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

特許第4117904号
(P4117904)

(45)発行日　平成20年7月16日(2008.7.16)　(24)登録日　平成20年5月2日(2008.5.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705	
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A

請求項の数 16　(全 25 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平9-530477
(86)(22)出願日　平成9年2月28日(1997.2.28)
(65)公表番号　特表2000-505301(P2000-505301A)
(43)公表日　平成12年5月9日(2000.5.9)
(86)国際出願番号　PCT/BE1997/000023
(87)国際公開番号　WO1997/032019
(87)国際公開日　平成9年9月4日(1997.9.4)
審査請求日　平成15年7月28日(2003.7.28)
(31)優先権主張番号　96870021.1
(32)優先日　平成8年3月1日(1996.3.1)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　96870102.9
(32)優先日　平成8年8月6日(1996.8.6)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

微生物の受託番号　BCCM　LMBP1657CB

(73)特許権者　501011129
エーロスクレーン　エッス．アー．
ベルギー　ベ－１１６０　ブリュッセル，
ルット　ドゥ　レンニク　８０２
(74)代理人　100066267
弁理士　白浜　吉治
(72)発明者　サムソン　ミシェル
フランス，エフ―９４２５０　ジェンティ
リ，リュ　ビクトール　マルキーニ　１１
(72)発明者　パルメンティール　マルク
ベルギー，ベ―１６０４　リンケベーク，
シャウセー　ドゥクレ　３０４
(72)発明者　バッサルト　フィルベルト
ベルギー，ベ―１２００　ブリュッセル，
アフェニュ　ランボイ，１３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｃ－Ｃ　ＣＫＲ－５，ＣＣ－ケモカインレセプタ、その誘導体及びこれらの利用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

図１に示す配列識別番号ＮＯ．３のアミノ酸配列を有することを特徴とするペプチド。

【請求項２】

請求の範囲第１項に記載のペプチドをコードすることを特徴とする核酸分子。

【請求項３】

ｃＤＮＡ分子またはゲノムＤＮＡ分子であることを特徴とする請求の範囲第２項に記載の核酸分子。

【請求項４】

請求の範囲第２項または第３項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項５】

細胞内発現用であって、請求の範囲第２項または第３項に記載の核酸分子と結合することによってそれらの発現を可能にする、前記細胞における核酸分子の発現に必要な調節因子を含むことを特徴とする請求の範囲第４項に記載のベクター。

【請求項６】

細胞を、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞から成るグループから選択したことを特徴とする請求の範囲第５項に記載のベクター。

【請求項７】

プラスミドまたはウィルスであることを特徴とする請求の範囲第４項から第６項のいずれか１項に記載のベクター。

【請求項８】
バキュロウィルス、アデノウィルス及びセムリキ森林熱ウィルスから成るグループから選択されるウィルスであることを特徴とする請求の範囲第７項に記載のベクター。
【請求項９】
ｐｃＤＮＡ３プラスミドであることを特徴とする請求の範囲第７項に記載のベクター。
【請求項１０】
請求の範囲第４項から第９項までのいずれか１項に記載のベクターを含む細胞。
【請求項１１】
哺乳類細胞であることを特徴とする請求の範囲第１０項に記載の細胞。
【請求項１２】
図１に示す配列識別番号ＮＯ．３の核酸配列と特異的にハイブリッド形成できる少なくとも１５ヌクレオチドの核酸分子を含むことを特徴とする核酸プローブ。
【請求項１３】
ＨＩＶ－１及び／またはＨＩＶ－２ウィルスに対する素因または耐性を有する患者を識別する方法において、患者からの生物学的サンプルが、請求の範囲第１項に記載のペプチドを発現する細胞または請求の範囲第２項または第３項に記載の核酸分子を有する細胞を含むかどうかを識別し、前記患者がＨＩＶ－１及び／またはＨＩＶ－２ウィルスに対する素因または耐性を有するかどうかを識別するステップを含むことを特徴とする前記方法。
【請求項１４】
請求の範囲第１項に記載のペプチドをコードするｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在を検出することによって前記ペプチドの発現を検出するステップを含み、細胞から全ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡを得、得られたｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡをハイブリッド形成条件下で請求の範囲第１２項に記載の核酸プローブと接触させ、プローブとハイブリッド形成したｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在を検出し、それによって細胞によるペプチドの発現を検出することを特徴とする請求の範囲第１３項に記載の方法。
【請求項１５】
請求の範囲第１項に記載のペプチドをコードするｍＲＮＡの存在を検出することによって前記ペプチドの発現を検出するステップを含み、細胞から全ｍＲＮＡを得、前記ｍＲＮＡを増幅するかまたは前記ｍＲＮＡのｃＤＮＡを作成して前記ｃＤＮＡを増幅し、可能なら増幅されたｍＲＮＡまたはｃＤＮＡを検出し、それによって細胞によるペプチドの発現を検出することを特徴とする請求の範囲第１３項に記載の方法。
【請求項１６】
請求の範囲第１項に記載の精製ペプチドの製法において、以下のステップを含むことを特徴とする前記製法：
（ａ）細胞を、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞から成るグループから選択し、前記ペプチドをコードする核酸分子の発現に必要な調節因子を含む細胞内発現用ベクターを構築する；
（ｂ）ステップ（ａ）のベクターを好適な宿主細胞に挿入する；
（ｃ）レセプタの発現を可能にする条件下で、ステップ（ｂ）の細胞をインキュベートする；
（ｄ）得られたペプチドを回収する；
（ｅ）回収されたペプチドを精製する。
【発明の詳細な説明】
本発明の分野
本発明は、新規のペプチドと前記ペプチドをコードする核酸分子、前記核酸分子から成るベクター、前記ベクターによって形質転換される細胞、前記ペプチドまたは前記核酸分子に対する阻害物質、前記生成物を含む製剤組成物及び診断及び／または投薬装置、及び本発明のペプチドまたは前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するヒト以外のトランスジェニック動物に係わる。
本発明は、リガンド結合の確定、発現の検出、特に前記ペプチドと結合する薬剤のスクリ

ーニング、及び本発明のペプチドまたは核酸分子を利用する治療の方法をも提供する。

技術的背景及び公知技術

走化性のサイトカインまたはケモカインは、最初の２つの保存システインの相対位置に応じて２の亜科（ＣＣ－及びＣＸＣ－ケモカイン）に分けることができる小さいシグナルタンパクである。インターロイキン－８（ＩＬ－８）は、この種のプロテインのうち最も良く知られたものであるが、多数のケモカイン、即ち、正常Ｔ細胞が発現分泌すると調節される物質（Ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ Ｎｏｒｍａｌ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ａｎｄ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ，ＲＡＮＴＥＳ：ランテス）、単球化学誘引性タンパク１（Ｍｏｎｏｃｙｔｅ Ｃｈｅｍｏａｔｔｒａｃｔａｎｔ Ｐｒｏｔｃｉｎ １，ＭＣＰ－１）、単球化学誘引牲タンパク２（ＭＣＰ－２）、単球化学誘引性タンパク３（ＭＣＰ－３）、成長関連遺伝子産物α（Ｇｒｏｗｔｈ－Ｒｅｌａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｐｒｏｄｕｃｔ α，ＧＲＯα）、成長関連遺伝子産物β（ＧＲＯβ）、成長関連遺伝子産物γ（ＧＲＯγ）、マクロファージ炎症タンパク１α（Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ Ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｐｒｏｔｅｉｎ １ α，ＭＩＰ－１α）、マクロファージ炎症タンパク１β（ＭＩＰ－１β）などが報告されている［４］。ケモカインは、特定の白血球サブセットを誘引し、シミュレートすることにより、急性及び慢性炎症発生の生理学やこれらの炎症の病理学的調節障害に基本的な役割を果す［３２］。例えば、ＲＡＮＴＥＳは単球、メモリーＴ細胞、好酸球に対して親和力を有し、好塩基性細胞によってヒスタミンを遊離させる。動脈硬化性障害の状態にある平滑筋細胞から放出されるＭＣＰ－１はマクロファージ誘引の、従って、障害の悪化を惹き起こす因子（または因子の１つ）と考えられる［４］。

ＭＩＰ－１α，ＭＩＰ－１β及びＲＡＮＴＥＳケモカインは、ＣＤ８＋Ｔ細胞によって生産される重要なＨＩＶ抑制因子として最近報告された［９］。ヒトの骨髄形成細胞増殖の調節にはＣＣ－ケモカインも関与する［６，７］。

ＣＣ－及びＣＸＣ－ケモカインの作用がＧタンパク結合レセプタの亜科によって仲介されることが、最近の研究で立証された。ケモカインの機能は多く、生物学的活性リガンドの数は増える一方であるにも拘らず、ヒトに関しては、現在までに６つの機能レセプタが同定されているに過ぎない。インターロイキン－８（ＩＬ－８）に関しては、２つのレセプタが報告されている［２０，２９］。その１つ（ＩＬ－８ＲＡ）は特異的にＩＬ－８と結合し、他の１つ（ＩＬ－８ＲＢ）はＩＬ－８のほか、ＧＲＯのような他のＣＸＣ－ケモカインと結合する。ＣＣ－ケモカインと結合するレセプタのうち、ＣＣ－ケモカインレセプタ１（ＣＣＲ１）と呼ばれるレセプタは、ＲＡＮＴＥＳともＭＩＰ－１αとも結合し［３１］、ＣＣ－ケモカインレセプタ２（ＣＣＲ２）は、ＭＩＰ－１及びＭＣＰ－３と結合する［８，４４，１５］。最近、さらに２つのＣＣ－ケモカインレセプタがクローニングされた：ＣＣ－ケモカインレセプタ３（ＣＣＲ３）は、ＲＡＮＴＥＳ，ＭＩＰ－１α及びＭＩＰ－１βによって活性化されることが判明した［１０］；ＣＣ－ケモカインレセプタ４（ＣＣＲ４）は、ＭＩＰ－１，ＲＡＮＴＥＳ及びＭＣＰ－１に応答する［３７］。これら６つの機能レセプタに加えて、構造的にはＣＣ－またはＣＸＣ－ケモカインレセプタと関連する多数のオーファンレセプタがヒト及びその他の種からクローニングされている。例えば、ヒトＢＬＲ１［１３］，ＥＢＩ１［５］，ＬＣＲ１［２１］，マウスＭＩＰ－１ＲＬ１及びＭＩＰ－１ ＲＬ２［１７］及びウシＰＰＲ１［２５］などである。ただし、これらオーファンレセプタのリガンド及び機能は、現時点では解明されていない。

発明の概要

本発明は、配列識別番号Ｎｏ．３で表わされるアミノ酸配列との間に８０％以上の、好ましくは９０％以上の同一性を示す、少なくとも１つのアミノ酸配列を有するペプチドに係わる。

本発明は、配列識別番号Ｎｏ．２のアミノ酸配列、またはその一部分（図１）で表わされるアミノ酸配列にも係わる。

“アミノ酸配列の一部分”とは、本発明の完全ペプチドと同じまたはそれ以上の結合性能を有する１つまたは２つ以上のアミノ酸セグメントを意味する。前記部分としては、前記

ペプチドの例えば既知“ナチュラルリガンド”、または前記リガンドのアゴニストまたは類似体、またはペプチドに対する前記リガンドのアンタゴニスト、ペプチドと前記リガンドとの結合を競合的に阻害することができる阻害剤と特異的に結合するエピトープが考えられる。
アミノ酸配列の前記部分及びその製法の具体例は、参考のため本願明細書に引用したＲｕｃｋｅｒ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ．の論文（Ｃｅｌｌ，ｖｏｌ．８７，ｐｐ４３７－４４６（１９９６））に記述されている。
本発明では、本発明のペプチドの前記アミノ酸配列の前記部分がＮ－末端セグメント及びペプチドの第１細胞外ループを含む。
従って、本発明では、配列識別番号Ｎｏ．１で表わされるアミノ酸配列は配列識別番号Ｎｏ．２及びＮｏ．３の共通アミノ酸配列である（図１）。従って、前記アミノ酸配列の第１の用途は、前記アミノ酸配列間の相同性識別、上記アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする種々の突然変異体のスクリーニング及び以下に述べる障害に対する疾病素質または耐性を示す患者タイプの識別である。
本発明のペプチドは、活性ＣＣ－ケモカインレセプタであることが好ましい。
本発明のＣＣ－ケモカインレセプタは、１０ｎｍまたはそれ以下の濃度のＭＩＰ－１βケモカインによって刺激されることが好ましく、ＭＩＰ－１αまたはＲＡＮＴＥＳケモカインによっても刺激されることが好ましい。ただし、前記ケモカインレセプタは、ＭＣＰ－１，ＭＣＰ－２，ＭＣＰ－３，ＩＬ－８及びＧＲＯαケモカインによって刺激されることはない。
また、本発明のペプチドまたはその一部分は、ＨＩＶウィルスまたは前記ＨＩＶウィルスの一部分のレセプタでもある。
“ＨＩＶウィルス”とは、ＨＩＶ－１またはＨＩＶ－２のほか、エイズの発生に関与するすべてのＨＩＶウィルス株を意味する。“ＨＩＶウィルスの一部分”という場合、前記レセプタと特異的に相互作用できる前記ウィルスのエピトープを意味する。本発明のペプチドとの相互作用に関与できるウィルスの前記部分には、ＥＮＶ及びＧＡＧウィルス遺伝子によってコードされるペプチドも含まれる。
好ましくは、ＨＩＶウィルスの前記部分は、グリコペプチドｇｐ１２０／１６０（膜結合ｇｐ１６０またはｇｐ１６０から誘導される遊離ｇｐ）またはその一部である。
“グリコペプチドｇｐ１２０／１６０の一部”という場合、エピトープ、好ましくは、本発明のペプチドと特異的に相互作用できる前記グリコペプチドの免疫優性エピトープ、例えば、Ｖ３ループ（第３超可変領域）を意味する。
本発明の他の実施例では、本発明のペプチドが不活性ＣＣ－ケモカインレセプタである。このような不活性ＣＣ－ケモカインレセプタの１例は、配列識別番号Ｎｏ．２で表わされるアミノ酸配列によってコードされる。
“不活性ＣＣ－ケモカインレセプタ”とは、既知のＣＣ－ケモカイン、特にＭＩＰ－１β，ＭＩＰ－１αまたはＲＡＮＴＥＳケモカインによって刺激されないレセプタである。
本発明の配列識別番号Ｎｏ．３のペプチドは、ＨＩＶウィルスまたは前記ＨＩＶウィルスの一部のレセプタではない不活性レセプタであり、このことは前記不活性レセプタが、前記不活性レセプタを表面に有する細胞への前誕ＨＩＶウィルスの侵入を許さないことを意味する。
本発明のペプチドは、ヒトレセプタであることが好ましい。
本発明は、図１に示す配列識別番号Ｎｏ．３の核酸配列の１つと８０％以上の、好ましくは９０％以上の同一性を有する核酸分子にも係わる。
好ましくは、前記核酸分子は、少なくとも図１に示す配列識別番号Ｎｏ．１，Ｎｏ．２またはＮｏ．３の核酸配列またはその一部分を有する。
“前記核酸分子の一部分”という場合、前記核酸分子またはその相補的な鎖の検出及び／または再構成に使用できる１５個以上のヌクレオチドから成る核酸配列を意味する。この部分としては、例えば、ＰＣＲ，ＬＣＲ，ＮＡＳＢＡまたはＣＰＲ技術を応用する遺伝子増幅において使用できるプローブまたはプライマーを挙げることができる。

本発明は特に、本発明のペプチドをコードする核酸分子に係わる。
前記核酸分子は、ＲＮＡまたはＤＮＡ分子、例えばｃＤＮＡ分子またはゲノムＤＮＡ分子である。
本発明は、本発明の核酸分子から成るベクターにも係わる。好ましくは、前記ベクターは、細胞中に発現することができ、本発明の核酸配列と結合する前記細胞中にアミノ酸分子を発現させるのに必要な調節因子を含む。
好ましくは、前記細胞を細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞から成るグループから選択する。本発明のベクターは、プラスミド、好ましくはｐｃＤＮＡ３プラスミド、またはウィルス、好ましくは、バキュロウィルス、アデノウィルスまたはセムリキ森林熱ウィルスである。
本発明は、本発明のベクターによって形質転換された細胞、好ましくは哺乳類細胞、例えばＣＨＯ－Ｋ１またはＨＥＫ２９３細胞にも係わる。好ましくは、前記細胞は、非ニューロン系であり、ＣＨＯ－Ｋ１，ＨＥＫ２９３，ＢＨＫ２１，ＣＯＳ－７細胞から成るグループから選択する。
本発明はまた、本発明のベクター及び前記細胞内での機能的応答を促進するタンパクをコードする他のベクターによって形質転換された細胞（好ましくはＣＨＯ－Ｋ１細胞のような哺乳類細胞）にも係わる。前記タンパクは、Ｇα１５またはＧα１６（Ｇ：タンパク、α：サブユニット）であることが好ましい。前記細胞はＣＨＯ－Ｋ１－ｐＥＦＩＮ　ｈＣＣＲ５－１／１６細胞であることが好ましい。
本発明はまた、本発明の核酸分子と特異的にハイブリッド形成できる少なくとも１５個のヌクレオチドから成る核酸分子を含む核酸プローブにも係わる。前記核酸プローブとして、ＤＮＡまたはＲＮＡを使用することができる。
本発明は、本発明のペプチドをコードするｍＲＮＡ分子と特異的にハイブリッド形成することによって前記ｍＲＮＡ分子の翻訳を阻止できる配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、または本発明のペプチドをコードするｃＤＮＡ分子と特異的にハイブリッド形成できる配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドにも係わる。
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドの化学的類似体、またはｍＲＮＡを不活性化する物質を含む。
本発明は、ＭＩＰ－１β，ＭＩＰ－１α，ＲＡＮＴＥＳケモカイン，ＨＩＶウィルス及び前記ＨＩＶウィルスの一部から成るグループから選択された、既知“ナチュラルリガンド”以外のリガンドまたはアンチリガンド（好ましくは抗体）にも係わり、前記リガンドは本発明のレセプタと結合でき、前記アンチリガンドは、前記既知“ナチュラルリガンド”または本発明のリガンドが本発明のペプチドと結合するのを（好ましくは競合的に）阻害できる。
公知のケモカイン、ＨＩＶウィルスまたはその部分の除外は、例えば遺伝子工学によって得られる、前記ウィルス及びその部分と本発明のペプチドとの相互作用をまねる前記“ナチュラル”ウィルスまたは前記“ナチュラル”部分の変異型を除外するものではない。
前記抗体は、好ましくは本発明のペプチドを発現する細胞の表面に存在する前記ペプチドのエピトープに向けられたモノクローナル抗体であることが好ましい。
前記抗体は、ハイプリドーマ細胞ＡｃｈＣＣＲ５－ＳＡＢ１Ａ７によって生産されることが好ましい。
本発明は、（哺乳類細胞の表面に存在するナチュラルペプチドからＨＩＶウィルスを誘引して前記哺乳類細胞がＨＩＶウィルスに感染するのを阻止するのに）有効量の本発明のペプチド、または有効量の上記リガンド及び／またはアンチリガンド、または細胞膜を通過して細胞内で本発明のペプチドをコードするｍＲＮＡと特異的に結合して前記ペプチドの活性を低下させ、その翻訳を阻止できるのに有効な量の本発明のオリゴヌクレオチドを含む製剤組成物にも係わる。この製剤組成物は、製剤上妥当なキャリヤ、好ましくは前記細胞膜を通過できるキャリヤをも含む。
前記製剤組成物において、オリゴヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードしているｍＲＮＡを不活性化する、例えば、リボザイムのような物質と結合していることが好ましい

。
製剤上妥当なキャリヤは、細胞上のレセプタと結合し、結合後、細胞によって吸収される構造から成ることが好ましい。前記製剤組成物中の前記製剤上妥当なキャリヤは、所与の細胞タイプに特異なレセプタと結合可能であることが好ましい。
本発明はまた、本発明のペプチドをコードする核酸分子を過剰発現（または異所発現）するヒト以外のトランスジェニック哺乳類にも係わる。
本発明はまた、本発明のナチュラルペプチドの相同組換えノックアウトから成るヒト以外のトランスジェニック哺乳類にも係わる。
本発明の好ましい実施例では、本発明のペプチドをコードするｍＲＮＡと相補関係にあって、前記ペプチドをコードするｍＲＮＡとハイブリッド形成することによってその翻訳を軽減するアンチセンスｍＲＮＡへ転写されるように本発明の核酸と相補関係に配置されたアンチセンス核酸をゲノム中に含むヒト以外のトランスジェニック哺乳類にも係わる。本発明のヒト以外のトランスジェニック哺乳類は、本発明のペプチドをコードする核酸分子を含むとともに、誘導プロモーターまたは組織特異調節因子をも含むことが好ましい。
ヒト以外のトランスジェニック哺乳類は、マウスであることが好ましい。
本発明は、リガンドが本発明のペプチドと特異的に結合可能であるかどうかを判定する方法において、前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを移入された細胞を、リガンドと前記ペプチドとの結合を可能にする条件下で前記リガンドと接触させ、前記ペプチドと特異的に結合した前記リガンドの存在を検出することによって、リガンドが前記ペプチドと特異的に結合するかどうかを判定するステップから成ることを特徴とする前記方法に係わる。
本発明はまた、リガンドが本発明のペプチドと特異的に結合可能であるかどうかを判定する方法において、前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを移入された細胞から細胞抽出物を調製し、細胞抽出物から膜部分を分離し、前記ペプチドとリガンドとの結合を可能にする条件下で、リガンドを膜部分と接触させ、前記ペプチドと結合しているリガンドの存在を検出することにより、化合物が前記ペプチドと特異的に結合可能であるかどうかを判定するステップから成ることを特徴とする前記方法に係わる。
本発明は、リガンドが本発明のペプチドのアゴニストであるかどうかを判定する方法において、前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを移入された細胞を、細胞からの機能的レセプタ応答を可能にする条件下でリガンドと接触させ、第二メッセンジャー濃度（好ましくはカルシウムイオンまたはＩＰ３のようなリン酸イノシトール）の変化、または細胞代謝（好ましくは培地の酸性化率に基づいて測定）の変化などのような生物学的定量法によってペプチド活性の増大を検出して、リガンドがペプチドのアゴニストであるかどうかを判定するステップから成ることを特徴とする前記方法にも係わる。
本発明は、リガンドが本発明のペプチドのアゴニストであるかどうかを判定する方法において、前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを移入された細胞から細胞抽出物を調製し、細胞抽出物から膜部分を分離し、官能ペプチド応答の活性化を可能にする条件下で膜部分をリガンドと接触させ、第二メッセンジャー（好ましくはＩＰ３のようなリン酸イノシトール）生成の変化のような生物学的定量法によってペプチド活性の増大を検出することで、リガンドがペプチドのアゴニストであるかどうかを判定するステップから成ることを特徴とする前記方法にも係わる。
本発明は、リガンドが本発明のペプチドのアンタゴニストであるかどうかを判定する方法において、前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを移入された細胞を、官能ペプチド応答の活性化を可能にする条件下で、既知ペプチドアゴニストの存在においてリガンドと接触させ、第二メッセンジャー（好ましくはカルシウムイオンまたはＩＰ３のようなリン酸イノシトール）の濃度変化、または細胞代謝（好ましくは培地の酸性化率に基づいて測定）の変化のような生物学的定量法によってペプチド活性の低下を検出することでリガンドがペプチドのアンタゴニストであるかどうかを判定するステップからなることを特徴とする前記方法にも係わる。
本発明は、リガンドが本発明のペプチドのアンタゴニストであるかどうかを判定する方法

において、前記ペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを移入された細胞から細胞抽出物を調製し、細胞抽出物から膜部分を分離し、官能ペプチド応答の活性化を可能にする条件下で、膜部分を既知ペプチドアゴニストの存在においてリガンドと接触させ、第二メッセンジャー生成の変化のような生物学的定量法によってペプチド活性の低下を検出することでリガンドがペプチドのアンタゴニストであるかどうかを判定するステップから成ることを特徴とする前記方法にも係わる。
第二メッセンジャー定量法は、カルシウムイオンまたはＩＰ３のようなリン酸イノシトールの測定であることが好ましい。
前記方法に使用する細胞は、ＣＨＯ－Ｋ１，ＨＥＫ２９３，ＢＨＫ２１，ＣＯＳ－７細胞のような非ニューロン系の哺乳類細胞であることが好ましい。
前記方法において、リガンドは既知リガンドではない。
本発明は、上記方法のいずれかによって分離され、検出されるリガンドにも係わる。
本発明は、本発明のペプチド活性を弱めるのに有効な量の前記ペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストと、製剤上妥当なキャリヤとから成る製剤組成物にも係わる。
“本発明のペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト”という場合、上記ペプチドの既知“ナチュラルリガンド”のあらゆるアゴニストまたはアンタゴニストを意味する。
従って、上記方法を、本発明のペプチドと特異的に結合する薬剤を同定するためのスクリーニングに利用することができる。
本発明は、上記方法のいずれかによって分離され、検出される薬剤にも係わる。
本発明は、前記薬剤及び製剤上妥当なキャリヤから成る製剤組成物にも係わる。
本発明は、ペプチドをコードしているｍＲＮＡの存在を検出することによって本発明のペプチドの発現を検出する方法において、細胞から全ＲＮＡまたは全ｍＲＮＡを得、得られたＲＮＡまたはｍＲＮＡを、ハイブリッド形成条件下で本発明の核酸プローブと接触させ、プローブとハイブリッド形成するｍＲＮＡの存在を検出することによって細胞によるペプチド発現を検出するステップから成ることを特徴とする前記方法にも係わる。
前記ハイブリッド形成条件は、緊縮条件である。
本発明は、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、喘息、特発性肺線維症及び乾せん症のような炎症、ヒト免疫不全ウィルス１及び２（ＨＩＶ－１及びＨＩＶ－２）による感染のようなウィルス感染症、白血病のような癌、アテローム硬化症及び／または自己免疫症から成るグループから選択された疾病の治療及び／または予防を目的とする本発明の製剤組成物の利用にも係わる。
本発明はまた、本発明のペプチドの活性及び／または被験体内に存在するＨＩＶウィルスのような感染要因に関連する障害に対する疾病素質または耐性を診断する方法にも係わる。この方法は：
ａ）被験体の細胞から前記ペプチドをコードする核酸分子を得、
ｂ）好ましくは、前記核酸分子を制限酵素群で制限消化し、
ｃ）好ましくは、得られた核酸フラグメントを、サイズドゲル上で電気泳動分離し、
ｄ）得られたゲルまたは核酸分子を、検出可能なマーカーを有し、かつ前記核酸分子と特異的にハイブリッド形成できる核酸プローブと接触させ、
ｅ）標識帯、または検出可能なマーカーで標識された前記核酸分子とハイブリッド形成することによってユニークな帯パターンまたは被験体に特異なｉｎ　ｓｉｔｕマーキングを形成するｉｎ　ｓｉｔｕ核酸分子を検出し、
ｆ）ステップａ）～ｅ）による診断のため、他の被検体の細胞から得られた前記ペプチドをコードする他の核酸分子を調製し、
ｇ）障害のある被験体についてステップｃ）において得られた核酸分子にユニークな帯パターンを、ステップｆ）において診断のために得られた核酸分子の帯パターンと比較することにより、それぞれのパターンが同じであるか異なるかを判定し、この判定に基づいて障害に対して疾病素質であるか耐性であるかを診断するステップから成る。
本発明は、本発明のペプチドの特異対立遺伝子の活性または細胞表面上における前記ペプチドの存在に関連し、及び／または被験体中に存在するＨＩＶウィルスのような感染要因

に関連する障害に対する疾病素質または耐性を診断する方法にも係わる。この方法は：
ａ）被験体から、抗原を有する細胞を含む体液、好ましくは血液の試料を得、
ｂ）前記試料に、本発明のリガンド及び／またはアンチリガンドを加え、
ｃ）前記リガンド及び／または前記アンチリガンドと特異ペプチドとの間の交差反応を検出し、
ｄ）ペプチドがレセプタまたは不活性レセプタに対応するかどうかを判定することにより、被験体の体液中に存在するペプチドのタイプに応じて、障害に対する疾病素質または耐性を診断する
ステップから成る。
本発明は、ペプチド、核酸分子、核酸プローブ、リガンド及び／またはアンチリガンド、その部分（例えば、プライマー、プローブ、エピトープ、…）またはこれらの混合物から成り、必要に応じて検出可能なマーカーで標識されている診断及び／または投薬装置、好ましくはキットにも係わる。
前記診断及び／または投薬装置は、フィルタ、固形支持体、溶液、“サンドイッチ”、ゲル、ドットブロットハイブリッド形成、ノーザンブロットハイブリッド形成、サザーンブロットハイブリッド形成、同位体または非同位体標識化（例えば、免疫蛍光法またはビオチン化法）、低温プローブ技術、遺伝子増幅、符にＰＣＲ，ＬＣＲ，ＮＡＳＢＡまたはＣＰＲ，二重免疫拡散法、逆免疫電気泳動法、血球凝集及び／またはこれらの方法の組合わせを使用するｉｎ ｓｉｔｕハイブリッド形成、ハイブリッド形成、または標識特異抗体、符に商品名ＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ，酵素結合イムノソルベント検定法）または商品名ＲＩＡ（Ｒａｄｉｏ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，放射線免疫検定法）による認識から成るグループから選択された方法によって抗原、抗体または核酸配列を検出及び／または投与するための反応体をも含む。
本発明は、本発明のペプチドを製造する方法において、
ａ）好ましくは、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞から成るグループから選択した細胞中に、前記ペプチドをコードする核酸分子と結合して前記ペプチドの発現を可能にするのに必要な調節因子を含み、前記細胞中に発現するベクターを構成し、
ｂ）ステップａ）で得たベクターを適当な宿主細胞に挿入し、
ｃ）本発明のペプチドの発現を可能にする条件下で、ステップｂ）の細胞をインキュベートし、
ｄ）得られたペプチドを回収し、
ｅ）好ましくは、回収されたペプチドを精製するステップから成ることを特徴とする前記方法にも係わる。
微生物ＡｃｈＣＣＲ５－ＳＡＢ１Ａ７及びＣＨＯ－Ｋ１－ｐＥＦＩＮ ｈＣＣＲ５－１／１６の寄託は、ブタペスト条約に従い、ベルギー，ベ－９０００，ヘント，ケイ．エル．レーデハンクストラート，ウニフェルシタイト ヘント，ラボラトリウム ホール モレクレーレ バイオロフィー（エルエムベーペー），ザ ベルジャム コオーディネイティド コレクション オブマイクロ－オーガニズムズ（ビーシーシーエム）（ｔｈｅ Ｂｅｌｇｉｕｍ Ｃｏｏｒｄｉｎａｔｅｄ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｒｏ－ｏｒｇａｎｉｓｍ（ＢＣＣＭ），Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｕｍ ｖｏｏｒ Ｍｏｌｅｃｕｌａｉｒｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｅ（ＬＭＢＰ），Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅｉｔ Ｇｅｎｔ，Ｋ．Ｌ．Ｌｅｄｅｇａｎｃｋｓｔｒａａｔ３５，Ｂ－９０００ＧＥＮＴ，ＢＥＬＧＩＵＭ）においてなされた。

【図面の簡単な説明】

図１は、本発明のペプチドの基本的な構造を示す。
図２は、ヒトのＣＣＲ１，ＣＣＲ２ｂ，ＣＣＲ３及びＣＣＲ４レセプタのアミノ酸配列と整列する本発明の活性ヒトＣＣＲ５ケモカインレセプタのアミノ酸配列を示す。活性ＣＣＲ５配列と同じアミノ酸をボックスで囲んである。
図３は、ヒトのＣＣＲ２及びＣＣＲ５ケモカインレセプタ遺伝子の染色体体制を示す。
図４は、ＣＨＯ－Ｋ１細胞系におけるヒト活性ＣＣＲ５レセプタの機能的発現を示す。

図５は、ヒト造血細胞における、ＣＣＲ５レセプタをコードするｍＲＮＡの分布を示す。
図６は、ヒトＣＣＲ５レセプタからの突然変異体の構造を示す。
図７は、ルシフェラーゼ定量法によるＥＮＶタンパク仲介融合の定量を示す。
図８は、ＰＣＲ、及びＣＥＰII科中のＣＣＲ５対立遺伝子分離による個体の遺伝子型の特定を示す。
図９は、本発明のＣＣＲ５－ＣＨＯ細胞系における血清アンチＣＣＲ５のＦＡＣＳ分析を示す。
図１０は、アンチＣＣＲ５抗体によるＨＩＶ感染の阻害を示す。

発明の詳細な説明

１．実験

材料

ＭＣＰ－１，ＭＩＰ－１α，ＭＩＰ－１β，ＲＡＮＴＥＳ，ＩＬ－８及びＧＲＯαを含む組換えヒトケモカインをＲ＆Ｄシステム社（Ｌｏｎｄｏｎ，ＵＫ）から入手した。［^{125}Ｉ］ＭＩＰ－１α（比活性、２２００Ｃｉ／ｍｍｏｌ）をデュポン（Ｄｕｐｏｎｔ）ＮＥＮ祉（Ｂｒｕｓｓｅｌｓ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）から入手した。Ｒ＆Ｄシステム社から入手したケモカインは、同社からのデータによれば、その純度がＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ｓｏｄｉｕｍ ｄｏｄｅｃｙｌ ｓｕｌｐｈａｔｅ－ｐｏｌｙａｃｒｙｌａｍｉｄｅ ｇｅｌ ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ，ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）の結果、９７％以上であり、各リガンドに特異な生物学的定量法の結果、生物学的に活性であるとのことであった。凍結乾燥したケモカインを無菌リン酸塩緩衝食塩水（ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－ｂｕｒｒｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ，ＰＢＳ）に溶かして１００μｇ／ｍｌ溶液を調製し、アリクオットに分けて－２０℃で貯蔵した。使用直前に、ケモカインを有効濃度にまで希釈した。この実験に使用された細胞系は、すべてＡＴＣＣ社（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ，ＵＳＡ）から入手した。

クローニング及び配列決定

すでに報告されているように［２４，３４］、ゲノムＤＮＡを鋳型に利用して、低緊縮ポリメラーゼ連鎖反応により、マウスＭＯＰ０２０クローンを得た。λＤＡＳＨベクター中に構成したヒトゲノムＤＮＡライブラリー（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）をＭＯＰ０２０（５１１ｂｐ）プローブによって低緊縮［３９］でスクリーニングした。正クローンを等質性に精製し、サザーンブロッティングによって分析した。遺伝子座の制限地図を確定し、関連のＸｂａＩフラグメント４，４００ｂｐをｐブルースクリプトＳＫ＋（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）中でサブクローニングした。Ｍ１３ｍｐ誘導体中でのサブクローニングのあと、蛍光プライマー及び自動ＤＮＡシーケンサー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ３７０Ａ）を使用して双方の鎖について配列決定した。ＤＮＡＳＩＳ／ＰＲＯＳＩＳソフトウェア（日立）及びＧＣＧソフトウェアパッケージ（ＧｅｎｅｔｉｃｓＣｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）を使用して配列処理及びデータ分析を実施した。

細胞系における発現

ＢａｍＨＩ及びＸｂａＩ認識配列をそれぞれ含むプライマーを使用して、全コード領域をＰＣＲによって１０５６ｂｐフラグメントとして増幅し、真核発現ベクターｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）の対応部位に制限したのち、クローニングした。得られた構造を、文献［３５］に記述されているように、配列決定し、ＣＨＯ－Ｋ１細胞へ移入することによって立証した。移入の２日後に、４００μｇ／ｍｌのＧ４１８（Ｇｉｂｃｏ）を添加することによって、安定的に移入が行われた細胞系を選択し、１０日目に耐性クローンを分離した。文献［３５，１１］に記述されているように、Ｈａｍ’ｓ Ｆ１２培地を使用してＣＨＯ－Ｋ１細胞を培養した。種々の細胞クローンにおける活性ＣＣＲ５レセプタの発現を、（後述する）細胞から調製した金ＲＮＡに対するノーザンブロッティングによる比転写レベルの測定によって評価した。

結合測定法

安定的に移入された、活性ＣＣＲ５レセプタを発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞を、１ｍＭ Ｅ

ＤＴＡを加えたリン酸塩緩衝食塩水中でインキュベートすることによって密集成長させ、培養皿から分離させた。低速遠心分離によって細胞を回収し、ノイバイエル・セルでカウントした。結合測定は、０．２％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）及び１０６個の細胞を含有する最終容積２００μｌのＰＢＳが入ったポリエチレン製ミニソープ・チューブ（Ｎｕｎｃ）中で、［^{125}Ｉ］－ＭＩＰ－１αの存在において実施された。１０ｎＭの無標識ＭＩＰ－１αを添加しても、特異な結合は観察されなかった。標識リガンドの濃度は、０．４ｎＭ（約１０００００ｃｐｍ／チューブ）であった。インキュベーションを４℃で２時間続け、４ｍｌの氷冷緩衝液を急激に添加することによって停止させ、あらかじめ０．５％ポリエチレンイミン（Ｓｉｇｍａ）に浸漬したＧＦ／Ｂグラスファイバーフィルタ（Ｗｈａｔｍａｎｎ）で真空濾過することによって細胞を一気に回収した。フィルタを４ｍｌ氷冷緩衝液で３回洗浄し、γカウンタでカウントした。

生物学的活性

ｐｃＤＮＡ３／ＣＣＲ５構造を安定的に移入されたＣＨＯ－Ｋ１細胞系または（対象として使用される）野性型ＣＨＯ－Ｋ１細胞をＴｒａｎｓｗｅｌｌ細胞カプセル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）の膜上で、Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２培地中に２．５×10_5個細胞／ウェルの密度で平板培養した。翌日、カプセルをマイクロフィジオメーター（Ｃｙｔｏｓｅｎｓｏｒ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）に移し、０．２％ＢＳＡを含有する１ｍＭリン酸塩緩衝液（ｐＨ７．４）ＲＰＭＩ－１６４０培地を灌流することによって、約２時間にわたって細胞を平衡させた。次いで、同じ培地で希釈した種々のケモカインを約２分間にわたって細胞に作用させた。１分間ごとに酸性化率を測定した。

ノーザンブロッティング

移入ＣＨＯ－Ｋ１細胞系、ヒト造血細胞系及びイヌ組織から、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して全ＲＮＡを分離した。グリオキサルの存在において［２６］ＲＮＡ試料（１０μｇ／レーン）を変性させ、１％アガロースゲルを含有する１０ｍＭリン酸塩緩衝液（ｐＨ７．０）で分面し、文献［４２］に記述されているようにナイロン膜（Ｐａｌｌ　Ｂｉｏｄｙｎｅ　Ａ，Ｇｌｅｎ　Ｃｏｖｅ，ＮＹ）に移した。ベーキング処理したのち、下記成分から成る４２℃の溶液中で４時間にわたってブロットを前ハイブリッド形成させた。前記溶液は、５０％ホルムアミド、５×デンハート溶液（１×デンハート：０．０２％フィコール、０．０２％ポリビニルピロリドン、０．０２％ＢＳＡ）、５×ＳＳＰＥ（１×ＳＳＰＥ：０．１８Ｍ ＮａＣｌ，１０ｍＭリン酸ナトリウム，１ｍＭ ＥＤＴＡ　ｐＨ８．３）、０．３％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）及びヘリングテストからの２５０μｇ／ｍｌ変性ＤＮＡから成る。ＤＮＡプローブをランダムプライミング［１４］によって（α32ｐ）－標識した。前ハイブリッド形成は、１０％（ｗｔ／ｖｏｌ）硫酸デキストラン及び熱変性プローブを含有する同じ溶液中において、４２℃で１２時間わたって行われた。フィルタを０．１×ＳＳＣ（１×ＳＳＣ：１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，１５ｍＭクエン酸ナトリウム　ｐＨ７．０）、６０℃の０．１％ＳＤＳで洗浄し、Ａｍｅｒｓｈａｍβ－マックスフィルムを使用して－７０℃でオートラジオグラフィー観察をした。

２．結果及び検討

クローニング及び構造分析

Ｇタンパク共役レセプタをコードする遺伝子は配列の相同性がその特徴であるから、低緊縮ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によってこの遺伝子ファミリーの新しいメンバーのクローニングができた［２４，３４］。マウスのゲノムＤＮＡから増幅されたクローンの１つであるＭＯＰ０２０は、特徴的なケモカインレセプタという点で強い類似性を示し、ＭＣＰ－１レセプタ（ＣＣＲ２）とは８０％［８］、ＭＩＰ－１α／ＲＡＮＴＥＳレセプタ（ＣＣＲ１）と６５％［３１］，ＩＬ－８レセプタとは５１％［２０，３０］の同一性を分け合った。クローンをプローブとして使用することによって、ヒトゲノムライブラリーをスクリーニングした。合計１６個のλファージクローンを分離した。各クローンの制限パターン及び部分配列データから、すべてのクローンが、２つのコーディング配列を含む単一の整列群に属することが推測された。コーディング配列の１つはＣＣＲ２レセプタをコードすると報告されている［８，４４］ｃＤＮＡと全く同じであった。ハイブリッド形

成の第２領域を含む代表的なクローンの４．４００ｐｂ ＸｂａＩフラグメントをｐブルースクリプトＳＫ＋中でサブクローニングした。配列決定の結果、ＣＣＲ５と仮称される新規遺伝子が発見された。この遺伝子は、ＭＯＰ０２０プローブと８４％の同一性を共有し、ＭＯＰ０２０がＣＣＲ５と同じ遺伝子座を占めるマウスの遺伝子であることを示唆した。ＭＯＰ０２０は、最近クローニングされた３つのマウスケモカインレセプタ遺伝子のいずれにも対応せず［１６］、第４のマウスケモカインレセプタの存在を証明した。

ＣＣＲ５の配列は、４０，６００Ｄａのタンパクをコードする３５２コドンの単一読取枠を明らかにした。提案されている開始コドンを囲む配列は、Ｋｏｚａｋ［２２］が記述しているようなコンセンサスと一致する。なぜなら、－３におけるヌクレオチドがプリンだからである。推定されるアミノ酸のハイドロパシープロフィルは、７個の貫膜セグメントの存在と一致する。ＣＣＲ５アミノ酸配列と他の機能的に特徴のあるヒトＣＣ－ケモカインレセプタの配列との整列を図２に示す。ＣＣＲ２レセプタ［８］との類似性が最も高く、７５．８％の全く同じ残基を共有する。ＣＣＲ１レセプタ［３１］とは５６．３％の、ＣＣＲ３［１０］とは５８．４％の、ＣＣＲ４［３７］とは４９．１％の同じ残基を共有する。従って、ＣＣＲ５は、ＣＣ－ケモカインレセプタ群の新規メンバーである［３０］。関連のＣＣＲ１及びＩＬ－８レセプタ［２０，２９，３１，１６］と同様に、ＣＣＲ５のコーディング領域にはイントロンが存在しないと考えられる。発明者の部分的配列決定データによれば、ＣＣＲ２遺伝子も、そのコーディング領域の最初の２／３にはイントロンが含まれていない。

ケモカインレセプタファミリー内での配列類似性は、貫膜域及び細胞内ループにおいて比較的高い。例えば、貫膜セグメントだけに限って云えば、ＣＣＲ５とＣＣＲ２との一致率は９２％である。これに反して、Ｎ－末端細胞外領域及び細胞外ループにおいては類似性が比較的低い。ＩＬ－８及びＣＣＲ２レセプタのＮ－末端域は、リガンドとの相互作用に重要な役割を果すことが報告されている［１９，１８］。ＣＣ－ケモカインレセプタは、種類に応じてこの領域が異なり、このことがファミリーの種々のリガンドに対して特異性を示す原因であると考えられる。

Ｎ－結合グリコシル化が行われる単一の部位が、ＣＣＲ５の第３細胞外ループに発見された（図１）。多くのＧタンパク共役レセプタがグリコシル化するレセプタのＮ－末端域にはグリコシル化部位は発見されなかった。他のケモカインレセプタＣＣＲ１及びＣＣＲ２は、このようなＮ－結合グリコシル化部位をそれぞれのＮ－末端域に示す［３１，８］。これとは対照的に、ＣＣＲ３レセプタ［１０］は、Ｎ－末端域にも細胞外ループにもグリコシル化部位を持たない。活性ＣＣＲ５レセプタは、その細胞外セグメントに４個のシステインを有し、４個はすべて他のＣＣ－及びＣＸＣ－ケモカインレセプタ中に保持される（図２）。第１及び第２細胞外ループに位置するシステインは、Ｇタンパク共役レセプタの大部分に存在し、レセプタ構造のジスルフィド架橋を形成すると考えられる［４１］。他の２個のシステイン、即ち、Ｎ－末端ゼグメントと第３細胞外ループに位置するシステインも同様にケモカインレセプタファミリーに特異な架橋を形成すると考えられる。ＣＣＲ５の細胞内領域は、タンパクキナーゼＣ（ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ Ｃ，ＰＫＣ）またはタンパクキナーゼＡによるリン酸化の部位を含まない。異種脱感作に関与するＰＫＣ部位は多くの場合、Ｇタンパク結合レセプタの第３細胞内ループ及びＣ－末端に存在する。ＣＣＲ１にもＰＫＣ部位は存在しない。これに反して、ＣＣ－ケモカインレセプタは、例外なくＣ－末端域にセリン及びトレオニン残基を豊富に含む。これらの残基は、Ｇタンパク共役レセプタキナーゼのファミリーによるリン酸化部位であり、相同的脱感作に関与すると考えられる［４１］。これらのＳ／Ｔ残基のうちの５個は、５つのレセプタのすべてにおいて完全に整列する（図２）。

ＣＣＲ５及びＣＣＲ２遺伝子の物理的リンケージ

上述したように、ＭＯＰ０２０プローブで分離された１６個のクローンは、ＣＣＲ５及びＣＣＲ２遺伝子を含む単一の整列群に対応した。ヒトゲノムにおける２つのレセプタ遺伝子の物理的リンケージを解明するため、この整列群の構成を検討した。制限地図、サザーンブロッティング、フラグメントのサブクローニング及び部分的配列決定を組合わせるこ

とによって、すべてのクローンのそれぞれの境界及びオーバーラップを検出することができた。１６個のクローンのうち、９個は特異な制限地図が特徴的であり、図３に示すような構成を有することが判明した。４個のクローン（＃１１，１８，２１，２２）はＣＣＲ２遺伝子だけを含み、４個のクローン（＃７，１３，１５，１６）はＣｈｅｍｉＲ１３遺伝子たけを含み、１個のクローン（＃９）は両コード配列の一部を含む。ＣＣＲ２及びＣＣＲ５遺伝子は縦列構成であり、ＣＣＲ５がＣＣＲ２の下流側に位置する。ＣＣＲ２及びＣＣＲ５読取り枠間の間隔は、１７．５ｋｂである。縦列の染色体位置は、今のところ明らかではない。ただし、ヒトゲノムには他のケモカインレセプタが位置検出されている、即ち、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成により、ヒト染色体３のｐ２１領域にＣＣＲ１遺伝子が検出された［１６］。２個のＩＬ－８レセプタ遺伝子及びその偽遺伝子が、ヒト２ｑ３４－ｑ３５領域に密集していることが判明した［１］。

活性ＣＣＲ５レセプタの機能発現及び薬理学

活性ＣＣＲ５レセプタを発現する安定ＣＨＯ－Ｋ１細胞系を樹立し、ノーザンブロッティングによるＣＣＲ５転写レベル測定値に基づいてスクリーニングした。３個のクローンを選出し、種々のＣＣ－及びＣＸＣ－ケモカインをポテンシャルアゴニストとして使用することによって、マイクロフィジオメーターでの生理学的応答をテストした。観察される応答が移入レセプタに特異であって、内在レセプタの活性化に起因しないようにするため、野性型ＣＨＯ－Ｋ１細胞を対照として使用した。マイクロフィジオメーターを使用すれば、細胞内カスケードの刺激に起因する細胞代謝の変化を測定することによって、レセプタ活性化をリアルタイムで検出することかできる［３３］。ケモカインレセプタの分野におけるマイクロフィジオメーターの有効性は、すでにいくつかの研究で立証されている。ＣＣ－ケモカインに応答するヒト単球の代謝活性変化が、このシステムを利用してモニターされた［４３］。ＭＣＰ－１及びＭＣＰ－３に応答するＴＨＰ－１細胞（ヒト単球細胞系）の酸性化率変化も同様に測定されている［３６］。この方法を利用する両タンパクのＥＣ30評価値は、他の研究［８，１５］において細胞内カルシウムのモニターで得られた値と一致した。

ＣＣ－及びＣＸＣ－ケモカイン分類に属するリガンドをＣＣＲ５移入ＣＨＯ－Ｋ１細胞でテストした。ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β及びＲＡＮＴＥＳは、新規レセプタのポテンシャル活性化因子であることが判明したが、ＣＣ－ケモカインであるＭＣＰ－１，ＭＣＰ－２，ＭＣＰ－３と、ＣＸＣ－ケモカインであるＧＲＯα及びＩＬ－８は、最高テスト濃度（３０ｎＭ）においても代謝活性に全く影響を示さなかった。ＣＣＲ５が応答しないケモカインの１つ（ＩＬ－８）の生物学的活性は、ＩＬ－８Ａインターロイキンレセプタを移入されたＣＨＯ－Ｋ１細胞系で立証することができた（Ｍｏｌｌｅｒｅａｕ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）：即ち、ＩＬ－８はマイクロフィジオメーターによる測定結果として１６０％の代謝活性増大を示した。Ｊ．Ｖａｎ　Ｄａｍｍｅによって提供されたＭＣＰ－２及びＭＣＰ－３試料の生物学的活性は、種々の文献で取上げられている［２，４０］。ＭＩＰ－１α，ＭＩＰ－１β及びＲＡＮＴＥＳを、野性型ＣＨＯ－Ｋ１細胞を使用して３０ｎＭ濃度でテストしたが、代謝応答を示したものは皆無であった。ＣＣＲ５移入ＣＨＯ－Ｋ１細胞系では、これら３つの活性リガンド（ＭＩＰ－１α，ＭＩＰ－１β及びＲＡＮＴＥＳ）は、いずれもリガンド灌流後２または３分間までに酸性化率を最大値まで急上昇させた。酸性化率は１０分間以内に基本値にまで戻った。細胞応答のタイミングは、ヒト単球の自然レセプタに対するケモカインに関して観察されたタイミングと同様である［４３］。同じ細胞に繰返しアゴニストを加えると、応答は最初の刺激よりも著しく弱くなり、レセプタの脱感作を示唆した。従って、測定値はすべて各カプセルの最初の刺激に基づいて得られた。

３つの活性リガンドに関して０．３～３０ｎＭの範囲で濃度と効果の関係を評価した（図３Ｂ及び３Ｃ）。効力の順位は、ＭＩＰ－１α＞ＭＩＰ－１β＝ＲＡＮＴＥＳであった。３０ｎＭの濃度では、ＭＩＰ－１αの効果は飽和レベル（ベースラインレベルの１５６％）となるのに対して、ＭＩＰ－１β及びＲＡＮＴＥＳは未だ上昇の余地を残した。しかし、これ以上高濃度のケモカインは使用できない。ＭＩＰ－１αに関して、約３ｎＭでＥＣ

５０を測定した。マイクロフィジオメーターによる測定に基づく生物学的応答を得るのに必要な濃度は、ＣＣＲ１［３１］，ＣＣＲ２ＡとＣＣＲ２Ｂ［８］、及びＣＣＲ３［１０］レセプタに関して細胞内カルシウム代謝に基づいて測定される濃度範囲と同じであった。ＣＣＲ５のリガンド特異性は、ＣＣＲ３に関して報告されているリガンド特異性と類似している［１０］。ＣＣＲ３は、ＭＩＰ－１βに応答する最初にクローニングされたレセプタとして説明した。しかし、１０ｎＭのＭＩＰ－１βは、ＣＣＲ５に対して顕著な効果を示すものの、同じ濃度でもＣＣＲ３移入細胞には効果４を示さない［１０］。これらのデータは、ＣＣＲ５がＭＩＰ－１βに対する生理学的レセプタであろうことを示唆している。

［^{125}Ｉ］－ヒトＭＩＰ－１αをリガンドとして使用する結合実験では、放射性リガンドの濃度を０．４ｎＭ、移入細胞数を１０００００００個／チューブとした場合でも、ＣＨＯ－Ｋ１細胞を発現するＣＣＲ５３との特異結合を立証することができなかった。結合データが得られなかったのは、レセプタのＭＩＰ－１αに対する比較的低い親和性によるのであろう。

ノーザンブロッティング分析

イヌの組織に対して行われたノーザンブロッティングでは、ＣＣＲ５転写を検出できなかった。ケモカインレセプタファミリーが炎症及び免疫反応に関与する各種細胞の親和及び活性化を仲介すると想定して、ヒト造血細胞系への特異な転写を検出するため、プローブを使用した（図５）。分析の対象とした前記ヒト細胞系は、リンパ芽球（Ｒａｊｉ）及びＴリンパ芽球（Ｊｕｒｋａｔ）細胞系、前骨髄芽球（ＫＧ－１Ａ）及び前骨髄球（ＨＬ－６０）細胞系、単球（ＴＨＰ－１）細胞系、赤白血病（ＨＥＬ９２．１．７）細胞系、巨核芽球（ＭＥＧ－１０）細胞系、及び骨髄性白血病（Ｋ－５６２）細胞系などであった。成熟単球及びリンパ球を含むヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）もテストされた。ＣＣＲ５転写（４．４ｋｂ）が検出されたのはＫＧ－１Ａ前骨髄芽球細胞系だけであり、前骨髄球細胞系ＨＬ－６０，ＰＢＭＣ，及び分析対象となったその他のどの細胞系でも検出されなかった。この結果に照らして、活性ＣＣＲ５レセプタは顆粒球系の前駆体中に発現できると考えられる。ＣＣ－ケモカインは、成熟顆粒球を刺激すると報告されている［２７，３８，２３，２］。しかし、最新のデータは、ＣＣ－及びＣＸＣ－ケモカインがマウス及びヒトの骨髄前駆細胞の増殖を調節することも立証している［６，７］。

ＣＣＲ５は、ＭＩＰ－１α，ＭＩＰ－１β及びＲＡＮＴＥＳに応答することが明らかになった。この３種のケモカインは、ＣＤ８＋Ｔ細胞によって生産される主要なＨＩＶ－抑制因子であり［９］、感染してはいないが、ひんぱんにＨＩＶウィルスと接触している個人からＣＤ４＋Ｔリンパ球によって大量に放出される［５１］。ＣＣＲ５は、マクロファージ親和（Ｍ－親和）ＨＩＶ－１の一次分離物及び株に対する主要なコレセプタである［４５，５０］。感染した個人の無症候段階ではＭ－親和株が優勢であり、ＨＩＶ－１の透過に関与すると考えられる。形質転換されたＴ－細胞系（Ｔ－親和株）中で成長する株は、コレセプタとしてＬＥＳＴＲ（またはｆｕｓｉｎ）を使用する［５０］。これもケモカインレセプタファミリに属するが、機能的に特徴のないオーファンレセプタである［２１，５２，５３］。感染の後期段階において過渡的形状を示す双方向親和ウィルス［５４］は、コレセプタとしてＣＣＲ５及びＬＥＳＴＲのほか、ＣＣ－ケモカインレセプタＣＣＲ２ｂ及びＣＣＲ３をも使用することが明らかになっている［４７］。双方向親和ウィルスが広範囲にわたるコレセプタを使用するということは、感染した個人の体内で、ウィルスが種々の細胞タイプに発現する多様なコレセプタを選択できることが進化の一因であることを示唆している。

不活性ΔＣＣＲ５レセプタの同定

繰返しＨＩＶ－１と接触しても、個人によっては感染しないままの場合があることは公知である［５５，５６，５１］。このように、接触しても感染しない個人のうちには、ウィルスと１回だけ接触し、汚染のリスクが比較的低かったことが原因の場合もあるが、真に耐性である個人も存在すると考えられている。事実、ウィルスに接触しながらも感染しない個人から分離されたＣＤ４＋リンパ球は、一次Ｍ－親和ＨＩＶ－１株による感染に対し

て高い耐性を示すが、Ｔ－親和ＨＩＶ－１株に対してはそのような高い耐性を示さない。また、種々のドナーからの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、どのＨＩＶ－１株でも感染しない［５７－５９］。Ｍ－親和ウィルスによる感染を仲介する融合にＣＣＲ５が重要な役割を果すと仮定すると、一部の個人が示すＨＩＶ－１感染に対する相対的または絶対的耐性には変異型のＣＣＲ５が関与し、感染患者の病状進行のばらつきにも関与するのではないかと考えられる［６６］。発明者らは、進行が遅い３名のＨＩＶ－１感染患者を選出し、４名の陰性の個人を対照として選出した。これらの被験者のＣＣＲ５の全コーディング領域をＰＣＲによって増幅し、配列決定した。予想に反して、進行の遅い患者の１名だけでなく、非感染の対象２名もＣＣＲ５遺伝子座に対立遺伝子多形性のための異型接合性を示した。ひんぱんに現われる対立遺伝子は、公知のＣＣＲ５配列と一致したが、小さい対立遺伝子は３２ｂｐの欠失を示し、その領域はレセプタの第２細胞外ループに相当する領域であった（図６）。図６は、ヒトＣＣ－ケモカインレセプタ５の突然変異形成の構造を示す。ａ）は非官能Δｃｃｒ５タンパクのアミノ酸配列を示す。貫膜構造は野性型ＣＣＲ５の予想される貫膜構造との類比によって与えられる。黒く塗りつぶして示すアミノ酸は欠失に起因するフレームシフトの結果としての不自然な残基に対応する。突然変異タンパクにはＣＣＲ５の最後の３つの貫膜セグメント、及びＧタンパク結合に関与する領域が欠けている。ｂ）は欠失傾城を囲むＣＣＲ５遺伝子のヌクレオチド配列と、正常なレセプタ（上段）または不完全な突然変異体（ｃｃｒ５，下段）への翻訳を示す。１０－ｂｐ直列反復をイタリックで示してある。ＣＣＲ５遺伝子の完全サイズコーディング領域を、５’－ＴＣＧＡＧＧＡＴＣＣＡＡＧＡＴＧＧＡＴＴＡＴＣＡＡＧＴ－３’及び５’－ＣＴＧＡＴＣＴＡＧＡＧＣＣＡＴＧＴＧＣＡＣＡＡＣＴＣＴ－３’をそれぞれ正及び逆プライマーとして使用するＰＣＲによって増幅した。同じオリゴヌクレオチドをプライマー及び内部プライマーとして、蛍光色素標識ジデオキシヌクレオチドをターミネータとして使用してＰＣＲ生成物をその双方の鎖について配列決定した。配列決定用産物をＡｐｐｌｉｅｄＢｉｏｓｙｓｔｅｍシーケンサーで分析し、コーディング配列に沿ってあいまいな位置を探した。直接配列決定から欠失の存在が疑われた場合には、ＢａｍＨＩ及びＸｂａＩエンドヌクレアーゼでｐｃＤＮＡ３に制限したのち、ＰＣＲ産物をクローンした。いくつかのクローンを配列決定することによって欠失を確認した。配列決定によって検査された３名の互いに血縁関係にない個人において、欠失は全く同じであった。

ＰＣＲ生成物のクローニングといくつかのクローンの配列決定によって欠矢が確認された。欠矢がフレームシフトの原因となり、このフレームシフトの結果として、翻訳の早過ぎる終結が起こると考えられる。従って、この突然変異対立遺伝子（Δｃｃｒ５）によってコードされるタンパクは、レセプタの最後の３つの貫膜セグメントを欠くことになる。欠失領域（図６ｂ）を両側から挟む１０－ｂｐ直列反復は、組換え事象を促進して欠失を発生させると考えられる。ケモカインレセプタを含む多様なＧタンパク結合レセプタに関して行われた多くの突然変異誘発の研究によって、このような不完全タンパクが、ケモカインによって誘発される信号導入に関与できないことが明らかになっている。即ち、不完全タンパクは、Ｇタンパク結合に重要な役割を果す２つの領域である第３細胞内ループとＣ－末端細胞質領域を欠いているからである［４１］。不完全タンパクがＨＩＶ－１コレセプタとして機能できるかどうかをテストするため、発明者らは一次Ｍ－親和及び双方向親和ウィルスＥＮＶタンパクによって膜融合を支持できるかどうかをテストした。ウズラＱＴ６細胞中に、組換えタンパクがヒトＣＤ４と一緒に発現した。次いで、ＱＴ６細胞を、上記ウィルスＥＮＶタンパクを発現するＨｅＬａ細胞と混合し、高感度の、かつ定量的な遺伝子レポーター測定法によって細胞間融合の範囲を測定した。野性型ＣＣＲ５とは対照的に、不完全レセプタはＭ－親和または双方向親和ウィルスからのＥＮＶタンパクを発現する細胞との融合を許さなかった（図７）。図７はルシフェラーゼ定量法によるＥＮＶタンパク仲介融合の測定結果を示す。細胞間融合事象を定量化するため、日本ウズラＱＴ６線維肉腫細胞に、野性型ＣＣＲ５、不完全ｃｃｒ５突然変異体、ＣＣＲ２ｂまたはダッフィケモカインレセプタに対応するコーディング配列を含むｐｃＤＮＡ３ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）またはｐｃＤＮＡ３ベクターだけを形質移入または同時形質移入した。

ターゲット細胞にはまた、ＣＭＶプロモーターから発現するヒトＣＤ４及びＴ７プロモーターの制御下のルシフェラーゼ遺伝子を移入した。ＨｅＬａエフェクタ細胞に、Ｔ７－ポリメラーゼ（ｖＴＦ１．１）及びＪＲ－ＦＬ（ｖＣＢ２８）または８９．６（ｖＢＤ３）エンベロープタンパクを発現するワクシニアベクターを感染させた（Ｍ０Ｉ＝１０）。細胞融合に起因するルシフェラーゼの活性は、野性型ＣＣＲ５について得られる活性％（相対光単位）で表わされる。形質移入は、必要に応じてｐｃＤＮＡ３をキャリヤとして使用し、同量のプラスミドＤＮＡで実施した。融合を開始させるため、ターゲット細胞とエフェクタ細胞を、シトシンアラビノシド（ａｒａ－Ｃ）及びリファンピシンの存在において、３７℃の温度で２４ウェル・プレート上で混合し、８時間にわたって融合させた。細胞を１５０μｌのレポーター溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ社）で溶解し、メーカー（Ｐｒｏｍｅｇａ）の指示に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。

ＣＣＲ５単独の場合と比較して、Δｃｃｒ５を野性型ＣＣＲ５と同時発現させた場合には、ＪＲ－ＦＬエンベロープについても８９．６エンベロープについても融合効率が低下した。このような試験管内抑制効果（対照として使用されたダッフィケモカインレセプタでは観察されない）が生体内でも起こるのかどうかは今のところ判明していない。ＣＣＲ５と最も密接な関係にあるＣＣ－ケモカインレセプタでありながらＭ－新和ＨＩＶ－１株［４８］による融合を促進しないＣＣＲ２ｂレセプタ［３１］と同時発現させた場合、ハイブリッド分子形成による突然変異は起こらなかった（図７）。

図８は、ＰＣＲ及びＣＥＰＨファミリーにおけるＣＣＲ５対立遺伝子分離による個人の遺伝子型特定を示す。ａ）は、ホモ接合体である野性型ＣＣＲ５対立遺伝子（ＣＣＲ５／ＣＣＲ５）、ヌルΔｃｃｒ５対立遺伝子（Δｃｃｒ５／Δｃｃｒ５）及びヘテロ接合体（ＣＣＲ５／ｃｃｒ５）に対するＰＣＲ増幅及びＥｃｏＲＩ切断の結果得られたパターンを示すオートラジオグラフィーである。双方の対立遺伝子に対しては、７３５ｂｐＰＣＲ産物をいずれも３３２ｂｐ帯に切断し、野性型及び突然変異体遺伝子に対しては４０３及び３７１ｂｐ帯にそれぞれ切断した。ｂ）は、ＣＥＰＨが被験対象とした２つのファミリーにおけるＣＣＲ５対立遺伝子分離の結果を示す。半分を黒く塗りつぶした記号と白抜きの記号とは、それぞれヘテロ接合体と野性型ホモ接合体とを示す。名家系中の数名については、ＤＮＡが得られなかった（ＮＤ：未鑑定）。５’－ＣＣＴＧＧＣＴＧＴＣＧＴＣＣＡＴＧＣＴＧ－３’、及び５’－ＣＴＧＡＴＣＴＡＧＡＧＣＣＡＴＧＴＧＣＡＣＡＡＣＴＣＴ－３’をそれぞれ正及び逆プライマーとして使用し、ゲノムＤＮＡ試料に対してＰＣＲｓを実施した。反応混合物は、３０μｌの１０ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．０）に５０ｍＭのＫＣｌ，０．７５ｍＭのＭｇＣｌ2，０．２ｍＭのｄＣＴＰ，ｄＧＴＰ及びｄＴＴＰ，０．１ｍＭのｄＡＴＰ，０．５μｉ［α－^{32}Ｐ］－ｄＡＴＰ，０．０１％ゼラチン、５％ＤＭＳＯ，２００ｎｇのターゲットＤＮＡ，６０ｎｇの各プライマー及び１．５ＵＴａｑポリメラーゼを混入した混合物であった。ＰＣＲ条件：９３℃で２分３０秒；９３℃で１分間；６０℃で１分間；７２℃で１分間、３０サイクル；７２℃で６分間。ＰＣＲ反応後、試料を１０Ｕ ＥｃｏＲＩと一緒に３７℃で６０分間インキュベートし、２μｌの変性した反応混合物を、３５％ホルムアミド及び５．６Ｍ尿素を含む変性剤としての５％ポリアクリルアミドゲルに加えた。次いで、オートラジオグラフィーによって帯を検出した。

最初の実験でテストされた１４個の染色体に基づいて、白色人種では欠失Δｃｃｒ５対立遺伝子が比較的ひんぱんに現れることが判明した。正確な頻度を算出するため、広範囲にわたる白色人種集団をテストした（図８ａ）が、この集団には、ＣＥＰＨ（Ｃｅｎｔｒｅ ｄ’Ｅｔｕｄｅ ｄｅｓ Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｅｓ Ｈｕｍａｉｎｓ：ヒトの多形現象研究センター）が被検対象としたファミリーのうち互いに血縁関係にないメンバー、ＩＲＩＢＨＮスタッフの一部及びブリュッセルのＥｒａｓｍｅ病院遺伝学部が採集した健常者からの匿名ＤＮＡ試料が含まれた。７００名以上の健常者から得られた結果として、対立遺伝子頻度が、野性型対立遺伝子については０．９０８、突然変異体対立遺伝子については０．０９２であることが判明した（表Ｉ）。この母集団で観察された遺伝子型頻度は、予想されたＨａｒｄｙ－Ｗｅｉｎｂｅｒｇ分布（ＣＣＲ５／ＣＣＲ５については０

．８２７：０．８２４；ＣＣＲ５／Δｃｃｒ５については０．１６２：０．１６７；Δｃｃｒ５／Δｃｃｒ５については０．０１１：０．００８，ｐ＞０．９９９）と大差は無く、ヌル対立遺伝子が適合性にさほど影響しないことを示唆している。２つのＣＥＰＨファミリーを利用することで、野性型ＣＣＲ５遺伝子とそのΔｃｃｒ５変異型とが対立遺伝子であり、メンデルの法則通りに分離することが判明した（図８ｂ）。興味深い所見として、中央アフリカ（Ｚａｉｒｅ，Ｂｕｒｋｉｎａ Ｆａｓｓｏ，Ｃａｍｅｒｏｕｎ，Ｓｅｎｅｇａｌ及びＢｅｎｉｎ）及び日本から採集された１２４個のＤＮＡ試料では、突然変異体対立遺伝子が全く発見されず、東洋人やアフリカの黒人にはこの対立遺伝子が全く存在しないか、極めて稀であることを示唆している（表Ｉ）。

健常な白色人種にＣＣＲ５のヌル対立遺伝子が存在することがＨＩＶ－１に感染し易いことと関連があると考えられた。予想されるように、もしＣＣＲ５が細胞への問題ウィルスの侵入に重要な（重複的でない）役割を果すとすれば、試験管内でも生体内でもΔｃｃｒ５／Δｃｃｒ５を持つ個人は、ＨＩＶ－１のチャレンジに対して特に耐性であるということになる。従って、Δｃｃｒ５／Δｃｃｒ５遺伝子型の頻度はＨＩＶ－１感染患者では極めて低く、接触しても感染しない個人において高い。また、もし白血球における官能レセプタの数が少ないか、または突然変異体対立遺伝子の優性阻害効果のため、ヘテロ接合体が統計的に有利であるとすれば、ＨＩＶ－感染集団ではヘテロ接合体（及び突然変異体対立遺伝子）の頻度は低いということになる。ブリュッセル、リエージュ及びパリの各種病院に属する多数の白人陽性患者（ｎ＝６４５）の遺伝子型を調べることによって、上記仮説を検討した（表Ｉ）。その結果、この集団では、ヌルΔｃｃｒ５対立遺伝子の頻度は著しく低く、０．０９２～０．０５３（$p<10^{-5}$）であった。ヘテロ接合体の頻度も０．１６２～０．１０６（ｐ＜０．００１）と低く、Δｃｃｒ５／Δｃｃｒ５の個人は皆無であった（ｐ＜０．０１）。

機能的データと統計的データは、ＣＣＲ５がＭ－親和ＨＩＶ－１株による自然感染の要因となる重要なコレセプタであることを示唆している。ヌルΔｃｃｒ５対立遺伝子ホモ接合性の個人（白色人種の約１％）は、感染に極めて強い耐性を持つと考えられる。現時点では、ＨＩＶ－１に対する耐性が絶対的なものか、相対的なものであるかは不明であり、耐性がウィルス汚染の態様に応じて変化するものかどうかも不明である。この点を解明するには、もっと多くの陽性患者をテストしなければならない。ヘテロ接合体には、目立たないが有意義な長所がある：ＨＩＶと接触する確率が等しいと仮定すると、表Ｉから明らかなように、野性型ＣＣＲ５対立遺伝子に対してホモ接合型の個人と比較して、ヘテロ接合型の個人では陽性に転ずる可能性は３９％低くなる。官能ＣＣＲ５レセプタ数の減少と、生体内でのΔｃｃｒ５の優性阻害効果とが、試験管内実験の結果（図７）に照らして相対的防御作用を裏付ける要因と考えることができる。ヒトにおける自然のノックアウトと考えられる突然変異体対立遺伝子は、ホモ接合型の個人において明確な表現型を伴なわない。しかし、明確な表現型の欠除は、ヘテロ接合型被験者を特徴づける相対的防御能力を併せ考えると、ＣＣＲ５を補助因子として利用するＨＩＶ－１の能力を選択的に阻止する医薬は、ＨＩＶ－１感染を予防するのに有効であり、ＣＣＲ５不活性化に起因する重大な副作用を伴なわないであろう。このような医薬は、他の細胞を感染させるためＨＩＶ一次分離体がコレセプタとして利用する他のケモカインレセプタを阻止する他の化合物と併用することができるであろう［４７］。白色人種におけるヌル対立遺伝子の高保有率は、ＨＩＶ（または同じコレセプタを利用する関連ウィルス）の流行が人類進化の過程でこのような高頻度で突然変異体ｃｃｒ５対立遺伝子を選択することによって安定に寄与して来たのかどうかという問題を提起する。

抗体アンチ－ＣＣＲ５の生産

遺伝子免疫法によって抗体を生産した。生後６週間の雌ｂａｌｂ／ｃマウスを使用した。ヒトＣＣＲ５レセプタをコードするＤＮＡを、ＣＭＶプロモーターの制御下に発現ベクターｐｃＤＮＡ３に押入し、前脛骨筋に１００μｇＤＮＡを注射し、５日後、この筋肉を（Ｎａｊａ Ｎｉｇｒｉｃｏｌｉｓの毒液から得た）心臓で前処理した。３週間隔で注射を２回繰返した。最後の注射から１５日後にそれぞれのマウスから採血し、アンチ－ＣＣＲ

５抗体の存在を検出するため血清をテストした。

蛍光活性化細胞選別装置（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓａｒｔｅｒ，ＦＡＣＳ）による血清テスト

ＣＣＲ５レセプタを発現する組換えＣＨＯ細胞を使用する蛍光活性化細胞選別によって血清をテストした。要約すれば、ＰＢＳ－ＥＤＴＡ－ＥＧＴＡ溶液を利用して細胞を脱離させ、１００，０００個細胞／試験管の割合で、５μｌの血清と一緒に、室温で３０分間、ＰＢＳ－ＢＳＡ培地中でインキュベーションした。次いで、細胞を洗浄し、フルオレセインで標識されたアンチマウス抗体と一緒に、氷中で３０分間インキュベートした。細胞を洗浄し、２００μｌのＰＢＳ－ＢＳＡ溶液中に移し、ＦＡＣＳ（ＦＡＣＳＣＡＮ，Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ社）によって蛍光を分析した。１０，０００個の細胞がカウントされた。対照として、ヒトＣＣＲ２ｂを発現する野性型ＣＨＯまたは組換えＣＨＯ細胞を使用した。

ＦＡＳＳ分析の際、最後の注射から２週間後（図９）、ＣＣＲ５ ｃＤＮＡで免疫化されたマウス血清はすべてＣＨＯ細胞上に発現した生来レセプタを認識し（蛍光の平均値＝２００）、ＣＣＲ２ｂを発現する制御細胞との目立った交差反応は観察されていなかった（蛍光の平均値＝２０）。

高レベルのＣＣＲ５レセプタ（黒く塗りつぶしたヒストグラム）を発現するＣＨＯ細胞系または負対照としてのＣＣＲ２ｂレセプタ（白抜きのヒストグラム）を発現するＣＨＯ細胞系について血清をテストした。それぞれの血清を個別にテストした。

抗体アンチ－ＣＣＲ５とＨＩＶの感染力

野性型ＣＣＲ５遺伝子ホモ接合型ドナーからの末梢血単球細胞（ＰＢＭＣ）を分離し、ＰＨＡの存在において３日間インキュベートした。

４日目に、８００μｌの細胞（10_5個の細胞／ｍｌ）を、ＣＣＲ５ ｃＤＮＡで免疫化したマウスから採取した８μｌの血清と一緒に、３７℃で３０分間インキュベートした。次いで１ｍｌのウィルス溶液（ＪＲＣＳＦ ＨＩＶ株）を加え、２時間にわたって、インキュベートした。次いで、細胞を２回洗浄し、１５日間インキュベートした。

０日目、４日目、７日目、１０日目及び１４日目に培地アリクオットで採取し、抗原ｐ２４を投与した。

実験開始から１４日後、１つの血清試料（血清ＢＯ）はｐ２４の生産を完全に阻害し、リンパ球がこのＨＩＶ株に感染するのを阻害できることを示した（図１０）。他の血清試料（血清Ａ２及びＢ１）もこの感染に対する部分的または全体的な効果を示した。その他の血清試料は、この感染に対して何らかの効果を示さなかった。

モノクローン抗体の生産

モノクローン抗体生産のため、最高位のＣＣＲ５抗体を有するマウスを選択し、ヒトＣＣＲ５レセプタを発現する10_7個の組換えＣＨＯ－Ｋ１細胞を静脈内注射した。３日後、マウスを殺し、注射部位に近いリンパ節からの細胞または脾臓細胞をＳＰ２／０骨髄腫細胞と融合させた。採用した融合プロトコールはＧａｌｆｒｅ ｅｔ ａｌ．のプロトコールであった（Ｎａｔｕｒｅ ２６６，５５０（１９９７））。ハイブリドーマを選択するため、選択的ＨＡＴ（ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ／ａｍｉｎｏｐｔｅｒｉｎ／ｔｈｙｍｉｄｉｎ，ハイポキサンチン／アミノプテリン／チミジン）を使用し、血清に対して実施したのと同様に、ヒトＣＣＲレセプタを発現する組換えＣＨＯ細胞を使用するＦＡＣＳによって上澄みをテストした。限界希釈によって正のハイブリドーマをクローニングした。ＦＡＣＳ分析の結果、正と判明したクローンはｂａｌｂ／Ｃマウスの腹水中で増殖し、生産される。

表1

Table 1

	血液陰性 Seronegative			血液陽性 Seropositive			Chi-squared χ^2 分布
	Number 個数	Frequency 頻度	Standard 標準 error 誤差	Number 個数	Frequency 頻度	Standard 標準 error 誤差	
Genotypes : 遺伝子型							2 degrees of freedom 2 自由度 17.7 $p < 0.0005$
CCR5/CCR5	582	0.827	0.014	645	0.892	0.012	
CCR5/Δ CCR5	114	0.162	0.014	78	0.108	0.012	
CCR5/Δ CCR5	0	0.011	0.004	0	0.000	< 0.001	
Total : 計	704	1.000		723	1.000		
Alleles : 対応遺伝子							1 degree of freedom 1 自由度 $p < 0.0005$
CCR5	1270	0.908	0.008	1368	0.946	0.006	
Δ CCR5	130	0.092	0.008	78	0.054	0.006	
Total : 計	1400	1.000		1446	1.000		

REFERENCES 参考文献

1. Ahuja et al. (1992) *Nature Genetics* 2, 31-36.
2. Alam et al. (1994) *J. Immunol.* 153, 3155-3159.
3. Alam et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 781-786.
4. Baggiolini et al. (1994) *Advances in immunology*, Academic press. Ed. Dixon, F.J. 55, 97-179.
5. Birkenbach et al. (1993) *J. Virol.* 67, 2209-2220.
6. Broxmeyer et al. (1990) *Blood* 76, 1110-1116.
7. Broxmeyer et al. (1993) *J. Immunol.* 150, 3448-3458.
8. Charo et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2752-2756.
9. Cocci et al. (1995) *Science* 270, 1811-1815.
10. Combadiere et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16491-16494.
11. Desarnaud et al. (1994) *Biochem. J.* 299, 367-373.
12. Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
13. Dobner et al. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 2795-2799.
14. Feinberg et al. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
15. Franci et al. (1995) *J. Immunol.* 154, 6511-6517.
16. Gao et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 17494-17501.
17. Gao et al. (1993) *J. Exp. Med.* 177, 1421-1427.
18. Gong et al. (1995) *J. Exp. Med.* 181, 631-640.
19. Hébert et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18549-18533.
20. Holmes et al. (1991) *Science* 253,1278-1283.
21. Jazin et al. (1993) *Regul. Peptides* 47, 247-258.
22. Kozak, M. (1989) *J. Cell. Biol.* 108, 229-241.
23. Kuna et al. (1992) *J. Immunol.* 149, 636-642.
24. Libert et al. (1989) *Science* 244, 569-572.
25. Matsuoka et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 504-511.
26. Mc Master et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4835-4838.

27. McColl et al. (1993) *J. Immunol.* 150, 4550-4560.
28. Mollereau et al. (1993) *Genomics* 16, 248-251.
29. Murphy, P.M. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593-633.
30. Murphy et al. (1991) *Science* 253, 1280-1283.
31. Neote et al. (1993) *Cell* 72, 415-425.
32. Oppenheim et al. (1991) *Ann. Rev. Immunol.* 9, 617-648.
33. Owicki et al. (1992) *Biosensors Bioelectronics* 7, 255-272.
34. Parmentier et al. (1989) *Science* 246, 1620-1622.
35. Perret et al. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 1044-1050.
36. Pleass et al. (1995) *Fourth International Chemokine Symposium*, Bath (UK), 27-30 June, P47.
37. Power et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 19495-19500.
38. Rot et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 1489-1495.
39. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
40. Sozzani et al. (1994) *J. Immunol.* 152, 3615-3622.
41. Strader et al. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* Ed. Dixon, R.A.F. 63, 101-132.
42. Thomas, P. S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205.
43. Vaddi et al. (1994) *The FASEB Journal* 8, A502.
44. Yamagami et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1156-1162.
45. Deng et al. (1996) *Nature* 381, 661-666.
46. Drajic et al. (1996) *Nature* 381, 667-673.
47. Doranz et al. (1996) *Cell* 85, 1149-1158.
48. Choe et al. (1996) *Cell* 85, 1135-1148.
49. Alkhatib et al. (1996) *Science* 272, 1955-1958.

50. Feng et al. (1996) *Science* 272, 872-877.

51. Paxton et al. (1996) *Nat. Med.* 2, 412-417.

52. Nomura et al. (1993) *Int. Immunol.* 5, 1239-1249.

53. Loetscher et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 232-237.

54. Collman et al. (1992) *J. Virol.* 66, 7517-7521.

55. Detels et al. (1994) *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 7, 1263-1269.

56. Taylor R. J. (1994) *J. NIH Res.* 6, 29-31.

57. Wainberg et al. (1987) *Clin. Exp. Immunol.* 1987, 136-142.

58. Williams et al. (1991) *Virology* 184, 723-728.

59. Spria et al. (1995) *J. Virol.* 69, 422-429.

60. Haynes et al. (1996) *Science* 271, 324-328.

61. Ben-Baruch et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11703-11706.

62. Nussbaum et al. (1994) *J. Virol.* 68, 5411-5422.

【図１ａ】

SEQ ID NO.1
配列識別番号

FIG.1 a

```
GAATTCCCCCAACAGAGCCAAGCTCTCCATCTAGTGGACAGGGAAGCTAGCAGCAAACC      59
                                                                  19

TTCCCTTCACTACAAAACTTCATTGCTTGGCCAAAAAGAGAGTTAATTCAATGTAGACAT     119
                                                                  39

CTATGTAGGCAATTAAAAACCTATTGATGTATAAAACAGTTTGCATTCATGGAGGGCAAC     179
                                                                  59

TAAATACATTCTAGGACTTTATAAAAGATCACTTTTTATTTATGCACAGGGTGGAACAAG     239
                                                                  79

ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGC     299
 M  D  Y  Q  V  S  S  P  I  Y  D  I  N  Y  Y  T  S  E  P  C      99

CAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTG     359
 Q  K  I  N  V  K  Q  I  A  A  R  L  L  P  P  L  Y  S  L  V     119

TTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGG     419
 F  I  F  G  F  V  G  N  M  L  V  I  L  I  L  I  N  C  K  R     139

CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTT     479
 L  K  S  M  T  D  I  Y  L  L  N  L  A  I  S  D  L  F  F  L     159

CTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATG     539
 L  T  V  P  F  W  A  H  Y  A  A  A  Q  W  D  F  G  N  T  M     179

TGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATC     599
 C  Q  L  L  T  G  L  Y  F  I  G  F  F  S  G  I  F  F  I  I     199

CTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGG     659
 L  L  T  I  D  R  Y  L  A  V  V  H  A  V  F  A  L  K  A  R     219

ACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCT     719
 T  V  T  F  G  V  V  T  S  V  I  T  W  V  V  A  V  F  A  S     239

CTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCT     779
 L  P  G  I  I  F  T  R  S  Q  K  E  G  L  H  Y  T  C  S  S     259

CATTTTCCATACA
 H  F  P  Y
```

【図１ｂ】

```
GAATTCCCCCAACAGAGCCAAGCTCTCCATCTAGTGGACAGGGAAGCTAGCAGCAAACC      59
                                                                  19

TTCCCTTCACTACAAAACTTCATTGCTTGGCCAAAAAGAGAGTTAATTCAATGTAGACAT     119
                                                                  39

CTATGTAGGCAATTAAAAACCTATTGATGTATAAAACAGTTTGCATTCATGGAGGGCAAC     179
                                                                  59

TAAATACATTCTAGGACTTTATAAAAGATCACTTTTTATTTATGCACAGGGTGGAACAAG     239
                                                                  79

ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGC     299
 M  D  Y  Q  V  S  S  P  I  Y  D  I  N  Y  Y  T  S  E  P  C      99

CAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTG     359
 Q  K  I  N  V  K  Q  I  A  A  R  L  L  P  P  L  Y  S  L  V     119

TTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGG     419
 F  I  F  G  F  V  G  N  M  L  V  I  L  I  L  I  N  C  K  R     139

CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTT     479
 L  K  S  M  T  D  I  Y  L  L  N  L  A  I  S  D  L  F  F  L     159

CTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATG     539
 L  T  V  P  F  W  A  H  Y  A  A  A  Q  W  D  F  G  N  T  M     179

TGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATC     599
 C  Q  L  L  T  G  L  Y  F  I  G  F  F  S  G  I  F  F  I  I     199

CTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGG     659
 L  L  T  I  D  R  Y  L  A  V  V  H  A  V  F  A  L  K  A  R     219

ACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCT     719
 T  V  T  F  G  V  V  T  S  V  I  T  W  V  V  A  V  F  A  S     239

CTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCT     779
 L  P  G  I  I  F  T  R  S  Q  K  E  G  L  H  Y  T  C  S  S     259

CATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAAGATAGTCATC     839
 H  F  P  Y  S  Q  Y  Q  F  W  K  N  F  Q  T  L  K  I  V  I     279
```

SEQ ID NO.2 FIG.1b
配列識別番号

【図１ｃ】

```
TTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACT   899
 L  G  L  V  L  P  L  L  V  M  V  I  C  Y  S  G  I  L  K  T    299

CTGCTTCGGTGTCGAAATGAGAAGAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATC   959
 L  L  R  C  R  N  E  K  K  R  H  R  A  V  R  L  I  F  T  I    319

ATGATTGTTTATTTTCTCTTCTGGGCTCCCTACAACATTGTCCTTCTCCTGAACACCTTC  1019
 M  I  V  Y  F  L  F  W  A  P  Y  N  I  V  L  L  L  N  T  F    339

CAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAG  1079
 Q  E  F  F  G  L  N  N  C  S  S  S  N  R  L  D  Q  A  M  Q    359

GTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCCATCATCTATGCCTTTGTC  1139
 V  T  E  T  L  G  M  T  H  C  C  I  N  P  I  I  Y  A  F  V    379

GGGGAGAAGTTCAGAAACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTC  1199
 G  E  K  F  R  N  Y  L  L  V  F  F  Q  K  H  I  A  K  R  F    399

TGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACC  1259
 C  K  C  C  S  I  F  Q  Q  E  A  P  E  R  A  S  S  V  Y  T    419

CGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGACACGGACTCAAGTGGGCTGGT  1319
 R  S  T  G  E  Q  E  I  S  V  G  L  *                         439

GACCCAGTCAGAGTTGTGCACATGGCTTAGTTTTCATACACAGCCTGGGCTGGGGGTNGG  1379

TTGGNNGAGGTCTTTTTTAAAAGGAAGTTACTGTTATAGAGGGTCTAAGATTCATCCATT  1439

TATTTGGCATCTGTTTAAAGTAGATTAGATCCGAATTC
```

配列識別番号　（続）
SEQ ID NO.2 (SUITE)

FIG.1c

【図１ｄ】

```
GAATTCCCCCAACAGAGCCAAGCTCTCCATCTAGTGGACAGGGAAGCTAGCAGCAAACC   59

TTCCCTTCACTACAAAACTTCATTGCTTGGCCAAAAAGAGAGTTAATTCAATGTAGACAT  119

CTATGTAGGCAATTAAAAACCTATTGATGTATAAAACAGTTTGCATTCATGGAGGGCAAC  179

TAAATACATTCTAGGACTTTATAAAAGATCACTTTTTATTTATGCACAGGGTGGAACAAG  239

ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGC  299
 M  D  Y  Q  V  S  S  P  I  Y  D  I  N  Y  Y  T  S  E  P  C    99

CAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTG  359
 Q  K  I  N  V  K  Q  I  A  A  R  L  L  P  P  L  Y  S  L  V    119

TTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGG  419
 F  I  F  G  F  V  G  N  M  L  V  I  L  I  L  I  N  C  K  R    139

CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTT  479
 L  K  S  M  T  D  I  Y  L  L  N  L  A  I  S  D  L  F  F  L    159

CTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATG  539
 L  T  V  P  F  W  A  H  Y  A  A  A  Q  W  D  F  G  N  T  M    179

TGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATC  599
 C  Q  L  L  T  G  L  Y  F  I  G  F  F  S  G  I  F  F  I  I    199

CTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGG  659
 L  L  T  I  D  R  Y  L  A  V  V  H  A  V  F  A  L  K  A  R    219

ACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCT  719
 T  V  T  F  G  V  V  T  S  V  I  T  W  V  V  A  V  F  A  S    239

CTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCT  779
 L  P  G  I  I  F  T  R  S  Q  K  E  G  L  H  Y  T  C  S  S    259

CATTTTCCATACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTTGTCATGGT  839
 H  F  P  Y  I  K  D  S  H  L  G  A  G  P  A  A  A  C  H  G    279
```

SEQ ID NO.3
配列識別番号

FIG.1d

【図１ｅ】

```
CATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTCGAAATGAGAAGAAGAGGCA   899
 H  L  L  L  G  N  P  K  N  S  A  S  V  S  K  *                299

CAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTTATTTTCTCTTCTGGGCTCCCTA   959

CAACATTGTCCTTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAG  1019

CTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTG  1079

CATCAACCCCATCATCTATGCCTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAAACTACCTCTTAGTCTT  1139

CTTCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGC  1199

TCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGG  1259

CTTGTGACACGGACTCAAGTGGGCTGGTGACCCAGTCAGAGTTGTGCACATGGCTTAGTT  1319

TTCATACACAGCCTGGGCTGGGGGTNGGTTGGNNGAGGTCTTTTTTAAAAGGAAGTTACT  1379

GTTATAGAGGGTCTAAGATTCATCCATTTATTTGGCATCTGTTTAAAGTAGATTAGATCC  1439

GAATTC
```

配列識別番号　（続）
SEQ ID NO.3 (SUITE)

FIG.1e

【図２】

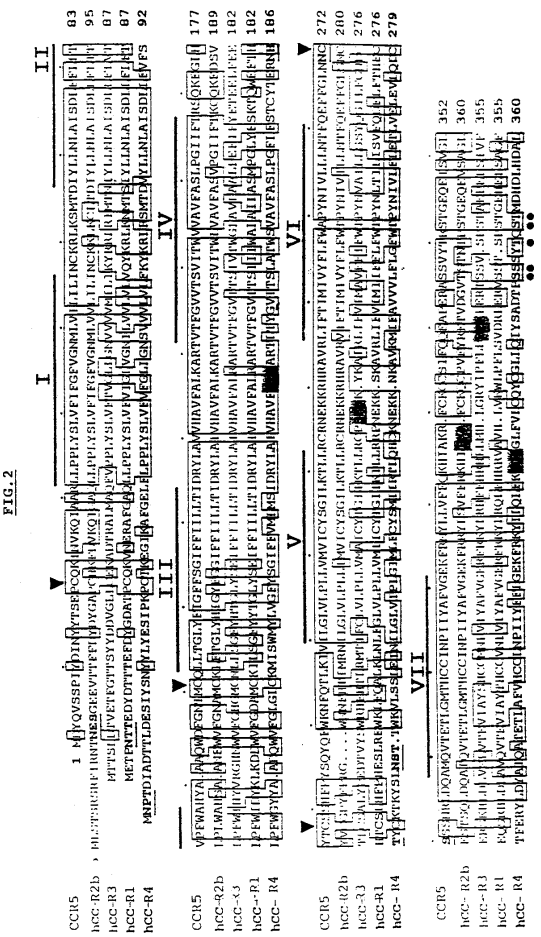


FIG.2

【図３】

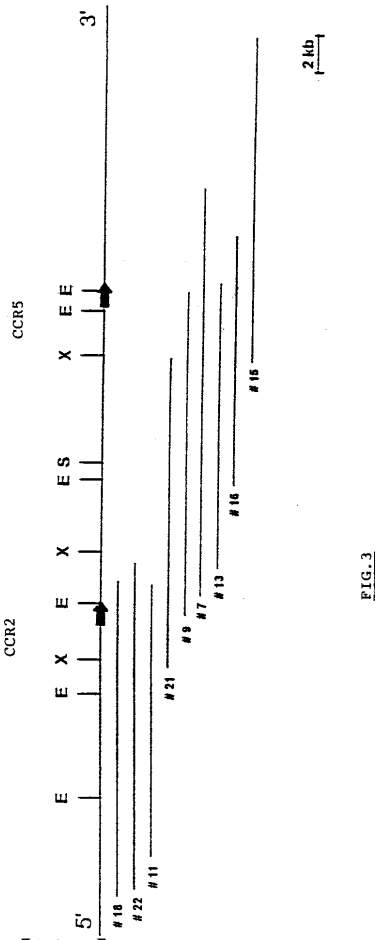


FIG.3

【図４ａ】

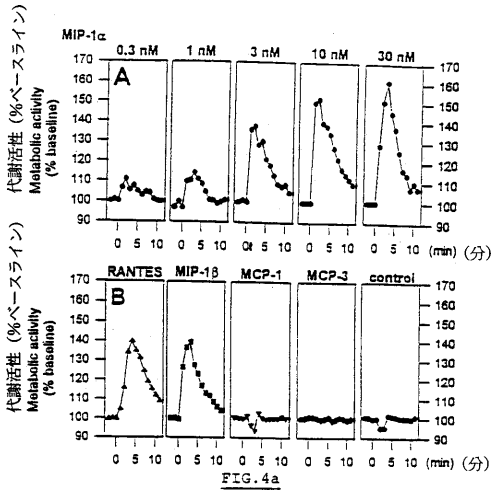


FIG.4a

【図４ｂ】

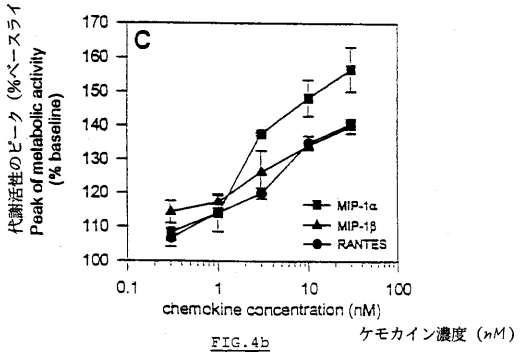


FIG.4b

【図５】

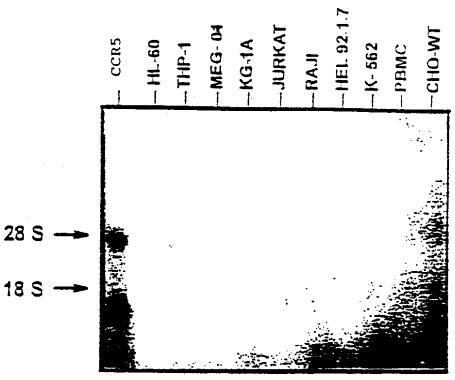


FIG.5

【図６】

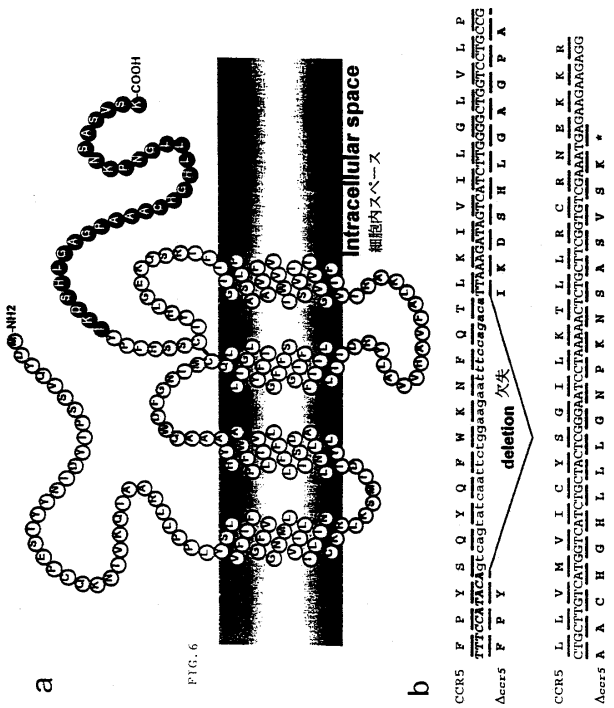


FIG.6

【図７ａ】

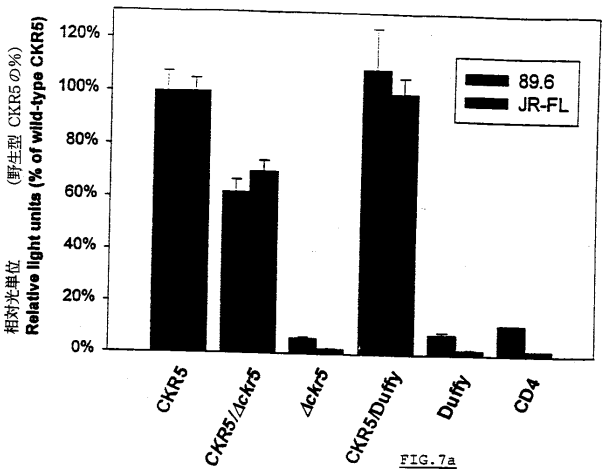


FIG.7a

【図７ｂ】

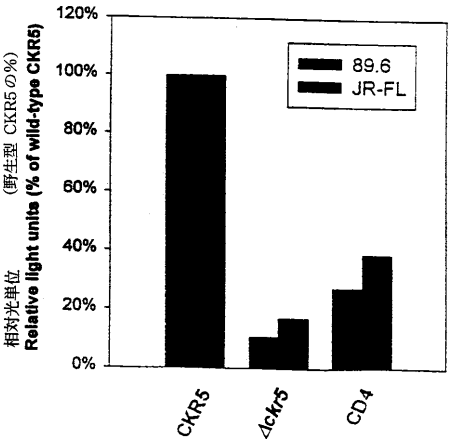


FIG.7b

【図８】

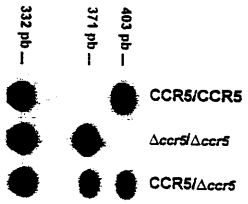


FIG.8

【図９】

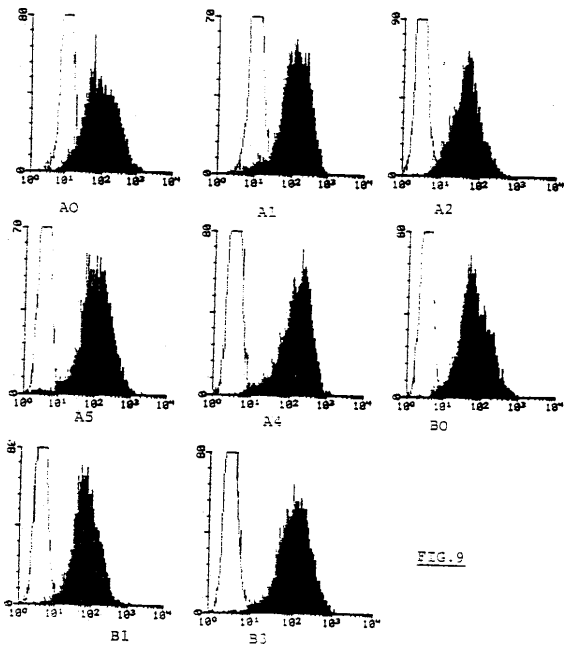


FIG.9

【図１０】

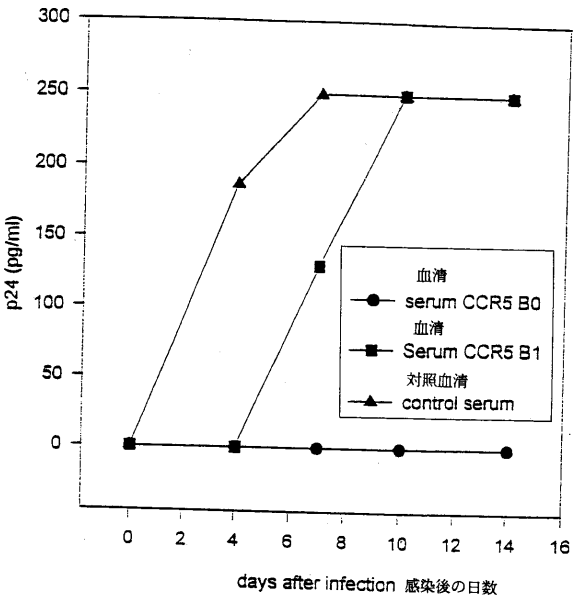


FIG.10

フロントページの続き

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

微生物の受託番号 BCCM LMBP1658CB

早期審査対象出願

(72)発明者 リベルト フレデリック
ベルギー，ベー１４２８ ブライネーラロイド，アフェニュ フラントーペイネ，２１

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第９５／０１９４３６（WO，Ａ１）
国際公開第９４／０１１５０４（WO，Ａ１）
国際公開第９４／０１２６３５（WO，Ａ１）
国際公開第９７／０２２６９８（WO，Ａ１）
国際公開第９６／０３９４３７（WO，Ａ１）
Biochemistry 35 p.3362-3367 (1996.03.19)
Nature 381 p.667-673 (1996 06.20)
Nature 381 p.661-666 (1996.06.20)
Molecular Medicine 3(1) p.23-36 (1997)
Nature 381(20) p.661-666 (1996)
Cell 86 p.367-377 (1996.08.09)
J Virol 71(4) p.329-3227 (1997)
Nature 382 p.722-725 (1996.08.22)
J Biol Chem 270(28) p.6491-16494 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 14/705
C07K 16/28