(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3908279号
(P3908279)
(45)発行日　平成19年4月25日(2007.4.25)　(24)登録日　平成19年1月26日(2007.1.26)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAC
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B

請求項の数 49　(全 42 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平9-539045
(86)(22)出願日　平成9年4月25日(1997.4.25)
(65)公表番号　特表2000-509277(P2000-509277A)
(43)公表日　平成12年7月25日(2000.7.25)
(86)国際出願番号　PCT/US1997/006930
(87)国際公開番号　WO1997/041224
(87)国際公開日　平成9年11月6日(1997.11.6)
審査請求日　平成13年9月4日(2001.9.4)
(31)優先権主張番号　08/639,891
(32)優先日　平成8年4月26日(1996.4.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/842,382
(32)優先日　平成9年4月23日(1997.4.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　505460156
アムセル　コーポレイション
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４０８９，サニーベール，ボルドー　ドライブ　１１９０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100108903
弁理士　中村　和広

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト造血幹細胞及び前駆細胞抗原並びにその使用方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２に示すアミノ酸配列を有するAC133抗原に対して特異的に結合する抗体。
【請求項２】
前記抗体が、ハイブリドーマ細胞系により生成されるモノクローナル抗体である請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
前記抗体が、対側性免疫化を通して誘導されるモノクローナル抗体である、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、又は両者の富化のための方法であって、
造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、又は両者を含んで成るヒト細胞の混合された集団と、配列番号２に示すアミノ酸配列を有するAC133抗原に対して特異的に結合する抗体又は抗体混合物とを組合せ；そして
前記抗体又は抗体混合物と結合する細胞を選択する；
ことを含んで成り、ここで前記選択された細胞が、前記ヒト細胞の混合された集団がそれぞれ、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞、又は両者を含むかどうかに依存して、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞活性又は両活性について富化されることを特徴とする方法。
【請求項５】
前記ヒト細胞の混合された集団と、細胞表面マーカーCD90，CD117及びHLA-DRの少なくと

も１つを特異的に認識する抗体試薬とを組合せ；そして
前記細胞表面マーカーの少なくとも１つに対して陽性である細胞を選択する；
ことをさらに含んで成る請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記抗体の少なくとも１つが、螢光色素に接合されている請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記螢光色素に接合された抗体による前記選択がフローサイトメトリーによる請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記抗体の少なくとも１つが、磁気粒子に接合されている請求項４に記載の方法。
【請求項９】
前記磁気粒子接合された抗体による前記選択が高グラジエント磁気選択による請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
配列番号１に示されるAC133のためのアミノ酸コード領域を有する配列を含んで成る単離された核酸分子を含んで成る分子であって、但し前記分子がRNA分子である場合、前記分子の配列においてＵがＴを置換している分子。
【請求項１１】
配列番号１に示されるAC133のためのアミノ酸コード領域に対して少なくとも90％の同一性を有し、且つ請求項１に記載の抗体により認識される抗原をコードする配列を含んで成る単離された核酸分子を含んで成る分子であって、但し前記分子がRNA分子である場合、前記分子の配列においてＵがＴを置換している分子。
【請求項１２】
請求項10又は11に記載の分子の配列に対して相補的な配列を含んで成る単離された核酸分子。
【請求項１３】
配列番号２に示されるAC133のアミノ酸分子をコードするDNAから成る単離された核酸分子。
【請求項１４】
請求項10又は11に記載の核酸配列を含んで成る発現ベクター。
【請求項１５】
請求項14に記載の分子によりトランスフェクトされた細胞。
【請求項１６】
単離されたポリペプチドであって；
（１）配列番号２に示されるAC133の第１アミノ酸配列；
（２）前記第１配列のサブ配列であり、請求項１に記載の抗体により認識される抗原を構成する第２アミノ酸配列；又は
（３）前記第１配列中の少なくとも１つのアミノ酸が異なったアミノ酸により置換されている第３配列；
を含んで成り、但し、前記アミノ酸置換が１つの酸性残基ともう１つの残基、１つの塩基性残基ともう１つの残基、１つの非極性残基ともう１つの残基、１つの荷電されていない極性残基ともう１つの残基：又は１つの芳香族残基ともう１つの残基との置換であり、そして前記第３配列が前記第１配列に対して少なくとも90％の同一性を有し且つ請求項１に記載の抗体により認識される抗原を構成する、ことを特徴とするポリペプチド。
【請求項１７】
前記ポリペプチドが前記第１配列を含んで成る請求項16に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項１８】
前記ポリペプチドが前記第２配列を含んで成る請求項16に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項１９】
前記ポリペプチドが前記第３配列を含んで成る請求項16に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項２０】
抗体に対して複合体を形成する請求項16に記載のポリペプチド。
【請求項２１】
ヒト造血幹細胞に対して結合するリガンドを同定するための方法であって、請求項16に記載のポリペプチドにより前記リガンドの結合性を検出することを含んで成る方法。
【請求項２２】
請求項16に記載のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体試薬。
【請求項２３】
前記試薬が、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体から成る群から選択される請求項22に記載の抗体試薬。
【請求項２４】
前記ポリペプチドがグリコシル化されてない請求項16に記載のポリペプチド。
【請求項２５】
前記ポリペプチドがグリコシル化されている請求項16に記載のポリペプチド。
【請求項２６】
造血幹細胞上の抗原性マーカーに対する抗体の選択的結合による幹細胞の同定に基づく細胞分離技法を用いて、前記幹細胞を単離するための方法であって；
前記抗原性マーカーとして、そのアミノ酸配列が配列番号２に示されているAC133抗原を用いることを特徴とする方法。
【請求項２７】
前記抗体が、前記AC133抗原の細胞外領域に結合する請求項26に記載の方法。
【請求項２８】
前記細胞外領域が、配列番号２の細胞外Ｎ－末端、aa 20-107；第１細胞外ループ、aa 180-435；又は第２細胞外ループ、aa 504-792から選択されたアミノ酸を含んで成る請求項26に記載の方法。
【請求項２９】
前記抗体が、試験化合物群中の化合物が前記AC133抗原に結合するかどうかを決定し、そして成熟血液細胞上に存在するいづれかの抗原と10％以下の交差反応性を有する、前記AC133抗原に対して特異的に結合する化合物間から前記抗体を選択することによって同定される請求項26に記載の方法。
【請求項３０】
前記交差反応性が、前記抗体がAC133への結合性を半－飽和する、AC133抗原及び前記抗体の濃度を用いて、純粋なAC133抗原、前記抗体、及び前記推定される交差反応性抗原の間の競争結合アッセイにより測定される請求項26に記載の方法。
【請求項３１】
請求項21に記載の方法により同定されるAC133に対する抗体。
【請求項３２】
成熟血液細胞上に存在するいづれかの抗原と５％以下の交差反応性を有する、配列番号２に示すアミノ酸配列を有するAC133抗原に対して特異的に結合する抗体試薬。
【請求項３３】
前記試薬が、表面又は検出できるラベルに結合される請求項32に記載の抗体試薬。
【請求項３４】
前記ラベルが螢光ラベルである請求項32に記載の抗体試薬。
【請求項３５】
AC133陽性細胞の集団を選択する方法において、
細胞の混合された集団を、配列番号２のアミノ酸配列を有するAC133抗原に対して特異的な抗体と接触せしめ、そして

前記抗体に結合する細胞を選択する；
ことを含んで成る方法。
【請求項３６】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項35に記載の方法。
【請求項３７】
前記抗体が蛍光色素に結合されている、請求項35に記載の方法。
【請求項３８】
前記蛍光色素に結合した抗体による前記の選択が、フローサイトメトリーによる、請求項37に記載の方法。
【請求項３９】
前記抗体が磁気粒子に結合されている、請求項35に記載の方法。
【請求項４０】
前記磁気粒子に結合した抗体による前記選択が、高グラジエント磁気選択による、請求項39に記載の方法。
【請求項４１】
前記細胞の混合された集団が、骨髄、胎児骨髄、肝臓、臍帯、血液、又はサイトカインで可動かされた血液に由来する、請求項35に記載の方法。
【請求項４２】
AC133抗原を発現する細胞の同定方法において、細胞の集団を、配列番号２のアミノ酸配列を有するAC133抗原に対して特異的な抗体と接触せしめ；そして
前記抗体に結合した細胞を検出する；
ことを含んで成る方法。
【請求項４３】
前記検出された細胞を単離する工程を更に含んで成る、請求項42に記載の方法。
【請求項４４】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項42に記載の方法。
【請求項４５】
前記抗体が蛍光色素に結合されている、請求項43に記載の方法。
【請求項４６】
前記蛍光色素に結合した抗体による前記の選択が、フローサイトメトリーによる、請求項45に記載の方法。
【請求項４７】
前記抗体が磁気粒子に結合されている、請求項43に記載の方法。
【請求項４８】
前記磁気粒子に結合した抗体による前記選択が、高グラジエント磁気選択による、請求項47に記載の方法。
【請求項４９】
前記細胞の混合された集団が、骨髄、胎児骨髄、肝臓、臍帯、血液、又はサイトカインで可動かされた血液に由来する、請求項42に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、造血幹細胞及び前駆細胞(progenitor cell)により発現された抗原、及びそのような抗原を、特に細胞分離及び精製のために使用する方法に関する。
背景
哺乳類血液細胞の高い交代速度（turnover）は、他の血液細胞系統を生ぜしめることができる造血幹細胞の供給を必要とする。造血幹細胞の直子孫は、前駆細胞と呼ばれ、そして１又は複数の系統、すなわちエリスロイド、ミエロイド及びリンパ系統内の種々の細胞型を生ぜしめることができる。幹細胞及び前駆細胞集団は、骨髄、胎児肝臓、等における全細胞数の数％のみを構成する。それらの集団は、造血系をもとの集団にもどす（repapulate）それらの能力のために、非常に興味あるものである。

造血幹細胞及び前駆細胞集団の精製又は富化のための多くの方法が、文献に記載されて来た。造血前駆細胞は多くの臨床的用途を有するので、それらの方法にかなりの商業的関心がよせられている。前駆細胞移植が、白血病、乳癌及び他の腫瘍の治療のために化学療法及び放射線と組合わせて現在使用されている。ときおり、移植片拒絶の危険性を回避するために自己由来の移植物が使用されているが、しかし移植細胞集団における腫瘍細胞の存在のために、病気再発の高い危険性が存在する。従って、より精製された前駆細胞源の移植が好ましい。

遺伝子治療のためのビークルとしての造血前駆細胞の使用にも興味がもたれている。臨床的にはまだ証明されてはいないが、造血幹細胞の寿命、及び脈管構造におけるそれらの子孫(progeny)の散在性(disseminity)は所望の特徴である。多くのベクター、たとえば造血幹細胞をトランスフェクトすることができる、いくつかのレトロウィルス及びアデノウィルスに基く構造体が記載されて来た。

造血幹細胞及び前駆細胞集団上に見出される、タンパク質及び他の細胞表面マーカーは、それらがそれらの集団の同定、分離及び単離のための試薬の調製、及びそれらの重要な細胞のさらなる特徴化において有用であるので、非常に興味あるものである。幹細胞の同定及び分離（陽性及び陰性）において使用され得るいくつかの抗原、たとえば幹細胞上に見出されるが、しかし成熟血液細胞上には見出されないCD34抗原が現在、知られているが、他の抗原、特に所望のクラス及びサブクラスの細胞、特に造血幹細胞及び前駆細胞の精製及び分離を単純にすることができる抗原の開発が常に必要とされている。

背景文献

アメリカ特許第5,061,620号は、実質的に均質なヒト造血幹細胞組成物及びそのような組成物を得る態様を記載する。ストロマ細胞関連の造血が、Paulなど．(1991) Blood 77 : 1723-1733により記載されている。ローダミン染色による幹細胞の表現型の同定が、Spangrnde and Johnson (1990) P.N.A.S. 87 : 7433-7437に論じられている。造血における細胞表面抗原発現が、Straussなど．(1983) Blood 61 : 1222-1231及びSieffなど．(1982) Blood 60 : 703-713に論じられている。多能性造血細胞の記載が、McNieceなど．(1989) Blood 74 : 609-612及びMooreなど．(1979) Blood Cells 5 : 297-311に見出される。幼若細胞－含有コロニーをインビトロで形成できるヒト造血前駆細胞の特徴化が、Gordonなど．(1987) J. Cell. Physiol. 130 : 150-156及びBrandtなど．(1988) J. Clin. Invest. 82 : 1017-1027に見出される。移植への前駆細胞の使用が、Toなど．Progenitor Threshold in Transplantation (ISBN 1-880854 17-1) pp.15-20に論じられている。前記方法を用いて得られる細胞組成物の利用性及び本発明の組成物が、中でもそれらの出版物に記載されている。

ヒト造血前駆細胞の単離のための高いグラジエントの磁気分離の使用が、Thomas and Landsdorp (1992) Advances in Bone Merrow Purging pp.537-544；及びKato and Radbrach (1993) Cytometry 14 : 384-392に記載されている。ヒト造血前駆細胞についての磁気選択の他の方法が、Bigasなど．(1992) Advances in Bone Merrow Purging pp.545-551 ; Okuなど．(1992) Advances in Bone Merrow Purging pp.553-560 ; 及びHardwickなど．(1992) Advances in Bone Merrow Purging pp.583-589に記載されている。高いグラジエントの磁気細胞分類が、Miltenyiなど．(1990) Cytometry 11 : 231-238に記載されている。Moldayのアメリカ特許第4,452,773号は、磁気性鉄－デキストラン微小球の分離を記載し、そして生物学的材料への結合のために適切な粒子の種々の調製手段を記載する要約を提供する。

発明の要約

ヒト造血前駆体及び幹細胞の富化及び特徴化のための方法及び組成物が提供される。幹細胞及び前駆細胞上に存在し、そして造血細胞の生物学的（又は他の）源に存在する莫大な数の細胞からのそれらの重要な細胞の同定及び／又は選択のために使用され得る、本明細書においてAC133抗原として言及される抗原が同定された。それら、たとえば抗体と反応する新規抗原組成物及び試薬が、本発明の方法への使用のために、並びに造血前駆体及び幹細胞生物学のさらなる研究のために供給される。たとえば、造血細胞は、種々の源、た

とえば胎児及び成人骨髄、サイトカイン可動化(mobilized)末梢血液細胞、及び胎児肝臓から得られ、そして本発明の試薬及び方法を用いて分離され得る。

【図面の簡単な説明】

本発明は今や、一般的に記載され、これは本明細書の一部を形成する図面と一緒に、特定態様の次の記載に関して、良好に理解されるであろう。

図１は、胎児肝臓細胞の螢光活性化細胞分別(fluorescence activted cell sorting)（FACS）分析からのドット－プロットを示す。ｙ軸はフィコエリトリン（PE）に接合されたAC133抗体による細胞染色を示す。細胞は、HPCA2－FITC（抗－CD34）により対比染色された（counterstained）。数字は、枠内に含まれる合計細胞の％を表わす。

図２は、ホルボールミリステートアセテート(PMA)活性化Ｙ79.1細胞上でのAC133抗原発現のFACS分析を示すグラフである。

図３は、PMA活性化Ｙ79.1細胞上でのAC133抗原及びCD34発現のFACS分析を示すグラフである。

図４Ａ及び４Ｂは、胎児肝臓細胞上での抗体AC133，CD38及びHLA－DRの３色FACS分析からのドット－プロットを示す。図４Ａ中のｘ軸は、HLA－DR－FITCを表わし、そしてｙ軸はAC133－PEによる細胞染色を示す。図４Ｂ中のｘ軸はCD38－FITCを表わし、そしてｙ軸はAC133－PEによる細胞染色を表わす。

図５Ａ，５Ｂ，５Ｃ及び５Ｄは、胎児肝臓から精製されたAC133陽性細胞上での抗体CD38，HLA－DR，CD90及びCD117のFACS分析からのドット－プロットを示す。図５Ａにおいては、ｘ軸はCD38－FITC染色を示し、そしてｙ軸はHPCA2－PE染色を示す。図５Ｂ，５Ｃ及び５Ｄにおいては、ｘ軸はHPCA2－FITCによる染色を示す。図５Ｂ中のｙ軸は抗－HLA－DR－PEによる細胞染色を表わす。図５Ｃ中のｙ軸は抗－CD90－PEによる細胞染色を表わす。図５Ｄ中のｙ軸は抗－CD117－PEによる細胞染色を表わす。数字は、ボックスゲート内にある合計細胞の％を示す。

図６は、AC133抗体並びに細胞系KG1a及びＹ79.1による免疫沈殿の結果を示すゲルである。レーンは次の通りである：１）分子量マーカー；２）未沈殿KG1a溶解物の１：５希釈物；３）未沈殿Ｙ79.1溶解物の１：50希釈溶液；４）AC101抗体（CD34）により沈殿したKG1a溶解物；５）AC101抗体により沈殿したＹ79.1溶解物；６）HPCA2抗体（CD34）により沈殿したKG1a溶解物；７）HPCA2抗体により沈殿したＹ79.1溶解物；８）16D11抗体（CD34）により沈殿したKG1a溶解物；９）16D11抗体により沈殿したＹ79.1溶解物；10）AC133抗体により沈殿したKG1a溶解物；11）AC133抗体により沈殿したＹ79.1溶解物；12）AC133及びHPCA2抗体の混合物により沈殿した、KG1a及びＹ79.1の混合物の溶解物；13）8A3(抗－CD109)抗体により沈殿したKG1a溶解物；14）15G5（抗－CD109）抗体により沈殿されたKG1a溶解物。

図７Ａ及び７Ｂは、PMA活性化された、ツニカマイシン処理された又は未処理のＹ79.1細胞上でのCD56（図７Ａ）及びAC133抗原（図７Ｂ）発現のFACS分析を示すグラフである。

図８は、AC133磁気精製された胎児肝臓細胞のHPCA2－PE（ｙ軸）染色のFACS分析を示すドット－プロットである。ｘ軸はグリコホリンＡ－FITC接合体による染色を示す。

図９Ａ及び９Ｂは、AC133磁気分離の前及び後の、バフィーコート末梢血液単核細胞のHPCA2染色のFACS分析を示すドット－プロットである。ｙ軸は、HPCA2－PEによる染色を示し、ｘ軸は抗－CD45及び抗－CD15－FITC接合抗体による染色を示す。

