

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-511049

(P2005-511049A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int.C1.⁷

F 1

テーマコード(参考)

C12N 15/09

C 12 N 15/00

Z N A A

2 G O 4 5

C07K 14/47

C 07 K 14/47

4 B O 2 4

C07K 19/00

C 07 K 19/00

4 B O 6 3

C12N 1/15

C 12 N 1/15

4 B O 6 4

C12N 1/19

C 12 N 1/19

4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 124 頁) 最終頁に続く

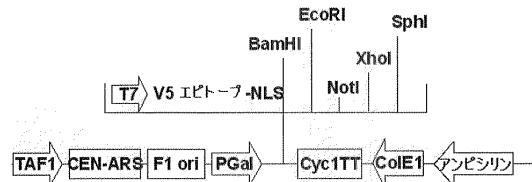
(21) 出願番号	特願2003-549524 (P2003-549524)	(71) 出願人	504058950 トゥールゲン・インコーポレイテッド 大韓民国、305-390 デジョン、ユ ソンヌ、ジョンミンードン 461-6 、デドク・バイオコミュニティー
(86) (22) 出願日	平成14年12月7日 (2002.12.7)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月7日 (2004.6.7)	(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(86) 國際出願番号	PCT/KR2002/002309	(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
(87) 國際公開番号	W02003/048345	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(87) 國際公開日	平成15年6月12日 (2003.6.12)	(74) 代理人	100075672 弁理士 峰 隆司
(31) 優先権主張番号	60/338,441		
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/376,053		
(32) 優先日	平成14年4月26日 (2002.4.26)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/400,904		
(32) 優先日	平成14年8月2日 (2002.8.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キメラタンパク質の表現型スクリーニング

(57) 【要約】

本発明の一態様において、異なる人工キメラタンパク質をコーディングする核酸のライブラリーをスクリーニングして細胞または生物体の表現形質を変化させるキメラタンパク質を同定する。キメラタンパク質は特定の標的遺伝子または経路に対する先知識がなくても同定できる。あるキメラタンパク質は多数のジンクフィンガードメインを含み、たとえば、熱抵抗性、溶媒抵抗性、変化した細胞成長度、インシュリン生産、分化および薬剤抵抗性を誘導できる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

人工転写因子をコーディングする異種核酸を含む変形細胞であって、前記人工転写因子は、前記変形細胞と実質的に同じであり、かつ異種核酸および人工転写因子を欠く対照細胞に比べて変形細胞にストレス抵抗性を与える、変形細胞。

【請求項 2】

前記人工転写因子が 2 つのジンクフィンガードメインを含む請求項 1 記載の変形細胞。

【請求項 3】

前記細胞が細菌細胞である請求項 1 記載の変形細胞。

【請求項 4】

前記細胞が真核細胞である請求項 1 記載の変形細胞。

【請求項 5】

前記ストレス抵抗性が、熱抵抗性、溶媒抵抗性、重金属抵抗性、浸透圧抵抗性、極限 pH 抵抗性、化学物質抵抗性、寒さ抵抗性、遺伝子毒性製剤抵抗性および放射能抵抗性の形質のうち一つ以上を含む請求項 2 記載の変形細胞。

【請求項 6】

前記変形細胞が、人工転写因子を発現し、人工転写因子を欠く実質的に同一の培養細胞に比べて増大したストレス抵抗性を示すことを特徴とする請求項 1 記載の変形細胞。

【請求項 7】

請求項 1 記載の変形細胞を提供する段階；

前記変形細胞を人工転写因子が生産される条件下で保持する段階；および

人工転写因子以外の、培養された細胞によって生産された生成物を回収する段階を含む、細胞生成物の生産方法。

【請求項 8】

前記変形細胞が人工転写因子以外の異種タンパク質をコーディングする核酸を含み、前記生成物が異種タンパク質である請求項 7 記載の生産方法。

【請求項 9】

前記生成物が代謝産物または内生 (endogenous) タンパク質である請求項 7 記載の生産方法。

【請求項 10】

前記変形細胞が異種タンパク質をコーディングする第 2 核酸をさらに含み、前記異種タンパク質が代謝産物の生産に関与することを特徴とする請求項 8 記載の生産方法。

【請求項 11】

前記変形細胞が 20 ~ 40 に保たれることを特徴とする請求項 7 記載の生産方法。

【請求項 12】

前記変形細胞が、人工転写因子を欠く実質的に同一細胞の成長を抑制する条件下で保持されることを特徴とする請求項 7 記載の生産方法。

【請求項 13】

前記人工転写因子がジンクフィンガードメインを含むことを特徴とする請求項 7 記載の生産方法。

【請求項 14】

前記ジンクフィンガードメインが、表 15 に記載されたジンクフィンガードメインの DNA 接触残基に相応する DNA 接触残基の集合を含むことを特徴とする請求項 13 記載の生産方法。

【請求項 15】

前記人工転写因子が少なくとも 3 つのジンクフィンガードメイン配列を含み、前記配列の各ジンクフィンガードメインの DNA 接触残基が表 15 の列に記載された任意の 3 つの連続するジンクフィンガードメインの DNA 接触残基に各々相応することを特徴とする請求項 14 記載の生産方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記ストレス抵抗性が、熱抵抗性、溶媒抵抗性、重金属抵抗性、浸透圧抵抗性、極限 pH 抵抗性、化学物質抵抗性、寒さ抵抗性および放射能抵抗性のうち一つ以上を含む請求項 7 記載の生産方法。

【請求項 17】

標的タンパク質をコーディングする遺伝子、および前記人工キメラタンパク質をコーディングする配列を含む異種核酸を含み、前記人工キメラタンパク質が（1）異種核酸を含まない細胞に比べて細胞のタンパク質生産量を増加させ、また（2）標的タンパク質をコーディングする遺伝子の転写を直接的に調節する転写調節領域に結合していない細胞。

【請求項18】

前記人工キメラタンパク質が 2 つのジンクフィンガードメインを含み、DNA に結合する
ことを特徴とする請求項 17 記載の細胞。 10

【請求項19】

前記細胞が真核細胞であり、人工キメラタンパク質がゲノム (genomic) DNA 部位に結合するために P B 0 8、K_F_0 2 または K_D_1 0 と競争することを特徴とする請求項 17 記載の細胞。

【請求項 20】

前記人工キメラタンパク質が細胞の細胞周期進行速度を変化させる請求項 17 記載の細胞。

【請求項 2 1】

前記遺伝子が内生遺伝子である請求項 17 記載の細胞。

【請求項 22】

(1) 人工転写因子を含まない細胞に比べて真核細胞による標的タンパク質の生産量を増加させ、また(2) 標的タンパク質をコーディングする遺伝子の転写を直接的に調節する転写調節領域に結合しない人工転写因子。

【請求項 2 3】

複数のジンクフィンガードメインを含み、真核細胞において細胞周期進行速度を変化させる人工転写因子。

【請求項 2 4】

請求項 17 に記載の細胞を提供する段階；および

前記人工キメラタンパク質が細胞の異種核酸を含まない細胞に比べて標的タンパク質の生産量を増加させる条件下で、前記細胞を保持する段階を含むタンパク質生産方法。 30

【請求項 25】

前記タンパク質が分泌タンパク質である請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 26】

分泌タンパク質をコーディングする内生遺伝子および人工転写因子をコーディングする配列を含む異種核酸を含む細胞であって、前記人工転写因子が異種核酸を含まない細胞に比べて細胞の分泌タンパク質の生産量を増加させる細胞。

【請求項 27】

前記細胞が真核細胞であり、分泌タンパク質がインシュリンである請求項 2 6 記載の細胞。

【請求項 28】

前記人工転写因子が、08-D04-p65が特異的に結合する内生DNA部位に特異的に結合することを特徴とする請求項26記載の細胞。

【請求項 29】

前記人工転写因子が、内生DNA部位に特異的に結合し、内生DNA部

に 0 8 _ D 0 4 _ p 6 5 と競争する請求項 2 6 記載の細胞。
【請求項 3 0】
前記人工転写因子が下記のアミノ酸配列を含む請求項 2 6 記載の細胞：
C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2

$\text{C}_{2-5} \text{X}_{\text{X}} \text{X}_{\text{X}} \text{B}_{\text{X}} \text{R}_{\text{X}} \text{D}_{\text{H}} \text{J}_{\text{X}} \text{T}_{\text{H}} \text{X}_{(3-5)} \text{H}_{\text{X}}_{(1-6)} \text{B}_{\text{X}} \text{C}_{\text{X}}_{(2-5)}$
 $\text{C}_{\text{X}} \text{X}_{\text{X}} \text{B}_{\text{X}} \text{V}_{\text{X}} \text{S}_{\text{S}} \text{J}_{\text{X}} \text{R}_{\text{H}} \text{X}_{(3-5)} \text{H}$ (配列番号：46)

(ここで、Bはフェニルアラニンまたはチロシンであり、Jは疎水性アミノ酸である。)

【請求項 3 1】

請求項 2 4 記載の細胞を提供する段階；および

前記異種核酸を含まない細胞に比べて前記人工転写因子が細胞のインシュリン生産量を増加させる条件下で細胞を保持する段階を含むインシュリン生産方法。

【請求項 3 2】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子であって、前記人工転写因子がないときは内生インシュリン遺伝子を発現しない哺乳動物細胞において内生インシュリン遺伝子の発現を誘導する人工転写因子。10

【請求項 3 3】

人工転写因子をコーディングする核酸を含まない同一細胞に比べて毒性物質に対する細胞の感受性を変化させる人工転写因子。

【請求項 3 4】

人工転写因子をコーディングする核酸を含み、発現する細胞であって、前記人工転写因子が前記核酸を含まない同一細胞に比べて毒性物質に対する細胞の感受性を変化させる細胞。20

【請求項 3 5】

前記毒性物質が薬剤 (drug) である細請求項 3 4 記載の細胞。

【請求項 3 6】

前記感受性が増加する請求項 3 4 記載の細胞。

【請求項 3 7】

前記感受性が減少する請求項 3 4 記載の細胞。

【請求項 3 8】

前記細胞が、真菌細胞である請求項 3 4 記載の細胞。

【請求項 3 9】

前記毒性物質がケトコナゾールである請求項 3 8 記載の細胞。

【請求項 4 0】

前記人工転写因子が 3 つのジンクフィンガードメインを含む請求項 3 4 記載の細胞。30

【請求項 4 1】

前記人工転写因子が、内生 DNA 部位に結合し、前記内生 DNA 部位に結合するために、表 5 に記載されたジンクフィンガータンパク質と競争することを特徴とする請求項 3 9 記載の細胞。

【請求項 4 2】

細胞において、AQY1、YJR147W、YLL052C、YLL053C または YPL091W のタンパク質の発現または活性を 70% 以上同等に変化させることを含む、真菌細胞の薬剤抵抗性を変化させる方法。

【請求項 4 3】

複数の核酸を含む核酸ライブラリーであって、複数の核酸のうち各核酸が少なくとも 3 つのジンクフィンガードメインの配列を含むキメラタンパク質をコーディングし、ここで、少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインは天然型タンパク質では互いに隣接して現れない、核酸ライブラリーを提供する段階；40

前記ライブラリーの構成員 (member) を試験細胞の複製物に導入して形質転換細胞を得る段階；

前記形質転換された細胞を毒性物質の存在下で培養する段階；および

前記毒性物質に対する感受性が試験細胞に比べて変化した細胞を、前記形質転換された細胞から同定する段階を含む。

毒性物質に対する細胞の感受性を変化させる人工キメラタンパク質の同定方法。

【請求項 4 4】

10

20

30

40

50

前記試験細胞が真菌細胞であり、前記毒性物質が抗真菌製剤である請求項43記載の方法。

【請求項45】

前記試験細胞が癌細胞であり、前記毒性物質が抗分裂製剤(anti-mitotic agent)である請求項43記載の方法。

【請求項46】

前記核酸によってコーディングされるキメラタンパク質が転写調節ドメインを含む請求項43記載の方法。

【請求項47】

選択された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質のジンクフィンガードメイン配列を含むが、同定された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質の転写調節ドメインは含まない第2のキメラタンパク質をコーディングする核酸を製作する段階をさらに含む請求項46記載の方法。 10

【請求項48】

(i) 前記選択された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質のジンクフィンガードメイン配列、および(ii) 同定された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質の転写調節ドメインでない転写調節ドメインを含む、第2のキメラタンパク質をコーディングする核酸を製作する段階をさらに含む請求項47記載の方法。

【請求項49】

3つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子をコーディングする配列を含み、前記人工転写因子の発現が少なくとも一つの脊椎動物細胞において神経細胞の表現型を誘導する核酸。

【請求項50】

前記ジンクフィンガードメインのうち、少なくとも一つが下記の配列を有する請求項49記載の核酸：

Cys-X₂-X₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃-X₅-His (配列番号：250)

Cys-X₂-X₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃-X₅-His (配列番号：251)；または

Cys-X₂-X₅-Cys-X₃-X_a-X-Cys-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃-X₅-His (配列番号：252) 30

(ここで、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり；X_bは疎水性アミノ酸である。)

【請求項51】

前記人工転写因子が下記の配列を含む請求項50記載の核酸：

Cys-X₂-X₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃-X₅-His-X₁-X₆-Cys-X₂-X₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃-X₅-His-X₁-X₆-Cys-X₂-X₅-Cys-X₃-X_a-X-Cys-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃-X₅-His (配列番号：253) 40

(ここで、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり；X_bは疎水性アミノ酸である。)

【請求項52】

請求項44記載の核酸を含む脊椎動物細胞を提供する段階；および前記脊椎動物細胞を、人工転写因子が生産され、神経突起の形成が誘導される条件下で培養する段階を含む、脊椎動物細胞において神経突起の形成を誘導する方法。

【請求項53】

前記脊椎動物細胞が哺乳動物細胞である請求項52記載の方法。

【請求項54】

10

20

30

40

50

前記哺乳動物細胞がヒト細胞である請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 5】

前記脊椎動物細胞が人工転写因子を生産する前の幹細胞である請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 6】

3つのジンクフィンガードメインからなる人工転写因子をコーディングする配列を含み、前記人工転写因子の発現が少なくとも一つの脊椎動物細胞において骨細胞形成(osteogenesis)を誘導する核酸。

【請求項 5 7】

前記ジンクフィンガードメインの少なくとも一つが下記の配列を有する請求項 5 6 記載の核酸：

Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X_b - X - Asp - Lys - His - X₃ - 5 - His (配列番号：254)；

Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Glu - X_b - X - Thr - His - His - X₃ - 5 - His (配列番号：255)；

Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Val - X_b - X - Ser - Thr - His - X₃ - 5 - His (配列番号：256)；または

Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X_b - X - Asp - Lys - His - X₃ - 5 - His (配列番号：257)

(ここで、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり；X_bは疎水性アミノ酸である。)

10

20

30

40

【請求項 5 8】

前記人工転写因子が下記のアミノ酸配列を含む請求項 5 7 記載の核酸：

Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X_b - X - Asp - Lys - His - X₃ - 5 - His - X₁ - 6 - Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Glu - X_b - X - Thr - His - His - X₃ - 5 - His - X₁ - 6 - Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Val - X_b - X - Ser - Thr - His - His - X₃ - 5 - His - X₁ - 6 - Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X_b - X - Asp - Lys - His - X₃ - 5 - His (配列番号：258)

(ここで、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり；X_bは疎水性アミノ酸である。)

【請求項 5 9】

請求項 4 4 記載の核酸を含む脊椎動物細胞を提供する段階；および

前記脊椎動物細胞を、人工転写因子が生産され、骨細胞形成が誘導される条件下で培養する段階を含む、脊椎動物細胞において骨細胞形成を誘導する方法。

【請求項 6 0】

複数のジンクフィンガードメインを含み、幹細胞の分化能力を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸および幹細胞を提供する段階；

前記核酸を幹細胞に導入する段階；および

前記人工転写因子が生産され、前記幹細胞の分化能力を変化させる条件下で前記幹細胞を保持する段階を含む、幹細胞の分化能力を変化させる方法。

【請求項 6 1】

前記人工転写因子が幹細胞の分化を誘導することを特徴とする請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

前記人工転写因子が幹細胞の自家複製(self-renewal)能力を増大させることを特徴とする請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 3】

前記幹細胞が胚性幹細胞である請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 4】

前記幹細胞が脊椎動物幹細胞または植物幹細胞である請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 5】

50

前記幹細胞が造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)、神経前駆細胞 (neuronal progenitor cell) または筋肉前駆細胞 (muscular progenitor cell) である請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 6】

各々少なくとも 2 つのジンクフィンガードメイン、および転写を活性化または抑制する調節ドメイン配列を含む異なる人工転写因子をコーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；

所定の形質 (trait) を有する細胞を提供する段階；

前記核酸ライブラリーの構成員を前記細胞内に導入する段階；

前記所定の形質を変化させるライブラリーの構成員を同定する段階；および

前記同定された構成員のジンクフィンガードメイン配列は含むが、同定された構成員の調節ドメインと同一の調節ドメインは含まない DNA 結合ポリペプチドをコーディングする配列を含むコーディング核酸を製造する段階を含む、人工転写因子の同定方法。 10

【請求項 6 7】

前記 DNA 結合ポリペプチドが、同定された構成員の調節ドメインを有しない請求項 6 6 記載の方法。

【請求項 6 8】

前記 DNA 結合ポリペプチドが、同定された構成員の調節ドメインに比べて突然変異された調節ドメインを含む請求項 6 6 記載の方法。

【請求項 6 9】

前記 DNA 結合ポリペプチドが、同定された構成員の調節ドメインと反対の機能を果たす調節ドメインを含む請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 7 0】

前記細胞に前記コーディング核酸を導入し、前記細胞の所定形質を評価することをさらに含む請求項 6 6 記載の方法。

【請求項 7 1】

前記同定段階が、所定の環境条件に対する抵抗性；分化；逆分化；増殖；アポトーシス (apoptosis)；血清 - 独立性 (serum-independence)；病原体抵抗性；および病原体感受性からなる群から選ばれる特性を有する細胞を同定することを含む請求項 6 6 記載の方法。 30

【請求項 7 2】

複数の第 1 核酸および第 2 核酸を複数含み、ここで、

(a) 複数の第 1 核酸の各々が少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインおよび転写を活性化する第 1 の機能ドメインを含む人工キメラタンパク質をコーディングし、

(b) 複数の第 2 核酸の各々が少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含み、第 1 の機能ドメインは含まない人工キメラタンパク質をコーディングする、核酸ライブラリー。 40

【請求項 7 3】

前記複数の第 2 核酸の各々によってコーディングされる人工キメラタンパク質が前記第 1 の機能ドメインとは異なる第 2 の機能ドメインを含む請求項 7 2 記載の核酸ライブラリー。

【請求項 7 4】

前記第 1 の機能ドメインが活性化ドメインであり、前記第 2 の機能ドメインが抑制ドメインである請求項 7 2 記載の核酸ライブラリー。

【請求項 7 5】

前記第 1 の機能ドメインが活性化ドメインであり、前記第 2 の機能ドメインが第 1 の活性化ドメインと異なる効率の活性化ドメインである請求項 7 3 記載の核酸ライブラリー。

【請求項 7 6】

前記第 1 の機能ドメインがヒストン脱アセチル化酵素 (deacetylase) ドメインである請求項 7 2 記載の核酸ライブラリー。 50

【請求項 7 7】

請求項 7 2 記載の核酸ライブラリーを提供する段階；

前記所定の形質を有する細胞に核酸ライブラリーの構成員を導入する段階；および
前記所定の形質を変化させるライブラリー構成員を同定する段階を含む、複数のキメラタンパク質の同定方法。

【請求項 7 8】

発現されると試験細胞の所定の形質を変化させる第 1 の人工キメラタンパク質をコーディングする核酸を含む試験細胞の複製細胞を提供する段階；

2 つのジンクフィンガードメインを含む異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする、複数の核酸を含む核酸ライブラリーの構成員を各複製細胞に導入する段階；および
前記各複製細胞がライブラリーの第 1 の構成員によってコーディングされるキメラタンパク質および導入された前記核酸ライブラリーの構成員によってコーディングされる第 2 のキメラタンパク質を発現する複製細胞をスクリーニングして所定の形質がさらに変化した細胞を同定する段階を含む、複数のキメラタンパク質の同定方法。10

【請求項 7 9】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む各々の異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする、複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；

細胞の所定の形質を変化させる前記ライブラリーの第 1 および第 2 の構成員を同定する段階；および

前記同定された第 1 および第 2 のライブラリー構成員によって各々コーディングされる第 1 および第 2 のポリペプチドを発現する細胞を製造する段階を含む、変形細胞の製造方法。20

【請求項 8 0】

前記同定段階が、細胞複製物に前記核酸ライブラリーの構成員を導入して形質転換細胞を提供し、所定の形質が変化した第 1 および第 2 の細胞を同定することを含む請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 8 1】

前記製造された細胞に対して前記所定形質を評価する段階をさらに含む請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 8 2】

前記細胞の製造段階が、前記第 1 のポリペプチドをコーディングする第 1 の遺伝子および前記第 2 のポリペプチドをコーディングする第 2 の遺伝子を細胞に導入することを含む請求項 7 9 記載の方法。30

【請求項 8 3】

前記第 1 および第 2 の遺伝子が同一核酸の成分 (components) である請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 4】

前記細胞の製造段階が、前記第 1 のポリペプチドをコーディングする第 1 の遺伝子を含む第 1 の細胞を、前記第 2 のポリペプチドをコーディングする第 2 の遺伝子を含む第 2 の細胞と融合することを含む請求項 7 9 記載の方法。40

【請求項 8 5】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；

所定の形質を有する細胞に前記核酸ライブラリーの構成員を導入する段階；

前記所定の形質を変化させるライブラリーの構成員を同定する段階；および

下記の変異体またはキメラタンパク質を各々コーディングする複数の核酸を含む第 2 のライブラリーを製作する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法：

(1) 1 ~ 6 個のアミノ酸の置換、挿入または欠失によって、前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質と区別される変異体、

(2) 前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質のジンクフィンガードメイ50

ンおよび追加のジンクフィンガードメインを含み、前記追加のジンクフィンガードメインが第2のライプラリーの構成員の間で多様に変化するキメラタンパク質、

(3) 前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質の変異体であって、他のジンクフィンガードメインで置換されたジンクフィンガードメイン位置の下位集合 (subset) および前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質の相応する位置にあるジンクフィンガードメインと同一な少なくとも一つの不变ジンクフィンガードメインを有する変異体、または

(4) 前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質の変異体であって、前記第2のライプラリーの構成員のうち、一つ以上のジンクフィンガードメインの位置が、前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質内の位置における特定のドメインがその位置における他のジンクフィンガードメインよりも高い頻度で現れるように変化させた変異体。

【請求項 8 6】

少なくとも2つのジンクフィンガードメインを各々含む異なる人工転写因子を各々コーディングする複数の核酸を含む核酸ライプラリーを提供する段階；

前記ライプラリーの構成員を試験細胞の複製物に導入して複数の形質転換細胞を提供する段階；

前記形質転換細胞を人工転写因子が発現される条件下で保持する段階；

前記複数の形質転換細胞から、試験細胞に比べて変化した表現型を有する複数の表現型変換細胞 (phenotypically altered cell) を同定する段階；

前記複数の各表現型変換細胞内の転写体 (transcripts) またはタンパク質の量をプロファイルリング (profiling) して各表現型変換細胞のプロファイルを提供する段階；および前記プロファイルを互いに比較して、前記複数細胞のうち少なくとも2つの表現型変換細胞においてその量が試験細胞に比べて同じように変化した一つ以上の転写体またはタンパク質を同定する段階を含む、

人工転写因子の標的 (target) を同定する方法。

【請求項 8 7】

少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子であって、前記人工転写因子が発現されない対照細胞に比べて細胞の表現形質を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む異種核酸を含む変形細胞を提供する段階；

前記変形細胞における発現が前記対照細胞に比べて変化した標的遺伝子を同定する段階；および

前記異種核酸を含み、前記人工転写因子を発現し、標的遺伝子の活性が変化した試験細胞の表現形質を評価する段階を含む、

細胞の評価方法。

【請求項 8 8】

前記標的遺伝子の活性が遺伝子突然変異によって変化する請求項8 7記載の方法。

【請求項 8 9】

前記標的遺伝子の活性が二本鎖RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはリボザイムによって変化する請求項8 7記載の方法。

【請求項 9 0】

前記標的遺伝子の活性が標的遺伝子の過発現によって変化する請求項8 7記載の方法。

【請求項 9 1】

少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子であって、前記人工転写因子が発現されない対照細胞に比べて細胞の表現形質を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む異種核酸を含む変形細胞を提供する段階；

前記ライプラリー核酸を変形細胞の複製物に導入する段階；および

前記人工転写因子による表現形質の変化を減少させるライプラリー核酸を同定する段階を含む、

人工転写因子を評価する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 2】

前記ライプラリー核酸が c D N A ライプラリー核酸を含む請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 3】

前記ライプラリー核酸が、異なる人工キメラタンパク質をコーディングする核酸を含む請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 4】

前記異なる人工キメラタンパク質が、異なるジンクフィンガードメインを含む請求項 9 3 記載の方法。

【請求項 9 5】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含むが、少なくとも一つのジンクフィンガードメインが天然型タンパク質から由来することを特徴とする、異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする複数の核酸を含む核酸ライプラリーを提供する段階；所定の形質を有する細胞に前記核酸ライプラリー構成員を導入する段階；および前記所定の形質を変化させるライプラリー構成員を有する細胞を同定する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法。 10

【請求項 9 6】

少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする複数の核酸を含むが、前記複数核酸のうち少なくとも一つの構成員の少なくとも一つのジンクフィンガードメインが表 1 に記載されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする核酸ライプラリーを提供する段階； 20

前記核酸ライプラリー構成員を所定の形質を有する細胞に挿入する段階；および前記ライプラリー構成員が前記所定の形質を変化させた細胞を同定する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法。

【請求項 9 7】

(1) 核酸によってコーディングされるポリペプチドの第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインが各々天然型タンパク質由来のジンクフィンガードメインであるが、(i) 同じ天然型タンパク質では同時に現れず、または(ii) 同じ天然タンパク質では前記ポリペプチドにおける配列とは異なり、(2) 前記第 1 のジンクフィンガードメインが複数の核酸の間で多様に変化し、(3) 前記第 2 のジンクフィンガードメインが複数の核酸の間で多様に変化する、第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインを含むポリペプチドをコーディングする核酸を含む複数の細胞を含む細胞ライプラリーを提供する段階； 30
対照細胞と表現型が異なるライプラリー細胞を同定する段階；および前記同定されたライプラリー細胞から核酸を回収する段階を含む、キメラタンパク質の同定方法。

【請求項 9 8】

人工転写因子を生産する細胞において異種の過発現されたタンパク質の溶解度を改善する人工転写因子をコーディングする単離された核酸。

【請求項 9 9】

前記人工転写因子が複数のジンクフィンガードメインを含む請求項 9 8 記載の核酸。

【請求項 10 0】

前記細胞が細菌細胞である請求項 9 8 記載の核酸。 40

【請求項 10 1】

前記タンパク質が哺乳動物タンパク質である請求項 9 8 記載の核酸。

【請求項 10 2】

前記タンパク質が A K T タンパク質を含む請求項 10 1 記載の核酸。

【請求項 10 3】

前記複数のジンクフィンガードメインが Q S T R - D S A R - R D H T - W S N R または V S T R - D G N V - Q S N R - Q S N K ドメインを含む請求項 9 9 記載の核酸。

【請求項 10 4】

請求項 9 8 ~ 10 3 のいずれか一項に記載の異種核酸を含む変形細胞。 50

【請求項 105】

異種標的タンパク質をコーディングする配列を含む第2核酸を含む請求項104に記載の变形細胞を提供する段階；および

前記变形細胞を人工転写因子および異種標的タンパク質が生産される条件下で保持する段階を含む、

異種標的タンパク質の生産方法。

【請求項 106】

前記变形細胞が培養細胞である請求項105記載の方法。

【請求項 107】

前記变形細胞が対象(subject)内に存在する請求項105記載の方法。 10

【請求項 108】

請求項1に記載の变形細胞を提供する段階；

前記变形細胞を人工転写因子が生産される条件下で保持する段階；および

前記培養細胞から生産された人工転写因子でない産物を回収する段階を含む、細胞産物の生産方法。 20

【請求項 109】

少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む異なる人工キメラタンパク質を各々コーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；

所定の形質を有する第1の細胞に前記核酸ライブラリー構成員を導入して形質転換された細胞を提供する段階；

前記形質転換された細胞から、前記ライブラリー構成員が所定の形質を変化させた細胞を同定する段階；

前記同定、変化された細胞から核酸ライブラリー構成員を回収する段階；

前記所定の形質外の表現形質が第1の細胞と異なる第2の細胞に前記核酸ライブラリー構成員を挿入する段階；および

前記核酸ライブラリー構成員を含み、該核酸ライブラリー構成員がコーディングする人工キメラタンパク質を発現する第2の細胞を評価する段階を含む、

第1の細胞から第2の細胞に変化した形質を転移させる方法。 30

【請求項 110】

前記第1および第2の細胞が真核細胞である請求項109記載の方法。

【請求項 111】

前記第1および第2の細胞が酵母細胞である請求項110記載の方法。

【請求項 112】

前記第1および第2の細胞が哺乳動物細胞である請求項110記載の方法。

【請求項 113】

前記第1および第2の細胞の増殖特性が異なる請求項112記載の方法。

【請求項 114】

前記第1細胞が癌細胞であり、前記第2の細胞が非癌細胞(non-cancerous)である請求項113記載の方法。 40

【請求項 115】

前記評価された第2の細胞が所定の形質が変化したかどうかによって評価される請求項109記載の方法。

【請求項 116】

配列番号：2，4，6，8，10，12，14，16，18，20，260，262および264からなる群から選ばれたアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 117】

請求項116のポリペプチドをコーディングする核酸配列を含む単離された核酸。

【請求項 118】

3つのジンクフィンガードメインから構成され、その発現が少なくとも一つの真核細胞のウイルス複製、ウイルス生産およびウイルス感染性からなる群から選ばれた特性を変化さ 50

せる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸。

【請求項 1 1 9】

3つのジンクフィンガードメインを含み、その発現が真核細胞と共同培養されるか、真核細胞によって調節された (conditioned) 培地で培養された幹細胞を調節する真核細胞の能力を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸。

【請求項 1 2 0】

3つのジンクフィンガードメインを含み、その発現が分泌されたタンパク質をグリコシリ化させる哺乳動物細胞の能力を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸。

【請求項 1 2 1】

前記分泌されたタンパク質が少なくとも一つの免疫グロブリン (immunoglobulin) 可変ドメインを含む異種タンパク質である請求項 1 2 0 記載の核酸。

【請求項 1 2 2】

前記細胞が CHO 細胞である請求項 1 2 0 記載の核酸。

【請求項 1 2 3】

3つのジンクフィンガードメインを含み、その発現が外生 (exogenous) 核酸を受け入れる細胞の能力を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0 0 0 1】

多くの遺伝子は、通常プロモーターまたはエンハンサー領域内にある該遺伝子内の特定の DNA 部位に結合するポリペプチド転写因子による転写水準で調節される。これらのタンパク質は、プロモーター部位で RNA ポリメラーゼによる転写開始を活性化または抑制することによって標的遺伝子の発現を調節する。活性化因子 (activator) であるかまたは抑制因子 (repressor) であるかにかかわらず多くの転写因子は、構造的に単位モジュール性 (module) を有する。そのような単位モジュールは、構造的に別個のドメインとしてフォールディングが可能であり、DNA 結合、二量化 (dimerization) または転写機構 (transcriptional machinery) との相互作用のような特定の機能を有する。活性化ドメインまたは抑制ドメインのようなエフェクター (effector) ドメインは、異種転写因子の DNA - 結合ドメインに連結されてもその機能を維持する (Brent および Ptashne, (1985) Cell 43:729-36; Dawson et al., (1995) Mol. Cell Biol. 15:6923-31)。

【0 0 0 2】

人工転写因子は、ジンクフィンガードメイン (zinc finger domain) のキメラタンパク質として製作できる。たとえば、WO 01 / 60970 (Kimら) は、ジンクフィンガードメインの特異性を決定する方法と特定の標的部位を認識する人工転写因子の製作方法を開示している。人工転写因子の適用の一つとして、特定の標的遺伝子の発現を変化させることが挙げられる。標的部位は標的遺伝子の調節領域で同定され、人工転写因子は少なくとも一つの標的部位を認識するように操作される。このような人工転写因子が細胞内に導入されると、これらは該当する標的部位に結合して転写を調節する。標的遺伝子の発現を調節するこのような方法はしばしば転写因子を同定するための「標的 - 誘導 (target-driven)」接近法として引用されている。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

本発明の一態様において、本発明は次の段階を含む方法を特徴とする：(1) 第 1 および 2 の結合ドメインを含む人工キメラポリペプチドを発現する異種核酸を有する細胞を複数含むライブラリーであって、この際、第 1 および 2 の結合ドメインは互いに異種であり、複数の細胞の各構成員の第 1 および第 2 の結合ドメインは他の構成員のものと異なることを特徴とするライブラリーを提供する段階；および(2) 対照細胞に比べて異なる形質を有する細胞を前記ライブラリーから同定する段階。結合ドメインは、たとえば、ジンクフィンガードメインのように独立的にフォールディング (folded) されたモジュールであ

10

20

30

40

50

り得る。多くの実施態様において、結合ドメインはDNA結合ドメインであり、対照細胞は一般的に核酸ライブラリーを含まないか、対照核酸を含む細胞である。対照細胞はライブラリーが作られた母細胞であるか、またはその誘導細胞である。

【0004】

特定の形質は、観察、選抜、推論および／または定量できる、測定可能なすべての表現形質である。本発明に用いられるキメラタンパク質は、互いに異種である少なくとも2つの結合ドメインを含む。2つの結合ドメインは異なる天然型タンパク質から由来し得る。2つの領域は同じ天然型タンパク質から由来することもあるが、キメラタンパク質においては該当する天然型タンパク質とは異なる配列に位置する。

【0005】

多くの実施態様において、細胞はレポーター遺伝子を含まない。すなわち、キメラポリペプチドの発現によって調節される標的遺伝子に対する先駆的な情報がなくても細胞を選別できる。また、細胞は、特定形質に関連するか、関連しないマーカー(marker)の追加的な標識子(indicator)としてレポーター遺伝子を含んでもよい。同様に、少なくとも一つの標的遺伝子がスクリーニングの前に同定されていてもよい。

【0006】

他の例において、特定形質は、ある化合物(たとえば、天然または人工化合物)を生産することであり得る。前記化合物は抗生剤、増殖抑制剤、麻酔剤、タンパク質などである。

【0007】

また他の例において、特定形質は重金属、塩度、環境毒素、生物毒素、病原菌、寄生物質、他の環境的極限(例：乾燥、熱、寒さ)などの環境条件に対する抵抗性、ストレス(例：熱、寒さ、極限pH、アンモニアのような化学物質、薬剤、浸透圧、電離放射線)に対する抵抗性または薬剤抵抗性であり、この際、特定形質の変化は、敏感性または抵抗性の増加または減少のどちらの方向でもあり得る。

【0008】

また他の実施態様において、細胞は植物、動物(例：哺乳類)、菌類または細菌の細胞である。哺乳動物細胞の場合、特定形質は細胞増殖；サイトカイン、ホルモンまたは信号物質の生産；細胞信号経路の活性化および生理的経路(例：ブドウ糖恒常性、代謝、肥満)の活性化である。

【0009】

DNA結合ドメインは、たとえば、ジンクフィンガードメインである。典型的に、第1のジンクフィンガードメインはライブラリーの核酸の間で多様に変化し、第2のジンクフィンガードメインもまたライブラリーの核酸の間で多様に変化する。核酸はまた少なくとも一つの第3DNA結合ドメイン、たとえば、第3ジンクフィンガードメインを発見することもできる。

【0010】

発現される各ポリペプチドのジンクフィンガードメインは異なる天然型タンパク質から由来するジンクフィンガードメインと同じであるか、DNA接触位置における突然変異体のような天然型タンパク質の誘導体であり得る。天然型タンパク質は、たとえば、菌類(例：酵母)、植物または動物由来タンパク質(例：ヒトやネズミタンパク質のような哺乳類のタンパク質)のように、任意の真核生物のジンクフィンガータンパク質であり得る。各々のポリペプチドは第3、第4、第5および／または第6のジンクフィンガードメインをさらに含み得る。各々のジンクフィンガードメインはヒトなどの哺乳類由来ジンクフィンガードメインであり得る。

【0011】

選択的に、複数の細胞の核酸は10, 20, 30, 40または50個以上の互いに異なる3-塩基対DNA部位を認識するのに十分な数の異なるジンクフィンガードメインをコーディングする。一実施態様において、複数の核酸は30, 20, 10または5個以下の互いに異なる3-塩基対DNA部位を認識するのに十分な数の異なるジンクフィンガード

10

20

30

40

50

メインをコーディングする。

【0012】

細胞ライブラリーの各核酸から発現されたポリペプチドは、転写活性化および抑制ドメイン、メチル化ドメイン、アセチル化ドメインまたは脱アセチル化ドメインのような機能性転写調節ドメインをさらに含み得る。また、多くのキメラポリペプチドは特定転写調節ドメインと融合していなくても作動する。ポリペプチドをコーディングする核酸は構造性(*constitutive*) または誘導性(*inducible*) プロモーターに作動可能に連結できる。

【0013】

前記方法は、同定された細胞から核酸を分離することをさらに含み得る。分離された核酸の配列は確認でき、核酸にコーディングされたポリペプチドを分離することもできる。
前記方法はまたポリペプチドが特異的に認識する核酸結合部位を同定することをさらに含み得る。結合部位は、たとえば、コンピュータを用いた一連の配列(特に、調節配列(*regulatory sequence*))データベースの検索を通じて確認されるか、インビトロで該ポリペプチドに結合する核酸を選別する方法(例: SELEX)で確認できる。核酸塩基配列のコンピュータデータベースは既に同定された核酸結合部位またはそれと類似する部位を検索することによって分析することができる。

【0014】

前記方法は、同定された細胞内で少なくとも一つの内生遺伝子の発現または発現された少なくとも一つの内生(*endogenous*) ポリペプチドの量 / 活性を、たとえば、mRNAプロファイリング(例: 微細配列(*microarray*) 分析)、2-D ゲル電気泳動、タンパク質リガンド(例: 抗体)配列、および / または質量分光法(*mass spectroscopy*)などを用いて分析することを含み得る。また、一つまたは少数の遺伝子またはタンパク質をプロファイルできる。一実施態様においては、プロファイルを参照プロファイル(*reference profile*)のデータベースと比較する。他の実施態様においては、同定されたキメラポリペプチドの発現によって変化した発現プロファイルを有する遺伝子の調節部位を比較してキメラポリペプチドの発現によって直接または間接的に発生する共同調節(*coordinate regulation*)を決定する候補部位を同定する。

【0015】

また、前記方法は、変化した形質を示すように細胞を培養することを含む。たとえば、変化した特性が代謝産物の生産量の増加であれば、本発明は代謝産物を生産するための細胞培養を含み得る。細胞はライブラリーから分離された細胞、またはキメラポリペプチドをコーディングする核酸を再導入した細胞であってもよい。キメラポリペプチドの発現は、たとえば、精巧な形質変換のために誘導プロモーターを使用するか、他の条件のプロモーター(例: 細胞型特異的プロモーター(*cell type specific promoter*))を用いて誘導できる。キメラポリペプチドをコーディングする核酸を有する細胞は有機体(*organism*)に導入(例: 生体外処理(*ex vivo treatment*))されるか、遺伝子転換体(*transgenic organism*)の製作に使用できる。

【0016】

一実施態様において、少なくともいくつかのライブラリー構成員は互いに異なる調節ドメインを有するタンパク質をコーディングする。たとえば、一部のライブラリー構成員は活性化ドメインを、他の一部要素は抑制ドメインを含み得る。すなわち、DNA結合ドメインの個別的組合せが、ある場合は活性化ドメインとの融合ライブラリーを意味し、他の場合は抑制ドメインとの融合ライブラリーを意味することもある。また、一部のライブラリー構成員は活性化ドメインを含む反面、他の構成員は調節ドメインを含まない。

【0017】

次は表現型のいくつかの例である: 幹細胞群(例: 造血幹細胞、神経幹細胞、上皮幹細胞、または臍帯血幹細胞)およびインビトロで制限された拡張能力を有する他の細胞の拡張; 幹細胞分化抑制; 細胞の増大した分化能力(例: 分化された細胞または幹細胞); 変化したストレス抵抗性(例: 熱、寒さ、極限pH、細胞培養の際に生成するアンモニアのような化学物質、薬剤、塩(浸透圧)、電離放射線などに対する増加または減少した抵抗

10

20

30

40

50

性) ; 癌細胞などにおいて増大すると分かっている、電離放射線または毒性物質(例:抗癌剤)に対する敏感性;ウイルス感染/増殖補助能力(例:C型感染ウイルス増殖);ウイルス、細菌または原生生物などの病原菌への抵抗能力;細胞内RNAi効率性増大;形質導入効率性の増大;細胞や有機体の老化遅延;成長因子が転化されていない無血清(serum-free)の化学的に定義された培地における成長、細胞含有体(inclusion body)の形成遅延または除去;および細胞内タンパク質分泌増加。

【0018】

前記方法は次の適用例を含む:病原体(例:病原細菌)内の必須遺伝子の同定;細菌の発病原因である(宿主または病原体の)遺伝子の同定;薬剤候補の標的同定、信号伝達経路における遺伝子発見、微生物の製作および産業的生命工学、商業的利用のための代謝産物の生産量増大、および成長方式の調節(例:微生物の成長促進または癌細胞の成長抑制)。

10

【0019】

他の態様において、本発明は、(a)タンパク質をコーディングする(細胞内生または外生)遺伝子および(b)人工転写因子を含む培養された細胞であって、前記細胞が前記遺伝子は含むが前記転写因子は含まない同一細胞よりも高い水準に前記タンパク質を生産し、前記転写因子は、前記遺伝子に作動可能に連結された調節領域に結合すること以外の方式でタンパク質の生産に影響を及ぼす、培養された細胞を提供する。この際、「人工」は天然型ではないことを意味し、「遺伝子」は、染色体(chromosomal)またはゲノム(genomic)(すなわち、イントロンを含む)DNA、および内生または(一時的にまたは安定的に遺伝子導入された)外生遺伝子の「コーディング配列」を意味する。

20

【0020】

人工転写因子は2つ、3つまたは4つ以上のジンクフィンガードメインを含むキメラDNA結合ドメインを含み得る。人工転写因子はまた調節ドメイン(活性および抑制ドメインの要約リスト)を含み得る。少なくとも一つまたは2つの個別ジンクフィンガードメインは天然型(哺乳類、植物またはヒト)から由来し得る。一実施態様においては、すべてのジンクフィンガードメインが天然型である。

20

【0021】

人工転写因子は細胞の異種(heterologous)遺伝子によってコーディングできる。異種転写因子をコーディングする異種遺伝子は誘導プロモーターによって調節できる。また、細胞は少なくとも2つ以上的人工転写因子を含み得る。

30

【0022】

たとえば、(i)人工転写因子は、第1の遺伝子を欠く同一細胞または培養細胞が、第1の遺伝子に作動可能に連結された調節領域とは異なる調節領域に作動可能に連結された第2の遺伝子によってコーディングされる第2のタンパク質を、第2の遺伝子を含むが該転写因子を含まない同一細胞よりも高い水準に生産させ、(ii)転写因子は第2の遺伝子に作動可能に連結された調節領域に結合すること以外の方式で第2のタンパク質の生産に影響を及ぼす。他の例において、(i)前記細胞はまた第2のタンパク質をコーディングする第2の遺伝子をさらに含み、(ii)該細胞は第2の遺伝子を含むが転写因子は含まない同一細胞よりも高い水準に第2のタンパク質を生産し、(iii)転写因子は第2の遺伝子に作動可能に連結された調節領域に結合すること以外の方式で第2のタンパク質の生産に影響を及ぼすことがある。第1の遺伝子に作動可能に連結された調節領域は、第2の遺伝子に作動可能に連結された調節領域と異なることもある。

40

【0023】

第1および2の転写因子は次を含む群から選択される。

a)配列番号:21のアミノ酸配列を含むポリペプチド(F E C K D C G K A F I Q K S N L I R H Q R T H T G E K P Y A C P V E S C D R R F S D S S N L T R H I R I H T G E K P Y A C P V E S C D R R F S D S S N L T R H I R I H)、

b)配列番号:22のアミノ酸配列を含むポリペプチド(S C G I C G K S F S D S S A K R R H C I L H T G E K P Y V C D V E G C T W K F A R S D K L N R H K K R H T)

50

G E K P Y V C D V E G C T W K F A R S D E L N R H K K R H T G E K P Y E C H D C
G K S F R Q S T H L T R H R R I H) 、および

c) 配列番号：23のアミノ酸配列を含むポリペプチド(Y E C D H C G K S F S Q S
S H L N V H K R T H T G E K P Y R C E E C G K A F R W P S N L T R H K R I H T G
E K P Y R C E E C G K A F R W P S N L T R H K R I H T G E K P F A C P E C P K R
F M R S D N L T Q H I K T H) 。

【0024】

他の態様において、本発明はタンパク質を生産する方法を提供する。この方法は、本願に記述された（例：前記の）細胞を提供する段階；前記遺伝子を含むが転写因子は含まない同一細胞よりも高い水準（例：2倍、3倍、5倍、10倍または100倍以上）のタンパク質生産を許容する条件下で細胞を培養する段階；細胞によって生産されたタンパク質を検出するか、細胞および／または細胞周囲の培地から発現されたタンパク質を精製する段階を含む。遺伝子は内生または外生遺伝子であってもよく、内生遺伝子の場合、天然型遺伝子または天然型遺伝子に比べて遺伝的に変形された遺伝子（たとえば、調節配列の挿入または修飾によって）であってもよい。また、内生遺伝子の例としては、ホルモン、細胞表面受容体（receptor）、抗体、生長因子、付着（adhesion）タンパク質、神経伝達物質、および酵素をコーディングする遺伝子などを含む。外生遺伝子はCMVまたはアデノウイルスのようなウイルスプロモーターに連結され、細胞は哺乳類由来細胞であってもよい。

【0025】

また、前記方法は、前記細胞をある対象（subject）に導入することをさらに含み得る。前記方法はまた、精製されたタンパク質を薬剤学的に許容可能な担体とともに製剤化（formulating）することを含み得る。

【0026】

前記方法は次のような特徴の一つ以上を含む：前記転写因子が、CMVプロモーターに作動可能に連結された遺伝子によってコーディングされたルシフェラーゼマーカータンパク質の生産を1.1または2倍以上増加させるのに十分な量で細胞内に存在する；前記転写因子が、SV40プロモーターに連結された遺伝子によってコーディングされたアルカリフォスファターゼマーカータンパク質の発現を2倍、5倍、7倍、10倍以上増加させるのに十分な量で細胞内に存在する；前記転写因子が、複数の内生遺伝子の発現を直接的に変化させる；転写因子が細胞分割率（rate of division）を変化させる；前記転写因子がPB08、K_F02またはK_D10によって特異的に認識される天然型DNA結合部位に競争的に結合し、50nM以下のDNA部位に対する解離常数を有する；前記転写因子が、PB08、K_F02またはK_D10によって特異的に認識されるDNA結合部位と部分重複されるDNA部位を特異的に認識する；前記転写因子が、QSNR-DSNR；DSNR-DSNR；DSAR-RDKR；RDKR-RDER；RDER-QTMR；QSHV-WSNR；WSNR-WSNR；WSNR-RDNQ，QSNR1-QSNK；QSNK-CSNR1からなる群から選ばれる2つの連続するジンクフィンガードメインを含み、この際、4文字標識は、各々ジンクフィンガードメインの-1、+2、+3および+6DNA接触残基に存在するアミノ酸を認識する；前記転写因子が配列番号：21、22または23のアミノ酸配列を含む。

【0027】

前記転写因子は配列番号21、22、または23において1～8個のアミノ酸が置換、挿入または欠失されることによって変形されたアミノ酸配列を含み得る。置換は、たとえば、金属配位システイン（Cysteine）および-1位置の間のようなDNA接触残基以外の位置で行われてもよく、保存的（conservative）置換であってもよい。前記転写因子は図17、18および19に示されている核酸によってコーディングされるアミノ酸を含む。

【0028】

他の例において、転写因子は不变部位で一つ～3つの置換を含む次の3つのジンクフィンガードメインを含む：

10

20

30

40

50

- a) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Glu - X - Ser - Asn - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 24);
 b) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Asp - X - Ser - Asn - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 25); および
 c) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Asp - X - Ser - Asn - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 26)、

【0029】

他の例において、転写因子は不变部位における一つ～3つの置換を含む例である次の4つのジンクフィンガードメインのうち少なくとも3つを(この順に)含む:

- a) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Asp - X - Ser - Ala - X_b 10
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 27);
 b) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X - Asp - Lys - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 28);
 c) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X - Asp - Glu - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 29); および
 d) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Glu - X - Thr - His - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 30)。

【0030】

他の例において、転写因子は不变部位における一つ～3つの置換を含む例である次の4つのジンクフィンガードメインの少なくとも3つを(この順に)含む:

- a) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Glu - X - Ser - His - X_b
 - X - Val - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 31);
 b) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Trp - X - Ser - Asn - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 32);
 c) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Trp - X - Ser - Asn - X_b
 - X - Arg - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 33); および
 d) Cys - X₂₋₅ - Cys - X₃ - X_a - X - Arg - X - Asp - Asn - X_b
 - X - Lys - His - X₃₋₅ - His (配列番号: 34)。

【0031】

前記リストにおいて、X_a は任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンであり; X_b は任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。 30

【0032】

他の態様において、本発明は細胞内(例:インビトロまたはインビボ)で標的タンパク質をコーディングする核酸の発現を含む標的タンパク質の生産方法を提供し、この際、細胞は、異種転写因子を含まない細胞とは違い、タンパク質の生産量を増加させる異種の人工転写因子を含む。一実施態様において、異種転写因子は標的タンパク質をコーディングする遺伝子の転写を直接調節しないで外の方法で生産量を増加させる。たとえば、異種転写因子は標的タンパク質をコーディングする核酸を直接調節する調節領域に結合しない。転写因子はタンパク質として細胞内に導入されるか、それをコーディングする核酸の導入および転写によって導入できる。前記方法は本願に記載された他の特徴を含み得る。 40

【0033】

また他の態様において、本発明は転写因子を同定する方法を提供する。前記方法は次の段階を含む:互いにキメラをなす2つのジンクフィンガードメインを有し、各々異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階;複数の細胞の各々にライブラリー構成員を導入する段階;複数の細胞から第1の転写調節配列に作動可能に連結された遺伝子によってコーディングされる第1の標的タンパク質の生産増大を示す細胞を同定する段階;および第1の転写調節配列と異なる第2の転写調節配列に作動可能に連結された遺伝子によってコーディングされた第2の標的タンパク質の生産を増大させるライブラリー構成員の能力を評価する段階。

【0034】

前記方法は次に述べる特徴の一つ以上を含み得る：第1および第2の標的タンパク質は同じである；ライブラリー構成員が導入された細胞は、各々、第2の転写調節配列に作動可能に連結された第2の標的タンパク質をコーディングする遺伝子を含む；前記細胞は真核細胞である；第1および／または第2の転写調節配列はウイルス調節配列を含む；前記方法は、第1および第2の標的タンパク質の生産を増加させるライブラリーの構成員によってコーディングされた転写因子をコーディングする遺伝子を含む宿主細胞を製造する段階をさらに含む；前記方法は宿主細胞から第1および第2の標的タンパク質とは異なる、第3標的タンパク質を生産する段階をさらに含む；そして、評価は同定された細胞の評価を含む。第2または第3標的タンパク質は、たとえば、エリスロポエチン (erythropoietin)、トロンボポエチン (thrombopoietin)、成長因子、インターロイキン (interleukin) またはケモカイン (chemokine) のような、分泌タンパク質であってもよい。他の実施態様においては、標的タンパク質は代謝産物の生産経路において反応を促進する酵素である。また、本願に記述された他の特徴を含み得る。

10

20

30

【0035】

関連態様において、本発明はキメラタンパク質を同定する方法を提供する。前記方法は次を含む：少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む異なる人工キメラタンパク質をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；特定の条件下で、第1の転写調節配列に作動可能に連結された遺伝子によってコーディングされた第1の標的タンパク質を所定水準に生産する試験用細胞を提供する段階；複数の核酸の各構成員を試験細胞の複製物に導入して複数の形質転換細胞を提供する段階；複数の形質転換された細胞またはその子孫細胞から、特定の条件下で第1の標的タンパク質を所定水準とは異なる水準に生産する細胞を同定する段階；および、第1の転写調節配列とは異なる第2の転写調節配列に作動可能に連結された遺伝子によってコーディングされた第2の標的タンパク質の生産量増大を示す同定された細胞内ライブラリー構成員の能力を評価する段階。また、本願に記述された他の特徴を含み得る。

20

30

【0036】

他の態様において、本発明は異種遺伝子のない標準宿主細胞に比べて、標的遺伝子によってコーディングされた標的タンパク質の生産量を30%以上増加させる人工転写因子をコーディングする異種遺伝子を含む遺伝物質を有する宿主細胞を提供する。一実施態様においては、転写因子は標的タンパク質の転写を直接的に調節しない。他の実施態様においては、転写因子は標的タンパク質の転写を直接的に調節する。宿主細胞は、プロモーター（例：ウイルスプロモーター）に作動可能に連結された、lacZ、分泌アルカリホスファターゼ (SEAP)、GFP、ルシフェラーゼなどをコーディングする配列のような塩基配列またはレポーター構造体 (reporter construct) を含み得る。また、細胞は本願に記述された他の特徴を有することもある。

30

【0037】

他の態様において、本発明は、少なくとも2つ、3つまたは4つ以上のジンクフィンガードメインから構成されたポリペプチドをコーディングする異種遺伝子を含む宿主細胞を提供する。この際、該ポリペプチドは50nM以下の平衡解離常数で天然型DNAに結合し、PBO8、K_F02またはK_D10とDNA結合部位に競争的に結合する。細胞は本願に記述された他の特徴を有することもある。

40

【0038】

また他の態様において、本発明は、標的タンパク質をコーディングする第1の異種遺伝子、および第2の異種遺伝子の導入がない場合よりも少なくとも30%以上に標的タンパク質の生産量を増加できる人工転写因子をコーディングする第2の異種遺伝子を含む細胞を提供する。この際、転写因子は標的タンパク質の転写を直接調節しない。細胞は本願に記述された他の特性を有することもある。

【0039】

さらに他の態様において、本発明は次の配列を有する遊離されたポリペプチドを提供する： $X_a - X - Cys - X_2 - \dots - Cys - X_3 - X_a - X_5 - X_b - X - Arg - His$

50

s - X₃ - 5 - His - X₁ - 6 - X_a - X - Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X₅ - X_b - X - Arg - His - X₃ - 5 - His - X₁ - 6 - X_a - X - Cys - X₂ - 5 - Cys - X₃ - X_a - X₅ - X_b - X - Arg - His - X₃ - 5 - His (配列番号：35）。この際、前記ポリペプチドは、ヒト293細胞において、適正濃度で存在する場合、次のような効果を一つ以上示す：a) CMVプロモーターに連結されたルシフェラーゼをコーディングする遺伝子の発現を2倍以上増加させる；b) SV40プロモーターに連結されたSEAPをコーディングする遺伝子の発現を2倍以上増加させる；およびc) 細胞の増殖速度を50%以上増加または抑制させる。

【0040】

他の態様において、本発明は、後生動物由来細胞の分化状態を変化させる方法を提供し、この方法は細胞の分化状態を変化させるのに十分な量の人工転写因子を細胞において発現させる。一実施態様において、分化された状態は神経(Neuronal)表現型(例：神経突起(neurite)拡張、シナプス(synapse)形成、または神経細胞マーカー発現)または骨細胞表現型(例：骨細胞マーカー発現)によって特定できる。一実施態様において、分化された状態を、細胞の分化能力(pluripotency)を増加させるように、たとえば、幹細胞または前駆細胞のように分化が進んでいる状態に変える。一実施態様においては、分化された状態は一つの分化状態から他の分化状態に変わる(例：筋肉細胞状態から骨細胞状態に、神経細胞状態からグリア(glia)細胞状態など)。一実施態様において、人工転写因子は神経突起の拡張を誘導する。たとえば、細胞は幹細胞、神経細胞、神経堤(neural crest)細胞または神経根源細胞(neuronal progenitor cell)である。人工転写因子は前記の転写因子、たとえば、ニューロ1-p65(Neuro1-p65)またはニューロ1(Neuro1)系の分子である(後記参照)。人工転写因子は天然型DNA結合部位に対する結合のためにNeuro1-p65と競争し得る。人工転写因子はNeuro1-p65と同じ部位またはNeuro1-p65が結合したDNA部位と重複する部位に結合できる。

【0041】

他の実施態様において、人工転写因子は、筋細胞(Myoblast)のように元は骨細胞でない細胞において、骨細胞特定的なマーカー(marker)を誘導する。

【0042】

他の態様において、本発明は次の段階を含む、転写因子を同定する方法を提供する：少なくとも2つのジンクフィンガードメインから構成された互いに異なる人工転写因子をコーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；複数の各細胞にライブラリーの構成員を導入する段階；および複数の細胞から分化状態が変化した細胞を選別する段階。前記方法は次のような特性を一つ以上含み得る：細胞は幹細胞である；細胞は神経細胞、神経堤(neural crest)細胞または神経根源細胞である；そして、分化された状態は神経高度成長(outgrowth)または神経突起形成を含む。また、他の特性を含み得る。

【0043】

また他の態様において、本発明は複数の転写因子を同定する方法を提供する。この方法は次の段階を含む：2つ以上のジンクフィンガードメインから構成された互いに異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；細胞の所定形質を変化させるライブラリーの第1の構成員を同定する段階；および、細胞を選別して所定形質がさらに変化した細胞を同定する段階、この段階において、各スクリーニングされた細胞はライブラリーの第1の構成員によってコーディングされる転写因子および同じ核酸ライブラリーまたは人工転写因子の他の核酸ライブラリーの第2の構成員によってコーディングされた転写因子を発現する。前記方法は第1および第2の転写因子の存在下での追加のスクリーニング段階を含み得る。ある場合には、前記方法は第1の構成員の影響による表現型の変化を逆転させる第2のライブラリー構成員を同定することを含む。この方法は本願に記述された他の特徴を含み得る。

【0044】

他の態様において、本発明は次の段階を含む、変形された細胞を製作する方法を提供す

10

20

30

40

50

る：少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインから構成された各々異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；細胞の所定形質を変化させる第 1 および第 2 のライブラリー構成員を同定する段階；第 1 および第 2 のライブラリー構成員によって各々コーディングされた第 1 および第 2 のポリペプチドを発現する細胞を製造する段階。前記方法はまた第 3 構成員のような追加の構成員に拡張できる。前記方法はまた製造された細胞の所定形質を評価することをさらに含み得る。

【 0 0 4 5 】

前記方法はさらに次の特性の一つ以上を含み得る：製造方法は、第 1 のポリペプチドをコーディングする第 1 の遺伝子および第 2 のポリペプチドをコーディングする第 2 の遺伝子を細胞内に導入することを含む；第 1 および第 2 の遺伝子は同じ核酸の構成要素である；ここで、製造方法は、第 1 のポリペプチドをコーディングする第 1 の遺伝子を含む第 1 細胞と第 2 のポリペプチドをコーディングする第 2 の遺伝子を含む第 2 の細胞を融合することを含む；所定の形質は代謝産物の生産である；所定の形質は標的ポリペプチドの生産である；そして、生産は分泌を含む。本願に説明された他の特徴も使用できる。

【 0 0 4 6 】

次の方法はジンクフィンガータンパク質 (ZFP) ライブラリーの有機体的性質をスクリーニングするためにウイルスを用いる方法に関するものである。転写因子を同定する方法は次を含む：各々少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む互いに異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；複数のウイルスまたはウイルス粒子 (viral particles) を形成するために、哺乳動物細胞を感染させるウイルスまたはウイルス粒子にライブラリー構成員を含ませる (packing) 段階；複数の非 - ヒト哺乳動物実験細胞に複数のウイルスまたはウイルス粒子を導入する段階；および複数の細胞から変形された表現型を示す実験細胞を同定する段階。たとえば、各実験細胞 (subject) は検出可能な障害 (disorder) を有する；複数のウイルスまたはウイルス粒子はグループ (pool) に分けられ、各々のグループは複数の実験細胞を構成する個々の実験細胞に導入される；複数のウイルスやウイルス粒子は個々の試料 (samples) を含むが、各試料は核酸ライブラリーの単一核酸内に含まれており、各試料は各実験体に導入される。

【 0 0 4 7 】

一態様において、本発明は、人工転写因子をコーディングする異種核酸を含む変形細胞であって、前記人工転写因子が前記変形 (modified) 細胞と実質的に同じであり、異種核酸および人工転写因子を欠く対照細胞に比べて変形細胞にストレス抵抗性を与える、変形細胞を提供する。たとえば、人工転写因子は少なくとも 2 つのジンクフィンガードメインを含む。一つまたはそれ以上のジンクフィンガードメインは、たとえば、下記表 1 に示す天然型ドメインであってもよい。代表的な人工転写因子は、たとえば、本願に記載された熱抵抗または溶剤 (solvent) 抵抗タンパク質のように、少なくとも一つの連続的なモチーフ (motifs) から構成された転写因子を含む。

【 0 0 4 8 】

変形された細胞は原核または真核細胞であってもよい。ストレス抵抗性は次の形質を一つ以上含む：熱抵抗性、溶剤抵抗性、重金属抵抗性、浸透圧抵抗性、極限 pH 抵抗性、化学物質抵抗性、寒さ抵抗性、ゲノム毒性物質に対する抵抗性および放射性物質抵抗性。ストレス抵抗性は抵抗性のない細胞が死ぬか生長できない条件下で生存または生長させる。たとえば、変形された細胞は人工転写因子を発現でき、同じ培養条件の人工転写因子のない細胞よりもストレスに対して遙かによく耐えられる。本発明はまたこのような人工タンパク質を提供し、このタンパク質は核酸を含む同一細胞に比べて毒性物質に対する細胞の感受性を変化させる。

【 0 0 4 9 】

他の態様において、前記方法は次の細胞生成物の生産方法を含む：人工転写因子をコーディングする異種核酸を含む変形された細胞を提供する段階；人工転写因子が生産される状態に変形された細胞を保持する段階；および培養された細胞によって生産された人工転

10

20

30

40

50

写因子外の産物を回収する段階。前記人工転写因子は、たとえば、ストレス抵抗性、またはタンパク質の生産、代謝産物の生産の変化などの前記の他の特性を与えることができる。たとえば、人工転写因子は少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む。少なくとも一つのジンクフィンガードメインは表1に記載されたような天然型であってもよい。代表的な人工転写因子は前記少なくとも一つの連続的なモチーフ（例：少なくとも2つ、3つまたは4つの連続するモチーフ、または非連続形態を含みながら、少なくとも3つのモチーフと同じ形態）から構成された転写因子を含む。

【0050】

代表的な生成物は代謝産物またはタンパク質（例：内生または外生タンパク質）を含む。

たとえば、変形細胞は人工転写因子以外の異種タンパク質をコーディングする核酸を含み、その生成物は異種タンパク質である。他の例において、変形細胞はまた異種タンパク質をコーディングする第2核酸を含み、その異種タンパク質は代謝産物の生産に関与する。変形細胞は20～40または37以上の温度で保存できる。一実施態様において、人工転写因子を欠く実質的に同一な細胞の成長が抑制される条件下で変形された細胞を保持する。

【0051】

一実施態様において、前記ジンクフィンガードメインは下記表15に記述するジンクフィンガードメインのDNA接触残基に該当するDNA接触残基セットを含む。関連する実施態様において、人工転写因子は少なくとも3つ以上のジンクフィンガードメインの整列(array)を含み、この際、各整列のDNA接触残基は下記表15の一列(row)に示す任意の連続する3つのジンクフィンガードメインのDNA接触残基に各々該当する。また他の実施態様において、人工転写因子は下記表15の一列に示すジンクフィンガードメイン配列を含むタンパク質と競争する。

【0052】

他の態様において、本発明は、標的遺伝子をコーディングする遺伝子および人工キメラタンパク質をコーディングする配列を含む異種核酸を含む細胞を提供する。この際、前記人工キメラタンパク質は、(1)異種核酸を含まない細胞に比べてタンパク質の生産量を増加させ、(2)標的タンパク質をコーディングする遺伝子の転写を直接調節できる転写調節領域に結合しない。前記人工転写因子は、たとえば、DNAに結合する、2つ以上のジンクフィンガードメインを含む。少なくとも一つのジンクフィンガードメインは、たとえば、下記表1の天然型ドメインのような天然型であってもよい。代表的な人工転写因子は前記の少なくとも一つの連続的なモチーフから構成された転写因子を含む。一実施態様において、前記細胞は真核細胞であり、人工キメラタンパク質はゲノム(genomic)DNA結合部位に対してPBO8、K_F02またはK_D10と競争する。

【0053】

一実施態様において、人工キメラタンパク質は細胞周期進行速度を変化（例：増加または減少）させる。本発明はまたこのような人工転写因子を提供する。

【0054】

前記細胞はタンパク質の生産方法に使用でき、この方法は次の段階を含む：細胞を提供する段階；および人工キメラタンパク質が異種核酸を含まない細胞に比べて細胞による標的タンパク質の生産量を増加させる条件で細胞を培養する段階。前記タンパク質は、たとえば、分泌タンパク質、細胞質タンパク質または核内タンパク質であってもよい。

【0055】

他の態様において、本発明は分泌タンパク質をコーディングする内生遺伝子および、異種核酸を含まない細胞に比べて細胞によって生産される分泌タンパク質の量を増加させる人工転写因子をコーディングする塩基配列を含む異種核酸を含む細胞を提供する。一実施態様において、前記細胞は真核細胞であり、前記分泌タンパク質はインシュリンである。一実施態様において、前記人工転写因子は、08_D04_p65が特異的に結合する内生DNA部位に結合する。他の実施態様において、前記人工転写因子は細胞内のDNA部位に特異的に結合し、内生DNA部位に対する結合のために08_D04_p65と競

10

20

30

30

40

50

争する。前記人工転写因子は、たとえば、次のようなアミノ酸配列を含む：

【0056】

C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H (配列番号：45) ; または

【0057】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X V X S S J X R H X (3 - 5) H (配列番号：46)

【0058】

この際、Bはフェニルアラニンまたはチロシンを意味し、Jは疎水性アミノ酸を意味する。

10

【0059】

前記細胞は分泌タンパク質（例：インシュリン）を生産する方法に使用できる。前記細胞は、たとえば、異種核酸を含まない細胞に比べて、人工転写因子が細胞によるインシュリンの生産量を増加させる条件で培養される。同じように、本発明は少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む転写因子を提供し、この際、前記人工転写因子は、人工転写因子のない状態では細胞内生インシュリン遺伝子を発現しない哺乳動物細胞において内生インシュリン遺伝子の発現を誘導する。

【0060】

また他の態様において、本発明は核酸を含まない同一の細胞に比べて毒性物質（例：薬剤（例：抗菌剤（例：ケトコナゾール）））に対する敏感性を変化させる人工転写因子を提供する。前記敏感性は増加または減少し得る。一実施態様において、前記細胞は菌類細胞である。前記人工転写因子は、たとえば、少なくとも2つ（例：少なくとも3つ）のジンクフィンガードメインを含む。少なくとも一つのジンクフィンガードメインは表1の天然型ドメインのような天然型であってもよい。代表的な人工転写因子は本願に記載された少なくとも一つの連続するモチーフを有する転写因子を含む。前記人工転写因子は、たとえば、内生DNA部位に結合し、細胞内のDNA結合部位に対して下記表5のジンクフィンガータンパク質と競争する。

20

【0061】

他の態様において、本発明は菌株細胞の薬剤抵抗性を変化させる方法を提供する。前記方法は、A Q Y 1 , Y J R 1 4 7 W , Y L L 0 5 2 C , Y L L 0 5 3 C または Y P L 0 9 1 W と少なくとも70%以上類似するタンパク質の発現または活性を変化させることを含む。この発現は、たとえば、転写因子を用いて変化させることができる。

30

【0062】

また他の態様において、本発明は毒性物質に対する細胞の敏感性を変化させる人工キメラタンパク質を同定する方法を提供する。その方法は次を含む：少なくとも3つのジンクフィンガードメインの配列を含み、このうち、少なくとも2つの隣接するジンクフィンガードメインは天然型タンパク質では隣接して現れないキメラタンパク質をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；形質転換された細胞を生産するためにライブラリー構成員を試験細胞に導入する段階；形質転換された細胞を毒性物質の存在下で培養する段階；および形質転換された細胞から、試験細胞に比べて毒性物質に対する敏感性が変わった細胞を選別する段階。前記試験細胞は、たとえば、菌株細胞であり、前記毒性物質は抗菌株製剤である。他の例において、前記試験細胞は癌細胞であり、前記毒性物質は抗体細胞分裂（anti-mitotic）製剤である。複数の各核酸によってコーディングされるキメラタンパク質は転写調節ドメインを含み得る。

40

【0063】

前記方法は、選別された細胞においてライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質のジンクフィンガードメイン配列は含むが、同一細胞のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質の転写調節ドメインは含まない第2のキメラタンパク質をコーディングする核酸を製作することをさらに含み得る。前記方法はまた（i）選別された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタ

50

ンパク質のジンクフィンガードメイン配列、および(ii)同定された細胞内でライブラリ－構成員によってコーディングされるキメラタンパク質の転写調節ドメイン以外の転写調節ドメインを含む第2のキメラタンパク質をコーディングする核酸を構成することを含み得る。

【0064】

他の態様において、本発明は3つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子をコーディングする塩基配列を含む核酸を提供し、この際、前記人工転写因子の発現は少なくとも一つの脊椎動物細胞において神経細胞表現型を誘導する。一例において、ジンクフィンガードメイン中の少なくとも一つは次の塩基配列を有する：

【0065】

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃₋₅-His (配列番号：250)

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃₋₅-His (配列番号：251)；または

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Cys-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃₋₅-His (配列番号：252)、

【0066】

この際、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり、X_bは疎水性アミノ酸である。前記人工転写因子は、たとえば、次の配列を含む。Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃₋₅-His-X₁₋₆-Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃₋₅-His-X₁₋₆-Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Cys-X_b-X-Ser-Asn-His-X₃₋₅-His (配列番号：253)。この際、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり、X_bは疎水性アミノ酸である。

【0067】

一つの方法は前記核酸を含む脊椎動物細胞（例：哺乳動物細胞、またはヒト細胞）を提供し、前記人工転写因子が発現され、神経突起が形成される条件下で該細胞を培養することを含む。一例において、前記脊椎動物細胞は人工転写因子の生産前の幹細胞である。

【0068】

他の態様において、本発明は3つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子をコーディングする塩基配列を含む核酸を特徴とする。この際、人工転写因子の発現は少なくとも一つの脊椎動物細胞において骨細胞化（osteogenesis）を誘導する。前記ジンクフィンガードメインの少なくとも一つは、たとえば、次の塩基配列を有する：

【0069】

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Arg-X_b-X-Asp-Lys-His-X₃₋₅-His (配列番号：254)；

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Thr-His-His-X₃₋₅-His (配列番号：255)；

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Val-X_b-X-Ser-Thr-His-X₃₋₅-His (配列番号：256)；または

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Arg-X_b-X-Asp-Lys-His-X₃₋₅-His (配列番号：257)；

【0070】

この際、X_aはフェニルアラニンまたはチロシン、X_bは疎水性アミノ酸であり、あるいは前記人工転写因子は次のアミノ酸塩基配列を含み得る：

【0071】

Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Arg-X_b-X-Asp-Lys-His-X₃₋₅-His-X₁₋₆-Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Gln-X_b-X-Thr-His-His-X₃₋₅-His-X₁₋₆-Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-X_a-X-Val-X_b-X-Ser-Thr-His-X₃₋₅-H

10

20

30

40

50

i s - X₁ - ₆ - C y s - X₂ - ₅ - C y s - X₃ - X_a - X - A r g - X_b - X - A s p - L y s - H i s - X₃ - ₅ - H i s (配列番号：258)：この際、X_a はフェニルアラニンまたはチロシンであり、X_b は疎水性アミノ酸である。

【0072】

一つの方法は前記核酸を含む脊椎動物細胞を提供し、前記人工転写因子が発現され、骨細胞化が誘導される条件下で該脊椎動物細胞を培養することを含む。

【0073】

他の態様において、本発明は幹細胞の分化能力を変化させる方法を提供する。この方法は次を含む：複数のジンクフィンガードメインを含み、幹細胞の分化能力を変化させる人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸と幹細胞を提供する段階；前記核酸を幹細胞に導入する段階；および前記人工転写因子の発現で前記幹細胞の分化能力を変化させる条件で前記幹細胞を培養する段階。前記人工転写因子は、たとえば、幹細胞の分化を誘導する。他の例において、前記人工転写因子は幹細胞の自家複製（self-renewal）能力を増加させる。前記幹細胞は胎児幹細胞、脊椎動物幹細胞、植物幹細胞、造血幹細胞、神経根源細胞または筋肉根源細胞であり得る。

【0074】

また他の態様において、本発明は次を含む方法を提供する：各々少なくとも2つのジンクフィンガードメインおよび転写を活性化または抑制する調節ドメインの配列を含む互いに異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；所定の形質を有する細胞を提供する段階；核酸ライブラリー成分を前記細胞に導入する段階；所定の形質を変化させるライブラリー構成員を同定する段階；および同定された構成員からのジンクフィンガードメイン配列を含むが、同定された構成員の調節ドメインと同じ調節ドメインは含まない、DNA結合ポリペプチドをコーディングする配列を含むコーディング核酸を製造する段階。前記DNA結合ポリペプチドは、たとえば、同定された構成員の調節ドメインを欠いている。また他の例において、前記DNA結合ポリペプチドは同定された構成員の調節ドメインが突然変異された調節ドメインを含む。一実施態様において、前記DNA結合ポリペプチドは同定された構成員の調節ドメインと相反する機能を有する調節ドメインを含む。

【0075】

前記方法はまた細胞に前記核酸を導入し、該細胞の所定形質を評価することをさらに含んでもよい。同定段階は次を含む群から選択される特性を有する細胞を同定することを含んでもよい：与えられた環境条件に対する抵抗性；分化；脱分化（dedifferentiation）；増殖；細胞死滅（apoptosis）；血清-独立性（serum-independence）；病原菌抵抗性；および病原菌敏感性。

【0076】

他の態様において、本発明は、人工転写因子を生産する細胞において過発現された異種タンパク質の水溶性を向上させる人工転写因子をコーディングする、分離された核酸を提供する。前記人工転写因子は、たとえば、複数のジンクフィンガードメインを含む。前記細胞は細菌または真核細胞であってもよい。一例において、前記タンパク質はAKTタンパク質のような哺乳類由来タンパク質である。一実施態様において、前記複数のジンクフィンガードメインは次のドメインを含む：Q S T R - D S A R - R D H T - W S N R またはV S T R - D G N V - Q S N R - Q S N K。本発明はまた、請求項99～104のいずれかに該当する異種核酸を含む変形細胞を提供する。本発明はまた、異種標的タンパク質を生産する方法を提供する。前記方法は異種標的タンパク質をコーディングする配列を含む第2核酸を含む変形細胞を提供し、前記変形細胞を人工転写因子および異種標的タンパク質が生産される条件下で培養することを含む。前記変形細胞は培養細胞または対象体内の生細胞であってもよい。

【0077】

他の態様において、本発明は変化した形質を第1細胞から第2の細胞に転移させる方法を提供する。この方法は次を含む：少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む互

10

20

30

40

50

いに異なる人工キメラタンパク質をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；前記核酸ライブラリー構成員を第1細胞に導入して形質転換された細胞を提供する段階；前記ライブラリー構成員の一つによってある形質が変化した細胞を前記形質転換された細胞から選別する段階；同定された前記変形細胞から核酸ライブラリー構成員を分離する段階；前記ライブラリー構成員を第2細胞に導入する段階：この際、第2細胞は所定の形質とは異なる表現形質によって第1細胞と区別される；および前記核酸ライブラリー構成員を含み、該核酸ライブラリー構成員がコーディングする人工キメラタンパク質を発現する第2細胞を評価する段階。前記第1および第2の細胞は、たとえば、酵母または哺乳動物細胞のような真核細胞である。前記第1および第2の細胞は増殖または分化の特性によって区別される。たとえば、第1細胞は癌細胞である反面、第2の細胞は癌細胞ではないか、またはその反対である。評価された第2細胞は所定の形質の変化によって評価できる。

10

【0078】

他の態様において、本発明は3つのジンクフィンガードメインを含む人工転写因子をコーディングする配列を含む核酸を提供する。前記人工転写因子の発現は、たとえば、少なくとも一つの真核細胞の特性を変化させ、この際、特性はウイルス増殖、ウイルス生産およびウイルス感染を含む群から選択される；前記人工転写因子の発現は、真核細胞と同時培養（co-cultured）されるか、または真核細胞によって調節された培地で培養される幹細胞を調節する真核細胞の能力を変化させる；前記人工転写因子の発現は、分泌タンパク質（例：抗体）を糖鎖化する哺乳類培養細胞（例：CHO細胞）の能力を変化させる；そして、前記人工転写因子の発現は、外生核酸を受け入れる細胞の能力を変化させる。

20

【0079】

また他の態様において、本発明は転写因子を同定する方法を提供する。この方法は次を含む：各々少なくとも2つのジンクフィンガードメインを含む互いに異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；基本形質を有する細胞に前記核酸ライブラリー構成員を導入する段階；所定の形質を変化させるライブラリー構成員を同定する段階；および下記（1）～（4）を各々コーディングする核酸を複数含む第2のライブラリーを製造する段階。（1）一つ～6つのアミノ酸の置換、挿入または欠失によって、前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質と区別される変異体、（2）前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質のジンクフィンガードメインおよび追加のジンクフィンガードメインを含み、前記追加のジンクフィンガードメインが第2のライブラリーの構成員の間で多様に変わるキメラタンパク質、（3）前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質の変異体であって、他のジンクフィンガードメインで置換されたジンクフィンガードメイン位置の下位集合（subset）および前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質の相応する位置にあるジンクフィンガードメインと同一である少なくとも一つの不变ジンクフィンガードメインを有する変異体、および／または（4）前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質の変異体であって、第2のライブラリーの構成員のうち、少なくとも一つのジンクフィンガードメインの位置が前記同定された構成員に相応する人工キメラタンパク質内の特定ドメインがその位置において他のジンクフィンガードメインよりも高い頻度で現れるように変化した変異体。前記方法は前記の他の特性を含み得る。

30

【0080】

他の態様において、本発明は次を含む転写因子を同定する方法を提供する：少なくとも2つのジンクフィンガードメインおよび転写を活性化または抑制する第1の転写調節ドメインを有するDNA結合要素を含む異なる人工転写因子をコーディングする核酸を複数含む核酸ライブラリーを提供する段階；所定の形質を有する細胞に前記核酸ライブラリー構成員を導入する段階；所定の形質を変化させるライブラリー構成員を同定する段階；および前記第1の調節ドメインとは異なる第2の調節ドメインおよび同定された前記構成員のDNA結合要素をコーディングする核酸を製作する段階。関連する一つの方法は調節ドメインのない転写因子を同定し、調節ドメインを添加すること；または調節ドメインを含む

40

50

転写因子から調節ドメインを除去することを含む。一部の転写因子は転写調節ドメインがなくても作用できる。本発明はまた、複数のジンクフィンガードメインおよび第1の調節ドメインから構成された人工転写因子を提供する。前記人工転写因子は細胞内で生産される場合、第1の形質を示すが、第1の調節ドメインが不活性化され、該ドメインと反対の特性を有する第2の調節ドメインが含まれる場合、第2の形質を示す。

【0081】

一例において、前記第1の調節ドメインは転写を活性化し、前記第2の調節ドメインは転写を抑制する。他の例において、前記第1の調節ドメインは転写を抑制し、前記第2の調節ドメインは転写を活性化する。また他の例において、前記第1の調節ドメインは前記第1の範囲まで転写を活性化し、前記第2の調節ドメインは前記第1の範囲の50%未満範囲まで転写を活性化する。前記方法は製作された核酸を試験細胞に導入し、この試験細胞の所定形質を評価することを含んでもよい。一実施態様において、前記同定された構成員は細胞の分割率を増加させ、製作された核酸は細胞分割率を減少させる転写因子をコーディングする。他の実施態様において、前記同定された構成員は化合物に対する抵抗性を惹起し、製作された核酸は化合物に対する感受性を惹起する転写因子をコーディングする。
。

【0082】

他の態様において、本発明は次の段階を含む、転写因子を同定する方法を提供する：前記第1および第2の複数の核酸を含むライブラリーを提供する段階であって、この際、第1の複数の核酸は各々少なくとも2つのジンクフィンガードメインおよび転写を活性化させる調節ドメインを含む互いに異なる人工転写因子をコーディングし、第2の複数の核酸は各々少なくとも2つのジンクフィンガードメインおよび転写を抑制する調節ドメインを含む互いに異なる人工転写因子をコーディングする段階；所定の形質を有する細胞に前記核酸ライブラリー構成員を導入する段階；および所定の形質を変化させるライブラリー構成員を同定する段階。

【0083】

また、本発明は、第1細胞において人工ジンクフィンガーキメラタンパク質の表現型を確認し、第2細胞においてタンパク質を発現し、第2細胞の表現型を確認することを含む方法を提供する。前記方法は、たとえば、第1細胞（例：酵母菌株（strain）または293細胞のようなヒト細胞株（cell line））において所定の表現型を変化させる転写因子ライブラリーの構成員を同定し、その構成員を別の細胞（例：別の酵母菌株またはHeLa細胞）で発現させることを含み得る。前記第1細胞は他の菌株または細胞株よりもスクリーニングにさらに適する。

【0084】

他の態様において、本発明は次の段階を含む、抗真菌製剤に対する真菌菌株の感受性を変化させる方法を提供する：少なくとも3つのジンクフィンガードメインからなる人工キメラタンパク質をコーディングする核酸を真菌細胞に導入する段階；および細胞に導入された核酸が発現される条件下で真菌細胞を培養する段階。前記真菌細胞は、たとえば、カンドジダ（Candida）、ピキア（Pichia）、ハンゼヌラ（Hansenula）、ヒストプラスマ（Histoplasma）またはクリプトコックス（Cryptococcus）などの酵母細胞である。一実施態様において、前記人工キメラタンパク質はK1～K11から選択されたタンパク質のジンクフィンガー整列のアミノ酸配列を含む（実施例3）。

【0085】

前記方法は次の特徴の少なくとも一つを含み得る：前記人工キメラタンパク質は転写調節ドメイン（例：転写活性または抑制ドメイン）からなる；前記細胞内的人工キメラタンパク質の発現は水運搬体（water transporter）の転写水準を変化させる；S.セレビジエー（S. cerevisiae）細胞内の前記人工キメラタンパク質の発現はYLL053遺伝子またはPDR5遺伝子の転写水準を変化させる；前記人工キメラタンパク質はK1～K11から選別されたポリペプチドと特定のDNA結合部位に対して競争する。

【0086】

10

20

30

30

40

50

他の態様において、本発明は抗真菌製剤に対する真菌菌株の感受性を変化させる方法を提供する。前記方法は、YLL053、AQY1、YJR147W、YLL052CまたはYPL091Wと30、50、60、70、80、90または95%以上同一な50個以上のアミノ酸の配列を含むタンパク質の発現または活性を変化させることを含む。前記真菌細胞は、たとえば、カンジダ(*Candida*)、ピキア(*Pichia*)、ハンセヌラ(*Hansenula*)、ヒストプラスマ(*Histoplasma*)またはクリプトコックス(*Cryptococcus*)などのような酵母細胞である。一実施態様において、活性または発現の増加によって感受性が減少される；すなわち、抵抗性が増加する。他の実施態様において、感受性を減少させるため、すなわち、抵抗性を増加させるために活性または発現を増加させる。他の実施態様において、感受性を増加させるために活性または発現を減少させる。活性または発現を変化させることは、人工転写因子の発現、YLL053、AQY1、YJR147W、YLL052CまたはYPL091W遺伝子に相応する少なくとも20個塩基の配列を含む二本鎖RNA(dsRNA)を細胞に接触されるか、または化学物質を細胞に接触させることを含み得る。

10

20

30

【0087】

関連する一つの方法は、前記タンパク質との相互作用に対して試験化合物(例：小さい有機化合物)をスクリーニングして、たとえば、YLL053/AQY1関連タンパク質の抑制を同定するか、AQY1、YJR147W、YLL052C、YLL053CまたはYPL091Wの活性または発現を変化させる試験物質をスクリーニングすることを含む。

20

30

【0088】

他の態様において、本発明は抗真菌製剤に対する真菌菌株の敏感性を変化させる人工キメラタンパク質を同定する方法を提供する。この方法は次を含む：天然型タンパク質においては少なくとも2つのジンクフィンガードメインが互いに隣接しないジンクフィンガードメインの少なくとも3つの配列からなる人工キメラタンパク質をコーディングする複数の核酸からなる核酸ライブラリーを提供する段階；形質転換された真菌細胞を生産するために真菌細胞に前記複数の核酸を各々導入する段階；抗真菌製剤の存在下で前記形質転換された真菌細胞を保持(例：培養(*culturing*))する段階；および前記形質転換された真菌細胞のうち対照細胞に比べて抗真菌製剤に対する敏感性が変化した細胞を選別する段階。

30

【0089】

前記方法は次の特性の一つ以上を含み得る：対照真菌細胞は形質転換されていないか、または対照核酸で形質転換される；複数の核酸各々によってコーディングされるキメラタンパク質は転写調節ドメインを含む；真菌細胞は、たとえば、カンジダ(*Candida*)、ヒストプラスマ(*Histoplasma*)またはクリプトコックス(*Cryptococcus*)のような病原性真菌細胞である。

40

【0090】

また、前記方法は、たとえば、(i)各々選別された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質のジンクフィンガードメイン配列、および(ii)前記選別された細胞内のライブラリー構成員によってコーディングされるキメラタンパク質の転写調節ドメイン以外の転写調節ドメインからなる第2のキメラタンパク質をコーディングする核酸を製作することを含み得る。前記方法は前記の他の特性を含み得る。

40

【0091】

他の態様において、本発明は、抗真菌製剤に対する真菌細胞の抵抗性を相殺させる製剤を同定する方法を提供する。この方法は次を含む：YJR147W、YLL052C、YLL053CまたはYPL091Wを含むポリペプチドに試験物質を接触させる段階；および、前記試験物質とポリペプチドの相互作用を明らかにする段階：この際、相互作用とは、試験物質の抗真菌製剤に対する抵抗性を相殺させる製剤としての有用性を意味する。また、前記方法は、たとえば、前記試験物質および抗真菌製剤を真菌細胞と接触させ、前記細胞の生存または生長を評価することを含み得る。前記細胞は抗真菌製剤(例：ケトコ

50

ナゾール)に対する抵抗性を有する細胞であってもよい。

【0092】

他の態様において、本発明は次の段階を含む、前記人工転写因子によって調節される標的遺伝子を同定する方法を提供する：少なくとも2つのジンクフィンガードメインを各々含む互いに異なる人工転写因子を各々コーディングする複数の核酸を含む核酸ライブラリーを提供する段階；前記ライブラリーの各構成員を試験細胞の複製物に導入して複数の形質転換された細胞を提供する段階；前記形質転換された複数の細胞から、試験細胞に比べて表現型が変形された複数の表現型変換細胞(*phenotypically altered cell*)を同定する段階；および、前記複数細胞のうち、少なくとも2つの表現型変換細胞においてその量が同じように変化した少なくとも一つの転写体またはタンパク質を同定する段階。

10

【0093】

一実施態様において、前記方法は、たとえば、試験細胞内における遺伝子変形(例：突然変異または過発現)または他の方法(例：RNA干渉(*interference*)、アンチセンス(*anti-sense*)または抗体結合)によって少なくとも2つの表現型変換細胞においてその量が同じように変化した転写体またはタンパク質の活性を変化させることを含む。ある場合には、複数の転写体またはタンパク質の活性が変化する。

【0094】

一実施態様において、前記複数の類似に変化した転写体またはタンパク質は各表現型変換細胞内の転写体またはタンパク質の量をプロファイリングし、各表現型変換細胞のプロファイルを提供し、該プロファイルを互いに比較することによって同定する。前記プロファイルは、たとえば、核酸またはタンパク質アレイ(*array*)、SAGE標識(*tag*)、ディファレンシャル・ディスプレー(*differential display*)または相殺ハイブリダイゼーション(*subtractive hybridization*)などを用いて得られる。

20

【0095】

一実施態様において、前記細胞はヒト癌細胞のような癌細胞である。前記一つ以上の同定された転写体は人工転写因子のない細胞には存在しない転写体である。

【0096】

前記同定された転写体のうちの一つによってコーディングされるポリペプチドは標的と相互作用する試験化合物を検索するスクリーニングにおいて標的ポリペプチドとして使用できる。この試験化合物は標的ポリペプチドの活性を増大または抑制するかを決定するために分析できる。一実施態様において、前記試験化合物は10、5、または2kDa以下の分子量を有する小分子である。

30

【0097】

前記のすべての方法にキメラジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸ライブラリーが使用できる。「ライブラリー」とは、類似するが同一ではない生分子(*biomolecules*)の物理的集合を意味する。前記集合は、たとえば、一つの容器(*vessel*)に集まるか、固体支持体上の分離された領域または分離された容器に(群または個別に)物理的に分離できる。ライブラリーの個別構成員は集合的に二重に存在してもよい。ライブラリーは 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^5 、 10^7 または 10^9 以上の互いに異なる構成員または $10^{1.3}$ 、 $10^{1.2}$ 、 $10^{1.0}$ 、 10^9 、 10^7 、 10^5 または 10^3 未満の互いに異なる構成員を含み得る。

40

【0098】

代表的な第1のライブラリーは複数の核酸を含み、各核酸は少なくとも第1、第2および第3のジンクフィンガードメインを含むポリペプチドをコーディングする。前記「第1、第2および第3」はポリペプチドにおいて如何なる順序でも存在できる3つの分離されたドメインを意味する：たとえば、各ドメインは他のドメインのいずれか一つまたは両方のN-末端またはC-末端に位置できる。第1のジンクフィンガードメインは複数の核酸間で多様に変わる。第2のジンクフィンガードメインも複数の核酸間で多様に変わる。少なくとも10の互いに異なるジンクフィンガードメインがライブラリーに現れる。一実施態様において、ライブラリー構成員のうち少なくとも0.5、1、2、5%、10%、ま

50

たは 25% は次の特性の一つまたは両方を示す。 (1) 各々は少なくとも一つの p1G レポータープラスミドの転写をインピボで少なくとも 1.25 倍抑制する; (2) 各々は少なくとも一つの標的部位に 7、5、3、2、1、0.5 または 0.05 nM 以下の解離常数 (dissociation constant) で結合する。第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインは異なる天然型タンパク質から由来するか、天然型タンパク質内における整列とは異なる整列に位置してもよい。たとえば、第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインはポリペプチド内で隣接するか、天然型タンパク質においては少なくとも一つの介在 (intervening) ジンクフィンガードメインによって分離されていてもよい。

【0099】

代表的な第 2 のライブラリーは少なくとも第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインを含むポリペプチドをコーディングする核酸を複数含む。各ポリペプチドの第 1 および第 2 のジンクフィンガードメインは、(1) 互いに異なる天然型タンパク質のジンクフィンガードメインと同じである (そして、一般的に同じ天然型タンパク質内に存在しないか、天然型タンパク質内の相対的位置とは異なる整列で位置する)、(2) 天然型タンパク質のドメインと、4つ、3つ、2つまたは一つ以下のアミノ酸基が異なり、または(3) 天然型タンパク質では隣接しないジンクフィンガードメインである。同じジンクフィンガードメインとは、第 1 の金属配位残基 (主としてシステイン) から最後の金属配位残基 (主としてヒスチジン) までの各アミノ酸が同じであるジンクフィンガードメインを意味する。第 1 のジンクフィンガードメインは複数の核酸間に多様で変化し、第 2 のジンクフィンガードメインも複数の核酸間で多様に変化する。天然型タンパク質は真核細胞由来のジンクフィンガータンパク質であってもよく：たとえば、真菌 (例：酵母)、植物、または動物タンパク質 (例：ヒトまたはネズミタンパク質のような哺乳類タンパク質) である。各ポリペプチドはまた第 3、第 4、第 5 および / または第 6 のジンクフィンガードメインを含み得る。各ジンクフィンガードメインはヒトのような哺乳類由来のジンクフィンガードメインであってもよい。

【0100】

突然変異されたジンクフィンガードメインのような他の形態のライブラリーを使用することもできる。

【0101】

一実施態様において、ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸ライブラリーまたはそのようなタンパク質自体のライブラリーは異なる調節ドメインを有する構成員を含み得る。このライブラリーは、たとえば、活性化ドメインを有する少なくとも 10% の構成員と、抑制ドメインを有する少なくとも 10% の他の構成員とを含み得る。他の例において、少なくとも 10% は活性または抑制ドメインを有し、他の少なくとも 10% は調節ドメインを有しない。また他の例においては、一部は活性化ドメインを含み；他の一部は抑制ドメインを含み；残りは調節ドメインを全く含まない。たとえば、少なくとも 20、25、30、40、50、60% のような他の百分率を使用できる。

* * *

【0102】

1. Neuro1p65 および関連分子

【0103】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0104】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X K H
X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X C X S N J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 36) 、

【0105】

この際、B は任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、J は任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。また、前記整

10

20

30

40

50

列は次のように略称する： Q S N R - Q S N K - C S N R。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0106】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X K H X (3 - 5) H (配列番号： 37)、および
C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X K H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X C X S N J X R H X (3 - 5) H (配列番号： 38)。

【0107】

前記ポリペプチドは、たとえば、ネズミのNeuro2a細胞に効果的な濃度で存在するとき神経突起を誘導し得る。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号： 2 内のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号： 2 内に存在するジンクフィンガードメインにおいて 8、6、4、3 または 2 個以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的 (conservative) 置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号： 2 内のジンクフィンガー整列と少なくとも 80、85、90、95 または 97 % 同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。たとえば、前記ポリペプチドは 10 nM 以下の K_d を有し、標的DNA部位に対する結合のために Neuro1p キメラ ZFP (配列番号： 2) と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性化または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは一つ、2つまたは3つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。

10

20

30

【0108】

また、前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号： 2 のアミノ酸を含む分離されたポリペプチドは配列番号： 1 の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー (enhancer) 配列、インシュレーター (insulator) 配列、非翻訳 (untranslated) 調節配列、ポリA 添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記コーディング核酸は誘導プロモーターまたは細胞 - 型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。

【0109】

さらに、本発明は、前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。前記宿主細胞は、たとえば、少なくとも部分的に前記ポリペプチドによる帰結となる神経突起を拡張する神経細胞であってもよい。

【0110】

2. Osteo1p 65 および関連分子

【0111】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0112】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X V X S T J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X
B X R X D K J X R H X (3 - 5) H (配列番号： 39)、

40

【0113】

この際、B は任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンであり、J は任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。また、前記整列は次のように略称する： RDKR - QTHR - VSTR - RDKR。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0114】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (

50

2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X V X S T J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 4 0) ;
 C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X V X S T J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 4 1) ;
 C X (2 - 5) C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 4 2) ; および
 C X (2 - 5) C X X X B X V X S T J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 4 3) 。
 【 0 1 1 5 】

前記ポリペプチドは、たとえば、C 2 C 1 2 筋芽細胞株に効果的な濃度で存在するとき、骨芽細胞 (osteoblasts) の他の標識またはアルカリホスファターゼを誘導できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号 : 4 内のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号 : 4 内に存在するジンクフィンガードメイン内の 8、6、4、3、または 2 つ未満の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号 : 4 内のジンクフィンガー整列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5 または 9 7 % 同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的 DNA 部位に特異的に結合してもよい。たとえば、前記ポリペプチドは K_d 1 0 nM 未満で結合する部位のような標的 DNA 部位に対する結合のために O s t e o 1 p キメラ Z F P (配列番号 : 4) と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは 1 つ、2 つまたは 3 つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。
 【 0 1 1 6 】

また、前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号 : 4 のアミノ酸を含む分離されたポリペプチドは配列番号 : 3 の配列を含む核酸によってコーディングされてよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリ A 添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記コーディング核酸は誘導プロモーターまたは細胞 - 型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体上に挿入されてもよい。

【 0 1 1 7 】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞 (例: 哺乳類宿主細胞) を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。前記宿主細胞は、たとえば、少なくとも部分的に人工キメラポリペプチドによる帰結となる骨芽細胞の表現型を有する幹細胞であってもよい。

【 0 1 1 8 】

3 . 0 8 _ D 0 4 _ 6 および関連分子

【 0 1 1 9 】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【 0 1 2 0 】

C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X V X S S J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 4 4) ,
 【 0 1 2 1 】

この際、B は任意のアミノ酸または選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、J は任意のアミノ酸または選択的に疎水性アミノ酸である。前記整列はまた次のように略称する：R S H R - R D H T - V S S R。代表的な他の人工ポリペプチドは次を含む：

【 0 1 2 2 】

C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)

10

20

30

40

50

{2 - 5}) C X X X B X R X D H J X T H X ({3 - 5}) H (配列番号: 45); および
 C X (_{2 - 5}) C X X X B X R X D H J X T H X (_{3 - 5}) H X (_{1 - 6}) B X C X (_{2 - 5}) C X X X B X V X S S J X R H X (_{3 - 5}) H (配列番号: 46)

【0123】

前記ポリペプチドは、たとえば、ヒト293細胞に効果的な濃度で存在するとき、インシュリン遺伝子の発現を誘導できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号: 6内のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号: 6内に存在するジンクフィンガードメイン内で8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号: 6内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM未満のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のために08_D04_6キメラZFP(配列番号: 6)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。

【0124】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号: 6のアミノ酸を含む分離されたポリペプチドは配列番号: 5の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリア添加部位などのよう、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記コーディング核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結される。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。

【0125】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞(例: 哺乳類宿主細胞)を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。前記宿主細胞は、たとえば、少なくとも部分的に人工キメラポリペプチドによる帰結となるインシュリン遺伝子を発現するヒト細胞であってもよい。また、本発明は本願に記述された細胞をインビトロ内で培養することを含むインシュリン生産方法、または前記ポリペプチドまたはこれをコーディングする核酸を対象の細胞内に導入することによって対象でインシュリンを生産する方法を提供する。

【0126】

4.P_B08および関連分子

【0127】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する:

【0128】

{2 - 5}) C X X X B X Q X S N J X R H X ({3 - 5}) H X (_{1 - 6}) B X C X (_{2 - 5}) C X X X B X D X S N J X R H X (_{3 - 5}) H X (_{1 - 6}) B X C X (_{2 - 5}) C X X X B X D X S N J X R H X (_{3 - 5}) H (配列番号: 47),

【0129】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンであり、Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。また、前記整列は次のように略称する: QSNR-DSNR-DSNR。他の人工ポリペプチドの例は次を含む:

【0130】

{2 - 5}) C X X X B X Q X S N J X R H X ({3 - 5}) H X (_{1 - 6}) B X C X (_{2 - 5}) C X X X B X D X S N J X R H X (_{3 - 5}) H (配列番号: 48); および
 C X (_{2 - 5}) C X X X B X D X S N J X R H X (_{3 - 5}) H X (_{1 - 6}) B X C X (_{2 - 5}) C X X X B X D X S N J X R H X (_{3 - 5}) H (配列番号: 49)。

【0131】

たとえば、該ポリペプチドは効果的な濃度で存在するとき、293細胞においてS V 4 - S E A Pレポーター構造体によってコーディングされるレポーターポリペプチドのような異種ポリペプチドの発現を増加できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：8のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：8内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：8内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにP_B08キメラZFP（配列番号：8）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。

10

【0132】

また、前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：8のアミノ酸を含む分離されたポリペプチドは配列番号：7の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記コーディング核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。

20

【0133】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。前記宿主細胞は、たとえば、増加された異種ポリペプチドの生産を有する哺乳動物細胞であってもよい。

【0134】

5.K_D10および関連分子

【0135】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

30

【0136】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X W X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X W X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X (配列番号：50) ,

【0137】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。前記整列はまた次のように略称する：Q S H V - W S N R - W S N R - R D N Q。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

40

【0138】

C X (2 - 5) C X X X B X W X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X W X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D N J X Q H X (3 - 5) H (配列番号：51) ; および
C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X W X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X W X S N J X R H X (3 - 5) H (配列番号：52) 。

【0139】

前記ポリペプチドは哺乳動物細胞内に十分な濃度で存在する場合細胞の増殖を少なくとも30、40、50または60%減少できる。細胞増殖は予定された培養（incubation）

50

時間後の細胞数によって評価される。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：10内のジンクフィンガー整列と同じであるか、または配列番号：10内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：10内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK-D10キメラZFP（配列番号：10）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性化または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。

10

【0140】

また、前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：10のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：9の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記コーディング核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。

20

【0141】

さらに、本発明は、前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞はまた核酸を発現する。前記宿主細胞は、たとえば、ポリペプチドを含まない同一細胞に比べて細胞増殖速度が減少した哺乳動物細胞であってもよい。

【0142】

6. K_F02および関連分子

【0143】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0144】

C X (2 - 5) C X X X B X D X S A J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D E J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H (配列番号：53) 、

30

【0145】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。前記整列は次のように略称する：D S A R - R D K R - R D E R - Q T H R。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0146】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D E J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) (配列番号：54) ；および
C X (2 - 5) C X X X B X D X S A J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X D E J X R H X (3 - 5) H (配列番号：55) 。

40

【0147】

前記ポリペプチドは293細胞のような哺乳動物細胞において少なくとも50、100または120%まで細胞の増殖を増加できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：12のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：12内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプ

50

チドは配列番号：12内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のKdで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK_F02キメラZFP（配列番号：12）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。

【0148】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：12のアミノ酸を含む分離されたポリペプチドは配列番号：11の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリア添加部位などのよう、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記核酸は誘導プロモーターまたは細胞特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に導入されてもよい。

【0149】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。前記宿主細胞は、たとえば、ポリペプチドを含まない同一細胞に比べて増加した細胞増殖速度を有する哺乳動物細胞であってよい。

【0150】

7.K12_A11および関連分子

【0151】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0152】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q F N J X R H X (3 - 5) H (配列番号：56) 。

【0153】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。前記整列は次のように略称する：RDHT-QSNV-QTHR-QFNR。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0154】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H (配列番号：57) ；および
C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q F N J X R H X (3 - 5) H (配列番号：58) 40

【0155】

前記ポリペプチドは哺乳動物細胞内でウイルスプロモーターのような強力なプロモーターに作動可能に連結された遺伝子のような異種遺伝子の発現を増加できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：260のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：260内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：260内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチド

10

20

30

40

50

ドは、たとえば、 10 nM 以下の K_d で結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK12_A_11キメラZFP(配列番号：260)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。K12_A_11キメラZFPは抑制ドメインを含んでいるので、異種遺伝子のプロモーターに直接結合することによって異種遺伝子の発現を増加させ得る。

【0156】

また、前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：260のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：259の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような調節配列に作動可能に連結されたことを含み得る。一実施態様において、前記コーディング核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に導入されてもよい。

【0157】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞(例：哺乳類宿主細胞)を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。

【0158】

8.K44-16-E12および関連分子

【0159】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0160】

$C X_{(2-5)} C X X X B X Q X S H J X V H X_{(3-5)} H X_{(1-6)} B X C X_{(2-5)}$
 $C X X X B X Q X S S J X R H X_{(3-5)} H X_{(1-6)} B X C X_{(2-5)}$
 $C X X X B X Q X T H J X R H X_{(3-5)} H$ (配列番号：59)、

【0161】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。前記整列は次のように略称する：QSHV-QSSR-QTHR。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0162】

$C X_{(2-5)} C X X X B X Q X S S J X R H X_{(3-5)} H X_{(1-6)} B X C X_{(2-5)}$
 $C X X X B X Q X T H J X R H X_{(3-5)} H$ (配列番号：60)；および
 $C X_{(2-5)} C X X X B X Q X S H J X V H X_{(3-5)} H X_{(1-6)} B X C X_{(2-5)}$
 $C X X X B X Q X S S J X R H X_{(3-5)} H$ (配列番号：61)。

【0163】

前記ポリペプチドは哺乳動物細胞内でウイルスプロモーターのような強力なプロモーターに作動可能に連結されている遺伝子のような異種遺伝子の発現を増加できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：262のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：262内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：262内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、 10 nM 以下の K_d で結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK44-16-E12キメラZFP(配列番号：262)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。K44-16-E12キメラZFPは抑制ドメインを含んでいるので、異種遺伝子のプロモーターに直接結合することによって異種遺伝子の発現を増加させないで

10

20

30

40

50

あろう。

【0164】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：262のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：261の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。

【0165】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。前記宿主細胞は、たとえば、増加された異種タンパク質生産の表現型を有する293細胞のような哺乳動物細胞であってもよい（例：CMVプロモーターに作動可能に連結された遺伝子によってコーディングされる分泌および細胞内のレポータータンパク質）。

【0166】

9.K13_B08および関連分子

【0167】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0168】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X Q X S S J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X
B X R X D K J X R H X (3 - 5) H (配列番号：62)、

【0169】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。前記整列は次のように略称する：QSNR-QSSR-QTHR-RDKR。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0170】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S S J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X R X D K J X R H X (3 - 5) H (配列番号：63)；および
C X (2 - 5) C X X X B X Q X S N J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X Q X S S J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H (配列番号：64)。

【0171】

前記ポリペプチドは、CMVプロモーターに作動可能に連結された異種遺伝子によってコーディングされるSEAPタンパク質に対して増加したSEAP生産を惹起し得る。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：264のジンクフィンガー整列と同じであるかまたは配列番号：264内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：264内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK13_B08キメラZFP（配列番号：264）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。

10

20

30

40

50

【0172】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：264のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：263の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー(enhancer)配列、インシュレーター(insulator)配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記核酸は誘導プロモーターや細胞特異的プロモーターのような条件的プロモーターに作動可能に連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか染色体内に挿入されてもよい。

【0173】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞(例：哺乳類宿主細胞)を提供する 10。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現できる。

【0174】

10. F104-p65および関連分子

【0175】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0176】

C X (2 - 5) C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X R H X (3 - 5) H (配列番号：65)、

【0177】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。この整列は次のように略称する：R D H T - R S H R - Q S H R。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0178】

C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X R H X (3 - 5) H (配列番号：66)；および
C X (2 - 5) C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H (配列番号：67)。

【0179】

たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：18のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：18内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：18内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにF104-p65キメラZFP(配列番号：18)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。

【0180】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：18のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：17の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。

【0181】

10

20

30

40

50

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現する。

【0182】

11. F121—p65 および関連分子

【0183】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0184】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H (配列番号： 68) , 10

【0185】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；また、Jは任意のアミノ酸または選択的に疎水性アミノ酸である。該整列は次のように略称する：Q S H T - R S H R - R D H T。他の人工ポリペプチドの例は次を含む：

【0186】

C X (2 - 5) C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X R X D H J X T H X (3 - 5) H (配列番号： 69) ; および
C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X T H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X R X S H J X R H X (3 - 5) H (配列番号： 70) 。 20

【0187】

たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：20のジンクフィンガー整列と同じであるか、または配列番号：20内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：20内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のKdで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにF121—p65キメラZFP（配列番号：20）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。前記ポリペプチドは、たとえば、インシュリン-類似成長因子2（insulin-like growth factor-2）の発現を調節するのに使用されてもよい。 30

【0188】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：20のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：19の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのような、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。 40

【0189】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現する。

【0190】

12. K44-11-D01とK44-11-G12 および関連分子

【0191】

また他の態様において、本発明は次の配列を含む人工ポリペプチドを提供する：

【0192】

C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
C X X X B X Q X S N J X I H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) 50

C X X X B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X
 B X C X S N J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 2 6 5),
 C X (2 - 5) C X X X B X Q X S H J X V H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 2 C X X X B X V X S T J X R H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5)
 C X X X B X R X D N J X Q H X (3 - 5) H X (1 - 6) B X C X (2 - 5) C X X X
 B X Q X T H J X R H X (3 - 5) H (配列番号 : 2 6 6).

【 0 1 9 3 】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。この整列は次のように略称する：Q S H V - S Q N I - Q T H R - C S N R および Q S H V - V S T R - R D
 10 N Q - Q T H R 。

【 0 1 9 4 】

たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：1 4 または配列番号：1 6 のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：2 0 内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：1 4 または1 6 内のジンクフィンガー整列と少なくとも8 0、8 5、9 0、9 5 または9 7 % 同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、1 0 n M 以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにF 1 2 1 - p 6 5 キメラZ F P (配列番号：1 4 または1 6)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。ポリペプチドは、たとえば、タンパク質生産を調節するのに使用できる。
 20

【 0 1 9 5 】

前記ポリペプチドをコーディングする核酸を提供する。たとえば、配列番号：1 4 または1 6 のアミノ酸を含むポリペプチドは配列番号：1 3 または1 5 の配列を含む核酸によってコーディングされてもよい。提供された核酸はプロモーター配列、エンハンサー配列、インシュレーター配列、非翻訳調節配列、ポリA添加部位などのよう、作動可能に連結された調節配列を含み得る。一実施態様において、前記核酸は誘導プロモーターまたは細胞-型特異的プロモーターのような条件的プロモーターに連結されている。前記核酸はベクターに含まれるか、染色体内に挿入されてもよい。
 30

【 0 1 9 6 】

さらに、本発明は前記ポリペプチドを含む宿主細胞（例：哺乳類宿主細胞）を提供する。この宿主細胞は前記核酸を含み、発現する。

【 0 1 9 7 】

* * *

本願において、「解離常数 (dissociation constant)」は、一つの9-塩基対標的部位を含む2 8 - 塩基対二本鎖DNAとの結合に関するポリペプチドの平衡解離常数を意味する。解離常数は、室温で2 0 m M Tris pH 7.7、1 2 0 m M NaCl、5 m M MgCl₂、2 0 μ M ZnSO₄ 10%グリセロール、0.1% Nonidet P-40、5 m M DTT および0.10 mg / mL BSA (ウシ血清アルブミン) 中で結合精製タンパク質を用いたゲルシフト分析 (Gel Shift Assay) によって決定する。追加的な細部事項は実施例1 0 およびレバーとパボの方法 (RebarとPabo, Science, 263, 671-673, 1994) に提示されている。
 40

【 0 1 9 8 】

本発明の「スクリーニング」は、所定の特性を有する少なくとも一つの特定の構成員を検索するためにライブラリー構成員を分析する過程を意味する。たとえば、各細胞が神経突起を拡張するかどうかを分析する。スクリーニングの他の形態である「選別」においては、各構成員を直接的に分析しない。かえって、特定の形質を有する構成員だけが残る条
 50

件下で、構成員を対象とする分析を行う。選別は生存（例：薬剤抵抗性）または表面結合（例：基質への接着）などによって媒介されてもよい。このような選別過程は「スクリーニング」の概念に含まれる。

【0199】

「塩基接触部位」、「DNA接触部位、または「核酸接触部位」はZIF268のアルギニン73、アスパラギン酸75、グルタミン酸76およびアルギニン79のアミノ酸部位に構造的に相応するジンクフィンガードメインの4つのアミノ酸位置を意味する。

【0200】

【化1】

10

```

Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser
   1           5          10          15
Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys
   20          25          30
Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His
   35          40          45
Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys
   50          55          60
Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His
   65          70          75          80
Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp
   85

```

20

(配列番号:71)

【0201】

このような位置は各々 - 1、2、3 および 6 の位置を意味する。塩基接触位置 (base contacting position) に相応する疑問 (query) 配列における部位を同定するために、疑問配列は、疑問配列のシステインおよびヒスチジン残基がZif268のフィンガー3のシステインおよびヒスチジン残基と整列するように目標のジンクフィンガードメインに整列される。ヨーロッパバイオインフォマティクス連合 (Thompsonら(1994)Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) のClustal WWWサービスはこのような配列整列のための便利な方法を提供する。

30

【0202】

保存的アミノ酸置換は類似の側鎖 (side chain) を有する残基の相互交換を意味する。たとえば、脂肪族 (Aliphatic) 側鎖を有するアミノ酸基はグリシン、アラニン、ロイシンおよびイソロイシンであり；脂肪族 - ヒドロキシル (aliphatic-hydroxyl) 側鎖を有するアミノ酸基はセリンおよびトレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸基はアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸基はフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸基はリジン、アルギニンおよびヒスチジンであり；酸性側鎖を有するアミノ酸基はアスパラギン酸およびグルタミン酸であり；および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸基はシステインおよびメチオニンである。状況に応じて、同じ群に属するアミノ酸は相互交換可能である。追加的な保存的アミノ酸置換群はバリン - ロイシン - イソロイシン；フェニルアラニン - チロシン；リジン - アルギニン；アラニン - バリン；アスパラギン酸 - グルタミン酸；およびアスパラギン - グルタミンである。

40

【0203】

「異種ポリペプチド」は、天然型配列を有するポリペプチド（例：雑種 (hybrid) ポリペプチド）または天然型ポリペプチドと同一配列を有するが、天然型ではない中間体として存在するポリペプチドを意味する。

50

【0204】

「ハイブリッド」および「キメラ」は、次から由来するアミノ酸配列を含む非-天然型ポリペプチドを意味する：(i)少なくとも2つの天然型配列、または同じ天然型配列の隣接しない領域であって、ハイブリッド内で隣接する該領域；(ii)少なくとも一つの人工配列（例：天然型ではない配列）および少なくとも一つの天然型配列；または(iii)少なくとも2つの人工配列（同一または相違）。人工配列の例は、天然型配列の突然変異体または新規にデザインされた配列を含む。「人工配列」は天然型配列中に存在しない。ここで記述された任意の人工配列（タンパク質、核酸）に関連して、本発明は同一要素を有する配列を意味するが、次のように全体ゲノム配列が明らかにされた有機体内には存在しない：人類 (*Homo sapiens*)、ハツカネズミ類 (*Mus musculus*)、シロイヌナズナ類 (*Arabidopsis thaliana*)、ショウジョウバエ類 (*Drosophila melanogaster*)、大腸菌類 (*Escherichia coli*)、酵母類 (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびイネ類 (*Oryza sativa*)。前記配列を有する分子は前記有機体中の一つの細胞内に異種分子として発現できる。

10

また、本発明は本願に記述された方法によって製造された配列（必然的に「人工」の概念ではない）を含む。その方法は、たとえば、互いに異なるジンクフィンガードメインをコーディングする核酸配列を連結する方法または表現型スクリーニングの方法である。本発明はそのような配列を含む細胞を提供する。

20

【0205】

本発明の「厳格な条件下のハイブリダイゼーション」は、 $6 \times$ 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SCC)、45 の条件下でハイブリッド化した後、 $0.2 \times$ SSC、0.1% SDS、65 で2回洗浄する条件を意味する。

20

【0206】

「結合優位 (binding preference)」は、他の部位に比べて一つの核酸結合部位を選択するポリペプチドの特性を区別することを意味する。たとえば、ポリペプチドが2つの互いに異なる核酸結合部位に結合できる量的制限があるとき、ポリペプチドがインビオまたはインビトロで他の部位に優先してさらに多く結合する部位を意味する。

30

【0207】

「対照細胞」はすべての種類の標準細胞を意味する。一例において、対照細胞はジンクフィンガータンパク質を発現する細胞の母細胞である。すなわち、ジンクフィンガータンパク質を発現する細胞と実質的に同じであるが、ジンクフィンガードメインを生成しない細胞を意味する。

30

【0208】

多くの長所のうち、多くの方法および組成は新規かつ有用なキメラタンパク質、すなわち、キメラ転写因子の同定および利用に関わっている。一部の実施態様は少なくとも一つの次のような長所を含む：i) 細胞内の遺伝子の発現を増大または減少するように調節できる。ある所定の人工キメラ転写因子も適切な転写活性化ドメインとの融合または抑制ドメインとの融合によって転写活性体または阻害体に変換できる。また、転写調節ドメインがなくても、たとえば、TATAボックスおよび開始部位 (initiator element) の近くに結合することによって、キメラ転写因子が強力な阻害体になれる。また、互いに異なるDNA結合特異性を有する活性体および阻害体の両方を含むライブラリーのスクリーニングも可能である。ii) 遺伝子発現を細密に調節できる。DNA-結合親和力によって、キメラ転写因子は、たとえば、中間乃至強い活性化および抑制のような範囲の効果を惹起できる。これは完全な非活性化または特定の標的遺伝子の高い水準の過発現によってのみ得られるものではない様々な表現型として現れる。たとえば、目的とする表現型を推進するためにいくつかの遺伝子の協同作業が要求される場合、幅広い特異性が利点となり得る。他の場合は、狭い特異性が要求される。特異性を柔軟に調節する一つの方法は、ジンクフィンガードメインを挿入または除去することである。3-フィンガーZFPsは理論的に6-フィンガーZFPsよりもさらに多くの遺伝子を調節する。iii) ZFPライブラリー接近法を幅広く適用できる。転写調節機構は高度に維持されており、すべての公知の有

40

50

機体は生きている間DNAおよび転写を使用するので、DNAに結合したキメラタンパク質はある目的とする細胞に対しても使用できる。また、ここに記述された多くの方法は有用なキメラタンパク質を同定するために細胞に対する先駆的情報（例：ゲノム配列）を要求しない。v) ZFP-TFは主転写調節因子のような主調節タンパク質の機能を模倣できる。たとえば、ZFP-TFは主調節タンパク質と同じ部位に結合するか、重なる部位に結合してもよい。vi) 遺伝子発現変化の水準およびこれによるZFP-TFによって生成した表現型の範囲は細胞内のZFP-TFの発現程度を変化させることによって細密に調節できる。

【0209】

本願に記述されたすべての特許、特許出願および参考文献は参照によって完全に援用される。次の特許出願：WO 01/60970（キムラ）；米国出願第60/338,441号；米国出願第60/313,402号；米国出願第60/374,355号；米国出願第60/376,053号；米国出願第60/400,904号；米国出願第60/401,089号；および米国出願第10/223,765号はすべての目的で参照によって完全に明白に援用される。本発明の少なくとも一つの態様による細部事項は添付の図面および下記明細書に示されている。本願に記述されたある特徴も本願に説明された他の両立可能な（compatible）特徴と組合せて使用できる。本発明の他の特徴、目的および利点は明細書および図面、および請求項から明らかになるであろう。

【発明の詳細記述】

【0210】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明の一態様において、細胞または個体の表現形質を変化させるキメラタンパク質を同定するために、互いに異なる人工キメラタンパク質をコーディングする核酸のライブラリーをスクリーニングする。キメラタンパク質は特定の標的遺伝子または経路に対する先知識がなくても同定できる。

【0211】

一例において、ライブラリーの各核酸は複数のジンクフィンガードメインを含む人工ポリペプチドをコーディングする。たとえば、前記のように別のキメラタンパク質をコーディングする核酸ライブラリーを製作できる。ライブラリー構成員は個々の細胞または培養中の細胞に導入できる。コーディングされたポリペプチドの発現のための時間が経った後、変形された表現形質を有する細胞または有機体を同定する。形質が変形された細胞のうち少なくとも一つにおいてライブラリー核酸が回収され、表現型に影響を与えるキメラポリペプチドを同定するようになる。

【0212】

このような方法は、下記では一般的にキメラジンクフィンガードメインの側面で記述したが、他のDNA結合ドメインまたは細胞信号（signal）ドメインを含む他の構造ドメインに容易に適用可能である。

【0213】

ライブラリーの製作：1. 構造ドメインの例

【0214】

核酸ライブラリーは少なくとも一つの構造ドメインのキメラ人工タンパク質をコーディングし、発現できる核酸を含むように製作される。ある態様においては、構造ドメインは、様々な結合特異性を有するタンパク質をコーディングするライブラリーのように、様々な特異性を有する核酸結合ドメインである。

【0215】

様々な構造ドメインは優れた親和度および優れた特異性を有する核酸に結合すると知られている。二本鎖DNAを認識する構造的モチーフに対する概説として文献 [PaboとSauer (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:1053-95; PatikoglouとBurley (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:289-325; Nelson (1995) Curr Opin Genet Dev. 5:180-189] がある。核酸結合ドメインのいくつかの例は次を含む：

10

20

30

40

50

【0216】

ジンクフィンガー

ジンクフィンガーは約30個のアミノ酸残基からなる小さいポリペプチドドメインであって、そのうち、システインまたはヒスチジンからなる4個のアミノ酸残基が適切に配置されて亜鉛イオンと配位結合ができる（総説としては、たとえば、文献 [Klug and Rhodes (1987) Trends Biochem. Sci. 12: 464-469 (1987); Evans and Hollenberg, (1988) Cell 52: 1-3; Payre and Vincent (1988) FEBS Lett. 234: 245-250; Miller et al., (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Berg (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:99-102; 10 および Rosenfeld and Margalit, (1993) J. Biomol. Struct. Dyn. 11: 557-570] を参照）。したがって、ジンクフィンガードメインは亜鉛イオンと配位結合する残基の種類によって、たとえば、Cys₂-His₂類、Cys₂-Cys₂類、Cys₂-Cys-His類などに分類できる。Cys₂-His₂ジンクフィンガーにおいて亜鉛と配位結合する残基は典型的に次のように配置されている：

【0217】

X_a-X-C-X₂₋₅-C-X₃-X_a-X₅- - X₂-H-X₃₋₅-H (配列番号：72)

【0218】

ここで、「（プサイ）」は疎水性残基であり (Wolfe et al., (1999) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 3:183-212)、「X」は任意のアミノ酸を示し、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり、下付きはアミノ酸の個数を示し、ハイフンでつないだ2つの下付きは介入アミノ酸の典型的な範囲を示す。普通、介入するアミノ酸はフォールディングされて - ヘリックスに対して充填される逆平行 (anti-parallel) - シートを形成するが、 - シートが短く、非理想的、または存在しない場合もある。フォールディングによって、亜鉛と配位結合する側鎖が亜鉛イオンと配位結合するのに適合な四面体構造を有するように配置される。塩基接触残基はフィンガーのN-末端に位置し、先行するループ領域内にある。

【0219】

便宜のために、ジンクフィンガードメインの主なDNA接触残基を次の例に基づいて - 1、2、3および6として番号付けた：

【0220】

-1 1 2 3 4 5 6

X_a-X-C-X₂₋₅-C-X₃-X_a-X-C-X-S-N-X_b-X-R-H-X₃₋₅-H (配列番号：73)、

【0221】

ここで、X_aはフェニルアラニンまたはチロシンであり、X_bは疎水性残基である。

【0222】

前記例に示したように、DNA接触残基はシステイン(C)、セリン(S)、アスパラギン(N)およびアルギニン(R)である。前記モチーフはCSNRに略記できる。本明細書に使用されたように、そのような略記は前記モチーフに相応するドメインを含む一部類の配列をいう。前記部類はまた、特定のポリペプチド配列、通常、前記モチーフに相応する表1または2に記載の配列を含む配列を有する種(species)を含む。2つの配列が同じモチーフを有する場合、各配列を区別するために数字を使用できる。

【0223】

ジンクフィンガータンパク質は通常、直列に配置された3つ以上のジンクフィンガードメインから構成できる。たとえば、モチーフが連続的に記載されたジンクフィンガードメインには、他のフォールディングされたドメインが散在してはいないが、ドメインの間に本明細書に記述された柔軟なリンクアーカーのようなリンクアーカーを含み得る。

【0224】

ジンクフィンガードメイン（「ZFD」）は最もありふれた真核生物DNA-結合モチーフ中の一つであって、酵母から高等植物およびヒトに至る様々な種から発見される。ヒトゲノムにも数千個以上、たぶん4,500個以上のジンクフィンガードメインが存在す

10

20

30

40

50

ると推測される。ジンクフィンガードメインはジンクフィンガータンパク質から同定されるか、それから単離できる。ジンクフィンガータンパク質の非制限的な例としては、C F 2 - I I ; クルッペル (Kruppel) ; W T 1 ; バソヌクリン (basonuclin) ; B C L - 6 / L A Z - 3 、赤血球クルッペル - 類似転写因子 ; 転写因子 S p 1 、 S p 2 、 S p 3 および S p 4 ; 転写抑制剤 Y Y 1 ; E G R 1 / K r o x 2 4 ; E G R 2 / K r o x 2 0 ; E G R 3 / P i l o t ; E G R 4 / A T 1 3 3 ; E v i - 1 ; G L I 1 ; G L I 2 ; G L I 3 ; H I V - E P 1 / Z N F 4 0 ; H I V - E P 2 ; K R 1 ; Z f X ; Z f Y ; および Z N F 7 などがある。

【 0 2 2 5 】

後述する電算化方法を用いて配列が明らかになったゲノムまたは核酸データベース中にコードィングされたすべてのジンクフィンガードメインを同定できる。そのようなジンクフィンガードメインはどれでも使用できる。また、電算化方法などの人為的ジンクフィンガードメインがデザインされている（例：Dahiyat and Mayo, (1997) Science 278: 82-7）。

10

【 0 2 2 6 】

少なくともいくつかのジンクフィンガードメインは R N A またはタンパク質のような非-D N A リガンドに結合する。したがって、ジンクフィンガードメインのキメラまたはジンクフィンガードメインと異なるタイプのドメインのキメラがただ D N A だけでなく、様々な標的化合物を認識して使用できる。W O 0 1 / 6 0 9 7 0 、米国特許出願第 6 0 / 3 7 4 , 3 5 5 号（出願日：2 0 0 2 年 4 月 2 2 日）および米国特許出願第 1 0 / 2 2 3 , 7 6 5 号（出願日：2 0 0 2 年 8 月 1 9 日）は人工ジンクフィンガータンパク質を製作するために使用できる例示的なジンクフィンガードメインを記述している。また、下記表 1 参照。

20

【 0 2 2 7 】

ホメオドメイン

ホメオドメインは、D N A の副溝 (minor groove) と接触する N - 末端アーム、および、次いで主溝 (major groove) と接触する 3 つの - ヘリックスから構成された簡単な真核生物ドメインである（たとえば、Laughon, (1991) Biochemistry 30: 11357-67 参考）。3 番目の - ヘリックスは主溝に位置し、最も重要な D N A - 接触側鎖を含有する。ホメオドメインは三番目の - ヘリックスに至る転換点 (turn) に存在する高度に保存されたモチーフを有する。このモチーフは、ドメインの疎水性コア中に充填される不变のトリプトファンを含む。このモチーフは、プロサイト (Prosite) データベース (Falquet et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:235-238 参照) に P D O C 0 0 0 2 7 ([L / I / V / M / F / Y / G] - [A / S / L / V / R] - X (2) - [L / I / V / M / S / T / A / C / N] - X - [L / I / V / M] - X (4) - [L / I / V] - [R / K / N / Q / E / S / T / A / I / Y] - [L / I / V / F / S / T / N / K / H] - W - [F / Y / V / C] - X - [N / D / Q / T / A / H] - X (5) - [R / K / N / A / I / M / W] ; 配列番号：77) として公知である。ホメオドメインは細胞同一性を決定し、有機体の発生過程中に位置的な情報を提供する転写因子から普通発見される。そのような古典的なホメオドメインは、ゲノム上にクラスター (cluster) の形で存在するが、クラスターのホメオドメインの順序はボディー軸 (body axis) に沿ってそれらの発現パターンにほぼ相応する。ホメオドメインは、たとえば、H o x - 1 のようなホメオドメインとの整列 (alignment) によって、またはホメオドメインプロファイルまたはホメオドメインヒドン・マルコフ・モデル (hidden Markov Model; H M M ; 下記参照) 、たとえば、P f a m データベースの P F 0 0 0 4 6 または S M A R T データベースの「H O X」との整列によって、または前記プロサイトモチーフ P D O C 0 0 0 2 7 によって同定できる。

30

40

【 0 2 2 8 】

ヘリックス・ターン・ヘリックスタンパク質

この D N A 結合モチーフは多くの原核生物転写因子から普通発見される。たとえば、L a c I 族、A r a C 族など多くの亜族がある。名称における 2 つのヘリックスは、二番目

50

の - ヘリックスをDNAの主溝内に配置させ、その主溝に対して充填される一番目の - ヘリックスおよび前記二番目の - ヘリックスをいう。これらのドメインはHMM、たとえば、SMARTデータベースから得られるHTH_ARAC, HTH_ARSR, HTH_ASNC, HTH_CRP, HTH_DEOR, HTH_DTXR, HTH_GNTR, HTH_ICLR, HTH_LACI, HTH_LUXR, HTH_MARR, HTH_MERRおよびHTH_XREプロファイルとの整列によって同定できる。

【0229】

ライブラリーの製作：2. 構造ドメインの同定

【0230】

様々な方法を用いて構造ドメインを同定できる。同定されたドメインをコーディングする核酸は核酸ライブラリーの製作に用いられる。また、このようなドメインをコーディングする核酸はライブラリーによってコーディングされる追加のドメインを提供するために多様化（例：突然変異）できる。

【0231】

電算化方法（Computational Method）

【0232】

本明細書に記述された方法によって単離されたDNA結合ドメインのアミノ酸配列を公知の配列のデータベース、たとえば、タンパク質配列を注釈したデータベースまたは核酸結合ドメインに対する記入を含む注釈を付けたデータベースと比較できる。また他の実施態様において、特徴づけられていない配列、たとえば、注釈づけられていないゲノム配列、ESTまたは全長cDNA配列のデータベース；特徴づけられた配列のデータベース、たとえば、SwissProtまたはPDB；およびドメインのデータベース、たとえば、Pfam、ProDom (Corpet et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:267-269)、およびSMART (Simple Modular Architecture Research Tool, Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242-244)が核酸結合ドメイン配列の供給源(source)を提供できる。疑問アミノ酸配列と比較するために、核酸配列データベースをすべての6個のリーディング・フレーム(reading frame)で翻訳できる。候補核酸結合ドメインをコーディングするものと標識された核酸配列を適合な核酸供給源、たとえば、ゲノムDNAまたは細胞RNAから増幅できる。そのような核酸配列を発現ベクターにクローニングできる。コンピュータに基づくドメイン同定の前記過程をオリゴヌクレオチド合成器およびロボットシステムと提携して高い作業処理能力でドメインをコーディングする核酸を生産できる。候補ドメインをコーディングするクローニングされた核酸を宿主発現ベクターに貯蔵し、制限酵素-媒介サブクローニングまたは部位-特異的組換え酵素-媒介サブクローニング(米国特許第5,888,732号参照)によってZif268フィンガー1および2とともに発現ベクター、たとえば、翻訳融合ベクターに容易に導入できる。このような高い作業処理能力を有する方式で異なる候補核酸結合ドメインをコーディングする核酸を含有する複数のマイクロタイタープレートを生成できる。

【0233】

出発配列またはプロファイルからドメインを同定する詳細な方法は当業界に周知されている。たとえば、プロサイト([Hofmann et al., (1999) Nucleic Acids Res. 27:215-219]参照)、FASTA、BLAST([Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]参照)などを参照。簡単なストリング(string)検索を行って疑問配列または疑問プロファイルに対する同一性を有するアミノ酸配列を見つけることができ、たとえば、Perlを用いてテキストファイルをスキャンできる。このように同定された配列は初期入力配列に対して約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の同一性を示す。

【0234】

疑問ドメインと類似するドメインを共用のデータベース、たとえば、文献[Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]のXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて同定できる。たとえば、スコア=50、単語長さ=3のXBLASTパラメ

10

20

30

40

50

ーターを用いてBLASTタンパク質の検索を行うことができる。文献 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402] に記述されたように、疑問配列または検索された配列に間隔 (gaps) を導入できる。XBESTおよびGapped BLASTプログラムに対するデフォルト変数はアメリカのメリーランド州ベセスダに所在する国立保健院内の国立生物工学情報センター (NCBI) から求められる。

【0235】

プロサイトプロファイルPS00028およびPS50157を用いてジンクフィンガードメインを同定できる。SWISSPROTが発表した80,000個のタンパク質配列のうちには上記の2つのプロファイルは各々3189および2316個のジンクフィンガードメインと検索される。様々な異なる技法を用いて関連タンパク質の多重配列整列からプロファイルを構築できる。グリブスコフ (Gribskov) ら [Gribskov et al., (1990) Meth. Enzymol. 183:146-159] は、シンボル比較表を用いて残基頻度分布が提供された多重配列整列を各位置に対する加重値に転換した。たとえば、PROSITEデータベースおよび文献 [Luethy et al., (1994) Protein Sci. 3:139-1465] を参照。

【0236】

目標のDNA結合ドメインのヒドン・マルコフ・モデル (Hidden Markov Models; HMM's) は、たとえば、Pfamデータベース、リリース2.1のようなそのようなモデルのデータベースから生成するか、得られる。追加的なドメインを発見するために、たとえば、前記デフォルト変数を用いてHMMでデータベースを検索できる (例: Bateman et al. (2002) Nucleic Acids Research 30:276-280参照)。または、使用者は前記パラメーターを最適化できる。境界スコア (threshold score) を選択して配列データベースを濾過することによって、境界以上のスコアを有する配列が候補ドメインとして表示されるようになる。Pfamデータベースの説明は文献 [Sonhammer et al., (1997) Protein 28(3):405-420] にあり、HMMに関する詳細な説明は、たとえば、文献 [Gribskov et al., (1990) Meth. Enzymol. 183:146-159; Gribskov et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4355-4358; Krogh et al., (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; およびStultz et al., (1993) Protein Sci. 2:305-314] にある。

【0237】

HMMのSMARTデータベース (Simple Modular Architecture Research Tool, Schultz et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857; およびSchultz et al., (2000) Nucl. Acids Res 28:231) は、HMMer2検索プログラム (Durbin et al., (1998) Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press.) のヒドン・マルコフ・モデルでプロファイルすることによって、同定されたジンクフィンガードメインのカタログ (ZnF_C2H2; ZnF_C2C2; ZnF_C2HC; ZnF_C3H1; ZnF_C4; ZnF_CHCC; ZnF_GATA; およびZnF_NFX) を提供する。

【0238】

ハイブリダイゼーションに基づく方法

【0239】

様々な形態のDNA結合ドメインをコーディングする核酸集合体を分析してアミノ末端およびカルボキシ末端の保存された境界部配列をコーディングする配列プロファイルが得られる。そのような保存された境界部配列をコーディングする配列にハイブリダイゼーションできる縮退オリゴヌクレオチドをデザインできる。また、そのような縮退オリゴヌクレオチドの有効性はそれらの組成と公知のゲノム配列上の可能なアニーリング部位の頻度を比較することによって評価できる。複数の反復されたデザインによって縮退オリゴヌクレオチドを最適化できる。たとえば、公知のCys₂-His₂ジンクフィンガーを比較することによって天然型配列中の隣接フィンガーの間のリンカー領域の共通配列を明らかにしている (文献 [Agata et al., (1998) Gene 213:55-64] 参照)。そのような縮退オリゴヌクレオチドは複数のDNA結合ドメインを増幅させるのに用いられる。増幅されたドメインを試験ジンクフィンガードメインとしてハイブリッド核酸中に挿入し、後続的に本

10

20

30

40

50

明細書に記述された方法に従って標的部位に対する結合を分析する。

【0240】

ライブラリーの製作：3.構造ドメインをコーディングする核酸

【0241】

ライブラリーを構成するのに用いられる核酸は様々な方法によって得られる。ライブラリー核酸成分の一部の構成員は天然型ドメインをコーディングできる。さらに、一部の核酸構成員は他の無作為的方法または突然変異によって得られた変異体である。一般的に、単一ドメインのみをコーディングする構成核酸は、他のドメインとの融合体をコーディングする核酸を創出するために互いに組合せることができる。

【0242】

天然型ドメインの分離

【0243】

ドメインのライブラリーをヒトのような真核生物のゲノムDNAまたはcDNAから構築できる。このため、複数の方法を用いることができる。たとえば、前述のように、利用可能なアミノ酸配列の電算検索でドメインを同定できる。核ドメインをコーディングする核酸を単離し、たとえば、プロモーター、活性化ドメインおよび選別マーカーを含有するベクターのような、細胞内発現に適したベクター内に挿入できる。また他の実施態様において、保存されたモチーフにハイブリダイゼーションする縮退オリゴヌクレオチドを用いて、たとえば、PCRによって該モチーフを含有する複数の関連ドメインを増幅させる。たとえば、クルッペル-類似Cys₂His₂ジンクフィンガーを文献(Agataら(1998)Gene 213:55-64)の方法によって増幅できる。この方法はまた、たとえば、Thr-Gly-(Glu/Gln)-(Lys/Arg)-Pro-(Tyr/Phen)(配列番号:74)のパターンを有する配列である、天然型ジンクフィンガードメインリーンカーペプチド配列を保有する。しかも、非選別的ゲノムライブラリーまたはcDNA配列のライブラリーをスクリーニングすることとは異なり、目標のドメインに制限された集合をスクリーニングすることは、ライブラリー複雑性が非常に減少し、大規模のライブラリーを完全にスクリーニングすることの内生的な難しさによって目的とする配列を落とす可能性を減少させる。

【0244】

ヒトゲノムは複数のジンクフィンガードメインを含有し、このうち、多数は特性化および同定されていない。ジンクフィンガードメインを有するタンパク質をコーディングする数千個の遺伝子があることと推定される(Pellegrino and Berg, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:671-675)。これらのヒトジンクフィンガードメインは、新規なDNA-結合タンパク質を構築できる様々なドメインの広範囲な集合である。ヒトジンクフィンガードメインの多くの例は2002年8月19日に出願されたWO01/60970、米国出願第60/374,355号(出願日:2002年4月22日)および米国出願第10/223,765号によく示されている。下記表1を参考できる。

【0245】

10

20

30

【表1】

ZFD	アミノ酸配列	配列番号	標的部位
CSNR1	YKCKQCGKAFGCPNSNLRRHGRTH	75	GAA>GAC>GAG
CSNR2	YQCNICGKCFSCNSNLHRHQRT	76	GAA>GAC>GAG
DSAR	YSCGICGKSFSDSSAKRRHCLH	77	GTC
DSCR	YTCSDCGKAFRDKSCLNRHRRTH	78	GCC
HSNK	YKCKECGKAFNHSSNFNKHRIH	79	GAC
HSSR	FKCPVCGKAFRHSSLVRHQRT	80	GTT
ISNR	YRCKYCDRSFSISSNLQRHVRNIH	81	GAA>GAT>GAC
ISNV	YECDHCGKAFSIGNSNLNVHRRIH	82	AAT
KSNR	YGCHLCGKAFSKSSNLRRHEMIH	83	GAG
QAHR	YKCKECGQAFRQRAHLIRHKLH	84	GGA
QFNR	YKCHQCGKAFIQSFNLRRHERTH	85	GAG
QGNR	FQCNQCGASFTQKGNNLRHKLH	86	GAA
QSHR1	YACHLCGKAFTQSSHLLRRHEKTH	87	GGA>GAA>AGA
QSHR2	YKCGQCGKFYSQVSHLTRHQKIH	88	GGA
QSHR3	YACHLCGKAFTQCSHLRRHEKTH	89	GGA>GAA
QSHR4	YACHLCAKAFIQCShLRRHEKTH	90	GGA>GAA
QSHR5	YVCRECGRGFRQHSHLVRHKRTH	91	GGA>AGA>GAA>CGA
QSHT	YKCEECGKAFRQSSHLLTHKJIIH	92	AGA,CGA>TGA>GGA
QSHV	YECDHCGKSFQSNSHLNVHKRTH	93	CGA>AGA>TGA
QSNI	YMCSECGRGFSQKSNLIIHQRT	94	AAA,CAA
QSNK	YKCEECGKAFTQSSNLTKHKKIH	95	GAA>TAA>AAA
QSNR1	FECKDCGKAFIQKSNLIRHQRT	96	GAA
QSNR2	YVCRECRGFSQKSNLIRHQRT	97	GAA
QSNR3	YECEKCGKAFNQSSNLTRHKKSH	98	GAA
QSNV1	YECNTCRKTFSQKSNLIVHQRT	99	AAA>CAA
QSNV2	YVCSKCGKAFTQSSNLTVHQKIH	100	AAA>CAA
QSNV3	YKCDECCKNFTQSSNLTVHKRIH	101	AAA
QSNV4	YECDVCGKTFQKSNLGVHQRT	102	AAA
QSNT	YECVQCGKGFTQSSNLITHQRVH	103	AAA
QSSR1	YKCPDCGKSFQSSSLIRHQRT	104	GTA>GCA
QSSR2	YECQDCGRAFNQNSSLGRHKRTH	105	GTA
QSSR3	YECNECGKFFSQSSSLIRHRRSH	106	GTA>GCA
QSTR	YKCEECGKAFNQSSTLTRHKIVH	107	GTA>GCA
QSTV	YECNECGKAFQNSTLVRHQRIH	108	ACA
QTHQ	YECHDCGKSFQSTHQLTQHRRIH	109	AGA>CGA,TGA
QTHR1	YECHDCGKSFQSTHQLTRHRRIH	110	GGA>AGA,GAA
QTHR2	HKCLECGKCFSQNTLHTRHQRT	111	GGA
RDER1	YVCDVEGCTWKFARSDELNRHKKRH	112	GCG>GTG,GAC
RDER2	YHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKH	113	GCG>GTG

10

20

30

40

RDER3	YRCSWEGCEWRFARSDELTRHFRKH	114	GCG>GTG
RDER4	FSCSWKGCCRFFARSDELSRHRTH	115	GCG>GTG
RDER5	FACSWQDCNKKFARSDELARHYRTH	116	GCG
RDER6	YHCNWWDGCGWKFARSDELTRHYRKH	117	GCG>GTG
RDHR1	FLCQYCAQRFGRKDHDLTRHMKKSH	118	GAG,GGG
RDHT	FQCKTCQRKFSRSRSDLKLKTHTRH	119	AGG,CGG,GGG,TGG
RDKI	FACEVCGVRFTRNDKLKIHMRKH	120	GGG
RDKR	YVCDVEGCTWKFARSDKLNRHKKRH	121	GGG>AGG
RSHR	YKCMECGKAFNRRSHLTRHQRIH	122	GGG
RSNR	YICRKCGRGFSRKSNLIRHQRTTH	123	GAG>GTG
RTNR	YLCSECDKCFSRSTNLIRHRRTH	124	GAG
SSNR	YECKEKGKAESSGSNFTRHQRIH	125	GAG>GAC
VSNV	YECDHCGKAFSVSSNLNVHRRIH	126	AAT>CAT>TAT
VSSR	YTCKQCGKAFSVSSSLRRHETTH	127	GTT>GTG>GTA
VSTR	YECNYCGKTFPSVSSTLIRHQRIH	128	GCT>GCG
WSNR	YRCEECGKAFRWPSNLTRHKRIH	129	GGT>GGA

10

20

【0246】

各ジンクフィンガードメインがユニークな3-~4-bp配列を認識する場合、すべての可能な3-~4-bp配列に結合するのに必要なドメインの総数はただ64~256(4^3 ~ 4^4)個である。ヒトゲノムの天然型目録がすべての可能な認識部位を特異的に認識できる十分な数のユニークなジンクフィンガードメインを含有できる。これらのジンクフィンガードメインは人工キメラDNA-結合タンパク質を構築するための貴重な供給源である。核酸ライブラリーは天然型ジンクフィンガータンパク質、前記ドメインの人工突然変異およびこれらの組合せを含むタンパク質をコーディングする核酸を含み得る。

【0247】

突然変異ドメイン

30

【0248】

一実施態様において、ライブラリーは天然型配列の人工変位である少なくとも一つの構造ドメインをコーディングする核酸を含む。一実施態様において、このような変異ドメインは縮退形態(degenerated patterned)のライブラリーから構成される。核酸結合ドメインの場合、核酸結合面に近いか、隣接する位置は突然変異の標的部位となる。たとえば、突然変異された試験用ジンクフィンガードメインは縮退形態のライブラリーを用いることによって任意の突然変異部位で、可能なアミノ酸のサブセット(subset)を作ることができる。縮退コドンセットは各位置にプロファイルをコーディングするのに利用できる。たとえば、疎水性残基のみ、脂肪族残基のみまたは親水性残基のみをコーディングするコドンセットを利用できる。フォールディングされたポリペプチドをコーディングする全長クローンのために前記ライブラリーを選別できる。文献[Cho et al., (2000) J. Mol. Biol. 297(2): 309-19]は、縮退オリゴヌクレオチドを用いてそのような縮退ライブラリーを製造する方法を提供し、また、全長ポリペプチドをコーディングするライブラリー核酸を選別する方法を提供する。このような核酸は制限酵素切断部位を用いて発現プラスミド内に容易に挿入できる。

40

【0249】

適合なコドンおよび所定位置における各ヌクレオチドの相対比率の選択は、遺伝子コードを示す表の簡単な調査、または電算化アルゴリズムによって決定できる。たとえば、前記チョ(Cho)らの文献では、タンパク質配列の目的とするプロファイルを入力し、そのプロファイルの配列をコーディングする好みのオリゴヌクレオチドデザインを出力する

50

電算プログラムが記載されている。

いくつかの有用なジンクフィンガードメインに対してZhangら, (2000) J. Biol. Chem. 275:33850-33860; RebarとPabo (1994) Science 263:671-673; Segal (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2758; Gogusら, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:2159-2164; Drierら, (2001) J. Biol. Chem. 276: 29466-29478; Liuら, (2001) J. Biol. Chem. 276(14): 11323-11334; およびHsuら, (1992) Science 257:1946-50を参考する。

【0250】

ライブラリーの製作：4. キメラジンクフィンガータンパク質ライブラリー

【0251】

様々なキメラジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸のライブラリーは実施例1に記述するように、連続的な連結によって形成できる。各核酸が3つ、4つまたは5つ以上のジンクフィンガードメインを有するタンパク質をコーディングするようにライブラリーが製造できる。いくつかの実施態様においては、特に大規模のライブラリーを作るために各ジンクフィンガータンパク質がジンクフィンガードメインのセットのいずれかを無作為で含むように考案できる。ジンクフィンガードメインのセットは、たとえば、64個の可能な3-塩基対下位部位のうち、30、40、50またはそれ以上をカバーする範囲の特異性を有するドメインを示すように選択できる。このセットは約12、15、20、25、30、40または50個以上の異なるジンクフィンガードメインを含み得る。これらのドメインのいくつかまたはすべては天然型タンパク質から分離されたドメインであってもよい。

【0252】

一つの例示的なライブラリーは各フィンガーごとに3つのジンクフィンガーおよび30個の可能なドメインを有するキメラジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸を含む。完全に表示された形態であるとき、該ライブラリーは 30^3 の結果である27,000個の配列を含む。該ライブラリーは30個の可能なすべてのドメインをコーディングする核酸のプール(pool)が各段階で付加される連続的な連結によって製造できる。最終ライブラリーはプールとして貯蔵できる。

【0253】

一実施態様においては、ライブラリーは無作為の集合として貯蔵できる。他の実施態様においては、各構成員が分離され、住所化が可能な位置に貯蔵され(たとえば、整列され)、配列分析される。40,000~50,000個の製造されたライブラリー構成員の高効率配列分析(high throughput sequencing)後に、完全な範囲を得るために、落とされたキメラ組合を個別的に組み立てることができる。たとえば、マイクロタイタープレートなどに一旦整列されると、各構成体は追加の分析または特定の応用のためにさらに回収できる。目的とする表現型を有する細胞は選別され、特徴化される。他の実施態様において、各ライブラリー構成員は細胞に形質転換され、各細胞は特徴化される。すなわち、核酸マイクロアレイ分析を用いて内生遺伝子の転写が変化したかを決定する(下記の「キメラジンクフィンガータンパク質の調節能力プロファイル化」参照)。

【0254】

核酸ライブラリーの細胞内導入

【0255】

核酸ライブラリーは様々な方法で細胞内に導入できる。一例として、ライブラリーは各核酸ライブラリーの多重複製を含む無作為的プールとして貯蔵する。そのプールの一部は細胞に形質転換される。他の実施態様において、個々のライブラリー構成員は個別的に貯蔵され(例:マイクロタイタープレートの分離されたウェル(well)または整列の分離された住所に貯蔵)、個別的に細胞に導入される。

【0256】

他の実施態様において、ライブラリー構成員は全体ライブラリーに比べて複雑でないプールに貯蔵される。たとえば、各プールは 10^5 または 10^6 の異なる構成員を有するライブラリーから 10^3 の異なるライブラリー構成員を含み得る。あるプールが特定効果を

10

20

30

40

50

もたらす構成員を有するものとして同定される場合、そのプールは表現型効果を媒介する個別ライブラリー構成員を同定するために分析できる。このような接近法は、アポトーシスを誘導するキメラタンパク質に対するスクリーニングにおけるように、変形された細胞の回収が難しい場合に有用である。

【0257】

核酸ライブラリーは様々な方法によって細胞に導入できる。代表的な方法は電気突孔法（米国特許第5,384,253号）、粒子銃（遺伝子銃）技術（参考：米国特許第5,550,318号；第5,538,880号；および第5,610,042号；およびWO94/09699）；リボソーム-媒介されたトランスフェクション（例：LIPOFECTAMINE（登録商標）（Invitrogen）またはSUPERFECT（登録商標）（QIAGEN GmbH）を使用；Nicolauら、Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.）；リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストリン媒介形質転換（例：Rippe et al., (1990) Mol. Cell Biol., 10: 689-695）；直接的な微細注入または超音波粉碎ローディング；受容体媒介トランスフェクション（例：EP273085）およびアグロバクテリア-媒介形質転換（参考：米国特許第5,563,055号および第5,591,616号）。ここで使用された「形質転換」という用語は、外生核酸を細胞に導入するいずれの方法も含む。

【0258】

インピトロまたはインピボで細胞に核酸ライブラリーを導入するためにウイルス粒子を使用できる。一実施態様において、ウイルス包装（packaging）はライブラリー核酸を個体内細胞に導入するのに用いられる。他の実施態様において、ライブラリー核酸がインピトロで細胞に導入された後細胞が個体に伝達される。

【0259】

ライブラリー核酸の導入後、ライブラリー核酸が発現されてライブラリーによってコーディングされるキメラタンパク質が細胞によって生成される。ライブラリー核酸の不变領域は発現を可能にする必須調節および支持配列を提供できる。そのような配列は転写プロモーター、転写終結部位、スプライス部位ドナーおよびアセプター（splice site donors and acceptors）、非翻訳調節部位（ポリA追加部位）、細菌複製開始部位（origin of replication）およびライブラリー核酸の存在を指すか、ライブラリー核酸の選別に用いられるマーカー（markers）を含む。

【0260】

キメラタンパク質をコーディングする核酸ライブラリーのスクリーニング

【0261】

スクリーニングにおいて、細胞または個体は変形された表現型を示すものを同定するために分析される。このような過程は目標の表現型によって異なる。可能な表現型の数が莫大となるにつれて、スクリーニングの可能な方法も莫大となる。数多くの遺伝子スクリーニングおよび選別が、突然変異体または特定の表現型を示す天然型遺伝子の過発現を同定するために行われた。各方法はキメラタンパク質をコーディングする有用な核酸ライブラリー構成員を同定するのに適用できる。スクリーニングは、ライブラリー核酸を含む各細胞または個体の分析および選別、すなわち、生存または特定の処理に耐える他の特徴を示す細胞または個体の分析を含み得る。

【0262】

細胞を分析する代表的な方法は顕微鏡（例：光学、共焦点、蛍光、電子走査および透過電子）、蛍光根拠細胞分類（sorting）、鑑別遠心分離、鑑別結合、免疫分析、酵素分析、成長分析、およびインピボ分析などを含む。

【0263】

一部のスクリーニングは特定の環境条件を含む。この条件に対して敏感であるか抵抗性がある細胞が同定される。

【0264】

一部のスクリーニングは、細胞の特定様態（例：走化性（chemotaxis）、形態変化またはアポトーシス）、または個体の特定様態（例：植物による走光性（phototaxis）、ショ

10

20

30

40

50

ウジョウバエ属の交配行動など)を要求する。一態様において、細胞または個体は、顕微鏡および選択的に変形細胞を自動で検索する電算プログラムを用いて視覚的検査によって直接的に分析できる。他の態様においては、細胞または個体は、目的とする表現型に係る分析または他の標識体(indicator)を用いて分析できる。

【0265】

一部のスクリーニングは細胞増殖に関連する。対照細胞(例:正常細胞)と異なる速度で増殖する細胞が同定される。また、増殖信号(例:成長因子または他のミトゲン(mitogen))に異なって反応する細胞が同定できる。細胞は信号に多かれ少なかれ敏感してもよい。

【0266】

細胞分化に関連するスクリーニングが用いられる。スクリーニングおよびキメラジンクフィンガータンパク質の使用は分化および様々な細胞の増殖能力を調節するために使用できるが、細胞はヒトまたはヒト以外のES細胞および体腔(somatic)幹細胞のような幹細胞を含む。ジンクフィンガータンパク質は、ES細胞を神経母細胞(neuronal progenitor cells)または造血幹細胞(hematopoietic stem cells)のように制限された系列(lineage)に直接分化させる場合に発見できる。また、幹細胞を限定された細胞分裂-後(post-mitotic)細胞亜型に、たとえば、ES細胞のおよび/または神經幹細胞のドパミン性またはコリン性神経への直接的分化に、直接分化させるジンクフィンガータンパク質に対するスクリーニングが可能であろう。

【0267】

分化を分析する他の表現型のうち、標識遺伝子および標識タンパク質の発現を観察することが可能である。前記標識は次を含む:

【0268】

- ・ 上皮細胞用FLK1(チョら,(2001) Blood 98:3635-42; Nishikawaら, Development 125: 1747-1757)、
- ・ 血管平滑筋細胞 - 特異的平滑筋用ミオシン重鎖(Drabら,(1997) FASEB J 11:905-15)
- ・ 骨 - 特異的アルカリホスファターゼ(BAP)および骨細胞用オーステオカルシ(osteocalci)(Demersら,(2000) Cancer 88:2919-26)
- ・ 白血球用CD4、CD8およびCD45(Odyら,(2000) Blood 96:3988-90, Martinら,(2000) Blood 96:2511-9)
- ・ 造血幹細胞用FLK-2およびCD34(Julieら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol. 98, Issue 25, 14541-14546, Woodward & Jenkinson. Eur J Immunol 2001 Nov;31(11):3329-38, George AAら, Blood 2001 Jun 15;97(12):3925-30)
- ・ 造血幹細胞およびMSC前駆細胞用CFU(Frimbergerら, Exp Hematol 2001 May;29(5):643-52)
- ・ 骨髄纖維細胞用Muc-18(CD146)(Filshieら, (1998) Leukemia 12:414-21)
- ・ 軟骨細胞用コラーゲンII型、コラーゲンIV型および軟骨細胞発現タンパク質-68(Carlbergら, (2001) Differentiation 67:128-38, Steckら, (2001) Biochem J 353:169-74)
- ・ 脂肪細胞用脂質-結合タンパク質(ALBP)および脂肪酸移動物質(transporter)(Amriら,(1995) J. Biol. Chem. 270:2367-2371, Bastieら, (1999) J. Biol. Chem. 274:21920-5, Frohnertら, (1999) J. Biol. Chem. 274, 3970-3977, Teboulら, (2001) Biochem. J. 360:305-312)
- ・ 神經幹細胞用CD133(Uchida Nら,(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:14720-5)
- ・ 星状膠細胞用GFAP(Daiら, (2001) Genes Dev 15:1913-25)
- ・ 神經用微小管 - 関連タンパク質-2(Royら, (2000) Nat Med 6:2717)

【0269】

抗癌効果、アポトーシスの変化およびウイルス抵抗性などの他の特性で哺乳類由来細胞

10

20

40

30

40

50

をスクリーニングすることが可能である。たとえば、ウイルス感染またはウイルスの生成に対する抵抗細胞を選別することによって、抗 - ウイルス製剤に用いられる人工キメラタンパク質を同定することが可能である。

【 0 2 7 0 】

類似に、細胞信号経路における変化も経路の活性または不活性と関連する探り針 (probe) を使用するか、経路の活性または不活性と関連する認識すべき標識を用いて検索できる。

【 0 2 7 1 】

あるスクリーニングは代謝産物、分泌タンパク質および翻訳後修飾されたタンパク質のような目標の合成物の生成と関係がある。たとえば、細胞は合成物の増大された生産量で同定できる。他の例において、細胞は好ましくない副産物のような合成物の減少した生産量で同定できる。目標の細胞は反応細胞、マイクロアレイ分析、化学検索分析および免疫分析の使用を含む様々な方法によって同定できる。

【 0 2 7 2 】

特定の実施態様のさらに多くの例は次を含む：

1) タンパク質可溶性 :

大腸菌において、多くの異種タンパク質は封入体 (inclusion body) として発現される。本発明においては、大腸菌で発現されるヒトタンパク質の溶解性分画を増加させるキメラジンクフィンガータンパク質を同定した (実施例 12 参照)。これによれば、本発明は発現された (例：細胞内過発現された) 異種タンパク質の溶解度を変化させる (例：増加させる) 人工転写因子またはキメラジンクフィンガータンパク質を提供する。

【 0 2 7 3 】

2) 糖鎖化 (Glycosylation) :

抗体を含む治療用タンパク質は主に CHO 細胞で生産される。しかし、このようなタンパク質は適切な糖鎖化様式 (Glycosylation pattern) を備えていない。一実施態様において、B 細胞から生産される抗体の特徴である糖鎖化を一つ以上 (例：すべて) 含む抗体のような分泌タンパク質に変形された CHO 細胞を同定するために、キメラタンパク質をコーディングするライブラリーがスクリーニングされる。これによれば、本発明は CHO 細胞によって分泌される抗体のように、CHO 細胞によって分泌されるタンパク質のような分泌タンパク質の糖鎖化を変化させる、人工転写因子またはキメラジンクフィンガータンパク質を提供する。

【 0 2 7 4 】

3) ウイルス力価 (titer) :

一実施態様において、細胞培養でウイルス力価を増加または減少させるキメラタンパク質を糾明するために、キメラタンパク質をコーディングするライブラリーがスクリーニングされる。ウイルスは遺伝子伝達体のような伝達体として使用できる。たとえば、治療用ウイルスは特定の形態の癌を治療するために開発中である (例：アデノウイルス)。ウイルス力価の増大は治療用ウイルスの製作に有用である。反面、細胞培養およびインビボでのウイルス生産阻害はウイルス性疾病を治療するのに有用である。これによれば、本発明は真核生物または哺乳動物細胞のような細胞でのウイルス生産を変化 (例：増加または減少) させる人工転写因子またはキメラジンクフィンガータンパク質を提供する。

【 0 2 7 5 】

4) 形質転換効率 :

多くの真核細胞株または原核個体における遺伝子工学は低いトランスフェクションまたは形質転換効率によって限界がある。人工転写因子はトランスフェクションまたは形質転換効率が増大するように改造された細胞で選別できる。そのような因子の選別は、限定された濃度の標識または標識で形質転換した後、標識獲得した細胞の選別で選別可能である。これにより、本発明は細胞の DNA 獲得効率または DNA 獲得過程の耐性を変化させる人工転写因子またはキメラジンクフィンガータンパク質を提供する。

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

5) 栄養細胞 (Feeder cells)

栄養細胞の生産によるように、幹細胞の増殖または分化を補助できるように培養細胞の特徴を変化させる人工転写因子または他のキメラタンパク質を同定できる。培養細胞はヒトまたは哺乳動物細胞であってもよい。このような細胞は、同じ環境で培養された幹細胞を幹細胞が増殖または分化するようにする細胞を同定するためにスクリーニング（例：ライブラリー構成員ブーリング）できる。人工転写因子は培地に分泌される主なサイトカインおよび成長因子を活性化できる。前記培地は幹細胞の分化または増殖を誘導（例：自家複製の補助を通じて）するのに用いられる。これにより、本発明は培地を調節するか、幹細胞の分化または増殖調節のような幹細胞の行動様式を変化させる哺乳動物細胞の能力を変化（例：増加）させる人工転写因子またはキメラジンクフィンガータンパク質を提供する。

【0277】

一種類の細胞を用いて人工転写因子をスクリーニングし、他の種類の細胞で人工転写因子を発現することもまた可能である。このような過程は一般的に転写因子によって誘導された第1細胞から第2細胞への表現型転移に使用される。たとえば、本発明者らは広範囲で互いに異なる2つの細胞株において部分的ジンクフィンガータンパク質の発現プロファイルを決定した；細胞株は癌細胞ではないヒト胎生期腎臓293細胞およびヒト頸部癌細胞であるHeLaである。本発明者らはそのプロファイルが非常に類似することを確認した。同じように、酵母においても本発明者らは一つの菌株内のあるZEPによって誘導された表現型が互いに異なる菌株に転移できることを確認した。

【0278】

幹細胞

【0279】

ここで記述する方法は一般的なある細胞にも適用可能であり、また、ある後生動物個体由来の幹細胞にもその様式の調節に特に有用である。幹細胞は自家複製（self-renewal）能力および分化可能性を有する細胞である。自家複製は無限に延長できる。幹細胞は高度に分化された子女細胞（descendants）を生産できる（WattおよびHogan（2000）Science 287: 1427-1430）。ヒト胚性幹細胞の培養に関する最近の成功によって細胞に基づく治療のための細胞根源を提示するようになった。しかし、幹細胞の維持、複製および分化は時によって難しい場合がある。たとえば、ES細胞はインビトロで無作為に分化する傾向を示す。

【0280】

キメラ転写因子ライブラリーは細胞分化を調節できるタンパク質を同定するのに用いられる。たとえば、制限された有糸分裂-後細胞亜型（defined post-mitotic cell subtype）（たとえば、ドバミン性またはコリン性神経）に幹細胞の分化を直接誘導するキメラ転写因子を同定できる。

【0281】

自家複製能力を増加させて分化を阻害するか分化の範囲および性格に直接影響を及ぼすタンパク質を同定できる。このようなタンパク質は、一般的に人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸を幹細胞または前駆細胞（progenitor）に導入し、その細胞の表現型を分析することによって同定できる。

【0282】

幹細胞の分化や増殖を調節する方法は、未分化細胞の大量供給を提供し、特定細胞形態への分化を調節することを可能にする。このような調節は治療目的または他の適用（例：形質転換動物の発達、インビトロ内細胞培養など）への使用が可能なように開発できる。

他の例において、ある場合には胚性幹細胞（ES細胞）を限定された系列に直接分化させるキメラ転写因子を同定できる。したがって、ES細胞から神経母細胞（neuronal progenitor）または造血幹細胞を生産できる。また、1) 分化された細胞を他の分化状態で適応させるか、2) 分化された細胞を幹細胞または前駆細胞（pluripotent progenitor cell）を作り出す未分化状態で適応させるように誘導するキメラZFPのようなキメラタ

10

20

30

40

50

ンパク質を同定できる。

【0283】

同定方法は特定の標的遺伝子に対する情報を必要としない。標的遺伝子は、たとえば、同定されたキメラ転写因子によって活性や発現が変化した遺伝子を転写体またはタンパク質のプロファイルで同定するスクリーニング後に同定できる。ZFP-TFによって調節された遺伝子の同定は細胞分化を理解するのに役立つだろう。

【0284】

細胞産物の生産

【0285】

本発明は、タンパク質または代謝産物のような細胞産物を生産する細胞の能力を変化させる人工転写因子（例：キメラジンクフィンガータンパク質）を提供する。細胞産物は内生または異種タンパク質であってもよい。たとえば、特定のタンパク質（例：特定の内生タンパク質）、過発現タンパク質、異種タンパク質またはミスフォールド（mis-folded）タンパク質のような、タンパク質を生産する細胞の能力を増加させる人工転写因子を同定することが可能である。

【0286】

一実施態様において、細胞は、たとえば、酵素的または蛍光的に追跡可能なレポータータンパク質を生産する能力に対してスクリーニングできる。一例において、レポータータンパク質は対照細胞において過発現される場合に不溶性である。たとえば、細菌細胞は封入体を減少させる人工転写因子に対してスクリーニングできる。他の実施態様において、レポータータンパク質は原核または真核細胞によって分泌される。細胞は、さらに高い分泌産物の増加、増大した糖鎖化、リン酸化またはタンパク質分解過程のような翻訳後修飾に対して同定できる。

【0287】

一実施態様において、細胞は異なる2つのレポータータンパク質の活性を変化（例：増加または減少）させる能力で同定される。レポータータンパク質は、活性、位置（例：分泌/細胞質/核内）、サイズ、溶解性、等電点（isoelectric point）、重合状態、翻訳-後調節、翻訳調節および転写調節（例：異なる配列によって調節されるレポータータンパク質をコーディングする遺伝子）で区分できる。本発明は、このような特徴で区分される異なる少なくとも2つのレポーター遺伝子を変形させる人工転写因子（例：ジンクフィンガータンパク質）やレポーター遺伝子を選択的に調節するジンクフィンガータンパク質を含む。

【0288】

表現型スクリーニング方法は人工転写因子を分離するのに利用できるので、ジンクフィンガータンパク質がどのようにタンパク質生産の増加を媒介するかを優先的に知る必要はない。確認可能な機構は、次のうちの少なくとも一つの変形を含む；翻訳機構、転写過程、転写、分泌、タンパク質分解、ストレス抵抗性、代謝産物の生産のような触媒活性。一例において、人工転写因子は代謝経路において少なくとも一つの酵素発現を調節でき、これによって代謝産物またはタンパク質のような細胞産物の生産を増加できる。

【0289】

反復（iterative）考案

【0290】

キメラDNA結合タンパク質が同定されると、細胞の表現型を変化させる能力は様々な方法によって改善できる。たとえば、約6～200個または50～2000個の構成員を有する小型ライブラリーまたは大型ライブラリーは特別に同定されたキメラタンパク質の最適化に利用できる。

【0291】

反復考案の一番目の代表的な実施態様においては、オリジナルキメラDNA結合タンパク質を変化させるのに突然変異技術が用いられる。この技術はオリジナルタンパク質の、たとえば、第1のライブラリーから同定されたタンパク質の、変異体である構成員を含む第2のライブラリーを製作するのに適用される。このような技術の例は次を含む：誤謬 -

10

20

30

40

50

誘発(error-prone)PCR(Leungら(1989)Technique 1:11-15)、組換え、無作為切断を用いたDNAシャフリング(shuffling)(Stemmer(1994)Nature 389:391), Cocoら(2001)Nature Biotech. 19:354、位置特異的突然変異(Zollnerら(1987)Nucl Acids Res 10:6487-6504)、カセット突然変異化(cassette mutagenesis)(Reidhaar-Olson(1991)Methods Enzymol. 208:564-586);縮退オリゴヌクレオチドの挿入(Griffithsら(1994)EMBO J 13: 3245);連続的連結、事前に製造され、整列されたライブラリーから特異的構成員のプール(pool)化、組換え(例:性的PCRおよび「DNAシャフリング(登録商標)(Maxygen, Inc., CA)」、またはこれらの方法の組合せ)。

【0292】

一実施態様において、ライブラリーはアミノ酸位置を突然変異させるように製作される。たとえば、キメラジンクフィンガータンパク質の場合、アミノ酸の位置はDNA接触残基に近接できるが、DNA接触残基そのものではない。他の実施態様において、ライブラリーはキメラタンパク質内の各々コーディングされたドメインが様々であるが、キメラDNA結合タンパク質が同定される初期のライブラリーよりは一層制限される。キメラジンクフィンガードメインでは、特定のドメインをコーディングする核酸はオリジナルキメラタンパク質に存在するドメインの特異性と類似する特異性を有すると知られている他のジンクフィンガータンパク質の間で多様に変化し得る。

【0293】

一部の技術は、一部の機能的特性を示す少なくとも2つのキメラDNA結合タンパク質ドメインをコーディングする核酸から、新しいキメラDNA結合タンパク質を創出することを含む。このようなDNAシャフリングおよび基本ドメイン交換(swapping)などの技術は新しいドメインの組合せを創出する。米国特許第6,291,242号参照。DNAシャフリングはドメイン交換だけでなく、点突然変異(point mutation)を導入できる。シャフリング反応は、目的とする表現型を誘導するキメラタンパク質コーディング核酸配列から始まる。核酸はシャフリングされる。第2のライブラリーはシャフリング産物から製作され、類似または強化された条件下で目的とする形質を誘導する構成員に対してスクリーニングされる。もし初期ライブラリーがすべての可能なドメイン組合せがスクリーニングされるように広範囲であれば、同一な初期ライブラリーから分離されたドメインのDNAシャフリングは無駄になる。DNAシャフリングは範囲(coverage)が幅広い場合、または幅広いスクリーニングが合理的でない場合に有用である。

【0294】

反復考案の第2の実施態様においては、目的とする表現型を生成するキメラDNA結合タンパク質が各ドメインの多様化によって変化する。ドメインは、1回につづつ、または一回に一つ以上に、順次変化できる。

【0295】

次の例は3つのジンクフィンガードメイン: フィンガーI、IIおよびIIIを含み、目的とする表現型を生産するオリジナルキメラタンパク質を意味する。第2のライブラリーはその各核酸構成員が初期に同定されたタンパク質と同一なフィンガーIIおよびフィンガーIIIをコーディングするように製作される。しかし、ライブラリーはオリジナルタンパク質のフィンガーIと異なる、フィンガーIの核酸構成員を含む。相違点はコーディングされたキメラタンパク質のアミノ酸配列を変化させる单一ヌクレオチドであるか、さらに根本的であり得る。第2のライブラリーはフィンガーIの塩基-接触残基が様々な形態で製作されるか、フィンガーIの塩基-接触残基は変わりないが、隣接残基が多様化できる。また、第2のライブラリーは、少なくとも20、30、40または60個の異なるトリヌクレオチド位置を認識する、十分な数のジンクフィンガードメインを含み得る。

【0296】

第2のライブラリーは細胞または個体の表現型を変化させる成分を同定するようにスクリーニングされる。変化の範囲はオリジナルタンパク質によるものと類似するかまたはさらに広い。

【0297】

10

20

30

40

50

同時にまたは連続的に、第3ライブラリーはフィンガーIIを多様に製作でき、第4ライブラリーはフィンガーIIIを多様に製作できる。もしキメラタンパク質または既に同定された変異体が十分であれば、キメラタンパク質をさらに向上させるためにすべてのドメインを多様化する必要はない。他の場合には、各ドメインを再最適化することが必要である。

【0298】

もし同時に他のドメインが多様化されるとすれば、特定のライブラリーから向上した変異体は他のライブラリーを製作するために互いに組換えることができる。このようなライブラリーも類似にスクリーニングされる。

【0299】

反復考案の3番目の実施態様においては、この方法がジンクフィンガードメインまたは調節ドメインのようなドメインを挿入、置換または欠失することを含む。挿入されたジンクフィンガードメインはキメラタンパク質の特異性を増加させるか、その結合親和度を増加できる。ある場合には、結合親和度の増加がキメラタンパク質を創出する表現型を強化することもある。第2の活性化ドメインまたは補助因子を誘導するドメインのような、挿入調節ドメインはキメラタンパク質が生産する表現型を強化することもある。欠失はキメラタンパク質の活性の特異性を強化または拡張させ、これは削除されたドメインの寄与度などによる。

【0300】

反復考案の4番目の実施態様において、この方法はオリジナルキメラタンパク質と第2のキメラDNA結合タンパク質を細胞で共発現することを含む。第2のキメラタンパク質は異なるキメラをコーディングする核酸ライブラリーをスクリーニングして同定できる。

一実施態様において、第2のキメラタンパク質はオリジナルキメラタンパク質を発現する細胞でライブラリーをスクリーニングして同定される。他の実施態様において、第2のキメラタンパク質は独立的に同定される。

【0301】

キメラジンクフィンガータンパク質の調節特性のプロファイリング (profiling)

【0302】

細胞の表現型を変化させるキメラ転写因子の特性をさらに確認して、このタンパク質が直接または間接的に調節する内生遺伝子を同定できる。普通、キメラ転写因子は内生遺伝子を細胞内で生成される。表現型の変化前、変化期間または変化後のような適切な時間に細胞を分析して細胞内または培地に存在する転写体やタンパク質の発現水準を測定する。たとえば、細胞からmRNAを抽出し、核酸マイクロアレイ分析を通じて分析する。

【0303】

核酸マイクロアレイ分析は、たとえば、フォトリソグラフィー法（例：米国特許第5,510,270号参照）、機械的方法（例：米国特許第5,384,261号に記載された直接流れ（directed flow）法）またはピン基盤（pin based）法（米国特許第5,288,514号に記載）などの様々な方法によって製作できる。この分析は、発現された特定の遺伝子に対する核酸を検出するのに適した特別なキャプチャープローブ（capture probe）を各住所に有するように製作される。

【0304】

mRNAは、たとえば、文献（Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, N.Y）に記述されたようにDNaseを処理し、ゲノムDNAを除去し、オリゴ-dTを結合した固体基質にハイブリダイゼーションすることを含む一般の方法で分離できる。基質を洗浄した後、mRNAを溶出させる。分離されたmRNAを米国特許第4,683,202号に記載されたように、RT-PCRなどによって逆転写させ、任意に増殖させる。増殖または逆転写過程中、標識されたヌクレオチドの挿入によって核酸を標識できる。好ましい標識の例は、赤色蛍光染料Cyanine5(Amersham)または緑色蛍光染料Cyanine3(Amersham)のような蛍光標識を含む。一方、核酸をビオチンで標識し、ストレプトアビ

10

20

30

40

50

ジンピコエリトリン (Molecular Probes) などの標識されたストレプトアビシンとのハイブリダイゼーションで検出できる。

【0305】

次いで、標識された核酸をアレイに接触させる。さらに、対照核酸または参考核酸を同じアレイに接触できる。対照核酸または参考核酸を標本核酸の標識とは異なる標識、たとえば、異なる最大放出 (emission) 波長を有する標識で認識できる。標識された核酸をハイブリダイゼーションの条件でアレイと接触させる。アレイを洗浄した後、アレイの各アドレスで蛍光を検出するために映像化する。

【0306】

プロファイルを作つて評価する一般的な方法はアレイの各アドレスでハイブリダイゼーションを検出する段階を含む。各アドレスのハイブリダイゼーションの程度は数字で表示してベクター、一次元マトリックス、または一次元アレイで貯蔵する。ベクター x はアレイの各アドレスに対する値を有する。たとえば、特定のアドレスでハイブリダイゼーションの程度に対する数値は x 。¹⁰という変数で貯蔵される。この数値は、各地域の背景水準、標本量および他の変異条件に合わせて調節できる。また、対照標本から核酸を準備し、同一または異なるアレイにハイブリダイゼーションできる。ベクター y はベクター x と等しく製作する。たとえば、2つのベクターの関数である数学式を用いて標本発現プロファイルを対照プロファイルと比較できる。この比較は、2つのプロファイルの類似性を示す値数などのスカラー (scalar) 値として評価できる。アレイによって検出される異なる遺伝子に加重値を与えるために前記ベクターのいずれかまたはすべてはマトリックスによって変換できる。²⁰

【0307】

発現データはデータベース、たとえば、SQLデータベース（例：オラクル（Oracle）またはサイバース（Sybase）データベース環境）のような関連データベースに貯蔵できる。データベースは数個の表を有する。たとえば、処理されていない（raw）発現データを、各縦列は分析される遺伝子（例：アドレスまたはアレイ）に該当し、各横列は標本に該当する一つの表に貯蔵できる。別途の表は、識別子、および使用したアレイのバッチ（batch）数字、日付および他の品質管理情報などの標本情報を貯蔵できる。

【0308】

同様に調節される遺伝子は共に調節される遺伝子を同定するために発現データをクラスタリング（clustering）することによって同定できる。このようなクラスターはキメラジンクフィンガータンパク質によって同等に調節される遺伝子セットを表示する。遺伝子は階層的クラスタリング（hierarchical clustering）[例:Sokal and Michener (1958) Univ. Kans. Sci. Bull. 38:1409参照]、ベイジアンクラスタリング（Bayesian clustering）、カッパー平均クラスタリング（k-means clustering）、および自体組織地図（self-organizing maps）[Tamayo et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2907参照] を用いてクラスタリングできる。³⁰

【0309】

標本発現プロファイルの対照発現プロファイル（例：対照細胞）との類似性は、たとえば、標本発現水準のログをプレディクター（predictor）または対照発現値のログと比較し、この比較結果をプロファイル内の例示値のすべての遺伝子に対する重要度によって調整することによって決定できる。⁴⁰

【0310】

また、活性化されたキメラタンパク質を有する細胞内でタンパク質をプロファイリングできる。代表的なタンパク質プロファイリング法の一例として、個別タンパク質の種類を特定化する2-Dゲル電気泳動(gel electrophoresis)および質量分光法(mass spectroscopy)が含まれる。2-Dゲル上の個別「点」は加水分解された後、質量分光器で分析される。この方法はタンパク質構成要素および、多くの場合の、翻訳段階の変形をすべて見極めることができる。

【0311】

10

20

30

40

50

タンパク質および核酸のプロファイリング方法はキメラタンパク質の特性に関する情報だけでなく、細胞内で作動する自然機構に関する情報も提供できる。たとえば、キメラタンパク質の発現によって増加したタンパク質または核酸は、キメラタンパク質の発現によって引起される表現型の変化に対して自然的作用体 (effector) であってもよい。

【0312】

さらに、他の方法を用いて人工キメラタンパク質によって直接または間接的に調節される標的遺伝子およびタンパク質を同定できる。一例として、人工キメラタンパク質が表現形質に及ぼす効果を相殺（例：抑制）させる変化を挙げることができる。このような変化は染色体遺伝子内の突然変異および特定遺伝子の過発現のような遺伝的変化だけでなく、RNA干渉（例：二本鎖RNAによる）のような他の変化も含む。

10

【0313】

特定の一例として、病原性細菌またはカビのような細胞内で条件的に発現される場合、成長欠陥または致死を引き起こすキメラZFPを分離する。このようなZFPは、ZFPをコーディングする核酸を含むZFPライブラリーを有する細胞の形質転換によって同定でき、核酸の発現は誘導性プロモーターによって調節される。形質転換体は誘導性および非誘導性培地で培養された後、誘導性および非誘導性プレート上に複製される。非誘導性プレートで正常に成長するが、誘導性プレート上では増殖欠陥を示すコロニーが観察され、これらは「条件的致死」または「条件的増殖欠陥」コロニーとして同定される。

【0314】

(a) cDNAライブラリーを用いた標的遺伝子の同定

cDNA発現ライブラリーは上述の「条件的致死」または「条件的増殖欠陥」菌株に形質転換される。形質転換体は誘導性プレートに塗布される。欠陥を引き起こすZFPの存在および発現にもかかわらず生存するコロニーを分離する。欠陥形質を補完するcDNAの配列を分析する。このcDNAは、欠陥形質に媒介するキメラZFPによって調節される標的遺伝子の直接的または間接的転写体であってもよい。

20

【0315】

(b) 第2のZFPライブラリーを用いた標的遺伝子の確認

第1のキメラタンパク質の効果を抑制する第2のキメラタンパク質が同定される。第2のキメラタンパク質の標的遺伝子は（第1のキメラタンパク質の存在または不在時）同定される。

30

【0316】

たとえば、ZFPライブラリーは（欠陥を引き起こす第1のキメラZFPを含む）「条件的致死」または「条件的成长欠陥」に形質転換される。形質転換体は誘導性プレートに塗布される。導入されたZFPの発現によって生存できるコロニーは「抑制された菌株」として同定される。第2のZFPの標的遺伝子はDNAマイクロアレイ分析によって分析される。比較分析は次の4つの菌株の間で行い得る：1) ZFPのない菌株；2) 第1のZFPのみを有する菌株；3) 第2のZFPのみを有する菌株；4) 第1および第2のZFPをすべて有する菌株。たとえば、第1および第2のキメラZFPによって反対方向に調節される遺伝子が成長・欠陥表現型に媒介する標的遺伝子の候補となる。この方法はただ増殖欠陥だけでなく、いずれの表現形質にも適用できる。

40

【0317】

(c) 発現プロファイル分析によって同定された共調節 (co-regulated) 遺伝子

キメラZFPの標的候補は発現プロファイリング (expression profiling) によって同定できる。段階的に、キメラZFPの表現型に媒介する標的候補を決定するために、標的候補を個別的に過発現または抑制（例：遺伝子欠失またはRNA干渉）できる。さらに、この分析法を多重標的候補に対して適用できる。これは少なくともいくつかの場合に、少なくとも一つの候補が表現型を示すことを妨げる必要があるためである。このような接近法の一例が実施例3（ケトコナゾール抵抗性）に示されている。

【0318】

(d) 時間 - 推移分析 (Time-Course Analysis)

50

キメラ Z F P の標的は細胞をキメラ Z F P に露出させた後遺伝子発現の特徴的な経時変化を分析して同定できる。たとえば、キメラ Z F P をコーディングする遺伝子は誘導プロモーターに連結できる。代表的な誘導プロモーターはドキシサイクリン (doxycycline) のような小分子 (small molecule) によって調節される。キメラ Z F P をコーディングする遺伝子は細胞に導入される。mRNA 試料は誘導プロモーターによる誘導後、様々な時間に細胞から得られる。たとえば、図 13 では、Z F P_F104-p65 の誘導過程で活性化または抑制された遺伝子が見られる。

【0319】

(e) タンパク質導入と cDNA マイクロアレイ技術を用いた、哺乳動物細胞における Z F P - T F の一次標的遺伝子の同定

キメラタンパク質を転移 (transduction) によって細胞内に伝達することもまた可能である。タンパク質は細胞外部条件で供給され、細胞はそのタンパク質を自身に転移させる。この接近は外生核酸の融合 (integration)、伝播 (propagation) などに対するそれを除去するだろう。タンパク質の量は正確に調節できる。一実施態様において、キメラ Z F P は Tat または VP22 のタンパク質転移ドメインに融合 (fusion) される。

【0320】

培養細胞に転移されたキメラタンパク質の効能を分析するために、キメラタンパク質は、たとえば、タンパク質転移ドメインとの融合のように、培養培地に添加される。調節された標的遺伝子の検索はシクロヘキシミド (cycloheximide) のようなタンパク質合成阻害剤の添加で向上できる。したがって、一次標的遺伝子の翻訳が遮断され、その一次標的遺伝子によってコーディングされたタンパク質によって調節される遺伝子が検索される。一次標的遺伝子の同定は DNA マイクロアレイ分析によって発見できる。

【0321】

一次標的遺伝子を同定するためのシクロヘキサミドの使用は、キメラタンパク質が細胞内の異種核酸によってコーディングされた場合にもまた使用できる。たとえば、異種核酸の発現は 30、20、15、10 または 5 分以内に誘導でき、この際、シクロヘキサミドを添加できる。

【0322】

(f) 活性分析

潜在標的遺伝子の機能は、たとえば、二本鎖 RNA (dsRNA) による RNA 干渉 (RNAi)、アンチセンス (anti-sense) 技術、リボザイム (Ribozyme)、または標的遺伝子の突然変異によって、標的遺伝子の活性を抑制することによって分析できる。標的遺伝子の活性が減少した細胞または個体は RNAi を処理していない对照群細胞または個体と比較し、分析できる。また他の例において、標的遺伝子を調節するとされる人工ジンクフィンガータンパク質を発現する細胞または個体に RNAi が処理される。一つの表現形質を誘導する人工ジンクフィンガータンパク質の効能は RNAi の存在または不在下で分析できる。ある場合には、もし潜在的標的遺伝子が実際に決定的標的であれば、RNAi 処理が潜在的を不活性化することは人工ジンクフィンガータンパク質による表現形質を弱化できる。

【0323】

dsRNA は、たとえば、カセット (cassette) の両方向に T7 プロモーターを含ませて一つのカセットを両方向から転写して製造できる。カセット内の挿入体 (insert) は潜在的標的遺伝子の相補的な配列を含むように選択される [HiScribe (登録商標) RNAi 転写キット (New England Biolabs, MA) および Fire, A. (1999) Trends Genet. 15, 358-363 を参照]。dsRNA はさらに小さい切片に分解できる [たとえば、米国特許出願第 2002-0086356 号参照]。dsRNA は哺乳動物細胞において遺伝子発現を不活性化させるのに使用できる [Clemens, ら (2000) Proc. Natl. Sci. USA 97, 6499-6503; Billy, E. ら (2001) Proc. Natl. Sci. USA 98, 14428-14433; Elbashir ら (2001) Nature 411(6836):494-8; Yang, D. ら (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9942-9947 参照]。

10

20

30

40

50

【0324】

標的DNA部位の確認

【0325】

キメラDNA結合タンパク質に関連して、目標の表現型を生産するキメラDNA結合タンパク質の標的部位を決定するために様々な方法が使用できる。このような方法は標的部位を探すために単独でまたは組合せて使用できる。

【0326】

一実施態様において、発現プロファイルによる情報はキメラジンクフィンガータンパク質によって認識される標的部位を同定するのに用いられる。キメラジンクフィンガータンパク質によって共調節される(*co-regulated*)遺伝子の調節領域(*regulatory region*)は、すべての、または大部分の調節領域内に共通して存在するモチーフを同定するために比較される。10

【0327】

他の実施態様において、生化学的方法がキメラジンクフィンガータンパク質によって結合されるDNA部位を決定するために用いられる。たとえば、クロマチン免疫沈澱(*Chromatin immuno-precipitation*)実験は、キメラジンクフィンガータンパク質が結合した核酸を分離するのに使用できる。分離された核酸はPCR方法で増幅され、配列が分析される。Gogusら(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:2159-2164の例を見ることができる。他の例として、SELLEX方法を使用できる。さらに、個別キメラジンクフィンガータンパク質の結合特異性に関する情報は標的部位を予測するのに用いられる。その予測は証明されるか、他の結果(例:クロマチン免疫沈澱、インシリコ(*in-silico*)共調節された遺伝子分析およびSELLEXからの結果)を解釈する指標として使用できる。20

【0328】

また他の態様において、潜在的標的部位は、各々のジンクフィンガー構成要素の結合特異性に関する情報に基づいて推論される。たとえば、図10Aおよび10Bから分かるように、N-末端ないしC-末端でジンクフィンガードメインを含むキメラ:CSNR、RSNRおよびQSNRは標的部位5'-GAAAGAGGACCC-3'(配列番号:130)を認識すると予想される。CSNR、RSNRおよびQSNRドメインは各々GAC、GAGおよびGAAにDNA結合特異性を有する。予想標的部位は、C-末端からN-末端への順にドメインを考慮し、それらの認識特異性を連結して5'から3'方向に一本鎖の標的部位を得ることによって形成する。30

【0329】

たとえ大部分の場合、キメラジンクフィンガータンパク質が転写調節子の機能をするだろうが、ある場合には、キメラジンクフィンガータンパク質がRNAまたはタンパク質標的に結合してそれらの表現型効果を媒介する。ある天然型ジンクフィンガータンパク質は実際にこのような高分子に結合する。

【0330】

キメラ転写因子の追加的特徴

【0331】

キメラ核酸結合ドメインをコーディングするライブラリーに関連して、コーディングされたポリペプチドは次の少なくとも一つの特徴を含み得る。このような特徴はそのライブラリーのすべての構成員の間で変わらないか、多様である。一例として、ある核酸は活性化ドメインを含むポリペプチドをコーディングし、他のものは阻害ドメインを含むか、転写調節ドメインを有しない。40

【0332】

活性化ドメイン

本発明に用いられる転写活性化ドメインは、酵母から由来するGal4活性化ドメインおよびヘルペスシンプレックスウイルス(*herpes simplex virus*)から由来するVP16ドメインを含むが、これに制限されない。転写を活性化させるドメインの能力は、既に公知のDNA結合ドメインに融合させ、その公知のDNA結合ドメインが認識する部位に連

10

20

30

40

50

結された標識遺伝子の発現がキメラタンパク質によって活性化されるかを決定して確認される。

【0333】

活性化ドメインの例として次のp65由来のドメインがある：

【0334】

YLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSPFSGPTDPRPP
 PRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTINYDEFPTMV
 FPSGQISQASALAPAPPQVLQPQAPAPAPAPAMVSALAQA
 PAPVPPVLA PGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSSEALLQLQFDD
 EDL GALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPH
 TT EPMLMEYPEA ITRLVTAQRPPDPAPAPLGA PG LPNGLL
 SGDEDFFSSIADMDFSALLSQ (配列番号：131) 10

【0335】

代表的なGal4活性化ドメインの配列は次の通りである：

【0336】

NFNQSGNIADSSLSFTFTNSNSNGPNLITTQTTNSQALSQPI
 ASSSNVHDNFMNNEITASKIDDGNNNSKPLSPGWTDQTAYNA
 FGITTGMFNTTMDDVYNYLFDDEDTPPNPKKEISMAYPY
 DVPDYAS (配列番号：132) 20

【0337】

バクテリアにおいて、活性化ドメインの機能は野生型RNA重合酵素アルファサブユニットC-末端ドメインまたはタンパク質結合ドメインと融合したC-末端ドメインのような突然変異アルファサブユニットC-末端ドメインによって模倣できる。

【0338】

抑制ドメイン

必要に応じて、活性化ドメインの代わりに抑制ドメインをDNA結合ドメインに融合できる。真核生物の抑制ドメインの例としては、Kid、UME6、ORANGE、グルーチョ(groucho)およびWRPW(Dawsonら, (1995) Mol. Cell Biol. 15:6923-31参照)などから由来する抑制ドメインが含まれる。抑制ドメインの能力はそのドメインを公知のDNA結合ドメインと融合させ、その公知のDNA結合ドメインによって認識される配列が連結された標識遺伝子が融合タンパク質によって阻害されるかを決定することによって確認できる。 30

【0339】

代表的な抑制ドメインは次のUME6タンパク質から由来するドメインである：

【0340】

NSASSSTKLDDDLGTA AAVL S NMRSSSPYRTHDKPI SNVND
 MNNTNALGVPA SRPHSSSFPSKGVL RPI L L R IHN SEQQPI
 FESNNSTACI (配列番号：133)

【0341】

他の代表的な抑制ドメインはKidタンパク質から由来するドメインである。 40

【0342】

VSVTFEDVAVLFTRD EWKKLDLSQRSLYREVMLENYSNLA
 SMAGFLFTKPKVISSL LQQGEDPW (配列番号：134)

【0343】

また他のキメラ転写因子は活性化ドメインも抑制ドメインも含まない。かえって、このような転写因子は、結合した内生転写因子(例：活性因子または抑制因子)を置換するか、これらと競争して転写を変化させる。

【0344】

ペプチドリンカー

DNA結合ドメインは様々なリンカーによって連結できる。リンカーの有用性とデザイ 50

ンはこの技術分野でよく知られている。特に有用なリンカーは、核酸によってコーディングされるペプチドリンカーである。したがって、第1のDNA結合ドメイン、ペプチドリンカー、および第2のDNA結合ドメインをコーディングする合成遺伝子を製造できる。このようなデザインは大規模な合成多数-ドメインDNA結合タンパク質を製造するために繰り返すことができる。PCT WO 99/45132およびキムおよびパボ(Kim and Pabo, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2812-7)は、ジンクフィンガードメインを連結するのに適したペプチドリンカーのデザインを記述している。

【0345】

無作為コイル、-螺旋または-ひだ状の3次構造を形成する追加的なペプチドリンカーを使用できる。適した柔軟性のあるリンカーを形成するポリペプチドはこの技術分野でよく知られている(Robinson and Sauer(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:5929-34参照)。柔軟性のあるリンカーは典型的にグリシンを含むが、これはグリシンが側鎖を欠いているため唯一の回転自由度を有するアミノ酸であるためである。親水性を増加させるためにセリンまたはトレオニンをリンカーに挿入できる。また、結合親和度を増加させるためにDNAのリン酸骨格と相互作用できるアミノ酸を使用できる。このようなアミノ酸の適切な使用によって親和度の増加と配列特異性の減少との間のバランスを取ることができる。もし、リンカーが厳格な伸張性を要求する場合、文献[Pantoliano et al. (1991) Biochem. 30:10117-10125]に記述された螺旋状リンカーのような-螺旋リンカーを使用できる。また、リンカーはコンピュータモデリングによってデザインできる(米国特許第4,946,778号参照)。分子モデリングのためのソフトウェアは市販のものを使用できる(たとえば、Molecular Simulation, Inc., San Diego, CA)。このようなリンカーは、タンパク質工学分野で実施される標準的な突然変異誘導技術および適切な生物物理学的テスト、および本明細書に記述された機能的分析法を用いて、抗原性を減少させ/減少させるか、安定性を増加させるための目的などに任意に最適化する。

【0346】

ジンクフィンガードメインを活用した実施のために、ジンクフィンガー間の天然ペプチドをジンクフィンガーと共に連結するためのリンカーとして使用できる。そのような天然リンカーとして典型的なものはThr-Gly-(GluまたはGln)-(LysまたはArg)-Pro-(TyrまたはPhe)(配列番号:74)である(アガタラ、前記参照)。一般的に、天然型ジンクフィンガーと結合する配列に基づいてリンカーを選別できる。

【0347】

二量化ドメイン

DNA結合ドメインを連結するまた他の方法は二量化ドメイン、特に異種二量化ドメイン(Pomerantz et al. (1998) Biochemistry 37: 965-970参照)を用いることである。この実施形態によれば、DNA結合ドメインが別個のポリペプチド鎖で存在する。たとえば、一番目のポリペプチドはDNA結合ドメインA、リンカーおよびドメインBをコーディングする反面、二番目のポリペプチドはドメインC、リンカーおよびドメインDをコーディングする。当業者は特性が明らかになった多くの二量化ドメインから一つの二量化ドメインを選別できる。同種二量体が好ましくない場合、異種二量体化を選好するドメインを使用できる。特に、適用可能な二量化ドメインはコイル化されたコイルモチーフ、たとえば、二量体平衡または逆平衡コイル化されたコイルである。優先的に異種二量体を形成するコイル化されたコイル配列も入手できる(Lumb and Kim, (1995) Biochemistry 34:8642-8648)。二量化ドメインのまた他の種類として二量化が小分子によってまたは信号伝達経路を通じて誘発されるものがある。たとえば、FK506の二量体形態は2つのFK506結合タンパク質(FKBP)ドメインを二量化するのに使用できる。このような二量化ドメインは追加的な調節段階を提供するために利用できる。

【0348】

非DNA適用キメラタンパク質

【0349】

10

20

30

40

50

本願の実施例を非DNA結合ドメインの互いに異なる組合せを含むキメラタンパク質をコーディングする核酸のライブラリーを製作するために変形でき、非DNA結合ドメインには細胞内信号伝達ドメイン(SH2、SH3、PDZ、Cheドメインまたはリン酸化ドメイン)がある。ライブラリーによってコーディングされたキメラタンパク質は細胞内で発現でき、変形された表現型を有する細胞は同定される。たとえば、信号伝達ドメインの異なる組合せからなるキメラタンパク質が細胞増殖速度の減少または増加を同定できる。

【0350】

ジンクフィンガータンパク質の発現

【0351】

本願に記述された方法は、分子生物学、生化学、古典的遺伝学および組換え遺伝学分野の典型的技術の使用を含み得る。本発明の一般的な利用方法を提示した基礎文献の例としては、Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら, eds., 1994)を含む。

【0352】

本願に記述された他に加えて、ジンクタンパク質をコーディングする核酸は、合成遺伝子を製造するために、リンカーとして合成オリゴヌクレオチドを用いて製作できる。他の例として、合成オリゴヌクレオチドは、人工または合成のRNAまたはDNA鑄型から一つ以上のジンクフィンガードメインをコーディングする配列を増幅させるためにプライマーとして使用される [米国特許第4,683,195号と第4,683,202号; PCRプロトコール(protocol):方法と応用に対する案内(A Guide to Methods and Applications) (Innisら, eds, 1990)] 参照]。重合酵素連鎖反応(PCR)のような方法がmRNA、cDNA、ゲノムまたはジンクフィンガータンパク質ライブラリーから直接核酸配列を増幅させるのに使用できる。変質オリゴヌクレオチドを本書に提供された配列を用いて類似体(homologs)を増幅させるように考案できる。制限酵素部位をプライマーに挿入できる。

【0353】

ジンクフィンガータンパク質の遺伝子発現は当業界で公知の方法、たとえば、mRNAの逆転写および増幅、全体RNAまたはpol y A⁺ RNAの分離、ノーザンプロット(Northern blotting)、ドットプロット(dot blotting)、その場合でのハイブリダイゼーション(in situ hybridization)、RNase保護(protection)分析、核酸アレイ技術およびそれと類似する分析法などを用いて分析できる。

【0354】

人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングするポリヌクレオチドは複製および/または発現のために原核または真核細胞を形質転換させる前にベクター内にクローニングできる。このベクターはプラスミド、ファージ(phage)またはシャuttle(shuttle)ベクターのような原核生物由来のベクターであるか、真核生物由来のベクターである。

【0355】

タンパク質発現

人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングするポリヌクレオチドの組換え発現(例:高い水準)を得るために、適合なコーディング核酸を発現ベクターにサブクローニング(subcloning)でき、該発現ベクターは直接転写のための強力なプロモーター、転写/翻訳終結部位および翻訳開始部位に対するリボソーム結合部位を含む。適合なバクテリアプロモーターは当業界に公知であり、次の例に具体的に提示されている(例:Sambrookら, およびAusubelら, 前記文献)。バクテリア発現システムは発現のために有用であるが、たとえば、大腸菌(*E. coli*)、バチルス(*Bacillus* sp.)およびサルモネラ(*Salmonella*)(Palvaら, (1983) *Gene* 22:229-235; Mosbachら, (1983) *Nature* 302:543-545)がある。このような発現システムのためのキットは市販のものを使用できる。哺乳動物細胞、酵母(例:*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia*, および*Hansenula*)および昆虫細胞における真核生物発現

10

20

30

40

50

システムは当業界で公知であり、また市販されている。

【0356】

異種核酸の直接発現に用いられるプロモーターの選別は適用範囲によって異なる。プロモーターは、天然型であるとき、転写開始部位からの距離と同一な転写開始部位からの距離に位置することが好ましい。しかし、当業界に公知のように、このような距離に対する若干の変化はプロモーターの機能が損なわれることなく適用可能である。

【0357】

プロモーターに加えて、発現ベクターは一般的に宿主細胞における発現に要求されるすべての追加的な要素が含まれた転写単位または発現カセットを含む。したがって、典型的発現カセットは、コーディング核酸に作動可能に連結されたプロモーターおよび転写の効率的なポリアデニル化、リボソーム結合部位および翻訳終結部位に要求される信号を含む。カセットの追加的な構成要素には、エンハンサーおよび、ゲノムDNAが構造遺伝子として用いられた場合、機能的スプライスドナーおよびアクセプター部位(splice donor and acceptor sites)を有するイントロンが含まれてもよい。

【0358】

プロモーター配列に加えて、発現カセットは効率的終結のために構造遺伝子の転写終結領域を下流(downstream)に含まなければならない。終結部位はプロモーター配列が由来する同一な遺伝子から得られるか、または異なる遺伝子から得られる。

【0359】

細胞内に遺伝的情報を伝達するのに用いられる特定の発現ベクターは特別に重要ではない。従来の原核または真核細胞において発現のために用いられたベクターはいずれも使用できる。標準バクテリア発現ベクターはpBR322に基づくプラスミド、pSKFおよびpET23Dのようなプラスミド、およびMBP、GSTおよびLacZのような融合発現システムを含む。分離の便宜のため、エピトープタグ(epitope tag)または組換えタンパク質を追加でき、たとえば、c-myc-またはヘキサ-ヒスチジンタグがある。

【0360】

発現ベクターは、SV40ベクター、パピロマウイルスベクターおよびエプステイン・バー・ウィルス由来のベクターのような真核ウイルス由来の調節要素を含み得る。他の代表的な真核ベクターにはpMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、およびCMVプロモーター、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネイン(metallothionein)プロモーター、マウス乳房癌ウイルスプロモーター(murine mammary tumor virus promoter)、ラウス肉腫ウイルスプロモーター(Rous sarcoma virus promoter)、ポリヘドリン(polyhedrin)プロモーターまたは真核細胞の発現に効果的に現れたプロモーターの指示下にタンパク質発現が許容される他のベクターが含まれる。

【0361】

真核ベクターからのタンパク質発現は誘導プロモーターを用いて調節できる。誘導プロモーターの使用によって、発現水準はテトラサイクリン(tetracycline)またはエクジソン(ecdysone)のような誘導製剤の濃度によって決定でき、これはこのような製剤に対する感應要素をプロモーターに併合させることによって行われる。一般的に、高い水準の発現はまだ誘導物質があるときにのみ誘導プロモーターから得られ；基本水準は最小限である。真核タンパク質の発現が真核細胞に有害な場合、誘導発現ベクターがしばしば用いられる。

【0362】

ある発現システムはチミジンリン酸化酵素(thymidine kinase)およびジヒドロ葉酸(dihydrofolate)還元酵素のように遺伝子を増幅できるマーカー(marker)を有するものもある。変形的に、遺伝子増幅を含まない高効率の発現システムは、昆虫細胞にバキュロウイルス(baculovirus)ベクターを用いることと同様に、ポリヘドリンプロモーターまたは他の強力なバキュロウイルスプロモーターの指示下に、ミトコンドリア呼吸鎖(mitochondrial respiratory chain)のコーディング配列および糖分解タンパク質コーディン

10

20

30

40

50

グ配列を有するものも適する。

【0363】

一般的に、発現ベクターに含まれる要素はまた大腸菌、組換えプラスミドを有するバクテリアの選別のための抗生剤抵抗性コーディング遺伝子および真核配列の挿入が許容されるプラスミドの非必須領域内の同一な制限部位に作用するレプリコン(*replicon*)を含む。原核配列は真核細胞内のDNA複製を妨げないものとして選択できる。

【0364】

標準トランスフェクション方法は、多量のジンクフィンガータンパク質を発現するバクテリア、哺乳類、酵母または昆虫の細胞株を作るために用いられ、このように発現されたタンパク質は標準技術を用いて分離される(Colleyら, *J. Biol. Chem.* 264:17619-17622 10

(1989); *Guide to Protein Purification*, in *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)参照)。真核および原核細胞の形質転換は標準技術に従って行われる(Morrison, *J. Bact.* 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* 101:347-362 (Wuら, eds, 1983)参照)。

【0365】

外来ヌクレオチド配列を宿主細胞内に導入するために従来のいずれの方法も使用できる。このような方法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、原形質体(protoplast)融合、電気穿孔法(electroporation)、リポソーム(liposomes)、微細注入(microinjection)、プラズマベクター(plasma vectors)、ウイルスベクター(viral vectors)およびその他のクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外来遺伝物質を宿主細胞に導入する従来の方法を含む(Sambrookら, supra参照)。ただ使用された特別な遺伝工学過程が少なくとも一つの遺伝子を宿主細胞に成功的に導入する能力があるかのみが重要である。

【0366】

発現ベクターを細胞内に導入した後、トランスフェクトされた細胞は発現するのによいか、または発現を活性化する条件下で培養される。タンパク質は細胞抽出物、細胞膜構成要素または小胞(vesicle)から分離でき、または培養液から分離できる。

【0367】

また、適切な調節配列を有する発現ベクターはショウジョウバエ類、線虫類、ゼブラフィッシュ(zebrafish)、蛙類(Xenopus)またはマウス類のようなモデル個体内で人工ジンクフィンガーをコーディングする異種遺伝子を発現するのに使用できる(Riddleら, ed s., *C. elegans II*. Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997参照)。

【0368】

タンパク質精製

ジンクフィンガータンパク質は、前述のように、ある適切な発現システムによって製造された物質から精製できる。

【0369】

ジンクフィンガータンパク質は標準方法によって高い純度で精製でき、このような方法には硫酸アンモニウム、カラムクロマトグラフィー、親和度(affinity)による分離、免疫分離(immunopurification)およびその他の物質を用いた選別沈澱を含む(Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); 米国特許第4,673,641号; Ausubelら, 前記文献; およびSambrookら, 前記文献)。たとえば、ジンクフィンガータンパク質は他の段階との組合せのように、分離段階で使用できる親和度タグ(affinity tag)を含み得る。

【0370】

組換えタンパク質は一般的にプロモーター誘導後多量の形質転換されたバクテリアによって発現されるが、発現は構成的であり得る(constitutive)。IPTGによるプロモーター誘導は誘導プロモーターシステムの一例である。バクテリアは当業界の標準方法に従って培養される。細胞タンパク質の分離のため、新規または冷凍のバクテリア細胞が用い

10

20

30

40

50

られる。バクテリアに発現されたタンパク質は不溶性凝集体（「封入体」（「inclusion bodies」））を形成できる。封入体からタンパク質を精製するのに適合な様々な方法がある（Sambrookら，前記文献；Ausubelら，前記文献参照）。もしタンパク質が溶解性であるか、ペリプラズム（periplasm）に伝達された形態であれば、細胞溶解物（lysates）またはペリプラズム分離液（periplasmic preparations）から得られる。

【0371】

選別的沈澱

塩添加 - 溶解または析出（Salting-in or out）法は、ジンクフィンガータンパク質または汚染タンパク質を選別的に沈澱させるのに使用できる。代表的な塩は硫酸アンモニウムである。硫酸アンモニウムはタンパク質の溶解度に基づいてタンパク質を沈澱させる。さらに強い疎水性のタンパク質であるほどさらに低い濃度の硫酸アンモニウムで沈澱される傾向にある。一般的な方法には硫酸アンモニウムの濃度が20～30%になるように飽和硫酸アンモニウムを添加させる段階を含む。この濃度は多くの疎水性の強いタンパク質を沈澱させる。沈澱物は目標のタンパク質が沈澱されたか、上澄み液に溶けているかを決定するために分析される。目標のタンパク質を沈澱させると知られた濃度になるように上澄み液に硫酸アンモニウムを添加する。その後、沈澱物は緩衝液に溶解し、過量の塩は必要に応じて透析またはダイアフィルトレーション（diafiltration）で除去される。

10

【0372】

カラムクロマトグラフィー

ジンクフィンガータンパク質は、タンパク質の大きさ、表面電位、疎水性およびリガンドに対する親和力に基づいて他のタンパク質から分離できる。さらに、タンパク質に反応する抗体はカラムマトリックスおよび免疫分離されたタンパク質に接合できる。このようなすべての方法は当業界で公知である。クロマトグラフィー技術はいずれの規模でも行うことができ、用いた方法はいずれの規模でも行うことができ、多くの他の製造会社（例：Pharmacia Biotech）の装置を用いて行うこともできる（一般的に、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982) 参照）。

20

【0373】

同じように、一般的なタンパク質の精製過程は、生産細胞内的人工ジンクフィンガータンパク質の発現にその生産が変化した（例：増大した）タンパク質を回収するのに使用できる。

30

【0374】

遺伝子および細胞 - 利用治療法

【0375】

前記本発明の一態様は、人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングする単離されたDNA分子を提供する。このような単離されたDNA分子は遺伝子を治療する目的で様々なDNA構造およびベクターに挿入できる。本願に用いられた「ベクター」は、他の核酸分子を共有的に連結して運搬できる核酸分子の構成要素である。ベクターは、プラスミド、コスミド、人工染色体（artificial chromosomes）およびウイルス要素を含む。ベクターは宿主細胞内で複製するか、宿主DNAに統合される構成要素である。ウイルスベクターは、たとえば、複製損傷レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ・関連ウイルスを含む。遺伝子治療ベクターは哺乳動物のような対象に投与するために考案されるが、対象の細胞はベクター内に含まれた治療用遺伝子を発現できる。

40

【0376】

遺伝子治療ベクターは、5'調節要素、エンハンサー、プロモーター、5'非翻訳領域、信号配列（signal sequence）、3'非翻訳領域、ポリアデニル化部位および3'調節領域のような調節要素を含み得る。たとえば、5'調節要素、エンハンサーまたはプロモーターは治療用ポリペプチドをコーディングするDNAの転写を調節できる。その調節は組織特異的であってもよい。たとえば、調節は目的とする遺伝子の転写を皮質神経または神経膠細胞のような脳細胞；造血細胞または上皮細胞（endothelial）のみに制限できる。他の方途として、調節要素はステロイド、テトラサイクリンまたはそれと類似する外部

50

薬剤に対する反応を含み得る。したがって、治療用ジンクフィンガーポリペプチド（例：VEGFを調節するポリペプチド）の発現の水準および時期は調節できる。

【0377】

遺伝子治療用ベクターは、核酸として、ウイルスの、または非活性化されたウイルスの構成要素として、またはリボソームまたは他の運搬媒介体として伝達されるために製作できる。他の方途として、ウイルスベクターのような遺伝子運搬製剤は遺伝子伝達システムを生成する組換え細胞から生産できる。適切なウイルスベクターにはモロニーレトロウイルス (*Moloney retrovirus*) のようなレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ・関連ウイルス、ヘルペスシンプレックスウイルス (HSV) のようなレンチウイルスなどが含まれる。HSVは神経組織細胞を感染させるのに潜在的に有用である。

10

【0378】

遺伝子治療用ベクターは、たとえば、静脈内注射、局部投与（米国特許第5,328,470号参照）または定位 (stereotactic) 注射 (Chenら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057参照) によって対象生物に投与できる。遺伝子治療製剤は、たとえば、徐放出マトリックスで製剤の放出を遅延または持続させるなど追加的調剤が可能である。治療用組換えトリ-ドメインポリペプチドを提供する一つの方法は、対象生物から抽出された骨髄細胞に遺伝子治療ベクターを挿入することである。たとえば、細胞はレトロウイルス遺伝子治療ベクターを用いて感染され、培地で成長する。一方、治療対象に放射能を照射して骨髄細胞を除去する。治療対象の骨髄は遺伝子治療ベクターに感染した培養細胞でさらに満たされる。治療対象の回復および治療用ポリペプチドの生産は細心に観察される。

20

細胞 - 基盤治疗方法は、培養細胞にプロモーターと作動可能に連結された人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸を導入することを含む。人工ジンクフィンガータンパク質は培養細胞内の内生遺伝子を調節するか、培養細胞に目的とする表現型を生産するように選別できる。また、形質転換遺伝子の挿入のような核酸組換えを用いて幹細胞のような細胞を修飾することが可能であり、形質転換遺伝子は内生遺伝子を調節する人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングする。修飾された幹細胞は対象生物に投与できる。インビトロ内の幹細胞の培養方法は米国特許出願第2002-0081724号に記述されている。特定例において、幹細胞は対象生物の体内で分化するように誘導でき、形質転換遺伝子を発現する。たとえば、幹細胞は、肝、脂肪または骨筋肉細胞に分化できる。幹細胞は、肝、脂肪、骨筋肉細胞のような目的とする組織形態の細胞を生産する系列から由来できる。

30

【0379】

他の実施態様において、本願に記述されているように、人工ジンクフィンガータンパク質を発現するか、または発現可能な組換え細胞は代替療法で治療対象に使用できる。たとえば、プロモーター（例：ステロイドホルモン受容体 - 調節プロモーターのような誘導プロモーター）に作動可能に連結された人工ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸はヒト、またはブタ組換え細胞のような哺乳動物などの非ヒト細胞に導入できる。細胞は培養され、アルギン酸ポリリジンのような生物学的親和性物質にカプセル化され、治療対象に移植できる (Lanza (1996) Nat. Biotechnol. 14:1107; Jokiら (2001) Nat. Biotechnol. 19:35; および米国特許第5,876,742号参照)。人工ジンクフィンガータンパク質が分泌タンパク質をコーディングする内生遺伝子を調節する実施態様において、分泌ポリペプチドの生産は治療対象に薬物（例：ステロイドホルモン）を投与することによって調節できる。

40

【0380】

また他の態様において、人工ジンクフィンガータンパク質を発現するか、発現できる組換え細胞はインビトロで培養される。組換え細胞によって生産されるタンパク質は細胞または細胞周囲の培養液から回収（例：分離）できる。

【0381】

タンパク質生産変化の標的

50

【0382】

一実施態様において、核酸ライブラリーは、少なくとも一つの特定の標的タンパク質の生産、合成または活性を変化させる人工ジンクフィンガータンパク質を同定するためにスクリーニングされる。変化は標的タンパク質の活性または量を増加または減少できる。スクリーニングの対象である表現型は少なくとも一つの標的タンパク質の変化した生産または活性が関係あるか、それ自体の生産または活性水準である。たとえば、内生標的遺伝子の調節配列（例：プロモーター）の統制下に、レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ、L a c Z、またはG F P コーディング遺伝子などの遺伝子）を活性化または抑制する人工転写因子に対する核酸ライブラリースクリーニングが可能である。ある代表的なタンパク質は次を含む：細胞表面タンパク質（例：糖鎖化した表面タンパク質）、癌関連タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、ペプチドホルモン、神経伝達体（neurotransmitter）、細胞表面受容体（例：細胞表面受容体リン酸化酵素、7つの膜透過性受容体、ウイルス受容体および共受容体（co-receptor））、細胞外構造体結合タンパク質、細胞-結合タンパク質および病原性抗原（例：バクテリア抗原、マラリア抗原など）。標的タンパク質には、エノラーゼ(enolases)、サイトクロムP 450、アシルトランスフェラーゼ(acyltransferases)、メチラーゼ(methylases)、T I M障壁酵素(TIM barrel enzymes)およびイソメラーゼ(isomerases)などが含まれる。

【0383】

さらに細分化した例としては次を含む：インテグリン、細胞接合分子または「C A M」（例：カドヘリン、セレクチン、N - C A M、E - C A M、U - C A M およびI - C A Mなど）；タンパク質分解酵素（例：ズブチリシン、トリプシン、キモトリプシン；ウロキナーゼまたはヒト組織-型プラスミノゲン活性化酵素のようなプラスミノゲン）；ボンベシン(bombesin)；因子IX、トロンビン；C D - 4；血小板-誘導成長因子；インシュリン-類似成長因子-I および-II；神経成長因子；纖維芽細胞成長因子（例：a F G F およびb F G F）；内皮成長因子(E G F)；V E G F a；形質転換成長因子(T G F - およびT G F -)のようなT G F；インシュリン-類似成長因子結合タンパク質；赤血球生成促進因子；血小板生成促進因子；ムチン；ヒト血清アルブミン；成長ホルモン（例：ヒト成長ホルモン）；プロインシュリン、インシュリンA-鎖およびインシュリンB-鎖；副甲状腺ホルモン；甲状腺促進ホルモン；チロキシン；卵胞促進ホルモン；カルシトニン；心房性ナトリウム排泄增加タンパクA、B またはC；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子V I I I；造血成長因子；組織壊死因子（例：TNF- およびTNF- ；エンケファリナーゼ；ミューラー管抑制物質；性腺刺激ホルモン-関連ペプチド；組織因子タンパク質；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；ホルモンまたは成長因子受容体；リウマチ因子；骨誘導因子；インターフェロン（たとえば、インターフェロン- , , , ）；コロニー促進因子(C S F s)（たとえば、M - C S F、G M - C S F およびG - C S F）；インターロイキン(I L s)（たとえば、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4など；崩壊促進因子；および免疫グロブリン。いくつかの実施態様においては、標的は癌のような疾病に関わっている）。

【実施例】

【0384】

以下、本発明を下記実施例によってさらに詳細に説明する。ただし、これらは本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲を制限しない。

【0385】

実施例1：ジンクフィンガーライブラリーの構築

一例において、サッカロマイセス・セレビジエー(Saccharomyces cerevisiae)の様々な表現型は、ジンクフィンガータンパク質(Z E P)発現ライブラリーを用いて遺伝子発現を調節することによって変化させる。このような代表的なライブラリーのジンクフィンガータンパク質は3または4個のジンクフィンガードメイン(Z F D s)からなり、各々9 - ~ 1 2 - 塩基対のD N A配列を認識する。キメラジンクフィンガータンパク質は標的遺伝子の先駆的知識がなくても同定される。互いに異なる3つの転写因子種類はライブラ

10

20

30

40

50

リー内のZFPから生産される：ZFPがプロモーター領域の近い部位に結合する場合、単離されたZFP自体が効果的な転写リプレッサーとして機能し；また、ZFPは転写活性化または阻害のために、転写活性化ドメインまたは抑制ドメインに融合したタンパク質として発現される。

【0386】

本発明では、3-フィンガーまたは4-フィンガーリングフィンガータンパク質を作成するため、モジュールビルディングブロックとして40個の異なるジンクフィンガードメインを用いた。これらの最大限界値として、3-フィンガーZFPライブラリーは64,000(=40³)配列を、4-フィンガーZFPライブラリーは2,560,000(=40⁴)配列を有する。

10

【0387】

これらのZFP発現プラスミドのライブラリーを酵母細胞内に形質転換させた。各々の形質転換細胞において、異なるZFP転写因子が発現され、ゲノム上の任意の標的遺伝子を調節した。このような遺伝子発現パターンの変化は表現形質の変化を引起す。多数の形質転換細胞をスクリーニングして目的とする表現型を有する單一クローンを分離できる。さらに、調節された標的遺伝子は、遺伝子発現プロファイル（例：DNAマイクロアレイ分析を通じて）のゲノム-範囲分析によって同定できるか、形質転換体に導入されたジンクフィンガータンパク質を同定した後標的DNA配列に対するインシリコ（*in silico*）予測で同定できる。

【0388】

(1) 酵母菌株

使用したS.セレビジエー菌株は、YPH499a(MATa, ade2-101, ura352, lys2-801, trp1-63, his3-200, leu2-1, GAL+)である。酵母細胞の形質転換は酢酸リチウム形質転換法（Gietzら、(1992) Nucl. Acids Res 20:1245）を用いて行った。

20

【0389】

(2) p3プラスミドの製作

ジンクフィンガータンパク質のライブラリーを製作するのに用いられる親ベクター（parental vector）はp3プラスミドである。p3は次のような方法でpCDNA3ベクター（インビトロジェン，San Diego CA）を操作して製作した。pCDNA3ベクターを HindIIIおよびXholで切断した。相応するオーバーハング（overhangs）を有する合成重複部位オリゴヌクレオチドを切断されたpCDNA3に連結した。重複部位はヘマグルチニン（HA）標識および核位置信号（nuclear localization signal）をコーディングする核酸を含む。また、重複部位は、BamHI、EcoRI、NotIおよびBglIIに対する制限酵素切断部位と終結コドンを含む。ベクター内のSV40由来のXmaI部位は、XmaI切断、切断されたオーバーハンの端部を充填し、また両末端をさらに連結することによって破壊した。

30

【0390】

(3) pYCT-Libプラスミドの製作

本発明では、酵母におけるジンクフィンガータンパク質の条件的発現のための親ベクターとしてpYCT-Libを用いた。pYCT-Libは誘導GAL1プロモーター（図1）を含む酵母シャトルベクターである。他の特徴としては、(i)核位置信号（NLS）およびヘマグルチニン（HA）標識、および(ii)トリプトファンのない合成最小培地でプラスミド含有細胞の選別のためのTRP1遺伝子を含む配列を挙げることができる。

40

【0391】

T7プライマー部位からSpbI部位にポリリンカーリング領域は次の配列を含み得る：

【0392】

```
TAATACGACTCACTATAAGGGAAATTAAAGCTAAGCTCACCC
ATGGGTAAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATT
CTACACAAAGCTATGGGTGCTCCCTCCAAAAAGAAGAGAAA
```

50

GGTAGCTGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAA
ATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGGCAT
GCATCTA (配列番号：135)

【0393】

pYCT-Libは次のように製作した。酵母発現プラスミドpYESTrp2 (In vitrogen, San Diego CA) はNgoM4によって切断した後、ベクターから2μori断片を除去するためにPstIで部分切断した。切断されたNgoM4-PstIからの5.0kb DNA断片はゲル電気泳動後分離し、pRS313 (前方向プライマー：5'-CGATCTGCAGGG TCCCTTTCATCACAGTGTGCT-3' (配列番号：136)、逆方向プライマー：5'-CGATCGATGCCGG CGGGACG GATCGCTTGCC (配列番号：137))から増幅されたCEN-ARS断片と結合した。

【0394】

B42活性化ドメインをコーディングするDNAセグメントはNcoIおよびBamHIで切断して除去し、これにV5エピトープ標識および核位置信号をコーディングするDNA断片を置換導入した。該DNA断片はpYESTrp2からPCR増幅 (前方向プライマー：5'-AATTCCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCC-3' (配列番号：138)、逆方向プライマー：5'-AATTGGATCCAGCTACCTTCTCTTCTT-3' (配列番号：139)) し、これをNcoIおよびBamHI制限部位に結合した。このプラスミドをpYTC-Lib (図1)と命名した。

【0395】

(4) pYCT-Lib-Gal4プラスミド製作

pYCT-Lib-Gal4を製作するために、Gal4活性化ドメインは酵母ゲノムDNA (前方向プライマー：5'-AAGGAAGGAAAGGAAGGCCGCGCAG CCAAATTTAACAAAGTGG-3' (配列番号：140)、逆方向プライマー：5'-ACATACATGCATGCCGTTACTAGTGGATCC-3' (配列番号：141))からPCR-増幅し、pYCT-LibのNotIおよびSphI認識部位に挿入してpYTC-Lib-Gal4を製作した。Gal4活性化ドメインをコーディングする代表的配列および連結配列は次を含む：

【0396】

【化2】

GGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCA
CCAATTTAACAAAGGGATATTGCTGATAGCTATTGCTCTTCACTTC
ACTAACAGTAGCAACGGTCCGAACCTCATAACAACCAAACAAATTCTCAAG
CGCTTCAACCAATTGCCTCTAACGTTCATGATAACTTCATGAATAAT
GAAATCACGGTAGAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAAACCACTGTCAC
CTGGTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTGGAATCACTACAGGGAT
GTTAACCAACTACAATGGATGATGTATAACTATCTATTGATGATGAAG
ATACCCCCACCAACCCAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGT
TCCAGATTACGCTAGCTAAGGATCCACTAGTAACGGCGCATGCATCTAGAGG
GCC

(配列番号:142)

【0397】

(5) pYCT-Lib-Ume6プラスミドの製作

10

20

30

40

50

p Y C T - L i b - U m e 6 を製作するために、S. セレビジエ - U m e 6 の 5 0 8 ~ 5 9 4 のアミノ酸をコーディングするDNA断片を酵母ゲノムDNA（前方向プライマー：5' - A A G G A A G G A A G G A A G C G G C C G C A A A T T C T G C A T C T T C A T C T A C C - 3'（配列番号：143）、逆方向プライマー：5' - A C A T A C A T G C A T G C T G T A G A A T T G T T G C T T T C G - 3'（配列番号：144））から増幅し、p Y C T - L i b の N o t I および S p h I 認識部位の間に挿入した。この 8 7 - アミノ酸領域は転写抑制ドメインとして機能する（KadoshおよびStruhl（1997）Cell 89:365-371）。U m e 6 抑制ドメインをコーディングする代表的配列および連結配列は次の配列を含む：

【0398】

10

【化3】

```
GGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCAA
ATTCTGCATCTTCATCTACCAAACATAGACGACGACTTGGGTACAGCAGCAGCA
GTGCTATCAAACATGAGATCATCCCCATATAGAACTCATGATAAACCCATTTC
CAATGTCAATGACATGAATAAACACAATCGCGCTCGGTGTGCCGGCTAGTAGG
CCTCATT CGTCATCTTTCCATCAAAGGGTGTCTTAAGACCAATTCTGTTACGT
ATCCATAATTCCGAACAAACAACCCATTTCGAAAGCAACAAATTCTACAGCATG
CATCTAGAGGGCC
```

(配列番号:145)

20

【0399】

(6) ライブライバーの製作

3つのZFDのアレイを有するジンクフィンガータンパク質をコーディングする、3 - フィンガータンパク質ライブライバー（「3 - F ライブライバー」）は40個の異なるZFDまたは「フィンガー」をコーディングする核酸から製作した。4 - フィンガータンパク質ライブライバー（「4 - F ライブライバー」）は27個の異なるZFDをコーディングする核酸から製作した（下記表2）。

【0400】

30

【表2】

表2: 3-フィンガーまたは4-フィンガ-ZFPライブリの製作に用いられたシンクフィンガードメイン

ドメイン名	根源	標的部位	アミノ酸配列	配列番号	ライブリー
DSAR	突然変異1	GTC	FMCTWSYCGKRTDRLSALARHKRTH	146	3F
DSHR	突然変異1	GTC	HICHIQCGKVKYGRDRSHLTRHLRWH	147	3F
DSKR	突然変異1	GGT	FACPECPKRFMDSSKLSRHKTH	148	3F
DSNR	突然変異2	GAC	YACPVESCDRRFSDDSSNLTRHIRIH	149	3F
DSSR	突然変異3	GCC	HICHIQCGKVKYGRDRSSLTRHLRWH	150	3F
HSNK	ヒト	GAC	YCKKECGKAFNHSNNFNKHHRIH	151	3F
HSSR	ヒト	GTT	FKCPVCGKAFRHSSLVLRHORTH	152	3F
ISNR	ヒト	GAA>GAT>GAC	YRKYCDRSFSISSLNLQRHVRNIH	153	3F
KSNR	ヒト	GAG	YCHLCGKAFSKSSNLRRHEMIH	154	3F
QAHR	ヒト	GGA	YKCKECGQAFRQRAHLIRHKLH	155	3F
QFNR	ヒト	GAG	YKCHQCGKAFIQSFNLRRHERTH	156	3F
QGNR	ヒト	GAA	FQCNQCGASFTQKGNLRLRHKLH	157	3F
QNTQ	ショウジョウバエ ⁴	ATA	YTCSYCGKSFTQSNTLKQHTRIH	158	3F
QSHR5	ヒト	GGA>AGA>GAA>CGA	YVCRECGRGFRQHSHLVRHKRTH	159	3F
QSHV	ヒト	CGA>AGA>TGA	YEDDHCGKSFQSSHLNVHKRTH	160	3F
QSNI	ヒト	AAA, CAA	YMCSECGRGFSQKSNLJHHQRT	161	3F
QSNK	ヒト	GAA>TAA>AAA	YKCEECGKAFTQSSNLTKHHKIH	162	3F
QSTR	ヒト	GTA>GCA	YKCEECGKAFNQSSTLTRHKIVH	163	3F
QTHR1	ヒト	GGA>AGA, GAA>TGA, CGA	YCHDCGKSFQSTHLTRHRRIH	164	3F
RDHR1	ヒト	GAG, GGG	FLCQYCAQRFGRKDHLLTRHMKSH	165	3F
RDKR	ヒト	GGG>AGG	YVCDVEGCTWKFARSQDKLNRHKKRH	166	3F
RDNQ	突然変異 ⁶	AAG	FACPECPKRFMRMSDNLTOQHKT	167	3F
SADR	突然変異 ³	AGA	FQCRICMRNFSSPADLTRHIRTH	168	3F
SSNR	ヒト	GAC>GAC	YECKECGKAFSSGSNTRHQRIH	169	3F
TIDR	突然変異 ⁵	ACT	FQCRICMRNFSTHIDLIRHIRTH	170	3F
VSNV	ヒト	AAT>CAT>TAT	YEDDHCGKAFVSNNLNVHRRIH	171	3F
VSTR	ヒト	GCT>GCG	YECNYCGKTFVSSTLIRHQRIH	172	3F
CSNR1	ヒト	GAA>GAC>GAG	YKCKQCGKAFGCPNSLRLHGRTH	173	3F, 4F
DGNV	突然変異 ⁵	AAC	FQCRICMRNFSDSGNLRVHIRTH	174	3F, 4F
QSHR3	ヒト	GGA>GAA	YACHLCGKAFTQCSHLRRHEKTH	175	3F
QSHT	ヒト	AGA, CGA>TGA>GGA	YKCEECGKAFRQSSHLLTHKIIH	176	3F, 4F
QSNR1	ヒト	GAA	FECKDCGKAFQKSNLIRHQRT	177	3F, 4F
QSNV2	ヒト	AAA, CAA	YVCSKCGKAFTOSSNLTVHQKIH	178	3F, 4F
QSSR1	ヒト	GTA>GCA	YKCPDCGKSFQSSSLIRHQRT	179	3F, 4F
QTHQ	ヒト	CGA>TGA, AGA	YCHDCGKSFQSTHLTQHRRIH	180	3F, 4F
RDER1	ヒト	GGG>GTG, GAG	YVCDVEGCTWKFARSDELNRHKKRH	181	3F, 4F
RDHT	ヒト	TGG, AGG, CGG, GGG	FQCKTCQRKFSSRSDHLKTHTRH	182	3F, 4F
RSHR	ヒト	GGG	YKCMEOGKAFNRRSHLTRHQRIH	183	3F, 4F
RSNR	ヒト	GAG>GTG	YICRKCGRGFSRKSNLIRHQRT	184	3F, 4F
VDYK	ショウジョウバエ ⁷	TAT, GAT	FHCGYCEBKSFVSKDYLTKIRTH	185	3F, 4F
VSSR	ヒト	GTT>GCT>GTG>GTA	YTCKQCGKAFSVSSLRRHETH	186	3F, 4F
DGAR	突然変異 ³	GTC	FQCRICMRNFSDPGALVRHIRTH	187	4F
DGHR	突然変異 ³	GGC	FQCRICMRNFSDPGHLVRHIRTH	188	4F
DGNR	突然変異 ³	GAC	FQCRICMRNFSDPGNLKRHIRTH	189	4F
DRDR	突然変異 ³	GCC	FQCRICMRNFSDCRDLARHIRTH	190	4F
MHHE	突然変異 ⁸	TGT	YACPVESCDRRFSMSHLKEHIRTH	191	4F
QASA	突然変異 ⁸	ATA	FQCRICMRNFSSQASLNAHIRTH	192	4F
QGDR	突然変異 ³	GCA, GCC	FQCRICMRNPSSQGDLRRHIRTH	193	4F
QSDR	突然変異 ⁹	GCT	FQCRICMRNFSSQSDLVRHIRTH	194	4F
QGTR	突然変異 ⁸	ACA	FQCRICMRNFSSQRTLTRHIRTH	195	4F
RDTN	突然変異 ⁵	AAG	FQCRICMRNFSSDTSNLNRHIRTH	196	4F
TDKR	突然変異 ³	GGG, GGT	FQCRICMRNFSTADKLSRHIRTH	197	4F
TGNR	突然変異 ³	GAT>GAA	FQCRICMRNFSTSGNLVRHIRTH	198	4F
TIDR	突然変異 ⁵	ACT	FQCRICMRNFSTHIDLIRHIRTH	199	4F

10

20

30

40

【0401】

前記表2の2列の上付きは、1) Zhangら, (2000) J. Biol. Chem. 275:33850-33860;

50

2) RebarおよびPabo(1994) *Science* 263:671-673; 3) Segal (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2758; 4) Gogusら, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:2159-2164; 5) Drierら, (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 29466-29478; 6)Liuら(2001)*J. Biol. Chem.* 276(14):11323-11334; 7) Hsuら, (1992) *Science* 257:1946-50を示す。

【0402】

図7は、様々な3-フィンガータンパク質ライブラリーを構築する方法を示す。各ZFDをコーディングする核酸断片は「単一フィンガー」ベクターを形成するために個別的にp3ベクター内にクローニングされた。同一量の各「単一フィンガー」ベクターを組合せてプールを形成した。プールの一部はAgeIとXhoIで切断して切断されたベクター断片を得た。このベクター断片を30分間脱リン酸化酵素で処理した。プールの他の一部はXmaIとXhoIで切断して单一フィンガーをコーディングするセグメントを得た。AgeIおよびXhoIで切断されたプールから切断されたベクター核酸をXmaIおよびXhoI切断によってベクターから放出された核酸セグメントと結合した。このような結合は、各々2つのジンクフィンガードメインをコーディングするベクターを生成した。大腸菌を形質転換した後、約 1.4×10^4 個の個別形質転換体を得、2-フィンガーライブラリーを形成した。2-フィンガーライブラリーの挿入領域のサイズは40個コロニーのPCR分析によって確認した。ライブラリー構成員の95%は所定のサイズの挿入を示した。

【0403】

3-フィンガーライブラリーを製作するために、単一フィンガーをコーディングするDNAセグメントを2つのフィンガーをコーディングするプラスミドに挿入した。2-フィンガーライブラリーはAgeIおよびXhoIで切断した。2つのジンクフィンガードメインを有する切断されたプラスミドは単一フィンガー（前記と同一な方法でXmaIおよびXhoIで切断された）をコーディングする核酸に結合した。この連結の生成物を大腸菌内に形質転換させて2.4×10⁵個の個別形質転換体を得た。挿入領域の確認でライブラリー構成員が3つのジンクフィンガードメインをコーディングする配列を優勢に有することを確認した。

【0404】

4-フィンガーライブラリーを製作するために、2-フィンガードメインをコーディングするDNAセグメントを、2-フィンガーをコーディングするプラスミドに挿入した。2-フィンガーライブラリーはXmaIおよびXhoIで切断し、2-フィンガードメインをコーディングする核酸セグメントを得た。2-フィンガーライブラリーはまたAgeIおよびXhoIで切断し、切断されたプラスミドプールを得た。2つのジンクフィンガードメインをコーディングする核酸配列を含有する切断されたプラスミドは2つのジンクフィンガードメインをコーディングする核酸セグメントに連結して異なる組合せの4-フィンガータンパク質を生成した。この連結の生成物を大腸菌内に形質転換させて約 7×10^6 の個別形質転換体を生成した。

【0405】

(7) 酵母内の発現のためのライブラリーの製作

3-フィンガー(3-F)および4-フィンガー(4-F)ライブラリーをpYTC-Lib、pYTC-Gal4およびpYTC-Ume6のEcoRIおよびNotI部位にサブクローニングした。このサブクローニングの段階では、転写調節ドメインを有するか、有しない3および4つのフィンガーZFPをコーディングする6つの異なるライブラリーが生成された。大腸菌での増幅後、各ライブラリーは酢酸リチウムを用いて酵母菌株であるYPH499a内に形質転換させた。形質転換は約 1.5×10^7 コロニーを生成した。ライブラリーの挿入領域のサイズは50コロニーのPCR分析で確認した。95%のライブラリー構成員は正確な挿入サイズを含んでいた。形質転換体はTE緩衝溶液に再懸濁し、-80でグリセロールに保管した。

【0406】

実施例2：ガラクトース培地上の成長・欠陥形質転換体

10

20

30

40

50

酵母細胞の成長を損なうキメラジンクフィンガータンパク質を同定するために3-Fライブラーをスクリーニングした。このスクリーニングはキメラジンクフィンガータンパク質を条件的に発現させるためにGALプロモーターを使用する。従来の研究は、過発現時に致命的な遺伝子を同定するために、酵母cDNAおよびゲノムDNA配列にGALプロモーターを使用した(Liuら, (1992) *Genetics* 132:665-673; Ramerら(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11589-11593; Espinetら, (1995) *Yeast* 11:25-32; Akadaら, (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254: 267-274; Stevensonら, (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 3946-3951)。

【0407】

酵母菌株YPH499aは3-Fライブラーから核酸で形質転換させた。形質転換体を、トリプトファンを欠き、グルコースを含有する合成最小培地が入っているプレート上で30℃で2日間成長させた。これらの各グルコースプレートはガラクトースプレートおよび第2のグルコースプレート上に複製・培養した。複製プレートは30℃で一晩培養した。その後、各ガラクトースプレートをそれに相応するグルコースプレートと比較した。ガラクトース上で成長しなかったが、グルコース上で成長したコロニーを同定した。このコロニーをグルコースプレートから回収し、さらにガラクトース培地上にストリーキング(streaking)して再試験を行った。再試験された各コロニーからライブラープラスミドを得た。プラスミドの成長欠陥がジンクフィンガータンパク質の発現によるものであるかを確認するためにYPH499a内に再質転換させた。如何なるジンクフィンガータンパク質もコーディングしない2つのベクタープラスマドpYTCとpYTC-Lib-Gal4ベクター对照群(0.2%)で得られた値と類似するか、遙かに高かった。

【0408】

表3から分かるように、3-Fと4-Fライブラーから形質転換体の0.7%~2.8%はガラクトース培地で成長できなかった。このような百分率は、对照群pYTC-Libベクター対照群(0.1%)およびpYTC-Lib-Gal4ベクター対照群(0.2%)で得られた値と類似するか、遙かに高かった。

【0409】

【表3】

表3: ガラクトース培地での増殖一欠陥形質転換体の比率

ライブライマー	グルコース培地でのコロニー数(A)	ガラクトース培地でのコロニー数(B)	成長一欠陥突然変異の比(B/A × 100)
3-フィンガー	5,820	42	0.7
3-フィンガー+Gal4AD	7,428	206	2.8
3-フィンガー+Ume6RD	8,400	78	0.93
PYTC-Lib ベクター	2,690	3	0.1
PYTC-Lib-Gal4 ベクター	2,750	6	0.2

10

20

30

40

【0410】

グルコース上で成長 - 欠陥を示す 10 個のコロニーからプラスミドを回収した。プラスミド (L1 ないし L10) を酵母細胞内に再形質転換させた。10 個のプラスミドをすべて再試験した。回収されたプラスミドで形質転換された細胞はグルコース培地では成長したが、ガラクトース培地では成長できなかった。このような 10 個のプラスミドによってコーディングされたジンクフィンガータンパク質を DNA 配列分析 (表 4) によって分析した。これらのタンパク質に対する潜在的標的 DNA 結合部位は構成要素ジンクフィンガードメインの結合特異性に関する情報から類推した。

【0411】

【表4】

表4：増殖一欠陥形質転換体から単離されたプラスミドがコーディングするZFP

順序	ZFD名 (NからC)			潜在的標的部位
	1	2	3	
L1	RSHR	CSNR1	RDHT	5'-NGG GAV GGG-3' (配列番号: 200)
L2	RSNR	RDHT	TDKR	5'-GGK NGG GAG-3' (配列番号: 201)
L3	RDHT	QSHR3	RDHT	5'-NGG GRA NTT-3' (配列番号: 202)
L4	QSDR	RDHT	RSNR	5'-GAANGG GCT-3' (配列番号: 203)
L5	CSNR1	RTDN	VSSR	5'-GTD AAG GAV-3' (配列番号: 204)
L6	RDHT	RDHT	RDER1	5'-GHG NGG KGG-3' (配列番号: 205)
L7	QSNR1	RTDN	QTHQ	5'-HGA AAG GAA-3' (配列番号: 206)
L8	TGNR	RDER1	RDHT	5'-NGG GHG GAW-3' (配列番号: 207)
L9	QSSR1	RDHT	QTHQ	5'-HGA NGG GYA-3' (配列番号: 208)
L10	QSSR1	RDHT	QSNR1	5'-GAA NGG GYA-3' (配列番号: 209)

【0412】

実施例3：抗菌薬物に対する抵抗性

ケトコナゾール (Ketoconazole) は経口吸収される抗菌性 (antimycotic) イミダゾール (imidazole) 薬剤である。これは特定の粘膜の治療のために投与できる。ケトコナゾールは酵母および他の真菌類においてエルゴステロール (ergosterol) の生合成を遮断し (Burdenら, (1989) Phytochemistry 28:1791-1804)、細胞の代謝に追加的効果を示す (Keillyら, (1992) In Fernandes, P. B. (Ed.) New Approaches for Antifungal Drug, Birkhauser, Boston, pp.155-187)。

【0413】

ケトコナゾールに対する試験菌株 YPH499a の真菌抵抗 (fungistatic) 反応を確認するために、YPH499a 菌株 10^7 細胞を異なる濃度の薬剤を含有する合成培地上に塗布した。本発明者らは、 $35 \mu M$ のケトコナゾールが YPH499a 細胞の増殖を阻害することを確認し、ケトコナゾール - 抵抗酵母コロニーをスクリーニングするためにこのような濃度を使用した。

【0414】

3 - フィンガーおよび4 - フィンガーライブラーからプラスミドを含有する 1 × 1 0

10

20

30

40

50

⁷ 酵母細胞を、ジンクフィンガータンパク質の発現を誘導するために、2%ガラクトース含有合成培養液で30⁻¹、3時間培養し、その後、35 μMケトコナゾール(ICN Biomedicals)を含有する合成ガラクトースアガプレートに塗布した。30⁻¹で4日間培養した後、35 μMケトコナゾールを含有するガラクトース培地上に約120個のクローニーを形成した。これらのケトコナゾール抵抗性酵母クローニーを採取して35 μMケトコナゾールを含有する新鮮な合成ガラクトース寒天プレートにストリーキングした。120個の抵抗性クローニーのうち、23個のクローニーを無作為に選別した。各々の23個のクローニーに対して、抵抗表現型はプラスミド回収で確認した。プラスミドを分離して増幅のために大腸菌内に形質転換させ、酵母菌株であるYPH499a内に再形質転換させた(Ausubelら(Eds)(1995) Current Protocols in Molecular Biology John WileyおよびSons Ltd, New York)。同じ数の形質転換体を、35 μMケトコナゾールを含有するか、含有しない合成ガラクトース寒天プレートにスポット(spot)した。再形質転換体は、薬剤抵抗性がジンクフィンガータンパク質のガラクトース-誘導発現によって誘導されたものであるかを確認するために、ケトコナゾールを含有するか、含有しない合成グルコース寒天プレートにまたスポットした。

10

20

【0415】

一つの実験において、各形質転換体から 5×10^4 細胞を順次希釈し(10⁻¹、10⁻²および10⁻³倍)、35 μMのケトコナゾールを含有するか、含有しないガラクトースまたはグルコース供給された培地にスポットした。細胞の成長を30⁻¹で4日後観察し、同じプレート上の対照群と比較した。対照群は、ケトコナゾールの抵抗性を誘導しないジンクフィンガータンパク質をコーディングするプラスミドおよびジンクフィンガータンパク質をコーディングする挿入体を有しないpYTC-Libプラスミドを含んでいた。23個のすべての場合において、回収されたプラスミドを再試験した。さらに、ケトコナゾール抵抗性をただガラクトース培地に塗布された細胞のみで観察し、これにより、ジンクフィンガータンパク質の発現がケトコナゾール抵抗性を誘導することが分かる。

30

【0416】

ケトコナゾール抵抗形質転換体から分離されたプラスミドの塩基配列を分析し、酵母ゲノム内の予想標的配列を予測した(表5)。11個のユニークなクローニーが同定された(表5)。

【0417】

【表5】

表5: ケトコナゾール抵抗性を誘発するZFPs

順序	ZFD内(NからC)				機能ドメイン	暫定的標的部位	分離物 ⁽¹⁾ の数
	#1	#2	#3	#4			
K1	QSHV	QFNR	RSHR	-	UME6	5'-GGG GAG HGA-3' (配列番号: 210)	3
K2	RSNR	RSNR	QSSR1	QSHT	UME6	5'-HGA GYA GAG GAG-3' (配列番号: 211)	1
K3	RSNR	RSNR	QGTR	QSHR5	UME6	5'-GRA ACA GAG GAG-3' (配列番号: 212)	2
K4	RSNR	RSNR	QGTR	QTHQ	UME6	5'-HGA ACA GAG GAG-3' (配列番号: 213)	1
K5	VSSR	DGNV	VSSR	VDYK	GAL4	5'-KAT GTD AAC GTD-3' (配列番号: 214)	2
K6	MHHE	QSNR1	VSSR	QGDR	GAL4	5'-GCA GTD GAA TGT-3' (配列番号: 215)	3
K7	DGNV	QSHT	QSSR1	DGHR	GAL4	5'-GGC GYA HGA AAC-3' (配列番号: 216)	3
K8	DGAR	RDTN	QTHQ	RDTN	-	5'-AAG HGA AAG GTG-3' (配列番号: 217)	1
K9	RDHT	QTHQ	QSHT	DGNV		5'-AAC HGA HGA NGG-3' (配列番号: 218)	1
K10	RDHT	QTHQ	QSHT	-		5'-HGA HGA NGG-3' (配列番号: 219)	5
K11	RDHT	QSHV	QSHV	-		5'-HGA HGA NGG-3' (配列番号: 220)	1

注) ⁽¹⁾ 23個の分離されたケトコナゾール抵抗性形質転換体中のZFPが分離され

た数

10

20

30

40

50

【0418】

このようなタンパク質のアミノ酸配列を下記に示す(ジンクフィンガードメインは下線で表示し、転写調節ドメインを[]内に示す)。K1: Q S H V - Q F N R - R S H R - U m e 6 は次のアミノ酸配列を含む:

【0419】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p Y E C
D H C G K S F S Q S S H L N V H K R T H T G E K P Y K C H Q C G K A F I Q S F N
L R R H E R T H T G E K P Y K C M E C G K A F N R R S H L T R H Q R I H A A A A
[N S A S S S T K L D D D L G T A A A V L S N M R S S P Y R T H D K P I S N V N
D M N N T N A L G V P A S R P H S S S F P S K G V L R P I L L R I H N S E Q Q P
I F E S N N S T A C I] (配列番号: 221)

【0420】

K2: R S N R - R S N R - Q S S R 1 - Q S H T - U m e 6 は次のアミノ酸配列を含む:

【0421】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p Y I C
R K C G R G F S R K S N L I R H Q R T H T G E K P Y I C R K C G R G F S R K S N
L I R H Q R T H T G E K P Y K C P D C G K S F S Q S S S L I R H Q R T H T G E K

P Y K C E E C G K A F R Q S S H L T T H K I I H A A A A [N S A S S S T K L D D
 D L G T A A A V L S N M R S S P Y R T H D K P I S N V N D M N N T N A L G V P A
 S R P H S S S F P S K G V L R P I L L R I H N S E Q Q P I F E S N N S T A C I]
 (配列番号 : 222)

【 0 4 2 2 】

K 3 : R S N R - R S N R - Q G T R - Q S H R 5 - U m e 6 は次のアミノ酸配列を含む :

【 0 4 2 3 】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p y I C
 R K C G R G F S R K S N L I R H Q R T H T G E K P Y I C R K C G R G F S R K S N
 L I R H Q R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S Q R G T L T R H I R T H T G E K
 P Y V C R E C G R G F R Q H S H L V R H K R T H A A A A [N S A S S S T K L D D
 D L G T A A A V L S N M R S S P Y R T H D K P I S N V N D M N N T N A L G V P A
 S R P H S S S F P S K G V L R P I L L R I H N S E Q Q P I F E S N N S T A C I]
 (配列番号 : 223)

【 0 4 2 4 】

K 4 : R S N R - R S N R - Q G T R - Q T H Q - U m e 6 は次のアミノ酸配列を含む :

【 0 4 2 5 】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p y I C
 R K C G R G F S R K S N L I R H Q R T H T G E K P Y I C R K C G R G F S R K S N
 L I R H Q R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S Q R G T L T R H I R T H T G E K
 P Y E C H D C G K S F R Q S T H L T Q H R R I H A A A A [N S A S S S T K L D D
 D L G T A A A V L S N M R S S P Y R T H D K P I S N V N D M N N T N A L G V P A
 S R P H S S S F P S K G V L R P I L L R I H N S E Q Q P I F E S N N S T A C I]
 (配列番号 : 224)

【 0 4 2 6 】

K 5 : V S S R - D G N V - V S S R - V D Y K - G a l 4 は次のアミノ酸配列を含む :

【 0 4 2 7 】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p y T C
 K Q C G K A F S V S S S L R R H E T T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D S G N
 L R V H I R T H T G E K P Y T C K Q C G K A F S V S S S L R R H E T T H T G E K
 P F H C G Y C E K S F S V K D Y L T K I R T H A A A A [N F N Q S G N I A D S S
 L S F T F T N S S N G P N L I T T Q T N S Q A L S Q P I A S S N V H D N F M N N
 E I T A S K I D D G N N S K P L S P G W T D Q T A Y N A F G I T T G M F N T T T
 M D D V Y N Y L F D D E D T P P N P K K E I S M A Y P Y D V P D Y A S] (配列番号 : 225)

【 0 4 2 8 】

K 6 : M H H E - Q S N R 1 - V S S R - Q G D R - G a l 4 は次のアミノ酸配列を含む :

【 0 4 2 9 】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p y A C
 P V E S C D R R F S M S H H L K E H I R T H T G E K P F E C K D C G K A F I Q K
 S N L I R H Q R T H T G E K P Y T C K Q C G K A F S V S S S L R R H E T T H T G
 E K P F Q C R I C M R N F S Q S G D L R R H I R T H A A A A [N F N Q S G N I A
 D S S L S F T F T N S S N G P N L I T T Q T N S Q A L S Q P I A S S N V H D N F
 M N N E I T A S K I D D G N N S K P L S P G W T D Q T A Y N A F G I T T G M F N
 T T T M D D V Y N Y L F D D E D T P P N P K K E I S M A Y P Y D V P D Y A S] (配列番号 : 226)

10

20

30

40

50

【0430】

K7 : D G N V - Q S H T - Q S S R 1 - D G H R - G a l 4 は次のアミノ酸配列を含む：

【0431】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p F Q C
 R I C M R N F S D S G N L R V H I R T H T G E K P Y K C E E C G K A F R Q S S H
L T T H K I I H T G E K P Y K C P D C G K S F S Q S S S L I R H Q R T H T G E K
P F Q C R I C M R N F S D P G H L V R H I R T H A A A A [N F N Q S G N I A D S
S L S F T F T N S S N G P N L I T T Q T N S Q A L S Q P I A S S N V H D N F M N
N E I T A S K I D D G N N S K P L S P G W T D Q T A Y N A F G I T T G M F N T T
T M D D V Y N Y L F D D E D T P P P N P K K E I S M A Y P Y D V P D Y A S] (配列番号：227)

10

【0432】

K8 : D G A R - R D T N - Q T H Q - R D T N は次のアミノ酸配列を含む：

【0433】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p F Q C
 R I C M R N F S D P G A L V R H I R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S R S D T
L S N H I R T H T G E K P Y E C H D C G K S F R Q S T H L T Q H R R I H T G E K
P F Q C R I C M R N F S R S D T L S N H I R T H A A A A A R G M H L E G R I M (配列番号：228)

20

【0434】

K9 : R D H T - Q T H Q - Q S H T - D G N V は次のアミノ酸配列を含む：

【0435】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p F Q C
 K T C Q R K F S R S D H L K T H T R T H T G E K P Y E C H D C G K S F R Q S T H
L T Q H R R I H T G E K P Y K C E E C G K A F R Q S S H L T T H K I I H T G E K
P F Q C R I C M R N F S D S G N L R V H I R T H A A A A A R G M H L E G R I M (配列番号：229)

30

【0436】

K10 : R D H T - Q T H Q - Q S H T は次のアミノ酸配列を含む：

【0437】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p F Q C
 K T C Q R K F S R S D H L K T H T R T H T G E K P Y E C H D C G K S F R Q S T H
L T Q H R R I H T G E K P Y K C E E C G K A F R Q S S H L T T H K I I H A A A A
R G M H L E G R I M (配列番号：230)

30

【0438】

K11 : R D H T - Q S H V - Q S H V は次のアミノ酸配列を含む：

【0439】

M G K P I P N P L L G L N S T Q A M G A p p k k k r k v g i r i p g e k p F Q C
 K T C Q R K F S R S D H L K T H T R T H T G E K P Y E C D H C G K S F S Q S S H
L N V H K R T H T G E K P Y E C D H C G K S F S Q S S H L N V H K R T H A A A A
R G M H L E G R I M (配列番号：231)

40

【0440】

同一の一般のモチーフ（例：4個のDNA接触残基のセット）を有するジンクフィンガードメインを2個、3個またはそれ以上を含み、前記如何なるタンパク質とも同一な一連の順に整列された残りのジンクフィンガータンパク質はまた真菌細胞に薬剤抵抗性を付与できる。

【0441】

あるクローンはジンクフィンガードメインと類似する構造を含む。K2、K3およびK4の第1および第2のフィンガーは互いに同じである。このようなクローンでは、4個の

50

フィンガーのうち3つが他のタンパク質の相応する位置にあるフィンガーと同じである。これらのZFPの関係がただ偶然ではないだろう($P < 1.6 \times 10^{-5}$)。したがって、K2、K3およびK4 ZFPは生体内の同一の標的部位に結合し、同一の標的遺伝子を調節できる。

【0442】

さらに、K10クローンによってコーディングされるジンクフィンガータンパク質はK9およびK11クローンにコーディングされたものと密接な関連がある。K9、K10およびK11から発見されたQTHQ、QSHTおよびQSHVフィンガーは同じ3-bp

DNA部位: 5'-HGA-3'を認識できる。それらが構造的に類似すると仮定する場合、K9、K10、K11 ZFPsはインビオで同一の標的に結合し、同一の遺伝子を調節できる。関連のあるクローン(例: K2、K3、K4; そして、K9、K10、K11)において、各2つの群を有するすべてのZFPは調節様相が同じ類型を含む。K2、K3、K4クローンは各々Ume6抑制ドメインを含む。K9、K10およびK11クローンは専用転写調節ドメインがなくても各々機能する。

【0443】

少なくとも2つのZFPが細胞内に共形質転換される場合、相乗的または追加的效果を示し得る。たとえば、K4およびK5 ZFPが共発現される場合、酵母細胞はケトコナゾールに対して完全に抵抗性を有することになった。この組合せは約1,000倍の表現形質の増大をもたらす。

【0444】

ZFP突然変異はDNA接触残基を変化させるか、調節ドメインを置換して製作した。一つの突然変異(VSSR-DGAV-VSSR-VDYK-GAL4AD)において、K5の第2のジンクフィンガーのアスパラギンDNAと接触する残基はアラニンに突然変異された。ゲルシフト分析は、このような突然変異されたZFPの予想DNA部位に対する結合力が10倍以上減少することを示す。このような突然変異K5タンパク質は酵母細胞に薬剤抵抗性を付与しない。他の突然変異においては、K5ジンクフィンガータンパク質のGal4活性化ドメインを、それをコーディングするDNA配列前に終結コドンを挿入して削除した。このようなタンパク質もまたケトコナゾール抵抗性を付与しない。類似する結果が他のケトコナゾール抵抗性ZFPからも得られた。

【0445】

K5 ZFPに融合した活性化ドメインがUme6抑制ドメインで置換される場合、Ume6-形タンパク質はケトコナゾール抵抗性表現型を逆にした。Ume6-形タンパク質を発現する細胞は対照細胞に比べてケトコナゾールにさらに敏感にした。このような結果は、目的とする表現型効果を有する転写因子を生産するために、表現型を悪化させる転写因子を選別し、接合調節ドメイン(例:機能的方向性の転換(swapping))を変形させることによって転写因子を選別できることを示す。目的とする形質と異なる反対の形質に対するスクリーニングは目的とする表現型自体をスクリーニングすることよりもさらに容易である。機能的方向性を転換する置換の例としては、一つの調節ドメイン型を他の型または他の調節ドメインで置換することおよび調節ドメインを除去することが含まれる。K5 ZFPの場合、薬剤敏感性を増大させるタンパク質は薬剤抵抗性を増加させるタンパク質をスクリーニングし、その転写活性化ドメインを転写抑制ドメインで置換して得られた。

【0446】

10

20

30

40

【表6】

表6:

ケトコナゾール濃度(μM)	対照群		K5		YLL053C	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
0	100	0	100	0	100	0
5	82.7	4.1569	89.9	15.544	84.167	16.003
10	0.031	0.0044	90.6	5.8207	28.433	7.0002
15	0.0123	0.0021	82.467	7.7106	15.7	11.95
20	0.001	0	50.367	4.7014	2.4	0.1
25			4.2	3.1193	0.0233	0.0058
30			0.0433	0.0058	0.0033	0.0006
35			0.0167	0.0058	0.0013	0.0006

10

20

30

【0447】

薬剤抵抗表現型に関連する遺伝子を同定するためにDNAマイクロアレイ分析を用いた。本発明者らは同一の表現型を付与する異なるZFPが直接的または間接的に表現型と関わる異なる発現を有する同定遺伝子セットを調節すると推論した。3個のZFPの「K5、K6およびK7」を発現プロファイルの分析のために選択した。この3つの転写因子はGal4活性化ドメインを含む。酵母の6400個のオープン・リーディング・フレームのうち、10個が少なくとも2つの異なるZFP転写因子によって2倍以上活性化され、4つの活性化したオープン・リーディング・フレームは試験した3つのすべてのZFP転写因子によって活性化された。4つのオープン・リーディング・フレームはYLL053C、YJR147W、YLL052CおよびYPL091Wである。

【0448】

表7は、少なくとも一つのキメラZFPによって調節された遺伝子の数を示す。

【0449】

【表7】

表7：同等に調節された遺伝子

K5	K6	K7	共同に調節された 遺伝子の数
+	-	-	39
+	+	-	1
+	-	+	2
+	+	+	4
-	+	-	95
-	+	+	3
-	-	+	126

10

【0450】

ケトコナゾールを細胞外に排出すると知られている P D R 5 は 2 つの Z F P である K 6 および K 7 によって活性化され、K 5 によっては活性化されなかった。このような結果は、K 5 が P D R 5 - 無関係な機構でケトコナゾール抵抗性を付与し、酵母においてケトコナゾール抵抗性を誘発するのに少なくとも 2 つの経路が関与することを示す。一つの経路は P D R の活性によるが、もう一つは P D R 5 と関係ない。

20

【0451】

薬剤抵抗表現型に関連する新しい遺伝子を同定するために、本発明者らは 3 つの試験 Z F P 転写因子によって活性化された 4 つの遺伝子中の一つを過発現する細胞の薬剤抵抗表現型を分析した。本発明者らは遺伝子中の一つの「Y L L 0 5 3 C」がその遺伝子の過発現時、ケトコナゾール抵抗性を誘発することを発現した。前記表 6 に示した Y L L 0 5 3 C はカンジダアルビカン (Candida albicans) の細胞膜および水分通路 (water channel) タンパク質と相同する。Y L L 0 5 3 C のアミノ酸配列は次の通りである：

30

【0452】

M W F P Q I I A G M A A G G A A S A M T P G K V L F T N A L G L G C S R S R G L
F L E M F G T A V L C L T V L M T A V E
K R E T N F M A A L P I G I S L F M A H M A L T G Y T G T G V N P A R S L G A A
V A A R Y F P H Y H W I Y W I S P L L G
A F L A W S V W Q L L Q I L D Y T T Y V N A E K A A G Q K K E D (配列番号：23
2)

30

【0453】

カンジダアルビカン (Candida albicans) の水分通路 1 タンパク質 (A Q Y 1) のアミノ酸配列は次の通りである：

40

【0454】

M V A E S S S I D N T P N D V E A Q R P V Y E P K Y D D S V N V S P L K N H M I
A F L G E F F G T F I F L W V A F V I A
Q I A N Q D P T I P D K G S D P M Q L I M I S F G F G F G V M M G V F M F F R V
S G G N L N P A V T L T L V L A Q A V P
P I R G L F M M V A Q M I A G M A A A G A A S A M T P G P I A F T N G L G G G A
S K A R G V F L E A F G T C I L C L T V
L M M A V E K S R A T F M A P F V I G I S L F L G H L I C V Y Y T G A G L N P A
R S F G P C V A A R S F P V Y H W I Y W

50

V G P I L G S V I A F A I W K I F K I L K Y E T C N P G Q D S D A (配列番号 : 2
33)

【0455】

Y L L 0 5 3 C 遺伝子生成物は P D R 5 遺伝子生成物と同様にケトコナゾールを細胞外に排出する作用を通じて抵抗性を付与する。このような結果は、表現型の変化に係る遺伝子が細胞の遺伝子発現プロファイル分析によって同定できることを示す。さらに、遺伝子同定は同一の表現型（本実施例において、ケトコナゾール抵抗性）を誘発する互いに異なるキメラ Z F P の使用によって更に容易になる。

【0456】

実施例 4：熱抵抗性形質転換体スクリーニング

本発明では、酵母細胞に熱抵抗性を付与するタンパク質をコーディングする核酸を同定するために、キメラジンクフィンガーをコーディングするライブラリーをスクリーニングした。

【0457】

3 - フィンガーライブラリーの核酸を含有する 1×10^7 酵母細胞を 2 % ガラクトースを含有する SD 合成培養液で 30 、 3 時間培養した後、 52 で 2 時間徐々に回転培養した。熱処理後、培養液をガラクトース培地に載せ、これを 30 で 5 日間培養した。成長酵母コロニーは熱抵抗表現型を確認するためにガラクトース培養液に希釀させて 52 で 2 時間培養した。これらの細胞からプラスミドを分離して前述の方法で酵母内に再形質転換させた。再形質転換体は 30 ガラクトース培養液で 3 時間培養した後、 52 で 2 時間培養した。培養された再形質転換体は SD ガラクトースアガプレートに 4 段階で希釀してスポットした。熱抵抗性が突然変異体のジンクフィンガータンパク質の発現によって誘導されたことを確認するために、再形質転換体を前記と同様な条件の SD グルコース培養液で培養した後、 SD グルコース寒天プレートにスポットした。 p Y T C ベクターの形質転換体および無作為に選択された 3 - フィンガータンパク質をコーディングするプラスミドを対照群として用いた。

【0458】

熱抵抗酵母細胞はジンクフィンガータンパク質発現プラスミドで形質転換された細胞から同定された。 p Y T C - L i b プラスミドまたは無作為に選定されたジンクフィンガータンパク質をコーディングするプラスミドを含有する野生型細胞を陰性対照群として使用した。総 10^7 細胞をガラクトース培養液で増殖した。ガラクトースはジンクフィンガータンパク質の発現を誘導した。細胞は 52 で 2 時間熱処理した後、最小ガラクトース寒天プレートに移した。 30 で 5 日間培養した後、 26 個のコロニーがプレートで成長した。本発明者らは、このコロニーからプラスミドを回収し、 Y P H 4 9 9 a 内に再形質転換させた。これから様々な程度の熱抵抗性を示す 9 個のクローンを分離した。普通、このようなクローンのジンクフィンガータンパク質発現は熱処理後ガラクトース培地では細胞の 10 % 以上が生存するよう誘導されたが、グルコースでは誘導されなかった。対照プラスミドで形質転換された細胞ではただ 0.3 % のみが同一条件で生存した。新しく成長した形質転換細胞は凍結保管された細胞よりも実験条件でよく生存した。このような結果は特定のジンクフィンガータンパク質の発現が酵母細胞において熱抵抗性を誘導できることを示す。 Z F P は、回収されたライブラリープラスミドの DNA 塩基配列分析で特徴付けられた（表 8 ）。

【0459】

10

20

30

40

【表8】

表8：熱抵抗性形質転換体から分離したプラスミドによってコーディングされる

ZFP

順序	ZFDモチーフの数 (NからC方向)			機能ドメイン	暫定的標的部位
	1	2	3		
H1	ISNR	QSNII	RDHQ	UME6	5'-AAG MAA GAH-3',
H2	QNTQ	QNTQ	HSNK	UME6	5'-GAC ATA ATA-3'
H3	QSHR5	DSHR	DSKR	GAL4	5'-GGT GGC GRA-3'
H4	RDKR	QSTR	QSHR5	GAL4	5'-GRA GYA RGG-3'
H5	RDHR1	QSSR1	QSHR5	UME6	5'-GRA GYA GRG-3'
H6	QAHR	RSHR	RSHR	UME6	5'-GGG GGG GGA-3'
H7	DSNR	RDHT	QNTQ	-	5'-ATA NGG GAC-3'
H8	ISNR	RSNR	RSNR	-	5'-GAG GAG GAH-3'
H9	RDHT	QSNK	QSTR	-	5'-GYA DAA NGG-3'

10

20

30

40

50

【0460】

実施例5：神経突起の生成

本発明者らは、神経細胞タイプに分化できるマウス神経芽細胞腫(neuroblastoma)細胞株Neuro2Aにおいて神経突起形成を誘導するジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸を検索するために核酸ライブラリーをスクリーニングした。本発明者らは、細胞の形態の変化および神経標識遺伝子の発現によって証明することにより神経分化を誘導する新規なキメラZFPを発見した。

【0461】

材料および方法

ライブラリーの製作

前記実施例1に示すように、3-フィンガーおよび4-フィンガー-ZFP-Tfライブラリーを各々40個および25個のジンクフィンガードメインを用いて製作した。3-フィンガーと4-フィンガーライブラリーは各々略9-および12-bp DNA結合部位を認識する。ZFPはp65転写活性化ドメインおよびKRB抑制ドメインとの融合タンパク質として発現された。

【0462】

Neuro2A細胞培養と神経分化

マウス神経芽細胞腫neuro2A細胞は10%FBSと抗生素を含むMEM-培地で37°、95%空気と5%CO₂の湿った空気状態で培養された。細胞は96-ウェルプレートのウェル当たりの8.0×10³細胞になるように分株し、リポフェクタミンプラス試薬(LIPOFECTAMINE PLUS(商標)reagent)(Invitrogen, CA)を用いてZFP 50ngおよびLacZ標識プラスミド20ngと共に製造社の方法に従ってトランスフェクトした。インビトロ分化はレチノイン酸(RA)(10uM)を添加するか、または添加しない条件で行われ、トランスフェクトされていない細胞の数を減らすためにG41

8 (1 m g / m l) をトランスフェクションしてから 2 4 時間後に処理した。細胞を 9 6 時間培養した後固定し、 β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase) の活性を観察するために染色後写真撮影した。 β -ガラクトシダーゼ - 陽性細胞のうち、神経突起の長さが細胞体の直径よりも少なくとも 2 倍以上拡張した場合、分化した細胞とみなした。

【 0 4 6 3 】

結果および考察

神経突起生成を誘導する Z F P - T F のスクリーニング

神経分化を誘導する Z F P - T F をスクリーニングするために、Neuro 2 A 細胞をライプラリープラスミドおよび Lac Z 遺伝子を含む標識プラスミドで一過性トランスフェクトした。Lac Z 発現はトランスフェクトされた細胞の形態を視覚化するのに使用された。分化する細胞は未分化細胞よりも徐々に成長し、未分化細胞が細胞集団で優勢になるので、トランスフェクトされていない細胞を除去するためにトランスフェクションしてから 2 4 時間後に培養細胞に G 4 1 8 を処理した。5 日後、細胞を固定して Lac Z - 染色した。その後、細胞形態的特徴によって細胞を分類した。特に、本発明者らは神経突起の長さおよび太さが増加した細胞を同定した。

【 0 4 6 4 】

本発明者らは神経突起生成を変化させるいくつかの Z F P - T F を同定した。この Z F P - T F は様々な程度に神経突起生成に影響を与えた。Neuro 1 - p 6 5 と命名された Z F P - T F は、誘導される神経突起の長さと厚さの測定値からみると、分化に最も優れた効果を示した。また、Neuro 1 - p 6 5 - トランスフェクトされた Neuro 2 A 細胞の神経突起生成増大を示す標識は 1 0 u M R A (レチノイン酸) で細胞を処理した場合にも観察された。

【 0 4 6 5 】

Neuro 1 - p 6 5 をコーディングする核酸配列およびアミノ酸配列を図 14 に示す。Neuro 1 - p 6 5 核酸は Q S N R 1 - Q S N K - C S N R 1 ジンクフィンガードメインを誘導するキメラ Z F P をコーディングする。同じモチーフを有する他の Z F P および / または Neuro 1 - p 6 5 の結合部位に少なくとも部分的に重なる部位に結合する Z F P もまた分化を調節すると予測した。ジンクフィンガー - D N A 結合部位リスト (表 6 参照) に基づいて、Neuro 1 の予想される結合部位は 5' - G A C G A A G A A - 3' である。

【 0 4 6 6 】

神経突起の生成を誘導するために Neuro 1 - p 6 5 は p 6 5 活性化ドメインを必要とする。K R A B 転写抑制ドメインと融合されたか、または如何なるエフェクタードメインも有しない同一のジンクフィンガードメインは神経突起生成を誘導しない。図 8 および表 9 参照。また、Neuro 1 - p 6 5 (Neuro1-p65mut) のジンクフィンガードメインが有する D N A 結合能力を失うと予想される突然変異によって、神経突起生成を誘導する能力が失われるので Neuro 1 - p 6 5 の D N A 結合能力は重要である。

【 0 4 6 7 】

細胞において Neuro 1 - p 6 5 が発現される間神経標識遺伝子の発現水準を示すために実時間 (Real-time) P C R を用いた。同じように、R A - 処理された細胞と Z F P - T F で処理された細胞間の分化過程の様々な時間ポイント別遺伝子発現パターンを比較するために核酸マイクロアレイ分析を用いた。Neuro 1 - p 6 5 は少なくともインビトロで神経芽細胞腫細胞が分化するのに必須的な経路を活性化させ得る。

【 0 4 6 8 】

10

20

30

40

【表9】

表9：神経突起を示す細胞の百分率

構造体(construct)	RAなし	RA 10uM
PCDNA3 (ベクター)	5.77±1.99	14.93±7.69
08_D1-p65	42.39±5.56	41.59±6.46
08_D1mut-p65	5.25±0.71	NA
08_D1 alone	5.85±4.44	NA
08_D1-KRAB	4.46±0.57	NA

10

【0469】

実施例6：骨細胞生成

C2C12細胞は筋芽細胞(myoblast)系列から由来するが、骨形成タンパク-2(BMP-2)(Katagiri, T.ら, (1994) J. Cell. Biol. 127, 1755)の存在下で骨芽細胞(osteoblast)に分化できる。いくつかの天然型転写因子がこのような過程を統制する候補者として同定された(Lee, K.-S.ら, (2000) Mol. Cell. Biol. 20:8783; Nakashima, K.ら, (2002) Cell 108:17)。

20

【0470】

本発明者らはBMP-2が存在しないとき、C2C12筋芽細胞から骨芽細胞に分化転換(transdifferentiation)するように誘導するキメラジンクフィンガータンパク質をスクリーニングした。キメラジンクフィンガータンパク質をコーディングするライプラリーナ酸をC2C12細胞に一過性にトランスフェクトし、BMP-2のない条件で分化転換する細胞をスクリーニングした。トランスフェクトしてから7日後、形質転換細胞を骨芽細胞の標識であるアルカリホスファターゼ(ALP)(Katagiri, T.ら, (1994) J. Cell. Biol. 127:1755)で染色した。

30

【0471】

約2000個のZFP-TFのスクリーニングから、約30%の細胞において強いALP染色を誘導する一つの活性化タンパク質Osteo1-p65を同定した。ALPで染色された細胞の百分率はLacZ染色によって検出されるトランスフェクトされた細胞の百分率と同等であった。このような結果から、本発明者らは、Osteo1-p65転写因子がBMP-2なしにC2C12筋芽細胞から骨芽細胞に分化転換を促進できると結論付けた。

30

【0472】

陽性対照群としては、細胞を1μg/mlのBMP-2で処理した。ほとんど100%の陽性対照群細胞はBMP-2処理によって強いALP染色を示した。BMP-2で処理せず、対照ベクターでトランスフェクトした陰性対照群細胞はただ背景のみが染色された。Osteo1-p65はRDKR-QTHR1-VSTR-RDKRジンクフィンガードメイン(N-末端からC-末端に)からなる4-フィンガータンパク質である。図15を参照。このタンパク質はDNA構成要素5'-GGGGCWRGAGGG-3'(配列番号:234)を認識すると予測される。

40

【0473】

このような実験において、マウス筋芽細胞細胞株であるC2C12は4.5g/Lグルコース、10%FBSおよび抗生剤を含むダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM)で37℃、95%空気および5%CO₂を含む湿った空気条件で保持された。細胞は96-ウェルプレート当たりの1.0×10⁴細胞に分株し

50

た。細胞はリポフェクタミンプラス (LIPOFECTAMINE PLUS (商標)、Invitrogen) を用いて製造社の方法に従ってライプラリー核酸 50 ng をトランスフェクトした。トランスフェクト後 24 時間に、成長培地は 2% FBS を含有する DMEM に取り替え、細胞をさらに 6 日間培養した。

【0474】

C2C12 細胞が骨芽細胞に分化するか否かを調べるため、Katagiri, T. ら、(1994) J. Cell. Biol. 127:1755 に記載の通りに ALP 染色を行った。

【0475】

要約すると (実施例 5 および 6 に従って)、2 つの異なる細胞分化過程を誘導できるタンパク質を発見するために人工転写因子ライプラリーをスクリーニングした。言い換えれば、この方法は特定の幹細胞の生物学的知識を要しない。

【0476】

実施例 7：インシュリン調節

本発明者らは、キメラジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸をヒト 293 細胞株に安定的にトランスフェクトし、形質転換細胞に対する DNA マイクロアレイ分析を用いて各々のキメラジンクフィンガーによって調節された遺伝子を分析した (図 4、5 および 9 を参照)。本発明者らは、ヒトインシュリン遺伝子の発現を 60 倍以上増加させるキメラジンクフィンガータンパク質 (08-D04-p65) を同定した。

【0477】

08-D04-p65 が、異なるヒト細胞株においてインシュリン遺伝子の発現を誘導するかどうかを確認するために、08-D04-p65 をコーディングする核酸を HeLa 細胞に一過性にトランスフェクトし、HeLa 細胞の核酸発現がインシュリン遺伝子の発現を 80 倍に増加させることを確認した。

【0478】

したがって、08-D04-p65、その誘導体および機能的に類似するジンクフィンガータンパク質は糖尿病治療剤として使用できる。08-D04-p65 または機能的に類似するジンクフィンガータンパク質をコーディングする DNA を糖尿病患者にウイルス性運搬またはカプセル化した形態 (例：リボゾーム) で伝達できる。一旦、DNA が細胞に伝達されると、ジンクフィンガータンパク質は発現され、インシュリンの生産を誘導できる。ある実施態様においては、ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸が Tet - 誘導性プロモーターのような誘導プロモーターに作動可能に連結されてもよい。誘導物質として、ドキシサイクリンを用いて、小さい化学物質でインシュリン生産の水準を調節することが可能である。08-D04-p65 のようなインシュリン - 誘導性ジンクフィンガータンパク質は異なるヒト細胞株で作用し得るため、臍臓細胞 (例：ベータ細胞と非ベータ細胞) および非臍臓細胞の両方において作用し得る。

【0479】

インシュリンの酵素の発現工程酵素を誘導する人工転写因子を同定することもまた可能である。細胞はこのような転写因子およびインシュリン遺伝子を誘導する転写因子、例：08-D04-p65 を誘導する転写因子を発現するように操作できる。さらに、インシュリン - 誘導ジンクフィンガータンパク質は生体外細胞治療に使用できる。一つの例として、患者の細胞をインシュリン - 誘導ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸の導入によってインビトロで変形できる。変形細胞は以降患者または他の対象動物に移植できる。

【0480】

材料および方法

ZFP-TF を発現する細胞株の DNA マイクロアレイ分析

ジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸は F1pTRex-293 細胞株 (Invitrogen) に製造者の方法に従って安定的に導入された。要約すると、pLFD-p65 または pLFD-Kid ベクターから切断された HindIII-XhoI 断片を pCDNA5/FRT/TO (Invitrogen CA) にサブクローニングした。この断片はジン

10

20

30

40

50

クフィンガータンパク質をコーディングする配列を含む。結果物として得られたプラスミドは pOG44 (invitrogen) とともに F1pTREx - 293 細胞に共同トランスフェクトした。ドキシサイクリンの誘導下に ZFP - TF を発現する安定した挿入細胞が得られた。

【 0481 】

7458ヒトESTクローニングを含むDNAマイクロアレイはゲノミックトリー (Genomic tree、韓国) から購入した。ZFP - TF を安定的に発現する F1pTREx - 293 細胞は 1 μg / ml ドキシサイクリンの存在下 (+ Dox) または不在下 (- Dox) で 48 時間培養した。総 RNA を各々の試料から得た。- Dox 試料から得られた RNA は標準 (Cy3) として、+ Dox は実験試料 (Cy5) として用いられた。マイクロアレイ分析は製造社の方法に従って行った。中間値の和が 500 以下であるものは赤色で表示し、分析しなかった。10

【 0482 】

特定のジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸は HeLa 細胞においても発現された。08-D04 ZFP を含有する pLFD - p65 はリポフェクタミン (LIPOFECTAMINE) (商標) 2000 (Invitrogen) を用いて HeLa 細胞に一過性にトランスフェクトした。ジンクフィンガータンパク質をコーディングしない pLF D - p65 ベクターは対照群として同等に細胞にトランスフェクトした。

【 0483 】

実施例 8

哺乳動物細胞において標識遺伝子の発現を変化させるタンパク質のコーディング核酸を同定するためにキメラジンクフィンガーをコーディングするライプラリーをスクリーニングした。20

【 0484 】

ライプラリーの製作

4 - および 3 - フィンガータンパク質として、変形 pcdNA3 ベクターである P3 に挿入された 2 種類の ZFP ライプラリーを製造した。このようなライプラリーの製作は前記の方法に従って行った。

【 0485 】

ZFP プラスミドによるトランスフェクション

ヒト胎生期腎臓 293 細胞を 95 % 空気および 5 % 二酸化炭素を含有する湿った空気条件で 10 % FBS の 100 μl DMEM で培養し、96 ウェルプレートのウェルに分株してトランスフェクトの一日前まで育てた。プラスミドは各ライプラリーの個別的方法に従って 293 細胞にトランスフェクトした。MTT 分析のために、機能ドメインが融合したジンクフィンガータンパク質遺伝子を含む 50ng のプラスミドをウェル当たりの 5×10^3 細胞で培養された細胞にトランスフェクトした。SEAP 分析のために、10ng の pSEAP2 - 対照 (クローンテック) プラスミドをウェル当たりの 1×10^4 細胞で培養された細胞に機能ドメインが融合したジンクフィンガータンパク質遺伝子を含む 50ng のプラスミドとともにトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は分析前 3 日間 37 度培養した。3040

【 0486 】

SEAP 分析

トランスフェクトしてから 3 日後に、培地を新しいチューブに移し、65 度 30 分間熱処理して内生アルカリホスファターゼを失活させた。培地 25 μl を 2 × SEAP 分析緩衝液 (2M ジエタノールアミン (pH 9.8) 10ml 、 1M MgCl₂ 10 μl 、 1M 酵母アルギニン 200 μl 、 パラ - ニトロフェニルリン酸 44.52mg) の同量と混合した。37 度指示された時間培養した後 405nm で吸光度を測定した。

【 0487 】

ルシフェラーゼ分析

10

20

30

40

50

ルシフェラーゼを分析するために、各々 5 n g の C M V - ルシフェラーゼおよび p R L - S V 4 0 プラスミドを Z F P コーディングプラスミド 5 0 n g とともに 9 6 ウェルプレートで育てた 2 9 3 細胞に共同 - トランスフェクトした。3 日間培養した後、細胞を収集し、デュアルルシフェラーゼレポーター分析システム（プロメガ）を用いて製造社の方法に従ってルシフェラーゼを分析した。

【 0 4 8 8 】

M T T 分析

M T T 分析は、細胞の成長を測定するのに用いられる。代謝活性のある細胞によって還元されたテトラゾリウム M T T (tetrazolium MTT) は黄色に変わった。黄色の吸光度測定値は生きている細胞の個数を示す。M T T 分析は M T T 分析キット (Trevigen) を用いて行った。M T T 分析はトランスフェクト後 3 日目に行った。簡略に説明すると、1 0 μ l の M T T 溶液を直接細胞培養液に添加し、二酸化炭素培養器で 2 時間培養した。その後、M T T 分析キットに含まれている界面活性剤 (detergent) 1 0 0 μ l を添加して 2 時間暗室で培養した後、パワー - ウエーブ 3 4 0 x (Bio-Tek Instrument) で 5 7 0 n m における吸光度を測定した。

【 0 4 8 9 】

細胞数を確認するために、2 9 3 細胞を 2 4 ウェルプレートに $1 . 5 \times 1 0^4$ 細胞 / ウェルでトランスフェクトの一日前に分株した。Z F P - コーディング核酸または対照ベクタープラスミド 2 0 0 n g をトランスフェクトしてから 3 日後、細胞を P B S で 1 回洗浄し、T E (1 0 mM トリス 1 mM EDTA, pH 8 . 0) 緩衝液 3 0 μ l で希釈した後ヘマサイトメーター (hemacytometer) で測定した。

【 0 4 9 0 】

結果

タンパク質生産性の変化

核酸ライブラーが異種核酸の発現を変化させたかどうかを調べた。Z F P が細胞内で生産される外部タンパク質の量に影響を与えたかどうかを調べるために、S E A P (分泌性アルカリホスファターゼ) をレポータータンパク質として用いた。表 1 0 は 8 1 個のウェルから得られた代表的な結果を示すが、各ウェルは、ライブラーから無作為に選択されたキメラ Z F P をコーディングする核酸でトランスフェクトされた細胞を含み、3 つのウェルは、対照群ベクターでトランスフェクトされた標準細胞を含む。いくつかのウェルは、無作為 Z F P をコーディングする核酸でトランスフェクトされた細胞を含むウェルおよび対照ベクターでトランスフェクトされた細胞を含むウェルに比べて増加した吸光度を示した。

【 0 4 9 1 】

【表10】

表10: 81個の無作為ZFPの存在下でのレポーター活性

ZFP	吸光度(405nm)	ZFP	吸光度(405nm)	ZFP	吸光度(405nm)
A01	0.29	C07	0.12	F01	0.15
A02	0.14	C08	0.16	F02	0.13
A03	0.14	C09	0.18	F03	0.13
A04	0.13	C10	0.17	F04	0.12
A05	0.19	C11	0.18	F05	0.13
A06	0.13	C12	0.15	F06	0.12
A07	0.12	D01	0.17	F07	0.12
A08	0.13	D02	0.15	F08	0.14
A09	0.11	D03	0.14	F09	0.19
A10	0.15	D04	0.14	F10	0.12
A11	0.15	D05	0.12	F11	0.20
A12	0.12	D06	0.13	F12	0.12
B01	0.15	D07	0.21	G01	0.15
B02	0.78	D08	0.12	G02	0.16
B03	0.15	D09	0.14	G03	0.14
B04	0.19	D10	0.15	G04	0.49
B05	0.13	D11	0.20	G05	0.26
B06	0.15	D12	0.12	G06	0.15
B07	0.14	E01	0.16	G07	0.22
B08	2.40	E02	0.13	G08	0.65
B09	0.11	E03	0.12	G09	0.18
B10	0.12	E04	0.41	ベクター	0.37
B11	0.13	E05	0.12	ベクター	0.39
B12	0.11	E06	0.15	ベクター	0.34
C01	0.20	E07	0.12		
C02	0.14	E08	0.12		
C03	0.31	E09	0.13		
C04	0.13	E10	0.34		
C05	0.13	E11	0.22		
C06	0.13	E12	0.11		

【0492】

p 65 ドメインに融合した一つのジンクフィンガータンパク質である P_B08 が最も高いS E A P 活性を示す。このような Z F P は 3 つの別々のトランスフェクトにおいて S E A P プラスミドでトランスフェクトして再確認した。表 11 は、そのような再確認結果のうち一つを示す。この分析において P_B08 に対する P 値は 0.008 である。P_B08 は親プラスミドに比べて約 1.6 倍増加した S E A P 活性を示す。

【0493】

10

20

30

40

【表11】

表11：293細胞におけるSV40-SEAP標識

発現プラスミド	平均	標準偏差
P_B08	16.51	0.54
ベクター(HANLS)	1	0.17

10

【0494】

SEAP分析は外部タンパク質の生産を分析するのに使用したので、観察されたSEAP活性の増加に対する原因は様々であるが、たとえば、一つはpSEAP2-対照プラスミドのSEAP遺伝子発現に用いられたSV40プロモーターの直接的または間接的活性化である。他の理由は、分泌経路に係るタンパク質の作用の増大した活性またはタンパク質生産に係る一般的な機構の活性化を含む。SEAPの増加した活性の機構は、他のレポータータンパク質（例：非分泌レポーター）および他のプロモーターに連結されたレポーターのような他のタンパク質の生産に対するp_B08の効果を決定することによって明らかにできる。

20

【0495】

これを調査するために、293F細胞においてCMVプロモーターの調節下にあるSEAPレポーター(CMV-SEAP)を用いて幅広いスクリーニングを行った。SEAPタンパク質の活性を増加させる2つのZFPであるK44_11_D01およびK44_11_G12を分離した。このような2つのZFPは2つの他のレポータープラスミドであるSV40-SEAPおよびCMVプロモーターの調節下にあるルシフェラーゼ(CMV-Luc)を用いてまた確認した。表12にその結果の一部を示す。K44_11_D01およびK44_11_G12は親プラスミド(ベクター)と比較して約3倍に増加したSEAP活性を示した。K44_11_D01はSV40-SEAPの活性を示したが、CMV-ルシフェラーゼは示さず、これは前記活性化が分泌のようなSEAPに特異的な機構に関連していることを示唆する。これに対し、K44_11_G12は、SV40-SEAPおよびCMV-ルシフェラーゼの両方に対して約2~3倍増加した活性を示したが、これは、その機構がプロモーターまたはレポーターに特異的でないことを暗示する。したがって、K44_11_G12は、真核細胞のような細胞にタンパク質の生産を一般的に増加させるのに使用できる。

30

【0496】

【表12】

表12: 293F細胞におけるCMV-SEAP、CMV-LucおよびSV40-SEA

Pレポーター

発現 プラスミド	CMV- SEAP	平均 CMV-Luc	SV40- SEAP	CMV- SEAP	標準偏差 CMV-Luc	SV40- SEAP
K44_11_D01	3.49	0.87	3.66	0.46	0.26	0.28
K44_11_G12	2.82	2.75	2.14	0.50	0.38	0.15
ベクター (HA-NLS)	1	1	1	0.22	0.19	0.17

10

【0497】

ジンクフィンガータンパク質であるK44-16-E12(図25)およびK12_A11(図24)は、CMV-SEAPおよびSMV-Luc発現によって表示された通り、タンパク質の生産を変化させ得る。

20

【0498】

同様な例として、サイクリンD1の過発現があるタンパク質の生産を増加させると報告されている(米国特許第6,210,924B1号)。サイクリンD1の発現を直接的または間接的に活性化させるジンクフィンガータンパク質はタンパク質の生産を上向調節できるが、ジンクフィンガータンパク質の効果は更に強力に、または広範囲に変化する。サイクリンD1の過発現と類似する生理的効果をもたらす他のジンクフィンガータンパク質をこのような分析によって分離できる。このようなジンクフィンガータンパク質は目標のタンパク質生産の増加に用いられる。

30

【0499】

細胞成長速度の変化

*kid*ドメインに結合した2つのZFPであるK_D10およびK_F02は、MTT分析結果に基づいて対照群と比較したとき最大変異を示すため、細胞成長を調節する代表的ZFPとして選別された。MTT分析結果を確認するために、293細胞にK_D10およびK_F02をトランスフェクトした後細胞数を確認した。このような結果は、親ベクターでトランスフェクトしたウェルの細胞数と比較して相対的な百分率に転換し、表13aに示す。親ベクターと比較して、対照群に比べて細胞成長活性においてK_D10は約3倍の阻害を示し、K_F02は約2.7倍の活性化を示した。K_D10およびK_F02に対するP値は各々0.001および0.01であった。配列の情報は、図18および19を参照。

40

【0500】

【表13a】

表13a: 2つのZFPに対するMTT分析結果

	相対的な細胞数	
	平均	標準偏差
K_F02	279.3	6.9
K_D10	27.4	4.3
ベクター	99.99	3.4

10

【0501】

細胞成長速度の変化

本発明者らは、細胞成長および増殖速度を変化させることができるジンクフィンガータンパク質を同定した。このような重要表現型は癌およびウイルス感染のような疾病および発達過程に関連している。細胞成長および増殖を調節するジンクフィンガータンパク質の能力は、細胞アポトーシス(apoptosis)調節、細胞分化、宿主細胞防御(例:ウイルス感染に対する)およびp53-媒介信号伝達を含む。

20

【0502】

これらの形質の一つ以上を生産するジンクフィンガータンパク質は直接または間接的に細胞成長または信号伝達を調節する遺伝子を調節する。前記特定のジンクフィンガータンパク質は、MTT分析によって検索されたように、細胞成長に検地できる効果をもたらす。たとえば、2つのジンクフィンガータンパク質は対照群に比べて少なくとも2倍の細胞成長の違いを示した。この分析が一過性トランスフェクトしてから3日後の細胞から観察されたことを考慮すると、この2倍の違いは有意義である。さらに、細胞数の変化はMTT分析を用いて検索された相違点が分析に特異的でないことを確認させる。

30

【0503】

細胞成長がこのように細胞生理の重要な変数であるので、この実験は細胞成長を調節する十分な数のジンクフィンガータンパク質を分離するために、大規模のスクリーニングに拡大できる。このような各ジンクフィンガータンパク質を発現する細胞の遺伝子発現パターンのプロファイリングのためにcDNAマイクロアレイを使用できる。このプロファイルは細胞増殖または死滅に関わる新規な遺伝子および経路を同定できる。

【0504】

このような実験はジンクフィンガータンパク質が、細胞増殖を変化させる場合におけるように、哺乳動物細胞において様々な表現型を誘導できることを示す。

【0505】

実施例9：溶媒抵抗性バクテリア細胞

40

人工キメラジンクフィンガータンパク質の結果として有機溶媒に抵抗性を示す細胞において、人工キメラジンクフィンガータンパク質を発現するバクテリア細胞をスクリーニングした。互いに異なる3つのジンクフィンガータンパク質が大腸菌細胞にヘキサン(hexane)抵抗性を付与する能力を同定した(表13b)。核酸抵抗性は、ジンクフィンガータンパク質中の一つの「HT-1、HT-2およびHT-3」を発現する形質転換体の生存率を対照細胞の生存率と比較して分析した。対照群細胞は空ベクター(empty vector)(C1)またはZFP-1のいずれかを含んでいた。ZFP-1構造体(construct)はヘキサン抵抗性を与えず、RDER-QSSR-DSKRのフィンガーを含むジンクフィンガータンパク質をコーディングする。ヘキサン抵抗性-付与ジンクフィンガータンパク質を発現するバクテリア細胞は200倍増加したヘキサン抵抗性を示した。

50

【0506】

【表13b】

表13b: ヘキサン抵抗性のジンクフィンガータンパク質

発現構造物	名前	生存率(%)
対照群	C1	0.14
対照群	ZFP-1	0.05
ヘキサン抵抗性 ZFP	HT-1	21.4
ヘキサン抵抗性 ZFP	HT-2	1.85
ヘキサン抵抗性 ZFP	HT-3	28.6

10

【0507】

このようなジンクフィンガータンパク質に対する発現プラスミドは IPTG - 誘導プロモーターを含む。各ヘキサン抵抗性誘導ZFPを発現する形質転換体はIPTGの有無によって区別された。HT-2を発現する形質転換体はIPTGの存在下でさらに高いヘキサン抵抗性を示すのに対し、HT-1またはHT-3発現細胞はIPTGがなくてもヘキサン抵抗性を示した。

【0508】

【表14】

表14: 大腸菌にヘキサン抵抗性を付与するジンクフィンガータンパク質

名前	F1	F2	F3	F4	暫定的DNA標的	発現数(##)
HT-1	RSHR	HSSR	ISNR		GAH GTT GGG	5
HT-2	ISNR	RDHT	QTHR	VSTR	GCT GRA NGG GAH (配列番号:235)	3
HT-3	QNTQ	CSNR	ISNR		GAH GAV ATA	1

30

注) (##) ヘキサン抵抗性スクリーニングの3回目に育った9個のコロニーにおけるZFPの発現回数

40

【0509】

大腸菌発現のためのZFPをコーディングする核酸ライブラリーの製作
大腸菌でのみジンクフィンガータンパク質を発現させるために、本発明者らは pYTC-Lib 酵母ベクターにクローニングされたジンクフィンガータンパク質を pZL1 にサブクローニングした。pZL1 は pBT-LGF2 (クローンテック、Palo Alto, CA) を操作して製作された。Plac-UV5 は pBT-LGF2 から PCR (前方向プライマー: 5' - GACA ACC GGT CAT CGA TAA GCT AAT T CT CAC - 3' (配列番号: 236) ; 逆方向プライマー: 5' - TTG TCC ATG GAC GCT GTT TCC TG GTG AAA - 3' (配列番号: 2

50

37)) によって増幅した。PCR産物はpYTC-LibベクターのAge IおよびNot I部位の間にクローニングした。このベクターをpYTC-1acと命名した。pYTC-1acはCla IおよびNot Iで切断して次の要素を含むDNA断片をサブクローニングした: P lac プロモーター - V5エピトープ - MCS。切断されたDNA断片はゲル - 電気泳動後分離してpBT-LGF2のCla IおよびNot I部位の間にサブクローニングした。結果ベクターをpZL1として命名した。pYTC-Libに構築された3F - または4F - ZFPライブラリーはEco RIおよびNot Iで切断した。切断されたDNA断片はゲル - 分離してpZL1のEco RIおよびNot I部位の間にサブクローニングし、これによって、大腸菌発現ライブラリーを作製した。

【0510】

10

溶媒抵抗性スクリーニング

大腸菌菌株であるDH5^rは原核発現のために構成された3 - フィンガーまたは4 - フィンガーZFP核酸ライブラリーで形質転換された。形質転換体はクロラムフェニコール(34 μg / ml)含有LBで一晩培養した。一晩培養した培地は1 mM IPTGおよびクロラムフェニコールを含有する新鮮なLB培地1mlに1 : 500に希釈してZFP発現を誘導した。30で3時間培養後、ヘキサンを1.5%加え、速やかにボルテックス(vortexing)してヘキサンおよび大腸菌培養液エマルジョンを製造した。混合液を37で3時間回転させながら(250 rpm)培養し、クロラムフェニコール(34 μg / ml)を含有するLBプレートに分株した。プラスミドは成長したコロニーから分離し、DH5^r内に形質転換させた。その後、形質転換体に前記の方法に従ってヘキサン処理を行った。ヘキサン抵抗性に対する選別は2回さらに繰り返した。選別の3番目の段階後クロラムフェニコール(34 μg / ml)を含有するLBプレートで育った20個の個別的なコロニーからプラスミドを回収した。このプラスミドをDH5^r内に再形質転換させた。各形質転換体は前記の方法に従ってヘキサン - 抵抗性に対して再確認された。コーディングされたジンクフィンガータンパク質を調べるためにヘキサン抵抗性を誘導するプラスミドの配列調査を行った。

20

【0511】

実施例10：熱 - 抵抗バクテリア細胞

本発明者らは、細胞に熱抵抗性を与えるジンクフィンガータンパク質をスクリーニングした。互いに異なるジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸ライブラリーを大腸菌細胞内に形質転換させた。この細胞を熱にさらした後、熱抵抗性細胞を回収した。表現型スクリーニングの3番目の段階後選択された23個のコロニーから個別的にプラスミドを分離した。10個の異なるジンクフィンガータンパク質が同定され(表15)、熱抵抗性の増大は熱処理条件でZFP形質転換体および対照細胞であるC1またはZFP-2の生存率と比較して分析した。C1またはZFP-2は各々空ベクター(empty vector)または無関係なZFP(QTHT-RSHR-QTHR1)の形質転換体を意味する。50で2時間熱処理条件で99.99%以上の野生型細胞が死んだ。これに対し、このような極限の条件下で、あるZFP-TF形質転換体は6%程度生存し、これは熱抵抗性表現型が700倍増加したことを示す。この値はすなわち、ストレス条件で生存したZFP-TF発現細胞の百分率(6.3%)を同一の条件で生存したC1の百分率(0.0085%)で割った値である。ZFP発現はIPTGによって誘導されるので、熱抵抗性を誘導するZFPの形質転換体をIPTGの有無下でその表現型を分析した。T-1またはT-10形質転換体はIPTGの存在下でさらに高い熱抵抗性を示した。

30

【0512】

40

【表15】

表15：熱抵抗性を付与するZFP

名前	F1	F2	F3	F4	暫定的DNA標的	出現回数
T-1	QSHV	VSNV	QSNK	QSNK	5' DAA DAA AAT HGA 3' (配列番号: 238)	6
T-2	RDHT	QSHV	QTHR1	QSSR1	5' GYA GRA HGA NGG K 3' (配列番号: 239)	3
T-3	WSNR	QSHV	VSNV	QSHV	5' HGA AAT HGA GGT 3' (配列番号: 240)	1
T-4	QTHR1	RSHR	QTHR1	QTHR1	5' GRA GRA GGG GRA 3' (配列番号: 241)	1
T-5	DSAR	RDHT	QSHV	QTHR1	5' GRA HGA NGG GTC 3' (配列番号: 242)	2
T-6	QTHQ	RSHR	QTHR1	QTHR1	5' GRA GRA GGG HGA 3' (配列番号: 243)	1
T-7	QSHV	VSNV	QSNR1	CSNR1	5' GAV GAA AAT HGA 3' (配列番号: 244)	3
T-8	VSNV	QTHR1	QSSR1	RDHT	5' NGG GYA GRA AAT 3' (配列番号: 245)	2
T-9	RDHT	QSHV	QTHR1	QSNR1	5' GAA GRA HGA NGG K 3' (配列番号: 246)	2
T-10	DSAR	RDHT	QSNK	QTHR1	5' GRA DAA NGG GTC 3' (配列番号: 247)	2

10

20

30

40

【0513】

熱抵抗性スクリーニング

原核細胞発現用ライブラリーは前記実施例9の方法に従って製作した。大腸菌菌株DH5を3-フィンガーまたは4-フィンガーゼフタリーライブラリーで形質転換させ、クロラムフェニコール(34 μg/ml)を含有するLBで一晩培養した。一晩培養した培養液を1mM IPTGおよびクロラムフェニコール(34 μg/ml)を含有する新鮮なLB培地1mlに1:500に希釈してZFP発現を誘導した。これを30度3時間培養した後、100 μlをマイクロ-遠心分離チューブに移した後、50の水浴で2時間培養した。培養液をクロラムフェニコール(34 μg/ml)を含有するLBプレートに載せた。成長したコロニーからプラスミドを分離してDH5内に形質転換させた。熱抵抗性の選別は再形質転換を用いて繰り返した。3番目の選別後、クロラムフェニコール(34 μg/ml)を含有するLBで育った30個のコロニーから個別にプラスミドを分離してDH5内に再形質転換した。各形質転換体は前記の方法に従って熱抵抗性を分析した。ZFPを同定するために熱抵抗性を誘導するプラスミドの配列を分析した。

【0514】

実施例11：ZFP_F121_p65による遺伝子

F121_p65ジンクフィンガータンパク質をヒト胎生期腎臓293細胞で発現した。細胞の転写体(transcripts)をプロファイリングし、プロファイリングされた転写体をF121_p65を発現しない対照細胞と比較した。F121_p65によって上向き調整された転写体の例を表16に示す。F121_p65は他の遺伝子中のインシュリン-類似成長因子2(insulin-like growth factor 2)の転写を増加させる。

【0515】

【表16】

表16: F121_p65によって上向き調節される遺伝子

名前	ID	平均の一般比 (ROM)
インシュリン類似成長因子2(ソマトメジン)	H59614	17.71
インシュリン類似成長因子2(ソマトメジン)	H59614	16.88
タンパク質 チロシンホスファターゼ、受容体t	R45941	16.45
インシュリン類似成長因子2(ソマトメジン)	N54596	14.40
暫定的遺伝子産物	H09111	12.35
ジュン(jun)B癌原遺伝子	N94468	11.61
細胞内のレチノイン酸-結合タンパク質2	AA598508	10.30
タンパク質ホスファターゼ2、調節サブユニット	R59165	9.89
活性化されたT-細胞の核因子, cyt	AA679278	9.64
FK506-結合タンパク質8(38kD)	N95418	8.66
タンパク質ホスファターゼ2、調節サブユニット	R59165	8.60
カドヘリン13、H-カドヘリン(心臓)	R41787	7.34
システィンーリッチ(rich)タンパク質2	AA485427	6.71
Zfp-36と類似するジンクフィンガータンパク質	R38383	6.46
癌壞死因子(ligand)スーパーファミリー	AI347622	6.15
カドヘリン13、H-カドヘリン(心臓)	R41787	5.90
脳特異的なタンパク質p25アルファ	AA133959	5.71
成長抑制およびDNA-障害-誘導、	AA404666	5.55
リンパ球抗原6コンプレックス、H位置	AI929550	5.50
ケトヘキソキナーゼ(フルクトキナーゼ)	T61256	5.28
サイクリンD1(PRAD1:副甲状腺腺腫)	AA487486	5.27
-	AA045731	5.27
I型膜透過性タンパク質Fn14	AI221536	5.06

10

20

30

40

【0516】

実施例12：大腸菌における外生タンパク質溶解度の変化

本発明者らは、大腸菌で発現された組換えタンパク質であるAkt1の溶解度を増加させるジンクフィンガータンパク質をスクリーニングした。哺乳類のAkt1遺伝子をpET12bベクターにクローニングし、Akt1 ORFのC-末端にGFPを連結した。互いに異なるジンクフィンガータンパク質をコーディングする核酸ライブラリーで大腸菌細胞を形質転換した。溶解性Akt1を発現する細胞はさらに多くの蛍光GFPを生成するので、Akt1の増加した溶解度をFACS分離によって分析した。8番目の表現型スクリーニング後個別コロニーを選別し、ウエスタンプロット(Western Blot)分析によってZFPが発現された細胞とC1が発現された細胞間の溶解性分画(fraction)のAkt1量を比較することによって溶解度の増加を分析した。ウエスタンプロット結果は、映像分析ソフトウェアであるQUANTITY ONE(Bio-rad, Hercules, CA)を用いて定量化した。C1は、共ベクターであるpZL1形質転換体を意味する。2つの互いに異なるジンクフィンガータンパク質が大腸菌で発現された組換えAkt1タンパク質の溶解度を増加させると同定された。

【0517】

50

C1における溶解および非溶解分画間のAkt1タンパク質の比は32.5:67.5であった。これに対し、あるジンクフィンガータンパク質で形質転換された細胞は溶解分画におけるAkt1の比が2倍増加したことが分かった。この値は、すなわち、ZFP-TF発現細胞の溶解分画Akt1タンパク質の百分率(66.1%)をC1における量(32.5%)で割った値である。

【0518】

【表19】

表19：大腸菌におけるAkt1タンパク質の溶解度向上させるZFP

10

発現構築	名前	Akt1タンパク質の比(%)	
		溶解分画	非溶解分画
対照群	C1	32.5	67.5
溶解度増加ZFP	S-1	66.1	33.9
溶解度増加ZFP	S-2	45.7	54.3

20

【0519】

【表20】

表20：大腸菌におけるAkt1タンパク質の溶解度を増加させるZFP

名前	F1	F2	F3	F4	暫定的DNA標的
S-1	QSTR	DSAR	RDHT	WSNR	GGT NGG GTC GYA (配列番号:248)
S-2	VSTR	DGNV	QSNR	QSNK	DAA GAA AAC GCT (配列番号:249)

30

【0520】

組換えタンパク質の溶解度増加のためのスクリーニング

原核細胞発現用ライブラリーは前記実施例9の方法に従って製作した。大腸菌菌株DH5⁺内にZFPライブラリーおよびAkt1発現ベクターと共に共同・形質転換させ、クロラムフェニコール(34 μg/ml)およびアンピシリン(50 μg/ml)を含有するLBで一晩培養した。一晩培養した培養液を1mM IPTG、クロラムフェニコール(34 μg/ml)およびアンピシリン(50 μg/ml)を含有する新鮮なLB培地1mlに1:500に希釀してZFPの発現を誘導した。30℃で3時間培養した後、10⁶細胞をFACSバンテージフローサイトメーター(Vantage flow cytometer)でFACS分析して高い蛍光を示す5~10%の細胞を分離した。GFP発現またはpET21b空ベクターで形質転換された細胞を各々陽性または陰性対照群として用いて背景(background)蛍光水準を定めた。

40

【0521】

分離された細胞をクロラムフェニコール(34 μg/ml)とアンピシリン(50 μg/ml)を含有するLB培地で一晩培養した。培養液からプラスミドを分離してDH5⁺を形質転換させた。組換えタンパク質の増加した溶解度に対するスクリーニングは再形質転換体を用いて繰り返した。8番目の選別後、LB+クロラムフェニコール(34 μg/ml)+アンピシリン(50 μg/ml)プレートで成長した個別コロニーからプラスミ

50

ドを分離して D H S を形質転換した。各形質転換体はウエスタンプロット分析による A k t 1 溶解度の増加に対して分析した。Z F P を同定するために A k t 1 の溶解度を増加させるプラスミドの配列を分析した。

【図面の簡単な説明】

【0 5 2 2】

【図 1】酵母プラスミド p Y T C - L i b の遺伝子マップである。

【図 2】例示的な標的 - 誘導接近方法の模式図である。

【図 3 A】例示的なジンクフィンガータンパク質ライブラリーの製造方法に対する模式図である。

【図 3 B】例示的な表現型 - 誘導接近方法の模式図である。

【図 4】一時的にトランスフェクトされた Z F P の発現プロファイルを示す。左図において、p 6 5 活性化ドメインのみを発現する細胞を対照細胞と比較した。右図において、F 1 2 1 p 6 5 ジンクフィンガータンパク質を発現する細胞を対照細胞と比較した。対角線から離脱した各点はその発現が実質上変化した遺伝子を意味する。

【図 5】安定的にトランスフェクトされた Z F P の発現プロファイルを示す図である。

【図 6】図 6 の A は K 5 Z F P に対する D N A - 結合ドメイン突然変異および作用ドメインの変化が薬剤抵抗性に及ぼす影響を示し、図 6 の B は K 5 と Y L L 0 5 3 C 過多発現の効果を示す。

【図 7】3 - フィンガーライブラリーの製作方法を示す。

【図 8】対照細胞および神経突起の形成が誘導された Z F P - 発現細胞の写真である。

図 8 の A はレチノイン酸 (R A) を処理していない p c D N A 3 (空ベクター) - トランスフェクトされた N e u r o 2 A 細胞であり、図 8 の B は R A を処理していない N e u r o 1 - p 6 5 (また 0 8 _ D 0 1 - 6 5 とも呼ぶ) であり、図 8 の C は 1 0 u M R A を処理した p c D N A 3 (空ベクター) - トランスフェクトされた細胞であり、図 8 の D は 1 0 u M R A を処理した N e u r o 1 - p 6 5 の発現である。

【図 9】インシュリン遺伝子が過発現された細胞に対する比較マイクロアレイデータを示す。キメラ Z F P は 0 8 _ D 0 4 - p 6 5 である。その配列は図 1 6 に示されている。

【図 10 A】Z F P D N A 結合特異性を列挙する表である。

【図 10 B】ジンクフィンガードメインおよび認識部位配列の相互連関性を示す模式図である。

【図 11】人工 Z F P の標的を同定する方法に対するフローチャートである。

【図 12】分化を誘導する Z F P を同定する方法に対する模式図である。

【図 13】F 1 0 4 - p 6 5 Z F P が存在する細胞に対する様々な時間帯別比較マイクロアレイ資料を示す。

【図 14】神経突起を誘導できるタンパク質である N e u r o 1 - p 6 5 に対するコーディング核酸配列 (配列番号 : 1) およびアミノ酸配列 (配列番号 : 2) を示す。 N e u r o 1 - p 6 5 はジンクフィンガードメイン Q S N R 1 - Q S N K - C S N R 1 および p 6 5 転写活性化ドメインを含む。 Q S N R 1 - Q S N K - C S N R 1 - p 6 5 のドメインと同一パターンの D N A 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質が神経突起をまた誘導できる。

【図 15】骨細胞を誘導できるタンパク質である O s t e o 1 - p 6 5 に対するコーディング核酸配列 (配列番号 : 3) およびアミノ酸配列 (配列番号 : 4) を示す。 O s t e o 1 - p 6 5 はジンクフィンガードメインである R D K R - Q T H R 1 - V S T R - R D K R および p 6 5 活性化ドメインを含む。 R D K R - Q T H R 1 - V S T R - R D K R - p 6 5 のドメインと同一パターンの D N A 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も骨細胞を誘導できる。

【図 16】インシュリン生産 (図 9) を増加させるタンパク質である 0 8 _ D 0 4 _ p 6 5 に対するコーディング核酸配列 (配列番号 : 5) とアミノ酸配列 (配列番号 : 6) を示す。 0 8 _ D 0 4 _ p 6 5 はジンクフィンガードメインである R S H R - R D H T - V S S R および p 6 5 活性化ドメインを含む。 R S H R - R D H T - V S S R のドメインと

10

20

30

40

50

同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もインシュリンの生産を増加させることができる。

【図17】SV40-SEAPの生産を増加させるタンパク質であるP_B08に対するコーディング核酸配列(配列番号:7)およびアミノ酸配列(配列番号:8)を示す。

P_B08はジンクフィンガードメインであるQSNR1-DSNR-DSNRとp65活性化ドメインを含む。QSNR1-DSNR-DSNRのドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もSV40-SEAPの生産を増加させることができる。

【図18】細胞増殖を減少させるタンパク質であるK_D10に対するコーディング核酸配列(配列番号:9)およびアミノ酸配列(配列番号:10)を示す。K_D10はジンクフィンガードメインであるQSHV-WSNR-WSNR-RDNQおよびkid抑制ドメインを含む。QSHV-WSNR-WSNR-RDNQのドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も細胞増殖を抑制できる。

【図19】細胞増殖を増加させるタンパク質、K_F02に対するコーディング核酸配列(配列番号:11)とアミノ酸配列(配列番号:12)を示す。K_F02はジンクフィンガードメインであるDSAR2-RDKR-RDER1-QTHR1およびkid抑制ドメインを含む。DSAR2-RDKR-RDER1-QTHR1のドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も細胞増殖を増加させることができる。

【図20】タンパク質の発現を増加させるタンパク質であるK44_11_D01に対するコーディング核酸配列(配列番号:13)およびアミノ酸配列(配列番号:14)を示す。K44_11_D01はジンクフィンガードメインQSHV-QSNI-QTHR1-CSNR1とkid抑制ドメインを含む。QSHV-QSNI-QTHR1-CSNR1のドメインと同一なDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もタンパク質発現を増加させることができる。

【図21】タンパク質発現を増加させるタンパク質であるK44_11_G12に対するコーディング核酸配列(配列番号:15)およびアミノ酸配列(配列番号:16)を示す。K44_11_G12はジンクフィンガードメインであるQSHV-VSTR-RDNQ-QTHR1およびkid抑制ドメインを含む。QSHV-VSTR-RDNQ-QTHR1のドメインと同一なDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もタンパク質発現を増加できる。

【図22】F104_p65に対するコーディング核酸配列(配列番号:17)およびアミノ酸配列(配列番号:18)を示す。F104_p65はジンクフィンガードメインであるRDHT-RSHR-QSHR2-p65を含む。

【図23】F121_p65に対するコーディング核酸配列(配列番号:19)およびアミノ酸配列(配列番号:20)を示す。F121_p65はジンクフィンガードメインであるQSHT-RSHR-RDHT-p65を含む。QSHT-RSHR-RDHTのドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もインシュリン-類似成長因子2の転写を増加させることができる。

【図24】ジンクフィンガードメインであるRDHT-QSNV2-QTHR1-QFNR-kidを含むK12_A11に対するコーディング核酸配列(配列番号:259)およびアミノ酸配列(配列番号:260)を示す。

【図25】ジンクフィンガードメインであるQSHV-QSSR1-QTHR1-kidを含むK44-16-E12に対するコーディング核酸配列(配列番号:261)およびアミノ酸配列(配列番号:262)を示す。

10

20

30

40

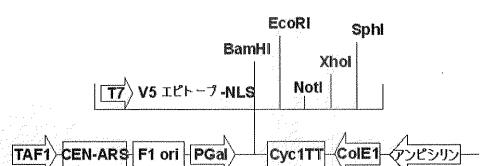
50

【図26】ジンクフィンガードメインであるQ S N R 1 - Q S S R 1 - Q T H R 1 - R D K R - K I Dを含むK13_B08に対するコーディング核酸配列(配列番号: 263)およびアミノ酸配列(配列番号: 264)を示す。図14~図26のDNA配列はHAタグ(tag)(灰色下線)をコーディングする配列および核位置信号(nuclear localization signal、ボックスで表記)をコーディングする配列を含み得る。開始および終了コドンは下線で表示されている。小文字は連結配列を示す。アミノ酸配列において、イタリック体および網かけ文字はジンクフィンガードメインを示し、網かけ文字でありながらイタリック体でないものはk i dやp 6 5ドメインのような調節ドメインを示す。図14~図24のDNA配列はHAタグ(tag)(灰色下線)をコーディングする配列および核位置信号(ボックスで表記)をコーディングする配列を含む。開始および終了コドンは下線で表示されている。網かけ文字はk i dまたはp 6 5ドメインのような調節ドメインをコーディングする配列を示す。小文字は連結配列を示す。アミノ酸配列と関連して、イタリック体および網かけ文字はジンクフィンガードメインを示し、網かけ文字でありながらイタリック体でないものはK i dやp 6 5ドメインのような調節ドメインを示す。

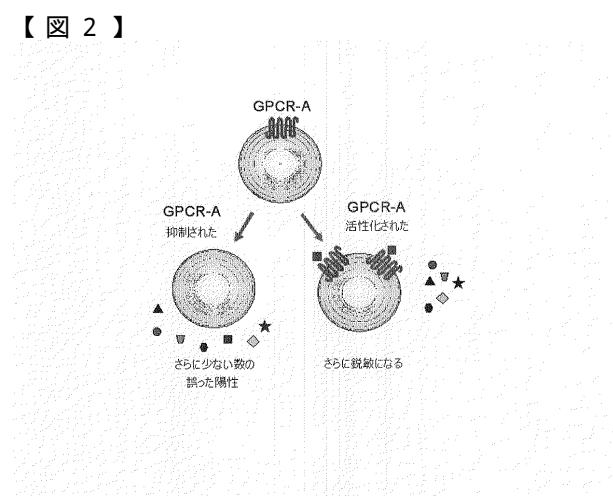
10

【0523】

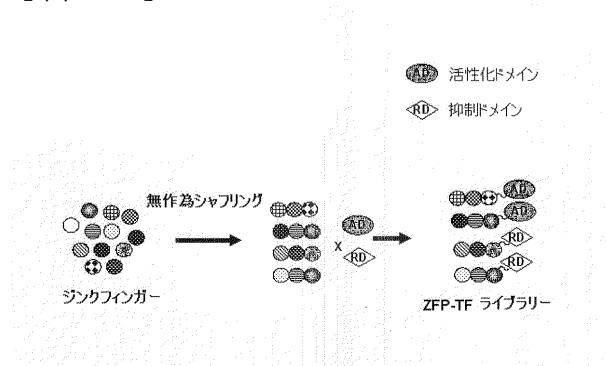
【図1】



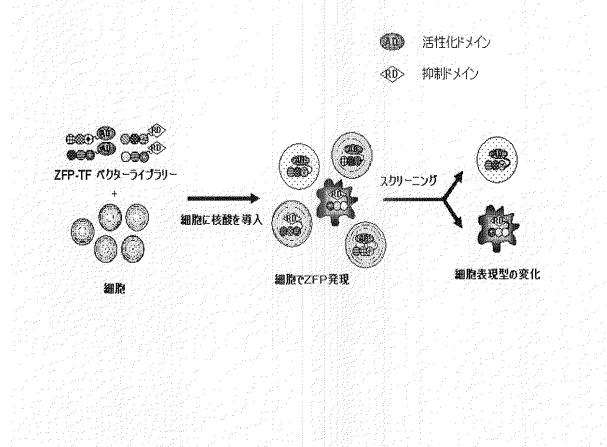
【図2】



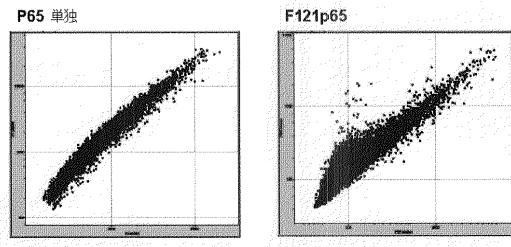
【図3A】



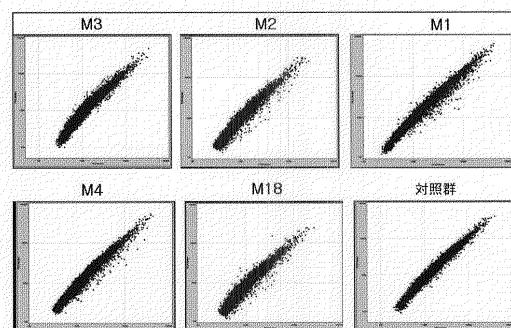
【図3B】



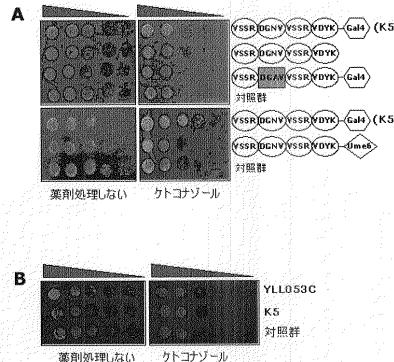
【図4】



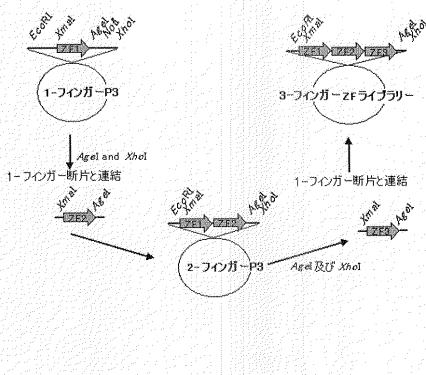
【図5】



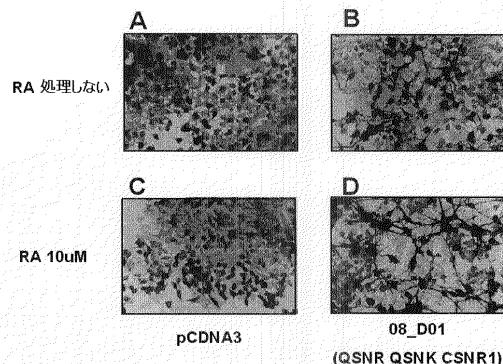
【図6】



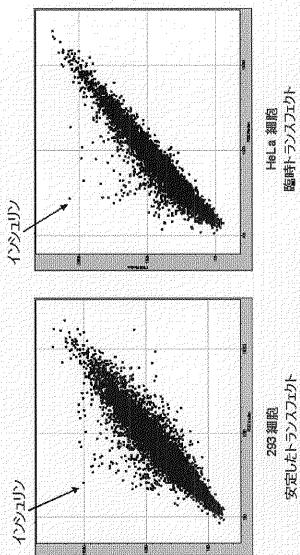
【図7】



【図8】



【図9】



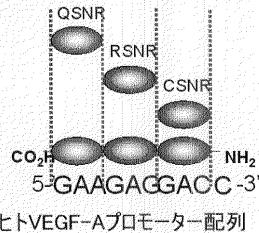
【図 10 A】

ジンクフィンガー-DNA相互作用に対する一部例表

3-bp 配列	ジンクフィンガー
GAA	QSNR
GAC	CSNR
GAG	RSNR
GAT	ISNR
GCA	QSSR
GCC	-
GCG	RDER
GCT	VSTR

【図 10 B】

ジンクフィンガーの混合及びマッチング



【図 11】

変化した表現型を示す細胞をスクリーニング

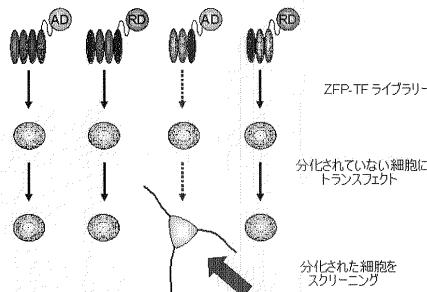
同一な表現型を誘導する多数のZFP-TFを同定

発現プロファイリング分析を行う

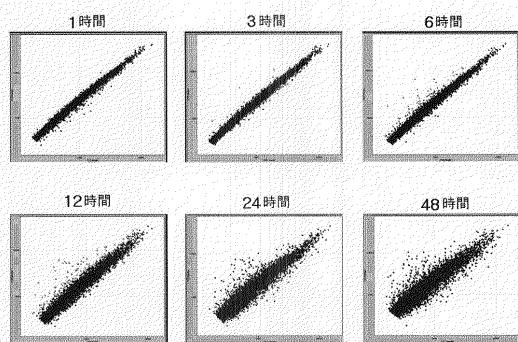
ZFP-TFによって共同一調節される遺伝子を同定

遺伝子の機能を確認

【図 12】



【図 13】



【図 14】

NEURO1-P65 (08_D1 とも命名)
QSNR1-QSNK-CSNR1-p65

核酸配列

ATGGTG[TACCCCTAACGACGTGCCGACTACGCCGAATT[GCTCCAAAAAAAAGAAGA
GAAAGGTA[GGGATC[gaat[ccggggaaaaaccgTTTGAGTGAAAGATTGCGG
GAAAGCTTATTAGAAAGCTAACCTCATCAGACACCAGAGAACTCACaccgg
gaaaaaccgTACAAGTGTAGAAATGTTGCAAAGCTTTACCCAATCTCAAAC
TTACTAAACATAAGAAAATTCATaccggggaaaaaccgTATAATGTAAAGCAATG
TGGAAACCTTTGGATTCCTCTGAAGGCCATGGAGGACTCACAcc
ggtaaaaaa[ggggcgtaataatt[ACCTGCCAGATA[AGAGGAT[CTCACCGGA
TTGAGGAAACGTAAGGACATATGAGACCTTCAAGAGCATCATGAAGAAG
TCCTTCAGCGGACCCACCGGACCCCCGGCTTCCACCTCGACGCATTGCTGTGCCT
TCCCCCAGCTCTCTGCTCCAAAGCCACCCCCAGGCCCTATCCCCTTACCT
CATCCCTGAGCACCATCAACTATGATGAGTTTCCACCATGGTGTTCCTCTG
GCAGATCAGCAGGCTCGGCCCTGGCCCCGGCCCTCCCCAAGCTCTGCCAG
GCTCCAGGCCCTGCCCTGCTCCAGGATGGTATCAGCTCTGGCCAGGCCAG
CCCCCTCCAGCTTCAACCCCGCCCTCTCAGCTGTCAGGCCCTACCTGCC
CAAGCCCACCCAGCTGGGGAGGAAGGACGCTGTCAGAGGCCCTGCTGCAGCTGCAG
TTGATGATGAAGACCTGGGGCTTCTTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTT
TCACAGACCTGGCATCCGTCAGCAACTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTGAACCAGGG
CATACCTCCCTAGTGACAGCCCCAGGGCCCCCGAACCAACTCTGGTCCACCTGG
ATAACTCCCTAGTGACAGCCCCAGGGCCCCCGAACCAACTCTGGTCCACCTGG
GGGGCCCCGGGCTCCCAATGGCCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCTCCAT
TGGGACATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAGTCAG TAA (配列番号:201)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPFECKDQGKAFTIQSNLIRHQRHTG
EKPYKEECKGKAFTQSSNLTKHHKIHTGEKPYKCKQCGKAFTQPSNLRRHGRHT
GEKAAAKYFLPDTDDRHRIEEKRKRKYTFKSIMKKSFPSGPTDRPRPPRRIAVE
SRSSASVKKPAPOPYPFSTSLISTINYDEFPTMVFPSQIISQASALAPAPPQVLPQ
APAPAPAPAMVSALAQAPAPPVFLAPGPQQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQI
FDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLNQQIPVAPHTTEPMIEMYPEA
ITRLVTAQRPPDPAPLIGAPGLPNGLLSGDEDFFSIAADMDFSAALLSQ (配列番号:
202)

【 図 1 5 】

OSTEO1-P65 (S045-15-D11 とも命名)
RDKR-QTHR1-VSTR-RDKR-p65

核酸配列

ATGCTGTACCCCTAGACGTGGCCGACTACCGCGAATTCTCTCCAAAAAAAGAAGAGAAAAG
CTAAGGATTCggaaatccggggaaaaccgTATGTATCCGTATGAGGGATGTACCTG
AAATTTGGCCGGCTCAGATAAGCTCAACAGCACAAAGAAAAGGCACccggggaaaaaccg
TATGAGTGTCAGCATGGCCGAAGTCCTTTAGGCCAGACGCCCTACTCTGACCC
AGGATCCACaccggggaaaaccgTATGAGTGTAAATTACTGTGGAAAACCTTTAGTGT
AGCTCAACCCATTAGACATCAGAGAATCCACccggggaaaaccgTATGTATGCCAT
GTAGAGGATGTAGCTGGAAATTGGCCGCTCAGATAAGCTCAACAGCACAAAGAAAAG
CAACGGGGtgaaaaccggccgcataattcTACCTGGCCAGATCACAGCATGCTGCG
ATTGAGGAGAACCTTAAAGGACATATGAGCCCTAACAGCATTCAGGAAGAACGTC
TCAGCGGCCAACCCGACCCCCGGCTCACCTCGACCCATTGCTGGCTTCCCGCAC
TCAGCTCTGTCCCCAACGGCAGCCCCAGCCCTATCCCTTACGTCATCCCTGAGCACC
ATCAACTATGAGTGTTCCTCCACCATGGTGTTCCTCTGGCGAGATCAGGCCCTCG
GCCCTTGGCCCCGGGGCCCTTCCCAAGCTTCAGCTGGCCAGGCTCCAGCCCTGGCTCC
TCTAGGGTATCTAGCTCTGGCCAGGGCCACCCCTGAGCTTCAGGCTTCCAGGCC
CTCCAGGGCTTGGGGCCACCTGGCCCAAGGCCAACCCAGCTGGGAAGGGAGCTG
GAGGCCCTCTGCGAGTTGATGATGAAGACCTGGGGCTTCTTGTGCAACAGC
ACAGACCCAGCTGTGTTCAAGACCTGGCATCCGTGCAACATCCGAGTTCTAGCACCTG
CTGAAACCGGACATCTCTGTGGGGCCCAACACTGAGCCCAAGCTGGAGTACCC
GAGGCTATAACTGGCTTAGTGCAGCCCCAGGGCCCCGGGGAGCTGGCTCTGCG
GGGGCCCGGGGGCTTACCTGGCTTCTTGTGGAGATGAAGACTCTCTCCATTGGC
GACATGGACTTCTAGGCCCTGGTGTAGTCAG TAA (配列番号: 203)

アミノ酸配列

MVVPYDPDVDAELPPKKRKGVRGIRIPEGEKPECKDCGKAFIQKSNNLIRHQRHTGEKPY
CPVESCRRFRSDSSNLTRHRIHTGEKFYACPVESCRRFRSDSSNLTRHRIHTGEKAAM
KFYLPDTDDRHRIEKKRKRTYEFTFSIMKKSPFSGTDPBPBPRRAVPSRSSASVPKPA
FQPYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPSGQSIQSASALAPAPPOVLPQAPAPAPAPAMVSALAC
AAPPAPVFLAPGPBPOAVAPPAPKPTQAGBTGTLSEALLQCFDDEDLGALLGNSTDPAVFT
LASVDNSEFOQLLNQGQIPVAPHTPEPMLEMEYPAITRLVTAQQRFPDPAPAPLGPAGLPN

LLSGDEDFFSSTIADMDFSALLSQ (配列番号:204)

【 四 16 】

08_D04_p65:
RSHR-RDHT-VSSR

核酸配列

ATGGTGATCCCCCTACCGACGTGCCCCACTACGCCGAATTGCTTCCAAAAAAAGAAGGAAAG
GTAGGGATCggatccggggaaaaaccgTATAAGTCGATGAGTGGGAAGGCTTT
AACCGCGGTACACCTCACAGCGGCGGATCAGGGGAACTCAGccccggggaaaaaccgTTCCAG
TGTAAAATCTTGTGGCGAAAGTTCTCCGGTGCACGGGACCTCTGAGACCCCAACAGGACT
CATaccggggaaaaccgTATACATGTAAACAGTGTGGGAAGGCTTCAGTTCCAGT
TCCCTTGAAGACATGAAACCCTACAccgggtaaaaaggccgcgttaattcTACCTG
CCAGATACAGCGATCTCGTACCGGATTGAGGAGAAACGTTAACGACATATGAGACCTTC
AAGAGCATACATGAAAGAGCTCTTCAAGCGGACCCACGGGGCCCTACCTCCAG
GCCATCTCTGGTCTTCCCGAGCTCAGCTTCTGCCCCAACGGCACCCCGAGCTTAC
CCCTTACGTACCTCTGAGCACCATCAACTATGATGAGTCCCCACATGGTGTTCCT
TCTGGGCAGATCAGGGAGCCCTGGCTTGGCCCGGCCCCCTCCCCAAAGTCTGGCCAG
GCTCCACCCCTCTGGCCCTGCTCAGCCATGATCTGAGCTTCTGGCCAGGGCCACCCCC
GTCCTCCAGTCAGCCCTGGCCCTCTGGCTTGGCCCGGCCCCCTGGCCCAAGGGG
CAGCTGGGGAAAGAACGCTCAGGGCCCTCTGGCTCAGCTTGTCTCAGGTTATGATGAAAC
CTGGGGCCCTGGCTTGGCAACAGCACAGCACGGCTCAGCTTCAACGACCTGGCATCGTC
GACAACCTCCGGAGTTCTCAGCAGCTGTAACCCAGGGCATACCTGTGGCCCCCACAACACT
GAGCCCATGCTGTGAGGATACCCCTGAGGCTATAACCTCTGGCTAGTGAGGCCAGGGCC
CCCCGGGGAAAGCTCTGGCTCAGGGGGCCCGGGGCTCCCCAATGGCTCCCTTCAGGA
GATGAAAGACTCTCCCTCATTGGGACATGGACTCTCAGCCCTGCTGAGTCAG TAA (A)

7031649995-0000000000000000

アミノ酸配列

HTTIVDVEVWVTRRNGKTYVQV
CTCKTORFSRSDHLKTHTRTHGKPYTCRQCGKAESVSSSLRRHETTTGKEAAKYI
PDTDDRHRIEKKRPTYETFKSIMKSPSPSGTDPRPFPRRIAVPSRSSASVPKPAQPQY
PTFSSLSTINLYDEEPTMVFPSQISQASALAPAPPQVLIQFAAPAPAMVALSALAQAP
PVFLAQLGPPQVAAPPKPTQAGEGLTSEALLQLQDDDEDLGLGNSTDPAVFTDLASU
DNSEFOCILONGTEVPAHTRTEMLMEYEPAITRLVATACRPDPAPALGAGPLPNLLSG
DEDFSSIAJMDFSALLSQ (配列番号: 206)

【 図 17 】

Name: P_B08
QSNR1-DSNR-DSNR-p65

核酸配列

ATGGTGTAACCCCTACGAGTGGCCCACTACGCCGATTGCTCTAAAAAAAGAAGAGAAAG
GTA GGATCC **gaatcc** cggggaaaacccgTTTGAAGTGTAAAGATTGCGGGAAAGCTTTC
ATTCAAGAATCACAACCTCATCAGCACCCAGAGAACCTCAcaccggggaaaacccgTATGCT
TGGCTCTGCAGTCTGCATGCCGCTTCTTCTGATTCTGCAGAACCTTCCGCCATATCC
CCATCCA CaccggggaaaacccgTTATCTGCTTCTGCAGTCTGCATGCCGCTTCTG
TCTGATTCTGCCAACCTTACCCGCCATATCCGCATCAcaccgggtaaaaaaggccgcgt
aaattc **TACCTGCC** CACATAACAGACCATGTCACCGGATTGAGGAAACGTAAGAGACA
TATGAGACCTTAAGAGCATCATGAGAAGAGTCCTTACCGGACCCACCGACCCCCGG
CCTCCACCTGCAGCCATTGCTGCTTCTCCCGCAGCTCAGCTCTGTCTCCAAACCGACA
CCCCAGCCCATTACCTCTTACGTCATCCTGACCCACCATCAACTATGATGAGTTTCCCCAC
ATGGTGTTCTCTCTGCGCAGATGCCGACCCCTGGCTTGGCTTGGCCGGGCCCCCTGG
FTCTGCTTCTCCCGCAGCTCAGCCCTGCTCAGCCGCTTGGCTTGGCCGGGCCCCCTGG
CCCCAGCCCCCTGTCAGCTTACGCCCCAGCCCTCTCAGGCTGTGCCCCACCTGCC
CCCCAGCCCCACCCAGCTGGGAAGGAAGCTGTCAAGGCCCCCTGCTGAGCTGAGCTT
GATGATGAAGACCTGGGGCCCTGGTGGCAACAGCACAGCCAGCTGTGTTACAGAC
CTGGCAATCCGGTGCACAACTCCGAGTTCTGGCAACAGCCAGCTGTCAAGGGCCATTCG
CCCCACACAACTGAGCCATTGCTGTAGGAGTACCTGGAGCTATAACTGCCAGTGCAC
GGCCAGGGCCCCCGGAGCTCTGCTCTGGGGGGGGGGGCTCCAAATGCT
CTCTCTTCTCAGAGATGAAGACCTTCTGCTCATCTGGCGACATGACTTCTCACCCCTGCT
AGTCAG TAA (配列番号: 207)

アミノ酸配列

MVYPVDPDVDAELPPKKRKGVIRI PGEKPECKDCGKAFTQKSNLIRHQTHTGEKPY
CPVESCRRFSDSLNRHIRIHTGEKP YACPVESCRRFSDSLNRHIRIHTGEKAA
KFYLPDTPDRRHRIEEKRKRTYETFKFSIMKKPSFGPTDPRPPRRIAVPSSASVVKP
PQPYPFTSSLSTINYDEEPTMVFVPSQCISQASALAPAEQVLQPAQAPAPAPAMVSYALAC
APAPVVPVLAQPGPQQAVAPPKPTQAGEGTLTSALLQLQFDEDLGLAIGNSTDPAVETI
LASVDNSETFQQLNQGIPVAPVHITPEPMIIMEYPEAIFTLVAQRPPDPAPAPLGPGLPNQ

【 図 1 8 】

Name: K_D10

核酸配基

ATGGTGACCCCCCTACGACGGCCGACTACCGGAATTGCTCTAAAAAGAAGGAAAAG
GTAGGGATCCgaattccggggaaaaaccgTATGAGTGTGATCACTGTGAAAATCCTT
AGCCAGAGCTCATCTGAATCTGCACAAAAGAACTCACaccggggaaaaaccgTACAGA
TGTGAGGAATGTGGCAAAGCCTTAGGTGGCCCTAACCTTACTAGACATAAGAGAATT
CACaccggggaaaaaccgTACAGATGTGAGGAATGTGCAAAGCCTTAGGTGGCCCTA
AACCTTACTAGACATAAGAGAATTCAaccggggaaaaaccgTTGCGCTGCCCTGAGTGT
CTAACGCCTCATGAGATCCGACAACCTGACCCACCATATCAAGACCCACaccgtgaa
aaaagccggccgataaattcGTGTCACTGACATTGAAGATSTGGCTGTGCTCTTACTCGG
GACGAGTGGAAAGAGCTGGATCTGTCTAGAGAACCTGTACCGTGAGGTGATGCTGGAG
AATTACAGCAACCTGGCCTCCATGGCAGGATTCTGTGTTACCAAACCAAAGGTGATCTCC
CTGTTGCGAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:209)

アミノ酸配列

MVYPYDVDPYAEELPKKKRKVGIRLPIGKEPYECDHCCKGSFSOSSHNLNVKRTHTGEKPYXR
CEECGKAFRWPSNLTRHKRHTGEKPYRCCECGKAFRWPSNLTRHKRHTGEKPYFACPEC
PKRFMRSDNLTQHIKHTGEKAAAKFVSVTFEDAVLFTRDEWKKLDSORSLYREVMLE
NYSNLASMAGFLFTKPKVISILOOGEDPW (配列番号:210)

【図19】

Name: K_F02

DSAR2-RDKR-RDER1-QTHR1-kid

核酸配列

ATGGTGTACCCCTACGACGTGCCGACTACCGGAATTCCCAAAAAAGAAGAGAAAG
 GTAGGGATCCgatccggggaaaaacgcgtACTCCTGTGGATTGTCAGGAAATCCTTC
 TCTGACTCCAGTGCAAAGGAGACACTGCATTACACaccggggaaaacgcgtATGTA
 TGCGATGTAGAGGGATGTACGTGGAAATTGCCGCTCAGATAAGCTAACAGACACAAG
 AAAAGGCCAcaccggggaaaaacgcgtATGTATGCCATGTAGAGGGATGTACGTGGAAATT
 GCCCGCTCAGATGAGCTAACAGACACAAGAAAAGGCCAcaccggggaaaacgcgtATGAG
 TGTACCGATTGGGAAACTCTTTAGGCAGACACCACCTACTCGCACCGGGAGGATC
 CAcaccgggtaaaaagccggcgctaaattcGTGTCACTGACATTGAAAGATGGGTGTG
 CTCTTACTCGGAGAGCTGGAGCTGGATCTGCTCAGAGAAGGCTGTACCGTGTG
 GTGATGCTGGAGAATTACAGAACCTGGCTCATGCCAGGATCTCTGTTACCAAACCA
 AAGGTGATCTCCCTGTTGCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号: 211)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYSCKICGKSFSDSSAKRRHCLHTGEKPVY
 CDVEGCTWKFARSDFKLNRHKKRHTGEKPVYCDVEGCTWKFARSDELNRHKKRHTGEKPVY
 CHDCGKSFROSTHLTRHRRHTGEKAIAAKFVSVTFEDVAVLFRDEWKKLQLSORSLYRE
 VMLENYSNLASMAGPLFTKPKVISLLOQGEDPW (配列番号: 212)

【図20】

Name: K12_A11

RDHT-QSNV2-QTHR1-QFNR-kid

核酸配列

ATGGTGTACCCCTACGACGTGCCGACTACCGGAATTCCCAAAAAAGAAGAGAAAG
 GTAGGGATCCgatccggggaaaaacgcgtTTCACTGTAAGACCCACCCAGGACTCATaccggggaaaacgcgtATGTT
 TCCCGTCCGACCACCTGAAGACCCACCCAGGACTCATaccggggaaaacgcgtATGTT
 TGCTCAAAATGTGGAAAGCCTTCACTCAGATTCAATCTGACTGTACATCAAAATC
 CAcaccggggaaaaacgcgtATGAGTGTACGATTGGGAAAGTCTTTAGGCAGACCA
 CACCTCACTCGCACCGGAGGATCCAaccggggaaaacgcgtATAAGTGTACATCAAAATC
 GGGAAAGCCTTATTCAACCTTAACTCGAAGACATGAGAGACTCAaccgggtaa
 aacgcggccgctaaattcGTGTCACTGACATTGAAAGATGGCTGTGCTCTTACTCG
 GACGAGTGGAGAAGCTGGATCTGCTCAGAGAAGGCTGTACCGTGAAGGTGATGCTGG
 ATTACAGAACCTGGCTCCATGGCAGGATCTCTGTTACCAAACCAAAGGTGATCTCC
 CTGTTGCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号: 213)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPFOCKTCQRKFSDHLLKTHTRHTGEKPVY
 CSKCGKAFTQSSNLTVHOKIHTGEKPYECDCGKSFROSTHLTRHRRHTGEKPVYCHOC
 GKAFTIOSFNLRRHERHTGEKAIAAKFVSVTFEDVAVLFRDEWKKLQLSORSLYRE
 NYSNLASMAGPLFTKPKVISLLOQGEDPW (配列番号: 214)

【図21】

K44-16-E12

QSHV-QSSR1-QTHR1-kid

核酸配列

ATGGTGTACCCCTACGACGTGCCGACTACCGGAATTCCCAAAAAAGAAGAGAAAG
 GTAGGGATCCgatccggggaaaaacgcgtATGAGTGTGATCAGTGGAAATCCTTC
 AGCAGAGCTCTCATCTGAATGTGCAAAAGAACCTCACaccggggaaaacgcgtTATAAG
 TGCCCTGATTGGAAAGAGTTTAGTCAGAGTCCAGCCTATTGCCACCAGCGGACA
 CAcaccggggaaaaacgcgtATGAGTGTACGATTGCGAAAGTCTTTAGGCAGAGCACC
 CACCTCACTCGCACCGGAGGATCCAaccgggtaaaaagccggccgctaaattcGTGTCA
 GTGACATTGAAGATGTGGCTGTGCTCTTACTCGGGAGCAGTGGAGAAGCTGGATCTG
 TCTCACAGAAGCCTGTACCGTGAGGTGATGCTGGAGAATTACAGAACCTGGCTCCATG
 GCACAGATTCTGTTACCAACCAAGGTGATCCTCCCTGTTGCCACCAAGGAGAGGATCCC
 TGGTAA (配列番号: 215)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYECDCGKSFQSSSHNVHKRHTGEKPVY
 CPDCGKSFQSSSLIRHORHTGEKPYECDCGKSFROSTHLTRHRRHTGEKAIAAKFV
 VTFEDVAVLFRDEWKKLQLSORSLYREVMLENYSNLASMAGPLFTKPKVISLLOQGED
 PW (配列番号: 216)

【図22】

K13_B08

QSNR1-QSSR1-QTHR1-RDKR-KID

核酸配列

ATGGTGTACCCCTACGACGTGCCGACTACCGGAATTCCCAAAAAAGAAGAGAAAG
 GTAGGGATCCgatccggggaaaaacgcgtTTCACTGTAAGACCCACCCAGGACTCATaccggggaaaacgcgtATGTT
 ATTCAAGCTCAACCTCATCAGACACCAGAGAACCTCACaccggggaaaacgcgtTATAAG
 TGCCCTGATTGGAAAGAGTTTAGTCAGAGTCCAGCCTATTGCCACCAGCGGACA
 CAcaccggggaaaaacgcgtATGAGTGTACGATTGCGAAAGTCTTTAGGCAGAGCACC
 CACCTCACTCGCACCGGAGGATCCAaccggggaaaaacgcgtTATGATGCGATGTAGAG
 GGATGTACGTGGAAATTGCGCCTCAGATAAGCTCAACAGACACAAGAAAAGGCACacc
 ggtaaaaagccggccgctaaattcGTGTCACTGACATTGAAAGATGGCTGTGCTCTT
 ACTCGGAGACTGCAAGAACGCTGGATCTGCTCAGAGAAGCCTGACCGTGAAGGTGATG
 CTGAGAATTACAGAACCTGGCTCCATGGCAGGATCTCTGTTACCAAACCAAAGGTG
 ATCTCCCTGTTGCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号: 217)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPFECKDCGKAFIOKSNLIRHORHTGEKPVY
 CPDCGKSFQSSSLIRHORHTGEKPYECDCGKSFROSTHLTRHRRHTGEKPVYCDVE
 GCTWKFARSDFKLNRHKKRHTGEKAIAAKFVSVTFEDVAVLFRDEWKKLQLSORSLYRE
 VMLENYSNLASMAGPLFTKPKVISLLOQGEDPW (配列番号: 218)

【 図 2 3 】

F104_p65

核酸配列

ATGGCTTACCCCCAACGCGTGGCCCACTAGGCCAAGTCCTCCAAAAAAAGAACAGAAAAG
GTGGGGATTCGG**gat**ttccggggaaaaacccggTTGGCATGGTAAACTTGTGCTAGCGGAAGGTT
TGCGATGGAGTGTGGAGGCTTTAACCGCAGGACTCATCaccggggaaaaacccgtATAAG
TGCGATGGAGTGTGGAGGCTTTAACCGCAGGTCACACCTCACACGGCCACCGGGATT
CACccggggaaaaacccgtATAAAATGGCGGCCAGTGTGGGAAGGTTCTACTCCCAAGTGTCC
CACCTCACCCGGCACCGAAAAATCCACccggggaaaaacccgt**ggggggggcataat**TACCTG
CCGACATACAGACGATCTGCCTGGGGATTCAGGGGAAACCTTAAGAACATATCAGACCCGAA
AAGAGCATCATGAAGAAGAGTCCTTTCAGGGGACCCACCCGGCCCTCCACCTGG
GGCATTTGCGCAGGCTTCTCCCGACGCTCAGCTTCGTCGCCCCAAAGCCACCCCCAGCCCTAT
CCCTTCTACGCTCATCTCCGGACCATCAACTATGATGGCTTCTCCACCATCTGGTGTCTTCT
TCTGGGGAGATCTGGGGAGCTGGGGCTTCTGGGGGGGGGGCTTCTCCCAAGTCTGGCCCG
GCTCCAGCCCCCTGGCCCTGCTCAGGCGCATGTGATTCAGCTCTGGCCCAAGCCCCAGCCCCAG
GGCCCAAGTCCCTAGGCCCAAGGGCCCTTCAGGGCTGTGGGCCCCACCTTGCCCCCAAGCCCCAC
CAGGGCTGGGGAGGAACGGCTGTCAAGGGCCCTGTGCGAGCTGTGAGTTGTGATGATGG
CTGGGGGGCTTCTGGCAACAGCACAGCACCAGCTGTGATTCAGACCCATGGCTCATGGC
GACAACCTGGGAGTTCTAGCAGCTGTGAAACCGGGCATACCTGTGGCCCCCACACAAC
GAGCCCCATGCTGATGAGTACCCCTGGCCATAACTCTCCCTAGTGACACCCCAAGGGCCC
GGCCACCCAGCTCTCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTG
GATGAGACAGTCTCTCCATTGCGGACATGGACTTCTAGCCCTGCTGAGTCAG**taa** (尾
列番号:219)

アミノ酸配列

MVYPVDPYAELPPKKKRRVGIRIPEKFPECKTQCRRFSRSDHLKTHTRHTGEKPYK
CMECGAKFNRSHLTHRQH1HTGPKYIYCCKGCKFYSQVSUHLTRHOKIIEGAKAAKFYL
PDTIDDRHREEKKRTERYETFCKSIMKSFESGFPDTRPRPPIRIAVPSRSSVAWPQPAQ
PFTTSSLSTINYDEFPTMVFFPSQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAMPSALAQPAP
VNPFLAPCQQPAWAPPATPFQAGETLSEILQLQFDDEOLIGLGNSTDAVTTDLASV
VNPFELNLQNGQTVPAPHTPEFMIMPEWFAITLTYTAQRPEDPAPAPAPLGPGLNGLLSG
DEDFESSIADMFSALLSQ (配列番号: 220)

【配列表】

200551104900001.app

【手続補正書】

【提出日】平成15年11月26日(2003.11.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 2 4 】

F121_p65
QSHT-RSHR-RDHT-p65

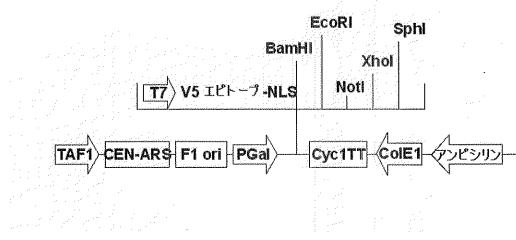
核酸配列

ATGGTGATCCCCCTACCGACGTGCCCCACTACGCCGAATTGCTTCAAAAGAAGAGAAAAG
GTAAGGATC~~G~~**aattc**ccggggaaaaaccgTACAAATGTGAAGAATGTGCCAACGCTTT
AGGAGCTCTCCACACTTACACATAAGATAATTCTACcggggaaaaaccgTATAAG
TGCAGGAGTGTGGAGGCTTTAACCCGAGGTACACCTTCACAGGGCACAGGGATT
CACaccggggaaaaaccgTTCCAGTGTAAAATTGTCAAGGGAAAGTCTCCGGTCCGAC
CACCTGAAGACCCCACCCAGGACTCATaccggtaaaaaggccgcataattcTACCTG
CCAGATACAGAGGATCTGTCACCCGATTGAGGAGAAACGTAAGGACATATGAGACCTTC
AAGAGCATCATCAAGAAAGACTCTTACCCGGACCCACCCGGCTCCACCTCTGA
CCGATTCCTGCTTCCCGAGCTCAGGTTCTGTCCCAAAAGCCACCCGGCTTCTGA
CCCTTTACGTCATCCCTGAGCACCATCAACTATGAGTTTCCACCATGGTGTTCCT
TCTGGGCAGATCAGGGCAGGCCCTGGCCCTTGGCCCGGCCCTCCCCAAGTCCTGGCCCCAG
GCTCCAGCCCCCTGCCCTGCTCCAGGCCATGGTATCAGCTCTGGCCAGGCCAGCCCC
GTCCTTACCTTCAGCCCCAGGCCCTCTCAGGGTGTGGCCCAACCTTCGCCCCAAGCCCC
CAGGGTGGGGAGGAAGCCGCTGTCAGGGCCCTGCTCAGGTGAGTTGATGAGAAC
CTGGGGCCCTTCCTGGCAACAGGACAGGACCCAGCTGTTCAGACGCTTGGCCTTC
GACAACCTCCGAGTTTCAGCAGGCTCTGAACAGGGCATACCTGTGGCCCCCACAACAT
GAGGCCATGCTGATGGAGTACCCCTGAGGTATAACTGCCCTAGTGACAGCCCCAGGGCC
CCCCACCCACCTCTGCTTCACTGGGGGCCCGGGCTCCCAAAATEGCCCTCTTTCAGGA
GATGAAGACTTCTCCCTCCATGGCCACATGGACTCTCAGCCCTGCTGAGTCAG TAA (配
列番号: 221)

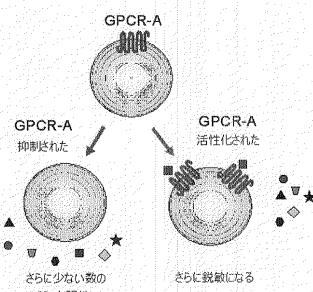
アミノ酸配列

MVYPFDVPDVAELPPKKRKVGIRIPIGERPKYCECBBGAFRAQSSHLLTIIKIIHTEGEKPYK
CMECGAKFNRSSRLHTRQHINTGEKFCPOCKTCQRKFSSRDLHKLTHTRQHINTGEKAACKFYK
PDTDDDRHRIEKKRKRTYETFKSINKKSPFGSPDTPRPPRRPAVPSRSSASVCPKPAQPQPY
PFTSSLSTINYDEPTFMPVMSPGQISALAPAPQQLPQAPAPAPAPAMPSALAAQAPAP
VPVLIAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTISSEALIQLQFLDDEDIGALLNSSTDPAVFTDLSAV
DNSEFQQLINQGIPVAPHTTEPMILMEYPEAITLEVTAQRPPDPAPALGAPGLPNGLLSG
DEDFFSIADMDFSALLSQ (配列番号:222)

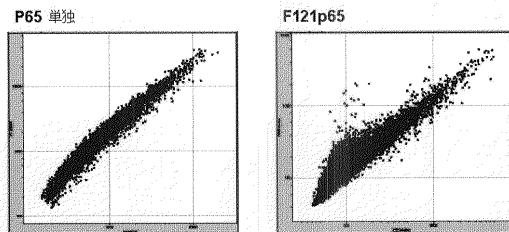
【図1】



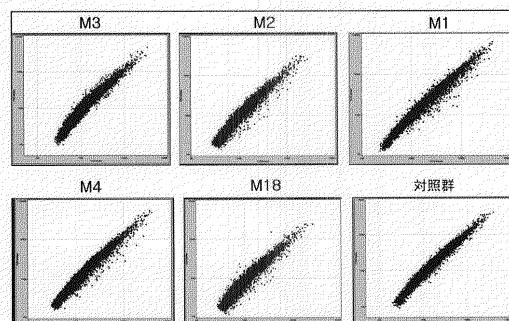
【図2】



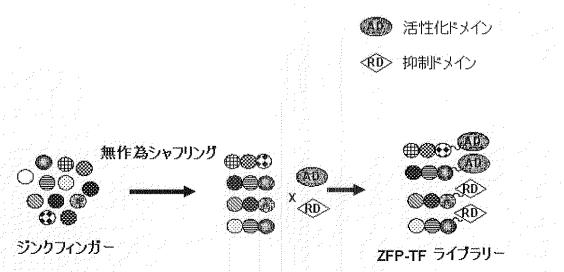
【図4】



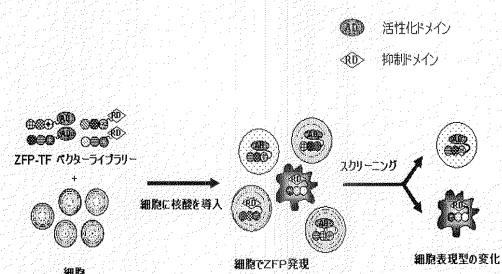
【図5】



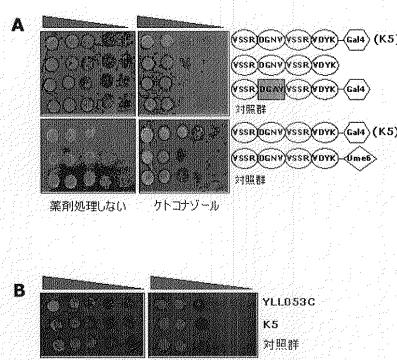
【図3A】



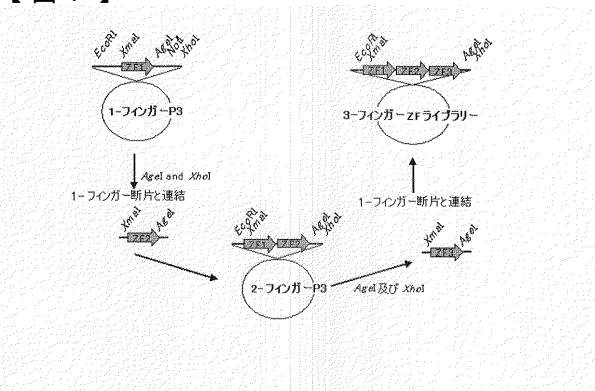
【図3B】



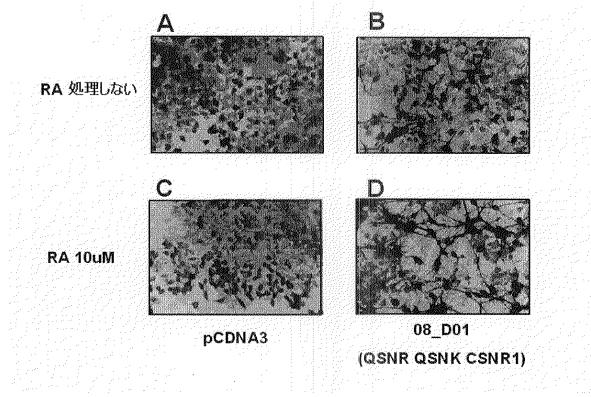
【図6】



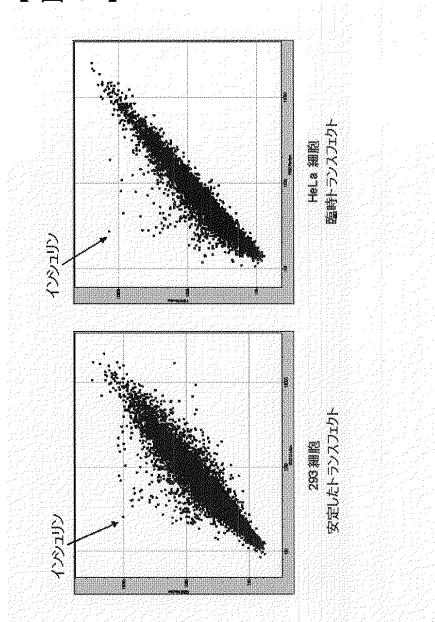
【図7】



【図8】



【図9】



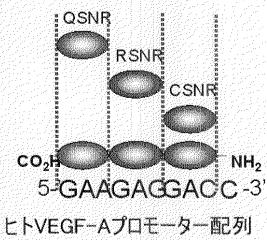
【図10A】

ジンクフィンガー-DNA相互作用に対する一部例挙表

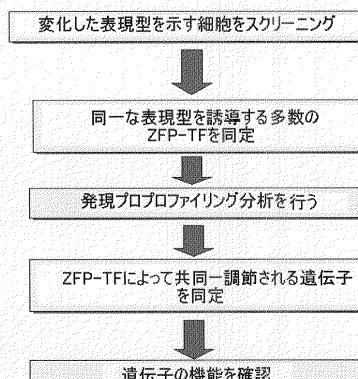
3-bp 配列	ジンクフィンガー
GAA	QSNR
GAC	CSNR
GAG	RSNR
GAT	ISNR
GCA	QSSR
GCC	-
GCG	RDER
GCT	VSTR

【図10B】

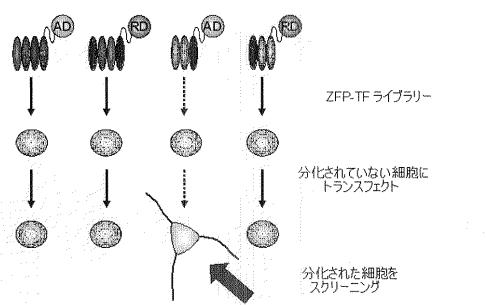
ジンクフィンガーの混合及びマッチング



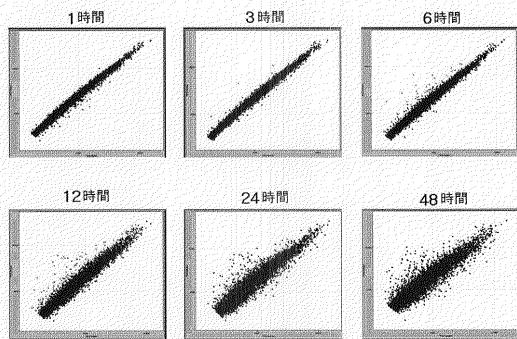
【図11】



【 図 1 2 】



〔 义 1 3 〕



【 义 15 】

OSTEO1-P65 (S045-15-D11 とも命名)
RDKR-QTHR1-VSTR-RDKR-p65

核酸配列

アミノ酸配列

MVYPVDPVDYALPPKKRKGVIRI PGEKPFECKDCGKAFTQKSNSLIRHQRHTGEKPYA
CEVESCDRRFSDSLNLTRHTRIHTGEKPYACPVESCDRFRFSDSSNLTRHTRIHTGEKAAA
KFYLPIPDIDDRHRIEKKRRTYETFRTSMIKKSPEGSFGLPDRPKRPEPRATAVESSSSASVVKPA
PQPQPTFTSSLSTINYDEFPTIMVFPSGSQISQASALAPAPQVLPQAPAPAPAMVSALAQ
APAVPVLPVLAQGPQVAAPWAPKPTDAGEGTSLBLAIIQQLFDDEDLGALLNSTDPAVFTD
LASNDVSEFOQQLNQGIPVAPHTEPMLIMEYFRAITRULTAQRPPDPAPAPLGPGLPNQ
LJLSGDEDFPSSTADMDESALISO (配列番号:4)

【 図 1 4 】

NEURO1-P65 (08_D1 とも命名)
QSNR1-QSNK-CSNRI-p65

核酸配列

ATGGTGTTACCCCTACGACGTGCCGACTACGCGAATTGCTTCAAAAAGAAGA
GAAAGGTAGGGATCC**gaattc**ccccggaaaaacccgtTTTGGAGTGTAAAGATTGGCG
GAAAGCTTCAAGCTAACAGTCAACCTCATCAGACACCAGAACGACTCAGccccgg
TTAACGggcTACAAGTGTGAAGAATGTGCCAACGGTTTACCAATCTCAAAC
TTACTAACATAAGAAAATTACtaccggggaaaaaccggTATAATGTAAAGCAATG
TGGGAAAGCTTGGAGTGTCCCCTAACAACTTCGGAGACGATCAGGAAAGCATTACcc
gggtttaaaa**gcggccgt**taatt**c**TACCTGGCCAGATGGACGATCTGGCACC
TTGAGGACAAACCTTAAAGGACATATGAGACCTTCAGGACCATCATGAAAGAACG
TCTCTTTCAGGGACCCACCGACCCCCGGCTCACCTGAGCCTATGGTGTGCCT
TCCCGGAGCTCAGCTTCTGTTCCAAAGGACAGCACCCTGAGCCTATGGTGTGCCT
CATCCCTGACCAACCATCAACTATGAGTCTTCCACCATGCTTCTCTCTCTGG
GCAGATCAGGGCCGGCTTCGGCCCTTGGCCCGGCCCTTCCCAAGTCTGGCCCGAG
GCTCCAGCCCCCTGGCCCTTGCTCCAGCCATGGTATGAGCTCTGGCCAGGGCCAG
CCCCCTGCCCCAGTCTAGGGCCAGGGCCCTCTCAGGGCTGTGGCCCACTCTGGCC
CAAGGGCCACCCAGGTGGGGAGAACGCTGTGCAAGGGCCCTGTGAGCTGGAG
TTTGATGTAGAACCTTGGGGCTCTGCTGTCACACCAAGCAGACCCAGTGTGAG
TCACAGACCTGGCATCGTGACAACTCCGAGTTTCAGCACCTGCTGAACCCAGGG
CATACCTGTGGCCCCCCCACACAACCTGAGGGCATGCTGATGGAGTACCCCTGAGGGT
ATAACTGGCTTGTGACAGCCGGAGGGCCCCGGACCCAGCTCTGGCCCACTTGG
GGGGGGGGGGCTCCCCAATGGCCCTTCTGGAGGRRGAAGACTTCTCCCTCAT
TCGGGGACATGGACTCTTCAGCCCTCTGAGTCAG TAA (配列番号: 1)

アミノ酸配列

MVYPVDPDYAEALLPKKKRKVGRIPIGKEPFECIKDCGKAFIQKSNLTRHQRHTG
EKPYKCEECGGKRAFTQSSNLTKRHHIITGKPKYCKRCGKAFGCPNLSLRRHGRHTG
GEKAAKAFTYLPDLTDDDRHIREKKRTRYTFSKMSKMSFFSGPDTDPRPPRRAVE
SRSSASVPKPAPQPYFTTSLSLTINYDEFTWMPFVSQICOSASALAPVQVLPQ
APAPAPAPAMVSALAQAOPAPVPLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTILSEALLQO
FDDDEDTGLALLGSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLEMEYPEA
ITRLVTAQRPPDPAAPLGLAPGLPNLGSQDDEDFTSIIADMDFSALLSQ (配列番号
2)

【 四 16 】

08_D04_p65:

核酸配列

ATGGTCATCCCCATACGACGTGCCCACTACGGCGAATTGCTCCAAAAGAAGAGAAG
GTAAGGATTCggattccggggaaaaccgTATAAGTCATGGAGTGTGGAAAGGCTTT
GGCAGGCTACACCTCACACGGGCCAGCGGATTCACccggggaaaaccgCTTCCAGT
TGTAACAAATGTCAGCGGAAAGTCTCCGGTCGACCCACTGAAGAACCCCACGAGACT
CATAccggggaaaaccgTATACATGAAACAGTGTGGAAAGCCTTCAGTGTTCAGT
TCCCTTCAAGACATGAAACCACATCACccgggtaaaaaagccgcataattcTACCTG
CCAGATACAGCGATCTCACCGGATTCAGAGGAAACCTAAAGGACATATGAGACCTTC
AAGAGCATCATGAAGAAGGACGTCTCACGGGCCACCCAGGGGGCCCTCACCTCGA
GGCCATGCTGCTCTTCAGCTCACGGCTCAGCTCTGICCCCAAGGCCACCCCCAGCCT
CCCCCTTACGTCATCCCTGAGCACCATCAACTATGATGAGTCTCCCATGTTTCT
TCTGGGCAGATCACCGCAGGCTCGGCTTGTGCCCCGGCCCTCCCAAAGTCTGGCCAG
GCTCCAGCCCCCTGCCCCCTECCTCACGGCATGTATCAGCTCTGCCCCAGGGCCAG
GTCCCCAGTCCTGCCCCAGGCCCCCTCAGCTCGTGGGCCCCCTACCTGGCCCAAGGCCAC
GAGCTGGGAAGGAAAGCTGCAAGGGCCCTCGCAGGCTCAGGTGTGATGAGAACG
CTGGGGGCTTGTGGCAACAGCACAGCACCCAGCTGTGTCACAGCACCTGGATCCTGGC
GACAACCTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTGAAACCGGCCATCTGTGGCCCCCACACA
GAGCCCCATGCTGATGGAGTACCCCTGAGCTATAACTCCCTAGTACAGCCCGAGGGCC
GAGCCCCAGGCTCTGCTTCACTGGGGGCCCGGGCTCCCAATGGCTCTCTTCTGGAG
GATGAAGACTTCCTCCATTGCGGACATGGACTCTCATGCCCTGCTGAGTCAG TAA (P
列番号: 5)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRVRGIRIPEKPFYKCMCECGAFNRRSLHTLRQRIFGEKPFQ
CTCKTQRKFESRDLHKTTRHTGPKYPTCROGCKAFVSSSLRHEHTTGEKAAYFL
PDFTDDDRHJEERKKRTRYTFETKCSIMKSPFSGFDPRFRPFRRIAVPSRSSAVFKPAWPQY
PFITSSLSTINYDEPMTMVFPSQISQASALAPAPPQVPIQAPAPAPAMPSALAAQAP
VPVIAFPGPQAVAPPAPKPTQAGECTLSSEALLQLQFDDEEDLGALLGNSTDPAVEFTLDSV
DDEPESFQOLLINGPVAWTHTEPMXEPAITKLTVTAQRFDPAPAPLPGAPGLPNGLLSG
DDEPESFQOLLINGPVAWTHTEPMXEPAITKLTVTAQRFDPAPAPLPGAPGLPNGLLSG
(配列番号:6)

【図17】

Name: P_B08
QSNR1-DSNR-DSNR-p65

核酸配列

ATGGTGTACCCCTAACGACGTGCCGACTACCGGAATTGCTCCAAAAAGAAGAGAAAG
GTAAGGATCCgaattccggggaaaaacgtttTGAGTGAAAGATTGGGAAAGCTTC
ATTCAAGCTAAEAKCATCAGACACCAGAGAACTCACaccggggaaaaaccgTATGCT
TGCCCCCTGCAGTCTGGATGCCGCTTTCTGATTCTGTAACCCCTACCGCCATATC
CGCATCCACaccggggaaaaacggTATGCTGCCCTGCGAGTCTCGGATGCCGCTTT
TCTGATTCTGCAACCTAACCGCCATATCCGATCCACaccgtgaaaaa~~gcggcgct~~
aaattcAACCTGCCAGATAACGACGATCTCACCGGATTCAGGGAGAACGTTAAAGGACA
TATGAGACCTCAAGAGGATCATGAGAAGAGTCTTTCAGCGGACCCACCGGACCCCG
CCTCCACCTCGACGCATTGCTGCTTCCCAGCTCAGCTCTGCCCCAACCGAGCA
CCCCAGCCCTATCTCTTACCTCATCTCTGGAGCAGCATCAACTATGATGACTTCTCC
ATGGTGTCTCTCTGGAGCAGATCACCGAGGCTCGGGCTTGGCCCCGGCCCTCCCCAA
GTCTGCCCCAGGCTCCAGCCCTGCCCCCTGCTCCAGGATCTGGATCAGCTCTGGCCAG
CCCCAGCCCTGTCCCAGCTAGCCCTAGCCCCAGGCTCTCAGGCTGTGGCCACCTGCC
CCCCAGCCACCCAGGCTGGGAAGAACGGCTCAGAGGGCCCTGCTCCAGCTGCACTT
GATGATGAAAGACCTGGGGCCCTGCTTGGCAACGACAGCACAGCCAGCTGTTAACAGAC
CTGGCAATCCGAGCAACTCCGAGTCTCAGGCTGAAACAGGGATACCTTGCTGGCC
CCCCACAACTCAGCCCATGCTGATGGAGTACCTGTGGGCTTAGCTAGGACA
GCCAGAGGCCCCCAGCCCTGCTTGTGGGCCCCGGCTCCCAAATGGC
CTCTCTCAGGAGATGAAGACTTCTCTCCATGGGACATGGACTCTCTCAGGCCGTG
ACTGAG TAA (配列番号:7)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYECDKDGKAFTQKSNLIRHQRHTGEKPYA
CPWESCDPRFSDSSNLTIRHRIHTGEKPYACPVESCDRRFSDSLNLTRHRIHTGEKAAA
KEYLPEDTDRHRRIEKKRRTYETPKS1IMKSPFSGPTDPRPFPPIAVESRSASVVKPA
PQPYEPFTSSLSTINYDEEFTMVFPSQIISOASALAPAPPVILPQAPAPAPAMVSALAO
APAPPVLPALPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLTSEALLQLQFDDEDLGALLGNSTIDPAVPTD
LASVDNSEFQOLINNOQIPVAPHTTEPMLMEYPEA1TRLVTIAQRPDPAPAPLGAAPGLPNG
LLSGDEFDFSSIADMDFSALLSQ (配列番号:8)

【図18】

Name: K_D10
QSHV-WSNR-WSNR-RDNQ-kid

核酸配列

ATGGTGTACCCCTAACGACGTGCCGACTACCGGAATTGCTCCAAAAAGAAGAGAAAG
GTAAGGATCCgaattccggggaaaaacggTATGAGTGATGACTGTGAAAGCTT
AGCCAGAGCTCATCTGAATGTCACAAAAGAACTCACaccggggaaaaaccgTACAGA
TGTGAGGAATGTTGCAAAGCCTTGTGGCCCTAAACCTTACTAGACATAAGAGAAATT
CAaccggggaaaaaccgTACAGATGAGGAAATGTCACAAAACCTTGTGGCCCTCA
AACCTTACTAGACATAAGAGAAATTCAAccggggaaaaaccgTTTGTGCCCCCTGAGTGT
CCTAAAGCGCTCATGAGATGCCACCTGACCCAGCATATCAAGACCCAAccggtgaa
aaag~~gcggcgct~~taattcGTGTCAGTGACATTGAAAGATGTCCTGTCTCTTACTCGG
GACGAGTGAAGAAGCTGATCTGTCAGAGAACCTGTAACCGTGAAGGTGATGTCGGAG
AATTACAGCAACCTGGCTCCATGGCAGGATTCTGTTACCAAACCAAGGTGATCTCC
CTGTTGCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:9)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYECDHCGKSFSQSSHINVHKRHTGEKPYR
CEECGKAFRNPSNLTRHRIHTGEKPYRCDECGKAFRWPSNLTRHRIHTGEKPFACPEC
PKRFMRSDNLTOHIKHTGEKAAAKFVSVTFEDAVLFTRDEWKLDLSQRSLYREVMLE
NYSNLASMAFLTPKPKVISLLOQGEDPW (配列番号:10)

【図19】

Name: K_F02
DSAR2-RDKR-RDER1-QTHRI-kid

核酸配列

ATGGTGTACCCCTAACGACGTGCCGACTACCGGAATTGCTCCAAAAAGAAGAGAAAG
GTAAGGATCCgaattccggggaaaaacggTACTCTGTGGCTTGTGGCAAATCTTC
TCTGACTCCAGTGCACAAAGGAGACACTGCATTACACaccggggaaaaaccgTATGTA
TGCAGTGTAGAGGGATGTACGTGGAAATTGCCCCTCAGATAAGCTAACAGACACAAG
AAAAGCACCAGGGaaaaaccgTATGATGCTGAGGGATGTACGTGGAAATT
GCCCGCTCAGATGAGCTAACAGACACAAGAAAGGCACaccggggaaaaaccgTATGAG
TGTACGATTGCGGAAAGCTTTAGGCAGAGCACCCACCTACTCGCACCGGAGGATC
CACaccgggtaaaaa~~gcggcgct~~taattcGTGTCAGTGACATTGAAAGATGTCGGTGTG
CTCTTACTCGGGACAGCTGGAGAAGCTGATCTGTCAGAGAACCTGTAACCGTGTG
GTGATGCTGGAGAATTACAGAACCTGGCTCATGGCAGGATCTCTGTTACCAAACCA
AAGGTGATCTCCCTGTTCCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:11)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYSCGICGKSFSDSLAKRRHCLHTGEKPYV
CDVEGCTWKFARSDKLNRRHKKRHTGEKPYVCDVEGCTWKFARSDELNRHKKRHTGEKPYE
CHDCGKSFRQSTHLRHHRIHTGEKAAAKFVSVTFEDAVLFTRDEWKLDLSQRSLYRE
VMLENSNLASMAFLTPKPKVISLLOQGEDPW (配列番号:12)

【図20】

Name: K_44_11_D01
QSHV-QSNI-QTHR1-CSNR1-kid

核酸配列

ATGGTGTACCCCTAACGACGTGCCGACTACCGGAATTGCTCCAAAAAGAAGAAAG
GAAAGGATCCgaattccggggaaaaacggTATGAGTGATGACTGTGG
AAAATCTTGTAGCCAGAGCTCATCTGAATGTCACAAAAGAACTCACaccggg
ggggaaaaaccgTACATGTCAGTGAGTGTGGCCAGGCTTCAAGCCAGAACGCTAAACC
TCATCATACACCAGAGGACACAccggggaaaaaccgTATGAGTGTCAGGATTG
CGGAAAGTCTTGTGGCAGAGCACCCACCTCACTCGCACCGAGGATCCACacc
ggggaaaaaccgTATAATGTAACGAAATGTCGGAAAGCTTGTGGATGTCCTCAA
ACCTTCAAGGAGCATGAGAGACTCACaccgggtaaaaa~~gcggcgct~~taattcGT
GTCAGTGACATTGAAAGATGTCGGTGTGCTCTTACTCGGAGCAGTGGAAAGAAG
CTGGATCTGTCAGAGAACCTGTAACCGTGAAGGTGATGTCGGAGAATTACAGCA
ACCTGGCCCTCATGGCAGGATTCTGTTACCAAACCAAGGTGATCTCCCTGTT
GCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:13)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYECDHCGKSFSQSSHINVHKRHTGE
EKPYMCSECGRGFSQKSNLTHQRHTGEKPYECDHCGKSFRQSTHLTRHRIHT
GEKPYKCKQCGKAFCGCPNSLRRHGRHTGEKAAAKFVSVTFEDAVLFTRDEWK
LDLSQRSLYREVMLENYSNLASMAFLTPKPKVISLLOQGEDPW (□□番号:14)

【図21】

Name: K 44_11_G12

QSHV-VSTR-RDNO-QTHR1-kid

核酸配列

ATGGTGACCCCTACGACGTGCCGACTACGCCGAATTGCTCaaaaAGAAG
GAAAGGTAGGGATCC**gaattc**ccggggaaaaaccgTATGAGTGTGATCACTGTGG
 AAAATCCTTAGCCAGAGCTCATCTGAATGTGCACAAAAGAACTCACccggg
 gaaaaaccgTATGAGTGTAAATTACTGTGAAAAACCTTGTGAGCTAACCC
 TTATTAGACATCAGAGAATCCA CaccggggaaaaaccgTTGCCTGCCGTAGTG
 TCCTAACGGCTCATGAGATCGACAACCTGACCCAGCATATCAAGACCCACcc
 gggggaaaaaccgTATGAGTGTACGATTGCGAAAGTCTTGTAGCAGACCC
 ACCTCACTCGGACCGAGGATCCACccgggtaaaaa**ggggccgc**ttaattcGT
 GTCACTGACATTGAAAGATGTGGCTGTCTTACTCGGACAGTGGAGAG
 CTGGATCTGTCTCAGAGAAGGCTGTACCGTGAGGTGATGTCAGAGAATTACAGCA
 ACCTGGCCTCCATGGCAGGATTCGTGTTACCAAACCAAGGTGATCTCCCTGTT
 GCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:15)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYECDHCGKSFQSQSSHNVHKRTHGEKPYE
 CNYCGKTFGSVSSTLIRHRIHTGEKFACPECPKRFMSDNLTHQIKHTGEKPYECHDC
 GKSFRQSTHLTRHRIHTGEKAAKFVSVTFFEDAVFLTRDEWKLDLSQRSLYREVMLE
 NYSNLASMAFGLFTKPKVISLLQQGEDPW (配列番号:16)

【図23】

F121_p65
QSHT-RSHR-RDHT-p65

核酸配列

ATGGTGACCCCTACGACGTGCCGACTACGCCGAATTGCTCaaaaAGAAGAAG
GTAGGGATCC**gaattc**ccggggaaaaaccgTACAAATGTGAAAGATGTGGAAAGCCTT
 AGGAGTCCCTCACACCTTACTACACATAAATAATTGATCAccgggaaaaaccgTAAAG
 TGCGTGGAGTGTGGAAAGGCTTACCGCAGGTACACCTCACGGGAACAGCGGATT
 CAACccggggaaaaaccgTCACTGTAACCTGTGAGCTAACCTCCGGTCCGAC
 CACCTGAAGACCCACACCAGGACTCATccgggtaaaaa**ggggccgc**ttaattcTACCTG
 CCAGATACAGACGATCGTACCCGATGAGGAGAACCTTAAAGGACATATGACACCTC
 AAAGACATCATGAAGAACAGTCTTACCGGACCCAGCCGGCTCCACCTCGA
 CGCATGCTGTGCTCCCGCAGCTCAGCTCTGTCACCCAGCAGCCCCAGCCCTAT
 CCCATTACGTCATCCTGAGCACCATCAACATGATGAGTTTCCACCATGGTGTTCCT
 TCTGGGAGATCAGCCAGGCTTCGGCTTGGCCCGGGCCCTCCCGAACGTCCTGCCAG
 GCTCCAGCCCTGCCCTGCTCAGCCATGGTATCAGCTGGCCAGGCCAGCCCT
 GTCCCACTCTGCCCCAGCCCTCTCAGGGCTGTGGCCCACCTGGCCCGAACGCCAG
 CAGGTGGGAAGGAAGCAGCTGTCAGGGCTCTGCTGAGCTTGTGATGAGAC
 CTGGGGCTCTGGCTGAGCACAGACGACAGCCAGCTGTACACGACTGGCATCGTC
 CACAACTCCGAGTTTACCGACGCTGCAACCCAGGCTAACCTGGCCCCACACAACT
 GAGCCCATGCTGATGGAGTACCCGTAGGGCTATACTGCCCTAGTGACAGCCCAGAGGCC
 CCCGACCCAGCTCTGCTCCACTGGGGCCCGGGCTCCCAATGGCTCTTCAGGA
 GATGAAGACATTCCTCCATTGGCAGATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAGTCAG TAA (配
 列番号:19)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYKCEECGKRAFRQSSHLLTHKIIHTGEKPYK
 CMECGKAFNRSHLTRHRIHTGEKFFOCKTCQRKFSSRSDHLKTHTRHTGEKAAKFL
 PDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKSPSFSGPTDPRLPPIPRTIAVPSRSSASVPKPAQPY
 PFTSSLSTINYDEFPTMVEPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQPAP
 VPVLAPGPPOAVAPPAPKPTQAGEGTILSEALLQLQFDEDLGLGNSTDPAVFTDLASV
 DNSEFQQLNQGIPVPAHTEPEMLMEYPEAIIRTLVTACRPPDPAPAPLGAAPGLPNGLSG
 DEDFSSIADMDFSALLSQ (配列番号:20)

【図22】

F104_p65

RDHT-RSHR-QSHR2-p65

核酸配列

ATGGTGACCCCTACGACGTGCCGACTACGCCGAATTGCTCaaaaAGAAGAGAAAAG
GTAGGGATCC**gaattc**ccggggaaaaaccgTTCCAGTGTAAAACCTTGTAGCGAAAGTTC
 TCCCGTCCGACCCACCTGAAGACCCACCCAGCTCATaccggggaaaaaccgTATAAG
 TGCGTGGAGTGTGGAAAGGCTTACCGCAGGTACACCTCACGGGAACAGCGGATT
 CAACccggggaaaaaccgTCACTGTAACCTGTGAGCTAACCTCCGGTCCGAC
 CACCTGAAGACCCACACCAGGACTCATccgggtaaaaa**ggggccgc**ttaattcTACCTG
 CCAGATACAGACGATCGTACCCGATGAGGAGAACCTTAAAGGACATATGACACCTC
 AAAGACATCATGAAGAACAGTCTTACCGGACCCAGCCGGCTCCACCTCGA
 CGCATGCTGTGCTCCCGCAGCTCAGCTCTGTCACCCAGCAGCCCCAGCCCTAT
 CCCATTACGTCATCCTGAGCACCATCAACATGATGAGTTTCCACCATGGTGTTCCT
 TCTGGGAGATCAGCCAGGCTTCGGCTTGGCCCGGGCCCTCCCGAACGTCCTGCCAG
 GCTCCAGCCCTGCCCTGCTCAGCCATGGTATCAGCTGGCCAGGCCAGCCCT
 GTCCCACTCTGCCCCAGCCCTCTCAGGGCTGTGGCCCACCTGGCCCGAACGCCAG
 CAGGTGGGAAGGAAGCAGCTGTCAGGGCTCTGCTGAGCTTGTGATGAGAC
 CTGGGGCTCTGGCTGAGCACAGACGACAGCCAGCTGTACACGACTGGCATCGTC
 CACAACTCCGAGTTTACCGACGCTGCAACCCAGGCTAACCTGGCCCCACACAACT
 GAGCCCATGCTGATGGAGTACCCGTAGGGCTATACTGCCCTAGTGACAGCCCAGAGGCC
 CCCGACCCAGCTCTGCTCCACTGGGGCCCGGGCTCCCAATGGCTCTTCAGGA
 GATGAAGACATTCCTCCATTGGCAGATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAGTCAG TAA (配
 列番号:17)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYKCEECGKRAFRQSSHLLTHKIIHTGEKPYK
 CMECGKAFNRSHLTRHRIHTGEKFFOCKTCQRKFSSRSDHLKTHTRHTGEKAAKFL
 PDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKSPSFSGPTDPRLPPIPRTIAVPSRSSASVPKPAQPY
 PFTSSLSTINYDEFPTMVEPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQPAP
 VPVLAPGPPOAVAPPAPKPTQAGEGTILSEALLQLQFDEDLGLGNSTDPAVFTDLASV
 DNSEFQQLNQGIPVPAHTEPEMLMEYPEAIIRTLVTACRPPDPAPAPLGAAPGLPNGLSG
 DEDFSSIADMDFSALLSQ (配列番号:18)

【図24】

K12_A11

RDHT-QSNV2-QTHR1-QFNR-kid

核酸配列

ATGGTGACCCCTACGACGTGCCGACTACGCCGAATTGCTCaaaaAGAAGAGAAAAG
GTAGGGATCC**gaattc**ccggggaaaaaccgTTCCAGTGTAAAACCTTGTAGCGAAAGTTC
 TCCCGTCCGACCCACCTGAAGACCCACCCAGCTCATaccggggaaaaaccgTATGTT
 TGCTCAAAATGTGGAAAGCCTTCACTCAGGTTCAATCTGACTGTACATCAAAATC
 CAACccggggaaaaaccgTATGAGTGTACGATTGCGAAAGTCTTCTAGGCAGAGCACC
 CACCTCAGCTGGCACGGAGGATCCACccggggaaaaaccgTATAAGTGTACATCAATGT
 GGGAAAGCCTTATTCAATCCTTAACTTCGAAGACATGAGAGAACTCACccgggtaaa
 aa**ggggccgc**ttaattcGTGTCAGTGAACATGAGATGTGGCTGTCTTACTTCGG
 GACCGAGCTGGAGAACGCTGTCAGGGCTCTGCTGAGCTTGTGATGAGAC
 ATTACAGCAACCTGGCCATGGCAGATGGCTCTGAGTCAGTCAAGCTGGAGGTGATCTCC
 CTGTTGCAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:259)

アミノ酸配列

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYKCEECGKRAFRQSSHLLTHKIIHTGEKPYK
 CMECGKAFNRSHLTRHRIHTGEKFFOCKTCQRKFSSRSDHLKTHTRHTGEKAAKFL
 PDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKSPSFSGPTDPRLPPIPRTIAVPSRSSASVPKPAQPY
 PFTSSLSTINYDEFPTMVEPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQPAP
 VPVLAPGPPOAVAPPAPKPTQAGEGTILSEALLQLQFDEDLGLGNSTDPAVFTDLASV
 DNSEFQQLNQGIPVPAHTEPEMLMEYPEAIIRTLVTACRPPDPAPAPLGAAPGLPNGLSG
 DEDFSSIADMDFSALLSQ (配列番号:260)

【図25】

K44-16-E12

QSHV-QSSR1-QTHR1-kid

核酸配列

```

ATGGTGTAACCCCTACGACGTGCCGACTACCGGAATTGCTCCAAAAAGAAGAGAAAG
GTAAGGATCCgaattcccggggaaaaacgcTATGAGTGTGATCACTGTGGAAAATCCTT
AGCCAGAGCTCTCATCTGAATGTGCACAAAGAACTCAcaccggggaaaaacgcTATAAG
TGCCTGATTGTGGAAAGAGTTTAGTCAGAGTTCAGCCTATTGCCACCAGCGGACA
CACaccggggaaaaacgcTATGAGTGTCACTGCGGAAGTCCTTAGGCAGAGCACC
CACCTCACTCGGCACCGGAGGATCCAcaccgggtaaaaagcccgcctaaattcGTGTCA
GTGACATTGAAGATGTGGCTGTGCTCTTACTCGGGACGACTGGAAAGACTGGATCTG
TCAGAGAAGCTGTACCCGTGAGGTGATGCTGAGAATTACAGCAACCTGGCTTCATG
GCAGGATTCTGTTACCAAACCAAGGTGATCTCCCTGTTGCAACAGAGGAGGATCCC
TGGTAA (配列番号:261)

```

アミノ酸配列

```

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPYECDHCGKSFSQSSHLMNVHKRTHTGEKPYK
CPDCGKSFQSSSLTRHQRTHGEKPYECHDCGKSFRQSTHLTRHRRHTGEKAAKFVS
VTFFEDAVLFTRDEWKLDLSQRSLYREVMLENYSNLASMAGFLTPKPVISLLQQGEDP
W (配列番号:262)

```

【図26】

K13_B08

QSNR1-QSSR1-QTHR1-RDKR-kid

核酸配列

```

ATGGTGTAACCCCTACGACGTGCCGACTACCGGAATTGCTCCAAAAAGAAGAGAAAG
GTAAGGATCCgaattcccggggaaaaacgcTTGAGTGTAAAGATTGCGGAAAGCTTC
ATTAGAAGTCAAACCTCATCAGACACCAAGAGAACTCAcaccggggaaaaacgcTATAAG
TGCCTGATTGTGGAAAGAGTTTAGTCAGAGTTCAGCCTATTGCCACCAGCGGACA
CACaccggggaaaaacgcTATGAGTGTCACTGCGGAAGTCCTTAGGCAGAGCACC
CACCTCACTCGGCACCGGAGGATCCAcaccggggaaaaacgcTATGTATGCGATGTAGAG
GGATGTACCTGGAAATTGCGCGTCAGATAAGCTCAACAGACACAAGAAAAGGCACacc
gggtaaaaagcccgcctaaattcGTGTCACTGACATTGAGATGTGGCTGTGCTCTT
ACTCGGGACGAGTGGAAAGACTGGATCTGTCAGAGAAGCCTGACCGTGAGGTGATG
CTGGAGAATTACACCAACCTGGCCTCCATGGCAGGATTCTGTTACCAAACCAAAGGTG
ATCTCCCTGTTGAGCAAGGAGAGGATCCCTGGTAA (配列番号:263)

```

アミノ酸配列

```

MVYPYDVPDYAELPPKKRKVGIRIPGEKPFECKDCGKAFIQKSNLIRHQRTHGEKPYK
CPDCGKSFQSSSLTRHQRTHGEKPYECHDCGKSFRQSTHLTRHRRHTGEKPYVCDVE
GCTWKFARSDKLNRHKKRHTGEKAAKFVSVTFFEDAVLFTRDEWKLDLSQRSLYREVM
LENYSNLASMAGFLTPKPVISLLQQGEDP (配列番号:264)

```

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0085】

前記方法は次の特徴の少なくとも一つを含み得る：前記人工キメラタンパク質は転写調節ドメイン（例：転写活性または抑制ドメイン）からなる；前記細胞内的人工キメラタンパク質の発現は水運搬体（water transporter）の転写水準を変化させる；S. cerevisiae 細胞内の前記人工キメラタンパク質の発現はYLL053C遺伝子またはPDR5遺伝子の転写水準を変化させる；前記人工キメラタンパク質はK1～K11から選別されたポリペプチドと特定のDNA結合部位に対して競争する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

他の態様において、本発明は抗真菌製剤に対する真菌菌株の感受性を変化させる方法を提供する。前記方法は、YLL053C、AQY1、YJRW147W、YLL052CまたはYPL091Wと30、50、60、70、80、90または95%以上同一な50個以上のアミノ酸の配列を含むタンパク質の発現または活性を変化させることを含む。前記真菌細胞は、たとえば、カンジダ（Candida）、ピキア（Pichia）、ハンセヌラ（Hansenula）、ヒストプラスマ（Histoplasma）またはクリプトコックス（Cryptococcus）などのような酵母細胞である。一実施態様において、活性または発現の増加によって感受性が

減少される；すなわち、抵抗性が増加する。他の実施態様において、感受性を減少させるため、すなわち、抵抗性を増加させるために活性または発現を増加させる。他の実施態様において、感受性を増加させるために活性または発現を減少させる。活性または発現を変化させることは、人工転写因子の発現、YLL053C、AQY1、YJR147W、YLL052CまたはYPL091W遺伝子に相応する少なくとも20個塩基の配列を含む二本鎖RNA(dsRNA)を細胞に接触されるか、または化学物質を細胞に接触されることを含み得る。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

関連する一つの方法は、前記タンパク質との相互作用に対して試験化合物（例：小さい有機化合物）をスクリーニングして、たとえば、YLL053C/AQY1関連タンパク質の抑制を同定するか、AQY1、YJR147W、YLL052C、YLL053CまたはYPL091Wの活性または発現を変化させる試験物質をスクリーニングすることを含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

1. Neuro1-p65および関連分子

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0107

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0107】

前記ポリペプチドは、たとえば、ネズミのNeuro2a細胞に効果的な濃度で存在するとき神経突起を誘導し得る。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：2内のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：2内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3または2個以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的（conservative）置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：2内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。たとえば、前記ポリペプチドは10nM以下のK_dを有し、標的DNA部位に対する結合のためにNeuro1-p65キメラZFP（配列番号：2）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性化または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは一つ、2つまたは3つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

2. Osteo1-p65および関連分子

【手続補正8】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0115**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0115】**

前記ポリペプチドは、たとえば、C2C12筋芽細胞株に効果的な濃度で存在するとき、骨芽細胞(osteoblasts)の他の標識またはアルカリホスファターゼを誘導できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：4内のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：4内に存在するジンクフィンガードメイン内の8、6、4、3、または2つ未満の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：4内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。たとえば、前記ポリペプチドはK_d 10nM未満で結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにOsteo1-p65キメラZFP(配列番号：4)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。

【手続補正9】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0118**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0118】**

3.08-D04-p65および関連分子

【手続補正10】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0123**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0123】**

前記ポリペプチドは、たとえば、ヒト293細胞に効果的な濃度で存在するとき、インシュリン遺伝子の発現を誘導できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：6内のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：6内に存在するジンクフィンガードメイン内で8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：6内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM未満のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のために08-D04-p65キメラZFP(配列番号：6)と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上の追加のジンクフィンガードメインを含み得る。

【手続補正11】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0155**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0155】**

前記ポリペプチドは哺乳動物細胞内でウイルスプロモーターのような強力なプロモーターに作動可能に連結された遺伝子のような異種遺伝子の発現を増加できる。たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：260のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：260内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：260内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK12-A11キメラZFP（配列番号：260）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。K12-A11キメラZFPは抑制ドメインを含んでいるので、異種遺伝子のプロモーターに直接結合することによって異種遺伝子の発現を増加させ得る。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0193

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0193】

この際、Bは任意のアミノ酸であるか、選択的にフェニルアラニンまたはチロシンである；Jは任意のアミノ酸であるか、選択的に疎水性アミノ酸である。この整列は次のように略称する：QSHV-QSNI-QTHR-CSNRおよびQSHV-VSTR-RD
NQ-QTHR。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0194

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0194】

たとえば、分離された前記ポリペプチドは配列番号：14または配列番号：16のジンクフィンガー整列と同じであるか、配列番号：14または16内に存在するジンクフィンガードメインにおいて8、6、4、3、または2つ以下の置換によって変わったアミノ酸配列を含み得る。置換は保存的置換であってもよい。前記分離されたポリペプチドは配列番号：14または16内のジンクフィンガー整列と少なくとも80、85、90、95または97%同一な配列を有してもよい。一実施態様において、前記ポリペプチドは標的DNA部位に特異的に結合してもよい。前記ポリペプチドは、たとえば、10nM以下のK_dで結合する部位のような標的DNA部位に対する結合のためにK44-11-D01またはK44-11-G12キメラZFP（配列番号：14または16）と競争できる。また、前記ポリペプチドは活性または抑制ドメインのような転写調節ドメインを含み得る。前記ポリペプチドは1つ、2つまたは3つ、またはそれ以上のジンクフィンガードメインを含み得る。ポリペプチドは、たとえば、タンパク質生産を調節するのに使用できる。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0522

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0522】

【図1】酵母プラスマミドpYTC-Libの遺伝子マップである。

【図2】例示的な標的-誘導接近方法の模式図である。

【図3A】例示的なジンクフィンガータンパク質ライブラリーの製造方法に対する模式図である。

【図3B】例示的な表現型・誘導接近方法の模式図である。

【図4】一時的にトランスフェクトされたZFPの発現プロファイルを示す。左図において、p65活性化ドメインのみを発現する細胞を対照細胞と比較した。右図において、F121p65ジンクフィンガータンパク質を発現する細胞を対照細胞と比較した。対角線から離脱した各点はその発現が実質上変化した遺伝子を意味する。

【図5】安定的にトランスフェクトされたZFPの発現プロファイルを示す図である。

【図6】図6のAはK5-ZFPに対するDNA結合ドメイン突然変異および作用ドメインの変化が薬剤抵抗性に及ぼす影響を示し、図6のBはK5とYLL053C過多発現の効果を示す。

【図7】3-フィンガーライブラリーの製作方法を示す。

【図8】対照細胞および神経突起の形成が誘導されたZFP-発現細胞の写真である。

図8のAはレチノイン酸(RA)を処理していないpCDNA3(空ベクター)-トランスフェクトされたNeuro2A細胞であり、図8のBはRAを処理していないNeuro1-p65(また08_D01-65とも呼ぶ)であり、図8のCは10uM RAを処理したpCDNA3(空ベクター)-トランスフェクトされた細胞であり、図8のDは10uM RAを処理したNeuro1-p65の発現である。

【図9】インシュリン遺伝子が過発現された細胞に対する比較マイクロアレイデータを示す。キメラZFPは08_D04_p65である。その配列は図16に示されている。

【図10A】ZFP-DNA結合特異性を列挙する表である。

【図10B】ジンクフィンガードメインおよび認識部位配列の相互連関性を示す模式図である。

【図11】人工ZFPの標的を同定する方法に対するフローチャートである。

【図12】分化を誘導するZFPを同定する方法に対する模式図である。

【図13】F104-p65ZFPが存在する細胞に対する様々な時間帯別比較マイクロアレイ資料を示す。

【図14】神経突起を誘導できるタンパク質であるNeuro1-p65に対するコーディング核酸配列(配列番号:1)およびアミノ酸配列(配列番号:2)を示す。Neuro1-p65はジンクフィンガードメインQSNR1-QSNK-CSNR1およびp65転写活性化ドメインを含む。QSNR1-QSNK-CSNR1-p65のドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質が神経突起をまた誘導できる。

【図15】骨細胞を誘導できるタンパク質であるOsteo1-p65に対するコーディング核酸配列(配列番号:3)およびアミノ酸配列(配列番号:4)を示す。Osteo1-p65はジンクフィンガードメインであるRDKR-QTHR1-VSTR-RDKRおよびp65活性化ドメインを含む。RDKR-QTHR1-VSTR-RDKR-p65のドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も骨細胞を誘導できる。

【図16】インシュリン生産(図9)を増加させるタンパク質である08_D04_p65に対するコーディング核酸配列(配列番号:5)とアミノ酸配列(配列番号:6)を示す。08_D04_p65はジンクフィンガードメインであるRSHR-RDHT-VSSRおよびp65活性化ドメインを含む。RSHR-RDHT-VSSRのドメインと同一パターンのDNA接触残基を有する少なくとも2つまたは3つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もインシュリンの生産を増加させることができる。

【図17】SV40-SEAPの生産を増加させるタンパク質であるP_B08に対するコーディング核酸配列(配列番号:7)およびアミノ酸配列(配列番号:8)を示す。

P_B08はジンクフィンガードメインであるQSNR1-DSNR-DSNRとp65活性化ドメインを含む。QSNR1-DSNR-DSNRのドメインと同一パターンのD

N A 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も S V 4 0 - S E A P の生産を増加させることができる。

【図 18】細胞増殖を減少させるタンパク質である K_D 1 0 に対するコーディング核酸配列（配列番号：9）およびアミノ酸配列（配列番号：10）を示す。K_D 1 0 はジンクフィンガードメインである Q S H V - W S N R - W S N R - R D N Q および k i d 抑制ドメインを含む。Q S H V - W S N R - W S N R - R D N Q のドメインと同一パターンの DNA 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も細胞増殖を抑制できる。

【図 19】細胞増殖を增加させるタンパク質、K_F 0 2 に対するコーディング核酸配列（配列番号：11）とアミノ酸配列（配列番号：12）を示す。K_F 0 2 はジンクフィンガードメインである D S A R 2 - R D K R - R D E R 1 - Q T H R 1 および k i d 抑制ドメインを含む。D S A R 2 - R D K R - R D E R 1 - Q T H R 1 のドメインと同一パターンの DNA 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質も細胞増殖を增加させることができる。

【図 20】タンパク質の発現を増加させるタンパク質である K 4 4 _ 1 1 _ D 0 1 に対するコーディング核酸配列（配列番号：13）およびアミノ酸配列（配列番号：14）を示す。K 4 4 _ 1 1 _ D 0 1 はジンクフィンガードメイン Q S H V - Q S N I - Q T H R 1 - C S N R 1 と k i d 抑制ドメインを含む。Q S H V - Q S N I - Q T H R 1 - C S N R 1 のドメインと同一な DNA 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もタンパク質発現を増加させることができる。

【図 21】タンパク質発現を増加させるタンパク質である K 4 4 _ 1 1 _ G 1 2 に対するコーディング核酸配列（配列番号：15）およびアミノ酸配列（配列番号：16）を示す。K 4 4 _ 1 1 _ G 1 2 はジンクフィンガードメインである Q S H V - V S T R - R D N Q - Q T H R 1 および k i d 抑制ドメインを含む。Q S H V - V S T R - R D N Q - Q T H R 1 のドメインと同一な DNA 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もタンパク質発現を増加できる。

【図 22】F 1 0 4 _ p 6 5 に対するコーディング核酸配列（配列番号：17）およびアミノ酸配列（配列番号：18）を示す。F 1 0 4 _ p 6 5 はジンクフィンガードメインである R D H T - R S H R - Q S H R 2 - p 6 5 を含む。

【図 23】F 1 2 1 _ p 6 5 に対するコーディング核酸配列（配列番号：19）およびアミノ酸配列（配列番号：20）を示す。F 1 2 1 _ p 6 5 はジンクフィンガードメインである Q S H T - R S H R - R D H T - p 6 5 を含む。Q S H T - R S H R - R D H T のドメインと同一パターンの DNA 接触残基を有する少なくとも 2 つまたは 3 つの連続的なジンクフィンガードメインを有する他の人工タンパク質もインシュリン - 類似成長因子 2 の転写を増加させることができる。

【図 24】ジンクフィンガードメインである R D H T - Q S N V 2 - Q T H R 1 - Q F N R - k i d を含む K 1 2 _ A 1 1 に対するコーディング核酸配列（配列番号：259）およびアミノ酸配列（配列番号：260）を示す。

【図 25】ジンクフィンガードメインである Q S H V - Q S S R 1 - Q T H R 1 - k i d を含む K 4 4 - 1 6 - E 1 2 に対するコーディング核酸配列（配列番号：261）およびアミノ酸配列（配列番号：262）を示す。

【図 26】ジンクフィンガードメインである Q S N R 1 - Q S S R 1 - Q T H R 1 - R D K R - k i d を含む K 1 3 _ B 0 8 に対するコーディング核酸配列（配列番号：263）およびアミノ酸配列（配列番号：264）を示す。図 14 ~ 図 26 の DNA 配列は H A タグ (tag) (灰色下線) をコーディングする配列および核位置信号 (nuclear localization signal、ボックスで表記) をコーディングする配列を含み得る。開始および終了コドンは下線で表示されている。小文字は連結配列を示す。アミノ酸配列において、イタリック体および網かけ文字はジンクフィンガードメインを示し、網かけ文字でありながらイタ

リック体でないものは k i d や p 6 5 ドメインのような調節ドメインを示す。 図 1 4 ~ 図 2 4 の D N A 配列は H A タグ (tag) (灰色下線) をコーディングする配列および核位置信号 (ポックスで表記) をコーディングする配列を含む。開始および終了コドンは下線で表示されている。網かけ文字は k i d または p 6 5 ドメインのような調節ドメインをコーディングする配列を示す。小文字は連結配列を示す。アミノ酸配列と関連して、イタリック体および網かけ文字はジンクフィンガードメインを示し、網かけ文字でありながらイタリック体でないものは K i d や p 6 5 ドメインのような調節ドメインを示す

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR02/02309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 C12N 5/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7 C12N 5/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI pubmed database, Delphion Research Intellectual Property network database , STN CAplus		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gene Ther 2000 Jun;7(12):1076-83 see entire document	1
A	J Biol Chem 2000 Oct 20;275(42):32617-27 see entire document	1-6,7-16, 22-23
A	Biochemistry 1998 Sep 29;37(39):13827-34 see entire document	1-6,7-16, 22-23
A	Biochemistry 2000 Apr 18;39(15):4383-90 see entire document	1-6,7-16, 22-23
A	J Biol Chem 2002 Nov 1;277(44):42224-32 see entire document	1-6,7-16, 22-23
A	Hum Mol Genet 2000 Jul 22;9(12):1853-64 see entire document	1-6,7-16, 22-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 26 MARCH 2003 (26.03.2003)	Date of mailing of the international search report 26 MARCH 2003 (26.03.2003)	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer LIM, Hea Joon Telephone No. 82-42-481-5590	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	E
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B

(31)優先権主張番号 60/401,089

(32)優先日 平成14年8月5日(2002.8.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 キム、ジン - ソ

大韓民国、305-390 デジョン、ユソン - グ、ジョンミン - ドン 299-8、ナンバー2
02

(72)発明者 パーク、キュン - ソン

大韓民国、305-720 デジョン、ユソン - グ、シンソン - ドン、ラッキー・ハナ・アパート
メント 107-1307

(72)発明者 リ、ドン - キ

大韓民国、305-729 デジョン、ユソン - グ、ジョンミン - ドン、チュン - グ・アパートメ
ント 101-1406

(72)発明者 ソル、ウォンギ

大韓民国、305-720 デジョン、ユソン - グ、シンソン - ドン、デリム・ドゥレ・アパート
メント 110-404

(72)発明者 リ、ホリム

大韓民国、チョンチヨングナム - ド、314-110 ゴンジュ、シンガン - ドン、ハンピット・
アパートメント 101-204

(72)発明者 リ、ソン - イル

大韓民国、305-390 デジョン、ユソン - グ、ジョンミン - ドン 297-4

(72)発明者 ヤン、ヒョ - ユン

大韓民国、305-390 デジョン、ユソン - グ、ジョンミン - ドン 297-2

(72)発明者 リ、ヤンソン

大韓民国、305-390 デジョン、ユソン - グ、ジョンミン - ドン 299-3、ナンバー2
02

(72)発明者 ジャン、ウン - ソン

大韓民国、305-720 デジョン、ユソン - グ、210-59、シンソン - ドン、ナンバー 2
02

F ターム(参考) 2G045 AA35 CB01 CB21 DA13

4B024 AA01 AA11 BA02 CA04 CA07 DA01 DA02 DA05 EA04 GA11

4B063 QA18 QQ79 QR60 QR75 QR77 QR80 QS24 QS28 QS33

4B064 AG16 CA02 CA10 CA19 DA01

4B065 AA26X AA90X AA90Y AC14 AC20 BA02 CA24 CA44 CA46

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA37 EA27 EA50 FA74