

(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. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 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)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成14年6月26日(2002.6.26)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2004-533259 (P2004-533259A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成16年11月4日(2004.11.4)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007060		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(87) 国際公開番号	W02003/002736		グレンツアーヘルストラツセ124
(87) 国際公開日	平成15年1月9日(2003.1.9)	(74) 代理人	100095832
審査請求日	平成16年2月5日(2004.2.5)		弁理士 細田 芳徳
(31) 優先権主張番号	01115424.2	(72) 発明者	シャオ, チーシン
(32) 優先日	平成13年6月27日(2001.6.27)		ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)		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ビトロ組換えのためのウォークスルー技術

(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】

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ビ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エーション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 Computing 17:619-632, Pal, K.F. 1993. Bio.Cybern. 69: 539-546, Pal, K.F. 1995. Bio.Cybern. 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、インビボ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

40

【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

50

い。

【 0 0 0 4 】

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プ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

10

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)、
- ・コンピ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)

20

- ・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-vi)

がこれらの問題に首尾よく適用されている。

【 0 0 0 5 】

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を含む:

30

- 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。

【 0 0 0 6 】

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

【 0 0 0 7 】

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、DNase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つた。

【0009】

本発明の主題は、DNA配列のインビトロウォークスルー組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によりさらに増幅され得、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エーションにいたる。これらのバリエーションは、実質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変異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ちうる。この技術は、*Bacillus subtilis* BMTU3420サルコシンオキシダーゼバリエーション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)を続いて繰り返す、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。全ウォークスルー組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

10

20

30

40

50

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、バリエーションライブラリ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ーション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、遺伝子シャッフリングが起こりうる。

【0015】

ウォークスルー技術のための条件は、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】

ウォークスルー手順を行うために、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反応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便な方法を提供し、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】

ウォーク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する。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～2pmolで変化する。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クスルー合成のために使用される。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る。一本鎖RNAテンプレートのために、逆転写酵素がウォークスルー合成に好ましい。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リホスフェート(ddNTP)を使用す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20μM～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4μM～400μMの濃度で使用される。

40

50

【 0 0 2 8 】

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。

【 0 0 2 9 】

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100～250M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。MaCl₂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、ウォークスルー反応を促進するためにバッファーに含まれうる。

【 0 0 3 0 】

ウォークスルーDNA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。

【 0 0 3 1 】

(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組換えのための第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。

【 0 0 3 2 】

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Kongsberg, 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'ブ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

30

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。MgCl₂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する。

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する。

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。MgCl₂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る。KClはまた、20~80mMの濃度で含まれる。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、バッファーに存在する。

50

【 0 0 4 1 】

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

【 0 0 4 2 】

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。

【 0 0 4 3 】

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

【 0 0 4 4 】

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、発現の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ーション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 Biotechnol.* 1997 Dec; 15(12):523-30; Patel PH, Loeb LA. *Procc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2000年5月9日; 97(10):5095-100は本明細書中に援用される。これらのバリエーションは、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

【 0 0 4 5 】

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「シャッフル」 (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。

【 0 0 4 6 】

(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/またはクロソオーバーが、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

【 0 0 4 7 】

(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「増殖ブロック」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(図1)。

20

【 0 0 4 8 】

(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、それらは位置の好ましさに於いて均一であり、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、変異およびクロソオーバーは、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。

【 0 0 4 9 】

(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

【 0 0 5 0 】

(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。

【 0 0 5 1 】

(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

【 0 0 5 2 】

(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

50

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Mn²⁺の存在下で、500ごとに約1塩基が間違っており取り込まれる(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.)。

10

【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。

20

【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せられうる。

【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った(例えば、実施例1)。

30

【0058】

ウォークスルー組換え技術は、ヒト胎盤アルカリホリファターゼおよびウシ腸アルカリホリファタ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。

40

【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】

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クローン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、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)またはモロニー Maus 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。

【 0 0 6 2 】

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。

【 0 0 6 3 】

2 . H₂O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。

【 0 0 6 4 】

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のジチオトレイール、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H₂Oで98μlにした。

【 0 0 6 5 】

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。

【 0 0 6 6 】

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DpnI(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。

【 0 0 6 7 】

6 . 消化したウォークスルー産物を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。

【 0 0 6 8 】

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の精製したウォークスルーDNAフラグメント、20μlの2×PCRプレミックス（5倍希釈のクローン化Pfuバッファー、0.5mMの各dNTP、0.1U/μlのクローン化Pfuポリメラーゼ(Stratagene La Jolla CA)）および15μlのH₂Oを氷上で混合した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

2 . 96 での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。

【 0 0 7 0 】

3 . 20、30、および40サイクルで3 μ lのアリコート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。

【 0 0 7 1 】

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。

【 0 0 7 2 】

1 . それぞれ0.2 μ MのpstF(5'GGTAGAGCGAG-TCTCGAGGGGAGATGC3'、配列番号：1)およびNsiR(5'AGCCGGCGTGACGTGGGTCAGC3'、配列番号：2)のプライマー、1.5mMのMgCl₂、10mMのTris-HCl[pH9.0]、50mMのKCl、それぞれ200 μ 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 μ lのPCR再構築アリコートを、100 μ l標準PCR反応におけるテンプレートとして使用した。

。

【 0 0 7 3 】

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サイ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。

【 0 0 7 4 】

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。

【 0 0 7 5 】

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(Pst/Nsi)にクローン化した。

30

【 0 0 7 6 】

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、変異体ライブラリーを形成した。

【 0 0 7 7 】

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。

【 0 0 7 8 】

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グリ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、デオキシウ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の代わりに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を使用して完全なU-DNA除去を確認しうる。

【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デ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。

【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性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。

【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。

【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グリコシラーゼ」Roche # 1444 646)に従って2.5mM MgCl₂、600 μM dUTP、および3つの他のヌクレオチドdATP、dCTP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の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

10

20

30

40

50

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

【 0 0 8 5 】

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	∞	

10

【 0 0 8 6 】

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

【 0 0 8 7 】

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
ブッファー	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 ₂ O	30 μl まで

30

【 0 0 8 8 】

サイクル条件：

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

40

【 0 0 8 9 】

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 (APphaF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)
ApxbaR	GCT TTC GAG GTG AAT TTC GAC C (配列番号:4)

10

ciap遺伝子のプライマー

CIAPint1F	GGT CAC GTC TGT GAT CAA CCG (配列番号:5)
CIAPint1R	CGG TTG ATC ACA GAC GTG AC C (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)

20

hpap遺伝子のプライマー

HPAPint1F	CCA AGA AAG CAG GGA AGT CAG TG (配列番号:9)
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】

30

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、H₂O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。

40

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 ₂ 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。

50

【 0 0 9 4 】

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	∞	

【 0 0 9 5 】

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。

【 0 0 9 6 】

再構築混合物	0.5 μ l	
プライマー-APhpaF	10 pmol	
プライマー-ApxbaR	10 pmol	
10 × Taqブッファ- (+ Mg; Roche # 1 271 318)	5 μ l	
Taq DNAポリメラーゼ(Roche # 1 418 432)	2.5 U	20
dATP, dCTP, dGTP, dTTP(Roche # 1 969 064)	各0.2 mM	
H ₂ O	50 μ l まで	

【 0 0 9 7 】

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

【 0 0 9 8 】

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」Quiagen # 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。

【 0 0 9 9 】

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つのバリエーションは、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。

【 0 1 0 0 】

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

【 0 1 0 1 】

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ーション(AP01、AP03、AP05、AP06、AP11およびAP15)を示す。

【 0 1 0 2 】

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ーション(AP2、AP9およびAP13)を示す。

【 0 1 0 3 】

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

20

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 4 】

【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クスルー、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スファターゼ(hpap)および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ラインメントを示す。

30

【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ーション(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ーション(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
agccggcgtg acgtgggtca gc

22

<210> 3

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial primer

<400> 3
cttcggcggtt cagtaacacg c 21

<210> 4
<211> 22 10
<212> DNA
<213> Artificial primer

<400> 4
gcttttcgagg tgaatttcga cc 22

<210> 5
<211> 21 20
<212> DNA
<213> Artificial primer

<400> 5
ggtcacgtct gtgatcaacc g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA 30
<213> Artificial primer

<400> 6
cggttgatca cagacgtgac c 21

<210>	7		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial primer		
<400>	7		
cgcaaagctt	atatggcact	gac	23
<210>	8		10
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial primer		
<400>	8		
gtcagtgcc	tataagcttt	gcc	23
<210>	9		20
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial primer		
<400>	9		
ccaagaaagc	agggaagtca	gtg	23
<210>	10		
<211>	23		30
<212>	DNA		
<213>	Artificial primer		

<400> 10
caatgacttc cctgctttct tgg

23

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 11
catgttccgac gacgccattg ag

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial primer

<400> 12
ctcaatggcg tcgtcgaaca tg

22

<210> 13

<211> 700

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase

<400> 13
gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag 60
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcggcg 120
cgcacgcgca cgcggcgatc ccagttgagg aggagaacc ggacttctgg aaccgcgagg 180
cagccgaggc cctgggtgcc gccagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccagaacc 240

10

20

30

aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccoct ggccatggac cgttcccat 360
 atgtggctct gtccaagaca tacaatgtag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420
 ccacggccta cctgtgctgg gtcaagggca acttcagac cattggcttg agtgcagccg 480
 cccgctttaa ccagtgcac acgacacgag gcaacgaggt catctccgtg atgaatcggg 540
 ccaagaaagc aggggaagtca gtgggagtgg taaccaccac acgagtgcag cacgcctcgc 600
 cagccggcac ctacgcccac acggtgaacc gcaactggta ctcgagcgcc gaagtgcctg 660
 cctcgggccc ccaggagggg tgccaggaca tcgctacgca 700

10

<210> 14

<211> 700

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 14

gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgtatata cctacataat aaaaccggag 60
 ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgcctgat ggcaagtctg ttattcgggg 120
 cccacgcgca cgcggcgatc ccagctgagg agggaaaacc cgccttcttg aaccgccagg 180
 cagccagggc ccttgatgta gccagaagt tgcagccgat ccagacagct gccagaatg 240
 tcacctcttt ctgggggat gggatggggg tgctacggg gacagccact cggatcctaa 300
 aggggcagat gaatggcaaa ctgggacctg agacacocct ggccatggac cagtcccat 360
 acgtggctct gtccaagaca tacaacgtgg acagacaggt gccagacagc gcaggcactg 420
 ccactgccta cctgtgtggg gtcaagggca actacagaac catcggtgta agtgcagccg 480
 cccgctadaa tcagtgcac acgacacgtg ggaatgaggt cacgtctgtg atcaaccggg 540
 ccaagaaagc aggggaaggc gtgggagtgg tgaccaccac cagggtgag catgcctccc 600
 cagccggggc ctacgcgcac acggtgaacc gaaactggta ctcagacgcc gacctgcctg 660
 ctgatgcaca gaagaatggc tgccaggaca tcgcgcaca 700

20

30

<210> 15

<211> 509

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 15

gttaacgtgc tgaacagccg ggcattcttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag	60	
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcgggg	120	10
cccacgcgca cgcggcgatc ccagttgagg aggagaacct ggacttctgg aaccgcgagg	180	
cagccaaggc cctgggtgcc gccagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccagaacc	240	
tcacatctct cctgggcgat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa	300	
aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgcttcccat	360	
atgtggctct gtccaagaca tacaatgtag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag	420	
ccacggccta cctgtgcggg gtcaaggcca acttcagac cattggcttg agtgcagccg	480	
ccgcctttaa ccagtgaac acgacacgc	509	20

<210> 16

<211> 445

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 16

gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag	60	30
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcggcg	120	
cgcacgcgca cgcggcgatc ccagttgagg aggagaacct ggacttctgg aaccgcgagg	180	
cagccaaggc cctgggtgcc gccagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccagaacc	240	

tcatacatctt cctgggcgat gggatggggg tgcctacggt gacagctgcc aggatacctaa 300
 aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agatacccct ggccatggac cgcttcccat 360
 atgtggctct gtccaagaca tacaatgtag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420
 ccacggccta cctgtgtggg gtcaa 445

<210> 17

<211> 624

<212> DNA

10

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 17

gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgtatac cctacataat aaaaccggag 60
 ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat gttaacgtgc tgaacagccg 120
 ggcatttttt tacgtatac cctacataat aaaaccggag ctaccatgaa taagaaggta 180
 ctgacccttt ctgccgtgat gccaagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccaagaacc 240
 tcgtcatctt cctgggcgat gggatggggg tgcctaoggt gacagccact cggaccctaa 300
 aagggcagaa gaaggacaaa ctggagcctg agatacccct ggccatggac cgcttcccat 360
 atgtggctct gtccaagaca tacaacgtgg acagacaggt gccagacagt ggagccacag 420
 ccacggccta cctgtgcggg gtcaagggca acttcagac cattggcttg agtgcagccg 480
 cccgctttaa ccagtgcaac acgacacgcg gcaacgaggt catctccgtg atgaatcggg 540
 ccaagaaagc agggaaagtca gtgggagtggt taaccaccac acgagtgcag cagcctcgc 600
 cagccggcac ctacgccac acgg 624

20

<210> 18

<211> 553

<212> DNA

30

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 18

```
gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag      60
ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcggcg      120
cgcacgcgca cgcggcgatc ccagttgagg aggagaacct ggacttcttg aaccgcgagg      180
cagccaaggc cctgggtgcc gccagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccagaacc      240
tcatcatctt cctgggcgat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa      300
aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgttcccat      360
atgtggctct gtccaagaca tacaatgtag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag      420
ccacggccta cctgtgcggg gtcaagggca acttcagac cattggcttg agtgcagccg      480
cccgctttaa ccagtgcac acgacacgcg gcagcgaggt catctccgtg atgaaccggg      540
ccaagaaagc agg                                         553
```

10

<210> 19

<211> 599

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 19

```
gttaacgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag      60
ctaccatgaa taagaaggta ttgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcggcg      120
cgcacgcgca cgcggcgatc ccagttgagg aggagaacct ggacttcttg aaccgcgagg      180
cagccaaggc cctgggtgcc gccagaagc tgcagcctgc acagacagcc gccagaacc      240
tcatcatctt cctgggcgat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa      300
aagggcagat gaatggcaaa ctgggacctg agacacccct ggccatggac cagttcccat      360
```

30

20

acgtggctct gtccaagaca tacaatgtag acaaacatgt gccagacagt ggagccacag 420
 ccacggccta cctgtgcggg gtcaagggca acttccagac cattggcttg agtgcagccg 480
 cccgctttaa ccagtgcaac acgacacgcg gcaacgaggt catctccgtg atgaatcggg 540
 ccaagaaagc aggggaagtca gtgggagtg taaccaccac acgagtgcag cagcctcg 599

<210> 20

<211> 528

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline

10

<400> 20

gttaccgtgc tgaacagccg ggcatttttt tacgctatac cctacataat aaaaccggag 60
 ctaccatgaa taagaaggta ctgacccttt ctgccgtgat ggcaagtctg ttattcgggg 120
 cccacgcgca cgcggcgatc ccagctgagg aggaaaaccc cgccttcttg aaccgccagg 180
 cagcccaggc ccttgatgta gccagaagt tgcagccgat ccagacagct gccagaatg 240
 tcctctctt cttgggggat gggatggggg tgtctacggt gacagctgcc aggatcctaa 300
 aagggcagaa gaaggacaaa ctggggcctg agataccctt ggccatggac cgcttcccat 360
 atgtggctct gtccaagaca tacaatgtag acaaacatat gccagacagt ggagccacag 420
 ccacggccta cctgtgcggg gtcaagggca acttccagac cattggcttg agtgcagccg 480
 cccgctttaa ccagtgcaac acgacacgcg gcaacgaggt catctccg 528

20

<210> 21

<211> 606

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase

30

<400> 21

cttccctgga cccgtctgtg accatctca tgggtctctt tgagcctgga gacatgaaat 60

acgagatcca ccgagactcc acactggacc cctccctgat ggagatgaca gaggctgccc 120
 tgcgcctgct gagcaggaac ccccgcggtt tcttcctctt cgtggagggt ggtcgcatcg 180
 accatgggtca tcatgaaagc agggcttacc gggcactgac tgagacgata atgttcgacg 240
 acgccattga gagggcgggc cagctcacca gcgaggagga cacgctgagc ctcgtcactg 300
 ggtcctccta tacggaaacg gtccaggcta tgtgctcaag gaaggcgccc ggccggatgt 360
 taccgagagc gagagcggga gccccgagta tcggcagcag tcagcagtgc ccctggacga 420
 agagacccac gcaggcgagg acgtggcggt gttcgcgcgc ggcccgagg cgcacdtggt 480
 tcacggcgtg caggagcaga cttcatagc gcacgtcatg gccttcgccc cctgcctgga 540
 gccctacacc gcctgcgacc tggcgccccc cgcgggcacc accgactgat aaaagcttgg 600
 tctaga 606

10

<210> 22

<211> 707

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase

20

<400> 22

cggccgatga ctccagtgtg acacacctca tgggcctctt tgagccggca gacatgaagt 60
 ataatgttca gcaagaccac accaaggacc cgaccctggc ggagatgacg gaggcggccc 120
 tgcaagtgtt gagcaggaac ccccgggggt tctacctctt cgtggaggga ggccgcattg 180
 accacgggtca ccatgacggc aaagcttata tggcactgac tgaggcgata atgtttgaca 240
 atgccatcgc caaggctaac gagctcacta gcgaactgga cacgctgata cttgtcactg 300
 cagaccactc ccatgtcttc tcttttggtg gctacacact gcgtgggacc tccattttcg 360
 gtctggcccc cggcaaggcc ttagacagca agtctacac ctccatcctc tatggcaatg 420
 gcccaggcta tgcgcttggc gggggctcga ggcccgatgt taatggcagc acaagcgagg 480
 aaccctcgta ccggcagcag gcggccgtgc ccctggctag cgagaccacac gggggcggaag 540

30

acgtggcgggt gttcgcgcga ggcccgccagg cgcacctggt gcacggcgtg caggaggaga 600
 ccttcgtggc gcacatcatg gcctttgagg gctgcgtgga gccctacacc gactgcaatc 660
 tgccagcccc ctccaccgcc accagcatcc ccgactgata atctaga 707

<210> 23

<211> 763

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

10

<400> 23

gagatccacc gagactccac actggacccc tccctgatgg agatgacaga ggctgccctg 60
 cgctctgtga gcaggaaccc ccgcggcttc ttcctcttcg tggagggtgg tcgcatcgac 120
 catggtcatc atgaaagcag ggcttacccg gcactgactg ggacgatcat gttcgacgac 180
 gacattgaga gggcgggcca gctcaccagc gaggaggaca cgctgagcct cgtcactgcc 240
 gaccactccc acgtcttctc cttcggaggc taccctctgc gagggagctc catcttcggg 300
 ctggcccttg gcaaggcccg ggacaggaag gcctacacgg tcctctctata cggaaacggt 360
 ccaggctatg tgcacaagga cggcgcccg ccgatgtta ccgagggcga gagcgggagc 420
 cccgagtatc ggcagcagtc agcagtgcgc ctggacgaag agaccacgc aggcgaggac 480
 gtggcggtgt tcgcgcgcgg ccgcgaggcg cacctggtgc acggcgtgca ggaggagacc 540
 ttctgtggcg acatcatggc ctttgccggc tgcgtggagc cctacaccga ctgcaatctg 600
 ccagccccct ccaccgccac cagcatcccc gactgataat ctagaggctc aaattcacct 660
 cgaaagcaag ggcgaattct gcagatatcc atcacactgg cggccgctcg agcatgcac 720
 tagagggcc aattcgccct atagtgagtc gtattacaat tca 763

20

30

<210> 24

<211> 757

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 24

caccgagact ccacactgga cccctccctg atggagatga cagaggctgc cctgcgcctg	60	
ctgaacagga acccccgagg cttcttctct tccgtggagg gtggtcgcat cgaccatggc	120	
catcatgaaa gcagggctta ccgggcactg actgagacga tcatgttcga cgacgccatt	180	
gagagggcgg gccagctcac cagcgaggag gacacgctga gcctcgtcac tgccgaccac	240	10
ttccacgtct tctcttctcg aggtacccc ctgcgaggga gctccatctt cgggctggcc	300	
cctggcaagg cccgggacag gaaggcctac acggtcctcc tatacggaaa cgggccaggc	360	
tatgtgtctca aggacggcgc ccggccggat gttaccgaga gcgagagcgg gagccccgag	420	
tatcggcagc agtcagcagt gccctggac gaagagaccc acgcaggcga ggacgtggcg	480	
gtgttcgcgc gcggcccgca ggcgacactg gttcacggcg tgcaggagca gaccttcata	540	
gcgcacgtca tggccttcgc cgcctgcctg gagccctaca ccgcctgcga cctggcgccc	600	
cccgcggca ccaccgactg ataaaagttt ggctctagag gtcgaaattc acctcgaaag	660	20
caagggcgaa ttctgcagat atccatcaca ctggcgggccg ctcgagcatg catctagagg	720	
gcccaattcg ccctatagtg agtcgtatta caattca	757	

<210> 25

<211> 756

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase and calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 25

accgagactc cacactggac cccctccctga tggagatgac agaggctgcc ctgcgcctgc	60
tgagcaggaa ccccgcgggc ttcttctctt tcgtggaggg tggtcgcata gaccatggtc	120

10

20

30

atcatgaaag cagggccttac cgggcactga ctgagacgat catgttcgac gacgccatcg 180
 agagggcggg ccagctcacc agcgaggagg acacgctgag cctcgtcact gccgaccact 240
 cccacgtctt ctctctcgga ggctaccccc tgcgagggag ctccatcttc gggctggccc 300
 ctggcaaggc ccgggacagg aaggcctaca cggtcctcct atacggaaac ggtccaggct 360
 atgtgctcaa ggacggcgcc cggccggatg ttaccgagag cgagagcggg agccccgagt 420
 atcggcagca gccagcagtg cccctggacg aagagaccca cgcaggcgag gacgtggcgg 480
 tgttcgcgcg cggcccgcag gcgcacctgg ttcacggcgt gcaggagcag accttcatag 540
 cgcacgtcat ggccttcgcc gcctgcctgg agccctacac cgcctgcgac ctggcgcccc 600
 ccgcccgcac caccgactga taaaagcttg gctctagagg tcgaaattca cctcgaaagc 660
 aagggcgaat tctgcagata tccatcacac tggcggcgcg tcgagcatgc atctagaggg 720
 cccaattcgc cctatagtga gtctattac aattca 756

<210> 26

<211> 1650

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase

<400> 26

cttcggcggt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgtata 60
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgacctt tctgcctga 120
 tggcaagtct gttattcggg gccacgcgc acgcgcgat ccagctgag gaggaaaacc 180
 ccgccttctg gaaccgccag gcagcccagg cccttgatgt agccaagaag ttgcagccga 240
 tccagacagc tgccaagaat gtcatcctct tcttggggga tgggatgggg gtgcctacgg 300
 tgacagccac tcggatccta aaggggcaga tgaatggcaa actgggacct gagacacccc 360
 tggccatgga ccagttccca tacgtggctc tgtccaagac atacaacgtg gacagacagg 420
 tgccagacag cgcaggcaat gccactgcct acctgtgtgg ggtcaagggc aactacagaa 480

ccatcggtgt aagtgcagcc gcccgctaca atcagtgcaa caccgacacgt gggaatgagg 540
 tcacgtctgt gatcaaccgg gccaaagaaag caggggaaggc cgtgggagtg gtgaccacca 600
 ccaggggtgca gcatgcctcc ccagccgggg cctacgcgca caccggtgaac cgaaactggg 660
 actcagacgc cgacctgcct gctgatgcac agaagaatgg ctgccaggac atcgccgcac 720
 agctgggtcta caacatggat attgacgtga tcttgggtgg aggcggaatg tacatgtttc 780
 ctgaggggac ccagaccct gaataccag atgatgccag tgtgaatgga gtcgggaagg 840
 acaagcagaa cctgggtgcag gaatggcagg ccaagcacca gggagcccag tatgtgtgga 900
 accgcactgc gctccttcag gcggccgatg actccagtgt aacacacctc atgggcctct 960
 ttgagccggc agacatgaag tataatgttc agcaagacca caccaaggac ccgaccctgg 1020
 cggagatgac ggaggcgccc ctgcaagtgc tgagcaggaa cccccggggc ttctacctct 1080
 tcgtggaggg aggcgcgatt gaccacggtc accatgacgg caaagcttat atggcactga 1140
 ctgaggcgat catgtttgac aatgccatcg ccaaggctaa cgagctcact agcgaactgg 1200
 acacgctgat ccttgtcact gcagaccact cccatgtctt ctcttttggg ggctacacac 1260
 tgcgtgggac ctccattttc ggtctggccc ccggcaaggc cttagacage aagtcctaca 1320
 cctccatcct ctatggcaat ggcccaggct atgcgcttgg cgggggctcg aggccegatg 1380
 ttaatggcag cacaagcgag gaacctctgt accggcagca ggcggccgtg cccctggcta 1440
 gcgagacca cggggggcgaa gacgtggcgg tgttcgcgcg aggcgcgcag gcgcacctgg 1500
 tgcacggcgt gcaggaggag accttcgtgg cgcacatcat ggcctttgcg ggctgcgtgg 1560
 agccctacac cgactgcaat ctgccagccc cctccaccgc caccagcacc cccgactgat 1620
 aatctagagg tcgaaattca cctcgaaagc 1650

10

20

<210> 27

30

<211> 1649

<212> DNA

<213> Human placental phosphatase

<400> 27

cttcggcggtt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata	60
cdctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga	120
tggcaagtct gttattcggc ggcacgcgc acgcggcgat ccagttgag gaggagaacc	180
cggacttctg gaaccgcgag gcagccgagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg	240
cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tcttgggcga tgggatgggg gtgtctacgg	300
tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actggggcct gagatacccc	360
tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg	420
tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaagggc aacttccaga	480
ccattggctt gagtgcagcc gcccgcctta accagtgcga cagcacagc ggcaacgagg	540
tcatctcogt gatgaatcgg gccaaagaaag caggggaagtc agtgggagtg gtaaccacca	600
cacgagtgca gcacgcctcg ccagccggca cctacgcca caggtgaac cgcaactggt	660
actcggacgc cgacgtgcct gcctcggccc gccaggaggg gtgccaggac atcgctacgc	720
agctcatctc caacatggac attgacgtga tcttaggtgg aggcgaaag tacatgtttc	780
ccatgggaac ccagaccct gagtaccag atgactacag ccaaggctgg accaggctgg	840
acgggaagaa tctgggtgcag gaatggctgg cgaagcgcca ggggtcccgg tatgtgtgga	900
accgcaotga gctcatgcag gcttccctgg acccgtctgt gaccatctc atgggtctct	960
ttgagcctgg agacatgaaa tacgagatcc accagactc cacactggac cctccctga	1020
tggagatgac agaggctgcc ctgcgcctgc tgagcaggaa ccccgcggc ttcttctct	1080
togtggaggg tggtcgcac gaccatggtc atcatgaaag cagggttac cgggcactga	1140
ctgagacgat catgttcgac gacgccattg agagggcggg ccagctcacc agcgaggagg	1200
acacgctgag cctcgtcact gccgaccact cccacgtctc ctcttcgga ggtaccccc	1260
tgcgagggag ctccatcttc gggctggccc ctggcaaggc cggggacagg aaggcctaca	1320
cggctctct atacggaaac ggtccaggct atgtgctcaa ggaaggcgcc cggccggatg	1380
ttaccgagag cgagagcggg agccccgagt atcggcagca gtcagcagtg cccctgga.cg	1440

10

20

30

aagagaccca cgcaggcgag gacgtggcgg tgttcgcgcg cggcccgag gcgcacctgg 1500
 ttccacggcgt gcaggagcag accttcatag cgcacgtcat ggccttcgcc gcttgccctgg 1560
 agccctacac cgcctgcgac ctggcgcccc cgcgcggcac caccgactga taaaagcttg 1620
 gtctagagggt cgaaattcac ctcgaaagc 1649

<210> 28

<211> 530

<212> DNA

10

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 28

cttcggcggt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattctt ttacgctata 60
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgacctt tctgcctga 120
 tggcaagtct gttattcggg gccacgcgc acgcggcgat ccagttgag gaggagaacc 180
 cggactttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240
 cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tctggggcga tgggatgggg gtgtctacgg 300
 tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actggggcct gagatacccc 360
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg 420
 tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaagggc aacttccaga 480
 ccattggctt gagtgcagcc gcccgcttta accagtgoaa cagcacagc 530

20

<210> 29

<211> 466

<212> DNA

30

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 29
 cttcggcggt cagtaacacg cgттаacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 120
 tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc acgcggcgat ccagttgag gaggagaacc 180
 cggacttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccttgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240
 cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tcttgggcga tgggatgggg gtgtctacgg 300
 tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actggggcct gagatacccc 360
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg 420
 tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgtgg ggtcaa 466

10

<210> 30

<211> 645

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

20

<400> 30
 cttcggcggt cagtaacacg cgттаacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 120
 tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc acgcggcgat ccagttgag gaggagaacc 180
 cggacttctg gaaccgcgag gcagccaagg ccttgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240
 cacagacagc cgccaagaac ctctcatct tcttgggcga tgggatgggg gtgcctacgg 300
 tgacagccac toggacccta aaagggcaga agaaggacaa actggagcct gagatacccc 360
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaacgtg gacagacagg 420
 tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgagg ggtcaagggc aacttccaga 480
 ccattggctt gagtgcagcc gcccgcttta accagtgcga cagacacgc ggcaacgagg 540
 tcctctccgt gatgaatcgg gccaaagaag cagggaaagtc agtgggagtg gtaaccacca 600

30

cacgagtgca gcacgectcg ccagccggca cctacgccca cacgg

645

<210> 31

<211> 574

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

<400> 31

cttcggcggtt cagtaacacg cgттаacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60

10

ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgcctga 120

tggcaagtct gttattcggc ggcacggcg acgcggcgat ccagttgag gaggagaacc 180

cggacttctg gaaccgagag gcagccaagg cctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240

cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tctggggcga tgggatgggg gtgtctacgg 300

tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actggggcct gagatacccc 360

tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg 420

tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtggg ggtcaagggc aacttccaga 480

20

ccattggctt gagtgcagcc gcccgcttta accagtgcga cacgacacgc ggcagcgagg 540

tcattctcgt gatgaaccgg gcccaagaaag cagg 574

<210> 32

<211> 620

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

30

<400> 32

cttcggcggtt cagtaacacg cgттаacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60

ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt attgaccctt tctgcctga 120

tggcaagtct gttattcggc ggcacggcg acgcgggcgat cccagttgag gaggagaacc 180
 cggacttctg gaaccggcag gcagccaagg ccctgggtgc cgccaagaag ctgcagcctg 240
 cacagacagc cgccaagaac ctcatcatct tcttggggga tgggatgggg gtgtctacgg 300
 tgacagctgc caggatccta aaagggcaga tgaatggcaa actgggacct gagacacccc 360
 tggccatgga ccagttccca tacgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacatg 420
 tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaagggc aacttccaga 480
 ccattggctt gagtgcagcc gcccgcttta accagtgcga cagcacagc ggcaacgagg 540
 tcatctccgt gatgaatcgg gccaaagaag cagggaagtc agtgggagtg gtaaccacca 600
 cagagtgca gcacgcctcg 620

10

<210> 33

<211> 549

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

20

<400> 33

cttcggcggt cagtaacacg cgttaccgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 60
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggc actgaccott tctgcogtga 120
 tggcaagtct gttattcggg gccacggcg acgcgggcgat cccagctgag gaggaaaacc 180
 ccgccttctg gaaccggcag gcagcccagg cccttgatgt agccaagaag ttgcagccga 240
 tccagacagc tgccaagaat gtcacctct tcttggggga tgggatgggg gtgtctacgg 300
 tgacagctgc caggatccta aaagggcaga agaaggacaa actggggcct gagatacccc 360
 tggccatgga ccgcttccca tatgtggctc tgtccaagac atacaatgta gacaaacata 420
 tgccagacag tggagccaca gccacggcct acctgtgcgg ggtcaagggc aacttccaga 480
 ccattggctt gagtgcagcc gcccgcttta accagtgcga cagcacagc ggcaacgagg 540
 tcatctccg 549

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	
cgccctgctga gcaggaaccc ccgcggcttc ttccctcttcg tggagggtgg tcgcacgcac	120	10
catgggtcatc atgaaagcag ggcttaccgg gcactgactg ggacgatcat gttcgacgac	180	
gacattgaga gggcgggcca gctcaccagc gaggaggaca cgctgagcct cgtcactgcc	240	
gaccactccc acgtcttctc cttcggagggc tccccctgc gagggagctc catcttcggg	300	
ctggcccctg gcaaggcccg ggacaggaag gcctacacgg tcctcctata cggaaacggt	360	
ccaggctatg tgcacaagga cggcgcccg ccggatgta ccgagggcga gagcgggagc	420	
cccaggtatc ggcagcagtc agcagtgcc ctggacgaag agaccacgc aggcgaggac	480	
gtggcggtgt tcgcgcgcgg ccgcagggc cacctggtgc acggcgtgca ggaggagacc	540	20
ttcgtggcgc acatcatggc ctttgcgggc tgcgtggagc cctacaccga ctgcaatctg	600	
ccagcccccct ccaccgccac cagcatcccc gactgataat ctagaggteg aaattcacct	660	
cgaaagc	667	

<210> 35

<211> 661

<212> DNA

<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase

30

<400> 35		
caccgagact ccacactgga cccctccctg atggagatga cagaggctgc cctgcgcctg	60	
ctgaacagga acccccgagg ttctctctc tccgtggagg gtggtcgcat cgaccatggt	120	
catcatgaaa gcagggctta ccgggcactg actgagaaga tcatgttcga cgacgccatt	180	
gagagggggg gccagctcac cagcgaggag gacacgctga gcctcgtcac tgccgaccac	240	
tcccaagtct tctccttcgg aggtacccc ctgcgaggga gctccatctt cgggctggcc	300	
cctggcaagg cccgggacag gaaggcctac acggctcctc tatacggaaa cgggccaggc	360	
tatgtgctca aggacggcgc ccggccggat gttaccgaga gcgagagcgg gagccccgag	420	10
tatcggcagc agtcagcagt gccctggac gaagagaccc acgcaggcga ggacgtggcg	480	
gtgttcgcgc gcggcccgca ggcgcacctg gttcacggcg tgcaggagca gaccttcata	540	
gcgcacgtca tggccttcgc cgcctgcctg gagccctaca ccgcctgoga cctggcgccc	600	
cccgccggca ccaccgactg ataaaagttt ggctctagag gtcgaaatto acctcgaaa	660	
c	661	
<210> 36		
<211> 660		20
<212> DNA		
<213> Calf intestinal alkaline phosphatase and human placental phosphatase		
<400> 36		
accgagactc cacactggac ccctccctga tggagatgac agaggctgcc ctgcgcctgc	60	
tgagcaggaa ccccgcgagg ttcttctct tctgtggagg tggtcgcac gaccatggtc	120	
atcatgaaag cagggcttac cgggcactga ctgagacgat catgttcgac gacgccatcg	180	30
agagggcggg ccagctcacc agcgaggagg acacgctgag cctcgtcact gccgaccact	240	
cccacgtctt ctcttcgga ggctacccc tgogagggag ctccatcttc gggctggccc	300	
ctggcaaggc ccgggacagg aaggcctaca cggctcctct atacggaaac ggtccaggct	360	
atgtgctcaa ggacggcgcc cggccggatg ttaccgagag cgagagcggg agccccgagt	420	
atcggcagca gccagcagtg cccctggacg aagagacca cgcaggcgag gacgtggcgg	480	
tgttcgcgcg cggcccgag gcgcacctg ttcacggcgt gcaggagcag accttcatag	540	40
cgcacgtcat ggccttcgcc gcctgcctgg agccctacac cgcctgcgac ctggcgcccc	600	
cgcgcggcac caccgactga taaaagcttg gctctagagg tcgaaattca cctcgaaagc	660	

1410 1420 1430 1440 1450
 CIAP : GAGCCCTGTATCGGCAGCAGCGCGCTGCCCTCTGTAGGAGACCCA : 1450
 HPAP : CCCCCTGTATCGGCAGCAGCGCGCTGCCCTCTGTAGGAGACCCA : 1450
 AP2 : CCCCCTGTATCGGCAGCAGCGCGCTGCCCTCTGTAGGAGACCCA : 1467
 AP9 : CCCCCTGTATCGGCAGCAGCGCGCTGCCCTCTGTAGGAGACCCA : 1461
 AP13 : CCCCCTGTATCGGCAGCAGCGCGCTGCCCTCTGTAGGAGACCCA : 1460

[illegible]

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 8 3 6 7 1 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 8 2 3 6 2 イン デア アウ 2 1
- (72)発明者 ケンクリース, ヤーネット
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 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