図10は、クローン原性アッセイにおけるAC133及びAC101で精製された細胞のクローニング効率を示す棒グラフである。

図11は、AC133で精製された細胞、及びAC133陰性，CD34陽性細胞のプート効率を示す棒グラフである。

図12は、AC133抗原についてのDNA及びアミノ酸配列を示す化学式である。

図13は、AC133抗原のトランスメンブラン領域及び他の領域の図解である。

特定の態様の記載

ヒト造血幹細胞及び／又は前駆細胞の富化及び／又は特徴決定に使用される方法及び組成物が提供される。本明細書においては“前駆”細胞と呼ばれる、造血幹細胞の直子孫(imm

ediate progeny)は、１又は複数の系統(lineage)内に種々の細胞型を生じさせることができる。本発明においては、幹細胞及び／又は前駆細胞のサブセット（すなわち、短期移植(short ingraftment)のために必要とされるCFU－GM細胞）が、それらの細胞に対して高い特異性を有するAC133抗原（Ag）として本明細書で言及される新しく発見された抗原に特異的に結合する試薬の使用を通して同定され、又は選択され得る。AC133抗原発現の高い組織特異性は、高く精製された前駆細胞集団についての富化の間、特に好都合である。AC133－陽性細胞集団は、前駆細胞活性、特にCFU－GM活性を測定するアッセイにおいて活性的である細胞について高度に富化される。AC133陰性であり、且つCD34陽性である細胞サブセットは、BFU－Ｅ活性、すなわちエリトロイド－コミッテッド(committed)前駆細胞活性の測定のために富化される。

AC133抗原に対して特異的に結合する試薬は、生理学的リガンド、合成リガンド、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を包含する。AC133モノクローナル抗体は、ヒト骨髄、胎児骨髄及び肝臓、臍帯血及び成人末梢血液に由来する造血前駆細胞上に発現されるAC133細胞抗原と特異的に相互作用するいづれかのモノクローナル抗体である。AC133に対して向けられる抗体により認識される前駆細胞のサブセットは、$CD34^{bright}$であり、そして$CD34^{+}$サブセット（及び前駆細胞の収集において収集されるまだ幹細胞である細胞）に存在する実質的にすべてのCFU－GM活性を含む。移植のためには、CFU－GMにおいて活性な細胞は、それらが好中球の生成を提供するので、特に興味あるものである。AC133抗体の使用は、造血前駆細胞集団の陽性免疫選択、及びフローサイトメトリーを用いての前駆細胞集団の表現型分析を可能にする。特に、AC133に対する抗体は、短期移植及び敗血症からの保護のために必要とされるCFU－GM細胞のみならず、さらに、長期の移植のために必要である原始的な長期のもとの集団にもどる細胞（primitive long-term re-populuting cells）を認識する。次に、AC133抗原の発現について選択される細胞は、他の造血幹細胞及び前駆細胞マーカーについての選択によりさらに精製され、そして／又は選択され得る。

下記に詳細に記載されるように、本発明の種々の方法における興味ある分子は、AC133抗原それ自体、AC133又はそのフラグメントに対して特異的に結合する試薬、AC133抗原をコードする核酸配列、及びAC133抗原又はそのいづれかのフラグメントを発現する細胞集団を包含する。AC133抗原は、天然源から単離され、又は組換えDNA技法を用いて製造され得る。核酸は、cDNA, RNA、ゲノム配列、又はコード配列を単独で、又は転写調節領域、及び発現及び／又はクローニングベクターに見出される他の配列と組合して含んで成る合成配列であり得る。AC133 Ag自体は、当業界において知られているアフィニティー結合法を用いてAC133抗体結合により陽性として同定され得る細胞からの単離により精製された形で得られる。陽性同定は、細胞膜タンパク質のタンパク質分解消化、及び図12に示されるAC133についてのタンパク質配列に対する配列の比較により入手できる。

mAb AC133は、明るい（bright）$CD34^{+}$細胞上に発現される新規の細胞表面抗原に対する特異性を有する抗体である。前記抗原は、ヒト骨髄、胎児骨髄及び肝臓、臍帯血、及び成人末梢血液に由来する造血前駆細胞のサブセット上に発現される。mAb AC133は、可能性ある治療利点、及びフローサイトメトリーを用いての前駆細胞集団の表現型分析をもたらす、造血前駆細胞集団を免疫選択するために磁気ビーズシステムに使用され得る。この新規分子の性質をさらに特長づけるために、AC133抗原がイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製された。AC133抗原は、約120KDの減じられた分子量を有する一本鎖ポリペプチドから成り、そして約20KDaのＮ－グリコシド結合多糖類と共に糖タンパク質を含んで成る。還元されたAC133抗原はmAb AC133により認識され、これは線状エピトープ又は糖エピトープを示唆する。

そのような分子は、類似性が同じ出発ペプチド構造体からの合成のために、AC133分子の収集において、糖構造体間に確かに存在するが、ペプチド合成のために存在する鋳型（すなわち、メッセンジャーRNA）なしに存在する正確に同一の糖構造体を、糖合成の酵素性質のために有することが予測されないことが、糖タンパク質の分野におけるそれらの実験により認識されるであろう。従って、“AC133抗原”は、グリコシル化部位に付加される

糖構造と共に図12（下記で論ぜられる）に示されるペプチド構造を有するタンパク質を意味する。糖構造における天然の変動のために、グリコシル化された分子のための広範囲の分子量がまた、予測され、そして本発明の範囲内にある。AC133抗原の場合、他の既知のタンパク質に比較して、結合される糖残基の構造及び大きさにおいて比較的低い変動性が存在すると思われる。AC133の分子量は典型的には、分子量を測定するために、使用される実験技法の詳細には無関係に、115～127KDの範囲にあることが見出されている。

精製されたAC133抗原は、リシルエンドペプチダーゼにより消化されてペプチドが生成され、これは逆相HPLCにより単離され、そしてEdman分解により配列決定された。それらのペプチドは、WERI－Rb－１cDNAライブラリー鋳型を用いてのポリメラーゼ連鎖反応に使用される縮重オリゴヌクレオチドを設計するために使用される。この技法は、次に、1.7KBの明白な配列を生成し、これは完全なcDNAクローンを単離するために使用された。このcDNAは、2598個のヌクレオチドの単一の読取り枠をコードし、そして解鎖を除去した抗原について見出される約90KDaの分子量に対応する。96.8KDaの分子量を有する865個のアミノ酸タンパク質を予測せしめる。疎水度及びトランスメンブランらせん度の分析は、２つの大きな細胞外ループをもたらす、５つのトランスメンブランドメインの存在を示唆する、Ｎ－結合されるグリコシル化の部位のための合計８個のコンセンサス配列が存在し、そのすべてが、２つの大きな細胞外ループ及び50個のアミノ酸のＣ－末端細胞質テイルを有する本発明者が提案した構造モデルを支持する２つの大きな（260及び290個のa.a.）ループ上にある。前記細胞質末端を失ったAC133抗原の末端切除されたものはまだ、mAb AC133により認識される。その生理学的リガンドとの受容体の相互作用に関与し得る、両細胞外ループにロイシンジッパーモチーフ（leucine zipper motif）のためのコンセンサス配列が存在する。図13に示されるように、AC133抗原は、細胞外Ｎ－末端及び細胞質Ｃ－末端を有する５－トランスメンブランタンパク質（“５TMタンパク質”）として現われる。

４MT（また、テトラスパンとも呼ばれる）、７TM及び11TMタンパク質のファミリーは、文献に特徴づけられている。テトラスパンファミリーの機能は知られていないが、７TMタンパク質は一般的に、走化性アゴニストを結合するＧ－タンパク質結合の受容体結合であると思われ、そして11TMはイオン－チャンネル受容体のファミリーを表わす。しかしながら、５TM分子はこれまで記載されておらず、そしてAC133抗原の構造は、分子量及び細胞外ループの大きさに関して、既知の７TM種類のメンバーと著しく異なる。さらに、AC133抗原は４TM又は７TMタンパク質と配列相同性を共有しないが、該TMメンバーは、特にトランスメンブランドメイン内でお互いと有意な相同性を共有する。

AC133遺伝子の短いフラグメントは、EST（発現された配列標識）、たとえば成人の網膜、ランゲルハンス島及び胎児の脳として、Genbankに存在する。しかしながら、AC133抗原の発現は、原始造血幹細胞及びいくつかの神経冠由来の組織に限定されると思われる。AC133抗原はまた、NT－２奇形癌細胞上に発現され；しかしながら、発現は、それらの細胞が最終的にニューロンに分化するにつれて失なわれる。AC133抗原（受容体）と生理学的リガンドとの相互作用は、細胞内シグナルを供給することができる。

AC133抗原に対する発見された元のモノクローナル抗体は、$CD34^{bright}$ヒト造血幹細胞及び前駆細胞上に選択的に発現される、約120,000Mrの新規抗原を定義する抗体のパネルの１つである。$CD34^{bright}$細胞は長期のＢ細胞リンパ球産生及び骨髄造血をインビトロで支持し、そしてＴ，Ｂ、骨髄単球及び巨核球のもとの集団へのもどりをインビボで仲介する。$CD34^{dim}$細胞は、インビトロ又はインビボで、長期の造血活性を付与しなかった。$CD34^{bright}$集団は、すべての原始幹細胞活性を含み、そして従って、造血幹細胞移植及び遺伝子療法におけるさらなる研究のために選択される集団である。AC133抗体は、造血幹細胞及びコミッテット（committed）前駆細胞のサブセットの陽性選択及び表現型分析のための手段を提供する。最初の特異的抗体AC133、すなわちネズミIgG_1抗体は、精製された$CD34^+$ヒト前駆細胞により免疫化されたマウスから誘導された。AC133陽性細胞の正確な抗原表現型を決定するために、AC133及びCD34二重陽性細胞が、３及び４色FACS分析を用いて、胎児肝臓、胎児及び成人骨髄、臍帯血及び末梢血液において試験された。すべての組織においてAC133抗体により認識されるサブセットは、$CD34^{bright}$、$CD38^{-/+}$，$HLA－DR^{+/-}$で

ある。$CD90^+$，$CD117^+$及び$CD109^+$幹細胞集団は、AC133陽性集団内に含まれる。典型的には、AC133はすべての$CD34^+$細胞の20～60％を染色し、その集団は系統に付されていない（non-lineage committed）$CD34^+$集団及び顆粒球／半球路に付された（committed）$CD34^+$細胞のすべてを含む。AC133抗原の発現は、標準のFACS法により、末梢血液単核細胞、顆粒球、血小板又は臍帯静脈由来の内皮細胞上で示されない。50人のヒト細胞系のパネルに対するFACS分析は、わずか２種の網膜芽腫細胞系、すなわちＹ79.1及びWERI－Rb－１が、NT－２奇形癌細胞と共にAC133抗原を発現することを示す。羊胎児へのAC133陽性細胞の移植は、選択された細胞の移植能力を示しており、そしてその胎児の羊骨髄に入ったヒト細胞が収穫され、そして二次受容体に移植することが示され、これは選択された細胞の長期のもとの集団へのもどりの能力を提供する。AC133遺伝子は、96.8KDaの予測されるサイズを有する、865個のaaから成るポリペプチドをコードする。このタンパク質は、膜を５回横切るユニークな構造を有する。従って、AC133抗原は、哺乳類５TM膜タンパク質の新しいクラスを定義する。それらのデータは一緒になって、AC133が造血幹細胞の同定及び分離のためのもう１つの抗原システムを提供することを示す。

幹細胞及び／又は前駆細胞に選択的に結合する抗体は、特に興味あるものである。AC133 Agに対する抗体は、ヒト造血前駆細胞により異種移植免疫担当哺乳類宿主（たとえば、ネズミ、ゲッ歯動物、ウサギ、羊、ブタ又はウシ宿主）を免疫化することによって得られる。免疫化のための適切な前駆細胞集団は、サイトカイン－可動化末梢血液、骨髄、胎児肝臓、又は他の前駆細胞源から$CD34^+$細胞を単離することによって得られる。細胞は、免疫原としてのそれらの使用の前、フィトヘマグルチニンと共にインキュベートされ得る。

免疫化は従来の技法に従って行なわれ、ここで細胞は宿主中に、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内注射され得る。通常、約10^6～10^8個の細胞が使用され、これは１回又はそれ以上の回数の注射～通常、約８回を越えない回数の注射に分けられ、そして約１～32週間の期間に及ぶ。この注射はアジュバントを伴って又はそれを伴わないで行なわれ得；アジュバントの例は完全又は不完全フロイントアジュバント、スペコール（specol）及びミョウバンを包含する。

好ましい態様においては、対側性免疫化（contralateral immunization）が、下記例に記載のようにして使用される。この方法は、抗原刺激の部位に向かう免疫リンパ球の自由に往来する能力による。動物は、身体の片側、たとえば左支脚皿上の局部で、免疫優性であるが、しかし無関係な多くの抗原を発現する細胞により予備免疫化される。種々の造血細胞がこの目的のために使用され得る。注目の免疫原が、動物の反対側上の局部で注射される。無関係の抗原により予備免疫化され、そしてその抗原に対して応答するリンパ球が左側の流入リンパ節におびき寄せられ、そして注目の免疫原に応答するリンパ球が支脚皿注射のために、右側の流入リンパ節、たとえば膝窩リンパ節に存在するであろう。この膝窩リンパ節は、融合のために細胞源として使用され得る。

免疫化スケジュールの完結の後、抗血清が、AC133 Agを包含する造血前駆細胞の表面膜タンパク質に対して特異的なポリクローナル抗血清を供給するために、従来の技法に従って収穫され得る。次に、リンパ球が適切なリンパ組織、たとえば脾臓又は流出リンパ節から収穫され、そして適切な融合パートナー、通常、骨髄腫系により融合せしめられ、特異的モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマが生成される。興味ある抗原特異性についてのハイブリドーマのクローンのスクリーニングが、従来の方法に従って行なわれ得る。特に次のものが興味あるものである：下記例に記載される特異的モノクローナル抗体AC133；AC133抗原に結合する他の抗体（モノクローナル及びポリクローナルの両者）、特に交差反応性抗体（すなわち、同じエピトープに結合し、そして同時結合を実質的に阻害するもの）；その種類似体；その結合フラグメント；及びその接合体。AC133抗原に対する抗体を発現するネズミハイブリドーマ細胞系の寄託は、1997年４月23日、American Type Cultuce Collection,1230）Parklawn Drivo,Rockville MD 20852で行なわれ、そしてATCC受託番号＿＿＿＿＿＿を与えられた。それらの抗体は、注目の造血細胞サブセットについて免疫選択することができる。

抗体が通常のマルチ構造の代わりに一本鎖として生成され得ることは知られている。一本

鎖抗体は、Jostなど．（1994）J.B.C. 269:26267-73、及び多くの他の文献に記載されている。Ｈ鎖の可変領域及びＬ鎖の可変領域をコードするDNA配列は、グリシン及び／又はセリンを包含する、少なくとも約４個のアミノ酸の小さな中性アミノ酸をコードするスペーサーに連結される。この融合体によりコードされるタンパク質は、機能的可変領域のアセンブルを可能にし、そして元の抗体の特異性及び親和性を保持する。

抗体をヒト化する方法もまた、当業界において知られている。ヒト化抗体は、トランスジェニックヒト免疫グロブリン－不変領域遺伝子を有する動物の生成物であり得る（たとえば、国際特許出願WO90/10077及びWO90/04036を参照のこと）。他方では、注目抗体は、CH１，CH２，CH３、ヒンジドメイン及び／又は骨格残基をその対応するヒト配列により置換する組換えDNA技法により構築され得る（WO92/02190を参照のこと）。

キメラ免疫グロブリン遺伝子の構成へのIg cDNAの使用は、当業界において知られている（Liuなど.(1987)P.N.A.S. 84:3439及び(1987)J.Immunol.159:3521）。それらの技法においては、mRNAが抗体を生成するハイブリドーマ又は他の細胞から単離され、そしてcDNAを生成するために使用される。注目のcDNAは、特異的プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅され得る（アメリカ特許第4,683,195号及び第4,683,202号）。他方では、ライブラリーが製造され、そして注目配列を単離するためにスクリーンされ得る。次に、抗体の可変領域をコードするDNA配列が、ヒト不変領域配列に融合される。ヒト不変領域遺伝子の配列は、Kabatなど.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,N.I.H.公開番号91－3242に見出され得る。ヒトＣ領域遺伝子は、既知のクローンから容易に入手できる。次に、ヒト化されたキメラ抗体が従来の方法により発現され得る。

抗体フラグメント、たとえばFv,Ｆ(ab')$_2$及びFabフラグメントは、たとえばプロテアーゼ又は化学的分解により注目抗体の切断により調製され得る。あるいは、切断された遺伝が設計され得る。たとえば、Ｆ(ab')$_2$フラグメントの部分をコードするキメラ遺伝子は、切断された抗体フラグメントを生成するために、Ｈ鎖のCH１ドメイン及びヒンジ領域をコードするDNA配列、続いて、翻訳停止コドンを含む。

AC133抗原に対する抗体は、約120KDの見掛け分子量（市販の標準に基づいて、還元SDS－PAGEゲルからのウェスターンブロット条件下で）を有し、そして一般的には、約115～127KDの範囲であるように見えるタンパク質に結合する。AC133抗体がツニカマイシン－処理されたWERI－Rb－１細胞から免疫沈殿され得ないので、抗体は糖エピトープを認識すると思われる。AC133抗原は、CD34$^+$細胞のサブセット上に発現されるが、しかし内皮細胞及び線維芽細胞上には不在である。HLA－DR$^+$，CD90$^+$及びCD117$^+$前駆細胞は、AC133－陽性細胞の集団に包含される（CD90$^+$としてこれまで知られている抗原は現在、CD90$^+$として知られており；DR陽性及び陰性、並びにCD38陽性及び陰性細胞はこの集団に包含される）。この集団は、造血細胞のCD34$^+$サブセットに存在する実質的にすべての造血幹活性を含む。

AC133抗原に特異的に結合する試薬は、抗体に制限されない。１つの種の他の種への結合を検出する当業界において知られている多くの方法のいづれかが、AC133抗原－結合試薬の存在についてアッセイするために使用され得る。１つの普遍的に適合できるアッセイは、放射性ラベルされた試験化合物、及び固相に結合されるAC133抗原を用いて検出され得る、溶解相と固相との間の放射能の分布を包含する。AC133抗原は、たとえばカラムにおける固相に結合され得、そして生理学的緩衝液におけるチタン－又は^{14}Ｃ－ラベルされた試験化合物がそのカラムに通され得る。結合された放射能は、カラム上で直接的に、又は適用された放射能から、カラムを通して通過する溶解相における放射能を引き算することにより検出され得る。結合親和性は、結合のために十分な時間、平衡化を可能にした後、試験化合物の種々の濃度での結合された放射能のレベルを測定することによって検出され得る。AC133に対する結合の特異性は、AC133に結合する試験化合物が成熟血液細胞上に存在する抗原（又は予備選択されたアッセイ媒体における興味ある他の抗原）にまた結合するかどうかを決定することによって検出され得る。特に好ましいリガンドは、成熟血液細胞上に存在するいづれかの抗原と10％以下、好ましくは５％以下の交差反応性をもって、AC133に対して選択的であるものである。交差反応性は、いづれかの標準技法により測定され得、そして好ましくは、純粋なAC133抗原、試験されるべきリガンド、及び予測され

る交差反応性抗原間での競争結合アッセイにより、一定濃度のAC133抗原及び試験リガンド（ここで、リガンドの半分がAC133に対する結合を飽和する）を用いて測定される。最とも好ましくは、交差反応性は、抗体が50ng/100μｌの濃度で存在する場合、その半分がモノクローナル抗体ATCC＿＿＿＿＿＿を飽和するAC133抗原の一定濃度で測定される。

AC133に特異的に結合する試薬が同定されると、その試薬（放射能ラベルされた形での、もう１つのラベルを含むように変性された非放射能形での、又はラベルされていない形での一定の使用での）は、AC133への試薬の結合を要する種々のアッセイ又は生物学的使用、たとえば螢光染色、細胞分離、又は細胞識別に、インビボ及びインビトロで使用され得る。たとえば、AC133に対する抗体による免疫選択は、造血前駆細胞及び造血幹細胞を精製する手段を提供する。抗体はまた、造血細胞を検出し又は数えるために診断に、CD34陽性集団を機能的に異るサブ集団に分割することに、前駆細胞の単離に、及び成熟血液細胞を生成する前駆体の調製にも使用される。生物学的サンプル（たとえば、血液又はその誘導体、生検、及び滑液）は、対象抗体により結合される表面分子を発現する細胞の存在についてアッセイされ得る。たとえば、アッセイは、細胞溶解物、損なわれていない細胞、又は凍結物に対して、異なった細胞型を区別するために実施され得る。

AC133に特異的に結合する対象の抗体及び他の試薬は、実質的に純粋なヒト造血前駆細胞及び造血幹細胞の調製のために有用である。前駆細胞のサブセットがAC133結合に基づいて他の造血細胞から分離され得、そして当業界において知られている他の表面マーカーに結合することによって、さらに相互に分離され得る。造血細胞源は、胎児又は成人骨髄；胎児肝臓；臍帯血；及び末梢血液、特にサイトカインで可動化された末梢血液を包含する（たとえば、Camposなど.(1993)Leukemia 7:1409-15及びGriggなど.(1993)Bone Marrow Transplant”,Suppl 2:23-9を参照のこと）。

ヒト幹細胞は、表現型$CD34^{bright}$；HLA－DR^{+}；$CD38^{dim/negative}$；CD117（ｃ－kit）^{dim}；CD90（Thy-1）$^{+}$を有し、そして種々の系統特異的マーカー、たとえばCD3, CD4, CD7, CD8, CD14, CD15及びCD19の発現を欠いていることが報告されている。Negativeの表示は、染色のレベルがイソタイプ－適合の陰性対照の明るさで又はそれ以下で存在することを示す。dimの表示は、染色のレベルが陰性染色のレベル近くで存在するが、しかしまた、イソタイプ適合の対照よりも明るいことを示す。

分離のための方法は、抗体被覆された磁気ビーズを用いての磁気分離、及び固体マトリックス（たとえば相）に結合される抗体を用いてのアフィニティークロマトグラフィー又は“パンニング”を包含する。正確な分離を提供する技法は、種々の程度の洗練性を有する、たとえば複数のカラーチャンネル、低角度及び鈍感な光分散検出チャンネル、又はインピーダンスチャンネルを有する螢光活性化された細胞ソーターを包含する。死亡細胞は、死亡細胞に関連する色素（たとえばヨウ化プロピジウム、LDS）による選択により排除され得る。赤血球細胞は、傾瀉、溶血又はFicoll－Paqueグラジエントにより除去され得る。選択された細胞の生存性に対して過度に有害でないいづれかの技法が使用され得る。

便利には、抗体は、多くの異なった目的のために次のラベルにより接合され得る：たとえば特定の細胞型の分離を容易にする磁気ビーズ；アビジン又はストレプタビジンに対して高い親和性で結合するビオチン；螢光活性化された細胞ソーターにより使用され得る螢光色素；ハプテン；及び同様のもの。多色分析がFACSと共に又は免疫磁気分離及び流動細胞計測を組合して使用され得る。多色分析は、次の複数の表面抗原に基づいての細胞の分離のために興味あるものである：たとえば$AC133^{+}$, $CD90^{+}$又は$CD117^{+}$, $AC113^{-}$、又は$CD34^{+}$。多色分析に使用される螢光色素は、フィコビリタンパク質、例えばフィコエリトリン及びアロフィコシアニン；フルオレセイン；及びテキサスレッドを包含する。

本発明の１つの態様においては、抗－AC133抗体は、磁気試薬、たとえば超常磁性微小粒子（微小粒子）に直接的に又は間接的に接合される。磁気粒子への直接的な接合は、当業界において知られているような種々の化学的結合基の使用により達成される。たとえば、抗体は、側鎖アミノ又はスルフヒドリル基及び異種機能性架橋試薬を通して微小粒子に結合され得る。多数の異種機能化合物が存在物に対して結合するために利用できる。抗体上の反応性スルフヒドリル基及び磁気ビーズ上の反応性アミノ基との好ましい結合基は、３

－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（SPDP）又は４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（SMCC）である。

他方では、抗－AC133抗体は、磁気粒子に間接的に結合される。その抗体はハプテンに直接的に結合され、そしてハプテン特異的な第２段階の抗体がその粒子に結合される。適切なハプテンは、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、FITC、ジニトロフェニル、ニトロフェニル、アビジン、及びビオチンを包含する。タンパク質へのハプテンの結合のための方法は当業界において知られており、そしてそのような結合のためのキットは市販されている。

幹細胞又は前駆細胞の分離又は同定のためには、抗体が造血細胞サンプルに添加される。特定の細胞サブセットを結合するのに必要な抗－AC133抗体は、試験分離及び分析を行なうことによって実験的に決定される。細胞及び抗－AC133 Abは、複合体が形成されるのに十分な時間、通常少なくとも約５分、より通常には少なくとも約１０分、及び通常には、１時間以下、より通常には約３０分以下の時間インキュベートされる。

さらに、細胞は、造血前駆細胞又は造血幹細胞上に存在するか又は不在であることが知られている細胞表面マーカーに対して特異的な抗体又は結合分子と共にインキュベートされ得る。たとえば、CD90，CD117及びHLA－DRは、幹細胞の陽性選択において有用である。幹細胞上に不在であることが知られている種々のマーカー、たとえばCD3，CD4，CD8，CD14，CD15及びCD19は、陰性選択のために使用され得る。ラベルされた細胞は、特異的抗体調製法に従って分離される。螢光色素－ラベルされた抗体はFACS分離のために、そして磁気粒子は免疫磁気選択又は特に高いグラジエントの磁気選択（HGMS）のために有用である。典型的な磁気分離装置は、WO90/07380,PCT/US96/00953及びEP438,520（それらは引用により本明細書に組込まれる）に記載されている。

精製された細胞集団は、いづれか適切な培地に集められ得る。種々の培地；たとえばダルベッコの改変イーグル培地（DMEM）、ハンクスの基本塩溶液（HBSS）、ダルベッコのリン酸緩衝溶液（DPBS）、RPMI,Isoveの変性ダルベッコ培地（IMDM）、及び５mMのEDTAを含むリン酸緩衝液（それらはいづれも、ウシ胎児血清（FCS）、ウシ血清アルブミン（BSA）、又はヒト血清アルブミン（HSA）により補充され得る）は、市販されており、そして使用され得る。

ヒト造血前駆細胞及び／又は造血幹細胞のために非常に富化された組成物（細胞源に依存する）は、この態様においては、単一の段階で達成される。所望の細胞は、細胞組成物中に約80％で又はそれ以上で存在し、そして好ましくは、細胞組成物中に約90％で又はそれ以上で存在する。注目の特定集団は、$CD34^{bright}$及びHLA－$DR^{+/-}$として特徴づけられる$AC133^{+}$細胞を含む。この集団はさらに、$CD90^{+}$，$CD117^{+}$及び／又は$CD38^{dim}$であるそれらの細胞のために選択され得る。機能的に、それらの細胞は、CFU－GM活性のために及び長期のもとの集団にもどった細胞について高く富化される。興味あるもう１つの集団は、BFU－Ｅ活性について富化された$CD133^{-}$及び$CD34^{+}$である。AC133がより制限された細胞集団により発現されるので、精製への対象の抗体の使用はCD34の使用に比べて好都合であり、それにより、注目の特定の活性のためにより富化されたサブセットを可能にする。

所望の細胞が単離されるとすぐに、それらは、基質細胞からのならし培地において増殖し、そのような基質細胞と共に同時培養し、又はそのような前駆細胞の増殖を支持する維持因子、たとえば幹細胞因子又はインターロイキンの組合せを含んで成る培地において増殖することによって成長せしめられ得る。細胞を培養するために使用される培地は、便利には、定義された富化培地、たとえばIMDM、又はIMDMとRPMI1640との混合物であり、そして一般的には、塩、アミノ酸、ビタミン、５×10^{-5}Ｍのβ－メルカプトエタノール、ストレプトマイシン／ペニシリン及び10％ウシ胎児血清から構成され、そして時間から時間に、一般的には週当たり少なくとも１～２度、変えられ得る。

対象の細胞組成物は種々の手段で使用される。それらは、照射された宿主及び／又は化学療法下にある宿主を再構成するために使用され得る。特定の異なった成長因子を通して１又は複数の選択された系統への成熟、増殖及び分化を付与することによって、前駆細胞は委託された系統に付された（committed）細胞源として使用され得る。エリトロポエチン

、コロニー刺激因子（たとえば、GM－CSF，Ｇ－CSF、又はＭ－CSF）、インターロイキン（たとえば、IL－１，－２，－３，－４，－５，－６，－７，－８，－９、又は－10）、又は同様のもののような因子又は基質細胞が、前駆細胞の増殖及び分化に影響を及ぼすために使用され得る。

前記細胞はまた、造血細胞の分化及び成熟に関与する因子、たとえばAC133抗原に特異的に結合する試薬の単離及び評価にも使用され得る。従って、前記細胞は、培地、たとえばならし培地の活性を測定するために；成長因子活性又は関与について流体を評価するために；又は同様のことを行なうためにアッセイにおいて使用され得る。

前記細胞は、遺伝的疾病の治療のために使用され得る。造血細胞に関連する遺伝的疾病は、遺伝的欠損を補正し、又は疾病、たとえばHIVに対しての保護のために治療するために自己由来の又は同種異系の幹細胞の遺伝的修飾により治療され得る。たとえば、疾病、たとえばβ－サラセミア、鎌状赤血球血症、アデノシンデアミナーゼ欠損症、組換え酵素（recombinase）欠損症、又は組換え酵素調節遺伝子欠損症は、相同又はランダム組換えのいづれかにより、対象細胞中への野生型遺伝子の導入により補正され得る。他方では、正常な同種異系前駆細胞が移植され得る。造血細胞に関連する疾病以外の疾病もまた、その疾病が特定の分泌される生成物、たとえばホルモン、酵素、インターフェロン、因子又は同様のものの欠乏に関係している場合、治療され得る。

前記細胞は液体窒素温度で凍結され、そしてそれらが融解され、そして再使用されるように、長期間、貯蔵され得る。細胞は通常、５％DMSO及び95％ウシ血清アルブミンにおいて貯蔵されるであろう。融解されるとすぐに、細胞は幹細胞増殖及び分化に関連する成長因子又は基質細胞の使用により拡張され得る。

AC133抗原は、天然源から又は組換え技法により実質的に純粋な形で得られる。天然源からは、抗原陽性細胞が溶解され、そして抗－AC133モノクローナル抗体のアフィニティーカラムに通される。造血前駆細胞が、従来の分離技法により天然源から単離され得、又は実験セクションに記載される細胞系が抗原源として使用され得る。アフィニティー精製されたタンパク質は、適切な塩溶液、又は通常、低い酸濃度、たとえば0.1～１％のトリフルオロ酢酸の存在下で、水性／有機グラジエント、たとえばアセトニトリル又はエタノールにより、アフィニティーカラムから溶離される。次に、その溶離されたタンパク質は、従来の技法に従って、クロマトグラフィー、電気泳動、又は同様のものによりさらに精製される。

下記例は、95％以上の純度のAC133抗原をもたらすアフィニティークロマトグラフィーによりAC133抗原を精製するためへのモノクローナル抗体の使用を記載する。そのような精製された調製物中のペプチドが配列分析のために調製され、そして単離され、その結果として、核酸プローブがAC133遺伝子配列の単離のために企画され得る。本明細書に示されるAC133の遺伝子配列（図12）は、組換え技法による抗原の獲得を可能にする。たとえば、全RNAが、標的化されたタンパク質を発現するよう抗体結合により示された細胞から単離される。残留DNAは、従来の技法に従って除去され、そしてポリアデニル化されたRNAは、たとえばオリゴ－dTセファロース上で又はゲルクロマトグラフィーによりさらに精製され得る。次に、cDNAが、逆転写酵素を用いて従来の技法に従って調製される（Sambrookなど.,前記及び下記例を参照のこと）。次に、前記cDNAが、cDNAが発現される適切なクローニングシステム、たとえばλgtll中に導入される。次に、ファージプラークが、対象の抗体を用いて、又はポリクローナル抗血清を用いることによってスクリーンされ得る。他方では、AC133抗原タンパク質配列に由来する核酸配列によるプローブを可能にするクローニングシステムが使用され得る。次に、そのcDNA挿入物は、所望により、他のベクター中にサブクローン化される。cDNAは、完全な転写体のためのcDNAライブラリーのさらなるプロービングのために使用され得る。他方では、そのcDNA配列は、対象のタンパク質をコードするゲノム遺伝子を同定するためのゲノムライブラリーをプローブするために使用され得る（たとえば、Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.,J.Sambrook,E.F.Fritsch,T.Maniatis,CSHL,Cold Spring Harbor,NY,1989を参照のこと）。

本発明のDNAは、AC133タンパク質又はそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列、

及び前記遺伝子によりコードされるタンパク質の発現の調節に関与する隣接する５’及び３’非コードヌクレオチド配列を包含し、そして成熟mRNA又はゲノムDNAの長さをほぼ含むであろう。従って、本発明は、単離された核酸分子を供給し、ここで前記分子は、（１）図１に示されるようなAC133のためのアミノ酸コード領域を有する第１配列（配列番号１）；（２）前記第１配列のサブ配列であり、そして少なくとも14個、好ましくは少なくとも17又は20個、より好ましくは少なくとも25個の長さのヌクレオチドである第２配列；（３）前記第１又は第２配列の少なくとも１つのヌクレオチドが異なったヌクレオチドにより置換されている第３配列；又は（４）前記第１、第２又は第３配列のいづれかに対して相補的な第４配列を含んで成り、但し、（ｉ）前記分子がRNA分子である場合、Ｕが前記分子中の前記配列においてＴを置換し、（ii）前記第3配列が前記第１又は第２配列に対して少なくとも90％、好ましくは少なくとも95％同一であり、そして（iii）前記第２配列が、配列番号１のヌクレオチド347－667，1564－1696又は2110－2386でない。また、本発明のDNAとして、イントロンを包含するその対応するゲノム配列が包含される。それらの非コード配列は、ターミネーター及びポリアデニル化配列、調節タンパク質結合配列、転写配列、及び同様の配列を包含する。十分な長さのAC133 cDNA配列を含む分子は、結果物の源として、又はAC133分子自体の調製のための出発材料として有用である。

“サブ配列（subsequence）”とはcDNA配列からの連続するヌクレオチドのグループである。それらの配列のいづれかが、AC133遺伝子の存在（又は不在）、又はAC133抗原をコードするmRNAの発現の同定に使用され得る。そのようなサブ配列は、出発ヌクレオチドからの化学的合成（自動遺伝子合成機におけるように）により、又は十分な長さの配列の生化学的操作（たとえば、フラグメントを調製するために制限エンドヌクレアーゼを用いて、任意には、続いて、（１）末端ヌクレオチドの切断及びエキソヌクレアーゼ及び／又は（２）所望する配列を選択するためにサイズソーティング及び／又は親和性捕獲による）により調製され得る。使用される条件下で存在する他の核酸間でユニークである十分な長さの配列番号１に記載されるAC133配列のいづれかのサブ配列は、ゲノムAC133遺伝子のすべて又は一部のポリメラーゼ鎖反応（PCR）増幅に使用される２つのプライマーの１つとして有用である。所望の標的配列とユニークにハイブリダイズするのに必要なサブ配列の長さは、使用される特定の方法により変化し、そしてその長さの選択は遺伝子材料の日常の同定を行なう当業者の範囲内である。好ましいサブ配列は、少なくとも15の長さのnt、より好ましくは少なくとも18のnt、さらにより好ましくは少なくとも19，20，21，25又は30の長さのntから、配列番号１に示されるヌクレオチド配列の全長さまで、好ましくは、ハイブリダイゼーションプローブとして使用される場合、200nt以下の長さ、又はPCRプライマーとして使用される場合、50nt以下の長さである。

配列番号１のコード領域内の３個のサブ配列は、機能未知のEST'sとしてGenbankにこれまで記録されている。従って、それらのGenbankサブ配列、すなわちヌクレオチド347－667，1564－1696及び2010－2386は、本発明のサブ配列としては請求されていない。さらに、配列番号１の３’非翻訳領域からの、又は機能未知の、特にヌクレオチド2684－3332及び3408－3804の領域における多くのESTがGenbankに存在する。それらの２つの領域からのサブ配列は、本発明の一部として請求されていない。Genbank配列の１又は複数の配列を含む、配列番号１として示される完全な配列の長い方のサブ配列、及び１又は複数のGenbank配列の一部を含むが、しかし配列番号１に示される新しく同定されたヌクレオチドをも含むサブ配列は、本発明の一部として見なされる。

本発明の核酸組成物は、対象タンパク質のすべて又は一部をコードするゲノム又はcDNA配列であり得る。従来の方法に従って、たとえば制限酵素消化又はPCR増幅によりオリゴヌクレオチドを化学的に合成することによって、cDNA又はゲノム配列のフラグメントが得られる。多くの場合、フラグメントは、少なくとも12個のnt、より通常には少なくとも18個のnt、又は上記の他の長さの１つのものであろう。好ましいフラグメントは、機能的エピトープを含むであろう。機能的エピトープを供給する配列は、前記配列の発現、及び従来のイムノアッセイによる特異的抗体とのその発現生成物の反応性についてのアッセイにより決定され得る。

本発明の典型的なアミノ酸及びDNA配列は、下記配列番号１及び２に示されている。ヌクレオチド及びアミノ酸についての標準の略語が本明細書において使用される。天然のAC133抗原に由来するポリペプチドは本発明の特に好ましい態様であるが、しかしそれらのポリペプチドの特定の配列に基づく変動もまた、本発明の一部である。、その広い観点においては、本発明は（それはポリペプチド自体に関係する場合）、（１）配列番号２に示されるAC133の第１アミノ酸配列；（２）第１配列のサブ配列であり、そして少なくとも６個、好ましくは８個、より好ましくは10個の長さのアミノ酸である第２アミノ酸配列；又は（３）前記第１又は第２配列中の少なくとも１つのアミノ酸が異なったアミノ酸により置換されている第３配列から成る群から選択されたいづれかのポリペプチドを包含し、但し、ここで前記アミノ酸置換は他の残基と１つの酸性残基との、他の残基と１つの塩基性残基との、他の残基と１つの非極性残基との、他の残基と１つの荷電されていない極性残基との、又は他の残基との１つの芳香族残基との置換であり、そして前記第３配列は、前記第１又は第２配列に対して少なくとも90％、好ましくは95％の同一性を有する。

２種のアミノ酸配列は、それらの配列間に部分的な又は完全な同一性が存在する場合、相同である。たとえば、85％の相同性とは、それらの２種の配列が最大の適合性をもって一直線に並べられる場合にアミノ酸の85％が同一であることを意味する。ギャップ（適合される２種の配列のいづれかにおける）は、最大の適合性で可能にされる。５又はそれ以下のギャップが好ましく、そして２又はそれ以下のギャップがより好ましい。あるいは、そして好ましくは、２種のタンパク質配列（又は少なくとも30個の長さのアミノ酸の配列に由来するポリペプチド配列）は、それらが、突然変異データマトリックスと共に整列プログラムを用いての５以上（標準偏差単位において）の一列整列評点（alignment score）、及び６又はそれ以上のギャップペナルティ（gap penalty）を有する場合、相同である（Duyhoff,M.O.,Atlas of Protein Sequence and Structure,1972,vol.5,National Biomedical Rosearch Foundation,pp.101-110、及び補足２，pp.1-10）。それらの２種の配列又はその一部は、より好ましくは、それらのアミノ酸が、整列プログラムを用いて最適に一列整列される場合、50％以上の又は50％の同一性を有する場合、相同である。

配列番号２に示される天然のアミノ酸配列からのマイナーなアミノ酸の変動は予期され；特に保存性アミノ酸置換が予期される。ある種類のアミノ酸内で生じるそれらのアミノ酸の保存性置換は、それらの側鎖に関連している。遺伝子的にコードされたアミノ酸は一般的に、次の４種の種類に分けられる：（１）酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；（２）塩基性：リシン、アルギニン、ヒスチジン；（３）非極性：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び（４）荷電されていない極性：グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは時々、芳香族アミノ酸として分類される。たとえば、イソロイシン又はバリンによるロイシンの、グルタミン酸によるアスパラギン酸の、セリンによるトレオニンの単離された置換、又は構造的に関連するアミノ酸によるアミノ酸の類似する置換は、特にその置換が、AC133又はその誘導体とAC133に対して特異的に結合する試薬との相互作用に関連する結合部位としてアミノ酸を含まない場合、得られる分子の結合特性に対して主要な効果を有さないであろうことを予測することが道理に合っている。アミノ酸の変化が機能的ペプチドに影響をもたらすかどうかは、そのペプチド誘導体の特異的結合性質をアッセイすることによって容易に決定され得る。

図13に示されるように、AC133のペプチド構造体に異なる機能を有する多くの領域が存在する。それらの領域は、細胞外Ｎ－末端、第１トランスメンブラン領域、第１細胞質ループ、第２トランスメンブラン領域、第１細胞外ループ、第３トランスメンブラン領域、第２細胞質ループ、第４トランスメンブラン領域、第２細胞外ループ、第５トランスメンブラン及び細胞質Ｃ－末端として（アミノ末端により開始して）記載され得る。前記領域のおおよそのサイズが図13に示されており、そして異なる領域に存在するアミノ酸の最良の見積りは次の通りである：細胞外Ｎ－末端、aa 20-107；第１トランスメンブラン領域、aa 107-126；第１細胞質ループ、aa 127-157；第２トランスメンブラン領域、aa 158-179

；第１細胞外ループ、aa 180-435；第３トランスメンブラン領域、aa 436-454；第２細胞質ループ、aa 455-480；第４トランスメンブラン領域、aa 481-503；第２細胞外ループ、aa 504-792；第５トランスメンブラン、aa 793-816；及び細胞質Ｃ－末端、aa 817-865。コードされたペプチドのアミノ末端で切断可能なシグナル配列（aa 1-19）が存在するように思え、この配列は、図13に示される領域の一部としては含まれないが、しかし合成的に生成されたAC133ペプチドに存在するであろう。

また、AC133抗原及びグリコシル化部位（結合の点で“Ｙ”により示される）の構造を確かめるために同定された短いペプチドセグメント（Ｐ１－Ｐ４）のおおよその位置が図13に示される。図12はまた、グリコシル化部位（アミノ酸配列がボックスで囲まれている）及びトランスメンブラン領域（下線が引かれている）を示す。２つのグリコシル化部位はオーバーラップ（NNTS、オーバーラップするNNT及びNTSから成る）し、そして点線により大きなボックスで示されており、これは個々のコンセンサスグリコシル化部位を示す。

DNA配列は、実質的な純度で得られ、そして損なわれていない染色体の配列以外の単離された分子として得られる。通常、DNAは他の核酸化合物を実質的に含まないで得られ、一般的には、少なくとも約50%、通常少なくとも約90%の純度であり、そして典型的には、“組換え”であり、すなわち天然の染色体上で通常関連しない１又は複数のヌクレオチドを両端に有する。

DNA配列は種々の手段で使用される。それらは同じか又は他の種における関連する表面タンパク質を同定するためのプローブとして使用され得る。DNAはまた、対象の遺伝子を発現する細胞又は器官を同定するためにも使用され得る。特定のヌクレオチド配列、特にDNA，mRNA又はcDNAの存在について細胞をプローブする技法は、文献において十分に確立されており、そして本明細書においては詳しく記載する必要はない。便利には、mRNAはDNAを有さないで単離され得、そして逆転写酵素及び特定のプライマーによるPCRを用いることによって、興味ある対象のDNAが拡張され、ゲル電気泳動上で分離され、そして次に、サザンブロット又は配列決定を用いてプローブされ得る。他の技法もまた、使用され得る。

相同配列は、本発明内に含まれるAC133抗原配列に対して実質的な配列類似性を有するものであり、すなわち対象のDNA配列のヌクレオチド配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する。配列類似体は、大きな配列のサブセットである対照配列、たとえば保存されたモチーフ、コード領域又はフランキング領域に基づいて計算される。対照配列は通常、少なくとも約18個の長さのnt、より通常には少なくとも約30個の長さのntであり、そして比較される完全な配列に延長することができる。そのような相同核酸配列は、低い緊縮条件下で、たとえば50℃及び10×SSC（0.9MのNaCl／0.09Mのクエン酸ナトリウム）でのハイブリダイゼーションにより検出され、そして１×SSCによる55℃での洗浄にゆだねられる場合、結合されたまま存続する。

発現のためには、DNA配列が適切な発現ベクター中に挿入され、ここで生来の転写開始領域又は外来性転写開始領域が使用され得る。プロモーターは、インビトロ組換え法により、又は染色体中への配列の相同組込みの結果として導入され得る。広範囲の種類の転写開始領域が広範囲の種類の発現宿主のために知られており、ここで発現宿主は、原核生物又は真核生物、特にＥ．コリ（E.coli）、Ｂ．サブチリス（B.subtilis）、哺乳類細胞、たとえばCHO細胞、サル腎細胞、リンパ球、特にヒト細胞系、及び同様のものを包含する。

一般的に、発現宿主において作動する選択マーカーが存在するであろう。プロモーター、翻訳可能なmRNA転写体を生成するために、興味ある遺伝子のコード配列に操作可能的に連結され得る。発現ベクターは、異種タンパク質をコードする核酸配列を挿入するためにプロモーター配列の近くに位置する便利な制限部位を有する。適切な発現ベクターにおけるプロモーターは、構成的又は誘導的のいづれかであり得る。外来性融合タンパク質が追加の機能性、たとえば高められたタンパク質合成、安定性、定義された抗血清との反応性、又は酵素マーカー、たとえばβ－ガラクトシダーゼを供給する、融合タンパク質の生成のためのプロモーターが特に興味あるものである。

内因性又は外因性エンハンサー配列を包含するエンハンサー配列を有するか又はそれを有さない、構成的又は誘導的であり得る転写開始領域、AC133遺伝子又はそのフラグメント、及びポリＡ配列の結合のためのシグナルを操作可能的に有する転写終結領域を含んで成る発現カセットが調製され得る。遺伝子は、生来のイントロンを包含するゲノム、又はcDNA遺伝子、又はその一部であり得る。機能的エピトープの発現を可能にする配列、通常少なくとも約24個の長さのヌクレオチド、より通常には少なくとも約48個の長さのヌクレオチド、及び前記遺伝子中の完全な読取り枠までの配列の使用が特に興味あるものである。DNAの導入の後、前記構造物を含む細胞が選択マーカーにより選択され、前記細胞が拡張され、そして次に、発現のために使用され得る。分泌が所望される場合、シグナルペプチドが、対象のタンパク質をコードする配列又はそのフラグメントに連結され、それにより、前記タンパク質が発現され、細胞膜を通してトランスロケートされ、そしてシグナルペプチドを除くために加工される。

発現カセットは種々のベクター中に導入され得、ここで前記ベクターは通常、発現ベクターを含んで成る細胞の選択を付与する能力により特徴づけられるであろう。ベクターは、特に、真核細胞における細菌又はウィルス中のプラスミドとして、染色体外維持を、又は特に哺乳類細胞における組込みを提供することができる。染色体外維持が所望される場合、元の配列は、低い－又は高い－コピーのプラスミドであり得るプラスミドの複製を提供するであろう。広範囲の種類のマーカー、特に毒素に対して、より特定には抗体に対して保護するマーカーが、選択のために利用できる。選択される特定のマーカーは、宿主の性質に従って選択され、ここで多くの場合、相補性が栄養要求宿主、たとえば酵母により使用され得る。DNA構造体の導入は、いづれか便利な手段、たとえばカルシウム－沈殿されたDNA、エレクトロポレーション、融合；トランスフェクション、又はウィルスベクターによる感染によるものであり得る。

次の例は、例示的であって、本発明を限定するものではない。

例

体側性免疫化（Contralateral Immunization）によりAC133モノクローナル抗体の合成

５匹のNew Zealand Black（NZB）マウスを、フィトヘマグルチニン（植物凝集素）（PHA）（Gibco/BRL）によりプレインキュベートされた、精製されたCD34陽性ヒト前駆細胞により、足肉趾経路を通して、20日間にわたって合計７回、接種した。

マウスを、多くの免疫優性ではあるが無関係の抗原を発現する細胞により、左脚の肉趾に３日目に予備免疫化した。この場合、末梢血液単核細胞（PBMC）を、それらが多くの抗原、たとえばクラスＩHLA抗原、HLA－DR，CD15，CD26，CD29，CD31，CD36，CD44，CD45，CD58、等（また、造血幹細胞上に発現される）を発現するように、無関係の細胞として使用した。０日目、PBMCを、左脚肉趾中に再注射し、そして精製された幹細胞を右脚肉趾中に注射した。PBMC及び精製された幹細胞を、PHAと共に10分間、プレインキュベートし、そして注射の前、PBSにより洗浄した。前駆細胞を、免疫磁気ビーズを用いて、サイトカイン可動化されたドナーの白血球搬出パックから単離した。この処置は、非特異的アジュバント効果を付与し、そして必要なアジュバント、たとえばフロイントアジュバントを不必要にする。マウスに、３日間隔で合計５～８回、そのような注射を行なう。

最後の注射の後の１日目、すなわち21日目、マウス右手膝窩リンパ節を除去した。リンパ球懸濁液を調製し、そして細胞を、Kohler and Milstein(1975)Nature 256:495-497により始めに記載された方法の変法を用いて、SP2／0Ag14骨髄腫細胞に融合せしめた。細胞を、10^{-4}Ｍのヒポキサンチン及び２μｇ／mlのアザセリンと共に、DMEM及び20％ウシ胎児血清を含む96ウェルプレート上にプレートした（Buckなど.(1984)Monoclonal Antiboudies and Functional Cell Lines,Kennetなど.eds.,Planum Press,New York pp.275-309）。

10日目、確認できるハイブリドーマコロニーが明白であった。ハイブリドーマを含むウェルからの上清液（ｓ／ｎ）を、２色流動細胞計測アッセイを用いて、15％までの$CD34^{+}$細胞を含む胎児細胞調製物に対する結合についてスクリーンした。試験細胞へのマウスIgを含むｓ／ｎの結合性を、フィコエリトリンに接合されるラット抗－マウス－Ig（IgPE）により追跡し、そして既知のマウス抗－CD34抗体（AC101）接合体により対比染色した。図

１は、AC133上清液を用いてのこの２色FACS分析からの結果を示す。AC133は、胎児肝臓調製物において明るいCD34陽性細胞のみを染色することが示される。AC133ハイブリドーマ細胞は、IgG1／カッパ抗体を分泌することが示された。前記細胞を培養において拡張し、そしてストックを液体窒素により凍結した。AC133細胞を制限希釈分析によりサブクローン化し、そして一連の陽性分泌サブクローンをまた、液体窒素により凍結した。

抗体の精製及び接合

AC133細胞を、ヌードマウスにおいて腹水腫瘍として最初に増殖せしめ、そして抗体に富む腹水を集めた。つい最近、AC133細胞は、中空繊維培養装置（Cellmax QUAD artificial copillary system,Cellco Inc.,Germantown,MD）において、非常に高い密度に増殖されている。純粋なIgG抗体を、中空繊維培養物又は腹水からプロテインＡクロマトグラフィーにより調製した。純粋な抗体を0.01%アジ化ナトリウムを含む0.01Mのリン酸緩衝溶液（PBS）に４℃で貯蔵した。この純粋な抗体ストックを用いて、フルオレセインイソチオシアネート（FI TC）（Wofsyなど. (1980)Selected Methods in Cellular Immunology,Mishelland Shiigi eds.,W.H.Freeman and Co.,San Francisco.pp.294-295）、フィコクリトリン(PE)（Hardy(1986)Handbook of Experimental Immunology,Weirなど.,eds.BlackwellScientific Press,Oxford.p.31）、又は磁気ビーズ接合体を、標準方法に従って調製した。

正常組織及び細胞系でのAC133発現

標準的FACS染色法を用いては、末梢血液単核細胞、顆粒球又は血小板、又はヒト臍帯静脈内皮細胞に、AC133抗体により検出できる染色は存在しなかった。FACS分析によるヒト細胞系のパネルの試験（データは表１に示される）は、試験された３種のみの細胞系、すなわち網膜芽腫細胞系Ｙ79.1及びWERI－Rb－１及び奇形癌細胞系NT－２が検出できるレベルのAC133抗原を発現することを示した。

表１．ヒト細胞系上でのAC133 発現

細胞系	細胞型	AC133
8402	Ｔ細胞系（$CD34^+$）	－
8866	Ｂ－LCL	－
AZ676	乳癌肉腫	－
BJAB	N. American Burkitt's リンパ腫	－
BT474	乳癌	－
BT549	乳癌	－
BT20	乳癌	－
CaCL74－36	黒色腫	－
Daudi	Ｂ－LCL $^-$	－
Du 4475	乳癌（$CD34^+$）	－
HEL 92.1.7	赤血球病	－
HL－60	前骨髄腫性白血病	－
HPB－ALL	急性リンパ白血病	－
HS－R	骨髄腫（EBV $^+$）	－
HT1080	線維肉腫	－
HT29	結腸腺癌	－
IM－9	Ｂ-LCL	－
JM	Ｔ細胞系	－
Jurkat	Ｔ細胞系	－
KG1a	急性骨髄性白血病（$CD34^+$）	－
KG1	急性骨髄性白血病（$CD34^+$）	－
GG1a.5	急性骨髄性白血病（$CD34^+$）	－
K562	赤血球病	－
MOLT－4	Ｔ細胞系	－

細胞系	細胞型	AC133
MCF－７	乳癌	－
Raji	Ｂ－LCL	－
RPMI8226	骨髄腫	－
SK HEP－１	肝癌	－
U937	組織球リンパ腫	－
WERI－Rb－１	網膜芽腫	＋
Ｙ79.1	網膜芽腫	＋
NT－２	網膜芽腫	＋

PMAによるＹ79.1細胞の活性化は、Ac133抗原の発現を高めることが見出された（図２に示される）。しかしながら、いくつかの他の細胞系のPMA活性化、又はヒトPBMCのPHA活性化は、AC133抗原の発現を誘発できなかった（データは表２に示される）。AC133抗原の発現は、試験された$CD34^+$細胞系上では検出できなかった。Ｙ79.1細胞系上でのCD34発現の欠失（図３に示される）と共に、この発見は、AC133がCD34抗原に向けられる可能性を除外する。AC133抗原の発現は、内皮及び線維芽細胞上でまた発現されるCD34抗原とは異なって、初期幹及び前駆細胞に制限される（Krauseなど.(1996)Blood87:1-13）。

AC133抗原は、胎児及び成人骨髄、胎児肝臓、臍帯血、白血球搬出（LP）パック、及びサイトカイン移動された血液からのLPパックから単離されたヒト前駆細胞系の$CD34^{bright}$集団上で発現される。典型的には、それはそれらの集団におけるすべての$CD34^+$細胞の30～50%を染色する。

表２．細胞系の活性化

下記時間、１ng／mlでのPMA の添加：						
	０時間	24時間	48時間	72時間	96時間	144時間
Y79.1	dim＋	＋	＋	＋	＋	＋
KG1a	－	－	－	－	－	N／A
K562	－	－	－	－	－	N／A
HEL 92.1.7	－	－	－	－	N／A	N／A
Jurkat	－	－	－	N／A	N／A	N／A
8402	－	N／A	N／A	－	N／A	N／A

下記時間、10μｇ／mlでのPWM の添加：			
	０時間	24時間	48時間
Y79.1	dim＋	＋	＋
KG1a	－	－	－

AC133陽性細胞の表現型決定

AC133及びCD34二重陽性細胞の表現型決定を、前駆細胞上に発現することが知られている細胞表面構造体に向けられる接合された抗体のパネルを用いる２及び３色FACS分析を用いて行なった。胎児肝臓、胎児及び成人骨髄、臍帯血及び末梢血液を用いて、AC133陽性細胞の正確な表現型を決定した。それらの組織のすべてに見出されるAC133細胞は、$CD34^{bright}$, $CD38^{-/+}$、及び$HLA-DR^{-/+}$である。データは図４に示される。$CD90(Thy1)^{+}$及び$CD117(c-kit)^{+}$幹細胞は、図５に示されるようにAC133陽性集団に包含される。AC133免疫磁気精製胎児肝臓細胞により行なわれた一連の実験においては、CD38－FITC接合抗体は、AC133精製細胞の74.5%を染色し、そして残りの24.8%はCD38陰性であった。予測されるように、HLA－DRは細胞の大部分を染色した（81.14%）。CD90は、27.4%を染色することが示され、そしてCD117は90%を染色した。初期（再集団化する）の造血幹細胞は$CD34^{bright}$, $CD38^{dim/+}$, $HLA-DR^{+}$, $CD117^{dim}$及び$CD90^{+}$の表現型を有すると一般的に思われる。従って、AC133抗体は、ヒト造血前駆細胞の表現型的に重要な集団を認識する。

AC133抗原の免疫沈殿

免疫沈殿実験は、AC133抗原が120KDの分子量を有することを示した。ビオチン（Pierce）ラベルされた、活性化Y79.1及びWeri－RB－１細胞を次の成分を含む溶解緩衝液により溶解した：2.5%のBrij（Sigma）、25mMのトリス－HCl, pH8.0, 125mMのNaCl, 2.5mMのEDTA, 2.2μｇ／mlのアプロチニン（Sigma)及び１mMのPMSF（Sigma）。前記溶解物をAC133及び対照抗体と共に、安全性を前もって保証した後にインキュベートした。免疫複合体をスタフィロコーカスアウレウス（Staphylococcus aureus）細胞（Cal Biochem）に対して集め、そして１%の２－メルカプトエタノールを含むSDS－PAGEサンプル緩衝液において95℃で５分間、加熱した。免疫沈殿物をSDS－PAGEにより分離し、そしてニトロセルロース膜（Novex）に移した。ホースラディシュペルオキシダーゼ（HRP）（Amersham）及びSupersignal（Ｌ－HRP基質システム（Pierce）に対して結合されるストレプタビジンを用いて可視化せしめた。CD49d, CD71及びCD98を対照として用い、そして133KD, 92KD及び80／40KDのそれらの予測されるバンドをそれらの対応するバンドにおいて観察した。AC133によ

る免疫沈殿は、120KDの分子量に対応する明確なバンドを示した。このバンドは、抗－CD34、抗体AC101，HPCA１及びHPCA２により免疫沈殿されたサンプルにおいては不在であり、このことは、CD34がＹ79.1細胞系において発現されないことを示唆する。これはFACSデータと一致する。

さらなる実験からのデータが図６に示されており、ここで、ビオチンによりラベルされたＹ79.1及びKG1a細胞が同じゲル上でCD34及びAC133沈殿物を比較することによってAC133分子量データを確めた。この実験においては、CD34及びＹ79.1抗原は、隣接するレーンにおける、ビオチル化されたKG1a（$CD34^+$）及びＹ79.1溶解物から沈殿せしめられた。前記結果は、１）個々の抗体がそれ自体の明確な抗原を沈殿せしめ、２）それらの２種の抗原の分子量が明らかに異なっており、それぞれ110及び127KDであることを明白に示す。対照レーン６及び８においては、HPCA２及び16D11（抗－CD34）は、KG1a溶解物からの110KDのバンドを沈殿せしめるが、しかしＹ79.1溶解物からのいづれのバンドも沈殿せしめない（レーン７及び９）。AC133はＹ79.1溶解物からの120KDタンパク質を沈殿せしめるが（レーン10）、しかしレーン11においてKG1aの溶解物からのいづれも沈殿せしめなかった。レーン12において、KG1a及びＹ79.1溶解物は混合され、そしてAC133 Ag及びCD34は同時沈殿せしめられた。それらの結果は、２種の抗原が異なった分子量のものであることを示す。

AC133磁気ビーズ接合

精製されたAC133抗体を、４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（SMCC）についての標準のプロトコールを用いて磁気アミノ－デキストランビーズに接合せしめた。AC133抗体を、OD_{450}単位当たり５μｇで、SMCC活性化されたビーズに添加し、そして室温で２時間インキュベートした。反応を、β－メルカプトエタノール及びNEMの添加により停止せしめた。接合体を、磁場の存在下で２つのカラム上で精製し、そして溶離した。濃度をOD_{450}＝10に調整し、そしてOPGを安定化のために添加した。PBS及び0.1%アジ化ナトリウムにおける接合体を0.2μｍのフィルターを通して濾過し、そして４℃で貯蔵した。

AC133磁気ビーズ接合体によるヒト造血前駆細胞の分離

AC133直接的磁気ビーズ接合体を調製し、そして淡黄褐色被膜PBMC、胎児肝臓WC１、胎児骨髄及び成人骨髄に対して試験した。図８は、miniMACSを用いてAC133ビーズ接合体により精製され、そしてグリコホリンＡ－FITC及びHCPA２－PEにより染色された胎児肝臓細胞のFACSドットプロットを示す。出発材料は7.4%の$CD34^+$細胞を含み、AC133精製に続いて、90%以上のAC133精製細胞は明るい$CD34^+$であった。図９は、AC133磁気接合体が、約26%の$CD34^+$細胞を含む淡黄褐色被膜からの$CD34^+$細胞の富化においても非常に効果的であったことを示す。最終の精製された集団は、HPCA２－PE染色により示されるように、CD34に対して64%の陽性であった。磁気精製システムにおける細胞の分離能力は、AC133の機能的及び表現型的性質のさらなる研究を可能にする。

AC133陽性細胞のクローン原性能力

白血球搬出パックから精製された、AC133磁気ビーズ選択の細胞を、市販のキット（Stem Cell Technologies,Vancouver,B.C.）を用いてクローン原性アッセイにより試験した。組換えヒト成長因子を用いて、調節された成長環境を提供することによって、この培養アッセイは、CD34陽性細胞集団内の主要コロニー形成単位（CFU）を同定する。それは、特定の系統特異的分子に向けられる細胞の相対的百分率に関して、前駆細胞集団の比較に基づく情報を提供する。典型的には、末梢血液由来の$CD34^+$細胞集団においては、BFU－ｅ（バースト形成単位－エリトロイド）及びCFU－GM（コロニー形成単位－顆粒球マクロファージ）が、認識される有力なコロニーであり、３：１の比で存在する。図10は分離白血球搬出パックから得られたAC133及びCD34精製された細胞を比較する典型的なクローン原性実験からの結果を示す。分別されていない対照細胞により得られたコロニーは典型的には主としてBFU－Ｅ（29.34%）であり、そしてCFU－GMは少数である（5.14%）。CD34精製された細胞は、23.3%BFU－Ｅ及び5.58%のCFU－GMの類似する分布を示す。対照的に、AC133精製された細胞は、13.1%のBFU－Ｅ及び10.2%のCFU－GMの異なったパターンを示す。計算は、58%のCFU－GMがAC133精製された画分から回収され、そしてわずか13%のBFUＥ

がその画分から回収されたことを示す。
図11は、AC133免疫磁気精製に続いて得られた類似するクロン原性アッセイからの結果を示す。この実験においては、AC133細胞を陽性選択し、そして次に、CD34陽性細胞を、AC133陰性の流れから陽性選択した。この企画は、$AC133^+$細胞（同じドナーからのものは除く）と$CD34^+$との直接的な比較を示した。それらの結果は、CFU－GM前駆体の93.8％がAC133陽性画分に回収され、残りの6.2％が$CD34^+$／$AC133^-$画分から回収されたことを示した。逆に言えば、$CD34^+AC133^-$画分はBFU－ｅ前駆体の78.0％を含み、そして残りの22.0％が$AC133^+$画分に得られた。
上記実験結果は、抗－AC133抗体がFc受容体に対する抗体であり、又は抗－AC133抗体が、Fc受容体摂取を通して幹細胞に結合する可能性を除外する。さらなる実験は、AC133抗体染色が遊離PEによる可能性を除外する。AC133抗体は、RTK、すなわち受容体チロシンキナーゼ、TIE、すなわち、免疫グロブリン様ドメイン及び成長因子相同ドメインを含み、そして血管内皮細胞及び造血細胞において発現されるチロシンキナーゼに対する抗体のように挙動しない。AC133抗体はまた、Ｐ－糖タンパク質、すなわち造血細胞においてまた発現される170KDの複数薬物耐性生成物に対する抗体のように挙動しない。
本発明者は、AC133抗体が、骨髄、胎児肝臓及び末梢血液における明るい$CD34^+$細胞上でのみ発現される抗原を認識することを示した。この抗体及びその抗原は、いづれか既知のCD抗原の分子量又は分布に適合しない。幹細胞は別として、AC133抗体は、CD34発現のために陰性であるヒト網膜芽腫細胞と反応することが示された。さらに、AC133抗原は、多くの$CD34^+$細胞系上で発現されない。
本発明は、初期幹細胞及び造血前駆細胞のサブセット上に見出される新規の抗原、及び前記抗原に対して特異的に結合する抗体を供給することが上記結果から明らかである。抗原の発現は高い組織特異性である。それは造血前駆細胞のサブセット上に単に検出され、そしてCFU－GMアッセイにおいて活性的である実質的にすべての細胞上に存在する。AC133抗原のこの高い特異的な分布は、ヒト造血前駆体及び幹細胞を単離し、そして特徴づけるための試薬として例外的に有用にする。

AC133抗原の精製及び特徴づけ

AC133抗原の精製及び特徴づけ、並びにcDNAクローンの単離が本明細書に記載される。この分子のタンパク質及び核酸配列分析は、AC133抗原が、既知のＧ－タンパク質結合の７種のトランスメンブランメンバーに対して、もし存在したとしても、低い相同性を有する５種のトランスメンブランドメインを有する新しい種類のトランスメンブラン受容体の最初に記載されるメンバーであることを示す。
抗体AC133を、上記のようにして調製し、そして精製し、そしてCNBrにより活性化されたセファロースに接合した。CNBr活性化されたセファロースは、Pharmacia（Alameda,CA）から購入し、そしてmAB AC133親和性樹脂を、25分間のリガンドカップリング反応を用いて、製造業者の方法により調製した。COS－７及びWERI－Rb－１網膜芽腫細胞系を、American Type Culture Collection（Rockville, MD）から入手した。特注プライマーは、Operon Technologies（Alameda,CA）により合成した。

AC133抗原の精製

AC133抗原を、96時間、PMAにより活性化されたＹ79網膜芽腫細胞（例えば、ATCCから市販されている）から単離した。細胞（２×10^9）を、PBSにより洗浄し、そして0.125MのNaCl，25mMのトリス、pH８，0.005％のNaN_3，2.5mMのEDTA及び1.00mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）及び１mg当たり４：１のトリプシンインヒビター単位を含むアプロチニンの2.2mg／ml溶液の１／1000希釈溶液（Sigma）を含む2.5％のBrij 99／96（２：１）界面活性剤溶液により溶解した。細胞を室温で５分間、断続的に回転せしめ、そして次に20分間、氷上に放置した。細胞核及び残骸を、12,000×Ｇで10分間の遠心分離により除去した。溶解物上清液を、洗浄緩衝液（0.125MのNaCl，25mMのトリス、pH8.0，0.01％のNaN_3，2.5mMのEDTA，0.1％Brij）により平衡化された0.5mlのmAb AC133親和性カラム上への負荷の前、0.2μＭのフィルターを通して濾過した。カラムを洗浄緩衝液により広範に洗浄し、そして抗原を、50mMのエタノールアミン、pH11.5，0.1％のBrij，0.01％のN

aN_3溶液に溶離した。pHをすぐに、HClにより中性に調節した。洗浄緩衝液により平衡化された300μｌの層体積のDEAEカラム上への抗原溶離液の通過により、汚染性タンパク質の多くを除去し、そして上記のようなAC133抗体カラムを用いての第２のアフィニティークロマトグラフィー処理段階は、タンパク質加水分解及びタンパク質配列決定分析に使用できる95％以上の純度のAC133抗原をもたらした。AC133抗原の純度及び同一性を、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（SDS-PAGE）及びウェスターン分析により確かめた（Towbin,H.,T.Staehelin,and J.Gordon(1979)PNAS 76,4350-4354;Towbin,H.and J.Gordon(1984)J.Immunol.Meth.7:313-340）。

精製されたAC133抗原のエンドグリコナーゼ処理

１μｇのAC133抗原を水50ml及び0.1Mの２－メルカプトエタノール及び0.5％SDS溶液125μｌに再懸濁した。タンパク質を５分間100℃で変性した。変性された混合物（35μｌ）を、0.5Mのトリス（pH8）25μｌ、水10μｌ、10％のNP-40（10μｌ）と共に５本の管の個々に添加した。０～0.1単位のPNGアーゼＦ（Sigma）を個々の管に添加し、そしてそれらの管を30℃で一晩インキュベートした。解糖化された抗原を、銀染色されたSDS－ポリアクリルアミドゲル上で可視化した。

AC133抗原のリシルエンドペプチダーゼ消化及びペプチドの単離

AC133抗原を、10％までのTCAの添加により２μｇ／mlの親和性カラム溶出液1.4mlから沈殿せしめた。その沈殿された乾燥タンパク質を25μｌの消化緩衝溶液（８Ｍの尿素、400mMのトリス、pH7.8）に懸濁し、これに45mのDTT５μｌを添加し、そしてその混合物を50℃で15分間インキュベートした。室温に冷却した後、100mMのヨードアセトアミド５μｌを添加し、そしてその混合物をさらに15分間インキュベートした。蒸留水（70μｌ）を添加し、尿素を２Ｍに希釈し、そして２ｐモルのリシルエンドペプチダーゼ、すなわちLysC（Wako Chemicals,USAから入手できる）を添加した。消化を37℃で24時間、行なった。ペプチドを、0.1％のトリフルオロ酢酸（TFA）における４～32％アセトニトリルグラジェントを有するVYDACの狭い内孔のＣ18逆相カラム上でのHPLC分離により単離した。

AC133抗原ペプチドのタンパク質配列分析

Ｎ－末端配列分析を、Applied Biosystems 477A又は473A液体パルスタンパク質配列決定機上で、Edman化学（Edman,P.,Begg,G.(1967)Eur.J.Biochem.1,80-91;Huwick,R.M.,Hunkapillar,M.W.,Hood,L.E.,and Dreyer,W.J.(1987)J.Biol.Chem.256,p.7990）を用いて決定した。PTH－アミノ酸を、Applied Biosystemsからの２～４％のABI Premix Buffer濃縮物の緩衝液Ｂ（アセトニトリル）への添加、12～36％の緩衝液Ｂ線状グラジエントでの18分間にわたって、続いて36％Ｂでの13分間のイソクラティク（isocratic）期間を伴って、緩衝液Ａ（3.5％のテトラヒドロフラン）において55℃でBrownlee C-18逆相カラム（2.1mm×22cm）上で分離した。

AC133抗原の単離及びタンパク質配列決定

120kDのAC133抗原を、収穫する96時間前、PMA活性化された網膜芽腫細胞系、すなわちＹ79からイムノアフィニティークロマトグラフィーにより単離した。連続的なアフィニティークロマトグラフィー及びDEAEクロマトグラフィーを用いて、SDS-PAGE及び銀染色により95％以上の純度のAC133抗原を生成し、そしてAC133抗原としてのその精製された分子の同一性をウェスターンブロットにより確かめた。Ｎ－末端糖を除去するためにPGNアーゼＦによる前記抗原の解糖は、約30kDの分子量が糖化によるものであることを示す。AC133抗原のＮ－末端を配列決定するための反復された初期の試みは失敗しており、このことは、このタンパク質がアミノ末端ブロックされることを示唆する。しかしながら、リシルエンドペプチダーゼによる精製された抗原の消化、続く逆相HPLC処理は、12～16個のアミノ酸の長さを有する４種のペプチド配列を生成した。前記ペプチド及び得られる変性オリゴヌクレオチド配列による主要タンパク質及び核酸データベスの研究は、AC133抗原がいづれか記載される分子により同定され得なかったことを示した。（そのアミノ酸配列は、現在、cDNAクローニングから推定されており、そして図12に示される。）

cDNAクローニング

全RNAをWERI-Rb-1網膜芽腫細胞（American Type Culture Collection,Rockville,MDから

入手できる）から単離し、そしてポリA+RNAを、ポリA+Tract System（Promega Corp.,Madison,WI）を用いて調製した。cDNAを、スーパスクリプト逆転写酵素（GIBCO BRL.,Gaithersburg,MD）及びオリゴdTプライマーを用いて合成し（Guebler,U.and B.J.Hoffman(1983) Gene25:263）。ブラント末端化されたcDNAを、非自己相補性Bst XIアダプターに連結し、そしてゲル精製し、連結されていないアダプター及び小さなフラグメントを除去した。次に、連鎖されたcDNAを、pcDNA-I発現ベクター中にエレクトロポレートした（Invitrogen,San Diego,CA）中に連結し、そしてＥ．コリ株MC1061／P3（Dower,W.J.(1990)Genetic Engineering V.12 Edited by J.K.Seflow,Plenum Press,New York 275-295.（細菌のエレクトロポレーション：遺伝子情報に対する一般的なアプローチ）；Ausubel,F.M.,R.Brent,R.E.Kingston,D.D.Moore,J.G.Seidman,J.A.Smith and K.Strahl.1987-1994 Current Protocols in Molecular Biology.John Wilest Surs;N.Y.)。WERI-Rb-１ライブラリーcDNA（100ng／反応）を、４種のAC133抗原ペプチドのタンパク質配列から企画された100ｐモルの個々の変性センス及びアンチセンスプライマーと共に、PCR鋳型として使用した。PCR反応を、反応当たり５単位のTaq DNAポリメラーゼ（Promega Corp,Madison,WI）により緩衝液（50mMのKCl、10mMのトリス、pH９、0.1%のTriton X-100、1.5mMのMgCl、0.2mMの（個々の）dNTP）において行なった。増幅を次の通りに、MJ研究（データ）装置において行なった：92℃で１分間、55～37℃で１分間、72℃で３分間、35サイクル。増幅の後、その反応混合物を１％アガロースゲル上で試験し、個々のプライマー対照に出現しないユニークなバンドをゲル精製し、そしてTA Cloning Kit（Invitrogen,San Diego,CA）を用いてpCR2.1中にクローン化した。その遺伝子の５′及び３′末端を、一群の組のAC133抗原遺伝子特異的プライマー及びライブラリー特異的プライマーを用いて、半－特異的PCRにより単離した。20サイクルの一本鎖PCRを、５単位のTaqポリメラーゼを含むPCR反応緩衝液（上記）における100ngのライブラリーcDNA及び10pモルの個々のプライマーと共に、50μｌの反応体積において個々の遺伝子特異的プライマーを用いて行なった。この反応混合物のアリコート（10μｌ）を除去し、そして遺伝子特異的プライマー及びライブラリー特異的プライマーの両者を用いて、第２の35サイクルPCR反応のために鋳型として使用した。次に、このPCR反応混合物のアリコート（５μｌ）を、一群のライブラリー及び遺伝子特異的プライマーを用いてのさらなる35サイクルの反応のために使用した。前記遺伝子の５′及び３′末端に対応するバンドをゲル精製し、そしてpCR2.1中にクローン化した。オーバーラップするcDNAクローンを、螢光色素ターミネーター及びABI配列決定機（Applied Biosystems,Foster City,CA）を用いて、ジデオキシ鎖反応により配列決定した。

AC133抗原のcDNAクローンの単離

このタンパク質のためのcDNAを単離するために、cDNAライブラリーを、PMA活性化されたＹ79細胞よりも約10倍、よりAC133抗原を発現するWERI-Rb-１網膜芽腫細胞系から調製した。変性プライマーを、前記ライブラリーとの低い緊縮性、PCR反応に使用し、５′末端でペプチド３の正しい配列及び３′プライム端でペプチド４の正しい配列を含む1.7kbのフラグメントを生成した。さらに、ペプチド２の配列を、正しい読取り枠におけるフラグメント内に見出した。遺伝子特異的プライマー及びライブラリー特異的プライマーによる半－特異的PCRは、その遺伝子の５′及び３′末端に対応し、そして初期1.7KBのクローンとオーバーラップする追加の1.2KB及び２KBフラグメントを生成した。

３種の部分的クローンの配列決定は、3.0KBの読取り枠を含み、そして遺伝子のポリＡ+部分と関係しているように見え、そして真核生物のコンセンサススプライス配列を含まない128bpのイントロンをまた含む４KBのcDNAを生成した。イントロンを有さない、損なわれていない幹細胞由来のクローンを単離するために、AC133+幹細胞を、mAb AC133の磁気接合体、及びMiltenyi磁気分離システム（Miltenyi Biotech,GMBH）を用いて、胎児肝臓から単離した。全RNAをそれらの細胞から単離し、そしてRT-PCR反応のための鋳型として使用した。イントロンを拡張するよう企画されたプライマーは、ポリＡ+由来のcDNA鋳型を有する582bpの一本鎖フラグメントを生成し、そしてAC133+細胞系における全RNAからのイントロンを有さない454bpの一本鎖フラグメントを生成し（図３）、この事は、スプライスされたmRNAが全RNAプール内の主要生成物であることを示唆する。RT-PCRを用いて、開

始メチオニンの前で始まり、そして完全なcDNA配列を含むcDNAクローンを生成した。AC133抗原をコードする十分な長さのcDNAは、96.8kDの分子量を有する863個のアミノ酸のタンパク質を予測する（図４）。前記配列の疎水性の分析（図５）及びトランスメンプランヘリックスアルゴリズムは、タンパク質が、２種の大きな（255及び280個のアミノ酸）細胞外ループ及びＣ－末端細胞質末端の存在を示す細胞膜を合計５倍に拡張する（図６）ことを示す。タンパク質配列により提供される他の構造的特徴は、推定上の大きな細胞外ループ及びＮ－糖化のための６種のコンセンサス配列の両者におけるロイシンジッパーモチーフを包含する。

トランスフェクトされたCOS-7細胞におけるAC133抗原の発現

AC133陽性細胞（１×10^7）を、上記のようにして胎児肝臓から単離した。全RNAを、Chomczynski,P.and Sacchi,N.(1987)Anal.Biochem.162,156に記載のようにして、RNAzol（Gibco BRL,Gaithersburg,MD）を用いて単離した。RT-PCRを、10ngの全RNA鋳型、及び開始メチオニンの前及び停止コドンの後に指図されたプライマーと共にPromega Access RT-PCRシステム（Promega Corp,Madison,WI）を用いて実施した。遺伝子のコード領域に対応する2.8kbのバンドを、CMVプロモーターを含むInvitrogen指図の真核TAクローニングベクター（pCR3.1）中にクローン化した。副集密的COS-7細胞（ATCC,Rockville,MDから入手できる）を、エレクトロポレーションを用いて、５μｇのクローン化されたDNAによりトランスフェクトし、そしてFASS分析の前、48時間インキュベートした。トランスフェクトされたCOS-7細胞を、50ng／100μｌの試験mAb AC133-PEにより染色し、そしてBecton Dickerson（San Jose,CA）FACS走査により分析した。

COS細胞におけるAC133抗原の発現

AC133抗原遺伝子によりトランスフェクトされたCOS細胞を、mAb AC133-PEにより染色し、そしてFACSにより分析した（図７）。AC133抗原遺伝子によりトランスフェクトされたCOS細胞はmAB AC133-PEにより明るく染色されたが、しかしながら、トランスフェクトされていない細胞、空のベクターによりトランスフェクトされた細胞、又はCD-8のための遺伝子はこの抗体により染色されない。

種々のリンパ及び非リンパ細胞系におけるAC133発現

種々の細胞系におけるAC133抗原転写体の存在を、ノザン分析により評価した。ノザンブロット分析を、Clontech（Palo Alto,CA）複合組織ノザンブロットを用いることによって、及び１％アガロース－２Ｍのホルムアルデヒドゲル上にRNAサンプルを溶解し、そしてナイロン膜中に一晩、細管ブロットすることによって実施した。全RNAをTri試薬により単離し、そしてその15μｇをレーン当たりに負荷した。メチレンブルーによるブロットの染色を、RNA濃度をモニターするために使用した。cDNAの800bp EcoRＩフラグメントを、^{32}P-dGTPにより、ランダムプライミングを用いてラベルし、そしてプローブとして使用した。

種々の細胞系におけるAC133抗原転写体の存在を、ノザン分析により評価した。4.4KBのmRNA転写体が、WERI-Rb-１細胞及びＹ79細胞、並びにMACS－単離されたAC133$^+$胎児肝臓細胞に検出できた。AC133抗原の発現はPMA活性化に基づいてＹ79細胞において増強されるが、その対応するmRNAはダウンレギレーションされるように思える。正常な造血組織においては、AC133抗原メッセージは、胎児鍛造に検出でき、そしてそれらの組織におけるAC133$^+$細胞が少数で存在する事実により予測されるように、成人骨髄においては、弱く検出できる。AC133抗原転写体がまた、非リンパ組織、特に膵臓、腎臓及び胎盤においても示された。弱いシグナルが肝臓、肺、脳及び心臓に観察された。すなわち、パラフィン組織断片の免疫組織化学染色に対比する場合、AC133抗原の発現が骨髄においてのみ検出できた。類似する態様において、AC133抗原に対して特異的である他の抗体が開発された。次の表は、抗体、免疫原、イソタイプ、及びそのような抗体パネルのための交差阻止を示す。

抗体	免疫学	イソタイプ	AC133 交差阻止
AC133	HSC	IgG1カッパ	＋＋＋
AC139	WERI-Rb-1	IgG1カッパ	＋＋＋
AC140	WERI-Rb-1	IgG1カッパ	＋／－
AC141	WERI-Rb-1	IgG1カッパ	－
AC142	WERI-Rb-1	IgG1カッパ	ND

本明細書に引用されるすべての出版物及び特許出願は、引用により本明細書に組込まれる。

前述の発明は、より理解を明確にするために例示的及び例的にいくらか詳細に記載されて来たが、一定の変更及び修飾が本発明の範囲内で行なわれ得ることは、当業者に明らかであろう。

配列表

（１）一般情報：

（ｉ）出願人：Miraglia,Sheri

Godfry,Wayne G.

Yin,Amy E.

Buck,David W.

（ii）発明の名称：ヒト造血幹細胞及び前駆細胞抗原、及びその使用方法

（iii）配列の数：２

（２）配列番号１についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：3804個の塩基対

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：二本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：cDNA

（iii）ハイポセティカル：NO

（ix）特徴：

（Ａ）名称／キー：CDS

（Ｂ）位置：38..2633

（xi）配列：配列番号１：

```
CCAAGTTCTA CCTCATGTTT GGAGGATCTT GCTAGCT ATG GCC CTC GTA CTC GGC        55
                                          Met Ala Leu Val Leu Gly
                                            1               5

TCC CTG TTG CTG CTG GGG CTG TGC GGG AAC TCC TTT TCA GGA GGG CAG        103
Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Cys Gly Asn Ser Phe Ser Gly Gly Gln
            10                  15                  20
```

```
CCT TCA TCC ACA GAT GCT CCT AAG GCT TGG AAT TAT GAA TTG CCT GCA      151
Pro Ser Ser Thr Asp Ala Pro Lys Ala Trp Asn Tyr Glu Leu Pro Ala
          25                  30                  35

ACA AAT TAT GAG ACC CAA GAC TCC CAT AAA GCT GGA CCC ATT GGC ATT      199
Thr Asn Tyr Glu Thr Gln Asp Ser His Lys Ala Gly Pro Ile Gly Ile
      40                  45                  50

CTC TTT GAA CTA GTG CAT ATC TTT CTC TAT GTG GTA CAG CCG CGT GAT      247
Leu Phe Glu Leu Val His Ile Phe Leu Tyr Val Val Gln Pro Arg Asp
  55                  60                  65                  70

TTC CCA GAA GAT ACT TTG AGA AAA TTC TTA CAG AAG GCA TAT GAA TCC      295
Phe Pro Glu Asp Thr Leu Arg Lys Phe Leu Gln Lys Ala Tyr Glu Ser
                  75                  80                  85

AAA ATT GAT TAT GAC AAG CCA GAA ACT GTA ATC TTA GGT CTA AAG ATT      343
Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val Ile Leu Gly Leu Lys Ile
              90                  95                 100

GTC TAC TAT GAA GCA GGG ATT ATT CTA TGC TGT GTC CTG GGG CTG CTG      391
Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys Cys Val Leu Gly Leu Leu
         105                 110                 115

TTT ATT ATT CTG ATG CCT CTG GTG GGG TAT TTC TTT TGT ATG TGT CGT      439
Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr Phe Phe Cys Met Cys Arg
     120                 125                 130

TGC TGT AAC AAA TGT GGT GGA GAA ATG CAC CAG CGA CAG AAG GAA AAT      487
Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His Gln Arg Gln Lys Glu Asn
135                 140                 145                 150

GGG CCC TTC CTG AGG AAA TGC TTT GCA ATC TCC CTG TTG GTG ATT TGT      535
Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile Ser Leu Leu Val Ile Cys
                155                 160                 165

ATA ATA ATA AGC ATT GGC ATC TTC TAT GGT TTT GTG GCA AAT CAC CAG      583
Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly Phe Val Ala Asn His Gln
            170                 175                 180

GTA AGA ACC CGG ATC AAA AGG AGT CGG AAA CTG GCA GAT AGC AAT TTC      631
Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys Leu Ala Asp Ser Asn Phe
        185                 190                 195

AAG GAC TTG CGA ACT CTC TTG AAT GAA ACT CCA GAG CAA ATC AAA TAT      679
Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr Pro Glu Gln Ile Lys Tyr
    200                 205                 210
```

```
ATA TTG GCC CAG TAC AAC ACT ACC AAG GAC AAG GCG TTC ACA GAT CTG      727
Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp Lys Ala Phe Thr Asp Leu
215                 220                 225                 230

AAC AGT ATC AAT TCA GTG CTA GGA GGC GGA ATT CTT GAC CGA CTG AGA      775
Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly Ile Leu Asp Arg Leu Arg
                235                 240                 245

CCC AAC ATC ATC CCT GTT CTT GAT GAG ATT AAG TCC ATG GCA ACA GCG      823
Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile Lys Ser Met Ala Thr Ala
            250                 255                 260

ATC AAG GAG ACC AAA GAG GCG TTG GAG AAC ATG AAC AGC ACC TTG AAG      871
Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn Met Asn Ser Thr Leu Lys
        265                 270                 275

AGC TTG CAC CAA CAA AGT ACA CAG CTT AGC AGC AGT CTG ACC AGC GTG      919
Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser Ser Ser Leu Thr Ser Val
    280                 285                 290

AAA ACT AGC CTG CGG TCA TCT CTC AAT GAC CCT CTG TGC TTG GTG CAT      967
Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp Pro Leu Cys Leu Val His
295                 300                 305                 310

CCA TCA AGT GAA ACC TGC AAC AGC ATC AGA TTG TCT CTA AGC CAG CTG     1015
Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg Leu Ser Leu Ser Gln Leu
                315                 320                 325

AAT AGC AAC CCT GAA CTG AGG CAG CTT CCA CCC GTG GAT GCA GAA CTT     1063
Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro Pro Val Asp Ala Glu Leu
            330                 335                 340

GAC AAC GTT AAT AAC GTT CTT AGG ACA GAT TTG GAT GGC CTG GTC CAA     1111
Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp Leu Asp Gly Leu Val Gln
        345                 350                 355

CAG GGC TAT CAA TCC CTT AAT GAT ATA CCT GAC AGA GTA CAA CGC CAA     1159
Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro Asp Arg Val Gln Arg Gln
    360                 365                 370

ACC ACG ACT GTC GTA GCA GGT ATC AAA AGG GTC TTG AAT TCC ATT GGT     1207
Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg Val Leu Asn Ser Ile Gly
375                 380                 385                 390

TCA GAT ATC GAC AAT GTA ACT CAG CGT CTT CCT ATT CAG GAT ATA CTC     1255
Ser Asp Ile Asp Asn Val Thr Gln Arg Leu Pro Ile Gln Asp Ile Leu
                395                 400                 405
```

```
TCA GCA TTC TCT GTT TAT GTT AAT AAC ACT GAA AGT TAC ATC CAC AGA      1303
Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val Asn Asn Thr Glu Ser Tyr Ile His Arg
            410                 415                 420

AAT TTA CCT ACA TTG GAA GAG TAT GAT TCA TAC TGG TGG CTG GGT GGC      1351
Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser Tyr Trp Trp Leu Gly Gly
        425                 430                 435

CTG GTC ATC TGC TCT CTG CTG ACC CTC ATC GTG ATT TTT TAC TAC CTG      1399
Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile Val Ile Phe Tyr Tyr Leu
    440                 445                 450

GGC TTA CTG TGT GGC GTG TGC GGC TAT GAC AGG CAT GCC ACC CCG ACC      1447
Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp Arg His Ala Thr Pro Thr
455                 460                 465                 470

ACC CGA GGC TGT GTC TCC AAC ACC GGA GGC GTC TTC CTC ATG GTT GGA      1495
Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly Val Phe Leu Met Val Gly
                475                 480                 485

GTT GGA TTA AGT TTC CTC TTT TGC TGG ATA TTG ATG ATC ATT GTG GTT      1543
Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile Leu Met Ile Ile Val Val
            490                 495                 500

CTT ACC TTT GTC TTT GGT GCA AAT GTG GAA AAA CTG ATC TGT GAA CCT      1591
Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu Lys Leu Ile Cys Glu Pro
        505                 510                 515

TAC ACG AGC AAG GAA TTA TTC CGG GTT TTG GAT ACA CCC TAC TTA CTA      1639
Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu Asp Thr Pro Tyr Leu Leu
    520                 525                 530

AAT GAA GAC TGG GAA TAC TAT CTC TCT GGG AAG CTA TTT AAT AAA TCA      1687
Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly Lys Leu Phe Asn Lys Ser
535                 540                 545                 550

AAA ATG AAG CTC ACT TTT GAA CAA GTT TAC AGT GAC TGC AAA AAA AAT      1735
Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Asn
                555                 560                 565

AGA GGC ACT TAC GGC ACT CTT CAC CTG CAG AAC AGC TTC AAT ATC AGT      1783
Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln Asn Ser Phe Asn Ile Ser
            570                 575                 580

GAA CAT CTC AAC ATT AAT GAG CAT ACT GGA AGC ATA AGC AGT GAA TTG      1831
Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly Ser Ile Ser Ser Glu Leu
        585                 590                 595
```

```
GAA AGT CTG AAG GTA AAT CTT AAT ATC TTT CTG TTG GGT GCA GCA GGA      1879
Glu Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe Leu Leu Gly Ala Ala Gly
    600                 605                 610

AGA AAA AAC CTT CAG GAT TTT GCT GCT TGT GGA ATA GAC AGA ATG AAT      1927
Arg Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys Gly Ile Asp Arg Met Asn
615                 620                 625                 630

TAT GAC AGC TAC TTG GCT CAG ACT GGT AAA TCC CCC GCA GGA GTG AAT      1975
Tyr Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Asn
                635                 640                 645

CTT TTA TCA TTT GCA TAT GAT CTA GAA GCA AAA GCA AAC AGT TTG CCC      2023
Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala Lys Ala Asn Ser Leu Pro
            650                 655                 660

CCA GGA AAT TTG AGG AAC TCC CTG AAA AGA GAT GCA CAA ACT ATT AAA      2071
Pro Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg Asp Ala Gln Thr Ile Lys
        665                 670                 675

ACA ATT CAC CAG CAA CGA GTC CTT CCT ATA GAA CAA TCA CTG AGC ACT      2119
Thr Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile Glu Gln Ser Leu Ser Thr
    680                 685                 690

CTA TAC CAA AGC GTC AAG ATA CTT CAA CGC ACA GGG AAT GGA TTG TTG      2167
Leu Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg Thr Gly Asn Gly Leu Leu
695                 700                 705                 710

GAG AGA GTA ACT AGG ATT CTA GCT TCT CTG GAT TTT GCT CAG AAC TTC      2215
Glu Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu Asp Phe Ala Gln Asn Phe
                715                 720                 725

ATC ACA AAC AAT ACT TCC TCT GTT ATT ATT GAG GAA ACT AAG AAG TAT      2263
Ile Thr Asn Asn Thr Ser Ser Val Ile Ile Glu Glu Thr Lys Lys Tyr
            730                 735                 740

GGG AGA ACA ATA ATA GGA TAT TTT GAA CAT TAT CTG CAG TGG ATC GAG      2311
Gly Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His Tyr Leu Gln Trp Ile Glu
        745                 750                 755

TTC TCT ATC AGT GAG AAA GTG GCA TCG TGC AAA CCT GTG GCC ACC GCT      2359
Phe Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys Lys Pro Val Ala Thr Ala
    760                 765                 770

CTA GAT ACT GCT GTT GAT GTC TTT CTG TGT AGC TAC ATT ATC GAC CCC      2407
Leu Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys Ser Tyr Ile Ile Asp Pro
775                 780                 785                 790
```

```
TTG AAT TTG TTT TGG TTT GGC ATA GGA AAA GCT ACT GTA TTT TTA CTT      2455
Leu Asn Leu Phe Trp Phe Gly Ile Gly Lys Ala Thr Val Phe Leu Leu
                795                 800                 805

CCG GCT CTA ATT TTT GCG GTA AAA CTG GCT AAG TAC TAT CGT CGA ATG      2503
Pro Ala Leu Ile Phe Ala Val Lys Leu Ala Lys Tyr Tyr Arg Arg Met
            810                 815                 820

GAT TCG GAG GAC GTG TAC GAT GAT GTT GAA ACT ATA CCC ATG AAA AAT      2551
Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu Thr Ile Pro Met Lys Asn
        825                 830                 835

ATG GAA AAT GGT AAT AAT GGT TAT CAT AAA GAT CAT GTA TAT GGT ATT      2599
Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys Asp His Val Tyr Gly Ile
    840                 845                 850

CAC AAT CCT GTT ATG ACA AGC CCA TCA CAA CAT T GATAGCTGAT            2643
His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln His
855                 860                 865

GTTGAAACTG CTTGAGCATC AGGATACTCA AAGTGGAAAG GATCACAGAT TTTTGGTAGT    2703

TTCTGGGTCT ACAAGGACTT TCCAAATCCA GGAGCAACGC CAGTGGCAAC GTAGTGACTC    2763

AGGCGGGCAC CAAGGCAACG GCACCATTGG TCTCTGGGTA GTGCTTTAAG AATGAACACA    2823

ATCACGTTAT AGTCCATGGT CCATCACTAT TCAAGGATGA CTCCCTCCCT TCCTGTCTAT    2883

TTTTGTTTTT TACTTTTTTA CACTGAGTTT CTATTTAGAC ACTACAACAT ATGGGGTGTT    2943

TGTTCCCATT GGATGCATTT CTATCAAAAC TCTATCAAAT GTGATGGCTA GATTCTAACA    3003

TATTGCCATG TGTGGAGTGT GCTGAACACA CACCAGTTTA CAGGAAAGAT GCATTTTGTG    3063

TACAGTAAAC GGTGTATATA CCTTTTGTTA CCACAGAGTT TTTTAAACAA ATGAGTATTA    3123

TAGGACTTTC TTCTAAATGA GCTAAATAAG TCACCATTGA CTTCTTGGTG CTGTTGAAAA    3183

TAATCCATTT TCACTAAAAG TGTGTGAAAC CTACAGCATA TTCTTCACGC AGAGATTTTC    3243

ATCTATTATA CTTTATCAAA GATTGGCCAT GTTCCACTTG GAAATGGCAT GCAAAAGCCA    3303

TCATAGAGAA ACCTGCGTAA CTCCATCTGA CAAATTCAAA AGAGAGAGAG AGATCTTGAG    3363

AGAGAAATGC TGTTCGTTCA AAAGTGGAGT TGTTTTAACA GATGCCAATT ACGGTGTACA    3423

GTTTAACAGA GTTTTCTGTT GCATTAGGAT AAACATTAAT TGGAGTGCAG CTAACATGAG    3483
```

TATCATCAGA CTAGTATCAA GTGTTCTAAA ATGAAATATG AGAAGATCCT GTCACAATTC 3543

TTAGATCTGG TGTCCAGCAT GGATGAAACC TTTGAGTTTG GTCCCTAAAT TTGCATGAAA 3603

GCACAAGGTA AATATTCATT TGCTTCAGGA GTTTCATGTT GGATCTGTCA TTATCAAAAG 3663

TGATCAGCAA TGAAGAACTG GTCGGACAAA ATTTAACGTT GATGTAATGG AATTCCAGAT 3723

GTAGGCATTC CCCCCAGGTC TTTTCATGTG CAGATTGCAG TTCTGATTCA TTTGAATAAA 3783

AAGGAACTTG GAAAAAAAAA A 3804

（２）配列番号２についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：865個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：タンパク質
（xi）配列：配列番号２：

Met Ala Leu Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Cys Gly Asn
1 5 10 15

Ser Phe Ser Gly Gly Gln Pro Ser Ser Thr Asp Ala Pro Lys Ala Trp
20 25 30

Asn Tyr Glu Leu Pro Ala Thr Asn Tyr Glu Thr Gln Asp Ser His Lys
35 40 45

Ala Gly Pro Ile Gly Ile Leu Phe Glu Leu Val His Ile Phe Leu Tyr
50 55 60

Val Val Gln Pro Arg Asp Phe Pro Glu Asp Thr Leu Arg Lys Phe Leu
65 70 75 80

Gln Lys Ala Tyr Glu Ser Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val
85 90 95

Ile Leu Gly Leu Lys Ile Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys
100 105 110

Cys Val Leu Gly Leu Leu Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr
115 120 125

Phe Phe Cys Met Cys Arg Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His
130 135 140

Gln Arg Gln Lys Glu Asn Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile
145 150 155 160

Ser Leu Leu Val Ile Cys Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly
165 170 175

Phe Val Ala Asn His Gln Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys
180 185 190

Leu Ala Asp Ser Asn Phe Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr
195 200 205

Pro Glu Gln Ile Lys Tyr Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp
210 215 220

Lys Ala Phe Thr Asp Leu Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly
225 230 235 240

Ile Leu Asp Arg Leu Arg Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile
245 250 255

Lys Ser Met Ala Thr Ala Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn
260 265 270

Met Asn Ser Thr Leu Lys Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser
275 280 285

Ser Ser Leu Thr Ser Val Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp
290 295 300

Pro Leu Cys Leu Val His Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Gln Leu Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro
325 330 335

Pro Val Asp Ala Glu Leu Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp
340 345 350

Leu Asp Gly Leu Val Gln Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro
355 360 365

Asp Arg Val Gln Arg Gln Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg
370 375 380

Val Leu Asn Ser Ile Gly Ser Asp Ile Asp Asn Val Thr Gln Arg Leu
385 390 395 400

Pro Ile Gln Asp Ile Leu Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val Asn Asn Thr
405 410 415

Glu Ser Tyr Ile His Arg Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser
420 425 430

Tyr Trp Trp Leu Gly Gly Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile
435 440 445

Val Ile Phe Tyr Tyr Leu Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp
450 455 460

Arg His Ala Thr Pro Thr Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly
465 470 475 480

Val Phe Leu Met Val Gly Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile
485 490 495

Leu Met Ile Ile Val Val Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu
500 505 510

Lys Leu Ile Cys Glu Pro Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu
515 520 525

Asp Thr Pro Tyr Leu Leu Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly
530 535 540

Lys Leu Phe Asn Lys Ser Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr
545 550 555 560

Ser Asp Cys Lys Lys Asn Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln
565 570 575

Asn Ser Phe Asn Ile Ser Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly
580 585 590

Ser Ile Ser Ser Glu Leu Glu Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe
595 600 605

Leu Leu Gly Ala Ala Gly Arg Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys
610 615 620

Gly Ile Asp Arg Met Asn Tyr Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys
625 630 635 640

Ser Pro Ala Gly Val Asn Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala
645 650 655

Lys Ala Asn Ser Leu Pro Pro Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg
660 665 670

Asp Ala Gln Thr Ile Lys Thr Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile
675 680 685

Glu Gln Ser Leu Ser Thr Leu Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg
690 695 700

Thr Gly Asn Gly Leu Leu Glu Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu
705 710 715 720

Asp Phe Ala Gln Asn Phe Ile Thr Asn Asn Thr Ser Ser Val Ile Ile
725 730 735

Glu Glu Thr Lys Lys Tyr Gly Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His
740 745 750

Tyr Leu Gln Trp Ile Glu Phe Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys
755 760 765

Lys Pro Val Ala Thr Ala Leu Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys
770 775 780

Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu Phe Trp Phe Gly Ile Gly Lys
785 790 795 800

Ala Thr Val Phe Leu Leu Pro Ala Leu Ile Phe Ala Val Lys Leu Ala
805 810 815

Lys Tyr Tyr Arg Arg Met Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu
820 825 830

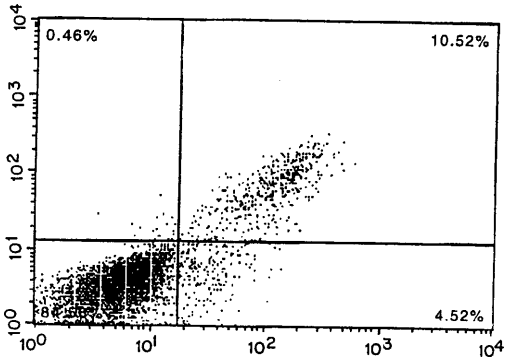
Thr Ile Pro Met Lys Asn Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys
835 840 845

Asp His Val Tyr Gly Ile His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln
850 855 860

His
865

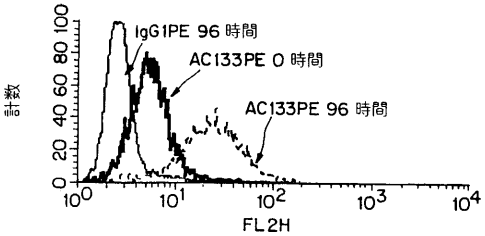
【図１】

FIG.1



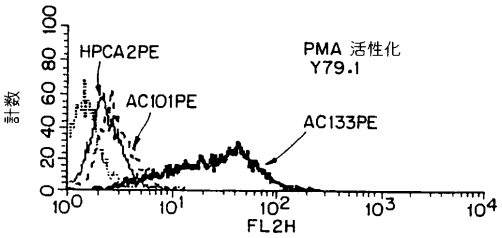
【図２】

FIG.2



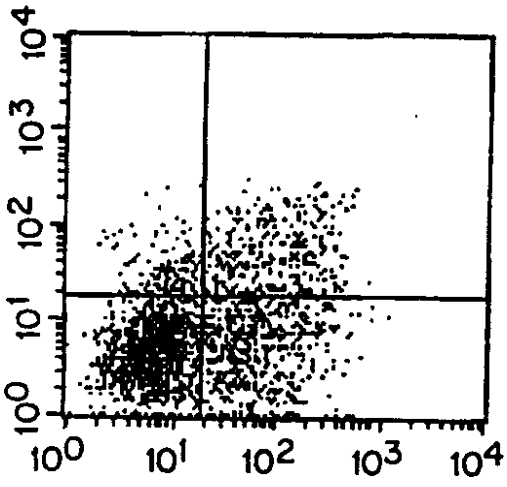
【図３】

FIG.3



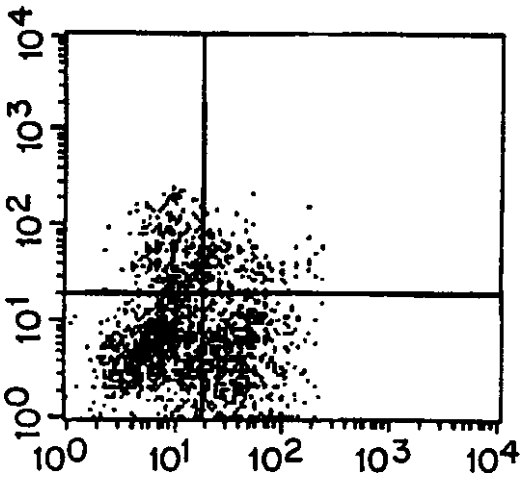
【図４Ａ】

FIG.4A



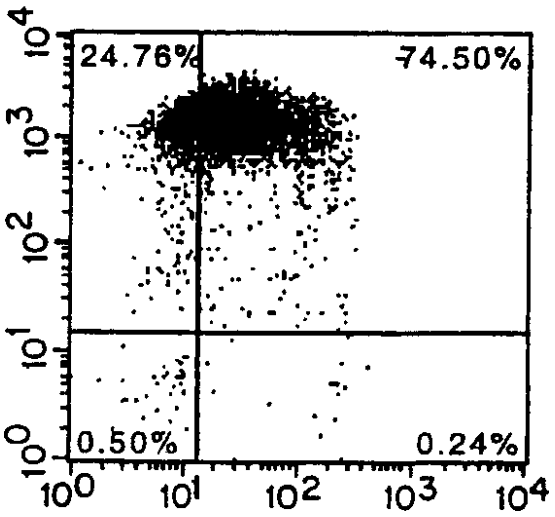
【図４Ｂ】

FIG.4B



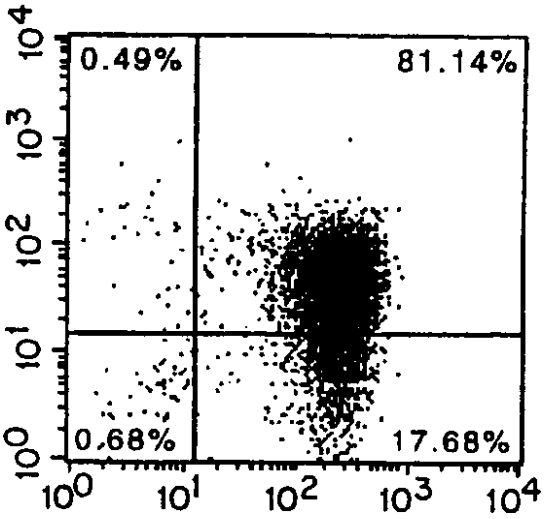
【図５Ａ】

FIG.5A



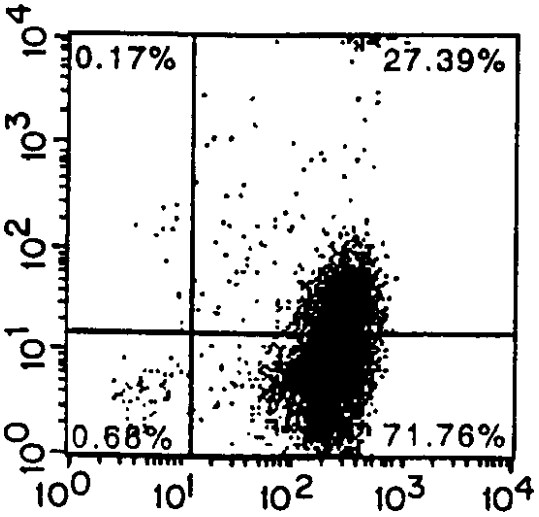
【図５Ｂ】

FIG.5B



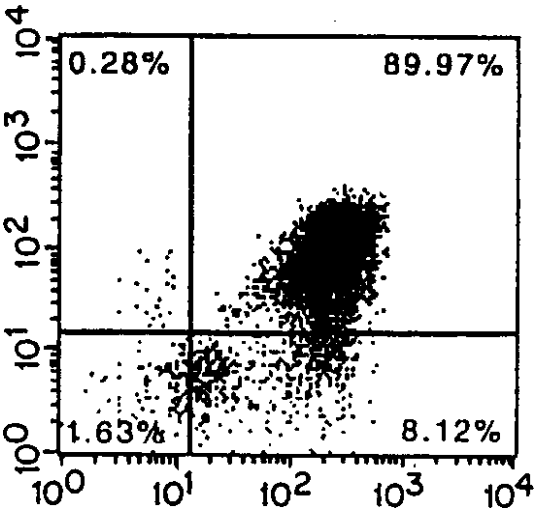
【図５Ｃ】

FIG.5C

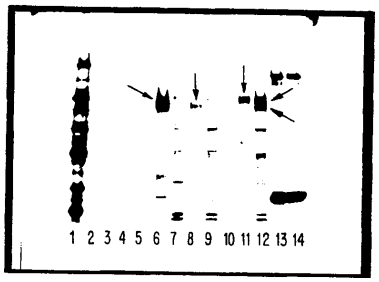


【図５Ｄ】

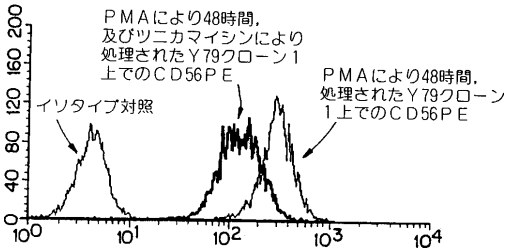
FIG.5D



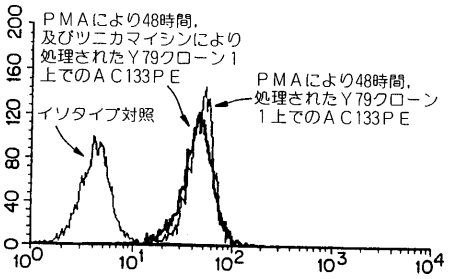
【図６】
FIG.6



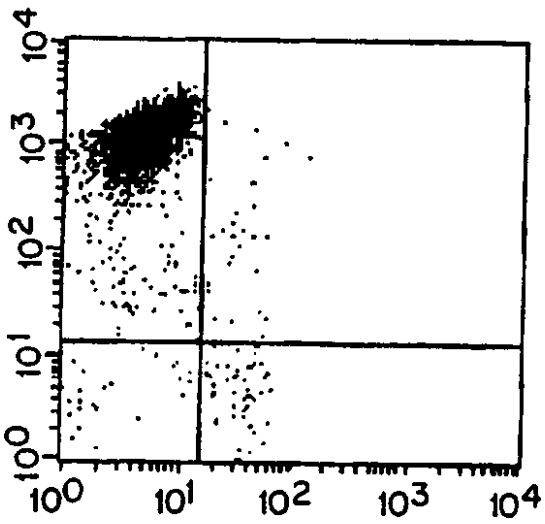
【図７Ａ】
FIG. 7A



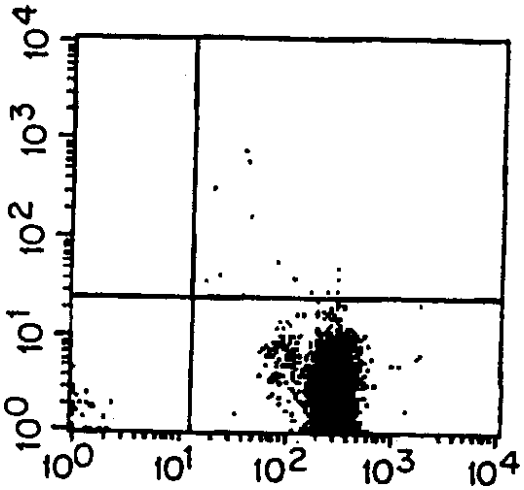
【図７Ｂ】
FIG. 7B



【図８】
FIG.8

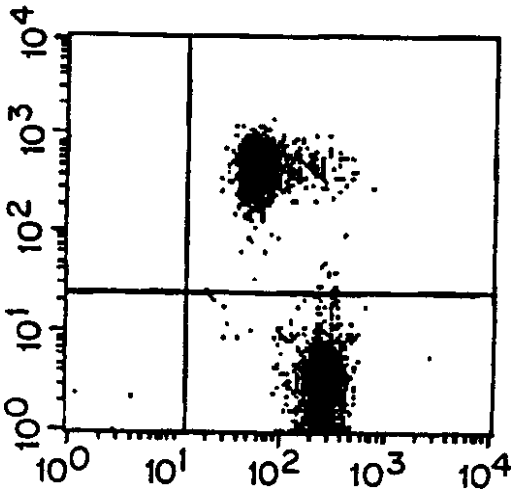


【図９Ａ】
FIG.9A



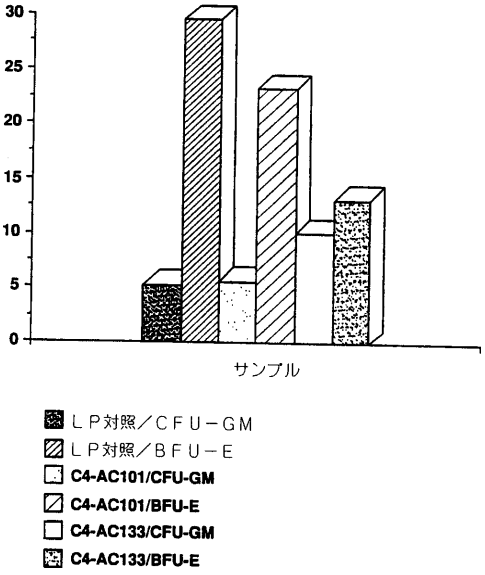
【図９Ｂ】

FIG.9B



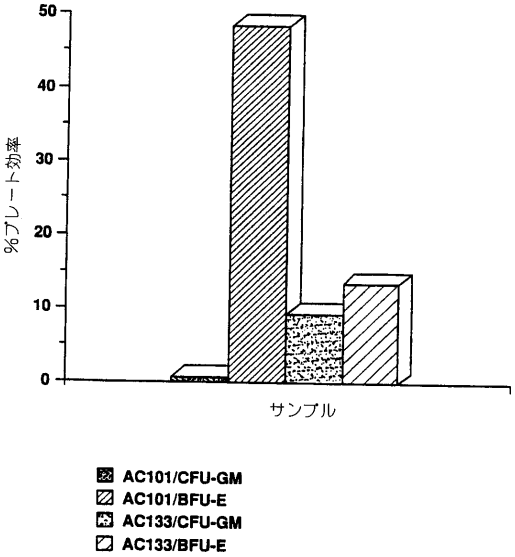
【図１０】

FIG.10



【図１１】

FIG.11



【図１２－１】

FIG.12-1

```
CCAAGTTCTA CCTCATGTTT GGAGGATCTT GCTAGCT ATG GCC CTC GTA CTC GGC        55
                                          Met Ala Leu Val Leu Gly
                                           1               5

TCC CTG TTG CTG CTG GGG CTG TGC GGG AAC TCC TTT TCA GGA GGG CAG      103
Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Cys Gly Asn Ser Phe Ser Gly Gly Gln
            10                  15                  20

CCT TCA TCC ACA GAT GCT CCT AAG GCT TGG AAT TAT GAA TTG CCT GCA      151
Pro Ser Ser Thr Asp Ala Pro Lys Ala Trp Asn Tyr Glu Leu Pro Ala
        25                  30                  35

ACA AAT TAT GAG ACC CAA GAC TCC CAT AAA GCT GGA CCC ATT GGC ATT      199
Thr Asn Tyr Glu Thr Gln Asp Ser His Lys Ala Gly Pro Ile Gly Ile
    40                  45                  50

CTC TTT GAA CTA GTG CAT ATC TTT CTC TAT GTG GTA CAG CCG CGT GAT      247
Leu Phe Glu Leu Val His Ile Phe Leu Tyr Val Val Gln Pro Arg Asp
55                  60                  65                  70

TTC CCA GAA GAT ACT TTG AGA AAA TTC TTA CAG AAG GCA TAT GAA TCC      295
Phe Pro Glu Asp Thr Leu Arg Lys Phe Leu Gln Lys Ala Tyr Glu Ser
                75                  80                  85

AAA ATT GAT TAT GAC AAG CCA GAA ACT GTA ATC TTA GGT CTA AAG ATT      343
Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val Ile Leu Gly Leu Lys Ile
            90                  95                  100

GTC TAC TAT GAA GCA GGG ATT ATT CTA TGC TGT GTC CTG GGG CTG CTG      391
Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys Cys Val Leu Gly Leu Leu
        105                 110                 115

TTT ATT ATT CTG ATG CCT CTG GTG GGG TAT TTC TTT TGT ATG TGT CGT      439
Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr Phe Phe Cys Met Cys Arg
    120                 125                 130

TGC TGT AAC AAA TGT GGT GGA GAA ATG CAC CAG CGA CAG AAG GAA AAT      487
Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His Gln Arg Gln Lys Glu Asn
135                 140                 145                 150

GGG CCC TTC CTG AGG AAA TGC TTT GCA ATC TCC CTG TTG GTG ATT TGT      535
Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile Ser Leu Leu Val Ile Cys
                155                 160                 165

ATA ATA ATA AGC ATT GGC ATC TTC TAT GGT TTT GTG GCA AAT CAC CAG      583
Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly Phe Val Ala Asn His Gln
            170                 175                 180

GTA AGA ACC CGG ATC AAA AGG AGT CGG AAA CTG GCA GAT AGC AAT TTC      631
Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys Leu Ala Asp Ser Asn Phe
        185                 190                 195

AAG GAC TTG CGA ACT CTC TTG AAT GAA ACT CCA GAG CAA ATC AAA TAT      679
Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr Pro Glu Gln Ile Lys Tyr
    200                 205                 210

ATA TTG GCC CAG TAC AAC ACT ACC AAG GAC AAG GCG TTC ACA GAT CTG      727
Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp Lys Ala Phe Thr Asp Leu
215                 220                 225                 230
```

【図１２－２】

FIG.12-2

```
AAC AGT ATC AAT TCA GTG CTA GGA GGC GGA ATT CTT GAC CGA CTG AGA
Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly Ile Leu Asp Arg Leu Arg
                235                 240                 245

CCC AAC ATC ATC CCT GTT CTT GAT GAG ATT AAG TCC ATG GCA ACA GCG
Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile Lys Ser Met Ala Thr Ala
            250                 255                 260

ATC AAG GAG ACC AAA GAG GCG TTG GAG AAC ATG AAC AGC ACC TTG AAG
Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn Met Asn Ser Thr Leu Lys
        265                 270                 275

AGC TTG CAC CAA CAA AGT ACA CAG CTT AGC AGC AGT CTG ACC AGC GTG
Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser Ser Ser Leu Thr Ser Val
    280                 285                 290

AAA ACT AGC CTG CGG TCA TCT CTC AAT GAC CCT CTG TGC TTG GTG CAT
Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp Pro Leu Cys Leu Val His
295                 300                 305                 310

CCA TCA AGT GAA ACC TGC AAC AGC ATC AGA TTG TCT CTA AGC CAG CTG
Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg Leu Ser Leu Ser Gln Leu
                315                 320                 325

AAT AGC AAC CCT GAA CTG AGG CAG CTT CCA CCC GTG GAT GCA GAA CTT
Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro Pro Val Asp Ala Glu Leu
            330                 335                 340

GAC AAC GTT AAT AAC GTT CTT AGG ACA GAT TTG GAT GGC CTG GTC CAA
Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp Leu Asp Gly Leu Val Gln
        345                 350                 355

CAG GGC TAT CAA TCC CTT AAT GAT ATA CCT GAC AGA GTA CAA CGC CAA
Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro Asp Arg Val Gln Arg Gln
    360                 365                 370

ACC ACG ACT GTC GTA GCA GGT ATC AAA AGG GTC TTG AAT TCC ATT GGT
Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg Val Leu Asn Ser Ile Gly
375                 380                 385                 390

TCA GAT ATC GAC AAT GTA ACT CAG CGT CTT CCT ATT CAG GAT ATA CTC
Ser Asp Ile Asp Asn Val Thr Gln Arg Leu Pro Ile Gln Asp Ile Leu
                395                 400                 405

TCA GCA TTC TCT GTT TAT GTT AAT AAC ACT GAA AGT TAC ATC CAC AGA
Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val Asn Asn Thr Glu Ser Tyr Ile His Arg
            410                 415                 420

AAT TTA CCT ACA TTG GAA GAG TAT GAT TCA TAC TGG TGG CTG GGT GGC
Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser Tyr Trp Trp Leu Gly Gly
        425                 430                 435

CTG GTC ATC TGC TCT CTG CTG ACC CTC ATC GTG ATT TTT TAC TAC CTG
Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile Val Ile Phe Tyr Tyr Leu
    440                 445                 450

GGC TTA CTG TGT GGC GTG TGC GGC TAT GAC AGG CAT GCC ACC CCG ACC
Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp Arg His Ala Thr Pro Thr
455                 460                 465                 470
```

【図１２－３】

FIG.12-3

```
775  ACC CGA GGC TGT GTC TCC AAC ACC GGA GGC GTC TTC CTC ATG GTT GGA   1495
     Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly Val Phe Leu Met Val Gly
                475                 480                 485

823  GTT GGA TTA AGT TTC CTC TTT TGC TGG ATA TTG ATG ATC ATT GTG GTT   1543
     Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile Leu Met Ile Ile Val Val
            490                 495                 500

871  CTT ACC TTT GTC TTT GGT GCA AAT GTG GAA AAA CTG ATC TGT GAA CCT   1591
     Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu Lys Leu Ile Cys Glu Pro
        505                 510                 515

919  TAC ACG AGC AAG GAA TTA TTC CGG GTT TTG GAT ACA CCC TAC TTA CTA   1639
     Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu Asp Thr Pro Tyr Leu Leu
    520                 525                 530

967  AAT GAA GAC TGG GAA TAC TAT CTC TCT GGG AAG CTA TTT AAT AAA TCA   1687
     Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly Lys Leu Phe Asn Lys Ser
535                 540                 545                 550

1015 AAA ATG AAG CTC ACT TTT GAA CAA GTT TAC AGT GAC TGC AAA AAA AAT   1735
     Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Asn
                555                 560                 565

1063 AGA GGC ACT TAC GGC ACT CTT CAC CTG CAG AAC AGC TTC AAT ATC AGT   1783
     Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln Asn Ser Phe Asn Ile Ser
            570                 575                 580

1111 GAA CAT CTC AAC ATT AAT GAG CAT ACT GGA AGC ATA AGC AGT GAA TTG   1831
     Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly Ser Ile Ser Ser Glu Leu
        585                 590                 595

1159 GAA AGT CTG AAG GTA AAT CTT AAT ATC TTT CTG TTG GGT GCA GCA GGA   1879
     Glu Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe Leu Leu Gly Ala Ala Gly
    600                 605                 610

1207 AGA AAA AAC CTT CAG GAT TTT GCT GCT TGT GGA ATA GAC AGA ATG AAT   1927
     Arg Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys Gly Ile Asp Arg Met Asn
615                 620                 625                 630

1255 TAT GAC AGC TAC TTG GCT CAG ACT GGT AAA TCC CCC GCA GGA GTG AAT   1975
     Tyr Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Asn
                635                 640                 645

1303 CTT TTA TCA TTT GCA TAT GAT CTA GAA GCA AAA GCA AAC AGT TTG CCC   2023
     Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala Lys Ala Asn Ser Leu Pro
            650                 655                 660

1351 CCA GGA AAT TTG AGG AAC TCC CTG AAA AGA GAT GCA CAA ACT ATT AAA   2071
     Pro Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg Asp Ala Gln Thr Ile Lys
        665                 670                 675

1399 ACA ATT CAC CAG CAA CGA GTC CTT CCT ATA GAA CAA TCA CTG AGC ACT   2119
     Thr Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile Glu Gln Ser Leu Ser Thr
    680                 685                 690

1447 CTA TAC CAA AGC GTC AAG ATA CTT CAA CGC ACA GGG AAT GGA TTG TTG   2167
     Leu Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg Thr Gly Asn Gly Leu Leu
695                 700                 705                 710

     GAG AGA GTA ACT AGG ATT CTA GCT TCT CTG GAT TTT GCT CAG AAC TTC   2215
     Glu Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu Asp Phe Ala Gln Asn Phe
                715                 720                 725
```

【図１２－４】

FIG.12-4

```
ATC ACA AAC AAT ACT TCC TCT GTT ATT ATT GAG GAA ACT AAG AAG TAT
Ile Thr Asn Asn Thr Ser Val Ile Ile Glu Glu Thr Lys Lys Tyr
        730                 735                 740

GGG AGA ACA ATA ATA GGA TAT TTT GAA CAT TAT CTG CAG TGG ATC GAG
Gly Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His Tyr Leu Gln Trp Ile Glu
    745                 750                 755

TTC TCT ATC AGT GAG AAA GTG GCA TCG TGC AAA CCT GTG GCC ACC GCT
Phe Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys Lys Pro Val Ala Thr Ala
760                 765                 770

CTA GAT ACT GCT GTT GAT GTC TTT CTG TGT AGC TAC ATT ATC GAC CCC
Leu Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys Ser Tyr Ile Ile Asp Pro
775                 780                 785                 790

TTG AAT TTG TTT TGG TTT GGC ATA GGA AAA GCT ACT GTA TTT TTA CTT
Leu Asn Leu Phe Trp Phe Gly Ile Gly Lys Ala Thr Val Phe Leu Leu
            795                 800                 805

CCG GCT CTA ATT TTT GCG GTA AAA CTG GCT AAG TAC TAT CGT CGA ATG
Pro Ala Leu Ile Phe Ala Val Lys Leu Ala Lys Tyr Tyr Arg Arg Met
        810                 815                 820

GAT TCG GAG GAC GTG TAC GAT GAT GTT GAA ACT ATA CCC ATG AAA AAT
Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu Thr Ile Pro Met Lys Asn
    825                 830                 835

ATG GAA AAT GGT AAT AAT GGT TAT CAT AAA GAT CAT GTA TAT GGT ATT
Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys Asp His Val Tyr Gly Ile
840                 845                 850

CAC AAT CCT GTT ATG ACA AGC CCA TCA CAA CAT T GATAGCTGAT
His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln His
855                 860                 865

GTTGAAACTG CTTGAGCATC AGGATACTCA AAGTGGAAAG GATCACAGAT TTTTGGTAGT   2703
TTCTGGGTCT ACAAGGACTT TCCAAATCCA GGAGCAACGC CAGTGGCAAC GTAGTGACTC   2763
AGGCGGGCAC CAAGGCAACG GCACCATTGG TCTCTGGGTA GTGCTTTAAG AATGAACACA   2823
ATCACGTTAT AGTCCATGGT CCATCACTAT TCAAGGATGA CTCCCTCCCT TCCTGTCTAT   2883
TTTTGTTTTT TACTTTTTTA CACTGAGTTT CTATTTAGAC ACTACAACAT ATGGGGTGTT   2943
TGTTCCCATT GGATGCATTT CTATCAAAAC TCTATCAAAT GTGATGGCTA GATTCTAACA   3003
TATTGCCATG TGTGGAGTGT GCTGAACACA CACCAGTTTA CAGGAAAGAT GCATTTTGTG   3063
TACAGTAAAC GGTGTATATA CCTTTTGTTA CCACAGAGTT TTTTAAACAA ATGAGTATTA   3123
TAGGACTTTC TTCTAAATGA GCTAAATAAG TCACCATTGA CTTCTTGGTG CTGTTGAAAA   3183
TAATCCATTT TCACTAAAAG TGTGTGAAAC CTACAGCATA TTCTTCACGC AGAGATTTTC   3243
ATCTATTATA CTTTATCAAA GATTGGCCAT GTTCCACTTG GAAATGGCAT GCAAAAGCCA   3303
TCATAGAGAA ACCTGCGTAA CTCCATCTGA CAAATTCAAA AGAGAGAGAG AGATCTTGAG   3363
AGAGAAATGC TGTTCGTTCA AAAGTGGAGT TGTTTTAACA GATGCCAATT ACGGTGTACA   3423
```

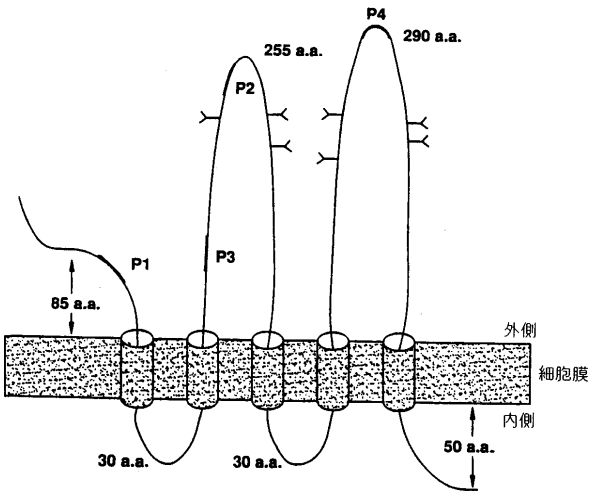
【図１２－５】

FIG.12-5

```
2263
     GTTTAACAGA GTTTTCTGTT GCATTAGGAT AAACATTAAT TGGAGTGCAG CTAACATGAG   3483
2311
     TATCATCAGA CTAGTATCAA GTGTTCTAAA ATGAAATATG AGAAGATCCT GTCACAATTC   3543
     TTAGATCTGG TGTCCAGCAT GGATGAAACC TTTGAGTTTG GTCCCTAAAT TTGCATGAAA   3603
2359
     GCACAAGGTA AATATTCATT TGCTTCAGGA GTTTCATGTT GGATCTGTCA TTATCAAAAG   3663
     TGATCAGCAA TGAAGAACTG GTCGGACAAA ATTTAACGTT GATGTAATGG AATTCCAGAT   3723
2407
     GTAGGCATTC CCCCCAGGTC TTTTCATGTG CAGATTGCAG TTCTGATTCA TTTGAATAAA   3783
     AAGGAACTTG GAAAAAAAAA A                                             3804
2455
```

【図１３】

FIG.13



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	D
G01N 33/577	***(2006.01)***	G01N	33/53	K
		G01N	33/577	B

(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 ミラグリア, シェリー
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４３０３, パロ アルト, クララ ドライブ ９０７
(72)発明者 ゴッドフライ, ウェイン ジー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４０２７, アサートン, #エー. ウォルシュ ロード ３３３
(72)発明者 イン, アミー
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９５１１７, サン ジョーズ, バンディアベニュ ３９７
(72)発明者 バック, デビッド
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９５０５４, サンタ クララ, アトランティック コート ４２４６

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 欧州特許出願公開第００６６２５１２（ＥＰ, Ａ１）
カナダ国特許出願公開第２０４２０９３号明細書, カナダ

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq