



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 15/10, 5/16 //, C12P 21/02		A1	(11) 国際公開番号 WO 92/12244
		(43) 国際公開日 1992年7月23日 (23. 07. 1992)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01779 (22) 国際出願日 1991年12月27日 (27. 12. 91)		(81) 指定国 CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), SE (欧州特許), US.	
(30) 優先権データ 特願平2/407119 1990年12月27日 (27. 12. 90) JP 特願平2/407945 1990年12月27日 (27. 12. 90) JP		添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 本田善一郎 (HONDA, Zen-ichiro) [JP/JP] 〒112 東京都文京区小日向3-11-5-301 Tokyo, (JP) 清水孝雄 (SHIMIZU, Takao) [JP/JP] 〒167 東京都杉並区荻窪5-9-16-102 Tokyo, (JP) 中村元直 (NAKAMURA, Motonao) [JP/JP] 〒227 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本たばこ産業株式会社 生命科学研究所内 Kanagawa, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 鈴江武彦, 外 (SUZUYE, Takehiko et al.) 〒100 東京都千代田区霞が関3丁目7番2号 鈴榮内外國特許事務所内 Tokyo, (JP)			

(54) Title : GENES WHICH CODE FOR GUINEA PIG AND HUMAN PLATELET ACTIVATING FACTOR RECEPTORS

(54) 発明の名称 モルモット血小板活性化因子受容体およびヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子

ATG GAG TTA AAC AGC TCT TCC CGG GTG GAT TCT GAG TTT CGA TAC ACA CTC TTC CCA ATT
 GTT TAC AGC ATT ATC TTT GTG CTG GGG ATC ATC GCC AAT GGC TAT GTG CTA TGG GTC TTT
 GCC CGC CTA TAC CCT TCC AAG AAA CTA AAT GAG ATA AAG ATC TTC ATG GTG AAC CTC ACG
 GTG GCT GAC CTG CTC TTC CTG ATC ACC TTG CCT CTG TGG ATC GTC TAC TAT TCC AAC CAG
 GGC AAC TGG TTT CTA CCC AAA TTC CTT TGT AAC CTG GCT GGC TGC CTC TTC ATC AAC
 ACC TAC TGC TCT GTG GCC TTC CTG GGA GTG ATC ACC TAT AAC CGC TTC CAG GCA GTG AAA
 TAT CCC ATC AAG ACT GCT CAG GCC ACC ACC CGC AAG CGA GGC ATC GCT TTG TCC TTG GTC
 ATC TGG GTG GCC ATT GTG GCT GCT GCA TCT TAC TTC CTT GTC ATG GAC TCC ACC AAC GTA
 GTG TCC AAT AAG GCA GGC TCG GGC AAC ATT ACT CGT TGC TTT GAG CAC TAT GAG AAG GGC
 AGC AAG CCT GTC CTC ATC ATC CAT AGC TGC ATT GTG CTC GGC TTC TTC ATT GTC TTC CTT
 CTC ATC CTC TTC TGC AAC CTG GTC ATC ATC CAC ACG CTG CTC AGG CAG CCA GTG AAG CAG
 CAG CGC AAT GCT GAG GTC AGG CGC CGA GCG CTG TGG ATG GTT TGC ACG GTT CTG GCA GTG
 TTT GTC ATC TGC TTT GTA CCA CAC CAC ATG GTA CAG CTG CCC TGG ACC CTG GCT GAG CTG
 GGG ATG TGG CCA AGC AGC AAC CAC CAG GCT ATT AAT GAT GCA CAT CAG GTC ACC CTC TGC
 CTC CTT AGC ACC AAC TGT GTC TTA GAC CCT GTC ATC TAC TGT TTC CTC ACC AAG AAG TTC
 CGC AAG CAC CTC ACG CAA AAG CTT AAT ATC ATG CGC AGC AGC CAG AAA TGC TCC CGG GTC
 ACC ACT GAC ACA GGC ACT GAA ATG GCC ATT CCA ATC AAC CAC ACT CCT GTC AAT CCC ATC
 AAA AAT NNN

(57) Abstract

The base sequence of a gene coding for a platelet activating factor receptor, which is important as a chemical mediator relating to diseases such as allergy or inflammation, has been determined with respect to each of guinea pig and man. Cell transformation has been conducted by using a recombinant DNA wherein genes coding for these receptors were introduced.

(57) 要約

アレルギー、炎症などの病体に関するケミカルメディエーターとして重要視されている血小板活性化因子の受容体をコードする遺伝子の塩基配列を、モルモットおよびヒトについて決定した。また、これらの血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子を導入した組換えDNAを作製し、この組換えDNAを用いて細胞の形質転換を行なった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナファソ	GN	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SD	スーダン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CH	スイス	KR	大韓民国	SN	セネガル
CI	コート・ジボワール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴェエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルク	TG	トーゴ
DE	ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

明 細 書

モルモット血小板活性化因子受容体および
ヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子

技術分野

この発明は血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子、特に、モルモット血小板活性化因子受容体およびヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子に関する。

背景技術

血小板活性化因子 (Platelet-activating factor、以下 PAF と略記する) は、新しいタイプの脂質メディエーターであり、最初ウサギ好塩基球由来の血小板凝集因子 (ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン 136 巻 1356 頁 (1972))、および腎髄質に存在する降圧物質 (ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション 39 巻

266 頁 (1960)) として認識された。この PAF は、現在ではアレルギー、炎症などの病態に関するケミカルメディエーターとして非常に重要視されている。代表的な生理活性として血小板、好中球、単球などの活性化、好酸球の遊走性、血管透過性促進、降圧、気管支収縮、胃や小腸の虚血性壊死などが挙げられる。いずれの作用も PAF を特異的に認識する受容体が細胞あるいは組織に存在し、そこに PAF が結合することにより引き起こされると考えられる。しかし、PAF

は極めて疎水性が強く、容易に脂質二重層に侵入するため受容体結合実験は難しく、受容体の精製も非常に困難である。また、現在 P A F 受容体は情報伝達の際、G T P 結合タンパク質と共役することがわかっているが、受容体遺伝子のクローニングは報告されていない。したがって、P A F 受容体を高発現する形質転換細胞を作り、有用なアゴニスト、アンタゴニストの開発や P A F 定量法の確立を行なうことも不可能であった。

上述のように、P A F 受容体の結合実験や精製は非常に困難であるため、有効なアゴニスト、アンタゴニストの開発は遅れている。したがって、今後これらの開発、およびアレルギー、炎症などのメカニズムの解明においては、P A F 受容体を発現する遺伝子を決定し、P A F 受容体を高発現する形質転換細胞を形成することが必要不可欠である。

発明の開示

この発明、モルモット P A F 受容体をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

また、この発明は、ヒト P A F 受容体をコードする遺伝子を提供することをも目的とする。

本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、モルモット P A F 受容体およびヒト P A F 受容体のアミノ酸配列を初めて決定し、これをコードする遺伝子 (c D N A) を調製した。

モルモット P A F 受容体は、第 1 図に示すアミノ酸配列を

有する。この発明による遺伝子（cDNA）は、このモルモット PAF 受容体をコードするものであり、第 2 図に示す塩基配列を有する。

第 2 図に示す配列から明らかなように、この cDNA は、塩基番号 1 から塩基番号 1029 の合計 1029 塩基対からなる。塩基番号 1 から 3 は翻訳開始遺伝暗号に相当し、塩基番号 1027 から 1029 までは翻訳停止遺伝暗号に相当する。なお、第 2 図に示す塩基配列において、塩基番号 1027 から 1029 の NNN は、TGA, TAA または TAG のいずれでもよい。また、翻訳開始暗号および翻訳停止暗号は任意の塩基対と結合することができる。この塩基対の種類および数は重要ではなく、バクテリア等が有する核外遺伝子と連結するための適当な塩基対であればよい。例えば、翻訳開始暗号は第 3 図に示す塩基配列を有する塩基対と、翻訳停止暗号は第 4 図に示す塩基配列を有する塩基対と、それぞれ結合することができる。

また、ヒト PAF 受容体は、第 5 図に示すアミノ酸配列を有する。この発明による他の遺伝子（cDNA）は、このヒト PAF 受容体をコードするものであり、第 6 図に示す塩基配列を有する。

第 6 図に示す配列から明らかなように、この cDNA は、塩基番号 1 から塩基番号 1029 の合計 1029 塩基対からなる。塩基番号 1 から 3 は翻訳開始遺伝暗号に相当し、塩基番号 1027 から 1029 までは翻訳停止遺伝暗号に相当する。なお、第 6 図に示す塩基配列において、塩基番号 1027 ないし 1029 の NNN は、TGA, TAA または TAG のいずれでもよい。また、

翻訳開始暗号および翻訳停止暗号は、それぞれ任意の塩基対と結合することができる。この塩基対の種類および数は重要ではなく、バクテリア等の核外遺伝子と連結するための適当な塩基対であればよい。例えば、翻訳開始暗号は第7図に示す塩基配列を有する塩基対と、翻訳停止暗号は第8図に示す塩基配列を有する塩基対と、それぞれ結合することができる。

この発明によるモルモット P A F 受容体をコードする遺伝子 (c D N A) は、モルモット肺 m R N A 由来の c D N A ライブラリーから、例えばアフリカツメガエル卵母細胞を用いた遺伝子発現系を利用し、受容体遺伝子の発現を電気生理学的に検知する方法で得ることができる。すなわちライブラリー内の c D N A を鋳型にしてイン・ビトロで R N A を合成し、これを卵母細胞にマイクロインジェクトして細胞内で翻訳させる。もし、マイクロインジェクトした R N A の中に目的とする P A F 受容体をコードするものが存在すれば、それを翻訳した卵母細胞は P A F 受容体を発現し、P A F に触れることにより、P A F 受容体と G T P 結合タンパク質の共役→ホスホリパーゼ C の活性化→ $I P_3$ の上昇→ $C a^{2+}$ の上昇という情報伝達の後、最終的に $C l^{-}$ チャンネルが開く。

このチャンネルの開きは、電気生理学的手法 (ボルテージ・クランプ (voltage clamp) 法) により、膜電流の変化という形で検知できる。仮に、ファージライブラリー内の

6×10^4 個の c D N A を鋳型にして P A F 受容体遺伝子の存在を示唆する上記レスポンスが得られたとすると、これを順次分割して上記検定を繰り返すことにより最終的に 1 つの目

的とするクローンを得ることができる。

こうして得られた cDNA は、次に、適当なベクター（プラスミド、ファージ等）に挿入し、これを宿主となるバクテリア中に導入して大量に生産させることができる。

なお、この発明によるモルモット PAF 受容体をコードする遺伝子を得るための cDNA ライブラリーはモルモット由来で PAF 受容体結合活性のある臓器に由来するものであれば、いずれのものでもよい。例えば、モルモット白血球 cDNA ライブラリーやモルモット腎臓 cDNA ライブラリーを用いることができる。

このようにして、モルモット PAF 受容体を作るために必要な全ての遺伝情報を持つこの発明の cDNA が得られる。

また、この発明によるヒト PAF 受容体をコードする遺伝子（cDNA）は、ヒト白血球 mRNA 由来の cDNA ライブラリーから、たとえばプローブハイブリダイゼーション法を利用して得ることができる。この方法によれば、すでに塩基配列がわかっている上記モルモット PAF 受容体遺伝子をプローブとして用い、cDNA ライブラリーからプローブと相補的な塩基配列を持つ DNA を得ることができる。

こうして得られた cDNA は、適当なベクター（プラスミド、ファージ等）に挿入し、これを宿主となるバクテリア中で大量に生産させることができる。

なお、この発明によるヒト PAF 受容体をコードする遺伝子を得るための cDNA ライブラリーはヒト由来で PAF 受容体結合活性のある臓器に由来するものであれば、いずれの

ものでもよい。例えば、ヒト肺 cDNA ライブラリーやヒト腎臓 cDNA ライブラリーを用いることができる。

このようにして、ヒト PAF 受容体を形成するために必要な全ての遺伝情報を有するこの発明の cDNA が得られる。

図面の簡単な説明

第 1 図は、モルモット PAF 受容体のアミノ酸配列を示す図、

第 2 図は、この発明によるモルモット PAF 受容体をコードする遺伝子の塩基配列を示す図、

第 3 図は、この発明によるモルモット PAF 受容体をコードする遺伝子の翻訳開始暗号が結合し得る塩基対の塩基配列を示す図、

第 4 図は、この発明によるモルモット PAF 受容体をコードする遺伝子の翻訳停止暗号が結合し得る塩基対の塩基配列を示す図、

第 5 図は、ヒト PAF 受容体のアミノ酸配列を示す図、

第 6 図は、この発明によるヒト PAF 受容体をコードする遺伝子の塩基配列を示す図、

第 7 図は、この発明によるヒト PAF 受容体をコードする遺伝子の翻訳開始暗号が結合し得る塩基対の塩基配列を示す図、

第 8 図は、この発明によるヒト PAF 受容体をコードする遺伝子の翻訳停止暗号が結合し得る塩基対の塩基配列を示す図、

第9図は、アフリカツメガエル卵母細胞にモルモット P A F 受容体遺伝子を含む 6×10^4 個のファージ群由来の R N A をマイクロインジェクトし、その発現をボルテージ・クランプ法により測定した結果を示す図、

第10図は、アフリカツメガエル卵母細胞に、単一化したモルモット P A F 受容体遺伝子を鋳型として合成した R N A をマイクロインジェクトし、その発現をボルテージ・クランプ法により測定した結果を示す図。

第11図は、C O S 細胞内発現用プラスミド p E U K P A F の構築の過程を示す図。

第12図は、プラスミド p E U K P A F を導入した C O S 7 細胞における P A F 受容体結合活性のデータを示す図。

第13図は、水をマイクロインジェクトしたアフリカツメガエル卵母細胞をボルテージ・クランプ法で測定した結果を示す図。

第14図は、クローン化したヒト P A F 受容体遺伝子を鋳型にして合成した R N A を、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクトし、その発現をボルテージ・クランプ法により測定した結果を示す図。

第15図は、C O S 細胞内発現用プラスミド p E U K h P A F の構築の過程を示す図。

第16図は、プラスミド p E U K h P A F を導入した C O S 7 細胞における P A F 受容体結合活性を示すグラフ。

発明を実施するための最良の形態

以下、この発明を実施例により説明する。もっとも、この発明は下記実施例に限定されるものではないことは明かである。なお、下記実施例において、各操作は、特に明示がない限り、マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング・ラボラトリーマニュアル 第2版 (1989) コールド・スプリング・ハーバー 記載の方法により行なった。また、制限酵素は市販のものを用い、その具体的使用法は市販品の指示書に従った。

実施例 1

この実施例においては、第2図に示す塩基配列を有する遺伝子に、塩基番号1の側に第3図に示す配列を有する塩基対、塩基番号1029の側に第4図に示す配列を有する塩基対がそれぞれ結合した塩基配列を有するDNAの製造法、およびこれを用いた形質転換体の作製を説明する。

(1) モルモット肺 mRNA の調製

ハートレー系モルモット、メス (約 350 g) 2匹から肺 (約 5 g) を取出し、ただちに凍結して、mRNA の分解を防いだ。この肺を液体窒素で冷却しながら、ハンマーで粉碎し、30 ml の GTC 緩衝液 (6M グアニジンチオシアネート, 5mM クエン酸ナトリウム, 17mM サルコシルナトリウム, 0.7 % β -メルカプトエタノール) を加えながらホモジナイズした。得られたホモジネートは、室温において 3,000 $\times$ g で 5分間遠心し、上清を別のチューブへ移した。このホモジネートの上清 25 ml を、0.1 M EDTA を含む 5.7M 塩化セシウムのクッション (8 ml) の上に重層し、日立 S

R P 28ローターを用いて、15℃において26,000×gで65時間遠心した。遠心後、褐色および茶褐色のタンパク質層、およびDNA層をアスピレーターで除去した。チューブの底に沈澱したRNAをTES緩衝液（100mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1% SDS, pH7.5）1mlに溶解し、フェノールクロロホルム（1：1）で抽出した。RNAを含む水層に、3M酢酸ナトリウム0.1ml、冷却したエタノール2mlを加え、RNAを沈澱させた。遠心分離により回収したRNAは、80%エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、滅菌蒸留水に溶解した。

次に、得られたRNA水溶液を、以下の手順でオリゴ（dT）セルロースカラムに通し、ポリ（A）を有するmRNAを分離した。すなわち、滅菌蒸留水に溶解したRNAに、2倍容の平衡化緩衝液（0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, pH7.6）を加え、65℃で5分間熱処理を施した後、予め平衡化緩衝液で平衡化したオリゴ（dT）セルロースカラムにかけ、10倍容の平衡化緩衝液で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液（20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.6）でmRNAを溶出して、エタノール沈澱により回収し、80%エタノールで洗浄後、真空乾燥し、滅菌蒸留水に溶解した。

次に、mRNAを以下の手順で5～30%ショ糖密度勾配遠心分離によりサイズ分画した。まず、5～30%のショ糖密度勾配をもつ溶液（10mM Tris-HCl 1mM EDTA, 0.1% SDS, pH7.5）に、65℃で5分間熱処理したRN

Aを約 150 μ g 重層し、日立 R P S 40 T ローターを用いて、15℃において、24,000 $\times$ g で、18時間遠心した。遠心後、0.4 ml ずつの画分に分画し、それぞれの画分からエタノール沈澱により、RNAを回収した。各画分の一部を 1%アガロースゲルで電気泳動して、18S rRNAを含む画分を同定し、それより大きい分子量のRNAを含む画分を用いて以下のcDNA合成を行なった。

(2) cDNAライブラリーの作製

調製したmRNAからのcDNA合成は、ファルマシア社から市販されているcDNA合成システムを用い、製品に添付されているプロトコールに従って行なった。すなわち、逆転写酵素によりmRNAに相補的なcDNAを合成した後、リボヌクレアーゼHで、RNA鎖にニックとギャップを入れ、これをT4DNAポリメラーゼを用いて修復合成することにより、RNA鎖をcDNA鎖に置換した。最後に、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントにより、cDNA鎖の両端を平滑化した。続いて、ストラテジーン社から市販されている λ ZAP IIライブラリーシステムを用いて、cDNAライブラリーを作製した。方法は、すべて製品に添付されているプロトコールに従って行なった。すなわち、まず、合成cDNAの両端にEcoRIアダプター(NotI siteを持たないもの)を付加し、これと予めEcoRIで切断処理が施されている λ ZAP IIアームとを連結した。その後、インビトロパッケージングを行ない、大腸菌XL1-Blue株(製品に付属)に感染させることにより、cDNAライブラ

リーを作製した。

(3) PAF受容体をコードするcDNAクローンの選抜

cDNAライブラリーからのPAF受容体遺伝子のスクリーニングには、サブスタンスK受容体遺伝子(ネイチャー、第329巻、836頁(1987))や、セロトニン1c受容体遺伝子(サイエンス、第241巻、558頁(1988))のクローニングと同様の方法、すなわちアフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系を利用する方法を採用した。

まず、ライブラリーを 6×10^4 個ずつのファージ群に分け、そこから常法通り、すなわちポリエチレングリコール沈澱、フェノール-クロロホルム(1:1)処理、数回のエタノール沈澱を行なうことによりファージDNAを調製した。このファージDNA(約 $10 \mu\text{g}$)は、T7プロモーターの下流に位置する*Not*Iサイトを切断後、イン・ビトロでのRNA合成のための鋳型とした。RNA合成は、0.5mM Cap-Aナログ 7-メチル-GpppG, 0.5mM ATP, 0.5mM UTP, 0.5mM CTP, 0.05mM GTPの存在下、40mM Tris-HCl (pH 7.9), $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, 10mM DTT, 6mM MgCl_2 , 2mM スペルミン, $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビターを含む反応液中で、10ユニットのT7 RNAポリメラーゼを37℃で60分間反応させることにより行った。反応後、フェノール-クロロホルム(1:1)処理、エタノール沈澱により合成RNAを回収し、最終的に $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるよう滅菌蒸留水に溶解した。

次に、合成RNAのマイクロインジェクション用卵母細胞を調製した。まず、氷中で麻酔したアフリカツメガエル（浜松実験動物供給所より購入）の腹をハサミで約5mm切り、ピンセットで卵母細胞の塊を1～2g取り出した。この塊を直ちに、3mlのMBS（88mM NaCl, 1mM KCl, 2.4mM NaHCO₃, 15mM Tris-HCl, 0.3mM Ca(NO₃)₂・4H₂O, 0.41mM CaCl₂・4H₂O, 0.82mM MgSO₄・7H₂O, 10μg/ml ペニシリンナトリウム塩、10μg/ml ストレプトマイシン硫酸塩, pH7.6）を入れたミニシャーレの中に入れ、3回MBSで洗浄した後、0.2% (w/v) コラゲナーゼ・タイプII（シグマ社製）を含むMBS中において室温で1.5時間処理した。処理後、卵母細胞の塊を新しいMBSで4～5回洗浄し、実体顕微鏡下でピンセットを使って卵母細胞表面の濾胞細胞膜を取り除いた。こうして膜を除いた卵母細胞に、合成RNAを50nlずつマイクロインジェクトし、その後、20℃のMBS中で3日間培養することにより注入RNA由来のタンパクを合成させた。

卵母細胞内で合成させたタンパク質中にPAF受容体が含まれるか否かは、リガンド依存性のCa²⁺感受性Cl⁻チャンネルの開口を指標として判断した。これは、ボルテージ・クランプ法を用いて膜電位の変化を測定することで検定できた。

実体顕微鏡下に0.5mlの槽をセットし、リンゲル液（115mM NaCl, 2mM KCl, 5mM HEPES

S, 1.8mM CaCl_2 , 1mg/ml BSA, pH7.2) で槽内を灌流しながら槽内に卵母細胞を置き、ボルテージ・クランプした。この場合、コマンド電位は、リンゲル液内での Cl^- のリバーサルポテンシャル以下 (通常 -50 ~ -100 mV) に設定した。ボルテージ・クランプを維持した状態で、 10^{-7} MのPAFを含むリンゲル液を流したが、PAF受容体が発現している卵母細胞に関しては、その受容体にPAFが結合することにより、GTP結合蛋白質の活性化→ホスホリパーゼCの活性化→細胞内 Ca^{2+} の上昇→ Cl^- チャンネルの開口という一連の反応が進み、シグナルとして外向きのClamp電流が得られた。このシグナルは、 6×10^4 個のファージ群を5種類スクリーニングした時点で、その中の1群から得られた。その時のレスポンスを第9図に示す。図に示す様に、GTP結合蛋白質に関連する受容体に特有とされる典型的な二相性のタイムコースを持つ膜電流が観察された。以下、レスポンスを見ながら 6×10^4 個のファージ群を順次分割して、7回のサイクルの後にシングルクローンを得ることができた。第10図は、シングルクローンを鋳型として合成したRNAをマイクロインジェクトした際に得られたレスポンスを示す。

得られたファージクローンから、f1ヘルパーファージR408 (ストラテジーン社製) を使ったプラスミドレスキュー法により、インサートを含むプラスミド (Zp74) を回収した。この際の詳細な方法は、すべてストラテジーン社のプロトコールに従った。Zp74のcDNAインサートの長さは、

約 3Kbp であった。

(4) cDNA インサートの全塩基配列の決定

cDNA インサートの全塩基配列をキロシーケンス用ディレクションキット（宝酒造（株）より購入）、およびシーケネースDNA シーケンスキット（東洋紡（株）より購入）を用いて決定した。決定した全塩基配列を第2図、第3図および第4図に示す。ここで、第3図に示す配列は第2図に示す配列の塩基番号1の塩基に結合しており、第4図に示す配列は第2図に示す配列の塩基番号1029の塩基に結合している。クローン Zp74 は、3017塩基対を挿入DNA として含み、翻訳開始遺伝暗号 ATG から翻訳停止遺伝暗号 TAG までの1029塩基対を、連続した最も大きなオープンリーディングフレームとして有していた。第2図に示すDNA 塩基配列から誘導されるアミノ酸配列を第1図に示した。

(5) モルモット PAF 受容体遺伝子の COS 細胞内発現を目的とした発現用プラスミド pEUKPAF の構築

クローニングしたモルモット PAF 受容体遺伝子を培養細胞 COS に導入し、発現の有無を調べるために第11図に示す発現プラスミドを構築した。

COS 細胞内発現用ベクター pEUK-C1（クロンテック社製）は、東洋紡（株）より購入した。このベクターは、導入遺伝子の転写開始のための SV40 後期プロモーターと、SV40 後期ポリアデニレーションシグナルを持ち、その間に5個のクローニングサイトを持っている。

まず、5 μ g の Zp74 を 5ユニットの *Bam*HI と *Xho*I で

消化し、得られた反応物を 1%アガロースゲル電気泳動にて分離した。そして、このアガロースゲル中の R A F 受容体遺伝子を含む約 3K b p の D N A 断片を、Gene clean (バイオテック社製) を用いて添付のプロトコールに従って回収し、エタノール沈澱後、滅菌蒸留水に溶解した。

次に、5 μ g の発現用ベクター p E U K - C 1 も 5 ユニットの *Bam* H I と *Xho* I で消化した後、同様の方法で、約 4.8 K b p の D N A 断片を回収し、滅菌蒸留水に溶解した。

上述の 2 種類の回収 D N A 断片、すなわち約 200 n g の P A F 受容体遺伝子を含む D N A 断片と約 50 n g のベクター D N A 断片を混合した後、結合反応を行なった。この反応は、タカラ・ライゲーションキットを用い、添付のプロトコールに従って行なった。この反応液を用いて常法により、大腸菌 X L 1 - B l u e を形質転換し、アンピシリン耐性

(A m p^R) のコロニーを得、このコロニーよりプラスミド D N A を回収した。回収したプラスミドが目的とするものであることは、*Bam* H I と *Xho* I で消化した後、アガロースゲル電気泳動にて確認した。このようにして、C O S 細胞内発現用プラスミド p E U K P A F を構築することができた。

(6) モルモット P A F 受容体遺伝子の C O S 7 細胞内での発現

上記 (5) で構築した C O S 細胞内発現プラスミド p E U K P A F を C O S 細胞の一種である C O S 7 細胞に導入し、P A F 受容体遺伝子の発現の有無を調べた。実験は、以下の 3 つのステップで進めた。

(a) プラスミド pEUKPAF の COS7 細胞への導入
COS7 細胞は、20% ウシ胎児血清 (ベーリンガー・マンハイム社製), 0.6 g/l L-グルタミン, 1.5 g/l 炭酸水素ナトリウム, 100 ユニット/ml ペニシリン, 50 μ g/ml ストレプトマイシンを補足した DMEM 培地 (日水製薬 (株) 社製) で、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。プラスミド導入の際に、細胞数は、10⁷ 個/ml のオーダーに調製した。導入方法は、ファルマシア社製セルフェクト・トランスフェクションキットを用い、添付のプロトコールに従った。プラスミドを導入した細胞は、さらに 3 日間培養を続け、導入遺伝子の発現を待った。

(b) 形質転換細胞からの膜画分の調製

培養後、培養容器の底面に付着した形質転換細胞は、培養液を十分懸濁し、4°C において 800 × g で 10 分間遠心することにより回収した。沈澱した細胞は、氷冷した HEPES 緩衝液 (25 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 0.25 M スクロース, pH 7.4) に懸濁し、氷上で懸濁液をホモジェナイズすることで完全に破碎した。

PAF 受容体結合実験に供する膜画分は、この破碎液を 4°C において 800 × g で 10 分間遠心後、上清をさらに 4°C において 40,000 × g で 20 分間遠心分離し、得られた沈澱物を HEPES 緩衝液に懸濁したものをを用いた。

(c) COS7 細胞で発現した PAF 受容体の確認

形質転換細胞に PAF 受容体が発現していることは、調製した膜画分における PAF 受容体結合活性の有無を測定する

ことで確認した。この実験は、トリチウムラベルされた P A F アントゴニスト W E B 2086 (N E N 社製) を用いて行なった。まず、 $100\mu\text{l}$ の反応緩衝液 (25mM H E P E S, 10 mM M g C l₂, 0.1 % B S A, pH7.4) に 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM あるいは 6.25 nM の [³H] W E B 2086 を加え、これに (b) で調製した $100\mu\text{l}$ の膜画分を入れて 25℃ で 90 分間反応させた。反応後、該反応液を直ちにグラスフィルター (ワットマン社製、G F / C) に通して膜画分をグラスフィルターに吸着させ、さらにグラスフィルターを反応緩衝液で十分洗浄することで未吸着の [³H] W E B 2086 を除いた。その後、このグラスフィルターを 80℃ で 30 分間乾燥し、液体シンチレーションを加えてカウントを測定した。なお、[³H] W E B 2086 の膜への非特異的吸着も知るために、各ポイントで反応系に $10\mu\text{M}$ P A F を存在させた場合の結合カウントも測定した。第 12 図は、その結果を示したものである。第 12 図において、○ は特異的な結合、● は非特異的な結合を表している。これにより、形質転換細胞膜上に P A F 受容体が発現していることが確認できた。

実施例 2

この実施例においては、第 6 図に示す塩基配列を有する遺伝子において、塩基番号 1 の塩基に第 7 図に示す配列を有する塩基対が、また塩基番号 1029 の塩基に第 8 図に示す配列を有する塩基対がそれぞれ結合した塩基配列を有する D N A の製造法、およびこれを用いた形質転換体の作製を説明する。

(1) ヒト白血球 m R N A の調製

予め -80°C に凍結保存しておいたヒト白血球を、 30m l の G T C 緩衝液 (6M グアニジンチオシアネート, 5mM クエン酸ナトリウム, 17mM サルコシルナトリウム, 0.7% β -メルカプトエタノール) を加えながら素早くホモジナイズした。

得られたホモジネートを、室温において $3,000\times g$ で 5 分間遠心し、上清を別のチューブへ移した。このホモジネートの上清 25m l を、 0.1M E D T A を含む 5.7M 塩化セシウムのクッション (8m l) の上に重層し、日立 S R P 28 ローターを用いて、 15°C において $26,000\times g$ で 65 時間遠心した。遠心後、褐色および茶褐色のタンパク質層、および D N A 層をアスピレーターで除去した。チューブの底に沈澱した R N A を T E S 緩衝液 (100mM T r i s - H C l , 5mM E D T A , 1% S D S , $\text{pH}7.5$) 1m l に溶解し、フェノール-クロロホルム ($1:1$) で抽出した。

R N A を含む水層に、 3M 酢酸ナトリウム 0.1m l 、冷却したエタノール 2m l を加え、R N A を沈澱させた。遠心分離により回収した R N A は、 80% エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、滅菌蒸留水に溶解した。次に、得られた R N A 水溶液を、以下の手順でオリゴ (d T) セルロースカラムに通し、ポリ (A) を有する m R N A を分離した。すなわち、滅菌蒸留水に溶解した R N A に、2 倍容の平衡化緩衝液

(0.5M N a C l , 20mM T r i s - H C l , 1mM E D T A , 0.1% S D S , $\text{pH}7.6$) を加え、 65°C で 5 分間熱処理を施した後、あらかじめ平衡化緩衝液で平衡化したオリゴ

(dT) セルロースカラムにかけ、10倍容の平衡化緩衝液で洗淨した。洗淨後、溶出緩衝液 (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.6) を用いて mRNA を溶出し、エタノール沈澱により回収した。回収した mRNA は 80% エタノールで洗淨した後、真空乾燥し、滅菌蒸溜水に溶解した。この mRNA 3 μ g を用いて以下の cDNA 合成を行った。

(2) cDNA ライブラリーの作製

調製した mRNA からの cDNA 合成は、ファルマシア社から市販されている cDNA 合成システムを用い、製品に添付されているプロトコルに従って行なった。逆転写酵素により、mRNA に相補的な cDNA を合成した後、リボヌクレアーゼ H で、RNA 鎖にニックとギャップを入れ、これを T4 DNA ポリメラーゼを用いて修復合成することにより、RNA 鎖を cDNA 鎖に置換した。最後に、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のクレノーフラグメントにより、cDNA 鎖の両端を平滑化した。続いて、ストラテジーン社から市販されている λ ZAP II ライブラリーシステムを用いて、cDNA ライブラリーを作製した。方法は、すべて製品に添付されているプロトコルに従って行なった。すなわち、まず、合成 cDNA の両端に *Eco*RI アダプター (*Not*I サイトを持たないもの) を付加し、これと予め *Eco*RI で切断処理が施されている λ ZAP II アームとを連結した。その後、インビトロパッケージングを行ない、大腸菌 XL I - Blue 株 (製品に付属) に感染させることにより、cDNA ライブラリーを作製した。

(3) ヒト P A F 受容体をコードする c D N A クローンの選抜

上記 (2) において調製した c D N A ライブラリーのうち、約 30 万個のファージ群を大腸菌 X L 1 - B l u e 株に吸収させて寒天プレートにまき、37℃で12時間培養した。その寒天上にニトロセルロースフィルターを置き、3分間放置してファージをフィルターに吸着させた後、フィルターを寒天から剥して変性液 (0.2 N N a O H , 1.5 M N a C l) 中で5分間変性処理を行なった。ペーパータオル上で十分変性液を除いた後、中和液 (1.5 M T r i s - H C l , 1.5 M , N a C l , p H 7.5) 中で5分間中和反応をし、続いて 2× S S C (1×は 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 15 m M クエン酸ナトリウム塩酸緩衝液, p H 7.0) 中で5分間洗浄した。このフィルターを乾燥後、80℃で2時間加熱した。室温に戻した後、5×デンハルツ液 (1×は 0.02% フィコール, 0.02% ポリビニルピロリドン, 0.02% ウシ血清アルブミン) , N E T 液 (5 M N a C l , 2 M T r i s - H C l , 0.5 M E D T A , p H 8.0) , 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、および 1 m l 当たり 100 μ g の変性サケ精子 D N A の溶液中において 55℃で 16 時間反応させた。

プローブの ³²P 標識は、モルモット P A F 受容体遺伝子の S m a I 消化断片 (約 800 b p) を鋳型として、マルチプライマーキット (アマシャム社製) を用いて行なった。この ³²P 標識したプローブを上記反応液に加えてさらに 24 時間ハイブリダイゼーション反応を行なった。その後、フィルターを

0.1 % ドデシル硫酸ナトリウムを含む 300ml の 2×SSC により室温で 2回、5分間ずつ洗い、さらに0.1 % ドデシル硫酸ナトリウムを含む 300ml の 2×SSC により55℃で 2回、20分間ずつ洗った。その後、フィルターを乾燥させ、-70℃でインテンシファイスクリーンを用いて 2日間オートラジオグラフィーを行なった。

ヒト PAF 受容体をコードする遺伝子の cDNA が挿入されているファージ DNA には ^{32}P で標識した DNA プロブが接合する。従ってニトロセルロースフィルターに吸着されたファージ DNA のブランクに相当する部分は X 線フィルムに黒点を生じる。この黒点を生じたブランクのファージを寒天プレートから単離し、約 1.7Kbp の長さの、cDNA が挿入されているクローンを得た。

得られたファージクローンから、f1 ヘルパーファージ R408 (ストラテジーン社製) を使ったプラスミドレスキュー法により、インサートを含むプラスミド (phPAF) を回収した。この際の詳細な方法は、すべてストラテジーン社のプロトコールに従った。

(4) cDNA インサートの全塩基配列の決定

cDNA インサートの全塩基配列をキロシーケンス用ディレクションキット (宝酒造 (株) より購入)、およびシーケネース DNA シーケンスキット (東洋紡 (株) より購入) を用いて決定した。決定した全塩基配列を第 6 図、第 7 図および第 8 図として示す。ここで第 7 図に示す配列は第 6 図に示す配列の塩基番号 1 の塩基に結合しており、第 8 図に

示す配列は第6図に示す配列の塩基番号1029の塩基に結合している。クローン p h P A F は、1780塩基対を挿入DNAとして含み、翻訳開始遺伝暗号A T Gから翻訳停止遺伝暗号T A Gまでの1029塩基対を、連続した最も大きなオープンリーディングフレームとして持っていた。第6図に示すDNA塩基配列から誘導されるアミノ酸配列を第5図に示した。

(5) ヒトP A F受容体遺伝子のアフリカツメガエル卵母細胞内での発現

上記(3)においてクローン化したDNAが確かにヒトP A F受容体をコードすることを、アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系を利用して確かめた。実験は、以下の3つのステップで進めた。

(a) クローン化DNAを鋳型としたイン・ビトロでのRNAの合成

5 μ gのプラスミドp h P A Fを制限酵素*Not* Iで消化し、フェノール-クロロホルム(1:1)抽出、エタノール沈澱後、50 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。RNA合成は、このDNA溶液と50 μ lの反応緩衝液(1mM Cap-アナログ7-メチル-G p p p G, 1mM A T P, 1mM C T P, 1mM U T P, 0.1mM G T P, 80mM Tris-HCl (pH7.9), 200 μ g/ml B S A, 20mM D T T, 12mM M g C l₂, 4mM, スペルミジン, 2 μ g/ μ lヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター)を混合し、10ユニットのT7 RNAポリメラーゼを加え、37℃で60分間反応させることにより行なった。反応後、5ユニットのDNA分解酵

23

素を加え、37℃で15分間インキュベートすることにより鋳型DNAを分解した。得られた反応液から、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱によりRNAを回収し、回収したRNAは $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるよう滅菌蒸留水に溶解した。

(b) 合成RNAマイクロインジェクション用卵母細胞の調製

実験に用いたアフリカツメガエルのメス(約100g)は、浜松実験動物供給所より購入した。水中で麻酔したアフリカツメガエルの腹をハサミで約5mm切り、ピンセットで卵母細胞の塊を1~2g取り出した。この塊を直ちに、3mlのMBS(88mM NaCl, 1mM KCl, 2.4mM NaHCO_3 , 15mM Tris-HCl, 0.3mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.41mM $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.82mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリンナトリウム塩, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン硫酸塩, pH7.6)を入れたミニシャーレの中に入れ、MBSで3回洗浄後、0.2%(w/v)コラゲナーゼ・タイプII(シグマ社製)を含むMBS中において室温で1.5時間処理した。処理後、卵母細胞の塊を新しいMBSで4~5回洗浄し、実体顕微鏡下でピンセットを使って卵母細胞表面の濾泡細胞膜を取り除いた。こうして調製した卵母細胞を、直ちにマイクロインジェクション用として使用した。

(c) 合成RNAの卵母細胞内での発現

上記(b)において調製した卵母細胞に、上記(a)で合

24

成したRNAを50n lずつマイクロインジェクトし、その後、20℃のMBS中で3日間培養することにより注入RNA由来のタンパクを合成させた。

卵母細胞内で発現させたタンパクがヒトPAF受容体であるか否かは、リガンド依存性の Ca^{2+} 感受性 Cl^- チャンネルの開口を指標として判断した。これは、ボルテージ・クランプ (Voltage Clamp) 法を用いて膜電位の変化を測定することで検定できた。

実体顕微鏡下に0.5mlの槽をセットし、リンゲル液 (115mM NaCl, 2mM KCl, 5mM HEPES, 1.8mM CaCl_2 , 1mg/ml BSA, pH7.2) で槽内を灌流しながら槽内に卵母細胞を置き、ボルテージ・クランプした。この際のコマンド電位は、リンゲル液内での Cl^- のリバーサルポテンシャル (通常 -50 ~ -100 mV) 以下に設定した。ボルテージ・クランプを維持した状態で、 10^{-7} MのPAFを含むリンゲル液を流すことにより、PAF受容体が発現している卵母細胞に関しては、その受容体にPAFが結合することにより、GTP結合蛋白質の活性化→ホスホリパーゼCの活性化→細胞内 Ca^{2+} の上昇→ Cl^- チャンネルの開口という一連の反応が進み、シグナルとして外向きのクランプ電流が得られた。第13図は水をマイクロインジェクトした場合、および第14図は、上記(a)で合成したRNAをマイクロインジェクトした場合にそれぞれ得られるレスポンスを示したものである。この結果から、クローン化したcDNAはヒトPAF受容体をコードするものであるこ

とが確かめられた。

(6) ヒト P A F 受容体遺伝子の C O S 細胞内発現を目的とした発現用プラスミド p E U K h P A F の構築

クローニングしたヒト P A F 受容体遺伝子を培養細胞 C O S に導入し、発現の有無を調べるために第15図に示す発現プラスミドを構築した。

C O S 細胞内発現用ベクター p E U K - C 1 (クロンテック社製) は、東洋紡 (株) より購入した。このベクターは、導入遺伝子の転写開始のための S V 40 後期プロモーターと、S V 40 後期ポリアデニレーションシグナルを持ち、その間に5個のクローニングサイトを持っている。

まず、 $5\mu\text{g}$ の p h P A F を 5 ユニットの *Bam* H I および *Xho* I で消化し、得られた反応生成物を 1% アガロースゲル電気泳動にて分離した。そして、このアガロースゲル中のヒト P A F 受容体遺伝子を含む約 1.7 K b p の D N A 断片を、Gene clean (バイオテック社製) を用いて添付のプロトコールに従って回収し、エタノール沈殿後、滅菌蒸留水に溶解した。

次に、 $5\mu\text{g}$ の発現用ベクター p E U K - C 1 も 5 ユニットの *Bam* H I および *Xho* I で消化した後、同様の方法で、約 4.8 K b p の D N A 断片を回収し、滅菌蒸留水に溶解した。

上述の2種類の回収 D N A 断片、すなわち約 200 n g のヒト P A F 受容体遺伝子を含む D N A 断片と約 50 n g のベクター D N A 断片を混合後、結合反応を行なった。この反応は、タカラ・ライゲーションキットを用い、添付のプロトコール

に従って行なった。この反応液を用いて常法により、大腸菌 X L 1 - B l u e を形質転換し、アンピシリン耐性 (A m p^R) のコロニーを得、このコロニーよりプラスミド D N A を回収した。回収したプラスミドが目的のものであることは、*Bam* H I および *Xho* I による消化反応後、アガロースゲル電気泳動にて確認した。このようにして、C O S 細胞内発現用プラスミド p E U K h P A F を構築することができた。

(7) ヒト P A F 受容体遺伝子の C O S 7 細胞内での発現

上記 (6) で構築した C O S 細胞内発現プラスミド p E U K h P A F を C O S 細胞の一種である C O S 7 細胞に導入し、P A F 受容体遺伝子の発現の有無を調べた。実験は、以下の3つのステップで進めた。

(a) プラスミド p E U K h P A F の C O S 7 細胞への導入

C O S 7 細胞は、20% ウシ胎児血清 (ベーリンガー・マンハイム社製), 0.6 g / l L - グルタミン, 1.5 g / l 炭酸水素ナトリウム, 100 ユニット / m l ペニシリン, 50 μ g / m l ストレプトマイシンを補足した D M E M 培地 (日水製薬 (株) 社製) において、37°C、5% C O₂ の条件下で培養した。プラスミド導入の際、細胞数は、10⁷ 個 / m l のオーダーに調製した。導入方法は、ファルマシア社製セルフェクト・トランスフェクションキットを用い、添付のプロトコールに従った。プラスミドを導入した細胞は、さらに 3 日間培養を続け、導入遺伝子の発現を待った。

(b) 形質転換細胞からの膜画分の調製

培養後、培養容器の底面に付着した形質転換細胞は、培溶液を十分懸濁し、4℃において800×gで10分間遠心することにより回収した。沈澱した細胞は、氷冷したH E P E S緩衝液(25mM H E P E S, 10mM M g C l₂, 0.25M スクロース, pH7.4)に懸濁し、氷上で懸濁液をホモジェナイズすることで完全に破碎した。

P A F受容体結合実験に供する膜画分は、この破碎液を4℃において800×gで10分間遠心後、上清をさらに4℃において40,000×gで20分間遠心分離し、得られた沈澱物をH E P E S緩衝液に懸濁したものをを用いた。

(c) C O S 7細胞で発現したヒトP A F受容体の確認

形質転換細胞でヒトP A F受容体が発現していることは、調製した膜画分にP A F受容体結合活性が存在することで確認した。この実験は、トリチウムラベルされたP A FアンタゴニストW E B 2086 (N E N社製)を用いて行なった。まず、100μlの反応緩衝液(25mM H E P E S, 10mM M g C l₂, 0.1% B S A, pH7.4)に200nM、100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM, 6.25nMあるいは3.125mMの[³H] W E B 2086を加え、これに上記(7), (b)で調製した100μlの膜画分を入れて25℃で90分間反応させた。反応後、反応液を、直ちにグラスフィルター(ワットマン社製、G F / C)に通して膜画分をグラスフィルターに吸着させ、さらにグラスフィルターを反応緩衝液で十分洗浄することで未吸着の[³H] W E B 2086を除いた。その後、グラス

フィルターを、80℃で30分間乾燥し、液体シンチレーションを加えてカウントを測定した。なお、[³H]WEB 2086の膜への非特異的吸着も知るために、各ポイントで反応系に10 μM PAFを存在させた場合の結合カウントも測定した。第16図は、その結果を示したものである。第16図において、○は特異的な結合、●は非特異的な結合を表している。これにより、形質転換細胞膜上にPAF受容体が発現していることが確認できた。

産業上の利用可能性

この遺伝子を用いて作成された形質転換細胞は、今後ますます有用性が増加するアゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングに応用することが可能である。また、この遺伝子は、現在困難とされているPAFの定量にも応用することができる。

請 求 の 範 囲

1. 下記アミノ酸配列を有するモルモット血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子。

Met Glu Leu Asn Ser Ser Ser Arg Val Asp
Ser Glu Phe Arg Tyr Thr Leu Phe Pro Ile
Val Tyr Ser Ile Ile Phe Val Leu Gly Ile
Ile Ala Asn Gly Try Val Leu Trp Val Phe
Ala Arg Leu Tyr Pro Ser Lys Lys Leu Asn
Glu Ile Lys Ile Phe Met Val Asn Leu Thr
Val Ala Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu
Pro Leu Trp Ile Val Tyr Tyr Ser Asn Gln
Gly Asn Trp Phe Leu Pro Lys Phe Leu Cys
Asn Leu Ala Gly Cys Leu Phe Phe Ile Asn
Thr Tyr Cys Ser Val Ala Phe Leu Gly Val
Ile Thr Tyr Asn Arg Phe Gln Ala Val Lys
Tyr Pro Ile Lys Thr Ala Gln Ala Thr Thr
Arg Lys Arg Gly Ile Ala Leu Ser Leu Val
Ile Trp Val Ala Ile Val Ala Ala Ala Ser
Tyr Phe Leu Val Met Asp Ser Thr Asn Val
Val Ser Asn Lys Ala Gly Ser Gly Asn Ile
Thr Arg Cys Phe Glu His Tyr Glu Lys Gly
Ser Lys Pro Val Leu Ile Ile His Ile Cys
Ile Val Leu Gly Phe Phe Ile Val Phe Leu
Leu Ile Leu Phe Cys Asn Leu Val Ile Ile
His Thr Leu Leu Arg Gln Pro Val Lys Gln

Gln Arg Asn Ala Glu Val Arg Arg Arg Ala
Leu Trp Met Val Cys Thr Val Leu Ala Val
Phe Val Ile Cys Phe Val Pro His His Met
Val Gln Leu Pro Trp Thr Leu Ala Glu Leu
Gly Met Trp Pro Ser Ser Asn His Gln Ala
Ile Asn Asp Ala His Gln Val Thr Leu Cys
Leu Leu Ser Thr Asn Cys Val Leu Asp Pro
Val Ile Tyr Cys Phe Leu Thr Lys Lys Phe
Arg Lys His Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ile
Met Arg Ser Ser Gln Lys Cys Ser Arg Val
Thr Thr Asp Thr Gly Thr Glu Met Ala Ile
Pro Ile Asn His Thr Pro Val Asn Pro Ile
Lys Asn

2. 下記塩基配列を有する、請求の範囲第1項記載のモル
モット血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子。

ATG GAG TTA AAC AGC TCT TCC CGG GTG GAT
TCT GAG TTT CGA TAC ACA CTC TTC CCA ATT
GTT TAC AGC ATT ATC TTT GTG CTG GGG ATC
ATC GCC AAT GGC TAT GTG CTA TGG GTC TTT
GCC CGC CTA TAC CCT TCC AAG AAA CTA AAT
GAG ATA AAG ATC TTC ATG GTG AAC CTC ACG
GTG GCT GAC CTG CTC TTC CTG ATC ACC TTG
CCT CTG TGG ATC GTC TAC TAT TCC AAC CAG
GGC AAC TGG TTT CTA CCC AAA TTC CTT TGT
AAC CTG GCT GGC TGC CTC TTC TTC ATC AAC

3 1

ACC TAC TGC TCT GTG GCC TTC CTG GGA GTG
ATC ACC TAT AAC CGC TTC CAG GCA GTG AAA
TAT CCC ATC AAG ACT GCT CAG GCC ACC ACC
CGC AAG CGA GGC ATC GCT TTG TCC TTG GTC
ATC TGG GTG GCC ATT GTG GCT GCT GCA TCT
TAC TTC CTT GTC ATG GAC TCC ACC AAC GTA
GTG TCC AAT AAG GCA GGC TCG GGC AAC ATT
ACT CGT TGC TTT GAG CAC TAT GAG AAG GGC
AGC AAG CCT GTC CTC ATC ATC CAT AGC TGC
ATT GTG CTC GGC TTC TTC ATT GTC TTC CTT
CTC ATC CTC TTC TGC AAC CTG GTC ATC ATC
CAC ACG CTG CTC AGG CAG CCA GTG AAG CAG
CAG CGC AAT GCT GAG GTC AGG CGC CGA GCG
CTG TGG ATG GTT TGC ACG GTT CTG GCA GTG
TTT GTC ATC TGC TTT GTA CCA CAC CAC ATG
GTA CAG CTG CCC TGG ACC CTG GCT GAG CTG
GGG ATG TGG CCA AGC AGC AAC CAC CAG GCT
ATT AAT GAT GCA CAT CAG GTC ACC CTC TGC
CTC CTT AGC ACC AAC TGT GTC TTA GAC CCT
GTC ATC TAC TGT TTC CTC ACC AAG AAG TTC
CGC AAG CAC CTC ACG CAA AAG CTT AAT ATC
ATG CGC AGC AGC CAG AAA TGC TCC CGG GTC
ACC ACT GAC ACA GGC ACT GAA ATG GCC ATT
CCA ATC AAC CAC ACT CCT GTC AAT CCC ATC
AAA AAT NNN

ここで、NNN は、TGA , TAA または TAGを表わす。

3. 下記アミノ酸配列を有するヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子。

Met Glu Pro His Asp Ser Ser His Met Asp
Ser Glu Phe Arg Tyr Thr Leu Phe Pro Ile
Val Tyr Ser Ile Ile Phe Val Leu Gly Val
Ile Ala Asn Gly Tyr Val Leu Trp Val Phe
Ala Arg Leu Tyr Pro Cys Lys Lys Phe Asn
Glu Ile Lys Ile Phe Met Val Asn Leu Thr
Met Ala Asp Met Leu Phe Leu Ile Thr Leu
Pro Leu Trp Ile Val Tyr Tyr Gln Asn Gln
Gly Asn Trp Ile Leu Pro Lys Phe Leu Cys
Asn Val Ala Gly Cys Leu Phe Phe Ile Asn
Thr Tyr Cys Ser Val Ala Phe Leu Gly Val
Ile Thr Tyr Asn Arg Phe Gln Ala Val Thr
Arg Pro Ile Lys Thr Ala Gln Ala Asn Thr
Arg Lys Arg Gly Ile Ser Leu Ser Leu Val
Ile Trp Val Ala Ile Val Gly Ala Ala Ser
Tyr Phe Leu Ile Leu Asp Ser Thr Asn Thr
Val Pro Asp Ser Ala Gly Ser Gly Asn Val
Thr Arg Cys Phe Glu His Tyr Glu Lys Gly
Ser Val Pro Val Leu Ile Ile His Ile Phe
Ile Val Phe Ser Phe Phe Leu Val Phe Leu
Ile Ile Leu Phe Cys Asn Leu Val Ile Ile
Arg Thr Leu Leu Met Gln Pro Val Gln Gln

33

Gln Arg Asn Ala Glu Val Lys Arg Arg Ala
 Leu Trp Met Val Cys Thr Val Leu Ala Val
 Phe Ile Ile Cys Phe Val Pro His His Val
 Val Gln Leu Pro Trp Thr Leu Ala Glu Leu
 Gly Phe Gln Asp Ser Lys Phe His Gln Ala
 Ile Asn Asp Ala His Gln Val Thr Leu Cys
 Leu Leu Ser Thr Asn Cys Val Leu Asp Pro
 Val Ile Tyr Cys Phe Leu Thr Lys Lys Phe
 Arg Lys His Leu Thr Glu Lys Phe Tyr Ser
 Met Arg Ser Ser Arg Lys Cys Ser Arg Ala
 Thr Thr Asp Thr Val Thr Glu Val Val Val
 Pro Phe Asn Gln Ile Pro Gly Asn Ser Leu
 Lys Asn

4. 下記塩基配列を有する、請求の範囲第3項記載のヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子。

ATG GAG CCA CAT GAC TCC TCC CAC ATG GAC
 TCT GAG TTC CGA TAC ACT CTC TTC CCG ATT
 GTT TAC AGC ATC ATC TTT GTG CTC GGG GTC
 ATT GCT AAT GGC TAC GTG CTG TGG GTC TTT
 GCC CGC CTG TAC CCT TGC AAG AAA TTC AAT
 GAG ATA AAG ATC TTC ATG GTG AAC CTC ACC
 ATG GCG GAC ATG CTC TTC TTG ATC ACC CTG
 CCA CTT TGG ATT GTC TAC TAC CAA AAC CAG
 GGC AAC TGG ATA CTC CCC AAA TTC CTG TGC
 AAC GTG GCT GGC TGC CTT TTC TTC ATC AAC

ACC TAC TGC TCT GTG GCC TTC CTG GGC GTC
ATC ACT TAT AAC CGC TTC CAG GCA GTA ACT
CGG CCC ATC AAG ACT GCT CAG GCC AAC ACC
CGC AAG CGT GGC ATC TCT TTG TCC TTG GTC
ATC TGG GTG GCC ATT GTG GGA GCT GCA TCC
TAC TTC CTC ATC CTG GAC TCC ACC AAC ACA
GTG CCC GAC AGT GCT GGC TCA GGC AAC GTC
ACT CGC TGC TTT GAG CAT TAC GAG AAG GGC
AGC GTG CCA GTC CTC ATC ATC CAC ATC TTC
ATC GTG TTC AGC TTC TTC CTG GTC TTC CTC
ATC ATC CTC TTC TGC AAC CTG GTC ATC ATC
CGT ACC TTG CTC ATG CAG CCG GTG CAG CAG
CAG CGC AAC GCT GAA GTC AAG CGC CGG GCG
CTG TGG ATG GTG TGC ACG GTC TTG GCG GTG
TTC ATC ATC TGC TTC GTG CCC CAC CAC GTG
GTG CAG CTG CCC TGG ACC CTT GCT GAG CTG
GGC TTC CAG GAC AGC AAA TTC CAC CAG GCC
ATT AAT GAT GCA CAT CAG GTC ACC CTC TGC
CTC CTT AGC ACC AAC TGT GTC TTA GAC CCT
GTT ATC TAC TGT TTC CTC ACC AAG AAG TTC
CGC AAG CAC CTC ACC GAA AAG TTC TAC AGC
ATG CGC AGT AGC CGG AAA TGC TCC CGG GCC
ACC ACG GAT ACG GTC ACT GAA GTG GTT GTG
CCA TTC AAC CAG ATC CCT GGC AAT TCC CTC
AAA AAT NNN

ここで、NNN は、TGA , TAA または TAGを表わす。

5. 請求の範囲第3項記載のヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子を含み、微生物細胞内で自己増殖可能な組換え体DNA。

6. 前記ヒト血小板活性化因子受容体をコードする遺伝子が下記塩基配列で表わされる請求の範囲第5項記載の組換え体DNA。

```
ATG GAG CCA CAT GAC TCC TCC CAC ATG GAC
TCT GAG TTC CGA TAC ACT CTC TTC CCG ATT
GTT TAC AGC ATC ATC TTT GTG CTC GGG GTC
ATT GCT AAT GGC TAC GTG CTG TGG GTC TTT
GCC CGC CTG TAC CCT TGC AAG AAA TTC AAT
GAG ATA AAG ATC TTC ATG GTG AAC CTC ACC
ATG GCG GAC ATG CTC TTC TTG ATC ACC CTG
CCA CTT TGG ATT GTC TAC TAC CAA AAC CAG
GGC AAC TGG ATA CTC CCC AAA TTC CTG TGC
AAC GTG GCT GGC TGC CTT TTC TTC ATC AAC
ACC TAC TGC TCT GTG GCC TTC CTG GGC GTC
ATC ACT TAT AAC CGC TTC CAG GCA GTA ACT
CGG CCC ATC AAG ACT GCT CAG GCC AAC ACC
CGC AAG CGT GGC ATC TCT TTG TCC TTG GTC
ATC TGG GTG GCC ATT GTG GGA GCT GCA TCC
TAC TTC CTC ATC CTG GAC TCC ACC AAC ACA
GTG CCC GAC AGT GCT GGC TCA GGC AAC GTC
ACT CGC TGC TTT GAG CAT TAC GAG AAG GGC
```

AGC GTG CCA GTC CTC ATC ATC CAC ATC TTC
ATC GTG TTC AGC TTC TTC CTG GTC TTC CTC
ATC ATC CTC TTC TGC AAC CTG GTC ATC ATC
CGT ACC TTG CTC ATG CAG CCG GTG CAG CAG
CAG CGC AAC GCT GAA GTC AAG CGC CGG GCG
CTG TGG ATG GTG TGC ACG GTC TTG GCG GTG
TTC ATC ATC TGC TTC GTG CCC CAC CAC GTG
GTG CAG CTG CCC TGG ACC CTT GCT GAG CTG
GGC TTC CAG GAC AGC AAA TTC CAC CAG GCC
ATT AAT GAT GCA CAT CAG GTC ACC CTC TGC
CTC CTT AGC ACC AAC TGT GTC TTA GAC CCT
GTT ATC TAC TGT TTC CTC ACC AAG AAG TTC
CGC AAG CAC CTC ACC GAA AAG TTC TAC AGC
ATG CGC AGT AGC CGG AAA TGC TCC CGG GCC
ACC ACG GAT ACG GTC ACT GAA GTG GTT GTG
CCA TTC AAC CAG ATC CCT GGC AAT TCC CTC
AAA AAT NNN

ここで、NNN は、TGA , TAA または TAGを表わす。

7. 請求の範囲第6項記載のDNAを保持する形質転換細胞。

1/12

Met	Glu	Leu	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg	Val	Asp	Ser	Glu	Phe	Arg	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Ile
1				5					10					15				20	
Val	Tyr	Ser	Ile	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Ala	Asn	Gly	Try	Val	Leu	Trp	Val	Phe
				25					30					35				40	
Ala	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Lys	Lys	Leu	Asn	Glu	Ile	Lys	Ile	Phe	Met	Val	Asn	Leu	Thr
				45					50					55				60	
Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Ile	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Gln
				65					70					75				80	
Gly	Asn	Trp	Phe	Leu	Pro	Lys	Phe	Leu	Cys	Asn	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Phe	Ile	Asn
				85					90					95				100	
Thr	Tyr	Cys	Ser	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	Asn	Arg	Phe	Gln	Ala	Val	Lys
				105					110					115				120	
Tyr	Pro	Ile	Lys	Thr	Ala	Gln	Ala	Thr	Thr	Arg	Lys	Arg	Gly	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Val
				125					130					135				140	
Ile	Trp	Val	Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Tyr	Phe	Leu	Val	Met	Asp	Ser	Thr	Asn	Val
				145					150					155				160	
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Ile	Thr	Arg	Cys	Phe	Glu	His	Tyr	Glu	Lys	Gly
				165					170					175				180	
Ser	Lys	Pro	Val	Leu	Ile	Ile	His	Ile	Cys	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Phe	Ile	Val	Phe	Leu
				185					190					195				200	
Leu	Ile	Leu	Phe	Cys	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	His	Thr	Leu	Leu	Arg	Gln	Pro	Val	Lys	Gln
				205					210					215				220	
Gln	Arg	Asn	Ala	Glu	Val	Arg	Arg	Arg	Ala	Leu	Trp	Met	Val	Cys	Thr	Val	Leu	Ala	Val
				225					230					235				240	
Phe	Val	Ile	Cys	Phe	Val	Pro	His	His	Met	Val	Gln	Leu	Pro	Trp	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu
				245					250					255				260	
Gly	Met	Trp	Pro	Ser	Ser	Asn	His	Gln	Ala	Ile	Asn	Asp	Ala	His	Gln	Val	Thr	Leu	Cys
				265					270					275				280	
Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Ile	Tyr	Cys	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Phe
				285					290					295				300	
Arg	Lys	His	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asn	Ile	Met	Arg	Ser	Ser	Gln	Lys	Cys	Ser	Arg	Val
				305					310					315				320	
Thr	Thr	Asp	Thr	Gly	Thr	Glu	Met	Ala	Ile	Pro	Ile	Asn	His	Thr	Pro	Val	Asn	Pro	Ile
				325					330					335				340	
Lys	Asn																		

F I G. 1

2/12

ATG GAG TTA AAC AGC TCT TCC CGG GTG GAT TCT GAG TTT CGA TAC ACA CTC TTC CCA ATT
GTT TAC AGC ATT ATC TTT GTG CTG GGG ATC ATC GCC AAT GGC TAT GTG CTA TGG GTC TTT
GCC CGC CTA TAC CCT TCC AAG AAA CTA AAT GAG ATA AAG ATC TTC ATG GTG AAC CTC ACG
GTG GCT GAC CTG CTC TTC CTG ATC ACC TTG CCT CTG TGG ATC GTC TAC TAT TCC AAC CAG
GGC AAC TGG TTT CTA CCC AAA TTC CTT TGT AAC CTG GCT GGC TGC CTC TTC TTC ATC AAC
ACC TAC TGC TCT GTG GCC TTC CTG GGA GTG ATC ACC TAT AAC CGC TTC CAG GCA GTG AAA
TAT CCC ATC AAG ACT GCT CAG GCC ACC ACC CGC AAG CGA GGC ATC GCT TTG TCC TTG GTC
ATC TGG GTG GCC ATT GTG GCT GCT GCA TCT TAC TTC CTT GTC ATG GAC TCC ACC AAC GTA
GTG TCC AAT AAG GCA GGC TCG GGC AAC ATT ACT CGT TGC TTT GAG CAC TAT GAG AAG GGC
AGC AAG CCT GTC CTC ATC ATC CAT AGC TGC ATT GTG CTC GGC TTC TTC ATT GTC TTC CTT
CTC ATC CTC TTC TGC AAC CTG GTC ATC ATC CAC ACG CTG CTC AGG CAG CCA GTG AAG CAG
CAG CGC AAT GCT GAG GTC AGG CGC CGA GCG CTG TGG ATG GTT TGC ACG GTT CTG GCA GTG
TTT GTC ATC TGC TTT GTA CCA CAC CAC ATG GTA CAG CTG CCC TGG ACC CTG GCT GAG CTG
GGG ATG TGG CCA AGC AGC AAC CAC CAG GCT ATT AAT GAT GCA CAT CAG GTC ACC CTC TGC
CTC CTT AGC ACC AAC TGT GTC TTA GAC CCT GTC ATC TAC TGT TTC CTC ACC AAG AAG TTC
CGC AAG CAC CTC ACG CAA AAG CTT AAT ATC ATG CGC AGC AGC CAG AAA TGC TCC CGG GTC
ACC ACT GAC ACA GGC ACT GAA ATG GCC ATT CCA ATC AAC CAC ACT CCT GTC AAT CCC ATC
AAA AAT NNN

F I G. 2

GGCACGAGTG CGGCCAGGCT GGACCCAGGG ACACAATAGA CACTACAGCC AAGCCACTGC
CGCTGCTGCA GGCAGTCCCA GGACCCTATG AGGAGCTGAC TCTTGCAGCC CAGAGCC

F I G. 3

3/12

TTCCTGCTTG CTGGGGTCAG GCCCAAAGTC TTCTGTTCCA TAAGGGGTAT CTGCTGTAGT
CACCTCCTCC CTGGCACTGG TGGCCCATGA AGTATAAAGC CTACCTCACA CACAGGCAGG
GACAATGGCC ATGCTGGACT GCTAGAAAAT CCAGAACTTG AACGAGTACC TTCACCCCTT
TTGCACACAT CTATGACCTG ATCCTGAGCC TCTGGGTCCG ATGAAGCTAA GAGGAATCTG
AGGGTCAGGG GACAGACTCT GAGCCATTCC CAGGTTGCCT ACTAGGGTAG TAGCCTAAAG
CCCTTAGGCA ATGACTCCCA AGTGCTCAGA CAGTGGAAGT GGCCTGGTAG AATCTTCTGA
TTCCGCCAGC AAACCTGTCC CAAATGACAA CTACAGAAAA GAAAACATGA ACAGAGCAAA
AGCTAAGACA TGAGCTTGTT TCCTGCACAG GATTTGGCTC AAGCTTGGGT CAGTCCTGAG
GGGCTGGGAG AGAGAGAGCC TCTCCTTCGT TTTCCAGCCT TACTAACAGA CCCTGAGTGA
AGACCTTCAG TGGGGCAGAA CGTCTCTTTA AAGCTTTTCC CGAGAGCACA CCAGCCAGGG
CAAGTCCAGA GGCTTCCATG GGAACAGCGC CTA CTAGGA AAGAGCCTGA GGTCTTCTGGT
TGGGAAAAAT CTGCTCCTTC TCTGGAAGGC CCTCTCTGCC TAATTTCCAG GAAATAGAAG
GGACAGTTAC ACAGGCTGGT GGGTGTACAG TTCTCCAGTA TTTCTAAGAC AGCTGCCTGT
CATTTTTGAT AAGCATTCOA ATGAGACGCT CTCCTTCCTT TAGCCAAGAA CTTGCAGTGT
GAGCCCTGGC CCTCAGACAT GGGGTGTCCA GTGCTCCTCT GAGAACTTCC TTCCAGCCAT
TGTCGCACTA ATTTGGGCTT TTCTGCCTGC CAGGCAACAC TGGATTGCTA ATTTTGATAC
ATAGTTCCCC AGGGGCTAGT AACCTGCTTG GGTCTGGGAG AGTAGCTGTG CACTGGCTCT
AGCTGATGGT GACCGTACCC GGTGGCCAGA GCAGCACACT CAAGCGTTGG TGTCACACAG
ACCCAAGTTC AGTCTTGGCT TTGTCACTTC CTGCCGAGTG GCTGGGGACT AATTTTCTAC
CTCTTAGTGT TGTTGCCTGT GAGGTAAGAC CTACCTCCCT GAGGTGTTCC CGCAGCAAAAT
GCCGAGAAAC GCACCTCTTG GTCAGGGTGA CTGCATCCCA GACCCTCCCT TTGACCTGAG
AATGTGGACC CTTCACTCCT CCGGTAGAGG CTGAAACAGT AAAGGGTGGC ACCTGCATGT
GGGGATGCTG CTTCAAGCTT TGCAGACCAC TCAGGTAAGA TATATGGACT CTCGAACTCT
GAGAGAGCGA CAGAGACAGA CACAGACACA GACACAGAGA CAGAGAGACA GAGACAGAGA
GGCAGAGAGA GAAGGGGGAG TGGGGTGGGT GTGTGCAGGA GTACTGCCCT GCGTGATTGT
GATTAGAGAA AATGACTCTG CTCACAGAAT AAATTTTCTA GAGCAAAGCA GAAGGCAGGG
AGAAATGACA GGAGCATGGT GGAAGAGGG GACAGATCTT GCAGGGGCCT GCTGGGTGAC
TGTCCTCTAC ACGCCTTCCA TTGTGTCCCA TGAGAGTCTC TTGTCCGGAC ACCTTACTTA
GTTGCTTAAG CTGATTTGAA TGAGTGTCTA TTA CTGGCAG CCCGAGAGC AGCAGATAAA
GAGTAAGTCT ATGTGCTAAC ATTGCACAGT GTTTCCTGAA CATCAGCCAT TTGCATCTCT
CCTTGCAAGC TTTGTAATGT CCACGCACCG GCTGTGTGTT TACTTAATAA ATACTTTTTC
TTTAAATCCA A

F I G . 4

4/12

Met	Glu	Pro	His	Asp	Ser	Ser	His	Met	Asp	Ser	Glu	Phe	Arg	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Ile	1	5	10	15	20
Val	Tyr	Ser	Ile	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Val	Ile	Ala	Asn	Gly	Tyr	Val	Leu	Trp	Val	Phe	25	30	35	40	
Ala	Arg	Leu	Tyr	Pro	Cys	Lys	Lys	Phe	Asn	Glu	Ile	Lys	Ile	Phe	Met	Val	Asn	Leu	Thr	45	50	55	60	
Met	Ala	Asp	Met	Leu	Phe	Leu	Ile	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Ile	Val	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Gln	65	70	75	80	
Gly	Asn	Trp	Ile	Leu	Pro	Lys	Phe	Leu	Cys	Asn	Val	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Phe	Ile	Asn	85	90	95	100	
Thr	Tyr	Cys	Ser	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	Asn	Arg	Phe	Gln	Ala	Val	Thr	105	110	115	120	
Arg	Pro	Ile	Lys	Thr	Ala	Gln	Ala	Asn	Thr	Arg	Lys	Arg	Gly	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Val	125	130	135	140	
Ile	Trp	Val	Ala	Ile	Val	Gly	Ala	Ala	Ser	Tyr	Phe	Leu	Ile	Leu	Asp	Ser	Thr	Asn	Thr	145	150	155	160	
Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Arg	Cys	Phe	Glu	His	Tyr	Glu	Lys	Gly	165	170	175	180	
Ser	Val	Pro	Val	Leu	Ile	Ile	His	Ile	Phe	Ile	Val	Phe	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Phe	Leu	185	190	195	200	
Ile	Ile	Leu	Phe	Cys	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	Arg	Thr	Leu	Leu	Met	Gln	Pro	Val	Gln	Gln	205	210	215	220	
Gln	Arg	Asn	Ala	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Ala	Leu	Trp	Met	Val	Cys	Thr	Val	Leu	Ala	Val	225	230	235	240	
Phe	Ile	Ile	Cys	Phe	Val	Pro	His	His	Val	Val	Gln	Leu	Pro	Trp	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	245	250	255	260	
Gly	Phe	Gln	Asp	Ser	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Ile	Asn	Asp	Ala	His	Gln	Val	Thr	Leu	Cys	265	270	275	280	
Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Cys	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Ile	Tyr	Cys	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Phe	285	290	295	300	
Arg	Lys	His	Leu	Thr	Glu	Lys	Phe	Tyr	Ser	Met	Arg	Ser	Ser	Arg	Lys	Cys	Ser	Arg	Ala	305	310	315	320	
Thr	Thr	Asp	Thr	Val	Thr	Glu	Val	Val	Val	Pro	Phe	Asn	Gln	Ile	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	325	330	335	340	
Lys	Asn																							

F I G. 5

5/12

ATG GAG CCA CAT GAC TCC TCC CAC ATG GAC TCT GAG TTC CGA TAC ACT CTC TTC CCG ATT
GTT TAC AGC ATC ATC TTT GTG CTC GGG GTC ATT GCT AAT GGC TAC GTG CTG TGG GTC TTT
GCC CGC CTG TAC CCT TGC AAG AAA TTC AAT GAG ATA AAG ATC TTC ATG GTG AAC CTC ACC
ATG GCG GAC ATG CTC TTC TTG ATC ACC CTG CCA CTT TGG ATT GTC TAC TAC CAA AAC CAG
GGC AAC TGG ATA CTC CCC AAA TTC CTG TGC AAC GTG GCT GGC TGC CTT TTC TTC ATC AAC
ACC TAC TGC TCT GTG GCC TTC CTG GGC GTC ATC ACT TAT AAC CGC TTC CAG GCA GTA ACT
CGG CCC ATC AAG ACT GCT CAG GCC AAC ACC CGC AAG CGT GGC ATC TCT TTG TCC TTG GTC
ATC TGG GTG GCC ATT GTG GGA GCT GCA TCC TAC TTC CTC ATC CTG GAC TCC ACC AAC ACA
GTG CCC GAC AGT GCT GGC TCA GGC AAC GTC ACT CGC TGC TTT GAG CAT TAC GAG AAG GGC
AGC GTG CCA GTC CTC ATC ATC CAC ATC TTC ATC GTG TTC AGC TTC TTC CTG GTC TTC CTC
ATC ATC CTC TTC TGC AAC CTG GTC ATC ATC CGT ACC TTG CTC ATG CAG CCG GTG CAG CAG
CAG CGC AAC GCT GAA GTC AAG CGC CGG GCG CTG TGG ATG GTG TGC ACG GTC TTG GCG GTG
TTC ATC ATC TGC TTC GTG CCC CAC CAC GTG GTG CAG CTG CCC TGG ACC CTT GCT GAG CTG
GGC TTC CAG GAC AGC AAA TTC CAC CAG GCC ATT AAT GAT GCA CAT CAG GTC ACC CTC TGC
CTC CTT AGC ACC AAC TGT GTC TTA GAC CCT GTT ATC TAC TGT TTC CTC ACC AAG AAG TTC
CGC AAG CAC CTC ACC GAA AAG TTC TAC AGC ATG CGC AGT AGC CGG AAA TGC TCC CGG GCC
ACC ACG GAT ACG GTC ACT GAA GTG GTT GTG CCA TTC AAC CAG ATC CCT GGC AAT TCC CTC
AAA AAT NNN

F I G. 6

TTCACGAGGG CTGGGGCCAG GACCCAGACA GAGACACACG GTCAGTGCAG CTGAAGCCGC
TGCCCCCTGCT ACAGGCACCA CCAGGACCAG CTGATCATTC CAGCCCACAG CA

F I G. 7

6/12

TCCCTGCTTC CAGGCCTGAA GTCTTCTCCT CCATGAAACA TCATGACTGA GCTGGGGGAA
GAAGGGATAT CTACTGTGGG TCTGGGCACC ACCTCTGTGG CACTGGTGGG CCATTAGATT
TGGAGGCTAC CTCACCTGGG CAGGGATGAT GCAGAGCCAG GCTGTTGGAA AATCCAGAAC
TCAAATGAGC CCCTTCATCC GCCTGTGGGC GCATACTACA GTAACCTGTGA CTGATGACTT
TATCCTGAGT CCCTTAATCT TATGGGGCCG GAAGGAATGT CAGGGCCAGG TGCAGACCTT
GGGGGAAGAC TTAAACCAC CTAGTTCTCC CACTGGGGCA TCGGTCTAAA GCTTTGGGGG
AGTGGCCCCA GTGGCTCACA CCTGTAATCC CAGCACTTTG GGAGGCCGAG GTGGGCAGAT
CATGGGTCAA GAGATCGAGA CATCCTGGCC AACATTGTAA AACCCCATCT CTACTAAAC
ATACAAAAAT TAGCCGGGCA TGGTGCACAC GCCTGTAGTC CCAGCTACTC AGGAGGCTGA
GGCAGGAGAA TCGCTTGAAC CTGGGAGGCA GAGGTTGCAG TGAACCTAGA TTGCACCATT
GCACTCTAGC CTGGCAACAG AGGCAGATTC CCTCCTGCC

F I G. 8

7/12

FIG. 9

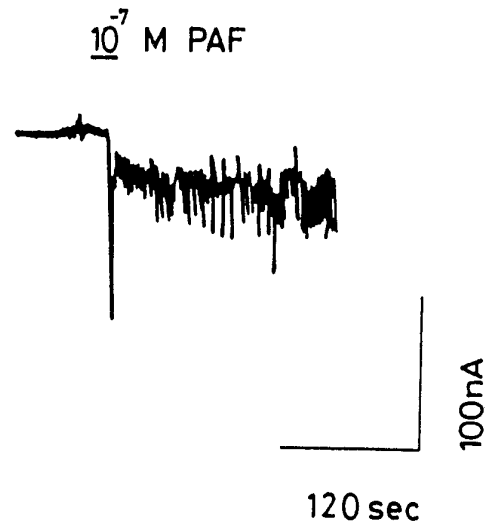
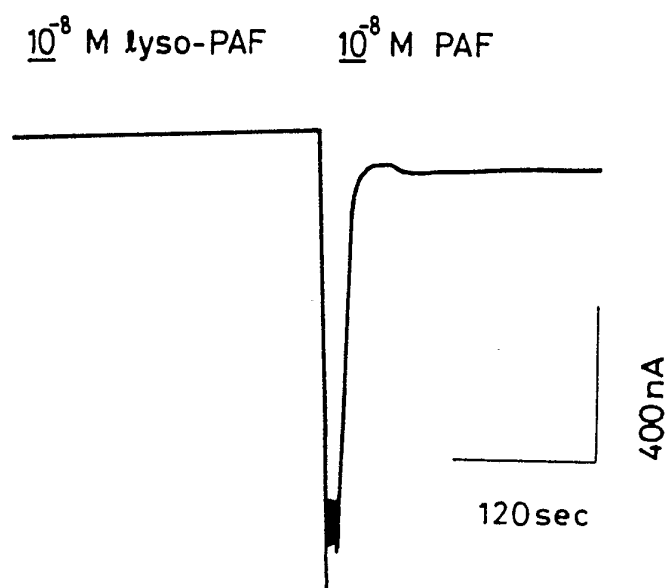
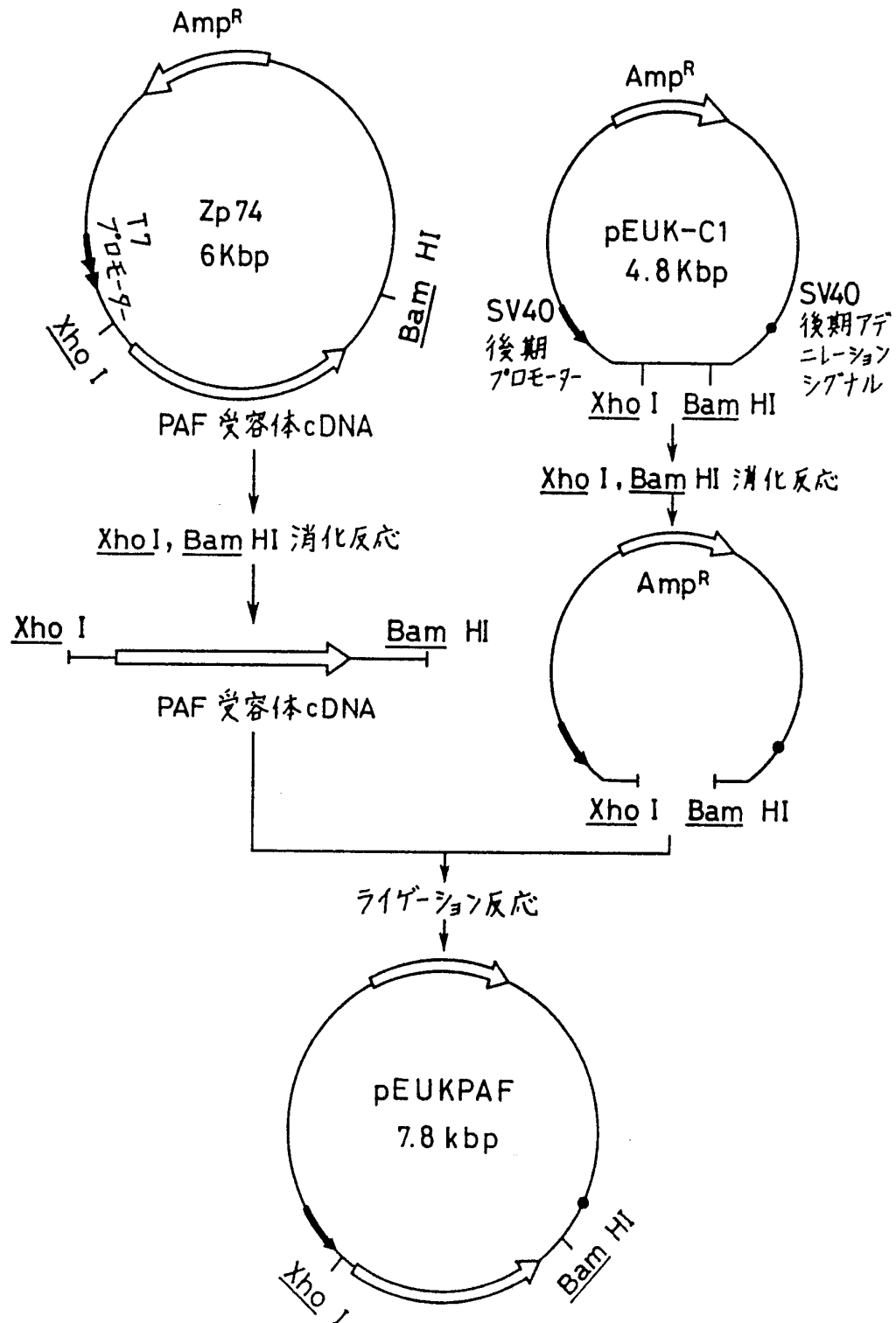


FIG. 10



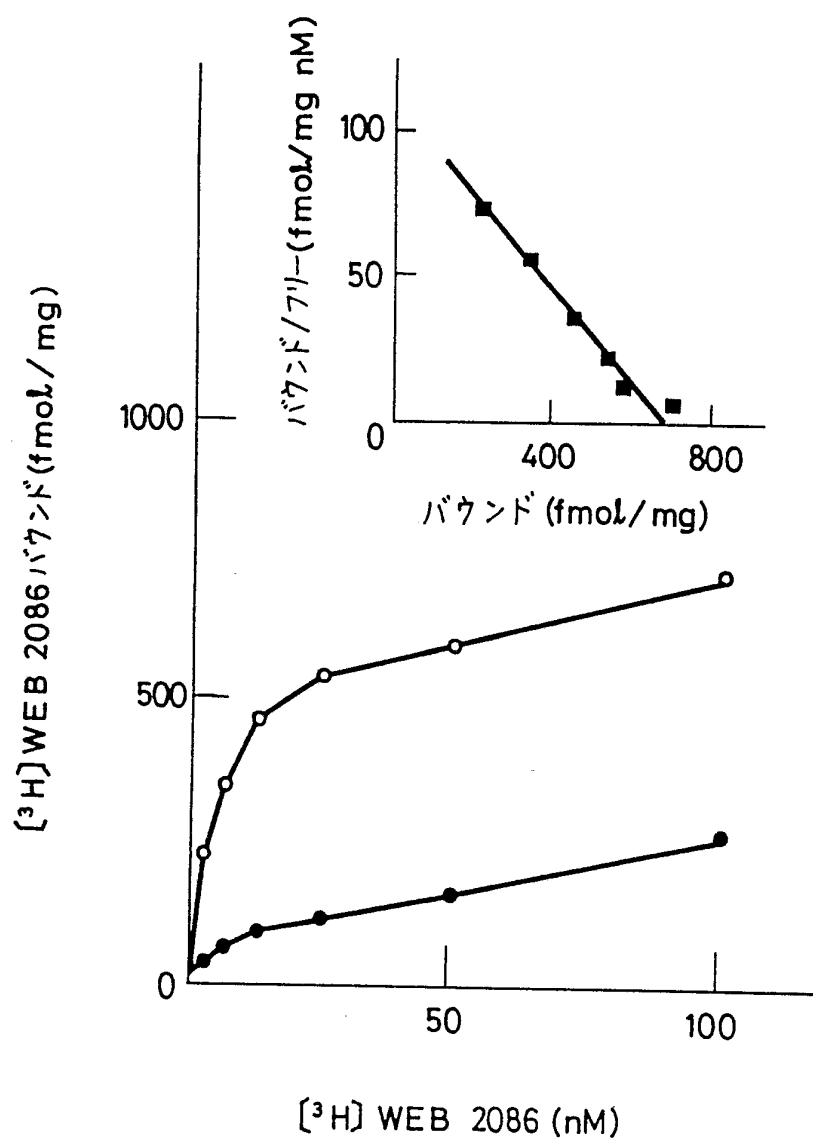
8/12

FIG. 11



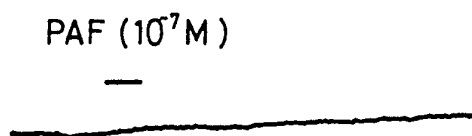
9/12

FIG. 12



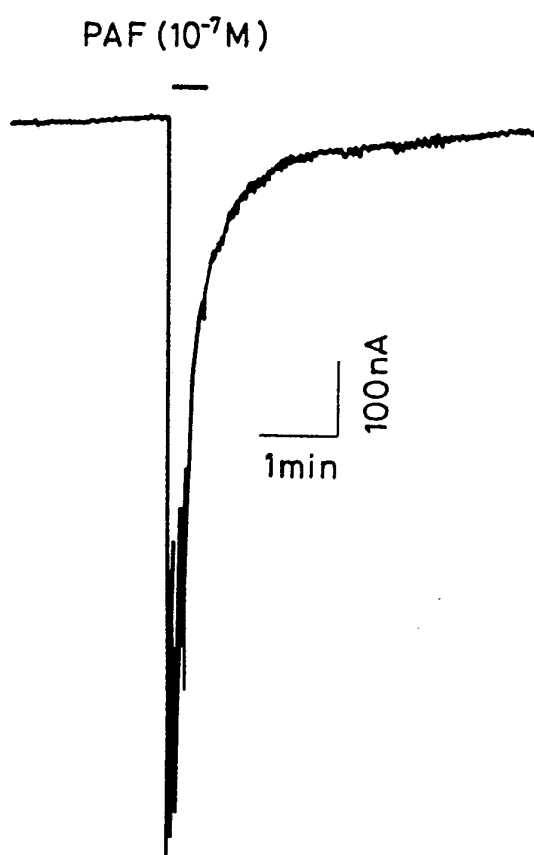
10/12

FIG. 13



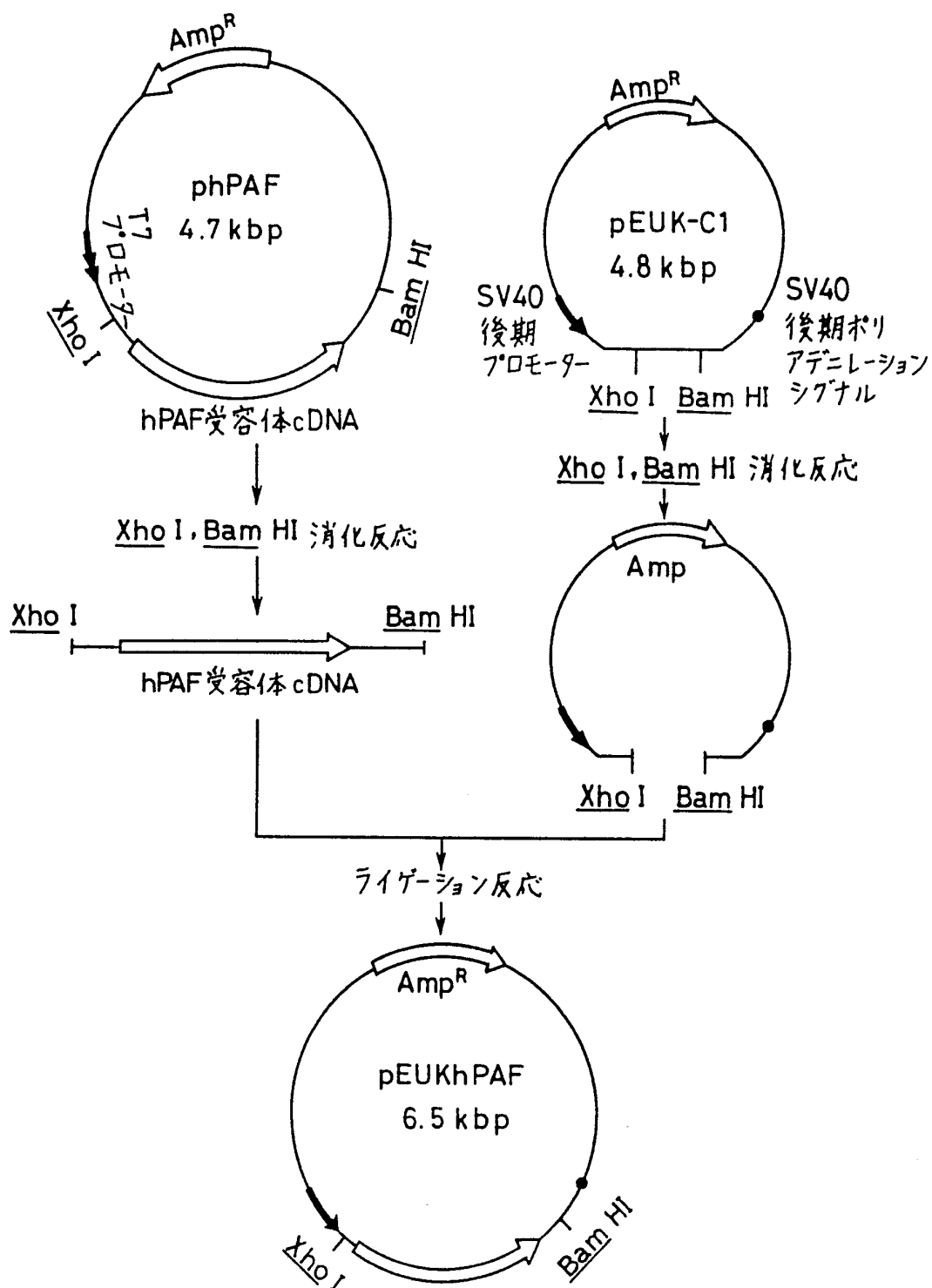
50nA
1min

FIG. 14



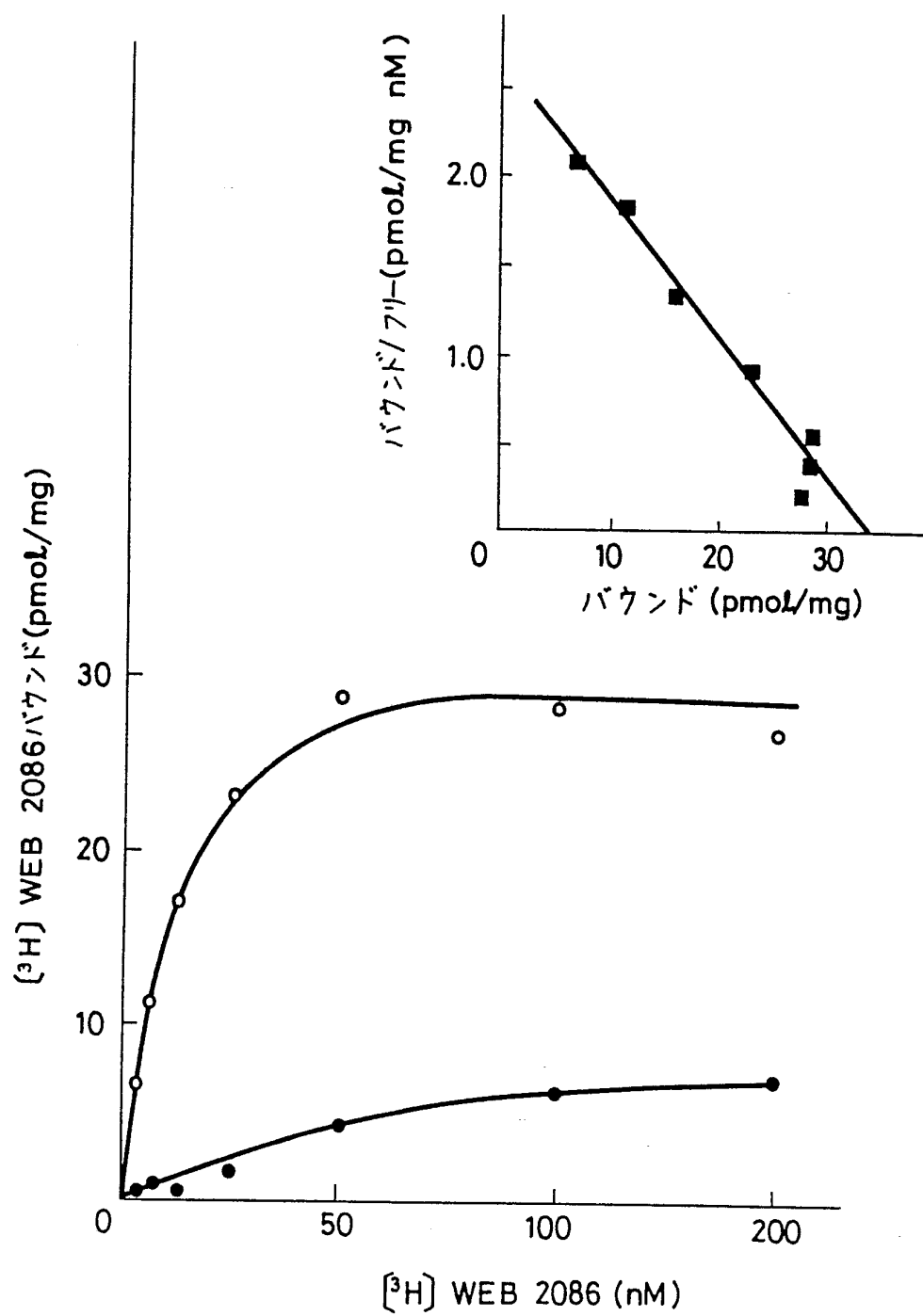
11/12

FIG. 15



12/12

FIG. 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01779

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C12N15/10, C12N5/16//C12P21/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12N15/00-15/90	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Biosis Database, Chemical Abstract Database (CA, REG)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	J. Lipid, Res., Vol. 28, No. 6, 1987, Bittman R. et al. "Synthesis and biochemical studies of analogs of platelet-activating-factor bearing a methyl group at C2 of the glycerol backbone" p. 733-738	1-7
A	Int. J. Tissue. React., Vol. 7, No. 5, 1985, Sanchez Crespo M. et al. "Synthesis of platelet-activating-factor from human polymorphonuclear leukocytes regulation and pharmacological approaches" p. 345-350	1-7
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "8" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
March 25, 1992 (25. 03. 92)		April 7, 1992 (07. 04. 92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁶ C12N15/10, C12N5/16//C12P21/02			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	C12N15/00-15/90		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
Biosis Database, Chemical Abstract Database (CA, REG)			
III. 関連する技術に関する文献			
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		請求の範囲の番号
A	J. Lipid. Res., 第28巻, 第6号, 1987, Bittman R. et al. [Synthesis and biochemical studies of analogs of platelet-activating-factor bearing a methyl group at C2 of the glycerol backbone] p.733-738	1-7	
A	Int. J. Tissue. React., 第7巻, 第5号, 1985, Sanchez Crespo M. et al. [Synthesis of platelet-activating-factor from human polymorphonuclear leukocytes regulation and pharmacological approaches] p.345-350	1-7	
※ 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日 25.03.92		国際調査報告の発送日 07.04.92	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)		権限のある職員 特許庁審査官 佐 伯 裕 子	