

(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 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 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 ゲーブ ムベーハー
	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ーゼ 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 ディー-82377ペ ンツバーグ, アン テル 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产生する方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【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 の产生方法、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。

【0002】

【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)。

【 0 0 0 3 】

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

【 0 0 0 4 】

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 (LVPVEED) 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 3000 U/mg で N- 末端が LVPVEED 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 8000 U/mg までの比活性を有する子ウシ由来の b I A P が市販されているが (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

【 0 0 0 5 】

【 発明が解決しようとする課題 】

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。 30

【 0 0 0 6 】

【 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、 3000 U/mg 以上、好ましくは少なくとも 3500 U/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

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プ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LIPAAEEN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プ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LIPAAEEN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。

【0010】

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

【0011】

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細胞が特に好みしい。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、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 2348)。

20

【0012】

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、触媒特性につい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 II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 低く、b I A P IVのT_m値はb I A P Iよりも13 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

【0013】

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、INT 1、INT 2およびINT 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)。

40

- ・ 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V21、V4AおよびD8Nは比活性の増大には関連していない。V21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。

【0014】

- ・ INT 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。

- ・ INT 2 突然変異体はINT 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、INT 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。

【0015】

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の効果が除外された。

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產生方法に関する。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的な通常の温度である(B M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 (A_{280nm} (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 DNA* 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 DNA* 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 DNA* 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 DNA* 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 RNA* 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 DNA* バンクを準備し、プローブとして *b I A P I c DNA* 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) *DNA* 標識キット (Boehringer Mannheim) を用いて放射能標識した。ファージ *DNA* 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プ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 DNA* 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 *DNA* 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 μg の精製した高活性 (約 6000U/mg) 子ウシ腸 A P を、450 μl の 6 M 塩酸グアニジン、0.25 M の Tris、1 mM の EDTA、pH 8.5 に溶解し、次いで 30 μl の メルカプトエタノールを加えた。100 °C で 30 分間還元した後、35 μl 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 HPLC Aquapore RP300 カラム (30 × 2.1 mm、Applied Biosystems、Wittenstadt) 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ェ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

10

20

30

40

50

発乾固した。酵素を脱グリコシル化するために、 $125\text{ }\mu\text{g}$ の A P を $15\text{ }\mu\text{l}$ の蒸留水および $6\text{ }\mu\text{l}$ のインキュベーション緩衝液 (250mMのNa₂HPO₄、50mMのEDTA、pH7.2) および15U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、切斷に用いた。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斷した。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HPLC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 ($8\text{ ng}/\mu\text{l}$) 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 ($10\text{ mg}/\text{ml}$) をマトリックスとして使用した。酵素的または化学的切斷から得られたペプチドを逆相HPLCによって、LiChrospher C18 seIBカラム125 × 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 $300\text{ }\mu\text{l}/\text{分}$ 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、API 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タンパク質シークエンサー (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 DNA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 DNAを調製するために、野生型制限断片ならびにc DNA b I A P I、IIIおよびIVの部位特異的突然変異誘発PCR断片を互いにライゲートして、L1N8 (3断片) およびINT1 (9断片) c DNA中間構築物を作製した。次いで、INT1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INT2 (8断片) c DNAを形成させた。次に、INT2の制限断片およびINT2の部位特異的突然変異誘発断片を組み立ててINT3 (5断片) c DNAを形成させ、最後にb I A P II (4断片) c DNA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) からの距離で切斷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、PCR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)。

【0025】

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; 10
 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 GGG 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、鑄型は、野生型cDNA bI API、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.bI API (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 P C R 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 c D N A 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。 L 1 N 8 = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + 1 / EcoRI-BsaI + 2 / BsaI-BamHI + b I A P I / BamHI-XbaI。 I N T 1 = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + L 1 N 8 / EcoRI-NcoI + 3 / NcoI-BsaI + 4 / BsaI + 5 / BsaI + 6 / BsaI + 7 / BsaI + 8 / BsaI + 9 / BsaI-StuI + b I A P I / StuI-XbaI。 I N T 2 = pcDNA-3 / EcoRI-NotI + I N T 1 / EcoRI-PstI + 10 / PstI-StuI + 11 / StuI-BsaI + 12 / BsaI + 13 / BsaI + 14 / BsaI + b I A P I / BsaI-NotI。 I N T 3 = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + I N T 2 / EcoRI-NcoI + I N T 2 / NcoI-PvuII + 10 / PvuII-EagI + I N T 2 / EagI-HindIII + I N T 2 / HindIII-XbaI。 b I A P II = pcDNA-3 / EcoRI-XbaI + I N T 3 / EcoRI-EagI + 15 / EagI-SmaI + 16 / SmaI-HindIII + I N T 3 / HindIII-XbaI。

【 0 0 2 7 】

10個のさらなる構築物を b I A P 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にサブクローニングした。5個の構築物を L 1 N 8 または b I A P I (I) および b I A P II (II) 間の制限断片の交換によって調製した。 L 1 N 8 EcoRI-Pm1I および (II) Pm1I-XbaI を [N122K] b I A P II 突然変異 c D N A 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] b I A P II 突然変異 c D N A に対して結合した。 (II) EcoRI-EagI、(I) EagI-BstEII、(II) BstEII-XbaI を [A289Q、A294V、Q297R、L299V] b I A P 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] b I A P 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] b I A P 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：

【 0 0 2 8 】

```
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.
```

【 0 0 2 9 】

鉄型として b I A P II を用いる下記の 8 個の P C R 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ーニングし、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。

実施例 4 : 組換え酵素の产生および特性付け

全 c D N A (b I A P I 、 b I A P II 、 b I A P III 、 b I A P 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) にクローニング

