

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-335400

(43) 公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08
	15/02	C 1 2 N 5/00
C 1 2 P 21/08		15/00
// (C 1 2 P 21/08		

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-141635	(71) 出願人	591111248 農林水産省家畜衛生試験場長 茨城県つくば市観音台3-1-1
(22) 出願日	平成10年(1998)5月22日	(72) 発明者	彦野 弘一 茨城県つくば市竹園3丁目5-301-514
		(72) 発明者	櫻井 通陽 茨城県つくば市竹園1丁目13-2-803-408
		(72) 発明者	大田 方人 茨城県つくば市松代5丁目16-517-301
		(72) 発明者	窪田 宜之 茨城県つくば市松代5丁目15-503-405
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシ由来c-K i tタンパク質に対するモノクローナル抗体とそれを用いた細胞分離法

(57) 【要約】

【解決手段】 ウシ由来c-Kitタンパク質と特異的に反応するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を用いて、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料からウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離することを特徴とするウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法である。

【効果】 ウシ由来c-Kitタンパク質と特異的に反応するモノクローナル抗体が提供され、該モノクローナル抗体を用いて、ウシ由来c-Kitタンパク質の精製及び定量、並びにウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離を効率よくかつ精度よく行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 2】 請求項 1 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 3】 請求項 1 記載のモノクローナル抗体を用いて、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料からウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離することを特徴とするウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を利用したウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】c-Kitタンパク質は、前ガン遺伝子(プロトオンコジーン)の一つであるc-kit遺伝子[EMBO J. 6,3341(1987), EMBO J. 7,1003(1988)]によってコードされるレセプター型タンパク質チロシンリン酸化酵素である。c-Kitタンパク質はc-Kitレセプター[Genes & Development 4, 390 (1990)], Kitレセプター[EMBO Journal 10, 2451 (1991)], SCFレセプター [特願平 4-502628 (1992), Advances in Immunology 55, 1 (1994)], 又は CD117 [Leukocyte typing V, Oxford University Press (1995)]とも呼ばれている。

【0003】かかるc-Kitタンパク質は、サイトカインの一つであるステムセルファクター(stem cell factor、以下「SCF」という) [特願平4-502628(1992), Cell 63, 167(1990), Cell 63, 175 (1990), Cell 63, 195 (1990), Cell 63, 203 (1990)]に対する細胞膜表面レセプターであることが既に報告されている[Cell 63, 167 (1990), Cell 63, 225 (1990)]。

【0004】ヒト[EMBO Journal 6, 3341 (1987)], マウス[EMBO Journal 7, 1003 (1988)], ニワトリ[Gene 128, 257 (1993)], ヤギ[Biochimica et Biophysica Acta 1352, 151 (1997)], 及びウシ[Gene 141, 305 (1994)]由来のc-kitタンパク質をコードするcDNAは既にクローニングされ、その塩基配列が決定されている。その結果、c-Kitタンパク質がそのアミノ末端から順に、分泌シグナル配列、細胞外領域、細胞膜貫通領域、及び細胞内領域からなる細胞膜タンパク質であり、さらに細胞内領域の一部にc-Kitタンパク質の有するタンパク質チロシンリン酸化酵素活性を担う領域(リン酸化酵素領域)が存在することが明らかにされている。

【0005】ヒトやマウスにおいて、c-Kitタンパク質が各種血液系細胞の前駆細胞(hematopoietic progenitor cells)、成熟マスト細胞、生殖細胞、メラニン形成

細胞などの細胞膜表面に発現しており、SCFに対する細胞膜表面レセプターとして、これらのc-Kitタンパク質陽性細胞種の正常な増殖や分化にとって必須の役割を有していることが知られている[Advances in Immunology 55, 1 (1994)]。

【0006】マウス由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体[EMBO Journal 10, 2111 (1991)]及びヒト由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体[特願平4-510017 (1992), Blood 76, Supplement 295a (1990), Leukemia Research 12,923 (1988), Leukemia Research 12, 929 (1988), Leukemia Research 11, 1329(1985), Blood 77, 1876 (1991), Blood 79, 338 (1992)]の作製に関しては既に報告されており、これらの抗体が血液前駆細胞、生殖細胞、メラニン形成細胞等のc-Kitタンパク質陽性細胞の同定や分離のために用いられている。

【0007】しかし、これらモノクローナル抗体のウシ由来c-Kitタンパク質に対する反応性は未知である。ヒト等のc-Kitタンパク質に関する知見から、c-Kitタンパク質がウシにおいても血液前駆細胞、生殖細胞、メラニン形成細胞等の増殖にとって主要な役割を有していると考えられる。従って、ウシ由来c-Kitタンパク質の生物学的役割の解明がウシにおける上記細胞種の形成過程を明らかにする上で重要であると考えられる。c-Kitタンパク質の生物学的役割の解明においては、血液前駆細胞や生殖細胞等のc-Kitタンパク質陽性細胞種の分離手段が必要である。

【0008】そして、ウシにおけるc-Kitタンパク質の動態や機能を調べるとともに、ウシの血液前駆細胞や生殖細胞等のc-Kitタンパク質陽性細胞を分離するためには、ウシ由来c-Kitタンパク質に対する特異性の高い抗体、特に特異性・再現性の点で優れているモノクローナル抗体の作製が必要である。しかし、これまでにウシ由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製は報告されていない。そこで、ウシ由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体の開発が渴望されている。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を利用したウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法を提供することを目的とする。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行なった結果、ウシ由来c-Kitタンパク質で免疫された動物から得られた抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合して得られるハイブリドーマから、ウシ由来c-Kitタンパク質と特異的に反応するモノクローナル抗体を開発した。

ノクローナル抗体を得ることに成功するとともに、該モノクローナル抗体を使用してウシ骨髄細胞からウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、ウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体である。

【0011】また、本発明は、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。さらに、本発明は、上記モノクローナル抗体を用いて、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料からウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離することを特徴とするウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法である。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. 本発明のモノクローナル抗体

本発明のモノクローナル抗体は、ウシ由来c-Kitタンパク質と特異的に反応し得るすべてのモノクローナル抗体を包含する。その中でも、ウシ由来c-Kitタンパク質の細胞外領域と特異的に反応するモノクローナル抗体を好ましいものとして例示でき、後述するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を最も好ましいものとして例示できる。

【0013】2. 本発明のモノクローナル抗体の作製  
本発明のウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体は、例えば、次の各工程を経て製造することができる。

- (1) 抗原の調製
- (2) 免疫及び抗体産生細胞の採取
- (3) 細胞融合
- (4) ハイブリドーマの選択及びクローニング
- (5) モノクローナル抗体の採取

以下、各工程について説明する。

【0014】(1) 抗原の調製

抗原とするウシ由来c-Kitタンパク質の調製は、特定の方法には限定されないが、ウシ由来c-Kitタンパク質をコードするcDNAが既に公知であるので[Gene 141, 305-306 (1994)]、該cDNAを利用して抗原とするウシ由来c-Kitタンパク質を調製するのが好ましい。ウシ由来c-Kitタンパク質をコードするcDNAとしては、例えば、配列番号1に記載の塩基配列からなるcDNAを利用できる。上記cDNAからのウシ由来c-Kitタンパク質の調製は、例えば、ウシ由来c-Kitタンパク質をコードするcDNAを含む組換えベクターを作製し、該ベクターにより適当な宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を適当な培地で培養して得られる培養物を精製することにより行うことができる。

【0015】ここで、使用するcDNAは、配列番号1に示すウシ由来c-Kitタンパク質をコードするcDNAの全領域であってもよいが、ウシ由来c-Kitタンパク質の細胞外領域(アミノ末端側から25~521番目のアミノ酸残基)をコードする領域が好ましい。ウシ由来c-Kitタンパク

質の細胞外領域をコードするcDNAを使用する際、ウシ由来c-Kitタンパク質の細胞外領域の一部(例えば、アミノ末端側から25~509番目のアミノ酸残基)をコードするcDNAを使用してもよい。組換えベクター及び宿主細胞としては、特に限定されず公知のいかなるものを使用してもよいが、特に、組換えバキュロウイルス及び昆虫培養細胞を使用するのが好ましい。形質転換体の培養及び培養物の精製は、常法に従って行うことができる。

【0016】(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られたウシ由来c-Kitタンパク質を免疫原として、アジュバンドとともに哺乳類、鳥類等に投与する。ここで、アジュバンドとしては、市販のフロイント完全アジュバンド、フロイント不完全アジュバンド、BCG、ハンターズ、タイターマック、キーホールリンペットヘモシアニン含有オイル等が挙げられ、これらを単独で用いてもよいし、これらの2種以上を混合して用いてもよい。

【0017】哺乳類としては、ウマ、サル、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ハムスター、マウス等を用いることができ、鳥類としては、ハト、ニワトリ等を用いることができるが、特にマウス、ラット等を用いることが好ましい。投与の方法としては、公知の何れの方法をも用いることができるが、静脈内投与、皮下投与、又は腹腔内投与が好ましい。

【0018】抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、通常10~200µg、好ましくは25~100µgである。免疫の間隔は、通常1~4週、好ましくは2週であり、免疫の回数は、通常2~5回、好ましくは3~4回である。

【0019】最終免疫日から1~5日後、好ましくは3日後に、抗体産生細胞を採集する。採取する抗体産生細胞としては、リンパ節細胞、脾臓細胞等が挙げられるが、好ましくは足リンパ節細胞である。

【0020】(3) 細胞融合

抗体産生細胞と細胞融合させるミエローマ細胞としては、マウス、ラット、ヒト等の種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能である株化細胞を使用できる。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地(例えばHAT培地)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ選択培地で生存できる性質を有するものが好ましい。一般的には、8-アザグアニン耐性株を用いることができる。この細胞株は、ヒポキサンチン-グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼを欠損し(HGPRT<sup>-</sup>)、HAT培地で生育できない。

【0021】このようなミエローマ細胞としては、P3/X63-Ag8-UI等のマウスミエローマ細胞株、210.RCY.Ag1.2.3等のラットミエローマ細胞株、SKO-007等のヒトミエローマ細胞株等を使用することができる。細胞融合は、例えば、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを混合比1:5~1:10の割合で、RPMI1640培地等の培地中で融合促進剤存在下、室温で2~5分間細胞同士を接触させることによ

って行うことができる。この際、融合促進剤としては、平均分子量1500～4000のポリエチレングリコール、ポリビニールアルコール等を用いることができる。また、センダイウイルス等の融合ウイルスを用いることもできる。

#### 【0022】(4) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合後、目的とするハイブリドーマを選別する。選別方法は、通常の方法に従えばよく、特に限定されない。選別方法としては、例えば、次の方法を用いることができる。すなわち、マイクロプレートの各ウェルにウシ由来c-Kitタンパク質を吸着させた後、ブロックエース(大日本製薬)等でブロックする。該マイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマの培養上清を加え、37℃で1時間放置し、ウシ由来c-Kitタンパク質とウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体とを反応させる。これを生理的食塩水で洗浄した後、適当に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗イムノグロブリンを加える。生理的食塩水で洗浄した後、ALPローゼ(シノテスト社)を用いてアルカリフォスファターゼの活性を測定し、アルカリフォスファターゼの呈色を有するウェルをウシ由来c-Kitタンパク質に特異的な抗体を産生する細胞を含むウェルとする。このウェルから目的とするハイブリドーマをクローニングする方法は、通常の方法に従えば良く、特に限定されない。ハイブリドーマのクローニングは、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリング法、蛍光励起セルソーター法等により行なうことができる。

#### 【0023】(5) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の方法や腹水形成法等を用いることができる。細胞培養法においては、例えば、ハイブリドーマを10～20%仔ウシ血清含有RPMI1640培地、MEM培地、E-RDF培地又は無血清培地等の動物細胞培地中で、通常の方法(例えば、37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度)で3～7日間培養し、その培養上清から目的とするモノクローナル抗体を取得できる。

【0024】腹水形成法においては、例えば、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にプリスタン(2, 6, 10, 14 テトラメチルペンタデカン)等の鉱油を投与し、その後、ハイブリドーマ1×10<sup>6</sup>～1×10<sup>7</sup>個、好ましくは5×10<sup>6</sup>個を腹腔内に投与する。投与した哺乳動物を1～4週間、好ましくは2週間、飼育した後、腹水又は血清を採取することにより目的とするモノクローナル抗体を取得できる。

【0025】上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合には、硫酸塩分析法、DEAE-セルロース等の陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインAセファロース等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子量や構造によって

ふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィー等の公知の方法を適宜に選択し、これらを単独で又は組み合わせで使用することにより精製を行うことができる。

【0026】3. 本発明のモノクローナル抗体の使用  
本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ウシ由来c-Kitタンパク質を含む試料からのウシ由来c-Kitタンパク質の精製、ウシ由来c-Kitタンパク質の定量、又はウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料からのウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離に使用することができる。ウシ由来c-Kitタンパク質を含む試料からのウシ由来c-Kitタンパク質の精製は、例えば、本発明のモノクローナル抗体を固定化した支持体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって行うことができる。この際使用するウシ由来c-Kitタンパク質を含む試料は、ウシ由来c-Kitタンパク質を含む限り特に限定されず、いかなる試料であってもよい。ウシ由来c-Kitタンパク質の定量は、例えば、本発明のモノクローナル抗体を使用したサンドウィッチ・エライザ法によって実施できる。

【0027】ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料からのウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離は、例えば、次のようにして実施できる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体をビオチンで標識し、これをウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料中に添加して、本発明のモノクローナル抗体とウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞とを反応させる。これに蛍光標識(例えば、蛍光色素フィコエリスリン標識)したストレプトアビジンを添加し、上記ビオチン標識モノクローナル抗体と反応させた後、蛍光活性化セルソーター(FACS)を用いて蛍光染色陽性画分を分取することにより、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離することができる。この際、使用するウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料は、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む限り特に限定されず、いかなる試料であってもよい。なお、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞とは、ウシ由来の細胞であって、かつ細胞膜表面上にc-Kitタンパク質を発現している細胞を意味する。

#### 【0028】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕モノクローナル抗体の作製

##### (1) 抗原の調製

ウシ由来c-Kitタンパク質をコードするcDNA(以下、「ウシ由来c-Kitタンパク質cDNA」という)は既に発明者らによってクローニングされ、その塩基配列が決定されている[Gene 141, 305-306 (1994)]。なお、ウシ由来c-Kitタンパク質cDNAの塩基配列を配列番号1に示す。

【0029】ウシ由来c-Kitタンパク質cDNAの塩基配列から、ウシ由来c-Kitタンパク質が977個のアミノ酸残基からなり、その配列がヒト及びマウスの配列とそれぞれ

90%、83%の相同性を有することが示されている。また、ヒトc-Kitタンパク質及びマウスc-Kitタンパク質のアミノ酸配列の比較から、ウシ由来c-Kitタンパク質がアミノ末端側から順に、分泌シグナル配列(1から24番目のアミノ酸残基)、細胞外領域(25から521番目のアミノ酸残基)、細胞膜貫通領域(522から545番目のアミノ酸残基)、及び細胞内領域(546から977番目のアミノ酸残基)の各領域を有すること、並びにウシ由来c-Kitタンパク質の578から686番目、さらに764から913番目までのアミノ酸残基からなる領域が、チロシンリン酸化酵素活性を担う領域(リン酸化酵素領域)であることが推測されている(図1)。

【0030】そこで、ウシ由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製するための抗原としてウシ由来c-Kitタンパク質の細胞外領域を使用することとし、該細胞外領域を大量に生産、精製するために、既知の方法[Virus Research 21, 123 (1991), Nucl. Acids Res. 15, 10233 (1987)]を用いて、ウシ由来c-Kitタンパク質の細胞外領域の大部分(1から509番目のアミノ酸残基までの領域)をコードするcDNAを組み込んだ組換えバキュロウイルスを作製し、該組換えバキュロウイルスによって形質転換した形質転換体を培養した。

【0031】培養により形質転換体内で生成するウシ由来c-Kitタンパク質の1から509番目のアミノ酸残基までの領域のうち、分泌シグナル配列部分(1から24番目のアミノ酸残基)を除く、25から509番目のアミノ酸残基までの領域(以下、「c-Kitタンパク質細胞外領域」という)が培養液中に分泌されると考えられるので、培養上清から通常の方法によってc-Kitタンパク質細胞外領域を精製した。以下、その詳細を述べる。

【0032】① c-Kitタンパク質細胞外領域をコードするcDNAを含むトランスファーベクターの作製  
以下において別段の記載のない限り、標準的な方法又は条件とは、モレキュラークローニング第2版に記載された方法又は条件を意味する。まず、c-Kitタンパク質細胞外領域をコードするcDNAを作製するために、プラスミドcl.75[Gene 141, 305(1994)]を鋳型とし、図2に示す2種の合成オリゴヌクレオチドA及びBをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応(以下、「PCR」という)を行った。

【0033】鋳型として使用したプラスミドcl.75は、ウシ由来c-Kitタンパク質cDNA(約3800塩基長)がプラスミドpBluescriptSK(-)(ストラタジーン社)の制限酵素EcoRI切断部位に挿入されたプラスミドである(図3)。なお、プラスミドcl.75を組み込んだ大腸菌Jmbkは、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16781として寄託されている(寄託日:平成10年4月23日)。

【0034】プライマーAの塩基配列中、5'側から11~27番目の塩基配列はウシ由来c-Kitタンパク質cDNA中の1

03から119番目の塩基配列と同一であるが、1~10番目の塩基配列はウシ由来c-Kitタンパク質cDNAの塩基配列とは異っており、特に3~8番目の塩基配列(CTCGAG)は制限酵素XhoIによる切断部位配列である。一方、プライマーBの塩基配列はウシ由来c-Kitタンパク質cDNAの789から808番目と相補的である。

【0035】PCRは、次のような一般的な反応条件の下で行なった。すなわち、PCRは、1µg/mlのcl.75、各1µMのオリゴヌクレオチドプライマー、1×PCR緩衝液(パーキンエルマー・ABI社)並びに各0.2mMのデオキシアデノシン-5'-3リン酸、デオキシグアノシン-5'-3リン酸、デオキシチジン-5'-3リン酸及びチミジン-5'-3リン酸からなる反応液100µlと、DNAサーマルサイクラー480(パーキンエルマー、ABI社)とを用い、94で1分、42で2分及び72で3分を1サイクルとして、これを20サイクル行った。

【0036】PCRによって増幅した約700塩基対の長さのDNA断片を、標準的な条件でアガロースゲル電気泳動によって精製した後、制限酵素XhoI及びHindIIIで消化した。消化物を、標準的な条件下、大腸菌T4リガーゼを用いて、予め制限酵素XhoI及びHindIIIで消化したプラスミドcl.75と連結させて、プラスミドpKitPCRを作製した。

【0037】プラスミドpKitPCRを用いて大腸菌JM109[Gene 33, 103 (1985)]を形質転換した後、標準的な方法で形質転換体を培養し、プラスミドpKitPCRを増幅した。次いで、pKitPCRを制限酵素XhoI及びDraIで消化して、ウシ由来c-Kitタンパク質の1から509番目までのアミノ酸残基をコードするcDNA断片を調製し、標準的な方法に従って予めXhoI及びSmaIで消化したプラスミドpBacPAK8(クローンテック社)[Nucleic Acids Res. 17, 2366 (1989), J. Gen. Virol 68, 1233 (1987)]と連結させてトランスファーベクターpBacPAK8CKITを作製した。

【0038】pBacPAK8のSmaI切断部位から16塩基下流には翻訳終止コドン(TAA)が存在する。従って、トランスファーベクターpBacPAK8CKIT中には、ウシ由来c-Kitタンパク質の1から509番目のアミノ酸残基までを含む領域のカルボキシル末端にpBacPAK8に由来する5アミノ酸残基(グリシン-アルギニン-プロリン-ロイシン-アスパラギン)が付加されたタンパク質がコードされていると考えられる。

【0039】② c-Kitタンパク質細胞外領域を生産する組換えバキュロウイルスの作製  
トランスファーベクターpBacPAK8CKIT及びバキュロウイルスBacPAK6のゲノムDNA(クローンテック社)[Biotechniques 14, 810 (1993)]を昆虫培養細胞IPLB-SF-21AE株(以下、「SF21AE細胞」という)[In vitro 13, 213(1977)]に共形質導入(cotransfection)することにより、c-Kitタンパク質細胞外領域を生産する組換えバキュロウイルスBacCKIT株を作製した [Virus Research 21, 123 (1

991), Nucleic Acids Research 15, 10233 (1987)].

【0040】すなわち、トランスファーベクターpBacPAK8CKIT (100 ng) と予め制限酵素Eco81Iで切断したBakPAK6ウイルスゲノムDNA (100 ng) とを、リポフェクチン (ギブコBRL社) (5 µg) と混合し、混合物を培養ディッシュ (35mm) で培養したSF21AE細胞 ( $1.5 \times 10^6$ 細胞) の培養液中に加え、28 で6時間培養した。その後、最終濃度10%となるようにウシ胎児血清を加えて、さらに3日間培養した。その後、培養上清を回収し、TC100培地で段階希釈した後、それぞれ0.2mlの希釈液を、35mmディッシュで培養した  $1.5 \times 10^6$  のSF21AE細胞に1時間吸着させた後、希釈液を除去した。このSF21AE細胞に1%のアガロースを含むTC100培地3mlを加え、3日間培養した後、20 µg/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル-3-D-ガラクトピラノシド (和光純薬) を20 µl添加し、さらに1日間培養した。出現したブランクのうち、青色に染まらないブランクを複数個採取し、それぞれをTC100培地0.3mlに懸濁して各組換えウイルスクローンの原液とした。35mmのディッシュに培養したSF21AE細胞にそれぞれの懸濁液を感染させ、4日間培養することによって組換えウイルスを含む培養液を得た。

【0041】ウイルス感染細胞から標準的方法に従って高分子量DNAを調製し、図2に示す2種の合成オリゴヌクレオチドC及びDをプライマーとして、一般的な条件でPCRを行ない、組換えウイルス各クローンのゲノムDNAにおけるウシc-Kitタンパク質cDNAの有無を調べた。プライマーCの塩基配列はpBacPAK8の1182~1202番目の塩基配列と同一であり、プライマーDの塩基配列はウシ由来c-kitタンパク質cDNAの372~391番目の配列と相補的である。この結果、期待されたとおりにウシ由来c-Kitタンパク質cDNAを含む組換えバキュロウイルスクローンBacCKITが得られた。このクローンをさらに多量の細胞に感染させることにより、約200mlのウイルス液が得られた。

【0042】③ 組換えバキュロウイルスを用いた組換えウシ由来c-Kitタンパク質の生産及び精製

75mlプラスチックボトル (ヌンク社) 内に培養された  $1 \times 10^7$  個のTn-5細胞に、実施例1で得られたウイルス液 ( $1 \times 10^6$  ブランク形成単位) を接種した後、細胞を10mlのTC100培地中で、28 で4日間培養した。その培養上清を回収後、毎分45000回転で1時間遠心し、遠心上清を得た。この上清を透析によって塩交換して10mMトリス (ヒドロキシル) アミノメタン塩酸溶液 (pH8.0) とした。これを流速1ml/分で陰イオン交換カラム (MonoQカラム、ファルマシア社) に吸着させた。

【0043】吸着せずに溶出した画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、「SDS-PAGE」という) で分析したところ、この画分にc-Kitタンパク質細胞外領域のみが含まれることがわかったので、これをマクロセップ10Kカラム (フィルトラン社) を用いて濃縮し、精

製c-Kitタンパク質細胞外領域標品とした。SDS-PAGEで決定されたc-Kitタンパク質細胞外領域の見かけの分子量は65,000であった。計200mlの培養上清から、約4.5mgのc-Kitタンパク質細胞外領域が得られた。

【0044】(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

① 免疫

メスのBalb/cマウス (8週令、日本クレア社) のフットパッド内に、完全フロイントアジュバンド中のc-Kitタンパク質細胞外領域25 µgを2週おきに3回注射した。さらに1週間後に、同一マウスのフットパッド内に生理食塩水中のc-Kitタンパク質細胞外領域30 µgを注射した。計4匹のマウスを免疫した。

【0045】② 細胞融合

最終免疫より3日後のマウスの足リンパ節を取り出し、単一細胞の懸濁液とした。マウス一匹につき  $1 \times 10^8$  個のリンパ節細胞を、  $1 \times 10^7$  個の8-アザグアニン耐性骨髄腫細胞P3/X63-Ag8-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1 (1978)] と、50%ポリエチレングリコール (平均分子量1540、バーリンガーマンハイム社) を用いて融合した。細胞は、96穴プレートに100 µlずつ分注した。HAT培地を1日後、2日後、3日後に各100 µlずつ加えて、HAT耐性細胞、すなわちハイブリドーマを増殖させた。

【0046】③ ハイブリドーマの選択及び単クローン化

c-Kitタンパク質細胞外領域を吸着させ、ブロックエース (大日本製薬) でブロック済みのマイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマの培養上清50 µlを加え、37 で1時間反応させた。生理食塩水で洗浄後、適当に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgGグロブリン50 µlを加え37 で1時間反応させた。生理食塩水で洗浄後、ALPローゼ (シノテスト) を用いてアルカリフォスファターゼの活性を測定した。アルカリフォスファターゼの呈色のあるところをウシ由来c-Kitタンパク質に特異的な抗体産生細胞を含むウェルとした。

【0047】抗体産生細胞の単クローン化は、フィーダー細胞としてマウス腹腔内マクロファージを用いて、選択したハイブリドーマを限界希釈法に3回かけることによりなされた。以上のようにして確立されたハイブリドーマクローンをbK-1と命名し、これを工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16780として寄託した (寄託日:平成10年4月23日)。なお、bK-1により産生された抗体 (以下、「bK-1抗体」という) のサブクラスはIgG1であった。

【0048】④ モノクローナル抗体の採取

予めプリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) を腹腔内に注射したBalb/cマウスの腹腔内に、上記ハイブリドーマを注射した。注射されたマウスを2週間飼育すると、マウス体内にハイブリドーマによる腹水

が形成され、それに伴い腹水内に高濃度の抗体が生成されるので、マウスの腹水を採取した。採取した抗体の精製は、50%飽和硫酸アンモニウムで分画後、DEAE-セファセルカラム（ファルマシア社）を用いて行った。

【0049】〔実施例2〕Cos-7細胞における組換えウシ由来c-Kitタンパク質の発現とこれに対するモノクローナル抗体の反応性の検討

これまでに、ヒト、マウス、及びニワトリ由来c-kitタンパク質をコードするcDNAを遺伝子導入したCos細胞におけるこれらの組換えタンパク質の発現が報告されており、この発現系がこれらの動物種由来のc-Kitタンパク質の生化学的性状を調べるための実験系として使われている[Cell 63, 213 (1990), EMBO Journal 10, 2451 (1991), Journal of Veterinary Medical Sciences 57, 231 (1995)]。

【0050】発現ベクターが導入されたCos細胞において、c-Kitタンパク質は分子量約120,000から150,000の糖タンパク質として細胞膜表面上に発現し、SCFに対するレセプターとしての活性を有することが知られている。そして、組換えc-Kitタンパク質はSCFとの結合活性及びタンパク質チロシンリン酸化酵素活性を有し、そのリン酸化酵素活性はSCFとの結合によって顕著に増大する。そこで、組換えウシ由来c-Kitタンパク質をCos-7細胞[Cell 23, 175 (1981)]で発現させ、これに対するモノクローナル抗体の反応性を検討した。以下に、その詳細を述べる。

【0051】(1) Cos-7細胞における組換えウシ由来c-Kitタンパク質の発現とウシ由来SCFに対する結合活性の測定

① ウシ由来c-Kitタンパク質に対するウサギ抗血清の作製

組換えウシ由来c-Kitタンパク質のCos-7細胞での発現を検出するため、以下に示すように、ウシ由来c-Kitタンパク質と細菌由来グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質（以下、「GST-c-Kit」という）を大腸菌において発現させ、それを抗原としてウサギ抗血清（以下、「抗GST-c-Kit抗血清」という）を作製した。

【0052】以下、その詳細を述べる。まず、ウシ由来c-Kitタンパク質の25番目のアミノ酸残基からカルボキシル末端までの領域をコードするcDNAを作製するため、ウシ由来c-Kitタンパク質cDNAを有するプラスミドcl.75 [Gene 141, 305(1994)]を鋳型とし、図2に示す2種の合成オリゴヌクレオチドB及びEをプライマーとして、一般的な反応条件下でPCRを行った。

【0053】プライマーEの塩基配列中、5'側から11～26番目の配列はウシ由来c-Kitタンパク質cDNA中の173から188番目の塩基配列と同一であるが、1～10番目の塩基配列はウシ由来c-Kitタンパク質cDNAの配列とは異なっており、特に3～8番目の塩基配列(CTCGAG)は制限酵素

XhoIによる切断部位配列であり、7～12番目の塩基配列(AGGCCT)は制限酵素StuIによる切断部位配列である。

【0054】PCRによって増幅した約650塩基対の長さのDNA断片を、標準的な条件でアガロースゲル電気泳動によって精製した後、制限酵素XhoI及びHind IIIで消化した。消化物を、標準的な条件下、大腸菌T4リガーゼを用いて、予め制限酵素XhoI及びHind IIIで消化したプラスミドcl.75と連結させて、プラスミドpBScKITを作製した。

【0055】このプラスミドを用いて大腸菌JM109を形質転換した後、標準的な方法で形質転換体を培養し、プラスミドpBScKITを増幅した。次いで、pBScKITを制限酵素StuI及びEcoRIで消化して、ウシ由来c-Kitタンパク質の25番目のアミノ酸残基からカルボキシル末端までをコードするcDNA断片を調製し、標準的な方法に従って、予めSmaI及びEcoRIで消化した原核細胞用遺伝子発現プラスミドpGEX-3X（ファルマシアバイオテク社）[Gene 67, 31 (1998)]と連結してプラスミドpGEXbckitを作製した。このプラスミドには、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのカルボキシル末端にウシ由来c-Kitタンパク質の25番目のアミノ酸残基からカルボキシル末端までの領域が結合した融合タンパク質（GST-c-Kit）がコードされていると考えられる。

【0056】pGEXbckitを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、GST-c-Kitを発現させた。すなわち、pGEXbckitで形質転換された大腸菌を、100 µg/mlアンピシリン、2%グルコースを含む8mlの2×TY培地（以下、「2×TY-G培地」という）で一晩培養し、これを800mlの2×TY-G培地に加え、37℃でさらに培養した。細胞密度約2×10<sup>8</sup> cells/mlまで大腸菌を増殖させた後、0.1mMのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを加え、融合タンパク質の発現を誘導し、さらに37℃で1時間培養した。この培養液を4000×gで10分間遠心して大腸菌体を回収し、それを1mg/mlのリゾチームを含む50mlの溶解用バッファー（10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、30mM NaCl、0.25% Tween20、10mM 2-メルカプトエタノール、10mM EDTA、10mM EGTA）に懸濁した。この懸濁液を4回凍結融解した後、超音波破碎し、大腸菌体を溶解した。これを800×gで10分間遠心し、融合タンパク質を含む沈殿を回収し、これをSDS-PAGEサンプルバッファー6mlに懸濁した。この試料を、分取用7.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、GST-c-Kitのみを含む溶出画分を集めた。計4リットルの大腸菌液から得られた溶出画分を、マクロセップ10Kカラム（フィルトラン社）を用いて濃縮することにより、約9 mgの精製融合タンパク質溶液が得られた。これを標準的な方法に従いウサギに免疫し、抗GST-c-Kit抗血清を作製した。

【0057】さらに、得られた抗血清のアフィニティー精製を行った。すなわち、実施例1(1)③において組換えバキュロウイルスを用いて生産された組換えウシ由



来c-Kitタンパク質約0.5mgを、標準的な方法によりHiTrap NHS-activatedカラム（ファルマシア社）に結合させ、アフィニティーカラムを作製した。抗血清 1mlを10mMトリス（ヒドロキシル）アミノメタン塩酸溶液（pH 7.4）で10倍に希釈し、これを流速 1ml / 分でアフィニティーカラムに吸着させた。カラムを10mMトリス（ヒドロキシル）アミノメタン塩酸溶液（pH 7.4）で洗浄後、カラムに結合した抗体を 4mlの100mMグリシン水溶液（pH 2.5）で溶出した。これをPBSに対して透析することにより、アフィニティー精製抗ウシ由来c-Kit抗体を得た。

【0058】② ウシ由来c-Kitタンパク質発現ベクターの作製とCos-7細胞への遺伝子導入

動物細胞においてウシ由来c-Kitタンパク質を発現させるための発現ベクターpSVLbckitを作製した。まず、標準的な方法に従い、プラスミドcl.75を制限酵素XhoI及びBamHIで切断することによりcl.75に含まれるウシ由来c-Kitタンパク質cDNAの全領域を含む断片を調製した。これを予めXhoI及びBamHIで切断した真核細胞用発現プラスミドpSVL（ファルマシア社）に接続し、発現プラスミドpSVLbckitを作製した。

【0059】Cos-7細胞への遺伝子導入はリポソーム法を用いて行った[Biotechniques 12, 643 (1987)]。すなわち、発現用プラスミドpSVLbckit 4 µgとプラス試薬（ギブコ BRL社）20 µlを混合し、室温で15分放置した。ここに30 µlのリポフェクタミン（ギブコ BRL社）を加え、さらに室温で15分放置した。この混合物を、予めOpti-MEM培地（ギブコ・ベセスダリサーチラボラトリー社）で洗浄したCos-7細胞に添加し、37 °Cで3時間放置し遺伝子導入を行った。その後、最終濃度10%になるようにウシ胎児血清を加え、さらに37 °Cで2日間培養して、以下の実験に用いた。

【0060】③ 抗GST-c-Kit抗血清を用いた、Cos-7細胞における組換えウシ由来c-Kitタンパク質の発現の検出

遺伝子導入されたCos-7細胞における組換えウシ由来c-Kitタンパク質の発現を、実施例2の(1)の①で示したアフィニティー精製抗ウシ由来c-Kit抗体及び抗GST-c-Kit抗血清を用いて間接免疫蛍光染色法及び免疫沈降法によって確認した。間接免疫蛍光染色は以下に行った。

【0061】発現ベクターを遺伝子導入したCos-7細胞及び遺伝子導入していないCos-7細胞それぞれ $1 \times 10^5$ 個を、50 µlのアフィニティー精製抗ウシ由来c-Kit抗体に懸濁し、4 °Cで20分放置した。これを1%ウシ胎児血清添加PBS（以下、「FCS/PBS」という）で洗浄後、50 µlのFCS/PBSに懸濁し、これに蛍光色素フルオレセインイソチオシアネートで標識した抗ウサギIgGヤギ抗血清（コールター社）を1 µl加え4 °Cで20分放置した。次いで、FCS/PBSで洗浄後、100 µlのFCS/PBSに懸濁し、蛍光

活性化セルソーター（EPICS Elite, コールター社）を用いて細胞の蛍光強度を測定した。

【0062】その結果、発現プラスミドを遺伝子導入したCos-7細胞の約15%が抗GST-c-Kit抗血清によって染色されることが示された。これに対して遺伝子導入を行っていないCos-7細胞は全く染色されなかった。一方、免疫沈降を以下のように行った。

【0063】すなわち、発現ベクターpSVLbckitを遺伝子導入したCos-7細胞及び遺伝子導入していないCos-7細胞それぞれ $2 \times 10^6$ 個を100mmプラスチックディッシュで培養し、遺伝子導入から2日後に培地を10%の透析ウシ胎児血清を添加したメチオニン・システイン不含DMEM培地（ギブコ・ベセスダリサーチラボラトリー社）に交換した。これに4.1 MBqの $[^{35}\text{S}]$ Expressタンパク質ラベリングミックス（NEN社）を添加して、37 °Cで4時間放置することにより、細胞のタンパク質を放射性アミノ酸で標識した。細胞をPBSで洗浄した後、1.5mlのRIPAバッファー[Molecular and Cellular Biology 8, 4896 (1988)]で溶解し、細胞溶解液を得た。1.5mlの溶解液に対し、体積比50%でRIPAバッファーに懸濁したプロテインGセファロース（ファルマシアバイオテック社）を50 µl加え4 °Cで一晩放置した後、これを $150 \times g$ で30分間遠心し、上清を回収した。この上清250 µlに抗GST-c-Kit抗血清を5 µl、及びプロテインGセファロース懸濁液を20 µl加え、4 °Cで一晩反応させた。これを遠心して得られた免疫沈降物をRIPAバッファーで4回洗浄した後、SDS-PAGEサンプルバッファーに懸濁し、100 °Cで5分間加熱した。これを、7.5%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した後、ゲルを増感剤（エンライトニング、デュボン社）で15分処理した。次いで、ゲルを乾燥させ、X線フィルムに感光させた。

【0064】その結果、発現プラスミドを遺伝子導入したCos-7細胞においては、組換えウシ由来c-Kitタンパク質が分子量約135,000と150,000の2本のバンドとして検出された（図4）。これに対して、遺伝子導入を行っていないCos-7細胞においては、これらのバンドが認められなかった。組換えマウス由来c-Kitタンパク質をCos細胞で発現させた研究において、マウス由来c-Kitタンパク質は、分子量130,000及び150,000の2本のバンドとして検出されている[EMBO Journal 10, 2451 (1991)]。組換えウシ由来c-Kitタンパク質の分子量はこれと良く一致するものである。間接免疫蛍光染色法及び免疫沈降法による以上の結果から、pSVLbckitが導入されたCos-7細胞において組換えウシ由来c-Kitタンパク質が細胞膜表面上に発現していることが確認された。

【0065】④ 組換えウシ由来c-Kitタンパク質のウシ由来SCFに対する結合活性の測定  
pSVLbckitを遺伝子導入したCos-7細胞上に発現している組換えウシ由来c-Kitタンパク質のウシ由来SCFに対する結合活性を、放射標識したSCFを用いた結合実験により



検討した。まず、以下のようにして組換えウシ由来SCFを作製した。ウシ由来SCFをコードするcDNA(以下、「ウシ由来SCFcDNA」という)はすでに発明者らによってクローニングされ、塩基配列が決定されている[Biochimica Biophysica Acta 1223, 148-150 (1994)]。なお、ウシ由来SCFをコードするcDNAの塩基配列を配列番号2に示す。

【0066】ウシ由来SCFcDNAの塩基配列[Biochimica Biophysica Acta 1223, 148-150 (1994)]から、ウシ由来SCFが274個のアミノ酸残基からなり、その配列がヒト・マウスの配列と比べてそれぞれ84.7%、79.6%の相同性を有することが示されている。また、ヒトSCF、マウスSCF及びラットSCFのアミノ酸配列との比較から、ウシ由来SCFが、アミノ末端側から順に、分泌シグナル配列(-25から-1番目のアミノ酸残基)、細胞外領域(+1から190番目のアミノ酸残基)、細胞膜貫通領域(191から213番目のアミノ酸残基)、及び細胞内領域(214から249番目のアミノ酸残基)の各領域を有すること、並びにウシ由来SCFの+1から165番目あるいは166番目までのアミノ酸残基からなる領域が、可溶性ウシ由来SCFとして機能する領域であることが推測された。

【0067】そこで、可溶性ウシ由来SCFを大量に生産・精製する目的で、ウシ由来SCFの-25番目から165番目までのアミノ酸残基を含むタンパク質(以下、「短縮型ウシ由来SCF」という)をコードするcDNAを作製し、既知の方法[Virus Research 21, 123 (1991)、Nucleic Acids Research 15, 10233 (1987)]を用いて短縮型ウシ由来SCFをコードするcDNAを含む組換え体を作製し、該組換え体によって形質転換された形質転換体を培養した。培養液中に可溶性ウシ由来SCFが分泌されると考えられるので、培養液から通常の方法によってウシ由来SCFを精製した。以下、その詳細を述べる。

【0068】i)ウシ由来SCFを生産する組換えバキュロウイルスの作製

まず、短縮型ウシ由来SCFをコードするcDNAを作製するため、ウシ由来SCFcDNAを有するプラスミドpbSCF1[Biochimica Biophysica Acta 1223, 111-222 (1994)]を鋳型として、図2に示す2種の合成オリゴヌクレオチドF及びGをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。プラスミドpbSCF1は、ウシ由来SCFcDNAがプラスミドpBluescript<sup>TM</sup> SK(-)(ストラタジーン社)の制限酵素BamHI切断部位とXbaI切断部位との間に挿入され、そのBamHI切断部位とcDNAの1番目の塩基の間に16塩基の配列[(5')-CAGCGCTGCCTTCCT-(3')]が挿入されているベクターである。なお、プラスミドpbSCF1を組み込んだ大腸菌を工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16232として寄託した(寄託日:平成9年5月19日)。

【0069】プライマーFの塩基配列中、5'側から9番目から24番目の配列はpbSCF1中の16塩基の挿入配列と同一である。プライマーGの塩基配列中5'側から10番目から25番目の配列はウシ由来SCFcDNAの塩基番号571番~556番と相補的である。しかし、それ以降の塩基配列はcDNAの配列とは異なっており、特に、7番目から9番目までの配列(TTA)がタンパク質合成終始コドンTAAと相補的な配列になっている。また、3番目から8番目までの配列(AAGCTT)は制限酵素HindIIIによる切断部位配列である。

【0070】PCRは一般的な反応条件の下で行なった。すなわち、PCRは、2µg/mlのpbSCF、各1µMのオリゴヌクレオチドプライマー、1×PCR緩衝液(パーキン・エルマー・ABI社)並びに各0.2mMのデオキシアデノシン-5'-3リン酸、デオキシグアノシン-5'-3リン酸、デオキシシチジン-5'-3リン酸及びチミジン-5'-3リン酸からなる反応液100µlと、DNAサーマルサイクラ-480(パーキン・エルマー・ABI社)とを用い、94で1分、52で1分及び72で2分を1サイクルとして、これを15サイクル行った。

【0071】PCRによって増幅した約600塩基対の長さのDNA断片を標準的な条件でアガロースゲル電気泳動によって精製したのち、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化した。消化物を標準的な条件で、大腸菌T4リガーゼを用いて、予め制限酵素BamHI及びHindIIIで消化したプラスミドpBluescript SK(-)(ストラタジーン社)と連結させて、プラスミドpSbSCFを調製した。このプラスミドを用いて大腸菌JM109[Gene 33,103-119(1985)]を形質転換した後、標準的な方法で、プラスミドpSbSCFを増幅した。次いで、pSbSCFを制限酵素HindIII及びSmaIで消化してcDNA断片を調製し、標準的な方法に従って、その両末端を大腸菌DNAポリメラーゼIで平滑化した後、プラスミドpAcYM1[Virus Research 21, 123 (1991)]のSmaI切断部位に挿入して、トランスファーベクターpAcSCFを作製した。

【0072】pAcSCF及びバキュロウイルスBakPAK6のゲノムDNA(ストラタジーン社)をSF21AE細胞(上出)に共形質導入(cotransfection)する[Virus Research 21, 123 (1991)、Nucleic Acids Research 15, 10233 (1987)]ことにより、ウシ由来SCFを生産する組換えバキュロウイルスAcSCF株を作製した。すなわち、pAcSCF 10ng及び予め制限酵素Eco81Iで切断したBakPAK6ウイルスゲノムDNA 100ngをリポフェクシン(ギブコ-BRL社)5µgと混合し、混合物を3.5cmの培養ディッシュで培養されたSF21AE細胞(1×10<sup>6</sup>細胞)の培養液に加え、28で6時間培養した。その後、最終濃度10%となるようにウシ胎児血清を加えて、さらに3日間培養した。培養上清を回収し、TC100培養液で段階希釈した後、それぞれ0.1mlの希釈液を、3.5cmディッシュで培養した10<sup>6</sup>のSF21AE細胞に1時間吸

着させた後、培養上清を除いた。このSF21AE細胞に1.5%のアガロースを含むTC100 培地 2mlを加え、3日間培養した。その後、10 $\mu$ g/mlの5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドイル - D - ガラクトピラノシド (和光純薬) を含むTC100 培地 1mlを重層し、さらに1日間培養した。出現したプラークのうち、青色に染まらないプラークを複数個採取し、それぞれをTC100 培地 0.3mlに懸濁して各組換えウイルスクローンの原液とした。3.5mlのディッシュに培養したSF21AE細胞にそれぞれの懸濁液を感染させ、4日間培養することによって組換えウイルスを含む培養液を得た。レムリー法 [Nature 227, 680 (1970)] に従い、培養液の一部(各10 $\mu$ l)をSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、「SDS - PAGE」という)し、泳動後ゲルをクマシー・ブリリアント・ブルーで染色して、培養液中の分子量約20,000のウシ由来SCFの有無を検討した。一方、ウイルス感染細胞から標準的方法に従って高分子量DNAを調製し、このDNAを制限酵素BamHIで消化した後、標準的な方法に従ってアガロースゲル電気泳動し、<sup>32</sup>P標識したウシSCFcDNAをプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションで分析し、組換えウイルス各クローンのゲノムDNAにおけるSCFcDNAの有無を調べた。この結果、期待された通りにSCFcDNAを含み、かつ培養上清中にウシ由来SCFを分泌する組換えパキウウイルスクローンAcbSCF株を得た。このクローンの培養上清をさらに多量のSF21AE細胞に感染させることにより、約200mlのウイルス液を得た。このウイルス液中のウイルス感染価は2 $\times$ 10<sup>7</sup>プラーク形成単位(PFU)/mlだった。

【0073】ii) 組換えパキウウイルスを用いた組換えウシ由来SCFの生産及び精製

75ml培養用プラスチックボトル(ヌンク社)内に培養された1 $\times$ 10<sup>7</sup>個のTn-5細胞に、上記ウイルス液(1 $\times$ 10<sup>6</sup>PFU)を接種し、接種後細胞を10mlのTC100 培養液中で28、4日間培養した。その培養上清を回収後、ゲル濾過カラム(PD-10 カラム、ファルマシア社)を用いて塩交

換し、10mMトリス(ヒドロキシル)アミノメタン塩酸(以下、「トリス塩酸」という)溶液(pH8.0)とした。これを流速1ml/分で陰イオン交換カラム(MonoQ カラム、ファルマシア社)に吸着させた後、10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)存在下、0~1 MまでのNaCl濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。各1mlずつの溶出画分の一部をレムリー法によるPAGEで分析してウシ由来SCFを含む画分を探し、これを集めて、PD-10カラムで塩交換し、10mM酢酸ナトリウム溶液(pH4.6)とした。これを流速1ml/分で陽イオン交換カラム(MonoS カラム、ファルマシア社)に吸着させた後、10mM酢酸ナトリウム(pH4.6)存在下、0から1 MのNaCl濃度勾配でタンパク質を溶出させた。各溶出画分の一部をPAGEで分析したところ、約0.5MのNaCl濃度で溶出される画分がウシ由来SCFのみを含んでいることがわかったので、これを集め精製組換えウシ由来SCF標品とした。これをSDS - PAGEで分析した結果、組換えウシ由来SCFの分子量が19000から23000であることが示された(図8)。精製されたウシ由来SCFの重量を定量的アミノ酸分析によって決定した。その結果、約400mlの培養上清から約2mgの精製ウシ由来SCFが得られた。

【0074】以上の(i)及び(ii)により得られた組換えウシ由来SCFをクロラミンT法[Nature 194,495 (1962)]により<sup>125</sup>Iで標識した。標識されたウシ由来SCF(以下、「<sup>125</sup>I - bSCF」という)の比活性は900 GBq/nmolだった。pSVLbckitを遺伝子導入したCos-7細胞及び遺伝子導入していないCos-7細胞(各2 $\times$ 10<sup>5</sup>)を20fmolの<sup>125</sup>I-bSCFと22で90分反応させた。その後、細胞に結合した<sup>125</sup>I - bSCFと遊離している<sup>125</sup>I - bSCFとをフタレート油を用いて分離し、細胞に結合した<sup>125</sup>I - bSCFの放射活性をガンマ線カウンターで測定した。その結果を以下の表1に示す。

【0075】

【表1】

組換えウシ由来c-Kitタンパク質と<sup>125</sup>I標識ウシ由来SCFとの結合

細胞	放射活性(cpm)
Cos-7	1049
pSVLbKit導入Cos-7	23875
pSVLbKit導入Cos-7 +非標識ウシ由来SCF	2258

【0076】表1に示すように、<sup>125</sup>I - bSCFは、発現プラスミドを遺伝子導入したCos-7細胞に結合したが、遺伝子導入していないCos-7細胞への有意な結合は認められなかった。また、反応の際20 fmolの<sup>125</sup>I - bSCFと

もに100倍過剰量の非標識組換えウシ由来SCFを同時に反応させた場合、遺伝子導入されたCos-7細胞と<sup>125</sup>I - bSCFとの結合が競合的に阻害されたことから、Cos-7細胞で発現している組換え型ウシ由来c-Kitタンパク質と<sup>125</sup>I -

bSCFとの結合が特異的であることが確認された。以上の結果から、pSVLbckitを導入されたCos-7細胞表面上に発現している組換えウシ由来c-Kitタンパク質が、ウシ由来SCFと特異的に結合する活性をもつことが示された。

【0077】(2)組換えウシ由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体の反応性の検討

Cos-7細胞表面上に発現している組換えウシ由来c-Kitタンパク質に対するbK-1抗体の反応性を、実施例2の

(1)の③の方法に準じて間接免疫蛍光染色法により検討した。この際、細胞 $1 \times 10^5$ 個に対し、bK-1抗体を $1 \mu\text{g}$ 加え反応させた。その結果、pSVLbckitを遺伝子導入したCos-7細胞のおよそ30%が特異的に染色されることが観察された。これに対して遺伝子導入を行っていないCos-7細胞は全く染色されなかった。

【0078】ついで、実施例2の(1)の③の方法に準じて免疫沈降法による検討を行った。この際、Cos-7細胞溶解液 $250 \mu\text{l}$ に対し、bK-1抗体を $5 \mu\text{g}$ とプロテインGセファロース懸濁液を $20 \mu\text{l}$ 加え、4で一晚反応させた後、免疫沈降物を検出した。その結果、発現プラスミドを遺伝子導入したCos-7細胞において分子量約135,000と150,000の2本のバンドが検出された(図5)。これらのバンドの分子量は実施例2の(1)の③において抗GST-c-Kit抗血清を用いて検出された組換えウシ由来c-Kitタンパク質の分子量と一致していることから、bK-1抗体が組換えウシ由来c-Kitタンパク質と特異的に反応することが示された。これに対して遺伝子導入を行っていないCos-7細胞においては、これらのバンドは検出されなかった。

【0079】〔実施例3〕モノクローナル抗体を用いたウシ血管内皮細胞中のウシ由来c-Kitタンパク質の検出ヒトにおいては血管内皮細胞でヒト由来c-Kitタンパク質が発現していることが知られている[Blood 83, 2145 (1994)]。そこで、ウシ血管内皮細胞に発現するウシ由来c-Kitタンパク質に対するモノクローナル抗体の反応性を間接免疫蛍光染色法及び免疫沈降法により検討した。

【0080】(1)免疫蛍光染色法による検討

まず、ビオチンで標識されたbK-1抗体(以下、「ビオチン標識bK-1抗体」という)を作製した。すなわち、 $2\text{mg}$ のbK-1抗体に、 $0.2 \text{ mg}$ のスルフォ-NHS-LC-ビオチン(ピアス社)を加え、室温で30分放置した。その後、ゲル濾過カラム(PD-10カラム、ファルマシアバイオテック社)を通し、ビオチン標識bK-1抗体を含む画分を回収した。

【0081】ウシ副腎毛細血管内皮細胞由来EJG細胞[米国特許第4,670,394] $1 \times 10^5$ 個と $0.5 \mu\text{g}$ のビオチン標識bK-1抗体とを4で20分反応させた。これをFCS/PBSで洗浄後、蛍光色素フィコエリスリンで標識されたストレプトアビジン(コールター社)と4で20分反応させた。こ

れをFCS/PBSで洗浄後、 $100 \mu\text{l}$ のFCS/PBSに懸濁し、蛍光活性化セルソーター(EPICS Elite、コールター社)を用いて細胞の蛍光強度を測定した。この際、ビオチン標識bK-1抗体を反応させず、フィコエリスリンで標識したストレプトアビジンのみを反応させたものを陰性対照とした。

【0082】その結果、陰性対照と比較して、ビオチン標識bK-1抗体を反応させた場合において、64%のEJG細胞の蛍光強度が顕著に増加した。この結果から、EJG細胞のうちの64%に発現しているウシ由来c-Kitタンパク質にビオチン標識bK-1抗体が特異的に反応することが示された。

【0083】(2)免疫沈降法による検討

実施例2の(1)の③に述べた方法に準じて免疫沈降を行った。予め $100\text{mm}$ ディッシュに培養しておいたEJG細胞( $3 \times 10^6$ 個)の培地を、10%透析ウシ胎児血清添加メチオニン-システイン不含DMEM培地に交換し、そこに $20.3 \text{ MBq}$ の $[^{35}\text{S}]$ Expressタンパク質ラベリングミックス(ニューイングランドニュークリアー社)を添加し、37で4時間放置した。これをPBSで洗浄後、 $1.5\text{ml}$ のRIPAバッファで可溶化し、細胞溶解液とした。 $1.5\text{ml}$ の細胞溶解液に $50 \mu\text{l}$ のプロテインGセファロース懸濁液を加え、4で一晚放置し、これを $150\text{g}$ で30分間遠心し、上清を回収した。この上清 $500 \mu\text{l}$ に、 $5 \mu\text{g}$ のbK-1抗体と $20 \mu\text{l}$ のプロテインGセファロース懸濁液を加え、4で一晚反応させ免疫沈降を行った。その後、実施例2の(1)の③で述べた方法により免疫沈降物の検出を行った。

【0084】その結果、分子量135,000及び150,000の2本のバンドがbK-1抗体によって特異的に免疫沈降された(図6)。それに対し、bK-1抗体と反応させない場合(陰性対照)にはこれらのバンドは認められなかった。これら2本のバンドの分子量が実施例2の(2)においてbK-1抗体を用いて検出された組換えウシ由来c-Kitタンパク質の分子量と一致することから、bK-1抗体がEJG細胞中のウシ由来c-Kitタンパク質と特異的に反応することが示された。

【0085】〔実施例4〕ウシ骨髓細胞からのウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離

ヒト骨髓中に含まれるc-Kitタンパク質陽性細胞がモノクローナル抗体を用いて分離されており、コロニー形成能を有する血液前駆細胞がc-Kitタンパク質陽性細胞画分に高頻度に含まれていることがコロニー形成試験(colony formation assay)によって明らかとなっている。[特願平4-510017, Blood 78, 30 (1991), Blood 78, 14 03 (1991)]。そこで、bK-1抗体を用いてウシ骨髓細胞からウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離し、そのコロニー形成能について検討した。

【0086】正常な新生雄ウシの大腿骨から骨髓細胞を採取し、これを0.15%EDTAを添加したPBSで希釈した後、フィコール・バック(ファルマシアバイオテック社)

を用いた密度勾配遠心により単核細胞を分取した。これをRPMI 1640培地中で37℃で2時間培養した後、プラスチックディッシュに付着しない細胞のみを回収した。これを34%のCP-1(極東製薬)と4%のウシ血清アルブミンを含むイスコーブ培地(ギブコーBRL社)に懸濁し、-80℃で保存して実験に用いた。融解後の骨髓単核細胞 $2 \times 10^7$ 個に、ピオチン標識bK-1抗体 $1 \mu\text{g}$ を加え、4℃で20分放置した。これをFCS/PBSで洗浄した後、蛍光色素フィコエリスリンで標識したストレプトアビジンを加え、4℃で20分放置した。これをFCS/PBSで洗浄した後、蛍光活性化セルソーター(EPICS Elite、コールター社)を用いて、蛍光染色陽性及び陰性の細胞画分を分取した。

【0087】その結果、蛍光染色陽性の細胞画分に含まれる全細胞のうちの94%が、c-Kitタンパク質陽性の細胞であった(図7)。この結果より、c-Kitタンパク質陽性細胞及びc-Kitタンパク質陰性細胞をそれぞれ蛍光染色陽性及び陰性の細胞画分として分取できることが判明した。分取された細胞のコロニー形成能を調べるため、既に報告されている方法[Experimental Hematology 19, 226 (1991)]に準じてコロニー形成試験を行った。

【0088】すなわち、各画分の細胞( $2 \times 10^4$ 個)を1 mlのコロニー形成試験用培養液に懸濁し、これを35 mmプラスチックディッシュ中で、37℃で7日間培養した後、形成されたコロニーの数を数えた。30%ウシ胎児血清、1.0%メチルセルロース、1%ウシ血清アルブミン、0.1 mMメルカプトエタノール、2 mMグルタミン、2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンフォテリシンB、50ユニット/mlペニシリン、

50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、及び100 ng/ml組換えウシ由来SCFを含むイスコーブ培地をコロニー形成試験用培地とした。

【0089】その結果、細胞 $2 \times 10^4$ 個あたり、分画前の細胞では平均30個、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞画分では平均224個、陰性細胞画分では平均3個のコロニー形成が認められた。また、コロニー形成試験用培養液からウシ由来SCFを除いた条件では、いずれの細胞画分についてもコロニー形成が認められなかった。以上の結果から、bK-1抗体を用いて分離されたc-Kitタンパク質陽性細胞画分が、ウシ由来SCFに依存したコロニー形成能を有する血液前駆細胞を高頻度を含むことが示された。

【0090】

【発明の効果】本発明により、ウシ由来c-Kitタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を用いたウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法が提供される。本発明のモノクローナル抗体を使用することにより、ウシ由来c-Kitタンパク質を含む試料からのウシ由来c-Kitタンパク質の精製、ウシ由来c-Kitタンパク質の定量、又はウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離を効率よくかつ精度よく行うことができる。

【0091】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3069

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：mRNA to cDNA

配列

```

CTTGCGCTC GCGGCTCTGG GGGCTCGGCT TTGCCGCGCT CCCGGCACTC GGGCGAGAGC   60
CGGAACGTGG AACAGAGCTC CGGTCCAGC GCAGCCACCG CG ATG AGA GGC GCT   114
                                     Met Arg Gly Ala
                                     1
CGC GGC GCC TGG GAT TTC CTC TTC GTT CTG CTG CTC CTG CTC CTC GTC   162
Arg Gly Ala Trp Asp Phe Leu Phe Val Leu Leu Leu Leu Leu Val
   5             10             15             20
CAG ACA GGC TCT TCT CAG CCA TCT GTG AGT CCA GGG GAA CTG TCT CTA   210
Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Leu Ser Leu
           25             30             35
CCA TCT ATC CAC CCA GCA AAA TCA GAG TTA ATT GTC AGC GTT GGC GAC   258
Pro Ser Ile His Pro Ala Lys Ser Glu Leu Ile Val Ser Val Gly Asp
           40             45             50
GAG ATT AGG CTG TTA TGC ACC GAT CCA GGA TTT GTC AAG TGG ACT TTT   306
Glu Ile Arg Leu Leu Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe
   55             60             65

```

GAG ATC CTG GGT CAA CTG AGT GAG AAA ACA AAC CCG GAA TGG ATC ACC	354
Glu Ile Leu Gly Gln Leu Ser Glu Lys Thr Asn Pro Glu Trp Ile Thr	
70 75 80	
GAG AAA GCA GAG GCC ACA AAT ACA GGC AAT TAC ACG TGC ACC AAT AAA	402
Glu Lys Ala Glu Ala Thr Asn Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Thr Asn Lys	
85 90 95 100	
GGC GGC TTG AGC AGT TCC ATT TAT GTG TTT GTT AGA GAC CCC GAG AAG	450
Gly Gly Leu Ser Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Glu Lys	
105 110 115	
CTT TTC CTG ATT GAC CTT CCC TTG TAC GGG AAA GAA GAA AAC GAC ACG	498
Leu Phe Leu Ile Asp Leu Pro Leu Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Thr	
120 125 130	
CTG GTT CGC TGT CCC CTG ACA GAC CCC GAG GTG ACC AAT TAC TCT CTT	546
Leu Val Arg Cys Pro Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Asn Tyr Ser Leu	
135 140 145	
ACG GGG TGT GAG GGG AAA CCT CTC CCC AAG GAT TTG ACA TTT GTG GCC	594
Thr Gly Cys Glu Gly Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Thr Phe Val Ala	
150 155 160	
GAC CCC AAG GCA GGT ATC ACA ATC AGA AAT GTG AAG CGC GAG TAC CAT	642
Asp Pro Lys Ala Gly Ile Thr Ile Arg Asn Val Lys Arg Glu Tyr His	
165 170 175 180	
CGG CTC TGT CTG CAC TGC TCA GCG AAT CAG AGG GGC AAG TCC ATG CTG	690
Arg Leu Cys Leu His Cys Ser Ala Asn Gln Arg Gly Lys Ser Met Leu	
185 190 195	
TCG AAG AAA TTC ACT CTG AAA GTG CGG GCA GCC ATC AAA GCT GTG CCA	738
Ser Lys Lys Phe Thr Leu Lys Val Arg Ala Ala Ile Lys Ala Val Pro	
200 205 210	
GTT GTG TCT GTG TCC AAA ACC AGC TAT CTT CTC AGG GAA GGA GAG GAA	786
Val Val Ser Val Ser Lys Thr Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu	
215 220 225	
TTT GCA GTG ACA TGC TTG ATT AAA GAC GTG TCT AGT TCC GTG GAC TCT	834
Phe Ala Val Thr Cys Leu Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Asp Ser	
230 235 240	
ATG TGG ATA AAG GAA AAC AGC CAG CAG ACT AAA GCA CAG ACG AAG AAG	882
Met Trp Ile Lys Glu Asn Ser Gln Gln Thr Lys Ala Gln Thr Lys Lys	
245 250 255 260	
AAT AGC TGG CAT CAG GGT GAC TTC AGT TAT CTC CGT CAG GAA AGG TTG	930
Asn Ser Trp His Gln Gly Asp Phe Ser Tyr Leu Arg Gln Glu Arg Leu	
265 270 275	
ACT ATC AGC TCA GCA AGA GTG AAT GAT TCC GGT GTG TTC ATG TGT TAC	978
Thr Ile Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr	
280 285 290	
GCC AAT AAC ACT TTT GGA TCA GCA AAT GTC ACA ACA ACC TTA GAA GTA	1026
Ala Asn Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val	
295 300 305	
GTA GAT AAA GGA TTC ATT AAT ATC TTC CCT ATG ATG AAC ACA ACA GTA	1074
Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Met Asn Thr Thr Val	
310 315 320	
TTT GTA AAT GAT GGA GAG AAT GTG GAT CTG GTT GTT GAA TAT GAG GCA	1122
Phe Val Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Val Val Glu Tyr Glu Ala	

325	330	335	340	
TAT CCC AAA CCT GTA CAC CGA CAA TGG ATA TAT ATG AAC AGA ACC TCC				1170
Tyr Pro Lys Pro Val His Arg Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Ser				
	345	350	355	
ACT GAT AAG TGG GAC GAT TAT CCT AAG TCT GAA AAT GAA AGT AAT ATC				1218
Thr Asp Lys Trp Asp Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile				
	360	365	370	
AGA TAC GTA AAT GAA CTT CAT CTA ACC AGA TTA AAA GGG ACT GAA GGA				1266
Arg Tyr Val Asn Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly				
	375	380	385	
GGC ACT TAC ACA TTT CAC GTG TCC AAT TCT GAT GTC AAT TCT TCC GTG				1314
Gly Thr Tyr Thr Phe His Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ser Ser Val				
	390	395	400	
ACA TTT AAT GTT TAC GTG AAC ACA AAA CCA GAA ATC CTG ACG CAT GAC				1362
Thr Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr His Asp				
	405	410	415	420
AGG CTG GTG AAT GGC ATG CTA CAG TGC GTG GCC GCA GGG TTC CCG GAG				1410
Arg Leu Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu				
	425	430	435	
CCA ACC ATC GAT TGG TAC TTT TGT CCA GGA ACT GAG CAG AGG TGT TCT				1458
Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser				
	440	445	450	
GTT CCC GTT GGG CCA GTG GAT GTA CAG ATC CAA AAC TCA TCT GTC TCA				1506
Val Pro Val Gly Pro Val Asp Val Gln Ile Gln Asn Ser Ser Val Ser				
	455	460	465	
CCA TTT GGA AAA CTA GTG GTT TAT AGC ACC ATT GAT GAC AGC ACA TTC				1554
Pro Phe Gly Lys Leu Val Val Tyr Ser Thr Ile Asp Asp Ser Thr Phe				
	470	475	480	
AAA CAC AAT GGG ACG GTG GAG TGC AGG GCT TAT AAC GAT GTG GGC AAG				1602
Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Arg Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys				
	485	490	495	500
AGT TCT GCC TCT TTT AAC TTT GCA TTT AAA GGT AAC AGC AAA GAA CAA				1650
Ser Ser Ala Ser Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Ser Lys Glu Gln				
	505	510	515	
ATC CAT GCT CAC ACC CTG TTC ACG CCG TTG CTG ATT GGT TTT GTG ATC				1698
Ile His Ala His Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Ile Gly Phe Val Ile				
	520	525	530	
GCA GCT GGT TTA ATG TGT ATC TTC GTG ATG ATT CTT ACA TAC AAA TAT				1746
Ala Ala Gly Leu Met Cys Ile Phe Val Met Ile Leu Thr Tyr Lys Tyr				
	535	540	545	
TTG CAG AAA CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAA GTT GTC GAG GAG ATA				1794
Leu Gln Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val Glu Glu Ile				
	550	555	560	
AAT GGA AAC AAT TAT GTT TAC ATA GAC CCA ACA CAA CTT CCT TAT GAT				1842
Asn Gly Asn Asn Tyr Val Tyr Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asp				
	565	570	575	580
CAC AAA TGG GAG TTT CCC AGG AAC AGG CTG AGT TTT GGG AAA ACC CTG				1890
His Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Arg Leu Ser Phe Gly Lys Thr Leu				
	585	590	595	
GGT GCT GGC GCC TTC GGG AAA GTT GTT GAG GCC ACC GCT TAT GGC TTA				1938

Gly Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Tyr Gly Leu  
 600 605 610  
 ATT AAA TCA GAT GCA GCC ATG ACT GTT GCT GTC AAG ATG CTC AAA CCA 1986  
 Ile Lys Ser Asp Ala Ala Met Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Pro  
 615 620 625  
 AGC GCC CAT TTA ACC GAA CGA GAA GCC CTA ATG TCT GAA CTC AAA GTC 2034  
 Ser Ala His Leu Thr Glu Arg Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Val  
 630 635 640  
 TTG AGT TAC CTC GGT AAT CAT ATG AAT ATT GTG AAT CTT CTG GGA GCG 2082  
 Leu Ser Tyr Leu Gly Asn His Met Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala  
 645 650 655 660  
 TGC ACC ATT GGA GGG CCC ACC CTG GTC ATT ACA GAA TAT TGT TGC TAT 2130  
 Cys Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr  
 665 670 675  
 GGT GAT CTT CTG AAT TTT TTG AGA AGA AAA CGT GAT TCA TTT ATT TGC 2178  
 Gly Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser Phe Ile Cys  
 680 685 690  
 TCA AAG CAG GAA GAT CAC GCC GAA GTG GCG CTT TAT AAG AAC CTT CTT 2226  
 Ser Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Val Ala Leu Tyr Lys Asn Leu Leu  
 695 700 705  
 CAT TCA AAG GAG TCT TCC TGC AAT GAT AGT ACT AAT GAG TAC ATG GAC 2274  
 His Ser Lys Glu Ser Ser Cys Asn Asp Ser Thr Asn Glu Tyr Met Asp  
 710 715 720  
 ATG AAA CCT GGA GTT TCT TAT GTT GTA CCA ACC AAG GCA GAC AAG AGG 2322  
 Met Lys Pro Gly Val Ser Tyr Val Val Pro Thr Lys Ala Asp Lys Arg  
 725 730 735 740  
 AGA TCT GCA AGA ATA GGT TCA TAC ATA GAA AGA GAC GTG ACT CCT GCT 2370  
 Arg Ser Ala Arg Ile Gly Ser Tyr Ile Glu Arg Asp Val Thr Pro Ala  
 745 750 755  
 ATC ATG GAA GAT GAT GAG CTG GCC CTG GAC CTG GAG GAC TTG CTG AGC 2418  
 Ile Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp Leu Leu Ser  
 760 765 770  
 TTT TCT TAC CAG GTG GCA AAA GGC ATG GCG TTC CTT GCC TCA AAG AAT 2466  
 Phe Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala Ser Lys Asn  
 775 780 785  
 TGT ATT CAT AGA GAC TTG GCA GCC AGA AAT ATC CTC CTT ACT CAT GGT 2514  
 Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Thr His Gly  
 790 795 800  
 CGA ATC ACA AAG ATT TGT GAT TTT GGT CTA GCC AGA GAC ATC AAG AAT 2562  
 Arg Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Lys Asn  
 805 810 815 820  
 GAT TCT AAT TAT GTG GTC AAA GGA AAC GCT CGA CTC CCT GTG AAG TGG 2610  
 Asp Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro Val Lys Trp  
 825 830 835  
 ATG GCA CCA GAG AGT ATT TTC AAC TGT GTA TAC ACA TTT GAA AGT GAT 2658  
 Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe Glu Ser Asp  
 840 845 850  
 GTC TGG TCC TAT GGG ATT TTT CTG TGG GAG CTG TTC TCT TTA GGA AGC 2706  
 Val Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser Leu Gly Ser  
 855 860 865



```

AGC CCC TAC CCT GGA ATG CCA GTC GAT TCT AAG TTC TAC AAG ATG ATC 2754
Ser Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr Lys Met Ile
      870                875                880
AAG GAA GGT TTC CGA ATG CTC AGC CCC GAG CAT GCA CCT GCG GAA ATG 2802
Lys Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro Ala Glu Met
885                890                895                900
TAT GAC ATC ATG AAG ACC TGC TGG GAT GCT GAT CCC TTG AAA AGG CCA 2850
Tyr Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu Lys Arg Pro
                905                910                915
ACA TTT AAG CAG ATT GTG CAG CTG ATT GAG AAG CAG ATC TCA GAG AGC 2898
Thr Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile Ser Glu Ser
                920                925                930
ACC AAT CAT ATT TAT TCC AAC TTA GCA AAC TGC AGC CCC CAC CGG GAG 2946
Thr Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro His Arg Glu
                935                940                945
AAC CCC GCC GTG GAC CAT TCT GTG CGC ATC AAC TCT GTG GGC AGC AGC 2994
Asn Pro Ala Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val Gly Ser Ser
                950                955                960
GCC TCC TCC ACG CAG CCT CTG CTT GTC CAC GAA GAT GTC TGA 3036
Ala Ser Ser Thr Gln Pro Leu Leu Val His Glu Asp Val *
965                970                975
AGCAGTCTGC ATCTGGGGGT CTCCTGACAA CCC 3069

```

【 0 0 9 2 】

配列番号 : 2

配列の長さ : 911

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : mRNA to cDNA

配列

```

T ATG AAG AAG ACA CAA ACT TGG ATT ATC ACT TGC ATT TAT CTT CAA 46
Met Lys Lys Thr Gln Thr Trp Ile Ile Thr Cys Ile Tyr Leu Gln
      1                5                10                15
CTG CTC CTA TTT AAT CCT CTC GTC CAC ACT CAA GGG ATC TGC AGT AAC 94
Leu Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val His Thr Gln Gly Ile Cys Ser Asn
                20                25                30
CGT GTG ACT GAT GAT GTG AAA GAC GTT ACA AAA TTG GTG GCA AAT CTT 142
Arg Val Thr Asp Asp Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu
                35                40                45
CCC AAA GAC TAT ATG ATA ACC CTC AAA TAT GTC CCC GGG ATG GAC GTT 190
Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly Met Asp Val
                50                55                60
TTG CCT AGT CAT TGT TGG ATA AGC GAG ATG GTG GAA CAA CTG TCA GTC 238
Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Glu Gln Leu Ser Val
                65                70                75
AGC TTG ACT GAT CTT CTG GAC AAG TTT TCG AAT ATT TCT GAA GGC TTG 286
Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu
                80                85                90                95
AGT AAT TAT TGT ATC ATA GAC AAA CTT GTG AAA ATA GTT GAT GAC CTT 334
Ser Asn Tyr Cys Ile Ile Asp Lys Leu Val Lys Ile Val Asp Asp Leu

```

	100	105	110	
GTG GAG TGC ATG GAA GAA CAC TCA TCT GAG AAT GTA AAA AAA TCA TCT				382
Val Glu Cys Met Glu Glu His Ser Ser Glu Asn Val Lys Lys Ser Ser				
	115	120	125	
AAG AGC CCA GAA CCC AGG CAG TTT ACT CCT GAG AAA TTT TTT GGA ATT				430
Lys Ser Pro Glu Pro Arg Gln Phe Thr Pro Glu Lys Phe Phe Gly Ile				
	130	135	140	
TTT AAT AAA TCC ATC GAT GCC TTC AAG GAC TTG GAG ATA GTG GCT TCT				478
Phe Asn Lys Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp Leu Glu Ile Val Ala Ser				
	145	150	155	
AAA ATG AGT GAA TGT GTG ATT TCC TCA ACA TCA AGT CCT GAA AAA GAT				526
Lys Met Ser Glu Cys Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Pro Glu Lys Asp				
	160	165	170	175
TCC AGA GTC AGT GTC ACA AAA CCA TTT ATG TTA CCC CCT GTT GCA GCC				574
Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala Ala				
	180	185	190	
AGC TCC CTT AGG AAT GAC AGC AGT AGC AGT AAT AGG AAG GCC TCA AAT				622
Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Ser Asn				
	195	200	205	
TCC ATT GAA GAT TCC AGC CTA CAA TGG GCA GCC GTA GCA TTG CCA GCA				670
Ser Ile Glu Asp Ser Ser Leu Gln Trp Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala				
	210	215	220	
TTC TTT TCT CTT GTG ATC GGG TTT GCT TTT GGG GCC TTT TAC TGG AAG				718
Phe Phe Ser Leu Val Ile Gly Phe Ala Phe Gly Ala Phe Tyr Trp Lys				
	225	230	235	
AAG AAA CAA CCA AAT CTT ACA AGG ACA GTT GAA AAC AGA CAG ATT AAT				766
Lys Lys Gln Pro Asn Leu Thr Arg Thr Val Glu Asn Arg Gln Ile Asn				
	240	245	250	255
GAA GAG GAT AAT GAA ATA AGT ATG TTG CAA GAG AAA GAG AGA GAG TTT				814
Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg Glu Phe				
	260	265	270	
CAA GAA GTG TAA TT GTGGCTTCTA TCAACACTGT TACTTTCGTA CATTGGCGGG				868
Gln Glu Val *				
	275			
TAACAGTTCA TGTTTGCTTC ATAAATGAAG CAGCTTTAAA CAA				911

【図面の簡単な説明】

【図 1】ウシ由来c-Kitタンパク質のアミノ酸配列の各領域を示す図である。

【図 2】PCRに用いた合成オリゴヌクレオチドプライマー A ~ G の塩基配列及び制限酵素部位を示す図である。

【図 3】プラスミド cl.75 の構造を示す図である。

【図 4】抗GST-c-Kit抗血清を用いた免疫沈降法により得られた免疫沈降物の電気泳動結果を示す写真である。

【図 5】bK-1抗体を用いた免疫沈降法により得られた免疫沈降物の電気泳動結果を示す写真である。

【図 6】bK-1抗体を用いた免疫沈降法により得られた免疫沈降物の電気泳動結果を示す写真である。

【図 7】ウシ骨髓細胞からのウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離結果を示す図である。

【図 8】精製された組換えウシ由来SCFのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】

分泌シグナル配列

MRGARGAWDFLFVLLLLLLVQTGSSQPSVSPGELSLPSIHPAKSELIVSVGDEIRLLCTD 60

PGFVKWTFEILGQLSEKTNPEWITEKAEATNTGNYTCTNKGGLSSSIYVFVRDPEKLFLLI 120

DLPLYGKEENDTLVRCPLTDPEVTNYSLTGCEGKPLPKDLTFVADPKAGITIRNVKREYH 180

RLCLHCSANQRGKSMLSKKFTLKVRAAIKAVPVVSVSKTSYLLREGEEFAVTCCLKDVSS 240

SVDSHWIKENSQQTKAQTCKNSWHQGDPSYLRQERLTISSARVNDSGVPMCYANNTFGSA 300

NVTTLLEVVDKGFINIFPMNNTTVFVNDGENVDLVVEYEAYPKPVHRQWIYMNRTSTDKW 360

DDYPKSENESNIRYVNELHLTRLKGTGGTYTFHVSNSDVNSSVTFNVYVNTKPEILTHD 420

RLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSVPVGPVDVQIQNSSVSPFGKLVVYSTID 480

DSTFKHNGTVECRAYNDVGKSSASFNAFKGNSKEQIHAHTLFTPLLLIGFVIAAGLMCIF 540

VHILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHWKWEFPRNRLSFGKTLGAGA 600

FGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGNHMNIYNLLGA 660

CTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAVALYKNLLHSESSCNDSTN 720

EYMDMKPGVSYVVPKADKRRSARIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLEDLLSFSYQVAKG 780

MAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNSNYVVKGNARLPVXWMAPE 840

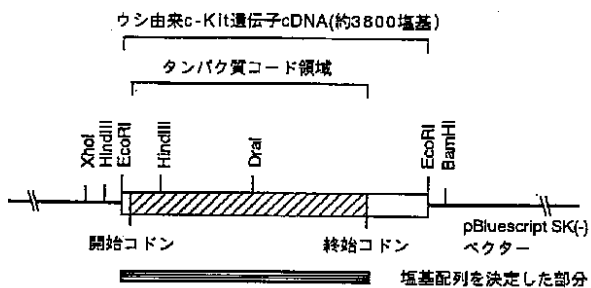
SIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPHAPAEM 900

YDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPHRENPAVDHSVRINS 960

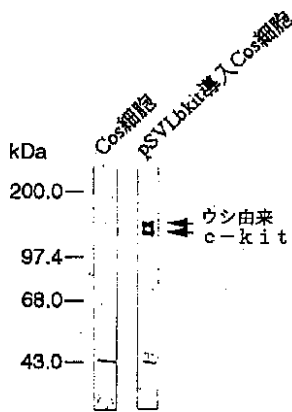
VGSSASSTQPLLVHEDV\* 977

細胞膜貫通領域

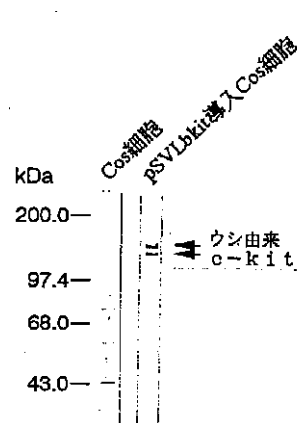
【図3】



【図4】



【図5】



【図2】

プライマーA  
 (5')-CCCTCGAGCCATGAGAGGCGCTCGCGG-(3')  
 XhoI

プライマーB  
 (5')-TAATCAAGCATGTCACTGCA-(3')

プライマーC  
 (5')-ACCATCTCGCAAATAAATAAG-(3')

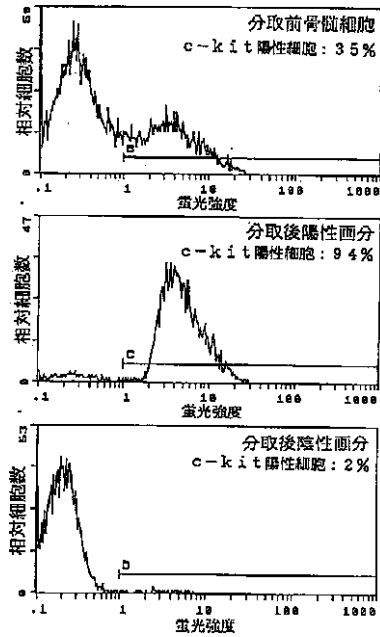
プライマーD  
 (5')-ACGTGTAATTGCCTGTATTT-(3')

プライマーE  
 (5')-CCCTCGAGGCCTTCTCAGCCATCTGT-(3')  
 XhoI StuI

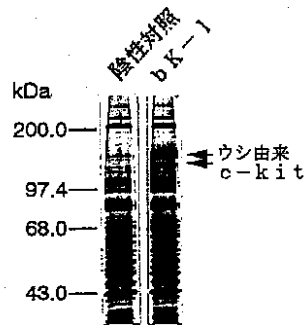
プライマーF  
 (5')-CCGGATCCAGCGCTGCCCTTTCCT-(3')  
 BamHI

プライマーG  
 (5')-GGAAGCTTATGCAACAGGGGTAAC-(3')  
 HindIII

【図7】



【図6】



【図8】

(kDa)

97.4 —

66.3 —

42.4 —

30.0 —

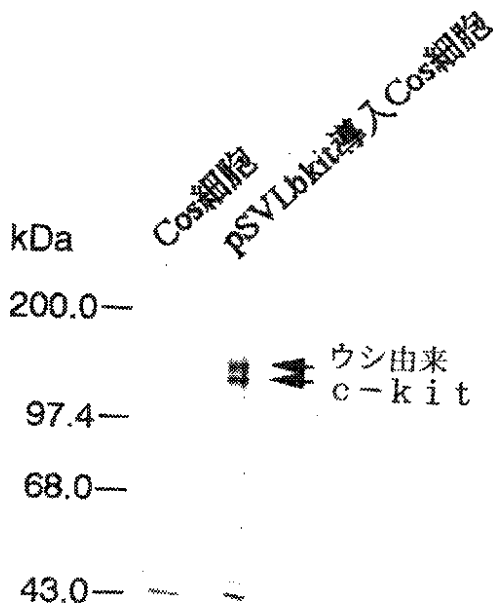
20.1 —

14.4 —

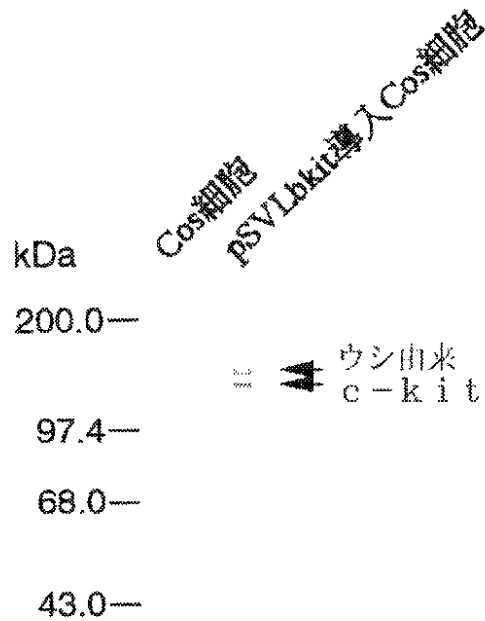


【手続補正書】  
 【提出日】平成 10 年 5 月 27 日  
 【手続補正 2】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図 4  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図 4】

図面代用写真



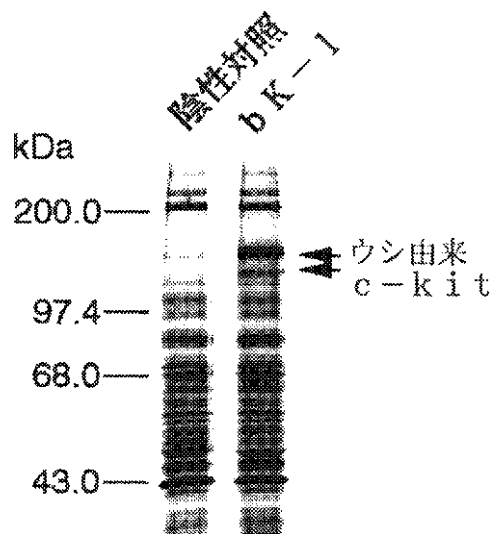
図面代用写真



【手続補正 4】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図 6  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図 6】

図面代用写真

【手続補正 3】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図 5  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図 5】



【手続補正 5】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図 8  
 【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【図8】

図面代用写真

(kDa)

97.4 —

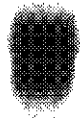
66.3 —

42.4 —

30.0 —

20.1 —

14.4 —



## 【手続補正書】

【提出日】平成11年4月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 受託番号がFERM P-16780であるハイブリ

ドーマにより産生されるモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】 請求項1記載のモノクローナル抗体を用いて、ウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を含む試料からウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞を分離することを特徴とするウシ由来c-Kitタンパク質陽性細胞の分離方法。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F I

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 犬丸 茂樹

茨城県つくば市並木4丁目10-1-908-201