場合の、様々な種のSF3b4の配列相同性

生物種		分類	タンパク質類似性(%):vsヒト	遺伝子同一性(%):vsヒト	Gene ID
Pan troglodytes	チンパンジー	ほ乳類	100	99	XM_513768
Gorilla gorilla gorilla	ゴリラ	ほ乳類	100	99	XM_004026557
Papio anubis	ヒヒ	ほ乳類	100	97	XM_003892563
Pan paniscus	ボノボ	ほ乳類	100	97	XM_003817322
Callithrix jacchus	マーモセット	ほ乳類	100	98	XM_002759857
Mus musculus	マウス	ほ乳類	100	92	NM_153053
Bos mutus	ヤク	ほ乳類	100	95	XM_005894874
Bos taurus	ウシ	ほ乳類	100	95	NM_001205584
Tursiops truncatus	イルカ	ほ乳類	100	96	XM_004315506
Macaca mulatta	サル	ほ乳類	100	99	NM_001261232
Macaca fascicularis	サル	ほ乳類	100	97	XM_005542035
Canis lupus	オオカミ	ほ乳類	100	93	XM_540295
Cricetulus griseus	チャイニーズハムスター	ほ乳類	100	91	XM_003498632
Jaculus jaculus	齧歯類	ほ乳類	100	88	XM_004668225
Otolemur garnettii	ガラゴ	ほ乳類	100	95	XM_003800416
Spermophilus tridecemlineatus	ジリス	ほ乳類	100	94	XM_005331144
Rattus norvegicus	ラット	ほ乳類	100	91	NM_001011951
Mustela putorius furo	フェレット	ほ乳類	100	94	XM_004776825
Microtus ochrogaster	ハタネズミ	ほ乳類	100	91	XM_005356945
Ochotona princeps	カヤネズミ	ほ乳類	100	91	XM_004588838
Heterocephalus glaber	ラット	ほ乳類	100	94	XM_004853946
Saimiri boliviensis boliviensis	サル	ほ乳類	100	96	XM_003941980
Odobenus rosmarus divergens	セイウチ	ほ乳類	100	94	XM_004404182
Orcinus orca	クジラ	ほ乳類	100	95	XM_004285129
Myotis lucifugus	コウモリ	ほ乳類	100	94	XM_006095177
Equus caballus	ウマ	ほ乳類	100	95	XM_001488599
Capra hircus	ヤギ	ほ乳類	100	95	XM_005677701
Mesocricetus auratus	ゴールデンハムスター	ほ乳類	100	92	XM_005084248
Sarcophilus harrisii	タスマニアデビル	ほ乳類	100	86	XM_003769946
Cavia porcellus	モルモット	ほ乳類	100	93	XM_003478880
Sorex araneus	トガリネズミ	ほ乳類	100	92	XM_004618056
Ceratotherium simum simum	サイ	ほ乳類	100	95	XM_004435941
Dasypus novemcinctus	アルマジロ	ほ乳類	100	91	XM_004461651
Felis catus	ネコ	ほ乳類	100	95	XM_004001496
Sus scrofa	ブタ	ほ乳類	100	95	XM_001926489
Trichechus manatus latirostris	マナティー	ほ乳類	100	94	XM_004389600

[0040]

[表2-2]

Condylura cristata	モグラ	哺乳類	100	92	XM_004689571
Pantholops hodgsonii	アンテロープ	哺乳類	100	95	XM_005970739
Chinchilla lanigera	チンチラ	哺乳類	100	93	XM_005378708
Echinops telfairi	テンレック	哺乳類	100	93	XM_004716571
Ovis aries	ヒツジ	哺乳類	100	95	XM_004002436
Geospiza fortis	鳥類	鳥類	98	77	XM_005430326
Pseudopodoces humilis	鳥類	鳥類	98	84	XM_005533471
Gallus gallus	ヤケイ	鳥類	98	81	XM_423721
Falco peregrinus	ハヤブサ	鳥類	97	74	XM_005244315
Chrysemys picta bellii	カメ類	爬虫類	97	83	XM_005293645
Alligator sinensis	アリゲータ	爬虫類	96	79	XM_006033517
Danio rerio	ゼブラフィッシュ	条鰭亜綱	92	79	NM_153661
Pundamilia nyererei	lapsus	条鰭亜綱	91	80	XM_005728504
Maylandia zebra	ムブナ	条鰭亜綱	91	80	XM_004549154
Capsaspora owczarzaki	メキシコトカゲ属	フィラステレア	88	77	XM_004345599
Xenopus tropicalis	カエル	両生類	88	79	NM_203785
Xenopus laevis	カエル	両生類	87	78	NM_001086631
Aplysia californica	ジャンボアメフラシ	腹足綱	77	66	XM_005109109
Drosophila melanogaster	ミバエ	昆虫綱	81	63	NM_078503.41
Anopheles gambiae	カ	昆虫綱	75	65	XM_321584.4
Apis mellifera	ミツバチ	昆虫綱	63	57	Group13.4(31702-33391)
Caenorhabditis elegans	蠕虫	双腺綱	73	65	II(8034428-8035767)
Daphnia pulex	ミジンコ	甲殻綱	79	65	scaffold_1(3898136-3899124)
Trichoplax adhaerens	センモウヒラムシ	平板動物綱	76	64	scaffold_6(4430698-4432902)
Nematostella vectensis	イソギンチャク	サンゴ虫類	68	62	scaffold_59(938974-944852)
Strongylocentrotus purpuratus	ウニ	ウニ綱	66	62	scaffold_1412
Schistosoma mansoni	住血吸虫	吸虫綱	65	60	Smp_scaff000217(455137-459876)
Arabidopsis thaliana	シロイヌナズナ	真正双子葉類	65	60	NM_127407.3
Phytophthora infestans	クロムアルベオラータ	卵菌類	62	56	supercont1.42(913888-914494)
Neurospora crassa	アカパンカビ	子嚢菌類	52	53	XM_956049.1
Schizosaccharomyces pombe	分裂酵母	シゾサッカロミケス属	54	55	NM_001019427
Saccharomyces cerevisiae	パン酵母	酵母	41	50	NP_014964
Ashbya gossypii	酵母	酵母	41	50	NM_208241.1
Kluyveromyces lactis	酵母	酵母	40	47	XM_452844.1
Chlamydomonas reinhardtii	緑藻類	緑藻類	50	46	DS496110
Chlamydomonas reinhardtii	緑藻類	緑藻類	50	56	XM_001696328

以上の様に、SF3b4タンパク質の一次アミノ酸配列が生物種間を超えて広く高度に保存されている事実より、ヒトSF3b4タンパク質を用いて確認された機能は他の生物種由来のSF3b4タンパク質を用いた場合にも再現される事が容易に推測される。

[0041] したがって、本発明において「SF3b4タンパク質」という場合、

(i) ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 4) と少な

くとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（ii）ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 4）において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（iii）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（iv）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（v）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と相補的なヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

のことをいう。

[0042] この態様の（i）において、アミノ酸配列同一性に関して、「ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 4）と少なくとも70%の配列同一性を有する」という場合、配列同一性の%値は、70%～100%のあいだのいずれの値を選択してもよく、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%などの配列同一性の%値を選択することができる。

[0043] この態様の（ii）において、「1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加」という場合、欠失、置換、または付加されるアミノ酸数は1～10個程

度までのことを意味し、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個のアミノ酸の数を選択することができる。

[0044] この態様の（iii）において、「ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と少なくとも70%の配列同一性を有する」という場合、配列同一性の%値は、70%～100%のあいだのいずれの値を選択してもよく、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%などの配列同一性の%値を選択することができる。

[0045] この態様の（iv）において、「1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加」という場合、欠失、置換、または付加されるヌクレオチド数は1～10個程度までのことを意味し、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個のアミノ酸の数を選択することができる。なお、このような「1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加」されることにより、終止コドンが導入されずに、目的とする機能を有するタンパク質が規定できることは前提である。

[0046] この態様の（v）において、「ストリンジェントな条件下」という場合、そのとり得る条件に付いては、p180タンパク質に関して前述したとおりである。

[0047] ヒトSF3b4タンパク質の全長は、SEQ ID NO: 4に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり（GenBank Accession No.NP_005841.1）、このタンパク質は、SEQ ID NO: 3に示されるヌクレオチド配列によりコードされる（GenBank Accession No.NP_005841.1）。このほか、上述したマウスのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. NP_694693.1により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、ラットのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. NP_001011951.1により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、チャイニーズハムスターのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. XP_003498680.1により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、イヌのSF3b4タン

パク質は、GenBank Accession No. XP_540295.3により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、ウマのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. XP_001488649.2により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、サルのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. NP_001097793.1により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、チンパンジーのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. XP_513768.2により示されるヌクレオチド配列によりコードされ、ブタのSF3b4タンパク質は、GenBank Accession No. XP_001926524.1により示されるヌクレオチド配列によりコードされる。

