

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-173531

(P2004-173531A)

(43) 公開日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 3/10	4 C O 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-341195 (P2002-341195)	(71) 出願人	000006792
(22) 出願日	平成14年11月25日 (2002.11.25)		理化学研究所
			埼玉県和光市広沢2番1号
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100120905
			弁理士 深見 伸子
		(72) 発明者	渋谷 彰
			茨城県つくば市松代2-11-10-1
		Fターム(参考)	2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50
			DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫受容体タンパク質

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】免疫応答を正又は負に調節する新規な免疫受容体タンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子の提供。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質；特定のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質；前記タンパク質をコードする遺伝子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) に示す免疫受容体タンパク質。

(a) 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質

【請求項 2】

以下の (c) 又は (d) に示す免疫受容体タンパク質。

(c) 配列表の配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

10

(d) 配列表の配列番号 4 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 4】

以下の (a) 又は (b) に示す DNA からなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなる DNA

(b) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質をコードする DNA

20

【請求項 5】

以下の (c) 又は (d) に示す DNA からなる遺伝子。

(c) 配列表の配列番号 3 に示す塩基配列からなる DNA

(d) 配列表の配列番号 3 に示す塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする DNA

【請求項 6】

請求項 4 又は 5 に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 7】

30

請求項 4 又は 5 に記載の遺伝子により形質転換された形質転換体。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から免疫受容体タンパク質を採取することを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質の製造方法。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質のいずれか一方、又はその両方を認識する抗体。

【請求項 10】

ITIMモチーフを有する抑制性免疫受容体の細胞外保存領域をコードする遺伝子をプローブとして用いて対となる活性化免疫受容体遺伝子を単離する方法。

40

【請求項 11】

ITAMモチーフを有する活性化免疫受容体の細胞外保存領域をコードする遺伝子をプローブとして用いて対となる抑制性免疫受容体遺伝子を単離する方法。

【請求項 12】

請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質、又は該タンパク質を発現する細胞若しくは細胞膜をリガンドが含まれることが予想される被験物質に作用させ、該免疫受容体タンパク質に対して親和性のある物質を選択することを特徴とする、該免疫受容体タンパク質に対するリガンドのスクリーニング方法。

【請求項 13】

50

請求項 1 2 に記載の方法により得られる請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質に対するリガンド。

【請求項 1 4】

(a) 請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質を該免疫受容体タンパク質に対するリガンドに被験物質の非存在下において作用させた場合と、(b) 請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質を該免疫受容体タンパク質に対するリガンドに被験物質の存在下において作用させた場合とを比較し、該免疫受容体タンパク質と該リガンドの結合に対して影響を与える物質を選択することを特徴とする、該免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト又はアゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質を含むことを特徴とする、該免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト又はアゴニストのスクリーニング用キット。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 に記載の方法、又は請求項 1 5 に記載のキットを用いて得られる、請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト又はアゴニスト。

【請求項 1 7】

請求項 1 若しくは 2 に記載の免疫受容体タンパク質、又は該タンパク質をコードする遺伝子を有効成分として含む免疫機能制御用医薬。

【請求項 1 8】

請求項 1 若しくは 2 に記載の免疫受容体タンパク質に対するリガンド、又は請求項 1 若しくは 2 に記載の免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト若しくはアゴニストを有効成分として含む免疫機能制御用医薬。

【請求項 1 9】

請求項 9 に記載の抗体を含む請求項 1 又は 2 に記載の免疫受容体タンパク質の検出用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な免疫受容体タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、及び該タンパク質の製造方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

免疫反応は活性化及び抑制性の細胞膜受容体からの正と負のシグナルのバランスにより制御を受けている。リンパ球や骨髄球系細胞などの免疫細胞の活性化は、活性化レセプターである細胞膜受容体がそのリガンドを認識し結合することによって、細胞膜受容体自身やその受容体に会合するアダプター分子の細胞内領域に存在する免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM) と呼ばれる Y-x-x-L-x (6-8) -Y-x-x-L (x は任意のアミノ酸) から成る特徴的な配列のチロシンがリン酸化されることにより開始される (非特許文献 1、非特許文献 2 参照)。一方、この活性化した免疫細胞は、抑制性レセプターである細胞膜受容体分子がリガンドと結合することによって細胞内領域に存在する免疫受容体チロシンベース抑制性モチーフ (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif: ITIM) と呼ばれる (I/V/L/S)-x-Y-x-x-(L/V) (x は任意のアミノ酸を示す) から成る特徴的な配列のチロシンが脱リン酸酵素を介して抑制的に制御されることがわかってきた (非特許文献 1、非特許文献 3 参照)。

【0003】

活性化受容体及び抑制性受容体は、▲1▼いずれも細胞外領域が高度に保存されていること、▲2▼活性化受容体はその細胞内領域に活性化モチーフ ITAM があるか、あるいは

10

20

30

40

50

膜貫通領域にFcεRIγ又はDAP12のようなITAMをもつアダプター分子と会合するための荷電アミノ酸を持っていること、▲4▼抑制性受容体は細胞内領域に抑制性モチーフITIMを有していること、▲5▼活性化受容体は抑制性受容体に比べて細胞内領域が短いこと、が特徴として挙げられる。また、活性化受容体の多くは、抑制性受容体と対（ペア）をなしており、その両方の遺伝子が染色体上の小さなクラスターに位置していることも明らかにされている（非特許文献4参照）。活性化受容体と抑制性受容体の両方を含む遺伝子ファミリー群としては、例えば、MHCクラスIリガンドを認識するNK抑制性受容体ファミリーであるKIR、CD94/NKG2、及びLy49が知られている（非特許文献5参照）。またT細胞上に発現するCD28及びCTLA4は同じリガンド（例えば、CD80及びCD86）に結合し、それぞれ相反する正及び負のシグナルを送達する（非特許文献6参照）。同様に、B細胞及び／又は骨髄球系細胞は、ヒト及びマウスFcγ受容体（非特許文献7、非特許文献8参照）、マウスペア免疫グロブリン（Ig）様受容体（PIR）（非特許文献9、非特許文献10参照）とそのヒトホモログIg様転写物（ILT；CD85）（非特許文献11、非特許文献12、非特許文献13参照）、及びシグナル制御タンパク質（SIRP）（非特許文献14、非特許文献15、非特許文献16参照）などのペア受容体ファミリーを発現する。

10

20

30

40

50

【0004】

これらのファミリー分子群は細胞外領域構造が極めて保存されているため、しばしば共通の、あるいは類似のリガンドを認識するが、その結果としての免疫細胞の反応は正（活性化）と負（抑制性）のまったく相反したものとなる。このようにまったく相反する免疫応答を誘導する現象の免疫学的意義は極めて興味深く、正と負のシグナルが生体内でどのように総合化され統御されているのかを解明することは免疫系の理解にとって非常に重要であると考えられる。

【0005】

【非特許文献1】

Lanier, L. L., Curr Opin Immunol, 13, 326-331, 2001

【非特許文献2】

Bolland, S., Ravetch, J. V., et al., Adv. Immunol., 72, 149-177, 1998

【非特許文献3】

Ravetch, J. V., Lanier, L. L., Science, 290, 84-89, 2000

【非特許文献4】

Martin, A. M., et al., Trends Immunol, 23, 81-8, 2002)

【非特許文献5】

Lanier, L. L., Annu Rev Immunol, 16, 359-93, 1998

【非特許文献6】

Chambers, C. A. & J. P. Allison, Curr Opin Cell Biol, 11, 203-210, 1999

【非特許文献7】

Ravetch, J. V. & R. A. Clynes, Annu Rev Immunol, 16, 421-32, 1998

【非特許文献8】

Daeron, M., Annu Rev Immunol, 15, 203-34, 1997

【非特許文献9】

Kubagawa, H., et al., Proc Natl Acad Sci

, USA, 94, 5261-5266, 1997

【非特許文献10】

Hayami, K., et al., J Biol Chem, 272, 7320-7327, 1997

【非特許文献11】

Samaridis, J. & M. Colonna, Eur J Immunol, 27, 660-665, 1997

【非特許文献12】

Borges, L., et al., J Immunol, 159, 5192-5196, 1997

【非特許文献13】

Wegtmann, N., et al., Curr Biol, 7, 615-618, 1997

【非特許文献14】

Kharitonov, A., et al., Nature, 386, 181-186, 1997

【非特許文献15】

Fujio, Y., et al., Mol Cell Biol, 16, 6887-6899, 1996

【非特許文献16】

Ohnishi, H., et al., J Biol Chem, 271, 25569-25574, 1996

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、骨髄球系細胞などの増殖、活性化、分化を含む免疫応答に關与する新規なペアの活性化及び抑制性免疫受容体遺伝子を取得し、該受容体の分子的及び機能的特性を解明することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、マウスのマクロファージから、細胞内領域にITIMを持ち、抑制性シグナルを伝達する抑制性免疫受容体タンパク質(MAIR-I)、該抑制性免疫受容体タンパク質の細胞外領域にある免疫グロブリンドメインに高い相同性を有し、活性化シグナルを伝達する活性化免疫受容体タンパク質(MAIR-II)を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 以下の(a)又は(b)に示す免疫受容体タンパク質。

(a) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質

(2) 以下の(c)又は(d)に示す免疫受容体タンパク質。

(c) 配列表の配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(d) 配列表の配列番号4に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質

(3) 上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質をコードする遺伝子。

(4) 以下の(a)又は(b)に示すDNAからなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNA

(b) 配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNAの相補配列とストリンジェン

10

20

30

40

50

トな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質をコードするDNA

(5) 以下の(c)又は(d)に示すDNAからなる遺伝子。

(c) 配列表の配列番号3に示す塩基配列からなるDNA

(d) 配列表の配列番号3に示す塩基配列からなるDNAの相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質をコードするDNA

(6) 上記(4)又は(5)の遺伝子を含有する組換えベクター。

(7) 上記(4)又は(5)の遺伝子で形質転換させた形質転換体。

(8) 上記(7)の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から免疫受容体タンパク質を採取することを特徴とする、上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質の製造方法。 10

(9) 上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質のいずれか一方、又はその両方を認識する抗体。

(10) 上記(9)の抗体を用いる上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質の定量方法。

(11) 上記(9)の抗体を含む上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質の定量用キット。

(12) ITIMモチーフを有する抑制性免疫受容体の細胞外保存領域をコードする遺伝子をプローブとして用いて対となる活性化免疫受容体遺伝子を単離する方法。 20

(13) ITAMモチーフを有する活性化免疫受容体の細胞外保存領域をコードする遺伝子をプローブとして用いて対となる抑制性免疫受容体遺伝子を単離する方法。

(14) 上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質、又は該タンパク質を発現する細胞若しくは細胞膜をリガンドが含まれることが予想される被験物質に作用させ、該タンパク質に対して親和性のある物質を選択することを含む、上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質に対するリガンドのスクリーニング方法。

(15) 上記(14)の方法により得られる上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質に対するリガンド。

(16) (a) 上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質を該免疫受容体タンパク質に対するリガンドに被験物質の非存在下において作用させた場合と、(b) 上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質を該免疫受容体タンパク質に対するリガンドに被験物質の存在下において作用させた場合とを比較し、該免疫受容体タンパク質と該リガンドの結合に対して影響を与える物質を選択することを特徴とする、該免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト又はアゴニストのスクリーニング方法。 30

(17) 上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質を含むことを特徴とする、該免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト又はアゴニストのスクリーニング用キット。

(18) 上記(16)の方法、又は上記(17)のキットを用いて得られる、上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト又はアゴニスト。

(19) 上記(1)若しくは(2)の免疫受容体タンパク質、又は該タンパク質をコードする遺伝子を有効成分として含む免疫機能制御用医薬。 40

(20) 上記(1)若しくは(2)の免疫受容体タンパク質に対するリガンド、又は上記(1)若しくは(2)の免疫受容体タンパク質に対するアンタゴニスト若しくはアゴニストを有効成分として含む免疫機能制御用医薬。

(21) 上記(9)の抗体を含む上記(1)又は(2)の免疫受容体タンパク質の検出用試薬。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の免疫受容体タンパク質は、その細胞外領域が互いに高度に保存された骨髓球系一関連免疫グロブリン様受容体(myeloid-associated immunoglobulin-like receptor) 50

lobulin-like receptors) MAIR-I 及び MAIR-II と称する新規なペアの活性化及び抑制性受容体タンパクである。MAIR-I は、マクロファージ、顆粒球、マスト細胞、及び樹状細胞を含む大多数の骨髄球系細胞上に発現し、細胞質内領域にチロシンベースの局在モチーフとチロシンベースの免疫受容体抑制性モチーフを含み、受容体のインターナリゼーションを誘発し、マスト細胞からの IgE-媒介脱顆粒を抑制する。他方、MAIR-II は、マクロファージ及び B 細胞のサブセットに発現し、チロシンベースの免疫受容体活性化モチーフを有するアダプター分子 DAP12 と会合し、マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌を亢進する。従って、MAIR-I 及び MAIR-II は、自然免疫応答を正又は負にそれぞれ調節し、細胞シグナリングと免疫応答に重要な制御的役割を果たす。

