

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4295386号
(P4295386)

(45) 発行日 平成21年7月15日(2009.7.15)

(24) 登録日 平成21年4月17日(2009.4.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

A

請求項の数 4 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-126494
 (22) 出願日 平成11年5月6日(1999.5.6)
 (65) 公開番号 特開平11-332586
 (43) 公開日 平成11年12月7日(1999.12.7)
 審査請求日 平成18年4月25日(2006.4.25)
 (31) 優先権主張番号 19819962:7
 (32) 優先日 平成10年5月5日(1998.5.5)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

微生物の受託番号 DSM ACC2348

微生物の受託番号 DSM ACC2349

微生物の受託番号 DSM ACC2350

(73) 特許権者 591215177
 ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエ
 ムペーハー
 ドイツ連邦共和国 68298 マンハイ
 ム, サンドホファーシュトラッセ 116
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (72) 発明者 ヴェルナー ホエルク
 ドイツ連邦共和国 デーラー 82377ペ
 ンツバーグ, アン デル フライハイ
 ト
 73

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高活性アルカリ性ホスファターゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示された DNA (b I A P II)。

【請求項 2】

請求項 1 に記載された c DNA を含むベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のベクターを含む真核または原核細胞。

【請求項 4】

請求項 1 に記載された DNA を用いることを特徴とする、3000 U/mg より高い比活性を有する高活性組換えアルカリ性ホスファターゼを産生する方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する分野】

本発明は、3000U/mg以上の比活性を有する真核生物高活性アルカリ性ホスファターゼをコードする DNA に関する。また、本発明は、本発明の DNA の産生方法、本発明の DNA を含むベクター、ならびにかかるベクターを含む細胞系に関する。本発明は、さらに、本発明の DNA によってコードされる、3000U/mg以上の比活性を有する組換え高活性アルカリ性ホスファターゼに関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

アルカリ性ホスファターゼ (A P) は、E.coliから哺乳動物に至る全ての生物において見出される、二量体、亜鉛含有の非特異的ホスホモノエステラーゼである (McCombら, 1979)。種々のアルカリ性ホスファターゼの一次構造を比較したところ、高度に相同性があることが示された (E.coliと哺乳動物 A P の間の相同性は25~30%) (Millan, 1988; Harris, 1989)。

【0003】

ヒトおよび高等動物においては、A P ファミリーは異なる遺伝子座においてコードされる4つのメンバーからなる (Millan, 1988; Harris, 1989)。アルカリ性ホスファターゼファミリーとしては、組織特異的 A P (胎盤 A P (P L A P)、生殖細胞 A P (G C A P) および腸 A P (I A P)) ならびに主に肝臓、腎臓および骨に局在する非組織特異的 A P (T N A P) が挙げられる。

10

【0004】

従来公知の A P の決め手となる特性は、比活性がE.coli A P よりも10~100倍高い哺乳動物 A P の触媒活性の大きな変動性である。哺乳動物 A P の中で、ウシ腸由来の A P (b I A P) が最も高い比活性を示す。この特性により、b I A P は診断試薬またはD N A の脱リン酸化のための酵素抱合体などのバイオテクノロジー用途に対して魅力的である。1985年、BesmanおよびColemanは、ウシ腸に2つの I A P イソ酵素、すなわち子ウシ腸由来の I A P および成熟ウシの腸由来の I A P (b I A P) が存在することを、クロマトグラフィーにて精製した A P 画分のアミノ末端配列決定によって立証した。アミノ末端における明確な相違が、成熟ウシの b I A P (LVPVEEED) と子ウシ腸由来の b I A P (LIPAEEN) の間に示されている。1993年、Weissigらは、比活性約3000U/mgでN-末端がLVPVEEEDである組換え b I A P (b I A P I) をクローニングすることによって正確な生化学的特性付けを行った。しかしながら、最大8000U/mgまでの比活性を有する子ウシ由来の b I A P も市販されているが (Boehringer Mannheim, Biozyme, Oriental Yeast)、さらなる特性付けは未だなされていない。これらの高活性アルカリ性ホスファターゼをクローニングする試みはすべてうまくいかなかった。したがって、組換え高活性アルカリ性ホスファターゼを産生することはできなかった。しかしながら、組換え体産生の可能性は、高活性アルカリ性ホスファターゼの経済的な産生には絶対必須である。

20

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

30

したがって、本発明の目的は、クローニングすることもできる組換え手段による高活性アルカリ性ホスファターゼを提供することである。本発明の意味に含まれる「高活性」は、本発明によるアルカリ性ホスファターゼが従来公知のアルカリ性ホスファターゼと比べて少なくとも10%高い活性を有することを意味するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

この目的は、本発明にしたがって、322位のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基よりも小さく、3000U/mg以上、好ましくは少なくとも3500U/mgの比活性を有する真核生物高活性アルカリ性ホスファターゼをコードするD N A の提供によって達成された。本発明の意味においては、真核生物D N A が好ましい。もはやイントロンを含まないD N A を意味する真核生物c D N A が特に好ましい。「アスパラギン酸残基よりも小さいアミノ酸残基」という用語は、アミノ酸であるアスパラギン酸残基の構造よりも小さい空間的寸法を有するあらゆるアミノ酸、好ましくは天然アミノ酸もしくは天然アミノ酸から誘導されるアミノ酸と理解される。本発明のD N A は、アミノ酸残基322がグリシン、アラニン、トレオニン、バリンまたはセリンであるものが好ましい。本発明のD N A は、アミノ酸残基322がグリシンまたはセリンであるものが特に好ましい。配列番号 (SEQ ID NO.) 1、3および5 (図1、3、5) に記載のD N A ならびに配列番号2、4および6 (図2、4、6) に記載の関連アミノ酸配列は、本発明の一部である。また、本発明は、N末端が配列番号2、4および6に記載のc D N A と比べて長いか短いということのみが前述と異なるc D N A にも関する。そのような場合、配列番号2、4および6の322位に対する名称はそれに応

40

50

じて変化する。例えば、N末端が配列番号2、4および6よりもXアミノ酸長いか短い場合、関連する322位もXアミノ酸の分だけシフトする。

【0007】

配列番号1は、高活性bIAP IIイソ酵素の配列をコードするDNAを含む。天然酵素は公知であるが、特性付けされておらず、クローニングすることができない。したがって、高活性bIAP IIイソ酵素のアミノ酸配列決定が本発明の主題である。子ウシ腸由来の、高比活性を有する高度に精製された画分(Boehringer Mannheim)を用いて配列を決定した。高活性APのペプチド地図をエンドプロテイナーゼLysC、AspN、GluC、トリプシンによる切断ならびにブロムシアンによる化学的切断によって作製した。この手法で産生させたペプチドを逆相HPLCによって分離し、単離した。各ペプチドをエレクトロスプレー質量分光法によって分析し、エドマン分解によって配列決定した。この方法で得られた配列を、刊行物に記載されたbIAP Iの配列(Weissigら, 1993)と比較した。予想どおり、bIAP IIのアミノ末端はBesmanおよびColeman(J. Biol. Chem. 260, 11190-11193(1985))によって記載されたような出発配列LIPAEENを有している。bIAP IIの完全アミノ酸配列を配列番号2に示す(図2)。この配列番号2によれば、bIAP IIはbIAP Iと比べて合計24個のアミノ酸置換を有する。単離された高活性bIAP IIイソ酵素のアミノ酸数は、480アミノ酸である。1798bpのヌクレオチド配列(図1)は、514アミノ酸のコード領域を含む。481位から514位までの可能なアミノ酸は、広い制限範囲内で変動し得る。

【0008】

以下、本発明は従来知られていない2つの新規bIAP(bIAP IIIおよびbIAP IV)のクローニングおよび完全特性付けを記載する。ウシ腸の異なる切片由来のRNA試料においてノーザンブロット分析を行った。最も強いハイブリダイゼーションシグナルを有するプローブのcDNAバンクを、ベクターIZAP II(Stratagene、サンディエゴ、CA、USA)においてオリゴdTプライマー(Stratagene、サンディエゴ、CA、USA)を用いて準備した。完全なバンク(1.0×10^6 組換えクローン)をbIAP I遺伝子のエキソンI~VIIIの領域をカバーするbIAP Iの1075bp HindIII断片を用いてスクリーニングした。65クローンを単離して配列決定した。このプロセスにおいて、2つの新規bIAPが同定された(bIAP IIIおよびbIAP IV)。その特性付けをさらに下記に記載する。これらはbIAP IともbIAP IIとも完全に相同ではなかった。bIAP IIIおよびIVのヌクレオチド配列を図3および5に示す。bIAP I~IVの配列の相違を図7に示す。しかしながら、新規bIAPはどれも予想したN末端LIPAEENを有しておらず、従来記載されていない新規のN末端を有していた(図7参照)。2つの新規bIAPイソ酵素のcDNAを適当な制限酵素を用いて再切断し、CHO発現ベクターpcDNA-3(例えば、Invitrogen社、サンディエゴ、CA、USA製)にライゲーション(連結)によって挿入した。新規bIAPイソ酵素を含むクローンをInvitrogenによって記載された方法にしたがって発現させ、イソ酵素の特性付けを行った。種々の宿主におけるbIAP遺伝子の発現は、WO 93/18139に記載されている(CHO細胞、E.coli、バキュロウイルス系)。この特許文献に記載されている方法、ベクターおよび発現系は、本出願の開示の一部である。本発明は、さらに、天然および組換え高活性アルカリ性ホスファターゼbIAP IIIおよびbIAP IVに関する。配列番号4および6に記載のアルカリ性ホスファターゼが特に好ましい。bIAP IIIおよびbIAP IV遺伝子を含むCHO細胞系はDSMZ、すなわち「Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH」、Mascheroder Weg 1b、D-38124 Braunschweigに寄託した(DSM ACC 2349、DSM ACC 2350)。

【0009】

以下、本発明は、bIAP I、IIIおよびIVの突然変異断片および野生型断片のライゲーションによるbIAP II配列の構築を記載する。このプロセスによって機能的イソ酵素をコードする一連の中間産物(L1N8、INT1、INT2およびINT3)を作製した。これらの中間産物を構築するために、各場合において、改変されるbIAP-cDNAの一部を適当な制限酵素を用いて切り出し、制限酵素を用いた消化による適合末端を有

10

20

30

40

50

する、所望の突然変異を含む別の b I A P - c D N A のセグメントで置換した。異なる b I A P - c D N A セグメントのライゲーションによって導入することができない突然変異は、部位特異的突然変異誘発によって導入した。その後、突然変異断片を適当な制限酵素を用いて再切断し、同様に切断した、適合末端を有する b I A P - c D N A に連結した (図 8)。次いで、この方法において導入された突然変異を制限分析および配列決定によって調べた。

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の主題は、1つまたは複数のアルカリ性ホスファターゼの D N A の突然変異断片および野生型断片が連結されていることを特徴とする、本発明の D N A の産生方法である。さらに、本発明は、機能的イソ酵素をコードし、本発明の上記方法において中間産物として形成される c D N A に関する。さらに、本発明は、本発明の c D N A を含むベクターに関する。

10

【 0 0 1 1 】

本発明のさらなる主題は、本発明のベクターを含む細胞系である。適当な細胞は、例えば、C H O、Pichia、Hansenula もしくは Saccharomyces cerevisiae のような真核細胞および Aspergillus、E.coli のような原核細胞であり、E.coli、酵母および C H O 細胞が特に好ましい。E.coli 株に適した出発ベクターは、例えば、pTE、pTaq、bPL、pBluescript である。適当な E.coli 株は、例えば、XL1-Blue、HB101、RR1 M15、BL21(DE)、MC 1000 などである。適当な Pichia ベクターは、例えば、pGAPZ および pPICZ (Invitrogen、サンディエゴ、CA、USA) である。C H O 細胞系に適したベクターは、例えば、pcDNA-3 (Invitrogen、サンディエゴ、CA、USA) である。b I A P II 遺伝子を含む C H O 細胞系は、D S M Z、すなわち「Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH」、Mascheroder Weg 1b、D-38124 Braunschweig に寄託した (DSM ACC 2348)。

20

【 0 0 1 2 】

組換え b I A P I、II、III および IV イソ酵素の速度論的特性付けにより、触媒特性に関してかなりの相違が示された (図 9)。例えば、b I A P II (約 8600U/mg) は b I A P I (約 2700U/mg) よりも比活性が 300% 以上、すなわち 3 倍以上高い。また、b I A P III および b I A P IV も、b I A P I よりもそれぞれ約 1.8 倍 (約 4700U/mg) および約 2.6 倍 (> 6700U/mg) 高い活性を示し (図 9)、百分率では、それぞれ約 170% および 250% の増加に相当する。さらに、イソ酵素の熱安定性においてかなりの測定可能な相違が存在した。b I A P I は、最も熱安定性のあるイソ酵素であり、b I A P II および III の T_m 値は b I A P I よりも 7 °C 低く、b I A P IV の T_m 値は b I A P I よりも 13 °C 低い (図 9)。 T_m 値は、10 分間のインキュベーション後に 50% 残留活性が測定される温度として理解される。

30

【 0 0 1 3 】

以下、本発明は、b I A P の比活性に影響を及ぼすアミノ酸残基の同定を記載する。これは、中間産物によって促進される。中間キメラ (chimers) L 1 N 8、I N T 1、I N T 2 および I N T 3 の発現により、24 アミノ酸の中の 11 が活性の増大のためのエフェクターから除外することができた (図 7)。

・ L 1 N 8 突然変異酵素は、b I A P I に匹敵する比活性を有しており；したがって、この場合において導入された突然変異 V2I、V4A および D8N は比活性の増大には関連していない。V2I という表記は、2 位のアミノ酸バリンがイソロイシンによって置換されることを意味する。

40

【 0 0 1 4 】

・ I N T 1 突然変異体は b I A P II に匹敵する比活性を有しており、したがってこの領域は重要である。

・ I N T 2 突然変異体は I N T 1 および b I A P II に匹敵する比活性を有しており、したがって、I N T 2 由来の突然変異 S380G、D411G、D416E、Q420R、Q427L、E453Q および T480A も除外することができる。

【 0 0 1 5 】

50

・ I N T 3 突然変異体の作製において、高比活性における変化は観察されず、したがって突然変異N192Yの効果は除外された。

13個の残りの残基の中のどれが高比活性にとって重要であるかを同定するために、本発明においては、b I A P II c D N Aをb I A P Iの対応するアミノ酸に対する単一突然変異のための鋳型として用いた。単一突然変異体N122K、I133M、A142S、K180M、M205K、E210V、E236A、G322DおよびI332G、ならびに結合したA289Q-A294V-Q297R-L299V b I A P II突然変異体が構築された(図9)。

【0016】

驚くべきことに、主に、突然変異G322Dは、b I A P IIの高比活性(約8600U/mg)を3分の1以下(2817U/mg)に低下させ得るものであり、よって、b I A P IIをb I A P Iと同程度の低さの比活性に変換し得るものであることがわかった。

この結果を検証するために、本発明において、復帰突然変異D322Gをb I A P Iに導入した。驚くべきことに、この場合、逆の効果、すなわち、10148U/mgという3倍以上の比活性の増大が測定され、したがってb I A P IIに匹敵する値が得られた(図9)。比較的活性の高いb I A P III(約4700U/mg)とより高活性のb I A P IV(>6700U/mg)のアミノ酸配列の比較により、再び、この結果が裏付けられる。b I A P IIIは322位にセリンを有し、b I A P IVはグリシンを有する。

【0017】

さらに、本発明においては、作製された突然変異体を熱安定性について調べた。その結果、b I A P Iとb I A P IIの間の熱安定性の相違は、1以上の置換の組み合わせ効果によるものである。[G³²²] b I A P Iならびに[D³²²] b I A P II突然変異体は、b I A P Iイソ酵素とb I A P IIイソ酵素の間にある安定度値を示す(図9)。D322G突然変異は、b I A P Iイソ酵素においてわずかな不安定化作用を有する(T₅₀においてほぼ4)のに対して、b I A P IIにおける置換G322Dにより、この突然変異酵素の安定性において対応する増大が生じる。しかしながら、野生型b I A P Iの熱安定性は得られない。

【0018】

したがって、本発明の主題は、特に、真核生物c D N Aによってコードされる、3000U/mg以上の比活性を有する高活性組換えアルカリ性ホスファターゼを提供することである。本発明による高活性組換えアルカリ性ホスファターゼは、322位にグリシン、アラニン、トレオニン、バリンまたはセリンがあるものが特に好ましい。本発明によるアルカリ性ホスファターゼは、322位にグリシンがあることが特に好ましい。

【0019】

本発明の高活性組換えアルカリ性ホスファターゼは、好ましくは、さらに、下記の位置の1つまたは複数に突然変異を有することが可能である：

その突然変異が活性の増大をもたらす1、108、125、149、181、188、219、221、222、223、224、231、252、258、260、282、304、321、330、331、354、383、385、400、405、413、428、431および461位のアミノ酸残基。さらに、本発明は、本発明の高活性アルカリ性ホスファターゼの産生方法に関する。また、本発明のアルカリ性ホスファターゼは、例えば、それらの熱安定性に関して特異的に突然変異誘発することによって改良することもできる。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明の高活性アルカリ性ホスファターゼの活性は、E.Mossnerら、Z. Physiol. Chem. 361(1980)、543-549にしたがって測定した。ただし、試験は、この論文に記載されている25ではなく37で行った。37での測定は、ジエタノール緩衝液中で活性を測定する際の世界적인通常の温度である(BM試験法5426)。

【0021】

本発明のA Pおよび公知のA Pのタンパク質測定は、280nmにおける水に対するタンパク質溶液の吸光度を測定することによって行われる。1mg/mlの濃度の低活性および高活性

10

20

30

40

50

A P 溶液の吸光度は280nmで1.0である (A280nm (1 mg / ml) は 1 に等しい)。
比活性は、活性とそれに伴うタンパク質の量の商を計算することによって決定される。

【 0 0 2 2 】

【実施例】

本発明は、さらに、下記の実施例によって説明される：

実施例 1 : クローニング

成熟ウシの腸から調製した gt 11 c D N A バンク (Clontech Laboratories, パロアルト (Palo Alto)、CA、USA) を、プローブとして b I A P I c D N A の 5' 末端から 1075bp の Hind III 断片を用いてスクリーニングした (Weissig ら, 1993)。この c D N A バンク由来のクローンを用いて成熟ウシの肝臓から調製された EMBL-3 SP6/T7 ゲノム c D N A バンク (Clontech Laboratories, パロアルト、CA、USA) をスクリーニングした。成熟ウシの小腸から Trisolv (商標名) 試薬を用いて単離された m R N A 由来のオリゴ d T プライマー (Stratagene、サンディエゴ、CA、USA) によって非増幅 ZAP II c D N A バンクを準備し、プローブとして b I A P I c D N A の 1075bp の Hind III 断片を用いてスクリーニングした。プローブをランダムプライムした (primed) D N A 標識キット (Boehringer Mannheim) を用いて放射能標識した。ファージ D N A を gt 11 および EMBL-3 SP6/T7 クローンについて記載したようにして調製した (Tsonis & Manes, 1988)。ZAP II クローンの in vivo 切断を製造業者 (Stratagene、サンディエゴ、CA) の指示にしたがって行った。ゲノムクローンを記載されているようなサザンブロット分析によって特性付けした (Sambrook ら, 1989)。gt 11 クローンの EcoRI c D N A 断片およびその他のバンクのクローン由来の種々の制限断片を KS+ベクター (Stratagene、サンディエゴ、CA、USA) にサブクローニングした。プラスミド D N A をアルカリ溶解によって調製した (Sambrook ら, 1989)。Sequenase を製造業者プロトコル (Amersham) にしたがって用いて配列決定を行った。b I A P III および IV の配列決定に使用したオリゴヌクレオチドを下記に記載する：

【 0 0 2 3 】

1s: SEQ ID NO.7: GCC AAG AAT

GTC ATC CTC; 1a: SEQ ID NO.8: GAG GAT GAC ATT CTT GGC;

2s: SEQ ID NO.9: GGT GTA AGT GCA GCC GC; 2a: SEQ ID

NO.10: GCG GCT GCA CTT AGA CC; 3s: SEQ ID NO. 11: AAT

GTA CAT GTT TCC TG; 3a: SEQ ID NO.12: CAG GAA ACA TGT

ACA TT; 4s: SEQ ID NO.13: CCA GGG CTT CTA CCT CTT; 4a:

SEQ ID NO.14: AAG AGG TAG AAG CCC TGG; 5s: SEQ ID NO.15:

ACC AGA GCT ACC ACC TCG; 5a: SEQ ID NO.16: AAG CAG GAA

ACC CCA AGA; 6s: SEQ ID NO.17: CTT CAG TGG CTT GGG ATT;

6a: SEQ ID NO.18: AAT CCC AAG CCA CTG AAG.

【 0 0 2 4 】

核酸配列は、MacVector 配列分析プログラム (International Biotechnologies 社、ニューヘブーン、CT、USA) を用いて分析した。

実施例 2 : b I A P II のアミノ酸配列の決定

約 500 μ g の精製した高活性 (約 6000U/mg) 子ウシ腸 A P を、450 μ l の 6 M 塩酸グアニジン、0.25 M の Tris、1 mM の E D T A、pH8.5 に溶解し、次いで 30 μ l のメルカプトエタノールを加えた。100 で 30 分間還元した後、35 μ l のビニルピリジンを加えることによってシステインをアルキル化し、この混合物を暗所で室温にて 45 分間インキュベートした。次いで、短い逆相 H P L C Aquapore RP300 カラム (30 \times 2.1mm、Applied Biosystems、Weiterstadt) 上で反応混合物をただちに脱塩した。0.1% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルの段階グラジエントを用いて結合した酵素を溶離させた。タンパク質を含む画分を蒸

発乾固した。酵素を脱グリコシル化するために、125 μ g の A P を 15 μ l の蒸留水および 6 μ l のインキュベーション緩衝液 (250mMの Na_2HPO_4 、50mMの E D T A、pH7.2) および 15 U の EndoF/PNGアーゼ (Boehringer Mannheim、Penzberg) に溶解した。混合物を一晩37

に維持し、その後、切断に用いた。還元され、アルキル化された A P を、種々の酵素 (エンドプロテイナーゼLysC、エンドプロテイナーゼAspN、エンドプロテイナーゼGluCおよびトリプシン (Boehringer Mannheim、Penzberg)) を用いて個々の酵素のデータシートの指示にしたがって酵素的に切断した。臭化シアン分解を、70% (v/v) ギ酸中10% (w/w) C NBrを用いて8時間行った。水を用いて溶解した後、溶液の容量をSpeedVac濃縮器 (Savant) を用いて減らし、逆相 H P L C に使用した。C - 末端トリプシンペプチドをカルボキシペプチダーゼ Y (8 ng / μ l) を用いて4分間消化し、放出されたペプチドを、Bruker Reflex III機器を用いるマトリックス支持レーザー脱着 / イオン化質量分析法により製造業者の指示にしたがって分析した。アセトニトリル / 水 (50/50、v/v) に2,5ジヒドロキシ安息香酸を加えたもの (10mg / ml) をマトリックスとして使用した。酵素的または化学的切断から得られたペプチドを逆相 H P L C によって、LiChrospher C18 selBカラム125 \times 2 mm (Merck、Darmstadt) 上で、0.1%トリフルオロ酢酸 / アセトニトリル溶媒系を用いて分離した。流量は300 μ l / 分であった。溶離剤を206nmにおけるUVモニタリングによって検出し、画分を手動で回収した。ペプチドの質量測定を、A P I IIIエレクトロスプレー質量分析計 (PE-Sciex、Langen) を用いて、製造業者の指示にしたがって行った。アミノ酸配列を492Aタンパク質シーケンサー (Applied Biosystems、Weiterstadt) を用いて、製造業者の指示にしたがって決定した。

実施例3：b I A P II c D N A の調製およびb I A P II突然変異誘発

b I A P IIをコードするc D N Aを調製するために、野生型制限断片ならびにc D N A b I A P I、IIIおよびIVの部位特異的突然変異誘発P C R断片を互いにライゲートして、L 1 N 8 (3断片) およびI N T 1 (9断片) c D N A中間構築物を作製した。次いで、I N T 1およびb I A P IIIを部位特異的突然変異誘発用の鋳型として使用し、これにより得られた断片を組み立てて完全I N T 2 (8断片) c D N Aを形成させた。次に、I N T 2の制限断片およびI N T 2の部位特異的突然変異誘発断片を組み立ててI N T 3 (5断片) c D N Aを形成させ、最後にb I A P II (4断片) c D N Aを形成させた。部位特異的突然変異誘発は、Tomicら(1990)の方法にしたがって、その認識配列 (GGTCTCN1/N5) からの距離で切断する制限酵素としてBsa I (II型) を用いて行った。二次的な突然変異が無いことを確認するために、P C R産物全てを配列決定した。全ての構築物を配列決定および制限消化によって確認した。部位特異的突然変異誘発断片の増幅に用いられるオリゴヌクレオチドプライマーの配列は下記のとおりである。プライマーの名称を最初に記載し、その後に配列を記載する (突然変異を示す位置に下線を引く)。

【 0 0 2 5 】

KS:SEQ ID NO.19: CGA GGT CGA
 CGG TAT CG; 1L:SEQ ID NO.20: GCA GGT CTC TCA GCT GGG ATG
 AGG GTG AGG; 8N:SEQ ID NO.21: GCA GGT CTC AGC TGA GGA GGA
 AAA CCC CGC; 122:SEQ ID NO.22: GCA GGT CTC TGT TGT GTC
 GCA CTG GTT; 1s:SEQ ID NO.7: GCC AAG AAT GTC ATC CTC;
 M133I:SEQ ID NO.23: GGT CTC TTT CTT GGC CCG GTT GAT CAC;
 S142A:SEQ ID NO.24: GGT CTC AAG AAA GCA GGG AAG GCC GTC;
 180:SEQ ID NO.25: GGT CTC GTG CAT CAG CAG GCA GGT CGG C;
 M180K:SEQ ID NO.26: GGT CTC ATG CAC AGA AGA ATG GCT GCC
 AG; K205M:SEQ ID NO.27: GGT CTC AAA CAT GTA CAT TCG GCC
 TCC ACC; V210E:SEQ ID NO.28: GT CTC CAT GTT TCC TGA GGG
 GAC CCC A; A236E:SEQ ID NO.29: GGT CTC CTG CCA TTC CTG
 CAC CAG GTT; 236:SEQ ID NO.30: GGT CTC TGG CAG GCC AAG
 CAC CAG GGA; 289:SEQ ID NO.31: GGT CTC CAG GGT CGG GTC
 CTT GGT GTG; E289A:SEQ ID NO.32: GGT CTC GAC CCT GGC GGA
 GAT GAC G; 330:SEQ ID NO.33: GGT CTC CTC AGT CAG TGC CAT
 ATA; 330E,V332I:SEQ ID NO.34: GGT CTC ACT GAG GCG ATC ATG
 TTT GAC; XIa:SEQ ID NO.35: TG CAC CAG GTG CGC CTG CGG
 GCC; N192Y:SEQ ID NO.36: GCC GCA CAG CTG GTC TAC AAC ATG
 GAT; S380G:SEQ ID NO.37: GCT GTC TAA GGC CTT GCC GGG GGC;
 N192Y:SEQ ID NO.38: GCC GCA CAG CTG GTC TAC AAC ATG GAT;
 D411G:SEQ ID NO.39: GGG GGT CTC GCT TGC TGC CAT TAA C:
 D416E:SEQ ID NO.40: GTT AAT GGT CTC ACA AGC GAG GAA CCC
 TCG; S428A:SEQ ID NO.41: CCC GTG GGT CTC GCT AGC CAG GGG
 CAC; D416E:SEQ ID NO.42: GTT AAT GGT CTC ACA AGC GAG GAA
 CCC TCG; T480S:SEQ ID NO.43: GAT GCT GGT CTC GGT GGA GGG
 GGC TGG CAG; 480:SEQ ID NO.44: CTG CCA GGT CTC ACC ACC
 GCC ACC AGC ATC; SP6:SEQ ID NO.45: CAT ACG ATT TAG GTG
 ACA CTA TAG; 236:SEQ ID NO.46: GGT CTC TGG CAG GCC AAG
 CAC CAG GGA; Q304R-:SEQ ID NO.47: GTA GAA GCC CCG GGG GTT
 CCT GCT; Q304+:SEQ ID NO.48: AGC AGG AAC CCC CGG GGC TTC
 TAC; E321D:SEQ ID NO.49: TGC CAT ATA AGC TTT GCC GTC ATG
 GTG.

10

20

30

40

【 0 0 2 6 】

種々のPCR反応を1～16と番号付けし、鋳型は、野生型cDNA bIAP I、IIIもしくはIVまたはキメラ構築物INT1もしくはINT2のいずれかである。オリゴヌクレオチドプライマー（括弧内）は上記で述べられている。1. bIAP IV (KS、1L) ; 2. bIAP IV (8N、122) ; 3. bIAP III (1S、M133I) ; 4. bIAP I (S142A、180) ; 5. bIAP I (M180K、K205M) ; 6. bIAP I (V210E、A236E) ; 7. bIAP I (236、289) ; 8. bIAP IV (E289A、330) ; 9. bIAP III (330E、V332I、XIa) ; 10. INT1 (N192Y、S380G) ; 11. INT1 (N192Y、D411G) ; 12. bIAP III (D416E、S428A) ; 13. INT1 (D416E、T480S) ; 14. INT1 (480、SP6) ; 15. INT2 (236、Q304R-) ; 16. INT2 (Q304R+、E321D)。下記の

50

ライゲーション反応を、全ての場合においてpcDNA-3 (Invitrogen、サンディエゴ、CA) 発現ベクターを用いて行った。断片を、上記のPCR反応番号にしたがって番号付けし、または野生型もしくはキメラcDNAの名称を付けて、その後制限酵素を用いてこの断片の付着末端を形成させた。L1N8 = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + 1 / EcoRI-BsaI + 2 / BsaI-BamHI + bIAP I / BamHI-XbaI。INT1 = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + L1N8 / EcoRI-NcoI + 3 / NcoI-BsaI + 4 / BsaI + 5 / BsaI + 6 / BsaI + 7 / BsaI + 8 / BsaI + 9 / BsaI-StuI + bIAP I / StuI-XbaI。INT2 = pcDNA-3 / EcoRI-NotI + INT1 / EcoRI-PstI + 10 / PstI-StuI + 11 / StuI-BsaI + 12 / BsaI + 13 / BsaI + 14 / BsaI + bIAP I / BsaI-NotI。INT3 = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + INT2 / EcoRI-NcoI + INT2 / NcoI-PvuII + 10 / PvuII-EagI + INT2 / EagI-HindIII + INT2 / HindIII-XbaI。bIAP II = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + INT3 / EcoRI-EagI + 15 / EagI-SmaI + 16 / SmaI-HindIII + INT3 / HindIII-XbaI。

10

【0027】

10個のさらなる構築物をbIAP IおよびIIの種々の動力学的特性の原因である残基を同定するために調製した。全構築物をpcDNA-3 / EcoRI-XbaIにサブクロニングした。5個の構築物をL1N8またはbIAP I (I) およびbIAP II (II) 間の制限断片の交換によって調製した。L1N8 EcoRI-PmIIおよび (II) PmII-XbaIを[N122K] bIAP II突然変異cDNAを調製するためにライゲートした。(II) EcoRI-BstEII、(I) BstEII-PvuII、(II) PvuII XbaIを[K180M] bIAP II突然変異cDNAに対して結合した。(II) EcoRI-EagI、(I) EagI-BstEII、(II) BstEII-XbaIを[A289Q、A294V、Q297R、L299V] bIAP II突然変異体に対してライゲートした。(II) EcoRI-EagI、(II) EagI-BstEII、(I) BstEII-HindIII、(II) HindIII-XbaIを[G322D] bIAP II突然変異体に対してライゲートした。(II) EcoRI-HindIII、(I) HindIII-SacI、(II) SacI-XbaIを[I332G] bIAP II突然変異体に対してライゲートした。5個のその他の位置は新たな部位特異的突然変異誘発が必要であった。下記のオリゴヌクレオチドをこれに用いた：

20

【0028】

I133M-:SEQ ID NO.50: GGT CTC TTT CTT GGC CCG GTT
CAT CAC; A142S-:SEQ ID NO.51: TGG TCA CCA CTC CCA CGG ACT
TCC CTG; M205K-:SEQ ID NO.52: GGT CTC AAA CAT GTA TTT TCG
GCC TCC ACC; E210V+:SEQ ID NO.53: GGT CTC ATG TTT CCT GTG
GGG ACC CCA GAC; E236A:SEQ ID NO.54: GGT CTC CTG CCA TGC
CTG CAC CAG GTT.

30

【0029】

鋳型としてbIAP IIを用いる下記の8個のPCR反応(a~h)を、これらのオリゴヌクレオチドおよび前に挙げたオリゴヌクレオチドを用いて行った：a. 1s, I133M-; b. S142A+, M205K-; c. 1s, A142S-; d. V210E+, 330-; e. E210V+, 330-; f. M180K+, E236A-; g. 236+, 330-; h. S142A, K205M-。これから形成された産物をサブクロニングし、配列決定し、次いで断片を下記のライゲーションのために単離した：I133Mに対して (II) EcoRI-NcoI、(a) NcoI-BsaI、(b) BsaI、PvuII、(II) PvuII-XbaI。A142Sに対して (II) EcoRI-NcoI、(c) NcoI-BstEII、(II) BstEII-PvuII、(II) PvuII-XbaI。M205Kに対して (II) EcoRI-BstEII、(b) BstEII-BsaI、(d) BsaI-HindIII、(II) HindIII-XbaI。E210Vに対して (II) EcoRI-BstEII、(h) BstEII-BsaI、(e) BsaI-HindIII、(II) HindIII-XbaI。E236Aに対して (II) EcoRI-NcoI、(II) NcoI-PvuII、(f) PvuII-BsaI、(g) BsaI-HindIII、(II) HindIII-XbaI。

40

実施例4：組換え酵素の産生および特性付け

全cDNA (bIAP I、bIAP II、bIAP III、bIAP IVおよび対応する突然変異体) を、pcDNA-3発現ベクター (Invitrogen、サンディエゴ、CA、USA) にクローニン

50

グし、チャイニーズハムスターの卵細胞（CHO細胞）に移入し、安定なトランスフェクタントを500 $\mu\text{g/ml}$ のジェネティシン（Gibco、BRL）の存在下で細胞を増殖させることによって選択した。組換えAPを、安定に移入されたCHO細胞から記載されたようにして抽出した（Hoylaertsら、1997）。0.1 $\mu\text{g/ml}$ の高親和性抗子ウシAPモノクローナル抗体（Scottish Antibody Production Unit、Lanarkshire、スコットランド）で被覆したマイクロタイタープレートを、 k_{cat} を測定するために酵素濃度を高めながらインキュベートした。結合酵素の活性を、基質としての30mMのp-ニトロフェニルホスフェートを含む1.0Mジエタノールアミン緩衝液（pH9.8）、1mM MgCl_2 、および20 μM ZnCl_2 を添加した後の、405nm、20 における経時的な吸光度の変化として測定した。生成したp-ニトロフェノールの濃度を、吸光係数 10,080リットル/モル/cmを用いて計算した。比活性既知の市販の調製物（Biozyme Laboratories、7822U/mgおよびBoehringer Mannheim、3073U/mg）ならびに精製bIAP II（8600U/mg）を標準として用いた。抗体を飽和させたこれらの溶液の酵素濃度（ E^0 ）を、同一試験条件下での既知の酵素濃度に対する活性の標準曲線から計算した。次いで、最大基質転化（ V_{max} ）を E^0 で割って k_{cat} を計算した。 K_m を計算するために、基質濃度を0.25~2.0mMのp-ニトロフェニルホスフェート（pNPP）間で変化させ、20 における初期反応速度を10分間以上測定した。 $[\text{pNPP}]/v$ 対X軸としての $[\text{pNPP}]$ の回帰曲線（Hanes曲線）により、 K_m が得られた。回帰において各x値に対して計算したy値の標準偏差の、 $K_m \cdot V_{max} \pm$ 標準偏差の標準偏差を得た回帰の勾配による割り算は、 $K_m \pm$ 標準偏差をy切片 \pm 標準偏差で割ることによって適当な方程式を用いて計算した。比活性を、抗体飽和活性に基づいて、Biozymeに対して計算した。熱安定性曲線を、前に記載されたように（Weissigら、1993）、10分毎に5 ずつ上昇させながら45~75 で抽出物をインキュベーションすることによって確立した。次いで、各試料の活性を上記のようにして測定し、残留活性を、非加熱試料に対する残留割合として計算した。50%残留活性が残る温度（ T_{50} ）を、温度曲線に対する残留活性から計算した。

【0030】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Highly active alkaline phosphatase

<130> PA99-140

10

<140>

<141>

<150> DE 198 19 962.7

<151> 1998-05-05

<160> 54

20

<210> 1

<211> 1798

<212> DNA

<213> Bovidae

<400> 1

30

```

gaattcggca cgagccaggt cccatcciga cctccgcca tcacacagct atgcagtgga 60
cctgtgtgct gctgtgtgtg ggccgtgtgg tacagctctc cctcaccctc atcccagctg 120
aggaggaaaa ccccgccctt tggaaaccgc aggcagccca ggcccttgat gtagccaaga 180
agttgcagcc gatccagaca gctgccaaaga atgcatcctt cttcttgggg gatgggatgg 240
gggtgcctac ggtgacagcc actcggatcc taaaggggca gatgaatggc aaactgggac 300
ctgagacacc cctggccaatg gaccagtcc catcgtggc tctgtccaag acatacaacg 360
tggacagaca ggtgccagac agcgcaggca ctgccactgc ctacctgtgt ggggtcaagg 420
gcaactacag aaccatcgtt gtaagtgcag ccgcccgtca caatcagtc aacacgacac 480

```

40

gtgggaatga ggtcacgtct gtgatcaacc gggccaagaa agcagggaag gccgtgggag 540
 tggtagaccac caccaggggtg cagcatgcct cccagccgg ggccctacgcg cacacgggtga 600
 accgaaactg gtactcagac gccgacctgc ctgctgatgc acagaagaat ggctgccagg 660
 acatgcgcgc acagctggtc tacaacatgg atatigacgt gatccigggg ggaggccgaa 720
 tgtacatgtt tctgagggg accccagacc ctgaataccc agatgatgcc agtgtgaatg 780
 gagtccggaa ggacaagcag aacctgggtgc aggaatggca ggccaagcac caggagagccc 840
 agtatgtgtg gaaccgcact gcgtctcttc aggcggccga tgactccagt gtaacacacc 900
 tcatgggcct cttigagccg gcagacatga agtataatgt tcagcaagac cacaccaagg 960
 acccgacctt ggccgagatg accgaggcgg ccttgcaagt gctgagcagg aacccccggg 1020
 gcttctacct ctctgtggag ggaggccgca ttgaccacgg tcacatgac ggcaaagcct 1080
 atatggcact gactgaggcg atcatgtttg acaatgccat cgccaaggct aacgagctca 1140
 cttagcgaact ggacacgctg atcttggca ctgcagacca ctcccatgtc ttctcttttg 1200
 gtggctacac actgcgtggg acctccattt tgggtctggc ccccggaag gccttagaca 1260
 gcaagtccta cactccatc ctctatggca atggcccagg ctatgcgtt ggccggggct 1320
 cgaggcccgga tgttaatggc agcacaagcg aggaacctc ataccggcag caggcggccg 1380
 tgcctctggc tagcgagacc cacgggggcg aagacgtggc ggtgttcgcg cgaggccgc 1440
 aggcgcacct ggtgcacggc gtgcaggagg agacctctgt ggcgcacatc atggcctttg 1500
 cgggtctgct ggagccctac accgactgca atctgccagc ccccgccacc gccaccagca 1560
 tccccagcg cgcgacctg gcggccagcc cgcctccact ggcgctgtg gctggggcga 1620
 tgcgtgtgt gctggcgccc acctgtgact aacccccacc agtccagggt ctggggattt 1680
 cccgtctcc tgcctaaaac ctccagctc aggccttacc ggagctacca cctcagagtc 1740
 cccacccga agtgcctatc tagctgccac tctgcagac ccgaccagc cggaattc 1798

10

20

30

<210> 2

<211> 480

<212> PRT

<213> Bovidae

<400> 2

40

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala

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

10

20

30

40

His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala
 245 250 255
 Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala
 260 265 270
 Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu
 275 280 285
 Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg
 290 295 300
 Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His
 305 310 315 320
 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn
 325 330 335
 Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile
 340 345 350
 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380
 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400
 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415
 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430
 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445
 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460
 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala

10

20

30

40

465

470

475

480

<210> 3

<211> 2640

<212> DNA

<213> Bovidae

10

<400> 3

gaattcggca cgagcgagac ccagactccc caggicccat cctgaccctc cgccatcaca 60
 cagctatgca gggggccctgc gtgctgtctgc tgcctgggctt gtggctacag ctctccctcg 120
 ccttcacccc agttgaggag gaagaccccg ccttcctggaa ccgccaggca gcccaggccc 180
 ttgatgtggc taagaagctg cagcccatcc agaaagccgc caagaatgtc atcctcttct 240
 tgggagatgg gatgggggtg cctacgggtg cagccactcg gatactgaag gggcagatga 300
 atgacaagct gggacctgag acacccctgg ccatggacca gtcccatatc gttgctctgt 360
 ccaagacata caacgtggac agacagggtc cagacagcgc aggcactgcc actgcctacc 420
 tgtgtggggt caagggaac tacagaacca tcgggtgtaag tgcagccgcc cgctacaatc 480
 agtgcaacac gacacgtggg aatgagggtc cgctgtgat gaaccgggccc aagaaagcag 540
 ggaagtcagt gggagtgggtg accaccacca ggggtgcagca cgctcccca gccgggtgctt 600
 atgcacacac ggtgaaccgt gactgggtact cagacgccga cctgccctgcc gatgcacaga 660
 cgtatggctg ccaggacatc gccacacaac tggtaacaa catggatatt gacgtgatcc 720
 tgggtggagg ccgaaagtac atgtttcttg aggggacccc agacctgaa taccacacag 780
 atgccagtgt gaattggagt cggaaggaca agcgggaatct ggtgcaggag tggcaggcca 840
 agcaccaggg agcccagtat gtgtggaacc gcacggagct ccttcaggca gccaatgact 900
 ccagtgttac acatctcatg ggctcttttg agccggcaga catgaagtat aatgttcagc 960
 aagaccccac caaggacccg accctggagg agatgacgga ggcggccctg caagtgtcga 1020
 gcaggaaccc ccagggtctc taccctctcg tggagggagg ccgcattgac cacggtcacc 1080
 atgatagcaa agcttataig gcgtgactg aggcgggtcat gtttgacaat gccatcgcca 1140
 aggctaacga gctcactagc gaactggaca cgctgatcct tgtcactgca gaccactccc 1200
 atgtcttctc ttgtgggtgc tacacactgc gtgggacctc cattttcggg ctggccccc 1260

20

30

40

gcaaggccctc agacaagaag tcctacacct ccattctcta tggcaatggc cctggctiagc 1320
 tgcttgggtgg gggctcaagg cccgatgita atgacagcat aagcgaggac cccatatacc 1380
 ggcagcaggc ggccgtgccc ctgtctagcg agaccacagg gggcgaagac gtggcgggtgt 1440
 tcgcgcgagg cccgcaggcg caccitggigc acggcgigca ggaggagacc ttcgtggcgc 1500
 acgtcatggc ctitgcgggc tgcgtggagc cctacaccga ctgcaatctg ccggcccccct 1560
 ctggcctctc cgacgccgcg caccitggcgg ccagcgcgcc ttcgtiagcg ctgctggccg 1620
 gggcgatgct gctgtgtctg gcgccgcct tgiactgacc cccaccaact ccaggctctg 1680
 gggtttcccg ctttcttgcc ccaaaatctc ccagcgcagg ccccatctga gctaccacct 1740
 cagagtcacc acctgaagt cctatctagc gcactccaga ccgcgactca gccccaccac 1800
 cagagcttca cctcccagca acgaaggagc ctiagctcac agcccttcat gggccagacc 1860
 attctggaga ctgaggccct gattttcccg acccaacttc agtggcttga gatitgtgt 1920
 tctgccacc cggatccctg taagggggct cggaccatcc agactccccc cactgcccac 1980
 agccgaacct gaggaccagg ctggcacggt ccagggggtc ccaggcccgg ctggaaccca 2040
 catctttgcc tticaggaga ccttgggact gtgggggttc caggaggcgt ggcttcttgg 2100
 aggcgtggct tcggaggggt ggcttccgag aaggcgiggc tccctgtcct ggaaccaccc 2160
 tgtgggnatc tggggcccaa ggagatgtct ggggcaaaga gtgccggggg accttggaca 2220
 cagaatcttc agcggccctt cctaggaacc cagcagtacc attatagaga ggggacaccg 2280
 acacagagga gaggagactt gtcccaggtc cctcagctgc tgtgaggggt gaccttgggt 2340
 tccggttacc aggcgtgggg atcccaggag cagcggggga cctgggggtg gggacacagg 2400
 cccacactc ctgggagggg ggaagcagcc ctinaataaa ctgttccctg tgccgaatic 2460

10

20

30

<210> 4

<211> 511

<212> PRT

<213> Bovidae

<400> 4

Phe Ile Pro Val Glu Glu Glu Asp Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala

1

5

10

15

40

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

10

20

30

40

	245		250		255	
Ala Asn Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala						
	260		265		270	
Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp Pro Thr Lys Asp Pro Thr Leu						
	275		280		285	
Glu Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Gln						
	290		295		300	
Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His						
305		310		315		320
Asp Ser Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Val Met Phe Asp Asn						
	325		330		335	
Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile						
	340		345		350	
Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr						
	355		360		365	
Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Ser Lys Ala Ser Asp						
	370		375		380	
Lys Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val						
385		390		395		400
Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Asp Ser Ile Ser Glu Asp						
	405		410		415	
Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ser Ser Glu Thr His						
	420		425		430	
Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu						
	435		440		445	
Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Val Met Ala Phe						
	450		455		460	
Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ser						
465		470		475		480

10

20

30

40

Gly Leu Ser Asp Ala Ala His Leu Ala Ala Ser Ala Pro Ser Leu Ala
 485 490 495
 Leu Leu Ala Gly Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Pro Ala Leu Tyr
 500 505 510

<210> 5

<211> 2542

10

<212> DNA

<213> Bovidae

<400> 5

gaattcggca cgaggagacc cggcctcccc aggtcccatc ctgacctcc gccatcacac 60
 agccatgcag tgggcttgig tgcctgctgt gctgggcttg tggctacagc tctccctcac 120
 ctccatccca gctgaggagg aagaccccg cttctggaac cgccaggcag cccaggccct 180
 tgatgtagcc aagaagtgc agccgatcca gacagctgcc aagaatgca tctcttctt 240
 ggggatggg atgggggtgc ctacggigac agccactcgg atcctaaagg ggcagatgaa 300
 tggtaagctg ggacctgaga caccctggc catggaccag tcccatatcg tggctctgtc 360
 caagacatc aacgtggaca gacaggigcc agacagcgca ggcactigcca ctgcctacct 420
 gtgtggggtc aagggaact acaaaacct tggigtgaag gcagccgccc gctacaacca 480
 gtgcaacaca acaagtggca atgaggcac gctctgtatg aaccgggcca agaaagcagg 540
 aaagtcagtg ggagtggtga ccacctccag ggigcagcat gccctcccag ccggtgctta 600
 tgcacacacg gtgaaccgaa actgggtact agatgccgac ctgcttgccg atgcacagac 660
 gtatggctgc caggacatcg ccacacaact ggicaacaac atggatatig acgtgatcct 720
 ggggtggaggc cgaatgtaca tgtttctga ggggaccccg gatcctgaat acccatacga 780
 tgtcaatcag actggagtc ggaaggacaa gcggaatcig gtgcaggagt ggcaggccaa 840
 gcaccaggga gccagtatg ttggaaccg cacggagctc ctccaggcag ccaatgacct 900
 cagtgtaca caccatcagg gccctttga gccggcagac atgaagtata atgttcagca 960
 agacccacc aaggaccga cctggagga gatgacggag gcggccctgc aagtgtgag 1020
 caggaacccc cagggtctt accctctgt ggaggaggc cgcatigacc acggtcacca 1080

20

30

40

tgaaggcaaa gcttataatgg cactgactga tacagtcattg ttigacaatg ccatcgccaa 1140
 ggctaacgag ctactatagcg aactggacac gcigatcccti gccacigcag accactccca 1200
 tgtcttctct ttiggtggct acacacigcg tgggacctcc atttctggc tggccccag 1260
 caaggccca gacaacaagt cctacacctc catctctat ggcaatggcc ctggctacgt 1320
 gcttgggtggg ggcttaaggc ccgatgtaa tgacagcata agcgaggacc cctcgtagcg 1380
 gcagcaggcg gccgtgcccc tgtctataga gtccacggg ggcgaggacg tggcgggtgt 1440
 cgcgcgaggc ccgcaggcgc acctggigca cggcgigcag gaggagacct tcgtggcgca 1500
 cgtcatggcc ttgctgggct gcgtggagcc ctacaccgac tgcaatctgc cggccccctc 1560
 tggctctcc gacgccgcgc acctggcggc cagcccgcti tcgtggcggc tgcgtggcgg 1620
 ggcatgctg ctgctgctgg cgcctgctt gtactgacct ccaccaactc caggctctgg 1680
 ggtttccgic ttctctgcca aaaatctccc agcgagacc ccaccagagc taccacctcg 1740
 gagtctccac cctgaagtc tatcttagcg gccactcccg gatcccgac caggccccac 1800
 tagcagagct tcactccca gaaatgaagg atcaccctc cagcaacgaa gaagccicag 1860
 ctacagccc tcatggccc agcccatcca gaggtgagg cctgatctc cctgtgacac 1920
 ccgtagacct actgcccgc ccaactcca gtggcttggg atttctgtt ctgccacccc 1980
 taaccccagt aagggggctc ggaccatcca gactctccc actgcccaca accccacctg 2040
 agaaccaggc tagcacggc ccaaggctc caggccccgc tagaaccac accatgcctt 2100
 tcaggagacc ctggggctcc ggggttccg ggaggcgigg ctctcttagg aggcgtggaa 2160
 actgaggagg cacggttcti gaggaggcgt gcgtctggg gagctgiggc ttccggctct 2220
 ccccatgccc tgtgggctcc tccctaacca aggagacggc caaggagacg tctggaacca 2280
 ggagcggcgg gggaacctig cagagccctc agcaacccct cctaggaacc cagggtaccg 2340
 ttagagagag gagacagca cacagaggag aggagactig tcccaggctc ctacgtgct 2400
 atgaaggigg ccccggtgcc cctccaggc tgggagatcc caggagcagc gggggagctg 2460
 gtgggtgggg acacagcccc gccctcatgg gagggaggaa gcagccctca aataaactgt 2520
 tctaagtgtg aaaaaatcta ga 2542

10

20

30

<210> 6

<211> 511

<212> PRT

40

〈213〉 Bovidae

〈400〉 6

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

10

20

30

40

Pro Glu Gly Thr	Pro Asp	Pro Glu Tyr	Pro Tyr Asp	Val Asn Gln Thr	
210		215		220	
Gly Val Arg Lys	Asp Lys Arg	Asn Leu Val	Gln Glu Trp	Gln Ala Lys	
225		230		235	240
His Gln Gly Ala	Gln Tyr Val	Trp Asn Arg	Thr Glu Leu	Leu Gln Ala	
	245		250		255
Ala Asn Asp Pro	Ser Val Thr	His Leu Met	Gly Leu Phe	Glu Pro Ala	10
	260		265		270
Asp Met Lys Tyr	Asn Val Gln	Gln Asp Pro	Thr Lys Asp	Pro Thr Leu	
	275		280		285
Glu Glu Met Thr	Glu Ala Ala	Leu Gln Val	Leu Ser Arg	Asn Pro Gln	
	290		295		300
Gly Phe Tyr Leu	Phe Val Glu	Gly Gly Arg	Ile Asp His	Gly His His	
305		310		315	320
Glu Gly Lys Ala	Tyr Met Ala	Leu Thr Asp	Thr Val Met	Phe Asp Asn	20
	325		330		335
Ala Ile Ala Lys	Ala Asn Glu	Leu Thr Ser	Glu Leu Asp	Thr Leu Ile	
	340		345		350
Leu Ala Thr Ala	Asp His Ser	His Val Phe	Ser Phe Gly	Gly Tyr Thr	
	355		360		365
Leu Arg Gly Thr	Ser Ile Phe	Gly Leu Ala	Pro Ser Lys	Ala Ser Asp	30
	370		375		380
Asn Lys Ser Tyr	Thr Ser Ile	Leu Tyr Gly	Asn Gly Pro	Gly Tyr Val	
385		390		395	400
Leu Gly Gly Gly	Leu Arg Pro	Asp Val Asn	Asp Ser Ile	Ser Glu Asp	
	405		410		415
Pro Ser Tyr Arg	Gln Gln Ala	Ala Val Pro	Leu Ser Ser	Glu Ser His	
	420		425		430
Gly Gly Glu Asp	Val Ala Val	Phe Ala Arg	Gly Pro Gln	Ala His Leu	40

	435		440		445										
Val	His	Gly	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Phe	Val	Ala	His	Val	Met	Ala	Phe
	450				455					460					
Ala	Gly	Cys	Val	Glu	Pro	Tyr	Thr	Asp	Cys	Asn	Leu	Pro	Ala	Pro	Ser
465					470					475				480	
Gly	Leu	Ser	Asp	Ala	Ala	His	Leu	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu	Ala
				485				490					495		
Leu	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Tyr	
			500					505					510		

10

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 7

gccaagaatg tcatcctc

18

30

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

40

<400> 8

gaggatgaca ttcttggc

18

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 9

ggtgtaagtg cagccgc

17

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

30

<400> 10

gcggctgcac ttagacc

17

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 11

aatgtacatg tttcctg 17

10

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

20

<400> 12

caggaaacat gtacatt 17

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 13

ccagggttc tacctctt 18

40

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV 10

<400> 14

aagaggtaga agccctgg 18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA 20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 15

accagagcta ccacctcg 18 30

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV 40

<400> 16

aagcaggaaa cccaaga

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 17

cttcagtggc ttgggatt

18

20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> An oligonucleotide used to sequence the bIAPIs III and IV

<400> 18

aatccaagc cacigaag

18

<210> 19

<211> 17

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 19

10

cgaggtcgac ggtatcg

17

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 20

gcaggtctct cagctgggat gagggtagg

30

30

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

40

<400> 21

gcaggcttca gctgaggagg aaaaccccgc

30

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 22

20

gcaggctctt gtgtgttcgc actggtt

27

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 23

ggctcttttc ttggcccggt tgatcac

27

40

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

10

<400> 24

ggctctcaaga aagcagggaa ggccgtc

27

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 25

ggctctcgtgc atcagcaggc aggtcggc

28

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 26

ggctcattgc acagaagaat ggctgccag 29

<210> 27

10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments 20

<400> 27

ggctcacaac atgtacattc ggctccacc 30

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 28

40

gtctccattg ttctgaggg gacccca 27

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 10
<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 29
ggctctctgc cattcctgca ccagggtt 27

<210> 30 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments 30

<400> 30
ggctctctggc aggccaagca ccaggga 27

<210> 31
<211> 27 40
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 31

10

ggctctccagg gtcgggtcct tgggtgtg

27

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 32

ggctctcgacc ctggcggaga tgacg

25

30

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

40

<400> 33

ggctctctca gtcagtcca tata

24

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 34

20

ggctctactg aggcgatcat gtttgac

27

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 35

tgcaccaggt gcgcctgcgg gcc

23

40

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

10

<400> 36

gccgcacagc tggctacaa catggat

27

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 37

gctgtctaag gccttgccgg gggc

24

30

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 38

gccgcacagc tggcttaca catggat

27

<210> 39

10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

20

<400> 39

gggggtctcg ctgtgtcca ttaac

25

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 40

40

gttaatggtc tcacaagcga ggaaccctcg

30

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 41

cccgtagggc tcgctagcca ggggcac

27

<210> 42

20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

30

<400> 42

gttaatggc tcacaagcga ggaaccctcg

30

<210> 43

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 43

gatgctggtc tcggtggagg gggctggcag

30

10

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 44

ctgccaggtc tcaccaccgc caccagcatc

30

<210> 45

30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

40

<400> 45

catacgattt aggtgacact atag

24

<210> 46

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 46

ggctctctggc aggccaaagca ccaggga

27

20

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

30

<400> 47

gtagaagccc cgggggttcc tgct

24

<210> 48

<211> 24

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

10

<400> 48

agcaggaacc cccggggcctt ctac

24

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 49

tgccatataa gctttgccgt catggtg

27

30

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

nized fragments

<400> 50

ggctctctttc ttggcccggg tcatcac

27

<210> 51

<211> 27

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

20

<400> 51

tggtcaccac tcccacggac ttccctg

27

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

<400> 52

ggctctcaaac atgtattttc ggccctccacc

30

40

〈210〉 53

〈211〉 30

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

10

〈400〉 53

ggctcattgt ttctgtggg gacccagac

30

〈210〉 54

〈211〉 27

20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

30

〈400〉 54

ggctcctgc catgctgca ccaggtt

27

【 0 0 3 1 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号7 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号8 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号9 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号10 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

40

配列番号11 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号12 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号13 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号14 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号15 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号16 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号17 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号18 : bIAP IIIおよびIVを配列決定するために使用したオリゴヌクレオチド

配列番号19 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

50

配列番号 44 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

50

配列番号 4 5 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 4 6 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 4 7 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 4 8 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 4 9 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

10

配列番号 5 0 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 5 1 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 5 2 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 5 3 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 5 4 : 部位特異的突然変異断片を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 (A) 配列番号 1 : b I A P II のヌクレオチド配列 (1798bp)。108 位が成熟 b I A P II のコード領域の開始位置。1649 位が末端。

(B) 配列番号 1 : b I A P II のヌクレオチド配列 (1798bp)。108 位が成熟 b I A P II のコード領域の開始位置。1649 位が末端。

【図 2】 配列番号 2 : 切断部位を有する b I A P II のアミノ酸配列 (480 アミノ酸)。

【図 3】 (A) 配列番号 3 : b I A P III のヌクレオチド配列 (2460bp)。123 位が成熟 b I A P III のコード領域の開始位置。1655 位が末端。

(B) 配列番号 3 : b I A P III のヌクレオチド配列 (2460bp)。123 位が成熟 b I A P III のコード領域の開始位置。1655 位が末端。

30

【図 4】 配列番号 4 : b I A P III のアミノ酸配列 (511 アミノ酸)。

【図 5】 (A) 配列番号 5 : b I A P IV のヌクレオチド配列 (2542bp)。122 位が成熟 b I A P IV のコード領域の開始位置。1654 位が末端。

(B) 配列番号 5 : b I A P IV のヌクレオチド配列 (2542bp)。122 位が成熟 b I A P IV のコード領域の開始位置。1654 位が末端。

【図 6】 配列番号 6 : b I A P IV のアミノ酸配列 (511 アミノ酸)。

【図 7】 b I A P I、b I A P II、b I A P III および b I A P IV イソ酵素間のアミノ酸の相違。異なる残基のみを示す。アステリスクは、b I A P II の触媒活性の増大の原因である残基を同定するために個々の突然変異誘発に対して選択された位置を特定するものである。

40

【図 8】 (A) b I A P II DNA のライゲーション戦略。

(B) b I A P II DNA のライゲーション戦略。

【図 9】 組換え野生型およびキメラ b I A P 酵素、ならびに部位特異的突然変異誘発によって変化させた該 b I A P 酵素の突然変異体の動力学的パラメーターおよび熱安定性。*

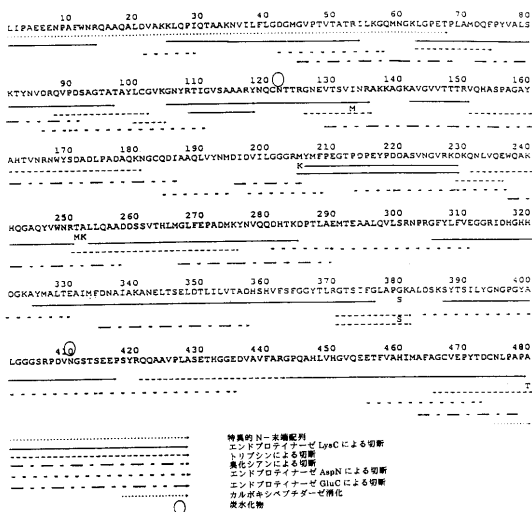
[Q V R V] b I A P II は [Q²⁸⁹、V²⁹⁴、R²⁹⁷、V²⁹⁹] b I A P II 突然変異体の略語である。

【図1】

(A)

```
1 GAATTCGGCA CGAGCCAGGT CCCATCCTGA CCCTCCGCC TCACACAGCT
51 ATGCAGTGGG CCGTGTGTCT GCTGTGCTG GGCCTGTGGC TACAGTCTC
101 CCTCACCTTC ATCCACAGTG AGGAGGAAAA CCCCGCCTTC TGAACCGCC
151 AGGCAGCCCA GGCCTTTGAT GTAGCCAAGA AGTTGCAGCC GATCCAGACA
201 GGTGCAAGA ATGTCATCCT CTTCTTGGG GATGGGATGG GGGTGCCTAC
251 GGTGACAGCC ACTCGGATCC TAAAGGGGCA GATGATGGC AAACCTGGAC
301 CTGAGACACC CCGGCCATG GACCAGTTCC CATACGTGGC TGTGTCCAAG
351 ACATACAACG TGGACAGACA GGTGCCAGAC AGCGCAGGCA CTGCCACTGC
401 CTACCTGTGT GGGGTCAAGG GCAACTACAG AACCATCGGT GTAAGTGCAG
451 CCGCCCGCTA CAATCAGTGC AACACGACAC GTGGGAATGA GGTACGTCT
501 GTGATCAACC GGGCCAAGAA AGCAGGGAAG GCGTGGGAG TGGTGACCAC
551 CACCAAGGTG CAGCATGCCT CCCAGCCGG GGCCTACGGC CACACGGTGA
601 ACCGAAACTG GTACTCAGAC GCCGACCTGC CTGCTGATGC ACAGAAGAAT
651 GGCTGCCAGG ACATCGCCGC ACAGCTGGTC TACAACATGG ATATTGACGT
701 GATCCTGGGT GGAGCCGAA TGTACATGTT TCCTGAGGG ACCCAGACC
751 CTGAATACCC AGATGATGCC AGTGTGAATG GAGTCCGAA GGACAAGCAG
801 AACCTGGTGC AGGAATGCCA GGCACAGCAC CAGGGAGCCC AGTATGTGT
851 GAACCGCACT GCGCTCCTTC AGGCGGCCGA TGAATCAGT GTAACACACC
901 TCATGGGCCT CTTTGAGCCG GCAGACATGA AGTATATGT TCAGCAAGAC
951 CACACCAAGG ACCCGACCCT GCGGAGATG ACAGAAGCGG CCCTGCAAGT
1001 GCTGAGCAGG AACCCCGGG GCTTCTACCT CTTCGTGGAG GGAGCCGCA
1051 TTGACCACGG TCACCATGAC GGCAAGCTT ATATGCACT GACTGAGCG
1101 ATCATGTTG ACAATGCCAT CGCAAGGCT AACGACTCA CTAGCAACT
1151 GGACACGCTG ATCCTTGTC CTGACAGCCA CTCCTATGTC TTCTCTTTG
1201 GTGGCTACAC ACTGCGTGGG ACCTCCATT TCGGTGTGGC CCGCGGCAAG
```

【図2】



(B)

```
1251 GCCTTAGACA GCAAGTCCTA CACCTCCATC CTCTATGGCA ATGGCCAGG
1301 CTATGCGCTT GCGGGGGGCT CGAGGCCCGA TGTTAATGGC AGCACAAGCG
1351 AGGAACCCCTC ATACCGGCAG CAGGCGGCGC TGCCCTTGGC TAGCGAGACC
1401 CACGGGGGGG AAGACGTGGC GGTGTTCGCG CAGGCCCCGC AGGCGCACCT
1451 GGTGCACGGC GTGCAGGAGG AGACCTTCGT GCGGCACATC ATGGCCTTTG
1501 CGGGTGCGT GGAGCCCTAC ACCGACTGCA ATCTGCCAGC CCGCGCCACC
1551 GCCACCAGCA TCCCGCAGCG CCGGCACCTG GCGGCACAGC CGCCTCCACT
1601 GCGGTGCTG GCTGGGGGCA TGCTGTCTGT GCTGCGCCGC ACCTTGTACT
1651 AACCCCCACC AGTTCAGGT CTCGGGATT CCGCTCTCC TGCCCAAAAC
1701 CTCACAGCTC AGGCCCTACC GGAGCTACCA CCTCAGAGTC CCCACCCGCA
1751 AGTGCTATCC TAGCTGCCAC TCCTGCAGAC CCGACCCAGC CGGAATTC
```

【図3】

(A)

```
1 GAATTCGGCA CGAGCCAGAC CCAGACTCCC CAGGTCCCAT CCTGACCTC
51 CGCCATCACA CAGCTATGCA GGGGGCCTGC GTGCTGTGTC TGCTGGCCCT
101 GTGGCTACAG CTCTCCCTCG CTTTCATCCC AGTTGAGGAG GAAGACCCCG
151 CTTCTGGAA CGCCAGGCA GCCCAGGCC TGTGATGGC TAAGAAGCTG
201 CAGCCCATCC AGAAAGCCGC CAAGAATGTC ATCCTCTTCT TGGGAGATGG
251 GATGGGGGTG CCTACGGTGA CAGCCACTCG GATACGTAAG GGGCAGATGA
301 ATGACAAGCT GGGACCTGAG ACACCCCTGG CCATGACCA GTTCCCATAC
351 GTGGCTCTGT CCAAGACATA CAACGTGGAC AGACAGGTGC CAGACAGCGC
401 AGGCACTGCC ACTGCCTACC TGTGTGGGT CAAGGSCAAC TACAGAACCA
451 TCGGTGTAAG TGCAGCCGCC CGCTACATC AGTGCAACAC GACACGTGGG
501 AATGAGGTCA CGTCTGTGAT GAACCGGGCC AAGAAAGCAG GGAAGTCAGT
551 GGGAGTGGTG ACCACCACCA GGGTCAGCA CCGCTCCCA GCCGTGCTT
601 ATGCACACAC GGTGAACCGT GACTGGTACT CAGACGCCGA CCTGCTGCC
651 GATGCACAGA CGTATGGCTG CCAGGACATC GCCACAACAC TGGTCAACAA
701 CATGGATATT GAGCTGATCC TGGGTGGAGG CCGAAGTATC ATGTTTCTTG
751 AGGGGACCCC AGACCTGAA TACCCACAGC ATGCCAGTGT GAATGGAGTC
801 CGGAAGGACA AGCGGAATCT GGTGCAGGAG TGGCAGGCA AGCACCAGGG
851 AGCCAGTAT GTGTGGAACC GCACGGAGCT CTTCAAGCA GCCAATGACT
901 CCAGTGTAC ACATCTCATG GGCCTCTTTG AGCCGCCAGA CATGAAGTAT
951 AATGTTTACG AAGACCCAC CAAGGACCCG ACCCTGGAGG AGATGACGGA
1001 GCGGGCCCTG CAAGTGTCTG GCAGGAACCC CCAGGGCTTC TACCTCTTGG
1051 TGGAGGGAGG CCGCATTGAC CACGGTCACC ATGATAGCAA AGCTTATATG
1101 GCGCTGACTG AGCGGTCAT GTTTGACAT GCCATCGCA AGGCTAACGA
1151 GCTCACTAGC GAACCTGACA CGCTGATCTC TGTCACTGCA GACCACTCC
1201 ATGTCTTCTC TTTTGGTGGC TACACACTGC GTGGGACCTC CATTTTCGGT
```

(B)

1251 CTGGCCCCCA GCAAGGCCTC AGACAAGAAG TCCTACACCT GCATCCTCTA
 1301 TGGCAATGGC CCTGGCTACG TGCTTGGTGG GGGCTCAAGG CCCGATGTTA
 1351 ATGACAGCAT AAGCAGGAGC CCCTCATACC GGCAGCAGGC GGCGTGCCCC
 1401 CTGTCTAGCG AGACCCACGG GGGCGAAGAC GTGGCGGTGT TCGCGCGAGG
 1451 CCCGAGGCGC CACCTGGTGC ACGGCGTGCA GAGGAGAGCC TTCTGGCGGC
 1501 ACGTCATGGC CTTTGGGGCG TGCGTGGAGC CCTACACCGA CTGCAATCTG
 1551 CGGCCCCCTT CTGGCTCTCT CGACGCCGCG CACCTGGCGG CCAGCGCGCC
 1601 TTCGCTAGCG CTGTGGCGCG GGGCGATGCT GCTGCTGCTG GCGCCCGCCT
 1651 TGTACTGACC CCCACCAACT CCAGGTCTTG GGGTTTCCCG CTTTCTTGCC
 1701 CCAAAATCTC CCAGCGCAGG CCCCATCTGA GCTACACCTC CAGAGTCCCC
 1751 ACCCTGAAGT CCTATCTAGC GCACTCCAGA CCGCGACTCA GCCCCACCAC
 1801 CAGAGCTTCA CCTCCAGACA ACGAAGGAGC CTTAGCTCAC AGCCTTTTCAT
 1851 GGCCCGAGCC ATTCTGGAGA CTGAGGCCCT GATTTTCCCG ACCCAACTTC
 1901 AGTGGCTTGA GATTTTGTGT TCTGCCACCC CGGATCCCTG TAAGGGGGCT
 1951 CGGACCATCC AGACTCCCCC CACTGCCAC AGCCGAACCT GAGGACCAGG
 2001 CTGGCACGGT CCCAGGGGTC CCAGGCCCGG CTGGACCCCA CATCTTTGCC
 2051 TTTCAGGAGA CCCTGGGACT GTGGGTTTC CAGGAGGCGT GGCTTCTTGG
 2101 AGGCGTGGCT TCGGAGGGGT GGCTTCCGAG AAGGCGTGGC TCCCTGTCCT
 2151 GGAACCAACC TGTGGGNATC TGGGGCCCAA GGAGATGTCT GGGGCAAGA
 2201 GTGCGGGGGG ACCCTGGACA CAGAATCTTC AGCGGCCCTC CCTAGGAACC
 2251 CAGCAGTACC ATTATAGAGA GGGGACACCG ACACAGAGGA GAGGAGACTT
 2301 GTCCAGGTC CCTCAGCTGC TGTGAGGGGT GACCCTTGGT TCOCGTTACC
 2351 AGGCTGGGGG ATCCAGGAG CAGCGGGGGA CCTGGGGGTG GGGACACAGG
 2401 CCCCACACTC CTGGGAGGGA GGAAGCAGCC CTNAAATAAA CTGTTCTCTG
 2451 TGCCGAATTC

【 図 4 】

1 FIPVEEDPA FWNQAAQAL DVAKKLQPIQ KAAKNVLEL GOGMGVPTVT
 51 ATRILKGQMN DKLGPETPLA MDQFFPVALS KTYNVDPQVP DSAGTATAYL
 101 CGVKGNRYRTI GVSAAARYNQ CNTTRGNEVT SVMNRAXKAG KSVGVVTTTR
 151 VQHASPAGAY AHTVNRDWYS DADLPADAQT YGQDIATQL VNNMDIDVIL
 201 GGRKYMFEPE GTPDPEYPHD ASVNGVRKOK RNLVQEWQAK HQGAQYVWNR
 251 TELLQAANDS SVTHLMGLFE PADMKYNVQK DPTKDPLEE MTEALQVLS
 301 RNPQGFYLFV EGGRIDHGH DSKAYMALTE AVMFDAIAK ANELTSELOT
 351 LILVTADHSV VFSFGYTLR GTSIFGLAPS KADKKSYTS ILYNGPGYV
 401 LGGGSRPDVN DSISEDPSYR QQAAPLSSE THGGEDVAVF ARGPAHLVH
 451 GVQEETFFVAH VMFAAGCPEP YTDNLPAPS GLSDAAHLAA SAPSLALLAG
 501 AMLLLAPAL Y

【 図 5 】

(A)

1 GAATTCGGCA CGAGGAGACC CGGCTCTCCC AGGTCCCATC CTGACCCCTC
 51 GCCATCACAC AGCCATGCAG TGGGCTCTGT TGCTCTTGCT GCTGGGCTG
 101 TGGCTACAGC TCTCCTCAC CTTATCCCA GCTGAGSAGG AAGACCCGCG
 151 CTTCTGGAAC CGCCAGGCGC CCCAGGCCCT TGATGTAGCC AAGAATTGCG
 201 AGCCGATCCA GACAGTGCC AAGAATGTCA TCCTCTTCTT GGGGATGGG
 251 ATGGGGGTGC CTACGCTGAC AGCCACTCGG ATCCTAAAGG GGCAGATGAA
 301 TGGTAAGCTG GGACCTGAGA CACCCTGGC CATGGAACAG TTCCATACG
 351 TGGCTCTGTC CAAGACATAC AACGTGGACA GACAGTGGC AGACAGGCGA
 401 GGCAC TGCCA CTGCTACCT GTGTGGGTC AAGGGCAACT ACAAAACCAT
 451 TGGTGAAGT GCAGCCGCCC GCTACAACCA GTGCAACACA ACAAGTGGCA
 501 ATGAGGTACG GTCTGTGATG AACCGGGCCA AGAAAGCAGG AAGTCAAGTG
 551 GGAGTGGTGA CCACCTCCAG GGTGCAGCAT GCCTCCCGC CCGGTGCTTA
 601 TGCACACACG GTGAACCGAA ACTGGTACTC AGATGCGGAC CTGCTGCCG
 651 ATGCACAGAC GTATGGCTGC CAGGACATCG CCACACAACCT GGTCACAAC
 701 ATGGATATTG ACGTGATCCT GGGTGGAGGC CGAATGTACA TGTTCTCTGA
 751 GGGGACCCCG GATCCTGAAT ACCCATACGA TGTCATTCAG ACTGGAGTCC
 801 GGAAGGACAA GCGAATCTG GTGCAGGAGT GGCAGTCCAA GCACCAGGGA
 851 GCCCAGTATG TGTGGAACCG CAGGAGGCTC CTTCAAGCAG CCAATGACCC
 901 CAGTGTAAACA CACCTCATGG GCCTCTTTGA GCGGCGAGAC ATGAAGTATA
 951 ATGTTCAAGCA AGACCCACCC AAGGACCCGA CCTGAGGGA GATGACGGAG
 1001 GCGGCCCTGC AAGTGTCTAG CAGGAACCCC CAGGGCTTCT ACCTCTCTGT
 1051 GGAGGGAGGC CGCATTTGACC ACGGTACCCA TGAAGGCAAA GCTTATATGG
 1101 CACTGACTGA TACAGTCATG TTTGACAATG CCATCTCCAA GGCTAACGAG
 1151 CTCAC TAGCG AACTGGACAC GCTGATCTTT GCCATCTCAG ACCACTCCCA
 1201 TGCTTCTCTT TTTGGTGGCT ACACACTGCG TGGGACTTCC ATTTTCGGTG

(B)

1251 TGGCCCCCAG CAAGGCCTCA GACAACAAGT CCTACACCTC CATCCTCTAT
 1301 GGCAATGGCC CTGGCTACGT GCTTGGTGGG GGCTTAAGGC CCGATGTAA
 1351 TGACAGCATA AGCAGGAGCC CCTCGTACCG GCAGCAGGCG GCGCTGCCCC
 1401 TGTCTAGTGA GTCCACGGG GGCAGGAGCG TGGCGGTGTT CGCGCAGGCG
 1451 CCGCAGGCGC ACCTGGTGCA CGGCGTGACG GAGGAGACCT TCGTGGCGCA
 1501 CGTCATGGCC TTTGGGGGCT GCGTGGAGCC CTACACCGAC TGCATCTGCG
 1551 CGGCCCCCTC TGCCCTCTCC GACGCCGCGC ACCTGCGCGC CAGGCCGCT
 1601 TCGCTGGCGC TGCTGGCCGG GCGGATGCTG CTGCTGCTGG CGCCTGCCCT
 1651 GTACTGACCC CCACCAACTC CAGGTCTTGG GGTTCCTGCG TTTCCTGCCA
 1701 AAAATCTCCC AGCGCAGACC CCACACAGG TACCACCTCG GAGTCTCCAC
 1751 CCTGAAGTCC TATCTTAGCG GCCACTCCCG GATCCCGGAC CAGGCCCCAC
 1801 TAGCAGAGCT TCACCTCCCA GAAATGAAGG ATTCACTTTC CAGCAACGAA
 1851 GAAGCCTCAG CTCACAGCCC TTCATGGCCC AGCCCATCCA GAGGCTGAGG
 1901 CCCTGATTTC CCTGTGACAC CCGTAGACCT ACTGCCCGAC CCCAACTTCA
 1951 GTGGCTTGGG ATTTTGTGTT TCGCCACCCC TAACCCAGT AAGGGGGCTC
 2001 GGACCATCCA GACTCTCCCC ACTGCCACA ACCCCACCTG AGAACGAGGC
 2051 TAGCACGGTC CCAAGGTTCC CAGGCCCGGC TAGAACCCAC ACCATGCTT
 2101 TCAGGAGACC CTGGGGCTCC GGGGTTTCCG GGAGGCTGG CTTTCTTAGG
 2151 AGGCGTGGAA ACTGAGGAGG CACGGTTTCT GAGGAGGCGT GCGTCTGGG
 2201 GAGCTGTGGC TTCCGGTCTT CCCCAGGCC TGTGGGCTCC TCCTTAACCA
 2251 AGGAGACGGC CAAGGAGAGC TCTGAACCA GGAGCGGGG GGAACCTTGG
 2301 CAGAGCCCTC AGCAACCCCT CCTAGGAACC CAGGTTACCG TTAGAGAGAG
 2351 GAGACAGCGA CACAGAGGAG AGGAGACTTG TCCCAGGTCT CTCAGCTGCT
 2401 ATGAAGGTGG CCCCCTGCC CTTTCCAGGC TGGGAGATCC CAGGAGCAGC
 2451 GGGGGAGCTG GTGGGTGGG ACACAGCCCC GCCTTCTTGG GAGGAGGAA
 2501 GCAGCCCTCA AATAAACTGT TCTAAGTGTG AAAAACTCTA GA

【 図 6 】

```

1 FIPAEEDPA FWNRQAQAL OVAKKLQPIQ TAAKNVILFL GOGMGVPTVT
51 ATRILKQQMN KGKGPETPLA MDQFPVVALS KTYNVDRQVP DSAGATATAYL
101 CGVKNGYKTI GVSAAARYNQ CNTTSGNEVT SVMNRKKAG KSVGVTVTSR
151 VQHASPAGAY AHTVNRNWYS DADLPDAQT YGCQDIATQL VNNMOIDIVIL
201 GGRMYMFFE GTDPPEYPYD VNQTGVRKDK RNLVQEWQAK HQGAQYVWNR
251 TELLQAANDP SVTHLMGLFE PADMKYNVQQ DPTKDPFLEE MTEAALQVLS
301 RNPQGFIYLFV EFGRIDGHGH EGKAYMALTD TVMFDNIAAK ANELTSELDO
351 LILATAOHSH VSFSGGYTLR QTSIFGLAPS KASONKSNTS ILYNGPGQGV
401 LGGGLRPDYN DSISEDPSYR QQAABVLSSE SHSGEDVAVF ARGQAHLVH
451 GVQEETFAVH VMAFAGCVP YTDCLNPAPS GLSDAAHLAA SPSSLALLAG
501 AMLLLLAPAL Y

```

【圖 7】

瑪基番号	1	2	4	8	31	61	108	122	125	133	142	149	167	180	181	188	192	205	210
BIAP I	L	V	V	D	T	G	R	K	R	K	S	I	N	M	N	A	K	V	
BIAP II	L	I	V	D	T	G	R	R	R	I	A	T	D	N	K	N	A	Y	M
BIAP III	F	I	V	D	K	D	R	N	R	M	S	T	D	T	N	A	T	M	E
BIAP IV	F	I	A	D	T	G	K	S	M	S	M	S	S	N	I	Y	T	N	M
瑪基番号	219	221	222	223	224	231	236	252	258	260	282	289	294	297	299	304	321	322	330
BIAP I	D	A	S	V	N	Q	A	A	D	S	H	Q	V	R	V	R	D	D	E
BIAP II	D	A	S	V	N	Q	E	A	D	S	H	A	A	Q	L	R	D	G	E
BIAP III	H	A	S	V	N	R	E	A	D	S	H	A	A	Q	L	Q	D	S	E
BIAP IV	Y	V	N	Q	T			E	E	N	P	E	A	Q	L	Q	E	N	S
瑪基番号	331	332	354	380	383	385	400	405	411	413	416	420	427	428	431	453	461	480	
BIAP I	A	G	V	S	L	S	A	S	D	T	D	Q	Q	Q		E	I	T	
BIAP II	A	I	V	S	L	S	A	S	D	T	E	R	L	A	T	Q	I	A	
BIAP III	A	V	V	S	S	K	V	S	D	I	D	R	L	S	T	Q	V	S	
BIAP IV	T	V	A	S	S	N	V	L	D	I	D	R	L	S	T	Q	V	S	

【 図 8 】

複製標的	断片中の 原 b1AP	PCR 番号 (種類)	断片起源 (PCR または cDNA)	断片中の 陽性陽性	制限酵素	3' 付着 末端
INb1AP	IV	1 (IV)	KS - 1 L	1, 2, 4	EcoRI - Bst	CAGC
	I	2 (IV)	8N - 122	8, 31	Bst I - BamHI	GATC
	I			181, 167, 181,	BamHI - XbaI	CTAG
				188, 218, 221,		
				222, 223, 224,		
				225, 226, 227,		
				228, 229, 230,		
				260, 283, 383,		
				385, 400, 405,		
				413, 461		
pcDNA-3					XbaI - EcoRI	AATT
LNb1AP	IV/1	3 (III)	1N-131	108, 122, 125, 133	EcoRI - NcoI	CATG
	III	4 (I)	1N-M13P	142,	NcoI - Bst	CTCT
	I	5 (I)	S142A - 180	180, 205	Bst - Bst	TGCA
	I	6 (I)	M180K - K203M	210, 236	Bst - Bst	AACA
	I	7 (I)	V210E - A216E	236, 289	Bst - Bst	TGCC
	IV	8 (IV)	E289A - 330	289, 294, 297,	Bst - Bst	GGGT
	III			298, 331,	Bst - Bst	TCAG
	III	9 (III)	E330-V332I - Xia	330, 331, 332, 354	Bst - Bst	CTCA
	III				XbaI - EcoRI	CTAG
						AATT
						平端
						平端

[illegible]

【図 9】

AP 突然変異体	$V_{max} \pm sd$	$V_{max} [U/mg]$	$T_{50} (10 \text{ 分})$
野生型			
bIAP I	5.26 ± 0.44	2.723 ± 249	66.2
bIAP II	16.61 ± 0.88	8.600 ± 843	58.8
bIAP III	9.07 ± 0.79	4.696 ± 494	59.1
bIAP IV	13.11 ± 0.65	6.767 ± 571	52.9
キメラ			
L1N8	5.90 ± 0.40	3.055 ± 336	65.8
INT 1	19.22 ± 1.08	$9.951 \pm 1,565$	59.7
INT 2	16.95 ± 0.95	$8.776 \pm 1,431$	55.6
INT 3	17.17 ± 0.90	$8.890 \pm 1,413$	57.9
突然変異体			
[K ¹³²]bIAP II	16.21 ± 2.33	$8.393 \pm 1,328$	58.0
[M ¹³²]bIAP II	17.69 ± 1.45	$9.159 \pm 1,099$	58.1
[S ¹⁴²]bIAP II	16.53 ± 1.06	8.559 ± 603	57.9
[M ¹⁸⁰]bIAP II	17.81 ± 0.80	10.433 ± 900	58.6
[K ²⁰⁵]bIAP II	20.29 ± 1.25	9.454 ± 819	57.5
[V ²¹⁵]bIAP II	17.98 ± 1.40	8.377 ± 908	58.1
[A ²²⁸]bIAP II	19.61 ± 2.61	$10.153 \pm 1,565$	58.1
[QVRV]bIAP II	19.25 ± 0.99	9.967 ± 534	59.0
[D ³²²]bIAP II	5.44 ± 0.34	2.817 ± 307	61.4
[G ³²²]bIAP II	16.53 ± 1.30	$8.559 \pm 1,075$	59.2
[G ³²²]bIAP I	19.60 ± 0.99	$10.148 \pm 1,021$	60.6

 フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/16 (2006.01) C 1 2 N 9/16 B
- (72)発明者 レイナー ミューラー
 ドイツ連邦共和国 デー - 8 2 3 7 7 ペンツバーク, アン デル フライハイム 5 4
- (72)発明者 ヘルムット プルトシャー
 ドイツ連邦共和国 デー - 8 2 3 9 2 ハパック, アム アーレンゲル 1 0
- (72)発明者 ホセ ルイス ミラン
 アメリカ合衆国 9 2 1 3 1 - 3 5 0 5 カリフォルニア州, サンディエゴ, カミニト アルト 1
 0 8 5 8

審査官 福岡 信子

- (56)参考文献 J. Biol. Chem. , 1 9 8 5 年, vol.260, no.20, p.11190-11193

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C12N 15/00-90
 - BIOSIS/WPIDS(STN)
 - GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 - SwissProt/PIR/GeneSeq
 - PubMed