

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3568552号
(P3568552)

(45) 発行日 平成16年9月22日(2004.9.22)

(24) 登録日 平成16年6月25日(2004.6.25)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C 1 2 N 9/52

C 1 2 N 9/52

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

// (C 1 2 N 9/52

C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91

請求項の数 5 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願平5-125760	(73) 特許権者	590005922
(22) 出願日	平成5年5月27日(1993.5.27)		イーライ・リリー・アンド・カンパニー
(65) 公開番号	特開平6-62855		E L I L L Y A N D C O M P A N Y
(43) 公開日	平成6年3月8日(1994.3.8)		アメリカ合衆国46285インディアナ州
審査請求日	平成12年2月15日(2000.2.15)		インディアナポリス市、リリー・コーポ
(31) 優先権主張番号	891542		レイト・センター
(32) 優先日	平成4年5月28日(1992.5.28)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
		(72) 発明者	エリック・ポール・ディクソン
			アメリカ合衆国46237インディアナ州
			インディアナポリス、ベイ・リーフ・サー
			クル4246番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼおよび関連DNA化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の配列：

【化 1】

Met	Lys	Lys	Leu	Met	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	Trp	Ala		
1				5					10					15			
Glu	Glu	Gln	Asn	Lys	Leu	Val	His	Gly	Gly	Pro	Cys	Asp	Lys	Thr	Ser		
			20					25					30				
His	Pro	Tyr	Gln	Ala	Ala	Leu	Tyr	Thr	Ser	Gly	His	Leu	Leu	Cys	Gly		
		35					40					45					
Gly	Val	Leu	Ile	His	Pro	Leu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Lys		
	50					55					60						
Lys	Pro	Asn	Leu	Gln	Val	Phe	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Leu	Arg	Gln	Arg		
65					70				75					80			
Glu	Ser	Ser	Gln	Glu	Gln	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Val	Ile	His	Pro		
			85						90					95			
Asp	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ser	His	Asp	Gln	Asp	Ile	Met	Leu	Leu	Arg	Leu		
			100					105					110				
Ala	Arg	Pro	Ala	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Ile	Gln	Pro	Leu	Pro	Leu	Glu		
		115					120					125					
Arg	Asp	Cys	Ser	Ala	Asn	Thr	Thr	Ser	Cys	His	Ile	Leu	Gly	Trp	Gly		
	130					135					140						
Lys	Thr	Ala	Asp	Gly	Asp	Phe	Pro	Asp	Thr	Ile	Gln	Cys	Ala	Tyr	Ile		
145					150					155					160		
His	Leu	Val	Ser	Arg	Glu	Glu	Cys	Glu	His	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gln	Ile		
				165					170					175			
Thr	Gln	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Asp	Ser		
			180					185					190				
Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Gly	Asp	His	Leu	Arg		
		195					200					205					
Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Gly	Asn	Ile	Pro	Cys	Gly	Ser	Lys	Glu	Lys	Pro		
	210					215					220						
Gly	Val	Tyr	Thr	Asn	Val	Cys	Arg	Tyr	Thr	Asn	Trp	Ile	Gln	Lys	Thr		
225					230					235					240		
Ile	Gln	Ala	Lys														
			244														

10

20

30

40

[以下、配列番号 1 という]

で示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸化合物、または、配列番号 1 における生物学的、生化学的、化学的、物理学的小および構造的品質と実質的に同一な品質を示す化合物を与える配列番号 1 のアミノ酸の保存的变化を含み、かつアミロイド前駆体タンパク質の Met₅₉₆ - Asp₅₉₇ 結合を切断するプロテアーゼとしての機能を有する機能的なその等価物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のアミノ酸化合物を暗号化している下記の配列：

【化 2】

ATGAAGAAGC TGATGGTGGT GCTGAGTCTG ATTGCTGCAG CCTGGGCAGA	50	
GGAGCAGAAT AAGTTGGTGC ATGGCGGACC CTGCGACAAG ACATCTCACC	100	
CCTACCAAGC TGCCCTCTAC ACCTCGGGCC ACTTGCTCTG TGGTGGGGTC	150	
CTTATCCATC CACTGTGGGT CCTCACAGCT GCCCACTGCA AAAAACCAGAA	200	
TCTTCAGGTC TTCCTGGGGA AGCATAACCT TCGGCAAAGG GAGAGTTCCC	250	
AGGAGCAGAG TTCTGTTGTC CGGGCTGTGA TCCACCCTGA CTATGATGCC	300	
GCCAGCCATG ACCAGGACAT CATGCTGTTG CGCCTGGCAC GCCCAGCCAA	350	10
ACTCTCTGAA CTCATCCAGC CCCTTCCCCCT GGAGAGGGAC TGCTCAGCCA	400	
ACACCACCAG CTGCCACATC CTGGGCTGGG GCAAGACAGC AGATGGTGAT	450	
TTCCCTGACA CCATCCAGTG TGCATACATC CACCTGGTGT CCCGTGAGGA	500	
GTGTGAGCAT GCCTACCCTG GCCAGATCAC CCAGAACATG TTGTGTGCTG	550	
GGGATGAGAA GTACGGGAAG GATTCCCTGCC AGGGTGATTC TGGGGGTCCG	600	
CTGGTATGTG GAGACCACCT CCGAGGCCTT GTGTCATGGG GTAACATCCC	650	
CTGTGGATCA AAGGAGAAGC CAGGAGTCTA CACCAACGTC TGCAGATACA	700	20
CGAACTGGAT CCAAAAAACC ATTCAGGCCA AG	732	

[以下、配列番号 2 という]

を含んでいる核酸。

【請求項 3】

選択的ハイブリダイゼーションに好適な条件下に請求項 2 の化合物の DNA 断片とハイブリッド形成する、ヒト染色体 19 ライブラリー由来の 4.0 キロベースの HindIII 断片を含んでいる、配列番号 1 のアミノ酸化合物を暗号化しているゲノムクローン。

【請求項 4】

- (a) 患者から取り出した DNA を制限酵素で消化し、30
 (b) 消化した DNA を配列番号 2 の化合物に対応する標識したヌクレオチド配列、またはその一部とハイブリッド形成させ、
 (c) アルツハイマー病の症状を現わし、またはかつて症状を現わしたことがあるドナー家族構成員の、同様に消化しハイブリッド形成させたバンドの形態とハイブリダイゼーションパターンを比較する
 ことからなる患者のアルツハイマー病またはアルツハイマー病の発病傾向を決定するためのデータを収集する方法。

【請求項 5】

- (a) 配列番号 1 のタンパク質を試験物質と接触させ、
 (b) 物理的に検出可能な手段によってタンパク質活性をモニターし、40
 (c) 試験物質を投与されていない対照と比較して、タンパク質活性と相互作用する物質、またはタンパク質活性に影響を与える物質を同定する
 方法からなる、試験物質が配列番号 1 のタンパク質の機能的なリガンドであるかどうかを測定する検定。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】

β - アミロイドペプチド (β / A4) として知られている 42 ~ 43 残基のペプチドがアルツハイマー病およびダウン症候群に関連している。研究者らは、この 4 キロダルトン (kd) のタンパク質の脳内異常蓄積がアミロイド前駆体タンパク質 (APP) と呼ばれる 50

一層大きい前駆体タンパク質の切断に起因していると仮定した。正常なA P Pの切断はA 4領域内で起こるので、これと異なった切断事件は正常な完全鎖長が生じたときに起こることが判る。β / A 4のアミノ末端残基はアスパラギン酸 (A S P) であることが最も多く、従ってこれらの事実は、A P Pの5 9 6位のメチオニン (M e t) [M e t _{5 9 6}、J . カン (K a n g) らのアミノ酸番号表示方法 (ネーチャー (N a t u r e)、3 2 5 巻、7 3 3 頁 (1 9 8 7 年)) を用いる] と A s p _{5 9 7} の間で切断するプロテアーゼがアミロイドを生成することを示している。従ってA P Pを切断してβ / A 4を生成するプロテアーゼはアルツハイマー病およびダウン症候群の特徴を明らかにする重要な手段である。

【 0 0 0 2 】

10

従来、研究者らは古典的なタンパク質精製技術を利用することによって、異常な切断事件の特徴を明らかにしようと企ててきた。これらの研究の結果、合成ペプチドのM e t - A s p 結合を切断する部分的に精製された6 8キロダルトンのプロテアーゼが報告された [C . アブラハム (A b r a h a m) ら、ニューロバイオロジー・オブ・エージング (N e u r o b i o l o g y o f A g i n g)、1 1 A 巻、3 0 3 頁 (1 9 9 0 年)]。1 9 9 1年にアブラハムおよびその共同研究者らは6 8 k dプロテアーゼの切断パターンを既知のセリンプロテアーゼ類と比較した [C . アブラハムら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (B i o c h e m i c a l a n d B i o p h y s i c a l R e s e a r c h C o m m u n i c a t i o n s)、1 7 4 巻、7 9 0 頁 (1 9 9 1 年)]。その後、以前の研究で観察した活性が、実際は2 つの独立したプロテアーゼの作用であることが同じ研究者らによって報告された。その1 つはカルシウム依存性セリンプロテアーゼであり、もう1 つはシステイン・メタロプロテアーゼであることが確認された [C . アブラハムら、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミストリー (J o u r n a l o f C e l l u l a r B i o c h e m i s t r y)、1 5 巻、1 1 5 頁 (1 9 9 1 年)、C . アブラハムら、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー (J o u r n a l o f N e u r o c h e m i s t r y)、5 7 巻、5 1 0 9 頁 (1 9 9 1 年)]。これらのプロテアーゼの構造または特性については報告されなかった。

20

【 0 0 0 3 】

【 発明が解決しようとする課題 】

30

本発明は、以前に報告された酵素類とは構造的に異なり、A P Pの切断によって、M e t _{5 9 6} - A s p _{5 9 7} 切断が期待される大きさのアミロイド原性断片を生じる新規酵素を提供する。従って新規酵素はアルツハイマー病およびダウン症候群の特徴をさらに明らかにするのに極めて有用である。そのうえ本発明を利用することによって、これらの疾患およびその他の関連疾患の処置をもたらし得る。

【 0 0 0 4 】

現在までのところ痴呆そのものが完全に証明されるまで、ヒトでアルツハイマー病を診断する満足すべき手段はなかった。アルツハイマー病によって痴呆が起こったと確認するには、患者の脳の死後剖検が必要である。本発明では、患者がまだ生存している間に、アルツハイマー病の患者またはアルツハイマー病の発病傾向をもつ患者を決定する手段を提供する。

40

【 0 0 0 5 】

【 課題を解決するための手段 】

本明細書の記載内容を明白にし、本発明の理解を助ける目的のため、下記の事項について定義する。

【 0 0 0 6 】

「 2 9 3 細胞 」とは、グラハムらが報告した広く入手可能な形質転換したヒト初代胎児性腎細胞系 [F . L . グラハム (G r a h a m) ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・バイロロジー (J o u r n a l o f G e n e r a l V i r o l o g y)、3 6 巻、5 9 ~ 7 2 頁 (1 9 7 7 年)] をいう。この細胞系は、例えばジ・アメリカン・タイプ・カル

50

チャー・コレクション (the American Type Culture Collection)、12301、パークローン・ドライブ (Parklawn Drive)、ロックビル (Rockville)、マリーランド (Maryland)、10852-1776 (ATCC) から、受入番号 ATCC CRL 1573 のもとに入手し得る。

