

## IL-6RとIL-6から成る新規な融合蛋白質の調製と造血領域への応用

驛	田	梯	二
土	屋	滋	夫
飯	田		寛
三	木	大	輔
井	出	輝	彦
田	崎	誠	一
中	村		誠
保	川		清
石	黒	敬	彦

### Preparation of a Novel Fusion Protein of IL-6R and IL-6 and its Application to Hematopoietic Field

Teiji EKIDA  
 Shigeo TSUCHIYA  
 Hiroshi IIDA  
 Daisuke MIKI  
 Teruhiko IDE  
 Seiichi TAZAKI  
 Makoto NAKAMURA  
 Kiyoshi YASUKAWA  
 Takahiko ISHIGURO

Here we report preparation of a novel fusion protein of IL-6R and IL-6 (FP6) with no polypeptide linker, as a potent activator of gp 130. We established the methylotrophic yeast *pichia pastoris* secreting FP6 and obtained purified FP6 in isoelectric point as well as molecular weight from the supernatant. Purified FP6 more potently stimulated the *ex vivo* expansion of human CD34<sup>+</sup> cells than IL-11 or TPO in the presence of stem cell factor (SCF). FP6 was also effective to induction of megakaryopoiesis of human CD34<sup>+</sup> cells in the presence of SCF.

#### 1. 緒 言

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) は血液のおもとの細胞であり、主に骨髄に存在する。造血幹細胞は自己再生を行う一方、各種造血前駆細胞を経て、血液細胞 (赤血球、白血球、血小板) に分化する。

造血幹細胞や造血前駆細胞の増殖分化には周囲に存在する細胞が生産するさまざまな蛋白質性のファクター (造血因子) が深く関わっている。各種造血因子の構造や機能が解明された結果、一部の造血因子は注射薬として応用されるに至った。

一方、造血幹細胞及び造血前駆細胞自身を用いた治療法も進歩した。例えば癌に対する化学療法や術

後の放射線療法は効果的である反面、骨髄における造血機能の破壊を伴う。造血機能の再構築のためには骨髄移植が広く用いられているが、これらの移植医療は血液の適合性の低さや、ドナーである健康人に多大な負担がかかるなど問題点が多い。臍帯血は造血幹細胞や造血前駆細胞を多く含む。しかも、ドナーの負担がなく、血液の適合性が高いことから、臍帯血移植は新しい移植法として注目されている。現在世界的には1000以上の実施例がある。国内では98年に保険適用を受け、99年の東海村での臨界事故被爆者の治療も含め、160以上の実施例がある(99年11月現在)。しかし、1回の出産で得られる臍帯血の量が限られており、細胞数が十分でなく、希望者の2割(主に体重の軽い子供)しか移植が受けられない。また、移植後の造血系の回復が遅いという欠点をもつ。臍帯血中の造血幹細胞(及び造血前駆細胞)の*ex vivo*増幅(体外増幅)が可能になり、*in vitro*で細胞数を増やすことができれば、成人にも移植が可能となる。実際、現行の臍帯血バンクに使われている保存容器は、将来の*ex vivo*増幅を想定し、2区画(*ex vivo*増幅用5mlと直接移植用20ml)から成る。

各種造血因子の組み合わせが競争的に評価される中で、われわれはIL-6(インターロイキン-6)<sup>1-2)</sup>、IL-6R(インターロイキン-6受容体)<sup>3-6)</sup>、SCF(幹細胞増殖因子)の組み合わせに、顕著な*ex vivo*増幅効果を見出した<sup>7-10)</sup>。これはgp130刺激剤が造血幹細胞の*ex vivo*増幅剤として有用であることを示唆する。

更にわれわれは、IL-6とIL-6Rによるgp130の刺激が巨核球分化にも重要であることを見出した<sup>11)</sup>。これはgp130刺激剤の、現行の血小板輸血に代わる血小板増加剤(注射剤)としての可能性を示唆する。

IL-6とIL-6RはIL-6R・IL-6複合体を形成した後に、細胞表面のシグナル伝達蛋白質gp130を刺激する。IL-6とIL-6RからIL-6R・IL-6複合体の形成は平衡反応であり、低い濃度では解離に傾き、gp130に十分な刺激が伝わらない。上記欠点を改良すべく、われわれは一分子でgp130を強く刺激する分子として、IL-6RとIL-6から成る新規な融合蛋白質(FP6; Fusion protein of IL-6R and IL-6)の調製を試みた。

## 2. 材料および方法

### 【1】FP6発現株G1の樹立

#### (1) オリゴマー

p6RAB20L: 5-CTCGAGAAGAGGCTGGCCCCAAG  
GCGCTGCCC-3 ;

p6RF320S: 5-AGATCTGGATTCTGTCCAAGG

CGTGCCCATGGC-3 ;

pIL6B2: 5-AGATCTGGTACCCCCAGGAGA  
AGATTCC-3 ;

pIL6F2: 5-ATGCGGCCGCTACATTTGCCGA  
AGAG CCC-3 ;

320S333AB: 5-GATCCCCTCCAGCTGAGAACGAG  
GTGTCCACCCCCATGCAAGCGCTG  
GTAC-3 ;

320S333AF: 5-CAGCGCTTGCATGGGGGTGGACA  
CCTCGTTCTCAGCTGGAGGG-3 ;

pKN6B38D: 5-TCTCGCGATGTAGCCGCCCCAC  
AC-3 ;

p6RAB112V: 5-CTCGAGAAGAGGGTCCCCCGA  
GGAGCCCCAG-3 ;

p344F: 5-TCTCTAGAGAATATTATCATCG-3

#### (2) 発現ベクターpPIC9-112VADの構築

pBluescript KS-(東洋紡)をKpnIで切断し、クレノウフラグメントで処理した後、ライゲーション反応により、KpnIサイトが消失したプラスミドpBSを作製した。

IL-6RのcDNAをプライマーp6RAB20Lとp6RF320Sを用いてPCRにより増幅し、XhoIで切断した。これをpBS(XhoI/EcoRV)(予めpBSをXhoIとEcoRVで切断したpBS、以下同)に挿入し、pBS6Rを得た。

IL-6のcDNAをプライマーpIL6B2とpIL6F2を用いてPCRにより増幅し、BglIIとNotIで切断した。これをpBS6R(BglII/NotI)に挿入し、pBS6R6Sを得た。更に、オリゴヌクレオチド320S333ABと320S333AFをアニールさせたものをpBS6R6S(BglII/KpnI)に挿入し、pBS6R6Lを得た。

IL-6のcDNAをpBS6R6LからプライマーpKN6B38DとpIL6F2を用いてPCRにより増幅し、NruIとNotIで切断した。これをpBS6R6L(Eco47III/NotI)に挿入し、pBS6R6L-38Dを得た。

pBS6R6L-38D(XhoI/NotI)からインサートDNAを取り出し、pPIC9(インビトロジェン社)(XhoI/NotI)に挿入し、pPIC9-20LADを得た。

IL-6RのcDNAをプライマーp6RAB112Vとp344Fを用いてPCRにより増幅し、XhoIとXbaIで切断した。これをpPIC9(XhoI/AvrII)に挿入し、pPIC9-112VLを得た。

最後にpPIC9-112VL(XhoI/PmaCI)からインサートDNAを取り出し、pPIC9-20LAD(XhoI/PmaCI)に挿入することにより、pPIC9-112VADを得た。

(3) pPIC9-112VADによるピキアパストリスの形質転換

ピキア・パストリスGS115株(インビトロジェン社)からコンピテントセルを調製し、Bgl II によって線状化したpPIC9-112VADで酵母を形質転換し、得られた酵母を最小栄養培地で培養してヒスチジン要求性を失った形質転換体を選別した。得られた形質転換体をMDプレート(1.34%(w/v) YNB、0.00004%ピオチン、2%(w/v) グルコース)とMMプレート(1.34%(w/v) YNB、0.00004%ピオチン、0.5%(v/v) メタノール)にそれぞれ接種し、各形質転換体に対し、mut<sup>+</sup>であるかmut<sup>-</sup>であるかを調べた。mut<sup>-</sup>のうち1株(G1と命名)を以後の実験に用いた。

## 【2】FP6発現株G1の培養

### (1) 前培養

100mlのBMGY(1%(w/v) Bacto Yeast Extract, 2%(w/v) Bacto Peptone、1.34%(W/V) YNB、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)、1%(v/v) グリセロール、0.00004%ピオチン)培地に100 $\mu$ lの20%グリセロール凍結株G1を接種し、市販の培養装置(NBS社製、G-20型)にて28 $^{\circ}$ C、200rpmの条件で24時間培養した。

### (2) 本培養

8 $\ell$ のBMGY(1.5%(w/v) Bacto Yeast Extract、3%(w/v) Bacto Peptone、その他は上記BMGYと同一組成)培地に前記培養液100mlを接種し、16 $\ell$ のジャー(NBS社製、SF-116型)にて28 $^{\circ}$ C、350rpm、通気量1vvmの条件で溶存酸素濃度をモニタリングしつつ培養を行った。

培養開始から14時間後、溶存酸素濃度が急激に上昇したことによりグリセロールの枯渇を確認し、培地にメタノール300ml、Bacto Yeast Extract 15g、Bacto Peptone 30gの混合水溶液2 $\ell$ を添加し、FP6の発現を誘導した。メタノール添加後24時間で培養を終了し、培養液を集めた。

## 【3】FP6の精製

### (1) 吸着流動床

培養液10 $\ell$ を1mM EDTA、1mM PMSFになるように調製した後、水に対して3.5時間透析した。次に、終濃度が5mMになるように酢酸ナトリウムを添加し、更に酢酸を加えpH5.5にした。

ストリームライン-SP(カラム; STREAMLINE C-50; 5cm ID x 100cm、ゲル; ストリームライン用SP; 600ml、アマシャムファルマシアバイオテク社)を20mM酢酸塩緩衝液(pH5.5)で平衡化し、上記精製原料を線速毎時250cmで送液した。20mM酢酸塩緩衝液(pH5.5)で洗浄後、250mM NaCl、5%(v/v) グリセロール、1mMMPMSF、20mMリン酸塩緩衝液

(pH6.4)を線速毎時110cmで溶出させ、ELISAにより活性画分を集めた。

### (2) ゲルろ過

上記活性画分を限外ろ過膜ペリコンXL(日本ミリポア社製)で21mlに濃縮した後、50mM NaCl、1mMMPMSF、10mM 2-メルカプトエタノール、20mM酢酸塩緩衝液(pH6.0)で平衡化したG3000SW(東ソー、21.5mmIDx30cm)に、流速5ml/minでアプライした。ELISAでの活性測定及び280nmにおける吸収を指標として、活性画分を集めた。

### (3) 陽イオン交換HPLC

上記活性画分を、1mMMPMSF、10mM 2-メルカプトエタノール、5%(v/v)グリセロール、20mM酢酸塩緩衝液(pH5.5)で5倍に希釈し、同液で平衡化したSP5PW(東ソー、7.8mmIDx7.5cm)に流速1ml/minでアプライした。送液後、同液でカラムを洗浄し、0mM~200mM NaClの濃度勾配をかけた。ELISAでの活性測定及び280nmにおける吸収を指標として、活性画分を集めた。

### (4) 陰イオン交換HPLC

上記活性画分を0.1%Tween20、10mM 2-メルカプトエタノール、20mM Tris-HCl(pH7.6)で12倍に希釈し、同液で平衡化したDEAE5PW(東ソー、21.5mmIDx15cm)に流速4ml/minでアプライした。送液後、同液でカラムを洗浄し、0mM~100mM NaClの濃度勾配をかけた。280nmにおける吸収を指標として、活性画分を集めた。

## 【4】アッセイ

### (1) ELISA

抗ヒトgp130抗体AM64<sup>12)</sup>を固定化してブロッキングした96穴イムノプレートに、可溶性gp130発現ピキアパストリスの培養上清を添加して、gp130を結合させた。これに検体を加えて4 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。gp130に結合したFP6は、1次抗体としてウサギ抗ヒトIL-6ポリクローナル抗体、2次抗体としてアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体、基質にp-ニトロフェニルリン酸を用いて発色させ、参照波長を492nmとしたときの405nmの吸光度で測定した。

### (2) BAF130の増殖

BAF130細胞の懸濁液を、96穴プレートに5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ml、5 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/ウエルとなるように添加し、FP6を0~500ng/mlの濃度範囲で添加した。20時間後、Cell Counting Kit(和光純薬工業)で1時間発色させ、参照波長を600nmとしたときの405nmの吸光度を得た。FP6非添加時の吸光度とFP6を過剰量加えたとき

の吸光度の半値を示すFP6の濃度を 1 unit/mlと定義した。

### (3) コロニー形成細胞の増幅

ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞 (BioWhittaker社) 2500個と各種造血因子を含む無血清培地Stem Span SFEM (Stem Cell社) 1 mlを24穴ウエルに分注し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%の条件で浮遊培養した。

0、3、5、7、10日後、細胞500個と40%メチルセルロース、30%ウシ胎児血清アルブミン、1% BSA、0.01mM 2-メルカプトエタノール、SCF (100ng/ml)、TPO (4 ng/ml)、EPO (2 U/ml)、IL-3 (20ng/ml)、IL-6 (100ng/ml)、G-CSF (10ng/ml)を含む -MEM 1 mlを35mm浮遊培養用プラスチック培養皿に分注し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%の条件で半固定培養を行った。2週間後、倒立顕微鏡下の観察でコロニーの同定を行った。

### (4) 巨核球の誘導

Mega Cult-C complete kit without cytokines (Stem Cell社)を用い、専用チャンバーあたりCD34陽性細胞5000個と各種造血因子を加えて培養した。12日後、抗ヒトGP II b III a抗体を用いたAPAAP染色法により、巨核球3個以上の集まりをコロニーとして巨核球コ

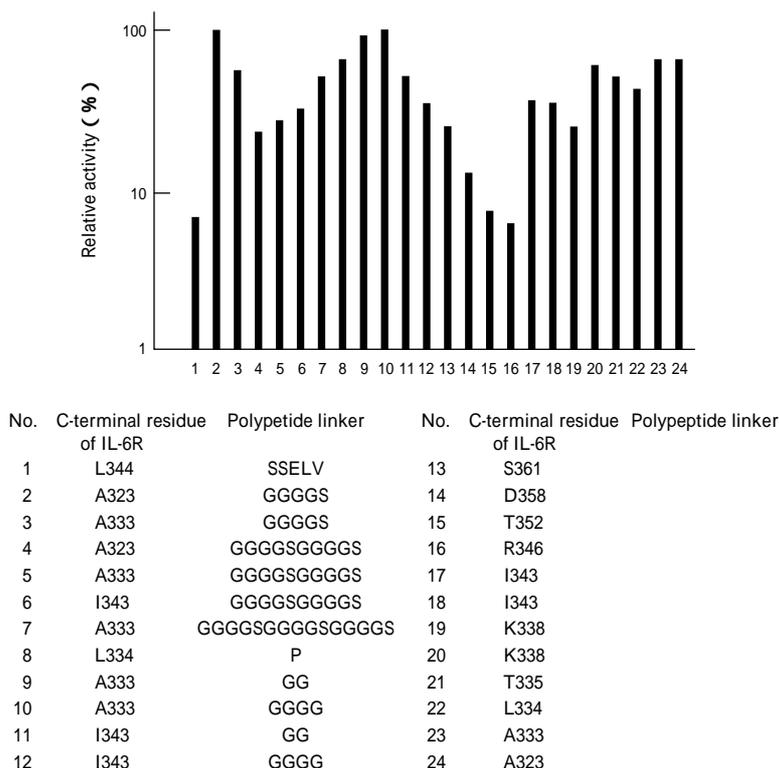
ロニーの同定を行った。

## 3. 結果および考察

### 〔1〕各種リンカー配列を有するIL-6R・IL-6融合蛋白質の活性比較

通常、一本のポリペプチド鎖から成る融合蛋白質においては、2つの蛋白質がそれぞれ本来の構造をとりうるように、間に自由度の高いアミノ酸から成るポリペプチドリッカーが挿入される。実際、他のグループから報告されているIL-6R・IL-6融合蛋白質はリンカー配列 (ArgGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerValGlu) を含む<sup>13)</sup>。しかし、リンカー配列は生体にとって異物であるから、リンカー配列をもたない構造である方が、体内投与時に抗原性の低下を期待できるので望ましい。

われわれはリンカー配列をもたないIL-6R・IL-6融合蛋白質でも、立体障害を起さず十分な活性を有するようなIL-6RとIL-6の結合箇所がありうるとの仮説をたてた。これを実証するために、Fig. 1に示すようにリンカー配列を有する12種類のIL-6R・IL-6融合蛋白質 (FP6) とリンカー配列をもたない12種類のFP6をデザインした。それぞれをピキアバストリス



The N-terminal residue of IL-6 is P29 for No.18 and 20, V30 for No. 22, and A28 for the others.

Fig. 1 Cell growth assay of the supernatant of *Pichia pastoris* transformed with each IL-6R/IL-6 fusion protein. N-terminal of IL-6 is Pro(29) for No. 18 and 20, Val(30) for No. 22, and Ala(28) for the others. Data represent the average of 5-14 independent *Pichia pastoris* transfectants.

で発現させ、上清中のFP6の生物活性をBAF130株により調べた。

Fig. 1 から明らかなように、IL-6 RのC末端が338番目のリジン残基 (No.20) 335番目のトレオニン残基 (No.21) 334番目のロイシン残基 (No.22)、333番目のアラニン残基 (No.23)、323番目のアラニン残基 (No.24) の5種類のFP6は、リンカー配列を有するものにほぼ匹敵する活性を示した。この結果はFP6が活性を示すのにリンカー配列は不要であることを示す。Fig. 2 にリンカーをもたないFP6 (a) とリンカーを有するFP6 (b) の、予想される構造を示す。

われわれはIL-6 RのC末端として333番目のアラニン残基を選んだ。更にIL-6 のN末端の最適化を行っ

た結果 (データは示さず)、38番目のAsp残基を選んだ。すなわち、N末端側の222アミノ酸残基はIL-6 R領域 (IL-6 RのN末端112番目バリン残基から333番目のアラニン残基まで) でC末端側の175残基はIL-6 領域 (N末端38番目Aspから212番目のMetまで) であり、2つ領域の間にリンカー配列をもたず、397アミノ酸残基の一本のポリペプチドであるFP6を以下の実験に用いた。

〔2〕FP6の調製

(1) 分子量及び等電点的に均一なFP6の精製

FP6発現ピキアパストリス株G1を16リットルジャーで培養して得られた培養上清から、4段階のHPLCにより、精製を試みた。HPLCの最終段階であるDEAE 5 PWの溶出パターンをFig. 3 に示す。

FP6 (pI6.4a) とFP6 (PI6.4b) はDEAE 5 PWでは溶出位置が異なり、等電点の違いが示された。しかし、後にFig. 4 に示すように、等電点電気泳動から得られた等電点はいずれも6.4であった。

16リットルジャー 1 バッチから得られる各ステージでの収率をTable 1 にまとめた。

(2) 等電点の異なる成分間の比較

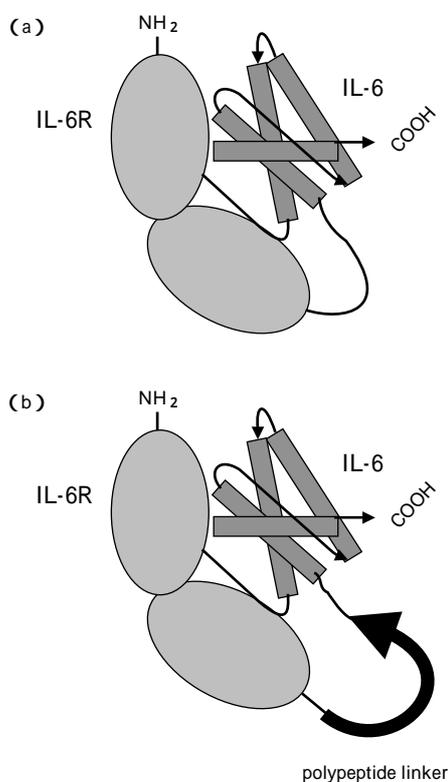


Fig. 2 Schematic illustration of FP6 without (a) or with (b) polypeptide linker between IL-6R and IL-6.

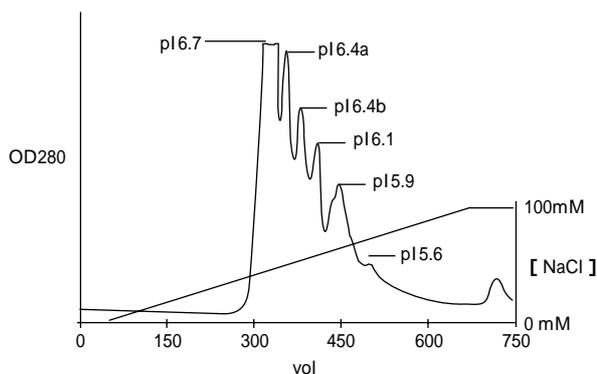


Fig. 3 Elution pattern of FP6 on DEAE5PW. A profile of absorbance at 280 nm of the DEAE5PW column chromatography is shown. The isoelectric point of each peak obtained by the isoelectric focusing is indicated.

Table 1 Purification of FP 6

Purification step	Volume(ml)	FP6(mg)	Recovery(%)
Harvest Culture	9,900	232	100
Streamline-SP	342	102	44
G3000SW	31	28	12
SP-5PW	14	24	10
DEAE-5PW	35	16*	6.7*

\*Data represent FP6(pI6.7)alone, but not FP6(pI6.4a), FP6(pI6.4b), FP6(pI6.1), FP6(pI5.9) or FP6(pI5.6).

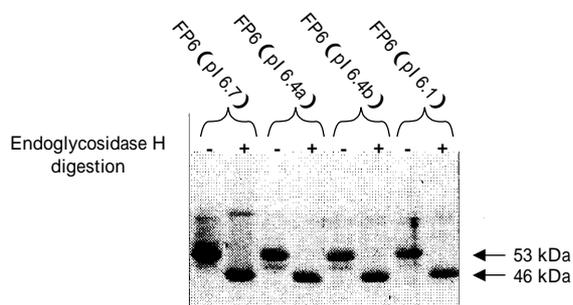


Fig. 4 SDS/PAGE of FP6. Each of FP6(pI6.7), FP6(pI6.4a), FP6(pI6.4b), and FP6(pI6.1) with or without endoglycosidase H digestion was analyzed by electrophoresis on a 0.1% SDS/12% polyacrylamide gel under a reducing condition.

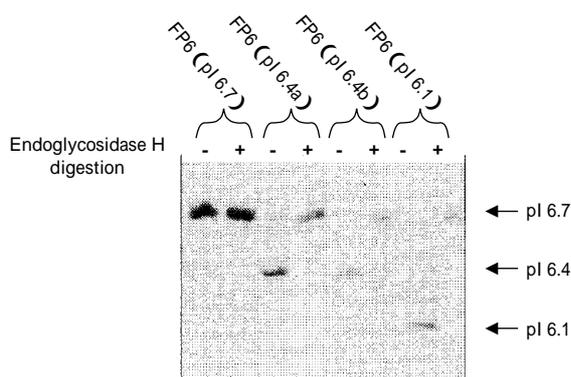


Fig. 5 Isoelectric focusing of FP6. Each of FP6(pI6.7), FP6(pI6.4a), FP6(pI6.4b), and FP6(pI6.1) with or without endoglycosidase H digestion was analyzed by a pre-cast polyacrylamide gel for analytical isoelectric focusing.

単離された主要4成分 (FP6 (pI6.7), FP6 (pI6.4a), FP6 (pI6.4b), FP6 (pI6.1)) のSDS/PAGEのパターンをFig. 4に、等電点電気泳動のパターンをFig. 5にそれぞれ示す。

Fig. 4から明らかなように、どの成分も分子量は53kDaであったが、エンドグリコシダーゼHを用いたN型結合糖鎖の切断により、46kDaに移行した。また、Fig. 5から明らかなように、成分間で異なっていた等電点は、N型結合糖鎖の切断により、すべて6.7になった。このことは、成分間で等電点が異なる原因は、N結合型糖鎖の電荷の違いによるものであり、FP6 (pI6.7) の糖鎖は電荷をもたないことを示す。実際、ピキアパストリスが生産する組換え蛋白質では、ハイマンノース型糖鎖にリン酸基がホスホジエステル結合している成分の存在が報告されている<sup>14)</sup>。

次に、上記4成分の比活性をBAF130細胞により求めた。その結果、成分間で比活性の差はなかった。更に、どの成分についても、糖鎖切断除去による比

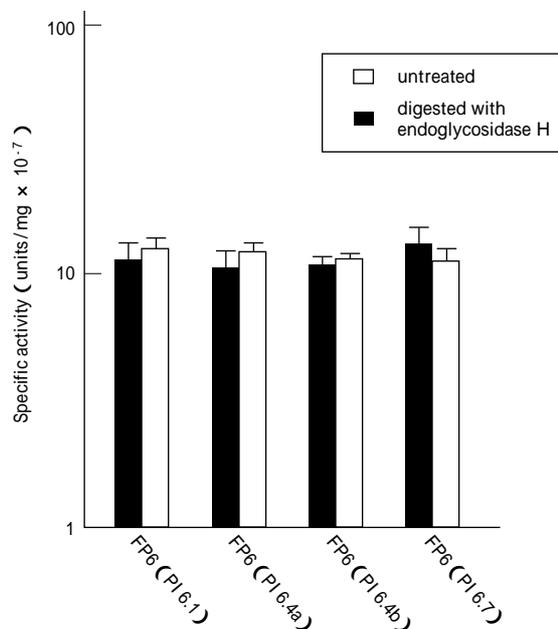


Fig. 6 Specific activity of FP6 by BAF130 cells assay. The specific activity of each of FP6(pI6.7), FP6(pI6.4a), FP6(pI6.4b), and FP6(pI6.1) with or without endoglycosidase H digestion was obtained by the method described in the materials and methods.

活性の差は認められなかった (Fig. 6)。

このことは、糖鎖の有無や糖鎖の電荷の違いは、活性に影響しないことを示す。

### 【3】FP6の薬効

以下の検討は、糖鎖を有するFP6 (pI6.7) を用いて行った。

#### (1) ex vivo増幅効果

FP6及び他のサイトカインによる、市販のヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を無血清で浮遊培養させたときの造血前駆細胞の増幅効果を調べた。培養前の造血前駆細胞の数と培養後の造血前駆細胞の数をそれぞれコロニーアッセイで求め、造血前駆細胞の増幅率を求めた。

Fig. 7から明らかなように、FP6あるいはSCFは単独では効果を示さない。しかし、FP6+SCFでは顕著な効果が認められた。その効果はFP6の代わりにIL-11あるいはTPOを用いたときを上回った。このことは造血幹細胞や造血前駆細胞の大部分が、gp130陽性であるが、IL-11R陰性であることを示唆する。また、gp130の刺激はTPOからの刺激よりもex vivo増幅に有効であることを示す。

最近、各種サイトカインの組み合わせでヒトCD34陽性細胞を培養して、NOD/SCIDマウス (免疫不全マウス) に移植した場合に、一生涯にわたって血球細胞を供給し続けるか、すなわち、移植したCD34陽性

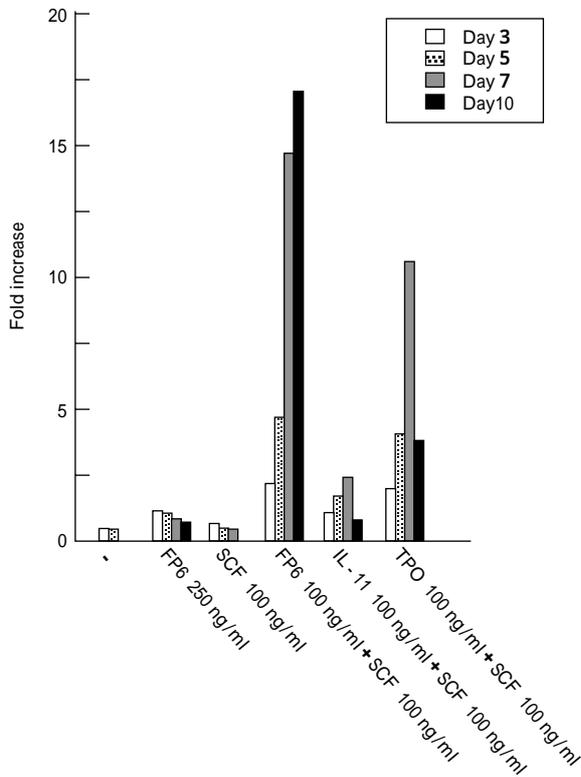


Fig. 7 Generation of total progenitor cells in non-serum containing suspension culture of CD34<sup>+</sup> cells supplemented with single factors or combinations. Data represent mean of triplicate cultures.

細胞中に造血幹細胞が存在するかどうかを調べる方法が報告されている<sup>15, 16)</sup>。ここでも、gp130を刺激するサイトカインを含む組み合わせの有効性が示されている。これらの結果と合わせると、FP6+SCFはex vivo増幅に最適の組み合わせであると思われる。

(2) 巨核球誘導効果

血小板は巨核球が分裂して生じる。FP6の巨核球誘導効果を、既に血小板増加剤として米国で認可されているIL-11及び現在血小板増加剤として開発中のTPOと比較した。

Fig. 8 から明らかなように、FP 6 はIL-11より強い効果を、またTPOとほぼ同等の効果を示した。このことはCD34陽性細胞中に含まれる造血前駆細胞の一種である巨核球前駆細胞はgp130陽性であるが、IL-11R陰性であることを示唆する。また、gp130の刺激はTPOからの刺激と同様に、巨核球への分化に重要であることを示す。

未分化な細胞が未分化な状態を保ったまま増幅するのにgp130の刺激が有効であることは、造血系細胞だけでなく、神経細胞<sup>17, 18)</sup>や胚性幹細胞<sup>19)</sup>でも報告されている。

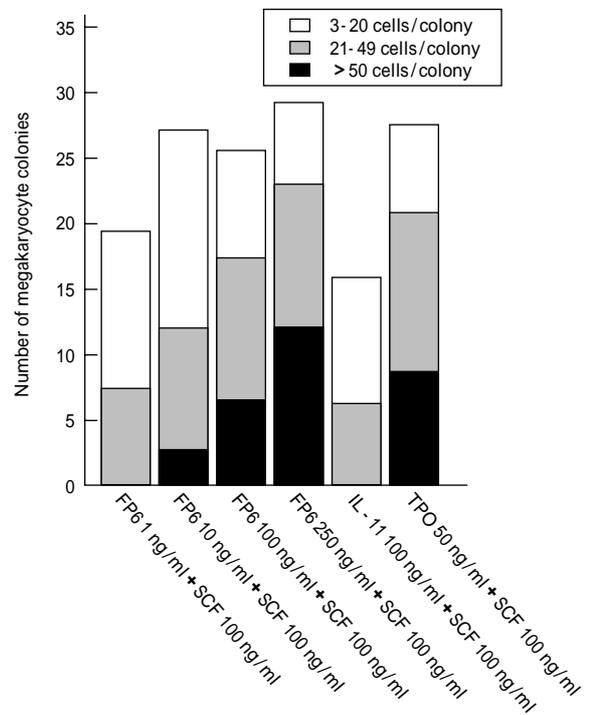


Fig. 8 Megakaryocyte colony formation in non-serum containing suspension culture of CD34<sup>+</sup> cells supplemented with single factors or combinations. Data represent mean of four cultures.

4. 結 論

本研究により、ポリペプチドリンカーをもたない直結型の組換えIL-6R・IL-6融合蛋白質(FP6)がgp130の強い刺激剤として調製された。FP6はピキアパストリス種の酵母で発現され、分子量的にも等電点的にも均一な状態にまで精製された。精製FP6は幹細胞増殖因子(SCF)存在下で、浮遊培養中のヒト造血前駆細胞を顕著に増殖した。将来的には、FP6はSCFとの併用で、造血幹細胞のex vivo増幅剤として臨床応用されることが期待できる。また、FP6は巨核球前駆細胞から巨核球への分化を誘導する効果を有することも示された。

文 献

- 1) 保川 清, 浅越義弘, 斉藤貴司, 丸尾直子, 三宅俊男; 東ソー研究報告, 32, 161 (1988)
- 2) Yasukawa, K. and Saito, T. *Biotech. Lett.*, 12, 419 (1990)
- 3) 保川 清; 免疫薬理, 10, 398 (1992)
- 4) Vollmer, P., Peters, M., Ehlers, M., Yamage, H., Matsuba, T., Kondo, M., Yasukawa, K.,

- Buschenfelde, K., and Rose-John, S.; *J. Immunol. Meth.*, 199, 47 (1996)
- 5) 保川 清, 齊藤貴司, 二木研輔, 鈴木 浩; 東ソ-研究報告, 35, 77 (1991)
- 6) Yasukawa, K., Saito, T., Fukunaga, T., Sekimori, Y., Koishihara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y., Matsuda, T., Yawata, H., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T.; *J. Biochem.* 108, 673 (1990)
- 7) 保川 清, 家亀晴彦, 井出輝彦, 田崎誠一, 中村 誠, 村山敬一, 勝浦公男; 東ソ-研究報告, 41, 23 (1997)
- 8) Sui X., Tsuji K., Tanaka, R., Tajima, S., Muraoka, K., Yashida, M., Ebihara, Y., Ikebuchi, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., and Nakahata, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2859 (1995)
- 9) Kimura, T., Sakabe, H., Tanimukai, S., Abe, T., Urata, Y., Yasukawa, K., Okano, A., Taga, T., Sugiyama, H., Kishimoto, T., and Sonod, Y. *Blood*, 90, 4767 (1997)
- 10) Tajima, S., Tsuji, K., Ebihara, Y., Sui, X., Tanaka, R., Muraoka, K., Yoshida, M., Yamada, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T. and Nakahata, T.; *J. Exp. Med.*, 184, 1357 (1996)
- 11) Sui X., Tsuji K., Ebihara Y., Tanaka R., Muraoka, K., Yoshida, M., Yamada, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Nakahata, T.; *Blood*, 93, 2525 (1999)
- 12) Saito, T., Taga, T., Miki D., Futatsugi, K., Yawata, H., Kishimoto, T., and Yasukawa, K.; *J. Immunol. Meth.*, 163, 217 (1993)
- 13) Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brankenhoff, J. P. G., Kallen, K-J., Wollmer, A., Grotzinger, J. and Rose-John, S.; *Nature Biotech.*, 15, 142 (1997)
- 14) Montesino, R., Nimtz, M., Quintero, O., Garcia, R., Falcon, V., and Cremata, J. A.; *Glycobiology*, 9, 1037 (1999)
- 15) Kollet, O., Aviram, R., Chebath, J., Nagler, H., Shultz, L., Revel, M., and Lapidot, T.; *Blood*, 94, 923 (1999)
- 16) Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., Ito, M., Yasukawa, K., and Nakahata T.; *J. Clin. Invest.*, 105, 1013 (2000)
- 17) Ikeda, K., Kinoshita, M., Tagaya, N., Shinojima, T., Taga, T., Yasukawa, K., Suzuki, H., and Okano, A. *Brain Res.* 726, 91, (1996)
- 18) 滝沢琢己、柳澤 亮、保川 清、石黒敬彦、中島欽一、田賀哲也; 日本分子生物学会 (1999)
- 19) Yashida, K., Chamber, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, A., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T. and Kishimoto, T.; *Mech. Dev.*, 45, 163 (1994)

著者  
氏名 驛田 悌二  
Teiji EKIDA  
入社 昭和59年4月2日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員

著者  
氏名 土屋 滋夫  
Shigeo TSUCHIYA  
入社 平成8年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
副主任研究員

著者  
氏名 飯田 寛  
Hiroshi IIDA  
入社 昭和63年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員

著者  
氏名 三木 大輔  
Daisuke MIKI  
入社 昭和62年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員

著者  
氏名 井出 輝彦  
Teruhiko IDE  
入社 平成元年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員

著者  
氏名 田崎 誠一  
Seiichi TAZAKI  
入社 昭和60年3月16日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野

著者  
氏名 中村 誠  
Makoto NAKAMURA  
入社 平成2年3月16日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野

著者  
氏名 保川 清  
Kiyoshi YASUKAWA  
入社 昭和59年4月2日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員

著者  
氏名 石黒 敬彦  
Takahiko ISHIGURO  
入社 昭和58年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主席研究員