

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3662948号
(P3662948)

(45) 発行日 平成17年6月22日(2005.6.22)

(24) 登録日 平成17年4月1日(2005.4.1)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 1/22
C 0 7 K 19/00
C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 1/22
C 0 7 K 19/00
C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 21 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願平5-340885	(73) 特許権者	591021970
(22) 出願日	平成5年12月9日(1993.12.9)		ニュー・イングランド・バイオレイブス・ インコーポレイテッド
(65) 公開番号	特開平7-70200		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 915、ピバリー、トザー・ロード・32
(43) 公開日	平成7年3月14日(1995.3.14)		
審査請求日	平成12年10月24日(2000.10.24)	(74) 代理人	100062007
(31) 優先権主張番号	004139		弁理士 川口 義雄
(32) 優先日	平成4年12月9日(1992.12.9)	(74) 代理人	100080403
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 至
(31) 優先権主張番号	146885	(74) 代理人	100094776
(32) 優先日	平成5年11月3日(1993.11.3)		弁理士 船山 武
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ドナルド・ジー・コーム
			アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 915、ピバリー、ウオーター・ストリー ト・109

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改質タンパク質及びその製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

介在タンパク質配列 (I V P S) 及びターゲットタンパク質の二つの構成要素を含む融合タンパク質であって、

改質されていてもよい I V P S がターゲットタンパク質領域中または近傍に挿入され；
該 I V P S は - O H または - S H 側鎖を持つアミノ酸残基を C 末端に有するスプライスジ
ャンクションを伴っており；

予め決定した条件の変化により切除またはスプライスされることにより融合タンパク質を
生じさせることを特徴とする前記融合タンパク質。

【請求項2】

I V P S がターゲットタンパク質のアミノまたはカルボキシ末端に融合していることを
特徴とする請求項1に記載の融合タンパク質。

【請求項3】

I V P S が、酵素であるターゲットタンパク質を実質的に不活化させるようにターゲッ
トタンパク質領域中に挿入されていることを特徴とする請求項1に記載の融合タンパク質
。

【請求項4】

ターゲットタンパク質領域からの I V P S のスプライシングにより、ターゲットタンパ
ク質の活性が実質的に回復することを特徴とする請求項3に記載の融合タンパク質。

【請求項5】

I V P Sが、ホーミングエンドヌクレアーゼに対して相同性をもつエンドヌクレアーゼをコードすることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

I V P Sのエンドヌクレアーゼ機能が実質的に不活化されていることを特徴とする請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

スプライシングがトランススプライシングを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

I V P Sが C I V P S 1、C I V P S 2 または C I V P S 3 からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 9】

I V P Sがターゲットタンパク質のセリン、トレオニンまたはシステイン残基の直前に挿入されていることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

I V P Sがそのアミノ末端にセリン、トレオニンまたはシステイン残基を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

I V P Sがそのカルボキシ末端にセリン、トレオニンまたはシステイン残基を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 12】

改質が、- O H または - S H 側鎖を有する少なくとも 1 つのアミノ酸残基において行われることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

改質が、翻訳後に、または翻訳と同時にされる側鎖の化学誘導体化であることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

予め決定した条件変化が、温度、p H、光、リン酸化及びグルコシル化からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

基質に対して親和性を有する結合タンパク質を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 16】

基質が I V P S に対する抗体であることを特徴とする請求項 15 に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

(a) ターゲットタンパク質をコードする D N A と、制御可能な I V P S をコードする D N A とを結合させて融合 D N A を形成し；

(b) 前記融合 D N A を発現させて、改質ターゲットタンパク質を産生する段階を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク質の製造法。 40

【請求項 18】

(a) ターゲットタンパク質、基質に対して親和性を持つ結合タンパク質および制御可能な I V P S を含む請求項 1 に記載の融合タンパク質を形成し；

(b) 融合タンパク質と結合タンパク質が結合する基質とを接触させ；

(c) I V P S の切断が起きる条件下に基質に結合した融合タンパク質をおき、次いで結合タンパク質からターゲットタンパク質を分離し；

(d) ターゲットタンパク質を回収する段階を含むことを特徴とするターゲットタンパク質の精製法。

【請求項 19】

(a) ターゲットタンパク質と制御可能な I V P S を含む請求項 1 に記載の融合タンパ 50

ク質を形成し；

(b) 融合タンパク質とIVPSが結合する基質とを接触させ；

(c) IVPSの切断が起きる条件下に基質に結合した融合タンパク質をおき、次いでIVPSからターゲットタンパク質を分離し；

(d) ターゲットタンパク質を回収する

段階を含むことを特徴とするターゲットタンパク質の精製法。

【請求項20】

基質がIVPSに対する抗体であることを特徴とする請求項19に記載の融合タンパク質。

【請求項21】

(a) IVPSを選択し；

(b) 場合によってはIVPSを改質し、予め決定した条件を変化させることの結果として切除またはスプライシングが起こるような融合タンパク質を形成するように、IVPSをターゲットタンパク質の領域中または近傍に挿入し；

(c) 融合タンパク質において、そのような制御が提供されているか否かを決定する段階を含むことを特徴とするIVPSを制御可能にする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、改質タンパク質及びその製造法に関する。より具体的には、本発明の改質タンパク質は、ターゲットタンパク質及び、予め決定した条件下で切除または切断し得る制御可能な介在タンパク質配列(CIVPS)を含む。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

成熟タンパク質の産生には、DNAからRNA、タンパク質への情報の流れが含まれる。その情報を妨げるDNA及びRNA要素を正確に切除することは、既に報告されている[M.Belfort, Annu.Rev.Genet.24:363(1990)；T.R.Cech,Annu.Rev.Biochem.59:543(1990)；Hunterら,Gene Dev.3:2101(1989)]。近年、介在タンパク質配列の正確な切除についての証拠が、Saccharomyces cerevisiae由来のTFPI対立遺伝子[Hirataら,J.Biol.Chem.265:6726(1990)；Kaneら,Science 250:651(1990)]及びMycobacterium tuberculosis由来のrec A遺伝子[Davisら,J.Bact.173:5653(1991)；Davisら,Cell 71:1(1992)]に関しても報告された。これらは、各々成熟タンパク質を産生するために除去しなければならない内部フレーム内ペプチドセグメントを含んでいる。各Tfp1及びRecAの発現により、2種類のペプチド、即ち、一方は介在タンパク質配列(IVPS)を表し、他方は外部タンパク質配列(EPS)の連結産生物を表すペプチドが生じる。この翻訳後プロセッシング事象(post-translational processing event)は、「タンパク質スプライシング」と呼称されてきた。同様に、好高熱性の原始Thermococcus litoralis由来のVent DNAポリメラーゼ遺伝子は、2個のフレーム内IVPSを含んでいる[Perlerら,PNAS 89:5577(1992)]。

【0003】

研究への応用とは別にIVPSまたはタンパク質スプライシングを使用する方法の開発に於ける大きな障害は、IVPSの活性及びスプライシング事象を制御することが不可能である点にある。

【0004】

従って、IVPSを用いるターゲットタンパク質を改質するための、特にIVPSの活性が制御可能な、便利な手段を提供する方法が望ましい。その活性が実質的に不活化されるようにターゲットタンパク質を特異的に改質し得る方法を得るのも望ましい。不活化改質タンパク質の活性を回復させるために使用し得る方法を得るのが望ましい。

【0005】

【課題を解決するための手段】

発明の概要

10

20

30

40

50

本発明は、予め決定した条件下でスプライシングなしに切断またはタンパク質スプライシングにより切除し得るIVPSとターゲットタンパク質とを含む改質タンパク質に関する。このような予め決定した条件(predetermined condition)は、使用したIVPSに依存し、例えば、温度上昇、pH条件の変化、光への暴露、脱リン酸化、またはアミノ酸残基の脱グリコシル化を包含し得る。IVPSは、ターゲットタンパク質にIVPSを挿入することによってまたは、ターゲットタンパク質のアミノ若しくはカルボキシ末端でターゲットタンパク質とIVPSを融合することによってターゲットタンパク質と結合し得る。従って、制御可能な介在タンパク質配列(CIVPS)と称されるこれらのIVPSは、スプライシングまたは切断反応を制御するのに有用である。本発明はさらに、CIVPSの産生、選択及び試験方法にも関する。

【0006】

好ましい態様の一つでは、CIVPSをコードするDNA配列は、両方のコード配列が連続する読み取り枠を形成するように、ターゲットタンパク質をコードするDNA配列に挿入するか、またはこれと結合させる。その後、この融合DNAの発現を利用して改質ターゲットタンパク質を産生する。もう一つの実施態様では、このようにして産生された改質タンパク質を、CIVPSを切除するか切断する予め決定した条件にかける。特定の実施態様に於いては、ターゲットタンパク質を実質的に不活化させるターゲットタンパク質領域にCIVPSを挿入し、そしてCIVPSの切除によりターゲットタンパク質の活性を回復させる。

【0007】

好ましいCIVPSとしては、*T. litoralis*から得られるCIVPS 1及び2 (Vent IVPS 1及び2または、IVS 1及び2とも称される)並びに、*Pyrococcus*種から得られるCIVPS 3 [Deep Vent IVPS 1またはIVS 1とも称される] が挙げられる。これらのCIVPSは、温度上昇時に改質タンパク質から除去、即ち、タンパク質スプライシングを介して除去し得る。

【0008】

本発明により、特定のCIVPSアミノ酸残基及び少なくとも第1の下流アミノ酸残基はスプライシング反応を調節し、且つこれらの残基の改質によりスプライシング反応が減少するかまたは停止することも知見された。これらの残基は、他のIVPSに保存されることが知見された。このような残基の改質を使用して、IVPSをCIVPSに転換させ得る。

【0009】

本発明により、特定の状況下では、完全スプライシング反応は必要でないか、または望ましくないことが知見された。このような状況下では、CIVPSを改質してスプライシングなしに切断し、ターゲットタンパク質からCIVPSの分離または切断を制御し得る。

【0010】

本発明のCIVPS及び改質タンパク質の潜在的な用途は多様である。これらの例としては、例えば、ターゲットタンパク質の酵素活性の制御、アフィニティークロマトグラフィーによるCIVPSに特異的な抗体を使用する改質タンパク質の精製、及び宿主細胞に毒性であるタンパク質の産生が挙げられる。

【0011】

本発明のCIVPSは、さらに、CIVPSに融合したターゲットタンパク質を含む改質タンパク質を産生するタンパク質精製方法で使用し得る。所望により、3部分融合は、CIVPSがターゲットタンパク質と基質(結合タンパク質)、例えばMBPに対する親和性を有するタンパク質との間にある場合に産生し得る。次いで改質タンパク質は、CIVPSまたは結合タンパク質が特異的親和性を有する基質と、例えばアフィニティークロマトグラフィーを使用して接触させる。高度に精製したターゲットタンパク質は、例えばCIVPSとターゲットタンパク質の間の切断を開始する予め決定した条件にCIVPSをかけることによって、カラムから遊離し得る。あるいは、融合タンパク質は上記の如く精製し得、次いでターゲットタンパク質は、CIVPSを予め決定した条件にかけることによって融合物から放出してもよい。

【0012】詳細な説明

本発明は、改質タンパク質及びその製造方法に関する。改質タンパク質は、制御可能な介在タンパク質配列(CIVPS)及びターゲットタンパク質を含み、CIVPSは、例えば温度上昇、

10

20

30

40

50

pH条件の変化、光分解によるアミノ酸残基不ブロック化、脱リン酸化、脱グリコシル化または他の手段などの予め決定した条件下で、タンパク質スプライシングなしに切断またはタンパク質スプライシングにより切除し得る。所望により、改質タンパク質をこれらの条件にかけ得る。CIVPSは実質的にターゲットタンパク質活性を不活化する領域にも挿入し得る。

【 0 0 1 3 】

介在タンパク質配列 (IVPS) は、前駆体タンパク質内に見出される内部フレーム内ペプチドセグメントであり、ネイティブタンパク質を形成するためにタンパク質スプライシングを介して除去または切り出される。IVPSは、*Saccharomyces cerevisiae*由来のTFPI対立遺伝子 [Hirataら, 上掲; Kaneら, 上掲] 及び*Mycobacterium tuberculosis*由来のrec A遺伝子 [Davisら, 上掲(1991); Davisら, 上掲(1992)] 中に存在することが報告されている。これらの文献は、本明細書中参照として含まれる。

10

【 0 0 1 4 】

本発明のCIVPSは、ネイティブのIVPSの固有の特性(例えば、温度の上昇)によりまたは、IVPSを制御すべき反応にかけ改質により切除または切断が制御され得る任意の介在タンパク質配列を含む。

【 0 0 1 5 】

好高熱性原始*Thermococcus litoralis*由来のVent DNAポリメラーゼ遺伝子は、発現したポリメラーゼの動力学的及び生化学的特性に影響することなく、DNAレベルで欠失し得る2つのフレーム内IVPS、即ちIVPS 1 (CIVPS1) 及びIVPS 2 (CIVPS 2) [Perlerら, 上掲] を含む。両方のIVPSを含むVent DNAポリメラーゼ遺伝子の正しいプロセッシングは、ネイティブの原始*T. litoralis*で起こる。さらに、IVPS1を欠失する発現構築物の正しいプロセッシングは、真正細菌の*E. coli* [Perlerら, 上掲]、真核生物のパキウウイルスに感染した昆虫細胞及び*in vitro*転写/翻訳系 [Hodgesら, *Nucleic Acids Research*, 20: 6153(1992)] 内で観察されている。さらに、ウサギ網状赤血球及び*E. coli in vitro*転写/翻訳系は、IVPS 2 配列を正しく除去して、成熟ポリメラーゼを産生する。理論に結び付けるつもりはないが、Vent及びDeep Vent IVPSは自己スプライシングすると考えられる。

20

【 0 0 1 6 】

Vent DNAポリメラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は、配列表中配列番号: 1として記載した。CIVPS 1のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド1773~3386である。CIVPS 2のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド3534~4703である。CIVPS 1及びCIVPS 2は、1990年4月24日にAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託し、ATCC受託番号40795号を受けたファージNEB619から得ることができる。

30

【 0 0 1 7 】

第3のIVPS(CIVPS3、即ち、DV IVPS1)は、好熱性の原始細菌、*Pyrococcus*種(単離物GB-D)のDNAポリメラーゼ遺伝子中に本発明者によって発見された。*Pyrococcus* DNAポリメラーゼは、時折Deep Vent DNAポリメラーゼと称される。Deep Vent DNAポリメラーゼのヌクレオチド配列は、配列表中配列番号: 2として記載した。CIVPS 3のヌクレオチド配列は、1839~3449である。CIVPS 3は、1991年10月1日にATCCに寄託し、受託番号68723を受けたプラスミドpNEB# 720から得ることができる。

40

【 0 0 1 8 】

本発明により、上記CIVPS 1、CIVPS 2及びCIVPS 3は、温度上昇時に改質タンパク質から切除し得る。例えば、CIVPSは37 以下の温度では低減した速度で切除されるが、約42~80 の温度ではより効率的に切除し得る。好ましい切除温度は、約42~60 である。予め決定した条件は、ターゲットタンパク質が変性しないか、熱不活化を受けない温度を実験的に考慮すると最も好ましい。改質タンパク質を予め決定した条件に、1分未満~数時間かけ得る。特定の状態では、ターゲットタンパク質の熱感受性に依存して、温度を下げながらインキュベーション時間を長くするのが好ましい。

【 0 0 1 9 】

さらに、異なる改質タンパク質は、種々の温度でスプライシング効率に違いを示し得る。

50

必要により、各改質タンパク質の単離及びスプライシングの最適温度は、実験的に決定し得る。CIVPSが目的温度よりも低すぎる温度でスプライスする場合、CIVPSを改質し得るか、ターゲットタンパク質中のその位置を最適スプライシング温度が上昇するように変化させ得る。改質タンパク質がin vivoでスプライスせず、無傷の改質タンパク質の収量を確実に増加させるために、宿主細胞を増殖して、改質タンパク質をより低い温度(例えば、12 ~ 30)で精製し得る。これは、スプライシング要素を突然変異させて、スプライシング温度を最適温度例えば30 ~ 37 から42 ~ 50 にシフトさせ、その結果、生理学温度でのスプライシングのレベルを減少させることによって達成し得る。

【0020】

他のIVPSは、例えば、コード容量(coding capacity)が知見されたタンパク質よりもかなり大きく、成熟タンパク質に存在しないタンパク質配列をコードする遺伝子類を識別することにより単離し得る。IVPSを含むタンパク質は、成熟タンパク質がIVPSを含む前駆体のN-末端及びC-末端配列を依然として有するという点で「プレ-プロ(pre-pro)」前駆体を有するタンパク質と区別し得る。さらに、IVPSは、特定のタンパク質ファミリー(例えばDNAポリメラーゼ)中に保存されるという特質(motifs)が存在しないことにより検出され得る。このような特質が存在しないということは、IVPSがその特質を妨害することを示している[Perlerら, 上掲]。挿入がマーカートンパク質活性を減少させるように、疑わしいタンパク質配列をマーカートンパク質、例えば -ガラクトシダーゼ中に挿入することにより、目的のIVPSをスクリーニングし得る。得られた改質タンパク質は、マーカートンパク質活性の増加に関して特定の時間間隔で評価し得る。実施例1~3参照。一度識別できたら、IVPSをコードするDNAを単離し、通常DNA増幅方法を使用して増幅し得る。

【0021】

IVPSは、以下の特性:

(1)HOエンドヌクレアーゼまたは他のホーミングエンドヌクレアーゼとの類似性、

(2)アミノ酸配列(Ala/Val)HisAsn(Ser/Cys/Thr)(配列番号:45)

をいくらか有する領域の存在及び、成熟タンパク質で観察されるよりも大きな読み取り枠によっても識別し得る。

【0022】

本発明のCIVPSは、スプライシング反応が制御され得るように改質されたIVPSも含む。図1(配列番号:30, 配列番号:31, 配列番号:32, 配列番号:33, 配列番号:34, 配列番号:35, 配列番号:36, 配列番号:37, 配列番号:38及び配列番号:39)に示されているように、IVPSをスプライシングする公知のタンパク質の並んだスプライス部位から幾つかの類似点が明らかになる。特に、-OH及び-SH側鎖は、下流スプライス部位でジベプチドHis-Asnにより先行した両方のスプライス部位のC-末端側の残基上に見出される。

【0023】

理論に結び付けるつもりはないが、ヒドロキシ/スルフヒドリル基は、スプライシング反応に関係し、これらの残基の改質はスプライシング反応を調節すると考えられる。このような改質は、挿入がマーカートンパク質活性を減少させるように、マーカートンパク質、例えば -ガラクトシダーゼに改質CIVPSを挿入することにより評価し得る。得られた改質タンパク質は、次いで、マーカートンパク質活性が増加する制御条件下で特定の時間間隔で評価し得る。実施例1~3参照。さらに、ウエスタンブロット分析を使用して、スプライシング及び切断産物を評価し得る。実施例8を参照。同定後、CIVPSをコードするDNAを単離し、標準DNA増幅方法を使用して増幅し得る。

【0024】

本発明により、CIVPS2のセリン1082の単一アミノ酸の変化は、タンパク質スプライシング反応を遅延させるかまたは遮断(block)することが知見された。特に、トレオニン置換変異体は、野生型酵素のポリメラーゼ活性の10%を示したが、システイン及びアラニン置換変異体は検出可能な活性を与えなかった。しかしながら、他のスプライス部位での切断に対応する反応生成物が観察された。この種は、スプライス部位でセリンとシステインを置き換えた変異体中に蓄積したが、セリンがトレオニンまたはアラニンと置き換えた時に

は変化がなかった。野生型CIVPS2は、スプライシング反応時にカルボキシ末端スプライス部位での切断で予想される大きさの種の蓄積を示したが、セリン1082がトレオニン、システインまたはアラニンに変えられた時もこの産生物の蓄積は減少したけれども依然として観察された。S1082A変異体(variant)はタンパク質スプライシングの証拠を示さなかったが、この産生物を産生した。

【0025】

カルボキシ-末端スプライス部位に於ける突然変異の誘発、即ちトレオニン1472(T1472)残基とセリンとのアミノ酸置換により、野生型と同一のスプライシングパターンが生じた。T1472とアラニン、グリシンまたはイソロイシンとの置換は検出可能なスプライシングを与えなかった。アスパラギン1471をアラニンと置換すると、スプライシングは観察されなかったが、アミノスプライス部位での切断の証拠が観察された。以下の表1は、CIVPS2に於ける切断及びスプライシングでのアミノ酸置換の効果をまとめたものである。

【0026】

【表1】

	N-末端切断 ↓		C-末端切断 ↓	
WT aa 残基 残基数	S 1082	N 1471	T 1472	
観察されたスプライシング	T		S	
上流/下流 スプライス部位切断	C		C	
上流スプライス部位切断		q, d, a		
下流スプライス部位	a			
切断またはスプライシング なし			l, a, G 停止	

タンパク質スプライシング上の単一アミノ酸置換の効果は、E. coli発現系中にIVPS2を含むVent DNAポリメラーゼのパルス-チェイス分析を使用して評価した[Hodgesら, 上掲(1992)]。矢印は、スプライス部位の位置を示している。小文字は、他のサンプルに関しては2時間以内に知見されたのと対照的に、一晚インキュベーション後でのみ見られた効果を示している。スプライシングが観察される場合、C-及びN-末端切断由来の切断産生物も知見された。

従って、CIVPSスプライス部位での切断は、タンパク質スプライシングなしに達成され、ターゲットタンパク質からCIVPSの分離を制御できた。特定の状況では、このような活性が望ましい。これらの状況では、本発明のCIVPSは、自己タンパク質分解性タンパク質、例えば、自己タンパク質分解性プロテアーゼなど、例えばレトロウイルスプロテアーゼ[例えば、HIV-1プロテアーゼ: Louisら, Eur. J. Biochem., 199:361(1991)及びDebouckら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8903-8906(1987)]も包含し得る。当業者には他のこのようなタンパク質も公知である。Krausslichら, Ann. Rev. Biochem., 701-754(1988)参照。このようなタンパク質は、開示の方法に従って、タンパク質分解活性が予め決定した条件下で誘導し得るように改質し得る。

【0027】

スプライス部位アミノ酸を含むCIVPSアミノ酸の改質は、種々の方法で実施し得る。例えば、改質すべきアミノ酸残基を取り囲む配列を変更して、生物学的リン酸化部位を作り出し、特異的なキナーゼ及びホスファターゼに対する基質とする。プロテインキナーゼの例としては、例えばカゼインキナーゼII、cAMP依存性プロテインキナーゼ、cdc2及びpp60^{src} [Pearson及びKemp, Methods in Enzymology 200:62(1991)]が挙げられる。ホスファターゼの例としては、例えばタンパク質ホスファターゼ2A、ホスファターゼ及びエルシニア(Yersinia)由来のyopホスファターゼ [Tonks, Current Opinion in Cell Biology, 2:1114(1990)]が挙げられる。

【0028】

実施例6Cに記載の如くCIVPS2を例として使用すると、アルギニン残基を位置1079で置換して、コンセンサスカルモジュリン依存性プロテインキナーゼII部位を作り出す [XRXXS* ; Pearsonら, 上掲]。タンパク質スプライシング反応は、リン酸化度によって調節され得、ホスホセリンを作り出し、スプライシングをブロックするためにキナーゼを、リン酸を除去するためにホスファターゼを使用し、野生型セリンを回復し、タンパク質スプライシングする。

【0029】

さらに、重要なスプライス部位残基は、改質が逆転するまでスプライシング反応がブロックされるように、化学的に改質され得る。これは、例えば、異常なアミノ酸突然変異誘発 [Norenら, Science 244:182(1989); Ellmanら, Methods in Enzymology 202:301(1991)]を使用することにより実施し得る。この方法を使用して、スプライシング反応に含まれるアミノ酸1個を翻訳時に、側鎖の側鎖官能基が化学的または光分解的に除去し得る基によって「マスク」される合成誘導体と置換し得る。例えば、実施例7に記載の如く、CIVPS2のセリン1082を以下の如く本方法により改質した。アンバー停止コドン(セリン1082に対応する位置でVentポリメラーゼ遺伝子に導入した(実施例6D参照))の遺伝子を、野生型遺伝子のタンパク質スプライシングを指示することが既に示されたin vitro転写/翻訳系 [Ellmanら, 上掲]に添加した。このコドンを介して読み取るtRNAの非存在下では、切頭産物だけが予想された。化学的にO-(o-ニトロベンジル)セリンでアミノアシル化したアンバーサプレッサー-tRNAをこの系に添加したときには、このコドンの先では連続的な翻訳が可能であり、その結果、改質セリンの部位特異性組み込み(incorporation)が得られた。予想通り、完全長前駆体だけが観察され、これは、スプライシング反応がブロックされたことを示している(図9)。o-ニトロベンジル基は350nmでの短時間の照射により除去可能なので [Pillai, Synthesis 1(1990)]、ブロックされた前駆体は、照射後には通常スプライスすると考えられる。ブロックされた前駆体は、可視光に暴露されるとセリンを放出し、インキュベートするとスプライシング反応が起きるので、スプライスされた産物がはっきりと知見される(図10)。

【0030】

この戦略は、CIVPS2の下流スプライス部位に見られるトレオニン1472並びに、側鎖の化学官能基がスプライシングに必要であるか、その位置に嵩高い基を導入することによりスプライシングを立体的に妨害する他の任意の残基に適用し得る。ブロック基は、保護すべき側鎖の化学的性質だけでなく、(化学的または光分解的)脱ブロックの望ましい方法に基づいて選択し得る。例えば、タンパク質スプライシングの他の例(図1)に存在するシステイン基は、例えば、ジスルフィド交換(例えば、ジチオジピリジンを用いる)または遷移金属イオン(例えば、Hg²⁺)との錯体形成を使用してブロックし得るチオール側鎖を有する。Corey及びSchultz, J. Biological Chemistry 264:3666(1989)参照。得られたブロック化前駆体は、次に、各々金属キレート化剤の添加または温和な還元によりスプライシングするために活性化し得た。

【0031】

IVPS1及びIVPS2は各々、エンドヌクレアーゼ、即ち、I-Tli-II及びI-Tli-Iをコードする。さらにDV IVPS1は、IVPS1がVent DNAポリメラーゼ遺伝子に挿入したのと同位置でD

10

20

30

40

50

V DNAポリメラーゼに挿入し、Vent IVPS1 遺伝子と62%の相同であるエンドヌクレアーゼI-PspIもコードする。Tfp1、M.tuberculosis rec A、Vent及びDeep Vent DNAポリメラーゼ中のIVPS読み取り枠は、ホーミングエンドヌクレアーゼ、イントロンを欠失する対立遺伝子を切断し得るイントロン-コード化タンパク質の種類と似たタンパク質配列を有する[Hirataら, 上掲, Kaneら, 上掲, Davisら, 上掲, Perlerら, 上掲]。

【0032】

特定の宿主細胞は、CIVPSの遺伝子産物に対して耐性がないので、場合により、エンドヌクレアーゼ機能を不活化するのが好ましい。本発明により、タンパク質スプライシングは、CIVPSエンドヌクレアーゼ機能が不活化された時に起きることが明らかになった。このような不活化は、例えば、ランダム突然変異誘発、欠失または挿入不活化または特定部位の突然変異誘発を含む種々の方法で達成し得る。エンドヌクレアーゼ機能は、部位特異的突然変異誘発により不活化されるのが好ましい。I-Tli-Iは、特徴的なドデカペプチドモチーフ対中の他の「ホーミングエンドヌクレアーゼ」と似た配列を共有する[Cummingsら, Curr.Gent.16:381(1989)]。実施例6Bに見られるように、エンドヌクレアーゼ活性は、これらのモチーフの一種内の単一残基のオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発により不活化された(アスパラギン酸1236からアラニンへ)。別の残基の置換は、タンパク質スプライシングに影響を及ぼすことなくエンドヌクレアーゼ活性を減少または除去し得た。エンドヌクレアーゼ機能の不活化により、改質タンパク質を保持する構築物の安定性を増加させることが明らかになった。

【0033】

本発明で使用し得るターゲットタンパク質としては、例えば、酵素、毒素、細胞毒素、糖タンパク質及び成長因子が挙げられる。このような多くのタンパク質は当業者には公知である。このようなタンパク質のアミノ酸及びヌクレオチド配列は、多くのコンピューターデータベース、例えば、GenBank、EMBL及びSwiss-Protにより容易に得られる。あるいは、ターゲットタンパク質のヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、当業界で日常的な方法を使用して決定し得る。

【0034】

実質的にターゲットタンパク質活性を不活化するのが望ましい場合、このような活性を不活化する領域にCIVPSを挿入する。このような領域は当業者には公知であり、例えば、結合部位、酵素活性部位、タンパク質の保存モチーフ、例えばDNAポリメラーゼ及び二量化または多量化部位(multimerization sites)が挙げられる。あるいは、CIVPSをランダムに挿入し、所望の活性レベルが得られるまで各改質タンパク質の活性を測定し得る。このような改質タンパク質は、ネイティブのタンパク質と比較して活性が約50%減少しているのが好ましい。約75%減少しているのがより好ましく、99%以上減少しているのが最も好ましい。

【0035】

CIVPSは、任意の多くの方法によりターゲット遺伝子に挿入し得る。好ましくは、適正なタンパク質スプライシングを確実にするためにCIVPSが切除される場合、CIVPSの切除によりそのアミノ酸がスプライス部位に残るので、適正なスプライス部位残基の直前にCIVPSを挿入することが重要である。これは、好適なスプライス部位アミノ酸の直前にCIVPSを挿入するか、またはCIVPSが好適なアミノ酸と一緒に「持ってくる(bring)」ようにCIVPSを改質することによって達成し得る。

【0036】

例えばCIVPS1、2または3は、好適なスプライス部位アミノ酸、例えばセリン、トレオニンまたはシステイン残基の直前、最も好ましくはセリンまたはトレオニンの直前に挿入し得る。図1を参照。このような部位は、殆どのターゲットタンパク質で便利に利用し得る。

【0037】

ターゲットタンパク質が毒素であるような特定の状態では、第2の制御を加えることによりタンパク質スプライシングをさらに制御することが望ましい。これは、例えばCIVPSが

10

20

30

40

50

通常先行せず、スプライシング反応を遅延させ得るようなそれほど最適でないアミノ酸の前にCIVPSを挿入することにより達成し得る。

【0038】

上記の如く、CIVPSが好適な下流アミノ酸と一緒に「持ってくる」場合、ターゲットタンパク質内の任意の部位に挿入し得る。これは、所望の下流のアミノ酸のコドンをもつCIVPS DNAの作製により達成し得る。このようなDNAの産生方法を以下に詳述する。このDNAは次いで、ターゲットDNA内の任意の部位に挿入し得る。得られた改質タンパク質のタンパク質スプライシング時には、CIVPSによりもたらされた過剰の残基は後方に残存する。従って、最終産生物の活性が重要である場合、当業者は、過剰の残基が、活性に悪影響を及ぼすようなターゲットタンパク質領域内に絶対残存しないように製造段階を取らねばならない。

10

【0039】

CIVPSは、標準法[例えば、Hunkapillerら, Nature 310:105(1984)]及び市販のタンパク質合成機を使用して、任意の所望の部位に挿入した、CIVPSを含む、ターゲットタンパク質の第1のアミノ酸配列を化学的に合成することにより、ターゲットタンパク質に挿入またはターゲットタンパク質に融合し得る。

【0040】

あるいは、CIVPSをコードするDNA配列は、両方のコード配列が連続読み取り枠を形成するようにターゲットタンパク質をコードするDNA配列に挿入または融合される。これは、当業者には公知の種々の方法を利用して実施し得、その幾つかを以下に記載する。

20

【0041】

例えば、CIVPS DNAを、ターゲット遺伝子内でプラント切断し且つ枠内にある任意の制限酵素部位に挿入する。これは、第1に、その3'末端にトレオニンコドン(Vent IVPS 2)またはセリンコドン(Deep Vent IVPS 1若しくはVent IVPS 1)をもつCIVPS DNAフラグメントを合成することにより実施し得る。次いで、このフラグメントを制限エンドヌクレアーゼによりプラント末端に切断した線状プラスミドにフレーム内で結合する。lacZ DNA配列、例えば、EcoRV部位を使用して、残基375(アスパラギン酸)と376(イソロイシン)との間にVent IVPS 2またはDeep Vent IVPS 1を挿入し得る。図2参照。しかしながら上記の如く、この方法を使用してCIVPSを切除する場合、過剰の残基がスプライス部位に残存し、従って、CIVPSが挿入される場所に応じて、得られたタンパク質はネイティブのタンパク質と同一機能または構造を持たなくてもよい。

30

【0042】

CIVPS DNAは、ターゲット遺伝子と適合性の制限部位を作り出すためにCIVPSの両方の末端または一方の末端の近くにサイレント突然変異(アミノ酸残基を維持する)を起こすことによっても挿入し得た。例としてCIVPS 2を使用すると、サイレント突然変異により、BspE1制限部位は5'末端の近くに作り出され得、SpeI制限部位はその3'末端の近くに作り出され得る。新しい制限部位と重複し、且つasp 594またはthr 595のいずれかに於けるlacZターゲット遺伝子の開始により連続するPCRプライマーを使用して、BspE1及びSpeI制限部位と適合性のlacZフラグメントを作製し得る。次いで、CIVPSをlacZコード領域内のアスパラギン酸コドン(残基 594)とトレオニンコドン(残基 595)の間に挿入する。DNAフラグメントは、CIVPS及びターゲット遺伝子の両方から、CIVPSの末端と重複する挿入部位のその末端とのPCRにより合成され得、従って同一制限部位を含む。好適な制限エンドヌクレアーゼ処理後、適合性末端を有するDNAフラグメントを連結して融合遺伝子を作製し得る。CIVPSの切除後には過剰残基は全く残らないので、スプライシング発生時にネイティブのポリペプチドが形成するだろう。作り出された制限部位がCIVPS内に1個及びターゲット遺伝子内に1個であると、多重フラグメントの連結及び複雑なスクリーニング方法を回避し得るので好ましい。

40

【0043】

ターゲット遺伝子配列を保持するプラスミドベクターが比較的小さい場合、例えば、約5 kb未満である場合、線状型プラスミドをPCRを使用して作製し、次いで線状プラスミドをC

50

IVPS遺伝子に連結する。この方法を使用して、CIVPS遺伝子を以下の如くターゲット遺伝子の任意の位置に挿入し得る。第1に、ターゲット遺伝子を含むプラスミドDNAを、挿入部位(例えば、CIVPS1、2及び3に関してはセリン若しくはトレオニンコドン)で開始するプライマー対または、CIVPSが好適な下流アミノ酸を持ってくる場合には任意のコドンを使用するPCRにより合成し得る。次に、(任意にセリンまたはトレオニンを含む)CIVPS遺伝子を(セリンまたはトレオニンコドンを含まない)線状プラスミドDNAに連結し得る。必要なスプライス部位アミノ酸(セリンまたはトレオニン)を、CIVPSフラグメントまたはターゲット遺伝子のいずれかの上に配置し得る。内在性セリンまたはトレオニンの上流に配置する際に必要なアミノ酸をCIVPSフラグメント上に有する利点は、コード領域にセリンまたはトレオニンが欠失しているので、(CIVPS挿入物を含まない)自己連結ベクターDNAがターゲット遺伝子の欠陥産物だけを発現し得るということである。これは、融合タンパク質がスプライスして機能性産物を産生する場合に、融合構築物に関する表現型の選択を助長し得る。

【0044】

改質タンパク質をコードする融合DNAは、好適な発現ベクター、即ち、挿入したタンパク質-コード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含むベクターに挿入し得る。種々の宿主-ベクター系を使用してタンパク質-コード配列を発現し得る。これらの例としては、ウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど)に感染した哺乳動物細胞系；ウイルス(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系；酵母ベクターを含む酵母のような微生物または、バクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNAで形質転換したバクテリアが挙げられる。使用した宿主-ベクター系に依存して、多数の好適な転写及び翻訳要素のうちの任意のものを使用し得る。例えば、改質真核生物タンパク質を発現する際、好適な真核生物ベクター及び宿主細胞を使用すると都合がよい。融合DNAの発現により、本発明の改質タンパク質が産生する。

【0045】

一度得られたら、公知方法を好適に組み合わせて、改質タンパク質を分離し且つ精製し得る。これらの方法としては、例えば、塩析及び溶媒沈殿などの溶解性を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの分子量の違いを利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの電荷の違いを利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的な親和性を利用する方法、逆相高性能液体クロマトグラフィーなどの疎水性の違いを利用する方法及び等電点電気泳動などの等電点の違いを利用する方法が挙げられる。

【0046】

所望により、改質タンパク質を、CIVPSが除去される予め決定した条件にかけ得る。このような条件は、使用するCIVPSに依存する。例えば、CIVPS1、2及び3は、改質タンパク質を高温、42 ~ 80、最も好ましくは42 ~ 60 にかけることにより除去し得る。これは、公知方法、例えば、水浴または熱発生レーザーを使用して実施し得る。インキュベーション時間は1分未満から数時間以上を変動し得る。上記の如く、特定の状態では、ターゲットタンパク質の熱感受性に依存して、温度を下げながらインキュベーション時間を延長するのが望ましい。さらに、in vivoスプライシングが望ましい場合、宿主生物の増殖と適合する温度が好ましい。

【0047】

本発明により、改質タンパク質が無毒性であるように毒性ターゲットタンパク質を改質するためにCIVPSを使用することにより宿主細胞に対して非常に毒性のタンパク質を産生し得る。これは、例えば、CIVPSを毒性に関与する領域に挿入することにより実施し得る。単離後、無毒性改質タンパク質を、CIVPSを除去し、得られた毒性を単離し得るような予め決定した条件にかけ得る。

【0048】

タンパク質が宿主細胞に対して非常に毒性が高い場合、「トランスプライシング(transplicing)」と称される方法を使用してそのタンパク質を産生するのが望ましい。この方法を

10

20

30

40

50

使用すると、毒性タンパク質は、別個の宿主細胞中にCIVPSを挿入することにより改質されている2つ以上の部分(pieces)内で産生する。例えば、ターゲットタンパク質のカルボキシ末端にCIVPSのアミノ末端フラグメントが挿入されるターゲットタンパク質のアミノ部分を含む第1の改質タンパク質を産生し、その後、ターゲットタンパク質のアミノ末端にCIVPSの残りのフラグメントが挿入されるターゲットタンパク質の残りの部分を含む第2の改質タンパク質を産生し得る。あるいは、重複CIVPSフラグメントを使用し得る。次いで、各改質タンパク質を宿主細胞から単離し、CIVPSのスプライシングに好適な条件下、一緒にインキュベートする。これにより連結したターゲットタンパク質が得られる。ターゲットタンパク質を2個の異なる宿主に分割することにより、微小画分でさえも宿主に悪影響を与えるin vivoスプライスする可能性はない。さらに、CIVPS全体を第1の改質タンパク質のスプライス部位の一方の側に挿入し、残りのターゲットタンパク質フラグメントをスプライシング混合物に添加した。

10

【0049】

本発明のIVPSは、「タンパク質連結」で使用し、非天然アミノ酸残基、構造プローブ、識別エピトープ若しくはタグ(tags)または、他の決定子(determinants)をターゲットタンパク質に添加し得る。例えば、ターゲットタンパク質をIVPSのアミノ末端に融合し得る。停止コドンを、IVPSのカルボキシ末端の直後に配置し得る。次いで融合すべきペプチドを混合物に添加し得る。天然のスプライシング機構を非常に厳密に模倣するためには、このペプチドのアミノ末端はセリン、トレオニンまたはシステインであってもよい。次いで、産生物のスプライシングへ質量作用により増大されたスプライシング反応を進行し得る。

20

【0050】

上記反応は、ターゲットタンパク質のアミノ末端にカルボキシ末端で融合したIVPSから構成される出発物質を用いて起きるようにもし得る。特定のCIVPS内で開始するセリン残基に先行するように工学的に作製されたメチオニンでの開始が、E.coli内でアミノ末端セリン残基を残すように翻訳を起こさせる。次いで、このターゲットタンパク質のアミノ末端に融合すべきペプチドを添加し、スプライシングを進行させた。添加されるペプチド上のカルボキシ末端残基に関しては公知の要件がないので、このような試みは好ましい。さらに、今回の実験的証拠から、上流スプライス部位の切断は連結反応に先行して起こることが示唆されており、この試みが天然の反応機構に非常に近いことを示している。ターゲットペプチドをペプチドに添加し、融合タンパク質を翻訳し易くすることが可能であった。

30

【0051】

本発明は、他のタンパク質の誘導または分化などの特定の条件下、または細胞周期の特定の部分の間にターゲットタンパク質の効果を研究するためにも使用し得る。例えば、特定のタンパク質をコードする遺伝子の染色体コピーをCIVPSを含むバージョンと置き換え得る。細胞周期の特定点、分化または他の所望の点で、細胞を加熱すると前駆体がスプライスし、活性ターゲットタンパク質はこの時点でのみ存在する。

【0052】

本発明のCIVPSを使用して、CIVPSに対して特異的な抗体を持つアフィニティクロマトグラフィーを使用することにより改質タンパク質を単離することもできる。例えば、標準法を使用してCIVPSに対して結合親和性を持つモノクローナルまたはポリクローナル抗体を産生し得る。これらの抗体は、アフィニティクロマトグラフィー精製法で使用し、改質タンパク質を単離し得る。精製後、所望により、改質タンパク質をCIVPSを切除する予め決定した条件にかけ得る。

40

【0053】

上記の如く、CIVPSスプライス部位での切断は、タンパク質スプライシングなしに実施でき、ターゲットタンパク質からCIVPSの分離を制御し得る。従って、このようなCIVPSは融合タンパク質精製系で使用し得る。

【0054】

融合タンパク質精製系は当業者には公知である[欧州特許出願第0 286 239号及びN.M.Sassenfeld、TIBTECH,8:88-93(1990)参照]。通常、このような系では、結合タンパク質とタ

50

ターゲットタンパク質はプロテアーゼ認識部位を持つリンカーで結合されている。次いで、融合物は、結合タンパク質に対して親和性を持つ基質上のアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。結合タンパク質とターゲットタンパク質を、次に、プロテアーゼ、例えば第 X a 因子と接触させることにより分離する。これらの系では、非常に精製されたターゲットタンパク質を得るために、プロテアーゼはターゲットタンパク質並びに汚染の可能性から分離せねばならず、従って、追加の精製段階にかける。プロテアーゼの代わりに CIVPS を使用することにより、本発明の方法は、現在使用されているタンパク質融合精製系に含まれるこれら及び他の問題を避けることができる。

【 0 0 5 5 】

本発明の方法により、基質（結合タンパク質）に対して親和性を持つタンパク質とターゲットタンパク質の間に CIVPS がある融合タンパク質を含む改質タンパク質が形成する。このような融合タンパク質を形成する方法は、当業者には公知である [欧州特許出願第 0 28 6 239 号及び J.Sambrook ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p.17.29-17.33 参照]。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法で使用し得る結合タンパク質としては、例えば、糖結合タンパク質、例えばマルトースまたはアラビノース結合タンパク質、レセプター結合タンパク質、アミノ酸結合タンパク質及び金属結合タンパク質が挙げられる。他の結合タンパク質は当業界で公知である [欧州特許出願第 0 28 6 239 号及び N.M.Sassenfeld, TIBTECH, 上掲、参照]。

【 0 0 5 7 】

次いで改質タンパク質を、結合タンパク質が特異的親和性を有する基質と、例えばアフィニティークロマトグラフィーを用いて接触させる。

【 0 0 5 8 】

非常に精製されたターゲットタンパク質を、例えば、CIVPS とターゲットタンパク質の間で切断が開始するような予め決定した条件に CIVPS をかけることにより、カラムから遊離し得る。あるいは、精製融合タンパク質を、上記の如くカラムから溶離且つ遊離し得る。

【 0 0 5 9 】

【 実施例 】

本発明を、以下の実施例によりさらに説明する。これらの実施例は、本発明を理解しやすくするためのものであり、限定するものではない。

【 0 0 6 0 】

上記及び下記引用の参照文献は、すべて本明細書中参照として含まれる。

【 0 0 6 1 】

実施例 1

ターゲット遺伝子コドンの間の平滑部位に挿入するための I V P S カセットの合成

lacZ コード領域 (lacZ coding region) 又は他の任意のターゲット遺伝子に I V P S をフレーム内挿入 (in - frame insertion) するための DNA フラグメント又はカセットは、第 1 の下流外部タンパク質配列 (external protein sequence = EPS) コドンをういて又は用いずにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって製造し得る。天然の (native) 下流残基は、D e e p V e n t I V P S 1 及び V e n t I V P S 1 の場合のセリン、又は V e n t I V P S 2 の場合のトレオニンである。I V P S 2 は、トレオニン又はシステインに先行していれば、程度は低いですが、スプライスできることが判明した。理論に拘束されたくはないが、全ての I V P S は、セリン、トレオニン又はシステインのいずれかに先行していれば、ある程度までスプライスできると考えられる。下流のセリン又はトレオニンを含むカセットは、セリン又はトレオニンに先行する位置を含めて、ターゲット遺伝子内の任意の所望位置に挿入することができる。この構築では、セリン又はトレオニンをターゲット遺伝子から欠失させ、これをカセット上の入来残基で置換し得る。下流のセリン、トレオニン又はシステインを有していないカセットは、ターゲット遺伝子内のセリン、トレオニン又はシステインより前に挿入し得る。

10

20

30

40

50

【0062】

下記のプロトコルは、第1の下流EPSコドンを含む、Deep Vent IVP S 1 (C I V P 3) 及びVent IVP S 2 (C I V P 2) (エンド⁺及びエンド⁻バージョン) 用カセットの製造を説明するものである。

【0063】

PCR混合物は、Vent DNAポリメラーゼ緩衝液(NEB)に、2mMの硫酸マグネシウムと、400µMの各dNTPと、0.9µMの各プライマーと、40ngのプラスミドDNAと、100µl中2単位のVent DNAポリメラーゼとを加えたものからなる。増幅は、Perkin-Elmer/Cetusサーマルサイクラー(thermal cycler)を用いて、94 で30秒、48 で30秒及び72 で2分のサイクルに30回かけることにより実施した。Deep Vent IVP S 1は、pUC19のBamHI部位に挿入したPyrococcus sp. DNAポリメラーゼ遺伝子を含む4.8KbのBamHIフラグメントを有するpNEB#720(ATCC No. 68723)から合成した。Vent IVP S 2は、ベクターBluescribe SK-(Stratagene)のVent DNAポリメラーゼ遺伝子配列の1.9kb EcoRIフラグメント(2851-4766)を有するpV153-2から合成した。IVP S 2にはpNEB671(ATCC No. 68447)を使用することもできる。pAMQ29は、Vent IVP S 2コード領域内にアミノ酸置換(アスパラギン酸1236をアラニンに)を有する、pV153-2のエンドヌクレアーゼ欠失誘導体である。プライマー5'-AGTGTCTCCGGAGAAAGTGAGAT-3' (配列番号: 3) (Vent IVP S 2正方向(forward)、3534-3556、A3542のCへの置換)及び5'-AGTATTGTGTACCAAGGATGTTG-3' (配列番号: 4) (Vent IVP S 2/Thr逆方向(reverse)、4685-4706)を用いて、3'末端にトレオニンコドン(1173bp)を合成した。プライマー5'-AGCATTTTACCGGAAGAATGGGTT-3' (配列番号: 5) (DV IVP S正方向、1839-1862)及び5'-GCTATTATGTGCATAGAGGAATCCA-3' (配列番号: 6) (DV IVP S 1/Ser逆方向、3428-3452)を用いて、3'末端にセリンコドン(1614bp)を合成した。C末端セリン又はトレオニンを欠失したIVP Sフラグメントの形成には、最後の3つのヌクレオチドを欠失した逆方向プライマーを使用し得る。

【0064】

PCR試料はフェノール及びクロロホルムで抽出し、0.3M NaAc及び70%エタノール中で-20 で一晩沈殿させ、ミクロ遠心機(microfuge)で10分間、10Kで遠心分離して回収し、乾燥し、各々を30µlの蒸留水に再懸濁し、1%アガロースゲル上に配置して60ボルトで15時間電気泳動にかけた。PCR増幅フラグメントを含むゲル切片を1%低融点(low melting)アガロースゲル中に配置して80ボルトで2時間電気泳動にかけた。0.5mlのTE緩衝液(10mM トリス-HCl/0.1mM EDTA、pH8.0)中65 で30分間インキュベートし、フェノール、フェノール-クロロホルム(1:1混合物)及びクロロホルムで抽出し、0.6M NaAc(pH5.2)及び50%イソプロパノール中で-20 で一晩沈殿させることにより、低融点アガロースゲルからDNAフラグメントを回収した。DNAを遠心分離し、70%エタノールで洗浄し、乾燥し、15.5µlの蒸留水に再懸濁した。

【0065】

IVP S DNAフラグメントのリン酸化を、2µlの10xポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液(NEB)と、15.5µlの精製DNAと、2µlの10mM ATPと、20µl中5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(NEB)とを用いて37 で60分間実施した。試料を65 の水浴中で10分間加熱した。80µlのTE緩衝液(10mM トリス-HCl/0.1mM EDTA、pH8.0)を加えた後、試料をフェノール、

10

20

30

40

50

フェノール - クロロホルム (1 : 1 混合物) 及びクロロホルムで逐次抽出した。DNA を 2 . 5 M NH₄Ac 及び 70 % エタノール中で - 70 ° で 3 . 5 時間沈殿させ、マイクロ遠心機で 10 分間 10 K で遠心分離してペレット化し、冷 70 % エタノールで洗浄し、乾燥し、蒸留水 (Vent I V P S 2 又は Deep Vent I V P S 1 DNA の場合は 20 μ l 、 Vent I V P S エンド DNA の場合は 10 μ l) に再懸濁した。

【 0066 】

実施例 2

ガラクトシダーゼをコードするプラスミドのような制限酵素直線化プラスミド (restriction enzyme linearized plasmid) への I V P S のフレーム内挿入

10

この実施例では、2つのコドンの間でターゲット遺伝子内に平滑切断 (blunt cut) を形成する制限酵素部位にカセットを挿入することによって、I V P S カセットをターゲット遺伝子にクローニングする方法を説明する。カセットは、必要であれば、C 末端セリン、システイン又はトレオニンを含み得る。このプロトコルは、制限酵素がターゲット遺伝子ベクターを 1 回又は 2 回切断する場合に最も効果的である。具体例として、lacZ 遺伝子の EcoRV 部位への挿入を説明する (図 2) 。

【 0067 】

EcoRV 直線化 pAHO5 の調製

pAHO5 は、tac プロモーターの下流の pAGR3 のポリリンカー内で BamHI 部位と SmaI 部位との間に挿入された pRS415 (Simons ら、Gene 53 : 85 - 96 (1987)) からの 3 . 31 kb BamHI - DraI フラグメント上に完全な lacZ 遺伝子配列を有する。tac プロモーターは、lacI^q 遺伝子の産物によって抑制され得且ツイソプロピル - D - チオガラクトシド (IPTG) によって誘導され得る転写制御エレメントである。5 . 9 Kb ベクター pAHO5 (NEB) は更に、tac プロモーター及びポリリンカーの上流の転写終結配列と、大腸菌 lacI^q 遺伝子とを有する。pAHO5 は 2 つの EcoRV 認識配列を含んでいる。EcoRV は開裂部位に平滑末端を残す。EcoRV 開裂部位の 1 つは、375 番目のコドン (アスパラギン酸) と 376 番目のコドン (イソロイシン) との間の lacZ コード領域内で切断を行い、I V P S フラグメントのフレーム内挿入用部位として予定される。もう 1 つの部位は大腸菌 lacI^q 遺伝子内で 3 . 2 kb 下流に位置する。該プラスミドを部分的に切断して、EcoRV 部位のうちの 1 つだけが開裂されている分子を幾つか産生する。これらの直線プラスミドを精製する。I V P S カセットはいずれかの EcoRV 部位にランダムにクローニングする。従って、得られた組換え体は、配向 (orientation) と固有の EcoRV 部位への挿入とのためにスクリーニングする必要がある。DNA は、15 μ g の pAHO5 DNA を 100 μ l の 1 × NEB 緩衝液 2 中 40 単位の EcoRV (NEB) と共に 37 ° で 60 分間インキュベートすることにより部分的に消化した。EcoRV を失活するために試料を 65 ° で 10 分間加熱した後、20 μ l の染料添加アガロースゲルを試料に加えた。1 % 低融点アガロースゲルでの電気泳動により DNA フラグメントを分離した。直線化 pAHO5 プラスミド DNA を実施例 1 と同様に低融点アガロースゲルから回収し、44 . 6 μ l の蒸留水に再懸濁した。

20

30

40

【 0068 】

EcoRV 直線化 pAHO5 の脱リン酸化を、2 μ g の DNA と 4 単位の子牛腸アルカリホスファターゼ (NEB) との存在下で、50 μ l の 1 × NEB 緩衝液 2 中 50 ° で 60 分間実施した。0 . 5 μ l の 0 . 5 M EDTA (pH 8 . 0) を加えた後、試料を 65 ° の水浴中で 30 分間加熱し、フェノール、フェノール - クロロホルム (1 : 1 混合物) 及びクロロホルムで抽出した。DNA を 0 . 75 M NH₄Ac 及び 70 % エタノール中で 2 時間沈殿させ、実施例 1 と同様に回収し、20 μ l の蒸留水に再懸濁した。

【 0069 】

I V P S - lacZ 融合遺伝子の構築

脱リン酸化 pAHO5 DNA とリン酸化 I V P S フラグメントとの連結を、20 μ l 倍

50

容で、8.6 μ lの蒸留水と、2 μ lの10 \times T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)と、4 μ lの0.1 μ g/ μ l脱リン酸化pAHO5 DNAと、前述のように調製した5 μ lのIVPS DNA(0.25 μ gのVent IVPS 2、0.4 μ gのDeep Vent IVPS 1又は0.25 μ gのVent IVPS 2エンド)と、160単位のT4 DNAリガーゼ(NEB)とを加えて16 で15時間実施した。

【0070】

100 μ lのコンピテントRR1細胞と10 μ lの連結反応試料とを氷上で30分間混合し、42 で2分間加熱し、氷上で5分間冷却し、0.8 mlのLB培地(10 g/リットルトリプトン、5 g/リットル酵母抽出物、10 g/リットルNaCl、1 g/リットルデキストロース、1 g/リットルMgCl₂·6H₂O、pH 7.2、25)を加え、30 で45分間インキュベートして、大腸菌株RR1を形質転換した。100 μ g/mlのアmpiシリンを加えたLBプレートに試料をプレーティングした。30 で一晩のインキュベーション後に、プレート当たり約150~300のコロニーが観察された。

10

【0071】

コロニーのハイブリダイゼーションを使用して、組換えプラスミドを有するクローンをスクリーニングした。実施例1で説明したVent IVPS 2正方向プライマー及びDeep Vent IVPS 1正方向プライマーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて[Y-³²P]で放射性標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。コロニーを採取してニトロセルロース上に配置し、下記の各溶液中で5分間処理した：10% SDS、0.5 M NaOH/1.5 M NaCl、0.5 M トリス-HCl (pH 7.5)/0.5 M NaCl (2回)及び2 \times SSC (2回)。ニトロセルロースフィルターを室温で1時間乾燥し、真空下80 で2時間焼成し、6 \times SSCに5分間浸漬し、50 mM トリス-Cl (pH 8.0)、1 M NaCl、1 mM EDTA及び0.1% SDSからなる溶液中で42 で2時間洗浄した。6 \times NET、5 \times デンハート(Denhardt's)、0.5% SDS及び25 μ g/ml変性サケ精子DNA中で42 で4時間処理した後、フィルターを放射性標識オリゴマープローブと共に同一条件で16時間インキュベートし、次いで6 \times SSC中で、室温で15分間の洗浄3回と、42 で2分間の洗浄2回と、50 で2分間の洗浄2回とにかけ、その後オートラジオグラムを撮った。36個のクローンが、対応するオリゴマープローブにハイブリダイズしていた。

20

【0072】

実施例1で説明したVent IVPS 2正方向プライマー(又はDeep Vent IVPS 1正方向プライマー)と、挿入部位から392 nt下流のlacZコード配列(1417-1440、1437にG:T不適合を有する)に対して相補的なlacZ逆方向プライマー(5'-AGGGTCGACAGATTTGATCCAGCG-3'(配列番号:7))とを用いて、ポジティブクローンから抽出したプラスミドDNAのPCR増幅により挿入位置の決定を行うために、ポジティブクローンを更に分析した。14個のクローンからのPCR反応で、対応するDNAフラグメントが産生された。クローンpVT133、138、139、141、142及び144は1.4 KbのVent IVPS 2挿入物を含んでおり、pVTE 834、836、839及び841はVent IVPS 2(エンド)挿入物を含んでおり、いずれも約1.1 kbのDNAフラグメントを産生する。クローンpDVS712、742、745及び746は1.6 KbのDeep Vent IVPS 1挿入物を有し、約2.0 KbのDNAフラグメントを産生する。

30

40

【0073】

IVPS-lacZ融合遺伝子の発現

前記クローンを、誘導物質IPTGとの融合(修飾)タンパク質を発現する能力について更に調べた。

【0074】

クローンは、100 μ g/mlのアmpiシリンを加えたLB培地中でOD_{600nm}が0.5になるまで30 で培養した。非誘導細胞(uninduced cell)から溶解物を調製するために、1.5 mlの培養液をペレット化し、100 μ lの尿素溶解緩衝液(

50

urea lysis buffer) に再懸濁し、10 分間沸騰させた。IPTG を最終濃度 0.3 mM で加えた後、培養物を 30 で更に 4 時間増殖させた。1.5 ml の培養液の細胞をペレット化し、2 時間及び 4 時間の誘導後に 250 µl の尿素溶解緩衝液で溶解した。クーマシーブルー染色ゲルでタンパク質生成物を分析した。Vent IVP S2-lacZ 融合構築物のうちの 3 つ (pVT139、142 及び 144) 並びに 4 つの Vent IVP S2 (エンド⁻)-lacZ 融合構築物の全ては、Vent IVP S2 - -ガラクトシダーゼ融合タンパク質について予想された大きさである約 162 ~ 165 KDa の主産物を発現した。4 つの Deep Vent IVP S1-lacZ 融合クローンはいずれも、Deep Vent IVP S1 - -ガラクトシダーゼ融合タンパク質について予想された大きさである 173 ~ 178 KDa のより大きい産物を発現した。 10

【0075】

I-Tli-I (NEB) 又は -ガラクトシダーゼ (Promega) に対する抗体を用いるウェスタンブロットにより、pVT142 及び 144 並びに pVTE836 及び 839 に由来する Vent IVP S2 融合タンパク質のアイデンティティを更に分析した。試料を、予備染色したマーカー (BRL) を用いて 4 ~ 20 % SDS ゲル (ISS, Daichi, Tokyo, Japan) で電気泳動にかけ、ニトロセルロースに移し、抗血清 (マウス由来) でプローブし、アルカリホスフェート結合抗マウス第二抗体を製造業者 (Promega) の指示通りに使用して検出した。試験した 4 つのクローン全部から得られた約 160 KDa のバンドは両方の血清と反応し、クーマシーブルー染色バンドと同じ位置に移動する。Deep Vent IVP S1 融合も調べた。 -ガラクトシダーゼ及び I-PspI (Deep Vent IVP S1 のタンパク質生成物) に対する血清を用いて pDVS712 及び 742 のウェスタンブロット分析を行ったところ、クーマシーブルー染色バンドと同じ約 168 ~ 175 KDa に予想された主バンドが得られた。 20

【0076】

実施例 3

-ガラクトシダーゼ - IVP S 融合におけるタンパク質スプライシングの熱制御

前述の構築物 (lacZ EcoRV 部位に挿入した IVP S) は誘導後に融合 (改質) タンパク質を産生した。IVP S タンパク質は、高温でのインキュベーションによって、連結ターゲットタンパク質 (活性 -ガラクトシダーゼ) と遊離 IVP S エンドヌクレアーゼとを形成するために、融合タンパク質から切り出すことができる。 30

【0077】

スプライシングは温度誘導によって制御できる：粗抽出物中の -ガラクトシダーゼ活性は温度シフトに応答して増加する。

【0078】

RR1 (大腸菌宿主) 及び pAH05 含有 PR1 (実施例 2 で説明した非融合 -ガラクトシダーゼ親プラスミド) 又は融合構築物 pVT142 (Vent IVP S2 もしくは CIVPS2)、pVTE836 (Vent IVP S1 エンド⁻) もしくは pDVS712 (Deep Vent IVP S1 もしくは CIVPS3) の培養物から下記のステップに従って粗抽出物を調製した。単コロニー (single colony) を、100 µg/ml のアンピシリンを加えた 10 ml の LB 培地に接種し、30 で一晚インキュベートし、1 リットルの LB 培地 (100 µg/ml アンピシリン) 中 30 で OD_{600nm} が約 0.5 になるまで継代培養し、0.3 mM の IPTG で 30 で 2 時間誘導した。細胞を遠心分離し、100 ml の LB に再懸濁し、4 で 3 分間超音波処理し、7000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を回収し、-20 で貯蔵した。 40

【0079】

粗抽出物の 7.5 ml アリコート を 42 又は 50 の水浴中でインキュベートした。1 ml アリコートを、pVT142 及び pVTE836 抽出物の場合は 1 時間後、2 時間後及び 12 時間後に採取し、pDVS712、pAH05 又は RR1 抽出物の場合は 0.5 50

時間後、1時間後、2時間後、4時間後及び16時間後に採取した。

【0080】

Millerらの方法 [Experiments in Molecular Genetics (1972), Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory] で β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。アッセイ緩衝液は、Z緩衝液を $2.7 \mu\text{l}/\text{ml}$ の2-メルカプトエタノールと混合することによって調製した。基質 o -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を $4 \text{ mg}/\text{ml}$ でアッセイ緩衝液に溶解した。処理した抽出物又は非処理抽出物 0.1 ml を、 0.9 ml のアッセイ緩衝液と1滴の 0.1% SDS とが入っている試験管に移し、28°C で5分間インキュベートした。ブランクには 0.1 ml のLB培地を使用した。 $4 \text{ mg}/\text{ml}$ のONPGを 0.2 ml 加えてアッセイ反応を開始させた。適当な黄色が発色した時点で、 0.5 ml の $1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ を加えて反応を停止させた。インキュベーション時間を記録し、活性をスペクトロホトメーターで $\text{OD}_{420 \text{ nm}}$ 及び $\text{OD}_{550 \text{ nm}}$ で測定した。熱処理した抽出物からの酵素活性は次のように計算した。インキュベーション後の活性をゼロ時点の活性で除算し、比に100を掛けてパーセンテージを出した。酵素活性の比較の結果、熱処理は最初の2時間のインキュベーションではRR1又はRR1/pAH05抽出物からの活性に作用しないことが判明し、3つのIVPS-LacZ融合構築物pVT142、pVTE836及びpDVS712は全て42°Cへの温度シフトにตอบสนองして非処理試料の143%から221%への酵素活性の増加を示した(図3)。 β -ガラクトシダーゼ活性の増加は、IVPSの切り出しと2つの β -ガラクトシダーゼ半体の連結とに起因するものであり、活性な酵素をより多く形成した。スプライシングはウェスタンブロット分析によって確認した。RR1細胞における β -ガラクトシダーゼ活性は、染色体遺伝子の発現に由来する。一晚のインキュベーションは、すべての試料からの酵素活性を低下させた。これはおそらく、 β -ガラクトシダーゼの熱失活に起因する(図3)。

【0081】

スプライシングは温度誘導によって制御できる：クーマシーブルー染色及びウェスタンブロットによるタンパク質の分析

RR1細胞におけるIVPS-lacZ融合タンパク質合成の分析は、 β -ガラクトシダーゼの染色体発現によって複雑になる。そこで、分析を容易にするために、すべての構築物を、 β -ガラクトシダーゼを合成しない大腸菌宿主に移した。

【0082】

IVPS-lacZ融合クローンからの粗細胞抽出物の調製、及び熱処理した試料のウェスタンブロット分析は下記のように実施した。

【0083】

融合構築物とlacZ発現ベクターpAH05とを、既述の標準的形質転換手法によってlacZ欠失大腸菌株ER2267 (NEB) に導入した。

【0084】

プラスミド含有細胞の場合はアンピシリンを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えたLB培地中で30°Cで、ER2267 (50 ml)、ER2267/pAH05 (50 ml)、pVT142又はpDVS712プラスミドの培養物(各々1リットル中)を増殖させた。 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ が $0.48 \sim 0.55$ に到達した時点で、誘導物質IPTGを最終濃度 0.3 mM で培養物に加え、該培養物を23°Cで更に3時間インキュベートした。細胞を遠心分離し、LB培地 50 ml (ER2267又はpAH05担持ER2267の場合)又は 100 ml (pVT142又はpDVS712担持ER2267)に再懸濁し、4°Cで3分間超音波処理し、 7000 rpm で10分間遠心分離した。上清を -20°C で貯蔵した。各抽出物の 5 ml アリコート3つを23°C、42°C又は50°Cで16時間インキュベートしサンプリングした。 0.9 ml のアリコートを1、2、3、4、6時間インキュベートした後 1.5 ml ミクロ遠心管に移した。非処理抽出物又は処理した抽出物 $5 \mu\text{l}$ を $10 \mu\text{l}$ の水及び $5 \mu\text{l}$ の $5\times$ 試料緩衝液 (0.31 M トリス-Cl、 $\text{pH } 6.8$ / 10% SDS / 2

10

20

30

40

50

5% 2-メルカプトエタノール / 50% グリセロール / 0.005% プロモフェノールブルー) と混合し、10分間沸騰させた。

【0085】

各試料 5 μ l を 4 / 20% SDS ポリアクリルアミド上に配置し、100ボルトで3~4時間電気泳動させた。 - ガラクトシダーゼに対する抗体 (Promega) とエンドヌクレアーゼ I - Tli - I もしくは I - Psp I に対する抗体 (NEB) とを用いて、Promega の手順でウェスタンブロットを行った。その結果、構築物 pVT142 及び pDVS712 の両方から 23 で IPTG 誘導した後の細胞中には、辛うじて痕跡量のエンドヌクレアーゼしか存在しないことが判明した。これは、切り出し活性があったとしても不十分なものであることを意味する。しかしながら、ER2267 / pVT142 抽出物をより高い温度 42 又は 50 にシフトした後では、Vent DNA ポリメラーゼ前駆体からの切り出しエンドヌクレアーゼと同じ大量の IVP S 2 生成物 (I - Tli - I、約 42 KDa) が蓄積された (図4)。42 又は 50 で処理した pDVS712 / ER2267 抽出物についても類似のパターンが観察され (図4)、Deep Vent IVP S 1 生成物 I - Psp I について予想された約 60 KDa の生成物が蓄積された。

10

【0086】

- ガラクトシダーゼに対する抗体を用いるウェスタンブロット分析では、IVP S ドメインの切り出しが、中断された - ガラクトシダーゼの Nドメインと Cドメインとの連結又は再結合に結びついていることが判明した。どちらの融合構築物の熱処理試料も、完全長の - ガラクトシダーゼと同じ大きさの 114 KDa の生成物を含んでいた (図4)。しかしながら、この生成物は pVT142 試料中には少量しか蓄積されなかった。これは、該融合タンパク質からのスプライシングが前述の条件下では効果がないことを意味する。

20

【0087】

融合タンパク質を、80 までの高温でスプライスする能力についてさらに調べた。種々の温度での初期反応速度を比較した。抽出物を 1.5 ml ミクロ遠心管内の 300 μ l アリコート中で 42、50、65 又は 80 でインキュベートした。15分、30分、1時間、2時間及び4時間後に各加熱抽出物試料から 20 μ l を採取し、40 μ l の水及び 20 μ l の 5x 試料緩衝液と混合し、10分間沸騰させた。ウェスタンブロット分析の結果、Deep Vent IVP S - - ガラクトシダーゼ融合タンパク質は 65 及び 80 でスプライスできることが判明したが、114 KDa 生成物の蓄積によって測定したところではスプライシング効率は 65 の方が大きかった。Vent IVP S 2 の切り出しは 65 では有効であったが、80 では抑止されると思われる。蓄積が見られなかった理由は、80 では経時的に - ガラクトシダーゼが熱変性し沈殿することにある。

30

【0088】

実施例 4

- アガラーゼ I をコードするプラスミドのような PCR 産生線状プラスミドへの IVP S のフレーム内挿入

40

実施例 2 では、実施例 1 で形成した IVP S カセットを制限酵素直線化プラスミドに挿入する方法を説明した。この方法は、ターゲット遺伝子内の適当な制限酵素部位の使用可能性 (availability) によって制限される。環状プラスミド上の互いに反対向きのプライマーを使用する PCR 増幅は、任意の位置で任意のプラスミドを直線化させ、PCR 反応の能力によってのみ制限される。ターゲットプラスミドが直線状になれば、該プロセスは本質的に、制限酵素によって形成された線状プラスミドについて実施例 2 で述べたものと同じである。

【0089】

実施例 2 で述べたように、ターゲット遺伝子への IVP S カセットの挿入は、IVP S フラグメントと線状プラスミドとの連結によって達成できる。この実施例では、PCR プラ

50

マーを用いて、セリン又はトレオニンコドンの直前で直線化したプラスミドを形成する。このようにすると、IVPSを切り出し2つのターゲットタンパク質半体を連結した時に、ターゲットタンパク質中に余計なアミノ酸が残らない。挿入部位のセリン又はトレオニンは、IVPSフラグメント上又はターゲット遺伝子上に配置し得る。セリン又はトレオニンがIVPSカセット上に存在する場合は、下流EPSの第1残基をコードする3つのヌクレオチドを欠失させて、ターゲット遺伝子PCRプライマーを構築し得る。IVPSカセットがセリン又はトレオニンコドンを欠く場合は、互いに反対向きの接し合うPCRプライマーを用いるPCRを用いて、セリン又はトレオニンコドンの部位で直線化されたターゲットプラスミドを合成する。

【0090】

この実施例では、実施例2に記載の手順で、2つのIVPSエレメント、即ちVent IVPS2及びDeep Vent IVPS1を - アガラーゼIコード遺伝子内にクローニングする方法を説明する[Yaphe, W., Can. J. Microbiol. 3: 987-993 (1957)]。Deep Vent IVPS1は290アミノ酸 - アガラーゼI遺伝子の108番目のコドンであるセリンの前に挿入し、Vent IVPS2は - アガラーゼI遺伝子の133番目のコドンであるトレオニンの前に挿入する。

【0091】

3'末端にセリンコドン(Deep Vent IVPS1の場合)又はトレオニンコドン(Vent IVPS2の場合)を含むIVPS DNAフラグメントを実施例1と同様に調製した。lacプロモーターの配向でベクターpUC18内の - アガラーゼI遺伝子配列を含む3.8Kbの組換えプラスミドであるpAG6a1(NEB)をPCR鋳型として用いて、線状プラスミドDNAフラグメントを合成した。プライマーagaS108.rv(5'-GAGAACTTTGTTCTCGTACCTG-3'(配列番号:8))及びagaS108.fw(5'-GGTATTATTTCTTCTAAAGCA-3'(配列番号:9))はそれぞれ108番目のコドンのDNA配列5'及び3'に対して相補的である。プライマーagaT133.rv(5'-GTTGTTTGTGGTTTACCA-3'(配列番号:10))及びagaT133.fw(5'-ATGGCAAATGCTGTATGGAT-3'(配列番号:11))はそれぞれ133番目のコドンの配列5'及び3'に対して相補的である。各プライマー対を用いて、セリン又はトレオニンコドンを欠失した線状プラスミドDNAフラグメントを合成した。PCR混合物は、Vent DNAポリメラーゼ緩衝液(NEB)に、2mM硫酸マグネシウムと、400µMの各dNTPと、0.5µMの各プライマーと、20ngのプラスミドDNAと、100µl中2単位のVent DNAポリメラーゼとを加えたもので構成した。増幅は、Perkin-Elmer/Cetusサーマルサイクラーを用いて、94で30秒、45で30秒及び72で5分のサイクルに30回かけて実施した。PCR試料はフェノール及びクロロホルムで抽出し、0.3M酢酸Na及び50%イソプロパノール中で沈殿させ、ミクロ遠心機で10分間10Krpmで遠心分離して回収し、乾燥し、100µlの蒸留水に再懸濁した。次いでDNA試料を1%低融点アガロースゲル上で電気泳動にかけ、PCR合成フラグメントを実施例1と同様に回収した。

【0092】

PCR合成フラグメントとリン酸化IVPSフラグメント(実施例1)との連結を、20µl倍容中で、9.5µlの蒸留水と、2µlの10xT4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)と、4µlの0.01µg/µl PCR合成プラスミドDNAと、4µlのIVPS DNA(0.20µgのVent IVPS2もしくは0.32µgのDeep Vent IVPS1)と、0.5µlの400,000M/mlのT4 DNAリガーゼ(NEB)とを加えて、16で12時間実施した。連結試料での大腸菌株RR1の形質転換を実施例2と同様に実施した。アルカリ溶解法(alkaline lysis method)(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1989), Cold Spring Harbor

10

20

30

40

50

Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York) を用いてプラスミドDNAを抽出するために、100 µg/mlのアンピシリンを加えたLB培地で形質転換体を培養した。0.8%アガロースゲル上での電気泳動と、その後の臭化エチジウムでの染色とによって、プラスミドDNAをpAG6a1と比較した。組換えプラスミドpAG108S18はDeep Vent IVP S1挿入物を含み、pAG133T22、26、31及び35はいずれもVent IVP S2挿入物を含んでいる。

【0093】

IVP S - アガラーゼI融合遺伝子の発現

クローンを、融合タンパク質を発現する能力について更に調べた。pAG108S18又はpAG133t35を有するRR1細胞を、デキストロースを含まず100 µg/mlのアンピシリンを加えた1リットルの改良LB培地で、OD_{600nm}が約0.5になるまで30で培養した。誘導物質IPTGを最終濃度0.3 mMで加えた後、培養物を冷却し、25で更に4時間増殖させた。細胞を遠心分離し、50 mlのLB培地に再懸濁した。粗抽出物を実施例3と同様に調製した。これらのクローンから発現された融合(改質)タンパク質を検出するために、I-Tli-I(NEB)、I-PspI(NEB)及び -アガラーゼI(NEB)に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。試料を、4~20% SDSゲル(ISS, Daichi, Tokyo, Japan)上で、予備染色したマーカー(BRL)を用いて電気泳動にかけ、ニトロセルロースに移し、抗血清(マウス由来)でプローブし、アルカリホスファターゼ結合抗マウス第二抗体を製造業者(Promega)の指示通りに使用して検出した。抗PspI血清及び抗 -アガラーゼI血清はどちらも、Deep Vent IVP S1(約60 KDa) - -アガラーゼI(約30 KDa)融合タンパク質(図5)について予想された大きさの、pAG108S18/RR1から発現された90~95 KDa産物と反応した。抗I-Tli-I血清及び抗 -アガラーゼI血清はどちらも、Vent IVP S2(42 KDa) - -アガラーゼI融合タンパク質(図5)について予想された大きさにほぼ等しい、pAG108S18/RR1からの70~75 KDa産物と反応した(図5)。

【0094】

実施例5

サイレント置換を介する新しい制限酵素部位の形成によるターゲット遺伝子内へのIVP Sの挿入 30

以上の実施例では、第1の下流EPSコドンを有する又は有していない、完全なIVP S配列を含むIVP Sカセットを、平滑な直線化プラスミドに挿入した。IVP S又はターゲット遺伝子の末端の近傍でサイレント突然変異(silent mutation)(アミノ酸残基を保持する)によって制限部位を形成することもできる。

【0095】

IVP Sの末端の近傍での制限部位の形成

ターゲット遺伝子内の任意の位置へのIVP Sの挿入を容易にするために、サイレント突然変異(アミノ酸残基を保持する)によってIVP Sの両端に制限部位を形成することができる。新しい制限部位の形成後に、これらの酵素でIVP Sを切断する。ターゲット遺伝子プラスミドはPCRで形成する。制限部位はIVP S内にあるため、IVP Sを完全にし且つターゲット遺伝子内に適合性クローニング部位を形成するためには、欠失しているIVP S配列をそれぞれのターゲット遺伝子PCRプライマーの5'末端に含ませなければならない(図6)。

【0096】

例えば、Vent IVP S2におけるサイレント突然変異は、プライマーVent IVP S2正方向BspEI(5'-AGTGTCTCCGGAGAAAGTGAGAT-3'(配列番号:12))を用いて5'末端にBspEI部位を形成することができ、プライマーVent IVP S2逆方向SpeI(5'-ATTGTGTACTAGTATGTTGTTTGCAA-3'(配列番号:13))を用いて3'末端にSpeIを形成する 50

ことができる。次に、これは例えば、lacZコード領域内のアスパラギン酸コドン（残基594）とトレオニンコドン（残基595）との間に挿入し得る。線状ターゲット遺伝子プラスミドは、実施例4で説明したように、BspEI及びSpeI部位、IVPSの残部、並びにlacZと一致する領域を含むプライマーで、プライマーlacZ1/BspEI逆方向（5' - GCCTCCGGAGACACTATCGCCAAATCACCCGCCGTA A - 3'（配列番号：14））及びプライマーlacZ2/SpeI正方向（5' - GCCACTAGTACACAATAACGCCGAACGATCGCCAGTTCT - 3'（配列番号：15））を用いて、PCRにより形成できる。DNAフラグメントはIVPS及びターゲット遺伝子の両方からPCRによって合成する。IVPS及びターゲット遺伝子プライマーは両方とも新しい制限部位を含んでいる。適切な制限エンドヌクレアーゼで切断した後で、融合遺伝子を形成すべく、適合性末端を有するDNAフラグメントを連結することができる。IVPSの切り出し後に余分の残基が残ることはないため、スプライシングが起これば生来の - ガラクトシダーゼポリペプチドが形成されると予想される。

10

【0097】

挿入部位の近傍の制限部位でのIVPSの挿入

別の一般的な方法では（図7）、ターゲット遺伝子（例えばトレオニン又はセリンコドン）内の挿入部位の近傍の制限部位を使用して、ターゲット遺伝子に適合した末端を有するIVPSを挿入することができる。挿入部位又はその近傍のサイレントヌクレオチド置換によって制限部位を形成するか、又は生来の制限部位を使用し得る。線状ターゲット遺伝子プラスミドは、挿入部位の近傍の制限部位で開始しながら実施例4と同様にPCRで形成する。IVPSは、適合性制限部位とターゲット遺伝子配列の残り（制限部位と挿入部位との間の配列）を含むプライマーを用いて合成する。両端が挿入部位で該配列と重なり合うIVPS DNAフラグメントを合成し、適当な酵素で切断し、次いで同じ酵素で切断したベクターに連結し得る。

20

【0098】

例えば、サイレント突然変異によりSalI部位（残基478～479）及びXbaI部位（残基481～482 セリン - アルギニン）を形成することによって、lacZ遺伝子内の残基479（アスパラギン酸）と481（セリン）との間にIVPSエレメントを挿入することができる。これは、プライマーlacZ3 SalI逆方向（5' - AGGGTCGACAGATTTGATCCAGCG - 3'（配列番号：7））及びlacZ4 XbaI正方向（5' - CCTTCTAGACCCGGTGCAGTATGAAGG - 3'（配列番号：16））を用いて、実施例2に記載のターゲットプラスミドpAHO5のPCRにより達成し得る。次に、プライマーVent IVS2正方向SalI（5' - GCCGTCGACCCCTAGTGTCTCAGGAGAAAGTGAGATC - 3'（配列番号：17））及びVent IVS2逆方向XbaI（5' - GCCTCTAGAAATGTGTACCCAGGATGTTGTTTGC - 3'（配列番号：18））を用いて、PCRによりIVPS2フラグメントを形成する。DNAフラグメントはIVPS及びターゲット遺伝子の両方からPCRによって合成する。IVPS及びターゲット遺伝子プライマーは両方とも新しい制限部位を含む。都合の悪いことに、このベクターは単一XbaI及びSalI部位を含む（図7）。従って、ターゲット遺伝子ベクターPCR生成物は、部分的消化を生起する条件下で切断しなければならない。次いで、必要な線状プラスミドをアガロースゲルから単離する。適当な制限エンドヌクレアーゼで切断した後、融合遺伝子を形成するために、適合性末端を有するDNAフラグメントを連結することができる。IVPSの切り出し後に余分な残基が残ることはないため、スプライシングが起これば、生来の - ガラクトシダーゼポリペプチドが形成されると予想される。通常は、前述のようなクローニングプロセスを容易にするために、ターゲット遺伝子及びベクター内で非反復部位を選択又は形成することが重要である。

30

40

【0099】

実施例6

50

A. Vent DNAポリメラーゼでのIVPS2のサプライシングに関する実験を容易にするために、T7プロモーター構築物pV174-1B1を改質したものを形成した。この改質構築物pANG5(図8)は、pV174-1B1と同じVent DNAポリメラーゼ前駆体をコードする。本明細書で検討しているような突然変異体の形成を簡単にするために、多数のサイレント突然変異を、特に上流及び下流プライス部位に導入した。変化は下記の通りである：

1. ベクタ - 主鎖内のXmaI及びPpuMI部位の破壊。XmaI部位はまずT7発現ベクタ-pAII17をXmaIで切断し、付着末端をDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントで修復し、次いで平滑末端を再連結することによって除去した。プラスミドをXmaIによる開裂に対する耐性についてスクリーニングした。得られたベクタ-からPpuMI部位を同様に除去し、今度はPpuMI開裂に対する耐性についてスクリーニングした。最終ベクタ-をpAML1と命名した。このベクタ-は、ポリメラーゼ遺伝子内の単一のXmaI及びPpuMI部位の使用を可能にした。

【0100】

2. 制限部位を形成するためのサイレント塩基変化(silent base change)の導入。この変化は、Kunkelの方法に従い[T. A. Kunkel, J. D. Roberts及びR. A. Zakour, Methods in Enzymology 154: 367-382 (1987)]、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発を用いて導入した。f1ヘルパーファージIR1での重感染により2つのBluescript SK-ファージミド(phagemid)誘導体内に一本鎖鋳型を形成した[Enear, Virology 122: 22-226 (1982)]。第1のフラグメントは、BamHI/EcoRV切断Bluescriptに連結したpV174-1B1からのBsaAI~BamHIフラグメント(Vent DNAポリメラーゼ配列のヌクレオチド3714~5837を表す)を含んでいた。第2のフラグメントは、ClaI/EcoRV切断Bluescriptに連結したClaI~SspIフラグメント(ヌクレオチド816~4408)を含んでいた。

【0101】

BsaAI/BamHI構築物に、下記の3つのオリゴヌクレオチドで同時に突然変異を与えた：

5' - GCAAAGAACCGGTGCGTCTCTTC - 3' (配列番号：19) (AgeI nt 4669~4674)、

5' - AGCAACAGAGTTACCTCTTG - 3' (配列番号：20) (アンバー1703オーカー)、

5' - CAGTTTCCAGCTCCTACAATGAGACCTACGAGC - 3' (配列番号：21) (D1236A)。

【0102】

改質塩基には下線を引き、変化は括弧内に示した。D1236Aを形成するためのオリゴヌクレオチドは、スクリーニングに使用するためのBsaI部位を形成するためのサイレント塩基変化も含んでいた。得られた単離体をpAMN2と命名した。

【0103】

ClaI/SspI構築物に、下記の4つのオリゴヌクレオチドで同時に突然変異を与えた：

5' - GTAGTGTCGACCCCATGCGG - 3' (配列番号：22) (SalI nt 3863~3468)、

5' - CGTTTTGCCTGATTATTATCTCACTTTC - 3' (配列番号：23) (BsaBI nt 3554~3563)、

5' - GTCACCTTCGAAAAAAGATCC - 3' (配列番号：24) (BstBI nt 3608~3613)、

5' - CCGCATAAAGGACCTTAAGC - 3' (配列番号：25) (PpuMI nt 3517~3523)。

10

20

30

40

50

【0104】

マークは前述の通りである。スクリーニングも前述のように行い、得られた構築物を p A M O 2 2 と命名した。

【0105】

B s a A I / B a m H I 構築物にも下記のオリゴヌクレオチド：

5' - G A G G A A G A G A T C A T C A T C A T A G C - 3' (配列番号：26) (B s a B I ブロッキング n t 5 6 4 1)

で突然変異を与え、d a mメチル化部位の付加に起因する B s a B I 開裂に対する耐性についてスクリーニングした。得られた構築物を p A M W 3 と命名した。

【0106】

最後に、p V 1 7 4 - 1 B 1 の開始コドンにおける N d e I 部位を、部分的 N d e I 開裂と、クレノウでの末端修復と、T 4 DNAリガーゼを用いる再環化とによって失活させた。プラスミドを適当な N d e I 部位の消失についてスクリーニングした。この種の構築物の1つを p A K C 4 と命名した。

【0107】

p A N G 5 構築物は前記部分から組み立てた：

1. p A K C 4 からの X b a I / C l a I (V e n t DNAポリメラーゼの翻訳開始及びアミノ末端)、
2. p A M O 2 2 からの C l a I / N d e I (よりアミノ末端ポリメラーゼ + I V P S 2 のアミノ末端領域)、
3. p A M N 2 からの N d e I / N s i I (I V P S 2 のカルボキシル末端領域、 V e n t DNAポリメラーゼのカルボキシル末端領域)、
4. p A M W 3 からの N s i I / B a m H I (ポリメラーゼの最後の5つのアミノ酸 + 下流領域)、
5. p A M L 1 からの B a m H I / X b a I (T 7 プロモーター、複製起点、アンピシリン耐性)。

【0108】

p A N G 5 と親 p V 1 7 4 - 1 B 1 とを比較すると、後述のように p A N G 5 含有株の生存率の方が高いという点を除いて、V e n t DNAポリメラーゼ及び I - T l i I 産生のパターンは同じである。これは、RNA又はDNAレベルでのスプライシングと対照的に、タンパク質レベルでスプライシングが生じた場合に予想されることである。

【0109】

B. 大腸菌における V e n t DNAポリメラーゼ遺伝子の発現の研究過程で、I V P S 1 及び I V P S 2 の欠失後に発現及び細胞生存率が大幅に増加することが判明した。この増加は、それぞれ I V P S 1 及び I V P S 2 の遺伝子産物である I - T l i I I 及び I - T l i I の毒性作用を表すか、又はスプライシング反応自体の毒性作用を表す。エンドヌクレアーゼ及びスプライシング活性は非依存的であり得、スプライシングに影響を与えずにエンドヌクレアーゼを失活させると推論された。p A N G 5 の構築で述べた A への単一アミノ酸置換を、I - T l i I のアミノ近位ドデカペプチドモチーフ内の保存残基内で行った(変更残基 D 1 2 3 6)。これらの構築物は V e n t DNAポリメラーゼを発現したが、I - T l i I 活性は検出されなかった。p V 1 7 4 - 1 B 1 と異なり、B L 2 1 (D E 3) のような T 7 発現株は 3 7 でも p A N G 5 に良く耐えた。ウェスタンブロットによるタンパク質スプライシングの分析及びパルス-チェイス分析では、p A N G 5 と p V 1 7 4 - 1 B 1 との間にタンパク質スプライシングの差は認められなかった。即ち、完全長の前駆体の産生、並びにその後の成熟ポリメラーゼと大きさが I - T l i I に対応するタンパク質の形成に差は見られなかった。

【0110】

C. カセット置換突然変異誘発を用いてチロシン 1 0 7 9 をアルギニンで置換することにより、共通のカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ I I 部位 (X R X X S * ; P e r s o n ら、前出の文献) を構築した。要約すれば、p A N G 5 を非反復部位 B s a B I

10

20

30

40

50

及び P p u M I で切断し、下記の二本鎖 (d u p l e x) (配列番号 : 27) を挿入して、所望の変化を導入した。

【 0 1 1 1 】

5' - G T C C T T T C G T G C G G A C A G T G T C T C A G G A G A A A G T G A G A T A A - 3'

3' - G A A G C A C G C C T G T C A C A G A G T C C T C T T T C A C T C T A T T - 5'。

【 0 1 1 2 】

正しい構築物を DNA 配列決定によって確認した。

【 0 1 1 3 】

D . ブロックされたアミノ酸を付加するためのアンバー終止コドンの導入を、

5' - G T C C T T T A T G C G G A C T A G G T C T C A G G A G A A A G T G A G A T A A - 3'

3' - G A A A T A C G C C T G A T C C A G A G T C C T C T T T C A C T C T A T T - 5'

内でのカセット置換突然変異誘発によって実施した。

【 0 1 1 4 】

同様に、A g e I 及び S m a I で切断した p A N G 5 中に下記の二本鎖 (配列番号 : 29) を配置することにより、チロシン 1472 をアンバー終止コドンで置換した :

5' - C C G G T T C T T T G C A A A C A A C A T C C T G G T A C A C A A T T A A A A G A C G G C T T T T A T G C C A C A A T A C C C - 3'

3' - A A G A A A C G T T T G T T G T A G G A C C A T G T G T T A A A T T C T G C C G A A A A T A C G G T G T T A T G G G - 5'

最後に、V e n t DNA ポリメラーゼ遺伝子がアンバーコドン (T A G) 内で終わるため、p A M N 2 (既述) からの適当な制限フラグメントを p A N G 5 内の対応する部位に挿入して、前記終結コドンをオーカーコドン (T A A) に変える。

【 0 1 1 5 】

実施例 7

C I V P S 2 のスプライス部位への O - (o - ニトロベンジル) セリンの導入によるタンパク質スプライシングの制御

光活性化可能な (p h o t o a c t i v a t a b l e) タンパク質スプライシングを明らかにするために、p V 174 . 1 B 1 を用いて 2 つのベクターを構築した。第 1 の構築物 p A N Y 5 (「野生型」とも称する) は下記のようにアミノ酸レベルで記述できる : p V 174 . 1 B 1 1 - 1063、1544 - 1702、V 1542 M、V 1541 M、1543 オパール (T G A) 。この構築物は、i n v i t r o 転写 / 翻訳系で翻訳された時に、45 . 3 k D a のエンドヌクレアーゼ (I - T l i I) をスプライスして 10 . 5 k D a の連結反応生成物を形成する 55 . 8 k D a の前駆体タンパク質を産生するように設計されている。第 2 の構築物 p A O D 1 (「アンバー変異体」とも称する) は、下記のようにアミノ酸レベルで記述できる : p V 174 . 1 B 1 - 1063、1544 - 1702、V 1542 M、V 1541 M、1543 オパール (T G A) 、S 1082 アンバー (T A G) 。この構築物は、標準的 i n v i t r o 転写 / 翻訳条件で 2 . 2 k D a のアンバーフラグメントを生成するように設計されているが、o - ニトロベンジルセリンで化学的にアミノシル化したアンバーサブレッサー t R N A で i n v i t r o 反応を補充すると、光活性化可能セリンを取り込むだろう。位置 1082 のセリンが「ブロック」されていると、前駆体はスプライスすることができない。強い 350 m 光で照射すると、o - ニトロベンジル基が放出され [P i l l a i 、前出の文献] 、セリンの求核性ヒドロキシル側鎖が遊離し、タンパク質がスプライスできるようになる。

【 0 1 1 6 】

アンバーサブレッサー t R N A (3' 末端 C A 残基を欠く) は、文献 [E l l m a n ら、前出の文献、N o r e n ら、N u c l e i c A c i d s R e s . 18 : 83 (199

10

20

30

40

50

0)]に記載のように、T7 RNAポリメラーゼでFokI直線化pYPhe2プラスミド鑄型の*in vitro*ランオフ(runoff)転写を行うことによりミリグラムスケールで合成した。アミンをBPOC、CBZ又はBOCのような官能基で保護したセリン誘導体は市販されている(Bachem、Sigma、Aldrich)。N-ブロックされたセリンは、o-ニトロベンジルプロミドのような試薬を用いて標準的アルキルハロゲン化物置換反応を行うことにより、N-ブロックされたO-(o-ニトロベンジル)セリンに変換できる。次いで、完全にブロックされたセリンを、文献[Ellemanら、前出の文献]に記載のように5'-ホスホデオキシリボシチジルル-(3'-5')-リボアデノシン(pdCpA)に結合した。次いで、T4 RNAリガーゼ(New England Biolabs, Inc.)を用いてアミノアシル化ダイマーを切頭(truncated)サブレッサー-tRNAに連結して、完全長のアミノアシル化サブレッサー-tRNAを得た。

10

【0117】

3 µgの塩化セシウム精製プラスミドDNAと、3 µlの100 mM酢酸マグネシウムと、1 µlの100 mM酢酸カルシウムと、7.5 µlの低分子量混合物[Ellemanら、前出の文献](カルシウム又はメチオニン無含有)と、1 µlの³⁵S-メチオニン(10 µCi/µl、1000 Ci/mmol)と、1 µlの3 mg/mlリファムピシンと、総量を30 µlにするのに必要な量の水とを氷上で混合することにより、「野生型」構築物の*in vitro*転写/翻訳を実施した。前記反応物質を37 °Cで3分間インキュベートし、その間に、大腸菌D10から調製したS-30抽出物[Ellemanら、前出の文]のアリコート解冻した。8.5 µlのS-30抽出物を加えた後、1.5 µlのT7 RNAポリメラーゼ(300 U/µl、New England Biolabs, Inc.)を加え、これらの反応物質を37 °Cで60分間インキュベートした。試料を10~20%トリシンSDS-PAGEゲル(NOVEX)上で電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーによってタンパク質を可視化した(図9)。

20

【0118】

「アンバー変異体」の*in vitro*転写/翻訳を、「野生型」で説明したように、但し反応物質に3.5 µlの化学的にアミノアシル化したo-ニトロベンジルセリン-tRNA_{amber}を約3 µg/µlの濃度で補充して実施した。サブレッサー-tRNAをS-30抽出物の添加の直前に反応に加えた。

30

【0119】

図9は、「野生型」(pANY5)又は「アンバー変異体」(pAOD1)構築体でプライムした*in vitro*転写/翻訳反応の10~20%トリシンSDS-PAGEゲルを示している。レーン1は、55.8 kDa前駆体と、「野生型」構築体から*in vitro*で発現された、切り出された45.3 kDaのI-TliIエンドヌクレアーゼとを示している。レーン2は、添加tRNAに起因する翻訳の阻害が存在しないことを示すために、13.5 µgの完全長の無変化アンバーサブレッサー-tRNAを加えた「野生型」反応を示している。レーン3及び4は、完全長の非アシル化サブレッサー-tRNA(10.5 µg)を加えた又は加えていない「アンバー変異体」の*in vitro*発現の結果を示している。これらの反応はいずれも、予想通りに、完全長の前駆体分子又はスプライス生成物を産生しない。これは、サブレッサー-tRNAが細胞抽出物中でいずれの内因性アミノアシル-tRNAシンターゼによってもアミノアシル化されないことを意味する。分子量約52 kDaのバンドは明らかに、アンバー変異体のすぐ下流の二次的翻訳開始部位によるものである。レーン5は、「アンバー変異体」に化学的にアミノアシル化したo-ニトロベンジルセリン-tRNA_{amber}を加えた場合の結果を示している。前駆体タンパク質は*in vitro*で産生されるが、スプライス生成物(即ちI-TliI)は見えない。

40

【0120】

前駆体タンパク質の位置1082に部位特異的に挿入したセリンからo-ニトロベンジル基を光化学的に除去して、調節スプライシングを行った。*in vitro*反応の6 µl

50

アリコート[®]を0.5 μlのRNase A (10 μg/μl)で処理して翻訳を停止させ、GEモデル#RSK6Bタニングランプ(tanning lamp)からの強力(275W)可視光により10cmの距離で10分間照射し、4 μlの水で希釈し、その後37で60分間インキュベートしてスプライシングを生起させた。得られたスプライス生成物を10~20%トリシンSDS-PAGEゲルでの電気泳動によって可視化し、次いでオートラジオグラフィーを行った(図10)。

【0121】

図10は、化学的にブロックした前駆体(レーン5、図9)を350nmの光に露光した結果を示している。レーン1~4は、「野生型」反応(レーン1、図9)を下記のように処理した対照である。レーン1は37で60分インキュベートしたもの、レーン2は0.5 μlのRNase (10 μg/μl)を加えて37で60分間インキュベートしたもの、レーン3は350nmの光で10分間照射し37で60分間インキュベートしたもの、レーン4はRNaseで前述のように処理し、350nmの光で10分間処理し、37で60分間インキュベートしたものである。レーン5~8は、「ブロックした」前駆体をそれぞれレーン1~4と同様に処理した結果を示している。「ブロックした」前駆体を照射すると、I-IVPS2でコードされるI-TliI(45.3kDa)エンドヌクレアーゼが切り出される(レーン7~8及びレーン5~6参照)。

【0122】

実施例8

ターゲット遺伝子への改質IVPSのフレーム内挿入及びペプチド結合開裂の熱制御

この実施例では、IVPS(CIVPS)カセットの改質方法及びターゲット遺伝子への挿入方法を説明する。具体例として、第1の天然下流残基(セリン)の置換又は欠失によるPyrococcus sp. (又はDeep Vent) IVPS1(CIVPS3)の改質と、大腸菌lacZ遺伝子のEcoRV部位への改質カセットのフレーム内挿入とを取り上げる。

【0123】

IVPSカセットの改質

一般的に、IVPSカセットは残基の置換及び欠失、又はIVPSの一端もしくは両端への残基の付加によって改質できる。このような改質IVPSカセットを用いた改質又は融合タンパク質は、特定のペプチド結合部位におけるスプライシング(ペプチド連結)又は開裂といった種々の触媒活性を示し得る。

【0124】

既述のように、カルボキシルスプライス部位の第1の下流残基は、Deep Vent IVPS1(CIVPS3)及びVent IVPS1の場合のセリン、又はVent IVPS2の場合のトレオニンである。CIVPS1、CIVPS2及びCIVPS3のアミノスプライス部位における第1のIVPS残基はセリンである。システイン残基は、酵母TFP1及びM.tuberculosis RecAのスプライス部位に発見された(Hirataら、前出の文献; Kaneら、前出の文献; Davisら、前出の文献)。スプライス部位のセリン、トレオニン又はシステイン残基は、タンパク質のスプライシング及び開裂に不可欠と考えられている。既述の実施例は、第1の下流残基を有するIVPSがタンパク質のスプライシングに関する情報を含むのに十分であることを明らかにした。しかしながら、これらの残基は種々のIVPSコンテキストで異なる機能を果たし得る。Vent IVPS2(CIVPS2)内で、天然残基、例えばセリンをトレオニン又はシステインで置換すると、スプライシングが低下し、開裂活性が変化した(Hodgesら、前出の文献参照)。

【0125】

ターゲット遺伝子コドンの間の平滑部位にフレーム内挿入するための改質IVPSカセットの合成

lacZコード領域又は他の任意のターゲット遺伝子にフレーム内挿入するためのIVPSカセットは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって調製できる。下記のプロトコル

は、それぞれC I V P S 3、C I V P S 3 / S e r、C I V P S 3 / T h r及びC I V P S 3 / C y sと称する、カルボキシル末端コドン、セリン、トレオニン又はシステインを有する又は有していない4つのD e e p V e n t I V P S 1カセットの製造を説明するものである。

【0126】

プライマー5' - A G C A T T T T A C C G G A A G A A T G G G T T - 3' (配列番号: 5) (D V I V P S 正、1839~1862)と、下記の4つの逆プライマーのうちの1つとを用いて、p N E B # 7 2 0 (A T C C N o . 6 8 7 2 3) からカセットを合成した。鑄型として使用したp N E B # 7 2 0は、p U C 1 9のB a m H I部位に挿入したD e e p V e n t D N Aポリメラーゼ遺伝子を含む4.8 K bのB a m H Iフラグメントを有する。逆プライマー5' - G C A A T T A T G T G C A T A G A G G A A T C C A - 3' (配列番号: 40)及び5' - G G T A T T A T G T G C A T A G A G G A A T C C A - 3' (配列番号: 41) (3428~3452)を用いて、それぞれC I V P S 3 / T h r及びC I V P S 3 / C y sフラグメント(1641bp)を形成した。P C R混合物は、V e n t D N Aポリメラーゼ緩衝液(N E B)に、2mMの硫酸マグネシウムと、400µMの各d N T Pと、100µg/mlのB S Aと、0.9µMの各プライマーと、40ngのプラスミドDNAと、100µl中2単位のV e n t D N Aポリメラーゼを加えたものを含む。増幅は、P e r k i n - E l m e r / C e t u sサーマルサイクラーを用いて94で30秒、48で30秒及び72で2分のサイクルに20回かけて実施した。プライマー5' - A T T A T G T G C A T A G A G G A A T C C A A A G - 3' (配列番号: 42) (3425~3449)を使用して、前述のP C Rで、但し増幅を30サイクル実施して、C I V P S 3フラグメント(1611bp)を合成した。プライマー5' - G C T A T T A T G T G C A T A G A G G A A T C C A - 3' (配列番号: 6) (3428~3452)を用いて実施例1と同様にI V P S 1 / S e rフラグメント(1614bp)を合成した。

【0127】

P C R試料をフェノール及びクロロホルムで抽出し、0.3µM N a A c及び50%イソプロパノール中-20で6時間沈殿させ、ミクロ遠心機で10分間10Krpmで遠心分離し、乾燥し、各々を20µlの蒸留水に再懸濁し、1%低融点アガロースゲル上に配置して80ボルトで6時間電気泳動にかけた。0.4mlのT E緩衝液(10mMトリス-H C l / 0.1mM E D T A、p H 8.0)中、65で30分間インキュベートし、フェノール及びクロロホルムで抽出し、0.3µM N a A c (p H 5.2)及び50%イソプロパノール中-20で一晩沈殿させることにより、低融点アガロースゲルからDNAフラグメントを回収した。DNAを遠心分離し、70%エタノールで洗浄し、乾燥し、10µlの蒸留水に再懸濁した。

【0128】

I V P S 1 D N Aフラグメントのリン酸化を、4µlの10xポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液(N E B)と、3µlの精製DNAと、4µlの10mM A T Pと、10単位のT 4ポリヌクレオチドキナーゼ(N E B)とを用いて40µl中37で60分間実施した。試料を65の水浴中で10分間加熱した。80µlのT E緩衝液(10mMトリス-H C l / 0.1mM E D T A、p H 8.0)を加えた後、試料をフェノール及びクロロホルムで逐次抽出した。DNAを2.4µM N H₄A c及び70%エタノール中で-70で一晩沈殿させ、ミクロ遠心機で10分間10Krpmで遠心分離してペレット化し、冷70%エタノールで洗浄し、乾燥し、20µlの蒸留水に再懸濁した。C I V P S 3 / S e rフラグメントのリン酸化を前述のように実施した。

【0129】

ベクターp A H O 5中の大腸菌l a c Z遺伝子のE c o R V部位へのC I V P S 3カセットのフレーム内挿入

P C R合成C I V P Sカセットは、ターゲット遺伝子を有する直線化ベクターとの連結によってターゲットコード領域に挿入できる。線状プラスミドベクターは、前述のような制

10

20

30

40

50

限酵素またはPCR合成によって調製し得る。pAHO5は、tacプロモーターの下流のpAGR3(NEB)のポリリンカー内でBamHI及びSmaI部位の間に挿入されたpRS415(Simonsら、Gene, 53:85-96(1987))からの3.1kb BamHI-DraIフラグメント上に完全なlacZ遺伝子配列を有する。tacプロモーターは、lacI^q遺伝子の産物によって抑制され得且つイソプロピル-D-チオガラクトシド(IPTG)によって誘導され得る転写制御エレメントである。pAHO5は2つのEcoRV認識配列を含む。EcoRVは開裂部位に平滑末端を残す。EcoRV開裂部位の1つはlacZコード領域内で375番目のコドン(アスパラギン酸)と376番目のコドン(イソロイシン)との間を切断する。

【0130】

15 µgのpAHO5 DNAを、100 µlの1×NEB緩衝液2中で40単位のEcoRV(NEB)と共に37 °Cで60分間インキュベートすることにより、DNAを部分的に消化した。EcoRVを失活させるべく試料を65 °Cで10分間加熱した後、20 µlの染料添加アガロースゲルを試料に加えた。1%低融点アガロースゲル上での電気泳動によってDNAフラグメントを分離した。実施例8の方法で低融点アガロースゲルから直線化pAHO5プラスミドDNAを回収し、蒸留水に再懸濁した。

【0131】

CIVPS-lacZ融合遺伝子の構築

CIVPS3/Ser-lacZ融合の構築は実施例2で説明した。CIVPS3-lacZ融合は、リン酸化pAHO5 DNAをリン酸化IVPS1フラグメントに連結することによって行った。該反応は、20 µl倍容中で、1×T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)と、0.1 µgのpAHO5 DNAと、0.5 µgのIVPS1 DNAと、160単位のT4 DNAリガーゼ(NEB)とを加えて16 °Cで15時間実施した。100 µlのコンピテントRR1細胞と10 µlの連結試料とを氷上で30分間混合し、42 °Cで2分間加熱し、氷上で5分加熱冷却し、0.8 mlのLB培地(10 g/リットルトリプトン、5 g/リットル酵母抽出物、10 g/リットルNaCl、1 g/リットルデキストロース、1 g/リットルMgCl₂·6H₂O、pH7.2、25 °C)を加え、30 °Cで45分間インキュベートして、大腸菌株RR1を形質転換した。100 µg/mlのアmpシリンを加えたLBプレートに試料をプレーティングした。30 °Cで一晩のインキュベーション後に、プレート当たり約150~300のコロニーが観察された。

【0132】

CIVPS3/Thr-lacZ及びCIVPS3/Cys-lacZ融合を、0.1 µgのEcoRV直線化pAHO5 DNAと0.7 µgのCIVPS3/Thr又はCIVPS3/Cysフラグメントとの連結によって行った。大腸菌株ER2252(NEB)の形質転換を前述のプロトコルで実施した。

【0133】

コロニーのハイブリダイゼーションを用いて、組換えプラスミドを有するクローンをスクリーニングした。前述のDeep Vent CIVPS3正方向プライマーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼで放射性標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。コロニーを採取してニトロセルロースに移し、下記の各溶液中で5分間処理した：10% SDS、0.5 M NaOH/1.5 M NaCl、0.5 M トリス-HCl (pH 7.4)/0.5 M NaCl (2回)及び2×SSC (2回)。ニトロセルロースフィルターを室温で1時間乾燥し、真空下80 °Cで2時間焼成し、6×SSCに5分間浸漬し、50 mM トリス-HCl (pH 8.0)、1 M NaCl、1 mM EDTA及び0.1% SDSの溶液中で42 °Cで2時間洗浄した。6×NET、5×デンハート及び0.5% SDS中で42 °Cで4時間処理した後、フィルターを放射性標識オリゴマープローブと共に同一条件下で一晩インキュベートし、次いで2×SSC中で、42 °Cで15分間の洗浄4回と、50 °Cで2分間の洗浄2回とにかけ、その後オートラジオグラフィーを行った。

【0134】

10

20

30

40

50

オリゴマープローブにハイブリダイズしたポジティブクローンを、誘導物質IPTGで融合タンパク質を発現する能力について更に調べた。クローンを、100 μ g/mlのアムピシリンを加えたLB培地中でOD_{600nm}が0.5に達するまで30で培養した。IPTGを最終濃度0.3mMで加えた後、培養物を30で更に4時間増殖させた。0.1mlの細胞を0.1mlの尿素溶解緩衝液と共に10分間沸騰させることにより粗溶解物を調製した。前述のポジティブクローンからの融合タンパク質のアイデンティティを、
 - ガラクトシターゼ (Promega) 又は I - P s p I (Deep Vent C I V P S 3 のタンパク質生成物、NEB) に対する抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。予備染色マーカー (BRL) を用いて4~20% SDSゲル (ISS, Daiichi, Tokyo, Japan) 上で試料を電気泳動にかけ、ニトロセルロースに移し、抗血清 (マウス由来) でプローブし、アルカリホスフェート結合抗マウス第二抗体を製造業者 (Promega) の指示通りに使用して検出した。Deep Vent C I V P S 3 - l a c Z 融合クローンは、両抗体と反応する173~178kDaの産物を発現した。この大きさは、C I V P S 3 - - ガラクトシターゼ融合タンパク質 (図11) について予想された大きさである。クローン p D V 7 及び p D V 1 5 は C I V P S 3 挿入物を含む。p D V 3 0 2、3 0 6 及び 3 0 7 は C I V P S 3 / C y s カセットを有し、p D V T 3 1 9、3 2 1 及び 3 2 3 は C I V P S 3 / T h r カセットを含む。C I V P S 3 / S e r 挿入物を含む p D V S 7 1 2 及び 7 4 2 は既に実施例2で説明した。

10

【0135】

改質 C I V P S 3 カセットを用いる C I V P S 3 - - ガラクトシターゼ中での特定ペプチド結合開裂の熱制御

20

カルボキシル末端でセリンを置換するためのトレオニン又はシステインを有するカセットを含む D V I V P S 1 (C I V P S 3) - - ガラクトシターゼ融合は、融合タンパク質中の特定ペプチド結合点で熱制御可能な開裂を示す。前述の構築物 (l a c Z E c o R V 部位に挿入した C I V P S 3 カセット) は、IPTGでの誘導後に融合タンパク質を産生する。25で増殖した細胞から調製した細胞抽出物をより高い温度 (42 又は 65) で処理し、
 - ガラクトシターゼ (Promega) 又は I - P s p I (Deep Vent C I V P S 3 の産物) に対する抗体を用いてウェスタンブロットで分析した (図11及び図12)。I V P S 1 / S e r 融合タンパク質は、高温でインキュベートすると、タンパク質スプライシングを起こして連結タンパク質と遊離 I V P S エンドヌクレアーゼとを生成し得る。連結反応活性は観察されなかったが、42ではC I V P S 3 / T h r 又は C I V P S 3 / C y s カセットを有する融合タンパク質が主にアミノスプライス部位で開裂し、65では両方の融合タンパク質がカルボキシルスプライス部位でより大きい開裂活性を示した。

30

【0136】

C I V P S 3 - l a c Z 融合クローンからの細胞抽出物の調製を下記の方法で実施した。種々の大腸菌宿主内で最初に構築した融合構築物の全てを、実施例8で述べた標準的形質転換手順で、
 - ガラクトシターゼを合成しない l a c Z 欠失大腸菌株 E R 1 9 9 1 (New England Biolabs, Inc.) 中に導入した。p D V 7、p D V C 3 0 2、p D V T 3 3 2 又は p D V S 7 1 2 クローンからの単コロニーを、100 μ g/mlのアムピシリンを加えた1.5mlのLB培地に接種し、OD_{600nm}が約0.5になるまで30でインキュベートし、1.5mlの0.6mM IPTG、100 μ g/mlアンピシリン/mlを加えることにより0.3mM IPTGで25で5時間誘導した。3mlの細胞を遠心分離し、0.5mlのLBに再懸濁し、4で1分間超音波処理し、4で5分間6,000rpmで遠心分離した。上清を回収し、-20で貯蔵した。

40

【0137】

細胞抽出物を室温で急速解凍した後、42 又は 65 で熱処理した。48 μ lの抽出物を12 μ lの5 \times 試料緩衝液 (0.31 トリス-HCl、pH6.8 / 10% SDS / 25% 2-メルカプトエタノール / 50% グリセロール / 0.005% プロモフェノールブルー) と混合し、10分間沸騰させて、非処理対照試料を調製した。48 μ l アリコー

50

トを1.5mlマイクロ遠心管に移し、42℃の水浴中で30、60、120もしくは240分間、又は65℃の水浴中で15、30、60もしくは120分間インキュベートした。各々を12μlの5×試料緩衝液と混合し、10分間沸騰させた。

【0138】

処理した試料を、I-PspI (NEB) (図11及び図12)又はβ-ガラクトシターゼ (Promega) (図12)に対する抗体を用いてウェスタンブロットで分析し、各試料5μlを4/20% SDSポリアクリルアミドゲル (ISS, Daichi, Tokyo, Japan)上に配置して100ボルトで4時間電気泳動にかけた。ウェスタンブロットはPromegaの手順に従って実施した。

【0139】

結果は、融合タンパク質前駆体が主要物質 (dominant species)であり、4つの融合構築物全部から25℃でIPTG誘導した後の細胞中には極めて微量のI-PspIエンドヌクレアーゼしか存在していないことを示した。これは、低温ではスプライシング及び切り出し活性が不十分であることを意味する。しかしながら、pDVS712 (CIVPS3/Ser-β-ガラクトシターゼ融合)抽出物をより高い温度42℃又は65℃にシフトすると、CIVPS3生成物I-PspI (約60kDa)が多量に蓄積された (図11及び図12)。IVPSドメインの切り出しは、中断されたβ-ガラクトシターゼのNドメイン及びCドメインの連結に結びついており、完全長のβ-ガラクトシターゼと同じ大きさである116kDaの生成物を産生した (図12)。約130kDa (アミノスプライス部位での開裂に対応する)の別の主産物 (IVPS1-C-EPS)も観察された。

【0140】

他の3つの変異体 (variant)の融合タンパク質 (CIVPS3、CIVPS3/Cys及びCIVPS3/Thrカセットを有する)は低温での安定性がより大きかった。非処理抽出物からは、スプライス部位での開裂に対応するI-PspI又は他の産物が極めて少量しか検出されなかった (図11)。CIVPS3/Ser融合と対照的に、これら3つの融合構築物の熱処理した試料では連結タンパク質は観察されなかった (図12)。pDV7 (CIVPS3-β-ガラクトシターゼ融合)試料は、65℃では、I-PspIと単一スプライス部位での開裂に対応する生成物とを微量しか産生しなかった。これは、いずれのスプライス部位でも切り出しが十分でないことを意味する (図11、レーン1~3)。CIVPS3/Cysカセットを含むpDVC302は、42℃で中庸量のI-PspI及びCIVPS3-C-EPS種の蓄積を示した (図11、レーン5)。I-PspI、C-EPS及びカルボキシルスプライス部位での開裂に対応する約110kDaの生成物 (N-EPS-CIVPS3)の収率は65℃で増加したが、CIVPS3-C-EPS種は減少した (図11、レーン4~6;図12)。この結果は、融合タンパク質及び/又はCIVPS3-C-EPS生成物からのカルボキシルスプライス部位でのペプチド結合開裂が促進されたことを意味する。pDVT321 (CIVPS3/Thrカセットを有する)は、42℃で処理すると、主要生成物CIVPS3-C-EPS以外のI-PspI又はC-EPSを極めて少量しか示さなかった (図11、レーン8;図12)。このデータは、42℃では、アミノスプライス部位でペプチド結合の効果的な開裂が得られるが、カルボキシルスプライス部位では該開裂が得られないことを意味する。65℃で見られた少量のI-PspIの蓄積は、カルボキシルスプライス部位での開裂が促進されたことを意味する (図11、レーン9)。

【0141】

要約すれば、前記データは、Deep Vent IVPS1 (CIVPS3)のカルボキシルスプライス部位で単一の天然残基セリンを置換すると、融合タンパク質のプロセッシングが変化し、温度によってより良く制御できるようになることを立証している。CIVPS3/Thr-β-ガラクトシターゼ融合タンパク質は (そして程度はより低い) CIVPS3/Cys融合タンパク質も)高温の時にだけ、アミノスプライス部位で特定ペプチド結合を開裂した。

10

20

30

40

50

【0142】

実施例9

M I Pの構築及び精製アフィニティークロマトグラフィーによるC I V P S融合体の精製M B P融合タンパク質へのD e e p V e n t I V P S 1のクローニング

本発明の実施態様の1つでは、C I V P Sと、容易に精製できるセグメント、例えば結合タンパク質と、対象となっているタンパク質又はペプチド、即ちターゲットタンパク質とを含む三部型融合体 (t h r e e - p a r t f u s i o n) を形成することができる。これらの部分の順序は変えることができる。この種の融合体の利点は精製が容易なことにある。前駆体タンパク質を精製すれば、対象となっているペプチドを、改質C I V P Sで誘導した単方向タンパク質開裂によって融合体から分離することができる。上述の実施例では、C I V P S部位の1つを改変してその部位のスプライシング又は開裂を低下又は防止すると、別の部位の開裂がスプライシングより促進されることを明らかにした(詳細な説明、並びに実施例8参照)。これは、融合体から対象ペプチドの分離を可能にするものである。

10

【0143】

この実施例は、結合タンパク質であるマルトース結合タンパク質 (M B P) と、C I V P S 3と、パラミオシンペプチドとを含む前述のような三部型融合体が、非スプライス前駆体としてアミロース樹脂で簡単に精製できることを明かにする。この実施例では、連結なしで開裂生成物のみを生成するためにスプライシングを妨害すべく開裂をC I V P Sの片側に制限する試みは行わなかった。

20

【0144】

D e e p V e n t I V P S 1挿入物 (C I V P S 3) の合成

上述の実施例と同様に、但し下記の点を変えて、P C RによりC I V P S 3カセットを合成した。P C R混合物は、V e n t D N Aポリメラーゼ緩衝液 (N E B) と、200Mの各d N T Pと、10 p m o l eの各プライマーと、40 n gのプラスミドDNAと、100リットル中2単位のV e n t D N Aポリメラーゼとを含んでいた。増幅は、P e r k e n - E l m e rサーマルサイクラーを用いて、94 で30秒、50 で3秒及び72 で2分のサイクルに20回かけて実施した。D e e p V e n t I V P S 1はp N E B # 7 2 0から合成した。

30

【0145】

正方向プライマーは、2つのフランキングK p n I部位を含む、D V I V P S 1の5'末端と同じ3'末端の26/27塩基からなるプライマー96-6、5'-GGTACC CGTCGTGCTAGCATTTTACCGGAAGAATGGGTACCA-3'(配列番号:43)であった。3'K p n I部位は、アミノ酸残基を変えずに制限部位を形成するサイレント置換を含む。D e e p V e n t I V P S 1逆方向プライマーであるプライマー96-7、5'-CCGCTATTATGTGCATAGAGGGATCC-3'(配列番号:44)は、3'末端にB a m H I部位を有する。3'末端の23/24塩基はD V I V P S 1の3'末端と相同であり、B a m H I部位を形成するための単一塩基置換を有する。プライマー96-6及び96-7を使用してD e e p V e n t I V P S 1カセット(1.6kb)を合成した。

40

【0146】

P C R試料を1:1でクロロホルムと混合し、上方水性層を1%低融点アガロースゲル上に配置して電気泳動にかけた。ゲルから1.6kbバンドを切り取り、65でインキュベートした。ゲルの融解後、0.25mlのT E緩衝液((10mMトリス-HCl/0.1mM EDTA、pH7.5)を65で加え、試料をフェノール-クロロホルム(1:1混合物)で抽出した。DNAを0.5M NaCl及び2倍容のイソプロパノール中で-20で30分間沈殿させた。DNAを遠心分離し、乾燥し、60μlのT E緩衝液に再懸濁した。

【0147】

50

pPR1002、即ちpMAL-c2-パラミオシン Sal プラスミドの調製 pMAL-c2-パラミオシン Sal 融合プラスミドである pPR1002 は、パラミオシン Sal 欠失と称する、D. immittis パラミオシン 遺伝子の EcoRI-SalI フラグメントに結合した、tac プロモーター制御下の malE 遺伝子を含む 7.2 kb のベクターである (Steel ら、J. Immunology, 145:3917-3923 (1990))。4 µg ずつの 2 つの pPR1002 試料を、100 µg/ml の BSA を含む 20 µl の 1×NEB 緩衝液 #2 中で 6 単位 × XmnI (NEB) により 37 で 2 時間直線化した。該反応物質を 1% 低融点アガロースゲルにかけた。7.2 kb バンドを切り取り、前述のようにゲルから精製し、40 µl の TE 緩衝液に再懸濁した。

【0148】

pMIP17 の構築

pPR1002 と Deep Vent IVPS1 との連結を、14.5 µl の蒸留水と、2.5 µl の 10×T4 DNA リガーゼ緩衝液 (NEB) と、1 µg/µg の開裂 pPR1002 DNA と、前述のように調製した 5 µl の 0.2 µg/µl Deep Vent IVPS1 と、800 単位の T4 DNA リガーゼ (NEB) とを加えた 25 µl 容中で 16 で 16 時間実施した。

【0149】

100 µl のコンピテント ER2252 細胞と 5 µl の連結試料とを、0.1 M CaCl₂ と 1×SSC (0.15 M NaCl, 15 mM クエン酸 Na) との 1:2 混合物 100 µl 中で混合し、42 で 3 分間加熱し、氷中で 5 分間冷却し、0.1 ml の LB 培地 (10 g/リットルのトリプトン、5 g/リットルの酵母抽出物、10 g/リットルの NaCl, 1 g/リットルのデキストロース、1 g/リットルの MgCl₂·6H₂O、pH 7.2, 25) を加え、30 で 30 分間インキュベートすることにより、大腸菌株 ER2252 を氷上で 5 分間形質転換した。形質転換細胞 300 µl をペレット化し、100 µl の上清に再懸濁し、LB amp プレートにプレーティングした。30 で一晩のインキュベーション後に、約 160 のコロニーが観察された。

【0150】

PCR 増幅を用いて、組換えプラスミドを有するコロニーのスクリーニングを行った。個々のコロニーを採取してウェル数 96 のマイクロタイター皿内の 100 µl の蒸留水に入れ、5 分間沸騰させて細胞を溶解した。PCR 混合物は、50 µl の反応混合物中 Vent DNA ポリメラーゼ緩衝液 (NEB) と、200 µM の各 dNTP と、10 pmol の各プライマー (同上) と、2.5 µl の細胞溶解物と、2 単位の Vent Exo DNA ポリメラーゼとを含んでいた。増幅は、Perkin-Elmer サーマルサイクラーを用いて 94 で 30 秒、50 で 30 秒及び 72 で 2 分のサイクルに 30 回かけることにより実施した。10 µl の各反応混合物を 1% アガロースゲル上で電気泳動させた。ポジティブクローンは IVPS1 (1.6 kb) に対応するバンドを有していた。1 つのポジティブプラスミドを pMIP17 と命名した。

【0151】

MIP の発現: MBP-Deep Vent IVPS1-パラミオシン Sal 融合 pMIP17 を含むポジティブクローンを、100 µg/ml のアンピシリンを加えた LB 培地中で OD_{600nm} が 0.5 になるまで 30 で培養した。非誘導細胞から溶解物を調製するために、1.0 ml の培養液をペレット化し、50 µl のタンパク質試料緩衝液 (125 mM トリス、700 mM -メルカプトエタノール、2% SDS、15% グリセロール及び 1 mg/ml プロモフェノールブルー) に再懸濁した。誘導培養物からの試料は下記のように調製した。IPTG を最終濃度 1 mM で加えた後、培養物を 30 で更に 20 時間増殖させた。誘導後 5 時間目及び 20 時間目の 0.5 ml 培養物からの細胞をペレット化し、100 µl の 5×タンパク質試料緩衝液に再懸濁した。予備誘導した 5 時間目の試料を -20 で 16 時間凍結し、20 時間目の試料を -70 で 15 分凍結した。前駆体の収率を増加させるために、培養物を 12 ~ 20 で誘導し、前駆体の量をクーマシーブルー染色ゲルで決定した。全ての試料を 5 分間沸騰させ、SDS-PAGE 電気

10

20

30

40

50

泳動と、クーマシーブルー染色か、又はI - P s p Iに対する抗体(NEB)を用いるウェスタンブロットとを順次行ってタンパク質生成物を分析した。試料は4 ~ 20% SDSゲル(ISS, Daichi, Tpk yo, Japan)上で予備染色マーカー(BRL)を用いて電気泳動させ、ニトロセルロースに移し、抗血清(マウス抗-I - P s p I)でプローブし、アルカリホスフェート結合抗マウス第二抗体を製造業者(Promega)の指示通りに使用して検出した。クーマシーブルー染色ゲル及びウェスタンブロットの両方で、予想した主要バンドが約132 kDaに観察された(データ示さず)。

【0152】

アミロース及びMono QカラムでのMBP - Deep Vent IVP S1パラミオシン Sal融合体の大規模精製

単コロニーを使用して、100 µg/mlのアンプシリンを加えた4 x 10 mlのLB培地に接種し、OD_{600nm}が0.5になるまで30 でインキュベートした。これらの培養物を用いて、100 µg/mlのアンプシリンを加えた4 x 1リットルのLB培地に接種し、OD_{600nm}が0.5になるまで30 でインキュベートした。次いで培養物を12にし、1 mM IPTGで一晩誘導した。細胞をペレット化し、カラム緩衝液(20 mM NaPO₄, pH 7.4, 200 mM NaCl及び1 mM EDTA)に再懸濁し、超音波処理し、遠心分離し、透明な培養溶解物をアミロース樹脂(NEBタンパク質融合及び精製システム)にかけた。融合タンパク質を(製造業者の指示に従って)マルトースで溶離し、SDS - PAGEゲルで調べた(図13)。アミロース樹脂溶離物を、FPLC Mono Qアニオン交換樹脂(Pharmacia)でのクロマトグラフィーにより更に精製した。カラムを0.2 M NaCl、10 mM トリス - HCl、pH 8.5で洗浄し、10 mM トリス - HCl、pH 8.5中0.2 ~ 1.0 MのNaCl直線勾配で溶離した。タンパク質は0.4 ~ 0.6 M NaClで溶離した。

【0153】

6つのタンパク質バンドを、MBP、I - P s p I及びパラミオシンに対する抗体を用いてウェスタンブロットで同定した。見掛け分子量180 kDa及び132 kDaの2つのバンドは前記3種類の抗体の全てと反応した。完全長の前駆体は132 kDaの筈である。分子量がより大きいバンドはスプライシング中間体と考えられ、類似の高分子量物質が全てのCIVPS構築物について見られた。切り出されたI - P s p Iは60 kDaで泳動し、I - P s p I抗体に認識されただけであった。また、スプライスされた生成物(MBP - パラミオシン Sal、72 kDa)は、MBP及びパラミオシン抗体と反応する血清に認識されただけであった。約103 kDaのバンドはMBP及びI - P s p I抗体とだけ反応した。このバンドは、IVPSのC末端での単一開裂の産物を表す。約89 kDaのバンドはI - P s p I及びパラミオシン抗血清とだけ反応した。該バンドはIVPSのN末端での単一開裂の産物を表す(図13)。

【0154】

MBP - Deep Vent IVP S1 - パラミオシン Sal融合体の切り出し及び連結

前駆体(132 kDa)を含む幾つかのMIP関連ポリペプチドと、泳動速度の遅い物質(見掛け分子量180 kDa)と、単一スプライス部位での開裂生成物(130 kDa及び89 kDa)と、少量のスプライスされた生成物及び切り出された生成物(72 kDa及び60 kDa)とを含むアミロース樹脂及びMono Q調製物を、20 mM リン酸ナトリウム(pH 6.0)及び0.5 M NaCl中で37 で2時間熱処理した。132 kDaの前駆体及び180 kDaの泳動速度の遅い物質は経時的に減少し、72 kDaのスプライスされた生成物及び60 kDaの切り出されたI - P s p Iは増加した(図13)。

【0155】

これらの結果は、三部型CIVPS融合体を精製できるだけでなく、単一開裂生成物を得ることもできることを意味する。CIVPS部位を更に操作すると、連結を伴わないいずれかのスプライス部位の開裂が促進され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 6 】

実施例 1 0

M I P 融合における C I V P S の 改 変置換可能なスプライス部位カセットを有する M I P の 構 築

この実施例では、両方のスプライス部位に置換可能カセットを有し、C I V P S がカセット置換によって改変された、M I P 融合体（実施例 9 参照）を構築した。また、2つの事例で、改質 C I V P S が主に単一スプライス部位で熱誘導的に開裂できるという事実も明らかにする。

【 0 1 5 7 】

実施例 9 では、3つの部分、即ち C I V P S、精製の容易な結合ドメイン（M B P）及び対象となっている遺伝子（パラミオシン S a l）で形成できる三部型融合体 M I P を説明した。精製融合タンパク質のスプライシングでは2種類の主要産物、連結タンパク質ドメイン、M B P - パラミオシン S a l 及び切り出された C I V P S（又は I - P s p I）が得られた。C I V P S における改変のなかには、連結反応の抑制と1つのスプライス部位での開裂の増加とを誘起し得るものがあり、その結果、改質 C I V P S により触媒された特定ペプチド結合部位での開裂によって、融合タンパク質から対象ペプチドが分離されるのであろうと推論された。実施例 8 では、1つのスプライス部位の開裂が C I V P S 3 の改変（T h r 又は C y s による C 末端 S e r の置換）によって促進され得、これらの変化がもう1つの部位のスプライシング又は開裂を低下又は防止することを明らかにした。制御可能なスプライシング又は開裂活性の好ましい特性での改変に関してスクリーニングを行うためには、スプライス部位に種々の変異を導入し分析しなければならない。これは、各改変を有する完全 C I V P S カセットの合成によって達成し得る。しかしながらこの操作は、P C R 時に余分の変異を導入する可能性がある。

【 0 1 5 8 】

本発明者は、スプライス部位の周りで短い範囲にわたる D N A だけを置換することによって前記操作を容易にする手法を開発した。該実施例では、実施例 9 で形成した元の M I P 融合体を、各スプライス部位を挟む2つの非反復制限部位を有するように修飾する方法を説明する。制限消化後のカセット置換では、スプライス部位の1つにおける2つの非反復制限部位の間の短い範囲の D N A を別の短い D N A カセットで置換することができる。この実施例では、実施例 9 で説明した p M I P 1 7 融合体を、各接合部位に2つの非反復制限部位を有するように、即ちアミノスプライス部位にフランキング配置する X h o I 部位及び K p n I 部位と、カルボキシルスプライス部位にフランキング配置する B a m H I 部位及び S t u I 部位とを有するように改変した（図 1 4 参照）。

【 0 1 5 9 】

スプライス部位カセットを有する M I P 融合体は2つのステップで構築した。まず、B a m H I 及び S t u I 部位を次のように導入した。4 μ g の p M I P 1 7（実施例 9）を 1 x E c o R I 緩衝液（N E B）中で 5 0 μ l 中 0 . 5 単位の E c o R I（N E B）により 3 7 $^{\circ}$ C で 1 0 分間消化した。1%アガロースゲルで電気泳動により分離した後、G e n e c l e a n I I キット（B I O 1 0 1）を用いて直線化 p M I P 1 7 プラスミド D N A（8 . 8 K b）を精製した。精製 p M I P 1 7 D N A を、1 0 0 μ g / m l の B S A と、4 0 単位の B a m H I（N E B）とを加えた 1 x B a m H I 緩衝液（N E B）中 3 7 $^{\circ}$ C で 3 時間消化し、フェノール及びクロロホルムで抽出した。D N A を 0 . 3 M 酢酸 N a（p H 5 . 2）及び 5 0 % 2 - プロパノール中で - 2 0 $^{\circ}$ C で 2 時間沈殿させた。D N A をミクロ遠心機で 1 0 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して回収し、乾燥し、2 0 μ l の無菌水に再懸濁した。

【 0 1 6 0 】

ベクターとの連結の前に、2つの相補オリゴマー M I P 3 0 1 F（5' - G A T C C C T C T A T G C A C A T A A T T C A G G C C T C - 3'（配列番号：46））及び M I P 3 0 2 R（5' - A A T T G A G G C C T G A A T T A T G T G C A T A G A G G - 3'（配列番号：47））をアニールさせて二本鎖リンカー M I P 3 0 1 F / M I P 3 0 2 R

を形成した。50 pmolのオリゴマーMIP301F及びMIP302Rを1×T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)中で68℃で15分間インキュベートし、20℃~30℃にゆっくりと冷却した。1µgのEcoRI-BamHI消化pMIP17 DNAを、80単位のT4 DNAリガーゼ(NEB)及び25 pmolのリンカーMIP301F/MIP302Rを加えた35µlの1×T4リガーゼ緩衝液(NEB)中で16℃で14時間にわたり連結反応させた。

【0161】

得られた構築物をpMIP18と命名した。上流XhoI及びKpnI部位を次の方法でpMIP18に導入した。2µgのpMIP18を、100µlの1×緩衝液2(NEB)、100µg/mlのBSA及び20単位のKpnI(NEB)中で37℃で4時間消化した。電気泳動で分離した後、線状pMIP18DNAをGeneCleanIIキット(BIO101)で精製した。ベクターと連結する前に、2つの相補オリゴマーMIP521F(5'-GCTCGAGGCTAGCATTTTACCGGAAGAATGGGTAC-3'(配列番号:48))及びMIP522R(5'-CCATTCCTTCCGGTAAATGCTAGCCTCGAGCGTAC-3'(配列番号:49))をアニールさせて二本鎖リンカーMIP521F/MIP522Rを形成した。50 pmolのオリゴマーMIP301F及びMIP302Rを1×T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)中で75℃で15分間インキュベートし、20℃~30℃にゆっくりと冷却した。0.2µgの消化pMIP18を、35µlの1×T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)、80単位のT4 DNAリガーゼ(NEB)及び25 pmolのリンカーMIP521F/MIP522R中で室温で3時間連結反応させた。いずれの場合も、連結DNA試料を用いて大腸菌株ER2252(NEB)を形質転換した。最終構築物pMIP21は、各プライス部位に2つの非反復制限部位を含む。N末端プライス部位を包囲するXhoI部位及びKpnI部位と、C末端プライス部位を包囲するBamHI部位及びStuI部位とが存在する(図14)。

【0162】

改質MIP21融合タンパク質の発現とスプライシング活性とを調べるためにウェスタンブロット分析を行った。pMIP21含有ER2252を、100µg/mlのアンピシリンを加えたLB培地中30℃でOD_{600nm}が0.5になるまで培養した。次いで培養物を1mMのIPTGで30℃で3時間誘導した。4.5mlの培養物をペレット化し、0.5mlのLB培地に再懸濁し、氷上で超音波処理した。透明上清を4/20%のポリアクリルアミドゲル上で100ボルトで4時間電気泳動させた。ウェスタンブロットを抗MBP血清でプローブした。結果は、改質MIP21融合体からのスプライシング活性がMIP17のそれと区別できないものであることを示している。

【0163】

スプライス部位カセット置換によるMIP21の改変

改変MIP融合構築物pMIP21では、アミノプライス部位カセットがXhoI及びKpnI部位の間に8つのアミノ酸残基を含んでおり、カルボキシルプライス部位カセットがBamHI及びStuI部位の間の6つのアミノ酸残基をコードする配列を含んでいる。スプライス部位は、N末端XhoI-KpnIカセット又はC末端BamHI-StuIカセットを置換することによって変えることができる。C末端カセット置換の場合は、pMIP21をまずBamHI及びStuIで消化する。元のBamHI-StuIカセットを、所望の変異を含む相補プライマーで置換する。この実施例では、2つの異なる部位カセットでMIP21 BamHI-StuIカセットを置換した。

【0164】

下記のカセット置換実施例では、Ala₅₃₅をLysで置換するか、又はHis₅₃₆をLeuで置換した。

【0165】

残基Ala₅₃₅をLysで置換するためには、相補オリゴマーMIP303F(5'-GATCCCTCTATAAGCATAATTTCAGG-3'(配列番号:50))及びM

10

20

30

40

50

I P 3 0 4 R (5 ' - C C T G A A T T A T G C T T A T A G A G G - 3 ' (配列番号 : 5 1)) を使用した。H i s₅₃₆をL e uで置換するためには、相補オリゴマーM I P 3 1 1 F (5 ' - G A T C C C T C T A T G C A C T G A A T T C A G G - 3 ' (配列番号 : 5 2)) 及びM I P 3 1 2 R (5 ' - C C T G A A T T C A G T G C A T A G A G G - 3 ' (配列番号 : 5 3)) を使用した。これら2対の相補オリゴマーを前述のように処理して二本鎖リンカーを形成した。どちらのリンカーも、p M I P 2 1のB a m H I - S t u I開裂後にカルボキシルスプライス部位を置換するための適合性末端を含む。2 μ gのp M I P 2 1 DNAを、1 0 0 μ g / m lのB S Aを加えた1 × B a m H I緩衝液(N E B)中4 0単位のB a m H I (N E B)で3 7 °Cで4時間消化し、クロコホルムで抽出し、0 . 3 M酢酸Na (p H 5 . 2) 及び5 0 % 2 - プロパノール中で- 2 0 °Cで2時間沈殿させた。ミクロ遠心機で1 0 , 0 0 0 r p mで1 0分間遠心分離してDNAを回収し、乾燥し、8 8 μ lの無菌水に再懸濁した。次いで、B a m H I消化p M I P 2 1 DNAを1 0 0 μ lの1 ×緩衝液2 (N E B)中4 0単位のS t u I (N E B)で3 7 °Cで3時間消化し、クロコホルムで抽出し、0 . 3 M酢酸Na (p H 5 . 2) 及び5 0 % 2 - プロパノール中- 2 0 °Cで一晩沈殿させた。ミクロ遠心機で1 0 , 0 0 0 r p mで1 0分間遠心分離してDNAを回収し、乾燥し、3 0 μ lの無菌水に再懸濁した。0 . 1 μ gのB a m H I - S t u I消化DNAを、4 0単位のT 4 DNAリガーゼ(N E B)の存在下で、1 0 μ lの1 × T 4 DNAリガーゼ緩衝液(N E B)中6 p m o lのリンカーM I P 3 0 3 F / M I P 3 0 4 R又はM I P 3 1 1 F / M I P 3 1 2 Rと2 3 °Cで6時間連結させた。連結DNAを用いて大腸菌R R 1を形質転換した。p M I P 2 3はA l a₅₃₅からL y sへの置換を含み、p M I P 2 8はH i s₅₃₆からL e uへの置換を含む。修飾M I P融合体M I P 2 3及びM I P 2 8の発現を、前述のように抗M B P抗体を用いるウェスタンブロット分析で調べた。その結果、どちらの融合構築物でもスプライシング活性がブロックされていることが判明した。しかしながら各改変は、一方のスプライス部位のみの開裂活性を増加させた。M I P 2 3におけるA l a₅₃₅からL y sへの置換はカルボキシルスプライス部位の開裂活性を急増させ、M I P 2 8におけるH i s₅₃₆からL e uへの置換は強度のアミノスプライス部位開裂を示した。

【 0 1 6 6 】

改質M I P融合タンパク質の精製及び熱誘導可能な開裂活性

融合タンパク質の発現を低温で誘発し、M I P融合タンパク質をアミロース樹脂カラムで精製した。p M I P 2 3又はp M I P 2 8を含有するR R 1を、1 0 0 μ g / m lのアンピシリンを加えた1リットルのL B培地中3 0 °CでO D_{600nm}が0 . 5になるまで培養した。培養物を氷上で約1 5 °Cに冷却した後、I P T Gを最終濃度0 . 3 m Mで加え、培養物を1 2 ~ 1 4 °Cで更に1 2時間増殖させた。細胞をペレット化し、- 7 0 °Cで即座に冷凍し、- 2 0 °Cで貯蔵した。ペレットをカラム緩衝液(1 0 m Mトリスp H 8 . 5、5 0 0 m M N a C l)中で別個に超音波処理し、遠心分離した。各M I P融合体からの透明溶解物をアミロース樹脂(N E Bタンパク質融合及び精製システム)にかけ、洗浄し、マルトースで溶離した(実施例9と同様)。

【 0 1 6 7 】

M I P 2 3の精製試料を2 0 m M N a P O₄ (p H 6 . 0) / 5 0 0 m M N a C l中で4 °Cで透析した。次いで試料を4 °C、3 7 °C、5 0 °C及び6 5 °Cで1時間インキュベートし、4 / 2 0 %のS D S - P A G Eゲル上で電気泳動させ、その後クーマシーブルーで染色した(図15のA)。ゲルは、温度を上げると、M I P 2 3が元の構築物のように連結生成物(M I P)又は切り出し生成物(I)を形成せずに、C末端開裂生成物(M I、1 0 3 k D及びP、2 9 k D)を蓄積することを示している。

【 0 1 6 8 】

精製M I P 2 8試料を2 0 m M N a P O₄ (p H 6 . 0) / 5 0 0 m M N a C l中で4 °Cで1 . 5時間透析した。次いで試料を4 °C、4 2 °C、5 0 °C及び6 5 °Cで1時間インキュベートし、1 / 5倍容の5 ×タンパク質試料緩衝液(1 2 5 m Mトリス、7 0 0 m M -メルカプトエタノール、2 % S D S、1 5 %グリセロール及び1 m g / m lプロモ

フェノールブルー)と混合した。タンパク質生成物を4/20%のSDS-PAGEゲルで分析し、次いでクーマシーブルーで染色した(図15)。データは、これらの条件下ではスプライシング活性が完全にブロックされることを示した。アミノスプライス部位の開裂活性は温度の増加に対応して増加し、65℃でより多くのMBP(M、43kD)及びCIVPS3-パラミオシンSal(IP、89kD)が得られた。

【0169】

これらの結果は、スプライス部位カセット置換法を使用して融合構築物のスプライス部位を改変することができ、このような改変がスプライシング及び開裂活性に著しい効果を与え得ることを示している。このデータは更に、CIVPSの連結及び完全切り出しの不在下で1つのスプライス部位のみにおける開裂が観察される構築物の一例を示している。

10

【0170】

実施例11

MICの構築及び精製

CIVPS融合体における外来遺伝子の置換

精製を容易にするための結合ドメインと、スプライシングドメイン(CIVPS3)と、ターゲットタンパク質(パラミオシン)とを含む三部型融合タンパク質(MIP)を、実施例9と同様に構築した。この構築物を精製し、熱活性化によってスプライスできることを明らかにした。この系が種々のターゲットタンパク質を受容する能力を調べるために、MIP構築物中のパラミオシンを*Saccharomyces cerevisiae*キチナーゼ遺伝子由来のキチン結合ドメイン(CBD)で置換した[Kuranda及びRobbins, *J. Biological Chem.*, 266(29):19758-19767(1991)]。この第2のタンパク質融合体がスプライスして連結生成物及び切り出し生成物の両方を形成する能力は、該融合方法を別の外来タンパク質に使用できることを立証するものである。更に、キチン結合ドメインはタンパク質精製の別の結合タンパク質として使用できる。

20

【0171】

キチン結合ドメイン(CBD)の合成

上述の実施例と同様の手順で、但し下記の点を変えて、PCRによりキチン結合ドメインを合成した。PCR混合物は、Vent DNAポリメラーゼ緩衝液(NEB)と、200µMの各dNTPと、10pmoleの各プライマーと、20ngのプラスミドDNAと、100µl中1単位のVent DNAポリメラーゼとを含んでいた。増幅は、Perkin-Elmerサーマルサイ클ーを用いて95℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で30秒のサイクルに20回かけて実施した。キチン結合ドメインは、*Saccharomyces cerevisiae*キチナーゼ遺伝子を含むプラスミドpCT30から合成した[Kuranda及びRobbins, *J. Biological Chem.*, 266(29):19758-19767(1991)]。

30

【0172】

正方向プライマーであるプライマー99-02、5'-GTCAGGCCCTCTCAGACAGTACAGCTCGTACAT-3'(配列番号:54)は5'末端にStuI部位(AGGCT(配列番号:55))を有する。該プライマーの3'末端の22塩基は、キチナーゼ遺伝子のキチン結合ドメインの5'末端と同じである。逆方向プライマーであるプライマー99-03、5'-CCCCCTGCAGTTAAAAGTAATTGCTTTCCAAATAAG-3'(配列番号:56)は5'末端にPstI部位(CTGCAG(配列番号:57))を有する。該プライマーの3'末端の26塩基は、キチナーゼ遺伝子のキチン結合ドメインの3'末端のアンチセンス鎖と同じである。プライマー99-02及び99-03を用いてキチン結合ドメインカセット(270bp)を合成した。

40

【0173】

PCR試料をフェノール-クロロホルム(1:1混合物)で抽出し、DNAを0.5MのNaCl及び2倍容のイソプロパノール中で-20℃で30分間沈殿させた。DNAを遠心分離し、乾燥し、40µlのTE緩衝液(10mMトリス-HCl、0.1mM ED

50

TA、pH 7.5) 中に最懸濁した。20 μ l の再懸濁 DNA と、21 μ l の蒸留水と、5 μ l の 10 \times NEB 緩衝液 # 2 と、40 単位の Pst I (NEB) と、20 単位の Stu I (NEB) とでの消化を 50 μ l 容で 37 $^{\circ}$ C で 2 時間実施した。該反応物質を 1.8 % の低融点アガロースゲル上に配置して電気泳動にかけた。ゲルから 0.25 kb Pst I / Stu I 消化生成物を切除し、ゲルが融解するまで 65 $^{\circ}$ C でインキュベートした。0.25 ml の TE 緩衝液を 65 $^{\circ}$ C で加え、試料をフェノール-クロロホルム (1 : 1 混合物) で抽出した。DNA を 0.5 M NaCl 及び 2 倍容のイソプロパノール中で -20 $^{\circ}$ C で 30 分間沈殿させ、遠心分離し、乾燥し、40 μ l の TE 緩衝液に再懸濁した。

【0174】

pMIP21 の調製

Pst I / Stu I 二重消化により、実施例 10 に記載の pMIP21 の残りからパラミオシンコード領域を分離する。5 μ g ずつの pMIP21 試料を 60 単位の Pst I (NEB) 及び 30 単位の Stu I (NEB) と、5 μ l の NEB 緩衝液 # 2 と、34 μ l の蒸留水とで、50 μ l 容中 37 $^{\circ}$ C で 2 時間消化した。該反応物質を 1 % 低融点アガロースゲルにかけた。8.1 kb バンドを切除して前述のようにゲルから精製し、40 μ l の TE 緩衝液に再懸濁した。

【0175】

MBP - Deep Vent IVPS1 - CBD 融合体 (MIC) の構築

MIP21 中のパラミオシンを下記のようにキチン結合ドメインで置換して、MBP - Deep Vent IVPS1 - CBD 構築体 (MIC) を形成した。1 μ l の 8.1 kb pMIP21 フラグメントと 10 μ l のキチン結合ドメイン (どちらも前述のように調製) とを、9.5 μ l の蒸留水、2.5 μ l の 10 \times T4 DNA リガーゼ緩衝液 (NEB) 及び 800 単位の T4 DNA リガーゼ (NEB) と混合し、25 μ l 容中 16 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。

【0176】

大腸菌株 RR1 tonA (NEB) を、(1) 100 μ l のコンピテント RR1 tonA 細胞と、5 μ l の連結試料と、0.1 M CaCl₂ 及び 1 \times SSC (0.15 M NaCl、15 mM 酢酸 Na) の 1 : 2 混合物 100 μ l とを氷上で 5 分間混合し、(2) 42 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱し、(3) 氷中で 5 分間冷却し、(4) LB amp プレートにプレートングすることによって形質転換した。30 $^{\circ}$ C で一晩のインキュベーション後に、約 200 のコロニーが観察された。

【0177】

アルカリ溶解物ミニプレパレーション (mini-prep) DNA (Sambrook、前出の文献) を用いて、キチン結合ドメインを含む組換えプラスミドを有するクロンのスクリーニングを行った。Pst I 及び Stu I で消化すると、ポジティブクローンはキチン結合ドメインに対応するバンドとベクターに対応するバンドとを有していた。10 μ l のミニプレパレーション DNA と、2.5 μ l の NEB 緩衝液 # 2 と、8.5 μ l の蒸留水と、40 単位の Pst I (NEB) と、20 単位の Stu I (NEB) とを 25 μ l 容中で 37 $^{\circ}$ C で 2 時間混合することにより制限酵素消化を実施した。

【0178】

MIC 融合体の発現

MIC 構築を確認するために、小規模タンパク質調製物をクーマシーブルー染色ゲル及びウェスタンブロットで分析した。ポジティブクローンを、100 μ g/ml のアンピシリンを加えた LB 培地中 30 $^{\circ}$ C で OD₆₀₀ が約 0.5 になるまで培養した。非誘導細胞から溶解物を調製するために、1.5 ml の培養液をペレット化し、25 μ l の 5 \times タンパク質試料緩衝液 (125 mM トリス、700 mM β -メルカプトエタノール、2 % SDS、15 % グリセロール及び 1 mg/ml プロモフェノールブルー) に再懸濁した。誘導細胞からのタンパク質試料は下記のように調製した。培養物を 12 $^{\circ}$ C に冷却した後、IPTG を最終濃度 1 mM で加え、培養物を 12 $^{\circ}$ C で更に 5 時間増殖させた。2 時間の誘導後に 1.5 ml の試料を採取し、5 時間の誘導後に 3 ml の試料を採取した。試料をペレット

10

20

30

40

50

化し、50 μ l の5 \times タンパク質試料緩衝液に再懸濁し、-20 で16時間冷凍し、次いで解凍し、5分間沸騰させた。タンパク質生成物をクーマシーブルー染色ゲルと、抗MBP抗体(NEB)を用いるウェスタンブロットとによって分析した。予備染色マーカー(BRL)を用いて試料を4~20% SDSゲル(ISS, Daichi, Tokyo, Japan)で電気泳動にかけ、ニトロセルロースに移し、抗MBP抗体でプローブし、アルカリホスフェート結合抗ウサギ第二抗体を製造業者(Promega)の指示通りに使用して検出した。クーマシーブルー染色ゲル及びウェスタンブロットの両方で、MIC融合タンパク質について予想された主バンドが約110 kDaに観察された。

【0179】

アミロース及びMono QカラムでのMICの大規模精製

単コロニーを用いて、100 μ g/mlのアンプシリンを加えた3 \times 10 mlのLB培地に接種し、30 で一晩インキュベートした。該培養物を用いて、100 μ g/mlのアンプシリンを加えた3 \times 1リットルのLB培地に接種し、30 でOD₆₀₀が0.5になるまでインキュベートした。次いで培養物を12 にし、1 mM IPTGで一晩誘導した。細胞をペレット化し、カラム緩衝液(10 mM トリス-HCl、pH 8.5、500 mM NaCl)に再懸濁し、超音波処理し、遠心分離し、透明培養溶解物をアミロース樹脂(NEBタンパク質融合及び精製システム)にかけた。融合タンパク質を(製造業者の指示通りに)マルトースで溶離し、SDS-PAGEゲルで分析した。アミロース樹脂溶解物を、FPLC Mono Qアニオン交換樹脂(Pharmacia)でのクロマトグラフィーで更に精製した。カラムを0.2 M NaCl、10 mM トリス-HCl、pH 8.5で洗浄し、10 mM トリス-HCl、pH 8.5中0.2~1.0 M NaClの直線NaCl勾配で溶離した。タンパク質は0.4~0.6 M NaClで溶離した。MIC及びMIPタンパク質融合生成物はアミロース樹脂及びMono Q樹脂の両方で同様に精製された。

【0180】

MBP-Deep Vent IVPS1-CBD融合体の切り出し及び連結

MICのアミロース精製試料を20 mM NaPO₄、pH 6.0、500 mM NaClに対して透析した。次いで試料を4、37、50及び65 で1時間熱処理し、その後SDS-PAGEゲルで調べた(図16)。ゲルは、4 試料中に約110 kDaのMIC前駆体が多量に存在することを示しているが、該前駆体は熱誘導後に減少する。前駆体の減少に伴い、約53 kDaの大きさの連結生成物MBP-CBD(MC)、及び約60 kDaの大きさの切り出し生成物Deep Vent IVPS1(I=I-psi)の蓄積が温度上昇に伴って観察された。ゲルは更に、約103 kDaの開裂生成物MBP-Deep Vent IVPS1(MI)及び約70 kDaのDeep Vent IVPS1-CBD(IC)と同じ大きさのバンドが存在していることを示している。

【0181】

以上、本発明を好ましい実施態様を含めて詳細に説明してきたが、これらの実施態様は当業者により、本明細書の開示に基づいて、「特許請求の範囲」に記載の本発明の思想及び範囲を逸脱することなく様々に変形され得るであろう。

【0182】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：5837塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：

配列：

【0183】

【表2】

10

20

30

40

50

GAATTCGCGA TAAAATCTAT TTCTTCCTC CATTTCCTCA TTTCAAAAAC GTAAGCATGA 60
 GCCAAACCTC TCGCCCTTTC TCTGTCCTTC CCGCTAACCC TCTTGAAAAC TCTCTCCAAA 120
 GCATTTTTTG. ATGAAAGCTC ACGCTCCTCT ATGAGGGTCA GTATATCTGC AATGAGTTCG 180
 TGAAGGGTTA TTCTGTAGAA CAACTCCATG ATTTTCGATT TGGATGGGGG TTTAAAAATT 240
 TGGCGGAACT TTTATTTAAT TTGAACTCCA GTTTATATCT GGTGGTATTT ATGATACTGG 300
 ACACTGATTA CATAACAAAA GATGGCAAGC CTATAATCCG AATTTTTAAG AAAGAGAACC 360
 GGGAGTTTAA AATAGAACTT GACCCTCATT TTCAGCCCTA TATATATGCT CTTCTCAAAG 420
 ATGACTCCGC TATTGAGGAG ATAAAGGCAA TAAAGGGCGA GAGACATGGA AAAACTGTGA 480
 GAGTGCTCGA TGCAGTGAAA GTCAGGAAAA AATTTTGGG AAGGGAAGTT GAAGTCTGGA 540
 AGCTCATTTT CGAGCATCCC CAAGACGTTT CAGCTATGCG GGGCAAATA AGGGAACATC 600
 CAGCTGTGGT TGACATTTAC GAATATGACA TACCCTTTC CAAGCGTTAT CTCATAGACA 660
 AGGGCTTGAT TCCCATGGAG GGAGACGAGG AGCTTAAGCT CCTTGCCTTT GATATTGAAA 720
 CGTTTTATCA TGAGGGAGAT GAATTTGGAA AGGGCGAGAT AATAATGATT AGTTATGCCG 780
 ATGAAGAAGA GGCCAGAGTA ATCACATGGA AAAATATCGA TTTGCCGTAT GTCGATGTG 840
 TGCCAATGA AAGAGAAATG ATAAAGCGTT TTGTCAAGT TGTTAAAGAA AAAGACCCCG 900
 ATGTGATAAT AACTTACAAT GGGGACAATT TTGATTTGCC GTATCTCATA AAACGGGCAG 960
 AAAAGCTGGG AGTTCGGCTT GTCTTAGGAA GGGACAAAGA ACATCCCGAA CCCAAGATTC 1020
 AGAGGATGGG TGATAGTTTT GCTGTGGAAA TCAAGGGTAG AATCCACTTT GATCTTTTCC 1080
 CAGTTGTGCG AAGGACGATA AACCTCCCAA CGTATACGCT TGAGGCAGTT TATGAAGCAG 1140
 TTTTAGGAAA AACCAAAAGC AAATTAGGAG CAGAGGAAAT TGCCGCTATA TGGGAAACAG 1200
 AAGAAAGCAT GAAAAAATA GCCCAGTACT CAATGGAAGA TGCTAGGGCA ACGTATGAGC 1260
 TCGGGAAGGA ATTCTTCCCC ATGGAAGCTG AGCTGGCAA GCTGATAGGT CAAAGTGTAT 1320
 GGGACGTCTC GAGATCAAGC ACCGGCAACC TCGTGGAGTG GTATCTTTTA AGGGTGGCAT 1380
 ACGCGAGGAA TGAAGTTGCA CCGAACAAAC CTGATGAGGA AGAGTATAAA CGGCGCTTAA 1440
 GAACAACTTA CCTGGGAGGA TATGTAAAAG AGCCAGAAAA AGGTTTGTGG GAAAATATCA 1500

10

20

30

【 0 1 8 4 】

【 表 3 】

TTTATTTGGA TTTCCGCAGT CTGTACCCTT CAATAATAGT TACTCACAAC GTATCCCCAG 1560
 ATACCCTTGA AAAAGAGGGC TGTAAGAATT ACGATGTTGC TCCGATAGTA GGATATAGGT 1620
 TCTGCAAGGA CTTTCCGGGC TTTATTCCCT CCATACTCGG GGACTIONAATT GCAATGAGGC 1680
 AAGATATAAA GAAGAAAATG AAATCCACAA TTGACCCGAT CGAAAAGAAA ATGCTCGATT 1740
 ATAGGCAAAG GGCTATTAAA TTGCTTGCAA ACAGCATCTT ACCCAACGAG TGGTTACCAA 1800
 TAATGAAAA TGGAGAAATA AAATTCGTGA AAATGGCGA GTTTATAAAC TCTTACATGG 1860
 AAAACAGAA GGAAAACCTT AAAACAGTAG AGAATACTGA AGTTCTCGAA GTAAACAACC 1920
 TTTTTCGATT CTCATTCAAC AAAAAATCA AAGAAAGTGA AGTCAAAAAA GTCAAAGCCC 1980
 TCATAAGACA TAAGTATAAA GGGAAAGCTT ATGAGATTCA GCTTAGCTCT GGTAGAAAA 2040
 TTAACATAAC TGCTGGCCAT AGTCTGTTA CAGTTAGAAA TGGAGAAATA AAGGAAGTTT 2100
 CTGGAGATGG GATAAAGAA GGTGACCTTA TTGTAGCACC AAAGAAAATT AACTCAATG 2160
 AAAAGGGGT AAGCATAAAC ATTCCCGAGT TAATCTCAGA TCTTCCGAG GAAGAACAG 2220
 CCGACATTGT GATGACGATT TCAGCCAAGG GCAGAAAGAA CTTCTTTAAA GGAATGCTGA 2280
 GAACTTTAAG GTGGATGTTT GGAGAAGAAA ATAGAAGGAT AAGAACATTT AATCGCTATT 2340
 TGTTCATCT CGAAAACTA GGCCTTATCA AACTACTGCC CCGCGGATAT GAAGTTACTG 2400
 ACTGGGAGAG ATTAAGAAA TATAACAAC TTTACGAGAA GCTTGCTGGA AGCGTTAAGT 2460
 ACAACGGAAA CAAGAGAGAG TATTTAGTAA TGTTCACGA GATCAAGGAT TTTATATCTT 2520
 ACTTCCCACA AAAAGAGCTC GAAGARTGA AAATGGAAC TCTCAATGGC TTTAGAACGA 2580
 ATTGTATTCT CAAAGTCGAT GAGGATTTG GGAAGCTCCT AGGTACTAT GTTAGTGAGG 2640
 GCTATGCAGG TGCACAAAA AATAAACTG GTGGTATCAG TTATTCGGTG AAGCTTTACA 2700
 ATGAGGACCC TAATGTTCTT GAGAGCATGA AAAATGTTGC AGAAAAATTC TTTGGCAAGG 2760
 TTAGAGTTGA CAGAAATTGC GTAAGTATAT CAAAGAAGAT GGCATACTTA GTTATGAAAT 2820
 GCCTCTGTGG AGCATTAGCC GAAAACAAGA GAATTCCTTC TGTTATACTC ACCTCTCCCG 2880
 AACCGGTACG GTGGTCATTT TTAGAGGCGT ATTTTACAGG CGATGGAGAT ATACATCCAT 2940
 CAAAAAGGTT TAGGCTCTCA AAAAAAGCG AGCTCCTGC AAATCAGCTT GTGTTCTTGC 3000
 TGAACTCTTT GGGAAATATCC TCTGTAAAGA TAGGCTTTGA CAGTGGGGTC TATAGAGTGT 3060
 ATATAAATGA AGACCTGCAA TTTCCACAAA CGTCTAGGGA GAAAAACACA TACTACTCTA 3120
 ACTTAATTCC CAAAGAGATC CTTAGGGACG TGTTTGAAA AGAGTTCCAA AAGAACATGA 3180
 CGTTCAAGAA ATTTAAAGAG CTTGTTGACT CTGGAAAAC TAACAGGGAG AAAGCCAAGC 3240
 TCTTGGAGTT CTCATTAAT GGAGATATTG TCCTTGACAG ACTCAAAGT GTTAAAGAAA 3300

10

20

30

【 0 1 8 5 】

【 表 4 】

40

AGGACTATGA AGGGTATGTC TATGACCTAA GCGTTGAGGA TAACGAGAAC TTTCTTGTTG 3360
 GTTTTGGTTT GCTCTATGCT CACAACAGCT ATTACGGCTA TATGGGGTAT CCTAAGGCAA 3420
 GATGGTACTC GAAGGAATGT GCTGAAAGCG TTACCGCATG GGGGAGACAC TACATAGAGA 3480
 TGACGATAAG AGAAATAGAG GAAAAGTTCG GCTTTAAGGT TCTTTATGCG GACAGTGTCT 3540
 CAGGAGAAAAG TGAGATCATA ATAAGGCAAA ACGGAAAGAT TAGATTTGTG AAAATAAAGG 3600
 ATCTTTTCTC TAAGGTGGAC TACAGCATTG GCGAAAAAGA ATACTGCATT CTCGAAGGTG 3660
 TTGAAGCACT AACTCTGGAC GATGACGGAA AGCTTGTCTG GAAGCCCCTC CCCTACGTGA 3720
 TGAGGCACAG AGCGAATAAA AGAATGTTCC GCATCTGGCT GACCAACAGC TGGTATATAG 3780
 ATGTTACTGA GGATCATTCT CTCATAGGCT ATCTAAACAC GTCAAAAACG AAAACTGCCA 3840
 AAAAAATCGG GGAAAGACTA AAGGAAGTAA AGCCTTTTGA ATTAGGCAAA GCAGTAAAT 3900
 CGCTCATATG CCCAAATGCA CCGTTAAAGG ATGAGAATAC CAAAAC TAGC GAAATAGCAG 3960
 TAAAATTCG GGAGCTCGTA GGATTGATTG TAGGAGATGG AAAGTGGGGT GGAGATTCTC 4020
 GTTGGGCAGA GTATTATCTT GGACTTTCAA CAGGCAAAGA TGCAGAAGAG ATAAAGCAAA 4080
 AACTTCTGGA ACCCCTAAAA ACTTATGGAG TAATCTCAA CTATTACCCA AAAACGAGA 4140
 AAGGGGACTT CAACATCTTG GCAAAGAGCC TTGTAAAGTT TATGAAAAGG CACTTTAAGG 4200
 ACGAAAAGG AAGACGAAAA ATTCCAGAGT TCATGTATGA GCTTCCGGT ACTTACATAG 4260
 AGGCATTTCT ACGAGGACTG TTTTCAGCTG ATGGTACTGT AACTATCAGG AAGGGAGTTC 4320
 CAGAGATCAG GCTAACAAAC ATTGATGCTG ACTTTCTAAG GGAAGTAAGG AAGCTTCTGT 4380
 GGATGTTGG AATTTCAAAT TCAATATTTG CTGAGACTAC TCCAAATCGC TACAATGGTG 4440
 TTTCTACTGG AACCTACTCA AAGCATCTAA GGATCAAAAA TAAGTGGCGT TTTGCTGAAA 4500
 GGATAGGCTT TTTAATCGAG AGAAAGCAGA AGAGACTTTT AGAACATTA AAATCAGCGA 4560
 GGGTAAAAAG GAATACCATA GATTTTGGCT TTGATCTTGT GCATGTGAAA AAAGTCGAAG 4620
 AGATACCATA CGAGGGTTAC GTTTATGACA TTGAAGTCGA AGAGACGCAT AGGTTCTTTG 4680
 CAAACAACAT CCTGGTACAC AATACTGACG GCTTTTATGC CACAATACCC GGGGAAAAGC 4740
 CTGAACTCAT TAAAAAGAAA GCCAAGGAAT TCCTAAACTA CATAAACTCC AAAGTCCAG 4800
 GTCTGCTTGA GCTTGAGTAT GAGGGCTTTT ACTTGAGAGG ATTCTTTGTT ACAAAAAAGC 4860
 GCTATGCAGT CATAGATGAA GAGGGCAGGA TAACAACAAG GGGCTTGAA GTAGTAAGGA 4920
 GAGATTGGAG TGAGATAGCT AAGGAGACTC AGGCAAAGGT TTTAGAGGCT ATACTTAAAG 4980
 AGGGAAGTGT TGAAAAAGCT GTAGAAGTTG TTAGAGATGT TGTAGAGAAA ATAGCAAAAT 5040
 ACAGGGTTCC ACTTGAAAAG CTTGTTATCC ATGAGCAGAT TACCAGGAT TAAAGGACT 5100

10

20

30

40

【 0 1 8 6 】

【 表 5 】

ACAAAGCCAT TGGCCCTCAT GTCGCGATAG CAAAAGACT TGCCGCAAGA GGGATAAAAG 5160
 TGA AACCGGG CACAATAATA AGCTATATCG TTCTCAAAGG GAGCGGAAAG ATAAGCGATA 5220
 GGGTAATTTT ACTTACAGAA TACGATCCTA GAAAACACAA GTACGATCCG GACTACTACA 5280
 TAGAAAACCA AGTTTTGCCG GCAGTACTTA GGATACTCGA AGCGTTTGGG TACAGAAAGG 5340
 AGGATTTAAG GTATCAAAGC TCAAAACAAA CCGGCTTAGA TGCATGGCTC AAGAGGTAGC 5400
 TCTGTTGCTT TTTAGTCCAA GTTCTCCGC GAGTCTCTCT ATCTCTCTTT TGTATTCTGC 5460
 TA TGTGGTTT TCATTCACATA TTAAGTAGTC CGCCAAAGCC ATAACGCTTC CAATTCCAAA 5520
 CTGAGCTCT TCCAGTCTC TGGCCTCAA TFCACTCCAT GTTTTGGAT CGTCGCTTCT 5580
 C C C T C T T C T G C T A A G C C T C T C G A A T C T T T T T C T T G G C G A A G A G T G T A C A G C T A T G A T G A T 5640
 T A T C T C T T C C T C T G G A A C G C A T C T T T A A A C G T C T G A A T T C A T C T A G A G A C C T C A C T C C 5700
 G T C G A T T A T A A C T G C C T T G T A C T T C T T T A G T A G T T C T T T T A C C T T T G G G A T C G T T A A T T T 5760
 T G C C A C G G C A T T G T C C C C A A G C T C C T G C C T A A G C T G A A T G C T C A C A C T G T T C A T A C C T T C 5820
 G G G A G T T C T T G G G A T C C 5837

10

配列番号：2

20

配列の長さ：4707塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：

ハイポセティカル：なし

アンチセンス：なし

フラグメント型：N-末端

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：363..4298

30

配列

【 0 1 8 7 】

【 表 6 】

GGATCCCTCT CTTTTTGGTA ACCCCATACG TCATCCCTC AACCAAACCT TCAGCATCGT 60
 TGCAGTGGTC AGTGTGTCTG TGGGAGATGA AGAGGACGTC GATTTTCTG GGGTCTATCT 120
 TGTATCTCCA CATTCTAACT AACGCTCCAG GCCCAGGATC AACGTAGATG TTTTGGCTCG 180
 CCTTAATGAA GAAGCCACCA GTGGCTCTTG CCTGCCGTTAT CGTGACCGAAC CTTCCACCAC 240
 CGCCACCGAG AAAAGTTATC TCTATCATCT CACACCTCCC CCATAACATC ACCTGCTCAA 300
 TTTTAAAGCG TTCTTAAAGG CTTAAATACG TGAATTTAGC GTAAATTATT GAGGGATTAA 360
 GT ATG ATA CTT GAC GCT GAC TAC ATC ACC GAG GAT GGG AAG CCG ATT 407
 Met Ile Leu Asp Ala Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Ile
 1 5 10 15

40

【 0 1 8 8 】

【 表 7 】

ATA	AGG	ATT	TTC	AAG	AAA	GAA	AAC	GGC	GAG	TTT	AAG	GTT	GAG	TAC	GAC	455	
Ile	Arg	Ile	Phe	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Glu	Tyr	Asp		
				20					25					30			
AGA	AAC	TTT	AGA	CCT	TAC	ATT	TAC	GCT	CTC	CTC	AAA	GAT	GAC	TCG	CAG	503	
Arg	Asn	Phe	Arg	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Ser	Gln		
			35					40					45				
ATT	GAT	GAG	GTT	AGG	AAG	ATA	ACC	GCC	GAG	AGG	CAT	GGG	AAG	ATA	GTG	551	
Ile	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Arg	His	Gly	Lys	Ile	Val		
		50					55					60					
AGA	ATT	ATA	GAT	GCC	GAA	AAG	GTA	AGG	AAG	AAG	TTC	CTG	GGG	AGG	CCG	599	10
Arg	Ile	Ile	Asp	Ala	Glu	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Arg	Pro		
	65					70					75						
ATT	GAG	GTA	TGG	AGG	CTG	TAC	TTT	GAA	CAC	CCT	CAG	GAC	GTT	CCC	GCA	647	
Ile	Glu	Val	Trp	Arg	Leu	Tyr	Phe	Glu	His	Pro	Gln	Asp	Val	Pro	Ala		
	80				85					90					95		
ATA	AGG	GAT	AAG	ATA	AGA	GAG	CAT	TCC	GCA	GTT	ATT	GAC	ATC	TTT	GAG	695	
Ile	Arg	Asp	Lys	Ile	Arg	Glu	His	Ser	Ala	Val	Ile	Asp	Ile	Phe	Glu		
				100					105					110			
TAC	GAC	ATT	CCG	TTC	GCG	AAG	AGG	TAC	CTA	ATA	GAC	AAA	GGC	CTA	ATT	743	
Tyr	Asp	Ile	Pro	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asp	Lys	Gly	Leu	Ile		
			115					120					125				
CCA	ATG	GAA	GGC	GAT	GAA	GAG	CTC	AAG	TTG	CTC	GCA	TTT	GAC	ATA	GAA	791	20
Pro	Met	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Leu	Ala	Phe	Asp	Ile	Glu		
		130					135					140					
ACC	CTC	TAT	CAC	GAA	GGG	GAG	GAG	TTC	GCG	AAG	GGG	CCC	ATT	ATA	ATG	839	
Thr	Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Glu	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Pro	Ile	Ile	Met		
	145					150					155						
ATA	AGC	TAT	GCT	GAT	GAG	GAA	GAA	GCC	AAA	GTC	ATA	ACG	TGG	AAA	AAG	887	
Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Glu	Glu	Glu	Ala	Lys	Val	Ile	Thr	Trp	Lys	Lys		
	160				165					170					175		
ATC	GAT	CTC	CCG	TAC	GTC	GAG	GTA	GTT	TCC	AGC	GAG	AGG	GAG	ATG	ATA	935	
Ile	Asp	Leu	Pro	Tyr	Val	Glu	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Arg	Glu	Met	Ile		
				180					185					190			
AAG	CGG	TTC	CTC	AAG	GTG	ATA	AGG	GAG	AAA	GAT	CCC	GAT	GTT	ATA	ATT	983	30
Lys	Arg	Phe	Leu	Lys	Val	Ile	Arg	Glu	Lys	Asp	Pro	Asp	Val	Ile	Ile		
			195					200					205				
ACC	TAC	AAC	GGC	GAT	TCT	TTC	GAC	CTT	CCC	TAT	CTA	GTT	AAG	AGG	GCC	1031	
Thr	Tyr	Asn	Gly	Asp	Ser	Phe	Asp	Leu	Pro	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Ala		
		210					215					220					
GAA	AAG	CTC	GGG	ATA	AAG	CTA	CCC	CTG	GGA	AGG	GAC	GGT	AGT	GAG	CCA	1079	
Glu	Lys	Leu	Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asp	Gly	Ser	Glu	Pro		
	225					230					235						
AAG	ATG	CAG	AGG	CTT	GGG	GAT	ATG	ACA	GCG	GTG	GAG	ATA	AAG	GGA	AGG	1127	
Lys	Met	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Met	Thr	Ala	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Arg		
	240				245					250					255		

【 0 1 8 9 】

【 表 8 】

ATA Ile	CAC His	TTT Phe	GAC Asp	CTC Leu 260	TAC Tyr	CAC His	GTG Val	ATT Ile	AGG Arg 265	AGA Arg	ACG Thr	ATA Ile	AAC Asn 270	CTC Leu	CCA Pro	1175	
ACA Thr	TAC Tyr	ACC Thr	CTC Leu 275	GAG Glu	GCA Ala	GTT Val	TAT Tyr	GAG Glu 280	GCA Ala	ATC Ile	TTC Phe	GGA Gly 285	AAG Lys	CCA Pro	AAG Lys	1223	
GAG Glu	AAA Lys	GTT Val 290	TAC Tyr	GCT Ala	CAC His	GAG Glu	ATA Ile 295	GCT Ala	GAG Glu	GCC Ala	TGG Trp 300	GAG Glu	ACT Thr	GGA Gly	AAG Lys	1271	
GGA Gly 305	CTG Leu	GAG Glu	AGA Arg	GTT Val	GCA Ala	AAG Lys 310	TAT Tyr	TCA Ser	ATG Met	GAG Glu	GAT Asp 315	GCA Ala	AAG Lys	GTA Val	ACG Thr	1319	10
TAC Tyr 320	GAG Glu	CTC Leu	GGT Gly	AGG Arg	GAG Glu 325	TTC Phe	TTC Phe	CCA Pro	ATG Met	GAG Glu 330	GCC Ala	CAG Gln	CTT Leu	TCA Ser	AGG Arg 335	1367	
TTA Leu	GTC Val	GGC Gly	CAG Gln	CCC Pro 340	CTG Leu	TGG Trp	GAT Asp	GTT Val 345	TCT Ser	AGG Arg	TCT Ser	TCA Ser	ACT Thr	GGC Gly 350	AAC Asn	1415	
TTG Leu	GTG Val	GAG Glu	TGG Trp 355	TAC Tyr	CTC Leu	CTC Leu	AGG Arg 360	AAG Lys	GCC Ala	TAC Tyr	GAG Glu	AGG Arg	AAT Asn 365	GAA Glu	TTG Leu	1463	
GCT Ala	CCA Pro	AAC Asn 370	AAG Lys	CCG Pro	GAT Asp	GAG Glu	AGG Arg 375	GAG Glu	TAC Tyr	GAG Glu	AGA Arg	AGG Arg 380	CTA Leu	AGG Arg	GAG Glu	1511	20
AGC Ser	TAC Tyr 385	GCT Ala	GGG Gly	GGA Gly	TAC Tyr	GTT Val 390	AAG Lys	GAG Glu	CCG Pro	GAG Glu	AAA Lys 395	GGG Gly	CTC Leu	TGG Trp	GAG Glu	1559	
GGG Gly 400	TTA Leu	GTT Val	TCC Ser	CTA Leu	GAT Asp 405	TTC Phe	AGG Arg	AGC Ser	CTG Leu	TAC Tyr 410	CCC Pro	TCG Ser	ATA Ile	ATA Ile	ATC Ile 415	1607	
ACC Thr	CAT His	AAC Asn	GTC Val	TCA Ser 420	CCG Pro	GAT Asp	ACG Thr	CTG Leu	AAC Asn 425	AGG Arg	GAA Glu	GGG Gly	TGT Cys	AGG Arg 430	GAA Glu	1655	
TAC Tyr	GAT Asp	GTC Val	GCC Ala 435	CCA Pro	GAG Glu	GTT Val	GGG Gly 440	CAC His	AAG Lys	TTC Phe	TGC Cys	AAG Lys	GAC Asp 445	TTC Phe	CCG Pro	1703	30
GGG Gly	TTT Phe	ATC Ile 450	CCC Pro	AGC Ser	CTG Leu	CTC Leu	AAG Lys 455	AGG Arg	TTA Leu	TTG Leu	GAT Asp 460	GAA Glu	AGG Arg	CAA Gln	GAA Glu	1751	
ATA Ile	AAA Lys 465	AGG Arg	AAG Lys	ATG Met	AAA Lys 470	GCT Ala	TCT Ser	AAA Lys	GAC Asp	CCA Pro	ATC Ile 475	GAG Glu	AAG Lys	AAG Lys	ATG Met	1799	
CTT Leu 480	GAT Asp	TAC Tyr	AGG Arg	CAA Gln	CGG Arg 485	GCA Ala	ATC Ile	AAA Lys	ATC Ile	CTG Leu 490	GCA Ala	AAC Asn	AGC Ser	ATT Ile	TTA Leu 495	1847	

【 0 1 9 0 】

【 表 9 】

CCG Pro	GAA Glu	GAA Glu	TGG Trp	GTT Val	CCA Pro	CTA Leu	ATT Ile	AAA Lys	AAC Asn	GGT Gly	AAA Lys	GTT Val	AAG Lys	ATA Ile	TTC Phe	1895	
				500				505						510			
CGC Arg	ATT Ile	GGG Gly	GAC Asp	TTC Phe	GTT Val	GAT Asp	GGA Gly	CTT Leu	ATG Met	AAG Lys	GCG Ala	AAC Asn	CAA Gln	GGA Gly	AAA Lys	1943	
			515					520						525			
GTG Val	AAG Lys	AAA Lys	ACG Thr	GGG Gly	GAT Asp	ACA Thr	GAA Gly	GTT Val	TTA Leu	GAA Glu	GTT Val	GCA Ala	GGA Gly	ATT Ile	CAT His	1991	
			530					535						540			
GCG Ala	TTT Phe	TCC Ser	TTT Phe	GAC Asp	AGG Arg	AAG Arg	TCC Ser	AAG Lys	AAG Lys	GCC Ala	CGT Arg	GTA Val	ATG Met	GCA Ala	GTG Val	2039	10
			545			550					555						
AAA Lys	GCC Ala	GTG Val	ATA Ile	AGA Arg	CAC His	CGT Arg	TAT Tyr	TCC Ser	GGA Gly	AAT Asn	GTT Val	TAT Tyr	AGA Arg	ATA Ile	GTC Val	2087	
			560		565					570					575		
TTA Leu	AAC Asn	TCT Ser	GGT Gly	AGA Arg	AAA Lys	ATA Ile	ACA Thr	ATA Ile	ACA Thr	GAA Glu	GGG Gly	CAT His	AGC Ser	CTA Leu	TTT Phe	2135	
				580					585					590			
GTC Val	TAT Tyr	AGG Arg	AAC Asn	GGG Gly	GAT Asp	CTC Leu	GTT Val	GAG Glu	GCA Ala	ACT Thr	GGG Gly	GAG Glu	GAT Asp	GTC Val	AAA Lys	2183	
				595				600						605			
ATT Ile	GGG Gly	GAT Asp	CTT Leu	CTT Leu	GCA Ala	GTT Val	CCA Pro	AGA Arg	TCA Ser	GTA Val	AAC Asn	CTA Leu	CCA Pro	GAG Glu	AAA Lys	2231	20
			610				615						620				
AGG Arg	GAA Glu	CGC Arg	TTG Leu	AAT Asn	ATT Ile	GTT Val	GAA Glu	CTT Leu	CTT Leu	CTG Leu	AAT Asn	CTC Leu	TCA Ser	CCG Pro	GAA Glu	2279	
			625			630					635						
GAG Glu	ACA Thr	GAA Glu	GAT Asp	ATA Ile	ATA Ile	CTT Leu	ACG Thr	ATT Ile	CCA Pro	GTT Val	AAA Lys	GGC Gly	AGA Arg	AAG Lys	AAC Asn	2327	
					645					650					655		
TTC Phe	TTC Phe	AAG Lys	GGA Gly	ATG Met	TTG Leu	AGA Arg	ACA Thr	TTA Leu	CGT Arg	TGG Trp	ATT Ile	TTT Phe	GGT Gly	GAG Glu	GAA Glu	2375	
				660					665					670			
AAG Lys	AGA Arg	GTA Val	AGG Arg	ACA Thr	GCG Ala	AGC Ser	CGC Arg	TAT Tyr	CTA Leu	AGA Arg	CAC His	CTT Leu	GAA Glu	AAT Asn	CTC Leu	2423	30
				675				680					685				
GGA Gly	TAC Tyr	ATA Ile	AGG Arg	TTG Leu	AGG Arg	AAA Lys	ATT Ile	GGA Gly	TAC Tyr	GAC Asp	ATC Ile	ATT Ile	GAT Asp	AAG Lys	GAG Glu	2471	
			690				695					700					
GGG Gly	CTT Leu	GAG Glu	AAA Lys	TAT Tyr	AGA Arg	ACG Thr	TTG Leu	TAC Tyr	GAG Glu	AAA Lys	CTT Leu	GTT Val	GAT Asp	GTT Val	GTC Val	2519	
			705			710					715						
CGC Arg	TAT Tyr	AAT Asn	GGC Gly	AAC Asn	AAG Lys	AGA Arg	GAG Glu	TAT Tyr	TTA Leu	GTT Val	GAA Glu	TTT Phe	AAT Asn	GCT Ala	GTC Val	2567	
					725					730					735		

【 0 1 9 1 】

【 表 1 0 】

CGG Arg	GAC Asp	GTT Val	ATC Ile	TCA Ser 740	CTA Leu	ATG Met	CCA Pro	GAG Glu	GAA Glu 745	GAA Glu	CTG Leu	AAG Lys	GAA Glu	TGG Trp 750	CGT Arg	2615	
ATT Ile	GGA Gly	ACT Thr	AGA Arg 755	AAT Asn	GGA Gly	TTC Phe	AGA Arg	ATG Met 760	GGT Gly	ACG Thr	TTC Phe	GTA Val	GAT Asp 765	ATT Ile	GAT Asp	2663	
GAA Glu	GAT Asp	TTT Phe 770	GCC Ala	AAG Lys	CTT Leu	CTT Leu	GGC Tyr 775	TAC Tyr	TAT Tyr	GTG Val	AGC Ser	GAG Glu	GGA Gly	AGT Ser	GCG Ala	2711	
AGG Arg	AAG Lys 785	TGG Trp	AAG Lys	AAT Asn	CAA Gln	ACT Thr 790	GGA Gly	GGT Gly	TGG Trp	AGT Ser	TAC Thr 795	ACT Thr	GTG Val	AGA Arg	TTG Leu	2759	10
TAC Tyr 800	AAC Asn	GAG Glu	AAC Asn	GAT Asp	GAA Glu 805	GTT Val	CTT Leu	GAC Asp	GAC Asp	ATG Met 810	GAA Glu	CAC His	TTA Leu	GCC Ala	AAG Lys 815	2807	
AAG Lys	TTT Phe	TTT Phe	GGG Gly	AAA Lys 820	GTC Val	AAA Lys	CGT Arg	GGA Gly	AAG Lys 825	AAC Asn	TAT Tyr	GTT Val	GAG Glu	ATA Ile 830	CCA Pro	2855	
AAG Lys	AAA Lys	ATG Met	GCT Ala	TAT Tyr 835	ATC Ile	ATC Ile	TTT Phe	GAG Glu 840	AGC Ser	CTT Leu	TGT Cys	GGG Gly	ACT Thr 845	TTG Leu	GCA Ala	2903	
GAA Glu	AAC Asn	AAA Lys 850	AGG Arg	GTT Val	CCT Pro	GAG Glu	GTA Val 855	ATC Ile	TTT Phe	ACC Thr	TCA Ser	TCA Ser	AAG Lys	GGC Gly	GTT Val	2951	20
AGA Arg	TGG Trp 865	GCC Ala	TTC Phe	CTT Leu	GAG Glu	GGT Gly 870	TAT Tyr	TTC Phe	ATC Ile	GGC Gly	GAT Asp 875	GGC Gly	GAT Asp	GTT Val	CAC His	2999	
CCA Pro 880	AGC Ser	AAG Lys	AGG Arg	GTT Val	CGC Arg 885	CTA Leu	TCA Ser	ACG Thr	AAG Lys	AGC Ser 890	GAG Glu	CTT Leu	TTA Leu	GTA Val	AAT Asn 895	3047	
GGC Gly	CTT Leu	GTT Val	CTC Leu	CTA Leu 900	CTT Leu	AAC Asn	TCC Ser	CTT Leu	GGA Gly 905	GTA Val	TCT Ser	GCC Ala	ATT Ile	AAG Lys	CTT Leu 910	3095	
GGA Gly	TAC Tyr	GAT Asp	AGC Ser 915	GGA Gly	GTC Val	TAC Tyr	AGG Arg	GTT Val 920	TAT Tyr	GTA Val	AAC Asn	GAG Glu	GAA Glu 925	CTT Leu	AAG Lys	3143	30
TTT Phe	ACG Thr	GAA Glu 930	TAC Tyr	AGA Arg	AAG Lys	AAA Lys	AAG Lys 935	AAT Asn	GTA Val	TAT Tyr	CAC His	TCT Ser 940	CAC His	ATT Ile	GTT Val	3191	
CCA Pro	AAG Lys 945	GAT Asp	ATT Ile	CTC Leu	AAA Lys	GAA Glu 950	ACT Thr	TTT Phe	GGT Gly	AAG Lys	GTC Val 955	TTC Phe	CAG Gln	AAA Lys	AAT Asn	3239	
ATA Ile 960	AGT Ser	TAC Tyr	AAG Lys	AAA Lys	TTT Phe 965	AGA Arg	GAG Glu	CTT Leu	GTA Val	GAA Glu 970	AAT Asn	GGA Gly	AAA Lys	CTT Leu	GAC Asp 975	3287	

【 0 1 9 2 】

【 表 1 1 】

AGG	GAG	AAA	GCC	AAA	CGC	ATT	GAG	TGG	TTA	CTT	AAC	GGA	GAT	ATA	GTC	3335	
Arg	Glu	Lys	Ala	Lys	Arg	Ile	Glu	Trp	Leu	Leu	Asn	Gly	Asp	Ile	Val		
				980					985					990			
CTA	GAT	AGA	GTC	GTA	GAG	ATT	AAG	AGA	GAG	TAC	TAT	GAT	GGT	TAC	GTT	3383	
Leu	Asp	Arg	Val	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Val		
			995					1000					1005				
TAC	GAT	CTA	AGT	GTC	GAT	GAA	GAT	GAG	AAT	TTC	CTT	GCT	GGC	TTT	GGA	3431	
Tyr	Asp	Leu	Ser	Val	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Phe	Gly		
		1010					1015					1020					
TTC	CTC	TAT	GCA	CAT	AAT	AGC	TAT	TAT	GGG	TAT	TAT	GGG	TAC	GCA	AAA	3479	10
Phe	Leu	Tyr	Ala	His	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Lys		
	1025					1030					1035						
GCC	CGT	TGG	TAC	TGT	AAG	GAG	TGC	GCA	GAG	AGC	GTT	ACG	GCC	TGG	GGG	3527	
Ala	Arg	Trp	Tyr	Cys	Lys	Glu	Cys	Ala	Glu	Ser	Val	Thr	Ala	Trp	Gly		
	1040				1045					1050					1055		
AGG	GAA	TAT	ATA	GAG	TTC	GTA	AGG	AAG	GAA	CTG	GAG	GAA	AAG	TTC	GGG	3575	
Arg	Glu	Tyr	Ile	Glu	Phe	Val	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Phe	Gly		
				1060					1065					1070			
TTC	AAA	GTC	TTA	TAC	ATA	GAC	ACA	GAT	GGA	CTC	TAC	GCC	ACA	ATT	CCT	3623	
Phe	Lys	Val	Leu	Tyr	Ile	Asp	Thr	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Pro		
			1075					1080					1085				
GGG	GCA	AAA	CCC	GAG	GAG	ATA	AAG	AAG	AAA	GCC	CTA	GAG	TTC	GTA	GAT	3671	20
Gly	Ala	Lys	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Lys	Ala	Leu	Glu	Phe	Val	Asp		
			1090				1095					1100					
TAT	ATA	AAC	GCC	AAG	CTC	CCA	GGG	CTG	TTG	GAG	CTT	GAG	TAC	GAG	GGC	3719	
Tyr	Ile	Asn	Ala	Lys	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Glu	Leu	Glu	Tyr	Glu	Gly		
	1105					1110					1115						
TTC	TAC	GTG	AGA	GGG	TTC	TTC	GTG	ACG	AAG	AAG	AAG	TAT	GCG	TTG	ATA	3767	
Phe	Tyr	Val	Arg	Gly	Phe	Phe	Val	Thr	Lys	Lys	Lys	Tyr	Ala	Leu	Ile		
	1120				1125					1130					1135		
GAT	GAG	GAA	GGG	AAG	ATA	ATC	ACT	AGG	GGG	CTT	GAA	ATA	GTC	AGG	AGG	3815	
Asp	Glu	Glu	Gly	Lys	Ile	Ile	Thr	Arg	Gly	Leu	Glu	Ile	Val	Arg	Arg		
				1140					1145					1150			
GAC	TGG	AGC	GAA	ATA	GCC	AAA	GAA	ACC	CAA	GCA	AAA	GTC	CTA	GAG	GCT	3863	30
Asp	Trp	Ser	Glu	Ile	Ala	Lys	Glu	Thr	Gln	Ala	Lys	Val	Leu	Glu	Ala		
			1155					1160					1165				
ATC	CTA	AAG	CAT	GGC	AAC	GTT	GAG	GAG	GCA	GTA	AAG	ATA	GTT	AAG	GAG	3911	
Ile	Leu	Lys	His	Gly	Asn	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Lys	Glu		
			1170			1175						1180					
GTA	ACT	GAA	AAG	CTG	AGC	AAG	TAC	GAA	ATA	CCT	CCA	GAA	AAG	CTA	GTT	3959	
Val	Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Lys	Tyr	Glu	Ile	Pro	Pro	Glu	Lys	Leu	Val		
			1185			1190					1195						
ATT	TAC	GAG	CAG	ATC	ACG	AGG	CCC	CTT	CAC	GAG	TAC	AAG	GCT	ATA	GGT	4007	
Ile	Tyr	Glu	Gln	Ile	Thr	Arg	Pro	Leu	His	Glu	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gly		
	1200				1205					1210					1215		

【 0 1 9 3 】

【 表 1 2 】

CCG CAC GTT GCC GTG GCA AAA AGG TTA GCC GCT AGA GGA GTA AAG GTG Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Val Lys Val 1220 1225 1230	4055	
AGG CCT GGC ATG GTG ATA GGG TAC ATA GTG CTG AGG GGA GAC GGG CCA Arg Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val Leu Arg Gly Asp Gly Pro 1235 1240 1245	4103	
ATA AGC AAG AGG GCT ATC CTT GCA GAG GAG TTC GAT CTC AGG AAG CAT Ile Ser Lys Arg Ala Ile Leu Ala Glu Phe Asp Leu Arg Lys His 1250 1255 1260	4151	
AAG TAT GAC GCT GAG TAT TAC ATA GAA AAT CAG GTT TTA CCT GCC GTT Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val 1265 1270 1275	4199	10
CTT AGA ATA TTA GAG GCC TTT GGG TAC AGG AAA GAA GAC CTC AGG TGG Leu Arg Ile Leu Glu Ala Phe Gly Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Trp 1280 1285 1290 1295	4247	
CAG AAG ACT AAA CAG ACA GGT CTT ACG GCA TGG CTT AAC ATC AAG AAG Gln Lys Thr Lys Gln Thr Gly Leu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Lys Lys 1300 1305 1310	4295	
AAG TAATGTTTAT GTACTCGTAA TGCGAGTATT AAGTGGGTGA TGAGATGGCA Lys	4348	
GTATTGAGCA TAAGGATTCC GGATGATCTA AAAGAGAAGA TGAAGGAGTT TGACATAAAC	4408	
TGGAGTGAGG AGATCAGGAA GTTCATAAAA GAGAGGATAG AGTATGAGGA AAGGAAGACA	4468	20
ACCCTTGAGA AAGCTCTAGA ACTTCTAAAG AATACTCCAG GATCAGTCGA GAGAGGATTT	4528	
TCAGCAAGGG CAGTGAGGGA GGATCGTGAT AGTCATTGAT GCATCAATCC TAGCTAAAAAT	4588	
AATTCTAAAA GAAGAGGGCT GGGAACAGAT AACTCTTACA CCGAGCACGA TAACTTTGGA	4648	
CTATGCTTTT GTTGAATGTA CAAACGCAAT ATGGAAGGCT GTCAGGCGGA ACAGGATCC	4707	

配列番号 : 3

配列の長さ : 23塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖

配列

AGTGTCTCCG GAGAAAGTGA GAT 23

配列番号 : 4

配列の長さ : 22塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖

配列

AGTATTGTGT ACCAGGATGT TG 22 40

配列番号 : 5

配列の長さ : 24塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖

配列

AGCATTTTAC CGGAAGAATG GGTT 24

配列番号 : 6

配列の長さ : 25塩基対

50

配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 GCTATTATGT GCATAGAGGA ATCCA 25
 配列番号：7
 配列の長さ：24塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖 10
 配列
 AGGGTCGACA GATTTGATCC AGCG 24
 配列番号：8
 配列の長さ：20塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 GAGAACTTTG TTCGTACCTG 20
 配列番号：9 20
 配列の長さ：21塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 GGTATTATTT CTTCTAAAGC A 21
 配列番号：10
 配列の長さ：20塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖 30
 トポロジー：直鎖
 配列
 GTTGTTTGTT GGTTTTACCA 20
 配列番号：11
 配列の長さ：20塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 ATGGCAAATG CTGTATGGAT 20 40
 配列番号：12
 配列の長さ：23塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 AGTGTCTCCG GAGAAAGTGA GAT 23
 配列番号：13
 配列の長さ：26塩基対
 配列の型：核酸 50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

ATTGTGTACT AGTATGTTGT TTGCAA 26

配列番号：14

配列の長さ：37塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GCCTCCGGAG ACACTATCGC CAAAATCACC GCCGTAA 37 10

配列番号：15

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GCCACTAGTA CACAATACGC CGAACGATCG CCAGTTCT 38

配列番号：16

配列の長さ：26塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CCTTCTAGAC CGGTGCAGTA TGAAGG 26

配列番号：17

配列の長さ：36塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GCCGTCGACC CTAGTGTCTC AGGAGAAAGT GAGATC 36 30

配列番号：18

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GCCTCTAGAA TTGTGTACCA GGATGTTGTT TGC 33

配列番号：19

配列の長さ：23塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GCAAAGAACC GGTGCGTCTC TTC 23

配列番号：20

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50

トポロジー：直鎖

配列

AGCAACAGAG TTACCTCTTG 20

配列番号：21

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CAGTTTCCAG CTCCTACAAT GAGACCTACG AGC 33 10

配列番号：22

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GTAGTGTCGA CCCCATGCGG 20

配列番号：23

配列の長さ：28塩基対

配列の型：核酸 20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CGTTTTGCCT GATTATTATC TCACTTTC 28

配列番号：24

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GTCCACCTTC GAAAAAAGAT CC 22 30

配列番号：25

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CCGCATAAAG GACCTTAAAG C 21

配列番号：26

配列の長さ：23塩基対 40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GAGGAAGAGA TCATCATCAT AGC 23

配列番号：27

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖 50

配列

GTCCTTCGTG CGGACAGTGT CTCAGGAGAA AGTGAGATAA 40

配列番号：28

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GTCCTTTATG CGGACTAGGT CTCAGGGAGAA AGTGAGATAA 40

配列番号：29

配列の長さ：61塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CCGGTTCTTT GCAAACAACA TCCTGGTACA CAATTAAGAC GGCTTTTATG CCACAATACC
C 61

配列番号：30

配列の長さ：22アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列

【 0 1 9 4 】

【 表 1 3 】

Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Ile Leu Pro Glu Glu Trp Val Pro Leu
1 5 10 15

Ile Lys Asn Gly Lys Val
20

30

配列番号：31

配列の長さ：22アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列

【 0 1 9 5 】

【 表 1 4 】

Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Ile Leu Pro Asn Glu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Ile Ile Glu Asn Gly Glu Ile
20

40

配列番号：32

配列の長さ：22アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

50

トポロジー：不明

配列

【 0 1 9 6 】

【 表 1 5 】

```

Lys Val Leu Tyr Ala Asp Ser Val Ser Gly Glu Ser Glu Ile Ile Ile
1          5          10          15
Arg Gln Asn Gly Lys Ile
                20

```

10

配列番号：33

配列の長さ：22アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列

【 0 1 9 7 】

【 表 1 6 】

```

Ala Ile Leu Tyr Val Gly Cys Gly Ala Lys Gly Thr Asn Val Leu Met
1          5          10          15
Ala Asp Gly Ser Ile Glu
                20

```

20

配列番号：34

配列の長さ：22アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列

【 0 1 9 8 】

【 表 1 7 】

```

Lys Val Val Lys Asn Lys Cys Leu Ala Glu Gly Thr Arg Ile Arg Asp
1          5          10          15
Pro Val Thr Gly Thr Thr
                20

```

30

配列番号：35

配列の長さ：22アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列

【 0 1 9 9 】

【 表 1 8 】

40

Glu Asx Gly Lys Ala Gly Phe Gly Phe Leu Tyr Ala His Asn Ser Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala
 20

配列番号 : 36

配列の長さ : 22アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 不明

トポロジー : 不明

配列

【 0 2 0 0 】

【 表 1 9 】

10

Glu Asn Phe Leu Val Gly Phe Gly Leu Leu Tyr Ala His Asn Ser Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Gly Tyr Met Gly Tyr Pro
 20

配列番号 : 37

配列の長さ : 22アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 不明

トポロジー : 不明

配列

【 0 2 0 1 】

【 表 2 0 】

20

Glu Thr His Arg Phe Phe Ala Asn Asn Ile Leu Val His Asn Thr Asp
 1 5 10 15
 Gly Phe Tyr Ala Thr Ile Pro
 20

配列番号 : 38

配列の長さ : 23アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 不明

トポロジー : 不明

配列

【 0 2 0 2 】

【 表 2 1 】

30

Asp His Gln Phe Leu Leu Ala Asn Gln Val Val Val His Asn Cys Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Asn Glu Met Ala
 20

40

50

配列の長さ：4アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の特徴

特徴を表す記号：ペプチド

存在位置：1

他の情報：/ノート = "位置1の X aa = (Ala/Val)"

配列の特徴

特徴を表す記号：ペプチド

10

存在位置：4

他の情報：/ノート = "位置4の X aa = (Ser/Cys/Thr)"

配列

【 0 2 0 4 】

【 表 2 3 】

Xaa His Asn Xaa
1

4

20

配列番号：46

配列の長さ：29塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GATCCCTCTA TGCACATAAT TCAGGCCTC

29

配列番号：47

配列の長さ：29塩基対

配列の型：核酸

30

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

AATTGAGGCC TGAATTATGT GCATAGAGG

29

配列番号：48

配列の長さ：35塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GCTCGAGGCT AGCATTITAC CGGAAGAATG GGTAC

35

配列番号：49

配列の長さ：35塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CCATTCTTCC GGTAATATGC TAGCCTCGAG CGTAC

35

配列番号：50

配列の長さ：25塩基対

50

配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 GATCCCTCTA TAAGCATAAT TCAGG 25
 配列番号：51
 配列の長さ：21塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖 10
 配列
 CCTGAATTAT GCTTATAGAG G 21
 配列番号：52
 配列の長さ：24塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 GATCCCTCTA TGCACTGAAT TCAGG 24
 配列番号：53 20
 配列の長さ：21塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 CCTGAATTCA GTGCATAGAG G 21
 配列番号：54
 配列の長さ：32塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖 30
 トポロジー：直鎖
 配列
 GTCAGGCCTC TCAGACAGTA CAGCTCGTAC AT 32
 配列番号：55
 配列の長さ：6塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 AGGCCT 6 40
 配列番号：56
 配列の長さ：35塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖
 配列
 CCCCTGCAGT TAAAAGTAAT TGCTTTCCAA ATAAG 35
 配列番号：57
 配列の長さ：6塩基対
 配列の型：核酸 50

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖
配列
CTGCAG

6

【図面の簡単な説明】

【図1】目的のタンパク質スプライス部位のアミノ酸配列（配列番号:30，配列番号:31，配列番号:32，配列番号:33，配列番号:34，配列番号:36，配列番号:37，配列番号:38及び配列番号:39）を示す図である。アミノ末端(上)及びカルボキシ末端(下)スプライス部位は矢印で示されたスプライス部位で示され、保存された類似のアミノ酸はボックスで示されている。

10

【図2】 β -ガラクトシダーゼ遺伝子のEcoRV部位へのIVPSの挿入を示す図である。Deep Vent IVPS 1 (CIVPS 3)またはVent IVPS 2 (CIVPS 2)のいずれかのPCR産物を、EcoRV消化pAH 05のAspと β -ガラクトシダーゼのIle残基との間に連結して、改質 β -ガラクトシダーゼ産物を産生した。

【図3】改質 β -ガラクトシダーゼのスプライシングにより活性 β -ガラクトシダーゼが産生することを示すグラフである。42に於ける表示IVPS- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現する宿主由来の粗な抽出物のインキュベーションにより、経時的に酵素活性が増加するが、宿主(RR1)のみまたは未改質 β -ガラクトシダーゼ構築物(pAH05)との42に於けるインキュベーションでは、酵素活性は増加しないことを示す。

【図4】温度制御したタンパク質スプライシング実験結果を示すウエスタンブロットを示す。CIVPS 2及びCIVPS 3を β -ガラクトシダーゼのEcoRVにクローン化した。CIVPSタンパク質(各々、I-TliI及びI-PspI)または β -ガラクトシダーゼに対する血清を用いる細胞抽出物のウエスタンブロット実験から、改質 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質(レーン1、4、7、10)を検出する。42(レーン2、5、8、11)または50(レーン12)に於ける抽出物の処理(6時間)から、遊離CIVPSタンパク質及び未改質 β -ガラクトシダーゼがスプライシング及び産生する(残留セリンまたはトレオニン残基を除く。実施例2&3参照)。pAH05由来の未改質 β -ガラクトシダーゼはレーン6である。レーン3&9は、サイズマーカーを含む。

20

【図5】 β -アガラーゼに対する血清を用いる細胞抽出物のウエスタンブロット実験により、改質 β -アガラーゼ融合タンパク質の検出を示す図である。

30

レーン1&4：サイズマーカー；
レーン2&5： β -アガラーゼ標準；
レーン3：CIVPS 2- β -アガラーゼ融合物；
レーン6：CIVPS 3- β -アガラーゼ融合物。

【図6】サイレント突然変異によるIVPS内での新しい制限部位(BspEI及びSpeI)の作製によるIVPS 2 (CIVPS 2)の β -ガラクトシダーゼ遺伝子への挿入を示す図である。

【図7】ターゲット遺伝子内のサイレント突然変異による新しい制限部位(XbaI及びSalI)の作製による β -ガラクトシダーゼ遺伝子へのDeep Vent IVPS 1 (CIVPS 3)またはVent IVPS 2 (CIVPS 2)のいずれかの挿入を示す図である。

【図8】pANG5のプラスミドマップを示す図である。

40

【図9】CIVPS 2の上流スプライシング部位に於ける化学的ブロック化セリンのサブレッサ-tRNA-媒介取り込みを示すSDS-PAGEのオートラジオグラムを示す図である。

【図10】化学的ブロック化前駆体タンパク質の可視光照射により開始したCIVPS 2のスプライシング反応を示すSDS-PAGEのオートラジオグラムを示す図である。

【図11】温度制御したタンパク質スプライシング及び切断を示すゲルを示す図である。Deep Vent IVPS 1 (CIVPS 3)カセットを β -ガラクトシダーゼのEcoRV部位にクローン化した。ウエスタンブロット分析を使用して、pDV7(CIVPS 3カセット、レーン1-3)、pDVC302(CIVPS 3/Cysカセット、レーン4-6)、pDVT321(CIVPS 3/Thrカセット、レーン7-9)及びpDVS712(CIVPS 3/Serカセット、レーン10-12)の細胞抽出物を試験した。CIVPS 3タンパク質(I-PspI)(NEB)に対する抗体で、融合タンパク質並びに、遊離CIVPS 3、N-EPS-CIVPS 3及び

50

CIVPS3-C-EPS(スプライス部位の一つでの切断由来)の切断産生物を検出する。未処理抽出物は、レーン1、4、7及び10である。42(レーン2、5、8及び11)または65(レーン3、6、9及び12)に於ける抽出物の処理(2時間)により、種々の効率でスプライシング及び/または切断活性が増加した。

【図12】温度制御したタンパク質スプライシング及び切断を示すウエスタンブロットを示す図である。I-PspI及び β -ガラクトシダーゼ(C-EPSドメイン)(Promega)に対する抗体を使用するウエスタンブロット分析を使用して、pDVC302(レーン1-3)、pDVT321(レーン4-6)及びpDVS712(レーン7-9)の融合構築物を試験した。42(レーン2、5及び8)または65(レーン3、6及び9)での抽出物の処理(2時間)により、スプライシング(pDVS712)または切断した。pDVS712抽出物に於けるタンパク質スプライシングにより、遊離CIVPS3タンパク質、I-PspI及び未改質 β -ガラクトシダーゼ(残留セリンを除く)が産生した。レーン1は、サイズマーカーを含む。

【図13】クーマシーブルー染色及びイムノブロットにより調べたアミロース及びMonoQカラム上のMIP前駆体の精製を示す図である。部分AとBとの間の図は、分枝状分子MIP*を含む各バンドの提案構物を示す。黒塗りボックスはMBPドメインを示し、白抜きボックスはIVPSドメインを、灰色ボックスはパラミオシン Salドメインを示す。プラス(+)は、サンプルが37°Cで120分熱処理したことを、マイナス(-)はサンプルを熱処理しなかったことを示す。

部分A：クーマシーブルー染色ゲル。全体：MIP培養物由来の粗な上清。F.T.：アミロース樹脂を素通り。アミロース溶離液(-)：アミロース樹脂で精製したMIP調製物。アミロース溶離液(+):レーン4のアミロース溶離液を37°Cで120分処理して、スプライシングを誘導した。MonoQ：MonoQ精製サンプル。MonoQ上でのクロマトグラフィー後、MBP-CIVPS3(MI)の回収率は多様であるが、通常低い。略号は以下の通りである。MIP*：見かけの分子量180kDaの分枝状分子(molecular mass branched molecule)；MIP：132kDa前駆体；単一スプライス部位切断産生物(MI, MBP-CIVPS3；IP, CIVPS3-パラミオシン Sal；M, MBP)；及びスプライス化産生物(MP, MBP-パラミオシン Sal及びI, CIVPS3=PI-PspI)。

部分B：イムノブロット。部分A由来のMonoQサンプルを上記の如く熱処理し、三重に電気泳動させた。MIP-関連タンパク質は、抗-MBP血清、抗-パラミオシン血清及び抗-PI-PspI(抗-CIVPS3)血清との免疫反応により同定した。

【図14】MIP21融合物中の置換可能なスプライス部位カセットを示す図である。pMIP21は、各スプライス部位とフランキングする2個のユニークな制限部位を含む。スプライス部位は矢印で示されている。スプライス部位の周囲のアミノ酸残基が示されている。スプライス部位は、アミノ末端XhoI-KpnIカセットまたはカルボキシ末端BamHI-StuIカセットのいずれかを別のDNAカセットと置き換えることにより変更し得る。

【図15】改質MIP融合物由来の単一スプライス部位での熱誘導可能な切断を示すゲル電気泳動図を示す。融合タンパク質は、アミロース樹脂カラムにより精製した。

図15のAは、MIP23融合物由来のC-末端スプライス部位での切断を示す図である。精製融合タンパク質サンプルは、4、37、50または65°Cで1時間インキュベートした。産生物を4/20% SDS-PAGE、次いでクーマシーブルー染色で分析した。MIP23融合タンパク質(MIP)由来のC-末端スプライス部位の切断から、MBP-CIVPS(MI)及びパラミオシン Sal(PI)が産生した。

図15のBは、MIP28融合物由来のN-末端スプライス部位での切断を示す図である。精製タンパク質サンプルは、4、42、50または65°Cで1時間インキュベートした。産生物を4/20% SDS-PAGE、次いでクーマシーブルー染色で分析した。MIP28融合タンパク質(MIP)由来のN-末端スプライス部位の切断から、MBP(M)及びCIVPS-パラミオシン Sal(IP)が産生した。サイズ標準(キロダルトン)を左側に示した。

【図16】MIC融合物の熱誘導可能な切断を示すゲル電気泳動図を示す。精製融合タンパク質サンプルは、4、37、50または65°Cで1時間インキュベートした。産生物を4/20% SDS-PAGE、次いでクーマシーブルー染色で分析した。MIC融合タンパク質(MIC)のイ

10

20

30

40

50

ンキュベーションから、連結産物、MBP-CBD(MC)及び切除産物、Deep-Vent IVPS 1 (I=I-PspI)が産生した。切断産物、MBP-Deep-Vent IVPS 1 (MI)及びDeep-Vent IVPS 1 -CBD(IC)は、すべてのサンプル中に存在し、この熱処理では変化しない。

【 図 1 】

スプライズ化タンパク質におけるスプライズ部位類似性

I. IVPSの上流または5' 末端におけるスプライズ部位類似性

	5' EPS	5' IVPS
<i>Pyrococcus</i> sp. IVPS1:	I K I L A N S	I L P E E W V P L I K N G K V
<i>T. litoralis</i> IVPS1:	I K L L A N S	I L P N E W L P I I E N G E I
<i>T. litoralis</i> IVPS2:	K V L Y A D S	V S G E S E I I R Q N G K I
Yeast TFP1:	A I L Y V G C	F A K G T N V L M A D G S I E
<i>M. tuberculosis</i> recA:	K V V K N K C	L A E G T R I R D P V T G T

II. IVPSの下流または3' 末梢におけるスプライズ部位類似性

	3' IVPS	3' EPS
<i>Pyrococcus</i> sp. IVPS1:	E B G K A G F G L Y A H N	S Y Y G Y G Y G Y A
<i>T. litoralis</i> IVPS1:	E N F L V G F G L L Y A H N	S Y Y G Y M G Y P
<i>T. litoralis</i> IVPS2:	E T H R F F A N N I L V H N	T D G F Y A T I P
Yeast TFP1:	D H Q F L L A N Q V V V H N	C G E R G N E M A
<i>M. tuberculosis</i> recA:	E L H T L V A E G V V V H N	C S S P P F K Q A E

FIG. 1

【 図 2 】

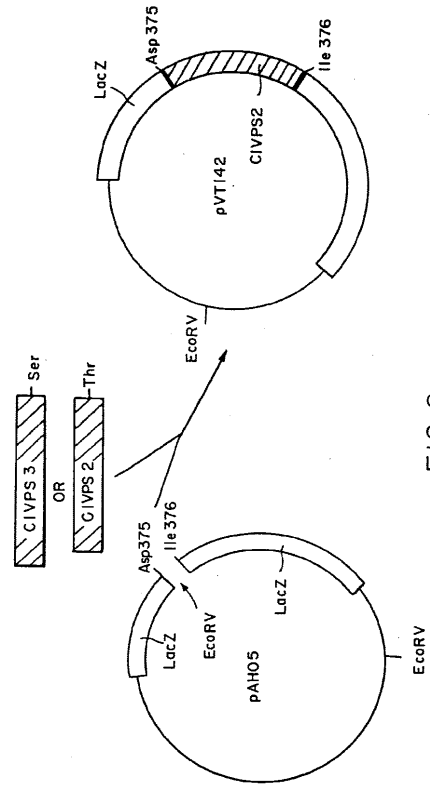


FIG. 2

【 図 3 】

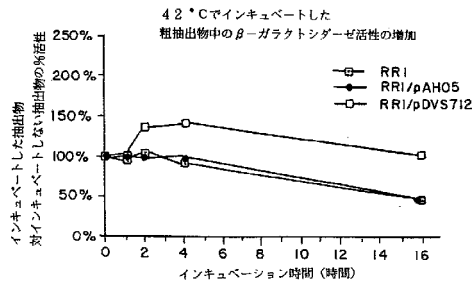


FIG. 3A

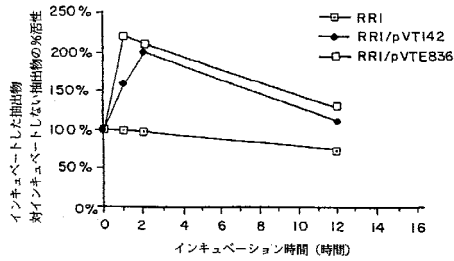


FIG. 3B

【 図 4 】

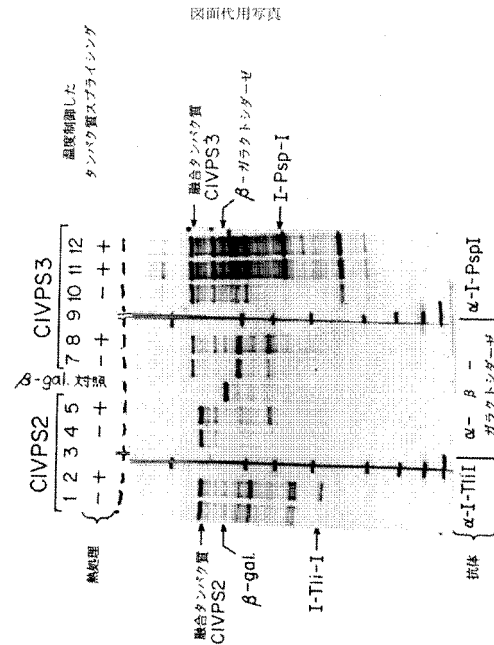


FIG. 4

【 図 5 】

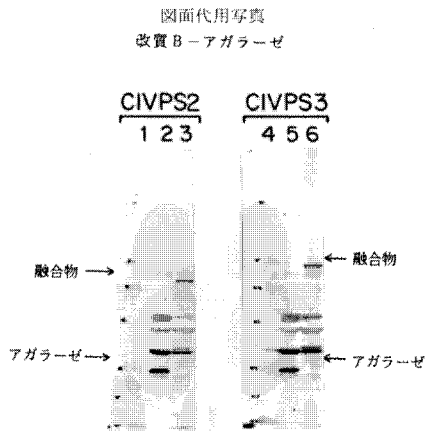


FIG. 5

【 図 6 】

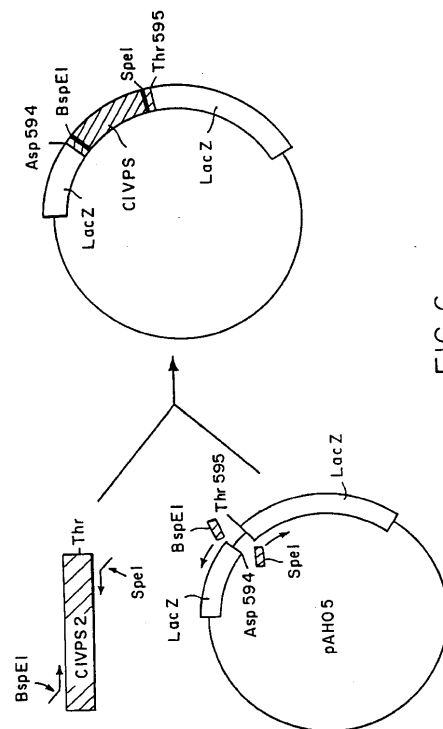


FIG. 6

【 図 7 】

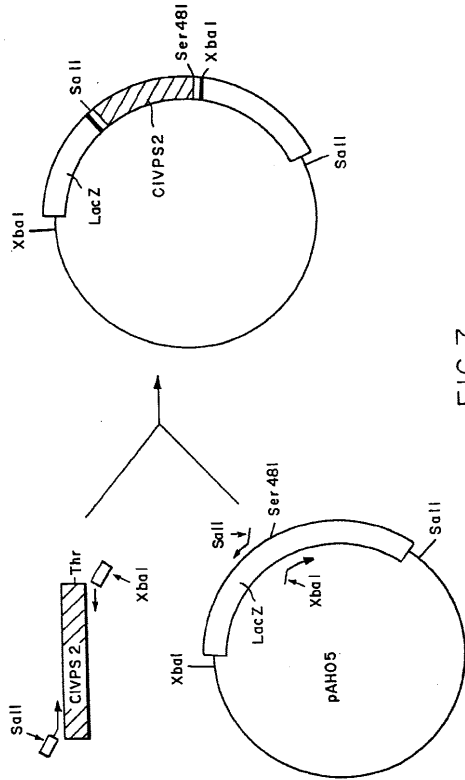


FIG.7

【 図 8 】

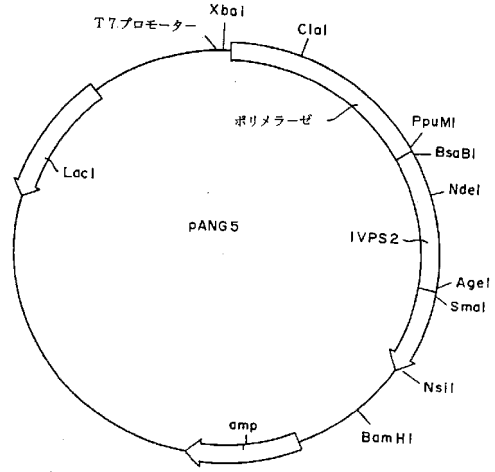


FIG.8

【 図 9 】

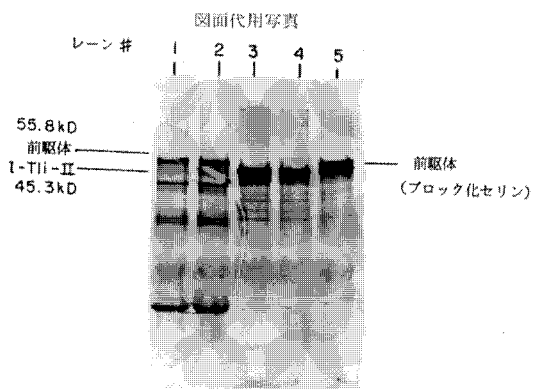


FIG.9

【 図 10 】

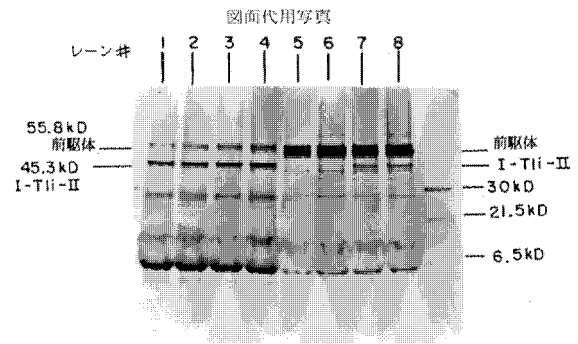


FIG.10

【 図 1 1 】

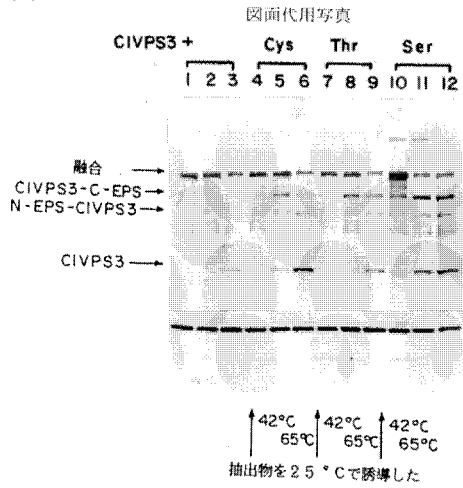


FIG.11

【 図 1 2 】

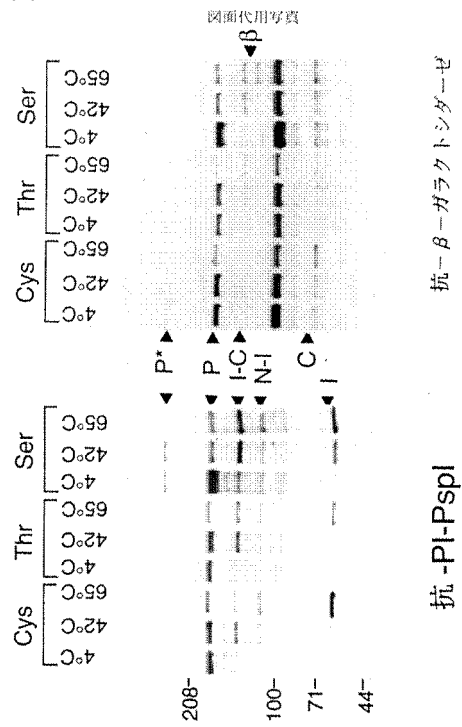


FIG.12

【 図 1 3 】

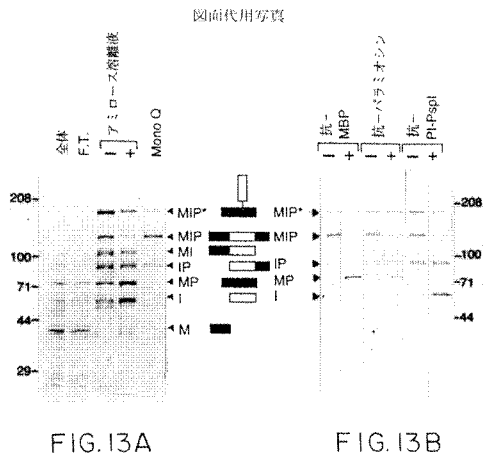


FIG.13A

FIG.13B

【 図 1 4 】

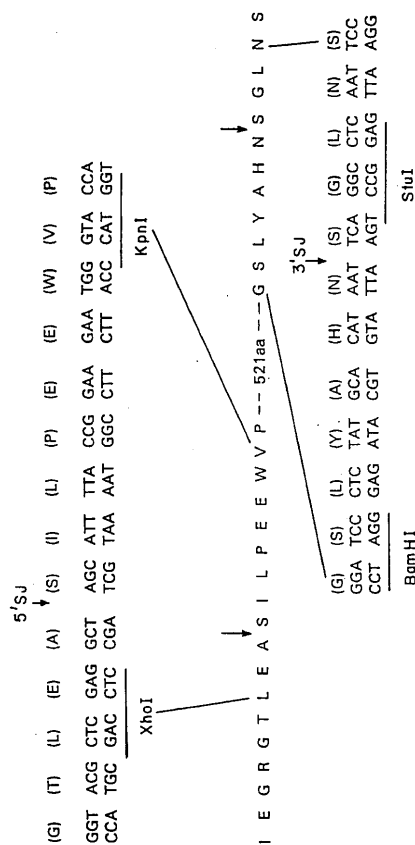


FIG.14

【 図 1 5 】

図面代用写真

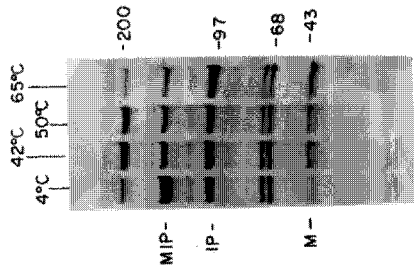


FIG.15B

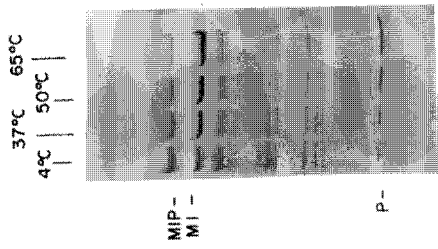


FIG.15A

【 図 1 6 】

図面代用写真

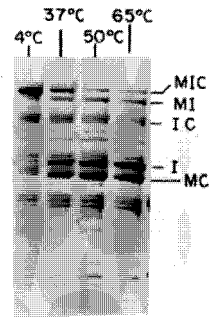


FIG.16

フロントページの続き

- (72)発明者 フランシン・ビー・パーラー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02146、ブルックリン、フラー・ストリート・74・エイ
- (72)発明者 ウィリアム・イー・ジャック
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01969、ロウリー、ボックスフォード・ロード・207
- (72)発明者 ミン・クン・クスユー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01915、ピバリー、トザー・ロード・8、ピバリー・コモンズ、ロツクポート・ハウス、アパートメント・ナンバー・3
- (72)発明者 ロバート・エイ・ホツジーズ
アメリカ合衆国、バージニア・22110、マナッサス、ナチュラル・ブリッジ・コート・9520
- (72)発明者 クリストファー・ジェイ・ノーラン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01966、ロツクポート、ジャードンズ・レーン・56

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 Cell, 1992年10月16日, Vol.71, p.201-210
FEBS LETTERS, 1990年, Vol.263, No.1, p.23-26

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C12N 15/00-90

C07K 1/00-16/46

C12P 21/00-08

C12N 1/00-7/08

C12Q 1/00-70

DB名 PubMed, MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

EUROPAT(QUESTEL)

GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq