

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3967319号  
(P3967319)

(45) 発行日 平成19年8月29日(2007.8.29)

(24) 登録日 平成19年6月8日(2007.6.8)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 14/00	(2006.01)	C 07 K 14/00	
C 12 P 21/02	(2006.01)	C 12 P 21/02	Z C C C

請求項の数 7 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2003-509098 (P2003-509098)  
 (86) (22) 出願日 平成14年6月26日 (2002.6.26)  
 (65) 公表番号 特表2004-533259 (P2004-533259A)  
 (43) 公表日 平成16年11月4日 (2004.11.4)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2002/007060  
 (87) 國際公開番号 WO2003/002736  
 (87) 國際公開日 平成15年1月9日 (2003.1.9)  
 審査請求日 平成16年2月5日 (2004.2.5)  
 (31) 優先権主張番号 01115424.2  
 (32) 優先日 平成13年6月27日 (2001.6.27)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013  
 エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCHE  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 T  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラッセ 124  
 (74) 代理人 100095832  
 弁理士 細田 芳徳  
 (72) 発明者 シャオ, チーシン  
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823  
 77 ヴェストエント 43  
 (72) 発明者 クラッツシュ, ペーター  
 ドイツ連邦共和国 アントドルフ 823  
 87 ドルフシュトラーセ 5  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリヌクレオチド配列のインピトロ組換えのためのウォークスルーテchnique

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a ) 少なくとも 1 つのプライマー、核酸合成活性を有する酵素、および核酸鎖終結分子および核酸鎖伸長分子の混合物、ならびにテンプレートポリヌクレオチドを含有する反応混合物の存在下で行われる核酸合成により核酸フラグメントラダーを作製する工程、
- b ) 該鎖終結分子を除去する工程、
- c ) 熱安定性酵素の存在下、核酸鎖終結分子を含まない核酸鎖伸長分子を含む反応混合物中で、工程 b ) で得られたフラグメントを互いに、またはテンプレートポリヌクレオチドにハイブリダイズさせ、アニーリングし、これらを伸長することによるポリヌクレオチド配列の再構築工程、ならびに

d ) 工程 a ) ~ c ) を繰り返すか、または工程 c ) のみを繰り返す工程  
を含むポリヌクレオチド配列の形成方法。

## 【請求項 2】

工程 a ) および / または c ) のテンプレートポリヌクレオチドが、種々のテンプレートポリヌクレオチドからなる混合物である請求項 1 記載のポリヌクレオチド配列の形成方法。

## 【請求項 3】

核酸鎖終結分子が ddNTP であり、核酸伸長分子が dNTP である請求項 1 または 2 記載のポリヌクレオチド配列の形成方法。

## 【請求項 4】

10

20

請求項 1 ~ 3 いずれか記載の工程を含み、さらに

- e) ベクターへの工程 d) で得られたポリヌクレオチド配列のクローニング工程、
- f) コードされる変異体ポリペプチドの発現工程、および
- g) 変異体ポリペプチドをコードするベクターのスクリーニング工程または選択工程を含む、変異体ポリペプチドまたはタンパク質の提供方法。

【請求項 5】

再構築産物の増幅工程をさらに含む、請求項 4 記載の工程を含む変異体ポリペプチドまたはタンパク質の提供方法。

【請求項 6】

生体分子の最適化のための請求項 1 ~ 5 いずれか記載の方法の使用。 10

【請求項 7】

酵素の最適化のための請求項 1 ~ 5 いずれか記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

鎖伸長分子および鎖終結分子、例えば、dNTP/ddNTPを用いたウォークスルー (walk-through)、続いて再構築および増幅に基づくポリヌクレオチド配列のランダムインピトロ変異誘発および組換えのシンプルかつ効率的な方法が記載される。タンパク質構造および/または機能を改善するためのこの方法の有用性は、新規サルコシンオキシダーゼバリアントを作製することおよびヒト胎盤アルカリホスファターゼおよび子ウシ腸アルカリホスファターゼを組換えることにより示される。 20

【0002】

遺伝子アルゴリズム (Holland, J.H. 1975. *Adaptation in natural and artificial systems*. The University Press, Ann Arbor, Goldberg, D.E. 1989. *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*. Addison-Wesley. Reading) および進化ストラテジー (Eigen, M. 1971. *Naturwissenschaften* 58: 465-523, Rechenberg, I. 1973. *Evolutionsstrategie: Optimierung technischer Systeme nach Prinzipien der biologischen Evolution*. Frommann-Holz-boog, Stuttgart) などの種々の最適化手順は、天然の進化により奮起されている。これらの手順は、特定の最適化目的を達成するために、変異（各々の単一メンバーの集団における小さいランダム変化を作製する）ならびにクロスオーバー（これらは、種々の個体の特性を合わせる）を利用する。種々の最適化問題のコンピューターシミュレーションにより示されるように、変異とクロスオーバーとの間に強い相互作用がまた存在する (Brady, R.M. 1985. *Nature* 317:804-806, Muhlenbein, H. 1991. *Parallel Coomputing* 17:619-632, Pal, K.F. 1993. *Bio.Cybern.* 69: 539-546, Pal, K.F. 1995. *Bio.Cybernn.* 73, 335-341）。これらの鍵となるプロセスを模倣する効率的かつ実用的な実験技術を開発することは科学的挑戦である。かかる技術の適用は、我々に、インビオまたは生体系の束縛から完全に解放された、例えば、タンパク質および核酸などの生物学的分子の機能を探索し、最適化することを可能にするはずである (Joyce, G.F. 1992. *Scientific American*, 267:90-97, Shao, Z. および Arnold F.H. 1996. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 6:513-518)。 30

【0003】

タンパク質は、それらの機能に基づく分子をより理解し、および実際の適用のためのそれらの性能を大いに改善する目的で操作される。「合理的」および「不合理な (irrational)」デザインを含む種々のアプローチが、タンパク質機能を最適化するために首尾良く使用されている (Shao, Z. および Arnold F.H. 1996. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 6:513-518)。所定の最適化問題のためのアプローチの選択は、配列、構造および機能の間の関係の理解の程度に依存する。酵素の触媒部位の合理的再デザインは、例えば、酵素構造、種々のリガンドとのその複合体および反応中間体のアナログの構造ならびに触媒機構の詳細の広範な知識をしばしば必要とする。かかる情報は、非常に少ない十分に研究された系についてのみ入手可能である；潜在的に興味深い酵素の大多数についてはほとんど知られてな 40

い。

#### 【0004】

タンパク質機能の最適化のために、いくつかの「不合理な(irrational)」最適化アプローチが使用されている (Shao, Z. および Arnold F.H. 1996. Curr.Opin.Struct.Biol.6:513-518により最近レビューされた)。これらの最適化手順は、酵素自身に関する多くの特定の知識を必要とせず、最適化対象の機能の評価のみを必要とする。これらの手順は、機能評価の不正確さおよびノイズにかなり耐性でさえある (Moore, J.C. および Arnold, F.H. 1996. Chem.Eng.Sci.51:5091-5102)。特に望みのあるアプローチは、同時に特定の最適化問題のために、変異およびクロスオーバーの両方を同調的に溶液のプローブ集団に使用することである。スクリーニングまたは選択の複数の世代によって、劣悪な局所的最適条件は逃れられ、徐々により良好な溶液が「育てられる (bred)」(Stemmer, W.P.C. 1994a. Nature, 370:389-391, 1994; Stemmer, W.P.C. 1994b. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 91:10747-10751)。過去数年の間、ますます多くの人々は、進化的検索ストラテジーのメリットを認識している。しかし、以下等の数種類のみの実際的な技術、

・経時的変異誘発PCR (Moore, J.C. および Arnold, F.H. 1996. Chem.Eng.Sci. 51:5091-5102)、

・コンビナトリアルカセット変異誘発 (Reidhaar-Olson, J.F. および Sauer, R.T. 1988. Science 241:53-57)、

「DNAシャッフリング (shuffling)」(Stemmer, W.P.C. 1994a. Nature, 370:389-391; Stemmer, W.P.C. 1994b. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 91:10747-10751) 10

・ランダムプライミング組換え (Shao, Zhixin, H.Zhao, Lori Giver および Frances H. Arnold. 1998. Nucleic Acids Res. 26(2):681-683)、

・ねじれ型-伸長 (StEP). H.Zhaoら、1998, Nature Biotechnol. 16(3):258-2661)、

・人工組換え (Shao, Zhixin. 1998. Protein Science 8 (Suppl.2):55; Volkov, Alexander, Zhixin Shao および Frances H. Arnold. 1999 Nucleic Acids Res. 27(18)e18:i-vii) 20

がこれらの問題に首尾よく適用されている。

#### 【0005】

手順における進化最適化の最も一般的に使用される技術の1つは、「DNA-シャッフリング」であり (米国特許第5,834,252号 ; 米国特許第5,605,793号 ; 米国特許第5,830,721号 ; 米国特許第5,837,458号 ; 米国特許第5,811,238号 )、DNA-シャッフリングは以下の工程 30 を含む :

1 ) 種々の二本鎖テンプレートポリヌクレオチドからのランダムな二本鎖フラグメントの作製、該種々のテンプレートポリヌクレオチドは、好ましくは同一のエリアおよび非相同エリアを含む

2 ) ランダムフラグメントの再構築

3 ) クローニング

4 ) 発現および

5 ) スクリーニング。

#### 【0006】

種々の二本鎖テンプレートポリヌクレオチドは、それらの配列 (すなわち同一ではない) および従ってその生物学的活性において異なるが、核酸またはタンパク質の同一のファミリーに属しうる (すなわち、関連する)。DNaseIの使用は、先行技術ではランダムフラグメント化について記載されている。 40

#### 【0007】

Stemmerらによって記載されるDNaseフラグメント化を用いるDNA-シャッフリングは、多数の不利な点を有する。まず第1に、DNaseIは、DNAを非ランダムに切断する。反応の初期の間に、切断は、好ましくはDNA配列の真ん中で起こり、フラグメント化の後期に、切断は、好ましくはプリンとピリミジンアナログとの間で起こる。これは、きびしく制御される断片化手順を導く。さらに、所望の遺伝子の最小の長さは、テンプレートポリヌクレオチドの制御可能ではない消化のために限定される。さらに、DNaseIは消化工程後に完全 50

に除去されるはずである。なぜなら、それはさらなる再構築反応に妨害を導入するからである。

#### 【0008】

従って、本発明の目的は、DNA配列の組換えのための新規技術を開発することであった。

#### 【0009】

本発明の主題は、DNA配列のインビトロウォークスルーグループ換えのための新規技術である。この技術は、低レベルの点変異を有する3'末端ランダム分布DNAフラグメントのプールを作製するために、鎖伸長分子および鎖終結分子の混合物、例えばdNTP/ddNTPを用いるテンプレート遺伝子をウォークスルーする工程を含む。従って、フラグメントラダーは、配列決定反応間のフラグメントラダーに類似して生成される。終結分子、例えば、ddNMP末端の除去後、これらの短いDNAフラグメントは、相同性に基づいて適切な反応条件下で互いにプライミングし得、従って、熱安定性DNAポリメラーゼの存在下でサーモサイクルを繰り返すことにより全長遺伝子を形成するように再構築されうる。これらの遺伝子は、従来のPCRによりさらに增幅され得、コードされるタンパク質の発現のために適切なベクターにクローニングされうる。発現された変異体のスクリーニングまたは選択は、改善された、またはさらに新規機能を有する新規バリアントにいたる。これらのバリアントは、実際的な問題に対する部分的解法として、すぐに使用されるか、またはそれらがウォークスルーチェンジ誘発および組換えのさらなるサイクルのための新規開始点として役立つ。この技術は、Bacillus subtilis BMTU3420サルコシンオキシダーゼバリアントを作製することにより、およびヒト胎盤アルカリホスファターゼおよび子ウシ腸アルカリホスファターゼを組換えることにより証明される。技術が簡単で効率的であることが見出された。

