



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類<sup>4</sup> C12N 15/00, 1/00, 5/00 C07K 13/00, 15/14, A61K 35/12 A61K 37/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 86/ 04605</p> <p>(43) 国際公開日 1986年8月14日 (14. 08. 86)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP86/00052 (22) 国際出願日 1986年2月7日 (07. 02. 86) (31) 優先権主張番号 特願昭60-23777 特願昭60-206066 特願昭60-209638 特願昭60-269455 特願昭60-269456 特願昭60-270838 特願昭60-270839 (32) 優先日 1985年2月8日 (08. 02. 85) 1985年9月17日 (17. 09. 85) 1985年9月20日 (20. 09. 85) 1985年12月2日 (02. 12. 85) 1985年12月2日 (02. 12. 85) 1985年12月3日 (03. 12. 85) 1985年12月3日 (03. 12. 85) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 中外製薬 株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)(JP/JP) 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p>	<p>(72) 発明者 尾野雅義 (ONO, Masayoshi) 野村 仁 (NOMURA, Hitoshi) 田村政彦 (TAMURA, Masahiko) 松本雅彦 (MATSUMOTO, Masahiko) 山崎達美 (YAMAZAKI, Tatsumi) 山本修己 (YAMAMOTO, Osami) 平田裕一 (HIRATA, Yuichi) 関森泰男 (SEKIMORI, Yasuo) 土屋政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) 〒171 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo, (JP) 長田重一 (NAGATA, Shigekazu) 〒146 東京都大田区多摩川2丁目24番62号 3号棟 305号室 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外(YUASA, Kyozo et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206号室 湯浅・原法律特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許). 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR

(54) 発明の名称 ヒト顆粒球コロニー刺激因子

Met-Ala-Gly-Pro-Ala-Thr-Gln-Ser-  
Pro-Met-Lys-Leu-Met-Ala-Leu-Gln-  
Leu-Leu-Leu-Trp-His-Ser-Ala-Leu-  
Trp-Thr-Val-Gln-Glu-Ala-Thr-Pro-  
Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-  
Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-  
Glu-Gln-Val-Arg-Lys-Ile-Gln-Gly-  
Asp-Gly-Ala-Ala-Leu-Gln-Glu-Lys-  
Leu-Val-Ser-Glu-Cys-Ala-Thr-Tyr-  
Lys-Leu-Cys-His-Pro-Glu-Glu-Leu-  
Val-Leu-Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-  
Ile-Pro-Trp-Ala-Pro-Leu-Ser-Ser-  
Cys-Pro-Ser-Gln-Ala-Leu-Gln-Leu-  
Ala-Gly-Cys-Leu-Ser-Gln-Leu-His-  
Ser-Gly-Leu-Phe-Leu-Tyr-Gln-Gly-  
Leu-Leu-Gln-Ala-Leu-Glu-Gly-Ile-  
Ser-Pro-Glu-Leu-Gly-Pro-Thr-Leu-  
Asp-Thr-Leu-Gln-Leu-Asp-Val-Ala-  
Asp-Phe-Ala-Thr-Thr-Ile-Trp-Gln-  
Gln-Met-Glu-Glu-Leu-Gly-Met-Ala-  
Pro-Ala-Leu-Gln-Pro-Thr-Gln-Gly-  
Ala-Met-Pro-Ala-Phe-Ala-Ser-Ala-  
Phe-Gln-Arg-Arg-Ala-Gly-Gly-Val-  
Leu-Val-Ala-Ser-His-Leu-Gln-Ser-  
Phe-Leu-Glu-Val-Ser-Tyr-Arg-Val-  
Leu-Arg-His-Leu-Ala-Gln-Pro

(57) Abstract

A gene which codes a polypeptide having a human granulocyte colony stimulating activity, a recombinant vector having said gene incorporated therein, a transformant containing said vector, a polypeptide or glycoprotein yielded from said transformant and having human granulocyte colony stimulating activity, and an infection inhibitor containing human granulocyte colony stimulating factor as an effective ingredient. Said stimulating factor includes one obtained by the gene recombination technology and one obtained from the supernatant of a culture medium of cells yielding a human granular colony stimulating factor.

(57) 要約

本発明は、ヒト顆粒球コロニー刺激因子（ヒトG-CSF）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を組み込んだ組換えベクター、該ベクターを含む形質転換体並びに該形質転換体から産生されたヒトG-CSF活性を有するポリペプチドまたは糖蛋白質、およびヒトG-CSFを有効成分とする感染防禦剤を提供する。感染防禦剤の有効成分として使用するヒトG-CSFは遺伝子組換えの手法によるものの他、ヒト顆粒状コロニー刺激因子産生細胞培養液上清から得られるものも含まれる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出版のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	ML	マリ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MR	モーリタニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	MW	マラウイ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NL	オランダ
BR	ブラジル	IT	イタリア	NO	ノルウエー
BG	ブルガリア	JP	日本	RO	ルーマニア
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SD	スーダン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SE	スウェーデン
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CM	カメルーン	LK	スリランカ	SU	ソビエト連邦
DE	西ドイツ	LU	ルクセンブルグ	TD	チャド
DK	デンマーク	MC	モナコ	TC	トーゴ
FI	フィンランド	MG	マダガスカル	US	米国

## 明 細 書

## ヒト顆粒球コロニー刺激因子

## 5 (技術分野)

本発明はヒト顆粒球コロニー刺激因子に関し、特に主としてヒト顆粒球系細胞のコロニー形成をさせるために必要な、特異的な刺激因子、すなわちコロニー刺激因子(以下「CSF」と略記する)活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、  
10 該遺伝子を組み込んだ組換えベクター、該ベクターを含む形質転換体並びに該形質転換体から産生されたCSF活性を有するポリペプチドまたは糖蛋白質、及びCSFを有効成分とする感染防禦剤に関する。

## (背景技術)

15 2層軟寒天培養法で、上層に標的細胞として骨髄細胞を、下層に腎細胞や胎児細胞を入れて培養すると、上層の細胞の一部が増殖分化し、好中球系顆粒球(以下「顆粒球  
(granulocyte)」と称す。)や単球マクロファージからなるコロニーが形成されることから、生体内にコロニー形成を促進する因子が存在することが知られていた(Pluznik と Sach;  
20 J. Cell. Comp. Physiol., 66巻 319頁(1965), Bradley と Metcalf; Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 44巻 287頁  
(1966))。

CSF と総称されるこの因子は、正常に広く生体内分布する  
25 細胞、たとえば、T細胞、単球マクロファージ、繊維芽細胞、



内皮細胞などより産生されることが知られている。CSFには顆粒球・単球マクロファージの幹細胞に作用して、その増殖を刺激し分化を誘導して、軟寒天中で顆粒球や単球マクロファージから成るコロニーを形成させる作用をもつ顆粒球-単球マクロファージCSF (GM-CSF と略記する。)、主として単球マクロファージのコロニーを形成させる作用をもつ単球マクロファージCSF (M-CSF と略記する。)、より未分化な多能性幹細胞に作用する多能性CSF (multi-CSF と略記する。)、あるいは本発明の如き、主として顆粒球系コロニーを形成させる作用をもつ顆粒球CSF (G-CSF と略記する。))などのサブクラスが存在し、それぞれのサブクラスによって標的細胞の分化段階も異なることが考えられる様になってきた [Asano ; 代謝 - Metabolism and Disease, 22巻 249頁 (1985), Yunis等 ; "Growth and Maturation Factors", edited by Guroff, John Wiley & Sons, NY, 1巻, 209頁 (1983)]。

ヒトCSFに関してはこれまでヒト正常組織由来のCSFやヒト腫瘍細胞由来のCSFについて多数報告されている(例えば、Stanley等 Fed. Proc. 35 2272 (1975), Burgess等 Blood 49 573 (1977), Shah等 Blood 50 811 (1977), Fojo等 Biochem, 17 3109 (1978), Okabe等 Cancer Res 38 3910 (1978), Asano等 Blood 49 845 (1977), Golde等 Blood 57 1321 (1981), Wu等 J. Biol. Chem 254 6226 (1979), Dipersio等 Blood 56 717 (1980)などを参照。)

しかしながらこれ等のヒトCSFは完全に純化されたもので

はなく従ってヒトCSFの医薬としての有用性または有効性については未だ不明のままである。

近年、感染症領域に於ける化学療法剤の進歩により、従来の特定の病原性を有する強毒物質産生菌は治療可能となり、  
5 一方、医療の進歩と高齢化とともに、生体防禦能の低下した宿主（compromised host）の増加により、病原性は弱い薬剤および消毒剤に耐性な病原菌による感染（日和見感染）が、臨床に於いて新たな問題を引き起こしている。この日和見感染症では、薬剤抵抗性の高い細菌や、有用な抗生物質の少ない真菌により発症し、その治療には従来の化学療法剤に加え、  
10 宿主の防禦能を賦活するような薬剤の使用が望まれているが現在まで有効な薬剤は見出されていない。

感染の初期には宿主のもつ防禦機能のうち白血球の貪食殺菌作用が最も強く影響すると考えられていることから好中球や  
15 マクロファージの増殖、分化成熟を高めることにより宿主の感染防禦能を亢進することができれば有効な感染治療薬となり得る可能性が示唆される。

従って純粋なヒトCSFの大量生産の研究が活発に行われているが現在まで成功したものはない。このような状況に於  
20 いて本発明者等は口腔底癌患者の腫瘍細胞から極めて高いヒトG-CSF産生能を有し、かつ良好な増殖能を示す細胞株CHU-1を樹立し、（C.N.C.M.受託番号「I-315」）、この細胞株の培養上清からヒト好中球のコロニー形成促進活性を示す純粋なヒトCSFの単離に初めて成功した（特願昭59--  
25 153273号）。

本発明者等は感染動物モデルを用いてこのヒトG-CSFの感染防禦効果を調べたところ、ヒトG-CSFがin vivoに於いて顕著な好中球の成熟能を有し、従って感染防禦効果を示したことから感染症治療薬として有効であることを見出した。

5 次いで本発明者等は同じくヒト口腔底癌由来の細胞株CHU-2を樹立し(C.N.C.M.受託番号I-483)、この細胞株の培養上清からもCHU-1由来のものと全く同一のG-CSFを単離した。

しかしながら、このように細胞培養法を用いて、その培養  
10 上清からG-CSFを単離する方法は、G-CSFが低濃度しか産生されないこと、大量の培養液から微量のG-CSFを得るには複雑な精製過程を必要とするなどの難点をかかえ未だ大量の均一なG-CSFを得るには至っていない。従って、組換えDNA技術を用いてG-CSFを大量に製造することが渴望  
15 されていた。

(発明の開示)

本発明は、ヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を提供するものである。

本発明はまた、該遺伝子を組み込んだ組換えベクターを提  
20 供する。

本発明はまた、該組換えベクターで宿主を形質転換した形質転換体および該形質転換体によって産生されるポリペプチドまたは糖蛋白質を提供する。

本発明は更にヒトG-CSFを有効成分とする感染防禦剤を  
25 も提供するものである。

( 図面の簡単な説明 )

図 1 はプローブ ( IWQ )、プローブ ( A ) およびプローブ ( LC ) の配列を示す。

図 2 は pHCS-1 インサートの塩基配列を示す。

5 図 3 ( A ) は pBRG4 の cDNA インサートの塩基配列を示す。

図 3 ( B ) ( I ) は pBRG4 cDNA から演えきしたヒト G - CSF 前駆体のアミノ酸配列を示す。

図 3 ( B ) ( II ) は pBRG4 cDNA から演えきしたヒト成熟 G - CSF のアミノ酸配列を示す。

10 図 4 ( A ) は pBRV2 の cDNA インサートの塩基配列を示す。

図 4 ( B ) ( I ) は pBRV2 cDNA から演えきしたヒト G - CSF 前駆体のアミノ酸配列を示す。

図 4 ( B ) ( II ) は pBRV2 cDNA から演えきしたヒト成熟 G - CSF のアミノ酸配列を示す。

15 図 5 は pBRG4 または pBRV2 由来ヒト G - CSF cDNA の制限酵素切断部位を示す。

図 6 は tac プロモーター含有ベクターの調製プロセスの一部を示す ( + VSE 系 ) 。

20 図 7 は合成 PL プロモーター含有ベクターの調製プロセスを示す ( + VSE 系 ) 。

図 8 は trp プロモーター含有ベクターの調製プロセスを示す ( + VSE 系 ) 。

図 9 は tac プロモーター含有ベクターの調製プロセスの一部を示す ( - VSE 系 ) 。

25 図 10 は合成 PL プロモーター含有ベクターの調製プロセス

を示す（-VSE系）。

図11はtrpプロモーター含有ベクターの調製プロセスを示す（-VSE系）。

図12はpHGA410の概略構造を示す。

5 図13は発現用組換えベクターpTN-G4の構築プロセスを示す。

図14aおよび図14bはpHGG4-dhfrの構築プロセスを示す。

図15はpHGV2の概略構造を示す。

10 図16は発現用組換えベクターpTN-V2の構築プロセスを示す。

図17aおよび図17bは発現用組換えベクターpHGV2-dhfrの構築プロセスを示す。

（発明を実施するための最良の形態）

15 本発明によるヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子はショ糖密度勾配遠心法により15~17S画分として得られる、ヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA(mRNA)に相補的なDNA(cDNA)である。

本発明者等は2系列のこのようなcDNAを得た。

20 そのうちの1つの系列のcDNAは図3(B)のポリペプチドI又はIIをコードする遺伝子あるいはその一部を有するものであり、さらに詳細には図3(A)の塩基配列の5'-末端から32~34ヌクレオチド位のATGから650~652ヌクレオチド位のCCCまでの配列、122~124位のACCから650~652位の  
25 CCCまでの配列または図3(A)に記載された配列あるいはそ



の一部を有するものである。この系列のcDNAをcDNA (+VSE) と称する。

他の系列のcDNAは図4(B)のポリペプチドI又はIIをコードする遺伝子あるいはその一部を有するものであり、さらに  
5 詳細には図4(A)の塩基配列の5'-末端から31~33ヌクレオチド位のATGから640~642ヌクレオチド位のCCCまでの配列、121~123位のACCから640~642位のCCCまでの配列または図4(A)に記載された配列あるいはその一部を有するものである。この系列のcDNAをcDNA (-VSE)と称する。

10 本発明の遺伝子は例えばG-CSF活性を有するポリペプチドを産生する能力を有する哺乳動物細胞等からG-CSFをコードするmRNAを調製した後、既知の方法により2本鎖cDNAに変換することによって得られる。

前記、mRNAの供給源となる哺乳動物細胞は本発明においては、  
15 ヒト口腔底癌由来の細胞株CHU-2 (Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (C.N.C.M)寄託番号I-483)であるが、腫瘍細胞株にかぎらず、哺乳動物から分離できる細胞、あるいは樹立した他の細胞株でもよい。又、mRNAの調製はすでに他のいくつかの生理活性タンパクの  
20 遺伝子をクローン化する際、用いられた方法、例えば、バナジウム複合体等のリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行う (Bergerと Birkenmeier ; Biochemistry 18巻5143頁 (1979) を参照) か、グアニジンチオシアナート処理後、CsCl密度勾配遠心を行  
25 行う (Chirgwin等 ; Biochemistry 18巻5294頁 (1979) を参

- 照) ことによって、全RNAを得た後、オリゴ(dT)-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法あるいはバッチ法によりポリ(A<sup>+</sup>) RNA (mRNA)を得ることができる。またショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A<sup>+</sup>) RNAを更に分画することもできる。上記の如くして得られたmRNAが、G-CSF活性をもつポリペプチドをコードするものであることを確認するためには、mRNAをタンパク質に翻訳させ、生理活性を調べるか、抗G-CSF抗体を用いてそのタンパクを同定する等の方法を行えばよい。例えば、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞にmRNAを注入して翻訳させたり (Gurdon等; Nature, 233 巻 177頁 (1972) を参照)、あるいはウサギ網状赤血球 (Reticulocyte) 系や小麦胚芽 (Wheat germ) 系を利用した翻訳反応が行われている (Schleif と Wensink ;
- 15 “Practical Methods in Molecular Biology”, Springer-Verlag, NY, (1981))。G-CSF活性の検定は骨髓細胞を用いた軟寒天培養法を適用して実施できる。それらの手法については総説がある (Metcalf ; “Hemopoietic Colonies”, Springer-Verlag, Berlin, Heideiberg, NY (1977))。
- 20 前述の如き方法で得たmRNAを鋳型にして1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成し、適当なベクターDNAとの組換えプラスミドを作成する。これで大腸菌 (*Escherichia coli*) などを形質転換して、形質転換株のDNA群 (以下、cDNAライブラリーと称する。) を得る。
- 25 mRNAから2本鎖cDNAを得るには、例えばmRNAの3'-末端

にあるポリA-鎖に相補的なオリゴ(dT)をプライマーとして逆転写酵素で処理するか、またはG-CSFタンパクのアミノ酸配列の一部に相応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして逆転写酵素で処理してmRNAに相補的な

5 cDNAを合成する。2本鎖cDNAは、アルカリ処理でmRNAを分解・除去した後、得られた1本鎖cDNAを逆転写酵素又はDNAポリメラーゼ(例えばKlenow断片等)処理後S1ヌクレアーゼ等で処理して得るか、あるいは、直接RNase HおよびDNAポリメラーゼ(例えば、大腸菌のDNAポリメラーゼI等)等で

10 処理することによっても得ることができる(例えば、Maniatis等; Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) および GublerとHoffman; Gene 25巻 263頁(1983)を参照。)

このようにして得られた2本鎖cDNAを適当なベクター、例えば、pSC101, pDF41, ColE1, pMB9, pBR322, pBR327, pACYC1などに代表されるEK型プラスミドベクターや、λgt, λc, λgt10, λgtWESなどに代表されるファージベクターなどに組み込んだ後、大腸菌(X1776; HB101; DH1, C600株など)等を形質転換してcDNAライブラリーを得ることができる(例えば、前出“Molecular cloning”を参照)。

15

20

2本鎖cDNAをベクターと連結させるには、DNA末端に連結可能な末端をつけるべく、適当な化学合成DNA断片を追加し、予め制限酵素を用いて開裂させたベクターDNAとATP存在下にT4ファージDNAリガーゼで処理することにより行うことができる。あるいは、予め制限酵素を用いて開裂させたベク

25

— DNA と 2 本鎖 cDNA のそれぞれに dG, dC-鎖 (あるいは dA, dT-鎖) を付加した後、例えば両 DNA を含む溶液を徐冷することによっても行うことができる (前記 Molecular cloning を参照)。

- 5        こうして得られた組換え DNA 体による宿主細胞の形質転換は、例えば宿主細胞が大腸菌の場合 Hanahan が詳細に記述している如き方法 (J. Mol. Biol.; 166 巻 557 頁 (1983))、すなわち、 $\text{CaCl}_2$  や  $\text{MgCl}_2$  又は  $\text{RbCl}$  を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加えることにより実施
- 10        することができる。

- 目的とする遺伝子を保有する細胞を検索するには、インターフェロン cDNA のクローン化で用いられたプラスマイナス法 (Taniguchi 等; Proc. Jpn. Acad. 55 巻 Ser. B, 464 頁 (1979)) や、ハイブリダイゼーション-トランスレーション
- 15        アッセイ法 (Nagata 等; Nature 284 巻 316 頁 (1980)) など、又は該タンパク質のアミノ酸配列をもとにして化学合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いたコロニーあるいはプラークハイブリダイゼーション法 (Wallace 等; Nucleic Acids Res., 9 巻 879 頁 (1981)) などを用いればよい。

- 20        このようにしてクローン化されたヒト G-CSF 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む断片は適当なベクター DNA に再び組み込むことにより、他の原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。更にこれらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現に係る配列
- 25        を導入することにより、それぞれの宿主細胞に於いて遺伝子

を発現させることが可能である。

原核生物宿主細胞としては、例えば *Escherichia coli*,  
*Bacillus subtilis*, *Bacillus thermophilus*等が挙げられる。  
目的の遺伝子をこれ等の宿主細胞内で形質発現させるには、  
5 宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起源お  
よび調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を  
形質転換させればよい。またベクターは形質転換細胞に表現  
形質（表現型）の選択性を付与することができる配列をもつ  
ものが望ましい。

10 例えば、*E. coli* は、それを宿主とするベクターである  
pBR322を用いて形質転換することができる（Boliver 等；  
Gene 2巻95頁(1975)を参照）。pBR322はアンピシリンおよび  
テトラサイクリン耐性の遺伝子を含んでおり、どちらかの耐  
性を利用することによって形質転換細胞を同定することがで  
15 きる。原核生物宿主の遺伝子発現に必要なプロモーターとし  
ては、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーター（Chang 等；  
Nature 275巻 615頁(1978)）、やラクトースプロモーター  
（Goeddel 等；Nature 281巻 544頁(1979)を参照。）および  
トリプトファンプロモーター（Goeddel 等；Nucleic Acid  
20 Res.）8巻4057頁(1980)を参照）等があげられ、どのプロモ  
ーターも本発明のヒトG-CSF活性をもつポリペプチドの産  
生に使用することができる。

真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えば  
*Saccharomyces cerevisiae*などが挙げられ、プラスミドYRp7  
25 （Stinchcomb等；Nature 282巻 39頁(1979)などを参照）等

によって形質転換することができる。このプラスミドは、トリプトファンを生産する能力を欠く酵母株に対する選択マーカーとなるTRP1遺伝子を有し、トリプトファンの非存在下で発育させることによって形質転換体を選択することができる。

5 遺伝子発現に利用可能なプロモーターとしては、酸性ホスファターゼ遺伝子プロモーター (Miyanochara等; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 巻 1頁 (1983)) やアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター (Valenzuela等; Nature 298 巻 347 頁 (1982)) などが挙げられる。

10 哺乳動物細胞由来の宿主細胞としては、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞、C-127細胞、HeLa細胞などが挙げられ、これ等の細胞を形質転換させるベクターとしては、pSV2-gpt (Mulligan と Berg; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 78 巻 2072頁 (1981)を参照) 等がある。これ  
15 等のベクターは複製起源、選択マーカー、発現させようとする遺伝子の前に位置するプロモーター、RNA スプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを含んでいる。

哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしては  
レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シ  
20 ミアンウィルス40 (SV40) などのプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan  
等の方法 (Nature 277 巻 108頁 (1979)) に従えば容易に実施  
することができる。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウ  
25 イルス、牛パピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用い

ることができ、選択マーカーとしては、ホストトランスフェラーゼ APH (3') II あるいは I (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を用いることができる。

以上の如き宿主-ベクター系を用いてヒト G-CSF 活性を有するポリペプチドを得るには、上記ベクターの適当な部位に該遺伝子を組み込んだ組換え DNA 体により宿主細胞を形質転換させた後、得られた形質転換体を培養すればよい。さらに細胞内または培養液から該ポリペプチドを分離・精製するには、公知の手段を用いて行うことができる。

一般に真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子等で知られているように、多形現象 (polymorphism) を示すと考えられ、(例えば Nishi 等; J. Biochem. 97 巻 153 頁 (1985) を参照)、この多形現象によって 1 個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

また例えば図 3 (B) アミノ酸配列の中の 1 個またはそれ以上のアミノ酸を欠くか又は付加されたポリペプチド、あるいは 1 個またはそれ以上のアミノ酸が 1 個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでも G-CSF 活性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン 2 (IL-2) 遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドがインターロイキン 2 活性を保持することもすでに公知となっている (Wang 等;

Science, 224巻1431頁(1984))。それゆえ、それ等天然に存在するかあるいは人工合成されたポリペプチドがヒトG-CSF活性を有する限りそれ等のポリペプチドをコードする遺伝子は全て本発明に含まれる。

- 5 本発明のヒトG-CSF活性をもつポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を有する組換えベクター及びこれを有する形質転換体、さらにこの形質転換体において発現されたヒトG-CSF活性を有するポリペプチドまたは糖蛋白質を得る方法について簡単に説明すると以下の通りである。

10 (1) プロープの調製

腫瘍細胞株CHU-2の培養上清から精製して得られた均一ヒトCSF・タンパクについてN末端よりアミノ酸配列を決定し、さらにブロムシアン分解、トリプシン処理などにより断片化した後その断片についてもアミノ酸配列を決定した。

15 (実施例3(i), (ii), (iii))

そのアミノ酸配列中から図1に示される配列に対応する3種類のヌクレオチドプロープ(A)、プロープ(LC)およびプロープ(IWQ)を合成した。(実施例4)プロープ(A)は連続した14個のヌクレオチドからなる混合型プロープである。

- 20 プロープ(IWQ)は、ヒトコレシストキニン遺伝子のクローン化で用いられた如き(Takahashi等; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82巻1931頁(1985))デオキシイノシンを使用した30個の連続したヌクレオチドである。プロープ(LC)は実施例3(i)に示したアミノ酸配列のN末端から32~39番に相当する部分を、図3に示した塩基配列を基にして合成した24
- 25



個のヌクレオチドからなるプローブである。

ヌクレオチドの化学合成は改良型ホスホトリエステル法を固相法に適用して行うことができ、Narangの総説に記述されている (Tetrahedron 39巻3-22頁(1983))。

- 5        使用するプローブは、本発明で用いたプローブ以外の位置のアミノ酸配列に基づくものであってもよい。

(2) cDNAライブラリーの構築

CHU-2 細胞にグアニジンチオシアナート溶液を加えてホモジナイズし、CsCl密度勾配遠心法により全RNAを得る。

- 10       この全RNAからオリゴ(dT)セルロースカラムによりポリ(A<sup>+</sup>) RNAを選別した後、逆転写酵素により1本鎖cDNAを合成し、RNase H およびE. coli DNAポリメラーゼ Iを加えて、2本鎖cDNAを得た。得られた2本鎖のcDNAにdC鎖を付加し、Pst I切断部位にdG鎖を付加したpBR322ベクターとつなぎ合  
15       せて、大腸菌X1776株を形質転換させ、pBR322系cDNAライブラリーを構築した。(実施例5, 6)

同様に、EcoRI リンカーを用いて、2本鎖cDNAをλgt10ベクターと連結し、λファージ系cDNAライブラリーを構築した。(実施例7)

- 20       (3) スクリーニング

- pBR322系cDNAライブラリー由来の組換え体をワットマン  
541 濾紙に固定し、<sup>32</sup>Pで放射標識したプローブ(IWQ)を用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行った結果、1個のクローンが選別できた。このクローンを、サザンブロッティング法(Southern; J. Mol. Biol. 98巻 503頁(1975))を  
25

用いて更に詳細に検討したところ、プローブ(A)ともハイブリダイズした。

このクローンの塩基配列をジデオキシ法 (Sanger; Science 214 巻1205頁(1981)) によって決定した。

5 得られたcDNAインサートの塩基配列を図2に示す。図2に示される如く、このcDNAインサートはプローブ(IWQ)およびプローブ(A)を含む308塩基対からなり、実施例3(iii)に示したアミノ酸配列を含む83個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを有していることがわかった。

10 この308塩基対を含むpBR322由来のプラスミドを以下pHCS-1と略記する。(実施例8)

pHCS-1から得られる308塩基対を含むDNA断片をニックトランスレーション法(前出、Molecular cloningを参照)にて放射標識し、これをプローブとして $\lambda$ gt10由来のcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーション(Bentonと Davis; Science 196巻180頁(1977))によりスクリーニングして5個のクローンを得、cDNAを含むと思われるクローンについてその塩基配列を前述と同様の方法で決定した。(図3(A))

20 図3(A)に示される如く、このcDNAインサートは一つの大きなオープンリーディングフレームを有する。

このcDNAによってコードされるアミノ酸配列は図3(A)に示された如く演えきできる。

25 実施例3(i)に示されているG-CSFタンパクのN末端アミノ酸配列との比較により、本cDNAは5'-末端から32~34ヌ

クレオチド位のATG配列から始まり、119～121位のGCC配列で終わる90塩基対によってコードされるシグナルペプチドおよび122～124位のACC配列から始まり650～652位のCCC配列で終わる531塩基対によってコードされる成熟G-CSFポリペプチドに相当する塩基配列を含んでいることがわかった。従って図3(B)に示されたアミノ酸配列Iのポリペプチドは207個のアミノ酸からなり、その分子量は22292.67ダルトンと計算された。同様にアミノ酸配列IIのポリペプチドは177個のアミノ酸からなり、その分子量は18986.74ダルトンであった。(実施例9)

但しタンパク質の開始部位に関しては、32～34位あるいは68～70位のATGも同様に考え得る。EcoRI切断部位にこのcDNA(+VSE)を挿入した、pBR322を保持するエシエリヒア・コリ(E.coli) X1776株は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(FERM寄託番号BP-954)。

図5には、得られた遺伝子の制限酵素切断部位を示した。

また、このcDNAをpBR327[Soberon等; Gene\_9巻287頁(1980)]とEcoRI部位で結合したプラスミドをpBRG4と称する。

このようにして得られたpBRG4を、制限酵素EcoRIで処理して得られる約1500塩基対のcDNAを含むDNA断片をニックトランスレーション法(前出のMolecular cloningを参照)にて放射標識し、これをプローブとして、再びλgt10由来のcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーション(前出BentonとDavisの文献参照)によりスクリーニングした。こ

の際、同時に入ファージDNAを固定したニトロセルロース濾紙を2枚作成しておき、先に述べたプローブ(LC)にて同様のブランクハイブリダイゼーションを行い、両プローブでポジティブとなるファージを選別した。完全長と思われるクローンを選別し、ジデオキシ法を用いてcDNAインサートの塩基配列を決定したところ図4(A)に示される如くであった。

このcDNAは一つの大きなオープンリーディングフレームを有し、コードされるアミノ酸配列は図4(A)に示された如く演えきできる。

10 実施例3(i)に示されているG-CSFタンパクのN末端アミノ酸配列との比較により、本cDNAは5'-末端から31~33ヌクレオチド位のATG配列から始まり、118~120位のGCC配列で終わる90塩基対によってコードされるシグナルペプチドおよび121~123位のACC配列から始まり640~642位の

15 CCC配列で終る522塩基対によってコードされる成熟G-CSFポリペプチドに相当する塩基配列を含んでいることがわかった。従って図4(B)に示されたアミノ酸配列Iのポリペプチドは204個のアミノ酸からなり、その分子量は

21977.35ダルトンと計算された。同様にアミノ酸配列IIの

20 ポリペプチドは174個のアミノ酸からなり、その分子量は18671.42ダルトンであった。(実施例10)

但しタンパク質の開始部位に関しては、31~33位以外に58~60位あるいは67~69位のATGも同様に考え得る。

EcoRI切断部位に本cDNA(-VSE)を挿入したpBR327を保持

25 するエシェリヒア・コリ(E.coli)X1776株は工業技術院微生物

物工業技術研究所に寄託されている（FERM寄託番号BP-955）。

図5には、得られた遺伝子の制限酵素切断部位を示した。

また、このcDNAをpBR327とEcoRI部位で結合したプラスミドをpBRV2と称する。

5 (4) 大腸菌用組換えベクターの構築

(A) +VSE系組換えベクター

かくして得られたpBRG4プラスミド（実施例9）からG-CSFポリペプチドのcDNA断片を制限酵素により切り出して来て、これと

10 ① tacプロモーターを含有するpKK223-3（ファルマシア社製）から調製した断片とアニーリングした合成リンカーを連結（ライゲーション）し組換えベクターを構築するか（実施例11）（図6）、

15 ② P<sub>L</sub>プロモーターを含むpPL-lambda（ファルマシア社製）から調製した3種の断片とアニーリングした合成リンカーを連結し、再調製して組換えベクターを構築するか（実施例12）（図7）、

あるいは

20 ③ trpプロモーター含有pOYIプラスミドから調製した断片とアニーリングした合成リンカーを連結して組換えベクターを構築する（実施例13）（図8）。

(B) -VSE系組換えベクター

pBRV2プラスミド（実施例10）を用いて同様に3種の組換えベクターを構築する（実施例18）（図9、図10、図11）。

(5) 大腸菌を宿主とする形質転換体の調製と培養、発現。

次に上記 +VSE 系および -VSE 系についての各々3種の組換えベクターを用いて前出の Molecular cloning に記載されている塩化カルシウム法又は塩化ルビジウム法で、夫々

5 E. Coli DH1株、E. coli N4830株 或いは E. coli JH105株を形質転換した。(実施例 11, 12, 13 および 18) 得られた形質転換株をアンピシリン含有ルリア (Luria) 培地でまず培養し次いで必要に応じて、適宜誘導をかけ、培養を行い形質発現せしめた。(実施例 14 および 19)

10 (6) 大腸菌からの G - CSF ポリペプチドの回収精製と  
アミノ酸分析

形質転換株の培養液を遠心にかけて集菌した後リゾチーム処理をし、凍結 - 融解をくりかえし溶菌させて上清を得るか、塩酸グアニジン処理後遠心で上澄液を得る。

15 これを Ultrogel ACA54 カラム (LKB 社製) でゲル濾過し、活性画分を限外濾過器で濃縮した。

次に、nプロパノールを含むトリフルオロ酢酸水溶液を添加し、水中放置、遠心分離し、逆相 C18 カラムに吸着、溶出操作を施す。溶出後各画分の活性を調べ、活性ピークを集め  
20 再度上記と同様の精製操作を行った後凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を溶解し、高速分子ふるいクロマトグラフィーにかけることにより取得したポリペプチドを SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ目的とする G - CSF ポリペプチドを示す単一のバンドを確認した。(実施例 15 および 19) こ  
25 の様にして得られたポリペプチドはヒト G - CSF 活性を示し

た。(実施例16および19)更に、得られたG-CSFポリペプチドのアミノ酸分析はアミノ酸組成を日立835アミノ酸自動分析装置(日立製作所製)を使用し、特殊アミノ酸分析法によって分析した。又、N末端アミノ酸分析は気相式シーケンサーを用いてエドマン分解し、高速液体クロマトグラフィー及び、Ultrasphere-ODSカラムを用いて行った。(実施例17および20)

#### (7) 動物細胞用組換えベクターの構築

宿主動物細胞としてC127細胞、NIH3T3細胞を使用する場合の組換えベクター(BPV由来)およびCHO細胞を使用する場合の組換えベクター(dhfr由来)の構築を+VSE系、-VSE系について各々行った。ここではC127細胞およびCHO細胞用組換えベクターの構築について略記するが詳しくは実施例を参照されたい。

#### 15 (A) +VSE系組換えベクターの構築

上記(3)で得られたcDNA(+VSE)断片をベクター-pdKCRに組み込みpHGA410プラスミドとした後(実施例21)(図12)これをEcoRIで部分消化し、末端をプラントエンド(blunt end)にする。このDNAにHindIIIリンカーを付加し、次いでHindIII処理をしT4DNAリガーゼ処理した後これで塩化ルビジウム法(前出Molecular cloning参照)を用い、E.coli DHI株を形質転換した。得られたプラスミドをpHGA410(H)と命名する。(図13)

25 pHGA410(H)をSal Iで処理し、次いで末端をプラントエンド化した後再びHindIII処理しHindIII-Sal I断片を回収する

一方、ウシ乳頭腫ウイルスの形質転換断片を有する pdBPV-1  
プラスミドを Hind III, Pvu II で処理し大きいほうの DNA 断片  
を分離し、これと先の Hind III - Sal I 断片を結合する。これ  
を用いて E. coli DHI 株を形質転換し pHGA410 由来の CSF -  
5 cDNA を有するプラスミド、 pTN - G4 を得る (図 13) (実施例  
22)。

一方、pHGA410 プラスミドか pHGA410(H) プラスミドと  
pAdd26SVpA プラスミドを用いて CHO 細胞用組換えベクター  
(+VSE) である pHGG4 - dhfr を構築した (図 14a および b)  
10 (実施例 24)。

#### (B) - VSE 系組換えベクターの構築

上記(3)で得られた cDNA (-VSE)断片をベクター pdKCR に組  
み込み pHGV2 プラスミドとした後 (実施例 27) これを EcoRI  
で部分消化し、末端をブランドエンド (blunt end) にする。  
15 この DNA に Hind III リンカーを付加し、次いで Hind III 処理をし  
T4DNA リガーゼ処理した後、これで塩化ルビジウム法 (前出  
Molecular cloning 参照) を用い、E. coli DHI 株を形質転換  
した。得られたプラスミドを pHGV2(H) と命名する。(図 16)

pHGV2(H) を Sal I で処理し、次いで末端をブランドエンド  
20 化した後再び Hind III 処理し Hind III - Sal I 断片を回収する一  
方、ウシ乳頭腫ウイルスの形質転換断片を有する pdBPV-1 プ  
ラスミドを Hind III, Pvu II で処理し大きい方の DNA 断片を分  
離し、これと先の Hind III - Sal I 断片を結合する。これを用  
いて E. coli DHI 株を形質転換し pHGV2 由来の CSF - cDNA を有  
25 するプラスミド、 pTN - V2 を得る (図 16) (実施例 28)。



+VSE と同様に pHGV2 プラスミドか pHGV2(H)プラスミドと pAdd26SVpAプラスミドを用いて CHO 細胞用組換えベクター (-VSE)である pHGV2 - dhfrを構築した (図 17a および b) (実施例 30)。

5 (8) 動物細胞による形質発現

ここではマウス C127細胞による形質発現を例にしてその概要を説明する。詳しくは各実施例を見られたい。

pTN - G4プラスミドまたは pTN - V2プラスミドを BamHI で  
10 処理しておく。これを用いて培養増殖させておいた C - 127  
細胞をリン酸 - カルシウム法で形質転換する。形質転換細胞  
は培養され CSF 生産能の高いクローンが選別される。形質発  
現 G - CSF の糖蛋白質はこの形質転換細胞の培養液から回収  
精製され、ヒト - G - CSF 活性を示すことが確認された。又  
15 試料のアミノ酸分析及び糖含有量分析により目的糖蛋白質の  
確認もなされた。

尚、糖含有分析に関しては、アミノ酸分析に用いた CSF 試  
料をエルソン - モルガン法によるアミノ糖定量、オルシノー  
ル硫酸法による中性糖の定量あるいはチオバルビツール法に  
20 によるシアル酸の定量をそれぞれ実施した。定量方法は生化学  
実験講座第 4 巻「糖質の化学 (下巻)」(東京化学同人)の  
13章に記載されている。各定量値から重量%を換算した結果、  
宿主細胞、発現ベクター及び培養条件等の違いにより、得ら  
れた G - CSF の糖含量は 1 ~ 20 (重量%) の範囲に分布して  
いた。

25 本発明はまた、ヒト G - CSF を有効成分とする感染防禦剤

をも提供する。

本発明の有効成分であるヒトG-CSFは前述した遺伝子組換えの手法によって得ることができる他、例えば前述の特許出願（特願昭59-153273号）に開示された方法に従ってヒト  
5 CSF産生細胞(CHU-1またはCHU-2)から得るか、或いはG-CSF産生細胞と自己増殖能を有する悪性腫瘍細胞とを細胞融合して得られるハイブリドーマをマイトジェンの存在または非存在下で培養することによって得ることもできる。

これ等の方法で得たヒトG-CSFは全て本発明に含まれる。  
10 得られたヒトG-CSF含有液は必要により公知の手段でさらに精製、濃縮した後凍結保存とするかまたは凍結乾燥、真空乾燥等の手段により水分を除去して保存することができる。また所望によりヒトG-CSFを適当な緩衝液に溶解した後、ミリポアフィルター等で無菌濾過して注射剤とすることも  
15 できる。

さらに本発明の感染防禦剤はヒトまたは動物医薬用に適した医薬製剤としての形態をとるために必要な製薬担体や賦形剤を、さらには安定化剤、吸着防止剤を含むことができる。

本発明の感染防禦剤に含まれるヒトG-CSFの投与量、投  
20 与回数は対象の疾患患者の病状を配慮して決めることができるが、通常成人一人当たり0.1～500 $\mu$ g好ましくは5～100 $\mu$ gのヒトG-CSFを有する製剤を1週間に1～7回投与することができる。しかし本発明はヒトG-CSFの含有量によって限定されるものではない。

25 本発明のヒトG-CSFを有効成分とする感染防禦剤が使用

され得る対象感染菌としては種々の菌を挙げる事ができ、特に限定されるものではないが、なかでもスタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属などのグラム陽性球菌、エシェリシア属、セラチア属、クレブシエラ属などの腸内細菌やヘモフィルスなどを含むグラム陰性通性嫌気性菌、シュードモナス属、アルカリゲネス属などのグラム陰性好気性菌、バクテロイデスなどのグラム陰性嫌気性菌、キャンディダ属、アスペルギルス属などの真菌およびリステリア菌のような細胞内寄生菌等による単独感染又はいくつかの菌による複合感染に対して高い感染防禦効果を得られる。

(実施例)

以下実施例をあげて本発明を詳細に説明するが、その前にCSF活性の測定法およびCHU-1からのヒトG-CSFの単離およびその理化学的性質について参考例で説明しておく。

15 <参考例1> CSF活性の測定方法

本発明において用いられたCSF活性(以下CSAと略す)の測定方法は次のとおりである。

「CSAの測定方法」

(a) ヒト骨髄細胞を用いる場合;

20 Bradley T.R., Metcalf D.等の方法(Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44巻 287~300頁, 1966年)に準じて単層軟寒天培養法により行った。すなわちウシ胎児血清 0.2ml、被検体 0.1ml、ヒト骨髄非付着性細胞浮遊液 0.1ml (1~2 × 10<sup>5</sup> 有核細胞)、改変McCoy's 5A培養液 0.2ml、寒天を  
25 0.75%含む改変McCoy's 5A培養液 0.4mlを混合して直径35

mmの組織培養プラスチックディッシュに入れて固まらせたのち、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件で培養を行い、10日後に形成されたコロニー数(50個以上の細胞からなる集落を1コロニーとする)を数え、1個のコロニーを形成する活性を1単位(Unit)としてCSAを求めた。

(b) マウス骨髄細胞を用いる場合;

ウマ血清 0.4ml、被検検体 0.1ml、C3H/He(メス)マウスの骨髄細胞浮遊液 0.1ml( $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 有核細胞)、寒天を0.75%含む改変McCoy's 5A培養液 0.4mlを混合し直径35mmの組織培養用プラスチックディッシュに入れて固まらせたのち、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件下にて5日間培養し、形成されたコロニー数(50個以上の細胞からなる集落を1コロニーとする)を数え、1個のコロニーを形成する活性を1単位(Unit)としてCSAを求めた。

尚、上記(a)、(b)の方法において用いた「改変McCoy's 5A培養液および(a)で用いたヒト骨髄非付着性細胞浮遊液は次の如くして作成した。

「改変McCoy's 5A培養液(2倍濃度)」

McCoy's 5A培養液(GIBCO社製) 12g、MEMアミノ酸ビタミン培地(日水製薬社製) 2.55g、重炭酸ナトリウム 2.18g、ペニシリンGカリウム 50000単位を2回蒸留水 500mlに溶解後、0.22  $\mu$ mのミリポアフィルターにて濾過滅菌を行った。

「ヒト骨髄非付着性細胞浮遊液」

健康人胸骨せん刺により得た骨髄液をRPMI 1640培養液に

て5倍に希釈し、Ficol - Paque 液（ファルマシア社製）に重層し、 $400\times g$ 、30分、 $25^{\circ}\text{C}$ にて遠心を行い、界面の細胞層（比重 $< 1.077$ ）を回収する。この細胞を洗浄後、20%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640 培養液にて $5\times 10^6$  Cell/mlの濃度に調整し、 $25\text{cm}^2$ の組織培養用プラスチックフラスコに入れ、炭酸ガス培養器にて30分間インキュベートしたのち、上清の非付着性細胞を回収し、再度 $25\text{cm}^2$ プラスチックフラスコに入れ、2時間30分インキュベートしたのち、上清の非付着性細胞を集めて用いた。

10 <参考例2> ヒトG-CSFの単離

ヒトG-CSF産生細胞CHU-1（CNCM受託番号「I-315」）の培養上清から以下の実施例2に記載の方法によってヒトG-CSFを単離精製した。

15 このようにして得られたヒトG-CSFは以下の理化学的性質を有していた。

I) 分子量：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定で約 $19,000\pm 1,000$ 。

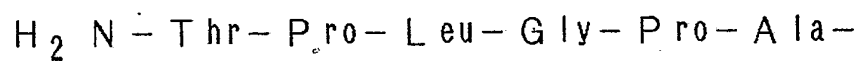
20 II) 等電点：以下の表-Iに示す三つの等電点（A, B, C）のうち少なくとも1つを有する。

表 - I

等 電 点 (pI)		
	4 M 尿素存在下の値	尿素不存在下の値
5 A	5.7 ± 0.1	5.5 ± 0.1
B	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.1
C	6.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1

10 III) 紫外部吸収: 280nmに極大吸収を有し、250nmに極小値をもつ。

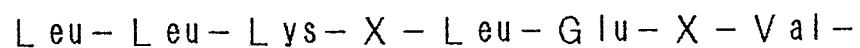
IV) N末端から21残基目迄のアミノ酸配列が次の如くである。



(10)

15 - Ser - Ser - Leu - Pro - Gln - (Ser) - Phe -

(20)



V) アミノ酸組成: 以下の表-IIに示すアミノ酸組成を有する。

表 - II

	アミノ酸	実測値 (nmol)	アミノ酸残基の予測数 ( )内はその整数値	
5	Asp (Asp+Asn)	3.54	4.3 (4)	
	Thr	4.58	5.5 (6)	
	Ser	10.64	12.9 (13)	
	Glu (Glu+Gln)	22.31	27.0 (27)	
	Pro	8.30	10.1 (10)	
10	Gly	10.60	12.8 (13)	
	Ala	14.85	18.0 (18)	
	1/2 Cys	2.59	3.1 (3)	
	Val	6.16	7.5 (7)	
	Met	2.26	2.7 (3)	
	15	Ile	3.29	4.0 (4)
		Leu	27.24	33.0 (33)
Tyr		2.60	3.1 (3)	
Phe		5.08	6.1 (6)	
Lys		3.68	4.5 (4)	
20		His	3.93	4.8 (5)
	Trp	1.61	1.9 (2)	
	Arg	4.29	5.2 (5)	
計			(166)	
算出分子量(166残基として糖は算定していない) 17961				

## 実施例 1 「CHU-2」の樹立

著明な好中球の増多が認められた口腔底癌患者の腫瘍を nu / nu マウスに移植した。この腫瘍は移植約10日後に著明な腫瘍の増大と好中球の増多が認められた。この腫瘍を移植12日  
5 後に無菌的に摘出し、1～2 mm<sup>3</sup> 角に細切し、これを以下の如く培養した。

上記細切した腫瘍塊10～15片を50 ml のプラスチック遠心管に入れ、5 ml のトリプシン溶液（トリプシン 0.25 %、EDTA 0.02 % 含む）を加え、37℃の温浴中で10分間振とうしたの  
10 ち上清を捨て、再度、同トリプシン溶液5 ml を加え、37℃で15分間攪拌しながらトリプシン消化を行った。上清の細胞浮遊液を回収し、ウシ胎児血清を1 ml 加えてトリプシンの作用を止めたのち氷中に保存した。

以上の操作を再度行い細胞浮遊液を回収し、前回の分と合  
15 わせて1,500 r.p.m. 10分間の遠心により細胞ペレットを得た。この細胞ペレットをウシ胎児血清を10%含むF-10にて2回洗浄したのち、25 cm<sup>2</sup> のプラスチック培養フラスコに細胞濃度  $5 \times 10^6$  個 / フラスコになるようにして植え込んだ。ウシ胎児血清を10%含有するF-10培養液を用い、炭酸ガスイン  
20 キュベーター（炭酸ガス濃度5%、湿度100%）中にて一晚インキュベートしたのち、上清を非付着細胞と共に除去し、新しい培養液を加えて培養を継続した。培養開始後6日目に細胞がいっぱいに増殖したので、この時点で培養液を新しいものに替えた。翌日、この培養液を捨て、RPMI 1640 で5倍  
25 希釈した抗マウス赤血球抗体（Cappel社製）2 ml と同じく



RPMI 1640 で 2.5倍希釈したモルモット補体（極東製薬社製）  
2 mlを加え37℃、20分間インキュベートした。インキュベー  
ション終了後ウシ胎児血清を10%含むF-10にて2回洗浄し  
nu/nuマウス由来のフィブロプラストを除去し、引き続きウ  
シ胎児血清を10%含むF-10培養液を加えて、さらに2日間  
5 培養を行った後細胞の一部を取り出し、限界希釈法によりク  
ローニングを行った。

得られた11個のクローンについてCSF活性を調べたところ、  
他のものよりも約10倍高い活性を示すクローン(CHU-2)が得  
10 られた。

#### 実施例 2 CSF の単離

上述の如くして樹立された細胞が完全に密に増殖した 150  
cm<sup>2</sup> の培養フラスコ2本より細胞を回収し、これをウシ胎児  
血清を10%含有するF-10培養液 500mlに浮遊したのち、  
15 1580cm<sup>2</sup> のガラス製ローラーボトル(Belco社製)に移し、  
0.5r.p.m.の速度で回転培養を行った。細胞がローラーボ  
トルの内壁に完全に密に増殖した時点で培養液を血清を含ま  
ないRPMI 1640に交換し、4日間培養したのち培養上清を回収  
し、ウシ胎児血清を10%含有するF-10を加えて培養を続行  
20 する。3日間培養したのち再び血清を含まないRPMI 1640に  
液替を行い、4日後に培養上清を回収した。以下同様の操作  
をくり返すことにより、毎週1ボトルより500mlずつの血清  
を含まない培養上清が得られ、しかもこの方法によりかなり  
長期間にわたって細胞を維持し、培養上清を回収することが  
25 可能であった。

得られた培養上清 5  $\mu$ l を 1 バッチとし、これに 0.01 % ツィーン 20 を添加後 Hollow Fiber DC-4 および Amicon PM-10 (アミコン社製) を用いた限外濾過法により約 1000 倍に濃縮したのち、これを以下の順序で精製した。

5 (i) 直径 4.6 cm、長さ 90 cm の Ultrogel AcA54 カラム (LKB 社製) を用い、0.15 M NaCl および 0.01 % ツィーン 20 (半井化学社製) を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて前記濃縮した培養上清 5 ml を流速約 50 ml / 時間でゲル濾過した。尚カラムはあらかじめウシ血清アルブミン (分子量 67,000)、オボアルブミン (分子量 45,000)、チトクローム C (分子量 12,400) にてキャリブレーションを行った。ゲル濾過  
10 終了後各フラクションより 0.1 ml ずつを採取し、10 倍に希釈した後、前述した「CSA の測定方法 (b)」により  
15 活性を示す画分を調べた。この結果、先ず  $V_e = 400 \sim 700$  ml の画分がマクロファージ優位の CSA を示し、 $V_e = 800 \sim 1200$  ml の画分が顆粒球優位の CSA を示すことがわかったので、後者の画分を集め PM-10 (アミコン社製) を用いる限外濾過器によって約 5 ml  
20 に濃縮した。

(ii) 上記濃縮画分に *n*-プロパノール (東京化成社製、アミノ酸配列決定用) を 30% 含む 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を添加し、氷中に 15 分程度放置したのち、  
15,000 r.p.m. 10 分の遠心により沈殿を除去した。次いで先の *n*-プロパノールおよびトリフルオロ酢酸を含  
25

む水溶液で平衡化した $\mu$ Bondapak C18カラム（Waters社製、セミ分取用、8 mm $\times$ 30 cm）に吸着後、30~60%の直線濃度勾配のn-プロパノールを含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で順次溶出した。高速液体クロマト装置は日立685-50型を、検出は日立638-41型検出器（いずれも日立製作所製）を用い、220 nmと280 nmの吸収を同時に測定した。溶出後、各画分より10 $\mu$ lを分取100倍希釈したのち、前述の「CSAの測定法(b)」により活性を示す画分を調べた。この結果、n-プロパノール40%にて溶出されるピークに活性が認められたので、このピークを集め再度同じ条件で再クロマトを行い上記と同様にしてCSAを調べたところ、やはりn-プロパノール40%の位置のピークに活性が認められたので、このピークを集め（4フラクション=4 ml）凍結乾燥した。

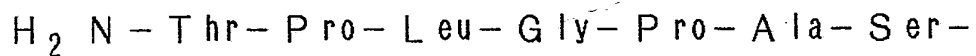
(iii) 上記凍結乾燥粉末をn-プロパノールを40%含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液200 $\mu$ lに溶解し、TSK-G 3000SWカラム（東洋曹達社製、7.5 mm $\times$ 60 cm）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にかけた。溶出は同水溶液により0.4 ml/分の流速で行い、フラクションコレクターFRAC-100（ファルマシア社製）により0.4 mlずつ分取した。分取した各画分についてCSAを前記と同様にして調べた結果、保持時間が37~38分の画分（分子量約2万に相当）に活性が認められたので、この画分を回収し、更に分析用

μ Bondapak C18 カラム (4.6mm × 30cm) による精製を施したのち、メインピークを回収し凍結乾燥した。得られた標品について前述の「CSA の測定方法(a)」によって検定したところヒト G-CSF 活性を有することを認められた。

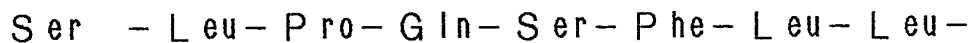
### 実施例 3 アミノ酸配列の決定

#### (i) N末端アミノ酸配列の決定

試料を気相式シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) を用いてエドマン (Edman) 分解し、得られた PTH アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー装置 (ベックマン・インストルメンツ社製) および Ultrasphere - ODS カラム (ベックマン・インストルメンツ社製) を用いて常法により分析した。カラム (5 μm、直径 4.6mm、長さ 250mm) を開始緩衝液 (15mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5、40% アセトニトリルを含む水溶液) にて平衡化したのち、検体 (20 μl の開始緩衝液にて溶解) を注入して開始緩衝液によるイソクラティック溶出により分離を行った。流速は 1.4 ml/分、カラム温度は 40°C に保持した。PTH アミノ酸の検出は 269nm と 320nm の紫外吸収を利用した。あらかじめ標準 PTH アミノ酸 (シグマ社製) 各 2 nmol を同一の系で分離して保持時間を決定し、被検体の保持時間から同定を行った。この結果、N末端から 40 残基目までのアミノ酸配列は次の如く決定された。



(10)



(20)

Lys - Cys - Leu - Glu - Gln - Val - Arg - Lys -

(30)

Ile - Gln - Gly - Asp - Gly - Ala - Ala - Leu -

5 Gln - Glu - Lys - Leu - Cys - Ala - Thr - Tyr -

(40)

Lys -

(ii) ブロムシアン分解

試料を70%ギ酸に溶かし、昇華精製したブロムシアン 200  
 10 当量を加えて、37°Cで一夜反応させた。次に反応物を凍結乾  
 燥後、TSK G3000SW カラム（東洋曹達社製）を用いたHPLCで  
 画分し4つのピークを得た。ピークを分子量の大きい順にCN  
 - 1, CN - 2, CN - 3, CN - 4と命名し、収率のよいCN - 1,  
 CN - 2についてアミノ酸配列を自動気相式シーケンサー  
 15 （アプライドバイオシステム社製）を用いて(i)と同様の条  
 件で分析した。

その結果、CN - 1はG - CSF タンパクのN末端からのペプ  
 チドであることがわかった。さらにCN - 2は以下のアミノ酸  
 配列を有していた。

20 Pro - Ala - Phe - Ala - Ser - Ala - Phe - Gln -  
 Arg - Arg - Ala - Gly - Gly - Val - Leu - Val -  
 Ala - Ser - His - Leu - Gln -

(iii) トリアシン分解

試料を8M尿素を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に  
 25 溶かし、0.1%2-メルカプトエタノールを含む0.1Mトリ

ス塩酸緩衝液 (pH7.4) を加えて最終的に 2 M の尿素となるように調製した。次いで試料と酵素が 50 : 1 となるように TPCK 処理トリプシン (シグマ社製商品名) を加え、25°C で 4 時間反応させた後、さらに同量の TPCK 処理トリプシンを加えて、  
5 再度 25°C で 16 時間反応させた。反応後、反応物を C8 カラム (山村化学社製) を用いた高速逆相カラムクロマトグラフィーに付した。溶出は 0.1% TFA を含む n-プロパノールを用い、n-プロパノール濃度を 5% ~ 60% に直線的に上げて行った。280 nm の紫外部吸収を測定して得られたピークのうち、  
10 メインピークについて (i) と同条件下に自動気相式シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) を用いてアミノ酸配列を分析した。その結果、メインピークは (ii) の CN-2 断片の一部を含む以下の配列を有するペプチドであることがわかった。

15 Gln-L eu-A sp-V al-A la-A sp-P he-A la-  
Thr-Thr-I le-Trp-G ln-G ln-M et-G lu-  
G lu-L eu-G ly-M et-A la-P ro-A la-L eu-  
G ln-P ro-Thr-G ln-G ly-A la-M et-P ro-  
A la-P he-A la-S er-

20 実施例 4 DNA プロープの作成

(i) プロープ (IWQ) の合成

実施例 3 (iii) で得られたアミノ酸配列の中から Ile-  
Trp-G ln-G ln-M et-G lu-G lu-L eu-G ly-M etで  
示される 10 個のアミノ酸の配列に基づいて、30 個の連続する  
25ヌクレオチドを得た (図 1)。図 1 の配列に於いて、例えば

5' - 末端から 9 位のヌクレオチドは dA および dG を等量含む混合物であることを示す。原料のヌクレオチドは主にダイマーを使用し、必要に応じて随時モノヌクレオチドも使用した。ガラスフィルター付きカラムに出発原料のヌクレオチド樹脂

5 Ap-d(G) (ヤマサ醤油社製) 20mg を入れ塩化メチレンにて洗浄を繰り返した後、3% トリクロロ酢酸を含む塩化メチレン溶液にて、4, 4'-ジメトキシトリチル基を脱離せしめ、次いで 1 ml の塩化メチレンでカラムを数回洗浄した。無水ピリジンで洗浄して溶媒を置換したのちヌクレオチドダイマー

10 (DMTr) ApTp(NHR<sub>3</sub>) (日本ゼオン社製; NHR<sub>3</sub> はトリエチルアンモニウム、DMTr はジメトキシトリチルを示す) 20mg と 0.2 ml のピリジンを加えて真空ポンプにてカラム内を真空乾燥した。次いで、2, 4, 6-トリメチルベンゼンスルホン

15 ル-3-ニトロトリアゾリド (MSNT、和光純薬社製) 20mg と無水ピリジン 0.2 ml を加えた後、カラム内を窒素ガスで置換して、室温下に 45 分間時々振とうさせることによってヌクレオチド樹脂とダイマーを縮合させた。反応終了後、ピリジンにてカラムを洗浄し、次いで未反応の OH 基を過剰の無水酢酸-4-ジメチルアミノピリジンにてアセチル化した後、

20 再びカラムをピリジンで洗浄した。以下同様に、

(DMTr) Ip(NHR<sub>3</sub>), (DMTr) GpGp(NHR<sub>3</sub>),  
(DMTr) Ip(NHR<sub>3</sub>), (DMTr) CpTp(NHR<sub>3</sub>) と  
(DMTr) TpTp(NHR<sub>3</sub>) の等量混合物、(DMTr) ApAp(NHR<sub>3</sub>) と  
(DMTr) ApGp(NHR<sub>3</sub>) の等量混合物、(DMTr) ApGp(NHR<sub>3</sub>)

と (DMTr) GpGp(NHR<sub>3</sub>) の等量混合物、(DMTr)GpAp(NHR<sub>3</sub>)、  
(DMTr) TpGp(NHR<sub>3</sub>)、(DMTr) ApAp(NHR<sub>3</sub>) と  
(DMTr) GpAp(NHR<sub>3</sub>) の等量混合物、(DMTr) CpAp(NHR<sub>3</sub>)、  
(DMTr) ApAp(NHR<sub>3</sub>) と (DMTr) ApGp(NHR<sub>3</sub>) との等量混合  
5 物、(DMTr) GpCp(NHR<sub>3</sub>)、(DMTr) TpGp(NHR<sub>3</sub>)、  
(DMTr) Ip(NHR<sub>3</sub>)、(DMTr) ApTp(NHR<sub>3</sub>)

[(DMTr) Ip(NHR<sub>3</sub>) はヤマサ醤油社製、その他は全て日本  
ゼオン社製]の順で、前述の操作を繰り返すことによって縮  
合させた。最終段階の反応終了後、アセチル化することなし  
10 に、ピリジン、塩化メチレン、エーテルの順で樹脂を洗浄し  
た後、乾燥させた。乾燥させた樹脂を1Mテトラメチルグア  
ニジンおよび1M $\alpha$ -ピコリンアルドキシムを含むジオキサ  
ン1ml、ピリジン0.5ml、水0.2mlの混合液1.7mlに懸濁し  
た後、一夜室温にて放置した後、100~200 $\mu$ lまで減圧濃  
15 縮した。この濃縮液に少量(2~3滴)のピリジンを加えた  
後、濃アンモニア水2~3mlを加え55℃で6時間加温した。  
次いで酢酸エチルを加えて抽出分離し、得られた水層を減圧  
濃縮した後、50mMトリエチルアンモニウム酢酸溶液(pH7.0)  
に溶解せしめてC-18カラム(1.0 $\times$ 15cm、Waters社製)を用  
いたカラムクロマトグラフィーに付した。溶出は、50mMトリ  
20 エチルアンモニウム酢酸溶液(pH7.0)中10%~30%の直線濃  
度勾配のアセトニトリルで行い、アセトニトリル濃度が25%  
付近の位置で溶出されるピーク画分を減圧濃縮した。

この濃縮液に80%酢酸を加えて室温下に30分間放置した後、  
25 酢酸エチルを加えて抽出・分離し得られた水層を減圧下に濃



縮した。得られた濃縮液は、C18カラム（センシュ－科学社製、SSC-ODS-272、6φ×200mm）を用いた高速液体クロマトグラフィーに付して、さらに精製した。溶出は50mMトリエチルアンモニウム酢酸溶液（pH7.0）中10%～20%の直線濃度勾配のアセトニトリルを用いて行い、10A<sub>260</sub> units 以上の収量で合成DNAが得られた。

得られたオリゴヌクレオチドはMaxam-Gilbert法（Meth. Enzym. 65 巻 499頁（1980）により塩基配列を調べた結果、図1に示された配列を有していることが確認された。

10 (ii) プロープ(A)の合成

実施例3(iii)で得られたアミノ酸配列の中からMet-Pro-Ala-Phe-Alaで示される5個のアミノ酸の配列に基づいて14個の連続するヌクレオチドを得た。（図1）

合成は、プロープ(IWQ)と同様な方法で行いヌクレオチド樹脂AP-d(T)（ヤマサ醤油社製）に(DMTr)CpAp(NHR<sub>3</sub>)；(DMTr)GpGp(NHR<sub>3</sub>)；(DMTr)CpAp(NHR<sub>3</sub>)，(DMTr)CpTp(NHR<sub>3</sub>)，(DMTr)CpGp(NHR<sub>3</sub>)および(DMTr)CpCp(NHR<sub>3</sub>)の等量混合物；(DMTr)ApGp(NHR<sub>3</sub>)，(DMTr)TpGp(NHR<sub>3</sub>)，(DMTr)GpGp(NHR<sub>3</sub>)および(DMTr)CpGp(NHR<sub>3</sub>)の等量混合物；(DMTr)ApAp(NHR<sub>3</sub>)；(DMTr)CpAp(NHR<sub>3</sub>)と(DMTr)CpGp(NHR<sub>3</sub>)の等量混合物(DMTr)Gp(NHR<sub>3</sub>)（いずれも日本ゼオン社製）の順に縮合させて約10A<sub>260</sub> unitsの合成DNAを得た。得られたオリゴヌクレオチドの塩基配列をMaxam-Gilbert法により調べたところ図1に示された塩基配列を有していることが確認され

た。

### (iii) プローブ (LC) の合成

アプライドバイオシステム社のDNA合成機380Aにより、自動合成を行った。この方法はCaruthers等の記載した原理

5 (J. Am. Chem. Soc., 103巻3185頁(1981))に基づいており、ホスホアミダイト法と称されている。

5'のジメトキシトリチル基(DMTri)を脱保護したdG-S

(Sは支持体)にテトラゾールで予め活性化した(DMTri)-dTのホスホアミダイト体を縮合させた後、未反応の水酸基を

10 アセチル化し、次いで水存在下でヨウ素酸化を行ってリン酸体に導いた。DMTri基を脱保護し、以後同様に縮合を繰り返して図1に示される如き配列の24個のヌクレオチドを合成した。得られたヌクレオチドを支持体から開裂せしめ脱保護した後、C18カラム(センシュウ科学社製SSC-ODS-272)を用いた  
15 逆相系高速液体クロマトグラフィーにて精製した。

### 実施例 5 CHU-2細胞の培養とmRNAの精製

#### 1) CHU-2細胞の培養と細胞の回収

樹立されたCHU-2細胞を150cm<sup>2</sup>の培養フラスコ2本に完全に密に増殖させた後、これをウシ胎児血清を10%含有する  
20 RPMI 1640培養液500mlに浮遊させたのち、1580cm<sup>2</sup>のガラス製ローラーボトル(Belco社製)に移し、0.5r.p.m.の速度で4日間回転培養を行った。細胞がローラーボトルの内壁に完全に密に増殖した時点で、ローラーボトルから培養液を除き、あらかじめ37℃に加温したEDTAを0.02%含む生理食  
25 塩水100mlを加え、37℃で2分間加温後、ピペット操作にて

細胞をはく離せしめた。得られた細胞懸濁液を1500r.p.m.  
10分間の遠心にて細胞ペレットを得る。細胞をEDTAを含まない生理食塩水5 mlに再び懸濁し、1500r.p.m.10分間遠心にて細胞ペレットを得た(湿重量約0.8g)、このようにして得られた細胞はRNA抽出操作を行うまで-80℃にて凍結保存する。

## 2) mRNAの精製

上記の如くして得られたCHU-2細胞からのmRNAの単離は本質的に“Molecular cloning”[Maniatis等, Cold Spring Harbor, 196頁(1982)]に記載されているようにして実施した。凍結保存されていたCHU-2細胞(湿重量3.8g)に20mlの6Mグアニジン溶液(6Mグアニジンチオシアナート、5mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.1M $\beta$ -メルカプトエタノール、0.5%ザルコシル硫酸ナトリウム)に懸濁し、Vortexミキサーにて2~3分よく混合した後、18Gの注射針を装てんした20ml容の注射器を用いて10回吸入排出を繰り返した。ベックマン社製SW40Tiローターに合うポリアロマー製の遠心チューブに6mlの5.7M CsCl - 0.1M EDTA、(pH7.5)を先に加えておき、チューブが満たされるように上述の細胞が壊れて粘稠になったグアニジン溶液約6mlを重層した。このようにして調製された遠心チューブ4本を30,000r.p.m.、20℃で15時間遠心した後、得られたペレットを少量の70%エタノールを用いて3回洗浄した。

各々のチューブから得られたペレットを合して550 $\mu$ lの水に溶解せしめNaCl濃度が0.2Mとなるように調製したの

ち、フェノール-クロロホルム（1：1）処理、クロロホルム処理後、2.5倍容量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行い全RNAを得た。（湿細胞 3.8g より全RNA 約10.1mgを得た。）

- 5 全RNA からポリ（A<sup>+</sup>）-RNA の精製は以下の如く行った。この方法はmRNAが3'末端にポリA鎖を付加していることを利用したアフィニティークロマトグラフィーである。オリゴ（dT）-セルロース（P-L Biochemical 社製Type7）を用い、吸着は全RNA を吸着緩衝液（10mMトリス-塩酸（pH7.5）、
- 10 0.5M NaCl、1mM EDTA、0.1% SDS 溶液を含む。）に溶解し、65℃で5分間加熱した後、同溶液にて充てんされたオリゴ（dT）-セルロースカラムに通過させて行い、溶出はTE溶液（10mMトリス-塩酸（pH7.5）、1mM EDTA を含む。）で行った。未吸着通過液は再び同カラムに通して同様に溶出操作を行い、1回目の溶出液と混合した。このような操作を用いて、ポリ（<sup>+</sup>A）-RNA 400μgを得た。
- 15

このようにして調整したmRNAをSchleif とWensink の実験技術書（Practical Methods in Molecular Biology, Springer-Verlag, NewYork, Heiderberg, Berlin, (1981)）中に記載されている方法と同様の操作で、シヨ糖密度勾配遠心法によりサイズ画分した。

- すなわち、SW40Tiローター（Bechman 社製）用チューブに5%～25%のシヨ糖密度勾配を作る。シヨ糖溶液は 0.1M NaCl、10mMトリス-塩酸、（pH7.5）、1mM EDTA、0.5%
- 25 SDS の溶液にそれぞれ5%、25%の割合いでRNase フリーの

シヨ糖 (Schwarz / Mann社製) を含んでいる。

上記で述べた如き方法で調製した mRNA (ポリ (A<sup>+</sup>) - RNA) 800 $\mu$ g を 200 $\mu$ l ~ 500 $\mu$ l の TE 溶液に溶解せしめ、65 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱後急冷した後、シヨ糖密度勾配液の上  
5 せる。30000 r.p.m. にて 20 時間遠心後 0.5 ml ずつの分画を集め 260nm の吸光度を測り、同様に行った標準 RNA (28S, 18S, 5S のリボソーム RNA) の位置に基いて、分画された RNA のサイズを決めると同時に各分画の G-CSF 活性をアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞系を用いて調  
10 べた。すなわち各分画の mRNA を 1 $\mu$ g /  $\mu$ l の濃度の水溶液に調製し、ツメガエル (生後約 1 年) から取り出した卵母細胞 1 個に 50ng の mRNA の割合いで注入した後、96 穴のマイクロタイタープレートの 1 穴に卵母細胞を 10 個ずつ入れ、それぞれ 100 $\mu$ l のバース培地 (88mM NaCl, 1mM KCl, 2.4mM  
15 NaHCO<sub>3</sub>, 0.82mM MgSO<sub>4</sub>, 0.33mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41mM CaCl<sub>2</sub>, 7.5mM トリス-塩酸 (pH7.6)、ペニシリン 10mg / l、ストレプトマイシン硫酸 10mg / l) 中で 48 時間室温で培養した後上清を回収し、濃縮・精製して G-CSF 活性を測定する。

20 この結果、15~17S 画分に G-CSF 活性が認められた。

実施例 6 cDNA の合成 (PBR 系 cDNA ライブラリーの構築)

前述の方法で得られたポリ (A<sup>+</sup>) - RNA から Land 等の方法 [Nucleic Acids Res, 9 巻 2251 頁 (1981)] に基づき、Gubler と Hoffman の方法 [Gene, 25 巻 263 頁 (1983)] を加味  
25 して cDNA を得た。

## 1) 1本鎖cDNAの合成

エッペンドルフ社製 1.5ml 容チューブに以下の如くの順序  
で試薬を入れる。80 $\mu$ l の反応緩衝液 (500mM KCl、50mM  
MgCl<sub>2</sub>、250mM トリス-塩酸、pH8.3)、20 $\mu$ l の200mM ジ  
チオスレイトール、32 $\mu$ l の12.5mM dNTP (dATP, dGTP,  
5 dCTP, dTTPを各々12.5mM含む)、10 $\mu$ l の $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP  
(アマシャム製、PB 10205)、32 $\mu$ l のオリゴ (dT) 12-18  
(P-L Biochemicals社製、500 $\mu$ g/ml)、20 $\mu$ l のポリ  
(A<sup>+</sup>)-RNA (2.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)、蒸留水 206 $\mu$ l の計 400  
10  $\mu$ l の反応液を65°Cで5分間加熱後、42°Cで5分間加温する。  
この反応液に逆転写酵素 (宝酒造製) 120単位を加え、さら  
に42°C、2時間反応させた後、RNase インヒビター  
(Bethesda Research Laboratories社製) 2 $\mu$ l、20 $\mu$ l の  
TE溶液、16 $\mu$ l の100mM ピロリン酸ナトリウム、48単位 (4  
15  $\mu$ l) の逆転写酵素を追加して、今度は46°C 2時間反応せし  
めた。0.5M EDTA 8 $\mu$ l、10% SDS 8 $\mu$ l を加えて反応  
を停止させた後、フェノール-クロロホルム処理、エタノー  
ル沈殿 (2回) を行い一本鎖cDNAを得た。

## 2) 1本鎖cDNAへのdC-鎖付加

20 上記で得られた一本鎖cDNAを60 $\mu$ l の蒸留水に溶解後、60  
 $\mu$ l のdC-鎖付加緩衝液 (400mM カコジル酸カリウム; 50mM ト  
リス-塩酸 (pH6.9); 4mM ジチオスレイトール; 1mM  
CoCl<sub>2</sub>; 1mM dCTP) に加え、37°Cで5分間加温した。この  
反応液にターミナルトランスフェラーゼ (27unit/ $\mu$ l,  
25 P-L Biochemicals社製) 3 $\mu$ l を加えて37°Cで2.5分間反応

した後、フェノール-クロロホルム処理（1回）、及びエタノール沈殿（2回）を行い、100mM NaClを含むTE溶液40 $\mu$ lに溶解せしめた。

### 3) 2本鎖cDNAの合成

5 上記40 $\mu$ lのDNA溶液に4 $\mu$ lのオリゴ(dG)<sub>12-18</sub> (200 $\mu$ g/ml, P-L Biochemicals社製)を加え65 $^{\circ}$ C 5分間、続いて42 $^{\circ}$ Cで30分間加温した後、反応液を0 $^{\circ}$ Cに保った。この反応液に緩衝液80 $\mu$ l (100mMトリス-塩酸pH7.5、20mM  
10 MgCl<sub>2</sub>、50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、500mM KCl)、4 $\mu$ lの4mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTPを各々4mMを含む)、60 $\mu$ lの1mM $\beta$ -NAD、及び210 $\mu$ lの蒸留水、20 $\mu$ lのE.coli DNAポリメラーゼI (宝酒造社製)、15 $\mu$ lのE.coli DNAリガーゼ (宝酒造社製)、15 $\mu$ lのE.coli RNase H (宝酒造社製)を加え12 $^{\circ}$ Cにて1時間反応させた後、さらに  
15 4 $\mu$ lの4mM dNTPを追加し、25 $^{\circ}$ Cで1時間反応して、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿（1回）を行って、約8 $\mu$ gの2本鎖cDNAを得た。この2本鎖cDNAをTE溶液に溶解せしめ1.2%アガロースゲル電気泳動を行い、約560塩基対(bp)~2キロ塩基対(Kbp)の大きさに相当する部分  
20 をワットマンDE81 (ワットマン社製)に吸着させ溶出回収したところ、約0.2 $\mu$ gが回収された。

### 4) 2本鎖cDNAへのdC-鎖付加

上記の如く得られた2本鎖cDNAを40 $\mu$ lのTE溶液に溶解し、  
2)の項で述べたdC-鎖付加緩衝液8 $\mu$ lを加え37 $^{\circ}$ Cで2分間  
25 加温した後、1 $\mu$ lのターミナルトランスフェラーゼ (27

unit/ $\mu\text{L}$ )を加えて37°Cで3分間反応せしめた。反応液を直ちに0°Cに冷却し0.5M EDTA 1 $\mu\text{L}$ を加えて反応を停止した後、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE溶液10 $\mu\text{L}$ に懸濁した。

5           5) pBR系cDNAライブラリーの構築

市販のオリゴ(dG)鎖付加pBR322ベクター(ベセスダリサーチラボラトリーズ社製、10ng/ $\mu\text{L}$ )4 $\mu\text{L}$ と上記dC-鎖付加2本鎖cDNA2 $\mu\text{L}$ を75 $\mu\text{L}$ の0.1M NaClを含むTE溶液の中でアニールさせた。アニールは65°C、5分加温した後40°Cにて2時間加温、その後、室温になるまで放置して行った。

一方、Maniatisらの実験書[Molecular cloning, Cold Spring Harbor, 249頁(1982)]に記載されている方法等を用いて大腸菌X1776株からコンピテント細胞を調製し、上記アニールされたプラスミドにより形質転換を行い、トランスフォーマント(形質転換体)が得られた。

15           実施例 7 cDNA合成(λファージ系ライブラリーの構築)

1) 1本鎖cDNAの合成

実施例5で述べた方法に従って3.8gの凍結保存CHU-2細胞から2回オリゴ(dT)セルロースカラムによる精製を経て400 $\mu\text{g}$ のポリ(A<sup>+</sup>)-RNAを得た。

このポリ(A<sup>+</sup>)-RNA 12 $\mu\text{g}$ を溶解したTE溶液10 $\mu\text{L}$ を10 $\mu\text{g}$ のアクチノマイシンD(シグマ社製)を含む反応チューブに入れた後、以下の順序で試薬類を加えた; 20 $\mu\text{L}$ の逆転写緩衝液(250mM トリス-塩酸(pH8.3)、40mM MgCl<sub>2</sub>、250mM KCl) 20 $\mu\text{L}$ の5mM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTPを



各々 5 mM 含む)、20  $\mu$ l のオリゴ (dT) <sub>12-18</sub> (0.2  $\mu$ g / ml P-L Biochemicals 社製)、1  $\mu$ l の 1 M ジチオスレイトール、2  $\mu$ l の 30 unit /  $\mu$ l の RNase (プロメガバイオテク社)、10  $\mu$ l の逆転写酵素 (10 unit /  $\mu$ l 生化学工業社製)、1  
5  $\mu$ l の  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP (10  $\mu$ Ci アマシャム社製)、16  $\mu$ l の水で計 100  $\mu$ l の液量の反応液になる。反応液を 42°C で 2 時間保った後、5  $\mu$ l の 0.5 M EDTA 及び 1  $\mu$ l の 20% SDS を加えて反応を停止した。フェノール-クロロホルム (100  $\mu$ l) 処理、エタノール沈殿 (2 回) を行って約 4  $\mu$ g の 1 本鎖  
10 cDNA を得た。

## 2) 2 本鎖 cDNA の合成

上記の如く得られた cDNA を 29  $\mu$ l の TE 溶液に溶解し以下の順序で試薬類を加えて反応液とした; 25  $\mu$ l のポリメラーゼ緩衝液 (400 mM HEPES (pH 7.6); 16 mM MgCl<sub>2</sub>; 63 mM の  $\beta$ -メルカプトエタノール; 270 mM KCl); 10  $\mu$ l の 5 mM dNTP;  
15 1.0  $\mu$ l の 15 mM  $\beta$ -NAD; 1.0  $\mu$ l の  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP (10  $\mu$ Ci /  $\mu$ l); 0.2  $\mu$ l E. coli DNA リガーゼ (60 unit /  $\mu$ l 宝酒造社製); 5.0  $\mu$ l の E. coli DNA ポリメラーゼ I (New England Biolabs 社, 10 unit /  $\mu$ l); 0.1  $\mu$ l の RNase H  
20 (60 unit /  $\mu$ l 宝酒造社製); 28.7  $\mu$ l の蒸留水。

反応液を 14°C で 1 時間インキュベートした後、室温にもどして、さらに 1 時間インキュベートした。次いで 5  $\mu$ l の 0.5 M EDTA と 1  $\mu$ l の 20% SDS を加えて反応を停止させ、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿を行った。得  
25 られた DNA を 0.5 mM EDTA 20  $\mu$ l に溶解せしめ、3  $\mu$ l の

Klenow緩衝液(500mMトリス-塩酸(pH8.0)、50mM  $MgCl_2$ )、  
3  $\mu l$  の5mM dNTP、及び水4  $\mu l$  を加えて反応液を調製し  
た後、1  $\mu l$  のDNAポリメラーゼ(Klenow断片)(宝酒造社  
製)を加えて30°C 15分インキュベートした。

- 5 この反応液に70  $\mu l$  のTE溶液を加えて希釈し、さらに5  
 $\mu l$  の0.5M EDTA、1  $\mu l$  の20% SDSを加えて反応を停止し  
た。反応液をフェノール-クロロホルム処理し、エタノール  
沈殿を行って約8  $\mu g$  の2本鎖cDNAを得た。

### 3) 2本鎖cDNAのメチル化

- 10 2)の項で合成した2本鎖cDNAの水溶液30  $\mu l$ 、メチル化緩  
衝液(500mMトリス-塩酸(pH8.0)、50mM EDTA)40  $\mu l$ 、SAM  
溶液(800  $\mu M$  S-アデノシル-L-メチルメチオニン  
(SAM)、50mM  $\beta$ -メルカプトエタノール)20  $\mu l$ 、水100  
 $\mu l$  を加えた混合液にEcoRIメチラーゼ(New England  
15 Biolabs社、20unit/ $\mu l$ )15  $\mu l$  を加えて全反応液を200  
 $\mu l$  とし、37°C 2時間インキュベートした。フェノール処理、  
エーテル処理を行った後、エタノール沈殿を行ってDNAを回  
収した。

### 4) EcoRIリンカーの付加

- 20 上記メチル化された2本鎖DNA約1.2  $\mu g$  にリガーゼ緩衝  
液(250mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM  $MgCl_2$ )1.5  $\mu l$ 、  
あらかじめリン酸酸化されたEcoRIリンカー0.5  $\mu l$  (10mer、  
宝酒造社製)、1.5  $\mu l$  の10mM ATP、100mM ジチオスレイト  
ール1.5  $\mu l$ 、2  $\mu l$  の $H_2O$ を加え、反応液を15  $\mu l$  とし

て  $T_4$  DNA リガーゼ (3.4u /  $\mu$ l、宝酒造社製) 0.7 $\mu$ l 加えて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた後、65 $^{\circ}$ C にて 10 分間加熱しリガーゼを失活させた。この反応液をさらに 100mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、5mM  $MgCl_2$ 、50mM  $NaCl$ 、100 $\mu$ g/ml のゼ  
5 ラチンの濃度で全液量が 50 $\mu$ l になるように調製した後、  
EcoRI (10unit/ $\mu$ l) 3.5 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。次いで 0.5M の EDTA 2.5 $\mu$ l ; 20% SDS 0.5 $\mu$ l を加えた後フェノール-クロロホルム処理を行いエタノール沈殿により DNA を回収した。この後 Ultrogel Aca34 (LKB 社製)  
10 のゲル濾過法あるいはアガロースゲル電気泳動法にて未反応の EcoRI リンカーを除去し、リンカー付加 2 本鎖 cDNA 約 0.5 ~ 0.7 $\mu$ g を回収した。

#### 5) 2 本鎖 cDNA と $\lambda$ gt10 ベクターの結合

上記のリンカー付加 2 本鎖 cDNA を 2.4 $\mu$ g の予じめ EcoRI  
15 処理した  $\lambda$ gt10 ベクター (ベクタークローニングシステム社)、リガーゼ緩衝液 (250mM トリス-塩酸、100mM  $MgCl_2$ )  
1.4 $\mu$ l、蒸留水 6.5 $\mu$ l を加えて、42 $^{\circ}$ C、15 分間処理した後 10mM ATP 1 $\mu$ l、0.1M ジチオスレイトール 1 $\mu$ l、  
 $T_4$  DNA リガーゼ 0.5 $\mu$ l を加え全量を 15 $\mu$ l とした後、12  
20  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。

#### 6) インビトロパッケージング

上記 5) で得られた組換え体 DNA の約  $1/3$  をインビトロパッケージングキット (プロメガ バイオテック社) を用いてパッケージングし、ファージブランクを得た。

実施例 8 プロープ (IWQ) による pBR 系ライブラリーのスクリーニング

コロニーの成育した寒天培地上にワットマン 541濾紙をのせ 37°C で 2 時間放置した。以下、Taub と Thompson の方法  
5 [Anal. Biochem. 126 巻 222 頁 (1982)] に準じて濾紙を処理した。

すなわち、541濾紙にコロニーを移した後、クロラムフェニコール (250  $\mu$ g /  $\mu$ l) を含んだ寒天培地に移し、さらに 37°C で一晩放置した。

- 10 541濾紙を取り出した後、室温下で 0.5N NaOH 溶液を浸した濾紙上に 3 分間放置し、これを 2 回くり返した。以下同様な操作を 0.5M トリス-塩酸 (pH 8) 溶液を用いて 3 分間、2 回行ない、さらに 4°C 下に 0.05 M トリス-塩酸 (pH 8) 溶液で 3 分、1.5mg / ml のリゾチーム液 (0.05 M トリス-塩酸 (pH 8)、25% ショ糖を含む) で 10 分間、次いで 37°C 下に  
15 1  $\times$  SSC (0.15M NaCl および 0.015クエン酸ナトリウム) 溶液で 2 分間、200  $\mu$ g / ml プロテアーゼ k を含む 1  $\times$  SSC 溶液で 30 分、再び室温下に 1  $\times$  SSC 溶液で 2 分間、95% エタノール溶液で 2 分間、2 回行った後、541濾紙を乾燥させた。
- 20 得られた乾燥 541濾紙を室温下にフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1、100mM トリス-塩酸 (pH 8.5)、100mM NaCl、10mMEDTA で平衡化したもの) 溶液に 30 分間浸した。以下同様の操作を 5  $\times$  SSC 溶液で 3 分間、3 回次いで 95% エタノール溶液で 3 分間、2 回行った後、  
25 濾紙を乾燥させた。

プローブ (IWQ) を常法 (Molecular cloning を参照) に従って  $^{32}\text{P}$  を用いて放射標識した後、Wallace 等の方法 (Nucleic Acids Res. 9巻 879頁 (1981)) に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。6×NET [ 0.9M NaCl、  
5 0.09 M トリス-塩酸 (pH7.5)、6 mM EDTA ]、5×Denhardt 溶液、0.1% SDS、0.1mg/ml 変性 DNA (仔牛胸腺 DNA) を含むハイブリダイゼーション緩衝液中で 65°C、4 時間、プレハイブリダイゼーションを行った後、放射標識化したプローブ (IWQ)  $1 \times 10^6$  cpm/ml を含む前記ハイブリダイゼーション緩衝液を用いて 56°C で一夜ハイブリダイゼーションを行  
10 った。反応終了後 541 濾紙を室温下に 0.1% SDS を含む 6×SSC 溶液で 30 分、2 回および 56°C、1.5 分間洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。

シグナルの出たクローンよりプラスミドを分離した後、  
15 プローブ (IWQ) を用いてサザンブロッティングを行った。ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーは前述と同一の条件で行なった。

同様にプローブ (A) を用いてサザンブロッティングを行った。ハイブリダイゼーションは前述のハイブリダイゼーション緩衝液を用い、49°C で 1 時間行い、39°C まで徐冷後さらに  
20 39°C で 1 時間行なった。反応終了後、ニトロセルロースフィルターを 0.1% SDS を含む 6×SSC で室温下に 30 分で 2 回洗浄し、次いで 39°C で 3 分間洗浄した後、オートラジオグラフィーを行なった。

25 この結果、1 個のクローンがポジティブなものとして得ら

れ、ジデオキシ法により塩基配列を決定したところ図2に示した如く、プローブ(IWQ)及びプローブ(A)部分を含む308塩基対よりなるDNAであることが判明し、このインサートを含むpBR322由来プラスミドをpHCS-1と命名した。

5 実施例 9 pHCS-1由来DNA プローブによるλファージ系ライブラリーのスクリーニング

BentonとDavisの方法[Science 196巻、180頁、(1977)]に準じてブランクハイブリダイゼーションを行った。実施例8で得られたpHCS-1をSau3AおよびEcoRIで処理して約600塩基対のDNA断片を得、このDNA断片を常法に従いニックトランスレーションにより放射標識した。ファージブランクの生じた寒天培地上にニトロセルロース濾紙(S&S社)をのせてファージを移し、0.5M NaOHにてDNAを変性させ、以下の順序で濾紙を処理した。0.1M NaOH、1.5M NaClで20秒  
10 続いて0.5M トリス-塩酸(pH7.5)、1.5M NaClで20秒2回、最後に120mM NaCl、15mMクエン酸ソーダ、13mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1mM EDTA、pH7.2で20秒処理した。

次いで濾紙を乾燥し、80℃で2時間加熱してDNAを固定した。5×SSC、5×Denhardt溶液、50mMリン酸緩衝液、50%ホルムアミド、0.25 mg/mlの変性DNA(鮭精巢DNA)、及び  
20 0.1% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液中で42℃にて一晩プレハイブリダイゼーションを行い、ニックトランスレーションにより放射標識化したpHCS-1プローブ $4 \times 10^5$  cpm/mlを含むハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC、  
25 5×Denhardt溶液、20mMリン酸緩衝液(pH6.0)、50%ホルム

アミド、0.1% SDS、10% デキストラン硫酸、0.1mg/ml  
の変性DNA（鮭精巢DNA）の混合液）で42℃にて20時間ハイ  
ブリダイゼーションを行った。

5 ニトロセルロース濾紙を室温下に0.1% SDSを含む2×  
SSCで20分間洗浄し、次いで44℃で、0.1% SDSを含む0.1  
×SSCで30分間、さらに室温下で0.1×SSCで10分間洗浄し  
た後、オートラジオグラフィで検出した。

その結果、5個のポジティブなクローン（G1～5）が得られ  
た。そこで、得られたクローンのうち完全長cDNAを含むと思  
10 われるクローンのDNA塩基配列をジデオキシ法にて調べたと  
ころ図3（A）に示される如き塩基配列が得られた。そこでこ  
のcDNAをλgt10ベクターより切りだし、pBR327 [Soberon等；  
Gene 9巻 287頁（1980）]とEcoRI部位で結合させ、プラスミ  
ドとして大量調製した。このプラスミドをpBRG4と称する。

15 実施例 10 pBRG4由来DNAプローブおよびプローブ  
（LC）によるλファージ系ライブラリーの  
スクリーニング

実施例9で用いたBentonとDavisの方法（前出の文献を参  
照）に準じてブランクハイブリダイゼーションを行った。フ  
20 ァージブランクの生じた寒天培地上にニトロセルロース濾紙  
（S&S社製）をのせてファージを移し、0.5M NaOHにて  
DNAを変性させ、以下の順序で濾紙を処理した。0.1M NaOH、  
1.5M NaClで20秒、続いて0.5M トリス-塩酸（pH7.5）、  
1.5M NaClで20秒2回、最後に120mM NaCl、15mMクエン

酸ソーダ、13mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1mM EDTA、(pH7.2)で20秒処理した。次いで濾紙を乾燥し、80℃で2時間加熱してDNAを固定した。このようにして同一の濾紙を2枚作製し、pBRG4由来DNAプローブとプローブ(LC)によるスクリーニングにそれぞれ供した。

pBRG4由来DNAプローブによる場合は、pBRG4をEcoRIで処理して約1500塩基対のDNA断片を得、このDNA断片を常法に従ってニックトランスレーションにより放射標識した。上記濾紙を5×SSC、5×Denhardt溶液、50mMリン酸緩衝液、50%ホルムアミド、0.25 mg/mlの変性DNA(鮭精巢DNA)、及び0.1% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液中で42℃にて一晩、プレハイブリダイゼーションを行い、上記の放射標識した約1500塩基対のDNAプローブ(約 $1 \times 10^6$  cpm/ml)を含むプレハイブリダイゼーション緩衝液[5×SSC、5×Denhardt溶液、20mMリン酸緩衝液(pH6.0)、50%ホルムアミド、0.1% SDS、10%デキストラン硫酸、0.1mg/mlの変性DNA(鮭精巢DNA)の混合液]で42℃にて20時間ハイブリダイゼーションを行った。ニトロセルロース濾紙を室温下に、0.1% SDSを含む2×SSCで20分間洗浄し、次いで44℃で、0.1% SDSを含む0.1×SSCで30分間、さらに室温下で0.1% SSCで10分間洗浄した後、オートラジオグラフィーで検出した。

プローブ(LC)の場合は、濾紙を0.1% SDSを含む3×SSCで、65℃にて2時間前処理した後、6×NET、1×Denhardt溶液、100μg/mlの変性DNA(鮭精巢DNA)を含む



溶液中、65℃で2時間、プレハイブリダイゼーションを行った。

放射標識したプローブ(LC) ( $2 \times 10^6$  cpm / ml) を含む  
プレハイブリダイゼーション緩衝液 [6×NET、1×

5 Denhardt溶液、100μg / ml 変性DNA (鮭精巢DNA)] で63℃  
にて一晩ハイブリダイゼーションを行った後、ニトロセルロ  
ース濾紙を室温下に、0.1% SDSを含む6×SSCで20分間洗  
浄し、この洗浄を3回行った後、0.1% SDSを含む6×SSC  
にて、63℃で2分間洗浄した。

10 濾紙を乾燥した後オートラジオグラフィで検出した。

このようにして行ったスクリーニングに於いて、2つのプ  
ローブの両方にポジティブなクローンを選別し、そのうち完  
全長のcDNAを含むと思われるクローンの塩基配列をジデオキ  
シ法にて調べたところ、図4(A)に示される如き塩基配列が  
15 得られた。そこでこのcDNAをλgt10ベクターより切りだし、  
pBR327とEcoRI部位で結合させ、プラスミドpBRV2を得た。

実施例 11 大腸菌用組換えベクター (+VSE) の構築  
および形質転換 [tacプロモーター含有  
ベクターを用いた例]

20 1) 組換えベクターの構築

① ベクターの調製

tacプロモーター含有ベクターpKK223-3 (ファルマシア  
社製) 5μgを30μlの反応液(40mM Tris-HCl、7mM

MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、7mM 2-メルカプトエタノール)

25 中、EcoRI (宝酒造社製) 8単位で37℃、2時間処理した。

次いで、アルカリホスファターゼ（宝酒造社製） $3\mu\text{l}$ を加え $60^{\circ}\text{C}$ 、30分間処理し、常法に従いフェノール処理3回、エーテル処理及びエタノール沈殿を行ってDNA断片を回収した。

- 5       このDNAを $50\text{mM Tris-HCl}$ 、 $5\text{mM MgCl}_2$ 、 $10\text{mM DTT}$ 、 $1\text{mM}$ の $d\text{ATP}$ 、 $d\text{CTP}$ 、 $d\text{GTP}$ 、 $d\text{TTP}$ からなる $50\mu\text{l}$ の混合液に溶解し、大腸菌DNAポリメラーゼI-Klenow断片（宝酒造社製） $3\mu\text{l}$ を加えて $14^{\circ}\text{C}$ 、2時間反応せしめ、末端をプラントエンド（blunt end）にした。

10       ② 合成リンカーの調製

- 合成リンカー、CGAATGACCCCTGGGCC及びCAGGGGGTCAATTCGの配列を有するオリゴヌクレオチド $3\mu\text{g}$ を $50\text{mM Tris-HCl}$ 、 $10\text{mM MgCl}_2$ 、 $10\text{mM}$  2-メルカプトエタノール、 $1\text{mM ATP}$ からなる反応液 $40\mu\text{l}$ 中で $T_4$ ポリヌクレオチドキナーゼ4単位存在下、 $37^{\circ}\text{C}$ 、  
15       60分間反応せしめ、リン酸化した。

- 次いで該リン酸化オリゴヌクレオチドを夫々 $0.2\mu\text{g}$ を $100\text{mM NaCl}$ を含むTE( $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $\text{pH}8.0$ 、 $1\text{mM EDTA}$ ) $20\mu\text{l}$ に溶解し、 $65^{\circ}\text{C}$ 、10分間処理した後、室温まで  
20       徐冷することによりアニーリングを行った。

③ G-CSFのcDNAの断片の調製

- 実施例9で得た図3(A)で示すcDNAを含有するpBRG4 $60\mu\text{g}$ を $6\text{mM Tris-HCl}$ 、 $6\text{mM MgCl}_2$ 、 $6\text{mM}$  2-メルカプトエタノールからなる反応液 $200\mu\text{l}$ 中、制限酵素Apa I  
25       (New England Biolabs社製) 100単位、Dra I（宝酒造社

製) 50単位で37℃、3時間処理し、1.2%アガロースゲル電気泳動にて約590bpのApa I - Dra I断片約2μgを回収した。

#### ④ 上記各断片の連結

- 5 ①, ②, ③各断片を夫々約0.1μgとり、20μlの連結反応液(66mM Tris-HCl、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATP)に溶解しT<sub>4</sub> DNA リガーゼ 175単位を加えて4℃で一晩反応し組換えベクターを得た(図6)。

#### 2) 形質転換

- 10 上記④で得られた組換えベクターを含む反応液20μlを用いて塩化ルビジウム法(前出T. Maniatis等(Molecular cloning)252頁(1982)参照)によりE. coli JM105株を形質転換した。得られた形質転換株はアンピシリン耐性のコロニー培養液よりプラスミドを分離し、制限酵素BamHI、Acc II、  
15 Apa Iで処理したところ目的の形質転換株であることが確認できた。

実施例 12 大腸菌用組換えベクター(+VSE)の構築  
および形質転換[PLプロモーター含有ベクターを使用した例]

#### 20 1) 組換えベクターの構築

##### ① ベクターの調製

- PLプロモーターを含むベクター pPL-lambda(ファルマシア社製) 100μgを制限酵素BamHI、50単位で反応液(10mM Tris-HCl、pH7.6、7mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、10mM  
25 DTT) 100μl中、37℃、一晩処理した。

これから、1%アガロースゲル電気泳動にて、約4Kbpの断片約49 $\mu$ gと約1.2Kbpの断片約11 $\mu$ gを回収した。

上記の断片のうち、まず約4Kbpの方を前記のTE緩衝液100 $\mu$ lに溶解し、アルカリホスファターゼ(宝酒造社製)5 $\mu$ lと60 $^{\circ}$ C、60分間反応せしめ脱リン酸化した。

残りの約1.2Kbpの断片の方は緩衝液(10mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、6mM KCl、1mM DTT)20 $\mu$ lに溶解し、制限酵素Mbo II(New England Biolabs社製)20単位で37 $^{\circ}$ C、一晚処理した。

次いで、4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約200bpのBamHI-Mbo II断片約0.9 $\mu$ gと約310bpのMbo II-BamHI断片約1.9 $\mu$ gを回収した。

### ② 合成リンカーの調製

合成リンカーTAAGGAGAAATTCATCGATおよびTCGATGAATTCCTTAGを実施例11の②と同様にしてリン酸化しアニーリングし、合成S/Dリンカーを得た。

### ③ 発現用ベクターの調製

上記①で調製した約4Kbp断片0.1 $\mu$ g及びO<sub>L</sub>P<sub>L</sub>領域を有するBamHI-Mbo II断片、tL<sub>1</sub>領域を有するMbo II-BamHI断片夫々0.05 $\mu$ gとアニールした合成S/Dリンカー0.1 $\mu$ gを40 $\mu$ lの反応液(66mM Tris-HCl、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATP)中、T<sub>4</sub>DNAリガーゼ(宝酒造社製)175単位存在下12 $^{\circ}$ C、一晚反応せしめた。この反応液20 $\mu$ lを用い、E.coli N99CI<sup>+</sup>株(ファルマシア社製)

を  $\text{CaCl}_2$  法（前出の“Molecular cloning”参照）にて形質転換した。

該形質転換株を培養し、そのアンピシリン耐性のコロニーの培養液よりプラスミドを分離して、制限酵素  $\text{EcoRI}$ 、  
5  $\text{BamHI}$ 、 $\text{Sma I}$  で処理したところ目的のプラスミドであることが確認された。

次に、このプラスミドを  $2\mu\text{g}$  とり、 $20\mu\text{l}$  の緩衝液（ $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $6\text{mM MgCl}_2$ 、 $50\text{mM NaCl}$ ）中、制限酵素  $\text{Cla I}$ （New England Biolabs 社製）を  $37^\circ\text{C}$ 、2 時間反応  
10 させた後  $65^\circ\text{C}$  10 分間で失活させた。

更にその反応液  $1\mu\text{l}$  を  $20\mu\text{l}$  の前記連結反応液及び  $\text{T}_4$  DNA リガーゼ（宝酒造社製）175 単位を用いて  $12^\circ\text{C}$ 、一晚反応した後、上記と同様にして  $E. coli$   $\text{N99cI}^+$  株（ファルマシア社製）を再び形質転換した。アンピシリン耐性コロニー  
15 培養液からプラスミドを分離し  $\text{EcoRI}$ 、 $\text{BamHI}$  で処理し、目的のプラスミドを確認した。

④ G-CSF 発現用組換えベクター及び形質転換体の調製

③ で得られた発現用プラスミドを制限酵素  $\text{Cla I}$  で処理し、  
20 末端をプラントエンドにした後実施例 11 と同様にして G-CSF の cDNA 断片を組み込み組換えベクターを得た。これを用い、前出の Molecular cloning に記載されている  $\text{CaCl}_2$  法にて  $E. coli$   $\text{N4830}$  株（ファルマシア社製）を形質転換した。  
なお、目的の形質転換体の確認も実施例 11 と同様に行った（図 7）。

実施例 13 大腸菌用組換えベクター (+VSE)の構築と  
形質転換 [trp プロモーター含有ベクター  
を用いた例]

1) 組換えベクターの構築

5 ① ベクターの調製

pBR322のCla I 部位にトリプトファンプロモーターを含む  
約330bp のHpa II - Taq I 断片を挿入し作製したpOY1プラス  
ミド10 $\mu$ gを10mM Tris-HCl、6mM MgCl<sub>2</sub>、50mM NaCl  
の反応液30 $\mu$ l中、制限酵素Cla I 7単位Pvu II 8単位  
10 で37 $^{\circ}$ C 3時間処理した。

次いで、アルカリホスファターゼ (宝酒造社製) 2 $\mu$ lを  
加え60 $^{\circ}$ C、1時間反応せしめた。

これから1%アガロースゲル電気泳動により約2.6Kbpの  
断片を約2.5 $\mu$ g回収した。

15 ② 合成リンカーの調製

合成リンカー-CGCGAATGACCCCTGGGC  
C及びCAGGGGGTCAATTCGを実施例11の②と同  
様にしてリン酸化し、アニーリングした。

③ 組換えベクターの調製

20 上記①で調製したベクターの断片約1 $\mu$ g、及び②の合成  
リンカー約1 $\mu$ gと、実施例11の③で調製したG-CSFの  
cDNA断片約1 $\mu$ gを前記の連結反応液20 $\mu$ l中、T<sub>4</sub> DNAリ  
ガーゼ (宝酒造社製) 175単位と12 $^{\circ}$ Cで一晩反応せしめ組換  
えベクターを得た (図8)。

## 2) 形質転換

上記③の反応液20 $\mu$ lを前出「Molecular cloning」の塩化ルビジウム法でE.coli DHI株に形質転換した。

実施例11と同様にしてアンピシリン耐性のコロニーからプラスミドをとり、制限酵素ApaI, DraI, NruI, PstIで目的とする形質転換体を得られていることを確認した。

### 実施例 14 形質転換株の培養

#### 1) 実施例11で得た形質転換株(tac含有)の培養

アンピシリン25 $\mu$ g/ml又は50 $\mu$ g/mlを含むルリア(Luria)培地100mlに、37 $^{\circ}$ C、一晩培養した該形質転換株の培養液1mlを加え37 $^{\circ}$ Cで2~3時間培養する。

次いで、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトシド2mMにして37 $^{\circ}$ C、2~4時間培養した。

#### 2) 実施例12で得た形質転換株(P<sub>L</sub>含有)の培養

アンピシリン25 $\mu$ g/ml又は50 $\mu$ g/mlを含むルリア培地100mlに28 $^{\circ}$ C一晩培養した該形質転換株の培養液1mlを加え28 $^{\circ}$ Cで約4時間培養した。

その後、これを42 $^{\circ}$ Cにし2~4時間培養を行った。

#### 3) 実施例13で得た形質転換株(trp含有)の培養

0.5%グルコース、0.5%カザミノ酸(Difco社製)、アンピシリン25 $\mu$ g/ml又は50 $\mu$ g/mlを含むM9培地100mlに37 $^{\circ}$ C一晩培養した該形質転換株の培養液1mlを加えて37 $^{\circ}$ Cで4~6時間培養する。次いで、3- $\beta$ -インドールアクリル酸(IAA)50 $\mu$ g/mlを加えて37 $^{\circ}$ Cで4~8時間培養した。

実施例 15 大腸菌からの G - CSF ポリペプチドの  
回収・精製

1) 回 収

5 実施例 14 で培養した形質転換株、夫々について以下の回収  
操作を行った。

培養液 100 ml を遠心分離にかけて菌体を集め、20mM Tris  
- HCl (pH7.5)、30mM NaCl 混合液 5 ml に懸濁させた。

10 次いで、各々 1 mM, 10mM, 0.2mg/ml になるように 0.2M  
フェニルメチルスルホニルフルオリド、0.2M EDTA、リゾ  
チームを加え、0℃で30分間放置した。

15 次に凍結 - 融解を3回くりかえし或いは更に超音波処理を  
行って溶菌させた。得られた溶菌液を遠心分離にて上清を得  
るか、或いは 8 M 塩酸グアニジンを用いて、最終的に 6 M 塩  
酸グアニジンにした後、30,000 r.p.m.、5 時間の遠心分離を  
行い、その上澄液を取得した。

2) 精 製

20 (i) 1) で得た上澄液を直径 4.6 cm、長さ 90 cm の Ultrogel  
AcA54 カラム (LKB 社製) にて、0.15M NaCl および  
0.01 % ツィーン 20 (半井化学社製) を含む 0.01 M  
トリス - 塩酸緩衝液 (pH7.4) を用いて流速約 50 ml / 時  
間でゲル濾過した。

次いで、前述した「CSA の測定方法 (b)」により活  
性を示す画分をとり pH - 10 (アミコン社製) を用いる  
限外濾過器によって約 5 ml に濃縮した。

25 (ii) 上記濃縮画分に n - プロパノール (東京化成社製、



アミノ酸配列決定用)とトリフルオロ酢酸を加え最終濃度がそれぞれ30%および0.1%となるように調製し、水中に15分程度放置したのち、15,000r.p.m.10分の遠心により沈殿を除去した。次いで先のn-プロパノールおよびトリフルオロ酢酸を含む水溶液で平衡化した

5  $\mu$  Bondapak C18カラム(Waters社製、セミ分取用、8mm×30cm)に吸着後、30~60%の直線濃度勾配のn-プロパノールを含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で順次溶出した。高速液体クロマト装置は日立685-50

10 型を、検出は日立638-41型検出器(いずれも日立製作所製)を用い、220nmと280nmの吸収を同時に測定した。溶出後、各画分より10 $\mu$ lを分取100倍希釈したのち、前述の「CSAの測定方法(b)」により活性を示す画分を調べた。この結果、n-プロパノール40%

15 にて溶出されるピークに活性が認められたので、このピークを集め再度同じ条件で再クロマトを行い上記と同様にしてCSAを調べたところ、やはりn-プロパノール40%の位置のピークに活性が認められたので、このピークを集め(4フラクション=4ml)凍結乾燥した。

20

(iii) 上記凍結乾燥粉末をn-プロパノールを40%含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液200 $\mu$ lに溶解し、TSK-G3000SWカラム(東洋曹達社製、7.5mm×60cm)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にか

25 けた。溶出は同水溶液により0.4ml/分の流速で行い、

5 フラクションコレクターFRAC-100（ファルマシア社製）により0.4mlずつ分取した。分取した各画分についてCSAを前記と同様にして調べ活性画分を回収し、更に分析用 $\mu$ Bondapak C18カラム（4.6mm $\times$ 30cm）による精製を施したのち、メインピークを回収し凍結乾燥した。

10 得られたタンパク質を2-メルカプトエタノールで処理してSDS-ポリアクリルアミドゲル（15.0%）電気泳動（15mV、6時間）にかけ、クマシーブルーで染色したところ目的とするG-CSFポリペプチドが単一のバンドとして確認できた。

実施例 16 発現物質のG-CSF活性の検定（+VSE）

15 実施例15で得たCSF試料を前述の〈参考例〉CSF活性の測定方法(a)に従って検定した。この結果を表-1に示す。

表 - 1

	ヒト好中球コロニー数 / dish
20 精製ヒトG-CSF (20ng)	73
実施例15で得たCSF試料 (50ng)	68
ブランク	0

## 実施例 17 アミノ酸分析 (+VSE)

## 1) アミノ酸組成の分析

実施例 15で精製したCSF 試料を常法により加水分解し、そのタンパク部分のアミノ酸組成を日立 835アミノ酸自動分析装置（日立製作所社製）を用いて特殊アミノ酸分析法により分析した。この結果を表-2に示した。尚、加水分解条件は次の如くである。

① 6N HCl、110℃、24時間、真空中

② 4N メタンスルホン酸 + 0.2% 3-(2-アミノエチル)インドール、110℃、24時間、48時間、72時間、真空中

試料は、40% n-プロパノールと 0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液(1.5 ml)に溶かした後、各々 0.1 ml をとり、乾燥窒素ガスにより乾燥させた後、①又は②の試薬を加えて真空封管し、加水分解に供した。

表中、実測値は①の24時間値と②の24, 48, 72時間値の合計4回の平均値である。但し、Thr, Ser, 1/2 Cys, Met, Val, IleおよびTrpは以下の方法で算出した（生化学実験講座、タンパク質化学Ⅱ（東京化学同人出版）を参照）。

- Thr, Ser, 1/2 Cys, Metは②の24, 48, 72時間値の経時変化をとり、零時間に補外。
- Val, Ileは②の72時間値。
- Trpは②の24, 48, 72時間値の平均値。

表 - 2 (アミノ酸分析表)

	アミノ酸	モル %
	A sp (A sp + A sn)	2.3
5	Thr	4.0
	Ser	8.5
	G lu (G lu + G ln)	15.2
	Pro	7.3
	G ly	7.9
10	A la	10.7
	1/2 C ys	2.8
	Val	4.5
	Met	2.0
	I le	2.3
15	L eu	18.3
	T yr	1.7
	P he	3.4
	L ys	2.3
	H is	2.8
20	T rp	1.1
	A rg	2.9

## 2) N末端アミノ酸分析

試料を気相式シーケンサー（アプライドバイオシステム社製）を用いてエドマン（Edman）分解し、得られた PTHアミ

ノ酸を高速液体クロマトグラフィー装置（ベックマン・イン  
ストルメンツ社製）およびUltrasphere - ODS カラム（ベッ  
クマン・インストルメンツ社製）を用いて常法により分析し  
た。カラム（5  $\mu$ m、直径 4.6mm、長さ 250mm）を開始緩衝  
5 液（15mM酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5、40%アセトニトリル  
を含む水溶液）にて平衡化したのち、検体（20  $\mu$ l の開始緩  
衝液にて溶解）を注入して開始緩衝液によるイソクラティッ  
ク溶出により分離を行った。流速は 1.4ml/分、カラム温度  
は40℃に保持した。PTHアミノ酸の検出は 269nm と 320nm の  
10 紫外部吸収を利用した。あらかじめ標準 PTHアミノ酸（シグ  
マ社製）各 2 nmol を同一の系で分離して保持時間を決定し、  
被検検体の保持時間から同定を行った。

その結果、PTH-メチオニンおよび PTH-スレオニンが検  
出された。

#### 15 実施例 18 大腸菌用組換えベクター（-VSE）の構築と 形質転換

##### 1) tacプロモーター含有ベクターを用いた例

実施例 11③における「実施例 9 で得た図 3 (A) で示す cDNA  
を含有する pBRG4 」のかわりに「実施例 10 で得た図 4 (A) で  
20 示す cDNA を含有する pBRV2 」を用いる他は、実施例 11 と全く  
同様の操作を行い、得られた形質転換株が目的とする形質転  
換株であることを確認した（図 9）。

##### 2) PLプロモーター含有ベクターを用いた例

cDNA（-VSE）を用いて実施例 12 を繰り返して、得られた形質  
25 転換体が目的の形質転換体であることを確認した（図 10）。

## 3) trpプロモーター含有ベクターを用いた例

cDNA (-VSE)を用いて実施例13を繰り返し、目的とする形質転換体を得られていることを確認した(図11)。

## 実施例 19 発現物質のG-CSF活性の検定(-VSE)

5 実施例18で得た形質転換株を各々、実施例14に記載の方法で培養し、次いで該培養した大腸菌から実施例15に記載の方法によって、G-CSFポリペプチドを回収し精製して単一のバンドとしてヒトG-CSFポリペプチドを得た。

10 かくして得られたCSF試料を前述の〈参考例〉CSF活性の測定方法(a)に従って検定した。この結果を表-3に示す。

表 - 3

	ヒト好中球コロニー数 / dish
精製ヒトG-CSF (20ng)	73
本実施例で得たCSF試料 (50ng)	73
ブ ラ ン ク	0

## 20 実施例 20 アミノ酸分析(-VSE)

## 1) アミノ酸組成の分析

実施例19で精製したCSF試料のアミノ酸組成分析を実施例17の1)に記載の方法により行った。得られた結果を表-4に示す。

表 - 4 (アミノ酸分析表)

	アミノ酸	モル%
	A sp (A sp + A sn)	2.3
5	Thr	4.0
	Ser	8.1
	Glu (Glu + Gln)	15.0
	Pro	7.5
	Gly	8.1
10	Ala	11.0
	1/2 Cys	2.9
	Val	4.1
	Met	2.0
	Ile	2.2
15	Leu	18.8
	Tyr	1.7
	Phe	3.4
	Lys	2.3
	His	2.7
20	Trp	1.1
	Arg	2.8

## 2) N末端アミノ酸分析

試料を実施例17の2)に記載の方法に従って、N末端アミノ酸分析に付した。

その結果、PTH-メチオニンおよびPTH-スレオニンが検出された。

実施例 21 pHGA410 ベクターの調製  
(動物細胞用、+VSE系)

5 実施例9で得られた図3(A)で示されるcDNAのEcoRI断片を制限酵素DraIにて37°Cで2時間で処理した後、DNAポリメラーゼIのKlenow断片(宝酒造社製)で処理し、末端を平滑末端とした。1μgのBglIIリンカー(8mer;宝酒造社製)をATPを用いてリン酸化した後、上記で得られた約1  
10 μgのDNA断片混合物と結合させた。次いで制限酵素BglIIで処理してアガロースゲル電気泳動を行い、最も大きいDNA断片だけを回収した。

このDNA断片を図5に示すようにヒトG-CSFポリペプチドをコードする部分を含む約710塩基対に相当していた。ベ  
15 クターpdKCR(Fukunaga等;Proc.Natl.Acad.Sci.USA;81巻5086頁(1984))を制限酵素BamHIで処理した後、アルカリリフォスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸して得られたベクターDNAをT<sub>4</sub>DNAリガーゼ(宝酒造社製)を加えて  
cDNA断片と結合させpHGA410を得た(図12)。図12に示され  
20 るごとくこのプラスミドは、SV40初期遺伝子のプロモーター、SV40の複製開始領域、ウサギβ-グロビン遺伝子の一部、pBR322の複製開始領域およびpBR322由来のβ-ラクタマーゼ遺伝子(Amp<sup>r</sup>)を含み、SV40初期遺伝子のプロモーター下流にヒトG-CSF遺伝子が接続されている。



実施例 22 C127細胞用組換えベクターの構築 (+VSE)

1) pHGA410 (H) の構築

実施例21で得られた(図12) pHGA410 プラスミド20 $\mu$ gを  
50mM Tris-HCl (pH7.5)、7mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、  
5 7mM 2-メルカプトエタノール、0.01%ウシ血清アルブ  
ミン(BSA)の反応液に溶解し、制限酵素EcoRI(宝酒造社製、  
10~15単位)を加えて約30分37℃にて反応させ、EcoRIによ  
る部分消化を行った。次いでフェノール-クロロホルム(1:  
1)処理を2回行いエーテル処理、エタノール沈殿を行って  
10 DNA断片を処理した。

このDNA断片を50mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM  
DTT、1mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTPからなる50 $\mu$ lの液に  
溶解しE.coli DNAポリメラーゼ--Klenow断片(宝酒造社製)  
5 $\mu$ lを加えて14℃2時間インキュベートしプラントエンド  
15 (blunt end)にした。

これから0.8%アガロースゲル電気泳動により約5.8kbの  
断片6 $\mu$ gを回収した。

回収したDNA断片5 $\mu$ gを再び50mM Tris-HCl (pH7.6)、  
10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATPからなる反応液50 $\mu$ g中  
20 に溶解し、HindIIIリンカー(宝酒造社製)2 $\mu$ g、及びT<sub>4</sub>  
DNAリガーゼ(宝酒造社製)100単位を加えて、4℃にて一  
晩反応した。

次いで、フェノール処理、エーテル処理、エタノール沈殿  
後、10mM Tris-HCl (pH7.5)、7mM MgCl<sub>2</sub>、60mM NaCl  
25 の溶液30 $\mu$ lに溶解し、制限酵素HindIII10単位存在下3時間

37°Cでインキュベートした。再びT<sub>4</sub> DNA リガーゼにより処理した後、このDNAを塩化ルビジウム法（前記の

「Molecular cloning」参照）によりE.coli DHI株に形質転換し、アンピシリン耐性（Amp<sup>r</sup>）のコロニーを得て、pHGA  
5 410 プラスミドのEcoRI部位がHindⅢに置きかわったプラスミドを保持する菌を選択した。このようにして得られたプラスミドをpHGA410（H）と命名する（図13）。

#### 2) 発現用組換えベクター pTN-G4の構築

上記1)で得られたpHGA410（H）（20μg）を10mM Tris-HCl（pH7.5）、7mM MgCl<sub>2</sub>、175mM NaCl、0.2mM EDTA、  
10 7mM 2-メルカプトエタノール、0.01%ウシ血清アルブミンからなる反応液50μlに溶解し、制限酵素SalI（宝酒造社製）20単位を加え、37°Cにて5時間インキュベートした。次いでフェノール処理、エタノール沈殿後、DNAポリメラー  
15 ぜKlenow断片（宝酒造社製）にて前出の反応と同様に14°C約2時間インキュベートし、プラントエンドにした。これを、アガロースで回収することなくエタノール沈殿したDNA断片を制限酵素HindⅢにて処理して、約2.7kbのHindⅢ-SalI断片を1%アガロースゲル電気泳動にて5μg回収し  
20 た。一方、ウシ乳頭腫ウイルス〔bovine papilloma virus（BPV）〕を有するプラスミドpdBPV-1（Sarver, n., SByrne, J.C & Howley, P.M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 79 巻7147-7151; Dr.Howleyより入手）をNagataらの方法の如く（Fukunaga, Sokawa, Nagata, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 81 巻5086-5090）をHindⅢ及び  
25

PvuIIで処理して8.4kbのDNA断片を得ておく。この8.4kbのDNA断片と上記の約2.7kbのHindIII-SalI DNA断片を常法に従ってT<sub>4</sub> DNAリガーゼにより処理し、前出の

「Molecular cloning」に記載された塩化ルビジウム法によりE.coli DHI株に形質転換し、pHGA410由来G-CSFのcDNAを有するプラスミドを保持するE.coliコロニーを選別したこのプラスミドをpTN-G4と命名する(図13)。

実施例 23 C127細胞の形質転換及びその発現(+VSE)

実施例22で得たpTN-G4をマウスC127細胞に形質転換する前に制限酵素BamHIで処理する。即ちpTN-G4プラスミド20μgを10mM Tris-HCl (pH8.0)、7mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、2mM 2-メルカプトエタノール、0.01% BSA 100μlに溶解せしめBamHI(宝酒造社製)20単位で処理し、フェノール処理、エーテル処理、エタノール沈殿を行った。

マウスC127I細胞は10%牛胎児血清(GIBCO)を含むDulbecco's minimal essential培地中で増殖させる。径5cmのプレートに増殖したC127I細胞に、プレート当たり上記調製DNAを10μgの割合いでリン酸-カルシウム法(Haynes, J & Weissmann, C (1983) Nucleic Acid Res 11 巻 687-706 参照)にて形質転換を行い、グリセロール処理の後、12時間37℃でインキュベートした。

次に、この細胞を3枚の新しい径5cmプレートに移し、1週間2回の割合いで培地交換をした。16日目にFoci(集塊)を形成した部分をそれぞれ新しいプレートに移し、上述の培地で継代培養し、G-CSF生産能の高いクローンを選別した。

その結果 ~ 1 ㎍/㎖ のレベルの G - CSF 生産がみられた。

尚、宿主細胞には上記の C127I 細胞のほか NIH3T3 細胞も用いることができる。

実施例 24 CHO細胞による G - CSF の発現 (+VSE)

5 1) pHGG4 - dhfr の構築

実施例 21 で得た pHGA410 プラスミド 20  $\mu$ g を 10mM Tris - HCl (pH7.5)、7 mM MgCl<sub>2</sub>、175mM NaCl、0.2mM EDTA、0.7mM 2 -メルカプトエタノール 0.01 % BSA を含む溶液 100  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 Sal I (宝酒造社製) 20 単位を  
10 加え 37°C 一晩反応した後、フェノール処理、エーテル洗浄、エタノール沈殿を行った。

次に、得られた DNA 沈殿を 50mM Tris - HCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1 mM の dATP, dCTP, dGTP, TTP からなる反応液 100  $\mu$ l に溶解し、E. coli DNA ポリメラーゼ -  
15 Klenow 断片 (宝酒造社製 10  $\mu$ l) を加えて 14°C、2 時間反応させ、フェノール処理、エーテル洗浄、エタノール沈殿を行った。

この DNA に EcoRI リンカーを付加する。即ち上記 DNA を 50  $\mu$ l の 50mM Tris - HCl (pH7.4)、10mM DTT、0.5mM スペルミジン、2 mM ATP、2.5mM ヘキサミン塩化コバルト、20  $\mu$ g / ml BSA からなる反応液に溶解し、EcoRI リンカー (宝酒造社製) を加え、200 単位の T<sub>4</sub> DNA リガーゼ (宝酒造社製) を加え 4°C、12~16 時間反応した。フェノール処理、エーテル洗浄、エタノール沈殿を常法に従って行った後、該 DNA を  
25 EcoRI で部分消化し、1 % アガロースゲル電気泳動で約 2.7

kbのフラグメントを3 $\mu$ g回収した。

一方、pAdd26SVpAプラスミド (Kaufman, R.G. & Sharp, P.A. (1982) Mol. Cell Biol, 2巻1304~1319) をEcoRIにて処理し、バクテリアアルカリフォスファターゼ (BAP)処理して脱リン酸を行う。即ち、pAdd26SVpA 20 $\mu$ gとEcoRI 20単位を反応液 50mM Tris-HCl (pH7.5)、7 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl、7 mM 2-メルカプトエタノール、0.01 % BSA 100 $\mu$ lに加え、37°C 10時間反応させ、続いて上記反応液に BAP 5単位を加え、68°Cにて30分間反応した。その後フェノール処理をし、電気泳動にてpAdd26SVpAのEcoRI断片を回収した (~5 $\mu$ g)。

上記した約 2.7kbの断片とpAdd26SVpAの断片のそれぞれ 0.5 $\mu$ gずつをアニールした。このプラスミドをE.coli DHI株に塩化ルビジウム法により形質転換して pHGG4-dhfrのプラスミドを保持するコロニーを選択する。得られたプラスミドを pHGG4-dhfrと命名した (図14a)。

なお、上記の別法として、pHGG4 プラスミドをSalI処理し、EcoRIリンカーを付加することなしにEcoRIで部分消化し約 2.7kbの断片を回収し、E.coli DNAポリメラーゼ-Klenow断片で該DNA断片を処理し末端をプラントエンド化する。

一方前述と同じ方法でpAdd26SVpAのプラントエンド化したEcoRI断片を調製し、両者をT<sub>4</sub> DNAリガーゼ処理して pHGG4-dhfrを調製することもできる。

また実施例22で得られたpHGA410 (H) を実施例22の2)で記

載した如く、制限酵素HindⅢおよびSalⅠにて処理し、HindⅢ - SalⅠ断片を上記pAdd26SVpAのプラントエンド化したEcoRI断片に連結しても pHGG4 - dhfrを得ることができる(図14b)。

## 5 2) 形質転換と発現

CHO細胞(dhfr<sup>-</sup>株、コロンビア大学Dr. L. Chasinより入手)を9 cm径のプレート(Nunc社製)中10%仔牛血清を含む $\alpha$ 最小必須培地( $\alpha$ -MEM、アデノシン、デオキシアデノシン、チミジン添加)で培養増殖し、これをリン酸-カルシウム法(Wigler等、Cell 14巻 725頁(1978))によって形質転換した。

即ち1)で調製した pHGG4 - dhfrプラスミド1  $\mu$ gにキャリアDNA(仔牛胸腺DNA)を適量加えて、TE溶液 375  $\mu$ lに溶解し1 M CaCl<sub>2</sub> 125  $\mu$ lを加える。3~5分氷上で冷やし500  $\mu$ lの2 $\times$ HBS(50mM Hepes、280mM NaCl、1.5mMリン酸緩衝液)を加え再び氷冷後、上記のCHO細胞培養液1 mlと混合し、プレートに移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で9時間培養した。

以下洗浄、20%グリセロール含有TBS(Tris-Buffered Saline)添加、再び洗浄とした後非選択培地(前出 $\alpha$ -MEM培地、ヌクレオチド添加)を添加して2日間インキュベートし選択培地(ヌクレオチド無添加)で1:10に細胞を分割した。次いで2日毎に選択培地にて培地交換を行いながら培養を続行し生じた集塊(foci)を選別して新しいプレートに移した。

新しいプレートでは 0.02  $\mu$ M メトトレキセート (MTX) 存在下で増殖し再び 0.1  $\mu$ M MTX 存在下で増殖させてクローニングを行った。

5 なお CHO細胞の形質転換は CHO細胞に対し pHGG4 と pAdD26SVpAを同時形質転換 (Cotransformation) することによっても行うことができる (Scahill 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 巻 4654 - 4658 (1983) 参照)。

10 又いわゆるポリシストロニック遺伝子を用いる方法で組換えベクターを構築し、これを用いて CHO細胞を形質転換することができる。例えば pAdD26SVpAを Pst I 処理し、2つの断片を回収しこれらと pBRG4 由来の CSFcDNA 断片を結合することにより、アデノウィルスプロモーター、CSFcDNA、DHFR、SV40のポリA部位の順序に配列した組換えベクターを構築し CHO細胞にいでて実施した。

15 実施例 25 発現物質の G-CSF 活性の検定 (+VSE)

20 実施例 23及び実施例 24で得られた C127細胞及び CHO細胞の培養上清を夫々 1 N 酢酸により pH4 に調製し、等容量の n-プロパノールを加えた後、生じた沈殿を遠心除去し、C8 逆相系担体 (山村化学社製) を充填したオープンカラム (1  $\phi$   $\times$  2 cm) に通し、50% n-プロパノールで溶出させた。溶出液を水で 2 倍に希釈した後、YMC-C8カラム (山村化学社製) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにて 0.1% TFA を含む 30~60% の直線濃度勾配の n-プロパノールを溶出させた。n-プロパノール濃度が 40% 付近の位置で溶出される画  
25 分を分取した後、凍結乾燥し、0.1M グリシン緩衝液 (pH9)

に溶解せしめた。このような過程を経ることによって、ヒト G - CSF は C127 及び CHO 細胞上清から約 20 倍に濃縮された。

5 コントロールとして、前述の方法に従ってヒト G - CSF cDNA を含まないプラスミドで細胞を形質転換した後その培養上清を濃縮した。得られた標品について〈参考例〉に記載された「ヒト G - CSF の測定方法 (a)」に基づいた方法にてヒト G - CSF 活性を検定した。尚、発現効率が十分に高い場合には培養上清を直接検定に供してもよい。ここでは濃縮した例について結果を示した。その結果は表 - 5 の通りであった。



表 - 5 ヒト G - CSF 活性の検定

		ヒト好中球コロ ニ - 数 / dish	
5	精製ヒト G - CSF (20ng)	96	
10	BPV	pdBPV-1 で形質転換された C127細胞の培養液 (20倍濃度)	0
		pdBPV-1 で形質転換された 3T3細胞の培養液 (20倍濃度)	0
		pTNG4 で形質転換された C-127 細胞の培養液 (20倍濃度)	82
		pTNG4 で形質転換された 3T3 細胞の培養液 (20倍濃度)	85
15	dhfr	pAdd26SVpA で形質転換された CHO細胞の培養液 (20倍濃度)	0
		pHGG4 - dhfr で形質転換された CHO細胞の培養液 (20倍濃度)	110

## 実施例 26 アミノ酸分析および糖分析 (+VSE)

## 20 1) アミノ酸組成の分析

実施例 25 で得た粗 CSF 試料を更に実施例 2 の (iii) の方法にしたがって精製した。この精製 CSF 試料を常法により加水分解し、そのタンパク部分のアミノ酸組成を日立 835 アミノ酸自動分析装置 (日立製作所社製) を用いて特殊アミノ酸分  
25 析法により分析した。この結果を表 - 6 に示した。尚、加水

分解条件は次の如くである。

- ① 6 N HCl、110°C、24時間、真空中
- ② 4 N メタンスルホン酸 + 0.2% 3 - (2 - アミノエチル) インドール、110°C、24時間、48時間、72時間、  
5 真空中

試料は、40% n - プロパノールと 0.1% トリフルオロ酢酸を含む溶液 (1.5 ml) に溶かした後、各々 0.1 ml をとり、乾燥窒素ガスにより乾燥させた後、①又は②の試薬を加えて真空封管し、加水分解に供した。

- 10 表中、実測値は①の24時間値と②の24, 48, 72時間値の合計4回の平均値である。但し、Thr, Ser,  $\frac{1}{2}$  Cys, Met, Val, IleおよびTrpは以下の方法で算出した(生化学実験講座、タンパク質化学Ⅱ(東京化学同人出版)を参照)
- Thr, Ser,  $\frac{1}{2}$  Cys, Metは②の24, 48, 72時間値  
15 の経時変化をとり、零時間に補外。
  - Val, Ileは②の72時間値。
  - Trpは②の24, 48, 72時間値の平均値。

表 - 6 (アミノ酸分析表)

	アミノ酸	モル %
	A sp (A sp + A sn)	2.3
5	Thr	3.9
	Ser	8.5
	G lu (G lu + G ln)	15.3
	Pro	7.4
	G ly	7.8
10	A la	10.8
	1/2 Cys	2.8
	Val	4.5
	Met	1.7
	I le	2.3
15	L eu	18.6
	T yr	1.7
	P he	3.4
	L ys	2.3
	H is	2.8
20	T rp	1.1
	A rg	2.8

## 2) 糖組成分析

上記アミノ酸組成分析で用いた精製CSF 試料200ng に内部  
 25 標準としてイノシトール25n mol を加えた後、1.5 NHCℓを

含むメタノール溶液(500 $\mu$ l)を加えて窒素ガス置換した封管中、90 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。開管後炭酸銀( $Ag_2CO_3$ )を加えて中和した後、無水酢酸50 $\mu$ lを加え振とう後、室温にて暗所に一晚放置した。上層をサンプルチューブにとり、

5 窒素ガスにて乾燥した。沈殿にメタノールを加え洗浄後軽く遠沈し、上層を同じサンプルチューブに加え乾燥した。これに50 $\mu$ lのTMS化試薬(ピリジン:ヘキサメチルジシラザン:トリメチルクロロシラン=5:1:1に混合したもの)を加え40 $^{\circ}$ Cで20分反応させた後、Deep Freezerに保存した。尚、

10 スタANDARDとしてガラクトース(Gal)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、シアル酸などを各50n mol及びイノシトール25n molを合わせ同様の操作を行った。

このサンプルについて以下に示す条件でガスクロマト分析を行った。

15 (分析条件)

カラム : 2% OV-17 VINport HP 60~80メッシュ、3m、ガラス

温度 : 110 $^{\circ}$ C~250 $^{\circ}$ Cまで4 $^{\circ}$ C/分の昇温

キャリアーガス : 最初は1.2~1.6kg/cm<sup>2</sup>

20 (窒素圧) 終了時は2~2.5kg/cm<sup>2</sup>

感度 : 10<sup>3</sup> M $\Omega$ レンジ 0.1~0.4V

圧 : 水素ガス 0.8kg/cm<sup>2</sup>

空気 0.8kg/cm<sup>2</sup>

サンプル量 : 2.5~3.0 $\mu$ l

25 分析の結果、本発明のCSFからガラクトース、N-アセチ

ルガラクトサミンおよびシアル酸が確認された。

実施例 27 pHGV2 ベクターの調製

(動物細胞用、-VSE系)

実施例10で得られた図4(A)で示されるcDNAのEcoRI断片  
5 を制限酵素DraIにて37°Cで2時間で処理した後、DNAポリ  
メラーゼIのKlenow断片(宝酒造社製)で処理し、末端を平  
滑末端とした。1μgのBglIIリンカー(8mer;宝酒造社  
製)をATPを用いてリン酸化した後、上記で得られた約1  
μgのDNA断片混合物と結合させた。次いで制限酵素BglII  
10 で処理してアガロースゲル電気泳動を行い、最も大きいDNA  
断片だけを回収した。

このDNA断片は図5に示すようにヒトG-CSFポリペプチ  
ドをコードする部分を含む約710塩基対に相当していた。ベ  
クターpdKCR(Fukunaga等;Proc.Natl.Acad.Sci.USA;  
15 81巻5086頁(1984))を制限酵素BamHIで処理した後、アルカ  
リフォスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸して得られた  
ベクターDNAをT<sub>4</sub>DNAリガーゼ(宝酒造社製)を加えて  
cDNA断片と結合させpHGV2を得た(図15)。図15に示される  
ごとくこのプラスミドは、SV40初期遺伝子のプロモーター、  
20 SV40の複製開始領域、ウサギβ-グロビン遺伝子の一部、  
pBR322の複製開始領域およびpBR322由来のβ-ラクタマーゼ  
遺伝子(Amp<sup>r</sup>)を含み、SV40初期遺伝子のプロモーター下流  
にヒトG-CSF遺伝子が接続されている。

実施例 28 C127細胞用組換えベクターの構築 (-VSE)

1) pHGV2(H)の構築

実施例27で得られた(図15) pHGV2 プラスミド20 $\mu$ gを用いて、実施例22の1)に記載した方法によってpHGV2(H)と命名するプラスミドを得た(図16)。

2) 発現用組換えベクター pTN-V2の構築

上記1)で得られたpHGV2(H) 20 $\mu$ gを用いて、実施例22の2)に記載した方法によってpHGV2由来G-CSFのcDNAを有するプラスミドを保持するE.coliコロニーを選別した。このプラスミドをpTN-V2と命名する(図16)。

実施例 29 C127細胞の形質転換及びその発現 (-VSE)

実施例28で得たpTN-V2をマウスC127細胞に形質転換する前に制限酵素BamHIで処理する。

次いでマウスC127I細胞を上記調製DNAで形質転換して発現させ(実施例23参照)G-CSF生産能の高いクローンを選別した。その結果 $\sim 1$ ng/ $\mu$ lのレベルのG-CSF生産がみられた。

尚、宿主細胞には上記のC127I細胞のほかNIH3T3細胞も用いることができる。

20 実施例 30 CHO細胞によるG-CSFの発現 (-VSE)

1) pHGV2-dhfrの構築

実施例27で得たpHGV2 プラスミド20 $\mu$ gから実施例24の1)に記載した方法によって得られる約2.7kbの断片とpAdd26SVpAの断片のそれぞれ0.5 $\mu$ gずつをアニールした。このプラスミドをE.coli DHI株に塩化ルビジウム法により形

質転換して pHGV2 - dhfrのプラスミドを保持するコロニーを選択する。得られたプラスミドを pHGV2 - dhfrと命名した (図17a)。

5 なお、上記の別法として、pHGV2 プラスミドを Sal I 処理し、EcoRI リンカーを付加することなしに EcoRI で部分消化し約 2.7kbの断片を回収し、E. coli DNAポリメラーゼ - Klenow断片で該DNA断片を処理し末端をプラントエンド化する。

10 一方前述と同じ方法で pAdd26SVpAのプラントエンド化した EcoRI断片を調製し、両者を T<sub>4</sub> DNAリガーゼ処理して pHGV2 - dhfrを調製することもできる。

また実施例28で得られた pHGV2(H)を実施例28の2)に記載した如く制限酵素、Hind IIIおよび Sal Iにて処理し、Hind III - Sal I断片を上記 pAdd26SVpAのプラントエンド化した EcoRI断片に連結しても pHGV2 - dhfrを得ることができる (図17b)。

## 2) 形質転換と発現

上記1)で調製した pHGV2 - dhfrプラスミドを用いて、実施例24の2)に記載の方法によって CHO細胞を形質転換して発現させた。

20 なお CHO細胞の形質転換は CHO細胞に対し pHGV2 と pAdd26SVpAを同時形質転換 (Cotransformation)することによっても行うことができる。

又いわゆるポリシストロニック遺伝子を用いる方法で組換えベクターを構築し、これを用いて CHO細胞を形質転換することができる。例えば pAdd26SVpAを Pst I 処理し、2つの断

25

片を回収しこれらとpBRV2由来のCSF cDNA断片を結合することにより、アデノウィルスプロモーター、CSF cDNA、DHFR、SV40のポリA部位の順序に配列した組換えベクターを構築しCHO細胞にいて実施した。

5 実施例 31 発現物質のG-CSF活性の検定(-VSE)

実施例29及び実施例30で得られたC127細胞及びCHO細胞の培養上清から、実施例25に記載の方法によってヒトG-CSFを得、そのヒトG-CSF活性を検定した。その結果は表-7の通りであった。



表 - 7 ヒト G - CSF 活性の検定

		ヒト好中球コロ ニ - 数 / dish	
5		精製 ヒト G - CSF (20ng)	96
10	BPV	pdBPV-1 で形質転換された C127細胞の培養液 (20倍濃度)	0
		pdBPV-1 で形質転換された 3T3 細胞の培養液 (20倍濃度)	0
		pTN-V2で形質転換されたC-127 細胞の培養液 (20倍濃度)	107
		pTN-V2で形質転換された3T3 細胞の培養液 (20倍濃度)	103
15	dhfr	pAdD26SVpAで形質転換された CHO 細胞の培養液 (20倍濃度)	0
		pHGV2 - dhfrで形質転換された CHO 細胞の培養液 (20倍濃度)	111

## 実施例 32 アミノ酸分析および糖分析 (-VSE)

## 20 1) アミノ酸組成の分析

実施例31で得た粗CSF試料を更に実施例2の(iii)の方法にしたがって精製した。この精製CSF試料を実施例26の1)に記載の方法によってアミノ酸組成分析に付した。この結果を表-8に示す。

表 - 8 (アミノ酸分析表)

	アミノ酸	モル %
	A sp (A sp + A sn)	2.3
5	Thr	4.0
	Ser	8.1
	Glu (Glu + Gln)	15.1
	Pro	7.5
	Gly	8.0
10	Ala	10.9
	1/2 Cys	2.8
	Val	3.9
	Met	1.7
	Ile	2.3
15	Leu	18.9
	Tyr	1.7
	Phe	3.5
	Lys	2.3
	His	2.9
20	Trp	1.2
	Arg	2.9

## 2) 糖組成分析

上記アミノ酸組成分析で用いた精製CSF試料を用いて、実施例26の2)に記載したのと同じ方法および同じ分析条件によ

って糖組成を分析した。分析の結果、本発明のCSFからガラクトース、N-アセチルガラクトサミンおよびシアル酸が確認された。

### 実施例 33 ヒトG-CSFの感染防禦効果

#### 5 <試験方法>

##### 1. Pseudomonas aeruginosa感染に対する防禦効果

8~9週令(体重 $35.3 \pm 1.38$  g)のICR系マウス(雄)にエンドキサン(シオノギ社製、商品名) 200mg/kgを腹腔内投与した後3群に分け、その2群にヒトG-CSF (25000u  
10 /マウス又は50000u/マウス)を含む溶媒(生理食塩水中1%プロパノール、0.5%(W/V)マウス血清アルブミン)を、そして別の1群には溶媒のみを、それぞれ24時間毎に0.1mlずつ4回皮下投与した。4回目の投与後3時間して各々の群にシュードモナス アエルギノーザ(Pseudomonas  
15 aeruginosa) GNB-139 ( $3.9 \times 10^5$  CFU/マウス)を皮下投与して感染させた。感染後21時間してさらにもう一度ヒトG-CSF (25000u/マウス又は50000u/マウス)を含む溶媒又は溶媒のみをそれぞれ対応する群に皮下投与した。

20 感染後10日目までの生存マウス数により感染防禦効果を調べた。

#### (菌液の調製)

ハートインフュージョン液体培地(Difco社製、商品名)を用いて37℃で一夜Pseudomonas aeruginosa GNB-139を振とう培養する。培養液を生理食塩水に懸濁させて調製した。

## 2. Candida 感染に対する防禦効果

8週令（体重 $40.5 \pm 1.60$  g）のICR系マウス（雄）にエンドキサン（シオノギ社製、商品名） $200\text{mg}/\text{kg}$ を腹腔内投与した後2群に分け1群にヒトG-CSF（ $50000\text{u}/\text{マウス}$ ）を含む溶媒（生理食塩水中1%プロパノール、10%（W/V）同種マウス血清）を、別の1群には溶媒のみをそれぞれ24時間毎に $0.1\text{ml}$ ずつ4回皮下投与した。4回目の投与後4時間して各々の群にキャンディダアルビカンス（*Candida albicans*）U-50-1（白血病患者尿分離株、東北大細菌学教室分与） $5.6 \times 10^5$  CFU/マウスを静脈内投与して感染させた。感染後10日目までの生存マウス数により感染防禦効果を調べた。

（菌液の調製）

酵母エキス含有サブロー液体培地（2%デキストロース（純正化学社製）10%トリプトケースペプトン（BBL社製：商品名）、5%酵母抽出物（Difco社製：商品名）、pH5.6）を用いて $37^\circ\text{C}$ で一夜*Candida albicans* U-50-1を振とう培養する。培養液を生理食塩水で2回洗浄した後、生理食塩水に懸濁させて調製した。

## 3. 細胞内寄生菌 *Listeria* 感染に対する防禦効果

7週令（体重 $34.7 \pm 1.24$  g）のICR系マウス（雄）にエンドキサン（シオノギ社製：商品名） $200\text{mg}/\text{kg}$ を腹腔内投与した後2群に分け1群にヒトG-CSF（ $50000\text{u}/\text{マウス}$ ）を含む溶媒（生理食塩水中1%n-プロパノール、10%（W/V）同種マウス血清）を、別の1群には溶媒のみをそれぞれ24時間毎に $0.1\text{ml}$ ずつ4回皮下投与した。4回目の投与後4時

間して各々の群にリステリア・モノサイトジェネス  
 (*Listeria monocytogenes*)46 (東北大細菌学教室分与)  
 $1.0 \times 10^7$  CFU/マウスを静脈内投与して感染させた。感染  
 後12日目までの生存マウス数により感染防禦効果を調べた。

5 (菌液の調製)

ブレインハートインフュージョン液体培地(Difco社製、商  
 品名)を用いて37℃で一夜*Listeria monocytogenes* 46を振  
 とう培養する。培養液を生理食塩水に懸濁させて調製した。

〈結 果〉

10 ① 天然型ヒトG-CSFの感染防禦効果

参考例2に記載したCHU-1から得られたヒトG-CSFに  
 ついて上記試験1, 2および3を行った。

得られた結果を表-9、表-10および表11に示す。

15

表 - 9

シュードモナス アエルギノーザに対する効果

20

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数 / 総数
溶 媒	0	0 / 11
CSF を含 む溶媒	25000	6 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	8 / 11

表 - 10

## カンジダ アルビカンスに対する感染防禦効果

5

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数 / 総数
溶 媒	0	0 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	10 / 10

10

表 - 11

## リステリア モノサイトジェネスに対する感染防禦効果

15

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数 / 総数
溶 媒	0	0 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	10 / 10

20

## ② 遺伝子組換え体から得られたヒト G - CSF の感染防禦効果

i) 実施例 15 で得た大腸菌からの G - CSF (+VSE) ポリペプチドについて上記試験 1、試験 2 および試験 3 を行った。

その結果を表 - 12, 13, 14 に示す。

表 - 12

シュードモナス アエルギノーザに対する効果

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数 / 総数
溶 媒	0	0 / 10
CSF を含 む溶媒	25000	6 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	8 / 10

表 - 13

カンジダ アルビカンスに対する感染防禦効果

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数 / 総数
溶 媒	0	0 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	10 / 10

表 - 14

リステリア モノサイトジェネスに対する感染防禦効果

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数/総数
溶 媒	0	0 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	10 / 10

10 ii) 実施例 19 で得た大腸菌からの G - CSF ( - VSE) ポリペ  
プチドについて上記試験 1 を行った。

その結果を表 - 15 に示す。

表 - 15

15

シュールドモナス アエルギノーザに対する効果

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数/総数
溶 媒	0	0 / 10
20 CSF を含 む溶媒	25000	6 / 10
CSF を含 む溶媒	50000	8 / 10

25

iii) 実施例 26 のアミノ酸組成分析に用いたのと同じ CHO



細胞由来の精製ヒトG-CSF試料(+VSE)について上記試験1を行った。

その結果を表-16に示す。

5

表 - 16

シュードモナス アエルギノーザに対する効果

10

群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数 / 総数
溶 媒	0	0 / 10
CSF を含 む 溶 媒	25000	9 / 10
CSF を含 む 溶 媒	50000	10 / 10

15

同様にして前記実施例26のアミノ酸組成分析に用いたのと同じC127細胞由来の精製ヒトG-CSF試料を用いて上記試験1の感染防禦効果を調べたところ、ほぼ同様の結果が得られた。

20

iv) 実施例32のアミノ酸組成分析に用いたのと同じCHO細胞由来の精製ヒトG-CSF試料(-VSE)について上記試験1を行った。

その結果を表-17に示す。

表 - 17

## シュードモナス アエルギノーザに対する効果

5	群	CSF 濃度 (u/マウス/日)	生存数/総数
	溶 媒	0	0 / 10
	CSF を含 む 溶 媒	25000	9 / 10
10	CSF を含 む 溶 媒	50000	10 / 10

同様にして前記実施例32のアミノ酸組成分析に用いたのと同じC127細胞由来の精製ヒトG-CSF試料を用いて上記試験1の感染防禦効果を調べたところ、ほぼ同様の結果を得た。

## 15 実施例 34

実施例2で得られたヒトG-CSF凍結乾燥標品を注射剤用溶解剤に溶解して所望の投与単位数になるよう分注して注射剤とした。

## 実施例 35

20 実施例15で得られた大腸菌からのヒトG-CSFポリペプチド凍結乾燥標品を注射剤用溶解剤に溶解して所望の投与単位数になるよう分注して注射剤とした。

## 請求の範囲

- (1) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。
- 5 (2) ショ糖密度勾配遠心法により15~17S画分として得られる、ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャー-RNA に相補的なDNA であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の遺伝子。
- 10 (3) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示されるポリペプチド配列またはその一部をコードするものである請求の範囲第1項記載の遺伝子。

	Met	Ala	Gly	Pro	Ala	Thr	Gln	Ser
	Pro	Met	Lys	Leu	Met	Ala	Leu	Gln
15	Leu	Leu	Leu	Trp	His	Ser	Ala	Leu
	Trp	Thr	Val	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro
	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro
	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu
	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly
20	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys
	Leu	(Val	Ser	Glu) <sub>m</sub>	Cys	Ala	Thr	Tyr
	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu
	Val	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly
	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser
25	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu

A l a   G l y   C y s   L e u   S e r   G l n   L e u   H i s  
 S e r   G l y   L e u   P h e   L e u   T y r   G l n   G l y  
 L e u   L e u   G l n   A l a   L e u   G l u   G l y   I l e  
 S e r   P r o   G l u   L e u   G l y   P r o   T h r   L e u  
 5   A s p   T h r   L e u   G l n   L e u   A s p   V a l   A l a  
 A s p   P h e   A l a   T h r   T h r   I l e   T r p   G l n  
 G l n   M e t   G l u   G l u   L e u   G l y   M e t   A l a  
 P r o   A l a   L e u   G l n   P r o   T h r   G l n   G l y  
 A l a   M e t   P r o   A l a   P h e   A l a   S e r   A l a  
 10   P h e   G l n   A r g   A r g   A l a   G l y   G l y   V a l  
 L e u   V a l   A l a   S e r   H i s   L e u   G l n   S e r  
 P h e   L e u   G l u   V a l   S e r   T y r   A r g   V a l  
 L e u   A r g   H i s   L e u   A l a   G l n   P r o

(ただし m は 0 または 1 を表わす)

- 15      (4) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示されるポリペプチド配列またはその一部をコードするものである請求の範囲第1項記載の遺伝子。

T h r   P r o   L e u   G l y   P r o   A l a   S e r   S e r  
 20   L e u   P r o   G l n   S e r   P h e   L e u   L e u   L y s  
 C y s   L e u   G l u   G l n   V a l   A r g   L y s   I l e  
 G l n   G l y   A s p   G l y   A l a   A l a   L e u   G l n  
 G l u   L y s   L e u   ( V a l   S e r   G l u )<sub>m</sub>   C y s   A l a  
 T h r   T y r   L y s   L e u   C y s   H i s   P r o   G l u  
 25   G l u   L e u   V a l   L e u   L e u   G l y   H i s   S e r

	L e u	G l y	I l e	P r o	T r p	A l a	P r o	L e u
	S e r	S e r	C y s	P r o	S e r	G l n	A l a	L e u
	G l n	L e u	A l a	G l y	C y s	L e u	S e r	G l n
	L e u	H i s	S e r	G l y	L e u	P h e	L e u	T y r
5	G l n	G l y	L e u	L e u	G l n	A l a	L e u	G l u
	G l y	I l e	S e r	P r o	G l u	L e u	G l y	P r o
	T h r	L e u	A s p	T h r	L e u	G l n	L e u	A s p
	V a l	A l a	A s p	P h e	A l a	T h r	T h r	I l e
	T r p	G l n	G l n	M e t	G l u	G l u	L e u	G l y
10	M e t	A l a	P r o	A l a	L e u	G l n	P r o	T h r
	G l n	G l y	A l a	M e t	P r o	A l a	P h e	A l a
	S e r	A l a	P h e	G l n	A r g	A r g	A l a	G l y
	G l y	V a l	L e u	V a l	A l a	S e r	H i s	L e u
	G l n	S e r	P h e	L e u	G l u	V a l	S e r	T y r
15	A r g	V a l	L e u	A r g	H i s	L e u	A l a	G l n
	P r o	(ただしmは0または1を表わす)						

(5) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第1項記載の遺伝子。

20	A T G	G C T	G G A	C C T	G C C	A C C	C A G	A G C
	C C C	A T G	A A G	C T G	A T G	G C C	C T G	C A G
	C T G	C T G	C T G	T G G	C A C	A G T	G C A	C T C
	T G G	A C A	G T G	C A G	G A A	G C C	A C C	C C C
25	C T G	G G C	C C T	G C C	A G C	T C C	C T G	C C C

	CAG	AGC	TTC	CTG	CTC	AAG	TGC	TTA
	GAG	CAA	GTG	AGG	AAG	ATC	CAG	GGC
	GAT	GGC	GCA	GCG	CTC	CAG	GAG	AAG
	CTG	(GTG	AGT	GAG) <sub>m</sub>	TGT	GCC	ACC	TAC
5	AAG	CTG	TGC	CAC	CCC	GAG	GAG	CTG
	GTG	CTG	CTC	GGA	CAC	TCT	CTG	GGC
	ATC	CCC	TGG	GCT	CCC	CTG	AGC	AGC
	TGC	CCC	AGC	CAG	GCC	CTG	CAG	CTG
	GCA	GGC	TGC	TTG	AGC	CAA	CTC	CAT
10	AGC	GGC	CTT	TTC	CTC	TAC	CAG	GGG
	CTC	CTG	CAG	GCC	CTG	GAA	GGG	ATC
	TCC	CCC	GAG	TTG	GGT	CCC	ACC	TTG
	GAC	ACA	CTG	CAG	CTG	GAC	GTC	GCC
	GAC	TTT	GCC	ACC	ACC	ATC	TGG	CAG
15	CAG	ATG	GAA	GAA	CTG	GGA	ATG	GCC
	CCT	GCC	CTG	CAG	CCC	ACC	CAG	GGT
	GCC	ATG	CCG	GCC	TTC	GCC	TCT	GCT
	TTC	CAG	CGC	CGG	GCA	GGA	GGG	GTC
	CTG	GTT	GCC	TCC	CAT	CTG	CAG	AGC
20	TTC	CTG	GAG	GTG	TCG	TAC	CGC	GTT
	CTA	CGC	CAC	CTT	GCC	CAG	CCC	

(ただし m は 0 または 1 を表わす)

- (6) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第 1 項記載の遺

101

伝子。

	ACC	CCC	CTG	GGC	CCT	GCC	AGC	TCC
	CTG	CCC	CAG	AGC	TTC	CTG	CTC	AAG
	TGC	TTA	GAG	CAA	GTG	AGG	AAG	ATC
5	CAG	GGC	GAT	GGC	GCA	GCG	CTC	CAG
	GAG	AAG	CTG	(GTG	AGT	GAG) <sub>m</sub>	TGT	GCC
	ACC	TAC	AAG	CTG	TGC	CAC	CCC	GAG
	GAG	CTG	GTG	CTG	CTC	GGA	CAC	TCT
	CTG	GGC	ATC	CCC	TGG	GCT	CCC	CTG
10	AGC	AGC	TGC	CCC	AGC	CAG	GCC	CTG
	CAG	CTG	GCA	GGC	TGC	TTG	AGC	CAA
	CTC	CAT	AGC	GGC	CTT	TTC	CTC	TAC
	CAG	GGG	CTC	CTG	CAG	GCC	CTG	GAA
	GGG	AFC	TCC	CCC	GAG	TTG	GGT	CCC
15	ACC	TTG	GAC	ACA	CTG	CAG	CTG	GAC
	GTC	GCC	GAC	TTT	GCC	ACC	ACC	ATC
	TGG	CAG	CAG	ATG	GAA	GAA	CTG	GGA
	ATG	GCC	CCT	GCC	CTG	CAG	CCC	ACC
	CAG	GGT	GCC	ATG	CCG	GCC	TTC	GCC
20	TCT	GCT	TTC	CAG	CGC	CGG	GCA	GGA
	GGG	GTC	CTG	GTT	GCC	TCC	CAT	CTG
	CAG	AGC	TTC	CTG	GAG	GTG	TCG	TAC
	CGC	GTT	CTA	CGC	CAC	CTT	GCC	CAG
	CCC							

(ただし m は 0 または 1 を表わす)

25 (7) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチ

ドをコードする遺伝子が図3(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第1項記載の遺伝子。

5 (8) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が図4(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第1項記載の遺伝子。

10 (9) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が微生物又はウィルス由来のレプリコンに接続されたものである請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の遺伝子。

(10) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクター。

15 (11) 遺伝子がシヨ糖密度勾配遠心法により15～17S画分として得られる、ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAに相補的なDNAであることを特徴とする請求の範囲第10項記載の組換えベクター。

20 (12) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第3項に記載のポリペプチド配列またはその一部をコードするものである請求の範囲第10項記載の組換えベクター。

25 (13) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第4項に記載のポリペプチド配列またはその一部をコードするものである請



求の範囲第10項記載の組換えベクター。

- 5 (14) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第5項に記載の塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第10項記載の組換えベクター。
- (15) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第6項に記載の塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第10
- 10 (16) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が図3(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第10項記載の組換えベクター。
- (17) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が図4(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第10項記載
- 15 の組換えベクター。
- (18) 大腸菌に使用するための請求の範囲第10項～第17項のいずれかに記載の組換えベクター。
- 20 (19) 動物細胞に使用するための請求の範囲第10項～第17項のいずれかに記載の組換えベクター。
- (20) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを含有する形質転換体。
- 25 (21) ショ糖密度勾配遠心法により15～17S画分として得ら

れる、ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAに相補的なDNAであることを特徴とする請求の範囲第20項記載の形質転換体。

5 (22) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第3項に記載のポリペプチド配列またはその一部をコードするものである請求の範囲第20項記載の形質転換体。

10 (23) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第4項に記載のポリペプチド配列またはその一部をコードするものである請求の範囲第20項記載の形質転換体。

15 (24) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第5項に記載の塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第20項記載の形質転換体。

20 (25) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が請求の範囲第6項に記載の塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第20項記載の形質転換体。

(26) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が図3(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第20項記載の形質転換体。

25 (27) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチ

ドをコードする遺伝子が図4(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである請求の範囲第20項記載の形質転換体。

5 (28) 大腸菌用組換えベクターによって形質転換された請求の範囲第20項～第27項のいずれかに記載の大腸菌形質転換体。

(29) 動物細胞用組換えベクターによって形質転換された請求の範囲第20項～第27項のいずれかに記載の大腸菌形質転換体。

10 (30) 下記のアミノ酸配列またはその一部で表わされるポリペプチド

	(Met) <sub>n</sub>	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser
	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu
	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys
15	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu
	Gln	Glu	Lys	Leu	(Val	Ser	Glu) <sub>m</sub>	Cys
	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro
	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	His
	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro
20	Leu	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala
	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser
	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu
	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu
	Glu	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gly
25	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu

Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr  
 Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu  
 Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe  
 5 Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala  
 Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His  
 Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser  
 Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala  
 Gln Pro (但し m は 0 又は 1 を表わし、n は 0 又  
 10 は 1 を表わす)

- (31) ポリペプチドがヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有することを特徴とする請求の範囲第30項記載のポリペプチド。
- (32) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを含有する形質転換体から産生されたヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド含有物。
- 15 (33) 図3(B)(II)に示されるアミノ酸配列の一部で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド。
- 20 (34) 図4(B)(II)に示されるアミノ酸配列の一部で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド。
- (35) 下記のアミノ酸配列またはその一部で表わされるポリ  
 25 ペプチドと糖鎖部分を有しヒト顆粒球コロニー刺激因子

活性を有する糖蛋白質。

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser  
 Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile  
 5 Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
 Glu Lys Leu (Val Ser Glu)<sub>m</sub> Cys Ala  
 Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu  
 Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser  
 Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu  
 10 Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu  
 Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln  
 Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr  
 Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu  
 Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro  
 15 Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp  
 Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile  
 Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly  
 Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr  
 Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala  
 20 Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly  
 Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu  
 Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr  
 Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln  
 Pro (但し m は 0 又は 1 を表わす)

25 (36) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチ

ドをコードする遺伝子を含む動物細胞用組換えベクターによって形質転換された動物細胞形質転換体から産生されたヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有する糖蛋白質含有物質。

5 (37) ヒト顆粒球コロニー刺激因子を有効成分とする感染防禦剤。

(38) ヒト顆粒球コロニー刺激因子が好中球コロニー刺激因子であることを特徴とする請求の範囲第37項記載の感染防禦剤。

10 (39) ヒト顆粒球コロニー刺激因子がヒト顆粒球コロニー刺激因子産生細胞の培養上清から得られることを特徴とする請求の範囲第37項記載の感染防禦剤。

(40) ヒト顆粒球コロニー刺激因子が次の理化学的性質を有するものであることを特徴とする請求の範囲第39項記載

15 の感染防禦剤。

「理化学的性質」

I) 分子量：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定で約19,000±1,000。

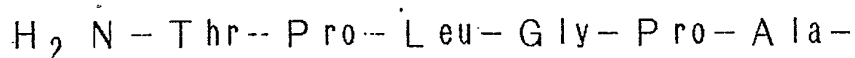
20 II) 等電点：以下の表-Iに示す三つの等電点(A, B, C)のうち少なくとも1つを有する。

表 - I

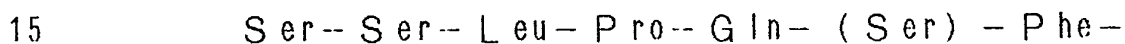
等 電 点 ( p I )		
	4 M 尿 素 存 在 下 の 値	尿 素 不 存 在 下 の 値
5 A	5.7 ± 0.1	5.5 ± 0.1
B	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.1
C	6.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1

10 III) 紫外部吸収: 280nmに極大吸収を有し、250nmに極小値をもつ。

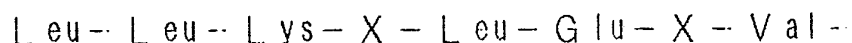
IV) N末端から21残基目迄のアミノ酸配列が次の如くである。



(10)



(20)



20 (41) ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを含有する形質転換体から産生されたヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドまたは糖蛋白質を有効成分とする請求の範囲第37項に記載の感染防禦剤。

25 (42) ヒト顆粒球コロニー刺激因子が請求の範囲第30項に記載のポリペプチドである請求の範囲第37項に記載の感染防禦剤。

110

- (43) ヒト顆粒球コロニー刺激因子が請求の範囲第35項に記載の糖蛋白質である請求の範囲第37項に記載の感染防禦剤。



1/29

例 1

プローブ ( I W Q )

Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met

5'----- ATI TGG CAA CAA ATG GAA GAA CTI GGI ATG -----3'  
                   G  G                  G  G  T

プローブ ( A )

Met Pro Ala Phe Ala

5'----- ATG CCA GCA TTT GC -----3'  
                   T      T      C  
                   G      G  
                   C      C

3'----- TAC GGA CGA AAA CG -----5'  
                   T      T      G  
                   G      G  
                   C      C

]} プローブ(A)

プローブ ( L C )

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr

5'----- CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC -----3'

3'----- GTC CTC TTC GAC ACA CGG TGG ATG -----5' プローブ(LC)

2/29

☒ 2

CC	CTG	GAA	GGG	ATC	TCC	CCC	GAG
TTG	GGT	CCC	ACC	TTG	GAC	ACA	CTG
CAG	CTG	GAC	GTC	GCC	GAC	TTT	GCC
ACC	ACC	ATC	TGG	CAG	CAG	ATG	GAA
GAA	CTG	GGA	ATG	GCC	CCT	GCC	CTG
CAG	CCC	ACC	CAG	GGT	GCC	ATG	CCG
GCC	TTC	GCC	TCT	GCT	TTC	CAG	CGC
CGG	GCA	GGA	GGG	GTC	CTA	GTT	GCC
TCC	CAT	CTG	CAG	AGC	TTC	CTG	GAG
GTG	TCG	TAC	CGC	GTT	CTA	CGC	CAC
CTT	GCC	CAG	CCC	TGA	GCC	AAG	CCC
TCC	CCA	TCC	CAT	GTA	TTT	ATC	TCT
ATT	TAA	TAT	TTA	TGT	CTA	TTT	

3/29

3(A)-1

CGGAGCCTGCAGCCAGCCACCCAGACCC

10 30  
 ATG GCT GGA CCT GCC ACC CAG AGC CCC ATG AAG CTG ATG GCC CTG CAG CTG CTG CTG TGG  
 Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln Leu Leu Trp  
 -30 50 90

110 150  
 CAC AGT GCA CTC TGG ACA GTG CAG GAA GCC ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC  
 His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro  
 -10 -1 1 10

170 210  
 CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG  
 Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala  
 20 30

230 270  
 CTC CAG GAG AAG CTG GTG AGT GAG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG  
 Leu Gln Glu Lys Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
 40 50

290 330  
 GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC CAG  
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln  
 60 70

350 390  
 GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG  
 Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly  
 80 90

4/29

3(A)-2

410  
 CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG 450  
 Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln 110  
 100  
 470  
 CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC 510  
 Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala 130  
 120  
 530  
 CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CQC CQG 570  
 Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg 150  
 140  
 590  
 GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CQC GTT 630  
 Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val 170  
 160  
 650  
 CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC TGA GCCAAGCCCTCCCATCCCATGTATTTATCTCTATTTAATTTATG 690  
 Leu Arg His Leu Ala Gln Pro End  
 710  
 TCTATTAAAGCCTCATATTTAAAGACAGGGAAAGCAGAACGGAGCCCAAGGCTCTGTGTCCCTCCCTGCATTTCTG 770  
 730  
 750  
 770  
 790  
 AGTTTCATTTCTCCTGCCTGTAGCAGTGAGAAAAAGCTCCTCCCTCCCATCCCTGGACTGGGAGGTAGATAGGTAAT 850  
 810  
 830  
 850  
 870  
 ACCAAGTATTTACTATGACTGCTCCCCAGCCCTG&CTCTGCAATGGGCACCTGGGATGAGCCGCTGTGAGCCCTGG 930  
 890  
 910  
 930

3(A)-3

950 970 990 1010  
 TCCTGAGGTCCTCCACCTGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCACGTTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTTAAATATTTA  
 1030 1050 1070 1090  
 AACAGCAGTGTTCCTCCATCTGGGTCCCTGACCCCTCACTCTGGCCTCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCCTT  
 1110 1130 1150 1170  
 GGCTGTGAGGCCCTGGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGGTCCCACGAAATTTGCTGGGGAA  
 1190 1210 1230 1250  
 TCTCGTTTTCTTCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTGACTCCCGAACATCACCGACGCGTCTCCTGTTTTTCTGGGTG  
 1270 1290 1310 1330  
 GCCTCGGGACACCTGCCCTGCCCCACGAGGTCAGGACTGTGACTCTTTTGGGCGCAGGCGTGCCTGGACATTTG  
 1350 1370 1390 1410  
 CCTTGCTGACGGGGACTGGGGATGTGGAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATGTCAGGCCCTGTGTGAAAGGAAGCTC  
 1430 1450 1470 1490  
 CACTGTACCCCTCCACCTCTTCACCCCCCACTCACCCAGTGTCCCTCCACTGTCACATTTGTAACTGAACCTTCAGGATA  
 1510 1530  
 ATAAAGTGTTCCTCCAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

6/29

3(B)

M P L T G G A L V I C A S L S A A G P A P L P  
e r o u r p e u n u i n u s p e u s l e u a l e y l a s e r e u s p i n p h e u  
- - - - -  
A l a - G l y - P r o - A l a - T h r - G l i n - S e r - A l a - T h r - G l i n - S e r -  
M e t - M e t - L e u - L e u - T r p - M e t - A l a - L e u - L e u - P r o - A l a -  
L e u - T h r - V a l - G l n - G l u - H i s - S e r - A l a - T h r - A l a - T h r -  
G l y - P r o - P h e - L e u - A r g - L e u - L e u - I l e - G l n - G l u - G l y -  
G l y - G l n - V a l - A l a - A l a - L e u - C y s - A l a - T h r - G l u - G l y -  
A s p - V a l - S e r - G l u - C y s - H i s - P r o - A l a - G l u - G l u - G l y -  
L e u - L e u - L e u - T r p - A l a - P r o - L e u - S e r - G l n - G l n - G l i -  
V a l - L e u - L e u - T r p - A l a - P r o - L e u - S e r - G l n - G l n - G l i -  
C y s - P r o - S e r - G l n - P h e - L e u - S e r - G l n - G l n - G l i -  
A l a - G l y - L e u - A l a - L e u - G l y - P r o - T h r - G l y - I l e -  
S e r - P r o - G l u - L e u - G l n - A l a - L e u - G l y - A s p - V a l - A l a -  
A s p - T h r - A l a - G l u - G l n - L e u - G l y - I l e - T r p - A l a - A l a -  
G l n - M e t - G l u - G l n - T h r - T h r - I l e - T r p - A l a - A l a -  
P r o - A l a - L e u - G l n - P r o - P h e - A l a - G l y - M e t - G l n - A l a -  
A l a - M e t - P r o - A r g - A r g - A l a - T h r - A l a - S e r - G l n - V a l -  
L e u - A r g - H i s - L e u - A l a - S e r - A l a - G l n - P r o - G l u - A r g -  
- - - - -

( I )

7/29

3(B)

Thr - Pro - Leu - Gly - Pro - Ala - Ser - Ser -  
 Leu - Pro - Glu - Ser - Phe - Leu - Lys - Ile -  
 Cys - Gly - Asp - Gly - Val - Arg - Lys - Gln -  
 Glu - Lys - Leu - Val - Ser - Glu - Cys - Ala -  
 Thr - Tyr - Lys - Leu - Cys - His - Pro - Glu -  
 Glu - Gly - Val - Leu - Leu - Gly - His - Ser -  
 Leu - Gly - Ile - Pro - Trp - Ala - Pro - Leu -  
 Ser - Ser - Cys - Pro - Ser - Gln - Ala - Leu -  
 Glu - Leu - Asp - Gly - Cys - Leu - Ser - Gln -  
 Glu - His - Ser - Gly - Leu - Phe - Leu - Tyr -  
 Gly - Ile - Ser - Pro - Glu - Leu - Gly - Pro -  
 Thr - Leu - Asp - Thr - Leu - Gln - Leu - Asp -  
 Val - Ala - Asp - Phe - Ala - Thr - Thr - Ile -  
 Trp - Gln - Gln - Met - Glu - Glu - Leu - Gly -  
 Met - Ala - Leu - Glu - Gln - Pro - Thr -  
 Glu - Gly - Phe - Met - Arg - Arg - Phe - Ala -  
 Ser - Val - Leu - Val - Arg - Ser - His - Leu -  
 Glu - Ser - Phe - Leu - Glu - Y - Ser - Tyr -  
 Arg - Val - Leu - Arg - His - Leu - Ala - Gln -

( II )

4(A)-1

GGAGCCTGCAGCCCAGCCCCACCCAGACCC<sup>30</sup>

ATG GCT GGA CCT GCC ACC CAG AGC CCC ATG AAG CTG ATG<sup>70</sup> GCC CTG CAG CTG CTG CTG TGG<sup>90</sup>  
 Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln Leu Leu Leu Trp

CAC AGT GCA CTC TGG ACA GTG CAG GAA GCC ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC<sup>150</sup>  
 His Ser Ala Leu Trp Thr Val Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro

CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG<sup>210</sup>  
 Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala

CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG CTC<sup>270</sup>  
 Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu

GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG<sup>330</sup>  
 Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln

CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG<sup>390</sup>  
 Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln



9/29

4(A)-2

GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC CTG GTC  
 Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val  
 410 430 450  
 100

GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC Thr Ile Thr ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG  
 Ala Asp Phe Ala Thr Thr Thr Thr Ile Trp Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu  
 470 510  
 120

CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CAG CGG GCA GGA GGG  
 Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly  
 530 550 570  
 140

GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CAG GTT CTA CGC CAC  
 Val Leu Val Ala Ser His Leu Leu Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
 590 610 630  
 160

CTT GCC CAG CCC TGA GCCAAGCCCTCCCCATCCCATGTATTATCTCTAATTAATATTATGTCTATTTAAGCC  
 Leu Ala Gln Pro End 650 670 690

TCATATTTAAAGACAGGGAAGCAGAACGGAGCCCGCCCTCTGTGTCTCCCTGCATTTCTGAGTTTCATCTCC  
 710 730 750 770

TGCCCTGTAGCAGTGAGAAAAGCTCCTGTCTCCATCCCTGGACTGGGAGGTAGATAGGTAATAACCAAGTATTAT  
 790 810 830 850

4 (A) - 3

870 TACTATGACTGCTCCCCAGCCCTGGCTCTGCAATGGGCACTGGGATGAGCCGCTGTGAGCCCCCTGGTCCCTGAGGGTCCC 910 930

950 CACCTGGGACCCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCACGCTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTTAAATATTTAAACAGCAGTGTTC 990 1010

1030 CCCATCTGGGTCCCTTGCACCCCTCACTCTGGCCTCAGCCGACTG CACAGCGGCCCTGCATCCCCCTTGGCTGTGAGGCC 1070 1090

1110 CCTGGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGTCCACGAAATTTGCTGGGGAATCTCGTTTTTCT 1130 1170

1190 TCTTAAAGACTTTTGGGACATGTTTGACTCCCGAACATCACCGACCGGTCTCTCTGTTTTTCTGGGTGGCCTCGGGACA 1210 1230 1250

1270 CCTGCCCTGCCCCACGAGGTCAGGACTGTGACTCTTTT AAGGCCAGGCAGGTGCCCTGGACATTTGCCCTTGCTGGAC 1290 1310 1330

1350 GGGGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATGTCAGGCCCTGTGTGTGAAGGAAGCTCCACTGTACCCC 1370 1390 1410

1430 TCCACCTCTTCACCCCCCACTCACAGTGTCCCCTCCACTGTCACATTTGTAACCTGAACCTCAGGATAATAAAGTGTG 1450 1470 1490

CCTCCAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA 1510

11/29

☑ 4(B)

M e t - A l a - G l y - P r o - A l a - T h r - G l n - S e r -  
 P r o - M e t - L y s - L e u - M e t - A l a - L e u - G l n -  
 L e u - L e u - L e u - T r p - H i s - S e r - A l a - L e u -  
 T r p - T h r - V a l - G l n - G l u - A l a - S e r - S e r - L e u -  
 L e u - G l y - P r o - P h e - L e u - L e u - L y s - C y s - L e u -  
 G l n - S e r - V a l - A r g - L y s - I l e - G l n - G l y -  
 A s p - G l y - A l a - A l a - L e u - G l n - G l u - L y s -  
 L e u - C y s - A l a - T h r - T y r - L y s - L e u - C y s -  
 H i s - P r o - G l u - G l u - L e u - V a l - L e u - L e u -  
 G l y - H i s - S e r - L e u - G l y - I l e - P r o - T r p -  
 A l a - P r o - L e u - S e r - S e r - S e r - C y s - P r o - S e r -  
 G l n - A l a - L e u - G l n - L e u - L e u - A l a - G l y - C y s -  
 L e u - S e r - G l n - L e u - H i s - S e r - G l y - L e u -  
 P h e - L e u - T y r - G l n - G l y - L e u - L e u - G l n -  
 A l a - L e u - G l y - P r o - T h r - L e u - A s p - T h r - L e u -  
 L e u - L e u - A s p - V a l - A l a - A s p - P h e - A l a -  
 T h r - T h r - I l e - T r p - G l n - A l a - G l n - M e t - G l u -  
 G l n - L e u - G l y - M e t - A l a - P r o - A l a - L e u -  
 G l n - P r o - T h r - G l n - G l y - A l a - P h e - M e t - P r o -  
 A l a - P h e - A l a - G l y - G l y - V a l - L e u - G l n - A r g -  
 A r g - A l a - L e u - G l n - S e r - V a l - L e u - V a l - A l a -  
 S e r - H i s - L e u - G l n - S e r - P h e - L e u - G l n -  
 V a l - S e r - T y r - A r g - V a l - L e u - A r g - H i s -  
 L e u - A l a - G l n - P r o

( I )

12/29

4(B)

Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-  
 Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-  
 Cys-Leu-Glu-Gln-Val-Arg-Lys-Ile-  
 Gln-Gly-Asp-Gly-Ala-Ala-Leu-Gln-  
 Glu-Lys-Leu-Cys-Ala-Thr-Tyr-Lys-  
 Leu-Cys-His-Pro-Glu-Glu-Leu-Val-  
 Leu-Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile-  
 Pro-Trp-Ala-Pro-Leu-Ser-Ser-Cys-  
 Pro-Ser-Gln-Ala-Leu-Gln-Leu-Ala-  
 Gly-Cys-Leu-Ser-Gln-Leu-His-Ser-  
 Gly-Leu-Phe-Leu-Tyr-Gln-Gly-Leu-  
 Leu-Gln-Ala-Leu-Glu-Gly-Ile-Ser-  
 Pro-Glu-Leu-Gly-Pro-Thr-Leu-Asp-  
 Thr-Leu-Gln-Leu-Asp-Val-Ala-Asp-  
 Phe-Ala-Thr-Thr-Ile-Trp-Gln-Gln-  
 Met-Glu-Glu-Leu-Gly-Met-Ala-Pro-  
 Ala-Leu-Gln-Pro-Thr-Gln-Gly-Ala-  
 Met-Pro-Ala-Phe-Ala-Ser-Ala-Phe-  
 Gln-Arg-Arg-Ala-Gly-Gly-Val-Leu-  
 Val-Ala-Ser-His-Leu-Gln-Ser-Phe-  
 Leu-Glu-Val-Ser-Tyr-Arg-Val-L-  
 Arg-His-Leu-Ala-Gln-Pro

( II )

13/29

図 5

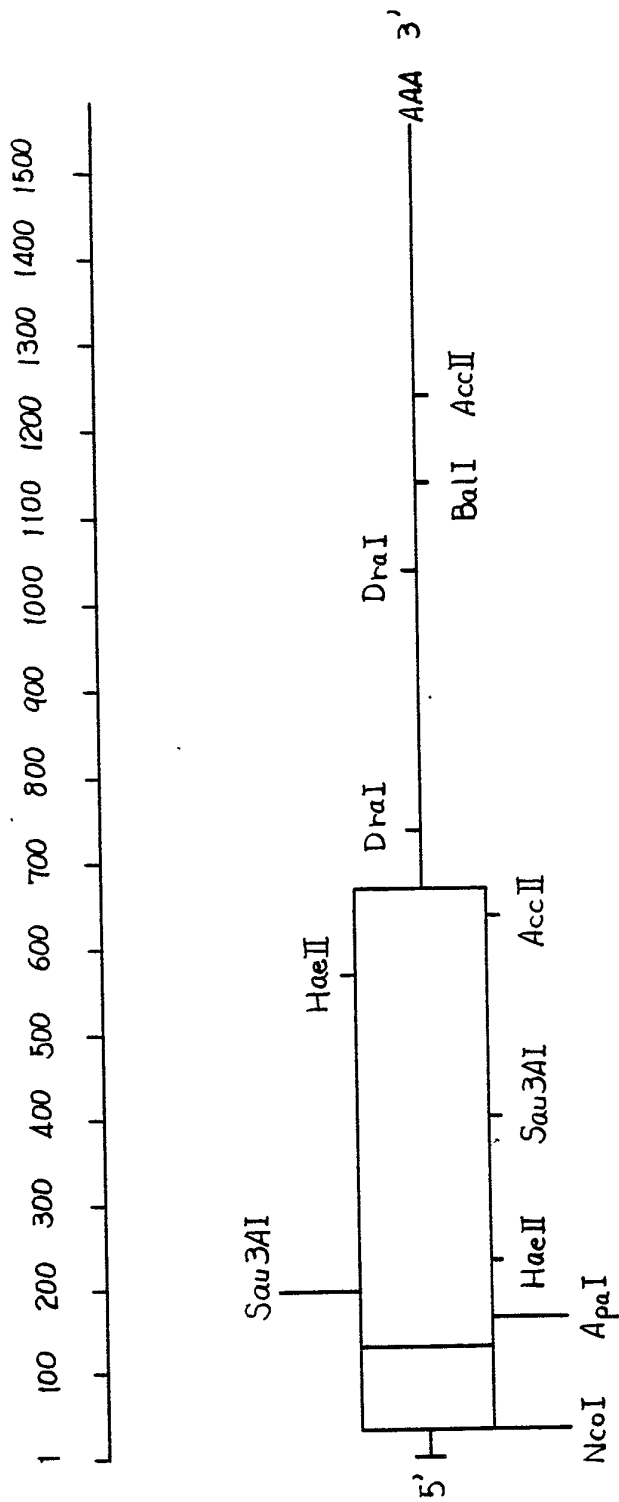


図 6

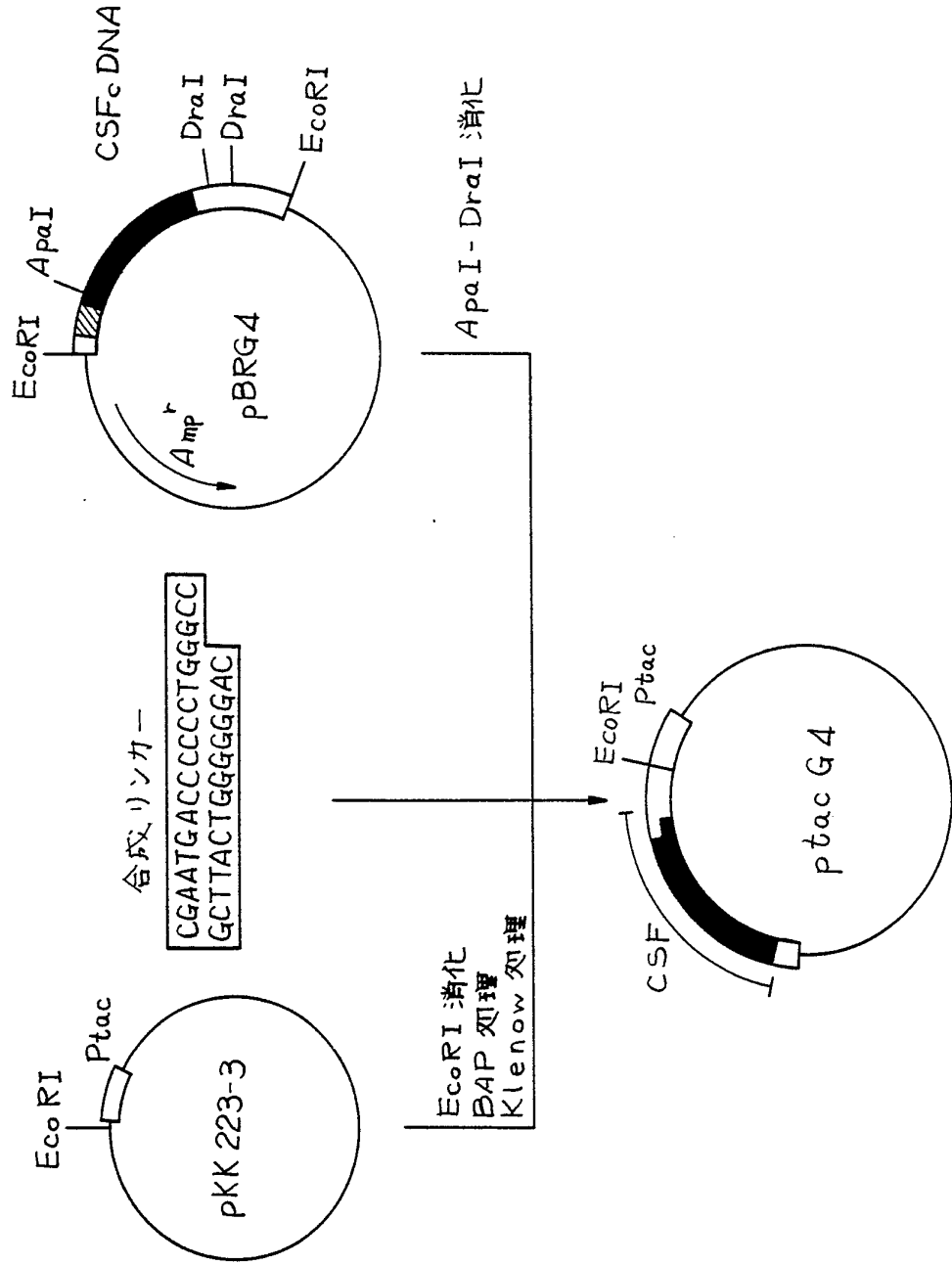


図 7(A)

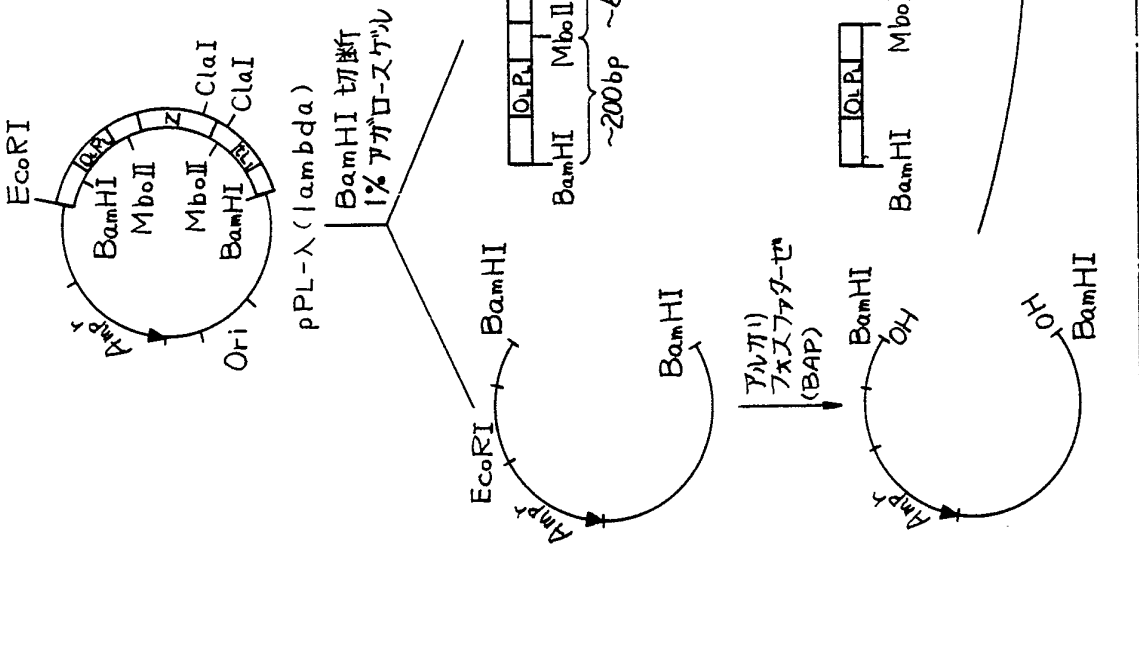
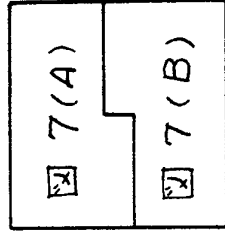
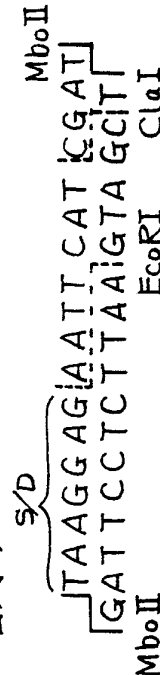


図 7



合成 S/D linker



7x779-2 (BAP)

図 7(B)

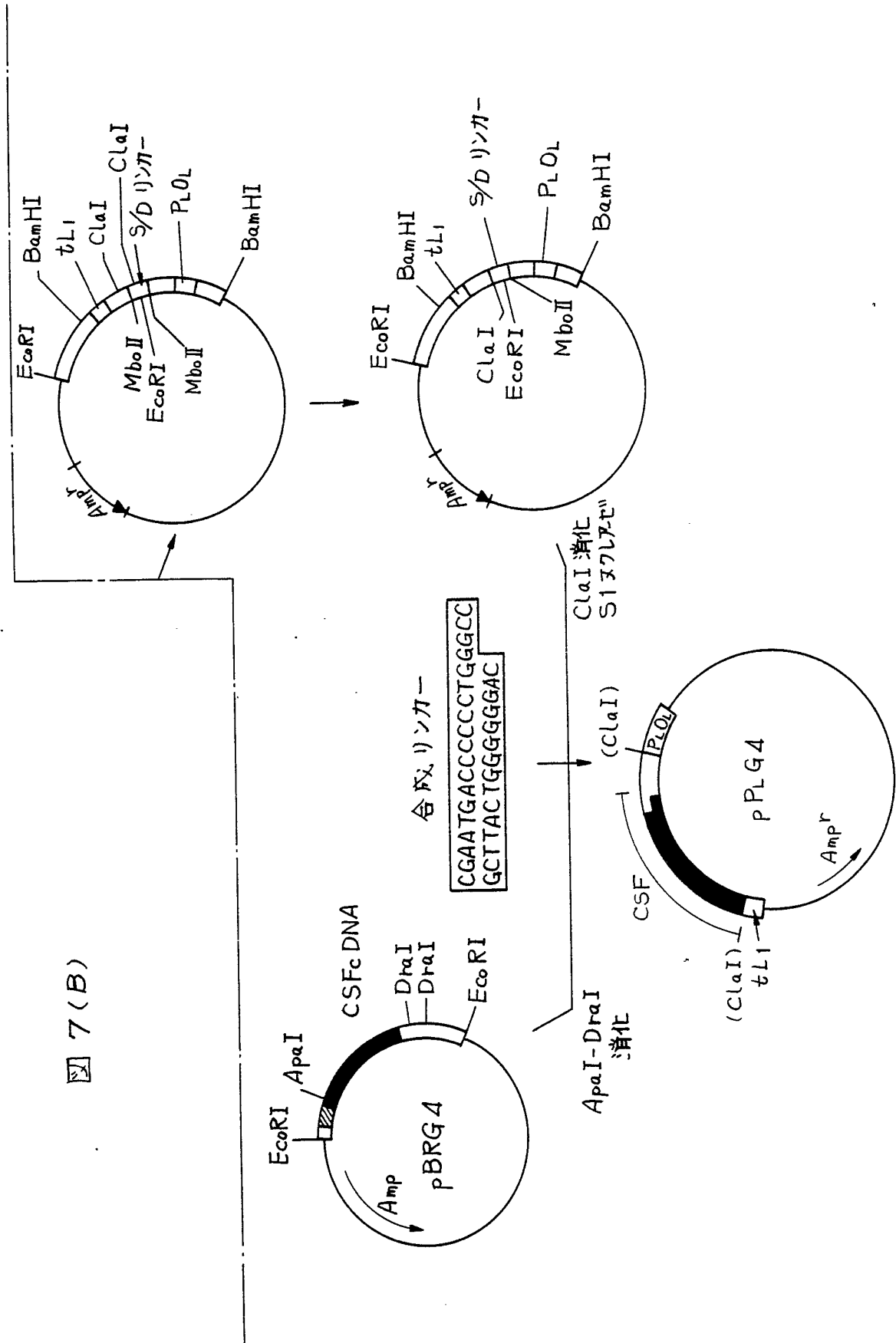




図 8

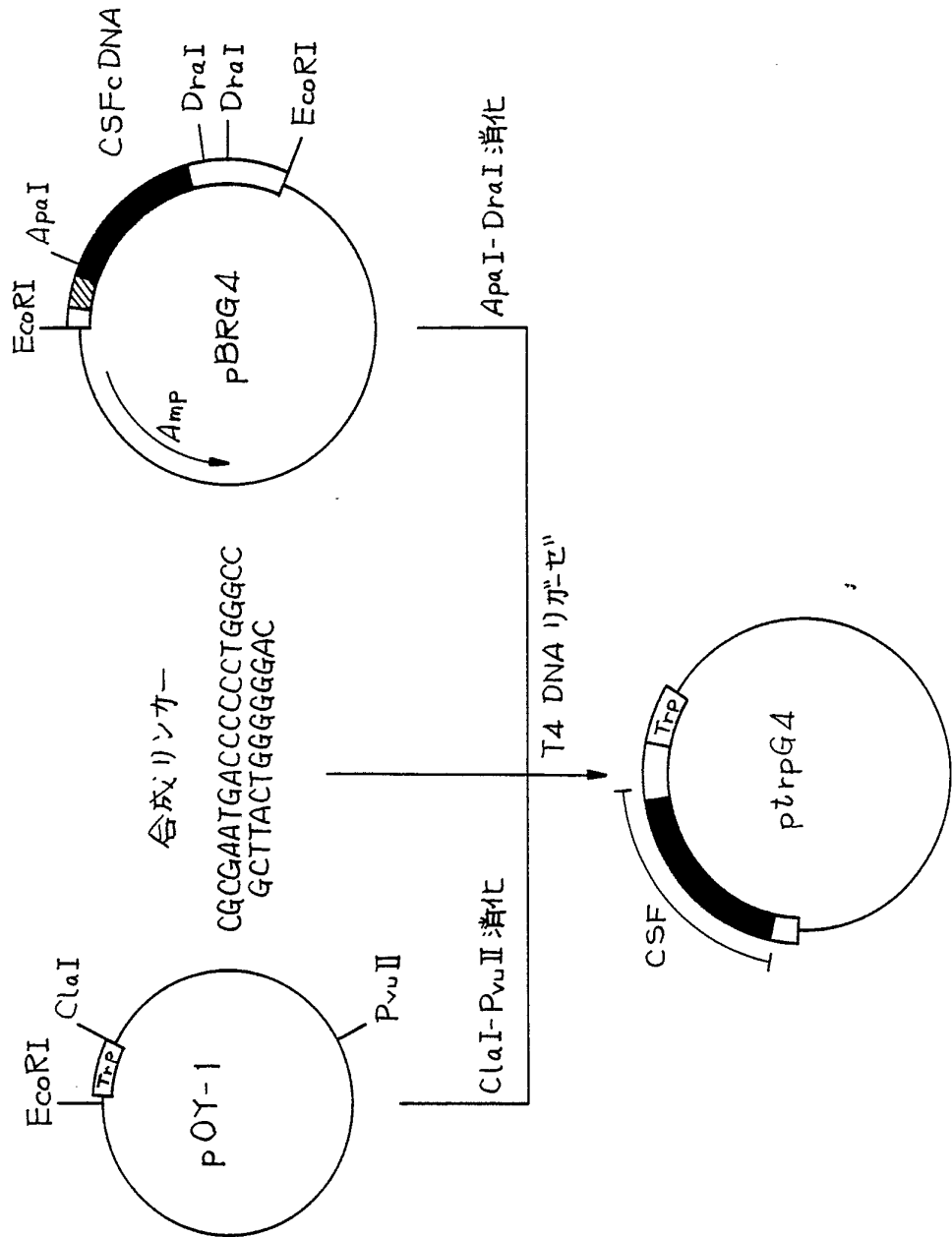
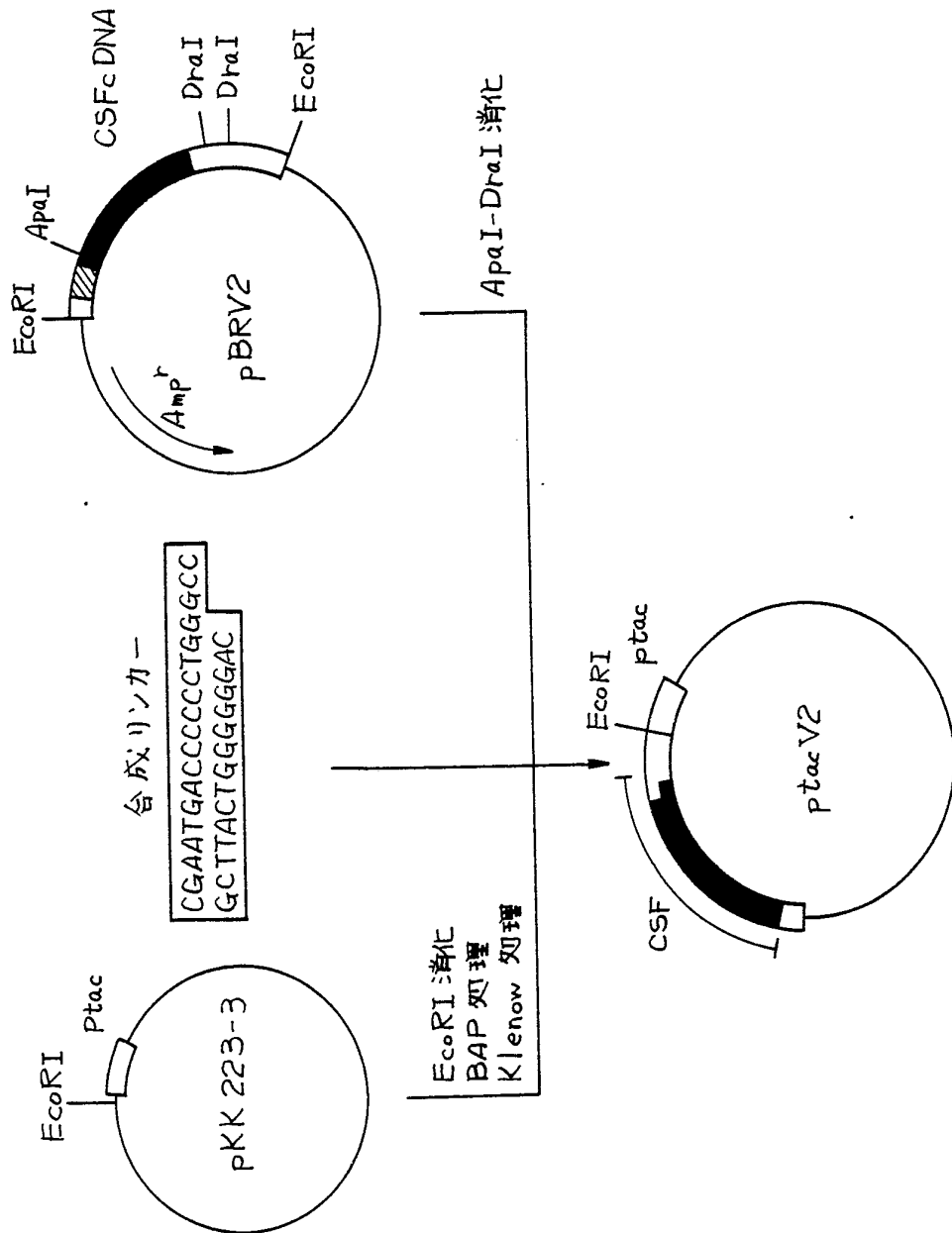


図 9



19/29

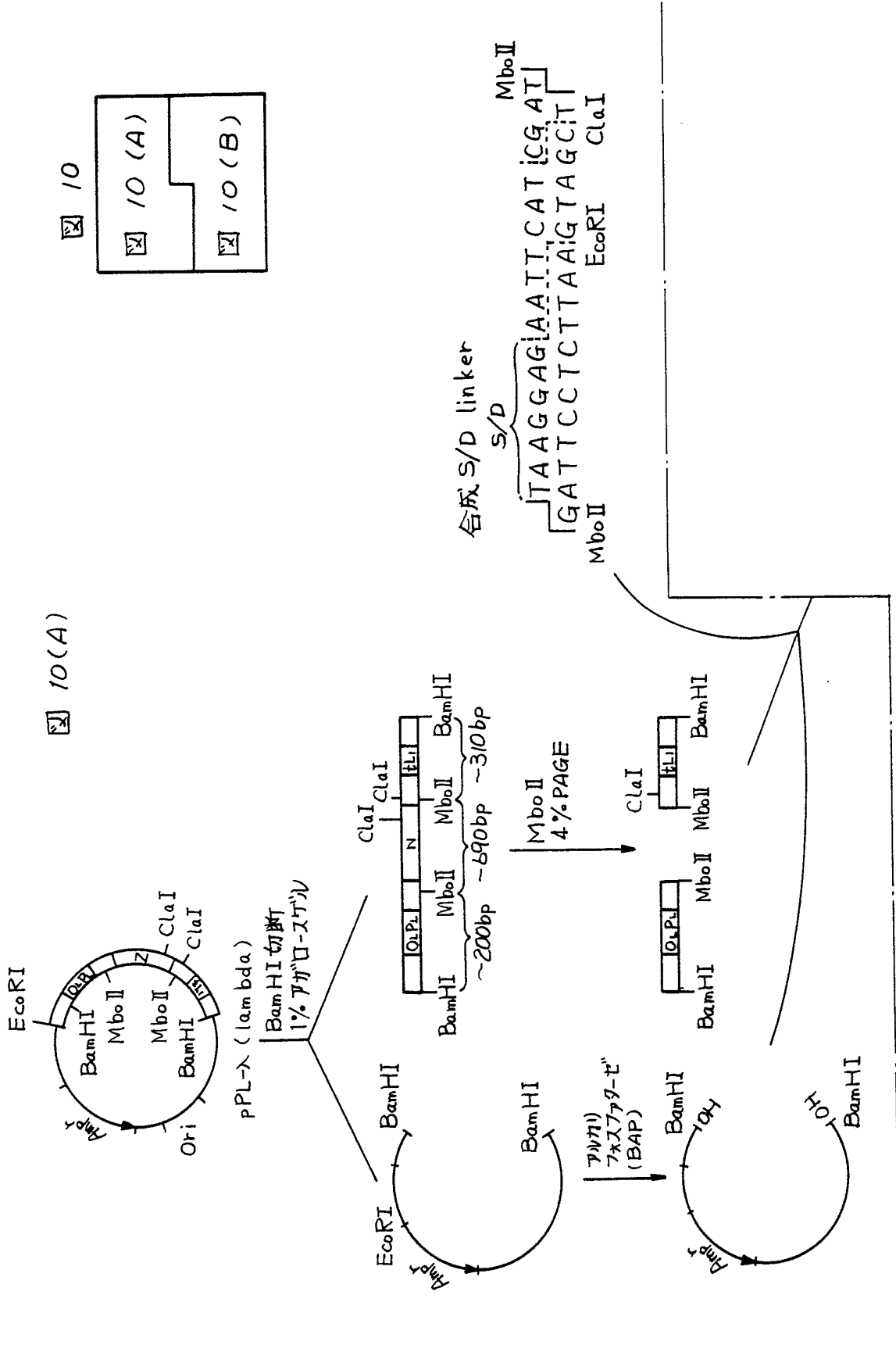


図 10(B)

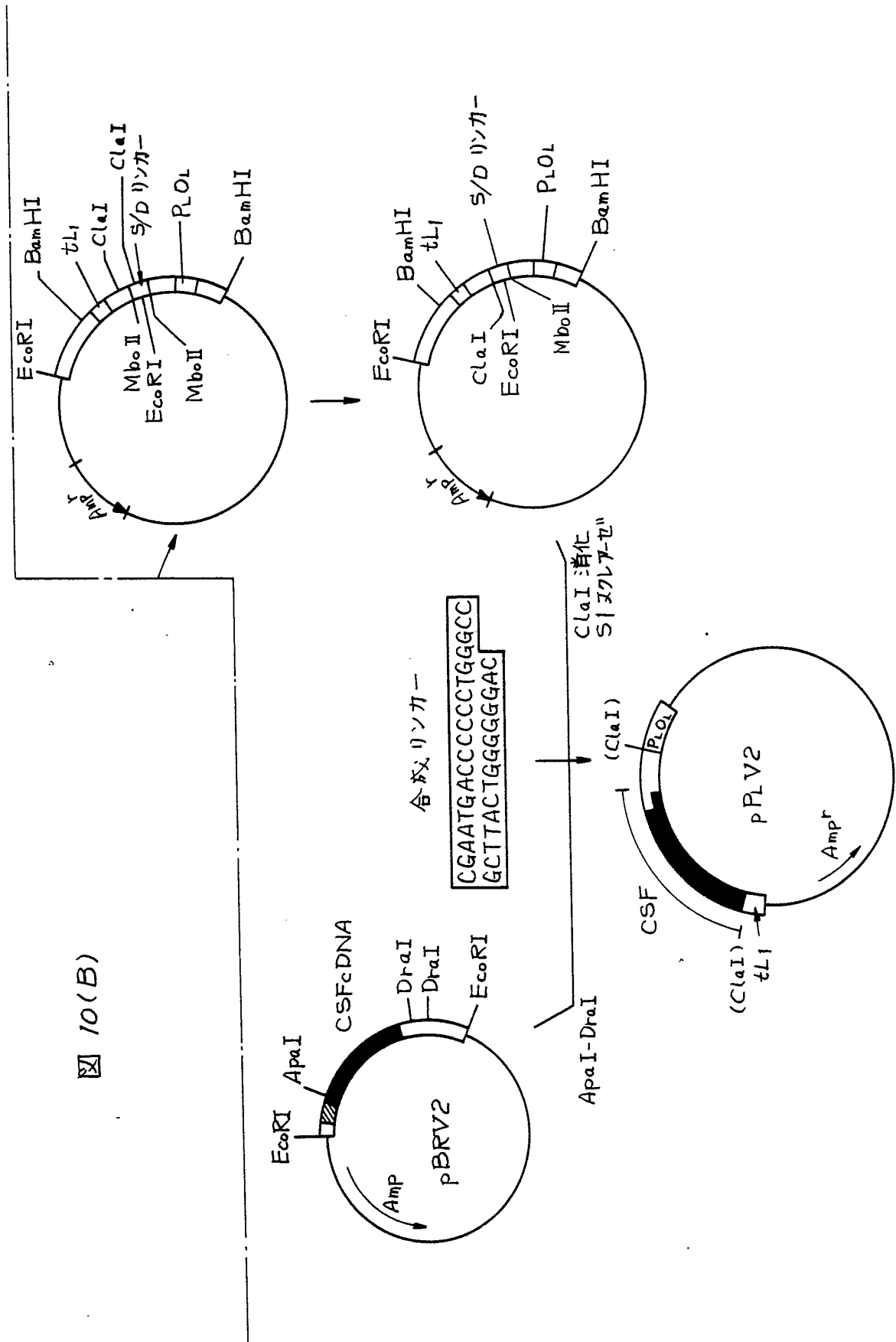
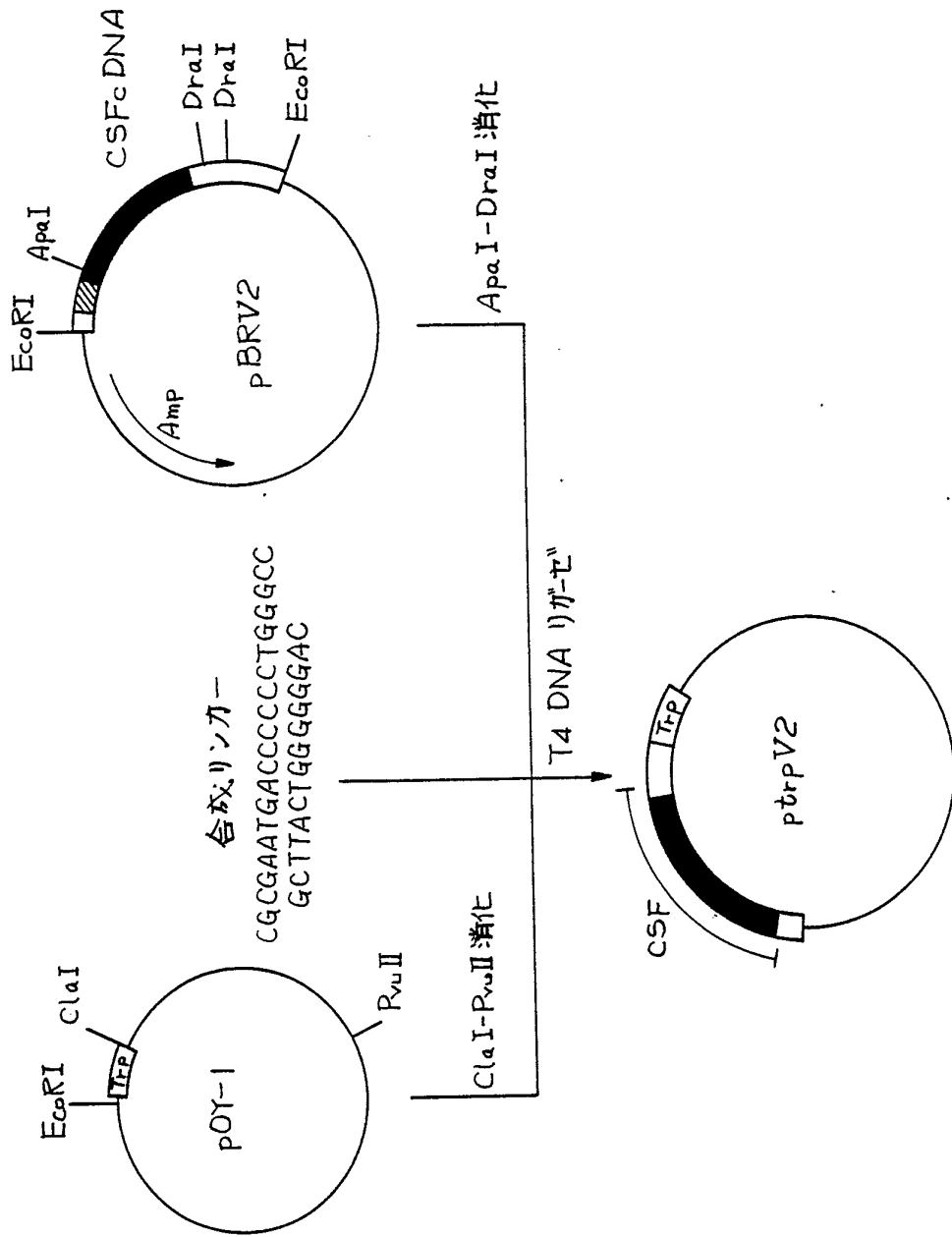
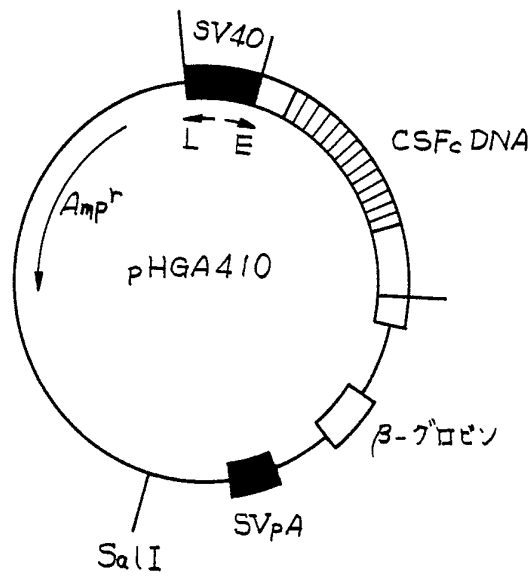


図 11



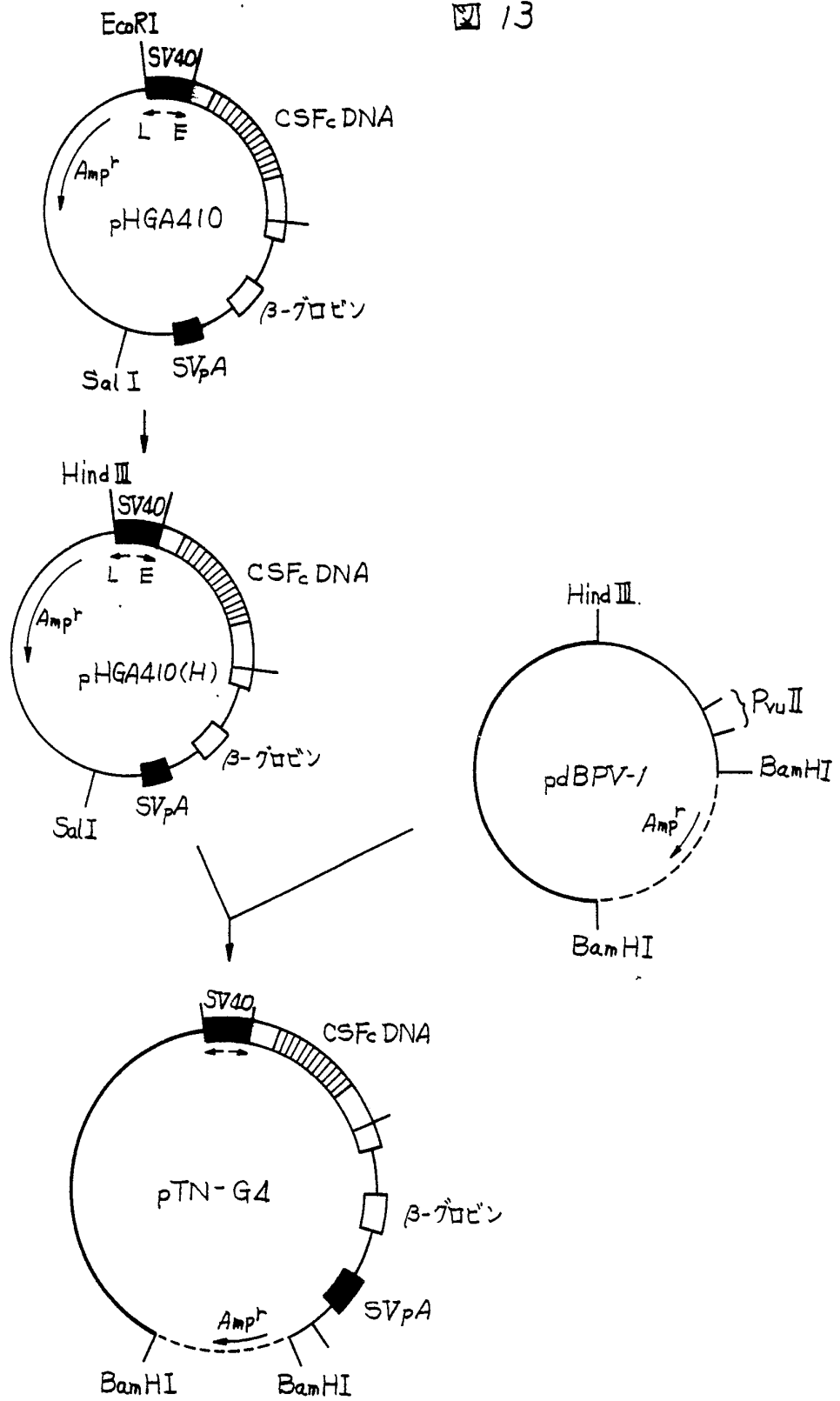
22/29

図 12



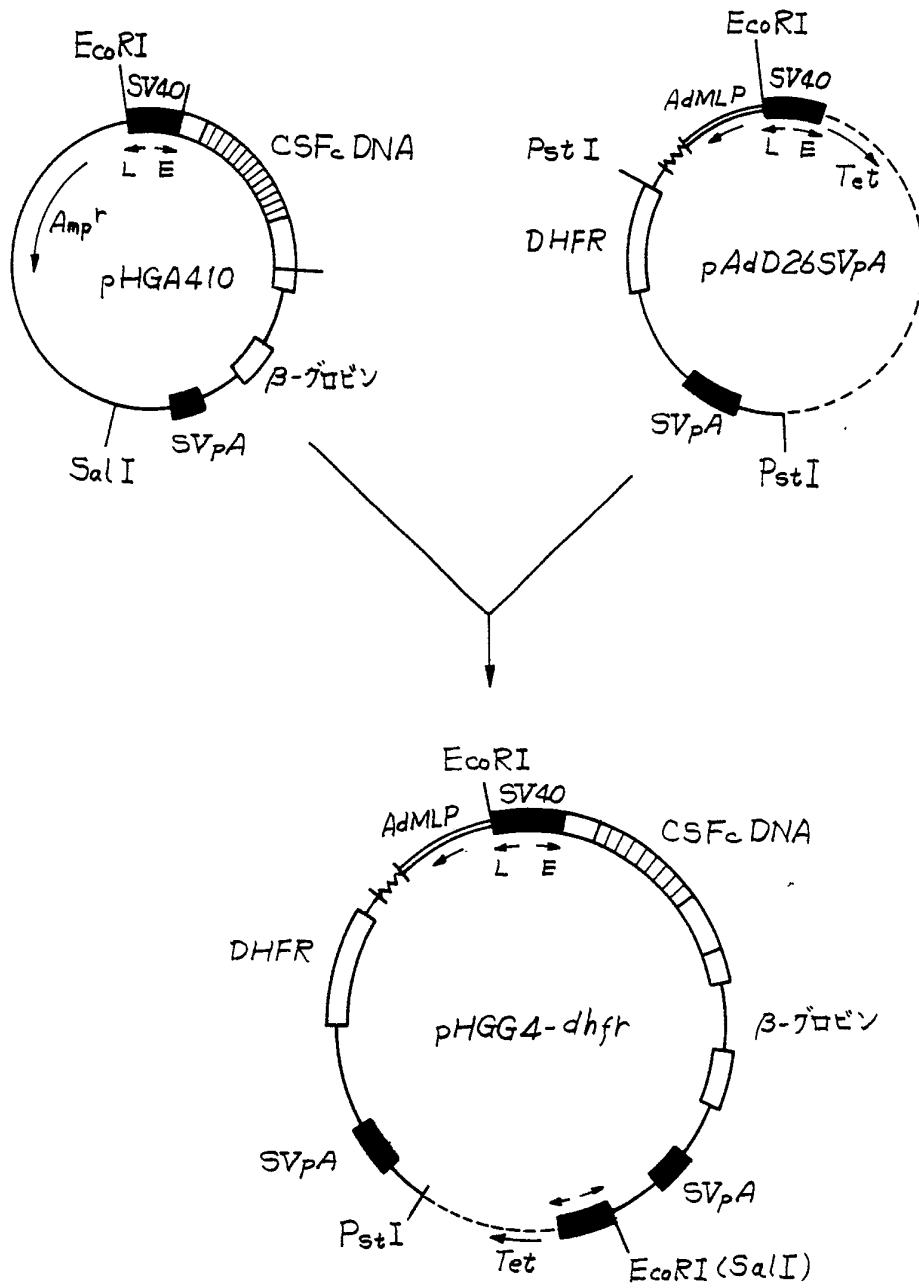
23/29

13



24/29

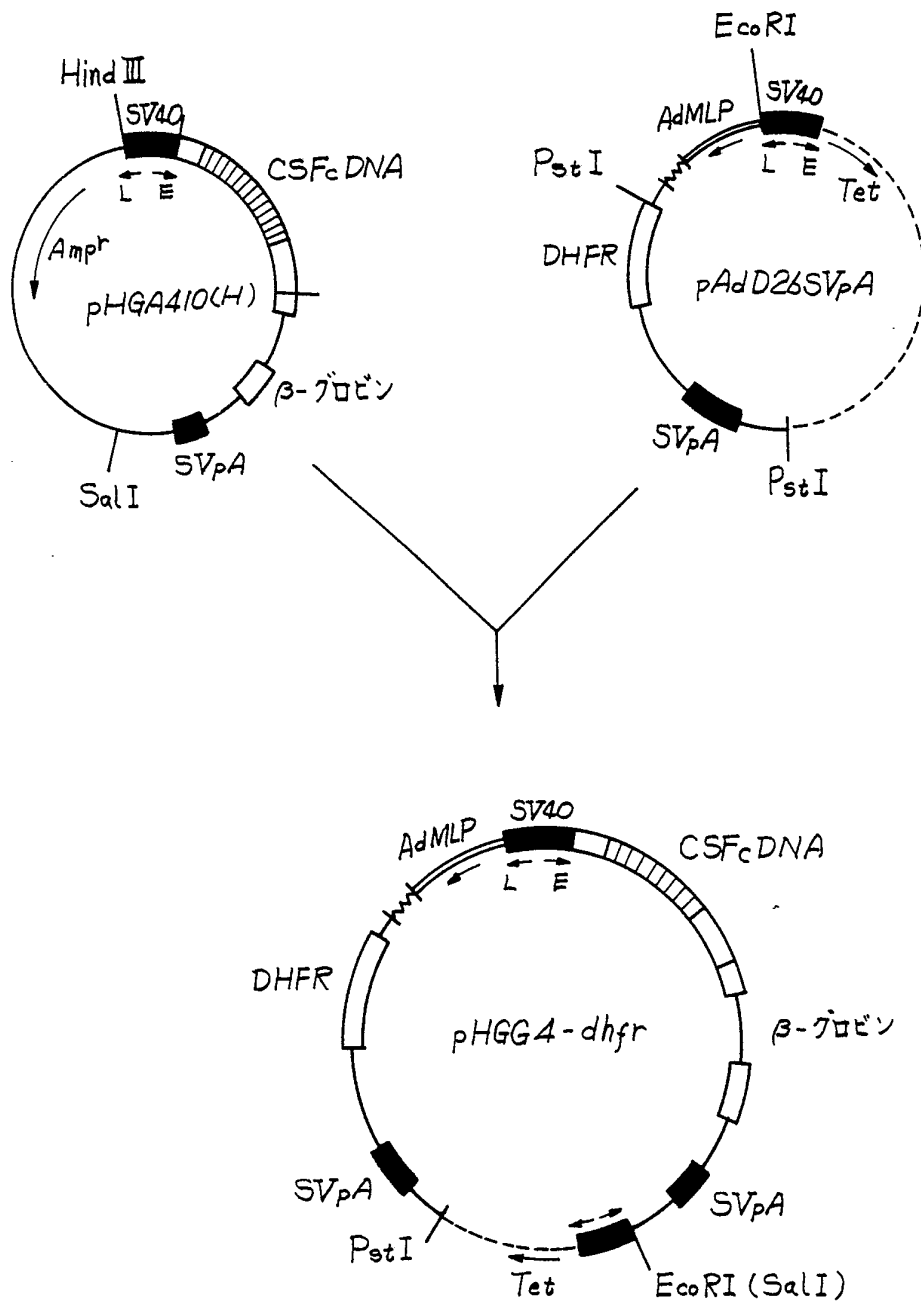
図 14a





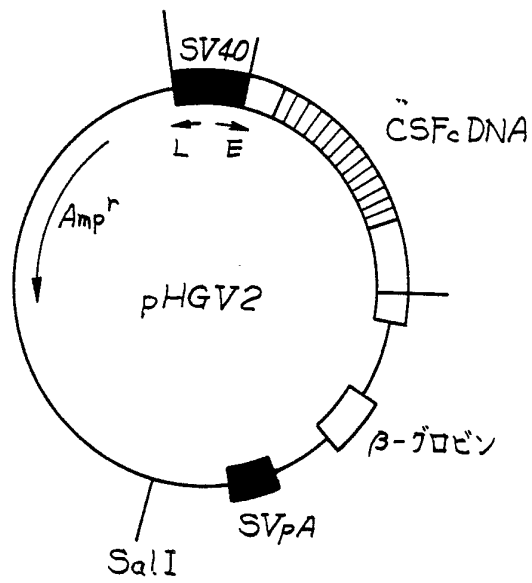
25/29

14 b



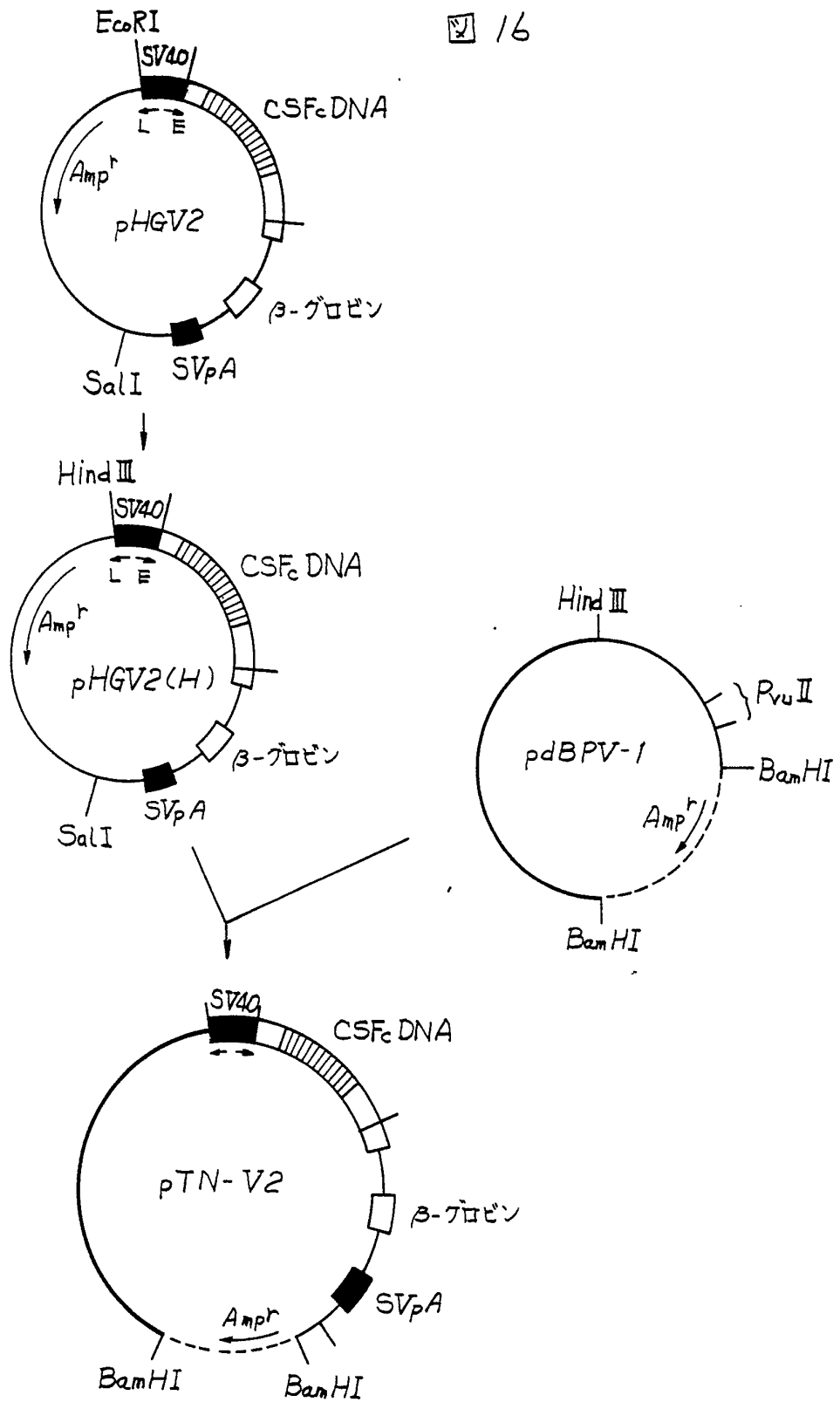
26/29

図 15



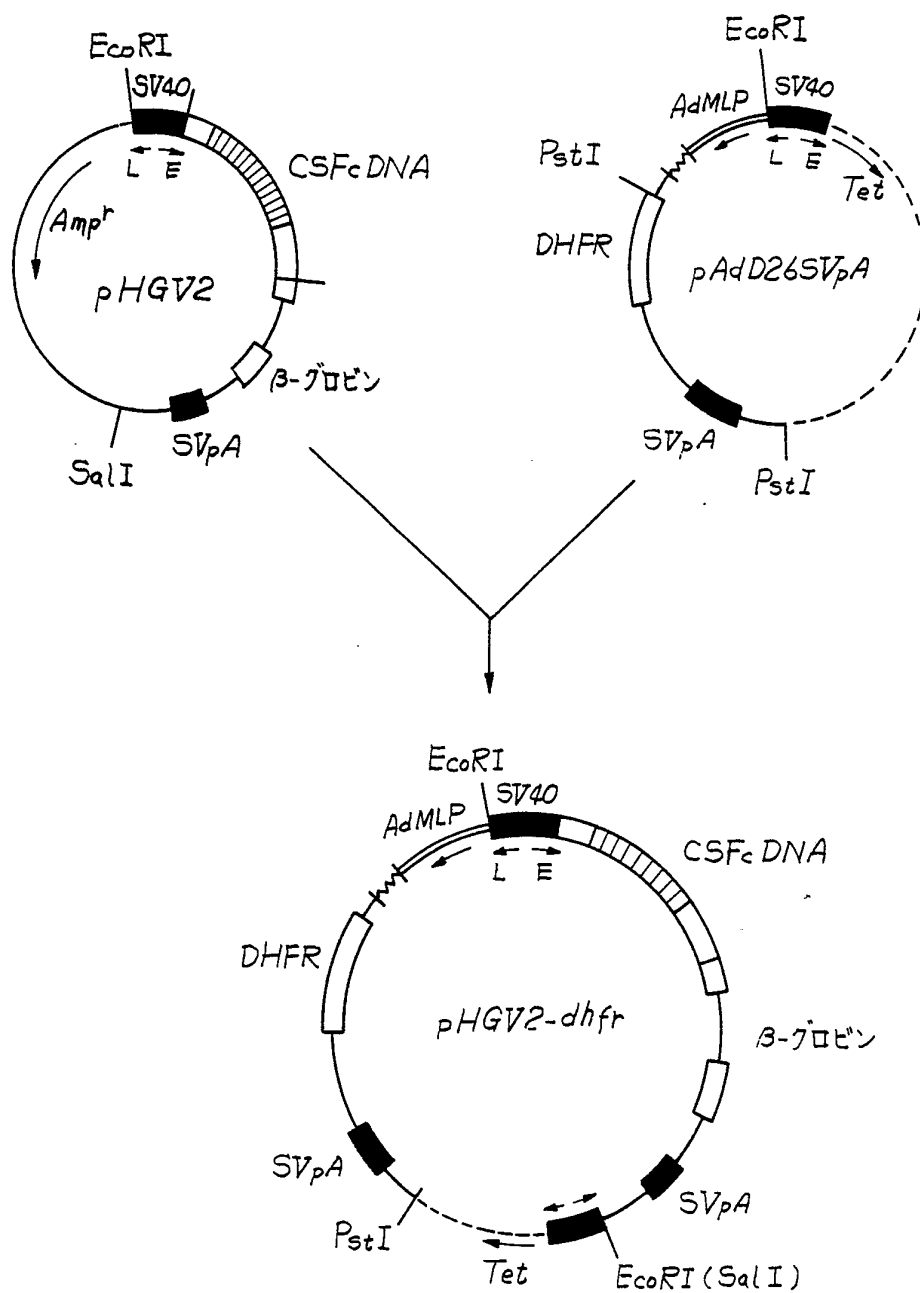
27/29

16



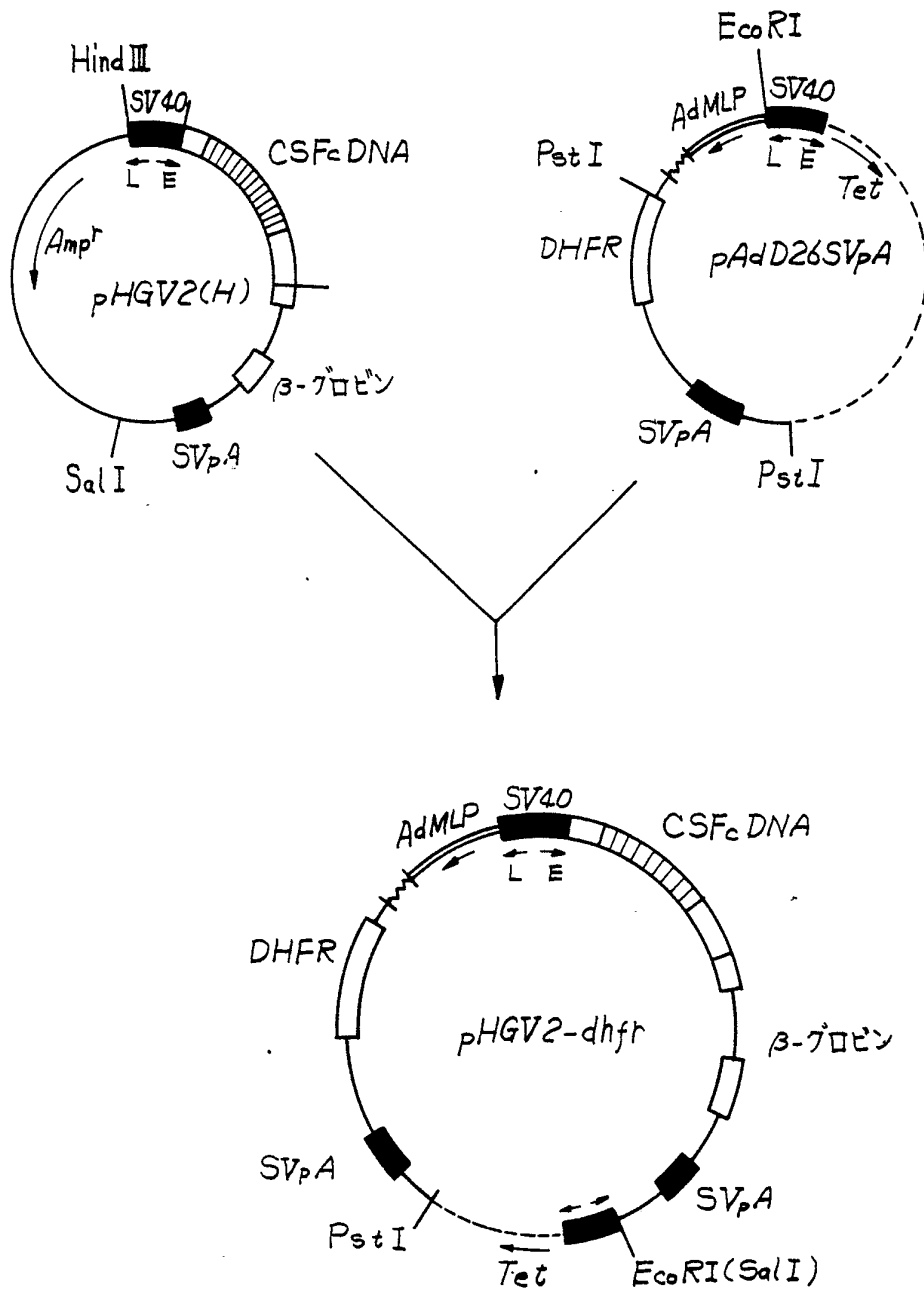
28/29

図 17 a



29/29

17b



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP86/00052

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>3</sup>				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl <sup>4</sup> C12N15/00, C12N1/00, C12N5/00, C07K13/00, C07K15/14, A61K35/12, A61K37/02				
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum Documentation Searched <sup>4</sup>				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	C12N15/00, A61K35/12			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>5</sup>				
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>14</sup>				
Category*	Citation of Document, <sup>15</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>17</sup>	Relevant to Claim No. <sup>18</sup>		
Y	JP, A, 54-140789 (Zaidan Hojin Jikken Dobutsu Chuo Kenkyusho) 1 November, 1979 (01. 11. 79) (Family: none)	37 - 39		
Y	JP, A, 57-114525 (Hayashi Genseibutsu Kagaku Kenkyusho Kabushiki Kaisha) 16 July, 1982 (16. 07. 82) & GB, A, 2092159 & FR, A, 2497099	37 - 39		
P	JP, A, 59-78122 (Ajinomoto Co., Inc.) 4 May, 1984 (04. 05. 84) (Family: none)	37 - 39		
<p>* Special categories of cited documents: <sup>15</sup></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">                     "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      "E" earlier document but published on or after the international filing date                      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                 </td> <td style="width: 50%; border: none;">                     "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step                      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                      "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
<b>IV. CERTIFICATION</b>				
Date of the Actual Completion of the International Search <sup>2</sup>	Date of Mailing of this International Search Report <sup>2</sup>			
April 17, 1986 (17. 04. 86)	April 28, 1986 (28. 04. 86)			
International Searching Authority <sup>1</sup>	Signature of Authorized Officer <sup>20</sup>			
Japanese Patent Office (ISA/JP)				

国際調査報告

国際出願番号 PC1/JP 86/00052

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>4</sup> C12N15/00, C12N1/00, C12N5/00, C07K13/09, C07K15/14, A61K35/12, A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N15/00, A61K35/12	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP, A, 54-140789 (財団法人実験動物中央研究所) 1. 11月. 1979 (01. 11. 79) (ファミリーなし)	37-39
Y	JP, A, 57-114525 (株式会社林原生物化学研究所) 16. 7月. 1982 (16. 07. 82) & GB, A, 2092159 & FR, A, 2497099	37-39
P	JP, A, 59-78122 (味の素株式会社) 4. 5月. 1984 (04. 05. 84) (ファミリーなし)	37-39
*引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリーの文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
17. 04. 86	28. 04. 86	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 7 1 1 5
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 広田 雅 紀	