免疫系蛋白質の構造と機能に関する研究†

(1992 年度農芸化学奨励賞受賞)

中 村 聡

(東京工業大学生命理工学部)

近年、免疫現象や免疫の機能を分子レベル・遺伝子レベルで明らかにしようとする、分子免疫学が急速に発展してきている。しかしながら、免疫系を構成する蛋白質(免疫系蛋白質)の構造を詳細に解析しようとする研究は少なく、その機能部位や作用機作等についても不明な点が多く残されている。これら免疫系蛋白質の構造と機能の相関について明らかにすることは、生体機能の解明という学問的興味のみならず、免疫系蛋白質の医薬品への応用という観点からも有意義と考えられる。

本稿では、免疫グロブリンGサブクラス1(IgG₁)Fc領域および腫瘍壊死因子(TNFα)の構造と機能の相関について、筆者らの研究成果を中心に概説する。

1. ヒト IgG₁-Fc 領域蛋白質

抗原と結合後の免疫グロブリンG(IgG)は、そのFc領域を介して種々のエフェクター分子と相互作用し、異物である抗原の排除を行う。しかしながら、補体系蛋白質やFcレセプターといったエフェクター分子が、Fc領域のどの部分に結合するかは明らかにされていない。また、IgGのFc領域には糖鎖が結合しているが、この糖鎖の存在意義や生理的役割についても定まった結論が得られていないのが現状である^(1,2)。そこで最初に、均質なFc蛋白質を大量に得る目的で、ヒトIgG₁-Fc蛋白質の大腸菌における菌体内および菌体外分泌生産を行った。

(1) IgG₁-Fc蛋白質の大腸菌による菌体内および菌体外分泌生産

ヒトIgG₁産生細胞ARH77株よりクローン化した

IgG₁-H鎖染色体遺伝子(図1)⁽³⁾の解析を行い、Fc領域エキソン部分の塩基配列を決定するとともに、その遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸一次構造を明らかにした⁽⁴⁾。また、合成オリゴヌクレオチドを用いてイントロンを除去したヒトIgG₁-Fc遺伝子は大腸菌菌体内発現ベクターに連結し、Fc蛋白質の大腸菌における菌体内生産を行った。ベクターの改良等により生産量の向上が認められ、発現型プラスミドpFC362Aを有する大腸菌においては、1ml培養当たり0.92μgのFc蛋白質が産生された⁽⁵⁾。しかしながら、菌体内で産生されたFc蛋白質の一部は大腸菌菌体内プロテアーゼによる分解を受けていた。このFc蛋白質は菌体内に単量体の形で産生されており、ジスルフィド結合で結ばれた二量体構造を有する天然型Fc蛋白質とは、互いに異なる高次構造をとっていることが明らかになった。

そこで、大腸菌用分泌発現ベクターpEAP8⁽⁶⁾を用いてFc遺伝子分泌発現型プラスミドpEXFC10(図1)を構築し、Fc蛋白質の大腸菌における菌体外分泌生産を試みた^(7,8)。その結果、産生されたFc蛋白質の約40%が菌体外にまで分泌されることがわかった。また、菌体外分泌により菌体内プロテアーゼの影響を回避できること、大腸菌分泌Fc蛋白質は天然型Fc蛋白質と同様な二量体構造をとっていること、分泌に際してシグナル・ペプチドは正しく切断されていること等が明らかとなった。次に、この大腸菌分泌Fc蛋白質の構造と機能の解析を行った。

(2) 糖鎖を含まない大腸菌分泌Fc蛋白質の構造と機能

大腸菌が菌体外に分泌したFc蛋白質について、円偏光二色性(CD)や¹H-NMRによる構造解析を行い、天然型Fc蛋白質と比較した⁽⁹⁻¹¹⁾。両Fc蛋白質は類似のCDスペクトルを与え、大腸菌分泌Fc蛋白質は糖鎖を含まないにもかかわらず、糖鎖を有する天然型Fc蛋白質

† Structures and Functions of Proteins Relevant to Immune System.

