(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2004 年12 月9 日 (09.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/106514 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/09, C07K 1/22, 16/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007575

(22) 国際出願日: 2004 年5 月26 日 (26.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-153363 2003 年5 月29 日 (29.05.2003) JP
特願2003-273076 2003 年7 月10 日 (10.07.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 嘉屋 元博 (KAYA, Motohiro) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 田村 範子 (TAMURA, Noriko) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 武内 純子 (TAKEUCHI, Junko) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 田村 具博 (TAMURA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** METHOD OF RECOVERING PROTEIN BY DEUBIQUITINATING UBIQUITINATED PROTEIN

(54) 発明の名称: ユビキチン化タンパク質からユビキチンを外しタンパク質を回収する方法

(57) **Abstract:** A method of recovering protein having been ubiquitinated, comprising recovering ubiquitinated protein with the use of a specific antibody capable of recognizing ubiquitin chains through immunological means, such as affinity chromatography or immunoprecipitation, and deubiquitinating the recovered ubiquitinated protein with the use of a deubiquitinating enzyme. There is provided a method of recovering protein decomposable through ubiquitin-dependent protein decomposition pathway of a sample with the use of an anti-ubiquitin chain antibody and a deubiquitinating enzyme.

(57) 要約: ユビキチン鎖を認識する特異的抗体を用いてユビキチン化タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降法等の免疫学的手法により回収し、脱ユビキチン化酵素を用いて回収したユビキチン化タンパク質からユビキチンを外し、ユビキチン化されていたタンパク質を回収する方法の提供。 抗ユビキチン鎖抗体および脱ユビキチン化酵素を用いて試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質を回収する方法。

WO 2004/106514 A1

明 細 書

ユビキチン化タンパク質からユビキチンを外しタンパク質を回収する方法

技術分野

本発明は、真核細胞内におけるユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解されるタンパク質群を同定する技術に関するものである。さらに詳しくは、ユビキチン鎖を認識する特異的抗体を固定したアフィニティー担体を用いてユビキチン化タンパク質を該担体に結合させ、非吸着タンパク質を除去した後に、脱ユビキチン化酵素を添加することで、ユビキチン化タンパク質のユビキチンを切り離しユビキチン化されていたタンパク質を遊離させ回収する方法に関する。

背景技術

ユビキチンは、76アミノ酸からなる酵母からヒトに至るまで高度に保存されているタンパク質である(配列番号 1)。このタンパク質は、元々ヌクレオソームの構成成分であるヒストン2HAにイソペプチド結合しているタンパク質として同定されていたが、細胞内のタンパク質分解における分解シグナルとして機能することが判明して以来、ユビキチン依存性タンパク質分解系の研究が大きく進展した。ユビキチンは、E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチンリガーゼ)の 3 種の酵素群の協調的反応により標的タンパク質のリジン残基のε-アミノ基にユビキチンのC末端グリシンがイソペプチド結合させられ、標的タンパク質上にユビキチン分子が1 分子結合することから反応は開始する。その後、タンパク質に結合したユビキチンのリジン残基のε-アミノ基に別のユビキチンのC末端グリシンがイソペプチド結合し、この反応が繰り返されることで、複数のユビキチンが結合したユビキチン鎖を形成する。このユビキチンが4分子以上連結することにより、初めて分解シグナルとしてタンパク質分解酵素である26Sプロテアソームにより認識され分解される(Thrower, J. S., et al., EMBO J., 19, 94-102(2000))。分解シグナルであるユビキチン鎖は、標的タンパク質分解時に脱ユビキチン化酵素により遊離型ユビキチン分子へと分解され、ユビキチンは

再利用されることが知られる(Hershko, A., & Ciechanover, A., Annu. Rev. Biochem., 67, 425-479(1992))。

標的タンパク質へのユビキチン付加反応に対してユビキチンを外す機構は、脱ユビキチン化反応と言われ、細胞内には複数の脱ユビキチン化酵素(DUB: de-ubiquitinating enzyme)が存在していることが知られる。脱ユビキチン化酵素は、一次構造の相同性からユビキチン C 末端加水分解酵素(UCH: ubiquitin C-terminal hydrolase)とユビキチン特異プロテアーゼ(UBP: ubiquitin specific protease)に大別される。出芽酵母においては、UCH に分類される酵素が 1 種類、UBP に分類される酵素が 16 種類存在する。UBP 酵素は、システインボックスとヒスチジンボックスと言われる保存された領域をもち、その他に保存されているアスパラギン酸残基と共に活性中心を形成している(Hochstrasser, M., Annu. Rev. Genet., 30, 405-439(1996))。それぞれの UBP タンパク質について、遺伝学的手法や生化学的手法で解析が行われているが、全ての UBP について調べられているわけではなく UBP8, 12, 13, 15, 16 についての報告はまだ無い。また脱ユビキチン化酵素については酵母以外のタンパク質について 4 件特許が出願されている(特開 2000-125880 号公報、特開 2001-128680 号公報、特開 2002-300880 号公報、特開 2003-070498 号公報)。

細胞内の多数の機能タンパク質がユビキチン依存的に分解されることが知られており、このことは、細胞の機能はタンパク質の分解制御によって大きく左右されることを意味する。事実、ユビキチン依存性タンパク質分解系は、細胞周期の制御に大きく関与しているほか(Huibregtse, J. et al., Science, 274, 1652-1659(1996))、シグナル伝達(Joazeiro, C. A. P., Science, 286, 309-32(1999); Jiang, J., & Struhl, G., Nature, 391, 493-496(1998))、転写(Conaway, R. C., et al., Science, 296, 1254-1258(2002))、アポトーシス(Jesenberger, V., & Jentsh, S., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3, 112-112(2002))、小胞体内タンパク質の品質管理(Hiller, M. M. et al., Science, 273, 1725-1728(1996); Plemper, R. K., & Wolf, D. H., Trends Biochem. Sci., 24, 266-270(1999))、MHC-classI 抗原プロセシング(Kloetzel, P.-M., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2, 179-187(2001))、発癌(Lisztwzn, J. et al., Genes Dev., 13,

1822-1833(1999); Higashitsuji, H. et al., Nature Med., 6, 96-99(2000))、ウイルス感染(Ferrel, K. et al., Trends Biochem. Sci., 25, 83-88(2000))、神経変性疾患(Kishino, T., et al., Nature Genet., 15, 70-73(1997); Shimura, H., et al., Nature Genet., 25, 302-305(2000))など多くの生体反応に関与している。

このことから、ユビキチン化タンパク質を同定する技術は、生体反応を理解する上で欠かせない基盤技術になると考えられる。しかし、現在進められているプロテオーム解析を用いた手法では、ユビキチン化タンパク質の同定は容易ではない。なぜなら、タンパク質にユビキチンが結合する数は一定ではなく不特定数結合することが大きな理由として挙げられる。即ち、ユビキチンが1分子標的タンパク質に結合する毎に分子量と等電点が変化するため、2次元電気泳動後に特定のスポットとして認識することは困難だからである。従って、他の手法を用いてユビキチン化タンパク質を同定する技術の開発が必要であり、これまで幾つかの手法が開発されている。最初に、ユビキチン鎖に対する特異的モノクローナル抗体FK2(特開平7-238096号公報)を用いてユビキチン化タンパク質を精製後、該タンパク質をリジルエンドペプチダーゼで分解し、その分解産物を解析する方法が挙げられる(Takada, K., et al., Biochem. J., 356, 199-206(2001))。次に、酵母細胞内にアフィニティー精製可能な異なるタグを融合させたユビキチンを2種類同時に発現させ、ユビキチン化タンパク質を2段階のアフィニティー精製により回収し、その後、精製ユビキチン化タンパク質を質量分析へ供する方法が開発されている(第25回分子生物学会大会要旨、横浜(2002))。更に、出芽酵母由来Rad23タンパク質の分子内に内包するユビキチン結合領域(UBA domain: ubiquitin associated domain)を介してユビキチン化タンパク質を回収することが可能であることが発表され(Chen, L., & Madura, K., Mol. Cell. Biol., 22, 4902-4913(2002))、この手法を用いたユビキチン化タンパク質濃縮キットが販売されている(CALBIOCHEM社)。同様にUBAペプチドをアガロースに架橋したアフィニティー精製担体、ポリユビキチンを認識する26Sプロテアソーム成分S5aをアガロースビーズに共有結合させたアフィニティー精製担体などが市販されている(Affiniti社)。これらいずれの方法においても、ユビキチン化タンパク質を濃縮

することは出来るが、そのままではユビキチン化されたタンパク質1分子に対し複数分子のユビキチンが結合した状態で解析する必要がある。ユビキチン化タンパク質の解析には、質量分析計等を用いた方法が最も適していると考えられるが、タンパク質分解酵素で処理したユビキチン化タンパク質は、ユビキチン化されたタンパク質由来ペプチドに対して大きくモル比の異なるユビキチン由来ペプチドが混在するため、その解析は容易ではなく、HPLCなどでペプチドを分離する必要がある。このような状況下、ユビキチン化タンパク質の同定技術の改良が望まれている。

特許文献1　特開2000-125880号公報

特許文献2　特開2001-128680号公報

特許文献3　特開2002-300880号公報

特許文献4　特開2003-070498号公報

特許文献5　特開平7-238096号公報

非特許文献1　Hochstrasser, M., Annu. Rev. Genet., 30, 405-439(1996)

非特許文献2　Takada, K., et al., Biochem. J., 356, 199-206(2001)

非特許文献3　第25回分子生物学会大会要旨、横浜(2002)

非特許文献4　Chen, L., & Madura, K., Mol. Cell. Biol., 22, 4902-4913(2002)

発明の開示

本発明では、ユビキチン化タンパク質を濃縮・精製可能なモノクローナル抗体を作製後、該抗体をセファロースに共有結合させたアフィニティー精製用担体を作製し、ユビキチン化タンパク質を濃縮する方法を確立する。一方、ユビキチン化タンパク質からタンパク質を外すため、組換え脱ユビキチン化酵素を調製する。最終的に、ユビキチン化タンパク質をアフィニティー精製担体により濃縮後、脱ユビキチン化酵素添加によりタンパク質からユビキチンを外し、該タンパク質を回収する一連の反応系を構築することである。

本発明を解決するために、大きく3つの要素が挙げられる。すなわち、ユビキチン鎖に対する特異的モノクローナル抗体の作製、組換え脱ユビキチン化酵素の

生産およびユビキチン化タンパク質の精製並びにユビキチンを外したタンパク質の回収である。

ユビキチン鎖に対するモノクローナル抗体の作製は、抗原となるユビキチン化リゾチームを作製しマウスに免疫する。免疫処理後、常法に従いハイブリドーマを作製しユビキチン化リゾチームを抗原としたELISAを行い、ユビキチン化リゾチームに反応する抗体産生細胞を選別する。その後、ユビキチン単独、あるいはリゾチーム単独に反応する抗体産生細胞を除いていくことで、ユビキチン鎖特異的な抗体産生細胞を選択する。最終的に得られた抗体産生細胞を用いて抗体を調製する。

次に、組換え脱ユビキチン化酵素を作製する。脱ユビキチン化酵素は、同一種において複数存在しており、どの酵素を選択すれば良いのか判断が難しい。従って、ゲノム情報が明らかで脱ユビキチン化酵素の情報が得られる出芽酵母に焦点を絞って組換え脱ユビキチン化酵素を大腸菌を宿主として発現させる。計16種類の組換え脱ユビキチン化酵素を生産し、ユビキチン化リゾチームをモデル基質として脱ユビキチン化反応を確認する。同時に、リゾチーム以外の基質として、蛍光タンパク質を改変し、ユビキチン化させたユビキチン化蛍光タンパク質も同様にモデル基質として用いる。16 種類のUBPの中から、実験に最も適したUBPを選択し系の構築に用いる。

最後に、調製した上記抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体をセファロースビーズに共有結合させ、アフィニティー精製用担体を作製する。その後、該担体をユビキチン化リゾチームを含む水溶液に加え、攪拌し、ユビキチン化リゾチームを精製担体に吸着させる。ユビキチン化リゾチーム吸着後の担体を回収した後、組換え脱ユビキチン化酵素を添加しユビキチン鎖の分解を進める。この反応により、ユビキチン化リゾチームからユビキチンが取り除かれると同時にリゾチームが精製担体より外れ、ユビキチンの付加していないリゾチームが回収できるはずである。

以上手法を基本として、培養細胞をはじめ生体試料からユビキチン化タンパク質を精製・濃縮し、脱ユビキチン化酵素を用いてタンパク質からユビキチンを切り放して該タンパク質を回収する技術を開発することとした。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 抗ユビキチン鎖抗体および脱ユビキチン化酵素を用いて試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質を回収する方法、

[2] 固定化用支持体に固定化した抗ユビキチン鎖抗体と試料を接触させ、ユビキチン化タンパク質を固定化用支持体に固定化した抗ユビキチン鎖抗体と結合させる工程、固定化した抗ユビキチン鎖抗体に結合していない試料中の成分を除去する工程、および抗体に結合したユビキチン化タンパク質に脱ユビキチン化酵素を接触させ、タンパク質をユビキチンから切り離す工程を含む、[1]のユビキチン化を受けるタンパク質を回収する方法、

[3] 抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する、[1]または[2]の方法、

[4] 抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端アミノ酸配列LHLVLRLRGGに含まれるエピトープを認識する、[3]の方法、

[5] 脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP1からUBP16の少なくとも1つである、[1]から[4]のいずれかの方法、

[6] 脱ユビキチン化酵素が、それぞれ配列番号20、25、30、35、38、41、46、49、52、55、58、63、66、69、74および77で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするユビキチン化酵素の少なくとも1つである、[1]から[4]のいずれかの方法、

[7] 脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP12である、[5]の方法、

[8] 脱ユビキチン化酵素が配列番号63で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするユビキチン化酵素である、[6]の方法、

[9] 脱ユビキチン化酵素がそれぞれ配列番号80、83、86および89で表される塩基配列からなるDNAがコードするUBP12の変異体、および該DNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードする

UBP12の変異体である、[1]から[4]のいずれかの方法、

[１０] [1]から[9]のいずれかの方法により回収したタンパク質を質量分析により同定する、試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質の同定方法、

[１１] [1]から[9]のいずれかの方法により回収したタンパク質を一次元あるいは二次元電気泳動分析により同定する、試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質の同定方法、

[１２] [1]から[9]のいずれかの方法により回収したタンパク質を一次元あるいは二次元電気泳動法により単離し、アミノ酸配列を決定する[１１]のタンパク質の同定方法、

[１３] ユビキチンのC末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する抗ユビキチン鎖抗体、

[１４] ユビキチンのC末端アミノ酸配列LHLVLRLRGGに含まれるエピトープを認識する、[１３]の抗ユビキチン鎖抗体、

[１５] 抗ユビキチン鎖抗体および脱ユビキチン化酵素を含む生体内でユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質を回収するためのキット、

[１６] 抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する、[１５]のキット、

[１７] 抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端アミノ酸配列LHLVLRLRGGに含まれるエピトープを認識する、[１６]のキット、

[１８] 脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP1からUBP16の少なくとも１つである、[１５]から[１７]のいずれかのキット、

[１９] 脱ユビキチン化酵素が、それぞれ配列番号２０、２５、３０、３５、３８、４１、４６、４９、５２、５５、５８、６３、６６、６９、７４および７７で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするユビキチン化酵素の少なくとも１つである、[１５]から[１７]のいずれかのキット、

[２０] 脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP12である、[１８]のキット、

[２１] 脱ユビキチン化酵素が配列番号６３で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするユビキチン化酵素である、[１９]のキット、

[２２] 脱ユビキチン化酵素がそれぞれ配列番号８０、８３、８６および８９で表される塩基配列からなるDNAがコードするUBP12の変異体、および該DNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするUBP12の変異体である、[１５]から[１７]のいずれかのキット、ならびに

[２３] 配列番号８０、８３、８６および８９で表される塩基配列からなるDNAがコードするUBP12の変異体、および該DNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするUBP12の変異体。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-153363、2003-273076号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１は、ユビキチン化リゾチームの電気泳動の結果を示す写真である。ユビキチン化リゾチームの反応開始後、30分おきに一部を回収し、それぞれ15μlをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。タンパク質はクーマーシーブリリアントブルーにより染色した。

図２は、調製したモノクローナル抗体群の認識特異性を示す写真である。レーン１に300ngのリゾチーム、レーン２に1μgのユビキチン、レーン３に実施例３で調製したユビキチン化リゾチーム4μlをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、実施例４で調製した抗ユビキチン抗体、抗リゾチーム抗体そして抗ubiquitin-X抗体を用いてウエスタンブロッティング法でタンパク質を検出した。

図３Ａは、Ub-ECFPに対する抗ubiquitin-X抗体の特異性を示す写真である。精製Ub-ECFPに調製したFraction II添加の有無により、Ub-ECFPからUbが切断され、それに伴い抗ubiquitin-X抗体はUb-ECFPを認識できなくなることがわかる。

図３Ｂは、Ub-ECFPを用いて調製したユビキチン化ECFPに対する抗ubiquitin-X抗体の認識特異性を示す写真である。抗ubiquitin-X抗体はユビキチン化されたECFPのみを認識する。

図４は、抗ubiquitin-X抗体認識部位の模式図を示す図である。抗ubiquitin-X抗体はユビキチンC末端と結合するタンパク質のリジン残基を含む、結合領域を認識する。このとき、ユビキチン-ユビキチン間あるいはユビキチン-タンパク質間のイソペプチド結合、並びにユビキチンとタンパク質の融合領域も同様に認識する。

図５は、酵母由来脱ユビキチン化酵素の活性測定の結果を示す写真である。酵母由来の16種類のUBPを組換えタンパク質として大腸菌内で生産し、該大腸菌細胞の粗抽出分画をユビキチン化リゾチームと反応させた後電気泳動に供した。電気泳動後に抗ubiquitin-X抗体で脱ユビキチン化反応を確認した。各レーンの内、(-)で表示したものは、UBPを発現していない大腸菌から調製した粗抽出分画を示す。ラダーが消失しているレーンはユビキチン化リゾチームから脱ユビキチン化が起こっていることを示す。

図６Ａは、ユビキチン化ECFPを用いてのUBP2, UBP3, UBP10, UBP12の比較を示す写真である。UBP2, UBP3, UBP10, UBP12を大腸菌で発現後、簡易精製しユビキチン化ECFPに対して脱ユビキチン化活性を調べた。反応後のタンパク質を電気泳動で分離し、抗ubiquitin-Xを用いたウエスタンブロッティング法にて脱ユビキチンの程度を比較した。

図６Ｂは、ユビキチン化リゾチームを用いてのUBP2, UBP3, UBP10, UBP12の比較を示す写真である。UBP2, UBP3, UBP10, UBP12を大腸菌で発現後、簡易精製しユビキチン化リゾチームに対して脱ユビキチン化活性を調べた。反応後のタンパク質を電気泳動で分離し、抗ubiquitin-Xを用いたウエスタンブロッティング法にて脱ユビキチンの程度を比較した。

図６Ｃは、Ub-ECFP融合タンパク質を用いてのUb-ECFP融合タンパク質UBP2, UBP3, UBP10, UBP12の比較を示す写真である。UBP2, UBP3, UBP10, UBP12を大腸菌で発現後、簡易精製しUb-ECFP融合タンパク質に対して脱ユビキチン化活性を調べた。反応後のタンパク質を電気泳動で分離し、抗ubiquitin-Xを用いたウエ

スタンブロッティング法にて脱ユビキチンの程度を比較した。

図７Ａは、野生型UBP12遺伝子を発現させ精製した組換えUBP12の電気泳動パターンを示す写真である。

図７Ｂは、UBP12遺伝子に変異導入後のUBP12の電気泳動パターンを示す写真である。

図７Ｃは、UBP12-FLAGの精製タンパク質の電気泳動パターンを示す写真である。

図８は、ユビキチン化リゾチームからリゾチームの回収の結果を示す写真である。ユビキチン化タンパク質を抗ubiquitin-X抗体セファロースと混合する前の試料(30μl)(レーン1)、セファロースと転倒混和後の非吸着分画(30μl)(レーン2)、セファロース洗浄後にUBP添加(レーン4)あるいは未添加(レーン3)で脱ユビキチン反応させた反応液(30μl)をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離後、実施例4で作製した抗リゾチーム抗体を用いてウエスタンブロッティング法で解析した。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

１．ユビキチン鎖に対するモノクローナル抗体の作製

本発明で用いる抗体は、ユビキチンが連結してできたユビキチン鎖を認識する抗体であり、単体のユビキチンを認識しない抗体である。ユビキチンは標的タンパク質に結合してはじめてユビキチン鎖として存在し得るので、このような抗体を得るには、抗体を産生させる動物において、ユビキチン鎖が認識されればよい。ユビキチン鎖のみを免疫原として用いるのは困難であるので、ユビキチン鎖が結合した標的タンパク質（ポリユビキチン化標的タンパク質）を抗原として用いればよい。標的タンパク質はユビキチン鎖が結合し得る限り限定されない。このような標的タンパク質は、生体内でユビキチン依存的に分解されるタンパク質であり、分子中の適当な位置に１個以上のリジン残基を有するタンパク質である。

本発明の抗ユビキチン鎖抗体の作製に用い得るタンパク質として、例えば、リゾチーム、ヘモグロビン、リボヌクレアーゼA等が挙げられる。これらの標的タンパク質へのユビキチン鎖の結合は、標的タンパク質のユビキチン化に必要な酵

素、およびATP存在下で標的タンパク質と、遊離型のユビキチンを混合反応させればよい。ユビキチン化に必要な酵素としてはE1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）およびE3（ユビキチン識別タンパク質）からなる酵素群が挙げられ、例えばウサギの網状赤血球から公知の方法で取得することができる。

この際、標的タンパク質をあらかじめ熱変性させておいてもよい。

本発明の抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のように公知の手段で作製することができる。

すなわち、上記ユビキチン鎖が結合したタンパク質を免疫原として用いて、通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

まず、上記免疫原で動物を免疫する。免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択すればよい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。免疫したマウスの脾細胞またはリンパ節細胞とマウスのミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマの培養上清又は該ハイブリドーマを腹腔内に投与して産生されるマウスの腹水から調製することができる。ミエローマ細胞は、一般に被免疫動物と同種の動物より得られたものを用いるが、異種間でも可能な場合がある。また、免疫されていない動物の脾細胞またはリンパ節をin vitroで免疫して、感作細胞を得ることもできる。動物の免疫は、公知の方法に従って行えばよい。例えば、免疫原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射する。具体的には、免疫原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに必要に応じてアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に数日毎に数回投与する。

免疫した動物の血清の抗体価が十分に上昇した時点で、動物から免疫細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合させる。免疫細胞としては、脾細胞、リンパ節細胞等を用いることができる。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株を使用することができ、例えば、P3（P3x63Ag8.653）（J. Immnol.（1979）123, 1548-1550）、

P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler. G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies. D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler. G. and Milstein, C.、Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に従い行うことができる。細胞融合は、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等を融合促進剤として用いて行う。また、電気細胞融合の技術を用いて行ってもよい。融合時の免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1～10 倍とするのが好ましい。免疫細胞とミエローマ細胞を MEM 培養液等の培養液中でよく混合し、予め 37℃程度に加温した PEG 溶液（平均分子量 1000～6000 程度）を 30～60％ (w/v) の濃度で添加し、混合することによってハイブリドーマが得られる。

このようにして得られたハイブリドーマは、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）等の選択培養液で培養することにより選択する。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、目的とする抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。

ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の免疫化学的方法で実施することができ、例えば ELISA 法、ウエスタンブロット法等が利用できる。この際、ユビキチン鎖のみを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択するためには、ユビキチン鎖を結合させた標的タンパク質を認識するが、標的タンパク質単独および遊離型のモノユビキチンを認識しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択すればよい。ユビキチン鎖を認識する抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液

体窒素中で長期保存することも可能である。

ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、ハイブリドーマを通常の方法で培養し、その培養上清として得ることもできるし、またハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得ることもできる。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

ハイブリドーマ上清またはマウス腹水からのモノクローナル抗体の調製は、当業者に知られた免疫グロブリン精製法を用いればよく、例えば、硫安分画法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等により行うことができる。

このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体は、ユビキチンが連結したユビキチン鎖を認識する。本発明の抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体は、標的タンパク質にイソペプチド結合しているユビキチンのC末端の結合領域を認識するものであってもよいし、モノユビキチンどうしがイソペプチド結合している結合領域を認識するものでもよいし、ユビキチン鎖の連結により形成される立体構造を認識するのもでもよい。好適には、ユビキチンのC末端領域を含むアミノ酸配列と、そこへ結合しているタンパク質との結合領域を認識する抗体を用いる。このような結合領域の配列として配列番号１５で表されるアミノ酸配列が例示できる。従って、本発明のモノクローナル抗体は、配列番号１５で表されるアミノ酸配列を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体を含む。

２．組換え脱ユビキチン化酵素の生産

脱ユビキチン化酵素（DUB）は、ユビキチン化タンパク質からユビキチンを切り離す酵素である。酵母やショウジョウバエなどの種々の生物種由来の種々の脱ユビキチン化酵素がしられており、本発明においてこれらの脱ユビキチン化酵素を用いることができる。脱ユビキチン化酵素にはUCHおよびUBPの２つのタイプが存在するが、本発明の方法においてはいずれのタイプの脱ユビキチン化酵素も使用することができる。例えば、出芽酵母では１７種類の脱ユビキチン化酵素が知られており、そのうちYuh1以外の16種類がUBP群に属する（UBP１～UBP16）。一方、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）に対し、同じ酵母で解析が進んでいる

分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)由来UBPの情報は少なく、サンガー研究所の分裂酵母のゲノムデータベース(http://www.genedb.org/genedb/pombe/index.jsp)によるとubpとしては16種類見つかっており、現在までに得られる情報はubp5とubp15に対する報告(Richert, K. et al., Mol. Genet. Gomonics, 267, 88-95(2002))とubp12に対する報告(Zhou, C. et al., Mol. Cell, 11, 9227-938(2003)の2報が挙げられる。分裂酵母ubp12は組換えタンパク質として生産されその生化学的情報も一部明らかとなっている。出芽酵母と分裂酵母のUBP間の相同性を遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX(株式会社ゼネティクス社製)を用いてグローバルホモロジー解析を行うと、UBPホモローグ間の相同性は48～75%を示しそれほど高くない。またそれぞれのタンパク質の全長もほぼ同じサイズ(例、UBP6(出芽酵母由来、499アミノ酸)に対してubp6(分裂酵母由来、467アミノ酸))から数百アミノ酸長さが異なるもの(例、UBP12(出芽酵母由来、1254アミノ酸)に対してubp12(分裂酵母、979アミノ酸)まで様々である。従って、UBPの選択には相同性だけで判断するのは注意が必要である。脱ユビキチン化酵素については、例えば、実験医学　増刊　タンパク質分解の最前線2001　田中啓二他　編集　羊土社　2001年1月30日発行等に記載されている。

好適には、出芽酵母由来の脱ユビキチン化酵素（UBP1～UBP16）を用いる。脱ユビキチン化酵素は、天然のものを単離精製して用いることもできるが、大量安定生産の観点からは、組換え酵素を用いるのが好ましい。UBP１～UBP16をコードする遺伝子の塩基配列は公知であり、該公知の配列情報に基づいて公知の手法を用い酵母ゲノムDNAからUBP１～UBP16をコードする塩基配列を取得することができる。例えば、配列情報に基づいて増幅用プライマーを設計・製造し、該プライマーを用いて脱ユビキチン化酵素をコードする遺伝子を増幅すればよい。得られた塩基配列を発現ベクターに組込むことにより、それぞれの脱ユビキチン化酵素発現用ベクターを得ることができ、該発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、培養することにより、UBP１～UBP16を得ることができる。

ベクターとして、プラスミド、ファージ、ウイルス等の宿主細胞において複製可能である限りいかなるベクターも用いることができる。例えば、pBR322、pBR325、

pUC118、pUC119、pKC30、pCFM536等の大腸菌プラスミド、pUB110等の枯草菌プラスミド、pG-1、YEp13、YCp50等の酵母プラスミド、λgt110、λZAPII等のファージのDNA等が挙げられ、哺乳類細胞用のベクターとしては、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40とその誘導体等が挙げられる。ベクターは、複製開始点、選択マーカー、プロモーターを含み、必要に応じてエンハンサー、転写終結配列(ターミネーター)、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル等を含んでいてもよい。

ベクターは、商業的に入手可能なものを使用することができ、例えば細菌性のものではpET22b、pET28a、pET3a、pET3b、pET3c、pET-11a(Novagen)、pEF1、pPROEX(Invitrogen)、pQE30、pQE31、pQE32、pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX-5X-3、pBluescriptII KS、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T(Pharmacia)、pUC118(宝酒造)、真核性のものではpXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、SV40(Pharmacia)等がある。

複製開始点として、大腸菌ベクターに対して、例えばColiE1、R因子、F因子由来のものが、酵母ベクターに対して、例えば2μmDNA、ARS1由来のものが、哺乳類細胞用ベクターに対して、例えばSV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス由来のものを用いることができる。また、プロモーターとしてアデノウイルス又はSV40プロモーター、大腸菌lacまたはtrpプロモーター、ファージラムダPLプロモーター、酵母用としてのADH、PHO5、GPD、PGK、AOX1プロモーター、蚕細胞用としての核多角体病ウイルス由来プロモーター等を用いることができる。また、組込んだ遺伝子を誘導的に発現させることもでき、この場合は、プロモーターとしてプロモーター下流の遺伝子の発現を誘導し得るものを用いる。

選択マーカーとして、大腸菌用ベクターには、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を、酵母用ベクターには、LEU2、TRP1、URA3遺伝子等を、哺乳類細胞には、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いることができる。

DNAのベクターへの導入は、任意の方法で行うことができる。ベクターは、種々の制限部位をその内部に持つポリリンカーを含んでいるか、または単一の制限部

位を含んでいることが望ましい。ベクター中の特定の制限部位を特定の制限酵素で切断し、その切断部位にDNAを挿入すればよい。本発明の融合遺伝子を含む発現ベクターを用いて適切な宿主細胞を形質転換することにより、宿主細胞に前記融合遺伝子がコードするタンパク質を発現、産生させることができる。

宿主細胞としては、BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS、HB101、DH5、TG1、JM109、XL1-blue、等の大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌等の細菌細胞、アスペルギルス属菌株等の真菌細胞、パン酵母、メタノール資化性酵母等の酵母細胞、ドロソフィラ S2、スポドプテラ Sf9等の昆虫細胞、CHO、COS、BHK、3T3、C127等の哺乳類細胞等が挙げられる。

形質転換は、塩化カルシウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、エレクトロポレーション等の公知の方法で行うことができる。

得られた組換えタンパク質は、公知の分離精製方法により、分離・精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物がGST等との融合タンパク質として発現される場合は、目的タンパク質と融合しているタンパク質またはペプチドの性質を利用して精製することもできる。例えば、FLAGタグとの融合タンパク質として発現させた場合、Anti-FLAG M2 agarose等の市販のアフィニティー担体を用いてアフィニティー精製を行うことができる。また、ヒスチジンが6個以上並んだアミノ酸配列、いわゆるヒスチジンタグとの融合タンパク質として発現させた場合、ヒスチジンタグを有するタンパク質はキレートカラムに結合するので、キレートカラムを用いて精製することができる、またGSTとの融合タンパク質として発現させた場合、GST はグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。

配列番号２０、２５、３０、３５、３８、４１、４６、４９、５２、５５、５８、６３、６６、６９、７４および７７には、それぞれUBP１～UBP16をコードする遺伝子が組込まれた発現ベクター中のそれぞれの脱ユビキチン化酵素がコードする遺伝子の塩基配列を示す。また、配列番号１６～１９、２１～２４、２６～

２９、３１～３４、３６および３７、３９および４０、４２～４５、４７および４８、５０および５１、５３および５４、５６および５７、５９～６２、６４および６５、６７および６８、７０から７３ならびに７５および７６には、それぞれ UBP１～UBP16 をコードする遺伝子を増幅するのに用いたプライマーの配列が示される。本発明に用いる脱ユビキチン化酵素は、上記配列番号で示されるベクター配列中の脱ユビキチン化酵素をコードする遺伝子の塩基配列に相補的な DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ脱ユビキチン化活性を有するタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子であってもよい。ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 500～1000mM、好ましくは 700mM であり、温度が 50～70℃、好ましくは 65℃での条件をいう。また上記配列からなる DNA と、BLAST 等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、少なくとも 85％以上、好ましくは 90％以上、さらに好ましくは 95％以上、特に好ましくは 97％以上の相同性を有しており脱ユビキチン化活性を有する酵素をコードする DNA からなる遺伝子であってもよい。さらに、上記配列で表される塩基配列からなる DNA において、１または複数の塩基が欠失、置換、付加され、かつ脱ユビキチン化活性を有するタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子であってもよい。ここで、１または複数の塩基とは、１～200 個、好ましくは１～100 個、さらに好ましくは１～50 個、特に好ましくは１～20 個もしくは１～10 個の塩基をいう。このようなタンパク質として、UBP12 の変異体が挙げられ、例えば配列番号８０、８３、８６および８９で表される塩基配列からなる DNA がコードする UBP12 の変異体、および該 DNA に相補的な DNA にストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA がコードする UBP12 の変異体がある。

これらの配列に変異を有する脱ユビキチン化酵素をコードする遺伝子は、Kunkel 法若しくは Gapped duplex 法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができる。例えば、変異オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた部位特異的突然変異誘発法に基づいて変異を導入するが、変異導入用キット（例えば Mutan-K (TAKARA 社製)、Mutan-G (TAKARA 社製)、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットなど）を用いて変異を導入することもできる。

さらに、酵母由来の脱ユビキチン化酵素を大腸菌で製造した場合、UBP1～UBP16

のうち、UBP2、3、10および12の活性が高く、これらが好適に用いられる。さらに、この中でもUBP12の活性が高く、本発明において特に好適に用いられる。

3．ユビキチン化タンパク質の回収、酵素処理

本発明は、上記抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体を用いて生体試料からユビキチン化された未知のタンパク質群を回収し、上記脱ユビキチン化酵素でユビキチンを切り離し、残ったタンパク質群を同定することにより、生体内でユビキチン化されているタンパク質群を同定する手法に関する。

ユビキチン化タンパク質の回収は、上記の抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーの手法を用いて行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーは適当な固定化用支持体に抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体を結合させ、該抗体を固定化した支持体と試料を、両者が結合する条件で接触させ、固定化抗体と試料中のユビキチン化タンパク質を結合させ、次いでアフィニティークロマトグラフィー固定化用支持体にユビキチン化タンパク質が結合している状態で脱ユビキチン化酵素を作用させて、タンパク質とユビキチンを切り離して、タンパク質を回収する。本発明で用いる試料はユビキチン化タンパク質が含まれている可能性がある試料ならば限定されず、真核細胞由来培養細胞抽出液、組織抽出液、等を広く用いることができる。支持体は通常アフィニティークロマトグラフィーにおいて用いられる支持体ならばいずれも用いることができ、Sepharose等のアガロース、Sephadex等のデキストラン、セルロース、Biogel等のポリアクリルアミド、多孔性シリカビーズ等を用いることができる。抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体の支持体への結合も前記支持体の水酸基やアミノ基等の官能基とモノクローナル抗体の官能基を活性化させて結合させればよい。官能基が活性化されたアフィニティークロマトグラフィー用支持体が種々市販されており、これらを用いることにより容易に抗体固定化支持体を得ることができる。また、支持体と抗体をスペーサーを介して結合させてもよい。この際、シアノゲンブロマイドやN-ヒドロキシサクシニイミド等を用いて結合させればよい。

また、上記の抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体はIgMであることから、κL鎖と結合することが知られるProtein Lをアガロースに結合させた市販ビーズを

用いて、抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体とprotein Lアガロースビーズを結合させることでユビキチン化タンパク質の回収を行ってもよい。この場合、抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体を試料と混合しユビキチン化タンパク質と該抗体を結合させた後、ユビキチン化タンパク質-抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体複合体をprotein Lアガロースビーズに結合させて回収することが可能になる。

このようにして得られた抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体固定化支持体に試料を接触させて、試料中のユビキチン化タンパク質と抗体とを結合させて、結合していない試料中の成分を洗浄除去する。抗体とユビキチン化タンパク質の結合は、通常抗体の保存等に用いられるリン酸バッファーやTris-HClバッファー等中で両者を混合すればよい。結合したユビキチン化タンパク質に上述の方法で得られた脱ユビキチン化酵素を作用させることにより、タンパク質とユビキチン鎖を切り離すことができる。タンパク質とユビキチンとの切り離しは、上記の脱ユビキチン化酵素を、２０℃～３７℃、pH７．５～８．５、０．５～３時間作用させればよい。タンパク質とユビキチンを切り離すとき、連結していたユビキチンも解離し、回収したタンパク質調製物中に、遊離型のユビキチンが含まれるが、両者の分子量との特性は大きく異なるので、後述の１次元あるいは２次元電気泳動を行うことにより完全に分離することができるし、また後述の質量分析による解析もユビキチンが混入した状態で行うことができる。

ユビキチン化タンパク質の結合およびユビキチンとタンパク質の切り離しは、適当な容器を用いたバッチ法で行ってもよいし、抗体を固定化した支持体をカラムに詰め、該カラムに試料、緩衝液、酵素溶液等を流して、結合解離させるカラム法により行ってもよい。

このようにして回収・単離したユビキチンと結合し得るタンパク質試料中には、生体内に存在するユビキチン化を受ける多くのタンパク質が存在しており、次いで、この試料について公知のタンパク質解析方法を用いてプロテオーム解析することができる。

例えば、タンパク質をその電荷と分子量で分離し得る一次元電気泳動あるいは二次元電気泳動法を用いて分析する。二次元電気泳動法は、一般的に一次元目に等電点電気泳動を行い、二次元目にSDS-PAGEあるいは密度勾配ゲル電気泳動を行

うことによって、タンパク質を電荷と分子量に従って、二次元的に展開する手法である。二次元電気泳動用ゲルとして、固定化 pH 勾配（immobilized pH gradient）ゲル等種々のゲルが市販されており、これらを用いて容易に二次元電気泳動を行うことができる。試料中にユビキチンが含まれていても、二次元電気泳動により各タンパク質のスポットとユビキチンのスポットが出現し、二次元情報に基づいてそれぞれのタンパク質を同定することが可能であるし、また各タンパク質をそれぞれ抽出回収し各々のタンパク質を単離することができる。回収単離したタンパク質は、さらに、質量分析により解析したり、アミノ酸配列を決定し、同定する。アミノ酸配列の決定は、エドマン分解法等の公知の方法により行うことができる。

二次元電気泳動法については、下記のプロテオーム解析についての文献の他に、新生化学実験講座１　タンパク質 Ⅰ　分離・精製・性質　日本生化学会編　東京化学同人　1990 年２月２６日発行、実験医学　Vol.20, No.1, pp.85-88, 2002 等に記載されており、これらの記載に従って行うことができる。

質量分析は MALDI-TOF 型の質量分析計や LC-MS/MS 等のタンデム質量（MS/MS）分析法により行うことができる。例えば、LC-MS/MS によればアミノ酸配列を決定することができるし（de novo seuquencing 法）、また MS/MS スペクトル中に含まれる部分的な配列情報を用いて直接データベースサーチを行いタンパク質を同定することもできる。この際、分析を行う試料中にユビキチンが含まれていてもタンパク質自体の解析を行うことが可能である。

その他、公知の種々の方法でポリユビキチン化を受け得るタンパク質を解析することができる。プロテオーム解析は、例えば、実験医学別冊　ポストゲノム時代の実験講座２　プロテオーム解析法　礒辺俊明　他編　羊土社　2000 年７月 10 日発行、実験医学　増刊　プロテオミクス時代のタンパク質研究　宮崎香　他編　羊土社　2002 年９月２５日発行、ポストシークエンスのゲノム化学(3)　プロテオミクス　タンパク質の系統的・網羅的解析　松原謙一　他監修　中山書店 2000 年 11 月 30 日発行、等に記載の方法で行うことができる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例において行う実験の方法

まず、以下の実施例１から実施例１４に書かれた実験に用いた手法を列挙する。

プラスミドは全て、常法（Sambrook, J., & Russell, D. W., Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition [2001], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）に従って構築した。ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCRと略記； Saiki et al., Science *239* 487-491 [1988]）には全てPfu turbo （STRATAGENE社製）を用いた。増幅したDNA断片は1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的のDNA断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen 社製）を用いて、使用説明書に準じて精製した。遺伝子に点変異を導入する際には、インバースPCR法(Clackson et al. (1992), In PCR-a practical approach (Mcpherson, M. J., eds.), Oxford university press, 187-215)を用いた。出芽酵母野生株w303株のゲノムDNAはQIAGEN社製QIAGEN Genome-tipを用い、使用説明書に準じて精製した。DNA断片の5'末端をリン酸化する必要のある場合は東洋紡社製T4 polynucleotide kinaseを用いた。塩基配列決定にはDNAシークエンサーABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer（ABI 社製）を用いた。リガーゼ反応にはNew England Biolabs社製のT4 DNA ligaseを用いた。

プラスミド構築に用いた大腸菌の培養はLuria Broth（LB: 1% Bacto trypton, 0.5 % Bacto yeast extract, 1 % 塩化ナトリウム）で行った。形質転換体を選択する際には、カナマイシン（10μg/ml)、クロラムフェニコール（34μg/ml)、アンピシリン（100μg / ml）を用いた。

組換えタンパク質は、ヒスチジンタグとの融合タンパク質として発現するよう発現ベクターを構築し、大腸菌BL21(DE3)RIL(STRATAGENE社製)に形質転換した。

IPTG(イソプロピル1-チオ-β-D-ガラクトシド)によるタンパク質発現誘導後、Ni-NTA Superflow(Qiagen社製)を用いたアフィニティ精製を行った。尚、組換えタンパク質の誘導方法及び精製方法はQiagen社による説明書に準じた。

ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の検出は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりタンパク質を分離後、トランスブロットSDセル(Bio-Rad社製)を用いてニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell 社製)へ転写後、常法に従って目的とするタンパク質を検出した(Harlow, E., & Lane, D., 1992,

Antibodies-a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。検出は、2 次抗体としてアルカリホスファターゼが結合した抗ポリクローナル抗体(Promega 社製)又は抗モノクローナル抗体(Promega 社製)を用い、NBT(Nitro blue tetrazolium)とBCI(5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate)試薬(Promega 社製)を用いて発色させた。

実施例1

ユビキチン化に必要な、E1, E2, E3 酵素群の調製

ユビキチン化タンパク質を調製するための酵素群(E1, E2 及び E3)の調製法は、ウサギより調製した網状赤血球を用いて田村らの方法をもとに調製した(Tamura, T et al., FEBS Lett., 292, 154-158(1991))。ウサギ網状赤血球を溶血させた後の粗抽出画分から FractionII を調製した後、ユビキチン-セファロース(20 mg ユビキチン/ml 担体)に酵素群を結合させ、洗浄後、50mM Tris-HCl (pH 9.0)/1M KCl/20 mM DTT で酵素群を溶出させ、1M Tris-HCl (pH 7.0)を溶出液に加えて直ちに中和した。回収した溶出液は、容量が約 1/10 になるまで限外ろ過により濃縮した後、50mM Tris-HCl (pH 7.5)/1 mM ATP/ 1 mM DTT/20 %グリセロールで透析した。透析後タンパク質量を測定後、-80℃に保存した。

実施例2

ユビキチン化リゾチームの調製

実施例1で精製した酵素群 270μl (0.4 mg/ml)に、60μl の 1M Tris-HCl (pH 9.0)、10.8μl の 300 mM MgCl2、10.8μl の 200 mM ATP、6μl の 100 mM DTT、6μl の無機ピロフォスファターゼ (200 U/μl、酵母由来、Roche 社製)、90μl の熱変性したリゾチーム(2 mg/ml、ニワトリ卵白由来, 生化学工業社製)、66μl のユビキチン(10 mg/ml、ウシ赤血球由来、Sigma 社製)を加え、milliQ 水で総容量が 600μl になるように加えて、37 ℃で 90 分間反応を行った。反応終了後、未反応のユビキチンとリゾチームを除くため、田村らの方法 (Tamura, T et al., FEBS Lett., 292, 154-158 (1991))によりユビキチン化リゾチームを回収した。回収したユビキチン化リゾチームは濃縮後-20℃に保存し、抗体作製用の抗原として、また脱ユビキチン化酵素の活性測定の基質として用いた。反応時に経時的に回収し

た15μlのユビキチン化リゾチーム溶液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、クーマーシー染色で確認すると、リゾチームに結合するユビキチン数依存的にバンドが多数確認され、ユビキチン化リゾチームの合成が確認された(図1)。

実施例3

モノクローナル抗体産生細胞の樹立

実施例2で得られたユビキチン化リゾチーム溶液 100μl に等量のアジュバント(一回目はフロイント完全アジュバント、二回目以降はフロイント不完全アジュバント)を加え乳化しBALB/cマウス一匹の免疫感作に用いた。免疫抗原は1.5週間隔で計4回マウス背部皮下に分散投与した。感作開始後七週にマウス尾静脈より採血し、抗体価の上昇を確認し、常法(安藤民衛・千葉丈著「単クローン抗体実験操作入門」講談社、1991年)に従って上記マウスの脾細胞を採取し、マウス・ミエローマ細胞 (Sp2/o-Ag14)と融合させてハイブリドーマを調製した。得られたハイブリドーマ集団の中から遊離ユビキチンとリゾチームには反応せずユビキチン化リゾチームに反応する抗体産生細胞をELISA法にてスクリーニングした。

このようにして選択した抗体産生細胞株を選択後、0.5ml/匹プリスタン(Sigma社製)を投与後2週間経過したBALB/cマウス腹腔内に、1匹当たり細胞数 5×10^6 個注入し、10～14 日飼育した後に腹水を回収した。回収した腹水から、HighTrapIgM(amasham biosciences 社製)を用いて抗体を精製した。精製方法は、HighTrapIgMに添付の説明書に従い、精製後の抗体はPBS緩衝液で透析しBradford法(Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976))をもとにしたProtein assay溶液(Bio-Rad 社製)でタンパク質濃度を測定した。測定した抗体は使用するまで-20℃に保存した。

本実施例において、ユビキチン鎖を認識する抗体スクリーニング時に、平行して遊離ユビキチンだけに反応する抗ユビキチン抗体と遊離リゾチームだけに反応する抗リゾチーム抗体を生産するハイブリドーマ細胞をそれぞれスクリーニングし抗体産生細胞を樹立した。得られたハイブリドーマを用いて、抗ユビキチン鎖抗体同様、マウスから腹水を回収し、Protein A-Sepharose(amersham biosciences社製)を用いて抗体を精製した。精製方法は、Protein A-Sepharoseに添付の説明

書に従い、精製後の抗体はPBS緩衝液で透析し分子吸光計数をもとにタンパク質濃度を測定後、-20℃に保存した。

スクリーニングで得られた 3 種の抗体について、Mouse monoclonal antibody isotyping kit (HyCult biotechnology 社製)を用いて抗体のサブクラスを調べた。その結果、抗ユビキチン鎖抗体はIgMであることが判明した。また抗ユビキチン抗体及び抗リゾチーム抗体は、それぞれIgGであることが判明した。

実施例1で調製した、4μlのユビキチン化リゾチーム(図2、レーン3)、300 ngのリゾチーム(図2、レーン1)と1μgのユビキチン(図2、レーン2)をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、精製した上記3種のモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング法で検出した。その結果、抗ユビキチン抗体は、リゾチームには反応せず、遊離のユビキチン並びにユビキチン化リゾチームに反応することが判明した。抗リゾチーム抗体は、遊離のリゾチームとユビキチン化リゾチームに対し反応を示し、遊離のユビキチンには反応を示さなかった。最後に抗ユビキチン鎖抗体は、遊離型ユビキチンとリゾチームには反応を示さず、ユビキチン化リゾチームやユビキチン 2 量体に反応を示すことが明らかとなった(図2)。以上の結果から、抗ユビキチン鎖抗体はユビキチン鎖を特異的に認識していることが判明した。

実施例4

ユビキチン(Ub)とシアン色蛍光タンパク質(ECFP)の融合タンパク質(Ub-ECFP)の構築

ユビキチン化リゾチームに加え、もう1つのモデルユビキチン化タンパク質、ユビキチン化ECFPを調製するため、ユビキチンと蛍光タンパク質ECFPを融合したタンパク質の発現ベクターを構築した。ECFPへのユビキチン化を促進するために、ユビキチンとECFPの間にユビキチン付加領域(Suzuki, T., & Varshavsky, A., EMBO J., 18, 6017-6026 (1999))を挿入した。ユビキチン付加領域は、N末端のアミノ酸から数えて3番目及び15番目の残基がリジンであること、2番目の残基がリジンでないことが重要な配列関係となる。構築したUb-ECFPタンパク質は、脱ユビキチン化酵素によりN末端のユビキチンが切断されると、新たなN末端としてリジン残基を露出する。このN末端から数えて、3, 8及び15番目に相当す

るアミノ酸がリジン、その他のアミノ酸がアスパラギンであるようにデザインした(KLKNNNNKNNNNNNK)（配列番号２)。また2番目に相当するアミノ酸は、立体的な障害が少ないようにロイシンとした。更に、ECFPとユビキチン付加領域との間に充分なスペースを確保する目的で、クローニングベクターpBluescript II (KS-)(Stratagene 社製)のマルチクローニングサイト由来のアミノ酸 17 残基(VDGIDKLDIEFLQPGGSMV)（配列番号３）を挿入した。

実際には、合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー(以下プライマーと略記)Ub-S（配列番号４)と Ub-AS（配列番号５)を用いて、ヒト由来 Ub-UBCP80 (I.M.A.G.E clone No. 1928724)をコードするcDNAを鋳型としてPCRを行い、約230塩基対のDNA断片を回収した後、制限酵素KpnIとAflIIIで二重消化した。一方、ユビキチン付加領域をコードする合成プライマーInsert-S（配列番号６)とInsert-AS（配列番号７)の両プライマーの5'末端をリン酸化した後、2本鎖DNAを形成させた。該2本鎖DNAと上記DNA断片をKpnIとSalIで二重消化したpBluescriptII (KS-)クローニングベクターに導入した。ユビキチン-ユビキチン付加領域を融合したDNA断片を持つプラスミドを単離、精製し、該プラスミドをNdeIとBamHIで二重消化し、ユビキチン-ユビキチン付加領域融合DNA断片をアガロースゲルより回収した。

ECFPをコードするcDNAをもつベクターpECFP-C1(Clontech社製)を鋳型に、プライマーUb-ECFP-S（配列番号８)とUb-ECFP-AS（配列番号９)でPCRを行い、約720bpのDNA断片を回収した。このDNA断片をBamHIとXhoIで切断し、pET22b発現ベクター(Novagen社製)のBamHIとXhoIサイトに挿入した。増幅したDNA断片のXhoIサイト側は終止コドンを除去し、ECFPのC末端にベクター由来のヒスチジンタグを融合する蛋白質として発現するようデザインした。ECFPが導入された発現ベクターをNdeIとBamHIで二重消化し、両酵素で消化した上記ユビキチン-ユビキチン付加領域融合DNA断片を挿入し、発現ベクターpET22-Ub-ECFPを構築した。該ベクターは、融合タンパク質、ユビキチン-KLKNNNNKNNNNNNKVDGIDKLDIEFLQPGGS（配列番号１０）-蛍光タンパク質(ECFP)-HHHHHH(ヒスチジンタグ)を生産する発現ベクターである(配列番号１１)。pET22-Ub-ECFPを大腸菌BL21(DE3)RIL細胞に形質転換し、Qiagenの説明書に準じ

てNi-NTA superflow(Qiagen社製)を用いて組換えタンパク質の生産及び精製を行った。精製後のタンパク質は25mM Tris-HCl (pH7.5)/20%グリセロールで透析し、透析後のタンパク質を-20℃で保存した。

実施例5

抗ECFPポリクローナル抗体の作製

pECFP-C1 ベクター(Clontech 社製)をテンプレートとして、プライマーECFP-S(配列番号12)とECFP-AS (配列番号13)を用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。プライマーはECFPのN末端にヒスチジンタグが融合されるよう設計した。増幅された約750bpのECFPをコードするDNA断片をNcoIとEcoRIで二重消化し、両酵素で消化した pTrc99a ベクター(Amersham Biosciences 社製)に導入し、pTrc99a-ECFP を構築した (配列番号14)。次に、該ベクターを大腸菌BL21(DE3)RIL細胞に形質転換しIPTGによる発現誘導を行いNi-NTA Superflow を用いて精製した。精製したタンパク質は 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)/20%グリセロールで透析し、透析後のタンパク質を-20℃で保存し、抗ECFPポリクローナル抗体作製のための抗原として用いた。

精製したECFPは、常法(Harlow, E., & Lane, D., 1992, Antibodies-a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)に従い、ウサギに免疫し、抗体力価が充分上昇するまで200μgタンパク質を2週間毎に免疫し、その後全採血を行い血清を回収し-20℃で保存した。この血清を用いたウエスタンブロッティング法によるECFPの検出は、抗血清を10,000倍希釈して使用することが可能な抗体であることが確認された。

実施例6

抗ユビキチン鎖抗体の認識特異性

実施例3で作製した、ユビキチン鎖に特異的に反応する抗体について、更にその認識特異性を検証した。図2に示すように、該抗体は、遊離型のユビキチンとリゾチームには反応しないことを確認している。このことは、リゾチームにイソペプチド結合しているユビキチンのC-末端を認識している可能性、あるいはユビキチン同士がイソペプチド結合している結合領域を認識している可能性がある。

更には、ユビキチン鎖における複数のユビキチン分子が構築する立体構造を認

識している可能性も否定できない。そこで実施例5で作製したUb-ECFPを用いて、抗体の認識部位の検証を行った。

最初にユビキチン化ECFPを作製した。60μlの1M Tris-HCl (pH 9.0)、10.8μlの300 mM MgCl2、10.8μlの200 mM ATP、6μlの100 mM DTT、6μlの無機ピロホスファーゼ (200 U/μl、酵母由来、Roche社製)、270μlの実施例2で精製した酵素群(E1, E2及びE3)、36μlのUb-ECFP (1.7 mg/ml)、66μlのユビキチン(10mg/ml、ウシ赤血球由来、Sigma社製)を混ぜ合わせ、総容量を600μlになるようmilliQ水を加え、37℃で90分反応を行った。反応終了後、実施例2で作製したユビキチン化リゾチームと同様にユビキチン化ECFPを精製した後-20℃に保存した。

1レーン当たり300ngのUb-ECFP単独あるいは300ngのUb-ECFPに40μgのFraction IIを混合した後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、抗ユビキチン鎖抗体あるいは抗ECFP抗体を用いてウエスタンブロッティング法でタンパク質を検出した(図3A)。また、上記した方法で作製したユビキチン化ECFPを8μlをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し抗ユビキチン鎖抗体あるいは抗ECFP抗体を用いてウエスタンブロッティング法でタンパク質を検出した(図3B)。図3Aに示すように、Ub-ECFPにFraction IIを混ぜ合わせると、Fraction IIに含まれる脱ユビキチン化酵素によりUb-ECFP融合タンパク質はUbとECFPに分解される。

そのため、Fraction IIの有無により抗ECFP抗体が認識するバンドはユビキチンの分子量の差だけ異なって検出される(図3A右)。一方、抗ユビキチン鎖抗体はUb-ECFP融合タンパク質は認識するが、Fraction IIでユビキチンが切断されると検出不能になることが判明した(図3A左)。また、抗ユビキチン鎖抗体はユビキチン化ECFPをユビキチン化リゾチームと同様認識し(図2および3B)、ECFPにユビキチンが1分子以上結合したユビキチン化ECFPを認識することが判明した(図3B)。

以上のことから、抗ユビキチン鎖抗体はユビキチンのC末端領域を含むアミノ酸配列と、そこへ結合しているタンパク質との結合領域を認識していると考えられる。このことは、Ub-ECFPからユビキチンが切断されることで、遊離したユビ

キチンあるいはECFPをそれぞれ認識できなくなることから判断される。一般的に、抗体が認識するエピトープは通常6～10アミノ酸であることから、抗ユビキチン鎖抗体は、ユビキチンのC-末端から10残基以内の配列(LHLVLRLRGG（配列番号１５）-COOH)を含む領域を認識すると考えられる。また、ユビキチン化反応は、ユビキチンのC末端グリシンが相手側のタンパク質のリジン残基のε-アミノ基にペプチド結合するので、該抗体は、ユビキチンC末端領域に加え、相手側のタンパク質のリジン残基を含むアミノ酸配列を認識していると考えられる。この時、ユビキチンと結合するタンパク質はユビキチンでもリゾチームでもECFPでも特定されないことから相手側のリジン残基周辺のアミノ酸配列は限定されないと考えられる(図4)。

以上のことから、抗ユビキチン鎖抗体は、ユビキチンC末端領域とタンパク質(ユビキチンを含む不特定タンパク質)との結合領域を認識することから、該抗体を抗ubiquitin-X抗体と命名した。

実施例7

脱ユビキチン化酵素の発現ベクターの構築

ユビキチン鎖に対する抗体作製に続き、ユビキチン化タンパク質からユビキチンを切り放す酵素、脱ユビキチン化酵素の発現ベクターを構築した。脱ユビキチン化酵素(UBP1～16)をコードする遺伝子は、出芽酵母ゲノムDNAを鋳型としてそれぞれのUBPに対応するプライマーを用いてPCRにより各標的遺伝子を増幅した。また2500塩基対を超える遺伝子については分割して増幅後、制限酵素部位を利用して結合させた。また、構築した16種の発現ベクターは、発現する組換えタンパク質のC末端にヒスチジンタグが融合するように設計を行った。

UBP1はプライマーUBP1S(配列番号１６)とUBP1AS(配列番号１７)およびプライマーUBP1S2(配列番号１８)とUBP1AS2(配列番号１９)の組合せでそれぞれDNAを増幅した。増幅された1061塩基対のDNA断片(UBP1 N-末端側)を制限酵素NdeIとHindIIIで二重消化し、1376塩基対のDNA断片(UBP1 C-末端側)を制限酵素HindIIIとXhoIで二重消化した後、制限酵素HindIIIの部位で両DNA断片を連結させ、pET22bの制限酵素NdeIとXhoI部位へ導入しpET22b-UBP1(配列番号２０)発現ベクターを構築した。

UBP2 はプライマーUBP2S (配列番号２１) と UBP2AS (配列番号２２) およびプライマーUBP2S2 (配列番号２３) と UBP2AS2 (配列番号２４) の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。増幅された 1415 塩基対の DNA 断片 (UBP2 N-末端側) を制限酵素 NdeI と BamHI で二重消化し、2401 塩基対の DNA 断片 (UBP2 C-末端側) を制限酵素 BamHI と XhoI で二重消化した後、制限酵素 BamHI の部位で両 DNA 断片を連結させ、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP2 (配列番号２５) 発現ベクターを構築した。

UBP3 はプライマーUBP3S (配列番号２６) と UBP3AS (配列番号２７) およびプライマーUBP3S2 (配列番号２８) と UBP3AS2 (配列番号２９) の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。増幅された 737 塩基対の DNA 断片 (UBP3 N-末端側) を制限酵素 NdeI と SacI で二重消化し、1999 塩基対の DNA 断片 (UBP3 C-末端側) を制限酵素 SacI と XhoI で二重消化した後、制限酵素 SacI の部位で両 DNA 断片を連結させ、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP3 (配列番号３０) 発現ベクターを構築した。

UBP4 はプライマーUBP4S (配列番号３１) と UBP4AS (配列番号３２) およびプライマーUBP4S2 (配列番号３３) と UBP4AS2 (配列番号３４) の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。増幅された 2154 塩基対の DNA 断片 (UBP4 N-末端側) を制限酵素 NcoI と SalI で二重消化し、624 塩基対の DNA 断片 (UBP4 C-末端側) を制限酵素 SalI と XhoI で二重消化した後、制限酵素 SalI の部位で両 DNA 断片を連結させ、pET28a (Novagen 社製) の制限酵素 NcoI と XhoI 部位へ導入し pET28a-UBP4 (配列番号３５) 発現ベクターを構築した。

UBP5 はプライマーUBP5S (配列番号３６) と UBP5AS (配列番号３７) の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。得られた 2415 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NcoI と NotI で二重消化した後、pET28a の制限酵素 NcoI と NotI 部位へ導入し pET28a-UBP5 (配列番号３８) を構築した。

UBP6 はプライマーUBP6S (配列番号３９) と UBP6AS (配列番号４０) の組合せで DNA を増幅した。得られた 1497 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化した後、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP6 (配列番号４１) を構築した。

UBP7 はプライマーUBP7S (配列番号４２) と UBP7AS (配列番号４３) およびプライマーUBP7S2 (配列番号４４) と UBP7AS2 (配列番号４５) の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。増幅された 1982 塩基対の DNA 断片 (UBP7 N-末端側) を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、1231 塩基対の DNA 断片 (UBP7 C-末端側) を制限酵素 EcoRI と NotI で二重消化した後、制限酵素 EcoRI の部位で両 DNA 断片を連結させ、pET22b の制限酵素 NdeI と NotI 部位へ導入し pET22b-UBP7 (配列番号４６) 発現ベクターを構築した。

UBP8 はプライマーUBP8S (配列番号４７) と UBP8AS (配列番号４８) の組合せで DNA を増幅した。得られた 1413 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化した後、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP8 (配列番号４９) を構築した。

UBP9 はプライマーUBP9S (配列番号５０) と UBP9AS (配列番号５１) の組合せで DNA を増幅した。得られた 2262 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化した後、pET28a の制限酵素 NcoI と XhoI 部位へ導入し pET28a-UBP9 (配列番号５２) を構築した。

UBP10 はプライマーUBP10S (配列番号５３) と UBP10AS (配列番号５４) の組合せで DNA を増幅した。得られた 2376 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化した後、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP10 (配列番号５５) を構築した。

UBP11 はプライマーUBP11S (配列番号５６) と UBP11AS (配列番号５７) の組合せで DNA を増幅した。得られた 2151 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化した後、pET28a の制限酵素 NcoI と XhoI 部位へ導入し pET28a-UBP11 (配列番号５８) を構築した。

UBP12 はプライマーUBP12S (配列番号５９) と UBP12AS (配列番号６０) およびプライマーUBP12S2 (配列番号６１) と UBP12AS2 (配列番号６２) の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。増幅された 892 塩基対の DNA 断片 (UBP12 N-末端側) を制限酵素 NcoI と NdeI で二重消化し、2870 塩基対の DNA 断片 (UBP12 C-末端側) を制限酵素 NdeI と NotI で二重消化した後、制限酵素 NdeI の部位で両 DNA 断片を連結させ、pET28a の制限酵素 NcoI と NotI 部位へ導入し pET28a-UBP12 (配列番号６３) 発現ベ

クターを構築した。

UBP13 はプライマーUBP13S(配列番号６４)と UBP13AS(配列番号６５)の組合せで DNA を増幅した。得られた 2244 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化した後、pET28a の制限酵素 NcoI と XhoI 部位へ導入し pET28a-UBP13(配列番号６６)を構築した。

UBP14 はプライマーUBP14S(配列番号６７)と UBP14AS(配列番号６８)の組合せで DNA を増幅した。得られた 2409 塩基対の DNA 断片を制限酵素 BspHI と XhoI で二重消化した後、pET28a の制限酵素 NcoI と XhoI 部位へ導入し pET28a-UBP14(配列番号６９)を構築した。

UBP15 はプライマーUBP15S(配列番号７０)と UBP15AS(配列番号７１)およびプライマーUBP15S2(配列番号７２)と UBP15AS2(配列番号７３)の組合せでそれぞれ DNA を増幅した。増幅された 2197 塩基対の DNA 断片(UBP15 N-末端側)を制限酵素 NdeI と HindIII で二重消化し、1493 塩基対の DNA 断片(UBP15 C-末端側)を制限酵素 HindIII と XhoI で二重消化した後、制限酵素 HindIII の部位で両 DNA 断片を連結させ、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP15(配列番号７４)発現ベクターを構築した。

UBP16 は合成プライマーUBP16S(配列番号７５)と UBP16AS(配列番号７６)の組合せで DNA を増幅した。得られた 1497 塩基対の DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化した後、pET22b の制限酵素 NdeI と XhoI 部位へ導入し pET22b-UBP16(配列番号７７)を構築した。

実施例８

UBP の発現と脱ユビキチン化活性の確認

各発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3)RIL 細胞に形質転換し LB 寒天培地で選択培養を行った後(pET22b を用いた発現ベクターは、アンピシリンとクロラムフェニコール存在下で選択培養、pET28a を用いたベクターは、カナマイシンとクロラムフェニコール存在下で選択培養を行った)、それぞれの UBP 発現ベクターを保持する大腸菌を抗生剤を含む LB 培地で前培養(37℃、12 時間)を行った。発現誘導は、前培養液 4 ml を 50 ml の LB 培地に接種し、抗生剤に加え 2-メルカプトエタノール(終濃度 10 mM)と IPTG(終濃度 0.4 mM)を添加し 20℃で 24 時間培養を行った。

培養後、菌体を回収し、600μlのリン酸緩衝液(pH 8.0)/300 mM NaClで懸濁後、リゾチーム及び超音波破砕処理により細胞を破砕し遠心分離により粗抽出液を回収した。回収した粗抽出液は、-20℃で保存すると共に、脱ユビキチン化活性の確認に用いた。

調製した各UBPを含む大腸菌の粗抽出液3.5μlを、実施例2で調製したユビキチン化リゾチーム6μlと0.5μlの20 mM DTTと混合し、30℃で1時間反応させた。

反応液全液をSDSポリアクリルアミド電気泳動により分離後、抗ubiquitin-X抗体を用いたウエスタンブロッティング法でユビキチン化リゾチームを検出した(図 5)。その結果、ユビキチン化リゾチームからユビキチンが外されて抗体が認識するバンドの消失が確認されたのは、UBP1, 2, 3, 6, 10, 12, 15であった。一方、UBP4, 5, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 16では脱ユビキチン化活性をほとんど示さなかった。これら、脱ユビキチン化活性を示さなかったUBPの多くは、組換えタンパク質として大腸菌内に生産されてはいたものの、不溶化タンパク質として回収され、可溶化タンパク質として生産されていないことをが判明した。このことが粗抽出液に活性型の可溶化タンパク質が回収されず脱ユビキチン化活性を確認出来なかった理由と考えられる。

実施例9

UBP2, 3, 10, 12各酵素の検討

脱ユビキチン化活性を示したUBPタンパク質の内、活性が高かったタンパク質UBP2, 3, 10, 12について各タンパク質を簡易精製し、タンパク質生産量と脱ユビキチン化反応を確認した。

UBPを実施例8に示す方法に従って発現誘導後、大腸菌粗抽出液を調製した。

該粗抽出液 1 mlに対しQiagen社の説明書に準じて平衡化したNi-NTA Superflowを100μl加え、4℃で1時間転倒混和し、タンパク質を担体に結合させた。精製担体を洗浄液で洗浄後、0.1 M EDTA(pH 8.0)を含む洗浄液でUBPタンパク質を溶出させ、溶出液を使用時まで-20℃で保存した。

実施例2で調製したユビキチン化リゾチーム 3μl、実施例4で調製したUb-ECFP 7μl (300ng)、または実施例7で調製したユビキチン化ECFP 7μlに対

して上記調製したUBP溶出液を0.5μl加え、DTTの終濃度が1 mMになるよう添加した総容量10μlの反応液を35℃で2時間反応させた。反応後、全液をSDSポリアクリルアミド電気泳動により分離後、抗ubiquitin-X抗体を用いたウエスタンブロッティング法で脱ユビキチン反応を確認した(図6A～図6C)。その結果、図6に示すように4種全てのタンパク質について、ユビキチン化リゾチームとユビキチン化 ECFP からの脱ユビキチン化反応が確認された。また全ての UBP が、Ub-ECFP融合タンパク質からUbを切断することが判明した。これらUBPをSDSポリアクリルアミド電気泳動により確認すると、大腸菌内における組換えタンパク質としての生産量がそれぞれ異なっていることが判明した。また、それぞれタンパク質の保存性や活性の安定性等を比較した結果、UBP12 が最も優れていると判断された。以上のことから、UBP12 を本発明に用いる脱ユビキチン化酵素として選択し以下の実験を行った。

実施例１０

UBP12の生産性を高めるための遺伝子改変

実施例８に示す発現誘導法を用いてUBP12を6LのLB培地で発現誘導しNi-NTA superflow を用いて精製を行った。精製後のタンパク質を電気泳動で分離し染色すると、図7Aで示すように精製されてくるタンパク質の内、全長UBP12のタンパク質量は非常に少なく他のバンドが多数確認された。Ni-NTA superflowで精製されてくるタンパク質を電気泳動で分離したことから、バンドのいくつかはヒスチジンタグを持つUBP12由来のバンドであると考え、電気泳動で確認された主要なバンドについてN末端のアミノ酸配列を決定した。

N末端アミノ酸配列の決定は、精製UBP12溶液をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離後、PVDF(polyvinylidene diflouride)膜(Invitrogen社製)に転写し、タンパク質を染色し、プロテインシークエンサーABI 491 型を用いてエドマン分解法によるシークエンスを行った。その結果、少なくとも4本のバンドがUBP12由来のものであることが判明した。バンド1は432番目のメチオニンから開始するMQRNA配列が確認された。バンド2は687番目のロイシンから開始するLNNPG配列が確認された。バンド3は871番目のメチオニンから開始するMELTD配列が確認された。そしてバンド4は1163番目のメチオニンから開始するMIECN配列が

確認された。

このことからそれぞれのバンドは大腸菌内でタンパク質を合成する際に、合成されたUBP12のmRNAに対して本来タンパク質の翻訳を開始すべき開始コドンからタンパク質を合成するのではなく、途中に存在するメチオニンを開始コドンとして認識し合成開始したか、あるいはUBP12合成終了後に非特異的な分解を受けた可能性が考えられる。実際、4本のバンドの内3本はメチオニンから開始するアミノ酸配列が確認され、またアミノ酸配列領域の塩基配列を確認すると、メチオニンの上流にリボソーム結合配列(RBS)様の塩基配列が確認されるものもあった。以上のことから、確認された4種のバンドについて、それぞれのN末端アミノ酸配列をコードしている遺伝子領域に変異を導入して非特異的に生産されるUBP12が軽減できるか検討を行った。

変異の導入は、インバースPCR法を用い、変異を導入したプライマーをそれぞれ用意して配列番号59に示すpET28a-UBP12発現ベクターを丸ごと増幅する手法を取った。バンド1に対する改変はプライマーinverse1-S(配列番号７８)とinverse1-AS(配列番号７９)を用いてpET28a-UBP12をテンプレートにインバースPCRを行い、432番目のメチオニンをアラニンに改変すると共に、該メチオニン上流にあるRBS様配列をリボソームが結合しないようにそしてアミノ酸置換が起こらないよう改変しpET28a-UBP12-1(配列番号８０)を作製した。バンド2に対する改変はプライマーinverse2-S(配列番号８１)とinverse2-AS(配列番号８２)を用いてpET28a-UBP12-1をテンプレートにインバースPCRを行い、687番目のロイシンをアラニンに改変しpET28a-UBP12-2(配列番号８３)を作製した。バンド3に対する改変はプライマーinverse3-S(配列番号８４)とinverse3-AS(配列番号８５)を用いてpET28a-UBP12-2をテンプレートにインバースPCRを行い、871番目のメチオニンをアラニンに改変すると共に、該メチオニン上流にあるRBS様配列をリボソームが結合しないようにそしてアミノ酸置換が起こらないよう改変しpET28a-UBP12-3(配列番号８６)を作製した。バンド4に対する改変はプライマーinverse4-S(配列番号８７)とプライマーinverse4-AS(配列番号８８)を用いてpET28a-UBP12-3をテンプレートにインバースPCRを行い、1163番目のメチオニン上流にあるRBS様配列をリボソームが結合しないように、そしてアミノ酸置換が

起こらないように改変しpET28a-UBP12-4(配列番号８９)を作製した。それぞれの変異導入は、DNA塩基配列をシークエンサーで確認した。

4回に渡り変異を導入したUBP12発現ベクター(pET28a-UBP12-4)を、BL21(DE3)RIL細胞に形質転換し、発現の誘導を行い、Ni-NTA superflowを用いて精製を行った。精製タンパク質をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離、染色すると、図7Bに示すように、明らかにUBP12の生産量が増えUBP12の中間産物が減ったことが確認できた。また、遺伝子改変によるUBP12の活性に変化は認められないことを確認した。

実施例１１

UBP12へヒスチジンタグ(N末端)とFLAGタグ(C末端)の導入

UBP12の遺伝子改変による生産性と精製度は高まったが、まだ非特異的なバンドが確認されることが判明した(図7B)。このことは、まだUBP中間産物が合成されていることを示唆する。そこで、精製されるUBP12が限りなく全長鎖であるようにするために、これまで生産していたUBP12タンパク質に融合していたヒスタグをN末端に移し換え、C末端には新たにFLAGタグ(Brizzard, B. L. et al., BioTechniques, 16, 730-735 (1994))を融合させたUBP12発現ベクターの構築を行った。この発現ベクターより生産されるUBP12は、Ni-NTA superflowとAnti-FLAG M2 agarose (Sigma社製)を用いた2段階のアフィニティ精製が可能になり、UBP12の精製度は格段と高まることが予想された。

そこでまずpET26(Novagen社製)のNdeIとEcoRI部位の間にヒスチジンタグをコードするリンカーを導入したベクターを構築した。プライマーlinker-S(配列番号９０)とlinker-AS(配列番号９１)を等モル量混ぜ合わせ70℃10分間熱変性させた後、変性プライマー混合液を1時間かけて室温へ戻すことで両プライマーのアニーリングを誘導し、リンカーを調製した。該リンカーをpET26のNdeIとEcoRI部位に挿入することで、NdeI部位に続いてヒスチジン6残基をコードする塩基とNcoI部位が挿入されたpET26M(配列番号９２)を構築した。

次に、プライマーFLAG-S(配列番号９３)とFLAG-AS(配列番号９４)を用いてpET28a-UBP12-4をテンプレートにPCRを行い2.9kbのUBP12断片を増幅し、得られたDNA断片をNdeIとNotIで二重消化した。引き続き、pET28a-UBP12-4をNcoI

とNdeIで消化し約900bpのUBP12のN末端領域をコードするDNA断片を精製した。調製した2本のDNA断片をNdeI部位同士で連結させNcoIとNotIで二重消化したpET26Mへ挿入しpET26M-UBP12-FLAG(配列番号９５)を構築した。該発現ベクターから生産されるUBP12は、N末端にヒスチジンタグが、そしてC末にFLAGタグ(DYKDDDDK)（配列番号９６）が融合したタンパク質として生産される。

実施例１２

UBP12-FLAGの発現と精製

pET26M-UBP12-FLAG(配列番号９５)をBL21(DE3)RIL細胞に形質転換し、実施例８で記載したUBPタンパク質生産条件と同様にUBP12-FLAGを発現・生産した。6LのLB培地を用いてUBP12-FLAGを発現誘導した大腸菌を回収し、Qiagenの説明書に従ってNi-NTA superflowにUBP12-FLAGを吸着、洗浄を行った。洗浄後、150 mM imidazole によりUBP12-FLAGを一括溶出した。溶出した該タンパク質を、50mM Tris-HCl (pH 7.5)/150 mM NaClにて透析後、Sigma社の説明書に従ってAnti-FLAG M2 agaroseを用いてUBP12-FLAGを精製した。Anti-FLAG M2 agaroseへ結合したUBP12-FLAGタンパク質をFLAGペプチド(DYKDDDDK)で溶出した後、該タンパク質を25mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.5 mM DTT/20 %グリセロールで透析し、透析後のタンパク質溶液を-20℃で保存した。精製タンパク質をSDSポリアクリルアミド電気泳動で確認すると、図 7C に示すように非特異的なバンドが少ない精製度の高いUBP12-FLAGタンパク質が回収された。

実施例１３

抗ubiquitin-X抗体セファロースの作製

ユビキチン化リゾチームを濃縮・回収した後に、脱ユビキチン化酵素で、リゾチームを遊離させる実験を行うために、ユビキチン化リゾチームを濃縮・回収するための抗ubiquitin-X抗体をセファロースビーズに架橋したアフィニティ精製担体を以下のように作製した。

Activated CH-Sepharose(Amersham Biosciences 社製)を説明書に従い 1 mM 塩酸溶液にて膨潤、活性化した後、200μlのセファロースに対してカップリングバッファー(1M 重炭酸ナトリウム溶液、pH 8.0)で透析した実施例 4 で作製した抗ubiquitin-X抗体を588μl (3.4 mg/ml)加え、室温で2時間転倒混和し抗体をセ

ファロースに結合させた。セファロースからカップリングバッファーで過剰の抗体を洗い流し、残りの活性基を500μlの1Mエタノールアミンで1時間転倒混和しブロッキングした。その後、100 mM酢酸緩衝液(pH 4.0) / 500 mM塩化ナトリウムと100 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 500 mM 塩化ナトリウムで4回交互に洗浄した。洗浄後のセファロースを25 mM Tris-HCl (pH 7.5)に懸濁し4 度で保存した。

実施例１４

ユビキチン化リゾチームの濃縮・回収およびリゾチームの遊離実験

実施例１３で作製した抗ubiquitin-X抗体セファロースを20μlに実施例２で作製したユビキチン化リゾチームを50μl加え、室温で2時間転倒混和しユビキチン化リゾチームを抗体に吸着させた。吸着後PBS緩衝液でセファロースを洗浄し非吸着ユビキチン化リゾチームを取り除き、セファロースを 2 等分し(10μlずつ)、2 mM DTTを2μl、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)を43μlずつ添加した。該セファロース溶液の一方には実施例１２で調製した UBP12-FLAG 溶液を 5μl(200ng)加え、もう一方には25 mM Tris-HCl (pH 8.0)を5μl加え35℃で2時間反応させた。反応後、セファロースを遠心分離により沈殿させ上清を回収した。

ユビキチン化タンパク質を抗ubiquitin-X抗体セファロースと混合する前の試料(30μl)(図8、レーン1)、セファロースと転倒混和後の非吸着分画(30μl) (図8、レーン2)、セファロース洗浄後にUBP添加(図8、レーン4)あるいは未添加(図8、レーン3)で脱ユビキチン化反応させた反応液(30μl)をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離後、実施例３で作製した抗リゾチーム抗体を用いてウエスタンブロッティング法で解析した。その結果、ユビキチン化リゾチームを抗ubiquitin-X 抗体セファロースに混ぜることでユビキチン化リゾチームがほぼ全てセファロースに結合し、遊離型リゾチームだけが結合せず残っていることが判明した(図8、レーン2)。ユビキチン化リゾチームが結合したセファロースは、緩衝液を加えただけではリゾチームが遊離せず(図8、レーン3)、UBP12-FLAGを添加することで初めてリゾチームが遊離してくることが判明した(図8、レーン4)。このとき観察されるリゾチームは、ユビキチンが1分子以上結合したリゾチームとしてではなく、ユビキチンが全て外れたリゾチームとして遊離されることが判明した。以上のことから、抗ubiquitin-X抗体セファロースを用いることでユビ

キチン化リゾチームを濃縮・回収できることが確認された。そしてユビキチン化リゾチームが結合したセファロースにUBP12-FLAGタンパク質を加えることで、脱ユビキチン化反応が起こり、ユビキチンを結合していないリゾチームを遊離することが確認された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明のモノクローナル抗体および脱ユビキチン化酵素を用いることにより、簡単な操作で生体中のユビキチン化を受けるタンパク質を単離・回収することができ、生体内のユビキチン化タンパク質を網羅的に解析することが可能である。

本発明のモノクローナル抗体および脱ユビキチン化酵素を用いることにより、簡単な操作で生体中のユビキチン化を受けるタンパク質を単離・回収することができ、生体内のユビキチン化タンパク質を網羅的に解析することが可能である。この結果、真核細胞内におけるユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解されるタンパク質群を同定することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号２，３、１０、１５：合成ペプチド

配列番号４～９、１２～１３、１６～１９、２１～２４、２６～２９、３１～３４、３６、３７、３９、４０、４２～４５、４７、４８、５０、５１、５３、５４、５６、５７、５９～６２、６４、６５、６７、６８、７０～７３、７５、７６、７８、７９、８１、８２、８４、８５、８７、８８、９０、９１、９３、９４：合成DNA

配列番号１１：pET22b-Ub-ECFPのUb-ECFPタンパク質コード領域

配列番号１４：pTrc99a-ECFPのECFPコード領域

配列番号２０：pET22b-UBP1のUBP1コード領域

配列番号２５：pET22b-UBP2のUBP2コード領域

配列番号３０：pET22b-UBP3のUBP3コード領域

配列番号３５：pET28a-UBP4のUBP4コード領域

配列番号３８：pET28a-UBP5のUBP5コード領域

配列番号４１：pET22b-UBP6のUBP6コード領域

配列番号４６：pET22b-UBP7のUBP7コード領域

配列番号４９：pET22b-UBP8のUBP8コード領域

配列番号５２：pET28a-UBP9のUBP9コード領域

配列番号５５：pET22b-UBP10のUBP10コード領域

配列番号５８：pET28a-UBP11のUBP11コード領域

配列番号６３：pET28a-UBP12のUBP12コード領域

配列番号６６：pET28a-UBP13のUBP13コード領域

配列番号６９：pET28a-UBP14のUBP14コード領域

配列番号７４：pET22b-UBP15のUBP15コード領域

配列番号７７：pET22b-UBP16のUBP16コード領域

配列番号８０：pET28a-UBP12-1のUBP12-1コード領域

配列番号８３：pET28a-UBP12-2のUBP12-2コード領域

配列番号８６：pET28a-UBP12-3のUBP12-3コード領域

配列番号８９：pET28a-UBP12-4のUBP12-4コード領域

配列番号９２：pET26Mの全領域

配列番号９５：pET26M-UBP12-FLAGのUBP12-FLAGコード領域

請 求 の 範 囲

1． 抗ユビキチン鎖抗体および脱ユビキチン化酵素を用いて試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質を回収する方法。

2． 固定化用支持体に固定化した抗ユビキチン鎖抗体と試料を接触させ、ユビキチン化タンパク質を固定化用支持体に固定化した抗ユビキチン鎖抗体と結合させる工程、固定化した抗ユビキチン鎖抗体に結合していない試料中の成分を除去する工程、および抗体に結合したユビキチン化タンパク質に脱ユビキチン化酵素を接触させ、タンパク質をユビキチンから切り離す工程を含む、請求項１記載のユビキチン化を受けるタンパク質を回収する方法。

3． 抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する、請求項１または２に記載の方法。

4． 抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンの C 末端アミノ酸配列 LHLVLRLRGG に含まれるエピトープを認識する、請求項３記載の方法。

5． 脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来の UBP１から UBP16 の少なくとも１つである、請求項１から４のいずれか１項に記載の方法。

6． 脱ユビキチン化酵素が、それぞれ配列番号２０、２５、３０、３５、３８、４１、４６、４９、５２、５５、５８、６３、６６、６９、７４および７７で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA がコードするユビキチン化酵素の少なくとも１つである、請求項１から４のいずれか１項に記載の方法。

7． 脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP12である、請求項５記載の方法。

8． 脱ユビキチン化酵素が配列番号６３で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするユビキチン化酵素である、請求項６記載の方法。

9． 脱ユビキチン化酵素がそれぞれ配列番号８０、８３、８６および８９で

表される塩基配列からなるDNAがコードするUBP12の変異体、および該DNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするUBP12の変異体である、請求項１から４のいずれか１項に記載の方法。

１０．　請求項１から９のいずれか１項に記載の方法により回収したタンパク質を質量分析により同定する、試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質の同定方法。

１１．　請求項１から９のいずれか１項に記載の方法により回収したタンパク質を一次元あるいは二次元電気泳動分析により同定する、試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質の同定方法。

１２．　請求項１から９のいずれか１項に記載の方法により回収したタンパク質を一次元あるいは二次元電気泳動法により単離し、アミノ酸配列を決定する請求項１１記載のタンパク質の同定方法。

１３．　ユビキチンのC末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する抗ユビキチン鎖抗体。

１４．　ユビキチンのC末端アミノ酸配列LHLVLRLRGGに含まれるエピトープを認識する、請求項１３記載の抗ユビキチン鎖抗体。

１５．　抗ユビキチン鎖抗体および脱ユビキチン化酵素を含む生体内でユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解され得るタンパク質を回収するためのキット。

１６．　抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する、請求項１５記載のキット。

１７．　抗ユビキチン鎖抗体が、ユビキチンのC末端アミノ酸配列LHLVLRLRGGに含まれるエピトープを認識する、請求項１６記載のキット。

１８．　脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP１からUBP16の少なくとも１つである、請求項１５から１７のいずれか１項に記載のキット。

１９．　脱ユビキチン化酵素が、それぞれ配列番号２０、２５、３０、３５、３８、４１、４６、４９、５２、５５、５８、６３、６６、６９、７４および７７で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズす

るDNAがコードするユビキチン化酵素の少なくとも１つである、請求項１５から１７のいずれか１項に記載のキット。

２０．　脱ユビキチン化酵素が出芽酵母由来のUBP12である、請求項１８記載のキット。

２１．　脱ユビキチン化酵素が配列番号６３で表される塩基配列からなるDNAがコードするユビキチン化酵素または該DNAに相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするユビキチン化酵素である、請求項１９に記載のキット。

２２．　脱ユビキチン化酵素がそれぞれ配列番号８０、８３、８６および８９で表される塩基配列からなるDNAがコードするUBP12の変異体、および該DNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするUBP12の変異体である、請求項１５から１７のいずれか１項に記載のキット。

２３．　配列番号８０、８３、８６および８９で表される塩基配列からなるDNAがコードするUBP12の変異体、および該DNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードするUBP12の変異体。

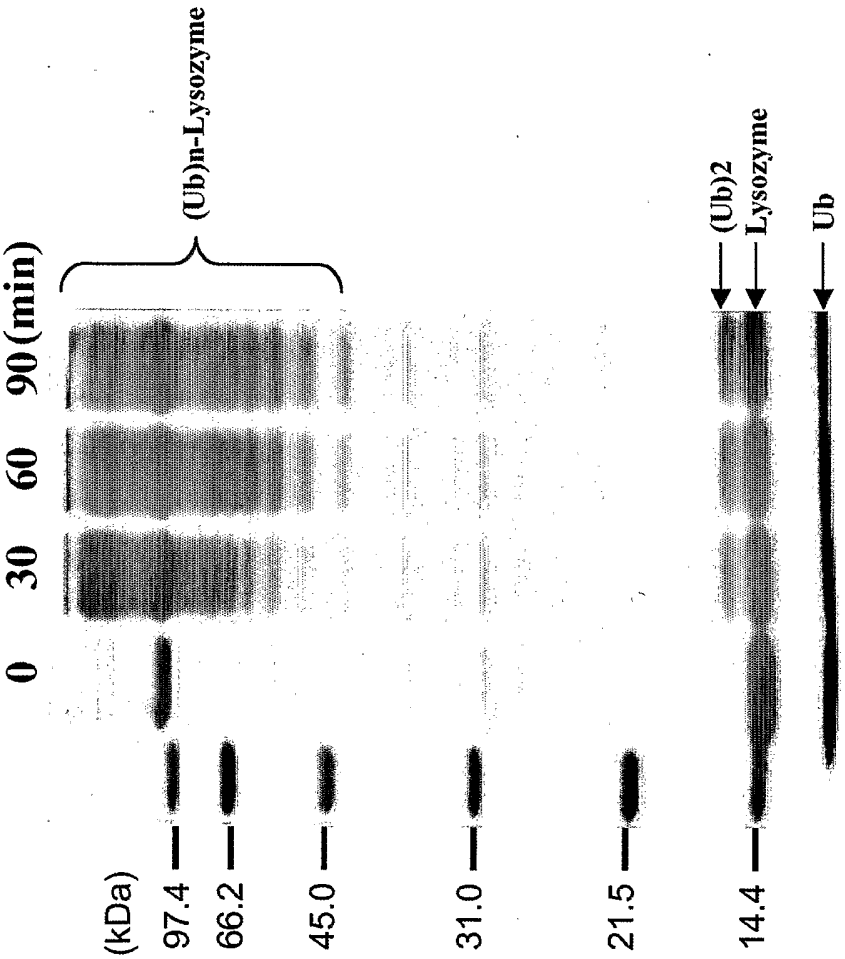

0
30
60
90(min)
(Ub)n-Lysozyme
(Ub)2
Lysozyme
Ub
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
21.5
14.4

図1

図2

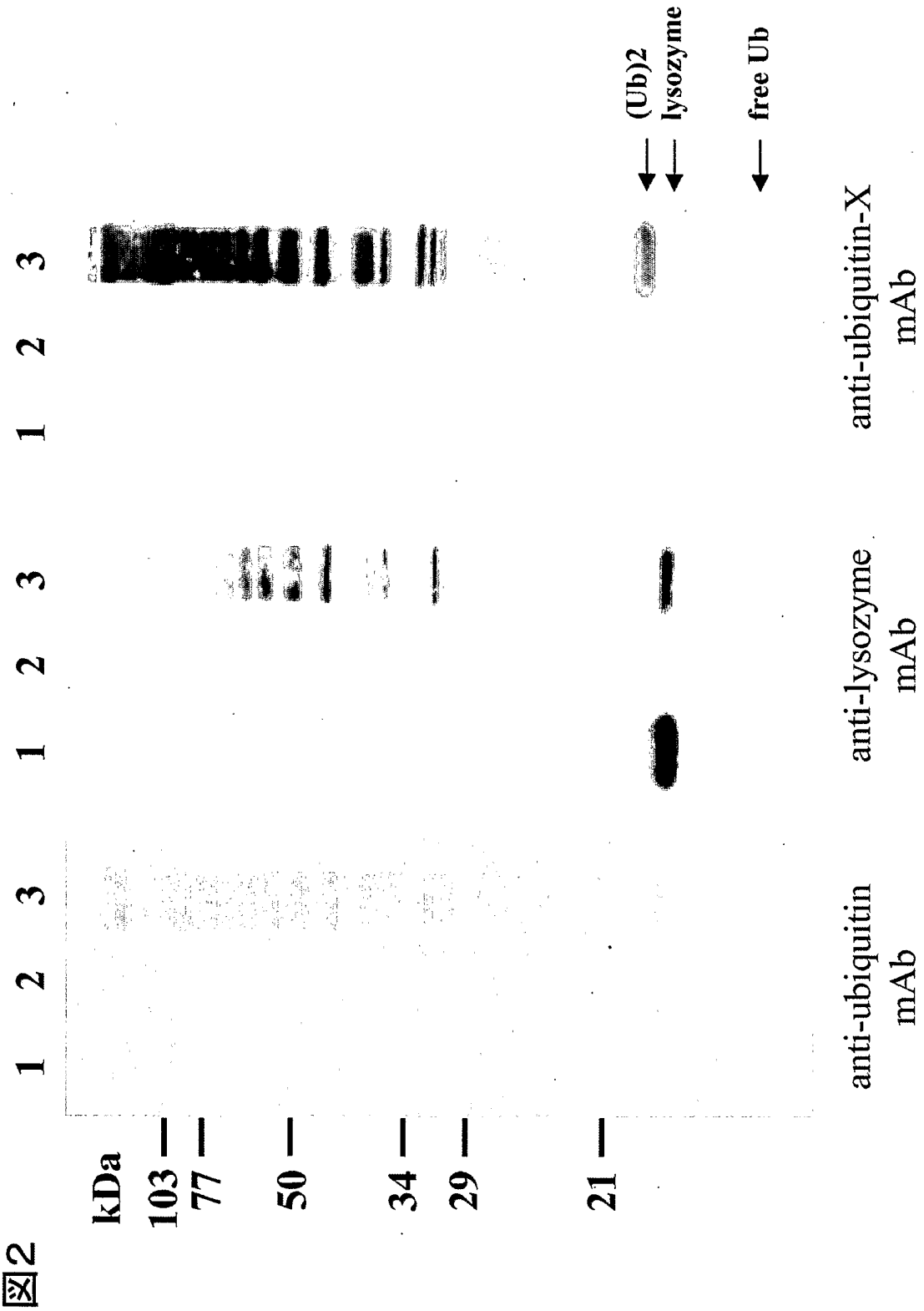

kDa
103
77
50
34
29
21
1 2 3
1 2 3
1 2 3
(Ub)2
lysozyme
free Ub
anti-ubiquitin mAb
anti-lysozyme mAb
anti-ubiquitin-X mAb

図3

A
Ub-ECFP + + + +
Fraction II - + - +
kDa
103
77
50
34
29
21
Ub-ECFP
ECFP
anti-ubiquitin-X mAb
anti-ECFP pAb
B
kDa
103
77
50
34
29
21
ECFP-(Ub)n
ECFP-(Ub)3
ECFP-(Ub)2
Ub-ECFP
ECFP
(Ub)2
anti-ubiquitin-X mAb
anti-ECFP pAb

図4

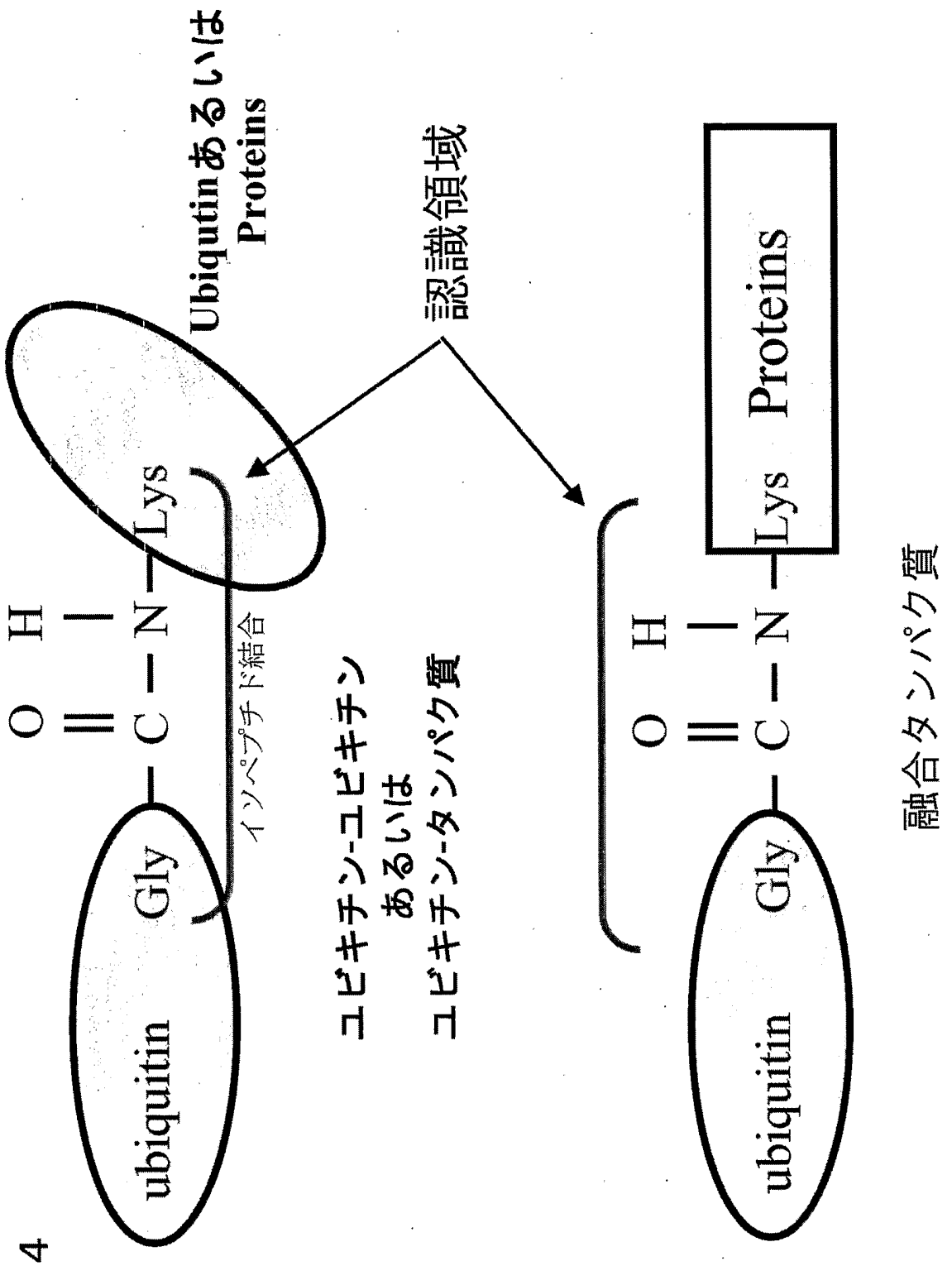

ubiquitin
Gly
C
O
N
H
Lys
イソペプチド結合
Ubiquitinあるいは
Proteins
認識領域
ユビキチン-ユビキチン
あるいは
ユビキチン-タンパク質
ubiquitin
Gly
C
O
N
H
Lys
Proteins
融合タンパク質

図5

kDa
103
77
50
34
29
21
(-)
UBP1
UBP2
UBP3
UBP4
UBP5
UBP6
UBP7
UBP8
UBP9
UBP10
UBP11
UBP12
UBP13
UBP14
UBP15
UBP16

図6

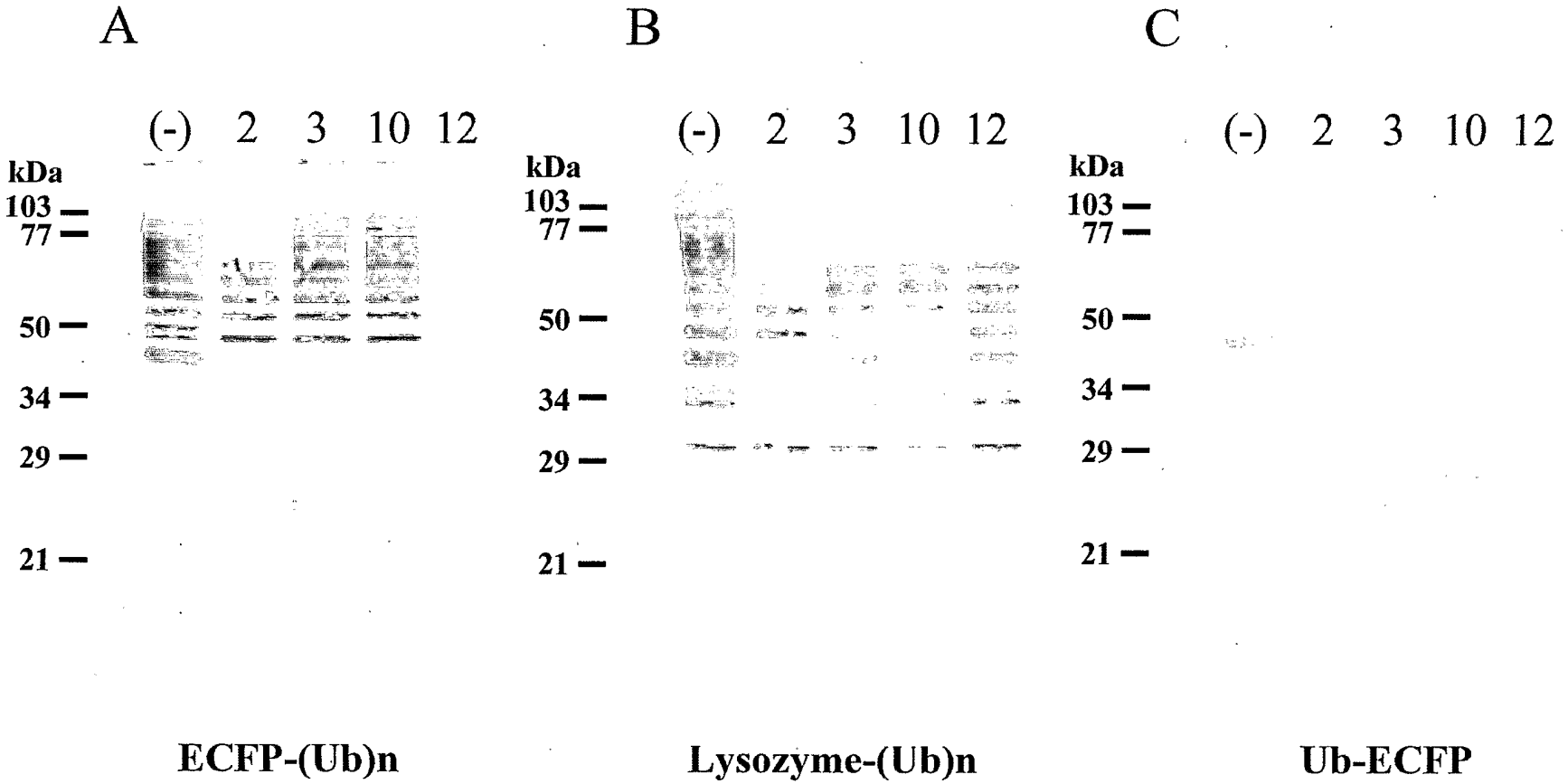


図7

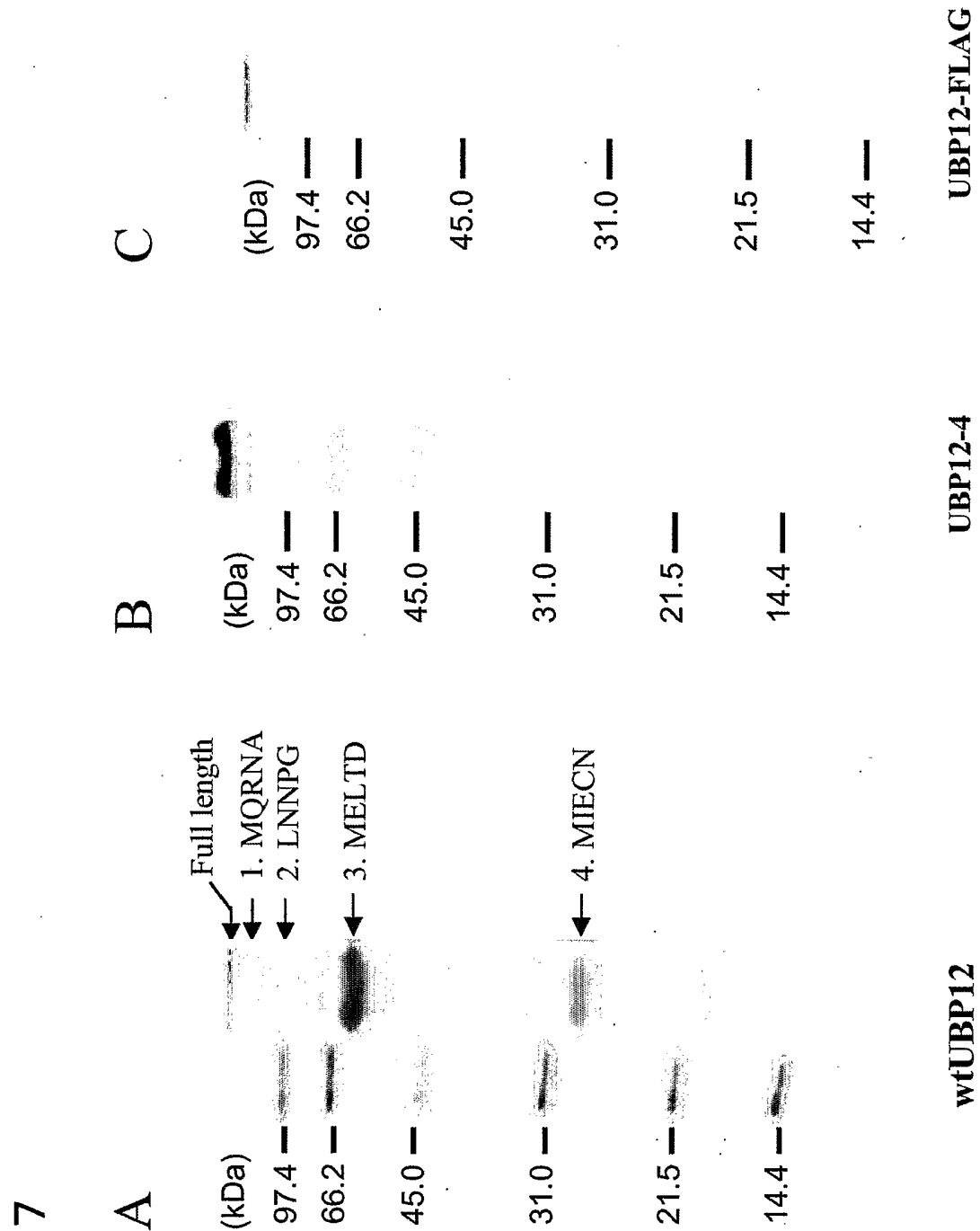
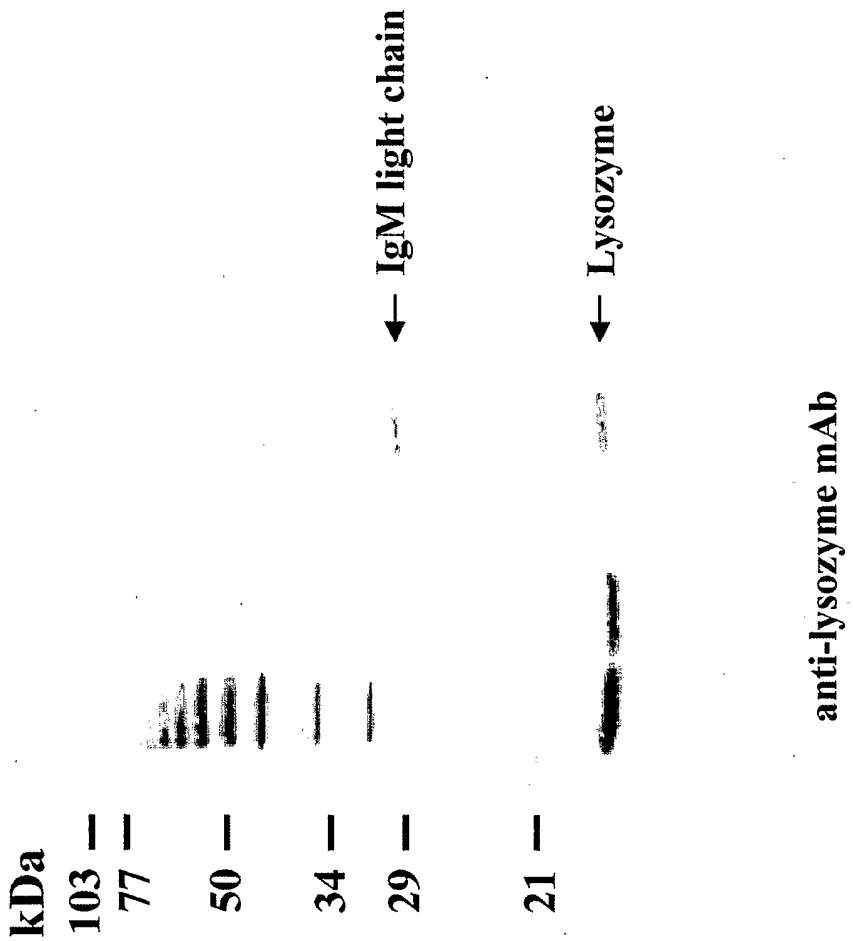

A
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
21.5
14.4
Full length
1. MQRNA
2. LNNPG
3. MELTD
4. MIECN
wtUBP12
B
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
21.5
14.4
UBP12-4
C
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
21.5
14.4
UBP12-FLAG

図8


kDa
103
77
50
34
29
21
1 2 3 4
← IgM light chain
← Lysozyme
anti-lysozyme mAb

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A method for removing ubiquitin from ubiquitinated proteins to collect the protein

<130> PH-2111-PCT

<140>
<141>

<150> JP 2003-153363
<151> 2003-05-29

<150> JP 2003-273076
<151> 2003-07-10

<160> 95

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 2
Lys Leu Lys Asn Asn Asn Asn Lys Asn Asn Asn Asn Asn Asn Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 19
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3

Val Asp Gly Ile Asp Lys Leu Asp Ile Glu Phe Leu Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Val

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

gggggggtac cgccgccacc catatgcaga ttttcgtgaa aaccc 45

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

gggggcttaa gtttaccacc acgaagtctc 30

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ttaagaacaa caacaacaag aacaacaaca acaacaacaa gg 42

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

tcgaccttgt tgttgttgtt gttgttcttg ttgttgttgt tc 42

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

ggggggatc catggtgagc aagggcga 28

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

gggggctcga gcttgtacag ctcgtccatg 30

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10

Lys Leu Lys Asn Asn Asn Asn Lys Asn Asn Asn Asn Asn Asn Lys Val
1 5 10 15

Asp Gly Ile Asp Lys Leu Asp Ile Glu Phe Leu Gln Pro Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 11

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<223> A coding region of Ub-ECFP protein in pET22b-Ub-ECFP

<400> 11

atgcagattt tcgtgaaaac ccttacgggg aagaccatca ccctcgaggt tgaaccctcg 60

gatacgatag aaaatgtaaa ggccaagatc caggataagg aaggaattcc tcctgatcag 120

cagagactga tctttgctgg caagcagctg gaagatggac gtactttgtc tgactacaat 180

attcaaaagg agtctactct tcatcttgtg ttgagacttc gtggtggtaa acttaagaac 240

aacaacaaca agaacaacaa caacaacaac aaggtcgacg gtatcgataa gcttgatatc 300

gaattcctgc agcccggggg atccatggtg agcaagggcg aggagctgtt caccggggtg 360

gtgcccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc 420

gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg caccaccggc 480

aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctggggcgt gcagtgcttc 540

agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat gcccgaaggc 600

tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag 660

gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcatcgagc tgaagggcat cgacttcaag 720

gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acatcagcca caacgtctat 780

atcaccgccg acaagcagaa gaacggcatc aaggccaact tcaagatccg ccacaacatc 840

gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc 900

cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcacccagt ccgccctgag caaagacccc 960

aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccgg gatcactctc 1020

ggcatggacg agctgtacaa gctcgagcac caccaccacc accactga 1068

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

catgccatgg gacatcacca tcaccatcac atggtgagca agggcgagga gctgttcacc 60

<210> 13

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

ccggaattca ttacttgtac agctcgtcca tgccgagagt gat 43

<210> 14

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<223> A coding region of ECFP in pTrc99a-ECFP

<400> 14

atgggacatc accatcacca tcacatggtg agcaagggcg aggagctgtt caccggggtg 60

gtgcccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc 120

gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg caccaccggc 180

aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctggggcgt gcagtgcttc 240

agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat gcccgaaggc 300

tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag 360

gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcatcgagc tgaagggcat cgacttcaag 420

gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acatcagcca caacgtctat 480

atcaccgccg acaagcagaa gaacggcatc aaggccaact tcaagatccg ccacaacatc 540

gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc 600

cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcacccagt ccgccctgag caaagacccc 660

aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccgg gatcactctc 720

ggcatggacg agctgtacaa gtaa 744

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15

Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly

1 5 10

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

ggaattccat atggatttgt ttattgaaag caagataaac 40

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

agtggaacca atattctcgt tcg 23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

gcataagata ttccgtattt tcg 23

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

ccgctcgagg tttacatctt taccagaaat atc 33

<210> 20

<211> 2454

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP1 in pET22b-UBP1

<400> 20

atggatttgt ttattgaaag caagataaac agtttattac aatttttatt tggttcccga 60

caggattttt tgagaaattt taaaacttgg agtaacaaca ataacaatct atcgatttat 120

ttattaattt ttggcatagt agtatttttt tataaaaaac cagaccatct aaactacatt 180

gttgagagcg ttagtgaaat gacaacaaac ttcagaaata ataatagcct tagccgttgg 240

ttgcccagaa gtaagtttac ccacttagac gaagagatct tgaaaagagg tggtttcatt 300

gctggtttag ttaatgatgg taacacttgt tttatgaact ctgttttgca atcattggca 360

tcatccagag aattaatgga gttcttggac aataatgtca taaggaccta tgaggagata 420

gaacaaaatg aacacaatga agaaggaaac gggcaagaat ctgctcaaga tgaagccact 480

cataagaaaa acactcgtaa gggtggcaaa gtttatggta agcataagaa gaaattgaat 540

aggaagtcaa gttcgaaaga agacgaagaa aagagccagg agccagatat cactttcagt 600

gtcgccttaa gggatctact ttctgcctta aatgcgaagt attatcggga taaaccctat 660

ttcaaaacca atagtttatt gaaagcaatg tccaaatctc caagaaaaaa tattcttctt 720

ggctacgacc aagaggacgc gcaagaattc ttccagaaca tactagccga gttggaaagt 780

aacgttaaat cattgaatac tgaaaaacta gataccactc cagttgcgaa atcagaatta 840

cccgatgatg ctttagtagg tcaacttaac cttggtgaag ttggcactgt ttacattcca 900

actgaacaga ttgatcctaa ctctatacta catgacaagt ccattcaaaa tttcacacct 960
ttcaaactaa tgactccttt agatggtatc acggcagaaa gaattggttg tttacagtgt 1020
ggtgagaacg gtggcataag atattccgta ttttcgggat taagcttaaa tttaccgaac 1080
gagaatattg gttccacttt aaaattatct cagttattaa gcgactggag taaacctgaa 1140
atcatcgaag gcgtagaatg taaccgttgt gccctcacag cagcgcactc tcatttattt 1200
ggtcagttga aagaatttga aaaaaaacct gagggttcga tcccagaaaa gttaattaac 1260
gctgtaaaag atagggtcca tcaaatcgaa gaagttcttg ccaaaccagt tattgacgat 1320
gaagattata agaagttgca tacagcaaat atggtacgta aatgctctaa atctaagcag 1380
attttaatat caagacctcc accattatta tccattcata tcaacagatc cgtatttgat 1440
ccaagaacgt acatgattag aaaaaataac tcgaaagtat tgtttaagtc aaggttgaat 1500
cttgccccat ggtgttgtga tattaatgaa atcaatttgg atgctcgttt gccaatgtca 1560
aaaaaggaaa aagctgcgca acaagattca agtgaagatg aaaacattgg cggtgaatac 1620
tatacgaaat tacatgaacg cttcgagcag gaatttgaag acagcgagga agaaaaagaa 1680
tacgatgacg cagaggggaa ctatgcgtct cattacaatc ataccaagga tatcagtaac 1740
tatgatcccc taaacggtga agtcgatggc gtgacatccg atgatgaaga tgagtacatt 1800
gaagaaaccg atgctttagg gaatacaatc aaaaaaagga tcatagaaca ttctgatgtt 1860
gaaaacgaga atgtaaaaga taatgaagaa ctgcaagaaa tcgacaatgt gagccttgac 1920
gaaccaaaga tcaatgttga agatcaacta gaaacatcat ctgatgagga agatgttata 1980
ccagctccac ctatcaatta tgctaggtca ttttccacag ttccagccac tccattgaca 2040
tattcattgc gctctgtcat tgttcactac ggtacccata attatggtca ttacattgca 2100
tttagaaaat acaggggttg ttggtggaga atatctgatg agactgtgta cgttgtggac 2160
gaagctgaag tcctttcaac acccggtgta tttatgttat tttacgaata tgactttgat 2220
gaagaaactg ggaagatgaa ggatgatttg gaagctattc agagtaataa tgaagaagat 2280
gatgaaaaag agcaggagca aaaaggagtc caggagccaa aggaaagcca agagcaagga 2340
gaaggtgaag agcaagagga aggtcaagag cagatgaagt tcgagagaac agaagaccat 2400
agagatattt ctggtaaaga tgtaaacctc gagcaccacc accaccacca ctga 2454

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

ggaattccat atgccgaacg aagataatga ac 32

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

tacagcccaa tattttcagg atc 23

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

atctttgtct tctttggatc ctg 23

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

ccgctcgagc tttagaattc ttttcaatgg ctc 33

<210> 25

<211> 3843

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP2 in pET22b-UBP2

<400> 25

atgccgaacg aagataatga acttcaaaaa gcaattgaga accatcataa tcaactacta 60

aaccaggata aagaaaatgc tgacagaaat gggtctgtta tagaagacct cccattatac 120

gggacaagta taaaccagca gtctacccct ggagatgttg acgatggaaa acacttactg 180

tatccagata ttgccaccaa cctaccactg aagacttctg acagactttt ggacgatata 240

ctttgcgata ctatttttct caattctaca gacccgaagg tcatgcaaaa gggcctgcaa 300

tcgaggggta ttttaaaaga gtctatgctt tcttactcaa ctttcagaag tagtattcgc 360
cctaactgct tgggttcatt aactgatcaa gtggtttttc aaacaaaatc cgagtatgat 420
tccatttcat gcccaaaata taataaaata catgtatttc aggcggtcat ctttaatcca 480
tcactggcag aacagcaaat ttcaactttt gatgatattg ttaaaattcc tatttatcat 540
cttaaggtta gcgtaaaagt ccgccaagaa ctggagcggt tgaagaagca tgtcggtgtt 600
actcaattcc actcactaga tcatttgcac gaatacgatc gagtagacct ttcgactttt 660
gattcttccg atcctaattt gttggattac ggtatttacg tttctgatga tactaacaaa 720
ctgatcttga ttgaaatttt taaacccgag tttaattcac ctgaagagca tgagagtttt 780
actgccgacg caattaagaa gagatacaat gctatgtgtg taaaaaatga atcactagat 840
aaaagcgaga cgccatctca agttgactgt ttttacacac tttttaaaat ttttaaaggg 900
cctttgacga ggaaaagtaa agcggaacct acaaagacaa ttgattctgg aaatttggcc 960
cttaacactc acctgaatcc tgaatggtta acgtccaagt atggatttca agcaagctca 1020
gaaatcgatg aggaaactaa tgagatattt actgaatacg tccctccaga tatggtggac 1080
tatgtaaacg atttggagac aagaaaaatt cgagaatcgt ttgtgaggaa gtgtttacaa 1140
ctgatatttt ggggtcaact atctacctca ttactggcac ctaattctcc cttgaaaaat 1200
acgaaaagcg taaagggaat gtcttcatta caaacttctt tctcaacact accttggttc 1260
catttattgg gagaatccag agcaaggatt ctattaaatt ccaatgagca aactcattcg 1320
cctttggacg cagaacctca ttttattaat ctttccgttt cgcattatta taccgataga 1380
gatataatca gaaactacga atctttgtct tctttggatc ctgaaaatat tgggctgtat 1440
tttgacgcac tgacatacat tgcaaatagg aaggggggcat atcaattgat tgcttactgt 1500
ggaaaacagg acattatagg ccaagaagct ctagaaaatg ctttgttaat gtttaaaatt 1560
aaccctaaag agtgtaacat ctccgaatta aatgaggcga ctttgctatc tatttacaaa 1620
tatgaaacat caaataagag ccaagtaacc tctaatcacc taacaaattt gaaaaatgct 1680
ctaagattgt tggccaaata taccaaatct gacaaactaa aattttacgt cgatcatgag 1740
ccctacagag ctttatccca ggcatacgac acactttcaa ttgacgagtc tgttgatgaa 1800
gacattataa aaactgcata ttcggtcaag attaacgact ctcccggatt aaagttggat 1860
tgtgatagag cactttacac cattgctatc agtaaaagaa gccttgattt gttcaatttt 1920
ttaacagagg aatgcccaca gttttccaac tattatggtc cagagaagct tgattaccaa 1980
gaggcattga agcttcttca agtgaatgaa aatgcctctg acgaaaccat tttgaaaatc 2040
tttaaacaaa agtggtttga tgaaaacgtt tatgagcctg accaatttct tattttgagg 2100

gcagcattga ccaaaatcag tatagaaaga aattcaactt taatcaccaa cttcttacta 2160
actggtacga tagatccaaa ttccttgccg ccagaaaatt ggccaactgg cattaataat 2220
atcgggaaca cctgttacct aaattcttta ttacaatatt acttttccat tgcgccacta 2280
agaagatatg tattggaata tcaaaaaacg gtagaaaatt tcaatgacca cctctctaat 2340
agtgggcata ttagaagaat tggtggaaga gaaattagta gaggcgaagt ggaaagatct 2400
attcaattca tataccaact tcgcaacctt ttctatgcga tggttcatac aagagaaaga 2460
tgtgtaacac cctcaaaaga gctagcatat ttggcatttg ctccaagtaa tgttgaagta 2520
gaatttgaag tggaaggcaa taaagtagtt gatcaaacag gagttctttc ggattcaaag 2580
aaggaaacaa cggatgacgc atttactaca aaaataaagg atacaagcct gattgattta 2640
gaaatggaag atggccttaa tggcgatgtt ggtacagatg cgaacagaaa aaaaaatgaa 2700
tcgaatgatg ctgaagtaag tgagaacgaa gatacaacag gattaacttc acctacgcgt 2760
gtggcaaaaa tcagttctga tcaattagaa aatgctttgg aaatgggtag gcaacaagat 2820
gttactgaat gcataggaaa cgtgttattt cagatagaaa gcggttcaga gcctatccga 2880
tatgatgaag acaacgagca atatgacttg gttaagcaac tattttatgg tactactaaa 2940
caaagtattg ttcctttgtc cgcaacaaat aaagtccgta cgaaagttga aagattccta 3000
tcgttactga taaatattgg cgatcatcct aaagatattt atgatgcgtt tgattcttat 3060
tttaaagacg aatatctgac aatggaagag tatggtgatg ttatacgtac cgttgctgtt 3120
acaacttttc ctactatttt gcaggtacaa atccaaagag tttattacga tcgtgaaaga 3180
ttaatgccgt ttaaatccat tgagccctta ccattcaaag aagttattta catggacaga 3240
tacgcggata cagagaaccc tttattgttg gcaaaaaaga aagaaacaga agaaatgaag 3300
caaaagttga aggtaatgaa aaatagacaa agagagcttt tgagtcgtga tgattcaggg 3360
cttacaagga aggatgcatt tttggagagt atcaagctat tggaatcgga taccataaag 3420
aaaactcctt taaaaattga ggctgctaat gatgtgataa agacgctgag aaacaacgtt 3480
caaaatatcg ataatgaatt gatgaaatta tacaatgata tcaacagttt ggaagagaaa 3540
ataagccatc aatttgacga tttcaaggaa tatggttact cactgttttc ggtttttatt 3600
catcgcggcg aggccagtta tggtcactat tggatatata tcaaggacag aaatcgcaat 3660
ggaatttgga ggaagtacaa tgatgaaacc atcagtgagg tccaggaaga ggaggtcttc 3720
aatttcaatg agggtaacac tgcaactcca tatttcctag tatatgtcaa acaaggacaa 3780
gaaggtgata ttgagccatt gaaaagaatt ctaaagctcg agcaccacca ccaccaccac 3840
tga 3843

<210> 26

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

ggaattccat atgaacatgc aagacgctaa caaag 35

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

ctatggcttt ttgtgtgatg atg 23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

aactcatctg tagaaaagag ctc 23

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

ccgctcgaga tttctctttt gatacattaa aa 32

<210> 30

<211> 2763

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP3 in pET22b-UBP3

<400> 30

atgaacatgc aagacgctaa caaagaagag tcgtactcga tgtacccgaa aacctcttct 60

ccaccaccac ctacgccaac caatatgcag attcctattt atcaagcgcc tttgcagatg 120
tacggctaca ctcaggcccc atatctatac cccacacaaa tacctgccta ttcgtttaat 180
atggtcaacc aaaaccagcc aatctaccat caaagtggca gcccacatca cttgcctccg 240
caaaacaata ttaacggcgg aagcactacc aataacaaca acattaacaa gaagaagtgg 300
cactctaatg gcattaccaa taacaatgga agcagcggta atcaaggcgc caactctagc 360
ggtagcggca tgagctacaa caaatcccac acctaccatc acaattactc taacaatcat 420
atccccatga tggcctctcc aaacagtggc agcaatgcgg gcatgaaaaa acagaccaac 480
tcttccaacg gcaacggttc ttcggctact tcaccatcgt actcttccta caactcttct 540
tcacagtatg atttatacaa gtttgatgtc actaaattaa agaatctcaa ggaaaattca 600
tcaaacttga ttcaattgcc actgttcata aacactacgg aagcagaatt tgctgcggca 660
agtgtccaaa ggtacgaatt aaacatgaag gctttgaacc taaactctga aagcttagag 720
aactcatctg tagaaaagag ctctgcccat catcacacaa aaagccatag tataccaaag 780
cataatgagg aagtaaagac agaaacacat ggggaagaag aagatgctca tgataaaaaa 840
ccacatgcga gcaaagatgc gcacgagctt aaaaagaaaa ctgaagtaaa gaaagaggat 900
gctaagcaag accgtaacga aaaagttata caggaacctc aagctactgt tttacctgta 960
gtggataaga aggaaccaga ggaatctgtt gaagaaaata cttccaagac atcttcacct 1020
tcaccatctc ctccagcagc aaaatcctgg tccgccatag catcagatgc gattaaaagt 1080
agacaagcta gtaacaaaac agtctccgga tcgatggtca ctaaaacacc aatttctggt 1140
acgaccgcag gcgtttcatc aacaaacatg gctgcggcga ctataggtaa atccagctct 1200
cccctgttgt ccaagcagcc tcagaaaaag gataaaaaat acgttccacc ttctacaaag 1260
ggtattgagc cactgggttc gattgcgtta agaatgtgtt ttgatcccga tttcattagt 1320
tacgttttac ggaataaaga tgttgaaaac aaaataccag tccattccat tattccaaga 1380
ggcataatta acagagccaa catttgtttt atgagttctg tgttacaagt gttactctac 1440
tgtaagccat ttattgatgt aattaacgtt ctcagtacac ggaataccaa ttcaagagtc 1500
ggcacatcat cctgtaaatt attagatgct tgtttgacta tgtataagca attcgataag 1560
gaaacctatg agaaaaaatt cctagagaat gctgatgatg ctgaaaaaac cacggaaagt 1620
gatgcaaaaa aatcatcaaa atccaagagt ttccaacact gcgccactgc cgatgctgtc 1680
aaacctgacg aattttacaa aactttgtct actataccga agttcaaaga cttgcaatgg 1740
ggccatcagg aagacgcaga agaatttttg acccacttat tggaccaatt acacgaggaa 1800
ttaatttctg caattgatgg cttaaccgat aatgaaattc aaaatatgct gcaaagtatt 1860

aatgatgaac aattgaaagt tttctttatt agaaatttgt cacgttatgg aaaagcagag 1920
tttatcaaaa atgctagtcc tagactgaag gagttgatag aaaaatatgg cgtgatcaat 1980
gatgactcta ccgaagaaaa tggttggcat gaagtgagcg gatctagcaa aagaggcaag 2040
aaaactaaga ccgctgccaa gaggactgtc gagattgttc catcaccaat ctccaaactt 2100
ttcggtggcc agttcagatc tgtgttagat ataccgaaca ataaggaatc tcaatcgatt 2160
acactcgatc cgttccaaac aattcaattg gacatttcag atgctggtgt gaatgatcta 2220
gaaactgcat tcaaaaaatt tagtgaatac gaattgctac cctttaagtc ctcgtcaggg 2280
aatgatgtcg aggccaagaa gcagactttt attgataaat tgccgcaagt tcttttaatc 2340
caattcaaaa gattctcatt cataaataat gtgaacaaag acaacgcaat gacgaactat 2400
aacgcgtaca atggacgtat tgagaagatc aggaaaaaaa ttaaatatgg tcacgagtta 2460
atcatacctg aagaatcaat gtcttccata acattgaaaa acaacacctc agggattgat 2520
gatagaagat ataagctaac cggagttata taccatcatg gggtaagttc cgatggcggt 2580
cattacacag cggatgttta tcatagcgag cacaacaaat ggtatagaat agatgatgta 2640
aatattaccg aactagagga cgatgacgtt ttgaaaggtg gcgaagaagc ttctgattcg 2700
aggactgcct atattttaat gtatcaaaag agaaatctcg agcaccacca ccaccaccac 2760
tga 2763

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31
catgccatgg agcagaatat tattagtacc 30

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

ttttagtcgt gaggcgtatt gtc 23

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

ctgatttcag tgttattgtc gac 23

<210> 34

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

ccgctcgaga acaccgtaga cgcggtgata aa 32

<210> 35

<211> 2805

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP4 in pET28a-UBP4

<400> 35

atggagcaga atattattag taccataagg gatgagtgta ttcgtcaccg gtcgaagtac 60

cttacgatag cacaactaac cgctattgca gaggctaaaa ttaacgaatt catcataact 120

ggtaaggcaa aagatcaaga tttgagcagt cttctagata aatgcatcga tattttatct 180

atttacaaga agaactcgaa agatatcaaa aatattatat cgtgcaaaaa taagggtgca 240

atgattagtt caaattccgt aatgattatt caattaaatt atgtttacta caaggtaatt 300

cacattattg taacaaccaa tattcctcat ttaagtgaat tcgccaagat taaattacat 360

aagagcacga gtgatgaggg caacggtaat aacaacaata atgaatttca actcatgaac 420

atttacaaca ctttgctgga aaccttatta aaagatgaaa acattgcaaa aataaaaagt 480

ttcattaagt cttccataaa acaaacaaaa ttgaaccatg agcaagaaga atgtaacctg 540

atgagaacgg gttcctatat cacttccaat caattaaact ccctaataag ttcatcagca 600

aattctgctt cctcccaaat ggagatacta ctgatagata tacgatcaag gttggaattc 660

aacaagtcac atattgatac aaaaaatatt atatgcctgg agcctatttc ttttaaaatg 720

tcatattcag atcatgattt ggagaaaaaa tcattaatta cttctcctaa tagtgagatt 780

aaaatgtttc aaagtagaaa tcttttcaag tttatcattc tctatacaga cgcaaacgaa 840

tacaatgtta aacagcagtc tgtcctgttg gacattctgg tgaatcattc ctttgaaaaa 900

ccaatatccg atgactttac caaaattttc attctggaat ctggttttcc aggttggctt 960

aagtcaaatt atgggaggca agtatcatca tcttttccat caaataacaa tattaaagat 1020

gatagtgttt atattaatgg taacacttct ggcctaagtt tacaacattt acctaagatg 1080

tctcccagta taagacattc aatggacgac tctatgaaag aaatgctagt tgcgcctact 1140

ccattaaatc atcttcaaca acagcaacaa cagcaatcag acaatgatca tgtgctaaaa 1200

agatcttcaa gtttcaaaaa attattctca aattatacgt ctcctaatcc gaagaattca 1260

aattcaaact tatattctat atcttcgttg tccatatcta gttcaccatc gcctttacct 1320

ctacattcgc ctgacccagt taagggcaat tcattgccaa tcaattatcc ggaaacgcca 1380

catctttgga aaaacagtga gacagatttt atgacaaatc aaagagaaca gttgaatcac 1440

aactcttttg ctcacatagc tcctatcaac acgaaggcca tcacttctcc atcaagaact 1500

gccacaccga agttacaacg cttcccgcaa acaattagta tgaaccttaa tatgaactcc 1560

aatggacaca gttctgccac ctctaccatt caaccttcgt gtctatcctt gtctaataat 1620

gactctttag atcatacaga tgttacacca acttcttctc ataattatga ccttgatttc 1680

gcggttggtt tggaaaatct aggaaattcg tgttacatga actgtatcat tcagtgtatc 1740

ttaggtacac acgaattaac ccaaatcttt ttggacgatt catatgctaa acacatcaat 1800

attaatagta agttgggatc gaaaggtatt ctggcaaaat attttgcaag gttggttcat 1860

atgatgtata aggaacaggt tgatggttca aagaaaattt ccatatcacc gataaaattt 1920

aaattggcat gtggatctgt taactcatta tttaagactg catcccaaca ggactgccaa 1980

gagttttgcc aattccttct agatggtctt catgaagact tgaaccaatg cggttcaaac 2040

ccacctttga aggagctttc tcaagaagct gaggcgagaa gagaaaaact gtctttgcga 2100

attgcctcgt caattgagtg ggaacgattc ttgactactg atttcagtgt tattgtcgac 2160

ttatttcagg gacaatacgc ctcacgacta aaatgtaaag tctgtagtca tacctcgaca 2220

acataccaac cttttacggt gctgtcaatc cctattccta aaaaaaattc ccgaaataat 2280

attaccattg aagattgttt cagagagttc accaaatgtg agaacttgga agtggatgag 2340

caatggttgt gcccacattg tgaaaaaagg cagccctcca cgaaacaatt gacaataacg 2400

agattaccga ggaatctgat agtccattta aagagatttg ataatttatt aaacaaaaat 2460

aatgacttcg tcatataccc ttttttgttg gacttgactc cattttgggc caatgatttt 2520

gacggggttt ttcctccagg tgttaatgac gatgaactac caataagggg acaaatacca 2580

ccttttaagt atgaattata tggtgtagca tgccactttg gtactttgta tggtggtcat 2640

tatacagcct atgtgaaaaa gggattaaag aagggatggc tatattttga tgataccaaa 2700

tataaacctg tcaaaaacaa agccgatgca attaactcta atgcatacgt tttgttttat 2760

caccgcgtct acggtgttct cgagcaccac caccaccacc actga 2805

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

catgccatgg gctcagaaca agccttaag 29

<210> 37

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

atagtttagc ggccgcaaaa attctttcgt aaaataaaac 40

<210> 38

<211> 2451

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP5 in pET28a-UBP5

<400> 38

atgggctcag aacaagcctt aagtgaggtt gtcgaatctg ctaaagagcg gttcggcagg 60
cttaggcatt tagttcagaa gtttcttgat gatgacgacg tgccacaaga gtgtctgcct 120
ttgctccaag aatgcgcaga aatatggtct agttatgtgg acgcatgcca ggatataacc 180
atgcaggccc ctaaagaaga tgcaaaccgg ttgtcaaagg ggtttctccg attgaatgaa 240
acagcttttt tatattacat gatcgtatat acgctcttgg aggatactct accaagacta 300
aaggaatttt cgagcaacaa ggaccagaat gttagaaatt tgtacgggga gagaatccag 360
cttttgcata atgacccaaa tattgagcgg attcgaaatg tcattgaaaa ttaccctaaa 420
tttatacagt tgcaaactat agagcctgga aaattaagtt caatgttgca ttttcatggt 480
gacgctctct tgcttatcga tgtacggccc aggtctgaat tcgttagggc ccatatcaaa 540
tgcaaaaaca ttatatgcat cgatcctgcc tcatttaagg attcttttac agaccaacaa 600
attgaaagtg tctctttgat cacttcgccg cactcagata tcactttctt ttcaaatcga 660
gacaagttca agttcattat tttatatact gacactcaat tgcataataa tttccagcaa 720
aggcaaactc gcatccttgc gaagattctt tcccaaaatt cagtaattaa accgctgagt 780
gggacgaaaa tactcatttt ggaaaatggg ttctcaaact gggttaaatt aggtggggcg 840
tatcaatcat ctgtcagtga aacagcgcat cttacatcct cgtcttcaac gccagctttt 900
ggtagtccgc aagtcccaac aggcttgttc aatcagaaat ctctatctcc aaataaagat 960
aagagtatgc cgatggtatc catgaatacg cagcctttgc taacaacggt gcaaaggcct 1020
caattaccct tatactattc agatttgccc attataccgc aaccaagccc caacagaaat 1080
tctcccaccg ttcaaaaatt tagtccacat ccaccaacca ctctctcaaa actcaataca 1140
ccctcgacca ttcaaaataa agcaaacact gtggaaagaa tatcgccaga tatccgcgct 1200
gcacaagccc atgcctattt gccccctgca tcgaatgtat tctcgccacg tattccgcct 1260
ttaccacaac agaacttgtc ttcgtcgagg cagaccatcc taaacaactc acaagtgctt 1320
gatctagatc ttatagtagg attggaaaat ataggtaact gttgttatat gaactgtata 1380

cttcaatgtt tggtgggaac acacgatttg gttcgaatgt ttttggataa cacatatctg 1440
aattttatta attttgatag ttcaagaggt tctaaggggt tgctagctaa aaatttcgcc 1500
atcttggtca ataatatgca cagacacggt gcattcacac ctcctaacgt aagaacgata 1560
ccagttcaga ctattcagtt taaaaaaatt tgcggccata tcaaccccat gtatagtgat 1620
tcaatgcagc aagattgtca agaattttgt caatttttgc ttgatggctt gcacgaggat 1680
ttgaaccaaa acggcagcaa aaagcatctt aaacagttat cagatgagga agaacgaatg 1740
agagaaaaaa tgtccatacg caaagctagt gctctcgagt gggaaagatt tttgcttacc 1800
gacttcagtg cgataattga ccttttccaa ggacagtacg catctaggct acaatgtcaa 1860
gtttgtgaac atacctccac aacttaccaa acattctctg ttctttctgt tcctgtccca 1920
cgcgttaaaa cttgtaacat attagactgt ttccgggaat tcaccaaatg cgaaaggtta 1980
ggtgtcgatg aacaatggtc atgtcctaaa tgcttaaaaa agcagccttc cactaaacaa 2040
ctgaagatta ctagattgcc taagaaacta attattaatt tgaaacgatt tgacaatcaa 2100
atgaataaga ataatgtgtt tgtccaatat ccttactcct tagatcttac accatattgg 2160
gcgagagatt ttaatcatga agctattgtt aatgaggaca ttcctaccag gggccaagta 2220
ccaccattta gatacagact gtatggggtt gcatgtcatt cggggagttt gtatggggga 2280
cactatactt catacgttta taagggacca aaaaaaggtt ggtatttttt cgatgactcg 2340
ctttatcgtc ctataacgtt tagtactgaa tttatcacac ccagtgcata tgttttattt 2400
tacgaaagaa tttttgcggc cgcactcgag caccaccacc accaccactg a 2451

<210> 39
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39
ggaattccat atgagcggag aaacgtttga gttc 34

<210> 40

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

ccgctcgagc agaccaaatc ctttatacat taag 34

<210> 41

<211> 1524

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP6 in pET22b-UBP6

<400> 41

atgagcggag aaacgtttga gttcaatatt agacattctg gtaaagttta cccaataaca 60

ctttccactg atgctacttc agcagatttg aaaagcaaag cagaggaatt gacccaagtc 120

ccaagtgccc gccaaaaata catggttaaa ggtggcttgt ctggcgaaga gtccattaaa 180

atatatccct taatcaagcc aggatcgaca gtaatgctat tggggactcc agatgctaac 240

ctgatttcta aaccagccaa aaagaataat ttcattgaag accttgcgcc tgagcaacaa 300

gtccaacaat ttgctcaatt gcctgttggt ttcaagaata tgggcaacac ctgttatctg 360

aatgctaccc tacaggcttt atacagagtg aacgatttaa gggatatgat tcttaattat 420

aacccttctc aaggtgtgtc taacagtggt gcacaagatg aagagattca caaacaaatc 480
gttattgaaa tgaagcgttg ttttgaaaat ttacagaata aaagtttcaa gagtgttttg 540
ccaattgtgt tattaaacac gctaagaaag tgttatccac aatttgctga acgtgattca 600
caaggtgggt tctataaaca gcaagacgct gaggagttgt ttacacaact attccatagt 660
atgagtattg tttttggtga caaattttcc gaagatttca ggattcaatt taaaactacc 720
atcaaagaca cagctaatga taacgatatt actgttaaag aaaatgaaag cgattctaaa 780
ttacaatgtc atatttctgg tactacaaat ttcatgagaa atgggctcct ggaaggtttg 840
aatgagaaaa ttgaaaaaag atcagacttg actggcgcca attccatcta tagcgtcgaa 900
aagaaaatat caagattacc aaagttttta actgttcagt acgttagatt tttctggaaa 960
aggtcaacca acaaaaaatc taaaatattg cgtaaggtcg ttttcccatt tcaattagat 1020
gttgcagaca tgcttacccc agaatacgca gcagagaagg taaaagttcg tgacgaactg 1080
agaaaagttg aaaaggagaa aaatgaaaag gaaagagaga tcaaaaggcg taaatttgac 1140
ccatcatcca gtgaaaatgt catgacacca agagaacaat atgagacaca agtggctctt 1200
aacgaaagtg aaaaagatca atggctcgaa gagtataaga aacattttcc tccaaacttg 1260
gaaaaaggtg aaaacccatc ttgtgtttat aacttgatcg gtgtcattac acatcaaggt 1320
gccaattctg agtctggaca ctatcaagct ttcataaggg acgaactgga cgaaaataaa 1380
tggtacaaat ttaatgatga taaagttagc gttgttgaaa aggaaaaaat tgaatcttta 1440
gccggtgggg gcgaaagtga tagtgcactg atcttaatgt ataaaggatt tggtctgctc 1500
gagcaccacc accaccacca ctga 1524

<210> 42
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

ggaattccat atgctagacg atgataaggg cac 33

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

gaagagcata cttagtgaat tcg 23

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

gagcaacgga tctcattatt ctc 23

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

atagtttagc ggccgcgtca taaacccttt cataaaaca 39

<210> 46

<211> 3249

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP7 in pET22b-UBP7

<400> 46

atgctagacg atgataaggg cacggccatg catccacata taacgccgtt cacgcctgag 60

tactcaaatg aattactgcg aagggtccag gacctgtacc acgaagatat caagcactac 120

tatccgcagc taaaactgga gaagctgctg gaccttctgg agcatacaga gtacctattc 180

gagttatatc tagattcaat ccatcacgat aggcccaacg atgcactgac agcgtttatc 240

attggatgct actacgtgtt cttaattatt ccacaatctt tgcagttcca aacacgaaac 300

aagtcctaca gcatctatac agatctaaaa aagatgtatg agaatgaaat gaacatgacc 360

aatgttgtgc ttatggtgaa gaaagaaatc ggtgtggtcc tagatgaatc ggttaaacac 420

ggggccggta ttgagcacag aatcaccaag aagagggcat tttcagttcc agctgacgat 480

ctttcaggtc aggtagcttc actatcactt gacaccgcgg caccgcaaga tcatggcctc 540

aaaggcacgt ttactgaaga cgacgcagaa caatcttcac ctgtttggac agcaccaaac 600

ttagagccca acgaccaatt gaaactggct ttattgcccg aagtgatacc aacgccagct 660

tttcgtgagc ctgaaagaaa gacaagtgtt ccagtgagac catctgtttt attggaagat 720

gtaccctcca tataccacga ggatgacact agtttcgcat ctttgaaccc accatttcga 780
gaaataaccg cagatagatc agtaactcat cgaaaggatt cttaccattc tgtttatatg 840
gtggatagcg gcaacctcaa ggaagacaat gatgatctgt tcaacgttga gaatgatggc 900
ttcatccaga gtttggatat tttacaaaag cagagtataa tcacagcacc agaattgttt 960
agtattttat cgaatcgcgt tgaacgtgaa aaggttttac tcatcgactt gagaatacca 1020
caaagatctg caataaatca cattgtggct ccgaacttag tgaatgtgga tccaaacttg 1080
ttgtgggaca agcagacgaa cacacctatc tacaaggatg acatattgga acatttactg 1140
aaggagaatg agaattttat aaaccgtaat aaatttgatt acattgttta ctatactgat 1200
gtgaagacct tcatgactat aaattttgat tatgcattta ttttttttta tttgatgctg 1260
acttctcaga agactccttt aacaactgta cctactaccc tcttaggtgg gtacgaaaaa 1320
tggaagaaaa ctctgcattc gtatgcccag gagtatcata tctctattga agattacttg 1380
tacagacctt actcacagaa ggcgcgctta caacaggagc agcagcagca gcagcagcag 1440
ccggattctc aggactcttt ttccgctaag gaatcatcta caaaagttcc tgagcctccc 1500
tcctggaagc cccctgacct gcctataagg ttaaggaaac gtcctccacc tccaccgcct 1560
gtatcaatgc ccacaacccc agaaattcca cctcctctgc cccctaagat aatggttcat 1620
tcacaagtca gttctatctc tcgaaagccg ccaataccag caaagcagca tgtcaaaaag 1680
gaacaactta actccaatga aattattcaa agaaaaagac agcaccagca tcagcattac 1740
gaccaacaaa tattacaacc gcaaagggcg tacaatattc caactattga acgcagtcca 1800
aacgtatacg tttcgttgtc catcacggga ctaagaaatt tgggcaatac atgttacatt 1860
aatagtatga tacaatgtct attcgctgcg aaaacattcc ggacactctt catttcatcc 1920
aaatataaga gctatctgca accaataagg agcaacggat ctcattattc tcctaaactt 1980
tcgaattcac taagtatgct cttcaacaag atgtatctaa atggtggttg ctcagttgtc 2040
ccaacaggat ttctcaaagt tatcaatcaa ttgcgtcccg atttgaaaat tcctgatgac 2100
caacaggata cccaagagtt cctaatgata cttttagaca ggttacacga tgaactttcc 2160
gaccaacagc atgtagcgaa cgattatccg aatttattat tgtataatgc agatgcccta 2220
aaggtttcaa acaacgaata taagcactgg tttgacaaaa atgtcattgg taatggtata 2280
tctcctattg atgacatttt tcaagggcaa atggagaaca gcttacaatg taaaaggtgc 2340
ggttacacta ctttcaacta tagcacattt tatgttttat cactggctat accaagacgt 2400
tccatgaagt tgagtaaact tggtaggtct actgagaaaa gagttaagtt agaggattgt 2460
attaatatgt ttacaagcga tgaggtactc tctggtgaaa atgcatggga ttgcccacgc 2520

tgtggcccca cggcgtctgt gtctacatct gtgtctgcat tagagaatga gccatccatt 2580
gttaagagta aaaagaaaaa aagtcggttt tttacattac atacaggaac caagcgtcgt 2640
catctcgact tttttggaga cggtattact gagggccata atagcaataa taataatacg 2700
acaatctttg aacgagaaag gtccagatca cccttcagga tgttgggtgg tagtgggaag 2760
aggtccagtt ccagtacacc gttcagtact ggtggtaatg atagtaacaa ctcgagtgat 2820
tacaagaaca aaaaattgac aacagtgaaa acgataaatt ttgtaacttt accaaaaatc 2880
ttagtcatcc atttatcgag attttattac gatttgacca agaaaaataa caccgtcgta 2940
acatatccat tgatactaaa cattatattg aaaaacaatg acactatgaa atataagcta 3000
tttggagtgg ttaaccatac aggcacatta atcagtggcc attacacgtc actggtgaat 3060
aaagaccttg aacacaatgt gaatattggg cgttctaaat ggtactattt cgacgatgag 3120
gttgtcaagg cagataggaa acatggatct gataaaaact tgaaaatttc aagtagcgat 3180
gtctacgtat tgttttatga aagggtttat gacgcggccg cactcgagca ccaccaccac 3240
caccactga 3249

<210> 47
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47
ggaattccat atgagcattt gtccacatat acagcaag 38

<210> 48
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 48

ccgctcgaga tttacttgac gaatggtgta g 31

<210> 49

<211> 1440

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP8 in pET22b-UBP8

<400> 49

atgagcattt gtccacatat acagcaagta tttcagaatg aaaagtctaa agatggggtt 60

ctaaaaacgt gcaatgctgc caggtatata ttaaatcatt ccgtacccaa ggaaaaattc 120

ttaaacacca tgaaatgtgg tacatgccac gaaataaact ctggtgcaac tttcatgtgt 180

ctacaatgtg gattttgtgg atgttggaac cattcgcatt ttctctctca cagtaaacag 240

attggtcaca tatttggtat caactcaaat aatggccttt tattttgctt caaatgtgag 300

gactatatag ggaatatcga tctgattaac gatgctatcc tagcgaagta ttgggacgac 360

gtgtgcacaa agaccatggt tcctagcatg gaaagaagag atgggctttc tggcctgatc 420

aacatgggat ccacttgttt catgagtagt attctccaat gtctaatcca taacccttac 480

tttattaggc actcaatgag tcaaattcat tctaataatt gtaaagtgcg ttctccagat 540

aaatgttttt catgtgcact cgataaaatt gttcatgaac tttatggagc gctgaataca 600

aagcaagctt cttcgtcatc tacatctact aatcggcaaa ccggattcat atatctttta 660

acttgtgcct ggaaaatcaa tcaaaatcta gcagggtatt cacaacaaga tgctcatgaa 720

ttttggcagt ttataattaa ccaaatccac caaagctatg ttcttgattt gccaaatgcc 780
aaggaagtca gcagagcaaa taataagcag tgtgaatgca tagtgcatac tgtgtttgag 840
ggctccttgg aaagttctat tgtgtgtcca ggctgtcaaa ataattcaaa gacaaccatt 900
gatccattct tggatctttc tctggatatc aaggataaga aaaaacttta tgaatgtctt 960
gacagtttcc ataaaaaaga acagttgaag gatttcaact atcattgtgg ggagtgtaac 1020
agcactcaag atgcaataaa gcaactaggc atacacaaat taccatcggt tttggttttg 1080
caattgaaaa gattcgaaca cctacttaat ggaagtaaca gaaaactaga cgattttatt 1140
gaatttccaa cttatttaaa tatgaaaaat tactgttcaa cgaaggaaaa agataagcat 1200
tctgaaaatg gcaaggttcc agacattatt tacgaattaa tcggtattgt ttcccacaag 1260
gggacggtta atgagggaca ttatattgca ttttgtaaaa tttctggagg gcaatggttt 1320
aaattcaatg attccatggt ctcctctata tctcaagaag aggttttaaa ggaacaggca 1380
tatttattat tctacaccat tcgtcaagta aatctcgagc accaccacca ccaccactga 1440

<210> 50
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50
catgccatgg gaataaaaag atggttatct gtgaat 36

<210> 51
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 51

ccgctcgagt ttgatgaagc tcaatattct cg 32

<210> 52

<211> 2292

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP9 in pET28a-UBP9

<400> 52

atgggaataa aaagatggtt atctgtgaat aggaaaaagt cacacccgga gaagaacact 60

caaggtaatg acgaaattaa tcggaaagca actagcctga agaaaacgaa aggttctgga 120

gatccctcca tagcgaaatc accaagtgct aagagtagta catcaagcat accttctaat 180

cttgcgagcc atgaaagaag aagcaagttt agtagtcaaa cggataacct tgcaggaaat 240

aaacattacc atgagcatta ccataatatg gcaagtactt cagatgaaag agagtacgat 300

tcctcgacta catatgaaga tcgtgcgttc gatacagagt cctccatact atttactact 360

attacagatt taatgccata tggggatggt tccaataaag tgtttggtta tgaaaatttt 420

gggaatactt gctactgcaa ctccgttcta caatgccttt ataatatccc cgaatttagg 480

tgtaatgtgc tgcgatatcc tgaaagagta gccgcagtaa acagaatacg caaaagtgat 540

ttgaagggtt caaaaataag ggtattcact aatgaaagtt ttgaaacatc tactaatagc 600

ggaaattcta atacggggta ccaaagcaat gataatgaag atgcacataa ccaccaccac 660

cttcagcaga gtgatcaaga taactcctct tcttctactc aagaaaaaca gaataatttt 720

gaaagaaaaa ggaactcgtt tatgggtttt ggaaaagata aatcgaacta taaagattct 780

gcaaagaaag atgataacaa tgagatggaa cggcctcagc ctgttcacac agttgtaatg 840
gcctctgata cattaacaga gaagcttcac gaaggctgta aaaaaattat tgtgggaaga 900
ccgcttttaa agcaaagcga ttccttatca aaagcttcaa ctacagattg tcaagcaaat 960
tcgcattgcc agtgtgattc acaaggcagt aggattacat cagtggatga tgatgtcctt 1020
gttaaccctg agagctgtaa cgatgctgtc aacaattcta ataataataa agagaatacg 1080
tttccaacaa gtgaacaaag aaaaaaagcc gctttaatta gaggccccgt tcttaacgta 1140
gatcatttac tttatccaac cgaggaagct acactttaca atggactaaa agatatattt 1200
gagtctatta ctgaaaactt gtcgctaacc ggtatcgttt cacctacaga gtttgtcaaa 1260
attttaaaaa aagaaaacgt cttgttcaac actatgatgc aacaagatgc ccatgaattt 1320
ttaaactttt tattaaatga tttcagtgaa tatattcaac gcaataatcc cagaatgaga 1380
ttcggaccac aaaagacaga caacagcaac gacaacttta taacggattt attcaaaggt 1440
acactgacga ataggatcaa atgtttaact tgtgacaata tcacctcaag ggacgaacca 1500
tttttagact ttccaataga agtacagggt gatgaagaga ctgatatcca gaagatgtta 1560
aaaagctatc atcagcgtga gatgttgaac ggggttaaca aattttattg taacaaatgt 1620
tatggtttac aagaagcaga acgtatggtc ggactgaagc aactgcccca tattctgtca 1680
ttgcacctaa aaagattcaa gtattcagag gagcaaaagt caaacatcaa acttttaac 1740
aaaatactct atccactaac tttggatgtt tcttccactt ttaatacatc agtatataaa 1800
aaatatgaac taagcggcgt cgtcatccat atggggagcg gtccacagca tggtcattac 1860
gtatgcattt gcaggaacga aaagtttggg tggcttttgt atgatgacga aacggtggaa 1920
tccataaaag aagaaactgt gttacaattc acaggtcatc caggtgatca aactacagcc 1980
tacgttttat tctataaaga aacacaggct gataagaccg aaaatcaaaa tgaaaatata 2040
gacacttcta gtcaagatca aatgcagact gacaataaca ttgaacagtt aataaaatgc 2100
gatgattggt taagggatcg taaattgagg gcagctgcaa atattgaacg caaaaagacc 2160
ttggggaata tacctgaagt taagactgca gaaaccaaga cgccattaaa tgataaaaaa 2220
cgcaataagc aaaaaagaaa atcgagaata ttgagcttca tcaaactcga gcaccaccac 2280
caccaccact ga 2292

<210> 53

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53

ggaattccat atgaccactc aagaatcgat caaacc 36

<210> 54

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

ccgctcgagt ttggtgaact tccttttttt attttttttc c 41

<210> 55

<211> 2403

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP10 in pET22b-UBP10

<400> 55

atgaccactc aagaatcgat caaacctttg gtagatagaa tcctatcaaa tcccctgcag 60
ttcaatgctg caatgatctc taacaaatcg aataataatg atacttccgc cgcgccggaa 120
aatagctcgt atattgtgat aggaaaacag cataataaca atagtaatag cacagctatt 180
gctgcaacgg ccgaatccaa gcaaataaaa gaaaataact tgatagacag gccaaacgga 240
aagaaaacca acactgttcc taaatctatg gctgaagctt tattgttgta tacttctaaa 300
aatgataaag atgctgcaga tgctactggt gccaagaagt cagcggagct ttctacggag 360
ctttctacgg agcctccttc ctcttcttcg gaagatgaca aagtaggaaa agaggaagag 420
gaagagggtg aaatatttca tgaggcaaga gactatgtag aaccccgaaa agctagtttg 480
aaggaacgcg acaacgcaga taagggcgat ggtgaagaca tcggcgaaga catcggtgaa 540
gacatcggtg aagacatcgg tgaagacatt ggtgaagaca ttggtgaaaa cttgggttct 600
ccattagcaa ccattgatga ttcatctaat gagaatgaaa aggaaaaaag aaaggaactg 660
tctacaagca ttagcagtga tgacgaaata gaagacgacg aggatgagga tgacatggat 720
tatgattcta gtgctatgga aaaagagctc cctgaagaag aggagaacga ttccagctcc 780
aaaatttctg aaggcgaaaa aaagagttta tatcaagatt taatggaaaa tagtacagtg 840
gaagtaaatc ggtacgaacc agtaaacaac accaaagaaa atggaaacag gaatccaaag 900
ggagaggagg aggaagaaga ggaagaagat ctgaaacata aatctaggtc aatcacccct 960
ccggttacaa tatcaaatct atcaaacttt taccaattca atgaaaatat caatgatcgt 1020
ggttctttaa actctactag aattgttaaa aattggggcg acaaattcac caatttgaag 1080
cctcgtggcc ttttgaatca tggtgttact tgttacacaa atgctgctgt acaggctatg 1140
ttacacattc cttcgataca acattatctt tttgatatac taatggggaa atacgatagc 1200
accatctcaa aaaattccgt ttcctatact ttagctgaaa caagtaaaaa aatgtggtta 1260
ccggtctcaa aaaaccctag aaagaacgtt tcagcttcct acattaatcc aaaacatttg 1320
atttccagat tggatgacat taattgtatg atgagcgaat ggcagcagga agattcacat 1380
gagtacttca tgtctctgat gtcaagatta caggaagatt ctgttcccaa gggtcataaa 1440
cttatagaat cgataatata tgacatattc ggtggtcttt taaagcagat cgttacttgc 1500
aaatcttgtg gcagtatatc taaaacagaa caaccatttt acgatttatc gttgcacttg 1560
aaagggaaga aaaaacttga tccaaattct gacctgtcga gtgatagcat taacggcact 1620
tcagccacca cttctaccac tacctccaat gctgccacaa aaccatctct ttcatcctct 1680
tcatctgtca atttaaacaa tggctcacca tttgccgctg ccagtgattt aagttcagcc 1740

aaccgcagat tttctattga aaaatcaatt aaagatttct tcaatcccga attaatcaag 1800
gttgacaagg agcaaaaggg ttacgtttgt gagaagtgtc acaagaccac gaacgccgtg 1860
aagcatagtt caatattaag ggctcctgaa actttacttg tgcatctgaa aaaattcaga 1920
ttcaatggca cgtcctcatc aaaaatgaag caagctgttt cttatcctat gtttttagat 1980
ttgacggaat attgtgagag taaagagcta cctgtcaaat accaactatt aagcgtggtg 2040
gttcatgagg gccgctccct ttcttcaggt cactacattg cccactgcaa gcaaccagac 2100
ggtagctggg ccacttacga cgacgagtat attaatataa tatctgaaag ggacgtttta 2160
aaggaaccca acgcatatta tctcctatac acgaggctaa ctccaaaatc ggttccattg 2220
ccattggcga aatctgccat ggccactggt aatgttacct ctaaatccaa acaggaacag 2280
gctgttaacg aaccaaataa ccgcccattg aagattaata gcaagaaaaa taacagaaaa 2340
aaatggaaaa aaaataaaaa aaggaagttc accaaactcg agcaccacca ccaccaccac 2400
tga 2403

<210> 56
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56
catgccatgg gattattaaa cccagatcaa attc 34

<210> 57
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

ccgctcgaga cagaattctt cttcatagtt ctc 33

<210> 58

<211> 2181

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP11 in pET28a-UBP11

<400> 58

atgggattat taaacccaga tcaaattcta aacctagttc gaaaagtata tgaagtagat 60

attaaacagt tttattcgca attacggcta aagaacttaa gaggattgtt agaccatgct 120

gctcatctgt ttaatgttta cctgagggat ttagaaatca atcaggaaat ggaagctttg 180

acagcattta ttattggttg ttattatctg taccttatta ttccacaatc gttacaattc 240

caaacaagaa ataatctcta cagcagttac gcaaagctaa aaaacgacta tcaagacgaa 300

cacgtgatgg gttatgtgtt aaaagtggta agagatgaaa gtactgttat tgttgaccgg 360

tatttagcgg agtcaaacgg aatttgcagg accataaaaa gaaaaagagc ctactcctta 420

ccgctacggc ctttacctgt tcatatggcc tctttgtcaa tacataacaa gtttgatggc 480

tcactacatg aaataccgaa tgagctaaca aaaccaacaa atgataattc gaaagaggac 540

atagtcaggg aaagtaatca gatagcatca agtaataaat tggaagctgg ttctgaagtg 600

gcgtactaca caagcaaaga agcattatca aaaccctcgt atttaaaact cagtactgga 660

aaggatgcat tattcaaaac gctgtctagt ccagcaactg ctcccccccgt gcactccttg 720

gaggtttcgt cacaaatcag agattctagc caagattctt catcctcttt atccaaggtg 780

gaaaagccaa aggaggaaga aggaaagatc gaggccatag aatcttcggc cccgaaagct 840
tacaatctac cagtaattga agattctaat gatctgttat cagagttatc tattactggc 900
ctgcaaaatc catgcaatac atgctatatt aacagtataa ttcaatgtct gtttggcact 960
accttatttc gggatttgtt tttaaccaag aaatataggc tattcctcaa tactaacaaa 1020
tatccgaaag aagtccaact ttcccgctcg atttacgttt tgttcaaaaa aatgtatttg 1080
aatggaggaa gagcgattat accaaataga ttcttaaaaa tgtgcaagaa gttaaggcca 1140
gatttgaaca tcccagatga tcaacaggat acacaggaat ttctactaat agttttagca 1200
cgaatacatg aagagctctc gaacgaaaat gttgtcaagt attatccaga tctagtgtca 1260
tatgatgcga atgctttaca agttaaccca tccaaatacg agaaatggta cgagagaaat 1320
gttattactg atggtttatc tccaattgat cacatatatc gagggcagtt ggagaacatt 1380
ttgaaatgtc agcgctgtgg taattcttct tatagctatt ctaccttcta tgttctgtca 1440
cttgcgattc caaaactatc attgtatagc tttacaagta agtcgagaaa aattaaatta 1500
gaggattgca taaacttatt tacaggcgat gaagaactgt caggcgacaa tgcttgggat 1560
tgtcctaatt gtagaattac tgattctaaa tccaaaaaag aagaaattac tagccagaag 1620
aaaaaatcaa ccatattcgg ttttcattcc agatcaaggt caaaatcacc ccaccatcat 1680
caccatcatc accatagcag cgatgattca acaaaaaatg caaagaagcg aaattctaaa 1740
aagttaacca cgattaagag tttagacttt atagttttac ctccgatact tgtcattcat 1800
ttatcaaggt tctattatga tttaacaaaa aaaaacagca ctgtaataac ctacccttg 1860
atattgaaca ttattttaaa gaacggtaaa gtgattcgat acaagttata tggaacggtg 1920
aatcattccg gtaaccttat caatggacac tatacttctg ttgtgaacaa agaaaagagc 1980
catgaaattg gactgaatag acaagtttgg gttacatttg atgacgatta tatacagcaa 2040
catcgcaagg atcgcaacaa ctttgaagcc ggcaaaacag aaatgtctag cgatgaggta 2100
tacgtcttat tctacgaaag aatggatgaa gagaactatg aagaagaatt ctgtctcgag 2160
caccaccacc accaccactg a 2181

<210> 59
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

catgccatgg gttcttcaga tgtttcaag 29

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60

tcggtagttc gagaaattga agc 23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61

gccacagata gcaatgttag tac 23

<210> 62

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62

atagtttagc ggccgcttct ggcgattcta gtgtcacac 39

<210> 63

<211> 3798

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP12 in pET28a-UBP12

<400> 63

atgggttctt cagatgtttc aagtcgtgaa tgttcattgg tttataatga agatcccgat 60

ttcaccgatg gcacaacacc atgtgatcgg ttgggagtgg acttgatgaa tgttctagat 120

gacaaggatg aaataaagca agagtctgtc ccagtctcag atcgtgaaat tgaggatacg 180

gaatccgatg cttccgctgt ttcttcattt gctagcgcta atgagttaat agctgagcca 240

cacgctgcaa gtgaaactaa tcttggaact aatggtcaag atggaagaaa tgtcttagaa 300

caacaaagag acgtggttgc tagactaata gaagaaaaca aggaaacgca aaaagagggt 360

gataaagtct gtattgtccc caaggtttgg tacgataaat ttttcgaccc cgatgttacc 420

gatcctgaag atataggccc tattaataca cgcatgattt gcagagactt tgaaaatttt 480
gtgcttgagg attacaatag atgtccgtat ctgtctattg cagagcctgt tttcaatttt 540
ctatcagaaa tttacggcat gacaagtggc tcttacccag tggtaactaa tttggttatc 600
aaccaaacca caggggagtt agagacagaa tacaataaat ggtttttcag actacattac 660
ctgaccgaaa aacaagacgg gaggaaaagg aggcatggcc aggacgattc aataatgtac 720
ctctcgatgt ctgcgttgaa tttagtacgt gatttggttg aaaagagtat gaatctgttt 780
tttgagaaag ctgatcatct agacgtgaat gcggtggatt ttaaaatttg gtttgtgtca 840
gagggatctg atattgccac agatagcaat gttagtactt ttttgaattc ttcatatgaa 900
ataactccgc ttcaatttct cgaactaccg ataaagaaac tactaatacc agacatgttt 960
gaaaaccgtt tagacaagat aacttcaaat ccgagtgacc ttgtcataga aattaaacct 1020
atagaaggga atcaccattg gccttcaaac tattttgctt ataataaact cgaaccagca 1080
tcaggtacta ctggtttggt caatttggga aatacatgtt acatgaattc tgcgttgcaa 1140
tgcctggtac acattccgca gttgcgtgat tatttccttt atgatggtta tgaagacgaa 1200
atcaatgaag aaaatcctct tgggtaccac ggctatgtgg ctagggcatt tagtgacttg 1260
gttcagaagt tgtttcaaaa caggatgagc ataatgcaaa gaaatgctgc tttccccccct 1320
tcaatgttca aatccactat cgggcacttt aattcgatgt tttctggtta tatgcaacag 1380
gattctcaag aatttttagc cttcctgtta gacagtttac atgaagattt gaacaggata 1440
ataaagaaag aatacacaga aaaaccatca ttatctcctg gtgatgacgt gaatgattgg 1500
aatgtagtca agaaactggc agacgatact tgggagatgc atttaaagag aaattgttcc 1560
gttataacgg atttatttgt cgggatgtac aaatcaacgc tatattgtcc cgaatgtcaa 1620
aatgtttcta taacgtttga cccgtataat gatgttacat tgccgcttcc ggttgataca 1680
gtgtgggata aaactataaa aatttttccc atgaactctc caccacttct tcttgaagtt 1740
gagttaagca aatcgtccac ttatatggac ttgaagaatt atgttggtaa aatgtcgggc 1800
ctagatccaa atacactatt tggctgtgag attttcagta atcaaatcta tgttaactat 1860
gagtcaacag agtcgaatgc tcaattttta accttgcagg aattgatcaa acctgctgat 1920
gacgttattt tttatgaatt accagtaaca aatgacaatg aagtaattgt tcccgtattg 1980
aatactagaa ttgaaaaagg ctacaaaaat gcaatgttat ttggagtccc tttctttatt 2040
acgttaaaag aagatgaatt gaataatcca ggtgcaataa gaatgaaatt gcaaaacagg 2100
tttgtccatt taagtggtgg gtatatccca tttcctgaac ctgtaggaaa tcgaaccgat 2160
tttgctgatg cttttccatt attagtagaa aaatatccag atgttgaatt tgaacaatat 2220

aaagatatac tacagtatac gtctattaag gtgactgaca aggataaatc ctttttttcc 2280
atcaagattc tgtctgtaga aaaagagcag caatttgcta gtaataaccg aacagggcct 2340
aatttctgga cccctatctc ccagttaaac cttgacaaag ctacagatat agacgataaa 2400
cttgaagatg tggtgaagga tatctacaat tattcatcct tagtagattg tgctgaaggg 2460
gtccttatgc aagtggatga tgagggagat accgagggta gtgaagcaaa gaatttttcc 2520
aagcccttcc aatcgggaga tgatgaagaa aataaagaaa ctgtaacaaa taatgaaaat 2580
gtaaataata ctaatgatcg ggatgaagat atggaactaa cagatgatgt tgaagaagat 2640
gcaagtacag agccagaatt aacagataag ccagaggcgt tagataaaat taaggatagc 2700
ttgacttcca ctccgtttgc gattctttct atgaatgata ttattgtttg tgagtggagc 2760
gaattgggtt caaatgaggc attttccgat gataaaatat ataactggga aaatccagct 2820
actttgccta acaaagagtt ggagaacgct aagttggaaa gatctaacgc taaggaaaga 2880
accataacct tggacgattg tctccaatta ttttccaaac cagaaatact aggattaacc 2940
gattcgtggt actgccctac atgcaaggaa catcgtcagg ctaccaaaca aatacaactt 3000
tggaatacac cagatattct gctaattcac cttaaaaggt ttgaaagtca aaggtctttt 3060
agcgataaaa ttgatgccac ggttaatttc cccattacag atttggatct gtcgaggtac 3120
gttgtctata aagatgatcc cagaggttta atctatgacc tgtatgcagt agataaccac 3180
tatggtggtt tgggtggtgg gcactatacc gcgtacgtaa agaattttgc cgacaataaa 3240
tggtactatt ttgatgattc tcgagtaact gaaactgcgc cagaaaatag tatagctgga 3300
tcggcttatt tgctatttta cattcgccgt cataaagatg gcaatggatt aggcagctct 3360
aaactacagg aaataatcca aaagtcacgc cacggatatg atgagcgtat caaaaagata 3420
tacgatgaac agatgaagtt gtatgaattt aataagactg acgaggagga agatgtttct 3480
gatgatatga tagaatgtaa tgaagatgtg caggcccctg aatatagtaa tcgtagtttg 3540
gaggttgggc atattgaaac tcaggactgc aacgacgaag atgacaatga tgatggtgag 3600
aggacaaatt caggtaggag aaagttaaga ttgttgaaaa aagtctacaa gaataattca 3660
ggcttgggtt catcgagtac gtctgaaata tctgagggat gcccagaaaa cgaagtcgct 3720
gatttgaatt taaaaaatgg tgtgacacta gaatcgccag aagcggccgc actcgagcac 3780
caccaccacc accactga 3798

<210> 64

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

catgccatgg gaatcagaag atggctaact ataag 35

<210> 65

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 65

ccgctcgagt attatcatct tgttcttttg cc 32

<210> 66

<211> 2094

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP13 in pET28a-UBP13

<400> 66

atgggaatca gaagatggct aactataagt aagtctggga agaagaaaaa ggctgttaat 60

gataccatta cagaagaagt agaaaaggtt gactttaagc ctgtaaacca cgatataaat 120

gatgaactct gttatagcga atcatccgat aatccctcta gctcattgtt tgtctctaat 180

ttggatacca aggaaacttt tttgaatgaa gacaataatt tgcagatttc ttccggacta 240

gactattctt ctgaaacgtg caatcaaggc agtaattaca gccaggatgg gatattttat 300

atttcaaacg caaaggctat aaacgcatac ggaggcatta tcacgcaagg gcccgaggca 360

cccatattag ctatgaaggt gtccgactca atgccctatg gagacggctc caacaaagtt 420

tttggatacg aaaattttgg caatacatgt tactgtaact cagttcttca atgtctctat 480

aatctgtcct cattacgtga aaatatattg caatttccaa aaaaatcaag agaatctgat 540

cacccaagaa agaaagaaat gagaggtaag aaaccaagaa tatttaccga agcaagtttt 600

gagaaaagca ttgctggtac caatggacat ttgcctaacc ctaaacctca atctgttgat 660

gatggaaagc ctacccctgt aaattctgta aattcaaata cagctgggcc ttcagagaag 720

aagagtaaat tttttaaaag ttttagcgcg aaacatgtac aagacaataa taaaaaggaa 780

ggaagtcctg ctatattaac cactggaaaa ccctcttctc gtcctcaaga cgcacctcca 840

ttgatagtcg aaacacctaa tgagcctggt gctccgagca gattgagttt cgagaacgtc 900

acagatagac ctccggatgt tccgcgtaaa ataattgttg gcagagttct caattatgaa 960

aatccttcaa gaggtagcag taatagtaat aacctggact tgaaaggaga aagtaatagc 1020

agcttatcca ctccacttga taaaaaagat actagaagat ctagttcctc ttctcaaata 1080

tccccagaac atagaaagaa atccgcactt attcgtgggc cagtgctcaa tattgaccat 1140

agcttaaacg gctcagataa ggctactttg tattccagtt tgagagatat ctttgaatgc 1200

ataactgaga atacgtattt aactggtgtt gtatcgccta gctcttttgt tgatgttctc 1260

aaaagagaaa atgtattatt taatactact atgcatcagg atgctcacga atttttcaat 1320

ttcttattaa acgagttgag tgaatatata gaacgtgaga ataaaaaaat agcagccagt 1380

gatatcaaca gcgatagcga accgagtaag agtaaaaatt tcatcagtga cttgtttcaa 1440

ggcactttaa cgaatcaaat aaaatgtctg acgtgcgata acattacatc tagggatgag 1500

ccatttttgg atttccccat agaagttcag ggagatgagg aaacagatat acaggaaatt 1560

ttgaaaagtt atcaccagcg agaaatgcta aatggctcaa acaagtttta ttgtgacgaa 1620

tgttgcggtt tacaggaggc agagagatta gttggtttga agcaattgcc tgatacttta 1680

acattacact tgaaaagatt caagtattct gagaaacaaa actgtaatat taagcttttt 1740
aataacattc actatcctct gacgctaaat gtttgctctt caataaattc taaggtttgt 1800
caaaagtatg aattggctgg gattgtcgtt catatgggcg gtgggccaca acacggccat 1860
tatgtttccc tatgtaaaca tgaaaagttt ggctggttgt tatttgatga cgaaacggta 1920
gaggcagtta aagaggaaac agtgttagaa ttcacaggtg aatctccaaa tatggcaaca 1980
gcatatgttt gttttataaa gcgatgtatt caaacgctgt tgaaaagaat gatcgtgaaa 2040
atatggcaaa agaacaagat gataatactc gagcaccacc accaccacca ctga 2094

<210> 67
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 67
agtcatgagt gcagtagaga tgacaggta 29

<210> 68
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

ccgctcgagg catcttgtat agaaataaat ataac 35

<210> 69

<211> 2439

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP14 in pET28a-UBP14

<400> 69

atgagtgcag tagagatgac aggtaaattc atccaaaaag agagcccgaa gtctttctca 60

cattcagaaa tggcagaagc agtactagaa aacgttaacg ttcctgcagt cgtttcaaaa 120

gatgagtgta tttattgctt tgaatcccct tataatgaac cattggccct caatgcatca 180

cctaaacatt cattgaatat atgcttaaac tgtttccaag ctacgtgcaa cagacatgtt 240

ccactccata tccgagtcac agaatatgct tgcgatacca tacattccaa ttatttaact 300

attgctaaag tggagaaacc taagcaagaa aatgtagaag aaaataataa caacaaaaaa 360

ataaagctac aggtaattga gacgtcagaa gacgacaccc acaacactat ttggagttta 420

caaaggttca atggtgaaaa tgttcccagg accgtacttt cgaagtcgac agactctgac 480

atttcttcta cggccttgga gaagattgaa aagatattaa aggcgaagtc acaagacttc 540

gaggataaga agaactcctg ggtgttagaa atcagcacct gtccacatac agaaaacttt 600

caaattccat ctaagcccga aaatactgtg aatttaaacc aatgctcttc ctgtgatttg 660

actcaaaatc tctggttatg cctacattgt ggtaatatcg gatgtggcag ggaacaaatc 720

gggattgatg gtcactcgca tgctttggat cattatcgga gtaataataa tcacccatta 780

gctatcaaat tagggtcttt aagctcttca acctatgatc tgtattgtta cgcatgtgac 840

gacgaaacta gatttccaga taatgttaat ttaggcagtg cactacaaat atacggaatt 900

aacatacaag aaaagattgc ggatgaaaag actctagttc aattacaagt ggaacagaac 960

gaaaattggc aatttagaat ggtcgattct agcggtaaag aatttgaaaa attatccgct 1020

agtaagaatt atggctgtgg tctgatcaat ttgggtaatt cctgttactt aaattcggtt 1080

atacaaagct tggtgaatgg tggcgtcccg aattggtcct tggattttct aggaagtaaa 1140
tttccactgg atgttgtata tccggacaat aatttaaagt gccaatggat caagctactc 1200
aatgccatga aatgtgaacc cgaactatat ccaaatggta tcaaacctac tactttcaag 1260
aaatgcattg ggcaaaatca tcaggaattc agttccaata gacaacagga tgcgatggaa 1320
tttctaacct tccttttaga cttgttagac aagaaatttt tttcaagtag ttcttcaggt 1380
attccaaatc ccaacgattt agttagattt atgatggagg ataggctcca atgtaacatt 1440
tgcgggaagg ttaaatattc ttatgaaccc acagaggcta tacagattcc cttagaggag 1500
aatgatgaac ctcaagatat gttagagaga atcaaggcgt attttgaagg gcagacgatt 1560
gaatttaaat gtgctaattg taaggaaaag gttaccgcaa ataaaaaacc tggtttcaaa 1620
tctcttcctc aaacacttat tttgaaccca ataaggatta gattacagaa ctggattcct 1680
gttaagacaa gtaatgagct ttctttacca ggtttaatag acagggatga tatgctagat 1740
gtttcgtctt atttatcaca aggatttgat cctcaaactg aaaacttatt gcctgatgag 1800
gacgaaaacc gtagctcttt tacgccaaac caatgcagta tttctcaatt aattgaaatg 1860
ggctttactc aaaatgctag cgtgcgcgcc ctatttaaca ccggaaacca agacgctgag 1920
agcgctatga attggctatt ccagcatatg gatgaccctg atttaaatga tccctttgtc 1980
ccgcctccta atgtccccaa gaaagataag agagaagtgg atgaggtatc attgacttca 2040
atgttatcca tgggactaaa tcccaactta tgtcgtaaag ccttgatact caacaacgga 2100
gatgttaatc gtagtgttga atgggtattt aacaacatgg atgatgatgg aacatttccc 2160
gaacctgaag tgccaaatga agaacagcaa caaaaaaagg atcttggata ttcgaccgct 2220
aaaccgtacg ctttaactgc agttatttgt cataagggaa attctgtcca ttctggtcac 2280
tatgttgttt ttattcgtaa actagtggca gacaaatgga agtgggttct ttataacgat 2340
gagaaactag ttgctgccga cagcattgaa gatatgaaaa aaaatggtta tatttatttc 2400
tatacaagat gcctcgagca ccaccaccac caccactga 2439

<210> 70

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 70

ggaattccat atgagctctg aagacgaatt ggg 33

<210> 71

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 71

gcctttgaga ttaaagaagc ttc 23

<210> 72

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 72

atttttgaac aagctgaagg aag 23

<210> 73

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 73

ccgctcgagg tttttaatga tcattggtct atc 33

<210> 74

<211> 3717

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP15 in pET22b-UBP15

<400> 74

atgagctctg aagacgaatt gggaagtatc ggtactgtgt ttcccggaag tcccatagat 60

aagagcattg ggagtattct cccacaattt gatgaagaag tggagacttt gctggaagat 120

agcttcacgt ggaacattcc tgactggaac gagttaacaa acccgaaata caattcgccc 180

aggtttagaa ttggtgattt cgaatgggac attctattat tccctcaggg aaaccataat 240

aaaggtgttg cggtatatct ggaacctcat ccggaagaaa aattagatga gactacggga 300

gagatggtgc cagttgatcc ggactggtat tgttgtgctc agtttgccat tggtatatct 360

agacctggta atggtgacac catcaattta attaacaaat cgcatcaccg attcaacgct 420

ctagatacag actggggatt tgcaaatttg atagatttga acaacttgaa acatccctca 480

aaaggaagac cgctttcgtt cttaaacgaa gggaccttga acataacagc gtatgtgcgc 540
atattgaagg atcctactgg tgtcttgtgg cataatttcc tgaattatga ctcgaagaaa 600
gtcacgggct atgttggctt ccgaaatcag ggtgccacat gctatttgaa ttcgttattg 660
caatcttact tctttacaaa atacttcaga aaactggttt acgaaatacc caccgaacat 720
gaaagtccaa acaacagtgt cccattggct ttgcaaagag ctttctacca actacaagta 780
tccgatatac cattagacac tttggaactt accaggtcat tcggttggga cactgcggaa 840
tccttcactc aacacgatgt gcaggaattg aataggatat taatggacag gctggaaaat 900
aatatgaagg gaacacccgt ggaggggaag ttaaatgaaa tatttgtcgg aaaaatgaaa 960
agttatatta aatgtatcaa tgttgattat gaatctgcta gagtggagga cttttgggat 1020
ctgcaactga atgtcaaaaa tttcaagaat ttacaagaat cttttgacaa ttacattgag 1080
atggaactaa tgaatggtga aaatcagtat gctgctcaag actatggttt gcaagatgct 1140
caaaaaggtg ttatattcga atcatttccg ccagttttac atctgcagtt gaaaagattt 1200
gaatacgatt ttaattatga tcagatggta aaggttaacg ataaatatga atttcctgaa 1260
acaattgact tgtcgccctt cgttgataaa gacgtattaa agaaaacgtt agactcggag 1320
aacaaggata agaatcctta tgtttataac ttacatggtg tgctagttca ttctggtgat 1380
atatctaccg gccactacta tactctgatt aaacctggtg ttgaagatca atggtacaga 1440
tttgatgatg aaagggtttg gagggtcaca aagaaacaag ttttccaaga aaattttgga 1500
tgtgataggt tgcctgatga aaaagttcgt acaatgacga gaggtgagta tcagaactat 1560
atcattcaac gccatacaag tgcttatatg cttgtttata tacgtcaaga acaagaggag 1620
gatttgctgc gtccagtttt ggaatctgat gttcctaagc atgtaatcac aagagtaaga 1680
gaagaaatca aagaacggga aacaaaagaa aaggaaatta gagaagcaca cctgtatgtc 1740
acgctcagat tgcactcaat caaagagttt attcattatg aaggatttga ctatttcgca 1800
catgatgggt ttaggttatt tgcagaggag ctcaatgact ctggtttgca gcaaatcaac 1860
ttaaaagtct tgagaacaac taagttatcg gatatttttg caagcattaa ggaaactatg 1920
aatattccac aagaaaggga cgtcaaatat tggaaaatgg attatcgcag aaacagcact 1980
ttgcgtttaa cacaacccat aaattttgaa tccgtaaaca tcactttgca ggaggcatta 2040
aaaaaggaga agaaaaggac tatgcaaacg caatatggag aggaaggtgt tgctagtact 2100
gaggaagacg acaaggcact tttagaaact gtatcattct tagatctttt cattgaggag 2160
ccctatctag agttacaatt tttgaacaag ctgaaggaag cttctttaat ctcaaaggcc 2220
cagctggatg atgagctgat atcaactata agaacgaatc ttccagaact aacaaaggga 2280

ggaatcgagc ctgtttttgc caccgacaat aaatctaatt tgctattcgt caagagctac 2340
gacccacata cccaaaagct attgggattt ggccattttg ccgtaaatca attgcaacag 2400
ctatcggata tatctgcaat tattgaggac agcatttctt ccaacgaaaa gctgactttc 2460
tacgaagaag tccaacctgg taccataaat gaaatatata tgaaggagac aatatatgat 2520
gctgatatag acacgggtga tatagtttca tttgaggttc caggtgctgt tttgccagat 2580
acttttccag tttacgcaac aatcaaagat ttttactcat atctgaggta tcgtgtaaaa 2640
ttgaagtttt ctaaatttga cggttcaagt gaggaatatg gagttagtaa tgaaatccca 2700
gagagcttcg aattctggat atccgcttat gcaccttatg atgaccttgc tagaatggtg 2760
tcgaaatatg cgcacgttaa gccagaatat ctaaagatta ttgcccttta ttctaatgga 2820
agatttgtgt taaaatcaac ctcacttttg aatgattacc ttttgaaaga tttcaattgc 2880
gatcaaatac cgccttttgc atttgaagta ttgtctgtgc ctttgaaaga attggagcgt 2940
ttgaggccaa ttaaattata ttggctaaaa aatagttata ttcattatca atgtttcgaa 3000
ttcgaagtcg caaacgatta tacagaatct caatttcttg aaaaagtgca acacaagatc 3060
ggctttaccg atgaagaaaa ggagaacatc ttactctgga ccaacacaaa tttccagttt 3120
cagggcttat tatcggacca aaacaccttc aaagatgtga gtaaacattc tttactcttt 3180
ggtagaattt tacccgagga gtctaaattg ttcaaagaat taaatcgtct agaaaacgta 3240
caaacatctt cattggagga ttttatggat gatgaaaacg cgactgacag accaatggac 3300
gatgagcaag atctaggtat ggcgatagaa cattctgaag atatgaaagg gcgtatagtg 3360
gttgttcaac aatatttcaa agaccttgag aatagacacg gaatatcctt cttatttaat 3420
ttaataccag acgaaacatt cccaaagaca aaagatcgtc ttcatgcaaa atttggtctc 3480
ggacaaaaag aattttcaaa gatcaaatta agtattggtt actccactga agaaggtacg 3540
gtgtttagaa gtttgcaagg attttcggac gaagaattgg acaaagttat attgtatgac 3600
attatgtcca acttagatta tatctacatg gatcatccgg atagattgag atcgcattct 3660
tcctatgata gaccaatgat cattaaaaac ctcgagcacc accaccacca ccactga 3717

<210> 75

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 75

ggaattccat atgtcttgga taaaaaatgt aacagaatc 39

<210> 76

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 76

ccgctcgagt ttatttacac gttcgtagta tagc 34

<210> 77

<211> 1524

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP16 in pET22b-UBP16

<400> 77

atgtcttgga taaaaaatgt aacagaatct ccgacttcac tgattaaaaa agtttcatgt 60

ggtttgataa ttgctgcttc tctatatgcc attgcaccca gcctaagtgc gctagtcttt 120
ggggattcta agcagagtat tgggaagtac acgacagtgg gcttaattaa tcgtgggaat 180
gattgcttca taacatcatc tttgcaaggc ctggctggaa tacctcgatt tgtagaatat 240
ttgaaacgga taagaacggt ccttctagaa ttagaaacta agctgtcaaa taatgcaaaa 300
ggcgacaatc ctacagttga taacactaca aggcatagtc gacttgaaaa ctcgtctaat 360
tcacttgccc ccttacacga aagtcttacc agtttaattt tggatttgat atctgtaaaa 420
gatcgtaaga cgtcaatttc tccgaaaata gtgataaaca cattagagtc catctttaaa 480
tcaaagatct catccaaaca aaatgatgca catgaattta cattaatatt actacaaaca 540
ttacaggaag aacgatcaaa attgatcgat tacagtaaac agatatgtaa tttgaatata 600
ccaaagtttc catttgaggg cgagacttcc aagtttctag tatgccttaa atgcaagggt 660
ctatcagaac catcatacaa acagactttc atccgcgaac tgtccgtacc acaacaaaca 720
tcagagaatc tatccaatat tctagcacac gatgaaacag aaatcataga cgactattca 780
tgcctgatct gccaaataag agcaatctta aaccatgaag aatatagaaa tttcaaggac 840
tgtaccccgg atgaaatttt aatgttggac agattgaaaa attatgccac taaagcccca 900
attaacgaaa atttaccatt cgaagtagaa cagtacgtca agcgttactc aaagggcaat 960
ttgcaggtat ctaatataaa gggaaaggtc atcaaaaaag atgtagtagt acaactgcca 1020
gacatattaa ttgttcactt atcgagatcc acattcaatg gtattacata ttctagaaat 1080
ccctgcaatg tcaaatttgg agaaagaata acactttctg aatatacatt ggctgagagt 1140
gggacaataa cagaaaacag gcaagtcaaa tataatttga aaagtgttgt gaaacacacc 1200
ggttctcatt cgagtggaca ctatatgtgt tacagacgca agactgaaat tcgtttcggg 1260
aaggaggatg aatcttcctt cagaagagca ccagttgtca acaatgaagt taacaagaat 1320
cgcgagcaaa acgttgcaca taatgattac aaaaaaagca gatataaaaa agtcaaaaac 1380
gccctgcggt atccttattg gcaaatatct gataccgcca taaaggaatc taccgcttca 1440
actgtcttga atgaacagaa atatgcttat atgctatact acgaacgtgt aaataaactc 1500
gagcaccacc accaccacca ctga 1524

<210> 78

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 78

gtttcaaaac cgtatgagca tagcgcaaag aaatgc 36

<210> 79

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 79

aacttctgaa ccaagtcact aaatgcccta gc 32

<210> 80

<211> 3798

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP12-1 in pET28a-12-1

<400> 80

atgggttctt cagatgtttc aagtcgtgaa tgttcattgg tttataatga agatcccgat 60
ttcaccgatg gcacaacacc atgtgatcgg ttgggagtgg acttgatgaa tgttctagat 120
gacaaggatg aaataaagca agagtctgtc ccagtctcag atcgtgaaat tgaggatacg 180
gaatccgatg cttccgctgt ttcttcattt gctagcgcta atgagttaat agctgagcca 240
cacgctgcaa gtgaaactaa tcttggaact aatggtcaag atggaagaaa tgtcttagaa 300
caacaaagag acgtggttgc tagactaata gaagaaaaca aggaaacgca aaaagagggt 360
gataaagtct gtattgtccc caaggtttgg tacgataaat ttttcgaccc cgatgttacc 420
gatcctgaag atataggccc tattaataca cgcatgattt gcagagactt tgaaaatttt 480
gtgcttgagg attacaatag atgtccgtat ctgtctattg cagagcctgt tttcaatttt 540
ctatcagaaa tttacggcat gacaagtggc tcttacccag tggtaactaa tttggttatc 600
aaccaaacca caggggagtt agagacagaa tacaataaat ggtttttcag actacattac 660
ctgaccgaaa aacaagacgg gaggaaaagg aggcatggcc aggacgattc aataatgtac 720
ctctcgatgt ctgcgttgaa tttagtacgt gatttggttg aaaagagtat gaatctgttt 780
tttgagaaag ctgatcatct agacgtgaat gcggtggatt ttaaaatttg gtttgtgtca 840
gagggatctg atattgccac agatagcaat gttagtactt ttttgaattc ttcatatgaa 900
ataactccgc ttcaatttct cgaactaccg ataaagaaac tactaatacc agacatgttt 960
gaaaaccgtt tagacaagat aacttcaaat ccgagtgacc ttgtcataga aattaaacct 1020
atagaaggga atcaccattg gccttcaaac tattttgctt ataataaact cgaaccagca 1080
tcaggtacta ctggtttggt caatttggga aatacatgtt acatgaattc tgcgttgcaa 1140
tgcctggtac acattccgca gttgcgtgat tatttccttt atgatggtta tgaagacgaa 1200
atcaatgaag aaaatcctct tgggtaccac ggctatgtgg ctagggcatt tagtgacttg 1260
gttcagaagt tgtttcaaaa ccgtatgagc atagcgcaaa gaaatgctgc tttccccccct 1320
tcaatgttca aatccactat cgggcacttt aattcgatgt tttctggtta tatgcaacag 1380
gattctcaag aatttttagc cttcctgtta gacagtttac atgaagattt gaacaggata 1440
ataaagaaag aatacacaga aaaaccatca ttatctcctg gtgatgacgt gaatgattgg 1500
aatgtagtca agaaactggc agacgatact tgggagatgc atttaaagag aaattgttcc 1560
gttataacgg atttatttgt cgggatgtac aaatcaacgc tatattgtcc cgaatgtcaa 1620
aatgtttcta taacgtttga cccgtataat gatgttacat tgccgcttcc ggttgataca 1680
gtgtgggata aaactataaa aatttttccc atgaactctc caccacttct tcttgaagtt 1740
gagttaagca aatcgtccac ttatatggac ttgaagaatt atgttggtaa aatgtcgggc 1800

ctagatccaa atacactatt tggctgtgag attttcagta atcaaatcta tgttaactat 1860
gagtcaacag agtcgaatgc tcaattttta accttgcagg aattgatcaa acctgctgat 1920
gacgttattt tttatgaatt accagtaaca aatgacaatg aagtaattgt tcccgtattg 1980
aatactagaa ttgaaaaagg ctacaaaaat gcaatgttat ttggagtccc tttctttatt 2040
acgttaaaag aagatgaatt gaataatcca ggtgcaataa gaatgaaatt gcaaaacagg 2100
tttgtccatt taagtggtgg gtatatccca tttcctgaac ctgtaggaaa tcgaaccgat 2160
tttgctgatg cttttccatt attagtagaa aaatatccag atgttgaatt tgaacaatat 2220
aaagatatac tacagtatac gtctattaag gtgactgaca aggataaatc ctttttttcc 2280
atcaagattc tgtctgtaga aaaagagcag caatttgcta gtaataaccg aacagggcct 2340
aatttctgga cccctatctc ccagttaaac cttgacaaag ctacagatat agacgataaa 2400
cttgaagatg tggtgaagga tatctacaat tattcatcct tagtagattg tgctgaaggg 2460
gtccttatgc aagtggatga tgagggagat accgagggta gtgaagcaaa gaatttttcc 2520
aagcccttcc aatcgggaga tgatgaagaa aataaagaaa ctgtaacaaa taatgaaaat 2580
gtaaataata ctaatgatcg ggatgaagat atggaactaa cagatgatgt tgaagaagat 2640
gcaagtacag agccagaatt aacagataag ccagaggcgt tagataaaat taaggatagc 2700
ttgacttcca ctccgtttgc gattctttct atgaatgata ttattgtttg tgagtggagc 2760
gaattgggtt caaatgaggc attttccgat gataaaatat ataactggga aaatccagct 2820
actttgccta acaaagagtt ggagaacgct aagttggaaa gatctaacgc taaggaaaga 2880
accataacct tggacgattg tctccaatta ttttccaaac cagaaatact aggattaacc 2940
gattcgtggt actgccctac atgcaaggaa catcgtcagg ctaccaaaca aatacaactt 3000
tggaatacac cagatattct gctaattcac cttaaaaggt ttgaaagtca aaggtctttt 3060
agcgataaaa ttgatgccac ggttaatttc cccattacag atttggatct gtcgaggtac 3120
gttgtctata aagatgatcc cagaggttta atctatgacc tgtatgcagt agataaccac 3180
tatggtggtt tgggtggtgg gcactatacc gcgtacgtaa agaattttgc cgacaataaa 3240
tggtactatt ttgatgattc tcgagtaact gaaactgcgc cagaaaatag tatagctgga 3300
tcggcttatt tgctatttta cattcgccgt cataaagatg gcaatggatt aggcagctct 3360
aaactacagg aaataatcca aaagtcacgc cacggatatg atgagcgtat caaaaagata 3420
tacgatgaac agatgaagtt gtatgaattt aataagactg acgaggagga agatgtttct 3480
gatgatatga tagaatgtaa tgaagatgtg caggcccctg aatatagtaa tcgtagtttg 3540
gaggttgggc atattgaaac tcaggactgc aacgacgaag atgacaatga tgatggtgag 3600

aggacaaatt caggtaggag aaagttaaga ttgttgaaaa aagtctacaa gaataattca 3660

ggcttgggtt catcgagtac gtctgaaata tctgagggat gcccagaaaa cgaagtcgct 3720

gatttgaatt taaaaaatgg tgtgacacta gaatcgccag aagcggccgc actcgagcac 3780

caccaccacc accactga 3798

<210> 81

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 81

ttaaaagaag atgaagcgaa taatccaggt gc 32

<210> 82

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 82

cgtaataaag aaagggactc caaataacat tg 32

<210> 83

<211> 3798

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP12-2 in pET28a-UBP12-2

<400> 83

atgggttctt cagatgtttc aagtcgtgaa tgttcattgg tttataatga agatcccgat 60
ttcaccgatg gcacaacacc atgtgatcgg ttgggagtgg acttgatgaa tgttctagat 120
gacaaggatg aaataaagca agagtctgtc ccagtctcag atcgtgaaat tgaggatacg 180
gaatccgatg cttccgctgt ttcttcattt gctagcgcta atgagttaat agctgagcca 240
cacgctgcaa gtgaaactaa tcttggaact aatggtcaag atggaagaaa tgtcttagaa 300
caacaaagag acgtggttgc tagactaata gaagaaaaca aggaaacgca aaaagagggt 360
gataaagtct gtattgtccc caaggtttgg tacgataaat ttttcgaccc cgatgttacc 420
gatcctgaag atataggccc tattaataca cgcatgattt gcagagactt tgaaaatttt 480
gtgcttgagg attacaatag atgtccgtat ctgtctattg cagagcctgt tttcaatttt 540
ctatcagaaa tttacggcat gacaagtggc tcttacccag tggtaactaa tttggttatc 600
aaccaaacca caggggagtt agagacagaa tacaataaat ggtttttcag actacattac 660
ctgaccgaaa aacaagacgg gaggaaaagg aggcatggcc aggacgattc aataatgtac 720
ctctcgatgt ctgcgttgaa tttagtacgt gatttggttg aaaagagtat gaatctgttt 780
tttgagaaag ctgatcatct agacgtgaat gcggtggatt ttaaaatttg gtttgtgtca 840
gagggatctg atattgccac agatagcaat gttagtactt ttttgaattc ttcatatgaa 900
ataactccgc ttcaatttct cgaactaccg ataaagaaac tactaatacc agacatgttt 960
gaaaaccgtt tagacaagat aacttcaaat ccgagtgacc ttgtcataga aattaaacct 1020
atagaaggga atcaccattg gccttcaaac tattttgctt ataataaact cgaaccagca 1080
tcaggtacta ctggtttggt caatttggga aatacatgtt acatgaattc tgcgttgcaa 1140
tgcctggtac acattccgca gttgcgtgat tatttccttt atgatggtta tgaagacgaa 1200
atcaatgaag aaaatcctct tgggtaccac ggctatgtgg ctagggcatt tagtgacttg 1260

gttcagaagt tgtttcaaaa ccgtatgagc atagcgcaaa gaaatgctgc tttccccccct 1320
tcaatgttca aatccactat cgggcacttt aattcgatgt tttctggtta tatgcaacag 1380
gattctcaag aatttttagc cttcctgtta gacagtttac atgaagattt gaacaggata 1440
ataaagaaag aatacacaga aaaaccatca ttatctcctg gtgatgacgt gaatgattgg 1500
aatgtagtca agaaactggc agacgatact tgggagatgc atttaaagag aaattgttcc 1560
gttataacgg atttatttgt cgggatgtac aaatcaacgc tatattgtcc cgaatgtcaa 1620
aatgtttcta taacgtttga cccgtataat gatgttacat tgccgcttcc ggttgataca 1680
gtgtgggata aaactataaa aatttttccc atgaactctc caccacttct tcttgaagtt 1740
gagttaagca aatcgtccac ttatatggac ttgaagaatt atgttggtaa aatgtcgggc 1800
ctagatccaa atacactatt tggctgtgag attttcagta atcaaatcta tgttaactat 1860
gagtcaacag agtcgaatgc tcaattttta accttgcagg aattgatcaa acctgctgat 1920
gacgttattt tttatgaatt accagtaaca aatgacaatg aagtaattgt tcccgtattg 1980
aatactagaa ttgaaaaagg ctacaaaaat gcaatgttat ttggagtccc tttctttatt 2040
acgttaaaag aagatgaagc gaataatcca ggtgcaataa gaatgaaatt gcaaaacagg 2100
tttgtccatt taagtggtgg gtatatccca tttcctgaac ctgtaggaaa tcgaaccgat 2160
tttgctgatg cttttccatt attagtagaa aaatatccag atgttgaatt tgaacaatat 2220
aaagatatac tacagtatac gtctattaag gtgactgaca aggataaatc ctttttttcc 2280
atcaagattc tgtctgtaga aaaagagcag caatttgcta gtaataaccg aacagggcct 2340
aatttctgga cccctatctc ccagttaaac cttgacaaag ctacagatat agacgataaa 2400
cttgaagatg tggtgaagga tatctacaat tattcatcct tagtagattg tgctgaaggg 2460
gtccttatgc aagtggatga tgagggagat accgagggta gtgaagcaaa gaatttttcc 2520
aagcccttcc aatcgggaga tgatgaagaa aataaagaaa ctgtaacaaa taatgaaaat 2580
gtaaataata ctaatgatcg ggatgaagat atggaactaa cagatgatgt tgaagaagat 2640
gcaagtacag agccagaatt aacagataag ccagaggcgt tagataaaat taaggatagc 2700
ttgacttcca ctccgtttgc gattctttct atgaatgata ttattgtttg tgagtggagc 2760
gaattgggtt caaatgaggc attttccgat gataaaatat ataactggga aaatccagct 2820
actttgccta acaaagagtt ggagaacgct aagttggaaa gatctaacgc taaggaaaga 2880
accataacct tggacgattg tctccaatta ttttccaaac cagaaatact aggattaacc 2940
gattcgtggt actgccctac atgcaaggaa catcgtcagg ctaccaaaca aatacaactt 3000
tggaatacac cagatattct gctaattcac cttaaaaggt ttgaaagtca aaggtctttt 3060

agcgataaaa ttgatgccac ggttaatttc cccattacag atttggatct gtcgaggtac 3120
gttgtctata aagatgatcc cagaggttta atctatgacc tgtatgcagt agataaccac 3180
tatggtggtt tgggtggtgg gcactatacc gcgtacgtaa agaattttgc cgacaataaa 3240
tggtactatt ttgatgattc tcgagtaact gaaactgcgc cagaaaatag tatagctgga 3300
tcggcttatt tgctatttta cattcgccgt cataaagatg gcaatggatt aggcagctct 3360
aaactacagg aaataatcca aaagtcacgc cacggatatg atgagcgtat caaaaagata 3420
tacgatgaac agatgaagtt gtatgaattt aataagactg acgaggagga agatgtttct 3480
gatgatatga tagaatgtaa tgaagatgtg caggcccctg aatatagtaa tcgtagtttg 3540
gaggttgggc atattgaaac tcaggactgc aacgacgaag atgacaatga tgatggtgag 3600
aggacaaatt caggtaggag aaagttaaga ttgttgaaaa aagtctacaa gaataattca 3660
ggcttgggtt catcgagtac gtctgaaata tctgagggat gcccagaaaa cgaagtcgct 3720
gatttgaatt taaaaaatgg tgtgacacta gaatcgccag aagcggccgc actcgagcac 3780
caccaccacc accactga 3798

<210> 84
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 84
gatgatgttg aagaagatgc aagtacagag cc 32

<210> 85
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 85

tgttagttcc gcatcttcat cacgatcatt ag 32

<210> 86

<211> 3798

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of USP12-3 in pET28a-UBP12-3

<400> 86

atgggttctt cagatgtttc aagtcgtgaa tgttcattgg tttataatga agatcccgat 60

ttcaccgatg gcacaacacc atgtgatcgg ttgggagtgg acttgatgaa tgttctagat 120

gacaaggatg aaataaagca agagtctgtc ccagtctcag atcgtgaaat tgaggatacg 180

gaatccgatg cttccgctgt ttcttcattt gctagcgcta atgagttaat agctgagcca 240

cacgctgcaa gtgaaactaa tcttggaact aatggtcaag atggaagaaa tgtcttagaa 300

caacaaagag acgtggttgc tagactaata gaagaaaaca aggaaacgca aaaagagggt 360

gataaagtct gtattgtccc caaggtttgg tacgataaat ttttcgaccc cgatgttacc 420

gatcctgaag atataggccc tattaataca cgcatgattt gcagagactt tgaaaatttt 480

gtgcttgagg attacaatag atgtccgtat ctgtctattg cagagcctgt tttcaatttt 540

ctatcagaaa tttacggcat gacaagtggc tcttacccag tggtaactaa tttggttatc 600

aaccaaacca caggggagtt agagacagaa tacaataaat ggtttttcag actacattac 660

ctgaccgaaa aacaagacgg gaggaaaagg aggcatggcc aggacgattc aataatgtac 720

ctctcgatgt ctgcgttgaa tttagtacgt gatttggttg aaaagagtat gaatctgttt 780
tttgagaaag ctgatcatct agacgtgaat gcggtggatt ttaaaatttg gtttgtgtca 840
gagggatctg atattgccac agatagcaat gttagtactt ttttgaattc ttcatatgaa 900
ataactccgc ttcaatttct cgaactaccg ataaagaaac tactaatacc agacatgttt 960
gaaaaccgtt tagacaagat aacttcaaat ccgagtgacc ttgtcataga aattaaacct 1020
atagaaggga atcaccattg gccttcaaac tattttgctt ataataaact cgaaccagca 1080
tcaggtacta ctggtttggt caatttggga aatacatgtt acatgaattc tgcgttgcaa 1140
tgcctggtac acattccgca gttgcgtgat tatttccttt atgatggtta tgaagacgaa 1200
atcaatgaag aaaatcctct tgggtaccac ggctatgtgg ctagggcatt tagtgacttg 1260
gttcagaagt tgtttcaaaa ccgtatgagc atagcgcaaa gaaatgctgc tttccccct 1320
tcaatgttca aatccactat cgggcacttt aattcgatgt tttctggtta tatgcaacag 1380
gattctcaag aatttttagc cttcctgtta gacagtttac atgaagattt gaacaggata 1440
ataaagaaag aatacacaga aaaaccatca ttatctcctg gtgatgacgt gaatgattgg 1500
aatgtagtca agaaactggc agacgatact tgggagatgc atttaaagag aaattgttcc 1560
gttataacgg atttatttgt cgggatgtac aaatcaacgc tatattgtcc cgaatgtcaa 1620
aatgtttcta taacgtttga cccgtataat gatgttacat tgccgcttcc ggttgataca 1680
gtgtgggata aaactataaa aatttttccc atgaactctc caccacttct tcttgaagtt 1740
gagttaagca aatcgtccac ttatatggac ttgaagaatt atgttggtaa aatgtcgggc 1800
ctagatccaa atacactatt tggctgtgag attttcagta atcaaatcta tgttaactat 1860
gagtcaacag agtcgaatgc tcaattttta accttgcagg aattgatcaa acctgctgat 1920
gacgttattt tttatgaatt accagtaaca aatgacaatg aagtaattgt tcccgtattg 1980
aatactagaa ttgaaaaagg ctacaaaaat gcaatgttat ttggagtccc tttctttatt 2040
acgttaaaag aagatgaagc gaataatcca ggtgcaataa gaatgaaatt gcaaaacagg 2100
tttgtccatt taagtggtgg gtatatccca tttcctgaac ctgtaggaaa tcgaaccgat 2160
tttgctgatg cttttccatt attagtagaa aaatatccag atgttgaatt tgaacaatat 2220
aaagatatac tacagtatac gtctattaag gtgactgaca aggataaatc ctttttttcc 2280
atcaagattc tgtctgtaga aaaagagcag caatttgcta gtaataaccg aacagggcct 2340
aatttctgga cccctatctc ccagttaaac cttgacaaag ctacagatat agacgataaa 2400
cttgaagatg tggtgaagga tatctacaat tattcatcct tagtagattg tgctgaaggg 2460
gtccttatgc aagtggatga tgagggagat accgagggta gtgaagcaaa gaatttttcc 2520

aagcccttcc aatcgggaga tgatgaagaa aataaagaaa ctgtaacaaa taatgaaaat 2580
gtaaataata ctaatgatcg tgatgaagat gcggaactaa cagatgatgt tgaagaagat 2640
gcaagtacag agccagaatt aacagataag ccagaggcgt tagataaaat taaggatagc 2700
ttgacttcca ctccgtttgc gattctttct atgaatgata ttattgtttg tgagtggagc 2760
gaattgggtt caaatgaggc attttccgat gataaaatat ataactggga aaatccagct 2820
actttgccta acaaagagtt ggagaacgct aagttggaaa gatctaacgc taaggaaaga 2880
accataacct tggacgattg tctccaatta ttttccaaac cagaaatact aggattaacc 2940
gattcgtggt actgccctac atgcaaggaa catcgtcagg ctaccaaaca aatacaactt 3000
tggaatacac cagatattct gctaattcac cttaaaaggt ttgaaagtca aaggtctttt 3060
agcgataaaa ttgatgccac ggttaatttc cccattacag atttggatct gtcgaggtac 3120
gttgtctata aagatgatcc cagaggttta atctatgacc tgtatgcagt agataaccac 3180
tatggtggtt tgggtggtgg gcactatacc gcgtacgtaa agaattttgc cgacaataaa 3240
tggtactatt ttgatgattc tcgagtaact gaaactgcgc cagaaaatag tatagctgga 3300
tcggcttatt tgctatttta cattcgccgt cataaagatg gcaatggatt aggcagctct 3360
aaactacagg aaataatcca aaagtcacgc cacggatatg atgagcgtat caaaaagata 3420
tacgatgaac agatgaagtt gtatgaattt aataagactg acgaggagga agatgtttct 3480
gatgatatga tagaatgtaa tgaagatgtg caggcccctg aatatagtaa tcgtagtttg 3540
gaggttgggc atattgaaac tcaggactgc aacgacgaag atgacaatga tgatggtgag 3600
aggacaaatt caggtaggag aaagttaaga ttgttgaaaa aagtctacaa gaataattca 3660
ggcttgggtt catcgagtac gtctgaaata tctgagggat gcccagaaaa cgaagtcgct 3720
gatttgaatt taaaaaatgg tgtgacacta gaatcgccag aagcggccgc actcgagcac 3780
caccaccacc accactga 3798

<210> 87
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 87

taataagact gacgaagaag aagatgtttc tg 32

<210> 88

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 88

aattcataca acttcatctg ttcatcgtat at 32

<210> 89

<211> 3798

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> A coding region of UBP12-4 in pET28a-UBP12-4

<400> 89

atgggttctt cagatgtttc aagtcgtgaa tgttcattgg tttataatga agatcccgat 60

ttcaccgatg gcacaacacc atgtgatcgg ttgggagtgg acttgatgaa tgttctagat 120

gacaaggatg aaataaagca agagtctgtc ccagtctcag atcgtgaaat tgaggatacg 180

gaatccgatg cttccgctgt ttcttcattt gctagcgcta atgagttaat agctgagcca 240
cacgctgcaa gtgaaactaa tcttggaact aatggtcaag atggaagaaa tgtcttagaa 300
caacaaagag acgtggttgc tagactaata gaagaaaaca aggaaacgca aaaagagggt 360
gataaagtct gtattgtccc caaggtttgg tacgataaat ttttcgaccc cgatgttacc 420
gatcctgaag atataggccc tattaataca cgcatgattt gcagagactt tgaaaatttt 480
gtgcttgagg attacaatag atgtccgtat ctgtctattg cagagcctgt tttcaatttt 540
ctatcagaaa tttacggcat gacaagtggc tcttacccag tggtaactaa tttggttatc 600
aaccaaacca caggggagtt agagacagaa tacaataaat ggtttttcag actacattac 660
ctgaccgaaa aacaagacgg gaggaaaagg aggcatggcc aggacgattc aataatgtac 720
ctctcgatgt ctgcgttgaa tttagtacgt gatttggttg aaaagagtat gaatctgttt 780
tttgagaaag ctgatcatct agacgtgaat gcggtggatt ttaaaatttg gtttgtgtca 840
gagggatctg atattgccac agatagcaat gttagtactt ttttgaattc ttcatatgaa 900
ataactccgc ttcaatttct cgaactaccg ataaagaaac tactaatacc agacatgttt 960
gaaaaccgtt tagacaagat aacttcaaat ccgagtgacc ttgtcataga aattaaacct 1020
atagaaggga atcaccattg gccttcaaac tattttgctt ataataaact cgaaccagca 1080
tcaggtacta ctggtttggt caatttggga aatacatgtt acatgaattc tgcgttgcaa 1140
tgcctggtac acattccgca gttgcgtgat tatttccttt atgatggtta tgaagacgaa 1200
atcaatgaag aaaatcctct tgggtaccac ggctatgtgg ctagggcatt tagtgacttg 1260
gttcagaagt tgtttcaaaa ccgtatgagc atagcgcaaa gaaatgctgc tttccccct 1320
tcaatgttca aatccactat cgggcacttt aattcgatgt tttctggtta tatgcaacag 1380
gattctcaag aatttttagc cttcctgtta gacagtttac atgaagattt gaacaggata 1440
ataaagaaag aatacacaga aaaaccatca ttatctcctg gtgatgacgt gaatgattgg 1500
aatgtagtca agaaactggc agacgatact tgggagatgc atttaaagag aaattgttcc 1560
gttataacgg atttatttgt cgggatgtac aaatcaacgc tatattgtcc cgaatgtcaa 1620
aatgtttcta taacgtttga cccgtataat gatgttacat tgccgcttcc ggttgataca 1680
gtgtgggata aaactataaa aatttttccc atgaactctc caccacttct tcttgaagtt 1740
gagttaagca aatcgtccac ttatatggac ttgaagaatt atgttggtaa aatgtcgggc 1800
ctagatccaa atacactatt tggctgtgag attttcagta atcaaatcta tgttaactat 1860
gagtcaacag agtcgaatgc tcaattttta accttgcagg aattgatcaa acctgctgat 1920
gacgttattt tttatgaatt accagtaaca aatgacaatg aagtaattgt tcccgtattg 1980

aatactagaa ttgaaaaagg ctacaaaaat gcaatgttat ttggagtccc tttctttatt 2040
acgttaaaag aagatgaagc gaataatcca ggtgcaataa gaatgaaatt gcaaaacagg 2100
tttgtccatt taagtggtgg gtatatccca tttcctgaac ctgtaggaaa tcgaaccgat 2160
tttgctgatg cttttccatt attagtagaa aaatatccag atgttgaatt tgaacaatat 2220
aaagatatac tacagtatac gtctattaag gtgactgaca aggataaatc ctttttttcc 2280
atcaagattc tgtctgtaga aaaagagcag caatttgcta gtaataaccg aacagggcct 2340
aatttctgga cccctatctc ccagttaaac cttgacaaag ctacagatat agacgataaa 2400
cttgaagatg tggtgaagga tatctacaat tattcatcct tagtagattg tgctgaaggg 2460
gtccttatgc aagtggatga tgagggagat accgagggta gtgaagcaaa gaatttttcc 2520
aagcccttcc aatcgggaga tgatgaagaa aataaagaaa ctgtaacaaa taatgaaaat 2580
gtaaataata ctaatgatcg tgatgaagat gcggaactaa cagatgatgt tgaagaagat 2640
gcaagtacag agccagaatt aacagataag ccagaggcgt tagataaaat taaggatagc 2700
ttgacttcca ctccgtttgc gattctttct atgaatgata ttattgtttg tgagtggagc 2760
gaattgggtt caaatgaggc attttccgat gataaaatat ataactggga aaatccagct 2820
actttgccta acaaagagtt ggagaacgct aagttggaaa gatctaacgc taaggaaaga 2880
accataacct tggacgattg tctccaatta ttttccaaac cagaaatact aggattaacc 2940
gattcgtggt actgccctac atgcaaggaa catcgtcagg ctaccaaaca aatacaactt 3000
tggaatacac cagatattct gctaattcac cttaaaaggt ttgaaagtca aaggtctttt 3060
agcgataaaa ttgatgccac ggttaatttc cccattacag atttggatct gtcgaggtac 3120
gttgtctata aagatgatcc cagaggttta atctatgacc tgtatgcagt agataaccac 3180
tatggtggtt tgggtggtgg gcactatacc gcgtacgtaa agaattttgc cgacaataaa 3240
tggtactatt ttgatgattc tcgagtaact gaaactgcgc cagaaaatag tatagctgga 3300
tcggcttatt tgctatttta cattcgccgt cataaagatg gcaatggatt aggcagctct 3360
aaactacagg aaataatcca aaagtcacgc cacggatatg atgagcgtat caaaaagata 3420
tacgatgaac agatgaagtt gtatgaattt aataagactg acgaagaaga agatgtttct 3480
gatgatatga tagaatgtaa tgaagatgtg caggcccctg aatatagtaa tcgtagtttg 3540
gaggttgggc atattgaaac tcaggactgc aacgacgaag atgacaatga tgatggtgag 3600
aggacaaatt caggtaggag aaagttaaga ttgttgaaaa aagtctacaa gaataattca 3660
ggcttgggtt catcgagtac gtctgaaata tctgagggat gcccagaaaa cgaagtcgct 3720
gatttgaatt taaaaaatgg tgtgacacta gaatcgccag aagcggccgc actcgagcac 3780

caccaccacc accactga 3798

<210> 90

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 90

tatgggccat caccatcacc atcacgccat ggg 33

<210> 91

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 91

aattcccatg gcgtgatggt gatggtgatg gccca 35

<210> 92

<211> 5299

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthtic DNA

<223> Entire region of pET26M

<400> 92

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt gccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380

ccettgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aaggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180

catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980

aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa 5040

ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgggccat caccatcacc atcacgccat 5100

gggaattcga gctccgtcga caagcttgcg gccgcactcg agcaccacca ccaccaccac 5160

tgagatccgg ctgctaacaa agcccgaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag 5220

caataactag cataacccct tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa 5280

ggaggaacta tatccggat 5299

<210> 93

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 93

gccacagata gcaatgttag tac 23

<210> 94

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 94

atagtttagc ggccgctcac ttgtcatcgt cgtccttgta gtctgcggct gcttctggcg 60

attctagtgt cacaccattt tttaaattc 89

<210> 95

<211> 3825

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<223> A coding region of UB12-FLAG in pET26M-UBP12-FLAG

<400> 95

atgggccatc accatcacca tcacgccatg ggttcttcag atgtttcaag tcgtgaatgt 60

tcattggttt ataatgaaga tcccgatttc accgatggca caacaccatg tgatcggttg 120

ggagtggact tgatgaatgt tctagatgac aaggatgaaa taaagcaaga gtctgtccca 180

gtctcagatc gtgaaattga ggatacggaa tccgatgctt ccgctgtttc ttcatttgct 240

agcgctaatg agttaatagc tgagccacac gctgcaagtg aaactaatct tggaactaat 300

ggtcaagatg gaagaaatgt cttagaacaa caaagagacg tggttgctag actaatagaa 360

gaaaacaagg aaacgcaaaa agagggtgat aaagtctgta ttgtccccaa ggtttggtac 420

gataaatttt tcgaccccga tgttaccgat cctgaagata taggccctat taatacacgc 480

atgatttgca gagactttga aaattttgtg cttgaggatt acaatagatg tccgtatctg 540

tctattgcag agcctgtttt caattttcta tcagaaattt acggcatgac aagtggctct 600

tacccagtgg taactaattt ggttatcaac caaaccacag gggagttaga gacagaatac 660

aataaatggt ttttcagact acattacctg accgaaaaac aagacgggag gaaaaggagg 720

catggccagg acgattcaat aatgtacctc tcgatgtctg cgttgaattt agtacgtgat 780

ttggttgaaa agagtatgaa tctgtttttt gagaaagctg atcatctaga cgtgaatgcg 840

gtggatttta aaatttggtt tgtgtcagag ggatctgata ttgccacaga tagcaatgtt 900

agtacttttt tgaattcttc atatgaaata actccgcttc aatttctcga actaccgata 960

aagaaactac taataccaga catgtttgaa aaccgtttag acaagataac ttcaaatccg 1020

agtgaccttg tcatagaaat taaacctata gaagggaatc accattggcc ttcaaactat 1080
tttgcttata ataaactcga accagcatca ggtactactg gtttggtcaa tttgggaaat 1140
acatgttaca tgaattctgc gttgcaatgc ctggtacaca ttccgcagtt gcgtgattat 1200
ttcctttatg atggttatga agacgaaatc aatgaagaaa atcctcttgg gtaccacggc 1260
tatgtggcta gggcatttag tgacttggtt cagaagttgt ttcaaaaccg tatgagcata 1320
gcgcaaagaa atgctgcttt ccccccttca atgttcaaat ccactatcgg gcactttaat 1380
tcgatgtttt ctggttatat gcaacaggat tctcaagaat ttttagcctt cctgttagac 1440
agtttacatg aagatttgaa caggataata aagaaagaat acacagaaaa accatcatta 1500
tctcctggtg atgacgtgaa tgattggaat gtagtcaaga aactggcaga cgatacttgg 1560
gagatgcatt taaagagaaa ttgttccgtt ataacggatt tatttgtcgg gatgtacaaa 1620
tcaacgctat attgtcccga atgtcaaaat gtttctataa cgtttgaccc gtataatgat 1680
gttacattgc cgcttccggt tgatacagtg tgggataaaa ctataaaaat ttttcccatg 1740
aactctccac cacttcttct tgaagttgag ttaagcaaat cgtccactta tatggacttg 1800
aagaattatg ttggtaaaat gtcgggccta gatccaaata cactatttgg ctgtgagatt 1860
ttcagtaatc aaatctatgt taactatgag tcaacagagt cgaatgctca atttttaacc 1920
ttgcaggaat tgatcaaacc tgctgatgac gttatttttt atgaattacc agtaacaaat 1980
gacaatgaag taattgttcc cgtattgaat actagaattg aaaaaggcta caaaaatgca 2040
atgttatttg gagtcccttt ctttattacg ttaaaagaag atgaagcgaa taatccaggt 2100
gcaataagaa tgaaattgca aaacaggttt gtccatttaa gtggtgggta tatcccattt 2160
cctgaacctg taggaaatcg aaccgatttt gctgatgctt ttccattatt agtagaaaaa 2220
tatccagatg ttgaatttga acaatataaa gatatactac agtatacgtc tattaaggtg 2280
actgacaagg ataaatcctt tttttccatc aagattctgt ctgtagaaaa agagcagcaa 2340
tttgctagta ataaccgaac agggcctaat ttctggaccc ctatctccca gttaaacctt 2400
gacaaagcta cagatataga cgataaactt gaagatgtgg tgaaggatat ctacaattat 2460
tcatccttag tagattgtgc tgaaggggtc cttatgcaag tggatgatga gggagatacc 2520
gagggtagtg aagcaaagaa tttttccaag cccttccaat cgggagatga tgaagaaaat 2580
aaagaaactg taacaaataa tgaaaatgta aataatacta atgatcgtga tgaagatgcg 2640
gaactaacag atgatgttga agaagatgca agtacagagc cagaattaac agataagcca 2700
gaggcgttag ataaaattaa ggatagcttg acttccactc cgtttgcgat tctttctatg 2760
aatgatatta ttgtttgtga gtggagcgaa ttgggttcaa atgaggcatt ttccgatgat 2820

aaaatatata actgggaaaa tccagctact ttgcctaaca aagagttgga gaacgctaag 2880

ttggaaagat ctaacgctaa ggaaagaacc ataaccttgg acgattgtct ccaattattt 2940

tccaaaccag aaatactagg attaaccgat tcgtggtact gccctacatg caaggaacat 3000

cgtcaggcta ccaaacaaat acaactttgg aatacaccag atattctgct aattcacctt 3060

aaaaggtttg aaagtcaaag gtcttttagc gataaaattg atgccacggt taatttcccc 3120

attacagatt tggatctgtc gaggtacgtt gtctataaag atgatcccag aggtttaatc 3180

tatgacctgt atgcagtaga taaccactat ggtggtttgg gtggtgggca ctataccgcg 3240

tacgtaaaga attttgccga caataaatgg tactattttg atgattctcg agtaactgaa 3300

actgcgccag aaaatagtat agctggatcg gcttatttgc tattttacat tcgccgtcat 3360

aaagatggca atggattagg cagctctaaa ctacaggaaa taatccaaaa gtcacgccac 3420

ggatatgatg agcgtatcaa aaagatatac gatgaacaga tgaagttgta tgaatttaat 3480

aagactgacg aagaagaaga tgtttctgat gatatgatag aatgtaatga agatgtgcag 3540

gcccctgaat atagtaatcg tagtttggag gttgggcata ttgaaactca ggactgcaac 3600

gacgaagatg acaatgatga tggtgagagg acaaattcag gtaggagaaa gttaagattg 3660

ttgaaaaaag tctacaagaa taattcaggc ttgggttcat cgagtacgtc tgaaatatct 3720

gagggatgcc cagaaaacga agtcgctgat ttgaatttaa aaaatggtgt gacactagaa 3780

tcgccagaag cagccgcaga ctacaaggac gacgatgaca agtga 3825

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/007575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/09, C07K1/22, C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/09, C07K1/22, C07K16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKEDA K. et al., Isolation of ubiquitin-E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) complexes from erythroleukaemia cells using immunoaffinity techniques, Biochem J., 2001, Vol.356, pages 199 to 206	1-6,10-12, 15-19
Y	USUBA T. et al., Purification and identification of monoubiquitin-phosphoglycerate mutase B complex from human colorectal cancer tissues, Int J. Cancer, 2001, Vol.94, No.5, pages 662 to 668	1-6,10-12, 15-19

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 August, 2004 (12.08.04)	31 August, 2004 (31.08.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/007575

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Baker R.T. et al., Ubiquitin-specific proteases of Saccharomyces cerevisiae. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family, J.Biol.Chem., 1992, Vol.267, No.32, pages 23364 to 23375	1-6,10-12, 15-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/007575

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-12 and 15-22 relate to a method of recovering protein decomposable through ubiquitin-dependent protein decomposition pathway of a sample with the use of an anti-ubiquitin chain antibody and a deubiquitinating enzyme. On the other hand, claims 13-14 relate to an anti-ubiquitin chain antibody capable of recognizing a bind region between an amino acid sequence of C-terminal region of ubiquitin and a protein. However, it does not appear that the anti-ubiquitin chain antibody is one specially designed for use in the protein recovering method of claims 1-12 and 15-22. Further, although claim 23 relates to deubiquitinating enzyme UBP12, it also does not appear that this enzyme
(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-12 and 15-22.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

is one specially designed for use in the protein recovering method of claims 1-12 and 15-22. Thus, among these inventions, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features. Consequently, it cannot be recognized that these inventions are so linked with each other as to form a single general inventive concept. Therefore, it appears that the number of inventions of this application is 3.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００４／００７５７５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl7　C12N15/09, C07K1/22, C07K16/00

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl7　C12N15/09, C07K1/22, C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Takeda K. et al., Isolation of ubiquitin-E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) complexes from erythroleukaemia cells using immunoaffinity techniques, Biochem J, 2001, Vol.356, pp.199-206	1-6,10-12,15-19
Y	Usuba T. et al., Purification and identification of monoubiquitin-phosphoglycerate mutase B complex from human colorectal cancer tissues, Int J Cancer, 2001, Vol.94, No.5, pp.662-668	1-6,10-12,15-19

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１２．０８．２００４	31.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	七條　里美	４Ｂ　２９３６
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８	

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Baker R.T. et al., Ubiquitin-specific proteases of Saccharomyces cerevisiae. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family, J Biol Chem, 1992, Vol.267, No.32, pp.23364-23375	1-6,10-12,15-19

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００４／００７５７５

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲１－１２，１５－２２は、抗ユビキチン鎖抗体および脱ユビキチン化酵素を用いて試料中のユビキチン依存性タンパク質分解経路によって分解されるタンパク質を回収する方法に関するものである。一方、請求の範囲１３－１４は、ユビキチンのＣ末端領域のアミノ酸配列とタンパク質との結合領域を認識する抗ユビキチン鎖抗体に関するものである。しかし、該抗ユビキチン鎖抗体は、請求の範囲１－１２，１５－２２におけるタンパク質回収方法に使用するために特に設計したものであるとは認められない。また、請求の範囲２３は、脱ユビキチン化酵素ＵＢＰ１２に関するものであるが、該酵素も、請求の範囲１－１２，１５－２２におけるタンパク質回収方法に使用するために特に設計したものであるとは認められない。したがって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められず、本出願に係る発明の数は３と認める。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲１－１２，１５－２２

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。