(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4392058号
(P4392058)

(45)発行日　平成21年12月24日(2009.12.24)　(24)登録日　平成21年10月16日(2009.10.16)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705	
C07K 14/735	(2006.01)	C07K	14/735	
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 27　(全 56 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-501000
(86)(22)出願日	平成7年5月22日(1995.5.22)
(65)公表番号	特表平10-501131
(43)公表日	平成10年2月3日(1998.2.3)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/006530
(87)国際公開番号	WO1995/033059
(87)国際公開日	平成7年12月7日(1995.12.7)
審査請求日	平成14年5月22日(2002.5.22)
審判番号	不服2006-6154(P2006-6154/J1)
審判請求日	平成18年4月4日(2006.4.4)
(31)優先権主張番号	08/249,553
(32)優先日	平成6年5月26日(1994.5.26)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/308,881
(32)優先日	平成6年9月12日(1994.9.12)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　591123609
イミュネックス・コーポレーション
ＩＭＭＵＮＥＸ　ＣＯＲＰＯＲＡＴＩＯＮ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９１３２０－１７９９，サウザンド・オークス，ワン・アムジェン・センター・ドライブ
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】オンコスタチンM受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ｇｐ１３０ポリペプチド及びオンコスタチンM受容体のβ鎖（ＯＳＭ－Ｒβ）ポリペプチドを含む、オンコスタチンMと結合可能な精製された受容体であって、ここにおいて：

ａ）上記ｇｐ１３０ポリペプチドが以下の：

ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるアミノ酸配列からなるｇｐ１３０ポリペプチド；

ｉｉ）オンコスタチンMと結合可能な、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のアミノ酸１－５８２を含む、（ｉ）のポリペプチドの断片；及び

ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のアミノ酸１ないし６８６から１又は数個のアミノ酸残基が欠失、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなる、オンコスタチンMと結合可能なｇｐ１３０ポリペプチド

からなるグループから選択され；

ｂ）上記ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドが以下の：

ｉｖ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示されるアミノ酸配列からなるＯＳＭ－Ｒβポリペプチド；

ｖ）ｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンMの間の結合を増強することのできる、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１－４３２を含む、（ｉｖ）のポリペプチドの断片；及び

ｖｉ）ｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンMの間の結合を増強することができ、そして、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１ないし９５２から１又は数個のアミノ酸残基

が欠失、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなる、ＯＳＭ－Ｒβポリペプチド
からなるグループから選択される、
前記受容体。
【請求項２】
前記受容体が、可溶性ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドに共有結合した可溶性ｇｐ１３０ポリペプチドを含む、請求項１に記載の受容体。
【請求項３】
前記受容体が、ペプチドリンカーを介してＯＳＭ－Ｒβに共有結合したｇｐ１３０を含む、請求項１に記載の受容体。
【請求項４】
前記受容体が、以下の式：
R_1－Ｌ－R_2またはR_2－Ｌ－R_1
［式中、R_1は可溶性のｇｐ１３０を表しており；R_2は可溶性のＯＳＭ－Ｒβを表しており；そして、Ｌはペプチドリンカーを表している。］
の組換え融合タンパク質である、請求項３に記載の受容体。
【請求項５】
前記可溶性ｇｐ１３０がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のアミノ酸１ないしｙ［ここで、ｙは３０８及び５９７の間の整数（３０８及び５９７を含む）を表す］を含み、そして、前記ＯＳＭ－ＲβがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１ないしｘ［ここで、ｘは４３２及び７１４の間の整数（４３２及び７１４を含む）を表す］、請求項４に記載の受容体。
【請求項６】
請求項４又は５の受容体をコードする単離されたＤＮＡ。
【請求項７】
請求項６のＤＮＡを含む組換え発現ベクター。
【請求項８】
請求項４又は５に記載の受容体を調製する方法であって、上記融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、上記融合タンパク質の発現を促進する条件下で培養し、そして、上記融合タンパク質を回収することを含む、前記方法。
【請求項９】
可溶性のｇｐ１３０のＣ末端に結合した抗体のＦｃ領域のポリペプチドを含む第１の融合タンパク質、及び、可溶性のＯＳＭ－ＲβのＣ末端に結合した抗体のＦｃ領域のポリペプチドを含む第２の融合タンパク質を含み、ここにおいて、上記第１の融合タンパク質はＦｃ領域ポリペプチド間のジスルフィド結合を介して上記第２の融合タンパク質に結合している、請求項２に記載の受容体。
【請求項１０】
請求項９に記載の受容体を調製する方法であって、上記第１の融合タンパク質をコードする第１の発現ベクター及び上記第２の融合タンパク質をコードする第２の発現ベクターでコトランスフェクトした宿主細胞を、上記第１及び第２の融合タンパク質の発現を促進する条件下で培養し、そして、上記受容体を回収することを含む、前記方法。
【請求項１１】
前記可溶性ｇｐ１３０がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のアミノ酸１ないしｙ［ここで、ｙは３０８及び５９７の間の整数（３０８及び５９７を含む）を表す］を含み、そして、前記ＯＳＭ－ＲβがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１ないしｘ［ここで、ｘは４３２及び７１４の間の整数（４３２及び７１４を含む）を表す］、請求項９に記載の受容体。
【請求項１２】
ｇｐ１３０ポリペプチド及びオンコスタチンM受容体のβ鎖（ＯＳＭ－Ｒβ）ポリペプチドを含む、オンコスタチンMと結合可能な精製された受容体であって、ここにおいて：
上記ｇｐ１３０ポリペプチドがオンコスタチンMと結合可能であり、そして、以下の：
ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列のコード領域を含むＤＮＡ；

ｂ）（ａ）のＤＮＡに、６８℃でのハイブリダイゼーション、次いで、６３－６８℃での０．１×ＳＳＣ／０．１％　ＳＤＳ中での洗浄を含む、非常にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であるＤＮＡ；及び
ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されているアミノ酸配列をコードするＤＮＡ
からなるグループから選択されるＤＮＡによってコードされており；
上記ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドがｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンＭの間の結合を増強することができ、そして、以下の：
ａ’）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に示されるヌクレオチド配列のコード領域を含むＤＮＡ；
ｂ’）（ａ’）のＤＮＡに、６８℃でのハイブリダイゼーション、次いで、６３－６８℃での０．１×ＳＳＣ／０．１％　ＳＤＳ中での洗浄を含む、非常にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であるＤＮＡ；及び
ｃ’）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示されているアミノ酸配列をコードするＤＮＡ
からなるグループから選択されるＤＮＡによってコードされている、
前記精製された受容体。
【請求項１３】
ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドをコードする単離されたＤＮＡであって、以下の：
ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸－２７ないし９５２を含むＯＳＭ－ＲβポリペプチドをコードするＤＮＡ；
ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１ないし９５２を含むＯＳＭ－ＲβポリペプチドをコードするＤＮＡ；
ｃ）ｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンＭの間の結合を増強することができる、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１－４３２を含む、（ａ）のポリペプチドの断片をコードするＤＮＡ；及び
ｄ）（ａ）のＤＮＡに、６８℃でのハイブリダイゼーション、次いで、６３－６８℃での０．１×ＳＳＣ／０．１％　ＳＤＳ中での洗浄を含む、非常にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であるＤＮＡ、ここにおいて、上記ＤＮＡによってコードされるＯＳＭ－Ｒβポリペプチドはｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンＭの間の結合を増強することができる
からなるグループから選択される、前記ＤＮＡ。
【請求項１４】
ＯＳＭ－Ｒβが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸－２７ないし９５２及びアミノ酸１ないし９５２からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の単離されたＤＮＡ。
【請求項１５】
前記ＤＮＡが可溶性ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドをコードする、請求項１３に記載の単離されたＤＮＡ。
【請求項１６】
前記可溶性ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸－２７ないしｘ、又は１ないしｘ［ここで、ｘは４３２及び７１４の間の整数（４３２及び７１４を含む）を表す］を含む、請求項１５に記載の単離されたＤＮＡ。
【請求項１７】
請求項１３ないし１６のいずれか１項に記載のＤＮＡを含む発現ベクター。
【請求項１８】
ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドを調製するための方法であって、請求項１７に記載のベクターで形質転換した宿主細胞を、ＯＳＭ－Ｒβの発現を促進する条件下で培養し、そして、ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドを回収する、ことを含む、前記方法。
【請求項１９】
請求項１３ないし１６のいずれか１項に記載のＤＮＡによってコードされたＯＳＭ－Ｒβポリペプチド。
【請求項２０】

可溶性ＯＳＭ－Ｒβポリペプチドである、請求項１９に記載のＯＳＭ－Ｒβポリペプチド。

【請求項２１】

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸－２７ないしｘ、又は１ないしｘ［ここで、ｘは４３２及び７１４の間の整数（４３２及び７１４を含む）を表す］を含む、請求項２０に記載の可溶性ＯＳＭ－Ｒβ。

【請求項２２】

以下の：

ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のＯＳＭ－Ｒβポリペプチド；

ｂ）ｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンＭの間の結合を増強することができる、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１－４３２を含む、（ａ）のポリペプチドの断片；及び

ｃ）ｇｐ１３０ポリペプチドとオンコスタチンＭの間の結合を増強することができ、そして、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１ないし９５２から１又は数個のアミノ酸残基が欠失、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなる、ＯＳＭ－Ｒβポリペプチド

からなるグループから選択される、精製されたＯＳＭ－Ｒβポリペプチド。

【請求項２３】

株ＡＴＣＣ６９６７５にて寄託されている組換えベクター中のＯＳＭ－Ｒβ　ｃＤＮＡによってコードされる、請求項２２に記載のＯＳＭ－Ｒβポリペプチド。

【請求項２４】

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸１ないし９５２を含む、請求項２２に記載のＯＳＭ－Ｒβポリペプチド。

【請求項２５】

請求項２０に記載の可溶性ＯＳＭ－Ｒβポリペプチド及び抗体Ｆｃポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項２６】

請求項２２に記載のＯＳＭ－Ｒβポリペプチドと免疫反応性である抗体。

【請求項２７】

前記抗体が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のＯＳＭ－Ｒβポリペプチドと免疫反応性であるモノクローナル抗体である、請求項２６に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

背景技術

オンコスタチンＭは、いくつかの腫瘍由来細胞系列及び正常細胞系列の増殖を制御する一本鎖ポリペプチドの分泌サイトカインである。多くの細胞型がオンコスタチンＭと結合することが今までに明らかになっている。例えば、Linsley et al.,J.Biol.Chem.,264:4282（1989）を参照されたい。オンコスタチンＭは多くの腫瘍細胞型の増殖を阻害することが示されている（Linsley et al.,上述）。しかし一方、このタンパク質はカポジ肉腫細胞の増殖を促進することが示唆されている（Nair et al.,Science 255:1430,1992;Miles et al.,Science 255:1432,1992;及びCai et al.,Am.J.Pathol.145:74,1994）。

オンコスタチンＭ結合タンパク質（例えば細胞表面オンコスタチンＭ受容体）の同定及び単離は、例えば受容体を介して伝達される生物信号の解析を可能にするという理由で望ましい。また可溶型のそのような受容体は、種々の試験管内（in vitro）実験または生体内（in vivo）反応においてオンコスタチンＭの生物活性を競争的に阻害するために用いることができる。例えば、可溶型の受容体を投与することによって、投与した受容体が生体内（in vivo）でオンコスタチンＭと結合して、細胞由来の細胞表面受容体とオンコスタチンＭとの結合を阻害するようにできる。

gp130として知られるタンパク質は、オンコスタチンＭと結合するが、結合の親和性は相対的に低いということが知られていた（Gearing et al.,Science 255:1434,1992）。白血病阻害因子（LIF）受容体及びgp130からなるヘテロ二量体受容体は、gp130単独の場合よりも高い親和性でオンコスタチンＭと結合するが、LIFとも高親和性で結合する（Gearing et al.,上述）。いくつかの利用目的には、オンコスタチンＭとは高親和性で結合するが、高

親和性LIF受容体としては機能しない受容体が有利であると考えられる。本発明以前には、そのような受容体の同定または単離はなされていなかった。

発明の概要

本発明は、本明細書中でオンコスタチンM受容体βサブユニット（OSM-Rβ）と呼称する新規のポリペプチドを提供する。また、gp130として知られるオンコスタチンM結合タンパク質に（好ましくは共有結合で）結合したOSM-Rβからなる受容体を提供する。gp130ポリペプチドのOSM-Rβポリペプチドに対する共有結合は、例えば架橋試薬またはポリペプチド架橋分子による、何らかの適した方法でなされ得る。本発明の一つの態様においては、受容体は組み換えDNA技術によって産生した融合タンパク質である。OSM-Rβ及びgp130からなるこの受容体は、gp130単独で結合する場合よりも高いレベルでオンコスタチンMと結合する。オンコスタチンMを介して起こる疾患は、このような疾患にかかった罹患者に治療上有効量のこの発明による受容体を投与することによって治療し得る。

【図面の簡単な説明】

図1には、組み換えgp130を発現している細胞による放射性ヨウ化オンコスタチンMの結合試験から得られたスカッチャード解析を示す。この試験は実施例2に記載する。

図2には、組み換えgp130及びOSM-Rβの両方を発現している細胞による、放射性ヨウ化オンコスタチンMの結合試験の結果のスカッチャード解析を示す。実施例2に記載した通り、図1に示したgp130単独によるオンコスタチンMとの結合と比較した、オンコスタチンMとの結合の高親和性を図2のデータは証明している。

図3は、実施例5に記載した種々の受容体タンパク質に対する白血病阻害因子（LIF）及びオンコスタチンMの結合を示す棒グラフである。

発明の詳細な説明

本発明は、オンコスタチンM受容体βサブユニット（OSM-Rβ）と呼称する新規のポリペプチドを提供する。OSM-RβをコードするDNA、OSM-RβDNAを含む発現ベクター、及びそのような発現ベクターで形質転換した宿主細胞を開示する。また、組み換えOSM-Rβポリペプチド（可溶型タンパク質を含む）の生産法を開示する。また、この新規のポリペプチドと免疫反応活性を有する抗体を本明細書中で提供する。

本発明のさらなる態様は、オンコスタチンMとの結合能を持つ受容体（この受容体はOSM-Rβ及びgp130からなるものとする）を対象とする。この受容体は、オンコスタチンMを介して起こる疾患を含む種々の生体内（in vivo）及び試験管内（in vitro）反応において利用し得る。

実施例1の単離したOSM-RβcDNAのDNA及びコードされるアミノ酸配列を配列番号5及び配列番号6に示す。コードされるタンパク質は、（N末端からC末端方向に向けて）シグナルペプチド（配列番号6のアミノ酸-27から-1）、続く細胞外ドメイン（アミノ酸1から714）、膜貫通領域（アミノ酸715から734）、及び細胞内ドメイン（アミノ酸735から952）からなる。クローニングベクターpBluescript（登録商標）SK-中にOSM-RβcDNAを持つものからなる組み換えベクターで形質転換した大腸菌細胞はAmerican Type Culture Collection、Rockville,MD,U.S.A.に1994年8月16日に寄託し、受託番号ATCC 69675を付与された。

実施例2に記載した結合試験では、gp130のみを発現している細胞またはgp130及びOSM-Rβの両者を発現している細胞による、オンコスタチンMの結合を比較した。gp130及びOSM-Rβの両者を発現している細胞は、gp130のみを発現している細胞よりも高いオンコスタチンM結合親和性を示した。実施例5に記載した試験は、OSM-Rβ単独ではオンコスタチンMと検出可能なレベルで結合しないことを証明している。しかし、可溶型OSM-Rβ/Fc融合タンパク質をコードするベクターと可溶型gp130/Fc融合タンパク質をコードするベクターの両者を共形質導入した細胞によって発現されるタンパク質は、可溶型gp130/Fc融合タンパク質をコードするベクターのみを形質導入した細胞によって発現されるタンパク質よりも高いレベルでオンコスタチンMに結合した。

1つの態様においては、本発明の受容体は何らかの適当な方法によって（例えば架橋試薬またはポリペプチド架橋分子を介して）OSM-Rβに共有結合したgp130からなる。gp130タンパク質とOSM-Rβタンパク質との共有結合は、その結果生じる受容体のオンコスタチンM

結合能を阻害しない形式でなされる。1つの態様においては、この受容体は組み換えDNA技術によって生産される融合タンパク質である。
また、受容体はOSM-Rβと非共有的に結合したgp130からなり得る。OSM-Rβに対するgp130の非共有結合は、受容体のオンコスタチンM結合能を阻害しない何らかの適当な方法でなされ得る。1つの方法としては、OSM-Rβに最初の化合物を付加し、この最初の化合物に非共有的に結合する第二の化合物をgp130に付加する。このような化合物の例としては、ビオチン及びアビジンがある。すなわちこの受容体は、ビオチンとアビジンの非共有的な相互作用を介して形成される。本発明の1つの態様においては、OSM-Rβ及びgp130は組み換えポリペプチドであり、それぞれガ組み換え細胞から精製され、次に受容体を形成するために互いに非共有的に結合させられる。宿主細胞はOSM-Rβ及びgp130の両者が組み換え宿主細胞によって発現されるような方法で、2つの異なったベクターで形質転換されてもよい。このように形質転換した宿主細胞によって産生されるOSM-Rβ及びgp130は、会合して非共有的な相互作用を通して複合体を形成する。このような形質転換細胞が膜結合型のこれらのタンパク質を発現する場合、このような細胞は、競合試験を含む種々の試験において有用である。
本明細書中でgp130と呼称するタンパク質は、胎盤組織及びミエローマ細胞系列U266を含む細胞材料から精製されている。Hibi et al.,Cell 63:1149（1990）による報告の通り、その他の多くの細胞型がgp130RNAを発現することが判明した。gp130は高親和性インターロイキン6結合部位の形成及びIL-6信号伝達に関わることが報告されている（Hibi et al.,上述）。また、gp130はLIF受容体の親和性調節分子（affinity converter）として働く（Gearing et al.,Science 255:1434,1992）。全長のgp130タンパク質をコードするcDNAのクローニング及び発現は、本明細書中では参照として挙げるHibi et al.（上述）によって報告されている。
本明細書中で用いられる場合のOSM-Rβ及びgp130という用語は、目的の生物活性を持つ天然のタンパク質の変異型及び短縮型を含む。天然の配列中の付加、置換、または（複数の）アミノ酸の欠失によって産生した変異型は、後述でより詳細に論ずる。
OSM-Rβポリペプチドの一例は、実施例1に記載したcDNAクローンによってコードされる（即ち、寄託株ATCC 69675中の組み換えベクターのOSM-Rβ cDNA挿入断片によってコードされる）ものである。他のOSM-Rβポリペプチドは、タンパク質の膜貫通領域または細胞内ドメインの全てまたは一部を欠くものを含む。その他の短縮型OSM-Rβポリペプチドは、ヘマトポエチン受容体ファミリーで保存されている配列に関して選び得る。シグナル配列を含むことが望ましいかどうかは、融合タンパク質中のOSM-Rβの位置及び受容体が組み換えDNA技術によって生産される際に使用される宿主細胞のような因子による。
適当なgp130ポリペプチドの一例は、配列番号2に示したアミノ酸配列からなるものである。B10G/pDC303と呼称されるgp130をコードする組み換えベクターを形質転換した大腸菌株DH5α細胞は、American Type Culture Collection、Rockville,MD,U.S.A.に1991年11月14日に寄託され、ATCC受託番号68827として登録された。哺乳類発現ベクターpDC303（これにgp130cDNAを挿入してB10G/pDC303を作製した）はSFCAVとしても知られ、PCT出願WO 93/19777に記載されている。プラスミドB10G/pDC303に含まれるgp130cDNAの核酸配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列を配列番号1及び配列番号2に示す。このタンパク質は、（N末端からC末端の順に）22アミノ酸のシグナル配列、完全な細胞外ドメイン（アミノ酸1から597）、膜貫通領域（アミノ酸598から始まる）、及び部分的な細胞内ドメイン（アミノ酸621から686）からなる。
また、Hibi et al.（上述）によって開示されたgp130タンパク質を利用し得る。Hibi et al.によって報告された配列のシグナルペプチドの8番目のアミノ酸はバリンであるが、配列番号2においてはロイシンである（-15の位置）。アミノ酸配列におけるこの差異は、遺伝的多型性（このタンパク質を産生する個人の間での対立遺伝子間の変化）に帰着しうる。さらに、配列番号2のgp130タンパク質はHibi et al.（上述）に示された配列の708の位置のロイシン残基が最後の残基であり、細胞内ドメインが短縮されている。配列番号2のgp130タンパク質は短縮されてはいるが、オンコスタチンMと結合する細胞外ドメインを含

むので、本発明の受容体の構成部品としての利用に適している。
いくつかの受容体間で保存されているドメインに対応するgp130タンパク質の領域は、Hibi et al.（上述）の1150頁第2段及び1151頁第1段で論じられている。これらの保存された領域を含むように選ばれたその他の短縮されたgp130ポリペプチドも利用し得る。
可溶型OSM-Rβ及びgp130ポリペプチドはいくつかの応用にとって好ましい。本発明の一つの態様においては、受容体は可溶性gp130に共有的に結合した可溶型OSM-Rβからなる。本発明の文中で用いる“可溶型OSM-Rβ”とは、天然のOSM-Rβの細胞外領域の全てまたは一部とアミノ酸配列において実質的に類似しており、ポリペプチドの細胞膜への保持をもたらす膜貫通領域を欠如しているために発現に際して分泌されるポリペプチドを指す。適当な可溶型OSM-Rβポリペプチドは、目的の生物活性を保持している。可溶型OSM-Rβは、可溶型OSM-Rβタンパク質が分泌されることが可能ならば、膜貫通領域の一部または細胞内ドメインまたは他の配列の一部を含み得る。
同様に、本明細書中で用いる“可溶型gp130”という用語は、天然のgp130の細胞外領域の全てまたは一部とアミノ酸配列において実質的に類似しており、発現に際して分泌されるが、目的の生物活性は保持しているポリペプチドを指す。可溶型gp130は、そのポリペプチドが分泌される限りは、膜貫通領域、細胞内ドメイン、または他の配列の一部を含み得る。
一つの態様においては、可溶型OSM-Rβ及びgp130ポリペプチドは細胞外ドメインの全てを含む。分泌を実現するために、これらの可溶型ポリペプチドは天然のシグナルペプチドまたは異種構造のシグナルペプチドを含む。例えば、可溶型OSM-Rβポリペプチドの例は、配列番号6のアミノ酸-27から714または1から714を含む。可溶型gp130ポリペプチドの例は、配列番号2のアミノ酸-22から597または1から597を含む。
可溶型gp130ポリペプチドのその他の例は、後述の実施例4に記載されている通り、細胞外ドメイン中に見られるフィブロネクチンドメインの1つから3つ全部を欠如したものである。これらの可溶型gp130ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸-22からyまたは1からy（yは308から597までの1つの整数）を含むポリペプチドを含む。
抗体のFc領域ポリペプチドに融合させた、配列番号6のOSM-Rβのアミノ酸-27から432を含む可溶型融合タンパク質を、実施例5に記載する。この融合タンパク質のOSM-Rβ部分（OSM-Rβ細胞外ドメインの断片）は、目的の生物活性を保持していた。従って、可溶型OSM-Rβポリペプチドの例は、配列番号6のアミノ酸-27からx、または1からx（xは432から714までの整数）を含む。
可溶型OSM-Rβ及び可溶型gp130は、目的のタンパク質を発現している無処理の細胞を例えば遠心で培養液から除き、培地（上清）中の目的のタンパク質の有無に対して検定を行うことによって同定（及び膜結合した非可溶型の相対物から区別）し得る。培養液は、後述の実施例に記載する方法と類似または同一の方法を用いて検定され得る。OSM-Rβまたはgp130の培地中における存在は、そのタンパク質が細胞から分泌されていること、及び故にそのタンパク質が目的のタンパク質の可溶型であることを示唆する。可溶型OSM-Rβ及びgp130は、これらのタンパク質の自然に発生する型であり得る。また、OSM-Rβ及びgp130タンパク質の可溶断片は、後述するように組み換えDNA技術によって製造され、または他の方法によって単離され得る。
OSM-Rβ及びgp130の可溶型の利用は、いくつかの応用にとって有利である。可溶型タンパク質が細胞から分泌されるので、宿主細胞からのこれらのタンパク質の精製は簡便化され得る。さらに、可溶型OSM-Rβ及びgp130タンパク質を含む本発明の受容体は、全般的に静脈内投与により適している。
OSM-Rβ及びgp130タンパク質のシグナルペプチド及び種々のドメインに関する前述の議論に関して、タンパク質のそのような領域の以前に記載した境界は概略的なものであることを当業者は認識するであろう。例えば、シグナルペプチドの切断部位を予想するコンピュータープログラムは利用可能であっても、予想された部位とは別の部位で切断が起こり得る。さらに、シグナルペプチドが一箇所以上で切断されるために、タンパク質試料が異なったN末端アミノ酸を持つタンパク質分子の混合物からなり得ることが認識される。さら

に、OSM-Rβ膜貫通領域はコンピュータープログラムの予想と、Gearing et al.（EMBO J. 10:2839,1991）によって記載されたLIF受容体タンパク質の膜貫通領域とのホモロジーによって同定されたものである。従って、細胞外ドメインを含む可溶型OSM-Rβポリペプチドには、細胞外ドメインのC末端として以前に同定されたものとは異なるC末端アミノ酸を持つポリペプチドも含まれる。さらに、使用される特定の発現系に応じて異なる翻訳後プロセシングに応じて、種々のN末端を持つタンパク質が産生され得る。目的の生物活性を保持するこのような変異型は、本明細書中で用いる“OSM-Rβポリペプチド”及び“gp130ポリペプチド”という用語に含まれる。

可溶型ポリペプチドを含めて短縮型の（truncated）OSM-Rβ及びgp130は、多くの在来技術のいずれかによって調製し得る。組み換えタンパク質の場合、目的の断片をコードするDNA断片を発現ベクターにサブクローニングし得る。また、目的のDNA配列を既知の技術を用いて化学的に合成し得る。DNA断片は、クローン化した全長のDNA断片を制限エンドヌクレアーゼ消化することによって産生し、アガロースゲル上での電気泳動によって単離し得る。目的のDNA断片を発現ベクターに挿入するため、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む架橋DNAを用い得る。または、その断片はその中に天然に存在する切断部位で消化し得る。DNA断片のNまたはC末端を所望の部位に再構築するオリゴヌクレオチドを合成し得る。そのようなオリゴヌクレオチドは、目的のコーディング配列の上流に制限エンドヌクレアーゼ切断部位を持ち得、コーディング配列のN末端に開始コドン（ATG）を位置させる。

よく知られたポリメレース連鎖反応の手順もまた、望ましいタンパク断片をコードするDNA配列を単離するために用い得る。その断片の望ましい末端を含むオリゴヌクレオチドプライマーが、このようなポリメレース連鎖反応に用いられる。任意の適切なＰＣＲ法が用いられ得る。このような方法のうちの一つがＳａｉｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：４８７（１９８８）に記載されている。別の方法がＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＤＮＡ　Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ，Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ（１９８９），ｐｐ．１８９－１９６に記載されている。一般的に、ＰＣＲ反応は５’および３’のオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型のＤＮＡ（この場合はＯＳＭ－Ｒβまたはｇｐ１３０のＤＮＡ）および四種類のデオキシヌクレオシド三リン酸のそれぞれとを、適切な緩衝溶液の中で組み合わせることを含む。二本鎖ＤＮＡの鋳型を変性させるために溶液を（例えば、９５℃から１００℃まで）熱した後、ＤＮＡポリメレース酵素を加える前に冷却する。この反応を繰り返すことで望まれるＤＮＡ断片が増幅される。

ｇｐ１３０ポリペプチドはＯＳＭ－Ｒβポリペプチドに、共有または非共有結合によって結合する。非共有結合と対照的に、一般的に共有結合によって安定性が増すことから、例えば生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で使用すると言ったある種の応用の場合は共有結合が望ましい。本発明の受容体を構築するにあたって、共有結合は架橋剤、ペプチド架橋分子、または任意の他の適切な技術によって達成され得る。あるタンパク分子ともう一つのタンパク分子を架橋するための多くの有用な試薬が知られている。この目的には例えばＰｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓの、二価異機能性および二価同一機能性の架橋分子が利用出来る。このような架橋分子は、アミノ酸の側鎖のある官能基に反応することであるポリペプチドを他のポリペプチドにつなぐ二つの官能基（例えばエステルまたは／およびマレイミド）を含む。

本発明において用いられ得る一つのタイプのペプチド架橋分子はｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβの領域をそれぞれの領域が望まれる生物活性に必要な二次および三次構造を正しくとることを保証するのに充分な距離を隔てる。架橋分子はまた、ｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβの細胞外ドメインが正しい空間的配置をとり、オンコスタチンＭに対する結合部位を形成することを可能にするべきである。

当該技術分野においては適切なペプチド架橋分子が知られており、それらは慣用的な技術によって用いられ得る。適切なペプチド架橋分子の中には米国特許第４，７５１，１８０号および４，９３５，２３３号に記載されているものがあり、本明細書ではそれらは参考

文献として援用する。ペプチド架橋分子はｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβに、あるポリペプチドをもう一つのポリペプチドにつなぐために用いられる慣用的な手順によってつながれ得る。Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙより入手出来る上述の架橋剤は用いられ得るものの例に含まれる。それらの試薬に反応する側鎖をもつアミノ酸が、ペプチド架橋分子の中、例えばその末端に、含まれ得る。好ましくはｇｐ１３０とＯＳＭ－Ｒβが、ペプチド架橋分子を介してつながれた融合タンパクは組み換えＤＮＡ技術によって調製される。

本発明の態様の一つにおいては、ＯＳＭ－Ｒβおよびｇｐ１３０を免疫グロブリン由来のポリペプチドを介して連結する。抗体由来のポリペプチドの様々な部位（Ｆｃ領域を含む）に融合された異種のポリペプチドからなる融合タンパクの調製は例えば、Ａｓｈｋｅｎａｚｉら（ＰＮＡＳ　ＵＳＡ８８：１０５３５，１９９１）、およびＢｙｒｎら（Ｎａｔｕｒｅ３４４：６７７，１９９０）によって記載されている。一つの例としては、抗体のＦｃ領域由来のポリペプチドがＯＳＭ－ＲβのＣ末端に結合され得る。別のＦｃポリペプチドがｇｐ１３０のＣ末端に結合される。二つのＦｃポリペプチド間にジスルフィド結合が（例えば抗体分子中で鎖間のジスルフィド結合が通常存在する、蝶番領域と呼ばれる領域において）形成され、ｇｐ１３０／Ｆｃ融合タンパクに連結されたＯＳＭ－Ｒβ／Ｆｃ融合タンパクからなるヘテロ二量体を生ずる。都合よいことに、一方は可溶型ＯＳＭ－Ｒβ／Ｆｃを、他方は可溶型ｇｐ１３０／Ｆｃをコードした二つの異なる発現ベクターで、同時に宿主細胞を形質導入する。細胞内で、もしくは分泌中にヘテロ二量体が生産されると考えられる。

本明細書中で使用される”Ｆｃポリペプチド”なる用語は天然型および変異型と共に、二量体化を促進する蝶番領域を含む短縮された（truncated）Ｆｃポリペプチドを含む。ヒトＩｇＧ１抗体のＦｃ領域に由来する単一鎖のポリペプチドをコードする　ｃＤＮＡをｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（登録商標）クローニングベクター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｌａｊｏｌｌａ，ＣＡ）にクローニングし、ｈＩｇＧ１Ｆｃと呼称する組み換えベクターを作製した。唯一のＢｇｌII部位が、挿入されたＦｃをコードする配列の５’端の近くにある。ＳｐｅＩサイトが終止コドンのすぐ下流にある。クローン化したＦｃ　ｃＤＮＡのＤＮＡおよびコードされるアミノ酸配列は、配列番号３および配列番号４に示した。ｃＤＮＡにコードされるＦｃポリペプチドはＮ末端の蝶番領域から天然型のＣ末端におよび、すなわち本質的に全長の抗体のＦｃ領域である。このＦｃポリペプチドの一つの適切な変異型は米国特許出願第０８／０９７，８２７号に示されており、本明細書中ではこれを参考文献として援用する。この変異型はＦｃ受容体に対する減少した親和性を示す。

ジスルフィド結合によってつながれた、二つのＯＳＭ－Ｒβ／Ｆｃポリペプチドまたは二つのｇｐ１３０／Ｆｃポリペプチドからなるホモ二量体もまた、本明細書で開示する形質導入された宿主細胞によって生産される。これらのホモ二量体は、大きさの違いによって（例えばゲル電気泳動によって）お互いにすなわちヘテロ二量体と分離され得る。ヘテロ二量体はまた、一連の免疫親和性クロマトグラフィー（後に記載する）によっても精製され得る。

別の態様においては、抗体軽鎖の定常領域（またはその断片）の上流にｇｐ１３０（またはその断片）を含む第一の融合ポリペプチドが調製される。第二の融合ポリペプチドは抗体重鎖の定常領域（またはそのＮ端が少なくともC_H1領域を通じてのびている重鎖断片）の上流にＯＳＭ－Ｒβを含む。ジスルフィド結合がｇｐ１３０－軽鎖融合ポリペプチドとＯＳＭ－Ｒβ－重鎖融合ポリペプチドの間に形成され、したがって本発明の受容体が生成する。さらに別の態様としてＯＳＭ－Ｒβ－軽鎖融合ポリペプチドを調製し、ｇｐ１３０を抗体重鎖に融合してなる融合ポリペプチドとつながれる（ジスルフィド結合させる）前述の二つのジスルフィド結合した分子を組み合わせると、さらなるジスルフィド結合が二つのＦｃ領域の間に形成される。この結果生ずる四つの融合ポリペプチドからなる本発明の受容体は、構造の点で抗体に類似し、また二価のオンコスタチンM結合部位を提示する。

ｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβポリペプチドは別々に細胞源より精製され、その後互いに連結され得る。または、本発明の受容体は組み換えＤＮＡ技術を用いて生産され得る。ｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβポリペプチドは別々に、形質導入した宿主細胞により生産され、精製され、続いて共有結合され得る。本発明の態様の一つにおいては、宿主細胞はｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβを別々のポリペプチドとしてコードする外来ＤＮＡによって形質転換／形質導入される。この二つのポリペプチドは二つの遺伝子それぞれに対し開始および終止コドンを有する同一の発現ベクターによってコードされ得、または組み換え細胞は二つの別々の発現ベクターによって同時に形質導入され得る。別の態様においては、この受容体は組み換え体細胞内で融合タンパクとして生産され得る。

本発明の態様の一つにおいては、受容体タンパクは次式の組み換え融合タンパクである。

R_1-L-R_2またはR_2-L-R_1

ここでR_1はｇｐ１３０またはｇｐ１３０断片を、R_2はＯＳＭ－ＲβまたはＯＳＭ－Ｒβ断片を、Ｌはペプチド架橋分子を表す。

本発明の融合タンパクはＯＳＭ－ＲβのＮ末端部分に融合したペプチド架橋分子にｇｐ１３０のＣ末端部分を融合した構築物およびｇｐ１３０のＮ末端部分に融合したペプチド架橋分子にＯＳＭ－ＲβのＣ末端部分を融合した構築物を含む。ｇｐ１３０はｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβの望まれる生物活性を保持する単一のタンパクを生ずるような方法でＯＳＭ－Ｒβに共有結合されている。融合タンパクの構成分子は存在する順序で挙げられている。（すなわちＮ末端のポリペプチドが始めに挙げられ、次に架橋分子が、次にＣ末端のポリペプチドが挙げられる。）

融合タンパクをコードするＤＮＡ配列は、組み換えＤＮＡ技術を用いてそれぞれｇｐ１３０とＯＳＭ－Ｒβをコードする別々のＤＮＡ断片を適切な発現ベクターに挿入することで構築される。ｇｐ１３０をコードするＤＮＡ断片の３’末端は（架橋分子を介して）、配列の読み枠がｍＲＮＡを単一の生物学的に活性のある融合タンパクに翻訳することを許すように、ＯＳＭ－ＲβをコードするＤＮＡ断片の５’端につながれる。もしくは、ＯＳＭ－ＲβをコードするＤＮＡ断片の３’端が（架橋分子を介して）、配列の読み枠をｍＲＮＡから単一の生物活性のある融合タンパクへの翻訳することを可能にするようにして、ｇｐ１３０をコードするＤＮＡ断片の５’端につながれる。Ｎ末端のシグナル配列をコードするＤＮＡ配列はＮ末端のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列上に保持され得るが、終止コドンは第二の（Ｃ末端側の）ＤＮＡ配列を読むことを妨げるため、除かれる。逆に、翻訳停止に必要な終止コドンは、第二のＤＮＡ配列上に保持される。シグナル配列をコードするＤＮＡ配列は好ましくはＣ末端のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列から除かれる。

望まれるポリペプチド架橋分子をコードするＤＮＡ配列はｇｐ１３０およびＯＳＭ－ＲβをコードするＤＮＡ配列の間にそれぞれの配列と同じ読み枠で任意の適切な慣用技術を用いて挿入され得る。例えば、化学的に合成された、架橋分子をコードし適切な制限酵素切断部位を含むオリゴヌクレオチドがｇｐ１３０およびＯＳＭ－Ｒβをコードする配列の間につながれ得る。

もしくは、化学的に合成されたＤＮＡ配列はｇｐ１３０またはＯＳＭ－Ｒβの一方の３’末端に相補的な（終止コドンを含まない）配列を含み、その後に架橋分子をコードする配列を、その後にｇｐ１３０またはＯＳＭ－Ｒβの他方の５’末端に相補的な配列を含み得る。次いで、ｇｐ１３０とＯＳＭ－Ｒβを直接融合させた配列を含むベクターに架橋分子をコードする配列を挿入するために、オリゴヌクレオチドを用いた変異導入が用いられる。

本発明はｇｐ１３０、ＯＳＭ－Ｒβ、およびペプチド架橋分子を含む上記の融合タンパク質をコードする単離されたＤＮＡ配列を提供する。本明細書において開示するＯＳＭ－Ｒβをコードする新規のＤＮＡ配列およびまた、免疫グロブリン由来のポリペプチドに融合したＯＳＭ－ＲβポリペプチドをコードするＤＮＡ配列も提供される。本発明に含まれるＯＳＭ－ＲβをコードするｄＮＡ配列は、例えば、ｃＤＮＡ、化学的に合成されたＤＮＡ、ＰＣＲによって単離されたＤＮＡ、ゲノムのＤＮＡ、およびそれらを組み合わせたもの

を含む。ＯＳＭ－Ｒβのゲノムの配列は実施例１において単離されたｃＤＮＡもしくはその断片をプローブとして用いて、標準的な技術によって単離され得る。
本明細書においてはまた、単離されたＤＮＡ配列を含む組み換え発現ベクターをも提供する。”発現ベクター”とは、複製可能なＤＮＡ構築物であり、求められるタンパクをコードし、一組みの（１）たとえばプロモーター、オペレーター、またはエンハンサーといった遺伝子発現において調節的な役割をもつ遺伝的要素、（２）上記遺伝的要素と機能的に結合する、ｍＲＮＡへ転写され、タンパク質に翻訳される求められるタンパクをコードするＤＮＡ配列、（３）転写および翻訳の適切な開始および終止配列を含むものを指す。プロモーターおよびその他の調節要素の選択は、意図された宿主細胞によって一般的に異なる。
発現ベクターにおいて転写または翻訳を調節する調節要素は一般的に、哺乳類、微生物、ウイルス、または昆虫の遺伝子に由来する。更にまた、通常は複製の起点によって与えられる宿主内で複製する能力、および形質転換体の認識を可能にするための選択に用いる遺伝子も取り込まれ得る。レトロウイルス由来のベクターもまた使用され得る。
ＤＮＡ領域は、互いに機能的に関連性のある場合には、機能的に（operably）結合させる。例えば、ポリペプチドが宿主細胞膜を通して分泌される前駆体として発現される場合には、シグナルペプチドをコードするＤＮＡ（分泌のリーダー配列）をポリペプチドをコードするＤＮＡに機能的に結合させる；プロモーターが配列の転写を制御している場合には、コード配列にプロモーターを機能的に結合させる；およびリボソーム結合部位が翻訳を可能にするような位置にある場合には、リボソーム結合部位をコード配列に機能的に結合させる。一般に、”機能的に結合させる”とは、隣接させることを意味し、分泌のリーダー配列の場合には、隣接および読み枠がずれないことを意味する。
形質転換した宿主細胞とは、組換えＤＮＡ技術を用いて外来ＤＮＡで形質転換または形質導入した細胞のことである。本発明において、外来ＤＮＡは、本発明のタンパク質をコードする配列を含む。宿主細胞は、外来ＤＮＡのクローニングまたは増幅の目的で形質転換し、または、タンパク質を作成するための発現ベクターで形質転換する。適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、または高等真核細胞を含む。細菌、菌類、酵母、および哺乳動物の細胞の宿主にて使用する適当なクローニングおよび発現ベクターは、ポウエルら（クローニングベクター：実験の手引（Cloning Vectors:A Laboratory Manual）、Elsevier、ニューヨーク、１９８５）によって記載されており、その中の関連する開示は、参考文献として本明細書中に援用される。
原核生物は、例えば大腸菌または桿菌のような、グラム陰性またはグラム陽性生物を含む。原核生物の発現ベクターは、一般に、例えば、抗生物質耐性になるようなタンパク質、または栄養要求性を与えるタンパク質をコードする遺伝子、および宿主内で増幅することが保証されるような宿主によって認識される複製開始点といった、１つまたはそれ以上の表現型のある選択マーカーを含む。形質転換に適した原核生物宿主の例には、大腸菌、枯草菌、サルモネラチフィムリウム、およびシュードモナス、ストレプトマイセス、およびスタフロコッカスのさまざまな種を含み、この他もまた、選択できる。
細菌に使用するのに有用な発現ベクターは、既知のクローニングベクターｐＢＲ３２２（ＡＴＣＣ３７０１７）の遺伝的要素を含む商業的に入手可能なプラスミド由来の選択マーカーおよび細菌の複製開始点を含む。このような市販されているベクターは、例えば、ｐＫＫ２２３-３（Pharumasia Fine Chemicals、ウプサラ、スウェーデン）およびｐＧＥＭ１（Promega Biotec、マディソン、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）を含む。コノヨウナｐＢＲ３２２の”骨格”部分ヲ、適切なプロモーターおよび発現させる構造配列と結合させる。大腸菌は、典型的には大腸菌種由来のプラスミドであるｐＢＲ３２２の誘導体を使用して形質転換する（ボリバーら、Gene 2;95,1977）。ｐＢＲ３２２は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、これによって形質転換された細胞を容易に同定する方法を提供する。
組換え微生物の発現ベクターに通常使用するプロモーターは、β-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトースプロモーターシステム（チャングら、Nature 275:615,1978:

およびゴッデルら、Nature 281;544,1979）、トリプトファン（trp）プロモーターシステム（ゴッデルら、Nucl.Acid.Res.8;4057,1980;およびEPA 36,776）およびtacプロモーター（マニアティス、分子クローニング；実験の手引、コールドスプリングハーバー研究所、ｐ４１２、１９８２）を含む。特に有用な細菌の発現システムは、ラムダファージPLプロモーターおよび高温で誘導されるcI857tsレプレッサーを使用するものである。アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手可能なλPLプロモーター誘導体を含むプラスミドベクターは、大腸菌株JMB9（ATCC37092）に中のプラスミドpHUB2および大腸菌RR1（ATCC53082）に中のpPLc28を含む。

組換え受容体タンパク質はまた、好適にはS.cerevisiaeのような酵母種由来の酵母宿主において発現させるてもよい。ピキアまたはクルイベロマイセスのような他の属の酵母もまた使用できる。酵母ベクターは、一般的に２μｍ酵母プラスミド由来の複製開始点または自動複製配列（ARS）、プロモーター、融合受容体タンパク質をコードするＤＮＡ、ポリアデニル化および転写終結のための各配列および選択のための遺伝子配列を含む。好適には、酵母ベクターは、複製開始点、および例えば、大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子およびトリプトファン存在下において増殖することができない酵母の変異株に選択マーカーを提供するS.cerevisiaeのtrp1遺伝子のような、酵母と大腸菌の両方の形質転換を可能にする選択マーカー、および下流の構造配列の転写を誘導する高発現酵母遺伝子由来のプロモーターを含む。宿主酵母細胞のゲノム中にtrp1が存在すれば、トリプトファンの非存在下において増殖することによって形質転換を検出できるという利点を提供する。

酵母ベクターの適切なプロモーター配列は、メタロチオネイン、グリセロ3-リン酸リン酸化酵素（ヒッツマンら、J.Biol.Chem.255:2073,1980）またはエノラーゼ、グリセロアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスフォフルクトキナーゼ、グルコース６リン酸イソメラーゼ、グリセロ３リン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼおよびグルコキナーゼのような他の解糖酵素（ヘスら、J.Adv.Enzyme Reg.7:149,1968;およびホランドら、Biochem.17:4900,1978）を含む。酵母中において発現させるのに使用する適切なベクターおよびプロモーターは、R.ヒッツエマンら、EPA73,657中にさらに記載されている。

好適な酵母のベクターは、大腸菌の中で選択および複製できるpBR322由来のＤＮＡ配列（Ampr遺伝子および複製開始点）およびグルコースで抑制可能なADH2プロモーターおよびαファクター分泌リーダー配列を含む酵母ＤＮＡ配列を使用して作成できる。ADH2プロモーターは、ラッセルら、（J.Biol.Chem.258:2674,1982）およびベイアーら、（Nature 300:724,1982）に記載されている。異種タンパク質の分泌を促す酵母αファクターの分泌リーダー配列を、プロモーターおよび発現させる構造遺伝子の間に挿入できる。例えば、カルジャンら、Cell 30:922,1982;およびビッターら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:5330,1984参照。リーダー配列は、外来遺伝子に融合させることを可能にするためにその３’末端付近に１つまたはそれ以上の有用な制限酵素部位を含むように改変できる。

適切な酵母の形質転換の手法は、当業者には既知である。例としての技術は、ヒンネンら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:1929,（1978）に記載されており、0.67%酵母ニトロゲンベース、0.5%カザミノ酸、2%グルコース、10μｇ/mlアデニンおよび20μg/mlウラシルを含む選択培地においてＴｒｐ$^{+}$の形質転換体を選択する。

ADH2プロモーターを含むベクターで形質転換した宿主細胞は、８０μg/mlのアデニンおよび８０μg/mlのウラシルを含む，１%酵母抽出液、２%ペプトン、および１%グルコースを含む栄養培地において発現用に増殖させることができる。ADH2プロモーターの脱抑制は、培地のグルコースが消費されるとおきる。酵母粗抽出液を濾過によって回収し、さらに精製する前に、４℃に保管しておく。

さまざまな哺乳動物または昆虫細胞培養システムは、組換えタンパク質を発現するのに使用できる。昆虫細胞中においてヘテロはタンパク質を生産するバキュロウイルスシステムは、ルッコウおよびサマー、Bio/Technology 6:47（1988）に記載されている。適切な哺乳動物の宿主細胞系列の例には、L細胞、Ｃ１２７、３Ｔ３、チャイニーズハムスター卵

巣（ＣＨＯ）、Ｈｅｌａ、およびＢＨＫ細胞系列が含まれる。さらに適切な哺乳動物の宿主細胞系列は、どちらもサル腎臓由来のＣＶ-１細胞（ATCC CCL70）およびＣＯＳ-7細胞（ATCC CRL １６５１；グルツマン、Cell 23:175,1981に記載されている）を含む。他のサル腎臓細胞系列であるＣＶ-1/EBNA（ATCC CCL 10478）は、エプスタイン-バーウイルス核抗原－１（ＥＢＮＡ－１）をコードする遺伝子およびCMV抑制配列を含むベクター（マックマーハンら、EMBO Ｊ 10:2821,1991）でCV-1細胞系列を形質導入することによって得られた。EBNA-1遺伝子は、EBV複製開始点を含むHAV-EOまたはpDC406のような発現ベクターに対して、エピソーム性の複製を可能にする。

哺乳動物の発現ベクターは、複製開始点、発現させる遺伝子に結合した適切なプロモーターおよびエンハンサー、および他の５’または３’に続く非転写領域のような転写されない要素、および必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与および受容部位、および転写終結配列のような５’または３’非翻訳配列を含む。脊椎動物を形質転換するために使用する発現ベクターの転写および翻訳制御配列は、ウイルスより提供される。例えば、通常使用されるプロモーターおよびエンハンサーは、ポリオーマ、アデノウイルス２、シアミンウイルス４０（ＳＶ４０）、およびヒトサイトメガロウイルス由来である。例えばＳＶ４０開始点、初期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライス、およびポリアデニル化部位といった、ＳＶ４０ウイルスゲノム由来のＤＮＡ配列は、異種ＤＮＡ配列を発現させるのに必要な他の遺伝的要因を提供するために使用される。初期および後期プロモーターは、どちらもＳＶ４０ウイルス複製開始点も含む断片としてウイルスから容易に得られるために、特に有用である（フィアスら、Nature 273:113,1978）。より小さいまたはより大きいＳＶ４０断片のどちらも使用できるが、ウイルスの複製開始点を含むHindIII部位からBglII部位にわたるおよそ250塩基対を含む必要がある。例としてのベクターは、岡山およびバーグによって記載されたように構築される（Mol.Cell.Biol.3:280,1983）。Ｃ１２７マウス乳腺上皮細胞における哺乳動物受容体ｃＤＮＡを安定に高レベルに発現させるための一つの有用なシステムは、コスマンら（Mol.Immunol.23:935,1986）によって実質的に記載されたようにして構築できる。レトロウイルス由来のベクターもまた使用できる。

宿主細胞からＯＳＭ-Ｒβタンパク質が分泌されることを望む場合には、発現ベクターは、シグナルまたはリーダーペプチドをコードするＤＮＡを含む。本来のシグナル配列のかわりに、米国特許第４、９６５、１９５号に記載されたインターロイキン７（ＩＬ７）のシグナル配列；コスマンら、Nature 312:768（1984）に記載されたインターロイキン２受容体のシグナル配列；ＥＰ第３６７、５６６号に記載されたインターロイキン４のシグナルペプチド；米国特許第４、９６８、６０７号に記載されたＩ型インターロイキン１受容体のシグナルペプチド；ＥＰ第４６０、８４６号に記載されたＩＩ型インターロイキン１受容体のシグナルペプチドのような異種のシグナル配列を付加してもよい。

本発明は、発現を促進する条件下において組換えタンパク質をコードするＤＮＡ配列を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養することを含む、本発明の組換えタンパク質を調製する方法を提供する。それから望ましいタンパク質を、培養液または細胞抽出液から精製する。望ましいタンパク質は、例えば、ＯＭＳＭ-Ｒβまたはヘテロ２量体受容体である。無細胞翻訳系もまた、本発明の新規ＤＮＡ由来のＲＮＡを使用して望ましいタンパク質を生産するのに使用できる。

一例として、培養液中に組換えタンパク質を分泌する発現システム由来の上清は、例えばアミコンまたはミリポアペリコンウルトラフィルトレーションユニットのような商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルターを使用して最初に濃縮できる。濃縮段階に続いて、濃縮物を適切な精製用マトリックスにかける。例えば、適切なアフィニティーマトリックスは、オンコスタチンＭを含む。オンコスタチンＭアフィニティーマトリックスは、業者の推薦に従ってシアノーゲンブロマイドで活性化したセファロース（ファルマシア）またはヒドラジドアフィゲル（バイオラッド）に組換えヒトオンコスタチンＭを結合させることによって調製できる。適切な支持体に結合した抗体を使用して段階的に免疫精製することが好ましい。ＯＭＳ-Ｒβに特異的な抗体に結合するタンパク質を回収し、不溶性の支

持体に担持したｇｐ１３０に特異的な抗体に接触させる。こうしてふたつの抗体に免疫反応を起こすタンパク質が同定されて単離される。
または、例えば、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）基を側鎖持つマトリックス又は支持体のような、陰イオン交換樹脂を使用できる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク精製において通常使用される他のタイプのものである。または、陽イオン交換工程を使用できる。適切な陽イオン交換剤は、スルフォプロピル基またはカルボキシメチル基を含むさまざまな不溶性のマトリックスを含む。スルフォプロピル基が好ましい。例えば、メチル基または他の脂肪基を側鎖に持つシリカゲルのような疎水性のＲＰ-ＨＰＬＣ基質を使用して一度またはそれ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ-ＨＰＬＣ）を、融合タンパク質をさらに精製するために使用できる。
上記の精製工程の一部または全てをさまざまな組み合わせで利用して、本質的に均一な組換えタンパク質を提供するために使用できる。組換え細胞培養液は、例えば、ある細胞型の表面のように、由来するそれぞれの生物種において本来みられるようなｇｐ１３０またはＯＳＭ-Ｒβと通常結合するタンパク質のコンタミネーションがない融合タンパク質の生産を可能にする。
上記の精製手段は、本発明の組換えしていない受容体を精製するために使用されるものと同様である。ホモ二量体を作成する結合手段（ｇｐ１３０-リンカー-ｇｐ１３０およびＯＳＭ-Ｒβ-リンカー-ＯＳＭ-Ｒβ）を使用する場合には、このようなホモ二量体からヘテロ二量体を分離する精製手段を使用する。このような手段の例は、上記に記載したような段階的な免疫精製である。ある態様において、ＯＳＭ-Ｒβ（組換えまたは組換えしていない）は、ＳＤＳ-ＰＡＧＥにおいて他の（コンタミネーション）タンパク質に相当するバンドが検出されないように精製される。
細菌培養において生産される組換えタンパク質は、通常、先ず細胞のペレットから抽出して単離し、続いて一度またはそれ以上の濃縮、塩析、水溶性イオン交換、または大きさで分離するクロマトグラフィー工程を行う。最終的に、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を、最終精製工程に使用できる。組換え融合タンパク質の発現に使用した細菌細胞は、凍結溶解繰り返し、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解溶液の使用を含む任意の従来方法によって破壊する。
分泌タンパク質として融合タンパク質を発現する酵母の発酵を利用すると、精製がおおいに簡素化される。大量に発酵させた培養液から得られる分泌組換えタンパク質は、調製用のＨＰＬＣカラムにて組換えタンパク質を精製する二段階の逆相ＨＰＬＣ段階を含む、ウルダルら、（J.Chromatog.296:171,1984）によって記載された方法に類似した方法によって精製できる。
ｇｐ１３０またはＯＳＭ-ＲβのＤＮＡまたはアミノ酸配列は、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に表したものと異なることもある。既知の遺伝コードの縮退のために、同じアミノ酸配列をコードする核酸配列には、かなりの多様性がある。さらに、ゆるやかな条件または厳しい条件においてＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５の本来のＤＮＡ配列にハイブリダイゼーションでき、および生物的に活性なｇｐ１３０またはＯＳＭ-ＲβポリペプチドをコードするＤＮＡ配列もまた、本発明においてｇｐ１３０にコードされた、またはＯＳＭ-ＲβにコードされたＤＮＡ配列であると考えられる。このようなハイブリダイゼーションする配列は、以下に記載するような変異型配列、および他の哺乳類由来のＤＮＡを含むがこれに限らない。ヒトＯＳＭ-Ｒβは、ラット、ウシ、ブタ、またはさまざまなヒト以外の霊長類を含むがこれに限らない他の哺乳動物種由来のＯＳＭ-Ｒβタンパク質として、本発明の範囲内である。
ゆるやかな洗い条件は、例えばザンブルクら、分子クローニング：実験の手法、第２版、第１巻ｐｐ1.101-104、コールドスプリングハーバー研究所印刷、１９８９に記載された条件を含む。ザンブルクらによって定義されたゆるやかな洗い条件は、５ＸＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ、１．０ｍＭＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）の予備洗浄溶液および約５５℃、５ＸＳＳＣ一晩のハイブリダーゼーション条件の使用を含む。厳しい洗い条件は、ハイブリダー

ゼーションおよび洗いの温度が高い。熟練している人は、温度および洗いの塩濃度はプローブの長さのような要因に従って必要に応じて調節できることを理解するであろう。本発明のある態様は、６８℃におけるハイブリダイゼーション、６３℃-６８℃で０．１ＸＳＳＣ/０．１％ＳＤＳにおける洗浄を含む非常に厳しい条件下においてＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５のＯＳＭ-ＲβＤＮＡにハイブリダイゼーションするようなＤＮＡ配列を目的としている。別の態様において、本発明は、ＯＳＭ-Ｒβおよびｇｐ１３０が、ゆるやかまたは厳しい洗い条件下においてＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のＤＮＡにハイブリダイゼーションするようなＤＮＡによってコードされる、ＯＳＭ-Ｒβおよびｇｐ１３０を含むヘテロな受容体を提供する。

さらに、ＯＳＭ-Ｒβまたはｇｐ１３０をコードする核酸配列中のある突然変異は、最終的なタンパク産物として発現されないであろう。例えば、主として転写されたｍＲＮＡにおいて二次構造のループの形成されることを妨げて発現を増強するために、核酸の置換を行うことができる（ＥＰ７５，４４４Ａ参照）。他の核酸配列の変更は、例えば大腸菌で発現させるために、既知の大腸菌に好まれるコドンのような、選択された宿主によって容易に翻訳されやすいようなコドンを提供するために行ってもよい。

本来のｇｐ１３０またはＯＳＭ-Ｒβのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加、またはｇｐ１３０またはＯＳＭ-Ｒβ誘導体を作成するために一つまたはそれ以上のアミノ酸の挿入によって変化させることができる。本来のｇｐ１３０またはＯＳＭ-Ｒβタンパク質の望ましい生物活性を保持する誘導体は、本発明の受容体として使用できる。変異型タンパク質の生物活性が分析できる測定法を、以下の実施例に記載した。生物的に活性なｇｐ１３０ポリペプチドは、オンコスタチンＭに結合できる。本明細書中に開示したＯＳＭ-Ｒβポリペプチドの望ましい生物活性は、オンコスタチンＭがｇｐ１３０のみに結合するレベルに比較して、ＯＳＭ-Ｒβがｇｐ１３０に結合したときのオンコスタチンＭの結合を増強させる能力である。

本来のアミノ酸配列の変換は、既知のいくつかの技術によって行われる。例えば、本来の配列断片にライゲーションでつなげることが可能な制限酵素部位を持つ変異配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することによって特定の位置に突然変異を導入できる。ライゲーションの結果構築された配列は、望ましいアミノ酸挿入、置換、または欠失を持つ類似体をコードする。

あるいは、オリゴヌクレオチドを利用した部位特異的突然変異導入手法を、必要とする置換、欠失、または挿入に従って変化させた特定のコドンを持つ変異遺伝子を提供するために使用できる。上記に述べた変異を作成する例示的な方法は、ワルダーら、（Gene 42:133,1986）；バウアーら、（Gene 37:73,1985）；クライグ（BioTechniques,一月号1985,12-19）；スミスら、（Genetic Engineering:原理と方法、プレナム印刷、1981）；本明細書中に参考文献として援用する、米国特許第４，５１８，５８４号および米国特許第４，７３７，４６２号に記載されている。

生物的に同等なＯＳＭ-Ｒβおよびｇｐ１３０の誘導体は、例えば、アミノ酸残基をさまざまに置換したり、または生物活性に必要ではない末端または内部のアミノ酸を欠失したりすることによって作成される。本発明のある態様において、変異体のアミノ酸配列は、本来の配列に比較して少なくとも８０％、好適には少なくとも９０％同一である。類似性のパーセントは、例えば、ウィスコンシン大学遺伝子解析グループ（ＵＷＧＣＧ）から入手可能なＧＡＰコンピュータープログラム、バージョン６．０を使用して配列情報を比較することによって決定する。ＧＡＰプログラムは、スミスおよびウォーターマン（Adv.Appl.Math.2:482,1981）が改訂した、ニーデルマンおよびウォンシュ（J.Mol.Biol.48:443,1970）のアライメント方法を使用する。簡単には、ＧＡＰプログラムは、似ている整列した記号（すなわち、核酸またはアミノ酸）の数を２つの配列のうち短いものの記号の総数で割ったものとして相同性を定義する。ＧＡＰプログラムの好適なデフォルトパラメーターは以下を含む：（１）核酸の単純比較係数（同一なら１および同一でない場合には０を含む）、およびシュワルツおよびダイフォッフ、編集、Atlas of Protein Sequence and Structure,National Biomedical Research Foundation,pp353-358,1979に記載されたギブ

スコウおよびバーゲス、Nucl.Acids Res.14:6745,1986の重味づけ比較係数；（２）それぞれのギャップに３．０のペナルティーおよびそれぞれのギャップのそれぞれの記号に対してさらに０．１０のペナルティー；および（３）末端のギャップにはペナルティーはつけない。

一般に、置換は、保存的に作成しなければならない；すなわち、最も好適なアミノ酸置換は、置換される残基に似た物理的特性を持つものである。保存的な置換の例は、イソロイシン、バリン、ロイシン、またはアラニンのような脂肪族残基の互いへの置換、またはリジンとアルギニン；グルタミン酸とアスパラギン酸；またはグルタミンとアスパラギンのような極性基の互いへの置換を含む。他のこのような保存的な置換は、例えば、同様な疎水特性を持つ全領域の置換がよく知られている。

システイン残基は、再び本来の構造に戻る際の不必要または間違った分子内ジスルフィド結合の形成を妨げるために欠失または他のアミノ酸に置き換えることができる。タンパク質の水への溶解性を増すためにｇｐ１３０およびＯＳＭ-Ｒβの膜貫通領域および/または細胞内ドメインの中の疎水性アミノ酸を親水性のアミノ酸に置換できる。

近接した二塩基性アミノ酸残基を修飾して、ＫＥＸ２プロテアーゼ活性が存在する酵母システムにおいて発現を増強することができる。ＥＰ２１２，９１４は、タンパク内のＫＥＸ２プロテアーゼのプロセシング部位を不活性化するために部位特異的変異導入法の使用を取り入れている。ＫＥＸ２プロテアーゼが作用するプロセシング部位は、近接する塩基性アミノ酸残基の存在を除くために、アルギニン-アルギニン、アルギニン-リジン、およびリジン-アルギニンの対を変換するために、残基を欠失、付加または置換することによって不活性化される。ＫＥＸ２プロテアーゼのプロセシング部位を構成するこれらのアミノ酸の対は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のＯＳＭ-Ｒβタンパクの290-291,291-292,580-581,および797-798残基に見られる。これらのＫＥＸ２部位は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のｇｐ１３０タンパクの153-154および621-622部位に見られる。リジン-リジンの対は、ＫＥＸ２切断をかなり受けにくいので、アルギニン-リジンまたはリジン-アルギニンをリジン-リジンに変換することは、ＫＥＸ２部位を不活性化するための保存的および好適な手法を示している。

本発明は、また、本来の糖鎖付加したまたはしないタンパク質も含む。大腸菌のような細菌中で融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現は、糖鎖が付加していない分子を提供する。不活性化したＮ－グリコシレーション部位を持つ機能的な変異体は、オリゴヌクレオチド合成およびライゲーションまたは部位特異的突然変異導入技術によって生産できる。これらの類似タンパク質は、酵母発現システムを使用して収率よく均一で還元された炭水化物のかたちで作成できる。真核生物のタンパク質におけるＮ－グリコシレーション部位は３つのアミノ酸の組：アスパラギン－$Ａ_1$－Ｚ（$Ａ_1$はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、Ｚはセリンまたはスレオニンである）によって特徴づけられる。この配列において、アスパラギンは、炭水化物が共有結合するための側鎖アミノ基を提供する。

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のＯＳＭ-Ｒβアミノ酸配列は、１６個のこのようなＮ－グリコシレーション部位を持ち、それらは全てＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６のアミノ酸15-17,57-59,104-106,136-138,149-151,194-196,280-282,299-301,318-320,334-336,353-355,395-397,419-421,464-466,482-484,および553-555の細胞外ドメインに見られる。ｇｐ１３０の細胞外ドメインは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２の21-23,61-63,109-111,135-137,205-207,224-226,357-359,361-363,368-370,531-533,および542-544の位置にＮ－グリコシレーション部位を含む。このような部位は、アスパラギンまたは残基Ｚのかわりに他のアミノ酸で置換すること、アスパラギンまたはＺを欠失させること、または$Ａ_1$およびＺのあいだにＺではないアミノ酸を挿入すること、またはアスパラギンおよび$Ａ_1$のあいだにアスパラギン以外のアミノ酸を挿入すること、によって除去できる。タンパク質のＮ－グリコシレーション部位を不活性化する既知の手法は、米国特許第５、０７１、９７２号およびＥＰ２７６、８４６号に記載されたものを含む。

本発明の変異型受容体タンパク質はまた、生物活性を保持している本来のタンパク質のさまざまな構造を含む。例えば、イオン化可能なアミノ基およびカルボキシル基の存在によ

って、受容タンパク質は、酸性塩または塩基性塩、または中性の形態をとる。個々のアミノ酸残基はまた、酸化または還元によって修飾できる。
アミノ酸の一次構造もまた、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基およびそれに類似したもののような他の化学分子と共有結合または結合体を形成することによって修飾できる。共有結合した誘導体は、アミノ酸の側鎖またはＮまたはＣ末端に特定の官能基を結合することによって調製できる。本発明の範囲内である受容体タンパク質の他の誘導体は、ＮまたはＣ末端融合体として組換え体の培養によって合成されるような、他のタンパク質またはポリペプチドと受容体タンパク質を共有結合体または結合体に形成したものを含む。例えば、結合させるポリペプチドは、転写と同時にまたは転写した後にタンパク質を合成した場所から細胞膜または細胞壁の内側または外側の機能する場所に向かわせるためのタンパク質のＮ末端領域のシグナル（またはリーダー）ポリペプチド配列である（例えば、酵母αファクターのリーダー）。
精製または同定を容易にするように、望ましいタンパク質にペプチドを融合させることができる（例えば、組換えＤＮＡ技術によって）。例は、ポリヒスチジンまたはフラッグ（FLAG）（登録商標）ペプチドAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）（ホップら、Bio/Technology 6:1204,1988,および米国特許第５、０１１、９１２号）を含む。Flag（登録商標）ペプチドは、非常に抗原性があり、特異的モノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、これによって発現した組換えタンパク質の素早い測定および容易な精製が可能になる。与えられたタンパク質のＮ末端またはＣ末端にFlag（登録商標）オクタペプチドを融合するのに有用な発現システムは、このオクタペプチドに結合するモノクローナル抗体と同様に、イーストマンコダック社、Scientific Imaging Systems Division,ニューヘブン、コネチカット州より入手可能である。
本発明は、二量体または三量体のようなオリゴマーの形態のＯＳＭ-Ｒβポリペプチドを含む。このようなオリゴマーは、自然に生じるか、または組換えＤＮＡ技術によって作成される。本発明は、ジスルフィド結合によってつながった、またはペプチドリンカーを使用してまたは使用しないで融合タンパクとして発現させたＯＳＭ-Ｒβオリゴマー（好適には、細胞外ドメインまたはその断片）を提供する。オリゴマーは、例えば、異なるＯＳＭ-Ｒβポリペプチド上のシステイン残基間のジスルフィド結合によって形成される。他の態様において、ＯＳＭ-Ｒβオリゴマーは、上述したように、免疫グロブリン由来のポリペプチドを使用して調製される。
自然に生じるＯＳＭ-Ｒβ誘導体はまた、本発明の範囲内である。このような誘導体の例は、望ましい生物活性が保持されたままで、ＯＳＭ-ＲβタンパクがｍＲＮＡの選択的スプライシングまたはタンパク分解された結果のタンパク質である。ｍＲＮＡの選択的スプライシングは、たとえば自然に生じるタンパク質の可溶な形態のような、トランケートされている（truncated）が生物的に活性なＯＳＭ-Ｒβタンパク質を作成する。タンパク分解により生じる変異体は、例えば、ＯＳＭ-Ｒβタンパク質の末端アミノ酸が１つまたはそれ以上（一般に、１から５個の末端アミノ酸）タンパク分解して除去されることによって、違う型の宿主細胞における発現によってＮ末端またはＣ末端が異なることを含む。自然に生じるｇｐ１３０の変異体は本発明の受容体に使用される。
本発明はまた、生体的に受容可能なキャリヤーまたは溶媒とともに本発明の受容体タンパク質を含む薬剤組成物を提供する。このようなキャリヤーおよび溶媒は、使用する量および濃度にて受容者に毒性はない。このような組成物は、例えば、アスコルビン酸のような酸化防止剤、低分子量（約１０残基以下）ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、グルコース、ショ糖またはデキストリンを含む炭水化物、ＥＤＴＡのようなキレート剤、グルタチオンおよび他の安定化剤および補形剤を添加した緩衝液中の受容体タンパク質を含む。本発明の受容体は、静脈内注射、局所投与、連続注入、移植片からの徐放性放出などのような病気に対して適切な方法によって投与される。
本発明のヘテロ二量体受容体（ｇｐ１３０およびＯＳＭ-Ｒβを含む）は、オンコスタチンM結合剤として有用である。好適には可溶性のｇｐ１３０および可溶性のＯＳＭ-Ｒβを含むこの受容体は、in vitroおよびin vivoの両方において応用できる。受容体は、例

えば、細胞上の受容体にオンコスタチンMが結合することによって開始される生物のシグナル伝達機構の研究のような、in vitroにおける測定に使用される。このような受容体はまた、さまざまなin vitro測定またはin vivo処理においてオンコスタチンMの生物活性を阻害するために使用できる。本発明のある態様において、本発明の受容体は、オンコスタチンMに結合するように投与されて、細胞表面受容体へのオンコスタチンMの結合を阻害する。従って、細胞へのこのようなオンコスタチンMの結合によって仲介される生物活性もまた、阻害される。

ｇｐ１３０のみでオンコスタチンMに結合するが、比較的親和性が低い（ゲーリングら、Science 255:1434,1992）。白血病阻害因子（ＬＩＦ）受容体およびｇｐ１３０を含むヘテロ二量体の受容体は、ｇｐ１３０のみよりも高親和性にてオンコスタチンMに結合するがＬＩＦとも高親和性にて結合する（ゲーリングら、上述）。ＯＳＭ-Ｒβおよびｇｐ１３０をコードするＤＮＡで共形質導入した細胞によって生産される本発明の受容体は、例えば、オンコスタチンMに高親和性にて結合するが、高親和性ＬＩＦ受容体としては機能しない。本発明のこのような受容体は、例えばオンコスタチンMによって仲介される活性阻害を望むが、ＬＩＦによって仲介される活性を阻害することは望まない場合に使用できる。オンコスタチンMは、ＬＩＦとある特性において類似しているが、ＬＩＦにはない他の活性を持つ。さらに、in vitroにおける測定で本発明の受容体を使用することによって、測定結果は受容体によるＬＩＦではなくオンコスタチンMへの結合に由来するということを決定できる。

本発明のある態様において、ＯＳＭ-Ｒβおよびｇｐ１３０を含むヘテロ二量体受容体を、オンコスタチンMの生物活性を阻害するためにin vivoに投与する。オンコスタチンMは、さまざまな異種細胞型に対して増殖を変化させる活性を示し、造血の刺激、上皮細胞の増殖刺激、プラスミン活性の上昇（これによって繊維素溶解を誘導する）、脈管形成の阻害および上皮細胞の主要組織適合性複合体の発現が報告されている。ＰＣＴ出願ＷＯ第９１０９０５７号および欧州特許出願第４２２、１８６号参照。こうしたまたは他のオンコスタチンMによる生体効果を望まない場合には、本発明の受容体をオンコスタチンMに結合させるために投与する。

本発明の受容体を、オンコスタチンMによって仲介される疾患を治療するのに薬剤的に効果的な量を患者に投与できる。オンコスタチンMが疾患の原因となり（直接または間接的に）、または疾患を悪化させる場合に、疾患はオンコスタチンMによって仲介されるといわれる。可溶な受容体タンパク質を使用することによりオンコスタチンMに競合的に結合させて、生体細胞表面の受容体へのオンコスタチンMの結合を阻害することができる。オンコスタチンMは、ブラウンら、J.Immunol.147:2175（1991）によって報告されたように、サイトカインであるインターロイキン６（ＩＬ６）の生産を刺激すると信じられている。それゆえ、オンコスタチンMは、ＩＬ６の存在に関連した疾患を間接的に仲介する。ＩＬ６は、エイズに関連したカポシ肉腫の病原性に関与することが報告されている（デウィットら、J.Intern.Med.［イギリス］229:539,1991）。オンコスタチンMは、カポシ肉腫細胞の増殖を刺激する役割を果たすことが報告されている（ナイルら、Science 255:1430,1992、およびミルスら、Science 255:1432,1992）。従って、本発明の受容体（好適にはその可溶化型）によるオンコスタチンMの結合は、カポシ肉腫を治療するのに有用である。

ｇｐ１３０に結合したＯＳＭ-Ｒβを含むヘテロ二量体受容体はまた、受容体への結合親和性を測定することにより、オンコスタチンMタンパク質の生物活性を測定するために使用することができる。例を示すと、受容体はオンコスタチンM断片、変異体、または突然変異体（ミューテイン）の生物活性を測定するための結合測定（バインディングアッセイ）において使用する。受容体は、オンコスタチンMの生物活性がオンコスタチンMタンパク質を修飾した後に（例えば、化学的修飾、突然変異導入など）保持されるかどうかを決定するのに有用である。受容体への修飾したオンコスタチンMタンパク質の結合活性は、生物活性に修飾が悪影響を及ぼすかを検出するために修飾していないオンコスタチンMタンパク質の受容体への結合活性と比較する。従って、生体活性は、例えば、修飾タンパク

質が研究または測定に使用される前に評価できる。
ヘテロ二量体受容体はまた、例えば、種々の条件下におけるオンコスタチンMタンパク質の貯蔵寿命および安定性を調べるといった、”品質保証”の研究を行うのに使用される試薬として使用できる。受容体は、例えば異なる温度で、異なる期間保存した、または組換え発現システムの異なる細胞で発現させたオンコスタチンMタンパク質における生物活性を（受容体への結合親和性という意味で）確証するために使用する。
本発明はさらに、本明細書中に示したＯＳＭ-Ｒβ核酸配列断片を提供する。このような断片は、望ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に示した配列の少なくとも約１４塩基を含む。上述の断片を相補するＤＮＡおよびＲＮＡは、ＯＳＭ-ＲβＤＮＡの一本鎖および二本鎖の両方と一緒に、本明細書中にて提供している。
このような核酸断片の用途には、プローブとしての使用を含む。このようなプローブは、他の哺乳動物種由来のＯＳＭ-ＲβＤＮＡを単離するための異種間ハイブリダーゼーション手法において使用できる。１つの例として、ＯＳＭ-Ｒβの細胞外ドメインに相当するプローブが、使用できる。プローブはまた、in vitro測定およびノーザンおよびサザンブロットのような手法において、ＯＳＭ-Ｒβ核酸の存在を検出するのに使用できる。ＯＳＭ-Ｒβを発現する細胞が、同定できる。このような手法は、既知であり、当業者は、意図する応用に応じて、適切な長さのプローブを選択できる。プローブは、従来の技術によって標識できる（たとえば^{32}Ｐによる）。
ＯＳＭ-Ｒβ核酸の他の有用な断片は、標的ＯＳＭ-ＲβｍＲＮＡ（センス）またはＯＳＭ-ＲβＤＮＡ（アンチセンス）配列に結合可能な一本鎖核酸配列（ＲＮＡまたはＤＮＡのいずれも）を含むアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドである。本発明に従った、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、ＯＳＭ-ＲβｃＤＮＡのコード領域の断片を含む。このような断片は一般に少なくとも約１４塩基、好適には約１４から３０塩基含む。与えられたタンパク質に対するｃＤＮＡ配列に基づいてアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを作成することについては、例えば、ステインおよびコーエン、Cancer Res.48:2659,1988およびファンデルクロールら、Bio Techniques 6:958,1988に記載されている。
標的核酸配列にアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが結合することによって、二重らせんが過剰に解けること、転写または翻訳の早期終結、またはその他の理由を含むいくつかの理由のうちの１つによって、翻訳（ＲＮＡ）または転写（ＤＮＡ）を阻害する二重らせんが形成する結果になる。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＯＳＭ-Ｒβタンパク質の発現を阻害するために使用される。
アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドはさらに、修飾された糖－ホスホジエステル結合の骨格（またはＷＯ９１/０６６２９に記載されたような他の糖結合体）を含み、およびこのような糖結合体は細胞内ヌクレアーゼに耐性である。耐性な糖結合を持つこのようなオリゴヌクレオチドは、in vivoにおいて安定であるが（すなわち、酵素による分解を受けない）、標的ヌクレオチド配列に結合することの可能な配列特異性は保持している。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、ＷＯ９０/１０４４８に記載されたような有機分子に共有結合したオリゴヌクレオチド、およびポリＬリジンのような標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの親和性を上昇させる他の分子に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらに、エリプチシンのようなインターカレート試薬およびアルキル化試薬または金属化合物を、標的ヌクレオチド配列へのアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を変化させるためにアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドに付着できる。
アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、例えば$CaPO_4$によるＤＮＡ形質導入、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子導入方法、またはエプスタインバーウイルスのような遺伝子導入用ベクターを使用して標的核酸配列を含む細胞内に導入できる。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、好適には適切なレトロウイルスベクターのなかにアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを挿入して、in vivoまたはex vivoにおいて挿入配列を含むレトロウイルスベクターを細胞に接触させることによって標的

核酸配列を含む細胞に導入する。適切なレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスM-MuＬＶ、Ｎ２（M-MuＬＶ由来のレトロウイルス）、またはＤＣＴ５Ａ、ＤＣＴ５ＢおよびＤＣＴ５Ｃと命名されたダブルコピーベクター（ＰＣＴ出願　ＵＳ９０/０２６５６参照）を含むが、これに限らない。
センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、ＷＯ９１/０４７５３に記載されたように、リガンド結合分子との結合を形成することによって標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入できる。適切なリガンド結合分子は、細胞表面受容体、増殖因子、他のサイトカイン、または細胞表面受容体に結合する他のリガンドを含むがこれに限らない。
または、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドはＷＯ９１/１０４４８に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体を形成することによって標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入できる。センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好適には細胞内のリパーゼによって細胞内で分離される。
以下の実施例は、本発明のある態様の例示を提供し、本発明の範囲を限定するものと解すべきものではない。
実施例
実施例１
ＯＳM-Ｒβをコードするｄｎａの単離
オンコスタチンM受容体のβサブユニットをコードするＤＮＡは、以下のように単離した。方法ははじめに、ヘマトポエチン受容体ファミリーのタンパク間で保存されているアミノ酸配列を縮退したオリゴヌクレオチドを調製した。
ヘマトポエチン受容体ファミリーの３つのタンパク質（ｇｐ１３０、ＬＩＦ受容体、およびG-ＣＳＦ受容体）のアミノ酸配列のアライメントは、いくつかの高度に保存された領域を示した。このような保存領域は、「多機能なサイトカイン：ＩＬ－６およびＬＩＦ（Polyfunctional Cytokines:IL-6 and LIF）」、ボックら、編集、ジョーンウィリーおよびサンズ、チッチェスター、イギリス、１９９２、２４５頁の中のゲーリングらによって同定されて論じられている。ＩＬ２受容体のγ鎖の相同配列も含めた後（竹下ら、Science 257:379,1992）、ある保存領域を縮退したオリゴヌクレオチド（すなわち、その保存領域内のアミノ酸をコードしうるあらゆる可能性のＤＮＡ配列を含む一連のオリゴヌクレオチド）を、従来の技術によって調製した。
２つの縮重オリゴヌクレオチド対を、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）におけるプライマーとして使用した。５’プライマーは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のｇｐ１３０配列の275-279残基に見られるアミノ酸配列ＰｈｅＡｒｇＸＡｒｇＣｙｓ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）を縮重した；ここでＸはイソロイシン（ｇｐ１３０およびＬＩＦ-Ｒの対応位置にみられる）またはバリン（ＩＬ２Ｒγにみられる）を示す。G-ＣＳＦ-Ｒの対応する位置にみられるＬｅｕＧｌｎＩｌｅＡｒｇＣｙｓ配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）を縮重したさらなる５’プライマーもまた使用した。３’プライマーは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のｇｐ１３０配列の288-292残基に見られるアミノ酸配列ＴｒｐＳｅｒＸＴｒｐＳｅｒ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：11）を縮重した；ここでＸはアスパラギン（ｇｐ１３０およびG-ＣＳＦ-Ｒの対応位置にみられる）、リジン（ＬＩＦ-Ｒにみられる）、またはグルタミン（ＩＬ２Ｒγにみられる）を示す。
この手法が実行可能かどうかについて試験するために、ＬＩＦ-Ｒ、ｇｐ１３０、G-ＣＳＦ-Ｒ、ＩＬ２ＲγＤＮＡを鋳型として、上述したプライマーを使用してＰＣＲを行った。反応は、従来の技術に従って行い、反応産物をゲル電気泳動によって解析した。各々の反応について、大きさがおよそ５０塩基対のバンドがゲル上に見られ、予期された大きさのＤＮＡ断片の増幅が成功したことを示している。
それから、ＰＣＲをヒトゲノムＤＮＡを鋳型として使用して行った。反応産物は、ゲル電気泳動によって解析し、５０ｂｐのバンドが可視化した。このバンドをゲルから切りだし、これからＤＮＡを溶出した。ＤＮＡを、ストラタジーンクローニングシステム（Stratagene Cloning Systems）、ラ　ホヤ、カリフォルニアから入手可能なクローニングベクターｐＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ（登録商標）ＳＫ中にサブクローニングした。大腸菌細胞を作

成した組換えベクターで形質転換し、個々の形質転換体のコロニーを９６穴プレートに接種した。
１２個のコロニーをランダムに選択し、組換えベクターをそれらから単離した。ベクターのインサートＤＮＡのヌクレオチド配列を決定した。これらのインサートのうち、７個はｇｐ１３０ＤＮＡの配列と一致し、２個はＬＩＦ-Ｒ、１個は停止コドンを含み興味の対象外と考えられ、および２個は新規の配列（同じ配列、同じ向き）を含むと同定された。この新規の配列を含むオリゴヌクレオチドプローブ（２つのプライマー配列のあいだのインサート部分）を調製し、標準的な技術によって^{32}Ｐで標識した。
^{32}Ｐで標識したプローブを、１つはヒト胎盤由来、もう１つはＩＭＴＬＨ-1と命名された細胞系列由来の２つの異なるｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするのに使用した。胎盤は増殖因子および分化因子が豊富であることから、胎盤ライブラリーを選択した。ヒト骨髄間細胞をｐＳＶ-neoで形質転換して得られたＩＭＴＬＨ細胞は、オンコスタチンＭに結合するがＬＩＦには結合しないことが分かっているために選択した（トーマら、J.Biol.Chem.269:6215,1994）。さらに、上記の^{32}Ｐで標識したプローブをプローブとして、ＩＭＴＬＨ-1細胞および胎盤由来のＲＮＡのノーザンブロットにおいて、およそ5.5-6.0ｋｂのＲＮＡバンドが検出された。
陽性のクローンを両方のライブラリーから単離し、ＤＮＡ配列を決定した結果、上記の興味のある新規のＤＮＡのさまざまな部分を含んでいた。開始コドンは（コード領域の５’末端を示す）同定されたけれども、コード領域の３’末端をあらわす停止コドンを含むと思われるクローンは存在しなかった。
いくつかのクローンの３’末端付近にみられる配列に相当するオリゴヌクレオチドプローブを合成し、標準的な技術によって^{32}Ｐによって標識した。このプローブはＳＶ４０で形質転換したヒト肺繊維芽細胞系列ＷＩ-２６　ＶＡ４由来のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするのに使用した。このライブラリーは、本明細書中に参考文献として援用する、米国特許第５，２６４，４１６号の実施例２に記載されたように構築した。３’末端のさらなるコード配列を含むクローン（以前に単離した上述のクローンに比較して）を単離した。
新規の配列の５’末端を含む上記に記載したクローン由来のＤＮＡ断片につないだこの新規の配列の３’末端を含むＤＮＡ断片を含む発現ベクターを構築した。作成した組換えベクターの中のヒトＯＳＭ-ＲβＤＮＡのヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に示す。単離されたＤＮＡによってコードされるタンパク質は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示す。
ベクターは、ｐＤＣ４０９と命名された哺乳動物の発現ベクターであった。このベクターは、マックマーンら、（EMBO J.10:2821,1991）に記載されたｐＤＣ４０６と類似している。ｐＤＣ４０６の中にあるマルチクローニング部位（ｍｃｓ）の外側のＢｇｌＩＩ部位は、ｐＤＣ４０９のｍｃｓ中のＢｇｌＩＩを唯一とするために除去されている。ｐＤＣ４０９のマルチクローニング部位（ｍｃｓ）は、制限酵素部位がいくつか加わったことおよび３個の停止コドン（各々の読み枠につき１個）を含む点で、ｐＤＣ４０６と異なる。ｍｃｓの下流のＴ７ポリメラーゼプロモーターは、ｍｃｓ内に挿入されたＤＮＡの配列分析を容易にする。
ＯＳＭ-ＲβｃＤＮＡインサートを、５’および３’のｃＤＮＡの非コード領域内で切断する制限酵素を使用して発現ベクターから切り出した。切り出したｃＤＮＡをクローニングベクターpBluescript（登録商標）ＳＫ-（ストラタジーンクローニングシステム、ラホヤ、カリフォルニア）のEcoRV部位にライゲーションした。ベクターのマルチクローニング部位に存在するEcoRVは、ｃＤＮＡの挿入の際に破壊された。作成した組換えベクターで形質転換した大腸菌細胞を、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックバイル、メリーランド州、アメリカ合衆国に１９９４年８月１６日に帰宅し、受託番号ＡＴＣＣ６９６７５を得た。寄託はブダペスト条約に従って行った。
コードされるＯＳＭ-Ｒβアミノ酸配列はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示され、Ｎ末端シグナルペプチド（アミノ酸-27から-1）に続いて細胞外ドメイン（アミノ酸１から７１４）

、細胞膜貫通領域（アミノ酸７１５から７３４）および細胞質ドメイン（アミノ酸７３５から９５２）を含む。ＯＳＭ-Ｒβアミノ酸配列は、ゲーリングら（EMBO J.10:2839,1991）、および本明細書中に参考文献として援用されている米国特許第５，２８４，７５５号に記載されているＬＩＦ受容体タンパク質とおよそ３０％同一である。ＯＳＭ-Ｒβのコード領域のＤＮＡ配列は、上記に記載したＧＡＰコンピュータープログラムを使用した場合にＯＳＭ-Ｒβコード領域とならんだＬＩＦ-Ｒ　ＤＮＡ部分とおよそ４８％同一である。

実施例２

オンコスタチンＭの結合を検出するアッセイ

組換えｇｐ１３０および組換えＯＳＭ-Ｒβを両方発現する細胞によるオンコスタチンＭの結合測定は、以下のように行った。ｇｐ１３０のみを発現する細胞によるオンコスタチンＭの結合測定もまた、対照のために行った。

オンコスタチンＭは、タンパク質が通常検出される細胞、またはオンコスタチンＭをコードする発現ベクターで形質転換した細胞から精製できる。オンコスタチンＭの１つの源は、ツアーリングら、PNAS USA 83:9739（1986）に記載されたホルボールエステルで処理したＵ９３７細胞である。組換えオンコスタチンＭの精製は、リンスリーら、（J.Biol.Chem.264:4282-4289,1989）およびゲーリングら、（EMBO J.10:2839,1991）に記載されている。

オンコスタチンＭ（ＯＳＭ）は、適切な従来の手法を用いて、放射性標識できる。オンコスタチンＭの放射性標識は、例えば、上述のリンスリーらによって記載されている。ある適切な手法において、ＯＳＭは商業的に入手可能なエンザイモビード放射性ヨウ素標識用試薬（BioRad）を使用して製造業者の指示書に従って放射性標識をする。生じた^{125}Ｉ-ＯＳＭは、2.5%（w/v）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、0.2%（w/v）ナトリウムアジド、および20mMヘペス、pH7.4を含むＲＰＭＩ１６４０培地である、結合培地中に希釈してストック溶液とする。

１５０ｍｍディッシュ中のＣＶ1-EBNA-1細胞（3.6X10^{6}細胞/皿）を、ｇｐ１３０をコードする発現ベクターで形質導入、またはｇｐ１３０をコードする発現ベクターおよびＯＳＭ-Ｒβをコードするベクターで同時形質導入した。全ての細胞は、以下に記載したように、ｐＤＣ４１０と命名した哺乳動物の発現ベクターでさらに共形質導入した。

ＯＳＭ-Ｒβをコードするベクターは、哺乳動物発現ベクターであるｐＤＣ４０９中に全長のＯＳＭ-ＲβＤＮＡを含む、実施例１に記載した組換えベクターであった。ｇｐ１３０をコードするベクターは、ｐＤＣ３０４と命名した哺乳動物の発現ベクター中に、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のヒトｇｐ１３０ＤＮＡ配列を含んでいた。哺乳動物の発現ベクターｐＤＣ３０３中に同じｇｐ１３０をコードするＤＮＡを含む同様の組換えベクターは大腸菌株ＤＨ５α宿主細胞中に入れて、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックバイル、メリーランド州に寄託してある。これらの形質転換した細胞は、１９９１年１１月１４日にＢ１０Ｇ/ｐＤＣ３０３（ＤＨ５α）の名前で寄託し、ＡＴＣＣ番号は第６８８２７号である。寄託は、ブタベスト条約に従って行った。

ｐＤＣ３０４は、マルチクローニング部位にNotI部位を含むが、それ以外はｐＤＣ３０３と同一である。ｐＤＣ３０４はまた、細菌中で機能的なクリプティックプロモーターを含むアデノウイルス２のトリパタイトリーダー（ＴＰＬ）断片が欠失している以外は、ＰＣＴ出願ＷＯ９０/０５１８３に記載されたｐＣＡＶ/ＮＯＴと本質的に同一である。クリプティックプロモーターからのタンパク質発現は、細菌細胞中における望ましい組換えプラスミドの調製および単離において、潜在的に不利である。

ｐＤＣ４１０ベクターは、ｐＤＣ４０９のＥＶＢ複製開始点が、ｐＤＣ４１０中のＳＶ４０プロモーターから転写されるＳＶ４０ラージＴ抗原をコードするＤＮＡによって置き換えられている以外は、実施例１に記載したｐＤＣ４０９ベクターと同一である。このベクターと共形質導入した細胞は、ＳＶ４０複製開始点を含む他のプラスミドベクターの高レベルのＤＮＡ複製を引き起こすＳＶ４０Ｔ抗原を提供する。従って、ｐＤＣ４１０は、ＣＶ1-EBNA-1細胞中において共形質導入したベクターの外来複製（エピソーマル　レプリケ

ーション）に重要である。
形質導入した細胞は、２４時間培養し、トリプシン分解し、再び培養してさらに２４時間後になってコードタンパク質の発現がおこり、細胞膜にとどまる。接着している細胞をＰＢＳ中の５ｍＭＥＤＴＡを使用して取り外し、それから二回結合培地（2.5%（w/v）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、0.2%（w/v）塩化アジド、および20mMヘペス、pH7.4を含むＲＰＭＩ１６４０培地）で洗浄した。それから細胞を、３７℃でゆっくりとしんとうさせて、１時間結合培地中でさまざまな濃度の125Ｉで標識したオンコスタチンＭとともにインキュベートした。
遊離および細胞に結合した125Ｉ-オンコスタチンＭを、本質的にはパークら、（J.Biol.Chem.261:4177,1986,およびProc.Natl.Acad.Sci.USA 84:5267,1987）に記載されているダウアーらのフタル酸オイル分離法（J Immunol.132:751,1984）を使用して分離した。遊離および細胞に結合した^{125}Ｉ-オンコスタチンＭをパッカードオートガンマカウンターで定量した。親和性の計算（スキャチャード,Ann,N.Y.Acad.Sci.51:660,1949）は、マイクロバックスコンピューター上においてＲＳ/１（ＢＢＮソフトウエア、ボストン、マサチューセッツ州）で算出した。
結果は、スキャチャード分析の形態で図１および２に示す。図１は、ｇｐ１３０のみを発現する細胞についての結果を示す。これらの形質導入した細胞は、細胞につきおよそ２９、３１０個の受容体部位を持つ一次親和性の結合を示し、親和定数（Ka）は、2.64X10^{8}であった。図２は、ｇｐ１３０およびＯＳＭ-Ｒβを発現する細胞についての結果を示す。二相性のパターンがみられ、これは２個の結合成分を示している。第一の成分（細胞あたりおよそ２１９６個の受容体部位）は、親和定数が7.18X10^{9}を示した。第二の成分（細胞あたりおよそ３６，４７１個の受容体）は、親和定数が2.34X10^{8}を示した。従って、比較的高親和性結合成分が、ｇｐ１３０およびＯＳＭ-Ｒβの両方を発現する細胞にみられる。これらの高親和性結合部位は、ｇｐ１３０のみ発現する細胞にみられなかった。
ＯＳＭ-Ｒβおよびｇｐ１３０をコードする発現ベクターで共形質導入した細胞は、本発明の受容体タンパク質を発現した。受容体は、ｇｐ１３０をコードする発現ベクターのみで形質導入した細胞上に発現したｇｐ１３０タンパク質よりも高親和性でオンコスタチンＭに結合する。
実施例3
OSM-Rβに対する抗体の調製
本発明の精製されたOSM-Rβポリペプチドは、たとえば米国特許第4,411,993号に開示されているような慣用された方法を用いて、それと免疫反応するモノクローナル抗体をつくるための免疫原として使用する。適当な免疫原には、限定されるものではないが、組換え体OSM-Rβの全長、または細胞外ドメインのようなその断片が含まれる。マウスを免疫するために、免疫原を完全フロインドアジュバントに乳化し、10-100μｇの範囲の量をBalb/cマウスに皮下注射する。10から12日後、免疫した動物を不完全フロインドアジュバントに乳化した免疫原でさらに力価を高め、その後毎週から隔週の免疫のスケジュールで定期的に力価を高める。血清試料はドット-ブロット分析（抗体サンドイッチ）またはELISA（酵素結合免疫吸着検定法）によって検定するために、後眼球孔採血または尾先切除によって定期的に回収する。その他の方法もまた差し支えない。
適切な抗体の力価の検出に続いて、陽性の動物に生理食塩水中の抗原を静脈注射する。3から4日後、その動物を殺して脾臓細胞を回収し、それをたとえばNS1、または好ましくはP3x63Ag8.653（ATCC CRL 1580）のようなネズミの骨髄腫細胞株に融合させる。この方法によってつくられたハイブリドーマ細胞株は、多孔マイクロタイタープレートに入れた非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するHATの選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）に植える。
このようにしてつくられたハイブリドーマのクローンを、たとえばEngvallら、Immunochem 8.871（1971）、および米国特許第4,704,004号で開示されている方法を脚色することによって、ELISAで受容体タンパク質との反応性からスクリーニングすることができる。より好ましいスクリーニング法は、Beckmannら（J.Immunol.144:4212、1990）に記載の抗体

捕捉法である。陽性のクローンは次に高濃度（1mg/mlよりも高い濃度）の抗OSM-Rβモノクローナル抗体を含む腹水をつくるために、同系のBalb/cマウスの腹膜腔に注射する。生じたモノクローナル抗体は硫酸アンモニウム沈澱に続くゲル排除クロマトグラフィー、および/または抗体のStraphylicoccus aureusのプロテインＡへの結合に基づいたアフィニティー・クロマトグラフィーによって精製することができる。

実施例4

FNIIIドメインを欠失したgp130ポリペプチドを含む受容体

フィブロネクチンIII型（FNIII）ドメインを欠失する可溶性のgp130タンパク質をコードするDNA配列を単離し、Fcをコードしている配列と融合させた。FNIIIドメインの欠失によってgp130/Fc融合タンパク質の大きさが減少するという利点が得られる。gp130はSEQ ID NO:2のそれぞれアミノ酸300（Tyr）から399（Phe）、400（Gln）から496（Pro）、および497（Pro）から597（Glu）を含む三つのFNIIIドメインを含んでいる。そのFNIIIドメインの一つから三つすべては、タンパク質の大きさを減少させるためにgp130から取り除くことができる。

組換え体gp130/Fcをコードしている発現ベクターをBstX1で消化し、続いて慣用された方法に従ってT4 DNAポリメラーゼを用いて突出部分を平坦化することによって、gp130のFNIIIドメインを取り除いた。BstX1の認識部位はSEQ ID NO:1（gp130）のヌクレオチド1231-1242に渡っており、gp130の最初のFNIIIドメインのアミノ酸10-11のコドン内を切断する。続いて切断されたベクターを、ベクターのFc配列の上流のベクターのポリリンカー内を切断し平滑末端を生ずるEcoR5で消化した。gp130の5’末端をコードする配列（FNIIIドメインを欠失している）、ベクター配列、Fc配列、およびポリリンカーの一部を含む（BstX1）/EcoR5断片を、ベクターを再び環状にするためにライゲーションした。

E.coliの細胞をライゲーション混合物でトランスフォーメーションし、そこからプラスミドを単離して制限分析によって望みの組換え体プラスミドを同定した。その構築物にコードされる融合タンパク質は、（Ｎ末端端からＣ末端に向かって）SEQ ID NO:2（gp130）のアミノ酸-22から308、ポリリンカー部分にコードされる4アミノ酸のスペーサーペプチド-Asn-Arg-Tyr-Val-、およびSEQ ID NO:3（Fc）のアミノ酸1-132を含んでいる。このgp130のポリペプチド部分には最初のFNIIIドメインの最初の9アミノ酸が含まれるが、最初のFNIIIドメインの残りの部分、およびすべての第二および第三のFNIIIドメインは欠失している。

本発明のヘテロ二量体の受容体は、OSM-Rβおよび、FNIIIドメインを欠失した前述のトランケートしたgp130ポリペプチドを含んでいる。COS-7細胞または他の適当な宿主細胞を、OSM-Rβをコードするベクター、およびトランケートしたgp130をコードする発現ベクターで共トランスフェクションする。共トランスフェクションした細胞をヘテロ二量体の受容体を発現するように培養する。

実施例5

受容体によるオンコスタチンMおよびLIFの結合分析

さまざまな受容体タンパク質によるオンコスタチンMまたは白血病抑制因子（LIF）の結合分析は、以下のようにして行った。受容体タンパク質は可溶性のOSM-Rβ/Fc、gp130/Fc、LIF-R/Fc、およびそれらの組み合わせを含んでいる。分析の結果は図3に示されている。

抗体由来のFc領域のポリペプチドのN末端に融合したOSM-Rβのトランケートされた細胞外ドメインを含む、可溶性のOSM-Rβ/Fc融合タンパク質をコードしている発現ベクターは、以下のようにして作製した。ベクターpDC409にOSM-Rβ のDNAを含む、実施例1で調製した組換え体発現ベクターを制限酵素SphIで消化し、3’の突出部分を除去するためにT4 DNAポリメラーゼで処理し（平滑末端を生ずる）、次にOSM-Rβ コード領域の上流を切断するSalIで消化した。OSM-Rβ DNAの5’末端を含み、SEQ ID NO:5のヌクレオチド1744で終結する、望みの断片は慣用された方法によって単離した。

上述したように、hIgG1Fcと命名された組換え体ベクターはSEQ ID NO:3のFcポリペプチドをコードするcDNAを含んでいる。ベクターhIgG1Fcを、ベクターのポリリンカー領域内のそれぞれ上流および下流で切断する、制限酵素Sna B1およびNotIで消化した。

このようにして単離したFcポリペプチドをコードするDNA断片、および上記のようにして単離したOSM-Rβをコードする DNA断片を、FcポリペプチドDNAがOSM-RβDNAの3’末端に融合されるように、SalI/NotI消化した発現ベクターpDC304にライゲーションした。哺乳動物の発現ベクターpDC304は実施例2に記載されている。生じた発現ベクターはSEQ ID NO:6のOSM-Rβ配列のアミノ酸-27から432までと、それに続く、ベクターのポリリンカー部分によってコードされるバリン残基、さらにそれに続くSEQ ID NO:4のFcポリペプチド配列のアミノ酸1から232までを含む融合タンパク質をコードしていた。

可溶性のヒトのgp130/Fc融合タンパク質をコードする発現ベクターは以下のようにして作製した。ヒトのgp130 cDNAを含む組換え体ベクターB10G/pDC303（ATCC 68827）をEcoRIで消化し、生じた5’の突出部分をT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑化した。EcoRIの認識部位はSEQ ID NO:1のヌクレオチド2056-2061を含んでいる。次にEcoRIで消化したベクターをgp130 cDNA挿入断片の上流にあるベクター内を切断するXhoIで切断した。

上述したようにFcポリペプチドをコードするcDNAを含むベクターhIgG1Fcを、挿入したFc cDNAのそれぞれ上流および下流で切断するStuI（平滑端カッター）およびNotIで消化した。上述の単離されたXhoI/（EcoR1）gp130断片を、Fcを含む断片、およびXhoI/NotIで消化した哺乳動物の発現ベクターpDC304にライゲーションした。

E.coliの細胞をライゲーションの混合液でトランスフォーメーションし、そこから慣用された方法によりプラスミドを単離して制限分析によって望みの組換え体プラスミドを同定した。組換え体ベクターによってコードされるgp130/Fc融合タンパク質は、（N末端からC末端に向かって）SEQ ID NO:2（gp130）のアミノ酸-22から582と、それに続いたプラスミドhIgG1Fcのポリリンカー部分にコードされるペプチドリンカーの構成要素となっている7アミノ酸と、さらにそれに続くSEQ ID NO:4（Fc）のアミノ酸1-232を含んでいる。

可溶性のヒトのLIF-R/Fc融合タンパク質をコードしている発現ベクターは、本明細書中に参考文献として援用されている米国特許第5,284,755号の実施例5に記載されているようにして作製した。簡潔に言うと、pHLIF-R-65と命名された組換えベクターは、ベクターpDC303中にヒトのLIF-R cDNA（完全なシグナルペプチド、細胞外ドメイン、および膜貫通領域、および部分的な細胞質ドメインをコードする部分的なクローン）を含んでいる。哺乳動物の発現ベクターpDC303はPCT出願WO 93/19777に記載されている。pHLIF-R-65で形質転換したE.coliの細胞はAmarican Type Culture Collection、Rockville、MD、に1990年12月11日に寄託され、寄託番号68491を与えられた。LIF-Rのシグナルペプチドおよび細胞外ドメイン（C末端がトランケートしている）をコードしているDNAを単離し、pBluescript^{R}SK^{-}中で抗体のFc領域のポリペプチドをコードしているDNAに融合した。その遺伝子融合体をクローニングベクターから切り出し、上記の哺乳動物発現ベクターpDC304に挿入した。生じた組換え体発現ベクターは、米国特許第5,284,755号に示されているLIF-R配列のアミノ酸-44から702までを含むLIF-R/Fc融合タンパク質と、それに続くベクターのポリリンカー部分にコードされる6アミノ酸を含むリンカーと、さらにそれに続くSEQ ID NO:4のFcのアミノ酸配列のアミノ酸1から232までをコードしていた。

CV-1-EBNA細胞は、以下のように、上記のようにして調製した三つの組換え体発現ベクターの中の一つでトランスフェクションするか、またはベクター二つで共にトランスフェクションした：

実験	下記のものを含むベクターをトランスフェクションした細胞
A	空の発現ベクター（対照）
B	gp130/Fc
C	LIF-R/Fc
D	OSM-Rβ/Fc
E	OSM-Rβ/FcおよびLIF-R/Fc
F	OSM-Rβ/Fcおよびgp130/Fc
G	gp130/FcおよびLIF-R/Fc

トランスフェクションした細胞を培養して融合タンパク質の発現およびその培養液中への分泌を可能にした。Protein Aをもつ、架橋させたアガロースビーズ（Protein A Sepharose CL-4B、Pharmacia Biotech、Inc.、Piscataway、NJ）を培養液の上清に加え、融合タンパク質をFc部分とProtein Aとの相互作用を介してビーズに結合させた。放射性ヨウ素標識したオンコスタチンMまたは放射性ヨウ素標識したLIFもまた培養液の上清に加えた。^{125}I-オンコスタチンMの調製は上記の実施例2に記載されている。LIFの精製および放射性ヨウ素標識の既知の方法には米国特許第5,284,755号の実施例1に記載されている方法がある。本分析で使用した^{125}I-LIFは、エイザイモビーズ試薬（BioRad）を用いて^{125}Iで標識したヒトの組換え体LIFであった。

培養液の上清はProtein Aビーズ、および^{125}I-LIFまたは^{125}I-オンコスタチンMと共に18時間、4℃でインキュベーションした。遊離および細胞に結合した^{125}I-LIFまたは^{125}I-オンコスタチンMは、PBS中3%のグルコースの一工程の濃度勾配で、低速遠心によって分離した。ビーズに結合した放射性ヨウ素標識タンパク質はPackard Autogammaカウンターで定量した。

結果は図3に示されている。図3の棒グラフは、上記の実験AからGのようにしてトランスフェクションした細胞によって発現されたタンパク質への、オンコスタチンMまたはLIFの結合を示している。発現されたタンパク質はProtein Aビーズに結合する。

実験A（対照）では、空のベクターpDC304をトランスフェクションした細胞によって発現されたタンパク質に対する有意なLIFまたはオンコスタチンMの結合は見られなかった。可溶性のgp130/Fcタンパク質はオンコスタチンMには結合したが、LIFの有意な結合は示されなかった（実験B）。可溶性のLIF/Fcタンパク質はLIFには結合したが、オンコスタチンMには結合しなかった（実験C）。可溶性のOSM-Rβ/FcはLIFまたはオンコスタチンMに結合しないことが示された（実験D）。

可溶性のLIF-R/FcおよびOSM-Rβをコードしているベクターを共にトランスフェクションした細胞によって発現されたタンパク質は、検出可能な量のオンコスタチンMとは結合しなかったが、LIFには結合した（実験E）。可溶性のOSM-Rβ/Fcおよび可溶性のgp130/Fcをコードしているベクターを共にトランスフェクションした細胞によって発現されたタンパク質は、オンコスタチンMには結合したが、検出可能な量のLIFには結合しなかった（実験F）。実験Fでは、オンコスタチンMの結合は、分析中に標識していない（コールドの）オンコスタチンMを入れることによって阻害できた。可溶性のgp130/FcおよびLIF-R/Fcをコードしている発現ベクターを共にトランスフェクションした細胞によって発現されたタンパク質（実験G）は、オンコスタチンMにもLIFにも結合した。実験GにおけるLIFの結合は、分析物にコールドのLIFを加えることによって阻害された。

本発明に従って、細胞に可溶性のOSM-Rβ/Fcおよび可溶性のgp130/Fcをコードしているベクターをトランスフェクションしたときに発現されるタンパク質は、このようにオンコスタチンMには結合するがLIFには結合しない。オンコスタチンMの結合が望ましいが、（たとえば、それの生物学的活性を阻害したり研究したりするために）LIFの結合が望まれな

いときには、これは有利である。可溶性のgp130/Fcおよび可溶性のLIF-R/Fcをコードしているベクターを共にトランスフェクションした細胞によって発現されるタンパク質は、オンコスタチンMおよびLIFの両方に結合し、このためこの有利な特性は提供しない。さらに、可溶性のOSM-Rβ/Fcおよび可溶性のgp130/Fcの両方を発現している細胞は、可溶性のgp130/Fcだけを発現しているよりも高いレベルでオンコスタチンMを結合した。

配列表の簡単な説明

SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2は、gp130のN末端断片をコードしているクローン化されたcDNAのDNA配列、およびコードされるアミノ酸配列を示している。

SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4は、IgG1抗体のFc領域に相当するポリペプチドをコードしているクローン化されたcDNAのDNA配列、およびコードされるアミノ酸配列を示している。

SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6は、本発明のオンコスタチンM受容体のβサブユニットをコードしているクローン化されたcDNAのDNA配列、およびコードされるアミノ酸配列を示している。

SEQ ID NO:7は、それに融合させたポリペプチドの精製を促進するために使用することのできるペプチドのアミノ酸配列を示している。

SEQ ID NO:8は、実施例4に記載されているように、発現ベクター中のポリリンカーによってコードされるスペーサーペプチドを示している。

SEQ ID NO:9、10、および11は、実施例1に記載されているように、保存配列に相当するペプチドである。

配列表

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:Mosley,Bruce

Cosman,David J.

(ii) 題名 OF INVENTION:Receptor for Oncostatin M

(iii) NUMBER OF 配列:11

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE:Immunex Corporation

(B) STREET:51 University Street

(C) CITY:Seattle

(D) STATE:WA

(E) COUNTRY:USA

(F) ZIP:98101

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM型:Floppy disk

(B) COMPUTER:IBM PC

(C) OPERATING SYSTEM:PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE:PatentIn Release #1,Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:US 08/308,881

(B) 出願日:09-SEP-1994

(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:US 08/249,553

(B) 出願日:26-MAY-1994

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME:Anderson,Kathryn A.

(B) REGISTRATION NUMBER:32,172

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER:2614-WO

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (206) 587-0430
(B) TELEFAX: (206) 233-0644
(C) TELEX:756822
(2) 配列情報 SEQ ID NO:1:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:2369塩基対
(B) 型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:cDNA to mRNA
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(v) フラグメント型:N-末端
(vi) 起源:
(F) 組織の種類:ヒトplacenta
(vii) 直接の起源:
(B) クローン名:B10G/pDC303
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:CDS
(B) 存在位置:244..2369
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:matペプチド
(B) 存在位置:310..2369
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:sigペプチド
(B) 存在位置:244..309
(xi) 配列:SEQ ID NO:1:

GGCCCGCGGA GTCGCGCTGG GCCGCCCCGG CGCAGCTGAA CCGGGGGCCG CGCCTGCCAG 60

GCCGACGGGT CTGGCCCAGC CTGGCGCCAA GGGGTTCGTG CGCTGTGGAG ACGCGGAGGG 120

TCGAGGCGGC GCGGCCTGAG TGAAACCCAA TGGAAAAAGC ATGACATTTA GAAGTAGAAG 180

ACTTAGCTTC AAATCCCTAC TCCTTCACTT ACTAATTTTG TGATTTGGAA ATATCCGCGC 240

AAG ATG TTG ACG TTG CAG ACT TGG CTA GTG CAA GCC TTG TTT ATT TTC 288

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe

-22 -20 -15 -10

CTC ACC ACT GAA TCT ACA GGT GAA CTT CTA GAT CCA TGT GGT TAT ATC 336

Leu Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile

-5 1 5

AGT CCT GAA TCT CCA GTT GTA CAA CTT CAT TCT AAT TTC ACT GCA GTT 384

Ser Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val

10 15 20 25

TGT GTG CTA AAG GAA AAA TGT ATG GAT TAT TTT CAT GTA AAT GCT AAT 432

Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn

30 35 40

TAC ATT GTC TGG AAA ACA AAC CAT TTT ACT ATT CCT AAG GAG CAA TAT 480

Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr

45 50 55

ACT ATC ATA AAC AGA ACA GCA TCC AGT GTC ACC TTT ACA GAT ATA GCT 528

Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala

60 65 70

TCA TTA AAT ATT CAG CTC ACT TGC AAC ATT CTT ACA TTC GGA CAG CTT 576

Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu

75 80 85

GAA CAG AAT GTT TAT GGA ATC ACA ATA ATT TCA GGC TTG CCT CCA GAA 624

Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu

90 95 100 105

AAA CCT AAA AAT TTG AGT TGC ATT GTG AAC GAG GGG AAG AAA ATG AGG 672

Lys Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg

```
                110                 115                 120
TGT GAG TGG GAT GGT GGA AGG GAA ACA CAC TTG GAG ACA AAC TTC ACT   720
Cys Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr
            125                 130                 135
TTA AAA TCT GAA TGG GCA ACA CAC AAG TTT GCT GAT TGC AAA GCA AAA   768
Leu Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys
        140                 145                 150
CGT GAC ACC CCC ACC TCA TGC ACT GTT GAT TAT TCT ACT GTG TAT TTT   816
Arg Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe
    155                 160                 165
GTC AAC ATT GAA GTC TGG GTA GAA GCA GAG AAT GCC CTT GGG AAG GTT   864
Val Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val
170                 175                 180                 185
ACA TCA GAT CAT ATC AAT TTT GAT CCT GTA TAT AAA GTG AAG CCC AAT   912
Thr Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn
                190                 195                 200
CCG CCA CAT AAT TTA TCA GTG ATC AAC TCA GAG GAA CTG TCT AGT ATC   960
Pro Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile
            205                 210                 215
TTA AAA TTG ACA TGG ACC AAC CCA AGT ATT AAG AGT GTT ATA ATA CTA  1008
Leu Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu
        220                 225                 230
AAA TAT AAC ATT CAA TAT AGG ACC AAA GAT GCC TCA ACT TGG AGC CAG  1056
Lys Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln
    235                 240                 245
ATT CCT CCT GAA GAC ACA GCA TCC ACC CGA TCT TCA TTC ACT GTC CAA  1104
Ile Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln
250                 255                 260                 265
GAC CTT AAA CCT TTT ACA GAA TAT GTG TTT AGG ATT CGC TGT ATG AAG  1152
```

```
Asp Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys
                270                 275                 280
GAA GAT GGT AAG GGA TAC TGG AGT GAC TGG AGT GAA GAA GCA AGT GGG  1200
Glu Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly
            285                 290                 295
ATC ACC TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA GCA CCA AGT TTC TGG TAT AAA  1248
Ile Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys
        300                 305                 310
ATA GAT CCA TCC CAT ACT CAA GGC TAC AGA ACT GTA CAA CTC GTG TGG  1296
Ile Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp
    315                 320                 325
AAG ACA TTG CCT CCT TTT GAA GCC AAT GGA AAA ATC TTG GAT TAT GAA  1344
Lys Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu
330                 335                 340                 345
GTG ACT CTC ACA AGA TGG AAA TCA CAT TTA CAA AAT TAC ACA GTT AAT  1392
Val Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn
                350                 355                 360
GCC ACA AAA CTG ACA GTA AAT CTC ACA AAT GAT CGC TAT CTA GCA ACC  1440
Ala Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr
            365                 370                 375
CTA ACA GTA AGA AAT CTT GTT GGC AAA TCA GAT GCA GCT GTT TTA ACT  1488
Leu Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr
        380                 385                 390
ATC CCT GCC TGT GAC TTT CAA GCT ACT CAC CCT GTA ATG GAT CTT AAA  1536
Ile Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys
    395                 400                 405
GCA TTC CCC AAA GAT AAC ATG CTT TGG GTG GAA TGG ACT ACT CCA AGG  1584
Ala Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg
410                 415                 420                 425
```

GAA TCT GTA AAG AAA TAT ATA CTT GAG TGG TGT GTG TTA TCA GAT AAA 1632
Glu Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys
430 435 440

GCA CCC TGT ATC ACA GAC TGG CAA CAA GAA GAT GGT ACC GTG CAT CGC 1680
Ala Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg
445 450 455

ACC TAT TTA AGA GGG AAC TTA GCA GAG AGC AAA TGC TAT TTG ATA ACA 1728
Thr Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr
460 465 470

GTT ACT CCA GTA TAT GCT GAT GGA CCA GGA AGC CCT GAA TCC ATA AAG 1776
Val Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys
475 480 485

GCA TAC CTT AAA CAA GCT CCA CCT TCC AAA GGA CCT ACT GTT CGG ACA 1824
Ala Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr
490 495 500 505

AAA AAA GTA GGG AAA AAC GAA GCT GTC TTA GAG TGG GAC CAA CTT CCT 1872
Lys Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro
510 515 520

GTT GAT GTT CAG AAT GGA TTT ATC AGA AAT TAT ACT ATA TTT TAT AGA 1920
Val Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg
525 530 535

ACC ATC ATT GGA AAT GAA ACT GCT GTG AAT GTG GAT TCT TCC CAC ACA 1968
Thr Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr
540 545 550

GAA TAT ACA TTG TCC TCT TTG ACT AGT GAC ACA TTG TAC ATG GTA CGA 2016
Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg
555 560 565

ATG GCA GCA TAC ACA GAT GAA GGT GGG AAG GAT GGT CCA GAA TTC ACT 2064
Met Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr

```
570                 575                 580                 585
TTT ACT ACC CCA AAG TTT GCT CAA GGA GAA ATT GAA GCC ATA GTC GTG  2112
Phe Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val
                590                 595                 600
CCT GTT TGC TTA GCA TTC CTA TTG ACA ACT CTT CTG GGA GTG CTG TTC  2160
Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe
            605                 610                 615
TGC TTT AAT AAG CGA GAC CTA ATT AAA AAA CAC ATC TGG CCT AAT GTT  2208
Cys Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val
        620                 625                 630
CCA GAT CCT TCA AAG AGT CAT ATT GCC CAG TGG TCA CCT CAC ACT CCT  2256
Pro Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro
    635                 640                 645
CCA AGG CAC AAT TTT AAT TCA AAA GAT CAA ATG TAT TCA GAT GGC AAT  2304
Pro Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn
650                 655                 660                 665
TTC ACT GAT GTA AGT GTT GTG GAA ATA GAA GCA AAT GAC AAA AAG CCT  2352
Phe Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro
                670                 675                 680
TTT CCA GAA GAT CTG AA                                          2369
Phe Pro Glu Asp Leu
            685
```

(2) 配列情報SEQ ID NO:2:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ:708アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直線状

(ii) 配列の種類:タンパク質

(xi) 配列:SEQ ID NO:2:

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
-22 -20 -15 -10
Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
-5 1 5 10
Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
15 20 25
Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
30 35 40
Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
45 50 55
Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
60 65 70
Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
75 80 85 90
Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
95 100 105
Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
110 115 120
Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
125 130 135
Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
140 145 150
Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
155 160 165 170
Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
175 180 185
Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
190 195 200
Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu

205 210 215

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys

220 225 230

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile

235 240 245 250

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp

255 260 265

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu

270 275 280

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile

285 290 295

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile

300 305 310

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys

315 320 325 330

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val

335 340 345

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala

350 355 360

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu

365 370 375

Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile

380 385 390

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala

395 400 405 410

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu

415 420 425

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala

430 435 440

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr
445 450 455
Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val
460 465 470
Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala
475 480 485 490
Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys
495 500 505
Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
510 515 520
Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
525 530 535
Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
540 545 550
Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
555 560 565 570
Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
575 580 585
Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
590 595 600
Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
605 610 615
Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
620 625 630
Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
635 640 645 650
Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
655 660 665
Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
670 675 680
Pro Glu Asp Leu
685

(2) 配列情報SEQ ID NO:3:

(i) 配列の特性:
(A) 長さ:705塩基対
(B) 型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:cDNA to mRNA
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(vii) 直接の起源:
(B) クローン名:hIgG1Fc
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:CDS
(B) 存在位置:1..699
(xi) 配列:SEQ ID NO:3:

```
GAG CCC AGA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA    48
Glu Pro Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1               5                  10                  15

CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC    96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG   144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG   192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
```

50 55 60

GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG 240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG 288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAC TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC 336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Asp Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

CTC CCA GCC CCC ATG CAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC 384
Leu Pro Ala Pro Met Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC 432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGG 480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

CAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC 528
His Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC 576
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC 624
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG 672

```
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220
AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGAACTAGT                       705
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

（2）配列情報SEQ ID NO:4:
（i）配列の特性:
（A）長さ:232アミノ酸
（B）型:アミノ酸
（D）トポロジー:直線状
（ii）配列の種類:タンパク質
（xi）配列:SEQ ID NO:4:

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

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Arg

145 150 155 160

His Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

(2) 配列情報SEQ ID NO:5:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:4171塩基対
(B) 型:核酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:cDNA to mRNA
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(vii) 直接の起源:
(B) クローン名:huOSM-Rァ
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:sigペプチド
(B) 存在位置:368..448
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:CDS
(B) 存在位置:368..3307
(ix) 特徴:
(A) NAME/KEY:matペプチド
(B) 存在位置:449..3304
(xi) 配列:SEQ ID NO:5:

GGGCCGCCTC TGCACGTCCG CCCCGGAGCC CGCACCCGCG CCCCACGCGC CGCCGAGGAC 60

TCGGCCCGGC TCGTGGAGCC CTTCGCCCGC GGCGTGAGTA CCCCCGACCC GCCCGTCCCC 120

GCTCTGCTCG CGCCCTGCCG CTGCGCCGCC CTCGGTGGCT TTTCCGACGG GCGAGCCCCG 180

TGCTGTGCGG GAAAGAATCC GACAACTTCG CAGCCCATCC CGGCTGGACG CGACCGGGAG 240

TGCAGCAGCC CGTTCCCCTC CTCGGTGCCG CCTCTGCCCA GCGTTTGCTT GGCTGGGCTA 300

CCACCTGCGC TCGGACGGCG CTCGGAGGGT CCTCGCCCCC GGCCTGCCTA CCTGAAAACC 360

AGAACTG ATG GCT CTA TTT GCA GTC TTT CAG ACA ACA TTC TTC TTA ACA 409

Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr

```
        -27     -25                 -20                 -15
TTG CTG TCC TTG AGG ACT TAC CAG AGT GAA GTC TTG GCT GAA CGT TTA   457
Leu Leu Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu
            -10                 -5                  1
CCA TTG ACT CCT GTA TCA CTT AAA GTT TCC ACC AAT TCT ACG CGT CAG   505
Pro Leu Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln
      5                 10                  15
AGT TTG CAC TTA CAA TGG ACT GTC CAC AAC CTT CCT TAT CAT CAG GAA   553
Ser Leu His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu
 20                  25                  30                  35
TTG AAA ATG GTA TTT CAG ATC CAG ATC AGT AGG ATT GAA ACA TCC AAT   601
Leu Lys Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn
                 40                  45                  50
GTC ATC TGG GTG GGG AAT TAC AGC ACC ACT GTG AAG TGG AAC CAG GTT   649
Val Ile Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val
            55                  60                  65
CTG CAT TGG AGC TGG GAA TCT GAG CTC CCT TTG GAA TGT GCC ACA CAC   697
Leu His Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His
         70                  75                  80
TTT GTA AGA ATA AAG AGT TTG GTG GAC GAT GCC AAG TTC CCT GAG CCA   745
Phe Val Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro
     85                  90                  95
AAT TTC TGG AGC AAC TGG AGT TCC TGG GAG GAA GTC AGT GTA CAA GAT   793
Asn Phe Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp
100                 105                 110                 115
TCT ACT GGA CAG GAT ATA TTG TTC GTT TTC CCT AAA GAT AAG CTG GTG   841
Ser Thr Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val
                120                 125                 130
GAA GAA GGC ACC AAT GTT ACC ATT TGT TAC GTT TCT AGG AAC ATT CAA   889
```

```
Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln
            135                 140                 145
AAT AAT GTA TCC TGT TAT TTG GAA GGG AAA CAG ATT CAT GGA GAA CAA   937
Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln
        150                 155                 160
CTT GAT CCA CAT GTA ACT GCA TTC AAC TTG AAT AGT GTG CCT TTC ATT   985
Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile
    165                 170                 175
AGG AAT AAA GGG ACA AAT ATC TAT TGT GAG GCA AGT CAA GGA AAT GTC  1033
Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val
180                 185                 190                 195
AGT GAA GGC ATG AAA GGC ATC GTT CTT TTT GTC TCA AAA GTA CTT GAG  1081
Ser Glu Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu
                200                 205                 210
GAG CCC AAG GAC TTT TCT TGT GAA ACC GAG GAC TTC AAG ACT TTG CAC  1129
Glu Pro Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His
            215                 220                 225
TGT ACT TGG GAT CCT GGG ACG GAC ACT GCC TTG GGG TGG TCT AAA CAA  1177
Cys Thr Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln
        230                 235                 240
CCT TCC CAA AGC TAC ACT TTA TTT GAA TCA TTT TCT GGG GAA AAG AAA  1225
Pro Ser Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys
    245                 250                 255
CTT TGT ACA CAC AAA AAC TGG TGT AAT TGG CAA ATA ACT CAA GAC TCA  1273
Leu Cys Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser
260                 265                 270                 275
CAA GAA ACC TAT AAC TTC ACA CTC ATA GCT GAA AAT TAC TTA AGG AAG  1321
Gln Glu Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys
                280                 285                 290
```

AGA AGT GTC AAT ATC CTT TTT AAC CTG ACT CAT CGA GTT TAT TTA ATG 1369
Arg Ser Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met
295 300 305

AAT CCT TTT AGT GTC AAC TTT GAA AAT GTA AAT GCC ACA AAT GCC ATC 1417
Asn Pro Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile
310 315 320

ATG ACC TGG AAG GTG CAC TCC ATA AGG AAT AAT TTC ACA TAT TTG TGT 1465
Met Thr Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys
325 330 335

CAG ATT GAA CTC CAT GGT GAA GGA AAA ATG ATG CAA TAC AAT GTT TCC 1513
Gln Ile Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser
340 345 350 355

ATC AAG GTG AAC GGT GAG TAC TTC TTA AGT GAA CTG GAA CCT GCC ACA 1561
Ile Lys Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr
360 365 370

GAG TAC ATG GCG CGA GTA CGG TGT GCT GAT GCC AGC CAC TTC TGG AAA 1609
Glu Tyr Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys
375 380 385

TGG AGT GAA TGG AGT GGT CAG AAC TTC ACC ACA CTT GAA GCT GCT CCC 1657
Trp Ser Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro
390 395 400

TCA GAG GCC CCT GAT GTC TGG AGA ATT GTG AGC TTG GAG CCA GGA AAT 1705
Ser Glu Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn
405 410 415

CAT ACT GTG ACC TTA TTC TGG AAG CCA TTA TCA AAA CTG CAT GCC AAT 1753
His Thr Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn
420 425 430 435

GGA AAG ATC CTG TTC TAT AAT GTA GTT GTA GAA AAC CTA GAC AAA CCA 1801
Gly Lys Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro

440 445 450

TCC AGT TCA GAG CTC CAT TCC ATT CCA GCA CCA GCC AAC AGC ACA AAA 1849

Ser Ser Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys

455 460 465

CTA ATC CTT GAC AGG TGT TCC TAC CAA ATC TGC GTC ATA GCC AAC AAC 1897

Leu Ile Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn

470 475 480

AGT GTG GGT GCT TCT CCT GCT TCT GTA ATA GTC ATC TCT GCA GAC CCC 1945

Ser Val Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro

485 490 495

GAA AAC AAA GAG GTT GAG GAA GAA AGA ATT GCA GGC ACA GAG GGT GGA 1993

Glu Asn Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly

500 505 510 515

TTC TCT CTG TCT TGG AAA CCC CAA CCT GGA GAT GTT ATA GGC TAT GTT 2041

Phe Ser Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val

520 525 530

GTG GAC TGG TGT GAC CAT ACC CAG GAT GTG CTC GGT GAT TTC CAG TGG 2089

Val Asp Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp

535 540 545

AAG AAT GTA GGT CCC AAT ACC ACA AGC ACA GTC ATT AGC ACA GAT GCT 2137

Lys Asn Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala

550 555 560

TTT AGG CCA GGA GTT CGA TAT GAC TTC AGA ATT TAT GGG TTA TCT ACA 2185

Phe Arg Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr

565 570 575

AAA AGG ATT GCT TGT TTA TTA GAG AAA AAA ACA GGA TAC TCT CAG GAA 2233

Lys Arg Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu

580 585 590 595

CTT GCT CCT TCA GAC AAC CCT CAC GTG CTG GTG GAT ACA TTG ACA TCC 2281

```
Leu Ala Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser
                600                 605                 610
CAC TCC TTC ACT CTG AGT TGG AAA GAT TAC TCT ACT GAA TCT CAA CCT  2329
His Ser Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro
            615                 620                 625
GGT TTT ATA CAA GGG TAC CAT GTC TAT CTG AAA TCC AAG GCG AGG CAG  2377
Gly Phe Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln
        630                 635                 640
TGC CAC CCA CGA TTT GAA AAG GCA GTT CTT TCA GAT GGT TCA GAA TGT  2425
Cys His Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys
    645                 650                 655
TGC AAA TAC AAA ATT GAC AAC CCG GAA GAA AAG GCA TTG ATT GTG GAC  2473
Cys Lys Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp
660                 665                 670                 675
AAC CTA AAG CCA GAA TCC TTC TAT GAG TTT TTC ATC ACT CCA TTC ACT  2521
Asn Leu Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr
                680                 685                 690
AGT GCT GGT GAA GGC CCC AGT GCT ACG TTC ACG AAG GTC ACG ACT CCG  2569
Ser Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro
            695                 700                 705
GAT GAA CAC TCC TCG ATG CTG ATT CAT ATC CTA CTG CCC ATG GTT TTC  2617
Asp Glu His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe
        710                 715                 720
TGC GTC TTG CTC ATC ATG GTC ATG TGC TAC TTG AAA AGT CAG TGG ATC  2665
Cys Val Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile
    725                 730                 735
AAG GAG ACC TGT TAT CCT GAC ATC CCT GAC CCT TAC AAG AGC AGC ATC  2713
Lys Glu Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile
740                 745                 750                 755
```

CTG TCA TTA ATA AAA TTC AAG GAG AAC CCT CAC CTA ATA ATA ATG AAT 2761
Leu Ser Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn
760 765 770

GTC AGT GAC TGT ATC CCA GAT GCT ATT GAA GTT GTA AGC AAG CCA GAA 2809
Val Ser Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu
775 780 785

GGG ACA AAG ATA CAG TTC CTA GGC ACT AGG AAG TCA CTC ACA GAA ACC 2857
Gly Thr Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr
790 795 800

GAG TTG ACT AAG CCT AAC TAC CTT TAT CTC CTT CCA ACA GAA AAG AAT 2905
Glu Leu Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn
805 810 815

CAC TCT GGC CCT GGC CCC TGC ATC TGT TTT GAG AAC TTG ACC TAT AAC 2953
His Ser Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn
820 825 830 835

CAG GCA GCT TCT GAC TCT GGC TCT TGT GGC CAT GTT CCA GTA TCC CCA 3001
Gln Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro
840 845 850

AAA GCC CCA AGT ATG CTG GGA CTA ATG ACC TCA CCT GAA AAT GTA CTA 3049
Lys Ala Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu
855 860 865

AAG GCA CTA GAA AAA AAC TAC ATG AAC TCC CTG GGA GAA ATC CCA GCT 3097
Lys Ala Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala
870 875 880

GGA GAA ACA AGT TTG AAT TAT GTG TCC CAG TTG GCT TCA CCC ATG TTT 3145
Gly Glu Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe
885 890 895

GGA GAC AAG GAC AGT CTC CCA ACA AAC CCA GTA GAG GCA CCA CAC TGT 3193
Gly Asp Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys

900 905 910 915

TCA GAG TAT AAA ATG CAA ATG GCA GTC TCC CTG CGT CTT GCC TTG CCT 3241
Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro

920 925 930

CCC CCG ACC GAG AAT AGC AGC CTC TCC TCA ATT ACC CTT TTA GAT CCA 3289
Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro

935 940 945

GGT GAA CAC TAC TGC TAACCAGCAT GCCGATTTCA TACCTTATGC TACACAGACA 3344
Gly Glu His Tyr Cys

950

TTAAGAAGAG CAGAGCTGGC ACCCTGTCAT CACCAGTGGC CTTGGTCCTT AATCCCAGTA3404
CAATTTGCAG GTCTGGTTTA TATAAGACCA CTACAGTCTG GCTAGGTTAA AGGCCAGAGG3464
CTATGGAACT TAACACTCCC CATTGGAGCA AGCTTGCCCT AGAGACGGCA GGATCATGGG3524
AGCATGCTTA CCTTCTGCTG TTTGTTCCAG GCTCACCTTT AGAACAGGAG ACTTGAGCTT3584
GACCTAAGGA TATGCATTAA CCACTCTACA GACTCCCACT CAGTACTGTA CAGGGTGGCT3644
GTGGTCCTAG AAGTTCAGTT TTTACTGAGG AAATATTTCC ATTAACAGCA ATTATTATAT3704
TGAAGGCTTT AATAAAGGCC ACAGGAGACA TTACTATAGC ATAGATTGTC AAATGTAAAT3764
TTACTGAGCG TGTTTTATAA AAAACTCACA GGTGTTTGAG GCCAAAACAG ATTTTAGACT3824
TACCTTGAAC GGATAAGAAT CTATAGTTCA CTGACACAGT AAAATTAACT CTGTGGGTGG3884
GGGCGGGGGG CATAGCTCTA ATCTAATATA TAAAATGTGT GATGAATCAA CAAGATTTCC3944
ACAATTCTTC TGTCAAGCTT ACTACAGTGA AAGAATGGGA TTGGCAAGTA ACTTCTGACT4004
TACTGTCAGT TGTACTTCTG CTCCATAGAC ATCAGTATTC TGCCATCATT TTTGATGACT4064
ACCTCAGAAC ATAAAAAGGA ACGTATATCA CATAATTCCA GTCACAGTTT TTGGTTCCTC4124
TTTTCTTTCA AGAACTATAT ATAAATGACC TGTTTTCACG CGGCCGC 4171

(2) 配列情報SEQ ID NO:6:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:979アミノ酸
(B) 型:アミノ酸
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:タンパク質
(xi) 配列:SEQ ID NO:6:

Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu
-27 -25 -20 -15
Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu
-10 -5 1 5
Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu
10 15 20
His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys
25 30 35
Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile
40 45 50
Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His
55 60 65
Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val
70 75 80 85
Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe
90 95 100
Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr
105 110 115
Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu
120 125 130
Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn
135 140 145
Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp
150 155 160 165
Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn
170 175 180
Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu

185 190 195

Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro

200 205 210

Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr

215 220 225

Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser

230 235 240 245

Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys

250 255 260

Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu

265 270 275

Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser

280 285 290

Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro

295 300 305

Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr

310 315 320 325

Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile

330 335 340

Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys

345 350 355

Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr

360 365 370

Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser

375 380 385

Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu

390 395 400 405

Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr

410 415 420

Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys
425 430 435
Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser
440 445 450
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile
455 460 465
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val
470 475 480 485
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn
490 495 500
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser
505 510 515
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp
520 525 530
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn
535 540 545
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg
550 555 560 565
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg
570 575 580
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala
585 590 595
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser
600 605 610
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe
615 620 625
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His
630 635 640 645
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys

650 655 660

Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu

665 670 675

Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala

680 685 690

Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu

695 700 705

His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val

710 715 720 725

Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu

730 735 740

Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser

745 750 755

Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser

760 765 770

Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr

775 780 785

Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu

790 795 800 805

Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser

810 815 820

Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala

825 830 835

Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala

840 845 850

Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala

855 860 865

Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu

870 875 880 885

Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp
890 895 900
Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu
905 910 915
Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro
920 925 930
Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu
935 940 945
His Tyr Cys
950

(2) 配列情報SEQ ID NO:7:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:8アミノ酸
(B) 型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:ペプチド
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(vii) 直接の起源:
(B) クローン名:FLAG peptide
(xi) 配列:SEQ ID NO:7:

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

(2) 配列情報SEQ ID NO:8:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:4アミノ酸
(B) 型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:ペプチド
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(vii) 直接の起源:
(B) クローン名:spacer peptide
(xi) 配列:SEQ ID NO:8:

Asn Arg Tyr Val
1

(2) 配列情報SEQ ID NO:9:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:5アミノ酸
(B) 型:アミノ酸

(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:ペプチド
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(xi) 配列:SEQ ID NO:9:

Phe Arg Xaa Arg Cys
1 5

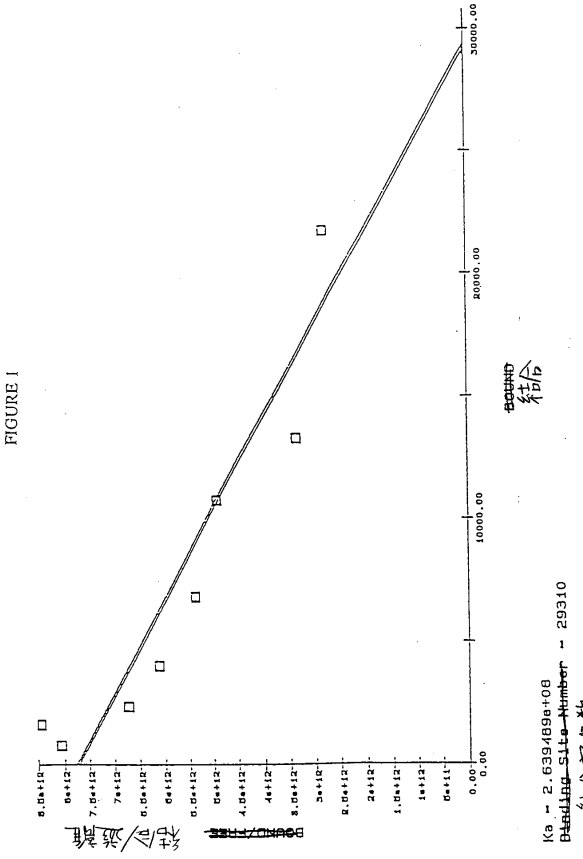
(2) 配列情報SEQ ID NO:10:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:5アミノ酸
(B) 型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:ペプチド
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(xi) 配列:SEQ ID NO:10:

Leu Gln Ile Arg Cys
1 5

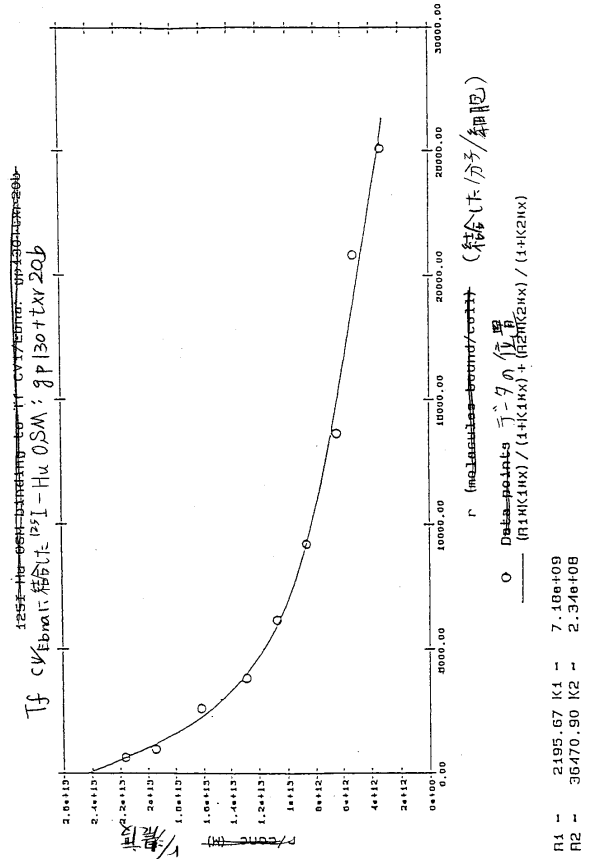
(2) 配列情報SEQ ID NO:11:
(i) 配列の特性:
(A) 長さ:5アミノ酸
(B) 型:アミノ酸
(C) 鎖の数:一本鎖
(D) トポロジー:直線状
(ii) 配列の種類:ペプチド
(iii) ハイポセティカル:NO
(iv) アンチセンス:NO
(xi) 配列:SEQ ID NO:11:

Trp Ser Xaa Trp Ser
1 5

【図１】

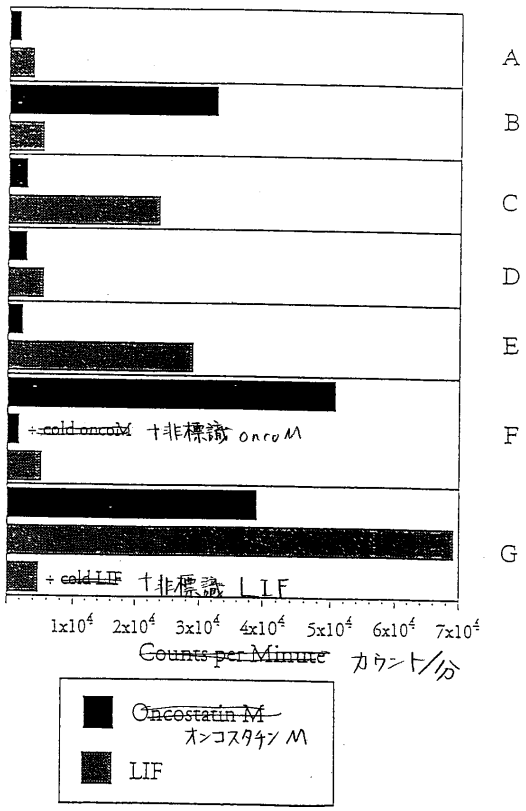


【図２】



【図３】

FIGURE 3



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12P 21/02	***(2006.01)***		C12P	21/02	C
C12P 21/08	***(2006.01)***		C12P	21/08	
C12N 5/10	*(2006.01)*		C12N	5/00	B
C12R 1/19	*(2006.01)*		C12N	1/21	
C12R 1/91	*(2006.01)*		C12R	1:19	
			C12P	21/02	C
			C12R	1:91	

微生物の受託番号　ATCC　69675

(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100107386
弁理士　泉谷　玲子
(72)発明者　モズレー，ブルース
アメリカ合衆国ワシントン州９８１２５，シアトル，サーティーシックスス・アベニュー・ノース・イースト　１１３３１
(72)発明者　コスマン，デヴィッド・ジェイ
アメリカ合衆国ワシントン州９８１１０，ベインブリッジ・アイランド，マンダス・オルソン・ロード・ノース・イースト　９８０８

合議体
審判長　平田　和男
審判官　齊藤　真由美
審判官　上條　肇