

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3623230号

(P3623230)

(45) 発行日 平成17年2月23日(2005.2.23)

(24) 登録日 平成16年12月3日(2004.12.3)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 35/00

A 6 1 K 35/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 5/00

B

請求項の数 25 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-501727
 (86) (22) 出願日 平成5年6月11日(1993.6.11)
 (65) 公表番号 特表平7-509599
 (43) 公表日 平成7年10月26日(1995.10.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1993/005569
 (87) 国際公開番号 W01993/025682
 (87) 国際公開日 平成5年12月23日(1993.12.23)
 審査請求日 平成12年5月22日(2000.5.22)
 (31) 優先権主張番号 899,075
 (32) 優先日 平成4年6月11日(1992.6.11)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502074002
 ニューヨーク・ユニバーシティ
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10016
 , ニューヨーク, ファースト アベニュー
 550
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100099128
 弁理士 早川 康
 (72) 発明者 メルーロ, ダニエル
 アメリカ合衆国 10510 ニューヨー
 ク州 スカボロー, カントリー クラブ
 レーン 9番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラ受容体ポリペプチド、ヒトH13タンパク質、ならびにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトに特異的なウイルスに対する配列番号8のアミノ酸残基210~250の結合部位を含むヒト受容体ポリペプチドが、ヒト以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合する少なくとも1つの結合部位を含むように改変されていることを特徴とするキメラ細胞ウイルス受容体ポリペプチドであって、該改変された結合部位が、該キメラ細胞ウイルス受容体ポリペプチドに該ヒト以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインに対する結合活性を付与する、少なくとも第一のアミノ酸残基および第二のアミノ酸残基を含むものである、上記キメラ細胞ウイルス受容体ポリペプチド。

【請求項2】

ヒト以外の種がマウスまたはハムスターである、請求項1記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項3】

配列番号8のアミノ酸残基210~250に対して少なくとも80%の相同性を有し、かつヒトに特異的なウイルスと結合可能な結合部位を含む、請求項1または2に記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項4】

前記相同性が少なくとも95%である、請求項3記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項5】

ヒト以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合する少なくとも1つ

10

20

の結合部位がERR受容体の結合部位である、請求項1～4のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項6】

前記ヒト受容体ポリペプチドが配列番号8を有するものであり、配列番号8の少なくとも第一のアミノ酸残基および第二のアミノ酸残基が改変されており、ここで、第一のアミノ酸残基は配列番号8のPro242であり、第二のアミノ酸残基は配列番号8のVal244、Glu239、Gly240及びGly225からなる群より選択されるアミノ酸である、請求項1～5のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項7】

第一のアミノ酸残基の改変が、配列番号8のPro242のTyrへの改変を含む、請求項6記載のキメラ受容体ポリペプチド。

10

【請求項8】

第二のアミノ酸残基の改変が、配列番号8のGly240のValへの改変またはVal244のGluへの改変から選択される、請求項6記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項9】

マウスに特異的なウイルスに対する配列番号4のアミノ酸残基210～242の結合部位を含むマウス受容体ポリペプチドが、マウス以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合する少なくとも1つの結合部位を含むように改変されていることを特徴とするキメラ細胞ウイルス受容体ポリペプチドであって、該改変された結合部位が、該キメラ細胞ウイルス受容体ポリペプチドに該マウス以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv

20

【請求項10】

マウス以外の種がヒトまたはハムスターである、請求項9記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項11】

配列番号4のアミノ酸残基210～242に対して少なくとも80%の相同性を有し、かつマウスに特異的なウイルスと結合可能な結合部位を含む、請求項9または10に記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項12】

前記相同性が少なくとも95%である、請求項11記載のキメラ受容体ポリペプチド。

30

【請求項13】

マウス以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合する少なくとも1つの結合部位がH13タンパク質の結合部位である、請求項9～12のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチド。

【請求項14】

真核細胞または組織を、ヒト以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインによる結合を受けやすくする方法であって、

(a) 該真核細胞または組織を、in vitroで、または非ヒト生物におけるin vivoもしくはin situで、請求項1～8のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸により形質転換して、キメラ受容体細胞または組織をつくり、そして

40

(b) 該キメラ受容体ポリペプチドの少なくとも1つの結合部位が該キメラ細胞ウイルス受容体細胞により発現されて、ヒト以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合できるような条件を付与する、ことを含む方法。

【請求項15】

真核細胞または組織を、マウス以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインによる結合を受けやすくする方法であって、

(a) 該真核細胞または組織を、in vitroで、または非ヒト生物におけるin vivoもしくはin situで、請求項9～13のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチドをコー

50

ドする核酸により形質転換して、キメラ受容体細胞または組織をつくり、そして
 (b) 該キメラ受容体ポリペプチドの少なくとも1つの結合部位が該キメラ細胞ウイルス受容体細胞により発現されて、マウス以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合できるような条件を付与する、
 ことを含む方法。

【請求項16】

真核細胞または組織が、非ヒト哺乳類、昆虫、鳥類または酵母由来のものである、請求項14又は15に記載の方法によりつくられたキメラ受容体細胞または組織。

【請求項17】

非ヒト哺乳類の細胞または組織が、霊長類、ハムスター、ウサギ、齧歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌ、またはネコ由来のものである、請求項16に記載のキメラ受容体細胞または組織。

10

【請求項18】

キメラ受容体細胞または組織に少なくとも1種の治療薬または診断薬を伝達する方法であって、

(a) 請求項16又は17に記載のキメラ受容体細胞または組織を用意し、

(b) 該キメラ受容体細胞または組織を、in vitroで、または非ヒト生物におけるin vivoもしくはin situで、ヒト以外の種またはマウス以外の種に特異的なウイルスのenv結合ドメインおよび少なくとも1種の治療薬または診断薬を含む運搬ベクターと接触させ、
 これにより該運搬ベクターが該キメラ受容体細胞または組織と結合し、かつ治療薬または
 診断薬が該キメラ受容体細胞または組織に対して治療または診断効果を及ぼすようにする

20

ことからなる方法。

【請求項19】

治療薬が治療用核酸であり、そしてキメラ受容体細胞または組織に対する治療効果が

(i) DNA配列の転写を阻止すること、

(ii) RNA配列の翻訳を阻止すること、

(iii) RNAまたはDNA配列の逆転写を阻止すること、

(iv) タンパク質の翻訳後修飾を阻止すること、

(v) DNA配列の転写を誘導すること、

30

(vi) RNA配列の翻訳を誘導すること、

(vii) RNAまたはDNA配列の逆転写を誘導すること、

(viii) タンパク質の翻訳後修飾を誘導すること、

(ix) 該核酸をRNAとして転写すること、

(x) 該核酸をタンパク質として翻訳すること、および

(xi) 該キメラ受容体細胞または組織の染色体へ該核酸を組み込むこと、

よりなる群から選ばれる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

生殖細胞と体細胞の実質的にすべてが請求項1～13のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸を含んでいるトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

40

【請求項21】

請求項1～13のいずれか1項に記載のキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸であって、該キメラ受容体ポリペプチドが、配列番号8に示されるアミノ酸配列においてPro242がTyrに改変されており、かつGly240がValにまたはVal244がGluに改変されているアミノ酸配列を有し、該核酸が、配列番号7に示される核酸配列が改変された核酸配列を有するものである、前記核酸。

【請求項22】

請求項21記載の核酸を用いてin vitroで真核細胞または組織を形質転換することにより作製されるキメラ受容体細胞または組織であって、該真核細胞または組織が、哺乳類、昆

50

虫、鳥類または酵母由来のものである、該キメラ受容体細胞または組織。

【請求項 2 3】

哺乳類の細胞または組織が、ヒト、霊長類、ハムスター、ウサギ、齧歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌまたはネコ由来のものである、請求項22記載のキメラ受容体細胞または組織。

【請求項 2 4】

キメラ受容体細胞または組織に対して治療または診断効果を及ぼすためのヒト以外の種に特異的なウイルスのenv結合ドメイン、および少なくとも1種の治療薬または診断薬を含む運搬ベクターであって、該運搬ベクターが、該キメラ受容体細胞または組織との結合能を有し、該キメラ細胞または組織が、

(a) 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸を用いて *in vitro*、*in vivo*、または *in situ* で形質転換されたものであり、

(b) 該キメラ受容体ポリペプチドの少なくとも1つの結合部位の発現が可能であり、

(c) ヒト以外の種に特異的なウイルスのウイルスenv結合ドメインと結合可能であり、そして

(d) 哺乳動物、昆虫、鳥類または酵母由来のものである、上記運搬ベクター。

【請求項 2 5】

治療薬が治療用核酸であり、そしてキメラ受容体細胞または組織に対する治療効果が

(i) DNA配列の転写を阻止すること、

(ii) RNA配列の翻訳を阻止すること、

(iii) RNAまたはDNA配列の逆転写を阻止すること、

(iv) タンパク質の翻訳後修飾を阻止すること、

(v) DNA配列の転写を誘導すること、

(vi) RNA配列の翻訳を誘導すること、

(vii) RNAまたはDNA配列の逆転写を誘導すること、

(viii) タンパク質の翻訳後修飾を誘導すること、

(ix) 該核酸をRNAとして転写すること、

(x) 該核酸をタンパク質として翻訳すること、および

(xi) 該キメラ受容体細胞または組織の染色体へ該核酸を組み込むこと、

からなる群より選択される、請求項24記載の運搬ベクター。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明はウイルス学ならびに分子遺伝学の分野に属するもので、ウイルスおよび/またはウイルスの外膜のタンパク質結合ドメインと結合する、哺乳類の変異型のウイルス受容体ポリペプチドを含む核酸、方法、およびタンパク質に関するものであり、本発明は、それらの製造方法、ならびに遺伝子治療をはじめとする診断および治療の用途等でのそれらの使用にも関するものである。

背景技術の説明

ウイルスによる細胞の感染は、細胞のウイルス受容体にウイルスが付着することから始まる。多数のウイルス特異的な細胞受容体が特定されており、こうした受容体分子の大半が、他の既知の細胞機能を有している。

こうしたウイルス結合性のタンパク質、すなわち受容体が発現していることが、ウイルス感染に対する感受性を決定する強力な要因である。ウイルスの外膜のタンパク質 (env) が標的細胞に融合する際には、ウイルスが結合することが必要である。この融合は、細胞表面で生じることも、受容体依存性エンドサイトーシスの後に酸性となったエンドソーム内で生じることもある (White et al., Quant. Rev. Biophys. 16:151 - 195, 1983)。この融合の後で、ピリオンのコアが細胞質に入りこみ、ウイルスの複製過程が開始される。たとえば、HIVの場合、CD4以外の細胞表面分子も、ウイルスがヒト細胞に入りこむ際に重要な

10

20

30

40

50

役目を果たしていることが、最近の研究によって示唆されている。

エコトロピックならびにアンフォトロピックマウスレトロウイルス受容体、ならびに感染エコトロピック（種特異的）マウス白血病ウイルス（E - MuLV）、あるいはアンフォトロピック（種非特異的）マウス白血病ウイルス（E - MuLV）による感染に対する細胞の感受性も、ウイルス外膜の膜受容体に対する結合性によって判定することができる。

ウイルス干渉検定にもとづいて、4種の特異的MuLV受容体が想定されている。すなわち、（a）E - MuLVに対する受容体、（b）野性型アンフォトロピックE - MuLVに対する受容体、（c）E - MuLVから誘導した組換え型ウイルス、たとえば「ミンク細胞フォーカス誘導性」、すなわちMCFウイルスに対する受容体、ならびに（d）アンフォトロピックMuLVから誘導した組換え型ウイルスに対する受容体である（Rein,A.et al.,Virology 136:144 - 152,1984）。

10

最近、マウスエコトロピックレトロウイルス受容体（ecotropic retroviral receptor、ERR）をコードするcDNAのクローン（W1と称する）（配列番号4）が特定された（Albritton,L.W.et al.,Cell 57:659 - 666,1989）。この研究によって、E - MuLVの感染に対する感受性が、ヒトEJ細胞での単一のマウス遺伝子の発現によって獲得されるものであることが実証された。

ウイルス受容体依存性組織特異性

HIVは、受容体依存性の組織限定を示すウイルスの一例で、この組織限定が、ウイルスが一次受容体としてCD4タンパク質を使用していることに基づくことは明らかである。しかし、細胞特異的受容体が、組織特異性の唯一の決定要因であるとは考え難い。レトロウイルスが有する組織指向性は、種々の要因、たとえば、長末端反復の組織特異性、ウイルスenvタンパク質の変異、細胞の要因、適当な細胞表面受容体の発現などが複雑に絡み合った結果である可能性が高い（Kabat,Curr.Top.Microbiol.Immunol.148:1 - 31,1989）。

20

tea（T細胞早期活性化、T cell early activation）遺伝子（配列番号5）、たとえばクローン20.5（MacLeod et al.,J.Biol.Chem.1:271 - 279,1990）は、T細胞が活性化される間に誘導される多重貫膜タンパク質をコードする能力があるクローニングされた遺伝子、すなわちcDNAの最初の例である（Crabtree,Science 243:355 - 361,1989）。tea遺伝子の機能は、まだわかっていない。

20.5cDNA（配列番号5）の配列は、上述のマウスERRcDNAクローン（配列番号3）と、驚くほどの相同性を有していた（Rec - 1遺伝子）。レトロウイルスの結合ならびに感染に関する研究では、teaによってコードされるタンパク質が、ウイルス受容体として機能しているのか否かを決定する必要が生じている（Rein et al.,Virology 136:144 - 152,1984）。teaとERRは高度の相同性を有するものの、双方の遺伝子は、染色体上の位置も異なっているし、想定されるタンパク質生成物の組織での発現パターンも異なる。

30

遺伝子治療ならびに遺伝子の搬送

遺伝子の搬送を達成するうえで、比較的効率は良いものの、問題の多い手段の一つが、アンフォトロピックレトロウイルス依存性の遺伝子の搬送（Gilboa,E.,Bio - Essays 5:252 - 258,1987;Williams,D.A.et al.,Nature 310:476 - 480,1984;Weiss,R.A.et al.,RNA Tum or Viruses,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1985）である。組換え型のアンフォトロピックレトロウイルスが、ヒト細胞に遺伝子を搬送する際のベクターとして使用する可能性を有するものとして、研究されている（Cone,R.D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6349 - 6353,1984;Danos,O.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460 - 6464,1988）。こうした研究が行われるのは、この種のアンフォトロピックウイルス、たとえばマウスアンフォトロピックE - MuLVがヒト細胞に感染しうるからである。こうしたアプローチにつきものの、臨床展開を阻みかねない安全上の問題の一つが、複製能欠損性としたアンフォトロピックのレトロウイルスであっても、複製能を生じてしまうような組換えによって、野性型の変種を生じることがあるという事実である。こうした変化は、遺伝的な改変を意図していなかった細胞や組織にまで、レトロウイルスによる感染が拡大するといった事態を引き起こしかねない。その結果、全身性の疾患、たとえば癌をはじめとする病的状態が生じる可能性もあり、これは、アンフォトロピックウイル

40

50

スの核酸が、長末端反復の核酸とともに細胞内の重要な機能性遺伝子に挿入され、機能性遺伝子が破壊されて病的状態が生じることによるものである (Mulligan, R., Science, 1993)。本発明は、こうした必要性にこたえ、こうした問題を解決することをもめざすものである。

このように、既知のアンフォトロピックレトロウイルスを使用して異種遺伝子を真核細胞に導入するのに伴う問題を一つならず克服することが必要とされている。ウイルスと結合し、免疫原性、ならびにマウスアンフォトロピック組換え型ウイルスを使用した際に見られる非特異的な細胞との結合という問題を生じることなく診断ならびに治療の用途に使用することのできるヒトウイルス受容体タンパク質を提供することも必要とされている。

本明細書では種々の文献を引用しているが、引用した文献が、本出願の請求の範囲のいずれかの特許性と格別の関連を有する従来技術あるいは考慮材料であるということではない。引用した文献の内容や日付けについての記載は、本出願の出願時に本出願人が有していた情報に基づくものであって、それらの記載が正確であると確言するわけではない。

発明の開示

本発明は、関連背景技術の欠陥を一つならず克服することを意図するものである。

本発明は、治療および/または診断上の効果を有する核酸を標的細胞まで運搬しうる、安全性および/または選択性が向上し、核酸が非特異的に細胞に組みこまれたり、付随したりすることの少ない、新規かつ/または優れた遺伝子治療の方法を提供することも意図するものである。

本発明では、こうした選択的な遺伝子治療を、選ばれた標的細胞に付随している可能性のある本発明のキメラ受容体ポリペプチドに結合しうるウイルス結合ドメインを有するベクターを使用することによって提供するものである。標的細胞は、キメラ受容体ポリペプチドが付随することによって、標的細胞の種以外の種のウイルス結合ドメインにとって選択性となっている。この変異型受容体ポリペプチドは、第一の種である標的細胞と同じ種のウイルス受容体の結合部位を有しており、この結合は、第一の種以外の種に特異的なウイルスとも結合するよう改変されている。

本発明は、少なくとも第一の種に特異的なウイルスの受容体の結合部分に対応し、第一の種以外の種に特異的なウイルスによる結合および/または感染、あるいは、少なくとも、第一の種以外の種に特異的なウイルスの外膜のタンパク質 (env) の結合性ドメインによる結合を許容するよう改変されているキメラ受容体ポリペプチドも提供せんとするものである。キメラ受容体ポリペプチドのアミノ酸配列で、キメラ受容体ポリペプチドのウイルス受容体の結合部位の改変部分を含むアミノ酸配列を、キメラ受容体の結合部位と称するものとする。この配列の使用は、その起源にかかわらず、キメラ受容体の概念で具体化されるものとする。

また、キメラ受容体ポリペプチドは、第一の種以外の種に特異的なウイルスのウイルス受容体結合部位の少なくとも1個のアミノ酸に対応する少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を生じるよう改変された第一種ウイルス受容体の結合部位の配列も含むことができるものである。こうした置換、欠失あるいは付加によって、キメラ受容体ポリペプチドの、第一の種以外の種に特異的なウイルスのenv結合性ドメインに結合する能力が付与されるのである。第一の種は、ヒト、霊長類、あるいはげっ歯類の種から選ぶのが好ましい。

キメラ受容体ポリペプチドは、単離、精製された、組換え型および/または有機合成ポリペプチドとして提供されるものである。したがって、得られたキメラ受容体ポリペプチド、あるいは、そうしたキメラ受容体ポリペプチドがその表面に発現あるいは付随しているキメラ受容体細胞は、第一の種以外の種に特異的なウイルスあるいはその結合性ドメインによって、インビボ、インシチュ、あるいはインビトロで結合および/または感染されうるものである。

したがって、本発明は、本明細書に提示する教示内容ならびに指針にもとづいて、過度の実験をおこなわなくても実施することのできる、すべての化合物、組成物、ならびにこの種のキメラ受容体ポリペプチドを製造ならびに使用する方法を包含するものである。

10

20

30

40

50

さらに、本発明のキメラ受容体ポリペプチドは、診断、研究あるいは治療、たとえばヒトの遺伝子治療あるいは癌の治療あるいは診断などの用途で、キメラ受容体ポリペプチドのキメラ受容体結合部位がその表面に発現あるいは付随している細胞を選択的に標的とする際に使用することも意図するものである。なお、用途はこれらに限定されるものではない。

本発明の一つの観点では、キメラ受容体ポリペプチドは、第一の種以外の種に特異的なウイルス、あるいはそのenv結合性ドメインを、キメラ受容体ポリペプチドが発現あるいは付随している標的細胞に対して選択的に結合させる際に使用することができる。第一の種以外の種に特異的なウイルス、あるいはそのenv結合ドメインを含む複合物は、標的細胞特異的な運搬ベクターとして、少なくとも1種の診断薬あるいは治療薬を、標的細胞ある

10

いは組織に運搬する際に使用することができる。
本発明は、この種のキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸、および/またはこの種のキメラ受容体ポリペプチドを発現する細胞あるいは組織を提供することも意図するものである。

このように、本発明は、関連技術での種々のアプローチと比べて安全性が改善されていると評価される、1種以上の治療薬および/または診断薬を含む運搬ベクター、たとえば遺伝子治療に適したベクターを提供することを意図するものである。特に、本発明は、キメラ受容体細胞である標的細胞、あるいは細胞表面キメラ受容体ポリペプチドを発現している組織とのみ実質的に結合する、治療薬および/または診断薬用の物質を細胞あるいは組織特異的運搬ベクターの使用を可能とするものである。この運搬ベクターは、非標的細胞ある

20

いは組織に対する結合性および/または感染性が実質的に低減しているか、実質的にない。
本発明は、第一の種のキメラ受容体細胞に付随する、すなわち、第一の種のキメラ受容体細胞表面上での、キメラ受容体ポリペプチドの過渡的あるいは構成的な発現を使用することによって、真核生物、たとえば哺乳動物、鳥類、昆虫、あるいは酵母の選ばれた細胞ある

いは組織に対する、インビトロ、インシチュ、あるいはインビボでの遺伝子治療を提供することも意図するものである。こうしたキメラ受容体細胞あるいは組織は、第一の種以外の種に特異的なウイルスベクター、あるいはそのenv結合ドメインによる排他的な感染、あるいは結合に対して感受性となっているのである。

非ヒト特異的ウイルスベクターあるいは結合部位の感染によって、遺伝子、たとえば治療用遺伝子が、インビボ、インシチュ、あるいはインビトロで、選ばれた細胞あるいは組織に安定的に組みこまれ、この選ばれた細胞あるいは組織によって、標的細胞あるいは組織

30

に対する所望の効果を有する遺伝子生成物が発現されることになる。
本発明は、非標的細胞がウイルスベクターに感染したり、そして/またはウイルスベクターと結合したりすることが実質的にないか、実質的に少ない、特定の標的細胞あるいは組織に対する遺伝子治療を提供することも意図するものである。

本発明は、さらに、遺伝子治療の治療薬の運搬に使用するウイルスベクターが、複製可能な状態、あるいはウイルスにパッケージングされうる状態に復帰したり組みかわったりすることが実質的にないか、実質的に少ない遺伝子治療を提供することも意図している。標的細胞は、本発明のキメラ受容体ポリペプチドを発現しうるか、伴いうるものである。

40

本発明は、インビボ、インシチュ、あるいはインビトロで、ヒト細胞あるいは組織のレトロウイルスによる感染を抑制する際に使用することのできるキメラ受容体ポリペプチド、あるいはレトロウイルスポリペプチドを提供することも意図するものである。
本発明は、本発明の受容体ポリペプチドを使用して、ウイルス感染症、たとえばレトロウイルス感染症(たとえばHIV)を予防あるいは治療する方法も提供するものである。なお、適用症例は、これらに限定されるものではない。

本発明は、H13分子、あるいはH13アミノ酸配列あるいはその突然変異体に実質的に対応する配列、あるいはH13アミノ酸配列あるいはその突然変異体から本質的になる配列をコードするヌクレオチド配列を含む、組換え型の核酸(配列番号8)も提供するものであり、

50

ここで核酸は、DNAあるいはRNAから構成される。

当業者であれば、以下の詳細な説明から、本発明の上記以外の目的、特徴、ならびに利点を理解しうるはずである。以下の詳細な説明ならびに特定の実施例は、本発明の好適な実施態様を示すものではないと理解されたい。本発明の精神から逸脱することなく、本発明の範囲内で多くの変更ならびに改変を行うことができ、本発明は、こうした改変をすべて包含するものである。

【図面の簡単な説明】

図1は、コード配列および非コード配列を含むH13の核酸配列（配列番号7）、ならびにH13タンパク質の想定されるタンパク質配列（配列番号8）を示すものである。

10

図2は、H13の一方の鎖とERRのcDNA配列（それぞれ、配列番号7ならびに3）を並列させた模式図を示すものである。配列の分析は、ジェネティクス・コンピュータ・グループ（Genetics Computer Group）の配列解析用ソフトウェア・パッケージ（Devereux, J. et al., Nucl. Acids. Res. 12:387 - 395, 1984）を使用して行った。

図3は、H13, ERR、ならびにTEAの想定アミノ酸配列を並列させて示すものである。縦線は、配列が相同であることを示す。点1つは、配列が相同でないことを示し、点2つは、同類アミノ酸置換を示す。配列は、図2と同様にして分析した。括弧内に示すのは、細胞外ドメイン3（残基210 - 249）、ならびに細胞外ドメイン4（残基310 - 337）に対応するH13の配列である。

図4は、EcoR Iで消化したヒト（CCL120、CCL119、SupT1、H9、MOLT4）、ハムスター（CH0 - K1）、およびマウス（Balb/c胸腺細胞あるいはBIOT6R）由来の核酸を、マウスERRのcDNAのKpn I - Kpn I断片（390bp）でプロービングしたものの、ハイブリダイゼーションパターンのオートラジオグラムを示す。

20

図5は、H13のcDNA（配列番号1）を有する種々の種から得た核酸をサザンプロットで分析した際のオートラジオグラムを示す。ハイブリダイズした核酸は、EcoR Iで消化したヒト（CCL120、CCL119、SupT1、H9、MOLT4）、ハムスター（CH0 - K1）、およびマウス胸腺細胞（Balb/cあるいはBIOT6R）由来の核酸である。

図6は、H13遺伝子の発現のオートラジオグラムを示す。図に示すヒト株化細胞由来のRNAを、H13のcDNA（配列番号1）とハイブリダイズさせた。

図7は、ヒト（CEM、H9、MOLT4、SupT1、CCL120、CCL119）、ハムスター（CHOK1）、およびマウス（RL）由来のRNAを、マウスERRcDNAのKpn I - Kpn I断片（390bp）でプロービングしたものの、ハイブリダイゼーションパターンのオートラジオグラムを示す。

30

図8は、耐性細胞をERRのcDNAでトランスフェクションすることによって、マウスエコロトピックレトロウイルスによる感染に対する感受性が獲得されたことを例証するノーザンプロットを示す。ERRのcDNAをハムスターのCHOK1細胞にトランスフェクションした後、マウスレトロウイルス受容体遺伝子を発現しているトランスフェクション生成物に、マウス放射線白血病ウイルス（RadLV）を感染させた。2週間後に、ウイルスプローブを使用してノーザンプロットによる分析を行い、細胞上清の逆転写酵素（RT）活性を測定した。

図9は、H13、ERR、ならびにTEAの想定タンパク質の親水性をプロットしたものである。縦軸は、PEPTIDESTRUCTUREプログラム（たとえば、Jameson et al., CABIOS 4:181 - 186, 1988を参照のこと）で得られた親水性の値を示す。

40

図10は、H13の想定タンパク質の抗原性を示すグラフを示すものであり、H13想定タンパク質の抗原性の分析に際しては、PEPTIDESTRUCTURETMプログラムを使用した。抗原性の高いペプチド部分の1つ（アミノ酸残基309 - 367）は、図14に示すAcc I - EcoR I断片を使用することによって調製した。

図11は、H13タンパク質をグルタチオン - S - トランスフェラーゼ（GST）とともに含む融合タンパク質が合成されていることを示す、SDS - PAGEのオートラジオグラムを示す。融合タンパク質は、H13のcDNAの180bpのAcc I - EcoR I断片を、抗原を融合タンパク質として発現するプラスミドpGEX - 2Tにライゲーションし、イソプロピル - β - チオガラクトピラノシド（IPTG）を加えることによって誘導し、グルタチオン - セファロースクロマトグ

50

ラフィーを使用することによって精製することによって生成した。

図12AおよびBは、H13遺伝子の、ヒト染色体13への遺伝的マッピングを示す。オートラジオグラム(図12A)は、ヒト-ハムスター体細胞雑種からのEcoR Iで消化した核酸を、H13 cDNA(配列番号1)でプロービングしたもののハイブリダイゼーションパターンを示す。レーン1ならびに11は、それぞれ、ヒトならびにハムスターの核酸を含むものである。レーン2-10は、図12Bの表に記載した染色体から誘導した核酸を含むものである。

図13は、H13遺伝子、ERR遺伝子、ならびにH13遺伝子とERR遺伝子の間の4種のキメラ構築物の遺伝的構造の模式図である。各種の構築物によってトランスフェクションされたヒト細胞に対して、E-MuLVが感染性を有していることも示唆されている。

図14は、H13ならびにERRの、細胞外ドメイン3と称する領域の配列(ヌクレオチド配列ならびにアミノ酸配列)を比較したものを示す(配列番号7、配列番号8、ならびに図1の一部としても示してある)。受容体タンパク質のこの領域は、ヒトの配列とマウスの配列が最も異なっている領域である。配列は、ジェネティクス・コンピュータ・グループ(Genetics Computer Group)の配列解析用ソフトウェア・パッケージ(たとえば、Devereux, J. et al., Nucl. Acids. Res. 12:387-395, 1984を参照のこと)を使用して並列させた。

図15は、H13の配列を決定する際に使用したいくつかのcDNAクロンの模式図を示す。相同なマウスERRとの間の一般的な構造上の関係も、これらのcDNAクロンを用いて決定したものである。クローン7-2(H13.7-2)は、完全なH13の核酸配列の一部を示す。このクローンが、配列を決定した最初のH13のクローンで、配列番号1ならびに配列番号2が得られた。クローン1-1(H13.1-1)ならびにクローン3-2(H13.3-2)は、それぞれ、H13の配列の一部を含んでいる。これらの3つのクローンを組み合わせて配列を決定したところ、H13全体の核酸配列ならびにアミノ酸配列(それぞれ、配列番号7および配列番号8)が得られた。

図16は、細胞外ドメイン3および4の模式図を示す。図中、*印は、MuLV-Eによる感染の際に必須のアミノ酸を含む位置を示す。マウス-ヒトキメラ受容体分子(キメラI-II)は、マウスERRならびにヒトH13の共通な制限部位を使用した置換によって調製し、そのMuLV-Eに対する受容体としての機能する能力は、組換え型MuLV-E、CRE/BAGピリオンを使用することによって測定した(たとえば、Price et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:156-160, 1987; Danos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 15:6460-6464, 1988を参照のこと)。図の上部の黒い四角は、ERRとH13の細胞外ドメインを示し(たとえば、Albritton et al., Cell 57:659-666, 1989; Yoshimoto et al., Virology 185:10-17, 1991を参照のこと)、細点ならびに斜線を付した棒は、それぞれERRならびにH13のヌクレオチド配列を示す。この図は、3回の異なった実験で得られた代表的な結果の一つである。

図17は、マウスERRとヒトH13の、細胞外ドメイン3ならびに4のヌクレオチド配列とアミノ酸配列とを比較したものを示す。両配列を並列させるにあたっては、ジェネティクス・コンピュータ・グループ(Genetics Computer Group)の配列解析用ソフトウェア・パッケージ(たとえば、Devereux, J. et al., Nucl. Acids. Res. 12:387-395, 1984を参照のこと)を使用した。必須のアミノ酸残基を特定するために、オリゴヌクレオチド依存性突然変異誘発を行って、四角で囲んで示した1ないし2個のアミノ酸の置換あるいは挿入を含む、13の別個の変異型ERR分子を生成した。

図18は、H13が、突然変異によって、MuLV-Eの受容体として機能する能力を獲得したことを例証する結果を示す。

図19は、受容体特異性を有するgp70のアミノ酸配列を、種々の白血病ウイルスの配列と並列させて示したものである。エコロトピックレトロウイルスの配列: Akv(8)、フレンドMLV(11)、モロニーMLV(12)。非エコロトピックレトロウイルスの配列: キセノトピックMLV NZB.1U6(2)、ポリトピックMCF247(2)、アンフォトロピックMLV 4070A(2)。(+) : アミノ酸同一性。(-) : 配列のギャップ。大文字: 同類アミノ酸置換。下側の事例: 非同類アミノ酸置換。数字は、gp70の配列でのアミノ酸の位置を示す。

図20は、エコロトピックのAkvと、アンフォトロピックのMLV 4070Aについて、N末端のenv領域のアミノ酸ならびに核酸を比較したものを示す。アンフォトロピックの配列には、

10

20

30

40

50

アミノ酸30個のギャップがある。ヌクレオチド配列、ならびに対応アミノ酸を示す。AKv配列(9):Genbankの受託番号V01164。アンフトロピックMLB4070(2):Genbankの受託番号mm469。上側の番号は、報告配列でのヌクレオチドの位置を示す。下側の番号は、アミノ酸の位置を示す(図4を参照のこと)。AKvのSma I制限部位、ならびにAmpho.Rsa I制限部位の位置も示す。PCRのプライマーに適したヌクレオチド配列を、矢印で示す。

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、遺伝子療法並びに特異性ウイルス、ウイルスベクター及び治療薬及び/又は診断薬の運搬ベクターに標的細胞特異的結合部位を与えることが発見されたキメラ受容体ポリペプチドに関する。本発明のかかるキメラ受容体ポリペプチドは、診断、研究及び遺伝子治療を含む治療的応用に用いることができ、この場合、かかるキメラ受容体ポリペプチドをそれらの表面上に有する標的細胞は、非ヒト特異性運搬ベクターにより独占的に及び/又は実質的に感染され得る。かくして、本発明は、非標的細胞の非特異的感染を起し易い既知のウイルスベクターを用いることに伴う1又は2以上の問題、並びにかかるウイルスベクターの複製コンピテンスへの逆突然変異又は突然変異を克服する。

本発明によれば、ヒト又は他の哺乳動物の細胞又は組織を、キメラ受容体ポリペプチドと会合するように又は一過的若しくは構成的にそれを発現するように、キメラ受容体細胞又は組織としてin vivo、in situ又はin vitroで処理することができる。かくして、かかるキメラ受容体細胞又は組織を有する動物又はヒト被験体を、本発明の細胞表面キメラ受容体ポリペプチドに結合するenv結合ドメインポリペプチドを更に含む治療薬及び/又は診断薬で、本発明の方法に従って治療又は診断することができる。

本発明の関係では、“キメラ受容体結合部位”又は“キメラ受容体”という用語は、改変された第一種ウイルス受容体結合部位であって、その改変が非第一種特異性ウイルス受容体結合部位から少なくとも2つのアミノ酸が置換、欠失又は付加されたキメラ受容体ポリペプチドから構成される受容体結合部位のことをいう。この少なくとも2つのアミノ酸欠失、置換又は付加は、非第一種特異性ウイルスの表面タンパク質のenv結合ドメインについてのキメラ受容体上に結合能力を付与する。好ましくは、この置換又は付加は、ERR、MuLV又はGALVの如き非ヒト特異性ウイルス受容体で置換されたヒトH13のドメイン3に対応する。好ましくは、この置換、欠失又は付加されたアミノ酸残基は、H13(配列番号:8)の残基200~280又は220~260、230~245又はそのうちのいずれかの範囲若しくは値の残基、例えば、以下の表1に示した置換と類似の残基に相当する。

“キメラ受容体細胞”又は“キメラ受容体組織”という用語は、キメラ受容体ポリペプチドをその細胞表面上に有するか又はキメラ受容体ポリペプチドと会合している結果、非第一種特異性ウイルス又はキメラ受容体ポリペプチドに特異的なenv結合ドメインが、このキメラ細胞又は組織にin vivo、in situ又はin vitroで結合できる、第一種の細胞又は組織のことをいう。好ましくは、このキメラ受容体ポリペプチドは、あるキメラ受容体ポリペプチドと会合した細胞特異性受容体を介してこのキメラ受容体細胞に会合してもよく、好ましくは、この組み合わせ体が、第一種特異性細胞型又は組織型に結合して、本発明のキメラ受容体細胞を提供する。他の好ましい態様においては、かかる会合は、少なくとも1つのキメラ受容体ポリペプチドのこの特異性細胞型又は組織型の組換え体発現によって与えられる。

本発明の関係で“会合”という用語は、共有結合、疎水/親水性相互作用、ファンデルワールス力、イオン対、リガンド-受容体相互作用、エピトープ-抗体結合部位相互作用、酵素-基質相互作用、リポソーム-疎水性相互作用、ヌクレオチド塩基対合、膜-疎水性相互作用及びそれに類したものの如きあらゆるタイプの共有又は非共有結合又は会合のことをいうが、これらに限定されない。

“キメラ受容体ポリペプチド”という用語は、ヒトウイルス受容体タンパク質又はそのコンセンサス配列に対応する少なくとも10アミノ酸のポリペプチドのことをいい、このキメラ受容体ポリペプチドは、10~700、10~100、10~50、10~30、20~30、20~40、40~60又はそのうちのいずれかの範囲若しくは値の如き非ヒト特異性ウイルスのenv結合ドメインに結合できるキメラ受容体結合部位を含有する。

10

20

30

40

50

一方、又は更に、本発明のキメラ受容体ポリペプチドを、第一種ウイルス受容体の対応するアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、83~85、87~90、93~95、97~98、又は99%又はそのうちのいずれかの範囲若しくは値の如き、81~99%又はそのうちのいずれかの範囲若しくは値）の相同性を有する少なくとも10残基のアミノ酸配列として、非第一種ウイルス受容体からのアミノ酸を含むように改変されかつ非第一種ウイルスのenvポリペプチドの結合ドメインに結合する生物活性を有するあらゆるエコトロピック又はアンフォトロピック第一種ウイルス受容体として定義することができる。好ましくは、この第一種がヒトであって第二種がげっ歯類であるか又はその逆である。そのような対応するヒトウイルス受容体配列の非限定的な例は、配列番号:8、例えば、配列番号:8の10~629アミノ酸又はそのうちのいずれかの値若しくは範囲に対応するものである。

10

一方又は更に、本発明のキメラ受容体ポリペプチドは、第一種ウイルス受容体タンパク質の少なくとも1~20の膜貫通ドメインに対応し、その対応する第一種ウイルス受容体に少なくとも80%（80~100%又はそのうちのいずれかの範囲若しくは値の如き）相同性である疎水性アミノ酸配列を更に含んでもよい。かかる膜貫通ドメインは、既に記載されたもの、例えば、ヒトH13配列（配列番号:8）又は14の潜在的な膜貫通ドメインを有するマウスERR（配列番号:4）（例えば、アイゼンベルグ（Eisenberg）ら、*J.Mol.Biol.*,179:125-142（1984））に類似するものであってもよく、例えば、そこに又はここに参考として引用されている既知の方法による疎水性プロット法を用いて確認することができる。

ヒトウイルス受容体としての第一種ウイルス受容体の非限定的な例は、ヒトH13タンパク質（配列番号:8）であり、本発明によるH13ポリペプチドとして、例えば、いずれも場合

20

もここで参考として引用されるような既知の方法に従って精製され又は化学的に合成され又は組換え法で産生されたものの如き天然に存在しない形で得ることができる。本発明のキメラ受容体ポリペプチドのそのような非限定的な例は、例えば、非限定的な例であるE-MuLV、gp-70又はERR受容体タンパク質（配列番号:4）の如き非ヒト特異性ウイルスに結合する能力を与えるように改変された少なくとも10アミノ酸の改変ヒトH13アミノ酸配列（例えば、配列番号:8の如き）であってよい。かかる改変は、好ましくは、ヒトウイルス受容体配列の受容体結合部位において、H13内の対応する部位内のマウスERRアミノ酸の如き少なくとも1つの非ヒトウイルス受容体アミノ酸による置換を含んでもよく、キメラ受容体ポリペプチドを有するヒト又は非マウス標的細胞、好ましくはヒト細胞の、E-MuLVの如きウイルス又はレトロウイルスでの感染を可能にする。

30

かくして、更なる非限定的な副次的例として、ヒト又は非マウス細胞にE-MuLV感染感受性を付与するには、H13のドメイン3の対応するE-MuLV受容体アミノ酸残基を置換するのが好ましい。ドメイン3は、位置210~250に数残基を含む（配列番号:7）。好ましい置換は、ERRの対応するドメインからの1~10アミノ酸残基又はそのうちの幾つか又はいずれかの範囲での、アミノ酸残基210~242（配列番号:4）の置換、好ましくはアミノ酸238、239及び242の置換、より好ましくは少なくとも242を置換することである。1~4残基の置換が好ましい。例えば、H13の細胞外ドメイン3とERR内で相違する残基及び位置を以下の表1に掲げる。より好ましい態様においては、これは図18に示すように、H13（配列番号:8）の少なくともPro242をTyrで置換し、Gly240とVal244（配列番号:8）の少なくとも1つをそれぞれValとGluで置換する。更に、好ましくは、H13アミノ酸239の少なくとも1つを対応するERRアミノ酸233で置換してもよい。

40

表 1

H13細胞外ドメイン3とドメイン4におけるE-MuLV結合のための置換の好例

ドメイン3

もとのH13		置換用ERR	
残基		残基	
V	214	I	214
E	222	K	222
E	223	N	223
G	225	S	225
L	233	N	227
E	239	N	232
P	242	Y	235
V	244	E	237

10

20

本発明によるキメラ受容体ポリペプチドの非限定的な例には、Tyr242、Phe242及び/又はTrp242、及びVal1240、Met240、Leu240、Ile240、Glu244、Gln244、Asp244、又はAsn244のうち少なくとも1つ；及びAsn239、Asp239、Glu239又はGln239（配列番号：3）が含まれ得るが、H13（配列番号：8）の少なくともPro242をTyrで置換し、そしてGly240とVal244（配列番号：8）の少なくとも1つをそれぞれValとGluで置換する。

30

H13のウィルス結合特異性を改変するためのもう1つの手段は、ERRの残基に対応しないH13内の1又は2以上の“余分な”アミノ酸残基を欠失させることによるものである。好ましい欠失（細胞外ドメイン4内での）は、H13位置326～331（配列番号：1）からの1～6残基の欠失、最も好ましくは、これら6残基全ての欠失である。

本発明のキメラ受容体ポリペプチドのもう1つの非限定的な例では、非ヒトウィルスのenv結合ドメインに結合するヒト細胞の結合能力を付与するH13キメラ受容体ポリペプチドを提供することができる。その場合、かかる結合能力を付与するために、H13の1～30アミノ酸をERRからの対応するアミノ酸によって置換、欠失又は修飾する。好ましくは、そのようなキメラ受容体ポリペプチドは、H13ポリペプチド（配列番号：8）の少なくともPro242がTyrで置換され、そしてGly240とVal244（配列番号：8）の少なくとも1つがそれぞれValとGluで置換されたペプチド、又はH13のアミノ酸配列に実質的に一致するアミノ酸配列を有するフラグメントを含み、その結果、得られるキメラ受容体は、他のヒト又は非マウス細胞型若しくは組織型を感染することができないマウスエコトロピックレトロウィルスにより選択的に結合される。

40

また、H13に対応するアンフォトロピック第一種ウィルス受容体の同種キメラ受容体ポリペプチドを同じように改変して、非第一種特異性アンフォトロピックウィルスの、例えばキメラ受容体細胞又は組織への結合をできるようにしてもよい。好ましくは、その第一種はヒト又はげっ歯類である。

ここに記載した全ての用途のための類似の生物活性を有する、H13又はキメラ受容体ポリペプチドの可溶型、並びにそれらの機能性誘導體も含まれる。キメラ受容体又はそのキメ

50

ラ受容体から誘導したH13ポリペプチド又はH13転写産物それぞれの全ての活性型、及びH13様活性を有する全ての突然変異体も意図されている。

正常では膜貫通タンパク質である受容体の可溶型を作る方法は当該技術分野で知られている(例えば、スミス(Smith, D.H.)ら, Science, 238:1704 - 1707 (1987); フィッシャー(Fisher, R.A.)ら, Nature, 331:76 - 78 (1988); ハッセイ(Hussey, R.E.)ら, Nature, 331:78 - 81 (1988); デーン(Deen, K.C.)ら, Nature, 331:82 - 84 (1988); トラウネッカー(Trauneker, A.)ら, Nature, 331:84 - 86 (1988); ゲルシヨニ(Gershoni, J.M.)ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:4087 - 4089 (1988)を参照のこと、これら文献は参照によってここに組み入れられるものとする)。かかる方法は、一般に、受容体タンパク質をコードする核酸のトランケーションに基づくものであって、膜貫通部分を排除して無傷のレトロウイルス又はレトロウイルスタンパク質若しくは糖タンパク質の如き特異性リガンドと相互作用できる1つ(又は複数)の細胞外ドメインを無傷で残すものである。本発明のためには、可溶性キメラ受容体ポリペプチド又はH13ポリペプチドが、ウイルスへの結合を可能にするキメラ受容体又はH13の結合部位の要素を含むことが重要である。キメラ受容体ポリペプチド又はH13ポリペプチドは多くのアミノ酸残基を有するが、2~15、又は3~5、6~9若しくは10~15の如きそのうちのいずれかの値若しくは範囲の如き1又は2又はそれ以上だけがウイルス認識及び結合に決定的に関与している。

ここで説明するように、本発明のH13タンパク質又はキメラ受容体ポリペプチドを、ドラッグデザインのために、例えば、免疫原性を低減するために、溶解性促進又は運搬増進のために、又はクリアランス若しくは分解を阻止するために、既知の方法に従って更に改変してもよい。更なる態様においては、本発明は、本発明のキメラ受容体ポリペプチドの突然変異タンパク質を提供する。“突然変異タンパク質”により、H13タンパク質又はキメラ受容体ポリペプチドの“フラグメント”、“変異体”又は“化学誘導体”が意味される。突然変異タンパク質は、本発明によりその利用が可能となるH13タンパク質の機能の少なくとも一部を保持している。

H13タンパク質又はキメラ受容体ポリペプチドの“フラグメント”は、この分子のあらゆるサブセット、即ち、より短いペプチドである。

H13キメラ受容体ポリペプチドの“突然変異タンパク質”とは、この全縁ペプチド又はそのフラグメントのいずれかに実質的に類似する分子のことをいう。突然変異タンパク質は、当該技術分野で周知の方法を用いて、直接化学合成法又は突然変異誘発法を含む突然変異タンパク質の組換え産生法によって都合良く調製することができる。例えば、サムブルーク(Sambrook)の前記文献、アウスベル(Ausubel)の前記文献、コリガン(Coligan)の前記文献を参照のこと。

また、H13又はキメラ受容体ポリペプチドの突然変異タンパク質は、この合成されたペプチドをコードする核酸内の突然変異によって調製することができる。かかる突然変異体には、例えば、ここに示したアミノ酸配列内の残基の欠失体、又は挿入体又は置換体が含まれる。最終構築体が所望の活性を有することを条件として、欠失、挿入及び置換のあらゆる組み合わせを用いて最終構築体に到達することもできる。明らかに、突然変異タンパク質ペプチドをコードする核酸内で行われる突然変異は、そのリーディングフレームを変化させてはならず、そして好ましくは第二mRNA構造をもたらし得る相補的領域を作り出さないであろう(例えば、ヨーロッパ特許公報EP75,444を参照のこと)。

遺伝子レベルでは、これら突然変異タンパク質は、通常、このペプチド分子をコードする核酸内のヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発(アデルマン(Adelman)ら, DNA 2:183 (1983)又はアウスベルの前記文献、サムブルークの前記文献又はコリガンら編, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Association and Wiley Intersciences N.Y., (1992,1993)により例示されている)を行い、それによってこの突然変異体をコードする核酸を作成した後、組換え細胞培養でこの核酸を発現することによって調製される。突然変異タンパク質は、典型的には、キメラペプチドと同質の生物活性を示す。

特に、ERRの如き他の非ヒト又は非動物特異性ウイルスから誘導した決定的なアミノ酸残基を有するキメラ受容体ポリペプチド又はH13ポリペプチドを、部位特異的突然変異誘発

10

20

30

40

50

法を用いて作ってもよい。

突然変異タンパク質のもう1つのグループは、このタンパク質分子内の少なくとも1つ、好ましくは唯1つだけのアミノ酸残基が除去されて異なる残基がその場所に挿入されたものである。タンパク質化学及び構造の詳細な説明については、シュルツ (Schulz, G.E.) から、Principles of Protein Structure, Springer - Verlag, New York, 1978、及びクレイトン (Creighton, T.E.)、Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983を参照のこと。なお、これらは参照により全体がここに組み入れられるものとする。本発明のタンパク質又はペプチド分子内に行うことができる置換のタイプは、シュルツらの前記文献の表1～2及びクレイトンらの前記文献の図3～9に示されたものの如き、異なる種の同種タンパク質間のアミノ酸置換の頻度の分析に基づくと
10
ことができる。そのような分析に基づけば、保存的置換は、ここでは次の5グループのうちの1グループ内での交換として定義される。

1. 小さい脂肪族の非極性又は僅かに極性の残基: ala, ser, thr (pro, gly) ;
2. 極性で負に荷電した残基及びそれらのアミド: asp, asn, glu, gln;
3. 極性で正に荷電した残基: his, arg, lys;
4. 大きい脂肪族の非極性残基: met, leu, ile, val (cys) ; 及び
5. 大きい芳香族残基: phe, tyr, trp.

機能的又は免疫学的特性の実質的な変化は、上記の5グループ内というよりもむしろ5グループ間の置換の如きあまり保存的ではない置換を選択することによってなされる。それら置換により、(a) その置換域内のペプチド主鎖の構造、例えば、シート又はヘリックスコンフォメーションのような構造の維持、(b) 標的部位における分子の電荷又は疎水性の維持、又は(c) 側鎖の嵩高さの維持へのそれらの効果がより有意に異なるであろう。かかる置換の例は、(a) gly及び/又はproの他のアミノ酸による置換又はgly若しくはproの欠失又は挿入; (b) 親水性残基、例えば、ser又はthrの、疎水性残基、例えば、leu, ile, phe, val又はalaに代わる(又はそれによる)置換; (c) cys残基の、他のいずれかの残基に代わる(又はそれによる)置換; (d) 電気的に正の側鎖を有する残基、例えば、lys, arg又はhisの、電気的に負の電荷を有する残基、例えば、glu又はaspに代わる(又はそれによる)置換; (e) 嵩高い側鎖を有する残基、例えば、pheの、そのような側鎖を有さない残基、例えば、glyに代わる(又はそれによる)置換である。
20

本発明による殆どの欠失及び挿入、及び置換は、そのタンパク質又はペプチド分子の特性に根本的な変化をもたらさないものである。しかしながら、置換、欠失又は挿入をするより先にそうすることの正確な効果を予見することが困難な場合には、当業者は、その効果が日常的なスクリーニング検定法、つまり免疫学的検定法又は生物学的検定法により評価されることが理解できるであろう。例えば、突然変異タンパク質は、典型的には、そのペプチド分子をコードする核酸の部位特異的突然変異誘発、その突然変異型核酸の組換え細胞培養での発現、及び随意であるが例えばカラムで(少なくとも1つのエピトープに結合することによってこの突然変異タンパク質を吸着するための)特異性抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーによるこの細胞培養物からの精製により作られる。
30

H13若しくはキメラ受容体ポリペプチドを含有する細胞溶解産物の活性、又はH13若しくはキメラ受容体の精製試料の活性は、所望の特性に適するスクリーニング検定法でスクリーニングすることができる。例えば、このタンパク質分子の所与の抗体への結合性の如き免疫学的特性の変化は、(ここに記載するような)競合型免疫学的検定法によって測定することができる。生物活性は、ここに記載したように、ウィルス感染性の如き適切な生物学的検定法でスクリーニングされる。
40

酸化還元又は熱安定性、疎水性、タンパク質分解への感受性又はキャリアーと若しくは多量体に凝集する傾向の如きペプチド特性の変更は、当業者に周知の方法によって検定される。

更に、本発明によるキメラ受容体ポリペプチドのアミノ酸の修飾アミノ酸又は化学的誘導体が提供され得るので、このポリペプチドは、正常ではこのタンパク質の一部ではない追加の化学部分又は修飾アミノ酸を含有する。かくして、本発明の範囲内には、このペプチ
50

ドの共有結合修飾体が含まれる。かかる修飾は、キメラ受容体ポリペプチドの標的アミノ酸残基を、選択した側鎖又は末端残基と反応することのできる有機誘導化剤と反応させることによってこのポリペプチド内に導入することができる。

二官能性物質での誘導化は、このペプチドを既知の方法に従って非水溶性支持マトリックス又は他の高分子キャリアーに架橋するのに有用である。普通に用いられる架橋剤には、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-ヒドロキシコハク酸イミドエステル、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(コハク酸イミジルプロピオネート)の如きジコハク酸イミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、及びビス-N-マレイミド-1,8-オクタン(の如き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の如き誘導化剤は、光の存在下で架橋を形成することのできる光活性化中間体を生成する。また、臭化シアン活性炭水化物の如き反応性非水溶性マトリックス及び米国特許第3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;及び4,330,440号(これらは参照により全体がここに組み入れられるものとする)に記載された反応性基質をタンパク質固定化に用いてもよい。

本発明のキメラ受容体ポリペプチドの他の修飾には、既知の方法による、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化(クレイトン, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983))、N-末端アミンのアセチル化、及びある場合にはC-末端カルボキシル基のアミド化が含まれ得る。

かかる誘導化された部分は、溶解性、吸収性、生物学的半減期及びそれに類したものを向上させ得る。キメラ受容体ポリペプチドのかかる部分又は修飾は、一方では、そのタンパク質及びそれに類したものの望ましくない副作用を排除又は弱め得る。かかる作用を媒介することができる部分が、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed, Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)に開示されている。

キメラ受容体ポリペプチドのかかる化学誘導体も、精製、抗体の生成又はクローニングのために;又はキメラ受容体ポリペプチド、それに対する抗体又はそのフラグメントを含む治療性組成物にとって望ましい、酵素的分解に対する抵抗性又は結合親和性の増加又はキメラ受容体ポリペプチドの変調の如き物性の変更のために、固体支持体に付着させることができる。かかるペプチド誘導体、並びにかかる誘導体を作る方法は、当該技術分野で知られている。

“単離された又は組換えH13ポリペプチド”とは、配列番号:8のアミノ酸配列の少なくとも10アミノ酸部分と実質的に一致するか、又は本質的にその部分からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、HIVenv結合ドメインの如きレトロウィルスに結合するポリペプチドのことをいう。キメラ受容体ポリペプチド又はH13タンパク質のアミノ酸配列に“実質的に一致する”とは、そのタンパク質分子の可溶性部分内の少なくとも1アミノ酸残基が除去されてその場所に異なる残基が挿入されたアミノ酸配列のことをいう。その置換の数は比較的小さいので、ここに記載するように十分に特徴付けられ又は保存的である。

キメラ受容体ポリペプチド又はH13ポリペプチドを作る方法

この発明の好ましい用途は、化学合成又は組換え核酸法によって単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチド又はそれらのフラグメントを作ることである。この場合、これらのフラグメントは、できるだけ小さいものであるが、非ヒト特異性レトロウィルス又はHIVへの結合に依然として十分に高い親和性を保持しているものである。H13の好ましいフラグメントには、ここに示したように細胞外ドメイン3が含まれる。

ウィルス受容体としてのその機能のために、本発明のH13の細胞外フラグメント又はキメラ受容体ポリペプチドは、それぞれヒト又は非ヒト特異性ウィルスに結合することができる。このペプチドのより小さなフラグメントを作ることにより、当業者は、既知の結合及

10

20

30

40

50

び阻害検定法を用いて、ここに示した教示及び指針に基づき、過度の実験をすることなしに、十分に高い親和性でウィルス又はレトロウィルスの結合ドメインに結合して感染力を抑制することのできる最小のペプチドを容易に同定することができるであろう。短いペプチドは大きなタンパク質よりも2つの利点、即ち、(1)より大きい安定性と拡散性、及び(2)より少ない免疫原性、を有していると考えられる。

非限定的な例として、マウスERR配列からのアミノ酸残基の存在のために、本発明の突然変異型キメラ受容体ポリペプチドは、この受容体を発現するヒト細胞又は他の非マウス細胞に、マウスE-MuLV又はHuLVの如き非ヒト特異性ウィルスにより感染される能力を与える。なお、この非ヒト特異性ウィルスは、複製コンピテント型への逆突然変異の可能性を低減するために修飾されていてもよい。

10

ウィルス受容体の1又は2以上のアミノ酸残基の適切な置換によって、ここに示した教示及び指針に基づき、過度の実験をすることなしに、本発明のキメラ受容体ポリペプチドを得ることができる。

本発明は、MuLV又はHuLVの如きレトロウィルス及びアデノウィルスを含む、類似の受容体特異性を有するあらゆる非ヒトエコトロピック又はアンフォトロピックウィルスへのキメラ受容体ポリペプチドの結合を包含することも意図している。

当業者は、ここに示した教示及び指針に基づき、過度の実験をすることなしに、あらゆる種又は細胞型から本発明のキメラ受容体ポリペプチドの獲得に用いるのに適するウィルス受容体をコードする核酸をどのように得るかを決定することができるであろう。かかる操作の非限定的な例として、最初に、興味の対象である種又は細胞型のcDNAライブラリー、例えば、ヒトT細胞cDNAライブラリーを(当該技術分野で日常的に行われる方法を用いて)H13の如きヒトウィルス受容体の配列に基づくプローブを用いてスクリーニングすることになる。次に、ハイブリダイズする核酸をクローン化及び配列決定して“新規な”レトロウィルス受容体の配列を得ることになる。目視検査により又は(ここに記載したような)コンピュータープログラムで、その新規なレトロウィルス受容体タンパク質の配列がERR又はH13と異なっている領域を同定することが可能である。特に、H13の細胞外ドメイン領域3又は類似するドメインに対応するドメインに注目することになる。

20

認められた配列相違点に基づき、ここに示した教示を用いて、その新規な受容体と既知受容体とのキメラ受容体を作り出されるような1又は2以上のアミノ酸置換を有する配列を作成することが可能である。次いで、このキメラ受容体を選び抜きの細胞内で発現して、慣用的なウィルス結合検定法又はウィルス感染力検定法を用いてその機能を容易に試験することができる。

30

更には、本発明によれば、マウス白血病ウィルスの如きウィルスの外膜糖タンパク質内の受容体選択決定基の知見に基づきウィルスの受容体付着部位を修飾して、それがその本来の受容体に結合しないように、又は異なる受容体に結合するようにすることが可能である。例えば、バッチニ(Battini)ら、*J.Virology*, 66(3):1468-1475(1992)を参照のこと。

例えば、HIV-1の結合を阻止するためにHIV-1 CD4-結合ドメインの配列を変化させると、このウィルスはCD4保有細胞に対し非感染性になるであろう。対応する変化をH13に導入でき、そうすれば、この突然変異型HIVはそれに結合するであろう。このようにして、適切な変異型受容体を保有する細胞を選択するためにだけ結合するがHIV-1の正常な標的には結合しない安全なHIV試料を生じさせることができる。

40

同じ細胞の表面上に2以上の無傷又は突然変異型ウィルス受容体ポリペプチドを発現させることも本発明の範囲に属する。かくして、第1発現キメラ受容体ポリペプチド、例えば、ERRによって、ヒト細胞を1つのウィルス株で*in vitro*で一過的に感染させることができ、そしてサイトカイン成長又は分化因子の適切な使用によって操作することができる。かかる細胞をレシピエントに導入してもよい。望ましい時期に、第2発現キメラ受容体ポリペプチドに結合する第2ウィルスをその個体に導入して、第2レトロウィルス受容体を保有するそれら導入細胞だけを安定に感染させそして変化させることができる。

H13配列の一部分に相当するオリゴヌクレオチド(配列番号:2)は、同種遺伝子の存在の

50

スクリーニング及びかかる遺伝子のクローニングに有用である。かかるオリゴヌクレオチドを合成する技術は、例えば、ウー (Wu, R) ら, *Prog. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.*, 21:101 - 141 (1978) ; アウスベルらの下記文献 ; サムブルークの下記文献 ; ベラガジェ (Belagaje, R) ら, *J. Biol. Chem.*, 254:5765 - 5780 (1979) ; *Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression*, ニエルリッヒ (Nierlich, D.P.) ら編, Acad Press, NY (1976) 中のマニアチス (Maniatis, T) らの報文 ; ウーら, *Prog. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.*, 21:101 - 141 (1978) ; コーラマ (Khorana, R.G.) , *Science*, 203:614 - 625 (1979) により開示されている。更に、DNA合成は、自動合成装置を用いて行うことができる。DNAハイブリダイゼーションの技術は、サムブルークらの前記文献及びハイメス (Haymes, B.D.) ら (*DNA Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985) 中の報文) により開示されている。なお、これら文献は参照によってここに組み入れられるものとする。上記の如き技術又はそれに類似の技術は、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (スー (Hsu, L.C.) ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:3771 - 3775 (1985))、フィブロネクチン (スズキら, *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 4:2519 - 2524 (1985)) の遺伝子、ヒトエストロゲン受容体遺伝子 (ウォルター (Walter, P.) ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:7889 - 7893 (1985))、組織型プラスミノゲン活性化因子 (ペニカ (Pennica, D.) ら, *Nature*, 301:214 - 221 (1983)) 及びヒト出産予定時期胎盤アルカリ性ホスファターゼ (相補的DNA (カム (Kam, W.) ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:8715 - 8719 (1985)) のクローニングをうまくできるようにした。

H13遺伝子、受容体突然変異体又はその相当物をクローニングする別の方法では、(H13、受容体突然変異体又はその相当物を発現することができる細胞からの) DNA又は、より好ましくは、cDNAを発現ベクター内にクローニングすることにより発現ベクターのライブラリーを調製する。次いで、そのライブラリーを、抗H13、抗突然変異体又は抗相当物抗体に結合し、かつH13、受容体突然変異体又はその相当タンパク質若しくはペプチド、又はそのフラグメントと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができるヌクレオチド配列を有するタンパク質を発現することができるメンバーについてスクリーニングする。

本発明のH13、受容体突然変異体又はその相当物、つまりポリペプチド若しくはタンパク質をコードする核酸配列、又はその機能性誘導体を、連結のための平滑末端又は粘着末端、適切な末端を得るための制限酵素消化、適切な場合の粘着末端のfilling in、望ましくない接合を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、及び適切なりガーゼでの連結を含む慣用的技術に従って、ベクターDNAで組み換え、そして適切な宿主細胞内で発現させることができる。かかる操作法は、サムブルークらの前記文献により開示されており、また当該技術分野において周知である。

原核細胞内での適切な発現には、遺伝子コーディング配列の上流でのリボソーム結合部位の存在も必要である。かかるリボソーム結合部位は、例えば、ゴールド (Gold, L) ら, *Ann Rev. Microbiol.*, 35:365 - 404 (1981) により開示されている。

真核性宿主には、in vivo又は組織培養でのいずれかの酵母、昆虫、真菌、及び哺乳動物細胞が含まれる。哺乳動物細胞では、タンパク質分子は、正確なフォールディング又は正確な部位でのグリコシル化を含む翻訳後修飾に付される。宿主として有用であり得る哺乳動物細胞には、VERO又はCHOの如き線維芽細胞起源の細胞又はハイブリドーマSP2/O - Ag14若しくはマウスメラノーマP3 - X63Ag8の如きリンパ球起源の細胞、及びそれらの誘導体が含まれる。好ましい哺乳動物細胞は、遺伝的に欠損のある細胞の機能をin vivoで置き換えるよう意図された細胞である。骨髄幹細胞は、造血又は免疫系の障害の遺伝子治療に好ましい。

哺乳動物細胞宿主については、多くの可能なベクター系が単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの発現に利用可能である。宿主の性質に依り、幅広い種々の転写及び翻訳調節配列を用いることができる。これら転写及び翻訳調節シグナルは、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、シミアンウイルス又はそれに類したものの如きウイルス性供給源から誘導することができる。この場合、調節シグナルは、高レ

10

20

30

40

50

ベルの発現を有する特定の遺伝子に関係する。また、アクチン、コラーゲン、ミオシンの如き哺乳動物発現産物からのプロモーターが、タンパク質産生を促進する。生きている昆虫を用いる場合、現時点では蚕の幼虫及びバキュロウィルスベクターが本発明による大規模単独キメラ受容体ポリペプチド又は複数キメラ受容体ポリペプチド産生に好ましい宿主である。例えば、アウスベルの下記文献、サンプルークの前記文献を参照のこと。

望ましい場合は、発現した単独キメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドを、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、電気泳動、又はそれらに類したものの如き慣用的条件に従って単離及び精製してもよい。例えば、細胞を遠心分離によって又は適当な緩衝剤で採集し、溶解し、そして、例えば、DEAE-セルロース、ホスホセルロース、ポリリボシチジル酸-アガロース、ヒドロキシアパタイトでのカラムクロマトグラフィーによって又は電気泳動若しくはイムノプレシピテーションによってタンパク質を単離することができる。また、ERR由来アミノ酸置換を含有するタンパク質と依然として反応する抗受容体ポリペプチド抗体の如き特異性抗体を用いることによって、キメラ受容体タンパク質を単離することができる。かかる抗体は、周知の方法により得ることができる。

更には、本発明の遺伝子構築体を操作すると、単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの膜貫通及び細胞質内部分上に特定のウィルス結合ドメインを移植できるか、又は別の分子の膜貫通及び細胞質内部分上に単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドのレトロウィルス受容体結合ドメインを移植でき、更に別のタイプのキメラ分子にすることができる。

キメラ受容体細胞又は組織の調製

本発明は、レトロウィルス感染の如き与えられた非ヒトウィルスのenv結合ドメインによる結合を受け易いヒト又はその他の真核細胞又は組織を与える方法にも関する。

この方法は、随意に、まず、真核細胞又は組織を、キメラ受容体ポリペプチドをコードする発現可能な核酸で、*in vitro*、*in vivo*又は*in situ*で形質転換して、非特異性ウィルスの細胞外ウィルスenv結合ドメインに結合することができるキメラ受容体ポリペプチドを発現できる組換えキメラ受容体細胞又は組織を作ることを含む。

組換えDNA法の一般的原理を述べた標準的な文献には、ワトソン (Watson, J.D.) ら, *Molecular Biology of the Gene, Volumes I and II, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., publisher, Menlo Park, CA (1987)*; ダーネル (Darnell, J.E.) ら, *Molecular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., publisher, New York, N.Y. (1986)*; レビン (Lewin, B.M.) , *Genes II, John Wiley & Sons, publisher, New York, N.Y. (1985)*; オールド (Old, R.W.) ら, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, 2d edition, University of California Press, publisher, Berkeley, CA (1981)*; サンプルークら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)*; 及びアウスベルら, *Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1993)* が含まれる。これら文献は参照によってその全体がここに組み入れられるものとする。

そのような方法においては、次のものから選択される1種により*in vivo*形質転換を行うのが好ましい、即ち、既知の方法による、組織又は細胞内への突然変異型核酸の注入; 組織又は細胞に特異的な少なくとも1つの組織特異的調節配列の制御下で突然変異型核酸を含む組換えレトロウィルスを用いるレトロウィルス感染; 組織又は細胞への突然変異型核酸のリボソーム運搬; 組織又は細胞への突然変異型核酸の抗体運搬; 又は突然変異型核酸に接合した細胞又は組織特異性抗体の組織又は細胞との接触。

そのような方法においては、次のものから選択される1種により*in situ*又は*in vitro*形質転換を行うのが好ましい、即ち、既知の方法による、組織又は細胞内への突然変異型核酸の注入; 発現可能な形で突然変異型核酸を含む組換えレトロウィルスを用いるレトロウィルス感染; 突然変異型核酸のリボソーム運搬; 突然変異型核酸の抗体運搬; 突然変異型核酸での組織又は細胞の形質移入; 又は突然変異型核酸に接合した細胞又は組織特異性抗体の組織又は細胞との接触。ウィルスが組換えマウスエコトロピック又はハムスターアン

10

20

30

40

50

フォトロピックレトロウイルスであり、キメラ受容体ポリペプチドがここに示したキメラ受容体ポリペプチドであるのが更に好ましい。

本発明のキメラ受容体ポリペプチドは、幾つかの細胞型、特にTリンパ球及び単球ノマクロファージ系列の細胞内で膜内在性タンパク質 (integral membrane protein) として細胞表面上で発現され得る。これは、HIV - 1 及びHTLV - 1 の如き既知のヒトレトロウイルスの *in vitro* 向性 (tropism) と合致する。かくして、本発明のキメラ受容体ポリペプチドは、正常では非ヒト特異性ウイルス感染に抵抗性であるヒトにおけるこれら系列の細胞をかかると感染されるようにするであろう。

ERRタンパク質で行うよりも本発明のキメラ受容体ポリペプチド置換受容体で非マウス細胞を形質転換することの主要な利点は、免疫原性の大きな低下である。

他の態様においては、本発明は、ここに記載した方法により作られた修飾キメラ受容体細胞又は組織を包含する。この場合、真核細胞又は組織は、哺乳動物、昆虫、鳥類又は酵母起源から選択されるがこれらに限定されない。哺乳動物細胞又は組織がヒト、霊長類、ハムスター、ウサギ、げっ歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌ又はネコ起源のものであるのが好ましいが、他のあらゆる哺乳動物細胞を用いることができる。

トランスジェニック及びキメラ非ヒト哺乳動物

本発明は、ヒトレトロウイルス受容体として役立つことができる単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドをコードする本発明によるゲノミックDNAをその生殖細胞及び体細胞が含有するトランスジェニック非ヒト真核動物 (好ましくはマウスの如きげっ歯類) にも向けられている。単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチド核酸は、トランスジェニックにされるべき動物又はその動物の祖先に、胚形成期に、好ましくは一細胞期、又は受精した卵母細胞期に、一般には約8細胞期より遅くはない時期に導入される。ここで用いる“トランスジェニック”という用語は、動物のゲノム内に組み込まれそしてその動物内で発現され、そのトランスジェニック動物内にタンパク質を存在させる遺伝子を意味する。

そのような遺伝子を既知の方法に従って染色体に組み込んで発現させるために、動物胎児のゲノム内に導入することができる幾つかの手段がある。

全部よりも少ない桑実胚の細胞がトランスジェニック哺乳動物の作成プロセス中に形質移入されるときに作られる動物の如き、全部よりも少ない体細胞及び生殖細胞が本発明のキメラ受容体ポリペプチド又はキメラ受容体ポリペプチド核酸を含有するキメラ非ヒト哺乳動物も、本発明の範囲内になるよう意図されている。

移植したヒト細胞又は組織をその体内に有するキメラ非ヒト哺乳動物も本発明に包含される。この哺乳動物は、ヒト組織内でのキメラ受容体ポリペプチドの発現を試験するのに及び/又は本発明のキメラ受容体ポリペプチドに優先的に結合する運搬ベクターを伴った治療薬及び/又は診断薬の有効性を試験するのに用いることができる。キメラ非ヒト哺乳動物を得る方法は、例えば、米国特許出願第07/508,225、07/518,748、07/529,217、07/562,746、07/596,518、07/574,748、07/575,962、07/207,273、07/241,590及び07/137,173に示されている。なお、どのようにしてヒト細胞又は組織を非ヒト哺乳動物の体内に移植するかのもこれらの記載については、参照により全体がここに組み入れられるものとする。

トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作成についてレーダー (Leder) の米国特許第4,736,866号 (参照によりその全体がここに組み入れられるものとする) に記載された技術を、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作成に用いてもよい。パルミター (Palmiter, R.) ら, *Ann Rev. Genet.*, 20:465 - 99 (1986) に記載された種々の技術も用いることができる。なお、この全内容は、参照によりここに組み入れられるものとする。

ヒトレトロウイルス感染又はかかる感染の結果として起こる疾患を予防、抑制又は治癒することのできる化合物又は他の治療法を、細胞を感染するそれらレトロウイルスについて試験するために、単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドを受容体として用いて、キメラ受容体ポリペプチド又はキメラ受容体ポリペプチド遺伝子を保持する動物を用いることができる。これら試験は、この発明のトランスジェニック動物に与えられるウイルスの用量を調節することができるので、非常に感度が高くなり得る

10

20

30

40

50

。かかる動物は、同じヒトレトロウイルス疾患の診断法を試験するためのモデルとしても役立つであろう。かかる疾患には、エイズ、HTLV誘発白血病、及びそれに類したものが含まれるが、これらに限定されない。本発明によるトランスジェニック動物は、細胞培養用の細胞の供給源としても用いることができる。

本発明のトランスジェニック動物モデルは、ヒト免疫系の適当な細胞を有するそれぞれ別々のマウスを再集団化することが必要なためにかなり多くの時間と実験を要する“SCIDマウス”モデル(マクキュン(McCune, J.M.)ら, Science, 241:1632 - 1639 (1988))よりも大きな経済的利点を有している。

キメラ受容体又はH13特異性抗体及び方法

この発明は、単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドのエピトープに特異的な抗体にも向けられている。更なる態様においては、本発明の抗体は、レトロウイルス感染を予防又は治療するのに、細胞内の又は細胞若しくは組織抽出物内の又は体液内の単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの存在を検出するのに、又はその量若しくは濃度を測定するのに用いられる。一般的には、コリガン(Coligan)の前記文献及びハーロー(Harlow)の下記文献を参照のこと。

“抗体”という用語は、ハイブリドーマ、組換え法又は化学合成の如きあらゆる既知の方法によって与えられる、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、キメラ抗体、抗イデオタイプ(抗Id)抗体、及びそれらのフラグメントを含む。

抗体は、ある分子と特異的に反応し、それによってその分子をその抗体に結合させるのであれば、その分子と“結合することができる”と言われる。“エピトープ”という用語は、ある抗体により結合されることができそしてその抗体により認識されることもできるあらゆる分子の部分のことをいう。エピトープ又は“抗原決定基”は、通常、アミノ酸又は糖側鎖の如き分子の化学的に活性な表面群体からなり、特異的3次元構造特性並びに特異的荷電特性を有している。

“抗原”は、抗体により結合されることができ、更に動物がその抗原のエピトープに結合できる抗体を産生するのを誘発することができる分子又は分子の一部である。抗原は1つまたは2つ以上のエピトープを有しうる。上で言及した特異的反応は、抗原が高い選択性でその対応する抗体と反応するが、他の抗原により喚起され得る他の多数の抗体とは反応しないことを示そうとするのもである。

ポリクローナル抗体は、ある抗原で免疫感作された動物の血清から誘導される抗体分子の異種個体群である。

モノクローナル抗体は、特異性抗原に対する抗体の実質的に同種の個体群である。MAbは、当業者に知られている方法により得ることができる。例えば、コーラー(Kohler)とミルスタイン(Milstein), Nature, 256:495 - 497 (1975)及び米国特許第4,376,110号を参照のこと。また、例えば、アウスベルら編, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); 及びハーローとレーン(Lane), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); コリガンら編, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)を参照のこと。かかる抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、及びそれらのあらゆるサブクラスを含むあらゆるイムノグロブリンクラスのものであってもよい。この発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroでもin vivoでも培養することができる。in vivo産生での高力価mAbの産生は、これを現時点で好ましい産生方法にする。簡単に説明すると、個々のハイブリドーマからの細胞をプリスタン感作したBalb/cマウスに腹腔内注射して、高濃度の所望のmAbを含有する腹水を生成させる。当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を用いて、アイソタイプIgM又はIgGのmAbを、かかる腹水から、又は培養上澄み液から精製することができる。

キメラ抗体は、マウスmAb由来の変部とヒトイムノグロブリン不変部とを有するものの如き、その異なる部分が異なる動物種から誘導された分子である。キメラ抗体及びそれらの産生方法は当該技術分野で既知である(例えば、モリソン(Morrison)ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6851 - 6855 (1984); ヌーバーガー(Neuberger)ら, Nature, 314:268

10

20

30

40

50

- 270 (1985) ; サン (Sun) ら ,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,84:214 - 218 (1987) ; ベター (Better) ら ,Science,240:1041 - 1043 (1988) ; ベター (Better,M.D.) 国際特許公開 W09107494を参照のこと、なお、これら文献は参照により全体がここに組み入れられるものとする)。

抗イディオタイプ (抗 Id) 抗体とは、ある抗体の抗原結合部位に広く関連する独特な決定基を認識する抗体である。Id抗体は、mAbの供給源と同じ種及び遺伝型 (例えば、マウス株) の動物を、それに対する抗 Idを調製しようとするmAbで免疫感作することによって調製することができる。免疫感作された動物は、その免疫感作抗体のイディオタイプ決定基を認識し、そしてこれらイディオタイプ決定基に対する抗体 (抗 Id抗体) を産生することによって応答するであろう。

10

抗 Id抗体を “免疫原” として用いて、更に他の動物に免疫応答を誘発させ、いわゆる抗抗 Id抗体を産生させることもできる。この抗抗 Id抗体は、抗 Idを誘発したもとのmAbに対して構造的類似性を有し得る。かくして、mAbのイディオタイプ決定基に対する抗体を用いることによって、特異性が同一の抗体を発現する他のクローンを同定することが可能である。

従って、本発明の単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドに対して生成したmAbを用いて、Balb/cマウスの如き適当な動物内で抗 Id抗体を誘発させることができる。かかる免疫感作マウスからの脾臓細胞は、抗 Id mAbを分泌する抗 Idハイブリドーマを産生させるために用いられる。更に、この抗 Id mAbをキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) の如きキャリアーにカップリングさせて、更なるBalb/cマウスを免疫感作するのに用いることができる。これらマウスからの血清は、キメラ受容体ポリペプチド又はキメラ受容体ポリペプチドエピトープに特異的なもとのmAbの結合特性を有する抗抗 Id抗体を含有するであろう。

20

かくして、抗 Id mAbは、単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドのエピトープの如き評価されるエピトープと構造的に類似するそれら自身のイディオタイプエピトープ又は “イディオタイプ” を有する。

上で示した “抗体” という用語は、無傷分子並びに例えばFab及びF(ab')₂ の如き抗原と結合できるそのフラグメントの両方を含めようとするものである。Fab及びF(ab')₂ フラグメントは、無傷抗体のFcフラグメントを欠いており、無傷抗体よりも急速に循環系から消え、そして無傷抗体よりも少ない非特異的組織結合性を有することができる (ウォール (Wahl) ら ,J.Nucl.Med.,24:316 - 325 (1983)) 。

30

抗体診断検定法

本発明に有用な抗体のFab及びF(ab')₂ 及びその他のフラグメントを、無傷抗体分子についてここに開示した方法に従って、単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの検出及び定量に用いることができるということが分かるであろう。かかるフラグメントは、典型的には、パパイン (Fabフラグメントを生成させる) 又はペプシン (F(ab')₂ フラグメントを生成させる) の如き酵素を用いるタンパク質分解によって作られる。

本発明の抗体、又は抗体のフラグメントは、それらの表面上又は細胞内で単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドを発現する細胞の存在を定量的に又は定性的に検出するのに用いることができる。これは、光学顕微鏡、フロー・サイトメトリ、又は蛍光光度検出法を結び付けた、蛍光標識抗体を用いる免疫蛍光法 (以下を参照のこと) によって行うことができる。

40

単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドのin situ検出のために、本発明の抗体を免疫蛍光法又は免疫電気顕微鏡法におけるように組織学に用いてもよい。そのような操作を用いることで、単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの存在のみならず、検査組織上でのその分布も測定することが可能になる。

更に、治療で用いた単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの存在及び量を追跡する手段の如き、本発明の抗体を用いて、生体サンプル中の可溶性

50

単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドの存在を検出することができる。

単独のキメラ受容体ポリペプチド又は複数のキメラ受容体ポリペプチドについてのかかる免疫検定法は、典型的には、体液、組織抽出物、採取したばかりのリンパ球又は白血球の如き細胞、又は組織培養液中でインキュベートした細胞の如き生体サンプルを、H13タンパク質を同定できる検出できるよう標識した抗体の存在下でインキュベートし、そして当該技術分野において周知の幾つかの技術のうちの一つによってその抗体を検出することを含む。

生体サンプルをニトロセルロースの如き固相支持体又はキャリアー（この用語はここでは相互に交換可能に用いられる）、又は細胞、細胞粒子又は可溶性タンパク質を免疫感作で
10
できる他の固体支持体で処理することができる。次いで、この支持体を適当な緩衝液で洗浄した後、検出できるよう標識した単独のキメラ受容体ポリペプチドに特異的な抗体又は複数のキメラ受容体ポリペプチドに特異的な抗体で処理することができる。次いで、この固相支持体を緩衝液で2回洗浄して未結合抗体を除去することができる。次いで、前記固体支持体上に結合した標識の量を、慣用的手段によって検出することができる。

“固相支持体”又は“キャリアー”により、抗原又は抗体に結合できるあらゆる支持体が意図される。周知の支持体、又はキャリアーには、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、及び磁鉄鉱が含まれる。

所与のロットの抗キメラ受容体ポリペプチド又は抗キメラ受容体ポリペプチド抗体の結合
20
活性は、周知の方法に従って測定することができる。当業者は、日常的な実験を用いることによって、それぞれの測定について効力がありかつ最適な検定条件下で測定できるであろう。

単独のキメラ受容体ポリペプチドに特異的な抗体又は複数のキメラ受容体ポリペプチドに特異的な抗体を検出できるよう標識できる1つの方法は、それを酵素に連結して、既知の方法による酵素免疫検定法（EIA）に用いることによる方法である。

検出は、Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology,ワーク（Work）ら、North Holland Publishing Company, New York（1978）、特にチャード（T.Chard）により“An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques”と題された章に関する如き、他の種々の免疫検定法のいずれかを用いて行うことができる。なお、上記
30
文献は参照により全体がここに組み入れられるものとする。

この抗体を蛍光化合物で標識することも可能である。

この抗体を¹⁵²Eu又はランタン系列のその他のものの如き蛍光放出性金属を用いて検出
30
できるよう標識することもできる。これら金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）又はエチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような金属キレート化群を用いて抗体に結合させることができる。

この抗体を化学発光性化合物にカップリングさせることによって検出できるよう標識
40
することもできる。次いで、この化学発光標識抗体の存在を、化学反応の間に発生するルミネセンスの存在を検出することによって測定する。特に有用な化学発光性標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマチック（theromatic）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルである。

同じく、生物発光性化合物を用いて本発明の抗体を標識してもよい。生物発光は、触媒性タンパク質が化学発光反応の効率を増加させる生物学的系内に見出される化学発光の1タイプである。生物発光性タンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することによって測定される。標識に重要な生物発光性化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。

本発明の抗体分子を“二部位（two site）”又は“サンドイッチ”検定法としても知られている免疫測定法での利用に適合させることができる。

典型的で好ましい免疫測定法には、固相に結合させた抗体を試験されるサンプルとまず接触させ、二成分の固相抗体-抗原複合体の形成によってそのサンプルから抗原を“抽出”
50

する“フォワード”検定法が含まれる。適当な時間インキュベーションした後、固体支持体を洗浄して、未反応抗原がもしあればそれを含む液体サンプルの残渣を除去してから、未知量の標識抗体（これは“受容体分子”として機能する）を含有する溶液と接触させる。未標識抗体を介して固体支持体に結合した抗原とこの標識抗体が複合化できる時間だけ2回目のインキュベーションをした後、固体支持体を2回洗浄して未反応の標識抗体を除去する。

本発明の抗原でやはり有用である他のタイプの“サンドイッチ”検定法では、いわゆる“同時”及び“リバース”検定法が用いられる。同時検定法は、固体支持体に結合した抗体及び標識抗体が両方とも、試験されるサンプルに同時に添加される単一のインキュベーション工程を包含する。インキュベーションが終わった後、固体支持体を洗浄して液体サンプルの残渣と未複合化標識抗体とを除去する。次いで、固体支持体と結合した標識抗体の存在を慣用的な“フォワード”サンドイッチ検定法の通りに測定する。

“リバース”検定法では、まず標識抗体の溶液を液体サンプルに段階的に添加してから、適当な時間インキュベーションした後、固体支持体に結合した未標識抗体を添加する。2回目のインキュベーション後に、慣用的なやり方で固相を洗浄して試験されるサンプルの残渣と未反応標識抗体の溶液とを除去する。次いで、固体支持体に結合した標識抗体の測定を“同時”及び“フォワード”検定法における通りに行う。

キメラ受容体及び／又はH13ポリペプチド及び／又はキメラ細胞又は組織を包含する治療及び診断方法

本発明により治療方法も提供される。その方法は、キメラ受容体ポリペプチドをコードする少なくとも1種の発現可能な核酸を有する組織又は細胞を、キメラ受容体ポリペプチドを発現するか又はそれが表面上に結合した細胞だけを認識する組換え非ヒト特異性レトロウイルスベクターによる感染に付するものであり、そのレトロウイルスベクターは、そのベクターの非ヒト特異性のために及び複製コンピテンスを提供するための復帰突然変異、突然変異又は組換え能力が比較的欠如しているために、他のヒト細胞を感染できない。本発明によれば、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸を有する組換えレトロウイルスにより感染させることによって、キメラ受容体ポリペプチドが標的細胞に選択的に会合できるか又は標的細胞上で発現される。この一時的及び／又は永久の会合が、特定の受容体を有する病的な細胞の如き標的細胞、並びに構成的にキメラ受容体ポリペプチドが発現される場合におけるかかる病的な細胞の子孫に、キメラ受容体ポリペプチドを選択的に曝

させるか又はそれを選択的に発現させる結果、本発明に従い、かかる標的細胞及び／又はそれらの子孫への治療薬の特異的運搬が可能となるのである。かくして、本発明により、キメラ受容体ポリペプチドを細胞表面受容体の如き標的細胞特異性細胞表面分子と一時的又は永久に会合させ、次いでこのキメラ受容体ポリペプチドと結合して標的細胞を感染する組換えレトロウイルスを投与することによる、特異型の標的細胞を（随意に組換え体、キメラ受容体ポリペプチドの染色体発現、それらの子孫で）マーキングする方法が提供される。感染性ウイルスベクターは、1又は2以上の機能を付与するあらゆる多様な治療用核酸又は治療性遺伝子を保持していてもよい。

1つの非限定的な例においては、キメラ受容体ポリペプチドを、抗体、リポソーム又は標的細胞特異性受容体リガンドの如き標的細胞特異性ベクターとの会合によって第一の種の標的細胞に特異的に運搬する。そうすると、このキメラ受容体ポリペプチドが標的細胞と十分な時間会合して、このキメラ受容体ポリペプチドと結合することができる第一の種以外の種に特異的なウイルスの受容体結合又はenvドメインと会合した治療薬又は診断薬を用いる治療又は診断が可能になる。こうして、治療性又は診断性核酸の如き治療薬又は診断薬が、標的細胞に優先的に運搬され、例えば、この核酸が標的細胞の染色体中に組み込まれる場合は、非標的細胞が排除される。

他の非限定的な例として、ウイルスベクターが細胞の中に修飾レトロウイルス受容体遺伝子を運べるかも知れない。標的細胞が感染されると、その標的細胞はキメラ受容体ポリペプチドをコードするDNAと一体となる。そうして、続いて標的及び細胞及び全ての子孫が標的細胞表面上でキメラ受容体ポリペプチドを発現するであろう。本発明に従ってキメラ

10

20

30

40

50

受容体ポリペプチドでかかる標的細胞及びそれらの子孫をマーキングすることにより、遺伝子治療を用いて病気を患っている動物被験体を治療することができる。この場合、遺伝子治療ベクターは、キメラ受容体ポリペプチドに特異的に結合して標的細胞に治療薬又は診断薬を運搬する。本発明のかかる方法を用いると、非特異性レトロウィルスベクター感染及び染色体内への遺伝子挿入の危険を実質的に低下させて又は低下させないで、特定の病気を治療することができる。

本発明によれば、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸を、特定のタイプの標的細胞に特異的な受容体に特異的に結合するポリペプチドをコードする配列と結合させる。組換え宿主内でそのような核酸を発現させると、治療的投与に適する融合タンパク質を回収可能な量で得られる。次いで、この薬学的に許容できる融合タンパク質を病気の被験体に投与することができる。そうすると、この融合タンパク質は標的細胞に特異的に結合して、本発明による非ヒト特異性ウィルスのenv結合ドメインとして作用するであろう。続いて、多様な遺伝子のいずれかをコードする核酸を有する非ヒト特異性ウィルスを投与すると、感染細胞に1又は2以上の機能を与えることができ、その細胞に正又は負の治療効果をもたらすであろう。

更なる非限定的な例として、ヒト腫瘍細胞表面受容体に特異的な抗体の抗体フラグメントへの融合タンパク質としてキメラ受容体ポリペプチドを用いて、ヒト腫瘍を治療することができる。薬学的に許容できる形でのそのような融合タンパク質を動物モデル又はヒト被験者に投与して、キメラ受容体ポリペプチドをコードするDNAを有する非ヒト特異性レトロウィルスによる感染用に腫瘍細胞をマーキングする。この融合タンパク質が標的細胞としての腫瘍細胞に結合したら、第2段階はこのレトロウィルスの投与からなるものであって、腫瘍細胞に感染すると、その感染した腫瘍細胞のサブサル(subsall)並びにそれらの子孫によるキメラ受容体ポリペプチドの発現がもたらされる。腫瘍細胞がキメラ受容体ポリペプチドを構成的に発現すると、実質的に非標的細胞に感染することなしに遺伝子治療を安全に用いて、標的細胞としての腫瘍細胞に治療薬を運搬することができる。しかしながら、この細胞が第2段階を介してこの受容体を発現する必要はない。事実、第2段階は、当業者によって決定されるときは、全体として省略してもよい。

非限定的な副次的例として、ヒト腫瘍細胞に特異的なB3抗体フラグメントを用いて融合タンパク質と遺伝子治療を提供することができる。この場合、特異性病細胞特異性抗体又は結合タンパク質は、まず融合タンパク質として発現され、(a)病的細胞に結合して、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸を有する非ヒト特異性ウィルスによるin vitro及びin vivoでの感染を可能にする結果、そのウィルス感染病的細胞の表面上でキメラ受容体ポリペプチドが発現され、(b)キメラ受容体ポリペプチドに結合する運搬ベクターとしてのenv結合ドメインと会合した少なくとも1種の治療薬により、ウィルス感染標的細胞がin vitro及びin vivoで死滅する。好ましくは、既知の方法に従い、ヒトの臨床治療の前に動物モデル系を用いてもよい。

エコトロピック又はアンフォトロピックウィルスの如き組換え非ヒト特異性ウィルスにより感染されることになる動物又はヒトの細胞若しくは組織へのキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸の選択的導入は、既知の方法に従って行うことができる。非限定的な例には、(幹細胞又は間質細胞のような)骨髄細胞、白血球、及び分化した又は分化していない顆粒球、単球、マクロファージ、リンパ球、赤血球、巨核球、中枢神経系の細胞、及び神経組織の如き組織細胞、肝細胞、腎細胞、筋肉細胞、心臓細胞又は心筋細胞、動脈又は静脈細胞又は組織、眼細胞、結合組織又は細胞、肺組織又は細胞、脾臓細胞又は組織、内分泌組織又は細胞、CSF、又は中枢神経系の細胞の如きヒト細胞又は組織の、キメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸でのin vitro形質転換、その後のヒト被験者内への再導入；又はキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸の、筋肉、心臓、肝臓、腎臓、脳、神経、脾臓、膵臓、精巣、卵巣、脳下垂体、視床下部、胆嚢、眼、肺、又は骨髄の如き組織内へのin vivo又はin situでの直接注射が含まれる。

かくして、本発明の一側面においては、少なくとも1種の治療薬又は診断薬をキメラ受容体保有細胞又は組織に移す方法が提供される。この方法は、本発明によるキメラ受容体細

10

20

30

40

50

胞又は組織を得ること及びそのキメラ受容体細胞又は組織を、非ヒトウイルスのenv結合ドメイン及び少なくとも1種の治療薬又は診断薬を含む運搬ベクターとin vitro、in vivo又はin situで接触させることを含む。その結果、この運搬ベクターがキメラ修飾細胞に結合して、その治療薬又は診断薬がそのキメラ受容体細胞に治療又は診断効果をもたらす。

治療薬又は診断薬は、本発明の方法に従い、キメラ受容体細胞又は組織としての標的細胞に、このキメラ受容体細胞上で細胞外発現されるキメラ受容体ポリペプチドのキメラ受容体に特異的であるウイルス外膜タンパク質のenv結合ドメインを含む運搬ベクターによって選択的に運搬される。

運搬ベクター

運搬ベクターは、ウィルスベクター、リポソーム、又は診断薬若しくは治療薬と会合したenv結合ドメインの複合体であってもよい。

運搬ベクターは、更に、その運搬ベクターの標的細胞としてのキメラ受容体細胞に治療又は診断効果をもたらす何らかの診断薬又は治療薬を含んでもよい。

診断薬又は治療薬

診断薬又は治療薬は、核酸、化合物、タンパク質、元素、脂質、抗体、サッカライド、アイソトープ、炭水化物、画像形成剤、リポタンパク質、糖タンパク質、酵素、検出可能なプローブ、及び抗体又はそのフラグメント、又はそれらの組み合わせから選択される少なくとも一種であってもよいが、これらに限定されない。なお、抗体の標識については、ここに記載したようにして、検出できるように標識することができる。かかる標識には、酵素標識、ラジオアイソトープ又は放射性化合物又は元素、蛍光化合物又は金属、化学発光性化合物及び生物発光性化合物が含まれるが、これらに限定されない。また、本発明の方法では、他のあらゆる既知診断薬又は治療薬を用いることができる。

治療薬の標的細胞

本発明で用いる治療薬は、キメラ受容体細胞としての標的細胞への治療効果を有することができるが、その効果は、欠損遺伝子又はタンパク質の矯正、薬物作用、毒性効果、成長刺激効果、成長抑制効果、代謝効果、異化作用、同化効果、抗ウイルス効果、抗菌効果、ホルモン効果、神経液性効果、細胞分化刺激効果、細胞分化抑制効果、神経修飾効果、抗新生物効果、抗腫瘍効果、インシュリン刺激又は抑制効果、骨髄刺激効果、多能性幹細胞刺激効果、免疫系刺激効果、及び本発明による運搬ベクターを介してキメラ受容体細胞に運搬される治療薬によって与えられ得る他のあらゆる既知の治療効果から選ばれるが、これらに限定されない。

治療用核酸

治療薬としての治療用核酸は、キメラ受容体細胞に次の治療効果のうちの少なくとも1種を有することができるが、これらに限定されない：DNA配列の転写を抑制すること；RNA配列の翻訳を抑制すること；RNA又はDNA配列の逆転写を抑制すること；タンパク質の翻訳後修飾を抑制すること；DNA配列の転写を誘発すること；RNA配列の翻訳を誘発すること；RNA又はDNA配列の逆転写を誘発すること；タンパク質の翻訳後修飾を誘発すること；RNAのような核酸の転写；タンパク質又は酵素のような核酸の翻訳；及び治療用核酸の構成的又は一過発現のためのキメラ受容体細胞の染色体への核酸の組み込み。

治療効果

かかる治療効果は、アンチセンスANA又はDNAの如き欠損遺伝子の消去又はその発現のプロセッシング；ウイルス複製又は合成の抑制；治療用タンパク質をコードする異種核酸の発現又は欠損タンパク質の矯正のような遺伝子治療；hnRNA、mRNA、tRNA、又はrRNAの如きRNAの欠損体又は不十分発現体の修飾；ドラッグ若しくはプロドラッグ、又はキメラ受容体を発現する病的又は正常細胞内でドラッグ又はプロドラッグとしての化合物を生成する酵素をコードすること；チミジンキナーゼ水痘-帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ（VZV TK）（例えば、フーバー（Huber）ら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,88:8039-8042（1992）を参照のこと、なお、この全内容はそこでの引用文献を含めて参照により組み入れられるものとする）を新生物細胞の如き病的細胞内でコードして、かかる病的細胞を直接又は間

10

20

30

40

50

接に死滅させること；及び他のあらゆる既知の治療効果を含むことができるが、これらに限定されない。かくして、上記の如き変異型核酸を遺伝子治療に用いることができる。病的細胞への運搬のために既知のあらゆる毒素、プロドラッグ又はドラッグ遺伝子をコードするか又は治療効果を提供する本発明の治療用核酸は、新生物細胞の如き病的細胞に特異的な組織特異的転写調節配列（TRS）（ - 胎児性タンパク質TRS又は肝臓関連アルブミンTRSを含む）（例えば、ダイナン（Dyan）とチアン（Tjian）, Nature (London) 316:774 - 778 (1985) を参照のこと）の制御の下で遺伝子を含むこともできる。かかるTRSは、本発明のキメラ受容体ポリペプチドを発現する癌細胞のような標的細胞内の細胞死滅性毒素、ドラッグ又はプロドラッグの発現を更に制限するであろう。

キメラ受容体細胞内に運搬されて発現される本発明の治療用核酸の更なる例は、脳腫瘍細胞の如き真核性デバイディング（dividing）細胞を選択的に死滅させるチミジンキナーゼをコードする治療用核酸である。なお、この腫瘍細胞を囲む脳細胞はデバイディングではない。従って、キメラ受容体ポリペプチドをコードする本発明の核酸を脳細胞に注射し、又はその核酸で脳細胞を形質移入又は *in vivo* でウィルスベクター形質転換した後に、チミジンキナーゼをコードする組換えエコトロピックレトロウィルスでそのキメラ受容体脳腫瘍細胞を治療処理すると、その脳腫瘍細胞がチミジンキナーゼの発現によって選択的に死滅するであろう。例えば、アンダーソン（F. Anderson）ら, Science, June, 1992 を参照のこと。

また、疾患に対し高い罹患率をもたらす異常H13分子を、変異型H13タンパク質の如きキメラ受容体ポリペプチドで形質移入された所望の系列の細胞（例えば、造血幹細胞）の注入によって、その注入された細胞が内因性の細胞個体群と優先的に置き換わるような条件下で置き換えてもよい。

本発明の方法では、運搬ベクターが組換え非ヒト特異性ウィルスであるのが好ましい。そうすれば、その非ヒト特異性ウィルスのキメラ受容体細胞又は組織への結合が、その修飾受容体細胞の感染とキメラ受容体細胞内の治療用核酸の治療効果をもたらす。他の好ましい態様においては、運搬ベクターが、リンカーによって治療薬又は診断薬に結合して、その結合又は接触が所望の治療的又は診断効果をもたらす、非ヒト特異性 *env* 結合ドメインを含む複合融合タンパク質又はそれをコードする核酸を含む。なお他の好ましい態様においては、運搬ベクターは、*env* 結合ドメインと治療薬を含有するリボソームを更に含んでもよい。そうすれば、*env* 結合ドメインがキメラ受容体細胞のキメラ受容体結合部位と結合できる。

他の好ましい態様においては、運搬ベクターのキメラ受容体細胞又は組織との接触が、治療用核酸の治療的有効量の発現産物を発現するキメラ受容体細胞又は組織をもたらすことができる。

他の好ましい態様においては、治療用核酸は、キメラ受容体含有細胞又は組織を選択的に死滅させるように作用する毒素をコードする。病的細胞は癌細胞であってもよい。他の態様においては、治療用核酸は、上皮増殖因子、インターロイキン - 2、インターロイキン - 4、インターロイキン - 6、組織増殖因子 - 、インシュリン増殖因子 - 1、又は線維芽細胞増殖因子から選択される増殖因子を更にコードしてもよい。

毒素は、精製されても又は組換え型毒素であってもよく、又は、例えば、リシン、シュードモナス解毒素、ジフテリア毒素、内毒素、毒液毒素、及びそれらに類したものの少なくとも1種から選択された毒素の少なくとも1つの機能性細胞毒性ドメインを含む毒素フラグメントであってもよい。

治療用核酸は、キメラ受容体細胞又は組織内での異常タンパク質の発現を遮断するように作用する単鎖リボソーム阻害性タンパク質から選択された少なくとも1メンバー；サイトカイン；又は増殖因子をコードしてもよい。

本発明の他の側面によれば、細胞毒性又は化学療法性物質を、標的キメラ受容体細胞としての病的細胞に優先的に結合する、*env* 結合ドメインを有する運搬ベクターに又は抗体若しくはそのフラグメント又は増殖因子に直接に結合させてもよい。このタイプの治療のための標的は、増殖因子受容体、分化抗原、又は他の病的細胞と特異的に会合した他のあま

10

20

30

40

50

り特徴付けされていない細胞表面抗原であってもよい。今日では、多くの癌は、オンコ遺伝子として又はオートクリン (autocrine) な様式で癌細胞の増殖を促進するよう機能できる増殖因子受容体を過剰産生することが確認されている (パスタン (Pastane) とフィツゲラルド (Fitzgerald), 1991; ベル (Velu) ら, 1987; カワノら; 1988; ヘルストロム (Hellstrom) & ヘルストロム, 1989)。例えば、上皮増殖因子受容体は、多くの扁平上皮細胞及び類表皮癌、グリア芽細胞腫、及び幾つかの転移性卵巣及び膀胱癌に大量に存在する (細胞当たり 3×10^6 受容体まで) (ヘンダー (Hender) ら, 1984; ジョーンズ (Jones) ら, 1990; ラウ (Lau) ら, 1988)。対照的に、正常細胞は、細胞当たりより少ない量を含むに過ぎない (デュン (Dunn) ら, 1986)。他の例では、インターロイキン - 2 (IL - 2) 受容体が、正常T細胞におけるよりも成人T細胞白血病の患者の細胞上に相当多くの数

10

で存在する (ATL; 細胞当たり 3×10^4 受容体)。Bリンパ球の如き正常細胞上に存在する他の分化抗原も、B細胞リンパ腫の如き腫瘍細胞上に存在することが多い。かかる抗原はB細胞を産生する幹細胞上に存在しないので、標的療法によって死滅させられるあらゆる成熟B細胞は、幹細胞個体群から置き換えられるであろうが、一方、癌細胞は置き換えられないであろう (ゲティー (Ghetie) ら, 1988)。最後に、その機能が未だ分かっていない癌細胞上で優先的に発現される抗原がある。癌胎児性抗原 (CEA) (ムラロ (Muraro) ら, 1985) の如きこれらの幾つかのものは、胎児性抗原であって、正常成人組織上に存在しないか又は少量だけ存在するかのいずれかである。このグループは、モノクローナル抗体とのそれらの反応性によって規定されるに過ぎない未知の起源の抗原も含有する (フラインケル (Fraenkel) ら, 1985; バルキ (Varki) ら, 1984; ウィリンガム (Willingham) ら, 1987)。

20

本発明の治療用又は診断用運搬ベクターの成分として用いることができる単鎖抗原結合タンパク質は、それらの大きさが小さいために臨床応用において数多くの利点を有している。これらタンパク質は、モノクローナル抗体又はFabフラグメントよりも速く血清から除去される。それらは細胞受容体により認識される抗体のFc部分を欠いているので、それらは画像形成に応用した場合のバックグラウンドが低く、免疫原性も低い。それらは、モノクローナル抗体よりも良好に固体腫瘍を取り囲む微小循環に浸透するとも考えられる。そのような治療用運搬ベクターでは、治療薬は毒素又は毒素フラグメント若しくはドメインであり、リシン、シュードモナス・エキソ毒素、ジフテリア毒素、チミジンキナーゼ、及びそれらに類したものの少なくとも1つから選択された毒素の少なくとも1種の機能性

30

in vivo遺伝子治療にとってより安全なベクターの獲得

in vivo遺伝子治療処理の安全限界を高めるのに用いることができる3つの異なる手段を使用することが、本発明により提供される。これら手段は：(a) 異なるパッケージング細胞株の使用；(b) アンフォトロピックよりもむしろエコトロピックを基礎とするベクターの使用；及び(c) in vivoでレトロウィルスベクターの標的を所望の細胞個体群に設定する方法を提供することである。

40

(a) 異なるパッケージング細胞株の使用

背景：

アンフォトロピックウィルスを基礎とするベクターを退かせることの安全性に関する問題は、高力価エコトロピックレトロウィルスベクターの産生のための新規な系を発見する動機を提供してきた。この戦略は、ヒト細胞はハムスター白血病ウィルスにより感染され得ないという事実 (ステンバック (Stenback) ら, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122:1219 - 1223, 1966) に依拠している。ハムスター白血病ウィルスは、マウス、ラット、ネコ、サル及びヒト細胞を感染しようと試みたが失敗に終わったので、ハムスター細胞しか感染しないと報告されている (リーバー (Lieber) ら, Science, 182:56 - 58 1973)。ハムスター細胞でのマウスエコトロピックウィルスの複製も用いることができる。これは、マウス又は修

50

飾ヒトエコトロピック受容体をこれら細胞内に形質移入してから感染させることによって行われた。この戦略は、アンフォトロピックウィルスを複製するこれら細胞の天然の抵抗性を更に利用するものであり、これら細胞内でのマウスエコトロピックウィルス配列の増幅を繰り返すことによって高力価のエコトロピック発現を達成するものである。

