

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4053084号
(P4053084)

(45) 発行日 平成20年2月27日 (2008. 2. 27)

(24) 登録日 平成19年12月14日 (2007. 12. 14)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 K

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47 Z N A

請求項の数 12 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願平5-510927	(73) 特許権者	593052785
(86) (22) 出願日	平成4年11月24日 (1992. 11. 24)		ザ スクリップス リサーチ インスティ テュート
(65) 公表番号	特表平7-502121		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
(43) 公表日	平成7年3月2日 (1995. 3. 2)		037 ラ ジョラ ノース トーリー
(86) 国際出願番号	PCT/US1992/010178		パインズ ロード 10550
(87) 国際公開番号	W01993/012127	(74) 代理人	100059959
(87) 国際公開日	平成5年6月24日 (1993. 6. 24)		弁理士 中村 稔
審査請求日	平成11年8月31日 (1999. 8. 31)	(74) 代理人	100067013
審査番号	不服2003-12790 (P2003-12790/J1)		弁理士 大塚 文昭
審査請求日	平成15年7月7日 (2003. 7. 7)	(74) 代理人	100065189
(31) 優先権主張番号	808, 457		弁理士 穴戸 嘉一
(32) 優先日	平成3年12月9日 (1991. 12. 9)	(74) 代理人	100074228
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 今城 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板 G P I I I a P 1 ▲ A 1 ▼ および P 1 ▲ A 2 ▼ エピトープ、その調整並びに使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 以下の配列 A のアミノ酸残基位置 1 ～ 6 5 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
又は(b) 配列 A の位置 1 ～ 6 5 とそれに続く追加のアミノ酸配列からなり、当該追加のアミ
ノ酸配列は、以下の配列 B の、アミノ酸残基位置 6 6 から出発し、位置 6 6 ～ 1 3 8 の任
意の位置までのアミノ酸配列からなる、ポリペプチド、であって、前記ポリペプチドが、P 1 ^{A1}又は P 1 ^{A2}に対する抗体と免疫反応するが、該抗
体の両方とは免疫反応せず、かつグリコシル化されていないことを特徴とする単離された
組換えポリペプチド。

配列 A :

Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
1				5					10					15
Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
				20					25					30
Leu	Pro	Xaa	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
				35					40					45
Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
				50					55					60
Ala	Arg	Val	Leu	Glu										
				65										

(但し、Xaa は、Leu 又は Proである。)

配列 B

Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Gln	Val
66				70					75					80
Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu	Arg	Leu	Arg	Pro	Asp
				85					90					95
Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr
				100					105					110
Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ser	Met	Lys
				115					120					125
Asp	Asp	Leu	Trp	Ser	Ile	Gln	Asn	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu		
				130					135					138

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、以下の配列(1)～(6)からなる群から選択されるアミノ酸残基配列からなる請求項 1 に記載のポリペプチド。

(1)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
	1				5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu										
					65										

10

(2)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
					5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly
					65					70					75
	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu
					80					85					90
	Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg
					95					100					105
	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp							
					110					113					

20

(3)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
					5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly
					65					70					75
	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu
					80					85					90
	Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg
					95					100					105
	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu
					110					115					120
	Ser	Tyr	Ser												
					123										

30

40

(4) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln		
5	10	15
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala		
20	25	30
Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly		
65	70	75
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu		
80	85	90
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg		
95	100	105
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu		
110	115	120
Ser Tyr Ser Met		
124		

10

(5) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln		
5	10	15
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala		
20	25	30
Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly		
65	70	75
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu		
80	85	90
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg		
95	100	105
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu		
110	115	120
Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly		
125	130	135
Thr Lys Leu		
138		

20

30

(6) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln		
5	10	15
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala		
20	25	30
Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn-Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu		
65		

40

第二のポリペプチドに機能しうるように連結された第一のポリペプチドを含む、単離された組換え融合ポリペプチドであって、

前記第一のポリペプチドが、前記第二のポリペプチドにペプチド結合したポリペプチド又は蛋白のアミノ酸残基配列を示し、該ポリペプチド又は蛋白が、前記第二のポリペプチドの免疫学的結合特性に干渉せず、

前記第二のポリペプチドが、

(a) 以下の配列Aのアミノ酸残基位置1～65のアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は

(b) 配列Aの位置1～65とそれに続く追加のアミノ酸配列からなり、当該追加のアミノ酸配列は、以下の配列Bの、アミノ酸残基位置66から出発し、位置66～138の任意の位置までのアミノ酸配列からなる、ポリペプチド、

であって、前記ポリペプチドが、 PI^{A1} 又は PI^{A2} に対する抗体と免疫反応するが、該抗体の両方とは免疫反応せず、かつグリコシル化されていないことを特徴とする、単離された組換え融合ポリペプチド。

配列A：

Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
1				5					10					15
Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
				20					25					30
Leu	Pro	Xaa	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
				35					40					45
Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
				50					55					60
Ala	Arg	Val	Leu	Glu										
				65										

(但し、Xaa は、Leu 又は Proである。)

配列B

Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Gln	Val
66				70					75					80
Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu	Arg	Leu	Arg	Pro	Asp
				85					90					95
Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr
				100					105					110
Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ser	Met	Lys
				115					120					125
Asp	Asp	Leu	Trp	Ser	Ile	Gln	Asn	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu		
				130					135			138		

【請求項4】

前記第一のポリペプチドが、ガラクトシダーゼのアミノ酸配列を有する請求項3に記載の融合ポリペプチド。

【請求項5】

前記第二のポリペプチドが、以下の配列(1)～(6)からなる群から選択されるアミノ酸残基配列からなる請求項4に記載の融合ポリペプチド。

(1) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln

1	5	10	15
Cys	Leu	Ala	Val
20	25	30	
Leu	Pro	Leu	Gly
35	40	45	
Lys	Asp	Asn	Cys
50	55	60	
Ala	Arg	Val	Leu
65			

10

(2) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln

5	10	15
Cys	Leu	Ala
20	25	30
Leu	Pro	Leu
35	40	45
Lys	Asp	Asn
50	55	60
Ala	Arg	Val
65	70	75
Asp	Ser	Ser
80	85	90
Arg	Leu	Arg
95	100	105
Gln	Val	Glu
110	113	

20

(3) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln

5	10	15
Cys	Leu	Ala
20	25	30
Leu	Pro	Leu
35	40	45
Lys	Asp	Asn
50	55	60
Ala	Arg	Val
65	70	75
Asp	Ser	Ser
80	85	90
Arg	Leu	Arg
95	100	105
Gln	Val	Glu
110	115	120
Ser	Tyr	Ser
123		

30

40

(4) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln

5	10	15
Cys	Leu	Ala
20	25	30
Leu	Pro	Leu

35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly		
65	70	75
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu		
80	85	90
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg		
95	100	105
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu		
110	115	120
Ser Tyr Ser Met		
124		

10

(5) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln		
5	10	15
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala		
20	25	30
Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly		
65	70	75
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu		
80	85	90
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg		
95	100	105
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu		
110	115	120
Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly		
125	130	135
Thr Lys Leu		
138		

20

30

(6) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln		
5	10	15
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala		
20	25	30
Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn-Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu		
65		

40

【請求項6】

天然の GPIIIa の P1^{A1}又は P1^{A2}決定基と免疫的に反応するヒトの抗体の存在についてヒト抗体含有身体サンプルを分析する方法であって、以下の工程、

(a) 前記身体サンプルを、

50

(i) 請求項 1 に記載の単離された組換えポリペプチド、又は
(ii) 請求項 3 に記載の単離された組換え融合ポリペプチド、
のいずれかである抗原と混合して、水性免疫反応混合物を形成する工程、
(b) 前記水性免疫反応混合物を、存在している抗体が前記抗原と免疫的に反応して免疫
反応生成物を形成するために十分な時間、生物学的な分析条件下で維持する工程、及び
(c) 形成した前記免疫反応生成物の存在を検出し、それによって前記抗体の存在を検出
する工程、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 7】

前記決定基が、天然の GPIIb/IIIa の P1^{A1} 決定基であり、前記抗原が、以下の配列(1)～(5)の配列及びβ-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された以下の配列(1)からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

(1)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
	1				5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu										
					65										

10

(2)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
					5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly
					65					70					75
	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu
					80					85					90
	Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg
					95					100					105
	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp							
					110					113					

20

(3)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
					5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly
					65					70					75
	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu
					80					85					90

30

40

Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg
				95					100					105
Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu
				110					115					120
Ser	Tyr	Ser												
														123

(4) Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
				5					10					15
Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
				20					25					30
Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
				35					40					45
Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
				50					55					60
Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly
				65					70					75
Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu
				80					85					90
Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg
				95					100					105
Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu
				110					115					120
Ser	Tyr	Ser	Met											
														124

(5) Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
				5					10					15
Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
				20					25					30
Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
				35					40					45
Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
				50					55					60
Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly
				65					70					75
Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu
				80					85					90
Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile	Gln	Val	Arg
				95					100					105
Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu
				110					115					120
Ser	Tyr	Ser	Met	Lys	Asp	Asp	Leu	Trp	Ser	Ile	Gln	Asn	Leu	Gly
				125					130					135
Thr	Lys	Leu												
														138

【請求項 8】

前記決定基が、天然の GPIIb/IIIa の P1^{A2} 決定基であり、前記抗原が、β-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された以下の配列(6)を有する請求項 6

10

20

30

40

50

に記載の方法。

(6) Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
				5					10					15
Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
				20					25					30
Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn-Leu	Leu	
				35					40					45
Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
				50					55					60
Ala	Arg	Val	Leu	Glu										
				65										

10

【請求項 9】

検出が、以下の工程、

(i) 前記免疫反応生成物を、ヒト抗体と免疫反応する第二の抗体と混合して第二の混合物を形成する工程であって、前記第二の抗体が、機能しうるようにマーカーに連結されている工程、

(ii) 前記第二の混合物を、前記第二の抗体が該ヒト抗体と免疫的に反応して第二の免疫反応生成物を形成するに十分な時間、生物学的分析条件下で維持する工程、及び、

(iii) 前記第二の免疫反応生成物に固定されたマーカーの量を決定し、それによって天然の GPIIb/IIIa の P1^{A1}又は P1^{A2}決定基と免疫反応するヒト抗体の存在を決定する工程、

20

を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

血小板 GPIIb/IIIa の P1^{A1}又は P1^{A2}決定基に対するヒト抗体の存在について分析するための診断分析キットであって、以下の要素、

(a) (i) 請求項 1 に記載の単離された組換えポリペプチド、又は、

(ii) 請求項 3 に記載の単離された組換え融合ポリペプチド、

のいずれかである抗原を含む容器であって、少なくとも 1 回の分析を実施するのに十分な量で存在する抗原を含む容器、及び

30

(b) 前記ヒト抗体と前記抗原との免疫反応を検出するための手段、

を含むことを特徴とする診断分析キット。

【請求項 11】

前記抗原が、以下の配列(1)～(6)及び、β-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結されている以下の配列(1)又は(6)からなる群から選択されるアミノ酸残基配列を有する請求項 10 に記載のキット。

(1)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
	1				5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu
					50					55					60
	Ala	Arg	Val	Leu	Glu										
					65										

10

(2)	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln
					5					10					15
	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala
					20					25					30
	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu
					35					40					45
	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu

50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly		
65	70	75
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu		
80	85	90
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg		
95	100	105
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp		
110	113	

(3) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln			10
5	10	15	
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala			
20	25	30	
Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu			
35	40	45	
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu			
50	55	60	
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly			
65	70	75	
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu			20
80	85	90	
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg			
95	100	105	
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu			
110	115	120	
Ser Tyr Ser			
123			

(4) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln			
5	10	15	
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala			30
20	25	30	
Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu			
35	40	45	
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu			
50	55	60	
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly			
65	70	75	
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu			
80	85	90	
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg			40
95	100	105	
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu			
110	115	120	
Ser Tyr Ser Met			
124			

(5) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln			
5	10	15	
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala			

20	25	30
Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly		
65	70	75
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu		
80	85	90
Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg		
95	100	105
Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu		
110	115	120
Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly		
125	130	135
Thr Lys Leu		
138		

10

(6) Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln		
5	10	15
Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala		
20	25	30
Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn-Leu Leu		
35	40	45
Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu		
50	55	60
Ala Arg Val Leu Glu		
65		

20

【請求項 1 2】

30

前記ヒト抗体の免疫反応を検出するための前記手段が、別の種からの標識結合抗ヒト抗体である請求項 1 0 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、G P I I I a と呼ばれる血小板表面の糖蛋白に関し、より具体的には、G P I I I a 分子の部分である P 1^A と呼ばれる三次構造依存性抗原、その調製および使用に関する。

従来技術

血小板抗原系、P 1^A は、2 種の臨床的症候群、新生児免疫異常血小板減少症 (N A I T) および輸血後紫斑病 (P T P) と深く関わっている [Aster, 免疫性血小板減少症、Kun icki & George 編、血小板の免疫学、387、フィラデルフィア、ペンシルバニア (1989)]。N A I T は、胎盤を通して移行した母体の血小板特異的抗体による血小板破壊の増加を伴う新生児の出血性疾患で、新生児 1 0 0 0 人に 1 人の頻度で発生すると算定される [B lanchette ら、Curr. Stud. Hematol. Blood Tranf., 52:87 (1986)]。P T P は、輸血後の血小板不適合に対する抗体介在性血小板減少症である。白色人種では N A I T および P T P の最も一般的な原因は P 1^{A1} 変態抗原 (アロアンチゲン) である。

40

抗 P 1^{A1} 抗体誘発の原因であるアロアンチゲン決定基は、血小板膜 G P I I I a 上に存在する [Kunicki ら、Mol. Immunol. 16:353 (1979)]。P 1^{A1} および P 1^{A2} 表現型は、G P I I I a の c D N A 配列の塩基 1 9 6 にそれぞれチミジン (T) またはシチジン (C) が存在するかどうかによる [Newman ら、J. Clin. Inmves., 83:1778 (1989)]。

50

T→Cの塩基変更は、成熟GPIIIaの残基33におけるロイシン／プロリン多形性を生じる。GPIIIaのアミノ末端におけるロイシンからプロリンへの多形性が、P1^{A1}／P1^{A2}血小板変態型（アロタイプ）の原因で〔Goldbergら、Blood, 78:681 (1989)〕、この多形性を有する合成直線状ペプチドは抗P1^{A1}抗体と反応しなかった〔Flugら、Blood, 77:1964 (1991)〕。このことは、ロイシン³³／プロリン³³多形性は、全体的な折りたたみまたはP1^{A1}エピトープの組み立てのための翻訳後プロセッシングに影響を及ぼしうることを提唱する。

要約

一つの特徴として、本発明は、P1^{A1}決定基を含むGPIIIaアミノ酸残基配列をコードする、約195から800ヌクレオチド塩基対を含む単離されたDNA分子に関する。好ましくは、該DNA分子は、配列番号：2、配列番号：6、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、または配列番号：18を有する。

10

本発明はまた、P1^{A2}決定基を含むGPIIIaアミノ酸配列をコードする、約195から800ヌクレオチド塩基対を含む単離されたDNA分子に関する。該DNA分子は、配列番号：4、配列番号：8、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、または配列番号：28を有する。

また別の特徴として、本発明は、血小板GPIIIaのP1^{A1}またはP1^{A2}決定基のアミノ酸残基配列をコードする外来DNAセグメントに機能しうるように連結された発現ベクターを含む組換え分子に関し、該組換え分子は、宿主細胞を形質転換させたとき、天然の血小板GPIIIa P1^{A1}またはP1^{A2}決定基のいずれかを発現させる。組換え分子で使用する外来DNAは、好ましくは、上記で説明した単離されたDNA分子である。好ましい発現ベクターはλgt22である。

20

更に別の特徴として、本発明は、天然の血小板GPIIIaのP1^{A1}またはP1^{A2}決定基を含むポリペプチドの調製方法に関し、該方法は、配列番号：1に示した約残基1から約残基65のアミノ酸残基配列をコードする外来DNAに機能しうるように連結させた発現ベクターを含む組換え分子で形質転換した宿主細胞を培養し、さらに、該ポリペプチドを発現させるために十分な時間、培養条件下で該形質転換宿主細胞を維持することを含む。好ましい宿主細胞は大腸菌（E. coli）である。好ましいベクターはλgt22で、好ましい外来DNAセグメントは、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および28を含む群から選ばれる。該ポリペプチドは融合ポリペプチドとして発現させてもよい。

30

さらにまた、本発明は、配列番号：1のアミノ酸残基配列を含み、血小板GPIIIaの約65から266アミノ酸残基を含み、該ポリペプチドが血小板GPIIIa P1^{A1}またはP1^{A2}決定基を示す単離されたポリペプチドに関する。好ましくは、該単離されたポリペプチドは、配列番号：3、5、7、9、11、15、17、19、21、23、25、27および29から成る群から選ばれるアミノ酸残基配列を有する。

本発明はまた、第二のポリペプチドに機能しうるように連結した第一のポリペプチドを含む、天然の血小板GPIIIa P1^{A1}またはP1^{A2}決定基を免疫学的に模倣した融合ポリペプチドに関する。第一のポリペプチドは、第二のポリペプチドにペプチド結合させた、免疫学的に不活性なポリペプチドまたは蛋白のアミノ酸残基配列である。第二のポリペプチドは、血小板GPIIIaの約65から266アミノ酸残基（配列番号：1のアミノ酸残基配列を含む）を含み、天然の血小板GPIIIaのP1^{A1}またはP1^{A2}決定基を表わしている。好ましい具体例では、第一のポリペプチドは、β-ガラクトシダーゼのアミノ酸配列を有し、第二のポリペプチドは、配列番号：3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27および29から成る群から選ばれるアミノ酸残基配列を有する。

40

さらにまた別の局面では、本発明は、天然のGPIIIa P1^{A1}またはP1^{A2}決定基と免疫的に反応するヒトの抗体の存在について、ヒトの抗体含有身体サンプルを分析する方法に関する。該方法は以下の工程を含む：

(a) 以下の(i)または(ii)の抗原と人体サンプルを混合することによって免疫反

50

応混合物水溶液を作成し、

(i) GPIIIaの配列を有し、約65から266アミノ酸残基を含有する単離ポリペプチド（該アミノ酸残基は、天然の Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基を表わし、さらに配列番号：1のアミノ酸残基配列を含む）または、

(ii) 天然の Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基を表すGPIIIaの約65から266アミノ酸残基のアミノ酸残基配列を含み、さらに配列番号：1のアミノ酸残基配列を含む融合ポリペプチド；

(b) 該免疫反応混合物水溶液を、存在する抗体が該抗原と免疫反応を起こして免疫反応生成物を形成するために十分な時間、生物学的分析条件下で維持し；さらに

(c) 形成された免疫反応生成物の存在を検出し、それによって該抗体の存在を検出する。

10

該決定基が天然のGPIIIa Pl^{A1} 決定基である場合は、該抗原は、配列番号：3、配列番号：7、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19およびβ-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された配列番号：11から成る群から選ばれる。

該決定基が天然のGPIIIa Pl^{A1} 決定基である場合は、該抗原は、配列番号：5、配列番号：9、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29およびβ-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された配列番号21から成る群から選ばれる。

好ましい具体例では、検出は以下によって遂行される：

20

(i) 免疫反応生成物をヒト抗体と免疫反応を起こす第二の抗体（この第二の抗体は機能しうるようにマーカーに連結されている）と混合して第二の混合物を形成し；

(ii) 該第二の抗体がヒト抗体と免疫反応を起こして第二の免疫反応生成物を形成するために十分な時間、生物学的分析条件下で該第二の混合物を維持し；さらに

(iii) 該第二の免疫反応生成物に結合したマーカー量を求め、それによって、天然のGPIIIa Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基と反応するヒト抗体の存在を決定する。好ましくは、該マーカーは、放射性、酵素、ビオチン、蛍光および化学ルミネッセンス標識から成る群から選ばれ、該抗原は、ヒト体液サンプルと抗原を混合する前に固形支持体に結合されている。

更に別の特徴として、本発明は、以下の工程を含む血小板の型分けの方法に関する：

30

(a) 供与者からの血小板を水溶液中で抗体と混合（この抗体はGPIIIaの Pl^{A1} および Pl^{A2} の両方とは結合しないが、いずれか一方と免疫反応を生じる）し、免疫反応混合物水溶液を形成し；

(b) 該免疫反応混合物水溶液を、該抗体が免疫反応を起こし免疫反応生成物を形成するために十分な時間、生物学的反応条件下で維持し；さらに、

(c) 一切の免疫反応生成物の存在を検出し、それによって、当該GPIIIa Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基の一方または他方の存在および該血小板の型を検出する。

また別の好ましい具体例では、該抗体(a)はGPIIIa Pl^{A1} 決定基と免疫的に反応するが、GPIIIa Pl^{A2} 決定基と反応しないか、または、(b) GPIIIa Pl^{A2} 決定基とは免疫的に反応するが、GPIIIa Pl^{A1} 決定基とは反応しない。好ましくは該抗体は単クローン抗体である。

40

また別の特徴として、本発明は、以下のものを含む容器を含む血小板GPIIIa Pl^{A1} 決定基の型分けのためのキット形をした診断用分析系に関する。該容器は、血小板GPIIIaの Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基の1つと免疫的に反応するが両方の決定基とは反応しない抗体の少なくとも1回の分析に十分な量、および当該抗体と血小板の免疫反応を検出するための標識を含む。該診断系はさらに第二の容器を含むことができ、これは、血小板GPIIIa Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基の他方と免疫的に反応するが両決定基とは反応しない抗体を、少なくとも1回の分析に十分な量で含む。好ましくは、該標識は該抗体に連結されている。

さらにまた、本発明は、以下を含む、血小板GPIIIa Pl^{A1} または Pl^{A2} 決定基に対

50

するヒト抗体の存在を調べるキット形の診断分析系に関する：

(a) 以下の (i) または (i i) の抗原を、少なくとも 1 回の分析を実施するために十分な量で含む容器：

(i) G P I I I a の配列を有しており、さらに、天然の P 1^{A1} または P 1^{A2} 決定基を有し配列番号：1 のアミノ酸残基配列を含む 65 から 266 アミノ酸残基を含んでいる単離されたポリペプチド；

(i i) 天然の P 1^{A1} または P 1^{A2} 決定基を有する G P I I I a の約 65 から 266 アミノ酸残基のアミノ酸残基配列含み、さらに配列番号 1：のアミノ酸残基配列を含む融合ポリペプチド；

(b) ヒト抗体と該抗原との免疫反応を検出するための手段。

10

好ましくは、該抗原は、配列番号：3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 および β -ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された配列番号：11 または 21 から成る群から選ばれるアミノ酸残基配列を有し、該抗原は固形支持体に結合されている。ヒト抗体の免疫反応を検出する手段は、別の種から得られる標識に連結させた抗ヒト抗体である。

【図面の簡単な説明】

本明細書の 1 部を成す図面において；

図 1 は、 λ g t 22 発現ライブラリーの構築に用いた完全な長さの血小板 G P I I I a の c D N A（一番上の黒棒線）およびコードされた蛋白（灰色の長四角）を模式的に表している。コード蛋白のシグナル配列（黒四角）および膜通過ドメイン（白四角）も該灰色の長四角内に描かれている。抗 P 1^{A1} 抗体を用いて λ g t 22 発現ライブラリーから単離された G P I I I a c D N A の領域は、模式的に描かれたコード蛋白の下に棒線として描きこんだ。各 c D N A によってコードされる残基の数は、各棒線の右に示した。

20

図 2 は、抗 P 1^{A1} 抗体と反応する、単離した最小発現クローンによってコードされるアミノ酸残基を単一文字コードで表している（配列番号：11 および 13）。該蛋白のシグナル配列には下線を施し、システイン（C）は箱内に示し、ロイシン³³/プロリン³³多形性は L と P の間の矢印で示し、フラッグラ（Flugら、Blood, 77:1964 (1991)）が記載した、抗 P 1^{A1} 抗体と反応しない 13 残基の直線状ペプチドは、該配列の下に点線で示してある。

定義

30

アミノ酸残基配列：隣接する残基間のペプチド結合を介して結合した 2 個または 2 個以上の一続きのアミノ酸残基でペプチドまたはポリペプチドを形成する。アミノ酸残基配列は、その構成アミノ酸について便宜的に 1 文字または 3 文字の略語によって表される。アミノ酸について本明細書で用いられる略語は、37 C. F. R. § 1. 822 (b) (2) で提供されたもので、以下の対照表で再現する：

略語

アミノ酸

1文字	3文字		
Y	Tyr	チロシン	
G	Gly	グリシン	10
F	Phe	フェニルアラニン	
M	Met	メチオニン	
A	Ala	アラニン	
S	Ser	セリン	
I	Ile	イソロイシン	
L	Leu	ロイシン	20
T	Thr	スレオニン	
V	Val	バリン	
P	Pro	プロリン	
K	Lys	リジン	
H	His	ヒスチジン	
Q	Gln	グルタミン	30
E	Glu	グルタミン酸	
Z	Glx	Gluおよび／またはGln	
W	Trp	トリプトファン	
R	Arg	アルギニン	
D	Asp	アスパラギン酸	
N	Asn	アスパラギン	40
B	Asx	Asnおよび／またはAsp	
C	Cys	システイン	
J	Xaa	未特定	

本明細書中のアミノ酸残基配列を構成する個々の残基はL型異性体である。また、アミノ酸残基配列は翻訳後修飾アミノ酸、例えばヒドロキシル化、グリコシル化アミノ酸残基、またはジスルフィド結合を介して連結された残基を含むことができる。さらに、アミノ酸残基配列は、1つまたは2つ以上の修飾アミノ酸または通常でないアミノ酸、例えば37

C. F. R. § 1. 8 2 2 (b) (4) に挙げられたようなものを含むことができ、これらは、本明細書に参考文献として含まれている。アミノ酸残基配列は、その構成アミノ酸に対応して略号によって表されている。

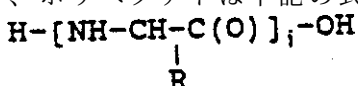
抗体：リガンドに免疫学的に結合するポリペプチドまたは蛋白。抗体は（ここで用いられているように）、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメントである。F a b、F a b'、F (a b')₂ および F_v として当該技術分野で既知の分子部分が含まれる。典型的には、抗体は、サイズが約 6 から約 3 4 Å の範囲のリガンドと、約 1 0⁴ から 1 0¹⁰ M⁻¹ の範囲で、さらに 1 0¹³ M⁻¹ の高さの会合定数で結合する。抗体は広範囲のリガンドと結合する。リガンドは小分子（例えばステロイド、プロスタグランジン）、バイオポリマー（例えば核酸、蛋白および多糖体）および合成ポリマー（例えばポリプロピレン）を含む。“抗体結合部位”とは、抗原と特異的に結合する（免疫的に反応する）重鎖および軽鎖の可変および超可変領域を構成する抗体分子の構造部分である。“免疫的に反応する”という用語は、抗原決定基含有分子（抗原）と抗体結合部位を含む分子（例えば完全抗体分子またはその一部分）との間の結合を指すために本明細書では用いられている。“抗原決定基”とは、抗体結合部位によって免疫学的に結合される抗原の構造部分である。この用語はまた、“エピトープ”および“決定基”と互換的に用いられる。抗体は、抗原の単一のエピトープ（単クローン性）または複数のエピトープ（多クローン性）と結合することができる。ポリペプチドによって誘発される抗体は、しばしば、蛋白免疫原で生じる多クローン抗体と反応するエピトープより少ない数のエピトープと免疫的に反応する。そのようなポリペプチド誘発抗体は、ここではオリゴクローン抗体と呼ぶ。

融合蛋白またはポリペプチド：2つの異なる蛋白の各々から由来するアミノ酸残基配列を含む蛋白またはポリペプチド；それは、2つのコード配列が、それらの読み枠が読み枠にしたがった状態で結合した組換え遺伝子の発現によって形成される。少なくとも1つの完全な蛋白配列が発現物質に含まれる場合に融合蛋白は得られ、一方、融合ポリペプチドには蛋白の一部分のみが存在する。このタイプのハイブリッド遺伝子は、例えば分析が容易な蛋白で特定の遺伝子生成物を標識するために、インビトロで構築することができる。例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) の l a c Z と遺伝子を融合する場合、β-ガラクトシダーゼ活性またはその部分配列をもつ融合蛋白またはポリペプチドを得ることができる。また別に、細胞によってそれが分泌されるように、外来シグナルペプチドに蛋白を結合させることができる。にもかかわらず、上記の融合蛋白と融合ペプチドとの区別は、特定の融合蛋白が考察されている場合を除き、融合ポリペプチドという用語は、両方の種類の分子について本明細書では通常用いられる。

リガンド：特異的に特定の受容体（レセプター）分子と、通常、静電気力および／または水素結合を介して結合する構造領域を有する分子。具体的なレセプター分子は抗体結合部位である。

オリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチド／DNAセグメント：一本鎖または二本鎖ヌクレオチドポリマー。ここで用いられているように、これらの用語は、天然に生じる核酸、例えば、アデノシン (A)、シチジン (C)、グアノシン (G)、チミジン (T)、ウリジン (U)、イノシン (I) の他、3 7 C. F. R. § 1. 8 2 (p) (1) に表されているような修飾塩基を含むことができる。

ペプチド／ポリペプチド：少なくとも2つのアミノ酸残基を含むポリマーで、当該アミノ酸残基において、1つの残基の α-アミノ基と隣接する残基の α-カルボニル基との間のペプチド結合によって隣接する残基が連結されている。ポリペプチドの一次構造は、該ポリマーの一方の末端に第一アミン基を、他方の末端にカルボン酸基を有する。したがって、ポリペプチドは下記の式によって表すことができる：



式中、Rは与えられたアミノ酸に特徴的な側鎖で、iはポリマーを構成するアミノ酸残基の数を示し、その数は2または2以上である。融合ポリペプチドの場合のように、ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは1つまたは1つ以上の異なるアミノ酸残基配列を含むことができる。また、水溶液中のポリペプチドは、該溶液のpHにしたがい通常1つまたは1つ以上の双性イオン形をしている。

蛋白：およそ50アミノ酸残基を含む単一のポリペプチドまたは一組の架橋ポリペプチド。蛋白は、同一のポリペプチド内または隣接ポリペプチド間で、例えばジスルフィド架橋を介する化学的架橋を有することができる。蛋白がグリコシル化されているとき、本明細書で考察されるGPIIIaの場合のように、それは糖蛋白と呼ばれる。

レセプター：別の分子（リガンド）と特異的に結合する構造領域を有する、生物学的に活性を有する蛋白性分子。抗体結合部位はレセプターの1つのタイプである。

ベクター：細胞内で自律的に増殖できるDNA分子であって、それに対してDNAセグメント（例えば遺伝子またはポリヌクレオチド）を機能しうるように連結でき、その結果結合されたセグメントの増殖を可能にする。発現ベクターは、該DNAセグメントが該ベクターのプロモーター配列の制御下にあるとき、適切に形質転換された宿主細胞中において、1つまたは1つ以上のポリペプチドをコードするDNAセグメントの発現を指令することができる。

発明の詳細な説明

A. 序

本発明に関する研究の結果は2つの重要な示唆を含んでいる。第一に、抗P1^{A1}およびP1^{A2}抗体に対するアロアンチゲンエピトープは、成熟GPIIIaのアミノ末端65残基に位置することがここで示されている。以前の研究は、ロイシン³³/プロリン³³アミノ酸多形性は2つのP1^{A1}表現形の原因であるという証拠を提示した〔Newmanら、J. Clin. Invest., 83:1778 (1989) ; Goldbergerら、Blood, 78:681 (1991) 〕。しかしながら、該多形性の同定によっては、臨床的に問題となっているアロ抗体に対するエピトープは明らかでない。

蛋白分解法を用いることによってP1^{A1}エピトープの位置についての矛盾する報告が存在する〔Newmanら、Mol. Immunol., 22:719 (1985) ; Calveteら、Biochem. J., 250:697 (1988) ; Beerら、J. Biol. Chem., 264:17564 (1989) ; Flugら、Blood, 77:1964 (1991) 〕。これらの証拠は、P1^{A1}エピトープは該多形性近傍に位置することを提案しているけれども、該多形性を含む合成ペプチドを利用する最近の研究では、該合成ペプチドは抗P1^{A1}抗体と結合することができず、抗ペプチド抗体は2種の表現形を区別することができないということが示された〔Flugら、Blood, 77:1964 (1991) 〕。ここに提示されたデータは、抗P1^{A1}およびP1^{A2}抗体に対するエピトープは、GPIIIaのアミノ末端7kDaに、さらに、P1^A表現形の原因である実際の多形性の33残基内に存在することを示した。フラッグらのデータとともに本明細書に示したデータは、P1^{A1}およびP1^{A2}エピトープは、非直線状でGPIIIa分子の折り畳みおよびそのP1^A含有決定基に依存している；すなわちこれらのエピトープは三次構造依存性であることを示している。

本研究における第二の重要な発見は、P1^{A1}およびP1^{A2}エピトープは、原核系で発現できるということである。P1^Aエピトープの特徴を調べるために原核系を利用することは、還元感受性エピトープの発現に必要なジスルフィド結合を保全することである〔Blanchetteら、Curr. Stud. Hematol. Blood Transf., 52:87 (1986) 〕。

7つのシステインが、本研究で同定された血小板GPIIIaの小フラグメントに存在する（図2）が、これは、これら残基間の局在スルフィドリル結合〔Calveteら、Biochem. J., 273:63 (1991) 〕は、エピトープの組み立てに大きく関与し、システイン⁵-システイン⁴³⁵ジスルフィド結合は必要ではないことを示している。これらの結果は、最近ニューマンらによって提唱された〔Newmanら、Thromb. Haemostas., 66:111 (1991) 〕、P1^{A1}アロアンチゲンのモデルと一致する。さらに、生化学的研究によって提唱されるように〔Newmanら、Mol. Immunol., 22:719 (1985) 〕、大腸菌でのP1^{A1}エピトープ合成は、それはグリコシル化に左右されないことを証明した。P1^{A1}およびP1^{A2}エピトープの小さな組換え模造物の大量生産の可能性は、これらエピトープに対するアロ抗体および

血小板の型分けのための簡単な検出分析の開発を可能にする。

B. $P1^{A1}$ および $P1^{A2}$ エピトープを免疫学的に模倣するポリペプチド

血小板は、その原形質膜の表面に糖蛋白を発現している。これら糖蛋白の1つは、 $GP1IIa$ と呼ばれる84.5キロダルトンの成熟糖蛋白である。

本発明は、天然の $GP1IIa$ の $P1^{A1}$ および $P1^{A2}$ エピトープの結合領域穴（エピトープまたは決定基）を免疫学的に類似する単離ポリペプチドに関する。ここで用いられているように、“天然”という用語は、血小板上で発現する $P1^{A1}$ 決定基の一次、二次および三次構造を指す。

$GP1IIa$ はアロアンチゲンである；すなわち、それぞれの個体は $GP1IIa$ の異なる形態を発現する。ここで問題となっているアロアンチゲン決定基は $P1^A$ と命名されている。

10

$GP1IIa$ の1形態は、該成熟糖蛋白のアミノ末端からアミノ酸残基33位にロイシン（ Leu ）残基を有する。 $GP1IIa$ のこの形態の抗原決定基は $P1^{A1}$ 決定基と呼ばれる。

発現される $GP1IIa$ の第二のアロアンチゲン形は33位の Leu 残基の代わりにプロリン（ Pro ）残基を有する。 $GP1IIa$ のこの第二の形態のアロアンチゲン決定基は $P1^{A2}$ 決定基と呼ばれる。

したがって、1つの具体例では、天然の $P1^{A1}$ または $P1^{A2}$ 決定基を免疫学的に模倣するポリペプチドが目的とされる。本発明のポリペプチドは、抗天然 $P1^{A1}$ または $P1^{A2}$ 抗体と免疫的に反応するが両方とは反応しない。したがって、目的とするポリペプチドは、天然の $P1^{A1}$ エピトープのそれを十分に模倣する一次、二次および三次構造を有し、免疫学的に天然のエピトープを模倣；すなわち天然のエピトープと免疫的に反応する抗体と免疫的に反応する。目的とされる単離ポリペプチドは、したがって、天然の $P1^A$ エピトープ（決定基）の一方または他方を表わしていると判断される。適切なヒト抗体組成物の調製は以下で考察する。

20

天然の $P1^{A1}$ または $P1^{A2}$ 決定基を免疫学的に模倣する、目的とするポリペプチドは、ヒト血小板 $GP1IIa$ のアミノ酸残基配列の $P1^A$ 含有部分と同一または（以下に述べるように）保存的に置換されたアミノ酸残基配列を含む。目的とするポリペプチドは、アミノ酸残基の1位から約266位の、 $GP1IIa$ の“切り詰められた”アミノ酸残基配列を含み、天然の $P1^{A1}$ または $P1^{A2}$ 決定基の範囲であるアミノ酸残基配列を含む。目的とするポリペプチドは、 $GP1IIa$ 配列の約65から約266アミノ酸残基を含む。特に好ましいポリペプチドは、成熟 $GP1IIa$ 配列のおよそ65アミノ酸残基、すなわち $GP1IIa$ の1位から65位を含むが、またアミノ末端の26残基を含む $GP1IIa$ のシグナルペプチドの配列も含むことができる（すなわちポリペプチドはアミノ酸残基—26位で始まる残基を含むことができる）。

30

意図するポリペプチドはまた、免疫学的に不活性な間隙充填（連結）アミノ酸残基配列、例えば β -ガラクトシダーゼ配列（約1200残基）、マルトース結合蛋白（MBP）配列（約105残基）またはlacZ遺伝子産物の α ペプチド（約105残基）を、当該免疫学的に不活性な配列が該ポリペプチドの免疫学的結合特性を、本明細書で述べるように実質的に干渉しない限り（すなわち免疫学的に不活性である限り）含むことができる。さらにまた、“ベクター誘導”アミノ酸残基も、本明細書で考察されるように、意図するポリペプチドの一方の端または両端に含むことができる。

40

好ましいポリペプチドは $P1^A$ 決定基を免疫学的に模倣し、 $GP1IIa$ の65残基から266残基を含み、さらに、成熟蛋白のアミノ酸残基1位から65位の、 $GP1IIa$ に存在する $P1^{A1}$ または $P1^{A2}$ 決定基のアミノ酸残基配列を含む。

$P1^{A1}$ 決定基のアミノ酸残基配列を含む好ましいポリペプチドは、配列番号：7に示されている。本発明はまた、配列番号：7のアミノ酸残基配列を含む65から約266残基を有するポリペプチドで、その残りの残基は $GP1IIa$ のアミノ酸残基配列であるポリペプチドを意図する。

そのような単離ポリペプチドの典型例は、配列番号：3、配列番号：11、配列番号：1

50

3、配列番号：15、配列番号：17および配列番号：19に示したアミノ酸残基配列を含む。

P1^{A2}決定基のアミノ酸残基配列を含む好ましいポリペプチドは配列番号：9に示されている。本発明はまた、配列番号：9のアミノ酸残基配列を含む、GPIIIaの65から約266残基を有するポリペプチドを意図する。

そのような単離ポリペプチドの典型例は、配列番号：5、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27および配列番号：29に示したアミノ酸残基配列を含む。

好ましくは、本発明で意図されるポリペプチドは、例えば大腸菌 (*E. coli*) のような原核宿主細胞で組換え体として発現される。したがって、天然のP1^{A1}またはP1^{A2}決定基を免疫学的に模倣する好ましいポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするベクターで形質転換された大腸菌で発現される。この点についての好ましいポリペプチドは、配列番号：6に示したDNAセグメント（これは配列番号：7のポリペプチドをコードする）を含む発現ベクターで形質転換された大腸菌で発現される。また別の好ましいポリペプチドは、配列番号：8に示したDNAセグメント（このDNAセグメントは配列番号：9のポリペプチドをコードする）を含む発現ベクターで形質転換された大腸菌で発現される。これらおよび他の発現ベクターを以下で極めて詳細に説明する。

本発明のまた別の局面は、天然のP1^{A1}またはP1^{A2}決定基を免疫学的に模倣する融合ポリペプチドである。他の場所で考察するように、P1^{A1}またはP1^{A2}決定基を免疫学的に模倣する組換えポリペプチドはまた、また別の免疫学的に不活性な蛋白（例えばβ-ガラクトシダーゼまたはマルトース結合蛋白）のアミノ酸配列の全体または一部に機能しうるように連結して、したがって融合ポリペプチドとして発現させることもできる。

ここで融合ポリペプチドと呼ぶ本題のポリペプチドは、免疫学的に不活性な蛋白の全体または一部分のアミノ酸残基配列を含む第二のアミノ酸残基配列に機能しうるように連結された、天然のP1^{A1}またはP1^{A2}決定基のアミノ酸残基配列および三次構造を含む第一のアミノ酸残基配列を含む。アミノ酸残基配列は、該配列が1つまたは1つ以上の共有結合によって（例えば直接的ペプチド結合またはペプチド結合させた連結アミノ酸配列を介在させることによって）結合されているとき、第二のアミノ酸残基配列に“機能しうるように連結されている”と言う。通常、第一および第二のアミノ酸残基配列は、ベクターによって導入される1つまたはそれ以上の残基をもつペプチド結合させた第三のアミノ酸残基を介して共に連結されている。

好ましいP1^{A1}融合ポリペプチドは、免疫学的に不活性な蛋白の全部または一部のアミノ酸残基配列のカルボキシ末端に機能しうるように連結したP1^{A1}決定基のアミノ酸残基配列を含む。融合ポリペプチドの長さは、P1^{A1}決定基、免疫学的に不活性な蛋白、さらには場合によって存在する、付加的なベクター導入連結アミノ酸残基配列のそれぞれの長さによって決定される。

好ましい融合ポリペプチドは、P1^{A1}抗原のアミノ末端にβ-ガラクトシダーゼ蛋白の一部分を含む。意図される特定の融合ポリペプチドは、機能しうるように読み枠にしたがってP1^AコードDNAセグメントに繋ぎ合わせたλgt22ファージベクターを含む組換えDNA分子で形質転換した大腸菌の発現産物である。該発現DNAは上記で考察したような目的のポリペプチドをコードする。

また別の好ましい融合ポリペプチドは、マルトース融合蛋白 (MBP) が目的のポリペプチドのアミノ末端に融合されている融合蛋白である。MBP含有融合蛋白は、機能しうるように読み枠にしたがってMALTMc2またはMALTMp2プラスミドベクター（ニュイングランドバイオラブより入手可能）に繋ぎ合わされているP1^AコードDNA配列を含む組換えDNA分子を用いて発現させることができる。ベクターMALTMc2またはMALTMp2から発現させた融合蛋白は、蛋白分解性血液因子Xaと反応させ、MBP部分を除去し、本発明の低分子量のP1^A決定基含有ポリペプチドを提供することができる。

本明細書で考察する本発明のいずれの単離DNA配列も、本明細書で考察する上記のまたは他の発現ベクターの1つまたは他のものに、以下に述べるように連結させ、続いて適切

10

20

30

40

50

な宿主を形質転換して目的の融合ポリペプチドの発現を得る。

典型的なベクター導入連結配列は、目的の融合ポリペプチドを発現させる組換え分子を構築させるために用いられるDNA分子のエンドヌクレアーゼ制限切断に利用されるヌクレオチド配列の発現によって形成される。したがって、例えば本明細書で考察する典型的なP1^{A1}コードDNA配列は、SalI制限酵素認識部位に近接し、λgt22のSalI部位でクローニングされる。このSalI部位は該ベクターにおいてEcoRIおよびNotI部位に近接している。したがって、発現された融合ポリペプチドは、GP111aのアミノ酸残基に加え、これら制限部位から発現されるアミノ酸残基を含んでいた。

分子生物学において習熟した者なら誰でも、いずれのポリペプチドも、ここで述べたように免疫学的に不活性である限り、さらに、発現物質の不溶化（SDSの非存在下で非拡散性）をもたらす、例えばシステインのような残基並びに例えばトリプトファンおよびフェニルアラニン等の残基を含まない限り、または他の方法でその免疫反応性を抑制しない限り、実質的にいずれのポリペプチドも連結配列として用いることができることは明白であろう。連結配列（本明細書では時にスペーシング配列ともいう）は、1残基からおよそ1200残基を含むことができるが、後者は、融合ポリペプチドまたは融合蛋白がβ-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に連結されて発現される場合である。

典型的には、融合ポリペプチドを含む本題のポリペプチドは、大腸菌のような原核宿主によって発現されるときにはグリコシル化されない。しかしながら、本発明のポリペプチドは真核細胞によって製造することができ、その場合にはそれはグリコシル化されうる。また、本題のポリペプチドは、結果として得られる分子が所望の特性を表す限り、種々の変化、例えば挿入、欠失、対立遺伝子変種において存在しうるようなアミノ酸の保存的置換を含むことができる。本明細書でいう“所望の特性”とは、ここで述べたように、未変更ポリペプチドのそれと同一または類似の免疫反応特性を修飾ポリペプチドが有することを含む。

このポリペプチドがアミノ酸残基配列に保存的置換を含む場合は、該置換アミノ酸残基は、また別の生物学的に類似のアミノ酸残基によって置き換えられ、その結果、生じたポリペプチドは未置換のアミノ酸残基配列と組成的に異なるアミノ酸残基配列を有する。保存的置換の幾つかの具体例は、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンのような親水性残基の別の親水性残基への置換を含む。また、アルギニン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン等の極性残基は、この群のまた別の種類と保存的に置換することができる。

また別の局面の保存的置換を含むポリペプチドは、置換アミノ酸残基が未置換の元のアミノ酸残基に置き換えられる場合に生じる。置換アミノ酸の例は37C. F. R. § 1. 822 (b) (4)で見出すことができるが、これらは参考文献として本明細書に含まれている。本題のポリペプチドが、1つまたは1つ以上の保存的置換を除いて天然のアポ蛋白の配列に対応するアミノ酸残基配列を有するとき、好ましくは、天然のアポ蛋白のアミノ酸残基の約40%未満、より好ましくは約20%未満が該ポリペプチドにおいて置換されている。

周知のように、蛋白またはポリペプチドにプロリン残基が存在するとき、配列に振れを生じ、これは一次構造だけでなく二次および三次構造の相違に繋がる。実際GP111aのロイシン³³/プロリン³³置換は、P1^{A1}およびP1^{A2}アロアンチゲン決定基の間の相違をもたらす。このように、別の残基のために置き換えられたプロリン残基は保存的置換ではない。

本発明のポリペプチドは、当業者に既知のペプチド合成技術のいずれによっても合成することができる。利用可能な該技術のいくつかの要旨は、スチュアートとヤングの文献（J. M. Stuard & J. D. Young, “ペプチド固相合成”（“Solid Phase Peptide Synthesis”）W. H. Freeman, Co., サンフランシスコ（1969））、マインホーファーの文献（J. Meinhofer, “ホルモン蛋白およびペプチド”（“Hormonal Proteins and Peptides” 2巻、46ページ、アカデミックプレス（ニューヨーク）1983）および米国特許第4631211号で見出すことができるが、これらは参考文献として本明細書に含まれている。通常

10

20

30

40

50

、これらの技術はメリフィールド (Merrifield, JACS, 85:2149 (1963)) が記載したような固相技術を用いる。また別に、本題ポリペプチドは、2つの小さなポリペプチドを、例えばペプチド結合またはジスルフィド結合を介して直接共役反応によって製造することができる。

しかしながら目的のポリペプチドにおける7つのシステインの存在のために、本題ポリペプチドは、好ましくは、組換えDNA技術によって合成される。そのような組換え技術は、所望のポリペプチドが本例の場合のように比較的大きい場合 (例えば長さが約50残基より大) は特に好ましい。本題ポリペプチドを製造するために組換え技術が用いられる場合、所望のポリペプチドまたは該ポリペプチドの前駆体をコードするDNAセグメントは、その後の発現のために予め選ばれたベクターに繋ぎ合わされる。

10

好ましい本題ポリペプチドは大腸菌によって発現される。したがって、大腸菌細胞によって行われる一切の翻訳後修飾を含む保存的に置換されたポリペプチドもまた意図されている。したがって、本題のポリペプチドは、ファージλgt22またはMALTMc2もしくはMALTMp2のようなベクターを含む組換え分子で形質転換された大腸菌によって発現させることができる。

C. DNAセグメント

本発明のDNAセグメント (目的のDNAセグメント) は前述の本題ポリペプチドをコードする。DNAセグメントは、下記で述べるようにポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) で作成した場合のように、高度な操作に利用可能な分断され “単離された” 化学的物質種であるべきである。ここで考察するすべてのDNAセグメントは、5' および3' の両末端を有する。

20

また別に、単離された本題のDNAセグメントは、クローニングし、または続いて適切な宿主で発現させる場合のように、ベクターに機能しうるように繋ぎ合わせることができる。周知のように、該DNAセグメントは、本題ポリペプチドまたは本題融合ポリペプチドの発現のためにベクターに読み枠にしたがって共有結合させるとき、ベクターに “機能しうるように繋ぎ合わされる”。さらに、DNAセグメントが機能しうるように発現ベクターに繋ぎ合わされるとき、該DNAセグメントの発現がプロモーター配列の制御下にあるように、該プロモーター配列が存在する。機能しうるように繋ぎ合わされた本題DNAセグメントを含むベクターは下記で極めて詳細に考察する。

好ましい単離DNAセグメントは、本題ポリペプチド (例えば配列番号: 7または配列番号: 9のアミノ酸残基配列) をコードする少なくとも195塩基対 (bp) のヌクレオチド配列を含む。P1^{A1}またはP1^{A2}決定基のアミノ酸残基配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号: 2または配列番号: 4に示したようにGP111aの約800ヌクレオチド塩基対までを含むことができる。

30

1つの具体例では、本発明の単離DNA分子は、P1^{A1}決定基を含むGP111aのアミノ酸残基配列をコードする約195から約800ヌクレオチド塩基対 (bp) を含む。好ましくは、このGP111aのアミノ酸残基配列は、配列番号: 3、配列番号: 7、配列番号: 11、配列番号: 13、配列番号: 15、配列番号: 17または配列番号: 19である。これらのアミノ酸残基配列をコードする単離されたDNA分子は、配列番号: 2、配列番号: 6、配列番号: 10、配列番号: 12、配列番号: 14、配列番号: 16および配列番号: 18にそれぞれ示されている。

40

また別の具体例では、本発明の単離DNA分子は、P1^{A2}決定基を含むGP111aのアミノ酸残基配列をコードする約195から約800ヌクレオチド塩基対を含む。好ましくは、このGP111aのアミノ酸残基配列は、配列番号: 5、配列番号: 9、配列番号: 21、配列番号: 23、配列番号: 25、配列番号: 27または配列番号: 29である。これらのアミノ酸残基配列をコードする単離DNA分子は、配列番号: 4、配列番号: 8、配列番号: 20、配列番号: 22、配列番号: 24、配列番号: 26および配列番号: 28にそれぞれ示されている。

本題の単離DNAセグメントまたは、以下で考察する組換えDNA分子としてベクターに繋ぎ合わされたそのセグメントは、P1^{A1}またはP1^{A2}決定基のアミノ酸残基以外のアミ

50

ノ酸残基をコードするコドン、すなわちベクター導入残基または配列もまた含むことができる。これらの他のコドンおよび発現ポリペプチドのコードされたアミノ酸残基は、先に述べたスペーシング（連結）配列を構成する。

したがって、目的のポリペプチドは、本題の単離DNAセグメントによってコードすることができる。発現された融合ポリペプチドの場合のように、しばしば目的のポリペプチドの一部分はベクターによって与えられる。とはいえ、ベクターおよび制限部位の適切な選択によって、本発明の単離DNAセグメントは、スペーシングアミノ酸残基配列のない所望のポリペプチドをコードすることもできる。

本発明の単離DNAセグメントの全長は、少なくとも前述のP1^{A1}またはP1^{A2}決定基をコードする配列が存在する限り、殆どの場合選択の問題である。例えば、千から数千の塩基対が発現終止コドンの下流に存在しうる。同じように、P1^{A1}またはP1^{A2}決定基発現開始コドンの上流に千から数千またはそれ以上の塩基対が存在しうる。ただし、本題DNAセグメントがP1^{A1}またはP1^{A2}決定基を、 β -gal遺伝子および β -gal遺伝子の制御配列部分同様そこに含まれている、該発現読み枠が維持されていなければならない。

10

上記に述べたDNAセグメントに匹敵する（相補的な）RNAセグメントもまた目的とされる。この具体例では、RNAセグメントはRNAベクター（例えばウイルスRNA）に周知のように繋ぎ合わせることができる。

本題のDNAセグメントは、化学的技術、例えば周知のホスホトリエステル法〔Matteucciら、JACS, 103:3185 (1981)〕で容易に合成することができる。DNAセグメントを化学的に合成することによって、鋳型のポリペプチドのアミノ酸残基または配列のどのような所望の置換、挿入または欠失も、該当する変更を該DNAセグメントのヌクレオチド配列に施すことによって容易に提供することができる。

20

化学合成技術に加え、酵素的技術によっても本発明のDNAセグメントを製造することができる。したがって、予め限定された認識配列でDNA分子を切断する制限酵素を、本題ポリペプチドをコードするより大きなDNA分子からDNAフラグメントを単離するために用いることができる。典型的には、この方法で産生されるDNAフラグメントは粘着“張り出し”末端を有し、それによって、一本鎖のヌクレオチド配列は該分子の二本鎖領域を越えて伸長する。そのような粘着末端の存在は平滑端DNA分子よりしばしば好ましいが、平滑端DNAも、1つの平滑端および1つの張り出し末端を有するフラグメントの場合のように用いることができる。典型的に平滑端を提供する、比較的特異性の少ない酵素（例えばDNA分解酵素I（DNアーゼI）も用いることができ、ここでも実際に用いた。続いて、単離DNAフラグメントを適切なベクターに機能しうるように繋ぎ（クローニングし）、それによって、目的DNAセグメントをベクターに取り入れることができる。目的ポリペプチドをコードするRNAセグメントを用いる場合はいつでも、該RNAセグメントを含むRNA分子は、逆転写酵素を用いて相補的DNA（cDNA）に転写される。続いて該cDNA分子を発現ベクターに繋ぎ、これで適切な宿主を形質転換し、所望の本題ポリペプチドを得ることができる。

30

上記のアミノ酸残基配列をコードするDNAセグメントに開始コドンおよび終止コドンを提供することができ、また開始および終止コドンの1つまたは両方をより大きなDNA分子（例えば該DNAセグメントに機能しうるように繋いだベクター）によって与えることができる。本発明の所望のポリペプチドは、開始および終止コドンを慎重に配置することによって生成することができる。例えば、ヌクレオチド配列は該セグメントの3'および5'末端の1つまたは両方に付与することができ、その結果、N-末端またはC-末端のアミノ酸残基配列を含むことによって、前述のエピトープアミノ酸残基配列より大きいポリペプチドが発現される。さらに、レギュレーター、プロモーターおよびオペレーター座位は、所望の場合、目的DNAセグメントの5'末端に与えられる。

40

標準的な化学的または酵素的合成技術に加え、このDNAセグメントはポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）を用いて生成することができる。PCRでは、鋳型の核酸の特定部分に相補的なプライマー分子を用い、該標的に相補的な核酸領域を含むプライ

50

マーの伸長生成物を形成する反応によって、特異的なポリ核酸標的が転写される。鋳型と伸長プライマーを単離した後、各プライマーの伸長生成物は鋳型として機能し、特異的に相補的プライマー分子とアニーリングする。生じた伸長が開始された鋳型はさらに進行する伸長反応のための基質として機能する。これらの工程は繰り返され（好ましくは自動反復工程を用いて）、それによってプライマーがハイブリダイズする最初のポリ核酸標的は指数関数的に増幅される。PCRを行う方法は既に詳しく記載されている（例えば米国特許第4683195号および4683202号参照、これらの記述は参考文献として本明細書に含まれている）。

標的DNAセグメントは、しばしば極めて少量しか存在しないので、PCRは標的DNAセグメントの十分な増幅をもたらす、標的セグメントの効率的なクローニングおよび発現を可能にする。

10

PCRは、各増幅段階で重合反応を開始するために正方向および逆方向の一本鎖オリゴヌクレオチドプライマー分子を用いるので、少なくとも標的DNAの一部に相補的な正方向および逆方向のプライマー分子が必要とされる。さらに必要とされるものは、標的DNAセグメントに相補的なプライマー分子の領域に近接する、予め選択した制限酵素の認識部位をもつヌクレオチド配列を有するプライマー分子である。

該プライマーは、重合のための薬剤の存在下で伸長生成物の合成を開始させるために十分長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度およびプライマーの由来を含む多くの因子に左右される。例えば、鋳型配列の複雑さにもよるが、ポリヌクレオチドプライマーは、典型的には15から25、またはそれより多いヌクレオチドを含むが、それより少ないヌクレオチドを含むことができる。ポリヌクレオチドプライマーでは8ヌクレオチドでも有効に使用できることが報告された〔Studierら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6917-21 (1989)〕。短いプライマー分子では、十分に安定なハイブリダイゼーション複合体を形成し、プライマー伸長を開始させるためにより低い温度が一般に必要である。

20

用いられるプライマーは、増幅させる各配列の鎖に対して実質的に相補的であるように選択される。したがって、プライマーは、その対応する鋳型配列と非恣意的にハイブリダイズするために十分に相補的なヌクレオチドを含む。それゆえ、プライマー配列のハイブリダイズする領域は鋳型と正確に相補的でないかもしれない。

例えば、非相補的ポリヌクレオチドは、実質的にそのポリヌクレオチドと相補的なプライマー配列の残りの部分とともに、プライマーの5'末端に結合することができる。そのような非相補的なポリヌクレオチドは蛋白結合部位をコードするか、または該コドンの読み枠の調製を可能にする。また、プライマー配列が鋳型の鎖の配列と十分な相補性を有することを条件として、非相補的塩基をプライマー内に点在させ、ハイブリダイズする条件下で非恣意的ハイブリダイゼーション（イノシン塩基が非特異的なコード化用いられる場合のように）が生じることを可能にすることができる。プライマーの3'末端に正確に適合する3ヌクレオチドの小さなプライマーは、プライマー伸長生成物を特異的に開始させることができる〔Sommerら、Nuc. Acid Res., 17:6749 (1989)〕。

30

好ましくは、効率を最大にするため一本鎖で提供されるが、二本鎖であってもよい。二本鎖のプライマーを用いる場合は、伸長生成物の調製に用いる前に、該プライマーをまず融解して鎖を単離する。好ましくは、プライマーはポリデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは種々の方法によって調製できるが、これらの方法は、デノーブ化学合成および天然の核酸配列（例えば遺伝子、対立形質遺伝子、イントロン、およびゲノム、プラスミドまたはベクターのコドン）からの核酸フラグメントの誘導を含む。フラグメントは、より大きな二本鎖核酸の制限エンドヌクレアーゼによる制限消化およびポリメラーゼと核酸鋳型を用いる重合合成のような方法によって得ることができる。ポリヌクレオチドのデノーブ化学合成は、一般に、本題ポリペプチドをコードする天然のDNA配列が既知のときに好ましく、適切ないずれの方法（例えば周知のホスホトリエステル法またはホスホジエステル法）によっても行うことができる（例えば以下を参照のこと：Narangら、Meth. Enzymol., 68:90 (1979)；Itakuraら、Ann. Rev. Biochem., 53:323-56 (1989)；Brown

40

50

ら、Meth. Enzymol., 68:109 (1979) ; および米国特許第4356270号、これらの記述は本明細書に参考文献として含まれている)。

核酸からのプライマー分子の誘導は、典型的には核酸をクローニングベクターとともに適切な宿主に導入し(ベクターの増殖はクローニングされる核酸の量を増加させる)、続いてクローニングされた核酸のフラグメントまたはサブフラグメントを単離することを含む。核酸フラグメントのサブクローニング技術についての記述は以下の文献に見出される: マニアーティス (Maniatis) ら、分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバー研究所刊、390-401ページ、(1982) ; 米国特許第4416988号および4403036号(これらの記述は本明細書に参考文献として含まれている)。

10

本方法でハイブリダイズされる鋳型核酸配列はいずれの核酸含有サンプルにおいても用いることができるが、ただしサンプルは、純度および濃度に関して核酸ハイブリダイゼーション反応に適合する形態である必要がある。ハイブリダイゼーションに適した程度に核酸を単離することは一般に既知で、種々の手段で達成できる(例えば次の文献を参照[マニアーティス (Maniatis) ら、分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバー研究所刊、390-401ページ、(1982) ; オースベル (Ausubel) ら、分子生物学の今日のプロトコル (Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons刊、(1987)])。

ハイブリダイゼーション反応は、プライマーがその相補的核酸鋳型にハイブリダイズすることができる、予め限定した条件下で実施される。ここで用いられている“ハイブリダイゼーション条件”とは、プライマーが鋳型配列とアニールし核酸二重合体を形成することができる、インキュベーションの時間、温度およびpHの指標の一組を指す。そのようなハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイズするプライマーの長さ、プライマーと鋳型との間の相補性の度合い、該ポリヌクレオチドのグアノシンおよびシチジン含量、所望するハイブリダイゼーションの厳密性およびハイブリダイゼーションの動態に影響を与えうる塩および付加的試薬の存在のような因子に左右される。与えられたハイブリダイゼーション反応混合物についてのハイブリダイゼーション条件の最適化のための方法は当業界で既知であるが、典型的には、ハイブリダイゼーション条件は、pHを4から9の間に緩衝させた溶液、温度は18℃から75℃、好ましくはおよそ37℃からおよそ65℃、より好ましくはおよそ54℃、時間は0.5秒から24時間、好ましくはおよそ2分を含む。

20

30

ハイブリダイゼーションは、周知のように均質または非均質形式で実施される。均質ハイブリダイゼーション反応は完全に溶液中で行われ、その場合、ハイブリダイズされるべきプライマーおよび鋳型配列の両方が溶液中で溶解形で存在する。非均質反応は、反応媒体中で不溶性であるマトリックスの使用が必要で、該マトリックスにプライマーまたは鋳型のいずれかが結合されている。さらにまた、cDNA形成、ジデオキシ配列形成、およびプライマーハイブリダイゼーションが最初の工程であるプライマー伸長反応を用いる他の工程のために、単離mRNAまたはウイルスRNAの逆転写が実施される均質ハイブリダイゼーション反応が意図される。

核酸含有鋳型配列が二本鎖(ds)形である場合、好ましくは、例えばハイブリダイゼーション反応の前に熱またはアルカリ処理でそれを変性させる。dsDNAの変性は、ハイブリダイズされるべきプライマーと混合する前に実施するか、またはプライマーとdsDNAを混合した後に実施することができる。プライマー自体が二本鎖分子として提供される場合、混合前にそれを変性させるか、または鋳型を含むdsDNAと一緒に変性させることができる。

40

プライマー伸長反応は適切ないずれの方法を用いても実施できる。好ましくは、プライマーの過剰分子(ゲノム核酸について、通常 $10^6:1$ (プライマー:鋳型))を鋳型鎖を含む緩衝液に混合する。高いモル過剰がこの方法の効率を高めるために好ましい。長さが約20から25ヌクレオチドのポリヌクレオチドプライマーについては、典型的な割合は、哺乳類ゲノムDNA 100 ngから500 ngにつきまたはプラスミド10から50 n

50

gにつき、50 ngから1 µgの範囲、好ましくは250 ngである。

デオキシリボヌクレオチドリホスフェート (dNTP) (dATP、dCTP、dGTP および dTTP) もまたプライマー伸長反応混合物に、プライマー伸長生成物の合成を支援するために適切な量で混合される。当業者は用いる量を容易に決定できる。

典型的なプライマー伸長反応では、ハイブリダイゼーション混合物は、約90–100℃、約1から10分、好ましくは約1から4分加熱される。この加熱時間後、溶液を室温まで冷却し、プライマー／鋳型のハイブリダイゼーションを可能にする。該冷却混合物に、プライマー伸長反応を誘導または触媒する適切な試薬を加える。合成反応は、室温から該誘導試薬がもはや効率よく機能できない温度以上で行うことができる。したがって、例えば誘導試薬としてDNAポリメラーゼが用いられる場合、ポリメラーゼが耐熱性でない限り、適切な温度は一般に約40℃を越えない。

誘導試薬は、プライマー伸長生成物の合成を達成するいずれの化合物または系でもよい。この目的のための適切な試薬は、例えば大腸菌DNAポリメラーゼI、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノフフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、組換え修飾T7 DNAポリメラーゼ、および他のDNAポリメラーゼ、逆転写酵素、並びにプライマー伸長反応を促進する他の酵素を含む。

耐熱性（熱好性）DNAポリメラーゼは、自動化温度サイクルのPCR形式でそれらは熱に安定であるという点で特に好ましい。代表的な耐熱性ポリメラーゼはバチルス・ステアロテルモヒルス (*Bacillus stearothermophilus*) (バイオラッド、リッチモンド、カリフォルニア)、テルムス・テルモヒルス (*Thermus thermophilus*) (FINZYNE, ATCC#27634)、テルムス・スペシズ (*Thermus species*) (ATCC #31674)、テルムス・アクアチクス (*Thermus aquatics*) TV株1151B (ATCC#25105)、スルフォロブス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) (Bukhrashuiliら、*Biochem. Biophys. Acta*, 1008:102 (1989) ; Elieら、*Biochem. Biophys. Acta*, 951:261 (1988))、テルムス・フィリホルミス (*Thermus filiformis*) (ATCC #43280) から単離されたDNAポリメラーゼ、テルムス・フラブス (*Thermus flavus*) (Molecular Biology Resources ; ミルウォーキー、ワイオミング) から単離されたポリメラーゼ、および“ベント” (“Vent”) ポリメラーゼ (ニューイングランドバイオラブ、ピバリー、マサチューセッツ) である。特に好ましいものはTaq DNAポリメラーゼで、パーキンエルマーシートス (ノーウォーク、コネチカット)、プロメガ (マジソン、ワイオミング) およびストラタジーン (ラホイヤ、カリフォルニア) を含む種々のものから入手可能である。さらに、組換えTaq DNAポリメラーゼであるAmpli TaqTM DNAポリメラーゼ (パーキンエルマーシートスから入手可能) も特に好ましい。

PCRは、典型的には以下の工程を反応混合物について反復することによって実施される：(1) 加熱して変性一本鎖鋳型およびプライマーを形成し、(2) 冷却して鋳型にプライマーをハイブリダイズさせ、(3) 予め限定した条件を維持してプライマー伸長生成物を形成させる。特定の核酸配列をPCRによって増幅させる方法およびシステムは米国特許第4683195号および4683202号（これらは参考文献として本明細書に含まれる）、並びにPCR技法 (PCR Technology), エルリッヒ (Erich) 編、ストックトンプレス (1989) ; ファルーナ (Faloona) ら、*Methods in Enzymol.* 155:335 (1987) ; ポリメラーゼ・チェーン・リアクション、エルリッヒら編、コールドスプリングハーバー研究室出版 (1989) に記載されている。

増幅核酸生成物の検出には、周知の種々の技術のいずれも用いることができる。好ましい具体例では、増幅生成物は、分子量を基にゲル電気泳動によって単離され、該単離生成物は核酸に特異的な染色で可視化される。種々の核酸特異的染色が存在し、電気泳動で単離された核酸を可視化するに適しているが、臭化エチジウムが好ましい。

増幅核酸生成物を検出するまた別の方法は、ハイブリダイゼーションによる検出手段を含むが、これは該増幅生成物にハイブリダイズすることができる標識オリゴヌクレオチドプローブを用いる。そのような検出手段の典型は、サザンブロット分析、インビトロ標識ポリリボヌクレオチドプローブを用いるリボヌクレアーゼ保護分析、および特定のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を有する核酸を検出する方法に類似するものを含む（例えばオーズベルらの文献を参照のこと；Ausubelら、今日の分子生物学のプロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）、John Wiley & Sons、1987）。

特定の核酸配列の存在を検出するまた別の方法では、プライマー伸長反応で用いられたデオキシヌクレオチドトリホスフェート（dNTP）が、プライマー伸長生成物を検出させる標識または指示団を含む。典型的には、そのような標識は、放射性原子、化学修飾ヌクレオチド塩基などである。適切な放射性標識は ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P および ^{35}S などである。

放射性標識dNTPに代わるものは、化学的に修飾され、金属錯塩化剤、ビオチン含有基、蛍光化合物などを含むdNTPである。有用な金属錯塩化剤は、蛍光ランタニド金属およびβ-ジケトネートリガンドによって形成されるランタニドキレート化合物である。ランタニドは核酸に結合し、それによって蛍光ランタニド／核酸複合体が形成される（米国特許第4374120号、同4569790号、並びに国際特許出願公告公報EP139675号およびW087/02708号（これらの記述は本明細書に参考文献として含まれている）を参照）。

ビオチンまたはアクリジンエステル標識オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドとしてのそれらの使用は既に記載されている（米国特許第4707404号、国際特許出願公告公報ep212951号および欧州特許出願公告公報87636号参照）。オリゴヌクレオチドの有用な蛍光マーカーには、フルオレセイン、ローダミン、テキサス赤、NBDなどが含まれる。

ハイブリダイズしたプローブからハイブリッド非形成標識プローブを単離する技術は周知であり、典型的には、その化学的特性に基づく一本鎖核酸の二本鎖核酸からの単離を含む。しばしば、非均質的単離形式が用いられ、その場合ハイブリッド非形成プローブは、不溶性マトリックスに結合した標識DNA二重合体から洗浄によって単離される。この技術の典型はサザンブロットで、この場合、マトリックスはニトロセルロース膜で標識は ^{32}P である〔サザン（Southern）, J. Mol. Biol. 98:503（1975）〕。

D. 組換えDNA分子

上記DNAセグメント（外来DNAセグメント）に機能しうるように連結されたベクターを含む組換えDNA分子もまた目的とされる。該組換えDNA分子（DNA構築物）は、本発明のポリペプチドをコードする本題DNAセグメントの増幅および／または発現を促進することができる。

目的の組換えDNA分子は、天然の P1^{A1} または P1^{A2} 決定基のアミノ酸残基配列をコードする前述の単離DNAセグメントを含んでいる。好ましくは、該DNAセグメントは、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および28から成る群から選ばれる。

特に好ましい組換えDNA分子（これは適切な宿主細胞内で形質転換により増殖することができる）は、 P1^{A1} 決定基のアミノ酸残基配列をコードする配列番号：10の本題DNAセグメントを含み、さらに、 GP111a のリーダーアミノ酸残基配列をコードするヌクレオチド塩基配列を含む。配列番号：20に示すまた別の好ましいDNAセグメントは P1^{A2} 決定基をコードする。好ましくは、該DNA構築物は、本題ポリペプチドをコードする約195から約800塩基対のヌクレオチド配列を含む。

典型的には、本発明の組換えDNA分子は、上記の P1^{A1} または P1^{A2} 決定基と融合させた免疫学的に“不活性な”連結ペプチド配列をコードするDNA配列を含む。この点に関して典型的な配列は、β-ガラクトシダーゼまたはMBP分子部分をコードする。そのような組換えDNA分子は、読み枠にしたがって目的DNAセグメントを、β-ガラクトシダーゼまたはMBP蛋白もしくはペプチドをコードする遺伝子を含むベクターに挿入することによって得ることができる。

目的の組換えDNA分子（ベクター）は環状化しても直線状にしてもよい。

本発明のまた別の局面は、融合ポリペプチドをコードする前述のDNAセグメントに、機能しうるように連結された発現ベクターを含む組換えDNA分子に関する。該ベクター分子は、前述の免疫学的に不活性な蛋白のアミノ酸残基配列に機能しうるように連結された、前述の天然形 P1^{A1} または P1^{A2} のアミノ酸残基配列を含む融合ポリペプチドの増幅および発現を可能にする。

10

20

30

40

50

したがって、本題融合ポリペプチドをコードする典型的なベクターは以下を含む：

(a) 免疫学的に不活性な蛋白（例えばβ-ガラクトシダーゼまたはMBP）の全体または部分のアミノ酸残基配列を含むアミノ酸残基配列をコードするおよそ3600ヌクレオチドを含む第一のヌクレオチド配列（これは、この第一のヌクレオチド配列に機能しうるように連結された第二のヌクレオチドを伴う）、および；

(b) 天然のP1^{A1}またはP1^{A2}決定基のアミノ酸残基配列を含むGP111aのアミノ酸残基配列をコードする約195から約800ヌクレオチドを含む第二のヌクレオチド配列。

好ましくは、第二のヌクレオチド配列は約275ヌクレオチドを含む。天然のP1^{A1}決定基のアミノ酸残基配列を含む、GP111aのアミノ酸残基配列をコードするヌクレオチド配列は配列番号：10に示される。天然のP1^{A2}決定基のアミノ酸残基配列を含む、GP111aのアミノ酸残基配列をコードするヌクレオチド配列は配列番号：20に示される。

目的の組換えDNA分子を形成するために、本発明のDNAセグメントが機能しうるように連結されるベクターの選択は、所望される機能的特性、例えば転写効率、選択される形質転換宿主細胞内での発現効率、制限部位の位置（例えばPCR生成物がベクターで直接クローニングされる場合）などに左右される。しかしながら、本発明のベクターは、少なくとも、本題のポリペプチドをコードするDNAセグメントの複製を指令することができる。

好ましくは、選ばれるベクターは原核細胞レプリコン、すなわち自律的複製および形質転換原核宿主細胞内での染色体外組換えDNA分子の維持を指令する能力を有するDNA配列を含む。そのようなレプリコンは当該技術分野で周知である。さらに、原核細胞レプリコンを含むベクターはまた、好ましくは、薬剤耐性遺伝子を含み、それによって、ベクターで形質転換された宿主は容易にスクリーニングすることができる。典型的な細菌の薬剤耐性遺伝子は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与するものである。糖代謝に基づくスクリーニング手段としてのβ-ガラクトシダーゼの使用もまた、本発明で意図されるものである。

原核細胞レプリコンを含むベクターは、好ましくは、本題ポリペプチドの遺伝子の転写を指令することができる原核細胞プロモーターを含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼの結合および、一本鎖DNAのメッセンジャーRNA (mRNA) 分子への転写を促進するDNA配列によって形成される発現制御要素（エレメント）である。細菌宿主に適合したプロモーター配列（例えばtacプロモーター）は、典型的には、本発明のDNAセグメントの挿入に好都合な制限部位を有するプラスミドベクターで提供される。そのようなベクタープラスミドの典型は、pUC8、pUC9、pBR322およびpBR329（バイオラッドラボラトリーズ（リッチモンド、カリフォルニア）より入手可能）；pPL、pUR、pKK223（ファルマシア（ピスカタウェー、ニュージャージー）より入手可能）；MALTMc2およびMALTMp2（ニューイングランドバイオラブ（ビバリー、マサチューセッツ）より入手可能）；およびλgt22（Promega Corp. ,（マジソン、ウィスコンシン）より入手可能）である。λgt22ベクターが好ましい。

真核細胞に適合する発現ベクター（好ましくは脊椎動物細胞に適合するもの）もまた、前述の組換えDNA分子を形成するために用いることができる。真核細胞発現ベクターは当該技術分野で周知であり、幾つかの発売元から入手できる。典型的には、そのようなベクターは、所望のDNAセグメントの挿入のために好都合な制限部位を有する。そのようなベクターの典型例は、pSVLおよびpKSV-10（ファルマシア）、pBPV-1pML2d（インターナショナルバイオテクノロジー社）、およびpTDT1（ATCC, #31255）である。真核細胞に適合するベクターで使用する好ましい薬剤耐性マーカーは、ネオマイシンホスホランスフェラーゼ（neo）遺伝子である〔サザンら、J. Mol. Appl. Genet., 1:327-341 (1982)〕。

本発明の組換えDNAを発現するレトロウイルスベクターもまた本発明が意図するものである。所望のDNA分子を発現させるレトロウイルスベクターの構築および使用は既に記

10

20

30

40

50

載されている（ソーグら（Sorgeら、Mol. Cell. Biol. , 4:1730-37（1984））の文献を参照）。

本DNAセグメントを相補的な粘着末端を介してベクターに機能しうるように連結するために、多くの方法が利用可能である。例えば、相補的なホモポリマー鎖を挿入されるべきDNAセグメントおよびベクターDNAに付加することができる。続いて、ベクターおよびDNAセグメントを相補的なホモポリマー付加部の間で水素結合によってハイブリダイズさせ、組換え二重合体DNA分子を形成する。また別に、1つまたは1つ以上の制限部位を含む合成リンカーを用い、本DNAセグメントをベクターに会合させることができる。

DNAセグメントをエンドヌクレアーゼ制限消化で調製するときは、突出3'一本鎖末端を除去し、さらに後退した3'末端を充填するDNAポリメラーゼで処理して、それによって平滑端を有するDNAセグメントを生成することができる。平滑端DNAセグメントを、例えばバクテリオファージT4 DNAリガーゼ（これは平滑端DNA分子の連結を触媒することができる）のような酵素の存在下で、極めて過剰モルのリンカー分子とともにインキュベートする。したがって、この反応生成物は、その中に制限部位を有するリンカー配列に末端で共有結合したDNAセグメントである。続いて、これらのDNAセグメントの制限部位は適切な制限酵素で切断され、この切断されたDNAセグメントの末端と適合する末端を有する発現ベクターに該セグメントは連結される。種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、インターナショナルバイオテクノロジー社（ニューヘブロン、コネチカット）を含む多数の発売元から市販されている。

E. 形質転換および精製

また、本発明で意図するものは、前述のDNAセグメントを含む前述の組換えDNA分子で安定的に形質転換された細胞である。宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもいずれでもよい。好ましい原核宿主細胞は大腸菌、例えば大腸菌Y1090 (r⁻) 株、Y1089 (r⁻) 株またはLE392株（プロメガより入手可能）である。好ましい真核宿主細胞は、麦酒酵母菌（S. cerevisiae）のような酵母菌および哺乳類細胞、好ましくは脊椎動物細胞（例えばマウス、ラット、ヤギまたは霊長類細胞株からの細胞）、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を含む。

本発明の組換えDNA分子による適切な宿主細胞（例えば大腸菌Y1090株）の形質転換は、用いられるベクターの種類に例によって依存する周知の方法によって達成される。原核細胞の形質転換に関しては、マニアーティスらの文献（Maniatisら、分子クローニング、実験室マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual）、コールドスプリングハーバー研究室、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク（1982））を参照し、脊椎動物細胞のレトロウイルスRNAベクターによる形質転換に関しては、ソーグらの文献（Sorgeら、Mol. Cell. Biol. , 4:1730-37（1984））を参照のこと。

首尾よく形質転換された細胞（すなわち本発明の組換えDNA分子で安定的に形質転換された細胞）は、周知の技術で同定することができる。例えば、安定的に形質転換された細胞はクローニングされ、単クローン性のコロニーを生じる。これらのコロニーからの細胞を採集して溶解し、そのDNA内容物を所望のDNAセグメントの存在について、サザン（Southern, J. Mol. Biol. , 98:503（1975））によって記載されたような方法を用いて調べる。

所望のDNAセグメントの存在の直接分析に加え、形質転換の成功は、形質転換細胞が前述のポリペプチドを発現しているときは、周知の免疫学的方法で確認することができる。この方法では、形質転換されていると思われる細胞サンプルを、該ポリペプチドを発現するために十分な時間、適切な栄養培地中で培養を続ける。これらの細胞を採集し、目的のポリペプチドと免疫的に反応する（特異的に結合する）抗体を用い所望の抗原性について調べる。

本発明でまた意図されるものは、安定的に形質転換された宿主細胞培養である。形質転換宿主細胞の培養に有用な栄養培地は当該技術分野で周知であり、幾つかの販売元から得ることができる。哺乳類宿主細胞を用いるときは、“血清非含有”培地を使用するのが好ま

10

20

30

40

50

しい。

一旦安定的に形質転換された宿主細胞が識別されると、これらの細胞は、該ポリペプチドを発現させるために十分な時間、適切な培養条件下でこれらの細胞を維持（培養）することによって、目的のポリペプチドを発現（調製）するための方法に使用することができる。発現されたポリペプチドは、好ましくは培養細胞から単離（回収）される。

培養から発現蛋白を回収する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、ゲルろ過、ゲルクロマトグラフィー、限外ろ過、電気泳動、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィーおよび関連技術が、培養から発現蛋白を単離するために用いることができる。さらに、免疫化学的方法（例えば免疫親和性、免疫吸着など）を、本明細書で述べる方法によって例証するように周知の方法を用いて実施することができる。

10

F. 抗体および接種物

本発明の単離ポリペプチドは、天然のGPIIIaPI^{A1}またはPI^{A2}決定基と免疫的に反応する抗体の調製のための免疫原として用いることができる。本発明の単離ポリペプチドは、天然のGPIIIaPI^{A1}およびPI^{A2}と実質的に同じ一次、二次および三次構造を有するので、産生された抗体は、該単離抗体および天然のPI^{A1}またはPI^{A2}抗原決定基の1つの両方と反応する（ただし決定基のもう一方とは反応しない）。

本発明の抗体は、典型的には本発明のポリペプチドを含む接種物で宿主哺乳動物を免疫し、抗体が生じるために十分な期間該宿主を維持し、それによって天然のGPIIIaPI^{A1}またはPI^{A2}決定基について免疫特異性を有する哺乳類の抗体分子を誘発することによって製造される。続いて、抗体分子を該哺乳類から採集し、周知の技術、例えばDEAE

20

セファデックスを用いてIgG分画を得ることによって所望の程度まで単離する。“接種物”という言葉は、天然のGPIIIaPI^{A1}またはPI^{A2}決定基と免疫的に反応する抗体の調製のために用いる活性成分として、免疫原となりうる量の本発明の単独ポリペプチドまたは融合ポリペプチドとして含有する組成物水溶液を指すために本明細書では用いられている。接種物はしばしば抗体誘発促進のためにアジュバントを含む。

天然のGPIIIaPI^{A1}決定基に対して免疫特異性を有する抗体分子を製造するために接種物に使用される、適切な本発明の単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドは以下に記載するようなものであり、それらは配列番号：3、7、11、13、15、17および19のアミノ酸配列を含む。特に好ましい単離ポリペプチドは、配列番号：7および配列番号：11のアミノ酸残基配列を含む。

30

天然のGPIIIaPI^{A2}決定基に対して免疫特異性を有する抗体分子を製造するために接種物に使用される、適切な本発明の単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドは以下に記載するようなものであり、それらは配列番号：5、9、21、23、25、27および29のアミノ酸配列を含む。特に好ましい単離ポリペプチドは、配列番号：9および配列番号：21のアミノ酸残基配列を含む。

上記の抗体組成物はオリゴクローン性である。

天然のGPIIIaPI^{A1}またはPI^{A2}決定基の一方のみと免疫的に反応するが、他のGPIIIaまたは他の決定基、例えば融合ポリペプチドの他の部分の決定基とは免疫的に反応しない抗体分子を製造するために、免疫吸着法を用い、望ましくない免疫特異性を除去する。

40

免疫特異性を除去するための免疫吸着法は一般に周知で、典型的にはまず第一に所望の抗体分子を含む組成物を、天然のGPIIIaPI^{A1}またはPI^{A2}決定基含有ポリペプチドの一方または他方を結合させた固相と接触させ、免疫吸着混合物を形成させることを含む。該ポリペプチドは、好ましくはGPIIIaの1から65のアミノ酸残基のただ1つを含み、その結果他のGPIIIaエピトープとの交叉反応を最小にする。

該免疫吸着混合物を免疫反応条件下で、免疫複合体が固相で形成される（すなわち固相結合免疫複合体が形成される）ために十分な時間維持する。その後、液相と固相を単離し、固相に免疫吸着された所望の抗体分子を有する固相を保有する。続いて、該免疫複合体の結合抗体を標準的な技術で該複合体から単離する。

固相に結合させた他方のPI^A抗原を用いて上記の単離を繰り返せば、一方の決定基と反

50

応するが他方とは反応しない抗体が液相で提供される。

好ましい抗体分子はオリゴクローン抗体、すなわち抗原上の限定された数のエピトープと免疫的に反応する抗体である。好ましいオリゴクローン抗体組成物は、天然のG P I I I a分子のアミノ末端の65アミノ酸のエピトープ、すなわちP I ^{A1}またはP I ^{A2}決定基の一方または他方と免疫的に反応する。そのようなオリゴクローン抗体は、上記の免疫吸着技術を用いて、または前述のP I ^A決定基含有ポリペプチドまたは融合ポリペプチドの1つで免疫することによって調製できる。

天然のP I ^A決定基に対する単クローン抗体(M a b)もまた本発明で意図されるものである。“単クローン抗体組成物”という言葉は、特定の抗原と免疫的に反応することができるただ1種の抗体結合部位を有する抗体分子の集団をいう。したがって本M a b組成物は、典型的には、それが免疫的に反応するいずれの抗原についてもただ1つの結合親和性を有する。本発明のM a bは、典型的には、ただ1種の抗体分子を分泌(生成)する単一細胞クローン(ハイブリドーマと呼ばれる)によって産生された抗体を含む。ハイブリドーマ細胞は、抗体産生細胞とミエローマまたは他の自律永続細胞株とを融合させることによって形成される。そのような抗体は、最初コーラーとミルシュタインによって記載された(Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)、その記述は本明細書に参考文献として含まれる)。単クローン抗体調製についてのより最近の記載は米国特許第4 8 1 8 6 7 8号に見出されるが、その記述はまた本明細書に参考文献として含まれる。

そのように調製したハイブリドーマまたは他の細胞(下記)上清を、天然のG P I I I a P I ^{A1}およびG P I I I a P I ^{A2}決定基の両方、例えば抗体産生宿主細胞を誘発するために接種物において使用した単離ポリペプチドとの免疫反応性についてスクリーニングすることができる。一方の決定基とは免疫的に反応するが他方とは反応しない抗体を分泌する1つまたは1つ以上のハイブリドーマまたは他の細胞株を、例えばクローニングによって永続させる。

単クローン抗体はまた、キメラ抗体を製造する技術分野で習熟した者にとって周知の方法によって製造できる。これらの方法は、免疫グロブリンの可変領域(免疫グロブリン軽鎖の可変領域を構成する可変領域の一部分および免疫グロブリン重鎖の可変領域を構成する可変領域の一部分の両方を含む)の全体または一部分をコードする核酸の単離、高等操作および発現を含む。可変領域コード核酸の単離、操作並びに原核細胞および真核細胞でのその発現は以下の文献に記載されている:ロビンソン(Robinson)ら、国際特許公開公報W089/0099号;ウィンター(Winter)ら、欧州特許出願公告公報第239400号;リーディング(Reading)米国特許第4714681号;キャビリー(Cabilly)ら、欧州特許出願公告公報第125023号;ソーグ(Sorge)ら、*Mol. Cell Biol.*, 4:1730-1737 (1984);ベア(Beher)ら、*Science*, 240:1041-1043 (1988);スケラ(Skerra)ら、*Science*, 240:1030-1041 (1988)およびオーランディー(Orlandi)ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837 (1989)。典型的には、該核酸は、予め選択された抗原(リガンド)に結合する免疫グロブリンの可変領域の全体または一部分をコードする。そのような核酸の起源は当業者にとって周知であるが、例えば、予め選択された抗原と結合する単クローン抗体を産生するハイブリドーマから得ることができ、また予め選択した抗原を複数の免疫グロブリン可変領域をコードする発現ライブラリーをスクリーニングするために、したがって核酸を単離するために用いることもできる。

本発明でまた意図されるものは、本発明の単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞およびハイブリドーマ細胞を含む培養である。

そのように産生される抗体は、とりわけ、体サンプル中の血小板の型分けまたは血液サンプルのスクリーニングのために本発明の方法およびシステムで用いることができる。

活性成分としてペプチドを含む接種物の調製は当該技術分野でよく理解されている。典型的には、そのような接種物は、注射できるように(溶液または懸濁液のいずれかのような)調製される。注射の前に液体に溶解または懸濁させるために適した固体形もまた調製できる。該調製物はまた乳化物であってもよい。

周知のように、免疫原活性成分は、医薬的に許容され、さらに該活性成分と適合する水性

10

20

30

40

50

賦形剤に溶解、懸濁または混合される。“医薬的に許容される”または“生理学的に耐える”という語は、宿主の哺乳類に投与したとき、典型的にはアレルギーまたは同様な不利な反応を生じない分子物質および組成物を指す。適切な賦形剤は、目的とする使用に左右されるが広範囲の形態をとることができ、例えば食塩を含む水溶液、磷酸緩衝食塩水（PBS）、デキストロース、グリセロール、エタノールおよびその組み合わせである。さらに所望の場合は、該接種物は少量の補助物質、例えば湿潤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、鉱物油、担体または接種物の有効性を強化するアジュバントを含むことができる。好ましい具体例は、活性成分として少なくともおよそ0.01%からおよそ99%の本発明の単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドを、典型的には賦形剤1ミリリットル（ml）につき10から200μgの活性成分の濃度で含む。

10

接種物はまた、免疫される哺乳動物の免疫反応の発生を促進させる抗原性担体に連結させた本発明の単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドを含むことができる。有用な担体は当該技術分野で周知で、一般には蛋白自体である。そのような担体の典型例は、キーホールリンベットのヘモシアニン、エデスチン、チログロブリン、アルブミン（例えばウシ血清アルブミン（BSA）またはヒト血清アルブミン（HSA））、赤血球細胞（例えばヒツジ赤血球（SRBC））、破傷風トキソイド、コレラトキソイドの他、ポリアミノ酸（例えばポリ（D-リジン：D-グルタミン酸））などである。

1つまたは1つ以上のアミノ酸残基を、それがポリペプチド上に予め存在しない場合は、該ポリペプチドのアミノまたはカルボキシ末端に付加して、担体へのポリペプチドの結合を助長させることができる。該ペプチドのアミノまたはカルボキシ末端に付加されたシステイン残基は、ジスルフィド結合を介してポリマーを形成するために特に有用である。しかしながら、結合物を調製するために当該技術分野で周知の他の方法もまた用いることができる。典型的な付加連結方法は、マイケル付加反応生成物、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド〔Klipsteinら、*J. Infect. Dis.*, 147:318-326 (1983)〕などの使用、または、担体にアミド結合を形成するために水溶性カルボジイミドを使用する場合のようなカルボジイミド技術の使用を含む。

20

また当該技術分野で周知のように、単離ポリペプチドを仲介連結基の手段によってその担体に結合させることはしばしば利点を有する。上記に述べたように、グルタルアルデヒドはそのような連結基の1つである。しかしながら、システインを用いるときは、仲介連結基は好ましくはm-マレイミドベンキソイルN-ヒドロキシスクシンイミド（MBS）である。

30

さらに、MBSは、エステル-アミド交換反応によって担体にまず付加することができる。その後、この付加に続いて、ブロックされたメルカプト基（例えばチオール酢酸、CH₃COSH）をマレイミド二重結合を越えて付加させることができる。該アシル遮断基の切断後、ジスルフィド結合は脱遮断連結基メルカプタンと該蛋白のシステイン残基のメルカプタンとの間で形成される。

抗原性担体は、免疫反応を高めまたは支援するため（免疫相乗作用）、または担体と一体となった接種物を使用することによって免疫反応のタイプを指令するために用いることができる。例えば以下の記載を参照のこと：ミリッヒ（Milich）ら、米国特許第4599231号、4599230号および4683136号並びにソーントン（Thornton）ら、米国特許第4818527号および4882145号。

40

免疫相乗作用の他の手段は、リポゾームおよび免疫刺激複合体（ISCOM）粒子の使用を含む。リポゾームの類のない多目的性はそのサイズ調整能、表面特性、脂質組成およびそれらが抗原を収容する方法にある。リポゾーム形成方法は当業界で既知である。例えば以下の文献を参照のこと：プレスコット（Prescott）編、細胞生物学における方法（Methods in Cell Biology）、14巻、アカデミックプレス、ニューヨーク、（1976）33ページから）。ISCOM粒子では、ケージ様マトリックスがQuilA（南アメリカの樹木の樹皮より抽出）で構成される。このマトリックスの表面との疎水性相互反応によって付加された抗原性蛋白またはペプチドによって強力な免疫反応が惹起される。

担体の選択は、免疫原の決定基部分より該免疫原の全体的な使用により依存し、さらに本

50

発明に必ずしも含まれない基準に基づく。例えば、接種物は哺乳類宿主に使用されるので、周知のように、特定の哺乳類で不利な反応を生じない担体を選択される。

接種物は、慣用的に非経口的（注射による）に、例えば皮下または筋肉内に投与される。他の投与態様に適したまた別の製剤は、座薬および、いくつかの事例では経口製剤を含む。座薬については、慣用的な結合剤および担体は、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリッドを含むことができ、そのような座薬は、0.5%から10%、好ましくは1-2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成できる。経口製剤は、例えば、医薬品等級のマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような通常用いられる賦形剤を含む。該組成物は、溶液、懸濁物、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤または粉末の形態をとり、10-95%、好ましくは25-70%の活性成分を含むことができる。

本発明の単離ポリペプチドは、中性形または塩として接種物に製剤化できる。医薬的に許容できる塩は酸付加塩（該蛋白または抗原の遊離アミノ基とともに形成される）を含むが、これらは、無機酸（例えば塩酸または磷酸）または酢酸、蔞酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸で生成される。遊離カルボキシル基とともに生成される塩はまた、無機塩基（例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄）およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロケインなどの有機塩基から調製できる。

該接種物は調剤形に適合した態様で、抗体産生免疫反応を誘発するために免疫原性を有しさらに効果的であるような量で投与される。所望の結果を達成するために投与されるべき接種物の分量は専門化の判定に左右され、さらに個々の哺乳類宿主に特有であるが、実験的宿主（例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギなど）については周知である。

接種物はまた、賦形剤の一部として前述のようにアジュバントを含むことができる。実験動物で使用されるフロイントの完全アジュバント（CFA）、フロイントの不完全アジュバント（IFA）は、当該技術分野で周知である。明礬のような医薬的に許容できるアジュバントもまた使用できる。したがって、典型的な接種物は、約0.5mgから約2.5mgの明礬、または0.1%から1%の $Al(OH)_3$ に吸着させた本発明の単離ポリペプチドの約50から200 μg を含む1mlの磷酸緩衝食塩水（PBS）を含む。好ましい接種物は、2.5mgの明礬担体に吸着させた100 μg のポリペプチドを含む1ml PBSを含む。

該接種物の投与後、該接種物を与えられた哺乳類宿主は、該哺乳類の免疫系が免疫学的に反応するために十分な時間、典型的には周知のように2から8週間のオーダーで Pl^A 含有免疫原と免疫的に反応する抗体の産生まで維持される。

本発明の単離ポリペプチド、融合ポリペプチド、および本発明の天然の $GP111aPl^{A1}$ または Pl^{A2} 決定基と免疫的に反応する抗体は、血小板の型分けおよび天然の $GP111aPl^{A1}$ または Pl^{A2} 決定基と免疫的に反応する抗体の検出のための診断方法および系に、後述のように用いることができる。

G. 診断方法

天然の $GP111aPl^{A1}$ または Pl^{A2} 決定基の1つと免疫学的に反応するが他方とは反応しない抗体を検出する方法、および血小板を型分けする方法も本発明の目的である。

血小板型分け方法は、天然の $GP111aPl^{A1}$ または Pl^{A2} 決定基の一方または他方を発現している血小板の性状を知るために用いられる。この方法は、供与者および受容者の血液をスクリーニングし、したがって血小板不適合の問題が発生する前にそれを明らかにするために（その結果PTPのような状態を避けることができる）用いることができる。さらに、血小板型分け方法および、天然の $GP111aPl^{A1}$ または Pl^{A2} 決定基と免疫学的に反応する抗体を検出する方法は、NAITの場合のような出生時および妊娠中の血小板不適合の可能性を明らかにするために、予想される両親の血小板および血液を検査するために用いることができる。

したがって、ある具体例では、本発明は特異的 $GP111aPl^A$ の存在を検出する方法を目的とする。天然の $GP111aPl^{A1}$ 決定基と免疫学的に反応する抗体の存在を患者

で検出するために、抗体を含有する体サンプル、好ましくは体液サンプル（例えば患者の血液、血漿、血清、尿または唾液）を生物学的分析条件下で、天然のGPIIa蛋白P1^{A1}またはP1^{A2}決定基を発現し、GPIIa蛋白配列の約65から約266アミノ酸残基をその中に含み、さらに配列番号：1のアミノ酸残基を包含する単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドである抗原と混合し、免疫反応混合物水溶液をつくる。この混合物を生物学的分析条件下で、抗体および抗原との間の免疫反応生成物（免疫複合体）の生成を可能にするために十分な時間維持する。続いて、複合体の存在、および好ましくは量を本明細書で述べるように検出することができる。複合体の存在は、天然のGPIIaP1^{A1}またはP1^{A2}決定基と免疫的に反応する抗体を示唆する。

好ましくは、P1^{A1}決定基に対する抗体の検出のために、この方法で用いられる抗原は、配列番号：3、配列番号：7、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19および、β-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された配列番号：7から成る群から選ばれる。上記の方法で天然のGPIIaP1^{A2}決定基と免疫的に反応する抗体の存在を検出するために、好ましくは用いられる抗原は、配列番号：5、配列番号：9、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29および、β-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端に機能しうるように連結された配列番号：9から成る群から選ばれる。

好ましい具体例では、単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドと患者の抗体との間で形成される免疫反応生成物の存在は、下記に極めて詳細に考察する特異的結合試薬を用いて検出される。標識した特異的結合試薬は、ここに記載するように特異的結合試薬および標識を含む。

例えば、まず免疫反応生成物を、標識した特異的結合試薬と混合して標識混合物をつくる。続いてこの標識混合物を、存在する免疫反応生成物が、標識された特異的結合試薬と結合し標識生成物を形成するために十分な時間、特異的結合に適した条件下で維持する。続いて、形成された標識生成物の存在、および好ましくは量が検出され、免疫反応生成物の存在または量が示される。

好ましい具体例では、本発明の方法は、ここで開示される系のように、免疫複合体が固相で形成され、検出される態様で実施される。

したがって、好ましい診断方法では、単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドは、固体マトリックスに結合され、固相を形成する。固体マトリックスへの固定方法は、当該技術分野で周知である。そのような方法は、吸着（これが好ましい）、該複合体に対する第二の抗体の使用（例えば該ポリペプチドに含まれるGPIIaのまた別の部分に対する抗体または、β-ガラクトシダーゼまたはその一部分が目的のポリペプチドに融合されている場合は、β-ガラクトシダーゼに対する抗体）を含む。共有結合による固定もまた意図される。特異的固体マトリックスは以下で極めて詳細に考察する。

特異的結合試薬が、該単離ポリペプチドと固相で免疫複合体を形成した抗体と複合体を形成することができる蛋白Aまたは抗ヒトIg（例えばIgGまたはIgM）であることはさらに好ましい。最も好ましいものは、標識された特異的結合試薬の使用で、この場合、標識は放射性同位元素、酵素、ビオチンまたは蛍光マーカー（例えばランタニド）である。

この固相の具体例では、前述の組換え融合ポリペプチドを使用することが特に好ましい。また別の好ましい診断方法では、本発明の単離ポリペプチドまたは融合ポリペプチドを前述のように固体マトリックスに固定し、さらに、該生物学的サンプルの希釈物を免疫複合体形成工程に付すが、この工程では、該固相支持体と生物学的サンプルの希釈物を接触させ、固相結合免疫複合体が形成されるために十分な時間、生物学的分析条件下で該接触を維持し、該固相および液相を単離して非結合物質を除去する。生物学的サンプルに存在する抗体は複数の結合手をもつので、続いて加えられる標識ポリペプチドまたは融合ポリペプチドは、固相ポリペプチドと可溶性標識分子との間でブリッジとして作用するサンプルの抗体によって該固相に付着する。固相における標識の存在は、サンプル中の特異的抗体の存在、好ましくは量を示す。当業者は希釈の範囲を決定し、それによって固相における

10

20

30

40

50

標識抗原の濃度を決定することができる。

該生物学的サンプルを固相と接触させる前または同時に、生物学的サンプルおよび本発明の単離ポリペプチドを混合し、二価または多価の特異的抗体の架橋特性を利用して三分子複合体を固相上で形成させることができる。特に有用な標識として、本発明のビオチン化ポリペプチドが標識抗原が可能である。これによって酵素ーストロプトアビジンまたは酵素ーアビジン複合体の添加とそれに続く適切な基質の添加によるその後の検出が可能になる。セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはウレアーゼのような酵素がしばしば用いられるが、これらおよび他のものは幾つかの適切な基質とともに市販されている。形成された複合体の直接検出を可能にするマーカーを用いる好ましい標識は、放射性同位元素（例えばヨウ素）またはユーロピウムのようなランタニドキレートを含む。別の具体例では、本発明は、以下の工程を含む血小板の型分け方法を目的とする：

（a）水溶液中で供与者の血小板を、G P I I I a P l^{A1}およびP l^{A2}決定基の一方または他方と免疫的に反応するが両方とは反応しない抗体と前述のように混合し、免疫反応混合物水溶液を形成し；

（b）これらの混合された抗体が免疫的に反応し、免疫反応生成物を形成するために十分な時間、生物学的分析条件下で該免疫反応混合物を維持し；さらに；

（c）当該免疫反応生成物の存在を検出し、それによって、G P I I I a P l^{A1}またはP l^{A2}決定基の一方または他方の存在並びに血小板型を検出する。この分析で用いられる抗体は血小板供与者の種以外の動物種由来であることが好ましい。したがって、例えば該抗体はマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマなどから産生することができる。このように、混合された抗体と血小板との間の免疫反応の存在は、前述のように酵素または放射性元素のような標識を含む種特異的抗-抗体とのさらに別の免疫反応によって検出される。

より好ましくは、混合される抗G P I I I a P l^{A1}またはP l^{A2}決定基抗体は、ここで考察するようにそれ自体の標識を含み、それによって、また別の免疫反応は必要とされない。最も好ましくは、これらの抗P l^A抗体は単クローン抗体で、アルカリホスファターゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼのような酵素標識を含む。

好ましい具体例では、この方法で用いられる抗体は、G P I I I a P l^{A1}決定基と免疫的に反応し、G P I I I a P l^{A2}決定基とは反応しない。

また別の好ましい具体例では、この方法で用いられる抗体は、G P I I I a P l^{A2}と免疫的に反応し、G P I I I a P l^{A1}決定基とは反応しない。

好ましくは、両方の具体例で用いられる抗体は単クローン抗体である。

血小板型分け方法もまた本発明内に含まれる。前述のように、この血小板型分け方法では、種々の周知の非均質的および均質的なプロトコルを用いることができる。好ましくは、供与者からの血小板含有体サンプルは、抗P l^{A1}またはP l^{A2}抗体と水性組成物中で混合され、免疫反応混合物を形成する。

上記で形成された免疫反応混合物は、該抗体が血小板上のそれらの抗原と免疫的に反応するために十分な時間、生物学的分析条件下で維持される。免疫複合体の形成は、特定の抗原を発現している血小板の存在を示し、その形成はここで考察されるいずれの手段によっても検出できる。

前述の免疫反応が生じる維持時間は、周知のように広範囲に変えることができる。典型的には、維持時間は約1分から約2時間の範囲で、典型的に用いられるのは約30分から約90分である。

抗体分子は、無傷の抗体またはその結合部位含有（パルトープ含有）部分を含む。典型的なパルトープ含有部分は、周知のようにF a b、F（a b'）₂およびF_v部分である。さらに、抗体のF_c部分が存在する場合は、この部分は、パルトープ含有部分とは異なる動物に固有のアミノ酸残基配列を有する。例えば、周知のようにヒトのF_c部分は、遺伝子工学技術を施した場合のように、マウスの結合部位を含む部分とともに存在させることが可能である。

本分析方法で用いられる“生物学的分析条件”は、分析されるサンプルの他、この分析で

10

20

30

40

50

用いる抗体およびポリペプチドの生物学的活性を維持するために選択される。典型的に許容される“生物学的分析条件”は、約4℃から約45℃の範囲、好ましくは約37℃の温度；pH値は約5から約9の範囲、好ましくは約7；さらに、イオン強度は蒸留水のそれから約1Mの塩化ナトリウムのそれ、好ましくは生理学的食塩水のそれを含む。そのような条件を最適化する方法は当業者にとり既知である。

目的分析で形成される免疫複合体の存在または量を決定する態様は、該免疫複合体を識別するために望ましい方法によって左右される。例えば、該分析で用いられる抗体は血小板との免疫複合体の形成前または形成後に標識することができる。該標識免疫複合体は、それぞれの標識の検出に適した方法、例えば放射性標識が用いられているときは放射能検出によって、蛍光物が用いられているときは蛍光検出によって、ビオチン標識が用いられているときはアビジンとの反応によって、酵素標識が用いられているときは酵素基質の検出生成物への変換によるなどして定量化できる。また別に、未標識免疫複合体は、該免疫複合体と標識された物質（これは免疫複合体と特異的に反応するもので、例えば標識抗-抗体である）との間の免疫反応生成物の形成によって検出することができる。それによって標識は分析されるべき免疫複合体に付着し、これは検出を容易にすることができる。

H. 診断系

キット形の診断系は、ここに記載する方法にしたがって少なくとも1回の分析に十分な量の中に、本発明の単離ポリペプチドもしくは融合ポリペプチド、または天然のGPIIaPI^{A1}もしくはPI^{A2}決定基と免疫的に反応する本発明の抗体を別々に梱包した試薬として含む。典型的には梱包された試薬の使用についての指示もまた含まれる。

“使用についての指示”は典型的には試薬の濃度または少なくとも1種類の分析方法のパラメーター（例えば、混合されるべき試薬およびサンプルの相対量、試薬／サンプル混合物の維持時間、温度、緩衝液の条件など）を記載する重要な表示を含む。

好ましい具体例では、本発明の診断系はさらに標識または、上記の方法で調製された免疫反応生成物の形成を示すことができる表示手段を含む。

本明細書で用いられるように、“標識”および“表示手段”という用語は、複合体の存在を示すための検出可能なシグナルの産生に直接的または間接的に含まれる単一原子または分子を指す。いずれの標識または表示手段も抗体のような試薬物質、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドに連結または取り込ませることができるが、また別々に用いることもできる。さらにこれらの原子または分子はまた別の試薬と関係させて用いてもよい。そのような標識は、それ自体臨床診断化学の分野で周知であるが、それらが別に新規な蛋白、方法および／または系を利用する限り本発明の部分を構成する。

該標識は、抗体または抗原を変性させることなくそれらと化学的に結合し、有用な免疫蛍光トレーサーであるフルオロクロム（染料）を形成することができる蛍光標識剤でもよい。適切な蛍光標識剤は、フルオレセインイソシアネート（FIC）、フルオレセインイソチオシアナイト（FITC）、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド（DANSC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）、リサミン、ローダミン8200スルホニルクロリド（RB200SC）、キレートーランタニド結合物（例えばEu、Tb、Sm）などである。免疫蛍光分析技術についての記載は以下の文献で見出される：デルカ（DeLuca）、“免疫蛍光分析”（“Immunofluorescence Analysis”）、手段としての抗体（Antibody as a Tool）より、Marchalonisら編、John Wiley & Sons, Ltd., 189-231ページ（1982）（本明細書には参考文献として含まれる）。

好ましい具体例では、該標識は酵素、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）（本明細書で実例として用いられている）、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどである。主たる標識がHRPまたはグルコースオキシダーゼのような酵素である場合、さらに別の試薬が、抗体-抗原複合体（免疫反応物）が形成された事実を可視化させるために要求される。HRPのためのそのような付加試薬は過酸化水素および酸化染料前駆体（例えばジアミノベンジン）を含む。HRPについて有用な付加試薬は、2, 2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）である。放射性元素はまた標識剤として有用である。典型的な放射性標識剤は、ガンマ線放射を起

こす放射性元素である。それ自体でガンマ線を放出する、例えば ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{128}I 、 ^{131}I および ^{51}Cr のような元素は、ガンマ線放射性元素表示群の1つの種類を代表する。特に好ましいものは ^{125}I である。有用な標識手段のまた別の群は、それ自体陽電子を放出する、例えば ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O および ^{13}N のような元素である。そのように放出された陽電子は、動物の体内に存在する電子に衝突するときガンマ線を放出する。また有用なものは、ベータ線放出物質で、例えば ^{111}In インジウム、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P である。また別の標識が当該技術分野で既に記載されており、本発明の診断系での使用に適している。例えば、分子対の間で見出される特異的な親和性を用いることができるが、その場合1つは特異的な結合剤に固定された標識として、他方は標識の存在を検出する手段として用いられる。典型的な分子対は、ビオチン：アビジン（この場合ビオチンは標識である）およびペルオキシダーゼ：抗ペルオキシダーゼ（PAP）（この場合ペルオキシダーゼは標識である）である。

10

標識の連結、すなわちポリペプチドおよび蛋白の標識は当該技術分野で周知である。例えば、ハイブリドーマによって産生される抗体分子は、培養液中の成分として提供される、放射性同位元素を含有するアミノ酸の代謝的取り込みによって標識される。例えばガルファーらの文献（Galfreら、Meth. Enzymol., 73:3-46（1981））を参照のこと。活性化官能基を介する蛋白の共役またはカップリングの技術は特に応用できる。例えば以下の文献を参照のこと：オーラメアス（Aurameas）ら、Scand. J. Immunol., 8巻、増補7:7-23（1978）；ロドウェル（Rodwell）ら、Biotech., 3:889-894（1984）；米国特許第4493795号。

20

診断系はまた、好ましくは別々の容器として、特異的な結合剤を含むことができる。“特異的な結合剤”は、試薬と選択的に結合する分子物質で、本発明の生成物と順序にしたがって反応するが、それ自体は本発明の蛋白発現生成物ではない。典型的な特異的な結合剤は抗体分子、例えば抗ヒトIgGもしくは抗ヒトIgM、補体蛋白もしくはそのフラグメント、蛋白Aなどである。好ましくは、特異的な結合剤は、これらの抗体が免疫反応生成物または免疫複合体の一部分として存在するとき、天然のGP111aP1^{A1}またはP1^{A2}決定基と免疫的に反応する抗体と結合することができる。

好ましい具体例では、該特異的な結合剤は標識される。しかし、該診断系が標識されていない特異的な結合剤を含む場合、典型的には、該結合剤は増幅手段または試薬として用いられる。これらの具体例では、標識された特異的な結合剤は、増幅手段が試薬物質含有複合体と結合するとき、該増幅手段に特異的に結合する。

30

本発明の診断キットは、例えば、“ELISA”形式で前述の方法において用いられ、体液サンプル（例えば血清、血漿または唾液）中の抗体の存在または量を検出することができる。“ELISA”は、サンプル中に存在する抗原または抗体の量を検出または定量するために、固相に結合させた抗体または抗原および酵素抗原または酵素抗体共役物を用いる酵素結合免疫吸着分析を指す。ELISA技術についての記載は以下の文献で見出される：サイト（D. P. Sites）らの基礎および臨床免疫学（Basic and Clinical Immunology）、第4版、22章、レンジメディカルパブリケーション、ロサンジェルス、カリフォルニア（1982）；米国特許第3654090号、3850752号、4016043号（これらは全て本明細書に参考文献として含まれる）。

40

したがって好ましい具体例では、前述のように本発明の天然のGP111aP1^{A1}またはP1^{A2}決定基と免疫的に反応する目的の単離ポリペプチド、融合ポリペプチドまたは抗体は、固形支持体を形成するために固体マトリックスに固定することができ、これは本題診断系に別々に梱包される。

有用な固体マトリックスは当該技術分野で周知である。そのような物質は、架橋デキストラン（ファルマシアファインケミカルズ（ピスカタウェー、ニュージャージー）からセファデックスの商標名で市販）；アガロース；直径およそ1ミクロンからおよそ5ミリメートルのポリスチレンビーズ（アボットラボラトリーズ（ノースシカゴ、イリノイ）から市販）；塩化ポリビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースもしくはナイロン基材網状物（例えばシート、細片もしくはへら状物）；または、ポリスチレ

50

ンもしくはポリビニルクロリドから製造された管、プレート、もしくはマイクロリットルプレートのくぼみを含む。

以下の実施例は本発明の特定の具体例を詳述するもので、いかなる場合にも本明細書および請求の範囲を制限するものではない。

I. 結果

無作為に切断したG P I I I a c DNAフラグメントを原核細胞発現ベクターλ g t 2 2に挿入して、血小板G P I I I aエピトープライブラリーを構築した。このライブラリーは、長さが平均100-200アミノ酸残基である、β-ガラクトシダーゼに融合させたG P I I I aの無作為フラグメントを発現する。

このλ g t 2 2-G P I I I aエピトープライブラリーを、P l^{A1}エピトープを発現しているクローンのために精製抗P l^{A1}抗体を用いてスクリーニングした。患者番号1からの精製抗P l^{A1}抗体と反応する、それぞれ別個の5クローンを単離し、この組換えファージの各々のDNAの配列分析によって、G P I I I aのアミノ末端に対するP l^{A1}エピトープの位置を決定した(図1)。

多クローン抗G P I I I a抗体を用いてλ g t 2 2-G P I I I aエピトープライブラリーをスクリーニングして、全G P I I I a配列からのフラグメントを単離した。しかしながら、これらG P I I I aの他の領域は、4人の患者の抗P l^{A1}抗体と反応しなかった。P l^{A1}抗原を含む最小フラグメントは、成熟G P I I I aのアミノ末端65残基および26残基のシグナル配列を発現していた(図2)。得られた全てのクローンはこの領域が共通で、4人から得た精製抗P l^{A1}抗体と反応したが、これはP l^{A1}エピトープはG P I I I aのアミノ末端65残基に位置することを示唆している。

成熟G P I I I aの残基33は2つのP l^A表現形に応答する[Newmanら、J. Clin. Invest., 83:1778 (1989) ;Goldbergerら、Blood, 78:681 (1991)]。T→C₁₉₆置換によってG P I I I aのアミノ末端65残基を発現しているλ g t 2 2クローンで、P l^{A2}(プロリン³³)表現形を構築した。

プロリンでロイシン³³を置換した結果、抗P l^{A1}抗体反応性は消失したが、多クローン抗G P I I I a抗体との反応性は、ファージプラークとの免疫反応によって証明されたようにそのままであった。したがって、残基33は、この7KDaのG P I I I aのアミノ末端フラグメントにおけるP l^{A1}エピトープの形成に重要であった。

J. 方法および材料

実施例1. 抗P l^{A1}アロ抗体

4人のPTP罹患者の血漿(Dr. S. Schinke, San Jacinto (患者1) ;Dr. G. Schmidt, シティオブホープ・メディカルセンター, Duarte (患者2) ;Dr. V. Blanchette, 小児病院、トロント (患者3および4) の好意により提供された血漿)由来の抗P l^{A1}アロ抗体を、C n B r-セファロース-4 B C L (ファルマシア、ピスカタウェー、ニュージャージー)に結合させた血小板糖蛋白複合体G P I I b-I I I aを用いてアフィニティー精製を行った。

洗浄正常血小板を、1%のトリトンX-100を含む等張のクエン酸緩衝液(pH 6.5)で30分4℃で溶解し、その後100000×gで4℃60分遠心した。上清をC n B r-セファロース-4 B C Lに結合させたマウス抗G P I I b単クローン抗体(2A9, Dr. V. Woods, カリフォルニア大学サンディエゴ分校により提供)とともに4℃で一晩インキュベートした。P B Sで洗浄後、結合G P I I b-I I I aをP B S (pH 10)中の1%オクタグルコピラノシド(OPG)中の0.1Mジエチルアミンで溶出させ、直ちに1%OPG含有0.1M磷酸緩衝液で透析した。この精製G P I I b-I I I a-セファロースを血漿とともに4℃で一晩インキュベートし、洗浄し、結合アロ抗体を0.1Mグリシン(pH 2.5)で溶出させ、直ちに1Mトリス(pH 9)で中和し、さらにP B Sで透析した。この抗体溶出液を抗原捕捉分析[Woodsら、Blood, 63:368 (1984)]で測定した。

実施例2. エピトープライブラリーの構築およびスクリーニング

完全な長さのG P I I I aをコードする2.6kbの二本鎖フラグメントを、制限酵素S

10

20

30

40

50

p h I および S p e I でプラスミド B S 3 a [O'Tooleら、Blood, 74:14 (1989)] を切断して単離し、続いてアガロースゲルから 2.6 kb のバンドを精製した。続いてこの単離したバンドの 5 μg を 0.5 ng の D N アーゼ I で 37℃ 30 分、20 mM トリス-C l (pH 7.5) および 1.5 mM M n C l₂ の 0.5 ml 中で消化した。該反応混合物のフェノール：クロロホルム抽出によって反応を迅速に停止させる。

生じた G P I I I a D N A をエタノールで沈澱させた後、フラグメントを T 4 D N A ポリメラーゼで二本鎖 S a l I リンカー G G T C G A C C (ここに示した方向の配列のみ；配列番号：30) に連結し、制限酵素 S a l I で切断し、さらに S a l I 消化脱リン酸 λ g t 2 2 (プログマ社、マジソン、ウィスコンシン) に連結した。続いて連結 D N A のパッケージングを行い、未増幅ライブラリーの力価を大腸菌 Y 1 0 9 0 で調べたところ、 2×10^4 (84% の組換え) の総ファージ数を含んでいることが分かった。

10

実施例 3. λ g t 2 2 組換えファージのスクリーニング

5000 プラーク／プレートの組換え λ g t 2 2 -G P I I I a エピトープライブラリーを大腸菌 Y 1 0 9 0 上に撒いた。l a c Z 遺伝子をイソプロピルー β-D-チオガラクトシダーゼ (I P T G) をヤングらの記載 [Youngら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:1194 (1983)] にしたがって飽和させた濾紙で誘発した。続いてこの濾紙をウサギ抗 G P I I I a 多クローン抗体 (λ g t 2 2 感染大腸菌 Y 1 0 9 0 溶解物で前処理吸収、正常ウサギ血清で前処理吸収) [Loftusら、Science, 249:915 (1990)] または精製抗 P l^{A1} 抗体 (1:100 希釈) のいずれかでスクリーニングした。

結合抗体は、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ免疫グロブリン G (I g G) または抗ヒト I g G 二次抗体を用い、発色性基質、o-フェニレンジアミンで増幅して検出した。この精製した抗 G P I I I a および抗 P l^{A1} 陽性ファージを、λ g t 2 2 と組換え λ g t 2 2 構築物の 1:1 混合物の 100 から 200 プラークを大腸菌 Y 1 0 9 0 上に撒いてスクリーニングした。l a c Z 遺伝子を誘発し、濾紙を小片に切り、前処理吸収抗 G P I I I a 抗体、正常ウサギ血清、抗 P l^{A1} 抗体およびヒト血清でスクリーニングした。

20

実施例 4. G P I I I a 挿入物の配列決定

組換え λ g t 2 2 D N A を記載 [分子クローニング：実験室マニュアル、第 2 版、サンプルック (Sambrook) ら編、コールドスプリングハーバー研究所出版部 (1989)] にしたがって単離し、E c o R I および N o t I 制限酵素で切断し、標準的技術でプラスミドブルースクリプト I I S K + / - (ストラタジーン、ラホイヤ、カリフォルニア) でサブクローニングした。続いて、ジデオキシ配列決定法 (Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463 (1977)) で T 7 および T 3 プライマー (ストラタジーン) を用いて両方の鎖の配列を決定し、該 D N A フラグメントの境界を求めた。最小の抗 P l^{A1} 陽性 G P I I I a フラグメント (292 bp) のプラスミドサブクローンの完全な配列を決定し、続いて突然変異誘発に用いた。

30

実施例 5. インビトロ突然変異

オリゴヌクレオチド誘導突然変異は、プライマー伸長法 [Zollarら、Nuc. Acids Res., 10:6487 (1982)] および鎖選別法 [Kunkelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985)] (これは非変異鎖に対して強力な生物学的選別を提供する) を組み合わせて実施した。G P I I I a の塩基 196 の T → C 単一変異を、オリゴヌクレオチド G G T G A G C C C G G A G G C A G G G C C T C A を用いて 292 bp フラグメントに導入した。期待の変異を有する挿入物を N c i I 部位の出現 [Newmanら、J. Clin. Invest., 83:1778 (1989)] でスクリーニングし、続いて、完全に配列決定を行った。

40

T → C 置換をもつ挿入物を続いて λ g t 2 2 にサブクローニングし、P l^{A2} エピトープ含有融合ポリペプチドを形成した。

実施例 6. F n フラグメント M B P 融合蛋白の調製および単離

2 つの M B P コードプラスミド、p M A LTM p 2 および p M A LTM c 2 を、本融合蛋白を大腸菌で発現するためのベクターとして使用する。融合蛋白の M B P 領域は、他の細胞性蛋白から該融合生成物を容易に精製することを可能にする。これらのベクターは周知の技術 [分子クローニング：実験室マニュアル、第 2 版、サンプルック (Sambrook) ら編、コ

50

ールドスプリングハーバー研究所出版部、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク（1989）〕とその後で以下に記載する方法を行うことによって構築される。これらのベクターに先行するものについての多くの考察（すなわちベクター p P R 7 3 4 および p I H 8 2 1（制限地図、構築遺伝子およびコード配列、使用および使用手順を含む））は、分子生物学の今日的手法（Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編、Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience, ニューヨーク（1989）16.6.1-16.6.12ページ）で見出すことができる。

A. MBPベクターの構築

典型的なMBPベクターの構築は、前述のE c o R I - N o t Iフラグメントに含まれる、P l ^{A1}の65アミノ酸残基エピトープをコードする配列番号：2のP l ^{A1}コードDNAを含むcDNAクローンを用いて以下の通りに行われる。このフラグメントは、所望のP l ^{A1}エピトープをコードするDNAだけでなく、λ g t 2 2ポリリンカー領域のDNAを含むが、それとともに5'末端にE c o R I部位を、3'末端にN o t I部位を、さらにそれらの間にS a l IおよびX b a I部位を有する。本明細書で考察されるP l ^{A1}またはP l ^{A2}エピトープをコードするまた別のcDNAクローンも同様に用いることができることは理解されるところであろう。

したがって、抗P l ^{A1}陽性G P I I I aフラグメントを含む前述のλ g t 2 2ベクターをS a l Iで消化する。マルトース結合蛋白融合蛋白ベクターp M A L TMc 2（ニューイングランドバイオラブ社、ビバリー、マサチューセッツ）をS a l Iで消化し、S a l I粘着末端を生成する。P l ^{A1}コードS a l I - S a l IフラグメントをDNA T 4リガーゼを用いて該ベクターに繋ぎ、クローニングしたP l ^{A1}コード遺伝子フラグメントを機能しうるようにMBPコード遺伝子フラグメントに連結させた、融合ポリペプチド形成構築物を作成する。得られた組換えDNA分子はMBP - P l ^{A1}融合ポリペプチドを発現させることができる。

上記の操作の結果、発現融合ポリペプチドのカルボキシ末端はいくつかの非G P I I I a残基配列を含んでいる。さらに、この後に詳しく考察するように、p M A L TMc 2ベクターのS a l I部位はポリリンカー領域の3'末端近くに位置している。したがって、ファクターX aで切断したあとですら、生じた組換えポリペプチドは、該分子のアミノ末端にいくつかのベクター誘導残基を含んでいる。これらのベクター誘導残基は前述のS a l Iリンカー付加によって導入されたものにさらに付加される。

当業者には、ベクター誘導残基を排除するために該発現融合ポリペプチドを短くするまた別の周知の技術が利用できることは理解されよう。そのような操作の1つは、読み枠にしたがった5'平滑端P l ^{A1}エピトープコードDNAフラグメントを利用するもので、これをp M A L TMc 2またはp M A L TMp 2ベクターのX m n I部位に挿入し、それによってファクターX aでの切断後、ベクター誘導アミノ酸残基は組換えポリペプチドには存在しなくなる。また別の操作はG P I I I aコード配列の3'末端に連結した読み枠にしたがった終止コドンを利用するもので、このコドン自体は、該DNAに挿入するために利用しうるさらに下流の制限部位に連結される。この操作により、組換えポリペプチドのカルボキシ末端からベクター誘導残基は除去される。

ベクターp M A L TMc 2およびp M A L TMp 2はニューイングランドバイオラブ（ビバリー、マサチューセッツ）から入手する。ベクターは各々、l a c Zにポリリンカーを介して連結したm a l Eを有する。ベクターp M A L TMc 2はm a l Eシグナル（リーダー）配列2-26（これは、存在すればペリプラズムへの融合蛋白の輸送を促進する）が欠失していることを除いて、ベクターp M A L TMc 2はベクターp M A L TMp 2と同一である。これらベクターの各々は、m a l E遺伝子上流にt a cプロモーター（P t a c）を有する。t a cプロモーターの直ぐ上流のl a c I^Qサプレッサー遺伝子は、I P T G（イソプロピルーβ-D-チオガラクトシド）が発現誘発に用いられるまで発現活性を抑制することができる。残余のベクターの骨格はp K K 2 3 3 - 2（ファルマシア、ピスカタウェー、ニュージャージー）のA v a l（充填連結）からE c o R I（充填連結）までの部分である。

マルトース結合蛋白融合発現系（MBP発現系）の重要な構成成分は、アマンらによって先に報告された（Amannら、Gene, 25:167-178（1983））プロモーター（P t a c I I）、ガンらによって先に報告された（Guanら、Gene, 67:21-30（1987））マルトース結合蛋白-l a c Z α融合遺伝子、ブロシウスらによって先に報告された（Brosiusら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6929-6933（1984））r r n Bリボソーム転写ターミネーターで、p M A Ltm p 2（p I H 8 2 1）およびp M A Ltm p 2（p P R 7 3 4）ベクター（ニューイングランドバイオラブ、ビバリー、マサチューセッツ）並びにp K K 2 2 3-3およびp K K 2 3 3-2（ファルマシア、ピスカタウェー、ニュージャージー）で市販されている。

MBP発現系は場合によって、先にファラボーによって報告された（Farabaugh, Nature, 274:765-769（1978））l a cリプレッサー遺伝子（l a c I）をコードする遺伝子を含んでいる。発現ベクターにl a c I遺伝子が存在しない場合、ラムダリプレッサーを発現している細菌株、例えばJM101、JM105、JM107、JM109（ATCC#33323）およびJM110（ATCC#47013）（Yanisch-Perronら、Gene, 33:103（1985））を用いてトランス形式で提供することができる。これらの細菌株はストラテジーン（ラホイヤ、カルフォルニア）から市販されている。

この発現系の成分を含む個々の核酸フラグメントは、例えば、分子クローニング：実験室マニュアル（第2版、サンプルック（Sambrook）ら編、コールドスプリングハーバー研究所出版部、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク（1989））に記載されているような標準的な分子生物学の技術を用いて、機能しうるように一緒に繋ぎ合わせることができる。必要な場合には、種々の成分の読み枠を合成リンカー、種々の空白充填反応または種々のエキソヌクレオシスを用いて調節することができる。さらに、読み枠における種々の欠失または調節を、ループ削除による変異または市販の突然変異キット（例えばバイオラッドラボラトリーズ（リッチモンド、カリフォルニア）製の突然変異キット）を用いて容易に行うことができる。

この発現系の必要な成分の各々はこれから詳細に述べる。アマンらによって先に報告された（Amannら、Gene, 25:167-178（1983））P t a c I Iプロモーターは、多数の入手可能なベクター、例えばP K K 2 2 3-3（ファルマシア）、P I H 8 2 1およびp P R 7 3 4（ニューイングランドバイオラブ、ビバリー、マサチューセッツ）、P t a c I I（ATCC#37245）およびP t a c 1 2（ATCC#37138）（Amannら、Gene, 25:167-178（1983））から単離することができる。例えば、P t a c I Iプロモーターは、E c o R IおよびH i n d I I IまたはC l a IおよびH i n d I I Iを用いて、P t a c I Iから制限エンドヌクレアーゼ処理で単離することができる。

ガンらによって先に報告された（Guanら、Gene, 67:21-30（1987））マルトース結合蛋白-l a c Z α融合遺伝子（M a l E-l a c Z α）は、大腸菌（例えばHB101（ATCC#33694）または野性型大腸菌K12）の染色体から単離したH i n f I制限エンドヌクレアーゼフラグメントにあるm a l E遺伝子を含んでいる。m a l E遺伝子はデュプレーらによって配列が決定され（Duplayら、J. Biol. Chem., 259:10606-10613（1984））、したがってm a l E遺伝子に特異的なプローブは容易に合成され、標準的なクローニングプロトコルを用いてm a l E遺伝子が大腸菌から単離することが可能である。また別に、m a l E遺伝子はセグメントとして化学的に合成することができ、これらのセグメントはT4DNAリガーゼを用いて連結され、m a l E遺伝子を製造することができる。成熟マルトース結合蛋白（m a l E遺伝子産物）は、デュプレーらの報告のように（Duplayら、J. Biol. Chem., 259:10606-10613（1984））、m a l E遺伝子配列のコドン28-342によってコードされる。該発現ベクターは、マルトース結合蛋白リーダー配列および成熟マルトース結合蛋白をコードするコドンを含むか（例えばp M A Ltm p 2の場合）、または成熟マルトース結合蛋白をコードするm a l E遺伝子の1部分のみ（例えばp M A Ltm c 2の場合）を含む。

マルトース結合蛋白-l a c Z α融合遺伝子の残余部分は、l a c遺伝子の短いαペプチド（長さがおおよそ107アミノ酸）をコードするl a c Z遺伝子の一部分を含む。このl

10

20

30

40

50

lacZ 遺伝子は、ヤニッシューペロンら (Yanisch-Perronら、Gene, 33:103-119 (1985)) が報告したプラスミドベクター pUC19 から単離できるが、さらに市販もされている。lacZ 遺伝子および malE 遺伝子は、有用な制限エンドヌクレアーゼ認識配列 (この部分へクローニングすることによって挿入のためのブルー/ホワイトスクリーニングが可能になる) を含むポリリンカーを用いて繋ぎ合わせることができる。

rriB リボソーム転写ターミネーターは、ブロシウスらによって先に報告された (Brosiusら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6929-6933 (1984) および Brosiusら、Plasmid, 6:112-118 (1981))。rriB リボソーム転写ターミネーターは、入手可能なベクター (例えば、PEA300 (ATCC#37181) P K K 2 2 3-3 および P K K 2 3 3-2 (ファルマシア) 並びに P I H 8 2 1 および P P R 7 3 4 (ニューイングランドバイオラブ)) から容易に単離できる。例えば、rriB リボソーム転写ターミネーターは、Hind I I I および P v u I 制限エンドヌクレアーゼを用いて p K K 2 2 3-3 から単離できる。ラムダリプレッサー蛋白をコードする lacI 遺伝子は、ファラボー (Farabaugh, Nature, 274:765-769 (1978)) によって配列が決定された。さらに、lacI 遺伝子は幾つかの入手可能なベクター (例えば p ブルースクリプト I I H K S および p ブルースクリプト S K (ストラテジーン) 並びに p U C 1 8 および p U C 1 9 (ファルマシア)) に含まれている。lacI 遺伝子は、これらのベクターから制限エンドヌクレアーゼおよび標準的分子生物学技術を用いて単離できる。lacI 遺伝子は、該発現ベクター内または該発現ベクターが増殖している細菌内に存在する。発現ベクター内の malE および lacZ 遺伝子の間に存在する複数のクローニング部位 (ポリリンカー) を表 1 に示し、配列番号 3 2 として配列リストに挙げた。

表 1

発現系におけるポリリンカーの配列

Xmn I Eco RI
malE ... ATC GAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC

Bam HI Xba I Sal I Pst I

GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG

Hind III

GCA AGC TTG ... lacZ

制限エンドヌクレアーゼ切断部位は上の表の DNA 配列の上に示され、各々の部位には下線が引かれている。融合蛋白のファクター X a 切断のための 4 残基の認識部位は、表に示す最初の 4 つのコドンによってコードされる。10 個のアスパラギン残基をコードする DNA が malE 遺伝子および上記のポリリンカーを単離する。

上に記したように、複数のクローニング部位 (ポリリンカー) は、malE と lacZ 遺伝子との間に位置するファクター X a 切断部位をコードする核酸セグメントを含む。このベクターによって産生されるマルトース結合蛋白融合蛋白はファクター X a 切断部位で切断することができ、それによって、所望の蛋白の精製および究極の低分子量組換え体の産生を促進する。ここに述べるように、例えば P I^{A1} または P I^{A2} をコードする外来遺伝子は表 1 に例示する 1 つまたは 1 つ以上の制限部位に挿入することができる。Xmn I 部位を用いられ、さらに発現融合蛋白がファクター X a で切断されるときは、該ベクターのために、P I^{A1} または P I^{A2} ポリペプチドに対して何も付加されない。また別の部位を用いる場合は、およそ 15 個までのベクター由来残基を付加することができるが、それはどの部位が用いられるかによる。

上記のように目的の P I^{A1} または P I^{A2} DNA 挿入物を含むプラスミドベクターが一旦調製されると、このベクターは標準的な技術にしたがい大腸菌を形質転換するために用いら

れる。形質転換可能ないずれの大腸菌も用いることができ、PR722またはER1451株（ニューイングランドバイオラブより入手可能）が特に適切である。生じた形質転換大腸菌を続いて培養増殖させる。

B. MBP融合蛋白の発現

特定のMBP融合蛋白の動態を知るための小規模実験につて述べる。このプロトコールにより3つの粗抽出分画が得られる；低浸透圧ショック工程によって調製した全細胞粗抽出物、この粗抽出物からの不溶性物質およびペリプラズム分画である。

80 mlの高栄養ブロス+グルコースおよびアンピシリン（1リットル当たり、10 gトリプトン、5 g酵母抽出物、5 g NaCl、1 gグルコースを含み、高圧蒸気滅菌しアンピシリンを100 μ g/lで添加）に、上記のようにして作成した融合プラスミドを含む形質転換大腸菌細胞を接種する。十分に通気して 2×10^8 細胞/mlまで37℃で増殖させる。1 mlのサンプルをとり微量遠心機で2分間遠心する（未誘発細胞）。上清を捨て、細胞を100 μ lのSDS-PAGEサンプル緩衝液に再浮遊させる。ヴォルテックスで攪拌し、氷上に静置する。

IPTG（イソプロピルチオガラクトシド）を残余の培養に加え、最終濃度を0.3 mMとする（例えばH₂O中の0.1 Mのストック溶液0.24 ml）。37℃で2時間培養を継続する。1 mlのサンプルを取り、微量遠心機で2分間遠心する（誘発細胞）。上清を捨て、細胞をSDS-PAGEサンプル緩衝液150 μ lに再浮遊させる。ヴォルテックスで攪拌し再浮遊させ、氷上に静置する。

る。

培養を2つの部分標本に分け、細胞を4000 $\times$ g 10分遠心して採集する。上清を捨て、5 mlの10 mM磷酸ナトリウム、30 mMのNaCl、0.25%のトゥイーン20、10 mMのEDTA、10 mMのEGTA（シグマE4378）、pH 7.0に一方のペレット（サンプルA）を再浮遊させる。他方のペレット（サンプルB）を10 mlの30 mMトリス-塩酸、20%蔗糖、pH 8.0（各々0.1 gの湿潤重量の細胞について9 ml）に再浮遊させる。

ドライアイス-エタノール浴でサンプルAを凍結し（または20℃でおよそ18時間）、続いて冷水中で融解させる。サンプルを超音波処理し、ブラッドフォードアッセーまたは280 nm（A₂₈₀）での吸収によって、それが最大となるまで蛋白の遊離を測定して細胞破壊をモニターする。9000 $\times$ gで20分遠心する。上清を捨て（粗抽出1）氷上で保存する。ペレットを5 mlの10 mM磷酸ナトリウム、0.25%トゥイーン20、30 mM NaCl、10 mM EDTA、10 mM EGTA、pH 7.0に再浮遊させる。これは不溶性物質の懸濁物である（粗抽出2）。

EDTAを1 mMのサンプルBに加え、震盪または攪拌しながら室温で5-10分インキュベートする。4℃で遠心し、上清をすべて除去し、ペレットを10 mlの氷冷5 mM硫酸マグネシウムに再浮遊させる。氷浴で10分震盪または攪拌する。上清は冷浸透圧ショック液である。

5 μ lの $2 \times$ SDS-PAGEサンプル緩衝液を5 μ lの粗抽出物1および2に加え、さらに10 μ lの $2 \times$ SDS-PAGEサンプル緩衝液を10 μ lの冷浸透圧ショック液に加える。これらのサンプルを、未誘発および誘発サンプルとともに5分間煮沸する。微量遠心機で2分遠心する。20 μ lの未誘発および誘発細胞サンプル並びに全抽出サンプルを10% SDS-PAGEゲルに添加する。上記サンプルの1:5希釈を用いる全く同じSDS-PAGEゲルもまた用いることができる。続いてウェスタンブロットを実施し、抗MBP血清またはクローニングしたGP111a部分に特異的な血清で展開し、所望のエピトープを含む抽出物を同定する。

C. MBP融合蛋白の精製

（1）架橋アミロース樹脂の調製

300 mlの樹脂用には、10 gのアミロース（シグマ、カタログ番号A-7043）、40 mlのH₂O、および1000 mlビーカーに入れた攪拌バーを用意し、攪拌しながら50℃に温める。換気フード中で60 mlの5 N NaOHを加え、続いて激しく攪拌しながら

30 mlのエピクロロヒドリン（シグマ、カタログ番号E-4255）を加える。この懸濁物はゲル化に際して発熱するであろう。懸濁物が固体ゲルを形成し微かに黄色となるまで、約10分攪拌を続ける。室温まで冷却し（約45分から1時間）、続いてゲルを切って細片にし、1000 mlのH₂Oで3回洗浄する。ゲルをウェアリングミキサーに移し、約3から5秒間ゲルを砕く。1000 mlの50 mMグリセリン-塩酸、0.5 M NaCl、pH 2.0で2回洗浄し、洗浄の間に微粒子を排除する。

水で3回洗浄し（微粒子は排除し続ける）、続いて10 mM 燐酸ナトリウム、pH 7.0で3回洗浄する。10 mMの燐酸ナトリウム、0.02%のアジ化ナトリウム、pH 7.0にゲルを懸濁させ、4℃で保存する。樹脂上の非特異的部位を1000 mlの3%無脂肪ドライミルクで4℃で一晩ブロックする。

10

(2) アフィニティークロマトグラフィー

以下はMBP融合蛋白の大規模精製のプロトコルである。

1リットルの高栄養ブロス、グルコースおよびアンピシリン（1リットルにつき10 gトリプトン、5 g酵母エキストラクト、5 g NaCl、1 gグルコース、加圧滅菌しアンピシリンを100 μg/mlに加える）に、所望のMBP融合蛋白を発現しているプラスミドを含む形質転換大腸菌細胞を接種する。2×10⁸細胞/ml（A₆₀₀は0.4）まで増殖させる。IPTGを最終濃度0.3 mMで加える（例えば0.1 Mのストック水溶液の85 mgまたは3 ml）。形質転換大腸菌細胞を発現が生じるために十分な時間（例えば1から3時間）37℃でインキュベートする。

4000×gで遠心して細胞を採集し、50 mlの10 mM 燐酸ナトリウム、30 mM NaCl、0.2% トゥイーン20、10 mM EDTA、10 mM EGTA（シグマ、カタログ番号E-4378）、pH 7.0に再浮遊させる。この再浮遊サンプルをドライアイス-エタノール浴で凍結し（または約20℃で18時間）、冷水で融解させる。超音波処理し、ブラッドフォード分析またはA₂₈₀を用いて蛋白遊離を測定し、それが最大に達するまで細胞破壊をモニターする。9000×g 30分遠心し、上清を採集し粗抽出物を形成する。

20

架橋アミロース樹脂をエーレンマイヤーフラスコに注ぎ入れ静置する。少なくとも等容量のカラム緩衝液+0.25% トゥイーン20で数分樹脂を洗浄する（カラム緩衝液=10 mM 燐酸ナトリウム、0.5 M NaCl、pH 7.0）。培養1リットルにつき約40から200 mlの樹脂をカラムに注ぎ入れ、カラムを同じ緩衝液の3カラム容量で洗浄する。

30

粗抽出物をカラム緩衝液+0.25% トゥイーン20で1:5に希釈する。希釈粗抽出物を、 $[10 \times (\text{カラム直径 (cm)})^2] \text{ ml} / \text{時間の流速}$ で添加する。これは、2.5 cmカラムで約1 ml/分である。粗抽出物の希釈は、蛋白濃度を約2.5 mg/mlに減少させることを目的とする。大雑把には、細胞湿潤重量1 gは約120 mg 蛋白に当たる。

すべてのMBP融合ポリペプチドがカラムに結合したことを確信するために、粗抽出物を2回カラムに通すが、殆どの場合、結合能力のあるMBP融合ポリペプチドは全て第一回のカラム通過でカラムに結合する。融合ポリペプチドはまた、粗抽出物と樹脂を4℃で2から76時間穏やかに攪拌しながらインキュベートすることによってバッチ式で樹脂に添加することができる。3カラム容量のカラム緩衝液+0.25% トゥイーン20で洗浄し、続いてトゥイーン20を含まない5カラム容量のカラム緩衝液で洗浄する。

40

融合ポリペプチドを10 mM 燐酸ナトリウム、0.5 M NaCl、10 mM マルトース、pH 7.0で溶出させる。10から20分画（各々はカラム容量の1/5から1/10である）を採集し、該分画を蛋白について、例えばブラッドフォード分析またはA₂₈₀を用いて分析する（MBP融合ポリペプチドを含む分画は容易に検出できる蛋白を有する）。MBP融合P1^{A1}またはP1^{A2}ポリペプチドは、カラムのボイドボリュームの後すぐに溶出する。蛋白含有分画をプールする。4×100容量の10 mM トリス-塩酸、100 mM NaCl、pH 8.0に対して透析し、マルトースを除去する。アミコン・セントリコンもしくはセントリプレッブ濃縮器、アミコン攪拌付き細胞濃縮器または同等物で濃縮す

50

る。MBPドメインがファクターXaでP1^{A1}またはP1^{A2}ポリペプチドから切断される場合、さらにアミロースアフィニティークロマトグラフィーでMBPを除去する。その後、所望のP1^{A1}またはP1^{A2}ポリペプチドを、例えばDEAEセファロースまたはモノ-QHPLCクロマトグラフィーのような標準的手段で精製することができる。

本発明は明確さと理解のために実施例によって詳細に説明したが、ある種の明白な修飾は添付の請求の範囲内で実施されうるであろう。

配列リスト

(1) 一般情報:

(i) 出願人: Ronald D. Bowditch

Robert McMillan

10

Mark H. Ginsberg

(ii) 発明の名称:

血小板GP1IIP1^{A1}およびP1^{A2}エпитープ、その製造および使用

(iii) 配列の総数: 32

(iv) 郵便物の宛先:

(A) 名宛人: Dressler, Goldsmith, Shore, Sutker & Milnamow, Ltd.

(B) 丁名: 180 North Stetson Avenue

(C) 町名: Chicago

(D) 州名: イリノイ

(E) 国名: アメリカ合衆国

20

(F) ジップコード: 60601

(v) コンピューター解読形式:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBMPCコンパチブル

(C) 演算システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフト: PatentIn Release #1.0, バージョン#1.25

(vi) 現在の出願状況:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

30

(viii) 代理人情報:

(A) 氏名: Edward P. Gamson

(B) 登録番号: 29381

(C) リファレンス/ドケット番号: SCRF276.0

(ix) 通信に関する情報:

(A) 電話: (312) 616-5418

(B) ファクシミリ: (312) 616-5460

(2) 配列番号: 1の情報:

(i) 配列の性状:

(A) 長さ: 65アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

40

(ii) 分子の種類: ペプチド

(ix) 特性:

(A) 名称/キー: 修飾部位

(B) 所在場所: 33

(D) 他の情報: /標識=Xaa

/註="Xaaはロイシンまたはプロリンである"。

(xi) 実際の配列: 配列番号: 1

Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro
 20 25 30
 Xaa Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn
 35 40 45
 Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu
 50 55 60
 Glu
 65

10

(2) 配列番号：2 の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：798 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..798

20

(xi) 実際の配列：配列番号：2

ATG	CGA	GCG	CGG	CCG	CGG	CCC	CGG	CCG	CTC	TGG	GTG	ACT	GTG	CTG	GCG	48	
Met	Arg	Ala	Arg	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Leu	Ala		
1				5					10					15			
CTG	GGG	GCG	CTG	GCG	GGC	GTT	GGC	GTA	GGA	GGG	CCC	AAC	ATC	TGT	ACC	96	
Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Gly	Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr		
			20					25					30				
ACG	CGA	GGT	GTG	AGC	TCC	TGC	CAG	CAG	TGC	CTG	GCT	GTG	AGC	CCC	ATG	144	
Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln	Cys	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met		
		35					40					45					
TGT	GCC	TGG	TGC	TCT	GAT	GAG	GCC	CTG	CCT	CTG	GGC	TCA	CCT	CGC	TGT	192	10
Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys		
	50					55					60						
GAC	CTG	AAG	GAG	AAT	CTG	CTG	AAG	GAT	AAC	TGT	GCC	CCA	GAA	TCC	ATC	240	
Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile		
65					70				75						80		
GAG	TTC	CCA	GTG	AGT	GAG	GCC	CGA	GTA	CTA	GAG	GAC	AGG	CCC	CTC	AGC	288	
Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser		
				85					90					95			
GAC	AAG	GGC	TCT	GGA	GAC	AGC	TCC	CAG	GTC	ACT	CAA	GTC	AGT	CCC	CAG	336	
Asp	Lys	Gly	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Gln		
			100					105					110				
AGG	ATT	GCA	CTC	CGG	CTC	CGG	CCA	GAT	GAT	TCG	AAG	AAT	TTC	TCC	ATC	384	20
Arg	Ile	Ala	Leu	Arg	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ile		
		115					120					125					
CAA	GTG	CGG	CAG	GTG	GAG	GAT	TAC	CCT	GTG	GAC	ATC	TAC	TAC	TTG	ATG	432	
Gln	Val	Arg	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met		
	130					135					140						
GAC	CTG	TCT	TAC	TCC	ATG	AAG	GAT	GAT	CTG	TGG	AGC	ATC	CAG	AAC	CTG	480	
Asp	Leu	Ser	Tyr	Ser	Met	Lys	Asp	Asp	Leu	Trp	Ser	Ile	Gln	Asn	Leu		
145					150					155					160		
GGT	ACC	AAG	CTG	GCC	ACC	CAG	ATG	CGA	AAG	CTC	ACC	AGT	AAC	CTG	CGG	528	30
Gly	Thr	Lys	Leu	Ala	Thr	Gln	Met	Arg	Lys	Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Arg		
				165					170					175			
ATT	GGC	TTC	GGG	GCA	TTT	GTG	GAC	AAG	CCT	GTG	TCA	CCA	TAC	ATG	TAT	576	
Ile	Gly	Phe	Gly	Ala	Phe	Val	Asp	Lys	Pro	Val	Ser	Pro	Tyr	Met	Tyr		
			180					185					190				
ATC	TCC	CCA	CCA	GAG	GCC	CTC	GAA	AAC	CCC	TGC	TAT	GAT	ATG	AAG	ACC	624	
Ile	Ser	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Pro	Cys	Tyr	Asp	Met	Lys	Thr		
		195					200					205					
ACC	TGC	TTG	CCC	ATG	TTT	GGC	TAC	AAA	CAC	GTG	CTG	ACG	CTA	ACT	GAC	672	
Thr	Cys	Leu	Pro	Met	Phe	Gly	Tyr	Lys	His	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asp		
	210					215					220						40
CAG	GTG	ACC	CGC	TTC	AAT	GAG	GAA	GTG	AAG	AAG	CAG	AGT	GTG	TCA	CGG	720	
Gln	Val	Thr	Arg	Phe	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Gln	Ser	Val	Ser	Arg		
225					230					235					240		
AAC	CGA	GAT	GCC	CCA	GAG	GGT	GGC	TTT	GAT	GCC	ATC	ATG	CAG	GCT	ACA	768	
Asn	Arg	Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	Gln	Ala	Thr		
				245					250					255			
GTC	TGT	GAT	GAA	AAG	ATT	GGC	TGG	AGG	AAT							798	
Val	Cys	Asp	Glu	Lys	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn								
			260					265									

(2) 配列番号: 3 の情報:

(i) 配列の性状:

(A) 長さ：266 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(i i) 分子の種類：ペプチド

(x i) 実際の配列：配列番号：3

```

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1           5           10           15

Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
          20           25           30

Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
          35           40           45

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
          50           55           60

Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
          65           70           75           80

Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
          85           90           95

Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
          100          105          110

Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
          115          120          125

Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
          130          135          140

Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
          145          150          155          160

Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg
          165          170          175

Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr
          180          185          190

Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr
          195          200          205

Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp
          210          215          220

Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg
          225          230          235          240

Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr
          245          250          255

Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn
          260          265

```

(2) 配列番号：4 の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：798 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(i i) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(i x) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1.. 798

(x i) 実際の配列：配列番号：4

ATG CGA GCG CGG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48	
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala		
1 5 10 15		
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr		
20 25 30		
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144	10
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met		
35 40 45		
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CCG GGC TCA CCT CGC TGT	192	
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys		
50 55 60		
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile		
65 70 75 80		
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC	288	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser		
85 90 95		
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG	336	20
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln		
100 105 110		
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC	384	
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile		
115 120 125		
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC ATC TAC TAC TTG ATG	432	
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met		
130 135 140		
GAC CTG TCT TAC TCC ATG AAG GAT GAT CTG TGG AGC ATC CAG AAC CTG	480	30
Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu		
145 150 155 160		
GGT ACC AAG CTG GCC ACC CAG ATG CGA AAG CTC ACC AGT AAC CTG CGG	528	
Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg		
165 170 175		
ATT GGC TTC GGG GCA TTT GTG GAC AAG CCT GTG TCA CCA TAC ATG TAT	576	
Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr		
180 185 190		
ATC TCC CCA CCA GAG GCC CTC GAA AAC CCC TGC TAT GAT ATG AAG ACC	624	
Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr		
195 200 205		
ACC TGC TTG CCC ATG TTT GGC TAC AAA CAC GTG CTG ACG CTA ACT GAC	672	40
Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp		
210 215 220		
CAG GTG ACC CGC TTC AAT GAG GAA GTG AAG AAG CAG AGT GTG TCA CGG	720	
Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg		
225 230 235 240		
AAC CGA GAT GCC CCA GAG GGT GGC TTT GAT GCC ATC ATG CAG GCT ACA	768	
Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr		
245 250 255		
GTC TGT GAT GAA AAG ATT GGC TGG AGG AAT	798	
Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn		
260 265		

(2) 配列番号：5 の情報：

50

50

(A) 名称／キー：C D S

(B) 所在場所：1 . . 1 9 5

(x i) 実際の配列：配列番号：6

GGG CCC AAC ATC TGT ACC ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC	48
Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys	
1 5 10 15	
CTG GCT GTG AGC CCC ATG TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT	96
Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro	
20 25 30	
CTG GGC TCA CCT CGC TGT GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC	144
Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn	10
35 40 45	
TGT GCC CCA GAA TCC ATC GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA	192
Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu	
50 55 60	
GAG	
Glu	195
65	

(2) 配列番号：7 の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：6 5 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(i i) 分子の種類：蛋白

(x i) 実際の配列：配列番号：7

Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys	
1 5 10 15	
Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro	
20 25 30	
Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn	
35 40 45	
Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu	30
50 55 60	
Glu	
65	

(2) 配列番号：8 の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：1 9 5 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(i i) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(i x) 特徴：

(A) 名称／キー：C D S

(B) 所在場所：1 . . 1 9 5

(x i) 実際の配列：配列番号：8

20

30

40

GGG	CCC	AAC	ATC	TGT	ACC	ACG	CGA	GGT	GTG	AGC	TCC	TGC	CAG	CAG	TGC	48
Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln	Cys	
1				5					10					15		
CTG	GCT	GTG	AGC	CCC	ATG	TGT	GCC	TGG	TGC	TCT	GAT	GAG	GCC	CTG	CCT	96
Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Pro	
			20					25					30			
CCG	GGC	TCA	CCT	CGC	TGT	GAC	CTG	AAG	GAG	AAT	CTG	CTG	AAG	GAT	AAC	144
Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	
		35					40					45				
TGT	GCC	CCA	GAA	TCC	ATC	GAG	TTC	CCA	GTG	AGT	GAG	GCC	CGA	GTA	CTA	192
Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	
	50					55					60					10
GAG																
Glu																195
65																

(2) 配列番号：9の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：65アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：9

Gly	Pro	Asn	Ile	Cys	Thr	Thr	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Cys	Gln	Gln	Cys	20
1				5					10					15		
Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Met	Cys	Ala	Trp	Cys	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Pro	
			20					25					30			
Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	
		35					40					45				
Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	
	50					55					60					
Glu																30
65																

(2) 配列番号：10の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：273塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..273

(xi) 実際の配列：配列番号：10

10

20

30

40

ATG CGA GCG CCG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala	
1 5 10 15	
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr	
20 25 30	
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met	
35 40 45	
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CTG GGC TCA CCT CGC TGT	192
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys	10
50 55 60	
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile	
65 70 75 80	
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG	273
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu	
85 90	

(2) 配列番号：1 1 の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：91 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：1 1

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala	
1 5 10 15	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr	
20 25 30	
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met	
35 40 45	
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys	
50 55 60	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile	
65 70 75 80	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu	
85 90	

(2) 配列番号：1 2 の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：417 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1.. 417

(xi) 実際の配列：配列番号：1 2

20

30

40

ATG CGA GCG CGG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala 1 5 10 15	48
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr 20 25 30	96
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met 35 40 45	144
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CTG GGC TCA CCT CGC TGT Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys 50 55 60	192
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC Asp Leu Lys Glu Asn Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile 65 70 75 80	240
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser 85 90 95	288
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln 100 105 110	336
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile 115 120 125	384
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp 130 135	417

(2) 配列番号：13の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：139アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：13

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala 1 5 10 15	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr 20 25 30	
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met 35 40 45	
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys 50 55 60	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile 65 70 75 80	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser 85 90 95	
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln 100 105 110	
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile 115 120 125	
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp 130 135	

10

20

30

40

50

(2) 配列番号：14の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：447塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1...447

10

(xi) 実際の配列：配列番号：14

ATG CGA GCG CGG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala	
1 5 10 15	
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr	
20 25 30	
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met	
35 40 45	
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CTG GGC TCA CCT CGC TGT	192
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys	
50 55 60	
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile	
65 70 75 80	
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC	288
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser	
85 90 95	
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG	336
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln	
100 105 110	
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC	384
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile	
115 120 125	
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC ATC TAC TAC TTG ATG	432
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met	
130 135 140	
GAC CTG TCT TAC TCC	447
Asp Leu Ser Tyr Ser	
145	

(2) 配列番号：15の情報：

40

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：149アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：15

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140

Asp Leu Ser Tyr Ser
145

(2) 配列番号：16の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：450塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1...450

(xi) 実際の配列：配列番号：16

10

20

30

ATG CGA GCG CGG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48	
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala		
1 5 10 15		
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr		
20 25 30		
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144	
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met		
35 40 45		
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CTG GGC TCA CCT CGC TGT	192	10
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys		
50 55 60		
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile		
65 70 75 80		
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC	288	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser		
85 90 95		
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG	336	
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln		
100 105 110		
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC	384	20
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile		
115 120 125		
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC ATC TAC TAC TTG ATG	432	
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met		
130 135 140		
GAC CTG TCT TAC TCC ATG	450	
Asp Leu Ser Tyr Ser Met		
145 150		

(2) 配列番号：17の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：150アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：17

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Tyr Ser Met
 145 150

10

20

(2) 配列番号：18の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：492塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..492

(xi) 実際の配列：配列番号：18

30

ATG CGA GCG CCG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48	
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala		
1 5 10 15		
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr		
20 25 30		
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144	
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met		
35 40 45		
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CTG GGC TCA CCT CGC TGT	192	10
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys		
50 55 60		
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile		
65 70 75 80		
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC	288	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser		
85 90 95		
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG	336	
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln		
100 105 110		
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC	384	20
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile		
115 120 125		
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC ATC TAC TAC TTG ATG	432	
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met		
130 135 140		
GAC CTG TCT TAC TCC ATG AAG GAT GAT CTG TGG AGC ATC CAG AAC CTG	480	
Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu		
145 150 155 160		
GGT ACC AAG CTG	492	30
Gly Thr Lys Leu		

(2) 配列番号：19の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ164アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：19

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
 145 150 155 160

10

20

Gly Thr Lys Leu

(2) 配列番号: 20 の情報:

(i) 配列の性状:

(A) 長さ: 273 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(i i) 分子の種類: DNA (ゲノム性)

(i x) 特徴:

(A) 名称/キー: CDS

(B) 所在場所: 1.. 273

(x i) 実際の配列: 配列番号: 20

ATG CGA GCG CCG CCG CCG CCC CCG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG 48
 Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC 96
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG 144
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CCG GGC TCA CCT CGC TGT 192
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC 240
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG 273
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu
 85 90

30

40

50

(2) 配列番号：21の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：91アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：21

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
20 25 30

Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
35 40 45

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys
50 55 60

Asp Leu Lys Glu Asn Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
65 70 75 80

Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu
85 90

(2) 配列番号：22の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：417塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..417

(xi) 実際の配列：配列番号：22

10

20

30

ATG CGA GCG CGG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48	
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala		
1 5 10 15		
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr		
20 25 30		
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144	
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met		
35 40 45		
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CCG GGC TCA CCT CGC TGT	192	10
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys		
50 55 60		
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile		
65 70 75 80		
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC	288	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser		
85 90 95		
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG	336	
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln		
100 105 110		
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC	384	20
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile		
115 120 125		
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC	417	
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp		
130 135		

(2) 配列番号：23の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：139アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：23

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp
 130 135

10

(2) 配列番号：24の情報：

20

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：447塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..447

(xi) 実際の配列：配列番号：24

30

ATG Met 1	CGA Arg	GCG Ala	CGG Arg	CCG Pro 5	CGG Arg	CCC Pro	CGG Arg	CCG Pro	CTC Leu 10	TGG Trp	GTG Val	ACT Thr	GTG Val	CTG Leu 15	GCG Ala	48	
CTG Leu	GGG Gly	GCG Ala	CTG Leu 20	GCG Ala	GGC Gly	GTT Val	GGC Gly	GTA Val 25	GGA Gly	GGG Gly	CCC Pro	AAC Asn	ATC Ile 30	TGT Cys	ACC Thr	96	
ACG Thr	CGA Arg	GGT Gly 35	GTG Val	AGC Ser	TCC Ser	TGC Cys	CAG Gln 40	CAG Gln	TGC Cys	CTG Leu	GCT Ala	GTG Val 45	AGC Ser	CCC Pro	ATG Met	144	
TGT Cys 50	GCC Ala	TGG Trp	TGC Cys	TCT Ser	GAT Asp	GAG Glu 55	GCC Ala	CTG Leu	CCT Pro	CCG Pro	GGC Gly 60	TCA Ser	CCT Pro	CGC Arg	TGT Cys	192	10
GAC Asp 65	CTG Leu	AAG Lys	GAG Glu	AAT Asn 70	CTG Leu	CTG Leu	AAG Lys	GAT Asp	AAC Asn	TGT Cys 75	GCC Ala	CCA Pro	GAA Glu	TCC Ser	ATC Ile 80	240	
GAG Glu	TTC Phe	CCA Pro	GTG Val	AGT Ser 85	GAG Glu	GCC Ala	CGA Arg	GTA Val 90	CTA Leu	GAG Glu	GAC Asp	AGG Arg	CCC Pro	CTC Leu 95	AGC Ser	288	
GAC Asp	AAG Lys	GGC Gly	TCT Ser 100	GGA Gly	GAC Asp	AGC Ser	TCC Ser	CAG Gln 105	GTC Val	ACT Thr	CAA Gln	GTC Val 110	AGT Ser	CCC Pro	CAG Gln	336	
AGG Arg	ATT Ile 115	GCA Ala	CTC Leu	CGG Arg	CTC Leu	CGG Arg	CCA Pro 120	GAT Asp	GAT Asp	TCG Ser	AAG Lys	AAT Asn 125	TTC Phe	TCC Ser	ATC Ile	384	20
CAA Gln 130	GTG Val	CGG Arg	CAG Gln	GTG Val	GAG Glu	GAT Asp 135	TAC Tyr	CCT Pro	GTG Val	GAC Asp	ATC Ile 140	TAC Tyr	TAC Tyr	TTG Leu	ATG Met	432	
GAC Asp 145	CTG Leu	TCT Ser	TAC Tyr	TCC Ser												447	

(2) 配列番号：25の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：149アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：25

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Tyr Ser
 145

10

20

(2) 配列番号：26の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：450塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..450

(xi) 実際の配列：配列番号：26

30

ATG Met 1	CGA Arg	GCG Ala	CGG Arg	CCG Pro 5	CGG Arg	CCC Pro	CGG Arg	CCG Pro	CTC Leu 10	TGG Trp	GTG Val	ACT Thr	GTG Val	CTG Leu 15	GCG Ala	48	
CTG Leu	GGG Gly	GCG Ala	CTG Leu 20	GCG Ala	GGC Gly	GTT Val	GGC Gly	GTA Val 25	GGA Gly	GGG Gly	CCC Pro	AAC Asn	ATC Ile 30	TGT Cys	ACC Thr	96	
ACG Thr	CGA Arg	GGT Gly 35	GTG Val	AGC Ser	TCC Ser	TGC Cys	CAG Gln 40	CAG Gln	TGC Cys	CTG Leu	GCT Ala	GTG Val 45	AGC Ser	CCC Pro	ATG Met	144	
TGT Cys 50	GCC Ala	TGG Trp	TGC Cys	TCT Ser	GAT Asp	GAG Glu 55	GCC Ala	CTG Leu	CCT Pro	CCG Pro	GGC Gly 60	TCA Ser	CCT Pro	CGC Arg	TGT Cys	192	10
GAC Asp 65	CTG Leu	AAG Lys	GAG Glu	AAT Asn 70	CTG Leu	CTG Leu	AAG Lys	GAT Asp	AAC Asn	TGT Cys 75	GCC Ala	CCA Pro	GAA Glu	TCC Ser	ATC Ile 80	240	
GAG Glu	TTC Phe	CCA Pro	GTG Val	AGT Ser 85	GAG Glu	GCC Ala	CGA Arg	GTA Val	CTA Leu 90	GAG Glu	GAC Asp	AGG Arg	CCC Pro	CTC Leu 95	AGC Ser	288	
GAC Asp	AAG Lys	GGC Gly	TCT Ser 100	GGA Gly	GAC Asp	AGC Ser	TCC Ser	CAG Gln 105	GTC Val	ACT Thr	CAA Gln	GTC Val	AGT Ser 110	CCC Pro	CAG Gln	336	
AGG Arg	ATT Ile	GCA Ala 115	CTC Leu	CGG Arg	CTC Leu	CGG Arg	CCA Pro 120	GAT Asp	GAT Asp	TCG Ser	AAG Lys	AAT Asn 125	TTC Phe	TCC Ser	ATC Ile	384	20
CAA Gln 130	GTG Val	CGG Arg	CAG Gln	GTG Val	GAG Glu	GAT Asp 135	TAC Tyr	CCT Pro	GTG Val	GAC Asp	ATC Ile 140	TAC Tyr	TAC Tyr	TTG Leu	ATG Met	432	
GAC Asp 145	CTG Leu	TCT Ser	TAC Tyr	TCC Ser	ATG Met 150											450	

(2) 配列番号：27の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：150アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：27

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Tyr Ser Met
 145 150

10

20

(2) 配列番号：28の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：492塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：1..492

(xi) 実際の配列：配列番号：28

30

ATG CGA GCG CGG CCG CGG CCC CGG CCG CTC TGG GTG ACT GTG CTG GCG	48	
Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala		
1 5 10 15		
CTG GGG GCG CTG GCG GGC GTT GGC GTA GGA GGG CCC AAC ATC TGT ACC	96	
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr		
20 25 30		
ACG CGA GGT GTG AGC TCC TGC CAG CAG TGC CTG GCT GTG AGC CCC ATG	144	
Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met		
35 40 45		
TGT GCC TGG TGC TCT GAT GAG GCC CTG CCT CCG GGC TCA CCT CGC TGT	192	10
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys		
50 55 60		
GAC CTG AAG GAG AAT CTG CTG AAG GAT AAC TGT GCC CCA GAA TCC ATC	240	
Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile		
65 70 75 80		
GAG TTC CCA GTG AGT GAG GCC CGA GTA CTA GAG GAC AGG CCC CTC AGC	288	
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser		
85 90 95		
GAC AAG GGC TCT GGA GAC AGC TCC CAG GTC ACT CAA GTC AGT CCC CAG	336	
Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln		
100 105 110		
AGG ATT GCA CTC CGG CTC CGG CCA GAT GAT TCG AAG AAT TTC TCC ATC	384	20
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile		
115 120 125		
CAA GTG CGG CAG GTG GAG GAT TAC CCT GTG GAC ATC TAC TAC TTG ATG	432	
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met		
130 135 140		
GAC CTG TCT TAC TCC ATG AAG GAT GAT CTG TGG AGC ATC CAG AAC CTG	480	
Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu		
145 150 155 160		
GGT ACC AAG CTG	492	30
Gly Thr Lys Leu		

(2) 配列番号：29の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：164アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

(xi) 実際の配列：配列番号：29

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Val Thr Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
 35 40 45
 Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Pro Gly Ser Pro Arg Cys
 50 55 60
 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
 145 150 155 160

Gly Thr Lys Leu

(2) 配列番号：30の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：8塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(xi) 実際の配列：配列番号：30

GGTCGACC

(2) 配列番号：31の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：24塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(xi) 実際の配列：配列番号：31

GGTGAGCCCCG GAGGCAGGGC CTCA

24

(2) 配列番号：32の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：57塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：DNA (ゲノム性)

(xi) 実際の配列：配列番号：33

ATCGAGGGAA GGATTTTCTAGA ATTCGGATCC TCTAGAGTCG ACCTGCAGGC AAGCTTG 57

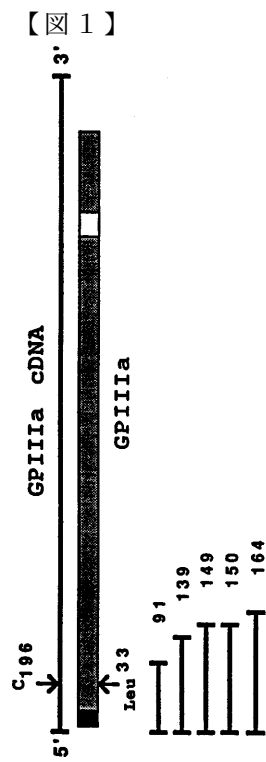


FIGURE 1

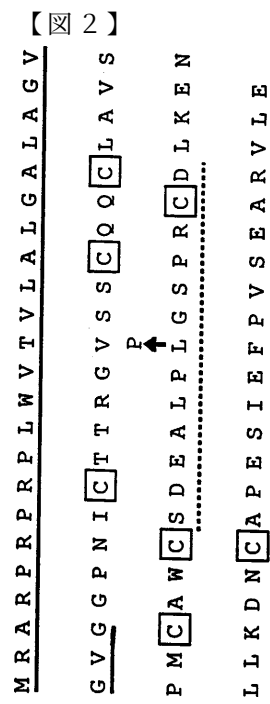


FIGURE 2

フロントページの続き

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(72)発明者 バウディッチ ロナルド ディー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92024 エンシニタス サード ストリート 810

(72)発明者 マックミラン ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92014 デル マー トゥエルヴス ストリート 203

(72)発明者 ギンズバーグ マーク エイチ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ レノールト プレイス 2944

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 鵜飼 健

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第90/12593 (WO, A1)

1. Blood, Vol. 78, No. 3 (Aug. 1991) p. 681-687
2. Methods Enzymol., Vol. 185 (1990) p. 159-143
3. Molecular Immunology 22 (6) : 719-729 (1985)
4. Blood, Vol. 77, No. 9 (1991) p. 1964-1969
5. J Clin Invest. 1989 Jul; 84 (1) : 56-61
6. Proc Natl Acad Sci USA. 1986 Sep; 83 (18) : 7013-7017
7. Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Jun; 81 (12) : 3675-3679