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

特許第4156662号
(P4156662)

(45)発行日　平成20年9月24日(2008.9.24)　(24)登録日　平成20年7月18日(2008.7.18)

(51)Int.Cl.		F I		
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
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 15　(全 54 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-510608
(86)(22)出願日	平成4年3月23日(1992.3.23)
(65)公表番号	特表平6-506697
(43)公表日	平成6年7月28日(1994.7.28)
(86)国際出願番号	PCT/US1992/002317
(87)国際公開番号	WO1992/017497
(87)国際公開日	平成4年10月15日(1992.10.15)
審査請求日	平成11年3月23日(1999.3.23)
審判番号	不服2003-2170(P2003-2170/J1)
審判請求日	平成15年2月10日(2003.2.10)
(31)優先権主張番号	677,211
(32)優先日	平成3年3月29日(1991.3.29)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	810,782
(32)優先日	平成3年12月19日(1991.12.19)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフォルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　リー，ジェイムス
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０６６、サン・ブルーノ、シェルター・クリーク・レイン　７０５番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトＰＦ４Ａ受容体とその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号１に記載の翻訳されたアミノ酸配列を有する単離されたＩＬ－８レセプターポリペプチドまたは、配列番号１に記載の翻訳されたアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するその変種であって、配列番号１に記載の翻訳されたアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドと同様のＩＬ－８レセプター活性を有するポリペプチド。

【請求項２】

配列番号１に記載のポリペプチドをコード化する部分の核酸の相補鎖と高い厳密条件下でハイブリッド形成する核酸によってコード化され、かつ配列番号１に記載の翻訳されたアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドと同様のＩＬ－８レセプター活性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項３】

配列番号１に記載の翻訳されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項１または２記載のＩＬ－８レセプターポリペプチド。

【請求項４】

ＩＬ－８レセプターポリペプチドとは異種のポリペプチドと融合している請求項１乃至３いずれかに記載のＩＬ－８レセプターポリペプチドを含む単離されたポリペプチド。

【請求項５】

ｆ－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅとは結合または反応せずにＩＬ－８と結合する請求項１乃至

４いずれかに記載のＩＬ－８レセプターポリペプチド。
【請求項６】
ヒト由来である請求項１乃至５いずれかに記載のＩＬ－８レセプターポリペプチド。
【請求項７】
請求項１乃至６いずれかに記載のＩＬ－８レセプターポリペプチドをコード化する核酸配列を含む単離された核酸分子。
【請求項８】
配列番号１に記載のポリペプチドをコード化する部分の核酸のＤＮＡ配列を有する請求項７に記載の核酸分子。
【請求項９】
ＩＬ－８レセプターポリペプチドをコード化する核酸配列と機能可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項７または８記載の核酸分子。
【請求項１０】
形質転換される宿主細胞によって認識される制御配列と機能可能に連結された請求項７乃至９いずれかに記載の核酸配列を含む発現ベクター。
【請求項１１】
請求項１０に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。
【請求項１２】
請求項１乃至３いずれかに記載のＩＬ－８レセプターポリペプチドと特異的に結合可能なモノクローナル抗体。
【請求項１３】
配列番号１に記載のＩＬ－８レセプターポリペプチドと特異的に結合可能なモノクローナル抗体。
【請求項１４】
請求項１２または１３記載のモノクローナル抗体および製薬的に許容される担体を含む、特定の細胞または組織におけるＩＬ－８レセプター発現を診断するための組成物。
【請求項１５】
診断に使用する請求項１２または１３記載のモノクローナル抗体。
【発明の詳細な説明】
本発明は、血小板因子４スーパーファミリーの構成要素(以下「ＰＦ４Ａ」と略記する)を検定する分野と、このファミリーの構成要素に対する作用薬および拮抗薬の調製に関する。
発明の背景
インターロイキン８は好中球にとっての化学誘引物質として最初に同定され、好中球上の受容体を結合することが知られていたが[8-10]、この物質はさらに、脱顆粒の刺激や細胞接着分子ＭＡＣ-１と補体受容体ＣＲ１[1]の上方調節を含む広範な前炎症活性を持っている。ＩＬ-８は活性化された内皮細胞に対する好中球の接着の阻害を媒介することもできる[2]。ＩＬ-８は約１００００のM_rを持つ１０またはそれ以上の前炎症性サイトカインのファミリーの構成要素である[1]。このかなり大きいタンパク質ファミリーは血小板因子４スーパーファミリーと呼ばれている(ウォルぺら,FASEB Ｊ.3:2565-73[1989])。一般にＣＸＣペプチド(ＩＬ-８を含む)と呼ばれる副集団である血小板因子４スーパーファミリーのいくつかの構成要素は、好中球作用薬活性を保持しており、例えばＮＡＰ-２、ＭＩＰ-２、血小板因子４およびＮＡＰ-３(ＭＧＳＡ／ｇｒｏ)などである。このファミリーの他の構成要素であるＣ-Ｃペプチドは好中球作用薬ではない。以下「ＰＦ４Ａ」とはＰＦ４スーパーファミリーを意味する。
本発明の目的は、ＰＦ４Ａスーパーファミリーの受容体(以下「ＰＦ４ＡＲ」と略記する)を同定することである。
本発明のもう１つの目的は、これらの受容体をコード化するＤＮＡもしくはこれらの受容体にハイブリッド形成するＤＮＡを得ること、並びに、宿主細胞中で該受容体を発現させることである。

本発明のさらなる目的は、診断的用途および医療的用途のためにＰＦ４ＡＲの単離物を提供することである。
本発明のさらなる目的は、該受容体の変種をコード化するＤＮＡを得ること、並びに、組換え細胞培養中で該変種を調製することである。
本発明のこれらの目的とその他の目的は本明細書全体から明らかになるであろう。

発明の要約

ある側面として、これらの目的は、構造的にＰＦ４ＡＲに関連するポリペプチドを含む、単離された新規なＰＦ４ＡＲポリペプチドを提供することによって達成される。この種に属するポリペプチドをこれ以降一般に「ＰＦ４ＡＲ」と呼び、それらの誘導体と変種を包含するものとする。
もう１つの側面として本発明は、ＰＦ４ＡＲからなる組成物であって、そのＰＦ４ＡＲが由来する動物種の混入ポリペプチドを含有しない組成物を提供する。
ＰＦ４ＡＲまたはその断片(これは化学的方法によって合成することもできる)を免疫原性ポリペプチドに(組換え発現またはインビトロ共有結合法によって)融合し、次いでその融合ポリペプチドを用いて動物を免疫化することにより、ＰＦ４ＡＲエピトープに対する抗体を生じさせる。抗ＰＦ４ＡＲ抗体は免疫化した動物の血清から回収される。別法として免疫化した動物の細胞から従来の方法でモノクローナル抗体を作成することもできる。
抗ＰＦ４ＡＲ抗体はＰＦ４ＡＲの診断(インビトロまたはインビボ)やＰＦ４ＡＲの精製(不溶性の基盤に固定化されている場合)にとりわけ有用である。
ＰＦ４ＡＲの置換、欠失または挿入変種はインビトロ法または組換え法によって作成され、ＰＦ４ＡＲとの免疫交差反応性およびＰＦ４ＡＲ拮抗薬または作用薬活性についてスクリーニングされる。
特にＰＦ４ＡＲとその抗体の診断のため、あるいはＰＦ４ＡＲ抗体のアフィニティー精製のためには、ＰＦ４ＡＲをインビトロで誘導体化することによって、固定化したＰＦ４ＡＲや標識したＰＦ４ＡＲを作成する。
特に医療的使用のためには、ＰＦ４ＡＲ、その誘導体またはその抗体を生理学的に許容される賦形剤中に製剤化する。そのような賦形剤にはＰＦ４ＡＲの徐放性製剤が含まれる。
さらに異なる側面として、本発明は、ＰＦ４ＡＲをコード化する単離された核酸(標識されているもの、あるいは標識されていないもの)およびＰＦ４ＡＲをコード化する核酸配列に相補的な核酸配列またはＰＦ４ＡＲをコード化する核酸配列に対して適当な条件下でハイブリッド形成する核酸配列を提供する。
さらに本発明は、複数可能なベクターであって、そのベクターによって形質転換される宿主によって認識される制御配列に機能可能に連結したＰＦ４ＡＲをコード化する核酸分子からなる複製可能なベクター、並びに、ＰＦ４ＡＲの生産を達成するためにＰＦ４ＡＲをコード化する核酸を使用する方法であって、形質転換された宿主細胞の培養中で該核酸分子を発現させ、その宿主細胞培養からＰＦ４ＡＲを回収することからなる方法を提供する。この核酸配列はＰＦ４ＡＲ核酸に関するハイブリッド形成検定法においても有用である。上記の組換え宿主細胞は適当なＰＦ４Ａ構成要素を検定する際にとりわけ有用である。
さらなる態様として、本発明は、ＰＦ４ＡＲを生産する方法であって、ＰＦ４ＡＲをコード化する核酸を含有する細胞のＤＮＡ中に、ＰＦ４ＡＲ核酸に対して、生物学的に活性なＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡの転写に影響を与えるか、もしくはその転写を破壊するに足る近さと配向で、転写変調要素を挿入することからなり、さらにその転写変調要素とＰＦ４ＡＲ核酸を含有する細胞を培養するという随意の段階を伴う方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

図１は、クローンｐＲＫ５Ｂ.ｉｌ８ｒ１.１でトランスフェクションされたＣＯＳ細胞に対するＩＬ-８の高親和性結合を表す。ａ）標識していないＩＬ-８またはｆＭＬＰとの競争。ｂ）ＩＬ-８競争データのスカチャード分析；見かけ上のＫｄ＝３.６ｎＭ、平均８２０００結合部位／細胞。ヒト好中球による同様の競争はＫｄ＝１.１ｎＭ、３１０００結合部位／細胞を与えた。
図２ａ～２ｃ(配列番号１)(以下これらを総合して図２と呼ぶ)は、クローンｐＲＫ５Ｂ.

ｉｌ８ｒ１.１から得たＩＬ-８受容体ｃＤＮＡ挿入物のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を表す。７つの推定貫膜ドメインを示す。４つの細胞外セグメントと４つの細胞内セグメントが存在し、それぞれのセグメントは貫膜ドメインの１つによって分離されている。細胞外セグメントはほぼ残基１～３９、９９～１１１、１３４～１５４、１７５～２０３および２６５～２９０によって表される。このＩＬ-８受容体は最初の細胞外領域に３つの潜在的Ｎ-結合型グリコシル化部位を含有しており、第３の細胞外ループにさらに３つの潜在的Ｎ-結合型グリコシル化部位を含有する。

図３ａは、トランスフェクションされたヒトＩＬ-８およびｆＭＬＰ受容体のそれらの配位子に対する細胞内Ca^{++}応答のフローサイトメトリー測定を表す。ヒト胚性腎臓２９３細胞をエレクトロポレーション[19]によって、ＩＬ-８受容体(クローンｐＲＫ５Ｂ.ｉｌ８ｒ１.１)、ｆＭＬＰ受容体(ベクターｐＲＫ５中のヒトｆＭＬＰ受容体ｃＤＮＡ[3])またはベクター(ｐＲＫ５Ｂ[18])ＤＮＡでトランスフェクションした。２日後に、ＲＰＭＩ培地中の２μＭインド-１アセトキシメチルエステルを３７℃で３０分間細胞に充填した。４０５ｎｍと５２５ｎｍの蛍光の比を用いて[23]、細胞内Ca^{++}をコールター７５３フローサイトメーターで測定した。

図３ｂは、ＩＬ-８の添加後の期間(各実験中で約１５秒間)の４００ｎＭCa_i^{++}以上の細胞の百分率を表す。

図４(配列番号２)と図５(配列番号３)は、ヒト単球様細胞系(ＨＬ-６０)とヒトＰＢＬから得たラムダライブラリーをＩＬ-８受容体ＤＮＡの大きい断片を用いてプローブすることによって同定した２つの追加のＰＦ４ＡＲ構成要素に関するポリペプチド配列を表す。

発明の詳細な説明

出願人らは、発現クローニングによってヒト好中球１Ｌ-８受容体をコード化するｃＤＮＡを２つの他の相同な受容体と共に単離した。そのアミノ酸配列は、このＩＬ-８受容体が、化学誘引物質ｆ-Ｍｅｔ-Ｌｅｕ-Ｐｈｅ[3]およびＣ５ａ[4]にとってのヒト好中球受容体に対して明確な類似性(アミノ酸同一性２９％)を伴うＧ-タンパク質共役受容体ファミリーの構成要素であることを示している。このＩＬ-８受容体配列はウサギのｆ-Ｍｅｔ-Ｌｅｕ-Ｐｈｅ受容体[5]のイソ型として同定されているもののヒト相同体であり得るが、出願人らは、哺乳類細胞中にトランスフェクションすると、この受容体クローンがＩＬ-８に対する高親和性結合を付与し、ｆ-Ｍｅｔ-Ｌｅｕ-Ｐｈｅに対する結合または応答を伴うことなく、ＩＬ-８に応答して一時的なCa^{++}の流動化を生み出すことを明らかにした。

ＩＬ-８受容体をコード化するクローンを単離するために、ＣＯＳ細胞発現クローニング法[6-7]を使用した。ヒト好中球ｍＲＮＡから哺乳類発現ベクターｐＲＫ５Ｂ中に構築したｃＤＮＡライブラリーを２５００クローンのプールとしてＣＯＳ-７細胞中にトランスフェクションし、その細胞を^{125}Ｉ-ＩＬ-８の結合についてスクリーニングした。最初の５８トランスフェクションから得た１つの陽性プールを純粋な１クローン(ｐＲＫ５Ｂ.ｉｌ８ｒ１.１)が得られるまで、より小さいプールに分配した。図１は、単離された上記クローンでトランスフェクションされたＣＯＳ細胞に対する、未標識のＩＬ-８による^{125}Ｉ-ＩＬ-８結合の競争を示す。このデータの分析により、ＩＬ-８結合に関するＫｄ値が、ヒト好中球に対するＩＬ-８結合について報告されている０.８～４ｎＭの範囲内[8-10]である３.６ｎＭであることがわかった。走化性ペプチドｆ-Ｍｅｔ-Ｌｅｕ-Ｐｈｅ(ｆＭＬＰ)によるＩＬ-８結合の競争はない。

単離されたｃＤＮＡクローンのＤＮＡ配列(図２)は、翻訳開始部位と予想されるコンセンサスに合致するメチオニン残基[11]に始まる１つの長い読み取り枠を含有している。この読み取り枠は３５０アミノ酸のタンパク質(翻訳されたM_rは３９.５ｋＤ)をコード化している。そのアミノ酸配列は、細胞膜をまたぐと予想される７つの疎水性ドメインとＮ-末端近くのＮ-結合型グリコシル化部位[12](下記参照)を含むロドプシンスーパーファミリーのＧ-タンパク質共役受容体といくつかの特徴を共有している。

コード化されているアミノ酸配列は最近クローン化されたウサギｆＭＬＰ受容体[5]に関する配列に最も類似している。その類似性は、これら２つの配列が充分に同じ受容体の種相同体であり得るほどに高い(２０以上の連続したアミノ酸が合致する複数の領域を伴う７

９％の総合アミノ酸同一性)。ヒトｆＭＬＰ受容体も既にクローン化されており[3]、それはウサギｆＭＬＰ受容体と２６％のアミノ酸同一性しか有さない(また本明細書に開示するヒトＩＬ-８受容体に対する同一性は２９％である)。ウサギｆＭＬＰ受容体アミノ酸配列とヒトｆＭＬＰ受容体アミノ酸配列の間のかなりの相違は、これらがｆＭＬＰ受容体の２つのイソ型であろう[5]という示唆を当該技術分野に与えてきた(これは現在ではおそらく誤りであろうと考えられる)。

好中球は化学誘引物質ＩＬ-８およびｆＭＬＰに対して迅速で一時的な細胞内遊離Ｃａ$^{++}$濃度の増大を伴って応答する[1,13]。本発明においてＩＬ-８受容体として単離されたクローンの同定を立証するために、出願人らは、添加されたＩＬ-８並びにｆＭＬＰに対する、トランスフェクションされた細胞の細胞内Ｃａ$^{++}$応答を決定した。出願人らはトランスフェクションされたヒトｆＭＬＰ受容体または対照としての発現ベクターを用いて平行実験を行った。フローサイトメーター分析は、トランスフェクションされたＩＬ-８受容体について、ＩＬ-８に対する応答として、細胞内Ｃａ$^{++}$の明らかな一時的増大を示している。ｆＭＬＰに対する応答は認められない。逆にヒトｆＭＬＰ受容体でトランスフェクションした細胞はｆＭＬＰには応答するが、ＩＬ-８には応答しない。ベクターでトランスフェクションされた細胞ではどちらの化学誘引物質に対する応答も認められない。トランスフェクション効率は１５～２５％と見積もられるので、これらの実験において応答すると予期されるのはこれらの細胞の副集団に過ぎない。結合実験[14]も発現されたＩＬ-８受容体に対する^{3}Ｈ-ｆＭＬＰの結合もしくは発現されたヒトｆＭＬＰ受容体に対する^{125}Ｉ-ＩＬ-８の結合を検出することができなかった。これらの実験は上記２つの受容体のそれぞれの配位子に対する特異性、即ちＩＬ-８とｆＭＬＰの間の好中球に関する結合競争の欠如に基づいて予期される結果[1]、を明確に立証している。またこれらの結果は、クローン化された受容体が配位子の結合に対する応答として、第２のメッセージを信号化するように機能することをも明らかにしている。

ヒト好中球ｍＲＮＡに対するクローン化したＩＬ-８受容体ｃＤＮＡのブロット・ハイブリッド形成は、２.４ｋｂおよび３.０ｋｂの強いバンドと共にかなり弱い３.５ｋｂのバンドを示す。図２に示すＤＮＡ配列データから、受容体のｍＲＮＡが長い３’非翻訳領域を持っていることは明らかであるが、複数のＲＮＡバンドが複数のポリアデニル化部位によるものであるかどうかを立証するにはさらなる研究が必要であろう。Ｂ細胞およびＴ細胞系統であるジュルカット(Jurkat)細胞系またはＵ２６６から得たｍＲＮＡに対するハイブリッド形成は検出されなかった。これらの細胞に対する低レベルのＩＬ-８結合が報告されているにもかかわらず、単球細胞系Ｕ９３７から得たｍＲＮＡについてもやはりハイブリッド形成は観測されなかった。

３種の好中球化学誘引物質１Ｌ-８、ｆＭＬＰ[3]およびＣ５ａ[4]に関する受容体配列の並列によって、それらが２９～３４％のアミノ酸同一性を伴うＧ-タンパク質共役受容体のサブファミリーを形成していることが示される。このサブファミリーは、β-アドレナリン作動性受容体[12]またはムスカリン性アセチルコリン受容体[15]などの他のＧ-タンパク質共役受容体と比較して短い第３の細胞内ループを持っている。このループは少なくとも部分的にはその受容体[12]に対するＧ-タンパク質の結合の原因である決定基を含有している。ＩＬ-８受容体の細胞内Ｃ-末端領域はｆＭＬＰおよびＣ５ａ受容体のそれとはあまり類似していないものの、リン酸化部位として機能し得る多数のセリンおよびスレオニン残基を保存している。Ｃ５ａ受容体について注記されているように[4]、ＩＬ-８受容体のＮ-末端細胞外領域は数個の酸性残基を持っている。これらは極めて塩基性であるＩＬ-８(ｐＩ～９.５)の結合を促進するのであろう。

Ｉ．定義

一般に、この説明、実施例および請求の範囲で使用する下記の用語あるいは表現は以下に示す定義を有する。

用語「ＰＦ４ＡＲ」は図２、４または５のポリペプチドに共通する定性的な生物学的活性を有するポリペプチドと定義される。随意に、ＰＦ４ＡＲは、図２、４または５のポリペプチドのいずれかと少なくとも３０％、通常は７５％のアミノ酸配列同一性を有するであ

ろう。随意に、ＰＦ４ＡＲは、ウサギｆＭＬＰ受容体[5]、ヒトｆＭＬＰ受容体[3]、ヒトＣ５ａ受容体[4]および／またはマーフィーら,Science 253:1280(1991)に記述されている受容体を除外する。

ＰＦ４ＡＲに関する同一性または相同性は、本明細書では、配列を並列させて、必要であれば最大の相同百分率が得られるように間隙を導入した後に、図２、４または５中の残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の百分率と定義され、保存的な置換は残基の同一性を表すものと見なさない。Ｎ-末端またはＣ-末端伸長や欠失または挿入は同一性または相同性を減少させるものと見なされないであろう。

ＰＦ４ＡＲの定性的な生物学的活性は、(１)図２、４または５に記載のポリペプチドの少なくとも１つのエピトープとの免疫学的交差反応性、(２)ＰＦ４スーパーファミリーの構成要素に特異的に結合する能力、または(３)図２、４または５のポリペプチドに自然に認められる何らかのエフェクター活性または機能的活性(スーパーファミリー構成要素以外の何らかの配位子を結合する能力を含む)のいずれか１つと定義される。

本明細書で使用される場合、免疫学的な交差反応性とは、候補ポリペプチドがＰＦ４ＡＲに対して生じさせた抗血清やポリクローナル抗体に対するＰＦ４ＡＲの結合を競争的に阻害することができることを意味する。このような抗体や血清は、ヤギやウサギなどの動物に完全フロイントアジュバント中の既知の天然のＰＦ４ＡＲを例えば皮下注射し、次いで不完全フロイントアジュバント中で腹腔内または皮下に追加免疫注射することによる従来の方法で調製される。

本明細書で使用する用語としてのＰＦ４ＡＲの範囲には、図２、４または５に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、そのようなアミノ酸配列のアミノ酸配列変種、それらのポリペプチドのグリコシル化変種およびそれらのポリペプチドの共有結合修飾体が含まれる。これらのそれぞれを以下に詳述する。

「単離された」ＰＦ４ＡＲ核酸またはポリペプチドとは、通常自然に伴う少なくとも１つの混入物(それぞれ核酸またはポリペプチド)から(例えばＰＦ４ＡＲ核酸またはポリペプチドの動物またはヒト供給源から)分離され、同定されたＰＦ４ＡＲ核酸またはポリペプチドをいう。好ましい態様では、ＰＦ４ＡＲが、その起源の種のタンパク質に関して医薬的に許容されるレベルの純度に単離されるであろう。好ましい態様では、ＰＦ４ＡＲタンパク質が、(１)ローリー法で決定したタンパク質の９５重量％以上(最も好ましくは９９重量％以上)に精製されるか、(２)本願の出願日に市販されているアミノ酸配列決定装置によってＮ-末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得ることができる程度に精製されるか、あるいは(３)クーマシー・ブルー(好ましくは銀染色)を用いる従来の非還元的ＳＤＳ-ＰＡＧＥによって均一に精製されるであろう。単離されたＰＦ４ＡＲは組換え細胞内の現位置にあるＰＦ４ＡＲを包含する。なぜなら、この例ではＰＦ４ＡＲの自然の環境の少なくとも１つの成分が存在しないであろうからである。単離されたＰＦ４ＡＲはある種の組換え細胞培養内にある別の種からのＰＦ４ＡＲを包含する。なぜなら、そのような環境にある受容体は供給源のポリペプチドを含まないであろうからである。しかし通常は単離された受容体が少なくとも一つの精製段階によって調製されるであろう。

単離されたＰＦ４ＡＲ核酸は、通常はその受容体核酸の天然の供給源に伴う少なくとも１つの混入核酸から分離され、同定された核酸を包含する。したがって、単離されたＰＦ４ＡＲ核酸は天然に認められる形態または状況とは異なる形態または状況で存在する。しかし単離された受容体コード化核酸は、その核酸が天然の細胞とは異なる染色体位置にあるか、もしくは天然に認められるもの以外の異なるＤＮＡ配列に隣接している、通常に受容体を発現させる細胞中のＰＦ４ＡＲ核酸を包含する。

該核酸またはポリペプチドを診断のためおよびプローブのために、下記の診断的検定法の議論で記述し定義する標識を用いて標識してもよい。

ＰＦ４ＡＲ「核酸」は図２、４または５内のポリペプチド配列をコード化する１０塩基以上を含有するＲＮＡまたはＤＮＡと定義され、図２、４または５の核酸配列に相補的であり、そのような核酸にハイブリッド形成して低い厳密条件下でそれに安定に結合したまま

であるか、あるいは図２、４または５に示す翻訳されたアミノ酸配列またはその断片と少なくとも３０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８５％の配列同一性を共有するポリペプチドをコード化する。図２、４または５の核酸にハイブリッド形成するＤＮＡは好ましくは少なくとも２０塩基、より好ましくは４０塩基、さらに好ましくは６０塩基を含有する。最も好ましくは、ハイブリッド形成するＤＮＡまたはＲＮＡが４５塩基、さらにより好ましくは９０塩基を含有する。しかしこのようなハイブリッド形成核酸または相補的核酸はさらに、ウサギｆＭＬＰ受容体[5]、ヒトｆＭＬＰ受容体または(随意に)マーフィーら(上記)のＩＬ-８受容体をコード化する核酸をコード化するか、低い厳密条件下で該核酸とハイブリッド形成するか、あるいは該核酸に相補的な核酸を含めて、先行技術のいずれの核酸に対しても新規であって自明でないものと定義される。

「高い厳密条件」とは、(１)洗浄のために低イオン強度と高温(例：５０℃で０.０１５Ｍ ＮａＣｌ／０.００１５Ｍクエン酸ナトリウム／０.１％ＮａＤｏｄＳＯ$_4$)を使用する条件であるか、もしくは(２)ハイブリッド形成の間に０.１％牛血清アルブミン／０.１％フィコール／０.１％ポリビニルピロリドン／５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液(ｐＨ６.５)を伴う５０％(体積／体積)ホルムアミドを７５０ｍＭ ＮａＣｌ、７５ｍＭクエン酸ナトリウムと共に４２℃で使用する条件か、あるいは(３)４２℃において５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ(０.７５Ｍ ＮａＣｌ、０.０７５Ｍクエン酸ナトリウム)、５０ｍＭリン酸ナトリウム(ｐＨ６.８)、０.１％ピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子ＤＮＡ(５０μｇ／ｍｌ)、０.１％ＳＤＳおよび１０％硫酸デキストランを使用し、それに伴って０.２×ＳＳＣおよび０.１％ＳＤＳ中４２℃で洗浄する条件のいずれかである。

用語「制御配列」は、特定の宿主生物中で機能可能に連結したコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を意味する。原核生物に適した制御配列には、例えばプロモーター、随意にオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することがわかっている。

ある核酸がもう１つの核酸配列と機能的な関係に置かれる場合、その核酸は「機能可能に連結」している。例えばプレ配列または分泌リーダーのＤＮＡは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される時、そのポリペプチドのＤＮＡに機能可能に連結している。またプロモーターやエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を与える時、そのコード配列に機能可能に連結している。さらにリボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するような位置にある時、コード配列に機能可能に連結している。「機能可能に連結している」とは、一般的には連結されるＤＮＡ配列が隣接していることを意味し、分泌リーダーの場合には隣接していて且つ解読相が一致していることを意味する。しかしエンハンサーは隣接している必要がない。連結は都合のよい制限部位での連結(ライゲーション)によって達成される。そのような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来の慣用に従って使用する。

本発明における出発プラスミドは市販されており、制限なく公に使用することができるか、もしくは上記の利用可能なプラスミドから公表されている手法に従って構築することができる。さらに他の等価なプラスミドも当該技術分野では知られており、当業者には明らかであろう。ＤＮＡの制限酵素消化、回収または単離、ハイブリッド形成分析および連結(ライゲーション)は慣用の方法であり、現時点で当業者によく知られている。

ある与えられたＤＮＡ断片の制限消化物からの「回収」または「単離」とは、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル上で電気泳動によって消化物を分離し、既知の分子量を有するマーカーＤＮＡ断片の移動度とその移動度とを比較することによって興味ある断片を同定し、所望の断片を含有するゲル切片を取り出し、ＤＮＡからゲルを分離することを意味する。この手法は一般的に知られている。例えばローンら,Nucleic Acids Res.,9:6103-6114(1981)およびゲッデルら,Nucleic Acids Res.8:4057(1980)を参照のこと。

II. 本発明を実施するための好適な方法

１. 天然のＰＦ４ＡＲおよび変種の調製

Ａ. ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡの単離

ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡは、ＰＦ４ＡＲ ｍＲＮＡを含有していると考えられる組織から調製されるｃＤＮＡライブラリー、一般的にはＨＬ６０またはＰＢＬライブラリーから得ることができる。ＰＦ４ＡＲ遺伝子をゲノムライブラリーから得ることもできる。興味ある遺伝子またはそれによってコード化されているタンパク質を同定するために設計されたプローブを用いてライブラリーをスクリーニングする。出願人らはＩＬ-８受容体と２つの相同的受容体について全ｃＤＮＡを記述した。この受容体ファミリーをコード化する核酸は図２、４または５の受容体遺伝子配列に由来するオリゴヌクレオチド配列を有するプローブを用いてゲノムＤＮＡまたは好中球ｃＤＮＡライブラリーから低い厳密条件下で容易に得ることができる。これらのプローブは通常約５００塩基またはそれ以上を含有するであろう。これらのプローブは３つの代表的ＤＮＡに完全にハイブリッド形成するであろうから、縮重配列を含有するプローブプールを使用する必要はない。図２、４または５の受容体を同定するための上記プローブによるスクリーニングを高い厳密条件下で行えば、より効率が高い。

図２、４または５に記載したもの以外のＰＦ４ＡＲが存在し、それが上記の代表的受容体に相同な領域を含有するものと考えられる。したがって図２、４または５に記載のＤＮＡ配列を有するプローブを用いてこれらの受容体を同様にスクリーニングすることができる。プローブとして最もよい候補は３つの代表的ヒト受容体の間で高度に相同な配列を表す(約１００塩基以上の)長い配列である。ＩＬ-８残基１５～３４、７８～９４、１７６～１９３、２６４～２８２および２９９～３１２をコード化するＩＬ-８ｃＤＮＡ(およびＩＬ-８Ｒファミリーの他の受容体から得られる同等なプローブ)は、とりわけＩＬ-８受容体ＤＮＡについてプローブする際に有用である。図４の受容体(および図５の受容体に特有の単離されたタンパク質)にとって有用なプローブは残基１～４８、７７～９２、１０７～１３７、１５６～１７７、１８９～２２６、２３９～２５７および２７１～３１５からなる配列によって表される。図４の受容体の相同的なプローブと残基、即ち残基１～３５、６４～７８、９４～１２４、１４３～１６４、１７６～１９７、２１９～２３９および２５１～２９５も有用である。図２、４または５ポリペプチドの下記の領域をコード化するｃＤＮＡからなるｃＤＮＡは他の受容体をプローブする際に有用である：９２～１０６、５７～７２、１３８～１５４、３１４～３２９および５７～１５４。

一般的には、ある与えられたＰＦ４Ａを特異的に結合することができ、そのＰＦ４Ａによって活性化される細胞を、典型的にはインビトロ生物検定法によって、また随意に標識されたＰＦ４Ａを用いる細胞結合分析によって、まず同定する。それゆえに、この過程によって同定される細胞(いくつかは個々のＰＦ４Ａについて既に知られている)はそのＰＦ４Ａに関する受容体を発現させている。そのような細胞からｃＤＮＡライブラリーを調製し、それ自体は慣用の手法によって受容体プローブを用いてスクリーニングする。しかしこの場合、(実施例２に記述するような)低い厳密条件を使用することが好ましく、次いで得られた陽性クローンを図２、４または５の受容体に対する相同性について分析する。一般に、候補ヒトＰＦ４ＡＲは図２、４または５の受容体に対して約３０％以上のアミノ酸配列相同性を示し、類似の貫膜ループ構造を保持しているであろう。

次にハイブリッド形成する全長遺伝子が所望のＰＦ４ＡＲであることを確認するために検定を行う。その候補を単に発現ベクター中に挿入し、それを通常は候補ＰＦ４Ａ配位子に結合しない宿主細胞中に形質転換する。したがって、その配位子を結合する能力を獲得した形質転換体は所望の受容体遺伝子を保持する。出願人らは実施例２において、ＰＲ４ＡＲを表す２つの追加の相同なポリペプチド配列が、特定のプローブが不可欠であるとは思われないが、残基２３～３１４をコード化するＩＬ-８Ｒ ＤＮＡを用いて同定されることを示す。

追加のＰＦ４ＡＲをコード化する遺伝子を単離する代替手段は、例えばサムブルックら(上記)の１４章に記述されているようにポリメラーゼ連鎖反応(ＰＣＲ)法(米国特許第４６８３１９５号；エルリッヒ編「PCR Technology」(1989))を用いて標的ＤＮＡまたはＲＮＡを増幅することである。この方法はＰＦ４ＡＲにハイブリッド形成すると予期されるオリゴヌクレオチドプライマーの使用を必要とし、これらは図２、４または５の受容体ｃＤ

ＮＡから容易に選択される。オリゴヌクレオチドプライマーの選択法は上述の通りである。

図２、４または５の受容体もしくは相同な受容体をコード化するＤＮＡを得るために、様々な組織、好ましくは哺乳類ＰＢＬ、単球、胎盤、胎児、脳および癌腫細胞系からｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることができる。より好ましくは、ヒトまたはウサギの胎盤、胎児、脳および癌腫細胞系ｃＤＮＡライブラリーを標識したオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングする。

興味ある遺伝子を得るためのもう１つの方法は、エンゲルスら(Agnew.Chem.Int.Ed.Engl.,28:716-734[1989])に記述されている方法の１つを使用して、それを化学的に合成することである。これらの方法には、典型的には固体支持体上でのオリゴヌクレオチド合成によって進行する、トリエステル、ホスファイト、ホスフォルアミダイトおよびH-ホスホネート法が含まれる。その遺伝子の全アミノ酸配列または核酸配列が知られているか、そのコード鎖に相補的な核酸の配列が利用できる場合に、これらの方法を使用することができる。所望のアミノ酸配列が既知である場合には、各アミノ酸残基について既知の好ましいコード残基を用いることにより、考え得る核酸配列を推論することができる。

Ｂ．ＰＦ４ＡＲのアミノ酸配列変種

ＰＦ４ＡＲのアミノ酸配列変種は、ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡに適当なヌクレオチド変化を導入するか、もしくは所望のＰＦ４ＡＲポリペプチドのインビトロ合成によって調製される。そのような変種には、例えばそれらの受容体について図２、４または５に示したアミノ酸配列内の残基からの欠失体、挿入体または置換体が含まれる。最終構築物が所望の特性を有する限り、最終構築物に到達するために欠失、挿入および置換のどのような組み合わせを行ってもよい。

グリコシル化部位の数または位置の変化、膜固定特性を変化させることによるなど、アミノ酸変化がＰＦ４ＡＲの翻訳後プロセシングを変化させてもよい。先行技術に対して法定の新規性および非自明性を持たないＰＦ４ＡＲ変種またはポリペプチドは本発明の範囲から除外される。

ＰＦ４ＡＲのアミノ酸配列変種を設計するにあたって、突然変異部位の位置と突然変異の性質は修飾されるべきＰＦ４ＡＲの特性(単数または複数)に依存するであろう。突然変異の部位は個別に修飾することもでき、連続的に修飾することもできる。例えば、(１)まず保存的なアミノ酸選択物で置換した後に、達成された結果に応じてより過激な選択物で置換するか、(２)標的残基を削除するか、あるいは(３)位置を特定した部位に隣接して同じ種類か異なる種類の残基を挿入するか、もしくは選択枝(１)～(３)の組み合わせによる。突然変異誘発法にとって好ましい位置にあるＰＦ４ＡＲポリペプチドのいくつかの残基または領域を同定する有用な方法は「アラニン走査突然変異誘発法(alanine scanning mutagenesis)」と呼ばれ、カニングハムとウェルスによって記述されている(Science,244:1081-1085[1989])。ここでは一残基または標的残基の群(例：ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓおよびｇｌｕなどの荷電残基)を同定し、中性または陰性に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)で置換することによってそれらのアミノ酸とそれらを取り巻く細胞内外の水性環境との相互作用に影響を与える。次に、置換の部位にさらなる変化または他の変化を導入することによって、置換に対して機能的な感受性を示したドメインを詳細に調べる。したがってアミノ酸配列変化を導入する部位は予め決定されるが、置換の性質そのものは予め決定しておく必要がない。例えばある与えられた部位での突然変異の効果を最適化するために、ａｌａ走査または無作為突然変異誘発法を標的コドンまたは領域で行い、発現したＰＦ４ＡＲ変種を所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングする。

一般に改変にとって好ましいＰＦ４ＡＲ分子の領域は非親水性領域または高度に保存されていない領域である。そのような領域は、ウサギｆＭＬＰ受容体、ヒトｆＭＬＰ受容体、ヒトＣ５ａ受容体および図２、４および５の受容体中の相同な位置において本質的に保存されていない５またはそれ以上の残基の配列からなる領域である。

ＰＦ４ＡＲ変種は少なくとも親配列の生物学的活性、例えば配位子結合活性や抗原性活性

などを示すであろう。抗原的に活性なＰＦ４ＡＲは天然に存在するＰＦ４ＡＲ配列に対して生じた抗体に対して少なくとも１０$^{-9}$ｌ／ｍｏｌの親和性で結合するポリペプチドである。通常そのポリペプチドは少なくとも約１０$^{-8}$ｌ／ｍｏｌの親和性で結合する。最も好ましくは、抗原的に活性なＰＦ４ＡＲが天然の立体配置にある受容体に対して生じた抗体に結合するポリペプチドであり、ここに「天然の立体配置」とは一般に、受容体の三次構造を本質的に改変するカオトロピック剤、熱または他の処理によって変性されていない自然に認められるままの受容体を意味する(これは例えば非還元的非変性的サイズ分画ゲル上での移動によって決定することができる)。抗原性活性の決定に使用される抗体は、フロイント完全アジュバント中に天然の非ウサギ受容体を製剤化し、その製剤を皮下注射し、抗受容体抗体の力価が平坦になるまでその製剤の腹腔内注射によって免疫応答を強化することによって生成させたウサギのポリクローナル抗体である。

変種の１つの群は欠失突然変異体または図２、４または５に記載の配列または他のＰＦ４ＡＲの断片である。一般にこれらの断片は受容体の細胞外領域を構成するものである(これらの受容体は、それらが外質中に輪を作ると考えられる親水性配列によって分離された複数の疎水性貫膜ドメインを含有すると考えられている点で最も異なっている)。特に興味深いのは、酸性アミノ酸残基を含有するＮ-末端細胞外領域である。しかし、無傷の受容体と交差反応するであろう抗体を生じさせることができる配列、もしくはＰＦ４スーパーファミリーの一構成要素に結合するであろう配列であれば、いずれも有用である。これらの断片は典型的には少なくとも約５(通常は少なくとも約１０)残基の連続的な配列を含有するであろう。

アミノ酸配列の欠失は一般に約１ないし３０残基の範囲であり、より好ましくは約１ないし１０残基であり、典型的には連続的である。図２、４および５の受容体の間で相同性が低い領域中に欠失を導入して、その受容体の活性を変化させることができる。そのような欠失は他の位置に行う欠失よりも有意にその受容体の生物学的活性を改変するものと考えられる。連続的な欠失の数は影響を加えるドメイン中のＰＦ４ＡＲの三次構造(例：ベータひだ状シートまたはアルファヘリックス)を保存するように選択されるであろう。

アミノ酸配列の挿入には１残基から１００残基以上を含有するポリペプチドに至る長さのアミノ-および／またはカルボキシル-末端融合と、１アミノ酸残基または複数アミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。配列内挿入(即ちＰＦ４ＡＲ配列内の挿入)は一般に約１ないし１０残基にわたり得、より好ましくは１ないし５残基、もっとも好ましくは１ないし３残基である。

ＰＦ４ＡＲの挿入変種またはその細胞外セグメントには、ＰＦ４ＡＲのＮ-またはＣ-末端に対する免疫原性ポリペプチド(例：ベータ-ラクタマーゼや大腸菌ｔｒｐ遺伝子座によってコード化されている酵素などの細菌ポリペプチド、または酵母タンパク質)の融合物、並びに、１９８９年４月６日に公開されたＷＯ８９／０２９２２に記述されているような、免疫グロブンリン定常領域(または他の免疫グロブリン領域)、アルブミンまたはフェリチンなどの長い半減期を持つタンパク質とのＣ-末端融合物が含まれる。

変種のもう１つの群はアミノ酸置換変種である。これらの変種ではＰＦ４ＡＲ分子中の少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、その位置に異なる残基が挿入されている。置換的突然変異誘発にとって最も興味深い部位には、ＰＦ４ＡＲの活性部位(単数または複数)と同定される部位、および様々な種から得たＰＦ４ＡＲ中に認められるアミノ酸が、側鎖のかさ高さ、電荷および／または疎水性の点で本質的に異なっている部位が含まれる。

その他の興味深い部位は、図２、４および５のＰＦ４ＡＲの特定の残基が同一である部位である。これらの位置はＰＦ４ＡＲの生物学的活性にとって重要であり得る。これらの部位(とりわけ少なくとも３つの他の同等に保存された部位の配列内にあるもの)は比較的保存的な方法で置換される。このような保存的置換を、好ましい置換と題した表１の欄に示す。このような置換が生物学的な活性の変化をもたらす場合には、表１で代表的な置換と名付けた、より本質的な変化、もしくはアミノ酸の種類に関してさらに後述するようなより本質的な変化を導入し、その産物をスクリーニングする。

表 1

元来の残基	代表的な置換	好ましい置換
Ａｌａ（A）	ｖａｌ；ｌｅｕ；ｉｌｅ	ｖａｌ
Ａｒｇ（R）	ｌｙｓ；ｇｌｎ；ａｓｎ	ｌｙｓ
Ａｓｎ（N）	ｇｌｎ；ｈｉｓ；ｌｙｓ；ａｒｇ	ｇｌｎ
Ａｓｐ（D）	ｇｌｕ	ｇｌｕ
Ｃｙｓ（C）	ｓｅｒ	ｓｅｒ
Ｇｌｎ（Q）	ａｓｎ	ａｓｎ
Ｇｌｕ（E）	ａｓｐ	ａｓｐ
Ｇｌｙ（G）	ｐｒｏ	ｐｒｏ
Ｈｉｓ（H）	ａｓｎ；ｇｌｎ；ｌｙｓ；ａｒｇ	ａｒｇ
Ｉｌｅ（I）	ｌｅｕ；ｖａｌ；ｍｅｔ；ａｌａ；ｐｈｅ；ノルロイシン	ｌｅｕ
Ｌｅｕ（L）	ノルロイシン；ｉｌｅ；ｖａｌ；ｍｅｔ；ａｌａ；ｐｈｅ	ｉｌｅ
Ｌｙｓ（K）	ａｒｇ；ｇｌｎ；ａｓｎ	ａｒｇ
Ｍｅｔ（M）	ｌｅｕ；ｐｈｅ；ｉｌｅ	ｌｅｕ
Ｐｈｅ（F）	ｌｅｕ；ｖａｌ；ｉｌｅ；ａｌａ	ｌｅｕ
Ｐｒｏ（P）	ｇｌｙ	ｇｌｙ
Ｓｅｒ（S）	ｔｈｒ	ｔｈｒ
Ｔｈｒ（T）	ｓｅｒ	ｓｅｒ
Ｔｒｐ（W）	ｔｙｒ	ｔｙｒ
Ｔｙｒ（Y）	ｔｒｐ；ｐｈｅ；ｔｈｒ；ｓｅｒ	ｐｈｅ
Ｖａｌ（V）	ｉｌｅ；ｌｅｕ；ｍｅｔ；ｐｈｅ；ａｌａ；ノルロイシン	ｌｅｕ

ＰＦ４ＡＲの機能的または免疫学的同一性の本質的な改変は、（ａ）置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造(例えばシートまたは螺旋立体配置)、（ｂ）標的部位におけるその分子の電荷または疎水性、あるいは（ｃ）側鎖のかさ高さ、の維持に対するそれらの効果がかなり異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は共通の側鎖特性に基づいていくつかの群に分類される。

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；
（２）中性親水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；
（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；
（４）塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；
（５）鎖の配向に影響を与える残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；
（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

非保存的置換はこれらの種類の一つの構成要素を別のものに交換することを必然的に伴うであろう。他のＰＦ４ＡＲと相同なＰＦ４ＡＲの領域に、より好ましくは該分子の非相同領域にそのような置換された残基を導入することができる。

ＰＦ４ＡＲの適性な立体配置の維持に関与していないシステイン残基はいずれも一般的にはセリンで置換することによってその分子の酸化的安定性を改善し、常軌を逸した架橋を防止することができる。

ＰＦ４ＡＲのアミノ酸配列変種をコード化するＤＮＡは当該技術分野で知られている様々

な方法で調製される。これらの方法には天然の供給源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列変種の場合)あるいはオリゴヌクレオチド媒介(または部位特異的)突然変異誘発法、ＰＣＲ突然変異誘発法、および先に調製されたＰＦ４ＡＲの変種または非変種型のカセット突然変異誘発法などが含まれるが、これらに限定されない。これらの技術ではＰＦ４ＡＲ核酸(ＤＮＡまたはＲＮＡ)またはＰＦ４ＡＲ核酸に相補的な核酸を使用するであろう。

オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法は、ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡの置換、欠失および挿入変種を調製する際に好ましい方法である。この技術はアデルマンら,DNA,2:183(1983)に記述されているように当該技術分野ではよく知られている。簡単に述べると、ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡの未改変のＤＮＡ配列または天然のＤＮＡ配列を含有するプラスミドまたはバクテリオファージの一本鎖型であるＤＮＡ鋳型に所望の突然変異をコード化するオリゴヌクレオチドをハイブリッド形成させることによって、ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡを改変する。ハイブリッド形成の後、ＤＮＡポリメラーゼを用いて上記鋳型の完全な第２の相補鎖を合成すれば、その相補鎖は上記オリゴヌクレオチドプライマーを組み込み、ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡ中の選択された改変をコード化するであろう。

一般に少なくとも２５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが使用される。最適なオリゴヌクレオチドは突然変異をコードするヌクレオチド(単数または複数)の両側に鋳型に対して完全に相補的な１２～１５ヌクレオチドを有するであろう。このことはそのオリゴヌクレオチドが一本鎖ＤＮＡ鋳型分子に対して適切にハイブリッド形成することを保証する。オリゴヌクレオチドは、クレアら(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,75:5765[1978])が記述しているような当該技術分野で既知の技術を用いて容易に合成される。

一本鎖ＤＮＡ鋳型も標準的な技術を用いて二本鎖プラスミド(または他の)ＤＮＡを変性させることによって生成させることができる。

(例えばアミノ酸配列変種を生成させるべく)天然のＤＮＡ配列を改変するために、適当なハイブリッド形成条件下でオリゴヌクレオチドを一本鎖鋳型にハイブリッド形成させる。次にＤＮＡ重合酵素(通常はＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片)を加えることにより、上記オリゴヌクレオチドを合成のプライマーとして用いて鋳型の相補鎖を合成する。したがってＤＮＡの１つの鎖はＰＦ４ＡＲの突然変異型をコード化し、他方の鎖(元の鋳型)はＰＦ４ＡＲの天然の変化していない配列をコード化しているというヘテロ二本鎖分子が形成される。次にこのヘテロ二本鎖分子を適当な宿主細胞(通常は大腸菌ＪＭ１０１などの原核生物)中に導入する。細胞を生育した後、それらをアガロースプレートに接種し、３２-ホスフェートで放射線標識したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてスクリーニングすることにより、突然変異したＤＮＡを含有する細菌コロニーを同定する。次に突然変異した領域を取り出し、タンパク質の生産に適したベクター(一般的に適当な宿主の形質転換に典型的に使用される種類の発現ベクター)中に入れる。

プラスミドのどちらの鎖も突然変異(単数または複数)を含有するようなホモ二本鎖分子を作成するように、すぐ上に記述した方法を改変することができる。この改変は以下の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチドを上述の一本鎖鋳型にアニールさせる。３種類のデオキシリボヌクレオチド(即ちデオキシリボアデノシン(ｄＡＴＰ)、デオキシリボグアノシン(ｄＧＴＰ)およびデオキシリボチミジン(ｄＴＴＰ))の混合物をｄＣＴＰ-(ａＳ)と呼ばれる改良されたチオ-デオキシリボシトシン(これはアマシャム・コーポレイションから入手できる)と混合する。この混合物を鋳型-オリゴヌクレオチド複合体に加える。この混合物にＤＮＡポリメラーゼを加えると、突然変異させた塩基以外は鋳型と同一な鎖が生成する。さらにこの新しいＤＮＡ鎖はｄＣＴＰの代わりにｄＣＴＰ-(ａＳ)を含有し、これは制限エンドヌクレアーゼ消化からその鎖を保護するように機能するであろう。二本鎖になったヘテロ二本鎖の鋳型鎖に適当な制限酵素で裂け目を入れた後、その鋳型鎖をＥｘｏＩＩＩヌクレアーゼまたは他の適当なヌクレアーゼを用いて、突然変異を誘発すべき部位を含有する領域を通過して消化することができる。次に、一部分のみが一本鎖である分子が残るように反応を停止させる。次に４種類すべてのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、ＡＴＰおよびＤＮＡリガーゼの存在下でＤＮＡポリメラーゼを用いることによって完全な二

本鎖になったＤＮＡホモ二本鎖を形成させる。次にこのホモ二本鎖分子を大腸菌ＪＭ１０１などの適当な宿主細胞中に上述の如く導入することができる。
置換すべきアミノ酸が１より多いＰＦ４ＡＲ突然変異体をコード化するＤＮＡは数種類の方法の１つで作成することができる。それらのアミノ酸がそのポリペプチド鎖中で互いに接近して位置する場合には、所望のアミノ酸置換のすべてをコードする１つのオリゴヌクレオチドを用いて同時にそれらを突然変異させることができる。しかしそれらのアミノ酸が互いにいくらか離れて位置する場合(約１０アミノ酸以上によって分離されている場合)には、所望の変化のすべてをコード化する１本のオリゴヌクレオチドを作成することがより困難になる。その代わりとして２つの代替方法のいずれかを使用することができる。
第１の方法では、置換すべき各アミノ酸について別個のオリゴヌクレオチドを作成する。次にこれらのオリゴヌクレオチドを一本鎖鋳型ＤＮＡに同時にアニールさせると、その鋳型から合成される第２のＤＮＡ鎖は所望のアミノ酸置換のすべてをコード化するであろう。
代替的な方法は所望の突然変異体を作成するために２回またはそれ以上の突然変異誘発を必要とする。第１回は単一の突然変異体について記述した通りであり、野生型ＤＮＡを鋳型として使用し、第１の所望のアミノ酸置換をコード化するオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニールさせ、次いでヘテロ二本鎖ＤＮＡ分子を生成させる。第２回の突然変異誘発では第１回の突然変異誘発で作成された突然変異したＤＮＡを鋳型として使用する。したがってこの鋳型はすでに１またはそれ以上の突然変異を含有している。次に追加の所望のアミノ酸置換(単数または複数)をコード化するヌクレオチドをこの鋳型にアニールさせると、得られるＤＮＡ鎖は第１回と第２回の突然変異誘発の両方に由来する突然変異をコード化していることになる。この得られたＤＮＡを第３回の突然変異誘発などで鋳型として用いることができる。
ＰＣＲ突然変異誘発法もＰＦ４ＡＲのアミノ酸変種を作成するのに適している。以下の議論ではＤＮＡについて述べるが、この技術がＲＮＡにも応用されることは理解されるところである。ＰＣＲ技術とは一般的には下記の操作を意味する(アールリッヒ(上記),アール・ヒグチによる章,６１～７０頁)。少量の鋳型ＤＮＡをＰＣＲにおける出発物質として使用すると、鋳型ＤＮＡ中の対応する領域とは配列がわずかに異なるプライマーを用いることによって、そのプライマーが鋳型と異なる位置だけが鋳型配列と異なる特異的なＤＮＡ断片を比較的大量に生成させることができる。プラスミドＤＮＡ中に突然変異を導入するためには、プライマーの１つを、それが突然変異の位置と重複し、その突然変異を含有するように設計する。他方のプライマーの配列はそのプラスミドの反対鎖の配列と同一でなければならないが、この配列はプラスミドＤＮＡに沿うどの位置にあってもよい。しかし、これらのプライマーによって挟まれた増幅されるＤＮＡの全領域が最終的には容易に配列決定することができるように、第２のプライマーの配列が第１のプライマーの配列から２００ヌクレオチド以内に位置することが好ましい。ここに記述したような一対のプライマーを用いるＰＣＲ増幅は、プライマーによって指定される突然変異の位置と、鋳型の複写がいくらか誤りがちであるのでおそらく他の位置とで異なるＤＮＡ断片の集団をもたらす。
生成物に対する鋳型の比率が極端に低い場合には、生成物ＤＮＡ断片の大部分が所望の突然変異(単数または複数)を組み込む。この生成物を用いて、標準的なＤＮＡ技術によって、ＰＣＲ鋳型として機能したプラスミドの対応する領域を置換する。離れた位置にある突然変異は、突然変異第２プライマーを用いるか、あるいは異なる突然変異プライマーを用いて第２ＰＣＲを行い、得られた２つのＰＣＲ断片をベクター断片に三(またはそれ以上)部分連結で同時に連結することによって、同時に導入することができる。
変種を作成するもう１つの方法であるカセット突然変異誘発法はウェルスらが記述した技術(Gene,34:315[1985])に基づく。
Ｃ．クローニングベヒクルへのＤＮＡの挿入
天然のＰＦ４ＡＲまたは変種ＰＦ４ＡＲをコード化するｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡを、さらなるクローニングのため(ＤＮＡの増幅)、あるいは発現のために、複製可能なベクタ

ー中に挿入する。多くのベクターを利用することができ、適当なベクターの選択は、（１）それをＤＮＡ増幅に使用するのか、それともＤＮＡ発現に使用するのかということ、（２）ベクター中に挿入されるべきＤＮＡの大きさ、および（３）そのベクターによって形質転換される宿主細胞、に依存するであろう。各ベクターはその機能(ＤＮＡの増幅またはＤＮＡの発現)とそれが適合する宿主細胞に応じて様々な成分を含有する。ベクター成分には一般に下記成分の１またはそれ以上が含まれるが、それらに限定されない：シグナル配列、複製起点、１またはそれ以上の標識遺伝子、エンハンサー要素、プロモーターおよび転写終止配列。

（ｉ）シグナル配列成分

一般にシグナル配列はベクターの一成分であるか、もしくはベクター中に挿入されるＰＦ４ＡＲ ＤＮＡの一部であり得る。天然のプロＰＦ４ＡＲ ＤＮＡは、出願人らの組換え細胞においてその細胞表面に向けられるが、それは従来のシグナルを含有しておらず、ＰＦ４ＡＲの膜挿入中に、そのポリペプチドの翻訳後プロセシングの間に切断されるＮ-末端ポリペプチドはない。

（ii）複製起点成分

発現ベクターとクローニングベクターは共に、１またはそれ以上の選択された宿主細胞中でそのベクターが複製することを可能にする核酸配列を含有する。一般にクローニングベクターでは、この配列は、ベクターが宿主染色体ＤＮＡとは独立して複製することを可能にする配列であり、複製起点または自律的複製配列を含む。このような配列は様々な細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。プラスミドｐＢＲ３２２から得られる複製起点はほとんどのグラム陰性菌に適しており、２μプラスミド起点は酵母に適しており、様々なウイルス起点(ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶまたはＢＰＶ)は哺乳類細胞中でのクローニングベクターに有用である。一般的に複製起点成分は哺乳類発現ベクターには必要でない(ＳＶ４０起点は典型的に使用され得るが、これは単にそれが初期プロモーターを含有しているからに過ぎない)。

ほとんどの発現ベクターは「シャトル」ベクターであり、即ち、それらのベクターは少なくとも１種類の細胞中で複製することができ、発現のために別の生物中にトランスフェクションすることができるのである。例えばあるベクターを大腸菌中でクローン化し、次いで同じベクターを(宿主細胞染色体から独立して複製することはできないが)発現のために酵母や哺乳類細胞中にトランスフェクションする。

宿主ゲノム中に挿入することによってＤＮＡを増幅することもできる。これはバチルス種を宿主として使用し、例えばバチルスゲノムＤＮＡ中に認められる配列と相補的なＤＮＡ配列をベクター中に含めることによって容易に達成される。このベクターによるバチルスのトランスフェクションはゲノムとの相同的な組換えとＰＦ４ＡＲ ＤＮＡの挿入をもたらす。しかしＰＦ４ＡＲをコード化するゲノムＤＮＡの回収は外因的に複製されるベクターの場合より複雑である。なぜならＰＦ４ＡＲ ＤＮＡを切り出すためには制限酵素消化が必要だからである。

（iii）選択遺伝子成分

発現ベクターとクローニングベクターは選択可能標識とも呼ばれる選択遺伝子を含有すべきである。この遺伝子は形質転換された宿主細胞の選択培養培地中での成長または生存にとって必要なタンパク質をコード化する。選択遺伝子を含有するベクターで形質転換されなかった宿主細胞は上記培養培地中で生存できないであろう。代表的な選択遺伝子は、（ａ）抗生物質または他の毒素(例：アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリン)に対する耐性を付与するタンパク質、（ｂ）栄養要求性の欠損を補足するタンパク質、または（ｃ）複合培地から利用することができない必須の栄養素を供給するタンパク質(例：バチルスにとってＤ-アラニンラセマーゼをコード化する遺伝子)をコード化する。

選択法の一例では宿主細胞の成長を抑制するために薬物を使用する。異種遺伝子で成功裏に形質転換された細胞は薬剤耐性を付与するタンパク質を発現させ、それゆえにその選択法を生き抜くことができる。そのような優性選択の例では薬物ネオマイシン(サザンら,J.

Molec.Appl.Genet.,1:327[1982])、ミコフェノール酸(ムリガンら,Science 209:1422[1980])またはハイグロマイシン(サジェンら,Mol.Cell.Biol.,5:410-413[1985])を使用する。上記の三例では適当な薬物(それぞれＧ４１８またはネオマイシン(ジェネチシン)、ｘｇｐｔ(ミコフェノール酸)もしくはハイグロマイシン)に対する耐性を伝えるために真核性制御下で細菌遺伝子を使用する。

哺乳類細胞に適する選択標識のもう１つの例は、ＰＦ４ＡＲ核酸を取り込む能力のある細胞の同定を可能にするもの、例えばジヒドロフォレート・レダクターゼ(ＤＨＦＲ)またはチミジン・キナーゼなどである。その標識を取り込んでいるがゆえに形質転換体のみが唯一生存に適合する選択圧下に哺乳類細胞形質転換体を置く。培地中の選択剤の濃度が連続的に変化するような条件下で形質転換体を培養し、それによって選択遺伝子とＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡの両方の増幅を導くことにより、選択圧をかけることができる。増幅とは、組換え細胞の連続的世代の染色体内で、成長にとって必須のタンパク質の生産がより強く求められる遺伝子が直列して反復される過程である。増大した量のＰＦ４ＡＲが増幅した遺伝子から合成される。

例えばＤＨＦＲ選択遺伝子によって形質転換された細胞は、ＤＨＦＲの競争的拮抗剤であるメトトレキセート(Ｍｔｘ)を含有する培養培地中ですべての形質転換体を培養することによって最初に同定される。野生型ＤＨＦＲを使用する場合に適当な宿主細胞はＤＨＦＲ活性が欠損しているチャイニーズ・ハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞であり、これはウルラウブおよびチェイシン,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216[1980]に記述されているように調製され、増殖される。次に形質転換細胞を増大したレベルのメトトレキセートにさらす。これはＤＨＦＲ遺伝子の複数コピーの合成を導き、これに付随して、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡなど、発現ベクターからなる他のＤＮＡの複数コピーを導く。この増幅技術は、例えばＭｔｘに対して高度に耐性な突然変異ＤＨＦＲ遺伝子使用すれば(ＥＰ１１７０６０)、内因的なＤＨＦＲの存在にもかかわらず、他の適当な宿主のいずれでも使用することができる(例：ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ６１ ＣＨＯ-Ｋ１)。別法として、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡ配列、野生型ＤＨＦＲタンパク質およびもう１つの選択可能標識(アミノグリコシド３’ホスホトランスフェラーゼ(ＡＰＨ)など)で形質転換または同時形質転換された宿主細胞(特に内因性ＤＨＦＲを含有する野生型宿主)を、アミノグリコシド性抗生物質(例：カナマイシン、ネオマイシンまたはＧ４１８)などの選択可能標識のための選択剤を含有する培地中での細胞成長によって選択することができる。米国特許第４９６５１９９号を参照のこと。

酵母での使用に適した選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７中に存在するｔｒｐ１遺伝子である(スチンクコームら,Nature,282:39[1979]；キングスマンら,Gene,7:141[1979]またはチェンパーら,Gene,10:157[1980])。ｔｒｐ１遺伝子はトリプトファン中での生育能を欠く酵母の突然変異株(例えばＡＴＣＣ番号４４０７６またはＰＥＰ４-１(ジョーンズ,Genetics,85:12[1977]))のための選択標識を提供する。酵母宿主細胞ゲノムにおけるｔｒｐ１損傷の存在は、トリプトファンの非存在下での成長によって形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。同様にＬｅｕ２欠損酵母株(ＡＴＣＣ２０６２２または３８６２６)はＬｅｕ２遺伝子を保持する既知のプラスミドによって補完される。

（iv）プロモーター成分

発現ベクターは通常、宿主生物によって認識されるプロモーターを含有しており、それがＰＦ４ＡＲ核酸に機能可能に連結している。プロモーターは構造遺伝子の開始コドンの上流(５’側)(一般的には約１００～１０００ｂｐ内)に位置する翻訳されない配列であり、この配列は、それが機能的に連結している特定の核酸配列(ＰＦ４ＡＲなど)の転写と翻訳を制御する。そのようなプロモーターは典型的には２つの種類、即ち、誘導性と構成性に分類される。誘導性のプロモーターは培養条件の何らかの変化(例：栄養素の存在または不在あるいは温度の変化)に応答してその制御下にあるＤＮＡからの増大したレベルの転写を開始させるプロモーターである。現在では様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターがよく知られている。これらのプロモーターは、制限酵素消化によって供給源ＤＮＡからそのプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクタ

ー中に挿入することによって、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡに機能可能に連結される。天然のＰＦ４ＡＲプロモーター配列と多くの異種プロモーターは共に、ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡの増幅および／または発現を管理するために使用することができる。しかし異種プロモーターは一般に天然のＰＦ４ＡＲプロモーターと比較してより高い転写と発現されるＰＦ４ＡＲのより高い収率を可能にするので、異種プロモーターが好ましい。

原核宿主と共に使用するのに適したプロモーターにはβ-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系(チャングら,Nature,275:615[1978]；ゴエッデルら,Nature,281:544[1979])、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファン(ｔｒｐ)プロモーター系(ゴエッデルら,Nucleic Acids Res.,8:4057[1980]およびＥＰ３６７７６)、並びに、ｔａｃプロモーターなどのハイブリッドプロモーター(デボアーら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:21-25[1983])が含まれる。しかしその他の既知の細菌プロモーターも好適である。それらのヌクレオチド配列は公表されているので、当業者は、必要な制限部位を供給するためにリンカーやアダプターを使用することによって、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡにそれらを機能可能に連結することができる(シーベンリストら,Cell,20:269[1980])。細菌系で使用されるプロモーターは一般に、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡに機能可能に連結したシャイン・ダルガノ(Ｓ.Ｄ.)配列をも含有するであろう。

酵母宿主と共に使用するのに適した促進配列には３-ホスホグリセレート・キナーゼ(ヒッチェマンら,J.Biol.Chem.,255:2073[1980])または他の解糖系酵素(ヘスら,J.Adv.Enzyme Reg.,7:149[1968]；ホーランド,Biochemistry,17:4900[1978])、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-３-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベート・デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-６-ホスフェート・イソメラーゼ、３-ホスホグリセレート・ムターゼ、ピルベート・キナーゼ、トリオセホスフェート・イソメラーゼ、ホスホグルコース・イソメラーゼおよびグルコキナーゼなどのプロモーターが含まれる。

生育条件によって転写を制御できるという追加の利点を有する他の酵母プロモーターは、アルコール・デヒドロゲナーゼ２、イソチトクロームＣ、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-３-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ、並びに、マルトースおよびガラクトース利用の原因である酵素のプロモーター領域である。酵母発現での使用に適した好適なベクターおよびプロモーターはさらにヒッチェマンら,ＥＰ７３６５７Ａに記述されている。酵母のエンハンサーも酵母プロモーターと共に有利に使用される。

真核生物のためのプロモーター配列が知られている。実質上すべての真核遺伝子が、転写が開始される部位から約２５～３０塩基上流に位置するＡＴに富む領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から７０～８０塩基上流に認められるもう１つの配列はＣＸＣＡＡＴ領域であり、ここにＸはいずれのヌクレオチドでもよい。ほとんどの真核遺伝子の３’末端にはＡＡＴＡＡＡ配列があり、この配列はコード配列の３’末端へのポリＡ尾部の付加のためのシグナルであるらしい。これらの配列はすべて好適に哺乳類発現ベクター中に挿入される。

哺乳類宿主細胞におけるベクターからのＰＦ４ＡＲの転写は、ポリオーマウイルス、家禽ポックスウイルス(１９８９年７月５日に公表されたＵＫ２２１１５０４)、アデノウイルス(アデノウイルス２など)、牛パピローマウイルス、ニワトリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、そして最も好ましくはシミアンウイルス４０(ＳＶ４０)などのウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種哺乳類プロモーター(例：アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター)から得られるプロモーター、熱ショックプロモーターから得られるプロモーター、並びに、ＰＦ４ＡＲ配列が正常時に伴っているプロモーター(ただしそのようなプロモーターが宿主細胞系に適合する場合に限る)によって制御される。

ＳＶ４０ウイルスの初期および後期プロモーターはＳＶ４０制限断片として都よく入手することができ、その断片はＳＶ４０ウイルス複製起点をも含有している。フィアースら,Nature,273:113(1978)；ムリガンおよびバーグ,Science,209:1422-1427(1980)；パブラキ

スら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78:7398-7402(1981)。ヒトサイトメガロウイルスの即時初期プロモーターはＨｉｎｄIII Ｅ制限断片として都合よく入手される。グリーンアウェイら,Gene,18:355-360(1982)。牛パピローマウイルスをベクターとして使用することにより哺乳類宿主中でＤＮＡを発現させる系は米国４４１９４４６に開示されている。この系の変法は米国４６０１９７８に記述されている。サル細胞中で免疫インターフェロンをコード化するｃＤＮＡを発現させることについてはグレイら,Nature,295:503-508(1982)を、マウス細胞中でヘルペスシンプレックスウイルスに由来するチミジンキナーゼプロモーターの制御下でヒトβ-インターフェロンｃＤＮＡを発現させることについてはレイエスら,Nature,297:598-601(1982)を、マウスおよびウサギの培養細胞におけるヒトインターフェロンβ１遺伝子の発現についてはカナーニおよびバーグ,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79:5166-5170(1982)を、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用するＣＶ-１サル腎臓細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞、ＨｅＬａ細胞およびマウスＮＩＨ-３Ｔ３細胞における細菌ＣＡＴ配列の発現についてはゴーマンら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79:6777-6781(1982)をも参照のこと。

（ｖ）エンハンサー要素成分

本発明のＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡの高等真核生物による転写はそのベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増大する。エンハンサーは通常１０～３００ｂｐのシス作用性のＤＮＡ要素であって、プロモーターに作用してその転写を増大させる。エンハンサーは配向と位置には比較的非依存性であり、転写単位の５’側(ライミンスら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78:993[1981])および３’側(ラスキーら,Mol.Cell Bio.,3:1108[1983])、イントロン内(バネルジら,Cell,33:729[1983])、並びに、コード配列自体の中(オスボーンら,Mol.Cell Bio.,4:1293[1984])に認められている。現在では哺乳類遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテインおよびインスリン)から多くのエンハンサー配列が知られている。しかし典型的には、真核細胞ウイルスから得られるエンハンサーを使用するであろう。その例には、複製起点の後期側(１００～２７０ｂｐ)のＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核プロモーターの活性化のための増進要素についてはヤニブ,Nature,297:17-18(1982)をも参照のこと。ＰＦ４ＡＲ ＤＮＡに対して５’側または３’側の位置でベクターにエンハンサーを接合することができるが、プロモーターの５’側に位置させることが好ましい。

（vi）転写終止成分

真核宿主細胞(酵母、カビ、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物から得られる有核細胞)中で使用される発現ベクターは転写の停止とそのｍＲＮＡの安定性にとって必要な配列をも含有するであろう。そのような配列は一般に真核またはウイルスＤＮＡもしくはｃＤＮＡの５’非翻訳領域と、時には３’非翻訳領域から入手することができる。これらの領域は、ＰＦ４ＡＲをコード化するｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化された断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。３’非翻訳領域は転写終止部位をも含む。

１またはそれ以上の上記成分と所望のコードおよび制御配列を含有する好適なベクターは、標準的な連結技術によって構築される。単離されたプラスミドまたはＤＮＡ断片を切断し、加工し、所望の形態で再連結して必要なプラスミドを作成する。

構築したプラスミド中の正しい配列を確認するための分析については、連結混合物を用いて大腸菌Ｋ１２株２９４(ＡＴＣＣ３１４４６)を形質転換し、成功した形質転換体を、それが適当な場合には、アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性によって選択する。形質転換体からプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析し、かつ／または、メッシングら,Nucleic Acids Res.,9:309(1981)の方法またはマキサムら,Methods in Enzymology,65:499(1980)の方法によって配列決定する。

本発明の実施において特に有用なものは、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡの哺乳類細胞における一時的発現を供給する発現ベクターである。一般に一時的発現は、宿主細胞が発

現ベクターの多くのコピーを蓄積し、次いでその発現ベクターによってコード化されている所望のポリペプチドを高レベルで合成するように、宿主細胞中で効率よく複製することができる発現ベクターの使用を必要とする。適当な発現ベクターと宿主細胞からなる一時的発現系はクローン化したＤＮＡによってコード化されるポリペプチドの便利な陽性同定を可能にすると共に、そのようなポリペプチドを所望の生物学的または生理学的特性について迅速にスクリーニングすることを可能にする。したがって一時的発現系はＰＦ４ＡＲ様活性を有するＰＦ４ＡＲの類縁体および変種を同定する目的にとって本発明において特に有用である。

組換え脊椎動物細胞培養におけるＰＦ４ＡＲの合成に適合させるのに適した他の方法、ベクターおよび宿主細胞はゲシングら,Nature,293:620-625[1981]；マンテイら,Nature,281:40-46[1979]；レビンソンら,ＥＰ１１７０６０およびＥＰ１１７０５８に記述されている。ＰＦ４ＡＲの哺乳類細胞培養発現にとって特に有用なプラスミドはｐＲＫ５(ＥＰ公開番号３０７２４７)である。

Ｄ．宿主細胞の選択と形質転換

本発明においてベクターをクローン化または発現させるのに適した宿主細胞は上述の原核生物、酵母または高等真核細胞である。好適な原核生物にはグラム陰性生物やグラム陽性生物などの真正細菌(例えば大腸菌、枯草菌などのバチルス、緑膿菌などのシュードモナス、ネズミチフス菌またはセラチア・マルセサンス)が含まれる。大腸菌Ｂ、大腸菌χ１７７６(ＡＴＣＣ３１５３７)および大腸菌Ｗ３１１０(ＡＴＣＣ２７３２５)などの他の株も好適ではあるが、好ましい大腸菌クローニング宿主の一つは大腸菌２４９(ＡＴＣＣ３１４４６)である。これらの例は限定的なものではなく単なる例示である。好ましくは宿主細胞が最小量のタンパク質加水分解酵素を分泌すべきである。別法として、インビトロ・クローニング法(例：ＰＣＲまたは他の核酸ポリメラーゼ反応)も好適である。

原核生物に加えて、糸状菌や酵母などの真核微生物もＰＦ４ＡＲ ＤＮＡを含有するベクターにとって好適な宿主である。サッカロミセス・セレビシェや一般的なパン酵母は下等真核宿主微生物のなかでは最も一般的に使用されるものである。しかし、他の属、種および株のいくつかも一般的に利用可能で、本発明において有用であり、例えばエス・ポムベ(S.pombe)［ビーチおよびナース,Nature,290:140(1981)］、クルイベロマイセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)［ルーベンコートら,J.Bacteriol.,737(1983)］、ヤロウィア(yarrowia)［ＥＰ４０２２２６］、ピチア・パストリス(Pichia pastoris)［ＥＰ１８３０７０］、トリコデルマ・レーシア(Trichoderma reesia)［ＥＰ２４４２３４］、ニューロスポラ・クラッサ(Neurospora crassa)［ケースら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:5259-5263(1979)］、およびエイ・ニドュランス(A.nidulans)［バランスら,Biochem.Biophys.Res.Commun.,112:284-289(1983)；チルバーンら,Gene,26:205-221(1983)；ヤルトンら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:1470-1474(1984)］やエイ・ニガー［ケリーおよびハイネス,EMBO J.,4:475-479(1985)］などのアスペルギラス宿主などである。

グリコシル化されたＰＦ４ＡＲポリペプチドの発現に適した宿主細胞は多細胞生物から誘導される。そのような宿主細胞は複雑なプロセシングを行う能力とグリコシル化活性を有する。脊椎動物培養に由来するか非脊椎動物培養に由来するかにかかわりなく、原則としてどのような高等真核細胞培養でも役に立つ。非脊椎動物細胞の例には植物および昆虫細胞が含まれる。例えばスポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)(イモムシ)、アエデス・アエジプチ(Aedes aegypti)(蚊)、アエデス・アルボピクツス(Aedes albopictus)(蚊)、ドロソフィラ・メラノガステル(Drosophila melanogaster)(ミバエ)およびボムビクス・モリ(Bombyx mori)宿主細胞などの宿主から数多くのバクロウイルス株と変種および対応する許容昆虫細胞が同定されている。例えばルコウら,Bio／Technology,6:47-55(1988)；ミラーら,「Genetic Engineering」(セトロウ,ジェイ・ケイら編,第８巻,プレナム・パブリッシング,1986)中の277～279頁；マエダら,Nature,315:592-594(1985)を参照のこと。そのような様々なウイルス株は公に利用可能であり(例：アウトグラファ・カリフォルニカＮＰＶ(Autographa californica NPV)のＬ１変種およびボムビクス・モリのＢｍ-５株)、そのようなウイルスを本発明に従って本発明でのウイルスとして(とりわけ

スポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションに)使用することができる。綿、トウモロコシ、ジャガ芋、大豆、ツクバネアサガオ、トマトおよびタバコの植物細胞培養を宿主として使用することができる。典型的には、予めＰＦ４ＡＲ ＤＮＡを含有するように操作しておいた細菌アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)のいくつかの株と共にインキュベートすることによって植物細胞をトランスフェクションする。植物細胞培養をエイ・ツメファシエンスと共にインキュベートする間にＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡが植物細胞宿主に移送されることによってそれがトランスフェクションされて、適当な条件下でＰＦ４ＡＲ ＤＮＡを発現させるであろう。さらに植物細胞に適合する調節およびシグチル配列も利用することができ、それらは例えばノパリン・シンターゼ・プロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列である。デピッカーら,J.Mol.Appl.Gen.,1:561(1982)。さらに、Ｔ-ＤＮＡ７８０遺伝子の上流域から単離されたＤＮＡセグメントは、組換えＤＮＡ含有植物組織における植物発現可能遺伝子の転写レベルを活性化または増大させることができる。１９８９年６月２１日に公開されたＥＰ３２１１９６を参照のこと。

しかし、最も興味を集めてきたものは脊椎動物細胞であり、脊椎動物細胞の培養中での増殖(組織培養)は近年日常的な手法になっている［「Tissue Culture」(アカデミック・プレス,クルセおよびパターソン編(1973)］。有用な哺乳類宿主細胞系の例は、ＳＶ４０で形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系(ＣＯＳ-７,ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１)、ヒト胚腎臓系(２９３または懸濁培養中での成長のためにサブクローニングされた２９３細胞,グラハムら,J.Gen Virol.,36:59[1971])、幼若ハムスター腎臓細胞(ＢＨＫ,ＡＴＣＣ ＣＣＬ １０)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ(ＣＨＯ,ウルラウブおよびチェシン,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216[1980])、マウスセリトーリ細胞(ＴＭ４,マザー,Biol.Reprod.,23:243-251[1980])、サル腎臓細胞(ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０)、アフリカミドリザル腎臓細胞(ＶＥＲＯ-７６,ＡＴＣＣ ＣＲＬ-１５８７)、ヒト頚部癌腫細胞(ＨＥＬＡ,ＡＴＣＣ ＣＣＬ ２)、イヌ腎臓細胞(ＭＤＣＫ,ＡＴＣＣ ＣＣＬ ３４)、バッファローラット肝臓細胞(ＢＲＬ３Ａ,ＡＴＣＣ ＣＲＬ １４４２)、ヒト肺細胞(Ｗ１３８,ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５)、ヒト肝臓細胞(Ｈｅｐ Ｇ２,ＨＢ ８０６５)、マウス乳房腫瘍(ＭＭＴ ０６０５６２,ＡＴＣＣ ＣＣＬ ５１)、ＴＲＩ細胞(マザーら,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68[1982])、ＭＲＣ５細胞、ＦＳ４細胞、およびヒト肝癌細胞系(Ｈｅｐ Ｇ２)である。好ましい宿主細胞はヒト胚腎臓２９３細胞およびチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞である。

宿主細胞を上述した本発明の発現ベクターまたはクローニングベクターでトランスフェクション(好ましくは形質転換)し、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、もしくは所望の配列をコード化する遺伝子を増幅するのに適するように改変した従来の栄養培地中で培養する。

トランスフェクションとは宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味し、何らかのコード配列が実際に発現されるかどうかにかかわらない。当業者は数多くのトランスフェクション法を知っており、例えば$CaPO_4$およびエレクトロポレーションなどである。トランスフェクションの成功は一般にこのベクターの機能の何らかの指標が宿主細胞内で起こる時に認識される。

形質転換とは、ある生物にＤＮＡを導入することであって、そのＤＮＡが染色体外要素として、あるいは染色体統合によって、複製可能であるような導入を意味する。形質転換は、使用する宿主細胞に応じて、その細胞に適した標準的な技術を用いて行われる。サムブルックら(上記)の１.８２章に記述されているような塩化カルシウムを使用するカルシウム処理は、一般に原核生物や強固な細胞壁障壁を含有する他の細胞に用いられる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスによる感染は、シャウら,Gene,23:315(1983)と１９８９年６月２９日に公開されたＷＯ８９／０５８５９に記述されているように、ある種の植物細胞の形質転換に用いられる。上述のような細胞壁を持たない哺乳類細胞については、サムブルックら(上記)の１６.３０～１６.３７章に記述されているリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳類細胞宿主系形質転換の一般的な側面はアレックスらが１９８３年８月

１６日に発効した米国４３９９２１６に記述している。酵母への形質転換は典型的にはファン・ゾーリンゲンら,J.Bact.,130:946(1977)とシャオら,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),76:3829(1979)の方法に従って行われる。しかし核注射、エレクトロポレーションあるいはプロトプラスト融合などの、細胞にＤＮＡを導入する他の方法も使用することができる。

Ｅ．宿主細胞の培養

本発明のＰＦ４ＡＲポリペプチドを生産するために使用する原核細胞を、サムブルックら(上記)に一般的に記述されているような適当な培地中で培養する。

本発明のＰＦ４ＡＲを生産するために使用する哺乳類宿主細胞は様々な培地中で培養することができる。ハムＦ１０(シグマ)、最小必須培地(［ＭＥＭ］,シグマ)、ＲＰＭＩ-１６４０(シグマ)およびダルベッコ変法イーグル培地(［ＤＭＥＭ］,シグマ)などの市販の培地は上記宿主細胞の培養に適している。さらに、ハムおよびワラス,Meth.Enz.,58:44(1979)、バーンズおよびサトー,Anal.Biochem.,102:255(1980)、米国４７６７７０４、４６５７８６６、７９２７７６２または４５６０６５５、ＷＯ９０／０３４３０、ＷＯ８７／００１９５または米国特許Ｒｅ.３０９８５に記述されている培地はいずれも上記宿主細胞のための培養培地として使用できる。これらの培地には必要に応じてホルモンおよび／または他の成長因子(インスリン、トランスフェリンまたは表皮成長因子など)、塩類(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩など)、緩衝剤(ＨＥＰＥＳなど)、ヌクレオシド(アデノシンやチミジンなど)、抗生物質(ジェンタマイシン(Gentamycin™)薬物など)、微量元素(通常はμＭ範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される)およびグルコースや等価なエネルギー源を補足することができる。また他の必要な補足物はいずれも当業者が知っているであろう適当な濃度で加えることができる。温度、ｐＨなどの培養条件は、発現のために選択した宿主細胞について過去に用いられた条件であり、当業者には明白であろう。

この開示で言う宿主細胞はインビトロ培養中の細胞と共に宿主動物内にある細胞をも包含する。

本発明のＰＦ４ＡＲを相同的組換えによって生産し得ること、あるいは、ＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡを既に含有している細胞中に導入される制御要素を利用する組換え生産法によって生産し得ることも、さらに予期されるところである。例えば強力なプロモーター／エンハンサー要素、サプレッサーまたは外因的転写変調要素を、所望のＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡの転写に影響を与えるに足る近さと配向で意図する宿主細胞のゲノム中に挿入する。制御要素は本発明のＰＦ４ＡＲをコード化しないが、宿主細胞のゲノム中に存在するＤＮＡである。次いで、所望に応じて、本発明のＰＦ４ＡＲを生産する細胞、あるいは発現レベルの減少または増大に関してスクリーニングする。

Ｆ．遺伝子増幅／発現の検出

試料中の遺伝子の増幅および／または発現は、例えば従来のサザンブロッティング、ｍＲＮＡの転写を定量するためのノーザンブロッティング(トーマス,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:5201-5205[1980])、ドットブロッティング(ＤＮＡ分析)、あるいは原位置ハイブリッド形成などによって、本明細書に開示する配列に基づき、適切に標識されたプローブを用いることによって直接測定することができる。様々な標識を使用することができるが、最も一般的なものは放射性同位体、とりわけ^{32}Ｐである。しかし、ポリヌクレオチド中へ導入するためにビオチン修飾核酸を使用することなど、他の技術を使用することもできる。次いでこのビオチンはアビジンまたは抗体に対する結合の部位として機能し、このアビジンや抗体は例えば放射性核種、蛍光剤、酵素などの様々な標識で標識することができる。別法として、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖およびＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッド二本鎖またはＤＮＡ-タンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖を認識することができる抗体を使用してもよい。次いでこの抗体を標識することができ、上記二本鎖が表面に結合して、表面上での二本鎖の形成時にその二本鎖に結合している抗体の存在が検出できるような検定法を行うことができる。

別法として、遺伝子産物の発現を直接定量するために、免疫学的方法、例えば組織切片の免疫組織化学的染色や細胞培養または体液の検定などによって、遺伝子発現を測定するこ

ともできる。免疫組織化学染色技術の場合、典型的には脱水と固定によって細胞試料を調製し、次いで結合した遺伝子産物に特異的な、標識された抗体と反応させる。ここで用いる標識は通常、例えば酵素標識、蛍光標識、発光標識など、視覚的に検出可能なものである。本発明での使用に適した特に感度の高い染色技術はシュら,Am.J.Clin.Path.,75:734-738(1980)に記述されている。

免疫組織化学的染色および／または試料液の検定に有用な抗体はモノクローン性であってもポリクローン性であってもよく、どのような哺乳動物中でも調製することができる。好都合なことに、天然のＰＦ４ＡＲポリペプチドに対して、あるいは下記第４章にさらに記述するように本明細書に記載のＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対して抗体を調製することができる。

Ｇ．ＰＦ４ＡＲポリペプチドの調製

ＰＦ４ＡＲは界面活性剤中で細胞膜を可溶化することによって細胞培養から回収される。ヒトＰＦ４ＡＲがヒト起源の細胞以外の組換え細胞中で発現される場合、そのＰＦ４ＡＲはヒト起源のタンパク質またはポリペプチドを全く含有しない。しかし、ＰＦ４ＡＲに関して実質上均一な調製物を得るためには、組換え細胞タンパク質またはポリペプチドからＰＦ４ＡＲを精製する必要がある。第１段階として、細胞を遠心分離することによってそれらを培養培地から分離する。次に膜画分と可溶性タンパク質画分を分離する。次に、界面活性剤による可溶化と、それに続く適当な精製法(免疫アフィニティーカラムまたはイオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカまたはカチオン交換樹脂(ＤＥＡＥなど)でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈殿、例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過、基板上に固定された適当なＰＦ４Ａを用いる配位子アフィニティーおよび疎水性アフィニティー樹脂)によって培養溶解液の膜画分からＰＦ４ＡＲを精製することができる

残基が欠失、挿入または置換されているＰＦ４ＡＲ変種は、その変化が引き起こす特性の本質的な変化を考慮に入れて、天然のＰＦ４ＡＲと同じ方法で回収される。例えば別のタンパク質またはポリペプチド(例：細菌またはウイルス抗原)とＰＦ４ＡＲの融合物を調製すれば精製が容易になる：その融合物を吸着させるためにその抗原に対する抗体を含有する免疫アフィニティーカラムを使用することができる。ウサギポリクローナル抗ＰＦ４ＡＲカラムなどの免疫アフィニティーカラムを利用して、少なくとも１つの残存する免疫エピトープにそれを結合させることによってＰＦ４ＡＲ変種を吸収することができる。精製中のタンパク質加水分解による分解を阻害するためにはフェニルメチルスルホニルフルオライド(ＰＭＳＦ)などのプロテアーゼ阻害因子も有用であり、付随的な混入物の発達を防止するために抗体を含めてもよい。組換え細胞培養における発現時のＰＦ４ＡＲまたはその変種の特性の変化を説明するために、天然のＰＦ４ＡＲに適した精製法を改変する必要があり得ることは当業者には理解されるであろう。

Ｈ．ＰＦ４ＡＲポリペプチドの共有結合的修飾

ＰＦ４ＡＲポリペプチドの共有結合修飾は本発明の範囲に包含される。天然のＰＦ４ＡＲとＰＦ４ＡＲのアミノ酸配列変種の両方を共有結合的に修飾することができる。ＰＦ４ＡＲ、その断片またはそれに対する抗体の共有結合的修飾は、ＰＦ４ＡＲ、その断片またはＰＦ４ＡＲ抗体の標的アミノ酸残基を、選択した側鎖もしくはＮ-末端またはＣ-末端残基と反応することができる有機誘導体化試薬と反応させることによって、その分子中に導入される。最も一般的には、ＰＦ４ＡＲまたはその抗体を診断で使用する検出可能な基(例：酵素、放射性同位体、抗原、蛍光または化学発光基など)に共有結合させる。

システイニル残基を、最も一般的にはα-ハロアセテート(および対応するアミン)、例えばクロロ酢酸やクロロアセタミドと反応させることによって、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイニル残基はブロモトリフルオロアセトン、α-ブロモ-β-(５-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、Ｎ-アルキルマレイミド、３-ニトロ-２-ピリジルジスルフィド、メチル２-ピリジルジスルフィド、ｐ-クロロメルクリベンゾエート、２-クロロメルクリ-４-ニトロフェノールまたはクロロ-７-ニトロベンゾ-２-オキサ-１,３-ジアゾールとの反応によっても誘導体化される。

ヒスチジル残基はｐＨ５．５～７．０でのジエチルピロカーボネートとの反応によって誘導体化される。なぜならこの試薬はヒスチジル側鎖に比較的特異的だからである。パラ-ブロモフェナシルブロミドも有用であり、その反応は好ましくは０．１Ｍカコジル酸ナトリウム(ｐＨ６．０)中で行われる。
リジニルおよびアミノ末端残基はコハク酸無水物または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの試薬による誘導体化はリジニル残基の電荷の反転という効果を持っている。
α-アミノ含有残基を誘導体化するのに適した他の試薬には、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル、ピリドキサルホスフェエート、ピリドキサール、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、Ｏ-メチルイソ尿素、２,４-ペンタンジオン、およびトランスアミナーゼが触媒するグリオキシレートとの反応が含まれる。
アルギニル残基は１または数種類の従来の試薬との反応によって修飾され、それらの試薬にはフェニルグリオキサール、２,３-ブタンジオン、１,２-シクロヘキサンジオンおよびニンヒドリンなどがある。アルギニン残基を誘導体化する際には、そのグアニジン官能基の高いｐK_aゆえに、その反応をアリカリ性条件下で行う必要がある。さらにこれらの試薬はアルギニンのイプシロン-アミノ基と同様にリジンの基とも反応し得る。
チロシン残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によってチロシン残基中に分光標識を導入するという特別な目的をもって行うことができる。最も一般的にはＮ-アセチルイミジゾールとテトラニトロメタンを用いて、それぞれＯ-アセチルチロシル種と３-ニトロ誘導体を形成させる。チロシル残基は、放射線免疫検定法用に標識されたタンパク質を調製するために^{126}Ｉまたは^{131}Ｉを用いてヨウ素化され、上述のクロラミンＴ法が好適である。
カルボキシル側鎖基(アスパルチルまたはグルタミル)はカルボジイミド(Ｒ’-Ｎ＝Ｃ＝Ｎ-Ｒ’；ここにＲとＲ’は異なるアルキル基を表す)、例えば１-シクロヘキシル-３-(２-モルホリニル-４-エチル)カルボジイミドまたは１-エチル-３-(４-アゾニア-４,４-ジメチルペンチル)カルボジイミドなどとの反応によって選択的に修飾される。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基はアンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。
二官能性試薬による誘導体化は、抗ＰＦ４ＡＲ抗体を精製する方法またはその逆の方法で使用するために、ＰＦ４ＡＲ、その断片または抗体を水不溶性の支持基盤または表面に架橋するのに有用である。固定化されたＰＦ４ＡＲは、その受容体が結合するＰＦ４スーパーファミリーの構成要素をスクリーニングする際にも有用である。一般的に使用される架橋剤には例えば１,１-ビス(ジアゾアセチル)-２-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル(例えば４-アジドサリチル酸とのエステル)、３,３’-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、およびビス-Ｎ-マレイミド-１,８-オクタンなどの二官能性マレイミドが含まれる。メチル-３-［(ｐ-アジドフェニル)ジチオ］プロピオイミデートなどの誘導体化試薬は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化中間体を与える。別法として、臭化シアン活性化炭水化物や米国３９６９２８７、３６９１０１６、４１９５１２８、４２４７６４２、４２２９５３７および４３３０４４０に記述されている反応性基質が、タンパク質の固定化に使用される。
グルタミニル残基とアスパラギニル残基はしばしばそれぞれ対応するグルタミル残基とアスパルチル残基に脱アミド化される。あるいはこれらの残基を穏やかな酸性条件下で脱アミド化する。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲に包含される。
他の修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシルのリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化(ティ・イー・クレイトン「Protein：Sturcture and Molecular Propertie」(ダブリュ・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー,サンフランシスコ)の79～86頁[1983])、Ｎ末端アミンのアセチル化およびＣ末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。
本発明の範囲に包含されるベータ-８ポリペプチドの共有結合的修飾のもう１つの種類はこのポリペプチドの天然のグリコシル化様式を改変することからなる。改変とは、天然の

受容体中に認められる１またはそれ以上の炭水化物の削除、および／または、天然の受容体には存在しない１またはそれ以上のグリコシル化部位の付加を意味する。
ポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型とはアスパラギン残基の側鎖に対する炭水化物部分の結合を意味する。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン(ここにXはプロリン以外のあらゆるアミノ酸を表す)はアスパラギン側鎖に対する炭水化物部分の酵素的結合にとっての認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらトリペプチド配列のいずれかの存在は潜在的なグリコシル化部位を作り出す。O-結合型グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸(５-ヒドロキシプロリンや５-ヒドロキシリジンも使用できるが、最も一般的にはセリンまたはスレオニン)に対する、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのひとつの結合を意味する。上述のようにＯＬ-８受容体は６つの推定N-結合型グリコシル化部位を含有している。
ＰＦ４ＡＲポリペプチドに対するグリコシル化部位の付加は、上述のトリペプチド配列の１またはそれ以上を含有するようにアミノ酸配列を改変することによって都合よく達成される(N-結合型グリコシル化部位について)。天然のＰＦ４ＡＲ配列に１またはそれ以上のセリンまたはスレオニン残基を付加するか、それらの残基で置換することによっても、この改変を施すことができる(O-結合型グリコシル化部位について)。容易のために、ＰＦ４ＡＲのアミノ酸配列をＤＮＡレベルでの変化によって、とりわけＰＦ４ＡＲポリペプチドをコード化するＤＮＡを予め選択した塩基で突然変異させて所望のアミノ酸に翻訳されるであろうコドンを作成することによって、改変することが好ましい。「ＰＦ４ＡＲポリペプチドのアミノ酸配列変種」と題した項で上述した方法を用いてＤＮＡ突然変異(単数または複数)を作成することができる。
ＰＦ４ＡＲ上の炭水化物部分の数を増大させるもう１つの手段は、このポリペプチドに対して化学的または酵素的にグリコシドを結合させることによる。これらの手法は、N-およびO-結合型グリコシル化に関するグリコシル化能を有する宿主細胞中で該ポリペプチドを生産する必要がないという点で有利である。使用する結合様式に応じて、糖(単数または複数)を(ａ)アルギニンおよびヒスチジン、(ｂ)遊離のカルボキシル基、(ｃ)システインのスルフヒドリル基などの遊離のスルフヒドリル基、(ｄ)セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンのヒドロキシル基などの遊離のヒドロキシル基、(ｅ)フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンの芳香族残基などの芳香族残基あるいは(ｆ)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は１９８７年９月１１日に公開されたＷＯ８７／０５３３０とアプリンおよびリストン,CRC Crit.Rev.Biochem.,259-306頁[1981]に記述されている。
天然のＰＦ４ＡＲポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は化学的もしくは酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化の場合、化合物トリフルオロメタンスルホン酸や等価な化合物に該ポリペプチドをさらす必要がある。この処理は結合糖(N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)以外のほとんどの糖もしくはすべての糖の切断をもたらすが、ポリペプチドは無傷のままである。化学的脱グリコシル化はハキマッディンら(Arch.Biochem.Biophys.,259:52[1987])およびエッジら(Anal.Biochem.,118:131[1981])に記述されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、トタクラら(Meth.Enzymol.,138:350[1987])が記述しているように様々なエンドグリコシダーゼとエキソグリコシダーゼを使用することによって達成することができる。
ダスキンら(J.Biol.Chem.,257:3105[1982])が記述している化合物ツニカマイシン(tunicamycin)の使用によって、潜在的グリコシル化部位でのグリコシル化を防止することができる。ツニカマイシンはタンパク質-N-グリコシド結合の形成を遮断する。
例えばコアセルベーション技術や界面重合(それぞれ例えばヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)によって調製したマイクロカプセル中、コロイド薬物送達系(例えばリポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中、あるいはマクロエマルジョン中にＰＦ４ＡＲを封入することもできる。そのような技術は「Remington’s

Pharmaceutical Science」(第１６版,オソル,エイ編,１９８０)に開示されている。
またＰＦ４ＡＲ調製物は、抗体を生成させる際に、あるいはＰＦ４ＡＲに関する検定における標品として(例：放射線免疫検定法、酵素結合免疫検定法または放射線受容体検定法において標品として使用するためにＰＦ４ＡＲを標識することによって)、アフィニティー精製技術において、並びに、放射性ヨウ素、酵素、発蛍光団、スピンラベルなどで標識されている場合には競争型受容体結合検定法において、有用である。
変種ＰＦ４ＡＲの特性を前以て予測することはしばしば困難であるので、最適な変種を選択するためには回収した変種の何らかのスクリーニングが必要になるであろうことは理解されるであろう。例えば、ある与えられた抗体に対する親和性などのＰＦ４ＡＲ分子の免疫学的特性の変化は、競争型免疫検定法によって測定される。同じ検定法で天然のＰＦ４ＡＲについて観測される活性との比較によって、その活性の抑制や増進の変化を検定する。タンパク質またはポリペプチド特性(例えば酸化還元安定性や熱安定性、疎水性、タンパク質加水分解的分解に対する感受性あるいは担体との会合傾向もしくは多量体への会合傾向など)の他の潜在的改変は当該技術分野でよく知られている方法によって検定される。

３．ＰＦ４ＡＲの医薬的組成物とその投与

ＰＦ４ＡＲ(ＰＦ４ＡＲ結合断片を含む)またはそれに対する抗体の医薬製剤は、所望の純度を有するＰＦ４ＡＲを随意の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤(Remington’s Pharmaceutical Science(上記))と混合することによって、凍結乾燥ケーキか水性溶液の形態で保存のために調製される。許容される担体、賦形剤または安定化剤は使用される投与量および濃度で受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子量(約１０残基未満)のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類および他の炭水化物、ＥＤＴＡなどのキレート剤、マンニトールやソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオンおよび／またはツィーン、プルロニクスまたはポリエチレングリコール(ＰＥＧ)などの非イオン性界面活性剤が含まれる。
インビボ投与に使用されるべきＰＦ４ＡＲまたは抗体は滅菌状態でなければならない。これは凍結乾燥および再構成の前もしくは後に滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。ＰＦ４ＡＲは通常は凍結乾燥された形態か溶液状で保存されるであろう。
医薬的なＰＦ４ＡＲまたは抗体組成物は一般に滅菌注入口を有する容器、例えば静脈内バックや皮下注射針によって突き刺すことができる蓋をもつバイアルなどの中に入れられる。
ＰＦ４ＡＲまたは抗体を投与する経路は、例えば静脈内、腹腔内、大脳内、筋肉内、眼球内、動脈内または外傷内経路による注射または注入、あるいは後述する徐放系によるなど、既知の方法に従って行われる。
徐放性調製物の好適な例には、成型品の形態(例：フィルムまたはマイクロカプセル)にある半透過性ポリマー基盤が含まれる。徐放性基盤にはポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド(米国３７７３９１９、ＥＰ５８４８１)、Ｌ-グルタミン酸とＬ-グルタミン酸ガンマエチルの共重合体(シドマンら,Biopolymers,22:547-556[1983])、ポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)(ランガーら,J.Biomed.Mater.Res.,15:167-277[1981]およびランガー,Chem.Tech.,12:98-105[1982])、エチレンビニルアセテート(ランガーら(上記))またはポリ-Ｄ-(－)-３-ヒドロキシラク酸(ＥＰ１３３９８８)が含まれる。徐放性ＰＦ４ＡＲまたは抗体組成物にはリポソームに封入したＰＦ４ＡＲまたは抗体も含まれる。ＰＦ４ＡＲまたは抗体を含有するリポソームはそれ自体は既知の方法によって調製される：ＤＥ３２１８１２１、エプスタインら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688-3692(1985)；ワングら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030-4034(1980)；ＥＰ５２３２２、ＥＰ３６６７６、ＥＰ

８８０４６、ＥＰ１４３９４９、ＥＰ１４２６４１、日本国特許出願８３-１１８００８、米国４４８５０４５および４５４４５４５、ＥＰ１０２３２４。通常リポソームは小さい(約２００～８００オングストローム)単層型であり、その脂質含量は約３０モル％コレステロール以上であるが、選択される比率は最適なＰＦ４ＡＲまたは抗体療法のために調節される。

治療的に使用すべきＰＦ４ＡＲまたは抗体の有効量は、例えば治療する対象、投与経路および患者の状態などに依存するであろう。したがって治療者は投与量を滴定し、必要に応じて投与経路を変更することによって最適な治療効果を得る必要があるであろう。典型的には、臨床医は投与量が所望の効果を達成する量に至るまでＰＦ４ＡＲまたは抗体を投与するであろう。この療法の進行は従来の検定法によって容易に監視できる。

４．ＰＦ４ＡＲ抗体の調製

一般にＰＦ４ＡＲとアジュバントの複数回の皮下(ｓｃ)または腹腔内(ｉｐ)注射によって、ＰＦ４ＡＲに対するポリクローナル抗体を動物中に生じさせる。ＰＦ４ＡＲで形質転換した組換え細胞(例：ｈｕＰＦ４ＡＲによって形質転換されたマウスまたはＣＨＯ細胞)による免疫化は満足できる結果を与え得る。あるいはＰＦ４ＡＲを分離し、それ、または標的アミノ酸配列を含有する断片を、二官能性試薬または誘導体化試薬(例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基による結合)、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基による)、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物、$SOCl_2$または$R^1N=C=NR$(ここにＲおよびR^1は異なるアルキル基を表す))を用いて、免疫化する種の中で免疫原性であるタンパク質(例：キーホール・リムペット・ヘモシアニン、血清アルブミン、牛チログロブリンまたは大豆トリプシン阻害因子)に結合させることも有用である。

通常は、１ｍｇまたは１μｇのＰＦ４ＡＲをフロイント完全アジュバントと混合し、その溶液を複数部位の皮内に注射することによって、動物を細胞または免疫原性複合体または誘導体に対して免疫化する。１カ月後に、元の量の１／５～１／１０のフロイント完全アジュバント中の複合体を用いて複数部位に皮下注射することによって動物を追加免疫する。７～１４日後に動物から採血し、その血清を抗ＰＦ４ＡＲ力価について検定する。力価が平坦になるまで動物を追加免疫する。好ましくは同じＰＦ４ＡＲの複合体で追加免疫するが、異なるタンパク質に結合させてもよく、かつ／または、異なる架橋剤によって結合させてもよい。組換え細胞培養中でタンパク質融合物として複合体を作成することもできる。また、免疫応答を増進させるためには明礬などの凝集剤を用いる。

もう１つの選択枝は結合可変ドメインライブラリーと所望の抗ＰＦ４ＡＲ抗体を同定するためのスクリーニング法を使用することである。

免疫化した動物から脾臓細胞を回収し、従来の方法で(例えば骨髄腫細胞との融合によって、あるいはエプスタイン-バー(ＥＢ)ウイルス形質転換によって)その細胞を不死化し、所望の抗体を発現させるクローンをスクリーニングすることによってモノクローナル抗体を調製する。

このモノクローナル抗体は好ましくは各標的ＰＦ４ＡＲポリペプチドに特異的であって、ウサギｆＭＬＰ受容体[5]、ヒトｆＭＬＰ受容体、ヒトＣ５ａ受容体、低親和性ＩＬ-８受容体またはＰＦ４ＡＲファミリーの他の構成要素とは交差反応しないであろう。図２、４または５の受容体に特異的な抗体が好ましい。作用薬性、拮抗薬性であるか、あるいは受容体を結合または活性化する際のＰＦ４スーパーファミリー構成要素の活性に対して効果を持たない抗体を選択する。

マーフィーら(上記)は図２の受容体に対して高度な相同性を有する受容体を記述している。マーフィーらは組換え卵母細胞中で彼らの受容体を、ＩＬ-８の「低親和性」受容体であって、ＭＧＳＡを結合する能力をほとんど持たないと特徴づけており、したがってＩＬ-８およびＭＧＳＡのインビボでの生物学的活性に関してわずかな役割しか果たしていないことを示唆している。しかしながら出願人らの研究は、マーフィーらの受容体が図２の受容体と同等かそれ以上のＩＬ-８親和性を示し、ＭＧＳＡに対しても同様に高い親和性(約１～１０ｎＭ)を示すことを明らかにした。したがって、リンパ様細胞のＩＬ-８および

／またはＭＧＳＡ応答の拮抗性は両受容体が共に阻害または遮断されることを必要とすると思われる。例えば、マーフィーらの受容体と共通する図２の受容体のエピトープに結合するＩＬ-８拮抗性抗体を選択すべきである。これは慣用のスクリーニング法によって容易に達成されるであろう。例えば、図２の受容体を保持する細胞への結合に関して標識したＩＬ-８に対して競争するというそれらの能力について候補抗体を検定し、次いで、同じ研究をマーフィーらの受容体を保持する細胞を用いて実行することができる。次に、両細胞に対する結合またはＩＬ-８活性化を阻害する抗体を医薬候補として選択する。他方、図２の受容体とマーフィーらの受容体を識別することができ、どちらか一方のみに結合する抗体は診断の際に有用である。マーフィーらの受容体とは対照的に、図２の受容体はＭＧＳＡをわずかにしか結合しない。

５．ＰＦ４ＡＲ、その核酸および抗体の使用

ＰＦ４ＡＲをコード化する核酸を、組織特異的分類のための診断剤として使用することができる。例えば原位置ハイブリッド形成やノーザンブロッティングおよびサザンブロッティング並びにＰＣＲ分析などの手法を用いることによって、評価される細胞型(単数または複数)中にＰＦ４ＡＲをコード化するＤＮＡおよび／またはＲＮＡが存在するか否かを決定することができる。これらの受容体は典型的にはＰＢＬまたは単球細胞の診断剤である。

単離されたＰＦ４ＡＲポリペプチドを定量的な診断的検定法での標品または対照として使用することができ、これに対して未知量のＰＦ４ＡＲを含有する、例えばＰＢＬまたは単球細胞から得た試料を比較することができる。ＩＬ-８受容体を発現させる組換え細胞は、例えばＩＬ-８検定法において好中球が用いられるのと同じ方法でＰＦ４ＡＲ配位子に関する検定法で使用することができる。ＰＦ４ＡＲに対する抗体を生産する際の免疫原として、あるいは腹水または組換え細胞培養からそのような抗体を精製するために、あるいはスーパーファミリー配位子(例：ＩＬ-８)の競争的拮抗薬として使用するために、ＰＦ４ＡＲポリペプチド、断片または細胞(そのままであるか、もしくは誘導体化したもの)を使用することができる。

ＰＦ４ＡＲはＰＦ４スーパーファミリー構成要素のアミノ酸配列変種または他の変種についてスクリーニングする際に有用である。例えば候補ＩＬ-８アミノ酸配列変種の一群を部位特異的突然変異誘発法によって調製する。ＩＬ-８変種の拮抗薬性または作用薬性を同定するために、これらを、図２のＩＬ-８受容体を保持する細胞について標識した天然のＩＬ-８と競争させてインキュベートする。結合または細胞の活性化は好適な検定終点である。別法として、受容体を細胞非含型で回収し、ＩＬ-８および候補変種の結合を検定する。

ＰＦ４ＡＲ抗体は特定の細胞または組織におけるＰＦ４ＡＲ発現に関する診断的検定法で有用である。ここにおいて該抗体は上述のＰＦ４ＡＲと同じ方法で標識され、かつ／または、不溶性基盤に固定化される。ＰＦ４ＡＲ抗体は、組換え細胞培養もしくは天然の供給源からＰＦ４ＡＲをアフィニティー精製する際にも有用である。他のＰＦ４ＡＲと検出可能なほどには交差反応しないＰＦ４ＡＲ抗体を用いて、他の相同的受容体を含有しない各ＰＦ４ＡＲを精製することができる。ＰＦ４拮抗薬であるＰＦ４ＡＲ抗体は他のＰＦ４スーパーファミリーが媒介する障害の治療において、あるいは抗炎症剤として有用である。

ＰＦ４ＡＲとその抗体に関する好適な診断的検定法それ自体はよく知られている。そのような検定法には競争的検定法、サンドイッチ検定法および立体的阻害検定法が含まれる。競争的検定法とサンドイッチ検定法ではその方法の必須部分として相分離段階を使用するが、立体的阻害検定法は単一の反応混合物で行われる。検定される物質の分子量に応じてある種の方法が好まれるであろうが、基本的にはＰＦ４ＡＲの検定とＰＦ４ＡＲを結合する物質には同じ手法が用いられる。したがって本明細書では、それが抗原であるか抗体であるかにかかわらず試験される物質を分析物と呼び、それらが抗体であるか、細胞表面受容体であるか、あるいは抗原であるかにかかわらず、その分析物に結合するタンパク質を結合相手と呼ぶ。

ＰＦ４ＡＲまたはその抗体に関する分析法はすべて、下記の試薬のうちの１または複数を

使用する：標識された分析物類縁体、固定化された分析物類縁体、標識された結合相手、固定化された結合相手および立体的複合体。標識された試薬は「トレーサー」としても知られている。
使用される標識(これはプローブとして使用するためにＰＦ４ＡＲ核酸を標識する際にも有用である)は、分析物とその結合相手の結合を妨害しないものであれば、どのような検出可能な官能基であってもよい。数多くの標識が免疫検定法での使用について知られており、その例には直接検出することができる部分(蛍光発色団、化学発光標識および放射能標識)と、検出するためには反応または誘導体化しなければならない部分(酵素など)が含まれる。そのような標識の例には、放射性同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈおよび^{131}Ｉ、発蛍光団(希土酸化物キレート、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシルなど)、アンベリフェロン、ルシフェラーゼ(例：ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ(米国特許第４７３７４５６号))、ルシフェリン、２,３-ジヒドロフタルアジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(ＨＲＰ)、アルカリ性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素(ＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼなど)と共役させた複素環オキシダーゼ(ウリカーゼやキサンチンオキシダーゼなど)、糖類オキシダーゼ(例：グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-６-ホスフェートデヒドロゲナーゼ)、ビオチン／アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離基などが含まれる。
これらの標識をタンパク質またはポリペプチドに共有結合させるためには従来法を利用することができる。例えばジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビスイミデート、ビスジアゾ化ベンジジンなどの結合試薬を用いて上述の蛍光、化学発光および酵素標識で抗体を標識することができる。例えば米国特許第３９４０４７５号(蛍光測定)および第３６４５０９０号(酵素)、ハンターら,Nature,144:945(1962)、デイビッドら,Biochemistry,13:1014-1021(1974)、ペインら,J.Immunol.Methods,40:219-230(1981)、ナイグレン,J.Histochem.and Cytochem.,30:407-412(1982)を参照のこと。本発明において好ましい標識は西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼなどの酵素である。
酵素を含む上記の標識を抗体に結合させることは免疫検定技術の当業者には標準的な操作法である。例えばオサリバンら「酵素免疫検定法で使用する酵素-抗体複合体の調製法(原題：Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay)」(Methods in Enzymology,ジェイ・ジェイ・ランゴンおよびエイチ・ファン・フナキス編,第７３巻(アカデミック・プレス,ニューヨーク,1981)の１４７～１６６頁を参照のこと。このような結合法は、すべてタンパク質性であるＰＦ４ＡＲまたはその抗体での使用に適している。
ある種の検定法では試薬の固定化が必要である。固定化には、溶液中に遊離して残っている分析物から結合相手を分離することが伴う。これは従来から、検定の前に結合相手か分析物類縁体のいずれかを不溶化することによって、水不溶性の基盤または表面への吸着によって(ベニッヒら,米国３７２０７６０)、(例えばグルタルアルデヒド架橋を用いて)共有結合することによって、もしくは相手または類縁体を(免疫沈降などによって)後で不溶化することによって、達成される。
競争的検定法またはサンドイッチ検定法として知られている他の検定法は充分に確立されており、商業的な診断薬産業において広く用いられている。
競争的検定法は、共通する結合相手上の限られた数の結合部位について試験試料分析物と競争するというトレーサー類縁体の能力によっている。結合相手は一般に競争の前または後に不溶化され、次いで結合相手に結合したトレーサーおよび分析物を未結合のトレーサーおよび分析物から分離する。この分離はデカンテーションすることによって(結合相手が予め不溶化されている場合)あるいは遠心分離によって(結合相手が競争反応後に沈殿された場合)達成される。試験試料分析物の量は、標識物質の量によって測定される結合したトレーサーの量に逆比例する。既知量の分析物を用いて服量-応答曲線を調製し、試験結果と比較することによって試験試料中に存在する分析物の量を定量的に決定する。これ

らの検定法は酵素を検出可能な標識として使用する場合にはＥＬＩＳＡ系と呼ばれる。
「均一」検定法と呼ばれるもう１つの種類の競争的検定法は相分離を必要としない。ここでは、抗分析物が分析物に結合したときに、抗分析物の存在が酵素活性を変化させるように酵素と分析物の複合体を調製し、使用する。この場合、ＰＦ４ＡＲまたはその免疫学的に活性な断片を二官能性有機橋でペルオキシダーゼなどの酵素に結合させる。抗ＰＦ４ＡＲの結合が標識である酵素の活性を阻害もしくは強化するように、抗ＰＦ４ＡＲと共に使用するための複合体を選択する。この方法自体はＥＭＩＴという名称で広く実施されている。
立体的複合体は均一検定のための立体的障害法において使用される。これらの複合体は、ハプテンに対する抗体が実質上抗分析物と同時には複合体に結合できないように低分子量のハプテンを小さい分析物に共有結合させることによって合成される。この検定法では試験試料中に存在する分析物が抗分析物を結合し、それによって抗ハプテンが複合体に結合することを可能にし、複合体ハプテンの特性の変化(例：ハプテンが発蛍光団である場合には蛍光の変化)をもたらすであろう。
サンドイッチ検定法はＰＦ４ＡＲまたはＰＦ４ＡＲ抗体の決定にとりわけ有用である。逐次的サンドイッチ検定法では固定化した結合相手を用いて試験試料分析物を吸着し、試験試料を洗浄などによって除去し、結合した分析物を用いて標識した結合相手を吸着し、次いで結合した物質を余ったトレーサーから分離する。結合したトレーサーの量は試験試料分析物に直接比例する。「同時」サンドイッチ検定法では、標識した結合相手を添加する前に試験試料を分離しない。抗ＰＦ４ＡＲモノクローナル抗体を１つの抗体として使用し、ポリクローナル抗ＰＦ４ＡＲ抗体をもう１つの抗体として使用する逐次的サンドイッチ検定法はＰＦ４ＡＲ活性について試料を試験する際に有用である。
上の記述はＰＦ４ＡＲと抗体に関する診断的検定法の具体例に過ぎない。これらの分析物を測定するためにここで開発された方法もしくは今後開発される方法は、上述の生物検定法を含めて本発明の範囲に包含される。
図４および５に記載のポリペプチドはＰＦ４スーパーファミリー(これはＣ-ＣおよびＣＸＣサブファミリーを含む)の異なる構成要素であって、今までのところはまだ決定されていない構成要素のための受容体であると考えられる。図２のＩＬ-８受容体と同様に、これらはＧ-タンパク質共役スーパーファミリーの構成要素であり、他の受容体よりもＩＬ-８受容体に対してより高い類似性を保持している。予備実験では、これらの受容体を保持する組換え細胞はランテス(Rantes)、ＭＣＰ１、ＩＬ-８またはＭＧＳＡに対して応答しなかったが、それらは最終的にはＰＦ４スーパーファミリーの他の構成要素または現在知られていない配位子を結合することが示されるであろう。しかし、図４または５のポリペプチドがＰＦ４スーパーファミリーの構成要素を結合するか否かにかかわらず、これらのポリペプチドはその受容体の組織分布を決定する際の診断的使用のために抗体を調製するのに有用であり、したがってそのような組織に関する組織化学的診断剤として、具体的にはＰＢＬまたは単球細胞に関する診断剤として有用である。なぜならそのような細胞が図４および５の受容体を発現させることがわかっているからである。当然のことながら、これらの受容体に結合するＰＦ４スーパーファミリーの構成要素が同定されたら、その同定された構成要素の存在を診断するためにこれらの受容体を使用するか、あるいは特異的なアフィニティー法によるそれら構成要素の精製にこれらの受容体を使用することができる。図４および５に記載のＤＮＡは低い厳密条件を使用するとき、ＩＬ-８受容体をコード化するＤＮＡまたはＲＮＡの存在に関する診断にも有用である。
以下の実施例は例示を目的とするものであって、限定を目的とするものではない。

実施例１

クローンｐＲＫ５Ｂ.ｉｌ８ｒ１.１を得るために、１,０００,０００クローンのｃＤＮＡライブラリー[16]をヒト好中球ｍＲＮＡ[17]からベクターｐＲＫ５Ｂ中にｂｓｔＸＩリンカーを用いて構築した。ｃＤＮＡは平滑型で作成された。ヘミキナーゼｂｓｔＸＩリンカーをｃＤＮＡに連結し、ｂｓｔＸＩで消化してホスファターゼ処理してその長いベクター断片を単離しておいたＰＲＫ５Ｂベクター中に、上記リンカーを連結した。どのような哺乳類

細胞発現ベクターでもよいことは理解されるであろうが、ＰＲＫ５Ｂはサイトメガロウイルスプロモーターとそれに続く５’イントロン、ｂｓｔＸＩクローニング部位およびＳＶ４０初期ポリアデニル化シグナルを含有するＰＲＫ５[18]の誘導体である。それぞれ２５００クローンの５８プールを、３,７５０,０００細胞へのＤＮＡ２０μｇのエレクトロポレーション[19]によって、ＣＯＳ-７細胞中にトランスフェクションした。１０％牛胎児血清を含有する培地(５０：５０：：ハムＦ１２：ＤＭＥＭ)中１５０ｍｍディッシュ上で２日間成長させた後、[125]Ｉ-ＩＬ-８結合を行った。大腸菌[20]中で作成された精製したヒトの７２アミノ酸ＩＬ-８をラクトペルオキシダーゼ法[21]によって約１１００Ｃｉ／ｍｍｏｌに標識し、これは少なくとも８５％結合可能であった。ディッシュをリン酸緩衝化食塩水で２回濯ぎ、２.５％牛胎児血清と約０.５ｎＭ[125]Ｉ-ＩＬ-８を含有する成長培地を１ディッシュあたり８ｍｌ用いて結合を行った。３７°で２時間の後、プレートをリン酸緩衝化食塩水で３回濯ぎ、底部を切り抜き[22]、オートラジオグラフィーに付した。次に、２５００ｃＤＮＡクローンのそれぞれの陽性プールを８００クローンのプールに分配し、これらのそれぞれをトランスフェクションし、検定した。次にそれぞれの陽性プールを１８５クローン、３０クローンのプールを通してさらに分割し、最終的に単一のクローンを同定することによって純粋な単離物を得た。各プールの一部のみをトランスフェクションに使用したので、形質転換体からクローンを回収する必要はなかった。

６穴ディッシュ中で１日の発現の後、エレクトロポレーションにかけたＣＯＳ-７細胞を用いて結合競争を行った(約１７５０００細胞／ディッシュ)。結合培地(２５ｎＭ Ｈｅｐｅｓで緩衝化し、０.５％ＢＳＡを補足したCa^{2+}およびMg^{2+}を含まないハンクス)中４℃で約２時間、放射性ヨウ素化した野生型のＩＬ-８を用いて結合を行った。次にウェルを洗浄し、細胞をトリプシンを用いて収集し、計数した。ベクターｐＲＫ５ＢからのＤＮＡでトランスフェクションした細胞を含有する平行したウェルで非特異的な結合を観測した。好中球結合は記述されているように行ったが[22]、ただし４°で２時間とした。

実施例２

ヒト細胞系ＨＬ６０およびヒト末梢血液リンパ球から得られた現存するλｇｔ１０ｃＤＮＡライブラリーを、クローン化した高親和性ヒトＩＬ-８受容体(図２)のコード領域からのプローブを用いて低い厳密性でスクリーニングした。このプローブはアミノ酸２３～３１４のコード領域を含有する該受容体の８７４ｂｐのＰｓｔＩ／ＮｃｏＩ断片であった。２０％ホルムアミド、４×ＳＳＣ、５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液(ｐＨ７)、０.２ｇ／ｌ超音波処理サケ精子ＤＮＡ、５×デンハルト、１０％硫酸デキストラン中４２℃でハイブリッド形成を行い、１×ＳＳＣ、０.１％ＳＤＳ、５０℃で洗浄した。変化する強度のいくつかの複製スポット(約６０)を拾いあげ、プラーク精製し、プラスミドベクター中にサブクローニングし、配列決定した。最も強い強度のスポットの選択から核酸配列決定を始めた。ある与えられたスポット(ファージ)について、ＩＬ-８受容体と構造上または配列上の相同性が存在するか否かを決定するに足る配列を得た。そのような相同性が存在する場合には、その遺伝子の残りの部分を得(必要な場合)、その全体を配列決定した。次いで、ハイブリッド形成するクローンすべての配列決定を避けるために、その配列を用いて、同じハイブリッド形成遺伝子を含有する他のスポットを同定してそれを捨てるべく、クローンＩＬ-８受容体ＤＮＡハイブリッド形成クローンの親収集物をプローブした。この技術は配列決定の負担を減じる上で極めて効果的であった。例えば、１クローンは最初の６０クローンのうちの約１／３によって表され、この結果のみに基づいて、それらのクローンを配列決定する際に必要な仕事を考慮すれば、陰性スクリーニングは減少することができた。

このスクリーニングから、２つの新しい遺伝子配列がＩＬ-８受容体と明らかに関連していることがわかった。新しい遺伝子の１つのコード領域は２つのクローン(８ｒｒ.２０および８ｒｒ.１５)に分割された。この遺伝子の組み合わせた配列(８ｒｒ.２０.１５)を図４に示す。第２の遺伝子に関する完全なコード領域はクローン８ｒｒ.９上に認められる(図５)。８ｒｒ.２０.１５の予想アミノ酸配列は高親和性および低親和性ＩＬ-８受容体配列の両方と３４％同一ある。８ｒｒ.９の配列は高親和性および低親和性ＩＬ-８受容体配

列と、それぞれ３６％および３８％同一である(ダブリュ・イー・ホルメスら,Science 253 1278(1991)およびピー・エム・マーフィーら,Science 253,1280(1991))。８ｒｒ.２０.１５と８ｒｒ.９のアミノ酸配列は３１％同一である。低い厳密条件下でのこのプローブの使用は、これらのライブラリー中に認められると予期されたｆＭＬＰ受容体遺伝子に対して検出可能なハイブリッド形成をもたらさなかった。

参考文献

１．オッペンハイム,ジェイ・ジェイら,Annu.Rev.Immunol.,9;617-648(1991)
２．ギムブロン,エム・エイ・ジュニアら,Science,246:1601-3(1989)
３．ボウレイ,エフら,Biochem.Biophys.Res.Comm.,168:1103-1109(1990)
４．ゲラード,エヌ・ピーおよびゲラード,シー,Nature,349:614-617(1991)
５．トーマス,ケイ・エム,ピウン,エイチ・ワイおよびナバッロ,ジェイ,J.Biol.Chem.265:20061-20064(1990)
６．シムス,ジェイ・イーら,Science,241:585-589(1988)
７．ドゥアンドリユー,エイ・ディ,ロディッシュ,エイチ・エフおよびウォング,ジー・ジー,Cell,57:277-285(1989)
８．サマンタ,エイ・ケイ,オッペンハイム,ジェイ・ジェイおよびマツシマ,ケイ,J.Exp.Med.,169:1185-1189(1989)
９．ベセマー,ジェイ,ヒューバー,エイおよびクーン,ビー,J.Biol.Chem.,264:17409-17415(1989)
１０．グロッブ,ピー・エムら,J.Biol.Chem.,265:8311-8316(1990)
１１．コザック,エム,Nucleic Acid Res.,12:857-872(1984)
１２．ディクソン,アール・エイ・エフ,シーガル,アイ・エスおよびストレイダー,シー・ディ,Cold Spring Har.Sym.Quant.Biol.,53:487-497(1988)
１３．コルチャック,エイチ・エムら,J.Biol.Chem.259:4076-4082(1984)
１４．テンネンバーグ,エス・ディ,チェムラン,エフ・ピーおよびソロムキン,ジェイ・エス,J.Immunol.,141:3937-3944(1988)
１５．ラマチャンドラン,ジェイら,BioEssay,10:54-57(1989)
１６．ガルブラー,ユーおよびホフマン,ビー・ジェイ,Gene,25:263-269(1983)
１７．チグウィン,ジェイ・ジェイら,Biochem.,18:5294-5299(1979)
１８．ＥＰ３０７２４７
１９．ゲーリング,ディ・ピーら,EMBO J.,8:3667-3676(1989)
２０．ヘベルト,シー・エイら,J.Immunol.,145:3033-3040(1991)
２１．モリソン,エムおよびバイゼ,ジー・エス,Biochem.,9:2995-3000(1970)
２２．パチョルクチク,ティ,ブライクレイ,アール・ディおよびアマラ,エス・ジー,BioTechniques,9:556-558(1990)
２３．グリンキヴィック,ジー,ポエニー,エムおよびチェン,アール・ワイ,J.Biol.Chem.,260:3440-3450(1985)

配列表

（1）一般的情報：
（i）出願人：ジェネンテク,インコーポレイテッド
（ii）発明の名称：ヒトＰＦ４ＡＲ受容体とその使用
（iii）配列の数：３
（iv）宛て先：
（A）宛て名：ジェネンテク,インコーポレイテッド
（B）町名：ポイント・サン・ブルーノ・ブールバード４６０番
（C）市：サウス・サン・フランシスコ
（D）州：カリフォルニア
（E）国：アメリカ合衆国
（F）郵便番号：９４０８０
（v）コンピューター読み取り形式：

(A) 媒体型：５.２５インチ,３６０Ｋｂプロッピーディスク
(B) コンピューター：ＩＢＭ ＰＣ互換機
(C) オペーレーティングシステム：ＰＣ-ＤＯＳ／ＭＳ-ＤＯＳ
(D) ソフトウェア：パティン(patin)(ジェネンテク)
(vi) 本願のデータ：
(A) 出願番号：
(B) 出願日：１９９２年3月２３日
(C) 分類：
(vii) 先の出願のデータ：
(A) 出願番号：０７／６７７２１１
(B) 出願日：１９９１年3月２９日
(vii) 先の出願のデータ：
(A) 出願番号：０７／８１０７８２
(B) 出願日：１９９１年１２月１９日
(viii) 弁理士／代理人情報：
(A) 氏名：ヘンズレイ,マックス・ディ
(B) 登録番号：２７,０４３
(C) 参照／整理番号：７０６Ｐ１
(ix) 通信情報：
(A) 電話：４１５／２６６-１９９４
(B) ファクシミリ：４１５／９５２-９８８１
(C) テレックス：９１０／３７１-７１６８
(2) 配列番号１に関する情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：１９３３塩基
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列の記載：配列番号１：

```
CCTGGCCGGT GCTTCAGTTA GATCAAACCA TTGCTGAAAC TGAAGAGGAC 50

    ATG TCA AAT ATT ACA GAT CCA CAG ATG TGG GAT TTT 86
    Met Ser Asn Ile Thr Asp Pro Gln Met Trp Asp Phe
      1               5                  10

GAT GAT CTA AAT TTC ACT GGC ATG CCA CCT GCA GAT GAA 125
Asp Asp Leu Asn Phe Thr Gly Met Pro Pro Ala Asp Glu
         15                  20                  25

GAT TAC AGC CCC TGT ATG CTA GAA ACT GAG ACA CTC AAC 164
Asp Tyr Ser Pro Cys Met Leu Glu Thr Glu Thr Leu Asn
                30                  35

AAG TAT GTT GTG ATC ATC GCC TAT GCC CTA GTG TTC CTG 203
Lys Tyr Val Val Ile Ile Ala Tyr Ala Leu Val Phe Leu
     40                  45                  50

CTG AGC CTG CTG GGA AAC TCC CTG GTG ATG CTG GTC ATC 242
Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile
             55                  60

TTA TAC AGC AGG GTC GGC CGC TCC GTC ACT GAT GTC TAC 281
Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg Ser Val Thr Asp Val Tyr
 65                  70                  75

CTG CTG AAC CTG GCC TTG GCC GAC CTA CTC TTT GCC CTG 320
```

```
Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu
        80                  85                  90

ACC TTG CCC ATC TGG GCC GCC TCC AAG GTG AAT GGC TGG 359
Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
                95                  100

ATT TTT GGC ACA TTC CTG TGC AAG GTG GTC TCA CTC CTG 398
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu
    105                 110                 115

AAG GAA GTC AAC TTC TAC AGT GGC ATC CTG CTG TTG GCC 437
Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala
            120                 125

TGC ATC AGT GTG GAC CGT TAC CTG GCC ATT GTC CAT GCC 476
Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
130                 135                 140

ACA CGC ACA CTG ACC CAG AAG CGT CAC TTG GTC AAG TTT 515
Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg His Leu Val Lys Phe
        145                 150                 155

GTT TGT CTT GGC TGC TGG GGA CTG TCT ATG AAT CTG TCC 554
Val Cys Leu Gly Cys Trp Gly Leu Ser Met Asn Leu Ser
                160                 165

CTG CCC TTC TTC CTT TTC CGC CAG GCT TAC CAT CCA AAC 593
```

```
Leu Pro Phe Phe Leu Phe Arg Gln Ala Tyr His Pro Asn
    170                 175                 180

AAT TCC AGT CCA GTT TGC TAT GAG GTC CTG GGA AAT GAC 632
Asn Ser Ser Pro Val Cys Tyr Glu Val Leu Gly Asn Asp
            185                 190

ACA GCA AAA TGG CGG ATG GTG TTG CGG ATC CTG CCT CAC 671
Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile Leu Pro His
195                 200                 205

ACC TTT GGC TTC ATC GTG CCG CTG TTT GTC ATG CTG TTC 710
Thr Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu Phe Val Met Leu Phe
        210                 215                 220

TGC TAT GGA TTC ACC CTG CGT ACA CTG TTT AAG GCC CAC 749
Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His
                225                 230

ATG GGG CAG AAG CAC CGA GCC ATG AGG GTC ATC TTT GCT 788
Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala
    235                 240                 245

GTC GTC CTC ATC TTC CTG CTT TGC TGG CTG CCC TAC AAC 827
Val Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn
            250                 255

CTG GTC CTG CTG GCA GAC ACC CTC ATG AGG ACC CAG GTG 866
```

```
Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val
260                 265                 270

ATC CAG GAG ACC TGT GAG CGC CGC AAC AAC ATC GGC CGG 905
Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg Asn Asn Ile Gly Arg
        275                 280                 285

GCC CTG GAT GCC ACT GAG ATT CTG GGA TTT CTC CAT AGC 944
Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Phe Leu His Ser
                290                 295

TGC CTC AAC CCC ATC ATC TAC GCC TTC ATC GGC CAA AAT 983
Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Asn
    300                 305                 310

TTT CGC CAT GGA TTC CTC AAG ATC CTG GCT ATG CAT GGC 1022
Phe Arg His Gly Phe Leu Lys Ile Leu Ala Met His Gly
            315                 320

CTG GTC AGC AAG GAG TTC TTG GCA CGT CAT CGT GTT ACC 1061
Leu Val Ser Lys Glu Phe Leu Ala Arg His Arg Val Thr
325                 330                 335

TCC TAC ACT TCT TCG TCT GTC AAT GTC TCT TCC AAC CTC  1100
Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Val Asn Val Ser Ser Asn Leu
        340                 345                 350

TGAAAACCAT CGATGAAGGA ATATCTCTTC TCAGAAGGAA AGAATAACCA 1150
```

ACACCCTGAG GTTGTGTGTG GAAGGTGATC TGGCTCTGGA CAGGCACTAT 1200

CTGGGTTTTG GGGGGACGCT ATAGGATGTG GGGAAGTTAG GAACTGGTGT 1250

CTTCAGGGGC CACACCAACC TTCTGAGGAG CTGTTGAGGT ACCTCCAAGG 1300

ACCGGCCTTT GCACCTCCAT GGAAACGAAG CACCATCATT CCCGTTGAAC 1350

GTCACATCTT TAACCCACTA ACTGGCTAAT TAGCATGGCC ACATCTGAGC 1400

CCCGAATCTG ACATTAGATG AGAGAACAGG GCTGAAGCTG TGTCCTCATG 1450

AGGGCTGGAT GCTCTCGTTG ACCCTCACAG GAGCATCTCC TCAACTCTGA 1500

GTGTTAAGCG TTGAGCCACC AAGCTGGTGG CTCTGTGTGC TCTGATCCGA 1550

GCTCAGGGGG GTGGTTTTCC CATCTCAGGT GTGTTGCAGT GTCTGCTGGA 1600

GACATTGAGG CAGGCACTGC CAAAACATCA ACCTGCCAGC TGGCCTTGTG 1650

AGGAGCTGGA AACACATGTT CCCCTTGGGG GTGGTGGATG AACAAAGAGA 1700

AAGAGGGTTT GGAAGCCAGA TCTATGCCAC AAGAACCCCC TTTACCCCCA 1750

TGACCAACAT CGCAGACACA TGTGCTGGCC ACCTGCTGAG CCCCAAGTGG 1800

AACGAGACAA GCAGCCCTTA GCCCTTCCCC TCTGCAGCTT CCAGGCTGGC 1850

GTGCAGCATC AGCATCCCTA GAAAGCCATG TGCAGCCACC AGTCCATTGG 1900

GCAGGCAGAT GTTCCTAATA AAGCTTCTGT TCC 1933

（2）配列番号２に関する情報：

（i）配列の特徴：

（A）長さ：１７３７塩基

（B）型：核酸

（C）鎖の数：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖状

（xi）配列の記載：配列番号２：

GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CGCGGCGCAA AGTGACGCCG AGGGCCTGAG 50

TGCTCCAGTA GCCACCGCAT CTGGAGAACC AGCGGTTACC ATG GAG 96
Met Glu
1

GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA GAT AAC TAC ACC GAG GAA 135
Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu
5 10 15

ATG GGC TCA GGG GAC TAT GAC TCC ATG AAG GAA CCC TGT 174
Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
20 25

TTC CGT GAA GAA AAT GCT AAT TTC AAT AAA ATC TTC CTG 213
Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu
30 35 40

CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC TTC TTA ACT GGC ATT GTG 252
Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val
45 50

GGC AAT GGA TTG GTC ATC CTG GTC ATG GGT TAC CAG AAG 291
Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys
55 60 65

AAA CTG AGA AGC ATG ACG GAC AAG TAC AGG CTG CAC CTG 330
Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
70 75 80

```
TCA GTG GCC GAC CTC CTC TTT GTC ATC ACG CTT CCC TTC 369
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe
                85                  90

TGG GCA GTT GAT GCC GTG GCA AAC TGG TAC TTT GGG AAC 408
Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn
     95                 100                 105

TTC CTA TGC AAG GCA GTC CAT GTC ATC TAC ACA GTC AAC 447
Phe Leu Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn
           110                 115

CTC TAC AGC AGT GTC CTC ATC CTG GCC TTC ATC AGT CTG 486
Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu
120                 125                 130

GAC CGC TAC CTG GCC ATC GTC CAC GCC ACC AAC AGT CAG 525
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln
        135                 140                 145

AGG CCA AGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TAT GTT 564
Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val
               150                 155

GGC GTC TGG ATC CCT GCC CTC CTG CTG ACT ATT CCC GAC 603
Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp
    160                 165                 170
```

```
TTC ATC TTT GCC AAC GTC AGT GAG GCA GAT GAC AGA TAT 642
Phe Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr
            175                 180

ATC TGT GAC CGC TTC TAC CCC AAT GAC TTG TGG GTG GTT 681
Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val
185                 190                 195

GTG TTC CAG TTT CAG CAC ATC ATG GTT GGC CTT ATC CTG 720
Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu
        200                 205                 210

CCT GGT ATT GTC ATC CTG TCC TGC TAT TGC ATT ATC ATC 759
Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile
                215                 220

TCC AAG CTG TCA CAC TCC AAG GGC CAC CAG AAG CGC AAG 798
Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
    225                 230                 235

GCC CTC AAG ACC ACA GTC ATC CTC ATC CTG GCT TTC TTC 837
Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe
            240                 245

GCC TGT TGG CTG CCT TAC TAC ATT GGG ATC AGC ATC GAC 876
Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp
250                 255                 260
```

TCC TTC ATC CTC CTG GAA ATC ATC AAG CAA GGG TGT GAG 915
Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu
265 270 275

TTT GAG AAC ACT GTG CAC AAG TGG ATT TCC ATC ACC GAG 954
Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
280 285

GCC CTA GCT TTC TTC CAC TGT TGT CTG AAC CCC ATC CTC 993
Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu
290 295 300

TAT GCT TTC CTT GGA GCC AAA TTT AAA ACC TCT GCC CAG 1032
Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln
305 310

CAC GCA CTC ACC TCT GTG AGC AGA GGG TCC AGC CTC AAG 1071
His Ala Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys
315 320 325

ATC CTC TCC AAA GGA AAG CGA GGT GGA CAT TCA TCT GTT 1110
Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val
330 335 340

TCC ACT GAG TCT GAG TCT TCA AGT TTT CAC TCC AGC TAAC 1150
Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
345 350 352

ACAGATGTAA AAGACTTTTT TTTATACGAT AAATAACTTT TTTTTAAGTT 1200

ACACATTTTT CAGATATAAA AGACTGACCA ATATTGTACA GTTTTTATTG 1250

CTTGTTGGAT TTTTGTCTTG TGTTTCTTTA GTTTTTGTGA AGTTTAATTG 1300

ACTTATTTAT ATAAATTTTT TTTGTTTCAT ATTGATGTGT GTCTAGGCAG 1350

GACCTGTGGC CAAGTTCTTA GTTGCTGTAT GTCTCGTGGT AGGACTGTAG 1400

AAAAGGGAAC TGAACATTCC AGAGCGTGTA GTGAATCACG TAAAGCTAGA 1450

AATGATCCCC AGCTGTTTAT GCATAGATAA TCTCTCCATT CCCGTGGAAC 1500

GTTTTTCCTG TTCTTAAGAC GTGATTTTGC TGTAGAAGAT GGCACTTATA 1550

ACCAAAGCCC AAAGTGGTAT AGAAATGCTG GTTTTTCAGT TTTCAGGAGT 1600

GGGTTGATTT CAGCACCTAC AGTGTACAGT CTTGTATTAA GTTGTTAATA 1650

AAAGTACATG TTAAACTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1700

AAAAAAAAAA AAAGCGGCCG CCAGCACACT GGAATTC 1737

(2) 配列番号３に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：１６７９塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：配列番号３：

GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CCGCCCAGTG TGCTGGCGGC GGCAGTTGAG 50

GGAAAGGACA GAGGTTATGA GTGCCTGCAA GAGTGGCAGC CTGGAGTAGA 100

GAAAACACTA AAGGTGGAGT CAAAAGACCT GAGTTCAAGT CCCAGCTCTG 150

CCACTGGTTA GCTGTGGGAT CTCGGAAAAG ACCCAGTGAA AAAAAAAAAA 200

AAAGTGATGA GTTGTGAGGC AGGTCGCGGC CCTACTGCCT CAGGAGACGA 250

TGCGCAGCTC ATTTGCTTAA ATTTGCAGCT GACGGCTGCC ACCTCTCTAG 300

AGGCACCTGG CGGGGAGCCT CTCAACATAA GACAGTGACC AGTCTGGTGA 350

CTCACAGCCG GCACAGCC ATG AAC TAC CCG CTA ACG CTG GAA 392
Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu
1 5

ATG GAC CTC GAG AAC CTG GAG GAC CTG TTC TGG GAA CTG 431
Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp Leu Phe Trp Glu Leu
10 15 20

GAC AGA TTG GAC AAC TAT AAC GAC ACC TCC CTG GTG GAA 470
Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu Val Glu
25 30

AAT CAT CTC TGC CCT GCC ACA GAG GGG CCC CTC ATG GCC 509
Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala
35 40 45

TCC TTC AAG GCC GTG TTC GTG CCC GTG GCC TAC AGC CTC 548
Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu
50 55 60

ATC TTC CTC CTG GGC GTG ATC GGC AAC GTC CTG GTG CTG 587
Ile Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu
65 70

GTG ATC CTG GAG CGG CAC CGG CAG ACA CGC AGT TCC ACG 626
Val Ile Leu Glu Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr
75 80 85

GAG ACC TTC CTG TTC CAC CTG GCC GTG GCC GAC CTC CTG 665
Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu
90 95

CTG GTC TTC ATC TTG CCC TTT GCC GTG GCC GAG GGC TCT 704
Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
100 105 110

GTG GGC TGG GTC CTG GGG ACC TTC CTC TGC AAA ACT GTG 743
Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val
115 120 125

ATT GCC CTG CAC AAA GTC AAC TTC TAC TGC AGC AGC CTG 782
Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu
130 135

CTC CTG GCC TGC ATC GCC GTG GAC CGC TAC CTG GCC ATT 821
Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
140 145 150

GTC CAC GCC GTC CAT GCC TAC CGC CAC CGC CGC CTC CTC 860
Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu
155 160

TCC ATC CAC ATC ACC TGT GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC 899
Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly
165 170 175

TTC CTC CTT GCC TTG CCA GAG ATT CTC TTC GCC AAA GTC 938
Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val
180 185 190

AGC CAA GGC CAT CAC AAC AAC TCC CTG CCA CGT TGC ACC 977
Ser Gln Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr
195 200

TTC TCC CAA GAG AAC CAA GCA GAA ACG CAT GCC TGG TTC 1016
Phe Ser Gln Glu Asn Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe
205 210 215

ACC TCC CGA TTC CTC TAC CAT GTG GCG GGA TTC CTG CTG 1055
Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala Gly Phe Leu Leu
220 225

CCC ATG CTG GTG ATG GGC TGG TGC TAC GTG GGG GTA GTG 1094
Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly Val Val
230 235 240

CAC AGG TTG CGC CAG GCC CAG CGG CGC CCT CAG CGG CAG 1133
His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln
245 250 255

AAG GCA GTC AGG GTG GCC ATC CTG GTG ACA AGC ATC TTC 1172
Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe
260 265

TTC CTC TGC TGG TCA CCC TAC CAC ATC GTC ATC TTC CTG 1211
Phe Leu Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu
270 275 280

GAC ACC CTG GCG AGG CTG AAG GCC GTG GAC AAT ACC TGC 1250
Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys
285 290

AAG CTG AAT GGC TCT CTC CCC GTG GCC ATC ACC ATG TGT 1289
Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile Thr Met Cys
295 300 305

GAG TTC CTG GGC CTG GCC CAC TGC TGC CTC AAC CCC ATG 1328
Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
310 315 320

CTC TAC ACT TTC GCC GGC GTG AAG TTC CGC AGT GAC CTG 1367
Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu
325 330

TCG CGG CTC CTG ACG AAG CTG GGC TGT ACC GGC CCT GCC 1406
Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala
335 340 345

TCC CTG TGC CAG CTC TTC CCT AGC TGG CGC AGG AGC AGT 1445

Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser

350 355

CTC TCT GAG TCA GAG AAT GCC ACC TCT CTC ACC ACG TTC TA 1486

Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe

360 365 370 372

GGTC CCAGTGTCCC CTTTTATTGC TGCTTTTCCT TGGGGCAGGC 1530

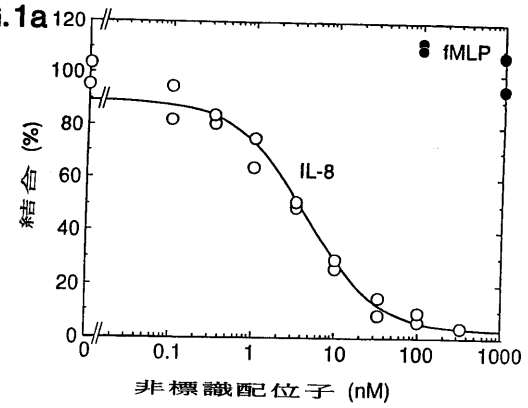
AGTGATGCTG GATGCTCCTT CCAACAGGAG CTGGGATCCT AAGGGCTCAC 1580

CGTGGCTAAG AGTGTCCTAG GAGTATCCTC ATTTGGGGTA GCTAGAGGAA 1630

CCAACCCCCA TTTCTAGAAC ATCCCGCGGC CGCCAGCACA CTGGAATTC 1679

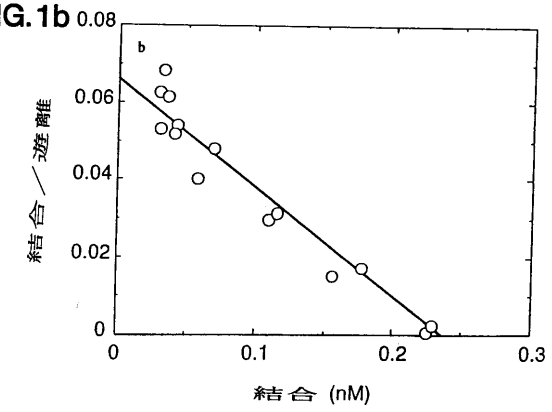
【図１ａ】

FIG.1a



【図１ｂ】

FIG.1b



【図２Ａ－１】

CCTGGCCGGT GCTTCAGTTA GATCAAACCA TTGCTGAAAC TGAAGAGGAC 50

ATG TCA AAT ATT ACA GAT CCA CAG ATG TGG GAT TTT 86
Met Ser Asn Ile Thr Asp Pro Gln Met Trp Asp Phe
1 5 10

GAT GAT CTA AAT TTC ACT GGC ATG CCA CCT GCA GAT GAA 125
Asp Asp Leu Asn Phe Thr Gly Met Pro Pro Ala Asp Glu
15 20 25

GAT TAC AGC CCC TGT ATG CTA GAA ACT GAG ACA CTC AAC 164
Asp Tyr Ser Pro Cys Met Leu Glu Thr Glu Thr Leu Asn
30 35

AAG TAT GTT GTG ATC ATC GCC TAT GCC CTA GTG TTC CTG 203
Lys Tyr Val Val Ile Ile Ala Tyr Ala Leu Val Phe Leu
40 45 50

FIG.2A-1

【図２Ｂ－１】

```
CTG CCC TTC TTC CTT TTC CGC CAG GCT TAC CAT CCA AAC 593
Leu Pro Phe Phe Leu Phe Arg Gln Ala Tyr His Pro Asn
    170                 175                 180

AAT TCC AGT CCA GTT TGC TAT GAG GTC CTG GGA AAT GAC 632
Asn Ser Ser Pro Val Cys Tyr Glu Val Leu Gly Asn Asp
            185                 190

ACA GCA AAA TGG CGG ATG GTG TTG CGG ATC CTG CCT CAC 671
Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile Leu Pro His
195                 200                 205
                                    TM5
ACC TTT GGC TTC ATC GTG CCG CTG TTT GTC ATG CTG TTC 710
Thr Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu Phe Val Met Leu Phe
        210                 215                 220
```

FIG.2B-1

【図２Ａ－２】

```
    TM1
CTG AGC CTG CTG GGA AAC TCC CTG GTG ATG CTG GTC ATC 242
Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile
            55                  60

TTA TAC AGC AGG GTC GGC CGC TCC GTC ACT GAT GTC TAC 281
Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg Ser Val Thr Asp Val Tyr
 65                  70                  75
                                    TM2
CTG CTG AAC CTG GCC TTG GCC GAC CTA CTC TTT GCC CTG 320
Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu
        80                  85                  90

ACC TTG CCC ATC TGG GCC GCC TCC AAG GTG AAT GGC TGG 359
Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
                95                  100
```

FIG.2A-2

【図２Ｂ－２】

```
TGC TAT GGA TTC ACC CTG CGT ACA CTG TTT AAG GCC CAC 749
Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His
                225                 230

ATG GGG CAG AAG CAC CGA GCC ATG AGG GTC ATC TTT GCT 788
Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala
    235                 240                 245
                                    TM6
GTC GTC CTC ATC TTC CTG CTT TGC TGG CTG CCC TAC AAC 827
Val Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn
            250                 255

CTG GTC CTG CTG GCA GAC ACC CTC ATG AGG ACC CAG GTG 866
Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val
260                 265                 270

ATC CAG GAG ACC TGT GAG CGC CGC AAC AAC ATC GGC CGG 905
Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg Asn Asn Ile Gly Arg
        275                 280                 285
```

FIG.2B-2

【図２Ａ－３】

```
ATT TTT GGC ACA TTC CTG TGC AAG GTG GTC TCA CTC CTG 398
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu
    105                 110                 115
                            TM3
AAG GAA GTC AAC TTC TAC AGT GGC ATC CTG CTG TTG GCC 437
Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala
            120                 125

TGC ATC AGT GTG GAC CGT TAC CTG GCC ATT GTC CAT GCC 476
Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
130                 135                 140

ACA CGC ACA CTG ACC CAG AAG CGT CAC TTG GTC AAG TTT 515
Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg His Leu Val Lys Phe
        145                 150                 155
                                            TM4
GTT TGT CTT GGC TGC TGG GGA CTG TCT ATG AAT CTG TCC 554
Val Cys Leu Gly Cys Trp Gly Leu Ser Met Asn Leu Ser
                160                 165
```

FIG.2A-3

【図２Ｃ－２】

```
AGGGCTGGAT GCTCTCGTTG ACCCTCACAG GAGCATCTCC TCAACTCTGA 1500
GTGTTAAGCG TTGAGCCACC AAGCTGGTGG CTCTGTGTGC TCTGATCCGA 1550
GCTCAGGGGG GTGGTTTTCC CATCTCAGGT GTGTTGCAGT GTCTGCTGGA 1600
GACATTGAGG CAGGCACTGC CAAAACATCA ACCTGCCAGC TGGCCTTGTG 1650
AGGAGCTGGA AACACATGTT CCCCTTGGGG GTGGTGGATG AACAAAGAGA 1700
AAGAGGGTTT GGAAGCCAGA TCTATGCCAC AAGAACCCCC TTTACCCCCA 1750
```

FIG.2C-2

【図２Ｃ－３】

```
TGACCAACAT CGCAGACACA TGTGCTGGCC ACCTGCTGAG CCCCAAGTGG 1800
AACGAGACAA GCAGCCCTTA GCCCTTCCCC TCTGCAGCTT CCAGGCTGGC 1850
GTGCAGCATC AGCATCCCTA GAAAGCCATG TGCAGCCACC AGTCCATTGG 1900
GCAGGCAGAT GTTCCTAATA AAGCTTCTGT TCC 1933
```

FIG.2C-3

【図２Ｂ－３】

```
GCC CTG GAT GCC ACT GAG ATT CTG GGA TTT CTC CAT AGC 944
Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Phe Leu His Ser
                290                 295

                    TM7
TGC CTC AAC CCC ATC ATC TAC GCC TTC ATC GGC CAA AAT 983
Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Asn
    300                 305                 310

TTT CGC CAT GGA TTC CTC AAG ATC CTG GCT ATG CAT GGC 1022
Phe Arg His Gly Phe Leu Lys Ile Leu Ala Met His Gly
            315                 320

CTG GTC AGC AAG GAG TTC TTG GCA CGT CAT CGT GTT ACC 1061
Leu Val Ser Lys Glu Phe Leu Ala Arg His Arg Val Thr
325                 330                 335

TCC TAC ACT TCT TCG TCT GTC AAT GTC TCT TCC AAC CTC  1100
Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Val Asn Val Ser Ser Asn Leu
        340                 345                 350
```

FIG.2B-3

【図２Ｃ－１】

```
TGAAAACCAT CGATGAAGGA ATATCTCTTC TCAGAAGGAA AGAATAACCA 1150
ACACCCTGAG GTTGTGTGTG GAAGGTGATC TGGCTCTGGA CAGGCACTAT 1200
CTGGGTTTTG GGGGGACGCT ATAGGATGTG GGGAAGTTAG GAACTGGTGT 1250
CTTCAGGGGC CACACCAACC TTCTGAGGAG CTGTTGAGGT ACCTCCAAGG 1300
ACCGGCCTTT GCACCTCCAT GGAAACGAAG CACCATCATT CCCGTTGAAC 1350
GTCACATCTT TAACCCACTA ACTGGCTAAT TAGCATGGCC ACATCTGAGC 1400
CCCGAATCTG ACATTAGATG AGAGAACAGG GCTGAAGCTG TGTCCTCATG 1450
```

FIG.2C-1

【図３ａ】

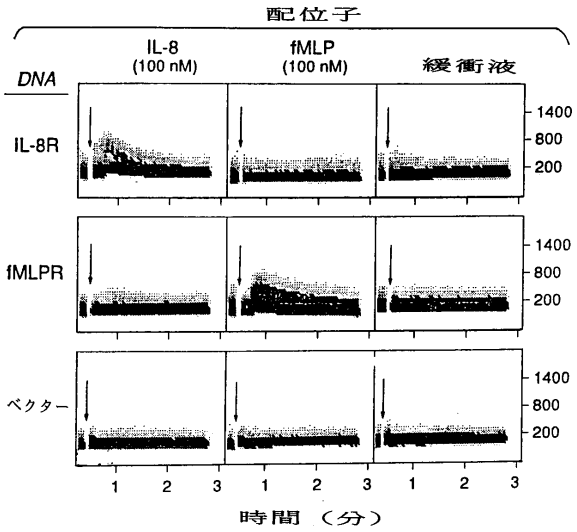


FIG.3a

【図３ｂ】

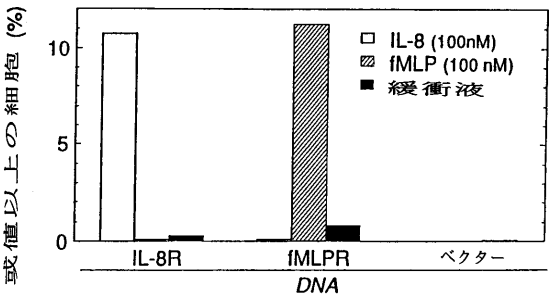


FIG.3b

【図４Ａ－１】

```
GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CGCGGCGCAA AGTGACGCCG AGGGCCTGAG 50

TGCTCCAGTA GCCACCGCAT CTGGAGAACC AGCGGTTACC ATG GAG 96
                                            Met Glu
                                              1

GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA GAT AAC TAC ACC GAG GAA 135
Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu
            5                  10                  15

ATG GGC TCA GGG GAC TAT GAC TCC ATG AAG GAA CCC TGT 174
Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
                20                  25

TTC CGT GAA GAA AAT GCT AAT TTC AAT AAA ATC TTC CTG 213
Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu
        30                  35                  40

CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC TTC TTA ACT GGC ATT GTG 252
Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val
                45                  50
```

FIG.4A－1

【図４Ａ－２】

```
GGC AAT GGA TTG GTC ATC CTG GTC ATG GGT TAC CAG AAG 291
Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys
    55                  60                  65

AAA CTG AGA AGC ATG ACG GAC AAG TAC AGG CTG CAC CTG 330
Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
            70                  75                  80

TCA GTG GCC GAC CTC CTC TTT GTC ATC ACG CTT CCC TTC 369
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe
                85                  90

TGG GCA GTT GAT GCC GTG GCA AAC TGG TAC TTT GGG AAC 408
Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn
        95                  100                 105
```

FIG.4A－2

【図4A－3】

```
TTC CTA TGC AAG GCA GTC CAT GTC ATC TAC ACA GTC AAC 447
Phe Leu Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn
            110                 115

CTC TAC AGC AGT GTC CTC ATC CTG GCC TTC ATC AGT CTG 486
Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu
120                 125                 130

GAC CGC TAC CTG GCC ATC GTC CAC GCC ACC AAC AGT CAG 525
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln
        135                 140                 145

AGG CCA AGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TAT GTT 564
Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val
                150                 155

GGC GTC TGG ATC CCT GCC CTC CTG CTG ACT ATT CCC GAC 603
Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp
    160                 165                 170
```

FIG.4A－3

【図4B－1】

```
TTC ATC TTT GCC AAC GTC AGT GAG GCA GAT GAC AGA TAT 642
Phe Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr
            175                 180

ATC TGT GAC CGC TTC TAC CCC AAT GAC TTG TGG GTG GTT 681
Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val
185                 190                 195

GTG TTC CAG TTT CAG CAC ATC ATG GTT GGC CTT ATC CTG 720
Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu
        200                 205                 210

CCT GGT ATT GTC ATC CTG TCC TGC TAT TGC ATT ATC ATC 759
Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile
                215                 220

TCC AAG CTG TCA CAC TCC AAG GGC CAC CAG AAG CGC AAG 798
Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
    225                 230                 235
```

FIG.4B－1

【図4B－2】

```
GCC CTC AAG ACC ACA GTC ATC CTC ATC CTG GCT TTC TTC 837
Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe
            240                 245

GCC TGT TGG CTG CCT TAC TAC ATT GGG ATC AGC ATC GAC 876
Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp
250                 255                 260

TCC TTC ATC CTC CTG GAA ATC ATC AAG CAA GGG TGT GAG 915
Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu
        265                 270                 275

TTT GAG AAC ACT GTG CAC AAG TGG ATT TCC ATC ACC GAG 954
Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
                280                 285

GCC CTA GCT TTC TTC CAC TGT TGT CTG AAC CCC ATC CTC 993
Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu
    290                 295                 300
```

FIG.4B－2

【図4B－3】

```
TAT GCT TTC CTT GGA GCC AAA TTT AAA ACC TCT GCC CAG 1032
Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln
            305                 310

CAC GCA CTC ACC TCT GTG AGC AGA GGG TCC AGC CTC AAG 1071
His Ala Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys
315                 320                 325

ATC CTC TCC AAA GGA AAG CGA GGT GGA CAT TCA TCT GTT 1110
Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val
        330                 335                 340

TCC ACT GAG TCT GAG TCT TCA AGT TTT CAC TCC AGC TAAC 1150
Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
                345                 350     352

ACAGATGTAA AAGACTTTTT TTTATACGAT AAATAACTTT TTTTTAAGTT 1200
```

FIG.4B－3

【図５Ａ－１】

```
GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CCGCCCAGTG TGCTGGCGGC GGCAGTTGAG 50

GGAAAGGACA GAGGTTATGA GTGCCTGCAA GAGTGGCAGC CTGGAGTAGA 100

GAAAACACTA AAGGTGGAGT CAAAAGACCT GAGTTCAAGT CCCAGCTCTG 150

CCACTGGTTA GCTGTGGGAT CTCGGAAAAG ACCCAGTGAA AAAAAAAAAA 200

AAAGTGATGA GTTGTGAGGC AGGTCGCGGC CCTACTGCCT CAGGAGACGA 250

TGCGCAGCTC ATTTGCTTAA ATTTGCAGCT GACGGCTGCC ACCTCTCTAG 300
```

FIG.5A－１

【図５Ａ－２】

```
AGGCACCTGG CGGGGAGCCT CTCAACATAA GACAGTGACC AGTCTGGTGA 350

CTCACAGCCG GCACAGCC ATG AAC TAC CCG CTA ACG CTG GAA 392
                    Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu
                      1               5

ATG GAC CTC GAG AAC CTG GAG GAC CTG TTC TGG GAA CTG 431
Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp Leu Phe Trp Glu Leu
     10                  15                  20

GAC AGA TTG GAC AAC TAT AAC GAC ACC TCC CTG GTG GAA 470
Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu Val Glu
             25                  30

AAT CAT CTC TGC CCT GCC ACA GAG GGG CCC CTC ATG GCC 509
Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala
 35                  40                  45
```

FIG.5A－２

【図４Ｃ－１】

```
ACACATTTTT CAGATATAAA AGACTGACCA ATATTGTACA GTTTTTATTG 1250

CTTGTTGGAT TTTTGTCTTG TGTTTCTTTA GTTTTTGTGA AGTTTAATTG 1300

ACTTATTTAT ATAAATTTTT TTTGTTTCAT ATTGATGTGT GTCTAGGCAG 1350

GACCTGTGGC CAAGTTCTTA GTTGCTGTAT GTCTCGTGGT AGGACTGTAG 1400

AAAAGGGAAC TGAACATTCC AGAGCGTGTA GTGAATCACG TAAAGCTAGA 1450

AATGATCCCC AGCTGTTTAT GCATAGATAA TCTCTCCATT CCCGTGGAAC 1500
```

FIG.4C－１

【図４Ｃ－２】

```
GTTTTTCCTG TTCTTAAGAC GTGATTTTGC TGTAGAAGAT GGCACTTATA 1550

ACCAAAGCCC AAAGTGGTAT AGAAATGCTG GTTTTTCAGT TTTCAGGAGT 1600

GGGTTGATTT CAGCACCTAC AGTGTACAGT CTTGTATTAA GTTGTTAATA 1650

AAAGTACATG TTAAACTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1700

AAAAAAAAAA AAAGCGGCCG CCAGCACACT GGAATTC 1737
```

FIG.4C－２

(51)
JP 4156662 B2 2008.9.24

【図5A－3】

```
TCC TTC AAG GCC GTG TTC GTG CCC GTG GCC TAC AGC CTC 548
Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu
          50                  55                  60

ATC TTC CTC CTG GGC GTG ATC GGC AAC GTC CTG GTG CTG 587
Ile Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu
                65                  70

GTG ATC CTG GAG CGG CAC CGG CAG ACA CGC AGT TCC ACG 626
Val Ile Leu Glu Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr
     75                  80                  85

GAG ACC TTC CTG TTC CAC CTG GCC GTG GCC GAC CTC CTG 665
Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu
               90                  95

CTG GTC TTC ATC TTG CCC TTT GCC GTG GCC GAG GGC TCT 704
Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
100                 105                 110
```

FIG.5A－3

【図5B－1】

```
GTG GGC TGG GTC CTG GGG ACC TTC CTC TGC AAA ACT GTG 743
Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val
          115                 120                 125

ATT GCC CTG CAC AAA GTC AAC TTC TAC TGC AGC AGC CTG 782
Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu
               130                 135

CTC CTG GCC TGC ATC GCC GTG GAC CGC TAC CTG GCC ATT 821
Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
     140                 145                 150

GTC CAC GCC GTC CAT GCC TAC CGC CAC CGC CGC CTC CTC 860
Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu
          155                 160

TCC ATC CAC ATC ACC TGT GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC 899
Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly
165                 170                 175
```

FIG.5B－1

【図5B－2】

```
TTC CTC CTT GCC TTG CCA GAG ATT CTC TTC GCC AAA GTC 938
Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val
      180                 185                 190

AGC CAA GGC CAT CAC AAC AAC TCC CTG CCA CGT TGC ACC 977
Ser Gln Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr
           195                 200

TTC TCC CAA GAG AAC CAA GCA GAA ACG CAT GCC TGG TTC 1016
Phe Ser Gln Glu Asn Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe
205                 210                 215

ACC TCC CGA TTC CTC TAC CAT GTG GCG GGA TTC CTG CTG 1055
Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala Gly Phe Leu Leu
           220                 225

CCC ATG CTG GTG ATG GGC TGG TGC TAC GTG GGG GTA GTG 1094
Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly Val Val
230                 235                 240
```

FIG.5B－2

【図5B－3】

```
CAC AGG TTG CGC CAG GCC CAG CGG CGC CCT CAG CGG CAG 1133
His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln
      245                 250                 255

AAG GCA GTC AGG GTG GCC ATC CTG GTG ACA AGC ATC TTC 1172
Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe
           260                 265

TTC CTC TGC TGG TCA CCC TAC CAC ATC GTC ATC TTC CTG 1211
Phe Leu Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu
205                 270                 275

GAC ACC CTG GCG AGG CTG AAG GCC GTG GAC AAT ACC TGC 1250
Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys
           285                 290
```

FIG.5B－3

FIG.5C-1

```
AAG CTG AAT GGC TCT CTC CCC GTG GCC ATC ACC ATG TGT 1289
Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile Thr Met Cys
295                 300                 305

GAG TTC CTG GGC CTG GCC CAC TGC TGC CTC AAC CCC ATG 1328
Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
        310                 315                 320

CTC TAC ACT TTC GCC GGC GTG AAG TTC CGC AGT GAC CTG 1367
Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu
                325                 330

TCG CGG CTC CTG ACG AAG CTG GGC TGT ACC GGC CCT GCC 1406
Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala
    335                 340                 345

TCC CTG TGC CAG CTC TTC CCT AGC TGG CGC AGG AGC AGT 1445
Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser
            350                 355
```



```
CTC TCT GAG TCA GAG AAT GCC ACC TCT CTC ACC ACG TTC TA 1486
Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe
360                 365                 370     372

GGTC CCAGTGTCCC CTTTTATTGC TGCTTTTCCT TGGGGCAGGC 1530

AGTGATGCTG GATGCTCCTT CCAACAGGAG CTGGGATCCT AAGGGCTCAC 1580

CGTGGCTAAG AGTGTCCTAG GAGTATCCTC ATTTGGGGTA GCTAGAGGAA 1630

CCAACCCCCA TTTCTAGAAC ATCCCGCGGC CGCCAGCACA CTGGAATTC 1679
```

FIG.5C-2

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12P 21/08		***(2006.01)***	C12P	21/08	
C12Q 1/68		***(2006.01)***	C12Q	1/68	A
G01N 33/53		***(2006.01)***	G01N	33/53	L
G01N 33/577		***(2006.01)***	G01N	33/53	P
A61K	*38/16*	*(2006.01)*	G01N	33/577	B
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	37/04	
			A61K	39/395	D
			A61K	39/395	N

(72)発明者 ホルメス，ウィリアム・イー
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０４４、パシフィカ、イーストレイク・アベニュー２９番
(72)発明者 ウッド，ウィリアム・アイ
アメリカ合衆国カリフォルニア９４４０２、サン・マテオ、テリータウン・ストリート１４００番

合議体
審判長 種村 慈樹
審判官 鈴木 恵理子
審判官 小暮 道明