10

【0010】

1. 本発明の免疫受容体タンパク質をコードする遺伝子の単離

本発明の免疫受容体タンパク質（以下、MAIR ともいう）をコードする遺伝子のクローニングは、例えば骨髄球と B 細胞の分化に必須の転写因子である PU. 1 を欠失した PU. 1-1 マウスと野生株マウスとの間で胎生 14 日齢肝臓を材料として RDA (Representational Difference Analysis) 法に基づく PCR Subtraction により行うことができる。RDA 法とは、制限酵素消化したゲノム DNA にアダプターを付加し、PCR によってゲノム DNA の断片を増幅 (representation) したものの同士を subtraction 法 (引き算法) により比較することによって変異欠失 DNA を検出するものがある。

20

【0011】

MAIR をコードする遺伝子また、下記の免疫系細胞や組織に由来する cDNA ライブラリーを、上記 RDA 法で調製した DNA 断片をもとにして合成した DNA プローブを用いてスクリーニングすることにより単離することができる。cDNA ライブラリーを作製するための mRNA 供給源としては、MAIR の mRNA が発現している細胞であれば特に限定されず、ヒトやその他の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）のあらゆる免疫系細胞 [例えば、マクロファージ、マスト細胞、顆粒球（好中球、好塩基球、好酸球）、単球、樹状細胞、B 細胞、NK 細胞等]、又はそれらの細胞が存在するあらゆる組織（例えば、脾臓、リンパ節、骨髄、肝臓等）が挙げられる。

30

【0012】

mRNA の調製は、当該技術分野において通常用いられる手法により行うことができる。例えば、上記細胞又は組織を、グアジニン試薬、フェノール試薬等で処理して全 RNA を得た後、オリゴ (dT) セルロースカラムやセファロース 2B を担体とするポリ U-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法により、あるいはバッチ法によりポリ (A) + RNA (mRNA) を得る。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ (A+) RNA をさらに分画してもよい。

【0013】

次いで、得られた mRNA を鋳型として、オリゴ dT プライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖 cDNA を合成した後、該一本鎖 cDNA から DNA 合成酵素 I、DNA リガーゼ及び RNase H 等を用いて二本鎖 cDNA を合成する。合成した二本鎖 cDNA を T4 DNA 合成酵素によって平滑化後、アダプター（例えば、EcoRI アダプター）の連結、リン酸化等を経て、λgt11 等のベクターに組み込んで in vivo パッケージングすることによって cDNA ライブラリーを作製することができる。また、λファージ以外にもプラスミドを用いて cDNA ライブラリーを作製することもできる。

40

【0014】

上記のようにして得られる形質転換体から目的の DNA を有する株を選択するスクリーニング方法としては、例えば、マウス肝から精製した後記 MAIR-Ia のアミノ酸配列に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを合成し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う方法が挙げられる。

50

【0015】

ここで用いられる鋳型DNAとしては、前記mRNAから逆転写反応により合成されたcDNAが挙げられる。また、プライマーは、増幅したときのDNA断片の予想サイズ、あるいは縮重コドンの組み合わせなどを適宜検討しながら、上記のアミノ酸配列情報に基づいて設計することができる。

【0016】

このようにして得られたDNA増幅断片を、32P、35S又はビオチン等で標識してプローブとし、これを形質転換体のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索することによりスクリーニングすることができる。

10

【0017】

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサムーギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えばPERKIN-ELMER社製373A DNAシーケンサー、TAKARA社製BcaBESTジデオキシシーケンシングキット等）を用いて配列決定が行われる。得られた塩基配列を、DNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング社）等のDNA解析ソフトによって解析し、得られたDNA鎖中にコードされているタンパク質コード部分を見出す。

【0018】

上記の方法で取得される本発明の受容体タンパク質コードする遺伝子としては、例えば、配列番号1の塩基配列で表されるマウス由来の免疫抑制性受容体タンパク質MAIR-Iaをコードする遺伝子、そのアイソタイプである配列番号5の塩基配列で表されるマウス由来の免疫抑制性受容体タンパク質MAIR-Ibをコードする遺伝子、配列番号3の塩基配列で表されるマウス由来の免疫活性化受容体タンパク質MAIR-IIaをコードする遺伝子、そのアイソタイプである配列番号7の塩基配列で表されるマウス由来の免疫活性化受容体タンパク質MAIR-IIbをコードする遺伝子が挙げられる。

20

【0019】

本発明の免疫受容体タンパク質は、（a）配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、又は（b）配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質；又は（c）配列表の配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、又は（d）配列表の配列番号4に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質である。

30

【0020】

上記の「配列番号2（又は配列番号4）に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0021】

上記アミノ酸の欠失、付加及び置換は、上記免疫受容体タンパク質をコードする遺伝子を変異を導入するには、Kunkel法又はGapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K（TAKARA社製）やMutant-G（TAKARA社製））などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

40

【0022】

上記の「細胞の免疫応答を抑制させる機能を有する」とは、細胞の免疫応答の抑制性活性（例えば、脱顆粒の抑制、サイトカイン産生減少、細胞障害活性抑制、抗原提示機能抑制

50

、貧喰能抑制等)が、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質が有する活性と実質的に同等であることをいう。

また、上記の「細胞の免疫応答を活性化させる機能を有する」とは、細胞の免疫応答の活性化活性(例えば、脱顆粒の促進、サイトカイン産生亢進、細胞障害活性亢進、抗原提示機能亢進、貧喰能亢進等)が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質が有する活性と実質的に同等であることをいう。

【0023】

より詳細には、当該活性が同等(例えば、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)である限り、分子量等の量的要素は元のタンパク質と異なってもよい。

10

【0024】

上記いずれかの免疫受容体タンパク質中の部分アミノ酸配列を含むペプチド(部分ペプチドともいう)も本発明の範囲に含まれる。特に、本発明の部分ペプチドの中でも、免疫受容体タンパク質が天然に存在する場合に細胞膜の外に露出し、且つリガンド結合活性を保有する部分は、免疫受容体タンパク質のリガンドを決定において特に有用である。そのような部分ペプチドとしては、配列番号2又は配列番号4で表わされるアミノ酸配列の疎水性プロット解析において、細胞外領域(親水性部位)と分析される部分が挙げられる。本発明の部分ペプチドを構成するアミノ酸数は、少なくとも10個以上、好ましくは30個以上、より好ましくは80個以上である。

【0025】

本発明の免疫受容体タンパク質又はその部分ペプチドは、必要に応じて塩の形態、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩の形態で提供され得る。そのような塩としては、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)の塩、有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)の塩等が挙げられる。

20

【0026】

本発明の免疫受容体タンパク質は、該タンパク質を発現しているヒトや哺乳動物の培養細胞又は組織からの抽出・分離によって、あるいは後述のように該タンパク質をコードするDNAを含む形質転換体を培養することによっても製造することができる。ヒトや哺乳動物の組織又は細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織又は細胞をホモジナイズ後、酸等で抽出を行い、得られた抽出液を疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィーを組み合わせるにより単離精製することができる。

30

【0027】

また、前記部分ペプチドは、公知のペプチド合成法又は前記免疫受容体タンパク質を適当なペプチダーゼ(例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ)で切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

【0028】

本発明の免疫受容体タンパク質をコードする遺伝子は、上記の本発明の免疫受容体タンパク質をコードする遺伝子であればいかなるものでもよく、具体的には、(a)配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNA、(b)配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞の免疫応答を抑制させる機能を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子;又は(c)配列表の配列番号3に示す塩基配列からなるDNA、(d)配列表の配列番号3に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞の免疫応答を活性化させる機能を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。

40

【0029】

上記の「配列番号1(又は配列番号3)に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配

50

列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNA」としては、配列番号1（又は配列番号3）で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNA等が挙げられる。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が600～900mMであり、温度が60～68℃、好ましくは65℃での条件をいう。

【0030】

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子のcDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

10

【0031】

2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpRSET、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEp13、YEp24、YCp50等）などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ（Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等）が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

20

【0032】

ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0033】

本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明の遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）などを含有するものを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

30

【0034】

このようなベクターとしては、宿主細胞が大腸菌である場合は、例えばpETベクター（Novagen社製）、pTrxFUSベクター（Invitrogen社製）、pCYBベクター（NEWENGLAMD Bio Labs社製）等が、宿主細胞が酵母である場合は、例えばpESP-1発現ベクター（STRATAGENE社製）、pAUR123ベクター（宝酒造社製）、pPICベクター（Invitrogen社製）等が、また宿主細胞が動物細胞である場合は、例えばpMAM-neo発現ベクター（CLONTECH社製）、pCDNA3.1ベクター（Invitrogen社製）、pBK-CMVベクター（STRATAGENE社製）等が、宿主細胞が昆虫細胞である場合は、例えばpBacPAKベクター（CLONTECH社製）、pAcUW31ベクター（CLONTECH社製）、pAcP(+)IE1ベクター（Novagen社製）等がそれぞれ挙げられる。

40

【0035】

(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主

50

中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ (*Rhizobium meliloti*) 等のリゾビウム属に属する細菌；サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等の酵母；サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウスL細胞、ヒトGH3、ヒトFL細胞等の動物細胞；あるいはSf9、Sf21等の昆虫細胞が挙げられる。

10

【0036】

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0037】

大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Cohen, S. N. et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69, 2110-2114)、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

20

【0038】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法 (Becker, D. M. et al. (1990) Methods. Enzymol., 194, 182-187)、スフェロプラスト法 (Hinnen, A. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75, 1929-1933)、酢酸リチウム法 (Itoh, H. (1983) J. Bacteriol. 153, 163-168) 等が挙げられる。

30

40

【0039】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

50

【0040】

昆虫細胞を宿主とする場合は、S f 9細胞、S f 2 1細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

また、上記の各宿主細胞への遺伝子導入は、組換えベクターによらない方法、例えばパーティクルガン法なども用いることができる。

【0041】

3. 本発明の免疫受容体タンパク質の製造

本発明の免疫受容体タンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。 10

【0042】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、その宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0043】

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー等が用いられる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。 20

【0044】

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは7.0～7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。 30

【0045】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0046】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。 40

【0047】

培養後、本発明の免疫受容体タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより該タンパク質を抽出する。また、本発明の免疫系受容体タンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせ 50

て用いることにより、前記培養物中から本発明の免疫受容体タンパク質を単離精製することができる。

【0048】

4. 本発明の免疫受容体タンパク質に対する抗体

本発明の抗体は以下の一般的な抗体調製方法によって取得できるが、特に、MAIR-Iのみを認識するTX-8、MAIR-IとMAIR-IIの両方を認識するTX-10、MAIR-IIのみを認識するTX-13は、Shibuya, A., et al., Natl. Immunol., 1, 441-6, 2000の記載に従って調製することができる。具体的には、後記実施例の示すように、MAIR-I又はMAIR-IIを発現しているBa/F3形質転換体とヒトIgGのFc部分の融合タンパク質を足
10 腫細胞株とを融合することによって調製する。

【0049】

(1) 抗原の調製

本発明においては、前記の通り単離精製した本発明の免疫受容体タンパク質又はその一部の断片を抗原として用いる。

(2) ポリクローナル抗体の作製

前記のようにして調製した抗原を用いて動物を免疫する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、ウサギの場合、例えばアジュバントを用いて100～500 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。
20

【0050】

免疫は、哺乳動物（例えばラット、マウス、ウサギなど）に投与することにより行われる。投与部位は静脈内、皮下又は腹腔内である。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～3週間間隔で、1～10回、好ましくは2～3回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6～60日後に抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。抗体価の測定は、酵素免疫測定法(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)、放射性免疫測定法(RIA; radioimmuno assay)等により行うことができる。

【0051】

抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。
30

【0052】

(3) モノクローナル抗体の作製

(3-1) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして調製された抗原タンパク質を用いて動物を免疫する。必要であれば、免疫を効果的に行うため、前記と同様アジュバント（市販のフロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント等）を混合してもよい。

【0053】

免疫は、哺乳動物（例えばラット、マウス、ウサギなど）に投与することにより行われる。抗原の1回の投与量は、マウスの場合1匹当たり50 μ gである。投与部位は、主として静脈内、皮下、腹腔内である。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～3週間間隔で、最低2～3回行う。そして、最終免疫後、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞が好ましい。
40

【0054】

(3-2) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物由来の細胞であって一般に
50

入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株として、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。例えば、ミエローマ細胞の具体例としてはP3X63-Ag.8.U1（P3U1）、P3/NS1/1-Ag4-1、Sp2/0-Ag14などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

【0055】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中に、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを15:1～25:1の割合で混合し、ポリエチレングリコール等の細胞融合促進剤存在下、あるいは電気パルス処理（例えばエレクトロポレーション）により融合反応を行う。

【0056】

（3-3） ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地を用いて培養し、生育する細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0057】

次に、増殖したハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法（ELISA；enzyme-linked immunosorbent assay）、RIA（radioimmuno assay）等によってスクリーニングすることができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的に単クローン抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。

【0058】

（3-4） モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%牛胎児血清含有RPMI-1640培地又はMEM培地等の動物細胞培養培地中、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で3～10日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【0059】

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらの方法を組み合わせることにより精製することができる。

【0060】

5. 本発明の抗体による免疫受容体タンパク質の定量方法、定量用キット

本発明の抗体を用いた免疫受容体タンパク質の定量は、例えばイムノブロット法、酵素抗体法（EIA）、放射線免疫測定法（RIA）、蛍光抗体法、免疫細胞染色等より行うことが可能であるが、それらに限定されるものではない。

また、上記抗体は、その断片であってもよく、具体的には、当該抗体の一本鎖抗体断片（scFv）が挙げられる。

【0061】

具体的には、ELISA法による場合は、以下の通り行う。まず、希釈した血液等の試料を96ウェルマイクロプレートに吸着させた後、一次抗体として本発明の抗体を反応させる。次いで、発色反応に必要なPOD（ペルオキシダーゼ）等の特異的酵素で標識した抗グロブリン抗体を反応させ、洗浄後、発色基質としてABTS2, 2'-アジノージ（3-エチルーベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）等を添加して発色させ、比色法

により測定することによって試料中の本発明の免疫受容体タンパク質を検出する。あるいは、サンドイッチELISA法による場合は、以下の通り行う。まず、希釈した血液等の試料を、予め本発明の抗体を吸着させた96ウェルマイクロプレートに添加して一定時間インキュベートする。その後、プレートを洗浄し、ビオチンで標識した精製抗体を各ウェルに添加して一定時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、酵素標識アビジンを添加してさらにインキュベートする。インキュベート後、プレートを洗浄し、発色基質としてオルトフェニレンジアミン等を添加して発色させ、比色法によって測定する。

【0062】

また、本発明の抗体は免疫受容体タンパク質定量用キットに用いることもできる。当該キットは、少なくとも本発明の抗体を含むものであればよく、該抗体を固相に固定させる場合にあっては、該抗体とは抗原認識部位が異なり、二次抗体として用いられる抗体を含んでいてもよい。二次抗体として用いられる抗体は、例えば酵素等で標識されていてもよく、これら2つの抗体の他に、各種試薬（例えば、酵素基質、緩衝液、希釈液等）を含んでいてもよい。

10

【0063】

6. ペア免疫受容体遺伝子の単離方法

ITIMモチーフを有する抑制性免疫受容体とITAMモチーフを有する活性化免疫受容体とは、その細胞外領域が互いに高度に保存されている。従って、本発明においては、上記のモチーフを有するいずれかの免疫受容体遺伝子が取得できれば、その細胞外保存領域をコードする遺伝子をプローブとして用いて対となる免疫受容体遺伝子を前述のcDNAライブラリー等から単離することができる。例えば、MAIR-Iの場合は、プローブとなりうる細胞外領域として、配列番号1に示される塩基配列のうち、第63番目～第596番目の塩基配列、好ましくは第135番目～第488番目の塩基配列を含むDNAが例示される。

20

【0064】

7. 本発明の受容体タンパク質に対するリガンドのスクリーニング方法

本発明の受容体タンパク質に対するリガンドのスクリーニング方法は、本発明の免疫受容体タンパク質、又は該タンパク質を発現する細胞若しくは細胞膜をリガンドが含まれることが予想される被験物質に作用させ、該タンパク質に対して親和性のある物質を選択することを特徴とする。親和性のある物質を選択する具体的手法としては、本発明の免疫受容体タンパク質、又は該受容体タンパク質を発現する細胞若しくは細胞膜に被験物質を作用させ、該受容体タンパク質に対する被験物質の結合量を測定するか、あるいは、細胞の免疫応答シグナルを測定することなどにより行う。ここで、免疫応答シグナルとしては、例えば、脱顆粒（ヒスタミン、セロトニンなどの化学物質の放出）、ロイコトリエンや血小板活性化因子の合成、サイトカイン放出、補体の活性化、抗体産生、細胞内タンパク質のリン酸化、貧喰、細胞障害などをいう。測定において結合量の多い被験物質、免疫応答シグナルが強い被験物質を本発明の受容体タンパク質に対するリガンドの候補物質として選択することができる。

30

【0065】

被験物質としては任意の物質を使用することができ、その種類は特に限定されない。被験物質の具体例としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、天然物抽出物（植物抽出液、動物組織・動物細胞抽出液）、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

40

【0066】

8. 本発明の受容体タンパク質に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング系

本発明の受容体タンパク質は、該受容体タンパク質とリガンドとの結合を阻害する物質（アンタゴニスト）、該受容体に結合してリガンドと同様な免疫応答を起こす物質（アゴニ

50

スト)のスクリーニングするための手段(スクリーニング方法、スクリーニング用キット)として有用である。

【0067】

本発明の受容体タンパク質に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法は、(a)免疫受容体タンパク質を該免疫受容体タンパク質に対するリガンドに被験物質の非存在下において作用させた場合と、(b)免疫受容体タンパク質を該免疫受容体タンパク質に対するリガンドに被験物質の存在下において作用させた場合とを比較し、該免疫受容体タンパク質と該リガンドの結合に対して影響を与える物質を選択することを特徴とする。被験物質を添加した場合に免疫受容体タンパク質とリガンドとの結合量が減少又は増加する被験物質が見つければ、その被験物質は、本発明のタンパク質とリガンドとの結合を阻害又は拮抗し、免疫応答を制御するのに役立つアンタゴニスト又はアゴニストの候補物質となる。

10

【0068】

また、本発明の受容体タンパク質は該タンパク質に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング用キットに用いることもできる。当該キットは、少なくとも本発明の受容体タンパク質を含むものであればよく、標識リガンド、リガンド標準液、各種試薬(例えば、緩衝液、洗浄液、希釈液等)を含んでいてもよい。

【0069】

被験物質としては任意の物質を使用することができ、その種類は特に限定されない。被験物質の具体例としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、天然物抽出物(植物抽出液、動物組織・動物細胞抽出液)、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる

20

【0070】

9. 本発明の免疫応答機能制御用医薬

本発明の免疫受容体タンパク質は免疫応答と活性化させる機能又は抑制させる機能を有する。また、本発明のリガンド、アンタゴニスト、アゴニストは前記受容体タンパク質に結合することができ、免疫受容体からの活性化シグナル、抑制性シグナルを変化させる機能を果たす。従って、本発明のタンパク質、遺伝子、リガンド、アンタゴニスト、アゴニストはいずれも免疫応答機能制御用医薬として用いることができる。例えば、本発明の医薬を免疫制御機構の不全が原因となる疾患に用いると、免疫活性化と免疫抑制性の方向を制御することによって該疾患の治療を行うことができる。かかる疾患としては、例えば、自己免疫疾患(例えば、多発性硬化症、全身性エリマトーデス、慢性関節リウマチ、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強直性脊椎炎、インスリン依存性糖尿病、悪性貧血など)、アレルギー性疾患(例えば花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、蕁麻疹血管浮腫、血清病、アナフィラキシー、薬剤アレルギーなど)、免疫不全疾患(原発性免疫不全症候群、続発性免疫不全症候群など)、腫瘍(肺癌、乳癌、大腸癌、膀胱癌、骨髄性白血病、神経芽細胞腫、黒色腫、パーキンソンリンパ腫など)などが挙げられるが、これらに限定はされない。

30

40

【0071】

本発明の医薬は、各種製剤形態に調製し、経口又は非経口的に全身又は局所投与することができる。本発明の医薬を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等に製剤化するか、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本発明の医薬を非経口投与する場合は、静脈内注射剤(点滴を含む)、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤、皮下注射剤、坐剤などに製剤化し、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供される。

【0072】

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛

50

化剤、安定化剤、等張化剤等などを適宜選択し、常法により製造することができる。

【0073】

上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

10

【0074】

本発明の医薬の投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。例えば、本発明のタンパク質の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組合せとして投与される有効量は、一回につき体重1kgあたり0.01mg～1000mgの範囲の投与量を選ぶことができ、1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

【0075】

本発明の遺伝子を免疫系疾患に対する遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の遺伝子を注射により直接投与する方法のほか、該遺伝子が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。また、本発明の遺伝子をリポソームなどのリン脂質小胞に導入し、そのリポソームを投与する方法を採用してもよい。

20

【0076】

遺伝子治療剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内等の全身投与のほか、免疫系組織（骨髄、リンパ節など）に局所投与を行うことができる。さらに、カテーテル技術、外科的手術等と組み合わせた投与形態を採用することもできる。

【0077】

本発明の遺伝子治療剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、通常は、本発明の遺伝子の重量にすると成人1日あたり0.1～100mg/体重の範囲が適当である。

30

【0078】

10. 免疫受容体タンパク質検出用試薬

本発明の抗体は、本発明の免疫受容体タンパク質又はその部分断片と反応するため、該受容体タンパク質の検出用試薬として使用することができる。免疫受容体タンパク質の検出方法は特に限定されるものではなく、例えばウエスタンブロッティング法などを採用することができる。例えば、被検対象（細胞成分又はその各分画等）を電気泳動等により分画し、次に、予め標識（放射標識、蛍光染色等）された本発明の抗体と反応させてシグナルを検出する。本発明の免疫受容体タンパク質の検出に使用する抗体は、該受容体タンパク質の全長アミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体でもよく、該受容体タンパク質の部分アミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体でもよい。

40

【0079】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0080】

実施例に用いた抗体のうち、コントロールラット及びマウスのIgG、抗マウスCD4、CD8、CD45R/B220、CD11b (Mac1)、CD11c、Ly6G (Gr-1) 及びCD32/16 mAbs、ならびにDX-5 mAbはPharMinge

50

n (San Diego, CA) より入手した。抗-ホスホチロシン mAb (4G10) 及び抗-FcεRI γ mAb は Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY) より、また抗-Flag mAb は Sigma (St. Louis, Missouri) より入手した。抗-SHP-1、抗-SHP-2、抗-SHIP 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より入手した。ラット IgE 抗-DNP mAb は Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) より入手した。抗-DAP12 ポリクローナル抗体は愛媛大学医学部より入手した。

【0081】

10

【実施例1】 (MAIR-I 及び MAIR-II のクローニング及び分子特性)

(1) MAIR-I 及び MAIR-II のクローニング

骨髓球系細胞による免疫応答に関与する新規な遺伝子を同定するために、骨髓球系細胞を欠いている PU. 1-ノーマウスと野生株由来の14日齢の胎仔肝を、PCRベースのサブトラクティブハイブリダイゼーションである representational difference analysis (RDA) に供した。

【0082】

まず、全RNAを Isogen LS 溶液 (Nippon Gene) を用いて単離し、オリゴ(dT)-プライム二本鎖 cDNA を cDNA 合成システム (GIBCO BRL) を用いて製造業者の指示に従って合成した。RDA は Iwama, A., et al., Nucleic Acids Res, 26, 3034-43, 1998 に記載の方法に従って実施した。サブトラクションして得られた DNA 断片から骨髓球細胞に特異的な cDNA (MAIR-Ia) を同定した。全長 MAIR-Ia cDNA を RDA によって作成した cDNA 断片をプローブとしてマクロファージ cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによってクローン化した。

20

【0083】

MAIR-Ia のアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。MAIR-Ia は314個のアミノ酸からなるI型膜貫通型糖タンパク質であり、27個のアミノ酸のリーダー配列、152個のアミノ酸の細胞外領域、23個のアミノ酸の膜貫通領域、及び112個のアミノ酸の細胞内領域を有する(図1A)。細胞内領域はアミノ酸配列 VEYSTL 及び LHYS SV を含み(図1A)、それらは ITIMs (I/V/L/SxYxxL/V) のコンセンサス配列と一致した。また、ITIM-様配列 YVNL 及び YSEI は MAIR-Ia がタンパク質チロシンホスファターゼを補充し、抑制性シグナルを媒介することを示した。なお、ITIM-様モチーフ YVNL は受容体インターナリゼーションに関与するコンセンサス配列でもある (Marks, S. M., et al., Trends in Cell Biology, 7, 124-128, 1997; Boll, W., et al., Embo J, 15, 5789-95, 1996)。

30

【0084】

次に、MAIR-Ia がペア受容体のメンバーであるかどうかを調べるために、MAIR-Ia の細胞外領域をコードする cDNA (配列番号1の第63番目~第596番目の塩基配列) をプローブとして用いてマクロファージ cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、MAIR-Ia のアミノ酸配列と92%相同性のある一つの Ig-様ドメインが存在する細胞外領域、荷電アミノ酸 (Lys) を有する膜貫通領域、及び短い (20アミノ酸) 細胞内テイルを含むタンパク質をコードするクローンを同定し、これを MAIR-IIa と命名した。さらに、MAIR-Ia に4つ、MAIR-IIa に2つの追加的アミノ酸を含むアイソフォームを見出し、それぞれ MAIR-Ib (アミノ酸配列: 配列番号6)、MAIR-IIb (アミノ酸配列: 配列番号8) と命名した。

40

【0085】

図1Aに、MAIR-Ia、MAIR-Ib、MAIR-IIa、MAIR-IIb のア

50

ミノ酸配列の比較を示す。図1Aにおいて、下線は推定されるリーダー配列及び膜貫通領域を、丸で囲んだ箇所は細胞外領域におけるN-結合グリコシル部位及び膜貫通領域における荷電アミノ酸残基を、太字（図1Aに示すアミノ酸配列の55番目及び113番目のアミノ酸）はIg-様ドメインのジスルフィド結合に参与するシステイン残基を表す。枠で囲んだ箇所は、細胞内領域のITIM、ITIM-様又は局在モチーフを表す。MAIR-I、MAIR-Ib、MAIR-IIa、及びMAIR-IIb cDNA配列データはEMBL/GenBank/DBJからそれぞれ受理番号AB0091765、AB0091766、AB0091767、及びAB0091768で入手可能である。

【0086】

図1Bは、MAIR-I及びMAIR-IIタンパク質の模式図を示す。細胞外領域における一对のシステイン残基はIg-様ドメインの形成のための内部鎖ジスルフィド結合に参与すると考えられ、MAIR-I及びMAIR-IIがIgスーパーファミリーのメンバーであることを示す。

【0087】

(2) MAIR-I及びMAIR-IIのサザンブロット分析

図1Cに、ゲノムMAIR-I及びMAIR-IIのサザンブロット分析を示す。マウスゲノムDNAを制限酵素（E；EcoRI、B；BamHI、H；HindIII、X；XbaI、P；PstI）で消化し、MAIR-Iの細胞外領域をコードするcDNAでプローブした。MAIR-Ib及びMAIR-IIbは、MAIR-I及びMAIR-IIのゲノムDNA配列によって示されるように、MAIR-Ia及びMAIR-IIaの代替的スプライシング変異体である。上記のサザンブロット分析によれば、単一のハイブリダイゼーションパターンであることがわかり、これはMAIR-I及びMAIR-IIが単一の遺伝子によってコードされることを示す（図1C）。

【0088】

(3) 染色体FISH法による解析

ダイレクトR-バンドFISH法をマウス及びラットにおけるMAIR-I遺伝子の染色体アサインメントのために用いた。R-バンド染色体及びFISHの調製をMatsuda, Y., et al., Cytogenet Cell Genet, 61, 282-5, 1992及びMatsuda, Y. & Chapman, V. M., Electrophoresis, 16, 261-72, 1995に記載されるように行った。MAIR-I及びMAIR-II遺伝子はマウス11番染色体のE2バンドの近位領域に位置し、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）及びゲノムDNA配列データベースによって決定されるように、それぞれ6つ及び4つのエクソンからなる。データベースリサーチによれば、MAIR-I及びMAIR-IIは、アミノ酸レベルでそれぞれヒトCMRF-35-H9（Green, B. J., et al., Int Immunol, 10, 891-9, 1998）と44%、ヒトCMRF-35（Green, B. J., et al., Int Immunol, 10, 891-9, 1998）と49%の相同性を有することがわかった。CMRF-35-H9、CMRF-35はマウス11番染色体に対応するヒト17番染色体上に位置することから（Clark, G. J., et al., Tissue Antigens, 55, 101-9, 2000）、これらがマウスMAIR-I及びMAIR-IIのヒト相同体であると考えられる。

【0089】

(4) 免疫ブロッティング

マウスT細胞白血球BW5147細胞を、N末端をFlagペプチドでタグ化したMAIR-Ia及びMAIR-IIa cDNAで形質転換した。Flag-タグ化MAIR-Ia又はMAIR-IIaを発現するBW5147細胞又は親BW5147細胞を1% NP-40、プロテアーゼインヒビター（1mM PMSF及び20 Kallikrein inhibitor U/mlアプロチニン）、及びホスファターゼインヒビター（1mM EGTA, 10mM NaF, 1mM Na₄P₂O₇, 0.1mM

β -グリセロリン酸塩、1mM Na₃VO₄)を含むTris-緩衝化生理食塩水(50mM Tris, 15mM NaCl, pH8.0)に溶解した。タンパク質を還元下又は非還元条件下で、抗-Flag mAbを用いて免疫ブロッティングによって分析した。結果を図2Aに示す。BW5147形質転換体上のFlag-タグ化MAIR-Ia及びMAIR-IIaの抗-Flag-mAbとの免疫沈降物は、それぞれ~50kDa及び~35kDaの分子量を有していた(図2A)。

【0090】

(5) MAIR-IaのN-グルコシダーゼ処理

MAIR-IaのN-グリコシル化を調べるために、Flag-タグ化MAIR-Iaを発現するBW5147形質転換体を抗-Flag mAb又はコントロールIgGと共に免疫沈降させ、製造業者によって推奨される条件を用いてN-グルコシダーゼF(Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN)にて処理した。

【0091】

MAIR-Iaの移動度はN-グルコシダーゼF処理後~50kDaから~45kDaに減少した(図2B)。これは、MAIR-I cDNAから予想されるポリペプチドのサイズ及び細胞外領域のN-結合グルコシル部位の存在に一致した。

【0092】

[実施例2] (MAIR-I及びMAIR-IIの発現)

(1) ノーザンブロット分析

MAIR-I cDNAをReady to Go DNA Labelling Beads (Amersham Bioscience Corp., Piscataway, NJ)を用いて[32P]-dCTPにて標識化した。種々のマウス組織由来の各レーン中にある約10 μ gの全RNAを含む膜を、[32P]-dCTP-標識化cDNAプローブに、改良Church'sハイブリダイゼーション緩衝液(0.5M Church's リン酸緩衝液、7% SDS、1% BSA)中で68℃にてハイブリダイズした。その膜をChurch's洗浄緩衝液(40mM Church's リン酸緩衝液、1% SDS)中で68℃にて1時間洗浄し、オートラジオグラフィーに供した。図3A、図3BにMAIR-I及び/又はMAIR-II転写物の発現をMAIR-I細胞外部分をコードするcDNAをプローブとして用いるノーザンブロット法によって分析した結果を示す。MAIR転写物の優位な発現が脾臓、骨髄、腹腔マクロファージ、骨髄球系細胞株(416B、WEHI3、RAW、及びM1細胞)などの造血組織において検出されたが、非造血器官では検出されなかった(図3A)。

【0093】

(2) 逆転写-ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)

さらに血球系列でのMAIR-I及びMAIR-IIの発現を詳細に解析するため、骨髄、脾臓、胸腺からフローサイトメトリーにより各血球系列に分離し、MAIR-I-特異的プライマー及びMAIR-II-特異的プライマーを用いてRT-PCRを以下のように行った。まず、RNAを骨髄、脾臓、胸腺からフローサイトメトリーによって精製した系統-分化した細胞(lineage-committed cells)から得た。このRNAを逆転写し、HPRTコントロールを用いて相対量に調節されたcDNAをセルソーターによる精製細胞から調製した。これらのcDNAを鋳型とし、MAIR-I-特異的プライマー(5'-AAGCTGATAGGCATCCAGAGC-3': 配列番号9及び5'-AAGGAGTCACAGGTAAAGGTC-3': 配列番号10)、MAIR-II-特異的プライマー(5'-TCGAGCCCTTGAGAGTGGTAGAC-3': 配列番号11及び5'-AGGAGCTGTGTTTATGGGACAG-3': 配列番号12)、又はHPRT-特異的プライマー(5'-GCTGGTGAAAGAGACCTCT-3': 配列番号13及び5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3': 配列番号14)を用いるPCR増幅に供した。cDNAの量をTaqMan Rodent GAPDHコントロール試薬(Perkin-Elmer Appl 50

ied Biosystems, Foster, City, CA)を用いて定量的PCRによって標準化した(Sakamoto, N., et al., Eur J Immunol, 31, 1310-6, 2001)。PCRは：各サイクル20秒間変性(94℃)、20秒間アニーリング(55℃)、及び30秒間伸長(72℃)の条件で行った。図3BにRT-PCR分析の結果を示す。MAIR-I及びMAIR-II転写物はいずれもリンパ球造血前駆細胞、顆粒球、マクロファージ、赤血球系細胞、及び骨髄中のB細胞、脾臓中のT, B, 及びNK細胞を含む多系列の前駆細胞において発現したが、胸腺中のT細胞では検出されなかった(図3B)。

【0094】

(3) MAIR-I及びMAIR-IIタンパク質の細胞表面発現解析 10
タンパク質レベルでの発現を解析するために、MAIR-I及びMAIR-IIタンパク質にそれぞれ特異的に反応するモノクローナル抗体TX-8及びTX-13を作成し、細胞表面における分子の発現をフローサイトメトリーで検討した。

【0095】

(3-1) 抗体の作成
TX-8(抗-MAIR-I)、TX-10(抗-MAIR-Iと抗-MAIR-II)及びTX-13(抗-MAIR-II)mAbは、Shibuya, A., et al., Natl. Immunol., 1, 441-6, 2000の記載に従い、MAIR-I又はMAIR-IIを発現しているBa/F3形質転換体とヒトIgGのFc部分の融合タンパク質を足跡に注射することによって免疫化したラット由来の膝窩リンパ節細胞とSp2/0 骨髄腫細胞株とを融合することによって調製した。 20

【0096】

(3-2) フローサイトメトリー
N-末端をFlag cDNAでタグ化したMAIR-I又はMAIR-IIをpMXレトロウイルスベクターにサブクローニングした(Kitamura, T., et al., Proc Natl Acad Sci, USA, 92, 9146-50, 1995)。Flag-タグ化MAIR-I及びMAIR-IIを安定に発現するBW5147, Ba/F3及びRAW細胞をShibuya, K., et al., Immunity, 11, 615-23, 1999に従って樹立した。

【0097】

図4AはMAIR-I又はMAIR-IIを発現しているBW5147形質転換体をコントロールIgG又は抗-MAIR-I(TX-8 mAb)又は抗-MAIR-II(TX-13 mAb)、続いてアロフィコシアニン(APC)-結合ストレプトアビジンで染色した結果を示す。 30

【0098】

また、図4B, C, DはC57/BL6マウス由来の脾臓、骨髄、又は腹腔マクロファージをビオチン-結合抗-MAIR-I(TX-8 mAb)又は抗-MAIR-II(TX-13 mAb)及びPE-結合mAb、続いてアロフィコシアニン(APC)-結合ストレプトアビジンで染色した結果を示す。フローサイトメトリーによる脾臓及び骨髄細胞の分析では、MAIR-Iはマクロファージ、樹状細胞、顆粒球、骨髄由来マスト細胞、及びB細胞の一部のサブセットを含むほとんどの骨髄球系細胞上で発現しているが、T細胞やNK細胞では発現していないことが示された(図4B, C, D)。他方、MAIR-IIタンパク質はB細胞のサブセット及び腹腔マクロファージのサブセットの細胞表面上でのみ検出され、RT-PCRの分析結果とは異なって樹状細胞、マスト細胞などには発現が認められなかった(図4B, C, D)。このことは、MAIR-II分子の細胞膜上の発現が何らかの機構によって制御されている可能性が示唆され、転写物発現が認められても必ずしもタンパク質の細胞表面発現が起こらないことがわかった。

【0099】

(4) 細胞表面上のMAIR-I及びMAIR-IIタンパク質発現の制御機構
細胞表面上のタンパク質発現の制御機構を調べるために、脾臓から精製したB細胞をLP 50

S (10 μ g/ml) の存在下又は不存在下で48時間培養し、培養前又は後、上記の抗-MAIR-I (TX-8 mAb) 又は抗-MAIR-II (TX-13 mAb) で染色した。48時間培養後、MAIR-II 分子が細胞膜上で顕著に検出され、LPS の刺激によってそれはさらに増強された (図4E)。

【0100】

〔実施例3〕 MAIR-I 及びMAIR-II の機能解析

(1) インターナリゼーションアッセイ

MAIR-I の細胞内領域はチロシンベースの局在モチーフ (YVNL) を含んでおり、(図1A)、このモチーフはタンパク質のエンドソーム及びライソソームターゲッティングに関係し、アゴニスト誘導インターナリゼーションに関与していることが報告されている (Marks, S. M., et al., Trends in Cell Biology, 7, 124-128, 1997; Boll, W., et al., Embo J, 15, 5789-95, 1996)。従って、MAIR-I が架橋後にインターナリゼーションを誘導するか否かを調べるために、腹腔マクロファージ上に発現しているMAIR-I をビオチン標識化抗-MAIR-I mAb (TX-8)、APC-標識化ストレプトアビジンで架橋し、4℃又は37℃にて1時間インキュベートした。インターナリゼーションを受けなかった細胞表面MAIR-I を除くために細胞を2.5%トリプシンにて処理 (+) 又は処理せず (-)、フローサイトメトリーによって分析した。架橋後4℃でインキュベートした細胞の蛍光強度はトリプシン処理により顕著に減少したのに対し、架橋後37℃でインキュベートした細胞では、トリプシン処理に関わらず蛍光は一定であった (図5A)。これはMAIR-I の架橋が37℃における培養中に受容体インターナリゼーションを誘導したことを示す。

【0101】

N末端をFlagタグ化したMAIR-I を発現するBa/F3形質転換体を抗-Flag mAbとインキュベートし、続いてFITC-標識化抗-マウスIgG第二抗体で架橋した。細胞を、10%FBSを含むRPMI 1640に再懸濁し、ポリリジンで前もって被覆したチャンバースライド (Lab-Tek II, Nalge Nunc, Naperville, IL) に載せ、37℃にて30分間インキュベートした。細胞を1500rpmで4℃にて5分間遠心し、PBSにて2回洗浄し、3%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞をDAPI (Vector, CA) を含むVECTASHIELDとともに載せ、共焦点走査レーザ顕微鏡下で分析した。緑色の蛍光がインキュベーション前では細胞表面にのみ検出されたのに対し、37℃にて30分間インキュベーション後では細胞内に豊富に観察され (図5B)、MAIR-I は架橋後にインターナリゼーションを受けたことを示している。これに対し、局在モチーフ内のチロシン残基 (Y-F233) が変異を受けたMAIR-I のインターナリゼーションは検出されず、これは233位のチロシンがMAIR-I のインターナリゼーションを担っていることを示す。

【0102】

(2) MAIR-I のチロシンリン酸化、ホスファターゼとの会合

MAIR-I の細胞内領域におけるITIMに対する共通配列の存在は、MAIR-I はチロシンリン酸化を受け、SH-2含有チロシンホスファターゼ補充する可能性を示唆した。そこで、骨髓由来培養マスト細胞上に発現したMAIR-I が過バナジン酸塩の刺激によってチロシンリン酸化されるかどうかを調べた。

【0103】

成体Balb/cマウス的大腿及び頸骨由来の骨髓細胞を10%FBS、マウスrIL-3 (4 ng/ml; Pharmingen) 及びマウスrSCF (10 ng/ml) を含むRPMI 1640培地において 2×10^5 /mlの濃度で培養した。培養後の骨髓由来のマスト細胞を10分間37℃にて過バナジン酸塩で刺激し、又は刺激せず、1%NP-40 (図6A) 又は1%ジギトニン (Sigma) 緩衝液 (0.12% Triton-100 (片山化学製)、150mM NaCl、20mM トリエチルアミン (片山化学製)、又はプロテアーゼ及びホスファターゼインヒビターを含む上述の1%NP-40緩

衝液) (図6B) に溶解し、コントロール IgG、抗-MAIR-I、抗-SHP-I、抗-SHP-II、又は抗-SHIPで免疫沈降した。免疫沈降物を抗-ホスホチロシン mAb (抗-pY) (図6A) 又は抗-MAIR-I (図6B) でイムノブロットした。図6Aに示すように、過バナジン酸塩による刺激はMAIR-Iのチロシンリン酸化を顕著に誘導した(図6A)。タンパク質-チロシンホスファターゼSHP-1及びSHP-2、及びポリホスフェートイノシトール5-ホスファターゼSHIPによって免疫沈降すると、マスト細胞の過バナジン酸塩の刺激後、MAIR-IはSHIPと結合したが、SHP-1及びSHP-2とは結合しなかった(図6B)。これらの結果は、MAIR-Iは細胞質内領域のチロシンがリン酸化された後、抑制性シグナルを媒介する可能性があることを示す。

10

【0104】

(3) セロトニン放出アッセイ

MAIR-Iは細胞質領域にITIMをもつが、これが実際に抑制性のシグナル伝達を担うどうかを確認するために、骨髓細胞をIL-3とSCFで培養して誘導したマスト細胞において、MAIR-IがIgE受容体(FcεRI)を介した脱顆粒を抑制するか否かを解析した。IgE-媒介セロトニン放出アッセイをUehara, T., et al., J Clin Invest, 108, 1041-50, 2001の記載に従って行った。まず、骨髓細胞由来マスト細胞を3H-セロトニン(5-[1, 2-3H(N)]-ヒドロキシトリプタミントラネキサミン硫酸塩)(5 µCi/ml; NEN Life Science Products Inc., Boston, MA)とともに5時間37℃にてインキュベートし、さらに1時間バックグラウンド放射活性を減らすために再インキュベートした。3H-セロトニン負荷マスト細胞を10 µlのラットIgE抗-DNP mAb (25 µg/ml) 及び種々の濃度のラット抗-MAIR-I又はコントロールIgG (IgE mAb+抗-MAIR-I 又はIgE mAb+コントロールIgG)を含む96ウェルプレートに入れ、30分間4℃にてインキュベートし、洗浄し、25 µlの培地中に再懸濁した。抗体-初回刺激を受けたマスト細胞を25 µlのウサギ抗-ラットIg抗体(40 µg/ml)のF(ab')₂断片で37℃にて30~60分間チャレンジした。反応を50 µlの冷PBSを加えることによって停止させた。上清の3H-セロトニンを液体シンチレーションカウンダーにて測定した。3H-セロトニンの全取り込み量を1% SDS/1% NP40を含むPBSにてマスト細胞を溶解することによって測定し、セロトニン放出の割合を100×(上清のcpm/全取り込み量のcpm)によって定義した。図6Cに示すように、MAIR-Iと抗-MAIR-I mAbの架橋は濃度依存的に骨髓由来マスト細胞からのIgE-媒介セロトニン放出を抑制した。

20

30

【0105】

(4) MAIR-IIのアダプター分子の会合

MAIR-Iとは異なって、MAIR-IIは細胞内領域が短く、シグナル伝達に参与する配列を持たないこと、及び膜貫通領域の正電荷を持つリジン酸残基の存在から考え、同部位に負に荷電したアミノ酸残基をもったFcεRIγやDAP12などのアダプター分子が会合することが予想された。そこで、MAIR-IIのFcεRIγ又はDAP12のようなアダプター膜貫通タンパクとの非共有結合を調べるために、FcεRIγもDAP12も発現しない293T細胞をMAIR-II cDNAとFcεRIγ又はDAP12のいずれかで形質転換した。形質転換体を1%ジギトニン緩衝液に溶解し、細胞溶解物をコントロールIgG、抗-DAP12又は抗-FcεRIγと共に免疫沈降させ、単離したタンパク質を抗-MAIR-IIでイムノブロットした。図7Aに示すように、MAIR-IIとDAP12との共免疫沈降が確認され、MAIR-IIはDAP12と会合していることが明らかとなったが、FcεRIγとの共免疫沈降は確認されなかった。同様に、MAIR-II遺伝子導入したマウスマクロファージRAW細胞を用いて免疫沈降を行ったところ、MAIR-IIとDAP12との共免疫沈降は確認されたが、FcεRIγとの共免疫沈降は確認されなかった(図7B)。

40

50

【0106】

一次細胞におけるMAIR-IIのDAP12との生理学的結合を確かめるために、脾臓細胞をLPSで刺激し、1%ジギトニン緩衝液に溶解し、抗-FcεRI又は抗-DAP12と免疫沈降した。単離したタンパク質を抗-MAIR-IIにて再び免疫ブロットすると、MAIR-IIはDAP12と共免疫沈降するが、FcεRIγとは共免疫沈降しなかった(図7C)。これらの結果は、DAP12がMAIR-IIに対する生理学的パートナーであることを示す。

【0107】

また、293T細胞をFlag-タグ化DAP12、MAIR-II、又はFlag-タグ化DAP12+MAIR-IIで形質転換し、ビオチン-結合抗-MAIR-II及びFITC-結合抗-Flag mAb、続いてAPC-結合ストレプトアビジンで染色した。MAIR-II及びDAP12の細胞表面発現をフローサイトメトリーによって分析した結果を図7Dに示す。293T細胞の細胞表面上のDAP12発現はMAIR-IIの発現に依存していることが観察された(図7D)。

10

【0108】

(5) TNF-α分泌

DAP12はITAMを有しており、活性化シグナルを伝えることが明らかになっている(Lanier, L. L., et al., Immunol. Today, 21, 611-614, 2000; Tomasello, E., et al., J. Biol. Chem., 273, 34115-34119, 1998; Lanier, L. L., et al., Nature, 391, 703-707, 1998)。実際に、MAIR-IIから活性化シグナルの伝達があるか否かを解析した。Flag-タグ化MAIR-II又はC57BL/6マウス由来の腹腔マクロファージを発現するRAW細胞を抗-CD32/16 (FcγR) で前処理し、プラスチック被覆コントロールIgG、抗-Flag又は抗-MAIR-II mAbで刺激し、48時間培養した。細胞上清中のTNF-α濃度をELISA kit (e-Bioscience, San Diego, CA) を用いて製造業者の指示に従って測定した。図8に示すように、N末端にFlagを付加したMAIR-II遺伝子を導入した形質転換体では、抗-Flag抗体で架橋すると炎症性サイトカインであるTNF-αの生産が有意に亢進した。また、腹腔マクロファージで直接MAIR-II分子を抗-MAIR-II 30
I抗体で架橋してもTNF-αの分泌が顕著に増加した。しかしながら、抗MAIR-II I抗体の架橋後、腹腔マクロファージからのIL-6及びIL-12分泌の顕著な増加は認められなかった。これらの結果はMAIR-IIが離れたシグナリング経路を媒介し、マクロファージにおけるTNF-α分泌を導くことを示す。

30

【0109】

【発明の効果】

本発明によれば、免疫応答を正又は負に調節する新規な免疫受容体タンパク質が提供される。本発明の免疫受容体タンパク質は、免疫応答を活性化及び抑制させる機能を有するため、自然免疫反応の制御機構の解明や免疫調節物質の探索、抗アレルギー薬や抗炎症薬などの医薬の開発に有用である。

40

【0110】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Immunoreceptor Protein

<130> RJH14-147A

<140>

<141>

10

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1676

20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (63)..(1007)

30

<400> 1

cgggactgaa ccgtggagcg tccagccgtg gcctgcctgc cggtagaccg tgtgtgggag 60

aa atg acc caa ctg gcc tca gct gtg tgg ctg ccc aca ctg ttg ctg 107

Met Thr Gln Leu Ala Ser Ala Val Trp Leu Pro Thr Leu Leu Leu

1

5

10

15

40

ctg ctg ctg ctt ttt tgg ctt cca ggc tgt gtc cct ctg cat ggt ccc 155

Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Pro Gly Cys Val Pro Leu His Gly Pro
 20 25 30

agc acc atg tca gga agt gta ggt gaa tcc ctg agt gtg tca tgt cga 203
 Ser Thr Met Ser Gly Ser Val Gly Glu Ser Leu Ser Val Ser Cys Arg
 35 40 45

tat gag gag aaa ttc aag act aag gac aaa tac tgg tgc aga gtg tca 251
 Tyr Glu Glu Lys Phe Lys Thr Lys Asp Lys Tyr Trp Cys Arg Val Ser
 50 55 60

ctt aag ata cta tgt aaa gat att gtc aag acc agc agc tca gaa gaa 299
 Leu Lys Ile Leu Cys Lys Asp Ile Val Lys Thr Ser Ser Ser Glu Glu
 65 70 75

gct agg agt ggc cga gtg acc atc agg gac cat cca gac aac ctc acc 347
 Ala Arg Ser Gly Arg Val Thr Ile Arg Asp His Pro Asp Asn Leu Thr
 80 85 90 95

ttt aca gtg acc tat gag agc ctc acc ctg gag gat gca gac acc tac 395
 Phe Thr Val Thr Tyr Glu Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr
 100 105 110

atg tgt gcg gtg gat ata tca ctt ttt gat ggc tcc ttg ggg ttc gat 443
 Met Cys Ala Val Asp Ile Ser Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp
 115 120 125

aag tac ttc aag att gag ttg tct gtg gtt cca agt gag gac cca gga 491
 Lys Tyr Phe Lys Ile Glu Leu Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Gly

10

20

30

40

130	135	140		
cca aca cta gag aca cct gtg gtg tcc acc agt ctg cct acc aag ggt	539			
Pro Thr Leu Glu Thr Pro Val Val Ser Thr Ser Leu Pro Thr Lys Gly				
145	150	155		
ccc gcc cta gga tcc aac aca gag ggc cac cgt gaa cat gac tat tcc	587			10
Pro Ala Leu Gly Ser Asn Thr Glu Gly His Arg Glu His Asp Tyr Ser				
160	165	170	175	
cag ggc ttg agg ctc cca gcg ctg ttg tct gtg tta gct ctc ctg ctg	635			
Gln Gly Leu Arg Leu Pro Ala Leu Leu Ser Val Leu Ala Leu Leu Leu				
180	185	190		
ttt ctg ttg gtg ggg acc tct ctg ctg gcc tgg agg atg ttc cag aag	683			20
Phe Leu Leu Val Gly Thr Ser Leu Leu Ala Trp Arg Met Phe Gln Lys				
195	200	205		
cgg ctg gtc aaa gct gat agg cat cca gag ctg tcc cag aac ctc aga	731			
Arg Leu Val Lys Ala Asp Arg His Pro Glu Leu Ser Gln Asn Leu Arg				
210	215	220		30
cag gct tct gag cag aat gag tgc cag tat gtg aat ttg cag ctg cac	779			
Gln Ala Ser Glu Gln Asn Glu Cys Gln Tyr Val Asn Leu Gln Leu His				
225	230	235		
acg tgg tct ctg agg gaa gag ccg gtg cta cca agt cag gta gaa gtg	827			
Thr Trp Ser Leu Arg Glu Glu Pro Val Leu Pro Ser Gln Val Glu Val				40
240	245	250	255	

gtg gaa tat agc aca ttg gca tta ccc cag gaa gag ctt cac tat tca 875
 Val Glu Tyr Ser Thr Leu Ala Leu Pro Gln Glu Glu Leu His Tyr Ser
 260 265 270

tcc gtg gca ttc aac tcc cag agg cag gat tct cac gcc aat gga gat 923
 Ser Val Ala Phe Asn Ser Gln Arg Gln Asp Ser His Ala Asn Gly Asp
 275 280 285

10

tct ctt cat caa cct cag gac cag aaa gca gag tac agt gag atc cag 971
 Ser Leu His Gln Pro Gln Asp Gln Lys Ala Glu Tyr Ser Glu Ile Gln
 290 295 300

aag ccc aga aaa gga ctc tct gac ctt tac ctg tga ctccttgta 1017
 Lys Pro Arg Lys Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Leu
 305 310

20

cctgatccctc tcagtgggtga ctaccagggtt ccaaggctcc ctgctggctg ctgccctcaa 1077

tgcatgagc ctcagtggct tcactaaaga tgagcaggag ccagggtctt gtgggcacag 1137

30

tctcatccca ctggctctct cctcttagcc tgtatittgt tctgcctctg ggtgtggaag 1197

acatcgaigc tgctcttttg gggctctggg aattgacatg gtctgtatag aacggtactt 1257

gtgttagtta gctttgtagt gtcagtccag gaagaacatc tgtggtcact gggaaagtgg 1317

gggacccatg agactacaaa ggaaggggag tcatggaggt actaaacacc aactccttca 1377

40

tctcacagag aaaaaaacct aagctctgag gacaaaagcc tggcccgtag caccaaggtc 1437
 aggggcaaatt tcctctggac tcatttttat tttttttttt tgttttttga gacaggggtct 1497
 ctctgigttag ctttggctgt cctggaactc actctgtaaa ccagaatggc ctgagactca 1557
 caaagatctg cctgcctctg cctccaaagg tgtgtgccac aatgcctggc ttctctgaat 1617
 tcttaagtaa aagaatgaaat aaagtttata atatcttita aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1676

10

<210> 2

<211> 314

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 2

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

30

40

Thr Val Thr Tyr Glu Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr Met
 100 105 110
 Cys Ala Val Asp Ile Ser Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp Lys
 115 120 125
 Tyr Phe Lys Ile Glu Leu Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Gly Pro
 130 135 140
 Thr Leu Glu Thr Pro Val Val Ser Thr Ser Leu Pro Thr Lys Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Ser Asn Thr Glu Gly His Arg Glu His Asp Tyr Ser Gln
 165 170 175
 Gly Leu Arg Leu Pro Ala Leu Leu Ser Val Leu Ala Leu Leu Leu Phe
 180 185 190
 Leu Leu Val Gly Thr Ser Leu Leu Ala Trp Arg Met Phe Gln Lys Arg
 195 200 205
 Leu Val Lys Ala Asp Arg His Pro Glu Leu Ser Gln Asn Leu Arg Gln
 210 215 220
 Ala Ser Glu Gln Asn Glu Cys Gln Tyr Val Asn Leu Gln Leu His Thr
 225 230 235 240
 Trp Ser Leu Arg Glu Glu Pro Val Leu Pro Ser Gln Val Glu Val Val
 245 250 255
 Glu Tyr Ser Thr Leu Ala Leu Pro Gln Glu Glu Leu His Tyr Ser Ser
 260 265 270
 Val Ala Phe Asn Ser Gln Arg Gln Asp Ser His Ala Asn Gly Asp Ser
 275 280 285
 Leu His Gln Pro Gln Asp Gln Lys Ala Glu Tyr Ser Glu Ile Gln Lys
 290 295 300
 Pro Arg Lys Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Leu
 305 310

10

20

30

40

<210> 3
 <211> 932
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (65)..(751)

10

<400> 3
 ctgagacaga tccttctcca ctcttggccc tgatgtgggc acaggtagaca gcggagctga 60

agaa atg att ccc aga gta ata aga ttg tgg ctg cct tca gct ctg ttc 109
 Met Ile Pro Arg Val Ile Arg Leu Trp Leu Pro Ser Ala Leu Phe
 1 5 10 15

20

ctc tct cag gtc cca ggc tgt gtc cca ctg cat ggc ccc agc act atc 157
 Leu Ser Gln Val Pro Gly Cys Val Pro Leu His Gly Pro Ser Thr Ile
 20 25 30

aca ggc gct gtt ggg gaa tcg ctc agt gtg tca tgt caa tac gag gag 205
 Thr Gly Ala Val Gly Glu Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Tyr Glu Glu
 35 40 45

30

aaa ttc aag act aag gac aaa ttc tgg tgc aga ggg tca ctg aag gta 253
 Lys Phe Lys Thr Lys Asp Lys Phe Trp Cys Arg Gly Ser Leu Lys Val
 50 55 60

40

ctc tgt aaa gat att gtc aag acc agc agc tca gaa gaa gtt agg aat 301

Leu Cys Lys Asp Ile Val Lys Thr Ser Ser Ser Glu Glu Val Arg Asn
 65 70 75

ggc cga gtg acc atc agg gac cat cca gac aac ctc acc ttc aca gtg 349
 Gly Arg Val Thr Ile Arg Asp His Pro Asp Asn Leu Thr Phe Thr Val
 80 85 90 95

acc tat gag agc ctc acc ctg gag gat gca gac acc tac atg tgt gcg 397
 Thr Tyr Glu Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr Met Cys Ala
 100 105 110

gtg gat ata tca ctt ttt gat ggc tcc ttg ggg ttc gat aag tac ttc 445
 Val Asp Ile Ser Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp Lys Tyr Phe
 115 120 125

aag att gag ttg tct gtg gtt cca agt gag gac cca gtc aca ggt tcg 493
 Lys Ile Glu Leu Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser
 130 135 140

agc ctt gag agt ggt aga gat atc ctg gaa tcc ccc aca tcc tca gtt 541
 Ser Leu Glu Ser Gly Arg Asp Ile Leu Glu Ser Pro Thr Ser Ser Val
 145 150 155

ggg cac act cat ccc agt gtg acc aca gat gac aca att cct gct ccc 589
 Gly His Thr His Pro Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ile Pro Ala Pro
 160 165 170 175

tgc cct cag cct cgg tct ctt cgg agc agc ctc tac ttc tgg gtc ctg 637
 Cys Pro Gln Pro Arg Ser Leu Arg Ser Ser Leu Tyr Phe Trp Val Leu

10

20

30

40

180

185

190

gtg tct ctg aag ttg ttc ctg ttc ctg agc atg ctt ggt gct gtc ctc 685

Val Ser Leu Lys Leu Phe Leu Phe Leu Ser Met Leu Gly Ala Val Leu

195

200

205

tgg gtg aac agg cct cag agg tgc tct ggg gga agc agc tct cgg ccc 733

Trp Val Asn Arg Pro Gln Arg Cys Ser Gly Gly Ser Ser Ser Arg Pro

210

215

220

tgt tat gag aac cag tga agtctgttga catcaaggcc ctgtccctaa 781

Cys Tyr Glu Asn Gln

225

acacagctcc tctgggtggct gaggacagcc agtaaataca tatttcttga gaatgctctg 841

agacttttag aagattctct gtgggtgtatc aaacacataa atgaatttac caaataaata 901

cctatatatt taaatgaaaa aaaaaaaaaa a 932

<210> 4

<211> 228

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ile Pro Arg Val Ile Arg Leu Trp Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu

1

5

10

15

Ser Gln Val Pro Gly Cys Val Pro Leu His Gly Pro Ser Thr Ile Thr

10

20

30

40

20 25 30
 Gly Ala Val Gly Glu Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Tyr Glu Glu Lys
 35 40 45
 Phe Lys Thr Lys Asp Lys Phe Trp Cys Arg Gly Ser Leu Lys Val Leu
 50 55 60
 Cys Lys Asp Ile Val Lys Thr Ser Ser Ser Glu Glu Val Arg Asn Gly
 65 70 75 80
 Arg Val Thr Ile Arg Asp His Pro Asp Asn Leu Thr Phe Thr Val Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr Met Cys Ala Val
 100 105 110
 Asp Ile Ser Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp Lys Tyr Phe Lys
 115 120 125
 Ile Glu Leu Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Ser
 130 135 140
 Leu Glu Ser Gly Arg Asp Ile Leu Glu Ser Pro Thr Ser Ser Val Gly
 145 150 155 160
 His Thr His Pro Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ile Pro Ala Pro Cys
 165 170 175
 Pro Gln Pro Arg Ser Leu Arg Ser Ser Leu Tyr Phe Trp Val Leu Val
 180 185 190
 Ser Leu Lys Leu Phe Leu Phe Leu Ser Met Leu Gly Ala Val Leu Trp
 195 200 205
 Val Asn Arg Pro Gln Arg Cys Ser Gly Gly Ser Ser Ser Arg Pro Cys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Gln
 225

10

20

30

40

<211> 1677

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(1003)

10

<400> 5

```

agcgtccagc cgtggcctgc ctgccggtga cccgtgtgtg ggagaa atg acc caa    55
                                     Met Thr Gln
                                     1

```

```

ctg gcc tca gct gtg tgg ctg ccc aca ctg ttg ctg ctg ctg ctg ctt    103
Leu Ala Ser Ala Val Trp Leu Pro Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
      5              10              15

```

20

```

ttt tgg ctt cca ggc tgt gtc cct ctg cat ggt ccc agc acc atg tca    151
Phe Trp Leu Pro Gly Cys Val Pro Leu His Gly Pro Ser Thr Met Ser
    20              25              30              35

```

30

```

gga agt gta ggt gaa tcc ctg agt gtg tca tgt cga tat gag gag aaa    199
Gly Ser Val Gly Glu Ser Leu Ser Val Ser Cys Arg Tyr Glu Glu Lys
      40              45              50

```

```

ttc aag act aag gac aaa tac tgg tgc aga gtg tca ctt aag ata cta    247
Phe Lys Thr Lys Asp Lys Tyr Trp Cys Arg Val Ser Leu Lys Ile Leu
      55              60              65

```

40

tgt aaa gat att gtc aag acc agc agc tca gaa gaa gct agg agt ggc 295
 Cys Lys Asp Ile Val Lys Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ala Arg Ser Gly
 70 75 80

cga gtg acc atc agg gac cat cca gac aac ctc acc ttt aca gtg acc 343
 Arg Val Thr Ile Arg Asp His Pro Asp Asn Leu Thr Phe Thr Val Thr
 85 90 95

10

tat gag agc ctc acc ctg gag gat gca gac acc tac atg tgt gcg gtg 391
 Tyr Glu Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr Met Cys Ala Val
 100 105 110 115

gat ata tca ctt ttt gat ggc tcc ttg ggg ttc gat aag tac ttc aag 439
 Asp Ile Ser Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp Lys Tyr Phe Lys
 120 125 130

20

att gag ttg tct gtg gtt cca agt gag gac cca gtt tca tct cca gga 487
 Ile Glu Leu Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Val Ser Ser Pro Gly
 135 140 145

cca aca cta gag aca cct gtg gtg tcc acc agt ctg cct acc aag ggt 535
 Pro Thr Leu Glu Thr Pro Val Val Ser Thr Ser Leu Pro Thr Lys Gly
 150 155 160

30

ccc gcc cta gga tcc aac aca gag ggc cac cgt gaa cat gac tat tcc 583
 Pro Ala Leu Gly Ser Asn Thr Glu Gly His Arg Glu His Asp Tyr Ser
 165 170 175

40

cag ggc ttg agg ctc cca gcg ctg ttg tct gtg tta gct ctc ctg ctg 631

Gln Gly Leu Arg Leu Pro Ala Leu Leu Ser Val Leu Ala Leu Leu Leu
 180 185 190 195

ttt ctg ttg gtg ggg acc tct ctg ctg gcc tgg agg atg ttc cag aag 679
 Phe Leu Leu Val Gly Thr Ser Leu Leu Ala Trp Arg Met Phe Gln Lys
 200 205 210

cgg ctg gtc aaa gct gat agg cat cca gag ctg tcc cag aac ctc aga 727
 Arg Leu Val Lys Ala Asp Arg His Pro Glu Leu Ser Gln Asn Leu Arg
 215 220 225

cag gct tct gag cag aat gag tgc cag tat gtg aat ttg cag ctg cac 775
 Gln Ala Ser Glu Gln Asn Glu Cys Gln Tyr Val Asn Leu Gln Leu His
 230 235 240

acg tgg tct ctg agg gaa gag ccg gtg cta cca agt cag gta gaa gtg 823
 Thr Trp Ser Leu Arg Glu Glu Pro Val Leu Pro Ser Gln Val Glu Val
 245 250 255

gtg gaa tat agc aca ttg gca tta ccc cag gaa gag ctt cac tat tca 871
 Val Glu Tyr Ser Thr Leu Ala Leu Pro Gln Glu Glu Leu His Tyr Ser
 260 265 270 275

tcc gtg gca ttc aac tcc cag agg cag gat tct cac gcc aat gga gat 919
 Ser Val Ala Phe Asn Ser Gln Arg Gln Asp Ser His Ala Asn Gly Asp
 280 285 290

tct ctt cat caa cct cag gac cag aaa gca gag tac agt gag atc cag 967
 Ser Leu His Gln Pro Gln Asp Gln Lys Ala Glu Tyr Ser Glu Ile Gln

10

20

30

40

295

300

305

aag ccc aga aaa gga ctc tct gac ctt tac ctg tga ctccttgta 1013

Lys Pro Arg Lys Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Leu

310

315

ccatgccctc tcagtgggtg ctaccagggt ccaaggctcc ctgctggctg ctgccctcaa 1073

10

tgcatgagc ctcagtggct tcactaaaga tgagcaggag ccagggtct gtgggcacag 1133

tcctatccca ctggctctct cctcttagcc tgtattttgt tctgcctctg ggtgtggaag 1193

acatcgaigc tgcctttttg gggctctggg aattgacatg gttcgtatag aacggtactt 1253

20

ggttagita gctttgtagt gtcagtcag gaagaacatc tgtggctact gggaaagtgg 1313

gggacccaig agactacaaa ggaaggggag tcatggaggt actaaacacc aatccttca 1373

tcctacagag aaaaaaacct aagctctgag gacaaaagcc tggcccgigg caccaaggct 1433

aggggcaaat tcctctggac tcatttttat tttattttt tgtttttga gacagggtct 1493

30

ctctgigtat ctctggctgt cctggaactc actctgtaaa ccagaatggc ctgagactca 1553

caaagatctg cctgcctctg cctccaaagg tgtgtgccac aatgcctggc ttctctgaat 1613

tcctaaagtaa aagatgaaat aaagtttata atatctttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1673

40

aaaa

1677

<210> 6

<211> 318

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

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

10

20

30

40

165	170	175
Asp Tyr Ser Gln Gly Leu Arg Leu Pro Ala Leu Leu Ser Val Leu Ala		
180	185	190
Leu Leu Leu Phe Leu Leu Val Gly Thr Ser Leu Leu Ala Trp Arg Met		
195	200	205
Phe Gln Lys Arg Leu Val Lys Ala Asp Arg His Pro Glu Leu Ser Gln		
210	215	220
Asn Leu Arg Gln Ala Ser Glu Gln Asn Glu Cys Gln Tyr Val Asn Leu		
225	230	235
Gln Leu His Thr Trp Ser Leu Arg Glu Glu Pro Val Leu Pro Ser Gln		
245	250	255
Val Glu Val Val Glu Tyr Ser Thr Leu Ala Leu Pro Gln Glu Glu Leu		
260	265	270
His Tyr Ser Ser Val Ala Phe Asn Ser Gln Arg Gln Asp Ser His Ala		
275	280	285
Asn Gly Asp Ser Leu His Gln Pro Gln Asp Gln Lys Ala Glu Tyr Ser		
290	295	300
Glu Ile Gln Lys Pro Arg Lys Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Leu		
305	310	315

<210> 7

<211> 923

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(740)

10

20

30

40

<400> 7

ccactcttgg cccatgatgtg ggcacaggtg acagcggagc tgaagaa atg att ccc 56
 Met Ile Pro
 1

aga gta ata aga ttg tgg ctg cct tca gct ctg ttc ctc tct cag gtc 104
 Arg Val Ile Arg Leu Trp Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu Ser Gln Val
 5 10 15

cca ggc tgt gtc cca ctg cat ggc ccc agc act atc aca ggc gct gtt 152
 Pro Gly Cys Val Pro Leu His Gly Pro Ser Thr Ile Thr Gly Ala Val
 20 25 30 35

ggg gaa tcg ctc agt gtg tca tgt caa tac gag gag aaa ttc aag act 200
 Gly Glu Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Tyr Glu Glu Lys Phe Lys Thr
 40 45 50

aag gac aaa ttc tgg tgc aga ggg tca ctg aag gta ctc tgt aaa gat 248
 Lys Asp Lys Phe Trp Cys Arg Gly Ser Leu Lys Val Leu Cys Lys Asp
 55 60 65

att gtc aag acc agc agc tca gaa gaa gtt agg aat ggc cga gtg acc 296
 Ile Val Lys Thr Ser Ser Ser Glu Glu Val Arg Asn Gly Arg Val Thr
 70 75 80

atc agg gac cat cca gac aac ctc acc ttc aca gtg acc tat gag agc 344
 Ile Arg Asp His Pro Asp Asn Leu Thr Phe Thr Val Thr Tyr Glu Ser
 85 90 95

10

20

30

40

ctc acc ctg gag gat gca gac acc tac atg tgt gcg gtg gat ata tca 392
 Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr Met Cys Ala Val Asp Ile Ser
 100 105 110 115

ctt ttt gat ggc tcc ttg ggg ttc gat aag tac ttc aag att gag ttg 440
 Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp Lys Tyr Phe Lys Ile Glu Leu
 120 125 130

10

tct gtg gtt cca agt gag gac cca gtt cca gtc aca ggt tcg agc ctt 488
 Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Val Pro Val Thr Gly Ser Ser Leu
 135 140 145

gag agt ggt aga gat atc ctg gaa tcc ccc aca tcc tca gtt ggg cac 536
 Glu Ser Gly Arg Asp Ile Leu Glu Ser Pro Thr Ser Ser Val Gly His
 150 155 160

20

act cat ccc agt gtg acc aca gat gac aca att cct gct ccc tgc cct 584
 Thr His Pro Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ile Pro Ala Pro Cys Pro
 165 170 175

cag cct cgg tct ctt cgg agc agc ctc tac ttc tgg gtc ctg gtg tct 632
 Gln Pro Arg Ser Leu Arg Ser Ser Leu Tyr Phe Trp Val Leu Val Ser
 180 185 190 195

30

ctg aag ttg ttc ctg ttc ctg agc atg ctt ggt gct gtc ctc tgg gtg 680
 Leu Lys Leu Phe Leu Phe Leu Ser Met Leu Gly Ala Val Leu Trp Val
 200 205 210

40

aac agg cct cag agg tgc tct ggg gga agc agc tct cgg ccc tgt tat 728

Asn Arg Pro Gln Arg Cys Ser Gly Gly Ser Ser Ser Arg Pro Cys Tyr
 215 220 225

gag aac cag tga agtctgttga catcaaggcc ctgtccctaa acacagctcc 780
 Glu Asn Gln
 230

10

tctggtagct gaggacagcc agtaaataca tatttcttga gaatgctctg agacttttag 840

aagattctct gtgggtgtatc aaacacataa atgaatttac caaataaata cctatatatt 900

taaatgaaaa aaaaaaaaaa aaa 923

<210> 8

20

<211> 230

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ile Pro Arg Val Ile Arg Leu Trp Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu

1 5 10 15

30

Ser Gln Val Pro Gly Cys Val Pro Leu His Gly Pro Ser Thr Ile Thr

20 25 30

Gly Ala Val Gly Glu Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Tyr Glu Glu Lys

35 40 45

Phe Lys Thr Lys Asp Lys Phe Trp Cys Arg Gly Ser Leu Lys Val Leu

50 55 60

Cys Lys Asp Ile Val Lys Thr Ser Ser Ser Glu Glu Val Arg Asn Gly

40

65 70 75 80

Arg Val Thr Ile Arg Asp His Pro Asp Asn Leu Thr Phe Thr Val Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asp Thr Tyr Met Cys Ala Val
 100 105 110
 Asp Ile Ser Leu Phe Asp Gly Ser Leu Gly Phe Asp Lys Tyr Phe Lys
 115 120 125
 Ile Glu Leu Ser Val Val Pro Ser Glu Asp Pro Val Pro Val Thr Gly
 130 135 140
 Ser Ser Leu Glu Ser Gly Arg Asp Ile Leu Glu Ser Pro Thr Ser Ser
 145 150 155 160
 Val Gly His Thr His Pro Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ile Pro Ala
 165 170 175
 Pro Cys Pro Gln Pro Arg Ser Leu Arg Ser Ser Leu Tyr Phe Trp Val
 180 185 190
 Leu Val Ser Leu Lys Leu Phe Leu Phe Leu Ser Met Leu Gly Ala Val
 195 200 205
 Leu Trp Val Asn Arg Pro Gln Arg Cys Ser Gly Gly Ser Ser Ser Arg
 210 215 220
 Pro Cys Tyr Glu Asn Gln
 225 230

10

20

30

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

40

<400> 9

aagctgatag gcatccagag c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

aaggagtcac aggtaaaggt c

21

20

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

30

<400> 11

tcgagccttg agagtggtag ac

22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

〈400〉 12

aggagctgtg tttagggaca g

21

10

〈210〉 13

〈211〉 19

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

20

〈400〉 13

gctgggtgaaa aggacctct

19

〈210〉 14

〈211〉 20

〈212〉 DNA

30

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

〈400〉 14

cacaggacta gaacacctgc

20

40

【 0 1 1 1 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号 9 : 合成 DNA

配列番号 10 : 合成 DNA

配列番号 11 : 合成 DNA

配列番号 12 : 合成 DNA

配列番号 13 : 合成 DNA

配列番号 14 : 合成 DNA

【 図面の簡単な説明 】

50

【図 1】図 1 A は、本発明の免疫受容体タンパク質 M A I R - I a、M A I R - I b、M A I R - I I a、M A I R - I I b のアミノ酸配列の比較を示す。

図 1 B は、M A I R - I 及び M A I R - I I タンパク質の模式図を示す。

図 1 C は、ゲノム M A I R - I 及び M A I R - I I のサザンブロット分析を示す。

【図 2】図 2 A は、F l a g タグ化 M A I R - I 又は M A I R - I I を発現する B W 5 1 4 7 細胞を溶解し、タンパク質を還元下又は非還元条件下で抗 - F l a g m A b で免疫ブロットした結果を示す。

図 2 B は、F l a g タグ化 M A I R - I を発現する B W 5 1 4 7 細胞又は親 B W 5 1 4 7 細胞を溶解し、タンパク質を抗 - F l a g m A b と免疫沈降させ、沈殿物を N - グリコシダーゼ F で処理又は処理せず、非還元下、抗 - F l a g m A b で免疫ブロットした結果を示す。 10

【図 3】図 3 A、図 3 B は M A I R - I 及び M A I R - I I 転写物の発現をノーザンブロット法によって分析した結果を示す。

【図 4】図 4 A は形質転換細胞（B W 5 1 4 7 細胞）における M A I R - I 又は M A I R - I I の細胞膜表面発現を抗 - M A I R - I （T X - 8 m A b）又は抗 - M A I R - I I （T X - 1 3 m A b）を用いて分析した結果を示す。図 4 B、C、D はマウス由来の脾臓、骨髓、又は腹腔マクロファージにおける M A I R - I 又は M A I R - I I の細胞膜表面発現を抗 M A I R - I （T X - 8 m A b）又は抗 - M A I R - I I （T X - 1 3 m A b）を用いて分析した結果を示す。図 4 E は、B 細胞を L P S の存在下又は不存在 20
下で培養後、M A I R - I 又は M A I R - I I の細胞膜表面発現を抗 - M A I R - I （T X - 8 m A b）又は抗 - M A I R - I I （T X - 1 3 m A b）で分析した結果を示す。

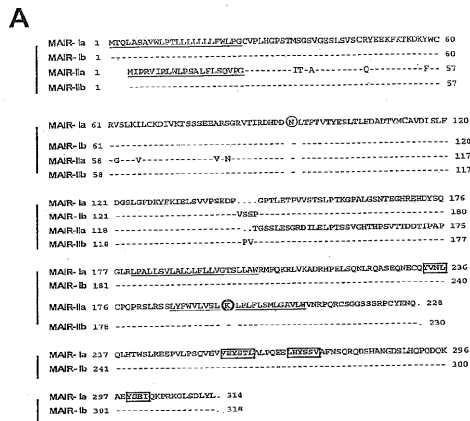
【図 5】図 5 A は、腹腔マクロファージ上の M A I R - I を抗 - M A I R - I m A b （T X - 8）で架橋し、4℃又は 37℃にてインキュベーション後、フローサイトメトリーで分析した結果を示す。図 5 B は、M A I R - I 発現細胞を抗 - M A I R - I m A b （T X - 8）で架橋し、37℃でインキュベーションする前後において共焦点レーザー顕微鏡下で分析した結果を示す。

【図 6】図 6 A は、骨髓由来マスト細胞を過バナジン酸塩で刺激後、コントロール I g G 又は抗 - M A I R - I で免疫沈降し、免疫沈降物を抗 - ホスホチロシン m A b （抗 - p Y）でイムノブロットした結果を示す。図 6 B は、骨髓由来マスト細胞を過バナジン酸塩で 30
刺激後、コントロール I g G、抗 - M A I R - I、抗 - S H P - I、抗 - S H P - I I、又は抗 - S H I P で免疫沈降し、免疫沈降物を抗 - M A I R - I でイムノブロットした結果を示す。図 6 C は M A I R - I と抗 - M A I R - I m A b の架橋後における骨髓由来マスト細胞からの I g E - 媒介セロトニン放出アッセイの結果を示す。

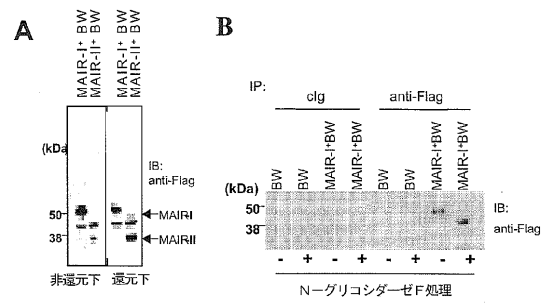
【図 7】図 7 A は、M A I R - I I + D A P 1 2、又は M A I R - I I + F c ε R I で形質転換した細胞（293T）をコントロール I g G、抗 - D A P 1 2、抗 - F c ε R I で免疫沈降し、免疫沈降物を抗 - M A I R - I I （T X - 10）でイムノブロットした結果を示す。図 7 B は、M A I R - I I で形質転換した細胞（RAW）をコントロール I g G、抗 - D A P 1 2、又は抗 - F c ε R I で免疫沈降し、免疫沈降物を抗 - M A I R - I I （T X - 10）でイムノブロットした結果を示す。図 7 C は脾臓細胞をコントロール I g G、抗 - D A P 1 2、又は抗 - F c ε R I で免疫沈降し、免疫沈降物を抗 - M A I R - I I （T X - 10）でイムノブロットした結果を示す。図 7 D は、293T 細胞を F l a g タグ化 D A P 1 2、M A I R - I I、又は F l a g タグ化 D A P 1 2 + M A I R - I で形質転換し、ビオチン結合抗 - M A I R - I I 及び F I T C - 結合抗 - F l a g m A b、続いて A P C - 結合ストレプトアビジンで染色後、M A I R - I I 及び D A P 1 2 の細胞表面発現をフローサイトメトリーによって分析した結果を示す。 40

【図 8】図 8（左の図）は、F l a g タグ化 M A I R - I I 遺伝子を導入した形質転換体を抗 - F l a g 抗体で架橋した後の T N F - α 生産を示す。図 8（右の図）は、腹腔マクロファージ上の M A I R - I I 分子を抗 - M A I R - I I 抗体で架橋した後の T N F - α の生産を示す。

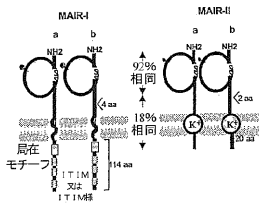
【図 1】



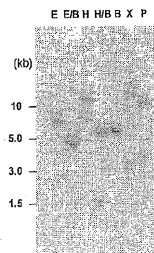
【図 2】



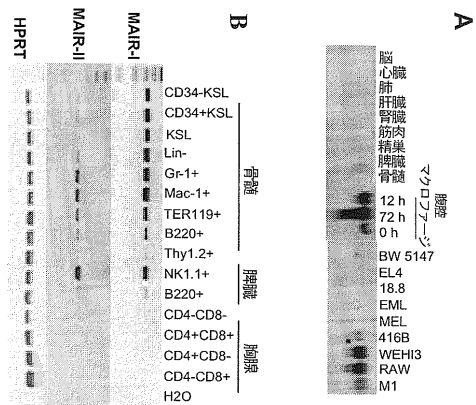
B



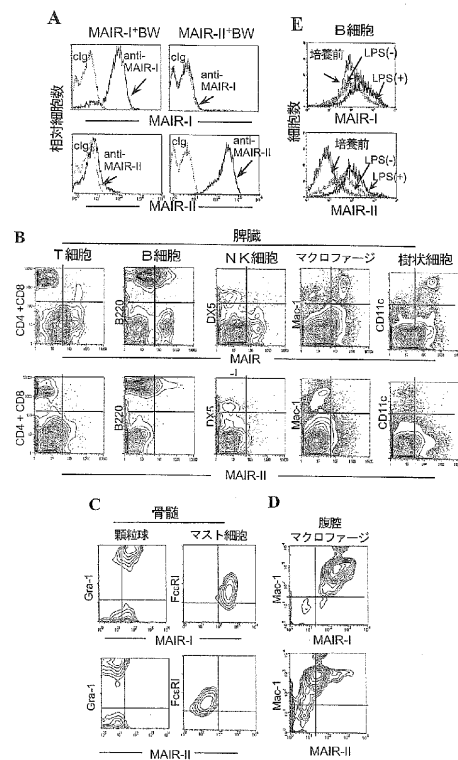
C



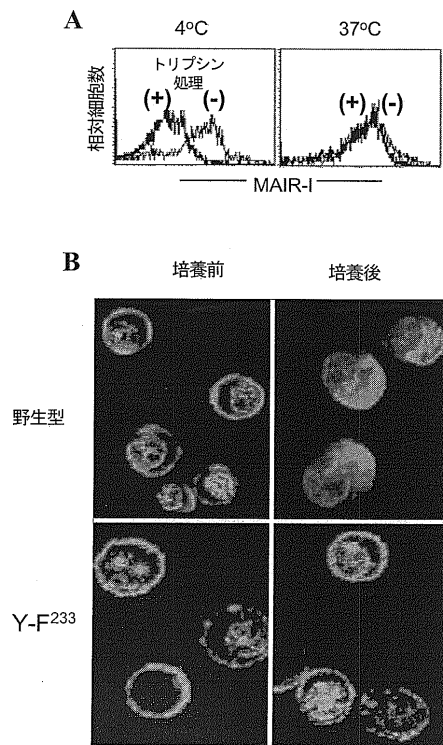
【図 3】



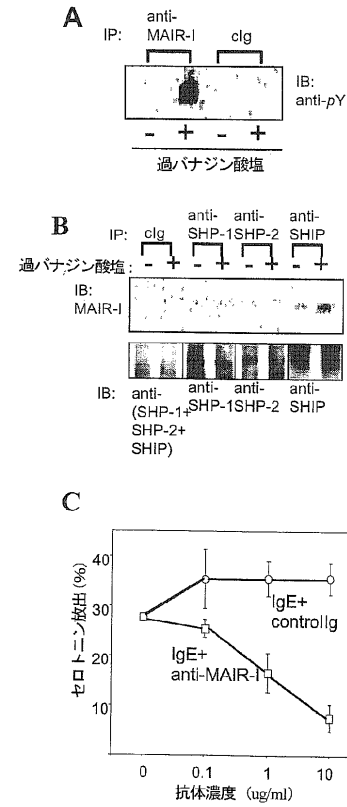
【図 4】



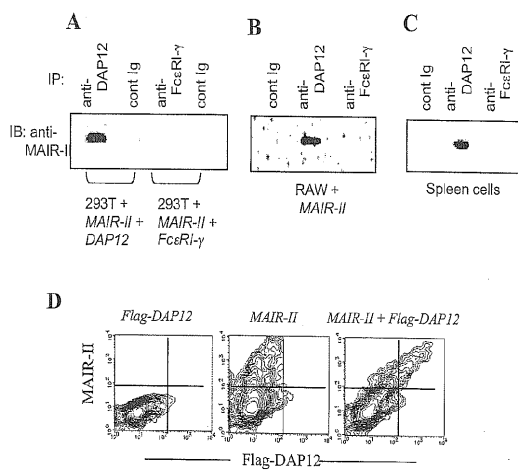
【図 5】



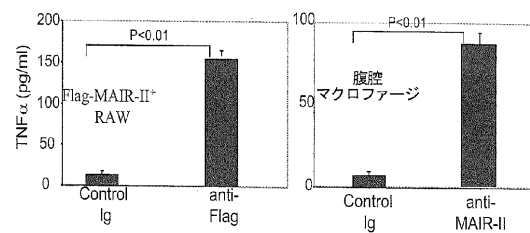
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 11/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

Fターム(参考)	4B024	AA01	AA11	BA63	CA04	CA06	DA02	DA05	DA06	DA11	DA12
	EA04	GA11	HA12								
	4B064	AG20	CA02	CA05	CA06	CA10	CA19	CC24	DA01	DA13	
	4B065	AA01X	AA57X	AA72X	AA90X	AA90Y	AB01	BA02	CA24	CA44	CA46
	4C084	AA02	AA03	AA07	AA13	AA17	BA01	BA08	BA22	BA23	CA23
		NA14	ZA022	ZA332	ZA342	ZA552	ZA592	ZA892	ZA942	ZA962	ZB052
		ZB072	ZB082	ZB092	ZB132	ZB152	ZB212	ZB262	ZB272	ZC352	
	4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA33	ZA34	ZA55
		ZA59	ZA89	ZA94	ZA96	ZB05	ZB07	ZB08	ZB09	ZB13	ZB15
		ZB21	ZB26	ZB27	ZC35						
	4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA53	CA40	DA50	DA75	EA22
		EA50	FA72	FA74							