

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年4月11日(11.04.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/069977 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/80 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/037026

(22) 国際出願日: 2018年10月3日(03.10.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-193624 2017年10月3日(03.10.2017) JP

(71) 出願人: キッコーマン株式会社 (**KIKKOMAN CORPORATION**) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 石川 隼也 (**ISHIKAWA, Junya**);
〒2788601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(**INABA, Yoshiyuki et al.**);
〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 T M I
総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING ALKALINE PHOSPHATASE, ALKALINE PHOSPHATASE OBTAINED USING SAID METHOD, AND VECTOR AND TRANSFORMANT FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: アルカリホスファターゼの製造方法及びそれを用いて得られるアルカリホスファターゼ、並びにその製造のためのベクター及び形質転換体

(57) **Abstract:** The present invention provides a method for producing alkaline phosphatase (ALP), the method including a step for culturing a transformant of the genus *Aspergillus* that has the ability to produce ALP.

(57) 要約: 本発明は、アルカリホスファターゼ (ALP) を生産する能力を有するアスペルギルス (*Aspergillus*) 属形質転換体を培養する工程を含む、ALPの製造方法、を提供する。



WO 2019/069977 A1

明 細 書

発明の名称：

アルカリホスファターゼの製造方法及びそれを用いて得られるアルカリホスファターゼ、並びにその製造のためのベクター及び形質転換体

技術分野

[0001] 本発明は、アルカリホスファターゼの製造方法及びそれを用いて得られるアルカリホスファターゼ、並びにその製造のためのベクター及び形質転換体に関する。

背景技術

[0002] アルカリホスファターゼ（以下、ALPと略称する。）は、分子生物学分野では、遺伝子組換え実験におけるDNAの脱リン酸化に用いられ、ウェスタンブロッティングの抗体の標識等に利用されている。また、産業分野では、臨床検査の免疫学的方法における標識酵素として用いられている。

効率良く均質に抗体を標識するためには、さらには、そのように標識された抗体（標識抗体）を利用して精度の良い臨床検査結果を得るためには、標識される抗体自体が、できる限り均質なものであることが好ましい。そして、そのためには、標識酵素自体も、できる限り均質なものであることが望ましい。

例えば標識抗体を均質なものとする方法として、抗体を標識する工程の後工程においては、標識された抗体と、標識されきらなかった抗体と、余剰の標識酵素とを物理的分離手法を用いて分離して、標識された抗体のみを取得する作業が必要となる。この作業において、標識酵素自体が、例えば分子量の点であるいは酵素としての性能の点で、不均一な混合物のような状態であった場合には、標識抗体も不均一な分子量及び酵素としての性能を有することになってしまう場合がある。

[0003] 分子量に関していえば、後工程の分離段階において、特定分子量の標識抗体のみを取得してくるという対処方法があるとはいえるが、その場合でも分

子量の分離には限界がある。また、後処理で目的の標識抗体画分を取得する上での歩留まりが悪化することから、やはり最初の標識酵素自体の均質性を高めることに対するニーズが存在する。

また、ALPには複数のアイソフォームが存在することも知られており、それらは比活性においてもばらつきを有しているため、例えば異なる比活性特性等を有する複数のアイソフォームの混合物からなるALP組成物を標識酵素として用いて抗体を標識したような場合においては、得られる標識抗体には活性の面での不均一性も生じてしまうこととなる。この観点からも、標識酵素自体の均質性を高めることに対するニーズが存在する。

[0004] 標識抗体の作製等に従来使用されてきたALPとしては、ウシ腸管からの抽出によって製造されるALPが挙げられる。このALPは、比活性が高く、標識酵素として有用であることから長年使用されてきているが、哺乳動物由来であるため、狂牛病等の感染症による原料輸出入制限、個体差による品質の大きなブレ等があり、安定供給性に劣るという問題が認識されている。また、ウシ腸管には複数のALPのアイソフォームが含まれており、抽出や精製を経て製造されている市販のALP製品であっても、なお複数種のアイソフォームを含む混合物であることが実情である。よって、上述の標識酵素として抗体を標識し、それを臨床検査に用いたいという目的に対しては、このALPは酵素製品としての均一性に劣るという問題を有している。

[0005] 上記の認識を踏まえ、これまでに、より均質性の高いALP製品を得るための様々な方法が検討されてきた。この方法として、例えば、ウシ腸管由来ALPを哺乳類細胞中で組換え発現させる方法が開示されている（例えば、特許文献1及び2参照）。この方法において、例えば、特定のアイソフォームをコードする遺伝子を選択し、その遺伝子のみを用いて組換え生産を行えば、発現されるタンパク質はその特定の1種のアイソフォームのみとすることができ、比活性が大きく異なる複数のアイソフォームが混在してしまうことによる活性の不均一性を解消することができる。

[0006] また、発現宿主としては、哺乳類細胞の代わりに酵母を宿主に採用して組

換えALPを大量に生産する方法も知られている（例えば、特許文献3参照）。さらに、酵母で組換え生産を行う方法としては、酵母を発現宿主として得られたALPを取得後に、後工程として脱グリコシル化処理することにより、糖鎖量を低減したALPを得るという方法も提案されている（例えば、特許文献4参照）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第93／18139号

特許文献2：特許第4295386号

特許文献3：特許第3657895号

特許文献4：国際公開第2004／083862号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、特許文献1及び2に開示されるようなウシ腸管由来ALPの組換え発現により得られるALPは、哺乳類細胞としてCHO細胞等を発現宿主として用いているため、ALPの生産量が少ないという課題を有する。

[0009] また、特許文献3に開示されるように酵母を発現宿主とした場合には、発現されるタンパク質に過剰に糖鎖が付加してしまうという、ハイパーグリコシレーションの課題が生じる。実際に、酵母を宿主として組換え生産したALPにおいては、ウシ腸管からの抽出によって製造されるALPに比べて、糖の付加量が極めて多く、しかもそれは不均一に多量に付加しているために、得られるALPは糖鎖の均一性の低い酵素になってしまうという課題を有する。酵素の不均一性の課題は、抗体を酵素標識する工程のみならず、ALPをコンジュゲート作製やセンサーへの応用に適用する場合にも、種々の工程におけるハンドリングの観点から課題となりえ、酵母で発現させる方法におけるALPへの糖鎖の過剰付加は産業上好ましくないと考えられる。

加えて、酵母細胞を宿主としたALP発現系においては、哺乳類細胞を宿主として発現させる時よりも生産量は多いとは言えるものの、生産されるALPはほとんど細胞外に分泌されず、細胞中に蓄積される。すなわち、ALPを取得するためには、酵母細胞を破碎して、細胞中のあらゆるその他の成分との混合状態の中から目的のALPを精製する工程を要し、製造工程上の作業効率の面でも未だ改善の余地を有する。

[0010] 特許文献4に開示される、酵母発現ALPの後処理的な脱グリコシル化処理は、酵素処理によって糖鎖付加量を減らすことができ、特許文献3に開示される糖鎖が過剰付加してしまうことによる酵母発現ALPが有する課題を一部解決する点では、好ましいと考えられる。しかし、実際には、酵素処理による糖鎖の切断はランダム的であって、必要な量の糖鎖を残しつつ脱糖鎖処理を行うことは難しく、また、処理バッチごとに均質な切断を実現することも難しい。従って、やはり、糖鎖付加状態の均質性という点では、継続的で再現性ある製品の供給には未だ課題を有するといえる。また、ALPを精製してきた後で、後工程としての酵素処理を追加し、その上で、脱グリコシル化されたALPと、脱グリコシル化されきらないALPと、脱グリコシル化用の酵素をゲルろ過等の分離工程によって、さらに分離し目的の脱グリコシル化されたALPのみを取得してこななければならないという、煩雑な脱糖鎖処理の工程が新たに必要となるという課題を有する。

[0011] 本発明が解決しようとする課題は、組換えALPの生産において、糖鎖が過剰かつ不均一に付加しすぎない単一アイソフォームのALPを高い生産性と分泌性を伴って製造できるALPの製造方法及びそれを用いて得られるALP I I又はI V、並びにその製造のためのベクター及び形質転換体を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] そこで、本発明者らは、上記課題の解決のために鋭意研究を重ねた結果、糖鎖付加されたALPを生産する能力を有するアスペルギルス属形質転換体を培養する工程を含むALPの製造方法を用いることにより、特にウシ組織

由来のALPのN末端側に対して、特定のアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する、アスペルギルス属形質転換用ベクターを用いて形質転換された、アスペルギルス属形質転換体を培養するALPの製造方法を用いることにより、糖鎖が過剰かつ不均一に付加しすぎない単一アイソフォームのALPを高い生産性で発現させることができ、しかも発現されるALPは非常に効率よくアスペルギルス属形質転換体の細胞外へと分泌されることを見出し、本発明を完成させた。

[0013] 即ち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

[1]

アルカリホスファターゼ（ALP）を生産する能力を有するアスペルギルス（*Aspergillus*）属形質転換体を培養する工程を含む、ALPの製造方法。

[2]

ALPは、N型糖鎖付加モチーフの一部に糖鎖が付加しない変異を含むALPである、

[1]に記載のALPの製造方法。

[3]

アスペルギルス属形質転換体は、ALPのN末端側に、CDHss、CDHcytbkex、CDHcytbKexmut1~4、CDHa11、GlaB、GlaBss、Ce1Bss、Ce1B、SK1K_CDHss、AsAP1ss54、及びAsAP3ss72からなる群より選択されるアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、

[1]又は[2]に記載のALPの製造方法。

[4]

アスペルギルス属形質転換体は、ALPをコードする塩基配列に対して、その5'末端側に：

以下の（a）～（c）のいずれかの塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

- （a）配列番号 2～15 のいずれかの塩基配列；
- （b）配列番号 2～15 のいずれかの塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；
- （c）配列番号 2～15 のいずれかの塩基配列と 90%以上の相同性を有し、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

あるいは、

以下の（d）～（f）のいずれかの分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

- （d）配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；
 - （e）配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；
 - （f）配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列と 90%以上の相同性を有し、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；
- を有する、

[1] 又は [2] に記載の A L P の製造方法。

[5]

A L P は、A L P I I 又は I V である、

[1] ～ [4] のいずれかに記載の A L P の製造方法。

[6]

A L P は、以下の（i）～（i i i）のいずれかのタンパク質：

- （i）配列番号 31 又は 32 のアミノ酸配列からなるタンパク質；
- （i i）配列番号 31 又は 32 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個の

アミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつALP活性を有するタンパク質；

(i i i) 配列番号31又は32のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有し、かつALP活性を有するタンパク質；

あるいは、

以下の(i v)～(v i)のいずれかの塩基配列によりコードされるタンパク質；

(i v) 配列番号33又は34の塩基配列；

(v) 配列番号33又は34の塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつALP活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(v i) 配列番号33又は34の塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつ、ALP活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

を有する、

[1]～[5]のいずれかに記載のALPの製造方法。

[7]

ALPは、3個のN型糖鎖付加モチーフのうち1個又は2個に変異を有し、変異を有する該N型糖鎖付加モチーフには糖鎖が付加していないALP I Iである、

[1]～[6]のいずれかに記載のALPの製造方法。

[8]

ALP I Iにおいて、N型糖鎖付加モチーフが有する変異は、配列番号31の122位、249位、251位、及び410位のうちの1個又は2個である、

[7]に記載のALPの製造方法。

[9]

ALP I Iにおいて、N型糖鎖付加モチーフが有する変異は、配列番号31の122位におけるAsnからGln又はLysへの変異、249位にお

ける A s n から G l n、A s p 又は H i s への変異、251 位における T h r から C y s への変異、410 位における A s n から G l n 又は L y s への変異のうちの 1 個又は 2 個である、

[7] 又は [8] に記載の A L P の製造方法。

[10]

アスペルギルス属形質転換体がショウユコウジカビ (*Aspergillus sojae*: アスペルギルス・ソヤ)、ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn: アスペルギルス・オリゼー)、クロコウジカビ (*Aspergillus luc huensis*: アスペルギルス・リュウキュウエンシス)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamar i i*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachi i*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ウサミ (*Aspergillus usami i*)、又はアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saito i*) のいずれかの形質転換体である、

[1] ~ [9] のいずれかに記載の A L P の製造方法。

[11]

アスペルギルス属形質転換体を培養した培養物から分泌画分を得る工程、及び、

分泌画分から A L P を抽出する工程、
をさらに含む、

[1] ~ [10] のいずれかに記載の A L P の製造方法。

[12]

ゲルろ過法によって測定される分子量が 80 ~ 150 k D a である、糖鎖付加アルカリホスファターゼ (A L P) 11。

[1 2 - 1]

単離された [1 2] に記載の A L P I I。

[1 3]

A L P の N 末端側に対して、C D H s s、C D H c y t b k e x、C D H c y t b K e x m u t 1 ~ 4、C D H a l l、G l a B s s、C e l B s s、C e l B、S K I K _ C D H s s、A s A P 1 s s 5 4、及び A s A P 3 s s 7 2 からなる群より選択されるアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する、アスペルギルス属形質転換用ベクター。

[1 4]

A L P をコードする塩基配列に対して、その 5' 末端側に：

以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

(a) 配列番号 2 ~ 1 5 のいずれかの塩基配列；

(b) 配列番号 2 ~ 1 5 のいずれかの塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

(c) 配列番号 2 ~ 1 5 のいずれかの塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

あるいは、

以下の (d) ~ (f) のいずれかの分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

(d) 配列番号 1 7 ~ 3 0 のいずれかのアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

(e) 配列番号 1 7 ~ 3 0 のいずれかのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；

(f) 配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列と 90%以上の相同性を有し、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；
を有する、アスペルギルス属形質転換用ベクター。

[15]

[13] 又は [14] に記載のアスペルギルス属形質転換用ベクターを用いて形質転換された、アスペルギルス属形質転換体。

[16]

[1] ～ [11] のいずれかに記載の A L P の製造方法によって得られる、糖鎖付加アルカリホスファターゼ。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、糖鎖が過剰かつ不均一に付加しすぎない単一アイソフォームの A L P を高い生産性と分泌性を伴って製造できる A L P の製造方法が提供され、また新規な A L P I I、ベクター、並びに形質転換体が提供され、産業上有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]実施例3において、各培養上清画分と各菌体内画分の A L P 活性測定を行い、分泌率を算出した結果と、比較例において、酵母発現での培養物の A L P 活性測定を行い、分泌率を算出した結果とを比較して示すグラフである。

[図2]実施例5において、精製された各種 b I A P I I の A L P 活性を測定し、比活性を算出した結果を示すグラフである。

[図3]実施例10において、各培養上清画分と菌体内画分の A L P 活性を測定し、分泌率を算出した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の A L P の製造方法（以下、本発明製造方法と略称する。）とは、A L P を生産する能力を有するアスペルギルス属形質転換体（以下、本発明形質転換体と略称する。）を培養する工程を含む製造方法である。より具体

的には、ウシ腸管由来のALPを組換え発現によって製造する方法であって、ウシ腸管由来のALPを生産する能力を有する本発明形質転換体を培養する工程を含む製造方法である。

[0017] 本発明製造方法は、ALPを生産する能力を有するアスペルギルス属形質転換体を用いる点が少なくとも公知の何れのALPの製造方法とも異なっている。また、このような本発明形質転換体を用いることにより、高い分泌率及び生産性でALPを製造することが可能である。

[0018] ALPは、既知のALPや新たに探索して得られたALPであってもよく、遺伝子工学的技術あるいは変異処理等の方法を用い、異なる理化学的性質を有するALPに改変することにより得られたALPであってもよい。例えば、既知のALPとしてはウシ (*Bos taurus*) 腸管由来のALP [b1AP11; Manes等, J. Biol. Chem., 273, No. 36, 23353-23360 (1998) 記載] 等が挙げられる。

[0019] ALPは、そのN末端側に分泌シグナルペプチド、及びそのC末端側にGP1 (グリコシルホスファチジルイノシトール) 付加シグナルペプチドを有してもよい。ALPを分泌発現させるために、GP1付加シグナルペプチドは除去してもよく、本来の分泌シグナルペプチドを残したまま用いてもよく、宿主由来の分泌シグナルペプチドをそのALP本来の分泌シグナルペプチドに代えて利用してもよい。N末端側に分泌シグナルペプチドを有するALPが本発明形質転換体内で発現された後、細胞内で分泌シグナルペプチド部分が削除され、その後、細胞から分泌シグナルペプチドを有していないALPが分泌される。一定の態様においては、上記の分泌シグナルペプチドは、N末端側に分泌シグナルペプチドとしての機能を有するペプチド部分（以下、「分泌シグナルペプチド部分」ともいう。）を有するキャリアタンパク質としてもよい。キャリアタンパク質は、C末端にリンカー（例えば、Kex2切断リンカー）が連結されたキャリアタンパク質を含むこともできる。ここで、分泌シグナルペプチド部分は、分泌シグナルペプチド自体と同じであってもよい。当該キャリアタンパク質は宿主によって効率的に分泌されるタ

ンパク質の全部又はN末端の一部である。K e x 2 切断リンカーは、酵素番号 E C 3 . 4 . 2 1 . 6 1 として定義されるセリンエンドペプチダーゼの切断モチーフ K R （リジン-アルギニンジペプチド）を C 末端に含むペプチドである。分泌経路においてタンパク質配列中に存在する切断モチーフ K R の C 末端側のペプチド結合がセリンエンドペプチダーゼによって分解される。キャリアタンパク質及び K e x 2 切断リンカーからなる分泌シグナルペプチド部分を N 末端側に有する A L P が本発明形質転換体内で発現された後、細胞内で分泌シグナルペプチドが削除され、その後、細胞から分泌シグナルペプチドを含まない A L P が分泌される。

A L P は単離された A L P であってもよく、単離する方法としては、例えば後述する抽出する工程が挙げられる。

[0020] 本発明形質転換体において機能する分泌シグナルペプチド及びキャリアタンパク質の例としては、宿主由来セロビオースデヒドロゲナーゼ及びそのシトクロームドメイン、グルコアミラーゼ、エンドグルカナーゼ、アルカリホスファターゼ等の分泌タンパク質及びその N 末端側の一部（分泌シグナルペプチド部分）が挙げられる。

[0021] A L P のアミノ酸配列中に含まれる N 型糖鎖付加モチーフ（A s n - X a a - T h r 又は A s n - X a a - S e r のアミノ酸配列；X a a は P r o 以外のアミノ酸を示す。）の数はアイソフォームによって異なり、例えば b 1 A P 1 1 は 3 個の N 型糖鎖付加モチーフを有する。本発明において、A L P は、少なくとも一つの N 型糖鎖付加モチーフに糖鎖が付加した A L P であればよく、本来有する N 型糖鎖付加モチーフが 2 個以上ある場合はそのうちの 1 つを除いた N 型糖鎖付加モチーフを N 型糖鎖が結合しなくなるように改変した N 型糖鎖付加モチーフ改変型 A L P でもよい。N 型糖鎖付加モチーフに糖鎖が結合しなくなるための改変としては、N 型糖鎖付加モチーフの 1 番目の A s n 残基を別のアミノ酸に変異させる、2 番目の X a a 残基を P r o に変異させる、又は、3 番目の T h r / S e r 残基を別のアミノ酸に変異させること等が挙げられる。

[0022] 次に、本発明形質転換体を作製するためのALPをコードする遺伝子及びそれを含むDNAの取得方法について、ウシ腸管由来のALPを例として以下に説明する。

本発明に用いるALPをコードする遺伝子を得るには、一般的に用いられている遺伝子のクローニング方法を用いることができる。例えば、ウシ腸管細胞から常法、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (WILEY Interscience, 1989) 記載の方法により、染色体DNA又はmRNAを抽出する。さらにmRNAを鋳型としてcDNAを合成することができる。

このようにして得られた染色体DNA又はcDNAのライブラリーを作製する。

次いで、ウシ腸管由来のALPのアミノ酸配列に基づき、適当なプローブDNAを合成して、これを用いて染色体DNA又はcDNAのライブラリーからスクリーニングする方法あるいは上記アミノ酸配列に基づき、適当なプライマーDNAを作製して、5' RACE法あるいは3' RACE法等の適当なポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)により、目的の遺伝子断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の目的遺伝子を含むDNAを得ることができる。

[0023] このようにして得られたウシ腸管由来のALPをコードする遺伝子の好ましい一例として、ウシ腸管由来のALP遺伝子〔bIAP I ; 特許文献1又はWeissig等, *Bioche. J.* 260, 503-508 (1993)〕、より好ましくは高比活性型のウシ腸管由来のALP遺伝子〔bIAP II等 ; 特許文献2又はManes等, *J. Biol. Chem.*, 273, No. 36, 23353-23360 (1998)〕が挙げられる。また、ウシ腸管由来のALPのアミノ酸配列は公開されていることから、全アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをDNAシンセサイザーにより合成して、相補鎖を会合させたうえでライゲーションして全長遺伝子を得ることもでき、全遺伝子中の一部分を合成したポリヌクレオチドを用い、部分的

に相補鎖を会合させ、相補しあう部分をポリメラーゼで増幅し、全長遺伝子を得ることもできる。

[0024] 好ましい遺伝子配列はA L Pの遺伝子配列とアミノ酸レベルで一致するコドン最適化したDNA配列である。コドンの最適化とは、例えばA L P遺伝子配列の各コドンをサイレント突然変異によって最適化することを意味し、すなわち、アミノ酸レベルではなんら影響を与えないで選択された発現宿主により要求されるとおりに翻訳を増大させるためにDNAレベルでの変異を加えることである。これらの遺伝子は、常法通り形質転換される宿主に応じて選択される各種ベクターにクローニングされることが好ましい。

[0025] A L Pをコードする遺伝子を含む組換えベクター（組換え体DNA）は、A L Pをコードする遺伝子を含むPCR増幅産物と各種ベクターとを、A L Pをコードする遺伝子の発現が可能な形で結合することにより構築することができる。例えば、適当な制限酵素でA L Pをコードする遺伝子を含むDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な制限酵素で切断したプラスミドと連結することにより構築することができる。又は、プラスミドと相同的な配列を両末端に付加した該遺伝子を含むDNA断片と、インバースPCRにより増幅したプラスミド由来のDNA断片とを、In-Fusion HD Cloning Kit（クロンテック社）などの市販の組換えベクター作製キットを用いて連結させることにより得ることができる。各種のベクターには、形質転換体で機能するプロモーターを含み、さらに、ターミネーター、5' -非翻訳領域、3' -非翻訳領域、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性マーカー遺伝子が含まれてもよい。

[0026] 次に、本発明形質転換体について説明する。

本発明形質転換体は、特に限定されないが、上述したように得られた種々の組換え体DNAを用いて、アスペルギルス属菌株を形質転換又は形質導入し、種々の改変されたA L P遺伝子断片を保有する組換え体DNAを含むアスペルギルス属形質転換体として得ることができる。

[0027] 本発明において、アスペルギルス属菌株とは、アスペルギルス属に属する

菌株であれば特に限定されない。アスペルギルス属菌株としては、例えば、ショウユコウジカビ (*Aspergillus sojae*: アスペルギルス・ソーヤ)、ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn: アスペルギルス・オリゼー)、クロコウジカビ (*Aspergillus luchuensis*: アスペルギルス・リュウキュウエンシス)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamaris*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachi*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ウサミ (*Aspergillus usami*)、アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillussaitoi*) 等の菌株が挙げられる。これらの中でも、ショウユコウジカビ及びニホンコウジカビの菌株が、より確実に高い分泌率及び生産性でALPを得る観点から好ましい。

[0028] 本発明の一態様において、本発明形質転換体は、ALPのN末端側に、アスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する。アスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドとしては、例えば、CDHss、CDHcytbkex、CDHcytbKexmut1~4、CHDHa11、GlaBss、GlaB、Ce1Bss、Ce1B、SK1K__CDHss、AsAP1ss54、及びAsAP3ss72が挙げられ、より優れた分泌性を得る観点から、CDHss、CDHcytbkex、CDHcytbKexmut1~4、CDH11、GlaB、GlaBss、Ce1Bss、Ce1B、SK1K__CDHss、AsAP1ss54、及びAsAP3ss72からなる群より選択されるものが好ましく、CDHss、CDHcytbkex、CDHcytbKexmut1、CDHcytbKexmut2、GlaB、GlaBss、Ce1Bss、Ce1B、AsAP1ss54、及びAsAP3ss72からな

る群より選択されるものがより好ましく、CDHss、CDHcytbkex、CDHcytbKexmut1、CeIBss、及びCeIBからなる群より選択されるものがさらに好ましく、CDHss及びCDHcytbkexからなる群より選択されるものが特に好ましい。

[0029] ここで、ALPのN末端側に分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列は、ALPのN末端側に直接的に分泌シグナルペプチドが結合されたアミノ酸配列であってもよく、ALPのN末端側にリンカー（例えば、Kex2切断リンカーをC末端に結合するキャリアタンパク質）を介する等により間接的に分泌シグナルペプチド部分が結合されたアミノ酸配列であってもよい。

[0030] 本発明形質転換体の一態様において、ALPをコードする塩基配列に対して、その5'末端側に：

以下の（a）～（c）のいずれかの塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

（a）配列番号2～15のいずれかの塩基配列；

（b）配列番号2～15のいずれかの塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつALPの分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

（c）配列番号2～15のいずれかの塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつALPの分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

あるいは、

以下の（d）～（f）のいずれかの分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

（d）配列番号17～30のいずれかのアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

（e）配列番号17～30のいずれかのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、か

つA L Pの分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；

(f) 配列番号17～30のいずれかのアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつA L Pの分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；
を有する。

[0031] 「1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された」という場合、欠失、置換若しくは付加される塩基の個数は、結果として得られる塩基配列がA L Pの分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする限り特に限定されない。また、ここでの「数個」は、2以上の整数を意味し、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個、さらに好ましくは2～5個、よりさらに好ましくは2個、3個又は4個である。各塩基配列における欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られる塩基配列がA L Pの分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする限り、5'末端でも、3'末端でも、その中間であってもよい。

[0032] 「配列番号Xの塩基配列とY%以上の相同性を有」とするとは、2つの塩基配列の一致が最大になるように整列（アライメント）させたときに、共通する塩基数の、配列番号Xに示す全塩基数に対する割合が、Y%以上であることを意味する。

[0033] 「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された」という場合、欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の個数は、結果として得られる分泌シグナルペプチドがA L Pの分泌活性を有する限り特に限定されない。また、ここでの「数個」は、2以上の整数を意味し、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個、さらに好ましくは2～5個、よりさらに好ましくは2個、3個又は4個である。各分泌シグナルペプチドにおける欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られる分泌シグナルペプチドがA L Pの分泌活性を有する限り、N末端でも、C末端でも、その中間であってもよい。

[0034] 「配列番号Xのアミノ酸配列とY%以上の相同性を有」とするとは、2つの

分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列の一致が最大になるように整列（アライメント）させたときに、共通するアミノ酸残基数の、配列番号Xに示す全アミノ酸残基数に対する割合が、Y%以上であることを意味する。

[0035] 配列番号1の塩基配列は、ウシ腸管由来アルカリホスファターゼI V（b I A P I V）のN末端側の分泌シグナルペプチド（b I A P I V s s）をコードする塩基配列である。

配列番号2の塩基配列は、麴菌セロビオースデヒドロゲナーゼ（C D H）由来の分泌シグナルペプチド（C D H s s）をコードする塩基配列である。

配列番号3の塩基配列は、キャリアタンパク質である麴菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカーからなる分泌シグナルペプチド（C D H c y t b k e x）をコードする塩基配列である。

配列番号4の塩基配列は、キャリアタンパク質である麴菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体1からなる分泌シグナルペプチド（C D H c y t b k e x m u t 1）をコードする塩基配列である。

配列番号5の塩基配列は、キャリアタンパク質である麴菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体2からなる分泌シグナルペプチド（C D H c y t b k e x m u t 2）をコードする塩基配列である。

配列番号6の塩基配列は、キャリアタンパク質である麴菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体3からなる分泌シグナルペプチド（C D H c y t b k e x m u t 3）をコードする塩基配列である。

配列番号7の塩基配列は、キャリアタンパク質である麴菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体4からなる分泌シグナルペプチド（C D H c y t b k e x m u t 4）をコードする塩基配列である。

配列番号8の塩基配列は、キャリアタンパク質である麴菌C D HとK e x

2切断リンカーからなる分泌シグナルペプチドキャリアタンパク質（C D H a l l）をコードする塩基配列である。

配列番号9の塩基配列は、麹菌グルコアミラーゼB由来の分泌シグナルペプチド（G l a B s s）をコードする塩基配列である。

配列番号10の塩基配列は、キャリアタンパク質である麹菌グルコアミラーゼBとK e x 2切断リンカーからなる分泌シグナルペプチド（G l a B）をコードする塩基配列である。

配列番号11の塩基配列は、麹菌エンドグルカナーゼ由来の分泌シグナルペプチド（C e l B s s）をコードする塩基配列である。

配列番号12の塩基配列は、キャリアタンパク質である麹菌エンドグルカナーゼとK e x 2切断リンカーからなる分泌シグナルペプチド（C e l B）をコードする塩基配列である。

配列番号13の塩基配列は、麹菌C D H由来の分泌シグナルペプチドの開始コドン直後にS K l Kのアミノ酸配列が挿入された分泌シグナルペプチド（S K l K__C D H s s）をコードする塩基配列である。

配列番号14の塩基配列は、麹菌A L P由来の分泌シグナルペプチド1（A s A P l s s 5 4）をコードする塩基配列である。

配列番号15の塩基配列は、麹菌A L P由来の分泌シグナルペプチド3（A s A P l s s 7 2）をコードする塩基配列である。

[0036] 配列番号16のアミノ酸配列は、ウシ腸管由来アルカリホスファターゼ l V（b l A P l V）のN末端側の分泌シグナルペプチド（b l A P l V s s）のアミノ酸配列である。

配列番号17のアミノ酸配列は、麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼ由来の分泌シグナルペプチド（C D H s s）のアミノ酸配列である。

配列番号18のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカーからなる分泌シグナルペプチド（C D H c y t b k e x）のアミノ酸配列である。

配列番号19のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌C D H由

来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体1からなる分泌シグナルペプチド (C D H c y t b k e x m u t 1) のアミノ酸配列である。

。

配列番号20のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体2からなる分泌シグナルペプチド (C D H c y t b k e x m u t 2) のアミノ酸配列である。

。

配列番号21のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体3からなる分泌シグナルペプチド (C D H c y t b k e x m u t 3) のアミノ酸配列である。

。

配列番号22のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌C D H由来のシトクロームbドメインとK e x 2切断リンカー変異体4からなる分泌シグナルペプチド (C D H c y t b k e x m u t 4) のアミノ酸配列である。

。

配列番号23のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌C D HとK e x 2切断リンカーからなる分泌シグナルペプチド (C D H a l l) のアミノ酸配列である。

配列番号24のアミノ酸配列は、麹菌グルコアミラーゼB由来の分泌シグナルペプチド (G l a B s s) のアミノ酸配列である。

配列番号25のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌グルコアミラーゼBとK e x 2切断配列からなる分泌シグナルペプチド (G l a B) のアミノ酸配列である。

配列番号26のアミノ酸配列は、麹菌エンドグルカナーゼ由来の分泌シグナルペプチド (C e l B s s) のアミノ酸配列である。

配列番号27のアミノ酸配列は、キャリアタンパク質である麹菌エンドグルカナーゼとK e x 2切断配列からなる分泌シグナルペプチド (C e l B) のアミノ酸配列である。

配列番号28のアミノ酸配列は、麹菌CDH由来の分泌シグナルペプチドの開始コドン直後にSKIKのアミノ酸配列が挿入された分泌シグナルペプチド(SKIK__CDHss)のアミノ酸配列である。

配列番号29のアミノ酸配列は、麹菌ALP由来の分泌シグナルペプチド1(AsAP1ss54)のアミノ酸配列である。

配列番号30のアミノ酸配列は、麹菌ALP由来の分泌シグナルペプチド3(AsAP1ss72)のアミノ酸配列である。

[0037] 本明細書においては、ALPの組換え発現に際し、分泌シグナルペプチドが細胞外にALPを分泌させるように機能することを「ALPの分泌活性」という。得られた本発明形質転換体において、分泌シグナルペプチドのALPの分泌活性を調べるには、例えば、次のように行うことができる。アスペルギルス属菌株が資化する炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、アスペルギルス属菌株の培養を効率良く行える天然培地又は合成培地に、形質転換体を接種し、温度20～42℃、好ましくは約30℃で10～120時間震盪培養しながらインキュベートする。炭素源としては、例えば、グルコース、フルクトース、スクロース等の糖、デキストラン、デンプン等の炭水化物が挙げられる。この中でも、デキストランが好ましい。窒素源としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス等が挙げられる。中でも、酵母エキスとペプトンが好ましい。無機塩類としては、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムが挙げられる。中でも、硫酸マグネシウムが好ましい。また、培養液にはALP活性に必要な金属イオンとしてマグネシウムイオン及び亜鉛イオンを添加することが望ましい。次いで、得られる培養物を回収し、遠心分離又は遠心等により培養上清と菌体を含む残渣に分ける。残渣の菌体を細胞壁溶解酵素、界面活性剤、EDTA等の薬剤、超音波、マルチビーズショッカー等により菌体を破壊し、遠心分離等により菌体破砕上清を得る。得られる培養上清及び菌体破砕上清を使用して、ALP活性を測定する。本発明においては、培養上清画分のALP活性が確認されることを以って、ALPの分泌活性を有するという。また、ALPの分泌活性の強

度は、下記式の分泌率として示すことができる。

$$\text{分泌率} = (\text{培養上清総活性 [U]} \div (\text{培養上清総活性 [U]} + \text{菌体内画分総活性 [U]})) \times 100$$

本発明形質転換体のALPの分泌活性は、特に限定されないが、例えば後述の実施例におけるAPVssを分泌シグナルペプチドとして用いた場合の分泌率と同等以上の分泌活性であることが好ましく、より具体的には後述の実施例において測定される分泌率として、10%以上であることがより好ましく、20%以上であることがさらに好ましく、30%以上であることがよりさらに好ましい。

[0038] このようにしてALPの生産能を有する本発明形質転換体を得ることができる。本発明の一態様としての本発明形質転換体は、ALPが、N型糖鎖付加モチーフの一部に糖鎖が付加しないように、デザインされた遺伝子を有する。

より具体的には、ウシ腸管由来のALPアイソフォームII (bIAPII又はALPII) が、3個のN型糖鎖付加モチーフのうち1個又は2個に変異を有し、変異を有する該N型糖鎖付加モチーフには糖鎖が付加しないように、デザインされた遺伝子を有する。さらに具体的には、そのウシ腸管由来のALPIIにおいて、N型糖鎖付加モチーフが有する変異が、配列番号31の122位、249位、251位、及び410位のうちの1個又は2個である。より具体的には、そのウシ腸管由来のALPIIにおいて、N型糖鎖付加モチーフが有する変異は、配列番号31の122位におけるAsnからGln又はLysへの変異、249位におけるAsnからGln、Asp又はHisへの変異、251位におけるThrからCysへの変異、410位におけるAsnからGln又はLysへの変異のうちの1個又は2個である。

[0039] このような本発明形質転換体が有する遺伝子の一例として、配列番号31の122位のAsnがGlnに、410位のAsnがGlnに置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

[0040] また、本発明の一態様としての本発明形質転換体は、A L P I I 又は I V であるように、デザインされた遺伝子を有する。具体的なこれらのA L Pは、以下の(i)～(i i i)のいずれかのタンパク質：

(i) 配列番号31又は32のアミノ酸配列からなるタンパク質；

(i i) 配列番号31又は32のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつA L P活性を有するタンパク質；

(i i i) 配列番号31又は32のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつA L P活性を有するタンパク質；

あるいは、

以下の(i v)～(v i)のいずれかの塩基配列によりコードされるタンパク質：

(i v) 配列番号33又は34の塩基配列；

(v) 配列番号33又は34の塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつA L P活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(v i) 配列番号33又は34の塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつ、A L P活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

を有する。

[0041] 「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された」という場合、欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の個数は、結果として得られるタンパク質がA L P活性を有する限り特に限定されない。また、ここでの「数個」は、2以上の整数を意味し、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個、さらに好ましくは2～5個、よりさらに好ましくは2個、3個又は4個である。各タンパク質における欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られるタンパク質がA L P活性を有する限り、N末端でも、C末端

でも、その中間であってもよい。

[0042] 「配列番号Xのアミノ酸配列とY%以上の相同性を有」するとは、2つのタンパク質のアミノ酸配列の一致が最大になるように整列（アライメント）させたときに、共通するアミノ酸残基数の、配列番号Xに示す全アミノ酸残基数に対する割合が、Y%以上であることを意味する。

[0043] 「1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された」という場合、欠失、置換若しくは付加される塩基の個数は、結果として得られる塩基配列がALP活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されない。また、ここでの「数個」は、2以上の整数を意味し、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個、さらに好ましくは2～5個、よりさらに好ましくは2個、3個又は4個である。各塩基配列における欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られる塩基配列がALP活性を有するタンパク質をコードする限り、5'末端でも、3'末端でも、その中間であってもよい。

[0044] 「配列番号Xの塩基配列とY%以上の相同性を有」するとは、2つの塩基配列の一致が最大になるように整列（アライメント）させたときに、共通する塩基数の、配列番号Xに示す全塩基数に対する割合が、Y%以上であることを意味する。

[0045] 得られた本発明形質転換体のALP活性を調べるには、ALPの分泌活性を調べるために上述したようにALP活性を測定する。

本発明形質転換体のALP活性は、特に限定されないが、例えば形質転換前の野生株を培養して得られる分泌画分と同等以上の活性であることが好ましく、より具体的には分泌画分における後述する酵素活性値（U／m l）が10（U／m l）以上であることがより好ましい。

[0046] 配列番号31のアミノ酸配列は、ウシ腸管由来アルカリホスファターゼII（b l A P l l）のアミノ酸配列である。

配列番号32のアミノ酸配列は、ウシ腸管由来アルカリホスファターゼI V（b l A P l V）のアミノ酸配列である。

[0047] 配列番号33の塩基配列は、ウシ腸管由来アルカリホスファターゼII（

b I A P I I) をコードする塩基配列である。

配列番号 34 の塩基配列は、ウシ腸管由来アルカリホスファターゼ I V (b I A P I V) をコードする塩基配列である。

[0048] 次に、本発明製造方法が含み得る各工程について説明する。

本発明形質転換体を培養する工程は、特に限定されないが、本発明変異化物を固体培養法又は液体培養法のいずれで培養してもよく、液体培養法で培養することが好ましい。

[0049] 本発明形質転換体を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、大豆、小麦麴の浸出液等の 1 種以上の窒素源に、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第 2 鉄、硫酸第 2 鉄、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、塩化コバルト、硫酸マンガン等の無機塩類の 1 種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

[0050] 培養は、好ましくは 20～37℃で、具体的には 30℃前後で 10～120 時間、通気攪拌深部培養、振とう培養等により行われる。

[0051] 本発明製造方法は、本発明形質転換体を培地に培養する工程により得られる培養物から、ウシ腸管由来の A L P を採取することによりウシ腸管由来の A L P を製造することができる。本発明製造方法は、通常の酵素採取手段により本発明形質転換体を培養した培養物からウシ腸管由来の A L P を採取することができ、好ましくは本発明形質転換体を培養した培養物から分泌画分を得る工程、及び、分泌画分からウシ腸管由来の A L P を抽出する工程をさらに含むことが好ましい。

[0052] 本発明形質転換体を培養した培養物から分泌画分を得るには、例えば、培養物から細胞内画分を分離すればよく、例えば、ろ過、遠心分離等の操作により細胞内画分を分離する。本発明形質転換体は、ウシ腸管由来の A L P の分泌率が高いため、細胞内画分に存在するよりも容易に抽出することが可能な分泌画分にウシ腸管由来の A L P が多く存在する傾向にある。これにより、本発明製造方法は、培養物から容易にウシ腸管由来の A L P を得ることが

できる。

[0053] 得られた分泌画分からウシ腸管由来のALPを抽出するためには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫安塩析法、有機溶媒沈殿法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲルろ過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を単独で又は適宜組み合わせて行うことが好ましい。このようにして、ウシ腸管由来のALPを、SDS-PAGE的にほぼ単一のバンドを示すまでに抽出することができる。また、このような方法を適宜組み合わせて、用途に応じた精製度合の異なる標品に調整することもできる。

[0054] また、培養工程により得られる培養物中の細胞内画分からウシ腸管由来のALPを採取してもよい。この場合には、培養物又は分離した細胞内画分を洗菌することが好ましく、これをそのまま用いることもでき、超音波破砕機、フレンチプレス、ダイノミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトンX-100等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からウシ腸管由来のALPを採取することが好ましい。

[0055] 本発明のウシ腸管由来のALPの比活性は、好ましくは6500U/mg以上である。ALPの比活性の測定方法としては、酵素の反応により変換される基質の発色量の増減を測定する方法等が主な測定方法として挙げられる。以下に、一例として、p-ニトロフェニルリン酸の変換により生じるp-ニトロフェノールの吸光度増加を測定する方法について示す。なお、酵素力価は、p-ニトロフェニルリン酸を基質として測定したとき、1分間に1μmolのp-ニトロフェノールを生成する酵素量を1Uと定義した。

A. 試薬の調製

(1) 試薬1：1.0M MgCl₂溶液

2.03gのMgCl₂・6H₂Oをイオン交換水に溶解し、10mlに定容する。

(2) 試薬2：ジエタノールアミン（DEA）バッファー（用時調製）

52. 2 g DEA (Sigma-Aldrich社) を400 mLイオン交換水に溶解し、0.25 mL $MgCl_2$ 溶液(試薬1)を加える。その後、37℃に暖めてから、2 N HClでpH9.8に調整し、イオン交換水で500 mLに定容する。

(3) 試薬3 : 0.65 M p-ニトロフェニルリン酸溶液

247 mg p-ニトロフェニルリン酸 (Sigma-Aldrich社) を1 mLのイオン交換水に溶解する。

(4) 酵素希釈液

活性測定値が、0.10~0.20 U/mLになるようにDEAバッファ(試薬2)で希釈する。

B. 活性測定法

2.90 mLのDEAバッファ(試薬2)と0.05 mLのp-ニトロフェニルリン酸溶液(試薬3)を混和し、37℃で5分加温する。その後、0.05 mLの酵素希釈液を添加し、混合の後、分光光度計(U-3010、日立ハイテクノロジーズ社)により、405 nmにおける吸光度を測定する。測定値(ΔOD_{test})は、405 nmにおける2分後から4分後の1分間あたりの吸光度変化とする。なお対照液(ΔOD_{blank})は、酵素液の代わりに0.05 mLのDEAバッファを加える以外は前記と同様にしたものである。下記の計算式に従い、算出した値を酵素活性値(U/mL)とした。

[数1]

$$U/mL = \frac{\Delta OD/min (\Delta OD_{test} - \Delta OD_{blank}) \times 3 (mL) \times \text{希釈倍率}}{18.2 \times 1.0 \times 0.05 (mL)}$$

18.2 : 上記の測定条件下でのミリモル分子吸光係数 ($cm^2/micro mole$)
1.0 : 光路長 (cm)

C. 比活性の算出

酵素溶液のタンパク質濃度 (mg/mL) は分光光度計(U-3010、

日立ハイテクノロジーズ社)を用いて280nmにおける吸光度を測定し、 $1.00D = 1.0\text{ mg/ml}$ として算出した。酵素活性値(U/ml)をタンパク質濃度(mg/ml)で除して、比活性(U/mg)を算出した。

[0056] 本発明において、ゲルろ過法によって測定されるALPの分子量は、好ましくは150kDa以下であり、より好ましくは80~150kDaであり、さらに好ましくは90~135kDaである。ゲルろ過法によって測定される分子量は、後述する実施例に記載の方法のとおり又はその方法に準じて測定される。

[0057] 本発明のアスペルギルス属形質転換用ベクターの一態様において、これは、ウシ腸管由来のALPのN末端側に対して、上述したアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する。また、本発明のアスペルギルス属形質転換用ベクターの一態様において、これは、ウシ腸管由来のALPをコードする塩基配列に対して、その5'末端側に上述した塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子を有する。本発明形質転換体は、これらの本発明のアスペルギルス属形質転換用ベクターを用いて形質転換されることにより、作製することができる。

[0058] 以下に、実施例により本発明を詳述する。

実施例

[0059] [実施例1. CDHss-bLAPを挿入したDNAコンストラクトの作製]

(1-1) コンストラクト用プラスミドの作製

国際公開第2016/121285号パンフレットの「[例1. 遺伝子AsEgtA、AsEgtB又はAsEgtCを挿入したDNAコンストラクトの作製] (3) コンストラクト用プラスミドの作製」に記載の方法と同様の方法で、In-Fusion HD Cloning Kit (クロンテック社)に付属されているpUC19 linearized VectorのマルチクローニングサイトにあるIn-Fusion Cloning Siteに翻訳伸長因子遺伝子tef1のプロモーター配列であるPte

f、アルカリプロテアーゼ遺伝子 *alp* のターミネーター配列である *Talp*、及びウリジン要求性を相補する形質転換マーカー遺伝子 *pyrG* を連結させたコンストラクト用プラスミドを作製した。

[0060] (1-2) 遺伝子挿入DNAコンストラクトの作製

コンストラクト用プラスミドの *Ptef* 及び *Talp* の間に、対象遺伝子である *bIAPII* を連結させたDNAコンストラクトを次のとおりに作製した。

鋳型DNAとして上記で得られたコンストラクト用プラスミド、PCRの酵素として *KOD-Plus-DNA Polymerase* (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置として *T100™* サーマルサイクラー (BIO-RAD社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施することによりコンストラクト用プラスミドのベクター断片を得た。使用したプライマーを下記に示す。増幅したベクター断片を1% (w/v) アガロースゲル中で分離し、*QIAquick Gel Extraction Kit* (キアゲン社) を用いて精製した。

[0061] [表1]

<i>Talp</i> 1 F	5' GTACCAGGAGTACATTGGAGAGTTCTAC
<i>Ptef</i> - 1 R	5' TTTGAAGGTGGTGC GAAC TTTGTAG

[0062] ウシ腸管由来のアルカリホスファターゼII (*bIAPII*) のN末端側分泌シグナルペプチド (配列番号36) の代わりに麴菌セロビオースデヒドロゲナーゼ由来分泌シグナルペプチド (*CDHss*) を融合した *bIAPII* 遺伝子を麴菌にコドン最適化した *CDHss-bIAPII* 合成遺伝子 (配列番号37) を委託合成した (*Genscript* 社)。鋳型DNAとして上記で得られた *CDHss-bIAPII* 合成遺伝子、PCRの酵素として *KOD-Plus-DNA Polymerase* (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置として *T100™* サーマルサイクラー (BIO-RAD社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってPCRを実施し、挿入遺伝子DNA断片を得た。増幅するために使用したプライマーを下記に示す。なお、配列のうち、小文字の配列はコンストラクト

用プラスミド（P t e f 及びT a l pの間）に連結するための付加配列を示す。増幅したDNA断片を1%（w／v）アガロースゲル中で分離し、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t（キアゲン社）を用いて精製した。

[0063] [表2]

P t e f - C I A P I I F w	cgcaccaccttcaaaATGAACTTGTC AAC
T a l p - C I A P I I R v	atgtactcctgtgtacCTAGGCTGGGGCTGG

[0064] 上記のとおり増幅したベクター断片と、C D H s s - b l A P I I D N A断片とを、I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i tを使用して、そのキットに添付されたプロトコールに従って連結して、C D H s s - b l A P I I が挿入された遺伝子挿入DNAコンストラクト（p b l A P I I）を得た。このようにして得られたDNAコンストラクトは、その上流から、p U C 1 9由来のDNA断片とP t e fのDNA断片とC D H s sのDNA断片とb l A P I IのDNA断片とT a l pのDNA断片とp y r GのDNA断片とp U C 1 9由来のDNA断片とが連結されたものである。すなわち、p U C 1 9 l i n e a r i z e d V e c t o r（クロンテック社）のI n - F u s i o n C l o n i n g S i t eに、P t e f - C D H s s - b l A P I I - T a l p - p y r Gの配列が順に連結されたDNAコンストラクトが得られた。

その後、氷水中で大腸菌コンピテントセルE C O S C o m p e t e n t E . c o l i J M 1 0 9（ニッポンジーン社）にDNAコンストラクト液を1／10量混合し、5分間氷水中で放置した後、42℃、45秒間処理することで形質転換した。その後、50 μg／mlのアンピシリンを含むL B（L u r i a - B e r t a n i）プレートへ塗り広げた。これを37℃で一晩静置培養し、コロニーを形成させた。

得られたコロニーを、50 μg／mlのアンピシリンを含むLB液体培地で37℃、一晩振とう培養した。培養後の培養液を遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体について、F a s t G e n e P l a s m i d M i n i K i t（日本ジェネティクス社）を用いて、そのキットに添付されたプ

ロトコールに従ってプラスミドDNA（DNAコンストラクト）を抽出した。

抽出したプラスミドDNA中に挿入された各DNAの塩基配列を決定することにより、CDHss-bIAPIIが挿入されたDNAコンストラクト（DNAコンストラクト名：pbIAPII）が得られたことを確認した。

[0065] （1-3）部位特異的変異によるN型糖鎖付加モチーフ改変型ALP遺伝子挿入DNAコンストラクトの作製

N型糖鎖付加モチーフ改変型ALP__Asn122Gln（ $\Delta 1$ ）を生成するために、CDHss-bIAPIIが挿入された遺伝子挿入DNAコンストラクト（pbIAPII）をテンプレートとし、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー（BIO-RAD社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施した。使用したプライマーを下記に示す。増幅したDNA断片を1%（w/v）アガロースゲル中で分離し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて精製した。上記のDNA断片を、In-Fusion HD Cloning Kitを使用して、そのキットに添付されたプロトコールに従って連結して、N型糖鎖付加モチーフへの変異Asn122Glnを含むCDHss-bIAPIIが挿入された遺伝子挿入DNAコンストラクト（p $\Delta 1$ ）を得た。以降、下記表に基づいて順次部位特異的変異を導入することで各種のN型糖鎖付加モチーフ改変型ALP遺伝子挿入DNAコンストラクトを得た。

[0066]

[表3]

テンプレート	プライマー配列	変異位置	導入変異	DNAコンストラクト名
p b I A P I I	F w : AGGTACAACCAGTGTCA GACCACTAGAGGA R v : ACACTGGTTGTACCTAG CGGCAG	1 2 2	N→Q	p Δ 1
p b I A P I I	F w : AGGTACAACCAGTGTAA GACCACTAGAGGA R v : ACACTGGTTGTACCTAG CGGCAG	1 2 2	N→K	p Δ 1 k
p Δ 1	F w : TCGAGGCCTGACGTGC AGGGTTCAACTAGT R v : CACGTCAGGCCTCGATC CGCCACC	4 1 0	N→Q	p Δ 1 3
p Δ 1 k	F w : TCGAGGCCTGACGTGC AGGGTTCAACTAGT R v : CACGTCAGGCCTCGATC CGCCACC	4 1 0	N→Q	p Δ 1 k 3

[0067] [実施例2. 形質転換 *Aspergillus sojae* の作製]

(2-1) *Aspergillus sojae* NBRC 4239株由来
p y r G破壊株

各遺伝子挿入DNAコンストラクトをエタノール沈殿した後に、TEバッファに溶解して、所望の濃度に調製したDNA溶液を、下記の手順で *Aspergillus sojae* NBRC 4239株由来 p y r G破壊株 (p y r G遺伝子の上流48bp、コード領域896bp、下流240bp欠損株) の形質転換に用いた。

[0068] (2-2) *Aspergillus sojae* NBRC 4239株由来
p y r G破壊株の形質転換

500ml容三角フラスコ中の20mMウリジンを含むポリペプトンデキストリン液体培地100mlに、*Aspergillus sojae* NBRC 4239株由来 p y r G破壊株の分生子を接種し、30℃で約20時間振とう培養を行った後、菌体を回収した。回収した菌体からプロトプラストを調製した。得られたプロトプラスト及び20μgの遺伝子挿入DNAコンストラクトを用いて、プロトプラストPEG法により形質転換を行い、次いで0.5% (w/v) 寒天及び1.2Mソルビトールを含むCzapex

ーDox最少培地（ディフコ社；pH6）を用いて、30℃、5日間以上インキュベートし、コロニー形成能があるものとして形質転換*Aspergillus sojae*を得た。

得られた形質転換*Aspergillus sojae*は、ウリジン要求性を相補する遺伝子であるpyrGが導入されることにより、ウリジン無添加培地に生育できるようになることで、目的の遺伝子が導入された株として選択できた。

[0069] [実施例3. 形質転換*Aspergillus sojae*の各種ALP生産]

3L容ジャーファーマンター中の液体培地（2%（w/v）ハイポリペプトン（日本製薬社）、2%（w/v）パインデックス#2（松谷化学工業社）、1%（w/v）酵母エキス（オリエンタル酵母社）、0.25%（w/v）KH₂PO₄（和光純薬工業社）、0.25%（w/v）K₂HPO₄（和光純薬工業社）、0.05%（w/v）MgSO₄·7H₂O（和光純薬工業社）、3mM MgCl₂（和光純薬工業社）、0.1mM ZnCl₂（和光純薬工業社）；pH未調整）1800mlに、各種形質転換株の分生子を接種し30℃、攪拌速度250rpm、通気毎分25L、0.05MPa圧力下で培養を開始し、48時間後から攪拌速度500rpmに変更し、計5日間培養を行った。次いで、培養後の培養物をミラクロス（カルバイオケム社）でろ過分離し、培養上清と菌体を回収した。回収した菌体を蒸留水で洗浄した後、菌体をペーパータオルに挟むことによって水分を押し出して湿菌体を得た。得られた湿菌体を秤量し、50mg湿菌体/mlになるようTrisバッファー（20mM Tris-HCl pH8.0、3mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂）を添加して、ホモジナイズ処理後、一部をジルコニアビーズと共に2mlスクリーキャップバイアルに入れ、ビーズショッカー（MS-100R、トミー精工社）を用いて2500rpm、20秒間の破碎を2回繰り返した。次いで、15000×gで5分間遠心し、得られた遠心上清を菌体内画分とした。

得られた培養上清画分と菌体内画分のALP活性測定を上述した「B. 活性測定法」以下の記載に従い、分泌率（培養上清総活性 [U] ÷ (培養上清総活性 [U] + 菌体内画分総活性 [U]) × 100) を計算した (図1)。

[0070] [比較例. 形質転換 *S. pombe* の各種 *b1AP11* 生産]

特開2008-5734号の実施例5で得られるALP生産酵母 *S. pombe* の培養液を同様に作製し、その培養液を遠心分離して菌体と培養上清画分に分け、続いて菌体を *Tris* バッファー (10mM *Tris-HCl* pH7.0、5mM $MgCl_2$ 、0.1mM $ZnCl_2$) に懸濁してビーズショッカーで菌体を破碎し、菌体内画分を取得した。得られた培養上清画分と菌体内画分について、実施例3と同様の方法でALP活性測定を行い、実施例3と同様に分泌率を計算した (図1)。

[0071] 麹菌 *A. sojae* で発現した場合、各DNAコンストラクト (DNAコンストラクト名: *p b1AP11*、*pΔ1*、*pΔ1k*、*pΔ13*、及び *pΔ1k3*) に対応する各種 *b1AP11* (ALP名: *b1AP11*、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 1k$ 、 $\Delta 13$ 、及び $\Delta 1k3$) の分泌率は75%以上と非常に高いが、酵母 *S. pombe* で発現した場合、*b1AP11* の分泌率は7%程度であった。また、酵母発現ではN型糖鎖付加モチーフの数が減るにつれて分泌率が低下していたが、麹菌発現ではN型糖鎖付加モチーフ数に依らず常に分泌率が高かった。

[0072] [実施例4. 各種ALPの精製]

培養上清を8000rpm、90分間遠心分離して上清を回収し、限外ろ過膜A1P-1010 (旭化成社) により濃縮、*Tris* バッファーで透析した。内液を回収し0.45 μ mフィルター (材質PES、ミリポア社) を通過したろ液を回収した。*Tris* バッファーで平衡化したQ-Sepharose Fast Flow (GEヘルスケア社) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに試料を吸着させた後、1M NaClを含む*Tris* バッファーでグラジエント溶出した。終濃度30%になるように硫酸アンモニウムを加え、0.2 μ mフィルター (材質PES、ミリポア社) を通過し

たる液を回収した。次いで、30%硫酸アンモニウムを含むTrisバッファーで平衡化したTOYOPEARL Butyl-650C（東ソー社）疎水カラムクロマトグラフィーに試料を吸着させた後、Trisバッファーでグラジエント溶出し、限外ろ過膜アミコンウルトラ-15（分画分子量30kDa、ミリポア社）を用いて濃縮した。次いで、Trisバッファーで平衡化したHiLoad Superdex 200pg（GEヘルスケア社）ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより分画精製した。

[0073] [実施例5. 比活性の測定]

精製された各種ALPのALP活性を測定し、タンパク質量を280nmの吸光度により求め、比活性を算出した（図2）。

麹菌発現したbIAP11、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 1k$ 、 $\Delta 13$ 、及び $\Delta 1k3$ は6000U/mg以上の高い比活性を示した。

[0074] [実施例6. 形質転換Aspergillus oryzaeによるbIAP11生産]

Aspergillus sojae NBRC4239株の代わりにAspergillus oryzae R1B40株を用いた以外は実施例2～5と同じ手順で、形質転換Aspergillus oryzae発現bIAP11を調製した。

[0075] [実施例7. 分子量の測定]

精製された各種ALPの分子量をHPLC（Agilent 1220 Infinity LC、アジレント社）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。0.1M NaClを含んだ100mMリン酸バッファーpH7.0で平衡化したTSK-gel G3000SW（7.5mm I.D. × 30cm、東ソー社）に精製ALP溶液50μLをアプライし、カラム温度25℃、流速1mL/minで同バッファーにより溶出させ、280nmの吸光度を測定した。分子量マーカー（MW-Marker proteins、オリエンタル酵母工業社）により検量線を作成し、精製ALPの分子量を算出した（表4）。対照として、市販の酵母組換え発現ウシ腸

管由来ALP (Alkaline Phosphatase recombinant highly active: Roche__ALP、Roche社)、脱糖鎖処理された酵母組換え発現ウシ腸管由来ALP (Alkaline Phosphatase recombinant highly active, Carbohydrate Reduced: Roche__ALP__CR、Roche社)、及び高比活性なウシ腸管抽出物由来ALP (ALP13G、BBI solutions社) を用いた。

[0076] [表4]

<各ALPの糖鎖付加モチーフ数とゲル濾過で算出された分子量(kDa)>

ALP	糖鎖付加 モチーフ数	発現宿主		
		A.sojae	A.oryzae	S.pombe
bIAPII	3	106	126	1100
Δ1	2	110	—	—
Δ1k	2	116	—	440
Δ13	1	92	—	120
Δ1k3	1	84	—	120

[0077] アミノ酸配列中のN型糖鎖付加モチーフ数はbIAPIIにおいては3つ、Δ1及びΔ1kにおいては2つ、Δ13及びΔ1k3においては1つ含まれる。各種ALPに付加される糖鎖量はN型糖鎖付加モチーフ数に比例すると考えられ、糖鎖の量に応じて分子量も増加すると考えられる。実際、特開2008-5734号に記載の酵母*S. pombe*で発現されたbIAPIIの分子量は1100kDa、Δ1kの分子量は440kDa、Δ13及びΔ1k3の分子量は120kDaであり（特開2008-5734号の表5）、N型糖鎖付加モチーフ数の減少に応じてALPの分子量が低下していた。一方で、麹菌*A. sojae*で発現して得られた各種ALPにおいても同様の傾向がみられ、さらに、麹菌*A. sojae*又は*A. oryzae*で発現した各種ALPの分子量は酵母*S. pombe*で発現された同じN型糖鎖付加モチーフ数を有するALPよりも分子量が著しく低下していた。市販の*Pichia pastoris*で発現されたウシ腸管由来ALP (Roche__ALP)、脱糖鎖処理されたRoche__ALP__CR、高比活性なウシ腸管由来ALP (ALP13G; BBI solutions社) の分子

量はそれぞれ220kDa、145kDa、131kDaであった。市販のウシ腸管由来ALPよりも麴菌で発現した各種ALPの方が分子量は小さかった。

[0078] [実施例8. 各種分泌シグナルペプチドが融合したbIAPIVを挿入したDNAコンストラクトの作製]

(8-1) コンストラクト用プラスミドの作製

実施例1-1のCDHss-bIAPIIを挿入したDNAコンストラクト用プラスミドと同様の手順で、各種分泌シグナルペプチドが融合したbIAPIVを挿入したDNAコンストラクト用プラスミドを作製した。

[0079] (8-2) ウシ腸管由来アルカリホスファターゼIV (bIAPIV) 遺伝子挿入DNAコンストラクトの作製

コンストラクト用プラスミドのPtef及びTalpの間に、対象遺伝子であるbIAPIV遺伝子を連結させたDNAコンストラクトを次のとおりに作製した。

鋳型DNAとして上記で得られたコンストラクト用プラスミド、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー (BIO-RAD社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施することによりコンストラクト用プラスミドのベクター断片を得た。使用したプライマーを下記に示す。増幅したベクター断片を1% (w/v) アガロースゲル中で分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社) を用いて精製した。

[0080] [表5]

Talp1F	5' GTACCAGGAGTACATTGGAGAGTTCTAC
Ptef-1R	5' TTTGAAGGTGGTGCGAACCTTTGTAG

[0081] ウシ腸管由来アルカリホスファターゼIV (bIAPIV) 遺伝子 (GenBankアクセッション番号配列; AAC33854) を麴菌にコドン最適化し、C末端側の膜結合シグナルペプチドをコードする領域を除いたbIAPIV合成遺伝子 (配列番号60) を委託合成した (Genscript

社)。鋳型DNAとして上記で得られたb I A P I V合成遺伝子、PCRの酵素としてK O D - P l u s - D N A P o l y m e r a s e (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT 1 0 0 ™ サーマルサイクラー (B I O - R A D社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってPCRを実施し、b I A P I V合成遺伝子DNA断片を得た。増幅するために使用したプライマーを下記に示す。なお、配列のうち、小文字の配列はコンストラクト用プラスミド (P t e f 及びT a l pの間) に連結するための付加配列を示す。増幅したDNA断片を1% (w/v) アガロースゲル中で分離し、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (キアゲン社) を用いて精製した。

[0082] [表6]

P t e f - C I A P I V F w	cgcaccacettcaaaaATGCAGTGGGCTGT
T a l p - C I A P I V R v	atgtactcctggtacCTAACCCGAAGGGG

[0083] 上記のとおり増幅したベクター断片と、b I A P I V合成遺伝子DNA断片とを、I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i tを使用して、そのキットに添付されたプロトコールに従って連結して、b I A P I V合成遺伝子が挿入された遺伝子挿入DNAコンストラクト (p b I A P I V) を得た。このようにして得られたDNAコンストラクトは、上流から、p U C 1 9由来のDNA断片とP t e fのDNA断片とb I A P I V合成遺伝子DNA断片とT a l pのDNA断片とp y r GのDNA断片とp U C 1 9由来のDNA断片とが連結されたものである。すなわち、p U C 1 9 l i n e a r i z e d V e c t o r (クロンテック社) のI n - F u s i o n C l o n i n g S i t eに、P t e f - b I A P I V合成遺伝子 - T a l p - p y r Gの配列が順に連結されたDNAコンストラクトが得られた。

その後、氷水中で大腸菌コンピテントセルE C O S C o m p e t e n t E . c o l i J M 1 0 9 (ニッポンジーン社) にDNAコンストラクト液を1/10量混合し、5分間氷水中で放置した後、42℃、45秒間処理することで形質転換した。その後、50 µg/mlのアンプシリンを含むL B (L u r i a - B e r t a n i) プレートへ塗り広げた。これを37℃で

一晩静置培養し、コロニーを形成させた。

得られたコロニーを、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB液体培地で 37°C 、一晩振とう培養した。培養後の培養液を遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体について、Fast Gene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス社）を用いて、キットに添付されたプロトコールに従ってプラスミドDNA（DNAコンストラクト）を抽出した。

抽出したプラスミドDNA中に挿入された各DNAの塩基配列を決定することにより、bIAPIV合成遺伝子が挿入されたDNAコンストラクト（pbIAPIV）が得られたことを確認した。

[0084] （8-3）各種分泌シグナルペプチドを有するbIAPIV合成遺伝子挿入DNAコンストラクトの作製

bIAPIV合成遺伝子がコードするN末端側分泌シグナルペプチドが表3に示す分泌シグナルペプチド（Kex2切断リンカーを融合したキャリアタンパク質としての分泌シグナルペプチドを含む。）に置き換えられたbIAPIV合成遺伝子が挿入された種々のDNAコンストラクトを次のとおりに作製した。

[0085]

[表7]

DNAコンストラクト名	分泌シグナルペプチド名
p b I A P I V	ウシ腸管由来アルカリホスファターゼ I V 分泌シグナルペプチド
p C D H s s	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼ分泌シグナルペプチド
p C D H c y t b k e x	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼシトクローム b ドメイン-K e x 切断リンカー
p C D H c y t b k e x m u t 1	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼシトクローム b ドメイン-K e x 切断リンカー変異 1
p C D H c y t b k e x m u t 2	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼシトクローム b ドメイン-K e x 切断リンカー変異 2
p C D H c y t b k e x m u t 3	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼシトクローム b ドメイン-K e x 切断リンカー変異 3
p C D H c y t b k e x m u t 4	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼシトクローム b ドメイン-K e x 切断リンカー変異 4
p C D H a l l	麹菌セロビオースデヒドロゲナーゼ-K e x 切断リンカー
p G l a B s s	麹菌グルコアミラーゼ B 分泌シグナルペプチド
p G l a B	麹菌グルコアミラーゼ B-K e x 切断リンカー
p C e l B s s	麹菌エンドグルカナーゼ分泌シグナルペプチド
p C e l B	麹菌エンドグルカナーゼ-K e x 切断リンカー
p S K I K _ C D H s s	麹菌 C D H 由来の分泌シグナルペプチドの開始コドン直後に S K I K のアミノ酸配列が挿入された分泌シグナルペプチド
p A s A P 1 s s	麹菌 A L P 由来の分泌シグナルペプチド 1
p A s A P 3 s s	麹菌 A L P 由来の分泌シグナルペプチド 3

[0086] 鋳型 DNA として p b I A P I V、PCR の酵素として K O D - P l u s - D N A P o l y m e r a s e（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置として T 1 0 0 ™ サーマルサイクラー（B I O - R A D 社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバース PCR を実施することにより、p b I A P I V の分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が除かれた、コンストラクト用プラスミドのベクター断片を得た。使用したプライマーを下記に示す。増幅したベクター断片を 1 %（w / v）アガロースゲル中で分離し、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t（キアゲン社）を用いて精製した。

[0087] [表8]

b I A P I V - 1 F	TTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCC
P t e f - 1 R	TTTGAAGGTGGTGCGAACTTTG

[0088] 国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 1 2 8 5 号パンフレットの「[例 1. 遺伝子 A

s E g t A、A s E g t B又はA s E g t Cを挿入したDNAコンストラクトの作製] (2) *Aspergillus sojae* NBRC4239株の染色体DNAの抽出」と同様の操作で得られた染色体DNAを鋳型として、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー (BIO-RAD社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってPCRを実施した。キャリアタンパク質となるセロビオースデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼB、及びエンドグルカナーゼの遺伝子 (それぞれc d h、g l a b、及びc e l b) を増幅するために使用したプライマーを下記表に示す。下表に記載の各プライマーを用いることで、各キャリアタンパク質のC末端にK e x 2切断配列を含むリンカー配列 (配列番号61) が連結したアミノ酸配列 (配列番号23、25、27) をコードするDNA断片を取得した。増幅したC D H遺伝子、G l a B遺伝子、及びC e l B遺伝子のDNA断片を1% (w/v) アガロースゲル中で分離し、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (キアゲン社) を用いて精製した。

[0089] [表9]

遺伝子	プライマー
<i>c d h</i>	F w : CGCACCACCTTCAAAATGAAGCTCGTTAAC R v : CTCAGCTGGGATGAAGCGCTTAGAGCCTCCACCGCCAGCGCAAGAATCTT
<i>g l a b</i>	F w : CGCACCACCTTCAAAATGCGGAACAACCTT R v : CTCAGCTGGGATGAAGCGCTTAGAGCCTCCACCGCCAGCGCAAGAATCTT
<i>c e l b</i>	F w : CGCACCACCTTCAAAATGATCTGGACACTC R v : CTCAGCTGGGATGAAGCGCTTAGAGCCTCCACCGCCATGCCTGTAGGTAGA

[0090] I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i tを使用して、C D H遺伝子、G l a B遺伝子、及びC e l B遺伝子のDNA断片と、コンストラクト用プラスミドのベクター断片とをそれぞれ連結して、C D H遺伝子、G l a B遺伝子、及びC e l B遺伝子が挿入された遺伝子挿入DNAコンストラクト (p C D H a l l、p G l a B、及びp C e l B) を得た。このようにして得られたDNAコンストラクトは、その上流から、p U C 19由来のDNA断片とP t e fのDNA断片と、各種キャリアタンパク質遺伝子のD

NA断片と分泌シグナルペプチドをコードする塩基を含まないb I A P I V合成遺伝子DNA断片とT a l pのDNA断片とp y r GのDNA断片とp U C 1 9由来のDNA断片とが連結されたものである。すなわち、p U C 1 9 l i n e a r i z e d V e c t o r (クロンテック社)のI n - F u s i o n C l o n i n g S i t eに、P t e f - 各種キャリアタンパク質の遺伝子 - K e x 2切断配列を含むリンカーをコードする塩基配列 - 分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列を含まないb I A P I V合成遺伝子 - T a l p - p y r Gの配列が順に連結されたDNAコンストラクト (p C D H a l l、p G l a B、及びp C e l B) が得られた。

[0091] 得られたDNAコンストラクトを用いて、大腸菌J M 1 0 9を形質転換した。その後、5 0 μ g / m l のアンピシリンを含むL B (L u r i a - B e r t a n i) プレートへ塗り広げた。これを3 7 °Cで一晩静置培養し、コロニーを形成させた。

得られたコロニーを、5 0 μ g / m l のアンピシリンを含むL B液体培地で3 7 °C、一晩振とう培養した。培養後の培養液を遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体について、F a s t G e n e P l a s m i d M i n i K i t (日本ジェネティクス社)を用いて、キットに添付されたプロトコールに従ってプラスミドDNA (DNAコンストラクト) を抽出した。

抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNAの塩基配列を決定することにより、目的のDNAコンストラクト (p C D H a l l、p G l a B、及びp C e l B) が得られたことを確認した。

[0092] 次いで、b I A P I Vの分泌シグナルシグナルペプチドがA s p e r g i l l u s s o j a e由来セロビオースデヒドロゲナーゼシクロームbドメイン (C D H c y t b) 及びK e x 2切断配列を含むリンカー配列 (配列番号6 1) からなる分泌シグナルペプチド (配列番号1 8) に置き換えられたb I A P I V合成遺伝子を含むDNAコンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型DNAとして上記で得られたp C D H a l l、配列番号7 1及び7 2のプライマー、PCRの酵素としてK O D - P l u s - D N A P o l

y m e r a s e（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー（BIO-RAD社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施し、CDHcytbkex-bIAPIVのコンストラクトDNA断片を得た。CDHcytbkex__bIAPIVのコンストラクトDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、大腸菌JM109に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミドDNAを回収した。抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNAの塩基配列を決定することによりDNAコンストラクト（pCDHcytbkex）が得られたことを確認した。

[0093] 次いで、bIAPIVの分泌シグナルシグナルペプチドがAspergillus sojaeセロビオースデヒドロゲナーゼ由来分泌シグナルペプチド（CDHss；配列番号17）に置き換えられたbIAPIV合成遺伝子を含むDNAコンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型DNAとして上記で得られたpCDHα11、配列番号73及び74のプライマー、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー（BIO-RAD社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施し、CDHss-bIAPIVのコンストラクトDNA断片を得た。CDHss__bIAPIVのコンストラクトDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、大腸菌JM109に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミドDNAを回収した。抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNAの塩基配列を決定することによりDNAコンストラクト（pCDHss）が得られたことを確認した。

[0094] 次いで、bIAPIVの分泌シグナルシグナルペプチドがAspergillus

Ilus sojae セロビオースデヒドロゲナーゼ由来分泌シグナルペプチド (CDHss) の開始メチオニン直後に SKIK を挿入した分泌シグナル (SKIK_CDHss ; 配列番号 28) に置き換えられた bIAPIV 合成遺伝子を含む DNA コンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型 DNA として上記で得られた pCDHss、配列番号 75 及び 76 のプライマー PCR の酵素として KOD-Plus-DNA Polymerase (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置として T100™ サーマルサイクラー (BIO-RAD 社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバース PCR を実施し、SKIK_CDHss-bIAPIV のコンストラクト DNA 断片を得た。SKIK_CDHss-bIAPIV のコンストラクト DNA 断片を In-Fusion HD Cloning Kit を使用して、大腸菌 JM109 に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミド DNA を回収した。抽出したプラスミド DNA 中に挿入された DNA の塩基配列を決定することにより DNA コンストラクト (pSKIK_CDHss) が得られたことを確認した。

- [0095] 次に、bIAPIV の分泌シグナルシグナルペプチドが *Aspergillus sojae* 由来セロビオースデヒドロゲナーゼシクローム bドメイン (CDHcytb) 及び Kex2 切断リンカー変異 1~4 を含むリンカー配列 (配列番号 62~65) からなる分泌シグナルペプチド (配列番号 19~22) に置き換えられた bIAPIV 合成遺伝子を含む DNA コンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型 DNA として上記で得られた pCDHcytbkex、配列番号 77~81 のプライマー、PCR の酵素として KOD-Plus-DNA Polymerase (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置として T100™ サーマルサイクラー (BIO-RAD 社) を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバース PCR を実施し、CDHcytbkexmut1__bIAPIV、CDHcytbkexmut2__bIAPIV、CDHcytbkexmu

t 3__b l A P l V、CDHc y t b k e x m u t 4__b l A P l V、のコンストラクトDNA断片を得た。得られたコンストラクトDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、大腸菌JM109に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミドDNAを回収した。抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNAの塩基配列を決定することによりDNAコンストラクト（pCDHc y t b k e x m u t 1、pCDHc y t b k e x m u t 2、pCDHc y t b k e x m u t 3、pCDHc y t b k e x m u t 4）が得られたことを確認した。

[0096] 次いで、b l A P l Vの分泌シグナルシグナルペプチドがA s p e r g i l l u s s o j a eグルコアミラーゼ由来分泌シグナルペプチド（配列番号24）に置き換えられたb l A P l V合成遺伝子を含むDNAコンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型DNAとして上記で得られたp b l A P l V、配列番号82及び83のプライマー、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー（BIO-RAD社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施し、G l a B s s__b l A P l VのコンストラクトDNA断片を得た。得られたコンストラクトDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、大腸菌JM109に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミドDNAを回収した。抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNAの塩基配列を決定することによりDNAコンストラクト（pG l a B s s）が得られたことを確認した。

[0097] 次いで、b l A P l Vの分泌シグナルシグナルペプチドがA s p e r g i l l u s s o j a eエンドグルカナーゼ由来分泌シグナルペプチド（C e l B s s；配列番号26）に置き換えられたb l A P l V合成遺伝子を含む

DNAコンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型DNAとして上記で得られたpCelB、配列番号84及び85のプライマー、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー（BIO-RAD社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施し、CelBss__bIAPIVのコンストラクトDNA断片を得た。CelBss__bIAPIVのコンストラクトDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、大腸菌JM109に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミドDNAを回収した。抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNAの塩基配列を決定することにより、bIAPIV遺伝子上流にCelBssをコードする遺伝子が挿入されたDNAコンストラクト（pCelBss）が得られたことを確認した。

[0098] 次いで、bIAPIVの分泌シグナルシグナルペプチドがAspergillus sojaeアルカリホスファターゼ由来分泌シグナルペプチド（配列番号29及び30）に置き換えられたbIAPIV合成遺伝子を含むDNAコンストラクトを以下の手順で作製した。鋳型DNAとして上記で得られたpbIAPIV、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、配列番号86～89のプライマー、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてT100™ サーマルサイクラー（BIO-RAD社）を使用して、本酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施し、AsAP1ss__bIAPIV及びAsAP3ss__bIAPIVのコンストラクトDNA断片を得た。得られたコンストラクトDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して、大腸菌JM109に形質転換した。

上述の方法でプレート培養し、得られたコロニーを培養後、菌体からプラスミドDNAを回収した。抽出したプラスミドDNA中に挿入されたDNA

の塩基配列を決定することによりDNAコンストラクト（pAsAP1ss54及びpAsAP3ss72）が得られたことを確認した。

[0099] [実施例9. 形質転換*Aspergillus sojae*の作製]

実施例8で得られた各種分泌シグナルペプチドを有するb1AP1V合成遺伝子を挿入したDNAコンストラクトを用い、実施例2に記載の方法に従って、*Aspergillus sojae* NBRC4239株由来pyrG破壊株の形質転換株を取得した。

[0100] [実施例10. 形質転換*Aspergillus sojae*のフラスコ培養試験]

50mL容三角フラスコ中の液体培地（2%（w/v）ハイポリペプトン（日本製薬社）、2%（w/v）パインデックス#2（松谷化学工業社）、1%（w/v）酵母エキス（オリエンタル酵母社）、0.25%（w/v） KH_2PO_4 （和光純薬工業社）、0.25%（w/v） K_2HPO_4 （和光純薬工業社）、0.05%（w/v） $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （和光純薬工業社）、3mM MgCl_2 （和光純薬工業社）、0.1mM ZnCl_2 （和光純薬工業社）；pH未調整）20mLに、実施例9で得られた各種形質転換株の分生子を接種し30℃、攪拌速度180rpmで培養を開始し、計3日間培養を行った。次いで、培養後の培養物をミラクロス（カルバイオケム社）でろ過分離し、培養上清と菌体を回収した。回収した菌体を蒸留水で洗浄した後、菌体をペーパータオルに挟むことによって水分を押し出して湿菌体を得た。得られた湿菌体を秤量し、50mg湿菌体/mLになるようTrisバッファー（20mM Tris-HCl pH8.0、3mM MgCl_2 、0.1mM ZnCl_2 ）を添加して、ホモジナイズ処理後、一部をジルコニアビーズと共に2mLスクリーキャップバイアルに入れ、ビーズショッカー（MS-100R、トミー精工社）を用いて2500rpm、20秒間の破碎を2回繰り返した。次いで、15000×gで5分間遠心し、得られた遠心上清を菌体内画分とした。

得られた培養上清画分と菌体内画分のALP活性測定を特開2008-5

734号に記載の方法で行い、分泌率（培養上清総活性 [U] ÷（培養上清総活性 [U] + 菌体内画分総活性 [U]）×100）を計算した（図3）。

[0101] [表10]

配列番号	説明	配列
1	bAPIVssをコードする塩基配列を示す。	ATGCAGTGGGCCTGTGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGTGGCTACAGCTCTCCCTCACC
2	CDHssをコードするイントロンを含む塩基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCTCGCTTCATTCCCTGTGACGAGCACCGGTGAGTGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTGTTGCAGTCATGCTGGGCT
3	CDHcytbkexをコードする塩基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCTCGCTTCATTCCCTGTGACGAGCACCGGTGAGTGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTGTTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGACACGGCCATCACGTTTGACACCTGGTCCGTACCTGCTGGTACCGGTACCGGCTGTCTCGTCTTCGGTGTAGCCCTGCCGGTTTCGGCATTGACCACCGATGCGAOCGAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGTGGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCCTCGTCCGCTGGCTGGTGTGGCATTTCCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTTCCTGGCCTATCCGTACGAGGATAACCATCTTGACCTCCCTGCGATTCCGGCTCGGGCTATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTAOGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGTCTGACCTGGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGGGTAGGTTAGTCTGCGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCCGTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGACAACCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCCCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTCCCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGAGGCTCTAAGCGC
4	CDHcytbKexmut1をコードする塩基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCTCGCTTCATTCCCTGTGACGAGCACCGGTGAGTGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTGTTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGACACGGCCATCACGTTTGACACCTGGTCCGTACCTGCTGGTACCGGTACCGGCTGTCTCGTCTTCGGTGTAGCCCTGCCGGTTTCGGCATTGACCACCGATGCGAOCGAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGTGGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCCTCGTCCGCTGGCTGGTGTGGCATTTCCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTTCCTGGCCTATCCGTACGAGGATAACCATCTTGACCTCCCTGCGATTCCGGCTCGGGCTATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTAOGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGTCTGACCTCGGACCAACATCGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGCGTAGGTTAGTCTGCGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCCGTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGACAACCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA CAATGCAGCCAGTGACTCCCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTCCCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGACGCCATAAGCGC
5	CDHcytbKexmut2をコードする塩基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCTCGCTTCATTCCCTGTGACGAGCACCGGTGAGTGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTGTTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGAGACGGCCATCACGTTTGACACCTGGTCCGTACCTGCTGGTACCGGTACCGGCTGTCTCGTCTTCGGTGTAGCCCTGCCGGTTTCGGCATTGACCACCGATGCGAOCGAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGTGGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCCTCGTCCGCTGGCTGGTGTGGCATTTCCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTTCCTGGCCTATCCGTACGAGGATAACCATCTTGACCTCCCTGCGATTCCGGCTCGGGCTATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTAOGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGTCTGACCTCGGACCAACATCGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGCGTAGGTTAGTCTGCGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCCGTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGACAACCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCCCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTCCCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGACGCCATAAGCGC

[表11]

6	C D H c y t b K e x m u t 3 をコードする塩 基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCCTCGCTTCATTCCCTGTCAGCGAGCACCGGTGAG TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGGACACGTGGTTCGGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCCGGTGTAGCCCTGCCGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCGACG CAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCTCGTCCG CTGGCTGGTGTGGCATTTCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTCT TGGCCTATCCGTACGAGGATACCATCTTGACCTCCCTGCCATTCCGGTCCGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCAACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGTCTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGGGTAGGTTAGTC CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCAACCCCGTCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCACGACAACCCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGCTGACCGTGCTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTC CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGGACAACGCTGGTCAAGCGC
7	C D H c y t b K e x m u t 4 をコードする塩 基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCCTCGCTTCATTCCCTGTCAGCGAGCACCGGTGAG TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGGACCGTGGTTCGGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCCGGTGTAGCCCTGCCGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCGACG GAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCTCGTCCG CTGCCCTCGTGTGGCATTTCCTTGGCTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTCTTCT TGGCCTATCCGTACGAGGATACCATCTTGACCTCCCTGCGATTCCGGTCCGGGT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCAACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGTCTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGGGTAGGTTAGTC CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCAACCCCGTCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCACGACAACCCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGCTGACCGTGCTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTC CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGAGTCCGAGTCGAAAAGCGC

[表12]

8	C D H a l l をコードする塩基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAAACCGTTTGGCTCGCTTCATTCCCTGTGACGAGCACCGGTGAG TGCTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGACACGTGGTCCGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCCGTGTAGCCCTGCCGGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCCAGC GAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCCTCGTCCG CTGGCTGGTGTCCGATTTCCTTGGCTGGTCCCATGAACAACAATCTCTTGTCTCT TGGCCTATCCGTACGAGGATACCATCTTGACCTCCCTGCGATTCCGGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACCTTACGTTGCTTTTCCGTTCGCGAGAATTGTCTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAAACGCGAACCAAGCAAGGCTAGGTTAGTCT CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCCGTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGACAAACAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCCACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCCGTCTC CCTGTCCCTGACGGTGTACATACGACTATATTGTCTGCTGGTGGAGGTGCCGGG GGTATCCCTGTCCCGATCCGCTGAGTGAGGCTGGACACAGTGTCTCTCTGATC GAGAAAGGTCTCTCTCTCTCCGGACCGCTGGCGTGGCACCATGAAGCCCAGCTC GCTGGATGATACCAACCTGACGCGATTGATGTCCCTGGGCTGTGCAACCAGAT CTGGGTGCTGACTCCAACGGTATCCGCTGCAGTGACACCGATCAGATGGCAGGTT GTGTGCTGGGTGGAGGCACCGCCGTCAACGCAGGATTGTGGTGAAGGTAAGC CGTGCCAGATGCCATGTTCCGATCCATCACTGACAATGTCCAGCCAAATCCCG TTGACTGGGACTACAACTTCCCCGAGGGATGGCAGTCCGACATGCAGGCT GCCGCGGACCGCGTGTCTCTCGCGGATCCCTGGAAACCAACCCCTCCACCGA TGGAAGGCTTTATTACCAACAAGGAGCCGATATACTGTTAAATGGCTTGCAATCC GCCGATGGTCACTCCGTCAACCTCAACGATGTCCCGGCCAGAAAACCAAGAC CTTTGGCCACGCACCATTCATGTTCTCTGGAGGTGAGCGCGGAGGGCCCATGG GGACGTATCTGGTGTCCGCGAGCGAGAGAGATAATTTTGCCCGCTGGTCCGAAC ACGACTGTGAAGAGGGTTGTTCTGTAAGGCGGACGTATCACCCGAGTTGAGGT CGAGGCGACCCCTCGATGGTGGCTACGCGGTACCGTCAATGTAAGTGCCTAATAC GGGTGAGTCACTCTTCTGTCAGGAACCTTTTGGAAACGCCAAGGTCTTATGAG AACTACGCTTCCCTTCGATGATATTGTTAGGCACTTATGCTAATGGCGTATAGGT GGTATCGGCCCGAAGGACGAGCTGTCCATCGTGAAGAGCTCAACTGATGGAGA GACAAATGATTGCCGAATCTGAGTGGATCGAATCTCCGGTTGGCGAGAATTTGCT CGATCATGTCAATGTGAGTGCCAAGTGGACCGGGGAGGCTACTACTATGCTAAT AGGATGCTTACAGACTGATGTTGTGGTGACCCACCCCTGATGTTGTCTCTATGA TTTCAAAGCGGCATACAAGACCCCCATCGAGAGTGATGCGACGAGCTATCTGAG TATGTAGTAATGCTTCGAAGGACAGTCCAGCACTAACTTGCCTAGACGATCGCA CCGGGATTTTCGCCCGAGGCTGCGCCTAACATTTGGTCTATGTAAGTTGCCCGTC TACCAACACGTCATGGTACTAACGCCCTGTAGAATCTTCGACGAAGTCAACGGC TCTGATGGCATTTAAACGACAGATACAGTGGACTGCTCGTGTGGAAGGCGGCCA CGACACGCTGACGGACGTACGTTGACTCCTAAGTGAAGATTAGTGCAATATA TTAACCGTGTGTAGACGCCATGACCATCAGCCAATACCTCGGCCGCGGCTCAA CCTCGCGTGGCGCATGACCATTACCGCAGGACTGGACACGGTGGTCTCGACG CTGCCATTCTACGGGACGAGAGCGACGTTAATGCTGTAATCCAGGGAATCCAG AACCTGAAGATGCCCTGAACGGCACAGCATTTACCTGGAAGTACCCCTGCTCC GAACACTTCCATTGCCGAGTTTGTCAATACTGTGAGTGCTGATTTCTGGAAGGA TGTTTCGACGTAAGTACACTGATAGATGCCAATCACTGCCGGAACACGCGGAGC TAATCACTGGATGGGTGAGTTATGAATCTGCTTTTAAATTTTCGTGCTAATTTG TTATAGGAACCTGCAAAATAGGTACAGATGATGGCCGTACTGGAGGTAGCGCCG TTGTTGATTTGAATACGAAGGTCTATGGAACGGACAACCTGTTCTGCTGGATG CTAGTATCTTCCCGGGTATGATCAGCTCCAATCCTTCGGCTTACATTGTTACGGT CGCGGAGCATGCAGCTGAAAGATTCTTGGCTGGGCGGTGGAGGCTCTAAGC GC
9	G l a B s s をコードする塩基配列を示す。	ATGCGCAACAACCTTCTTTTTTCCCTCAATGCCATTGCTCGCGCTCTCCCG

[表13]

10	G l a Bをコードする塩基配列を示す。	ATGCGGAACAACCTTTCTTTTCCCTCAATGCCATTGCTGGCGCTGTGCGGCAT CCGTCGTTCCCTGTCCATAAGAGGCAGTCGGATGTCAACGCCCTTCATTGAGACA CAGACACCCATCGCCAAACAGGGCGTCCTCAATAATATCGGCGCTGATGGCAAG CTTGTAGAGGGGGCTGCCGCGGGTATTGTTGTAGCCTCCCATCCAAGAGTAAT CCCGACTGTTCTGACAAATCCTACCCCTCTAAACCGCTTAATACGACCATAGAACTA ATTATATTTAGACTTCTATACCTGGACGCGGACGCTGGCCTCACCATGGAAGA AGTGATAGAGCAATTCATCGGGGGAGACGCGACTCTCGAGTCTACAATCCAGAA TTATGTTGACTCTCAAGCGAAGCAGCAGGCAGTCTCCAACCCATCAGCCAGCCT GTGGATGGCTCGGGTCTTGCTGAACCCAAGTTTTACGTCAACATCTCTCAATT CACCGATTCTTGGGGCCGACCCAGCGGACGGGCCAGCTTTACGTGCTTCCG CCTTGATCGCATATGGCAACTCCCTGATCGCCAGGACAAGCAATCTGTTGTCA AAGCCAAACATCTGGCCAATTGTCCAGAATGACTTGTCTTACGTGGGTCAATACT GGAACCAGACCGGGTTTGATCTTTGGGAAGAGGTTTCAGGGCAGCTCCTTCTTC ACTGTTGCTGTACAGCACAAGGCCCTTGGTGGAGGGCGACGCGTTTGCGAAGGC ACTCGGAGAGGAATGCCAGGCGTGTCCGTGGCGCCGCAAATCCTCTGCCATC TTCAGGATTTCTGGAATGGGTCCGCTGTTATTCTAACTTACAAACCCAGTGGGC GCAGTGGACTGGATGCCAACTCGCTTTTGGGTTCATCCATACTTTTGACCCAG CTGCTGCTTGTGATGATACAACGTTCCAACCCCTGCTCCTCTCGGGCTCTGTCAA ACCATAAGCTTGTGCTGGACTCTTTCCGGTCCGCTTACGCTATCAACAAACGGAC GTGGAGCAGGAAAGGCCGAGCAGTGGGCCGTTACGCAGAGGACACCTATCAG GGAGGCAATCCATGGTTGGTACTCTGTCTCATTGATTCCAAAGGCTTAAACTAAT GAATAATAGGTATCTTACCCTCTGGTGGCTGCGGAATTGCTCTACGACGCCCTT GTATCAATGGGACAAACAAGGTCAAGTGAACGTCACCGAAACTTCCCTTCCCTT CTTCAAGGACCTCTCCAGCAATGTCAAGACCGGATCTACGCCAAGTCTTCCCTC AGCCTACGAGTCCCTTACAAGCGCTGTCAAGACCTACGACGCGCTTCATCTC CGTTGTCCAGGAGTATCTCCTGATGGCGGTGCTCTGGCCGAGCAGTACAGTC GGGACCAGGGCACCCAGTTTTCGGCATCCGATCTGACTTGGTCTTATGCAGCTT TCTTGAGTGTCTTTGGGAGACGAAACGGCACTGTCCCTGCTAGCTGGGGCTCT TCCACGGCCAACGCAGTTCCAAGCCAATGTTGGGGGGGTACAGTTTCTGGAAG TTACACTACCCCAACTGTTGGGTCTGGGGCGGTGGAGGCTCTAAGCGC
11	C e l B s sをコードする塩基配列を示す。	ATGATCTGGACACTCGCTCCCTTTCTGGCACTCCTGCCACTGCTAACCGCT
12	C e l Bをコードする塩基配列を示す。	ATGATCTGGACACTCGCTCCCTTTGTGGCACTCCTGCCACTGGTAACGGCTCAA CAGGTGGGAACCTACAGCGGACGCCATCCAGACTCACCAGTATAAATGTACT TCACAGAACCGCTGCACGAGGCAGAACACCTCAGTGGTCTTGTATGCAGCAAC CCATTTTATCCACAAAAAAGGAACACAAACATCCTGCACCAACAGCAACGGCTT GGACACTTCCATTTGTCCGGACAAACAGACCTGCGCGGACAACTGTGTCTGTG ATGGGATCACGGACTACGCTAGCTACGGCGTCCAGACGAAGAATGACACATTTGA CCCTTCACCAATATCTGCAAACTGGCAATGAAACAAAGTCCGTGCTACCCGCTG TCTACCTCCTCGCTGAAGACCGAGAGAACTATTCATGCTGCAACTCCTCAATC AGGAATTCACCTTCGATGTGACGCGCTCTACCTCGTCTGCGGCATGAATGGTG CTCTATATCTCTGAAATGGAGGCTTCGGGCGGAAAGAGTTCCCTAAATCAAG CGGCAGCCAAATACCGAACCCGTTACTGTCTATGCCAATGCTACACCACGCCCTT GGATCAACGGCGAAGGCAACACCGAGAGTGTCCGCTCCTGCTGTACAGGAAATG GATATTTGGGAAGCCAACGCCCGAGCAACAGGGCTTACACCGCACCCCTTGCAA CACAACCGGTTTGTACGAGTGCAGCGGCTCGGGATGCGGAGACTCGGGGTCT GTGACAAGTCCGGCTGTGGATTCAACCCATATGGCCTAGGTGCAAAGGACTACT ACGGTTACGGCCTCAAGGTCAACACCAACGAGACATTACGGTCTGTAACCCAG TTCCTCACAAAGCGATAACACGACATCGGGCCAGCTCAGCGAAATCCGCGCTCTC TACATCCAGAACGGCCAGGTATTCAAATGCTGCCGTACCTCAGGAGGAAAA ACTGTCGACTCAATCACAAGCATTTCTGCAACCGGTGAAGGAACTGCCTTCAAC CGACTTGGCGGCCCTCGAGGAAATGGGCCACGCCCTTGGGCGCGGCATGGTTCT TGCGCTCAGTGTCTGGAACGACGCGAGGCTCATTCATGCAATGGCTTGATGGGG GCAGCGCAGGACCGTGACGCGCAGGAGGGAGACCGGCGTTGATCGAGAA GTTGTATCCGATACTCATGTGAAGTTTTCCAAGATCCGGTGGGGAGATATTGG ATCTACCTACAGGCATGGCGGTGGAGGCTCTAAGCGC
13	S K I K _ C D H s sをコードする塩基配列を示す。	ATGTCCAAGATCAAGAAGCTCGTTAACCGTTTGCTCGCTTCATTCTGTACGCG AGCACCGGTGAGTGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTTCTGCTGACTT TTCTTGGCAGTGTGACGTCATGCTGGGCT
14	A s A P l s s 5 4をコードする塩基配列を示す。	ATGAGGTTCCCTCTCAATTGTAGGTGCGGCGCTCTTCCGCTTCCAGCGCTGTGGC

[表14]

15	A s A P 3 s s 72をコードする 塩基配列を示す。	ATGCATATCCGCACTGCCATCACCGCGGGCGGGCCCTTGTCCAGACTGCAGTTT GCAGCTTCTGTTCAGGCA
16	b I A P I V s sのアミノ酸配 列を示す。	MQWACVLLLLLGLWLQLSLT
17	C D H s s のア ミノ酸配列を示 す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWA
18	C D H c y t b k e x のアミノ 酸配列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRNCENCLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCP DNISLAQH DNQGHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPGDCSGDGGGGGNEPTVPVPDGGGGGSKR
19	C D H c y t b K e x m u t 1 のアミノ酸配 列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRNCENCLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCP DNISLAQH DNQGHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPGDCSGDGGGGGNEPTVPVPDGGGGGPHKR
20	C D H c y t b K e x m u t 2 のアミノ酸配 列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRNCENCLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCP DNISLAQH DNQGHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPGDCSGDGGGGGNEPTVPVPDGGGGGPHKR
21	C D H c y t b K e x m u t 3 のアミノ酸配 列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRNCENCLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCP DNISLAQH DNQGHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPGDCSGDGGGGGNEPTVPVPDGGGGGRLVKR
22	C D H c y t b K e x m u t 4 のアミノ酸配 列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRNCENCLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCP DNISLAQH DNQGHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPGDCSGDGGGGGNEPTVPVPDGGGGGVAVEKR
23	C D H a l l の アミノ酸配列を 示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRNCENCLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCP DNISLAQH DNQGHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPGDCSGDGGGGGNEPTVPVPDGGGGGATYDYIVVGGGAGGIPVADRLSE AGHSVLLIEKGPPSSGRWGGTMKPSWLD D TNLTRFDVPGLCNQIWVDSNGIACS D TDQMAGCVLGGGTAVNAGLWWKPNPVDW DYNFPEGWQSSDMQAAADRVFS RIPGTTTPSTDGKLYYQQCADILLNGLQASAGWSSVTLNDVPAQKTKTFCHAPFM FSGGERGGPMGTYLVSASERDNFARWSNTTVKRVRREGGRITGVEVEATLDGGY AGTVNVTANTGRVILSAGTFGTPKVLMRSGIGPKDQLSIVKSSTDGETMIAESEW IELPVGENLVDHVNTD V V V T H P D V V F Y D F K A A Y K T P I E S D A T S Y L N D R T G I F A Q A A P N I G P I I F D E V T G S D G I K R Q I Q W T A R V E G G H D T P D G H A M T I S Q Y L G R G S T S R G R M T I T A G L D T V V S T L P F L R D E S D V N A V I Q G I Q N L K M A L N G T G F T W N Y P A R N T S I A E F V N T M P I T A G T R R A N H W M G T C K I G T D D G R T G G S A V V D L N T K V Y G T D N L F V V D A S I F P G M I T S N P S A Y I V T V A E H A A E K I L A L G G G G S K R
24	G l a B s s の アミノ酸配列を 示す。	MRNNFLFSLNALAGAVA
25	G l a B のアミ ノ酸配列を示 す。	MRNNLLFSLNALAGAVAHPSFPIHKRQSDLNALFIEAQTPIAKQGVLNNIGADGKL VEGAAAGIVVASPSKSNPDYFYTWTRDAGLTMEEVIEQFIGGDATLESTIQNYVD SQANEQAVSNPSGGLSDGSGLAEPKFYVNISQFTDSWGRPQRDGPALRASALAY GNSLISSDKQSVVKANIWPIVQNDLSYVGQYWNQTFGDLWEEVQGSFFTVAVQ IHKALVEGDFAKALGEECCQACSVAPQILCILQDFWNGSAVLSNLP TNGRSGLD T NSLLGSIHTFDPAACDDTTTFQPCSSRALS NHKLVD SFRSVYGINNGRGAGKAA AVGPYAEDTYQGGNPWYLTTLVAAELLYDALYQWDKQGGVNVNTETSLPFFKDL S SNVTTGSAKSSSAYESLTS AVKTYADGFISVVQ EYTPDGGALAEQYSRDQGT PVS ASDLTWSYAAF LSAVGRRNGTVPASWGSSTANAVPSQCSGGTVSGSYTTPTVGSW GGGGSKR

[表15]

26	C e l B s s の アミノ酸配列を 示す。	MIWTLAPFVALLPLVTA
27	C e l B のアミ ノ 酸 配 列 を 示 す。	MIWTLAPFVALLPLVTAQVGTADAHPRLLTTYKCTSQNGCTRQNTSVVLDAAT HFIHKKGTQTSCTNSNGLDTSICPDKQTCADNCVVDGITDYASYGVQTKNDTLT LHQYLQGTGNETKSVSPRVYLLAEDGENYSMLQLLNQEFTFDVDASTLVCGMNG ALYLSEMEASGGKSSLNQAGAKYGTGYCDAQCYTTPWINGEGNTESVSGCCQE MDIWEANARATGLTPHPCNTTGLYECSSGSGCGDSGVCDKSGCGFNPHYGLGAKD YYGYGLKVNTNETFTTVTQFLTSDNTTSGQLSEIRRLYIQNGQVIQNAAVTSGGK TVDSITKDFCSGEGSAFNRLGGLEEMGHALGRGMVLALSVWNDAGSFMQWLD GGSAGPCSATGEDPALIEKLYPDTHVKFSKIRWGDIGSTYRHGGGSGKR
28	S K I K C D H s s のアミノ 酸配列を示す。	MSKIKKLVNRLASFLSASTVLQSCWA
29	A s A P 1 s s 5 4 のアミノ酸 配列を示す。	MRFLSIVGAALFASSAVA
30	A s A P 3 s s 7 2 のアミノ酸 配列を示す。	MIIRTAITAGAALVQTAVAASVQA
31	分泌シグナルと C末端シグナル を含まないA L P I I のアミノ 酸配列を示す。	LIPAEFEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRIIL KGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYR TIGVSAARYNQCNTRGNEVTSVINRAKKAGKAVGVVTTTRVQHASPAGAYAH TVNRNWYSDADLPADAQKNGCQDIAAQLVYNMIDIVLGGGRMYMFEGTPDP EYPDDASVNGVRKDKQNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAADDSSVTHLMG LFEPADMKYNVQDHTKDPDLAEMTEAALQVLSRNPGRFYLFVEGGRIDHGH DGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSELDTLILVTADHSHVFSFGGYTLRGTSIF GLAPGKALDSKSYTSILYGNPGYALGGGSRPDVNGSTSEEPSYRQQAAPLASE THGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHIMAFAGCPEPYTDCNLPAPA
32	分泌シグナルと C末端シグナル を含まないA L P I V のアミノ 酸配列を示す。	FIPAEFEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRIIL KGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYK TIGVSAARYNQCNTRGNEVTSVMNRRAKKAGKSVGVVTTSRVQHASPAGAYAH TVNRNWYSDADLPADAQTYGCQDIATQLVNNMIDIVLGGGRMYMFEGTPDP EYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDPSVTHLM GLFEPADMKYNVQDHTKDPDLAEMTEAALQVLSRNPQGFYLFVEGGRIDHGH HEGKAYMALTDVTFMFDNALAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSI FGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVLCGGRLRPDVNDISIEDPSYRQQAAPLSS ESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMFAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
33	A L P I I をコ ードする塩基配 列を示す。	CTCATCCCAGCTGAAGAGGAAAACCCGGCCTTCTGGAACAGGCAGGCTGCCCA AGCTCTGGACGTGGCCAAGAAGCTCCAGCCTATCCAAACGGCCGCTAAGAACG TCATCCTCTTCTTGGGAGATGGCATGGGCGTGCCAACAGTCACTGCCACTCGTA TCCTTAAGGGCCAAATGAACGGGAAAGTTGGGCCACAGACTCCTCTGGCTATG GACCAGTTCCCATACGTGGCCCTGTGCAAGACATACAGCTTGACCGTCAAGTG CCGGATTCCGCTGGAACAGCCACCGCTTACCTCTGCGGCGTCAAGGGAAACTA CCGCACAATCGGCGTTTCCGCTGCGCTAGGTACAACCAGTGTAACACCACTAG ACGAAAACGACGTTACCTCTGTGATCAACCGTGCTAACAAGGCTGGCAAGCCCG TTGGCGTGGTCACAACCACTAGAGTGCAACCGCTTCTCCCGCCGGTGCTTAC GCCCACACCGTCAACCGCAACTGGGTACAGCGACGCCGATCTGCCTGTGACGCG CCAGAAGAACGGCTGCCAAGACATCGCCGCTCAGTTGGTCTACAACATGGACA TCGATGTTATCCTGGGAGGTGGCAGGATGTACATGTTCCCGAGGGAACTCCCG ACCTGAATACCTGACGATGCTTCCGTCAACGGTGTTAGAAAGGATAAGCAGA ACCTGGTCCAGGAGTGGCAAGCTAAGCACCAGGGAGCCCAATACGTTTGGAAAC CGTACAGCTCTGCTCCAGGCGCGTGACGATTCCCTCTGTGACCCACTTGATGGGT CTGTTTCAACCCGCTGACATGAAGTACAACGTCCAGCAAGACCACACTAAAGAT CCTACACTGGCCGAGATGACTGAAGCCGCTCTCCAGGTTTGTGCCGTAACCCG CGTGGTTTCTACCTCTTCGTGGAGGGAGGTGCGATCGACCAGGTCACCACGA CGGCAAGGCTTACATGGCTTTGACAGAAGCTATCATGTTGACAAACGCTATCGC CAAGGCTAACGAGCTGACAAGCGAACTCGACACCCTGATCCTCGTGACTGCCG ATCACTCCCACGTCTTCTCTTTTCGGCGGATACACCTGAGGGGCACTTCAATCT TCGGCCTCGCTCCTGGAAAGGCCCTTGGACTCTAAGAGCTACACCTCAATCCTGT ACGGAACCGGTCCCGGCTACGCTCTCGGTGGCGGATCGAGGCTACGCTGAAC GGTTCAACTAGTGAGGAACCAAGCTACAGACAGCAAGCCGCTGTCCCGTTGGC CTCAGAGACTCACGGTGGCGAAGACGTTGTGTGTTGCGCCGTGGTCCACAAG CTCACCTGGTGACGGCGTCCAGGAAGAAACCTTCGTGGGCCACATCATGGCC TTTCGCTGCTGTGTCGAGCCTTACACCGACTGCAACCTCCAGCCCCAGCC

[表16]

34	ALPIVをコードする塩基配列を示す。	TTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCA GGCTCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATG TCATCCTCTTCCCTGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCA TCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAGCTCGGCCAGAAACCCCGCTGGCTATG GACCAGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGCAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTC CCTGACTCTGCTGGTACTGTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAATTTAT AAGACCATCGGCGTTTCCGCGCTGCGCGGTATAACAGTGTAATACCACCTTCT GGTAACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGGCAAGTCTGT TGCTGTCTGTGACCACTTCGCGCTCCAGCATGCTTCCCCTGCTGGAGCCTACG CTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTC AGACCTACGGCTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCG ACGTGATCCTGGGAGGCGGTCTGTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATC CCGAGTACCCCTATGACGTGAACCAGACTGGAGTTCCGAAGGACAAGCGCAAT CTTGTGCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAACCG CACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGACT GTTGGAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTCGAGCAGGATCCTACTAAGGACCC CACCTTGAAGAGATGACCGAGCCTGCCCTCAGGTTTGTCTCCGCAACACA GGGCTTCTACTTGTTCGTGAGGGCGGCCGATCGATCATGGACATCAGAGG GCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAACGCCATCGCTA AGGCCAATGAACCTCACCTTCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCGGACC ATTGCAACGCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCG GATTGGCTCCTTCCAAGGCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATG GCAATGGTCCTGGATACGTCCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGAC AGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCT CAAAGCCATGGCGGTGAGCATGTGGCTGTTTTCGCTGCGGACCACAGGCTCA TTTGGTGACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCGTGCGCCAGCTGATGGCTTTTG CGGGTTGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT
35	APIIsをコードする塩基配列を示す。	ATGCAAGGTGCTTGCTTTTATTAATCTTCTTGGTTTACATTTACAATTATCTTTAGG T
36	APIIsのアミノ酸配列を示す。	MQGACVLLLLGLHLQLSLG
37	CDHss-b I APIIの塩基配列を示す。	ATGAAACTTGTCAACCGTCTGCTGGCTTCGTTCTTGTCGGCATCCACCGTTCTC CAGTCGTGCTGGGCTCTCATCCCAGCTGAAGAGGAAAACCCGGCTTCTGGAA CAGGCAGGCTGCCAAGCTCTGGACGTGGCCAAGAAGCTCCAGCCTATCCAAA CGGCCGCTAAGAACGTCATCCTCTTCTTGGGAGATGGCATGGGCGTGCCAACA GTCACTGCCACTCGTATCCTTAAGGGCCAAATGAACGGAAGTTGGGCCCAGA GACTCCTCTGGCTATGGACCAGTTCCCATACGTGGCCCTGTGCAAGACATACAA CGTTGACCGTCAAGTGCCTGATTCCTGCAACAGCCACCGCTTACCTCTGCG CGCTCAAGGGAACCTACCGCACAAATCGGCGTTTCCGCTGCCGTAGGTACAAC CAGTGTAACACCACTAGAGGAAACGAGGTTACCTCTGTGATCAACCGTGCTAAG AAGGCTGGCAAGGCCGTTGGCGTGGTCACAACCACTAGAGTGCAGCACGCTTC TCCCGCCGGTGCTTACGCCACACCGTCAACCGCAACTGGTACAGCGACGCCG ATCTGCCCTGCTGACGCCAGAAACCGCTGCCAAGACATGCCCGCTCAGTTG GTCTACAACATGGACATCGATGTTATCTCTGGGAGGTGGCAGGATGTACATGTT CCCGAGGGAACCTCCCGACCTGAATACCCCTGACGATGCTTCCGTCAACGGTGTT AGAAAGCATAAGCAGAACCTGCTCCAGGAGTGCCAAAGCTAAGCACCACGGAGC CCAATACGTTTGGAAACCGTACAGCTCTGCTCCAGGCCGTGACGATTCCTCTGT GACCCACTTGATGGGTCTGTTTCGAACCCGCTGACATGAAGTACAACGTCAGCA AGACCACACTAAAGATCCTACACTGGCCGAGATGACTGAAGCCGCTCTCCAGGT TTTGTCCCGTAACCCCGTGTTTCTACCTCTTCTGTTGAGGGAGGTGCGATCGA CCACGGTCACCACGACGGCAAGGCTTACATGGCTTTGACAGAAGCTATCATGTT CGACAACGCTATCGCCAAGGCTAACGAGCTGACAAGCGAACTCGACACCCTGA TCCTCGTGAAGTCCGATCACTCCACGCTCTCTCTTTCGGCGGATACACCCTGA CGGCACTTCAATCTTCGGCTCGCTCCTGCAAGGCCCTTGGACTCTAAGAGCT ACACCTCAATCCTGTACGGAAACGGTCCCGCTACGCTCTCGTGGCGGATCG AGGCCTGACGTGAACGGTTCAACTAGTGAGGAACCAAGCTACAGACAGCAAGC CGCTGTCCCGTTGGCCTCAGAGACTCAGGCTGCCGAAGACGTTGCTGTGTTCC CCCGTGGTCCACAAGCTCACCTGGTGCACGGCGCTCAGGAAGAACTTCGTG GCCACATCATGGCTTCGTGTTGTGTCGAGCCTTACACCGACTGCAACCTC CCAGCCCCAGCC
38	TalplFの塩基配列を示す。	GTACCAGGAGTACATTTGGAGAGTTCTAC

[表17]

39	P t e f - 1 R の塩基配列を示す。	TTTGAAGGTGGTGC GAAC TTTGTAG
40	P t e f - C I A P I I F w の塩基配列を示す。	cgcaccaccttcaaaATGAAACTTTGTCAAC
41	T a l p - C I A P I I R v の塩基配列を示す。	atgtactcctggtacCTAGGCTGGGGCTGG
42	p / 1 F w の塩 基配列を示す。	AGGTACAACCAGTGT CAGACCACTAGAGGA
43	p / 1 R v の塩 基配列を示す。	AACTGGTTGTACCTAGCGGCAG
44	p / 1 k F w の塩 基配列を示す。	AGGTACAACCAGTGT AAGACCACTAGAGGA
45	p / 1 k R v の塩 基配列を示す。	AACTGGTTGTACCTAGCGGCAG
46	p / 1 3 F w の塩 基配列を示す。	TCGAGGCCCTGACGTGCAGGGTTCAACTAGT
47	p / 1 3 R v の塩 基配列を示す。	CACGTCAGGCCCTCGATCCGCCACC
48	p / 1 k 3 F w の塩 基配列を示す。	TCGAGGCCCTGACGTGCAGGGTTCAACTAGT
49	p / 1 k 3 R v の塩 基配列を示す。	CACGTCAGGCCCTCGATCCGCCACC
50	D N A コンスト ラクト Δ1 の塩 基配列を示す。	ATGAAACTTTGTCAACCGTCTGCTGGCTTCGTTCTTGTCCGCATCCACCGTTCTC CAGTCGTGCTGGGCTCTCATCCAGCTGAAGAGGAAAACCCGGCTTCTGGAA CAGGCAGGCTGCCAAGCTCTGGACGTGGCCAAGAAGCTCCAGCCTATCCAAA CGGCCGCTAAGAACGTCATCCTCTTCTTGGGAGATGGCATGGGCGTGCCAACA GTCAGTCCACTCGTATCCTTAAGGGCCAAATGAACGGAAGTTGGGCCAGCA CACTCCTCTGCTATCGACCACTTCCCATACCTGCGCCCTGTCCGAAGACATACAA CGTTGACCGTCAAGTGCCGATTCCGCTGGAACAGCCACCGCTTACCTCTGCG GCGTCAAGGGAAAACCTACCGCACAATCGGCGTTTCCGCTGCCGCTAGGTACAA CAGTGTTCAGACCACTAGAGGAAAACGAGGTTACCTCTGTGATCAACCGTGCTAAG AAGGCTGGCAAGGCCGTTGGCGTGGTCACAACCACTAGAGTGCAGCACGCTTC TCCCGCCGGTGCTTACGCCACACCGTCAACCGCAACTGGTACAGCGACGCCG ATCTGCCTGCTGACGCCCAGAAGAACGGCTGCCAAGACATCGCGCTCAGTTG GTCTACAACATGGACATCGATGTTATCCTGGGAGGTGGCAGGATGTACATGTT CCCCAGCGAACTCCCGACCTGAATACCTGACCATGCTTCCCTCAACGGTCTT AGAAAGGATAAGCAGAACCTGGTCCAGGAGTGGCAAGCTAAGCACCAGGGAGC CCAATACGTTTGGAAACCGTACAGCTCTGCTCCAGGCCGCTGACGATTCTCTGT GACCCACTTGATGGGTCTGTTCGAACCCGCTGACATGAAGTACAACGTTCCAGCA AGACCACACTAAAGATCCTACACTGGCCGAGATGACTGAAGCCGCTCTCCAGGT TTTGTCCCGTAACCCCGTGGTTTCTACCTCTTCTGTTGAGGGAGGTTCGATCGA CCACGGTCAACCGACCGCAAGGCTTACATGGCTTTGACAGAAGCTATCATGT CGACAACGCTATCGCCAAGGCTAACGAGCTGACAAGCGAAGCTCGACACCTGA TCCTCGTGAATGCCGATCACTCCACGCTCTCTCTTTCCGCGGATACACCTGA GGGGCACTTCAATCTTCGGCCTCGCTCCTGGAAAGGCCCTTGGACTCTAAGAGCT ACACCTCAATCTGTACGGAACGGTCCCGCTACGCTCTCGGTGGCGGATCG AGCCCTGACCTGAACCGTTCAACTAGTGAGCAACCAAGCTACAGACAGCAAGC CGCTGTCCCGTTGGCCTCAGAGACTCAAGGTGGCGAAGACGTTGCTGTGTTCC CCCGTGGTCCACAAGCTCACCTGGTGACGGCGTCCAGGAAGAAACCTTCGTG GCCCACATCATGGCTTTCGCTGGTTGTGTGAGGCTTACACCGACTGCAACCTC CCAGCCCCAGCCTAG

[表18]

5 1	DNA コンストラクト Δ1 k の塩基配列を示す。	ATGAAACTTGTCAACCGTCTGCTGGCTTCGTTCTTGTCCGCATCCACCGTTCTC CAGTCGTGCTGGGCTCTCATCCCAGCTGAAGAGGAAAACCGGCCCTTCTGGAA CAGGCAGGCTGCCAAGCTCTGGACGTGGCCAAGAAGCTCCAGCCTATCCAAA CGGCCGCTAAGAACGTCATCCTCTTTCTTGGGAGATGGCATGGGCGTGCCAACA GTCACTGCCACTCGTATCCTTAAGGGCCAAATGAACGGAAAAGTTGGGCCCCAGA GACTCCTCTGGCTATGGACCAGTTCCCATACGTGGCCCTGTGGAAGACATACAA CGTTGACCGTCAAGTGCCGGATTCCGCTGGAACAGCCACCGCTTACCTCTGCG GCGTCAAGGGAAAACCTACCGCACAAATCGGCGTTTCCGCTGCCGCTAGGTACAAC CAGTGTAAGACCACTAGAGGAAAACGAGGTTACCTCTGTGATCAACCGTGCTAAG AAGGCTGGCAAGGCCGTTGGCGTGGTCACAACCACTAGAGTGCAGCAGCGTTTC TCCCGCCGGTGCTTACGCCACACCGTCAACCGCAACTGGTACAGCGACGCCG ATCTGCCTGCTGACGCCCAGAAGAACGGCTGCCAAGACATCGCCGCTCAGTTG GTCTACAACATGGACATCGATGTTATCCTGGGAGGTGGCAGGATGTACATGTTTC CCCGAGGGAACTCCCGACCCGTGAATACCCCTGACGATGCTTCCGTCAACCGTGTT AGAAAAGGATAAGCAGAACCCTGGTCCAGGAGTGGCAAGCTAAGCACCAGGGAGC CCAATACGTTTGGAAACCGTACAGCTCTGCTCCAGGCCGCTGACGATTCCCTCTGT GACCCACTTGATGGGTCTGTTCGAACCCGCTGACATGAAGTACAACGTCACAGCA AGACCACACTAAAGATCCTACACTGGCCGAGATGACTGAAGCCGCTCTCCAGGT TTTGTCCCGTAACCCCGCTGGTTTCTACCTCTTCGTGGAGGGAGGTGCGATCGA CCACGGTCACCAACGACGGCAAGGCTTACATGGCTTTGACAGAAGCTATCATGTT CGACAACGCTATCGCCAAGGCTAACGAGCTGACAAGCGAACTCGACACCCCTGA TCCTCGTGA CTGCCGATCACTCCCACGCTCTCTCTTTTCGGCGGATACACCCTGA GGGGCACTTCAATCTTCGGCCCTCGCTCCTGGAAAGGCCTTGGACTCTAAGAGCT ACACCTCAATCCTGTACGGAAACGGTCCCGGCTACGCTCTCGGTGGCGGATCG AGCCCTGACCTGAACGGTTCAACTAGTGAGGAACCAAGCTACAGACAGCAAGC CGCTGTCCCGTTGGCCTCAGAGACTCAACGGTGGCGAAGACGTTGCTGTGTTCCG CCCGTGGTCCACAAGCTCACCTGGTGACGGCGTCCAGGAAGAAACCTTCGTG CCCCACATCATGGCCTTCGCTGGTTGTGTCGAGCCTTACACCGACTGCAACCTC CCAGCCCCAGCCTAG
5 2	DNA コンストラクト Δ13 の塩基配列を示す。	ATGAAACTTGTCAACCGTCTGCTGGCTTCGTTCTTGTCCGCATCCACCGTTCTC CAGTCGTGCTGGGCTCTCATCCCAGCTGAAGAGGAAAACCGGCCCTTCTGGAA CAGGCAGGCTGCCAAGCTCTGGACGTGGCCAAGAAGCTCCAGCCTATCCAAA CGGCCGCTAAGAACGTCATCCTCTTTCTTGGGAGATGGCATGGGCGTGCCAACA GTCACTGCCACTCGTATCCTTAAGGCCCAAATGAACGGAAAAGTTGGGCCCCAGA GACTCCTCTGGCTATGGACCAGTTCCCATACGTGGCCCTGTGGAAGACATACAA CGTTGACCGTCAAGTGCCGGATTCCGCTGGAACAGCCACCGCTTACCTCTGCG GCGTCAAGGGAAAACCTACCGCACAAATCGGCGTTTCCGCTGCCGCTAGGTACAAC CAGTGTCAGACCACTAGAGGAAAACGAGGTTACCTCTGTGATCAACCGTGCTAAG AAGGCTGGCAAGGCCGTTGGCGTGGTCACAACCACTGGAAGAGTGTGCTGCTTTC TCCCGCCGGTGCTTACGCCACACCGTCAACCGCAACTGGTACAGCGACGCCG ATCTGCCTGCTGACGCCCAGAAGAACGGCTGCCAAGACATCGCCGCTCAGTTG GTCTACAACATGGACATCGATGTTATCCTGGGAGGTGGCAGGATGTACATGTTTC CCCGAGGGAACTCCCGACCCGTGAATACCCCTGACGATGCTTCCGTCAACCGTGTT AGAAAAGGATAAGCAGAACCCTGGTCCAGGAGTGGCAAGCTAAGCACCAGGGAGC CCAATACGTTTGGAAACCGTACAGCTCTGCTCCAGGCCGCTGACGATTCCCTCTGT GACCCACTTGATGGGTCTGTTCGAACCCGCTGACATGAAGTACAACGTCACAGCA AGACCACACTAAAGATCCTACACTGGCCGAGATGACTGAAGCCGCTCTCCAGGT TTTGTCCCGTAACCCCGCTGGTTTCTACCTCTTCGTGGAGGGAGGTGCGATCGA CCACGGTCACCAACGACGGCAAGGCTTACATGGCTTTGACAGAAGCTATCATGTT CGACAACGCTATCGCCAAGGCTAACGAGCTGACAAGCGAACTCCACACCCCTGA TCCTCGTGA CTGCCGATCACTCCCACGCTCTCTCTTTTCGGCGGATACACCCTGA GGGGCACTTCAATCTTCGGCCCTCGCTCCTGGAAAGGCCTTGGACTCTAAGAGCT ACACCTCAATCCTGTACCGAAAACGGTCCCGGCTACGCTCTCGCTGGCGGATCG AGGCCTGACGTGCAGGGTTCAACTAGTGAGGAACCAAGCTACAGACAGCAAGC CGCTGTCCCGTTGGCCTCAGAGACTCAACGGTGGCGAAGACGTTGCTGTGTTCCG CCCGTGGTCCACAAGCTCACCTGGTGACGGCGTCCAGGAAGAAACCTTCGTG CCCCACATCATGGCCTTCGCTGGTTGTGTCGAGCCTTACACCGACTGCAACCTC CCAGCCCCAGCCTAG

[表19]

53	DNAコンストラクト Δ1k3の塩基配列を示す。	ATGAAACTTGTCAACCGTCTGCTCGCTTCGTTCTTGTCCGCATCCACCGTTCTC CAGTCGTGCTGGGCTCTCATCCCAGCTGAAGAGGAAAAACCCGGCCTTCTGGAA CAGGCAGGCTGCCCAAGCTCTGGACGTGGCCAAGAGCTCCAGCCTATCCAAA CGGCCGCTAAGAACGTCATCCTCTTTCTTGGGAGATGGCATGGCGCTGCCAACA GTCAGTGCCTGCTATCCTTAAGGGCCAAATGAACGGAAAGTTGGGCCCAGA GACTCCTCTGGCTATGGACCAGTTCCCATACGTGGCCCTGTGGAAGACATACAA CGTTGACCGTCAAGTGCCGGATTCCGCTGGAACAGCCACCGCTTACCTCTGCG GCGTCAAGGGAAACTACCGCAACAATCGGCGTTTCCGCTGCGCGTAGGTACAAAC CACTGTAAGACCACTAGAGGAAACGAGGTTACCTCTGTGATCAACCGTGCTAAG AAGGCTGGCAAGGCGGTTGGCGTGGTCACAACCACTAGAGTGCAGCACGCTTC TCCCGCCGGTGCTTACGCCACACCGTCAACCGCAACTGGTACAGCGACGCGG ATCTGCCTGCTGACGCCCAAGAAACCGGCTGCCAAGACATCGCCGCTCAGTTG GTCTACAACATGGACATCGATGTTATCCTGGGAGGTGGCAGGATGTACATGTTT CCGGAGGGAACTCCCGACCCCTGAATACCCCTGACGATGCTTCCGTCACCGGTGTT AGAAAGGATAAGCAGAACCTTGGTCCAGGAGTGGCAAGCTAAGCACCAGGGAGC CCAATACGTTTGGAAACCGTACAGCTCTGCTCCAGGCGCGTGAAGATTCTCTGT GACCCACTTGATGGGTCTGTTGAAACCCGCTGACATGAAGTACAACGCTCCAGCA AGACCACACTAAACATCCTACACTGCCCGAGATGACTGAAGCCGCTCTCCAGCT TTTGTCCCGTAAACCCCGTGGTTTCTACCTCTTCGTGGAGGGAGGTGCGATCGA CCACGGTCACCACGACGGCAAGGCTTACATGGCTTTGACAGAAGCTATCATGTT CGACAACGCTATCGCCAAGGCTAACGAGCTGACAAGCGAACTCGACACCCCTGA TCCTCGTGAAGTCCGATCACTCCACGCTCTCTCTTTTCGGCGGATACACCCCTGA CGGCGCACTTCAATCTTCGCGCTCGCTCCTCGAAAGCCCTTGGACTCTAAGAGCT ACACCTCAATCCTGTACGGAAACGGTCCCGGCTACGCTCTCGGTGGCGGATCG AGGCGTGACGTGCAGGGTTCAACTAGTGAGGAACCAAGCTACAGACAGCAAGC CGCTGTCCCGTTGGCGCTCAGAGACTCACGGTGGCGAAGACGTTGCTGTGTTCG CCGTGGTCCACAAGCTCACCTGGTGCACGGCGTCCAGGAAGAAACCTTCGTG GCCACATCATGGCCTTCGCTGGTTGTGTGAGCCTTACACCGACTGCAACCTC CCAGCCCCAGCCTAG
54	b I A P I I Δ1のアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWALIPAEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTA AKNVILFLGDGMGVPVTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVD RQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYRTIGVSAARYNQCTTRGNEVTSVINRAKKAG KAVGVVTTTRVQHASPAGAYHTVNRNWYSDADLPADAQKNGCQDIAAQLVYN MDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPDDASVNGVRKDKQNLVQEWQAKHQGAQ YVWNRTALLQAADDSSVTHLMGLFEPADMKYNVQDHTKDPDLAEMTEAALQ VLSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHDGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSSELDLTL ILVTADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPGKALDSKSYTSILYGNPGYALGGGSRP DVNGSTSEEPSYRQQAAPLASETHGGEDVAVFARGPQAHVLHGVQEETFVAHI MAFAGCPEPYTDCNLPAPA
55	b I A P I I Δ1kのアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWALIPAEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTA AKNVILFLGDGMGVPVTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVD RQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYRTIGVSAARYNQCTTRGNEVTSVINRAKKAG KAVGVVTTTRVQHASPAGAYHTVNRNWYSDADLPADAQKNGCQDIAAQLVYN MDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPDDASVNGVRKDKQNLVQEWQAKHQGAQ YVWNRTALLQAADDSSVTHLMGLFEPADMKYNVQDHTKDPDLAEMTEAALQ VLSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHDGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSSELDLTL ILVTADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPGKALDSKSYTSILYCNPGYALGGGSRP DVNGSTSEEPSYRQQAAPLASETHGGEDVAVFARGPQAHVLHGVQEETFVAHI MAFAGCPEPYTDCNLPAPA
56	b I A P I I Δ13のアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWALIPAEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTA AKNVILFLGDGMGVPVTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVD RQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYRTIGVSAARYNQCTTRGNEVTSVINRAKKAG KAVGVVTTTRVQHASPAGAYHTVNRNWYSDADLPADAQKNGCQDIAAQLVYN MDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPDDASVNGVRKDKQNLVQEWQAKHQGAQ YVWNRTALLQAADDSSVTHLMGLFEPADMKYNVQDHTKDPDLAEMTEAALQ VLSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHDGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSSELDLTL ILVTADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPGKALDSKSYTSILYGNPGYALGGGSRP DVQGSTSEEPSYRQQAAPLASETHGGEDVAVFARGPQAHVLHGVQEETFVAHI MAFAGCPEPYTDCNLPAPA

[表20]

57	b I A P I I Δ 1 k 3 のアミノ 酸配列を示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWALIPAEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTA AKNVILFLGDGMGVPTVTATRIKKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVD RQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYRTIGVSAARYNQCKTTRGNEVTSVINRAKKAG KAVGVVTTTRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQKNGCQDIAAQLVYN MDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPDDASVNGVRKDKQNLVQEWQAKHQGAQ YVWNR TALLQAADDSSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDHTKDP TLAEMTEAALQ VLSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHDGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSSELDL ILVTADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPGKALDSKSYTSILYGNPGYALGGGSRP DVQGSTSEEPSYRQQAAPLASETHG GEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHI MAFAGC VEPYTD CNLPAPA
58	P t e f - C I A P I V F w の 塩基配列を示 す。	cgcaccaccttcaaaATGCAGTGGGCCTGT
59	T a l p - C I A P I V R v の 塩基配列を示 す。	atgtactctggtacCTAACCCGAAGGGGC
60	b I A P I V 合 成遺伝子の塩基 配列を示す。	ATGCAGTGGGCCTGTGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGTGGCTACAGCTCTCCCT CACCTTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTG CTCAGGCTCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAG AATGTCATCCTCTTCTCGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACC CGCATCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAGCTCGGCCAGAAAACCCCGCTGGC TATGGACCAAGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGCGAAGACTTATAACGTTGATCGTCA AGTCCCTGACTCTGCTGGTACTGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAAA TTATAAGACCATCGGCGTTTCCGCGCTGCCCGGTATAACCAAGTGAATACCCAC TTCTGGTAACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGCAAGTC TGTTGGTGTGCTGACCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTA CGCTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCCGATGC TCAGACCTACGGCTGCCAGGACATGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATAT CGACGTGATCCTGGGAGGCGGTGCTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGA TCCCGAGTACCCCTATGACGTGAACCAAGACTGGAGTTCGGAAGGACAAGCGCA ATCTTGTCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAC CGCACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGA CTGTTGCAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGAC CCCACCTTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTGTCCCGGAATCCA CAGCGCTTCTACTTCTTCTGTCAGCGCGGCCGATCGATCATGGACATCACGA GGGCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAACGCCATCGC TAAGGCCAATGAACCTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTATCTTGGCTACTGCCGA CCATTCGCACGTCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCTGTTACCTCCATCTTC GGATTGGCTCCTTCCAAGGCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTAT GGCAATGCTCCTGGATACCTCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATCTGAAACGA CAGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTC TGAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTCGCTCGTGGACCACAGGCTC ATTTGCTGCACGGCGTTCAGGAAGAGACCTTCCTCGCCACGTGATGGCTTTT GCGGTTGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT
61	K e x 2 認識配 列を含むリンカ ー K e x のアミ ノ酸配列を示 す。	GGGGSKR
62	K e x 2 認識配 列を含むリンカ ー K e x m u t 1 のアミノ酸配 列を示す。	GGGRHKR
63	K e x 2 認識配 列を含むリンカ ー K e x m u t 2 のアミノ酸配 列を示す。	GGGPHKR

[表21]

6 4	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x m u t 3 のアミノ酸配列を示す。	GGGQRLVKR
6 5	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x m u t 4 のアミノ酸配列を示す。	GGGVAVEKR
6 6	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x をコードする塩基配列を示す。	GGCGGTGGAGGCTCTAAGCGC
6 7	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x m u t 1 をコードする塩基配列を示す。	GGCGGTGGACGCCATAAGCGC
6 8	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x m u t 2 をコードする塩基配列を示す。	GGCGGTGGACCCCATAAGCGC
6 9	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x m u t 3 をコードする塩基配列を示す。	GGCGGTGGACAACGCCTGGTCAAGCGC
7 0	K e x 2 認識配列を含むリンカー K e x m u t 4 をコードする塩基配列を示す。	GGCGGTGGACTCGCACTCGAAAAGCGC
7 1	プライマー K e x Fw の塩基配列を示す。	GGCGGTGGAGGCTCTAAGCGCTTCA
7 2	プライマー C y t b b r e v の塩基配列を示す。	AGAGCCTCCACCGCCACCGTCAGGGACAGG
7 3	b l A P I V - 1 F の塩基配列を示す。	TTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCC
7 4	プライマー C D H s s r e v の塩基配列を示す。	CTCAGCTGGGATGAAAGCCCAGCATGACTG
7 5	プライマー S K l K Fw の塩基配列を示す。	CGCACCACTTCAAAATGTCCAAGATCAAGAAGCTCGTTAACCGT
7 6	P t e f 1 R の塩基配列を示す。	TTTGAAGGTGGTGCGAACTTTGTAG

[表22]

77	プライマーK e x m u t 1 F の 塩基配列を示 す。	GACGGTGGCGGTGGACGCCATAAGCGCTTCATCCCA
78	プライマーK e x m u t 2 F の 塩基配列を示 す。	GACGGTGGCGGTGGACCCCAATAAGCGCTTCATCCCA
79	プライマーK e x m u t 3 F の 塩基配列を示 す。	GACGGTGGCGGTGGACAACGCCTGGTCAAGCGCTTCATCCCA
80	プライマーK e x m u t 4 F の 塩基配列を示 す。	GACGGTGGCGGTGGAGTCGCAGTCGAAAAGCGCTTCATCCCA
81	プライマーK c x m u t R v の 塩基配列を示 す。	TCCACCGCCACCGTCAGGGA
82	プライマーG l a B s s F の塩 基配列を示す。	AACTTTCCTTTTCCCTCAATGCCATTGCTGGCGCTGTCGCGTTCATCCCAGCT GAG
83	プライマーG l a B s s R v の 塩基配列を示 す。	GGAAAAAAGAAAGTTGTTCCGCATTTTGAAGGTGGTGCG
84	プライマーC e l B s s F の塩 基配列を示す。	CCACTGGTAACGGCTTTCATCCCAGCTGAG
85	プライマーC c l B s s R v の 塩基配列を示 す。	AGCCGTTACCAGTGGCAGGAGTGCC
86	プライマーA s A P 1 s s 5 4 F の塩基配列を 示す。	TAGGTGOGGCGCTCTTCGCTTCCAGCGCTGTTGCCTTCATCCCAGCTGAG
87	プライマーA s A P 1 s s 5 4 R の塩基配列を 示す。	AGAGCGCGCACCTACAATTGAGAGGAACCTCATTTTGAAGGTGGTGCG
88	プライマーA s A P 3 s s 7 2 F の塩基配列を 示す。	CCCTTGTCAGACTGCAGTTGCAGCTTCTGTTTCAGGCATTTCATCCCAGCTGAG
89	プライマーA s A P 3 s s 7 2 R の塩基配列を 示す。	CAGTCTGGACAAGGGCCGCGCCGCGGTGATGGCAGTGGGATATGCATTTTG AAGGTGGTGCG

[表23]