#### 【0010】

それゆえ、本発明の主題は、  
a) 少なくとも1つのプライマー、核酸合成活性を有する酵素、および核酸鎖終結分子および核酸鎖伸長分子の混合物ならびにテンプレートポリヌクレオチドを含有する反応混合物の存在下で行われる核酸合成により核酸フラグメントラダーを作製する工程、  
b) 鎖終結分子を除去するか、または鎖終結分子を非終結分子に変化させる工程、  
c) 核酸合成活性を有する熱安定性酵素の存在下で、これらのフラグメントを互いにまたはテンプレートポリヌクレオチドにハイブリダイズさせ、  
i) 核酸鎖終結分子および核酸鎖伸長分子の混合物の存在下で、または  
ii) 鎖終結分子を含まない核酸鎖伸長分子の反応混合物の存在下で  
のいずれかで核酸合成を行うことによるポリヌクレオチドの再構築を含み、ただし i) の場合、工程 b) および c) を繰り返す、ポリヌクレオチド配列の形成方法である。

#### 【0011】

鎖ターミネーター(terminator)を除去する工程およびフラグメント再構築の工程はまた、同時に行われうる。工程 a、b、cにおけるプロセスの再分化は、3つの別々の工程が行われなければならないことを意味しない。3つの工程はまた、同時に起こりうる。全ウォークスルーグループ換えがより好ましい形態、例えば、単一のコンテナ、容器またはチューブ中で行われうることも可能である。

#### 【0012】

1つのプライマーがフラグメント合成（または鎖伸長）に十分であったとしても、その後の再構築のために正しい方向のフラグメントを得るために、異なるフラグメント合成反応のための2つ以上のプライマーが必要である。すなわち、2つ以上のプライマーが、全体のウォークスループロセスのために必要である。

#### 【0013】

多様性は鎖合成およびフラグメント再構築の間に導入されうる（例えば、DNAポリメラーゼの合成エラーから生じる）ので、1つのみのテンプレートがウォークスループロセスに十分である。このことは、テンプレートポリヌクレオチドが種々のポリヌクレオチドの

混合物でない場合には、DNAフラグメントは、いくつかの合成誤差により低レベルの局所変異を含み得、新規配列が作製されることを意味する。

#### 【0014】

1つ以上のテンプレートを用いることにより、バリエントライブラーの多様性を有意に増大させ得、結果的に潜在的に陽性のバリエントを見出すことが容易になり得る。好ましくは、工程a)および/またはc)のテンプレートポリヌクレオチドは、核酸またはタンパク質の同じファミリーに属し得る(すなわち、関連する)が、その配列において異なり(即ち、同一でない)、従って生物学的活性において異なる種々のテンプレートポリヌクレオチドからなる混合物である。この場合、遺伝子シャッフルングが起こりうる。

#### 【0015】

ウォークスルーテchniqueのための条件は、場合によって変化し得、  
 (a)鎖ターミネーター(terminator)の存在下でのフラグメント合成、  
 (b)組み込まれた鎖ターミネーターを除去すること、および  
 (c)工程(b)由来のフラグメントを再構築すること  
 の3つの主要な異なるレベルで最適化されうる。

#### 【0016】

a)鎖ターミネーターの存在下でのフラグメント合成

この工程は、通常のポリヌクレオチド配列決定反応になぜか類似し、それゆえ、種々の標的を配列決定するのに適切な種々の条件がこの工程に適用されうる。

#### 【0017】

ウォークスルーハンドルを行うために、テンプレートは、直鎖または閉環形態の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドでありうる。テンプレートはまた、天然の、インタクトな、未精製の、またはクローニングされていないゲノムDNAの形態でありうる。ほとんどの場合、テンプレート遺伝子は、更なる変異が導入されずにベクターにクローニングされるので、それらは、通常制限エンドヌクレアーゼで最初に切断され、アガロースゲル電気泳動によりベクターから精製される。例えば、直鎖DNA分子が変性され、鎖伸長分子/鎖終結分子、例えば、dNTP/ddNTPの適切な量の存在下でウォークスルーレアクションのためにオリゴデオキシヌクレオチドにアニールされる。従って、そのオリゴヌクレオチドは、テンプレートDNAの各鎖に相補的なDNAフラグメントを生成するために伸長された全体の標的領域に沿って異なる位置で目的のDNAをプライミングする。いくらかの合成エラーライフのために、これらのDNAフラグメントはまた、低レベルの局所変異を含む。ddNMP'の鎖終結末端を除去した後、これらのDNAフラグメントは、相同性に基づく適切な反応条件下で互いにプライミングし得、熱安定性DNAポリメラーゼの存在下でのサーモサイクルの繰り返しにより全長遺伝子に再構築されうる。得られた全長遺伝子は多様な配列を有するが、そのほとんどは、なおも元のテンプレートDNAに類似する。

#### 【0018】

フラグメント合成は、中温のDNAポリメラーゼを用いる温和な条件下での鎖伸長または熱安定性ポリメラーゼを用いたサーモサイクル配列決定のいずれかにより行われうる。ウォークスルーハンドルにPCRを適合させるために、合成は、より初期の(nascent)DNAフラグメントのためのより簡単な方法を提供し、我々の技術をより強固にする。

#### 【0019】

サーモサイクルがフラグメント合成に使用される場合、サーモサイクルの数は、テンプレートの量およびその純度に応じて、約15~約55サイクルであり得る。具体的なサイクル数は、新たに合成されたフラグメントの質および量に従ってより容易に決定されうる。

#### 【0020】

最初のDNAテンプレートの数は、鎖伸長条件に従って変化しうる。通常、0.1~10pmolのds-DNAはこの種類の反応に十分である。

#### 【0021】

使用されるプライマーの長さは、14マー~28マーで変化しうる。選択されたプライマーの長さは、非特異的DNA結合位置へのアニーリングを妨げ、良好なシグナル対ノイズ比を

10

20

30

40

50

保証するのに十分な長さであるべきである。我々は、通常18~21マーのプライマーを使用する。

**【0022】**

ウォーカスループライマー間の距離は、鎖反応様式に依存し、100~800ヌクレオチドで変化しうる。我々の場合には、2つのプライマー間の平均距離は、通常500ヌクレオチド付近である。

**【0023】**

各プライマーの濃度は、使用される連鎖反応の種類に応じて0.05pmol~2 pmolで変化しうる。通常、0.1pmolプライマーは、*B.subtilis*サルコシンオキシダーゼ遺伝子の鎖伸長に使用され、一方、1.0pmolの各プライマーは、ヒト胎盤アルカリホスファターゼおよび子ウシ腸アルカリホスファターゼの鎖伸長のために使用される。

10

**【0024】**

何十というポリメラーゼが現在利用可能であり、ランダムに分布された3'末端を有する初期のDNAフラグメントの合成は、より様々な様式で達成されうる。例えば、バクテリオファージT4DNAポリメラーゼ(Nossal 1974)またはT7配列バージョン2.0 DNAポリメラーゼ(TaborおよびRichardson 1987, 1989)および/または熱安定性DNAポリメラーゼがウォーカスループライマー合成のために使用されうる。より好ましくは、野生型ポリメラーゼよりも効率的にddNTPを取り込む、他の改変DNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼの混合物が使用されうる。一本鎖RNAテンプレートのために、逆転写酵素がウォーカスループライマー合成に好ましい。これらの酵素の各々は、通常、鎖伸長を促進するための最適化条件下で使用される。核酸合成活性を有する酵素は、DNAまたはRNA依存性ポリメラーゼでありうる。

20

**【0025】**

種々のDNAポリメラーゼが、一本鎖テンプレートにおけるDNA合成(Klenow, H.およびI. Henningsen. 1970. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 65:168)のための基質として2',3'-ジデオキシヌクレオチドトリホスフェート(ddNTP)を使用しうることが長い間知られている(Sanger, F., Nicklen, S.およびCoulson, A.R. 1977. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463-5467, Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.M.およびRoe, B.A. 1980. *J.Mol.Biol.* 143:161-178)。

**【0026】**

ddNMPが成長する鎖の3'末端に取り込まれた場合、鎖伸長はA、C、GまたはTで終結する。なぜなら、鎖はいまや3'水酸基を欠乏するからである。4つの鎖ラダーを作製するために、4つの可能なddNTPの内の1つのみが4つの反応の各々に含まれる。各反応におけるddNTP/dNTP比は、伸長鎖の一部が、含まれる相補的ddNTPに対応するテンプレートの塩基の各出現で終結するように調整される。この方法で、4つの伸長反応の各々は、伸長された鎖の集団を含み、その全てがアニールされたプライマーにより決定される固定された5'末端、および特定のジデオキシヌクレオチドで終結した可変性の3'末端を有する。鎖伸長および終結はまた、ddNTP/dNTPの正確な量の存在下で1つの反応中で行われうる。

30

**【0027】**

鎖終結分子は、これらの分子が核酸合成を終結し、それゆえ、フラグメントラダーが作製されることを意味する。フラグメントラダーの作製後、適切な鎖終結分子は除去されうる。適切な鎖終結ヌクレオチドは、例えば、ddGTP、ddATP、ddCTP、ddTTP等のジデオキシヌクレオチドまたはその誘導体である。ジデオキシヌクレオチドの誘導体は、サーモサイクル反応において合成される成長するDNA分子に熱安定性DNAポリメラーゼによって導入されうるジデオキシヌクレオチドとして規定される。これらのジデオキシヌクレオチドおよび誘導体は、好ましくは、約20 μM~1.0mMの濃度で使用される。かかる誘導体は、dATP、dGTP、dTTPまたはdCTPに対する置換デオキシヌクレオチドとして使用されうるチオヌクレオチド、7-デアザ-2'-dGTP、7-デアザ-2'-dATPおよびデオキシイノシントリホスフェートを含みうるが、これらに限定されない。これらのデオキシヌクレオチドおよび誘導体は、好ましくは、約4 μM~400 μMの濃度で使用される。

40

50

**【0028】**

ddNTP/dNTPの濃度および比は、より短いまたはより長いフラグメントを得るために場合により変化しうる。1/50~5/1のdNTP/ddNTPの比は鎖伸長に対して良好に働くが、これは、ランダムに分布した3'末端を有するフラグメントプールを得るために、異なる個々のテンプレートについて最適化されるべきである。これは、テンプレートの全てのヌクレオチドが類似した頻度で産物にコピーされるべきであることを可能にするために非常に重要であり、それらが互いに非常に近接しているにも関わらず、組換えるために、または2つ以上の変異を分析(dissect)するための可能性を提供する。

**【0029】**

好ましいウォークスルーバッファー系は、通常、約50~500mM、好ましくは約100~250mMの濃度でTris-HClを含む。これらのバッファー系のpH値は、使用されるポリメラーゼに依存してpH6.5~pH10.0の範囲である。MgCl<sub>2</sub>は、一般に、1.0~5.0mMの範囲の濃度でバッファー系に含まれる。KClはまた、2~80mMの濃度で含まれうる。所定の量のメルカプトエタノール(0.5~1.5%)、Tween20(0.2~0.4%)およびDMSO(1~5%)がバッファーに存在しうる。テンプレートの融点を低下しうるグリセロール、ベタイン等の他の薬剤はまた、ウォークスルーリアクションを促進するためにバッファーに含まれうる。

**【0030】**

ウォークスルーダNA合成は、テンプレートによりガイドされる鎖伸長に基づき、初期の鎖は、ポリメラーゼおよび4つのデオキシヌクレオシドトリホスフェートを用いてプライマーの3'-OH末端から合成され、ddNTP取り込み後に停止する。従って、反応は、DNAテンプレートの長さに依存しない。

**【0031】****(b) 取り込まれた鎖ターミネーターの除去**

この工程は首尾よいウォークスルーリアクションのための第2の鍵工程である。各々の新たに作製されたフラグメントの末端ヌクレオチド、または取り込まれたターミネーターは、各々のかかるフラグメントがさらなるフラグメント再構築に必要な遊離3'-OH基を得るように除去されなければならない。

