(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4118327号
(P4118327)

(45)発行日　平成20年7月16日(2008.7.16)　(24)登録日　平成20年5月2日(2008.5.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 3　(全 44 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-507857
(86)(22)出願日　平成7年8月17日(1995.8.17)
(65)公表番号　特表平10-504461
(43)公表日　平成10年5月6日(1998.5.6)
(86)国際出願番号　PCT/GB1995/001949
(87)国際公開番号　WO1996/006166
(87)国際公開日　平成8年2月29日(1996.2.29)
審査請求日　平成13年12月18日(2001.12.18)
(31)優先権主張番号　9416880.4
(32)優先日　平成6年8月20日(1994.8.20)
(33)優先権主張国　英国(GB)
(31)優先権主張番号　9422534.9
(32)優先日　平成6年11月8日(1994.11.8)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(73)特許権者　507421522
ゲンダック・リミテッド
イギリス、イー・シィ・２・ブィ　７・キュー・ジェイ　ロンドン、ノーブル・ストリート、１０、オールダー・キャスル、ヘイル・アンド・ドーア内
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　チョー，イェン
シンガポール共和国、シンガポール　０５１１、ハイデラバード・ロード、５、アレキサンドラ・パーク

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡ認識のための結合タンパク質におけるまたはそれに関連する改良

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヌクレオチドトリプレットに結合する亜鉛フィンガー結合ドメインの設計方法であって、該ヌクレオチドトリプレットはＧ又はＴで始まり、該方法は、位置＋１を該亜鉛フィンガー結合ドメインのαヘリックスの一番目のアミノ酸とし、複数の亜鉛フィンガー結合ドメインがあるときは、位置＋＋２をＣ末端側の隣の亜鉛フィンガー結合ドメインのα－ヘリックスの二番目のアミノ酸として、該亜鉛フィンガー結合ドメインの位置－１、＋３及び＋６のアミノ酸を以下のように割り当てることを含む、設計方法：

ａ）　該ヌクレオチドトリプレットの５’側の核酸がＧであれば、位置＋６はＡｒｇであるか、あるいは、位置＋６はＳｅｒ又はＴｈｒであって位置＋＋２はＡｓｐであり；

ｂ）　該ヌクレオチドトリプレットの５’側の核酸がＴであれば、位置＋６はＳｅｒ又はＴｈｒであって位置＋＋２はＡｓｐであり；

ｃ）　該ヌクレオチドトリプレットの中央の核酸がＧであれば、位置＋３はＨｉｓであり；

ｄ）　該ヌクレオチドトリプレットの中央の核酸がＡであれば、位置＋３はＡｓｎであり；

ｅ）　該ヌクレオチドトリプレットの中央の核酸がＴであれば、位置＋３はＡｌａ、Ｓｅｒ又はＶａｌであり；

ｆ）　該ヌクレオチドトリプレットの中央の核酸がＣであれば、位置＋３はＡｓｐ、Ｌｅｕ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり；

ｇ）　該ヌクレオチドトリプレットの３’側の核酸がＧであれば、位置－１はＡｒｇであって位置＋２はＡｓｐであり；
ｈ）　該ヌクレオチドトリプレットの３’側の核酸がＡであれば、位置－１はＧｌｎであって位置＋２はＡｌａであり；
ｉ）　該ヌクレオチドトリプレットの３’側の核酸がＴであれば、位置－１はＡｓｎであるか、あるいは、位置－１はＧｌｎであって位置＋２はＳｅｒであり；　そして
ｊ）　該ヌクレオチドトリプレットの３’側の核酸がＣであれば、位置－１はＡｓｐである。

【請求項２】

ヌクレオチドトリプレットに結合する亜鉛フィンガー結合ドメインの設計方法であって、該ヌクレオチドトリプレットは以下のヌクレオチドトリプレットの何れか一種を含み、該方法は、位置＋１を該亜鉛フィンガー結合ドメインのαヘリックスの一番目のアミノ酸として、該亜鉛フィンガー結合ドメインの位置－１、＋３及び＋６のアミノ酸を以下のように割り当てることを含む、設計方法：
ａ）　該ヌクレオチドトリプレットがＡＴＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＡｌａ又はＶａｌであり、位置＋６はＡｌａ、Ａｓｎ又はＳｅｒであり；
ｂ）　該ヌクレオチドトリプレットがＡＣＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＶａｌであり、位置＋６はＡｓｎ又はＳｅｒであり；
ｃ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＡＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＧｌｙであり、位置＋６はＴｈｒであり；
ｄ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＴＡであれば、位置－１はＧｌｎであり、位置＋３はＳｅｒであり、位置＋６はＳｅｒであり；
ｅ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＴＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり、位置＋６はＧｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり；
ｆ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＧＡであれば、位置－１はＧｌｎであり、位置＋３はＨｉｓであり、位置＋６はＧｌｕ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり；
ｇ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＧＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＨｉｓであり、位置＋６はＡｓｐ又はＴｈｒであり；
ｈ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＣＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＧｌｙ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり、位置＋６はＧｌｙ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり；
ｉ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＡであれば、位置－１はＡｌａ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ａｓｎ又はＧｌｎであり、位置＋３はＡｓｎであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｊ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＴであれば、位置－１はＡｓｐ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり、位置＋３はＡｓｎであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｋ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＧであれば、位置－１はＡｒｇ又はＳｅｒであり、位置＋３はＧｌｙ又はＡｓｎであり、位置＋６はＡｒｇ又はＴｈｒであり；
ｌ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＣであれば、位置－１はＩｌｅ又はＬｅｕであり、位置＋３はＡｓｎであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｍ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＡであれば、位置－１はＡｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ又はＴｈｒであり、位置＋３はＳｅｒ又はＴｈｒであり、位置＋６はＡｒｇ又はＳｅｒであり；
ｎ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＴであれば、位置－１はＡｓｎ又はＴｈｒであり、位置＋３はＳｅｒ又はＴｈｒであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｏ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｌｅｕ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり、位置＋６はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり；
ｐ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＣであれば、位置－１はＡｓｐ又はＧｌｕであり、位置＋３はＳｅｒであり、位置＋６はＡｒｇであり；

ｑ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＧＡであれば、位置－１はＧｌｎであり、位置＋３はＨｉｓであり、位置＋６はＧｌｕであり；
ｒ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＧＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＨｉｓであり、位置＋６はＡｓｐ又はＴｈｒであり；
ｓ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＧＣであれば、位置－１はＡｓｐであり、位置＋３はＨｉｓであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｔ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＡであれば、位置－１はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり、位置＋３はＳｅｒ又はＴｈｒであり、位置＋６はＡｒｇ又はＳｅｒであり；
ｕ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＴであれば、位置－１はＧｌｕ、ＧＩｙ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ又はＳｅｒであり、位置＋３はＡｌａ、Ａｓｐ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｖ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＧであれば、位置－１はＡｌａ又はＡｒｇであり、位置＋３はＡｓｐ、Ｇｌｙ、Ｌｅｕ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり、位置＋６はＧｌｙ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり；
ｗ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＣであれば、位置－１はＡｓｐ又はＧｌｕであり、位置＋３はＬｅｕ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり、位置＋６はＡｒｇであり；
ｘ）　該ヌクレオチドトリプレットがＣＡＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＨｉｓであり、位置＋６はＡｓｐ又はＴｈｒであり；
ｙ）　該ヌクレオチドトリプレットがＣＣＧであれば、位置－１はＡｒｇであり、位置＋３はＡｓｐ、Ｔｈｒ又はＶａｌであり、位置＋６はＧｌｙ、Ａｓｎ、Ａｒｇ又はＳｅｒであり；　そして、
ｚ）　該ヌクレオチドトリプレットがＡＡＡ、ＡＡＴ、ＡＧＡ、ＡＧＴ、ＡＧＣ、ＡＣＴ、ＴＴＴ、ＴＴＣ、ＣＡＴ、ＣＴＴ、ＣＧＡ及びＣＣＴの何れか一つであれば、位置－１はＬｙｓ又はＬｅｕであり、位置＋３はＡｓｎであり、位置＋６はＳｅｒ又はＴｈｒである。

【請求項３】
位置＋１を前記亜鉛フィンガー結合ドメインのαヘリックスの一番目のアミノ酸として、前記亜鉛フィンガー結合ドメインの位置＋２のアミノ酸を以下のように割り当てることを更に含む、請求項２に記載の設計方法：
ａ）　該ヌクレオチドトリプレットがＡＴＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｂ）　該ヌクレオチドトリプレットがＡＣＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｃ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＡＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｄ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＴＡであれば、位置＋２はＡｌａであり；
ｅ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＴＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｆ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＧＡであれば、位置＋２はＡｌａ、Ｇｌｙ又はＶａｌであり；
ｇ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＧＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｈ）　該ヌクレオチドトリプレットがＴＣＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｉ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＡであれば、位置＋２はＧｌｙ又はＳｅｒであり；
ｊ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＴであれば、位置＋２はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ又はＳｅｒであり；
ｋ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＧであれば、位置＋２はＡｓｐ又はＧｌｙであり；
ｌ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＡＣであれば、位置＋２はＡｌａ又はＳｅｒであり；
ｍ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＡであれば、位置＋２はＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｙ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり；
ｎ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＴであれば、位置＋２はＡｓｐ又はＧｌｙであ

り；
ｏ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｐ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＴＣであれば、位置＋２はＳｅｒ又はＴｈｒであり；
ｑ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＧＡであれば、位置＋２はＧｌｙであり；
ｒ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＧＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｓ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＧＣであれば、位置＋２はＳｅｒであり；
ｔ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＡであれば、位置＋２はＡｌａ、Ｇｌｙ又はＧｌｎであり；
ｕ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＴであれば、位置＋２はＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ｇｌｎ又はＳｅｒであり；
ｖ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＧであれば、位置＋２はＡｌａ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ又はＰｒｏであり；
ｗ）　該ヌクレオチドトリプレットがＧＣＣであれば、位置＋２はＧｌｙ、Ａｒｇ又はＳｅｒであり；
ｘ）　該ヌクレオチドトリプレットがＣＡＧであれば、位置＋２はＡｓｐであり；
ｙ）　該ヌクレオチドトリプレットがＣＣＧであれば、位置＋２はＡｌａ、Ａｓｐ又はＳｅｒであり；　そして、
ｚ）　該ヌクレオチドトリプレットがＡＡＡ、ＡＡＴ、ＡＧＡ、ＡＧＴ、ＡＧＣ、ＡＣＴ、ＴＴＴ、ＴＴＣ、ＣＡＴ、ＣＴＴ、ＣＧＡ及びＣＣＴの何れか一つであれば、位置＋２はＨｉｓ又はＳｅｒである。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、とりわけ亜鉛フィンガー結合モチーフを含むポリペプチドの選択および設計の方法、同方法により作られるポリペプチド、およびそのさまざまな応用に関連する。

発明の背景

選択的な遺伝子発現は、タンパク質転写因子と遺伝子の調節領域内にある特定のヌクレオチド配列との相互作用によって仲介される。タンパク質転写因子内で最も広く使用されるドメインは亜鉛フィンガー（Ｚｆ）モチーフのようである。これは、モジュールが繰返されるように使用され、ＤＮＡの配列特異的認識を行なう、独立して折り畳まれた亜鉛含有ミニドメインである（Klug 1993 Gene 135, 83-92）。最初の亜鉛フィンガーモチーフはアフリカツメガエルの転写因子ＴＦＩＩＩＡにおいて確認された（Miller他、1985年EMBO J. 4,1609-1614）。Ｚｆタンパク質の構造についてはＮＭＲ研究（Lee他、1989 Science 245, 635-637）および結晶学（Pavletich & Pabo、1991 Science 252, 809-812）によって確定されてきた。

ＤＮＡ結合タンパク質ドメインでどのようにして異なるＤＮＡ配列を区別するかは、分化と発生における遺伝子発現の制御等の重要な過程を理解する上で重要な疑問点である。亜鉛フィンガーモチーフについては、真核生物のゲノムに広く行き渡っていることやショウジョウバエ（Harrison & Travers 1990 EMBO J. 9、207-216）、マウス（Christy他、1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、7857-7861）およびヒト（Kinzler他、1988 Nature（London）332、371）における遺伝子発現を制御するタンパク質において重要な役割を果たしていることから、この問題に何らかの見識を与える目的で広範な研究が行なわれてきた。

配列特異的ＤＮＡ結合タンパク質の多くはαヘリックスを主溝内へ挿入することによりＤＮＡ二重螺旋に結合する（Pabo & Sauer、1992 Annu. Rev. Biochem. 61、1053-1095、Harrison、1991 Nature（London）353、715-719およびKlug、1993 Gene 135、83-92）。配列特異性は、αヘリックスのアミノ酸側鎖と塩基対の端部上に露出されるアクセス可能な基との間の幾何学的かつ化学的相補性から生じる。ＤＮＡ配列のこのような直接的読取りに加え、ＤＮＡ骨格との相互作用は、複合体を安定させるものであり、かつ塩基配列に依存して核酸のコンフォメーションに対し敏感である（Dickerson & Drew 1981 J. Mol. Bi

ol．149、761-786）。ある種のアミノ酸側鎖が特定の塩基対を好むという可能性に基づき、すべての複合体におけるタンパク質とＤＮＡとの特異的結合は、単純な一連のルールによってアプリオリに説明できるかもしれない。しかし、タンパク質－ＤＮＡ複合体の結晶構造は、タンパク質がＤＮＡ認識のモードにおいて特異質になる可能性を示しており、これは少なくとも一部にはタンパク質が自己の知覚αヘリックスをＤＮＡに対し提示するために代替的ジオメトリを使用することができ、単一のアミノ酸によりなされる異なった塩基接触の多様化が可能になったり、またその逆になったりするからである（Matthews、1988 Nature（London）335、294-295）。

Ｚｆタンパク質の突然変異誘発により、ドメインのモジュール方式が確認された。指定部位突然変異誘発を利用して、配列相同性の整合および構造に関するデータから確認された鍵となるＺｆ残基を変化させ、Ｚｆドメインの特異性が変更されてきた（Nardelli他、1992 NAR26、4137-4144）。この文献の著者らは、新規な結合特異性の設計が望ましいが、設計は配列および構造に関するデータを考慮する必要があるだろうと示唆している。彼らは「亜鉛フィンガー認識コードを達成する見込みはない」とも述べている。

にもかかわらずそのようなコードを目指して多くの研究グループが作業を進めてきたが、今のところごく限られた規則が提案されているのみである。たとえば、Desjarlais他（1992b PNAS89、7345-7349）は、ポリペプチドＳｐｌのフィンガー２における３つの接触残基（共通配列に基づく）のうち２つの系統的な突然変異を利用して、限定された縮重コードが存在する可能性を示唆している。続いて彼らはこのことを利用して、結合特異性および親和性が異なる３つのＺｆタンパク質を設計した（Desjarlais & Berg、1993 PNAS 90、2250-2260）。彼らは、特異性および親和性が予測可能なＺｆタンパク質の設計は「必ずしも容易ではないかもしれない」としている。

我々は、ＴＦIIIＡクラスの亜鉛フィンガーが構造およびＤＮＡとの相互作用が非常に単純であることから、より一般的に適用可能な特異性の一連の規則を導き出すのに適した候補であると考える。この亜鉛フィンガーは、亜鉛イオンを利用してαヘリックスに抗する逆平行βシートのパッキングを安定させる独立した折り畳みドメインである（Miller他、1985 EMBO Ｊ．4、1609-1614、Berg、1988 Proc．Natl．Acad．Sci．USA 85、99-102およびLee他、1989 Science 245、635-637）。亜鉛フィンガー－ＤＮＡ複合体の結晶構造は、相互作用の半保存されたパターンを示し、そこにおいて、αヘリックスからの３つのアミノ酸がＤＮＡにおける３つの隣接する塩基（トリプレット）に接触している（Pavletich & Pabo、1991 Science 252、809-817、Fairall他、1993 Nature（London）366、483-487、およびPavletich & Pabo 1993 Science 261、1701-1707）。したがって、ＤＮＡ認識のモードは基本的にアミノ酸と塩基との間の１対１の相互作用である。亜鉛フィンガーは独立したモジュールとして作用するため（Miller他、1985 EMBO Ｊ．4、1609-1614、Klug & Rhodes 1987 Trends Biochem．Sci．12、464-469）、トリプレット特異性が異なる複数のフィンガーを組合せることにより、より長いＤＮＡ配列の特異的認識を行なうことができるはずである。ＤＮＡ標的配列と結合するため３つのアミノ酸が提示されるように各フィンガーは折り畳まれているが、結合はこれらの位置のうち２つのみを介して直接的に行なわれ得る。たとえばＺｉｆ２６８の場合には、タンパク質は標的ＤＮＡの９塩基対連続配列に接触する３つのフィンガーから作られる。核酸と直接接触しないと思われるリンカー配列がフィンガーの間に見られる。

タンパク質工学実験によって、１つまたはそれ以上のαヘリックスの位置をいくつかのタンパク質において変化させると、個々の亜鉛フィンガーのＤＮＡ結合特性を合理的に変化させることができることがわかった（Nardelli他、1991 Nature（London）349、175-178、Nardelli他、1992 Nucleic Acids Res．20、4137-4144、およびDesjarlais & Berg 1992a Proteins 13、272）。αヘリックス上のアミノ酸と、結合されたＤＮＡ配列の対応する塩基とを関連付けるいくつかの原則を提案することが既に可能となっている（Desjarlais & Berg 1992b Proc．Natl．Acad．Sci．USA 89、7345-7349）。しかしながら、このやり方では、αヘリックス上の変更された位置が予め判別されているため、現在重要とは考えられていない位置の役割について見過ごす可能性があり、かつ第２には状況の重要性に

よって、特異性に影響を及ぼす付随的改変が必要になる場合があり（Desjarlais & Berg 1992b）、アミノ酸と塩基との間の重要な相関関係が誤って解釈される可能性がある。
突然変異体Ｚｆタンパク質の結合を調査するため、ThiesenおよびBach（1991 FEBS 283、23-26）は、Ｚｆフィンガーを突然変異させ、電気泳動移動度シフト検定を使用して、ランダム化されたオリゴヌクレオチド類に対するそれらの結合を研究した。その後ファージディスプレイ技術を使用してバクテリオファージの表面上にＺｆ突然変異体タンパク質のランダムなライブラリを発現させた。フィンガー１内の４つの位置が無作為化（ランダム化）されているＺｉｆ２６８の３つのＺｆドメインがRebarおよびPabo（1994 Science 263、671-673）によって繊維状ファージの表面上に提示された。このライブラリには、新たな結合特異性を有するＺｆタンパク質を得るために、標的ＤＮＡオリゴヌクレオチド配列に結合させることによって何回もの親和性選択が行なわれた。新規な結合特異性および親和性を創出するため、ファージディスプレイでのＺｉｆ２６８のフィンガー１のランダムな突然変異誘発（RebarおよびPaboにより選択されたものと同じ位置での）もまたJamieson他（1994年、Biochemistry 33、5689-5695）により使用されている。
より最近では、Wu他（1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 344-348）が、各々Ｚｉｆ２６８からの異なるフィンガーからなり、かつ各々αヘリックスの６つまたは７つの位置が無作為化された３つのライブラリを作っている。選別において６つのトリプレットが使用されたが、いずれの配列塩基によってもフィンガーは戻らず、かつＺｉｆ２６８結合部位の３つのトリプレットを対照として個別に使用したところ、選択されたフィンガーの大多数が、野性型Ｚｉｆ２６８フィンガーの配列に似ておらず、かつインビトロ（in vitro）でそれぞれの標的部位に強く結合することができるにもかかわらず、通常、異なるトリプレットに対しては強く区別をつけることができなかった。著者らはこの結果をコードの存在に否定的な証拠と解釈している。
要約すると、ＺｆタンパクモチーフはＤＮＡ結合タンパク質に広く行き渡っており、かつ結合は、各々標的ＤＮＡ配列において１つの塩基対に接触する３つの鍵となるアミノ酸を介するものであることがわかっている。複数のモチーフは、モジュールによるものでありかつ互いに連結されて連続するＤＮＡ配列を認識する１組のフィンガーを構成する（たとえば3フィンガーのタンパク質が９ｍｅｒを認識する等）。ＤＮＡ結合に必要なこの鍵となる残基は配列のデータによりかつ構造に関する情報から同定されてきた。指定されかつランダムな突然変異誘発によって、特異性および親和性を決定する上でのこれらアミノ酸の役割が確認されてきた。ファージディスプレイを用いてフィンガーのランダム突然変異体の新たな結合特異性についてスクリーニングが行なわれてきた。新たなフィンガー特異性の設計を補助する認識コードを求めて研究が進められてきたが、特異性の予測は困難であることが指摘されてきた。

発明の要約

第１の局面で、本発明はＤＮＡ配列のライブラリを提供し、各々の配列はウィルス粒子上での提示（ディスプレイ）のために少なくとも１つの亜鉛フィンガー結合モチーフをコードし、該配列は、位置－１、＋２、＋３、＋６、ならびに位置＋１、＋５および＋８の少なくとも１つでアミノ酸がラシダムに割当てられている亜鉛フィンガー結合モチーフをコードする。
亜鉛フィンガー結合モチーフは、当業者には周知の、亜鉛フィンガー結合タンパク質において見られるαヘリックス構造モチーフである。上記の番号付けでは、亜鉛フィンガー結合モチーフのαヘリックスにおける最初のアミノ酸が位置＋１となっている。位置－１のアミノ酸残基は厳密に言えば亜鉛結合フィンガーモチーフのαヘリックスの一部を構成しないことは当業者には明らかであろう。しかしながら、－１の残基は機能的に大変重要であることがわかったので、本発明の目的のため結合モチーフαヘリックスの一部として考える。
配列は、位置＋１、＋５および＋８のすべてにランダムな割当てを有する亜鉛フィンガー結合モチーフをコードし得る。また、該配列は他の位置（たとえば位置＋９、ただしこの位置ではアルギニンまたはリシン残基を保持することが一般に好ましい）で無作為化（ラ

ンダム化）され得る。さらに、指定された「ランダム」な位置におけるアミノ酸の割当ては、純粋にランダムとすることができるが、それらの位置には疎水性残基（Ｐｈｅ、ＴｒｐまたはＴｙｒ）またはシステイン残基を避けることが好ましい。

亜鉛フィンガー結合モチーフは、（逆平行βシートを含む）亜鉛フィンガーを形成するように他のアミノ酸のコンテクスト内に存在する（亜鉛フィンガータンパク質に存在してもよい）ことが好ましい。さらに、亜鉛フィンガーは、好ましくは亜鉛フィンガーポリペプチドの一部として提示され、このポリペプチドは介在リンカーペプチドにより結合される複数の亜鉛フィンガーを含む。典型的には、配列のライブラリは、該亜鉛フィンガーポリペプチドが、アミノ酸配列が規定された（一般的には野性型配列の）２つまたはそれ以上の亜鉛フィンガーと、上記で規定された態様で無作為化された亜鉛フィンガー結合モチーフを有する１つの亜鉛フィンガーを含むようになっている。このポリペプチドの無作為化されたフィンガーは、規定された配列をもつ２つまたはそれ以上のフィンガーの間に位置することが好ましい。この規定された複数のフィンガーは、このポリペプチドのＤＮＡに対する結合の「相」を成立させ、そのことによって無作為化されたフィンガーの結合特異性の増大を助ける。

好ましくはこれらの配列はＺｉｆ２６８ポリペプチドの中央のフィンガーの無作為化された結合モチーフをコードする。これらの配列で好都合なのは、野性型Ｚｉｆ２６８における中央のフィンガーのアミノ酸Ｎ末端とＣ末端をもコードし、それぞれ第１および第３の亜鉛フィンガーをコードすることである。特定の具体例においては、配列はＺｉｆ２６８ポリペプチドの全体をコードする。当業者であれば、ここでリンカーペプチドの配列および／または亜鉛フィンガーポリペプチドのβシートに対しても各種改変を行ない得る点が理解されるであろう。

さらなる局面において、本発明はＤＮＡ配列のライブラリを提供し、その各々の配列は、ウィルス粒子上での提示のための亜鉛フィンガー結合ポリペプチドの少なくとも中央のフィンガーの亜鉛フィンガー結合モチーフをコードし、これらの配列は、位置－１、＋２、＋３および＋６にアミノ酸がランダムに割当てられる結合モチーフをコードする。亜鉛フィンガーポリペプチドはＺｉｆ２６８であることが好都合である。

典型的には、いずれのライブラリの配列も、亜鉛フィンガー結合ドメインをバクテリオファージｆｄの小コートタンパク質（ｐIII）との融合体としてクローン化できるようになっている。好都合には、このコードされたポリペプチドは亜鉛フィンガードメインのＮ末端としてトリペプチド配列Ｍｅｔ－Ａｌａ－Ｇｌｕを含んでおり、これはバクテリオファージｆｄ系を使用しての発現および提示が可能であることが知られている。好ましくは、このライブラリは10^6またはそれ以上の異なる配列を含む（理想的には、実施可能な限り多く）。

他の局面において、本発明は特定の標的ＤＮＡ配列に結合するための亜鉛フィンガーポリペプチドを設計する方法であって、標的ＤＮＡ配列の少なくとも有効部分に対して複数の亜鉛フィンガー結合モチーフの各々をスクリーニングするステップと、標的ＤＮＡ配列に結合するモチーフを選択するステップとを含む方法を提供する。標的ＤＮＡ配列の有効部分は、ＤＮＡに対する亜鉛フィンガー結合モチーフの結合を可能にするのに十分な長さのＤＮＡである。これは必要な最小の配列情報（標的ＤＮＡ配列に関連する）である。望ましくは少なくとも２回、好ましくは３回またはそれ以上のスクリーニングを行なう。

本発明はまた特定の標的ＤＮＡ配列に結合するための亜鉛フィンガーポリペプチドを設計する方法であって、複数の亜鉛フィンガー結合モチーフの各々の１つまたはそれ以上のＤＮＡトリプレットに対する結合を比較するステップと、好ましい結合特性を示すモチーフを選択するステップとを含む方法を提供する。好ましくは、この方法の前に上のパラグラフで定義した方法に従うスクリーニング工程を行なう。

したがって、２つのステップによる選択工程が好ましく、第１のステップは、主にまたは全体的に標的配列に対する親和性に基づき複数の亜鉛フィンガー結合モチーフ（典型的にはディスプレイライブラリの形態において）の各々をスクリーニングし、第２のステップは最初のスクリーニングステップにより選択されるモチーフの結合特性を比較しかつ特定

のＤＮＡトリプレットについて好ましい結合特性を有するモチーフを選択する。
複数の亜鉛フィンガー結合モチーフを１つのＤＮＡトリプレットに対してスクリーニングする場合、このトリプレットは適切な位置の標的ＤＮＡ配列に相当することが好ましい。ただし、さまざまな結合モチーフの結合の特異性を比較するためには、複数の亜鉛結合モチーフの標的ＤＮＡ配列に相当しない１またはそれ以上のＤＮＡトリプレット（たとえば３つの塩基対のうちの１つだけが異なる）に対する結合を比較することも望ましい。複数の亜鉛フィンガー結合モチーフを３つのＤＮＡ塩基の可能な６４の順列すべてに対してスクリーニングしてもよい。
適切な亜鉛フィンガー結合モチーフが同定され得られると、それらのモチーフは１つの亜鉛フィンガーポリペプチドにおいて有利に組合わされる。典型的には、これは組換えＤＮＡ技術を利用することによって行なわれ、ファージディスプレイシステムの使用が好都合である。
他の局面において、本発明は６４の配列から構成されるＤＮＡライブラリを提供し、各々の配列は上に規定する選択方法においての使用に適した形の３つのＤＮＡ塩基の６４の可能な順列のうちの異なる１つを含む。好ましくは、これら配列は分離手段と結びつけるかまたは結びつけ得る。有利には、分離手段は以下のうちの１つから選択される、すなわちミクロタイタープレート、磁気ビーズまたはアフィニティクロマトグラフィカラムのうちの１つである。配列をビオチニル化することが都合よい。好ましくは、これらの配列は他の箇所で説明するとおり１２のミニライブラリ内に含まれる。
さらなる局面において、本発明は上に規定される方法の一方または両方により設計される亜鉛フィンガーポリペプチドを提供する。好ましくは、この方法により設計する亜鉛フィンガーポリペプチドは複数の亜鉛フィンガーの組合せ（隣接する亜鉛フィンガーを介在リンカーペプチドで結合する）を含み、各フィンガーが亜鉛フィンガー結合モチーフを含む。好ましくは、亜鉛フィンガーポリペプチド内の各亜鉛フィンガー結合モチーフは、上に規定する方法によって好ましい結合特性について選択されたものである。介在リンカーペプチドは各々の隣接するフィンガー間で同じでもよく、または同じ亜鉛フィンガーポリペプチドが複数の異なるリンカーペプチドを含んでもよい。介在リンカーペプチドは天然起源の亜鉛フィンガーポリペプチド内に存在するものでもまたは人工的配列のものでもよい。特に、介在リンカーペプチドの配列は、たとえば標的配列に対する亜鉛フィンガーポリペプチドの結合を最適化する目的でさまざま変化し得る。
亜鉛フィンガーポリペプチドが複数の亜鉛結合モチーフを含む場合、各々のモチーフが、対象とする配列において連続するかまたは実質的に連続するＤＮＡとなる複数のＤＮＡトリプレットに結合することが好ましい。いくつかの結合モチーフの候補またはモチーフの組合せの候補が存在する時、これらはポリペプチドの最適組成を決定するために実際の標的配列に対しスクリーニングすることができる。以下に説明するとおり、スクリーニング検定においては、比較のため競合体ＤＮＡを含めてもよい。
全タンパク質－ＤＮＡ相互作用のうち非特異的要素は糖－リン酸の骨格に対する接触と塩基対に対する曖昧な接触とを含み、複合体の形成に対しかなりの駆動力となり、また与えられるＤＮＡ配列に対してかなりの親和性でＤＮＡ－結合タンパク質の選別をもたらすものであるが、特異性を示さないものである。したがって、ポリペプチドを設計する場合にはこれらの非特異的相互作用を最小限に抑えるため、選択は、競合体ＤＮＡのバックグラウンドにおける特異的結合部位の濃度を低くして行なうのが好ましく、かつ結合は、好ましくは局所的濃縮による影響および固体表面上に固定されたリガンドに対する多価ファージの結合活性を避けるために溶液中で行なうべきである。
偽の選択に対する保護手段として、個々のファージの特異性を、選択の最終ラウンドの後に決定する必要がある。少数の結合部位に対する結合についてテストを行なう代わりに、可能なすべてのＤＮＡ配列をスクリーニングすることが望ましい。
本発明者らにより真にモジュールとなる亜鉛結合ポリペプチドを設計することが可能である点が示され（下記）、それにおいて各亜鉛結合フィンガーの亜鉛結合モチーフは特定のトリプレットに対するその親和性に基づき選択される。したがって、単に、標的ＤＮＡに

存在するトリプレットの配列について考慮しかつ結合するのに必要な結合特性を有する亜鉛フィンガー結合モチーフを含む亜鉛フィンガーを適切な順序に組合せることによって、どの所望の標的ＤＮＡ配列にも結合することができる亜鉛フィンガーポリペプチドを設計することが、十分に当業者の能力の範囲内でのことになるはずである。標的ＤＮＡのわかっている配列の長さが長いほど、亜鉛フィンガーポリペプチドに含まれ得る亜鉛フィンガー結合モチーフの数は多くなる。たとえば、わかっている配列が９塩基長しかない場合には、ポリペプチドに含まれ得る亜鉛フィンガー結合モチーフの数は３つである。わかっている配列が２７塩基長であれば、理論的には９つまでの結合モチーフがポリペプチドに含まれ得る。標的ＤＮＡ配列が長いほど、ＤＮＡの所与の部分におけるその発生の可能性が低くなる。

さらに、ポリペプチドに含めるため選択されたこれらのモチーフは、それらの結合特性をさらに最適化するために人工的に修飾され得る（たとえば指定された突然変異誘発によって）。代替的には（または付加的には）、隣接する亜鉛結合フィンガーに結合するリンカーペプチドの長さおよびアミノ酸配列は上に説明したとおりさまざまにすることができる。そうすることによって対象とするＤＮＡ配列に対して亜鉛フィンガー結合モチーフの位置を変位させる効果が得られ、それによって結合特性にさらに影響を与えることができる。

一般的には、標的トリプレットに対し高い親和性と高い特異性とを有するモチーフを選択することが好ましい。

さらなる局面において、本発明は、対象とする核酸配列に結合する亜鉛フィンガーポリペプチドを製作するためのキットであって、ベクター中でクローニングするのに適した形態の結合特性がわかっている亜鉛フィンガー結合モチーフをコードするＤＮＡ配列のライブラリと、そのライブラリから１つまたはそれ以上の配列を受入れるのに適したベクター分子と、使用説明とを含むキットを提供する。

ベクターは、単一の亜鉛フィンガーポリペプチドとしてクローン化された配列の発現を導くことができるものが好ましい。特に、ベクターは、ウィルス粒子、典型的には当業者に知られるウィルスディスプレイ粒子の類の表面に提示される単一の亜鉛フィンガーポリペプチドとしてクローン化された配列の発現を導くことができるものが好ましい。ＤＮＡ配列は、発現したポリペプチドが相当数の亜鉛フィンガーポリペプチドに自己集合することができるような形態のものが好ましい。

上に規定するキットは、結合特性が既にわかっている複数の亜鉛フィンガー結合モチーフを含む亜鉛フィンガーポリペプチドを設計する上で特に有用性があることが明らかであろう。他の局面において、本発明は、適切な結合特性を有する亜鉛フィンガー結合モチーフが依然として同定されていない場合に使用するためのキットを提供し、すなわち本発明によるキットは、対象とする核酸配列に結合する亜鉛フィンガーポリペプチドを調製するためのキットであって、各々が上に規定した方法によるスクリーニングおよび／または選択に適した形態の亜鉛フィンガー結合モチーフをコードするＤＮＡ配列のライブラリと、使用説明とを含む。

このキットにおけるＤＮＡ配列のライブラリは、本発明の第１の局面に従うライブラリであることが有利である。好都合には、キットはまた６４のＤＮＡ配列のライブラリを含んでもよく、各配列は先に規定した選択方法においての使用に適した形態の３つのＤＮＡ塩基の可能な６４の順列のうち異なる１つを含んでいる。典型的には、この６４の配列は１２の別個のミニライブラリの中にあって、各ミニライブラリは、関連するトリプレットにおいて１つの位置が固定され２つの位置が無作為化（ランダム化）されている。好ましくは、このキットはまた、適切な緩衝液および／または結合された亜鉛フィンガーの検出に使用するための試薬を含んでもよい。このキットはまた、亜鉛フィンガー結合モチーフをコードするＤＮＡ配列のライブラリから選択された１またはそれ以上の配列を受入れるのに適したベクターを含むことができ、有用である。

好ましい実施例において、６４のトリプレットのうちの１つにより前もって選択されていて、特異的ＤＮＡ結合活性を有すると考えられる中央の亜鉛フィンガーについての遺伝子

を分離するために、本発明の教示を使用する。所与のトリプレットに結合するフィンガーを特定する遺伝子の混合物が、３組のプライマを使用して、ＰＣＲにより増幅される。これらプライマの組は、亜鉛フィンガーの３フィンガーポリペプチドへのアセンブリを明らかにするような、ユニークな制限部位を有することになる。適切な試薬をキットの形で備えることが好ましい。

たとえば、最初の組のプライマはＳｆｉＩおよびＡｇｅＩ部位を有し、第２の組がＡｇｅＩおよびＥａｇＩ部位、かつ第３の組がＥａｇＩおよびＮｏｔＩ部位を有しているかもしれない。なお、「第１」の部位をＳｆｉＩとし、かつ「最後」の部位をＮｏｔＩにして、ファージベクターの毎ＳｆｉＩおよびＮｏｔＩ部位へのクローニングを容易にすることが好ましい。配列ＡＡＡＧＧＧＧＧＧを認識する３フィンガータンパク質のライブラリを組立てるため、トリプレットＧＧＧにより選択されるフィンガーは、プライマの最初の２組を使用して増幅され、かつプライマの第３の組を使用して増幅されたトリプレットＡＡＡにより選択されたフィンガーに連結される。組合せのライブラリは、ファージの表面上でクローン化され、９塩基対の部位を使用し一まとめにして最良の組合せのフィンガーを選択することができる。

６４のトリプレットの各々に結合するフィンガーについての遺伝子は、各組のプライマにより増幅し、適切な制限酵素を用いて切断することができる。３フィンガータンパク質のためのこれら構築用ブロックは、上に説明したような使用のためのキットを構成する要素として販売することができる。異なるプライマで増幅したライブラリについても同様で、４または５フィンガーのタンパク質を構築することができる。

さらに、すべてのトリプレットにより選択されたフィンガーのすべての組合せからなる大型（予め組立てられた）ライブラリを、９ｂｐ．またはそれよりずっと長いＤＮＡフラグメントを使用するＤＮＡ結合タンパク質の単一ステップ選択用に開発することもできる。この特定の用途では新規な３フィンガータンパク質の大変大きいライブラリが必要になるが、ファージディスプレイ以外の選択方法、たとえばタンパク質およびｍＲＮＡが連結されている、（アフィマックス（Affimax）が開発した）ストールされたポリソーム（Stalled Polysomes）を使用することが好ましい。

さらなる局面において、本発明は標的細胞において対象とする遺伝子の発現を変化させる方法であって、（必要な場合）対象とする遺伝子の構造領域および／または調節領域のＤＮＡ配列の少なくとも一部を決定するステップと、配列がわかっているＤＮＡに結合する亜鉛フィンガーポリペプチドを設計し、この亜鉛フィンガーポリペプチドを標的細胞中（好ましくはその核の中）に存在するようにさせるステップとを含む方法を提供する。（既にわかっている場合にはＤＮＡ配列を決定する必要がないことは明らかであろう。）

調節領域は、対象とする遺伝子の構造領域からかなり離れている可能性がある（たとえば離れた位置にあるエンハンサ配列など）。好ましくは亜鉛フィンガーポリペプチドは上に規定した本発明の方法の一方または両方により設計される。

標的配列に亜鉛フィンガーポリペプチドを結合することで、たとえばそのポリペプチドが結合する標的配列の性質（たとえば構造性または調節性）に応じて対象とする遺伝子の発現が増減し得る。

さらに、有利には、亜鉛フィンガーポリペプチドは、他のタンパク質からの機能的ドメイン（たとえば制限酵素、リコンビナーゼ、レプリカーゼ、インテグラーゼ等からの触媒領域）あるいは「合成」エフェクタードメインでさえも含み得る。ポリペプチドはまた、核局在化シグナル等の活性化またはプロセッシングシグナルを含み得る。これらは、核内の標的（ゲノムＤＮＡ等）に対するポリペプチドの結合を増強するためポリペプチドを細胞の核に向けさせる際特に有用である。このような局在化シグナルの特定的な例はＳＶ４０の大型Ｔ抗原からのものである。このような他の機能的ドメイン／シグナル等は亜鉛フィンガーポリペプチドとの融合体として存在することが好都合である。他の望ましい融合パートナーは、結合活性を有する免疫グロブリンまたはそのフラグメント（たとえばＦａｂ、ｓｃＦｖ等）を含む。

亜鉛フィンガーポリペプチドは、このポリペプチドの発現を導くＤＮＡの細胞へのデリバ

リーの結果、細胞において原位置（in situ）で合成され得る。ＤＮＡのデリバリーを容易にする方法は、当業者によく知られており、たとえば組換えウィルスベクター（レトロウィルス、アデノウィルス等）、リポソーム等がある。代替的には、亜鉛フィンガーポリペプチドは細胞の外部で作られた後細胞に運ぶことも可能である。デリバリーは、ポリペプチドをリポソーム等に組込んだりまたはポリペプチドを標的部分（たとえば抗体またはホルモン分子の結合部）に付けることによって容易になり得る。実際、亜鉛フィンガータンパク質が、遺伝子発現を制御する上でオリゴヌクレオチドやタンパク質－核酸（ＰＮＡ）よりもかなり有利な点の１つは、標的細胞へのタンパク質のベクターのないデリバリーであると考えられる。これ以外に、細胞表面受容体に対する抗体を含む可溶性タンパク質挿入細胞の多くの例が知られている。本発明者らは現在、ＮＩＰ（４－ヒドロキシ－５－ヨード－３－ニトロフェニルアセチル）を認識することができる一本鎖（ｓｃ）Ｆｖフラグメントに対する抗－ｂｃｒ－ａｂｌフィンガー（下の例３を参照）の融合を行なっている。ＮＩＰと共役されたマウスのトランスフェリンを用いてマウスのトランスフェリン受容体を介してフィンガーをマウスの細胞へ運ぶ。

固定化された亜鉛フィンガーが必要な用途（たとえば特異的核酸の精製）には、ＮＩＰでコーティングした媒体（たとえばミクロタイターウェル、樹脂等）を抗ＮＩＰｓｃＦｖｓに融合される亜鉛フィンガー用の固相支持体として使用することもできる。

特定の実施例では、本発明は、細胞分裂を可能にする遺伝子の発現を阻害する亜鉛フィンガーポリペプチドを細胞に存在させることによって、細胞分裂を阻害する方法を提供する。

特定の実施例においては、本発明は癌を治療する方法であって、癌細胞の分裂を可能にする遺伝子の発現を阻害する亜鉛フィンガーポリペプチドを患者にデリバリーするかまたは患者の体内に存在せしめるステップを含む方法を提供する。標的はたとえば癌遺伝子または癌細胞内で過度に発現している正常遺伝子等が考えられる。

本発明者らの知識の範囲では、これまで遺伝子発現の調節における（以下に記述）亜鉛フィンガーポリペプチドの設計および使用の成功例は全く発表されていない。この画期的発明はさまざまな可能性を提示する。特に、亜鉛フィンガーポリペプチドを疾病に関連する遺伝子の発現を調節することで治療および／または予防用途用に設計することができる。たとえば、亜鉛フィンガーポリペプチドを使用してヒトまたは動物における外来遺伝子（たとえば細菌またはウィルス性病原体の遺伝子等）の発現を阻害しまたは突然変異した宿主遺伝子（癌遺伝子等）の発現を改変することができる。

したがって本発明は疾病に関連する遺伝子の発現を阻害することができる亜鉛フィンガーポリペプチドを提供する。典型的には、この亜鉛フィンガーポリペプチドは天然由来のポリペプチドではなく、疾病に関連する遺伝子の発現を阻害するよう特別に設計されるものである。このポリペプチドは上に定義する本発明の方法の一方または両方により設計することが好都合である。疾病に関連する遺伝子は癌遺伝子で、典型的にはＢＣＲ－ＡＢＬ融合癌遺伝子またはｒａｓ癌遺伝子である。特定の実施例において、本発明はＤＮＡ配列ＧＣＡＧＡＡＧＣＣに結合するように設計されかつＢＣＲ－ＡＢＬ融合癌遺伝子の発現を阻害することができる亜鉛フィンガーポリペプチドを提供する。

さらに他の局面において、本発明は亜鉛フィンガーポリペプチドを結合することによって、サンプル混合物に存在する対象となる核酸配列を修飾する方法であって、対象とする配列の少なくとも一部分に対して親和性を有する亜鉛フィンガーポリペプチドに同サンプル混合物を接触させて、この亜鉛フィンガーポリペプチドが対象とする配列に特異的に結合するようにさせるステップを含む方法を提供する。

本明細書中で使用される「修飾」という用語は、単に亜鉛フィンガーポリペプチドの結合によって配列が修飾されると考えられることを意味する。ヌクレオチドの配列の変化（および他の変化）は、次いで対象とする核酸に対する亜鉛フィンガーポリペプチドの結合を引起こすことができるが、ここではそのようなヌクレオチドの配列の変化を示唆しようとしていない。核酸配列はＤＮＡであることが好都合である。

対象とする核酸の修飾（亜鉛フィンガーポリペプチドによる結合という意味での）はいく

つかの方法のいずれにおいても検出することができる（たとえばゲル移動度シフト検定、ラベルされた亜鉛フィンガーポリペプチドの使用等。ラベルは放射性、蛍光、酵素またはビオチン／ストレプトアビジンラベルを含みうる）。
対象とする核酸配列の修飾（およびその検出）が必要とされるすべてとなり得る（たとえば疾病の診断等において）。ただし、サンプルをさらに処理することが望ましい。亜鉛フィンガーポリペプチド（およびこのポリペプチドに特異的に結合した核酸配列）をサンプルの残りの部分から分離することが好ましい。亜鉛フィンガーポリペプチドを固相支持体に結合すれば、このような分離が容易になる。たとえば、亜鉛フィンガーポリペプチドをアクリルアミドまたはアガロースゲルマトリックス内に存在させてもよいしまたより好ましくは膜の表面上またはミクロタイタープレースのウェル内に固定化する。
適切に設計された亜鉛フィンガーポリペプチドの可能な用途は以下のとおりである。
ａ）　治療（たとえば２本鎖ＤＮＡを標的とするもの）
ｂ）　診断（たとえば遺伝子配列における突然変異を検出する等。本研究では、「誂えた」亜鉛フィンガーポリペプチドが塩基対１つ分異なるＤＮＡ配列を区別できることがわかっている。）
ｃ）　ＤＮＡの精製（亜鉛フィンガーポリペプチドを使用して溶液から制限フラグメントを精製したりまたはゲル上のＤＮＡフラグメントを見えるようにすることができる［たとえばポリペプチドが適切な融合パートナーに連結していたり、または抗体で調べることによって検出される場合］）。
さらに、亜鉛フィンガーポリペプチドはｓｓまたはｄｓＲＮＡ（たとえばＲＮＡ分子の多くに存在するような自己相補的ＲＮＡ）等の他の核酸または分子レベルで細胞の事象に影響を与える他の可能な機構を提供すると考えられるＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドさえも標的にすることができる。
例１において、本発明者らは明確にされたオリゴヌクレオチド標的配列を使用して、ランダムな亜鉛フィンガー結合モチーフライブラリを構成し、スクリーニングするためのファージディスプレイ技術の使用について記述、論証に成功している。
例２においては、例１のスクリーニング過程によって選択された亜鉛フィンガー結合モチーフ配列についての分析を開示し、無作為化されたＤＮＡ標的配列のミニライブラリに対する結合によってモチーフのＤＮＡ特異性を研究し、標的トリプレットの各位置に受容可能な塩基のパターンである「結合部位サイン」の存在を明らかにしている。
例３においては、先の２つのセクションの発見を利用して、親和性の高い特定のＤＮＡ標的に結合させるため、亜鉛フィンガー結合ポリペプチドを合理的に選択かつ修飾しており、このペプチドが標的配列に結合しかつ生体外で（in vitro）培養される細胞において遺伝子発現を修飾できることがはっきり示されている。
例４は代替的亜鉛フィンガー結合モチーフのライブラリの開発を記述している。
例５は特別な臨床的重要性のあるＤＮＡ配列に結合する亜鉛フィンガー結合ポリペプチドの設計について記述している。
ここで本発明について例および添付の図面を参照してさらに説明することにする。図において、
図１は、ファージコートタンパク質に融合される亜鉛フィンガー結合モチーフを提示するファージ粒子のアフィニティ精製を示す模式図である。
図２はファージディスプレイライブラリにおいて使用される３つのアミノ酸配列を示す図である。
図３はファージディスプレイ粒子のアフィニティ精製において使用される３つのオリゴヌクレオチドのＤＮＡ配列を示す図である。
図４はさまざまな亜鉛フィンガー結合モチーフについて決定された結合部位サインの「チェッカーボード」である。
図５はさまざまな結合モチーフおよび標的ＤＮＡトリプレットについて、ＤＮＡ（ｎＭ）の濃度に対する飽和分率を示す３つのグラフを示す。
図６はｐ１９０ｃＤＮＡにおけるＢＣＲ配列とＡＢＬ配列との間の融合体のヌクレオチド

配列とＢＣＲおよびＡＢＬ遺伝子における対応するエキソン境界を示す図である。
図７はＢＣＲ／ＡＢＬ融合体に対する結合についてのテスト用に設計されたさまざまな亜鉛フィンガー結合モチーフのアミノ酸配列を示す図である。
図８はペプチド結合（$A_{450-460}$ｎｍにより測定される）と標的または対照ＤＮＡ配列のＤＮＡ濃度（μＭ）との関係を示すグラフである。
図９は上のパネルにおいてはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）検定の薄層クロマトグラフィ分析の結果を示し、かつその結果を下のパネルでは棒グラフで示す。
図１０はさまざまなトランスフェクションされた細胞（パネルＡ－Ｄ）の蛍光抗体分析の写真を示す。
図１１はさまざまなトランスフェクションされた細胞について時間に対する生存度をパーセンテージで示すグラフである。
図１２はＡＢＬ特異的およびアクチン特異的プローブを使用したさまざまなトランスフェクションされた細胞系のノーザンブロット分析を示す図である。
図１３および図１４は亜鉛フィンガー結合ポリペプチドを設計するさまざまな方法を模式的に示す図である。
図１５は特定のＤＮＡ配列（ｒａｓ癌遺伝子）に結合するよう設計されたポリペプチドにおける亜鉛フィンガーのアミノ酸配列を示す図である。
例１
この例では、本発明者らはスクリーニング技術を用いて亜鉛フィンガー結合モチーフによる配列特異的ＤＮＡ認識の研究を行なった。この例は、バクテリオファージの表面上に提示された亜鉛フィンガー結合モチーフのライブラリが、所与のＤＮＡトリプレットに結合することができるフィンガーの選択をいかにして可能にするかを説明する。同じトリプレットに結合する選択されたフィンガーのアミノ酸配列を比較して、配列特異的ＤＮＡ認識がいかにして起こるかを調査した。いくつかのαヘリックスの位置からの塩基接触を伴う、亜鉛フィンガーとＤＮＡとの間のコードされた相互作用という観点から結果を理論付けることができる。
新たな特異性を有するタンパク質の合理的だが偏った設計に対する他の選択肢として、大型のプールから所望の突然変異体を分離するやり方がある。そのようなタンパク質を選択する強力な方法には、バクテリオファージｆｄの小コートタンパク質（ｐIII）への融合体としてペプチドをクローニングする方法（Smith 1985 Science 228、1315-1317）またはタンパク質ドメインをクローニングする方法（McCafferty他1990 Nature（London）348、552-554、Bass他、1990 Proteins 8、309-314）があり、これによるとキャプシドの先端上にペプチドおよびタンパク質が発現する。対象のペプチドを提示するファージをアフィニティ精製し、かつ増幅して、選択のさらなるラウンドおよびクローン化遺伝子のＤＮＡ配列決定に利用することができる。本発明者らは、機能的亜鉛フィンガータンパク質をｆｄファージの表面上で提示することができかつ誘導されたファージを特異的ＤＮＡでコーティングした固体支持体上で捕獲できることを実証した後、この技術を亜鉛フィンガー－ＤＮＡ相互作用の研究に応用した。Ｚｉｆ２６８（３つの亜鉛フィンガーを含むマウス転写因子、Christy他、1988年）のＤＮＡ結合ドメインからの中央フィンガーの変異型を含むファージディスプレイライブラリを作った。固定した配列のＤＮＡを使用して、数ラウンドの選択を通じてこのライブラリからファージを精製し、所与のＤＮＡに結合するいくつかの異なるが関連のある亜鉛フィンガーが得られた。機能的に等価なフィンガーのアミノ酸配列における類似性を比較することによって、これらのフィンガーのＤＮＡとの相互作用のありそうなモードを推理する。驚くべきことに、多くの塩基接触が、亜鉛フィンガーのαヘリックス上にある３つの主要な位置から生じ得るようであり、（これは結果論として）ＤＮＡに結合するＺｉｆ２６８の結晶構造（Pavletich & Pabo 1991年）の意味するところに相通じる。所望の特異性を有する亜鉛フィンガーを選択または設計できるということは、亜鉛フィンガーを含むＤＮＡ結合タンパク質をここに「誂える」ことができることを意味する。

「材料および方法」
遺伝子の構成およびクローニングについて。転写因子IIIA（ＴＦIIIA）の最初の３つのフィンガー（残基３－１０１）に対する遺伝子を、それぞれＮｏｔＩおよびＳｆｉＩの制限部位を含む順方向プライマおよび逆方向プライマを用いてＴＦIIIAのｃＤＮＡクローンからＰＣＲによって増幅した。Ｚｉｆ２６８フィンガー（残基３３３－４２０）の遺伝子は、ＳｆｉＩおよびＮｏｔＩのオーバーハングを与える８つのオーバーラップした合成オリゴヌクレオチドから組立られた。ファージライブラリのフィンガーのための遺伝子を、３つの短い相補的リンカーを用いて指向性の末端対末端連結により４つのオリゴヌクレオチドから合成し、それぞれＮｏｔＩとＳｆｉＩの部位を含んだ順方向および逆方向のプライマを用いて一本鎖からＰＣＲにより増幅した。さらに逆方向ＰＣＲプライマは亜鉛フィンガーペプチドの最初の３つのアミノ酸としてＭｅｔ－Ａｌａ－Ｇｌｕを導入し、かつその後に本文中で議論するような野性型またはライブラリフィンガーの残基が続いた。必要な場合、ＳｆｉＩとＮｏｔＩでの消化によってクローニングオーバーハングを生成した。フラグメントを１μｇの同様に調製したＦｄ－Ｔｅｔ－ＳＮベクターに連結した。これは、ｆｄ－ｔｅｔ－ＤＯＧ１の誘導体であって（Hoogenboom他、1991 Nucleic Acids Res.19、4133-4137）、ｐｅｌＢリーダの区分と酵素ＳｆｉＩの制限部位（下線部分）とが、次のオリゴヌクレオチド（Ｓｅｑ　ＩＤ　Ｎｏ．１）を用いる指定部位突然変異誘発によって付加されているものである。

5' CTCCTGCAGTTGGACCTGTGCCATGGCCG

GCTGGGCCGCATAGAATGGAACAACTAAAGC 3'

このオリゴヌクレオチドはポリリンカーの領域においてアニールする（L. Jespers、私信）。エレクトロコンピテントなＤＨ５α細胞を２００ｎｇアリコート中で組換えベクターにより形質転換させ、１％グルコースの２ｘＴＹ培地中で１時間増殖させ、１５μｇ／ｍｌテトラサイクリンと１％グルコースとを含むＴＹＥ上で平板培養した。
図２はファージディスプレイライブラリにおいて使用されるＺｉｆ２６８からの３つの亜鉛フィンガーのアミノ酸配列（Ｓｅｑ　ＩＤ　Ｎｏ．２）を示す。上と下の列はそれぞれ第１および第３のフィンガーの配列を示す。真中の列は中央フィンガーの配列を表わす。中央フィンガーのαヘリックスにおける無作為化された位置は「X」で示す残基を有する。アミノ酸位置は第１のらせん残基（位置１）に対して番号付けされている。保存されたＬｅｕおよびＨｉｓを除いて、位置－１から＋８のアミノ酸に対して、コドンは（Ｇ，Ａ，Ｃ）ＮＮの均等な混合物である。第１の塩基位置においてＴを停止コドンを避けるために除外しているが、これはＴｒｐ、Ｐｈｅ、ＴｙｒおよびＣｙｓについてのコドンが表現されないという残念な効果がある。位置＋９はコドンＡ（Ｇ、Ａ）Ｇにより特定され、ＡｒｇまたはＬｙｓのいずれかを可能にする。疎水性コアの残基は円で囲み、亜鉛リガンドは黒地の円に白抜き文字で示している。亜鉛フィンガーのβシートおよびαヘリックスを形成する位置については配列の下に記す。
「ファージの選択」
コロニーを平板から２００ｍｌの２ｘＴＹ／Ｚｎ／Ｔｅｔ（５０μＭ　Ｚｎ（CH_3COO）$_2$および１５μｇ／ｍｌテトラサイクリンを含む２ｘＴＹ）へ移し一晩増殖させた。５０μＭ　Ｚｎ（CH_3COO）$_2$を含む２０％ＰＥＧ／２．５ＭＮａＣｌの０．２容量を用いた２回の沈澱により培養物の上清からファージを精製し、亜鉛フィンガーファージ緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、５．０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭの$MgCl_2$および５０μＭのＺｎ（CH_3COO）$_2$）中に再懸濁した。ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ（ダイナル（Dynal））を亜鉛フィンガーファージ緩衝液中で洗浄し、同じ緩衝液を無脂肪乾燥乳（マーベル（Marvel））６％に調製したもので１時間室温でブロックした。ファージの選択は３ラウンドにわたって行なわれ、第１のラウンドではビーズ（１ｍｇ）がビオニチル化されたオリゴヌクレオチド（～８０ｎＭ）で飽和され、その後ファージ結合前に洗浄されたが、第２および第３のラウンドでは、１．７ｎＭオリゴヌクレオチドと５μｇポリｄＧＣ（シグマ（Sigma））をファージとともにビーズに添加した。１５

℃で１時間にわたる結合反応（１．５ｍｌ）が、無脂肪乾燥乳（マーベル）２％およびトゥイーン（Tween）２０の１％に調製された亜鉛フィンガーファージ緩衝液中で行なわれ、典型的には５×１０^{11}のファージが含有された。ビーズは１ｍｌの同じ緩衝液で１５回洗浄された。ファージは５分間０．１Ｍトリエチルアミン中での振とうにより溶出され、かつ等容量の１ＭのＴｒｉｓ、ｐＨ７．４で中和された。２×ＴＹ中の対数期の大腸菌ＴＧｌを３７℃で３０分間溶出したファージで感染させかつ上記のように平板培養した。ファージの力価は感染されたバクテリアの連続希釈物を平板培養することにより決定された。

アフィニティ精製に基づくファージ選択の過程を図１に模式的に示す。亜鉛フィンガー（Ａ）は、小コートタンパク質（Ｃ）に対する融合体としてｆｄファージ（Ｂ）の表面上に発現される。第３のフィンガーはＤＮＡの螺旋により大体が隠れている。亜鉛フィンガーファージは、ストレプトアビジンがコーティングされた常磁性ビーズ（Ｅ）に付着する５′ビオニチル化ＤＮＡオリゴヌクレオチド［Ｄ］に結合され、磁石［Ｆ］を用いて捕獲された。（図は、Dynal ＡＳおよびMarks他（1992 J. Biol. Chem. 267、16007-16105）からのものを脚色したものである。）

図３は、（ｉ）ＴＦIIIAの最初の３つのフィンガーを提示するファージと、（ii）Ｚｉｆ２６８の３つのフィンガーを提示するファージと、（iii）ファージディスプレイライブラリからの亜鉛フィンガーファージとを精製するのに使用されるＤＮＡオリゴヌクレオチドの配列（Ｓｅｑ　ＩＤ　Ｎｏ．３－８）を示す。Ｘ線結晶構造において使用されるＺｉｆ２６８共通オペレータ配列（Pavletich & Pabo 1991 Science 252、809-817）は、（ii）と（iii）において強調して示し、（iii）では「Ｘ」が、新しい特異性を有するファージを精製するために使用されるオリゴヌクレオチドにおける理想的なオペレータからの塩基の変化を表わしている。一本鎖のビオチニル化は円で囲んだＢで示す。

「選択されたファージの配列決定」

上記のような３ラウンドの選択を行なった後に得られた形質転換細胞の単一コロニーを２ｘＴＹ／Ｚｎ／Ｔｅｔ中で一晩増殖させた。培養物の小さなアリコートが－２０℃で１５％グリセロール中に貯蔵され、これを保管所として使用した。一本鎖のＤＮＡを培養物の上清中のファージから調製し、かつシーケナーゼ（Sequenase（商標）２．０キット（米国バイオケミカル社、U.S. Biochemical Corp.）を使用して配列決定した。

結果および議論

「ＴＦIIIAまたはＺｉｆ２６８からの３フィンガーＤＮＡ結合ドメインのファージディスプレイ」

ファージディスプレイライブラリの構築に先立ち、本発明者らは、３つの完全に機能的な亜鉛フィンガーを含むペプチドはベクターＦｄ－Ｔｅｔ－ＳＮ中でクローニングすると生きたｆｄファージの表面上に提示され得ることを明らかにした。予備実験では、本発明者らはｐIIIへの融合体としてまずＴＦIIIAからの３つのＮ末端フィンガー（Ginsberg他、1984 Cell 39、479-489）をクローニングし、次にＺｉｆ２６８からの３つのフィンガー（Christy他、1998年）をクローニングした。その双方についてＤＮＡ結合部位はわかっている。小コートタンパク質に融合化したペプチドが、抗ｐIII抗体（Stengele他、1990J. Mol. Biol. 212、143-149）を用いてウェスタンブロットで検出された。ファージ調製物中の全ｐIIIのうちおよそ１０％から２０％が融合タンパク質として存在していた。

いずれの組のフィンガーを提示するファージも特異的ＤＮＡオリゴヌクレオチドに結合することが可能であったが、これは亜鉛フィンガーがいずれの場合においても発現されかつ正しく折り畳まれたこと示している。特異的オリゴヌクレオチドでコーティングした常磁性ビーズを、その上でＤＮＡ結合ファージを捕獲するための媒体として使用し、遊離のビーズまたは非特異的ＤＮＡでコーティングされたビーズの場合と比べて、１００倍から５００倍以上のそのようなファージを一貫して回収することが可能であった。代替的には、Ｚｉｆ２６８のうち３つのフィンガーを提示するファージを、亜鉛フィンガーを保有していないＦｄ－Ｔｅｔ－ＳＮファージで１：１．７×１０^{3}の比率に希釈し、その混合物をＺｉｆ２６８オペレータＤＮＡでコーティングしたビーズとともにインキュベートした時

、溶出されかつ大腸菌へトランスフェクションされた全ファージの３つに１つが、コロニーハイブリッド形成によってＺｉｆ２６８遺伝子を運ぶことが示されたが、これは亜鉛フィンガーファージについて５００を超えるエンリッチメントファクターとなる。したがって、明らかに、ｆｄファージ上に提示された亜鉛フィンガーが、特定の複合体を形成できるＤＮＡ配列に優先的に結合することができ、単一のアフィニティ精製ステップで５００倍まで必要なファージを濃縮することが可能になる。したがって、複数回の選択および増幅によって、配列特異的ＤＮＡ結合が可能な非常に稀少なクローンが大型のライブラリから選択され得る。

「Ｚｉｆ２６８からの亜鉛フィンガーのファージディスプレイライブラリ」

本発明者らはＺｉｆ２６８の３つのフィンガーのファージディスプレイライブラリを作製し、そのうち中央のフィンガーにおける選択された残基を無作為化し（図２）、かつ修飾したＺｉｆ２６８オペレータ配列（Christy & Nathans 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、8737-8741）を用いて所望の特異性を有する亜鉛フィンガーを保有するファージを分離した。Ｚｉｆ２６８オペレータ配列のうち中央のＤＮＡトリプレットが対象の配列に改変されている（図３）。データベース分析（Jacobs 1992 EMBO Ｊ. 11、4507-4517）により示唆される一次的および二次的な推定の塩基認識位置を両方とも研究できるように、本発明者らは、αヘリックスの第１の残基（位置＋１）を基準にして、保存されるＬｅｕおよびＨｉｓを除く位置－１から＋８が、それらの位置ではほとんど生じることのないＰｈｅ、Ｔｙｒ、ＴｒｐおよびＣｙｓ（Jacobs 1993年、ケンブリッジ大学博士論文）を除くいずれのアミノ酸にもなり得るような中央フィンガーのライブラリを設計した。さらに、本発明者らは、位置－２でＳｅｒとフィンガー間接触を作る可能性のある（Pavletich & Pabo 1991年）位置＋９が、その位置で最も頻繁に発生する残基であるＡｒｇまたはＬｙｓの２つのいずれかになるようにした。

Ｚｉｆ２６８の結晶構造（Pavletich & Pabo 1991年）に基づくこのプロトコルの論理は、タンパク質－ＤＮＡ接触の全体的な記録は隣りにある２つによって固定されるので、無作為化されたフィンガーは中央のトリプレットに向けられるというものである。この論理によれば、無作為化されたフィンガーのうちどのアミノ酸が、配列がわかっているＤＮＡと特異的複合体を形成する上で最も重要であるかを調べることができる。包括的なバリエーションがαヘリックスのすべての推定される接触位置にプログラムされるので、ＤＮＡ結合における各位置の重要性の客観的研究を行なうことができる（Jacobs 1992年）。

８つの可変位置の完全な縮重を仮定すれば、必要なファージディスプレイライブラリの大きさは（$16^7 \times 2^1$）＝５．４×10^8となるが、Ｆｄ－Ｔｅｔ－ＳＮによる形上質転換の効率には実質的に限界が存在するので、本発明者らはそのうち２．６×10^6のみをクローニングできた。したがって使用したライブラリはαヘリックスの可能なバリエーションのすべてを網羅するのに理論上必要な大きさに比べて２００倍ほど小さいものである。それにもかかわらず、所与のＤＮＡ配列に高い親和性および特異性で結合するファージを分離することができ、これは亜鉛フィンガーモチーフの顕著な融通性を示すものである。

「ファージディスプレイ選択から推定される亜鉛フィンガー－ＤＮＡ複合体におけるアミノ酸－塩基接触」

フィンガー２のバリエーションに対して結合部位を形成することが可能な６４塩基トリプレットのうち、本発明者らは現在までのところ３２個を使用して記載のとおり亜鉛フィンガーファージの分離を試みている。これらの選択から生じた結果を表１に示す。表１は、Ｚｉｆ２６８オペレータの変異体で３ラウンドのスクリーニングを行なった後に選択されたライブラリファージのクローンからの変異体αヘリックス領域のアミノ酸配列を示す。

表 1

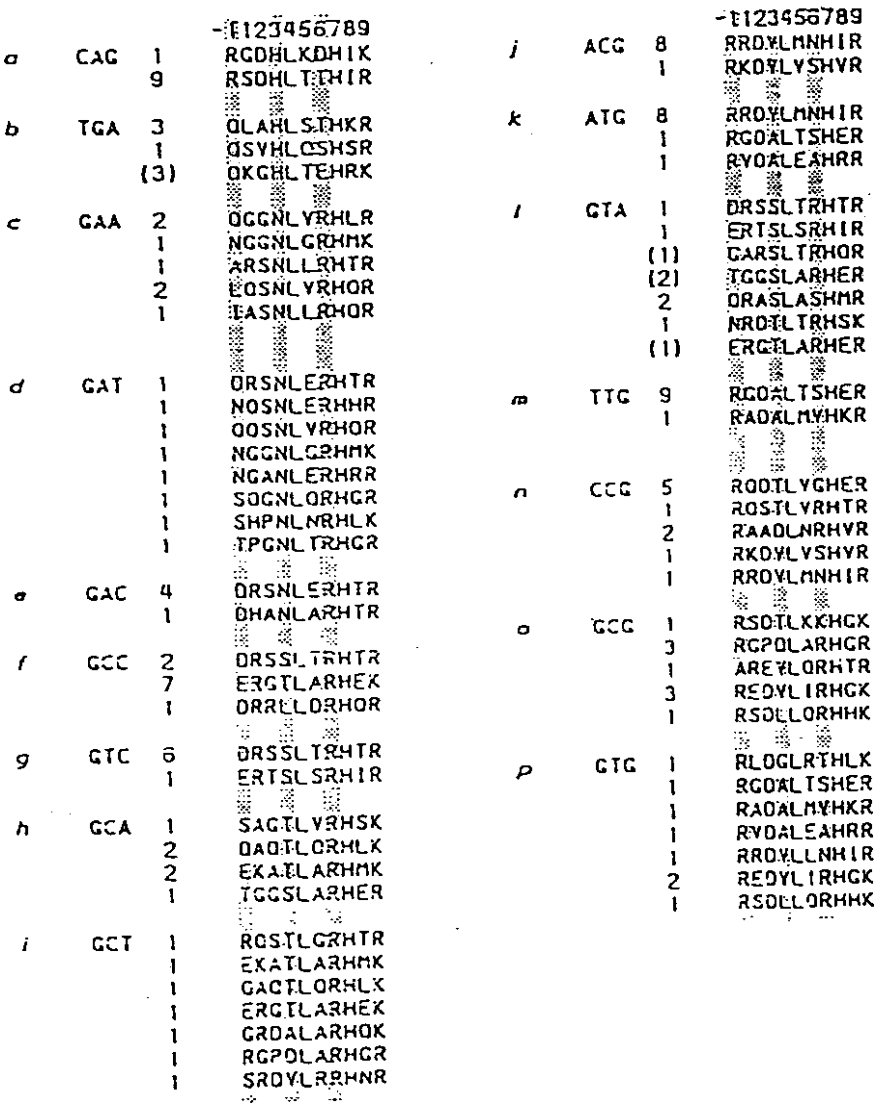


表１において、１文字のコードで並べられたアミノ酸配列は、その精製に使用されたＤＮＡオリゴヌクレオチド（ａからｐ）の横に並べて示されている。後者は、特異体Ｚｉｆ２６８オペレータの「結合された」鎖における中央ＤＮＡトリプレットの配列によって表わされる。アミノ酸位置は第１のらせん残基（位置１）に対して番号付けされ、かつ３つの主要な認識位置を強調して示す。添付した番号は、そのクローンの配列決定された集団（５から１０のコロニー）におけるそれぞれの発生数を示し、括弧書の番号の場合、クローンは最終ラウンドではなく、最終から２番目のラウンドの選択で検出されたものである。ここに示すＤＮＡトリプレット以外のものもライブラリから亜鉛フィンガーファージを選択しようとして用いたが、ほとんどが２つのクローンを選択し、その一方はαヘリックス配列ＫＡＳＮＬＶＳＨＩＲを有し、もう一方は配列ＬＲＨＮＬＥＴＨＭＲを有していた。これらのトリプレットはＡＣＴ、ＡＡＡ、ＴＴＴ、ＣＣＴ、ＣＴＴ、ＴＴＣ、ＡＧＴ、ＣＧＡ、ＣＡＴ、ＡＧＡ、ＡＧＣおよびＡＡＴであった。

概して、本発明者らは、３ラウンドの選択（参照）の後、すべてが同じ限られた組のファージをもたらす５′または３′グアニンのないトリプレットに特異的に結合する亜鉛フィンガーを選択することはできていない。しかしながら、ライブラリをスクリーニングするのに使用する他のトリプレットの各々に対して、一群の亜鉛フィンガーファージが取出さ

れる。これらの群の中に無作為化されたαヘリックスの配列偏向が見られ、これはＤＮＡに接触するために使用されるアミノ酸の位置および種類を明らかにするものとして解釈される。たとえば、トリプレットＧＡＴ（表１ｄ）で選択された８つの異なるクローンからの中央のフィンガーはすべて位置＋３にＡｓｎを有しかつ位置＋６にＡｒｇを有しているが、これは丁度、特定のＤＮＡとの共同結晶体において同じトリプレットに接触を行なうことがわかっているショウジョウバエタンパク質tramtrackの第１の亜鉛フィンガーと同様である（Fairall他、1993年）。このことは、機能的に等価なフィンガーにおける特定のアミノ酸の位置的な再現が偶然に一致するのではなく、むしろ何らかの機能的な役割が有ることによることを示している。したがって、ファージディスプレイライブラリ（表１）から収集したデータを使用して、特異的アミノ酸－ＤＮＡ相互作用のほとんどを推論することが可能である。驚くべきことに、結果のほとんどをＸ線結晶学（Pavletich & Pabo 1991年）およびデータベース分析（Jacobs、1992年）から確認される３つの主要なヘリックス位置（－１、＋３および＋６）からの接触という観点から論理付けることができる。

既に指摘される通り（Berg 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89、11109-11110）、グアニンは亜鉛フィンガー－ＤＮＡ相互作用において特に重要な役割を果たしている。トリプレットの５′（たとえば表１、ｃ－ｉ）または３′（たとえば表１、ｍ－ｏ）末端に存在する場合、Ｇはαヘリックスの位置＋６または－１でＡｒｇを有するフィンガーをそれぞれ選択する。Ｇがトリプレットの中央の位置に存在する場合（たとえば表１ｂ）、位置＋３における好ましいアミノ酸はＨｉｓである。時折トリプレットの５′末端にあるＧが＋６でＳｅｒまたはＴｈｒを選択する（たとえば表１ｂ）。Ｇは絶対的にＡｒｇによってのみ特定することができるので（Seeman他、1976 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73、804-808）、これは－１と＋６とにおける最も一般的な決定要素である。この種の接触が、Ｚｉｆ２６８の結晶構造（Pavletich & Pabo、1991 Science 252、809-817）およびtramtrack（Fairall他、1993年）に見られるような二座水素結合相互作用であることが予想できる。これらの構造物においておよびＡｒｇが３′末端におけるＧを認識する選択されたフィンガーのほとんどすべてにおいて、Ａｓｐが位置＋２に生じて、長いＡｒｇの側鎖を支えている（たとえば表１ｏ、ｐ）。位置－１がＡｒｇでない場合、Ａｓｐは＋２においてほとんど生じず、この場合、第２のＤＮＡ鎖と作る可能性のある他の接触は、タンパク質－ＤＮＡ複合体の安定に大きく寄与していないことを示唆している。

アデニンも、二座接触を作ることができるＡｓｎまたはＧｌｎによりほとんど排他的に認識される、配列特異性の重要な決定要素である（Seeman他、1976年）。Ａがトリプレットの３′末端に存在する場合、Ｇｌｎはαヘリックスの位置－１で選択される場合が多く、＋２に小さい脂肪族残基が伴うことが多い（たとえば表１、ｂ）。＋３に両方ともＨｉｓを有する２種類のフィンガー（一方は実験中ライブラリを汚染した野性型Ｚｉｆ２６８）のみを選択したトリプレットＣＡＧ（表１、ａ）の場合を除いて、トリプレットの中央のアデニンは、位置＋３でＡｓｎを強く選択する（たとえば表１、ｃ－ｅ）。トリプレットＡＣＧ（表１、ｊ）およびＡＴＧ（表１、ｋ）は５′末端にＡを有するが、これもファージのオリゴクローナル混合物をもたらし、その大多数が＋６においてＡｓｎを有する１つのクローンからなっていた。

理論上は、シトシンとチミンを、主溝において水素結合するアミノ酸側鎖によって確実に区別することはできない（Seeman他、1976年）。しかしながら、トリプレットの３′位置におけるＣは、位置＋１におけるＡｒｇとともに位置－１におけるＡｓｐまたはＧｌｕに対し顕著な好みを示す（たとえば表１、ｅ－ｇ）。Ａｓｐも、Ｃが中央（たとえば表１、ｏ）および５′（たとえば表１、ａ）位置にそれぞれある場合、＋３と＋６において選択される場合がある。ＡｓｐはＣのアミノ基からの水素結合を受入れることができるが、主溝におけるＣの正の分子電荷（Hunter 1993 J. Mol. Biol. 230、1025-1054）は、水素結合接触に関係なくＡｓｐとの相互作用に好都合である点に留意すべきである。

しかしながら、中央位置のＣは＋３においてＴｈｒ（たとえば表１、ｉ）ＶａｌまたはＬｅｕ（たとえば表１、ｏ）を最も頻繁に選択する。同様に、中央位置のＴは、位置＋３に

おいてＳｅｒ（たとえば表１、ｉ）、ＡｌａまたはＶａｌ（たとえば表１、ｐ）を最も頻繁に選択する。脂肪族アミノ酸は水素結合を作ることができないが、ＡｌａはＴのメチル基と疎水性相互作用を有する可能性があり、一方Ｌｅｕ等のより長い側鎖は、Ｔを排除しかつＣの環に抗してコンパクトになる。Ｔがトリプレットの５′末端にある場合、ＳｅｒおよびＴｈｒが位置＋６で選択される（時折５′末端のＧについて生じる場合と同様）。トリプレットの３′末端のチミンは－１においてさまざまな極性アミノ酸を選択し（たとえば表１、ｄ）、かつ時々＋２にＳｅｒを有するフィンガーを選ぶが（たとえば表１、ａ）、これはtramtrack結晶構造（Fairall他、1993年）に見られるような接触を作ることができる。

「ファージディスプレイの限界」

表１から、等価なフィンガーのいずれの族についても３つの主要な位置（－１、＋３および＋６）のうちの２つに通常、コンセンサスまたはバイアスが生じることがわかるが、これは多くの場合ファージの選択が、Ｚｉｆ２６８結晶構造（Pavletich & Pabo 1991年）において見られるものと同様に、フィンガー当り２つの塩基接触のみによって行なわれることを示唆している。したがって、同じフィンガー配列が、しばしば中央のトリプレットにおいて１塩基異なるＤＮＡ配列の間で生じてくる。この理由の１つは、ファージディスプレイの選択が本質的に親和性による精製であり、同じぐらい強く複数のＤＮＡトリプレットに結合するために区別できない亜鉛フィンガーをもたらし得るからである。第２に、複合体の形成が質量作用の法則に支配されるので、親和性の選択では、ＤＮＡに対する本当の親和性がライブラリにおける他の数の少ないクローンよりも劣っていても、ライブラリにおいて発現が最も多いクローンが優先され得るからである。したがって、親和性によるファージディスプレイの選択は、複合体を安定化させるのに必要な塩基接触を超えて相互作用の可能なものと特異的なものとを区別するには限界がある。したがって、所与のＤＮＡに特異的に結合することができるフィンガーに対して競合がない場合、最も強く結合する非特異的複合体がファージのライブラリから選択されることになる。結果として、ライブラリからのファージディスプレイ選択により得られる結果は、特にそのライブラリのサイズが限られている場合には、特異性検定によって確認する必要がある。

「結論」

機能的に等価な亜鉛フィンガー族内において見られるアミノ酸配列の偏りは、この研究において無作為化されたαヘリックス位置のうち、３つの主要な（－１、＋３および＋６）位置および１つの補助的（＋２）位置のみがＤＮＡの認識に関連していることを示す。さらに、限られた組のアミノ酸がそれらの位置で見られ、これらが塩基に対して接触すると考えられる。したがって、亜鉛フィンガー－ＤＮＡ相互作用を記述するコードを導出することができることが示唆される。しかしながら、この段階では、配列の相同関係は特定の塩基対に対するアミノ酸の好みを強く示唆してはいるが、ＤＮＡトリプレットに対する個々のフィンガーの特異性が確認されるまではそのような法則をはっきり推定することはできない。したがって、本発明者らは、どのようにして無作為化されたＤＮＡ結合部位をこの目的で使用することができるかを記述する以下の例を説明するまで、このような好みについての要約表を作成していない。

この研究が進行している間、RebarおよびPaboによる論文が発表され（Rebar & Pabo、1994 Science 263、671-673）、その中でもファージディスプレイが新たなＤＮＡ結合特異性を有する亜鉛フィンガーを選択するために使用されていた。同論文の著者らはＺｉｆ２６８の第１のフィンガーが無作為化されたライブラリを構築し、テトラヌクレオチドでスクリーニングを行なってこのフィンガーの変異体からの付加的な接触等の末端効果を考慮した。４つの位置（－１、＋２、＋３および＋６）のみが、無作為化され、先に得られたＸ線結晶構造に基づき選択された。より多くの位置が無作為化された上記の結果は、明らかな効果の損失がないRebarおよびPaboによる４つのランダムな位置の使用をある程度正当化するものだが、さらに選択を行なうことによってライブラリに疑念の余地があることが明らかになるかもしれない。一方、４つの位置のみを無作為化することで理論的なライブラリの寸法が低減されるので、実際に完全な縮重が達成され得る。しかしながら、本発明

者らは、RebarおよびPaboが２つの変異体Ｚｉｆ２６８オペレータを用いてそれらの完全なライブラリをスクリーニングすることによって得た結果が、不完全なライブラリから導出されるそれらの結果と一致することを見出した。この結果も一方では亜鉛フィンガーの多面性を目立たせるものであるが、注目すべきことに、今までのところいずれの研究も配列ＣＣＴに結合するフィンガーを生成できていない。RebarおよびPaboのライブラリを使用してより多くの選択を行なえば我々が検出したような配列の偏りが明らかとなるかどうかは興味のあるところである。いずれにしても、現在まで使用されているものよりもっと完全なライブラリにおいて異なる数の無作為化された位置を使用することが選択にどのような影響を与えるかを調査することが望ましいであろう。

ファージディスプレイライブラリにおける無作為化されたフィンガーのもとの位置または前後関係（コンテクスト）が、新たなＤＮＡ－結合ドメイン内へ組込まれる際に選択されるフィンガーの有効性に影響している可能性がある。３フィンガーペプチドの外側のフィンガーのライブラリからの選択（Rebar & Pabo、1994 Science 263、671-673、Jamieson他、1994 Biochemistry 33、5689-5695）により、さまざまに異なるモードでＤＮＡに結合するフィンガーを生成できる。だが、中央のフィンガーのライブラリからの選択では、より限定的なモチーフが生成されるはずである。そこで、RebarおよびPaboは、Ｚｉｆ２６８の第１のフィンガーが常にトリプレットに結合するとは仮定せず、テトラヌクレオチド結合部位でスクリーニングを行なって異なる結合モードを考慮している。したがって、外側のフィンガーのライブラリから選択されたモチーフはマルチフィンガータンパク質のアセンブリの影響を受けにくいことが証明されるかもしれない。というのも、組立られた３フィンガータンパク質の中央の位置を占めるはずのフィンガーの場合のように、これらフィンガーの結合は、これらを特定の結合モードに制約する際に混乱させられる可能性があるからである。対照的に、もとから制約を受けている中央のフィンガーのライブラリから選択されたモチーフは、組立てられたＤＮＡ結合ドメインの外側の位置に置かれた場合でも、それらの結合モードを保存することができるかもしれない。

図１３は、誂えられる亜鉛フィンガータンパク質の設計に関する他の戦略法を示す。（Ａ）３フィンガーＤＮＡ結合モチーフは３つの無作為化されたフィンガーのライブラリからひとまとめにして選択される。（Ｂ）３フィンガーＤＮＡ結合モチーフは１つの無作為化されたフィンガー（たとえばＺｉｆ２６８の中央のフィンガー）のライブラリからそれぞれ独立して選択されたフィンガーから組立てられる。（Ｃ）３フィンガーＤＮＡ結合モチーフは、無作為化された亜鉛フィンガーの３つの位置的に特異的なライブラリからそれぞれ独立して選択されたフィンガーから組立てられる。

図１４は、ひとまとめの選択が後に続く、組合せアセンブリの戦略法を示す図である。ファージディスプレイ選択により分離されるトリプレット特異的亜鉛フィンガーのグループ（Ａ）はランダムな組合せで組立てられかつファージ（Ｂ）上に再提示される。全長標的部位（Ｃ）を用いて最も好ましい組合せのフィンガー（Ｄ）をひとまとまりで選択する。

「例２」

この例は、所定の亜鉛フィンガーについてのＤＮＡ結合部位の選択を効果的に扱う新規な技術について説明する（本質的には例１の逆）。この技術は、ディスプレイライブラリのスクリーニングに基づく偽りの選択に対する予防策として望ましい。これは、２つの位置において無作為化されている一方１つの塩基が第３の位置で固定されているＤＮＡトリプレット結合部位のライブラリに対するスクリーニングによって行なうことができる。この技術は、ここではファージディスプレイにより予め選択されたフィンガーの特異性を決定するために適用される。本発明者らは、これらフィンガーのうちのいくつかが、同族のトリプレットの各位置において独自の塩基を特定できることを発見した。このことは、それぞれの平衡解離定数による測定で密接に関連するトリプレット間を区別することができるフィンガーの例によってさらに示される。トリプレットにおける特定の塩基を特定するフィンガーのアミノ酸配列を比較して、我々は、多くの場合ＤＮＡに対する亜鉛フィンガーの配列特異的結合は、コードに従う小さな組のアミノ酸－塩基接触を用いて達成され得ると推定する。

無作為化されたＤＮＡのライブラリからの選択によって、これら（および他の）タンパク質の最適結合部位を決定することができる。この方法は、その原理が本質的に亜鉛フィンガーファージディスプレイの逆になっており、同じように情報量の多いデータベースを提供するものであり、そのデータベースから同じ法則が独立して推定され得る。しかしながら、今まで、結合部位決定のための好ましい方法（標的ＤＮＡを繰返し選択しかつ増幅した後に配列決定する方法を含む）は、骨の折れるプロセスであり、大型データベースの分析への利用にはあまり適していなかった（Thiesen & Bach 1990 Nucleic Acids Res. 18、3203-3209、Pollock & Treisrnan 1990 Nucleic Acids Res. 18、6197-6204）。

この例が提示する便利でかつ迅速な新規な方法では、小型ライブラリから単一工程で選択することによってＤＮＡ結合タンパク質の最適結合部位を明らかにすることができ、これを用いて、ファージディスプレイにより予め選択された亜鉛フィンガーの結合部位の好みをチェックすることができる。本出願用に、本発明者らはＺｉｆ２６８結合部位の１２の異なるミニライブラリを使用しており、その各々は、１つの位置が特定の塩基対で規定されかつ他の２つ位置が無作為化された中央トリプレットを有する。したがって、各ライブラリは１６のオリゴヌクレオチドを含みかつ多数の潜在的結合部位を中央フィンガーに対し与えるが、ただし後者は規定された塩基対を許容できるものである。各亜鉛フィンガーファージが、ミクロタイタープレートのウェル中で個々に固定化された１２のライブラリすべてに対しスクリーニングされ、かつ結合が酵素免疫検定法によって検出される。かくして、各位置における受容可能な塩基のパターンが明らかにされ、これを本発明者らは「結合部位サイン」と呼ぶ。結合部位サインに含まれる情報は、亜鉛フィンガーにより認識される結合部位のレパートリーを包含する。

例１において記載されるとおり選択された亜鉛フィンガーファージを利用して得られた結合部位サインは、選択によって、トリプレットの３つの位置すべてにおいて区別をつける高度に配列特異的な亜鉛フィンガー結合モチーフがいくつか得られていることを明らかにする。平衡解離定数の測定から、これらのフィンガーがそれらのサインに示されるトリプレットに硬く結合し、密接に関連する部位に対し（通常少なくとも１０のファクタで）区別をつけていることがわかる。結合部位サインは、亜鉛フィンガーとＤＮＡとの相互作用についての特異性コードへの取組を前進させるものである。

材料および方法

「結合部位サイン」

フレキシブルな平底９６ウェルミクロタイタープレート（Falcon）を、ストレプトアビジン（０．１ＭのＮａＨＣＯ$_3$、ｐＨ８．６、０．０３％ＮａＮ$_3$中０．１ｍｇ／ｍｌ）で４℃において一晩コーティングした。ウェルは２％無脂肪乾燥乳（Marvel）を含むＰＢＳ／Ｚｎ（ＰＢＳ、５０μＭのＺｎ（ＣＨ$_3$ＣＯＯ）$_2$）で１時間ブロックし、０．１％トゥイーンを含むＰＢＳ／Ｚｎで３回かつＰＢＳ／Ｚｎでさらに３回洗浄した。各オリゴヌクレオチドライブラリの「結合された」鎖は合成されたものであり、かつ他の鎖はＤＮＡポリメラーゼＩ（Klenowフラグメント）を用いて５′ビオチニル化された一般的なプライマから伸ばされたものである。充填反応物がＰＢＳ／Ｚｎのウェル（各々０．８ｐモルのＤＮＡライブラリ）に１５分間添加され、その後０．１％のトゥイーンを含むＰＢＳ／Ｚｎで１回、再びＰＳＢ／Ｚｎで１回洗浄された。選択された亜鉛フィンガーファージをそれぞれ含む細菌培養物を一晩５０ｍＭのＺｎ（ＣＨ３．ＣＯＯ）$_2$と１５μｍ／ｍｌのテトラサイクリンとを含む２ｘＴＹ中で３０℃において一晩増殖させた。ファージを含む培養物の上清を、２％無脂肪乾燥乳（Marvel）、１％トゥイーンおよび２０μｇ／ｍｌの音波処理されたサケ精子ＤＮＡを含むＰＢＳ／Ｚｎを添加することによって１０倍に希釈した。希釈されたファージ溶液（５０μｌ）をウェルに添加しかつ２０℃で１時間結合を進行させた。結合されていないファージは、１％トゥイーンを含むＰＢＳ／Ｚｎで５回、続いてＰＢＳ／Ｚｎで３回洗浄して取除いた。結合されたファージは、上に述べた方法（Griffith他、1994 EMBO J.印刷中）またはＨＲＰ共役抗Ｍ１３ＩｇＧ（Pharmacia）を用いて検出され、かつＳＯＦＴｍａｘ２．３２（Molecular Devices Corp）を用いて定量された。この結果を図４に示す。図４では個々の亜鉛フィンガーファージの結合部位サインを示し

ている。図４はミクロタイタープレートのウェルに固定化された無作為化ＤＮＡに対する亜鉛フィンガーファージの結合を表わす。各亜鉛フィンガーファージを各オリゴヌクレオチドライブラリに対しテストするため（上記を参照）、ＤＮＡライブラリをウェルの縦列（プレートにおいて縦の方向）に付与し、一方ウェルの横列（プレートを横切る方向）に等容量の亜鉛フィンガーファージ溶液を含ませる。各ライブラリは、Ｚｉｆ２６８オペレータの「結合された」鎖の中央のトリプレットについて区別され、Ｎは４つのヌクレオチドすべての混合物を表わしている。亜鉛フィンガーファージは中央のフィンガーの可変領域の配列によって特定され、番号は第１のらせん残基（位置１）に対して付けられたものであり、かつ３つの主要な認識部位が強調して示されている。結合されたファージは酵素免疫検定法により検出される。結合のおよその強度を酵素活性に比例する影の濃淡によって示している。各クローンの「サイン」と呼ばれるＤＮＡライブラリに対する結合のパターンから、１つまたは小数の結合部位を読取ることができ、かつこれらを図の右側に書いている。

「見かけの平衡解離定数の決定」

細菌培養物を３０℃で２ｘＴＹ／Ｚｎ／Ｔｅｔ中、一晩増殖させた。ファージを含む培養物の上清を、４％無脂肪乾燥乳（Marvel）、２％トゥイーンおよび４０μｇ／ｍｌの音波処理されたサケ精子ＤＮＡを含むＰＢＳ／Ｚｎを添加することによって２倍に希釈した。適当な濃度の特定の５′－ビオニチル化ＤＮＡおよび等容量の亜鉛フィンガーファージ溶液を含む結合反応物を２０℃で１時間平衡になるまで置いた。ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズ（ウェル当り５００μｇ）上に全ＤＮＡが捕獲され、これらを１％トゥイーンを含むＰＢＳ／Ｚｎで６回、その後ＰＢＳ／Ｚｎで３回洗浄した。結合されたファージはＨＲＰ共役抗Ｍ１３ＩｇＧ（Pharmacia）を用いて検出し、上記のとおり（Griffiths他、1994年）開発された。ＳＯＦＴｍａｘ２．３２（Molecular Devices Corp）を用いて最適密度を定量した。

この結果について図５に示しており、同図はＤＮＡの濃度（ｎＭ）と飽和分率との関係を示す一連のグラフからなる。２つの外側のフィンガーは、２つの同族の外側のＤＮＡトリプレットと同様、本来の配列を保持している。変化したフィンガーのらせん位置－１から＋９までを占めるアミノ酸の配列を各ケースについて示す。グラフは、中央のフィンガーが通常１０のファクタで密接に関連するトリプレットを区別することができることを示す。これらグラフによって、以下に述べるとおり見かけの平衡解離定数の決定が可能となる。

KaleidaGraph（商標）バージョン２．０プログラム（Abelbeck Software）を用いて、式K_d＝［ＤＮＡ］．［Ｐ］／［ＤＮＡ．Ｐ］に当て嵌めることによってK_dを見積もる。タンパク質－ＤＮＡ複合体を検出するために使用したＥＬＩＳＡの感度に従い、本発明者らは、K_dの正確な計算に要求されるとおり、亜鉛フィンガーファージの濃度をＤＮＡのものよりかなり低くして使用することができた。ここで使用される方法は、ＤＮＡの濃度（変数）が正確にわかっている必要がある一方、亜鉛フィンガーの濃度（定数）についてはわかっている必要がないという利点がある（Choo & Klug 1993 Nucleic Acids Res. 21、3341-3346）。これによって各ファージの先端上に発現される亜鉛フィンガーペプチドの数を計算するという問題が避けられる一方、遺伝子IIIタンパク質（ｐIII）のうち１０％から２０％しかそのようなペプチドを保有しておらず、平均してファージ当りの１コピーを下回ることが予想される。表面に固定化されたＤＮＡに対するファージの結合活性により引起こされる影響（Marks他、1992年）を避けるため、結合は溶液中で行なわれる。さらに、この場合、固相上で捕獲する前に溶液中で平衡状態に到達するので、ＥＬＩＳＡによるK_dの測定が可能となる。

結果および議論

「Ｚｉｆ２６８の第２フィンガーにおける結合部位サイン。」

図４の一番上の行は野性型Ｚｉｆ２６８の第２フィンガーのサインを示す。公開されている共通配列（Christy & Nathans 1989 Proc. Natl. Acad Sci. USA 86, 8737-8741）に従えば、中央トリプレットとしてＧＮＮ、ＴＮＮ、ＮＧＮおよびＮＮＧを有するオリゴヌク

レオチドライブラリへの結合を示す強いシグナルのパターンから、このフィンガーのための最適な結合部位はＴ／Ｇ，Ｇ，Ｇであるということが明らかとなる。これは、ＴＧＧを中央トリプレットとして有する共通オペレータ（Pavletich & Pabo 1991年）との複合体において解決されるＺｉｆ２６８のＸ線結晶構造の解釈について暗示するものである。たとえば、中央フィンガーの位置＋３におけるＨｉｓはＧのＮ７への水素結合を与えるものとして形作られるものであって、これは等価な接触がＡのＮ７と可能であることを示唆しているが、結合部位のサインから、Ａとの区別があることを見て取ることができる。これが示唆するのは、ＨｉｓはむしろＧのＯ６への水素結合またはＯ６およびＮ７の双方への二又の水素結合をなすことを選び得ること、またはＡのアミノ基との立体衝突によりこの塩基との緊密な相互作用が阻止され得ることである。したがって、二重螺旋ＤＮＡの立体化学を考慮することにより、結合部位のサインで亜鉛フィンガーＤＮＡの相互作用の詳細を洞察することができるようになる。

「結合部位サインから推察される亜鉛フィンガーＤＮＡ複合体におけるアミノ酸－塩基接触。」

他の亜鉛フィンガーにおける結合部位サインは、例１で行なわれるファージ選択が高度に配列特異的なＤＮＡ結合タンパク質をもたらしたことを明らかにしている。これらのいくらかは、変異型Ｚｉｆ２６８結合部位における中央トリプレットのための独自の配列を特定することができ、したがってその共通部位については、Ｚｉｆ２６８そのものよりも特異的である。さらに、特定のオリゴヌクレオチドライブラリ、すなわち規定された位置における特異的な塩基を認識するフィンガーを、図４の列を下方に見ていくことによって識別することができる。これらのフィンガーのアミノ酸配列を比較することにより、結合されたＤＮＡ上の特定の塩基を真に好むいかなる残基をも識別することができる。いくつかの例外を除けば、これらはファージディスプレイを基準として以前に予測されたようなものであり、表２にまとめられる。

表２は選択された亜鉛フィンガーのＤＮＡとの相互作用において、アミノ酸－塩基接触のよく見られるものをまとめたものである。所与の接触は、適切なトリプレットのための「シラビックな」認識コードを含む。同族アミノ酸およびそれらのαヘリックス中での位置が、トリプレットの各位置と各塩基を関連付けるマトリックスの中に入れられている。位置＋２からの補助的なアミノ酸は、位置－１におけるアミノ酸の特異性を高めるかまたは調節することができ、これらは対として列挙されている。位置＋６におけるＳｅｒまたはＴｈｒは、後続するフィンガーにおけるＡｓｐ＋２（Ａｓｐ＋＋２と表示）が、間接的にＧおよびＴの両方を特定することを許容しており、これらの対が列挙されている。Ｔに対するＳｅｒ＋３およびＣに対するＴｈｒ＋３の特異性が互いに交換可能であってもよい場合は稀であり、一方Ｖａｌ＋３は常に曖昧なものとして現われる。

表２

トリプレット中の位置

	5'	中央	3'
G	Arg +6 Ser +6/Asp ++2 Thr +6/Asp ++2	His +3	Arg -1/Asp +2
A		Asn +3	Gln -1/Ala +2
T	Ser +6/Asp ++2 Thr +6/Asp ++2	Ala +3 Ser +3 Val +3	Asn -1 Gln -1/Ser +2
C		Asp +3 Leu +3 Thr +3 Val +3	Asp -1

結合部位サインはまた、選択結果の解釈のために大切である、ファージディスプレイライブラリの重要な特徴を明らかにする。本発明者らのパネルにおけるフィンガーはすべて、位置＋６に存在するアミノ酸に関係なく、トリプレットの５′末端におけるＧまたはＧおよびＴの双方を認識することができる。これを説明するとおそらく、中央トリプレットの５′位置が、相補的な鎖上のいずれかの塩基のパートナーへのフィンガー３の位置＋２における非変異体Ａｓｐからのの接触によって、ＧまたはＴのいずれかとして固定されるということであり、これはＺｉｆ２６８（Pavletich & Pabo 1991 Science 252, 809-817）およびtramtrack（Fairall et al,. 1993）の結晶構造（ＣまたはＡのNH_2へのそれぞれ主溝内における接触）で見られるものに類似する。したがってフィンガー３の位置＋２におけるＡｓｐは、中央フィンガーの位置＋６に存在するアミノ酸よりも優性であり、５′位置におけるＡまたはＣの認識の可能性は予め排除されている。将来のライブラリは、この相互作用の除外、または位置の変動につき設計されなければならない。興味深いことには、３つのフィンガーにおける保存された領域のフレームワークを考えると、ＧおよびＴ双方との頻繁な相互作用、すなわちいずれの塩基への水素結合にも寄与し得る位置＋６におけるＳｅｒまたはＴｈｒの出現を特定する第２のフィンガーにおける規則を認めることができる。

「補助的な位置による塩基認識の調節。」

上で注目されたように、位置＋２は、「同族トリプレット」の３′直接的に塩基を特定することができ、したがって先行するフィンガーの位置＋６に関連して働き得る。結合部位

サインは、３つの主要な位置からのアミノ酸－塩基接触を示す一方で、補助的な位置が塩基認識において他の役割を果たすことができることを示す。明らかな適例は、位置－１におけるＧｌｎである。これは位置＋２がＡｌａなどの小さな非極性アミノ酸である場合にはトリプレットの３′末端におけるＡについて特異的であるが、Ｓｅｒなどの極性残基が位置＋２にある場合にはＴについて特異的である。亜鉛フィンガーのＸ線結晶構造からその根拠が理解される、位置－１におけるＡｒｇと位置＋２におけるＡｓｐとの間の強い相関性は、これらの２つの位置の間における相互作用の別の例である。したがって、位置＋２におけるアミノ酸は、他の位置におけるアミノ酸の特異性を調節または強めることができる。

位置＋３では、ＴｈｒおよびＶａｌの場合に異なったタイプの調節が見られ、これはトリプレットの中央位置ではＣを最も頻繁に好ましいとするが、いくつかの亜鉛フィンガーではＣおよびＴの双方を認識することが可能である。この曖昧さは、おそらくはこれらの残基におけるメチル基にかかわる異なった疎水性の相互作用の結果として生じるものであって、ここでは別の位置からの効果それ自体よりもむしろフィンガーの性向におけるフレキシビリティが、曖昧な読取りの原因となり得るだろう。

「解離定数の定量的測定」

亜鉛フィンガーの結合部位サインは、ＤＮＡの所与の濃度においてその示差的な塩基の好みを明らかにする。ＤＮＡの濃度が変わるにつれ、どのクローンの結合部位サインも変化して、低［ＤＮＡ］ではより特徴的になり、かつより高い［ＤＮＡ］では、好みのより少ない部位におけるK_dに近づいてさらなる塩基がトリプレットの各位置において受入れ可能となるにつれ、それほど特徴的ではなくなることを予測することができる。さらに、２つの塩基位置がオリゴヌクレオチドのどの１つのライブラリにおいてもランダムに占拠されるため、結合部位サインは正式にはいくつかの相互作用についてはコンテクスト依存性の可能性を排除することができない。したがって本質的に比較的なものである結合部位サインを補足するには、異なったＤＮＡ結合部位のための各ファージの平衡解離定数を定量的に決定する必要がある。ファージディスプレイ選択および結合部位サインの後では、それが亜鉛フィンガーの特異性を評定する際の第３の最終的な段階となる。

図５に提示されるそのような研究の例は、亜鉛フィンガーファージがそれらの結合部位サインに示されるオペレータを10^{-8}～10^{-9}Mの範囲内のK_dｓで結合し、かつ１桁よりも大きいファクタで、緊密に関連した結合部位に対し区別をつけることができることを明らかにする。実際、図５が示すのは、９つの塩基対のうちただ１つのみにおいて異なる結合部位に対する親和性におけるそのような差異である。我々のパネルにおける亜鉛フィンガーは、非競合的なアフィニティ精製によってライブラリから選択されるので、より一層識別力のあるフィンガーを、競合的選択プロセスを用いて分離できる可能性がある。

解離定数を測定することで、結合の強度に従って、優先順に、異なるトリプレットをランク付けすることができる。ここでの例は、位置－１または＋３のいずれかからの接触が識別力に寄与し得ることを示す。また、上で言及したいくつかの結合部位サインの曖昧さが、密接に関連した複数のトリプレットに対するいくつかのフィンガーの等価な親和性に基準を有することが示され得る。これは、三重のＴＴＧおよびＧＴＧに対するアミノ酸配列ＲＧＤＡＬＴＳＨＥＲを含むフィンガーのK_dｓにより明らかにされる。

「亜鉛フィンガー－ＤＮＡ認識のためのコード」

亜鉛フィンガーモチーフの融通性により、単一のコードの範囲内に入るには多様すぎるさまざまなモードのＤＮＡへの（そしてさらにはＲＮＡへの）結合を開発する進化が可能ではないかという期待がなされよう。しかしながら、１つのコードが必ずしもすべての亜鉛フィンガー－ＤＮＡ相互作用に適用できるものではないとはいえ、今や１つのコードが実質的なサブセットに適用されるという説得力のある根拠が存在する。このコードは、いかなる所与の亜鉛フィンガーのＤＮＡ結合部位の好みをもそのアミノ酸配列から間違いなく予測するには不十分であるが、それでも所定のＤＮＡ配列に対して特異性を備えた亜鉛フィンガーの設計を可能とするには十分に包括的であろう。

（上述のような）ファージディスプレイおよび結合部位サインの選択方法を用いることで

、Ｚｉｆ２６８様亜鉛フィンガーの場合には、ＤＮＡの認識にαヘリックス上の４つの固定された主な位置（３つは主要なもの、１つは補助的なもの）がかかわっていることが見出され、ここからアミノ酸－塩基接触における限定された特異的なセットが、さまざまなＤＮＡトリプレットの認識をもたらすことが見出された。換言すれば、１つのコードで亜鉛フィンガーとＤＮＡとの相互作用を記述することができる。このコードの方向に、各塩基をトリプレットの各位置に関連付けるマトリックスに入るものほとんどすべてについてアミノ酸－塩基接触を提案することができる（表２）。重複があるところでは、ここに提示される結果は、データベースに導かれた突然変異体を用いて亜鉛フィンガーの特異性を変えることにより類似の規則を導き出したDesjarlaisおよびBergのものを補足する（Desjarlais & Berg 1992 Proc Natl, Acad. Sci. USA 89, 7345-7349; Desjarlais & Berg 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2256-2260）。

「コードされた接触の組合せでの使用」

表２に列挙される個々の塩基接触は、コードの一部ではあるが、任意の組合せで用いられた場合に、必ずしも予想される塩基トリプレットに対して配列特異的結合をもたらすとは限らないかもしれない。まず第１には、亜鉛フィンガーが、このコードを用いてもいくつかのトリプレットにおいてはある種の組合せの塩基を認識できないかもしれないか、または全く何も認識できないかもしれないことを承知しておかなければならない。さもなければ、不一致の大部分は、亜鉛フィンガーの三又の読取ヘッドの、それが相互作用しているトリプレットに対する性向の変動を考慮することによって説明され得る。αヘリックスの任意の１つの位置におけるアミノ酸の同一性は、３塩基接触が同時に起こるように他の２つの位置における残基の同一性と調子を合わされていると思われる。したがってたとえば、ＡｌａがトリプレットＧＴＧ内でＴを選び得るためには、位置＋６からＧを認識するのにＡｒｇを用いてはいけない。なぜなら、それによって前者がＤＮＡからあまりにも遠くに離されてしまうからである。（たとえばアミノ酸配列ＲＧＤＡＬＴＳＨＥＲを含むフィンガーを参照されたい。）第２に、αヘリックスのピッチは螺旋１回転当り３．６個のアミノ酸なので、位置－１、＋３および＋６は離れた螺旋回転の整数ではないため、位置＋３は－１または＋６よりもＤＮＡに近い。したがってたとえば、ＨｉｓおよびＡｓｎなどの短いアミノ酸の方が、むしろより長いＡｒｇおよびＧｌｎよりも、トリプレットの中央位置におけるプリンの認識に用いられる。

これらの距離効果の結果として、このコードは実は「アルファベット的」（常に同一のアミノ酸：塩基接触）ではなく、むしろ「シラビック」（複数のアミノ酸：塩基接触の、少ないレパートリを用いる）であると言えるかもしれない。アルファベット的コードは４つしか規則を必要としないが、成節性によって、体系的な規則の組合せがコードを構成することとなるので、さらなるレベルの複雑さが付加される。それでも、各トリプレットの認識はやはり「表語記号」（トリプレットに応じた特異質のアミノ酸：塩基接触）のカタログよりもむしろ節からなるコードによって最もよく記述される。

「結論。」

ＤＮＡとの相互作用の「シラビック」なコードは、亜鉛フィンガーの融通性のあるフレームワークによって可能なものとされる。これは、わずかな配向の変化によりＤＮＡとの界面における適合性が可能になり、それによって多くの異なった複合体における塩基対１つ当り１つの共平面性アミノ酸の化学量論が維持される。アミノ酸と塩基との間の相互作用のこのモードを考えると、それぞれＡｒｇおよびＡｓｎ／ＧｌｎによるＧおよびＡの認識がこのコードの重要な特徴であることが予想されるが、しかし注目すべきことには、他の相互作用が、予期されていた（Seemanら、１９７６年）よりも識別力のあるものとなり得る。反対に、異なった調節ＤＮＡ配列との複雑な相互作用を見込んで、縮重が亜鉛フィンガー内でさまざまな度合いにおいてプログラムされ得ることが明らかである（Harrison & Travers, 1990; Christy & Nathans, 1989）。この原理がいかにして転写因子の限られたセットにより示差的遺伝子発現の調整を可能にするかを見ることができる。

既に上で注目されたように、フィンガーモチーフの融通性はＤＮＡへの結合の他のモードを許容しがちである。同様に、Fairallらにおいて見られるような核酸の順応性を考慮に

入れなければならない。Fairallらにおいてはフレキシブルな塩基ステップにおける二重螺旋の変形により、同族トリプレットの３′位置のＴに対するフィンガー１の位置＋２におけるＳｅｒからの直接的な接触が可能となる。本発明者らによる選択においてさえ、結合モードがはっきりしないフィンガーの例が存在し、明確化のためには構造的分析が必要とされるであろう。したがって、たとえばＡｓｐ、ＡｓｎまたはＳｅｒなどの短い側鎖が位置－１から塩基に相互作用する場合には、水が重要な役割を果たすことを見ることができるであろう（Qian et al., 1993 J. Am. Chem, Soc. 115, 1189-1190; Shakked et al., 1994 Nature（London）368, 469-478）。

結局、それらのアミノ酸配列からいくつかの亜鉛フィンガーにおける結合部位の好みを予測できるであろう、ＤＮＡへの亜鉛フィンガー結合を説明するいくつかのコードを開発することが可能となるかもしれない。位置－１、＋３、およびある程度までこの研究では＋６で選択される機能的アミノ酸は、天然に存在するフィンガー中の同じ位置で非常に頻繁に見られ（たとえばDesjarlais and Berg 1992 Proteins 12, 101-104の図４を参照）、これら３つの位置からのコードされた接触の存在を支持するものである。しかしながら、現在の研究室の技術（本明細書およびThiesen & Bach 1990 and Pollock & Treisrnan 1990）が所定のＤＮＡ結合タンパク質のための結合部位の同定を可能にするであろうから、決定的な予測の方法が欠如していることは、実用上深刻な制約とはならない。むしろ、ファージ選択および認識の規則についての知識を、逆の課題、すなわち予め定められたＤＮＡ部位を結合するためのタンパク質の設計に応用することができる。

「ＤＮＡ結合タンパク質の設計についての見通し」

亜鉛フィンガーの配列特異性を操作できるということは、医学および研究に応用するための所望の特異性を備えるＤＮＡ結合タンパク質の設計が目前であることを意味している（Desjarlais & Berg, 1993, Rebar & Pabo, 1994）。これがなぜ可能かというと、他のすべてのＤＮＡ結合モチーフとは対照的に、ＤＮＡの部位は一列に並んで結合されたそれぞれ独立して作用する複数のフィンガーの適切な組合せによって認識され得るため、亜鉛フィンガーのモジュールによる性質を利用できるからである。

ＤＮＡと亜鉛フィンガーとのコードされた相互作用は、もっと有望なこととしてファージディスプレイ選択の適切な候補とともに、新たに個々の亜鉛フィンガーの特異性のモデルを作るのに用いることができる。このようにして、必要に応じて、所定の結合部位に対する親和性を調節するか、または特定の塩基位置における無差別性の適切な度合いを操ることさえできるだろう。さらには、複数回繰返されるドメインの付加効果により、広げられ、したがって非常に稀なゲノム座に特異的かつ緊密に結合する機会が与えられる。したがって、亜鉛フィンガータンパク質は、正常であろうと変異体であろうと、所定の遺伝子の作用を抑制するか、または修飾する際にアンチセンス核酸の代わりに用いる良い代替物となり得るだろう。この目的のため、適切な天然または合成のエフェクタを付与することによりこれらのＤＮＡ結合ドメインには追加の機能が導入され得るだろう。

例３

これまでの例で提示される根拠から、本発明者らは亜鉛フィンガーを含む特異的ＤＮＡ結合タンパク質を「誂え」のものにすることができるということを提案する。その可能性を示すため、本発明者らは、ＢＣＲ－ＡＢＬ融合癌細胞のユニークな９ｂｐ領域に部位特異的に結合でき、それを親ゲノム配列（Kurzrock et al., 1988 N. Engl. J. Med. 319, 990-998）から区別できる３フィンガーポリペプチドを作り出した。培養において形質転換された細胞をモデルとして用いて、染色体ＤＮＡにおける標的癌細胞への結合が可能であって、それにより転写の阻止がもたらされることが示される。その結果、癌遺伝子の働きによって成長因子から独立した状態になったマウス細胞（Daley et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9312-9316）が、設計された亜鉛フィンガーポリペプチドを発現するベクターによる一過性のトランスフェクションにおいて因子依存性の状態に戻ることが見出される。

特異的ＤＮＡ配列を認識するよう設計されたＤＮＡ結合タンパク質は、広い範囲の応用のために、キメラ転写因子、リコンビナーゼ、ヌクレアーゼ等に組入れることができるであ

ろう。本発明者らは、亜鉛フィンガーのミニドメインが、緊密に関連したＤＮＡトリプレット間で区別を行ない得ることを示しており、より長いＤＮＡ配列の特異的な認識のためのドメインを形成すべくそれらをともに結合することができるということを提案している。そのようなタンパク質ドメインの使用について、１つの興味深い可能性は、病原体または形質転換された細胞内で、選択的に遺伝子の差異を標的とすることである。ここでは、１つのそのような応用を説明する。

相互の染色体の転座ｔ（９；２２）（ｑ３４；ｑ１１）が、切りつめられた染色体２２と、ｃ－ＡＢＬプロトオンコジーンからの配列の融合物をブレークポイントにおいてコードするフィラデルフィア染色体（Ｐｈ１）５（Bartram et al., 1983 Nature 306, 277-280）と、ＢＣＲ遺伝子（Groffen et al., 1984 Cell 36, 93-99）とをもたらす、一連のヒト白血病が存在する。慢性の骨髄性白血病（ＣＭＬ）では、ブレークポイントは通常、ｃ－ＡＢＬ遺伝子の第１のイントロンおよびＢＣＲ遺伝子のブレークポイントクラスタ領域において生じるものであり（Shtivelman et al., 1985 Nature 315, 550-554）、かつｐ２１０$^{BCR-ABL}$遺伝子産物を生じさせるものである（Konopka et al., 1984 Cell 37, 1035-1042）。代わりに、急性リンパ芽球白血病（ＡＬＬ）では、ブレークポイントは通常ＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬの双方における第１イントロンで生じ（Hermans et al., 1987 Cell 51, 33-40）、ｐ１９０$^{BCR-ABL}$遺伝子産物をもたらす（図６）（Kurzrock et al., 1987 Nature 325, 631-635）。

図６は、ｐ１９０ｃＤＮＡにおけるＢＣＲおよびＡＢＬ配列間の融合点、およびＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬ遺伝子内の対応するエキソンの境界のヌクレオチド配列（ＳｅｑＩＤ　Ｎｏ．９－１１）を示す。エキソン配列は大文字で書かれ、一方イントロンは小文字で示されている。１行目はｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｃＤＮＡを示し、２行目はエキソン１とイントロン１の接合点におけるＢＣＲゲノム配列を示し、３行目はイントロン１とエキソン２の接合点におけるＡＢＬゲノム配列を示す（Hermans et al 1987）。標的として用いられるｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｃＤＮＡの９ｂｐ配列は下線を付けられており、ゲノムＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬにおける相同配列も同様である。

これらの再配列された遺伝子の複製物は、細胞培養物（Daley et al., 1988）およびトランスジェニックマウス（Heisterkamp et al., 1990 Nature 344, 251-253）において優勢な形質転換癌遺伝子として作用する。それらのゲノム相当物と同様に、これらのｃＤＮＡはＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬ遺伝子の融合点において独自のヌクレオチド配列を保持しており、これは部位特異的ＤＮＡ結合タンパク質によりＤＮＡレベルで認識され得る。本発明者らは、ｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｃ－ＤＮＡにおける独自の融合部位を認識するようなタンパク質を設計している。この融合は明らかに、患者間で変動し得るものであると考えられる、自然発生的な遺伝子の転位におけるブレークポイントからは明らかに区別されるものである。そのようなペプチドの設計は癌研究について示唆をもたらすものではあるが、ここでの主な目的は、タンパク質設計の原理を証明し、入手可能なモデル系における染色体ＤＮＡへのインビボでの結合の実現可能性を評定することである。

ｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｃＤＮＡ（Hermans et al., 1987）における融合点に及ぶ、３亜鉛フィンガーペプチドのための９塩基対標的配列（ＧＣＡ、ＧＡＡ、ＧＣＣ）が選択された。この結合部位を形成する３つのトリプレットは、各々例１で上述したように３ラウンドにわたって亜鉛フィンガーファージライブラリをスクリーニングするのに用いられた。次に、選択されたフィンガーが、それらによって好まれるトリプレットを明らかにするため、結合部位サインによって分析され、特異性を向上させるための突然変異が、ＧＣＡへの結合のために選択されたフィンガーに対してなされた。推定されるＢＣＲ－ＡＢＬ結合３フィンガータンパク質のファージディスプレイミニライブラリは、適切な順序に結合された、６つの選択されたかまたは設計されたフィンガー（１Ａ，１Ｂ；２Ａ；３Ａ，３Ｂおよび３Ｃ）の６つの可能な組合せを含むｆｄファージにおいてクローニングされた。これらのフィンガーは図７に示される（ＳｅｑＩＤ　Ｎｏ．１２－１７）。図７では、二次的構造の領域がリストの下で下線を付けられており、一方で残基の位置は、αヘリックスの第１の位置（位置１）に対して上方に示されている。亜鉛フィンガーファージは、各々がトリ

プレットＧＣＣ、ＧＡＡまたはＧＣＡの１つを含む３つのＤＮＡ結合部位を用いて、２．６×１０^{6}変異体のライブラリから選択された。結合部位サイン（例２）は、フィンガー１Ａおよび１ＢがトリプレットＧＣＣを特定しており、フィンガー２ＡがＧＡＡを特定しており、一方でトリプレットＧＣＡを用いて選択されたフィンガーはすべてＧＣＴに結合することを好むことを示す。後者のもののうちにはフィンガー３Ａがあり、その特異性は本発明者らの信じるところによると、認識の規則に基づき、点変位によって変化させることができよう。選択されたフィンガー３Ａに基づくが、その中では螺旋位置＋２におけるＧｌｎがＡｌａに改変されているフィンガー３Ｂは、ＧＣＡについて特異的であるはずである。フィンガー３Ｃは、Ｃの認識がＴｈｒ＋３よりもむしろＡｓｐ＋３によって仲介される、フィンガー３Ａの代替的なバージョンである。

ミニライブラリは、弱いバインダーおよびバックグラウンドのベクターファージに対して強い結合のクローンを選択するために、９塩基対ＢＣＲ－ＡＢＬ標的配列を含むオリゴヌクレオチドで、１回スクリーニングされた。ライブラリが小さかったため、本発明者らはゲノムＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬ遺伝子の相同領域に対する競合ＤＮＡ配列を含ませず、代わりに選択されたクローンをそれらの識別能力についてチェックした。選択されたクローンはすべてＢＣＲ－ＡＢＬ標的配列を結合し、かつこれとゲノムＢＣＲ配列とを区別することができたが、ただ１つのサブセットしか、イントロン１とエキソン２の間の接合点でＢＣＲ－ＡＢＬ標的配列に対して８／９塩基対の相同性を有するｃ－ＡＢＬ配列（Hermans et al., 1987）を区別することができなかった。識別力を有するクローンの配列決定は、２つのタイプの選択されたペプチドを明らかにし、１つは組成１Ａ－２Ａ－３Ｂを備えるものであり、他方は１Ｂ－２Ａ－３Ｂを備えるものであった。したがって双方のペプチドが、トリプレットＧＣＡに対して特異的に設計された第３のフィンガー（３Ｂ）を保持するが、ペプチド１Ａ－２Ａ－３Ｂはペプチド１Ｂ－２Ａ－３Ｂよりも高い親和性でＢＣＲ－ＡＢＬ標的配列に結合することが可能であった。

ペプチド１Ａ－２Ａ－３Ｂは、これ以降では抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドと称するが、これをさらなる実験において用いた。抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドは、インビトロでｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｃＤＮＡ配列に対して６．２＋／－０．４×１０$^{-7}$Ｍの見かけの平衡解離定数（K_d）を有しており、１桁よりも大きいファクタによりゲノムＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬのＤＮＡに見られる類似の配列を識別する（図８）。図８を参照して（これは抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドの結合について、そのｐ１９０$^{BCR-ABL}$標的部位ならびにゲノムＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬの類似領域に対する識別力を示すものであるが）、このグラフはさまざまな［ＤＮＡ］での結合（$A_{450-650}$として測定）を示している。酵素免疫検定法による結合反応および複合体の検出が前述したように行なわれ、K_dの計算に全曲線解析が用いられた（Choo & Klug 1993）。使用されたＤＮＡは、ｃＤＮＡの融合点またはエキソン境界のいずれの側にも９ｂｐが及ぶオリゴヌクレオチドであった。抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドは、K_d＝６．２＋／－０．４×１０$^{-7}$Ｍでその意図する標的部位に結合し、かつゲノムＢＣＲおよびｃ－ＡＢＬ配列を識別することができるが、後者のものは結合された９ｂｐ領域内でただ１つの塩基対だけしか異なっていない。測定された解離定数は、Ｓｐｌ（Kadonaga et al., 1987 Cell 51,1079-1090）またはＺｉｆ２６８（Christy et al., 1988）などの天然に存在するタンパク質からの３フィンガーペプチドのものよりも高い。これら天然のものの有するK_dｓは、１０$^{-9}$Ｍの範囲内にあるが、むしろtramtrack（ｔｔｋ）タンパク質からの２つのフィンガーのものに匹敵している（Fairall et al., 1992）。しかしながら、抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドの親和性は、もし所望するならば、指定部位突然変異またはファージディスプレイライブラリの「アフィニティ・マチュレーション」によって、精製され得るであろう（Hawkins et al., 1992 J. Mol. Biol. 226, 889-896）。

ＤＮＡの識別力をインビトロで確立した上で、本発明者らは、抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドがインビボにおいて部位特異的にＤＮＡ結合できるかどうかをテストしたかった。このペプチドを単純ヘルペスウイルス（Field 1993 Methods 5, 116-124）からのＶＰ１６活性化ドメインに融合し、一過性のトランスフェクション検定に用いて（図９）、ＴＡＴＡボックス（Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051）の上流の結合部位からのＣＡ

Ｔ（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）リポーター遺伝子の生成をもたらした。詳細には、この実験は以下のように行なわれた。リポータープラスミドｐＭＣＡＴ６ＢＡ、ｐＭＣＡＴ６Ａ、およびｐＭＣＡＴ６Ｂが、ｐ１９０$^{BCR-ABL}$標的部位（ＣＧＣＡＧＡＡＧＣＣ）、ｃ－ＡＢＬの第２のエキソン－イントロン接合配列（ＴＣＣＡＧＡＡＧＣＣ）またはＢＣＲの第１のエキソン－イントロン接合配列（ＣＧＣＡＧＧＴＧＡＧ）のそれぞれの６複製物を、ｐＭＣＡＴ３（Luscher et al.,1989 Genes Dev. 3. 1507-1517）中に挿入することにより構成された。抗ＢＣＲ－ＡＢＬ／ＶＰ１６発現ベクターは、単純ヘルペスウイルスＶＰ１６（Fields 1993）の活性化ドメインとｐＥＦ－ＢＯＳベクター（Mizushima & Shigezaku 1990 Nucl. Acids Res. 18, 5322）におけるＺｎフィンガーペプチドとの間にイン・フレーム融合体を挿入することにより生成された。Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞が、リポータープラスミド１０μｇおよび発現ベクター１０μｇで、一過性に同時トランスフェクションされた。ルシフェラーゼに結合されたラウス肉腫ウイルスＬＴＲ（長末端反復）を含むＲＳＶＬ（de Wet et al., 1987 Mol. Cell Biol. 7, 725-737）が、トランスフェクション効率における差異を正規化するための内部コントロールとして用いられた。細胞はリン酸カルシウム沈降法によりトランスフェクションされ、ＣＡＴ検定が記述のとおり行なわれた（Sanchez-Garcia at al., 1993 EMBO J, 12, 4243-4250）。５つの共通１７－ｍｅｒのＧＡＬ４結合部位をアデノウイルスＥｌｂ　ＴＡＴＡボックスの最小限のプロモータから上流のところに有するプラスミドｐＧＳＥＣ、およびＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインと単純ヘルペスウイルスＶＰ１６の活性化ドメインとの間のインフレーム融合物をコードするｐＭｌＶＰ１６ベクターが、正のコントロールとして用いられた（Sadowski et al.,1992 Gene 118,137-141）。その結果を、図９に示す。

図９について述べると、Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞が、ＣＡＴリポータープラスミドおよび抗ＢＣＲ－ＡＢＬ／ＶＰ１６発現ベクター（ｐＺＮ１Ａ）で一過性に同時トランスフェクションされた。図の一番上のパネルは、異なるトランスフェクションからのサンプルの薄層クロマトグラフィーの結果を示しており、ここではリポーターが単独でトランスフェクトされた場合のサンプル（パネル１）に対するＣＡＴ活性の誘導倍数が、下方の柱状グラフにプロットされている。

インビボでの結合を示す、ＢＣＲまたはｃ－ＡＢＬの半相同配列のいずれかの複製物を保有するリポータープラスミドで同時トランスフェクションされた細胞においてはほとんど増加が検出できないのに比べて、ｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｃＤＮＡ標的部位の複製物を保有するリポータープラスミドで同時トランスフェクションされた細胞ではＣＡＴ活性について特定の（３０倍の）増加が見られ、インビボでの結合を示した。異なるトランスフェクションにおいて用いられる特定の構造物を、柱状グラフの下に記載する。

転写の選択的な刺激は、高度に部位特異的なＤＮＡ結合が、インビボにおいて起こり得ることを説得力を持って示している。しかしながら、一過性のトランスフェクションは結合プラスミドＤＮＡを分析するが、一方、これと他のＤＮＡ結合タンパク質のほとんどに対する真の標的部位は、ゲノムＤＮＡである。これは重要な問題を提示することとなるかもしれない。なぜなら、ゲノムＤＮＡが核膜によって細胞質ゾルから物理的に分離されているだけではなく、これが染色質内にパッケージされ得るからである。

ゲノムを標的とすることが可能であるかどうかを研究するため、抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドのＮ末端側面にＳＶ４０ウイルスの大型Ｔ抗原からの核位置測定シグナル（Kalderon et al., 1984 Cell 499-509）を付けかつＣ末端側面に９Ｅ１０抗体によって認識可能な１１アミノ酸ｃ－ｍｙｃエピトープ標識（Evan et al., 1985 Mol. Cell. Biol. 5, 3610-3616）を付けた構造物を調製した。この構造物は、ＩＬ－３－依存マウス細胞系Ｂａ／Ｆ３（Palacious & Steinmets 1985 Cell 41 727-734）、または代替的にはｐ１９０$^{BCR-ABL}$またはｐ２１０$^{BCR-ABL}$のいずれかをそれぞれ発現する統合されたプラスミド構造物によって予めＩＬ－３依存性にされたＢａ／Ｆ３＋Ｐ１９０およびＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞系を一過性にトランスフェクションするのに用いられた。９Ｅ１０抗体とそれに続く二次的な蛍光共役体での細胞の染色により、抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドでトランスフェクションされたそれらの細胞において効率的な核の位置測定が示された。

実験の詳細は以下のとおりである。抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターをｐＥＦ－ＢＯＳベクター（Mizushima & Shigezaku 1990）において生成させた。これは、カルボキシル末端において、９Ｅ１０抗体（Evan et al., 1985）により認識可能な１１アミノ酸ｃ－ｍｙｃエピトープ標識（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＮ）を含ませ、かつアミノ酸末端において、ＳＶ４０ウイルスの大型Ｔ抗原の核位置測定シグナルＰＫＫＫＲＫＶ（Kalderon et al., 1984）を含ませるものである。３つのグリシン残基が、核位置測定シグナルの下流にスペーサとして導入され、折り畳まれた分子からの核のリーダーが確実に露出されるようにした。Ｂａ／Ｆ３細胞が記述のとおり９Ｅ１０ｃ－ｍｙｃエピトープで標識付けされる抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現構造物２５μｇでトランスフェクションされ（Sanchez-Garcia & Rabbitts 1994 Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. in press）、４８時間後にタンパク質の生成が次のようにして蛍光抗体標識によって分析された。細胞は１５分間、４％（ｗ／ｖ）のパラホルムアルデヒド中で固定され、リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で洗浄され、２分間メタノール中で浸透可能の状態にされた。３０分間、ＰＢＳ中１０％のウシ胎児血清においてブロックを行なった後、マウスの９Ｅ１０抗体が加えられた。室温で３０分間のインキュベーションの後、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）共役ヤギ抗マウスＩｇＧ（SIGMA）が加えられ、さらに３０分間インキュベートが行なわれた。蛍光細胞が共焦点走査顕微鏡（倍率２００×）を用いて目に見えるようにされた。その結果を図１０に示す。

図１０では（Ｂａ／Ｆ３＋ｐ１９０およびＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞が抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターで一過性にトランスフェクションされ、９Ｅ１０抗体で染色されている免疫蛍光法）、影像は抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドの発現および核位置測定を示す（パネルＢ、Ｃ、およびＤ）。加えて、トランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋Ｐ１９０細胞は、染色質の凝集と、核のアポトーシス小体へのフラグメント化（パネルＢおよびＣ）を示すが、一方、トランスフェクションされていないＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞（パネルＡ）またはトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞（パネルＤ）のいずれもそうではない。

個体群のうちの蛍光抗体細胞の割合として測定された一過性トランスフェクションの効率は、１５－２０％であった。ＩＬ－３の組織培養における使用をやめると、相当する割合のＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞は、因子依存性に戻って死滅し、一方Ｂａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞は影響を受けない。実験の詳細は次のとおりであった。細胞系Ｂａ／Ｆ３、Ｂａ／Ｆ３＋ｐ１９０およびＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０が、１０％のウシ胎児血清を補充したダルベッコ修正イーグル培地（ＤＭＥＭ）に維持された。Ｂａ／Ｆ３細胞系の場合、１０％のＷＥＨＩ－３Ｂ調整培地が、ＩＬ－３の供給源として含まれていた。抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターでのトランスフェクションの後、細胞（５×１０^{5}／ｍｌ）は血清のない培地で２回洗浄され、ＷＥＨＩ－３Ｂ調整培地なしで１０％ウシ胎児血清のＤＭＥＭ培地内において培養された。生存率が、トリバンブルー排除によって決定された。データは、３連の培養物の平均値として表されている。その結果を、図１１にグラフ形式で示す。

ＩＬ－３の不在下におけるトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞の疫学蛍光顕微鏡検査により、染色質の凝集および核のアポトーシス小体へのフラグメント化が示される一方で、Ｂａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞の核は無傷のままである（図１０）。抗ＢＣＲ－ＡＢＬペプチドで一過性にトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞からの全細胞質ＲＮＡのノーザンブロットにより、トランスフェクションされていない細胞に対してｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｍＲＮＡのレベルが低下していることが明らかとなった。対照的に、同様にトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞ではｐ２１０$^{BCR-ABL}$ｍＲＮＡのレベルにおいて減少が見られなかった（図１２）。ブロットは次のようにして行なわれた。指定された細胞からの、全細胞質ＲＮＡ１０μｇが、グリオキシル化され、ｐＨ７．０の１０ｍＭ　ＮａＰＯ$_{4}$緩衝液中１．４％アガロースゲルにおいて分画された。電気泳動の後、ゲルはハイボンド（Hybond）－Ｎ（Amersham）上にブロットされ、ＵＶ架橋され、^{32}Ｐ標識ｃ－ＡＢＬプローブに対してハイブリッド形成された。オートラジオグラフィが、１４時間、－７０℃で行なわれた。ローディングは、フィルタをマウスβ

－アクチンｃＤＮＡで再プローブすることによってモニタされた。
図１２（抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターでトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０およびＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞系のノーザンフィルターハイブリッド形成分析）について述べると、レーン１はトランスフェクションされていないＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞系からのものであり、レーン２および３は抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターでトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞系からのものであり、レーン４はトランスフェクションされていないＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞系からのものであり、レーン５および６は抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターでトランスフェクションされたＢａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞系からのものである。抗ＢＣＲ－ＡＢＬ発現ベクターでトランスフェクションされた場合、Ｂａ／Ｆ３＋ｐ１９０細胞ではｐ１９０$^{BCR-ABL}$ｍＲＮＡの特異的ダウンレギュレーションが見られる一方、ｐ２１０$^{BCR-ABL}$の発現は、Ｂａ／Ｆ３＋ｐ２１０細胞において影響を受けない。
まとめると、本発明者らはインビトロで特異的ＤＮＡ配列を認識すべく設計されたＤＮＡ結合タンパク質が、インビボで活性であり、付与された位置決定シグナルによって核に導かれ、染色体ＤＮＡにおける標的配列に結合し得ることを明らかにしてきた。これは、そうでなければ活発に転写されるＤＮＡ上に見出され、おそらくペプチドの結合がポリメラーゼの経路をブロックし、失速または中断を引き起こしている。この場合、特異的ポリペプチドを標的の遺伝子内配列に対して用いることは、選択された遺伝子の発現を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムに基づくアプローチを思い起こさせる（Stein & Cheng 1993 Science 261, 1004-1013）。アンチセンスオリゴヌクレオチドと同様に、亜鉛フィンガーＤＮＡ結合タンパク質を、遺伝子内の調節配列だけでなく、染色体転座または点変異によって改変された遺伝子に対してもあつらえることができる。また、ホモプリン－ホモピリミジンプロモータ内での三重螺旋形成により転写を抑えるべく設計され得るオリゴヌクレオチド（Cooney et al., 1988 Science 245, 725-730）と同様に、ＤＮＡ結合タンパク質は、遺伝子の外のさまざまな独自の領域に結合できるが、しかし対照的に、ＤＮＡ結合タンパク質は、活性化ドメイン（Seipel et al,. 1992 EMBO Ｊ. 11, 4961-4968）または抑制ドメイン（Herschbach et al., 1994 Nature 370, 309-311）に融合されたときに転写開始のアップレギュレーションまたはダウンメギュレーションの双方によって遺伝子の発現を支配することができる。いずれの場合でも、任意のＤＮＡ上に直接働きかけ、さまざまなタンパク質エフェクターへの融合を可能にすることによって、あつらえられた部位特異的ＤＮＡ結合タンパク質は、医学および研究において、遺伝子発現を制御し、現実に遺伝子材料そのものを操作する能力を有するようになる。
例４
ここまでの例で説明されたファージディスプレイ亜鉛フィンガーライブラリは、次のいくつかの態様において、最適状態には至っていないものであると考えられる。
ｉ）　ライブラリが、理論上での最大サイズよりもずっと小さかった。
ii）　外側のフィンガーが双方ともＧＣＧトリプレットを認識した（いくつかの場合では、３つの亜鉛フィンガーに対するほぼ対称的な結合部位を作り出し、それらは、ペプチドをＤＮＡの「ボトム」鎖に結合できるようにし、そのため本発明者らがセットしたいと思った相互作用の記録を回避する。）。
iii）　フィンガー３のＡｓｐ＋２（「Ａｓｐ＋＋２」）は、中央トリプレットの５′塩基とフィンガー２（位置＋６）との相互作用よりも優勢であった。
iv）　すべてのアミノ酸が、無作為化された位置に提示されたわけではなかった。
これらの問題点を克服するため、次のような新しい３フィンガーライブラリが作り出された。
ａ）　中央フィンガーは４つの位置（－１、＋２、＋３および＋６）のみにおいて完全に無作為化され、ライブラリのサイズがより小さく、すべてのコドンが表わされるようにする。ライブラリはPharmaciaによるｐＣＡＮＴＡＢ５Ｅファージミドベクターにおいてクローニングした。このベクターは、ファージよりも形質転換頻度を高くすることができるものである。

ｂ）　第１および第３のフィンガーは、それぞれトリプレットＧＡＣおよびＧＣＡを認識し、高度に非対称な結合部位を達成する。フィンガー３による、後者のトリプレットでの３′Ａの認識は、Ｇｌｎ－１／Ａｌａ＋２によって仲介される。ここで重要なのは、短いＡｌａ＋２は、ＤＮＡ（特に中央トリプレットの５′塩基）への接触をなすべきではなく、これによって上述の（iii）で留意した問題点が回避される。

例５

ヒトのｒａｓ遺伝子は、それを癌遺伝子に変換することができるいくつかの異なった突然変異を受けやすい。ｒａｓ癌遺伝子は多数のヒトの癌に見出される。１つの特定的な突然変異は、Ｇ１２Ｖ突然変異（すなわち変異体遺伝子によってコードされるポリペプチドが、グリシンからバリンへの置換を含んでいる）として知られる。ｒａｓ癌遺伝子はヒトの癌では非常にありふれたものなので、効果的な治療法にとって極めて重要な標的である。ｒａｓのＧ１２Ｖ変異体を認識できる３フィンガータンパク質が設計されてきた。タンパク質は知られた特異性の規則に基づき合理的な設計を用いて生成された。略述すると、（ＧＣＣを結合するべく選択されたフィンガーの１つからの）亜鉛フィンガーフレームワークが、位置＋３で点変異によって修飾され、２つの付加的な異なるトリプレットを認識するフィンガーをもたらした。ＧＣＣを認識するフィンガーおよびその２つの誘導体は、ｐＣＡＮＴＡＢ５Ｅにおいてクローニングされ、ファージの表面上で発現された。

元来、Ｇ１２Ｖ結合ペプチド「ｒ－ＢＰ」は、関連するタンパク質の小さなライブラリから選択されるべきものであった。ライブラリが用いられるべきだった理由は、アミノ酸：塩基接触のうち８／９が何であるべきかが明らかであった一方、ＧＣＣトリプレットの中央のＣが、＋３Ａｓｐによって認識されるべきなのか、Ｇｌｕによって認識されるべきなのか、Ｓｅｒによって認識されるべきなのか、Ｔｈｒによって認識されるべきなのかがはっきりしなかったからである（上述の表２を参照）。したがって３フィンガーペプチド遺伝子は、標準的な手順に従いアニールされ連結された８つのオーバーラップする合成オリゴヌクレオチドおよび２％のアガロースゲルから精製された～３００ｂｐの生成物から組立てられた。フィンガー１のための遺伝子は、位置＋３において部分的なコドンの無作為化を含み、これにより上述のアミノ酸（Ｄ、Ｅ、ＳおよびＴ）の各々、また実際には望ましいという予測はされていなかった、ある種の他の残基（たとえばＡｓｎ）が含まれ得るようになる。合成オリゴヌクレオチドは、アニールされるときにＳｆｉＩおよびＮｏｔＩのオーバーハングを有するように設計された。～３００ｂｐのフラグメントは、ＳｆｉＩ／ＮｏｔＩ切断ＦｄＳＮベクターに連結し、連結混合物は電気穿孔法によりＤＨ５α細胞に導入した。ファージがこれらから、前述したように生成され、選択ステップが、Ｇ１２Ｖ配列を用いて（やはり既述のように）実行され、挿入なしのファージおよび結合が十分でないライブラリのファージが排除された。

選択に続き、いくつかの分かれたクローンが分離され、これらから生成されたファージは、Ｇ１２Ｖｒａｓ配列への結合および野性型ｒａｓ配列との区別について、ＥＬＩＳＡによりスクリーニングされた。いくつかのクローンにこれを行なうことができ、ファージＤＮＡの配列決定により、後にこれらが２つの範疇に分類されることが明らかとなった。１つは＋３の無作為化された位置においてアミノ酸Ａｓｎを有するものであり、もう１つは２つの他の望ましくない突然変異を有するものであった。

位置＋３におけるＡｓｎの出現は予期されないものであり、最も可能性のある原因は、位置＋３においてシトシン特異的残基を備えるタンパク質がいくつかの大腸菌ＤＮＡ配列に致命的なほど緊密に結合するということであろう。したがって、ファージディスプレイ選択は、必ずしも常に最もしっかりした結合クローンの生成を保証するとは限らない。というのも、細菌を通過することは、この技術には不可欠であり、選択されるタンパク質は、結合が有害なものであれば、宿主のゲノムに結合しないものとなり得るからである。

K_dの測定により、Ａｓｎ＋３を備えるクローンはしかしながらｎＭ範囲内のK_dで変異体Ｇ１２Ｖ配列に結合し、かつ野性型ｒａｓ配列を区別することが示された。しかしながら、本発明者らが作り出したいと願ったポリペプチドは最適な結合のためシトシンを特定すべきであるのに、Ａｓｎ＋３は中央位置でアデニン残基を特定するはずであることが予測

された。
したがって本発明者らは、再度合成オリゴ体を用いるため、（図１５に示すように）フィンガー１の位置＋３でＳｅｒを有する３フィンガーペプチドを組立てた。今回、遺伝子はｐＣＡＮＴＡＢ５Ｅファージミドに連結された。形質転換細胞は（ストラタジーン（Stratagene）から）大腸菌ＡＢＬＥ－Ｃ株において分離され、３０℃で増殖させられた。これらの条件下においてこの株は、プラスミド複製物の数を低減し、細胞内においてそれらの毒性産物がふえないようにする。
フィンガーのアミノ酸配列（ＳｅｑＩＤ　Ｎｏ．１８）が図１５に示される。数字はαヘリックスのアミノ酸残基についてのものである。フィンガー（Ｆ１、Ｆ２およびＦ３）は次のＧ１２Ｖ変異体ヌクレオチド配列に結合する。

5′ ＧＡＣ ＧＧＣ ＧＣＣ 3′
　　Ｆ３　Ｆ２　Ｆ１

太字のＡは、Ｇ１２Ｖ配列がこれによって野性型配列とは異なったものとなる、単一点変異を示す。
真核生物におけるタンパク質の検定（たとえばＣＡＴレポータ産物を駆使するもの）は、弱いプロモータの使用を必要とする。抗ＲＡＳ（Ｇ１２Ｖ）タンパク質の発現が強い場合、ペプチドはおそらく（必要とされる）野性型ｒａｓ対立遺伝子に結合し、細胞の死をもたらす。この理由により、調節可能なプロモータ（たとえばテトラサイクリンに対して）が、治療的な応用ではタンパク質のデリバリーを行なうのに用いられ、これによってタンパク質の細胞内濃度がＧ１２Ｖ点変異遺伝子についてのＫｄを上回る一方、野性型対立遺伝子についてのＫｄを上回らないようにする。Ｇ１２Ｖの突然変異は、（ｐ１９０ｂｃｒ－ａｂｌのようにｃＤＮＡ突然変異だけでなく）自然に起こるゲノム突然変異であるため、ヒト細胞系および他の動物モデルを、研究で用いることができる。
遺伝子の発現を抑えることに加えて、本発明のタンパク質は、ゲノムＤＮＡ内またはより有望にはＰＣＲ増幅されたゲノムＤＮＡ内に存在する正確な点変異を、配列決定を行なうことなく診断するのに用いることができる。したがって、さらなる工夫を伴うことなく、ＤＮＡ上の変異（たとえば点変異）を検出するための診断キットを設計することができるはずである。ＥＬＩＳＡに基づく方法が、特に適切なものであると判明するはずである
ヒトのトランスフェリン受容体に結合するｓｃＦｖフラグメントに亜鉛フィンガー結合ポリペプチドを融合させることが望まれる。これにより、ヒト細胞へのデリバリーと、ヒト細胞による取込みとが向上するはずである。トランスフェリン受容体は、特に有用であると考えられるが、理論上では、ヒト標的細胞の表面上に発現されるいかなる受容体分子（好ましくは高い親和性のもの）でも、適切なリガンド、特異的イムノグロブリンもしくはフラグメントのための、または亜鉛フィンガーポリペプチドに融合または結合される受容体の天然のリガンドのための適切なリガンドとして作用し得るであろう。
配列リスト
（１）一般情報：
（ｉ）出願人：
（Ａ）名称：メディカル・リサーチ・カウンシル
（Ｂ）番地：２０　パーク・クレセント
（Ｃ）市：ロンドン
（Ｅ）国：イギリス
（Ｆ）郵便番号：Ｗ１Ｎ　４ＡＬ
（ii）発明の名称：ＤＮＡの認識のための結合タンパク質におけるまたはそれに関連する改良
（iii）配列の数：１８
（iv）コンピュータ読出可能形式：
（Ａ）媒体種類：フロッピーディスク
（Ｂ）コンピュータ：ＩＢＭ　ＰＣ互換機
（Ｃ）オペレーティングシステム：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ

（Ｄ）ソフトウェア：PatentIn Release#1. 0. Version #1. 30（EPO）
（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：６０個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１：

CTCCTGCAGT TGGACCTGTG CCATGGCCGG CTGGGCCGCA TAGAATGGAA CAACTAAAGC

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：９２個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：タンパク質
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２：

Met Ala Glu Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg
1 5 10 15

Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr
20 25 30

Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa His Xaa Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro
50 55 60

Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg
65 70 75 80

Lys Arg His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp
85 90

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２６個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３：

TATGACTTGG ATGGGAGACC GCCTGG

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２８個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４：

AATTCCAGGC GGTCTCCCAT CCAAGTCA

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５についての情報：

（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２１個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５：
TATATAGCGT GGGCGTATAT A
（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２４個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６：
GCGTATATAC GCCCACGCTA TATA
（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２１個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７：
TATATAGCGN NNGCGTATAT A
（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２４個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８：
GCGTATATAC GCNNNCGCTA TATA
（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：３３個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９：
TTCCATGGAG ACGCAGAAGC CCTTCAGCGG CCA
（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：３３個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０：
TTCCATGGAG ACGCAGGTGA GTTCCTCACG CCA

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１についての情報：
（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：３３個の塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１：

CCCCTTTCTC TTCCAGAAGC CCTTCAGCGG CCA

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：３３個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：ペプチド
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２：

Met Ala Glu Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
1 5 10 15

Ser Asp Arg Ser Ser Leu Thr Arg His Thr Arg His Thr Gly Glu Lys
20 25 30

Pro

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：３３個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：ペプチド
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３：

Met Ala Glu Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
1 5 10 15

Ser Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg His Glu Lys His Thr Gly Glu Lys
20 25 30

Pro

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２７個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：ペプチド
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４：

Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Gly Gly Asn Leu
1 5 10 15

Val Arg His Leu Arg His Thr Gly Glu Lys Pro
20 25

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５についての情報：
（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：２６個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：ペプチド
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５：

```
Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ala Gln Thr Leu
1               5                  10                  15

Gln Arg His Leu Lys His Thr Gly Glu Lys
            20                  25
```

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２６個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：ペプチド
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６：

```
Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ala Ala Thr Leu
1               5                  10                  15

Gln Arg His Leu Lys His Thr Gly Glu Lys
            20                  25
```

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：２６個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：ペプチド
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７：

```
Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ala Gln Asp Leu
1               5                  10                  15

Gln Arg His Leu Lys His Thr Gly Glu Lys
            20                  25
```

（２）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：８９個のアミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：
（Ｄ）トポロジー：不明
（ii）分子の型：タンパク質
（xi）配列の記載：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８：

```
Met Ala Glu Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
1               5                  10                  15

Ser Asp Arg Ser Ser Leu Thr Arg His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu
            20                  25                  30

Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Asp Arg Ser
        35                  40                  45

His Leu Thr Arg His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln
    50                  55                  60

Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
65                  70                  75                  80

His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys
                85
```

【図１】

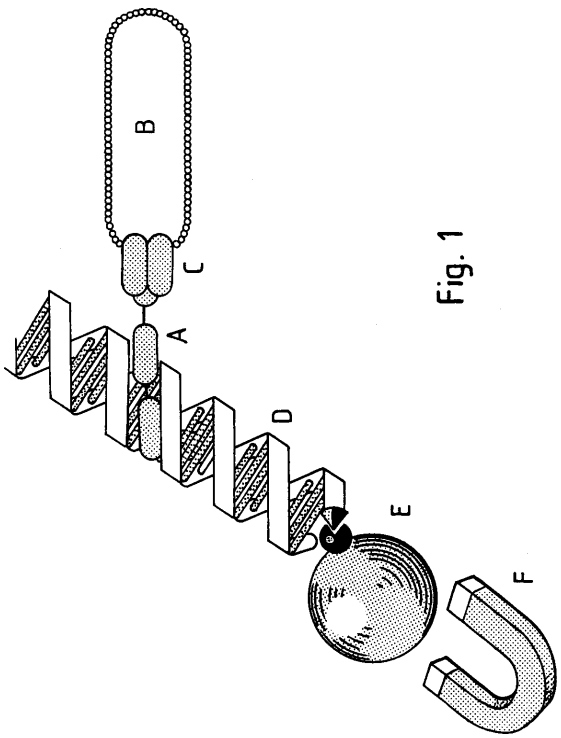


Fig. 1

【図２】

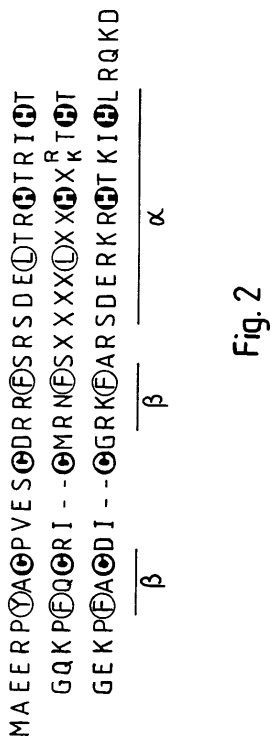


Fig. 2

【図３】

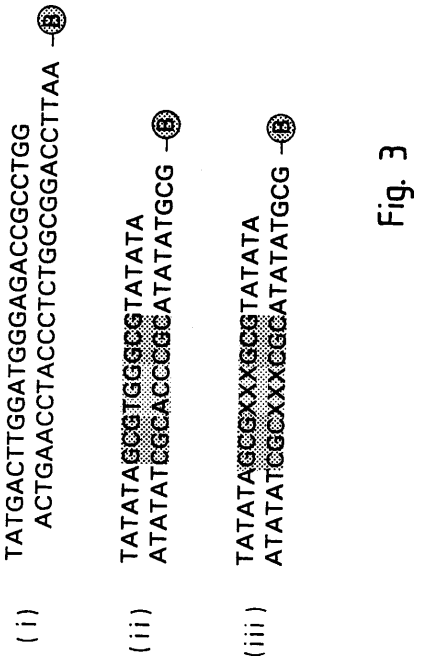


Fig. 3

【図４】

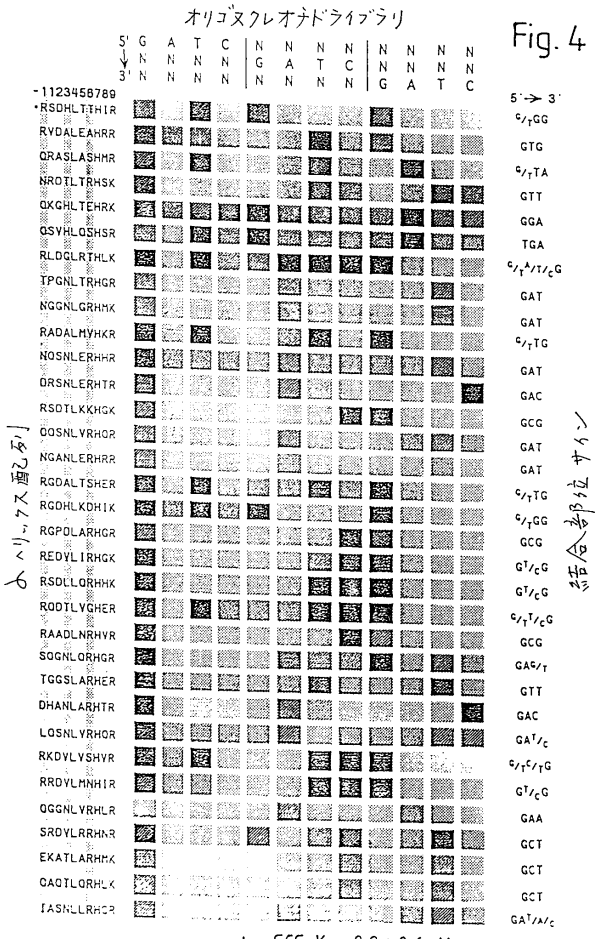
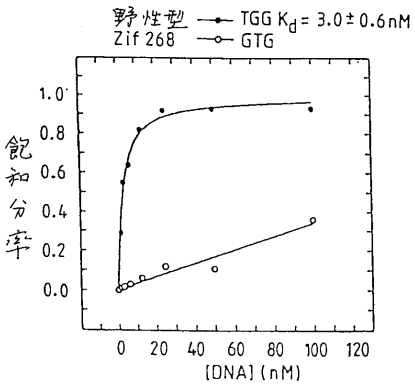


Fig. 4

【図５】



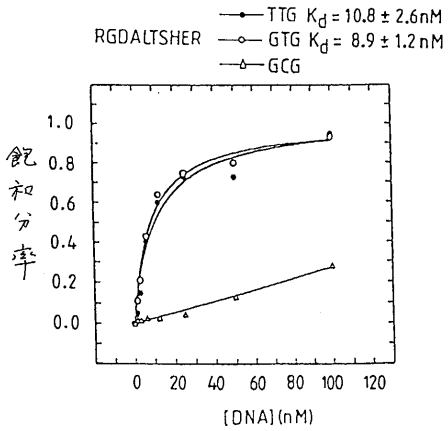
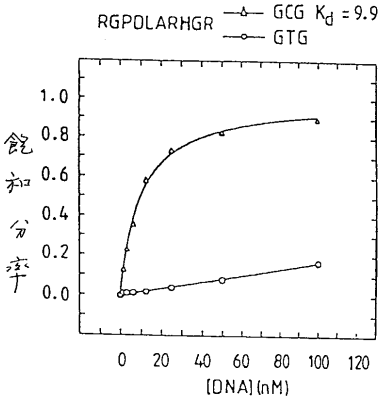


Fig. 5



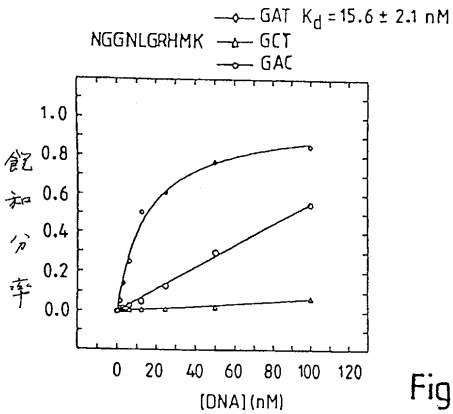


Fig. 5

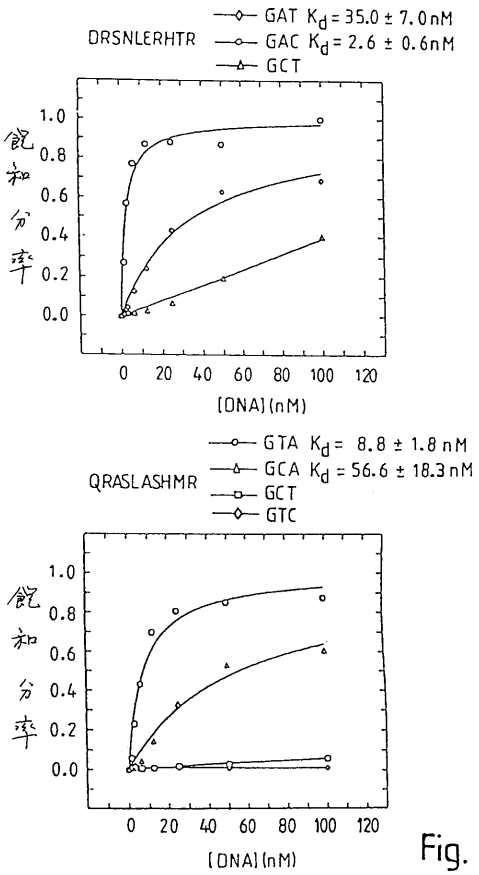

DRSNLERHTR
GAT Kd = 35.0 ± 7.0 nM
GAC Kd = 2.6 ± 0.6 nM
GCT
飽和分率
[DNA] (nM)
QRASLASHMR
GTA Kd = 8.8 ± 1.8 nM
GCA Kd = 56.6 ± 18.3 nM
GCT
GTC
飽和分率
[DNA] (nM)

Fig. 5

【図６】

| | | |

【図９】

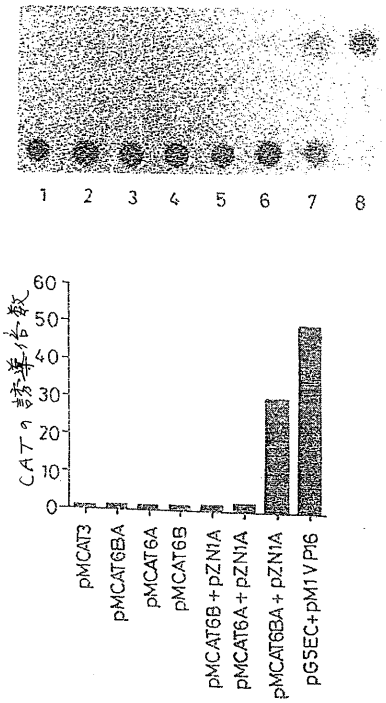
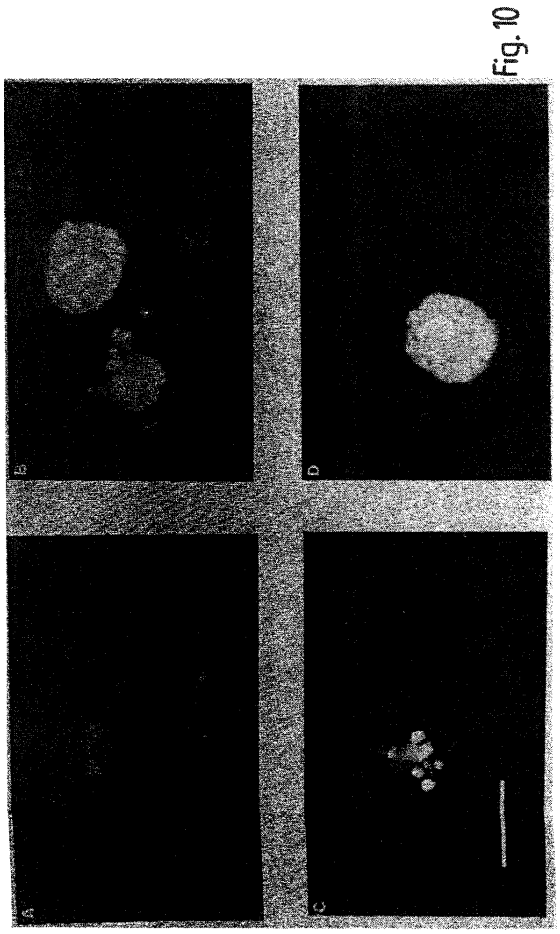


Fig. 9

【図１０】



【図１１】

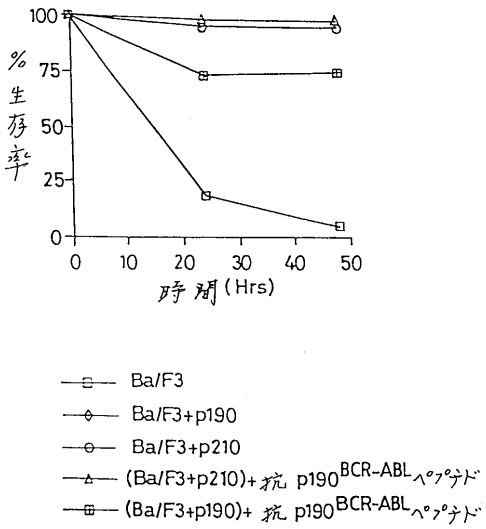


Fig. 11

【図１２】

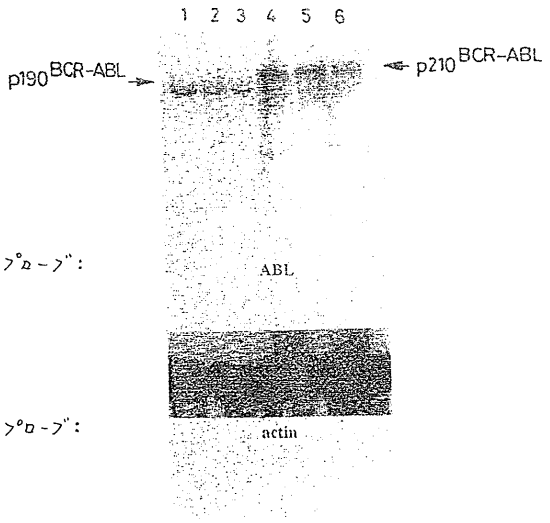


Fig. 12

【図１３】

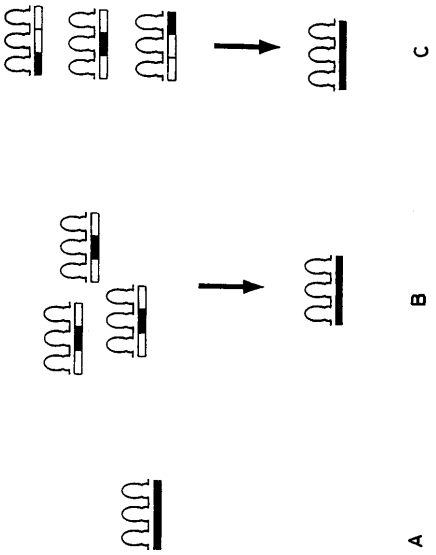


Fig. 13

【図１４】

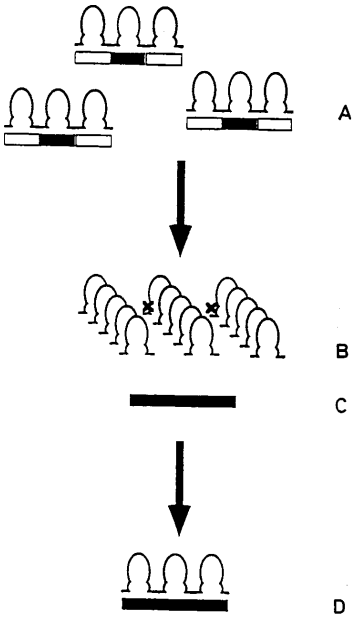


Fig. 14

【図１５】

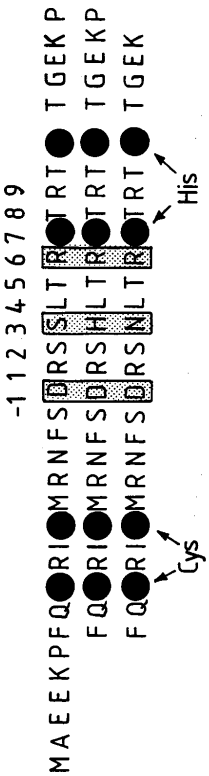


Fig. 15

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ｃ１２Ｑ 1/68 (2006.01) Ｃ１２Ｑ 1/68 Ａ

(31)優先権主張番号 9514698.1
(32)優先日 平成7年7月18日(1995.7.18)
(33)優先権主張国 英国(GB)

(72)発明者 クラッグ，アーロン
イギリス、シィ・ビィ・１ ４・ユー・ティ ケンブリッジ、キャベンディッシュ・アベニュ、７０
(72)発明者 サンチェスーガルシア，イシドロ
スペイン、エーー３７００１ サラマンカ、５°デー、６－８、クエスタ・デル・サンクティ・スピリタス

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 Science，１９９１年，Vol.253，p.1550-1553
FEBS Lett.，１９９１年，Vol.283，p.23-26
Science ，１９９４年 2月，Vol.263，p.671-673
Biochemistry，１９９４年 5月，Vol.33，p.5689-5695
Mol.Cell.Biol.，１９９３年，Vol.13，p.4556-4571
Proc.Natl.Acad.Sci.USA，１９９４年 2月，Vol.91，p.1178-1182

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 19/00