【0007】

「AV12細胞」とは、受入番号 ATCC CRL 9595 のもとに ATCC から入手し得る別の広く入手可能な細胞系をいう。

【0008】

「アミロイド原性断片」とは、 β /A4ペプチドを含有しているAPP断片をいう。

10

【0009】

「配列番号1の機能的な化合物」とは、APPを切断できる配列番号1を含んでいる化合物をいう。

【0010】

「クニッツ様ドメイン」とは、大豆トリプシンインヒビターと類似のプロテアーゼインヒビター、または大豆トリプシンインヒビターと類似のプロテアーゼインヒビターを暗号化している核酸配列をいう。例えばP.ポンテ (Ponte) ら [ネーチャー、331巻、525頁 (1988年)]、またはR.E.タンジ (Tanzi) ら [ネーチャー、331巻、528頁 (1988年)]、またはN.キタグチら [ネーチャー、331巻、530頁 (1988年)] が報告したAPPのクニッツ・プロテアーゼインヒビター (KPI) 領域はクニッツ様ドメインである。

20

【0011】

「pRc/ザイム (Zyme)」とは、修飾したpRc/CMV真核性発現ベクターをいい、pRc/CMVベクターは商業的に入手可能である [インビトロジェン・コーポレーション (Invitrogen Corporation)、3985、ソレント (Sorrent)、バレイ (Valley) Blvd.、シュート (Suite) B、サンジエゴ (San Diego)、カリフォルニア (California)、92121]。プラスミドpRc/ザイムはヒト・シトメガロウイルスプロモーターおよびエンハンサー、ウシ成長ホルモン・ポリアデニル化シグナル、ネオマイシン耐性遺伝子、エシェリキア・コリ (E. coli) におけるアンピシリン耐性マーカーとして有用な β -ラクタマーゼ遺伝子、およびその他の多数の特徴 (1991年、インビトロジェン社カタログ、29頁) および全ザイムのコード領域を含んだ1451塩基対のNotI/SalI挿入体を含んでいる。

30

【0012】

「pSザイム (pSZyme)」とは、修飾したエシェリキア・コリ・クローニングベクターpSPORT-1 (商標) [E.Y.チェン (Chen) ら、DNA、4巻、165頁 (1985年)] をいい、プラスミドpSPORT-1 (商標) は商業的に入手可能である [ギブコ (Gibco) - BRL社、8400、ヘルガーマン・コート (Hergeman Court)、ガイザースバーグ (Gaithersburg)、マリーランド、20877]。このプラスミドはpUCベクターからの複製開始点を含んでいる。このプラスミドはC.ヤニッシュ・ペロン (Yanisch-Perron) ら [ジーン (Gene)、33巻、103~119頁 (1985年)] に報告されており、アンピシリン耐性を付与する β -ラクタマーゼ遺伝子、ザイムの全コード領域を含んだ1451塩基対のNotI/SalI挿入体、およびその他の特徴を含んでいる。

40

【0013】

「配列番号1の一部」とは、配列番号1の少なくとも6個の連続したアミノ酸残基をいう。

【0014】

「mRNA」とは、イン・ビトロまたはイン・ビボの何れかで転写されたりボ核酸 (RNA) をいい、例えばRNAポリメラーゼによるDNA暗号配列の転写によってイン・ビト

50

口で調製されたRNA転写物を含む。

【0015】

「配列番号1または機能的なその等価物」とは、配列番号1、または配列番号1のアミノ酸配列の保存的な変化物をいい、ここでその保存的变化とは、配列番号1と実質的に同一な生物学的、生化学的、化学的、物理学的、および構造的品質を示す化合物を生じる。

【0016】

「配列番号3」とは、以下に示すDNA配列をいう。

【化3】

A T G G C T G G C G G C A T C A T A G T C A G G G

【0017】

「配列番号4」とは、以下に示すDNA配列をいう。

【化4】

A A C C G A A T C T T C A G G T C T T C C T G G G G

【0018】

「配列番号5」とは、以下に示すDNA配列をいう。

【化5】

T C G C T C T C T C C T G G G G A C A C A G A

【0019】

「配列番号6」とは、以下に示すDNA配列をいう。

【化6】

C C A G G T G C T A T T C C A T G T A T G T C A T A G

【0020】

「配列番号7」とは、以下に示すDNA配列をいう。

【化7】

T C T G T G T C C C C A G G A G A G A G C G A

【0021】

「配列番号8」とは、以下に示すDNA配列をいう。

【化8】

A T A G T G A A G C T G T C T T C T C A A T

【0022】

「トランスフェクション」とは、宿主細胞ゲノムへの核酸の組込みを伴ない、または伴わない宿主細胞への核酸の任意の伝達をいう。

【0023】

「ザイム」とは、配列番号1のアミノ酸配列、またはその機能的な等価物をいう。

【0024】

「ザイム関連バンドの立体配置」とは、本明細書に記載した制限断片多型の2種のバンド立体配置から選ばれた2種のバンド配置のうちの1つをいう。一方のパターンは2400塩基対バンドを示すが、2500塩基対バンドを示さない。他方のパターンは2500塩基対バンドを示すが、2400塩基対バンドを示さない。

【0025】

本発明は、下記の配列：

【化9】

10

20

30

40

Met Lys Lys Leu Met Val Val Leu Ser Leu Ile Ala Ala Ala Trp Ala
 1 5 10 15

Glu Glu Gln Asn Lys Leu Val His Gly Gly Pro Cys Asp Lys Thr Ser
 20 25 30

His Pro Tyr Gln Ala Ala Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu Cys Gly
 35 40 45

Gly Val Leu Ile His Pro Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys
 50 55 60

Lys Pro Asn Leu Gln Val Phe Leu Gly Lys His Asn Leu Arg Gln Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Ser Gln Glu Gln Ser Ser Val Val Arg Ala Val Ile His Pro
 85 90 95

Asp Tyr Asp Ala Ala Ser His Asp Gln Asp Ile Met Leu Leu Arg Leu
 100 105 110

Ala Arg Pro Ala Lys Leu Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu
 115 120 125

Arg Asp Cys Ser Ala Asn Thr Thr Ser Cys His Ile Leu Gly Trp Gly
 130 135 140

Lys Thr Ala Asp Gly Asp Phe Pro Asp Thr Ile Gln Cys Ala Tyr Ile
 145 150 155 160

His Leu Val Ser Arg Glu Glu Cys Glu His Ala Tyr Pro Gly Gln Ile
 165 170 175

Thr Gln Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ser
 180 185 190

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Asp His Leu Arg
 195 200 205

Gly Leu Val Ser Trp Gly Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Glu Lys Pro
 210 215 220

Gly Val Tyr Thr Asn Val Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Ile Gln Ala Lys
 244

10

20

30

[以下、配列番号 1 という]

40

で示されるアミノ酸配列、または機能的なその等価物を含むアミノ酸化合物を提供する。
 特に配列番号 1 であるアミノ酸化合物は好ましい。

【 0 0 2 6 】

当業者であれば、配列番号 1 の若干の変更がアミノ酸化合物の働きを変え得ないことを認めるであろう。例えばある疎水性アミノ酸は他の疎水性アミノ酸と交換し得、類似の側鎖をもつアミノ酸は互いに交換し得、塩基性アミノ酸は他の塩基性アミノ酸と交換し得、酸性アミノ酸は他の酸性アミノ酸と交換し得、小型アミノ酸は他の小型アミノ酸と交換し得、そのほか種々の保存的な入れ替えを実施し得る。例示したアミノ酸化合物と実質的に同一の態様で、実質的に同一の働きを付与するこれらの変化したアミノ酸化合物も、本発明の範囲に包含される。

50

【0027】

当業者であれば、このタンパク質が多数の異なった方法によって合成できることは理解し得よう。本発明のすべてのアミノ酸化合物は、固相ペプチド合成法または組換え法等を含む当業界で既知の化学的な方法によって製造できる。上記の方法はともに米国特許第4617149号に記載されている。高収量を望むのなら、組換え法が好ましい。任意の所望のDNA配列を組み立てる一般的な方法はブラウンら[ブラウン(Brown)ら、メソックス・イン・エンジモロジー(Methods in Enzymology)、68巻、109頁(1979年)]によって報告されている。

【0028】

他の生産経路も周知である。真核細胞での発現は配列番号2を経由して達成できる(後記)。例えば配列番号1を暗号化しているDNAを含んでおり、シミアンウイルス40、シトメガロウイルス、またはマウス乳がんウイルスで誘導された発現ベクターを使用して、真核細胞でアミノ酸化合物を生産することができる。また当業界で周知のように、ある種のウイルスも好適なベクターである。例えばアデノウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルスおよびラウス肉腫ウイルスは有用である。そのような方法は米国特許第4775624号に報告されている。発現に関する数種の別法が、サンプルックら[J. サンプルック(Sambrook)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、ア・ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、第16および17章(1989年)]によって報告されている。

10

20

【0029】

本発明の別の実施態様では、配列番号1を暗号化している核酸配列を含んだ核酸化合物を包含する。当業者であれば理解し得るように、本発明のアミノ酸化合物は大部分のアミノ酸が1組以上の核酸トリプレットによって暗号化されている遺伝コードの同義性のため、多数の異なった核酸配列によって暗号化できる。それらの入れ替わった核酸配列は同一のアミノ酸配列を暗号化しているから、本発明はさらにこれらの入れ替わった核酸配列を包含する。好ましくは核酸化合物は、DNA、センスまたはアンチセンスmRNAである。ザイムを暗号化しているDNA化合物の最も好ましい具体例は、下記の配列：

【化10】

ATGAAGAAGC TGATGGTGGT GCTGAGTCTG ATTGCTGCAG CCTGGGCAGA	50	
GGAGCAGAAT AAGTTGGTGC ATGGCGGACC CTGCGACAAG ACATCTCACC	100	
CCTACCAAGC TGCCCTCTAC ACCTCGGGCC ACTTGCTCTG TGGTGGGGTC	150	
CTTATCCATC CACTGTGGGT CCTCACAGCT GCCCACTGCA AAAAACCGAA	200	
TCTTCAGGTC TTCCTGGGGA AGCATAACCT TCGGCAAAGG GAGAGTTCCC	250	
AGGAGCAGAG TTCTGTTGTC CGGGCTGTGA TCCACCCTGA CTATGATGCC	300	
GCCAGCCATG ACCAGGACAT CATGCTGTTG CGCCTGGCAC GCCCAGCCAA	350	10
ACTCTCTGAA CTCATCCAGC CCCTTCCCCCT GGAGAGGGAC TGCTCAGCCA	400	
ACACCACCAG CTGCCACATC CTGGGCTGGG GCAAGACAGC AGATGGTGAT	450	
TTCCCTGACA CCATCCAGTG TGCATACATC CACCTGGTGT CCCGTGAGGA	500	
GTGTGAGCAT GCCTACCCTG GCCAGATCAC CCAGAACATG TTGTGTGCTG	550	
GGGATGAGAA GTACGGGAAG GATTCCTGCC AGGGTGATTC TGGGGGTCCG	600	
CTGGTATGTG GAGACCACCT CCGAGGCCTT GTGTCATGGG GTAACATCCC	650	
CTGTGGATCA AAGGAGAAGC CAGGAGTCTA CACCAACGTC TGCAGATACA	700	
CGAACTGGAT CCAAAAAACC ATTCAGGCCA AG	732	20

[以下、配列番号 2 という]

を有するものである。ただしセンスおよびアンチセンス m R N A である核酸化合物も好ましい。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、配列番号 1 または機能的なその等価物を暗号化した核酸を含んでいる核酸ベクターを提供する。好ましい核酸ベクターは D N A である核酸ベクターである。最も好ましいものは、配列番号 2 である D N A 配列を含んでいる D N A ベクターである。特に好ましい D N A ベクターはプラスミド p S ザイムである。

30

【 0 0 3 1 】

エシェリキア・コリノ p S ザイムは配列番号 2 を含んだクローニングベクターを含んでいるが、この株をザ・ノーザン・レジオナル・リサーチ・ラボラトリーズ (The Northern Regional Research Laboratories) (N R R L)、アグリカル チュラル・リサーチ・サービス (Agricultural Research Service)、U . S . デパートメント・オブ・アグリカルチャー (U . S . Department of Agriculture)、ペオリア (Peoria)、イリノイズ (Illinois)、6 1 6 0 4 に寄託し (1 9 9 2 年 4 月 2 9 日)、N R R L B - 1 8 9 7 1 の受入番号のもとにその保存培養株の一つとして貯蔵された。配列番号 2 は、例えば 1 4 5 1 塩基対の N o t I / S a l I 制限断片としてプラスミドから単離できる。その他の断片も配列番号 2 を得るのに有用である。

40

【 0 0 3 2 】

また D N A 配列は、A B S [アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems)、8 5 0、リンカーン・センタードライブ (Lincoln Centre Drive)、フォスターシティー (Foster City)、C A、9 4 4 0 4] 3 8 0 B D N A シンセサイザーのような商業的に入手可能な自動 D N A シンセサイザーを使用して合成することができる。また D N A 配列は、米国特許第 4 8 8 9 8 1 8 号に報告されたポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって生産することができる。

【 0 0 3 3 】

またこれらのベクターの制限断片も提供される。好ましい断片は、p S ザイムの 1 4 5 1

50

塩基対のN o t I / S a l I制限断片、803塩基対のB s r B I / E s p 3 I制限断片、および815塩基対のE c o N I / B f a I制限断片である。

【0034】

さらに本発明のDNAベクターは好ましくは配列番号2、または機能的なその対応物の発現を推進させる位置にプロモーターを含む。プロモーターがヒト胎児性腎細胞(293細胞)、AV12細胞、酵母細胞、またはエシェリキア・コリ(E s c h e r i c h i a c o l i)細胞で機能するようなベクターが好ましい。最も好ましいDNA発現ベクターはプラスミドp R c / ザイムである。

【0035】

標準的な手技を用いてエシェリキア・コリから単離できるプラスミドp S ザイムを容易に修飾して、例えばエシェリキア・コリ、サッカロマイセテス(S a c c h a r o m y c e t e s)科に属する酵母、スポドプテラ(S p o d o p t e r a)属のフォール・アーミーワーム(f a l l a r m y w o r m)の卵巣に由来するS f 9細胞(バキュロウイルス発現系の宿主として普通に使用される)等を含むさまざまな生物で、ザイムを生産する発現ベクターを組み立てる[これらの手技については、例えばサンプルックら(前掲)参照]。

10

【0036】

現在の文献はAV12発現ベクターを組み立て、AV12宿主細胞をトランスフェクトする技術を含んでいる(例えば米国特許第4992373号参照)。また現在の文献は293発現ベクターを組み立て、293宿主細胞をトランスフェクトする多数の技術を含んで

20

【0037】

必要であれば周知の技術を用い、単に好適な調節要素を置き換えることによって、293細胞を利用する組立てのプロトコルをその他の細胞系の類似のベクター組立てに応用することができる。使用し得るプロモーターは、例えばチミジンキナーゼプロモーター、メタロチオニンプロモーター、熱ショックプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、またはマウス乳がんウイルスプロモーター、SV40プロモーター、ヘルペスウイルスプロモーター、BKウイルスプロモーターのような種々のウイルスプロモーター等が挙げられる。さらに「共通」配列から誘導し、または他のプロモーターのハイブリッドとして作り出して人工的に組み立てたプロモーターも本発明を実施する過程で使用し得る。

30

【0038】

また本発明のDNA化合物はプライマーおよびプローブを含む。配列番号1、またはその一部を暗号化している少なくとも18個連続した塩基対からなる核酸化合物は本発明に包含される。DNAであるプローブまたはプライマーは好ましい。最も好ましいプローブまたはプライマーは配列番号3および配列番号4である。当業者にとって、プローブおよびプライマーに関連する技術が周知であることは明白であろう。

【0039】

例えば配列番号3または配列番号4の全部または一部を、暗号配列へハイブリッド形成するのに使用し得る。ついで周知の技術を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を用いて、完全鎖長の配列を生産できる。ついで完全鎖長の配列を任意の最も適したベクターへサブクローンすることができる。

40

【0040】

別法として、通常的手段によってcDNAライブラリーをスクリーニングするため、配列番号3または配列番号4を5'末端で放射能で標識し得る。また結合したmRNA転写物を逆転写するため、フィルターへ結合したザイム暗号化DNAの任意の一片を全mRNA転写物で飽和し得る。

【0041】

プライマーおよびプローブは当業界周知的手段によって入手し得る。例えばp S ザイムを単離したら、制限酵素およびそれに続くゲル分離を用いて、最も適した断片を単離し得る。

50

【 0 0 4 2 】

本発明のもう1つの態様は、ザイムのゲノムクローンである。好ましいゲノムクローンは、配列番号1を暗号化しているDNA断片とハイブリッド形成するヒト染色体19ライブラリーからの4.0キロベースのHindIII断片である。これは、配列番号2またはその一部とのハイブリダイゼーションによって得ることができる。例えば配列番号3および配列番号4を放射能標識し、ついで対応するゲノムDNAを同定し、単離するために、染色体19ライブラリーをプローブするのに使用し得る。

【 0 0 4 3 】

本発明はまた、ドナーのヒトDNAを

(1) 制限酵素TaqIで消化し、

(2) 標識したザイムDNAとハイブリッド形成して、ザイム関連バンドの形態(立体配置)を明らかにし、

(3) アルツハイマー病の症状を示し、またはかつて症状を示したことがあるドナー家族の構成員の、同様に消化しハイブリッド形成したバンドの形態と比較する

ことからなるアルツハイマー病の診断検定を提供する。好ましくはアルツハイマー病の診断検定では、ドナーのヒトDNA供給源として血液試料を利用する。

【 0 0 4 4 】

ゲノムDNAが本発明で提供され、ザイム関連制限断片鎖長の多型が本発明の開示によって確認されるから、この操作の残りの部分は当業界既知の方法によって達成し得る。例えば米国特許第4666828号には、これらの操作が記載されている[例えばB. リューイン(Lewin)、ジーンズ(Genes)、78頁(1987年)、レビュー・レストリクション・フラグメント・レングス・ポリモルフィズム・テクニクス・アンド・セオリー(review restriction fragment length polymorphism techniques and theory)のような多数の参考文献がある]。

【 0 0 4 5 】

本発明によって提供された核酸を内蔵している宿主細胞は、本発明の範囲に包含される。好ましい宿主細胞は卵母細胞である。好ましい卵母細胞は、本発明のセンスmRNAまたはDNA化合物を注入したものである。一層好ましい卵母細胞は、本発明のセンスmRNAまたはDNA化合物を、APPを暗号化しているDNAまたはmRNAとともに注入したものである。最も好ましい本発明の卵母細胞はセンスmRNAを注入したものである。

【 0 0 4 6 】

それ以外の好ましい宿主細胞は、配列番号2を含んだベクターでトランスフェクトしたものである。配列番号2をトランスフェクトした好ましい宿主細胞としては、293細胞、AV12細胞、酵母細胞、およびエシェリキア・コリ細胞等が挙げられる。最も好ましい293およびエシェリキア・コリの宿主細胞は、293/pRc/ザイム、エシェリキア・コリ/pSザイムである。

【 0 0 4 7 】

同様に好ましい宿主細胞は、配列番号2を含んでいるDNAベクターとAPPの暗号配列を含んでいるDNAで同時トランスフェクトしたものである。293細胞、AV12細胞、酵母細胞、およびエシェリキア・コリ細胞は特に有用な同時トランスフェクトの宿主細胞である。

【 0 0 4 8 】

卵母宿主細胞はリュールベルトらが報告した方法に従って組み立てることができる[リュールベルト(Luebbert)ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(USA)(Proceedings of the National Academy of Sciences (USA))、84巻、4332頁(1987年)]。APPを暗号化しているDNAまたはRNA(ともに695および751アミノ酸の形)はセルコエらの報告に従って入手し得る[セルコエ(Seelkoe)ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス

10

20

30

40

50

(USA)、85巻、7341頁(1988年)]。その他の宿主細胞のトランスフェクションは当業界周知のものである。細胞の同時トランスフェクションは標準的な手技を用いて達成し得る[例えばゴーマン(Gorman)ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)、2巻、1044頁(1982年)参照]。

【0049】

従って本発明はまた、配列番号1を発現できる宿主細胞を組み立てる方法を提供する。その方法は、配列番号1を暗号化したDNA配列を含んでいるDNAベクターで宿主細胞をトランスフェクトすることからなる。好ましい方法では293細胞を宿主細胞として使用する。この293細胞は受入番号ATCC CRL1573のもとにATCCから入手し得る。別の好ましい方法としては、AV12細胞を宿主細胞として使用する。AV12細胞は受入番号ATCC CRL9595のもとにATCCから入手し得る。別の好ましい方法では、サッカロマイセテス科に属する酵母細胞、または細菌エシェリキア・コリを宿主細胞として使用する。

10

【0050】

好ましい方法では293細胞で配列番号2を含んでいる発現ベクターを利用する。この目的のため特に好ましいものはpRc/ザイムである。

【0051】

別の好ましい方法は、(a)配列番号2を含んでいるDNAベクター、および(b)APP暗号配列を暗号化しているDNA発現ベクターからなる。最も好ましい方法では、DNAベクターpRc/ザイムを利用する。トランスフェクトした宿主細胞を、配列番号1が発現されるような当業者周知の条件下で培養し、このようにしてトランスフェクトした宿主細胞内でザイムを生産し得る。

20

【0052】

また本発明は、本発明のプロープと相同なDNAを同定する方法を提供する。この方法は、ハイブリッド形成条件下で試験核酸をプロープと組み合わせ、ハイブリッド形成する試験核酸を同定することからなる。この方法で使用する好ましいプロープは、配列番号3および配列番号4である。ハイブリダイゼーション技術は当業界周知のものである[例えばサンプルックら(前掲)参照]。

【0053】

また本発明によって提供された化合物を利用する検定も本発明の範囲に包含される。提供された検定は、物質がザイムのリガンドであるかどうかを決定するものであって、その方法は、ザイムを物質と接触させ、物理的に検出可能な手段によってザイム活性をモニターし、ザイムと相互作用し、またはザイムに影響を与える物質を同定する方法からなる。

30

【0054】

本発明の好ましい検定は、細胞培養検定、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)検定、または合成競合検定である。

【0055】

好ましい細胞培養検定は、ザイムおよびAPPを暗号化している核酸を同時発現する卵母細胞、AV12細胞、エシェリキア・コリ細胞、酵母細胞、または293細胞を使用する。好ましい同時発現細胞培養検定は293/pRc/ザイムを利用するものである。好ましい検定は酵母細胞とAPPのアミノ酸587~606を暗号化しているDNA化合物を利用する。ザイム暗号化DNAおよびMet₅₉₆/Asp₅₉₇切断部位コドンを含んだAPP暗号化DNAを使用した酵母検定を実施する1方法が報告されている[スミス(Smith)およびコホーン(Kohorn)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、USA、88巻、5159頁(1991年)]。

40

【0056】

最も好ましい卵母細胞検定はmRNAを同時発現する。最も好ましい細胞培養検定はウエスタンブロット分析、または物理学的に検定可能な手段として放射能標識したAPPを使

50

用する。好ましいHPLC検定では、基質として完全鎖長の真核細胞で誘導したAPPを利用する。

【0057】

最も好ましい合成競合検定は、物質がクニッツ様ドメイン遺伝子生産物とザイムへの結合を競合するものである。最も好ましいザイム/クニッツドメイン競合検定は、APPを放射性同位元素で標識したものである。

【0058】

細胞培養検定はアウスベルらによって詳細に報告された方法に従って達成され得る[F. アウスベル(Ausubel)ら、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、1989年、9.1~9.5頁]。HPLC検定は主としてヒルズおよびチマシェフが報告した方法により実施し得る[ヒルズ(Hirs)およびチマシェフ(Timashoff)編、メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods in Enzymology)、91巻、第VおよびVI節(1983年)]。ザイム/クニッツ様ドメイン結合または競合検定は、ベンネットおよびヤマムラの報告に従って実施し得る[J. ベンネット(Bennet)およびH. ヤマムラ(Yamamura)、ニューロトランスミッター・レセプター・バインディング(Neurotransmitter Receptor Binding)、1985年、第3章]。

【0059】

本発明はまた、ザイムを同定し、または精製する方法を提供する。この方法は試験タンパク質を抗ザイム抗体で飽和し、結合できなかった抗ザイム抗体を除去し、結合したまま残っている抗ザイム抗体を検出することからなる。抗体イメージング技術は当業界既知の方法である。

【0060】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を説明する。実施例は単に発明を説明するためのものであって、これによって本発明の範囲を限定する目的をもつものではない。

【0061】

実施例 1: 293細胞内におけるザイムの生産

エシェリキア・コリ・pSザイムの凍結乾燥品のアリコートをや・ノーザン・レジオナル・リサーチ・ラボラトリーズ、ペオリア、イリノイズ、USA、61604から受入番号NRRLB-18971のもとに入手し、下記の方法で、培養として直接使用できた。この培養はNRRLに寄託された。

【0062】

エシェリキア・コリ/pSザイムの培養から塩化セシウム精製によってプラスミドpSザイムを単離した。ついでプラスミドpSザイムをSalIおよびNotIで消化した。生じた断片は直線状であった。DNAリガーゼを使用して、あらかじめ直線化したpRCプラスミド(商標)(インビトロジェン、カタログ#V750-20)へこのSalI-NotI断片およびSalI-HindIIIリンカーをライゲーションした。

【0063】

ついで新たに作成した配列番号2を含んでいるpRC/ザイム・ベクターでコンピテント・エシェリキア・コリ細胞をトランスフェクトし、これをアンピシリン含有培地で増殖することにより、アンピシリン耐性遺伝子を含んでいる細胞を選び出した。

【0064】

エシェリキア・コリへpRC/ザイム・ベクターをトランスフェクトしたのち、pRC/ザイムベクターを単離するため、引き続きプラスミド調製品を作成した。293細胞をpRC/ザイム・ベクターでトランスフェクトするため、チェンおよびオカヤマが開発した方法を用いた[C. チェン(Chen)およびH. オカヤマ(Okayama)、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、7巻、2745頁(1987年)]。これらの細胞を実施例2で報告する細胞培養検定に使用した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

293細胞内で安定な形質転換体を生産するため、抗生物質G418（ゲネチシン）による選択をこの段階に加えた。ついでG418の存在で生育したコロニーをザイムの供給源として使用した。

【 0 0 6 6 】

実施例 2：細胞培養検定

ヒト胎児性腎細胞（293細胞）をpRcザイムとAPP暗号化ベクターで同時トランスフェクトした。一方の場合は、695アミノ酸のAPPを暗号化しているベクター（クニッツ様ドメインを欠いている）をpRcザイムとともに同時トランスフェクトした。また他方

10

【 0 0 6 7 】

トランスフェクションは標準的なリン酸カルシウム・トランスフェクションを用いて達成した。サンプルックら（前掲）が報告したようなそれ以外のトランスフェクション・プロトコールでも有効であった。695アミノ酸（KPIを含まず）のAPP暗号配列を使用すると、サンプルックら（前掲）が報告したようなAPPタンパク質のカルボキシ末端アミノ酸に対する抗血清を使用するウエスタン・プロット分析により、アミロイド原性断片が検出された。この方法では、オルタースドルフら〔T.オルタースドルフ（O l t e r s d o r f）ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y）、265巻、4492～4497頁（1991年）〕が報告した抗BX6を使用した。751アミノ酸（KPIを含む）のAPPを使用すると、アミロイド原性断片は検出されなかった。

20

【 0 0 6 8 】

実施例 3：HPLC検定

APPを暗号化しているバキュロウイルスで感染させた細胞で、完全鎖長のAPPを生産する。この方法は、クノップスらの方法〔J.クノップス（K n o p s）ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、266巻、7285頁（1991年）〕によって達成される。ついで活性ザイムおよび試験化合物の存在でAPPをインキュベートする。そのあとAPP断片を高速液体クロマトグラフィーによって分離する。それぞれブールした断片をヒルズおよびチマシェフの方法〔ヒルズおよびチマシェフ編、メソッズ・イン・エンジモロジー、91巻、第VおよびVI節（1983年）〕のような標準的な方法を用いて微量配列決定する。生成したアミロイド原性断片（M e t₅₉₆またはA s p₅₉₇の何れかで終わる）の量を、試験化合物が存在しない場合に生じる量と比較して、試験化合物のザイムに与える影響の強さを決定する。

30

【 0 0 6 9 】

実施例 4：ザイム/クニッツ様ドメインの競合検定

APPのKPIDメインのペプチドを合成し、これを同位元素ヨウ素-125（¹²⁵I）で標識する。ついでJ. P. ベンネットおよびH. ヤマムラの方法〔ニューロトランスミッター・レセプター・バインディング、61巻、（1985年）〕に従って、競合結合検定を実施する。ついで従来のELISA検定の場合と同様に、ザイムをプラスチック微量滴定板ウエルへ結合させる。この段階の代表的なプロトコールの1つはF. アウスベルが報告している〔カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、2巻、11.1～11.3（1989年）〕。引き続き、放射能標識したKPIDメインおよび未標識競合化合物を96穴の微量滴定板ウエルへ添加する。ついでウエルを洗浄する。ザイムに対する未標識競合化合物の比親和性を計算するため、残留する同位元素を記録する。

40

【 0 0 7 0 】

実施例 5：ゲノムクローンの単離

カロン21Aバクテリオファージ内のヒト染色体19ゲノムライブラリーに特異的なゲノムライブラリーをアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、12301、パーク

50

ローン・ドライブ、ロックビル、マリーランド、USA 20852 (ATCC) (カタログ番号 57711) から購入した。これらのファージをエシェリキア・コリ K802 *recA*⁻ 宿主株 (カタログ番号 47026) へトランスフェクトした。ファージの力価は、1 マイクロリットル当たり $6.5 \sim 7.0 \times 10^4$ プラーク形成単位であった。ザイムを暗号化している遺伝子のゲノムクローンを、ファージライブラリーの通常のスクリーニング [例えば サンプルックら、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル、2.6 ~ 2.114 (1989 年) 参照] によって単離した。

【0071】

ポリメラーゼ連鎖反応 [例えば ショワルター (Schowalter) および ゾンマー (Sommer)、アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、177 巻、90 ~ 94 頁 (1989 年) が報告したような] を利用して、EcoRI/NotI 精製した [バイオ・ラド・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories)、P.O. ボックス 708、ロックビル・センター (Rockville Centre)、ニューヨーク (New York)、USA、11571、カタログ番号 732-6010) pRc - ザイム DNA 断片へ配列番号 5 および配列番号 6 のプライマーを特異的にアニーリングすることにより、放射能標識した cDNA プローブを合成した。

【0072】

ゼータ・プローブ (Zeta-Probe) (商標)・プロットティング・メンブランの使用説明書 (バイオ・ラド、カタログ番号 164-0153) の記載に従い、ハイブリダイゼーションおよび洗浄を 65 °C で実施した。推定初代ザイム・バクテリオファージをクロロホルム 2 ~ 3 滴を含有する SM 緩衝液中に貯蔵した。ついで単一で均質なプラーク (711-4) を 3 次スクリーンから単離した。ザイムへのイン・シトウ・ハイブリダイゼーションによって陽性であった λ -バクテリオファージ DNA の単離を標準的な手技を用いて達成した。

【0073】

精製した λ -ファージ・ザイム DNA を HindIII で消化し、1% アガロース / TBE [0.1 M トリス - HCl (pH 8.3)、0.1 M ほう酸、1 mM エチレンジアミン四酢酸] ゲルで電気泳動した。ついで分離した DNA を、ゼータ・プローブ (商標) 使用説明書の 2.5 節に記載された非変性条件 [0.5 $\times$ TBE 泳動緩衝液、80 ボルト (一定)、1 時間]、ついでゼータ・プローブ (商標) 使用説明書の 2.8 節に記載された変性条件 [0.4 M NaOH、10 分間] を用いて、ゼータ・プローブ (商標)・プロットティング・メンブラン上へ移動させた。

【0074】

pRc / ザイムの BamHI / XbaI 断片を含んでいる放射能標識したプローブを、ランダム・プライミングした DNA 標識キット (例えば ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション (Boehringer Mannheim Corporation)、9115、ヘグ・ロード (Hague Road)、P.O. ボックス 50414、インジアナポリス (Indianapolis)、インジアナ (Indiana)、USA、46250-0414、カタログ番号 1004760 により商業的に入手可能である) とともに使用し、本発明のクローン中に 3' 暗号配列が見つかるかどうかを測定した。上記のゼータ・プローブ (商標)・メンブランへ前述のようにハイブリダイゼーションおよび洗浄を実施し、オートラジオグラフィーによりザイムの 3' 領域との相同性を明らかにした。

【0075】

5' ザイムのコード領域を含んでいるファージ 711-4 を確かめるため、配列番号 7 および配列番号 8 を使用するポリメラーゼ連鎖反応をもう一度利用してカインツらの方法 [カインツ (Kainz) ら、アナリティカル・バイオケミストリー、202 巻、46 頁 (1992 年)] に従い、3 次プラーク精製した染色体 19 ザイム・ファージ DNA から 470 塩基対のバンドを増幅した。この DNA 断片を精製し、ついで pUc19 発現プラス

10

20

30

40

50

ミドへ前述のようにサブクローンした。5' ザイム cDNA コード領域の 1 ~ 33 配列、および 5' ザイムコード領域の上流の追加的な 272 ヌクレオチドに対応する DNA 配列の同一性を標準的な手技を用いる DNA 配列分析によって確認した。

【0076】

ブラスミドの寄託:

ブダペスト条約 [ザ・ブダペスト・トリーティー・オン・ジ・インターナショナル・レコグニション・オブ・ザ・デポジット・オブ・マイクロオーガニズムス・フォア・パーパシズ・オブ・パテント・プロシデュアズ (the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for Purposes of Patent Procedures)] の規定に従い、下記の培養を、ザ・ノーザン・レジオナル・リサーチ・センター (NRRL)、アグリカルチュラル・リサーチ・サービス、U.S. デパートメント・オブ・アグリカルチャー、1815 N. ユニバーシティー・ストリート、ペオリア、イリノイズ、61604 へその永久保存株として寄託した。

10

【0077】

寄託物質

受入番号

エシェリキア・コリ K12 / pS ザイム

NRRL B-18971

フロントページの続き

- (72)発明者 エドワード・マリオン・ジョンストン
アメリカ合衆国 4 6 2 2 0 インディアナ州インディアナポリス、イースト・シックスティナインス
・ストリート 5 1 2 9 番
- (72)発明者 シーラ・パークス・リトル
アメリカ合衆国 4 6 2 0 8 インディアナ州インディアナポリス、ノース・メリディアン・ストリー
ト 4 4 8 0 番
- (72)発明者 フランクリン・ハーポルド・ノリス
アメリカ合衆国 4 6 2 3 7 インディアナ州インディアナポリス、サウス・アーリントン・アベニュー
5 5 1 8 番

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 国際公開第 9 2 / 0 0 7 0 6 8 (WO, A 1)
国際公開第 9 1 / 0 1 3 9 0 4 (WO, A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
MEDLINE(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq