(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4664677号
(P4664677)
(45)発行日　平成23年4月6日(2011.4.6)　(24)登録日　平成23年1月14日(2011.1.14)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 1/14	(2006.01)	C07K	1/14	
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00	ZCC

請求項の数 31　(全 41 頁)

(21)出願番号	特願2004-533653 (P2004-533653)
(86)(22)出願日	平成15年9月5日(2003.9.5)
(65)公表番号	特表2005-537795 (P2005-537795A)
(43)公表日	平成17年12月15日(2005.12.15)
(86)国際出願番号	PCT/GB2003/003860
(87)国際公開番号	WO2004/022746
(87)国際公開日	平成16年3月18日(2004.3.18)
審査請求日	平成18年5月22日(2006.5.22)
(31)優先権主張番号	0220759.5
(32)優先日	平成14年9月6日(2002.9.6)
(33)優先権主張国	英国(GB)
(31)優先権主張番号	0304521.8
(32)優先日	平成15年2月27日(2003.2.27)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　505081032
イソゲニカ　リミテッド
イギリス国　ピーイー１　１キューエフ、ピーターボロ、　シティー　ロード、スツアート　ハウス
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イン・ビトロでのペプチド発現ライブラリー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）（ｉ）ＤＮＡ標的配列、
（ｉｉ）ライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡ、及び
（ｉｉｉ）（ｉ）の前記ＤＮＡ標的配列に直接的又は間接的に非共有結合することができるペプチドをコードするＤＮＡを含むＤＮＡ構築物であって、前記ＤＮＡ構築物及びコードされたタンパク質がシス活性を有するように選択したＤＮＡ構築物を提供する段階、
（ｂ）各発現ペプチドが生成元のＤＮＡに非共有結合するように、前記ＤＮＡ構築物が複数のライブラリー構成ペプチドをコードする、（ａ）による複数のＤＮＡ構築物を発現する段階、
を含み、各ペプチドが前記ペプチドをコードする前記ＤＮＡ構築物に結合した、複数のペプチドを含むイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーの作製方法。
【請求項２】
前記ＤＮＡ構築物が、
（ｉｖ）シス活性をもたらすＤＮＡ要素、
をさらに含む請求項１記載の方法。
【請求項３】
（ａ）の前記ＤＮＡ構築物が、
（ｖ）ｒｅｐＡタンパク質のＣ末端の少なくとも２０個のアミノ酸を含む断片をコー

ドするＤＮＡであって、前記断片が（ｉｖ）の前記ＤＮＡ要素と相互作用できるＤＮＡ、をさらに含み、（ｉｖ）の前記ＤＮＡ要素が、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）及び（ｖ）の前記ＤＮＡの３’に位置する請求項２記載の方法。

【請求項４】

（ｉｉｉ）の前記ＤＮＡでコードされたペプチドが（ｉ）の前記ＤＮＡ標的配列を認識し、それに直接結合することができる請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５】

（ｉｉｉ）の前記ＤＮＡでコードされたペプチドがｒｅｐＡタンパク質であり、（ｉ）の前記ＤＮＡ標的配列がｏｒｉである請求項４記載の方法。

【請求項６】

（ｉｉ）の前記ＤＮＡが制限酵素消化及び連結によって（ｉ）及び（ｉｉｉ）の前記ＤＮＡに結合した請求項４又は５に記載の方法。

【請求項７】

前記ｒｅｐＡが、ＩｎｃＩ複合プラスミドのｒｅｐＡ並びにＩｎｃＦ、ＩｎｃＢ、ＩｎｃＫ、ＩｎｃＺ及びＩｎｃＬ／ＭプラスミドのｒｅｐＡから選択された請求項３～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

前記ＤＮＡ構築物が、ｒｅｐＡをコードする配列、ＩｎｃＦＩＩプラスミドＲ１のｃｉｓＤＮＡ要素及びｏｒｉＤＮＡを含む請求項５記載の方法。

【請求項９】

前記ｒｅｐＡタンパク質が、配列番号１６の配列を有し、前記ｃｉｓＤＮＡ要素が配列番号１７の配列を有する請求項３～８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

（ｉｉｉ）の前記ＤＮＡでコードされたペプチドに結合しないＤＮＡが非特異的ＤＮＡ結合タンパク質に結合する請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１】

（ｉｉｉ）の前記ＤＮＡでコードされたペプチドがエストロゲン受容体ＤＮＡ結合ドメインであり、（ｉ）の前記ＤＮＡ標的配列はエストロゲン受容体標的配列である請求項４記載の方法。

【請求項１２】

前記ＤＮＡ結合ドメインがエストロゲン受容体ＤＮＡ結合断片のアミノ酸１７６から２８２までを含み、前記ＤＮＡ標的配列は配列番号１４のエストロゲン受容体標的配列を含む請求項１１記載の方法。

【請求項１３】

前記ＤＮＡが適切なプロモーター及びイン・ビトロでの転写及び翻訳を可能にする翻訳配列の制御下にある請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４】

前記ライブラリー構成ペプチドが抗体又はその断片である請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

前記ライブラリーが少なくとも10^4個の分子を含む請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

前記発現は、ヌクレアーゼ活性を防御し、非特異的ＤＮＡ－タンパク質又はタンパク質－タンパク質相互作用を減少させる化合物の存在下で実施する請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７】

前記発現は細菌の一連の転写／翻訳環境で実施する請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８】

前記細菌の一連の転写／翻訳環境はＳ３０抽出系である請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
少なくとも（ａ）イン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーをスクリーニングする段階、及び（ｂ）関連するライブラリー構成要素を選択し単離する段階を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法によって生成された前記ライブラリーから所望の特性を示すペプチドを同定及び／又は精製する方法。
【請求項２０】
特異的リガンド結合ペプチドの同定方法であって、少なくとも（ａ）固相支持体に場合によっては結合したリガンド分子で請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法によって生成したイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーをスクリーニングする段階、（ｂ）前記リガンド分子に結合するライブラリー構成要素を選択し単離する段階、及び（ｃ）前記リガンド分子に特異的に結合するペプチドを単離する段階を含む方法。
【請求項２１】
前記ライブラリー構成ペプチドが抗体又はそれらの断片である請求項１９又は２０に記載の方法。
【請求項２２】
少なくとも、
（ａ）（ｉｉｉ）のＤＮＡでコードされたペプチドはＤＮＡ結合活性を有するライブラリー構成ペプチドであり、（ｉ）の前記ＤＮＡ標的配列は関心のある特異的ＤＮＡ標的配列である請求項１～１８のいずれか一項に記載のイン・ビトロでの発現ライブラリーを提供する段階、
（ｂ）コードタンパク質が前記標的配列に結合するライブラリー構成要素を選択し単離する段階、及び
（ｃ）前記標的配列に結合するペプチドを単離する段階、
を含む、前記特異的ＤＮＡ標的配列に結合する能力を有するペプチドを同定及び／又は精製する方法。
【請求項２３】
前記ライブラリー構成ペプチドが、ジンクフィンガータンパク質、ヘリックス－ループ－ヘリックスタンパク質又はヘリックス－ターン－ヘリックスタンパク質である請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
前記スクリーニング及び／又は選択段階は、ヌクレアーゼ活性を防御し、非特異的ＤＮＡ－タンパク質又はタンパク質－タンパク質相互作用を減少させる化合物の存在下で実施する請求項１９～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記化合物がヘパリンである請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
さらに前記単離ペプチドを発現するＤＮＡを単離する請求項１９～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＤＮＡを発現ベクターにクローニングすることをさらに含む請求項２６記載の方法。
【請求項２８】
前記発現ベクターをイン・ビトロで細胞に導入することをさらに含む請求項２７記載の方法。
【請求項２９】
前記ＤＮＡでコードされたペプチドを発現することをさらに含む請求項２７又は２８に記載の方法。
【請求項３０】
請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法によって生成したイン・ビトロでのペプチ

ド発現ライブラリー。
【請求項３１】
請求項１～１８のいずれか一項に記載のＤＮＡ構築物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般的には組換えＤＮＡ技術に関し、より具体的には、生物活性分子をコードするＤＮＡ配列についてＤＮＡライブラリーを構築しスクリーニングするイン・ビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）法に関する。
【背景技術】
【０００２】
組換えＤＮＡライブラリーから所望のペプチドをコードする未知の遺伝子を単離することは、困難な操作である。ハイブリダイゼーションプローブを使用することによってこの操作を容易にすることができるが、これを使用するには一般的に、タンパク質をコードする遺伝子配列の少なくとも一部が公知であることが必要である。配列が分かっていないときは、ＤＮＡライブラリーは発現ベクターで発現させることができ、抗体を使用して所望のタンパク質抗原のプラーク又はコロニーをスクリーニングしてきた。この方法は小さなライブラリーのスクリーニングには有用であるが、発現が希なｃＤＮＡ分子又は合成ペプチドの場合のように、クローン10^5個当たり約１個未満しか現れないような出現が希な配列は見逃されやすく、クローン数が10^6個より大きなライブラリーをスクリーニングすることは細心の注意が必要で、困難を極める。大きなライブラリーをスクリーニングするためには、希にしか生じない配列の単離に対応するために考案された方法を開発することが必要である。イン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）方法、たとえば、ファージディスプレイ及びペプチドのｌａｃＩ融合を使用した「プラスミド上のペプチド」などは、大きなライブラリーをスクリーニングするために開発されてきた。
【０００３】
ファージディスプレイ法は、繊維状バクテリオファージコートタンパク質のＮ末端に融合したＤＮＡライブラリー及び細菌宿主におけるそれらの発現に基づき、ファージ粒子にパッケージされた融合タンパク質コードＤＮＡを有するファージ粒子表面上における外来ペプチドの提示を引き起こす（Ｓｍｉｔｈ　Ｇ．Ｐ．、１９８５、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２８：１３１５～１３１７）。ファージに取り込まれた融合タンパク質のライブラリーは、次に関心のある標的（リガンド）に対する結合因子で選択することができる。次に、結合したファージを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に再感染させ、その後増幅して選択を繰り返し、結合因子を濃縮することができる（Ｐａｒｍｌｅｙ、Ｓ．Ｆ．＆　Ｓｍｉｔｈ、Ｇ．Ｐ．１９８８．、Ｇｅｎｅ．７３：３０５～３１８、Ｂａｒｒｅｔｔ　Ｒ．Ｗ．他、１９９２、Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２０４：３５７～３６４　Ｗｉｌｌｉａｍｓｏｎ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：４１４１～４１４５、Ｍａｒｋｓ他、１９９１、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１～５９７）。
【０００４】
ＬａｃＩ融合プラスミドは、ｌａｃリプレッサーのＤＮＡ結合能力に基づいている。ランダムペプチドのライブラリーをｌａｃＩリプレッサータンパク質のＣ末端に融合する。ＬａｃＩペプチド融合物のそのコードＤＮＡへの結合は、プラスミドのｌａｃＯ配列を介して行われ、安定したペプチド－ＬａｃＩ－ペプチド複合体が形成される。これらの複合体は、細胞溶解によって宿主細菌から放出され、関心のあるペプチドは、アフィニティ精製によって固定された受容体標的上に単離される。したがって、単離したプラスミドをエレクトロポレーションによって大腸菌に再導入して、スクリーニングを重ねるために選択した集団を増幅することができる（Ｃｕｌｌ、Ｍ．Ｇ．他、１９９２　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：１８６５～１８６９）。
【０００５】

これらの細菌による方法は、宿主細菌にＤＮＡを導入する現在の方法で作製できるライブラリーの大きさには限界があり、導入した発現ペプチドには潜在的細胞毒性がある上、翻訳後に変更を行ったり、新規アミノ酸を発現ペプチドに取り込んだりできないことが制限となる。

【０００６】

完全なイン・ビトロでのリボソーム系は、ペプチドの該ペプチドコードＲＮＡへのリボソームによる結合に基づいて説明されている（ＷＯ９１／０５０５８）。リボソームディスプレイはまた、１本鎖Ｆｖ抗体断片（ｓｃＦｖ）を選択するために使用されてきた（Ｍａｔｈｅａｋｉｓ、Ｌ．Ｃ．他、１９９４　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：９０２２～９０２６、Ｈａｎｅｓ、Ｊ．＆　Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ、Ａ．１９９７　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４：４９３７～４９４２）。この方法の欠点は、ＲＮＡ遺伝物質の安定性が低いこと、ＲＮＡ分解酵素が存在するおそれがある選択条件下では分解が増加しやすいことである。

【０００７】

Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ及びＴａｗｆｉｋが報告したイン・ビトロ法（ＷＯ９９／０２６７１及びＷＯ００／４０７１２）では、ペプチド発現の前にＤＮＡを区分し、その後区分内のＤＮＡを改変することによってこれらの問題のいくつかに取り組んでいる。改変可能なペプチドは、関心のある酵素活性から得られ、その後の段階で選択する。しかし、そのペプチドをコードするＤＮＡを変更せず、区分から改変ＤＮＡを放出して、ペプチドとＤＮＡの両方のペプチド結合活性を直接的に選択することは不可能である。

【０００８】

他の従来方法、共有結合ディスプレイ法又はＣＤＴは、ＷＯ９８３７１８６に記載されている。この方法は、架橋結合タンパク質のシス作用によるタンパク質とＤＮＡとの架橋結合によって、遺伝子型と表現型との結合を保持することによる。この方法は、この技術をうまく使用するためには２つの必要条件が必要であることを示している。第１に、タンパク質はそれらをコードするＤＮＡ配列とイン・ビトロで相互作用する（シス作用）ことが必要で、第２に、前記タンパク質はそれ自身のＤＮＡ鋳型と共有結合を確立しなければならない。この方法は、ＤＮＡが化学的に変更され、関心のある結合ペプチドの回収及び同定が妨害されるおそれがあるという事実が欠点となっている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

依然として、前述の方法に加えて、結合活性並びに酵素活性の直接選択が可能で、関心のあるペプチドをコードする完全な遺伝子材料の回収できる上、複合ペプチド構造の効果的な生成を可能にする用途の広いイン・ビトロでのペプチドライブラリー構築方法の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

したがって、本発明は、

（ａ）（ｉ）ＤＮＡ標的配列、

（ｉｉ）ライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡ、及び

（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記ＤＮＡ標的配列に直接的又は間接的に非共有結合することができるペプチドをコードするＤＮＡを含むＤＮＡ構築物であって、前記ＤＮＡ構築物及びコードされたタンパク質がシス活性を有するように選択されたＤＮＡ構築物を提供する段階、

（ｂ）各発現ペプチドが生成元のＤＮＡに非共有結合するように、前記ＤＮＡ構築物が複数のライブラリー構成ペプチドをコードする、（ａ）による複数のＤＮＡ構築物を発現する段階を含み、各ペプチドが前記ペプチドをコードするＤＮＡ構築物に結合した、複数のペプチドを含むイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーの作製方法を提供する。

【００１１】

また、本発明は、
（ａ）（ｉ）ライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡ、及び
（ｉｉ）二価性物質に非共有結合することができるペプチドをコードするＤＮＡを含むＤＮＡ構築物であって、前記ＤＮＡ構築物及びコードタンパク質はシス活性を有するように選択されたＤＮＡ構築物を提供する段階、
（ｂ）二価性物質又は二価性物質に結合することができるＤＮＡタグを（ａ）の前記ＤＮＡ構築物へ結合させる段階であって、前記二価性物質が（ｉｉ）の前記ＤＮＡでコードされたペプチドに結合することができる段階、及び
（ｃ）各発現ペプチドが前記二価性物質を介して生成元のＤＮＡに結合するように、前記ＤＮＡ構築物が複数のライブラリー構成ペプチドをコードする、（ｂ）による複数のＤＮＡ構築物を発現する段階を含み、各ペプチドがペプチドをコードするＤＮＡ構築物に結合した複数のペプチドから構成されるイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーの作製方法を提供する。

【００１２】

本発明は、このような方法によって作製されたペプチドライブラリー及びこのような方法で使用したＤＮＡ構築物にも適用される。

【００１３】

本発明はまた、本発明のイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーのスクリーニング方法を提供する。１態様では、少なくとも（ａ）前記ライブラリーをスクリーニングする段階及び（ｂ）関連するライブラリー構成要素を選択し単離する段階を含む、添付の特許請求の範囲のいずれか一項に記載の方法によって作製されたイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーから所望の特性を示すペプチドを同定及び／又は精製する方法を提供する。第２の態様では、特異的リガンド結合ペプチドの同定方法を提供し、前記方法には少なくとも（ａ）固相支持体に場合によっては結合したリガンド分子で本発明の方法で作製したイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーをスクリーニングする段階、（ｂ）前記標的分子に結合するライブラリー構成要素を選択し単離する段階、及び前記標的分子に特異的に結合するペプチドを単離する段階が含まれる。第３の態様では、少なくとも（ａ）（ｉｉｉ）の前記ペプチド又はタンパク質はＤＮＡ結合活性を有するライブラリー構成ペプチドであり、（ｉ）の前記ＤＮＡ標的配列は関心のある標的配列である本発明によるイン・ビトロでの発現ライブラリーを提供する段階、（ｂ）コードされたタンパク質が前記標的配列に結合するライブラリー構成要素を選択し単離する段階、（ｃ）前記標的配列に結合するペプチドを単離する段階を含む、特異的なＤＮＡ標的配列に結合する能力を有するペプチドを同定及び／又は精製する方法を提供する。

【００１４】

本発明のライブラリーから特異的ペプチドを単離及び／又は同定することに加えて、本発明のスクリーニング方法を使用して該ライブラリーから特異的ペプチドをコードするＤＮＡを単離及び／又は同定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１５】

本発明は、イン・ビトロで関心のあるペプチドをコードするヌクレオチド配列のライブラリーの構築及びスクリーニングに関する。関心のあるペプチドをコードする構築物は、発現したペプチドが構築物にシス活性を示すように設計する。シス活性は、ペプチドが生成元、すなわち転写し翻訳した元のＤＮＡに結合する能力として定義される。該構築物をイン・ビトロで発現することによって、非共有的相互作用によってペプチドの同ペプチド分子をコードするＤＮＡへの結合が引き起こされる。これは、タンパク質とそれをコードしたＤＮＡとのイン・ビトロでの非共有的相互作用の可能性を考慮せず、実際にライブラリーをスクリーニングするための実用的利用からこのような相互作用を特異的に排除しているＷＯ９８／３７１８６の教示とは異なる。

【００１６】

非共有結合とは、当業者に公知の方法、たとえば適切な溶媒の添加又はイオン状態の変

更、たとえば、ｐＨの低いグリシン又はｐＨの高いトリエチルアミンの添加によって切断できる会合のことである。この場合では、非共有結合の一般的な例は、ＤＮＡ結合タンパク質とＤＮＡ分子との非共有的相互作用であろう。反対に、共有結合がＤＮＡとコードされたポリペプチドとの間で形成されると、非共有的なＤＮＡ結合タンパク質：ＤＮＡ相互作用を切断するイオン状態及び溶媒では、ディスプレイされたペプチド又はタンパク質がＤＮＡから遊離しない。たとえば、細菌の複製開始タンパク質ｒｅｐＡはその標的ＤＮＡ配列ｏｒｉＲと非共有的に結合し、０．２Ｍを上回る塩濃度のＫＣｌでこの標的ＤＮＡ配列を遊離することができる（Ｇｉｒａｌｄｏ　Ｒ．＆　Ｄｉａｚ　Ｒ．１９９２　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２８：７８７～８０２）。この塩濃度は共有結合には影響を及ぼさず、共有結合したタンパク質を遊離させるためにはもっと厳しい条件が必要で、回収されたＤＮＡに損傷が及ぶ危険性が増大する。

【００１７】

本発明は、得られたタンパク質ＤＮＡ複合体の混合物から個々のペプチド及び関心のある活性を備えたペプチドをコードする会合ＤＮＡを分離するのに十分な半減期で、コードされたペプチド又はタンパク質とＤＮＡ構築物との会合を維持させるシス活性及び非共有結合について記載する。たとえば、コードしたタンパク質とそのＤＮＡとの会合の半減期は、３０分まで、４５分まで、１時間まで、２時間まで、６時間まで又は１２時間までであってよい。したがって、本発明のスクリーニング方法は、ライブラリー構築後すぐに、又は後で、たとえば１時間後、２時間後、６時間後、１２時間後、又は２４時間後までに、又は２４時間以上後で実施してよい。

【００１８】

したがって本発明はここで、驚くべきことにこのようにコードされたペプチド又はタンパク質はイン・ビトロで発現し、その他のＤＮＡ配列の存在下でそのペプチドのコードＤＮＡと結合することができることを示す。本発明はまた、タンパク質とＤＮＡとの共有結合はこのようなシス活性の維持に必要ではなく、イン・ビトロでの発現及び選択系でペプチドの選択を可能にするには、ＤＮＡと結合タンパク質との間の非共有的相互作用で十分であることを示唆する。

【００１９】

本発明では、それぞれがペプチド発現ライブラリーで発現するペプチド（ライブラリー構成ペプチド）をコードする個々のＤＮＡライブラリー構成要素を適切なＤＮＡ構築物に配置する。該ＤＮＡライブラリー構成要素を入れたＤＮＡ構築物には、該構築物から該ライブラリー構成ペプチドを発現させるため、該構築物でコードされたペプチドを、それをコードしたＤＮＡ構築物に結合させるために必要な配列全てが含まれる。該ライブラリーの各ペプチドには一般的に、融合タンパク質の関連ＤＮＡ構築物への結合に必要なペプチドに融合した該ライブラリー構成ペプチドを含む融合タンパク質が含まれる。このような融合タンパク質には、他の配列を含めることができ、前記ライブラリーペプチドはリンカー配列を介して前記結合ペプチドに結合することができる。

【００２０】

複数の異なるライブラリー構成ペプチドをコードするこのような複数の構築物は、本発明のＤＮＡライブラリーを形成する。このようなＤＮＡ分子ライブラリーの発現によって、該ライブラリーのその他の要素をコードするその他多くのＤＮＡ分子の存在下で、コードされた個々のタンパク質は、それらをコードする転写翻訳元ＤＮＡに非共有的に結合するようになる。したがって、特定のコードされたタンパク質に存在するペプチドライブラリー構成要素をコードする配列は、そのタンパク質に結合したＤＮＡに存在するだろう。したがって、この方法によって、（通常結合活性を備えた）生物活性型のライブラリー構成ペプチドはそのペプチドをコードする特異的ライブラリー構成ＤＮＡ配列に結合し、たとえば特定の結合活性によって関心のあるペプチドを選択し、その後該ライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡを単離同定することが可能になる。

【００２１】

したがって、本発明の目的のためには、ＤＮＡライブラリーはＤＮＡ構築物の集団であ

る。各構築物には、ライブラリー構成ペプチドとして発現するペプチドをコードするＤＮＡ配列が含まれ、それぞれには適切なプロモーター、翻訳開始シグナル及び停止シグナルが含有される。本発明のＤＮＡライブラリーには複数のこのようなＤＮＡ分子が含有される。複数のＤＮＡ構築物それぞれは、ライブラリー構成ペプチドをコードし、複数の異なるライブラリー構成要素を提供するようになっている。ＤＮＡライブラリーは少なくとも10^4個の異なるＤＮＡ分子を含有することが好ましい。たとえば、ＤＮＡライブラリーは、10^6個、10^8個、10^{10}個、10^{12}個、10^{14}個を上回る異なるＤＮＡ分子を含有することができる。

【００２２】

ペプチド発現ライブラリーは、ＤＮＡ分子のライブラリーから発現したペプチド配列の集団として定義される。したがって、本発明のペプチド発現ライブラリーにはそれらをコードするＤＮＡに非共有的に結合したペプチドのライブラリーが包含される。たとえば、本発明のペプチド発現ライブラリーは、ＤＮＡ分子のライブラリーから発現した、ライブラリーペプチド配列をそれぞれ含む少なくとも10^4個の異なるタンパク質のライブラリーであることができる。本発明のペプチド発現ライブラリーは、本発明のＤＮＡライブラリーの発現によって形成された任意のライブラリーであることができる。

【００２３】

ペプチドライブラリー構成要素は、長さが少なくとも２個のアミノ酸である様々な成分のアミノ酸鎖、又は酵素などの天然に生じるタンパク質の一部又は全部、受容体又は抗体又はそれらの断片などの結合分子として定義することができる。適切なペプチドライブラリー構成要素は、無作為なアミノ酸成分を有するペプチドであってよい。様々な、又は無作為な成分のペプチドは、Ｎ末端及び／又はＣ末端に公知のアミノ酸配列を隣接させて、構造を制限することができる。これらの公知の配列の長さは変化させることができる。様々な、又は無作為な成分のペプチドには、受容体又は抗体又はそれらの断片などの公知のタンパク質骨格の様々な位置に挿入することができる。該ペプチドは、同タンパク質骨格に１回又は複数回、たとえば２回以上挿入することができる。

【００２４】

本発明によるＤＮＡ構築物は、ライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡ及びコードされたペプチドがコードしたＤＮＡ構築物に結合するための手段を含むことができる。ライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡに加えて、本発明の適切なＤＮＡ構築物には、少なくともＤＮＡ標的配列及び該ＤＮＡ標的配列に直接的に又は間接的に結合することができるペプチドをコードするＤＮＡが含まれる。

【００２５】

本発明では、該ＤＮＡ構築物及びコードされたタンパク質は、シス活性を有するように選択される。すなわち、コードされたタンパク質は、それをコードしたＤＮＡ分子に特異的に結合する能力を有する。たとえば、シス活性は、コードされたＤＮＡ結合ペプチドが、他のＤＮＡ構築物の標的配列よりもそれをコードするＤＮＡ構築物の標的配列に特異的に（直接的又は間接的に）結合させるように作用することできる。

【００２６】

シス活性は、シス活性をもたらすＤＮＡ要素、すなわち、ＤＮＡでコードされたタンパク質にシス活性を持ち、したがってそのコード配列に結合するのを可能にするか、又は強制するＤＮＡ要素の存在によってもたらすことができる場合がある。コードしたＤＮＡの性質がコードされたペプチドにシス活性を付与する場合、別のＤＮＡ要素自体は必要とされない場合もある。

【００２７】

シス活性をもたらすＤＮＡ要素は、該ｃｉｓ要素と相互作用するペプチドをコードするＤＮＡと一緒にＤＮＡ構築物中に形成することができる。たとえば、以下で論じるｒｅｐＡ系のｃｉｓ要素の場合、ｒｅｐＡのＣ末端の少なくとも２０個のアミノ酸を含むｒｅｐＡ配列断片をコードするＤＮＡは、ｃｉｓＤＮＡ要素と一緒にもたらすことができる。ＤＮＡ構築物にこのようなＤＮＡ要素及びその作用に必要な他の配列を含めることによって

、通常シス作用のないＤＮＡ結合ペプチドにシス活性を付与することができる。たとえば、使用したｃｉｓ要素と相互作用するペプチドをコードするＤＮＡを該ＤＮＡ構築物に含めることができる。

【００２８】

或いは、ｃｉｓ要素と相互作用するペプチドは該ＤＮＡ結合ペプチドの一部であることができる。たとえば、該ＤＮＡ結合ペプチドは、ｒｅｐＡｃｉｓ要素と相互作用する配列を含むｒｅｐＡであることができる。或いは、該ＤＮＡ結合ペプチドは、別のｃｉｓ要素を必要とせずにシスでそのコードＤＮＡに結合することができる。

【００２９】

適切なＤＮＡ要素は、シス活性を可能にする、又はもたらす任意の要素であってよい。このようなＤＮＡ要素は、たとえば、コードされたペプチドの産生及び遊離を遅延させるように該ＤＮＡ構築物の翻訳及び転写に関与する機構との相互作用によって作用することが可能である。

【００３０】

コードされたペプチドが特異的に、それをコードするＤＮＡ分子に結合するのを可能にする任意のＤＮＡ要素は、本発明によるＤＮＡ要素として使用することができる。適切なＤＮＡ要素の一例は、以下により詳細に説明したｒｅｐＡ－ｃｉｓ系の要素である。この系では、ＲＮＡポリメラーゼは、転写のｒｈｏ依存性終結の前に５’ｃｉｓ配列のループによって停止する。したがって、ＤＮＡ要素の作用でコードされた結合ペプチドが生成元の構築物中の該ＤＮＡ標的配列に結合することが可能になる。

【００３１】

該ｃｉｓＤＮＡ要素は、ＤＮＡ構築物中においてライブラリー構成ペプチド及びＤＮＡ標的配列に結合することができるペプチド又はタンパク質の３’に位置することが好ましい。これは、ＲＮＡポリメラーゼがシス作用配列に達する前にこれらの配列が転写翻訳され得ることを意味する。

【００３２】

本発明では、該結合ペプチドはＤＮＡ構築物に直接的又は間接的に結合することができる。直接的な結合の場合、該結合ペプチドは直接的かつ非共有的に該ＤＮＡ標的配列に結合する。間接的な結合の場合、該結合ペプチドとＤＮＡ構築物との間の結合は他の分子によって形成される。このような分子、たとえば以下に説明したような二価性物質は、該ペプチドと該ＤＮＡ標的配列の両方に関係する。

【００３３】

適切なＤＮＡ構築物には、他の配列、たとえば、コードされたペプチドの発現を可能にする適切なプロモーター配列を含めることができる。

【００３４】

シス活性が存在する系の一例は、ｒｅｐＡと称するシス作用不適合群プラスミド複製タンパク質系である。この系の特性を以下に説明するように本発明で利用することができる。

【００３５】

数多くのプラスミドには、ｒｅｐＡをコードする配列及びｃｉｓＤＮＡ要素が含まれる。本発明のＤＮＡ構築物に存在するｒｅｐＡ配列及びｃｉｓＤＮＡ要素は、同じプラスミド種から得ることができるか、又は異なるプラスミド種から得ることができる。

【００３６】

ｒｅｐＡ－ｃｉｓ系は図１に示したように作用するものと考えられている。簡単に説明すると、ＲＮＡポリメラーゼは、転写のｒｈｏ依存性終結の前に５’－ＣＩＳ配列のループによって停止される。これによって、ｒｅｐＡのＣ末端ペプチドとＣＩＳとの一時的な相互作用が可能になり、ＤＮＡ屈曲が起こることができる。次にｒｅｐＡペプチドは、ｒｅｐＡコーディング配列の末端アミノ酸から決まった距離にあるｏｒｉに結合する（Ｐｒａｚｋｉｅｒ他、２０００　Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ　１８２：３９７２～３９８０、Ｐｒａｓｚｋｉｅｒ及びＰｉｔｔａｒｄ　１９９９　Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８

１：２７６５～２７７２； Ｍａｓａｉ及びＡｒａｉ．１９８８ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：６４９３～６５１４）。

【００３７】

プラスミドから得られたＲｅｐＡ配列と他のプラスミドから得られたｃｉｓ配列との適合性は、ＲｅｐＡと選択されたｃｉｓ配列との相互作用をモニターすることによって容易に決定することができる。

【００３８】

適切なＲｅｐＡタンパク質及び配列及びｃｉｓＤＮＡ要素には、ＤＮＡレベルでの関連性は疎遠であるが、シス作用ＲｅｐＡタンパク質の作用によってプラスミド複製を制御するＩｎｃＩ複合プラスミド又はＩｎｃＦ、ＩｎｃＢ、ＩｎｃＫ、ＩｎｃＺ及びＩｎｃＬ／Ｍプラスミドのものが含まれる。（Ｎｉｋｏｌｅｔｔｉ他、１９８６ Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７０：１３１１～１３１８、Ｐｒａｚｋｉｅｒ Ｊ．他 １９９１ Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７３：２３９３～２３９７）。これらの配列を提供するために使用することができる特定のプラスミドには、ＩｎｃＩＩ不適合群のＲ１プラスミド及びｉｎｃＢプラスミドｐＭＵ７２０が含まれる。（Ｐｒａｓｋｉｅｒ Ｊ．＆ Ｐｉｔｔａｒｄ Ｊ．１９９９「ＩｎｃＢプラスミドの複製におけるＣＩＳの役割」（Ｒｏｌｅ ｏｆ ＣＩＳ ｉｎ ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎ ＩｎｃＢ ｐｌａｓｍｉｄ）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８１：２７６５～２７７２に記載されている）。ＩｎｃＩＩのＲ１プラスミドから得られたｒｅｐＡのＤＮＡ及びアミノ酸配列を配列番号１５及び１６に挙げる。ＩｎｃＩＩのＲ１プラスミドから得られたｃｉｓＤＮＡ要素のＤＮＡ配列を配列番号１７に挙げる。一般的に、該ｃｉｓ要素の長さはヌクレオチド１５０個から２００個である。該配列がＲｅｐＡと相互作用し、シス活性を表す能力を維持する限り、より長い又はより短い配列を使用することができる。ｃｉｓ配列内の置換又は欠失などの小さな変更、たとえば野生型ｃｉｓ配列内の１個、５個、１０個、２０個までのヌクレオチドの変更は企図される。

【００３９】

該ｃｉｓ要素は、該ＲｅｐＡタンパク質のシス活性に必要である。（Ｐｒａｓｚｋｉｅｒ及びＰｉｔｔａｒｄ １９９９ Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８１：２７６５～２７７２）。したがって、ｃｉｓＤＮＡ要素はまた、該ＤＮＡ構築物のｒｅｐＡ配列をコードするＤＮＡの３’に位置しなければならない。シス配列に達すると、ＲＮＡポリメラーゼは停止し、該コードタンパク質の該ＤＮＡ標的配列への結合が可能になる。

【００４０】

本発明の１実施形態では、該ＤＮＡ結合タンパク質自体にはｒｅｐＡ又はＤＮＡ結合可能なそれらの断片又は変種が含まれ、該ｃｉｓＤＮＡ要素に結合できるｒｅｐＡの少なくとも２０個のＣ末端アミノ酸が含まれる。この実施形態では、該ＤＮＡ標的配列には、ｏｒｉ配列、たとえばｏｒｉＲ配列が含まれる。本発明の他の態様では、該ＤＮＡ結合タンパク質は、配列に取り込まれたこのような結合タンパク質によって認識される関連ＤＮＡ標的配列を有する他のタンパク質によってもたらされる。これらの実施形態それぞれでは、該ＤＮＡ構築物でコードされたペプチドが直接的に該コードＤＮＡ構築物に結合するので、ＤＮＡ－タンパク質結合は直接的である。本発明の他の態様では、以下にさらに詳細に説明するように、該ＤＮＡ－タンパク質結合は、ペプチドタグ－ＤＮＡタグ、二価性物質及び／又は適切なリンカーを使用して、間接的であってよい。

【００４１】

したがって、１態様では、同じ配列がＤＮＡ標的配列に結合できるペプチドとｒｅｐＡのＣ末端アミノ酸の両方を提供することができる。このような配列は、完全なｒｅｐＡ配列、又は使用したＤＮＡ標的配列に結合する能力を維持したｒｅｐＡ配列の断片又は変種であることが可能であるか、含むことが可能である。該ｒｅｐＡはＤＮＡ結合タンパク質として作用する場合、ｃｉｓ配列及びｏｒｉ配列の両方（Ｐｒａｓｚｋｉｅｒ及びＰｉｔｔａｒｄ １９９９ Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８１：２７６５～２７７２）がシス活性（ｃｉｓ）及びＤＮＡ結合（ｏｒｉ）に必要である。したがって、この態様では、該Ｄ

ＮＡ標的配列は、ｏｒｉ配列であり、前記標的に結合できるペプチド又はタンパク質はｒｅｐＡタンパク質である。本発明のＤＮＡ構築物のｏｒｉの位置は変更可能である。前に説明したように、適切なｒｅｐＡ、ｃｉｓ及びｏｒｉ配列は１個又は複数のプラスミドによってもたらすことができる。たとえば、適切な配列は、Ｉｎｃ複合プラスミド又はＩｎｃＦ、ＩｎｃＢ、ＩｎｃＫ、ＩｎｃＺ及びＩｎｃＬ／Ｍプラスミドからもたらすことができる。ＩｎｃＩＩのＲ１プラスミドから得られたｏｒｉのＤＮＡ配列を配列番号１８に挙げる。この配列又はその断片は、本発明のＤＮＡ構築物に含めることができる。本発明のＤＮＡ構築物には、完全なｏｒｉ配列を含めることができるか、又は使用するｒｅｐＡタンパク質が結合することができるそれらの断片を含めることができる。

【００４２】

本発明に従って使用したＲｅｐＡタンパク質はまた、ＲｅｐＡの変種又は断片が選択したｏｒｉ配列への結合能力を維持している限り、このようなＲｅｐＡの断片又は変種を含むことができる。このようなｒｅｐＡの変種又は断片には、このような変種がｏｒｉ配列への結合能力を維持する限り、ｒｅｐＡ配列内の、たとえば１個、２個、３個、２０個までのアミノ酸の置換を含めることができる。ＲｅｐＡの適切な断片は、ＲｅｐＡのｏｒｉ結合配列である。ｏｒｉ配列には、前述のような野生型プラスミドに存在するものが含まれる。一般的に、このようなｏｒｉ配列の長さはヌクレオチド１７０個から２２０個である。このようなｏｒｉ配列がＲｅｐＡによって認識される能力を維持している限り、野生型ｏｒｉ配列の断片及び変種もまた使用することができる。ＲｅｐＡタンパク質ファミリーの他のシス作用要素を使用することができる。たとえば、タンパク質のＲｅｐＡファミリーは、宿主範囲の広範なプラスミド上に見いだされ、すなわち、１個のＲｅｐＡプラスミドを異なる細菌種で見いだすことができる。（たとえば）好熱性、好硫化物性、好塩性又は好酸性細菌のＲｅｐＡファミリープラスミドの単離によって、本発明の高温又は過剰な塩、ｐＨ又は硫黄濃度で使用できるＲｅｐＡ－ｃｉｓ－ｏｒｉＤＮＡがもたらされるだろう。ＲｅｐＡファミリーのこのような要素は、このような極度の条件下でも標的分子に結合できるライブラリー構成要素の単離に有利であろう。選択したＲｅｐＡタンパク質と組み合わせて使用するために適切なｏｒｉ配列は、ＲｅｐＡとこのようなｏｒｉ配列との相互作用をモニターすることによって容易に決定することができる。

【００４３】

したがって、本発明の基本的原理は、図１に示したようなｒｅｐＡ／ｃｉｓ／ｏｒｉ系を参考にして説明することができる。これは本発明のＤＮＡ構築物の一例である。該構築物には、５’から３’に向かって、プロモーター配列、ライブラリー構成ペプチドをコードした配列、ｒｅｐＡタンパク質をコードした配列、ｃｉｓＤＮＡ要素及びｏｒｉ配列が含まれる。簡単に説明すると、該ＤＮＡ配列は、ＲＮＡポリメラーゼによってプロモーターからＲＮＡに転写される。該ｃｉｓＤＮＡ要素に存在するｒｈｏ依存性終結機能が、ＲＮＡポリメラーゼが該配列のこの部分で停止する原因となる。これによって、該ｒｅｐＡタンパク質及び該ライブラリーペプチドの翻訳が可能となる。該ｒｅｐＡタンパク質は、次にｏｒｉ配列に結合し、コードされたタンパク質がコードＤＮＡ構築物に結合することが可能である。

【００４４】

好ましい１実施形態では、ライブラリー構成要素ＤＮＡ配列は該ｒｅｐＡ、ｃｉｓ及びＩｎｃＦＩＩプラスミドＲ１のｏｒｉＤＮＡに融合する（Ｍａｓａｉ　Ｈ　他　１９８３　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８０：６８１４～６８１８）。この実施形態では、関心のあるライブラリー構成要素ＤＮＡ配列は、イン・ビトロでの転写／翻訳用の適切なプロモーター及び翻訳配列の制御下で、柔軟なアミノ酸リンカーをコードするＤＮＡの領域によってｒｅｐＡＤＮＡの５’末端に結合することができる。多くの適切なプロモーター、中でも、ａｒａＢ、ｔａｃプロモーター或いはＴ７、Ｔ３又はＳＰ６プロモーターなどが当業者には公知である。該プロモーターは発現させるポリペチド配列の上流に置くべきである。

【００４５】

ｒｅｐＡファミリーのタンパク質を本明細書で例として使用したが、これだけに限定はしない。他の関連のない非共有結合シス作用性ＤＮＡ結合タンパク質を本発明で使用することも可能である。

【００４６】

他の実施形態では、非シス作用性ＤＮＡ結合タンパク質がシス活性を有するように変換することができる（図２参照）。これは、ＤＮＡ標的配列に直接的に、又は間接的に結合できるこのようなタンパク質を、それらにシス活性を与えることができる配列と組み合わせて使用することによって実現することができる。ＤＮＡ構築物にｒｅｐＡ系のｃｉｓ要素などのシス活性をもたらすＤＮＡ要素を含めることによって、通常シスで作用しない結合タンパク質にシス活性を与えることができる。このような要素を含めると、ＤＮＡ結合タンパク質によるＤＮＡ結合は確実にシスとなり、すなわち、コードされたＤＮＡ結合タンパク質は、転写及び翻訳元のＤＮＡ構築物に結合することができるだろう。

【００４７】

１実施形態では、したがって、適切なＤＮＡ構築物はｒｅｐＡ系からシス活性（ｃｉｓ ＤＮＡ要素）をもたらすＤＮＡ要素を含んでよい。このような要素はさらに、ｒｅｐＡのＣ末端の一部をコードするＤＮＡ、好ましくはＲｅｐＡのＣ末端部分の少なくとも２０個のアミノ酸、より好ましくは３０個のアミノ酸、４０個、５０個、６０個又は７０個までのアミノ酸を含み、ｒｅｐＡの前記断片は該構築物内のＤＮＡ要素と相互反応することができる。他の例では、中でもシス作用するトランスポザーゼなどのタンパク質、Ｔｎ５及びＩＳ９０３を本発明で使用することができた（ＭｃＦａｌｌ Ｅ．Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９８６ Ａｕｇ １６７：４２９～４３２、Ｄｅｒｂｙｓｈｉｒｅ ＫＭ & Ｇｒｉｎｄｌｅｙ ＮＤ．Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１９９６ Ｓｅｐ １：１２６１～７２）。本発明のＤＮＡコード配列には、ＲｅｐＡの所望の断片をコードする野生型配列、野生型ＲｅｐＡの断片をコードする変性配列又は該ＤＮＡ構築物に取り込まれたｃｉｓ要素と相互作用する能力を維持したＲｅｐＡのこのような断片の変種をコードする配列を含めることができる。このような変種は、ＲｅｐＡのＣ末端の２０個のアミノ酸のうち１個、２個、３個又は４個のアミノ酸の置換を含んでよい。

【００４８】

ｒｅｐＡファミリーのタンパク質を本明細書で例として使用したが、それだけに限定はしない。非シス作用タンパク質にシス活性を与えることができる任意のＤＮＡ要素を使用することができた。

【００４９】

任意の非シス作用タンパク質はこのように変換することができる。例としては、エストロゲン受容体ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）はシス作用ＤＮＡ結合タンパク質に変換することができるが、それだけに限らない。該エストロゲン受容体ＤＮＡ結合ドメイン断片（アミノ酸１７６～２８２）は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で発現し、特異的な２本鎖ＤＮＡエストロゲン受容体標的ＨＲＥヌクレオチド配列に対して親分子と同等の親和性（０．５Ｍ）で結合を示した（Ｍｕｒｄｏｃｈ他 １９９０、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２９：８３７７～８３８５、Ｍａｄｅｒ他、１９９３、ＤＮＡｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２１：１１２５～１１３２）。１実施形態では、この配列をコードするＤＮＡは、好ましくは３’末端で、ｒｅｐＡの少なくとも２０個のアミノ酸をコードするＤＮＡ、ｃｉｓＤＮＡ配列、及びｏｒｉ配列に続くｒｅｐＡｏｒｉ認識配列の代わりのエストロゲン受容体標的認識配列（５’－ＴＣＡＧＧ ＴＣＡＧＡ ＧＴＧＡＣ ＣＴＧＡＧ ＣＴＡＡＡ ＡＴＡＡＣ ＡＣＡＴＴ ＣＡＧ－３’、配列番号１４）までのＤＮＡに融合する。関心のあるＤＮＡ配列は次に、イン・ビトロでの転写／翻訳用の適切なプロモーター及び翻訳配列の制御下で、柔軟なアミノ酸リンカーをコードするＤＮＡの領域によってエストロゲン受容体ＤＮＡ断片の５’末端に結合することができる。このポリペプチドの発現によって、そのポリペプチドをコードするＤＮＡ上の、正常なｏｒｉ配列の代わりに存在するその標的配列に該エストロゲン受容体ＤＢＤを方向付ける。次に、タンパク質－ＤＮＡ複合体は、標的タンパク質上に捕捉することによって単離することができる。結合しなかったタンパク

質－ＤＮＡ複合体は洗浄して、関心のあるペプチド又はタンパク質をコードするＤＮＡを濃縮することが可能で、それらは次にＰＣＲによって回収することができ、既に説明した方法を使用して、イン・ビトロでの発現及びタンパク質－ＤＮＡ複合体捕捉をさらに何回か実施することによってさらに濃縮することができる。

【００５０】

この取り組みは、該ｃｉｓＤＮＡ要素及びｒｅｐＡのＣ末端の少なくとも２０個のアミノ酸をコードする配列、又は該ＤＮＡ構築物の異なるシス作用系の同等要素を使用することによって、簡単にその他のＤＮＡ結合タンパク質に適用できることは明らかである。

【００５１】

他の実施形態では、例としてジンクフィンガータンパク質、ヘリックス－ループ－ヘリックスタンパク質又はヘリックス－ターン－ヘリックスタンパク質などの無作為化したＤＮＡ結合タンパク質のライブラリーは、関心のある標的配列への特異的な結合についてスクリーニングすることができる（図３参照）。この実施形態では、ｒｅｐＡのｏｒｉ認識配列を関心のある標的配列によって、ｒｅｐＡコーディング配列の多くは無作為化ジンクフィンガータンパク質のライブラリーによって置換することができる。したがって、この態様ではＤＮＡ結合タンパク質はライブラリー構成ペプチド及びＤＮＡ標的配列に結合することができるタンパク質の両方として作用する。それぞれのジンクフィンガータンパク質をコードするＤＮＡはさらに、５’末端では、抗体などの他の捕捉タンパク質が認識できるペプチドタグ配列に結合し、３’末端では、ｒｅｐＡの少なくとも２０個のアミノ酸をコードしたＤＮＡ、ｃｉｓＤＮＡ要素、及びｏｒｉ配列に続く関心のある標的配列までのＤＮＡに結合することができる。このポリペプチドの発現によって、そのポリペプチドをコードするＤＮＡ上に、正常なｏｒｉ配列の代わりに存在する関心のある標的配列に該ジンクフィンガータンパク質を方向付ける。標的配列への結合は、無作為化フィンガードメインが関心のある配列に結合できる場合にのみ生じる。次に、タンパク質－ＤＮＡ複合体は、融合タンパク質ポリペプチドのＮ末端のペプチドタグを認識する結合タンパク質で捕捉することによって単離することができる。結合しなかったＤＮＡは洗浄して、標的配列に結合できるジンクフィンガータンパク質をコードするＤＮＡを濃縮することが可能で、それらは次にＰＣＲによって回収することができ、イン・ビトロでの発現及びタンパク質－ＤＮＡ複合体捕捉をさらに何回か実施することによってさらに濃縮することができる。

【００５２】

前記で説明したように、たとえばＤＮＡ結合タンパク質－標的配列の組み合わせの場合、結合ペプチドはＤＮＡ標的配列に直接結合することができ、或いは、たとえば二価性物質及び場合によってはＤＮＡタグを介して、ＤＮＡ標的配列に間接的に結合することができる（図４参照）。

【００５３】

１実施形態では、ＤＮＡ標的配列に直接結合することができないペプチドタグをコードするＤＮＡは、イン・ビトロでの転写／翻訳用の適切なプロモーター及び翻訳配列の制御下で、場合によっては柔軟なアミノ酸リンカーをコードするＤＮＡの領域によって、関心のあるライブラリー構成要素ＤＮＡ配列の５’末端に結合する。コードされたペプチドはＤＮＡ標的配列に間接的に結合するので、これによって結合ペプチドをコードするＤＮＡが形成される。場合によっては、該ライブラリー構成要素の３’末端のＤＮＡ配列はｒｅｐＡの少なくとも最後の２０個をコードするＤＮＡ及びｃｉｓＤＮＡ要素であるが、ｒｅｐＡのｏｒｉ標的配列ではない。該ＤＮＡ標的配列はＤＮＡタグであってよく、又はＤＮＡタグを含むことが可能である。このようなＤＮＡタグは１カ所変更した塩基であってよい。たとえば、前述の要素を含有するライブラリーＤＮＡ構築物を調製するとき、該ＤＮＡの３’末端に、例としてフルオレセイン又はビオチンなどの分子をタグ付けすることができるが、これだけには限定されない。

【００５４】

イン・ビトロでの発現の前に、ライブラリーＤＮＡ断片を二価性物質と混合することが

でき、この物質の１つの機能はＤＮＡの５’末端であることが可能な標的配列を認識し、ＤＮＡ断片対二価性物質１対１の割合で結合することである。この二価性物質のもう一つの機能要素は、ＤＮＡ断片の５’末端でコードされることができるペプチドタグを認識し、結合することができる結合剤である。例として、該二価性物質は、ＤＮＡ上のフルオレセイン又はビオチンを認識するＦａｂ断片及びＤＮＡ上にコードされたペプチドタグを認識する他のＦａｂ断片から構成されることができるがそれだけに限定されない。この二価性物質は、２種類の要素の化学的架橋結合などの多くの様々な方法によって、又は融合タンパク質若しくは二特異的抗体として二種類の要素を発現することによって作製できることは当業者であれば明らかである。二価性物質を生成する前記方法は、例として挙げたものであって、これだけに限定はしない。

【００５５】

該二価性物質は、コードされたペプチドを発現する前にＤＮＡ構築物に結合するか、又は発現中に与えることができる。

【００５６】

該融合タンパク質は、二価性物質に結合する間に、次にＤＮＡ構築物から転写翻訳される。ペプチドタグがまず翻訳され、メッセンジャーＲＮＡ又はＲＮＡポリメラーゼがＤＮＡから遊離する前に、二価性物質の第２の要素によって結合することができる。これによって、発現したポリペプチド及びこのペプチドをコードするＤＮＡの両方が二価性物質によって結合した機能性タンパク質－ＤＮＡ複合体が生成する。該ペプチドタグ分子は、したがって間接的ではあるが、特異的にＤＮＡ標的（タグ）に結合する。タンパク質がこのようにＤＮＡ構築物に結合することによって、以下に説明するように、特定の特性を有するタンパク質をスクリーニングし、次にこのタンパク質に結合するコードＤＮＡを同定することが可能である。タンパク質とＤＮＡとの間の共有結合よりも二価性物質を使用することによって、ＤＮＡ構築物はＤＮＡに損傷を与える危険性を伴わずにタンパク質から容易に分離することができる。

【００５７】

次に、タンパク質－ＤＮＡ複合体は標的タンパク質を捕捉することによって単離することができる。結合しなかったタンパク質－ＤＮＡ複合体は洗浄して、関心のあるペプチド又はタンパク質をコードするＤＮＡを濃縮することが可能で、これは次にＰＣＲによって回収することができ、既に説明した方法を使用して、イン・ビトロでの発現及びタンパク質－ＤＮＡ複合体捕捉をさらに何回か実施することによってさらに濃縮することができる。

【００５８】

さらに、この実施形態では、該ＤＮＡは直接、たとえば、共有結合によって、ポリマーなどの二価性物質に結合することができる。このようなポリマーは、ペプチドタグを認識できる複数の結合要素を含むことができ、ペプチド発現ライブラリー分子をディスプレイするペプチドをコードするＤＮＡを含有する単位に多価ディスプレイすることができる。例として、前記ポリマーは、ポリエチレン並びにＤＮＡに融合できるその他のポリマー化合物から構成することができるが、それだけに限定されない。したがって、本発明のＤＮＡ構築物はこのような二価性物質に結合させるか、又はこのような二価性物質に結合させることができる前述のようなＤＮＡタグに結合することができる。

【００５９】

本発明の実施形態全てにおいて、ＤＮＡ構築物にはイン・ビトロでの転写／翻訳用の適切なプロモーター及び翻訳配列が含まれる。任意の適切なプロモーター、中でも、ａｒａＢ、ｔａｃプロモーター、Ｔ７、Ｔ３又はＳＰ６プロモーターなどを使用することができる。このような配列を発現させるために、本発明のＤＮＡ配列に操作可能に結合するようにプロモーターを配置する。

【００６０】

ライブラリー構成ペプチドをコードしたＤＮＡは、任意の調達可能な手段によって作製することができる。特に、このようなＤＮＡにはｃＤＮＡから単離された、ＤＮＡシャッ

フリングによって得られたＤＮＡ、及び合成ＤＮＡを含めることができる。

【００６１】

該ＤＮＡ構築物はまた、発現した融合タンパク質内にアミノ酸リンカーをコードすることができる。特に、柔軟性のあるアミノ酸リンカーを含めて、ライブラリー構成ペプチドに該ＤＮＡ結合ペプチド／ＲｅｐＡを結合させることができる。

【００６２】

本発明では、この好ましい実施形態を参照にして、自身のコードＤＮＡに結合させたペプチド又はタンパク質発現ライブラリーを作製し、所望の活性を有するペプチドを以下の段階によって選択した。

【００６３】

（融合タンパク質ライブラリーの構築）

ペプチドライブラリー構成要素及び結合タンパク質のイン・ビトロでの発現に適した方法で、適切なプロモーター及び翻訳又はリボソーム結合部位、開始コドン及び終止コドンの制御下で、柔軟なアミノ酸リンカーをコードしたＤＮＡの領域によって、ペプチド又はタンパク質のＤＮＡライブラリーを、シス作用ＤＮＡ結合タンパク質などのＤＮＡ標的配列に結合することができるペプチドをコードしたＤＮＡに融合することができる。ｒｅｐＡタンパク質の例では、ＤＮＡ（たとえばＤＮＡ）ライブラリー構成要素をｒｅｐＡＤＮＡ結合タンパク質又はそれらの断片に融合する。ｃｉｓ及びｏｒｉ配列を構築物のその他の要素の下流に含めることができる。ＤＮＡライブラリーの場合、前記ＤＮＡ構築物は、イン・ビトロでの転写及び翻訳に適するように設計する。

【００６４】

（ＤＮＡライブラリー融合タンパク質の発現及びシス結合）

シス活性を可能にするために、Ｓ３０抽出系などの細菌の一連の転写／翻訳連結環境を使用することができる（Ｚｕｂａｙ、Ｇ．１９７３．Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．７：２６７）。ｃｉｓ及びｏｒｉ配列が存在するならば、この環境においてＤＮＡライブラリー構成ペプチド－ｒｅｐＡ融合タンパク質などのペプチドを発現することによって、この融合タンパク質をコードするＤＮＡへの融合タンパク質の結合が生じる。ペプチド－ｒｅｐＡ融合タンパク質のライブラリーをこの方法で発現すると、この方法によってタンパク質－ＤＮＡ複合体のライブラリーが作製され、該ＤＮＡに結合したタンパク質は、それを発現するＤＮＡの断片でコードされ、それによってその後関心のあるペプチド又はタンパク質及び前記ペプチドをコードするＤＮＡの両方を選択することが可能になる。これらのライブラリーは、該方法のイン・ビトロでの性質によってさらに複雑になり、より大きなライブラリーであっても、少なくとも10^{10}～10^{14}個のＤＮＡ断片が容易に生じ得る。

【００６５】

ヌクレアーゼ活性を阻害するか、非特異的ＤＮＡ－タンパク質又はタンパク質－タンパク質相互作用を減少させる化合物を、この転写／翻訳反応及びシス結合の間に添加することができる。適切な化合物の例には、界面活性剤及びウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）などのブロックタンパク質が含まれる。

【００６６】

（関心のあるペプチドの選択）

本発明の方法によって作製されたイン・ビトロでのペプチド発現ライブラリーを使用して該ライブラリーの特定の要素をスクリーニングすることができる。たとえば、該ライブラリーは特定の活性又は特定の結合アフィニティを備えたペプチドをスクリーニングすることができる。関心のあるタンパク質－ＤＮＡ複合体は、たとえば、親和性又は活性増大技術によってライブラリーから選択することができる。これは、関心のあるタンパク質に特異的なリガンドによって、関心のあるタンパク質が抗体であれば抗原などで実現することができる。該リガンドは、たとえばビオチン化リガンドと共に、ＥＬＩＳＡプレートウェルの表面などの固相表面上又は溶液中に存在させることができ、その後、タンパク質－ＤＮＡ複合体のライブラリーをリガンドとインキュベートしてリガンド－リガンド相互作

用を可能にした後で、ストレプトアビジンコーティング表面又は磁気ビーズ上に捕捉させる。固相又は溶液中のいずれかでインキュベートした後、結合しない複合体を洗浄除去して、ウェル中のｐＨを変更することによって、或いはプロテアーゼ消化など当業者に公知のその他の方法によって、或いは加熱又はフェノール－クロロホルム抽出でｒｅｐＡ－ｏｒｉＤＮＡ結合を変性させて複合体から直接ＤＮＡを遊離させ、リガンド－リガンド相互作用を分断して、結合した複合体を単離する。ＤＮＡはまた、前記の方法の１つによって、ＰＣＲ緩衝液中に直接遊離させて、増幅することができる。或いは、ＤＮＡは複合体から遊離することなく直接ＰＣＲ増幅することができる。場合によっては、たとえばｒｅｐＡタンパク質との結合によって結合しないＤＮＡは、例として、ヒストンなどの非特異的ＤＮＡ結合タンパク質による変性から保護することができる。当業者であれば、多くのその他の非特異的ＤＮＡ結合タンパク質がこの目的に使用できることが明らかであろう。さらに、ヌクレアーゼ活性を阻害するか、非特異的ＤＮＡ－タンパク質又はタンパク質－タンパク質相互作用を抑える化合物を選択過程中に存在させることができる。適切な化合物の例には、界面活性剤及び粉乳又はウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）などのブロックタンパク質、ヘパリン或いはオーリントリカルボン酸（ａｕｒｉｎｔｒｉｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ　ａｃｉｄ）が含まれる。

【００６７】

結合した複合体を回収し、結合したＤＮＡを再増幅し、選択法を反復することによって、所望の配列をコードするクローンを濃縮し、その後配列決定、さらにはクローニング及び／又は発現のために単離することができる。たとえば、関心のあるペプチドをコードしたＤＮＡを単離し、たとえばＰＣＲによって増幅することができる。１実施形態では、何重もネスティングしたＰＣＲプライマーを使用することによって、選択及びＤＮＡ回収の反復を容易にすることができる。何度もＰＣＲ段階を重ねた後は、ＤＮＡ末端は一般的に障害を受けている。このような障害を受けた分子からＤＮＡを回収するために、ＤＮＡ構築物の末端から離れたところでプライマーをアニーリングさせることが必要で、それによって選択毎に構築物が次々と短くなる。

【００６８】

１実施形態では、ＤＮＡ構築物及び／又はコードタンパク質はタグを含めるように設計することができる。このようなペプチド又はＤＮＡタグは、たとえば前述のように、関心のあるライブラリー構成要素の分離及び単離に使用することができる。このようなタグを使用してまた、たとえば本明細書で説明したスクリーニング方法で使用するための固相支持体に該ライブラリー要素を保持することができる。

【００６９】

したがって、本発明のスクリーニング方法には、関連のあるライブラリー構成ペプチドを選択し単離する段階をさらに含めることができ、ペプチドが所望の特性を示すことが可能になる上、該ペプチドをコードするＤＮＡを同定し精製することが可能になる。

【００７０】

したがって、本発明には本発明の方法によって同定されたペプチド及びＤＮＡが包含される。これらのペプチド及びＤＮＡを単離及び／又は精製することができる。本発明の方法によって単離されたペプチド又はＤＮＡは、たとえばアミノ酸又はヌクレオチドの欠失、添加又は置換によって改変することができる。適切に改変したペプチド又はＤＮＡは、本発明の方法によって単離したペプチド又はＤＮＡと少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％以上のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列同一性を示すことが可能である。本発明の方法によって同定されたペプチドは、輸送及び／又は安定化の目的のために改変することができる。たとえば、このようなペプチドはペグ化して（ポリエチレングリコールに結合させて）血清中の半減期を延長するか、又はプロテアーゼ攻撃を防御することができる。本発明の方法によって同定されたペプチドは、ファージディスプレイなどのその他のディスプレイ系で、又はペプチド変種を合成しスクリーニングすることによって改変することができる。このように改変した配列の集合物は、本発明の構築物に取り込むことができ、たとえば、特定のリガンドへの結合を増強した変種

配列を発見するためにスクリーニングできる新規ライブラリーを形成することができる。したがって、１実施形態では、本発明の方法で使用するためのペプチドライブラリーは、構造的に関連のあるペプチドのライブラリーであってよい。

【００７１】

或いは、本質的に無作為なペプチド配列のライブラリーを使用することが可能である。シス作用ＤＮＡ結合タンパク質に融合したペプチドの様々な種類のライブラリーは、以下のものを含むこの実施形態でスクリーニングすることができる。

（ｉ）様々な長さの合成ＤＮＡをコードした無作為ペプチド配列。

（ｉｉ）抗体又は抗体断片、たとえば１本鎖Ｆｖ抗体断片。これらは、１本鎖抗体結合分子を生成するために、柔軟なリンカーペプチドに結合した抗体重鎖及び軽鎖可変領域ドメインから構成される。

（ｉｉｉ）関心のある活性を含有する細胞集団から単離された天然に生じるタンパク質の無作為ｃＤＮＡ断片。

（ｉｖ）公知のタンパク質配列が無作為ペプチド配列に制約を加える骨格として作用する、公知のタンパク質領域に挿入された、又は置換された無作為ペプチド配列。多くのこのような骨格は、例として説明したが、これだけに限定するものではなく、ＣＴＬＡ－４（ＷＯ００／６００７０）をペプチドライブラリー用の骨格として使用した。

【００７２】

他の実施形態では、本発明は、たとえば、リガンドを結合するための抗体Ｆａｂ断片で必要とされるような、構成要素が活性のために複数の鎖を必要とするＤＮＡライブラリーのスクリーニング方法に関する。この実施形態では、重鎖又は軽鎖抗体ＤＮＡを、たとえばｒｅｐＡのＤＮＡ結合ドメインをコードしたヌクレオチド配列に結合させる。一般的に、重鎖遺伝子（ＶＨ及びＣＨ１）又は軽鎖遺伝子（ＶＬ及びＣＬ）のいずれかのための未知の抗体ＤＮＡライブラリー配列をｒｅｐＡＤＮＡの５’領域の適切なプロモーター及び翻訳配列の後ろに挿入する。したがって、ＤＮＡライブラリー構成要素－コードされたタンパク質に融合したｒｅｐＡは、そのタンパク質をコードするＤＮＡに結合して生成される。軽鎖又は重鎖タンパク質のいずれかをコードする第２の公知の鎖は、

（ａ）ｒｅｐＡ及び第１のポリペプチド融合タンパク質ライブラリーを含有する同じＤＮＡ断片、又は

（ｂ）イン・ビトロでの転写／翻訳反応に存在するＤＮＡの別の断片のいずれかから別々に発現する。

【００７３】

公知の鎖は、ｒｅｐＡタンパク質に融合し、それによって未知鎖のＤＮＡに結合した未知の融合タンパク質ライブラリーと関連する。機能性Ｆａｂライブラリーは、次に該抗体に特異的なリガンドによって選択することができる。

【００７４】

本発明のスクリーニング方法によって同定されたＤＮＡ、たとえば選択されたライブラリー構成ペプチドをコードするＤＮＡは、ベクターにクローニングすることができる。１実施形態では、本発明の方法によって同定されたＤＮＡは、宿主細胞によってコーディング配列の発現をもたらすことができる制御配列に操作可能に結合しており、すなわち、該ベクターは発現ベクターである。「操作可能に」という用語は、記載した成分が企図した方法でそれらが機能するのを可能にする関係にある並列を意味する。コーディング配列に「操作可能に結合した」、たとえばプロモーターなどの調節配列は、コーディング配列の発現が該調節配列に適合した条件下で実現するように配置される。

【００７５】

このような発現ベクターは、分子生物学の分野では日常的に構築されており、たとえばプラスミドＤＮＡ及び適切なイニシエーター、プロモーター及びその他の要素、たとえば、タンパク質発現を可能にするために必要で、正確な方向に配置されたポリアデニル化シグナルなどの使用に関わることができる。その他の適切なベクターは、当業者には明らかである。この点に関する他の例としては、Ｓａｍｂｒｏｏｋ他、１９８９が参考である。

【００７６】
該ベクターは、たとえば、複製起点、場合によっては前記ＤＮＡの発現用のプロモーター、場合によっては該プロモーターの調節因子を備えたプラスミド、ウイルス又はファージベクターであることが可能である。該ベクターは、１個又は複数の選択可能なマーカー遺伝子、たとえば、細菌プラスミドの場合はアンピシリン耐性遺伝子、又は真菌ベクターの場合は耐性遺伝子を含有することが可能である。ベクターは、たとえば、ＤＮＡ又はＲＮＡ産生のため、イン・ビトロで使用することができ、或いは宿主細胞、たとえば、哺乳類宿主細胞をトランスフェクト又は形質転換するために使用することができる。該ベクターはまた、イン・ビボで、たとえば遺伝子治療法で使用するために適応させることが可能である。

【００７７】
プロモーター及びその他の発現調節シグナルは、発現を設計するための宿主細胞に適合するように選択することができる。たとえば、酵母プロモーターには、サッカロマイセス　セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＧＡＬ４及びＡＤＨプロモーター、サッカロマイセス　ポンベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ）ｎｍｔ１及びａｄｈプロモーターが含まれる。哺乳類のプロモーターには、カドミウムなどの重金属に対する応答を誘導することができるメタロチオネインプロモーターが含まれる。ＳＶ４０大型Ｔ抗原プロモーター又はアデノウイルスプロモーターなどのウイルスプロモーターもまた使用することができる。これらのプロモーターは全て、当業界で容易に入手することができる。

【００７８】
哺乳類プロモーター、たとえばβ－アクチンプロモーターを使用することができる。組織特異的プロモーターは、特に好ましい。ウイルスプロモーター、たとえば、マウスのモロニー白血病ウイルス末端反復配列（ＭＭＬＶ　ＬＴＲ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ＩＥプロモーター、アデノウイルス、ＨＳＶプロモーター（たとえばＨＳＶＩＥプロモーター）又はＨＰＶプロモーター、特にＨＰＶ上流調節領域（ＵＲＲ）もまた使用することができる。ウイルスプロモーターは全て、当業界で容易に入手することができる。

【００７９】
該ベクターはさらに、真核細胞ゲノム配列、好ましくは哺乳類ゲノム配列、又はウイルスゲノム配列に相同な配列を含むポリヌクレオチドの元となる関心のあるポリヌクレオチドに隣接した配列を含むことができる。これによって、本発明のポリヌクレオチドを真核細胞又はウイルスのゲノムに相同組換えによって導入することが可能であろう。特に、ウイルス配列に隣接した発現カセットを含むプラスミドベクターを使用して、本発明のポリヌクレオチドを哺乳類細胞に輸送するために適したウイルスベクターを調製することができる。適切なウイルスベクターのその他の例には、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス及びＨＰＶウイルスが含まれる。これらのウイルスを使用した遺伝子輸送技術は当業者には公知である。たとえば、レトロウイルスベクターを使用して、宿主ゲノムにポリヌクレオチドを生じさせるポリヌクレオチドを安定して組み込むことができる。これとは対照的に、複製欠損アデノウイルスベクターはエピソームに残存するので、一時的な発現を可能にする。

【００８０】
このような発現ベクターを使用して関心のあるリガンド、すなわち、ＥＬＩＳＡなどの標準的結合アッセイ、又は適切な基質を与えると、たとえば色変化、発光又は蛍光発光を示す酵素アッセイによってペプチドライブラリー構成要素に結合する分子を同定することができる。利用可能であれば、その他の機能的アッセイを使用することもできる。

【００８１】
他の実施形態では、本発明の方法によって同定されたＤＮＡは、非発現ベクターにクローニングすることができる。このようなベクターを使用して、さらにＤＮＡを特徴付けること、たとえば配列決定することができる。

【００８２】

或いは、関心のあるリガンドをクローニングせずに同定することができる。適切な方法の例には、本発明のスクリーニング方法から回収された個々のＤＮＡ配列のイン・ビトロでの発現及びこのようなスクリーニング方法から回収された個々のＤＮＡの配列決定が含まれる。このような個々のＤＮＡ配列は場合によっては増幅することができる。

【００８３】

本発明はまた、本発明の方法によって、たとえば、前述の発現ベクターを細胞に導入することによって、同定されたペプチドが発現するように改変した細胞が含まれる。このような細胞には、たとえばバキュロウイルス発現系を使用した、たとえば哺乳類細胞又は昆虫細胞などの一時的、又は好ましくは安定した高等真核細胞株、酵母などの低級真核細胞或いは細菌細胞などの原核細胞を含めることができる。特に、本発明の方法によって同定されたペプチドをコードするベクターを挿入することによって改変できる細胞の例には、哺乳類ＨＥＫ２９３Ｔ、ＣＨＯ、ＨｅＬａ及びＣＯＳ細胞が含まれる。好ましくは、選択された細胞株は安定であるだけでなく、十分なグリコシル化が可能で、ペプチドの細胞表面発現が可能なものである。形質転換した卵母細胞で発現を実施することができる。本発明の方法で同定したペプチドは、トランスジェニック非ヒト動物、好ましくはマウスの細胞で発現させることができる。本発明の方法によって同定したペプチドはまた、アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｌａｅｖｉｓ）卵母細胞又は黒色素胞で発現させることができる。

【００８４】

本発明を完全に理解するために、以下の図を参考にして実施形態を詳細に説明するが、単に例示するにすぎず、これだけに限定するものではない。

【００８５】

本発明の実施形態のいくつかの例を以下に挙げる。

【００８６】

材料及び方法

本出願で使用した以下の方法、アガロースゲルでの制限酵素消化産物の分析、フェノール／クロロホルム保存溶液を使用したＤＮＡ精製、リン酸緩衝生理食塩水の調製は、前述のＳａｍｂｒｏｏｋ、Ｊ．他、１９８９に記載されている。

【００８７】

一般的な試薬は、ＳＩＧＭＡ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｌｔｄ（Ｐｏｏｌｅ、Ｄｏｒｓｅｔ、Ｕ．Ｋ．）から購入した。オリゴヌクレオチドはＳＩＧＭＡ－Ｇｅｎｏｓｙｓ　Ｌｔｄ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ、Ｕ．Ｋ．）から入手した。アミノ酸、及びＳ３０抽出物はＰｒｏｍｅｇａ　Ｌｔｄ（Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ、Ｈａｍｐｓｈｉｒｅ、Ｕ．Ｋ．）から入手した。ディープベント（Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔ）及びＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼは、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ、Ｕ．Ｋ．）から入手した。Ｔａｑｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼは、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ．（Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）から入手した。ＧｅｎｅＣｌｅａｎ　ＤＮＡ　ゲル精製キットは、ＢＩＯ１０１（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）から、抗ヒトＩｇκ抗体はＩｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌｓ　Ｄｉｒｅｃｔ　Ｌｔｄ（Ｏｘｆｏｒｄｓｈｉｒｅ、Ｕ．Ｋ．）から、抗ｃ－ｍｙｃポリクローナル抗体はＶｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ　Ｉｎｃ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ　Ｕ．Ｋ．）から、抗Ｖ５抗体はＡｂｃａｍ　Ｌｔｄ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅｓｈｉｒｅ　Ｕ．Ｋ．）から入手した。Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋブロック剤はＰｅｒｂｉｏ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｃｈｅｓｈｉｒｅ、Ｕ．Ｋ．）から入手した。

【実施例１】

【００８８】

特異的シス作用タンパク質－ＤＮＡ複合体の精製

イン・ビトロでの発現構築物は、ＴＡＣプロモーター、ｃ－ｍｙｃエピトープ、ヒトカッパ定常部又はＶ５エピトープのいずれかをＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ領域に次々と添加し、ＰＣＲ増幅することによって調製した。このような構築物は、当業者に公知の多くの

方法、たとえば異なるＤＮＡ断片を増幅した後、アセンブリーＰＣＲ（ａｓｓｅｍｂｌｙ）によって調製することができる。この実施例では、最初の増幅用鋳型は、ＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ領域を含有するＲ１プラスミドであった。（Ｍａｓａｉ、Ｈ．及びＡｒａｉ、Ｋ．（１９８８）。ＤＮＡｓ　Ｒｅｓ．１６、６４９３～６５１４）。

【００８９】

（ａ）１次増幅。ＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ領域は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、Ｔａｑｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５単位、１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＲＥＰＡＦＯＲ（配列番号０１）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用して、プラスミドＲ１を含むＥＣＯＫ１２株の単一コロニーからＰＣＲ増幅した。ＲＥＰＡＦＯＲプライマーはＲｅｐＡコーディング領域の５’末端にアニーリングする。ＯＲＩＲＥＶプライマーは非コーディングＯＲＩ領域の３’末端にアニーリングする。

【００９０】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で４分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，４５秒を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【００９１】

（ｂ）２次増幅。ゲル精製し、１００倍に希釈した１次反応生成物１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、Ｔａｑｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５単位、１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＣＫＲＥＰＦＯＲ（配列番号０３）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用して再増幅した。ＣＫＲＥＰＦＯＲプライマーは、該プライマー反応生成物の５’末端にアニーリングし、カッパ定常部ＤＮＡの３’末端に付加する。ＯＲＩＲＥＶプライマーは該プライマー反応生成物の３’末端にアニーリングする。

【００９２】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，２分を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【００９３】

（ｃ）３次増幅。ゲル精製し、１００倍に希釈した１次反応生成物１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、Ｔａｑｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５単位、１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＶ５ＲＥＰＦＯＲ（配列番号０４）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用して再増幅した。Ｖ５ＲＥＰＦＯＲプライマーは、該プライマー反応生成物の５’末端にアニーリングし、Ｖ５エピトープの３’部分に付加する。ＯＲＩＲＥＶプライマーは該プライマー反応生成物の３’末端にアニーリングする。

【００９４】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，２分を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉ

ｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【００９５】

（ｄ）４次増幅。１００倍に希釈したｐＣＫＶ５プラスミド１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、Ｔａｑｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５単位、１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＭＹＣＣＫＦＯＲ（配列番号０５）及びＣＫＲＥＶ（配列番号０６）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用した。ｐＣＫＶ５プラスミドはヒトカッパ定常部ｃＤＮＡ（ＭｃＧｒｅｇｏｒ　ＤＰ、Ｍｏｌｌｏｙ　ＰＥ、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　Ｃ、＆　Ｈａｒｒｉｓ　ＷＪ．１９９４　Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１：２１９～２６）及びＶ５エピトープＤＮＡ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　ＪＡ、Ｙｏｕｎｇ　ＤＦ、Ｈｅａｎｅｙ　Ｆ、Ｂａｕｍｇａｒｔｎｅｒ　ＷＫ、Ｒａｎｄａｌｌ　ＲＥ．１９９１　Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７２：１５５１～７）を含有する。ＭＹＣＣＫＦＯＲプライマーは、カッパ定常部ＤＮＡの５’末端にアニーリングし、ＭＹＣエピトープＤＮＡの３’部分に付加する。ＣＫＲＥＶプライマーはカッパ定常部ＤＮＡの３’末端にアニーリングする。

【００９６】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，２分を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【００９７】

（ｅ）５次増幅。１００倍に希釈したｐＣＫＶ５プラスミド１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、Ｔａｑｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＭＹＣＶ５ＦＯＲ（配列番号０７）及びＶ５ＲＥＶ（配列番号０８）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用した。ＭＹＣＶ５ＦＯＲプライマーは、Ｖ５エピトープＤＮＡの５’末端にアニーリングし、ＭＹＣエピトープＤＮＡの３’部分に付加する。Ｖ５ＲＥＶプライマーはＶ５エピトープＤＮＡの５’末端にアニーリングする。

【００９８】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，３０秒を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【００９９】

（ｆ）６次増幅。１００倍に希釈したｐＴＡＣＰ２Ａプラスミド（参照）１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、Ｔａｑｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｉｎｃ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣ３（配列番号０９）及びＭＹＣＴＡＣＲＥＶ（配列番号１０）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣ３プライマーはＴＡＣプロモーターＤＮＡの５’末端にアニーリングする。ＭＹＣＴＡＣＲＥＶプライマーは、ＴＡＣプロモーターＤＮＡの３’末端にアニーリングし、ＭＹＣエピトープＤＮＡの５’部分に付加する。

【０１００】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９

４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，３０秒を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１０１】

（ｇ）１次アセンブリーＰＣＲ。（ｆ）及び（ｄ）の反応生成物それぞれ１μｌ（５０ｎｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣ５（配列番号１１）及びＣＫＲＥＶ（配列番号０６）それぞれ５０ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣ５プライマーは反応生成物（ｆ）の５’末端にアニーリングし、２０個のヌクレオチドを付加する。ＣＫＲＥＶプライマーは、反応生成物（ｄ）の３’末端にアニーリングする。

【０１０２】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，４５秒を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１０３】

（ｈ）２次アセンブリーＰＣＲ。（ｆ）及び（ｅ）の反応生成物それぞれ１μｌ（５０ｎｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣ５（配列番号１１）及びＶ５ＲＥＶ（配列番号０８）それぞれ５０ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣ５プライマーは反応生成物（ｆ）の５’末端にアニーリングし、２０個のヌクレオチドを付加する。該ＣＫＲＥＶプライマーは、反応生成物（ｅ）の３’末端にアニーリングする。

【０１０４】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，４５秒を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１０５】

（ｉ）３次アセンブリーＰＣＲ。（ｂ）及び（ｇ）に溶かした反応生成物それぞれ１μｌ（５０ｎｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣ３（配列番号０９）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）それぞれ５０ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣ３プライマーは、反応生成物（ｇ）の５’末端の下流の２０個のヌクレオチドにアニーリングする。ＯＲＩＲＥＶプライマーは、反応生成物（ｂ）の３’末端にアニーリングする。（ｉ）の反応性生成物はＴＡＣ－ＭＹＣ－ＣＫ－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ（配列番号１２）と称する。

【０１０６】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，１分を３０回、その後７２℃で１０分を１回実

施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１０７】

（ｊ）４次アセンブリーＰＣＲ。（ｂ）及び（ｈ）の反応生成物それぞれ１μｌ（５０ｎｇ）は、ｄＮＴＰ ０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣ３（配列番号０９）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）それぞれ５０ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣ３プライマーは、反応生成物（ｇ）の５’末端の下流の２０個のヌクレオチドにアニーリングする。ＯＲＩＲＥＶプライマーは、反応生成物（ｂ）の３’末端にアニーリングする。（ｉ）の反応性生成物はＴＡＣ－ＭＹＣ－Ｖ５－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ（配列番号１３）と称する。

【０１０８】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で２分１５秒を１回、９４℃，４５秒、６０℃，４５秒、７２℃，１分を３０回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１０９】

イン・ビトロでの転写／翻訳反応の準備。以下のＰｒｏｍｅｇａ細菌直線鋳型Ｓ３０を組み合わせたイン・ビトロでの転写／翻訳反応キット、
ＴＡＣ－ＭＹＣ－ＣＫ－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ鋳型２０μｌ（前記の最終構築ＤＮＡ配列番号０１２、０．５μｇ）、完全アミノ酸ミックス２０μｌ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、Ｓ３０プレミックス８０μｌ、Ｓ３０ミックス６０μｌ
を使用した該反応を氷上に設置し、該反応は２５℃で３０分間進行させ、氷上に置き、その後ブロック緩衝液で１０倍に希釈した（Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｐｅｒｂｉｏ Ｌｔｄ）、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、ニシン精子ＤＮＡ ２００μｇ／ｍｌ）。

【０１１０】

ＤＮＡ－タンパク質複合体捕捉。ＮＵＮＣｓｔａｒイムノチューブは、ＰＢＳに溶かした抗ｃ－ｍｙｃ抗体、抗Ｃ５抗体、又は抗ヒトカッパ鎖抗体のいずれか１０μｇ／ｍｌで、チューブ当たり５００μｌのＰＢＳにより終夜４℃でコーティングした。他のチューブは、陰性対照として盲検のままにした。チューブは、ＰＢＳで２回洗浄し、Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ／ＰＢＳ／０．１ｍｇ／ｍｌニシン精子ＤＮＡ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０を用いて室温で１時間ブロックし、次にＰＢＳで２回洗浄した。希釈した転写／翻訳反応液５００μｌを各チューブに添加し、室温で１時間インキュベートした。チューブは、ＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で５回、次にＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋ／ＰＢＳ／０．１ｍｇ／ｍｌニシン精子ＤＮＡ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０を用いて室温で３０分間１回洗浄し、次にＰＢＳで５回洗浄した。ＤＮＡは、Ｔ．Ｅ．緩衝液３００μｌ及びフェノール／クロロホルム３００μｌで５分間振盪して回収した。これを１３，２００ｇで５分間遠心して、ＤＮＡを０．５倍量の７．５Ｍ酢酸アンモニウム、グリコーゲン２０μｇ及び３倍量の無水エタノールで沈殿させた。遠心後、ペレットを７０％エタノールで洗浄し、真空乾燥して、水２０μｌに再懸濁した。回収したＤＮＡ １０μｌは、ＴＡＣ３（配列番号０９）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーを含む反応液５０μｌで再増幅した。反応生成物は、１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動した（図５）。

【実施例２】

【０１１１】

ＲｅｐＡ－ＤＮＡ複合体の分離

実施例１で既に説明した２種類のイン・ビトロでの発現構築物（配列番号１２及び配列番号１３）は、ＤＮＡを回収し、以下の方法、グリシン、トリエチルアミン、フェノール／クロロホルム、プロテインキナーゼＫ及びＥＤＴＡのいずれかを使用することによってＲｅｐＡから遊離すること以外は、実施例１で説明した通り、抗ヒトＣ－カッパ抗体に対する選択実験で使用した。これらの方法を以下に説明する。

【０１１２】

グリシン：チューブをグリシン２００ｍＭ、ＮａＣｌ　１５０ｍＭ（ｐＨ２．０）５００μｌで１０分間インキュベートした。次に、グリシンを新しいエッペンドルフチューブに移し、２Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．５）５０μｌを添加した。

【０１１３】

トリエチルアミン：チューブを０．１Ｍトリエチルアミン５００μｌで１０分間インキュベートし、次にトリエチルアミン溶出液を新しいエッペンドルフチューブに移し、１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）２５０μｌを添加した。

【０１１４】

フェノール／クロロホルム：前記の実施例１の通りである。

【０１１５】

プロテインキナーゼＫ：チューブをＴｒｉｓ　１００ｍＭ（ｐＨ８．０）、ＥＤＴＡ　１０ｍＭ（ｐＨ８．０）、０．５％ＳＤＳ　５００μｌを用いて３７℃、３０分間インキュベートした。次に、プロテインキナーゼＫ溶出液を新しいエッペンドルフチューブに移した。

【０１１６】

ＥＤＴＡ：チューブをＴｒｉｓ　１０ｍＭ（ｐＨ８．０）、ＥＤＴＡ　１ｍＭ　ＮａＣｌ　５００ｍＭ　２５０μｌ及びフェノール／クロロホルム２５０μｌで５分間インキュベートした。次に、ＥＤＴＡ溶出液を新しいエッペンドルフチューブに移した。

【０１１７】

ＤＮＡを回収した後、該ＤＮＡをフェノール／クロロホルムで抽出し、適切であれば、実施例１で説明したようにエタノール沈殿を行った。再懸濁したＤＮＡ　１０μｌは、ＴＡＣ３（配列番号０９）プライマー及びＣＩＳＲＥＶ（配列番号０１９）プライマーを含む反応液５０μｌで再増幅した。ＣＩＳＲＥＶプライマーは、ＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）の結合部位の上流１９６塩基にアニーリングする。反応生成物は、１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動した（データは示さず）。構築物（配列番号１２）を含有するＣＫ－ＤＮＡのみを、ほぼ等量で増幅した。

【０１１８】

これは、ＲｅｐＡからＤＮＡを回収し遊離するための前述の方法のいずれかを使用できることを教示するだけでなく、この結果はまた、ＲｅｐＡはコグネイトＤＮＡと非共有的方法で相互作用することを示唆している。

【実施例３】

【０１１９】

ＣＩＳディスプレイ技術を使用したＶ５スパイキング実験における特異的抗Ｖ５結合因子の検出

イン・ビトロでの発現構築物は、ＴＡＣプロモーター及びＶ５エピトープ又は１２マーＮＮＢライブラリーのいずれかをＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ領域に添加し、ＰＣＲ増幅することによって調製した。このような構築物は、当業者に公知の多くの方法、たとえば異なるＤＮＡ断片を増幅した後、アセンブリーＰＣＲによって調製することができる。この実施例では、最初の増幅鋳型は、ＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ領域を含有するＲ１プラスミドであった。（Ｍａｓａｉ、Ｈ．及びＡｒａｉ、Ｋ．（１９８８）．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１６、６４９３～６５１４）。

【０１２０】

（ａ）１次増幅。ＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ領域は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応

緩衝液（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＲＥＰＡＦＯＲ（配列番号０１）及びＯＲＩＲＥＶ４０８（配列番号０２）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用して、プラスミドＲ１を含むＥＣＯＫ１２株の単一コロニーからＰＣＲ増幅した。ＲＥＰＡＦＯＲプライマーはｒｅｐＡコーディング領域の５’末端にアニーリングする。ＯＲＩＲＥＶ４０８プライマーは非コーディングＯＲＩ領域の３’末端の下流にアニーリングする。

【０１２１】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で４分３０秒を１回、その後９４℃，３０秒、６０℃，４５秒、７２℃，１分を２５回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１２２】

（ｂ）２次増幅。１００倍に希釈したゲル精製１次反応生成物１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ ０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＶ５（ＮＮＢ）ＲＥＰＦＯＲ（配列番号２１）及びＯＲＩＲＥＶ４０８（配列番号２０）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用して再増幅した。Ｖ５（ＮＮＢ）ＲＥＰＦＯＲプライマーは、１次反応生成物の５’末端にアニーリングし、Ｖ５エピトープ ＤＮＡに付加する。ＯＲＩＲＥＶ４０８プライマーは該プライマー反応生成物の３’末端にアニーリングする。

【０１２３】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で４分３０秒を１回、９４℃，３０秒、６０℃，４５秒、７２℃，１分を２５回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１２４】

（ｃ）３次増幅。１００倍に希釈したゲル精製１次反応生成物１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ ０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＮＮＢＲＥＰＦＯＲ（配列番号２２）及びＯＲＩＲＥＶ４０８（配列番号２０）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用して再増幅した。ＮＮＢＲＥＰＦＯＲプライマーは、該プライマー反応生成物の５’末端にアニーリングし、無作為アミノ酸１２マーＮＮＢライブラリーＤＮＡに付加する。ＯＲＩＲＥＶ４０８プライマーは該プライマー反応生成物の３’末端にアニーリングする。

【０１２５】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で４分３０秒を１回、９４℃，３０秒、６０℃，４５秒、７２℃，１分を２５回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１２６】

（ｄ）４次増幅。１００倍に希釈したｐＴＡＣＰ２Ａプラスミド（参考）１μｌ（５００ｐｇ）は、ｄＮＴＰ ０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏ

ｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣＦＡＲＵＰ（配列番号２３）及びＴＡＣＲＥＶ（配列番号２７）それぞれ１２．５ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣＦＡＲＵＰプライマーはＴＡＣプロモーターＤＮＡの５’末端にアニーリングする。ＴＡＣＲＥＶプライマーはＴＡＣプロモーターＤＮＡの３’末端にアニーリングする。

【０１２７】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で１分４５秒を１回、９４℃，１５秒、６０℃，３０秒、７２℃，３０秒を２５回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１２８】

（ｅ）１次アセンブリーＰＣＲ。（ｂ）及び（ｄ）の反応生成物それぞれ１μｌ（５０ｎｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣＦＡＲＵＰ（配列番号２３）及びＯＲＩＲＥＶ４０８（配列番号２０）それぞれ５０ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣＦＡＲＵＰプライマーは、反応生成物（ｄ）の５’末端にアニーリングする。ＯＲＩＲＥＶ４８０プライマーは、反応生成物（ｂ）の３’末端にアニーリングする。（ｅ）の反応性生成物はＴＡＣ－Ｖ５－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ－４０８（配列番号２４）と称する。

【０１２９】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で４５秒を１回、９４℃，１５秒、６０℃，３０秒、７２℃，１分３０秒を２５回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。

【０１３０】

（ｆ）２次アセンブリーＰＣＲ。（ｃ）及び（ｄ）の反応生成物それぞれ１μｌ（５０ｎｇ）は、ｄＮＴＰ　０．２５ｍＭ、ＴａｑディープベントＤＮＡポリメラーゼ混合物（２０：１）２．５単位、及び１ｘＰＣＲ反応緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を含有する反応液５０μｌ中で、プライマーＴＡＣＦＡＲＵＰ（配列番号２３）及びＯＲＩＲＥＶ４０８（配列番号２０）それぞれ５０ｐｍｏｌを使用した。ＴＡＣＦＡＲＵＰプライマーは、反応生成物（ｄ）の５’末端にアニーリングする。ＯＲＩＲＥＶ４８０プライマーは、反応生成物（ｃ）の３’末端にアニーリングする。

【０１３１】

ＰＣＲ反応は、エッペンドルフマスターサイクラーで、９４℃で１分４５秒を１回、９４℃，１５秒、６０℃，３０秒、７２℃，１分３０秒を２５回、その後７２℃で１０分を１回実施した。反応生成物は、アガロースゲル上で電気泳動して、ゲルを切り出し、Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ＩＩキットを使用して、製造者（Ｂｉｏ１０１、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）の指示に従って、生成物をゲルから滅菌水４０μｌに精製した。（ｆ）の反応生成物はＴＡＣ－ＮＮＢ－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ－４０８（配列番号２５）と称する。

【０１３２】

イン・ビトロでの転写／翻訳反応物の調製。Ｐｒｏｍｅｇａ細菌線上鋳型Ｓ３０を組み合わせた以下のイン・ビトロでの転写／翻訳反応キット、

５０００倍希釈したＴＡＣ－Ｖ５－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ－４０８鋳型（０．１ｎｇ

の前記の最終構築物ＤＮＡ配列番号２４）２０μｌ
ＴＡＣ－ＮＮＢ－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ－４０８鋳型（０．５μｇの前記の最終構築物ＤＮＡ配列番号２５）２０μｌ
完全アミノ酸ミックス（Ｐｒｏｍｅｇａ）２０μｌ
Ｓ３０プレミックス８０μｌ
Ｓ３０ミックス６０μｌ
を使用して反応装置を氷上に設置し、該反応は、２５℃で３０分間進行させ、氷上に置き、次に２％Ｍａｒｖｅｌ／ＰＢＳで１０倍に希釈した。

【０１３３】

ＤＮＡ－タンパク質複合体捕捉。ＮＵＭＣｓｔａｒイムノチューブは、ＰＢＳ　５００μｌに溶かした抗Ｖ５抗体１０μｇ／ｍｌ、４℃で一晩コーティングした。もう１本のチューブは陰性対照として盲検のままにした。チューブをＰＢＳで２回洗浄し、ブロッキング緩衝液（２％Ｍａｒｖｅｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、０．１ｍｇ／ｍｌニシン精子ＤＮＡ）で室温で１時間ブロックし、次にＰＢＳで２回洗浄した。希釈した転写／翻訳反応液１ｍｌを各チューブに添加し、室温で１時間インキュベートした。チューブをＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で５回、次いでＰＢＳで５回洗浄した。ＤＮＡはＴＥ緩衝液５００μｌ及びフェノール／クロロホルム５００μｌで回収した。これを１３，２００ｇで５分間遠心して、ＤＮＡを１／１０量の３Ｍ酢酸ナトリウム、グリコーゲン５０μｇ／ｍｌ及び２倍量の無水エタノールで沈殿させた。遠心後、ペレットを７０％エタノールで洗浄し、真空乾燥し、水４０μｌに再懸濁した。回収したＤＮＡ　２０μｌをビオチン化プライマーｂＴＡＣ６（配列番号２６）及びｂＣＩＳＲＥＶ（配列番号１９）を含む反応液５０μｌで再増幅した。反応生成物は、１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動した。

【０１３４】

回収したＤＮＡの発現ベクターｐＤＭＧ－Ｋ（配列番号２７）へのクローニング。反応生成物はゲル精製して、ＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（ＱＩＡＧＥＮ　ＬｔｄＷｅｓｔ　Ｓｕｓｓｅｘ、Ｕ．Ｋ．）を使用して製造者の指示に従って滅菌水５０μｌで溶出した。精製した反応生成物とプラスミドｐＤＭＧ－Ｋの両者をＮｃｏＩ及びＮｏｔＩ２０単位で消化した。（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）。切断したプラスミドをＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（ＱＩＡＧＥＮ　ＬｔｄＷｅｓｔ　Ｓｕｓｓｅｘ、Ｕ．Ｋ．）を使用して製造者の指示に従ってゲル精製し、次にウシ腸アルカリホスファターゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ、Ｕ．Ｋ．）０．０１単位で処理し、次にフェノール／クロロホルム抽出し、前記のようにエタノール沈殿させた。沈殿したＤＮＡを水２０μｌに溶解した。切断したＰＣＲ生成物は、１ｘＴＢＳ、ＢＳＡ　０．３ｍｇ／ｍｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０中のストレプトアビジンをコーティングした細片（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｉｔｃｓ　Ｌｔｄ、Ｅａｓｔ　Ｓｕｓｓｅｘ、Ｕ．Ｋ．）に移し、室温で振盪しながら３０分間インキュベートした。この取り組みによって、ＰＣＲ生成物のＮｃｏＩ及びＮｏｔＩ部位の上流又は下流に隣接するビオチン化ＤＮＡが除去され、選択したペプチド配列を含有する小ＤＮＡ断片の回収が可能になる。上清をフェノール／クロロホルム抽出し、前述のようにエタノール沈殿させた。沈殿したＤＮＡを水１０μｌに溶解した。切断したプラスミド及びＮｃｏＩ及びＮｏｔＩオーバーハングの両者を有する選択したペプチド配列を含有する単離小ＤＮＡ断片はＱｕｉｃｋ連結キット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）を使用して製造者の指示に従って連結し、次にフェノール／クロロホルム抽出し、前述のようにエタノール沈殿させた。沈殿したＤＮＡを水１０μｌに溶解し、製造者の指示に従ってエレクトロコンピテントＴＧ１細胞にエレクトロポレーションし、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ、及び２％グルコースを有するプレートで選択した。

【０１３５】

選択したクローンの抗Ｖ５抗体ＥＬＩＳＡスクリーニング。８８個のクローンを２ｘＴＹ、２％グルコース及びアンピシリン１００μｇ／ｍｌ、４００μｌに採取し、３００ｒ

ｐｍで振盪しながら３７℃で一晩増殖させた。一晩培養したもの５０μｌを２ｘＴＹ、２％グルコース及びアンピシリン１００μｇ／ｍｌ、１ｍｌに移し、３００ｒｐｍで振盪しながらＯＤ０．５になるまで増殖させた。次に細胞を１０００ｘｇで１０分間遠心した。上清を廃棄し、ペレットを２ｘＴＹ、０．４Ｍスクロース、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ及びＩＰＴＧ　１ｍＭ、６００μｌに再懸濁し、３００ｒｐｍで３７℃で４時間増殖させた。インキュベーション後、細胞を１０００ｘｇで１０分間遠心した。上清１５０μｌをＥＬＩＳＡ試験で使用した。ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐプレートを１ｘＰＢＳに溶かした抗ヒトカッパ領域抗体又は抗Ｖ５抗体１μｇ／ｍｌ又はＢＳＡ　５０μｇ／ｍｌ、１００μｌ、室温で７時間コーティングした。もう１枚のプレートは盲検用に残し、ＰＢＳのみでコーティングした。ウェルはＰＢＳで２回洗浄し、その後１ｘＰＢＳに溶かした４％Ｍａｒｖｅｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ　３００μｌで室温で１時間ブロックした。ウェルをＰＢＳで２回洗浄し、次に上清１５０μｌ及び１ｘＰＢＳに溶かした４％Ｍａｒｖｅｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、１５０μｌをウェルに添加し、室温で１時間インキュベートした。次にウェルをＰＢＳ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で２回、ＰＢＳで２回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に結合させた２次抗体抗ヒトカッパ領域抗体（最終濃度１．６μｇ／ｍｌ）を４％Ｍａｒｖｅｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、１ｘＰＢＳで５００倍に希釈し、ウェルに添加して、室温で１時間インキュベートした。次にウェルをＰＢＳ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で４回、ＰＢＳで２回洗浄した。ＨＲＰシグナルはＴＭＢ基質を２００μｌ添加することによって検出した。反応は０．５Ｍ硫酸１００μｌで停止させた。吸光度は４５０ｎｍで読み取った。８８個のクローンのうち３５個は、抗ヒトカッパ領域抗体に対するスクリーニングで明瞭に判定できるクローンのＨＲＰシグナルを示した。これら３５個のクローンのうち７個は、抗Ｖ５抗体に特異的な結合性を示したので、Ｖ５ペプチドの濃縮は５０００分の１から５分の１に、すなわち濃縮係数は１０００になった（図６）。

【実施例４】

【０１３６】

ＣＩＳディスプレイライブラリーの構築。バシルス　グロビギ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｇｌｏｂｉｇｉｉ）による選択及びスクリーニング

ライブラリー構築

ライブラリーＤＮＡを作製するためには、プロモーターライブラリーＤＮＡ断片及びＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ｏｒｉ断片を作製し、次に消化連結によって一緒に結合しなければならない。Ｐ２Ａ－ＨＡベクターのｔａｃプロモーターをこの実施例で使用したが、多くの利用可能なプロモーターを使用することができ、当業者には周知である。Ｒｅｐ－ＣＩＳ－ｏｒｉの最初のＰＣＲ及びＴＡＣ断片をＢｓｐ１２０Ｉ部位及びランダムライブラリー／ＮｏｔＩ部位それぞれに付加する。２つのマスターミックスを調製した。

【０１３７】

１：５０に希釈したＰ２Ａ－ＨＡプラスミドＤＮＡ（２５ｎｇ／反応液）１０μｌは、ｄＮＴＰ　２００μＭ、１ｘＮＥＢポリメラーゼ増幅緩衝液（ＫＣｌ　１０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$　１０ｍＭ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．８、$MgSO_4$　２ｍＭ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）を含有し、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，６０秒を２５回、その後７２℃で５分間伸長するためのＴＡＣＦＡＲＵＰ（配列番号２３）プライマー及びＮＴＥＲＭ１８ＭＥＲ（配列番号２８）プライマーそれぞれ１０ｐｍｏｌ並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含む反応量２０ｘ５０μｌでＰＣＲ増幅した。反応生成物２０μｌは１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動して撮影し、一方残りはＱＩＡＧＥＮカラムで水２００μｌに精製した。

【０１３８】

Ｂｓｐ１２０Ｉ修正Ｒｅｐ－ＣＩＳ－ｏｒｉＤＮＡ（５０ｎｇ／反応液）１０μｌは、ｄＮＴＰ　２００μＭ、１ｘＮＥＢポリメラーゼ増幅緩衝液（ＫＣｌ　１０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$　１０ｍＭ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．８、$MgSO_4$　２ｍ

Ｍ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）を含有し、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，９０秒を２５回、その後７２℃で５分間伸長するためのＢＳＰＲＥＰＡＦＯＲ（配列番号２９）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーそれぞれ１０ｐｍｏｌ並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含む反応量１０ｘ５０μｌでＰＣＲ増幅した。反応生成物２０μｌは１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動して撮影し、一方残りはＱＩＡＧＥＮカラムで水１２０μｌに精製した。

【０１３９】

次にライブラリー－ＴＡＣ生成物をＮｏｔＩ（ＮＥＢ）（１００ｕ）１０μｌで反応量３００μｌ中、３７℃で１時間消化し、次いでＱｉａｇｅｎカラムで水１２０μｌに精製した。次に、制限連結によってこの２種類の生成物を以下のように結合した。

【０１４０】

【表１】

10xNEB 緩衝液4	17μl
100mM ATP (SIGMA)	15μl
10mg/ml アセチル化 BSA (NEB)	1μl
RepA DNA	40μl
TAC-ライブラリー DNA	40μl
Bsp120I (10u/μl Fermentas)	5μl
NotI (10u/μl NEB)	5μl
T4 DNA リガーゼ (400u/μl NEB)	5μl
水	39μl

【０１４１】

反応は、３７℃で２時間実施した。２０μｌをゲル電気泳動で評価し、３０μｌは１０ｘ５０μｌ反応液で直接ＰＣＲ増幅し、残りはゲル精製して、ライブラリーのバンドを切り出し、Ｑｉａｇｅｎカラムで精製して、プライマーＴＡＣＦＡＲ４（配列番号３０）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）を含む２０ｘ５０μｌ反応液で、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，９０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長してＰＣＲ増幅した。ＤＮＡは４本のＱｉａｇｅｎカラムでゲル精製し、溶出液２００μｌをＩＴＴ反応／選択用に収集した。

【０１４２】

１回目の選択

２ｘ２００μｌ　ＩＴＴ反応を設定し、室温で以下のように１時間インキュベートした。

【０１４３】

【表２】

反応	1
ライブラリー DNA	56μl (7μg)
2.5x 緩衝液	80μl
100mM メチオニン	2μl
S30 抽出物	60μl

【０１４４】
ブロック緩衝液１ｍｌを各反応液（ブロック緩衝液は、４％Ｍａｒｖｅｌ、剪断サケ精子ＤＮＡ　１００μｇ／ｍｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、ヘパリン２．５ｍｇ／ｍｌのＴＢＳ溶液）に添加し、１０，０００ｇで２分間遠心し、新しいチューブに移し、その後氷上に置いた。
【０１４５】
バシラス　グロビギ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｇｌｏｂｉｇｉｉ）（Ｂｇ）の胞子懸濁液１００μｌをＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０　１ｍｌで２回洗浄し、ブロック緩衝液１００μｌに再懸濁した。次に、これをブロック緩衝液に添加し、混合しながら室温で１時間結合させた。
【０１４６】
次にこの混合物を１６，１００ｇで１分間遠心して、胞子ペレットは遠心前にピペットで混合しボルテックスすることによってＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で６回洗浄した。該ペレットを最後にＴＢＳ　１ｍｌで洗浄し、上清を廃棄した。
【０１４７】
ＤＮＡは、０．５Ｍ酢酸ナトリウムｐＨ５．５　１２０μｌ中で該胞子を１０分間ミキサー上でインキュベートすることによって溶出した。該胞子は１６，１００ｇで１分間遠心し、上清はＴｒｉｓ　ｐＨ８．０　１２０μｌを添加することによって中和し、次にフェノール／$CHCl_3$で１６，１００ｇで５分間抽出した。ＤＮＡは、担体グリコーゲン２０μｇ及び２．５倍量のエタノールで沈殿させた。ＤＮＡは１６，１００ｇで２０分間でペレットにして、該ペレットを７０％エタノール０．７５ｍｌで３回洗浄して、各洗浄の間に１６，１００ｇで３分間遠心し、次に空気乾燥して、水２０μｌに再懸濁した。
【０１４８】
回収したＤＮＡ　１０μｌは、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，９０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長するためのプライマーＣＩＳＲＥＶ（配列番号１９）及びＴＡＣＦＡＲ５（配列番号３１）並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含む１０ｘ５０μｌ反応液でＰＣＲ増幅した。該ＤＮＡを精製し、エタノールで沈殿させ、水１０μｌに再懸濁した。５μｌは、前記の条件を使用するが、プライマーＮＯＴＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）及びＴＡＣＦＡＲ５（配列番号３１）を使用して１０回ＰＣＲすることによってさらに増幅した。該生成物をＱｉａｇｅｎＰＣＲ精製キットを使用して精製し、５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０　５０μｌに溶出した。
【０１４９】
制限－連結
これは、反応液３０μｌで３７℃で１時間実施し、さらに選択を重ねるためにＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ｏｒｉＤＮＡを回収したペプチドに再度結合させた。
【０１５０】

【表３】

10xNEB 緩衝液4	3μl
100mM ATP (SIGMA)	1.5μl
10mg/ml アセチル化 BSA (NEB)	0.3μl
RepA DNA	2μl
TAC-ライブラリーDNA	10μl
Bsp120I (10u/μl Fermentas)	1.5μl
NotI (10u/μl NEB)	1.5μl
T4 DNA リガーゼ (400u/μl NEB)	1.5μl
水	8.7μl

【０１５１】
２０μｌは、プライマーＴＡＣＦＡＲ５．１（配列番号３３）及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）を有する１０ｘ５０μｌ反応液で直接、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，９０秒を２０回、その後７２℃で５分間伸長してＰＣＲ増幅した。ＤＮＡは１Ｑｉａｇｅｎカラムでゲル精製し、溶出液は２回目のＩＴＴ反応／選択用に使用した（Ｒ２では５８μｌを使用した）。
【０１５２】
２回目
２回目の選択は、１回目のように実施したが、以下の通り変更した。投入したＤＮＡの約３μｇを使用した。ブロック緩衝液は、ＴＢＳに溶かした２％ウシ血清アルブミン、１％ゼラチン、剪断サケ精子ＤＮＡ　１００μｇ／ｍｌ、ヘパリン２．５ｍｇ／ｍｌであった。各選択では、洗浄胞子１０μｌを使用した。回収ＰＣＲでは、ＴＡＣＦＡＲ５．２（配列番号３４）プライマー及びＮＯＴＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）プライマーを使用した。最後に、ＴＡＣＦＡＲ５．２（配列番号３４）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーを１０回使用したＰＣＲを行った。
【０１５３】
３回目
３回目の選択は、２回目のように実施したが、以下の通り変更した。投入ＤＮＡは約２．５μｇ使用した。回収ＰＣＲでは、ＴＡＣＦＡＲ６（配列番号３５）プライマー及びＮＯＴＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）プライマーを使用した。最後に、ＴＡＣＦＡＲ６（配列番号３５）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーを１０回使用したＰＣＲを行った。
【０１５４】
４回目
４回目は、選択用に投入ＤＮＡ約２マイクログラムを使用したこと以外は３回目のように実施した。回収ＰＣＲでは、ＴＡＣ３（配列番号０９）プライマー及びＮＯＴＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）プライマーを使用した。最後に、ＴＡＣ３（配列番号０９）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーを１０回使用したＰＣＲを行った。
【０１５５】
５回目
５回目は４回目のように実施した。
【０１５６】
ＮｃｏＩ－ＮｏｔＩ断片をクローニングするために、５回目から回収した保存ＤＮＡを

ビオチン化ＴＡＣ６（配列番号２６）プライマー及びＮＯＴＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）でＰＣＲ増幅した。ＮｏｔＩで消化した後、ＱｉａｇｅｎＰＣＲ精製キットを使用して精製し、ＮｃｏＩで消化した後ストレプトアビジンでコーティングしたプレートでインキュベートした。フェノール／$CHCl_3$精製及びエタノール沈殿後、消化したＤＮＡを同様に消化したｐＶＩＩＩファージミドベクターに連結し、ＥＲ２７３８大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に形質転換し、２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌプレートに播種し、３７℃で一晩インキュベートした。

【０１５７】

個々のコロニーを２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ培地２００μｌを入れた９６ウェルプレートに採取し、３７℃／２００ｒｐｍで６時間増殖させた。１００μｌを、２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを１００μｌ及びウェル当たりＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージ１０μｌを含有するウェルの深いプレートに移し、振盪せずに３７℃で１時間インキュベートした。ウェル当たり２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ、カナマイシン２５μｇ／ｍｌ、２０μＭ　ＩＰＴＧ培地５００μｌを添加し、インキュベーションは３７℃／２００ｒｐｍで一晩実施した。

【０１５８】

ＥＬＩＳＡスクリーニング

丸底９６ウェルプレートをＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０のＰＢＳ溶液に溶かした４％Ｍａｒｖｅｌで室温で１時間ブロックした。採取したファージ培養物を３０００ｇで５分間遠心して、ファージ上清をＥＬＩＳＡでアッセイした。各ウェルで、ファージ上清５０μｌを４％ウシ血清アルブミン、１％ゼラチンのＴＢＳ溶液５０μｌに溶かしたＢｇ胞子５μｌと混合し、振盪しながら室温で１時間インキュベートした。４％牛血清アルブミン、１％ゼラチンのＴＢＳ溶液に溶かした西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗Ｍ１３抗体０．２μｇ／ｍｌでインキュベーションする前に、該ウェルをＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０　２００μｌで、洗浄それぞれの間に３０００ｇで５分間遠心することによって５回洗浄した。胞子は室温で１時間振盪しながらインキュベートした。次に、ウェルをＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄し、胞子を新しいプレートに移した。次に、胞子をＴＭＢ基質で発色させる前に前述のようにＴＢＳで１回洗浄した。発色は０．５Ｍ　H_2SO_4で停止し、該溶液を新しい平底プレートに移し、４５０ｎｍで読み取った。選択したペプチドの結合データを図７に示す。

【実施例５】

【０１５９】

ＣＩＳディスプレイライブラリーの構築、抗Ｖ５抗体による選択及びスクリーニング

ライブラリー構築は実施例４で説明したように実施した。

【０１６０】

１回目の選択

１ｘ２００μｌのイン・ビトロでの転写／翻訳反応液（ＩＴＴ）反応液を設定して、実施例４で説明したように室温で１時間インキュベートした。ブロック緩衝液１ｍｌを各反応液（ブロック緩衝液は、５％脱脂粉乳、剪断サケ精子ＤＮＡ　１００μｇ／ｍｌ、ヘパリン２．５ｍｇ／ｍｌのＴＢＳ溶液）に添加し、その後氷上に置いた。

【０１６１】

第１回目ライブラリー選択のために、７０ｘ１１ｍｍ　ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐイムノチューブ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐａｉｓｌｅｙ、Ｓｃｏｔｌａｎｄ　Ｕ．Ｋ．）をＰＢＳに溶かした抗Ｖ５ペプチドポリクローナル抗体（Ｈａｒｌａｎ－Ｓｅｒａｌａｂ）１０μｇ／ｍｌの１ｍｌを用いて、３７℃で１時間コーティングした。該チューブをＰＢＳで３回洗浄し（注いでは捨てる）、ブロック緩衝液３ｍｌを用いて３７℃で１時間ブロックして、前記のように洗浄した。ブロック緩衝液に溶かしたライブラリータンパク質－ＤＮＡ複合体を添加し、室温で１時間静置してインキュベートした。該チューブをＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄し、その後ＰＢＳのみでさらに５回洗浄した。

【０１６２】
ＤＮＡをブラッドミキサー上で１Ｍ酢酸ナトリウムｐＨ５．２　５００μｌに１０分間溶出し、１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０　１００μｌを用いて中和し、その後フェノール／ＣＨＣｌ$_3$を用いて１６，１００ｇで５分間抽出した。ＤＮＡは、担体グリコーゲン２０μｇ、１／２倍量の７．５Ｍ酢酸アンモニウム及び３倍量のエタノールで沈殿させた。ＤＮＡは１６，１００ｇで２０分間かけてペレットにして、該ペレットを７０％エタノール０．５ｍｌで、１６，１００ｇで５分間洗浄して、真空乾燥して、水２０μｌに再懸濁した。
【０１６３】
回収したＤＮＡ　１０μｌは、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，９０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長するためのプライマーＮＯＴ１ＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）及びＴＡＣＦＡＲ４（配列番号３０）並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含む１ｘ５０μｌ反応液でＰＣＲ増幅した。反応生成物５０μｌを１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動し撮影して、次にＧｅｎｅＣｌｅａｎで水１０μｌに精製した。ＤＮＡはＲｅｐＡＤＮＡに再結合して、実施例４で説明したようにＴＡＣＦＡＲ５プライマー（配列番号３１）及びＯＲＩＲＥＶプライマー（配列番号０２）を使用して２回再増幅した。
【０１６４】
２回目の選択は、実施例４で説明したのと同じプライマーの組み合わせを使用して、以下の変更を加えて１回目のように実施した。抗Ｖ５抗体コーティング濃度は５μｇ／ｍｌに減少させた。投入したＤＮＡは約４μｇであった。３回目の選択は、２回目のように実施したが、以下の通り変更した。投入ＤＮＡは約４μｇ使用した。回収ＰＣＲでは、ＴＡＣＦＡＲ５．１（配列番号３３）プライマー及びＮＯＴＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）プライマーを使用した。最後に、ＴＡＣＦＡＲ６（配列番号３５）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーを１０回使用したＰＣＲを行った。４回目は３回目のように実施した。
【０１６５】
ＮｃｏＩ－ＮｏｔＩ断片としてクローニングするために、４回目から回収した保存ＤＮＡをビオチン化（配列番号２６）ＴＡＣ６プライマー及びＮＯＴＩＲＥＰＲＥＣＲＥＶ２（配列番号３２）プライマーでＰＣＲ増幅し、ｐＶＩＩＩファージミドベクターにクローニングして、実施例４で説明したようにエレクトロコンピテントＴＧ－１大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）にエレクトロポレートした。
【０１６６】
個々のコロニーを２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ培地２００μｌを入れた９６ウェルプレートに採取し、３７℃／２００ｒｐｍで６時間増殖させた。１００μｌを、２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ、１００μｌ及びウェル当たり10^9ｋｒｕのＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージを含有するウェルの深いプレートに移し、振盪せずに３７℃で１時間インキュベートした。ウェル当たり２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ、カナマイシン２５μｇ／ｍｌ、２０μＭ　ＩＰＴＧ培地４００μｌを添加し、ファージ増幅は２００ｒｐｍで振盪しながら３７℃で１６時間継続した。細菌培養をベンチトップ遠心機においてマイクロタイタープレートキャリアで４℃で２０００ｇで１０分間回転させ、細菌をペレットにして、培養上清をＥＬＩＳＡ用に使用した。
【０１６７】
ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ　ＥＬＩＳＡプレートは、ＰＢＳ　１００μｌ／ウェルに溶かした抗Ｖ５ペプチド抗体１００ｎｇ／ウェルで３７℃で１時間コーティングした。該プレートはＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄し、２％ＢＳＡ／ＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで３７℃で１時間ブロックし、次にＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄した。ファージ培養上清５０μｌを５０μｌ／ウェルの４％ＢＳＡ／ＰＢＳを含有する各ウェルに添加し、室温で１時間結合させた。該プレートは、ＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０

２００μｌ／ウェルで２回、次いでＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄した。結合したファージは、２％ＢＳＡ／ＰＢＳで１：５０００に希釈した抗Ｍ１３－ＨＲＰ複合体（Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａ）１００μｌ／ウェルで室温で１時間検出し、前記のように該プレートを４回洗浄した。該プレートは、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）基質緩衝液１００μｌ／ウェルで室温で５分間発色させた。反応は０．５$NH_2SO_4$１００μｌ／ウェルで停止させ、４５０ｎｍで読み取った。次に、ＥＬＩＳＡ陽性クローンのファージミドＤＮＡは、標準的なｐＵＣフォワードプライマー及びリバースプライマーで配列決定した。単離したこれらクローンのアミノ酸配列を以下に示す。４個のＥＬＩＳＡ陽性クローンを培養量１０ｍｌで増殖させ、ファージ粒子をＰＥＧ－ＮａＣｌで沈殿させ、ＰＢＳ　１ｍｌに再懸濁して、５０μｌを前記のようにＥＬＩＳＡで再試験した。抗Ｖ５抗体及び対照抗ＡＣＴＨペプチド抗体に対するＯＤ４５０ｎｍのシグナルを図８に示す。

【０１６８】

選択後に単離されたペプチド配列

Ｐ１Ｃ１２（配列番号３６）　ＣＧＣＰＴＭＡＡＲＶＲＰＶＬＮＳＫＨ
Ｐ２Ｈ１（配列番号３７）　ＭＴＴＶＰＶＬＭＩＳＶ
Ｐ１Ｂ５（配列番号３８）　ＴＬＳＴＲＨＨＮＶＩＤＲＦＮＬＲＮＦ
Ｐ２Ｂ８（配列番号３９）　ＳＩＲＴＬＴＧＳＴＰＡＱＦＤＡＴＡＤ

【実施例６】

【０１６９】

ＣＩＳディスプレイライブラリーからのオボアルブミン結合ペプチドの選択

いずれの選択方法についても、重要なことは、選択及びスクリーニングの最中に、関与した担体分子とは関係なく、選択物が選択した標的に結合できることである。この実施例では、標的結合の確認を可能にするために選択ペプチドを選択し、合成する。無作為な１２量体（１２ｍｅｒ）ペプチドライブラリーの構築は、実施例３で説明したように実施する。実施例４で説明したように、オボアルブミン（ＳＩＧＭＡ、Ｄｏｒｓｅｔ、ＵＫ）１００μｇ／ｍｌでコーティングしたイムノチューブで選択を４回実施した。

【０１７０】

ＮｃｏＩ－ＮｏｔＩ断片としてクローニングするために、実施例４で説明したように、４回目から回収したＤＮＡをビオチン化ＴＡＣ６プライマー（配列番号２６）及びＮＯＴＩＲＥＰＲＥＣＲＥＶ２プライマー（配列番号３２）でＰＣＲ増幅し、ｐＶＩＩＩファージミドベクターにクローニングして、エレクトロコンピテントＴＧ－１大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）にエレクトロポレートした。

【０１７１】

個々のコロニーを２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ培地２００μｌの入った９６ウェルプレートに採取し、３７℃／２００ｒｐｍで６時間増殖させた。１００μｌを２％グルコース、２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ、１００μｌ及び10^9ｋｒｕＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージ／ウェルを含有するディープウェルプレートに移し、振盪せずに３７℃で１時間インキュベートした。ウェル当たり２ｘＴＹ、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ／カナマイシン２５μｇ／ｍｌ／２０μＭ　ＩＰＴＧ培地４００μｌを添加し、ファージ増幅を２００ｒｐｍで振盪しながら３７℃で１６時間継続した。培養した細菌をベンチトップ遠心機中、マイクロタイタープレートキャリアで４℃、２０００ｇで１０分間遠心して、細菌をペレットにして、培養上清をＥＬＩＳＡ用に使用した。

【０１７２】

ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ　ＥＬＩＳＡプレートは、ＰＢＳ　１００μｌ／ウェルに溶かしたオボアルブミン１００μｇ／ウェルを用いて４℃で１晩コーティングした。該プレートは２００μｌ／ウェルのＰＢＳで２回洗浄し、２％ＢＳＡ／ＰＢＳ、２００μ／ウェルを用いて３７℃、１時間ブロックし、次に２００μｌ／ウェルのＰＢＳで２回洗浄した。４％ＢＳＡ／ＰＢＳ　５０μｌ／ウェルを含有する各ウェルにファージ培養上清５０

μｌを添加し、室温で１時間結合させた。該プレートは、ＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０　２００μｌ／ウェルで２回、次いでＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄した。結合したファージは、２％ＢＳＡ／ＰＢＳを用いて１：５０００に希釈した抗Ｍ１３－ＨＲＰ複合体（Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａ）１００μｌ／ウェルを用いて室温で１時間検出し、前記のように該プレートを４回洗浄した。該プレートは、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）基質緩衝液１００μｌ／ウェルを用いて室温で５分間発色させた。反応は０．５Ｎ　H_2SO_4　１００μｌ／ウェルで停止させ、４５０ｎｍで読み取った。次に、ＥＬＩＳＡ陽性クローンのファージミドＤＮＡは、Ｍ１３ＲＥＶプライマーで配列決定した。単離したこれらのクローンのアミノ酸配列を以下に示す。

【０１７３】

Ｃｌ（配列番号４０）　ＡＮＬＷＲＩＶＬＨＧＷＷ
Ｃ４（配列番号４１）　ＶＳＦＭＬＬＧＰＨＲＨＲ
Ｃ６（配列番号４２）　ＬＶＬＨＷＬＳＬＧＳＲ
Ｃ８（配列番号４３）　ＳＮＱＶＶＬＩＬＨＬＲＰ
対照（配列番号４４）　ＡＥＳＷＬＨＱＳＷＩＨＬ

【０１７４】

４種類の代表的なＥＬＩＳＡ陽性クローンのペプチド配列を合成し（ＳＩＧＭＡ－Ｇｅｎｏｓｙｓ　Ｌｔｄ）、ＥＬＩＳＡで検出するためにＣ末端にビオチンを添加した。これらのペプチドは、Ｂ．グロビギ胞子に対するファージディスプレイ選択によって既に単離した対照ペプチドと共に、ＥＬＩＳＡでオボアルブミンについて試験した。ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ　ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ　１００μｌ／ウェルに溶かしたオボアルブミン１００μｇ／ウェル又はＰＢＳに溶かした抗Ｖ５ポリクローナル抗体２００ｎｇ／ウェルを用いて４℃で一晩コーティングした。該プレートをＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄し、２％脱脂粉乳／ＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで３７℃で１時間ブロックして、次にＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄した。希釈したペプチド１μｇを２％ＢＳＡ／ＰＢＳ　１００μｌ／ウェルで各ウェルに添加し、室温で１時間結合させた。該プレートをＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０　２００μｌ／ウェルで２回洗浄し、次いでＰＢＳ　２００μｌ／ウェルで２回洗浄した。結合したペプチドを、２％ＢＳＡ／ＰＢＳで１：２０００に希釈したストレプトアビジン－ＨＲＰ複合体（Ｐｉｅｒｃｅ）１００μｌ／ウェルを用いて室温で１時間検出して、該プレートを前記のように４回洗浄した。該プレートをＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）基質緩衝液１００μｌ／ウェルを用いて室温で５分間発色させた。この反応は、０．５Ｎ　H_2SO_4　１００μｌ／ウェルで停止し、４５０ｎｍで読み取った（図９）。

【実施例７】

【０１７５】

ＣＩＳディスプレイ系における１本鎖Ｆｖ抗体（ｓｃＦＶ）断片のディスプレイ

ｔａｃ－ｓｃＦｖ－ＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ｏｒｉ構築物は、本質的に実施例１で既に説明したようにＰＣＲ重複伸長によって構築した。抗ｍｅｃｏｐｒｏｐ　ｓｃＦｖＤＮＡ（Ｈａｐｔｏｇｅｎ　Ｌｔｄ、Ａｂｅｒｄｅｅｎ、ＵＫ）は、ｄＮＴＰ　２００μＭ、１ｘＮＥＢポリメラーゼ増幅緩衝液（ＫＣｌ　１０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$　１０ｍＭ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．８、$MgSO_4$　２ｍＭ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）を含有し、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，８０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長するためのＴＡＣＭＥＣＯＦＯＲ（配列番号４５）プライマー及びＲＥＰＡＭＥＣＯＢＡＫ（配列番号４６）プライマーそれぞれ１０ｐｍｏｌ並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含む反応量５０μｌｘ２０でＰＣＲ増幅した。生成物は１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動し、ＧｅｎｅｃｌｅａｎＩＩキットで水２０μｌに精製した。これは、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，８０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長するためのＴＡＣ３（配列番号０９）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーそ

れぞれ１０ｐｍｏｌ並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含むｄＮＴＰ ２００μＭ、１ｘＮＥＢポリメラーゼ増幅緩衝液（ＫＣｌ １０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$ １０ｍＭ、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．８、$MgSO_4$ ２ｍＭ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）を含有する反応量５０μｌ中で、ＯＲＩＲＥＶ４０８（配列番号２０）及びＭＥＣＯＲＥＰＡＦＯＲ（配列番号４７）で作製したＲｅｐＡ－ＣＩＳ－ｏｒｉＤＮＡ並びにＴＡＣＦＡＲＵＰ（配列番号２３）及びＭＥＣＯＴＡＣＢＡＫ（配列番号４８）で作製したＴａｃプロモーターＤＮＡと組み合わせた。生成物は１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動し、ＧｅｎｅｃｌｅａｎＩＩキットで水２０μｌに精製した。

【０１７６】

ＤＮＡは、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，８０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長するためのＴＡＣ３（配列番号０９）プライマー及びＯＲＩＲＥＶ（配列番号０２）プライマーそれぞれ１０ｐｍｏｌ並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）を２単位を含むｄＮＴＰ ２００μＭ、１ｘＮＥＢポリメラーゼ増幅緩衝液（ＫＣｌ １０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$ １０ｍＭ、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．８、$MgSO_4$ ２ｍＭ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）を含有する反応量５０μｌで再増幅した。生成物は１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動し、ＧｅｎｅｃｌｅａｎＩＩキットで水１００μｌに精製した。

【０１７７】

次に、ＳｃＦｖＤＮＡを以下の２種類の反応条件で翻訳した。

【０１７８】

【表４】

反応	1	2
Tac-ScFv-RepA DNA	28μl (1μg)	28μl (1μg)
2.5x 緩衝液	40μl	40μl
10mM メチオニン	1μl	1μl
H_2O	1μl	-
S30 抽出物	30μl	30μl

【０１７９】

反応は、３０℃で３０分インキュベートし、次に０．２５Ｍオキシグルタチオン１μｌを反応２に添加し、３０℃でさらに３０分インキュベーションを継続した。ブロック緩衝液１ｍｌを各反応液に添加し（ブロック緩衝液は１％ゼラチン、剪断サケ精子ＤＮＡ １００μｇ／ｍｌ、ヘパリン２．５ｍｇ／ｍｌのＴＢＳ溶液である）、１０，０００ｇで２分間回転させ、その後氷上に置いた。

【０１８０】

ＮＵＮＣ ｓｔａｒイムノチューブは、ＢＳＡ－ｍｅｃｏｐｒｏｐ複合体１０μｇ／ｍｌ、０．５ｍｌ又はＰＢＳに溶かしたＢＳＡ １０μｇ／ｍｌで３７℃で１時間コーティングした。チューブはＰＢＳで２回洗浄し、次にブロッキング緩衝液３ｍｌを用いてブラッドミキサー上、室温で１時間ブロックし、次にチューブをＰＢＳで２回洗浄した。

【０１８１】

希釈した各ＩＴＴ ０．５ｍｌをブロックしたＢＳＡコーティング又はＢＳＡ－ｍｅｃｏｐｒｏｐコーティングチューブのいずれかに添加し、室温で１時間インキュベートした。チューブをＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で５回、ＴＢＳで５回洗浄した。

【０１８２】

結合したＤＮＡは、０．５Ｍ　ＮａＣｌ／１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８、ＥＤＴＡ　１ｍＭ　０．５ｍｌを用いて室温で１０分間溶出し、次にフェノール／クロロホルム０．５ｍＬで抽出し、担体グリコーゲン２０μｇ、１／２量の７．５Ｍ酢酸アンモニウム及び３倍量のエタノールで沈殿させた。ＤＮＡは１４，０００ｇで２０分間でペレットにして、該ペレットを７０％エタノール０．５ｍｌを用いて１４，０００ｇで５分間洗浄し、真空乾燥し、水２０μｌに再懸濁した。

【０１８３】

回収したＤＮＡは、９４℃，４０秒、６０℃，４０秒、７２℃，８０秒を３０回、その後７２℃で５分間伸長するためのＴＡＣＭＥＣＯＦＯＲ（配列番号４５）プライマー及びＲＥＰＡＭＥＣＯＢＡＫ（配列番号４６）プライマーそれぞれ１０ｐｍｏｌ並びにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ：ディープベントＤＮＡポリメラーゼ２０：１混合物（ＮＥＢ）２単位を含むｄＮＴＰ　２００μＭ、１ｘＮＥＢポリメラーゼ増幅緩衝液（ＫＣｌ　１０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$　１０ｍＭ、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　２０ｍＭ　ｐＨ８．８、$MgSO_4$　２ｍＭ、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）を含有する反応量５０μｌでＰＣＲ増幅した。生成物は、１％アガロース／ＴＡＥゲルで電気泳動し、撮影した。抗体標的上での選択によってＢＳＡコーティングしたチューブから回収するよりも多くのＤＮＡが認められ、機能的ｓｃＦｖ－ＲｅｐＡ－ＤＮＡ複合体が選択されたことが示された（図１０）。

【０１８４】

配列の簡単な説明

配列番号１から１１、１９から２３、２６から３５及び４５から４７は実施例で使用したプライマーを示す。

配列番号１２は、ＴＡＣ－ＭＹＣ－ＣＫ－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ構築物の配列を示し、配列番号１３は、ＴＡＣ－ＭＹＣ－Ｖ５－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ構築物の配列を示し、配列番号２４はＴＡＣ－Ｖ５－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ－４０８構築物の配列を示し、配列番号２５はＴＡＣ－ＮＮＢ－ＲＥＰＡ－ＣＩＳ－ＯＲＩ－４０８構築物の配列を示す。

配列番号１４は、エストロゲン受容体標的認識配列を示す。

配列番号１５及び１６は、ｉｎｃＦＩＩ不適合群のＲ１プラスミドのｒｅｐＡ遺伝子のＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。配列番号１７及び１８は、ｃｉｓＤＮＡ要素の配列を示し、同系のｏｒｉ配列を形成する。

配列番号３６から３９は、実施例５で選択した後、単離したペプチドの配列を示す。配列番号３９及び４３は、実施例６で単離したクローンの配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【０１８５】

【図１】本発明のＤＮＡ構築物がコードするペプチドに結合することができる方法の概略図である。

【図２】ＤＮＡ結合タンパク質をシス作用ＤＮＡ結合タンパク質に変換することができる本発明の方法の概略図である。

【図３】標的配列特異的ＤＮＡ結合タンパク質を本発明のライブラリーから単離する方法を示した概略図である。

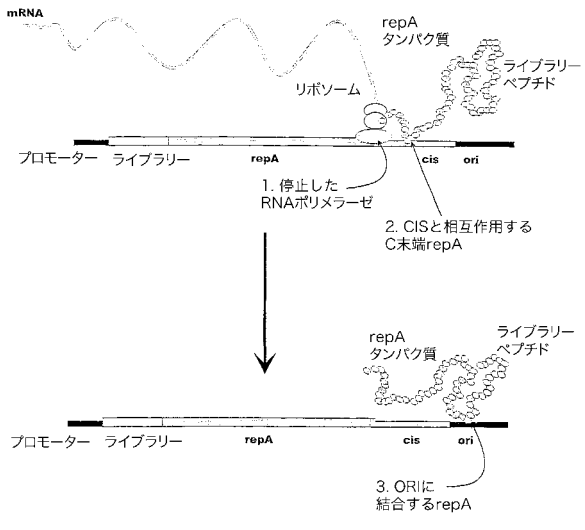
【図４】ライブラリータンパク質がシス作用及び二特異的な結合分子の使用によってそのコーディングＤＮＡに結合する方法を示した概略図である。

【図５】いずれかの抗体で選択した大きさの異なる２種類の投入ＤＮＡ（ＣＫ－ＲｅｐＡ又はＶ５－ＲｅｐＡ）の１：１混合物のシス活性を示す。１－マーカーＤＮＡ、２－抗ヒトＣＫ抗体で選択した後のＰＣＲ増幅物、３－抗Ｖ５ペプチド抗体で選択した後のＰＣＲ増幅物。

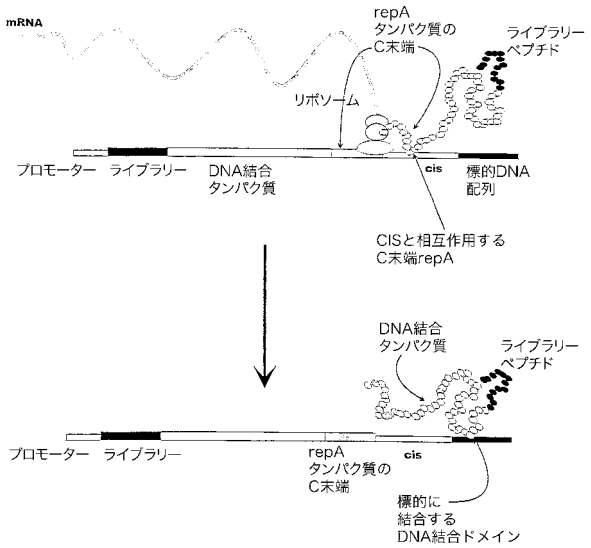
【図６】抗Ｖ５抗体を結合するクローンの特異性を示す。抗Ｖ５抗体に対する特異的結合を示す７個のクローン（１～７）の４５０ｎＭで読み取ったＥＬＩＳＡスクリーニング。ひとまとまりの４本の棒グラフは、左から右へ、抗ヒトカッパ領域抗体、抗Ｖ５抗体、ＢＳＡ及び盲検に対してスクリーニングしたクローンのＥＬＩＳＡ値を表す。ＣＫもＶ５も

発現しない陰性対照もまた示す（８）。
【図７】実施例４でバシラス　グロビギ（Ｂ．ｇｌｏｂｉｇｉｉ）胞子で５回選択した後、回収されたペプチドの培養上清のＥＬＩＳＡ　ＯＤ４５０ｎｍの値を示す。Ａ＝クローン１ｅ、Ｂ＝クローン１ｆ、Ｃ＝クローン１ｇ、Ｄ＝クローン８ａ、Ｅ＝クローン１０ｃ、Ｆ＝クローン１０ｅ、Ｇ＝陰性対照。
【図８】実施例５で抗Ｖ５抗体で４回選択した後、単離されたペプチドのＯＤ４５０ｎｍの値を示す。Ａ＝Ｐ１Ｃ１２、Ｂ＝Ｐ２Ｈ１、Ｃ＝Ｐ１Ｂ５、Ｄ＝Ｐ２Ｂ８。ペプチド－ファージを抗Ｖ５及び抗ＡＣＴＨペプチド抗体で試験した。
【図９】オボアルブミンで４回選択した後、単離された合成ペプチドのＯＤ４５０ｎｍの値を示す。Ａ＝Ｃ１、Ｂ＝Ｃ４、Ｃ＝Ｃ６、Ｄ＝Ｃ８、Ｅ＝陰性対照。オボアルブミン、抗Ｖ５抗体及びブロックした（プラスティック）プレートでペプチドを試験した。
【図１０】ＢＳＡ又はＢＳＡ－メコプロップで選択した後のｓｃＦｖＤＮＡのＰＣＲ回収を示す。Ａ．ＢＳＡ、ｏｘ－グルタチオン２．５ｍＭで選択した抗メコプロップｓｃＦｖ、Ｂ．メコプロップ－ＢＳＡ、ｏｘ－グルタチオン２．５ｍＭで選択した抗メコプロップｓｃＦｖ、Ｃ．ｏｘ－グルタチオンなしで、ＢＳＡで選択した抗メコプロップｓｃＦｖ、Ｄ．ｏｘ－グルタチオンなしで、メコプロップ－ＢＳＡで選択した抗メコプロップｓｃＦｖ。

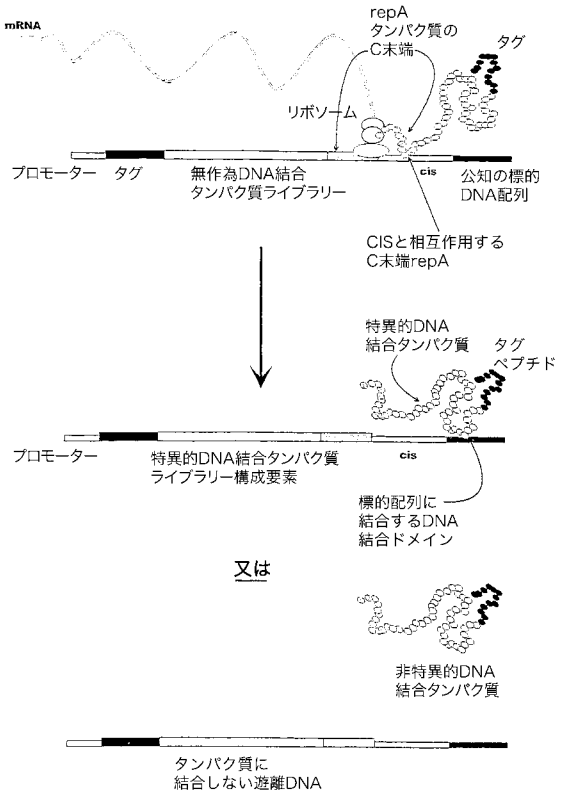
【図１】



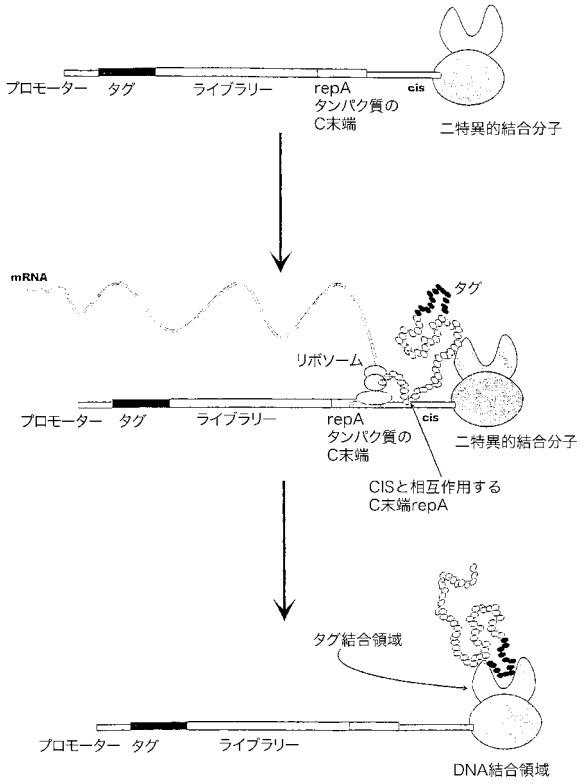
【図２】



【図３】



【図４】



【図５】

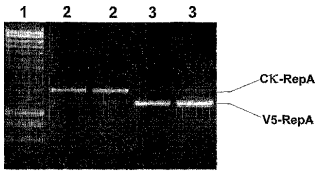


Figure 5

【図６】

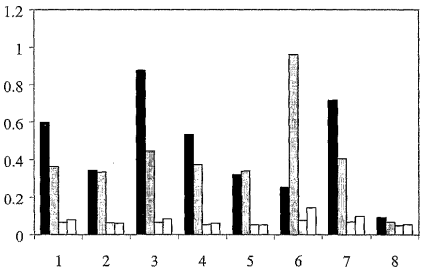


Figure 6

【図７】

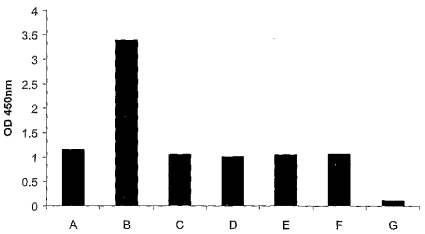
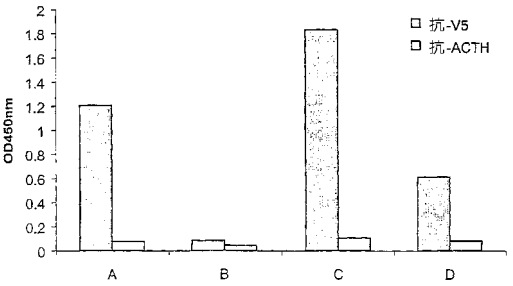
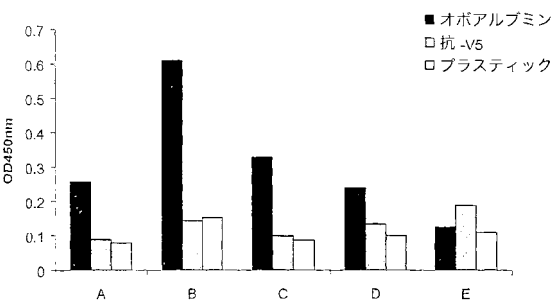


Figure 7

【図８】



【図９】



【図１０】

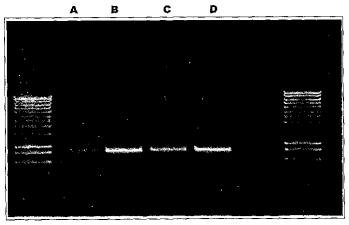


Figure 10

【配列表】

0004664677000001.xml

フロントページの続き

(31)優先権主張番号　0304657.0
(32)優先日　平成15年2月28日(2003.2.28)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(72)発明者　マクレガー、ダンカン
イギリス国、ケンブリッジ、フーパー　ストリート　２１
(72)発明者　オーデグリップ、リチャード
スウェーデン国、ストックホルム、ハントフェルカルガタン　６０
(72)発明者　フィッツジェラルド、ケヴィン
イギリス国、エセックス、ヘンプステッド、　ハイ　ストリート、ザ　カッブ
(72)発明者　ヘデレー、ローズマリー
イギリス国、ケンブリッジ、１シー　モートロック　アヴェニュー
(72)発明者　エルドリッジ、ビル
イギリス国、エセックス、サフラン　ウォールデン、　リトル　ウォールドレン　ロード　１９
(72)発明者　ウルマン、クリス
イギリス国、ケンブリッジ、クランリー　クローズ　１０
(72)発明者　クールマン、フィリップ
イギリス国、ケンブリッジシア、セント　アイヴス、　ラウリー　クローズ　３
(72)発明者　カーンバー、デーヴィッド
オーストラリア国、ニューサウスウェールズ、オレンジ、　ウォーリゲル　プレース　６

審査官　佐々木　大輔

(56)参考文献　国際公開第９８／０３７１８６（WO，Ａ１）
CULL M G, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF USA, 米国, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, １９９２年　３月　１日, V89 N5, P1865-1869

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N　15/00-15/90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)