

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4597689号
(P4597689)

(45) 発行日 平成22年12月15日(2010.12.15)

(24) 登録日 平成22年10月1日(2010.10.1)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 9/04 (2006.01)	C 1 2 N 9/04 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 18 外国語出願 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-19619 (P2005-19619)	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成17年1月27日(2005.1.27)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公開番号	特開2005-218447 (P2005-218447A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公開日	平成17年8月18日(2005.8.18)		E AKTIENGESSELLSCHAF
審査請求日	平成18年4月19日(2006.4.19)		T
(31) 優先権主張番号	10/769, 481		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(32) 優先日	平成16年1月30日(2004.1.30)		グレンツァーヘルストラツセ124
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
微生物の受託番号	ATCC PTA-5782	(74) 代理人	100096183
微生物の受託番号	ATCC PTA-5783		弁理士 石井 貞次
微生物の受託番号	ATCC PTA-5784	(74) 代理人	100118773
微生物の受託番号	ATCC PTA-5785		弁理士 藤田 節
微生物の受託番号	ATCC PTA-5786	(74) 代理人	100122389
微生物の受託番号	ATCC PTA-5787		弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾ヒトイノシン-5'-リン酸デヒドロゲナーゼ(IMPDH)ポリペプチドであって、該 IMPDHポリペプチドがヒスチジンタグを有し、かつ配列番号12に示される位置130、132、134、140、142、143、155、159、167または173のアミノ酸の1つ以上が、負に荷電したアミノ酸で置換されているアミノ酸配列を有し、また該 IMPDHポリペプチドが野生型 IMPDHポリペプチドと対比して速度安定性を保持している、上記修飾 IMPDHポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号14、16、18、20、または22のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の修飾 IMPDHポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号12に示される位置130、132、134、140、142、143、155、159、167または173の正に荷電したアミノ酸の1つ以上が、グルタミン酸またはアスパラギン酸で置換されているアミノ酸配列を有し、かつ野生型 IMPDHポリペプチドと対比して速度安定性を保持している、請求項 1 に記載の修飾 IMPDHポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の修飾 IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む宿主細胞であって、該宿主細胞が、細菌、酵母、哺乳

動物細胞、真菌細胞、および昆虫細胞よりなる群から選択される上記宿主細胞。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか1項に記載の修飾 IMPDH を産生するための方法であって、

(a) 前記修飾 IMPDH ポリペプチドを産生するのに好適な条件下で請求項 5 に記載の宿主細胞を培養するステップと；

(b) 産生された前記修飾 IMPDH ポリペプチドを回収するステップと；
を含む上記方法。

【請求項 7】

修飾ヒト I 型または II 型 IMPDH ポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、
該 IMPDH ポリペプチドがヒスチジntag を有し、かつ配列番号 12 に示される位置 130、132、134、140、142、143、155、159、167 または 173 のアミノ酸の 1 つ以上が、負に荷電したアミノ酸で置換されているアミノ酸配列を有し、また該 IMPDH ポリペプチドが野生型 IMPDH ポリペプチドと対比して速度安定性を保持している、上記単離された核酸分子。

10

【請求項 8】

前記単離された核酸分子の相補的配列が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 13、15、17、19、または 21 に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズする、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 9】

配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、および配列番号 21 よりなる群から選択される配列を含む、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

20

【請求項 10】

プロモーターに機能しうる形で連結された請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 11】

前記単離された核酸分子の相補的配列が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、および配列番号 21 よりなる群から選択される配列のヌクレオチド 346 ~ 750 にハイブリダイズする、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 12】

プロモーターに機能しうる形で連結された請求項 11 に記載の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

30

【請求項 13】

請求項 11 に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

前記 IMPDH ポリペプチドが、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 よりなる群から選択されるアミノ配列を含む、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 16】

配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、および配列番号 21 よりなる群から選択される配列のヌクレオチド 346 ~ 750 を含む、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

40

【請求項 17】

ATCC 受託番号 PTA-5786、PTA-5782、PTA-5784、PTA-5785、または PTA-5783 を有する *E. coli* H712 から取得可能な請求項 9 に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 3 のいずれか1項に記載の修飾 IMPDH ポリペプチドを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、修飾イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼに関する。より特定的には、本発明

50

は、野生型イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼと対比して安定化された活性を有するヒスチジンタグ付き修飾イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼに関する。

【背景技術】

【0002】

イノシン-5'-リン酸デヒドロゲナーゼ(IMPDH; EC 1.1.1.205)は、プリンのde novo合成における主要な酵素である。IMPDHは、イノシン-5'-リン酸(IMP)からキサントシン-5'-リン酸(XMP)へのNAD依存性酸化を触媒し、NADHおよびXMPを産生させる。IMPDHにより触媒されるIMPからXMPへの酸化は、グアニンヌクレオチド合成の律速段階である。

【0003】

IMPDHは、ホモテトラマーとして存在する(すなわち、この酵素は、4つのサブユニットを有し、各サブユニットがIMPDHポリペプチドを含む)。多くの種において、IMPDHの2種のアイソフォームが報告されている。これらは、I型およびII型IMPDHと呼ばれる。ヒトI型およびII型IMPDHが同定され配列決定されている。ヒトIMPDHのI型およびII型は、いずれも、514アミノ酸の長さであり、それらは84%の配列同一性を共有する。ヒトI型IMPDHのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、Natsumeda, Y., et al., J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990)に開示されており、ヒトII型IMPDHのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、Natsumeda, Y., et al., J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990)、Collart, F.R. and Hubermann, E., J. Biol. Chem. 263:15769-15772 (1988)、および米国特許第5,665,583号に開示されている。IMPDHホモテトラマーを構成するヒトIMPDHのI型およびII型のサブユニットは、それぞれ、56kDaのサブユニット分子量を有する。ヒトII型IMPDHは、触媒コアドメイン(アミノ酸1~109および245~514)と、機能が未知であるサブドメイン(アミノ酸110~244)とを有する。

【0004】

IMPDHは、抗腫瘍(たとえば、抗白血病)療法および免疫抑制化学療法の標的である。IMPDHは、新生物細胞および分化中の細胞でアップレギュレートされる。さらに、増殖中のBおよびTリンパ球では、グアニンヌクレオチド合成はサルベージ経路ではなくde novo経路に依存し、グアニンヌクレオチド合成が阻害されるとDNA合成が阻害される。したがって、IMPDHは、BおよびT細胞増殖に重要な酵素であり、IMPDH活性が阻害されるとBおよびT細胞増殖の両方が阻害されるので、IMPDHは免疫抑制化学療法の重要な標的となる。

【0005】

ミコフェノール酸(MPA)は、ヒトI型およびII型IMPDHの非競合阻害剤であり、MPAは、NADHの放出後かつXMPの産生前にIMPDHに結合する。MPAは、エステルプロドラッグミコフェノール酸モフェチル(CellCept; MMF)のin vivo活性代謝物である。MMFは、BおよびT細胞増殖を阻止する免疫抑制剤であり、MMFは、腎臓および心臓移植拒絶反応の治療に用いることが承認されている。MMFはまた、癌およびウイルス感染症を治療するために臨床的に使用され、抗血管過増殖剤、抗乾癬剤、抗菌剤、抗真菌剤として使用され、さらに自己免疫性疾患の治療に使用されてきた。

【0006】

MMFは、in vivoでMPAに加水分解されるので、in vivoにおけるMPAレベルのモニタリングによりMMF投与量のモニタリングが可能である。MPAレベルのモニタリングにより、治療効力が改善され(たとえば、適切な免疫抑制に必要な最適MMFレベルを決定することができる)、薬剤の有害な副作用が最小限に抑えられるので、MMFで治療された患者のMPAレベルの測定は、临床上重要である。MMFで治療された患者のMPAレベルを測定するアッセイにおいて、たとえば、米国特許第6,107,052号および同第6,524,808号に記載されているアッセイにおいて、単離された組換えIMPDHが使用されてきた。

【0007】

大量の安定な組換えIMPDH(たとえば、凝集が最小限に抑えられたIMPDH)を産生および単離する能力は、MMFで治療された患者のMPAレベルをモニターするアッセイに使用するうえでまたは任意の他の治療上有用なIMPDH阻害剤の患者サンプル中レベルをモニターするアッセイに使用するうえで重要である。IMPDHの他の阻害剤は、Anderson, J. H. et al., J

10

20

30

40

50

. Biol. Chem. 243:4762-4768 (1968)、ならびに米国特許第5,380,879号、同第5,444,072号、および同第5,807,876号、ならびにPCT公開WO 94/01105およびWO 94/12184に記載されている。

【0008】

また、大量の安定な組換えIMPDHを産生および単離する能力は、癌療法および免疫抑制療法に有用な新しいIMPDH阻害剤の同定およびデザインならびにそれらの阻害剤に対するIMPDHの感受性の決定のような他の臨床用途および研究用途にも重要である。

【発明の開示】

【0009】

本発明は、修飾組換えIMPDHポリペプチド、およびこの修飾組換えIMPDHポリペプチドをコードする単離された修飾核酸分子に関する。本発明はまた、そのような修飾組換えIMPDHポリペプチドを産生するための方法、ベクター、および宿主細胞、ならびに修飾IMPDHポリペプチドを含むキットに関する。ニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィーにより精製するためのヒスチジンタグを含有するように、組換えIMPDHポリペプチドを修飾し、さらに、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が野生型IMPDHポリペプチドと対比して保持されるように、ポリペプチドのサブドメイン領域で修飾する。

【0010】

一実施形態では、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドは、配列番号14、16、18、20、または22のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態では、配列番号12で示される位置116~250のアミノ酸の1つ以上を、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドにおいて、負に荷電したアミノ酸で置換する。さらに他の実施形態では、配列番号12で示される位置130、132、134、140、142、143、155、159、167、173、177、187、188、201、209、211、212、214、230、234、235、237、244、247、または248の正に荷電したアミノ酸の1つ以上を、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドにおいて、負に荷電したアミノ酸で置換する。他の実施形態では、配列番号12で示される位置130、132、134、140、142、155、159、167、または173の正に荷電したアミノ酸の1つ以上を、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドにおいて、負に荷電したアミノ酸で置換する。

【0011】

ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする単離された核酸分子もまた、提供される。したがって、本明細書に提供される単離された核酸分子は、修飾IMPDHポリペプチドがヒスチジンタグを有し、かつ野生型IMPDHポリペプチドと対比してヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が保持されるようにIMPDHポリペプチドのサブドメインが修飾されている修飾I型またはII型IMPDHポリペプチドをコードする。一実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、およびそれらの相補的配列よりなる群から選択される配列を含みうる。他の実施形態では、単離された核酸分子の相補的配列がストリンジェントな条件下で配列番号13、15、17、19、または21で示されるヌクレオチド配列のいずれか1つにハイブリダイズする単離された核酸分子が提供される。

【0012】

さらに他の実施形態では、単離された核酸分子の相補的配列がストリンジェントな条件下で配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、および配列番号21よりなる群から選択される配列のヌクレオチド346~750にハイブリダイズする単離された核酸分子が提供される。さらに他の実施形態では、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、および配列番号21よりなる群から選択される配列のヌクレオチド346~750を含む単離された核酸分子が提供される。他の実施形態では、コードされたIMPDHポリペプチドが配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、および配列番号22よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離された核酸分子が提供される。さらに他の実施形態では、E. coli H712から取得可能でありかつそれぞれATCC受託番号PTA-5786、PTA-5782、PTA-5784、PTA-5785、およびPTA-5783を有する配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、または配列番号21の単離された核酸分子を含むベクターが提供される。

【 0 0 1 3 】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒスチジンタグ付き修飾組換えIMPDHポリペプチド、およびこのIMPDHポリペプチドをコードする単離された修飾核酸分子に関する。本発明はまた、そのようなヒスチジンタグ付き修飾組換えIMPDHポリペプチドを産生するための方法、ベクター、および宿主細胞、ならびに修飾IMPDHポリペプチドを含むキットに関する。ニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィーにより精製するためのヒスチジンタグを含有するように、組換えIMPDHポリペプチドを修飾し、さらに、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が野生型IMPDHポリペプチドと対比して保持されるように、ポリペプチドのサブドメイン領域で修飾する(図1参照)。

10

【 0 0 1 4 】

野生型IMPDH酵素の精製は、結果として、低い収率および低い純度をもたらす。したがって、多くの場合、精製時間を短縮し、収率および純度を増大させるために、6ヒスチジンタグのようなアフィニータグが野生型IMPDHに組み込まれる。そのようなアフィニータグを付加すると、溶液中におけるIMPDHの溶解性および安定性が低下する可能性がある。したがって、ポリペプチドのサブドメイン領域でアミノ酸置換をコードするように、ヒスチジンタグ付きヒトIMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を本明細書に記載の部位限定突然変異誘発により修飾した。このアミノ酸置換を行うと、野生型IMPDHポリペプチドと対比してヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が維持される(図18~24参照)。

20

【 0 0 1 5 】

野生型IMPDHポリペプチドと対比してヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が維持されるとは、4におけるヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が野生型IMPDHポリペプチドの速度安定性の少なくとも約80%、野生型IMPDHポリペプチドの速度安定性の少なくとも約85%、野生型IMPDHポリペプチドの速度安定性の少なくとも約95%、または野生型IMPDHポリペプチドの速度安定性の少なくとも約98%であることを意味する。

【 0 0 1 6 】

本明細書中で使用する場合、「修飾IMPDHポリペプチド」という用語は、通常はサブドメイン中に存在する少なくとも1つのアミノ酸を通常は存在しないアミノ酸で置換することにより修飾された野生型IMPDHポリペプチドのIMPDHサブドメイン(すなわち、内部非触媒サブドメイン)を有するIMPDHポリペプチドを意味する。「修飾IMPDHポリペプチド」は、触媒機能を有し、多量体(たとえば、ホモテトラマー)を形成することが可能であり、これもまた、本発明に係る「修飾IMPDHポリペプチド」である。本明細書に記載の「修飾IMPDHポリペプチド」は、典型的には、組み換えられたものであるが、合成されたものであってもよい。

30

【 0 0 1 7 】

本明細書中で使用する場合、「相補的配列」という用語は、プリンおよびピリミジンのヌクレオチドの配列が水素結合により会合して二本鎖核酸分子を形成する能力を意味する。グアニンとシトシン、アデニンとチミン、およびアデニンとウラシルは、相補的であり、2つの核酸分子が「相補的」配列を有する場合、水素結合により会合して二本鎖核酸分子を形成することができる。相補的配列は、DNA配列であってもRNA配列であってもよい。

40

【 0 0 1 8 】

本明細書中で使用する場合、「単離された」核酸分子とは、異なるポリペプチドをコードする他の汚染物質の核酸分子から実質的に分離された核酸分子である。

【 0 0 1 9 】

アミノ酸の一字コードは次のとおりである：A=アラニン、R=アルギニン、N=アスパラギン、D=アスパラギン酸、C=システイン、Q=グルタミン、E=グルタミン酸、G=グリシン、H=ヒスチジン、I=イソロイシン、L=ロイシン、K=リシン、M=メチオニン、F=フェニルアラニン、P=プロリン、S=セリン、T=トレオニン、W=トリプトファン、Y=チロシン、およびV=

50

バリン。

【0020】

I型およびII型IMPDHポリペプチドは、N末端触媒ドメイン、内部非触媒サブドメイン、およびC末端触媒ドメインを含む(図1参照)。本明細書に記載されているように、さまざまな種に由来するI型またはII型IMPDHポリペプチドにヒスチジントグを付け、ポリペプチドのサブドメイン領域で修飾することにより、安定化されたヒスチジントグ付き組換えIMPDHポリペプチドを高い収率および純度で産生および単離することができる。ヒスチジントグは、ニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質の精製に有用である任意の長さを取りうる。

【0021】

ヒスチジントグを含有しかつIMPDHサブドメインで修飾された本明細書に提供されるI型またはII型IMPDHポリペプチドは、得られる発現IMPDHポリペプチドまたはその断片が本明細書に例示されたヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドと同一のIMPDH活性を実質的に保持するかぎり、他のポリペプチドによるさらなる置換、欠失、末端切断、もしくは融合、またはそれらの組合せを行うことができる。これらの置換、欠失、末端切断、もしくは融合が行われたポリペプチドは、例示された修飾IMPDHポリペプチドの等価物であるとみなされ、本発明の範囲内にある。

【0022】

「さらなる置換」とは、1つ以上のアミノ酸置換により等価物が本明細書に記載のIMPDHポリペプチドと異なることを意味し、さらなる置換は、保存的であっても非保存的であってもよく、さらなる置換は、アミノ酸類似体による置換であってもよい。特定の原核または真核宿主細胞における修飾IMPDHポリペプチドの産生レベルを最適化するように、さらなる置換を行うこともできる(すなわち、コドン選択変異体)。さらなる置換は、サブドメインまたはIMPDHポリペプチドの任意の他の部分(たとえば、N末端触媒ドメインもしくはC末端触媒ドメイン)のいずれにおいても行うことができる。

【0023】

一実施形態では、修飾I型またはII IMPDHポリペプチドが提供される。修飾IMPDHポリペプチドは、ヒスチジントグを有し、かつIMPDHポリペプチドのサブドメインは、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が野生型IMPDHポリペプチドと対比して保持されるように修飾されている。他の実施形態では、修飾IMPDHポリペプチドは、配列番号14、16、18、20、または22のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有する。配列番号14で示される実施形態では、位置155および159の各アルギニン(配列番号12参照)が、グルタミン酸(配列番号14の位置155および159)で置換されている。配列番号16で示される実施形態では、位置167のアルギニン、位置173のリシン、および位置390のバリン(配列番号12参照)が、それぞれ、グルタミン酸、グルタミン酸、およびアスパラギン酸(配列番号16の位置167、173、および390)で置換されている。配列番号18で示される実施形態では、位置140のリシンおよび位置142のアルギニン(配列番号12参照)が、グルタミン酸(配列番号18の位置140および142)で置換されている。配列番号20で示される実施形態では、位置167のアルギニンおよび位置173のリシン(配列番号12参照)が、グルタミン酸(配列番号20の位置167および173)で置換されている。配列番号22で示される実施形態では、位置130のリシン、位置132のアルギニン、位置134のアルギニン、位置140のリシン、位置142のアルギニン、位置155のアルギニン、および位置159のアルギニン(配列番号12参照)が、それぞれ、グルタミン酸(配列番号22の位置130、132、134、140、142、155、および159)で置換されている。

【0024】

さらに他の実施形態では、配列番号12で示される位置116~250のアミノ酸の1つ以上が、修飾IMPDHポリペプチドにおいて、アスパラギン酸またはグルタミン酸のような負に荷電したアミノ酸で置換されている。さらに他の実施形態では、配列番号12で示される位置130、132、134、140、142、143、155、159、167、173、177、187、188、201、209、211、212、214、230、234、235、237、244、247、または248の正に荷電したアミノ酸の1つ以上

10

20

30

40

50

が、修飾IMPDHポリペプチドにおいて、負に荷電したアミノ酸で置換されている。他の実施形態では、配列番号12で示される位置130、132、134、140、142、155、159、167、または173の正に荷電したアミノ酸の1つ以上が、修飾IMPDHポリペプチドにおいて、負に荷電したアミノ酸で置換されている。

【0025】

核酸分子のIMPDHサブドメインコード領域で修飾することができ、かつ本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを産生するために使用することができるI型またはII型IMPDHをコードする核酸分子の例としては、ヒト起源もしくは他の哺乳動物起源または細菌、真菌、酵母、もしくは植物起源のIMPDHコード核酸が挙げられる。また、野生型IMPDHポリペプチドと対比してヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が保持されるようにサブドメイン領域で修飾されたヒスチジントグ付きI型またはII型IMPDHポリペプチドを産生するために、真核生物または原核生物起源の任意の他のI型またはII型IMPDHコード核酸分子を使用することもできる。

10

【0026】

一実施形態では、たとえば、細菌、真菌、または酵母のようなとくに高いIMPDH活性を呈する単離された微生物から得られる核酸分子を使用することができる。他の実施形態では、発現されるIMPDH核酸分子は、異種核酸分子であってよく、さらに他の実施形態では、発現されるIMPDH核酸分子は、同種核酸分子であってよい。異種核酸分子とは、本明細書中では、核酸分子の発現に使用される種とは異なる種に由来する核酸分子として定義される。同種核酸分子とは、本明細書中では、核酸分子の発現に使用されるものと同一の種に由来する核酸分子として定義される。

20

【0027】

使用することのできるIMPDHの代表的な核酸配列またはアミノ酸配列は、Natsumeda et al., J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990)、Collart, F. R. and Hubermann, E., J. Biol. Chem. 263:15769-15772 (1988)、米国特許第5,665,583号、Gu et al., J. Biol. Chem. 272:4458-4466 (1997)、Dayton et al., J. Immunol. 152:984 (1994)、Zimmermann et al., J. Biol. Chem. 270:6808-6814 (1995)、およびGlesne et al., Biochem. And Biophys. Res. Comm. 537-544 (1994)に記載されている。

【0028】

ヒスチジントグのコード配列を含有するように修飾され、かつ核酸分子のIMPDHサブドメインコード領域で修飾されたI型またはII型IMPDHコード核酸分子に、他の核酸分子によるさらなる置換、欠失、末端切断、および/または融合を行って、得られる発現IMPDHポリペプチドまたはその断片が、本明細書に例示されたヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドと同一のIMPDH活性を実質的に保持する場合、例示されたヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの等価物であるとみなされ、本発明の範囲に含まれる。

30

【0029】

このほかに本発明の範囲に含まれるのは、本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子に相補的な核酸分子およびこの相補的な核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子である。典型的なストリンジェントな条件としては、たとえば、5×SSPEおよび50%ホルムアミド中における50 ~ 65 °Cでのハイブリダイゼーションならびに0.5×SSPE中における50 ~ 65 °Cでの洗浄、または0.1% SDSおよび1×SSC中における65 °Cでのハイブリダイゼーションが挙げられる。他のストリンジェントな条件は、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。この文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする

40

本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子は、DNAであってもRNAであってもよく、組み換えられたものであっても合成されたものであってもよい。一実施形態では、核酸分子は、放射性同位体、蛍光性化合物、生物発光性化合物、化学発光性化合物、金属キレート化剤、または酵素のような検出可能なマーカーで標識化され、プローブとして使用される。

50

【 0 0 3 0 】

他の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子は、一本鎖DNAまたはRNAに特異的に結合するペプチド核酸(PNA)またはホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、およびメチルホスホネートのような誘導体を包含する(Goodchild, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:4143-4146 (1986))。

【 0 0 3 1 】

さらに他の実施形態では、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子は、単離されている。当技術分野で公知の方法を用いることにより、本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を単離することができる。そのような方法は、以下に、より詳細に記載されている。また、核酸分子を単離する他の方法は、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)に記載されている。

10

【 0 0 3 2 】

たとえば、野生型IMPDHタンパク質をコードするcDNAクローンを単離することにより、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を生成させることができる。その後、IMPDHサブドメイン中でアミノ酸置換をコードするように、かつヒスチジントグのコード配列を、たとえば、IMPDHコード配列の5'末端に組み込むように、組換えDNA技術を用いてcDNA配列を改変することができる。cDNA配列の改変は、たとえば、部位限定突然変異誘発PCRを用いてIMPDHサブドメイン中でアミノ酸置換をコードするようにcDNA配列を改変することにより、またはPCRを用いてIMPDHコード配列の5'末端にヒスチジントグのコード配列を挿入することにより、達成することができる(参照により本明細書に組み入れられるものとする米国特許第4,603,102号を参照されたい)。

20

【 0 0 3 3 】

類似の方法を用いて、本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を単離した。配列番号1および2の配列を有するPCRプライマー(図3参照)を用いて、プラスミドpKK117(図2参照)中の野生型ヒトII型IMPDHコード配列の5'末端にヒスチジントグのコード配列を挿入した。配列番号3~8の配列を有するPCRプライマー(図3参照)を用いて、5'末端にヒスチジントグのコード配列を有するpKK117中のヒトII型IMPDH配列を改変することにより、本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子(すなわち、IMPDHサブドメイン中にアミノ酸置換を有する核酸分子)を産生させた。

30

【 0 0 3 4 】

得られた核酸分子およびヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドは、2B+AHクローンA、(3+1A)+AHクローンA、1,2A+AHクローンB、3B+AHクローンB、および(2+1A)+AHクローンBと記されている。これらのクローンは、それぞれ、配列番号13、15、17、19、および21で示されるヌクレオチド配列(図8、10、12、14、および16)、ならびにそれぞれ、配列番号14、16、18、20、および22で示される推定アミノ酸配列(図9AおよびB、11AおよびB、13AおよびB、15AおよびB、ならびに17AおよびB参照)を有する。ヒト野生型IMPDH II型コード配列は、配列番号9の配列(図4)および配列番号10の推定アミノ酸配列(図5AおよびB)を有する。分子の5'末端に組み込まれたヒスチジントグのコード配列を有するヒト野生型IMPDH II型のコード配列は、配列番号11のヌクレオチド配列(図6)および配列番号12の推定アミノ酸配列(図7 AおよびB)を有する。

40

【 0 0 3 5 】

ヒスチジントグ付き野生型IMPDHコード核酸分子およびヒスチジントグ付き修飾IMPDHコード核酸分子はすべて、American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va.に寄託されている。これらの各核酸分子をpKK117中に挿入し、インサートを有するベクターをE. coli H712中にトランスフォームした。分子の5'末端に組み込まれたヒスチジントグのコード配列を有するヒト野生型IMPDH II型DNAを含有するクローン、ならびに2B+AHクローンA、(3+1A)+AHクローンA、1,2A+AHクローンB、3B+AHクローンB、および(2+1A)+AHクローンBと記されたクローンは、それぞれ、ATCC受託番号PTA

50

-5787、PTA-5786、PTA-5782、PTA-5784、PTA-5785、およびPTA-5783を有する。

【0036】

したがって、単離された核酸分子が提供される。単離された核酸分子は、IMPDHポリペプチドがヒスチジントグを有し、かつ野生型IMPDHポリペプチドと対比してヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が保持されるようにIMPDHポリペプチドのサブドメインが修飾されている修飾I型またはII型IMPDHポリペプチドをコードする。一実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、およびそれらの相補的配列よりなる群から選択される配列を含みうる。他の実施形態では、単離された核酸分子の相補的配列がストリンジェントな条件下で配列番号13、15、17、19、または21で示されるヌクレオチド配列のいずれか1つにハイブリダイズする単離された核酸分子が提供される。

10

【0037】

さらに他の実施形態では、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、および配列番号21よりなる群から選択される配列のヌクレオチド346~750を含む単離された核酸分子が提供される。他の実施形態では、コードされたIMPDHポリペプチドが配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、および配列番号22よりなる群から選択されるアミノ配列を含む単離された核酸分子が提供される。さらに他の実施形態では、E. coli H712から取得可能でありかつそれぞれATCC受託番号PTA-5786、PTA-5782、PTA-5784、PTA-5785、およびPTA-5783を有する配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、または配列番号21の単離された核酸分子を含むベクターが提供される。

20

【0038】

本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを発現するために、当業者に公知の任意の原核または真核宿主細胞ベクター系を使用することができる。たとえば、ベクターが自律的に複製されるかまたは宿主ゲノム中に一体化される系を使用することができる。ベクターという用語には、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、および修飾ウイルスベクターが包含されるが、これらに限定されるものではない。原核生物発現ベクターの具体例は、BLUESCRIPT(Stratagene)、pINベクター(Van Heeke, et al., J. Biol. Chem. 264:5503-5509 (1989)、参照により本明細書に組み入れられるものとする)、E. coli中で発現させるためのpET24a(Novagen, Inc., Madison, Wisconsin)、および本明細書に記載のpKK117である。真核生物発現ベクターの具体例は、真核細胞中で発現させるためのアデノウイルス発現ベクター(Logan, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655-59 (1984)、参照により本明細書に組み入れられるものとする)である。

30

【0039】

一実施形態では、ベクターは、核酸分子を挿入するための制限エンドヌクレアーゼ切断部位および宿主細胞形質転換体を選択するための遺伝子マーカー(たとえば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、またはネオマイシンに対する耐性マーカー)を有する。発現ベクターでは、特定の宿主細胞ベクター系でIMPDHポリペプチドの発現を指令することのできるプロモーターにIMPDHコード核酸分子を機能しうる形で結合することができる。代表的な原核生物プロモーターとしては、構成プロモーター(たとえば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーターまたは 因子プロモーター)および誘導プロモーター(たとえば、ADH2、GAL-1-10、GAL 7、PHO5、T7、T5、またはメタロチオニンプロモーター)が挙げられる。また、転写を調節するために、プロモーター-オペレーターの組合せを使用することができる。

40

【0040】

代表的な真核生物プロモーターとしては、CMVプロモーター、ASVプロモーター、RSV-LTRプロモーター、MMTV-LTRプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、他のウイルスプロモーター、解糖酵素を合成するためのプロモーター、ならびにhMTIIプロモーターが挙げられる。他の実施形態では、リボソーム結合部位配列もまた存在する。他のプロモーター系は、Chang et al., Nature 198:1056 (1977), Goeddel, et al., Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980)およびShimatake, et al., Nature 292:128 (1981)に記載されてい

50

る。これらの各文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【0041】

他の一般に使用される調節配列をベクターに組み込むことができる。たとえば、一実施形態では、IMPDHコード核酸は、転写終結のためのターミネーター配列(たとえば、rrnBT1/T2またはHSP150ターミネーター)を有する。他の実施形態では、IMPDHコード核酸分子は、転写エンハンサーエレメントによりインフレームでスプライシングされる。DNAの産生を容易にすべく細菌中でベクターを複製できるように、かつメッセンジャーRNAを安定化させる配列を組み込むことができるように、ベクターに細菌複製起点(たとえば、ColE1)を組み込むこともできる。

【0042】

原核宿主細胞は、グラム陰性またはグラム陽性の細菌における発現を含む。真核宿主細胞の例としては、初代細胞であるか不死化細胞であるかにかかわらず任意の哺乳動物細胞(たとえば、COS、CHO、NIH/3T3、HeLa、Daudi、293、293-EBNA、およびVERO細胞)、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、および*P. pastoris*のような酵母細胞、ならびにSf9細胞のような昆虫細胞(Smith et al., J. Virol. 46:584 (1983)、Engelhard, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 91:3224-7 (1994)、および米国特許第4,215,051号、いずれも、参照により本明細書に組み入れられるものとする)、さらには真菌細胞(たとえば、トリコデルマ属)が挙げられる。タンパク質の適正な翻訳後修飾が保証されるように真核宿主細胞を選択することができる。種々の宿主細胞-ベクター系が、米国特許第6,451,572号およびPCT公開WO 01/366 07 A1号に記載されている。いずれも、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【0043】

他の実施形態では、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドを発現するための宿主細胞-ベクター系は、本明細書に記載のpKK117ベクター-*E. coli* H712系である。図2は、プラスミドpKK117の地図を示している。pKK117は、T5プロモーターおよびlacオペロン(PT5)を含有し、これらの調節配列は、pKK117中のヌクレオチド30~90に位置する。ヒトIMPDH IIコード配列(配列番号9; 1545塩基対)は、プラスミド中のヌクレオチド141~1685に挿入された。転写終結領域(rrnBT1/T2)は、ヌクレオチド1842~2268に位置し、アンピシリン耐性遺伝子(AmpR)は、ヌクレオチド2359~3219に位置する。細菌中でpKK117を複製するための複製起点(ColE1)は、ヌクレオチド3924~4024に位置する。ヒスチジンタグのコード配列(配列番号1; 6ヒスチジン)は、pKK117中のヌクレオチド144でATG開始コドンの後のヒト野生型IMPDH II型コード配列の5'末端に挿入された。本明細書に記載の実施例では、ヒスチジンタグ付き野生型IMPDHポリペプチドのコード配列を含有するpKK117で、PCRを用いる部位限定突然変異誘発を行った(PCRプライマーの配列については配列番号3~8を参照されたい)。

【0044】

一実施形態では、本明細書に記載の核酸分子を含む宿主細胞が提供される。宿主細胞は、細菌、酵母、哺乳動物細胞、真菌細胞、および昆虫細胞よりなる群から選択することができる。宿主細胞は、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする本明細書に記載の核酸分子またはその断片を含むベクター、プラスミド、ファージミド、またはコスミドを含む。他の実施形態では、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする本明細書に記載の核酸分子のいずれかまたはその断片を含むベクターが提供される。

【0045】

当業者に公知の任意のトランスフォーメーションまたはトランスフェクションの手順を用いて、ヒスチジンタグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクター構築物を宿主細胞にトランスフォームまたはトランスフェクトすることができる。そのような手順としては、エレクトロポレーション、プロトプラストトランスフォーメーション、マイクロインジェクション、ウイルス媒介トランスフェクション、CaPO₄媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、およびCaCl₂ショックが挙げられる。宿主細胞-ベクター系の説明を含めて当技術分野で公知

他のトランスフォーメーションおよびトランスフェクションの手順ならびに他のクローニング方法については、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)(参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい。トランスフォームまたはトランスフェクトされた原核細胞または真核細胞の増殖条件は、当技術分野で公知である。

【0046】

ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を有する宿主細胞は、当技術分野で周知の方法により同定することができる。たとえば、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子を有する細菌宿主細胞は、単一のコロニーを産生するようにクローン化することができる。単一のコロニーを培養し、そしてたとえば、音波処理、熱、またはリゾチームや界面活性剤などによる化学的処理により培養物中の細菌宿主細胞を溶解させてDNAを放出させ、そしてホモジネートを遠心分離して細胞デブリを除去することができる。以下に、より詳細に記載されている方法を用いて、または当技術分野で公知の任意の他の方法を用いて、DNAを単離することができる。制限酵素分析または配列決定のような当技術分野で公知の方法により、単離されたDNAを分析し、DNAが所望のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードするインサートを含有するかを決定することができる。その後、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードするDNAを含有する細菌を培養し、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを発現させることができる。

【0047】

ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを発現するために、以下に、より詳細に記載されているように、発現に好適な条件下で宿主細胞を培養する。その後、たとえば、音波処理、熱、またはリゾチームや界面活性剤などによる化学的処理により培養細胞を溶解させて、発現されたポリペプチドを放出させ、そしてホモジネートを遠心分離して細胞デブリを除去する。ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの発現は、当技術分野で公知の方法により検出することができる。たとえば、SDS-PAGEゲルのクーマシー染色、IMPDHに結合する抗体を用いるイムノブロットティング、またはIMPDH活性のアッセイにより、修飾IMPDHポリペプチドを検出することができる。

【0048】

ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドおよびヒスチジントグ付き野生型IMPDHポリペプチドは、以下に記載されているようなニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィーを単独で用いてまたは他の従来の精製方法と併用して、精製することができる。そのような精製方法としては、硫酸沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-Sepharoseカラムクロマトグラフィー、IMPや抗IMPDH抗体などを用いるアフィニティクロマトグラフィー、溶媒-溶媒抽出、限外濾過、およびHPLCが挙げられる。ニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィーに続いて、エンテロキナーゼ切断のような当技術分野で公知の酵素をベースとした方法により、ヒスチジントグを除去することができ、そして上記の従来技術のいずれかを用いて、修飾IMPDHポリペプチドを放出されたタグから精製することができる。例示的な実施形態では、精製とは、少なくとも約60%の純度、少なくとも約70~80%の純度、少なくとも約90%の純度、または少なくとも約95%の純度を意味する。使用することのできるこのほかの精製方法については、R. Scopes, "Protein Purification, Principles and Practice," Third Edition, Springer-Verlag (1994)(参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい。当然のことながら、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドまたはヒスチジントグ付き野生型IMPDHポリペプチドを精製するための先に記載した精製方法は限定されるものではなく、当業者に公知の任意の精製方法を用いてヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドまたはヒスチジントグ付き野生型IMPDHポリペプチドを精製することができる。必要ならば、たとえば、限外濾過および接線流動濾過のような方法により、IMPDHポリペプチドを濃縮させることができる。

【0049】

したがって、一実施形態では、本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペ

10

20

30

40

50

プチドを産生する方法が提供される。本方法は、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドをコードする核酸分子でトランスフォームされた宿主細胞を培養するステップを含む。トランスフォームされた宿主細胞は、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを産生するのに好適な条件下で培養される。本方法は、上述したように、トランスフォームされた宿主細胞中で発現されたヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを回収するステップをさらに含む。この方法により産生されるヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドもまた提供される。

【0050】

野生型IMPDHポリペプチド、ヒスチジントグ付き野生型IMPDHポリペプチド、およびヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの活性は、本明細書に記載の*in vitro*法を用いて、またはCarr, et al., J. Biol. Chem. 268:27286-27290 (1993)およびXiang, et al., J. Biol. Chem. 271:1435-1440 (1996)(参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている方法のような当技術分野で公知の方法により、アッセイすることができる。たとえば、野生型IMPDHポリペプチド、ヒスチジントグ付き野生型IMPDHポリペプチド、またはヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの活性は、分光光度測定により340 nmで測定することができる。そのようなアッセイでは、単位時間あたりの340nmにおけるNADHの吸光度の変化を測定し、NADHの吸光度の変化をIMPDHによるNADHの生成速度に対応させる。他の実施形態では、HPLCおよび分光光度アッセイ(Montero, C. et al., Clinica Chimica Acta 238:169-178 (1995)(参照により本明細書に組み入れられる)を参照されたい)を用いてIMPおよびNADからのXMPおよびNADHの産生を測定することにより、IMPDHポリペプチドの活性をアッセイすることができる。

【0051】

精製されたヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの種々の製剤を調製することができる。修飾IMPDHポリペプチドは、公知の方法により、散剤や液剤などとして製剤化することができる。IMPDH酵素を緩衝溶液に添加し、化学物質(たとえば、グリセロール、ポリエチレングリコール、EDTA、他のタンパク質、界面活性剤など)の添加により安定化させることができる。修飾IMPDHポリペプチドは、4℃で保存することができるか、または保存のために凍結させることができるか、または凍結乾燥させることができる。

【0052】

一実施形態では、サンプル中のIMPDH阻害剤または他のアナライトの濃度を測定するのに有用なキットが提供される。IMPDH阻害剤は、薬剤、薬物誘導体、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドなどでありうる。ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドは、米国特許第6,107,052号および同第6,524,808号(参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されているようなアッセイで使用するためのキットの構成要素である。簡潔に述べると、これらのアッセイでは、たとえば、尿、全血、血漿、血清、唾液、精液、糞便、喀痰、脳脊髄液、涙、粘液などのようなサンプルを分析して、サンプル中のIMPDH阻害剤、阻害剤の代謝物、または他のアナライトのレベルを決定する。

【0053】

アッセイでは、単位時間あたりの340nmにおけるNADHの吸光度の変化を測定し、NADHの吸光度の変化をIMPDHによるNADHの生成速度に対応させる。MPAもしくはIMPDHの他の阻害剤または他のアナライトは、NADHの形成を阻害することができるので、サンプル中のMPA、MPA代謝物、またはIMPDHの他の阻害剤の濃度は、340nmにおけるNADHの吸光度に反比例する。したがって、そのようなアッセイを用いて、サンプル中のIMPDH阻害剤(たとえば、MPA)または他のアナライトのレベルを決定することができる。

【0054】

キットは、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチド、IMP基質、およびNADを含有しうる。IMPDH、IMP、およびNADは、一般的には、適切な緩衝剤および他の材料と組み合わせられた後、パッケージ化される。一実施形態では、試薬は、液体形態を保持することができる。他の実施形態では、試薬を凍結乾燥させることができる。検量試薬をキットに組み込むこともできる。「検量試薬」とは、既知量の測定対象の阻害剤、たとえば、MPAもし

くはその代謝物、他のIMPDH阻害剤または他のアナライトを含有する任意の標準物質または参照物質を意味する。阻害剤(たとえば、MPA)を含有すると推測されるサンプルおよび検量試薬は、類似の条件下でアッセイされる。その後、未知試料で得られた結果を標準系で得られた結果と比較することにより、阻害剤濃度を算出する。

【0055】

キットに組み込みうる他の物質は、たとえば、緩衝剤、アッセイ培地用安定化剤およびアッセイ成分、アルブミンのような追加のタンパク質、または界面活性剤、とくに非イオン性界面活性剤などである。

【0056】

本明細書中に記載されているヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドは、IMPDH阻害剤のレベルをモニターするためのアッセイだけに使用できるのではなく、他の臨床用途および研究用途にも重要である。たとえば、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドは、天然に存在するIMPDH阻害剤もしくは他のIMPDH結合性リガンドを同定するために、または癌療法および免疫抑制療法に有用である合成阻害剤をデザインするために、さらにはこれらの阻害剤に対するIMPDHの感受性を決定するために、使用することができる。

【0057】

モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはそれらのフラグメント(たとえば、Fab、F(ab')₂、Fvフラグメント、もしくは融合タンパク質)を当技術分野で公知の方法により誘導するために、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドを使用することも可能である。一実施形態では、治療用途のヒト化抗体を産生させることができる。他の実施形態では、診断的アッセイなどで使用するための検出可能なマーカーで抗体を標識化することが可能であるか、またはIMPDHを精製するために使用することが可能である。

【0058】

以下の実施例は、単に例示を目的としたものにすぎず、本発明の範囲をなんら限定しようとするものではない。

【実施例】

【0059】

特定の実施形態

以下の実施例では、太字の数字は、図面中の対応する構造を意味する。

【0060】

実施例1. 野生型ヒトII型IMPDHの修飾

当技術分野で公知のクローニング法により、野生型ヒトII型IMPDH配列(配列番号9)をpKKI17(pKK/T7とも記される; 図2参照)中の部位にクローン化した。配列番号1および配列番号2で示されるプライマーを用いるPCRによりATG開始コドンの後のpKKI17中の野生型IMPDH II配列中に配列番号1で示される配列を挿入することにより、野生型IMPDH II配列の5'末端に6ヒスチジントグをコードするように、野生型IMPDH II配列を修飾した。QuikChangeTM部位限定突然変異誘発キット(Stratagene, La Jolla, CA)を使用し、プライマーのデザインおよびPCRのプロトコールは、本質的に、QuikChangeTM部位限定突然変異誘発キットの取扱説明書に記載されているとおりであった。プライマーは、Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, VAにより合成され精製された。

【0061】

簡潔に述べると、PCRプロトコールは以下のとおりであった。PCR反応系には、プラスミドに挿入されたIMPDH II配列を有する2 μ Lの二本鎖pKKI17 DNA(この2 μ Lの体積には、TE緩衝液中の5、10、20、または50ngのプラスミドDNAが含まれていた)、5 μ Lの10 \times 反応緩衝液、TE緩衝液中の125ngの各プライマー(各2 μ L)、1 μ LのdNTP混合物、およびddH₂O(37 μ L)が含まれていた。50 μ Lの最終体積になるようにPfuTurbo DNAポリメラーゼ(2.5U/ μ L; 1 μ L)を添加し、各反応系に30 μ Lのミネラルオイルをオーバーレイした。温度サイクルパラメーターは、セグメント1のとき、95 $^{\circ}$ Cで30秒間のサイクルを1回、セグメント2のとき、95 $^{\circ}$ Cで30秒間および68 $^{\circ}$ Cで12分間のサイクルを18回であった。PCR反応後、反応混合物を4 $^{\circ}$ Cまで冷却させた。QuikChangeTM部位限定突然変異誘発キットに提供されているpWh

itescriptプラスミドおよびPCRプライマーを用いる対照反応も行った。

【0062】

その後、ミネラルオイルオーバーレイの下方にピペットを挿入して1 μ LのDpn Iを反応混合物に添加し、反応混合物を混合し、各反応混合物を37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートしてプラスミドDNAを消化させることにより、Dpn IによるPCR産物の消化を行った。Dpn Iは、親の非突然変異プラスミドDNAは消化するが、突然変異プラスミドDNAは消化しない。

【0063】

PCR産物は、ニックの入った弛緩型dsDNAの形態である。XL-1 Blueスーパーコンピテント細胞(QuikChangeTM部位限定突然変異誘発キットで提供される)は、ニックの入った弛緩型dsDNAを取り込んでニックを修復することができる。次のようにXL-1 Blueスーパーコンピテント細胞に突然変異プラスミドをトランスフォームした。XL-1 Blueスーパーコンピテント細胞を氷上で解凍し、4 $^{\circ}$ Cで保持した。スーパーコンピテント細胞を等分(50 μ L)してあらかじめ冷却されたFalcon 2059ポリプロピレンチューブに入れた。各対照およびサンプルチューブからのDpn I消化DNAのアリコート(1 μ L)を、スーパーコンピテント細胞の個々のアリコートに移した。トランスフォーメーション反応系を混合し、4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その後、反応混合物を42 $^{\circ}$ Cで45秒間加熱し、そして氷上で2分間インキュベートした。NZYプロス(42 $^{\circ}$ C; 0.5ml)を各反応混合物に添加し、反応系を37 $^{\circ}$ Cで振盪(225~250 rpm)させながら1時間インキュベートした。

【0064】

QuikChangeTM部位限定突然変異誘発キットの取扱説明書に記載されているように調製した100 μ g/mLのアンプシリンと共に、トランスフォーメーション反応系を、X-galおよびIPTGを有するLB寒天プレート上に個々にプレーティングした(250 μ L)。プレートを37 $^{\circ}$ Cで少なくとも16時間インキュベートした。単一コロニーを採取し、100 μ g/mLのアンプシリンを有するLBプロス中、37 $^{\circ}$ Cにおいて、225rpmで振盪させながら一晚増殖させ、培養物を増大させた。一晚培養物を4400 \times gで30分間遠心分離してペレット細胞にし、上清を廃棄した。

【0065】

細菌を溶解させ、キット取扱説明書に従ってQIAprep(登録商標)キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いてXL-1 Blue細胞からプラスミドDNAを単離した。制限酵素消化を行い、6ヒスチジンタグのコード配列が組み込まれたクローンを同定した。当技術分野で公知の手順に従って4~20% TBEグラジエントゲル(厚さ1.0mm; Invitrogen Cat. No. EC62252)およびTBE実験緩衝液(Invitrogen Cat. Nos. LC6678およびLC2675)を用いて、得られた消化物を分析した。100bpラダー(Gibco Cat. No. 15628-019)およびDNA銀染色キット(Pharmacia Cat. No. 17-6000-30)を使用した。

【0066】

先に記載したものと類似のプロトコール(QuikChangeTM部位限定突然変異誘発キット)を用いて、本明細書に記載のヒスチジンタグ付き修飾IMPDHコードヌクレオチドのそれぞれのサブドメインを修飾した(すなわち、2B+AHクローンA、(3+1A)+AHクローンA、1,2A+AHクローンB、3B+AHクローンB、および(2+1A)+AHクローンB)。PCRに使用したDNAは、QIAprep(登録商標)キットを用いてXL-1 Blue細胞から単離されたプラスミドDNAであった。IMPDH II配列の5'末端に6ヒスチジンタグをコードするように修飾された野生型IMPDH II配列を、PCRによりクローンのそれぞれのサブドメイン領域でさらに修飾した(pKK117中で5'末端に6ヒスチジンタグをコードするように修飾されたIMPDH II配列および配列番号3~8で示されるプライマーを用いて)。PCR反応の温度サイクルパラメーターが、セグメント2のとき、95 $^{\circ}$ Cで30秒間および64 $^{\circ}$ Cで12分間のサイクルを18回であったという点を除いて、プロトコールは先に記載したとおりであった。

【0067】

スーパーコンピテントXL-1 Blue細胞のトランスフォーメーション、細菌細胞の溶解、およびQIAprep(登録商標)キットを用いるDNAの単離を含めて先に記載のものと同様のプロトコールを用いて、所望のIMPDH修飾に陽性のクローンを単離した。ただし、制限酵素消

化によるのではなく、Qiagen, Bothell, WAにより行われた配列決定により、陽性クローンを確認した。

【0068】

実施例2. E. coli H712のトランスフォーメーション

E. coli H712 (Yale University)をトランスフォームして、ヒスチジインタグ付き修飾IMPDHポリペプチドの発現ならびに野生型ポリペプチドおよびヒスチジインタグ付きポリペプチドの発現に使用した。E. coli H712のトランスフォーメーションに使用したDNAは、QIA prep(登録商標)キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて単離された陽性クローンまたは野生型ポリペプチドをコードするインサートを有するpKK117プラスミドに由来するプラスミドDNAであった。

10

【0069】

Chung, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:2172 (1989)(参照により本明細書に組み入れられるものとする)の方法に変更を加えて、E. coli H712をコンピテントにした。簡潔に述べると、LBブロス中のE. coli H712の新たな一晚培養物を加温されたLBブロス中に60mlの最終体積になるように1:50希釈した。培養物が約0.3~0.4のOD_{600nm}に達するまで、37 °Cにおいて225rpmで振盪させながら培養物をインキュベートした。60mLの培養物を4100×gで15分間遠心分離し、ペレットを6mLの低温TSS(LBブロス、10% PEG(MW 8000)、5% DMSO、42mM MgCl₂)中に再懸濁させた。再懸濁させた細胞のアリコート(0.1ml)を液体窒素の浴内のクライオバイアル中に調製し、細胞を-70 °Cで保存した。

【0070】

20

E. coli H712コンピテント細胞を次のようにトランスフォームした。コンピテント細胞の入ったチューブを氷上で解凍した。各精製プラスミドの1μLアリコートを別々のチューブに添加し、液体を穏やかに混合した。トランスフォーメーション混合物を氷上で30分間インキュベートした。前加熱(42 °C)されたNZYMブロス(0.5ml)を添加し、細胞に42 °Cで2分間熱ショックを与えた。その後、ただちに細胞を2分間氷上に戻した。その後、前加熱(37 °C)されたNZYMブロス(0.9ml)を添加し、液体を穏やかに混合した。トランスフォーメーション混合物を37 °Cにおいて225rpmで振盪させながらインキュベートした(30分間)。その後、アリコート(20μL)を寒天プレート(LB寒天+100μg/mLのアンプシリン)上に拡げた。プレートを37 °Cで一晩インキュベートした。コロニーを採取し、培養物を一晚増殖させ、グリセロールストックを調製した。

30

【0071】

実施例3. E. coli H712を用いる IMPDHの発現

37 °Cで振盪させながら一晚培養物を凍結されたグリセロールストックから増殖させた。Terrific Broth+M9 Minimal Medium Salts、2%グルコース、および100μg/mLのアンプシリン中で、細胞を増殖させた。次に、IPTG(0.5mM)を有する新たな培地中に細胞を1:1000希釈した。培養物を37 °Cで振盪させながら22時間増殖させた。細胞を遠心分離(4100×gで30分間)により採取し、0.9% NaClで洗浄し、再び遠心分離し、そして-70 °Cで保存した。

【0072】

細胞を解凍し、細胞1グラムあたり4.5mLの溶解緩衝液を添加することにより溶解させた。溶解緩衝液は、10mM Tris Base、7.5mM TCEP-HCl、推奨濃度のComplete EDTA-freeプロテアーゼ阻害剤(Roche Diagnostics)、500mM KCl、および10mMイミダゾール、pH8.0であった。全ペレットが溶解状態になるまで、溶液を混合した。その後、リゾチーム20,000 U/mL(Epicenter Cat. No. R1810M)を添加し、溶液を30分間混合した。Benzonase(1μl/ml; Novagen lysis solution Cat. No. 70746)を添加し、溶液を30分間混合した。その後、溶解物1部あたり2部の溶解希釈緩衝液を添加した。溶解希釈緩衝液は、20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、6.0Mウレア、20mMイミダゾールおよび0.3% NP-40、pH8.0であった。溶解物を少なくとも30分間混合し、4 °Cよりも高い温度の冷気中に一晚保存した。溶解物を20,000×gで30分間遠心分離し、上清を保持し、pHを8.0に調整し、セルロースアセテートフィルターを用いて濾過した。

40

【0073】

50

実施例4. E. coli H712から単離されたIMPDHの精製

ニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィーを行った後、当技術分野で公知の手順を用いて溶出タンパク質を脱塩カラムにかけることにより、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドおよび野生型ヒスチジントグ付きIMPDHポリペプチドを精製した。

【0074】

ニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィー

ニッケル樹脂は、たとえば、Pharmacia(XK 26カラム)およびQiagen(Valencia, CA; Ni-NTA Superflow Resin)から入手可能である。Pharmacia製またはQiagen製のニッケルキレートアフィニティ樹脂に、次の精製プロトコルを適用可能である。緩衝液はすべて、使用前に脱ガスした。

【0075】

緩衝液

サンプル希釈緩衝液：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、6Mウレア、0.02Mイミダゾール、および0.3% NP-40、pH8.0。

平衡/結合/洗浄緩衝液：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、4Mウレア、0.02Mイミダゾール、および0.175% NP-40、pH8.0。

洗浄緩衝液(Qiagenのみ)：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、0.02Mイミダゾール、および0.175% NP-40、pH8.0。

溶出緩衝液A(Qiagenのみ)：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、0.05Mイミダゾール、および0.175% NP-40、pH8.0。

溶出緩衝液B：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、0.1Mイミダゾール、および0.175% NP-40、pH8.0。

溶出緩衝液C(Qiagenのみ)：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、0.2Mイミダゾール、および0.175% NP-40、pH8.0。

溶出緩衝液D(Pharmaciaのみ)：20mM NaPO₄、7.5mM TCEP-HCl、0.5M KCl、0.2Mイミダゾール、および0.175% NP-40、pH8.0。

【0076】

精製手順

【表1】

ステップ	Pharmacia樹脂(100mLカラム)	Qiagen樹脂(25mLカラム)
充填	10ml/分間	3ml/分間(圧力仕様を超えない)
洗浄1	平衡/結合/洗浄緩衝液、10ml/分間	平衡/結合/洗浄緩衝液、3ml/分間
洗浄2	N/A	洗浄緩衝液、ウレアなし、3ml/分間
溶出1	溶出緩衝液B(0.1Mイミダゾール)、10ml/分間	溶出緩衝液A(0.05Mイミダゾール)、3ml/分間
溶出2	溶出緩衝液D(0.3Mイミダゾール)、10ml/分間	溶出緩衝液B(0.1Mイミダゾール)、3ml/分間
溶出3	N/A	溶出緩衝液C(0.2Mイミダゾール)、3ml/分間
生成物	0.3Mイミダゾール中の溶出物	0.1Mイミダゾール中の溶出物

【0077】

脱塩カラムクロマトグラフィー

材料

HiPrep 26/10脱塩カラム、Pharmacia (Cat. No. 17-5087-01)

脱塩緩衝液：0.437M TAPSO、25.8M酢酸カリウム、4.32mM IMP、7.5mM TCEP-HCl、0.2% Suttocide A、および0.175% NP-40、pH8.0。

【0078】

脱塩手順

緩衝液はすべて、使用前に脱ガスした。充填時、脱塩カラムは、十分に平衡化され、流動状態(ゼロ設定状態)でなければならない。ニッケルキレートアフィニティーカラムから溶出されたタンパク質を脱塩カラムに適用した際、5mL画分を収集するようにフラクションコレクターをセットした。酵素ピークがカラムから溶出した時、フラクションコレクターを停止させ、流れを排出に切り換えた。ピーク画分をプールし、アッセイした。溶出されたIMPDHの後にショルダーすなわち第2のピークが観測されたが、このショルダーには活性がなかったので、プールしなかった。実施例5に記載されているアッセイを用いて画分の酵素活性を測定することにより、IMPDHを有するカラム画分を同定した。精製されたIMPDHを4 または-20 で保存した。

10

【0079】

実施例5. IMPDH酵素活性アッセイ

カラム画分の酵素活性を次のようにアッセイした。精製IMPDHの比活性も決定した。酵素活性をタンパク質濃度測定と組み合わせることにより、分布集中度の指標である精製タンパク質の比活性を決定する手段が提供される。

【0080】

酵素アッセイ材料

希釈剤：100mM TAPSO、3.1mM TCEP-HCl、100mM KCl、0.2mM IMP、pH8.0。

反応緩衝液：100mM TAPSO、3.1mM TCEP-HCl、10mM KCl、0.2mM IMP、0.4mM NAD、pH8.0

20

酵素アッセイ装置

Cary 50 BioSpec温度制御型UV/vis分光光度計

【0081】

酵素アッセイ手順

精製酵素を希釈してキュベットに入れ、キュベットをキュベットキャリアーに入れ、溶液を37 で平衡化させた。アッセイ反応緩衝液(990 µL)を個々のキュベットに添加し、キュベットにカバーをしてキュベットキャリアー中に配置した。溶液を37 で平衡化させた。加温されたサンプル(115.5 µL)を加温された反応緩衝液に添加し、反転させて溶液を混合し、分光光度計に戻した。ただちに、10秒毎に3分間にわたり吸光度を読み取ることに
より、340nmにおいて反応をモニターした。酵素活性を次のように算出した：

30

【数1】

$$\frac{\Delta \text{吸光度}}{6.22} \times \text{希釈倍率} \times \frac{\text{全体積}}{\text{サンプル体積}} = \text{全酵素活性}$$

【0082】

Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set (Pierce Cat. No. 23215)またはProtein Assay ELC (Roche Diagnostics Cat. No. 1767003)を用いて、タンパク質レベルを決定した。比活性は、タンパク質の単位質量あたりの活性として定義され、修飾IMPDH IIポリペプチドでは約1単位/mgであった。

40

【0083】

実施例7. IMPDH速度安定性アッセイ

ヒスチジンタグ付き修飾IMPDH酵素の速度安定性(図20~24)を測定し、ヒスチジンタグ付き修飾酵素(すなわち、サブドメインで修飾された酵素)の速度安定性をヒスチジンタグ付き野生型IMPDH酵素の速度安定性(図19)と比較した。タグのない野生型酵素の速度安定性も測定した(図18)。次のように速度安定性を測定した：

緩衝液

R1 C(1)：0.437M TAPSO、0.0258M酢酸ナトリウム、2.35mM TCEP、4.32mM IMP、0.3mMジナトリウムEDTA、0.72mMリン酸ナトリウム、10.7mM KCl、および0.1% Suttocide A、pH8.0。代替的な緩衝液R1 C(1)処方、0.437M TAPSO、25.8mM酢酸カリウム、7.5mM TCEP、4.3

50

2mM IMP、0.175% NP40、および0.2% Suttocide A、pH8.0である。

R1 F : 0.116M TAPSO、0.347M酢酸ナトリウム、2.35mM TCEP、4.32mM IMP、3.51mMジナトリウムEDTA、0.72mMリン酸ナトリウム、10.7mM KCl、および0.05% Suttocide A、pH8.0。

R2 : 2.5mM NAD、0.175% NP40、および0.05% Suttocide A、pH6.0。代替的なR2処方、0.1M ACES、10mM NAD、7.5mM TCEP、0.175% NP40、および0.05% Suttocide A、pH6.0である。

ACES=N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸またはN-(カルバモイルメチル)-2-アミノエタンスルホン酸またはN-(カルバモイルメチル)タウリンまたは、2-(カルバモイルメチルアミノ)エタンスルホン酸。

TAPSO=N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]-3-アミノ-2-ヒドロキシ-プロパンスルホン酸または2-ヒドロキシ-3-[トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-1-プロパンスルホン酸。

TCEP=トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンまたは3,3',3''ホスフィニジントリプロピオン酸。

TCEP-HCl=トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロリドまたは3,3',3''ホスフィニジントリプロピオン酸ヒドロクロリド。

【0084】

酵素アッセイ手順

速度安定性アッセイを4 および37で行った。速度をt=0、4 速度と比較した。また、緩衝液R1 C(1)またはR1 Fのいずれかを使用した。次のパラメーターを用いてHitachi 917アナライザーにより速度安定性アッセイを行った：

レートA、10分間、リードウィンドウ28~33

主波長：340nm

副波長：700nm

サンプル体積：2 μ L

R1体積：167 μ L

R2体積：33 μ L

検量タイプ：スプライン

【0085】

先に述べたように、ヒスチジントグ付き修飾IMPDH酵素の速度安定性(図20~24)を測定し、ヒスチジントグ付き修飾酵素(すなわち、サブドメインで修飾された酵素)の速度安定性をヒスチジントグ付き野生型IMPDH酵素の速度安定性(図19)と比較した。図18~24に示される結果は、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドの速度安定性が野生型タンパク質のときとほぼ等しいことを示している(すなわち、ヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチドは、サブドメインで修飾されていないヒスチジントグ付きIMPDHポリペプチドで観測された速度安定性の低下を示さない)。したがって、本明細書に記載されているようにサブドメインでヒスチジントグ付きIMPDHポリペプチドの修飾を行うと、野生型IMPDH酵素と対比して酵素の速度安定性が維持される。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】図1は、野生型IMPDHポリペプチドの触媒コア領域およびサブドメイン領域を示す野生型IMPDHポリペプチドの概略図である。本明細書に記載のヒスチジントグ付き修飾IMPDHポリペプチド中で行われるアミノ酸置換の位置については、図9AおよびB、11AおよびB、13AおよびB、15AおよびB、ならびに17AおよびBを参照されたい。

【図2】図2は、プラスミドpKK117の地図を示している。T5プロモーターおよびlacオペロン(PT5)は、pKK117中のヌクレオチド30~90に位置する。ヒトIMPDH IIコード配列(1545塩基対)は、プラスミド中のヌクレオチド141~1685に位置する。これは、MunIおよびHindIIIの部位に挿入された。サブドメイン領域は、「エクストラドメイン」と記されている。転写終結領域(rrnBT1/T2)は、ヌクレオチド1842~2268に位置する。アンピシリン耐性遺

10

20

30

40

50

伝子(AmpR)は、ヌクレオチド2359~3219に位置する。複製起点(CoIE1)は、pKK117中のヌクレオチド3924~4024に位置する。ヒスチジntag(6ヒスチジン)のコード配列は、pKK117中のヌクレオチド144でATG開始コドンの後のヒト野生型IMPDH II型コード配列の5'末端に挿入された。

【図3】図3は、ヒト野生型IMPDH II型コード配列の5'末端にヒスチジntagのコード配列を組み込むために使用したPCRプライマー((+)および(-))のヌクレオチド配列を示している(配列番号1および配列番号2)。図3はまた、アミノ酸130~142(配列番号3および配列番号4)、155~159(配列番号5および配列番号6)、ならびに167~173(配列番号7および配列番号8)に対応するコード配列の領域でヒスチジntag付きヒト野生型IMPDH II型配列を部位限定突然変異誘発により突然変異させるために使用したPCRプライマー((+)および(-))のヌクレオチド配列をも示している。

10

【図4】図4は、ヒト野生型IMPDH II型のヌクレオチド配列を示している(配列番号9)。

【図5A】図5Aは、ヒト野生型IMPDH II型の推定アミノ酸配列を示している(配列番号10)。サブドメインには下線が付されている。

【図5B】図5Bは、ヒト野生型IMPDH II型の推定アミノ酸配列を示している(配列番号10)。サブドメインには下線が付されている。

【図6】図6は、コード配列の5'末端に組み込まれたヒスチジntagのコード配列を有するヒト野生型IMPDH II型のヌクレオチド配列を示している(配列番号11)。

【図7A】図7Aは、ポリペプチドのアミノ末端に組み込まれたヒスチジntagを有するヒト野生型IMPDH II型の推定アミノ酸配列を示している(配列番号12)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸は、イタリック文字で記されている。

20

【図7B】図7Bは、ポリペプチドのアミノ末端に組み込まれたヒスチジntagを有するヒト野生型IMPDH II型の推定アミノ酸配列を示している(配列番号12)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸は、イタリック文字で記されている。

【図8】図8は、ヒトIMPDH II型 2B+AHクローンAのヌクレオチド配列を示している(配列番号13)。

【図9A】図9Aは、ヒトIMPDH II型 2B+AHクローンAの推定アミノ酸配列を示している(配列番号14)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

30

【図9B】図9Bは、ヒトIMPDH II型 2B+AHクローンAの推定アミノ酸配列を示している(配列番号14)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図10】図10は、ヒトIMPDH II型(3+1A)+AHクローンAのヌクレオチド配列を示している(配列番号15)。

【図11A】図11Aは、ヒトIMPDH II型(3+1A)+AHクローンAの推定アミノ酸配列を示している(配列番号16)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

40

【図11B】図11Bは、ヒトIMPDH II型(3+1A)+AHクローンAの推定アミノ酸配列を示している(配列番号16)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図12】図12は、ヒトIMPDH II型 1,2A+AHクローンBのヌクレオチド配列を示している(配列番号17)。

【図13A】図13Aは、ヒト 1,2A+AHクローンB IMPDH II型の推定アミノ酸配列を示している(配列番号18)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジntagをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

50

【図 1 3 B】図13Bは、ヒト 1,2A+AHクローンB IMPDH II型の推定アミノ酸配列を示している(配列番号18)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジントグをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図 1 4】図14は、ヒト IMPDH II型 3B+AHクローンBのヌクレオチド配列を示している(配列番号19)。

【図 1 5 A】図15Aは、ヒト IMPDH II型 3B+AHクローンBの推定アミノ酸配列を示している(配列番号20)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジントグをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図 1 5 B】図15Bは、ヒト IMPDH II型 3B+AHクローンBの推定アミノ酸配列を示している(配列番号20)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジントグをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図 1 6】図16は、ヒト IMPDH II型(2+1A)+AHクローンBのヌクレオチド配列を示している(配列番号21)。

【図 1 7 A】図17Aは、ヒト IMPDH II型(2+1A)+AHクローンBの推定アミノ酸配列を示している(配列番号22)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジントグをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図 1 7 B】図17Bは、ヒト IMPDH II型(2+1A)+AHクローンBの推定アミノ酸配列を示している(配列番号22)。サブドメインには下線が付されている。また、ヒスチジントグをコードするアミノ酸およびサブドメイン中のアミノ酸置換は、イタリック文字で記されている。

【図 1 8】図18は、ヒト野生型 IMPDH II型の速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。IMPDH 活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

【図 1 9】図19は、ヒスチジントグ付きヒト IMPDH II型の速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。ヒスチジントグ付き IMPDH 活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

【図 2 0】図20は、IMPDH II型 2B+AHクローンAの速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。IMPDH II型 2B+AHクローンA活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

【図 2 1】図21は、ヒト IMPDH II型(3+1A)+AHクローンAの速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。IMPDH II型(3+1A)+AHクローンA活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

【図 2 2】図22は、ヒト IMPDH II型 1,2A+AHクローンBの速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。IMPDH II型 1,2A+AHクローンB活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

【図 2 3】図23は、ヒト IMPDH II型 3B+AHクローンBの速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。IMPDH II型 3B+AHクローンB活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

【図 2 4】図24は、ヒト IMPDH II型(2+1A)+AHクローンBの速度安定性データ(すなわち、残存 IMPDH 活性%/時間)を初期速度に対するパーセント(x軸)vs試験した日数(y軸)として示している。IMPDH II型(2+1A)+AHクローンB活性は、緩衝系R1 C(1)(黒三角、)またはR1 F(+、)を用いて試験し、また4 (黒三角、 +)および25 (、)で試験した。

10

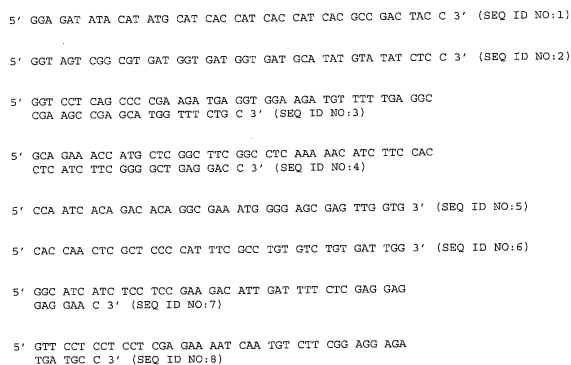
20

30

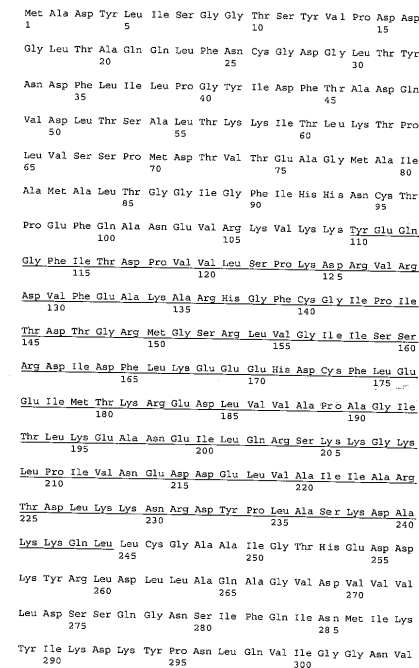
40

50

【 図 3 】



【 図 5 A 】



【 図 4 】

atggccgact	acctgatgat	tgggggcacg	tctcagtgtc	cagacgacgg	actcacagca	60
cagcagctct	tcaactggcg	agacggcttc	acctacaagt	actttctcat	tctccctggg	120
tacatcgact	tcactgcaga	ccagggtgac	ctgactcttg	ctctgaccaa	gaaatacact	180
cttaagaccc	cattctgttc	ctctcccatg	gacacagaca	cagaggctgg	gatggcccta	240
gcaattggcg	ttaacggctg	tattgtcttc	atcacacaca	actgtacacg	tgaattccag	300
gcgaatgaag	tctggaaagt	gaagaatat	gaacagggat	tcatcacaga	ccctctggtc	360
ctcagcccca	aggatcgctg	gcgggatgtt	tttgaggcca	aggcccgcca	tggttctctg	420
ggatccccaa	tccacgaac	aggccggatg	gggagcgctt	tgttgggcat	catctccctc	480
agggacattg	attttctcaa	agaggaggaa	catgactgtt	tcttggaaag	gataatgaca	540
aagagggaag	atctgttggt	agccctcgca	gggtacacac	tgaaggagga	aataagaaat	600
ctcgacgcga	gcgaaggaaa	aaagtgtccc	atgttaaatg	aagatgatga	gcttctggcc	660
atcattgtcc	ggacagacct	gaagaagaat	cgggaactac	cactagcttc	caaagatgcc	720
aagaaacagc	tgtgtgtgtg	ggagcccat	ggcactcatg	aggatgacaa	gtataggctg	780
gacttgcctg	cccgagcttg	tgtgatgtga	tgtggtttgc	actcttccca	gggaataatc	840
actttcccaa	tcaatatgat	caagtcatca	aaagcaaaat	acctcaatat	ccagtcacat	900
ggaggcgaat	gtgtcactgc	tgcgccagcc	aagaacctca	ttgatgcagg	tgtggatgcc	960
ctgggggttg	gcatgggaag	tggctccatc	tgcattacgc	aggaagtgtc	ggcctgtggg	1020
cgggcccaag	caacagcagt	gtacaaagtg	tcaagatgat	cacggcgctt	tgtgttctcg	1080
gtcatctgtg	atggaggaaat	ccaaaatgtg	ggtcatactg	cgaaagcctt	ggcccttgat	1140
gcctccacag	tcatgatgtg	ctctctctctg	gtgcaccaca	ctgaggccctc	tgtgtgaatac	1200
ttcttttccg	ataggagggc	ctaaagaata	tatggoggtg	tgtgttctct	agatgcctatg	1260
gacaagaccc	tccagagcca	gaacagatat	ttcagatgaag	ctgacaaaat	caaagtgccc	1320
cagggagtgt	ctgtgtgtgtg	gcaggacaaa	gggtcaatcc	acaaatttgt	cccttaacctg	1380
atgtgtggca	tccacacact	atgcaggagc	atgtgtggca	agagcttgac	ccaaagtcga	1440
gcctgatgat	actctggggg	gcttaattgt	gagaagagaa	cgctctcagc	ccaggtggaa	1500
gtctgccttc	actagctcca	tcttgatgag	agccggcttt	tcgtga		1545

【図 5 B】

Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile Asp Ala Gly Val Asp Ala
305 310 315 320

Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile Cys Ile Thr Gln Glu Val
325 330 335

Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala Val Tyr Lys Val Ser Glu
340 345 350

Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile Ala Asp Gly Gly Ile Gln
355 360 365

Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Ser Thr Val
370 375 380

Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr Glu Ala Pro Gly Glu Tyr
385 390 395 400

Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys Tyr Arg Gly Met Gly Ser
405 410 415

Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser Gln Asn Arg Tyr Phe Ser
420 425 430

Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly Val Ser Gly Ala Val Gln
435 440 445

Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro Tyr Leu Ile Ala Gly Ile
450 455 460

Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys Ser Leu Thr Gln Val Arg
465 470 475 480

Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe Glu Lys Arg Thr Ser Ser
485 490 495

Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser His Ser Tyr Glu Lys Arg
500 505 510

Leu Phe

【図 6】

atgcatacc atccaccatc a ggcgactac ctgattagtg ggggca gctc ctacttgcca 60

gacgacgac tccacgacac a gacgctcttc aa ctgogag agggcc tacc ctacaatgac 120

ttctcattc tccctgggt a cctgacttc actgcagac aggttg acct gactctgct 180

ctgaccaaga aaatcactc t taagaccoca ct ggttctct ctccca tggc caccgtcaca 240

gaggtggga tggccatag c aatggcgtt ac aggcgcta tgggt test ccaccacaa 300

tgtacacctg aattccagg c aatgaagtt ogaaaagtga agaaat atga acagggattc 360

atcacagacc ctgtggccct cagccccaag ga tgcgtg c gggatgttt tgaggccaag 420

gcccgccatg gttctgggg tatcccaatc ac agacacag gccgga tggg gagcgcgtg 480

gtgggcatac tctctccag ggaatgtat tt tctcaag aggagg aaca tgactgttc 540

ttggaagaga taatgacaaa gagggaaagac tt ggtgttag cccctg cagg catcacactg 600

aaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc aa gaaggga agtgc coar tgtanaatgaa 660

gatgatgagc ttgtgcca t cattgcctg a cagacctga agaat aatg ggaactccc 720

ctagctcca aagatgcca a gaaacagctg ct ggtgggg cagcca ttgg cactcagag 780

gatgacaagt ataggctgg a ctgtctgccc caggctggg tggatgtat ggttttgac 840

tcttccagg gaatttcca tttccagatc aa tatgatca agtaca tcaa agacaaatc 900

cctaatctcc aagtcattgg aggaatgtg gt cactgtg cccaggcca gaacctcatt 960

gatgcagggt tggatgccc t ggggtggg at ggaagtg gctcca tctg cactcagag 1020

gaagtcctgg cctgtgggg gccccaagca acagcagtg acaagg tctc agagtatga 1080

cggtccttg ggttccgt cattgtgat gg aggaatcc aaatgtgg tcatattgg 1140

aaagccttg ccttggggc ctccacagtc atgattggct ctctctggc tggccactg 1200

gagggccctg gtgaatact t ctttccgat gg gatccggc taagaata tgcgtgatg 1260

ggtctctctg atgcatgga c aagcaccctc agcagccaga acagatatt cagtgagct 1320

gacaaatca aagtgccc a gggagtgtct gg tctgtg aggaca aag gtcaatccac 1380

aaattgtcc cttaactga t tctgtgac ca aactcat gccagacat tgggtgcaag 1440

agottgaccc aagtcagc c catgatgac t tggggagc ttaagt ttga gaagagaacg 1500

tctccagccc aggtggaa gg tggctcatc a gctccatt cgtat gagaa ggggttttc 1560

tga 1563

【図 7 A】

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15

Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys
20 25 30

Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile
35 40 45

Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys
50 55 60

Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
65 70 75 80

Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe
85 90 95

Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys
100 105 110

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser
115 120 125

Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly
130 135 140

Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu
145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu Glu
165 170 175

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val
180 185 190

Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln
195 200 205

Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu
210 215 220

Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro
225 230 235 240

Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
245 250 255

Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
260 265 270

Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
275 280 285

Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
290 295 300

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
305 310 315 320

【図 7 B】

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile
325 330 335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala
340 345 350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
355 360 365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala
370 375 380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
385 390 395 400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
405 410 415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
420 425 430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
435 440 445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro
450 455 460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
465 470 475 480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
485 490 495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
500 505 510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
515 520

【図 8】

atgcatacc ataccatca cgcgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctaagtcca 60
gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgoggag acggcctcac ctacaatgac 120
ttttcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gactttctgt 180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttctt ctcccatgga cacagtca 240
gaggtggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtg ttggtttcat ccaccacaac 300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagt ctggaagtga agaatatga acagggattc 360
atcacagacc ctgtgttctt cagccccaag gatcgctgac gggatgtttt tgaggccaag 420
gcccgcatg gttttctggg tatcccaatc acagacacag gcgaatggg aagcgagttg 480
gtgggcatca tctctccag ggacattgat tttctcaag aggaggaaca tgaactgttc 540
ttgggaagaga taatgacaaa gaggggaagac ttggtgttag cccctgcagg catcacactg 600
aaggaggcaa atgaattct gcagcgacg aagaaggaa agttgcccc tgtaaatgaa 660
gatgatgagc ttgtggccat cattgcccg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720
ctagcttcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780
gatgacaagt ataggctgga ctgtctgccc caggctggtg tggatgtagt ggttttgac 840
tcttccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacctaa agacaaatc 900
cctaattccc aagtcaattg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt 960
gatgcaggtg tggatgcccc ggggtgggc atgggaagt gctccatctg cattacgac 1020
gaagtgtcgg cctgtgggg gccccaagca acagcagtg acaaggtgtc agagtatgca 1080
cggcgcttgg gtgttccggt cattgctgat ggggaatcc aaaatgtcgg tcatattgag 1140
aaagccttgg cccctggggc ctccacagtc atgatgggt ctctctcggc tgcccaccat 1200
gagccccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaata tcgggtatg 1260
ggttctctcg atgccatgga caagcactc agcagccaga acagatatct cagtgaagct 1320
gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgtgtgac agacaaagg gtcaatcac 1380
aaatttgccc cttaacctgat tctgggcatc caacatcat gccaggacat tggtgccaa 1440
agcttgaccc aagtcagag catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500
tctcagccc aggtggaagg tgggttccat agctccatt cgtatgagaa cgggtctttc 1560
tga

【図 9 A】

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15
Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys
20 25 30
Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile
35 40 45
Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys
50 55 60
Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
65 70 75 80
Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe
85 90 95
Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys
100 105 110
Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser
115 120 125
Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly
130 135 140
Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Glu Met Gly Ser Glu Leu
145 150 155 160
Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu Glu
165 170 175
His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val
180 185 190
Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln
195 200 205
Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu
210 215 220
Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro
225 230 235 240
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
245 250 255
Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
260 265 270
Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
275 280 285
Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
290 295 300

【図 9 B】

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
305 310 315 320
Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile
325 330 335
Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala
340 345 350
Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
355 360 365
Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala
370 375 380
Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
385 390 395 400
Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
405 410 415
Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
420 425 430
Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
435 440 445
Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro
450 455 460
Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
465 470 475 480
Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
485 490 495
Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
500 505 510
His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
515 520

【図 10】

atgcatacc ataccatca cgcgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctaagtcca 60
gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgoggag acggcctcac ctacaatgac 120
ttttcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gactttctgt 180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttctt ctcccatgga cacagtca 240
gaggtggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtg ttggtttcat ccaccacaac 300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagt ctggaagtga agaatatga acagggattc 360
atcacagacc ctgtgttctt cagccccaag gatcgctgac gggatgtttt tgaggccaag 420
gcccgcatg gttttctggg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagcogcttg 480
gtgggcatca tctctccag agacattgat tttctcagg aggaggaaca tgaactgttc 540
ttgggaagaga taatgacaaa gaggggaagac ttggtgttag cccctgcagg catcacactg 600
aaggaggcaa atgaattct gcagcgacg aagaaggaa agttgcccc tgtaaatgaa 660
gatgatgagc ttgtggccat cattgcccg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720
ctagcttcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780
gatgacaagt ataggctgga ctgtctgccc caggctggtg tggatgtagt ggttttgac 840
tcttccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacctaa agacaaatc 900
cctaattccc aagtcaattg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt 960
gatgcaggtg tggatgcccc ggggtgggc atgggaagt gctccatctg cattacgac 1020
gaagtgtcgg cctgtgggg gccccaagca acagcagtg acaaggtgtc agagtatgca 1080
cggcgcttgg gtgttccggt cattgctgat ggggaatcc aaaatgtcgg acatattgag 1140
aaagccttgg cccctggggc ctccacagac atgatgggt ctctctcggc tgcccaccat 1200
gagccccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaata tcgggtatg 1260
ggttctctcg atgccatgga caagcactc agcagccaga acagatatct cagtgaagct 1320
gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgtgtgac agacaaagg gtcaatcac 1380
aaatttgccc cttaacctgat tctgggcatc caacatcat gccaggacat tggtgccaa 1440
agcttgaccc aagtcagag catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500
tctcagccc aggtggaagg tgggttccat agctccatt cgtatgagaa cgggtctttc 1560
tga

【図 1 1 A】

Met His His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15
Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys
20 25 30
Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile
35 40 45
Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys
50 55 60
Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
65 70 75 80
Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe
85 90 95
Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys
100 105 110
Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser
115 120 125
Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly
130 135 140
Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu
145 150 155 160
Val Gly Ile Ile Ser Ser Glu Asp Ile Asp Phe Leu Glu Glu Glu
165 170 175
His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val
180 185 190
Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln
195 200 205
Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu
210 215 220
Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro
225 230 235 240
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
245 250 255
Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
260 265 270
Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
275 280 285
Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
290 295 300

【図 1 1 B】

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
305 310 315 320
Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile
325 330 335
Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala
340 345 350
Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
355 360 365
Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala
370 375 380
Leu Gly Ala Ser Thr Asp Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
385 390 395 400
Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
405 410 415
Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
420 425 430
Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
435 440 445
Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro
450 455 460
Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
465 470 475 480
Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
485 490 495
Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
500 505 510
His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
515 520

【図 1 2】

atgcacacc accaccatca cgcgcactac ctgattagtg ggggca cgtc ctacgtgcaa
1 120
gacgcgggac tcaacgcaca gcagctcttc aactgcggag aggcgcacac ctacsaatga c
180
ttctctattc tccctgggtc catcgacttc actgcagacc agtggaacct gactctctgt
240
ttgaccaaga aaatcactct taagacacca ct gtttctct ctcacatgga cacagtcaca
300
gaggtcggga tggccatagc aatggcgctt acagcggtla ttgcttcac ccaccacaac
360
tgtcacctcg natccacagg caatgaagtt cggaaagtga agaaat atga acaggagattc
420
atcacagacc ctgtgtctct cagccccaag ca tgcgcgtgc gggatgtttt tgaaggccga
480
gcgcagcatg gtttctcg c tatcccaatc ac agacacag gccgga tggg gagccgcttg
540
gtgggcaccca tctcctcccg ggcactatgat tt tctccaag aggaggaaca tgactgttcc
600
ttgggaagaga taatgacaa a gagggaagac tt ggtggtag cccctg cagg catcacactg
660
aaggaggcaa atgaattct gcagcgcagc aa gaaaggaa agtgc ccat tgtaaatgaa
720
gatgatgagc ttgtggccat cattgcocgg ac agacctga agaaga atcg ggaatcacca
780
ctagcctcca aagatgcaa a gaaacagctg ct ggtggggg cagcca ttgg cactcatgag
840
gatgacaagt ataggctgga c ttgtctcgcc ca ggtcggtg tggatgtagt ggttttgac
900
tcttcccgagg gaaatccat cttccagatc aa tatgatca agtac tcaa agacaaatc
960
cctaactccc aagtcaattg agccaatgtg gt cactgtg cccaggccaa gaaacctcatt
1020
gatgcaggtg tggatgccct gcgggtgggc at gggaaagt gctcca ctg cattacgcag
1080
gaagtgcctg cctgtgggc gccccaagca ac agcagtgct acaagg tctc agagtatgca
1140
cggcgctttg gtgtccgg t cattgtgat gg agaatcc aaaaatg tggg tcatattgoc
1200
aaagccttgg cccctggggc cttccacagtc atgatgggt cttctctggc tggccaccat
1260
gagggccctg gtgaatact cttttccgat gg gatccggc taaga aata tcgggtatg
1320
ggtctctctg atgcctgg a caagcaactc ag cagccaga acagat attt cagtggaact
1380
gacaaatca aagtggccca gggagtgtct gg tctgtgagc aggaca aagg gtcacatcac
1440
aaattgtccc cttacctgat tgcgtgacac ca acactcat gccagacat tggcgccaa
1500
agcttgacc agtcocagc catgatgtac tctggggagc ttaagt tga gaagagacg
1560
tctcagccc agtggaagg tgggtctcat ag cctccatt cgtatgagaa gggcttttc
1620
tga 1623

【図 1 3 A】

Met His His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15
Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys
20 25 30
Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile
35 40 45
Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys
50 55 60
Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
65 70 75 80
Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe
85 90 95
Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys
100 105 110
Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser
115 120 125
Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Glu Ala Glu His Gly
130 135 140
Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu
145 150 155 160
Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu Glu
165 170 175
His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val
180 185 190
Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln
195 200 205
Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu
210 215 220
Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro
225 230 235 240
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
245 250 255
Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
260 265 270
Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
275 280 285
Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
290 295 300

【図 13 B】

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
305 310 315 320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile
325 330 335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala
340 345 350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
355 360 365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala
370 375 380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
385 390 395 400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
405 410 415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
420 425 430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
435 440 445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro
450 455 460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
465 470 475 480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
485 490 495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
500 505 510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
515 520

【図 14】

atgcacacc atcaccatca cgccgactac ctgattagt ggggacgctc ctacgtgcc 60

gacgaaggac tcacagcaca gaagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac 120

ttttctattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gactcttgc 180

ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttctt ctcccattga cacagtcaca 240

gaggtcggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtg ttggtctcat ccacacaaac 300

tgtacacctg aattccaggc caatgaagt cggaaagtga agaaataga acagggattc 360

atcacagacc ctgtgttctt cagccccaa gctgcgtgc gggatgtttt tgaggccaag 420

gcccggcatg gttttcgagg tatcccaatc acagacacag gccgagtgag gacgcgttg 480

gtgggcatca tctctccga agacattgat tttctcagg aggaggaaca tgactgttc 540

ttggaagaga taatgacaaa gaggaagac ttggtgtag cccctgcagg catcacatg 600

aaggaggcaa atgaattct gcagcgagc aagaaggga agtgcccat tgtaaatgaa 660

gatgatgagc ttgtggccat catbgcccg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720

ctagctcca aagatgcca gaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780

gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggtg tggatgtagt ggtttggac 840

tcttccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatc agtaccatca agacaaatc 900

cctaactctc aagtcattgg aggcaatgt gtaactgtc cccaggccaa gaacctatt 960

gatgcagggtg tggatgacct ggggtgggg atgggaagtg gctccatctg cattaacgag 1020

gaagtgcgtg cctgtgggg gccccaagca acagcagtg acaagtgct agagtatgca 1080

cggcgcttg gtgttcgggt cattgtgat ggaggaatcc aaatgtggg tcatattgag 1140

aaagccttg ccttggggg ctccacagtc atgatgggt cctctctggc tgccacctat 1200

gaggccctg gtgaatactt cttttccat gggatccggc taaagaata tcgggtatg 1260

ggttctctg atgcatgga caagcactc agcagccaga acagatattt cagtgaagt 1320

gacaaaatca aagtggccca gggagtctt ggtgctgtg aggacaaagt gtaactcac 1380

aaattgttc cttactgat tgcgtgcac caacactcat gccagagcat tgggtgccaag 1440

agctgaccc aagtccgagc catgatgac tctggggagc ttaagttga gaagagaacg 1500

tctcagccc aggtggaagg tggcgtcat agcctcatt cgtatgagaa gcggcttttc 1560

tga 1563

【図 15 A】

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15

Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys
20 25 30

Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile
35 40 45

Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys
50 55 60

Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
65 70 75 80

Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe
85 90 95

Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys
100 105 110

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser
115 120 125

Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly
130 135 140

Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu
145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ser Ser Glu Asp Ile Asp Phe Leu Glu Glu Glu
165 170 175

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val
180 185 190

Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln
195 200 205

Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu
210 215 220

Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro
225 230 235 240

Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
245 250 255

Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
260 265 270

Gly Val Asp Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
275 280 285

Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
290 295 300

【図 15 B】

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
305 310 315 320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile
325 330 335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala
340 345 350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
355 360 365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala
370 375 380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
385 390 395 400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
405 410 415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
420 425 430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
435 440 445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro
450 455 460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
465 470 475 480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
485 490 495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
500 505 510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
515 520

【図 16】

atgcatcacc atccaccatca cgcgcactac ctgattatgt ggggcaogtc ctacgtgcca 60
gacgacggac tcaacagcaa gcagctcttc aactgoggag aogggctoac ctacaatgac 120
tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gactttctgt 180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctgggttctc ctcccatgga cagactcaaa 240
gaggtcggga tggccatagc aatggcgctt acagcggtta ttgggttcac ccaccacaac 300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagt cggaaagtga agaaatatga acagggattc 360
atocagaccc ctgtgtctct cagcccgcaa gatgaggtgg aagatgtttt tgagggcgaa 420
gocgagcatg gtttctgctg tatcccaatc acagacacag gogaaatggg aagcgagttg 480
gtgggcatca tctctccacg ggacattgat tttctcaaa aggaggaaca tgactgtttc 540
ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttggtgttag cccctgcagg catcacactg 600
aaggaggcaa atgaaattct gcagcgacgc aagaagggaa agttgcccac tgtaaatgaa 660
gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgc acagacctga agaagaatcg ggactaccca 720
ctagctccca aagatgccaa gaacacgctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780
gatgacaagt ataggctgga cttgtctgac caggctgggtg tggatgtagt ggttttggac 840
tcttccaggg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtatcatca agacaaatc 900
cctaattccc aagtcattgg aggcattgtg gtcactgtcg cccaggccaa gaacctcatt 960
gatgcaggtg tggatgcctt gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag 1020
gaagtgcctg cctgtggggc gccccaagca acagcagtgat acaaggtgtc agagtatgca 1080
cggtgctttg gttctcgggt cactgctgat ggaggaaacc aaatgtggg tcatattgctg 1140
aaagccttgg cccctggggc ctccacagtc atgatgggtc ctctctgctg tgcacacct 1200
gagggccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgctgtatg 1260
ggttctctcg atgcatgga caagcacttc agcagccaga acagatattt cagtgaagct 1320
gacaaatcaa aagtggccca gggagtgctt ggtcgtctgc aggacaaagg gtcaatccac 1380
aaattgtccc cttaactgat tgcctggcctc caacactcat gccaggaatc tggtgocaaag 1440
agcttgaccc aagtcggagc catgatgtac tctgggggac ttaagtttga gaagagaacg 1500
tctcagccc aggtggaagg tggcgtccat agcctccatt ogatagagaa goggtctttc 1560
tga 1563

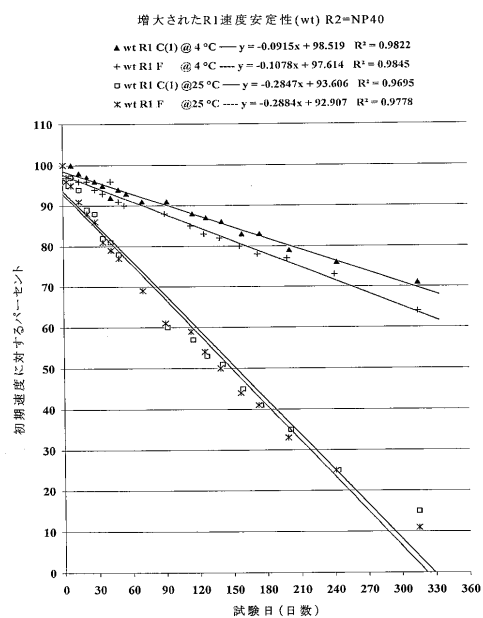
【図 17 A】

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15
Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys
20 25 30
Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile
35 40 45
Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys
50 55 60
Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
65 70 75 80
Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe
85 90 95
Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys
100 105 110
Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser
115 120 125
Pro Glu Asp Glu Val Glu Asp Val Phe Glu Ala Glu Ala Glu His Gly
130 135 140
Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Glu Met Gly Ser Glu Leu
145 150 155 160
Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu Glu
165 170 175
His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val
180 185 190
Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln
195 200 205
Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu
210 215 220
Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro
225 230 235 240
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
245 250 255
Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
260 265 270
Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
275 280 285
Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
290 295 300

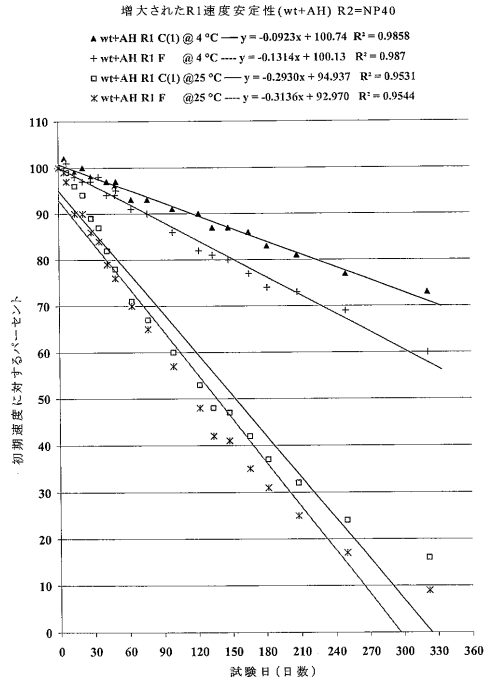
【図 17 B】

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
305 310 315 320
Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile
325 330 335
Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala
340 345 350
Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
355 360 365
Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala
370 375 380
Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
385 390 395 400
Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
405 410 415
Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
420 425 430
Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
435 440 445
Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro
450 455 460
Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
465 470 475 480
Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
485 490 495
Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
500 505 510
His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
515 520

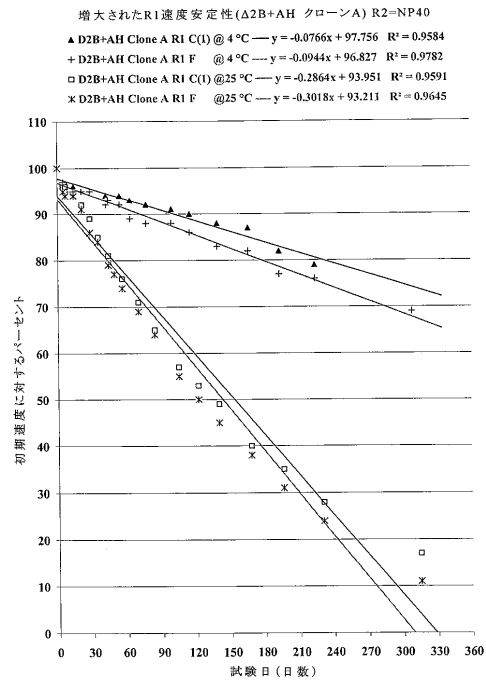
【図 18】



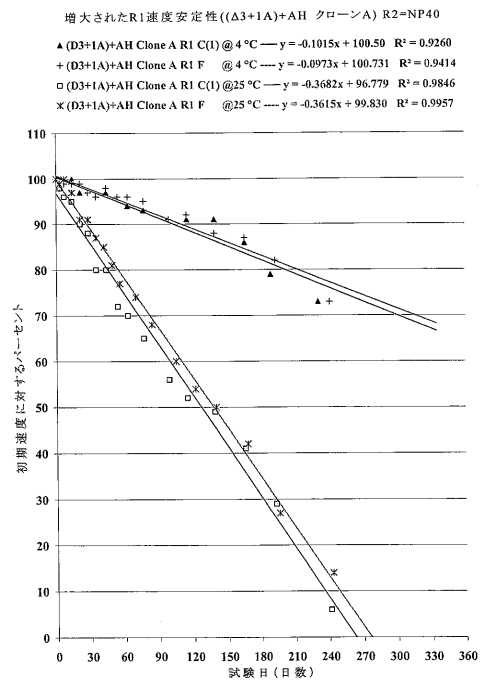
【図 19】



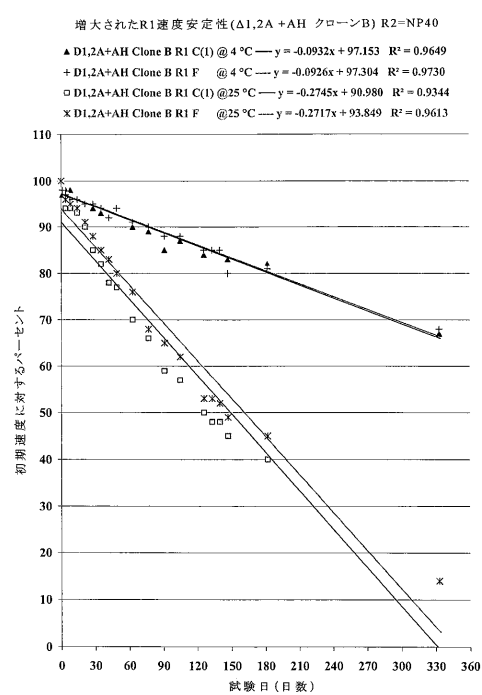
【図 20】



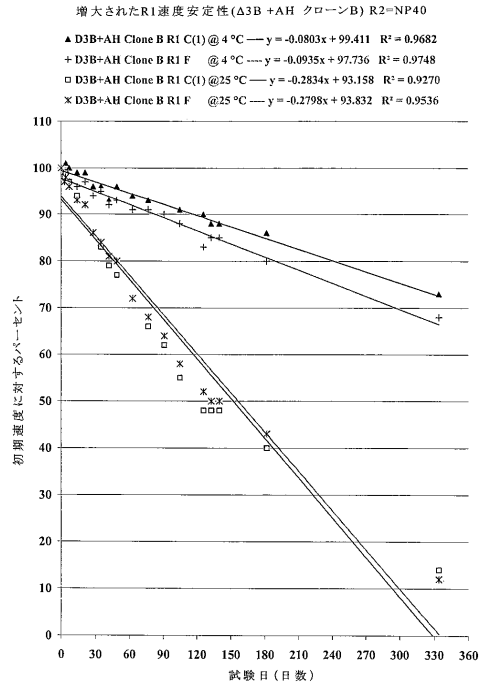
【図 21】



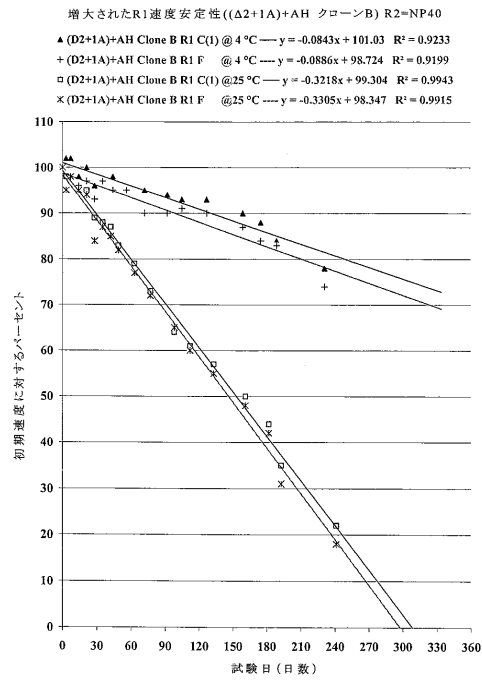
【図 22】



【図 23】



【図 24】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 2

前置審査

(74)代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (72)発明者 アラン アール・ドーン
 アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州, カーメル, ドーブ ドライブ 1 4 2 4 1
 (72)発明者 ジャニス イー・ラガバー
 アメリカ合衆国 4 6 2 2 0 インディアナ州, インディアナポリス, エヌ・ルラル ストリート
 5 6 3 9

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 8 5 9 5 2 (WO, A 1)
 Protein Expr. Purif., 1 9 9 9 年, Vol.17, p.282-289
 Biochem J., 2 0 0 4 年 4 月, Vol.379, p.243-251

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C 1 2 N 1 / 1 5
 C 1 2 N 1 / 1 9
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 5 / 1 0
 C 1 2 N 9 / 0 4
 CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 PubMed