[0048] 本発明において発現が求められる、目的物としてのタンパク質をコードするDNAを、タンパク質発現系において用いられる細胞に対して形質転換すると、そのDNAから転写されたmRNA（前駆体）は、スプライシングによりアミノ酸の遺伝情報を持たないイントロン部分が除去され、成熟型mRNAに変換される。その過程はスプライソソームという核内低分子RNA（snRNA）-タンパク質からなる巨大複合体が担う。スプライソソームには、5種の低分子リボ核タンパク質複合体（snRNP）が存在し、SF3b4タンパク質はこのうちのU2-snRNPの構成成分であり、RNA結合ドメインを有する。

[0049] これまで、SF3b4タンパク質を含めたスプライシング因子がタンパク質の翻訳レベルで何らかの機能を持つという報告は無かったが、発明者らの解析により、SF3b4タンパク質が細胞質内の小胞体を含む膜画分に有意に増加し、それとともにmRNAと結合したSF3b4タンパク質が、p180タンパク質のcoiled-coilドメインと相互作用することにより、mRNAの小胞体への局在化を促進させ、その結果として培養細胞の分泌機能を上昇させうることを明らかにした。

[0050] すなわち、このような2つのタンパク質のいずれかまたはそれら両方の発現が亢進された組換え細胞において、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換すると、目的物としてのタンパク質をコードするDNAから転写されたmRNAが細胞内において発現されたSF3b4タンパク質と作用した結果、またはp180タンパク質と相互作用した結果、あるいは目的物としてのタンパク質をコードするDNAから転写されたmRNAがSF3b4タンパク質と相互作用し

、ついでp180タンパク質のcoiled-coilドメインとSF3b4タンパク質とが相互作用した結果、mRNAの小胞体への局在化を促進させ、この細胞内において目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が亢進されることが明らかになった。

[0051] 様々な組織が長期にわたって傷害され線維化してしまう状態である線維症は、いずれも原因および詳詳細な発症機序、有効な治療法が不明であり、予後不良の疾患である。例えば特発性肺線維症は様々な刺激によって生じた肺胞上皮の傷害に対して、その修復のためのコラーゲン等が増加し異常な修復反応が起こるために線維化が進むと考えられているが、有効な治療法は確立していない。このような病態において、コラーゲンの異常増加を阻止するための手がかりも得られていなかったが、本発明において新たに、これまでスプライシング因子として機能すると考えられていたSF3b4タンパク質が、コラーゲンの合成/分泌に不可欠な役割を果たすことが判明し、SF3ｂ4を機能阻害または発現抑制することによりコラーゲン合成を抑制可能であることが示された。SF3ｂ4の発現抑制はその特異的shRNA等の投与により、その機能阻害はスプライシング過程を阻害する各種薬剤により可能であると考えられるため、SF3ｂ4の機能阻害または発現抑制により線維症における異常コラーゲンの蓄積を抑制して線維症の重症化を防止できる可能性が示された。

[0052] 本発明において組換え細胞を作製するために使用することができる細胞は、タンパク質発現に適した細胞であればどのようなものであってもよく、例えば、起源となる細胞としては、CHO細胞、HEK293細胞、HeLa細胞などの哺乳動物由来の細胞を使用することができる。これらの細胞に対して、前述したp180タンパク質の全長またはその部分および／またはSF3b4タンパク質の全長またはその部分を、当該技術分野において一般的に使用されている方法を使用してトランスフェクトして、これらの細胞内においてp180タンパク質の全長またはその部分および／またはSF3b4タンパク質の全長またはその部分を両方とも発現させることができる。

[0053] 前述したp180タンパク質の全長またはその部分および／またはSF3b4タンパ

ク質の全長またはその部分を、これらの細胞内において発現させるためには、当該技術分野において一般的に使用されている形質転換方法を使用することができる。その形質転換を行うためには、p180タンパク質の全長またはその部分をコードするDNAおよび／またはSF3b4タンパク質の全長またはその部分をコードするDNAをそれぞれ、例えば、pcDNA、pEGFP、pCAGGSなどの発現ベクター中に組み込み、それぞれの発現ベクターを細胞に対して形質転換して使用することができる。

[0054] 本発明においては、p180を安定に発現する組換え細胞として、CHO細胞に由来する細胞株CHO 5g細胞、SF3b4タンパク質を安定に発現す遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、る組換え細胞として、CHO細胞に由来する細胞株CHO 3D5細胞、そしてこれら2つのタンパク質の発現が同時に亢進された組換え細胞として、CHO細胞に由来する細胞、CHO YA7細胞を作製し（後述する実施例1を参照）、これらの細胞株を独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センターに寄託した（CHO 3D5細胞について受託番号NITE BP-01753）、CHO YA7細胞について受託番号NITE BP-1535、またはCHO 1B2細胞に付いて受領番号NITE ABP-01811）。

[0055] 本発明の発明者らはまた、p180タンパク質の全長またはその部分の発現および／またはSF3b4タンパク質の全長またはその部分の発現をともに亢進させた組換え細胞において、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換するかまたは目的物としてのタンパク質の産生量を増加させることにより、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能を亢進し、その結果としてタンパク質を製造する方法を提供することができることを示した。

[0056] この方法において、合成能または分泌能を亢進し、その結果としてタンパク質を製造する目的物としてのタンパク質は、バイオテクノロジー的手法により産生することを目的としたいずれのタンパク質であってもよい。例えば、目的物としてのタンパク質として、糖タンパク質を挙げることができ、その例として、抗体、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどを選択することできるが、これらには限定されない。

[0057] 本発明の発明者らは、本発明の第二の態様において、目的物としてのタンパク質を発現するための発現ユニット中、プロモータの下流でかつ目的物としてのタンパク質をコードするDNAのヌクレオチド配列の開始コドンの上流に、cis-エレメントを挿入することにより、発現系細胞内における目的物としてのタンパク質の発現量を増大させる方法を提供する。上述した発現ユニットにcis-エレメントの配列を挿入するという場合、例えば、目的物のタンパク質の発現プラスミド内においてプロモータの下流でかつ目的物としてのタンパク質をコードするDNAのヌクレオチド配列の開始コドンの上流にcis-エレメント配列を挿入する場合の他に、すでに細胞内へプロモータおよび目的物が遺伝子導入されている場合にプロモータの下流でかつ目的遺伝子のORF開始コドンの上流にcis-エレメント配列を部位特異的に挿入する場合なども含まれる。

[0058] 背景技術の項においても記載したように、コラーゲン遺伝子などの一部のタンパク質のmRNAには、タンパク質合成装置であるリボソームが複数付着したポリソームが形成されやすい性質を備えることが明らかとなっている（特許文献１、非特許文献２）。しかしながら、目的物としてのタンパク質をコードするDNAでトランスフェクトした細胞内において、目的物としてのタンパク質をコードする遺伝子転写産物が高レベルで発現しているのに関わらず、そのタンパク質の合成／分泌量が低い問題が生じる場合がしばしば見られ、利用されている細胞においてmRNAが小胞体膜上での翻訳装置に利用しやすい形で提供できていない可能性が推測された。

[0059] この様な検討に基づいて解析を進めた結果、コラーゲン遺伝子の5'非翻訳領域に存在するcis-エレメントが、タンパク質の発現量を増大させる作用を有することを見出した。より具体的には、成熟mRNAの5'非翻訳領域にあるcis-エレメント配列を認識するRRMタンパク質がそこに結合することにより、分泌タンパク質の合成の場である小胞体の膜上へのmRNAの輸送／局在化を増強し、さらに翻訳効率を上昇させる機能があると考えられた。

[0060] 本発明において確認されたcis-エレメントは、1型コラーゲン遺伝子の解析

の結果から明らかになったものであり、このcis-エレメントのヌクレオチド配列は、1型コラーゲン遺伝子の5'非翻訳領域に存在することが明らかになった。したがって、本発明においては、その様なcis-エレメントのヌクレオチド配列として、タイプIコラーゲン遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列を挙げることができるが、所望の効果を有する限りにおいて、フィブロネクチン遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、マトリックスメタロプロテアーゼ14（MMP14）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、プロリル4-ヒドラキシラーゼA2（P4HA2）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、プロリル4-ヒドラキシラーゼA1（P4HA1）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、などの他の遺伝子に由来するcis-エレメントを使用することもできる。

[0061] 本発明において使用することができるcis-エレメントの構造的な特徴としては、目的物のタンパク質を発現するための発現プラスミドに含まれる遺伝子の5'非翻訳領域中に、9つ～12個のヌクレオチドから構成されるモチーフ「GAN_1-$(X)_n$-ACN_2」（n=3～6）（N_1およびN_2は独立してA、T、C、Gのいずれのヌクレオチドであってもよい）を1または数個含むことにより特徴づけられる。具体的なモチーフの例としては、天然のcis-エレメントとして存在するモチーフを挙げることができ、これらはN_1がGであること、そしてN_2がAまたはGまたはCであることを特徴としている。さらに詳細には、「GAG xxx ACV」（SEQ ID NO: 17）、「GAG xxxx ACV」（SEQ ID NO: 18）、「GAG xxxxx ACV」（SEQ ID NO: 19）、および「GAG xxxxxx ACV」（SEQ ID NO: 20）（これらの配列において、VはAまたはGまたはCを示す）と表すことができる。例えば、1型コラーゲン遺伝子の場合には、その5'非翻訳領域中に4個のモチーフを内包していることが分かった。

[0062] I型コラーゲン遺伝子に由来するcis-エレメントを利用する場合、cis-エレメントのヌクレオチド配列を、SEQ ID NO: 5の全長またはSEQ ID NO: 7の全長の他、SEQ ID NO: 5のうち1～102番ヌクレオチド、1～78番ヌクレオチド、

1～60番ヌクレオチド、61～126番ヌクレオチド、16～57番ヌクレオチド、79～126番ヌクレオチド、103～126番ヌクレオチド、58～78番ヌクレオチド、51～78番ヌクレオチド、1～27番ヌクレオチド、70～78番ヌクレオチドなどからなる群から選択されるいずれかの配列を使用することができる。

[0063] また、フィブロネクチン遺伝子に由来するcis-エレメントを利用する場合、cis-エレメントのヌクレオチド配列を、SEQ ID NO: 6の全長およびSEQ ID NO: 8の全長の他、からなる群から選択されるいずれかの配列を使用することができる。

[0064]

[表3]

表 3：cis-エレメントの配列一覧

Cis-エレメント	配列	SEQ ID NO
#1	tcgtcggagc agacgggagt ttctcctcgg ggtcggagca ggaggcacgc ggagtgtgag gccacgcatg agcggacgct aaccccctcc ccagccacaa agagtctaca tgtctagggt ctagac	5
#2	gcccgcgccg gctgtgctgc acaggggggag gagagggaac cccaggcgcg agcgggaaga ggggacctgc agccacaact tctctggtcc tctgcatccc ttctgtccct ccacccgtcc ccttccccac cctctggccc ccaccttctt ggaggcgaca acccccggga ggcattagaa gggatttttc ccgcaggttg cgaagggaag caaacttggt ggcaacttgc ctcccggtgc gggcgtctct cccccaccgt ctcaac	6
#3	tcgtcggagc agacgggagt ttctcct	7
#4	ccaccttctt ggaggcgaca acccccggga gg	8
#5	tcgtcggagc agacgggagt ttctcctcgg ggtcggagca ggaggcacgc ggagtgtgag	21
#6	gccacgcatg agcggacgct aaccccctcc ccagccacaa agagtctaca tgtctagggt ctagac	22
#7	aacgggcgcc gcggcgggga gaagacgcag agcgctgctg ggctgccggg tctcccgctt ccccctcctg ctccaagggc ctcctgcatg agggcgcggt agagacccgg acccgcgccg tgctcctgcc gtttcgctgc gctccgcccg ggcccggctc agccaggccc cgcggtgagc c	23
#8	caggggggagg agagggaacc ccaggcgcga	24
#9	gagcgggaag aggggacctg cagccacaac tt	25
#10	caggggggagg agagggaacc ccaggcgcga gcgggaagag gggacctgca gccacaactt	26
#11	tcgtcggagc agacgggagt ttctcctcgg ggtcggagca ggaggcacgc ggagtgtgag gccacgcatg agcggacgct aaccccctcc ccagccacaa agagtctaca tgt	27

この様なcis-エレメントを含む発現プラスミドを、無傷の宿主細胞だけでなく、本願発明において調製した、p180タンパク質の全長またはその部分の発現が亢進された細胞、スプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タン

パク質の全長またはその部分の発現が亢進された細胞、またはこれらの両方の発現がともに亢進された細胞、において使用することができる。

[0065] 本明細書においては、ここまでに説明した本発明をさらに具体的に説明することを目的として、以下の実施例を記載するが、しかしながら、以下の実施例の記載は、本発明を限定することを目的としたものではない。

実施例

[0066] 実施例1：SF3b4タンパク質、またはp180タンパク質とSF3b4タンパク質を共発現する細胞株の樹立

プラスミドの調製

SF3b4タンパク質、またはp180タンパク質とSF3b4タンパク質を共発現する細胞株の樹立は、p180タンパク質をコードする核酸を含む発現プラスミドとSF3b4タンパク質をコードする核酸を含む発現プラスミドとを別個に調製し、CHO細胞に対して順番にトランスフェクトすることにより、行った。

[0067] ヒトp180タンパク質（GenBank Accession No.AB287347）全長をコードする発現プラスミドpcDNA-p180／54Rは、特許文献1（特開2005-312409）に記載の方法に準じて調製した。

[0068] ヒトSF3b4タンパク質全長をコードする発現プラスミドpEF-SF3b4は、以下の方法に従い調製した。即ち、ヒトSF3b4タンパク質（GenBank Accession No.NP_005841.1）全長をコードするcDNA配列をPCRにて増幅後、pEF1/Myc-Hisベクター（Life Technologies社製）のKpnI-EcoRVサイトに挿入連結して、プラスミドpEF-SF3b4を得た。

[0069] チャイニーズハムスターSF3b4タンパク質全長をコードする発現プラスミドpEF-CHO-SF3b4は、以下の方法に従い調製した。即ち、CHO細胞よりtotal RNAを抽出し、チャイニーズハムスターSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_003498680.1）全長をコードするcDNA配列をPCRにて増幅した。その後pEF1/Myc-HisベクターのKpnI-EcoRVサイトに挿入連結して、プラスミドpEF-CHO-SF3b4を得た。

[0070] ヒトcisエレメントの配列（例えば、cis-エレメント#1～#11）をコードす

る発現プラスミドpEF-Cisは、以下の方法に従い調製した。即ち、ヒトcis-エレメント（例えば、cis-エレメント#1の場合には、SEQ ID NO: 5）をコードする核酸配列をPCRにて増幅後、pEGFPベクター（clontech社製）のbglII-HindIIIサイトに挿入連結して、プラスミドprCMV-cis#-SEAPを得た。各cis-エレメントを含む発現ベクターの詳細は実施例9に記載した。

[0071] p180タンパク質を安定に発現する細胞の調製

ヒトp180タンパク質を安定に発現するCHO細胞の樹立は、特許文献１に記載の方法に準じて行った。即ち、CHO細胞にヒトp180タンパク質発現プラスミドpcDNA-p180／54Rをリポフェクション法によりトランスフェクションした後、Zeocin 400μg/ml存在下で培養し、薬剤選択を行った。10日間培養後、Zeocinに耐性を持つ細胞株のコロニーを分離し、p180タンパク質を安定に発現する細胞株CHO 5g細胞を樹立した。

[0072] SF3b4タンパク質を安定に発現する細胞の調製

ヒトSF3b4タンパク質を安定に発現するCHO細胞を調製するため、CHO細胞にヒトSF3b4タンパク質発現プラスミドpEF-SF3b4をリポフェクション法によりトランスフェクションした後、G418 400μg/ml存在下で培養し、薬剤選択を行った。10日間培養後、G418に耐性を持つ細胞株のコロニーを分離し、SF3b4タンパク質を安定に発現する細胞株CHO 3D5細胞を樹立した（独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPMD）、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8（日本）、受託番号NITE BP-01753、受託日2013年11月21日）。

[0073] p180タンパク質とSF3b4タンパク質を安定に共発現する細胞の調製

次に、ヒトp180タンパク質とヒトSF3b4タンパク質とを安定に共発現するCHO細胞を樹立するため、細胞株CHO 5g細胞に対して、SF3b4タンパク質発現プラスミドpEF-SF3b4をリポフェクション法によりトランスフェクションした。その後、G418 400μg/ml、Zeocin 100μg/ml存在下で培養し、薬剤選択を行った。14日間培養後、G418とZeocinに耐性を持つ細胞株のコロニーを分離し、ヒトp180タンパク質とヒトSF3b4タンパク質とを安定に共発現する細胞株CHO YA7細胞を樹立した（独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託セ

ンター（NPMD）、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8（日本）、受託番号NITE BP-1535、受託日2013年2月13日）。

[0074] 次にヒトp180タンパク質とチャイニーズハムスターSF3b4タンパク質を安定に共発現するCHO細胞を樹立するため、CHO細胞にヒトp180およびチャイニーズハムスターSF3b4を発現するプラスミドをリポフェクション法によりトランスフェクションした。その後、Hygromycin 300μg/ml存在下で培養し、薬剤選択を行った。14日間培養後、Hygromycinに耐性を持つ細胞株のコロニーを分離し、ヒトp180タンパク質とチャイニーズハムスターSF3b4タンパク質とを安定に共発現する細胞株CHO 1B2細胞を樹立した（独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPMD）、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8（日本）、受領番号NITE ABP-01811、受領日2014年3月4日）。

[0075] 細胞の性状確認

CHO 5g細胞がp180タンパク質を安定に発現していること、CHO 3D5細胞がSF3b4タンパク質を安定に発現していること、そしてCHO YA7細胞およびCHO 1B2細胞がp180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現していることをそれぞれ確認するため、CHO 5g細胞、CHO 3D5細胞、CHO YA7細胞、CHO 1B2細胞のそれぞれを、5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で、5%CO_2存在下、37℃で培養した。コントロール細胞として、CHO細胞も併せて培養した。

[0076] 40時間後、トリプシン処理により懸濁した各細胞1×10^5個を遠心により回収し、解析用のサンプルとした。その後、細胞内で発現するp180タンパク質については抗p180抗体（Ogawa-Goto, K. et.al., J. Virol., 76(2002) 2350-2362参照）を使用して、そしてSF3b4タンパク質については抗SF3b4抗体（Santacruz社製）を使用して、ウェスタンブロット法によりそれぞれ解析した。

[0077] 図1に示すように、CHO細胞のp180発現量は検出限界以下で、内在性のSF3b4タンパク質の発現が低いレベルで認められた（レーン1）。CHO 3D5細胞は、p180タンパク質の発現量はCHO細胞と同様に、検出限界以下であったが、SF3B4タンパク質を高発現していた（レーン2）。CHO 5g細胞は、p180タンパク質を

高発現し、SF3b4タンパク質は内在性の発現が低いレベルで認められた（レーン3）。CHO YA7細胞およびCHO 1B2細胞は、p180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共に高発現していた（レーン4、レーン6）。これらのことから、p180タンパク質を高発現するCHO 5g細胞、SF3b4タンパク質を高発現するCHO 3D5細胞、そしてp180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現するCHO細胞由来の細胞株、CHO YA7細胞およびCHO 1B2細胞が樹立できたことを確認した。

[0078] 実施例2：p180タンパク質の発現および／またはSF3b4タンパク質の発現による分泌活性化

実施例1において作製したp180タンパク質を発現する細胞株CHO 5g細胞、SF3b4タンパク質を発現する細胞株CHO 3D5細胞、およびp180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現する細胞株CHO YA7細胞を使用して、p180タンパク質の発現および／またはSF3b4タンパク質の発現と、タンパク質分泌の活性化について調べた。

[0079] 分泌マーカーであるヒト胎盤由来分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）の発現プラスミドを以下の方法に従い構築した。即ち、SEAPタンパク質（Gen Bank Accession No. NP_001623.3）全長をコードするcDNAフラグメントを哺乳動物細胞用発現ベクター（pEGFP-C3, Clontech社製）のNheI-XhoIサイトに挿入連結し、SEAPタンパク質発現プラスミドprCMV-SEAPを得た。

[0080] それぞれの細胞のSEAPタンパク質分泌能を評価するため、CHO 3D5細胞、CHO 5g細胞、CHO YA7細胞、ならびにCHO細胞それぞれに対して、SEAP発現プラスミドと内部標準化用のβ-ガラクトシダーゼを発現するプラスミドpEF1-LacZ（Life technologies社製）をLipofectamine LTX試薬（Life technologies社製）を用いてコトランスフェクションした。0.1%ウシ胎児血清を含むDMEM中で20時間培養した後、培養上清とp-Nitrophenyl phosphate（pNPP、Sigma社製）を含む基質溶液を混合した。室温で30分反応後、波長405 nmに対する吸光度を吸光度計にて測定した。細胞画分のβ-ガラクトシダーゼ活性はβ-Galactosidase Enzyme Assay System（promega社製）の定法に従って測定した。

[0081] β-ガラクトシダーゼ測定値で標準化した SEAP活性を図2に示す。p180タンパク質を単独発現させたCHO 5g細胞およびSF3b4タンパク質を単独発現させたCHO 3D5細胞においては、培養上清中のSEAP分泌活性はCHOと比較して1.7～2.0倍に有意に増加した（図2）。CHO YA7細胞におけるp180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現させた場合には、CHO細胞と比較して3.1倍にまでSEAP活性がさらに増加した。これらのことから、p180タンパク質を単独発現させる場合およびSF3b4タンパク質を単独発現させる場合のいずれにおいても、CHO細胞の場合と比較して、SEAP分泌活性が有意に上昇させることができたが、p180タンパク質とSF3b4タンパク質を共発現させることで、CHO細胞の場合と比較して、細胞の分泌能を著しく上昇させることが示された。

[0082] またCHO細胞のSEAP活性を１としたときのCHO 1B2細胞のSEAP活性比は3.1倍であり、SEAP活性が著しく増加した。このことから、ヒトSF3b4と高い類似性をもつチャイニーズハムスターSF3b4は、ヒトSF3b4と同等の分泌増強活性をもつことが示された。

[0083] 実施例3：p180タンパク質とSF3b4タンパク質の共発現による、mRNAの膜画分への局在化促進

実施例1において作製したp180タンパク質を発現する細胞株CHO 5g細胞、SF3b4タンパク質を発現する細胞株CHO 3D5細胞、およびp180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現する細胞株CHO YA7細胞を使用して、p180タンパク質の発現および／またはSF3b4タンパク質の発現と、mRNAの膜画分への局在化の促進との関係について調べた。

[0084] CHO YA7細胞およびコントロール細胞に上述のSEAP発現プラスミドをlipofectamine LTXを用いてトランスフェクションし、40時間後、細胞質画分と膜画分に分画した。分画方法は非特許文献１（Ueno, et al., (2010) J Biol Chem 285, 29941-29950）に記載の方法に準じて行った。それぞれの画分からTrisol-LS試薬（Life technologies社製）の定法に従ってRNAを抽出した。その後、SEAP特異的なプライマーを用いて定量的PCR法を行い、SEAP mRNA量を定量した（図3）。

[0085] その結果、CHO 3D5細胞、CHO 5g細胞、CHO YA7細胞、CHO細胞では、細胞質と膜画分の総和となる全mRNA量はほぼ同定度であった。しかしながら、CHO細胞、CHO 3D5細胞、CHO 5g細胞では全体の約3割のmRNAが膜画分に存在していたのに対し、CHO YA7細胞では約7割が膜画分に局在化しており、細胞質から膜画分へmRNAの局在が著しくシフトしていた。

[0086] これらのことから、p180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現するCHO YA7細胞は、分泌タンパク質の生合成の際にmRNAを膜画分へ積極的に局在化させる特性をもつことが示された。

[0087] 実施例4：分泌型アルカリホスファターゼ発現ユニット内に各種cis-エレメントを挿入した発現ベクターの構築

本実施例においては、実施例1において作製したSF3b4タンパク質を発現する細胞株CHO 3D5細胞、およびp180タンパク質とSF3b4タンパク質とを共発現する細胞株CHO YA7細胞を使用して、タンパク質の発現効率を更に上げることを目的として、発現プラスミドの構造を検討した。

[0088] 実施例2で示したSEAP発現プラスミドprCMV-SEAPにcis-エレメントを挿入した発現ベクターを以下の方法に従い構築した。ヒト線維芽細胞由来のRNAを非特許文献１（Ueno, et al., (2010) J Biol Chem 285, 29941-29950）に記載の方法に準じて調製し、鋳型としてRT-PCRを行った。増幅時に5'、3'側にBglIIとHindIII認識配列をそれぞれ付加したプライマー（SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16）を使用し、ヒト由来のI型コラーゲンα1由来cis-エレメント#1（SEQ ID NO: 5）を増幅した。prCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIII部位に、増幅断片をBglII-HindIIIで処理したのち挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#1を挿入した発現プラスミドprCMV-cis#1-SEAPを得た（図4A）。

[0089] 実施例5：cis-エレメントによるタンパク質の分泌活性化

実施例4において作製したcis-エレメントを含む発現プラスミドにより、発現タンパク質の分泌への影響を検討した。実施例4で作成した2種の発現プラスミド、prCMV-cis#1-SEAPおよびprCMV-SEAPを、LipofectamineLTX試薬（Lif

e technologies社製）を用いてトランスフェクションした。細胞は実施例1で作製した4種の細胞株を用いた。0.1%FBSを含むDMEM中で20時間培養した後、培養上清と蛍光基質4-Methylumbelliferyl phosphate（4-MUP、Sigma社製)を含む基質溶液を混合した。室温で30分反応後、蛍光強度（励起光360 nm、蛍光440nm）を蛍光光度計にて測定した。またトランスフェクション効率をSEAP cDNA総量で補正するため、細胞画分からTrizol試薬（Lifetechnologies社製）を用いて全mRNAを抽出し、SEAP特異的なプライマーを用いて定量的PCRを行い、SEAP cDNA量を定量した。SEAP cDNA量で補正したprCMV-cis#1-SEAPのprCMV-SEAPに対するSEAP活性比を図4B、図4Cに示す。

[0090] その結果、CHO細胞においてcis-エレメント#1の挿入により、SEAP活性は2.7倍に増加した。CHO 3D5細胞、CHO 5g細胞、そしてCHO YA7細胞の各細胞においてもcis-エレメント#1の挿入により、SEAP活性はいずれも3.0～3.2倍に増加した。これらの結果から、cis-エレメント#1を発現ユニット内に挿入することで、各種CHO細胞において転写産物あたりのタンパク質合成および分泌量を増加できることが示された。

[0091] 以上の各細胞のcis-エレメント#1の挿入後のSEAP活性比を、CHO細胞のcis-エレメント#1の未挿入SEAP活性と比較するため、CHO細胞でのprCMV-SEAP導入時のSEAP活性を1として各細胞でのprCMV-cis#1-SEAP導入時活性を求めた（図4C）。cis-エレメント#1を用いた場合のCHO 3D5細胞、CHO 5g細胞のSEAP活性比はそれぞれ、コントロールであるCHO細胞の4.7、6.3倍に増加した。更にCHO YA7細胞では、コントロールであるCHO細胞の9.4倍と、SEAPの分泌活性が著しく増加していた。

[0092] 以上より、cis-エレメント#1とSF3b4タンパク質が共存すること、あるいはcis-エレメント#1とp180タンパク質が共存することで、発現プラスミドから発現されるタンパク質の分泌活性が上昇し、更に、cis-エレメント#1、SF3b4タンパク質およびp180タンパク質の3因子が共存することで、細胞のタンパク質分泌活性を著しく増強できることが示された。

[0093] 実施例6：cis-エレメント#1によるコラーゲンの分泌活性化

本実施例においては、cis-エレメントを含む発現プラスミドにより、コラーゲン発現への影響を検討した。

[0094] ヒトI型コラーゲンα1（COL1A1）の発現プラスミドを以下の方法に従い構築した。即ち、COL1A1（GenBank Accession No. NM_000088.3）全長をコードするcDNAフラグメントを哺乳動物細胞用発現ベクター（pEGFP-C3、Clontech社製）のNheI-XhoIサイトに挿入連結し、CMVプロモーターの制御下でcis-エレメント#1を含んだCOL1A1（1～5297）を発現するプラスミドprCMV-COL1A1を得た。また、COL1A1遺伝子全長の代わりに、COL1A1 ORF全長のみをコードする127～4251、および127～5297までの遺伝子断片を同様に増幅し、prCMV-COL1A1-ORF、およびprCMV-COL1A1-ORF-UTRを構築した。またヒトII型コラーゲンα1（COL2A1）、ヒトIII型コラーゲンα1（COL3A1）の発現プラスミドを以下の方法に従い構築した。即ち、COL2A1（GenBank Accession No. NP_001835.3）またはCOL3A1（GenBank Accession No. NP_000081.1）全長をコードするcDNAフラグメントを、哺乳動物細胞用発現ベクター（pcDNA、Invitrogen社製）にcis-エレメント#1を挿入したpcDNA-cis#1のEcoRV-NotIサイトに挿入連結し、CMVプロモーターの制御下でCOL2A1（1～4464）を発現するプラスミドpcDNA-cis#1-COL2A1、COL3A1（1～4401）を発現するプラスミドpcDNA-cis#1-COL3A1を得た。

[0095] cis-エレメント#1のプロコラーゲンに対する分泌活性化能を調べるため、実施例1で作製した3種の細胞株に、prCMV-COL1A1をリポフェクション法にてトランスフェクションした。0.1%ウシ胎児血清、200μMアスコルビン酸を含むDMEM中で40時間培養した後、培養上清中のCOL1A1 procollagen量をウェスタンブロット法により解析した（図5A）。

[0096] その結果、コントロールであるCHO細胞のプロコラーゲン量を1とするとCHO YA7細胞では約20倍に増加した。また、cis-エレメント#1の評価のため、コントロールCHO細胞に、cis-エレメント#1を含まないprCMV-COL1A1-ORF、prCMV-COL1A1-ORF-UTRも同様に遺伝子導入した。この場合は、培養上清中のプロコラーゲン量はウェスタンブロット法による検出限界以下であった。

[0097] 更に、ホモトライマーを形成したコラーゲンの分泌量を調べるため、実施例1で作製した3種の細胞株に、pcDNA-cis#1-COL2A1、pcDNA-cis#1-COL3A1または実施例6で作製したprCMV-COL1A1およびprCMV-COL1A1-ORFをリポフェクション法にてトランスフェクションした。2%ウシ胎児血清、200μMアスコルビン酸を含むDMEM中で72時間培養した後、培養上清を回収して0.1 Nとなるようにを加えて酸性とし、0.5 mg/mlとなるようペプシン（SIGMA社製）を加え4℃で16時間消化反応を行った。これに1 Mとなるようにを添加し氷上で3時間静置した後、遠心分離を行い、得られた沈殿を1 M と95%エタノールとで洗浄した。このコラーゲン精製試料をSDS-PAGEで泳動して各コラーゲンのバンド強度を比較した。その結果、コントロールCHO細胞の分泌量を1としたとき、CHO YA7細胞におけるCOL1A1、COL2A1、COL3A1の各ホモトライマーの分泌量はそれぞれ1.8、1.9、3.7倍へ有意に増加していた（図5B～図5D）。cis-エレメント#1非存在下においても、CHO 3D5細胞、CHO YA７細胞ではコントロールの1.5倍、2.1倍へホモトライマー分泌量が増加した。

[0098] 以上より、cis-エレメント#1は各種CHO細胞においてコラーゲン分子の発現を増強させ、SF3b4タンパク質および/またはp180タンパク質の存在下でcis-エレメント#1を利用すると3重螺旋構造を保ったコラーゲン分泌量が更に増加することが示された。

[0099] 実施例7：cis-エレメントによる抗体分子の発現増強効果

cis-エレメントによる抗体発現への影響を以下のように検討した。

[0100] 抗体重鎖および軽鎖全長の発現プラスミドを以下の方法に従い構築した。即ち、抗IL-8抗体発現プラスミド（p6G425V11N35A.choSD, ATCC 209552）にコードされる抗体重鎖（Heavy chain, HC）および軽鎖(Light chain, LC)全長配列を人工遺伝子合成サービス（MBL社）により合成した。その後、重鎖ORF全長はpEF1/Myc-HisベクターのNheI-SpeIサイトに、軽鎖ORF全長はpEF1/Myc-HisベクターのKpnI-EcoRVサイトにそれぞれ挿入連結した。その後、軽鎖発現カセットをClaIで切り出し、重鎖発現ベクターのClaIサイトに挿入連結し、抗IL-8抗体（重鎖、軽鎖）共発現プラスミドpEF-HC-LCを構築した。更にこ

のプラスミドの重鎖および軽鎖ORF上流にcis#1を挿入した発現プラスミドpEF-cis#1-HC-LCも併せて構築した。

[0101] 実施例1で作製した3種の細胞株に、pEF-HC-LC 、pEF-cis#1-HC-LCをリポフェクション法にてトランスフェクションした。0.1%ウシ胎児血清を含むDMEM中で96時間培養した後、培養上清中の抗体産生量をHuman IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl社) を使用してELISA法により定量した。その結果、CHO細胞においてcis-エレメント#1の挿入により、抗体分泌量は2.7倍に増加した。CHO 3D5細胞、CHO YA7細胞の各細胞においてもcis-エレメント#1の挿入により、抗体分泌量はそれぞれ2.5、1.8倍に増加した（図6A）。これらの結果から、cis-エレメント#1を発現ユニット内に挿入することで、各種CHO細胞において抗体分泌量を増加できることが示された。

[0102] 図6Bに示した通り、CHO細胞でのpEF-HC-LC導入時の抗体分泌量を1とした場合SF3b4を導入したCHO 3D5細胞、SF3b4およびｐ180を導入したCHO YA7細胞の抗体分泌量は2.5倍、12.6倍に増加し、p180タンパク質、および／またはSF3b4の導入により抗体分泌量の増加が確認された。これらの傾向は、cis-エレメント#1を用いると更に顕著な効果が得られ、CHO 3D5細胞の抗体分泌量は、コントロールであるCHO細胞の5.6倍に増加し、CHO YA7細胞では21.3倍に著しく増加していた。

[0103] 以上より、cis-エレメント#1が抗体生産に有効に作用すること、その活性はSF3b4タンパク質またはp180タンパク質の、またはその両者の存在下において更に顕著に作用することが示された。

[0104] 実施例8：kozak配列とcis-エレメント#1の分泌活性化効果の比較

本実施例においては、真核細胞のmRNA中において翻訳の開始に関与する共通配列として知られるkozak配列が示す分泌活性化効果と、cis-エレメントが示す分泌活性化効果とを比較することを目的として行った。

[0105] 実施例4において作製したprCMV-SEAPおよびprCMV-cis#1-SEAPの開始メチオニンコドンATGの直前の6 bpの配列TCCTGCをGCCACCに置換した発現プラスミドprCMV-SEAP-kozak、prCMV-cis#1-SEAP-kozakを以下の方法により構築した。

即ち、SEAP特異的プライマーを用いてPCRを行い、ATGの直前にGCCACCを付加したSEAP断片（1～132）を増幅した。続けてprCMV-SEAPおよびprCMV-cis#1-SEAPからSEAP(1～132)領域をHindIII-PstIで除去し、HindIII-PstIで処理した増幅断片と置換することで、SEAP ORF上流にkozak配列を挿入したSEAP発現プラスミドprCMV-SEAP-kozakとprCMV-cis#1-SEAP-kozakを得た。

[0106] CHO細胞、CHO 3D5細胞およびCHO YA7細胞にprCMV-SEAP、prCMV-SEAP-kozak、prCMV-cis#1-SEAP、prCMV-cis#1-SEAP-kozakをトランスフェクションし、20時間後の培養上清中のSEAP活性を実施例5に記載の方法で測定した。その結果、prCMV-SEAPに比して、prCMV-cis#1-SEAP、prCMV-cis#1-SEAP-kozakの場合にはCHO細胞のSEAP活性は2倍以上に増強し（図7）、その効果はタンパク質発現に有効として知られるコザック配列と同等以上を示す事が確認された。

[0107] この増加傾向はCHO 3D5細胞やCHO YA7細胞においても強く観察され、cis-エレメント#1を付加すると、SEAP活性比が3.3～3.4倍に、kozak配列とcis-エレメント#1の両者を付加した際には3.3～4.9倍に増加した（図7）。

[0108] これらより、CHO細胞、CHO 3D5細胞およびCHO YA7細胞おいてcis-エレメント#1による分泌活性化の効果はkozak配列の効果よりも高く、cis-エレメント#1、SF3b4タンパク質、およびp180タンパク質の3因子とkozak配列を併用することで、分泌活性能を更に増強できることが示された。

[0109] 実施例9：cis-エレメント付加によるタンパク質発現増強効果

実施例1において作製した細胞に対して、各種cis-エレメントを含む発現プラスミドを使用して、タンパク質発現増強作用のあるcis-エレメント配列の詳細を検討した。

[0110] prCMV-SEAPにヒト由来のフィブロネクチン遺伝子のcis-エレメント配列、cis-エレメント#2（SEQ ID NO: 6）を挿入した発現ベクターprCMV-cis#2-SEAPは、以下の方法に従い構築した。即ち、ヒト線維芽細胞由来のRNAを非特許文献1（Ueno, et al., (2010) J Biol Chem 285, 29941-29950）に記載の方法に準じて調製したRNAを鋳型としてRT-PCRを行った。増幅時に5'、3'側にBglIIとHindIII認識配列をそれぞれ付加したプライマー（SEQ ID NO: 13、SEQ ID

NO: 14）を使用し、cis-エレメント#2を含む断片を増幅した。増幅断片をBglII-HindIIIで処理した後、prCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIIIサイトに挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#2を挿入した発現プラスミドを得た。

[0111] prCMV-SEAPに対して、ヒト由来のI型コラーゲンα1遺伝子のcis-エレメント配列、cis-エレメント#3、およびヒト由来のフィブロネクチン遺伝子のcis-エレメント配列、cis-エレメント#4を挿入した発現ベクターprCMV-cis#3-SEAP等は、以下の方法に従い構築した。即ち、cis-エレメント#3のcis-エレメントを含むプライマー（SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10）あるいはcis-エレメント#4のcis-エレメントを含むプライマー（SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12）を95℃で10分熱処理後に段階的に25℃まで下げ2本のプライマーをアニーリングさせることで各種リンカーを調製した。各種リンカーをprCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIII サイトに挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#3（SEQ ID NO: 7）、cis-エレメント#4（SEQ ID NO: 8）を挿入した発現プラスミドを得た。

[0112] prCMV-SEAPにcis-エレメント#5、#6を挿入した発現ベクターprCMV-cis#5-SEAP、prCMV-cis#6-SEAPは、以下の方法に従い構築した。cis-エレメント#1の部分配列をBglIIとHindIII認識配列をそれぞれ付加したプライマー（SEQ ID NO: 28および29、SEQ ID NO: 30および31）を使用し、cis-エレメント#5(1-60)、cis-エレメント#6(61-126)を含む断片を増幅した。増幅断片をBglII-HindIIIで処理した後、prCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIIIサイトに挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#5、cis-エレメント#6を挿入した発現プラスミドをそれぞれ得た。

[0113] prCMV-SEAPにcis-エレメント#7を挿入した発現ベクターprCMV-cis#7-SEAPは以下の方法に従い構築した。COL2A1遺伝子由来配列を合成後、末端に付加

したBglII、HindIII認識配列を用いてprCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIIIサイトに挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#7を挿入した発現プラスミドを得た。

[0114] prCMV-SEAPにcis-エレメント#2由来配列であるcis-エレメント#8、#9、#10を挿入した発現ベクターprCMV-cis#8-SEAP、prCMV-cis#9-SEAP、prCMV-cis#10-SEAPは、以下の方法に従い構築した。即ち、cis-エレメント#8のcis-エレメントを含むプライマー（SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33）、cis-エレメント#9のcis-エレメントを含むプライマー（SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35）、cis-エレメント#10のcis-エレメントを含むプライマー（SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37）を95℃で10分熱処理後に段階的に25℃まで下げ2本のプライマーをアニーリングさせることで各種リンカーを調製した。各種リンカーをprCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIII サイトに挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#8（SEQ ID NO: 24）、cis-エレメント#9（SEQ ID NO: 25）、cis-エレメント#10（SEQ ID NO: 26）を挿入した発現プラスミドを得た。

[0115] prCMV-SEAPにcis-エレメント#11を挿入した発現ベクターprCMV-cis#11-SEAPは、以下の方法に従い構築した。cis-エレメント#1の部分配列をBglIIとHindIII認識配列をそれぞれ付加したプライマー（SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39）を使用し、cis-エレメント#11(1-113)を含む断片を増幅した。増幅断片をBglII-HindIIIで処理した後、prCMV-SEAPのCMVプロモーターとSEAP ORFの間にあるBglII-HindIIIサイトに挿入連結した。これにより、CMVプロモーターとSEAPの開始メチオニンの間にcis-エレメント#11（SEQ ID No: 27）を挿入した発現プラスミドをそれぞれ得た。

[0116]

[表4]

表 4：cis-エレメント増幅のためのプライマー一覧

標的 cis#	プライマー配列	SEQ ID NO
#1	aaaaaaagat cttcgtcgga gcagacg	15
#1	aaaaaaaagc ttgtctagac cctagac	16
#2	aaaaaaagat ctgcccgcgc cggctgt	13
#2	aaaaaaaagc ttgttgagac ggtgggggga	14
#3	gatcttcgtc ggagcagacg ggagtttctc cta	9
#3	agcttaggag aaactcccgt ctgctccgac gaa	10
#4	gatcttctgc atcccttctg tccctccaca	11
#4	agcttgtgga gggacagaag ggatgcagaa	12
#5	aaaaaaagat cttcgtcgga gcagacggga gt	28
#5	aaaaaaaagc ttctcacact ccgcgtgcct cc	29
#6	aaaaaaagat ctgccacgca tgagcggacg ct	30
#6	aaaaaaaagc ttgtctagac cctagacatg ta	31
#8	gatctcaggg ggaggagagg gaaccccagg cgcgaa	32
#8	agctttcgcg cctggggttc cctctcctcc ccctga	33
#9	gatctgagcg ggaagagggg acctgcagcc acaactta	34
#9	agcttaagtt gtggctgcag gtcccctctt cccgctca	35
#10	gatctcaggg ggaggagagg gaaccccagg cgcgagcggg aagaggggac ctgcagccac aactta	36
#10	agcttaagtt gtggctgcag gtcccctctt cccgctcgcg cctggggttc cctctcctcc ccctga	37
#11	aaaaaaagat cttcgtcgga gcagacggga gt	38
#11	aaaaaaaagc ttacatgtag actctttgtg gc	39

CHO YA7細胞に、prCMV-cis#1-SEAP、prCMV-cis#2-SEAP、prCMV-cis#3-SEAP、prCMV-cis#4-SEAP、prCMV-cis#5-SEAP、prCMV-cis#6-SEAP、prCMV-cis#7-SEAP 、prCMV-cis#8-SEAP、prCMV-cis#9-SEAP、prCMV-cis#10-SEAP、prCMV-cis#11-SEAP、prCMV-SEAPをトランスフェクションした。20時間後の培養上清中のSEAP活性を実施例5記載の方法で測定した。prCMV-SEAPの場合のSEAP活性を1とすると、使用した全てのcis-エレメントは約2.0～3.4倍にSEAPの分泌活性

比が上昇した（図8A）。このとき膜画分のSF3b4タンパク質量をウェスタンブロット法で解析し、デンシトメトリー処理により定量するとcis-エレメント#1、cis-エレメント#2、cis-エレメント#3、cis-エレメント#4、cis-エレメント#5、cis-エレメント#6それぞれの膜画分中のSF3b4タンパク質量はコントロールの2.0～3.6倍と有意に増加していた（図8B）。

[0117] 以上の結果から、cis-エレメント#1～#11を発現ユニット内に付加するとタンパク質発現増強効果のあるSF3b4タンパク質を小胞体膜上へ局在化させる事が可能となり、これを介して細胞の分泌能を増強可能であることが示された。

[0118] 実施例10：モチーフ内配列鎖長の効果

cis-エレメント#1に同定されたモチーフ配列GAN_1-$(X)_n$-ACN_2について、有効な鎖長数nの検討を以下のように行った。GAG-$(X)_n$-ACV（VはAまたはGまたはCを示す）について、nを1-9merまで変化させたcis-エレメント#3由来の変異体を実施例8と同様の方法で構築した(図9A)。またモチーフを欠失させた変異体（motif delete）も併せて構築した。各エレメントのSEAP分泌活性を評価するため、実施例5に記載の方法に従い、それぞれの分泌活性を評価した。その結果、n=3～6の場合に、cis-エレメント#3と同等の活性が得られた（図9B)。以上の結果より、本系において分泌活性化に重要となるcis-エレメント内のモチーフはGAN_1-(X)n-ACN_2のX鎖長nが3～6残基であることが判明した。

[0119] 実施例11：モチーフ配列の塩基置換、挿入による影響

モチーフ内の塩基置換および挿入による発現増強活性への影響を検討した。Cis-エレメント#3内のモチーフGAN_1-$(X)_n$-ACN_2について、N_1およびN_2をそれぞれA、G、C、Tとしたcis-エレメント#3由来の変異体を実施例8と同様の方法で構築した(図10A)。またpolyA配列、polyC配列にモチーフを挿入した変異体とコントロールも併せて構築した（図10A）。実施例5に記載の方法に従い、各エレメントの分泌活性を評価した。その結果、cis-エレメント#3のN_2をGからA、C、Tに置換したときのSEAP活性は、いずれもcis-エレメント#3と同等の活性が得られた（図10B)。cis-エレメント#3のN_1をGからA、C、Tに置換したとき

のSEAP活性は、いずれもcis-エレメント#3と同等の活性を示した（図10B)。またモチーフを挿入したエレメントもcis-エレメント#3と同等の活性を有していた。以上の結果から、高い活性を有するモチーフとしてGAN_1-$(X)_n$-ACN_2（N_1およびN_2はA、G、C、Tのいずれの塩基でもよく、n＝3～6の整数)であると確認された。

[0120] 実施例12：SF3b4発現抑制に伴うコラーゲン分泌量の低下

SF3b4の発現抑制に伴ったコラーゲン分泌量への影響を検討した。ヒト胎児肺由来繊維芽細胞（HEL）に、Oligofectamine（Life technologies）の定法に従ってSF3b4に対するsiRNA（Life technologies, human SF3b4 siRNA HSS115684）をトランスフェクションした。0.1%FBS-DMEM、アスコルビン酸リン酸エステル200μMの条件下で4日間培養した。その後、培地を回収し、培養上清中のCOL1A1プロコラーゲン量ならびに細胞画分のSF3b4タンパク質量を実施例６の方法に準じて解析した。その結果、細胞内のSF3b4発現量がコントロールの20%に低下した時、分泌されたCOL1A1プロコラーゲン量は10%に低下した（図11）。以上の結果より、SF3b4の発現抑制に伴いコラーゲンの産生が顕著に抑制されることが示された。

[0121] 実施例13：p180/SF3b4共発現浮遊細胞株におけるコラーゲン分泌への影響

ヒトp180タンパク質とヒトSF3b4を安定共発現するCHO-S細胞株を以下の方法により樹立した。CHO-S細胞（Life technologies 社）に、pCDNA-p180/54Rをリポフェクション法によりトランスフェクションし、Zeocin 300μg/ml存在下で14日間培養し、薬剤選択を行った。Zeocin 耐性細胞株のコロニーを分離しpEF-SF3b4をリポフェクション法により、トランスフェクションし、Hygromycin 600μg/mlの条件で薬剤選択を行った。14日間培養後、Zeocin およびHygromycinの両者に耐性を持つ細胞株のコロニーを分離し、ヒトp180タンパク質とヒトSF3b4を安定に共発現するCHO-S由来細胞株54#160を樹立した。

[0122] コントロールとしてCHO-S細胞および作製した 54#160細胞に、prCMV-COL1A1、prCMV-COL1A1-ORFをそれぞれリポフェクション法にてトランスフェクションした。無血清、8 mM L-グルタミンを含むCD FortiCHO培養液（Life techno

logies 社）中で96時間培養した後、培養上清中のCOL1A1プロコラーゲン量をウェスタンブロット法により解析した。cis-エレメント#1を含むprCMV-COL1A1を遺伝子導入した場合、コントロールであるCHO-S細胞のプロコラーゲン量を1とすると54#160細胞では約3.5倍に増加した。また、cis-エレメント#1を含まないprCMV-COL1A1-ORFを遺伝子導入した場合、培養上清中のプロコラーゲン量はウェスタンブロット法による検出限界以下であった。

[0123] 以上より、浮遊化CHO-S細胞において無血清条件下で、cis-エレメント#1は、巨大分子であるコラーゲンの合成/分泌を増強させる事ができ、更にcis-エレメント#1、SF3b4タンパク質およびp180タンパク質の3因子により浮遊化CHO細胞の分泌活性を著しく増強可能であることが示された。

[0124] 実施例14：cis-エレメント#1によるポリソーム中mRNAの重量化シフト

CHO YA7細胞にprCMV-COL1A1、prCMV-COL1A1-ORFをそれぞれリポフェクション法にてトランスフェクションした。40時間後、実施例3に記載の方法に従い、膜画分を調製した。得られた膜画分を15～50%のショ糖密度勾配遠心分離に供し、ポリソーム画分を分画した。各画分から実施例5に記載の方法に準じてmRNAを抽出し、定量的PCRによりCOL1A1 cDNA量を定量した。また、このときの分泌プロコラーゲン量を実施例6に記載の方法で解析した。その結果、ポリソーム画分中のCOL1A1 cDNAは、cisエレメントを含まないprCMV-COL1A1-ORFの場合、フラクション24をピークとする分布であるのに対し、cis#1を含む場合はフラクション26をピークとした分布となり、より高密度の画分へと分布がシフトしていた（図12）。さらにピークのシフトに伴って、プロコラーゲンの分泌量はcis-エレメント#1存在下ではコントロールの4.9倍に増加していた。p180およびSF3b4存在下においてcis-エレメント#1はmRNAの重量化シフトを起こす能力を有し、この重量化シフトは発現増加と相関する事が確認された。

産業上の利用可能性

[0125] p180タンパク質の全長またはその部分の発現、そしてSF3b4タンパク質の全長またはその部分の発現が亢進された本発明の組換え細胞は、目的物として

のタンパク質をコードするDNAを形質転換すると、目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が、飛躍的に増加することが明らかになった。

配列表フリーテキスト

[0126] SEQ ID NO: 1：ヒトp180をコードするヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 2：ヒトp180タンパク質のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 3：ヒトSF3b4をコードするヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 4：ヒトSF3b4タンパク質のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 5：cis-エレメント#1

SEQ ID NO: 6：cis-エレメント#2

SEQ ID NO: 7：cis-エレメント#3

SEQ ID NO: 8：cis-エレメント#4

SEQ ID NO: 9：cis-エレメント#3のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 10：cis-エレメント#3のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 11：cis-エレメント#4のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 12：cis-エレメント#4のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 13：5'側にBglII認識配列を付加した、cis-エレメント#2のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 14：3'側にHindIII認識配列を付加した、cis-エレメント#2のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 15：5'側にBglII認識配列を付加した、cis-エレメント#1を増幅するためのプライマー

SEQ ID NO: 16：3'側にHindIII認識配列を付加した、cis-エレメント#1を増幅するためのプライマー

SEQ ID NO: 17：cis-エレメントのモチーフ（9mer）

SEQ ID NO: 18：cis-エレメントのモチーフ（10mer）

SEQ ID NO: 19：cis-エレメントのモチーフ（11mer）

SEQ ID NO: 20：cis-エレメントのモチーフ（12mer）

SEQ ID NO: 21：cis-エレメント#5

SEQ ID NO: 22：cis-エレメント#6

SEQ ID NO: 23：cis-エレメント#7

SEQ ID NO: 24：cis-エレメント#8

SEQ ID NO: 25：cis-エレメント#9

SEQ ID NO: 26：cis-エレメント#10

SEQ ID NO: 27：cis-エレメント#11

SEQ ID NO: 28：5'側にBglII認識配列を付加した、cis-エレメント#5のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 29： 3'側にHindIII認識配列を付加した、cis-エレメント#5のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 30： 5'側にBglII認識配列を付加した、cis-エレメント#6のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 31： 3'側にHindIII認識配列を付加した、cis-エレメント#6のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 32： cis-エレメント#8のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 33： cis-エレメント#8のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 34： cis-エレメント#9のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 35： cis-エレメント#9のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 36： cis-エレメント#10のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 37： cis-エレメント#10のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 38： 5'側にBglII認識配列を付加した、cis-エレメント#11のcis-エレメントを含むプライマー