関連する特定の方法

ベストウィック (Bestwick) ら (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,85:5404 - 5408,1988) のいわゆる “ピンポン” 戦略に実質的に手を加える。どつらもヒト細胞内で正常に複製することができない2種のレトロウィルスを用いる。 - HaLVを発現し; マウスエコトロピックウィルス受容体を安定に発現するチャイニーズハムスター細胞 (細胞株A) を用いてヘルパーウィルスを得、そして - エコトロピックMuLVを発現するがマウスエコトロピックウィルス受容体を発現しない第2チャイニーズハムスター細胞 (細胞株B) と共に同時培養する。このように細胞株A内で増殖したウィルスは、HaLV受容体を介して細胞株Bに感染することができる。この細胞内で複製されたウィルスは、マウスエコトロピックgp70を有し、そして細胞株Aに感染することができる。このプロセスは、理論最大数 (約 $10^9 \sim 10^{10}$ PFU) の粒子の産生が達成されるまで続くと考えられる (ボディン (Bodine) ら, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,87:3738 - 3742,1990)。ここで説明するように、混合パッケージング系同時培養でのレトロウィルス配列の増幅は、組織培養時間で割った増加コピー数と関係することが分かった (ヘソルファー (Hesorffer) ら, Hematology/Oncology Clinic of North America 5:423 - 432,1991)。更に、レトロウィルスベクターDNAは、それが細胞中に形質移入されたときは、プロウィルス組み込み後に得られるレベルに比較して相対的に発現が乏しいようなので (ベストウィックら, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,85:5404 - 5408,1988; ヒュアング (Huang) とギルボア (Gilboa), J.Virol.,50:417 - 424,1984)、このアプローチは好ましい。

このアプローチに従えば、ゲノム内に組み込まれた多コピーのエコトロピックウィルス配列を含有し、そして少なくとも約 $10^7 \sim 10^{10}$ 、好ましくは約 $10^9 \sim 10^{10}$ を産生するチャイニーズハムスター細胞株が提供されるが、それらのウィルス受容体が本発明に従って修飾されなければ、組換えで又は他の方法でヒト細胞に感染できる粒子は産生されない。この結果が得られたことを確認するために、ウィルス感染性を検出するために普通に用いられる種々のヒト及びマウス細胞株で適切なウィルス感染性検定を行う。このアプローチは、これまで利用可能であったよりも遙に安全なパッケージング系を生み出すと考えられる。HaLVをクローン化してそのパッケージングシグナル内に欠失を生じさせる。パッケージングシグナルの除去は、既知の方法に従って得ることができる。次に、CHOハムスター細胞内へのマウスエコトロピックウィルス受容体の形質移入及び安定発現を既知の方法、例えば、ヨシモトら (1993) に記載されたような方法に従って行う。随意に、クローン化したヘルパーウィルスを追加の安全性のためのスプリットゲノム (split genome) としてこれら細胞内に導入してもよい。マウスエコトロピックウィルスヘルパーの場合、パッケージング配列の134塩基対が欠失したエコトロピックモロニーマウス白血病ウィルスに相当する3P0プラスミドから誘導したプラスミドpgag-polgpt及びpenvは、商業的供給機関から又はここに示した公表された研究者から容易に得ることができる。かかるプラスミドをうまく用いて、アンスプリット (unsplit) ヘルパーウィルスゲノムを用いるものよりも幾分高い安全性を有するPCLを生成させた。

HaLVをクローン化するために、既知の操作、例えば、組換え型チャイニーズハムスター卵巣細胞株からの欠損レトロウィルス粒子のクローニングに類似するアンダーソンら (1992) の操作を用いる。例えば、かかるクローンは、アンダーソンによって同定されたpCH0C.ML10配列又は内因性のポリトロピックマウス白血病ウィルス (MuLV) 分離株、MX27 (ストイ (Stoye) 及びコフィン (Coffin), 1987) を含む。後者のプローブは、完全9.3kbプロウィルスゲノムを包含する12.3kbマウスゲノミックフラグメントからなる。ハムスターC型関連配列をlgt10内の粒子RNAのランダムにプライムしたcDNAから単離する。後者のプローブを用いる場合、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションを用いて興味の対象であるブランクを同定する。細胞外粒子は、培養液組換え型CHO細胞サブクローン、3 - 300

10

20

30

40

50

0 - 44 (ラスキイ (Lasky) ら, 1986) から調製される。このサブクローンは、マウス dhfr の遺伝子と 1 型ヒト免疫不全ウイルス (HIV - 1) の組換え型外膜糖タンパク質 (gp120) を含有する発現ベクターで形質移入した後のジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 欠乏 CHO - DuxB11 細胞 (シモンセン (Simonsen) とレビンソン (Levinson), 1983; ウルラブ (Urb) とチャシン (Chasin), 1980) から誘導した。CHO - K1 細胞株 (CHO - DUXB11 細胞株の祖先) は、もとは成熟チャイニーズハムスターの卵巣バイオプシー (プック (Puck) ら, 1958) から誘導されたものであるが、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) の如き商業的供給機関から容易に入手できる。また、ハムスター配列をマウスエコトロピックウイルスの同等部分で修復する。アンダーソンらによって観察されたようにして、ウイルス粒子が産生されると考えられる。pCHOC.ML10 配列は、そのエンドヌクレアーゼ 10 遺伝子の 3 つ全てのリーディングフレーム内に潜在的コーディング配列の複数の中断を含んでいるので、もしもそのクローンが無傷エンドヌクレアーゼをコードしないならば、そのエンドヌクレアーゼ領域は、エコトロピック MuLV の如き同種レトロウイルスゲノムのそれで置き換えられることができる。HaLV 表面外膜タンパク質は、その粒子が他のハムスター細胞を感染できるように適度に発現されるが、他の全ての HaLV 遺伝子は必須ではないので (LTR はおそらく排除される)、同種 MuLV 配列によって置換可能である。クローン HaLV の領域を欠失させるには、マーン (Mann) らの方法を用いる (Cell 33:153 - 159, 1983)。

(b) キメラ受容体ポリペプチドの使用

非限定的な例として、遺伝子運搬のために修飾されたエコトロピックレトロウイルス受容体 (MERR) は、遺伝子治療中の癌及び関連する疾患の潜在的な発生率を低下させる筈である。 20

本発明の方法には幾つかの利点がある。第 1 に、マウスエコトロピックウイルスはヒト細胞内で複製できないので、思い浮かべられるどの組換えウイルスもヒト細胞に感染することはできないであろう。更には、遺伝子治療をする者は、感染されるのが望ましい標的細胞に対してだけ精巧な特異性で感染を限定できるであろう。種々のタイプの器官内のヒトゲノム全てにわたるウイルスの可能なランダム挿入が起こることは、ヒト感染性アンフォトロピックレトロウイルスを基礎とするベクターが用いられる時はいつでも考えられるようには、考えられず又示されもしないであろう。更に、本発明の方法は、修飾を最小限に止めたヒトウイルス受容体タンパク質を用いるので、感染したヒト細胞の免疫系による拒絶反応の可能性は、相当に低下されているか又は排除される。 30

(c) 標的指向性ベクターの様式

背景:

特に in vivo 法についての本発明の好ましい側面は、標的細胞に治療効果を提供する組換え型非ヒト特異性エコトロピックウイルスによって感染される細胞の特異的標的化を可能にする運搬ベクターを用いて動物を治療する方法である。そのような物質の非限定的な例には、適当なリンカーペプチド及びマウスエコトロピックウイルス受容体又は修飾ヒトエコトロピック受容体と結合した細胞表面分子 (MHC クラス 1 抗原の如きもの) に特異的な抗体の V_H 及び V_L 領域を包含する融合タンパク質が含まれる。また、膜受容体 (上皮増殖因子受容体の如きもの) のリガンドは、マウスエコトロピックウイルス受容体又は修飾ヒトウイルスエコトロピック受容体と融合した。デザインは、その特異性が比較的簡単に修飾できるよう十分に柔軟なものとなる。 40

医薬組成物:

少なくとも 1 種のキメラ受容体ポリペプチド又は抗体の如き本発明のタンパク質、ペプチド又は抗体を含む医薬組成物は、少なくとも 1 種の治療薬がその意図する目的を達成するに有効な量で含まれる全ての組成物を包含する。更に、少なくとも 1 種の治療薬を含有する医薬組成物は、活性化化合物を薬学的に用いることができる製剤に加工するのを容易にする賦形剤及び補助剤を含む適当な薬学的に許容できる担体を含有してもよい。

医薬組成物は、注射による投与又は経口投与に適する溶液を含み、約 0.001 ~ 99%、好ましくは約 20 ~ 75% の活性成分 (即ち、治療薬) を賦形剤と共に含有する。経口投与のため 50

の医薬組成物は、錠剤及びカプセル剤を含む。直腸に投与することができる組成物は座薬を含む。

治療薬の担体

活性成分のための担体は、噴霧できるものであっても噴霧できないものであってもよい。噴霧できない形態は、局所投与に助けとなる担体を含みそして好ましくは水の粘度よりも大きな動的粘度を有する半固体又は固体であってもよい。適する製剤には、溶液剤、懸濁剤、乳濁剤、クリーム剤、軟膏剤 (ointment)、散剤、塗布剤、軟膏剤 (salve) 及びそれらに類したものが含まれるがこれらに限定されない。所望により、これらを滅菌しても又は補助剤、例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤、緩衝剤、又は浸透圧に影響を及ぼす塩及びそれらに類したものと混合してもよい。噴霧できない局所製剤に好ましいビヒクルには、軟膏ベース、例えば、ポリエチレングリコール - 1000 (PEG - 1000); HEBクリームの如き慣用的なクリーム; ゲル; 並びに石油ゼリー及びそれらに類したものが含まれる。

全身適用にも局所適用にも適するが、特に粘膜及び肺への適用に適するのは、活性成分が好ましくは固体又は液体の不活性な担体物質と組み合わせさせた噴霧可能なエアゾール製剤である。このエアゾール製剤は、本発明のタンパク質又はペプチドに加えて溶媒、緩衝剤、界面活性剤、香料、及び/又は酸化防止剤を含有してもよい。エアゾール投与については、本発明による治療薬をスクィーズボトル内に、又はバルブとアクチュエーターの適当な系を有する与圧容器内に包装してもよい。当該技術分野では全く周知であるが、計量バルブを用い、そのバルブチャンバーは駆動又は投与の間に再装填されるのが好ましい。

治療薬の投与

本発明の治療薬は、その意図する目的、例えば、感染を有しているか又は受け易い被験体における居所感染の治療又は全身感染の治療、を達成するあらゆる手段によって投与することができる。例えば、免疫抑制された個体は、レトロウイルス感染及び疾患を特に受け易い。

例えば、投与は、皮下、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、頭蓋内、経皮、又は舌下ルート of the like 種々の非経口ルートによることができる。別に又は同時に、投与は経口ルートによってもよい。非経口投与は、一回の注射により又は時間をかけて徐々に灌流することによってもよい。

本発明の治療薬を用いる更なる様式は、局所投与によるものである。本発明の治療薬を、皮膚上への平滑効果並びに患部に直接活性成分を投与する手段の両方を有する軟膏剤 (salve, ointment) の如き局所用に適用されるビヒクルに混和してもよい。

局所適用については、本発明による有効量の治療薬を感染、例えば、皮膚表面、粘膜等に投与するのが好ましい。この量は、一般に、治療すべき面積、その用途が予防のためであるか治療のためであるか、症状の重さ、及び用いる局所ビヒクルの性質に依存して、1回の適用で約0.0001mg ~ 約1gである。好ましい局所製剤は、軟膏剤ベースcc当たり約0.001 ~ 約50mgの活性成分が用いられる軟膏剤である。軟膏剤ベースは好ましくはPEG - 1000である。

治療又は予防のための局所療法は、1日又は数日間、1週間 ~ 約6か月まで及び1週間 ~ 約6か月を包含する期間にわたって有効量を投与することを含む。

*in vivo*又は*in vitro*で投与される本発明の治療薬の投与量は、レシピエントの年齢、性別、健康状態、及び体重、もしあるとすれば同時に行っている治療の種類、治療の頻度、及び所望の効果の性質に依存するであろうと理解される。以下に示す有効投与量の範囲は、限定することを意図したものではなくて好ましい投与量の範囲を表わすものである。しかしながら、最も好ましい投与量は、個々の被験体に適するように決められるであろうが、当業者によって理解されかつ決定可能であろう。

それぞれの治療に要求される総投与量は、複数投与あるいは1回投与で投与されてもよい。治療薬は、単独で投与してもウイルス感染に向けられた又はウイルス性疾患の他の症状に向けられた他の治療薬と共に投与してもよい。

本発明の治療薬の有効量は、約0.001 μ g ~ 約100mg/kg体重であり、好ましくは約1 μ g ~ 約50mg/kg体重である。

10

20

30

40

50

非経口投与用の製剤には、滅菌水溶液又は非水溶液剤、懸濁剤、及び乳濁剤がふくまれ、当業者に知られている補助剤又は賦形剤を含有してもよい。錠剤及びカプセルの如き医薬組成物も慣用的方法に従って調製される。

診断的検定法

本発明は、被験体の正常な若しくはキメラな受容体又はH13タンパク質又はmRNAの存在及びレベルを評価する方法を提供する。個体中のH13遺伝子の不存在、又はより典型的には、H13遺伝子の低発現又は変異型H13の存在は、レトロウィルス感染に対する抵抗性及びかくしてエイズ又は一定のタイプの白血病又は他のレトロウィルス媒介疾患の発症の重要な予測材料として役立つ。また、H13の過剰発現は、レトロウィルス感染を受け易くなったことの重要な予測材料として役立つ。

10

更に、ウィルスに誘発された腫瘍細胞株では、ERR又はH13mRNA発現が増加するが、これはmRNA又は受容体タンパク質発現のレベルが、他の方法では検出できないウィルス感染の有用な指標として役立つことを示している。従って、H13mRNA（以下を参照のこと）又はタンパク質（上記のような免疫検定法を用いる）の量を測定する手段を提供することによって、本発明は、被験体内のヒトレトロウィルス感染又はレトロウィルス形質転換細胞を検出する手段を提供する。

キメラ受容体ポリペプチドの種々の部分をコードするオリゴヌクレオチドプローブ又はキメラ受容体ポリペプチドをコードする核酸配列を用いて、キメラ受容体ポリペプチド又はキメラ受容体ポリペプチドDNA若しくはmRNAの存在について被験体からの細胞を試験する。好ましいプローブは、キメラ受容体ポリペプチド又はキメラ受容体ポリペプチド配列の少なくとも12、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドをコードする核酸配列に向けられたものである。定性的又は定量的検定法は、かかるプローブを用いて行うことができる。例えば、ノーザン分析（以下を参照のこと）を用いて、細胞又は組織試料中のキメラ受容体ポリペプチド又はキメラ受容体ポリペプチドmRNAの発現を測定する。

20

かかる方法は、選択的増幅技術の使用が知られているので、個体から得られた非常に少量の核酸を使用して用いることができる。精製核酸フラグメントを増幅できる組換え核酸法が、長い間認められてきた。典型的には、かかる方法は、核酸フラグメントのDNA又はRNAベクター内への導入、そのベクターのクローン増幅、及び増幅した核酸フラグメントの回収を包含する。かかる方法の例は、コーエンら（米国特許第4,237,224号）、サムブルーからの前記文献等によって示されている。

30

最近になって、かかる所望の核酸分子の濃度を増加できる。in vitro酵素的な方法が記載された。この方法は、“ポリメラーゼ連鎖反応”又は“PCR”と言われている（ムリス（Mullis, K.）ら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 - 273 (1986)；エルリッヒ（Erllich, H.）, EP50,424; EP84,796; EP258,017; EP237,362; ムリス, EP201,184; ムリスら, 米国特許第4,683,202号；エルリッヒ, 米国特許第4,582,788号；及びサイキ（Saiki, R）ら, 米国特許第4,683,194号）。これら全ては、参照により全体がここに組み入れられるものとする。

このポリメラーゼ連鎖反応は、特定のDNA配列がそれまでに精製されておらずかつ特定のサンプル中に単一のコピーが存在するに過ぎない場合でも、そのDNA配列の濃度を選択的に増加する方法を提供する。この方法は、一本鎖又は二本鎖DNAのいずれを増幅するのにも用いることができる。この方法の真髄は、所望のDNA分子の鋳型依存性ポリメラーゼ媒介複製のためのプライマーとして役立つ2つのオリゴヌクレオチドの使用を包含することである。

40

PCRの委細は、ムリス（Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 - 273 (1986)；サイキら（Bio/Technology 3:1008 - 1012 (1985)）；及びムリスら（Meth. Enzymol. 155:335 - 350 (1987)）により示されている。

ここまで本発明を一般的に説明してきたが、以下の実施例を参照することによって本発明をより容易に理解できるであろう。この実施例は、説明のために示したものであって本発明を限定しようとするものではない。

実施例 I

50

一般的な材料及び方法細胞株

次の細胞株を以下に記載した検討に用いた:CCL120(ATCC CCL120), ヒトBリンパ芽球様細胞株;CCL119(CEM,ATCC CCL119), ヒトTリンパ芽球様細胞株;SupT1, ヒト非ホジキンTリンパ腫細胞株;H9,HUT78由来単一細胞クローン, ヒト皮膚T細胞リンパ腫細胞株;MOLT4(ATCC CRL1582), ヒト急性リンパ芽球白血病細胞株;HOS(ATCC CRL1543), ヒト骨肉腫細胞株;HeLa(ATCC CCL2), ヒト類上皮癌細胞株;CHO-K1(ATCC 61), チャイニーズハムスター卵巣細胞株;B10T6R,B10.T(6R)マウスの放射線誘発胸腺腫;及びRL12,C57BL/6Kaマウスの放射線誘発胸腺腫。

スクリーニング

ヒトCEM及びHUT78T細胞cDNAライブラリー(gt11)をクローンテック・ラボラトリーズ社(パロアルト, カルフォルニア)から入手した。ヒトリンパ球コスミドライブラリー(pWE15)をストラタジェン(ラジョラ,CA)から入手した。これらライブラリーをマニアチスらの方法(マニアチスら,Cell,15:887-701(1978))によってスクリーニングした。ERR cDNA(pJET)の全縁オープンリーディングフレームを含有するBamH I-EcoR Iフラグメントを、アルブリットン(Albritton)及びクニンハム(Cunningham)の両博士(ハーバード医学校, ボストン,MA)から提供して貰った。このDNAをニックトランスレーションにより³²Pで約 2×10^6 cpm/ μ gの比活性に標識して、ハイブリダイゼーションプローブとして用いた。

サザンブロット分析

プリン(Blin,N.)ら(Nucleic Acids Res.,3:2303-2308(1976))により記載され、パンペノ(Pampeno,C.L.)とメロイロ(Meruelo)(パンペノら,J.Virol.,58:296-306(1986))により手を加えられた通りにして、高い相対質量のDNAを細胞から調製した。制限エンドヌクラーゼ消化、アガロースゲル電気泳動、ニトロセルロースへの写し取り(Schleicher & Schuell社, キーン, ニューハンプシャー)、ハイブリダイゼーション及び洗浄は記載されているとおりであった(パンペノらの前記文献;ブラウン(Brown,G.D.),Immunogenetics 27:239-251(1988))。

ノーザンブロット分析

全細胞RNAを酸性グアニジニウム・チオシアネート・フェノール・クロロホルム法(コムクジンスキイ(Chomczynski,P.)ら,Anal.Biochem.,162:156-159(1987))によって細胞から単離した。そのDNAを1%ホルムアルデヒドアガロースゲル中で電気泳動してナイトラン(Nytran)フィルター(Schleicher & Schuell社, キーン, ニューハンプシャー)に写し取った。ハイブリダイゼーション及び洗浄は、アマリ(Amari,N.M.B.)ら(Mol.Cell.Biol.,7:4159-4168(1987))に従って行った。

DNA配列分析

陽性ファージからのcDNAクローンをプラスミドベクターpBluescript(ストラタジェン)のEcoR I部位に再クローン化した。このプラスミドの一方向欠失体をエキソヌクラーゼIII及びS1ヌクラーゼを用いることによって構築し、シーケナーゼ(Sequenase)試薬(U.S.バイオケミカル社, クリーブランド, オハイオ)でのジデオキシシチエンターミネーター法(サンガー(Sanger,F.S.)ら,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,74:5463-5467(1977))によって配列決定した。他で記載された部分消化コスミドDNAを探り出すT3又はT7プロモーター特異性オリゴヌクレオチドを用いて(エバンス(Evans,G.A.)ら,Meth.Enzymol.152:604-610(1987))、陽性コスミド挿入体の制限酵素地図を決定した。このコスミドのEcoR I-EcoR I又はEcoR I-Hind IIIフラグメントをpBluescript又はpSport1(GIBCO BR L,ガイセルスブルグ,MD)内にサブクローン化した。そのエキソン同志及びエキソン-イントロン接合部を、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて配列決定した。配列は、ジェネティックス(Genetics)コンピューターグループ配列分析ソフトウェアパッケージを用いて編集及び分析した(デベロークス(Devereux,J.)ら,Nucleic Acids Res.,12:387-395(1984))。

実施例II

H13のDNA及び推定タンパク質配列

コーディング配列の5'及び3'末端において非コーディング配列を含むH13の全ヌクレオチド配列(配列番号:7)を図1に示す。この配列は、クローン7-2(配列番号:1)からもととも得られる部分配列を含む。配列番号:1のヌクレオチド1~6及び1099~1102は、もともとも誤って決定されたものであった。図1は、このヌクレオチド配列から推定される全アミノ酸配列(配列番号:8)も示している。この配列は、このヌクレオチド配列からもともとも誤って推定されたN-末端Pro-Gly及びC-末端Proを除いては、もともとも記載されていた部分アミノ酸配列(配列番号:2)を含む。

H13とERRのヌクレオチド配列の比較を図2に示し、H13、ERR及びTEAのアミノ酸配列の比較を図3に示す。

これら比較した配列間の相同性は非常に高く、例えば、H13とERRのDNA間の相同性は87.6%であり、H13とTEAのアミノ酸間の相同性は52.3%である。

実施例 III

ヒト細胞内でのH13遺伝子の存在と発現

種々の種の細胞から採取したDNAのサザン分析により、マウスERRcDNAプローブ(図4)及びH13cDNA(図5)とハイブリダイズできるDNAが、CCL120、CCL119、SupT1、H-9及びMOLT-4を含む5つのヒト細胞株内に、及びハムスター細胞(CHO-K1)とマウス細胞(正常Balb/cマウス胸腺細胞)内に存在することが分かった。H13遺伝子発現は、ノーザン分析を用いて、H13cDNAプローブを用いて検査した。このプローブは、HeLa、SupT1、HOS及びCCL119細胞からのRNA内中に約9kbの転写産物を検出した(図6)。このRNAは、マウスERRcDNAプローブを用いても検出できた(図7)。

実施例 IV

ハムスター細胞内へのマウスレトロウイルス受容体cDNAの形質移入

マウスレトロウイルス受容体(ERR)cDNAを、選択可能マーカープラスミドDNAP、pSV₂Neoで、リン酸カルシウムを用いて、マウスエコトロピックレトロウイルスによっては感染され得ないハムスターCHO細胞内に同時形質移入した(ウィグナー(Wigler, M.)ら, Cell, 14:725-731(1978))。次いで、この受容体遺伝子を発現する形質移入体をマウス放射線白血病ウイルス(RadLV)により感染した。感染後2週間してその上澄み液の逆転写酵素(RT)活性を測定し(ステフェンセン(Stephensen, J.R.)ら, Virology 48:749-756(1972))、ノーザンプロット分析をウイルスプローブを用いてそのRNAの調製後に行った。図8に示すように、この受容体遺伝子を発現しない未形質移入CHO細胞内で検出されたRT活性は、組織培養培地の活性(バックグランド)と区別できなかった。これは、この細胞がMuLVによって感染されなかったことを示している。

このERRcDNAで形質移入した後は、その形質移入細胞上澄み液のRT活性はバックグランドよりも大いに高かった(図8)。

MuLVウイルスプローブは、この形質移入体から調製したRNA中に転写産物を検出したが、未形質移入CHO細胞から調製したRNA中では検出しなかった。これらの結果は、ERRcDNAで形質移入された細胞は、エコトロピックマウス白血病ウイルスに対する感受性を与えることができることを示している。

実施例 V

H-13に対する抗体の作製および使用

予測される全タンパク質(配列番号2)を有するH-13含有融合タンパク質を作製することは非常に困難である。というのは、図9に示されるように、予測されるタンパク質は疎水性が高いからである。従って、このタンパク質中に存在する抗原エピートプを予測するために、PEPTIDESTRUCTUREのプログラム(Jameson et al., CABIOS 4:181-186(1988))を用いてコンピューター分析を行った。図10は、H-13タンパク質配列の抗原性プロフィールを示す。

180bpのAcc I - EcoR I断片を生じる制限酵素Acc IとEcoR Iで切断することにより、抗原性の高い部分をコードするDNA配列(配列番号2、アミノ酸残基309-367)を作製した。オープンリーディングフレームの発現を可能にする配向(Smith, D.B. et al., Gene 67:31

10

20

30

40

50

- 40 (1988)) で、H - 13 cDNAのこの断片をpGEX - 2Tプラスミドベクター (ファルマシアLKBバイオテクノロジー) のクローニング部位に連結した。なお、このプラスミドベクターはグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として抗原を発現することができる。

イソプロピル - チオガラクトピラノシド (IPTG) を培養物に添加して融合タンパク質を誘導し、グルタチオンセファロース4Bクロマトグラフィー (ファルマシアLKBバイオテクノロジー) を用いて精製した (図11参照)。精製した融合タンパク質をフロインド完全アジュバントとともにウサギに筋肉内および皮下注射して抗血清を得た。

この抗血清は、H - 13タンパク質およびそのエピトープ断片への特異的な結合を示す。

ヒト細胞由来の膜タンパク質を標準的な手法に従って作製し、ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、ウェスタンブロット分析用ニトロセルロース上にブロットした。このH - 13特異的抗体は、これらのブロット上のタンパク質への結合を示す。

10

実施例VI

H - 13の遺伝地図作製

H - 13遺伝子の染色体上の位置をヒト - ハムスター体細胞ハイブリッド (Kouri, R.E. et al., Cytogenet. Cell Genet. 51:1025 (1989)) のパネルからのDNAを含む染色体ブロット (Bios Corp., New Haven, Connecticut) を用いて決定した。ヒト - ハムスターハイブリッド細胞中に残っているヒト染色体とH13 cDNAの発現を比較することにより、そのH - 13遺伝子はヒト染色体13にマッピングされた (図12参照)。染色体13に結合しているヒト遺伝子 (あるいはその中の変異により生じる疾患) には、以下のものが含まれる。網膜芽細胞腫、骨肉腫、ウィルソン病、レテラー - ジーヴェ病、デュービン - ジョンソン症候群、凝固因子VIIおよびX、コラーゲンIV 1および2鎖、X線感受性、リンパ球細胞質ゾルタンパク - 1、頸動脈小体腫瘍 - 1、プロピオルCoAカルボキシラーゼ (サブユニット) 等。

20

実施例VII

キメラH13/ERR DNAによりコードされたキメラ受容体ポリペプチドおよびタンパク質分子マウスERR配列およびヒトH13配列間の数個のキメラ分子を作製し、キメラI - キメラIVと命名した。詳細には、図13に示される共通の制限部位の使用に基づいて、H13 cDNAの4つの領域を置換した。

pSG5またはpCDM8発現ベクターを用いて、これらのDNA配列をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) セルラインに一過的にトランスフェクトした。

30

2日後、これらのトランスフェクタントのE - MuLV感染を支持する能力を試験した。細胞を2BAGと命名された組換えモロニーE - MuLV (Price, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:156 - 160 (1987)) に感染させた。この組換えウィルスはまた、選択可能なマーカーおよび検出可能な産物を提供する - ガラクトシダーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (neo^R) 遺伝子を含んでいた。その後、前記細胞を0.6mg/mlの濃度の抗生物質G418の存在下、選択的な条件下で増殖させて、 neo^R - 発現トランスフェクタントを選択した。2週間後、G418 - 耐性コロニーの数を計測した。

これらの結果は、E - MuLV感染に必須のERR遺伝子の部分がNco I - Bst XI制限部以内に位置し、細胞外ドメイン3を含むものであることを示している。(図13の上段に示されるような) 細胞外ドメイン3は、図14に示されるように、ヒトおよびマウス配列間で非常に異なる受容体タンパク質の領域である。Genetics computer group sequence analysis software package (Devereux, J. et al., Nucl. Acids Res. 12:387 - 395 (1984)) を用いて、(図1 - 3に示される配列から誘導された) 図14の配列を整列させた。

40

次に、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発 (oligonucleotide - directed mutagenesis) により、細胞外ドメイン3内の個々のアミノ酸置換を含むキメラ分子を作製した。これらを上記のようにしてトランスフェクトし、上記のようにしてトランスフェクタント細胞のE - MuLVによる感染に対する感受性の試験を行った。

上記の検討の結果は、本来のアミノ酸配列をマウスERRタンパク質の対応する位置由来の1 - 4個のアミノ酸で置換することにより、ヒトH13分子がE - MuLVに結合する能力を獲

50

得することを示す。

実施例VIII

エコトロピックのマウス白血病レトロウィルスの感染性を与えることができるH13誘導体としてのキメラ受容体ポリペプチド

図18に記載のように、ヒトH13アミノ酸残基をマウスERR残基で置換した。細胞外ドメイン3および/または4が重要なアミノ酸残基を含んでいることを明らかにしている共通の制限部位を利用した置換により、マウス-ヒトキメラ受容体分子を作製した。その後、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発により、上記の2つの細胞外ドメイン内に1個または2個のアミノ酸の置換または挿入を有する13個の個々の変異体ERR分子を創製した。ヒトH13の242および244アミノ酸残基のProおよびValの少なくとも2個のアミノ酸を対応するアミノ酸残基TyrおよびGluで置換したり、あるいはヒトH13のGly240およびPro242をValおよびTyr (ERRのVal233およびTyr235に対応する。)で置換すると、得られる変異体H13はマウスエコトロピックレトロウィルス受容体として機能する能力を持つようになる。この変異体H13は、遺伝子治療に利用できるであろう。

マウスERRおよびヒトH13がMuLV-Eの受容体として機能する相対的な能力を比較するために、チャイニーズハムスター卵巣(CHO-K1)セルラインをマウスERRまたはヒトH13のいずれかを発現するベクターで一過的にトランスフェクトした(図16の文字を参照)。2日後、これらのトランスフェクタントを大腸菌lacZ-ガラクトシダーゼおよびTn5 neo耐性遺伝子を含む組換えMuLV-E、CRE/BAGピリオンに感染させ(Price et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:156-160 (1987); Danos et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:6460-6464 (1988))、G418で選択した。10~14日後、G418耐性コロニーの数を計測した(図16)。H13トランスフェクタントでは陽性クローンは得られなかったが、ERRトランスフェクタントでは 10^3 個以上のコロニーが得られた。このことは、アミノ酸の置換または欠失により改変されなかったH13分子がMuLV-Eの受容体として機能する能力を欠いていることを示している。

図18に表されているような、MuLV-E感染のためのアミノ酸残基の改変を同定するために、共通でかつ単一の制限部位であるKpn Iを利用した置換によりH13改変タンパク質を作製し、それらのMuLV-Eの受容体として機能する能力を測定した(図16)。前半部分がERRの対応する領域で置換されているキメラIのトランスフェクタントについては約 10^3 個のコロニーが得られたが、後半部分がERRの対応する領域で置換されているキメラIIのトランスフェクタントについてはコロニーは得られなかった。このことは、重要なアミノ酸残基が前半部分に位置していることを示している。必須の領域をより狭く特定するために、Nco I-Nco I断片がERRの対応する領域で置換されているキメラIIIを作製し、その受容体として機能する能力を測定した(図16)。約 10^3 個のコロニーが得られたが、このことは、感染に重要な領域がNco I-Nco I制限部位内に位置していることを示している。

図17は、マウスERRおよびヒトH13における細胞外ドメインおよび4の配列の比較を示すものであるが、それらの配列はGenetics Computer group sequence analysis software package (Devereaux et al. Nucleic Acid Res. 12:387-395 (1984))を用いて整列させてある。細胞外ドメイン3は、上記の2つのドメイン内に1個または2個のアミノ酸置換または挿入を有するマウスERR分子(変異体1~11)間で最も異なる領域である(図17および表2)。各置換については、ERRのアミノ酸残基をH13配列の同じ位置に見いだされるものと置換した。各挿入については、H13のアミノ酸残基を図17に示されるように整列させたERR配列の同じ位置に付加した。

変異型ERRタンパク質を発現するCHO-K1細胞のMuLV-Eの受容体として機能する能力を試験した。驚くべきことに、変異体7のみについてはコロニーが得られなかったが、他の変異体については約500個のコロニーが得られ、このことは、これらの11個の変異体のうち、変異体7だけが前記受容体として機能する能力を失っていることを示している(表2)。変異体7は2個のアミノ酸置換を有しており、Tyr (ERRの235アミノ酸残基)がPro (H13のアミノ酸残基242に相当する。)に、Glu (ERRのアミノ酸残基244に対応する。)がVal (H13の244アミノ酸残基)に置換している。従って、たった1個のアミノ酸置換を含む(

10

20

30

40

50

変異体7A:TyrからPro、変異体7B:GluからVal)変異体7AおよびBを作製し、前記受容体として機能するそれらの能力を試験した。変異体7Bは、もとのERRとほぼ同じ程度で、前記受容体として機能する能力を有しているが、変異体7Aはこの能力をほぼ完全に失っていることが見いだされた(表2)。これらの結果は、ERR配列の235アミノ酸残基に位置するTyrがMuLV-Eの受容体タンパク質として機能するためには極めて重要であり、このアミノ酸残基を置換するとERRが該受容体として機能する能力を失うことを示唆している。

H13のあるアミノ酸残基がERRの対応するアミノ酸残基で置換されると、H13分子が前記受容体として機能する能力を獲得するか否かを決定するために、H13の8個の変異体を図18に示されるように作製し、前記受容体として機能するそれらの能力を測定した。例えば、Lewis and Thompson, Nucleic Acid Res. 18:3439 - 3443 (1990)に提示されているように、ファージミドベクターpSELECT-1 (Promega)を用いる変法部位特異的突然変異誘発(altered site-directed mutagenesis)の方法により、前記H13変異体を創製した。この突然変異誘発は、一本鎖DNAおよび2個のプライマーの使用に基づくものである。前記2個のプライマーは、ひとつが突然変異誘発性プライマーで、もう一つは第2の修正プライマー(ベクター中のアンピシリン耐性に対する欠損を修正する。)である。

pSG5H13の挿入物をBamH Iで完全に、EcoR Iで部分的に消化し、pSELECT-1のBamH I-EcoR I部位にサブクローニングして、pSELECT-1アンチセンスH13を得た。pSG5H13変異体5および8の挿入物をEcoR Iで切り出し、pSELECT-1のEcoR I部位にサブクローニングして、pSELECT-1アンチセンスH13変異体5および8を得た。鋳型としてのpSELECT-1アンチセンスH13およびオリゴヌクレオチド:

AAAGAAGGGAAGTACGGRGRRGGRGG (配列番号9) (H13変異体1);

ACACAAAAGAAGTGAAGTACGGTGTGGTGG (配列番号10) (H13変異体2);

ATGACACAAAAACGTGAAGTACGGTGTGGTGG (配列番号11) (H13変異体3); および

AAAGAAGGGAAGTACGGTGAGGGTGGATTCATG (配列番号12) (H13変異体5)

を用いて、H13変異体1~3および5を作製した。pSELECT-1アンチセンスH13変異体8およびオリゴヌクレオチド:

TGAAGTACGGTGTGGTGGATTCATG (配列番号13)

を用いて、H13変異体4を作製した。pSELECT-1アンチセンスH13変異体5およびオリゴヌクレオチド:

ACACAAAAGAAGTGAAGTACGGTGA (配列番号14) (H13変異体6);

AATGACACAAAAACGTGAAGTACGGTGA (配列番号15) (H13変異体7); および

AACAATGACACAAACGTGAAGTACGGTGAGGGTGGATTCATG (配列番号16) (H13変異体8)

を用いて、H13変異体6~8を作製した。

例えば、Lewis and Thompson, Nucleic Acids Res. 18:3439 - 3443 (1990)に提示されているように、ファージミドベクターpSELECT-1 (Promega)を用いる変法部位特異的突然変異誘発の方法により、前記ERR変異体を創製した。この突然変異誘発は、一本鎖DNAおよび2個のプライマーの使用に基づくものである。前記2個のプライマーは、ひとつが突然変異誘発性プライマーで、もう一つは第2の修正プライマー(ベクター中のアンピシリン耐性に対する欠損を修正する。)である。

pSG5ERRの挿入物をBamH IおよびEcoR Iで部分的に消化し、pSELECT-1のBamH IおよびEcoR I部位にサブクローニングして、pSELECT-1センスおよびアンチセンスERRを得た。一本鎖DNAをpSELECT-1センス(変異体2および6の作製用)およびアンチセンス(他の変異体の作製用)ERRから調製し、製造元の指示(Promega)に従って突然変異誘発を行った。Sequenase (USB) およびプライマーとしての2つのERR特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド(変異体1~7用のGGTGGCGATGCAGTCAA

(配列番号17) および変異体8~11用のTCAGCCATGGCATAGATA (配列番号18))

を用いる直接配列決定により、正しく突然変異させたクローンを選択した。ミニプレップにより作製したファージミドの突然変異した挿入物をEcoR Iで切り出し、pSG5のEcoR I部位にサブクローニングした。上記で使用したのと同じプライマーを用いて各プラスミドの配列決定を行うことにより、突然変異の存在を確認した。その後、リポフェクシン試薬

10

20

30

40

50

を用いる方法により、各変異体をCHO - K1細胞に一過的にトランスフェクトし、MuLV - Eによる感染に対するそれらの感受性を上記のようにして測定し、図18に示されるような結果を得た。

その結果、Tyr242並びにVal 240およびGlu244の少なくとも1つを含む本発明の変異型H13ポリペプチドは、そのようなキメラ受容体ポリペプチドがヒト細胞の細胞外表面に発現されることによりマウスエコトロピックレトロウイルスによる結合および感染が可能となるように、MuLV - Eのようなマウスエコトロピックレトロウイルスにより機能的に認識される変異型H13受容体結合領域を与えることが示された。従って、このような方法を本発明に従って、*in vitro*、*in vitro*または*in situ*の遺伝子治療の方法として用いることができる。あるいはまた、本発明のこのような方法を用いて、マウスエコトロピックレトロウイルスベクターを使用してヒト細胞または組織に異種または外来遺伝子を導入することができる。従って、本発明のH13変異体を使用することにより、アンフォトロピックレトロウイルスベクターを使用するより、はるかに安全な遺伝子治療の手段が提供され、これによりアンフォトロピックレトロウイルスによる非標的細胞の意図しない感染の問題の他、組換えエコトロピックウイルスを比較的低い投与量で使用するための免疫抗原性の減少の問題が解決された。

以上をまとめると、ヒトエコトロピックレトロウイルス受容体がクローニングされ、マウスエコトロピックウイルスは、分子改変の導入がなければ、通常ヒト細胞を感染できないことが認識されると、レトロウイルスを包含する遺伝子治療の安全性が劇的に改良される状態となる。第1工程において、エコトロピックレトロウイルス受容体の改変された遺伝子は標的細胞に運ばれ、一過的に発現されるであろう。その後、マウスエコトロピックウイルスベクターを使用して感染させ、安定に組み込んで、所望の治療用遺伝子を発現させることとなる。感染の第1工程には、時間が全くかからないか、いくらかかかるかもしれない。

使用すべきエコトロピックウイルスベクターは、構造遺伝子の欠失を有しており、安全性を付加するための“安全な”パッケージングセルライン中で増殖するであろう。 $10^8 \sim 10^{10}$ 粒子/mlの範囲のウィルス力価を産する新規なパッケージングラインが構築されると予想されるが、この構築においては、ヒト細胞を感染できる組換えウイルスが欠けている。さらに、ウィルスの外膜糖タンパク質の改変により、*in vivo*のウィルス感染性を妨げるか、または、ウィルス力価を減少させるようなあらゆる決定基が排除されよう。また、ヒトエコトロピックウイルス受容体相同体を研究することにより、その正常な遺伝子機能を決定したり、遺伝子治療プロトコルがその正常な機能に有害な影響を及ぼす可能性を排除するためのそのタンパク質に関する十分な理解が得られる。

実施例IX

ヒトアンフォトロピックウイルス受容体のクローニング

遺伝子治療ベクターの開発のために、アンフォトロピック受容体をクローニングする。公知の工程（例えば、Brown et al,1990;Anderson et al,1991）に従い、テナガザル（Gibbon ape）白血病ウイルスおよびマウスエコトロピックウイルス（E - MLV）の受容体をクローニングするのに用いられるものと類似の戦略により、アンフォトロピックMLVの受容体をクローニングする。その戦略は、ヒト細胞がA - MLVに感染されうるがハムスター細胞は感染され得ないという事実に依るものである。ハムスター細胞を感染できないのは、それらが適当な受容体を欠いているからであり、そのヒト遺伝子をハムスター細胞にトランスフェクトすれば、A - MLVに感染可能とすることができる。これらの細胞を抗生物質耐性の組換えウイルスに感染させることにより単離し、次いで、抗生物質含有培地の選択を行う。前記の受容体遺伝子はヒト反復DNAと会合するのでクローニングしやすい。アンフォトロピック受容体遺伝子をクローニングして、種々のアッセイおよび種々の手法で前記エコトロピックウイルス受容体との類似性および非類似性を検討する（例えば、Yoshimoto et al.,1993）。

方法 CHO細胞をトランスフェクションの朝にプレートした。切断したヒトゲノムDNA（50 μ g）およびpSV₂gpt DNA（1 μ g）をWiglerら（1978）の方法によりリン酸カルシウムで

10

20

30

40

50

共沈させ、CHO細胞に適用した。翌日、トランスフェクトした細胞をgpt選択培地 (DMEM/10% FCS、ヒポキサンチン15 μ g、キサンチン μ g/ml、チミジン10 μ g/ml、グリシン10 μ g/ml、メトトレキセート0.1 μ M、およびミコフェノール酸25 μ g/ml) 中でプレート当たり 2×10^5 細胞で継代培養した。選択下21日後、コロニーをトリプシン/EDTAに簡単に晒して分散させ、ウイルスに晒す前に置換して、ヒトDNAを獲得した細胞を富化した。

PA317/LNL6アンフォトロピックレトロウイルス産生線維芽細胞をコンフルエンスになるまで増殖させ、新鮮な培地で再培養した。12~20時間後、培養培地を濾過し(0.45 μ m、Nalge)、ポリブレン(polybrene)8 μ g/mlとし、トランスフェクトしたCHO細胞とともにインキュベートした。4~12時間後、新鮮な培地を添加し、感染プロトコルをその翌日繰り返した。3日後、これらの細胞を1mg/mlのG418を含有するDMEM/10% FCS中で82mmプレート当たり 2×10^5 細胞で再プレートし、選択培地を3日毎に15日間置換した。20,000個のトランスフェクタントのうち、数個(10~20個)だけがg418耐性コロニー中に発生することが予想された。クローンがこのアンフォトロピックウイルスに感染可能で、実際にこのアンフォトロピックウイルス受容体を発現することを証明するために、それらをまた第2のアンフォトロピックウイルス(-2-AM-ZIP-DHFR)に感染させた。細胞は前記ウイルス受容体を含まない効率の低い経路により前記ウイルスを獲得することが可能である。G418耐性コロニーを細胞クロニングシリンダーで単離し、ネオマイシンウイルスについて上記したように各々を-2-AM-ZIP-DHFRウイルスに晒した。前記ウイルスへの暴露に続いて、細胞をメトトレキセート(150nM)を含有するDMEM/10%透析FCS中で選択した。14日後、プレートを1%クリスタルバイオレットで染色して、メトトレキセート耐性コロニーの存在を調べた。

その後、DNAをこの最初にトランスフェクトしたセルライン(1°TF)から調製し、トランスフェクション/感染プロトコルの第2のサイクルにおいて使用した。第2のトランスフェクタントセルライン中の前記受容体遺伝子を同定するために、ヒト反復配列のパネルをプローブとして用いるサザンロットを行った。DNAトランスフェクションの効率が低いために(0.1%ゲノム/サイクル)、数サイクルのトランスフェクション/選択はマウスゲノムの残りから前記受容体遺伝子を分離するに足るものであった(Murray et al., 1981)。所望の断片を単離するために、ランダファージライブラリーを二次トランスフェクタントDNAから作製し、サザンロットスクリーニングから非常に適していると思われる放射性標識した反復プローブとハイブリダイズさせた。アンフォトロピック受容体遺伝子の部分をコードするタンパク質を含む分子クローンを同定するために、前記のアンフォトロピックウイルスを増殖させている2°TFsに存在するRNA転写物を同定した。問題の遺伝子の特定の転移により、アンフォトロピックウイルス感染に対する感受性も同じように移動することが予想され、この分子を発現するこれらのウイルスに感染しうる大パネルの細胞が提供される。

実施例 X

本発明の治療用運搬ベクターの発現

抗体B3(例えば、Brinkmann et al., 1991)からの相補的DNA(cDNA)を用いて、本発明のキメラ受容体ポリペプチドに融合しているFv断片を構築した。この一本鎖組換え受容体を用いれば、標的ヒト細胞のレトロウイルス感染が可能となる。多くの癌腫の表面に発現されている炭水化物抗原に結合する、B3に対する抗体を用いてマウスにおいてヒト腫瘍の完全な退縮を起こす単鎖組換え毒素が製造されてきた(Brinkmann et al., 1991)。単鎖Fvおよび2種の異なる(B3(Fv)イムノトキシン、B3(Fv)-PE40およびB3(Fv)PE38KDEL)ベクターを標準的な組換えDNA手法で使用して、核酸をコードするキメラ受容体ポリペプチドに挿入したり、その組換え毒素を前記ヒトエトロピックウイルス受容体の改変領域をコードする遺伝子のウイルス結合ドメインで置換した。得られたプラスミド(B3(Fv)-mH13)およびイムノトキシンベクターB3(Fv)PE38KDELを大腸菌のような宿主で発現させ、一本鎖免疫受容体および一本鎖イムノトキシンを当業界で知られているように均質になるまで精製した。

B3(Fv)-mH13の抗腫瘍活性をまずin vitroで測定した。このB3抗体は結腸、胃、および

10

20

30

40

50

卵巣の多くのムチン癌腫の表面と、また、胃腺、気管および膀胱の上皮、食道の分化した上皮、および小腸ムチンのような正常組織とよく反応する (Pastan et al. (Cancer Res. 51:3781 - 3787, 1991))。また、このB3抗体は、MCF7、MDA - MB - 468、およびHTB20 (胸)、A431 (上皮細胞)、TH29 (結腸)、HTB33 (頸部)、およびDU145 (前立腺) を含む多くのヒト腫瘍セルラインとよく反応する。B3 (Fv) - mH13から誘導された融合タンパク質を用いて改変した受容体ペプチドを細胞にまず運んだ後、A431のような、これらの細胞のいくつかまたは全てにおける、ネオマイシン耐性遺伝子を有するマウスエコトロピックレトロウィルスベクターのような、非ヒト特異的組換えレトロウィルスベクターの感染が予想される。チミジンキナーゼ遺伝子を有するマウスエコトロピックレトロウィルスベクターのような、前記キメラ受容体ポリペプチドおよび治療薬を結合するenv結合ドメインを有するウィルスベクターを予め使用して、細胞培養物にガンシクロビル (ganciclovir) を添加することにより、A431細胞のような培養腫瘍細胞の細胞死を生ぜしめる。

そのような細胞が培養中に作用することがわかったら、ウサギモデルまたはラットモデルのような動物モデル系で致死的な病的な細胞を使用する。その結果、キメラ受容体ポリペプチドまたはマウスエコトロピックウィルス受容体の対応する領域が選択した動物モデル細胞表面上に本明細書に提示した運搬ベクターによって発現されない限り、本発明のマウスエコトロピックウィルスをベースとするベクターはこれらの細胞を感染できないことが予想される。融合タンパク質注入後に種々の時間間隔で、チミジンキナーゼ遺伝子を有するウィルスベクターを用いて、選択した標的細胞上の前記キメラ受容体ポリペプチドを発現している動物モデルを感染させる。この発現の後、動物にガンシクロビルを投与する。このプロトコールにより、ガンシクロビルが腫瘍細胞内でその毒性のある形態にリン酸化され、関連する“バystander効果 (bystander effect)” と共同して、腫瘍が減少することが予想される。

実施例XI

キメラ受容体ポリペプチドと、腫瘍または病的な細胞または組織を認識する一本鎖抗原結合タンパク質との融合タンパク質の発現用ベクターの構築

導入の適切な方法論の一例を図4に示す。発現プラスミドpUL1はイムノトキシンB3 (Fv) - PE40の遺伝子を含んでいるが、該イムノトキシンは、癌腫細胞に特異的なB3に対する抗体に対する抗体断片を含み、毒素PE40に結合した融合タンパク質である。PE40毒素をコードする部分を本発明のキメラ受容体ポリペプチドまたはマウスエコトロピックウィルス受容体の対応する領域で置換して、キメラ受容体ポリペプチドを発現するように *in vivo*、*in situ* または *in vitro* で癌腫細胞をトランスフォームする運搬ベクターを提供するように、前記pUL1発現プラスミドを改変した。

B3 (Fv) は、B3に対するモノクローナル抗体から誘導された一本鎖抗原結合タンパク質である。このB3抗体断片は、多くのムチン癌腫の表面に見いだされる炭水化物抗原を認識する。しかしながら、この抗体断片は、*in vivo* で癌腫細胞を優先的に結合するように、限られた数の正常組織のみと反応する。PE40は、シュードモナス外毒素の切り出された誘導体である。PE40コード領域は、5'末端にHind III制限部位、B3 (Fv) をコードするDNAに接続する部位、および3'末端を少し越えたところにEcoR I部位を有する。PE40をコードするこのHind III - EcoR I断片をpUL1から除き、直線化したpUL1の両末端を部分的にdATPで *fill-in* し、粘着末端-AAとする。B3 (Fv) コード領域の3'末端の - TTCGAおよび直線化したプラスミドの他の末端のAATTC - を以下のように同様に改変して、前記のキメラ受容体ポリペプチドをコードするDNAを補足した。

本発明のキメラ受容体ポリペプチドのNru I - Pst I断片は、改変H13 cDNAのように、改変H13の全コード領域を含んでいるが、これをTfi Iで消化し、改変H13の第3の細胞外ドメインをコードする領域を含む850bpの断片を1.5%アガロースゲル上で精製した。その後、この精製した850bpのTfi I断片をBsr Iで消化し、改変H13の全第3細胞外ドメインをコードする85bpのBsr I - Tfi I断片をEx3mH13と命名した。得られた制限断片EX3m13を2.0%アガロースゲル上で精製した。この精製した85bpのBsr I - Tfi I断片は5'末端に粘着末端AGC - を、

10

20

30

40

50

CGTCG -

3'末端に - GGを有する。

- CCTAA

この3'末端をdATPで部分的にfill-inし、3'末端を - GGA - CCTAAとする。

部分的にfilling-inした後、アダプター

CGCTTTCAACTGGC (配列番号19)

AAGTTGAC

およびTTCTAATTAG (配列番号20)

GATTAATCTT (配列番号21)

(これらは、いかなるフレームシフトも妨げるように特別にデザインされている。)を用いて、前記の85bpのBsr 1 - Tfi断片を直線化したpUL1の部分的にfill-inしたHind III - EcoR I部位に連結した。得られたプラスミドをpBH30と命名する。

B3 (Fv) をコードする上記の遺伝子は5'末端にNdeI部位を有している。その後、得られたプラスミドpBH30をNdeIで消化し、その末端をdATPおよびdTTPでfill-inし、平滑末端とした。次いで、前記の直線化したfill-inしたプラスミドをEcoR Iで消化し、B3 (Fv) - Ex3mH13コード領域を含む断片をアガロースゲル上で精製した。

いかなるフレームシフトも妨げられるように、アダプター

GATCCCCGGG (配列番号22)

GGGCC

を用いて、前記の精製した断片をBg III - EcoR I部位で発現ベクターpTrcHisBに組み込んだが、該部位は、一連のTrcプロモーター、ATG開始コドン、ポリヒスチジンコード領域およびエンテロキナーゼ切断部位コード領域の下流に位置する。

得られたプラスミドをpBH3と命名する。

B3 (Fv) - Ex3mH13融合タンパク質の発現および精製

上記の発現プラスミドpBH3は、B3 (Fv) - Ex3mH13をポリヒスチジン金属結合ドメイン、エンテロキナーゼ切断部位およびB3 (Fv) - Ex3mH13から構成される融合タンパク質として発現させることができる。

その後、大腸菌HB101をpBH3でトランスフォームした。イソプロピル - d - チオガラクトシドで発現を誘導し、細胞を回収して緩衝液に懸濁させた。懸濁液を音波処理して、上清をNi²⁺金属アフィニティー樹脂カラムにかけた。樹脂に結合したタンパク質をグリシンとの競合により溶離させた。

その後、溶離したタンパク質を除去すべきポリヒスチジン配列用のエンテロキナーゼで処理した。

得られた融合タンパク質は、上記の病的な細胞を特異的に結合することが予想され、本明細書中に記載したように治療の標的としてのキメラ細胞を提供するのに適している。

実施例XII

本発明のキメラ受容体ポリペプチドのような受容体に結合するウィルス外膜の重要な領域を決定することにより、in vivoのウィルス複製の効率を増加させる

背景

前記受容体に結合するウィルス外膜の重要な領域を理解することは、改良されたベクターを開発するというゴールにとって等しく重要である。本発明により、新規なベクターを工学的に作製することが劇的に改良され、それらのin vivo力価が効果的に増加する。その結果、本発明により、両受容体への結合に必要なウィルス外膜要素、および、当該受容体を結合する能力を失うことなくこれらのタンパク質を許容するであろうという改変の程度のキャラクタリゼーションの詳細な分析であって、ウィルスの結合を可能にするヒトおよびマウスエコトロピック受容体間の限られた相違を検討するための詳細な分析が提供された。第2の目的は、ヒトにおけるウィルスの溶解を導くかもしれないウィルス外膜上のあらゆる潜在的な補体結合領域を排除することである。これは、おそらくマウスレトロウィルスをベースとする治療用ベクターのin vivoの感染能力を制限すると何人かの研究者により議論されてきた問題である。

非特異的不活性化およびマウス、ネコ、サルC型ウィルスの溶解に関する知見は最初にWelshら(1975,1976)により公表された。この溶解は、gp70へのヒトC1q補体成分の抗体非依存性結合によるものであり、古典補体経路の活性化につながるものである(Cooper et al.,1976)。gp70分子は免疫グロブリンのFc断片上のC1q認識部位に類似したドメインを有するので、C1qはgp70を認識すると考えられている。ヒト補体によるレトロウィルスの非特異的溶解は、ウィルス血症から保護し、その表面上にgp70を発現する細胞の溶解を引き起こすかもしれない適応防禦系であることが示唆された(Welsh et al.,1975;Cooper et al.,1976)。しかし、補体欠乏患者は霊長類レトロウィルスに対する交差反応性抗体のレベルの上昇を示し、このことは、これらの患者においてはレトロウィルス感染に対する感受性がこれ以上上がることはないことを示しているということを示唆している(Kurth et al.,1979b)。さらに、Gallagherら(1978)により、レトロウィルス外膜に対するテナガザル血清の類似の溶解活性が示されたが、同じテナガザルの何匹かはGALVに感染し抗GALV抗体を合成した。従って、レトロウィルスの補体依存性溶解の保護効果については議論の余地があるところである。

前記ウィルス受容体に結合するマウスエコトロピックウィルス外膜の配列

マウス白血病ウィルス(MuLV)表面糖タンパク質(gp70^{SU})の結合パラメータを定義するひとつの方法は、gp70^{SU}のどの領域が細胞表面受容体との特異的相互作用に参与しているかを決定することである。種々の研究により、受容体特異性の決定基はgp70^{SU}のN末端の3分の2にあることが示唆されている(Ott and Rein J.Virol 66:4632 - 4638,1992 - 引用文献13、16)。事実、最近HeardおよびDanos(1991)により、フレンドMULV gp70^{SU}のこの領域の大半を含むEnv断片がNIH 3T3細胞における前記のエコトロピック受容体に結合できることが示された。また、最近、OttおよびReinは、モロニーMCF(Mo-MCF)、10A1、およびアンフトロピックgp70^{SU}配列を用いて、一連のキメラenv遺伝子を構築することにより、gp70^{SU}における受容体特性をマッピングすることを試みた。これらのキメラgp70^{SU}を含むMuLVsの分析により、単純な結果および複雑な結果の両方が得られた。ある場合には、受容体特異性はgp70^{SU}の一つの領域にマッピングできた。最後に、いくつかの組合せは、ひとつの受容体と完全に機能的に相互作用することができるが、ひとつまたは2つの受容体とは部分的に相互作用するかあるいは全く相互作用できないようであった。HeardおよびDanos(J.Virol.65:4036 - 4032,1991)により、干渉アッセイ(interference assay)により、gp70アミノ末端ドメインは、この分子のカルボキシ末端部分に関係なく、前記のエコトロピック受容体を認識する構造に折り畳まれることが示された。彼らは、ウィルスエントリーアッセイを用いることにより、外膜糖タンパク質に導入された、構造改変の機能的結果を解釈することは難しいかもしれないと論じている。一方、外膜糖タンパク質を構成的に発現している細胞において、干渉現象は外膜-受容体相互作用のみによるものである。従って、同じ受容体を結合するウィルス粒子のさらなるエントリーに対する細胞耐性の描写は、機能性受容体結合アッセイを提供する。

実験

干渉アッセイを使用して、受容体への結合に重要であるマウスエコトロピックエンベロープ糖タンパク質(MuLVE-gp70)の領域を更に正確に特定する。エコトロピック受容体への結合に関する構造上の要件を更に正確に確立するために、アミノ末端ドメイン内のイン・フレーム(in-frame)欠失により、そしてオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によりMuLVE-gp70を修飾する。エンベロープ配列を比較すると、MLVgp70はそれらのアミノ末端ドメインが二つの限定領域において異なることがわかる。これらはアミノ酸50~116および170~183である。また、それらはプロリンに富むセグメント、アミノ酸244~283が異なっている。トリ肉腫および白血病ウィルスエンベロープ糖タンパク質(この場合、受容体相互作用の決定因子が短い超可変配列に帰せられた(HeardおよびDanos J.Virol.65:4026 - 4032,1991))から類推すると、これらの三つの超可変領域の一つ以上が受容体結合細胞を含むものと予測される。修飾E.coli lacZ遺伝子を導入する欠陥レトロウィルスベクターを使用して、野生型または修飾MuLVE-gp70を発現する細胞を感染させる。感染に対する感受性を、X-Gal陽性フォーカスをカウントすることにより測定する。

10

20

30

40

50

エコトロピックエンベロープN末端ドメインペクターを、外在性マウスエコトロピックレトロウイルス受容体遺伝子 (Albrittonら, 1989) を発現するサルのCos-7細胞に一過性にトランスフェクトする。pSG5ペクターは初期SV40真核生物プロモーターを使用するので、Cos細胞 (T抗原遺伝子を発現する) は高レベルのenv遺伝子発現を可能にする (Gluzman, 1981)。トランスフェクト細胞をエコトロピック偽型 CRE/BAG (ATCC CRL 1850) ウイルス粒子 (Priceら, 1987) で感染し、そして -galフォカス (gal) フォカスの数を分析する。 -galフォカスの数を減少する修飾envフラグメントを、ERRと相互作用するそれらの能力につき更に調べる。

1. Cos-7細胞へのERR遺伝子のトランスフェクション

ERR遺伝子をpcDNA/neo発現ペクター (インビトロゲン) にクローン化し、CaPO₄法 (ストラタジーン) によりCos-7細胞にトランスフェクトした。Cos-7細胞は高力価のMuLVレトロウイルスを産生し得ることがわかっている (LandauおよびLittman, 1992)。トランスフェクト細胞を500 µg/mlのG418に対するネオマイシン耐性につき選択する。耐性クローンを、CRE/BAGウイルス粒子 (Priceら, 1987) により感染されるそれらの能力につき試験する。細胞を生理緩衝塩類液中0.5%のグルタルアルデヒドで固定し、そして1mg/mlのX-gal (Sanesら, 1986) を含む組織化学液で染色する。最大数の -galフォカスを有する細胞を干渉アッセイに使用する。

10

2. 受容体結合配列を更に概説するための修飾env遺伝子の構築

この実験は、エコトロピックウイルス感染を阻止する最小のN末端フラグメントを決定する。Akv内在性マウス白血病ウイルスからのgp70遺伝子をこれらの研究に使用する。Akvゲノムは活性ウイルス粒子を産生することができ、そしてenv配列が決定されている (Lenzら, 1982)。

20

Acc I制限部位とXba I制限部位の間に含まれる完全gp70遺伝子をpSG5真核生物発現ペクター (ストラタジーン) にクローン化する。また、env遺伝子のフラグメントをクローン化して下記のN末端ペプチドを産生する。Acc1/AluI 247 aaフラグメントはHeardおよびDanos (1991) の結果を生じ、そして感染を機能的に阻止する。受容体結合特異性を決定すると考えられる領域を含む122aa Acc1/Sma Iフラグメントが特に興味をもてる (Battiniら, 1992)。

3. 修飾env遺伝子構築物の干渉アッセイ

組換えenv遺伝子構築物を、マウスERRを含むCos-7細胞に一過性にトランスフェクトする。この系はマウス細胞中に存在し得る内在性env転写産物により引き起こされる潜在的な問題を排除すると予測される。Cos細胞は、SV40プロモーターを含む発現プラスミド (Gluzman, 1981) の高度の発現を可能にすると予測される。細胞をストラタジーンのプロトコルに従ってDEAEデキストラン法によりトランスフェクトする。env遺伝子トランスフェクションの約48時間後に、 2×10^5 の細胞を6ウェル培養皿にまき、そしてHeardおよびDanos (1991) の方法に従って8 µgのポリブレン/mlの存在下で $10^2 \sim 10^3$ のCRE/BAGウイルス粒子を感染させる。細胞が集密まで増殖した後、それらをPBS中0.5%のグルタルアルデヒド中で固定し、そして1mg/mlのX-galを含む組織化学液 (sanesら, 1986) で染色する。 -galフォカスの数を、pSG5ペクター単独でトランスフェクトした細胞に対して評価する。 -galフォカスの減少した数がpSG5ペクター単独でトランスフェクトした細胞に対して評価されると予測される。 -galフォカスの減少した数は、トランスフェクトされたenv構築物がおそらくERRを結合でき、かつウイルス粒子相互作用を阻止できることを表している。

30

40

4. トランスフェクト細胞中の修飾env生合成の分析

組換えenv遺伝子産物がトランスフェクト細胞により産生されるか否かを決定するために、タンパク質分析を行う。細胞を³⁵Sメチオニンと³⁵Sシステインの混合物 (ICN) で代謝標識する。何となれば、envタンパク質は対象の領域が比較的システイン残基に富むからである。30~60分間標識した後、細胞をペレットにし、ペレットと上澄みの両方をポリクロノールヤギ抗ローシャー (Rauscher) gp70抗体 (NIHレポジトリ) または非マウス血清、続いてS.aureusA細胞による免疫沈殿のために処理する。免疫沈殿物をSDS-ポリア

50

クリルアミドゲルで分析する。免疫沈殿タンパク質の不在は、envタンパク質が分解されるか、または抗gp70抗体により認識され得ないことを意味すると予測される。この現象では、env RNA転写産物の存在がトランスフェクト細胞から全RNAを抽出し、続いてAKv env 配列プローブを使用してノーザンブロット分析により測定される。免疫沈殿により検出でき、かつ CRE/BAGウイルス粒子感染を阻止するフラグメントが本発明の更に別の実施例および方法に使用される。

5.1 修飾envフラグメントの突然変異

数種のエコトロピックおよび非エコトロピックレトロウイルスgp70遺伝子のDNA配列を決定した。これらの配列の比較は、受容体相互作用に重要である領域を示唆するであろう。例えば、図19は、受容体特異性に関与すると考えられる、N末端領域内の、3つのエコトロピックおよび非エコトロピックgp70アミノ酸配列の比較を示す。3種のエコトロピックレトロウイルスが強い配列相同性を示す。エコトロピック配列と非エコトロピック配列にはかなりの相違があり、最も顕著な相違は位置68~97に存在する約30のアミノ酸のギャップである (Battiniら, 1992)。この領域はエコトロピック結合部位を含みうるが、レトロウイルスの異なるサブグループに異なるコンホメーションを与えることもあるらしい。N末端envタンパク質の限定領域がウイルス-受容体相互作用を阻止することがわかったら、重要な残基を同定するためにアミノ酸を系統的に修飾することが可能である。次に突然変異誘発性オリゴヌクレオチドを使用してin vitro突然変異誘発を行い、そしてERRの修飾につき先に記載されたプロメガのpSelected (pAlter) 系 (Yoshimotoら, 1993) を使用する。

点突然変異を生じることが実施可能となるように受容体結合ドメインの位置を制限することができない場合、異なるウイルスサブグループの制限gp70領域の間の欠失分子またはキメラ分子が作製される。

a) 欠失変異体の作製の基準およびプロトコル

1. 組換えプラスミド中の対象の領域および比較的少ない他の領域内に部位を有する酵素による消化。
2. 読み取り枠が変更される場合、エキソヌクレアーゼIIIを使用してヌクレオチドを次第に除去する。
3. S1ヌクレアーゼを使用して平滑末端をつくる(13)。欠失分子を連結し、そして形質転換する。
4. 欠失クローンの配列を決定して正確な読み取り枠を維持するものを見出す。

例えば(図20)、163bpのSma₁フラグメントがAk_v env N末端配列(Lenzら, 1992)の可変領域内に存在する(404bp, 567bp)。このフラグメントは、アンフォトロピック配列から欠失される30のアミノ酸を含む(図19および20)。この配列の単純な除去は不正確な読み取り枠を生じるであろう。何となれば、一つのSma₁部位(404bp)がアミノ酸トリプレットの一つのヌクレオチドを欠いているからである。

b) 挿入の作製

標準プロトコル(Sambrook, 前掲; Ausubel, 前掲)に従って対象の配列を増幅するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用することにより特定の配列の挿入を行う。PCRプライマーを、envタンパク質の適切な読み取り枠を維持するように設計する。

例えば、アンフォトロピックウイルス配列へのエコトロピックウイルスの30アミノ酸領域の挿入を下記の工程により行う。

1. 位置325におけるRsaIによるアンフォトロピックenv配列の消化は平滑末端部位を生じ、そしてチロシンに関するアミノ酸コドンの第二および第三のヌクレオチド(A、C)から第一ヌクレオチド(T)を分離する。
2. エコトロピック配列を挿入するために、チロシン残基を保持するために5'末端に追加のACを含むプライマーを合成する。チロシン残基を追加し、そして読み取り枠を保持する追加のTをその5'末端に有する3'プライマーを合成する。Ak_v配列に対する提案されたプライマーの位置を表IIIに示す。

表 III

5'プライマー: 5' AC CCG GGG CCC CCC TGC 3' (配列番号:23)

3'プライマー: 5' A GGG AGT ATA ATG AAG 3' (配列番号:24)

PCR後に、生成物を2%のアガロースゲルで処理して、90bpフラグメントを切り出し、精製し、そしてRsaI部位でアンフォトロピックenv配列につなぐ。組換えクローンの配列を決定してPCRフラグメントの正しい方向を有するものを決定する。

7. ウイルスエンベロープ配列結合C1qの同定

gp70分子は免疫グロブリンのFcフラグメントのC1q認識部位に類似しているドメインを有することが提起されていた。これが正しければ、そしてこの領域がウイルス結合および侵入にとってその分子の不必要な部分にあるならば、その除去および置換は遺伝子治療用のレトロウイルスベクターの直接的なin vivo使用に対する血清オンコルナウイルス溶解活性(SOLA)の潜在的影響を軽減すると予測される。C1q結合に重要なアミノ酸残基を同定するために、そのドメインが免疫グロブリンのFcフラグメントのC1q認識部位に類似している場合には、インフレーム欠失により、そしてオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発によりMuLVE-gp70を修飾する。C1q認識が一旦同定されると、本発明者らは、非C1q結合配列により置換されたこの領域を有する修飾MuLVE-gp70env遺伝子を構築しようとするであろう。

血清中のSOLA活性、およびウイルス感受性について分析するために、スクロースで分画化し、そして精製したクローン化放射線白血球ウイルスをPBSで基準化濃度に希釈し、少なくとも100,000cpmが本発明者らの標準逆転写酵素アッセイ(Brownら,1990)で検出できるようにする。種々の希釈率のヒト血清をウイルス調製物に添加し、そして通常の実験室照明条件下で30分間インキュベートする。対照試料を0.5%のトリトンX-100(シグマ)で処理する。次に全ての試料を以前に記載されたように(Merueloら,1988)RT活性について分析する。

雑誌または抄録、公開され、もしくは相当する米国もしくは外国の特許出願、発行された米国もしくは外国の特許、またはあらゆるその他の文献を含む本明細書で引用された全ての文献は、引用文献中に示された全てのデータ、表、図、および本文を含み、本明細書に参考としてそのまま組み入れるものとする。更に、本明細書で引用された文献中に引用されている文献の内容も参考としてそのまま組み入れられる。

公知方法の工程、慣用方法の工程、公知の方法または慣用の方法に関する言及は、本発明のあらゆる面、説明または実施態様が関連技術において開示され、教示され、または示唆されるということをいかなる場合も容認するものではない。

特定の実施態様の以上の説明は、当業者の知識(本明細書で引用された文献の内容を含む)を適用することにより、他の当業者が、無用な実験を行わないで、本発明の全概念から逸脱しないで、このような特定の実施態様を容易に改良し、かつ/または種々の用途に採用するのに十分なほど、本発明の一般的な特質を明らかにするであろう。それ故、このような適用および改良は、本明細書に示された教示および指針に基いて、開示された実施態様の均等物の意味および範囲内に包含されるものとする。本明細書中の表現または用語は説明のためであり、限定のためではないことを理解するべきであり、それ故、このような用語または表現は本明細書に示された教示および指針に鑑みて当業者により解釈されるべきである。

文献

Aaronson, S.ら "BALB/c細胞の内在性C型: 自然誘導および化学誘導の頻度" J.Virol.13:181-185,1974;

Adam, M.A.ら, J.Virol.62:3802-3806,1998;

Albritton, L.M.ら "推定のマウスエコトロピックレトロウイルス受容体遺伝子は多重膜にかかるタンパク質をコードし、そしてウイルス感染に対する感受性を与える" Cell,57:659-666,1989;

10

20

30

40

50

- Anderson, C. “ 論争の癌試験に関して非難を受けている遺伝子治療研究者 ” *Nature*, 360:399 - 400, 1992;
- Anderson, K.P.ら “ 組換えチャイニーズハムスター卵巣細胞系からの欠陥レトロウイルス様粒子の内在性起源 ” *Virology*, 181:305 - 311, 1991;
- Anderson, W.F. “ ヒト遺伝子治療 ” *Science*, 256:808 - 813, 1992;
- Armentano, D.ら “ レトロウイルスベクターの利用性に関する内部ウイルス配列の影響 ” *J. Virol.*, 62:1647 - 1650, 1987;
- Battini, J.L.ら “ アンフォトロピック、キセノトロピック、およびポリトロピックのマウス白血病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質中の受容体選択決定因子 ” *J. Virol.*, 66:1468 - 1475, 1992;
- Bender, M.A.ら “ モロニーマウス白血病ウイルスのパッケージングシグナルがgag領域に及びことの証明 ” *J. Virol.*, 61:1639 - 1649, 1987;
- Bestwick, R.K. “ レトロウイルス重複感染に対する干渉を解消することがクローン遺伝子の増幅された発現および伝達をもたらす ” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5404 - 5408, 1988;
- Bird, R.E.ら “ 一本鎖抗原結合タンパク質 ” *Science*, 242:423 - 426, 1988;
- Bodine, D.M.ら “ インターロイキン3および6の組み合わせが培養中に幹細胞機能を保存し、そして造血幹細胞へのレトロウイルス介在性遺伝子移入を増進する ” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:8897 - 8901, 1989;
- Bodine, D.M.ら *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3738 - 3742, 1990
- Brinkmann, U.ら “ マウスのヒト癌腫の完全な回帰を生じる一本鎖免疫毒素であるB3 (Fv) - PE38KDEL ” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:8616 - 8620, 1991;
- Brown, D.G.ら “ 分子クローン化されたエコトロピックMuLV.による感染後の増大されたH - 2D^d発現 ” *Immunogenetics*, 31:94 - 103, 1990;
- Chang, S.M.W.ら “ ヒトヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼcDNAを含む欠陥レトロウイルスの構築並びに培養細胞およびマウス骨髄中のその発現 ” *Mol. Cell. Bio.*, 7:854 - 863, 1987;
- Chaudhary, V.K.ら *Nature*, 339:394, 1989;
- Cooper, N.R.ら “ ヒト血清によるRNA腫瘍ウイルスの溶解：古典的補体経路の直接の抗体依存性誘発 ” *J. Exp. Med.*, 144:970 - 985, 1976;
- Culver, K.W.ら “ 実験の脳腫瘍の治療のためのレトロウイルスベクター産生細胞による生体内遺伝子移入 ” *Science*, 256:1550 - 1152, 1992;
- Dalgleish, A.G.ら “ CD4 (T4) 抗原はエイズレトロウイルスの受容体の必須成分である ” *Nature*, 312:763 - 767, 1984;
- Danos, O.ら “ アンフォトロピックおよびエコトロピック宿主範囲による組換えレトロウイルスの安全かつ有効な発生 ” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:6460 - 6464, 1988;
- Davies, D.R.ら *Ann. Rev. Immunol.*, 1:87, 1983;
- Devereux, J.ら “ VAXに関する配列分析プログラムの広範囲の組 ” *Nucleic Acids Res.*, 12:387 - 395, 1984;
- Dunn, W.A.ら *J. Cell Biol.*, 102:24, 1986;
- Fraenkel, A.E.ら *J. Biol. Response Mod.*, 4:373, 1985;
- Friedmann, T. “ ヒト遺伝子治療に関する進歩 ” *Science*, 244:1275 - 1281, 1989;
- Gallagher, R.E.ら “ テナガザル類人猿の血清中のオンコルウイルス溶解活性 ” *J. Natl. Cancer Inst.*, 60:677 - 682, 1978;
- Ghetie, M.A.ら *Cancer Res.*, 48:261, 1988;
- Gluzman, Y “ SV40形質転換サル細胞が初期SV40変異体の複製を支持する ” *Cell*, 23:175 - 182, 1981;
- Hartley, J.W.ら “ 野生マウス中の天然産マウス白血病ウイルス：新規な “ アンフォトロピック ” クラスの特性決定 ” *J. Virol.*, 19:19 - 25, 1976;
- Harwood, P.J.ら *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 21:1515, 1985;

10

20

30

40

50

- Heard, J.M.ら “フレンドマウス白血病エンベロープ糖タンパク質のアミノ末端フラグメントがエコトロピック受容体を結合する”*J.Virol.*, 65:4026 - 4232, 1991;
- Hellstrom, K.E.ら *FASEB J.*, 3:1715, 1989;
- Hendler, F.J.ら *J.Clin. Invest.*, 74:647, 1984;
- Henikoff, S. “DNA配列分析におけるエキソヌクレアーゼIIIによる一方向性消化”*Method Enz.*, 155:156, 1987;
- Hertler, A.A.ら *J.Biol. Response Mod.*, 7:97, 1988;
- Hesdorffer, C.ら “体性遺伝子治療”*Hematology/Oncology Clinics of North America*, 5:423 - 432, 1991;
- Hock, R.A.ら “ヒト造血前駆細胞中の薬剤耐性遺伝子のレトロウイルス介在性移入および発現”*Nature*, 327:275 - 277, 1986; 10
- Huangら *J.Virol.*, 50:417 - 424, 1984;
- Huber, B.E.ら “肝細胞癌腫の治療のためのレトロウイルス介在性遺伝子治療：癌治療のための革新的なアプローチ”*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 83:8039 - 8040, 1991;
- Huston, J.S.ら “抗体結合部位のタンパク質操作：エシェリキア・コリ中に産生された抗ジゴキシン一本鎖Fv類似体における比活性の回復”*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85:5879 - 5883, 1988;
- Jones, N.R.ら *Cancer*, 66:152, 1990;
- Kawano, T.J.ら *Nature*, 332:83, 1988;
- Kim, J.W.ら “マウスレトロウイルス受容体によるカチオン性アミノ酸の輸送”*Nature*, 352: 20
725 - 729, 1991;
- Koch, W.ら “フレンドマウス白血病ウイルスのenv遺伝子のヌクレオチド配列”*J.Virol.*, 45:1 - 9, 1983;
- Kohn, D.B.ら “遺伝的疾患の遺伝子治療”*Cancer Invest.*, 7:179 - 192, 1989;
- Kurth, R.ら “ヒト血清によるシミアンサルコマウイルスの認識”*In Modern trends in human leukemia* (R.Nethら編集) 3巻, 385 - 394頁, Springer, Heidelberg, 1979;
- Landau, N.R.ら “可変向性によるマウス白血病ウイルスベクターの迅速な生産のためのパッケージング系”*J.Virol.*, 66:5110 - 5113, 1992;
- Lander, R.C., 米国特許第4,704,692号, 1987;
- Lasky, L.A.ら “組換えエンベロープ糖タンパク質の抗体によるエイズレトロウイルスの中 30
和”*Science*, 233:209 - 212, 1986;
- Lau, J.L.T.ら *J.Urol.*, 139:170, 1988;
- Lenz, J.ら “AKv env遺伝子のヌクレオチド配列”*J.Virol.*, 42:519 - 529, 1982;
- Lieber, M.M.ら “培養中の哺乳類細胞がC型ウイルスを頻繁に放出する”*Science*, 182:56 - 58, 1973;
- MacLeod, C.L.ら “活性化T細胞が、マウスエコトロピックレトロウイルス受容体に密接に関係する染色体8につき新規な遺伝子を発現する”*Mol.Cell.Biol.*, 10:3663 - 3674, 1990;
- Manlatis, T.ら *J.Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York, 1982; Mann, R.ら “レトロウイルスパッケージング変異体の構築およびヘルパー欠陥レトロウイルスを生産するためのその使用”*Cell*, 33:153 - 159, 1983; 40
- Markowitz, D.ら “遺伝子移入に安全なインラインのパッケージング：2種の異なるプラスミドに関するウイルス遺伝子の分離”*J.Virol.*, 62:1120 - 1124, 1988;
- Markowitz, D.ら “安全かつ有効なアンフォトロピックパッケージング細胞系”*Virol.*, 167:400 - 406, 1988a;
- Meruelo, D.ら “有効投薬量で著しい抗レトロウイルス活性および低毒性を有する治療薬：芳香族多環式ジオンハイペリシンおよびシュードハイペリシン”*Proc.Natl.Acad.Sci.*, 85:5230 - 5234, 1988;
- Miller, A.D.ら “ヘルパーウイルス生産をもたらず組換えを避けるためのレトロウイルスパッケージング細胞系の再設計”*Mol.Cell Biol.*, 6:2895 - 2902, 1986;
- Miller, A.D.ら “ヘルパー無レトロウイルスベクターの生産に関する因子”*Somat.Cell.M* 50

- ol.Genet.,12:175 - 183,1986;
- Muenchau,D.ら “複製コンピテントウイルスの発生のためのレトロウイルスパッケージング系の分析”*Virology*,176:262 - 265,1990;
- Murano,R.ら *Cancer Res.*,45:5769,1985;
- Murphy,J.R.*Cancer Treat.Res.*,37:123,1988;
- Murray,M.J.ら *Cell*,25:355 - 361,1981;
- Neville,D.J.*Crit.Rev.Therap Drug Carrier Syst.*,2:329,1986;
- Ogata,M.ら *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,86:4215,1989;
- Ogata,M.ら *J.Immunol.*,141:4224,1988;
- O'Hara,B.ら “テナガザル類人猿白血病ウイルスによる感染に対する感受性を与えるヒト 10
遺伝子の特性決定”*Cell Growth Diff.*,1:119 - 127,1990;
- Ott,D.ら “非エコトロピックマウス白血病ウイルス表面糖タンパク質gp70^{SU}の受容体特異性の基礎”*J.Virol.*,66:4632 - 4638,1992;
- Pastan,I.ら “癌治療のための組換え毒素”*Science*,254:1173 - 177,1991;
- Pastan,I.ら “粘液性癌腫と反応するモノクローナル抗体B1およびB3の特性決定”*Cancer Res.*,51:3781 - 3787,1991;
- Pastan,I.ら *J.Biol.Chem.*,264:15157,1989;
- Pastan,I.ら *Cell*,47:641,1986;
- Poljak,R.S.ら *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,70:3305,1973;
- Porter,R.R.*Science*,180:713,1973; 20
- Price,J.ら “レトロウイルス介在性遺伝子移入による脊椎動物神経系における系列分析”*Proc.Natl.Acad.Sci.*,84:157 - 160,1987;
- Rasheed,S.ら “天然産野生マウス白血病ウイルスのアンフォトロピック宿主範囲”*J.Virol.*,19:13 - 18,1976;
- Rein,A.ら “異なる組換えマウス白血病ウイルスは異なる細胞表面受容体を使用する”*Virology*,136:144 - 152,1984;
- Sambrook,J.ら *In Molecular Cloning:a Laboratory Manual*,CSH Press,1989;
- Sanes,J.R.ら “マウス胚中の後移植細胞系列を研究するための組換えレトロウイルスの使用”*EMBO J.*,5:3133 - 3142,1986;
- Sattentau,Q.J.ら “ヒトおよびサル免疫不全ウイルスHIV - 1、HIV - 2およびSIVがそれらの細胞表面受容体、CD4分子の同様のエピトープと相互作用する”*AIDS*,2:101 - 105,19 30
88;
- Scadden,D.T.ら “レトロウイルスベクターで感染されたヒト細胞が内在性マウスプロウイルスを獲得する”*J.Virol.*,64:424 - 427,1990;
- Schifferら *Biochemistry*,12:4620,1973;
- Shih,C.C.ら “レトロウイルス組み込みに非常に好ましい標的”*Cell*,53:531 - 537,1988;
- Shinnick,T.M.ら “モロニーマウス白血病ウイルスのヌクレオチド配列”*Nature*,293:543 - 548,1981;
- Simonsen,C.C.ら “変性マウスジヒドロフォレートレダクターゼcDNAの単離および発現”*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,80:2495 - 2499,1983; 40
- Skerra,A.ら “エステルシリア・コリ中の機能性免疫グロブリンFvフラグメントの構築”*Science*,240:1038 - 1041,1988;
- Sommerfelt,M.A.ら “ヒト細胞に塗布する20のレトロウイルスの受容体干渉群”*Virology*,176:58 - 69,1990;
- Sommerfelt,M.A.ら “ヒトT細胞白血病ウイルスは、ヒト染色体17により決定された受容体を使用する”*Science*,242:1557 - 1559,1988;
- Sommerfelt,M.A.ら “ヒト染色体19におけるD型シミアンレトロウイルスの受容体遺伝子の局在化”*J.Virol.*,64:6214 - 6220,1990;
- Stenback,W.A.ら “電子顕微鏡により明らかにされるようなハムスター腫瘍中のウイルス粒子”*Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*,122:1219 - 1223,1966; 50

- Stoye, J.P.ら “ 内在性マウス白血病ウイルスの4種のクラス：構造上の関係および潜在的な組換え ” *J.Virol.*, 61:2859 - 2669, 1987;
- Thompson, L. *Science*, 258:744 - 746, 1992;
- Thompson, L. *Monkey Tests Spark Safty review. Science*, 257:1854, 1992;
- UrIab, G.ら “ ジヒドロフォレートレダクターゼ活性を欠乏しているチャイニーズハムスター細胞変異体の分離 ” *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 77:4216 - 4220, 1980;
- Varki, N.ら *Cancer Res.*, 44:681, 1984;
- Velu, T.J.ら *Science*, 238:1408, 1987;
- Verma, I.M., 1990. 遺伝子治療 *Sci.Am.*, 262:68 - 84;
- Vile, R.G.ら “ パーミアーズとしてのウイルス受容体 ” *Nature*, 352:666 - 667, 1991; 10
- Vitetta, E.S.ら *Science*, 238:1098 - 1177, 1987;
- Wahl, R.L.ら *J.Nucl.Med.*, 24:316, 1983;
- Waldemann. *Cell.Immunol.*, 99:53 - 731, 1986;
- Walz, G.ら *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86:9485, 1989;
- Wang, H.ら “ エコトロピックマウスレトロウイルスの細胞表面受容体は基本的なアミノ酸トランスポーターである ” *Nature*, 352:729 - 731, 1991;
- Weiss, R.ら “ RNA腫瘍ウイルス：腫瘍ウイルスの分子生物学 ” *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*, 1984;
- Welsh, R.M.ら “ ヒト血清はRNA腫瘍ウイルスを溶解する ” *Nature*, 257:612 - 614, 1975;
- Welsh, R.M.ら “ ヒト血清によるオンコルナウイルスの不活化および溶解 ” *Virology*, 74:432 - 440, 1976; 20
- Wigler, M.ら “ ドナーとして完全細胞DNAを使用する単一コピー真核生物遺伝子の生化学的移入 ” *Cell*, 14:725 - 731, 1978;
- Williams, D.P.ら *Protein Eng.*, 1:49, 1987;
- Willingham, M.C.ら *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 84:2474, 1987;
- Yee, J.K.ら *Cold Spring Harbor Symp.Quant., Biol.*, 51:1021, 1986;
- Yoshimoto, T.ら “ マウスエコトロピックレトロウイルス受容体に相同の新規なヒト遺伝子の分子クローニングおよび特性決定 ” *Virology*, 185:10 - 17, 1991;
- Yoshimoto, T.ら “ エコトロピックマウス白血病レトロウイルスによる感染に重要なアミノ酸残基の同定 ” *J.Virol.*, 印刷中、1993; 30
- Yu, S.F.ら “ 哺乳類細胞への完全遺伝子の移入に設計された自己不活化レトロウイルスベクター ” *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 83:3194 - 3198, 1986;

* それぞれのオリゴヌクレオチド配列の上の文字はもとのERR 配列のものであり、整列（図 ）によるERR 配列中の対応ヌクレオチド配列の不在を意味する。

**これらの2つはアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、その他はセンスオリゴヌクレオチドである。

配列表

配列番号:1

配列の長さ:1102

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号:CDS

存在位置:1..1102

配列

CCG	GGC	GCC	ACC	TTC	GAC	GAG	CTG	ATA	GGC	AGA	CCC	ATC	GGG	GAG	TTC		
Pro	Gly	Ala	Thr	Phe	Asp	Glu	Leu	Ile	Gly	Arg	Pro	Ile	Gly	Glu	Phe	48	
1				5					10					15			
TCA	CGG	ACA	CAC	ATG	ACT	CTG	AAC	GCC	CCC	GGC	GTG	CTG	GCT	GAA	AAC		
Ser	Arg	Thr	His	Met	Thr	Leu	Asn	Ala	Pro	Gly	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	96	
			20					25					30				
CCC	GAC	ATA	TTC	GCA	GTG	ATC	ATA	ATT	CTC	ATC	TTG	ACA	GGA	CTT	TTA		
Pro	Asp	Ile	Phe	Ala	Val	Ile	Ile	Ile	Leu	Ile	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	144	
		35					40					45					
ACT	CTT	GGT	GTG	AAA	GAG	TCG	GCC	ATG	GTC	AAC	AAA	ATA	TTC	ACT	TGT		
Thr	Leu	Gly	Val	Lys	Glu	Ser	Ala	Met	Val	Asn	Lys	Ile	Phe	Thr	Cys	192	
	50						55				60						
ATT	AAC	GTC	CTG	GTC	CTG	GGC	TTC	ATA	ATG	GTG	TCA	GGA	TTT	GTG	AAA		
Ile	Asn	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Val	Lys	240	
65					70					75					80		
GGA	TCG	GTT	AAA	AAC	TGG	CAG	CTC	ACG	GAG	GAG	GAT	TTT	GGG	AAC	ACA		
Gly	Ser	Val	Lys	Asn	Trp	Gln	Leu	Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Thr	288	
				85					90					95			
TCA	GGC	CGT	CTC	TGT	TTG	AAC	AAT	GAC	ACA	AAA	GAA	GGG	AAG	CCC	GGT		
Ser	Gly	Arg	Leu	Cys	Leu	Asn	Asn	Asp	Thr	Lys	Glu	Gly	Lys	Pro	Gly	336	
			100					105						110			

10

20

30

40

GTT Val	GGT Gly	GGA Gly	TTC Phe	ATG Met	CCC Pro	TTC Phe	GGG Gly	TTC Phe	TCT Ser	GGT Gly	GTC Val	CTG Leu	TCG Ser	GGG Gly	GCA Ala	384	
		115					120					125					
GCG Ala	ACT Thr	TGC Cys	TTC Phe	TAT Tyr	GCC Ala	TTC Phe	GTG Val	GGC Gly	TTT Phe	GAC Asp	TGC Cys	ATC Ile	GCC Ala	ACC Thr	ACA Thr	432	
	130					135					140						
GGT Gly	GAA Glu	GAG Glu	GTG Val	AAG Lys	AAC Asn	CCA Pro	CAG Gln	AAG Lys	GCC Ala	ATC Ile	CCC Pro	GTG Val	GGG Gly	ATC Ile	GTG Val	480	
	145				150					155					160		
GCG Ala	TCC Ser	CTC Leu	TTG Leu	ATC Ile	TGC Cys	TTC Phe	ATC Ile	GCC Ala	TAC Tyr	TTT Phe	GGG Gly	GTG Val	TCG Ser	GCT Ala	GCC Ala	528	10
				165					170					175			
CTC Leu	ACG Thr	CTC Leu	ATG Met	ATG Met	CCC Pro	TAC Tyr	TTC Phe	TGC Cys	CTG Leu	GAC Asp	AAT Asn	AAC Asn	AGC Ser	CCC Pro	CTG Leu	576	
			180					185					190				
CCC Pro	GAC Asp	GCC Ala	TTT Phe	AAG Lys	CAC His	GTG Val	GGC Gly	TGG Trp	GAA Glu	GGT Gly	GCC Ala	AAG Lys	TAC Tyr	GCA Ala	GTG Val	624	
		195					200					205					
GCC Ala	GTG Val	GGC Gly	TCC Ser	CTC Leu	TGC Cys	GCT Ala	CTT Leu	TCC Ser	GCC Ala	AGT Ser	CTT Leu	CTA Leu	GGT Gly	TCC Ser	ATG Met	672	20
	210					215					220						
TTT Phe	CCC Pro	ATG Met	CCT Pro	CGG Arg	GTT Val	ATC Ile	TAT Tyr	GCC Ala	ATG Met	GCT Ala	GAG Glu	GAT Asp	GGA Gly	CTG Leu	CTA Leu	720	
	225			230						235				240			
TTT Phe	AAA Lys	TTC Phe	TTA Leu	GCC Ala	AAC Asn	GTC Val	AAT Asn	GAT Asp	AGG Arg	ACC Thr	AAA Lys	ACA Thr	CCA Pro	ATA Ile	ATC Ile	768	
				245				250					255				
GCC Ala	ACA Thr	TTA Leu	GCC Ala	TCG Ser	GGT Gly	GCC Ala	GTT Val	GCT Ala	GCT Ala	GTG Val	ATG Met	GCC Ala	TTC Phe	CTC Leu	TTT Phe	816	
			260				265						270				
GAC Asp	CTG Leu	AAG Lys	GAC Asp	TTG Leu	GTG Val	GAC Asp	CTC Leu	ATG Met	TCC Ser	ATT Ile	GGC Gly	ACT Thr	CTC Leu	CTG Leu	GCT Ala	864	30
		275					280					285					
TAC Tyr	TCG Ser	TTG Leu	GTG Val	GCT Ala	GCC Ala	TGT Cys	GTG Val	TTG Leu	GTC Val	TTA Leu	CGG Arg	TAC Tyr	CAG Gln	CCA Pro	GAG Glu	912	
	290					295					300						
CAG Gln	CCT Pro	AAC Asn	CTG Leu	GTA Val	TAC Tyr	CAG Gln	ATG Met	GCC Ala	AGT Ser	ACT Thr	TCC Ser	GAC Asp	GAG Glu	TTA Leu	GAT Asp	960	
	305			310						315				320			
CCA Pro	GCA Ala	GAC Asp	CAA Gln	AAT Asn	GAA Glu	TTG Leu	GCA Ala	AGC Ser	ACC Thr	AAT Asn	GAT Asp	TCC Ser	CAG Gln	CTG Leu	GGG Gly	1008	
				325					330					335			40
TTT Phe	TTA Leu	CCA Pro	GAG Glu	GCA Ala	GAG Glu	ATG Met	TTC Phe	TCT Ser	TTG Leu	AAA Lys	ACC Thr	ATA Ile	CTC Leu	TCA Ser	CCC Pro	1056	
		340						345					350				
AAA Lys	AAC Asn	ATG Met	GAG Glu	CCT Pro	TCC Ser	AAA Lys	ATC Ile	TCT Ser	GGG Gly	CTA Leu	ATT Ile	GTG Val	AAC Asn	CCG Pro	G	1102	
		355					360					365					

配列番号:2

配列の長さ:367

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Pro	Gly	Ala	Thr	Phe	Asp	Glu	Leu	Ile	Gly	Arg	Pro	Ile	Gly	Glu	Phe	
1				5					10					15		
Ser	Arg	Thr	His	Met	Thr	Leu	Asn	Ala	Pro	Gly	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	
			20					25					30			
Pro	Asp	Ile	Phe	Ala	Val	Ile	Ile	Ile	Leu	Ile	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	
		35					40					45				
Thr	Leu	Gly	Val	Lys	Glu	Ser	Ala	Met	Val	Asn	Lys	Ile	Phe	Thr	Cys	
	50					55					60					
Ile	Asn	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Val	Lys	
	65				70					75					80	
Gly	Ser	Val	Lys	Asn	Trp	Gln	Leu	Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Thr	
				85					90					95		
Ser	Gly	Arg	Leu	Cys	Leu	Asn	Asn	Asp	Thr	Lys	Glu	Gly	Lys	Pro	Gly	
			100					105					110			
Val	Gly	Gly	Phe	Met	Pro	Phe	Gly	Phe	Ser	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ala	
		115					120					125				
Ala	Thr	Cys	Phe	Tyr	Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Asp	Cys	Ile	Ala	Thr	Thr	
	130					135					140					
Gly	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Pro	Gln	Lys	Ala	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Val	
	145				150					155				160		
Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Cys	Phe	Ile	Ala	Tyr	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	
				165					170					175		
Leu	Thr	Leu	Met	Met	Pro	Tyr	Phe	Cys	Leu	Asp	Asn	Asn	Ser	Pro	Leu	
			180					185					190			
Pro	Asp	Ala	Phe	Lys	His	Val	Gly	Trp	Glu	Gly	Ala	Lys	Tyr	Ala	Val	
		195					200					205				
Ala	Val	Gly	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ser	Met	
	210					215					220					
Phe	Pro	Met	Pro	Arg	Val	Ile	Tyr	Ala	Met	Ala	Glu	Asp	Gly	Leu	Leu	
					230					235					240	

10

20

30

Phe Lys Phe Leu Ala Asn Val Asn Asp Arg Thr Lys Thr Pro Ile Ile
 245 250 255

Ala Thr Leu Ala Ser Gly Ala Val Ala Ala Val Met Ala Phe Leu Phe
 260 265 270

Asp Leu Lys Asp Leu Val Asp Leu Met Ser Ile Gly Thr Leu Leu Ala
 275 280 285

Tyr Ser Leu Val Ala Ala Cys Val Leu Val Leu Arg Tyr Gln Pro Glu
 290 295 300

Gln Pro Asn Leu Val Tyr Gln Met Ala Ser Thr Ser Asp Glu Leu Asp
 305 310 315 320

Pro Ala Asp Gln Asn Glu Leu Ala Ser Thr Asn Asp Ser Gln Leu Gly
 325 330 335

Phe Leu Pro Glu Ala Glu Met Phe Ser Leu Lys Thr Ile Leu Ser Pro
 340 345 350

Lys Asn Met Glu Pro Ser Lys Ile Ser Gly Leu Ile Val Asn Pro
 355 360 365

10

配列番号:3
 配列の長さ:2425
 配列の型:DNA
 鎖の数:一本鎖
 トポロジ-:直鎖状
 配列の種類:cDNA
 配列の特徴
 特徴を表す記号:CDS
 存在位置:199..2064

20

配列

GATTCGGCCC GCGTGCGCCA TCCCCTCAGC TAGCAGGTGT GAGAGGCTTT CTACCCGCGG 60

TCTCCACACA GCTCAACATC TTGCCGCCTC CTCCGAGCCT GAAGCTACCG TGGACTCTGC 120

TGTGGCGTCT TGGCCCCCAG GTGCGGATCC TCCCCAGTGA GAAGTCCCAC GAGTCTTACA 180

GCAGATTTCGC TCAGCACA ATG GGC TGC AAA AAC CTG CTC GGT CTG GGC CAG 231
 Met Gly Cys Lys Asn Leu Leu Gly Leu Gly Gln
 1 5 10

CAG ATG CTG CGC CGG AAG GTG GTG GAC TGC AGC CGG GAG GAG AGC CGG 279
 Gln Met Leu Arg Arg Lys Val Val Asp Cys Ser Arg Glu Glu Ser Arg
 15 20 25

CTG TCC CGC TGC CTC AAC ACC TAT GAC CTG GTA GCT CTT GGG GTG GGC 327
 Leu Ser Arg Cys Leu Asn Thr Tyr Asp Leu Val Ala Leu Gly Val Gly
 30 35 40

30

40

AGC Ser	ACC Thr	TTG Leu	GGC Gly	GCT Ala	GGT Gly	GTC Val	TAT Tyr	GTC Val	CTA Leu	GCC Ala	GGT Gly	GCC Ala	GTG Val	GCC Ala	CGT Arg	375	
	45					50					55						
GAA Glu	AAT Asn	GCT Ala	GGC Gly	CCT Pro	GCC Ala	ATC Ile	GTC Val	ATC Ile	TCC Ser	TTC Phe	TTG Leu	ATT Ile	GCT Ala	GCT Ala	CTC Leu	423	
60					65					70					75		
GCC Ala	TCC Ser	GTG Val	CTG Leu	GCC Ala	GGC Gly	CTG Leu	TGC Cys	TAC Tyr	GGC Gly	GAG Glu	TTT Phe	GGT Gly	GCC Ala	CGT Arg	GTC Val	471	
				80					85					90			
CCC Pro	AAG Lys	ACG Thr	GGC Gly	TCA Ser	GCC Ala	TAC Tyr	CTC Leu	TAC Tyr	AGC Ser	TAC Tyr	GTG Val	ACG Thr	GTG Val	GGG Gly	GAG Glu	519	10
			95				100						105				
CTT Leu	TGG Trp	GCC Ala	TTC Phe	ATC Ile	ACT Thr	GGC Gly	TGG Trp	AAC Asn	CTG Leu	ATT Ile	CTC Leu	TCC Ser	TAC Tyr	ATC Ile	ATC Ile	567	
		110					115					120					
GGT Gly	ACT Thr	TCA Ser	AGC Ser	GTG Val	GCA Ala	AGA Arg	GCC Ala	TGG Trp	AGT Ser	GCG Ala	ACT Thr	TTT Phe	GAC Asp	GAG Glu	CTG Leu	615	
	125					130					135						
ATA Ile	GGC Gly	AAG Lys	CCC Pro	ATC Ile	GGA Gly	GAG Glu	TTC Phe	TCA Ser	CGT Arg	CAG Gln	CAC His	ATG Met	GCC Ala	CTG Leu	AAT Asn	663	
140					145					150					155		
GCT Ala	CCT Pro	GGG Gly	GTG Val	CTG Leu	GCC Ala	CAA Gln	ACC Thr	CCG Pro	GAC Asp	ATA Ile	TTT Phe	GCT Ala	GTG Val	ATT Ile	ATA Ile	711	20
				160					165					170			
ATT Ile	ATC Ile	ATC Ile	TTA Leu	ACA Thr	GGA Gly	CTG Leu	TTA Leu	ACT Thr	CTT Leu	GGC Gly	GTG Val	AAG Lys	GAG Glu	TCA Ser	GCC Ala	759	
			175				180						185				
ATG Met	GTC Val	AAC Asn	AAA Lys	ATT Ile	TTC Phe	ACC Thr	TGT Cys	ATC Ile	AAT Asn	GTC Val	CTG Leu	GTC Val	TTG Leu	TGC Cys	TTC Phe	807	
		190					195					200					
ATC Ile	GTG Val	GTG Val	TCC Ser	GGG Gly	TTC Phe	GTG Val	AAA Lys	GGC Gly	TCC Ser	ATT Ile	AAA Lys	AAC Asn	TGG Trp	CAG Gln	CTC Leu	855	
	205					210					215						
ACG Thr	GAG Glu	AAA Lys	AAT Asn	TTC Phe	TCC Ser	TGT Cys	AAC Asn	AAC Asn	AAC Asn	GAC Asp	ACA Thr	AAC Asn	GTG Val	AAA Lys	TAC Tyr	903	30
220				225						230					235		
GGT Gly	GAG Glu	GGA Gly	GGG Gly	TTT Phe	ATG Met	CCC Pro	TTT Phe	GGA Gly	TTC Phe	TCT Ser	GGT Gly	GTC Val	CTG Leu	TCA Ser	GGG Gly	951	
				240				245						250			
GCA Ala	GCG Ala	ACC Thr	TGC Cys	TTT Phe	TAT Tyr	GCC Ala	TTC Phe	GTG Val	GGC Gly	TTT Phe	GAC Asp	TGC Cys	ATC Ile	GCC Ala	ACC Thr	999	
			255					260					265				
ACA Thr	GGG Gly	GAA Glu	GAA Glu	GTC Val	AAG Lys	AAC Asn	CCC Pro	CAG Gln	AAG Lys	GCC Ala	ATT Ile	CCT Pro	GTG Val	GGC Gly	ATC Ile	1047	
		270					275					280					
GTG Val	GCG Ala	TCC Ser	CTC Leu	CTC Leu	ATT Ile	TGC Cys	TTC Phe	ATA Ile	GCG Ala	TAC Tyr	TTT Phe	GGC Gly	GTG Val	TCC Ser	GCC Ala	1095	40
	285					290					295						
GCT Ala	CTC Leu	ACG Thr	CTC Leu	ATG Met	ATG Met	CCT Pro	TAC Tyr	TTC Phe	TGC Cys	CTG Leu	GAC Asp	ATC Ile	GAC Asp	AGC Ser	CCG Pro	1143	
300					305					310					315		

CTG CCT GGT GCC TTC AAG CAC CAG GGC TGG GAA GAA GCT AAG TAC GCA 1191
 Leu Pro Gly Ala Phe Lys His Gln Gly Trp Glu Glu Ala Lys Tyr Ala
 320 325 330

GTG GCC ATT GGC TCT CTC TGC GCA CTT TCC ACC AGT CTC CTA GGC TCC 1239
 Val Ala Ile Gly Ser Leu Cys Ala Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Ser
 335 340 345

ATG TTT CCC ATG CCC CGA GTT ATC TAT GCC ATG GCT GAA GAT GGA CTA 1287
 Met Phe Pro Met Pro Arg Val Ile Tyr Ala Met Ala Glu Asp Gly Leu
 350 355 360

CTG TTT AAA TTT TTG GCC AAA ATC AAC AAT AGG ACC AAA ACA CCC GTA 1335
 Leu Phe Lys Phe Leu Ala Lys Ile Asn Asn Arg Thr Lys Thr Pro Val
 365 370 375

ATC GCC ACT GTG ACC TCA GGC GCC ATT GCT GCT GTG ATG GCC TTC CTC 1383
 Ile Ala Thr Val Thr Ser Gly Ala Ile Ala Val Met Ala Phe Leu
 380 385 390 395

TTT GAA CTG AAG GAC CTG GTG GAC CTC ATG TCC ATT GGC ACT CTC CTG 1431
 Phe Glu Leu Lys Asp Leu Val Asp Leu Met Ser Ile Gly Thr Leu Leu
 400 405 410

GCT TAC TCT TTG GTG GCT GCC TGT GTT TTG GTC TTA CGG TAC CAG CCA 1479
 Ala Tyr Ser Leu Val Ala Ala Cys Val Leu Val Leu Arg Tyr Gln Pro
 415 420 425

GAA CAA CCT AAT CTG GTA TAC CAG ATG GCC AGA ACC ACC GAG GAG CTA 1527
 Glu Gln Pro Asn Leu Val Tyr Gln Met Ala Arg Thr Thr Glu Glu Leu
 430 435 440

GAT CGA GTA GAT CAG AAT GAG CTG GTC AGT GCC AGT GAA TCA CAG ACA 1575
 Asp Arg Val Asp Gln Asn Glu Leu Val Ser Ala Ser Glu Ser Gln Thr
 445 450 455

GGC TTT TTA CCG GTA GCC GAG AAG TTT TCT CTG AAA TCC ATC CTC TCA 1623
 Gly Phe Leu Pro Val Ala Glu Lys Phe Ser Leu Lys Ser Ile Leu Ser
 460 465 470 475

CCC AAG AAC GTG GAG CCC TCC AAA TTC TCA GGG CTA ATT GTG AAC ATT 1671
 Pro Lys Asn Val Glu Pro Ser Lys Phe Ser Gly Leu Ile Val Asn Ile
 480 485 490

TCA GCC GGC CTC CTA GCC GCT CTT ATC ATC ACC GTG TGC ATT GTG GCC 1719
 Ser Ala Gly Leu Leu Ala Ala Leu Ile Ile Thr Val Cys Ile Val Ala
 495 500 505

GTG CTT GGA AGA GAG GCC CTG GCC GAA GGG ACA CTG TGG GCA GTC TTT 1767
 Val Leu Gly Arg Glu Ala Leu Ala Glu Gly Thr Leu Trp Ala Val Phe
 510 515 520

GTA ATG ACA GGG TCA GTC CTC CTC TGC ATG CTG GTG ACA GGC ATC ATC 1815
 Val Met Thr Gly Ser Val Leu Leu Cys Met Leu Val Thr Gly Ile Ile
 525 530 535

TGG AGA CAG CCT GAG AGC AAG ACC AAG CTC TCA TTT AAG GTA CCC TTT 1863
 Trp Arg Gln Pro Glu Ser Lys Thr Lys Leu Ser Phe Lys Val Pro Phe
 540 545 550 555

GTC CCC GTA CTT CCT GTC TTG AGC ATC TTC GTG AAC ATC TAT CTC ATG 1911
 Val Pro Val Leu Pro Val Leu Ser Ile Phe Val Asn Ile Tyr Leu Met
 560 565 570

ATG CAG CTG GAC CAG GGC ACG TGG GTC CGG TTT GCA GTG TGG ATG CTG 1959
 Met Gln Leu Asp Gln Gly Thr Trp Val Arg Phe Ala Val Trp Met Leu
 575 580 585

10

20

30

40

ATA GGT TTC ACC ATC TAT TTC GGT TAT GGG ATC TGG CAC AGT GAG GAA 2007
 Ile Gly Phe Thr Ile Tyr Phe Gly Tyr Gly Ile Trp His Ser Glu Glu
 590 595 600

GCG TCC CTG GCT GCT GGC CAG GCA AAG ACT CCT GAC AGC AAC TTG GAC 2055
 Ala Ser Leu Ala Ala Gly Gln Ala Lys Thr Pro Asp Ser Asn Leu Asp
 605 610 615

CAG TGC AAA TGACGTGCAG CCCACCCAC CAGGGTGACA GCGGTTGACG 2104
 Gln Cys Lys
 620

GGTGCCCGTA GAAGCCTGGG ACCCTCACAA TCTCTCCACT CATGCCTCAG GATCAGCTCA 2164

CACCCCAAT GTCACCAAAG CTGGTTTGCT GCCAGCTCGT GAGATCCTGG TCATTTCTGG 2224
 ACAGTCCCTT GGTTTACTCA TCTCCCTCTG AACAAAGAAA GCAGCCCTTC TCCTTGCCGG 2284

CCGGCCGGGC GCTTCGCTGC TCGGGCCCCA GCAGAAGGGA GGCCCCCTTC TCCTCTCACT 2344
 TGGGAAGCAG GCCTCCCTCC CTCCCTGGGA CCACCCTGGC ATGCCCCATG TGCACACTCC 2404
 AGATGGCTAG TGAGCCTCTC C 2425

配列番号:4

配列の長さ:622

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:タンパク質

配列

Met Gly Cys Lys Asn Leu Leu Gly Leu Gly Gln Gln Met Leu Arg Arg
 1 5 10 15

Lys Val Val Asp Cys Ser Arg Glu Glu Ser Arg Leu Ser Arg Cys Leu
 20 25 30

Asn Thr Tyr Asp Leu Val Ala Leu Gly Val Gly Ser Thr Leu Gly Ala
 35 40 45

Gly Val Tyr Val Leu Ala Gly Ala Val Ala Arg Glu Asn Ala Gly Pro
 50 55 60

Ala Ile Val Ile Ser Phe Leu Ile Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Cys Tyr Gly Glu Phe Gly Ala Arg Val Pro Lys Thr Gly Ser
 85 90 95

Ala Tyr Leu Tyr Ser Tyr Val Thr Val Gly Glu Leu Trp Ala Phe Ile
 100 105 110

Thr Gly Trp Asn Leu Ile Leu Ser Tyr Ile Ile Gly Thr Ser Ser Val
 115 120 125

Ala Arg Ala Trp Ser Ala Thr Phe Asp Glu Leu Ile Gly Lys Pro Ile
 130 135 140

10

20

30

40

Gly Glu Phe Ser Arg Gln His Met Ala Leu Asn Ala Pro Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Ala Gln Thr Pro Asp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ile Ile Ile Leu Thr
 165 170 175
 Gly Leu Leu Thr Leu Gly Val Lys Glu Ser Ala Met Val Asn Lys Ile
 180 185 190
 Phe Thr Cys Ile Asn Val Leu Val Leu Cys Phe Ile Val Val Ser Gly
 195 200 205
 Phe Val Lys Gly Ser Ile Lys Asn Trp Gln Leu Thr Glu Lys Asn Phe
 210 215 220
 Ser Cys Asn Asn Asn Asp Thr Asn Val Lys Tyr Gly Glu Gly Gly Phe
 225 230 235 240
 Met Pro Phe Gly Phe Ser Gly Val Leu Ser Gly Ala Ala Thr Cys Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Phe Val Gly Phe Asp Cys Ile Ala Thr Thr Gly Glu Glu Val
 260 265 270
 Lys Asn Pro Gln Lys Ala Ile Pro Val Gly Ile Val Ala Ser Leu Leu
 275 280 285
 Ile Cys Phe Ile Ala Tyr Phe Gly Val Ser Ala Ala Leu Thr Leu Met
 290 295 300
 Met Pro Tyr Phe Cys Leu Asp Ile Asp Ser Pro Leu Pro Gly Ala Phe
 305 310 315 320
 Lys His Gln Gly Trp Glu Glu Ala Lys Tyr Ala Val Ala Ile Gly Ser
 325 330 335
 Leu Cys Ala Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Ser Met Phe Pro Met Pro
 340 345 350
 Arg Val Ile Tyr Ala Met Ala Glu Asp Gly Leu Leu Phe Lys Phe Leu
 355 360 365
 Ala Lys Ile Asn Asn Arg Thr Lys Thr Pro Val Ile Ala Thr Val Thr
 370 375 380
 Ser Gly Ala Ile Ala Ala Val Met Ala Phe Leu Phe Glu Leu Lys Asp
 385 390 395 400
 Leu Val Asp Leu Met Ser Ile Gly Thr Leu Leu Ala Tyr Ser Leu Val
 405 410 415
 Ala Ala Cys Val Leu Val Leu Arg Tyr Gln Pro Glu Gln Pro Asn Leu
 420 425 430
 Val Tyr Gln Met Ala Arg Thr Thr Glu Glu Leu Asp Arg Val Asp Gln
 435 440 445
 Asn Glu Leu Val Ser Ala Ser Glu Ser Gln Thr Gly Phe Leu Pro Val
 450 455 460
 Ala Glu Lys Phe Ser Leu Lys Ser Ile Leu Ser Pro Lys Asn Val Glu
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Phe Ser Gly Leu Ile Val Asn Ile Ser Ala Gly Leu Leu
 485 490 495
 Ala Ala Leu Ile Ile Thr Val Cys Ile Val Ala Val Leu Gly Arg Glu
 500 505 510
 Ala Leu Ala Glu Gly Thr Leu Trp Ala Val Phe Val Met Thr Gly Ser
 515 520 525

10

20

30

40

Val Leu Leu Cys Met Leu Val Thr Gly Ile Ile Trp Arg Gln Pro Glu
 530 535 540

Ser Lys Thr Lys Leu Ser Phe Lys Val Pro Phe Val Pro Val Leu Pro
 545 550 555 560

Val Leu Ser Ile Phe Val Asn Ile Tyr Leu Met Met Gln Leu Asp Gln
 565 570 575

Gly Thr Trp Val Arg Phe Ala Val Trp Met Leu Ile Gly Phe Thr Ile
 580 585 590

Tyr Phe Gly Tyr Gly Ile Trp His Ser Glu Glu Ala Ser Leu Ala Ala
 595 600 605

Gly Gln Ala Lys Thr Pro Asp Ser Asn Leu Asp Gln Cys Lys
 610 615 620

10

配列番号:5

配列の長さ:2397

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号:CDS

存在位置:410..1768

20

配列

GGGTGTCITT CCTCATCGCT GCCCTGGCCT CGGTTATGGC CGGCCCTTTC TATGCTGAAT 60
 TTGGGGCCCG AGTACCCAAG ACTGGATCTG CGTATCTATA CACTTACGTC ACGGTCGGAG 120
 AGCTGTGGGC CTTCATCACT GGCTGGAATC TCATCCTGTC ATATGTCATA GGTACGTCCA 180
 GTGTCGCAAG AGCATGGAGT GGCACCTTTG ACGAACTTCT TAATAAACAG ATTGGCCAGT 240
 TTTTCAAAC GTACTTCAA ATGAATTACA CTGGTCTGGC AGAGTATCCA GACTTCTTTG 300
 CCGTGTGCCT TGTATTACTC CTGGCAGGTC TTTTATCTTT TGGAGTAAAA GAGTCTGCTT 360
 GGGTGAATAA ATTTTTACAG CTATTAATAT CCTGGTCCTT CTCCTTGTG ATG GTG 415

30

GCT GGG TTT GTG AAA GGA AAT GTG GCT AAC TGG AAG ATC AGT GAA GAG 463
 Ala Gly Phe Val Lys Gly Asn Val Ala Asn Trp Lys Ile Ser Glu Glu
 5 10 15

TTT CTC AAA AAT ATA TCA GCA AGT GCT AGA GAA CCA CCT TCT GAG AAC 511
 Phe Leu Lys Asn Ile Ser Ala Ser Ala Arg Glu Pro Pro Ser Glu Asn
 20 25 30

GGA ACA AGC ATC TAC GGG GCT GGC GGC TTT ATG CCC TAT GGC TTT ACA 559
 Gly Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Met Pro Tyr Gly Phe Thr
 35 40 45 50

40

GGG ACG TTG GCT GGT GCT GCA ACG TGC TTT TAT GCC TTT GTG GGC TTT 607
 Gly Thr Leu Ala Gly Ala Ala Thr Cys Phe Tyr Ala Phe Val Gly Phe
 55 60 65

GAC TGC ATT GCA ACA ACC GGT GAA GAG GTT CGG AAT CCA CAA AAG GCG 655
 Asp Cys Ile Ala Thr Thr Gly Glu Glu Val Arg Asn Pro Gln Lys Ala

70				75				80									
ATC	CCC	ATC	GGA	ATA	GTG	ALG	TCC	TTA	CTT	GTC	TGC	TTT	ATG	GCT	TAC	703	
Ile	Pro	Ile	Gly	Ile	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Cys	Phe	Met	Ala	Tyr		
		85					90					95					
TTT	GGG	GTT	TCT	GCA	GCT	TTA	ACG	CTT	ATG	ATG	CCT	TAC	TAC	CTC	CTG	751	
Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Met	Met	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Leu		
	100					105					110						
GAT	GAG	AAA	AGT	CCA	CTC	CCA	GTC	GCG	TTT	GAG	TAT	GTC	AGA	TGG	GGC	799	
Asp	Glu	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Glu	Tyr	Val	Arg	Trp	Gly		
115					120					125					130		
CCC	GCC	AAA	TAC	GTT	GTG	GCA	GCA	GGC	TCC	CTC	TGC	GCC	TTA	TCA	ACA	847	10
Pro	Ala	Lys	Tyr	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Thr		
				135					140					145			
AGT	CTT	CTT	GGA	TCC	ATT	TTC	CCA	ATG	CCT	CGT	GTA	ATC	TAT	GCT	ATG	895	
Ser	Leu	Leu	Gly	Ser	Ile	Phe	Pro	Met	Pro	Arg	Val	Ile	Tyr	Ala	Met		
			150					155					160				
GCG	GAG	GAT	GGG	TTG	CTT	TTC	AAA	TGT	CTA	GCT	CAA	ATC	AAT	TCC	AAA	943	
Ala	Glu	Asp	Gly	Leu	Leu	Phe	Lys	Cys	Leu	Ala	Gln	Ile	Asn	Ser	Lys		
		165					170					175					
ACG	AAG	ACA	CCA	GTA	ATT	GCT	ACT	TTG	TCA	TCG	GGT	GCA	GTG	GCA	GCT	991	
Thr	Lys	Thr	Pro	Val	Ile	Ala	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	Ala		
	180					185					190						
GTG	ATG	GCC	TTT	CTT	TTT	GAC	CTG	AAG	GCC	CTC	GTG	GAC	ATG	ATG	TCT	039	20
Val	Met	Ala	Phe	Leu	Phe	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Val	Asp	Met	Met	Ser		
195					200					205					210		
ATT	GGC	ACC	CTC	ATG	GCC	TAC	TCT	CTG	GTG	GCA	GCC	TGT	GTG	CTT	ATT	087	
Ile	Gly	Thr	Leu	Met	Ala	Tyr	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Cys	Val	Leu	Ile		
				215					220				225				
CTC	AGG	TAC	CAA	CCT	GGC	TTG	TGT	TAC	GAG	CAG	CCC	AAA	TAC	ACC	CCT	1135	
Leu	Arg	Tyr	Gln	Pro	Gly	Leu	Cys	Tyr	Glu	Gln	Pro	Lys	Tyr	Thr	Pro		
			230					235					240				
GAG	AAA	GAA	ACT	CTG	GAA	TCA	TGT	ACC	AAT	GCG	ACT	TTG	AAG	AGC	GAG	1183	
Glu	Lys	Glu	Thr	Leu	Glu	Ser	Cys	Thr	Asn	Ala	Thr	Leu	Lys	Ser	Glu		
		245					250					255					
TCC	CAG	GTC	ACC	ATG	CTG	CAA	GGA	CAG	GGT	TTC	AGC	CTA	CGA	ACC	CTC	1231	30
Ser	Gln	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Leu		
		260				265					270						
TTC	AGC	CCC	TCT	GCC	CTG	CCC	ACA	CGA	CAG	TCG	ECT	TCC	CTT	GTG	AGC	1279	
Phe	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Thr	Arg	Gln	Ser	Ala	Ser	Leu	Val	Ser		
275					280					285					290		
TTT	CTG	GTG	GGA	TTC	CTG	GCT	TTC	CTC	ATC	CTG	GGC	TTG	AGT	ATT	CTA	1327	
Phe	Leu	Val	Gly	Phe	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu		
				295					300					305			
ACC	ACG	TAT	GGC	GTG	CAG	GCC	ATT	GCC	AGA	CTG	GAA	GCC	TGG	AGC	CTG	1375	
Thr	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Ala	Ile	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Trp	Ser	Leu		
			310					315					320				
GCT	CTT	CTC	GCC	CTG	TTC	CTT	GTC	CTC	TGC	GCT	GCC	GTC	ATT	CTG	ACC	1423	40
Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	Leu	Cys	Ala	Ala	Val	Ile	Leu	Thr		
		325					330					335					
ATT	TGG	AGG	CAG	CCA	CAG	AAT	CAG	CAA	AAA	GTA	GCC	TTC	ATG	GTC	CCG	1471	
Ile	Trp	Arg	Gln	Pro	Gln	Asn	Gln	Gln	Lys	Val	Ala	Phe	Met	Val	Pro		

340	345	350		
TTC TTA CCG TTT CTG CCG GCC TTC AGC ATC CTG GTC AAC ATT TAC TTG Phe Leu Pro Phe Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Val Asn Ile Tyr Leu 355 360 365 370			1519	
ATG GTC CAG TTA AGT GCG GAC ACT TGG ATC AGA TTC AGC ATC TGG ATG Met Val Gln Leu Ser Ala Asp Thr Trp Ile Arg Phe Ser Ile Trp Met 375 380 385			1567	
GCG CTT GGC TTT CTG ATC TAT TTC GCC TAT GGC ATT AGA CAC AGC TTG Ala Leu Gly Phe Leu Ile Tyr Phe Ala Tyr Gly Ile Arg His Ser Leu 390 395 400			1615	10
GAG GGT AAC CCC AGG GAC GAA GAA GAC GAT GAG GAT GCC TTT TCA GAA Glu Gly Asn Pro Arg Asp Glu Glu Asp Asp Glu Asp Ala Phe Ser Glu 405 410 415			1663	
AAC ATC AAT GTA GCA ACA GAA GAA AAG TCC GTC ATG CAA GCA AAT GAC Asn Ile Asn Val Ala Thr Glu Glu Lys Ser Val Met Gln Ala Asn Asp 420 425 430			1711	
CAT CAC CAA AGA AAC CTC AGC TTA CCT TTC ATA CTT CAT GAA AAG ACA His His Gln Arg Asn Leu Ser Leu Pro Phe Ile Leu His Glu Lys Thr 435 440 445 450			1759	
AGT GAA TGT TGATGCTGGC CCTCGGTCTT ACCACGCATA CCTTAACAAT Ser Glu Cys			1808	20
GAGTACACTG TGGCCGGATG CCACCATCGT GCTGGGCTGT CGTGGGTC TG GGCTTGCCTA ACTTGTACTT CCTCCTCCAG ACAGCTTCTC TTCAGATGGT GGATTTCTGTG			1868	
TCTGAGGAGA CTGCCTGAGA GCACTCCTCA GCTATATGTA TCCCCAAAAC AGTATGTCCG			1928	
TGTGCGTACA TGTATGTCTG CGATGTGAGT GTTCAATGTT GTCCGTTATT AGTCTGTGAC			1988	
ATAATTCCAG CATGGTAATT GGTGGCATAT ACTGCACACA CTAGTAAACA GSTATATTGCT			2048	
GAATAGAGAT GTATTCTGTA TATGTCCCTAG GTGGCTGGGG AAATAGTGGT GGTTCCTTTA			2108	
TTAGGTATAT GACCATCAGT TTGGACATAC TGAAATGCCA TCCCCTGTCA GGATGTTTAA			2168	30
CAGTGGTCAT GGGTGGGGAA GGGATAAGGA ATGGGCATTG TCTATAAATT GTAATGCATA			2228	
TATCCTTCTC CTACTTGCTA AGACAGCTTT CTTAAACGGC CAGGGAGAGT GTTTCCTTCC			2288	
TCTGTATGAC AAGATGAAGA GGTAGTCTGT GGCTGGAGAT GGCCAATCC			2348	
			2397	

配列番号:6

配列の長さ:453

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:タンパク質

配列

Met Val Ala Gly Phe Val Lys Gly Asn Val Ala Asn Trp Lys Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Phe Leu Lys Asn Ile Ser Ala Ser Ala Arg Glu Pro Pro Ser
 20 25 30
 Glu Asn Gly Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Met Pro Tyr Gly
 35 40 45
 Phe Thr Gly Thr Leu Ala Gly Ala Ala Thr Cys Phe Tyr Ala Phe Val
 50 55 60
 Gly Phe Asp Cys Ile Ala Thr Thr Gly Glu Glu Val Arg Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Lys Ala Ile Pro Ile Gly Ile Val Thr Ser Leu Leu Val Cys Phe Met
 85 90 95
 Ala Tyr Phe Gly Val Ser Ala Ala Leu Thr Leu Met Met Pro Tyr Tyr
 100 105 110
 Leu Leu Asp Glu Lys Ser Pro Leu Pro Val Ala Phe Glu Tyr Val Arg
 115 120 125
 Trp Gly Pro Ala Lys Tyr Val Val Ala Ala Gly Ser Leu Cys Ala Leu
 130 135 140
 Ser Thr Ser Leu Leu Gly Ser Ile Phe Pro Met Pro Arg Val Ile Tyr
 145 150 155 160
 Ala Met Ala Glu Asp Gly Leu Leu Phe Lys Cys Leu Ala Gln Ile Asn
 165 170 175
 Ser Lys Thr Lys Thr Pro Val Ile Ala Thr Leu Ser Ser Gly Ala Val
 180 185 190
 Ala Ala Val Met Ala Phe Leu Phe Asp Leu Lys Ala Leu Val Asp Met
 195 200 205
 Met Ser Ile Gly Thr Leu Met Ala Tyr Ser Leu Val Ala Ala Cys Val
 210 215 220
 Leu Ile Leu Arg Tyr Gln Pro Gly Leu Cys Tyr Glu Gln Pro Lys Tyr
 225 230 235 240
 Thr Pro Glu Lys Glu Thr Leu Glu Ser Cys Thr Asn Ala Thr Leu Lys
 245 250 255
 Ser Glu Ser Gln Val Thr Met Leu Gln Gly Gln Gly Phe Ser Leu Arg
 260 265 270
 Thr Leu Phe Ser Pro Ser Ala Leu Pro Thr Arg Gln Ser Ala Ser Leu
 275 280 285
 Val Ser Phe Leu Val Gly Phe Leu Ala Phe Leu Ile Leu Gly Leu Ser
 290 295 300
 Ile Leu Thr Thr Tyr Gly Val Gln Ala Ile Ala Arg Leu Glu Ala Trp
 305 310 315 320
 Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Leu Val Leu Cys Ala Ala Val Ile
 325 330 335
 Leu Thr Ile Trp Arg Gln Pro Gln Asn Gln Gln Lys Val Ala Phe Met
 340 345 350

10

20

30

40

Val Pro Phe Leu Pro Phe Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Val Asn Ile
 355 360 365
 Tyr Leu Met Val Gln Leu Ser Ala Asp Thr Trp Ile Arg Phe Ser Ile
 370 375 380
 Trp Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Tyr Phe Ala Tyr Gly Ile Arg His
 385 390 395 400
 Ser Leu Glu Gly Asn Pro Arg Asp Glu Glu Asp Asp Glu Asp Ala Phe
 405 410 415
 Ser Glu Asn Ile Asn Val Ala Thr Glu Glu Lys Ser Val Met Gln Ala
 420 425 430
 Asn Asp His His Gln Arg Asn Leu Ser Leu Pro Phe Ile Leu His Glu
 435 440 445
 Lys Thr Ser Glu Cys
 450

10

配列番号:7

配列の長さ:2157

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

20

配列の特徴

特徴を表す記号:CDS

存在位置:148..2034

配列

CGATCCTGCC GGAGCCCCGC CGCCGCCGGC TTGGATTCTG AACCTTCCT TGTATCCCTC 60
 CTGAGACATC TTTGCTGCAA GATCGAGGCT GTCCTCTGGT GAGAAGGTGG TGAGGCTTCC 120
 CGTCATATTC CAGCTCTGAA CAGCAAC ATG GGG TGC AAA GTC CTG CTC AAC ATT 174
 Met Gly Cys Val Leu Leu Asn Ile Ile
 5
 GGG CAG CAG ATG CTG CGG CGG AAG GTG GTG GAC TGT AGC CGG GAG GAG 222 30
 Gly Gln Gln Met Leu Arg Arg Lys Val Val Asp Cys Ser Arg Glu Glu
 10 15 20 25
 ACG CGG CTG TCT CGC TGC CTG AAC ACT TTT GAT CTG GTG GCC CTC GGG 270
 Thr Arg Leu Ser Arg Cys Leu Asn Thr Phe Asp Leu Val Ala Leu Gly
 30 35 40
 GTG GGC AGC ACA CTG GGT GCT GGT GTC TAC GTC CTG GCT GGA GCT GTG 318
 Val Gly Ser Thr Leu Gly Ala Gly Val Tyr Val Leu Ala Gly Ala Val
 45 50 55
 GCC CGT GAG AAT GCA GGC CCT GCC ATT GTC ATC TCC TTC CTG ATC GCT 366 40
 Ala Arg Glu Asn Ala Gly Pro Ala Ile Val Ile Ser Phe Leu Ile Ala
 60 65 70
 GCG CTG GCC TCA GTG CTG GCT GGC CTG TGC TAT GGC GAG TTT GGT GCT 414
 Ala Leu Ala Ser Val Leu Ala Gly Leu Cys Tyr Gly Glu Phe Gly Ala
 75 80 85

CGG GTC CCC AAG ACG GGC TCA GCT TAC CTC TAC AGC TAT GTC ACC GTT	462
Arg Val Pro Lys Thr Gly Ser Ala Tyr Leu Tyr Ser Tyr Val Thr Val	
90 95 100 105	
GGA GAG CTC TGG GCC TTC ATC ACC GGC TGG AAC TTA ATC CTC TCC TAC	507
Gly Glu Leu Trp Ala Phe Ile Thr Gly Trp Asn Leu Ile Leu Ser Tyr	
110 115 120	
ATC ATC GGT ACT TCA AGC GTA GCG AGG GCC TGG AGC GCC ACC TTC GAC	558
Ile Ile Gly Thr Ser Ser Val Ala Arg Ala Trp Ser Ala Thr Phe Asp	
125 130 135	
GAG CTG ATA GGC AGA CCC ATC GGG GAG TTC TCA CGG ACA CAC ATG ACT	606
Glu Leu Ile Gly Arg Pro Ile Gly Glu Phe Ser Arg Thr His Met Thr	
140 145 150	
CTG AAC GCC CCC GGC GTG CTG GCT GAA AAC CCC GAC ATA TTC GCA GTG	654
Leu Asn Ala Pro Gly Val Leu Ala Glu Asn Pro Asp Ile Phe Ala Val	
155 160 165	
ATC ATA ATT CTC ATC TTG ACA GGA CTT TTA ACT CTT GGT GTG AAA GAG	702
Ile Ile Ile Leu Ile Leu Thr Gly Leu Leu Thr Leu Gly Val Lys Glu	
170 175 180 185	
TCG GCC ATG GTC AAC AAA ATA TTC ACT TGT ATT AAC GTC CTG GTC CTG	750
Ser Ala Met Val Asn Lys Ile Phe Thr Cys Ile Asn Val Leu Val Leu	
190 195 200	
GGC TTC ATA ATG GTG TCA GGA TTT GTG AAA GGA TCG GTT AAA AAC TGG	798
Gly Phe Ile Met Val Ser Gly Phe Val Lys Gly Ser Val Lys Asn Trp	
205 210 215	
CAG CTC ACG GAG GAG GAT TTT GGG AAC ACA TCA GGC CGT CTC TGT TTG	846
Gln Leu Thr Glu Glu Asp Phe Gly Asn Thr Ser Gly Arg Leu Cys Leu	
220 225 230	
AAC AAT GAC ACA AAA GAA GGG AAG CCC GGT GTT GGT GGA TTC ATG CCC	894
Asn Asn Asp Thr Lys Glu Gly Lys Pro Gly Val Gly Gly Phe Met Pro	
235 240 245	
TTC GGG TTC TCT GGT GTC CTG TCG GGG GCA GCG ACT TGC TTC TAT GCC	942
Phe Gly Phe Ser Gly Val Leu Ser Gly Ala Ala Thr Cys Phe Tyr Ala	
250 255 260 265	
TTC GTG GGC TTT GAC TGC ATC GCC ACC ACA GGT GAA GAG GTG AAG AAC	990
Phe Val Gly Phe Asp Cys Ile Ala Thr Thr Gly Glu Glu Val Lys Asn	
270 275 280	
CCA CAG AAG GCC ATC CCC GTG GGG ATC GTG GCG TCC CTC TTG ATC TGC	1038
Pro Gln Lys Ala Ile Pro Val Gly Ile Val Ala Ser Leu Leu Ile Cys	
285 290 295	
TTC ATC GCC TAC TTT GGG GTG TCG GCT GCC CTC ACG CTC ATG ATG CCC	1086
Phe Ile Ala Tyr Phe Gly Val Ser Ala Ala Leu Thr Leu Met Met Pro	
300 305 310	
TAC TTC TGC CTG GAC AAT AAC AGC CCC CTG CCC GAC GCC TTT AAG CAC	1134
Tyr Phe Cys Leu Asp Asn Asn Ser Pro Leu Pro Asp Ala Phe Lys His	
315 320 325	
GTG GGC TGG GAA GGT GCC AAG TAC GCA GTG GCC GTG GGC TCC CTC TGC	1182
Val Gly Trp Glu Gly Ala Lys Tyr Ala Val Ala Val Gly Ser Leu Cys	
330 335 340 345	
GCT CTT TCC GCC AGT CTT CTA GGT TCC ATG TTT CCC ATG CCT CGG GTT	1230
Ala Leu Ser Ala Ser Leu Leu Gly Ser Met Phe Pro Met Pro Arg Val	
350 355 360	
ATC TAT GCC ATG GCT GAG GAT GGA CTG CTA TTT AAA TTC TTA GCC AAC	1278
Ile Tyr Ala Met Ala Glu Asp Gly Leu Leu Phe Lys Phe Leu Ala Asn	
365 370 375	
GTC AAT GAT AGG ACC AAA ACA CCA ATA ATC GCC ACA TTA GCC TCG GGT	1326
Val Asn Asp Arg Thr Lys Thr Pro Ile Ile Ala Thr Leu Ala Ser Gly	
380 385 390	
GCC GTT GCT GCT GTG ATG GCC TTC CTC TTT GAC CTG AAG GAC TTG GTG	1374
Ala Val Ala Ala Val Met Ala Phe Leu Phe Asp Leu Lys Asp Leu Val	
395 400 405	

10

20

30

40

GAC Asp 410	CTC Leu	ATG Met	TCC Ser	ATT Ile	GGC Gly 415	ACT Thr	CTC Leu	CTG Leu	GCT Ala	TAC Tyr 420	TCG Ser	TTG Leu	GTG Val	GCT Ala 425	GCC Ala	1422	
TGT Cys	GTG Val	TTG Leu	GTC Val	TTA Leu 430	CGG Arg	TAC Tyr	CAG Gln	CCA Pro	GAG Glu 435	CAG Gln	CCT Pro	AAC Asn	CTG Leu	GTA Val 440	TAC Tyr	1470	
CAG Gln	ATG Met	GCC Ala	AGT Ser 445	ACT Thr	TCC Ser	GAC Asp	GAG Glu	TTA Leu 450	GAT Asp	CCA Pro	GCA Ala	GAC Asp	CAA Gln 455	AAT Asn	GAA Glu	1518	
TTG Leu	GCA Ala	AGC Ser 460	ACC Thr	AAT Asn	GAT Asp	TCC Ser	CAG Gln 465	CTG Leu	GGG Gly	TTT Phe	TTA Leu	CCA Pro 470	GAG Glu	GCA Ala	GAG Glu	1566	10
ATG Met	TTC Phe 475	TCT Ser	TTG Leu	AAA Lys	ACC Thr	ATA Ile 480	CTC Leu	TCA Ser	CCC Pro	AAA Lys 485	AAC Asn	ATG Met	GAG Glu	CCT Pro	TCC Ser	1614	
AAA Lys 490	ATC Ile	TCT Ser	GGG Gly	CTA Leu	ATT Ile 495	GTG Val	AAC Asn	ATT Ile	TCA Ser	ACC Thr 500	AGC Ser	CTT Leu	ATA Ile	GCT Ala 505	GTT Val	1662	
CTC Leu	ATC Ile	ATC Ile	ACC Thr 510	TTC Phe	TGC Cys	ATT Ile	GTG Val	ACC Thr 515	GTG Val	CTT Leu	GGA Gly	AGG Arg	GAG Glu	GCT Ala 520	CTC Leu	1710	
ACC Thr	AAA Lys	GGG Gly	GCG Ala 525	CTG Leu	TGG Trp	GCA Ala	GTC Val	TTT Phe 530	CTG Leu	CTC Leu	GCA Ala	GGG Gly 535	TCT Ser	GCC Ala	CTC Leu	1758	20
CTC Leu	TGT Cys	GCC Ala 540	GTG Val	GTC Val	ACG Thr	GGC Gly	GTC Val 545	ATC Ile	TGG Trp	AGG Arg	CAG Gln	CCC Pro 550	GAG Glu	AGC Ser	AAG Lys	1806	
ACC Thr	AAG Lys 555	CTC Leu	TCA Ser	TTT Phe	AAG Lys	GTT Val 560	CCC Pro	TTC Phe	CTG Leu	CCA Pro	GTG Val 565	CTC Leu	CCC Pro	ATC Ile	CTG Leu	1854	
AGC Ser 570	ATC Ile	TTC Phe	GTG Val	AAC Asn	GTC Val 575	TAT Tyr	CTC Leu	ATG Met	ATG Met	CAG Gln 580	CTG Leu	GAC Asp	CAG Gln	GGC Gly	ACC Thr 585	1902	30
TGG Trp	GTC Val	CGG Arg	TTT Phe	GCT Ala 590	GTG Val	TGG Trp	ATG Met	CTG Leu	ATA Ile 595	GGC Gly	TTC Phe	ATC Ile	ATC Ile	TAC Tyr 600	TTT Phe	1950	
GGC Gly	TAT Tyr	GGC Gly	CTG Leu 605	TGG Trp	CAC His	AGC Ser	GAG Glu	GAG Glu	GCG Ala	TCC Ser	CTG Leu	GAT Asp	GCC Ala 615	GAC Asp	CAA Gln	1998	
GCA Ala	AGG Arg	ACT Thr	CCT Pro	GAC Asp	GGC Gly	AAC Asn	TTG Leu 625	GAC Leu	CAG Asp	TGC Gln	AAG Cys	TGACGCACAG				2044	
CCCCGCCCCC	CGGAGGTGGC	AGCAGCCCCG	AGGGACGCCC	CCAGAGGACC	GGGAGGCACC											2104	40
CCACCCTCCC	CACCACTGCA	ACAGAAACCA	CCTGCGTCCA	CACCCTCACT	GCA											2157	

配列番号:8

配列の長さ:629

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:タンパク質

配列

Met Gly Cys Val Leu Leu Asn Ile Ile Gly Gln Gln Met Leu Arg Arg
 5 10 15
 Lys Val Val Asp Cys Ser Arg Glu Glu Thr Arg Leu Ser Arg Cys Leu
 20 25 30
 Asn Thr Phe Asp Leu Val Ala Leu Gly Val Gly Ser Thr Leu Gly Ala
 35 40 45
 Gly Val Tyr Val Leu Ala Gly Ala Val Ala Arg Glu Asn Ala Gly Pro
 50 55 60
 Ala Ile Val Ile Ser Phe Leu Ile Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Ala
 65 70 75 80
 Gly Leu Cys Tyr Gly Glu Phe Gly Ala Arg Val Pro Lys Thr Gly Ser
 85 90 95
 Ala Tyr Leu Tyr Ser Tyr Val Thr Val Gly Glu Leu Trp Ala Phe Ile
 100 105 110
 Thr Gly Trp Asn Leu Ile Leu Ser Tyr Ile Ile Gly Thr Ser Ser Val
 115 120 125
 Ala Arg Ala Trp Ser Ala Thr Phe Asp Glu Leu Ile Gly Arg Pro Ile
 130 135 140
 Gly Glu Phe Ser Arg Thr His Met Thr Leu Asn Ala Pro Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Ala Glu Asn Pro Asp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ile Leu Ile Leu Thr
 165 170 175
 Gly Leu Leu Thr Leu Gly Val Lys Glu Ser Ala Met Val Asn Lys Ile
 180 185 190
 Phe Thr Cys Ile Asn Val Leu Val Leu Gly Phe Ile Met Val Ser Gly
 195 200 205
 Phe Val Lys Gly Ser Val Lys Asn Trp Gln Leu Thr Glu Glu Asp Phe
 210 215 220
 Gly Asn Thr Ser Gly Arg Leu Cys Leu Asn Asn Asp Thr Lys Glu Gly
 225 230 235 240
 Lys Pro Gly Val Gly Gly Phe Met Pro Phe Gly Phe Ser Gly Val Leu
 245 250 255
 Ser Gly Ala Ala Thr Cys Phe Tyr Ala Phe Val Gly Phe Asp Cys Ile
 260 265 270

10

20

30

Ala Thr Thr Gly Glu Glu Val Lys Asn Pro Gln Lys Ala Ile Pro Val
 275 280 285
 Gly Ile Val Ala Ser Leu Leu Ile Cys Phe Ile Ala Tyr Phe Gly Val
 290 295 300
 Ser Ala Ala Leu Thr Leu Met Met Pro Tyr Phe Cys Leu Asp Asn Asn
 305 310 315 320
 Ser Pro Leu Pro Asp Ala Phe Lys His Val Gly Trp Glu Gly Ala Lys
 325 330 335
 Tyr Ala Val Ala Val Gly Ser Leu Cys Ala Leu Ser Ala Ser Leu Leu
 340 345 350
 Gly Ser Met Phe Pro Met Pro Arg Val Ile Tyr Ala Met Ala Glu Asp
 355 360 365
 Gly Leu Leu Phe Lys Phe Leu Ala Asn Val Asn Asp Arg Thr Lys Thr
 370 375 380
 Pro Ile Ile Ala Thr Leu Ala Ser Gly Ala Val Ala Ala Val Met Ala
 385 390 395 400
 Phe Leu Phe Asp Leu Lys Asp Leu Val Asp Leu Met Ser Ile Gly Thr
 405 410 415
 Leu Leu Ala Tyr Ser Leu Val Ala Ala Cys Val Leu Val Leu Arg Tyr
 420 425 430
 Gln Pro Glu Gln Pro Asn Leu Val Tyr Gln Met Ala Ser Thr Ser Asp
 435 440 445
 Glu Leu Asp Pro Ala Asp Gln Asn Glu Leu Ala Ser Thr Asn Asp Ser
 450 455 460
 Gln Leu Gly Phe Leu Pro Glu Ala Glu Met Phe Ser Leu Lys Thr Ile
 465 470 475 480
 Leu Ser Pro Lys Asn Met Glu Pro Ser Lys Ile Ser Gly Leu Ile Val
 485 490 495
 Asn Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ala Val Leu Ile Ile Thr Phe Cys Ile
 500 505 510
 Val Thr Val Leu Gly Arg Glu Ala Leu Thr Lys Gly Ala Leu Trp Ala
 515 520 525
 Val Phe Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Leu Cys Ala Val Val Thr Gly
 530 535 540
 Val Ile Trp Arg Gln Pro Glu Ser Lys Thr Lys Leu Ser Phe Lys Val
 545 550 555 560
 Pro Phe Leu Pro Val Leu Pro Ile Leu Ser Ile Phe Val Asn Val Tyr
 565 570 575
 Leu Met Met Gln Leu Asp Gln Gly Thr Trp Val Arg Phe Ala Val Trp
 580 585 590
 Met Leu Ile Gly Phe Ile Ile Tyr Phe Gly Tyr Gly Leu Trp His Ser
 595 600 605
 Glu Glu Ala Ser Leu Asp Ala Asp Gln Ala Arg Thr Pro Asp Gly Asn
 610 615 620
 Leu Asp Gln Cys Lys
 625

10

20

30

40

配列番号:9

配列の長さ:26

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:DNA

50

配列
AAAGAAGGGA AGTACGGTGT TGGTGG

26

配列番号:10
配列の長さ:31
配列の型:DNA
鎖の数:一本鎖
トポロジー:直鎖状
配列の種類:DNA
配列

ACACAAAAGA AGTGAAGTAC GGTGTTGGTG G
31

10

配列番号:11
配列の長さ:35
配列の型:DNA
鎖の数:一本鎖
トポロジー:直鎖状
配列の種類:DNA
配列

AATGACACAA AAAACGTGAA GTACGGTGTT GGTGG
35

20

配列番号:12
配列の長さ:33
配列の型:DNA
鎖の数:一本鎖
トポロジー:直鎖状
配列の種類:DNA
配列

AAAGAAGGGA AGTACGGTGA GGGTGGATTC ATG
33

30

配列番号:13
配列の長さ:26
配列の型:DNA
鎖の数:一本鎖
トポロジー:直鎖状
配列の種類:DNA
配列

TGAAGTACGG TGTGGTGGGA TTCATG
26

配列番号:14
配列の長さ:25
配列の型:DNA
鎖の数:一本鎖
トポロジー:直鎖状
配列の種類:DNA
配列

ACACAAAAGA AGTGAAGTAC GGTGA
25

40

配列番号:15
配列の長さ:29
配列の型:DNA

50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AATGACACAA AAAACGTGAA GTACGGTGA

29

配列番号：16

配列の長さ：42

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10

配列の種類：DNA

配列

AACAATGACA CAAACGTGAA GTACGGTGAG GGTGGATTCA TG

42

配列番号：17

配列の長さ：17

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

20

配列

GGTGGCGATG CAGTCAA

17

配列番号：18

配列の長さ：18

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCAGCCATGG CATAGATA

18

30

配列番号：19

配列の長さ：17

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AAGGCTCCGT TAAAAAC

17

配列番号：20

配列の長さ：28

40

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TACAGGAGAA ATCTTCCTCC GTGAGCTG

28

配列番号：21

配列の長さ：30

配列の型：DNA

50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GAGAAAAATT TCGGCAACTG TAACAACAAC 30

配列番号：22

配列の長さ：30

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状 10

配列の種類：DNA

配列

AAAAATTTCT CCCGTCTCTG TAACAACAAC 30

配列番号：23

配列の長さ：26

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列 20

AATTTCTCCT GTTCAACAA CGACAC 26

配列番号：24

配列の長さ：29

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCACCGTATT TCCCFCTGT GTCGTTGTT 29

配列番号：25

配列の長さ：32

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

ACAAACGTGA AACCCGGTGT GGGAGGTTT AT 32

配列番号：26

配列の長さ：26

配列の型：DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

ACAAACGTGA AACCCGGTGA GGGAGG 26

配列番号：27

配列の長さ：17

50

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:DNA

配列

ATACGGTGTG GGAGGGT 17

配列番号:28

配列の長さ:27

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

10

トポロジー:直鎖状

配列の種類:DNA

配列

TCTGCCTGGA CAACAACAGC CCGCTGC 27

配列番号:29

配列の長さ:26

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:DNA

20

配列

GCCCGCTGCC TGACGCCTTC AAGCAC 26

配列番号:30

配列の長さ:28

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:DNA

配列

GCCTTCAAGC ACGTGGGCTG GGAAGGAGCT AAGTACGC 28 30

配列番号:31

配列の長さ:28

配列の型:DNA

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:DNA

配列

GCCTTCAAGC ACGTGGGCTG GGAAGGAGCT AAGTACGC 28

FIG. 2A(2)

480 CATCACCGCTGGAACTTAATCCTCTCTACATCATCGGTAFTCAAGCGGTAGCGAGGGCCCTGGAGCGCC 549 N
 490 ATCTGGTATCCAGATGGCCGAGTCTTCCGACCGAGGAGTACGAGTGGATCGAATGAGCTGGTCACTGC 600 A
 500 CAATGATCCAGCTGGGGTTTTCACGAGGCGAGATGTTCTTTTGAACCACTCTCTCCACCAAA 619 C
 510 CAGTGAATCAGACAGCGCTTTTACCGTAGCGGAGATTTCTCGAATCACTCTCTCAACCCAG 670 N
 520 AACATGAGCCTTCCAAATFCCTGGGCTAAATGGAACATTTCAACAGGCTTATGCTGTCTATCA 689)
 530 AACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 740]
 540 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 759
 550 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 810
 560 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 829
 570 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 868
 580 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 899
 590 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 929
 600 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 969
 610 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 999

FIG. 2B(2)

1460 ACCCTGGTATACCGATGGCCAGTACTTCCGACCGAGTGTAGTCCAGACCAAAATGATGGCCAGCAC 1529 N
 1470 ATCTGGTATCCAGATGGCCGAGTCTTCCGACCGAGGAGTACGAGTGGATCGAATGAGCTGGTCACTGC 1559 B
 1480 CAATGATCCAGCTGGGGTTTTCACGAGGCGAGATGTTCTTTTGAACCACTCTCTCCACCAAA 1599 C
 1490 CAGTGAATCAGACAGCGCTTTTACCGTAGCGGAGATTTCTCGAATCACTCTCTCAACCCAG 1629 N
 1500 AACATGAGCCTTCCAAATFCCTGGGCTAAATGGAACATTTCAACAGGCTTATGCTGTCTATCA 1669)
 1510 AACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1739
 1520 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1769
 1530 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1809
 1540 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1839
 1550 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1879
 1560 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1909
 1570 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1949
 1580 TCAACCTTCTGCAATGTGAACCGTGTCTTGAAGGAGCTTCCAAAGGGGCGCTGGGCAAGTCTTCT 1979

FIG. 2B(1)

970 AAGGTGAAGAGTGAAGAACCCACAGAGGGCCATCCCGTGGGATCGTGGGATCGTGGATCTGCT 1039 N
 980 ACAGGGGAGAGTCAAGAACCCCGAGAGGCCATTCCTGTGGGCAAGTGGGCTCCCTCTCATTTGCT 1069 B
 990 TCAATCGCTACTTTTGGGGTGTCCGCTGCTCAAGCTCAATGAGTCCCTTCTTTCCTGGCAATAACAG 1109 C
 1000 TCAATAGCCTACTTTTGGGGTGTCCGCTGCTCAAGCTCAATGAGTCCCTTCTTTCCTGGCAATAACAG 1139
 1010 CCGCTGCTGGTCCCTTCAAGCACAGGGCTGGGAGAGCTAAGTACCGAGTGGCCATTTGGCTCTCTC 1179)
 1020 TGGGCTCTTCCCGCTAGTCTTAGGTTCAATGTTCCATGCTCCCGGTTACTACTATGCCATGGCTGAGG 1249
 1030 TGGCAGCTTCCCGCTAGTCTTAGGTTCAATGTTCCATGCTCCCGGTTACTACTATGCCATGGCTGAGG 1279
 1040 ATGGACTCTATTTAAATTTCTAGCAGCGTCAATGATGAGGACCAACCAACCAATGAGGCAATGAGC 1319
 1050 ATGGACTCTATTTAAATTTTGGCCAAATCAATGATGAGGACCAACCAACCAATGAGGCAATGAGC 1349
 1060 CTCGGGTCCTGGCTGTGGCTCTTCTTTCAGCCTTTCAGCCTTTCAGCCTTTCAGCCTTTCAGCCTT 1389
 1070 CTCAGGCGCAATGCTGCTGAGTGGCTTCTTTCAGCCTTTCAGCCTTTCAGCCTTTCAGCCTTTCAG 1419
 1080 GGCATCTCTGGGCTTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1459
 1090 GGCATCTCTGGGCTTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1489

FIG. 2C

1950 TGGCTATGCTGTGGCAGCGAGGAGGCGTCCCTGGATGCCAGCAGCAGGACTCTGAGCGGCAAC 2019 N
 1960 CCGTATGAGGATCTGGCAGTGAAGGAGCGTCCCTGGCTGCTGGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 2049 C
 1970 TTGGACCAATGCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2089
 1980 GAGCGGAGGACCCCAACCTCCAGTGCACAGAAACCACTGCTGCTCCACACCTCCATCTGCA 2157
 1990 CCCTCCAACTCTGCACTCATGCTCTGAGGATCAGTCTACACCCCAATGTCACCAAGC 2185

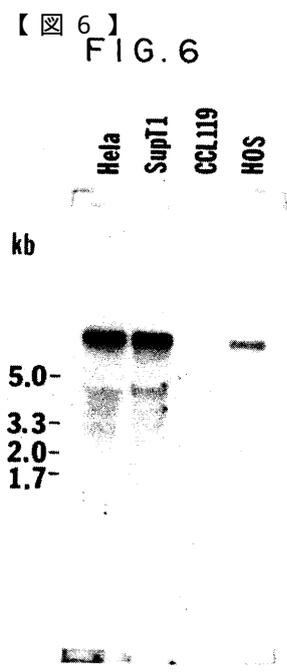


FIG. 6

ERR 1 MGCKNLLGLGQQMLRRKVVDCSRESRLSCLNRYDVALGVGSLGAVTLAGAVARENAGPAIVISF 70
 H13 1 MGCKVLLNTGQQMLRRKVVDCSRETRLSRCLNRYDVALGVGSLGAVTLAGAVARENAGPAIVISF 70 B
 ERR 71 LLAALASVLAGLICYGFGARVFKTGSALYSIVVGLMFIKGNMLLSYIIIGTSSVARAWSATFDELI 140
 H13 71 LLAALASVLAGLICYGFGARVFKTGSALYSIVVGLMFIKGNMLLSYIIIGTSSVARAWSATFDELI 140
 ERR 141 GKPIGFSRQHMALMAPGVLAGFPDIFAVIIIIICGLLGLGVKESAMVKNKFTCNVVLVLCFVVSQFV 210
 H13 141 GRPTIGFSRTHMTLMAPOVLAENPDIFAVIIIIILATGLLTLGVKESAMVKNKFTCNVVLVLCFVVSQFV 210
 TEA 7 KGVANWKISEEFLKMSASAREPFSENGTSIYGAGGFPIGFTGLAGAAKCFYAVGFDCLATVVEV 6
 ERR 211 KGSIKWQTEKHSCWNNDT.NVXY.GEGGFMPFGFSGVLSGAAKCFYAVGFDCLATVVEV 272
 H13 211 KGSVKNWQLEEDFGNFSRCLNNDTHEORP.GVGGFMPFGFSGVLSGAAKCFYAVGFDCLATVVEV 279
 TEA 7 KGVANWKISEEFLKMSASAREPFSENGTSIYGAGGFPIGFTGLAGAAKCFYAVGFDCLATVVEV 76
 ERR 273 KNPKAIPVGIVASLILICFIYFGVSAALTLMPYFCILDIDSLPGAFKHOQWEAKYAVAGSICALST 342
 H13 280 KNPKAIPVGIVASLILICFIYFGVSAALTLMPYFCILDNRSPLDPAFKHVGWEGAKYAVAGSICALSA 349
 TEA 77 KNPKAIPVGIVTSLLVCFMAIFGVSAALTLMPYIILDEKSPFLVAFEVRWGPAKYVVAAGSICALST 146

FIG. 3B

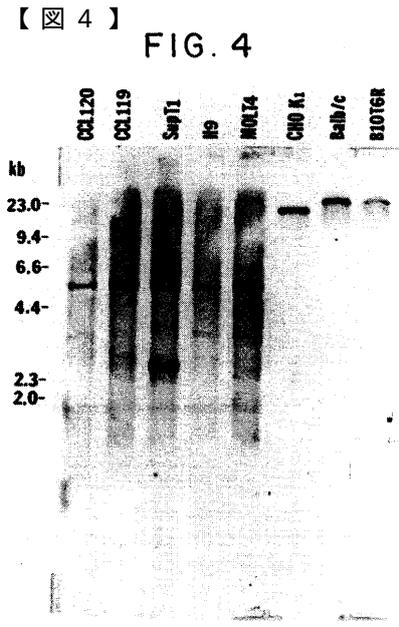
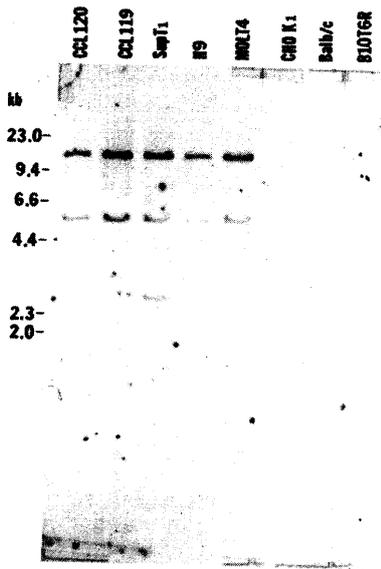


FIG. 4

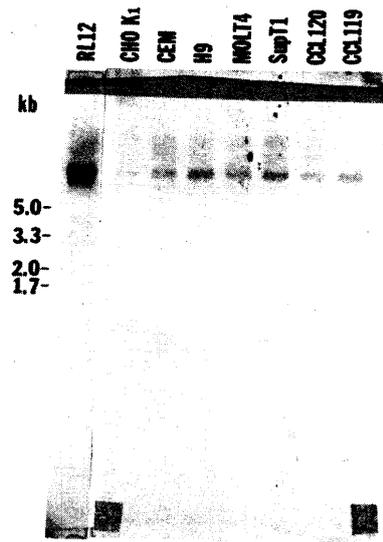
ERR 343 SLLGSMFPVRVIYAWAEDGLLFFFLAKINRRTKTPVIAVTSGAIAAVMAPFLFKDLVDMISIGTLLA 412
 H13 350 SLLGSMFPVRVIYAWAEDGLLFFFLAVDRKTFPIATLASGAVAVMAPFLFKDLVDMISIGTLLA 419 A
 TEA 147 SLLGSIFPVRVIYAWAEDGLLFFKLAQINSKTKTFVIATLSSGAAVAVMAPFLFKDLVDMISIGTLLA 216
 ERR 413 YSLVAACVLRTPQEPNLYVQARTTEELDRVDQNELVSASESQTQFLVFAEKFSIKSILSPKRVFES 482
 H13 420 YSLVAACVLRTPQEPNLYVQARTTEELDRVDQNELVSASESQTQFLVFAEKFSIKSILSPKRVFES 489
 TEA 217 YSLVAACVLRTPQEPNLYVQARTTEELDRVDQNELVSASESQTQFLVFAEKFSIKSILSPKRVFES 282
 ERR 483 KFSGLIVNISAGLLAALITVCIVAVLGREALAEPTLWAVFVNTGSLVLLCMVGTGIWROPEKTKLSFK 552
 H13 490 KISGLIVNISTSLIIVLITFCIVTVLGRREALTKGALWAVFLIAGSALICAVVTVGVWROPEKTKLSFK 559
 TEA 283 QRSASLVSVLGVFLAFLILGLSILITTYGVQAIARLEANSLLALLFLVLCAAVILTIVROPEKTKLSFK 352
 ERR 563 VPFVPLVLSIFVNIYLLMMQDQGTWRFVAVWMLIGFTIYGVYWHSEASL..AAGQAKTSDSLDQ 620
 H13 560 VPFVPLVLSIFVNIYLLMMQDQGTWRFVAVWMLIGFTIYGVYWHSEASL..DADQARTPDGMLDQ 627
 TEA 353 VPFVPLVLSIFVNIYLLMMQDQGTWRFVAVWMLIGFTIYGVYWHSEASL..DADQARTPDGMLDQ 422
 ERR 621 CK 622
 H13 628 CK 629
 TEA 423 ATEEKSVQANDHQRNLSLPPFILMEKTSK 453

FIG. 3A

【 図 5 】
FIG. 5



【 図 7 】
FIG. 7



【 図 8 】
FIG. 8

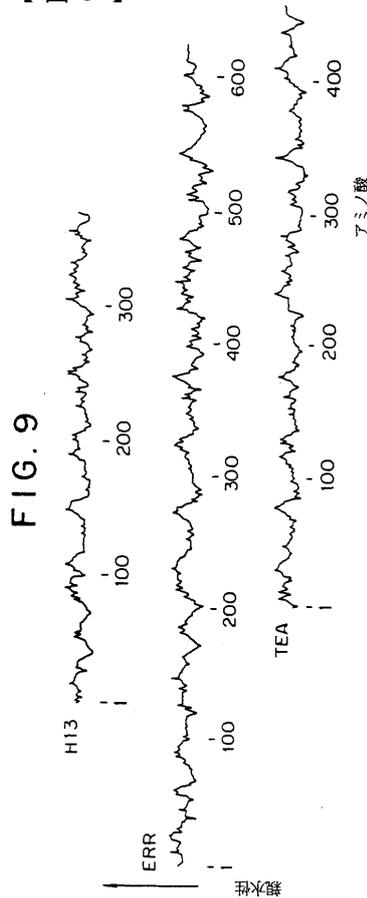
CHO BRRcDNAで
トランスフェクションを行ったCHO

ウイルス - + - +

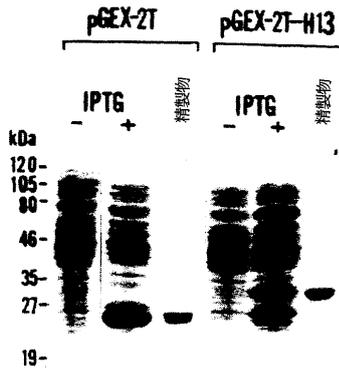
kb
5.0-
3.3-
2.0-
1.7-

培地	ウイルス	RT活性 (cpm)
培地		2146
CHO	-	1872
	+	2099
BRRcDNAでトランス フェクションを行ったCHO	-	1792
	+	28172

【 図 9 】



【 1 1 】
FIG. 11



【 1 2 A 】
パネル1

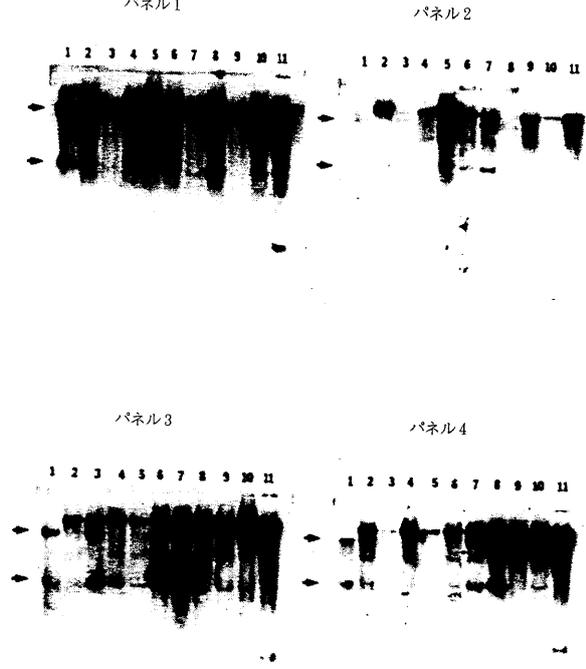
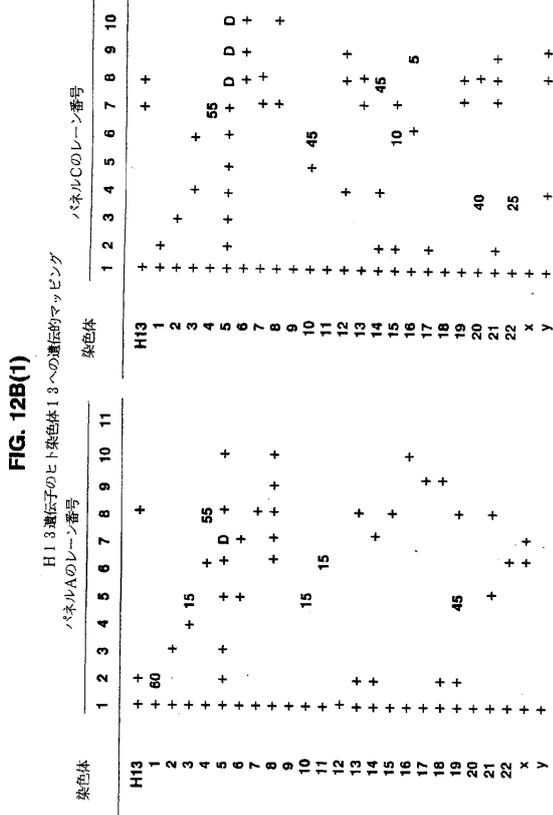


FIG. 12A

【 1 2 B (1) 】



【 1 2 B (2) 】

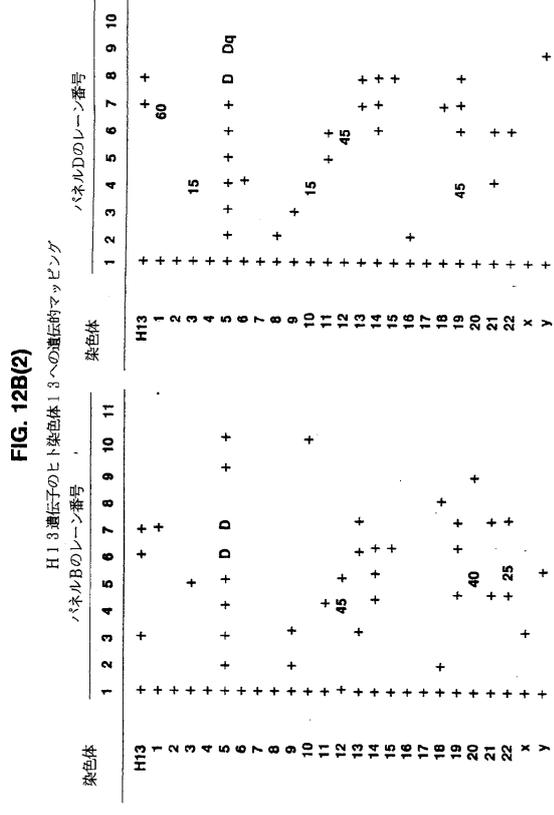


FIG. 15

【 1 5 】

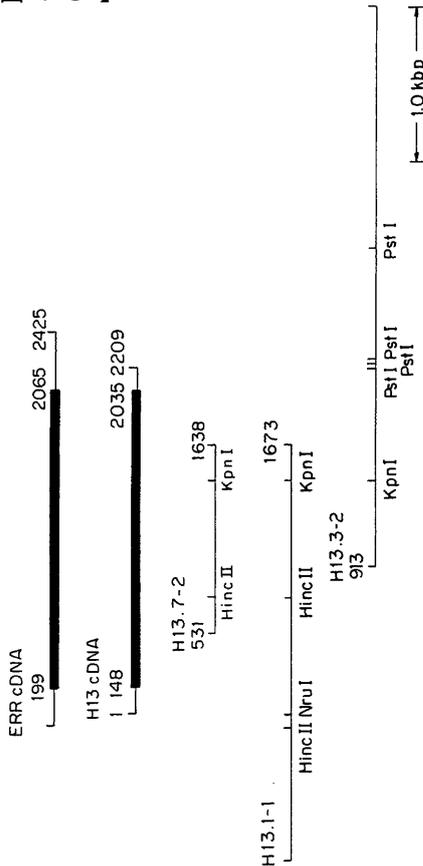


FIG. 13

【 1 3 】

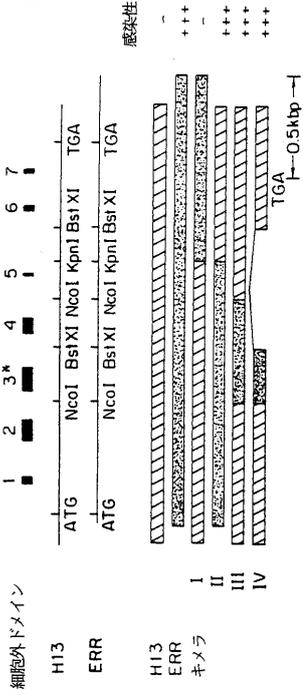


FIG. 16

【 1 6 】

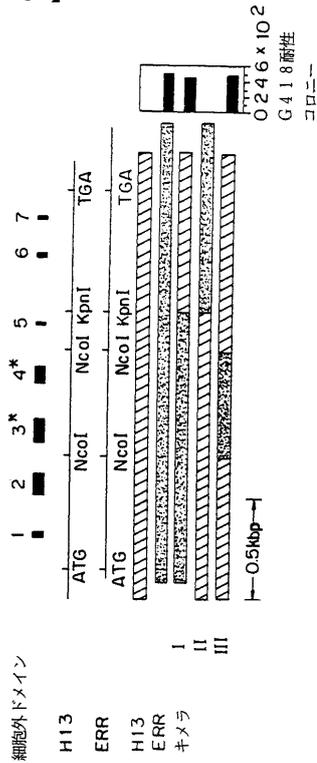


FIG. 14

【 1 4 】

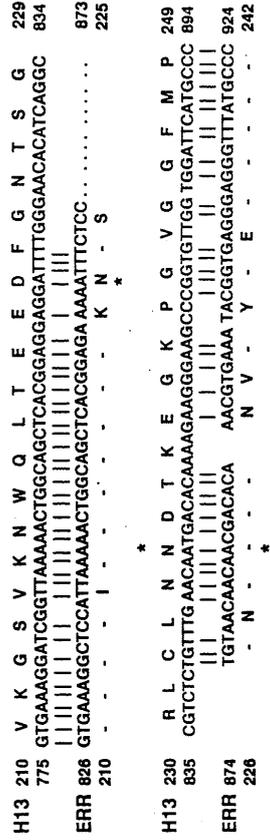


FIG. 19

AKR 50 60 70 80 90
 HG PS YWGLE Y RAP FSP P PG PPCC S - GSSDS T PGCS RDCE E PLT
 FRIEND S+ +PH+++++Q++Y+S ++++++G S+G++SA+++++D+++++
 MoMLV ++++++GS+++++G ++++++p+++++
 XENO - -D++Dd p ep di gd - - - - -
 MCF - -dD+De T G1 - - - - -
 AMPHO ++ +eE+Dp s DQ e +YvG y- - - - -

AKR 100 110 120 130
 SY T PRCNT AWN R L KLSK V T HAHNG GFY VCPG PHR PRWARS
 FRIEND +1 ++++++ ++++++G ++++++eSE ++++++S+++++e+K+
 MoMLV +1 ++++++ ++++++G T++k s-E ++++++ ++++++e+K+

XENO - - - g+r+ PGG + r r t r l Y D - - - - - ++++++ h t v t l g - - -
 MCF - - - g+r+ PGG + r r t r l y d - - - - - ++++++ h t v t l g - - -
 AMPHO - - - g+rT PAG + g r t r t F D - - - - - ++++++ h t v k s g - - -

FIG. 17

細胞外ドメイン3
 H13 210 V K G S V K N W Q L T E E D F G N T S G 229
 775 GTGAAAGGATCCGTTAAAACTGGCAGCTCACGGAGGAGTATTTGGGAACATCAGGC 894
 ERR 828 GTGAAAGGCTCCATTAATAAAGCTCACGGAGAAAATTTCTCC 873
 210 K N - S 225

細胞外ドメイン4
 H13 230 R L C L N N D T K E G K P G V G G F M P 249
 835 CGTCTCTGTTGAAACAATGACACAAAGGAGCCCGGTTGTTGG TGGATTCTGCCC 894
 ERR 874 TGTAAACAACACGACACA AACGTGAA ATACGGTGAAGGAGGTTTATGCC 924
 226 N Y - E 242

H13 300 T L M P Y F C L D N N S P L P D A F K H V G W E G A 335
 1072 ACCTCATGATGCCCTACTCTGCTGACATTAACAGCCCTCCCGAGCCCTTTAAGCAGTGGGCTGGGAAGGTGCC 1152
 ERR 1102 ACGCTCATGATGCCCTACTCTGCTGACATTAACAGCCCTCCCGAGCCCTTTAAGCAGCAGGCTGGGAAGGCT 1182
 302 I L D G Q E 328

【 17 】

FIG. 20

AKV 391 SMAI
 TTTTCTCCCGGGGGCCCCCTGCTGTTGAGGAAGCAGGACTCCACGCCAGGCTGTTCCAGAN
 F S P P P G P P C C S G S D S T P G C S R
 64
 304

AMPHO TATGTCGGGTAT- - - - -
 Y V G Y

AKV 64
 GATTGTGAGGAGCCCTGACTTCATATACTCCCGTGAATACGGCTGGAACAGACTTAAGTTA
 D C E E P L T S Y T P H C N T A W N R L K L
 R SAI

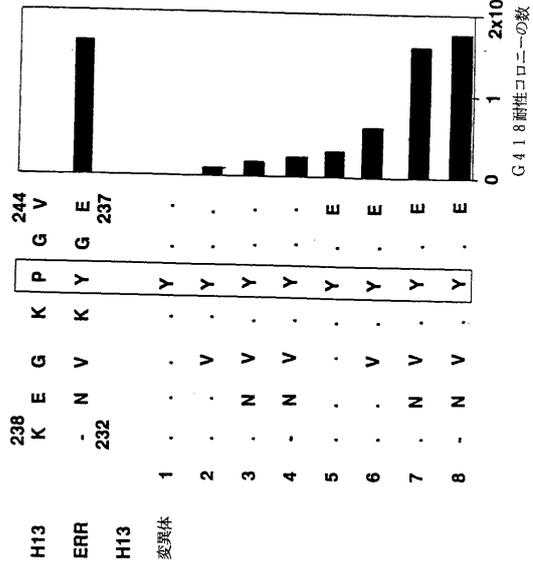
AMPHO GGCTGCAAGTACCCCGCAGGAGGACAGCGGACC
 G C L Y P A G R Q R T
 78

AKV TCTAAAGTGACACATGCACACAATGGAGGATTCTATGTCGCCCGGGCCACAT
 S K V T H A H N G G F Y V C P G P H
 126

AMPHO CGGACTTTTGAC- - - - -TTTACGTGTGCCCTGGGGTAACCGTAAAGTCGGCG
 R T F D F Y V C P G H T V K S G
 394

【 18 】

FIG. 18



【 18 】

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
// C 0 7 K 14/705 C 0 7 K 14/705
G 0 1 N 33/569 G 0 1 N 33/569 H

(72)発明者 善本 隆之
東京都港区白金台4 6 1

審査官 田村 明照

(56)参考文献 Virology, Vol. 185, No. 1, pp. 10-17 (1991)
Journal of Virology, Vol. 66, No. 3, pp. 1468-1475 (1992 Mar.)
Nature, Vol. 335, No. 6188, pp. 363-366 (1988)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
C12N 15/00
BIOSIS/WPI (DIALOG)
MEDLINE (STN)