Satoshi NAKAMURA (Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Midori-ku, Yokohama 227)

図 1 ヒト IgG₁-H 鎖染色体遺伝子と各種 IgG₁-Fc 遺伝子発現型プラスミド。P, プロモーター; L, リーダー領域; E, エンハンサー; T, ターミネーター; Ex, Ex プロモーター; kil, *kil* 遺伝子; S, シグナル領域。V·D·J, C_H1, h, C_H2 および C_H3 は, それぞれ IgG₁ を構成する各ドメインのエキソンを示す。Fc 領域は h-C_H2-C_H3 からなる。

図 2 天然型 Fc 蛋白質および大腸菌分泌 Fc 蛋白質の ¹H-NMR ピークの pH 滴定曲線と pK_a 値。天然型 Fc 蛋白質のデータ (Nat, 曲線 a~m) の上, 大腸菌分泌 Fc 蛋白質のデータ (Rec, 各種プロット) を重ね合わせて示した。

図3 ヒト IgG₁-Fc 領域の立体構造. 文献⁽¹⁴⁾を改変. 数字はアミノ酸残基番号を示す. ヒンジ (h) 部分については明確な回折像が得られていない.

質と同様な二次構造を有していることが明らかとなった. さらに, 両 Fc 蛋白質の ¹H-NMR スペクトルを種類の pH 条件下で測定し, 現在までに同定されているいくつかのピーク^(9,12)について, その化学シフトの pH 滴定を行った (図2). 大部分のアミノ酸残基の pH 滴定曲線と pK_a 値は両 Fc 蛋白質間で一致しており, 大腸菌分泌 Fc 蛋白質は天然型 Fc 蛋白質と巨視的には類似の高次構造をとっていることがわかった. しかしながら, His²⁶⁸ および Tyr²⁹⁶ の滴定曲線は互いに異っており, これらの残基の化学的環境には差があることが明らかになった. ヒト IgG₁ の Fc 領域については, すでに X 線結晶構造解析がなされている (図3)^(13,14). 図3よりわかるように, His²⁶⁸ および Tyr²⁹⁶ は, 立体構造上, 糖鎖結合部位である Asn²⁹⁷ の近傍に位置している. したがって, ¹H-NMR で観察された両 Fc 蛋白質間の違いは, 糖鎖の有無による両 Fc 蛋白質の (糖鎖結合部位近傍に存在する局所的な) 高次構造の違いを反映しているものと考えられた.

引き続き, 大腸菌分泌 Fc 蛋白質の機能 (生物活性) について検討した (表1). プロテイン A 蛋白質は黄色ブドウ状球菌の細胞壁構成成分の1つであり, 種々の動物由来の IgG-Fc 領域と結合することが知られてい

表1 天然型 Fc 蛋白質および大腸菌分泌 Fc 蛋白質の機能比較

機 能	天 然 型 Fc	大腸菌分泌 Fc
プロテイン A 結合能 (%)	100	100
Clq 結合能 (%)	100	86
親和性 (M)	2.6×10^{-8}	4.6×10^{-8}
補体系活性化能 (%)	100	75
FcRI 結合能 (%)	100	<0.2

る⁽²⁾. 大腸菌分泌 Fc 蛋白質のプロテイン A 蛋白質との親和性は, 天然型 Fc 蛋白質とおおむね同一であった. したがって, 糖鎖の有無はプロテイン A 蛋白質との相互作用には無関係であることがわかる. ヒト補体成分 Clq 蛋白質の大腸菌分泌 Fc 蛋白質への結合能は, 天然型 Fc 蛋白質への結合能の 86% を保持していた. しかしながら, Clq 蛋白質の両 Fc 蛋白質への親和性を K_d 値で比較した場合には, 大腸菌分泌 Fc 蛋白質の親和性は天然型 Fc 蛋白質の約 1/2 に低下していた. また, ヒト補体系活性化能についても, 両 Fc 蛋白質間で若干の差が認められた. さらに, ヒト・マクロファージ表面上に存在する Fc レセプター・タイプ I (FcRI) への結合能を調べたところ, 大腸菌分泌 Fc 蛋白質では FcRI への結合能が消失していることがわかった⁽¹⁵⁾. ここで観察された両 Fc 蛋白質間の生物活性の違いは, 糖鎖の有無に起因する高次構造の微妙な違いと相関しているものと推察された.

従来より, IgG の Fc 領域の生物活性には糖鎖が必須であるとされていたが⁽¹⁾, この糖鎖は生物活性 (少なくとも, 補体系蛋白質との相互作用や補体系の活性化能) の発現に直接は関与しておらず, むしろその高次構造を適切に保持するために機能していることが明らかとなった. また, 糖鎖の有無による高次構造の違いは, 補体系蛋白質との相互作用よりは, FcRI 結合能に大きく影響をおよぼすことがわかった.

大腸菌分泌 Fc 蛋白質を医薬品へ応用しようとした場合, たとえば免疫賦活化剤としての利用が考えられ, 現在その有効性について検討中である. 筆者らは最近, ヒト IgG₁ とヒト IgE とのキメラ Fc 遺伝子の大腸菌における菌体外分泌発現にも成功している⁽¹⁶⁾. この IgG₁/IgE キメラ Fc 蛋白質はアレルギー治療薬への応用が期待できる. また, IgG₁-Fc 遺伝子分泌発現型プラスミドを用いて蛋白質工学研究を行うことにより, IgG₁ における補体系蛋白質結合部位に関する基礎的知見を得るこ

ともできよう。筆者らは主にヒト IgG₁ の Fc 領域に着目した研究を行ってきたが、免疫グロブリン（抗体）の抗原結合部位に関する研究も数多くなされている⁽¹⁷⁾。また最近になって、触媒活性を有するような抗体分子（抗体触媒）が発見され、注目を集めている⁽¹⁸⁾。そして、抗体の蛋白質工学研究や抗体触媒に関する研究等を取りまとめて、「抗体工学」と呼ばれる学問分野ができあがりつつある。この抗体工学研究は今後もますます盛んになっていくことが予想され、その成果が実用化される日も近いものと思われる。

2. ヒト TNF α 蛋白質

TNF α は主としてマクロファージが産生する抗腫瘍性サイトカインの1つである。TNF α は腫瘍細胞を傷害するばかりでなく、免疫系の細胞等に作用して種々の生物活性を発現する⁽¹⁹⁾。しかしながら、TNF α の多彩な作用が TNF α 蛋白質分子のどの部分に担われているのかは不明である。また、TNF α がその生物活性を発現するためには、標的細胞の表面上に存在する TNF レセプターへの結合が必須であるが、TNF レセプターへの結合部位も明らかにされていない⁽²⁰⁾。そこで、TNF α の機能部位解明と TNF α 分子の改良を目的として、ヒト TNF α の蛋白質工学研究を行った。

(1) TNF α 遺伝子の化学合成と大腸菌における菌体内および菌体外分泌発現

まず最初に、すでに報告されているヒト TNF α の遺伝子配列^(21,22)を基盤として、新たにヒト TNF α をコードする DNA 配列のデザインを行った。この約 500 塩基対の DNA 断片を化学合成し、菌体内発現ベクターにクローン化した後、TNF α 遺伝子の大腸菌における菌体内発現を行った⁽²³⁾。菌体内発現型プラスミド pTNF 401 A (図 4) を有する大腸菌においては、全可溶性蛋白質の 20% 以上にもおよぶ野生型 TNF α 蛋白質の産生が認められた。

次に、上記の化学合成 TNF α 遺伝子を分泌発現ベクター pEAP 8 に挿入した形の分泌発現型プラスミド (pEXTNF シリーズ, 図 4) を用いて、各種アミノ末端欠失 TNF α の大腸菌における菌体外分泌生産を行った⁽²³⁾。とくにアミノ末端 2 残基欠失 (N Δ 2)TNF α の分泌生産効率が高く、抗ヒト TNF α モノクローナル抗体⁽²⁴⁾を用いた ELISA 法によれば、1 ml 培養当り 8.6 μ g の N Δ 2-TNF α が菌体外に分泌されていた。大腸菌が菌体外に分泌した N Δ 2-TNF α は、大腸菌が菌体内に産生した野生型 TNF α や N Δ 2-TNF α に比して、高い抗腫瘍活性⁽²⁵⁾ (*in vitro* および *in vivo*) を有していた。また、ゲル濾過において、大腸菌分泌 N Δ 2-TNF α は菌体内産生 N Δ 2-TNF α とは異なる位置に溶出された⁽²⁶⁾。

図 4 ヒト TNF α 遺伝子の菌体内発現および菌体外分泌発現のためのプラスミド。用いた記号については図 1 を参照。

表 2 各種 TNF α 変異体の性質

変異体 No.	アミノ酸配列	<i>In vitro</i> 抗腫瘍活性比 ^a	致死毒性比 ^b
(401A)	野生型	1	1
412	Cys ⁶⁹ →Ala	0.62	N. T. ^c
412	Cys ¹⁰¹ →Ala	0.13	N. T.
418	Cys ⁶⁹ , Cys ¹⁰¹ →Ala	0.40	N. T.
428 A	N Δ 2 ^d	1.3	N. T.
427 A	N Δ 6	1.9	N. T.
416 A	N Δ 7	3.3	N. T.
421	N Δ 10	0.68	N. T.
425	N Δ 12	0	N. T.
480	N Δ 7, Arg ⁸² →Glu	0.00012	1/1000
493	N Δ 7, Ala ⁸⁴ →His	0	1/1000
471	N Δ 7, Pro ⁸ Ser ⁹ Asp ¹⁰ →ArgLysArg	6.1	1/18

^a アクチノマイシンD存在下でマウス L929 細胞を障害する活性. 野生型 TNF α 型の比活性を1として比較.

^b β -D-ガラクトサミン負荷 C3H/HeJ マウスに対する致死毒性. 野生型 TNF α の 50% 致死用量を1として比較.

^c 実験未実施.

^d アミノ末端2残基欠失を表す.

ヒト TNF α は水溶液中でコンパクトな三量体構造をとっていることが知られているが^(27,28), 大腸菌分泌 N Δ 2-TNF α と菌体内産生 N Δ 2-TNF α とでは, 三量体形成の際の分子のパッキングのされ方が異なっている可能性がある. したがって, 大腸菌分泌 N Δ 2-TNF α が, 同一のアミノ酸配列を有する菌体内産生 N Δ 2-TNF α よりも高い抗腫瘍活性を示したのは, 菌体外分泌によってその高次構造が最適化されたためと考えられよう.

(2) TNF レセプター結合部位の解析

蛋白質工学の手法を用いて, TNF α の構造-活性相関の検討を行った. TNF α 分子中には Cys が2残基存在しており (Cys⁶⁹ および Cys¹⁰¹), 互いにジスルフィド結合で結ばれている⁽²²⁾. これらの Cys 残基を Ala へ置換した場合にも *in vitro* 抗腫瘍活性は消失しなかったことから (表2), ジスルフィド結合は *in vitro* 抗腫瘍活性の発現に必須ではないことがわかった⁽²⁹⁾.

TNF α のアミノ末端を順次欠失させていくと, *in vitro* 抗腫瘍活性の向上がみられた (表2)⁽²⁹⁻³¹⁾. *In vitro* 抗腫瘍活性は, アミノ末端7残基の欠失により極大 (野生型 TNF α の3.3倍) となった後, 徐々に減少し, アミノ末端12残基の欠失により消失した. アミノ末端の7残基の欠失によって腫瘍細胞表面上の TNF レセプターへの親和性も高まることから, TNF α のアミノ末端 (とくに, Val¹~Pro¹² 領域) は TNF レセプターへの結合に直接関与していることが強く示唆された. また, Ala¹⁴ を欠失させた TNF α 変異体は不溶性のインクルージョン・ボディを形成したことより (図5)^(32,33), TNF

図5 TNF α 変異体をインクルージョン・ボディの形で産生している大腸菌. 菌体内発現型プラスミド pTNF483 を有する大腸菌 C600r⁻m⁻ 株を用いた. A: 菌体超薄切片の透過型電子顕微鏡写真, B: 菌体の走査型電子顕微鏡写真, C: 菌体より取り出したインクルージョン・ボディの走査型電子顕微鏡写真.

α のアミノ末端に続く領域は適切な高次構造の保持にも関与しているものと考えられた.

ヒト TNF α のアミノ酸一次構造より, 分子表面上に露出していると考えられる領域を予測し, その部位の改変を行った. Arg⁸² または Ala⁸⁴ の改変により, *in vitro* 抗腫瘍活性の大幅な低下が認められた (表2)^(30,31). これらの TNF α 変異体は腫瘍細胞表面上の TNF レセプターへの結合能を失っており, Arg⁸² および Ala⁸⁴ は TNF レセプター結合に直接関与していることが示唆された. これら2種の TNF α 変異体においては, 正常マウスに対する致死毒性も消失していた. 正常マウスに対する致死毒性には正常細胞が関与することから, 正常細

図 6 ヒト TNF α の立体構造と各種 TNF α 変異体の *in vitro* 抗腫瘍活性. 筆者らの実験結果を TNF α の立体構造⁽³⁴⁾の上に重ねて示した. 改変により活性の向上をもたらした残基の位置には▲を, そして活性が減少した場合には▼を記した. d はアミノ末端からその位置までの欠失を表す.

胞表面上の TNF レセプターは腫瘍細胞表面上の TNF レセプターと TNF α 分子中の同一部位を認識していることが推察された.

最近になって, ヒト TNF α の立体構造が X 線結晶構造解析によって明らかにされている^(34,35). 筆者らの TNF α 改変結果を TNF α の立体構造の上に重ねて示したのが図 6 である. TNF レセプター結合への関与が示唆されたアミノ末端領域, Arg³² および Ala⁸⁴ は, 図 6 において右側に位置している. したがって, 図 6 において右側の領域が TNF レセプターと直接相互作用するものと推察された. また, アミノ末端近傍 Pro⁸Ser⁹Asp¹⁰ 領域の荷電を高めたり, カルボキシル末端 Ala¹⁵⁶Leu¹⁵⁷ 領域の疎水性度を上げることによっても, *in vitro* 抗腫瘍活性の向上が認められている⁽³⁶⁾. おそらく, これらの領域の改変により, 直接的あるいは間接的に (たとえば, 高次構造の安定化を通じて), TNF レセプターへの親和性が高まったものと思われる.

(3) 高活性・低副作用型新規 TNF α 変異体

TNF α のアミノ末端を 7 残基欠失させ, さらに Pro⁸Ser⁹Asp¹⁰ の ArgLysArg への置換を行ったところ, 野生型 TNF α に比して, *in vitro* 抗腫瘍活性が 6.1 倍に向上した変異体 471 が得られた (表 2)^(37,38). 変異体 471 においては TNF レセプターへの親和性が高まっており, そのことが *in vitro* 抗腫瘍活性の向上に大きく寄与したものと考えられた. また, 変異体 471 は *in vivo* においても高い抗腫瘍活性を示しており, 野生型 TNF α

ではその増殖を抑制しきれなかった腫瘍も, 変異体 471 の投与により完全治癒が認められている (図 7). 一方, 副作用に着目した場合, 変異体 471 の正常マウスに対する致死毒性は野生型 TNF α の 1/18 に低減していた. また, カケクチン作用こそが TNF α の副作用の元凶であるとする報告⁽³⁹⁾も見受けられるが, 変異体 471 のカケクチン活性は野生型 TNF α と同程度にすぎなかった. したがって, TNF α の抗腫瘍作用と副作用とは必ずしも比例するわけではなく, 蛋白質工学による TNF α の抗腫瘍作用と副作用との分離の可能性が示された.

野生型 TNF α の臨床応用に際しては, その重篤な副作用が問題とされてきた. ここで得られた変異体 471 の *in vitro* 抗腫瘍活性は, 現在までに他の研究グループより報告されている TNF α 変異体^(40~42)のどれよりも高いものである. また, 変異体 471 の有効性を抗腫瘍活性 (*in vitro*) と副作用 (正常マウスに対する致死毒性) の両面から評価した場合, 野生型 TNF α に比して 100 倍以上も有利であり, その臨床への応用が期待される. 筆者らは最近, TNF α の抗腫瘍活性 (*in vitro* および *in vivo*) がリソソーム不安定化剤との併用により増強されることを見出している⁽⁴³⁾. TNF α 変異体の臨床応用を考えた場合, より優れた変異体の取得はいうにおよばず, より望ましい (併用) 投与方法の開発も重要となろう.

本研究を行うにあたり終始ご指導を賜りました東京工

図7 変異体 471 を用いた担癌マウスの治療. BALB/c マウス側腹部皮内にマウス MethA 細胞の固形腫瘍を形成させた後, 野生型 $\text{TNF}\alpha$ または変異体 471 を同量ずつ静脈内投与し, 腫瘍の様子を観察した. コントロール群には生理食塩水のみを投与した.

業大学教授堀越弘毅先生に厚く御礼申し上げます. 本研究は主として帝人株式会社において, 市川弥太郎博士, 渡嘉敷通之博士, 山中義之氏, 柵木津希夫氏, 北井一男氏, 松田裕生氏, 加藤 革氏, 福岡政実氏, 森谷久雄氏, 関根芳江氏, 永沢祥子氏, 橋島郁代氏, 新井邦子氏を始めとする多数の共同研究者とともに行われたものであり, 関係各位に心より謝意を表します. また, ご指導いただきました東京工業大学教授大倉一郎先生, 東京大学教授別府輝彦先生, 九州大学教授渡辺 武先生, 理化学研究所副主任研究員工藤俊章先生, 東京大学教授荒田洋治先生, 東北大学助教授能勢真人先生, 札幌医科大学教授新津洋司郎先生, 日本女子大学教授大隅正子先生, 東京農業大学教授御船 昭先生, 北陸先端科学技術大学院大学長慶伊富長先生に深く感謝いたします. 最後に, 東京工業大学助教授青野力三先生をはじめとする東京工業大学遺伝子工学講座の皆様のご助言に御礼申し上げます.

- (1) D. R. Burton : *Mol. Immunol.*, **22**, 161—206 (1985).
- (2) D. R. Burton : in "Molecular Genetics of Immunoglobulin," ed. by F. Calabi, and M. S. Neuberger, Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 1—50.
- (3) A. Kudo, T. Ishihara, Y. Nishimura, and T. Watanabe : *Gene*, **33**, 181—189 (1985).
- (4) S. Nakamura, T. Masegi, K. Kitai, A.

Kudo, T. Watanabe, and Y. Ichikawa : *J. Biotechnol.*, **8**, 141—148 (1988).

- (5) T. Masegi, S. Nakamura, K. Kitai, and Y. Ichikawa : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1609—1610 (1988).
- (6) C. Kato, T. Kobayashi, T. Kudo, T. Furusato, Y. Murakami, T. Tanaka, H. Baba, T. Oishi, E. Ohtsuka, M. Ikehara, T. Yanagida, H. Kato, S. Moriyama, and K. Horikoshi : *Gene*, **54**, 197—202 (1987).
- (7) K. Kitai, T. Kudo, S. Nakamura, T. Masegi, Y. Ichikawa, and K. Horikoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 52—56 (1988).
- (8) S. Nakamura : *Teijin Technol. Rep.*, **6**, 6—7 (1990).
- (9) H. Matsuda, S. Nakamura, Y. Ichikawa, K. Kozai, R. Takano, M. Nose, S. Endo, Y. Nishimura, and Y. Arata : *Mol. Immunol.*, **27**, 571—579 (1990).
- (10) S. Nakamura, H. Matsuda, K. Kozai, Y. Ichikawa, R. Takano, M. Nose, S. Endo, Y. Nishimura, and Y. Arata : *Prot. Eng.*, **3**, 336 (1990).
- (11) H. Matsuda : *Teijin Technol. Rep.*, **5**, 7—8 (1989).
- (12) A. Shimizu, M. Honzawa, S. Ito, T. Miyazaki, H. Matsumoto, H. Nakamura, T. E. Michaelson, and Y. Arata : *Mol. Immunol.*, **20**, 141—148 (1983).
- (13) R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman,

- M. Matsushima, and W. Palm: *Nature (London)*, **264**, 415—420 (1976).
- (14) J. Deisenhofer: *Biochemistry*, **20**, 2361—2370 (1981).
- (15) M. Nose, R. Takano, S. Nakamura, Y. Arata, and M. Kyogoku: *Int. Immunol.*, **2**, 1109—1112 (1990).
- (16) S. Nakamura, K. Kitai, K. Soma, Y. Ichikawa, T. Kudo, R. Aono, and K. Horikoshi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 349—350 (1992).
- (17) 古賀寛史, 渡辺 武: 蛋白質・核酸・酵素, **37**, 322—334 (1992).
- (18) 掘越弘毅, 虎谷哲夫, 北爪智哉, 青野力三: 「酵素: 科学と工学」, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1992, pp. 239—245.
- (19) L. J. Old: *Science*, **230**, 630—632 (1985).
- (20) N. Watanabe and Y. Niitsu: *Biotherapy*, **5**, 1634—1643 (1991).
- (21) D. Pennica, G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal, and D. V. Goeddel: *Nature (London)*, **312**, 724—729 (1984).
- (22) T. Shirai, H. Yamaguchi, H. Ito, C. W. Todd, and R. B. Wallace: *Nature (London)*, **313**, 803—806 (1985).
- (23) S. Nakamura, T. Masegi, K. Kitai, Y. Ichikawa, T. Kudo, R. Aono, and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3241—3250 (1990).
- (24) K. Yone, J. Suzuki, N. Tsunekawa, Y. Ichikawa, and S. Furukawa: *Immunobiology*, **175**, 106 (1987).
- (25) 加藤 革, 川上正舒: 臨床免疫, **22** (Suppl. 15), 78—85 (1990).
- (26) S. Nakamura, T. Masegi, Y. Ichikawa, T. Kudo, R. Aono, K. Horikoshi, N. Watanabe, and Y. Niitsu: *Biotherapy*, **5**, 424—428 (1991).
- (27) R. A. Smith and C. Baglioni: *J. Biol. Chem.*, **262**, 6951—6954 (1987).
- (28) P. Wingfield, R. H. Pain, and S. Craig: *FEBS Lett.*, **211**, 179—184 (1987).
- (29) T. Masegi, S. Nakamura, K. Kitai, M. Fukuoka, A. Kato, and Y. Ichikawa: *Prot. Eng.*, **3**, 375—376 (1990).
- (30) S. Nakamura, T. Masegi, M. Fukuoka, K. Kitai, A. Kato, Y. Ichikawa, N. Watanabe, and Y. Niitsu: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 53—57 (1991).
- (31) S. Nakamura, T. Masegi, M. Fukuoka, K. Kitai, A. Kato, Y. Ichikawa, N. Watanabe, and Y. Niitsu: *Biotherapy*, **4**, 520—523 (1990).
- (32) S. Nakamura, H. Moriya, J. Kaneko, T. Masegi, Y. Yamanaka, K. Kozai, Y. Ichikawa, and M. Osumi: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 257—260 (1991).
- (33) H. Moriya, J. Kaneko, S. Nakamura, and M. Osumi: *J. Electron Microsc.*, **40**, 364—367 (1991).
- (34) E. Y. Jones, D. I. Stuart, and N. P. C. Walker: *Nature (London)*, **338**, 225—228 (1989).
- (35) M. J. Eck and S. R. Sprang: *J. Biol. Chem.*, **264**, 17595—17605 (1989).
- (36) T. Masegi, S. Nakamura, Y. Ichikawa, N. Watanabe, and Y. Niitsu: *Biotherapy*, **6**, 459—460 (1992).
- (37) S. Nakamura, A. Kato, T. Masegi, M. Fukuoka, K. Kitai, H. Ogawa, Y. Ichikawa, M. Maeda, N. Watanabe, Y. Kohgo, and Y. Niitsu: *Int. J. Cancer*, **48**, 744—748 (1991).
- (38) T. Masegi, A. Kato, Y. Ichikawa, S. Nakamura, N. Watanabe, and Y. Niitsu: *Biotherapy*, **5**, 429—433 (1991).
- (39) B. Beutler and A. Cerami: *Nature (London)*, **320**, 584—588 (1986).
- (40) 杉源一郎: 医学のあゆみ, **152**, 589—593 (1990).
- (41) X. Van Ostade, J. Tavernier, T. Prange, and W. Fiers: *EMBO J.*, **10**, 827—836 (1991).
- (42) L. S. Lin: in "Tumor Necrosis Factors: The Molecules and Their Emerging Role in Medicine," ed. by B. Beutler, Raven Press, New York, 1992, pp. 33—48.
- (43) A. Kato, S. Nakamura, T. Masegi, K. Kitai, M. Fukuoka, Y. Ichikawa, N. Watanabe, and Y. Niitsu: *Biotherapy*, **4**, 538—541 (1990).