**【0032】**

鎖終結分子を除去する方法は当業者に公知である。鎖終結分子は、例えば、DNAポリメラーゼにより除去され得、多くのDNAポリメラーゼは3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。この活性は、1回に単一のヌクレオチドを除去し、ヌクレオチド5'モノホスフェートを放出する。dNTPの非存在下で、この活性は、一本鎖および二本鎖のDNAの3'末端からの段階的分解を触媒する。この目的で働きうるポリメラーゼには、大腸菌ポリメラーゼIのクレノーフラグメント(Jacobsen, H., Klenow, H.およびOvergaard-Hansen, K. 1974. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from Escherichia coli and of the Large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. Eur. J. Biochem. 45:623-627. Joyce, C.M.およびGridley, N.D.F. 1983. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1830-1834)、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ(Nossal, N.G. 1984, Prokaryotic DNA replication systems. Annu. Rev. Biochem. 53:581-615. Lin, T.C., Rush, J., Spicer, E.K.およびKingsberg, W.H. 1987. Cloning and expression of T4 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7000-7004)、バクテリオファージT7 DNAポリメラーゼ(Tabor, S.およびRichardson, C.C. 1987. DNA sequencing analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:4767-4771)が挙げられる。3'末端ターミネーターは、温和条件下で非常に限定されたdNTPの存在下またはdNTPの非存在下で、3'->5' プルーフリーディング活性を有するDNAポリメラーゼによりフラグメントから除去され得る。あるいは、鎖終結分子はまた、Exonuclease IIIのようなエキソヌクレアーゼにより除去されうる。この酵素は、二本鎖DNAのホスホジエステル結合のいくつかのタイプの加水分解を触媒する多機能性酵素である。ExoIIIの主な適用は、二本鎖DNAの3'末端か

10

20

20

30

40

40

50

ら3'ヌクレオチドの放出を触媒する3'-5'二本鎖特異的エキソヌクレアーゼとしてである（Roger, S.G.およびWeiss, B. 1980. Exonuclease III of Escherichia coli K-12, an AP exonuclease. Meth. Enzymol. 65:201-211）。

#### 【0033】

ターミネーター除去反応に使用される好ましい反応バッファーは、通常、約40～200mM、好ましくは約50～100mMの濃度でTris-HClを含む。これらのバッファー系のpH値は、使用される3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素に応じてpH6.5～pH9.0の範囲である。MgCl<sub>2</sub>は、一般に、1.0～3.0mMの範囲の濃度でこれらのバッファー系に含まれる。KClもまた5～50mMの濃度で含まれうる。所定の量のメルカプトエタノール（0.5～1.5%）もまたバッファーに存在しうる。

10

#### 【0034】

反応は、通常、37℃で0.5～2.0時間で行われる。

#### 【0035】

適切なバッファー中で、かつ最適化された条件下で、熱安定性DNAポリメラーゼおよび3'->5'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性酵素を用いて、ターミネーター除去および再構築の工程もまた合わされ、その結果、別々の（B）および（C）工程が必要とされない。本発明のこの方法は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼおよび子ウシ腸アルカリホスファターゼの組換えの例で示されるように特に好ましい。

#### 【0036】

##### （C）フラグメントの再構築

20

フラグメントの再構築はPCR様反応であり、DNA変性、アニーリングおよびDNA合成のサイクルを含む。アニーリングの間、ssDNA-フラグメントはホモログ領域でハイブリダイズする。ssDNAのオーバーラップする末端は、ポリメラーゼにより伸長される。この場合、種々のポリヌクレオチド由来のssDNAランダムフラグメントは、ハイブリダイズし、遺伝子シャッフリングが起こる。遺伝子シャッフリングは、ホモログ（homologues）であるが同一でない配列間の組換えを意味する。用語「同一」は、2つの核酸配列が同一の配列または相同性配列を有することを意味する。従って、「同一の領域」は、核酸フラグメントまたはポリヌクレオチドの領域またはエリアが別のポリヌクレオチドまたは核酸フラグメントに同一または相補的であることを意味する。用語「ホモログ」は、1つの一本鎖（ss）核酸配列が相補的ss核酸配列にハイブリダイズしうることを意味する。ハイブリダイゼーションの程度は、配列間の同一性の量ならびに後述されるような温度および塩濃度等のハイブリダイゼーション条件を含む多数の因子に依存しうる。

30

#### 【0037】

再構築工程は、工程（A）の間の全ての合成されたフラグメントが、添加されるいかなるさらなるプライマーもなしに伸長について互いにプライミングので、全ウォークスループロセスにおいて最も重要な工程である。

#### 【0038】

DNAの濃度が最も重要な変数であるので、異なる濃度（高、中、低）を有する3つの別個の反応を設定することは有用である。我々の実験によれば、0.1μg～2.0μg間のDNAフラグメントの量は、通常、20～25μlの反応容積で飽和再構築結果を生じる。

40

#### 【0039】

再構築の間のデオキシヌクレオチドは、好ましくは、約100μM～400μMの濃度で使用され、選択される濃度は反応のサイクル数に依存する。

#### 【0040】

好ましい再構築バッファーは、通常、約5～50mMの濃度、好ましくは約10mMでTris-HClを含む。これらのバッファー系のpH値は、使用されるポリメラーゼに依存してpH7.5～pH10.0の範囲である。MgCl<sub>2</sub>は、一般に、これらのバッファー系に1.0～5.0mMの濃度範囲で含まれうる。KClはまた、20～80mMの濃度で含まれうる。所定の量のメルカプトエタノール（0.5～1.5%）、Tween20（0.2～0.4%）またはTriton-X100（0.1～0.5%）もまた、バッファーに存在しうる。

50

## 【0041】

典型的な再構築サイクルは3つの工程からなる：第1の工程は、二本鎖標的核酸の熱変性である。サンプル核酸の変性に必要とされる正確な条件は、サンプル核酸の長さおよび組成に依存する。典型的には、約10秒～5分間の90～100でのインキュベーションは、サンプル核酸を変性するのに効率的である。再構築反応で使用されるアニーリング温度は、約40～70であり、通常、約55～65の範囲であり、15秒～60秒の期間続く。伸長は、通常、フラグメント末端にヌクレオチドの重合を提供するのに十分な条件下で行われる。重合条件を達成するために、反応混合物の温度は、最終的に再構築されるDNAの長さに応じて、典型的には約65～75、より好ましくは68～72の範囲の温度で約15秒～2分、好ましくは30秒～1分に維持される。

10

## 【0042】

サーモサイクルの数は、テンプレートの量および最終的に再構築されるDNAの長さに応じて、約15～約55サイクルでありうる。具体的なサイクル数は、新規に合成されたフラグメントの質および量に従って容易に決定されうる。

## 【0043】

異なる合成忠実度を有するいくつかの熱安定性ポリメラーゼが、最終的に再構築された産物がどのようなエラーを有するかに応じて再構築に使用されうる。これらの酵素の各々は、再構築を促進する最適化条件下で通常使用される。目的は、得られる全長遺伝子が、多様な配列を有するが、そのほとんどが元のテンプレートDNAの配列に依然として類似していることである。

20

## 【0044】

再構築工程後に得られるこれらの配列は、従来のPCRによりさらに増幅され、発現ためのベクターにクローニングされうる。適切なベクターは当業者に公知であり、以下の参考文献Kingsman SM, Kingsman AJ. Philos Trans. R.Soc.Lond B. Biol.Sci. 1989, 324(1224):477-485; Bailey JE. Adv.Biochem. Engl.Biotechnol. 1993, 48:29-52に記載されるベクターは参考として本明細書中に援用される。適切な発現系は当該分野で公知であり、以下の参考文献Shatzman AR, Rosenbrg M. Methods Enzymol. 1987; 152:661-73に記載される発現系は参考として本明細書に援用される。発現変異のスクリーニングまたは選択は、改善された、新規でさえある特異的機能を有するバリエントにいたるはずである。適切なスクリーニングおよび選択系は当該分野で公知であり、以下の参考文献に記載されるスクリーニングおよび選択系はKuchner O, Arnold FH. Trends Biotechno. 1997 Dec; 15(12):523-30; Patel PH, Loeb LA. Procc.Natl.Acad.Sci.USA, 2000年5月9日; 97(10):509-5100は本明細書中に援用される。これらのバリエントは、実際の問題の部分的解法としてすぐに使用されうるか、それらは定方向進化のさらなるサイクルに関する新規出発点として働きうる。

30

## 【0045】

コンビナトリアルカセットおよびオリゴヌクレオチド定方向変異誘発 (Reidhaar-Olson, J.F. および Sauer, R.T. 1988. Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. Science 241:53-57; Oliphant, A.R., Nussbaum, A. L., および Struhl, K. 1986. Cloning of random-sequence oligodeoxy-nucleotides. Gene 44: 173-183, Hermes, J.D., Blacklow, S.C. および Knowles, J.R. 1990. Searching sequence space by definably random mutagenesis - improving the catalytic potency of an enzyme. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87:696-700)、誤りがちなPCR (Leung, D.W., Chen, E. および Goeddel, D.V. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. BioTechnique 1:11-15; Chen K. および Arnold, F.H. 1993. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5681-5622)、またはDNA「シャッフリング」 (Stemmer, W.P.C. 1994a. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature, 370: 389-391; Stemmer, W.P.C. 1994b. DNA shuffling by random

40

50

fragmentation and reassembly-in vitro recombination for molecular evolution. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:10747-10751) 等のタンパク質最適化のために使用される他の技術と比べて、このウォークスルーに基づく技術は、インビトロタンパク質最適化にいくらかの利点を示す。

#### 【0046】

(1) ウォークスルー合成に使用されるテンプレートは、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかでありうるので、DNA「シャッフリング」(Stemmer,W.P.C. 1994a. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature, 370: 389-391;)のテンプレートとして二本鎖ポリペプチドを使用する必要があるという1つの限定は、もはや存在しない。本明細書に記載される技術を用いて、任意の潜在的な変異および/またはクロスオーバーが、種々のDNA依存性DNAプライマーを用いることによりDNAレベルで、または種々のRNA依存性DNAプライマーを用いることによりmRNAレベルから直接的にさえ導入されうる。このことは、タンパク質特異的機能を最適化する目的を達成するためのより多くの機会および現実性を提供する。10

#### 【0047】

(2) ランダムなフラグメントを得るためにDNase Iを用いて二本鎖DNAテンプレートのフラグメント化を必要とするDNA「シャッフリング」手順(Stemmer,W.P.C. 1994a. Nature, 370: 389-391; Stemmer,W.P.C. 1994b. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 91:10747-10751)とは異なり、本明細書に記載される技術は、ウォークスルー合成を使用して、さらなる再構築のための「増殖プロック」としてランダムに分配された3'末端を有するサイズ制御可能なDNAを得る20(図1)。

#### 【0048】

(3) ウォークスルー鎖は、位置ごとに各々停止するフラグメントの集団であるので、それらは位置的好ましさにおいて均一であり、配列バイアスを欠如する。配列不均一性は両方を可能にし、変異およびクロスオーバーは、例えば、誤りがちなPCRまたはDNA「シャッフリング」を用いるよりもランダムに起こりうる。

#### 【0049】

(4) 通常の誤りがちなPCRおよびDNAシャッフリングは、それらが互いに非常に近い場合、2つ以上の変異を効率よく組換えるかまたは分析(dissect)することができない。(Stemmer,W.P.C. 1994a. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature, 370: 389-391;)。対照的に、ウォークスルーアプローチは、テンプレートの全ての位置で生じる組換えを可能にし、したがってそれらが互いに非常に近い場合でさえも2つ以上の変異を組換えまたは分析する可能性を提供する。30

#### 【0050】

(5) ウォークスルーDNA合成は、テンプレートにより導かれる鎖伸長に基づき、初期鎖は、ポリメラーゼおよび4つのデオキシヌクレオシド三リン酸を用いてプライマーで3'-OH末端から合成され、ddNTP取り込みの後停止する。したがって、この反応は、DNAテンプレートの長さに依存しない。これは、小さなペプチドまたは大きな酵素あるいは酵素経路の遺伝子工学のために特に有用である。

#### 【0051】

(6) DNase Iは、二本鎖DNAを好ましくはピリジンヌクレオチドに隣接する部位で加水分解するエンドヌクレアーゼであるので、DNAシャッフリング(Stemmer,W.P.C. 1994a.. Nature, 370: 389-391; Stemmer,W.P.C. 1994b. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:10747-10751)におけるその使用は、テンプレート遺伝子消化の工程で偏り(特に、高G+Cまたは高A+T含量を有する遺伝子について)を生じうる。全体の変異率および組換え頻度におけるこの潜在的バイアスの効果はまだ調査されていないが、ウォークスルーアプローチを用いることにより避けられうる。40

#### 【0052】

(7) 十数個のポリメラーゼが現在入手可能であるので、ランダムに分配された3'末端を有する初期DNAフラグメントの合成は、より種々の様式で達成されうる。例えば、バク

テリオファージT4 DNAポリメラーゼ(Nossal,N.G. 1974.J.Biol.Chem.249:5668-5676)またはT7シークエナーゼバージョン2.0 DNAポリメラーゼ(Tabor,S.およびRichardson,C.C.1987. Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,84:4767-4771,Tabor,S.およびRichardson,C.C.1989.J.Biol.Chem.264; 6447-6458)および/または熱安定性DNAポリメラーゼは、ウォークスルー合成のために使用されうる。

#### 【0053】

一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートのために(特にRNAテンプレートのために)、ウォークスルー合成について逆転写酵素が好ましい。この酵素は、3'->5'エキソヌクレアーゼ活性を欠如するので、したがって、エラーの傾向がある。高濃度のdNTPおよびMn<sup>2+</sup>の存在下で、500ごとに約1塩基が間違って取り込まれる(Sambrook,J., Fritsch,E.F.およびManiatis,T.1989. Molecular cloning:A Laboratory Manual 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)。

#### 【0054】

(8) 本発明者らの技術における重要な工程の1つは、ウォークスループロセスの間に合成される初期一本鎖DNAの3'末端を調節することである。一定の条件下で、この工程は、効率のよい末端および/または内部挿入/欠失に使用され、種々のサイズを有する分子を生じうる。標的分子サイズの効率的のよい変更は、誤りがちなPCRまたはDNAシャッフリングを介しては通常達成できない。

#### 【0055】

(9) 反応条件を改変することにより、初期短鎖DNAフラグメントに対する熱安定性ポリメラーゼを用いるウォークスルー合成に対してPCRが調整されうる。ウォークスルー合成にPCRを適合させることにより、より多くの初期DNAフラグメントに対するより多くの便利な方法が提供され、本発明者らの技術をより確固としたものにする。

#### 【0056】

しかしながら、本発明の本方法は、それが有利であるような場合、当該分野の他の公知の方法とあわされうる。

#### 【0057】

ウォークスルーDNA合成は、Bacillus subtilis BMTU3420サルコシンオキシダーゼ遺伝子に対して変性した線状二本鎖DNA(例えば、ゲル電気泳動により精製された制限フラグメント)からのランダムに分配された3'末端を有するDNAフラグメントの作製に使用された。モル過剰のプライマーを用いて混合した精製DNAを変性させ、次にStoffelフラグメントを用いて合成を行なった。この酵素は、5'->3'エキソヌクレアーゼ活性を欠如するので、ウォークスルー産物を伸長によりもっぱら合成し、エキソヌクレアーゼにより消化しなかつた(例えば、実施例1)。

#### 【0058】

ウォークスルー組換え技術は、ヒト胎盤アルカリホルファーゼおよびウシ腸アルカリホルファーゼを組換える別の例を用いてさらに証明される。(実施例2を参照)。実施例2では、鎖末端を除去する工程およびフラグメント再構築工程の工程が同時になされうる。

#### 【0059】

本明細書に記載された技術は、広範囲の適用において最適な挙動に関する潜在的に有用な触媒の巨大な空間を調査するため、ならびに基礎の構造・機能研究のための新規酵素を開発するかまたは発展させるために使用されうる。

#### 【0060】

本明細書に記載されるほとんどの実験条件は、天然酵素、酵素経路の一部(または全部)、ならびに他の生体分子を最適化するためにほとんど改変することなく潜在的に使用されうる。例えば、タンパク質分解活性の減少、アクチベーター遺伝子のプローピング、分泌機構の増強、または他の基本的な酵素遺伝子工学問題の解決に関しては、本明細書に記載の技術が、直接の適用を見出しうる。

#### 【0061】

10

20

30

40

50

このプロトコルは、テンプレートとしてDNA依存DNAポリメラーゼおよび一本鎖DNAを用いることを記載する一方、別のプロトコルはまた、テンプレートとして一本鎖RNAの使用に適している。テンプレートとして特異的酵素mRNAおよび触媒としてRNA-依存DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)を使用することにより、本発明者らのアプローチは、cDNAクローニングに変異およびクロスオーバーを導入するように、およびmRNAレベルから分子多様性を直接作製して酵素機能の最適化の目的を達成するように改変されうる。逆転写酵素は、トリ骨髓芽球症ウイルス(AMV)またはモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)などのレトロウイルスに由来し、それらを使用してRNAゲノムのDNAコピーを作製する。AMVおよびMMLV逆転写酵素(Verma IM. The reverse transcriptase. Biochim. Biophys. Acta. 1977 Mar. 21;473(1):1-38. Roth MJ. Tanese N. Goff SP. Gene product of Moloney murine leukemia virus required for proviral integration is a DNA-binding protein. J. Mol. Biol. 1988; 203(1):131-9)は、RNA指向DNAポリメラーゼとして主に使用される。特異的には、デオキシオリゴヌクレオチドは、RNA(通常メッセンジャーRNA)テンプレートの伸長のためのプライマーとして使用され、相補的なDNAを作製する。

## 【0062】

## 実施例1

1. 適切な制限エンドヌクレアーゼを有する目的のDNAおよび目的の精製DNAフラグメントを、Roche High Pure PCR Prep Kit(Roche Diagnostics GmbH, Germany))を用いてゲル電気泳動により精製した。1つの例として、*Bacillus subtilis* BMTU3420 サルコシンオキシダーゼ遺伝子を組換えプラスミドpBMTU5823から1.2kb長PstI-NsiIフラグメントとして切断した。

## 【0063】

2. H<sub>2</sub>Oに溶解した約0.5pmolの二本鎖DNAを、SODF1、SODF2、SODR1およびSODR2プライマーそれぞれの0.1pmolと混合した。3分間、沸騰水中で浸漬した後、ただちに混合物を氷/エタノール浴に配置した。

## 【0064】

3. 10μlの10×反応バッファー[10×バッファー：900mMのHEPES、pH6.6；0.1Mの塩化マグネシウム、10mMのジチオトレイル、5mMの各dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、ならびに2mMの各ddATP、ddCTP、ddGTPおよびddTTP]を変性サンプルに添加し、反応混合物の全容積をH<sub>2</sub>Oで98μlにした。

## 【0065】

4. 10ユニット(約2μl)のStoffelフラグメントを添加した。チューブの外側を穏やかにタッピングすることにより全ての成分を混合し、マイクロフュージ(microfuge)中で1~2秒間12,000gで遠心分離して、全ての液体を底に移動させた。標準のためのTaq DNA配列決定キットおよびサイクル配列決定キット(Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた標準PCRサイクル配列決定条件下で反応を行った。

## 【0066】

5. Wizard DNAクリーンアップシステム(Promega, WI, USA)、に反応産物を供し、酵素、プライマー、反応バッファー成分およびdNTP/ddNTPを除去した。精製した産物を1×クレノウバッファーおよび10Uのクレノウ中で37℃で40分間インキュベートした。2μlのDpn I(10U/μl)を混合物に添加し、インキュベーションを37℃でさらに40分間続けた。

## 【0067】

6. 消化したウォータースルーパーフォームをHigh Pure PCR精製キット(Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いて精製し、全体の遺伝子の再構築のために使用した。

## 【0068】

## 全体の遺伝子の再構築

1. PCRによるSarcOD遺伝子の再構築のために、5μlの精製したウォータースルーパーフォームフラグメント、20μlの2×PCRブレミックス(5倍希釈のクローニングPfuバッファー、0.5mMの各dNTP、0.1U/μlのクローニングPfuポリメラーゼ(Stratagene La Jolla CA))および15μlのH<sub>2</sub>Oを氷上で混合した。

## 【0069】

2. 96 で5分間のインキュベーション後、それぞれ95 で1.0分間、55 で1.0分間および72 で0+5秒 / サイクル、Eppendorf Mastercycler Gradient(Eppendorf, Germany) 中で72 で10分間続行する最終サイクルの伸長工程で40サーモサイクルを行った。

## 【0070】

3. 20、30、および40サイクルで $3\mu\text{l}$ のアリコートを反応混合物から取り出し、アガロースゲル電気泳動により解析した。40サイクルで再構築したPCR産物は、より大きいサイズおよびより小さいサイズのスミア中に正しいサイズの産物を含んでいた。

## 【0071】

増幅

10

この最初のPCRの正しく再構築した産物を、テンプレートDNAの末端に相補的なPCRプライマーを含む第2のPCR反応においてさらに増幅した。

## 【0072】

1. それぞれ $0.2\mu\text{M}$ のpstF(5'GGTAGAGCGAG-TCTCGAGGGGAGATGC3'、配列番号：1)およびNsiR(5'AGCCGGCGTGACGTGGGTCAAGC3'、配列番号：2)のプライマー、 $1.5\text{mM}$ の $\text{MgCl}_2$ 、 $10\text{mM}$ のTris-HCl[pH9.0]、 $50\text{mM}$ のKCl、それぞれ $200\mu\text{M}$ の4個のdNTP、2.5UのTaqポリメラーゼ(Roche, Germany)、および2.5UのPfuポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA)を含む $2.0\mu\text{l}$ のPCR再構築アリコートを、 $100\mu\text{l}$ 標準PCR反応におけるテンプレートとして使用した。

。

## 【0073】

20

2. 96 で5分間のインキュベーション後、エッペンドルフマスタークラーグラジエント(Eppendorf GmbH Germany)においてそれぞれ95 で1.0分、および72 で1.0分と、72 で10分続くラストサイクルの伸長工程と共に、30サーモサイクルを行なった。

## 【0074】

3. 増幅により、サルコシンオキシダーゼ全遺伝子の正しいサイズの大量のPCR産物が生じた。

## 【0075】

クローニング

1. Bs SarcOD遺伝子のPCR産物をPstIおよびNsiI制限酵素を用いて消化し、pBMTU5823(PstI/NsiI)にクローニングした。

30

## 【0076】

2. 大腸菌XL1 F' 細胞を上記ライゲーション混合物を用いて形質転換し、変異体ライブラーを形成した。

## 【0077】

結果：

野生型SarcOD遺伝子のこの技術の1ラウンドのみの適用後、2つのHind IIIおよびPvu II耐性変異体が酵素的に活性であることが見出された。

## 【0078】

実施例 2

ヒト胎盤アルカリホスファターゼおよび子ウシ腸アルカリホスファターゼ遺伝子の組換え

40

## 1. 方法の説明

ウォークスルー組換えは、2つ以上のDNA配列をそれらの相同性に基づいて組換えるために使用される方法である。さらなる点変異もまた、組換え工程の間に導入されうる。この方法は、主に5つの工程：

フラグメント合成

テンプレート除去

ターミネーター除去

再構築

増幅

50

からなる。

**【0079】**

**1.1 フラグメント合成**

フラグメント合成はDNA合成反応から生じ、伸長はジデオキシヌクレオチドの取り込みにより終結される。組換えのために選択される標的DNA配列は、この反応におけるテンプレートとして役に立つ。プライマーの数は、標的DNA配列の長さおよび得られるフラグメントの長さに依存して選択されるべきである。フラグメントの長さはまた、反応条件により調節されうる。さらに、「サイクル配列決定反応」は、そのより高い産物収率および簡単な使用のために好ましい。

**【0080】**

**1.2 テンプレート除去**

再構築工程の妨害を避けるために、フラグメント合成後、テンプレートDNAを完全に除去する必要がある。この目的のために、いくつかの方法が使用されうる。本発明者らは、U-DNAおよびウラシル-DNAグルコシラーゼの使用を選択した。ウラシル-DNAグリコシラーゼを使用して、デオキシリジレートが取り込まれている部位(U-DNA)でウラシル塩基を除去することができる。得られる非塩基性(abasic部位は、続いてアルカリ処理、高温または特異的エンドヌクレアーゼにより加水分解されうる。本発明者らのアプローチでは、単純な温度処置で十分である。U-DNAは、dTTPの変わりにdUTPを使用するPCR反応により調製されうる。U-DNAはフラグメント合成に対するテンプレートとして役に立った後、全ての反応がウラシル-DNAグリコシラーゼ処理および温度処理に供される。別の対照PCRを用いて完全なU-DNA除去を確認しうる。

10

**【0081】**

**1.3 ターミネーター除去**

再構築反応のために、フラグメントは3'-OH末端を有する必要がある。本発明者らのフラグメントはジオキシヌクレオチドで終結されるので、このフラグメントは3'-OH末端を保有しない。これらのターミネーターは、数個のヌクレアーゼまたはDNAポリメラーゼの3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性により除去され、3'-OH末端を生じうる。本発明者らは、この工程のために熱安定性エキソヌクレアーゼIIIおよびTaqポリメラーゼを使用することによりターミネーター除去と再構築とを合わせる。エキソヌクレアーゼIIIは、その3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性(dsDNAでのみの酵素活性、およびしたがってDNAアニーリング後ののみの酵素活性)によりターミネーターを切断し、Taqポリメラーゼは、その5'-3'-ポリメラーゼ活性によりフラグメントを伸長する。

20

**【0082】**

**1.4 再構築**

再構築は、プライマー無しのPCR様反応であり、フラグメントはそれぞれ互いにその相同意に基づいてアニールし、伸長する。変性の全サイクルを通して、アニーリングおよび伸長フラグメントが、オリジナルDNA配列の長さまで増殖または再構築する。

30

**【0083】**

**1.5 増殖**

再構築したDNAの増殖は、配列クローニングおよび解析工程に十分な材料を提供するために、配列隣接プライマーを用いるPCRにおいて生じる。

40

**【0084】**

**2. 実験プロトコル**

**2.1 U-DNAの調製**

dUTP含有DNAテンプレートを、マニュアル(「ウラシル-DNAグルコシラーゼ」Roche # 1444 646)に従って2.5mM MgCl<sub>2</sub>、600 μM dUTP、および3つの他のヌクレオチドdATP、dTTPおよびdGTPをそれぞれ200 μMで用いるPCRにより作製する。アルカリホスファターゼを組換えるために使用される典型的な反応混合物およびサイクル条件を以下に示す。

テンプレートDNA(プラスミド) 40ng

プライマーAPhpAF 20pmol

50

プライマー APxbaR 20pmol  
 10×Taq プッファー (Puffer) 10 μl  
 Taq DNAポリメラーゼ 0.5U  
 $Mg_2Cl_2$  2.5mM  
 dATP, dCTP, dGTP (Roche # 1 969 064) 各 0.2mM  
 dUTP (Roche # 1 420 470) 0.6mM  
 H<sub>2</sub>O 100 μlまで

## 【0085】

サイクル条件:

95 °C	5 分
95 °C	1 分
60 °C	1 分
72 °C	2 分
72 °C	10 分
4 °C	∞

10

## 【0086】

合成したU-DNAを、調製用アガロースゲル電気泳動 (1% アガロース / TAE) およびゲル抽出 ('QIAquickゲル抽出キット' Quiagen # 28706)によりテンプレートDNAから分離する 20  
。

## 【0087】

## 2.2 フラグメント合成

いくつかの改変を有するサイクル配列決定反応 (標準およびサイクル配列決定のための 'DIG Taq DNA配列決定キット' Roche # 1449443) を用いてフラグメントを合成する。12 個の反応混合物を、全 6 個のプライマーおよび 2 個のU-DNAテンプレートに対してセットする。2つのアルカリホスファターゼ遺伝子を組換えるために使用されるサイクル条件での典型的な反応混合物を以下に示す。

U-DNA 175ng  
 プライマー (1 μM) 1pmol  
 プッファー 3 μl  
 Taq DNAポリメラーゼ (5U/ μl) 0.6 μl  
 終結混合物 ddATP/dGTP 2.5 μl  
 終結混合物 ddCTP/dGTP 2.5 μl  
 終結混合物 ddGTP/dGTP 2.5 μl  
 終結混合物 ddTTP/dGTP 2.5 μl  
 H<sub>2</sub>O 30 μlまで

30

## 【0088】

サイクル条件:

95 °C	5 分
95 °C	30 秒
60 °C	30 秒
72 °C	1 分
4 °C	∞

40

## 【0089】

子ウシ腸アルカリホスファターゼ遺伝子 (ciap) およびヒト胎盤アルカリホスファターゼ遺伝子 (hpap) は、81% の配列類似性を示し、約 1530bp 長を有する。6 個のプライマーをフラグメント合成に使用する。2つの外部プライマー (APhpaF および APxbaR) は、同じ配列を 50

共有する。図2は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ(hpap)および子ウシ腸アルカリホスファターゼ(ciap)遺伝子に沿ったプライマーアレンジメントを示す。

### 【0090】

#### プライマー配列

##### 隣接プライマー

APhpaf	CTT CGG CGT TCA GTA ACA CGC (配列番号:3)	10
ApxbaR	GCT TTC GAG GTG AAT TTC GAC C (配列番号:4)	

##### ciap遺伝子のプライマー

CIAPint1F	GGT CAC GTC TGT GAT CAA CCG (配列番号:5)	20
CIAPint1R	CGG TTG ATC ACA GAC GTG ACC (配列番号:6)	
CIAPint2F	CGC AAA GCT TAT ATG GCA CTG AC (配列番号:7)	
CIAPint2R	GTC AGT GCC ATA TAA GCT TTG CC (配列番号:8)	

##### hpap遺伝子のプライマー

HPApint1F	CCA AGA AAG CAG GGA AGT CAG TG (配列番号:9)	30
HPApint1R	CAC TGA CTT CCC TGC TTT CTT GG (配列番号:10)	
HPApint2F	CAT GTT CGA CGA CGC CAT TGA G (配列番号:11)	
HPApint2R	CTC AAT GGC GTC GTC GAA CAT G (配列番号:12)	

### 【0091】

#### 2.3 ウラシル-DNAグリコシラーゼ処理および温度処理

この工程は、各フラグメント合成混合物への1μlのウラシル-DNAグリコシラーゼ(1U/μl; Roche, # 1775375)の添加、およびU-塩基の切断のための37℃で4時間のインキュベーション、続く非塩基性部位の加水分解および酵素の活性化のための95℃で2分間のインキュベーションにより達成される。別のPCRが、テンプレートU-DNAの完全な除去を制御するために使用されうる。

### 【0092】

#### 2.4 再構築

重大な再構築工程において適量の精製DNAを使用することが重要である。DNAフラグメントは、Microcon(Microcon50; Millipore # 42415)を用いることにより切断生成物から精製され、H<sub>2</sub>O中に残っている。2つのアルカリホスファターゼ遺伝子を組換えるために使用される典型的な混合物およびサイクル条件を以下に示す。

精製フラグメント	x μl (適量)
dNTP(Roche # 1 969 064)	各0.4mM
Expand High Fidelity10×バッファー(Roche # 1 759 175)	5 μl
Taq/Exo IIIミックス	1U
H <sub>2</sub> O	50 μlまで

### 【0093】

30サイクル後、さらなる再構築のための反応混合物に、1μlのTaq / ExoIIIを添加する。

## 【0094】

サイクル条件:

95 °C	5 分		
95 °C	1 分		
45 °C	1 分	50 サイクル	
72 °C	30 秒		
72 °C	10 分		
4 °C	∞		

## 【0095】

10

## 2.5 増幅PCR(対照PCRとしても使用した)

増幅PCRは、2つの配列隣接プライマー(AphpaFおよびApxbaR)を用いる標準的PCRである。以下は、2つのアルカリホスファターゼ遺伝子を組換えるために使用されるサイクル条件での典型的な混合物である。

## 【0096】

再構築混合物	0.5 μl
プライマー APhpaF	10pmol
プライマー APxbaR	10pmol
10 × Taq プッファー (+ Mg; Roche # 1 271 318)	5 μl
Taq DNAポリメラーゼ(Roche # 1 418 432)	2.5U
dATP, dCTP, dGTP, dTTP(Roche # 1 969 064)	各0.2mM
H <sub>2</sub> O	50 μlまで

## 【0097】

20

サイクル条件:

95 °C	5 分		
95 °C	1 分		
60 °C	1 分	30 x	
72 °C	2 分		
72 °C	10 分		
4 °C	∞		

30

## 【0098】

## 2.6 クローニングおよび発現

増幅産物を、調製用ゲル電気泳動(1%アガロース／TAE)およびゲル抽出(「QIAquickゲル抽出キット」Qiagen # 28076)により精製し、供給者のマニュアルに従ってベクターpCR(登録商標)-XL-TOP0(登録商標)(Invitrogen # K475020)にクローン化し、ベクターと共に送達した大腸菌TOP 10細胞に発現させる。

## 【0099】

## 2.7 配列決定結果

40

9個の組換えクローンを、1つの配列決定用プライマーを用いる配列決定により解析した。結果を表1に要約する。これらのクローンの8個は、配列決定領域内(445～645bp)に1つ以上の組換え事象を示す。1つのバリエントは、上記領域内に4つのクロスオーバーを含む。全体の変異率は、約0.25%である。再構築産物は、ベクターに2つの異なる配向でライゲートされ得、1つのプライマーのみを用いるこれらのクローンの配列決定は、N-末端の配列およびC-末端の領域のコーディングの両方を与えた。

## 【0100】

クローン	配列決定の方向	配列決定した領域の長さ	クロスオーバー	変異	
AP 1	N-末端	509 bp	1	1	
AP 3	N-末端	445 bp	1	0	
AP 5	N-末端	624 bp	4	3	
AP 6	N-末端	553 bp	1	1	
AP 11	N-末端	599 bp	2	1	
AP 15	N-末端	528 bp	1	2	
AP 2	C-末端	645 bp	1	3	
AP 9	C-末端	639 bp	0	1	
AP13	C-末端	638 bp	2	1	10

表1： 2つのアルカリホスファターゼ遺伝子の組換え後の配列決定の結果

【0101】

## 2.8 配列

図3は、親ciapおよびhpap遺伝子のN-末端配列アラインメントおよびそれらの組換えバリエント(AP01、AP03、AP05、AP06、AP11およびAP15)を示す。

【0102】

図4は、親親ciapおよびhpap遺伝子のC-末端配列アラインメントおよびそれらの組換えバリエント(AP2、AP9およびAP13)を示す。

【0103】

図5は、hpap、ciap、AP01、AP03、AP05、AP06、AP11、AP15、AP2、AP9およびAP13の配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】図1は、ランダムに分配された3'末端を有するフラグメントの作製のためのdNTP/ddNTPを用いた一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートのウォータースルーリー、3'末端からのddNMPの除去、DANNポリメラーゼの存在下でのサーモサイクルによる全長DNAの再構築、ならびにさらなるクローニングおよびスクリーニングのための従来のPCRによる再構築した産物の増幅を示す。

【図2】図2は、ヒト胎盤アルカリホルファターゼ(hpap)およびウシ腸アルカリホルファターゼ(ciap)遺伝子に沿ったプライマーアレンジメントを示す。

【図3】図3は、親ciapおよびhpap遺伝子およびその組換えバリエント(AP01、AP03、AP05、AP06、AP11およびAP15)のN-末端配列アラインメントを示す。

【図4】図4は、親親ciapおよびhpap遺伝子およびその組換えバリエント(AP2、AP9およびAP13)のC-末端配列アラインメントを示す。

【図5】図5は、hpap、ciap、AP01、AP03、AP05、AP06、AP11、AP15、AP2、AP9およびAP13の配列を示す。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> A walk-through technique for in vitro recombination of  
polynucleotide sequences

<130> 19061-Koe

10

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial primer

20

<400> 1

ggtagagcga gtctcgaggg ggagatgc

28

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial primer

30

<400> 2

agccggcggtg acgtgggtca gc

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 3

c<sub>t</sub>t<sub>c</sub>g<sub>g</sub>cg<sub>t</sub>tt c<sub>a</sub>gtaaacacg c

21

<210> 4

<211> 22

10

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 4

g<sub>c</sub>t<sub>t</sub>t<sub>c</sub>gagg t<sub>g</sub>aatttcga cc

22

<210> 5

<211> 21

20

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 5

g<sub>g</sub>t<sub>c</sub>acgtct gtgatcaacc g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

30

<213> Artificial primer

<400> 6

c<sub>g</sub>g<sub>t</sub>t<sub>g</sub>atca c<sub>a</sub>gacgtgac c

21

<210> 7  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial primer

<400> 7  
cgcaaaggctt atatggcact gac 23

<210> 8 10  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial primer

<400> 8  
gtcagtgccca tataagcttt gcc 23

<210> 9 20  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial primer

<400> 9  
ccaagaaaagc agggaaagtca gtg 23

<210> 10  
<211> 23 30  
<212> DNA  
<213> Artificial primer

<400> 10  
cactgacttc cctgcttct tgg

23

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 11  
catgttcgac gacgccattg ag

10

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 12  
ctcaatggcg tcgtcgaaca tg

20

22

<210> 13

<211> 700

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase

<400> 13  
gttaaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag  
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgcgcgtat ggcaagtctg ttatccggcg  
cgcacgcgca cgccggcgatc ccagttgagg aggagaaccc ggacttctgg aaccgcgagg  
cagcccgaggc cctgggtgcc gccaaagaagg tgcagacctgc acagacagcc gccaaagaacc

60

30

120

180

240

aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agatacccat ggcacatggac cgcttcccat 360  
 atgtggctct gtccaagaca tacaatgttag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420  
 ccacggccta cctgtgcggg gtcaaggca acttccagac catggcttg agtgcagccg 480  
 cccgotttaa ccagtgcac acgacacgacg gcaacgaggt catctccgtg atgaatccgg 540  
 ccaagaaaagc aggaaagtca gtgggagtgg taaccaccac acgagtgcag cacgcctcg 600  
 cagccggcac ctacgcac accgtgaacc gcaactggta ctggacgac gacgtgcctg 660  
 cctcgccccg ccaggagggg tgccaggaca tcgctacgca 700

10

<210> 14  
<211> 700  
<212> DNA  
<213> Calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 14  
 gtaaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cttacataat aaaaccggag 60  
 ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgcgtgtat ggcaagtctg ttattccggg 120  
 20  
 cccacgcgca cgcggcgatc ccagctgagg aggaaaaaccc cgccttcgg aaccgccagg 180  
 cagcccaggc ctttgcgtgtat gccaagaagt tgcagccat ccagacagct gccaagaatg 240  
 tcatcctctt cttggggat gggatggggg tgccctacggt gacagccact cggatcctaa 300  
 agggcagat gaatggcaaa ctgggacctg agacaccctt ggcacatggac cagttcccat 360  
 acgtggctct gtccaagaca tacaacgtgg acagacaggt gccagacagc gcaggcactg 420  
 ccactgccta cctgtgtggg gtaaggca actacagaac catcggtgtt agtgcagccg 480  
 cccgctacaa tcagtgcac acgacacgtg ggaatgaggt cacgtctgtt atcaaccggg 540  
 30  
 ccaagaaaagc aggaaaggcc gtgggagtgg tgaccaccac caggggtgcag catgcctccc 600  
 cagccggggc ctacgcac accgtgaacc gaaactggta ctccagacgac gacctgcctg 660  
 ctgatgcaca gaagaatggc tgccaggaca tcgcccaca 700

30

<210> 15

<211> 509

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 15

gttaacgtgc tgaacagccg ggcattttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag	60	
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtat ggcaagtctg ttattcgggg	120	10
cccacgcgca cgccggcgatc ccagttgagg aggagaaccc ggacttctgg aaccgcgagg	180	
cagccaaggc cctgggtgcc gccaagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccaagaacc	240	
tcatcatott cctgggcgat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa	300	
aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggcacatggac cgcttccat	360	
atgtggctct gtccaagaca tacaatgttag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag	420	
ccacggccta cctgtgcggg gtcaaggca acttccagac cattggcttg agtgcagccg	480	
cccgcttaa ccagtgcAAC acgacacgc	509	20

<210> 16

<211> 445

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 16

gttaacgtgc tgaacagccg ggcattttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag	60	30
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtat ggcaagtctg ttattcgggg	120	
cccacgcgca cgccggcgatc ccagttgagg aggagaaccc ggacttctgg aaccgcgagg	180	
cagccaaggc cctgggtgcc gccaagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccaagaacc	240	

tcatcatctt cctggcgat gggatgggg tgcgtacggt gacagctgcc aggatcctaa · 300  
 aaggcgagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgcttccat 360  
 atgtggctct gtccaagaca tacaatgttag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420  
 ccacggccta cctgtgtggg gtcaa 445

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 624

&lt;212&gt; DNA

10

&lt;213&gt; Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 17  
 gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag 60  
 ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgcccgtat gttaacgtgc tgaacagccg 120  
 ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag ctaccatgaa taagaaggta 180  
 ctgacccttt ctgcccgtat gccaagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccaagaacc 240  
 tcgtcatctt cctggcgat gggatgggg tgcgtacggt gacagccact cggaccctaa 300  
 aaggcgagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgcttccat 360  
 atgtggctct gtccaagaca tacaacgtgg acagacaggt gccagacagt ggagccacag 420  
 ccacggccta cctgtgtggg gtcaaggggca acttccagac cattggcttg agtgcagccg 480  
 cccgctttaa ccagtgcac acgacacgcg gcaacgaggt catctccgtg atgaatcggg 540  
 ccaagaaagc agggaaagtca gtggggagtgg taaccaccac acgagtgcag cacgcctcgc 600  
 cagccggcac ctacgccccac acgg 624

20

30

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 553

&lt;212&gt; DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 18  
gttaacgtgc tgaacagccg ggcattttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag 60  
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcggcg . 120  
cgcacgcgca cgccggcgtat ccagttgagg aggagaaccc ggacttctgg aaccgcgagg 180  
cagccaaggc cctgggtgcc gccaagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccaagaacc 240  
tcatcatctt cctgggcgtat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa 300 10  
aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgcttcccat 360  
atgtggctct gtccaagaca tacaatgttag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420  
ccacggcccta cctgtgcggg gtcaaggcgtat ccgttccat cattggatgg agtgcagccg 480  
cccgctttaa ccagtgcac acgacacgcg gcagcggatgt catctccgtg atgaaccggg 540  
ccaaagaaagc agg 553

<210> 19

<211> 599

20

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 19  
gttaacgtgc tgaacagccg ggcattttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag 60  
ctaccatgaa taagaaggta ttgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcggcg . 120  
cgcacgcgca cgccggcgtat ccagttgagg aggagaaccc ggacttctgg aaccgcgagg 180 30  
cagccaaggc cctgggtgcc gccaagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccaagaacc 240  
tcatcatctt cctgggcgtat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa 300  
aagggcagat gaatggcaaa ctgggacctg agacacccctt ggccatggac cagttcccat 360

acgtggatct gtccaaagaca tacaatgtag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420  
 ccacggccta cctgtgcggg gtcaaggca acttccagac cattggcttg agtgcagccg 480  
 cccgcttaa ccagtgcaac acgacacgctg gcaacgaggt catctccgtg atgaatcggg 540  
 ccaagaaaagc agggaaagtca gtgggagttgg taaccaccac acgagtgcag cacgcctcg 599

<210> 20

<211> 528

10

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline

<400> 20  
 gttaccgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag 60  
 ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcgggg 120  
 cccacgcgca cgccggcgatc ccagctgagg aggaaaaccc cgccttctgg aaccgccagg 180  
 cagcccaggc ctttgatgtt gccaagaagt tgccagccat ccagacagct gccaagaatg 240  
 tcatcctctt cttggggat gggatggggg tgtctacggt gadagctgcc aggatcctaa 300  
 aaggccagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgcttcccat 360  
 atgtggctct gtccaaagaca tacaatgtag acaaacatat gccagacagt ggagccacag 420  
 ccacggccta cctgtgcggg gtcaaggca acttccagac cattggcttg agtgcagccg 480  
 cccgcttaa ccagtgcaac acgacacgctg gcaacgaggt catctcccg 528

<210> 21

<211> 606

30

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase

<400> 21  
 cttccctgga cccgtatgtt acccatctca tgggtctctt tgagcctgga gacatgaaat 60

acgagatcca	ccgagactcc	acactggacc	cctccctgat	ggagatgaca	gaggctgcc	120
tgcgcctgct	gaggcaggAAC	ccccggggCT	tcttccttT	cgtggaggGT	ggtcgcATCG	180
accatggtca	tcatgaaAGC	agggcttacc	gggcactgac	tgagacgatc	atgttcgacG	240
acgccattga	gagggcgGGG	cagtcacca	gcgaggagGA	cacgctgAGC	ctcgtaCTG	300
ggtcctccta	tacggaaACG	gtccaggCTA	tgtgctcaAG	gacggcgccc	ggcaggatGT	360
tacggagAGC	gagagcgGGG	gecccgAGTA	tcggcAGCAG	tcagcAGTGC	ccctggACGA	420
agagacccAC	gcaggcgAGG	acgtggggT	gttcgcgcGC	ggcccgCAGG	cgcacdtGGT	480
tcacggcgtq	caggAGCAGA	ccttcataGC	gcacgtcatG	gcattcgccc	cctgcctGGA	540
gcctacacc	gcctgcgACC	tggcgcccc	cgccggcAcc	accgactgat	aaaagcttGG	600
tctaga						606
 						10
<210>	22					
<211>	707					
<212>	DNA					
<213>	Calf intestinal alkaline phosphatase					20
<400>	22					
oggcccgatga	ctccagtgtA	acacacctca	tgggccttT	tgagccggca	gacatgaagt	60
ataatgttca	gcaagaccAC	accaaggACC	cgaccctggC	ggagatgacG	gaggcgGCC	120
tgcaagtgt	gaggAGGAAC	ccccggggCT	tctaccttT	cgtggaggGA	ggccgcATTG	180
accacggtca	ccatgacggC	aaagcttATA	tggactgac	tgaggcgatC	atgtttgaca	240
atgcacatcgc	caaggctAAC	gagctactA	gcgaactggA	cacgctgatC	cttgtcactG	300
cagaccactc	ccatgtctTC	tcctttggTG	gctacacACT	gcgtgggACC	tccatTTTGT	360
gtctggcccc	cggcaaggCC	ttagacAGCA	agtccctacAC	ctccatcTC	tatggcaATG	420
gcggaggCTA	tgcgcttggG	gggggctcGA	ggcccgatGT	taatggcAGC	acaagcgagg	480
aaccctcgta	ccggcaggAG	geggccgtGC	ccctggctAG	cgagacccAC	ggggggcgAAg	540

acgtggcggt gttcgccgca ggcccgccagg cgcacctggc gcacggcggt caggaggaga 600  
 ctttcgtggc gcacatcatg gcctttgcgg gctgcgtgga gcccataacc gactgcaatc 660  
 tgccagcccc ctccaccgcc accagcatcc ccgactgata atctaga 707

<210> 23

<211> 763

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 23  
 gagatccacc gagactccac actggacccc tccctgatgg agatgacaga ggctgcctg 60  
 cgccctgctga gcaggaaccc cccgggttcc ttccctttcg tggagggtgg tcgcatacgac 120  
 catggtcatac atgaaagcag ggottaccgg gcactgactg ggacgatcat gttcgacgac 180  
 gacattgaga gggcgggcca gtcaccaggc gaggaggaca cgctgacgcct cgtcaactgcc 240  
 gaccactccc acgtcttctc cttcggaggc tacccttgc gagggagctc catttcggt 300 20  
 ctggccctg gcaaggcccg ggacaggaag gcctacacgg tccctctata cggaaacgg 360  
 ccaggctatg tgctcaagga cggcgcccg ccggatgtta ccgaggcgaa gagcgggagc 420  
 cccgagtatc ggcagcagtc agcagtgcac ctggacgaaag agacccacgc aggcgaggac 480  
 gtggcggtgt tcgcgcgcgg ccacgcaggcg cacctggc acggcggtca ggaggagacc 540  
 ttctgtggcgc acatcatggc ctttgcgggc tgcgtggagc cttacaccga ctgcaatctg 600  
 ccagccccct ccaccggcac cagcatcccc gactgataat cttagaggtcg aaattcadct 660  
 cggaaagcaag ggcgaattct gcagatatcc atcacactgg cggccgctcg agcatgcac 720 30  
 tagaggggccc aattcgccct atagtgagtc gtattacaat tca 763

<210> 24

<211> 757

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 24						
caccgagact ccacactgg a cccctccctg atggagatga c agaggctgc cctgcgcctg	60					
ctgaacagga accccccggcgg ct ttttcctc tccgtggagg gtggtcgcac cgaccatgg	120					
catcatgaaa gcagggctta c cgggactg actgagacga tcatgttoga cgacgccatt	180					
gagagggcgg gcaagctcac cagcgaggag gacacgctga gctctgtcac tgccgaccac	240	10				
tcccacgtct tcttccttcgg aggctacccc ctgcgaggga gctccatctt cgggctggcc	300					
cctggcaagg cccgggacag gaaggcctac acggtcctcc tatacggaaa cggtccaggc	360					
tatgtgtca aggacggcgc cggccggat gttaccgaga g c g a g a g c g g g a g c c c c g a g	420					
tatcgccagc agtcagcagt gcccctggac gaagagaccc acgcaggcga ggacgtggcg	480					
gtgttcgcgc g c g g c c c g c a g g c a c c t g g t t c a c g g c g t g c a g g a g c a g c a c t t c a t a	540					
g c g c a e g t c a t g g c t t c g c c g c t g g a c g c a c t t c a t a c a c c t g g a g a g c a c t t c a t a	600					
cccggccggca ccacggactg ataaaagttt ggctcttagag gtcgaaattt acctcgaaag	660	20				
caaggggcga ttctgcagat atccatcaca ctggcggccg ctcgagcatg catctagagg	720					
gcccaattcg ccctatactg agtcgttatta caattca	757					

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 756

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

30						
<400> 25						
accgagactc cacactggac ccctccctga tggagatgac agaggctgcc ctgcgcctgc	60					
tgagcaggaa ccccccggc ttcttcctct tcgtggaggg tggtcgcac gaccatggc	120					

atcatgaaag caggcattac cggcactga ctgagacat catgttcgac gacgccatcg 180  
 agagggcggg ccagctcacc agcgaggagg acacgcttag cctcgtaact gccgaccact 240  
 cccacgttctt ctccattcgga ggctaccccc tgcgaggagg ctccatcttc gggctggccc 300  
 ctggcaaggc cgggacagg aaggcctaca cggtcctcct atacggaaac ggtccaggct 360  
 atgtgctcaa ggacggcgcc cggccggatg ttaccgagag cgagagcggg agcccccagt 420  
 atccggcagca gcacgcgtg ccctggacg aagagaccca cgcaggcgag gacgtggcgg 480  
 tttcgcgcg cggcccgag ggcacactgg ttcacggcgt gcaggagcag accttcata 540  
 cgcacgtcat ggccattcgcc gctgccttg agccctacac cgcctgcgac ctggcgcccc 600  
 ccgcggcac caccgactga taaaagcttg gctctagagg tcgaaattca cctcgaaagc 660  
 aagggcgaat tctgcagata tccatcacac tggcggccgc tcgagcatgc atctagaggg 720  
 cccaaattcgc octatagtga gtcgtattac aattca 756

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 1650

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 26  
 cttcggcggtt cagtaaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60  
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 120  
 tggcaagtct gttattcggtt gcccacgcgc acgcggcgat cccagcttag gaggaaaaacc 180  
 ccgccttctg gaaccggccag gcagcccagg cccttgcgtt agccaagaag ttgcagccga 240  
 tccagacagc tgccaaagaat gtcatctct tcttggggga tggatgggg gtgcctacgg 300  
 tgacagccac tcggatccca aagggggcaga tgaatggcaa actggacact gagacacccc 360  
 tggccatgga ccagttccca tacgtggctc tgtccaagac atacaacgtg gacagacagg 420  
 tgccagacag cgcaggcaact gcaactgcct acctgtgtgg ggtcaaggc aactacagaa 480

10

20

30

ccatcggtgt aagtgcagcc gcccgtaca atcagtgc aa cacgacacgt gggaatgagg	540
tca cgtctgt gatcaaccgg gccaagaaa ag cagggaaaggc cgtgggagtg gtgaccacca	600
cdagggtgca gcatgcataa ccagccgggg cctacgcgca cacggtaac cgaaactgg	660
actcagacgc cgacctgact gctgatgc ac agaagaatgg ctgccaggac atgcgcac	720
agctggtcta caacatggat attgacgtga tctgggtgg aggccgaatg tacatgttc	780
ctgaggggac cccagaccct gaatacccg agtgcac agtgtgaatgg gtcggaaagg	840
acaaggcagaa cctggtgca gaaatggcagg ccaagoacca gggagcccg tatgtgtgga	900
accgcactgc gctccattcag gcggccogatg actccagtgt aacacacccctc atgggcctct	960
ttgagccggc agacatgaag tataatgttc agcaagacca caccaggac cegaccctgg	1020
cggagatgac ggaggcggcc ctgcaagtgc tgaggcaggaa cccccggggc ttctacctct	1080
tcgtggaggg aggccgcatt gaccacggtc accatgacgg caaaggcttat atggcactga	1140
ctgaggcgtat catgtttgac aatgcacatcg ccaaggctaa cgagctcact agcgaactgg	1200
acacgctgat cttgtcact gcagaccact cccatgtctt ctcccttggt ggctacacac	1260
tgcgtgggac ctccatttc ggtctggccc cggcaaggc cttagacagc aagtctaca	1320
cctccatcct ctatggcaat ggcccaggct atgcgcctgg cggggctcg aggccccatg	1380
ttaatggcag cacaagcgag gaadccctcgat accggcagca ggccggccgtg cccctggct	1440
gcgagaccca cggggcggaa gacgtggcgg tttcgccg aggcccgcag ggcacactgg	1500
tgcacggcgt gcaggaggag accttcgtgg cgcacatcat ggcccttgcg ggctgcgtgg	1560
agccctacac cgactgcaat ctgccagccc cctccaccgc caccagcatc cccgactgat	1620
aatcttagagg tcgaaattca cctcgaaaggc	1650

&lt;210&gt; 27

30

&lt;211&gt; 1649

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human placental phosphatase

10

20

30

<400> 27  
 cttagggcggtt cagtaacacg cgtaaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60  
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgcgtga 120  
 tggcaagtct gttattcggc ggcacgcgc acgcggcgat cccagtttag gaggagaacc 180  
 cggacttctg gaaccgcgag gcagccgagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240  
 cacagacaga cgcacaagaac ctcatcatct tcctggcgta tggatgggg gtgtctacgg 300  
 tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actgggcct gagataacccc 360  
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaacatg 420 10  
 tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaagggc aacttccaga 480  
 ccattggctt gagtcagcc gcccgttta accagtgc当地 caccacacgc ggcaacgagg 540  
 tcatctccgt gatgaatcg gccaagaaag cagggaaatgc agtgggagtg gtaaccacca 600  
 cacgagtgca gcacgcctcg ccagccggca cctacgccc cacggtaaac cgcaactgg 660  
 actcggacgc cgacgtgcct gcctcgcccc gccaggagggt gtgccaggac atcgctacgc 720  
 agctcatctc caacatggac attgacgtga tcctaggtagg aggccgaaag tacatgtttc 780  
 ccatggaaac cccagaccct gagtacccag atgactacag ccaagggtggg accaggctgg 840 20  
 acgggaagaa tctgggtcag gaatggctgg cgaagccca gggtgccccg tatgtgtgga 900  
 accgcactga gtcatgc当地 gctccctgg acccgctgt gacccatctc atgggtctct 960  
 ttgagcctgg agacatgaaa tacgagatcc accgagactc cacactggac ccctccctga 1020  
 tggagatgac agaggtgc当地 ctgcgcctgc tgagcaggaa ccccccggc ttcttcctct 1080  
 tcgtggagggg tggtcgc当地 gaccatggc当地 atcatgaaag cagggcttac cgggcactga 1140  
 ctgagacgat catgttc当地 gacgccattg agagggcggg ccagctcacc agcgaggagg 1200  
 acacgctgag cctcgact gccgaccact cccacgtctt ctcttc当地 ggctacccccc 1260 30  
 tgcgagggag ctccatcttc gggctggccc ctggcaaggc cccggacagg aaggccatac 1320  
 cggtcctctt atacggaaac ggtccaggct atgtgtcaa ggacggcgcc cggccggatg 1380  
 ttaccgagag cgagagcggg agcccccgagt atcggcagca gtcagcagtg cccctggacg 1440

aagagaccca cgcaggcgag gacgtggagg tggcgcgcg cggcccgcaag ggcacactgg 1500  
ttcacggcgt gcaggaggcag accttcatacg cgacatgcatt ggcttcgcgc ggcgcctgg 1560  
agccctacac cgcctgcgcac ctggcgcccc cgcgcggcac caccgactga taaaagcttg 1620  
gtcttagaggt cgaaattcac ctgcgaaagc 1649

<210> 28

<211> 530

<212> DNA

10

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 28  
cttcggcggtt cagtaaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattctt ttacgctata 60  
ccctacataaa taaaacccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgcgcgtga 120  
tggcaagtctt gttattcggg gcccacgcgc acgcggcgat cccagttgag gaggagaacc 180  
cggaacctctg gaaccgcgag gcagccaaagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240  
cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tcctggcga tggatgggg gtgtctacgg 300  
tgacagctgc caggatcta aaaggcaga agaaggacaa actggggact gagataacccc 360  
tggccatgga ccgcattccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg 420  
tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaaggc aacttccaga 480  
ccattggctt gagtgcagcc gcccgcattt accagtgoaa cacgacacgc 530

20

<210> 29

<211> 466

30

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 29  
 cttcgccgtt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60  
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 120  
 tggcaagtct gttattccgc ggcacgcgc acgcggcgat cccagtttag gaggagaacc 180  
 cgacttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240  
 cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tcctggcga tggatgggg gtgtctacgg 300  
 tgacagctgc caggatccta aaaggcaga agaaggacaa actgggcct gagatacccc 360  
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgt aacaaacatg 420 10  
 tggcagacag tggagccaca gcaacggcct acctgtgtgg ggtcaa 466

<210> 30

<211> 645

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 30 20  
 cttcgccgtt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60  
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 120  
 tggcaagtct gttattccgc ggcacgcgc acgcggcgat cccagtttag gaggagaacc 180  
 cgacttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240  
 cacagacagc cgccaagaac ctcgtcatct tcctggcga tggatgggg gtgcctacgg 300  
 tgacagccac tcggacccta aaaggcaga agaaggacaa actgggcct gagatacccc 360  
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaacgtg gacagacagg 420 30  
 tggcagacag tggagccaca gcaacggcct acctgtgtgg ggtcaaaggc aacttccaga 480  
 ccattggctt gagtgccagcc gcccgcctta accagtgcaa cacgacacgc ggcaacgagg 540  
 tcatctccgt gatgaatcgg gccaagaaag cagggaaagtc agtggagtg gtaaccacca 600

cacgagtgca gcacgcctcg ccagccggca cctacgcccc cacgg 645

<210> 31

<211> 574

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 31	10
cttcggcggtt cagtaaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata	60
ccctacataaa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga	120
tggcaagtct gttattccgc ggcacgcgc acgcggcgat cccagtttag gaggagaacc	180
cggacttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagccctg	240
cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tcctggcga tggatgggg gtgtctacgg	300
tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actggggct gagataacccc	360
tggccatgga ccgttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg	420
tggccatgga ccgttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg	480
ccattggctt gagtgcagcc gcoogctta accagtgcaa cacgacacgc ggcagcgagg	540
tcatctccgt gatgaaccgg gccaagaaag cagg	574

<210> 32

<211> 620

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

30

<400> 32	
cttcggcggtt cagtaaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata	60
ccctacataaa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt attgaccctt tctgccgtga	120

tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc acgcggcgat cccagtttag gaggagaacc 180  
 cgacttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccctgggtgc cgccaaagaag ctgcagcctg 240  
 cacagacagc cgccaaagaac ctcatcatct tcctggcga tggatgggg gtgtctacgg 300  
 tgacagctgc caggatccta aaaggcaga tgaatggcaa actggacct gagacacccc 360  
 tggccatgga ccagttcca tacgtggctc tgtccaagac atacaatgt acaaaccatg 420  
 tggccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaaggc aacttccaga 480  
 ccattggctt gagtgccagcc gcccgttta accagtgcaa cacgacacgc ggcaacgagg 540  
 tcatctccgt gatgaatcgg gccaagaaag cagggaaatc agtggagtg gtaaccacca 600  
 cacgagtgcg gcacgcctcg 620

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 549

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 33  
 ctccgggtt cagtaaacacg cgttaccgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60  
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgcgtga 120  
 tggcaagtct gttattcggg gcccacgcgc acgcggcgat cccagcttag gaggaaaacc 180  
 ccgccttctg gaaccgcag gcagcccagg cccttgatgt agccaagaag ttgcagccga 240  
 tccagacagc tgccaaagaat gtcatctct tcttggggga tggatgggg gtgtctacgg 300  
 tgacagctgc caggatccta aaaggcaga agaaggacaa actggggcct gagataacccc 360  
 tggccatgga ccgcttcca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgt acaaaccata 420  
 tggccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaaggc aacttccaga 480  
 ccattggctt gagtgccagcc gcccgttta accagtgcaa cacgacacgc ggcaacgagg 540  
 tcatctccg 549

10

20

30

<210> 34

<211> 667

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 34

gagatccacc gagactccac actggacccc tccctgatgg agatgacaga ggctgccctg	60	
cgcctgctga gcaggaaccc ccgcggcttc ttccctttcg tggagggtgg tcgcacgac	120	10
catggtcatc atgaaagcag ggcttaccgg gcactgactg ggacgatcat gttcgacgac	180	
gacattgaga gggcgggcca gtcaccaggc gaggaggaca cgctgagcct cgtcactgcc	240	
gaccactccc acgtcttctc ctteggaggc tacccctgc gagggagctc catcttcggg	300	
ctggccccctg gcaaggcccg ggacaggaag gcctacacgg tcctcctata cggaaaacgg	360	
ccaggctatg tgctcaagga cggcgcccg ccggatgtta ccgaggggcga gagcggggagc	420	
cccgagtatc ggcagcagtc agcagtgcgg ctggacgaag agacccacgc aggegaggac	480	
gtggcggtgt tcgcgcgcgg ccogcagggcg cacctggtgac acggcgtca ggaggagacc	540	20
ttcgtggcgc acatcatggc ctttgcgggc tgcgtggagc cctacacccga ctgcaatctg	600	
ccagccccct ccaccggccac cagcatcccc gactgataat ctagaggtcg aaattcacct	660	
cgaaaagc	667	

<210> 35

<211> 661

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

30

<400> 35  
 caccgagact ccacactggc cccctccctg atggagatga cagaggctgc cctgcgcctg 60  
 ctgaacagga accccccggg ctttttcctc tccgtggagg gtggtcgcac cgaccatgg 120  
 catcatgaaa gcagggctta cccggcactg actgagacga tcatgttca cgacgccatt 180  
 gagagggcgg gccagctcac cagegaggag gacacgctga gcctcgctac tgccgaccac 240  
 tccccacgtct tctccttcgg aggctacccc ctgcgaggga gctccatctt cgggctggcc 300  
 cctggcaagg cccgggacag gaaggcctac acggctctcc tatacgaaa cggccaggc 360  
 tatgtgtotca aggacggcgc ccggccggat gttaccgaga gcgagagcgg gagccccgag 420 10  
 tatcggcagc agtcagcagt gccccctggac gaagagaccc acgcaggcga ggacgtggcg 480  
 gtgttcggcgc gcggcccgca ggccgcacctg gttcacggcg tgcaggagca gacccatata 540  
 ggcgcacgtca tggcccttcgc cgcctgcctg gagccctaca ccgcctgcga cctggcgccc 600  
 cccgcggcga ccaccgactg ataaaagttt ggctcttagag gtcgaaattc acctcgaaag 660  
 c 661

<210> 36 20  
<211> 660  
<212> DNA  
<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 36  
 accgagactc cacactggac cccctccctgatggagatgac agaggctgcc ctgcgcctgc 60  
 tgagcaggaa ccccccggg ttcttccttc tccgtggagggtggtcgcac gaccatggtc 120  
 atcatgaaaag cagggcttac cgggcactgatggagacgtatgttcgcac gacccatcg 180 30  
 agagggcggg ccagctcacc agcgaggagg acacgctgag cctcgtaact gccgaccact 240  
 cccacgtctt ctcccttcggaa ggctacccccc tccgtggagg ctccatcttc gggctggccc 300  
 ctggcaaggc cccggacagg aaggccataca cggcccttcatacggaaac ggtccaggct 360

atgtgtotcaa ggacggcgcc cggccggatgttaccgagag cgagagcggg agccccgagt 420  
 atcggcagca gccagcagtgc cccctggacg aagagaccca cgcaggcggag gacgtggcg 480  
 ttttcggcgc cggcccgccag gcgcacctgg ttcacggcgatgcaggagcag accttcata 540 40  
 cgcacgtcat ggcatttcgc cccctggacg aagccctacac ccgcctgcgcac ctggcgcccc 600  
 cccggcgcac caccgactgataaaagcttg gtccttagagg tcgaaattca cctcgaaagc 660

【 図 1 】

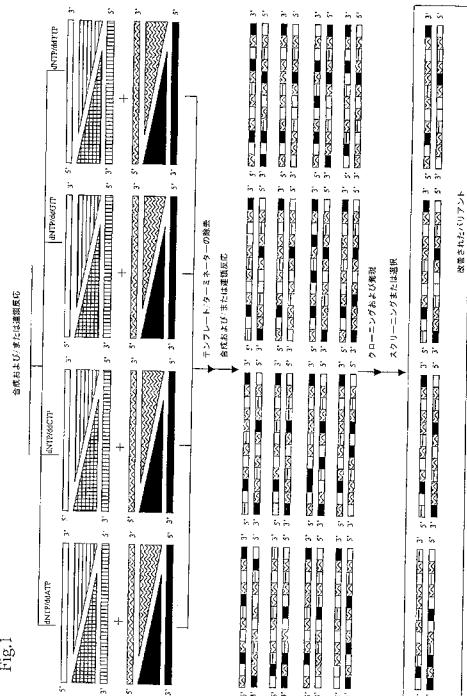


Fig. 1

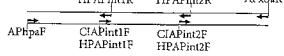
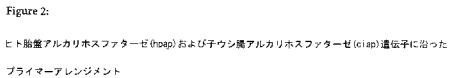
【図3(a)】

Figure 3 1/4

親cicapおよびhpap遺伝子ならびにそれらの組換えバリエント（AP01, AP03, AP05, AP06, AP11およびAP15）のN末端配列アラインメント

	10	20	30	40	50
C1AP	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
HBPAP	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
AP01	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
AP03	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
AP05	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
AP06	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
AP11	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
AP15	CTTCGGCCCTCGAAGAACCGGTT	TGTCGCTGAGACGGGGGCAATT	TC	TC	TC
	60	70	80	90	100
C1AP	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
HBPAP	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
AP01	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
AP03	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
AP05	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
AP06	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
AP11	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
AP15	TTAACGCTATACTTCTACTTAATACACCGGCTTA	CTGTAACTTAAAGAAAGCTT	TC	TC	TC
	110	120	130	140	150
C1AP	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
HBPAP	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
AP01	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
AP03	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
AP05	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
AP06	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
AP11	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
AP15	ATGGACCCCCCTTCGCGCTGATGCCAAGCTTGATTGGC	TCCTGCACCGCG	TC	TC	TC
	160	170	180	190	200
C1AP	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
HBPAP	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
AP01	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
AP03	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
AP05	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
AP06	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
AP11	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC
AP15	ACCGCGGGATCCACCGTGAGGATGACCG	TCCTTGACCGCG	TC	TC	TC

【 四 2 】



【図3(b)】

Figure 3 2/4

CIAP	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
HIPAP	GCGCCGCGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
AP01	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
AP03	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
AP05	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
AP06	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
AP11	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
AP13	GCGACGCCAGGGCCCTTGATGTCAGCAGAAGTCAGCAGCTTGACAGACG	220	230	240	250
		260	270	280	290
CIAP	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
HIPAP	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
AP01	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
AP03	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
AP05	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
AP06	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
AP11	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
AP13	TGGCCAGATGTCCTGCTTCTGCGATGATGGCAATGGGGTGCTGCTACGG	300			
		310	320	330	340
CIAP	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
HIPAP	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
AP01	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
AP03	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
AP05	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
AP06	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
AP11	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
AP13	TGACAGCGCTCCGGCATCTAAAGGGCGAGCTGAACTCAACTCTGGCTCC	350			
		360	370	380	390
CIAP	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
HIPAP	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
AP01	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
AP03	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
AP05	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
AP06	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
AP11	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
AP13	GAGGACCCCCGGCCATGGACATTTCCCATGTTGGCTCTGTCCAGAAC	400			
		410	420	430	440
CIAP	ATATCACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT	450			
HIPAP	ATATCACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT	450			
AP01	ATATCACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT	450			
AP03	ATATCACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT	450			





---

フロントページの続き

(72)発明者 シュムック,ライナー  
ドイツ連邦共和国 ベーネディクトボイアーン 83671 アム クロスター・ヴァイアー 7  
(72)発明者 フォン デル エルツ,ヘルベルト  
ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム 82362 イン テア アウ 21  
(72)発明者 ケンクリース,ヤーネト  
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 82377 アム アルテン バーンホフ 1

審査官 引地 進

(56)参考文献 特表平10-500561(JP,A)  
Nucleic Acids Research, 1998年, Vol.26, No2, pp.681-683  
生化学,日本,2000年12月,第72巻、第12号,pp.1430-1433  
J.Mol.Biol., 1996年, Vol.255, pp.589-603

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00  
C12Q 1/68  
JSTPlus(JDream2)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
PubMed  
Science Direct