

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁸

<i>C07K 14/52</i> (2006.01)	(45) 공고일자	2006년01월27일
<i>C07K 16/24</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0514015
<i>C12N 15/19</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2005년09월02일
<i>C12P 21/02</i> (2006.01)		

(21) 출원번호	10-1998-0702231	(65) 공개번호	10-1999-0063764
(22) 출원일자	1998년03월26일	(43) 공개일자	1999년07월26일
번역문 제출일자	1998년03월26일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP1996/002801	(87) 국제공개번호	WO 1997/11969
국제출원일자	1996년09월27일	국제공개일자	1997년04월03일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장	95-249457	1995년09월27일	일본(JP)
	96-56044	1996년03월13일	일본(JP)

(73) 특허권자 시오노기세이야쿠가부시키가이샤
일본국 오오사카시 주우오쿠 도슈마찌 3쵸메 1방 8고

(72) 발명자 이마이 도시오
일본 교토후 602 교토시 가미교쿠 니시호리카와도리모토쇼간지 아가루
다테몬젠초 414-502

요시다 데쓰야
일본 오사카후 569 다카쓰키시 가미타나베초 6-24-411

요시에 오사무
일본 효고켄 651-14 니시노미야시 기타록코다이 5-22-17

(74) 대리인 김창세

심사관 : 박정웅

(54) 씨씨형케모카인유형의단백질

요약

면역학적인 자극의 존재하에 말초혈 단핵구로부터 발견되고 세포유주활성을 갖는 분리된 신규한 CC형 케모카인 유형의 단백질, 해당 단백질을 코딩하는 DNA, 해당 DNA를 함유하는 발현 벡터 및 형질전환체, 및 해당 형질전환체를 이용하는 재조합 단백질의 제조방법, 및 해당 단백질을 함유하는 의약 조성물.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 CC형 케모카인 유형의 단백질, 그것을 코딩하는 DNA, 해당 DNA를 함유하는 벡터, 해당 벡터를 함유하는 형질전환체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기의 신규한 단백질의 용도, 및 상기 단백질을 함유하는 의약 조성물, 예컨대 항염증제, 면역응답조절제, 염증 및/또는 면역 관련 질환의 진단약에 관한 것이다. 본 발명은 또한 해당 단백질의 단클론 항체 및 해당 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마에 관한 것이다.

배경기술

물리적, 화학적, 또는 생물학적인 자극에 의해 일어나는 외래성 또는 내인성의 여러가지 조직장해, 침습, 항원폭로 등은 강한 염증반응이나 면역반응을 유도한다. 이들의 반응은 중요한 생체방어반응이지만, 때로는 급성 또는 만성 질환의 원인으로 될 수 있다. 염증반응이나 면역반응을 유발하는 원인이 조직에 가해지면, 우선 호중구, 과립구, 림프구, 혹은 매크로파지 등과 같은 염증성 세포 혹은 면역담당세포의 혈관내피세포로의 흡착 및 혈관외로의 이동, 및 침습 혹은 장해된 조직이나 항원이 존재하는 조직에서의 집적이 일어난다. 이러한 일련의 세포유주반응을 유도하는 물질로서 1군의 케모택틱(chemotactic) 사이토킨, 즉 케모카인이 존재한다. 케모카인은 유주반응(케모택틱 반응)을 유도하는 1군의 사이토킨이고, 지금까지 인간에서는 적어도 18종의 케모카인이 보고되어 있다. 이들 케모카인은 아미노산 서열의 유사성으로 인해 구조적으로 서로 밀접히 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

공통으로 보존된 4개의 시스테인 잔기중의 최초 2개의 배열에 기준하여, 케모카인은 α 혹은 CXC형(2개의 시스테인이 1개의 아미노산에 의해 분리되어 있음) 및 β 혹은 CC형(2개의 시스테인이 연속되어 있음)으로 대별된다. CXC형 케모카인으로서, 인간에서는 IL-8, β -TG, PF-4, MGSA/CRO, ENA-78, NAP-2, GCP-1, GCP-2, IP-10 등이 알려져 있고, 이들은 주로 호중구의 활성화와 유주를 유도한다. 한편, CC형 케모카인으로서, 인간에서는 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, I-309 등이 알려져 있고, 이들은 주로 단핵세포/매크로파지의 활성화와 유주를 유도한다. 또한, CC형 케모카인에는 T세포, 호염기구, 호산구 등에 대하여 활성화와 유주 유도를 나타내는 것이 알려져 있다(J. J. Oppenheim 등, Annu. Rev. Immunol. 9: 617-648, 1991; M. Baggiolini & C. A. Dahinden, Immunol. Today 15: 127-133, 1994). 더우기 최근에는 이들 두 가지의 케모카인 그룹중 어디에도 속하지 않는 γ 형 혹은 C형이라고 생각되는 케모카인 SCM-1의 존재가 보고되어 있다(T. Yoshida 등, FEBS Letters 360: 155-159, 1995).

전술한 바와 같이, 케모카인은 생체의 방어반응에 깊게 관여하고 있기 때문에, 신규한 케모카인을 동정하여 활성을 밝힘으로써 그 케모카인이 관여하는 면역응답의 해명 뿐만 아니라, 관련되는 증상이나 이상의 치료, 예방 또는 진단방법의 개발 등에 크게 공헌할 수 있다. 그와 같은 목적에는 인간 유래의 케모카인이 유용하지만, 필요한 동물실험을 하기 위해서는 인간 이외의 동물, 바람직하게는 마우스 유래의 케모카인을 이용할 필요가 있다. 따라서, 신규한 인간 유래 케모카인 및 대응하는 마우스 유래의 케모카인을 얻는 것이 바람직하다. 그러나, 미량으로 활성을 나타내는 많은 생리활성물질과 마찬가지로, 신규한 케모카인을 얻는 것은 용이하지 않다.

본 발명자들은 케모카인이 구조상의 유사성을 갖는 분비 단백질인 점에 착안하여, 시그널 서열 트랩법에 의해 신규인 케모카인을 얻기 위해서 예의 연구를 계속하였다.

즉, 독자적으로 제작한 시그널 서열 트랩 벡터(Yoshida 등, FEBS Letters 360:155-159, 1995)를 이용하여 마이토젠으로 자극한 정상인 말초혈 단핵구(단핵세포)로부터 분비단백질이나 I형 막단백질을 코딩하는 cDNA 단편을 다수 분리하여, 그의 염기 서열을 기존의 데이터베이스와 비교하여 CC형 케모카인에 특징적인 배열을 코딩할 가능성이 있는 cDNA 단편을 찾아내었다. 이어서, 그 cDNA 단편을 이용하여 전장 cDNA를 분리하여 염기 서열을 결정하고 동정하였다. 이렇게하여, 최종적으로, 시그널 서열을 갖고, 시그널 서열이 분리된 후에는 성숙형의 CC형 케모카인에 속하는 분비 단백질을 코딩하는 DNA를 얻는데 성공하였다.

이 신규한 DNA를 적당한 발현 벡터에 삽입하고 해당 벡터로 적당한 숙주세포를 형질전환시키고 형질전환체를 배양하면, 해당 형질전환체는 HUT78 세포 등에 대하여 세포유주활성을 나타내는 CC형 인간 케모카인 유형의 단백질을 생산하였다. 이어서, 이 인간 유래 케모카인 유형의 단백질을 코딩하는 DNA를 이용하여 대응하는 마우스의 게놈 DNA 및 cDNA를 얻고, 최종적으로 형질전환체에 발현시키는데 성공하였다. 신규한 인간 유래의 CC형 케모카인 유형의 단백질을 코딩하는 DNA의 염기 서열 및 추정된 아미노산 서열은 서열번호 1에, 마우스 유래의 CC형 케모카인 유형의 단백질을 코딩하는 DNA의 염기 서열 및 추정된 아미노산 서열은 서열번호 2에 각각 기재되어 있다.

발명의 개요

본 발명은, (1) 면역학적인 자극의 존재하에 말초혈 단핵세포로부터 발현이 유도되고, (2) 비자극하에 흉선으로부터 주로 발현되며, 또한 비장으로부터는 발현되지 않고, (3) CC형 케모카인에 특징적인 연속적인 2개의 시스테인 잔기를 갖는 특징이 있는 단백질을 제공하는 것이다.

본 발명의 신규한 CC형 케모카인 유형의 단백질은, 면역학적인 자극의 존재하에 말초혈 단핵세포로부터 발현되지만, 파이토헤마글루티닌(PHA) 및 액성면역(humoral immunity)의 유도조건하에서 보다 잘 발현된다. 특히, 단구로부터의 발현은 액성면역의 유도에 관여하는 GM-CSF, IL-3 및 IL-4로부터 선택되는 사이토킨의 존재하에 가장 잘 유도된다. 그러나, 이 단백질은 세포성면역을 유도하는 사이토킨인 TFN- α , IFN- γ , 또는 LPS에 의해서는 유도되지 않는다고 하는 특징을 갖는다.

본 발명자들은 본 발명의 신규한 단백질을 구성적으로 발현하고 있는 장기가 흉선이고 면역학적 자극에 응답하여 그 생산이 유도된다고 하는 성상에 근거하여, 해당 단백질을 TARC(Thymus and Activation-Regulated Chemokine)로 명명하였다. 따라서, 본 명세서에서는 이 신규한 단백질을 TARC 또는 TARC 단백질로, 또한 그것을 코딩하는 DNA를 TARC DNA로 호칭한다. TARC는 인간 및 마우스 유래의 TARC를 포함하지만, 필요에 따라 인간 유래의 TARC를 인간 TARC 또는 hTARC로, 또한 마우스 유래의 TARC를 마우스 TARC 또는 mTARC로 호칭한다. 또한, 이들 단백질을 코딩하는 DNA를 각각 인간 TARC DNA, hTARC DNA, 마우스 TARC DNA, mTARC DNA로 호칭한다. 그러나, 인간 TARC 및 그것을 코딩하는 DNA를 가리키는 경우에는, 간단히 TARC 및 TARC DNA로 칭하기도 한다. 또, 본 명세서에서는 TARC에 관해서 그것을 코딩하는 DNA 또는 유전자라는 어구를 상호 변환가능하게 사용한다. 또한, DNA는 합성된 DNA 또는 천연의 DNA중 어느 것이라도 좋다.

또한, 본 발명에 의해서 TARC를 코딩하는 DNA가 밝혀졌기 때문에, 당업자라면 해당 기술분야에서 이미 알려진 방법에 의해 용이하게 1개 이상의 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 상기 아미노산 서열을 갖는 TARC와 실질적으로 동등한 기능 또는 활성을 갖는 TARC 변이체를 얻을 수 있다. 따라서, 그와 같이 얻어진 변이체도 또한 본 발명의 TARC에 포함되는 것으로 한다.

따라서, 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 잔기 24~94의 아미노산 서열을 갖는 인간 CC형 케모카인 유형의 단백질, 또는 이 서열에 아미노산 또는 아미노산 서열의 치환, 삽입, 결실이 포함된 서열을 갖는 동시에 해당 인간 CC형 케모카인 유형의 단백질과 실질적으로 동등한 기능 또는 활성을 갖는 그의 변이체를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 잔기 1~94의 아미노산 서열을 갖는 인간 CC형 케모카인 유형의 단백질 또는 이 서열에 아미노산 또는 아미노산 서열의 치환, 삽입, 결실이 포함된 서열을 갖는 동시에 해당 인간 CC형 케모카인 유형의 단백질과 실질적으로 동등한 기능 또는 활성을 갖는 그의 변이체를 제공하는 것이다.

더우기, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 잔기 24~93의 아미노산 서열을 갖는 마우스 CC형 케모카인 유형의 단백질 또는 이 서열에 아미노산 또는 아미노산 서열의 치환, 삽입, 결실이 포함된 서열을 갖는 동시에 해당 마우스 CC형 케모카인 유형의 단백질과 실질적으로 동등한 기능 또는 활성을 갖는 그의 변이체를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 잔기 1~93의 아미노산 서열을 갖는 마우스 CC형 케모카인 유형의 단백질 또는 이 서열에 아미노산 또는 아미노산 서열의 치환, 삽입, 결실이 포함된 서열을 갖는 동시에 해당 마우스 CC형 케모카인 유형의 단백질과 실질적으로 동등한 기능 또는 활성을 갖는 그의 변이체를 제공하는 것이다.

본 명세서에서, TARC의 변이체는 명세서에 기재된 아미노산 서열을 갖는 TARC와 기능 또는 활성이 실질적으로 동등하면, 화학적 또는 생화학적인 개변, 또는 천연 또는 비천연의 아미노산을 포함하고 있더라도 관계없다.

도면의 간단한 설명

도 1은 인간 TARC의 cDNA의 염기 서열과 추정된 아미노산 서열을 도시한 도면이다.

도 2는 본 발명의 인간 TARC 단백질과 이미 알려져 있는 7종의 인간 CC형 케모카인의 아미노산 서열을 비교한 결과를 도시한 도면이다.

도 3은 정상인 말초혈구 단핵구를 PHA로 자극한 후의 시간 및 hTARC mRNA의 발현을 노던 블롯(Northern blot)에 의해 해석한 결과(A) 및 각종 인간 조직에서의 hTARC mRNA의 발현을 노던 블롯에 의해 해석한 결과(B)를 각각 나타내는 사진이다.

도 4는 재조합 벡터 pVL-TARC의 유전자지도이다.

도 5에 있어서, A는 곤충세포에서 생산된 인간 TARC의 최종 정제품의 코스모 실(Cosmosil) 5C4-300 컬럼[나칼라이 테스크(Nacalai Tesque)]으로부터의 용출패턴을 나타내고, B는 SDS-PAGE의 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 6은 발현 벡터 pGEMEX-TARC의 유전자지도이다.

도 7은 대장균에서 발현시킨 인간 TARC의 각 정제단계에서의 SDS-PAGE의 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 8은 마우스 TARC의 cDNA의 염기 서열과 추정된 아미노산 서열을 도시한 도면이다.

도 9는 재조합 벡터 pVL-mTARC의 유전자지도이다.

도 10에서, A는 곤충세포에서 생산된 마우스 TARC의 최종 정제품의 코스모 실 5C4-300 컬럼(나칼라이 테스크)으로부터의 용출패턴을 도시한 도면이고, B는 SDS-PAGE의 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 11은 곤충세포에서 생산되어 정제한 마우스 TARC를 Balb/C 마우스의 피하에 주사한지 24시간 후의 세포침윤상을 헤마토크실린-에오신으로 염색한 조직의 형태를 도시한다.

도 12는 PBS만을 Balb/C 마우스에 피하 주사한지 24시간 후의 세포침윤상을 헤마토크실린-에오신으로 염색한 경우의 조직의 형태를 나타내는 사진이다.

도 13은 125I 표식 TARC의 각종 세포로의 특이적 결합의 결과를 나타내는 막대그래프이다.

도 14에 있어서, A는 125I 표식 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 Jurkat 세포로의 특이적 결합량의 변화를 나타내는 그래프이고, B는 그의 스캐트차드(Scatchard) 그래프이다.

도 15에 있어서, A는 125I TARC의 농도를 고정하고 비표식 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 Jurkat 세포로의 특이적 결합량의 변화를 나타내는 그래프이고, B는 125I 표식 TARC 농도를 일정하게 한 경우에 있어서, 비표식 케모카인 비존재하 또는 200nM의 다른 케모카인 또는 TARC의 존재하에서의 Jurkat 세포로의 125I 표식 TARC의 결합량을 나타내는 그래프이다.

도 16은 125I 표식 TARC의 농도를 고정하고 비표식의 다른 케모카인 혹은 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 적혈구로의 특이적 결합량의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 17은 도 16에 나타난 그래프의 스캐치드 그래프이다.

도 18은 HUT78세포의 유주활성에 대한 TARC 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 19는 과립구의 유주활성에 대한 TARC 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 20은 단구의 유주활성에 대한 TARC 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 21은 PHA, 항CD3항체 및 LPS에 의한 자극하의 정상인 말초혈 단핵구로부터의 TARC 발현의 경시변화를 나타내는 그래프이다.

도 22는 각종 사이토킨{IL-1 α [알앤드디(R&D) 제품], IL-2[시오노기제약(Shionogi Pharmaceutical Co.) 제품], IL-3[젠자임(Genzyme) 제품], IL-4[페프로테크(PeproTech, Inc.) 제품], IL-7[페프로테크 제품], IL-10[젠자임 제품], GM-CSF[젠자임 제품], TNF- α [페프로테크 제품], IFN- γ [시오노기제약 제품], M-CSF 및 PHA[알앤드디 제품]}의 자극하에서 정상인 말초혈 단핵구로부터의 TARC의 발현량을 나타내는 그래프이다.

도 23은 사이토킨의 농도와 정상인 말초혈 단핵구로부터의 TARC 발현량의 관계를 나타내는 그래프이다.

도 24는 정상인 말초혈 단핵구로부터 분리한 CD14 양성 단구와 CD14 음성 림프구에 있어서의, PHA, PHA/PMA, GM-CSF, IL-3, IL-4에 의한 TARC의 발현유도효과를 나타내는 그래프이다.

도 25는 인간 말초혈 단핵구를 PHA[깁코-비알엘(GIBCO-BRL) 제품], LPS[L4391, 시그마(Sigma Chemical Co.) 제품], IL-4[페프로테크 제품], IL-3[젠자임 제품] 또는 GM-CSF[젠자임 제품]로 자극한 경우의, 해당 세포에 있어서의 TARC mRNA의 발현을 노던 블롯으로 해석한 결과를 나타낸다.

도 26의 A는 사이토킨(IL-4, IL-3 또는 GM-CSF)에 의한 자극하에 정상인 말초혈 단구로부터 분리되는 TARC의 T세포주 HUT78에 대한 유주활성을 나타내는 그래프이고, 도 26의 B는 HUT78에 대한 유주활성이 항TARC 항체에서만 소실하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 27은 사이토킨 자극하의 정상인 말초혈 단핵구로부터의 TARC 발현에 대한 사이토킨 IFN- γ 및 IL-10의 발현억제효과를 나타내는 그래프이다.

도 28은 TARC를 SEAP와의 융합단백으로서 발현시키기 위한 재조합 벡터 pDREF-TARC-SEAP (His)6의 유전자지도이다.

도 29는 TARC-SEAP의 농도를 1nM로 고정시키고 비표식 TARC의 농도를 변화시킨 경우의, CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1세포로의 TARC-SEAP의 특이적 결합량의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 30은 TARC-SEAP의 농도를 1nM로 고정시킨 경우의, CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1세포로의 TARC-SEAP의 결합에 대한 TARC를 포함하는 각종 비표식 인간 케모카인 200nM에 의한 저해작용을 나타내는 그래프이다.

도 31은 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1세포의 유주활성에 대한 TARC, RANTES 및 MIP-1 α 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 TARC에 대하여 여러가지 검토를 행한 결과, 하기와 같이 이미 알려진 CC형 케모카인과 다른 성질을 갖는 신규한 단백질임이 분명해졌다.

(1) 인간 TARC는 유전자레벨에서는 94개의 아미노산으로 이루어지는 단백질이지만, 구조상의 해석에 의해 성숙단백에서는 23번 및 24번 위치의 알라닌 사이에서 시그널 서열이 절단되어 71개의 아미노산으로 이루어지는 분자량 약 8kDa의 염기성 단백질인 것으로 추정된다.

- (2) 성숙형의 TARC는 CC형의 케모카인과 상당한 상동성을 나타내고, 특히 CC형 케모카인에 보존되어 있는 4개의 시스테인이 전부 보존되어 있다(도 2 참조).
- (3) 기존의 CC형 케모카인과의 상동성은 30% 미만이며, 가장 높은 RANTES에 대하여도 29% 정도이다.
- (4) 조직으로서는, 기존의 CC형 케모카인과 달리 대부분 흉선에서만 구성적으로 발현한다.
- (5) 면역학적인 자극하에 말초혈 단핵구(PBMC)에 의해 발현된다.
- (6) PBMC에 의한 발현과 관련하여 예컨대 이하의 특징적인 성질을 갖는다.
- ① T세포 특이적인 항CD3 항체보다도 비특이적인 파이토헤마글루티닌(PHA)에 의해 보다 강하게 자극되지만, 통상의 케모카인에 대하여 발현유도활성을 갖는 LPS에 의해서는 유도되지 않는다.
- ② 생리적 조건의 농도의 사이토킨(GM-CSF, IL-3, IL-4)에 의해 발현이 유도된다.
- ③ 이미 알려진 케모카인의 발현을 유도하는 TNF- α , IFN- γ 에 의해서는 유도되지 않는다.
- ④ TARC mRNA의 발현도 PHA, GM-CSF, IL-3 및 IL-4에 의해 유도된다.
- ⑤ GM-CSF, IL-3, IL-4 자극에 의해 단구에서만 분비되고, PHA, PHA/PMA 자극에 의해서는 반대로 림프구에서만 분비되며, PHA 자극에 의한 발현유도는 PMA를 가함으로써 현저히 억제된다.
- ⑥ TARC의 mRNA는 미자극 및 LSP 자극의 인간 말초혈 단핵구에서는 거의 발현되지 않지만, GM-CSF, IL-3 자극에 의해 약 400배, IL-4, PHA 자극에 의해 약 40배의 발현유도가 확인된다.
- (7) 마우스 TARC는 인간 TARC와 마찬가지로 특징을 갖지만, 유전자레벨에서는 93개의 아미노산으로 이루어지는 단백질이고, 구조상의 해석에 의해 성숙단백에서는 23번 및 24번 위치의 알라닌 사이에서 시그널 서열이 절단되어 70개의 아미노산으로 이루어지는 분자량 약 8kDa의 염기성 단백질인 것으로 추정된다.
- (8) 인간 TARC와 마우스 TARC와의 상동성은 약 64.4%로 높다.
- (9) 백혈구 침윤작용을 갖는다(케모카인 유형의 활성을 나타낸다).
- (10) TARC의 수용체는 특정 T세포(Jurcat, Molt3, CEM, Hut78, MT2, MT4, Hut102), 말초혈 림프구, 활성화 말초혈 T세포에 발현하고 있다.
- (11) 세포상의 TARC 수용체는 다른 케모카인의 수용체와 독립하고 있어, TARC의 결합은 다른 케모카인에 의해서 저해되지 않는다.
- (12) 적혈구상의 케모카인 수용체중 하나인 DARC와 특이적으로 결합한다.
- (13) IL-3 및 GM-CSF로 자극한 정상인 말초혈 단구의 배양액은 HUT78세포의 강한 유주를 야기시키지만, 미자극 혹은 IL-4로 자극한 배양액은 유주를 야기하지 않는다. 또한, GM-CSF 처리된 배양상청액의 Hut78세포에 대한 유주활성은 모르모트(guinea pig) 항TARC 항체처리로 거의 소실된다.
- (14) IL-4에 의해 유도되는 액성면역을 억제하는 IFN- γ , 면역반응전반을 억제하는 IL-10에 의해서, GM-CSF, IL-3, IL-4 자극에 의한 말초혈 단핵구에서의 TARC의 발현유도는 억제된다.
- (15) MIP-1 α , RANTES, MCP-1의 수용체인 것으로 보고되어 있는[파워(C. A. Power) 등, J. Bio1. Chem. vol. 270, No. 33, 19495-19500, 1995] CCR4와 특이적으로 결합한다(이 문헌에는, 크세노푸스 라에비스(*Xenopus laevis*) 알세포에 발현된 CCR4의 실험이 보고되어 있다).

(16) CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1세포에 대하여 유주활성을 나타낸다.

이상으로부터, 본 발명의 TARC는 CC형 케모카인에 속하는 신규의 사이토킨인 것이 분명하다. 또한, TARC는 면역학적 자극에 의해 생산이 유도되고, 더구나 거의 흉선에서만 구성적으로 발현하고 있으며, 또한 말초에서는 특정 사이토킨(GM-CSF, IL-3 또는 IL-4)에 의해 자극된 말초혈 단구로부터 발현된다.

따라서, TARC는 미숙한 T세포의 흉선조직으로의 유주나 흉선조직에서의 T세포의 분화성숙에 관여하고 있는 것으로 추측된다. 또한 말초의 단핵구를 면역자극함으로써 생산이 유도되기 때문에, 염증 및 면역반응에서 중요한 작용을 하는 것으로 추측된다. 따라서, TARC는 생체내의 염증반응 및 면역반응에 있어서 백혈구의 유주와 활성화를 유도하는 동시에 흉선에서의 T세포의 분화성숙등에도 중요한 역할을 하여, 의학상 중요한 단백질인 것으로 생각된다.

상기 TARC의 발현에 있어서의 기존의 CC형 케모카인과의 현저한 차이는 TARC의 생리학적 기능의 특이성을 나타내는 것이다. 예컨대, T세포 특이적인 항CD3 항체보다도 비특이적인 파이토헤마글루티닌(PHA)에 의해 보다 강하게 자극되는 것은, TARC가 T세포로부터 직접 분비되기 보다는 오히려 T세포로부터 분비된 사이토킨의 자극하에 말초혈 단핵구(PBMC)로부터 발현되어야 함을 보이고 있다. 이것은, 이미 알려진 케모카인의 대부분의 발현을 유도하는 단구에서의 LPS 자극에 의해서는 TARC가 발현되지 않았다는 점에서도 명백하다.

구체적으로는, TARC의 발현은 여러가지의 사이토킨에 의해 유도되는데, 특히GM-CSF, IL-3 및 IL-4에 의해서 강하게 유도된다. 이들 사이토킨중 앞의 2개는 또한 항상적인 면역계의 유지에 관여하고, IL-4는 알레르기등의 액성면역의 유도에 관여하고 있기 때문에, TARC도 그와 같은 액성면역을 유도하는 상황하에서 기능하는 것으로 추측된다. 또, 이미 알려진 케모카인의 발현을 유도하는 TNF- α , IFN- γ 에 의해서는 유도되지 않은 것도, TARC가 다른 케모카인과는 다른 상황에서 발현하여 기능하는 것을 입증한다. 그러나, 이들 사실은 정상인 말초 단구 이외에 림프구에서도 TARC가 발현될 가능성을 부정하는 것은 아니다.

또한, 대부분의 케모카인은 PHA와 함께 PMA(포르볼 미리스테이트 아세테이트)를 첨가하면 발현이 보다 강하게 유도되지만, TARC의 경우에는 발현이 감소했다. 이것은 TARC의 발현이 IL-4의 발현과 동일한 제어하에 있음을 시사하고 있고, IL-4와 동일한 액성면역에 관여한다는 추측을 뒷받침하는 것이다.

또한, 정상인 말초혈 단구를 GM-CSF, IL-3 자극하여 수득된 배양액은 재조합TARC와 마찬가지로 HUT78세포에 대해서 세포유주활성을 나타내었다. 또한, GM-CSF자극하여 수득된 배양액의 유주활성은 항TARC 항체에 의해 중화되었다. 이것은 재조합 TARC와 마찬가지로 정상인 말초혈 단구에서 분비되는 TARC도 TARC 특이적 수용체를 발현하고 있는 세포에 대해서 세포유주활성을 지님을 시사하고 있다.

전술한 바와 같이, TARC는 다른 케모카인과는 달리 말초혈 단핵구를 액성면역 유도했을 때에 발현이 유도된다. 액성면역은 IL-4로 유도되고 IFN- γ 로 억제되며, 반대로 세포성 면역는 IFN- γ 로 유도되고 IL-4로 억제된다. 또한, 면역전반은 IL-10에 의해 억제된다. TARC의 GM-CSF, IL-3 및 IL-4에 의한 정상인 말초혈 단구로부터의 발현이 IFN- γ 및 IL-10으로 억제된 것은, TARC가 면역반응의 유도로 발현되고 또한 액성 면역상태에서 유도되며, 반대로 세포성 면역상태에서는 억제됨을 나타내고 있다. 따라서, TARC는 특히 알레르기, 아토피, 천식 등의 액성면역 상태에서 발현되어 기능하는 것으로 생각된다.

본 발명의 TARC는 그 기능의 해명에 의해 흉선의 기능, T세포의 분화와 성숙, 염증반응 및 면역반응의 제어등을 해명하는데 유용하고, 이로써 염증반응 또는 면역반응을 유도하거나 혹은 억제하기 위한 새로운 수단을 제공하기 위해서 유용하다. 또한, 본 발명의 TARC를 코드하는 유전자(DNA) 및 항TARC 항체는 TARC의 유전자 변이 및 그의 mRNA 및 단백질의 발현상태를 해석하는데 유용하고 혈액계질환 및 면역계질환의 원인규명이나 진단에 새로운 수단을 제공할 수 있어, 혈액계질환 및 면역계질환의 진단 및 치료방법의 새로운 개발에 유용하다.

또한, 본 발명의 TARC를 코드하는 유전자(DNA)는 적당한 벡터에 삽입되어 엑스 비보(*ex vivo*)로 배양세포에 도입하고 나서 혹은 직접 체내에 투여함으로써 TARC의 유전자의 이상에 의한 유전성질환, 각종 암, 및 AIDS 같은 치사성 감염성질환 등을 대상으로 한 유전자치료의 개발에 유용할 수 있다.

그외, TARC의 혈중농도를 측정함으로써 알레르기, 아토피, 천식 등의 진단도 가능하다고 생각된다. 또한, TARC의 발현이나 활성을 억제함으로써 알레르기, 아토피, 천식 등의 치료 또는 예방도 가능하고, TARC의 발현이나 활성을 유도함으로써 액성면역상태를 유도하여 세포성면역을 억제하는 것도 가능하다고 생각된다.

따라서, 본 발명은 본 발명의 TARC 또는 그의 변이체를 포함하는 의약조성물을 제공한다. 본 발명의 의약조성물은 예방 약, 치료약 및 진단약을 포함하고, 그의 투여량 및 투여경로는 통상적인 방법에 의해서 사용목적, 투여대상의 질환 상태 등으로부터 적절하게 결정할 수 있다. 또 본 발명의 TARC 단백질은 본래 생체내활성물질이므로, 해당 단백질의 활성이 발생하는 양, 즉 본 발명의 의약조성물의 사용량의 범위내에서 그의 급성독성이 문제되지 않음은 용이하게 이해될 것이다.

이들 여러가지 목적에는, TARC 및 그의 활성부분을 포함하는 단편, 해당 TARC 또는 그의 단편에 대한 단클론 또는 다클론 항체, TARC와 특이적으로 결합하는 수용체 등도 유용하다고 생각된다.

따라서, 본 발명은 TARC에 특이적인 단클론 항체 및 그것을 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다. 그와 같은 항체 및 하이브리도마는 후술의 실시예에 기재된 바와 같이 해당 기술분야에서 확립된 공지 방법으로 제조할 수 있다.

또한, 본 발명의 TARC 단백질의 작용에 비추어보아, 해당 단백질의 작용물질 또는 길항물질을 검출할 수 있으면, TARC에 관련되는 질환이나 이상의 치료, 예방 또는 진단에 유용하다고 생각된다. 그와 같은 물질의 스크리닝은 본 발명에서 명백해진 TARC 단백질의 정량법, 수용체 특이성 등을 이용하여 실행할 수 있다.

따라서, 본 발명은 TARC 단백질의 작용물질 또는 길항물질을 스크리닝하는 방법으로서, 해당 작용물질 또는 길항물질을 함유하는 것으로 추정되는 시료, 해당 단백질을 분비하는 세포 및 해당 단백질의 분비를 유도하는 사이토킨을 혼합하여 해당 단백질의 분비량을 측정하는 공정을 포함하는 방법을 제공하는 것이다.

TARC 단백질의 정량은 예컨대 후술의 실시예에 표시되어 있는 단백질 정량법에 따라서 실행할 수 있다.

또한, 상기의 방법에 이용할 수 있는 사이토킨으로서는 GM-CSF, IL-3 및 IL-4를 예시할 수 있고, TARC를 분비하는 세포로서는 말초혈 단핵구를 들 수 있다.

뿐만 아니라, 본 발명은 TARC 단백질의 작용물질 또는 길항물질을 스크리닝하는 방법으로서, 해당 작용물질 또는 길항물질을 함유하는 것으로 추정되는 시료와 해당 단백질에 특이적인 수용체를 반응시켜 그의 결합활성 및/또는 반응성을 측정하는 공정을 포함하는 방법을 제공하는 것이다.

상기의 방법에 이용할 수 있는 수용체로서는 CCR4을 들 수 있고, 결합활성 또는 반응성의 측정은 후술의 실시예에 기재된 방법으로 실행할 수 있다.

이어, 본 발명의 TARC의 제조 방법, 동정법 등을 설명한다. 이하의 기재는 예시하기 위한 것이고, 특별히 지시하지 않는 한, 당업자에게 공지된 유전자재조합 기술, 숙주세포의 형질전환 및 형질전환체에 의한 재조합 단백질의 생산 기술, 발현한 단백질의 분리정제법 및 분석법, 및 면역학적 방법 등을 적절히 이용할 수 있다.

I. TARC 단백질을 코딩하는 DNA의 서열결정

본 발명의 TARC 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 DNA 단편은 예컨대 파이토헤마글루티닌(PHA)으로 자극한 정상인 말초혈 단핵구(PBMC)유래의 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

(1) 프로브의 조제

cDNA 라이브러리로부터 TARC 단백질을 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 프로브를 이하의 방법으로 조제한다.

TARC는 분비단백질이기 때문에, 그의 mRNA의 5' 말단에는 시그널 서열을 코딩하는 영역이 있다. 따라서, 우선 PHA 자극 PBMC로부터 퀵프렙(QuickPrep) mRNA 정제 키트(kit)[파마시아(Pharmacia) 제품]를 사용하여 poly(A)+ RNA를 추출한다. 이 mRNA로부터 랜덤 프라이머(킵코-비알엘 제품)를 이용하여 단일가닥 DNA를 제작하고, 3' 말단에 올리고(dC) 앵커(앵커)를 부착시킨다.

이어, 올리고(dG) 프라이머로 이중가닥 DNA를 합성하고, 초음파처리에 의해 분해하여, T4 폴리머라제로 복원시킨다. 이것을 유니-앰프 어댑터(Uni-amp adapter)[클론테크(C1ontech) 제품]와 결합시키고, 아가로스 전기영동시킨 후, 5' 말단 서열이 풍부한 300-600bp의 단편을 추출한다. 얻어진 단편을 시그널 서열 트랩 벡터 pDREF-CD4ST(요시다 등, FEBS Letters 360: 155-159, 1995)에 삽입한다. 이 벡터는 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 비루스(EBV)의 복제기점을

가지는 서플렉터이고, EBNA-1 단백질의 존재하에 자기복제할 수 있다. 또한 강력한 EF-1 α 프로모터의 하류에 시그널 서열이 없는 인간의 CD4를 코딩하는 DNA가 삽입되어 있고, 이 사이에 시그널 서열을 코딩하는 미지의 cDNA 단편이 정확하게 삽입된 경우, 형질감염된 Raji 세포에서 CD4가 발현하게 된다고 하는 특징을 갖는다.

상기 단편을 삽입한 벡터 pDREF-CD4ST에서 Raji 세포를 형질감염시키고, CD4 양성으로 된 Raji 세포를 분류하여 농축시킨 후, 이로부터 플라스미드를 회수한다. 이어서, 개개의 플라스미드를 다시 Raji 세포에 도입하여 CD4의 발현을 확인함으로써 최종적으로 시그널 서열을 코딩하는 것으로 생각되는 cDNA 단편이 삽입된 플라스미드를 분리한다. 이들 플라스미드의 삽입 cDNA의 염기 서열을 결정하고 기존의 데이터베이스와 비교함으로써 CC형 케모카인에 특징적인 서열을 코딩하는 cDNA 단편을 선택한다. 이것은 원하는 신규 단백질을 코딩하고 있을 가능성이 있으므로, 완전한 길이의 cDNA를 얻기 위해서 3'P 등으로 표식하여 통상의 PHA 자극 인간 PBMC 유래의 cDNA 라이브러리의 스크리닝을 위한 프로브로서 사용한다.

cDNA 라이브러리는 예컨대 이하의 방법에 따라 통상적인 방식으로 구축된다. PHA 자극 인간 PBMC로부터 퀵프렙 마이크로(QuickPrep Micro) mRNA 정제 키트(파마시아 제품)를 이용하여 poly(A)+ RNA를 추출하고, 이 poly(A)+ RNA로부터 올리고(dT)를 프라이머로 하여 역전사효소에 의해 cDNA를 합성하고, 예컨대 pSPORT1 벡터(길코-비알엘 제품)에 삽입한다. 라이브러리의 스크리닝은 앞 단락에서 얻어진 프로브를 이용하여, 재조합 파지 플라크의 플라크 하이브리다이제이션(hybridization) 및 재조합 대장균의 콜로니 하이브리다이제이션 등 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 실행된다.

이어서, 얻어진 재조합 플라스미드의 삽입 cDNA의 염기 서열을 결정한다. 서열결정은 예컨대 아래와 같이 실행된다. 우선, 삽입단편을 해당 단편의 내부에 존재하는 제한효소부위를 이용하여 절단하고, 각 cDNA 단편을 각각 적당한 서열결정 벡터, 예컨대 pBluescript[스트라타진(Stratagene) 제품]에 서브클로닝한다. 다음에 클로닝한 단편의 염기 서열을, 예컨대 상거(Sanger) 방법[상거(F. Sanger) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467, 1977]에 의해서 결정한다.

II. 재조합형 TARC 단백질의 발현

본 발명의 TARC 단백질을 코딩하는 DNA를 적당한 발현 벡터에 도입시키고, 얻어진 발현 벡터를 적당한 숙주세포, 예컨대 세균, 효모, 곤충세포 또는 동물세포에 도입하여 형질전환체를 얻는다.

본 발명의 TARC DNA의 발현에 적절한 발현 벡터로서, 숙주세포가 세균인 경우에는 pRSET, pGEVEX 및 pKK233-2가, 효모인 경우에는 pYES2가, 곤충세포인 경우에는 pVL1393이, 또한 동물세포인 경우에는 pEF-BOS, pSR α 및 pDR2 등이 예시되지만, 이들에 한정되지 않는다.

TARC DNA는, 대장균등의 원핵미생물의 경우에는, 강력한 프로모터(예컨대 T7 프로모터)의 지배하에, 원핵미생물에 의해서 분비되는 단백질의 천연 전구물질에서 유래되는 시그널 서열(예컨대 시그널 펩티드 OMPa)과 성숙형 TARC 단백질로 이루어지는 전구체 단백질로서 발현시킬 수 있다.

효모의 경우에는, 효모에 의해서 분비되는 단백질의 천연 전구물질에서 유래되는 서열(예컨대 페로몬 α 의 prepro-서열)과 성숙형 TARC 단백질로 이루어지는 전구체 단백질로서 발현시킬 수 있다.

동물세포의 경우에는, TARC 단백질 유전자를 적당한 발현 벡터의 강력한 프로모터(예컨대 EF-1 α 프로모터)의 하류에 삽입하고, 효과적인 선택 마커(예컨대 디히드로폴레이트 리덕타제)와 함께 동물세포(예컨대 CHO dhfr- 세포)에 도입하여, 약제(이 경우에는 메토타렉세이트)에 대한 내성에 의해 세포를 선택함으로써 고발현의 세포주를 수립할 수 있다.

인간세포의 경우에는, TARC 단백질 유전자를 비루스 또는 레트로비루스에 도입하고 이 재조합 비루스를 세포에 감염시킨다. 이렇게 하여 얻어진 형질전환체를 TARC의 발현에 알맞은 조건하에서 배양하면, 형질전환체에 의해서 TARC 단백질이 생산된다. 또한, 성숙형 TARC 단백질은, 예컨대 고상법을 이용하고 2개의 디설파이드 결합의 존재에 주의하면서 공지 방법으로 전합성할 수 있다.

따라서, 본 발명은 상기 유전자공학적으로 또는 화학적으로 합성된 TARC를 포함한다.

III. 항TARC 항체의 제작

전술한 바와 같이, 본 발명의 TARC에 특이적인 항체는 TARC가 관여하는 생리학적인 현상의 해명, TARC 활성이 관여하는 이상이나 질환의 치료, 예방 또는 진단에 유용하다. 따라서, 본 발명은 또한 TARC 단백질에 대한 항체를 제공하는 것이다.

단백질에 대한 항체(다클론 및 단클론)의 제조방법은 해당 기술분야에 널리 공지되어 있다.

예컨대, 서열번호 1 또는 2에 기재된 TARC의 아미노산 서열의 일부에 기초하여, 통상의 펩티드 합성기로 합성한 합성 펩티드나 TARC를 발현하는 벡터로 형질전환시킨 세균, 효모, 동물세포, 곤충세포 등에 의해 생산된 TARC 단백질을 통상의 단백질 화학적 방법으로 정제하고, 이들을 면역원으로서, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 등의 동물을 면역화시킴으로써 그 혈청 유래의 다클론 항TARC 항체를 제작할 수 있다.

다르게는, 면역화된 마우스나 래트의 비장 또는 림프절에서 세포를 취출하여 골수종 세포와 융합시키고, 코흘러(Kohler) 및 밀스타인(Milstein)의 방법[Nature, 256, 495-497(1975)] 또는 그의 개량법인 우에다(Ueda) 등의 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4386-4390(1982)]에 따라서 하이브리도마를 제작한 후, 해당 하이브리도마로부터 단클론 항TARC 항체를 생산시킬 수 있다. 단클론 항체 조제를 위한 공정을 이하에 예시한다.

- (a) TARC 단백질에 의한 마우스의 면역화;
- (b) 면역화된 마우스의 비장의 제거 및 비장세포의 분리;
- (c) 분리된 비장세포 및 마우스 골수종 세포의 융합촉진제(예컨대 폴리에틸렌 글리콜)의 존재하에서의 상기 코흘러 등에 기재된 방법에 의한 융합;
- (d) 미융합 골수종 세포가 성장하지 않는 선택배지에서의, 얻어진 하이브리도마 세포의 배양;
- (e) ELISA법 및 면역전기이전법 등에 의한 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선택 및 한정희석법 등에 의한 클로닝; 및
- (f) TARC 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 배양 및 배양물부터의 단클론 항체의 분리.

IV. TARC mRNA 및 TARC 단백질의 검출

본 발명의 TARC mRNA 및 TARC 단백질의 존재는 각각 통상의 특이적인 mRNA 검출법 및 단백질 검출법을 이용하여 검출할 수 있다.

mRNA는 예컨대 안티센스 RNA 또는 cDNA를 프로브에 이용한 노던 블롯 해석이나 동일 반응계(*in situ*) 하이브리다이제이션법에 의해 검출할 수 있다. 또한, mRNA를 역전사효소에 의해 cDNA내로 변환한 후, 적당한 프라이머의 조합에 의한 폴리머라제 연쇄반응법(이하, PCR이라 칭한다)에 의해서도 검출할 수 있다.

단백질은 상기 III에서 얻어진 TARC 특이항체를 이용한 통상의 면역침강법이나 웨스턴 블롯법에 의해 그 존재를 확인할 수 있다.

V. TARC 단백질의 면역학적 정량법

예컨대, 방사성 동위원소, 피옥시다제나 알칼라인 포스포타제와 같은 효소, 혹은 형광색소 등으로 표식한 일정량의 TARC에, 농도를 알고 있는 비표식 TARC, 및 혈청유래의 항TARC 다클론 항체 또는 단클론 항체를 가하여 항원항체결합반응을 수행한다. 비표식 항원의 농도를 적당히 변화시킨 후, 항체와 결합한 표식 항원과 항체에 결합하지 않는 표식 항원을 적당한 방법으로 분리하고, 항체와 결합한 표식 항원의 방사능량, 효소활성 또는 형광강도를 측정한다. 비표식 항원량이 늘어남에 따라 항체와 결합하는 표식 항원의 양은 감소한다. 이 관계를 그래프로 그려 표준곡선을 얻는다. 또한, TARC 단백질 상의 다른 에피토프를 인식하는 두가지의 단클론 항체중 하나를 고상화시키고 다른 하나를 상기 임의의 방법으로 표식하여 고상화 항체에 결합한 TARC의 양을 표식 항체로 검출정량하는, 소위 샌드위치법에 의해서도 가능하다.

이어, 상기 반응계에 농도를 알고 있는 비표식 항원 대신 미지량의 항원을 포함하는 시료를 가하여 이것을 반응시킨 후에 얻어지는 방사능량, 효소활성 또는 형광강도를 표준곡선과 비교해보면, 시료중의 항원, 즉 TARC 단백질의 양을 알 수 있으므로, 염증반응이나 면역반응 또는 T세포의 분화성숙을 모니터링하기 위한 새로운 방법이 제공될 수 있다.

VI. TARC 단백질의 케모카인 활성의 확인

본 발명의 TARC 단백질의 케모카인 활성은 예컨대 시험관내에서는 일정한 직경의 공극을 갖는 필터에 의해 구획이 나눠어진 배양용기의 한쪽에 TARC를 넣고 다른쪽에 표적세포를 넣어, 일정시간후에 필터의 공극을 통과하여 TARC가 존재하는 쪽으로 이동한 세포수를 랜덤 이동수와 비교함으로써 확인할 수 있다. 또한, 생체내에서는 정제된 TARC 단백질을 동물의 피하에 투여하여 세포의 침윤과 집합을 조직학적 방법으로 검출함으로써도 확인할 수 있다.

본 발명을 이하의 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명한다.

실시예

실시예 1 인간 TARC을 코드하는 DNA의 단리

1. 인간 TARC cDNA의 클로닝

(1) 파이토헤마글루티닌 자극 인간 말초혈 단핵세포 유래의 cDNA 라이브러리의 제작

파이토헤마글루티닌(PHA)으로 자극한 정상인 말초혈 단핵세포의 cDNA 라이브러리는 겐코-비알엘의 제품인 cDNA 합성 시스템 및 cDNA 클로닝 시스템을 이용하여, 문헌[샘브룩(J. Sambrook) 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]에 공지되어 있는 통상적인 방법에 따라 아래와 같이 제작하였다.

우선, 킥프레프 마이크로 mRNA 정제 키트(파마시아 제품)를 이용하여, PHA로 자극한 정상인 말초혈 단핵세포로부터 poly(A)+ RNA를 추출하였다. PHA로 72시간 자극한 인간 말초혈 단핵세포 2x10⁷개를 키트에 첨부된 세포용해액에 의해 용해하였다. 이어, 올리고-dT 수지를 가하여 3분 혼화시키고 poly(A)+ RNA를 올리고-dT 수지에 결합시킨 후, TOMY 원심기 MRX-150[도미정공(TOMY Seiko) 제품]에서 12000회전으로 1분간 원심분리하였다. 얻어진 침전물을 염농도가 높은 세정액으로 3회, 염농도가 낮은 세정액으로 5회 세정한 후, 용출액으로 용출하였다. 이 용출액에, 0.1배량의 3M 아세트산나트륨과 2배량의 에탄올을 가하여 -80℃에서 1시간 냉각시키고 TOMY 원심기 MRX-150(도미정공 제품)에서 12000회전으로 5분간 원심분리시킨 다음, 침전된 poly(A)+ RNA를 멸균증류수에 용해하였다. 그리고, 파장 260nm에서의 흡광도를 측정함으로써 회수한 poly(A)+ RNA의 양을 계산하였다. PHA 자극 인간 말초혈 단핵세포로부터 10µg의 poly(A)+ RNA를 얻을 수 있었다.

다음에, 정제된 poly(A)+ RNA를 주형으로서 사용하여 cDNA의 합성을 아래와같이 행하였다. 우선, 4µg의 poly(A)+ RNA를 주형으로서, 역전사효소 SUPER SCRIPT II(겐코-비알엘 제품)를 이용하여 반응완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 500µM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 50µg/ml NotI 프라이머-어댑터(겐코-비알엘 제품) 및 2만U/ml 역전사효소 SUPER SCRIPT II RT)중에서 37℃에서 1시간 반응시켜, 단일가닥 DNA를 합성하였다. 또, NotI 프라이머-어댑터의 서열을 서열표의 서열번호 3에 나타낸다. 이 단일가닥 DNA를 주형으로서, 반응완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM (NH₄)₂SO₄, 1.2mM DTT, 0.15mM β-NAD⁺, 250µM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 65U/ml DNA 리가제, 250U/ml DNA 폴리머라제 I 및 13U/ml RNase H)중에서 16℃에서 2시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 다음에, T4 DNA 폴리머라제를 최종농도가 65U/ml가 되도록 첨가하고 16℃에서 5분간 반응시켜 이중가닥 DNA를 수득하였다. 이 이중가닥 DNA를 반응완충액(55mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG 8000, 200µg/ml SalI 어댑터(겐코-비알엘 제품) 및 100U/ml의 T4 DNA 리가제)중에서 16℃에서 16시간 반응시켜 SalI 어댑터에 결합시켰다. 또, SalI 어댑터는 서열표의 서열번호 4 및 5에 나타내는 DNA가 어닐링된 이중가닥 DNA이다. 이렇게 해서 완성한 cDNA를 pSPORT1 벡터의 NotI 및 SalI 부위 사이에 삽입하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다.

(2) 시그널 서열 트래핑용 cDNA 라이브러리의 제작

시그널 서열 트랩 라이브러리는, PHA 자극 인간 말초혈 단핵세포로부터 mRNA의 5' 말단 근방을 농축한 cDNA를 조제하고 킵코-비알엘 제품인 cDNA 합성 시스템, 5' RACE 시스템 및 cDNA 클로닝 시스템을 이용하여 문헌[샘브룩 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]에 기재된 통상적인 방법에 따라서 제작하였다.

우선, PHA 자극 인간 말초혈 단핵세포로부터 얻어진 poly(A)+ RNA를 주형으로 하여 mRNA의 5' 말단 근방을 농축한 cDNA를 아래와 같이 합성하였다. 5 μ g의 poly(A)+ RNA를 주형으로서, 역전사효소 SUPER SCRIPT II RT(킵코-비알엘 제품)를 이용하여 반응완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 500 μ M dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 150ng 랜덤 프라이머(킵코-비알엘 제품) 및 2만U/ml 역전사효소 SUPER SCRIPT II RT)중에서 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 단일가닥 DNA를 합성하였다. 이 반응액에 6N NaOH를 최종농도가 0.4N로 되도록 첨가하고 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜, 주형 poly(A)+ RNA를 가수분해한 후, 6N 아세트산을 최종농도가 0.4N로 되도록 가하여 중화하였다. 다음에, 등량의 10mM Tris-HCl, pH 8.0 포화 페놀과 클로로포름 혼합액(1:1)을 가하여 교반한 다음, TOMY 원심기 MRX-150에서 12000회전으로 5분간 원심분리하였다. 그의 수층을 제거하고 0.2배량의 3M 아세트산나트륨, 2배량의 에탄올을 가하여 -80 $^{\circ}$ C에서 1시간 냉각시킨 후, 다시 TOMY 원심기 MRX-150(도미정공 제품)에서 12000회전으로 5분간 원심분리하여, 그 침전물을 멸균증류수에 용해하였다. 이 단일가닥 DNA를 반응완충액(20mM Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dCTP, 및 400U/ml 말단 데옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제)중에서 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜, 3' 말단에 올리고dC 테일(tail)을 결합시켰다. 이어, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하여 말단 데옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제를 실행시켰다. 이 올리고-dC 테일을 결합시킨 단일가닥 DNA를 반응완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM (NH₄)₂SO₄, 1.2mM DTT, 0.15mM β -NAD⁺, 250 μ M dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 500ng 앵커 프라이머(서열표의 서열번호 6), 65U/ml DNA 리가제, 250U/ml DNA 폴리머라제 I 및 13U/ml RNase H)중에서 16 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켜, 이중가닥 DNA를 합성하였다. 또, 앵커 프라이머는 DNA 합성기[사이클론 플러스 DNA 신테사이저(Cyclone Plus DNA Synthesizer), 밀리젠(Milligen)/바이오써치(Biosearch) 제품]에서 합성하였다. 합성에는 밀리젠/바이오써치 제품인 β -결합된 베타-시아노에틸포스포아미다이트 시약을 이용하였다. 합성 후, 암모니아수(28%, 나칼라이 테스크 제품) 2ml로 합성 걸럼으로부터 합성 올리고뉴클레오티드를 용출한 후, 60 $^{\circ}$ C에서 5시간 처리함으로써 보호기를 이탈시켰다. 탈보호한 올리고뉴클레오티드를 10배량의 부탄올을 첨가하여 TOMY 원심기(도미정공 제품)에서 3000회전으로 10분간 원심분리함으로써 침전시켜 회수하였다. 회수한 올리고뉴클레오티드를 멸균수에 용해하고, 파장 260nm에서의 흡광도를 측정함으로써 그 양을 결정하였다.

이 이중가닥 DNA를 냉각시키면서 TOMY 초음파 파쇄장치 UD-201(도미정공 제품)에서 50초간 최대출력으로 부분분해시키고, T4 DNA 폴리머라제를 최종농도가 65U/ml로 되도록 가하고 16 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음, 반응완충액(50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG 8000, 200 μ g/ml UNI-Amp 어댑터 및 100U/ml의 T4 DNA 리가제)중에서 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켜 UNI-Amp 어댑터(클론테크 제품)에 결합시켰다. 또, UNI-Amp 어댑터는 서열표의 서열번호 7 및 8에 나타내는 DNA가 어닐링된 것이다. 이렇게 하여 수득된 부분분해 이중가닥 DNA를 주형으로서, 반응완충액(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% 젤라틴, 200 μ M dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 400nM UAP 프라이머(킵코-비알엘 제품), 400nM UNI-Amp 프라이머(클론테크 제품) 및 100U/ml AmpliTaq DNA 폴리머라제 I)중에서 PCR 반응을 수행하였다. 또, UAP 프라이머와 UNI-Amp 프라이머의 서열을 서열표의 서열번호 9와 10에 각각 나타낸다. PCR은 다카라주조에서 구입한 앰플리택 키트(AmpliTaq Kit)를 이용하여 DNA 썬말 사이클러(Thermal Cycler)[퍼킨-엘머(퍼킨-엘머) 제품]에서 행하였다. 반응은, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 전처리한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초간, 58 $^{\circ}$ C에서 45초간, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간의 반응사이클을 30회 반복하고, 최후에 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리하여 행하였다.

이렇게 해서 완성한 mRNA의 5' 말단 근방을 농축한 cDNA를 별도로 제작한 pDREF-CD4ST 벡터(요시다 등, FEBS Letters 360: 155-159, 1995)의 SalI 및 XbaI 부위 사이에 삽입하여, 시그널 서열 트랩 라이브러리를 제작하였다. 이 시그널 서열 트랩 라이브러리를 아래와 같이 인간 B 세포주 Raji에 도입하고 세포표면에 CD4를 발현시킬 수 있는 클론을 동정함으로써 시그널 서열을 가지는 유전자의 단편을 선택하였다.

(3) 시그널 서열 트래핑

상기 (2)에서 조제한, PHA 자극 인간 말초혈 단핵세포 유래의 mRNA의 5' 말단 근방을 농축한 cDNA로 이루어지는 시그널 서열 트랩 cDNA 라이브러리 10 μ g을 500 μ l의 PBS에 현탁하고, 전기영동법에 의해 1x10⁷개의 Raji 세포에 도입하였다. 전기영동은 바이오라드(BioRad) 제품인 진 펄서(Gene Pulser)에서 전압 250V, 정전용량 500 μ F로 행하였다. cDNA 라이브러리가 도입된 Raji 세포는, 하이그로마이신(200 μ g/ml) 존재하에 1주간 배양하여 약제내성을 나타내는 세포를 선택함에 의해 얻어졌다. 이 약제내성을 나타내는 세포를 마우스 항인간 CD4 항체(OKT4, ATCC로부터 입수)와 4 $^{\circ}$ C에서 30

분간 반응시키고 세정한 다음, 자기 비드(bead) 표식 양 항마우스 IgG 항체[다이나비드(Dynabeads), 다이날(Dynal)로부터 구입]로 40°C에서 30분간 반응시켰다. 이 자기 비드로 표식한 세포표면에 CD4를 발현하는 세포를 자기분리기를 이용하여 분리하였다. 이 자기분리를 3회 실행하여, 최종적으로 45%의 세포가 세포표면에 CD4를 발현하는 세포집단을 얻었다.

이 세포집단으로부터 Magic Minipreps DNA 정제시스템[프로메가(Promega) 제품]에 의해서 플라스미드 DNA를 회수하고 다시 대장균 DH10B에 도입하였다. 이 대장균을 LB-암피실린-아가-플레이트(10g 트립톤, 5g 효모 추출물, 10g NaCl, 15g 아가, 50µg/ml 암피실린/증류수 1리터)에 도말하고, 밤새 37°C에서 배양하였다. 플레이트상에 발생된 대장균의 각 콜로니를 5ml의 LB-암피실린 배지(10g 트립톤, 5g 효모 추출물, 10g NaCl, 50µg/ml 암피실린/증류수 1리터)에서 밤새 37°C에서 배양하였다. 이들 배양액으로부터 Magic Minipreps DNA 정제시스템(프로메가 제품)에 의해서 플라스미드 DNA를 정제하고, 다시 500µl의 PBS에 현탁한 1x10⁷개의 Raji 세포에 전기영동법에 의해 도입하였다. 이들 Raji 세포를 마우스 항CD4 항체(OKT4, ATCC로부터 입수)와 4°C에서 30분간 반응시키고 세정한 후, 다시 FITC 표식 토끼 항마우스 IgG(Fab')₂ 항체(Dako로부터 구입)와 4°C에서 30분간 반응시켰다. 이 FITC로 표식한 세포표면에 CD4를 발현하는 세포를 FacStar Plus[벡턴-딕킨슨(Becton-Dickinson) 제품]를 이용하여 동정하였다. 100개의 대장균의 콜로니를 조사하여, 최종적으로 세포표면으로의 CD4의 발현을 유도한 42개 클론을 얻었다.

이들 클론의 염기 서열을 상거의 방법에 의해 파마시아 제품인 오토리드 시퀀스 키트(Autoread Sequence Kit)와 A. L. F. II 자동 서열 결정기를 이용하여 결정하였다. 이들 클론의 서열을 기존의 데이터베이스와 비교한 결과, 클론 98은 추정상의 시그널 서열 절단부위의 9개 아미노산 하류에 2개의 연속한 시스테인을 갖고 있고, 세포유주성 사이토킨의 1종으로서 CC형 케모카인의 특징과 일치하는 구조상의 특징을 가짐을 알았다.

(4) 인간 TARC의 전체 길이 cDNA의 클로닝

다음에, 클론 98의 전체 길이 cDNA를 얻기 위해서, 207bp의 클론 98의 cDNA 단편을 프로브로 하여 멀티프라임 DNA 표식 시스템(Multiprime DNA Labeling System)[애머삼 저팬(Amersham Japan) 제품]에 의해 32P로 표식하고, 이것을 이용하여 (1)에서 제작한 PHA 자극 인간 말초혈 단핵세포의 cDNA 라이브러리를 콜로니 하이브리다이제이션법에 의해 스크리닝하였다. 콜로니 하이브리다이제이션법은 문헌[샘브룩 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]에 기재된 공지 방법으로 행하였다.

인간 PHA 활성화 말초혈 단핵세포 cDNA 라이브러리를 함유하는 대장균 DH10B를 LB-암피실린-아가 플레이트(10g 트립톤, 5g 효모 추출물, 10g NaCl, 15g 아가, 50µg/ml 암피실린/증류수 1리터)에 도말하여 밤새 37°C에서 배양하였다. 플레이트상에 발생된 대장균의 콜로니를 나일론 막(Hybond-N+, 애머삼 저팬 제품)에 전사한 후, SDS 처리(10% SDS), 알칼리 변성(0.5N NaOH, 1.5M NaCl), 그리고 세정(2xSSC)의 조작을 행하였다. 32P 표식 클론 98을 프로브로서 사용하여 이 막을 하이브리다이제이션하였다. 하이브리다이제이션 용액은 6xSSC(1xSSC는 0.15M NaCl, 0.015M 시트르산나트륨으로 이루어짐), 50% 포름아미드, 0.5% SDS, 5배의 덴하르트 용액 및 100µg/ml 연어정자 DNA를 이용하여 42°C에서 밤새 하이브리다이제이션 하였다. 막의 세정은 2xSSC, 0.1% SDS의 완충액으로 실온에서 10분간, 0.2xSSC, 0.1% SDS의 완충액으로 60°C에서 30분간으로 2회 수행한 후, X선 필름[코닥(Kodak) 제품]에 감광시키고 그것들을 현상하여 프로브와 반응하는 콜로니를 동정함으로써 최종적으로 1개의 cDNA 클론(클론 D34)을 얻었다. 이 클론 D34에 삽입되어 있는 cDNA의 서열을 상거 방법에 의해 파마시아 제품인 오토리드 시퀀스 키트와 A. L. F. II 자동 서열결정기를 이용하여 결정하고, 후술의 여러가지 검토를 가한 결과, 해당 cDNA는 원하는 신규한 CC형 케모카인 유형의 단백질(TARC)을 코드하고 있음을 확인하였다.

II. 인간 TARC의 구조결정

(1) hTARC cDNA의 염기 서열 및 그것이 코드하는 아미노산 서열의 해석

상기 I. (4)에서 얻은 클론 D34의 염기 서열을 상거 방법에 의해 파마시아 제품인 오토리드 시퀀스 키트와 A. L. F. II 자동 서열결정기를 이용하여 결정하였다. cDNA 클론 D34의 염기 서열 및 내부에 번역 종료 코돈을 가지지 않는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)의 아미노산 서열을 도 1에 나타낸다.

도 1에 표시되어 있는 바와 같이, 클론 D34에 삽입되어 있는 유전자는 94개의 아미노산으로 이루어지는 오픈 리딩 프레임을 갖고, N 말단에 시그널 펩티드에 특징적인 소수성이 강한 아미노산 서열을 갖는 유전자인 것으로 밝혀졌다. 이 94개의

아미노산으로 이루어지는 단백질의 분자량 계산치는 10,507이다. 또한, 추정상의 시그널 펩티드 절단부위는 계산에 의하면 Ala-23과 Ala-24의 사이에 있고, 도 1에는 세로막대로 표시되어 있다. 이 절단부위로부터 9개 아미노산 하류에 CC형 케모카인의 특징인 2개의 연속하는 시스테인이 표시되어 있다.

또한, 시그널 펩티드 절단 후의 71개의 아미노산으로 이루어진 추정상의 성숙형 단백질은 분비단백질인 것으로 추정된다. 이 71개의 아미노산으로 이루어진 추정상의 성숙형 분비단백질의 분자량 계산치는 8,083이고, 등전점은 계산에 의하면 9.7이다.

(2) CC형 케모카인류와의 서열상의 유사성

FASTA 및 Clustal V 프로그램을 이용하여, hTARC의 아미노산 서열과 공지된 CC형 케모카인의 아미노산 서열을 비교하였다. 결과를 도 2에 나타낸다. 도 2에서, hTARC를 포함해서 모든 CC형 케모카인에 보존되어 있는 아미노산은 실선으로 둘러싸서 빗금쳐진 반면, 대부분의 케모카인에 보존되어 있는 아미노산에는 단지 빗금만 쳐져 있다. 또한, hTARC와 다른 CC형 케모카인과의 상동성의 정도를 %로 우측에 보이고 있다.

도 2로부터, hTARC의 성숙형 분비단백질의 아미노산 서열은 CC형 케모카인에 속하는 RANTES와 29%, MIP-1a와 26%, MIP-1b와 28%, I-309와 24%, MCP-1과 24%, MCP-2와 24%, MCP-3와 28%의 상동성이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 모든 CC 케모카인에 보존되어 있는 4개의 시스테인은 hTARC에도 보존되어 있음이 분명해졌다. 이상의 결과는 얻어진 아미노산 서열이 신규의 인간 CC형 케모카인의 것임을 시사하고 있다.

III. 노던 블롯 해석에 의한 hTARC mRNA의 발현 해석

각종의 인간조직으로부터 단리한 poly(A)+ RNA 2 μ g을 아가로스 겔 전기영동에 걸고 이를 나일론 막에 전사한 것[다중 조직 블롯(multiple tissue blot)]은 클론테크로부터 구입하였다. 또한 인간 말초혈 단핵세포를 PHA로 자극하고, 0, 4, 24 및 72시간 후에, QuickPrep Micro mRNA 정제 키트(파마시아 제품)를 이용하여 poly(A)+ RNA를 추출하였다. 단리한 poly(A)+ RNA 1 μ g을 0.66M 포름알데히드를 포함하는 1% 아가로스 겔 중에서 전기영동에 걸어, 나일론 막(Hybond-N+) (애머삼 저팬 제품)에 전사하였다. 멀티프라임 DNA 표식 시스템(애머삼 저팬 제품)에 의해 32P로 표식한 hTARC의 cDNA 클론 D34의 SmaI-PstI 단편을 프로브로 하여 이들 막을 하이브리다이제이션 하였다. 하이브리다이제이션 용액은 5xSSPE(1xSSPE는 0.18M NaCl, 0.01M 인산나트륨, pH 7.5, 1mM EDTA로 이루어짐), 50% 포름아미드, 2% SDS, 10x 덴하르트 용액, 100 μ g/ml 연어정자 DNA를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 밤새 하이브리다이제이션을 수행하였다. 막의 세정은 2xSSC, 0.1% SDS의 완충액으로 실온, 10분간, 0.2xSSC, 0.1% SDS의 완충액으로 60 $^{\circ}$ C, 30분간으로 2회 행한 후, X선 필름(코닥 제품)에 감광시키고 그것들을 현상하여 해석하였다. PHA로 자극한 후의 시간 및 TARC mRNA의 발현 결과를 도 3A에, 각종 인간조직에서의 TARC mRNA의 발현을 도 3B에 나타낸다.

도 3A에서는, hTARC의 mRNA가 미자극의 인간 말초혈 단핵세포에서는 발현하지 않지만, PHA로 자극하면 4시간 후에는 아직 검출되지 않지만, 24시간 후에는 거의 최대가 되도록 유도되고, 72시간 후에도 소량의 발현이 지속하는 것으로 표시되어 있다.

또한, 도 3B에서는, hTARC의 mRNA가 흉선에 있어서 대량으로 발현하고, 폐, 대장 및 소장에서는 극히 소량 발현하고 있지만, 다른 조직에서는 거의 검출되지 않음을 알 수 있다.

이들 결과는, hTARC가 다른 CC형 케모카인과는 달리 흉선에서만 구성적으로 발현하고 있고, 그 생산이 면역학적 자극에 의해 유도되는 것을 보이고 있다.

실시에 2 재조합 인간 TARC의 누에세포에서의 발현

(1) 누에세포에 있어서의 hTARC DNA의 발현을 위한 재조합 벡터 pVL-TARC의 구축

양단에 EcoRI 및 NotI 부위를 갖고, hTARC의 번역 개시 코돈으로부터 번역 종료 코돈까지를 포함하는 0.5kb의 DNA 단편을, 실시에 1에 기재된 클론 D34를 EcoRI와 NotI로 동시에 소화함으로써 얻었다. 이 DNA 단편을 재조합형 바칼로비루스의 제작에 이용하는 pVL1393[인비트로젠(Invitrogen) 제품]의 EcoRI 부위와 NotI 부위 사이에 삽입하여 재조합 벡터 pVL-TARC를 얻었다. 이 재조합 벡터 pVL-TARC의 유전자 지도를 도 4에 나타낸다.

(2) 형질전환체의 배양

다음에, 재조합 벡터 pVL-TARC와 치사적인 결실을 갖는 직선상의 AcNPV의 DNA를 Sf9 곤충세포에 동시에 도입하여 재조합 바콜로바이러스를 얻었다. 얻어진 재조합 바콜로바이러스는 한계희석법에 의해 순화하고, 또한 Sf9 곤충세포에 M.O.I.= 0.1로 감염시켜 종 바이러스(seed virus)를 얻었다. 이러한 종 바이러스를 Tn5B-4 곤충세포[인비트로젠(Invitrogen) 제품](150cm²의 플라스크당 12x107개)에 M.O.I.= 10 내지 20으로 감염시켜, EX-CELL 400 무혈청배지[제이알에이치 바이오사이언스(JRH Biosciences) 제품](150cm²의 플라스크당 30ml)에서 27°C에서 2일간 배양하였다.

(3) 생성물의 단리, 정제

배양상청을 회수하고 0.22 μ m의 필터 막에서 여과하였다. 이 여액에 1/10 부피의 500mM MES(pH 6.5)를 가하고, A 완충액(50mM MES(pH 6.5)/100mM NaCl)으로 평형화시킨 1ml의 리소스-에스(Resouce-S) 컬럼(파마시아 제품)에 걸었다. 이 hTARC 단백질이 결합한 컬럼을 A 완충액으로 세정한 후, A 완충액 및 B 완충액(50 mM MES(pH 6.5)/1.0M NaCl)을 이용한 NaCl의 염농도의 구배에 의해 용출하였다. hTARC 단백질을 포함하는 분획은 SDS-PAGE와 은염색을 이용하여 동정하였다. SDS-PAGE의 결과를 도 5B에 나타낸다. 도 5B에서, F는 FPLC 분획(최종단계 하나 앞의 정제단계), H는 HPLC 분획에 대한 결과를 각각 보이고 있다.

이 hTARC 단백질을 포함하는 분획에 최종농도가 0.1%로 되도록 TFA를 가한 다음, A 완충액(0.1% TFA)으로 평형화시킨 코스모실 5C4-300 컬럼(나칼라이 테스크 제품)에 걸고, A 완충액 및 B 완충액(0.1% TFA, 60% 아세토니트릴)을 이용한 아세토니트릴의 농도구배에 의해 용출하였다. hTARC 단백질의 용출패턴을 도 5A에 나타낸다. hTARC 단백질을 포함하는 분획을 모아 진공건조시킴으로써 아세토니트릴을 휘발시키고, 내독소를 함유하지 않는 PBS에 대하여 투석하여 최종적인 정제품을 얻었다. 단백질의 농도는 BCA 키트[피어스(Pierce) 제품]를 이용하고 BSA를 대조용으로 하여 결정하였다. 배양상청 300ml로부터 300 μ g의 정제 hTARC 단백질을 얻었으며 발현량은 양호했다. 혼입하고 있는 내독소의 양은 Limulus amoebocyte lysate assay[QCL-1000, 바이오 휘태커(Bio Whitaker) 제품]를 이용하여 정량하고, 4pg/ μ g 이하였다. 정제 hTARC 단백질의 N 말단 아미노산 서열은 아미노산 서열결정기[시마즈(Shimazu) 제품]를 이용하여 결정하고, ARGTNVGRE였다. 도 5C에 표시되어 있는 바와 같이, 이 아미노산 서열은 염기 서열로부터 예측된 시그널 펩티드가 절단되어 발생할 수 있는 71개의 아미노산으로 이루어지는 성숙형 분비단백질의 N 말단 아미노산 서열과 일치하였다.

정제된 TARC 단백질의 활성은 세포 유주 시험에 의해 평가하였다. HUT78 세포, 과립구 및 단핵세포를 이용하여 얻어진 결과는 각각 도 18 내지 20에 도시되어 있다. 이들 결과는, 정제 TARC 단백질이 T세포주 HUT78에 대해 유주활성을 나타냄을 표시한다.

실시예 3 재조합 인간 TARC의 대장균에서의 발현

(1) 대장균에 있어서의 hTARC DNA의 발현을 위한 재조합 벡터 pGEMEX-TARC의 구축

양단에 NdeI 및 NotI 부위를 갖고 hTARC의 성숙형의 개시 코돈으로부터 번역 종료 코돈까지를 포함하는 0.2kb의 DNA 단편을 실시예 1에 기재된 클론 D3A를 주형으로 하여 PCR법에 의해 얻었다. PCR에 이용한 2개의 올리고뉴클레오티드의 서열을 서열표의 서열번호 11 및 12에 나타낸다. PCR은 다카라주조에서 구입한 앰플리택 키트를 이용하여 DNA 씨말 사이클러(피킨-엘머 제품)에서 행하였다. 반응은 클론 D3A의 DNA를 주형으로 하여 반응완충액(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% 젤라틴, 200 μ M dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 400 μ M 프라이머 및 100U/ml 앰플리택 DNA 폴리머라제 I)중에서 행하였다. 반응은, 94°C에서 3분간 전처리한 후, 94°C에서 45초간, 55°C에서 45초간, 72°C에서 1분간의 반응 사이클을 15회 반복하고 최후에 72°C에서 3분간 처리하여 행하였다. 이 반응생성물을 NdeI와 NotI로 동시에 소화시키고, pGEMEX1(프로메가 제품)의 NdeI 부위와 NotI 부위 사이에 삽입하여, 발현 벡터 pGEMEX-TARC를 얻었다. 이 벡터의 유전자지도를 도 6에 나타낸다.

(2) 형질전환체의 배양

발현 벡터 pGEMEX-TARC를 도입한 대장균 BL21주를 이용하여, 성숙형 hTARC의 아미노 말단에 메티오닌이 부가된 단백질로서 발현시켰다. 대장균 BL21주의 배양은 IPTG를 1mM이 되도록 가한 LB 배지에서 실행하고, 37°C에서 3시간 배양하였다.

(3) 생성물의 단리, 정제

대장균을 트리스완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM 2-ME, 50mM NaCl, 0.2mM PMSF)에 현탁시키고, 동결융해를 5회 행하였다. 이어서, DNaseI를 10 μ g/ml, MgCl₂를 10mM이 되도록 가하여, 실온에서 10분간 방치하였다. 10,000회전, 15분간, 4 $^{\circ}$ C의 조건에서 원심분리시키고, 침전된 hTARC 단백질을 세정액(0.5% Triton X-100, 10mM EDTA)으로 3회 세정하여, 부분정제한 재조합형 hTARC 단백질을 얻었다. hTARC의 정제를 나타내는 SDS-PAGE 영등의 결과를 도 7에 나타낸다. 도 7에서, S는 원심분리한 상청에 대하여, W1, W2, W3는 원심분리에 의해 얻어진 침전을 세정액으로 각각 1, 2 및 3회 세척했을 때의 용출물에 대하여, P는 hTARC를 포함하는 세정 후의 침전에 대한 결과이다.

실시에 4 마우스 TARC를 코딩하는 DNA의 단리

I. 마우스 TARC 게놈 DNA의 클로닝

마우스 TARC의 게놈 DNA를 얻기 위해서, 실시에 1에 기재된 인간 TARC의 cDNA 클론 D3A의 SmaI-PstI 단편을 프로브로 하여 멀티프라이머 DNA 표식 시스템(애머삼 저팬 제품)에 의해 32P로 표식하고, 이것을 이용하여 Balb/C 마우스 유래의 게놈 DNA 라이브러리(클론테크 제품)를 플라크 하이브리다이제이션법에 의해 스크리닝하였다. 플라크 하이브리다이제이션법은 문헌[샘브룩 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]에 기재된 방법에 따라서 행하였다.

Balb/C 마우스 유래의 게놈 DNA 라이브러리의 파지 용액과 대장균 LE392를 LB-플레이트(10g 트립톤, 5g 효모 추출물, 10g NaCl, 15g 아가/1L 증류수)에 도말하여 밤새 30 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 플레이트상에 발생된 파지의 플라크를 나일론 막(Hybond-N+, 애머삼 저팬 제품)에 전사한 후, SDS 처리(10% SDS), 알칼리 변성(0.5N NaOH, 1.5M NaCl), 그리고 세정(2xSSC)의 조작을 수행하였다. 32P로 표식한 hTARC의 cDNA 클론 D3A의 SmaI-PstI 단편을 프로브로 하여 이 막을 하이브리다이제이션하였다. 하이브리다이제이션 용액은 5xSSPE(1xSSPE는 0.18M NaCl, 0.01M 인산나트륨, pH 7.5, 1mM EDTA로 이루어짐), 30% 포름아미드, 2% SDS, 10x덴하르트 용액, 100 μ g/ml 연어정자 DNA를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 밤새 하이브리다이제이션을 행하였다. 막의 세정은 2xSSC, 0.1% SDS로 실온에서 10분간, 2xSSC, 0.1% SDS로 60 $^{\circ}$ C에서 30분간으로 2회 행한 다음, X선 필름(코닥 제품)에 감광시키고 그것들을 현상하여, 프로브와 반응하는 플라크를 동정하였다. 최종적으로 8개의 게놈 DNA 클론을 수득하였다.

그중 1개의 클론(클론 #3)의 4234개의 염기 서열을 상거 방법에 의해 파마시아 제품인 오토리드 시퀀스 키트와 A. L. F. II 자동 서열결정기를 이용하여 결정하였다. 3개의 영역에서, 인간 TARC와 동일성이 높은 부위가 확인되었다. 이 3개의 영역을 엑손(exon)인 것으로 추정하였고, 연결한 염기 서열은 93개의 아미노산으로 이루어지는 오픈 리딩 프레임을 갖고, 인간 TARC와 64.4%의 높은 동일성을 나타내었다. 따라서, 이 DNA를 마우스 TARC의 게놈 DNA인 것으로 판단하였다.

II. 마우스 TARC cDNA의 클로닝

(1) PHA 자극 Balb/C 마우스 비장세포 유래의 cDNA 라이브러리의 제작

PHA로 자극한 Balb/C 마우스 비장세포 유래의 cDNA 라이브러리는 문헌[샘브룩 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]의 기재에 따라서 김코-비알엘 제품인 cDNA 합성 시스템 및 cDNA 클로닝 시스템을 이용하여 아래와 같이 제작하였다.

우선, QuickPrep Micro mRNA 정제 키트(파마시아 제품)를 이용하여 PHA로 자극한 Balb/C 마우스 비장세포로부터 poly(A)+ RNA를 추출하였다. PHA로 4시간 자극한 Balb/C 마우스 비장세포 2x10⁷개를 키트에 첨부된 세포용해액에 의해 용해하였다. 다음에, 올리고-dT 수지를 첨가하여 3분동안 혼화하여 poly(A)+ RNA를 올리고-dT 수지에 결합시킨 후, TOMY 원심기 MRX-150(도미정공 제품)에서 12000회전으로 1분간 원심분리하였다. 얻어진 침전물을 염농도가 높은 세정액으로 3회, 염농도가 낮은 세정액으로 5회 세정한 후, 용출액으로 용출하였다. 이 용출액에 0.1배량의 3M 아세트산나트륨과 2배량의 에탄올을 가하여 -80 $^{\circ}$ C에서 1시간 냉각시키고 TOMY 원심기 MRX-150(도미정공 제품)에서 12000회전으로 5분간 원심분리하여, 침전된 poly(A)+ RNA를 멸균 증류수에 용해하였다. 그리고, 파장 260nm에서의 흡광도를 측정함으로써 회수한 poly(A)+ RNA의 양을 계산하였다. PHA 자극 Balb/C 마우스 비장세포로부터 10 μ g의 poly(A)+ RNA를 수득하였다.

다음에, 정제한 poly(A)+ RNA를 주형으로 하여 cDNA의 합성을 아래와 같이 행하였다. 우선, 4 μ g의 poly(A)+ RNA를 주형으로서, 역전사효소 SUPER SCRIPT II RT(김코-비알엘 제품)를 이용하여 반응완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 500 μ M dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 50 μ g/ml NotI 프라이머-어댑터(김

코-비알엘 제품) 및 20000U/ml 역전사효소 SUPER SCRIPT II RT)중에서 37°C에서 1시간 반응시켜 단일가닥 DNA를 합성하였다. 또, NotI 프라이머-어댑터의 서열을 서열표의 서열번호 3에 나타낸다. 이 단일가닥 DNA를 주형으로서, 반응완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM (NH₄)₂SO₄, 1.2mM DTT, 0.15mM β-NAD⁺, 250μM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 65U/ml DNA 리가제, 250U/ml DNA 폴리머라제 I 및 13U/ml RNase H)중에서 16°C에서 2시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 다음에, T4 DNA 폴리머라제를 최종농도가 65U/ml가 되도록 첨가하고 16°C에서 5분간 반응시켜 이중가닥 DNA를 수득하였다. 이 이중가닥 DNA를 반응완충액(50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG 8000, 200μg/ml EcoRI 어댑터(파마시아 제품) 및 100U/ml T4 DNA 리가제)중에서 16°C에서 16시간 반응시켜, EcoRI 어댑터에 결합시켰다. 또, EcoRI 어댑터는 서열표의 서열번호 13 및 14에 나타내는 DNA가 어닐링된 이중가닥이다. 이렇게 해서 완성한 cDNA를 λ ExCel1 벡터(파마시아 제품)의 NotI 부위와 EcoRI 부위 사이에 삽입하여, cDNA 라이브러리를 제작하였다.

(2) 프로브의 제작

상기 (1)에서 조제한 PHA 자극 Balb/C 마우스 비장세포 유래의 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 반응완충액(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% 젤라틴, 200μM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 400nM mG98 엑손 상부 프라이머, 400nM mG98 엑손 하부 프라이머 및 100U/ml 앰플리택 DNA 폴리머라제 I)중에서 폴리머라제 연쇄반응(PCR)을 행하였다. 또, mG98 엑손 상부 프라이머와 mG98 엑손 하부 프라이머는 상기 I에서 얻은 마우스 게놈 DNA에 근거하여 설계되었다. 이들 각 프라이머의 서열을 각각 서열표의 서열번호 15와 16에 나타낸다. mG98 엑손 상부 프라이머와 mG98 엑손 하부 프라이머는 DNA 합성기(사이클론 플러스 DNA 신테사이저, 밀리젠/바이오써치 제품)에서 합성하였다. 합성에는 밀리젠/바이오써치 제품인 β-연결된 β-시아노에틸포스포아미다이트 시약을 이용하였다. 합성 후, 암모니아수(28%, 나칼라이 테스크 제품) 2ml로 합성 컬럼으로부터 합성 올리고뉴클레오티드를 용출한 후, 60°C, 5시간 처리에 의해 보호기를 이탈시켰다. 탈보호한 올리고뉴클레오티드를 10배량의 부탄올을 첨가하여 TOMY 원심기(도미정공 제품)에서 3000회전으로 10분간 원심분리함으로써 침전시켜 회수하였다. 회수한 올리고뉴클레오티드를 멸균수에 용해하여 파장 260nm에서의 흡광도를 측정함으로써 그 양을 결정하였다. PCR은 다카라주조에서 구입한 앰플리택 키트를 이용하여 DNA 썬말 사이클러(파킨-엘머 제품)에서 행하였다. 반응은 94°C에서 3분간 전처리한 후, 94°C에서 45초간, 60°C에서 45초간, 72°C에서 1분간의 반응사이클을 40회 반복하고 최후에 72°C에서 3분간 처리하여 행하였다. 얻어진 321bp의 DNA 단편은 마우스 TARC의 전체길이 cDNA를 얻기 위한 프로브로서 이용하였다.

(3) 마우스 TARC의 전체길이 cDNA의 클로닝

마우스 TARC의 전체길이 cDNA를 얻기 위해서, 상기 (2)에서 얻은 321bp의 DNA 단편을 프로브로 하여 멀티프라이밍 DNA 표식 시스템(애머삼 저팬 제품)에 의해 32P로 표식하고, 이것을 이용하여 (1)에서 제작한 PHA 자극 Balb/C 마우스 비장세포 유래의 cDNA 라이브러리를 플라크 하이브리다이제이션법에 의해 스크리닝하였다. 플라크 하이브리다이제이션법은 문헌[마니아티스(T. Maniatis) 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]에 기재된 방법에 따라서 아래와 같이 행하였다.

PHA 자극 Balb/C 마우스 비장세포 유래의 cDNA 라이브러리의 파지용액과 대장균 LE392를 LB-플레이트(10g 트립톤, 5g 효모 추출물, 10g NaCl, 15g 아가/1L 증류수)에 도말하고 밤새 30°C에서 배양하였다. 플레이트상에 발생된 파지의 플라크를 나일론 막(Hybond-N+, 애머삼 저팬 제품)에 전사한 후, SDS 처리(10% SDS), 알칼리 변성(0.5N NaOH, 1.5M NaCl) 및 세정(2xSSC)의 조작을 하였다. 32P 표식한 321bp의 DNA 단편을 프로브로 하여 이 막을 하이브리다이제이션하였다. 하이브리다이제이션 용액은 5xSSPE(1xSSPE는 0.18M NaCl, 0.01M 인산나트륨, pH 7.5, 1mM EDTA로 이루어짐), 50% 포름아미드, 2% SDS, 10x텐하르트용액, 100μg/ml 연어정자 DNA를 이용하여 42°C에서 밤새 하이브리다이제이션하였다. 막의 세정은 2x SSC, 0.1% SDS로 실온에서 10분간, 0.2xSSC, 0.1% SDS로 60°C에서 30분간으로 2회 행한 다음, X선 필름(코닥 제품)에 감광시키고 그것들을 현상하여, 프로브와 반응하는 플라크를 동정하였다. 최종적으로 1개의 cDNA 클론(클론 #1)을 얻었다. 이 클론 #1에 삽입되어 있는 cDNA의 염기 서열을 상거 방법에 의해 파마시아 제품인 오토리드 시퀀스 키트와 A. L. F. II 자동 서열결정기를 이용하여 결정하고, 후술의 여러가지 검토를 가한 결과, 해당 cDNA는 원하는 신규한 CC형 케모카인 유형의 단백질(mTARC)을 코드하고 있음을 확인하였다.

III. 마우스 TARC의 구조결정

(1) mTARC cDNA의 염기 서열 및 그것이 코드하는 아미노산 서열의 해석

상기 II. (3)에서 얻은 마우스 cDNA 클론 #1의 염기 서열 및 내부에 번역 종료 코돈을 가지지 않는 오픈 리딩 프레임의 아미노산 서열을 도 8에 나타낸다.

도 8에 표시되어 있는 바와 같이, 클론 #1에 삽입되어 있는 유전자는 93개의 아미노산으로 이루어지는 오픈 리딩 프레임 을 갖고 N 말단에 시그널 펩티드에 특징적인 소수성이 강한 아미노산 서열을 갖는 유전자임이 밝혀졌다. 이 93개의 아미노산으로 이루어지는 단백질의 분자량 계산치는 10,466이고, 추정상의 시그널 펩티드의 절단부위는 계산에 의하면 Ala-23과 Ala-24 사이에 있고 도 8에는 세로막대로 표시되어 있다. 이 절단부위로부터 9개 아미노산 하류에 CC형 케모카인의 특징인 2개의 연속하는 시스테인이 표시되어 있다.

또한, 시그널 펩티드 절단 후의 70개의 아미노산으로 이루어지는 추정상의 성숙형 단백질은 분비단백질인 것으로 추정되었다. 이 70개의 아미노산으로 이루어지는 추정상의 성숙형 분비단백질의 분자량 계산치는 7,916이다. 이 70개의 아미노산으로 이루어지는 추정상의 성숙형 분비단백질의 등전점은 계산에 의하면 10.2이다.

(2) 인간 TARC와의 유사성

성숙형 분비 마우스 TARC 단백질의 아미노산 서열은 인간 TARC와 65%의 동일성이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 마우스 TARC의 오픈 리딩 프레임의 염기 서열은 인간 TARC와 74%의 동일성이 있는 것으로 밝혀졌다. 모든 CC 케모카인에 보존되어 있는 4개의 시스테인은 마우스 TARC에 보존되어 있음이 확인되었다. 이러한 사실은 마우스 TARC가 인간 TARC의 마우스 상동 유전자 및 단백질을 시사하고 있다.

실시예 5 재조합 마우스 TARC의 누에세포에서의 발현

(1) 누에세포에 있어서의 mTARC DNA의 발현을 위한 재조합 벡터 pVL-mTARC의 구축

양단에 EcoRI 및 NotI 부위를 갖고 마우스 TARC의 번역 개시 코돈으로부터 번역 종료 코돈까지를 포함하는 0.5kb의 DNA 단편을, 클론 #1을 EcoRI와 NotI로 동시에 소화함으로써 얻었다. 이 DNA 단편을, 재조합형 바콜로바이러스의 제작에 이용하는 pVL1393(인비트로젠 제품)의 EcoRI 부위와 NotI 부위 사이에 삽입하여 재조합 벡터 pVL-mTARC를 얻었다. 이 벡터의 유전자지도는 도 9에 나타낸다.

(2) 형질전환체의 배양

다음에, 재조합 벡터 pVL-mTARC와 치사적인 결실을 갖는 직선상의 AcNPV의 DNA를 Sf9 곤충세포에 동시에 도입하여 재조합 바콜로바이러스를 얻었다. 얻어진 재조합 바콜로바이러스는 한계희석법에 의해 순화하고 Sf9 곤충세포에 M.O.I.= 0.1로 감염시켜, 종 비루스를 얻었다. 이러한 종 비루스를 Tn5B-4 곤충세포(인비트로젠 제품)(150cm²의 플라스크당 1.2x10⁷개)에 M.O.I.=10 내지 20으로 감염시켜, EX-CELL 400 무혈청배지(제이알에이치 바이오사이언스 제품)(150cm²의 플라스크당 30ml)에서 27°C에서 2일간 배양하였다.

(3) 생성물의 단리, 정제

배양상청을 회수하고 0.22 μ m의 필터 막에서 여과하였다. 이 여액에 1/10 부피의 500nM MES(pH 6.5)를 가하고, A 완충액(50mM MES(pH 6.5)/100mM NaCl)로 평형화시킨 1ml의 리소스-에스 컬럼(파마시아 제품)에 걸었다. 이 mTARC 단백질이 결합한 컬럼을 A 완충액으로 세정한 후, A 완충액 및 B 완충액(50mM MES(pH 6.5)/1.0M NaCl)을 이용한 NaCl의 염농도의 구배에 의해 용출하였다. 마우스 TARC 단백질을 포함하는 분획은 SDS-PAGE와 은염색을 이용하여 동정하였다. SDS-PAGE의 결과를 도 10B에 나타낸다. 도 10B에서, F는 FPLC 분획(최종단계 하나 앞의 정제단계), H는 HPLC 분획에 대한 결과를 각각 보이고 있다.

이 마우스 TARC 단백질을 포함하는 분획에 최종농도가 0.1%로 되도록 TFA를 가한 다음, A 완충액(0.1% TFA)으로 평형화시킨 코스모실 5C4-300 컬럼(나갈라이 테스크 제품)에 걸고, A 완충액 및 B 완충액(0.1% TFA, 60% 아세토니트릴)을 이용한 아세토니트릴의 농도구배에 의해 용출하였다. 마우스 TARC 단백질의 용출패턴을 도 10A에 나타낸다. 마우스 TARC 단백질을 포함하는 분획을 모아 진공건조시킴으로써 아세토니트릴을 휘발시키고, 내독소를 함유하지 않는 PBS에 대하여 투석하여 최종적인 정제품을 얻었다. 단백질의 농도는 BCA 키트(피어스 제품)를 이용하고 BSA를 대조용으로 하여 결정하였다. 배양상청 300ml로부터 168 μ g의 정제 마우스 TARC 단백질을 수득하였다. 혼입하고 있는 내독소의 양은 Limulus amoebocyte lysate assay(QCL-1000, 바이오 휘태커 제품)를 이용하여 정량하고, 2pg/ μ g 이하였다. 정제 mTARC 단백질의 N 말단 아미노산 서열은 아미노산 서열결정기(시마즈 제품)를 이용하여 결정하고, ARATNVGRE**LDYF였다. 이 아미노산 서열은 도 10C에 표시되어 있는 바와 같이, 염기 서열로부터 예측된 시그널 펩티드가 절단된 후의, 70개의 아미노산으로 이루어지는 성숙형 분비단백질의 N 말단 아미노산 서열과 일치하였다.

실시에 6 마우스 TARC에 의한 백혈구 침윤의 유도

실시에 5에서 얻은 마우스 TARC의 마우스 피내(intradermal)투여에 의한 백혈구 침윤의 유도를 조사하였다.

정제된 마우스의 TARC 단백질을 Balb/C 마우스의 등에 피내투여하고 백혈구 침윤의 유무를 조사함으로써 mTARC의 케모카인 유형의 활성을 확인하였다. 구체적으로는 마우스 TARC의 정제품 50ng을 내독소를 포함하지 않는 PBS에 용해시켜 50 μ l로 만들고 Balb/C 마우스의 등피내에 투여하였다. 음성 대조용으로서, 내독소를 포함하지 않는 PBS 50 μ l를 이용하였다. 투여후, 4, 24시간 후에 경추탈구에 의해 마우스를 도살하고, 투여부위의 피부를 절단해내어 10% 포르말린에 고정시켰다. 그 후, 고정시킨 피부를 파라핀에 매립하고 마이크로톰(microtome)에 의해 두께 5 μ m의 절편을 제작하여, 헤마토크실린-에오신 염색을 하였다. 이 결과를 mTARC에 대해서는 도 11에, 대조용에 대해서는 도 12에 각각 나타낸다. 도 11 및 도 12에서, A는 배율 100의, B는 배율 400의 투여 4시간 후의 현미경 사진이다. 도 11A 및 도 11B에 나타낸 바와 같이, 마우스의 TARC를 투여한 피하조직에서는 림프구 및 단핵세포의 침윤이 TARC 투여 24시간 후에 나타났다. 한편, 도 12A 및 도 12B에 표시되어 있는 바와 같이 PBS만으로는 그와 같은 변화를 나타내지 않았다.

실시에 7 TARC 수용체를 발현하는 세포의 검출

요오드 표식한 인간 TARC을 이용하여 TARC 수용체를 발현하고 있는 세포를 검출하였다. 실시에 2에 기재된 바와 같이 곤충세포로 발현시켜 정제된 인간 TARC 단백질을, 125I 표식 볼튼-헌터(Bolton-Hunter) 시약(애머삼 저팬 제품)을 이용하여 125I로 표식하였다. 바이오-겔(Bio-Gel)(바이오라드 제품)을 이용하여 겔 여과하여 125I 표식 hTARC를 정제된 후 비활성을 구한 바 81.6 μ Ci/ μ g이었다. 이 표식 hTARC를 이용하여 여러가지 종류의 세포로의 결합실험을 하였다.

1x10⁶~8x10⁶의 피검세포를 결합완충액(PREMI-1640, 20mM HEPES(pH 7.4), 1% BSA, 0.02% NaN₃)으로 세정한 후, 100 μ l의 결합완충액에 현탁하였다. 이 세포현탁액에 125I 표식 hTARC를 최종농도 0.66nM로 가한 100 μ l의 결합완충액을 가하여, 실온에서 1시간 결합시켰다. 결합반응 후, 반응액을 300 μ l의 디부틸프탈산:올리브유(4:1) 용액에 부어넣고, 원심에 의해 세포에 결합한 125I 표식 TARC와 비결합의 125I 표식 TARC를 분리한 후, 세포에 결합한 125I 표식 TARC의 방사선량을 감마카운터로 측정하였다. hTARC의 세포로의 특이적 결합은 비표식 TARC 비존재하에 결합한 125I 표식 TARC의 값에서 200nM의 비표식 hTARC 존재하에 비특이적으로 결합한 125I 표식 TARC의 값을 빼어 구하였다. 125I 표식 TARC의 여러가지 종류의 세포 106개당특이적 결합을 도 13에 나타낸다.

도 13으로부터 명백하듯이, 상당한 특이적 결합이 일부 T세포주(Jurkat, Molt3, CEM, Hut78, MT2, MT4, Hut102), 말초혈 림프구, 활성화 말초혈 T세포에서 확인된다. 그 밖의 T세포주(Molt4, HPB-ALL, TCL-Kan, TLOm1), 단구세포주(U937, THP1), 적아구세포주(K562), 말초혈 단구에서는 매우 적은 특이적 결합밖에 확인되고 없었다. B 세포주(Raji), 태아신장유래의 세포주(293E), 말초혈 과립구에서는 거의 특이적 결합이 확인되지 않았다.

이상의 결과는 TARC의 수용체가 특정 T세포에 많이 발현하고 있음을 보여준다.

실시에 8 TARC와 수용체와의 결합특성

T세포주 Jurkat을 이용하여, TARC의 수용체에 대하여 더욱 자세히 해석하였다.

(1) 결합정수와 수용체 수

결합정수와 수용체 수를 구하기 위해서, 결합이 평형에 도달하는 조건을 검토하였다. 그 결과, 125I로 표식한 인간 TARC의 Jurkat 세포로의 특이적 결합은 15 $^{\circ}$ C, 1시간으로 평형에 도달한다는 것을 알았다. 그래서, 125I 표식 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 4x10⁶개의 Jurkat 세포로의 특이적 결합량의 변화를 조사하였다. 특이적 결합량은, 비표식 TARC 비존재하에 결합한 125I TARC의 값에서 1 μ M의 비표식 TARC 존재하에 비특이적으로 결합한 125I 표식 TARC의 값을 빼어 구하였다. 그 결과를 도 14A에 나타낸다. 125I 표식 TARC의 Jurkat 세포로의 특이적 결합은 포화곡선을 나타내었다. 또한, 그의 스캐트차트 해석의 결과를 도 14B에 나타낸다. 125I 표식 TARC의 Jurkat 세포로의 특이적 결합부위는 1종류이고, 결합정수는 계산에 의하면 2.lnM이며, 1개의 세포당 결합수는 603이었다.

다음에, 125I 표식 TARC의 농도를 2nM로 고정하고 비표식 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 4x10⁶개의 Jurkat 세포로의 특이적 결합량의 변화를 조사하였다. 특이적 결합량은, 여러가지의 농도의 비표식 TARC 존재하에 결합한 125I 표식 TARC의 값에서 1 μ M의 비표식 TARC 존재하에 비특이적으로 결합한 125I 표식 TARC의 값을 빼어 구하고, 비표식

TARC 비존재하에서의 특이적 결합량을 100%로 하여 계산하였다. 그 결과를 도 15A에 나타낸다. 스킷차드 해석의 결과, 125I 표식 TARC의 Jurkat 세포로의 특이적 결합부위는 1종류이고, 결합정수는 계산에 의하면 2.1nM이며, 1개의 세포당 결합수는 948이었다.

(2) 다른 CC형 케모카인에 의한 결합저해

TARC의 Jurkat 세포로의 결합이 다른 케모카인에 의해 경합되는가를 조사하였다. 125I 표식 hTARC의 농도를 0.66nM로 하고, 비표식 케모카인 비존재하 또는 200nM의 IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1 α (모두 페프로테크 제품) 혹은 TARC의 존재하에서의 4x10⁶개의 Jurkat 세포로의 결합을 실온에서 1시간 행하였다. 그 결과를 도 15B에 나타낸다. 125I TARC의 결합은 비표식 TARC에 의해서만 경합저해되고, 다른 케모카인에 의해서는 결합저해가 확인되지 않았다. 따라서, Jurkat 세포상의 TARC의 수용체는 다른 케모카인의 수용체와는 다른 독립적인 수용체임을 알았다.

(3) 적혈구상의 수용체와의 결합활성

적혈구에는 여러가지 케모카인이 결합할 수 있는 수용체, 더피(Duffy) 항원/ 케모카인 수용체(receptor for chemokine (DARC))가 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 125I 표식 TARC의 농도를 0.66nM로 고정하고, 비표식의 다른 케모카인 IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1 α 혹은 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 108개의 적혈구로의 특이적 결합량의 변화를 조사하였다. 특이적 결합량은, 여러가지의 농도의 비표식 케모카인 존재하에 결합한 125I 표식 TARC의 값에서 1 μ M의 비표식 TARC 존재하에 비특이적으로 결합한 125I 표식 TARC의 값을 빼어 구하고, 비표식 TARC 비존재하에서의 특이적 결합량을 100%로 하여 계산하였다. 그 결과를 도 16에 나타낸다. 125I 표식 TARC의 결합은 비표식 TARC, IL-8, RANTES, MCP-1에 의해 경합저해되고, MIP-1 α 에 의해서는 거의 결합저해가 확인되지 않았다. 또한, 그의 스킷차드 해석의 결과를 도 17에 나타낸다. 125I 표식 TARC의 적혈구로의 특이적 결합부위는 1종류이고, 결합정수는 계산에 의하면 17nM이었다. TARC의 결합정수 및 경합저해 양식은 다른 케모카인, 예컨대 IL-8의 DARC로의 결합정수 및 경합저해 양식과 마찬가지로, 따라서 TARC는 적혈구상의 DARC에 결합하는 것이 분명해졌다.

실시에 9 TARC의 면역학적 정량법

I. 고상화 항TARC 항체의 제작

(1) 글루타치온-S-트랜스퍼라제와 TARC의 융합 단백질의 조제

글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST)와 TARC의 융합 단백질을 해당 융합 단백질의 발현 벡터 pGEX-TARC를 이용하여 조제하였다.

양단에 BamH1 및 NotI 부위를 갖고 TARC 성숙형의 개시 코돈으로부터 번역 종료 코돈까지를 포함하는 0.2kb의 DNA 단편을 실시예 1에 기재된 클론 D3A를 주형으로 하여 PCR법에 의해 얻었다. PCR에 이용한 2개의 올리고뉴클레오티드의 서열을 서열표의 서열번호 17 및 18에 나타낸다. PCR은 다카라주조에서 구입한 앰플리택 키트를 이용하여 DNA 썬말 사이클러(퍼킨-엘머 제품)에서 실행하였다. 반응은 클론 D3A의 DNA를 주형으로 하여 반응완충액(10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% 젤라틴, 20 μ M dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 400 μ M 프라이머 및 100U/ml 앰플리택 DNA 폴리머라제 I)중에서 수행하였다. 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 전처리한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초간, 57 $^{\circ}$ C에서 45초간, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 반응사이클을 15회 반복하고 최후에 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리하여 행하였다. 이 반응생성물을 BamH1과 NotI로 동시에 소화하여, pGEX 4T-3(파마시아 제품)의 BamH1 부위와 NotI 부위 사이에 삽입함으로써 발현 벡터 pGEX-TARC를 얻었다.

발현 벡터 pGEX-TARC를 도입한 대장균 JM109주를 이용하여, 성숙형 TARC의 아미노 말단에 GST 부가한 단백질로서 발현시켰다. 대장균 JM109주의 배양은 IPTG를 0.1mM이 되도록 가한 0.2% 글루코오스를 포함하는 2xYT 배지에서 실행하고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양하였다. 그 후 대장균을 STE 완충액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1mM PMSF, 100 μ g/ml 라이소자임)에 현탁하고, 빙상에서 15분간 방치하였다. 이어서, DTT를 5mM, 사르코실을 1.4%가 되도록 가하고, 빙냉시키면서 TOMY 초음파 파쇄장치 UD-201(도미정공 제품)에서 300초간 최대출력으로 처리하였다. 10,000회전, 5분간, 4 $^{\circ}$ C의 조건하에 원심분리하고, 상청에 Triton X-100을 2.5%가 되도록 가한 다음, 글루타치온 세파로즈 4B 수지를 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 결합반응시켰다. GST-TARC 융합단백질이 결합한 수지는 PBS로 5회 세정한 후, 수지와 동일한 부피의 1% SDS를 포함하는 PBS를 가하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하고, GST-TARC 융합단백질을 수지로부터 해리시켰다. 얻어진 GST-TARC 융합단백질 용액에는 9배 부피의 PBS를 가하여 항원으로서 이용하였다.

(2) 항TARC 항체의 제작

항체의 제작에는 모르모트를 사용하여 100 μ g의 GST-TARC 융합단백질을 동일 부피의 프로인트 컴플리트 보조제 (Freund's complete adjuvant)와 혼합한 후 피하에 투여하였다. 추가면역은 2주간마다 실행하는데, 100 μ g의 GST-TARC 융합단백질을 동일 부피의 프로인트 인컴플리트 보조제와 혼합한 후 피하에 투여하였다. 합계 3회 면역을 행하고 혈청을 채취하였다.

(3) 항TARC 항체의 정제와 표식

바이오틴화 항TARC 항체의 제작은 아래와 같이 행하였다. Affi-Gel 15 수지(바이오라드 제품)에 3배 부피의 정제한 GST-TARC 융합단백질 또는 GST 단백질 용액을 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 방치하였다. 단백질 용액을 제거한 후, 수지에 블로킹 용액(10mM 에탄올아민, pH 8.0)을 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하였다. 수지는 20배 부피의 PBS로 세정한 후, 결합 완충액(20mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.5M NaCl)을 가하였다. 얻어진 혈청에 동일 부피의 포화 황산암모늄을 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 방치한 후, 12,000회전, 20분간, 4 $^{\circ}$ C의 조건하에 원심분리하였다. 얻어진 침전은 PBS에 용해시키고 동일 부피의 포화 황산암모늄을 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치한 다음, 12,000회전, 20분간, 4 $^{\circ}$ C의 조건에서 원심분리하였다. 얻어진 침전에 PBS를 첨가하여 용해시키고 결합완충액에 대하여 투석시킨 다음, GST 단백질 결합 수지에 걸어 실온에서 2시간 방치함으로써 GST에 대한 항체를 제거하였다. 이렇게 얻어진 투과(flow-through) 용액을 GST-TARC 융합단백질 결합 수지에 걸어 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 방치시키고, 수지는 20배 부피의 결합완충액으로 세정한 후, TARC에 대한 항체를 0.1M 글리신으로 용출하였다. 이 항체용액에 1M Tris-HCl, pH 9.5를 첨가하고, 0.1M NaHCO₃에 대하여 투석하고, NHS-LC-Biotin(피어스 제품)을 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 2.5시간 방치하였다. 이 바이오틴화 항체는 50mM Tris-HCl, pH 7.5에 대하여 투석하고, 이어 PBS에 대하여 투석하였다.

고상화용 항TARC 항체의 정제는 아래와 같이 행하였다. 항혈청에 Tris-HCl, pH 8.0을 100mM이 되도록 가하고, 하이트랩-프로테인 A(Hitrap-protein A) 컬럼에 걸고, 컬럼의 10배 부피의 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 계속해서 컬럼의 10배 부피의 10mM Tris-HCl, pH 8.0으로 세정하였다. 결합한 항체는 0.1M 글리신으로 용출하고, 1M Tris-HCl, pH 9.5를 가한 후, PBS에 대하여 투석하였다.

II. TARC 단백질의 면역학적 정량법

TARC 단백질의 정량은 고상화 항체에 결합한 TARC의 양을 바이오틴화 항체로 검출정량하는, 소위 샌드위치법으로 이하와 같이 행하였다. 우선, 고상화용 항체를 10 μ g/ml가 되도록 50mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액에 용해시키고 96개 웰 플레이트[막시솔브(Maxisorb), 눈크(Nunc) 제품]에 1개 웰당 50 μ l씩 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 방치하였다. 항체용액을 제거한 후, 1mg/ml의 BSA-함유 PBS 100 μ l를 가하여 실온에서 1시간 방치하고, 0.02% Tween-20-함유 PBS로 1회 세정하였다. 농도를 알고 있는 곤충세포에서 발현시켜 정제한 재조합 인간 TARC 또는 미지량의 항원을 포함하는 시료에 Triton X-100을 0.5%가 되도록 가한 후, 1개 웰당 50 μ l씩 가하고 실온에서 1시간 방치하였다. Tx-PBS 용액(0.5% Triton X-100)으로 3회 세정한 후, 바이오틴화 항TARC 항체를 Tx-PBS 용액으로 1000배 희석하여, 1개 웰당 50 μ l씩 가하고 실온에서 30분간 방치하였다. Tx-PBS 용액으로 3회 세정한 후, 피옥시다제 표식 스트렙타비딘[벡터(Vector) 제품]을 Tx-PBS 용액으로 4000배 희석하여, 1개 웰당 50 μ l씩 가하고 실온에서 30분간 방치하였다. Tx-PBS 용액으로 3회 세정하고 PBS로 1회 세정한 후, 기질용액(100mM NaOAc, pH 5.5, 1mM EDTA, 6.72mg/ml TMBZ, 0.03% H₂O₂)을 100 μ l 가하여 정색 반응을 하였다. 1N H₂SO₄를 50 μ l 가하여 반응을 정지시킨 후, 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. 다음에, 농도를 알고 있는 재조합 인간 TARC를 이용하여 표준곡선을 제작하고, 여기에 비교함으로써 시료중의 TARC 단백질의 양을 알 수 있다. 검출감도는 50pg/ml였다.

실시에 10 TARC 유도활성을 갖는 물질

(1) TARC 단백질을 유도하는 자극의 동정

정상인 말초혈 단핵구를 96개 웰 플레이트[코스터(Coaster) 제품]에 1개 웰당 5x10⁵개씩 가하고, 자극물질 없이 혹은 자극물질로서 PHA(김코-비알엘 제품)를 100배 희석, 항CD3 항체(OKT3)를 10 μ g/ml 또는 LPS[L4391, 시그마(Sigma) 제품]를 100ng/ml가 되도록 가하여, 250 μ l의 RPMI-1640/10% FCS에서 배양하였다. 6, 12, 24, 36, 48, 72시간 후에 배양액을 회수하고, 0.45 μ m의 필터로 여과한 다음 얻어진 여액을 이용하여 TARC 단백질을 정량하였다. 그 결과를 도 21에 나타낸다. 도 21에 표시된 바와 같이, TARC 단백질은 PHA, 항CD3 항체 자극에 의해 시간의존적으로 발현하고, 발현량은

72시간까지 직선적으로 증가하였다. 발현은 PHA 자극하에 12시간, 항CD3 항체 자극하에 4시간부터 검출되고, 72시간에서는 PHA 자극하에 16ng/ml, 항CD3 항체 자극하에 2.5ng/ml에 달하였다. LPS나 미자극에서는 발현이 거의 검출되지 않았다.

(2) TARC 단백질을 유도하는 사이토킨의 동정

PHA가 항CD3 항체보다 강한 TARC 발현유도작용을 갖기 때문에, 이러한 유도에는 사이토킨이 관여하고 있을 것으로 생각된다.

따라서, 정상인 말초혈 단핵구를 96개 웰 플레이트(코스터 제품)에 1개 웰당 2.5x10⁵개씩 가하고, 사이토킨 없이 혹은 사이토킨으로서 10ng/ml IL-1 α (알앤드디 제품), 100U/ml IL-2(시오노기제약 제품), 50ng/ml IL-3(젠자임 제품), 50ng/ml IL-4(페프로테크 제품), 50ng/ml IL-7(페프로테크 제품), 50ng/ml IL-10(젠자임 제품), 10ng/ml GM-CSF(젠자임 제품), 50ng/ml TNF α (페프로테크 제품), 1000U/ml IFN- γ (시오노기제약 제품), 10ng/ml M-CSF(알앤드디 제품)를 가하여 250 μ l의 RPMI-1640/10% FCS에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액을 회수하고, 0.45 μ m의 필터에서 여과하여 수득된 여액을 이용하여 TARC 단백질을 정량하였다. 그 결과를 도 22에 나타낸다. 도 22에 표시된 바와 같이, TARC 단백질은 GM-CSF, IL-3, IL-4에 의해 발현이 유도되고, 발현량은 각각 12, 6, 2ng/ml정도였다.

마찬가지로 GM-CSF, IL-3, IL-4의 농도의존성을 조사하였다. 그 결과를 도 23에 나타낸다. 도 23에 표시된 바와 같이, GM-CSF의 경우 ED50은 0.7ng/ml이고, 발현은 3.3ng/ml에서 최대에 도달하며, 더욱 높은 농도에서는 반대로 유도가 이루어지지 않았다. IL-3, IL-4의 경우에는 포화곡선을 그리고, ED50은 0.5, 0.8ng/ml였다.

상기의 결과는, 많은 케모카인의 발현이 TNF- α , IFN- γ 에 의해 유도되는 것과 대조적으로 TARC의 발현이 지극히 특징적임을 보이고 있다.

실시에 11 TARC 단백질을 발현하는 세포의 동정

(1) TARC을 발현하는 세포를 확인하기 위해서 정상인 말초혈 단핵구를 CD14 양성 단구와 CD14 음성 림프구로 분리하고, PHA, PHA/PMA, GM-CSF, IL-3 및 IL-4로 자극하였다. 정상인 말초혈 단핵구를 2x10⁷/ml가 되도록 수냉한 분리완충액(5mM EDTA, 1% FCS, PBS)에 현탁하고, FITC로 표식한 항CD14 항체(벡틴-디킨슨 제품)를 1/50 부피의 양으로 가한 다음 빙상에 30분 방치하였다. 분리완충액으로 세정하고, 107개 세포/80 μ l가 되도록 분리완충액에 현탁시킨 다음, 107개 세포당 20 μ l의 자기 비드 표식 항마우스 IgG 항체[밀텐이-바이오텍(Miltenyi-Biotec) 제품]를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 15분 방치하였다. 분리완충액으로 세정하고 500 μ l의 분리완충액에 현탁시킨 후, MACS(밀텐이 바이오텍 제품)를 이용하여 CD14 양성 단구와 CD14 음성 림프구로 분리하였다. 96개 웰 플레이트(코스터 제품)의 1개 웰당 정상인 말초혈 단핵구와 CD14 음성 림프구는 2.5x10⁵개, CD14 양성 단구는 1.8x10⁵개씩 가하고, 자극없이 혹은 자극으로서 100배 희석 PHA(킵코-비알엘 제품), 100배 희석 PHA(킵코-비알엘 제품)와 50ng/ml PMA, 50ng/ml IL-4(페프로테크 제품), 50ng/ml IL-3(젠자임 제품), 10ng/ml GM-CSF(젠자임 제품)를 가하여 250 μ l의 RPMI-1640/10% FCS에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액을 회수하고 0.45 μ m의 필터로 여과하여 얻어진 여액을 이용하여 TARC 단백질을 정량하였다. 그 결과를 도 24에 나타낸다. 도 24의 그래프에 표시되어 있는 바와 같이 TARC은 GM-CSF, IL-3, IL-4 자극에 의해 단구에서만 분비되었다. PHA, PHA/PMA 자극에 의해서는 반대로 림프구에서만 분비되어, PHA 자극에 의한 발현유도는 PMA를 가함으로써 현저히 억제됨을 나타내었다.

(2) 노던 블롯 해석에 의한 TARC mRNA의 발현해석

인간 말초혈 단핵세포를 미자극 혹은 100배 희석 PHA(킵코-비알엘 제품), 100ng/ml LPS(L4391, 시그마 제품), 10ng/ml IL-4(페프로테크 제품), 10ng/ml IL-3(젠자임 제품), 4ng/ml GM-CSF(젠자임 제품)로 자극하고, 24시간 후에 TRIZOL RNA 정제 시약(킵코-비알엘 제품)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 단리한 RNA 5 μ g을 0.66M 포름알데히드를 포함하는 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동에 걸어, 나일론 막(Hybond-N+)(애머삼 저팬 제품)에 전사하였다. 멀티프라이머 DNA 표식 시스템(애머삼 저팬 제품)에 의해 32P로 표식한 TARC의 cDNA 클론 D3A의 SmaI-PstI 단편을 프로브로 하여 이들 막을 하이브리다이제이션하였다. 하이브리다이제이션 용액은 QuickHyb 용액(스트라타진 제품), 100 μ g/ml 연어정자 DNA를 이용하여 68 $^{\circ}$ C에서 1.5시간 하이브리다이제이션하였다. 막의 세정은 2xSSC, 0.1% SDS의 완충액으로 실온, 10분간, 0.2xSSC, 0.1% SDS의 완충액으로 55 $^{\circ}$ C, 30분간으로 2회 행한 후, X선 필름(코닥 제품)에 감광시키고 그것들을 현상하여 해석하였다. 도 25의 결과로부터, TARC의 mRNA는 미자극 및 LPS 자극의 인간 말초혈 단핵세포에서는 거의 발현하지 않지만, GM-CSF, IL-3 자극에 의해 약 400배, IL-4, PHA 자극에 의해 약 10배의 mRNA의 발현유도가 확인되었다.

이상의 결과는, TARC의 GM-CSF, IL-3, IL-4 자극에 의한 말초혈 단핵구에서의 발현유도는 분비과립등에 축적된 단백질의 방출에 의한 것이 아니라, 주로 mRNA의 증가에 의한 것임을 보이고 있다.

실시에 12 인간 PBMC 유래 TARC의 T세포주에 대한 유주활성

사이토킨 자극에 의해 정상인 말초혈 단구로부터 분비되는 TARC의 T세포주에 대한 유주활성을 이하의 방법으로 조사하였다.

세포 유주활성은 48개 웰의 주화성 챔버[chemotaxis chamber, 뉴로 프로브(Neuro Probe) 제품]를 이용하여 측정하였다. 인간 말초혈 단구를 미자극 혹은 50ng/ml IL-4(페프로테크 제품), 50ng/ml IL-3(젠자임 제품), 10ng/ml GM-CSF(젠자임 제품)로 자극하여, 36시간 후에 배양액을 회수하고, 0.45 μ m의 필터로 여과하여 얻어진 여액을 이용하여 세포유주활성을 측정하였다. 배양 여액을 하부 웰에 가하는 한편 완충액[RPMI-1640, 20mM HEPES(pH 7.4), 1% BSA]에 현탁한 4x10⁵개의 T세포주 HUT78을 상부 웰에 가하였다.

Type IV 콜라겐 용액(5 μ g/ml 수용액)으로 실온, 1시간 코팅한 폴리비닐피롤리돈-비함유 폴리카보네이트 막(공극 크기 5 μ m, 뉴로 프로브 제품)으로 상하웰을 분리시켰다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양한 후, 막을 제거하여 PBS로 상부웰을 세정하고 고정 및 염색하였다.

유주한 세포는 800배의 현미경하에서, 1개 웰에 대하여 무작위적으로 선택한 5개 시야(HPF)에 대하여 수를 측정하였다. 그 결과를 도 26에 나타낸다. 도 26의 그래프에 표시된 바와 같이, IL-3 및 GM-CSF로 자극한 배양액은 HUT78 세포의 강한 유주를 야기하였지만, 미자극 혹은 IL-4로 자극한 배양액은 유주를 야기하지 않았다.

또한, GM-CSF 처리의 배양상청의 Hut78 세포에 대한 유주활성은 10 μ g/ml 모르모트 항TARC 항체(TARC Ab) 처리로 거의 소실되었다.

이들 결과는, 유주활성을 가지는 TARC가 사이토킨의 자극에 의해 단구로부터 분비되는 것을 보여준다.

실시에 13 사이토킨에 의한 TARC 발현의 억제

액성면역의 유도에 관여하는 Th2 타입의 사이토킨 IL-4에 의해 TARC가 유도되므로, Th2의 유도를 억제하는 Th1 타입의 사이토킨 IFN- γ , 면역반응 전반을 억제하는 사이토킨 IL-10의 발현유도에 미치는 영향을 조사하였다. 정상인 말초혈 단핵구를 96개 웰 플레이트(코스터 제품)에 1개 웰당 2.5x10⁵개씩 가하고, 사이토킨으로서 10ng/ml IL-4(페프로테크 제품), 10ng/ml IL-3(젠자임 제품), 5ng/ml GM-CSF(젠자임 제품)를 가하고, 이 혼합물을 50ng/ml IL-10(젠자임 제품) 혹은 1000IU/ml IFN- γ (시노노기 제약 제품)의 존재하에 250 μ l의 RPMI-1640/10% FCS에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액을 회수하고 0.45m의 필터로 여과하여, 얻어진 여액을 이용하여 TARC 단백질을 정량하였다. 그 결과를 도 27에 나타낸다.

도 27의 그래프에 표시된 바와 같이 GM-CSF, IL-3, IL-4 자극에 의한 말초혈 단핵구에서의 TARC의 발현유도는 IFN- γ , IL-10에 의해 억제되었다. 따라서 TARC의 분비는 액성면역의 유도의 자극에 의해 유도되고, 세포성면역의 유도상태에서는 억제된다고 생각된다.

실시에 14 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포에 대한 TARC의 결합활성

TARC를 분비된 알칼라인 포스파타제(SEAP)-(히스티딘)6과의 융합단백으로서 생산하고, 이것을 이용하여 293/EBNA-1 세포표면에 발현시킨 CCR4 수용체와의 결합을 검토하였다.

(1) 융합 단백질(TARC-SEAP)의 조제

TARC를 SEAP와의 융합단백으로서 발현시키기 위한 벡터 pDREF-SEAP(His)6을 도 28에 나타낸다. 우선 이 벡터의 제작법을 설명한다. 클론테크 제품인 플라스미드 pSEAP-Enhancer를 주형으로 하여 히스티딘이 6개 이어진 서열, (His)6 부분을 코드하는 영역을 5'-XbaI-AP 프라이머(서열번호 19)와 3'-AP(HIS)6-NotI 프라이머(서열번호 20)를 이용한 PCR에 의해 증폭시키고, 얻어진 PCR 산물을 제한효소 XbaI와 NotI로 분해시킨 후, pDREF-Hyg(요시다 등, FEBS Letters 360: 155-159, 1995)의 XbaI와 NotI 부위 사이에 도입하여, pDREF-SEAP(His)6을 제작하였다.

다음에, 도 28에 도시하는 바와 같이 pDREF-SEAP(His)6 벡터의 SalI와 XbaI 부위 사이에 TARC cDNA의 ORF를 삽입하고, TARC가 5개의 아미노산으로 이루어지는 링커(Ser-Arg-Ser-Ser-Gly)를 거쳐서 SEAP-(HIS)6와 융합한 단백을 코딩하는 벡터 pDREF-TARC-SEAP(HIS)6를 제작하였다. 이 벡터의 제작법을 다음에 설명한다.

TARC를 코딩하는 염기 서열을 TARC cDNA를 주형으로 하여 TY98F 프라이머(서열번호 3)과 TY98R 프라이머(서열번호 4)를 이용한 PCR로 증폭시키고, 얻어진 PCR 산물을 제한효소 SalI와 XbaI로 분해시킨 후, pDREF-SEAP(HIS)6의 SalI와 XbaI 부위 사이에 도입하여, pDREF-TARC-SEAP(HIS)6를 제작하였다. 이 벡터를 293/EBNA-1 세포(인비트로젠 제품)에 리포펙타민(lipofectamine)(김코-비알엘 제품)을 이용하여 도입하였다. 배양한지 3 내지 4일 후, 배양상청을 회수하고 0.45mm의 공극크기를 갖는 필터에 통과시키고, 20mM HEPES(pH 7.4)와 0.02% 아지드화나트륨을 가하여 4°C에 보존하였다.

(2) 융합 단백질(TARC-SEAP)의 어세이

생산된 융합단백(TARC-SEAP)의 분석은 샌드위치형의 효소-결합 면역흡수 어세이(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)에 의해 행하였다.

즉, 96개 웰의 마이크로테스트플레이트(막스솔브, 닌크 제품)를 단 클론형 항태반성 알칼라인 포스파타제(placental alkaline phosphatase) (anti-PLAP)[메디스 바이오테크(Medix Biotech) 제품](2µg/ml, 50mM Tris-HCl, pH 9.5)로 코팅하고, 소혈청 알부민(BSA)(1mg/ml, 인산염 완충된 염수)으로 블로킹하였다. 검체는 희석액(0.02% Tween-20을 포함하는 PBS)으로 희석하고, 마이크로플레이트에 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, 희석액으로 세정한 다음 500배로 희석한 바이오틴화 토끼 항PLAP 항체를 첨가하여 1시간 반응하였다. 또한, 세정 후 퍼옥시다제-결합 스트렙트아비딘(벡터 제품)을 가하여 30분간 반응하였다. 세정 후, 결합한 퍼옥시다제의 활성을 3,3'-5,5'-테트라메틸 벤지딘으로 검출하였다. 반응을 1N H₂SO₄로 정지시키고 450nm의 흡광도를 측정하였다.

알칼라인 포스파타제(AP)의 활성을 그레이트 에스케이프 디텍션 키트(Great EscApe Detection Kit, 클론테크 제품)를 이용한 케미루미네선스(chemiluminescence)법으로 측정하여, 상대 광 단위(relative light unit; RLU)/s로서 구하였다. AP 표준곡선의 제작은 정제 PLAP[코스모 바이오(Cosmo Bio) 제품]를 이용하여 행하였다. 이용한 SEAP과 TARC-SEAP는 1pmol당 각각 8.7x10⁷ RLU/s 및 1.2x10⁸RLU/s였다.

(3) CCR4를 발현하는 293/EBNA-1 세포의 조제

인간 태반 게놈 DNA(클론테크 제품)를 주형으로 하여, CCR4를 코딩하는 영역을 CKR4-XbaF 프라이머(서열번호 23)와 CKR4-XbaR 프라이머(서열번호 24)를 이용한 PCR에 의해 증폭시키고, 얻어진 PCR 산물을 제한효소 XbaI로 분해시킨 후, pBluescript SK+ (스트라타진 제품)의 XbaI 부위에 도입하였다. 얻어진 플라스미드로부터, CCR4를 코딩하는 영역을 SalI와 NotI로 분해한 후, pDREF-Hyg(요시다 등, FEBS Letters 360: 155-159, 1995)의 SalI와 NotI 부위 사이에 도입하여 pDREF-CCR4를 제작하였다. 이 벡터를 293/EBNA-1 세포(인비트로젠 제품)에 리포펙타민(김코-비알엘 제품)을 이용하여 도입하였다. CCR4가 도입된 293/EBNA-1 세포는 하이그로마이신(200µg/ml) 존재하에 1주간 배양하여 약제 내성을 나타내는 세포를 선택함으로써 얻어졌다.

(4) TARC-SEAP 융합 단백질의 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포로의 특이적 결합

TARC-SEAP의 농도를 1nM로 고정하고, 비표식 TARC의 농도를 변화시킨 경우의 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포로의 특이적 결합량의 변화를 조사하였다. 결합실험은 20mM HEPES(pH 7.4), 1% BSA, 0.02% 아지드화나트륨을 포함하는 RPMI-1640 200µl중에서 행하였다. 배제형의 결합실험에서는 4x10⁵의 세포에 1nM의 TARC-SEAP와 각종 농도의 비표식 TARC를 가하여 실온에서 1시간 반응시키고, 세정 후 세포를 50µl의 1% Triton X-100을 포함하는 10mM Tris-HCl(pH 8.0)로 용해시키고, 세포로부터 유래하는 포스파타제를 65°C에서 10분간의 처리로 불활성화시키고, 원심 후 25µl의 상청중의 AP 활성을 측정하였다. 비특이적 결합은 1nM의 SEAP를 이용하여 측정하였다. 특이적 결합량은, 여러가지의 농도의 비표식 TARC 존재하에 결합한 TARC-SEAP의 값으로부터 비특이적으로 결합한 SEAP의 값을 빼어 구하고, 비표식 TARC 비존재하에서의 특이적 결합량을 100%로 하여 계산하였다. 그 결과를 도 29에 나타낸다. 결합 강도를 나타내는 50% 저해농도는 약 3nM이고, 따라서 TARC는 CCR4에 강하게 결합함을 알았다.

(5) TARC-SEAP 융합 단백질의 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포로의 특이적 결합에 대한 다른 케모카인의 영향

TARC의 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포로의 결합이 다른 케모카인에 의해 경합되는지를 조사하였다.

TARC-SEAP의 농도를 1nM로 하여, 비표식 케모카인 비존재하 또는 200nM의 MCP-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β (모두 페프rote크 제품), LARC 혹은 TARC의 존재하에서의 4x10⁵개의 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포로의 결합을 실온에서 1시간 행하였다. 그 결과를 도 30에 나타낸다. TARC-SEAP의 결합은 비표식 TARC에 의해서만 경합저해되고, 다른 케모카인에 의해서는 결합저해가 확인되지 않았다. 이 결과는, CCR4가 다른 케모카인과는 강하게 결합하지 않고 TARC와만 강하게 결합하는 수용체임을 보이고 있다.

실시에 15 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포에 대한 hTARC의 유주활성

인간 TARC의, CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포에 대한 유주활성을 48개 웰의 주화성 챔버(뉴로 프로브 제품)를 이용하여 측정하였다. 실시예 2의 기재에 따라서, 곤충세포에서 발현시켜 정제한 재조합 인간 TARC는 완충액[RPMI-1640, 20mM HEPES(pH 7.4), 1% BSA]으로 희석하여 하부 웰에 가하고, 1x10⁵개의 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포를 상부 웰에 가하였다. 콜라겐 IV 용액(20 μ g/ml 수용액)으로 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 코팅한 폴리비닐피롤리돈-비함유 폴리 카보네이트 막(공극크기 8 μ m, 뉴로 프로브 제품)에 의해 상하웰을 분리시켰다. 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양 후, 막을 제거하여 PBS로 상부를 세정하고 고정 및 염색하였다.

유주한 세포는 400배의 현미경하에서, 1개 웰에 대하여 무작위적으로 선택한 5개 시야(HPF)에 대해 수를 측정하였다. 그 결과를 도 31에 나타낸다. 도 31의 그래프에 표시된 바와 같이, CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포는 TARC에 대하여 농도의존적으로 유주하였다. 또 세로축상의 사각의 도장은 TARC를 첨가하지 않은 대조용의 결과를 보이고 있다. 한편, TARC와는 상이한 다른 케모카인인 RANTES 및 MIP-1 α 는 CCR4를 발현시킨 293/EBNA-1 세포에 대해 유의의 유주활성을 나타내지 않았다.

[서열 목록]

서열번호: 1

서열의 길이: 582

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 2본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: cDNA 내지 mRNA

기원

생물명: 인간

서열의 특징

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 53..334

특징을 결정하는 방법: S

[서열 1]

```

CCCTGAGCAG AGGGACCTGC ACACAGAGAC TCCTCCTGG GCTCCTGGCA CC ATG GCC 58
Met Ala
1
CCA CTG AAG ATG CTG GCC CTG GTC ACC CTC CTC CTG GGG GCT TCT CTG 106
Pro Leu Lys Met Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu
5 10 15
CAG CAC ATC CAC GCA GCT CGA GGG ACC AAT GTG GGC CGG GAG TGC TGC 154
Gln His Ile His Ala Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys
20 25 30
CTG GAG TAC TTC AAG GGA GCC ATT CCC CTT AGA AAG CTG AAG ACG TGG 202
Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp
35 40 45 50
TAC CAG ACA TCT GAG GAC TGC TCC AGG GAT GCC ATC GTT TTT GTA ACT 250
Tyr Gln Thr Ser Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr
55 60 65
GTG CAG GGC AGG GCC ATC TGT TCG GAC CCC AAC AAC AAG AGA GTG AAG 298
Val Gln Gly Arg Ala Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys
70 75 80
AAT GCA GTT AAA TAC CTG CAA AGC CTT GAG AGG TCT TGA AG CCTCCTCACC 349
Asn Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser
85 90
CCAGACTCCT GACTGTCTCC CGGGACTACC TGGGACCTCC ACCGTTGGTG TTCACCGCCC 409
CCACCCGTGAG CGCCTGGGTC CAGGGGAGGC CTCCAGGGA CGAAGAAGAG CCACAGTGAG 469
GGAGATCCCA TCCCCTTGTG TGAACCTGGAG CCATGGGCAC AAAGGGCCCA GATTAAAGTC 529
TTTATCCTCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 582

```

서열번호: 2

서열의 길이: 558

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 2분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류:

기원

생물명: 마우스

서열의 특징

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 2..280

특징을 결정하는 방법: S

[서열 2]

```

C ATG AGG TCA CTT CAG ATG CTG CTC CTG GCT GCT CTG CTT CTG GGG ACT 49
  Met Arg Ser Leu Gln Met Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu Gly Thr
    1         5         10        15
TTT CTG CAG CAT GCC AGA GCT GCT CGA GCC ACC AAT GTA GGC CGA GAG 97
Phe Leu Gln His Ala Arg Ala Ala Arg Ala Thr Asn Val Gly Arg Glu
    20        25        30
TGC TGC CTG GAT TAC TTC AAA GGG GCC ATT CCT ATC AGG AAG TTG GTG 145
Cys Cys Leu Asp Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Ile Arg Lys Leu Val
    35        40        45
AGC TGG TAT AAG ACC TCA GTG GAG TGT TCC AGG GAT GCC ATC GTG TTT 193
Ser Trp Tyr Lys Thr Ser Val Glu Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe
    50        55        60
CTG ACT GTC CAG GGC AAG CTC ATC TGT GCA GAC CCC AAA GAC AAA CAT 241
Leu Thr Val Gln Gly Lys Leu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Asp Lys His
    65        70        75        80
GTG AAG AAG GCC ATC AGA TTG GTG AAA AAC CCA AGG CCG TGA CCITCCCGC 292
Val Lys Lys Ala Ile Arg Leu Val Lys Asn Pro Arg Pro
    85        90
TGAGGCATTT GGAGACGCCA GGGCTGCTGT CCATGGTTTC AACATAAAGC GGCCTGTGAC 352
CAGCAGAGCC CAAGAGCAGC CACAGAGCAG AAGTCCCTGT TCCTTTTTTT ATGGACTCTT 412
ATGCACTACA GCGGAACACA AAAAAAGCA ACGGAATAAA GCCTTCTCC CTCAAAAAAA 472
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 532
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 558
    
```

서열번호: 3

서열의 길이: 45

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 3]

GATTAGTTCT AGATCGCGAC GCGGCCGCC TTTTTTTTTT TTTT

서열번호: 4

서열의 길이: 16

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 4]

TCGACCCACG CGTCCG

서열번호: 5

서열의 길이: 12

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 5]

CGGACGCGTG GG

서열번호: 6

서열의 길이: 48

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 6]

CTACTACTAC TAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGGGGGG GGGGGGGG

서열번호: 7

서열의 길이: 31

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 7]

CCTCTGAAGG TTCCAGAATC GATAGTCTAG A

서열번호: 8

서열의 길이: 35

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 8]

5' P-CTCTAGACTA TCGATTCTGG AACCTTCAGA GGTTT-3'

서열번호: 9

서열의 길이: 32

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 9]

CTACTACTAC TAGGCCACGC GTCGACTAGT AC

서열번호: 10

서열의 길이: 25

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 10]

CCTCTGAAGG TTCCAGAATC GATAG

서열번호: 11

서열의 길이: 27

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 11]

CGCCATATGG CTCGAGGGAC CAATGTG

서열번호: 12

서열의 길이: 29

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 12]

CGCGCGGCCG CTCAAGACCT CTCAAGGCT

서열번호: 13

서열의 길이: 14

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 13]

AATTCGGCAC GAGG

서열번호: 14

서열의 길이: 10

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 14]

5' P-GGAGCACGGC-3'

서열번호: 15

서열의 길이: 24

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 15]

CTCTGCTTCT GGGGACTTTT CTGC

서열번호: 16

서열의 길이: 24

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 16]

GGTCACAGGC CGCTTTATGT TGAA

서열번호: 17

서열의 길이: 27

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 17]

CGCGGATCCG CTCGAGGGAC CAATGTG

서열번호: 18

서열의 길이: 29

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 18]

CGCGCGGCCG CTCAAGACCT CTCAAGGCT

서열번호: 19

서열의 길이: 42

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 19]

CGCTCTAGAA GCTCCGGAAT CATCCCAGTT GAGGAGGAGA AC

서열번호: 20

서열의 길이: 53

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 20]

CGCGCGGCCG CTCAGTGATG GTGATGGTGA TGACCCGGGT GCGCGGCGTC GGT

서열번호: 21

서열의 길이: 27

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1분쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 21]

CGCGTCGACG GCACCATGGC CCCACTG

서열번호: 22

서열의 길이: 27

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 22]

CGCTCTAGAA GACCTCTCAA GGCTTTG

서열번호: 23

서열의 길이: 38

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 23]

GCTCTAGAGC CACCATGAAC CCCACGGATA TAGCAGAT

서열번호: 24

서열의 길이: 32

서열의 타입: 핵산

쇄의 수: 1본쇄

토폴로지: 선형

서열의 종류: 기타 핵산 합성 DNA

[서열 24]

CGTCTAGACT ACAGAGCATC ATGGAGATCA TG

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 아미노산 잔기 24 내지 94의 아미노산 서열을 갖는 인간 CC형 케모카인 유형의 단백질.

청구항 2.

서열번호 1의 아미노산 잔기 1 내지 94의 아미노산 서열을 갖는 인간 CC형 케모카인 유형의 단백질.

청구항 3.

서열번호 2의 아미노산 잔기 24 내지 93의 아미노산 서열을 갖는 마우스 CC형 케모카인 유형의 단백질.

청구항 4.

서열번호 2의 아미노산 잔기 1 내지 93의 아미노산 서열을 갖는 마우스 CC형 케모카인 유형의 단백질.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항중 어느 한 항에 따른 단백질을 코딩하는 DNA.

청구항 6.

제 5 항에 따른 DNA를 포함하는 발현 벡터.

청구항 7.

제 6 항에 따른 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 획득된 형질전환체.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,

숙주세포가 누에세포인 형질전환체.

청구항 9.

제 7 항에 따른 형질전환체를 배양하는 단계, 및 생산된 단백질을 배양배지로부터 회수하는 단계를 포함하는, 제 1 항 내지 제 4 항중 어느 한 항에 따른 단백질의 제조 방법.

청구항 10.

제 1 항 내지 제 4 항중 어느 한 항에 따른 단백질에 대한 단클론 항체.

청구항 11.

제 10 항에 따른 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포.

도면

도면1

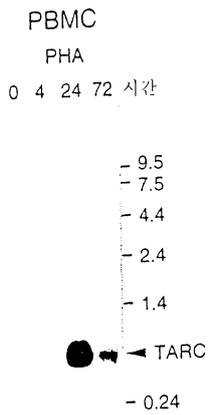
```

1          CCTGTAGACAGAGGGACCTGTGCACACAGAGACTCCCTCTGGGCTCTGGGACC      52
53  ATG  GCC  CCA  CTG  AAG  ATG  CTG  GCC  CTG  GTC  ACC  CTC  CTC  CTG  GGG      97
1  M   A   P   L   K   M   L   A   L   V   T   L   L   L   G
98  GCT  TCT  CTG  CAG  CAC  ATC  CAC  GCA  GCT  CGA  GGG  ACC  AAT  GTG  GGC      142
16  A   S   L   Q   H   I   H   A   A   R   G   T   N   V   G
143  CGG  GAG  TGC  TGC  CTG  GAG  TAC  TTC  AAG  GGA  GCC  ATT  CCC  CTT  AGA      187
31  R   E   C   C   L   E   Y   F   K   G   A   I   P   L   R
188  AAG  CTG  AAG  ACG  TGG  TAC  CAG  ACA  TCT  GAG  GAC  TGC  TCC  AGG  GAT      232
46  K   L   K   T   W   Y   Q   T   S   E   D   C   S   R   D
233  GCC  ATC  GTT  TTT  GTA  ACT  GTG  CAG  GGC  AGG  GCC  ATC  TGT  TCG  GAC      277
61  A   I   V   F   V   T   V   Q   G   R   A   I   C   S   D
278  CCC  AAC  AAC  AAG  AGA  GTG  AAG  AAT  GCA  GTT  AAA  TAC  CTG  CAA  AGC      322
76  P   N   N   K   R   V   K   N   A   V   K   Y   L   Q   S
323  CTT  GAG  AGG  TCT  TGA  AGCTCTCACCCTCCAGACTCTGACTGTCTCCCGGGACT      376
91  L   E   R   S   *
377  ACCTGGGACCTCCACCCTGTGGTGTTCACCCGCCCCACCCTGAGCGCCCTGGGTCCAGGGG      435
436  AGGCTTCCAGGGAGCAGAAAGAGAGCCACACAGTGAAGGAGATCCCATCCCTTGTCTGAAAC      494
495  TGGAGCCATGGGCACAAAAGGGCCCAATTAAGTCTTTAATCTC      538
    
```

도면2

TARC	AR - GTNVGRE	LEYFKGAI	PLRRLKLTWYQ -	TTSEDC	SSR	100%
RANTES	SPYSSDT - TPCC	FAYIARPL	PRAHIKKEYF -	YTTISGKC	SN	29%
MIP-1A	ASLAADPTACC	FSYTSRQI	PQNF IADYF -	ETISSQC	SK	26%
MIP-1b	APMGSDPPTACC	FSYTARKL	PRNFVVDY -	ETSSLCSO	SO	28%
I-309	KSMQVPFSR -	CCSFSAEQEI	PLRALCY -	RNTSSICS	SN	24%
MCP-1	OPDAINAPVTC	CYNFTNRK	SVORLAS	YRRI	SSKCPK	24%
MCP-2	OPDSVSIPTCC	FNVINRKI	PIORLES	YTRI	NIQC	24%
MCP-3	OPVGINNTST	CCYRFINKKI	PKORLES	YRRT	ISSHC	28%
TARC	DAIIVFV	TVQGRAI	QSDPN	NNKRW	KNVYKY	LSLERS
RANTES	PAVVFV	TRKNROV	CANP	EKKW	REYINS	LEMS
MIP-1A	PGVIFL	TKRSROV	CADP	SEEW	QKYS	DSLESA
MIP-1b	PAVVFQ	IKRSKQV	CADP	SESW	QEVY	YDLELN
I-309	EGLIFK	LKRGKEA	CALD	TVGW	ORHR	KMLRHCP
MCP-1	EAVIFK	TIVAKEI	CADP	KQKW	QDSMD	HLDKQ
MCP-2	EAVIFK	TKRGKEV	CADP	KERW	RDSMK	HLDQIF
MCP-3	EAVIFE	KTIKLDEI	CADP	TOKW	ODFM	KHLDKK

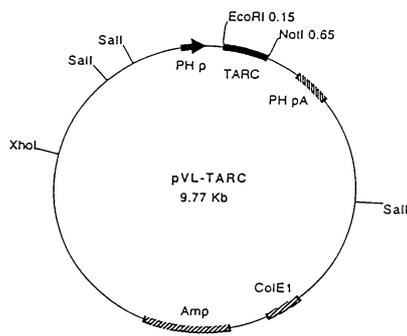
도면3A



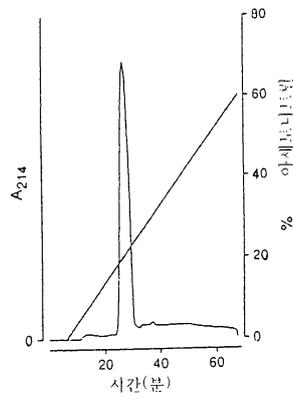
도면3B



도면4

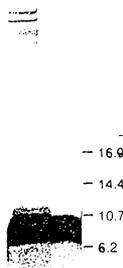


도면5A



도면5B

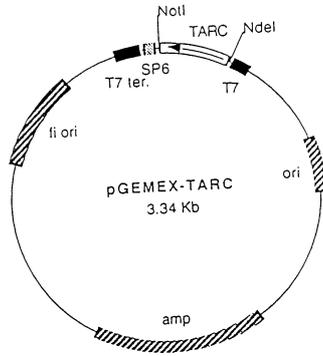
F H



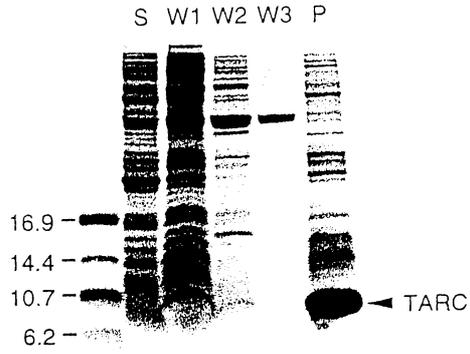
도면5C

예측된 서열: MAPLKMLALVTL L L L GASLOHIHAARGT N VGRECC...
 결정된 서열: ARG T N VGRE **

도면6



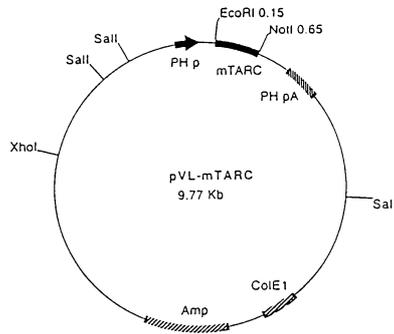
도면7



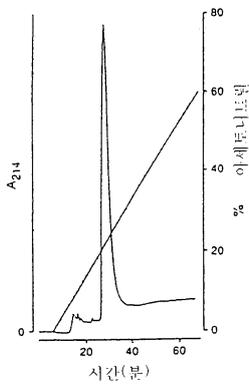
8면도

1	ATG AGG TCA CTT CAG ATG CTG CTC CTG GCT GCT CTG GGG	1	46
2	M R S L Q M L L L A A L L L G	15	15
47	ACT TTT CTG CAG CAT GCC AGA GCT GCT CGA GCC ACC AAT GTA GGC	91	30
15	T F L Q H A R A A R A T N V G	30	
92	CGA GAG TGC TGC CTG GAT TTC TAC TTC AAA GGG GCC ATT CCT ATC AGG	136	45
30	R E C C L D Y F K G A I P I R	45	
137	AAG TTG GTG AGC TGG TAT AAG ACC TCA GTG GAG TGT TCC AGG GAT	181	60
45	K L V S W Y K T S V E C S R D	60	
182	GCC ATC GTG TTT CTG ACT GTC CAG GGC AAG CTC ATC TGT GCA GAC	226	75
60	A I V F L T V Q G K L I C A D	75	
227	CCC AAA GAC AAA CAT GTG AAG AAG GCC ATC AGA TTG GTG AAA AAC	271	90
75	P K D K H V K K A I R L V K N	90	
272	CCA AGG CCG TGA CCTCCCGCTGAGGCAATTGGAGAGCCCGCGCTGCTGCAT	326	93
91	P R P *	93	
327	GATTTCACATATAAGCGGCTGTGACCGACAGGCCCAAGACGACGACAGCAGAAAG	385	
386	TCCCTGTTCCCTTTTATAGACTTATGCACTACAGGCGACACAAAAAAGCAAC	444	
445	GGAAATAAAGCCTTCTCCCTC	465	

9면도

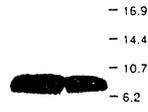


10A면도



도면10B

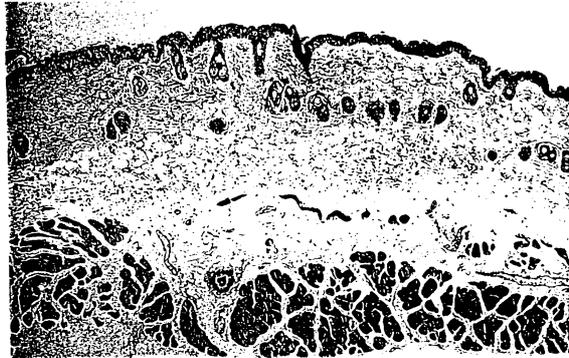
F H



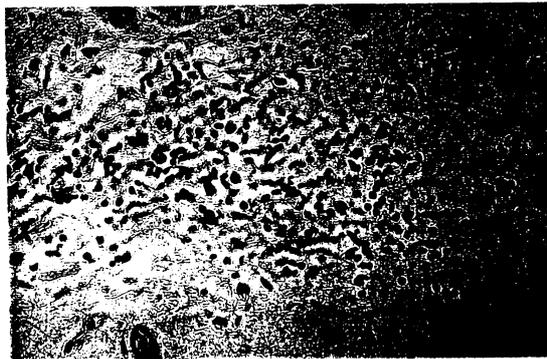
도면10C

예측된 서열: MAPLKMLALVTLLLGASLOHIHAARGTNVGRECC...
결정된 서열: ARGTNVGRE**

도면11A



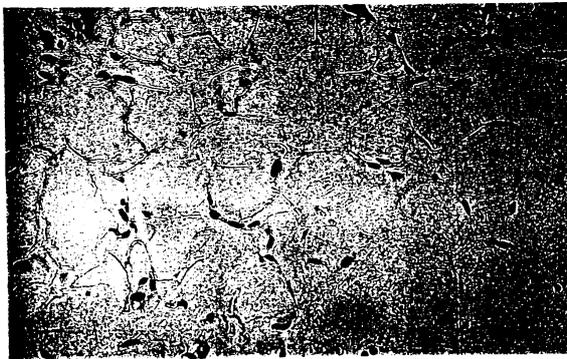
도면11B



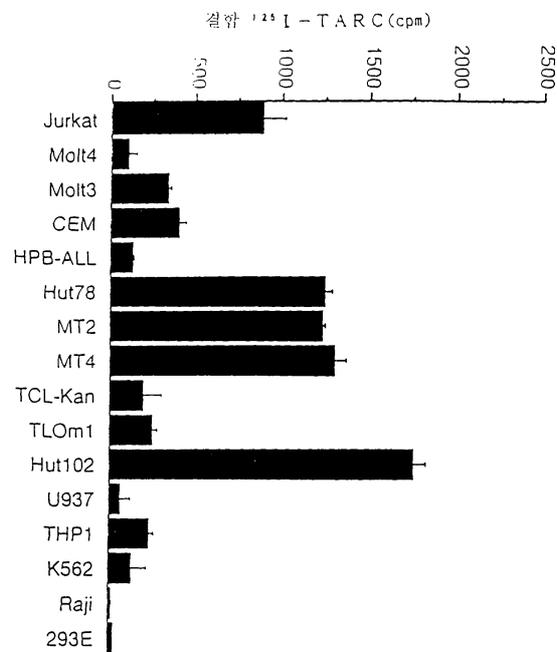
도면12A



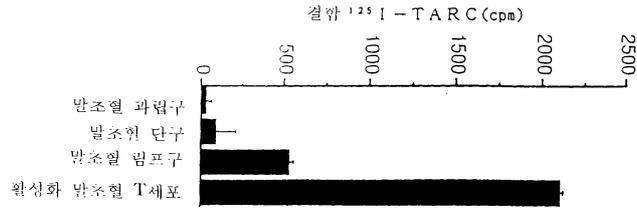
도면12B



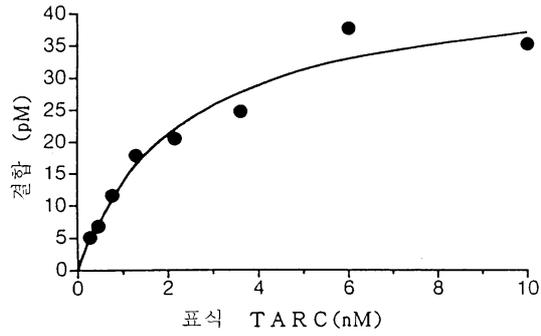
도면13A



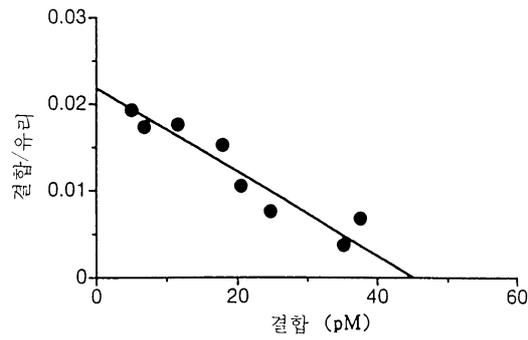
도면13B



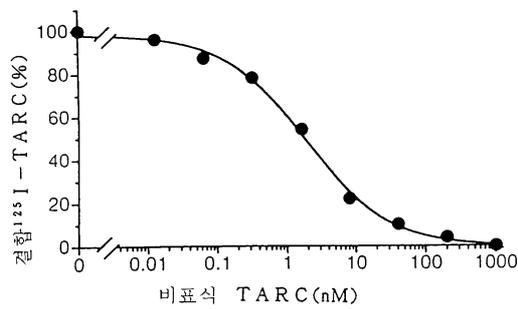
도면14A



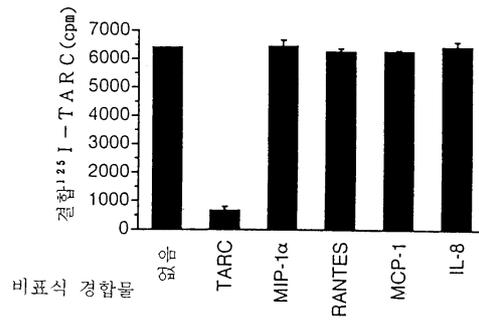
도면14B



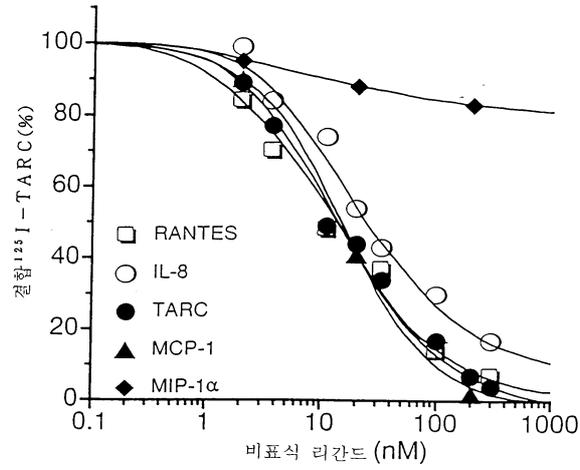
도면15A



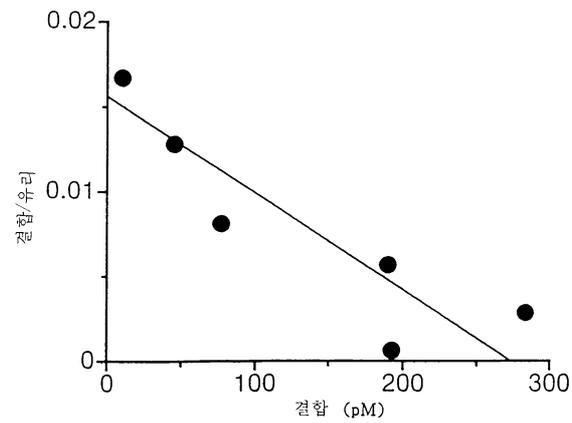
도면15B



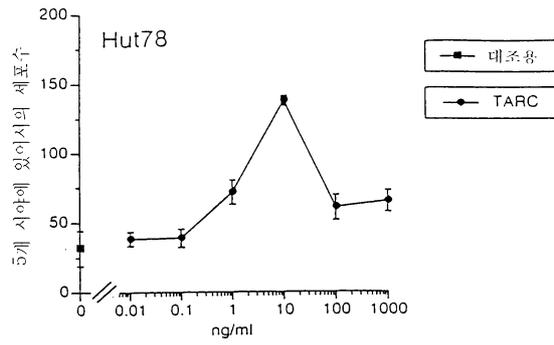
도면16



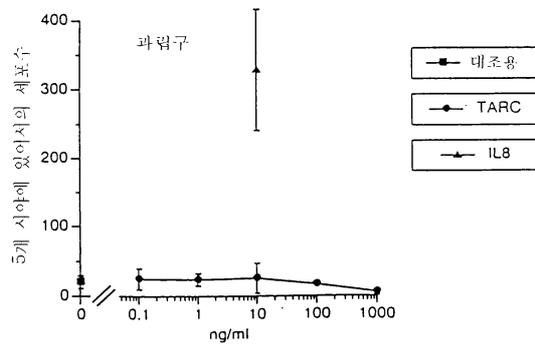
도면17



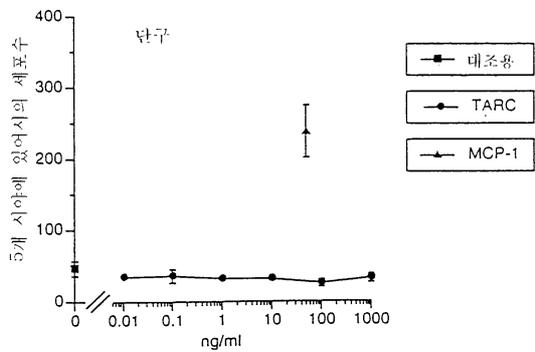
도면18



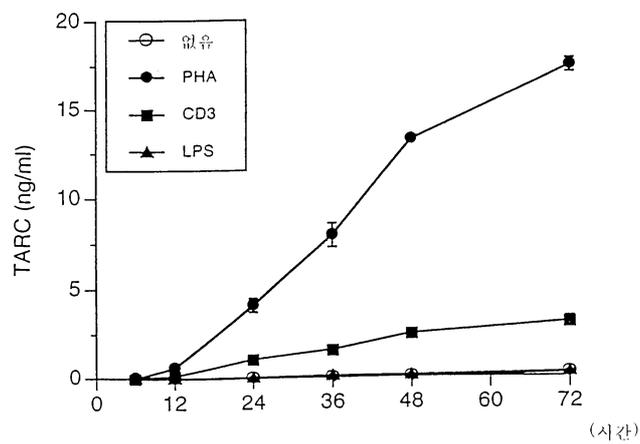
도면19



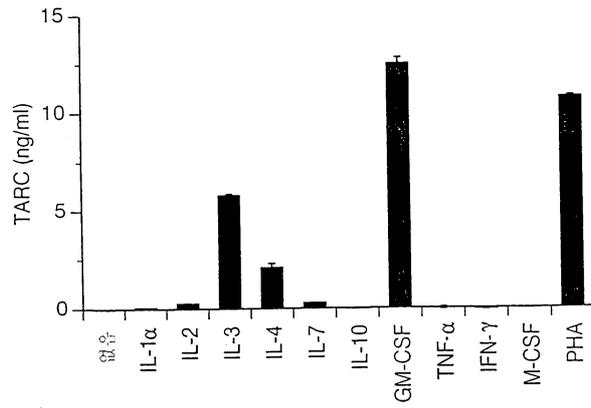
도면20



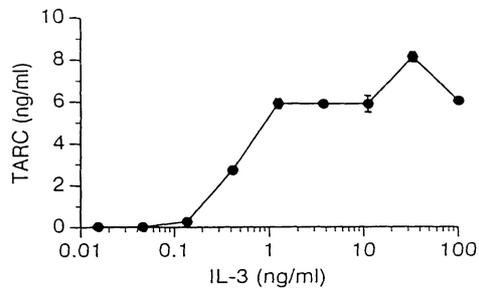
도면21



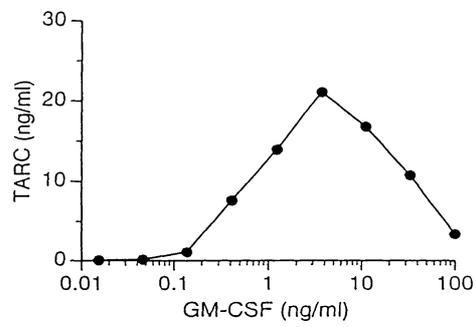
도면22



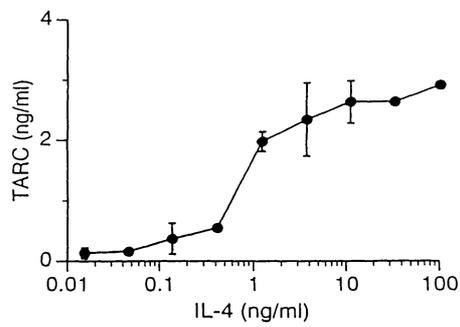
도면23A



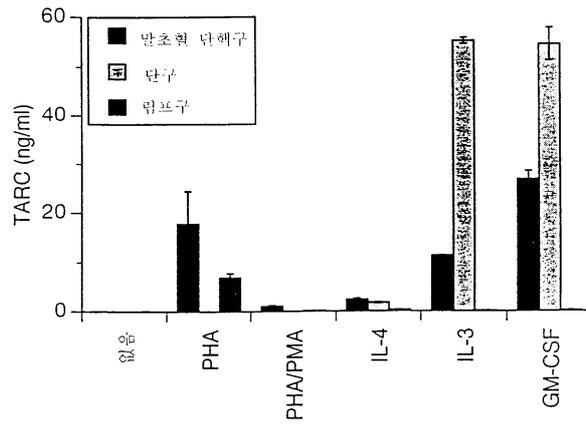
도면23B



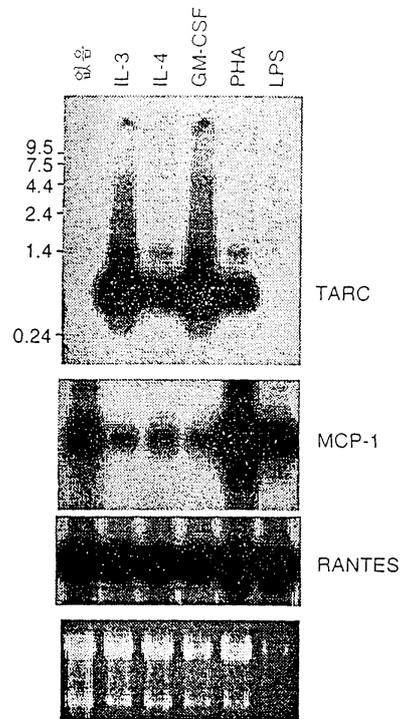
도면23C



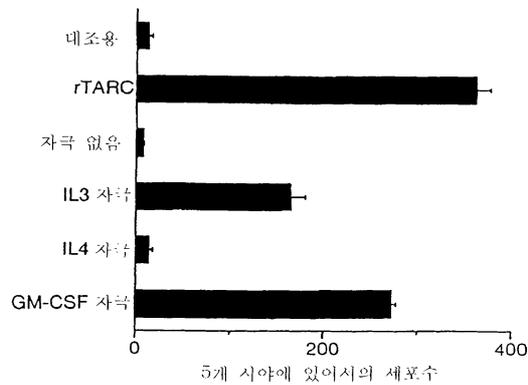
도면24



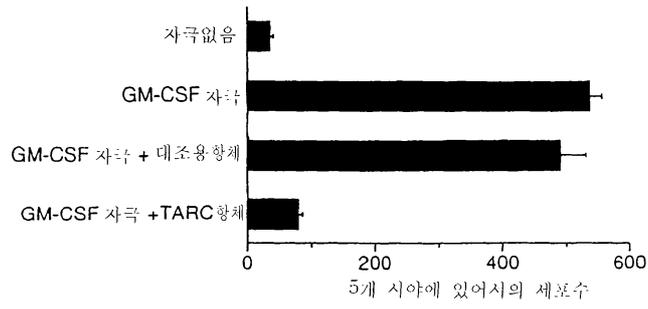
도면25



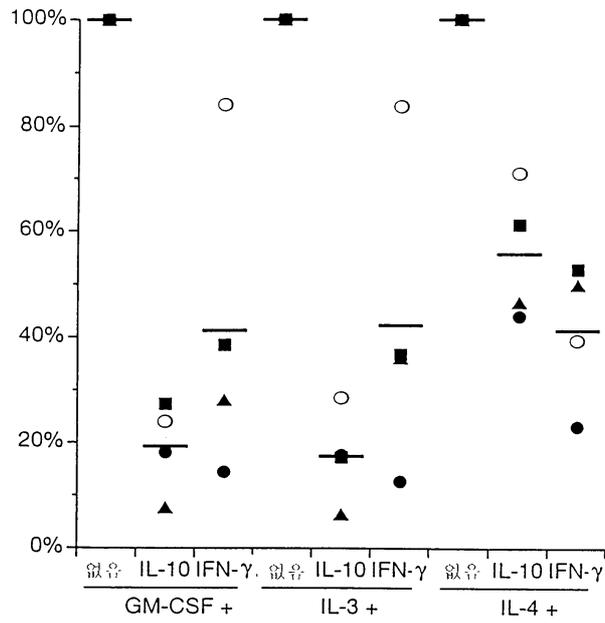
도면26A



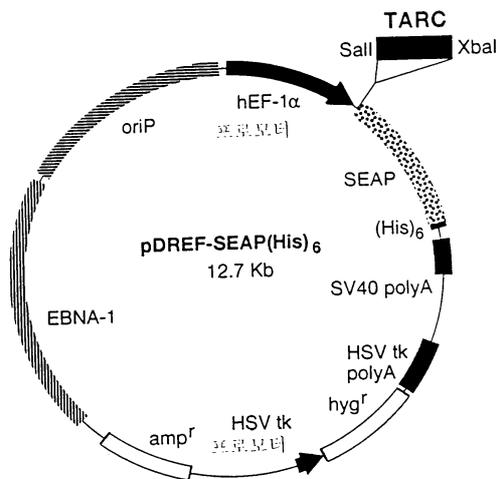
도면26B



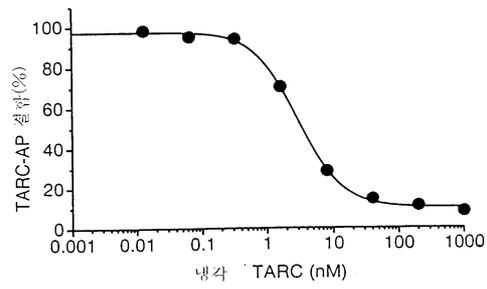
도면27



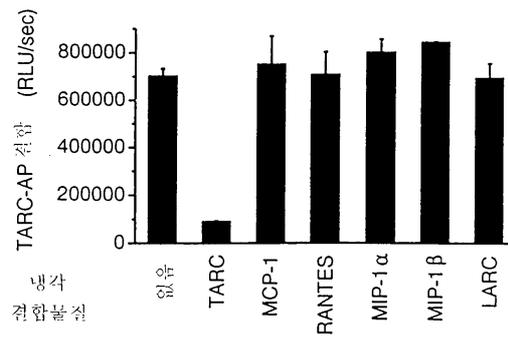
도면28



도면29



도면30



도면31