グし、チャイニーズハムスターの卵細胞（C H O 細胞）に移入し、安定なトランスフェクタントを500 μ 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A Pを、安定に移入されたC H O 細胞から記載されたようにして抽出した（Hoylaertsら, 1997）。0.1 μ g/mlの高親和性抗子ウシA P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）、1 mM MgCl₂、および20 μ M ZnCl₂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-ニトロフェニールの濃度を、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b I A P 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（E⁰）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E⁰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（p N P P）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。[p N P P] / v 対 X 軸としての [p N P P] 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・V_{max} ± 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 ± 標準偏差をy切片 ± 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（T₅₀）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 cgagccagg t cccatcctga ccctccgcca tcacacagct atgcagtggg 60

cctgtgtgct gctgctgtcg gccctgtggc tacagctctc cctcaccctc atcccagctg 120

aggaggaaaa ccccgccctc tggAACCGCC aggCAGCCC ggCCCTTGTAT gtGCCAAGA 180

atTTGCAAGCC GATCCAGACA GCTGCCAAGA ATGTCATCCT CTTCTTGGGG GATGGGATGG 240

GGGTGCCTAC GGTGACAGCC ACTCGGATCC TAAAGGGCA GATGAATGGC AAACCTGGGAC 300

CTGAGACACC CCTGGCCATG GACCAGTTCC CATACTGGC TCTGTCCAAG ACATACAACG 360

TGGACAGACA GGTGCCAGAC AGCGCAGGCA CTGCCACTGC CTACCTGTGT GGGGTCAAGG 420

GCAACTACAG AACCACATCGGT GTAAGTGCAG CGCCCCGCTA CAATCAGTGC AACACGACAC 480

40

gtgggaatga ggtcacgtct gtgatcaacc gggccaagaa agcagggaaag gccgtgggag 540
 tggtgaccac caccagggtg cagcatgcct ccccagccgg ggccctacgcg cacacggta 600
 accgaaaactg giactcagac gccgacctgc ctgctgtatgc acagaagaat ggctgccagg 660
 acatcgccgc acagctggtc tacaacatgg atattgacgt gatccctgggt ggaggccgaa 720
 tgtacatgtt tcctgagggg accccagacc ctgaataccc agatgtatgcc agtgtgaatg 780
 gagtccggaa ggacaaggcag aaccctggtc aggaatggca ggccaagcac cagggagccc 840
 agtatgtgtg gaaccgcact gcgccttc aggccggcga tgactccagt gtaacacacc 900 10
 tcatggccct cttttagccg gcagacatga agtataatgt tcagcaagac cacaccaagg 960
 acccgaccct ggcggagatg acggaggccgg ccctgcaagt gctgaggcagg aaccccccggg 1020
 gcttctaccc ttctgtggag ggaggccgca ttgaccacgg tcaccatgac ggcaaagctt 1080
 atatggcaact gactgaggcg atcaatgttg acaatgccat cgccaaggct aacgagctca 1140
 ctatcgact ggacacgcgt atcccttgca ctgcagacca ctccccatgtc ttcttttttg 1200
 gtggctiacac actgcgtggg acctccatTT tcggctggc ccccgcaag gccttagaca 1260
 gcaaggcccta cacccatc ctctatggca atggccagg ctatgcgtt ggccggggct 1320 20
 cgaggcccga tgttaatggc agcacaagcg aggaaccctc ataccggcag caggccggc 1380
 tgccccctggc tagcgagacc cacggggcg aagacgtggc ggtgttcgcg cgaggcccgc 1440
 aggcgcacctt ggtgcacggc gtgcaggagg agacccctgt ggccgcacatc atggcccttg 1500
 cggcgtgcgt ggagccctac accgactgca atctgcgcgc ccccgccacc gccaccagca 1560
 tccccgacgc cgccgcacctg gcggccagcc cgcctccact ggccgtgcgt gctggggcga 1620
 tgctgtgtct gctggcgccc accttgtact aaccccccacc agttccaggt ctgggatTT 1680
 cccgccttcc tgcccaaaac ctccccatgc cggccctacc ggagctacca cctcagagtc 1740 30
 cccaccccgaa agtgcatacc tagctgccac tcctgcagac ccgaccacgc cgaaattc 1798

<210> 2

<211> 480

<212> PRT

<213> Bovidae

<400> 2

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala 40

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		10
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				20
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		30
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 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				40
225	230	235	240	

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 10
 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 20
 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 Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu 30
 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 40
 450 455 460
 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala

465

470

475

480

<210> 3

<211> 2640

<212> DNA

<213> Bovidae

10

<400> 3

gaattcggca cgagcgagac ccagactccc caggtcccat cctgaccctc cgccatcaca 60
cagctatgca gggggctgc gtgcgtgc tgctggccct gtggctacag ctctccctcg 120
ccitcatccc agttttagggag gaagaccccg ccttctggaa ccggccaggca gcccaggccc 180
tttatgtggc taagaagctg cagccatcc agaaagccgc caagaatgtc atccctttct 240
tgggagatgg gatgggggtg cctacggta cagccactcg gatactgaag gggcagatga 300
atgacaaggct gggacctgag acacccctgg ccatggacca ttccccatac gtggctctgt 360
ccaagacata caacgtggac agacaggtgc cagacagcgc aggcaactgcc actgcctacc 420
tgtgtgggtt caagggcaac tacagaacca tcggtgtaag tgcagccgcc cgctacaatc 480
atgtcaaacac gacacgtggg aatgaggta cgtctgtat gaaccgggcc aagaaagcag 540
ggaagtcaatg gggagtggtg accaccacca gggtcagca cgcctccca gcccgtgtt 600
atgcacacac ggtgaaccgt gactggtaact cagacgcccga cctgcctgcc gatgcacaga 660
cgtatggctg ccaggacatc gccacacaac tggtaacaa catggatatt gacgtgatcc 720
tgggtggagg ccgaaagtac atgtttctg agggacccc agaccctgaa tacccacacg 780
atgccagtgt gaatggagtc cggaaaggaca agcggaatct ggtgcaggag tggcaggcca 840
agcaccaggg agcccagtat gtgtggacc gcacggagct cttttaggca gccaatgact 900
ccagtgttac acatctcatg ggcccttttg agccggcaga catgaagtat aatgttca 960
aagacccac caaggacccg accctggagg agatgacgga ggcggccctg caagtgtga 1020
gcaggaaccc ccagggcttc tacctttcg tggagggagg ccgcattgac cacggtcacc 1080
atgatagcaa agcttataatg ggcgtgactg aggccgtcat ttgtgacaat gccatcgcca 1140
aggctaacga gctcaactagc gaactggaca cgctgatcct tgtcaactgca gaccactccc 1200
atgttttctc ttttgtggc tacacactgc gtgggacctc cattttcggt ctggccccc 1260

20

30

40

gcaaggcctc agacaagaag tcctacacct ccatccctcta tggcaatggc cctggctacg 1320
 tgcttggtgg gggctcaagg cccgatgtta atgacagcat aagcgaggac ccctcataacc 1380
 ggcagcaggc ggccgtgccc ctgtctagcg agacccacgg gggcgaagac gtggcggtgt 1440
 tcgcgcgagg cccgcaggcg caccctggtc acggcgtagca ggaggagacc ttctgtggcgc 1500
 acgtcatggc ctttgcggc tgcgtggagc cctacaccga ctgcaatctg ccggccccct 1560
 ctggcccttc cgacgccgctg caccctggcgg ccagcgcgccc ttctgtctgctg 1620
 gggcgtatgtct gctgtgtcg gcgcggccct tgcgtactgacc cccaccaact ccaggcttg 1680
 gggtttcccg ctttttgtcc ccaaaatctc ccagcgcagg ccccatctga gctaccacct 1740
 cagagcccc accctgaagt cctatcttagc gcactccaga ccgcgactca gcccccaccac 1800
 cagagcttca cctcccgca acgaaggagc tttagctcac agectttcat ggcccagacc 1860
 attctggaga ctggggccctt gattttcccg acccaacttc agtggcttga gattttgtgt 1920
 tctgccaccc cggatccctg taagggggct cggaccatcc agactcccc cactgcccac 1980
 agccgaacctt gaggaccagg ctggcacgtt cccaggggtc ccaggcccggtt ctggaaaccca 2040
 catctttgccctt cttcaggaga ccctggact gtggggttt caggaggcgt ggcttcttgg 2100
 aggctggcgtt tcggaggggtt ggcttcccgag aaggcgtggc tccctgtctt ggaaccaccc 2160
 tgtgggnatc tggggcccaa ggagatgtct ggggcaaaga gtgcccgggg accctggaca 2220
 cagaatcttca agcggccctt ccttaggaacc cagcagttacc attatagaga gggacacccg 2280
 acacagagga gaggagactt gtccctgggtc cctcagctgc tgtgaggggtt gacccttttgtt 2340
 tccctgttacc aggctgggggatccctaggag cagcggggga ctgtgggggtt gggacacagg 2400
 ccccacactt ctggggaggga ggaaggcagcc cttaaaaataaa ctgtttctcg tgccgaattt 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

40

1

5

10

15

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 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

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	10
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	20
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 Ser Arg Pro Asp Val Asn Asp Ser Ile Ser Glu Asp			
405	410	415	30
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

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 cggccctcccc aggtccccatc ctgacccttcc gccatcacac 60
 agccatgcag tggccctgtg tgctgttgt gctgggcctg tggctacagc tctccctcac 120
 cttcatccca gctgaggagg aagaccccgc ctcttggAAC cggcaggcag cccaggccct 180 20
 tggatgtatcc aagaagtgtc agccgatcca gacagctgcc aagaatgtca ttctttttt 240
 gggggatggg atgggggtgc tacgggtac agccactcgg atcctaaagg ggcagatgaa 300
 tggtaagctg ggaccttgaga cacccctggc catggaccag ttccctatacg tggctctgtc 360
 caagacatac aacgtggaca gacaggtgcc agacagcgca ggcactgcca ctgcctacct 420
 gtgtggggtc aaggccaact aaaaaaccat tggtaagt gcagccgccc gctacaacca 480
 gtgcaacaca acaagtggca atgagggtac gtctgtgtatg aaccgggcca agaaaggcagg 540
 aaagtcatgtt ggagtggta ccaccccttccag ggtgcagcat gcctcccttccag ccgggtgtta 600 30
 tgcacacacg gtgaaccgaa actgggtactc agatgccgac ctgcctgccc atgcacagac 660
 gtatggctgc caggacatcg ccacacaact ggtcaacaac atggatattt acgtgtatct 720
 ggggtggaggc cgaatgtaca tggtttccctga ggggaccccg gatccctgaat acccatacga 780
 tgtcaatcag actggagtcc ggaaggacaa gcgaaatctg gtgcaggagt ggcaggccaa 840
 gcaccaggga gcccagtatg tggtaaccg cacggagctc ctgcaggcag ccaatgaccc 900
 cagtgttaca cacccatgg gccttttgc gcccggcagac atgaagtata atgtttagca 960
 agacccccc aaggacccga ccctggaggaa gatgacggag gcgccctgc aagtgtttagca 1020 40
 cagggatcc cagggcttctt accttttgtt ggaggaggc cgcattgacc acggcacca 1080

tgaaggcaaa gcttatatgg cactgactga tacagtcatg tttgacaatg ccatgccaa 1140
 ggctaacgag ctcaactagcg aactggacac gctgatecctt gccactgcag accactccca 1200
 tgtcttcctt tttggggct acacactgctg tgggacctcc atttcggtc tggccccag 1260
 caaggccica gacaacaagt cctacaccc tcataccctat ggcaatggcc ctggctacgt 1320
 gcttggtgccc ggcttaaggc ccgaigttaa tgacagcata agcgaggacc cctcgtaaccg 1380
 gcagcaggcg ggcgtgcccc tgcgttagtga gtcccacggg ggcgaggacg tggcggtgtt 1440
 cgcgcgaggc cgcaggcgc acctggtgca cggcgicgcag gaggagacct tcgtggcgca 1500 10
 cgtcaitggcc tttgccccctt gcgtggagcc ctacaccgac tgcaatctgc cggccccctc 1560
 tggcccttc gacgcccgcgc acctggcgcc cagcccgct tcgtggcgcc tgcgtggccgg 1620
 ggcgtatgtc tgcgtgtgg cgccgtgcctt gtactgaccc ccaccaactc caggtcttgg 1680
 ggtttccctgc ttccctgcca aaaatctccc agcgagacc ccaccagagc taccacctcg 1740
 gagtcicccac cctgaagtcc tatcttagcg gccactcccg gatccccgac caggccccac 1800
 tagcagagct tcaccccttca gaaatgaagg attcacccctc cagcaacgaa gaaggccctag 1860
 ctcacagcccc ttcattggccc agcccatccca gaggctgagg ccctgatttc cctgtgacac 1920 20
 ccgttagaccc actgcccgcac cccaaacttca gtggcttggg attttgtgtt ctggccaccc 1980
 taaccccttca aagggggctc ggaccatccca gactctcccc actgcccaca accccaccc 2040
 agaaccagggc tagcacggtc ccaagggttcc caggccccggc tagaaccac accatgcctt 2100
 tcaggagacc ctggggctcc ggggtttccg ggaggcggttgg ctttcttagg aggctgtggaa 2160
 actgaggagg cacggtttctt gaggaggcgt gcgtcttggg gagctgtggc ttccggctt 2220
 ccccatgcctt tgcgtggctcc tcccttaacca aggagacggc caaggagacg tctggaaacca 2280
 ggagcggcgg gggAACCTTG cagagccctc agcaacccctt ccttaggaacc cagggttaccg 2340 30
 tttagagagag gagacagcga cacagaggag aggagacttg tccctaggctt ctcaagtgtt 2400
 atgaagggtgg ccccggtgcc cttccagggc tgggagatcc caggagcagc gggggagctg 2460
 gtgggtgggg acacagcccc gccttcatgg gagggaggaa gcagccctca aataaactgt 2520
 tctaagtgtt aaaaaatcta ga 2542

<210> 6

<211> 511

<212> PRT

⟨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		10
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				20
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				30
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				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 20
 Glu Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Asp Thr 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 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 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 40
 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
Gly Leu Ser Asp Ala Ala His Leu Ala Ala Ser Pro Pro Ser Leu Ala			
485	490	495	10
Leu Leu Ala Gly Ala Met Leu Leu Leu Ala Pro Ala Leu Tyr			
500	505	510	

⟨210⟩ 7

⟨211⟩ 18

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

20

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide used to sequence the bIAPs 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 bIAPs 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 bIAPs III and IV

⟨400⟩ 9

ggtgtaaatg cagccgc

17

20

⟨210⟩ 10

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide used to sequence the bIAPs III and IV

30

⟨400⟩ 10

gcggctgcac tttagacc

17

⟨210⟩ 11

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

40

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide used to sequence the bIAPs 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 bIAPs III and IV

20

⟨400⟩ 12

cagggaaacat gtacatt

17

⟨210⟩ 13

⟨211⟩ 18

⟨212⟩ DNA

30

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide used to sequence the bIAPs III and IV

⟨400⟩ 13

ccagggcttc tacctctt

18

40

〈210〉 14

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 An oligonucleotide used to sequence the bIAPs 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 bIAPs III and IV

〈400〉 15

accagagcta ccacacctg

18

30

〈210〉 16

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 An oligonucleotide used to sequence the bIAPs III and IV

40

⟨400⟩ 16

aaggcaggaaa ccccaaga

18

⟨210⟩ 17

⟨211⟩ 18

⟨212⟩ DNA

10

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide used to sequence the bIAPs III and IV

⟨400⟩ 17

cttcagtgcc ttgggatt

18

20

⟨210⟩ 18

⟨211⟩ 18

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

30

⟨223⟩ An oligonucleotide used to sequence the bIAPs III and IV

⟨400⟩ 18

aatccccaaaggc cactgaag

18

⟨210⟩ 19

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ DNA

40

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

⟨400⟩ 19

cgaggtcgac ggtatcg

10

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

gcaggctct cagctggat gagggtgagg

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

gcaggctctca gctgaggagg aaaacccgc

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

gcaggctctt gtttgtcgc actggtt

27

20

⟨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

ggtccttttcc 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

ggtctcaaga aagcaggaa 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

30

ggtctcggtgc atcagcaggc aggtcggtc

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

ggtctcatgc acagaagaat ggctgccag

29

〈210〉 27

〈211〉 30

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

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

20

〈400〉 27

ggtctcaaac atgtacattc ggcctccacc

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

gtctccatgt ttccctgaggg gacccca

27

⟨210⟩ 29

⟨211⟩ 27

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

10

⟨400⟩ 29

ggtctccctgc cattcctgca ccaggtt

27

⟨210⟩ 30

⟨211⟩ 27

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

20

⟨220⟩

⟨223⟩ An oligonucleotide primer used to amplify the site-directed mutagenized fragments

30

⟨400⟩ 30

ggtctctggc aggccaagca ccaggga

27

⟨210⟩ 31

⟨211⟩ 27

⟨212⟩ DNA

40

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

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

〈400〉 31

10

ggtctccagg gtcgggtcct tggtgta

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

30

ggtctcgacc ctggcggaga tgacg

25

〈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

ggtctccctca gtcagtgcca 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

ggtctcaactg aggcgatcat gtttgac

27

20

⟨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

tgcaccagggt ggcgcctgcgg 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 tggtctacaa 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

30

gctgtctaag gccttgccgg gggc

24

〈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 tggctcacaa catggat

27

〈210〉 39

〈211〉 25

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

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

20

〈400〉 39

gggggtctcg ct tgctgcca 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

gttaatggtc tcacaaggcga ggaaccctcg

40

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

cccggtggtc tcgctagcca gggcac 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

gttaatggtc tcacaaggcga 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

gatgcgtggtc tcggtgagg 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

ctgccaggta tcaccacccgc 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

ggtcctctggc 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 cccggggctt 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

tgcctatataa gctttgccgt catggtg

27

30

〈210〉 50

〈211〉 27

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

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

40

nized fragments

⟨400⟩ 50

ggtctctttc ttggcccggt 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 tccccacggac ttcccctg

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

ggtctcaaac atgtatttc ggcctccacc

40

30

〈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

ggtctcatgt ttccctgtggg gaccccaagac

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

ggtctccctgc catgcctgca ccaggtt

27

【0031】

【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增幅するために使用したオリゴヌクレオチドブ

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

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

【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。

【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。

【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。

10

20

30

40

【 図 1 】

(A)

1 GAATTCGGCA CGGCCCCGGT CCCATCCCTGA CCCTCCGCCA TACACAGCT
51 ATGCAGTGGG CCTGTGTGCT GCTGCTGCTG GGCGCTGTGGC TACAGCTCTC
101 CCTCACCCCTC ATCCCAGCTG AGGAGGGAAA CCCCGGCTTC TGGAACCGCC
151 AGGCAGGGCA GGCGCTTGAT GTAGCCAAGA AGTGGCAGGG CATCCAGACA
201 GCTGCCAAGA ATGTCATCCT CTTCTTGGGG GATGGGATGG GGTTGCCCTAC
251 GGTGACAGCC ACTCGGATCC TAAAGGGGCA GATGATGGC AACTGGGAC
301 CTGAGACACC CCTGGCCATG GACCAGTTCC CATACTGGC TCTGTCCAAG
351 ACATACAAAGC TGGACAGACA GGTGCCAGAC AGGGCAGGCC CTGCCACTGC
401 CTACCTGTGT GGGGTCAAGG GCAAACACTACG AACCCATCGGT GTAAGTGCAG
451 CCGCCCCGCTA CAATCAGTC AACACGACAC GGGGGPATGA GGTCACGCTCT
501 GTGATCAACC GGGCCAAGAA AGCAGGGAAAG CCCGTGGGGAG TGGTACCCAC
551 CACCAAGGGT CAGCATGCT CCCAGCCCGG GGCGCTCGCC CACACGGTGA
601 ACCGAAACTG GTACTCAGAC GCGCACCTGC CTGCTGATGC ACAGAAAGAT
651 GGCTGCCAGG ACATCGCCCG ACAGCTGGTC TACAACATGG ATTGACGGT
701 GATCCCTGGGT GGAGGCCGAA TGTACATGTT TCCTGAGGGG ACCCCAGACC
751 CTGAATACCC AGATGATGCC AGTGTGAATG GAGTCGGGAA GGACAAGCAG
801 AACCTGGTC AGGAATGGCA GGCAACGAC CAGGGGAGCCC AGTATGTGTC
851 GAACCGCACT GCGCTCCTTC AGGCGCCGGA TGACTCCAGT GTAAACACACC
901 TCTATGGGCC TTTGAGGCCG GCAGACATGA AGTATRATGT TCAGCAAGAC
951 CACACCAAGG ACCCGACCCCT GCGGGAGATG ACGGGAGGCCG CGCTGCAAGT
1001 GCTGAGCAGG AACCCCCGGG GCTTCTACCT CTTCTGGGAG GGAGGCCGCA
1051 TTGACCCACG TCACCATGAC GGCAAAAGCTT ATATGCACT GACTGAGGCC
1101 ATCATGTTG ACAATGCCAT CGCCAAAGCT AACGAACTCA CTAGCGAACCT
1151 GGACACGCTG ATCCTTGTCA CTGCGACCA CTCCCATGTC TTCTCTTTTG
1201 GTGGCTACAC ACTGGCTGGG ACCTCCATTG TCGGTGTGGC CCCGGCCAAAG

(B)

1251 GCCTTAGACA GCAAGTCTTA CACCTCTCATC CTCTATGGCA ATGGGCCAGG
1301 CTATGCGCTT GGCGGGGGCT CGAGGCCCGA TGTTAATGGC AGCACAAAGG
1351 AGGAACCTCTC ATACCGGCCAG CAGGCCGGCG TGCCCCCTGGC TAGCCGAGACC
1401 CACGGGGGCCG AAAGACGTGGC GGTTGTTGCCG CGAGGGCCCG AGGCGCACCT
1451 GGTGCACGGC GTGCAAGGAGG AGACCTTCGTG GGCGCACATC ATGGCTTGTG
1501 CGGGCTGCGT GGAGCCCTAC ACCGACTGCA ATCTGCGCAGC CCCCGCCACG
1551 GCCACCAGCA TCCCCGRGCG CGCGCACCTG CGGCCAGGCC CGCCCTCCACT
1601 GGGCCTGCTG GCTGGGGCCA TGCTGCTGCTG GCTGGCCGCC ACCTTGTA
1651 AACCCCCAACG AGTTCGAGGT CTGGGGATT CCCGCTCTCC TGCCCCAAAC
1701 CTCCCAAGCTC AGGCCCTACCG GGAGCTACCA CCTCTAGAGTC CCCACCCCGA
1751 AGTGCATTC TAGCTGCCAC TCCCTGCGACAG CCGACCCAGC CGGAATTC

【図2】

10 20 30 40 50 60 70 80
 LIPSEENPATHNQRQAALDVAKKLQPIOTAARKNVILFGDGCHVPTVATRLKGQMGNGKLGPEPLAMQCPYVALS

 90 100 110 120 130 140 150 160
 KTYNVRDQFQDSAGTATAYLGGVKGNYRTIGVSAAARYNCNTTRNEVTSVINARRAKKAGAVGVVTTTRVQHASPAG

 M .

 170 180 190 200 210 220 230 240
 AKTVNRNYYSDADLPADAKQNGCQDIAGELVYNHMDIVLGDDGMHNPMEGTPDOPETPFQDSAVNCVRKQKLYVEQEG

 K-

 250 260 270 280 290 300 310 320
 HQGAGQYVWNCLLQLQADDSVTHMGLTTERDMMVYQDQNTKDITLAEMTAALQVLSRNPRGFYLFVEGGRIODGH
 MK

 330 340 350 360 370 380 390 400
 OGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSELDLTLLVTADHSHVFSFGGYTLRGTSFGFLPGAKLDSKSYTSILYCNPGYA
 S

 410 420 430 440 450 460 470 480
 LGGGSRFDVNGSTSEEPYQQAAVPLASETGGEDEVAFARGFQHQAHVGQSETFVAHIMAFAGCPEYPTDCNLU
 T

【図3】

(A)

```

1  GAATTCCGCA CGAGCGAGAC CCAGACTCCC CAGGTCTCAT CCTGACCCCT
51   CGGCCATCACA CAGCTATGCA GGGGCCCTGC GTGCTCTGC TGCTGGGCT
101  GTGGCTTACAG CTCTCCCTCG CCTTCATCCC AGTTGAGGAG GAAGACCCCC
151  CCTCTCTGGAA CGGCCAGGCA GCCCAGGCCCT TTGATCTGGC TAAGAACGTC
201  CAGCCCCATCC AGAAAGCCGC CAAGAATGTC ATCCCTTTCT TGGGAGATGG
251  GATGGGGGTG CCTACGGTGA CAGCCACTCG GATACTGAAG GGGCAGATGA
301  ATGACACAGCTGGGACCTGAG ACACCCCTGG CCATGSAACCA GTTCCCATAC
351  GTGGCTCTGT CCAAGACATA CAACGTGGAC AGACAGGTGC CAGACAGCGC
401  AGGCACATGCC ACTGCCTACCC TTGTTGGGGT CAAGGGCAAC TACAGAACCA
451  TCGGTGTAAG TGCAGCCGGCC CGCTACATAC AGTGCACACAC GACACGGTGGG
501  AATGAGGTCAGCTCTGTGAA GAAACGGGCC AGAGAAAGCAG GGAAGTCAGT
551  GGGAGTGGTG ACCACCACCA GGGTGCAGCA CGCCTTCCCCA GCGGGTGTCTT
601  ATGCACACAC GGTGAACCGT GACTGGTACT CAGACGGCGA CCTGCTGGCC
651  GATGCAACAGA CGTATGGCT CGAGGACATC GCCACACACAC TGGTCAACAA
701  CATGGATATT GACGTGATCC TGGGTTGGAGG CCGAAAGTAC ATGTTCTCTG
751  AGGGGACCCCC AGACCCCTGAA TACCCACACG ATGCCAGTGT GAATGGAGTC
801  CGGAAGGACA AGCGGAACCT GGTGCAGGAG TGGCAGGCCA AGCACCAAGGG
851  AGCCCCAGTAT GTGTTGAAACCC GCACGGAGCT CCTTCAGGCCA GCCAATGACT
901  CCAGTGTTCAC ATACATCTCATG GGCCCTCTTTC AGCCGGCCAGA CATGAAAGTAT
951  AATGTTCTACG AAGACCCACCA AGAGGACCCG ACCTCTGGAGG AGATGACCGGA
1001  GGCGGGCCCTG CAAGTGTCA GCAGGAACCC CCAGGGCTTC ACCTCTTCCG
1051  TGGAGGGAGG CGCATTGAC CACGGTCACCC ATGATAGCAA AGCTTATATG
1101  GCGCTGACTG AGGGGGTCAAT GTTTGACAAT GCCATCSCCA AGGCTAACGA
1151  GCTCACTAGC GAACGTGGACA CGCTGATCCT TGTCACTGCA GACCACCTCC
1201  ATGTTCTCTC TTTGGTGGC TACACACTGC GTGGGACCTC CATTTCGGT

```

(B)

1251 CTGGCCCCCA GCAAGGCCTC AGACAAGAAG TCCTACACCT CCATCCCTCA
 1301 TGGCAATGGC CCTGGCTACG TGCTTGGTGG GGGCTCAAGG CCCGATGTTA
 1351 ATGACAGCAT AAGCGAGGAC CCCTCATACC GGCAAGCAGGC GGCGGTGCC
 1401 CTGTCAGCG AGACCCACGG GGGCGAAGAC GTGGCGGTGT TGCGCGAGG
 1451 CCCGCAGGGC CACCTGGTGC ACAGCGTGCA GGAGGAGACC TTGGTGGCC
 1501 ACGTCATGGC CTTTGGGGC TGCGTGGAGC CCTACACCGA CTGCAATCTG
 1551 CGGGCCCCCT CTGGCTCTC CGACGCCGCG CACCTGGCGG CGAGCGGCC
 1601 TTCGCTAGCG CTGCTGGCG GGGCGATGCT GCTGCTGCTG CGGCCGCC
 1651 TGTACTGACC CCCACCAACT CCAGGTCTTG GGGTTTCCCG CTTTCTGCG
 1701 CCAAAATCTC CCAGCGCAGG CCCCATCTGA CCTACACCT CAGAGTCCCC
 1751 ACCCTGAAGT CCTATCTGC GCACCTCAGA CGCGACTCA GCCCCAAC
 1801 CAGAGCTTC CCTCCAGCA ACAGAGGAGC CTAGCTCAC AGCCTTCAT
 1851 GGGCCAGACC ATTCTGGAGA CTGAGGCCCT GATTTTCCCG ACCCAACTTC
 1901 AGTGGCTTGA GATTTTGTGT TCTGCCACCC CGGATCCCTG TAAGGGGCT
 1951 CGGACCATCC AGACTCCCC CACTGCCAC AGCCGACCT GAGGACAGG
 2001 CTGGCACGGT CCCAGGGGTC CCAGGGCCCG CTGGAGACCA CATTGCG
 2051 TTTCAGGAGA CCCTGGGACT GTGGGGTTTC CAGGAGGGCT GGCTTCTGG
 2101 AGGCGTGGCT TCGGAGGGGT GGCTTCCGAG AAGGCTGGC TCCCTGCTC
 2151 GGAACCAACCC TGTGGGNATC TGGGGCCCAA GGAGATGCT GGGGCAAAGA
 2201 GTGCCGGGG ACCCTGGACA CAGAACATTC AGGGGCCCCCT CCTAGGAACC
 2251 CAGCAGTAC ATTATAGAGA GGGGACACCG ACACASAGGA GAGGAGACTT
 2301 GTCCCAGGTC CCTCAGCTGC TGTGAGGGT GACCCCTTGGT TCCCGTTACC
 2351 AGGCTGGGGG ATCCCAGGAG CAGCGGGGGA CCTGGGGGTG GGGACACAGG
 2401 CCCCACACTC CTGGGAGGGG GGAAGCAGCC CTAAATAAA CTGTTCTCG
 2451 TGCGAATTG

【図4】

1 FIPVEEEDPA FWNRQAAQAL DVAKKLQPIQ KAAKNVILFL DQGMGVPTVT
 51 ATRILKGQMN DKLGPETPLA MDQFPYVALS KTYNVDPQVP DSAGTATAYL
 101 CGVKGNYRTI GVSAARYNQ CNTRGRNEVT SVMNRRAKAG KSVGVVITTR
 151 VQHASPAGAY AHTVNDRWYS DADLPADQAT YGCQDIAQTL VNNDMDIVIL
 201 GGGRKYMFP E GTDPPEYPHD ASVNGVRKDK RNLVQEWAQK HQGAQYVWNR
 251 TELLQAANDS SVTHLMGLFE PADMKYNVQQ DPTKDPTLEE MTEAAALQVLS
 301 RNPQGFYLFV EGGRIDHGHH DSKAYMALTE AVMFDNIAIK ANELTSELD
 351 LILVTADHSH VFSFEGGYTLR GTSIFGLAPS KASDKKSSTS ILYGNPGYV
 401 LGGGSRPDVN DSISEDPSYR QQAAVPLSSE THGGEDVAVF ARGPQAHLVH
 451 GVQEETFVAH VMAFAGCVP YTDCNLPAPS GLSDAAHLAA SAPSLALLAG
 501 AMLLLAPAL Y

【図5】

(A)

1 GAATTGGCA CGAGGAGACC CGGCCTCCCC AGGTCCCATC CTGACCCCTCC
 51 GCCATCACAC AGCCATGAG TGCGCTGTG TGCTGCTGCT GCTGGGCC
 101 TGGCTACAGC TCTCCCTAC CTTCATCCA GCTGAGGAGG AAGACCCCGC
 151 CTTCTGGAAC CGCAGGGCAG CCCAGGCCCT TGATGTAGCC AAGAAGTTGC
 201 AGCCGATCCA GACAGCTGCC AAGGATGTC TCTCTCTCTT GGGGGATGG
 251 ATGGGGTGC CTACGGTGCAG AGCCACTCGG ATCTTAAGG GGAGATGAA
 301 TGGTAACTG GGACCTGAGA CACCCCTGGC CATGGACAG TTCCCATAG
 351 TGGCTCTGTC CAGACATAC AACCTGGACA GACAGTGCC AGACAGCGA
 401 GGCACGTCCA CTGCTTACCT GTGTGGGTC AAGGGCAACT ACAAAACCAT
 451 TGGTGTAAAGT GCAGCGCCC GCTACACCA GTGCAACACA ACAAGTGGCA
 501 ATGAGGTAC GTCTGTGATG AACCGGGCCA AGAAAACAGG AARAGTCAGTG
 551 GGAGTGGTGA CCACCTCCAG GGTGAGCAT GCTCTCCAG CGGGTCTTA
 601 TGCACACAGC GTGAACCGAA ACTGGTACTC AGATGCCAGC CTGCTGGCG
 651 ATGCACAGAC GTATGGTGC CAGGACATCG CCACACAACT GGTCAACAC
 701 ATGGATATTG ACGTGTATCTT GGGTGGAGC CGAATGTACA TGTTCTGA
 751 GGGGACCCCC GATCTGAAT ACCCATAGA TGTCATCGAG ACTGGAGTCC
 801 GGAAGGACAA CGGAATCTG GTGCAAGGAGT GGCAAGGCCAA GCACCAAGGA
 851 CGCCAGTATG TGTGGAACCG CACGGAGCTC CTTCAGGCG CCAATGACCC
 901 CAGTGTAAACA CACCTCATGG GCTCTTTGA GCGCGAGAC ATGAAGTATA
 951 ATGTTACAGCA AGACCCACCC AAGGACCCGA CCTGGAGGA GATGACGGAG
 1001 CGGGCCCTGC AAGTGTCTGAG CAGGAACCC CAGGGCTCTT ACCTCTTCTG
 1051 GGAGGGAGGC CGCATTGACC ACGGTCACCA TGAAGGCAAA GCTTATATGG
 1101 CACTGACTGA TACAGTCATG TTTGACAATG CCATCGCCAA GGCTAACAGG
 1151 CTCACTAGGC AACTGGACAC GCTGATGCTT GCGACTGAG ACCACTCCCA
 1201 TGTCTTCTCT TTTGGTGGCT ACACACTGCG TGGGACCTCC ATTTCGGTC

(B)

1251 TGGCCCCAG CAAGGCCTCA GACAACAAAGT CCTACACCTC CATCCTCTAT
 1301 GGCAATGGCC CTGGCTACGT GCTTGGTGGG GGCTTAAGGC CGATGTTAA
 1351 TGACAGCATCA AGCGAGGACCC CCTCGTACCC GCAGCAGGGG GCCGTGCCCC
 1401 TGTCTAGTGA GTCCCCACGGG GGCGAGGAGCG TGGGGGTGTT CGCGCGAGGC
 1451 CGCGAGGGC ACCTGGTCA CGGGCGTGCAG GAGGAGACCT TCGTGGCGCA
 1501 CGTCATGGCC TTGCGGGCT GCGTGGAGCC CTACACCGAC TGCAATCTC
 1551 CGGCCCTCC TGGCCTCTCC GACGCCGCCG ACCTGGCGGC CAGCCCGCCT
 1601 TCGCTGGCG TCCTGGCCGG GGCGATGCTG CTGCTGCTGG CGCTGCGCTT
 1651 GTACTGACCC CCACCAACTC CAGGTCTGG GGTTTCTGCTC TTTCTGCCA
 1701 AAAATCTCCC AGCGCAGACC CCACCAAGGC TACCACTCTG GAGTCTCCAC
 1751 CCTGAAGTCC TATCTTAGCG GGCACCTCCC GATCCCGAC CAGGCCCGAC
 1801 TAGCAGAGCT TCACCTTCCA GAAATGAAGG ATTCAACCTTC CAGCAACGAA
 1851 GAAGGCTAG CTCACAGCCC TTCATGGCCC AGCCCATCCA GAGGCTGAGG
 1901 CCCTGATTTC CCTGTGACAC CGCTGAGACCT ACTGCCCGAC CCCAACCTCA
 1951 GTGGTTGGG ATTTGGTGTG CTGCCACCC TAACCCCAAGT AAGGGGGCTC
 2001 GGACCATCCA GACTCTCCCC ACTGCCACCA ACCCCACCTG AGAACACAGG
 2051 TAGCAGGTC CCAAGGTTCC CAGGCCGGC TAGAACCAC ACCATGCCCT
 2101 TCAGGAGACCC CTGGGGCTCC GGGGTTCCG GGAGGCTGTTG CTTTCTTAGG
 2151 AGGCGTGGAA ACTGAGGAGG CACGGTTCT GAGGAGGCGT CGGTCTGGG
 2201 GAGCTGTGGC TTCCGGTCT CCCCCATGCCCT TGTGGGCTCC TCCCTAACCA
 2251 AGGAGACGGC CAGGAGACCG TCTGGAAACCA GGAGCGGGG GGGAACCTG
 2301 CAGAGCCCTC AGCAACCCCT CCTAGGAACCC CAGGGTACCG TTAGAGAGAG
 2351 GAGACAGCGA CACAGAGGAG AGGAGACTTG TCCCAAGGTCT CTCAGCTGCT
 2401 ATGAAGGTGG CCCCGGTGCC CCTCCAGGCC TGGGAGATCC CAGGAGCAGC
 2451 GGGGAGCTG GTGGGGGGG ACACAGCCCCC CCCTTATGG GAGGGAGGAA
 2501 GCAGCCCTCA AATAAACTGT TCTAAGTGTG AAAAATCTA GA

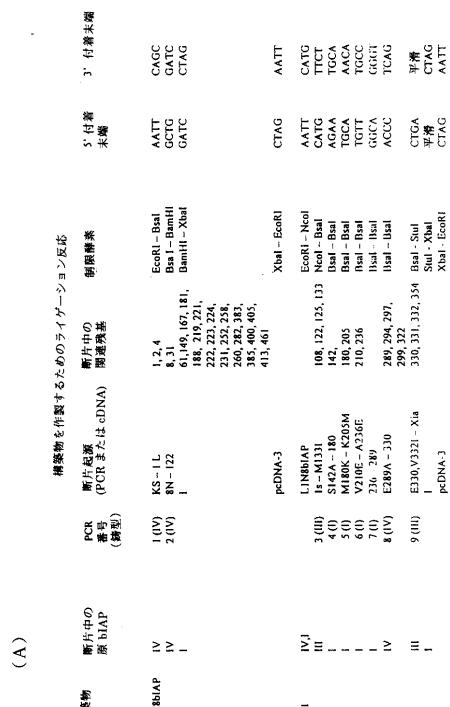
【図6】

1 FIPAEEDPA FWNRQAAQAL OVAKKLQPIQ TAAKNVILFL GOGMGVPTVT
 51 ATRILKGQMN GKLGKETPLA MDQFPYVALS KTYNVRDQVP DSAGTATAYL
 101 CGVKGNYKTI GVSAARYNQ CNTTSGNEVT SVMNRRAKAG KSVGVVTTSR
 151 VQHASPAGY AHTVNRNWYS DADLPADQAT YGCQDIATQL VNNMDIDWIL
 201 GGRMRYMFPE GTPDPEPYD VNQTVRKDK RNLVQEWAQ HQGAQYWWNR
 251 TELLQAANDP SVTHLMGLFE PADMKYNVQQ DPTKOPTLEE MTEAALQVLS
 301 RNPQGFYLFV EGGRIDHGHG EKGAYMALTD TVMFDNIAIK ANELTSELDT
 351 LILATADHSH VFSEGGYTLR GTSIFGLAPS KASDNKSVTS ILYGNPGYV
 401 LGGGLRPDVN DSISEPDSYR QQAVAVLSSE SHGGEDVAVF ARGPQAHLVH
 451 GVQEETFVAH VMFAGCVP YTDCNLPAPS GLSDAAHLAA SPPSLALLAG
 501 AMLLLLAPAL Y

【図7】

塗基番号		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	M	S	T	N	M	N	A	■	K	V
bIAP II		L	I	A	N	T	G	R	N	R	R	N	R	T	A	T	Y	M	Y	W
bIAP III	F	I	V	D	K	D	R	N	R	M	S	T	D	T	Y	T	T	K	E	E
bIAP IV	F	■	A	■	D	T	G	K	N	S	M	S	S	N	T	Y	T	N	M	E
																				.

【図8】



【図9】

AP 突然変異体	$V_{max} \pm sd$	V_{max} [U/mg]	T ₅₀ (10 分)
野生型			
b AP I	5.26 ± 0.44	2.723 ± 249	66.2
b AP II	16.61 ± 0.88	8.600 ± 843	58.8
b AP III	9.07 ± 0.79	4.696 ± 494	59.1
b AP IV	13.11 ± 0.85	6.787 ± 571	52.9
キメラ			
L1NB	5.90 ± 0.40	3.055 ± 336	65.8
INT 1	19.22 ± 1.08	9.951 ± 1.565	59.7
INT 2	16.95 ± 0.95	8.776 ± 1.431	55.6
INT 3	17.17 ± 0.90	8.890 ± 1.413	57.9
突然変異体			
[K] ¹²² b AP II	16.21 ± 2.33	8.393 ± 1.328	58.0
[M] ¹³³ b AP II	17.69 ± 1.45	9.159 ± 1.099	58.1
(S) ¹⁴² b AP II	16.53 ± 1.06	8.559 ± 603	57.9
[M] ¹⁸⁰ b AP II	17.81 ± 0.80	10.433 ± 900	58.6
[K] ²⁰⁵ b AP II	20.29 ± 1.25	9.454 ± 819	57.5
[V] ²¹⁰ b AP II	17.98 ± 1.40	8.377 ± 908	58.1
[A] ²³⁸ b AP II	19.61 ± 2.81	10.153 ± 1.565	58.1
[Q R V]b AP II	19.25 ± 0.99	9.967 ± 534	59.0
[D] ³²² b AP II	5.44 ± 0.34	2.817 ± 307	61.4
[G] ³²² b AP II	16.53 ± 1.30	8.559 ± 1.075	59.2
[G] ³²² b AP I	19.60 ± 0.99	10.148 ± 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 ディー - 8 2 3 7 7 ペンツバーグ , アン デル フライハイト 5 4

(72)発明者 ヘルムット ブルトシャー
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 9 2 ハバック , アム アーレナングル 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 福間 信子

(56)参考文献 J. Biol. Chem. , 1985年 , vol.260, no.20 , p.11190-11193

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-90
BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed