

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-5699

(P2009-5699A)

(43) 公開日 平成21年1月15日(2009.1.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-153485 (P2008-153485)	(71) 出願人	500181278
(22) 出願日	平成20年6月11日 (2008. 6. 11)		アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ
(62) 分割の表示	特願平10-546687の分割		サーント エ ドゥ ラ ルシエルシュ
原出願日	平成10年4月30日 (1998. 4. 30)		メディカル (イ エン エス ウ エル
(31) 優先権主張番号	97/05411		エム)
(32) 優先日	平成9年4月30日 (1997. 4. 30)		フランス国 1 3 セデクス パリー リ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ュ ドゥ トルビアック 1 0 1
(31) 優先権主張番号	98/00927	(74) 代理人	100083149
(32) 優先日	平成10年1月28日 (1998. 1. 28)		弁理士 日比 紀彦
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100060874
			弁理士 岸本 瑛之助
		(74) 代理人	100079038
			弁理士 渡邊 彰
		(74) 代理人	100106091
			弁理士 松村 直部
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 活性化レセプタに会合される新しいポリペプチド及びその生物学的応用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 免疫グロブリンタイプ又はレクチンタイプの K I R レセプタ (キラー細胞阻害性レセプタ) の非阻害性対応物である K A R レセプタ (キラー細胞活性化レセプタ) の異常な又は望ましくない機能を診断し、予防し、矯正し、治療することを可能にする新しい手段を提供する。

【解決手段】 特定の配列を含む核酸、該核酸によってエンコードされた単離されたポリペプチド。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 31 の配列を含む核酸。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸によってエンコードされた単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のポリペプチド又はそのフラグメント又は相同体であって、前記相同体又はフラグメントは K A R に由来するシグナルを形質導入する能力を有するものであり、細胞中で K A R 活性化不全の回復を可能にすること、K A R に会合しかつこの K A R を阻害する相対物には会合しない能力をもつこと、及び

10

そのアミノ酸配列が、

- リン酸化可能なチロシンアミノ酸を少なくとも 1 つ有し、
- 10 ± 2 から 16 ± 2 k D a の間に含まれる分子質量を有し、
- 少なくとも 1 つの I T A M Y x x L / I x₆ . . . Y x x L / I パターンを有し、
- 細胞質外領域、膜内外領域及び細胞質内領域を含み、
- 少なくとも 1 つの細胞質外システインアミノ酸を含んで成り、
- 少なくとも 1 つの膜内外荷電アミノ酸 (R , K , D , E) を有することを特徴とする、

ポリペプチド又はそのフラグメント又は相同体。

【請求項 4】

前記細胞が N K 細胞及び / 又は T 細胞及び / 又は骨髄性細胞及び / 又は B 細胞及び / 又はマスト細胞であることを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 5】

少なくとも 1 つのチロシン残基レベルでリン酸化されていることを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

2 量体の形を有することを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

S H 2 又は P T B ドメインをもつ分子に結合されることを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

グリコシル化、リン酸化、スルホン化、ビオチニル化、アシル化、エステル化；ホスホン酸塩のようなリン酸塩基のものに近い分子形態をもつ物質 (entity) の添加、置換又は抑制；ルシフェラーゼ、G F P (Green Fluorescence Protein) 又はその類似体のような標識付け試薬の添加；親和性リガンドのような精製用標的の添加；その可溶性を修正する物質の添加；によって修飾されることを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 9】

細胞膜を横断する能力を有することを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

シグナルを形質導入するその能力を阻害するように修飾されることを特徴とする請求項 3 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 11】

特にホスホン酸塩基の添加により生物学的条件下で加水分解不能となるような形で修飾されることを特徴とする請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

フェニルアラニン残基によるチロシン残基の置換により修飾されることを特徴とする請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 2 または 3 に記載のポリペプチドに結合する抗体又はかかる抗体のフラグメント特に F c , F V , F a b , F (a b ')₂ 又は C D R フラグメント。

【請求項 14】

50

請求項 3 に記載のポリペプチドの獲得方法において、

i . 抗 C D 1 5 8、抗 p 7 0 / N K B 1、抗 p 1 4 0 抗体、より特定のには、E B 6、G L 1 8 3 または P A X 2 5 0 モノクローナル抗体のような単数又は複数の抗 K I R 及び/又は抗 K A R 抗体を用いて K A R + 細胞の細胞溶解産物の単数又は複数のポリペプチド分画の免疫沈降する段階を含み、ここで

ii . 各ポリペプチド分画は、任意には、さらに以前に抗 C D 3 及び/又は抗 F c R I を用いた免疫沈降された分画の除去により枯渇され得及び/又は新たに抗 C D 1 5 8、抗 p 7 0 / N K B 1 または抗 p 1 4 0 抗体、より特定のには、E B 6、G L 1 8 3 または P A X 2 5 0 モノクローナル抗体のような単数又は複数の抗 K I R 及び/又は抗 K A R 抗体を用いて免疫沈降され得、

iii . その分子量に従って前記ポリペプチド分画のポリペプチドを分離し 12 ± 2 k D a の分子量に対応するポリペプチドを回収するか又は、

前記単数又は複数のポリペプチド分画をキナーゼ試験に付した後その分子量に従って前記ポリペプチド分画のポリペプチドを分離し、 12 、 14 及び/又は 16 ± 2 k D a の分子量に対応するリン酸化されたポリペプチドを回収する段階をも含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項 15】

前記 K A R + 細胞が N K 細胞及び/又は T 細胞及び/又は骨髄性細胞及び/又は B 細胞及び/又はマスト細胞であることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 3 に記載のポリペプチドの配列を獲得する方法であって、

- リン酸化可能なチロシンアミノ酸を少なくとも 1 つ有し、
- 5 から 25 k D a の間の分子質量を有し、
- 細胞質外領域、膜内外領域及び細胞質内領域を有し、
- その細胞質外領域内にシステインアミノ酸を少なくとも 1 つ有し、
- その膜内外領域内に荷電アミノ酸 (R , K , D , E) を少なくとも 1 つ有し、かつ
- その細胞質内領域内に I T A M Y x x L / I x ₆ . ₈ Y x x L / I パターンを少なくとも 1 つ有するもののみを選択するため候補配列の間でのスクリーニングによって作業を行なうこと及び、選択された配列 (単複) に対応するポリペプチド (単複) が、K A R を阻害する対応物レセプタに会合することなく K A R レセプタに会合する能力を有することを確保することを特徴とする方法。

【請求項 17】

候補ポリペプチドが、請求項 3 に記載のポリペプチドに対応するか否かを決定するための方法において、

- 候補ポリペプチド、特にこの候補ポリペプチドの細胞質外領域及び/又は少なくとも 1 つの I T A M パターンを含む領域に対して導かれたモノ又はポリクローナル抗体を産する段階、

- 抗原 - 抗体タイプの結合反応を可能にする穏やかな条件下で候補ポリペプチドが K A R A P を構成すると想定されている対象の活性化又は非阻害性レセプタを、1 つの機能的形態にて有する細胞の溶解産物と、この抗体を接触させる段階、

- 場合によって形成される反応産物の中に、前記活性化又は非阻害性レセプタのものに近い見かけの分子質量をもつ産物及び候補ポリペプチドのものに近い見かけの分子質量をもつ産物が存在する場合に候補ポリペプチドを同定する段階、

を含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項 18】

薬学的に受容可能なビヒクルと会合した状態で、有効量の請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド又はそのフラグメント、又は有効量の請求項 13 に記載の抗体またはそのフラグメント、又は有効量の請求項 1 に記載の核酸又はその変異体を含んで成る薬学組成物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

1つの細胞の異常な又は望ましくない機能のインビトロ診断方法において、

- 少なくとも1つの細胞又は細胞抽出物を、請求項13に記載の抗体又はそのフラグメント、または該抗体またはそのフラグメントと反応するポリペプチドまたはそのフラグメントをエンコードする核酸又はその変異体を接触させる段階、及び
 - 形成され得た反応産物の存在を明らかにする段階、
- を含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項20】

前記異常な又は望ましくない機能が、免疫増殖疾患、HIV疾患のような免疫不全疾患、顆粒リンパ球増殖疾患のようなガン、リウマチ様多発性関節炎のような自己免疫疾患、マラリアのような感染性疾患、アレルギー応答、移植片拒絶の形で現われることを特徴とする請求項19に記載のインビトロ診断方法。

10

【請求項21】

KARの活性化のアダプタ分子又はエフェクタ分子の同定方法において、

- i. 請求項2～12のいずれか1つに記載のポリペプチド（又はそのフラグメント）と候補分子を接触させる段階、及び
 - ii. 前記ポリペプチド（又はそのフラグメント）に対する結合が観察される候補分子を選択する段階、
- を含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項22】

KARの活性化の結果として得られる細胞活性を変調させる能力を有する分子の同定方法において

20

- i. 請求項21に記載の方法によって得られるようなKARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子、及び請求項2～12のいずれか1つに記載のポリペプチド（又はそのフラグメント）と、候補分子を接触させる段階；及び
 - ii. 候補分子のうち、かかる候補分子の不存在下で観察されるような前記ポリペプチド（又はそのフラグメント）と前記アダプタ又はエフェクタ分子の間の結合に対し効果を及ぼす候補分子を選択する段階、
- を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、自律したレセプタとしてか又はコレセプタとして機能するクラスIのMHC（主要組織適合性遺伝子複合体）の分子に対する活性化レセプタ、及び特にKAR（キラー細胞活性化レセプタ）に由来するシグナルを形質導入する能力をもつ新しい特殊なポリペプチド。免疫原として役立つ前記ポリペプチドから得られる抗体及び、前記ポリペプチドに対応する核酸に関する。

【0002】

本発明は同様に、かかるポリペプチドの獲得方法及び前記ポリペプチド、抗体及び核酸の生物学的応用、より特定のには予防、治療及び診断へのその応用に関する。

【背景技術】

40

【0003】

生体の一貫性を維持し、無欠性を確保するためには、免疫系は、調整のとれた細胞間連絡系を利用しなければならない。

【0004】

これらの連絡には異なるタイプのレセプタが関与する。そのうちの3つ、すなわちBリンパ球抗原に対するレセプタ（BCR）、Tリンパ球抗原に対するレセプタ（TCR）及び抗体のFc部分（Rfc）を認識するレセプタについて今や十分に記述されており、それらの異なる構造は比較的良く知られている。

【0005】

抗原に対するレセプタでも抗体に対するレセプタでもないその他のレセプタは、記述さ

50

れてきたものの、その構造及び作用メカニズムはまだよく知られていない。

【0006】

これらは、KAR（キラー細胞活性化レセプタ）及びその阻害性対応物KIR（キラー細胞阻害性レセプタ）のようなMHC（主要組織適合性遺伝子複合体）の分子に対するレセプタである。

【0007】

KARとKIRは、NK細胞に制限されない：これらは同様に、T細胞により天然に発現される。

【0008】

KARは、KIRと高い相同性をもつ（細胞質外レベルでのKARとKIRの間の相同性は最高96%）。

【0009】

しかしながら、KAR及びKIRは同じ機能を果たすものではない。すなわち、KIRは、NK及びT細胞の活性化の負の制御（阻害作用）に参与するのに対し、KARはNK及びT細胞の活性化の正の制御（刺激作用）に参与する。

【0010】

細胞質内外及び細胞質内のドメインのレベルでの主たる差異は、活性化同型化（KAR）及び阻害性同型体（KIR）の間で実証することができた。

【0011】

実際、KIRとは異なり、KARはその膜内外ドメイン内で荷電アミノ酸残基（リシン）を発現し、その細胞質内ドメイン内にいかなるITIMパターン（チロシン残基に基づく免疫レセプタの阻害パターン）も含んでいない。しかし単量体レセプタKARは、ITAM（チロシン残基に基づく免疫レセプタ活性化パターン）を含んでいない。

【0012】

MHCの分子に対する活性化レセプタであり、IgSF（免疫グロブリンの上科）すなわち、それ自体ITIMもITAMも有さず膜内外荷電アミノ酸（リシン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸）を有するITIM阻害性レセプタの対応物である活性化レセプタの一員であるKARについて観察された状況は、その他のタイプのレセプタについても観察することができる。かくして、（レクチンタイプのものであり、かつその阻害性対応物がNKG2A/Bである）NKG2C/DのようなMHCの分子についての活性化レセプタ（又は少なくとも非阻害性レセプタ）のみならず、そのリガンドがなおも未知である、造血細胞及び非造血性細胞（SIRP）についてか又はB細胞、マクロファージ及び樹枝状細胞（ILT1）について記述されたSIRP及びILT1のようなその他の非阻害性レセプタについても同様のことがいえる。

【0013】

KARは、特にクラスIのMHCの分子について、自律性レセプタとして機能することができる。かくして、標的細胞の表面上で発現されたクラスIのMHCの分子とKARの係合が、細胞質内Ca²⁺の可動化及び標的細胞の溶解の誘発から実証されたようにリンパ球活性化プログラムを開始することがわかっている。

【0014】

MHC分子に対するその自律性レセプタの機能の他に、KARは同様に、レセプタTCR及びRfcのためのコレセプタ機能をも果たすことができる（非特許文献1、2）。

【0015】

実際、CD16（Rfc III）のようなレセプタによる免疫グロブリンG（IgG）の定常フラグメント（Fc）の認識の際及びクラスI又はIIのMHCの分子により制限された複合体CD3/TCRによる抗原の認識の際には、KARはコレセプタの役目を果たし、かくして特に少量の抗原に直面して、細胞応答の強度を増大し、経時的細胞応答を維持し、同様に細胞増殖の刺激のために共働することができる。

【0016】

NK及びTリンパ球下位母集団上で天然に発現されるKARの役目は、その固有のリガ

10

20

30

40

50

ンドすなわちクラス I の M H C の分子により制限されず、免疫系全般の平衡にまで拡大されている。

【 0 0 1 7 】

かくして天然に発現された K A R の機能は、N K 及び T 細胞の増殖、かかる細胞によるサイトカインタイプの物質の産生、有害な、悪性の又はウイルス感染を受けた自己由来細胞、同種異系細胞のような標的細胞の分解のみならず、或る種の抗原に直面した免疫系の寛容に対し影響を及ぼす。

【 0 0 1 8 】

従って、K A R の全ての無機能又は機能不全は、全て免疫系の機能に関連する、例えば免疫不全疾患、自己免疫疾患（例えば多発性硬化症）、腫瘍、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、アレルギー、移植片拒絶のような、さまざまな疾病又は望ましくない反応を導く可能性がある。例えば、ヒトが K A R を発現するリンパ球を平均して 1 0 % 未満しか有していないとすると、L D G L（顆粒リンパ球増殖病）にかかった患者のリンパ球のほぼ全ては K A R を発現する。

【非特許文献 1】マンデルボイム・オー（Mandelboim O）ら著、「Science」、1996 年、第 274 巻、p. 2097

【非特許文献 2】カムビアッジ・エイ（Cambiaggi A.）ら著、「Blood」、1996 年、第 87 巻、p. 2369

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 9 】

本発明の目的は、K A R のようなクラス I の M H C の分子についての活性化レセプタの異常な又は望ましくない機能を診断しその機能を制御することを可能にする手段を提供することにある。

【 0 0 2 0 】

かくして、本発明は、K A R に由来するシグナルの形質導入に必要な、以下 K A R A P（K A R 会合タンパク質）と呼ばれる新しいポリペプチド、ならびに、これらの新しいポリペプチドから得られた抗体及び核酸を目的とする。本発明は同様に、前記新しいポリペプチドの獲得方法ならびにその生物学的応用をもその目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 1 】

「K A R レセプタ」というのは、本明細書においては、K A R p 5 0 レセプタ（K I R II D S 1 ~ K I R II D S 5）のような K I R レセプタの非阻害性対応物である免疫グロブリンタイプのヒトレセプタ、K I R III D S 1、ならびにこれらの K A R レセプタに類似する構造をもつ非阻害性のあらゆるレセプタ、特に（N K 細胞及び T 細胞上で天然に発現されている）N K G 2 C、N K G 2 D のようなレクチンタイプのヒトレセプタ、（骨髄性細胞、B 細胞上で天然に発現されている）p i r A のような免疫グロブリンタイプのマウスレセプタ、（マスト細胞上で天然に発現されている）g p 4 9 A、（N K 及び T 細胞上で天然に発現されている）L y 4 9 D、L y 4 9 H のようなレクチンタイプのマウスレセプタを意味している。

【 0 0 2 2 】

従って、K A R A P ポリペプチドというものは、それが無い状態では前記 K A R レセプタが天然に、検出可能な活性化シグナルを形質導入する能力をもたないような、単離された全てのポリペプチド（K A R 以外）のことを意味している。これにより、決定された K A R A P ポリペプチドが以上のような K A R レセプタのみならず、上述のような K A R の構造に近い構造をもつ活性化又は非阻害性のその他の単量体レセプタにも、そして特に、I L T 1 のような L I R / M I R / I L T 系統群の免疫グロブリンタイプのヒト活性化レセプタにも会合（associate）されうるという事実が排除されることはない。

【 0 0 2 3 】

本出願においては、「ポリペプチド」という語は、前記ポリペプチドのみならず、アミ

10

20

30

40

50

ノ酸の保存的欠失、挿入、逆位又は置換によって得られるようなこのポリペプチドの相同体及び、プロテアーゼを用いて前記ポリペプチドの加水分解によって得られるようなこのポリペプチドのフラグメントをも含んでおり、これらの相同体又はフラグメントは、KARに由来するシグナルを形質導入する能力をもつ。この「ポリペプチド」という語は、本出願において、ポリペプチドと同様タンパク質をも網羅する。

【0024】

本発明に従ったポリペプチドは、KARレセプタにより受理されたシグナルの形質導入に必要なものである：従って、これは、KAR活性化不足の回復を可能にする単離されたタンパク質である。一定の与えられた単離されたポリペプチドが、KAR活性化不足の回復を可能にするか否かを決定するためには、当業者は、このポリペプチドの不在で適切な細胞によりそれが発現される場合でも、検出可能な活性化シグナルを形質導入するには至らず、又は目的とされている利用分野にとって満足のいく活性化シグナルを形質導入するには至らないKARレセプタが存在することを示すことにより作業を進めることができる。この決定の1実施形態が、KARp50.2レセプタのみを発現するRBL-2H3細胞の活性化能力（セロトニンの塩析）及びKARp50.2レセプタとそのKARAPポリペプチドを同時に発現するRBL-2H3細胞の能力の間での比較により後述の実施例3において提示されている。適切な細胞の例が、後の図5に示されている。

10

【0025】

「回復されたKAR活性化不足(deficient)」というのは、有意な活性化シグナルの前記KARによる細胞での形質導入が可能であるか場合によっては充分であることを意味する。このことは、特に抗体による細胞刺激を用いてテストされうる。

20

【0026】

細胞レベルで、KARに由来するシグナルが形質導入されているか否かを決定するため、及び、かかるシグナルが刺激されているか又は阻害されているかを決定するために、当業者は数多くの手段を利用することができる。のような手段の例としては、リガンドによる前記KARの刺激及び、分泌されたサイトカイン（例えば、Cambiaggi et al., 1996, Blood 87:2369参照）、細胞増殖（例えばMandelboim et al., 1996年、Science 274:2097参照）、細胞毒性（例えば後で記述する再誘導された細胞毒性テスト参照）、細胞質内カルシウム可動化（例えばBlery et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 8989-8996参照）、及び/又はリン酸化の誘発（例えばVivier et al., 1991, J. Immunol. 146:206参照）の測定が含まれる。

30

【0027】

本発明に従ったポリペプチドはさらに、KARには会合するもののこのKARの阻害性対応物には会合しないという能力をもつことを特徴とする。

【0028】

1つのポリペプチドがKARに会合するもののこのKARの阻害性対応物には会合しない（すなわち対応するKIRレセプタに会合しない）能力をもつか否かの決定を可能にする方法は、当業者には周知のものである。かかる方法の一例には、特に次の段階が含まれる：

- 一方ではKAR⁺KIR⁻細胞に、そして他方ではKAR⁻KIR⁺細胞にこのポリペプチドを発現させる段階；
- 少なくとも抗KAR及び/又は抗KIR抗体を用いてこれらの細胞の溶解産物から単数又は複数のポリペプチド分画を免疫沈降させる段階；
- KAR⁺KIR⁻細胞に由来する単数又は複数の分画内での前記ポリペプチドの存在及び、KAR⁻KIR⁺細胞に由来する単数又は複数の分画内でのこの同じポリペプチドの不存在を観察する段階。抗KIR及び/又は抗KAR抗体の例としては、抗CD158固体、抗p70/NKB1抗体、抗P140抗体そしてより特定的にはEB6, GL183又はPAX250モノクローナル抗体が含まれる。細胞によりこのようなポリペプチドを発現させることを可能にする方法が、後述の実施例3で示されている。

40

【0029】

50

なお本発明に従ったK A R A Pポリペプチドは、

- i. 抗C D 1 5 8, 抗P 7 0 / N K B 1, 抗P 1 4 0抗体のような単数又は複数の抗K I R及び/又は抗K A R抗体, より特定的には、モノクローナル抗体E B 6, G L 1 8 3又はP A X 2 5 0を用いて活性化シグナルを形質導入する能力をもつK A Rレセプタを発現する細胞溶解産物の単数又は複数のポリペプチド分画の免疫沈降により得られ、
- ii. 各ポリペプチド分画は、任意には、これより以前に抗C D 3 及び/又は抗F c R I を用いた免疫沈降された分画の除去により枯渇され得及び/又は新たに抗C D 1 5 8, 抗P 7 0 / N K B 1, 抗P 1 4 0抗体のような単数又は複数の抗K I R及び/又は抗K A R抗体、そしてより特定的にはモノクローナル抗体E B 6, G L 1 8 3又はP A X 2 5 0を用いて免疫沈降され得、
- iii. その分子量に従った前記単数又は複数のポリペプチド分画のポリペプチドの分解及び約1 2 ± 2 k D aの分子量に対応するポリペプチドの回収によってか又は、

前記単数又は複数のポリペプチド分画をキナーゼ試験に付した後その分子量に従って前記単数又は複数のポリペプチド分画を分解し、約1 2, 1 4及び/又は1 6 ± 2 k D aの分子量に対応するリン酸化されたポリペプチドを回収することによっても得られるものであることを特徴とする。

【0030】

活性化シグナルを形質導入する能力をもつK A Rレセプタを発現する前記細胞は、特に、NK細胞及び/又はT細胞及び/又は骨髄性細胞及び/又はB細胞及び/又はマスト細胞でありうる。K A Rが、細胞においてシグナルを形質導入する能力を有するか否かを決定する方法が以上で示された。

【0031】

本発明に従ったK A R A Pポリペプチドはさらに、そのアミノ酸配列が、

- リン酸化可能なチロシンアミノ酸を少なくとも1つ有し、
- 約1 0 ± 2 から1 6 ± 2 k D aの間に含まれる分子質量(特に1 0 ± 2 k D aの実際の分子質量、リン酸化の程度に応じて1 2 ± 2 ~ 1 6 ± 2 k D aの変性条件下でのポリアクリルアミドゲル上の見かけの分子質量)を有することを特徴とする。

【0032】

さらにこのポリペプチドは、そのアミノ酸配列が細胞質内領域において少なくとも1つのI T A M Y x x L / I x 6 - 8 Y x x L / Iパターンを有することを特徴とする。

【0033】

本発明の1態様に従うと、K A R A Pポリペプチドのアミノ酸配列は、細胞質外領域、膜内外領域及び/又は細胞質内領域を含む。特徴的には、この細胞質内領域は、このポリペプチドの配列その他の領域との関係において大半を占めている。細胞質外、膜内外、細胞質内領域を同定するための手段は、当業者には既知のものである(例えば、水治療法アルゴリズム、逆小胞形成)。

【0034】

本発明のもう1つの態様に従うと、K A R A Pポリペプチドのアミノ酸配列は、細胞質外システインアミノ酸を少なくとも1つ有する。

【0035】

本発明のさらにもう1つの態様に従うと、K A R A Pポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも1つの膜内外荷電アミノ酸(R, K, D, E)を有する。

【0036】

本発明に従ったポリペプチドは、少なくとも1つのチロシンのレベルでリン酸化されてもよいし、或いは又リン酸化されなくてもよい。

【0037】

本発明に従った一実施形態においては、前記ポリペプチドは、ジスルフィド架橋により結合された2量体の形を有している。これらは、クラスIのM H Cの分子のための自律的レセプタとしてか又はC D 1 6のようなR F c又はT C Rのコレセプタとして機能するK A Rに対し、選択的かつ非共有結合的に会合させられる。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明の有利な一形態に従うと、K A R A Pポリペプチドは、Z A P - 7 0 , P 7 2 ^S Y K , P 5 6 ^{I C K} , P 5 9 ^{f y n} , P 6 0 ^{l y n} , G r b - 2 , P P 3 6 - 3 8 (l a t) , P L C - 1 , P 8 5 (P I - 3 キナーゼ) , S h c のようなドメイン S H 2 をもつ分子、又は S h c のようなドメイン P T B (ホスホチロシン結合) をもつ分子に結合される能力をもつ。かかる結合は、本発明のポリペプチドをドメイン S H 2 又は P T B をもつ分子と共にインキュベートしプラズモン共鳴を測定することによって観察できる (Olcese et al., 1996, The Journal of Immunology 156: 4531 ~ 4534)。

【0039】

本発明に従った特定の K A R A P ポリペプチドは、基本的に配列番号 2 により構成されたアミノ酸配列を有する。本発明は、同様に、その配列が基本的に配列番号 2 の細胞質外部分つまり配列番号 3 によってか又は配列番号 2 の膜内外部分つまり配列番号 4 , 又は配列番号 2 の細胞質内部分つまり配列番号 5 によって構成されているポリペプチドをも目的としている。本発明に従ったその他の特別な K A R A P ポリペプチドは、基本的に配列番号 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 7 (マウス C 5 7 B 1 / 6 の K A R A P タンパク質のコンセンサス配列) 又は配列番号 2 8 (ゲノミック配列から得られるマウス 1 2 9 の K A R A P のタンパク質配列) によって構成されている。

【0040】

かかるポリペプチドは同様に、配列決定の後、化学的合成又は組換え型 D N A 技術を用いて得ることもできる。

【0041】

前記 K A R A P ポリペプチドは、細胞質内 I T A M も I T I M も有していないものの膜内外アミノ酸残基を有する活性化レセプタ K A R に由来するシグナルの形質導入に必要なものである。

【0042】

有利な配置に従うと、本発明に従ったポリペプチドは、グリコシル化、リン酸化、スルホン化、ピオチニル化、アシル化、エステル化；ホスホン酸塩のようなリン酸塩基のものに近い分子形態をもつ実体の添加、置換又は抑制；ルシフェラーゼ、G F P (Green Fluorescence Protein) 又はその類似体のような標識付け試薬の添加；親和性リガンドのような精製用標的の添加；その可溶性を修正する実体の添加；によって修飾される。特に有利な修飾としては、受理したシグナルを形質導入するその能力を阻止又は阻害するような形で前記ポリペプチドを修飾するものが含まれる (負のトランス優性形質の戦略) 。このように修飾された形をした本発明に従ったポリペプチドは、特に、一定の与えられた免疫応答特に望ましくない又は異常な免疫応答 (例えば自己免疫疾患、アレルギー、移植片拒絶) を負に変調させる (阻害する) ことを目的とする全ての組成物又は方法において利用される。このように適切な修飾としては、前記ポリペプチドのチロシン上でのリン酸化を生物学的条件下で加水分解不能にする (例えばホスホン酸塩の添加により) ような修飾が含まれる。この修飾には同様に、本発明に従ったポリペプチドの機能にとって重要なアミノ酸残基を非機能的にする修飾も含まれる。これは例えば特に I T A M パターン内に含まれるチロシン残基のようなチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) に置換又は突然変異させることによる。これにより、こうして修飾された前記ポリペプチドの、ドメイン S H 2 又は P T B をもつタンパク質に対する結合が妨げられる。

【0043】

もう1つの有利な措置に従うと、本発明のポリペプチド、そのフラグメント、相同体又は修飾された形態は、細胞膜すなわち脂質 2 層を横断する能力をもつ。

【0044】

本発明は同様に、本発明に従った K A R A P ポリペプチドからの免疫誘発によって得られる、又はかかるポリペプチドのフラグメント、相同体又は修飾された形態から得られるような抗体特にモノクローナル抗体及びかかる抗体のフラグメント特にフラグメント F c , F v , F a b , F (a b) ' 2 , C D R をも目的としている。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

本発明の目的は特に、その配列が基本的に本発明に従ったかかる K A R A P ポリペプチドの細胞質外、細胞質内又は膜内外部分によって構成されているポリペプチドから免疫誘発によって得られるような、かかる抗体のフラグメント特にフラグメント、F c , F v , Fab , F (ab)'₂ , C D R にある。本発明は特に、抗原抗体タイプの反応に従って配列番号 2 , 配列番号 3 , 配列番号 4 , 配列番号 5 , 配列番号 1 1 , 配列番号 1 2 , 配列番号 1 3 , 配列番号 1 4 , 配列番号 1 5 , 配列番号 1 7 及び/又は配列番号 2 8 を認識する能力をもつような抗体、ならびにそのフラグメントを目的とする。

【 0 0 4 6 】

かかる抗体は、基本的に電気泳動バンドの溶出、化学的合成又は可溶性融合タンパク質技術 (G S T) により得られ、任意には卵白アルブミンのような免疫原に結合された、本発明に従ったポリペプチド、フラグメント、相同体又は修飾形態に対して、ウサギ及びマウスのような動物を免疫化することによって得られる。

10

【 0 0 4 7 】

このときモノクローナル抗体は、免疫脾細胞のハイブリドーマ融合、スクリーニング及び培養上清の精製によって産生される (Kohler et Milstein, 1 9 7 5 , Nature 2 5 6 , 4 9 5 - 4 9 7 ; 抗体, その実験室マニュアル, 1 9 8 8 , Harlow 及び David Lane, Ed, Cold Spring Harbor laboratory) 。

【 0 0 4 8 】

これらの抗体から、標準的な手順に従ってジ抗体を生成することができる。前記フラグメントは、必要とあらばヒト化構造に挿入又は移植することができる。

20

【 0 0 4 9 】

本発明は同様に、本発明に従ったポリペプチド、フラグメント又は相同体のアミノ酸配列の世界遺伝子コードに従いこのコードの縮重を考慮に入れた読取り枠読取りに対応する 1 つの配列ならびにかかる核酸と 6 0 % 以上の相同性を有しかつ上述のような K A R に由来する活性化シグナルの形質導入分子についてコードすることのできる変異体をも目的としている。本発明は、特に、その D N A が基本的に配列番号 1 (配列番号 2 の配列の成熟 K A R A P タンパク質の c D N A) , 配列番号 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 6 (C 5 7 B 1 / 6 マウスの K A R A P のコンセンサス c D N A 配列) , 配列番号 2 7 (ゲノミック配列から得られた 1 2 9 マウスの K A R A P の c D N A) , 配列番号 1 8 (1 2 9 マウスの K A R A P のゲノミック配列) 、又は配列番号 3 1 (ヒト K A R A P の c D N A 配列) によって、又はこれらの配列の細胞質外、細胞質内及び/又は膜内外領域に対応するあらゆる部分、又はこれらの配列のエキソン又はイントロンに対応するあらゆる部分によって構成されているようなあらゆる核酸をも目的としている。

30

【 0 0 5 0 】

本発明は同様に、以下の段階を含む本発明に従ったポリペプチドの獲得方法をも目的としている：

- i . 抗 C D 1 5 8 , 抗 P 7 0 / N K B 1 , 抗 P 1 4 0 抗体のような単数又は複数の抗 K I R 及び/又は抗 K A R 抗体、より特定的には、モノクローナル抗体 E B 6 , G L 1 8 3 又は P A X 2 5 0 を用いて機能的 K A R レセプタを発現する細胞 (例えば N K 細胞及び/又は T 細胞及び/又は骨髄性細胞及び/又は B 細胞及び/又はマスト細胞) の溶解産物の単数又は複数のポリペプチド分画を免疫沈降する段階、
- ii . 各ポリペプチド分画は、任意には (場合によっては) 、これより以前に抗 C D 3 及び/又は抗 F c R I I を用いた免疫沈降された分画の除去により枯渇され得及び/又は新たに抗 C D 1 5 8 , 抗 P 7 0 / N K B 1 , 抗 P 1 4 0 抗体のような単数又は複数の抗 K I R 及び/又は抗 K A R 抗体、そしてより特定的にはモノクローナル抗体 E B 6 , G L 1 8 3 又は P A X 2 5 0 を用いて免疫沈降され得る、
- iii . その分子量に従って前記単数又は複数のポリペプチド分画のポリペプチドを分離し約 1 2 ± 2 k D a の分子量に対応するポリペプチドの回収するか、又は

40

前記単数又は複数のポリペプチド分画をキナーゼ試験に付した後その分子量に従って前

50

記単数又は複数のポリペプチド分画を分離し、約 12, 14 及び/又は 16 ± 2 kDa の分子量に対応するリン酸化されたポリペプチドを回収する段階。

【0051】

本出願は同様に、本発明に従った特殊な K A R A P ポリペプチド配列を得るための方法をも目的としている。後述の実施例 2 でその一例を記述する（生物情報処理戦略）この方法は、特に、ポリペプチド配列のうち以下の基準を満たすもののスクリーニングを含んで成る：

- リン酸化可能なチロシンアミノ酸を少なくとも 1 つ有する、
- 5 から 25 kDa の間の分子質量を有する、
- 細胞質外領域、膜内外領域及び細胞質内領域を有する、
- その細胞質外領域内にシステインアミノ酸を少なくとも 1 つ有する。

10

【0052】

- その膜内外領域内に荷電アミノ酸（R, K, D, E）を少なくとも 1 つ有する、及び

- その細胞質内領域内に I T A M YxxL / Ix6-8YxxL / I パターンを少なくとも 1 つ有する、

- 選択された配列に対応するポリペプチドは、前述のように、K A R に会合しかつ対応する阻害性対応物レセプタ（K I R）には会合しないという能力をもたなくてはならない。

20

【0053】

本出願は同様に、候補ポリペプチドが本発明に従った K A R A P ポリペプチドに対応するか否かを決定する又は制御するための方法をもその目的としている。かかる方法の一例は、後述の実施例 2 に示されている。かかる方法は、この候補ポリペプチドの特徴的部分（例えば少なくとも 1 つの I T A M パターン又は細胞質外領域を含む細胞質内領域）に対する抗体を産生すること及び 1 つの細胞上で機能的に発現された場合に前記抗体により抗原抗体タイプの反応に従って認識済みの要素に会合された状態となっている K A R レセプタが存在するか否かを確認することから成る。

【0054】

本発明に従ったこの K A R A P ポリペプチド同定方法は、かくして特に、

- 候補ポリペプチド、特にこの候補ポリペプチドの細胞質外領域及び/又は少なくとも 1 つの I T A M パターンを含む領域に対して導かれたモノ又はポリクローナル抗体（例えば、以上で同定された配列番号 2 のマウス K A R A P タンパク質の場合には配列番号 2 の細胞質外部分（配列番号 3）又は細胞質内部分（配列番号 5）の領域に対し導かれた抗体を産生すること、

- 抗原 - 抗体タイプの結合反応を可能にする穏やかな条件下で候補ポリペプチドが K A R A P を構成すると想定されている対象の活性化又は非阻害性レセプタを、1 つの機能的形態にて有する細胞の溶解産物と、この抗体を接触させること、

- 場合によって形成される反応産物の中に、前記活性化又は非阻害性レセプタのものに近い見かけの分子質量（K A R p 50 については約 50 kDa）をもつ産物及び候補ポリペプチドのものに近い見かけの分子質量（特に約 10 ~ 16 kDa の間）をもつ産物が存在する場合に、本発明に従った K A R A P ポリペプチドであるものとしてその候補ポリペプチドを同定すること、

から成る。

30

40

【0055】

本発明に従ったこの同定方法は特に、

- 上述の通りに前記抗体を接触させ、

- 分子複合体を保存する洗剤の穏やかな条件下で（例えば 1 % のジギトニン、上述の実施例 1 参照）、場合によって形成された反応産物を沈降させ、

- 例えば、変性条件内でポリアクリルアミドゲル上の分子質量マーカーの存在下での電気泳動遊走により、沈降された産物の分子質量を測定し、

50

- 上述のとおりの本発明に従ったK A R A Pポリペプチドであるものとして候補ポリペプチドを同定することによって実施することができる。

【0056】

本発明は同様に、薬学的に受容可能なビヒクルと会合した(組み合わせた)形で、本発明に従った少なくとも1つのポリペプチド, K A R A P, フラグメント, 相同体又は修飾された形態、本発明に従った少なくとも1つの抗体又は抗体フラグメント又は、本発明に従った少なくとも1つの核酸又は核酸変異体を有効量含んで成る薬学組成物にも関する。

【0057】

本発明に従った薬学組成物は、経口投与、非経口投与、局所施用、腔内投与、直腸内投与又は経口及び/又は経鼻吸入のため、固体、液体の形又は懸濁液の形で製剤することができる。

【0058】

本発明に従った前記薬学組成物は、K A Rの活性を変調させることを目的とする。K A Rの活性を刺激するためには、前記薬学組成物は、例えば、脂質2層を横断する能力をもつ本発明に従った変異体であるポリペプチド, フラグメント, 相同体又は核酸のような、前記K A Rに由来するシグナルの形質導入を容易にする作用物質を含むことになる。K A Rの活性を阻害するため、前記薬学組成物は、細胞のK A R A Pを遮断するような形で脂質2層を横断する能力をもつ本発明に従った抗体フラグメント, 又は、SH2 (Z A P - 70, P 72^{S Y K}) 又はP T Bドメインをもつタンパク質又は前記K A Rの活性化のあらゆるアダプタ又はエフェクタ分子を遮断するような形で生物学的条件下で加水分解不能のリン酸などでリン酸化された又はされていない本発明に従った修飾済みポリペプチドのような、前記K A R由来のシグナルの形質導入を遮断する作用物質を含むことになる。かかる修飾は、特にリン酸塩基の添加及び/又は少なくとも1つのチロシン残基(Y)のフェニルアラニン残基(F)への突然変異を含む。

【0059】

従って、本出願は、免疫反応に関与する細胞の異常な又は望ましくない機能の予防、一時的緩和、及び/又は治療を目的とする組成物を目的とする。かかる組成物は、有利には本発明に従ったポリペプチド又は場合によっては修飾済みポリペプチドを含んで成る。

【0060】

細胞のレベルで、K A Rに由来するシグナルが翻訳されたか否かを決定するため及びかかるシグナルが刺激又は阻害されたか否かを決定するため、当業者は数多くの手段を利用することができる。かかる手段の例が以上で示されてきた。

【0061】

診断用作用物質としての前記ポリペプチド, 抗体及び核酸の利用も又、本発明の範囲内に入る(診断方法及びその利用を可能にする診断用キット)。

【0062】

本発明は同様に、以下の段階を含む細胞の異常な又は望ましくない機能のインビトロ診断方法をも目的としている。

【0063】

- 少なくとも1つの細胞又は細胞抽出物を、本発明に従った抗体又はそのフラグメント, 又は本発明に従った核酸又はその変異体を接触させる段階、及び
- 場合によって形成された反応産物の存在を明らかにする段階。

【0064】

接触段階は、E L I S A (酵素結合免疫吸着検定法)のような抗原抗体タイプの反応、又は核酸ハイブリダイゼーションタイプの反応及びP C R (ポリメラーゼ連鎖増幅)の樹立を可能にする、特に接続時間、温度、緩衝液、場合によってはゲル網状化の条件の中で実施される。

【0065】

場合によって形成される反応産物を明らかにするためには、蛍光マーカー、酵素マーカー

10

20

30

40

50

一、放射性マーカー、又は発光マーカーを利用することができる。

【0066】

本発明に従った前記インビトロ診断方法は、免疫増殖疾患、HIV疾患のような免疫不全疾患、顆粒リンパ球増殖疾患のようなガン、リウマチ様多発性関節炎のような自己免疫疾患、マラリアのような感染性疾患、アレルギー応答、移植片拒絶の形で現われうる異常な又は望ましくない細胞機能の診断を可能にする。

【0067】

本発明は同様に、KARの活性化のアダプタまたはエフェクタ分子の同定方法及び、KARの活性化の結果としての細胞活性を変調させる能力をもつ分子の同定方法にも関する。

10

【0068】

本発明に従ったKARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子の前記同定方法は、次の段階を含んで成る：

- i. 本発明に従ったポリペプチド（又はそのフラグメント又はその相同体）と候補分子を接触させる段階、及び
- ii. 前記ポリペプチド（又はそのフラグメント）に対する結合が観察される候補分子を選択する段階。

【0069】

KARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子である可能性のある候補分子は、例えばSH2又はPTBドメインをもつ分子の中から選択することができる。これらの分子は、可溶性組換え型形態を有することができる。

20

【0070】

接触段階は例えば、KARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子である可能性のある可溶性組換え型形態で得られた候補分子を、シンチレーション液の球のような放射能測定を可能にする球にカップリングさせること及び前記球上にトリチウム標識づけされた形の本発明に従ったポリペプチド（又はそのフラグメント又は相同体）を通過させることによって実施することができる。このとき、候補分子のうち、放射能測定（cpm）によって前記ポリペプチド、フラグメント又は相同体に対するその結合が観察された候補分子が選定される。

【0071】

接触段階は同様に、マイクロ支持体BIAcore(Pharmacia)のようなプラズモン共鳴の測定を可能にするマイクロ担体上の本発明に従ったポリペプチド（又はそのフラグメント又はその相同体）の不動化によって（例えば、Olcese et al., 1996, The Journal of Immunology 156: 4531 - 4534; Vely et al., Immunology Letters 1996, vol. 54, p 145 - 150を参照のこと）又はストレプトタビジン球上でリン酸化及びビオチニル化された本発明に従ったポリペプチドの不動化（Vely et al. Eur. J. Immunol. 1997, 27: 1994 - 2000; Le Drean et al. Eur. J. Immunol. 1998, 28: 264 - 276）によって、及び前記マイクロ支持体上の、KARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子である可能性のある候補分子の通過によっても実施可能である。このとき、プラズモン共鳴の測定（Resonance Unit）により、候補分子のうち、前記ポリペプチド、フラグメント又は相同体に対するその結合が観察された候補分子が選定される。

30

40

【0072】

KARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子のこの同定方法は、その実施様式の如何に関わらず、本発明に従ったKARの活性化の結果としてもたらされる細胞活性を変調させる能力をもつ分子の同定方法の実施における基準として役立つこともできる。

【0073】

本発明に従ったKARの活性化の結果として得られる細胞活性を変調させる能力を有する分子のこの同定方法は、以下の段階を含んで成る：

- i. 上述の本発明に従った方法によって得られるようなKARの活性化のアダプタ又はエ

50

フェクタ分子、及び本発明に従ったポリペプチド（又はそのフラグメント又は相同体）と、候補分子を接触させる段階、及び

ii. 候補分子のうち、かかる候補分子の不存在下で観察されるような前記ポリペプチド（又はそのフラグメント又は相同体）と前記アダプタ又はエフェクタ分子の間の結合に対し効果を及ぼす候補分子を選択する段階。

【0074】

KARの結果得られた細胞活性を変調する可能性のある候補分子は、天然又は合成の化合物バンク、特に化学的又は組合せバンクの中から選択することができる。前記候補分子は、（例えば本発明に従った抗体のような抗イディオタイプ抗体の誘導体又はフラグメント、触媒抗体の誘導体又はフラグメントのような）タンパク質、炭素質、脂質又は核タイプのものでありうる。

10

【0075】

本発明に従ったKARの活性化の結果としての細胞活性を変調させる能力をもつ分子の同定方法の接触段階は、例えば、本発明に従ったポリペプチド（又はそのフラグメント又は相同体）及び本発明に従った方法によって得られるようなKARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子を用いて前記候補分子を、例えば、酵素特性、リン酸化又は自己リン酸化特性のような未結合状態の前記アダプタ又はエフェクタ分子の化学特性に基づいて前記KARの活性化のアダプタ又はエフェクタ分子と前記ポリペプチドの間の結合率を測定することを可能にするような条件下でインキュベートさせることによって実施することができる。

20

【0076】

本発明に従ったKARの活性化の結果として得られる細胞活性を変調させる能力をもつ分子の同定方法の接触段階は、同様に、それぞれ放射能又は候補分子の不存在下又は存在下での前記アダプタ又はエフェクタ分子と前記ポリペプチドの間の結合の結果として得られるプラズモン共鳴を測定することによる、上述のようなシンチレーション液球又はトリチウム標識づけされたポリペプチドタイプの技術又はマイクロ支持体及びプラズモン共鳴の測定タイプの技術を利用することによって実施可能である。このとき、候補分子のうち、これらの分子の不存在下で前記アダプタ又はエフェクタ分子と前記ポリペプチドの間で測定されるコントロール結合率を統計的に有意な形で増大又は減少させる候補分子が選定される。

30

【0077】

本発明に従った方法により同定されるようなKARの活性化を変調させる能力をもつ分子は、それらを生物学的条件下で加水分解不能にするような形で及び/又はそれらが細胞脂質2層を横断しうるような形で、化学的に修飾されうる。

【0078】

本発明に従った、KARの活性化を変調させる能力をもつ分子は、有利には前記KAR APとその細胞エフェクタ又はアダプタの間の相互作用を修飾することによって作用する。

【0079】

このとき、本発明に従ったKARの活性化の結果としての細胞活性を変調させる能力をもつ前記分子は、例えばリガンドとの接触によりそのKARが刺激されたリンパ球のようなインビトロで培養された細胞に対して適用することができる。この適用は、例えば、脂質2層を超えることができるようにする化学的修飾又は電気穿孔法による前記細胞内部への進入によって行なわれる。

40

【0080】

本発明は、いかなる場合であっても制限的なものとみなされてはならない後述の実施例によって例示されている。

【0081】

ここでは、以下の23の図が参考にされている：

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 8 2 】

実施例 1 :

1. 材料と方法モノクローナル抗体 (m A b s) 及び試薬

以下のモノクローナル抗体が利用された :

- J T 3 A (Coulter Immunotech 照会番号 0 1 7 8) , K D 1 (Coulter Immunotech 照会番号 0 8 1 3) 及び T A 1 8 1 , H 1 2 (Coulter Immunotech 照会番号 1 8 4 4) のようなイソタイプ I g G 1 の抗 C D 3 , 抗 C D 1 6 及び抗 C D 5 6 抗体、

- T I A - 2 のような抗 C D 3 抗体 (Coulter Immunotech 6 6 0 4 5 P 2) 、

- 抗 C D 1 5 8 抗体、すなわち E B 6 のような抗 p 5 8 . 1 抗体 (Coulter Immunotech 照会番号 1 8 4 7) 、 G L 1 8 3 のような抗 p 5 8 . 2 抗体 (Coulter Immunotech 照会番号 1 8 4 6) 、 及び Bottino et al. (Eur. J. Immunol. 1 9 9 6 , 2 6 , 1 8 1 6) 内で記述されている P A X 2 5 0 のような抗 p 5 0 . 3 抗体、

- Jouvin M. H. et al. , 1 9 9 4 , J. Biol. Chem. , 2 6 9 , 5 9 1 8 - 5 9 2 5 中に記述された抗血清 6 6 6 のようなウサギ抗 F c R I 抗血清、

- Bociano L. K. et al. , 1 9 8 6 , J. Biol. Biochem. 2 6 1 , 1 1 8 2 3 - 1 1 8 3 1 の中で記述されている抗血清 B C 4 のようなウサギ抗 F c R I 抗血清、

- ワサビペルオキシダーゼに複合されたヤギ抗マウス抗血清 (Sigma A - 2 3 0 4) 及びワサビペルオキシダーゼに複合されたヤギ抗ウサギ抗血清 (Sigma A - 0 5 4 5) ,

- イソチオシアン酸フルオレセイン (Coulter Immunotech 0 8 1 9 F (a b ') ₂) に複合されたヤギ抗マウス免疫グロブリン (Coulter Immunotech 0 8 1 9 F (a b ') ₂) ,

- G L 1 8 3 - フィコエリスリン (G L 1 8 3 - P E) (Coulter Immunotech 2 2 7 8) (E B 6 - フィコエリスリン (E B 6 - P E) モノクローナル抗体 (Coulter-Immunotech 2 2 7 7) 及びヤギ抗マウスフィコエリスリン免疫グロブリン (抗マウス P E) (Coulter Immunotech 0 8 5 5 F (a b ') ₂) 。

【 0 0 8 3 】

溶解緩衝液は、p H 7 . 5 のトリス - H C l 2 5 0 m M ; N a C l 1 5 0 m M ; ジギトニン 1 % ; オルトパナジン酸ナトリウム 1 0 0 μ M ; N a F 1 0 m M ; アプロチニン 2 μ g / m l ; ロイペプチン 2 μ g / m l を含有し、これらの物質は全て、Sigma 社 (U S A , M O , St Louis) から購入された。

【 0 0 8 4 】

キナーゼ緩衝液は、p H 7 . 2 の H e p e s 2 0 m M ; N a C l 1 0 0 m M ; M n C l ₂ 5 m M ; M g C l ₂ 5 m M ; ^{3 2} A T P 1 0 μ C i = 3 7 0 k B q (Amersham, Buckinghamshire, UK) を含有していた。

【 0 0 8 5 】

薄層電気泳動緩衝液 (T L E) は、1 0 % の氷酢酸及び水中 1 % のピリジン ; p H 3 . 5 を含んでいた。

【 0 0 8 6 】

細胞L D G L 患者由来のヒト N K 細胞又は L D G L 細胞

ヒト N K 細胞は、N K 細胞系統 C D 5 6 ⁺ , C D 1 6 ⁺ , C D 3 ⁻ の顆粒リンパ球増殖性疾患 (L D G L , Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes) を患う患者から、ヒト N K 細胞を得た。末梢血リンパ球 (P B L , Peripheral Blood Lymphocyte) を、フィコール/ハイパーク勾配に従った遠心分離により、L D G L を患う患者の血液標本から単離した。次に、これらの L D G L 細胞を、照射された異質遺伝子型栄養細胞及び 1 0 0 U / m l の r I L - 2 の存在下において、1 0 % ウシ胎児血清及び 1 0 μ g / m l のペニシリン - ストレプトマイシンにより、R P M I - 1 6 4 0 培地上で 1 m l につき 1 0 ⁶ 個の細胞の濃度、3 7 ° C の温度で培養した。

【 0 0 8 7 】

トランスフェクションを受けた細胞 R T I I B . p 5 0 . 2 ⁺ の獲得

40

50

K A R p 5 0 . 2 を発現する R B L - 2 H 3 細胞のトランスフェクタント (American Type Culture Collection) (R T I I B . 5 0 . 2 ⁺ 細胞) を、Blery et al., 1997. J. Biol. Chem., 272, 8989 - 8996 に記述された通りに実現した。図 6 は、概略的に、K I R p 5 8 レセプタ (免疫グロブリンタイプの阻害性ヒトレセプタ) 及び K A R p 5 0 (K I R p 5 8 レセプタの非阻害性対応物) の構造を表わしている。

【 0 0 8 8 】

簡単に言うと、利用されている R T I I B 細胞は、マウス C D 3 の完全な細胞質内ドメインに結びつけられたヒト C D 2 5 の完全な膜外及び膜内外ドメインを含むキメラ分子 C D 2 5 / C D 3 及びマウス F c R I I b 2 レセプタを発現するような形でトランスフェクションを受けた R B L - 2 H 3 細胞であるものとして従来記述されてきた細胞である。

10

【 0 0 8 9 】

これらの R T I I B 細胞は、さらに、発現ベクター R S V - 5 g p t 上に支持された (p 5 0 . 2 8 3 についてコードする) c D N A 1 8 3 . A c t ² の電気穿孔法によるトランスフェクションを受けた。

【 0 0 9 0 】

安定したトランスフェクション済みの R T I I B . p 5 0 . 2 ⁺ 細胞は、キサンチン (2 5 0 μ g / l) , ハイポキサンチン (1 3 . 6 μ g / l) 及びマイコフェノール酸 (2 μ g / l) の存在下での培養により樹立された。

【 0 0 9 1 】

細胞溶解試験

I L - 2 上で培養された L D G L 細胞の細胞溶解活性は、抗 C D 1 6 , 抗 C D 1 5 8 及び抗 C D 5 6 m A b s の不存在下又は存在下で、P 8 1 5 マウス細胞系統 (American Type Culture Collection) との関係において測定された。

20

【 0 0 9 2 】

簡単に言うと、⁵¹Cr で標識づけされた 5×10^3 個の標的細胞を、4 時間、⁵¹Cr の標準遊離試験の開始時点でハイブリドーマの上清モノクローナル抗体 5 0 μ l の存在下でエフェクタ細胞の連続希釈液に添加した (Vivier E. et al., 1991. J. Immunol. 146 : 206) 。

【 0 0 9 3 】

放射性ヨウ化

P B S (リン酸ナトリウム緩衝液) の中で 0 . 5 % のホルムアルデヒドに細胞 ($10 - 50 \times 10^6$) を固定し、その後、Anderson P. et al., 1989, J. Immunol. 143 : 1899) によって記述されたようにラクトペルオキシダーゼ (¹²⁵I , NEN-Dupont Wilmington, DE, USA) を触媒としたヨウ化に先立って、P B S 中で 3 0 μ g / m l のジギトニンを用いて 5 分間、これに透過性を付与した。

30

【 0 0 9 4 】

細胞を、ジギトニン入り溶解緩衝液中で 4 で 3 0 分間、溶解させた。このとき、予め精製した核後上清を、S 4 B - セファローズ球 (Pharmacia, Piscataway, NJ. USA) を被覆する特異的抗体を用いて免疫沈降させた (Vivier E. et al., 1991, J. Immunol. 146 : 206) 。免疫沈降物を、S D S - P A G E (ドデシル硫酸ナトリウム及びゲル上の電気泳動によるタンパク質の分解) 及びオートラジオグラフィによって分析した。

40

【 0 0 9 5 】

インビトロキナーゼ試験

1 m l の溶解緩衝液 (試薬参照) の中に細胞 (試料 1 個あたり 10×10^6 個) を溶解させた。予備精製した核後上清を、C n B r (Pharmacia) により活性化させたセファローズ 4 B に共有結合させたモノクローナル抗体を利用して 2 ~ 3 時間免疫沈降させた。溶解緩衝液中で、免疫複合体を 3 回洗浄し、そのとき 4 0 μ l のキナーゼ緩衝液 (試薬参照) を 3 7 で 1 0 分間、免疫沈降物に添加した。試料 - S D S 還元緩衝液を添加することによってキナーゼ反応を停止させた。S D S - P A G E による分析及びオートラジオグラフィに先立ち、試料を沸とうさせた。いくつかの実験において、試料を 2 次元非変性/変性

50

対角線 SDS - PAGE により分析した。

【0096】

KARAP のリン酸化の分析

インビトロでのキナーゼ試験及び SDS - PAGE による分離の後、リン酸化したタンパク質を乾燥したゲルから切除し、Centrilutor (Amicon) 又は PBS (リン酸ナトリウム緩衝液) 中 0.1% の SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液を利用して溶出させた。溶出したタンパク質を、90 分間 110 での 200 μ l の HCl 5.7 M 中のインキュベーションに先立ち、2 時間 4 で 20% のトリクロロ酢酸中で沈降させた。個々のアミノ酸を次に乾燥させ、標準レフェレンスとして標識づけされていないホスホチロシン、ホスホトレオニン、ホスホセリン (Sigma) の各々を 5 μ g を含む TLE 緩衝液 (試薬) 5 μ l 中で再び懸濁させた。セルロースプレート (DC - セルロース 100 - μ m) 上に試料を被着させ、Multiphor II (pharmacia) 上で 4 で 45 分間 1500 V で遊走させた。アセトン及び ³²P で標識づけされたアミノ酸の中で 1% のニンヒドリンを用いて標準レフェレンスを開発した。

10

【0097】

免疫トランスファによる分析

免疫沈降物を SDS - PAGE により分解させ、ニトロセルロースフィルタ上に移し、脱脂粉乳 5% の PBS 溶液中で希釈された抗 CD3 又は抗 FC RI 抗体プローブに対峙させた。ワサビペルオキシターゼ (それぞれ Sigma 照会番号 A - 2304 及び A - 0545) に接合されたやぎ抗マウス又は抗ウサギ抗血清及び Amersham (RPN 2209) によって市販されている ECL 検出システムを用いて免疫トランスファを明らかにした。

20

【0098】

2. 結果

表面表現型

LDGL 患者に由来し、IL - 2 (インタロイキン - 2) 上で培養された NK 細胞の表面表現型を間接的免疫蛍光での FACS can (蛍光により活性化された細胞の選別) により分析した。

【0099】

以下で報告するのは、以下の R.P., D.F. 及び MAL と呼称するこれらの患者のうちの 3 名に関する研究の結果である。

30

【0100】

前記結果は、LDGL (顆粒リンパ球増殖性疾患) 細胞 R.P., D.F. 又は MAL の間接的免疫蛍光 FACS can による分析が示されている図 1A によって例示されている。イソチオシアン酸フルオレセインに接合されたヤギ抗マウス免疫グロブリンが、第 2 段階の試薬として用いられた。各タイプの LDGL (上部水平バンド内に示された分析については LDGL 細胞 R.P., 中央水平バンドの分析については LDGL 細胞 D.F., 下部水平バンドの分析については LDGL 細胞 MAL) 及び受けた治療の各々について (左側に示されたグラフについてはコントロール治療し、左から右へ抗 CD3, 抗 CD16, 抗 CD158 EB6, 抗 CD158 GL183, 抗 CD158 PAX250 という表示されたモノクローナル抗体による治療)、横座標には蛍光強度が、又縦座標には、相対的細胞数が報告されている。

40

【0101】

以下のことが観察できる：

- NK 細胞 R.P., D.F. 及び MAL は全て CD3⁻ 及び CD16⁺ である。

【0102】

- NK 細胞 R.P. は、p50.1⁺, p50.2⁻, p50.3⁻ である。これらは、抗 CD158 EB6 モノクローナル抗体によって認識され、抗 CD158 GL183 及び PAX250 モノクローナル抗体によっては認識されない。

【0103】

50

- NK細胞D.F.は、p50.1⁻、p50.2⁺、p50.3⁻である。これらは、抗CD158GL183モノクローナル抗体によって認識され、抗CD158EB6及びPAX250モノクローナル抗体によって認識されない。

【0104】

- NK細胞MALは、p50.1⁻、p50.2⁻、p50.3⁺である。これらは抗CD158 PAX250モノクローナル抗体によって認識され、抗CD158 EB6及びGL183モノクローナル抗体によつては認識されない。

【0105】

従つて、LDGLを患う3人の患者は、それぞれ抗KIR p58.1 (EB6)、抗KIR p58.2 (GL183)及び抗KAR p50.3 (PAX250)という抗CD158抗体によって認識されるNK細胞のリンパ球増殖を示した。かくして3つのNK細胞グループ、すなわちLDGL R.P細胞、LDGL D.F細胞及びLDGL MAL細胞を定義づけることができた。

10

【0106】

細胞溶解試験

標的細胞Fc R⁺としてP815を利用して再誘導される細胞毒性試験を、NK細胞R.P.p50.1⁺、D.F.p50.2⁺及びMAL.p50.3⁺について実現した。

【0107】

結果は、異なるモノクローナル抗体で再誘導された細胞毒性試験を示す図1Bに例示されている：表示された供与体（左側のR.P.p50.1⁺、中央のD.F.p50.2⁺又は右側のMAL.p50.3⁺）に由来し、IL-2上で培養されたNK細胞がエフェクタ細胞として利用された。試験は、抗体無し（白色円）で、又は抗CD16モノクローナル抗体（黒色三角形）、抗CD56モノクローナル抗体（白色三角形）、抗CD158モノクローナル抗体（R.PについてはEB6、D.FについてはGL183、MALについてはPAX250）（黒色円）の存在下で実施された。横座標には、エフェクタ細胞と標的細胞の比率（E:T比；8:1；4:1；2:1；1:1；0.5:1；0.25:1）が報告されており、縦座標には、特異的溶解百分率（0~120%の目盛）が報告されている。

20

【0108】

再誘導された細胞毒性試験は、KIRレセプタの刺激の際に観察されたものとは対照的に、NK細胞に対する抗CD158抗体の添加が細胞P815の細胞溶解を著しく増大させる（図1B）ということを示している。

30

【0109】

コントロールとして、抗CD16モノクローナル抗体は、イソタイプに適合（match）された抗CD56モノクローナル抗体がいかなる効果ももたないのに対し、抗CD158モノクローナル抗体と類似の要領でP815の自発的細胞溶解を増大させる。

【0110】

従つて、これらのNK細胞は、その表面において、KIRの活性化イソタイプの型タンパク質であるKARを発現する。さらにこれらの結果はcDNA KIR/KARの逆転写酵素を用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖増幅）分析により確認された。

40

【0111】

放射性ヨウ化及び免疫トランスファにより発現されたKARの分析：KARAPの同定LDGL患者由来のNK細胞上で発現されたKARレセプタを、内部放射性ヨウ化とそれに続く免疫沈降によって分析した。

【0112】

結果は図2Aに例示されており、この図では、¹²⁵Iで放射性標識づけされ抗CD158 EB6モノクローナル抗体を用いて免疫沈降され（トラック1）その後抗CD3 / 抗Fc RIモノクローナル抗体を用いて精製され（トラック2~7）、最後に抗CD158 EB6モノクローナル抗体を用いて再度免疫沈降された（トラック8）供与体R

50

. P. (p 5 0 . 1 +) のNK細胞 (10×10^6 細胞/トラック) から実施された、変性条件下で13%のゲル上のSDS-PAGE分析が示されている。

【0113】

同じプロフィールは、供与体D.F. (p 5 0 . 2 +) 及びM.A.L. (p 5 0 . 3 +) を用いて得られた (データ示さず) 。

【0114】

NK細胞の溶解産物から調製された抗CD158抗体の免疫沈降物が、50kDaで観察されたKARに加えて、約 12 ± 1 kDaで遊走するさらに小さい分子質量のバンドを含有することを観察することができる。

【0115】

KIRは、ヒトNK細胞内でポリペプチドCD3 及びFc RI と会合することが示された。抗CD3 及び抗Fc RI 抗体を利用した予備枯渇実験により、KARに会合した約12kDaのバンドがCD3 又はFc RI であるという可能性 (図2A) は無くなっていた。

【0116】

この約 12 ± 1 kDaのバンドに対応するタンパク質集合体を、KARAP (KAR - associated proteins, KARに会合したタンパク質) と命名した。

【0117】

これらの結果は、NK細胞溶解産物から調製した抗CD158 mAbsの免疫沈降物中には、抗CD3 抗体の存在下で反応性あるバンドがごとく存在していないことを明らかにした免疫トランスファ実験になって確認された。

【0118】

抗CD3 抗体の存在下で得られたこれらの結果は、変性条件下での15%のゲル上のSDS-PAGE分解及び抗CD3 モノクローナル抗体プローブ (右側標識付け矢印) を用いたニトロセルロースフィルタのインキュベーションによる、D.F.細胞の完全溶解産物及びかかる溶解産物の免疫沈降物の分析を示す図2Bによって例示されている。D.F.細胞の完全溶解産物 (LCC) を、トラック1にトラックあたり 5×10^6 個の細胞の割合で被着させ、かかる溶解産物の免疫沈降物をトラック2~4にトラックあたり 15×10^6 個の細胞の割合で被着させた。免疫沈降は、コントロールとしてトラック2で抗Fc RI BC4モノクローナル抗体を、トラック3で抗CD16モノクローナル抗体を、そしてトラック4で抗CD158GL183モノクローナル抗体を利用して、D.F.細胞溶解産物について実施された。

【0119】

同じ結果は、抗CD3 mAbを用いて細胞R.P.及びM.A.L.についても得られた。

【0120】

抗Fc RI mAbを用いて得た結果 (データ図示せず) は、同じ確認事実をもたらした。

【0121】

インビトロキナーゼ試験及び薄層電気泳動 (TLE) によるKARAPの分析

抗CD158モノクローナル抗体の免疫沈降物について実施されたインビトロキナーゼ試験は、KARが、NK細胞内で約 14 ± 1 kDaで遊走する低分子量の支配的なリンタンパク質に会合することを明らかにした。

【0122】

結果は、図3Aに例示されている： NK細胞M.A.L.から調製された溶解産物を、インビトロキナーゼ試験に先立ち、表示された抗体 (トラック1では抗Fc RI , トラック2では抗CD16 , トラック3では抗CD158) で免疫沈降させた。リン酸化されたタンパク質を、変性条件下で15%のゲル上でSDS-PAGEにより分離した。

【0123】

これらの結果は、内部ヨウ化によって観察された12kDaのKARAPのリン酸化された形態について予想された分子質量の変化と一致している。その上、NK KAR + 細

10

20

30

40

50

胞から調製された抗CD158mAbsの免疫沈降物は、(図3Aに14kDaでのKARAPの矢印の両側の星印により示された)それぞれ 16 ± 1 kDa及び 12 ± 1 kDaで遊走するその他の2つのホスホ-KARAPを含んでいる。

【0124】

リン酸化されたKARAPの類似したグループとKARの会合は、NK細胞KAR⁺クローンのパネルでも観察され、NK KIR⁺クローンでは見られなかった。16, 14及び12kDaでのホスホ-KARAPの相対的強度はNK細胞の由来に従って変動するということが観察された。

【0125】

リン酸化されたアミノ酸の分析は、14kDaの主要KARAPが主としてチロシン残基レベルでリン酸化されることを明らかにした。

10

【0126】

結果は、図3Cにより例示されている: インビトロキナーゼ試験の後、KARAP(左)及びCD3(右)KARAPバンドを切除し、薄層電気泳動によるリン酸化アミノ酸分析に付した。この実験では、それぞれNK細胞R.Pの溶解産物から調製された抗CD158及び抗CD16モノクローナル抗体の免疫沈降物から、KARAP及びCD3バンドを単離した。

【0127】

それでも、トレオニン残基レベルではなくセリン残基レベルでのリン酸化も検出することができる。コントロールとしてリン酸化アミノ酸分析は、チロシン残基のレベルでのみCD3のリン酸化を確認した。

20

【0128】

KARAP及び活性化シグナルの形質導入(トランスフェクタントKAR⁺)

KIRp58.2とは対照的に、非リンパ球様の細胞系統RBL-2H3のトランスフェクタント内でのKARp50.2の発現は、KARp50.2の活性化機能の再構築を導くものではない。実際、抗CD158抗体により誘発されるRBL-2H3p50.2⁺

細胞トランスフェクタントの刺激は、細胞質内Ca²⁺の検出可能な可動化もセロトニンの検出可能な遊離も全く導かない。驚くべきことに、RBL-2H3p50.2⁺細胞トランスフェクタントから調製された抗CD158モノクローナル抗体の免疫沈降物について実施されたインビトロキナーゼ試験は、検出可能なKARAPを全く内含していな

30

【0129】

結果は、図3Bによって例示されている: RBL-2H3p50.2⁺細胞から調製した溶解産物を、インビトロキナーゼ試験に先立ち、表示された抗体(トラック1では抗CD3, トラック2では抗FcRI, トラック3では抗CD158)で免疫沈降させた。リン酸化タンパク質を、変性条件下で15%のゲル上でのSDS-PAGEにより分離した。

【0130】

RBL-2H3p50.2⁺細胞のトランスフェクタント内でのKARAPに対するKARの会合の欠如は、内部ヨウ化によっても確認された(データ図示せず)。

40

【0131】

従ってKARAPは、選択的にKARに会合し、KARAPに対するKARの会合の欠如は、検出可能な任意の活性化シグナルを形質導入する能力をKARがもたないことと相關される。

【0132】

KAR-KARAP会合(対角線ゲル)

最終的に、抗CD158モノクローナル抗体の免疫沈降物の対角線2次元ゲル上での分析が、対角線ゲルに沿って約16, 14及び12kDaのホスホ-KARAPが減少することを明らかにした。

【0133】

50

結果は図4に例示されている：NK R.P.細胞の溶解産物から調製された抗CD158モノクローナル抗体の免疫沈降物（IP）を、非変性/（水平方向）/変性（垂直方向）条件での2次元13%ゲル上でのSDS-PAGEによる分析に先立ち、インビトロキナーゼ試験に付した。

【0134】

かくしてこれらの結果は、ジスルフィド結合により結合されたKARAP二量体複合体に対しNK細胞内でKARが会合させられるということを表わしている。

【0135】

3. 論述

特にクラスIのMHCの分子についての自律的活性化レセプタ又はTCR（Tリンパ球レセプタ）又はRfc（免疫グロブリン定常フラグメントについてのレセプタ）のコレセプタであるKARは、NK及びT細胞の活性化のための新しい1つの方法を表わしている。

【0136】

本発明者は、KARが実際NK細胞内で、ジスルフィド結合によって結合された二量体の形で会合されたKARAPを介入させる多量体複合体の形に集合させられていることを実証した。

【0137】

放射性ヨウ化による分析が約 12 ± 1 kDaのKARAPを立証したとすると、キナーゼ試験による分析は、約16, 14, 及び 12 ± 1 kDaの3つのホスホ-KARAPを立証した。

【0138】

KARAPに対するKARの会合と、KARの活性化機能の間の相関は、KARAPが、多量体KAR複合体の形質導入サブユニットとして作用することを示唆している。

【0139】

しかしながら、RBL-2H3細胞のトランスフェクタントについて観察されたようなKARAPに対するKARの会合の欠如は、ITAM（チロシン残基に基づく免疫レセプタの活性化パターン）をもつポリペプチドを内含する抗原又は抗体に対する多量体活性化レセプタについて観察されたこととは異なり、細胞表面上のレセプタの発現を妨げるものではない。

【0140】

免疫グロブリンの上科の活性化又は少なくとも非阻害性のその他のレセプタは、KARp50（免疫グロブリンタイプのヒトKAR）すなわち：レクチンタイプのヒトKARレセプタNKG2C/D, 免疫グロブリンタイプのマウスKARレセプタpirA, gp49A, レクチンタイプのマウスKARレセプタLy49D, Ly49Hのみならず、ILT1のようなLIR/MIR/ILT系統群のヒト活性化レセプタと驚くほどの類似性を示している。

【0141】

これらの類似性は、免疫グロブリン上科（IgSF）又はレクチンタイプの活性化又は非阻害性レセプタ又はそれらの阻害性対応物を示している図5によって例示されている。各々のレセプタ対の名称（左から右へ、mPIR-B - mPIR-A, ILT2 - ILT1, SIRP - SIRP, KIR - KAR, FcRIIB - FcRIII, NKG2A/B - NKG2C/D, mL y 49A/B/C/E/F/G/I - mL y 49D/H）の下には、それらを天然に発現する細胞が表示されている。活性化又は非阻害性レセプタは、ITIM（チロシン残基に基づく免疫レセプタ阻害パターン）もITAM（チロシン残基に基づく免疫レセプタ活性化パターン）も有さず、それらの膜内外（TM）ドメイン内に荷電アミノ酸を有する（R = アルギニン、K = リシン、D = アスパラギン酸、E = グルタミン酸）。阻害性対応物（各対の左側要素）は、その細胞質内（IC）部分内にITIMパターンを有する。各々の活性化又は非阻害性レセプタは、細胞質外（EC）レベルで、その阻害性対応物との強い相同性を示す。

10

20

30

40

50

【0142】

実施例 2 :

K A R A P 分子の生化学的特徴づけ (上述の実施例 1 参照) により、我々は、特に以下のようなポリペプチドの主要な同定基準を明確にすることができた：すなわち

- ジスルフィド結合の形成を可能にする、細胞質外システインアミノ酸を有するポリペプチド (図 4 参照) ;
- 約 1 2 ~ 1 6 k D a の間に含まれるみかけの分子質量をもつポリペプチド ;
- リン酸化可能なチロシンアミノ酸を少なくとも 1 つ有するポリペプチド (図 3 C 参照) 。

【0143】

1 2 , 1 4 及び 1 6 k D a において同定された K A R A P 分子の間に存在する強い類似性のため、我々は、これら 3 つの分子形態が、1 2 k D a を超えることのあり得ない分子量をもつ同じ K A R A P ポリペプチドの異なるリン酸化度を表わしているということをも想定した。

【0144】

さらに、K A R A P の主要な特性は、K I R とではなく K A R とのその選択的会合にある。K I R とは異なり K A R は、K A R は膜内外荷電アミノ酸 (リシン : K) を有し、この特殊性は同じく複合体 C D 3 / T C R , B C R , F c R I 及び F c R I I I A (C D 1 6) の中に存在する I T A M をもつポリペプチドの会合に基づくものであることから、我々は、K A R A P が I T A M をもつ膜内外ポリペプチドの系統群の新メンバであることを考慮して我々の K A R A P 遺伝子の同定戦略を方向づけした。これらのポリペプチドは、

- 実際 K A R A P と、同じ特徴を分ち合っている：すなわち、
- ジスルフィド架橋の形成を可能にする細胞質外システインアミノ酸 (C) を有するポリペプチド、
- 2 5 k D a を超えない低分子質量のポリペプチド、
- Y X X L / I X ₆₋₈ Y X X L / I , のような I T A M パターン内に含まれたリン酸化可能なチロシンアミノ酸を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、及び
- 膜内外荷電アミノ酸の存在。

【0145】

かくして、我々は、E S T , G E N B A N K , S W I S S P R O T 及び E M B L のような形で入手可能な公共の c D N A バンクから 1 つの遺伝子を同定する生物学的情報処理戦略を作り上げた。我々は、次のような異なる 2 つのアプローチを利用した：

1) 我々は、5 0 ~ 2 0 0 個のアミノ酸 (考慮対象の分子量は 5 . 5 ~ 2 2 k D a の間に含まれる) をもつペプチドのみをとり上げて、E S T の集合体を 6 つの読取り段階に従って翻訳した。このサブベースに対して、我々は次のような複数の基準を適用した：

- Argos 方法 (Rao & Argos, 1 9 8 6 , Biochem, Biophys. Acta, 8 6 9 , 1 9 7 - 2 1 4) に従って、アミノ酸 3 0 の前に始まる、少なくとも 1 0 個のアミノ酸の予測された膜内外領域の存在。実際、C D 3 及び F c R I のような I T A M をもつポリペプチドとの相同性により、K A R A P 配列の主要な部分は、細胞質内のものと予測されている。

【0146】

膜内外ゾーンの C 末端位置における I T A M パターン (Y - x - x - [I L] - x (6 , 8) - Y - x - x [I L]) の探索。

【0147】

- 荷電アミノ酸 (R , K , D , E) の膜内外領域内における存在。

【0148】

- 膜内外ゾーンの C 末端位置におけるシステインアミノ酸 (C) の存在。

【0149】

2) C D 3 Z _ H U M A N 入力との配列相同性を有する E S T 入力の探索 (E M B L , G E N B A N K 及び S W I S S P R O T でも同様に行なわれる分析) 。利用されるプロ

10

20

30

40

50

グラムは、T B L A S T N (1 , 4 , 1 1 バージョン ; Altschul, Stephen F., Warren G ish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman, 1 9 9 0 , J. Mol. Biol. 2 1 5 , 4 0 3 - 1 0) 又は T B L A S T N (2 , 0 , 3 バージョン ; Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, 1 9 9 7 , Nucleic Acids Res. 2 5 , 3 3 8 9 - 3 4 0 2) である。これらの類似入力に対して、我々は次に、第 1 のアプローチで利用した選択基準を適用した。

【 0 1 5 0 】

これら 2 つの生物学的情報処理アプローチを組合せることにより、疎水性プロフィールを用いて連続的に (Genworks プログラム , D N A Strider) , 候補分子のリーダー領域、膜内外領域、細胞質内及び細胞質外領域を決定した後、我々は、潜在的に K A R A P のものに対応する配列を多数得た。これらの配列のうち、Genbank 上で A A 2 4 2 3 1 5 の受入れ番号に対応する配列が、我々にはマウスの K A R A P 遺伝子の配列 (C 5 7 B 1 / 6 マウス c D N A 配列番号 1) であるように思われた。図 7 は、本発明に従った K A R A P ポリペプチドの D N A 配列 (c D N A 配列番号 1) を表わしている。この配列は、マウスの K A R A P 遺伝子の配列に対応する。実際、ヌクレオチド配列の翻訳は、3 9 6 ヌクレオチドの読取り枠 (配列番号 2) を与える。この結果は、リーダー配列 (これを含まず) から停止コドンまでに含まれる K A R A P 遺伝子のヌクレオチド配列の一部 (配列番号 1) を表わし、かつ同様にこのヌクレオチド配列の下に対応するアミノ酸配列 (1 文字コード) (配列番号 2 , 3 文字コード) , すなわち本発明に従った成熟マウスの K A R A P タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2) をも表わしている図 8 によって例示されている。この配列の標準的な分析は、8 7 個のアミノ酸の成熟タンパク質 (9 . 6 k D a の分子質量) , 1 6 アミノ酸の細胞質外部分 (Q 1 ~ G 1 6) , 2 4 アミノ酸の膜内外部分 (V 1 7 - G 4 0) 及び 4 7 アミノ酸の細胞質内部分 (R 4 1 ~ R 8 7) を予測している。我々の探索戦略に従うと、細胞質外部分は、少なくとも 1 つのシステインアミノ酸 (実際には 2 つ、C 8 及び C 1 0) , 膜内外アミノ酸 (D 2 5) 及び細胞質内 I T A M (Y 6 5 Q E L Q G Q R H E V Y 7 6 S D L) を含む。図 9 は、以前に記述された I T A M を有するポリペプチドと I T A M パターン (単複) を有する本発明に従ったポリペプチドの間の配列のアラインメントによって行なうことのできる比較を例示し、その結果としてのコンセンサス I T A M 配列を示す。図 9 は、I T A M をもつポリペプチドの I T A M (6 個の C D 3 , 1 個の I g , 1 個の I g , F c R I 及び F c R I) 及び (この図 9 に「 K A R A P 」と表示された) 本発明に従った以上で同定されたマウスの K A R A P ポリペプチド (配列番号 2) の I T A M パターンのアラインメントを表わしている。以前に記された I T A M (図 9) とのこの比較に基づいて、我々には、(Z A P - 7 0 及び p 7 2 S y k といったような) 縦列 S H 2 基をもつチロシンキナーゼタンパク質とリン酸化された K A R A P の会合を考慮することが可能となった。Z A P - 7 0 の S H 2 基に対応する組換え型融合タンパク質 (Olcese L., Lang P., Vely F., Cambiaggi A., Marguet D., Blery M., Hippen K. L., Biassoni R., Moretta A., Moretta L., Cambier J. C., Vivier E. 1 9 9 6 , J. Immunol. 1 5 6 : 4 5 3 1 - 4 5 3 4 の中で記述された調製物) と K A R A P の会合はインビトロで確認された。これらの実験は、図 3 A , トラック 3 に記述されている通りに実施されたが、細胞溶解産物は、抗 C D 1 5 8 抗体ではなく Z A P - 7 0 の S H 2 基に対応する組換え型融合タンパク質によって吸着された。かくして、K A R A P は、K A R に会合され、リン酸化されたチロシンの形で Z A P - 7 0 に会合する新しい I T A M 入り膜内外分子である。従って K A R A P は、T 及び N K リンパ球の新たな形質導入要素である。K A R A P 又は K A R A P 類似体が同様に I T I M 含有レセプタの活性化イソ型タンパク質にも会合し、これらの形質導入サブユニットの多分子複合体の中で、レセプタの係合の際に発せられるシグナルとして役立つことも可能である。

【 0 1 5 1 】

配列がわかっている候補ポリペプチドが本発明に従った K A R A P タンパク質に対応す

ることを決定又は制御するために特に適した方法は、この候補ポリペプチドの特徴的部分（例えば少なくとも1つのITAMパターン又は細胞質外領域を含む細胞質内領域）に対する抗体を産生すること及び、この抗体が、機能的細胞上で、例えばその候補ポリペプチドがそのKARAPであると想定されているレセプタに会合した状態にある標的である機能的KAR⁺細胞を認識することを確認すること（すなわち、KAR⁺細胞の場合、抗体が、KARレセプタに会合した状態にある標的を認識することを確認すること）から成る。

【0152】

本発明に従ったこのKARAPポリペプチドの同定方法は、かくして以下の段階から成る。

【0153】

- 候補ポリペプチド、特にこの候補ポリペプチドの少なくとも1つのITAMパターンを含む領域に対して導かれたモノ又はポリクローナル抗体（例えば、以上で同定されたマウスKARAPタンパク質の場合には配列番号2の細胞質外部分（配列番号3）又は細胞質内部分（配列番号5）の領域に対し導かれた抗体）を産生する段階；

- 抗原-抗体タイプの結合反応を可能にする穏やかな条件下で候補ポリペプチドがKARAPを構成すると想定されている対象の活性化又は非阻害性レセプタを、1つの機能的形態にて有する細胞、例えばNK又はT細胞のような機能的KAR⁺細胞の溶解産物と、この抗体を接触させる段階、

- 場合によって形成される反応産物の中に、KARのものに近い見かけの分子質量（約50kDa）をもつ産物及び候補ポリペプチドのものに近い見かけの分子質量（特に約10~16kDaの間）をもつ産物が存在する場合に、本発明に従ったKARAPポリペプチドであるものとしてその候補ポリペプチドを同定する段階。

【0154】

本発明に従ったこの同定方法は特に、

- 上述の通りに前記抗体を接触させ、

- 分子複合体を保存する洗剤の穏やかな条件下で（例えば1%のジギトニン、上述の実施例1参照）、場合によって形成された反応産物を沈降させ、

- 例えば、変性条件内でポリアクリルアミドゲル上の分子質量マーカーの存在下での電気泳動遊走により、沈降された産物の分子質量を測定し

- 上述のとおりの本発明に従ったKARAPポリペプチドであるものとして候補ポリペプチドを同定すること、

によって実施することができる。

【0155】

実施例3

1. KARAPに対応する複数のESTの同定

上述の実施例2に示されたような生物学的情報処理による我々のマウスKARAPクローニング戦略は、同様に、我々のKARAPの定義に対応する5EST（Expressed Tag Sequences：発現済みタグ配列）の存在をも明らかにする。つまり、これは、EST AA242315、AA734769、W88159、AA098506及びW41142である。図10A~14Aは、それぞれ、EST AA242315、AA734769、W88159、AA098506及びW41142のcDNA配列を例示している（それぞれ配列番号6~10）。図10B~14Bは、それぞれこれらのESTに対応するタンパク質配列を例示する（それぞれEST AA242315、AA734769、W88159、AA098506及びW41142のタンパク質について配列番号11~15）。これらのESTは全てC57B1/6マウス由来の組織から得られ、読取り枠に対応するcDNA配列を得るよう整理させられたものである。このことは、EST AA098506（配列番号9）、AA242315（配列番号6）、W88159（配列番号8）、AA734769（配列番号7）及びW41142（配列番号10）の配列のアラインメントを表わし、結果として得られたコンセンサス配列（コンセンサスマウスKA

10

20

30

40

50

R A P c D N A : 配列番号 1 6) を示す図 1 5 によって例示されている。

【 0 1 5 6 】

このことは同様に、E S T A A 2 4 2 3 1 5 (配列番号 1 1) , W 8 8 1 5 9 (配列番号 1 3) , W 4 1 1 4 2 (配列番号 1 5) , A A 0 9 8 5 0 6 (配列番号 1 4) 及び A A 7 3 4 7 6 9 (配列番号 1 2) のタンパク質配列のアラインメントを表わし、かつ結果として得られるコンセンサス配列 (コンセンサス配列 K A R A P タンパク質 , 配列番号 1 7) を表わす図 1 6 によっても例示されている。これらの図 1 5 及び 1 6 上で、記号「・」は、考慮対象のコンセンサス配列との同一性を表わし、記号「-」は、配列決定データの欠如を表わす。

【 0 1 5 7 】

10

2 . マウス K A R A P のゲノム配列

1 2 9 マウス系統のマウスから単離したゲノミック D N A のライブラリ (ラムダファージ、E M B L 3) を、従来の技術に従って E S T A A 7 3 4 7 6 9 の配列に対応する c D N A を用いてスクリーニングした。1 8 k b のフラグメントを含むファージを、陽性として同定した。一連の制限酵素での切断によりこのファージのカルトグラフィを実施し、ファージから得た 9 k b の E c o R I - E c o R I フラグメントを p B l u e - S c r i p t クローニングベクター内でクローニングした。これには、マウス K A R A P 遺伝子全体 (初期 A T G から S T O P 配列まで) が含まれている。このマウス K A R A P 遺伝子の配列は、図 1 7 に示されている (配列番号 1 8 ; 2 8 3 8 p b) 。

【 0 1 5 8 】

20

その上、マウス K A R A P のゲノム組織を得るべく、オリゴヌクレオチドプライマが生成された。利用されたプライマは以下の表 1 に示されている (配列番号 1 9 ~ 2 6) 。

【表 1】

表 1

同定 no.	ストランデッド ネス	位置 *	配列 (5'-3')	SEQ ID No.
7134	Sense	60-81	GGC TCT GGA GCC CTC CTG GTG C	19
7132	Antisense	581-561	ACT CTG GGC CTG TAC GGG ACT	20
7133	Sense	561-581	AGT CCC GTA CAG GCC CAG AGT	21
7130	Antisense	800-780	CAG AGT CAA CAC CAA GTC ACC	22
7131	Sense	780-800	GGT GAC TTG GTG TTG ACT CTG	23
7128	Antisense	978-958	CTC AGT CTC AGC AAT GTG TTG	24
7129	Sense	958-978	CAA CAC ATT GCT GAG ACT GAG	25
7127	Antisense	2703-2683	CTG TGT GTT GAG GTC ACT GTA	26

* ゲノム配列に従う位置

10

20

30

40

【0159】

マウス K A R A P のゲノム組織は図 1 8 に示されている。我々はこれらのデータから、1 2 9 系統のマウスの K A R A P の c D N A 配列ひいてはタンパク質配列を得た。この c D N A 配列 (配列番号 2 7) 及びこのタンパク質配列 (配列番号 2 8) は図 1 9 に示され

50

ている。

【 0 1 6 0 】

かくして翻訳されたタンパク質配列は、以下のとおりである。

【 0 1 6 1 】

- (配列) シグナル配列
- (配列) 細胞質外ドメイン
- (配列) 膜内外ドメイン
- (配列) 細胞質内ドメイン

ゲノミックカルトグラフィのこれらの結果全体は、マウス K A R A P 遺伝子 (初期 A T G から S T O P 配列まで) が長さ約 2 . 9 k b であり、5 個のエキソンを含むことを示している。これらの結果は、上から下へ、1 2 9 マウスのマウス K A R A P のゲノミック D N A (黒色 : 翻訳済みエキソン ; 水平ハッチング : 未翻訳エキソン、白色 : イントロン)、対応するタンパク質配列 (エキソン 1 ~ エキソン 5 までの配列番号 2 8) 及びこのタンパク質の異なる領域の性質 (S S = シグナル配列 ; E C = 細胞質外ドメイン ; T M = 膜内外ドメイン ; I C = 細胞質内ドメイン) を表わす図 2 0 によって例示されている。エキソン 1 は、シグナル配列の N 末端部分についてコードし、エキソン 2 はシグナル配列の残りの部分及び細胞質外部分の最初の 3 つのアミノ酸についてコードし、エキソン 3 は、細胞質外部分の残りの部分、膜内外部分及び細胞質内部分の最初の 9 つのアミノ酸についてコードし、エキソン 4 は、細胞質内部分の 1 4 のアミノ酸についてコードし、エキソン 5 はタンパク質の残りの部分についてコードする。K A R A P といったような I T A M を有するポリペプチドのゲノム組織に期待されるように、I T A M は、タイプ 0 のイントロンによって分離された 2 つのエキソン (エキソン 4 及び 5) によってコードされる。

10

20

【 0 1 6 2 】

3 . D A P - 1 2 ヒト K A R A P により R B L - 2 H 3 の中で発現される K A R (p 5 0 . 2) の機能的再構築

我々は、マウス K A R A P の配列から演繹されるオリゴヌクレオチドプライマを生成することにより R T - P C R によってヒト K A R A P についてコードする c D N A を得た。利用されたプライマは、以下の表 2 に示されている (配列番号 2 9 及び 3 0) 。

【表 2】

表 2

同定 no.	ストランデッドネス	ロケーション*	配列 (5'-3')
7367	Sense	ATG (53)	CCGCTCGAGGGCTTCATGGGGGACTTGAAC (SEQ ID No. 29)
			Xho I Start codon
7368	Antisense	398	CTAGTCTAGA GGATCCAGGTATCATTTGCTGACTGTTCATGATTCG(398)
			Xba I Bam III (SEQ ID No. 30)

* マウス cDNA 配列 (SEQ ID No. 27) の機能として番号付け

得られた cDNA 配列は図 2 1 に示されている (配列番号 3 1 : ヒト K A R A P の cDNA)。K A R + ヒト N K クローンから抽出された RNA は、この cDNA の生成のベースとして役立った。この cDNA を、p N T - ^{n e o} 真核生物発現ベクタ内でクローニングし、このヒト K A R A P について安定したトランスフェクタントを、R B L - 2 H 3 細胞系統の K A R + (p 5 0 . 2) トランスフェクタント内で生成した (Blery et al, J. Biol. Chem., 1997)。p 5 0 . 2 + 及び K A R A P + というこのように 2 重にトランスフェクションを受けた R B L - 2 H 3 細胞上で発現された K A R レセプタがもつ活性化シグナルを形質導入する能力を、p 5 0 . 2 の細胞質外部分に対して導かれた抗体を用いての刺激によって、又トリチウム標識づけされたセロトニンの塩析に従ってテストした。

10

【 0 1 6 4 】

このトリチウム標識づけされたセロトニンの塩析実験のために従ったプロトコルは以下のとおりである：

これらの細胞を剥離させ、遠心分離に付し、1 ml につき 1×10^6 個の細胞という最終濃度で R P M I - 10 % S V F の中で再懸濁させる。このとき、細胞を、1 時間細胞 1 ml あたり $2 \mu Ci$ のトリチウム標識づけ済みセロトニンを用いてインキュベートさせる。細胞を洗浄し、次に、細胞がその原液から余剰のセロトニンを塩析させるべく 37 °C で 1 時間培地の中に戻す。その後、細胞をマウスの I g E (2 6 8 1 - I) 又は抗 p 5 0 A C (G L 1 8 3) と共に、96 ウェル付き平板 (1 ウェルあたり細胞 20000 個) の中に分布させる。細胞を 1 時間附着させその後洗浄する。細胞を 15 分間 37 °C に戻し、次に F (ab')₂ G モノクローナル抗体 (50 $\mu g/ml$) を用いて刺激する。37 °C で 30 分間、細胞を放置してそれらがそのセロトニンを遊離させることができるようにする。低温 H B S S を添加し細胞を氷上に置くことによって反応を終結させる。このとき各ウェルの上清の半分を回収し、1 ml のシンチレーション液中加入する。セロトニンが投入された未刺激の細胞から得られた同量の溶解産物から 100 % の脱顆粒化が得られる。このとき カウンタで試料を計数する。

20

【 0 1 6 5 】

得られた結果は、ヒトの p 5 0 / K A R A P の 2 重トランスフェクションを受け、横座標に示された抗体 (左側 : 抗体無し ; 中央 : マウス I g E : m I g E 1 / 5 0 0 ; 右側 : G L 1 8 3 5 $\mu g/ml$) による刺激を受けた R B L - 2 H 3 細胞により上清内で塩析されたセロトニンの % を示す図 2 2 によって例示されている。この図 2 2 に示されているように、K A R の細胞質外部分と反応する抗体 (モノクローナル抗体 G L 1 8 3) による R B L - 2 H 3 中の K A R の係合が細胞の活性化という形で現われないのに対し、ヒトの K A R と K A R A P を同時に発現する 2 重トランスフェクタント R B L - 2 H 3 での G L 1 8 3 による K A R の係合は細胞活性化 (ここでは細胞からのセロトニンの遊離により表出される) という形で現われる。従ってこのことは、同定されたヒト K A R A P 配列が K A R の機能性を再構築するということの明確な証拠である。

30

【 0 1 6 6 】

図 2 3 は、ヒト K A R A P 遺伝子の組織とマウス K A R A P 遺伝子の組織の間の相同性を例示する (E 1 ~ E 5 : エキソン 1 ~ エキソン 5 ; I 1 ~ I 4 : イントロン 1 ~ イントロン 4)。ここには、ヒト及びマウスの K A R A P 遺伝子の塩基対の番号づけが表示されている。

40

【 0 1 6 7 】

(配列表)

【化 1】

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人:

- (A) 名称: I. N. S. E. R. M.
- (B) 地番: 101、リュウ・ド・トリビアック
- (C) 都市: パリ、CEDEX 13
- (E) 国名: フランス
- (F) 郵便番号: 75654

10

(ii) 発明の名称: 活性化レセプタに会合される新しいポリペプチド及びその生物学的応用

(iii) 配列数: 31

(iv) コンピュータにより解読可能な形態

- (A) 媒体のタイプ: フロッピーディスク
- (B) コンピュータ: IBM PCコンパチブル
- (C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: パテントイン リリース# 1.0、バージョン# 1.30 (OE

20

B)

(2) 配列番号1に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 517塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド
- (C) 鎖の数: 2本
- (D) 立体配置: 環状

30

(ii) 分子のタイプ: cDNA

(vi) 由来:

- (A) 生体: *Mus musculus*
- (B) 菌株: C57BL/6J

40

(vii) 直接の入手源:

- (A) ライブラリー: ソアレスマウス 3NME12 5'
- (B) クローン: 671865

【化 2】

(xi) 配列の記述： 配列番号 1

GGTCACACCA GGTCCCACCA GCCCCTGGAC TGTGGTGTCC AGTGCATATC TGGCCACCAT 60
 GGGGCTCTGG AGCCTCCTGG TGCCTTCTGT TCCTTCCTGT CCTCCTGACT GTGGGAGGAT 120
 TAAGTCCCGT ACAGGCCAG AGTGACACTT TCCAAGATG CACTGTTCT TCCGTGAGCC 180
 CTGGTGTACT GTCTGGGATT GTTCTGGGTG ACTTGGTGT GACTCTGCTG ATTGCCCTGG 240
 CTGTGTACTC TCTGGGCCGC CTGGTCTCCC GAGGTCAAGG GACAGCGGAA GGGACCCGGA 300
 AACAAACACAT TGCTGAGACT GAGTCGCCTT ATCAGGAGCT TCAGGGTCAG AGACATGAAG 360
 TATACAGTGA CCTCAACACA CAGAGGCAAT ATTACAGATG AGCCCACTCT ATGCCCATCA 420
 GCGGCCTGAT GCCCGGATCC GGTCAATCCA GATGCCTACT CAACAAGCCC TCTCTGAGAT 480
 CAGGACTCCC GTTGAATAC AGATCCACAG GGTACCT 517

10

(3) 配列番号 2 に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 87 アミノ酸

(B) タイプ： アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) 立体配置： 不明

(ii) 分子のタイプ： タンパク質

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： マウス K A R A P

(xi) 配列の記述： 配列番号 2

Gln Ser Asp Thr Phe Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gly Ile Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile
 20 25 30
 Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly
 35 40 45
 Thr Ala Glu Gly Thr Arg Lys Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro
 50 55 60
 Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg His Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn
 65 70 75 80
 Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg
 85

30

40

【化3】

(4) 配列番号3に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 16アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) 立体配置: 不明

10

(ii) 分子のタイプ: ペプチド

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: マウスKARAP、細胞質外部分

(xi) 配列の記述: 配列番号3

Gln Ser Asp Thr Phe Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

20

(5) 配列番号4に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 24アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) 立体配置: 不明

(ii) 分子のタイプ: ペプチド

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: マウスKARAP、膜内外部分

(xi) 配列の記述: 配列番号4

Val Leu Ser Gly Ile Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly
 20

30

(6) 配列番号5に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 47アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

40

【化 4】

- (C) 鎖の数 :
- (D) 立体配置 : 不明
- (ii) 分子のタイプ : ペプチド
- (vii) 直接の入手源 :
 - (B) クローン : マウスKARAP、細胞質内部分

(xi) 配列の記述 : 配列番号 5

10

```

Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly Thr Ala Glu Gly Thr Arg Lys Gln
1           5           10           15
His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg
                20           25           30
His Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg
                35           40           45

```

(7) 配列番号 6 に関する情報

- (i) 配列の特性 :
 - (A) 長さ : 515 塩基対
 - (B) タイプ : ヌクレオチド
 - (C) 鎖の数 : 2本
 - (D) 立体配置 : 2の配置
- (ii) 分子のタイプ : c DNA
- (vii) 直接の入手源 :

20

(B) クローン : EST AA242315

30

(xi) 配列の記述 : 配列番号 6

```

TCACACCAGG TCCCACCAGC CCCTGGACTG TGGTGTCCAG TGCATATCTG GCCACCATGG      60
GGCTCTGGAG CCTCCTGGTG CCTTCTGTTC CTTCCTGTCC TCCTGACTGT GGGAGGATTA      120
AGTCCCGTAC AGGCCCAGAG TGACACTTTC CCAAGATGCG ACTGTTCTTC CGTGAGCCCT      180
GGTGTACTGT CTGGGATTGT TCTGGGTGAC TTGGTGTGTA CTCTGCTGAT TGCCCTGGCT      240
GTGTACTCTC TGGGCCGCCT GGTCTCCCGA GGTCAAGGGA CAGCGGAAGG GACCCGAAAA      300
CAACACATTG CTGAGACTGA GTCGCCTTAT CAGGAGCTTC AGGGTCAGAG ACATGAAGTA      360
TACAGTGACC TCAACACACA GAGGCAATAT TACAGATGAG CCCACTCTAT GCCCATCAGC      420
GGCCTGATGC CCGGATCCGG TCATTCCAGA TGCCTACTCA ACAAGCCCTC TCTGAGATCA      480
GGACTCCCGT TGGAATACAG ATCCACAGGG TACCT                                515

```

40

【化 5】

(8) 配列番号7に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 371塩基対

(B) タイプ: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 2本

(D) 立体配置: 2の配置

(ii) 分子のタイプ: c DNA

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: EST AA734769

(xi) 配列の記述: 配列番号7

GTGCATATCT	GGCCACCATG	GGGGCTCTGG	AGCCTCCATG	GTGCCTTCTG	TTCCTTCCTG	60
TCCTCCTGAC	TGTGGGAGGA	TTAAGTCCCG	TACAGGCCCA	GAGTGACACT	TTCCCAAGAT	120
GCGACTGTTC	TTCCGTGAGC	CCTGGTGTAC	TGGCTGGGAT	TGTTCTGGGT	GACTTGGTGT	180
TGACTCTGCT	GATTGCCCTG	GCTGTGTACT	CTCTCGGCCG	CCTGGTCTCC	CGAGGTCAAG	240
GGACAGCGGA	AGGGACCCGG	AAACAACACA	TTGCTGAGAC	TGAGTCGCCT	TATCAGGAGC	300
TTCAGGGTCA	GAGACCAGAA	GTATACAGTG	ACCTCAACAC	ACAGAGGCAA	TATTACAGAT	360
GAGCCCACTC	T					371

10

20

(9) 配列番号8に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 376塩基対

(B) タイプ: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 2本

(D) 立体配置: 2の配置

(ii) 分子のタイプ: c DNA

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: EST W88159

(xi) 配列の記述: 配列番号8

GCCTTCTGTT	CCTTCCTGTC	CTCCTGACTG	TGGGAGGATT	AAGTCCCGTA	CAGGCCCAGA	60
GTGACACTTT	CCCAAGATGC	GGCTGTTCTT	CCGTGAGCCC	TGGTGTACTG	GCTGGGATTG	120
TTCTGGGTGA	CTTGGTGTG	ACTCTGCTGA	TTGCCCTGGC	TGTGTACTCT	CTGGGCCGCC	180

30

40

【化 6】

TGGTCTCCCG AGGTCAAGGG ACAGCGGAAG GGACCCGAA ACAACACATT GCTGAGACTG 240
 AGTCGCCTTA TCAGGAGCTT CAGGGTCAGA GACATGAAGT ATACAGTGAC CTCAACACAC 300
 AGAGGCAATA TTACAGATGA GCCCACTCTA TGCCCATCAG CGGCCTGATG CCCGGATCCG 360
 GTCATTCCAG ATGCCT 376

(10) 配列番号9に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 402塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド
- (C) 鎖の数: 2本
- (D) 立体配置: 2の配置

(ii) 分子のタイプ: c DNA

(vii) 直接の入手源:

- (B) クローン: EST AA098506

(xi) 配列の記述: 配列番号9

CCAGCCCCTG GACTGTGGTG TCCAGTGCAT ATCTGGCCAC CATGGGGGCT CTGGAGCCTC 60
 CTGGTGCCTT CTGTTCCCTC CTGTCCTCCT GACTGTGGGA GGATTAAGTC CCGTACAGGC 120
 CCAGAGTGAC ACTTTCCCAA GATGCGACTG TTCTCCGTG AGCCCTGGTG TACTGGCTGG 180
 GATTGTTCTG GGTGACTTGG TGTTGACTCT GCTGATTGCC CTGGCTGTGT ACTCTCTGGG 240
 CCGCCTGGTC TCCCGAGGTC AAGGGACAGC GGAAGGGACC CGGAAACAAC ACATTGCTGA 300
 GACTGAGTCG CCTTATCAGG AGCTTCAGG TCAGAGACCA GAAGTATACA GTGACCTCAA 360
 CACACAGAGG CAATATTACA GATGAGCCAC TCTATGCCCA TC 402

(11) 配列番号10に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 482塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド
- (C) 鎖の数: 2本
- (D) 立体配置: 2の配置

(ii) 分子のタイプ: c DNA

(vii) 直接の入手源:

10

20

30

40

【化 7】

(B) クローン: EST W41142

(xi) 配列の記述: 配列番号10

G TTCCTTCCT	G TCCTCCTGA	C TGTGGGAGG	A TTAAGTCCC	G TACAGGCCC	A GAGTGACAC	60	
T TTCCCAAGA	T GCGACTGTT	C TTCCGTGAG	C CCTGGTGTA	C TGGCTGGGA	T TGTCTGGG	120	
T GACTTGGTG	T TACTCTGTC	T GATTGCCCT	G GCTGTGTAC	T CTCTGGGCC	G CCTGGTCTC	180	
C CGAGGTCAA	G GGACAGCGG	A AGGGACCCG	G AAAACAACAC	A TTGCTGAGA	C TGAGTCGCC	240	10
T TATCAGGAG	C TTCAGGGTC	A GAGACCTGA	A GTATACAGT	G ACCTCAACA	C CACAGAGCG	300	
A TATTACAGA	T GAGCCCACT	C TATGCCCAT	C AGCGGCCTG	A TGCCCGGAT	C CGGTCATTC	360	
C AGATGCCTA	C TCAACAAGC	C CTCTGTGG	G ATCAGGACT	C CCGTTGGAA	T ACAGATCCA	420	
C AGGGTACCT	C CCTGAGATA	T CTGACATTG	T ACCATTTCT	G TCCCCAAAT	A GAAGACGGA	480	
CA						482	

(12) 配列番号11に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 171アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) 立体配置: 不明

(ii) 分子のタイプ: タンパク質

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: EST AA242315

(xi) 配列の記述: 配列番号11

Ser	His	Gln	Val	Pro	Pro	Ala	Pro	Gly	Leu	Trp	Cys	Pro	Val	His	Ile	
1				5				10						15		
Trp	Pro	Pro	Trp	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Trp	Cys	Leu	Leu	Phe	Leu	Pro	
			20					25					30			
Val	Leu	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Gln	Ser	Asp	
			35				40					45				
Thr	Phe	Pro	Arg	Cys	Asp	Cys	Ser	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Val	Leu	Ser	
	50					55					60					
Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	
65					70				75					80		40
Val	Tyr	Ser	Leu	Gly	Arg	Leu	Val	Ser	Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Ala	Glu	
				85					90					95		

【化 8】

Gly Thr Arg Lys Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
 100 105 110
 Leu Gln Gly Gln Arg His Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg
 115 120 125
 Gln Tyr Tyr Arg Xaa Ala His Ser Met Pro Ile Ser Gly Leu Met Pro
 130 135 140
 Gly Ser Gly His Ser Arg Cys Leu Leu Asn Lys Pro Ser Leu Arg Ser
 145 150 155 160
 Gly Leu Pro Leu Glu Tyr Arg Ser Thr Gly Tyr
 165 170

10

(13) 配列番号12に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 123アミノ酸
 (B) タイプ: アミノ酸
 (C) 鎖の数:
 (D) 立体配置: 不明

20

(ii) 分子のタイプ: タンパク質

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: EST AA734769

(xi) 配列の記述: 配列番号12

Ala Tyr Leu Ala Thr Met Gly Ala Leu Glu Pro Pro Trp Cys Leu Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Pro Val Leu Leu Thr Val Gly Gly Leu Ser Pro Val Gln Ala
 20 25 30
 Gln Ser Asp Thr Phe Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly
 35 40 45
 Val Leu Ala Gly Ile Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile
 50 55 60
 Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Ala Glu Gly Thr Arg Lys Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro
 85 90 95
 Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Pro Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn
 100 105 110
 Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg Xaa Ala His Ser
 115 120

30

40

【化 9】

(14) 配列番号 13 に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 124 アミノ酸

(B) タイプ： アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) 立体配置： 不明

10

(ii) 分子のタイプ： タンパク質

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： EST W88159

(xi) 配列の記述： 配列番号 13

Leu	Leu	Phe	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Val	
1				5					10					15		
Gln	Ala	Gln	Ser	Asp	Thr	Phe	Pro	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser	Ser	Val	Ser	
			20					25					30			
Pro	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	
		35					40					45				
Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	Val	Tyr	Ser	Leu	Gly	Arg	Leu	Val	Ser	Arg	Gly	
	50					55					60					
Gln	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Arg	Lys	Gln	His	Ile	Ala	Glu	Thr	Glu	
65					70					75					80	
Ser	Pro	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Arg	His	Glu	Val	Tyr	Ser	Asp	
			85						90					95		
Leu	Asn	Thr	Gln	Arg	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Xaa	Ala	His	Ser	Met	Pro	Ile	
			100					105					110			
Ser	Gly	Leu	Met	Pro	Gly	Ser	Gly	His	Ser	Arg	Cys					
		115					120									

20

30

(15) 配列番号 14 に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 133 アミノ酸

(B) タイプ： アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) 立体配置： 不明

40

(ii) 分子のタイプ： タンパク質

(vii) 直接の入手源：

【化 1 0】

(B) クローン: EST AA098506

(xi) 配列の記述: 配列番号14

Gln Pro Leu Asp Cys Gly Val Gln Cys Ile Ser Gly His His Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Ala Ser Trp Cys Leu Leu Phe Leu Pro Val Leu Leu Thr Val
 20 25 30
 Gly Gly Leu Ser Pro Val Gln Ala Gln Ser Asp Thr Phe Pro Arg Cys
 35 40 45
 Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly Thr Ala Glu Gly Thr Arg Lys Gln
 85 90 95
 His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg
 100 105 110
 Pro Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg Xaa
 115 120 125
 Ala Thr Leu Cys Pro
 130

10

20

(16) 配列番号15に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 160アミノ酸
 (B) タイプ: アミノ酸
 (C) 鎖の数:
 (D) 立体配置: 不明

30

(ii) 分子のタイプ: タンパク質

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: EST W41142

(xi) 配列の記述: 配列番号15

Phe Leu Pro Val Leu Leu Thr Val Gly Gly Leu Ser Pro Val Gln Ala
 1 5 10 15
 Gln Ser Asp Thr Phe Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly
 20 25 30
 Val Leu Ala Gly Ile Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly
 50 55 60

40

【化 1 1】

Thr Ala Glu Gly Thr Arg Lys Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro
 65 70 75 80
 Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Pro Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn
 85 90 95
 Thr Gln Arg Arg Tyr Tyr Arg Xaa Ala His Ser Met Pro Ile Ser Gly
 100 105 110
 Leu Met Pro Gly Ser Gly His Ser Arg Cys Leu Leu Asn Lys Pro Phe
 115 120 125
 Cys Gly Ile Arg Thr Pro Val Gly Ile Gln Ile His Arg Val Pro Pro
 130 135 140
 Xaa Asp Ile Xaa His Cys Thr Ile Ser Val Pro Lys Xaa Lys Thr Asp
 145 150 155 160

10

(17) 配列番号16に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 570塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド
- (C) 鎖の数: 2本
- (D) 立体配置: 2の配置

20

(ii) 分子のタイプ: c DNA

(vii) 直接の入手源:

- (B) クローン: ESTのアライメントコンセンサスマウスKARAP

(xi) 配列の記述: 配列番号16

TCACACCAGG TCCCACCAGC CCCTGGACTG TGGTGTCCAG TGCATATCTG GCCACCATGG 60
 GGGCTCTGGA GCCTCCATGG TGCCTTCTGT TCCTTCCTGT CCTCCTGACT GTGGGAGGAT 120
 TAAGTCCCCT ACAGGCCAG AGTGACACTT TCCCAAGATG CGRCTGTTCT TCCGTGAGCC 180
 CTGGTGTACT GKCTGGGATT GTTCTGGGTG ACTTGGTGTT GACTCTGCTG ATTGCCCTGG 240
 CTGTGTACTC TCTSGGCCGC CTGGTCTCCC GAGGTCAAGG GACAGCGGAA GGGACCCGGA 300
 AACAACACAT TGCTGAGACT GAGTCGCCTT ATCAGGAGCT TCAGGGTCAG AGACMWGAAG 360
 TATACAGTGA CCTCAACACA CAGAGGCAT ATTACAGATG AGCCCACTCT ATGCCCATCA 420
 GCGGCCTGAT GCCCGGATCC GGTCAATCCA GATGCCTACT CAACAAGCCC TTCTSTGRGA 480
 TCAGGACTCC CGTTGGAATA CAGATCCACA GGGTACCTCC CTGAGATATC TGACATTGTA 540
 CCATTTCTGT CCCCAAATAG AAGACGGACA 570

30

40

(18) 配列番号17に関する情報

【化 1 2】

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 120アミノ酸

(B) タイプ： アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) 立体配置： 不明

(ii) 分子のタイプ： タンパク質

10

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： ESTのアライメントコンセンサスマウスKARAP

(xi) 配列の記述： 配列番号17

Trp Cys Leu Leu Phe Leu Pro Val Leu Leu Thr Val Gly Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Val Gln Ala Gln Ser Asp Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser
 20 25 30

Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu
 35 40 45

20

Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly
 50 55 60

Gln Gly Thr Ala Glu Gly Thr Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Pro Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn
 85 90 95

Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg Xaa Ala His Ser Met Pro Ile Ser Gly
 100 105 110

Leu Met Pro Gly Ser Gly His Cys
 115 120

30

【化 1 3】

(xi) 配列の記述： 配列番号 17 (より正確には)

Trp Cys Leu Leu Phe Leu Pro Val Leu Leu Thr Val Gly Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 Pro Val Gln Ala Gln Ser Asp Thr Phe Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Leu Gly Asp Leu Val Leu
 35 40 45
 Thr Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser
 50 55 60
 Arg Gly Gln Gly Thr Ala Glu Gly Thr Arg Lys Gln His Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Pro Glu Val Tyr
 85 90 95
 Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg Xaa Ala His Ser Met
 100 105 110
 Pro Ile Ser Gly Leu Met Pro Gly Ser Gly His Ser Arg Cys
 115 120 125

10

20

30

(19) 配列番号 18 に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 2838 塩基対

(B) タイプ： ヌクレオチド

(C) 鎖の数： 2本

(D) 立体配置： 2の配置

(ii) 分子のタイプ： DNA (ゲノミック)

40

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： DNAマウスKARAP (ゲノミック)

【化 1 4】

(xi) 配列の記述： 配列番号 1 8

ACACCAGGTC	CCACCAGCCC	CTGGACTGTG	GTGTCCAGTG	CATATCTGGC	CACCATGGGG	60	
GCTCTGGAGC	CCTCCTGGTG	CCTTCTGTTC	CTTCCTGTCC	TCCTGACTGT	GTAGGTGAGT	120	
CGGGGGGCTT	CTGTGGATGC	CTCCTGTGTC	CTCAGCTCAT	GTTGGGGCCA	GGACTAGGCA	180	
GAGAGCAGGA	AGGGACAGCA	CAGACAAGGG	GAAGGCTGGG	CAGAAGAAGG	TTCCTCTAGA	240	
GCCTGTGGGT	TTCACCCTGA	GCTAGAGGCC	CTGAGATTTG	GAACCTGGTA	GTATCAGTAG	300	
GGGGGACATT	GAAGCTCACA	GATATACCTA	CCACATGTTG	GTCAGTACCG	GCCGCTGGGT	360	10
GCTGTGAGAC	CAGCTCTTTC	CAACCTTCTT	CACCTTCTAC	ATCCACTGTC	TGTGCCTCAA	420	
TTTACATCTT	TCTTTTGAAT	ATAGAATCAC	ATATAGCCCA	GGCTAGCTTC	AAATTTGCTA	480	
CGTAATTGAG	GATAACCTCA	ACCTTTCTAT	TCTCTGTCTC	CACCTCTCTC	AGTTTACCTG	540	
TTCTTTTCTC	CTTAGGATTA	AGTCCCGTAC	AGGCCCAGAG	TGGTAAGCCA	TAATACCCCC	600	
GATCTTTCTC	TCTTCCTCTC	AAAGACCTCC	TCAGGCCACC	CCTTCTCCTT	CTAGCCCTCT	660	
TTGTGCTAAC	ACCAAGCCCT	GATTGTAAAC	CTGTGTCCCC	CTCTTCATCC	TCCTGAGACA	720	
CTTTCCCAAG	ATGCGACTGT	TCTTCCGTEA	GCCCTGGTGT	ACTGGCTGGG	ATTGTTCTGG	780	20
GTGACTTGGT	GTTGACTCTG	CTGATTGCCC	TGGCTGTGTA	CTCTCTGGGC	CGCCTGGTCT	840	
CCCCAGGTCA	AGAGAGTAAG	AAGGTAAATA	AATCTTTAAA	AAAAATTGTC	CCAGTCCCCA	900	
GCTTAGTCCT	TCTTCACACC	ATATGTCACT	CTCTATCCCT	CTCTAGGGAC	CCGGAACAA	960	
CACATTGCTG	AGACTGAGTC	GCCTTATCAG	GTAAGAACGC	CAAATTCTTC	TCCACCCTTG	1020	
CTCCTGCCCC	GTCCTGGCTA	TCCCCCTCCC	CAGTACAGAC	ACACAGACAA	ACACACACAC	1080	
ACAAATACAC	AGAGACATAT	ATAAACACAC	TCACATAAAT	AAACACACAC	ACATACCTAC	1140	
ACACACACAC	ACACATACCT	ACACACACAC	ACACACATAC	CTACACACAC	ACACACACAC	1200	
ACACACACAC	ACTACCCTTC	CCAGAACCTT	AAGGTCCCTT	CCTCAGGAGC	TCCCCAATC	1260	30
CTGAAGGCAA	AGGACTAACT	GTCAAACATA	TTGGTGTTG	AACCATGACC	TTTAAGCTCA	1320	
GCTTCTAATG	AGTCTCTTGT	CAAGATTCTA	TTCTCTGTG	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	1380	
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTGCGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	1440	
TGTGTAGGCA	GGTTATAAGA	GGACATCAAA	TCCTATCTTT	ACCTTATTTT	TAAAATGGCA	1500	
CTGATTTTGC	TCTGTATTTA	CATGTGTGTG	TGGAGCAGGT	GTGCATATGC	ACTGGCAGCC	1560	
ATGTGGGGGT	CAGAAGACAA	CCCGTGGGGG	CTGGTTCTCT	CCTTCCACCT	TGTGGATCTC	1620	
TGAACTCTAA	ATTCTAGTTG	TCAAGCTTGG	CAGCAAGTGC	TTACCCACT	GAACCATCTC	1680	40
ACCAGCCCCA	AGCCTCCTTC	CTAACCTTTG	GGCTCTGGGT	GAGGCTATGT	CTCTAGGGAA	1740	
ACACACACCA	GGCTGGTCTC	TGGTACATGC	TCTCAGAGAC	TCTGCCCCTG	GGAGGCACAG	1800	
ACCCCTGCTC	TGTGACCCAA	TTTCTGGAAG	TCTACCTCCC	TCCCTGTAGC	CAGTTTTGCC	1860	
CATTGACTG	ACTCCTTGCT	GGAGGAACTT	TTTCTCTGAA	AAGTGTTAGA	ATCTCTTGAT	1920	

【化 1 5】

TCTGTTTTG AGTTTGGTGT GGGGAAGTAG TGGCGTGTGT CTTAATCCC AGCGCTCTGG 1980
 TGGCAGAGGT AGGCAGATCT CTGTGAATTT GAGGCTGGCC TGGTCTACAG TGTGAGTTCC 2040
 TGGACAGGCA GGGCTACCCA AAGAAACCCT GTCTACAAGC AAACAAACAA AAAAAACAA 2100
 AACAAACAA AAAAGAATCT CAATATTGGC CATCTGATGT CCAGAAGACC CCGGGCTGTC 2160
 TAGTTTCTGA GAGCCAGGAA ACTTTAGGGC AAATGTCAGC CTGATTTTTT TATCCTTCGG 2220
 TATCTTGGTT GAGGCCTACA TGGATCAACA CAGCACTCCA ATTGGAGAAG CTTATTTGAA 2280
 GCAACTTAAC AAAATCATT GGGGTGACAT TATGAAGAGA TTGAAGTGAA CCAATATAAT 2340
 GGTGGGACAG GAAAGAACT GAAGATGGGG AACTAAAAC ATTGCCAAGA CTCAAAGGGT 2400
 GAGCAGGTTG AAGATCTGTG GGCTTGGTGC TCCAGGCATC GGGGTGGGG GCTGCACATG 2460
 TAAGGACCCT GGGGTTGGTG CCTAATGTGC AGGCAGAAAAG GCCAGGAGAA TGCTGAGTGC 2520
 ATTTGAATAA AATCTTGACC TTTTCATGAT TTTAAGTTT AAAAACTGC CAGAGACCTT 2580
 GAAGGTCATT AGGAGGCTAG ATTTGTTTTT ATTTGCTGGG CCCCTCCAA TGATGGCCTT 2640
 TTTTTTTTTT TTTAAGGAGC TTCAGGGTCA GAGACCAGAA GTATACAGTG ACCTCAACAC 2700
 ACAGAGGCAA TATTACAGAT GAGCCCACTC TATGCCCATC AGCGGCCTGA TGCCCGGATC 2760
 CGGTCATTCC AGATGCCTAC TCAACAAGCC CTCTCTGAGA TCAGGACTCC CGTTGGAATA 2820
 CAGATCCACA GGGTACCT 2838

10

20

(20) 配列番号19に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 22塩基対

(B) タイプ: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 1本

(D) 立体配置: 線状

(ii) 分子のタイプ: 他の核酸

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の記述: 配列番号19

GGCTCTGGAG CCCTCCTGGT GC

22

40

【化 1 6】

(21) 配列番号20に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 21塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド
- (C) 鎖の数: 1本
- (D) 立体配置: 線状

(ii) 分子のタイプ: 他の核酸

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の記述: 配列番号20

ACTCTGGGCC TGTACGGGAC T

21

10

(22) 配列番号21に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 21塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド
- (C) 鎖の数: 1本
- (D) 立体配置: 線状

(ii) 分子のタイプ: 他の核酸

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の記述: 配列番号21

AGTCCCGTAC AGGCCAGAG T

21

20

30

(23) 配列番号: 22に関する情報

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 68塩基対
- (B) タイプ: ヌクレオチド

40

【化 1 7】

(C) 鎖の数： 1 本

(D) 立体配置： 線状

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

10

(xi) 配列の記述： 配列番号 2 2

GATAGCACAG AGAGAATAAA AATGAGAAGG GGTAAGGTAG GAAGTGTGGG GGAGGATAAT 60
GAGGTTAG 68

(2 4) 配列番号 2 3に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 2 1塩基対

20

(B) タイプ： ヌクレオチド

(C) 鎖の数： 1 本

(D) 立体配置： 線状

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

30

(xi) 配列の記述： 配列番号 2 3

GGTGACTTGG TGTGACTCT G 21

(2 5) 配列番号 2 4に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 2 1塩基対

(B) タイプ： ヌクレオチド

40

(C) 鎖の数： 1 本

(D) 立体配置： 線状

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

【化 1 8】

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の記述： 配列番号 2 4

CTCAGTCTCA GCAATGTGTT G

21

10

(2 6) 配列番号 2 5 に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 2 1 塩基対

(B) タイプ： ヌクレオチド

(C) 鎖の数： 1 本

(D) 立体配置： 線状

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

20

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の記述： 配列番号 2 5

CAACACATTG CTGAGACTGA G

21

(2 7) 配列番号 2 6 に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 2 1 塩基対

(B) タイプ： ヌクレオチド

(C) 鎖の数： 1 本

(D) 立体配置： 線状

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

30

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： マウスKARAP遺伝子のクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

40

(xi) 配列の記述： 配列番号 2 6

CTGTGTGTTG AGGTCACTGT A

21

【化 19】

(28) 配列番号27に関する情報

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ： 452塩基対
- (B) タイプ： ヌクレオチド
- (C) 鎖の数： 2本
- (D) 立体配置： 2の配置

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

(vii) 直接の入手源：

- (B) クローン： 129系統マウスのマウスKARAP

(xi) 配列の記述： 配列番号27

ATGGGGGCTC TGGAGCCCTC CTGGTGCCTT CTGTTCCCTC CTGTCCTCCT GACTGTGGAG	60
GGATTAAGTC CCGTACAGGC CCAGAGTGAC ACTTTCCCAA GATGCGACTG TTCTTCCGTG	120
AGCCCTGGTG TACTGGCTGG GATTGTTCTG GGTGACTTGG TGTTGACTCT GCTGATTGCC	180
CTGGCTGTGT ACTCTCTGGG CCGCCTGGTC TCCCGAGGTC AAGAGAGGAC CCGGAAACAA	240
CACATTGCTG AGACTGAGTC GCCTTATCAG GAGCTTCAGG GTCAGAGACA TGAAGTATAC	300
AGTGACCTCA ACACACAGAG GCAATATTAC AGATGAGCCC ACTCTATGCC CATCAGCGGC	360
CTGATGCCCG GATCCGGTCA TTCCAGATGC CTAACAACA AGCCCTCTCT GAGATCAGGA	420
CTCCCGTTGG AATACAGATC CACAGGGTAC CT	452

10

20

(29) 配列番号28に関する情報

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ： 111アミノ酸
- (B) タイプ： アミノ酸
- (C) 鎖の数：
- (D) 立体配置： 不明

(ii) 分子のタイプ： タンパク質

(vii) 直接の入手源：

- (B) クローン： 129系統マウスのマウスKARAP

(xi) 配列の記述： 配列番号28

30

40

【化 2 0】

Met Gly Ala Leu Glu Pro Ser Trp Cys Leu Leu Phe Leu Pro Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Val Glu Gly Leu Ser Pro Val Gln Ala Gln Ser Asp Thr Phe
 20 25 30
 Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile
 35 40 45
 Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr
 50 55 60
 Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Glu Arg Thr Arg Lys Gln
 65 70 75 80
 His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg
 85 90 95
 His Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg
 100 105 110

10

(30) 配列番号29に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 31塩基対

(B) タイプ: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 1本

(D) 立体配置: 線状

(ii) 分子のタイプ: 他の核酸

(vii) 直接の入手源:

(B) クローン: ヒトKARAPcDNAクローニング用オリゴヌクレオチド

プライマー

(xi) 配列の記述: 配列番号29

CCGCTCGAGG GCTTCATGGG GGGACTTGAA C

31

20

30

(31) 配列番号30に関する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 46塩基対

(B) タイプ: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 1本

(D) 立体配置: 線状

40

【化 2 1】

(ii) 分子のタイプ： 他の核酸

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： ヒトKARAPヒトcDNAクローニング用オリゴヌクレオチドプライマー

(xi) 配列の記述： 配列番号30

CTAGTCTAGA GGATCCAGGT ATCATTGTGC TGA CTGT CAT GATTCG

46

10

(3 2) 配列番号31に関する情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ： 431塩基対

(B) タイプ： ヌクレオチド

(C) 鎖の数： 2本

(D) 立体配置： 2の配置

20

(ii) 分子のタイプ： cDNA

(vii) 直接の入手源：

(B) クローン： ヒトKARAP

(xi) 配列の記述： 配列番号31

GGCTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTC CTCGAGGGCT TCATGGGGGG 60
 ACTTGAACCC TGCAGCAGGC TCCTGCTCCT GCCTCTCCTG CTGGCTGTAA GTGGTCTCCG 120
 TCCTGTCCAG GCCCAGGCC AGAGCGATTG CAGTTGCTCT ACGGTGAGCC CGGGCGTGCT 180
 GGCAGGGATC GTGATGGGAG ACCTGGTGCT GACAGTGCTC ATTGCCCTGG CCGTGTACTT 240
 CCTGGGCCGG CTGGTCCCTC GGGGGCGAGG GGCTGCGGAG GCAGCGACCC GGAAACAGCG 300
 TATCACTGAG ACCGAGTCGC CTTATCAGGA GCTCCAGGGT CAGAGGTCGG ATGTCTACAG 360
 CGACCTCAAC ACACAGAGGC CGTATTACAA ATGAGCCCGA ATCATGACAG TCAGCACAAT 420
 GATACCTGGA T 431

30

40

【化 2 2】

なお、図 1 6 の配列番号 1 7 は、より正確には下記の通りである。

配列番号 1 1	AA242315 タンパク質	SRQVFPAPGL WCFVHIDMFEW GSGGS	50
配列番号 1 3	W88159 タンパク質	-----	23
配列番号 1 5	W41142 タンパク質	-----	21
配列番号 1 4	AAC98506 タンパク質	QPLDCVQCI SGRHG	45
配列番号 1 2	AA734769 タンパク質	AVL-----ATMG-----AIEFF-----	37
配列番号 1 7	コンセンサス	-----WCLLF LFWLLTQGL SPVQKQSDTF	50
AA242315 タンパク質S.....	100	
W88159 タンパク質G.....	73	
W41142 タンパク質	71	
AAC98506 タンパク質	95	
AA734769 タンパク質	87	
コンセンサス	PRCCSSVSP GVLAGIVLGD LVTWLLIILA VVSLGRVSR GCGRAEGTRK	100	
AA242315 タンパク質H.....	150	
W88159 タンパク質H.....	133	
W41142 タンパク質R.....	121	
AAC98506 タンパク質X.TL-----	131	
AA734769 タンパク質X.....	123	
コンセンサス	QHIAETESFY QELCGQRPPEV YSDLNTQRPQ YR.AHSIPIS GLMFGSGHER	150	
AA242315 タンパク質	..LLNKP..SL R6..GL.....FLER.....RSTGY	171	
W88159 タンパク質	124	
W41142 タンパク質	..LLNPFCCGI FTFVGIQIER VFFQDLGACT ISVFAKKTID	150	
AAC98506 タンパク質	-----CP-----	133	
AA734769 タンパク質	-----	123	
コンセンサス	C-----	189	

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【 0 1 6 8】

【図 1 A】R . P . , D . F . , 及び M A L と呼称される L D G L (顆粒リンパ球増殖性疾患)を患う患者に由来し I L - 2 (インタロイキン 2) 上で培養された細胞の間接的免疫蛍光検査法でのフラックス白球計算器 (Becton-Dickinson の登録商標 F A C S can) による分析を示す。

【図 1 B】異なる供与体に由来する I L - 2 上で培養された N K 細胞上で実施された、異なるモノクローナル抗体を用いて再度導かれた細胞毒性試験の結果を示している。

【図 2 A】抗 C D 3 / 抗 F c R I 抗体を用いて F c R I 及び C D 3 の枯渇後に、抗 C D 1 5 8 E B 6 モノクローナル抗体を用いて免疫沈降された、^{1 2 5} I での放射性標識づけ済みの供与体 R . P . (p 5 0 . 1 ⁺) の N K 細胞から実施された S D S - P

40

50

A G E (ドデシル硫酸ナトリウム及びゲル上電気泳動によるタンパク質の分解)分析を示す。

【図2B】細胞D・Fの完全溶解産物及びかかる溶解産物の免疫沈降物の抗CD3抗体プローブを用いたSDS-PAGE分析を示している。

【図3A】MAL NK細胞の溶解産物の免疫沈降物が付されたインビトロキナーゼ試験に由来するリン酸化されたタンパク質のSDS-PAGE分析を示す。

【図3B】図3Aと同じタイプではあるものの、RBL-2H3p50.2⁺細胞から実施されたSDS-PAGE分析を示す。

【図3C】R.P., NK細胞のそれぞれ抗CD-158及び抗CD16免疫沈降物について実施されたインビトロキナーゼ試験後に切除された、KARAP及びCD3バンドのリン酸化されたアミノ酸の薄層電気泳動(TLE)による分析を示している。

【図4】キナーゼ試験を受けたR.P. NK細胞の溶解産物の抗CD158免疫沈降物の非変性/変性条件での2次元SDS-PAGE分析を示す。

【図5】免疫グロブリン上科又はレクチンタイプの活性化又は非阻害性レセプタ及びそれらの阻害性対応物を示す。

【図6】KIR(p58)及びKAR(p50)の概略的構造を表わす。

【図7】本発明に従ったマウスのKARAPポリペプチドのcDNA配列を表わす(配列番号1)。

【図8】本発明に従ったKARAPポリペプチドのアミノ酸配列(成熟タンパク質配列番号2)及びヌクレオチド配列(リーダ配列(これを除く)から停止コドンまでに含まれたもの)を表わしている。

【図9】本発明に従ったKARAPポリペプチドのITAM及び複数のITAMのアライメントを表わしている。

【図10A】ESTのAA242315のcDNA配列(配列番号6)を例示する。

【図10B】ESTのAA242315のタンパク質配列(配列番号11)を例示する。

【図11A】ESTのAA734769のcDNA配列(配列番号7)を例示する。

【図11B】ESTのAA734769のタンパク質配列(配列番号12)を例示する。

【図12A】ESTのW88159のcDNA配列(配列番号8)を例示する。

【図12B】ESTのW88159のタンパク質配列(配列番号13)を例示する。

【図13A】ESTのAA098506のcDNA配列(配列番号9)を例示する。

【図13B】ESTのAA098506のタンパク質配列(配列番号14)を例示する。

【図14A】ESTのW41142のcDNA配列(配列番号10)を例示する。

【図14B】ESTのW41142のタンパク質配列(配列番号15)を例示する。

【図15A】EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506及びW41142のcDNA配列のアライメント及び、結果としてもたらされるコンセンサス配列(配列番号16:コンセンサスC57B1/6マウスのKARAPcDNA)。

【図15B】EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506及びW41142のcDNA配列のアライメント及び、結果としてもたらされるコンセンサス配列(配列番号16:コンセンサスC57B1/6マウスのKARAPcDNA)。

【図16】EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506及びW41142のタンパク質配列のアライメント及び結果として得られるコンセンサス配列(配列番号17:コンセンサスC57B1/6マウスのKARAPタンパク質)を表わす。

【図17A】129系統のマウスのKARAP遺伝子配列(配列番号18:2838pb)を表わす。

【図17B】129系統のマウスのKARAP遺伝子配列(配列番号18:2838pb)を表わす。

【図18】129系統のマウスのKARAPのゲノム組織を表わす。

10

20

30

40

50

【図19】129系統のマウスのKARAPのcDNA配列（配列番号27）及び対応するタンパク質配列（配列番号28）を表わす。

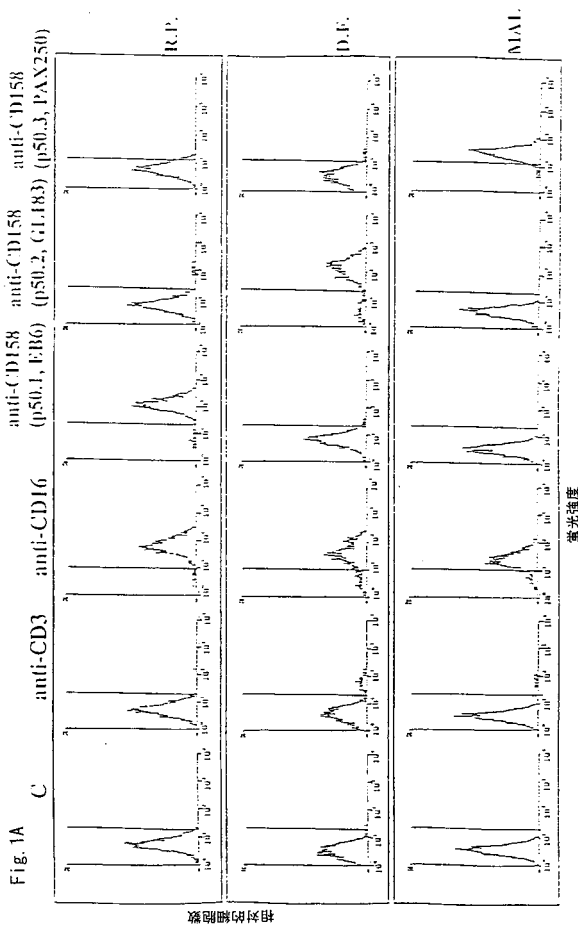
【図20】上から下に129系統のマウスのKARAP遺伝子のゲノム組織、対応するタンパク質配列及びこのタンパク質の異なる領域の性質を表わしている。

【図21】ヒトKARAPのcDNA（配列番号31）を表わす。

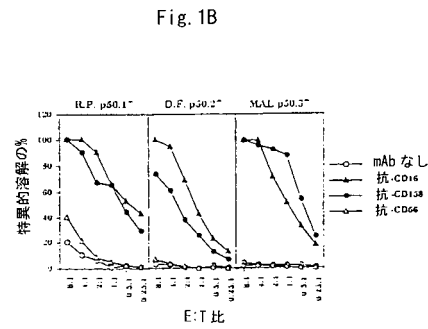
【図22】ヒトp50/KARAPの2重トランスフェクションを受け横座標に記された抗体（左側：抗体無し；中央：マウスIgE：mIgE 1/500；右側：GL183 5 μg/ml）による刺激を受けたRBL-2H3細胞による、上清中で塩析されたセロトニンの百分率を表わす。

【図23】ヒトKARAP遺伝子の組織とマウスKARAP遺伝子の組織の間の相同性を例示する。

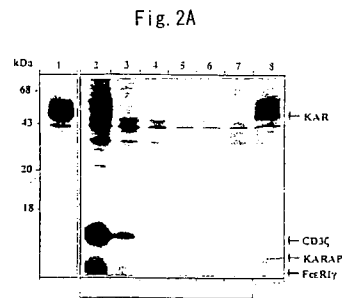
【図1A】



【図1B】



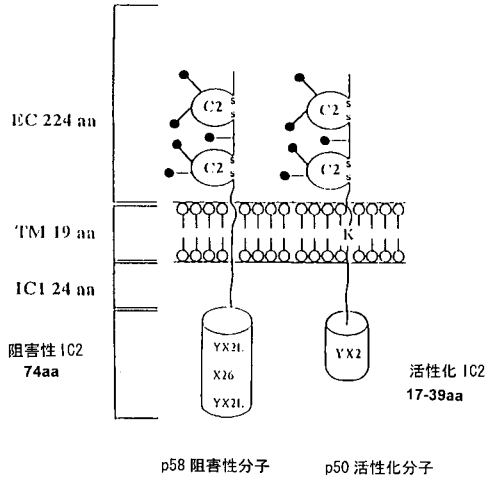
【図2A】



【 図 6 】

Fig. 6

クラス I の MHC の分子に対する
NKp 58 / 細胞のレセプタ



【 図 7 】

Fig. 7

```

1 gggtcaacaa gttccacaa gcccctggac tgggtgtcc agtgcatac tggccacaa
81 gggggctgg agcctctgg tgcctctg tctctctg cctctgact gttggaggat
121 taagctctg acagccctag agtgcact tcccaagat cgaactgtt tctgtgacc
181 caggtgact gttgggatt gttctggg acaggtgt gactctgct attgccctg
241 ctgttactc tctggctgc ctgtctcc gaggccaag gacagcggaa gggccctgg
301 aacaaacat tcttgagat gactctcc atcaggagct tcaaggctag agacatgaa
361 tatacagtg cccaacaca cagaggcaat attacagat agcccaact atgcccaaa
421 gggctgat gcccggacc ggtcaaca gctcactt caacaagcc tcttgagat
481 caggactccc gttgatac agatccac ggtact

```

【 図 8 】

Fig. 8

```

1/1 31/31
cag agt gaa att tcc tcc aqa tga gaa tct tcc tcc gta aga ccc ggt gta cag tcc ggg
Q S D T F P R C D C S S V S P G V L E G
61/61
att gaa cag ggt gaa tcc gaa cag att cag cag att gaa cag gaa tcc tcc cag gaa
D V L G D E V L T L L C A L A V Y S L S
121/121
gaa cag gaa tcc gaa gaa caa gaa gaa gaa gaa att cag aaa caa cag att ggt gaa
R L L V E R G D G T A E G T R K Q H I A E
181/181
att gaa cag att tcc tcc aqa tga gaa tct tcc tcc gta aga ccc ggt gta cag tcc ggg
T E E P Y Q E L C S L R H E V Y S D L N
241/241
tcc cag agt gaa tcc tcc aqa
T Q R Q Y Y R

```

【 図 9 】

Fig. 9

ITAM 含有ポリペプチド	
CD3ε ₁	YnaEnLqptrea-YcvaL
CD3ε ₂	YnaDqkdkmaaaYsaL
CD3ε ₃	YqgDa taakob-YsaL
CD3γ	YqpLkstedag-YsaL
CD3δ	YqpLnsstoaq-YsaL
CD3ε	YqpLksggal-YsaL
Iga (CD79a)	YedLl qqqq-YqcV
Igβ (CD79b)	YqpLl cqqat-YedL
FceRIγ	Yqgldttnqaa-YedL
FceRIβ	YaaLnllysat-YsaL
FcγRIIb	YqgLqqqthav-YsaL
Consensus	Y---L-----Y---L

【 図 10 A 】

Fig. 10A

配列番号 6

10	20	30	40	50	
1214567890	1214567890	1214567890	1214567890	1214567890	
TCGCHCQGG	TTCCHCQGG	CCCTGCHQGG	TGGGTCQGG	TGACACQGG	50
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	100
TCCTGCHQGG	GGCHCQGG	AGTCCQGG	AGCCCTCQGG	TGACACQGG	150
GGCHCQGG	AGTCCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	200
TTCCTGCHQGG	TTCCTGCHQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	250
TTCCTGCHQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	300
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	350
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	400
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	450
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	500
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	550
GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	GGCHCQGG	600

【 図 10 B 】

Fig. 10B

10	20	30	40	50	
1214567890	1214567890	1214567890	1214567890	1214567890	
SPVPPAPL	WPPVHNPV	GGASWLLF	LPVLLVGL	SPVQSDTF	50
PPVSSVSP	GLSSGVLD	LVLLVLLA	VYSLVSLV	GGVHGVTK	100
QVAVSFPV	QLQQGFHV	YSLNTQPV	YVPHVPLS	GLVGGVSR	150
GLVGGVSR	GLVGGVSR	Y			200

配列番号 11

【 図 1 7 B 】

Fig. 17 (続き)

配列番号 18 (続き)

10	20	30	40	50	
1214567890	1214567890	1214567890	1214567890	1214567890	
GAGCTAGCGA	AGGAAACCTT	GTCTAATAGC	AAACAAACAA	ACAAAAACA	2100
AAAGAAACAA	AAAGAACTTT	CAATATAGCC	CAATATAGCT	CGAGAAAGCC	2150
CGGGCGTGTG	TAATTTATGA	GAGCGAGAA	ACTTTAGTCC	AAATGTGAGC	2200
CTGATTTTTT	CTGCTTTCCG	TACTTTGGTT	GAGGCTTACA	TGGATCAACA	2250
CAAGCTTACA	ATTGCGAGAG	CTATTTTGA	GCAATTTAG	AAATGCTTT	2300
GGGCTGCAAT	TATTAAGAGA	TTGATTTGA	CGAAGAAAT	GGTGGGAGC	2350
GAAGAAAT	GAGATGCGG	AAATTAAG	ATTGCTAAG	CTGAAAGGT	2400
GAGAGGTTG	AGATATGTTG	GGTTTGTCC	TGAGGCTTC	GGGTTGGGG	2450
GCTGCACTG	TAAATACCTT	GGGTTGTTT	CTTATGTTG	AGCGAAGAG	2500
GGCGAGAA	TGCTAATTC	ATTGAAATA	AACTTTGAT	TTTTCAATC	2550
TTTATGTTG	AAATGCTTC	CAAGCTTT	GAGCTTAT	AGTCCCTTG	2600
ATTGTTTTT	ATTGTTGGG	CGGCTTCA	TGAGGCTTT	TTTTTTTTT	2650
TTTAAAGAG	TTTACCTTA	GAGTATGA	GATTAATTC	ACTTCAATC	2700
AAAGAGGAA	TATTAAGAT	GAGGCTTT	TAAAGCTTC	AGGCTTATG	2750
TGCGGAT	CGGCTTCC	AGTCTTCA	TGAAAGG	CTTCTTGA	2800
TGAGATTTT	CGTTGAA	GATTAATTC	GGTCAAT		2850

【 図 1 8 】

Fig. 18

3' インترون配列 (供与体部位)	エキソン配列	5' インترون配列 (アクセプタ部位)
....TCGTTAG	MetGly ATGGGG...-Exon 1-...TCGAGG	alGluG GAGGTGA....
....TCGTTAG	lyLeuS GATTAA...-Exon 1-...ACAGTG	lnSerA GTAAGCC...
....TCGTTAG	spThzF ACACTT...-Exon 3-...AAAGAG	lnGluA GTAAGAA....
....TCGTTAG	lyThzA GGACCC...-Exon 4-...TATCAG	DysGln GTAAGAA....
....TTTTAAG		

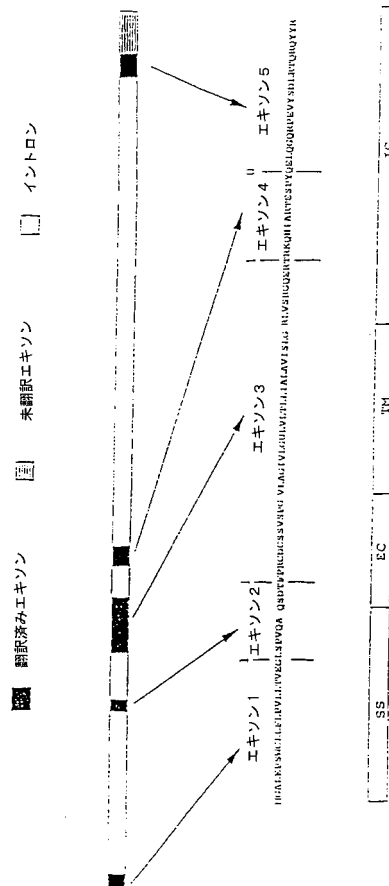
【 図 1 9 】

Fig. 19

配列番号 27	配列番号 28	10	20	30	40	50	
ATGGGGGCTG	TGGAGCCCTG	CTGGTCCCTG	CTGTTGCTTC	CTGTTGCTTC	CTGTTGCTTC	CTGTTGCTTC	31
M G A L	S E P S	V Q L L	L F L S	L F L S	L F L S	L F L S	
GACTGTGGAG	GGATTAAGTC	TGTTAAGCCG	CGACAGTGAC	ACTTTCCCAA			100
T V E	G L S P	V Q A	L S D	T F P R			
GATGCACTG	TTGTTCCCTG	AGCCCTGCTG	TACTTCCCTG	GATTTCTCTG			150
D D C	S S V	S E Q V	L A S	T V L			
GCTTACTTGG	TGTTACTTCC	GCTGATTTCC	CTGCTTCTTC	ACTCTCTGGG			200
G U L V	L T L L	L A A	L A V V	E L G			
CGGCTTGCTG	TCCCGAGCTG	AAAGAGGAG	CCCGAAUAA	CAGATTGCTG			250
R L V	S R G Q	E R T	K Q	H I A E			
AGACTGATTC	GGCTATTAC	GAGCTTCAAG	CTCAGAGACA	TGAATATAC			300
T E E	F Y Q	E L C G	G R H	E V Y			
AGTACCTTGA	AGAAACAGAG	CGAAATATAC	AGATGAGCCG	ACTCTATGCC			350
S E L X	D Q R	C Y V	E A R	S M P			
CATCAAGCCG	CTGATGCCCG	GATCCGCTCA	TTCAGATGC	CTACTCAACA			400
T S G	L M F G	S G H	E R C	L L V X			
AGCCCTCTCT	GAGATCAGGA	CTCCCGTTGG	AATACAGATC	CACAGGCTAC			450
P S L	R S G	L P L E	Y R S	T G Y			

【 図 2 0 】

Fig. 20



【 図 2 1 】

Fig. 21

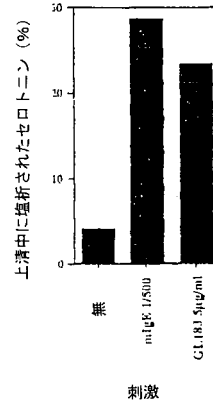
配列番号 31

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGGTCGCTTT	TGCTGTCGCG	GGGGTTCGCG	ATCCAGCGCG	GTTCGCGGCT	50
TCAGCGCGCGG	ACTCTGACCG	TGCGCGCGCG	TGCTGCTGCT	GGCTGCTGTC	100
Codon Substitution					
GTGGCTGCTCA	GGCTGCTGCG	TGCTGCTGCG	GGCGCGCGCG	AGCGCGCTTC	150
CGCTGCTGCTT	ACCGCTGCGC	CGGGCTGCTT	GGCGCGCGCG	GTTCGCGGCG	200
ACCGCTGCTT	GGCGCTGCTT	ATGGCTGCTG	CGCTGCTGCT	GTTCGCGGCG	250
CGCTGCTGCT	GGGGCGCGCG	GGCTGCTGCG	GGCGCGCGCG	CGTTCGCGC	300
TATCGCTGCG	ACCGCTGCGC	GTTCGCTGCG	GTTCGCGGCT	CGCTGCTGCG	350
ATGGCTGCG	CGCTGCTGCG	ACCGCTGCGC	CGTTCGCGC	AGCGCGGCGA	400
Stop					
ATCGCTGCG	TGCGCTGCG	GGCTGCTGCG	T		431

【 図 2 2 】

Fig. 22

RBL-2H3 細胞内で再構築された p50/KARAP 複合体によって誘発されたセロトニンの塩析



【 図 2 3 】

Fig. 23



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/48	M	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02		
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00		

- (72)発明者 ヴィヴィエ エリック
フランス国 カシス シュマン デュ ブダール 20 - 2
- (72)発明者 モレッタ アレッサンドロ
イタリア国 ジェノヴァ 18 - 8 ヴィア ニッツァ (番地なし)
- (72)発明者 オルチェーセ ルチア
イタリア国 ジェノヴァ 23 - 7 アー ヴィア パレストロ (番地なし)
- (72)発明者 ヴェリィ フレデリック
フランス国 カシス レジダーンズ デュ ヴアラ ラ ファランドール (番地なし)
- (72)発明者 トマセッコ エレナ
フランス国 マルセイユ アレー デ パン 30

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
4B024 AA01 BA44 BA63 CA01 GA11 HA12 HA15
4B063 QA05 QA19 QQ03 QQ42 QQ79 QQ96 QR48 QS15 QS32
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA21 BA22 CA53 CA59 NA14
ZB072 ZB212
4C085 AA13 AA14 BB11 BB41 BB43 CC02 DD88 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74 GA05

专利名称(译)	与活化受体相关的新多肽及其生物学应用		
公开(公告)号	JP2009005699A	公开(公告)日	2009-01-15
申请号	JP2008153485	申请日	2008-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	研究所国立拉萨在水泥埃杜拉尔外壳格哈德医疗日元上课以及EM		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉RECHERCHE医疗 (李EN ESÇLM)		
[标]发明人	ヴィヴィエエリック モレッタアレッサンドロ オルチエーセルチア ヴェリイフレデリック トマセツコエレナ		
发明人	ヴィヴィエ エリック モレッタ アレッサンドロ オルチエーセルチア ヴェリイ フレデリック トマセツコ エレナ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/15 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P43/00 A61P37/02 C07K19/00 A61K31/711 C12N15/12		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/70503 C07K16/2803		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/48.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K37/02 A61K39/395.N A61K48/00 A61P43/00.105 A61P37/02 C07K19 /00 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024 /BA44 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS32 4C084 /AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085 /BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA05		
代理人(译)	渡边 彰		
优先权	1997005411 1997-04-30 FR 1998000927 1998-01-28 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了诊断和预防KAR受体（杀伤细胞激活受体）的异常或不良功能，KAR受体是免疫球蛋白型或凝集素型KIR受体（杀伤细胞抑制性受体）的非抑制性对应物，它提供了进行校正和治疗的新方法。包含特定序列的核酸，该核酸编码的分离的多肽。[选择图]无

順 号	ス ト ラ ン ド 配 列	位置*	配列(5'3')
7194	Sense	60-81	GGCTCTGGAGCCCTCCCTGCTGC SEQID No.19
7192	Antisense	581-561	ACTCTGCGCCCTGTACGGGACT SEQID No.20
7193	Sense	561-581	AGTCCCCTACAGGCCGAGAGT SEQID No.21
7190	Antisense	800-780	CAGAGTCAACACCAAGTCACC SEQID No.22
7191	Sense	780-800	GGTGACTTGTGTGACTCTG SEQID No.23
7128	Antisense	978-958	CTCAGTCTCAGCAATGTCTTG SEQID No.24
7129	Sense	958-978	CAACACATTGCTGAGACTGAG SEQID No.25
7127	Antisense	2703-2683	CTGTGTGTTGAGCTCACTGTA SEQID No.26

*片/全配列に依る位置