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

特許第3771585号
(P3771585)

(45)発行日　平成18年4月26日(2006.4.26)　(24)登録日　平成18年2月17日(2006.2.17)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C07K 14/715	(2006.01)	C07K	14/715	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	

請求項の数 18　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-522719
(86)(22)出願日　平成8年1月24日(1996.1.24)
(65)公表番号　特表平10-513046
(43)公表日　平成10年12月15日(1998.12.15)
(86)国際出願番号　PCT/GB1996/000143
(87)国際公開番号　WO1996/023068
(87)国際公開日　平成8年8月1日(1996.8.1)
審査請求日　平成14年5月16日(2002.5.16)
(31)優先権主張番号　9501683.8
(32)優先日　平成7年1月27日(1995.1.27)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(73)特許権者
グラクソ、グループ、リミテッド
イギリス国ミドルセックス、グリーンフォード、バークレー、アベニュ、グラクソ、ウェルカム、ハウス（番地なし）
(74)代理人
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人
弁理士　藤田　節
(74)代理人
弁理士　石井　貞次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１αおよび／またはＲＡＮＴＥＳに結合可能なケモカインレセプターおよびその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

第３図に示されるアミノ酸配列（配列番号20）を含むか、または第３図に示されるアミノ酸配列（配列番号20）に対して１個～数個のアミノ酸の欠失、挿入または置換を有しており、第３図に示されるアミノ酸配列と少なくとも90％のアミノ酸配列の同一性を有し、RANTES、MIP-1αおよび/またはMCP-1に結合することができるポリペプチド。

【請求項２】

第３図に示されるアミノ酸配列（配列番号20）を有する、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項３】

請求項１または２に記載のポリペプチドの使用を含む、治療に有用な薬剤のスクリーニング方法。

【請求項４】

前記薬剤がアレルギーの治療に有用である、請求項３に記載のスクリーニング方法。

【請求項５】

前記薬剤が喘息、枯草熱、アトピー性皮膚炎または鼻炎の治療に有用である、請求項３に記載のスクリーニング方法。

【請求項６】

前記薬剤が喘息の治療に有用である、請求項３に記載のスクリーニング方法。

【請求項７】

前記薬剤がアンタゴニストである、請求項３～６のいずれか１項に記載のスクリーニング方法。
【請求項８】
前記薬剤が抗体である請求項３に記載のスクリーニング方法。
【請求項９】
前記薬剤がT-リンパ球の活性化によって引き起こされる免疫状態および炎症状態に関与する、請求項３に記載のスクリーニング方法。
【請求項１０】
前記薬剤が移植の拒絶反応の可能性を提言するかもしくは拒絶反応が起こるまでの時間を延長し、アテロームを治療し、または、ウイルスによって媒介される疾病を治療するのに有用である、請求項３に記載のスクリーニング方法。
【請求項１１】
前記薬剤が幹細胞増殖を抑制する、請求項３に記載のスクリーニング方法。
【請求項１２】
前記薬剤がMCP-1、MIP-1αおよび/またはRANTESとケモカインレセプターとの結合をブロックする、請求項３に記載のスクリーニング方法。
【請求項１３】
請求項１または２に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。
【請求項１４】
請求項１または２に記載のポリペプチドをコードしている、請求項13に記載の核酸分子。
【請求項１５】
第３図に示されるヌクレオチド配列を有する、請求項14に記載の核酸分子。
【請求項１６】
第３図に示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド183～1262を含む、請求項15に記載の核酸分子。
【請求項１７】
請求項13～16のいずれか１項に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項１８】
請求項17に記載のベクターを含んでなる宿主。
【発明の詳細な説明】
本発明は、ケモカインレセプターに関する。
ケモカインは、走化性サイトカインの成長する群であり、細胞の回復および活性化に役割を果たしていると考えられている(Oppenheim, J.J. et al., Ann Rev Immunol., 9 617-48, (1991), Schall, T.J., Cytokine, 3 165-183, (1991))。それらは、主として白血球の活性化および回復に関与しているが、これに限定されるものではない。タンパク質のこのスーパーファミリーを更に分析することにより、これは更にタンパク質の２個の亜科に分割することができることが示された。これらは、タンパク質のアミノ末端付近の２個の保存されたシステイン残基のスペーシングに基づいてＣＸＣまたはα－ケモカイン、およびＣＣまたはβ－ケモカインと呼ばれている。
今日までに、ＣＣケモカイン群について２個のレセプターが同定されている。第一の、主としてＭＩＰ－１α（マクロファージ炎症性ポリペプチド－１α）およびＲＡＮＴＥＳ（活性化時に生じた、誘導され分泌された正常なＴ－細胞(Raised on Activation, Normal T-cell derived and Secreted)は、以前に記載されている(Gao, J.L. et al., J. Exp. Med., 177, 1421-7(1993), Neote, K. et al., Cell, 72, 415-25(1993))。最近になって報告された第二のＣＣ－ケモカインレセプターは、ＭＣＰ－１（単球ケモトラクタントタンパク質－１（monocyte chemotractant protein-1), Charo, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2752-2756(1994)）に対するものである。更に最近になり、ヒトサイトメガロウイルスによって発現されたもう一つのレセプターＵＳ２８は、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ－１α、およびＭＣＰ－１のレセプターであることが示された(Gao, J.L. and Murphy, P.M., J. Biol. Chem., 269, 28539-28542(1994))。３種類のレセプターは総て、セ

ブン・トランスメンブレーン・アルファ・ヘリカル・セグメント型(seven transmembrane alpha helical segment type)のものであり、細胞の膜中に発現される。
しかしながら、これまで開示されていないケモカインレセプターを同定し、これらを特定し、ケモカインレセプターの構造および機能を更に完全に明らかにする必要が残っている。
本発明によれば、第３図に示されるアミノ酸配列を有するケモカインレセプターが提供される。
このレセプターは、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１α、およびＲＮＡＴＥＳを結合することができるのが好ましい。これは、好塩基性細胞およびＴ－細胞の機能に重要であることがある。
これは、薬学活性を有する薬剤をスクリーニングするのに用いることができる。従って、本発明は、その範囲内に（タンパク質であってもよくまたはあってはならない）このような薬剤を包含する。これらの薬剤は、薬学上許容可能なキャリヤーとの医薬組成物で提供することができる。
このような組成物は、本発明の範囲内にある。これは、キャリヤーを薬学活性を有する薬剤を無菌条件下にて混合することによって製造することができる。医薬組成物は、単位投与形態で提供することができる。これは、使用説明書を含むキットの一部として存在することもできる。
医薬組成物は、例えば経口（口腔または舌下を含む）、直腸、鼻内、局所（口腔、舌下または経皮を含む）、腔内、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、または皮内を含む）経路のような任意の適当な経路によって投与に適合させることができる。
本発明のレセプターは、アレルギー、例えば喘息、アトピー性皮膚炎、鼻炎、枯草熱、湿疹、または食物アレルギーの治療に有用な薬剤をスクリーニングするのに用いることができる。これは、結膜炎の治療に有用な薬剤をスクリーニングするのにも用いることができる。ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１αおよびＲＡＮＴＥＳは総て、本発明のレセプターに結合し、好塩基性細胞からヒスタミンを放出させることができる。この結合をブロックする薬剤は、これによって好塩基性細胞からヒスタミンの放出を防止または減少させる（すなわち、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１αまたはＲＡＮＴＥＳに拮抗的に作用する）。このような薬剤は、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１αまたはＲＡＮＴＥＳの変異体（ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１αまたはＲＡＮＴＥＳに対して１個以上のアミノ酸が欠失、置換または挿入されているもの）であってもよいが、これは本質的なことではない。
これは、Ｔ－リンパ球の活性化である免疫および他の炎症状態の共通の特徴にも関与することがある。
薬剤の本発明のレセプターへの結合は、適当な手法によって分析することができる。
例えば、電気生理学的手法を用いることができる。一つのこのような手法では、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞を用いて、本発明のレセプターを発現することができる。レセプターを卵母細胞膜上で発現させた後、上記レセプターをコードするＲＮＡの卵母細胞への微量注入を行うことができる。
リガンドレセプターに結合するときには、リガンドは、細胞内の貯蔵所または細胞外供給源からカルシウムイオンを放出させることができる。次いで、これらのカルシウム・フラックス(calcium fluxes)により、電気生理学的に測定することができる細胞膜中の塩化物電流が生じる。
このような電流は、例えばWahlestedt, C., Ann. N.Y. Acad. Sci., 632, 116-22(1991)、およびBoton, R. et al., J. Physiol. (London), 408, 511-534 (1989)に記載されている。
電気生理学的手法またはレセプター結合に対する生物学的応答に依存する他の手法の使用に対する代替法としては、更に直接的な結合分析法を用いることができる。例えば、リガンドを検出可能な標識で標識し、レセプターに結合させ、次に標識を検出することができる。用いることができる好適な標識としては、放射能標識、蛍光標識、検出可能な変化を引き起こすことができる酵素などが挙げられる。

本発明のレセプターは、アテロームの治療に好適な薬剤をスクリーニングするのに用いることもできる。この場合には、ＭＣＰ－１がアテローム性動脈硬化症斑に対する単球の重要な補充装置であることに留意すべきである。レセプターを用いて、このような補充を防止または減少する（ＭＣＰ－１αに対して拮抗的に作用する）薬剤をスクリーニングすることができる。このような薬剤はＭＣＰ－１自身の変異体（ＭＣＰ－１に対して１個以上のアミノ酸が欠失、置換または挿入されているもの）であってもよいが、これは本質的なことではない。

本発明のレセプターのもう一つの用途は、幹細胞の増殖を抑制する薬剤をスクリーニングすること、すなわちＭＩＰ－１αの作動薬をスクリーニングすることである。ＭＩＰ－１αは、造血幹細胞の増殖を抑制することが示されている(Graham, G.J. et al., Nature, 344, 442-(1990))。レセプター作動薬は、それ自体で、化学療法の際に幹細胞の増殖を防止するのに用いることができ、従ってこれは幹細胞をこのような化学療法の潜在的損傷作用から保護する。

ＭＩＰ－１αは、幹細胞増殖抑制剤であることが知られており、幹細胞増殖抑制剤である薬剤を、本発明のレセプターを用いてスクリーニングすることができる。このような薬剤はＭＩＰ－１α自身の変異体（ＭＩＰ－１αに対して１個以上のアミノ酸が欠失、置換または挿入されているもの）であることができるが、これは本質的なものではない。

本発明のレセプターのもう一つの用途は、移植の拒絶反応の可能性を減少させまたは拒絶反応が起こるまでの時間を増加させるのに用いられる薬剤をスクリーニングすることにある。高濃度のＲＡＮＴＥＳが腎臓移植片に見られることがあり、このような移植の拒絶反応に関係していることがある。従って、本発明のレセプターへのＲＡＮＴＥＳの結合を防止しまたは減少させる薬剤は、ＲＡＮＴＥＳに拮抗的に作用することによって移植に用いられることがある。このような薬剤はＲＡＮＴＥＳ自身の変異体（ＲＡＮＴＥＳに対して１個以上のアミノ酸が欠失、置換または挿入されているもの）であることができるが、これは本質的なものではない。

本発明のもう一つの用途は、ウイルスによって媒介される疾病の治療に有用な物質のスクリーニングにある。従って、本発明は、抗ウイルス薬のスクリーニングに用いることができる。

この一例は、ＡＩＤＳの治療に用いられる薬剤のスクリーニングにある。ＭＩＰ－１αおよびＲＡＮＴＥＳ濃度は、他の患者より長期間生存している幾人かのＡＩＤ患者に少なくとも部分的に関与していることが示されてきた。本発明のレセプターはＭＩＰ－１αおよび／またはＲＡＮＴＥＳに結合することがあるので、これはＡＩＤＳの治療に用いることができる他の薬剤のスクリーニングに用いることができる。

ヒトサイトメガロウイルスおよびヘルペスウイルスはケモカインレセプターを有することも注目に値する。本発明を用いて、このようなウイルスによって媒介される疾病の治療に用いられる薬剤のスクリーニングに用いることができる。

本発明は第３図に示されるアミノ酸配列を有するレセプターに限定されず、上記配列に対して１個以上のアミノ酸の欠失、挿入または置換を有する変異体（対立および非対立変異体）であって、この変異体がケモカイン：ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ－１α、およびＭＣＰ－１の少なくとも１個に結合することができるものを包含することに留意すべきである。（しかしながら、レセプターはこれらのケモカインの総てに結合することができるのが望ましい。）結合は、既に説明したように、卵母細胞を用いて電気生理学的分析法での細胞の応答を観察することによって決定することができる。

例えば、当業者であれば、タンパク質のある種の特性を実質的に変更しまたはこれに悪影響を及ぼすことなく同様な特性を有する他のアミノ酸の代わりに各種のアミノを用いることができることが多いことを理解されるであろう。例えば、アミノ酸であるグリシン、バリン、ロイシンまたはイソロイシンを互い（脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸）の代わりに用いることができる。互いに代わりによく用いることができる他のアミノ酸としては、

フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン（芳香族性側鎖を有するアミノ酸）；

リシン、アルギニンおよびヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；アスパルテートおよびグルタメート（酸性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギンおよびグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）、およびシステインおよびメチオニン（硫黄を含む側鎖を有するアミノ酸）
が挙げられる。従って、本発明は、１個以上の上記置換を有する第３図に示されるレセプターの変異体を本発明の範囲内に包含する。
しかしながら、第３図に示されるアミノ酸配列を有するレセプターの変異体が、このアミノ酸配列と実質的なアミノ酸同一性を有することが好ましい。アミノ酸の同一性の程度は、「ベストフィット(bestfit)」（SmithおよびWaterman著、応用数学の進歩(Advances in Applied Mathematics), 482-489, (1981)）のようなプログラムを用いて計算して、２個の配列の間の類似性の最適セグメントを見いだすことができる。アラインメント(alignment)は、SchwartzおよびDayhof (1979)タンパク質配列および構造の図解(Atlas of Protein Sequence and Structure)、Dayhof, M.O.監修、353-358頁に記載されているようなアミノ酸類似性のマトリックスを用いて得た得点を最大にすることに基づいている。
しかしながら、配列同一性の程度は少なくとも５０％または少なくとも６０％であるのが好ましく、７５％を上回るのが更に好ましい。少なくとも８０％、例えば少なくとも９０％または少なくとも９５％の配列同一性が、最も好ましい。
レセプターまたはその変異体はＮ－末端メチオニンを含むことができる。このようなメチオニンは翻訳の際に取り込まれ、以後外れないことがある。
レセプターまたは変異体は、別の残基（例えば、タンパク質）に共有結合することができる。従って、融合タンパク質を形成することができる。これらは当該技術分野では周知であり、同定または精製を助け、またはレセプターまたはその変異体の特性を変更する（例えば、その安定性および／またはその結合特性を変更するのに用いることができる。
ＭＩＰ－１α、ＲＡＮＴＥＳおよび／またはＭＣＰ－１に対する結合を保持したまま１個以上のアミノ酸を第３図に示されるアミノ酸配列から欠失することができるので、上記配列を有するレセプターの末端切断型変異体を提供することもできる。これらは、Ｎ－末端欠失、Ｃ－末端欠失であってもよく、または上記配列内部で起こることもある。
（どのような性質の）レセプターまたは変異体でも、実質的に純粋な形態で提供することができる。これは、他のタンパク質から単離することができ、また細胞膜から単離することができる。これは、（用いた発現系によって）グリコシル化したまたはグリコシル化していない形態であってもよい。本発明のレセプターまたはその変異体は、任意の適当な手法によって提供することができる。
遺伝子クローニングの手法を用いるのが好ましい。このような手法は、例えばJ. Sambrook et al., 分子クローニング(Molecular Cloning)第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に開示されている。
あるいは、化学的合成を用いることもできる（この方法は余り好ましくない）。例えば、短い合成ペプチドを製造して、次にこれらを互いに結合して、本発明の物質を提供することができる。このようなペプチドは、当業者に知られている手法によって製造することができる。従って、分子の一端を固定して、所望なアミノ酸残基を順次に添加することができる。保護基を用いて、望ましくない副反応を回避することができ、次に外すことができる。
本発明のレセプターの変異体は、レセプター自身と共に、以下において本発明による物質と呼ばれる。
このような物質は、抗体を生じさせまたは選択するのに用いることができる。従って、本発明は、本発明の物質に結合する抗体を包含する。好ましい抗体は、本発明の物質に特異的に結合して、このような物質を精製するのに用いることができる。抗体は、モノクローン性でも、またはポリクローン性であってもよい。
本発明の物質を適当な動物宿主（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギまたはサル）に注射すると、その動物でポリクローン性抗体の産生を刺激することによってポリクローン性抗体を生じさせることができる。必要ならば、アジュバントを、

本発明の物質と共に投与することができる。次に、抗体を、本発明の物質へのそれらの結合によって精製することができる。
モノクローン性抗体は、ハイブリドーマから産生させることができる。これらは、所望な抗体を産生するメラノーマ細胞および脾臓細胞を融合させ、不変の細胞系を形成することができる。これは、周知のKohler & Milstein法である(Nature, 256, 52-55(1975))。
特定のタンパク質に結合するモノクローン性およびポリクローン性抗体を産生する手法は、現在では当該技術分野において完全に開発されている。それらは、標準的な免疫学の教科書、例えばRoitt et al., 免疫学、第二版（１９８９年）, Churchill Livingstone, ロンドンに記載されている。
全抗体の他に、本発明は、本発明の物質に結合することができるその変異体を包含する。
従って、本発明は、抗体断片および合成構造体を包含する。抗体断片および合成構造体の例は、Dougall et al., Tibtech, 12, 372-379(1994年9月)によって示されている。
抗体断片としては、例えばＦａｂ、Ｆ（ａｂ′）$_2$、およびＦｖ断片が挙げられる（Roitt et al.［上記引用］を参照されたい）。
Ｆｖ断片を修飾して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子として知られている合成構造体を産生することができる。これには、分子の安定性に寄与する$Ｖ_h$および$Ｖ_1$領域を共有結合するペプチドリンカーが挙げられる。
他の合成構造体としては、ＣＤＲペプチドが挙げられる。これらは、抗原結合決定基を含んでなる合成ペプチドである。ペプチド類似体を用いることもできる。これらの分子は通常はコンホメーションが限定された有機環であって、ＣＤＲループの構造に類似しておりかつ抗原と相互作用する側鎖を有するものである。
合成構造体としては、キメラ分子が挙げられる。従って、例えば人体に適応させた（または霊長類に適応させた）抗体またはその誘導体は、本発明の範囲内にある。人体に適応させた抗体の例は、齧歯類の高頻度可変領域を除くヒト骨格領域を有する抗体である。
合成構造体としては、抗原との結合製の他に幾つかの所望な特性を有する分子を提供する共有結合した残基を含んでなる分子も挙げられる。例えば、この残基は、標識（例えば、蛍光または放射性標識）、または薬学活性を有する薬剤であることができる。
本発明の抗体またはその誘導体は、多種多様な用途を有する。それらは、本発明の物質の精製および／または同定に用いることができる。従って、それらは、診断に用いてもよい。
それらは、本発明の物質をスクリーニングするためのキットの形態で提供することができる。
本発明は、本発明の物質（すなわち、上記レセプターまたはその変異体）をコードする核酸分子もその範囲内に包含する。核酸分子はＲＮＡまたはＤＮＡでよく、単離したまたは組換え形態で提供することができる。
本発明の核酸分子は、任意の適当な手法によって提供することができる。
遺伝子クローニングの手法が好ましい（Sambrook et al.,上記引用を参照されたい）。所定の核酸配列の変異体は、突然変異誘発の手法（例えば、特定部位の突然変異誘発）によって調製することができる。
化学的合成法を用いることもできるが、余り好ましくない。
ベクターを用いて、本発明の核酸分子を組み込むことができる。ベクターは真核性または原核性ベクターでよく、適当な宿主細胞中または非細胞性発現系に組み込むことができる。
上記核酸分子に相補性の核酸分子も、本発明の範囲内にある。これらは、「アンチセンス分子」と呼ばれることがある。それらを相補性核酸分子にハイブリダイゼーションさせることができ、それによって遺伝子生成物の発現を防止または減少させることができる。従って、それらを用いて、遺伝子発現を変更させることができる。
このような分子の使用は、遺伝子機能および調節を検討する上で有用である。適当な標識およびハイブリダイゼーションの手法を用いて、コード領域の配置を同定することができる。

本発明は、ケモカインレセプターのプローブとして用いることができる核酸もその範囲内に包含する。好ましいプローブは、上記したように、第３図に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質またはその変異体をコードする核酸に特異的にハイブリダイゼーションすることができる。このようなプローブは任意の好適な長さのものであることができるが、典型的には１５個を上回るヌクレオチドの長さであり、少なくとも１００個のヌクレオチドの長さであることができる。

プローブは、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で標的配列にハイブリダイゼーションする。緊縮ハイブリダイゼーション条件の一例は、３５°～６５℃の温度および約０．９モルの塩濃度である。他の緊縮ハイブリダイゼーション条件を用いることができ、塩濃度を０．９モル程度とする必要はない。

本明細書の第１図および３図に示される核酸配列またはその断片は、プローブまたはプライマーとして、またはプローブまたはプライマーを調製する目的で用いることができる。プライマーを用いて、例えばＰＣＲまたは他の増幅法を用いることによって核酸配列を増幅することができる。プローブは、診断または精製に用いることができる。

本発明は、添付の図面に関して単なる例として説明される。

第１図は、ヒト脾臓λＧＴ１１ｃＤＮＡライブラリーの検査に用いた「ＴＭ（２－７）５．５」と命名されたクローンのｃＤＮＡ配列および推定アミノ酸配列を示す。

第２図は、ＴＭ（２－７）５．５ＤＮＡをプローブとして用いることによって上記第１図に関して引用されたライブラリーから単離されたクローンの配列決定に用いた各種プライマーを示す。

第３図は、上記の第２図に関して引用された、「Ｋ５．５」と命名されたクローンに関するｃＤＮＡ配列および推定アミノ酸配列を示す。

第４図～６図は、様々なハイブリダイゼーションの研究においてＴＭ（２－７）５．５ＤＮＡを用いて調製したノザンブロット分析を示す。これらの図においては、下記の得点系を用いている。

+++　オートラジオグラフの４時間暴露した後に視認される極めて強い陽性シグナル。

++　　オートラジオグラフの４時間暴露した後に視認される明確な陽性シグナル。

+　　オートラジオグラフの４時間暴露した後に視認されないが、２４時間後には明確になるシグナル。

+/-　２４時間の暴露の後にのみ視認される弱い陽性シグナル。

-　　シグナルなし。

プローブは、10^6 ｃｐｍ／ｍｌハイブリダイゼーション溶液の比活性で用いた。

第７図は、白血球および幾つかのヒト細胞系からのＫ５．５レセプターｍＲＮＡ発現生成物であって、ＲＮＡが逆転写酵素ＰＣＲを用いて増幅したもののアガロースゲル上での分析を示す。

図８Ａ図は、Ｋ５．５ｃＲＮＡを微量注射した電圧固定したアフリカツメガエルの卵母細胞を各種のケモカインリガンドで刺激したときに誘導される電流の分析を示す。

第８Ｂ図は、異なるケモカイン（両図で比較のために示しているＭＩＰ－１αとは異なる）を用いることを除き、第８Ａ図について行ったのと同様な分析を示す。本発明者は、ＩＬ－８がＣＣ－ＣＫＲ３分子に結合することを示す如何なるデーターを得ることもできなかった。本発明の範囲内の好ましいレセプターは、ＩＬ－８に結合しない。

第９図は、［^{125}Ｉ］ＭＩＰ－１αおよび［^{125}Ｉ］ＲＡＮＴＥＳを用いてヒトおよびネズミＣＣ－ＣＫＲ－３分子に結合する結合分析の結果を示す。

実施例

ＩＬ－８レセプターＡおよびＢ、およびＣ－Ｃ　ＣＫＲ－１（ＭＩＰ－１α／ＲＡＮＴＥＳレセプター）のアミノ酸配列のアラインメントは、提案されたトランスメンブランドメイン３および４の間の領域が、保存されたアミノ酸配列ＲＹＬＡＩＶＨＡを含むことを示していた。

第二の保存されたアミノ酸配列は、下記のようにこれらの３種類のレセプター並びにｆＭＬＰ（ホルミル－メチオニン－ロイシン－フェニルアラニン）およびＣ５ａについての２

種類の非ケモカイン走化性ペプチドレセプターに置ける提案された７番目のトランスメンブランドメインに生じる。
ＣＬ（またはＶ，Ｉ）ＮＰＩ（またはＬ，Ｍ，Ｖ）Ｉ（またはＬ）ＹＡ（またはＶ）Ｆ（またはＶ）
翻訳して上記のアミノ酸配列を提供することができる可能なコドンの大半を含む縮重オリゴヌクレオチドを調製した。
これらのオリゴヌクレオチドは、配列
a) センス　　５′ＧＩＴ　ＡＹＹ　ＴＩＧ　ＣＩＡ　ＴＨＧ　ＴＩＣ　ＡＹＧ　Ｃ
または
b) アンチセンス　５′ＡＭＩ　ＲＣＲ　ＴＡＩ　ＡＤＩ　ＡＩＩ　ＧＧＲ　ＴＴＩ　Ａ　ＩＲ　Ｃ
ＩＵＢ／ＧＣＧコードを用いる、但し
Ｉ＝Ａ、Ｔ、ＧまたはＣの代わりに用いることができるイノシン
Ｙ＝ＣまたはＴ
Ｈ＝Ａ、ＣまたはＴ
Ｍ＝ＡまたはＣ
Ｒ＝ＡまたはＧ
Ｄ＝Ａ、ＧまたはＴ
次にオリゴヌクレオチドを、下記の手続きを用いてヒトＣＣケモカインレセプターをクローニングするのに用いた。
(a) ヒトＫ５．５（ＣＣ－ＣＫＲ－３）＊と命名された配列のクローニング
（＊ＣＣ－ＣＫＲ－３という名称を、優先権書類に用いた名称と一貫性を持たせるため本明細書で用いる。しかしながら、他の研究グループは異なる分子にＣＣ－ＣＫＲ－３という名称を用いており、本明細書でＣＣ－ＣＫＲ－３と表される分子は、文献ではＣＣ－ＣＫＲ－４を表すことがある点が注目される。）
総ＲＮＡは、ChomczynskiおよびSacchiの方法（１９８７年）（酸グアニジニウムチオシアネート－フェノール－クロロホルム抽出によるＲＮＡ単離の一段階法(Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction), Anal. Biochem, 162, 156-159)によって１×１０^{8}ＫＵ８１２細胞から単離した。これらの細胞は、K. Kishi博士、新潟、日本から贈られたヒト好塩基性ＫＵ８１２細胞系からのものであった。
次に、ポリＡ＋ｍＲＮＡを、ポリＡ迅速ｍＲＮＡ精製キット(polyA quik mRNA purification kit)(Stratagene)を用いてオリゴｄＴセルロースクロマトグラフィによって単離した。一本鎖ｃＤＮＡは、１μｇオリゴｄＴ$_{12\text{-}18}$′、４ｍＭメチルマーキュリックヒドロオキシド、１ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、５０ｍＭ　トリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．３緩衝液、５０ｍＭ　ＫＣｌ、８ｍＭ　ＭｇＣｌ$_{2}$、１０単位のＲＮＡｓｉｎおよび１００単位のＡＭＶ逆転写酵素－ＸＬ(Life Science Inc.)を含む５０μｌ反応中でポリＡ＋ｍＲＮＡ１μｇから、４２℃で６０分間で調製した。次に、反応混合物５μｌを、Techne PHC-2温度循環装置(thermal cycler)中でそれぞれ宿重したオリゴヌクレオチドプライマー（センス５′ＧＩＴ　ＡＹＹ　ＴＩＧ　ＣＩＡ　ＴＨＧ　ＴＩＣ　ＡＹＧ　Ｃおよびアンチセンス５′ＡＭＩ　ＲＣＲ　ＴＡＩ　ＡＤＩ　ＡＩＩ　ＧＧＲ　ＴＴＩ　ＡＩＲ　Ｃ）３μＭを用いて、１０ｍＭ　トリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．３緩衝液、５０ｍＭ　ＫＣｌ、１．５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_{2}$、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰＳおよび２．５単位のAmplitaq TM(Perkin Elmer Cetus)中でＰＣＲ（９５℃、２分；３７℃、２分；および７２℃、２分）４０サイクルを施した。ＰＣＲ反応生成物を、０．５μｇ／ｍｌエチジウムブロミドを含む１％アガロースゲル上で可視化した。予測した大きさ（５００～５５０ｂｐ）で移動する反応生成物を、標準的方法によってゲル精製した（Sambrook, J. et al., 1989、分子クローニング：実験室便覧(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク）。次に、ゲル精製したＤＮＡを、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs)を用いて製造業者の使用説明に準じ

て総容積５０μｌで３７℃で１時間順次処理することによって平滑末端とした。その後、２．５ｍＭ ｄＮＴＰｓ ２．５μｌおよびE. coli ＤＮＡポリメラーゼＩクレノー断片(New England Biolabs)１μｌを加え、インキュベーションを３７℃で更に３０分間継続した。次いで、反応混合物を７０℃で３０分間熱不活性化した後、トリス－ＨＣｌ ｐＨ８．０で飽和したフェノール／クロロホルム（１：１（ｖ／ｖ））で１回抽出した。ＤＮＡを、－２０℃で３M酢酸ナトリウムｐＨ５．５ １０μｌ、グリコーゲン（２０ｍｇ／ｍｌ）(Boehringer)１μｌ、およびエタノール２５０μｌを添加することによって沈澱させた。ＤＮＡを、１０，０００×ｇで４℃にて２０分間遠心分離して回収し、７０％エタノールで洗浄した。最終ペレットを、滅菌水に１０ｎｇ／μｌの濃度で再懸濁した。

ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ II ＳＫ－クローニングベクター(Stratagene)を、下記のようにして調製した。ＣｓＣｌグラディエントによって精製したプラスミドを、１００μｌの反応容積で、ＥｃｏＲＶまたはＥｃｏＲＩ(New England Biolabs)２００単位を用いて製造業者の使用説明に従って、３７℃で２時間消化した。２時間後に、消化したベクターを子牛腸アルカリ性ホスファターゼ（２０単位／ｍｌ）(Boehringer)１０μｌで、３７℃で更に３０分間処理した。反応混合物を６８℃で１５分間加熱することによって不活性化した後、トリス－ＨＣｌ ｐＨ８．０で飽和したフェノール／クロロホルム（１：１（ｖ／ｖ））で１回抽出した。プラスミドＤＮＡを、－２０℃で、３M酢酸ナトリウム ｐＨ５．５ １０μｌ、およびエタノール２５０μｌを添加することによって沈殿させた。ＤＮＡを、１０，０００×ｇで４℃にて２０分間遠心分離して回収し、７０％エタノールで洗浄した。最終ペレットを、滅菌水に５０ｎｇ／ｍｌの濃度で再懸濁した。

平滑末端ＰＣＲ生成物（１０ｎｇ）を、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ（４００，０００単位／ｍｌ）(New England Biolabs)２μｌを用いて、１５℃で少なくとも１６時間２０μｌの容量でＥｃｏＲＶで消化してアルカリ性ホスファターゼ処理を行ったｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ IIＳｋ－プラスミドクローニングベクター５０ｎｇに連結した。連結生成物を１×ＴＥ（１０ｍＭ トリス－ＨＣｌ ｐＨ８．０／１ｍＭ ＥＤＴＡ）で１００μｌまで希釈し、上記と同様にしてフェノール／クロロホルム抽出した。連結生成物を、３M酢酸ナトリウム ｐＨ５．５ １０μｌ、グリコーゲン（２０ｍｇ／ｍｌ）１μｌ、およびエタノール２５０μｌを－７０℃で１５分間添加することによって沈澱させた。ＤＮＡを上記と同様にして遠心分離によって回収し、滅菌水に１０μｌに再懸濁した。次に、再懸濁した連結生成物５μｌを、Bio Rad Geneパルサーを用いて、製造業者の使用説明に従って、エレクトロコンピテントなE. coli XL-1ブルー株（ｒｅｃＡ１、ｅｎｄＡ１、ｇｙｒＡ９６、ｔｈｉ－１、ｈｓｄＲ１７、ｓｕｐＥ４４、ｒｅｌＡ１、ｌａｃ、｛Ｆ′ｐｒｏＡＢ、ＬａｃＩｑＺＤＭ１５、Ｔｎ１０（ｔｅｔ^{r}］（４０μｌ）にエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの後、ＬＢ培地１ｍｌを加え、細胞を３７℃で１時間成育させた。この後、培地１００μｌを、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含むＬＢプレートに採取して、３７℃で１６時間成育させた。次に、細菌コロニーを、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含むＬＢ培地５ｍｌに採取して、３７℃で一晩成育させた。次いで、小規模のプラスミドＤＮＡ調製物（ミニーｐｒｅｐｓ）を、Wizard（商品名）ミニーｐｒｅｐＤＮＡ精製システム(Promega)を用いて製造業者の使用説明に従って、それぞれの培養物３ｍｌから作成した。次に、ミニーｐｒｅｐＤＮＡ ３μｌを、制限酵素ＨｉｎｄIIIおよびＥｃｏＲＩ（両方ともNew England Biolabs製）を用いて、製造業者の使用説明に従って、１５μｌの反応容積で消化した。反応生成物を、０．５μｇ／ｍｌエチジウムブロミドを含む１％アガロースゲル上で分析した。約５００～５５０ｂｐの挿入サイズを生じたミニーｐｒｅｐを、次にＴ３およびＴ７プライマーおよびSequenase(USB)を用いて製造業者の使用説明に従ってＤＮＡ配列分析を施した。

得られた配列をGenbank/EMBL/DDBJデーターベースに対して比較したところ、分析を行った１０／２３配列はヒトＣ－Ｃ ＣＫＲ－１（ＭＩＰ－１α／ＲＡＮＴＥＳレセプター）に対してＤＮＡ水準で６０％の同一性を示すことが明らかになった(Neote et al.,分子クローニング、Ｃ－Ｃケモカインレセプターの機能発現およびシグナル化の特徴(Molecular cloning, functional expression and signalling characteristics of a C-C chemokin

e receptor), Cell, 72, 415-425(1993))。ＴＭ（２－７）５．５（Ｋ５．５と省略）と命名されたクローンの一つの配列を、第１図に示す。

ＣｓＣｌグラディエントによって精製したプラスミドＤＮＡを、クローンＫ５．５について標準的方法によって調製した。プラスミドＤＮＡ２０μｇを、制限酵素ＨｉｎｄIIIおよびＥｃｏＲＩを用いて、製造業者の使用説明(New England Biolabs)に従って３７℃で消化した。消化生成物を０．５μｇ／ｍｌエチジウムブロミドを含む１％アガロースゲル上で分析した。配列決定したＰＣＲ生成物に相当する５１４ｂｐのインサートＤＮＡを、上記と同様にしてゲル精製した。５１４ｂｐインサート１００μｇを、ランダムープライドＤＮＡ標識キット(Boehringer)を用いて製造業者の使用説明に従って^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ(Amersham International)で標識し、ヒト脾臓λＧＴ１１　ｃＤＮＡライブラリー(Clontech)の５×１０^{5}個のクローンを製造業者の使用説明に従ってスクリーニングするのに用いた。ハイブリダイゼーションの後、二重陽性のものを、純粋な陽性ファージプラークが得られるまで、同じプローブで再スクリーニングした。ファージＤＮＡを、標準的方法(Sambrook, J. et al. (1989))を用いて陽性プラークから回収した。精製したファージＤＮＡ（１００μｇ）を、緩衝液２(New England Biolabs)中でＥｃｏＲＩ(New England Biolabs)２００単位を用いて３７℃で１６時間消化した。消化生成物を、エチジウムブロミド（０．５μｇ／ｍｌ）を含む１％アガロースゲル上で分画し、ｃＤＮＡインサートをゲル精製し、上記と同様にしてｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　II　ＳＫ－ベクターのＥｃｏＲＩ部位に連結した。連結生成物を、上記と同様にしてエレクトロポレーションによってE. coli XL-1ブルー株（ｒｅｃＡ１、ｅｎｄＡ１、ｇｙｒＡ９６、ｔｈｉ－１、ｈｓｄＲ１７、ｓｕｐＥ４４、ｒｅｌＡ１、ｌａｃ、［Ｆ′ｐｒｏＡＢ、ｌａｃＩｑＺＤＭ１５、Ｔｎ１０（ｔｅｔ^{r}）］（４０μｌ）に形質転換した。個々のアンピシリン耐性の細菌コロニーを、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬ－ブロスに接種して、３７℃で１６時間成育させた。ミニーｐｒｅｐＤＮＡを、上記と同様にして一晩培地３ｍｌから調製した。次に、ミニーｐｒｅｐＤＮＡ　３μｌを、制限酵素ＥｃｏＲＩを用いて製造業者の使用説明に従って、１５μｌの反応容積で消化した。反応生成物を、０．５μｇ／ｍｌエチジウムブロミドを含む１％アガロースゲル上で分析した。ｃＤＮＡインサートを含むミニーｐｒｅｐを、次にApplied Biosystems DNAシークエンサー上でSequenase（商品名）およびＴ３およびＴ７プライマーを用いて配列決定した。

Ｅ１－Ｃ１９と命名した一つのクローンを、Ｔ７プライマーでＫ５．５の推定上の５′末端を含むように配列決定することによって示した。クローンＥ１－Ｃ１９のＣｓＣｌグラディエントによって精製したＤＮＡを、次にＴ３およびＴ７プライマーおよび上記の配列決定の結果（プライマー配列は第２図に示す）に基づく数個の内部配列決定プライマーで再度配列決定した。Ｅ１－Ｃ１９インサートｃＤＮＡの配列を、第３図に示す。

(b)　ノザンブロット分析

多重組織ノザンブロットをClontechから購入し、製造業者の使用説明に従ってｐＴＭ（２－７）５．５の５１４ｂｐ　ＨｉｎｄIII／ＥｃｏＲＩ断片にハイブリダイゼーションした。他のノザンブロットについては、総ＲＮＡをChomczynskiおよびSacchiの方法（１９８７年）によって細胞系および末梢血白血球母集団から調製した。この研究に用いた細胞系の総ては、１０％熱不活性化したＦＣＳおよび５０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（いずれもGibco-BRLから購入した）を含むＲＰＭＩ１６４０培地中に保持した。総末梢血単核細胞および多形核細胞は、Ficoll(Pharmacia)上で密度グラディエント遠心分離によって精製した。白血球を、ＦＡＣＳスター(Becton Dickinson)上で適当に標識した抗体を用いてＦＡＣＳによって選別して、Ｂ細胞（ＣＤ２０）、Ｔ細胞（ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５Ｒ０、ＣＤ４５ＲＡ）、および単球（ＣＤ１４）の純粋な母集団（＞９０％）を得た。肺マクロファージおよび混合した肺白血球を、Nicod et al.（１９８９年）の方法（自己蛍光に基づく強いおよび弱い機能のヒト肺修飾細胞の分離(Separation of potent and poorly functional human lung accesory cells based on a utofluorescence), J. Leukocyte. Biol., 45, 458）を用いて切除したヒト肺試料から調製した。

それぞれのＲＮＡ５μｇを、２．２％（ｖ／ｖ）ホルムアルデヒドを含む１％アガロース

ゲルで電気泳動し、ニトロセルロースに移し、標準的なノザンブロット法(Sambrook et al(1989))を用いてＴＭ（２－７）５．５から^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ標識した５１４ｂｐのインサートでプローブした。結果を、第４図～６図に示す。

(c) 逆転写酵素ＰＣＲによる白血球および幾つかのヒト細胞系におけるＫ５．５レセプターｍＲＮＡ発現の分析

総ＲＮＡ（容積１０μｌ）１０μｇ、およびオリゴｄＴ$_{15}$の０．５ｍｇ／ｍｌ溶液０．５μｌを７０℃で１０分間加熱し、次に氷上で２分間冷却した後、５Ｘファースト・ストランド緩衝液(5X 1st strand buffer)４μｌ、０．１Ｍ ＤＴＴ ２μｌ、１０ｍＭ ｄＮＴＰｓ １μｌ、および１μｌのSuperscript（商品名）を３７℃で１時間加えた。逆転写（ＲＴ）反応のための総ての試薬は、オリゴｄＴ$_{15}$(Stratagene)以外は、Gibco-BRL製であった。次に、それぞれのＲＴ反応の２μｌを、プライマーＫ５－５ＦＬＡおよびＫ５－５ＦＬＢのそれぞれ１００ピコモルを含む１００μｌ反応混合物中で、ＰＣＲ（９５℃、２分間；５５℃、２分間、および７２℃、２分間）を４０サイクル施した。ＰＣＲ反応生成物（１０μｌ）を上記の方法と同様にして１％アガロースゲル上でＫ５．５の完全コード配列に相当する１０８５ｂｐの反応生成物の存在について分析した。結果を第７図に示し、第７図に示されたレーンの試料は下記の通りである。

レーン	試料
1	分子量マーカー（１ｋｂラダー)
2	ＰＢ Ｔ細胞（ＩＬ－２で刺激)
3	ＰＢ Ｔ細胞
4	Jurkat
5	ＭＯＬＴ－４
6	ＰＢ Ｂ細胞
7	ＰＢ Ｂ細胞
8	肺マクロファージ
9	ＰＢ単球
１０	ＫＵ８１２
１１	ＥＯＬ－３
１２	ＳＷ９００（肺上皮細胞系)
１３	ＣＣＬｕ３２（肺線維芽細胞系)
１４	ＬＬ２４（肺線維芽細胞系)
１５	ＡＡＬＴ．１６（大動脈平滑筋細胞系)

(d) アフリカツメガエル卵母細胞におけるＫ５．５ ｃＲＮＡの発現

ＣｓＣｌグラディエントによって精製したｐＥ１－Ｃ１９プラスミドＤＮＡ（５μｇ）を、１０μｌ反応容積中で制限酵素ＢａｍＨＩ(New England Biolabs)を用いて３７℃で一

晩線形化した。線形化したプラスミドを、プロテイナーゼＫ（１６．７ｍｇ／ｍｌ、Boehringer)２μｌで、３７℃で３０分間処理した。ＤＮＡをフェノール（０．１Ｍトリスで飽和したもの、ｐＨ８．０）で２回、およびクロロホルムで１回抽出した。グリコーゲン（２０ｍｇ／ｍｌ保存溶液１μｌ）を水相に加え、３Ｍ酢酸ナトリウムｐＨ５．５　０．１容およびエタノール２．５容を加えた後、線形化したＤＮＡを－８０℃で１時間沈澱した。ＤＮＡを遠心分離（１４，０００ｒｐｍ、４℃、微量遠心分離機中）によって回収し、７０％エタノールで洗浄し、ＲＮアーゼを含まない水に２５０ｎｇ／ｍｌの濃度で溶解した。

キャップ形成したｃＲＮＡ転写物を、２０μｌ転写緩衝液（５Ｘ）、４μｌＮＴＰ混合物（１０ｍＭ　ＡＴＰ、ＵＴＰおよびＣＴＰ、３ｍＭ　ＧＴＰ）、４μｌの０．７５Ｍ　ＤＴＴ、２．５μｌのＲＮＡｓｉｎ、０．５μｌＧＴＰ（１０ｍＭ）、４μｌＣＴＰカタログ（１０ｍＭ　ｍ７Ｇ（５′）ｐｐｐ（５′）Ｇ）、およびＴ７またはＴ３　ＲＮＡポリメラーゼをそれぞれ２．５μｌ含む１００μｌの反応容積中でＢａｍＨＩ(New England Biolabs)で線形化したＤＮＡ１μｇから生成した。イン・ビトロの転写反応に用いた総ての試薬は、ＣＡＰ類似体(Pharmacia)以外はPromega製であった。３７℃で１．５時間後に、４μｌのＲＱ１　ＤＮアーゼ(Promega)を加え、反応混合物を３７℃で更に１５分間インキュベーションした。反応混合物を、０．１Ｍトリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．０で飽和したフェノール／クロロホルム（１：１、ｖ／ｖ）で２回、およびクロロホルムで１回抽出した。グリコーゲン（上記と同様のもの１μｌ）を水相に加え、３Ｍ酢酸ナトリウムｐＨ５．５　０．１容およびエタノール２．５容を加えた後、ｃＲＮＡを－２０℃で一晩沈澱した。ｃＲＮＡを遠心分離（１４，０００ｒｐｍ、４℃、２０分間、微量遠心分離機中）によって回収し、ペレットを７０％エタノールで洗浄し、滅菌水に１μｇ／μｌの濃度で再懸濁した。ｃＲＮＡ濃度の近似値は、既知濃度のＲＮＡマーカーに対して２．２％（ｖ／ｖ）ホルムアルデヒドを含む１％アガロースゲル上で再懸濁した材料の一部を移動させることによって得た。試料は、使用前には－８０℃で保存した。

卵母細胞は、標準的な方法(Bertrand et al., 1991)によって成熟した雌のアフリカツメガエルから採取した。卵母細胞は、スピナーフラスコ中でCa^{2+}を含まないおよびMg^{2+}を含まない５０ｍｌのＯＲ２培地中０．２％（ｗ／ｖ）コラーゲナーゼ(Sigma)中で緩やかに拡販しながら室温で２時間インキュベーションすることによって脱濾胞形成した（ＯＲ２培地は８２．５ｍＭ　ＮａＣｌ、２．５ｍＭ　ＫＣｌ、１ｍＭ　Na_2HPO_4、１５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２ｍＭ　$CaCl_2$、１ｍＭ　$MgCl_2$、ｐＨ７．６である）。卵母細胞をＯＲ２で注意しながら濯いだ後、ＭＢＳ（改質Barth食塩水：８８ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＫＣｌ、０．３３ｍＭ　$Ca(NO_3)_2$、０．４１ｍＭ　$CaCl_2$、０．８２ｍＭ　$MgSO_4$、２．４ｍＭ　$NaHCO_3$、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．６）で濯ぎ、ステージＶ～VIの卵母細胞を選択する前に少なくとも１～２時間ＭＢＳ中で回収した。選択した卵母細胞を、ペニシリン／ストレプトマイシン（１００単位／ｍｌ）(Gibco-BRL)を補足したＭＢＳで１８℃で一晩インキュベーションした後、注射した。卵母細胞を、Drummondの較正６ｍｌ毛細管から作られた針を用い、Inject+Matic空気ポンプ(Gabay)を用いて微量注入した。ｃＲＮＡ（２５ｎｇ／５０ｎｌ）を細胞質に注入した。卵母細胞を、個々に９６穴の平底培養皿のウェルに移して、ＭＢＳ中で２４～７２時間インキュベーションした。

電気生理学的記録は、２個の微小電極（１～２ＭΩ、いずれも３Ｍ　ＫＣｌを満たしたもの）を用いて電位固定した条件下で室温にてＯＲ２培地で超融合した(superfused)卵母細胞に注入した後１～３日間行い、膜電位は、Gene Clamp 500装置(Axon)を用いて－１００ｍＶに常套的に固定されている。

試験ケモカインはPeptroTechから購入し、またはGlaxo Institute for Molecular Biologyで社内で製造し、ＰＢＳ中に１μＭの濃度で再懸濁した。それぞれのケモカイン５０μｌを直接電位固定した卵母細胞に適用し、誘導した電流をＩＢＭ－ＰＣに結合したTektronix 5113デュアルービーム保存オシロスコープで監視した。多重ケモカインを単一の卵母細胞で試験した場合には、それぞれの適用の間に２分間の回収時間を設定した。結果を、

第８Ａ図に示す。
第８Ｂ図は、異なるケモカイン（ＭＩＰ－１αとは異なる）を用いることを除き、第８Ａ図に示したものと同様な分析の結果を示す。
ＭＩＰ－１αについて得た結果とは対照的に、ＩＬ－８を用いたときには、有意な電気生理学的応答は見られなかったことが分かる。
(e) ＨＬ－６０細胞トランスフェクションおよびリガンド結合分析
３０μｇのヒトＣＣ－ＣＫＲ－３－ｐｃＤＮＡ１ｎｅｏ、ネズミＣＣ－ＣＫＲ－３－ｐｃＤＮＡ１ｎｅｏ、またはｐｃＤＮＡ１ｎｅｏを、Bio Rad Geno Pulster（２６０ボルト、９６０μＦ、０．４ｃｍギャップセル）を用いて、５００μｌ ＨＬ－６０細胞（２×１０^{7}個／０．１５Ｍ ＮａＣｌ １ｍｌ、２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．３）にエレクトロポレーションを行った。細胞を、２５ｍｌのＡＩＭ－Ｖ血清不含培地(Gibco)を含むＴ－１７５フラスコに播種した。トランスフェクションから２または３日目に、細胞を６００μｇ／ｍｌ Ｇ４１８を含むＡＩＭ－Ｖ培地で４５ｍｌの総容量まで希釈し、６日目に、細胞を６００μｇ／ｍｌ Ｇ４１８を含むＡＩＭ－Ｖ培地で１８０ｍｌまで更に希釈した。トランスフェクションの後７～１５日目に、細胞をＡＩＭ－Ｖ培地（＋Ｇ４１８）中で０．４～１．２×１０^{6}個／ｍｌの密度に保持し、この間に結合分析を行った。平衡競争結合を、Millipore（商品名）-DV96穴フィルタープレートで、５×１０^{5}個の細胞を１００μｌ結合緩衝液（１ｍＭ ＣａＣｌ$_{2}$、５ｍＭ ＭｇＣｌ$_{2}$、０．５％ＢＳＡ、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．２）、０．３４ｎＭ［^{125}Ｉ］放射性リガンド、および０．５～２０００ｎＭコールドリガンド中でインキュベーションすることによって行った。室温で１．５時間のインキュベーションの後、細胞を０．５Ｍ ＮａＣｌを含む結合緩衝液で真空濾過により４回洗浄した。５０μｌのOptiphaseシンチラント(Wallac)をそれぞれのウェルに加え、放射能をWallac Microbeta Plate Readerで測定した。総てのデーターは、総結合の百分率として規格化した。所定のリガンドに対する総結合は、競合リガンドの非存在下でヒトＣＣ－ＣＫＲ－３でトランスフェクションした５×１０^{5}個の細胞に結合した放射能として定義した（範囲：１０００～２５００ｃｐｍ）。
結果を第９図に示し、この図は［^{125}Ｉ］ＭＩＰ－１αおよび［^{125}Ｉ］ＲＡＮＴＥＳのヒトおよびネズミＣＣ－ＣＫＲ－３への高親和性結合を示している。ＨＬ－６０細胞を、ヒトＣＣ－ＣＫＲ－３（●）、ネズミＣＣ－ＣＫＲ－３（■）、または空ベクター（○）でトランスフェクションし、Ｇ４１８を含むＡＩＭ－Ｖ培地に７～１５日間保持した。平衡競争分析を、上記と同様にして、［^{125}Ｉ］ＭＩＰ－１α(A)および［^{125}Ｉ］ＲＡＮＴＥＳ(B)を用いて行った。それぞれの点は、３回(A)または４回(B)の異なる実験からの重複点(duplicate points)の平均値±Ｓ．Ｄ．である。データーに、方程式Ｂ／B_{max}^{app}＝１／（１＋（［Ｌ［／IC_{50}））（式中、Ｂ＝結合したｃｐｍ、B_{max}^{app}＝競合リガンドの非存在下で結合したｃｐｍ、Ｌ＝競合リガンド、およびIC_{50}＝［放射性リガンド］＋K_{d} (Cheng., Y. and Prusoff, W.H., Biochem. Pharmacol., 22: 3099-3108(1973)) を用いてGraFit 3.01ソフトウェア(Leatherbarrow., R.J., GraFit Versions 3.01, Erithicus Software Ltd., ステインス, 英国（１９９２年））により曲線に当てはめた。

【図１】
クローンTM(2-7)5.5のcDNA配列および推定アミノ酸配列

```
1   GGTATCTGGCGATAGTGCACGCGGTGTTTTCCTTGAGGGCAAGGACCTTGACTTATGGGG   60
      Y  L  A  I  V  H  A  V  F  S  L  R  A  R  T  L  T  Y  G  V

61  TCATCACCAGTTTGGCTACATGGTCAGTGGCTGTGTTCGCCTCCCTTCCTGGCTTTCTGT  120
      I  T  S  L  A  T  W  S  V  A  V  F  A  S  L  P  G  F  L  F

121 TCAGCACTTGTTATACTGAGCGCAACCATACCTACTGCAAAACCAAGTACTCTCTCAACT  180
      S  T  C  Y  T  E  R  N  H  T  Y  C  K  T  K  Y  S  L  N  S

181 CCACGACGTGGAAGGTTCTCAGCTCCCTGGAAANCAACATTCTCGGATTGGTGATCCCCT  240
      T  T  W  K  V  L  S  S  L  E  X  N  I  L  G  L  V  I  P  L

241 TAGGGATCATGCTGTTTTGCTACTCCATGATCATCAGGACCTTGCAGCATTGTAAAAATG  300
      G  I  M  L  F  C  Y  S  M  I  I  R  T  L  Q  H  C  K  N  E

301 AGAAGAAGAACAAGGCGGTGAAGATGATCTTTGCCGTGGTGGTCCTCTTCCTTGGGTTCT  360
      K  K  N  K  A  V  K  M  I  F  A  V  V  V  L  F  L  G  F  W

361 GGACACCTTACAACATAGTGCTCTTCCTAGAGACCCTGGTGGAGCTAGAAGTCCTTCAGG  420
      T  P  Y  N  I  V  L  F  L  E  T  L  V  E  L  E  V  L  Q  D

421 ACTGCACCTTTGAAAGATACTTGGACTATGCCAGCCAGGCCACAGAAACTCTGGCTTTTG  480
      C  T  F  E  R  Y  L  D  Y  A  S  Q  A  T  E  T  L  A  F  V

481 TTCACTGCTGCCTCAATCCCCTCCTCTACGCCGT  514
      H  C  C  L  N  P  L  L  Y  A
```

【図２】
オリゴヌクレオチドプライマー

K5-5AS	5' AGA GTA CTT GGT TTT GCA GTA G	(アンチセンス)
K5-5AS2	5' GCA GCA GTG AAC AAA AGC CAG	(アンチセンス)
K5-5A	5' CAT AGT GCT CTT CCT AGA GAC	(センス)
K5-5B	5' GGT TGA GCA GGT ACA CAT CAG	(アンチセンス)
K5-5C	5' CAA TAC TGT GGG CTC CTC C	(センス)
K5-5D	5' GCT CAG GTC CAT GAC TG	(センス)
K5-5E	5' CTC ATG AGC ATT GAT AG	(センス)
K5-5F	5' CTG AGC GCA ACC ATA CC	(センス)
K5-5G	5' GCT AGA AGT CCT TCA GG	(センス)
K5-5H	5' GGA TCA TGA TCT TCA TG	(センス)
K5-5FLA	5' AAA TGA AAC CCC ACG GAT ATA GCAG	(センス)
K5-5FLB	5' TCC TAC AGA GCA TCA TGA AGA TC	(アンチセンス)

【図３】
K5.5のcDNA配列および推定アミノ酸配列

```
1   CGGGGGTTTTGATCTTCTTCCCCTTCTTTTCTTCCCCTTCTTCTTTCCTTCCTCCCTCCC   60

61  TCTCTCATTTCCCTTCTCCTTCTCCCTCAGTCTCCACATTCAACATTGACAAGTCCATTC  120

121 AGAAAAGCAAGCTGCTTCTGGTTGGGCCCAGACCTGCCTTGAGGAGCCTGTAGAGTTAAA  180

181 AAATGAACCCCACGGATATAGCAGATACCACCCTCGATGAAAGCATATACAGCAATTACT  240
      M  N  P  T  D  I  A  D  T  T  L  D  E  S  I  Y  S  N  Y  Y

241 ATCTGTATGAAAGTATCCCCAAGCCTTGCACCAAAGAAGGCATCAAGGCATTTGGGGAGC  300
      L  Y  E  S  I  P  K  P  C  T  K  E  G  I  K  A  F  G  E  L

301 TCTTCCTGCCCCCACTGTATTCCTTGGTTTTGTATTTGGTCTGCTTGGAAATTCTGTGG  360
      F  L  P  P  L  Y  S  L  V  F  V  F  G  L  L  G  N  S  V  V

361 TGGTTCTGGTCCTGTTCAAATACAAGCGGCTCAGGTCCATGACTGATGTGTACCTGCTCA  420
      V  L  V  L  F  K  Y  K  R  L  R  S  M  T  D  V  Y  L  L  N

421 ACCTTGCCATCTCGGATCTGCTCTTCGTGTTTTCCCTCCCTTTTGGGGCTACTATGCAG  480
      L  A  I  S  D  L  L  F  V  F  S  L  P  F  W  G  Y  Y  A  A

481 CAGACCAGTGGGTTTTTGGGCTAGGTCTGTGCAAGATGATTTCCTGGATGTACTTGGTGG  540
      D  Q  W  V  F  G  L  G  L  C  K  M  I  S  W  M  Y  L  V  G

541 GCTTTTACAGTGGCATATTCTTTGTCATGCTCATGAGCATTGATAGATACCTGGCGATAG  600
      F  Y  S  G  I  F  F  V  M  L  M  S  I  D  R  Y  L  A  I  V

601 TGCACGCGGGTGTTTTCCTTGAGGGCAAGGACCTTGACTTATGGGGTCATCACCAGTTTGG  660
      H  A  V  F  S  L  R  A  R  T  L  T  Y  G  V  I  T  S  L  A

661 CTACATGGTCAGTGGCTGTGTTCGCCTCCCTTCCTGGCTTTCTGTTCAGCACTTGTTATA  720
      T  W  S  V  A  V  F  A  S  L  P  G  F  L  F  S  T  C  Y  T

721 CTGAGCGCAACCATACCTACTGCAAAACCAAGTACTCTCTCAACTCCACGACGTGGAAGG  780
      E  R  N  H  T  Y  C  K  T  K  Y  S  L  N  S  T  T  W  K  V

781 TTCTCAGCTCCCTGGAAATCAACATTCTCGGATTGGTGATCCCCTTAGGGATCATGCTGT  840
      L  S  S  L  E  I  N  I  L  G  L  V  I  P  L  G  I  M  L  F

841 TTTGCTACTCCATGATCATCAGGACCTTGCAGCATTGTAAAAATGAGAAGAAGAACAAGG  900
      C  Y  S  M  I  I  R  T  L  Q  H  C  K  N  E  K  K  N  K  A

901 CGGTGAAGATGATCTTTGCCGTGGTGGTCCTCTTCCTTGGGTTCTGGACACCTTACAACA  960
      V  K  M  I  F  A  V  V  V  L  F  L  G  F  W  T  P  Y  N  I

961 TAGTGCTCTTCCTAGAGACCCTGGTGGAGCTAGAAGTCCTTCAGGACTGCACCTTTGAAA 1020
      V  L  F  L  E  T  L  V  E  L  E  V  L  Q  D  C  T  F  E  R

1021 GATACTTGGACTATGCCATCCAGGCCACAGAAACTCTGGCTTTTGTTCACTGCTGCCTTA 1080
      Y  L  D  Y  A  I  Q  A  T  E  T  L  A  F  V  H  C  C  L  N

1081 ATCCCATCATCTACTTTTTTCTGGGGGAGAAATTTCGCAAGTACATCCTACAGCTCTTCA 1140
      P  I  I  Y  F  F  L  G  E  K  F  R  K  Y  I  L  Q  L  F  K

1141 AAACCTGCAGGGGCCTTTTTGTGCTCTGCCAATACTGTGGGCTCCTCCAAATTTACTCTG 1200
      T  C  R  G  L  F  V  L  C  Q  Y  C  G  L  L  Q  I  Y  S  A

1201 CTGACACCCCCAGCTCATCTTACACGCAGTCCACCATGGATCATGATCTCCATGATGCTC 1260
      D  T  P  S  S  S  Y  T  Q  S  T  M  D  H  D  L  H  D  A  L

1261 TGTAGAAAAATGAAATGGTGAAATGCAGAGTCAATGAACTTTTCCACATTCAGAGCTTAC 1320
      *

1321 TTTAAAATTGGTATTTTTAGGTAAGAGATCCCTGAGCCAGTGGTCAGGAGGAAAGGCTTA 1380

1381 CACCCACAGGTGGGAAAGACAGGTTCTCATCCCTGCAGGNAGGTTTTTCTTCTCCCCACT 1440

1441 TAGANAAAGTNCCAGGCCTGGAAGGGGTCCAACCCNGGGTTGAGGATCCTTCCCCCAAAC 1500

1501 CCAGGGTTTGGCCTGGAGGATTAATNCAAAANNTTTNTTGAAACTCTTGAAANANGTTGNG 1560

1561 NTAAGTTTNGGGGGGTNTTTTGAAGGNAAGTTTTTCCCTTCTTNCC 1607
```

【図４】
末梢組織でのＫ５．５発現のノザンブロット分析

組　織	Ｋ５．５
心　臓	－
脳	－
胎　盤	－
肺	－
肝　臓	－
骨格筋	－
腎　臓	－
膵　臓	－
脾　臓	＋＋
胸　腺	＋＋＋
前立腺	－
精　巣	＋／－
卵　巣	－
小　腸	＋／－
結　腸	－
末梢血白血球	＋＋＋

【図５】
Ｋ５．５レセプターｍＲＮＡ末梢血Ｔ細胞母集団およびＴ細胞系の発現

Ｔ細胞／Ｔ細胞系	Ｋ５．５
Ｔ細胞 ＋ ＩＬ－２（４時間）	＋＋
Ｔ細胞 ＋ ＩＬ－２（12時間）	＋＋
Ｔ細胞 ＋ ＩＬ－２（24時間）	＋＋
Ｔ細胞 ＋ ＩＬ－２（48時間）	＋＋
Ｔ細胞 ＋ ＩＬ－２（72時間）	＋＋
Ｔ細胞 ＋ ＩＬ－２（７日間）	＋＋
Ｔ細胞 ＋ ＰＭＡ （２日間）	＋＋
Ｊｕｒｋａｔ	＋
ＭＯＬＴ－４	＋／－
Ｔ細胞（未刺激）	＋
ＣＤ８ ＋ Ｔ細胞クローン	＋
Ｔ８クローン	＋＋＋
Ｔ８ ＋ ＧＨ	＋＋＋
Ｔ８ ＋ ＧＲ	－
Ｔ８ ＋ Ｇ／α	＋
Ｔ４クローン	＋＋＋
ＴＴ２０（ＩＬ２刺激）	＋＋
ＣＤ４５ＲＯ	－
ＣＤ４５ＲＯ（刺激）	－
ＣＤ４５ＲＡ	－
ＣＤ４５ＲＡ（刺激）	－
ＨＵＴ７８	－
ＨＵＴ７８（刺激）	－

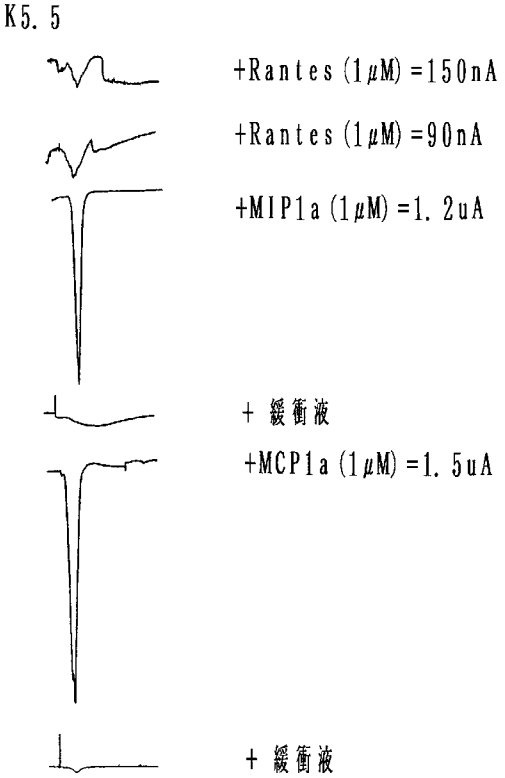
【図６】
非Ｔ白血球および細胞系におけるＫ５．５レセプターの発現

非Ｔ細胞白血球／細胞系	Ｋ５．５
末梢血Ｂ細胞	＋
Ｂ細胞（活性化）	
Ｒａｊｉ	－
ＧＣＣ（扁挑）	－
ＧＣＣ（Ａｎｔｉ ＣＤ４０ ＭＡｂ）	－
ＢＬ２系	－
ＲＰＭＩ８６６６	－
ＫＵ８１２	＋＋
ＥＯＬ－３系	＋／－
マクロファージ（肺胞）	－
混合肺白血球	＋／－
巣球	－
ＨＭＣ－１系	－

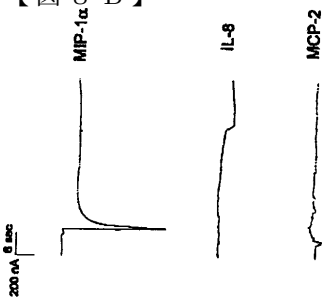
【図７】
ヒト細胞系および末梢血白血球母集団におけるＲＴ－ＰＣＲによる
Ｋ５．５レセプターｍＲＮＡ発現の分析



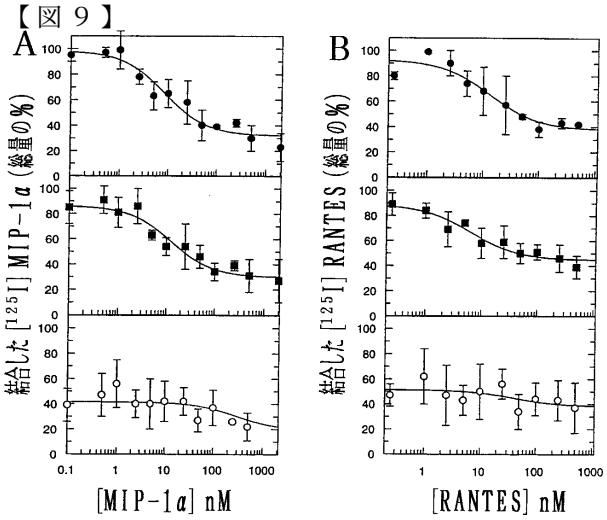
【図８Ａ】
電圧固定したアフリカツメガエルの卵母細胞を各種ケモカインリガンド（1μM）で2秒間隔で刺激した際に誘導される電流（試験したそれぞれの卵母細胞の結果を示す）



【図８Ｂ】



【図９】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K 45/00		***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00	
A61K 48/00		***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00	
A61P 37/00		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/00	
A61P 37/08		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/08	
A61P 9/10		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	9/10	１０１
A61P 7/00		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	7/00	
A61P 31/12		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/12	
A61P 27/02		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	27/02	
A61P 27/16		***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	27/16	
G01N 33/566		***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/566	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｑ
C12R	*1/91*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ｂ
			Ｃ１２Ｒ	1:91	

(72)発明者　ウェルス，チモシー　ナイジェル　カール
スイス国プラン－レーズアート、シュマン、ド、オール、１４、グラクソ、インスティテュート、フォー、モレキュラー、バイオロジー、ソシエテ、アノニム内
(72)発明者　パワー，クリスチーヌ　アンナ
スイス国プラン－レーズアート、シュマン、ド、オール、１４、グラクソ、インスティテュート、フォー、モレキュラー、バイオロジー、ソシエテ、アノニム内

審査官　田村　明照

(56)参考文献　国際公開第９４／０１１５０４（WO，Ａ１）
特開２００３－０３８１９１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00
C12P 21/08
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
SwissProt/PIR/GeneSeq