SEQ ID NO: 39： 3'側にHindIII認識配列を付加した、cis-エレメント#11のcis-エレメントを含むプライマー

請求の範囲

[請求項1] 細胞において、p180タンパク質の全長またはその部分の発現、mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現、またはこれらの両方の発現がともに亢進された、細胞内での目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が亢進された組換え細胞。

[請求項2] p180タンパク質が、

（a）ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 2）と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

（b）ヒト由来のp180タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 2）において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

（c）ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）と少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

（d）ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、および

（e）ヒト由来のp180タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 1）と相補的なヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、細胞内の小胞体膜上でのポリソーム形成を促進する機能を有するタンパク質、

からなる群から選択される、請求項1に記載の組換え細胞。

[請求項3] p180タンパク質が哺乳動物由来のものである、請求項1または2に記載の組換え細胞。

[請求項4] 哺乳動物のp180タンパク質の全長またはその部分が、ヒトp180タンパク質（SEQ ID NO: 2）、マウスp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_077243）、ラットp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_230637）、チャイニーズハムスターp180タンパク質（GenBank Accession No. XM_003496471）、イヌp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_001003179）、ウマp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001915027）、サルp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_002798281）、チンパンジーp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_514527）、ブタp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926148）、またはそれらの部分である、請求項3に記載の組換え細胞。

[請求項5] p180タンパク質の部分が、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、623～737番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、738～944番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列、945～1540番アミノ酸からなる領域に対応するアミノ酸配列を含む部分、から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の組換え細胞。

[請求項6] mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質が、スプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タンパク質の全長またはその部分（SEQ ID NO: 4の全長アミノ酸配列424 AA；RRM1であるSEQ ID NO: 4の13～91 AA；.RRM2であるSEQ ID NO: 4の100、からなる群から選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の組換え細胞。

[請求項7] SF3b4タンパク質が、

（i）ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 4）

と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（ii）ヒト由来のSF3b4タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 4）において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（iii）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（iv）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

（v）ヒト由来のSF3b4タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 3）と相補的なヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であるヌクレオチド配列により規定されるアミノ酸配列からなり、mRNAの小胞体への局在化を促進させる機能を有するタンパク質、

からなる群から選択される、請求項6に記載の組換え細胞。

[請求項8] SF3b4タンパク質が哺乳動物由来のものである、請求項6または7に記載の組換え細胞。

[請求項9] 哺乳動物のSF3b4タンパク質の全長またはその部分が、ヒトSF3b4タンパク質（SEQ ID NO: 4）、マウスSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_694693.1）、ラットSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001011951.1）、チャイニーズハムスターSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_003498680.1）、イヌSF3b4タンパク質

（GenBank Accession No. XP_540295.3）、ウマSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001488649.2）、サルSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001097793.1）、チンパンジーSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_513768.2）、ブタSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926524.1）、またはそれらの部分である、請求項8に記載の組換え細胞。

[請求項10] 目的物としてのタンパク質の合成能または分泌能が、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換するかまたは目的物としてのタンパク質の産生量を増加させることにより亢進された、請求項1～9のいずれか1項に記載の組換え細胞。

[請求項11] 受託番号NITE BP-01753（CHO 3D5）、受託番号NITE BP-1535（CHO YA7）、または受領番号NITE ABP-01811（CHO 1B2）により表される、細胞株。

[請求項12] p180タンパク質の全長またはその部分の発現を亢進させ、mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質の発現を亢進させ、またはこれらのタンパク質両方の発現を亢進させた組換え細胞において、目的物としてのタンパク質をコードする核酸分子を形質転換するかまたは目的物としてのタンパク質の産生量を増加させることによる、目的物としてのタンパク質を製造する方法。

[請求項13] p180タンパク質が哺乳動物由来のものである、請求項12に記載の方法。

[請求項14] 哺乳動物のp180タンパク質の全長またはその部分が、ヒトp180タンパク質（SEQ ID NO: 2）、マウスp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_077243）、ラットp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_230637）、チャイニーズハムスターp180タンパク質（GenBank Accession No. XM_003496471）、イヌp180タンパク質（GenBank Accession No. NP_001003179）、ウマp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001915027）、サルp180タンパク質（GenBank Accession No.

XP_002798281）、チンパンジーp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_514527）、ブタp180タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926148）、またはそれらの部分である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 哺乳動物のp180タンパク質の部分が、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質（ヒトp180タンパク質）の27～157番アミノ酸からなる領域を含む部分、623～737番アミノ酸からなる領域を含む部分、738～944番アミノ酸からなる領域を含む部分、945～1540番アミノ酸からなる領域を含む部分、から選択される、請求項13または14に記載の方法。

[請求項16] mRNAの小胞体（ER）局在化を促進するタンパク質が、スプライシング因子3Bサブユニット4（SF3b4）タンパク質の全長またはその部分（SEQ ID NO: 4の全長アミノ酸配列424 AA；RRM1であるSEQ ID NO: 4の13～91 AA；.RRM2であるSEQ ID NO: 4の100、からなる群から選択される、請求項12～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] SF3b4タンパク質が哺乳動物由来のものである、請求項16に記載の方法。

[請求項18] 哺乳動物のSF3b4タンパク質の全長またはその部分が、ヒトSF3b4タンパク質（SEQ ID NO: 4）、マウスSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_694693.1）、ラットSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001011951.1）、チャイニーズハムスターSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_003498680.1）、イヌSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_540295.3）、ウマSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001488649.2）、サルSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. NP_001097793.1）、チンパンジーSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_513768.2）、ブタSF3b4タンパク質（GenBank Accession No. XP_001926524.1）、またはそれらの部分である、請求項17に記載の方法。

[請求項19] 組換え細胞が、受託番号NITE BP-01753（CHO 3D5）、受託番号NITE

BP-1535（CHO YA7）、または受領番号NITE ABP-01811（CHO 1B2）により表される細胞株である、請求項12～18のいずれか1項にに記載の方法。

[請求項20] 目的物としてのタンパク質が、糖タンパク質である、請求項12～19のいずれか1項に記載の方法。

[請求項21] 目的物としてのタンパク質が、コラーゲン、フィブロネクチンまたは抗体である、請求項20に記載の方法。

[請求項22] 目的物としてのタンパク質を発現するための発現ユニット中、プロモータの下流でかつ目的物としてのタンパク質をコードするDNAのヌクレオチド配列の開始コドンの上流に、RNA結合タンパク質が認識／結合（あるいは相互作用）するcis-エレメントを挿入することにより、発現系細胞内における目的物としてのタンパク質の発現量を増大させる方法。

[請求項23] cis-エレメントが、RNA認識モチーフ（RRM）型RNA結合タンパク質が認識／結合（あるいは相互作用）するものである、請求項22に記載の方法。

[請求項24] cis-エレメントが、SF3b4タンパク質のRNA認識モチーフ（RRM）が認識／結合（あるいは相互作用）するものである、請求項23に記載の方法。

[請求項25] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、1または数個の9mer～12merの配列モチーフGAN_1-$(X)_n$-ACN_2（n=3～6）（N_1およびN_2は独立してA、T、C、Gのいずれのヌクレオチドであってもよい））を含むものである、請求項22～24のいずれか1項に記載の方法。

[請求項26] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、1または数個の9mer～12merの配列モチーフ（GAG-$(X)_n$-ACV（n=3～6）（VはAまたはGまたはCを示す）、SEQ ID NO: 17～20）を含むものである、請求項25に記載の方法。

[請求項27] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、タイプIコラーゲン遺伝子

の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、フィブロネクチン遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、マトリックスメタロプロテアーゼ14（MMP14）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、プロリル4-ヒドラキシラーゼA2（P4HA2）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、プロリル4-ヒドラキシラーゼA1（P4HA1）遺伝子の5'非翻訳領域のヌクレオチド配列に由来する配列、からなる群から選択される配列である、請求項22～26のいずれか1項に記載の方法。

[請求項28] cis-エレメントのヌクレオチド配列が、SEQ ID NO: 5の全長またはSEQ ID NO: 7の全長の他、SEQ ID NO: 5のうち1～102番ヌクレオチド、1～78番ヌクレオチド、1～60番ヌクレオチド、61～126番ヌクレオチド、16～57番ヌクレオチド、79～126番ヌクレオチド、103～126番ヌクレオチド、58～78番ヌクレオチド、51～78番ヌクレオチド、1～27番ヌクレオチド、70～78番ヌクレオチドからなる群から選択されるいずれかの配列である、請求項22～27のいずれか1項に記載の方法。

[請求項29] 発現系細胞が、無傷の宿主細胞、p180タンパク質の全長またはその部分の発現が亢進された細胞、SF3b4タンパク質の全長またはその部分の発現が亢進された細胞、またはこれらの両方の発現がともに亢進された細胞である、請求項22～28のいずれか1項に記載の方法。

[請求項30] SF3ｂ4を機能阻害または発現抑制することにより、コラーゲン合成を抑制し、異常コラーゲンによる肺胞上皮、線維症の重症化を防止するための医薬組成物。