90	b I A P I V 合 成遺伝子の塩基 配列を示す。	ATGCAGTGGGCCTGTGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGTGGCTACAGCTCTCCCT CACCTTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAAACCGTCAGGCTG CTCAGGCTCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAG AATGTCATCCTCTTCTGCGGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGAAGCTGCTACC CGCATCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAGCTCGGCCAGAAACCCCGCTGGC TATGGACCACTTCCCTTAAGTGGCCCTGTGGAAGACTTATAACGTTGATCGTCA AGTCCCTGACTCTGCTGGTACTGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAAA TTATAAGACCATCGGCGTTTCCCGCCGCTGCCCGCTATAACCAGTCTAATACCAC TTCTGGTAACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGCAAGTC TGTGGTGTGCTGACCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTA CGCTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCCGATGC TCAGACCTACGGCTGCCAGGACATGCCACTCAGCTCGTCAACAAATATGGATAT CGACGTGATCCTGGGAGGCGGTGCTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGA TCCCGAGTACCCCTATGAAGTGAACCAGACTGGAGTTCGGAAGGACAAGCGCA ATCTTGTGCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAAC CGCACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACTCATGGGA CTGTTGGAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGAC CCCACCCCTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTTGTCCCGGAATCCA CAGCGCTTCTACTTGTTCGTGAGGGCGGCCGCGCATGATCATGGACATCAAGCA GGGCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAACGCCATCGC TAAGGCCAATGAACCTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGA CCATTCGCACGCTCTCTCTCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTC GGATTGGCTCCTTCCAAGGCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTAT GGCAATGGTCTCGGATACGTCCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGA CAGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCGTTGTCTCT TGAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTGCTCGTGGACCACAGGCTC ATTTGGTGCACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCGTGCCCCACGTGATGGCTTTT GCGGGTTGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCCCTTCGGGT
91	C D H s s _ b A P I V をコー ドする塩基配列 を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGTCTCGCTTCATTCCTGTCAAGCAGCACCGGTGAG TGGTGCCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTTTTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTCG AACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCA GACCGCCGCTAAGAATGTCATCCTCTTCTCGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGAC CGTGACTGCTACCCGCACTCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAGCTCGGCCAG AAACCCCGCTGGCTATGGACCAAGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGGAAGACTTATA ACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGCTGGTACTGCTACCGCCTACCTTTGCG GTGTGAAGGGAAATTATAAGACCATCGGCGTTTCCCGCGCTGCCCGGTATAACC AGTGTAATACCACTTCTGGTAACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGA AGGCCGCAAGTCTCTTGGTCTCCTGACCACTTCGCGCTCCAGCATGCTTCC CCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGAC CTGCCCGCCGATGCTCAGACCTAAGGCTGCCAGGACATGCCACTCAGCTCGT CAACAATATGATATCGACGTGATCCTCGGAGCGCGCTCGTATCTATATGTTCCCT GAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGACGTGAACCAGACTGGAGTTCC GAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCC AGTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCA CTCACCTCATGGGACTGTTGGAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAG GATCCTACTAAGGACCCCAACCTTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTT TTGTCCCGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCGTGAGGGCGGCCGATCGAT CATGGACATCAAGAGGGCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTT GACAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAACCTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTATC TTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGTCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGT GGTACCTCCATCTTCGATTGGCTCCTTCCAAGGCTCTGACAACAAGAGCTAC ACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCTGGATACGTCTTCGGCGGTGGATTGCGT CCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCC GTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTGCTCGT GCACACAGGCTCATTTCCGTGCACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCCTCGCCCA CGTGATGGCTTTTGGCGGTTGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGC CCTTCGGGT

[表24]

92	CDHcytb kex—bAP IVをコードする塩基配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCCTCGCTTCATTCCTGTCAGCCGAGCACCGGTGAG TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCACACGGATACTGA CACGGGCATCACGTTTGCACCGTGGTCCGTACCTGCTGCTACGGCTACCGGCTG GTCTCGTCTTCCGGTGTAGCCCTGCCGGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCCGACG GAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCCTCGTCCG CTGGCTGGTGTGGCATTTCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTTCCT TGCCCTATCCGTACCGAGGATACCATCTTGACCTCCCTGCCGATTCGGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCCGAGAATTGCTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGGCAAGGGTAGGTTAGTC CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCGCTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCACGACAACCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA CAATGCAGCCAGTCACTCCTACCGAGCTCCGTCAAGTTGCCCTAATAAGACTC TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGCTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTG CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGAGGCTCTAAGCGCTTCATCCCAAGCTGAAGGA AGAGGATCCTGCTTTCTCGAACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTACGCTTGCCA AGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTCATCCTCTTCCCTGGGCG ATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCCTCAAGGGCCAGATG AATGGAAAAGCTCGGCCCGAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAAGTTCCCTTACGT GGCCCTGTGGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGCTGGTAC TGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGCAAAATTATAAGACCATCGGCGTTTC CGCCGCTGCCCGGTATAACCAAGTGTAATACCACTTCTGGTAACGAGGTTACTAG CGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGGCAAGTCTGTTGGTGTCTGACCACTT CGCGCTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCGC AATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTCAGACCTACGGCTGCCAG GACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGTGATCCTGGGAGGC GGTCGTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGAC GTGAACCAGACTGGAGTTTCGGAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAATGGCA GGCTAAGCATCAGGGTGCCCGAGTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCTGCAGG CTGCCAATGATCCATCGCTCACTCACCTCATGGGACTGTTTCCGAACCGGCCGACA TGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCACCCCTTGAAGAGATGA CCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCG TCGAGGGCGGCCGATCGATCATGGACATCACGAGGGCAAGGCTTATATGGCC CTCACTGATAACCGTTATGTTGACAAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAACCTCACT TCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGTCTTCTCC TTCCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTCCAAG GCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCCTGGATAC GTCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGGATCC ATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGA GGATGTGGCTGTTTTCGCTCGTGACCAACAGGCTCATTTGGTGCACGGCGTTC AGGAAGAGACCTTCGTGCCACCGTATGGCTTTTTCGGGTTCGTTGAGCCC TATACTGACTGTAACTTGGCAGCCCTTCCGGT
----	--	---

[表25]

93	CDHcytb Kexmut1 —bAPIVを コードする塩基 配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAAACCGTTTGGCTCGCTTCATTCCTGTCAGCGAGCACCCGCTGAC TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGACACGTGGTCCGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCGGTGTAGCCCTGCCGGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCGAAG GAGTTTATCGGTTAOCCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCTCGTCCG CTGGCTGGTGTGGCATTTCCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTCT TCCCTATCCGTACGAGGATAACATCTTGACCTCCCTGCCATTCCGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCAACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGCTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGGGTAGGTTAGTCT CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTGAACCCGTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGACAACCCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCCCTACGAGGACTGGGTCAAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGCTGGCGGCAGCCGACTCCTGTCT CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGACGCCATAAGCGCTTCATCCAGCTGAGGA AGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACGTTGCCA AGAAGTTGCAGCCAAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTATCCTCTTCTCGGGCG ATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCTCAAGGGCCAGATG AATGGAAAGCTCGGCCCGAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAAGTTCCCTTACGT GGCCCTGTGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGCTGGTAC TGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAATTTATAAGACCATCGGCGTTTC CGCCGCTGCCCGGTATAACCAAGTGTAATACCACTTCTGGTAACGAGGTTACTAG CGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGCAAGTCTGTTGGTGTCTGACCACTT CGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCCG AATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTCAGACCTACGGCTGCCAG CACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATCGATATCGACGTGATCCTGGGAGGC GGTCGTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGAC GTGAACCAGACTGGAGTTCCGGAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAATGGCA GGCTAAGCATCAGGGTGCCCACTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCTGCAGG CTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGACTGTTTGAACCCGGCCGACA TGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCACCCCTTGAAGAGATGA CCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCG TCGAGGGCGGCCGCATCGATCATGGACATCACGAGGGCAAGGCTTATATGGCC CTCACTCATACCGTTATGTTCCGACAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAACCTACT TCGGAGCTGGATACCTTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGTCTTCTCC TTCCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTCCAAG GCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCTCGGATAC GTCCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGGATCC ATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGA GGATGTGGCTGTTTTCGCTCGTGGACCAAGGCTCATTTGGTGCACGGCGTTTC AGGAAGAGACCTTCGTGCCCCACGTGATGGCTTTTTCGGGTGGCTTGGAGCCC TATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT
----	--	---

[表26]

94	CDHcytb Kexmut2 —bAPIVを コードする塩基 配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGGCTCGCTTCATTCCTGTGACCGAGCACCCGGTGAC TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGGACACGTGGTTCGGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCCGGGTAGCCCTGCCGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCCGACG CAGTTTATCCGTTACCTGGTGAGGATCTCCAGCTAATCATGACCGCTCTGAACT GGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCTCGTCCG CTGGCTGGTGTGGCATTTCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTCTCT TGGCCTATCCGTACGAGGATACCATCTTGACCTCCCTGCCATTCCGGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCAACCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCCGAGAATTGCTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGGGTAGGTTAGTCT CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCAACCCCGTCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGACAACCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCTCTGTCT CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGACCCCATAAAGCGCTTCATCCAGCTGAGGA AGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACGTTGCCA AGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTCATCCTCTCTCTGGGCG ATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCTCAAGGGCCAGATG AATGGAAAAGCTCGGCCCAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAAGTTCCCTTACGT CGCCCTGTCGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAACTCCCTGACTCTGCTGCTAC TGCTACCGCCTACCTTTGGGGTGTGAAGGGAAATTTATAAGACCATCGCGCTTTC CGCCGCTGCCCGGTATAACCAAGTGAATACCACTTCTGGTAACGAGGTTACTAG CGTCATGAATCGGGCTAAGAAAGCCCGCAAGTCTGTTGGTGTGCTGACCACTT CGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCGC AATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCCGATGCTCAGACCTACGGCTGCCAG GACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGTGATCCTGGGAGGC GGTCGTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGAC GTGAACCAGACTGGAGTTCCGAAGGACAAGCGCAATCTTCTGCAGGAATGCCA GGCTAAGCATCAGGGTGCCCACTACGTTTGAACCGCACCGAGCTCCTGCAGG CTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGACTGTTTGAACCGGCCGACA TGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCACCCCTTGAAGAGATGA CCGAGGCTGCCCTCAGGTTTGTGCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCG TOGAGGGCGGCCGATCGATCATGGACATCACGAGGGCAAGGCTTATATGGCC CTCACTGATACCGTTATGTTGACAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAACCTACT TCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGTCTTCTCC TTCCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTCCAAG GCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCCTGGATAC CTCCTTGGCGGTGGATTGCCGTCCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGGATCC ATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGA GGATGTGGCTGTTTTCTGCTCGTGGACCAAGGCTCATTTGGTGCACGGCGTTC AGGAACAGACCTTCGTGCCACCGTGTATGCTTTTGGCGGTGGCTTGAGCCC TATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCCGGT
----	--	---

[表27]

95	CDHcytb Kexmut3 —bAPIVを コードする塩基 配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAACCGTTTGCCTCGCTTCATTCCTGTCAGCGAGCACCGGTGAG TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA CACGGGCATCACGTTTGCACCGTGGTCCGTACCTGCTGCTACGGCTACGGCTG GTCTCGTCTTCCGGTGTAGCCCTGCCGGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCCAGC GAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCGTCGTCCG CTGGCTGGTGTGGCATTTCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTTCCT TGGCCTATCCGTACCAGGATACCATCTTGACCTCCCTGCCGATTCGGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGCTCGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCCACAAGCAAGGGTAGGTTAGTC CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCGCTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCACGACAACCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA CAATGCAGCCAGTCAGTCCTAACGAGACTCGGTCAAGTTGCCCTAATAAGACTC TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTG CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGACAACGCGCTGCTCAAGCGCTTCATCCGAGC TGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACC TTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTCATCCTCTTCC TGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCCTCAAGGGC CAGATGAATGGAAAGCTCGGCCCGAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAGTTCCG TTACGTGGCCCTGTGGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGC TGCTACTGCTACCGCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAATATAAGACCATCGG CGTTTCCGCGCGCTGCCCGGTATAACCAGTGTAATACCACTTCTGGTAACGAGGT TACTAGCGTCATGAATCCGGGCTAAGAAGGCCCGCAAGTCTGTTGGTGTGCTGA CCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGTCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCA ACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCCGATGCTCAGACCTACGGCT GCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGTGATCCTGG GAGGCGGTGCTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCT ATGACGTGAACCAGACTGGAGTTCCGGAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAA TGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCT GCAGGCTGCCAATCATCCATCCGTCACTCACCTCATGCCACTGTTCCAACCGGC CGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCCCACCCCTGAAGA GATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTT GTTCGTGAGGGCGGGCCGATCGATCATGGACATCACGAGGGCAAGGCTTATAT GGCCCTCACTGATACCGTTATGTTCCGACAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAAC CACTTCGCAGCTGGATACCCCTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGCTCTT CTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTC CAAGGCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCCTGG ATACGTCCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGG ATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCG GTGAGGATGTGGCTGTTTTGCTCGTGGACCCACAGGCTCATTTGGTGCACGGC GTTCAGGAAGAGACCTTCGTGCGCCACGTGATGGCTTTTTCGGGTTGCGTTGA GCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCCGGT
----	--	---

[表28]

96	CDHcytb Kexmut4 —bAPIVを コードする塩基 配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAAACCGTTTGGCTCGCTTCATTCCTGTCAGCGAGCACCCGGTGAC TGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGACACGTGGTCCGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCGGTGTAGCCCTGCCGGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCGAOC GAGTTTATCGGTTAOCCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCTCGTCCG CTGGCTGGTGTGGCATTTCCCTTGGGTGGTGGCATGAACAACAATCTCTTGTTCCT TCCCTATCCGTACGAGGATAACCATCTTGACCTCCCTGCCATTCGGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCAACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACTTTACGTTGCTTTTCCGTTGCGAGAATTGTCGTGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGACCAACAAGCAAGGGTAGGTTAGTCT CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCAACCCCGTCCGTGTCGGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGCAACACAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCCCTACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGCTGGCGGCAACGAGCCGACTCCTGTG CCTGTCCCTGACGGTGGCGGTGGAGTCGCAGTCGAAAAGCGCTTACCCAGC TGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACG TTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTGATCCTCTTCC TGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGATCCTCAAGGGC CAGATGAATGGAAGCTCGGCCAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAAGTTCCCT TTACGTGGCCCTGTGGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGC TGGTACTGCTACCGCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAATATATAAGACCATCGG CGTTTCCGCGCGTCCCGGTATAACAGTGTAATACCACTTCTGGTAAACGAGGT TACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGCAAGTCTGTTGGTGTCGTGA CCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCA ACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCCGATGCTCAGACCTACGGCT CCCAGGACATCGCCACTCAGCTCCTCAACAATATGGATATCGACGTGATCCTCG GAGGCGGTGCTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCT ATGACGTGAACCAGACTGGAGTTCCGAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAA TGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCT GCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGACTGTTCGAACCGGC CGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCCTACTAAGGACCCACCCCTTGAAGA GATGACCGAGGCTGCCCTCAGGTTTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTT GTTCGTGCGAGGGCGGCCGATCGATCATGGACATCAGAGGGCAAGGCTTATAT CGCCCTCACTCATACCGTTATGTTTCGACAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAAC TCACTTCGGAGCTGGATACCTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGTCTT CTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTC CAAGGCCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCTCTGG ATACGTCCCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGG ATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCG GTGAGGATGTGGCTGTTTTCGCTCGTGGACACAGGCTCATTTGGTGCACGGC GTTCAGGAAGAGACCTTCGTGCGCCACGTGATGGCTTTTTCGGGTTCGCTTGA GCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT
----	--	---

[表29]

97	CDH a l l — b I A P I Vを コードする塩基 配列を示す。	ATGAAGCTCGTTAAACCGTTTGGCTCGCTTCATTCCCTGTGACGAGCACC GG GTGAG TGGTGGCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTGGTCTGACTTTTCTTGGCAGTG TTGCAGTCATGCTGGGCTCAGTCCGGCACACCGGTTGCCTACACGGATACTGA GACGGGCATCACGTTTGACACGTGGTGGTACCTGCTGGTACGGGTACGGGTG GTCTCGTCTTCCGTGTAGCCCTGCCGGGTTCCGGCATTGACCACCGATGCCAGC GAGTTTATCGGTTACCTGGTGAGGATCTCGAGCTAATCATGACCGCTCTGAAGT GGCGCTAAACGTTCTAATGTTTCAAGCAATGTGCGTCCCAAAATGCCCTCGTCCG CTGGCTGGTCTCGCATTTCCCTTGGGTGGTGGCATCAACAACAATCTCTTGTTCCT TGGCCTATCCGTACGAGGATAACCATCTTGACCTCCCTGGGATTCGGCTCGGGCT ATAGCATGCCCGGGGTCTATACCGGCAATGCCAACGTCACCCAGATTTCTTCAA GCATCAATGCCACTCACCTTACGTTGCTTTTCCGTTGCGGAGAATTGCTCGACCT GGGACCAAGATGGTCAAACCGGAAACGCGAACCAAGCAAGGAGTAGGTTAGTCT CTGGGATGGGCACAGTCTACGGAGAGCCCGTCGAACCCGTCCTGTCCGGACAA TATCAGCCTGGCGCAGCAGCACAACCCAGGGTATTATCTCAGCCACTCTGGATGA GAATGCAGCCAGTGAGTCCACGAGGACTGGGTCAAGTTGGCTAATAAGACTG TTCCCGGGGACTGCTCCGGTGACGGTGGTGGCGGCAACGAGCCGACTCTGTCTC CCTGTCCCTGACGGTGCTACATACGACTATATTGTGCTCGGTGGAGGTGCCGGG GGTATCCCTGTGCGCGATCCGGCTGAGTGAGGCTGGACACAGTGTCTCTCTGATC GAGAAAGGTCTCTCTCTCGGGAACCTGCGGTGGCACCATGAAGCCCAGCTC GCTGGATGATACCAACCTGAACGCGATTGATGTCCCTGGGCTGTGCAACCAGAT CTGGGTGAGTCCAAACGGTATCGCTGCAAGTGACACCGATCAGATGGCAGGTT GTGTGCTGGGTGGAGGCACCGCCGTCAAACGAGGATTGTGGTGGAAAGGTAAGC CGTGCCAGATGCCATGTTCCGATCCATCACTGACAATGTCCAGCCAAATCCCG TTGACTGGGACTACAACCTTCCCGGAGGGATGGCAGTCCGACATGCAGGCT GCCGCGGACCGCGTGTCTCGCGGATCCCTTGGAAACCAACCCCTCCACCGA TGGAAAGCTTTATTACCAACAAGGAGCCGATATACTGTAAATGGCTTGCAATCC GCCGATGGTGCATCCGTCAACCTCAACGATGTCCCGGCCAGAAAACCAAGAC CTTTGGCCACGCACCATTCATGTTCTCTGGAGGTGAGCGCGGAGGGCCCATGG GGACGTATCTGGTGTCCGCGAGCGAGAGAGATAATTTTGCCCGCTGGTCCGAAC ACGACTGTGAAGAGGGTTGTTCTGTAAGGCGGACGATACCCGGAGTTGAGGT CGAGGCGACCCCTCGATGGTGGCTACGCGGTACCGTCAATGTAACTGCCAATAC GGGTGAGTCATTCTTTCTGCAAGAACTTTTGGAAACGCCCAAGGTCTTATGAG AACTACGCTTCCCTTCGATGATATTGTTAGGCACTTATTGCTAATGGCGTATAGGT GGTATCGGCCCGAAGGACGAGCTGTCCATCGTGAAGAGCTCAACTGATGGAGA GACAATGATTGCCGAATCTGAGTGGATCGAACTTCCGGTTGGCGAGAACCTGGT CGATCATGTCAATGTGAGTGCCAAGTGGACCGGGGAGGCTACTACTATGCTAAT AGGATGCTTACAGACTGATGTTGTGGTGACCCACCCCTGATGTTGTCTCTATGA TTTCAAAGCGGCATACAAGACCCCATCGAGAGTGATGCGACGAGCTATCTGAG TATGTAGTAATGCTTCCGAAGGACAGTCCAGCACTAACTTGGTGGATGACGATGCCA CCGGGATTTTCGCCCGAGGCTGCGCCTAACATTTGGTCTATGTAAGTTGCCCGTC TACCAACACGTCATGGTACTAAGCCTGTAGAATCTTCGACGAAGTCACCGGC TCTGATGGCATTAACGACAGATACAGTGGACTGCTCGTGTGGAAAGCGGCCA CGACACGCTGACGGACGTACGTTGACTCCTAAGTGAAGATTAGTGCAATATA TTAACCGTGTGTAGACGCCATGACCATCAGCCAATACCTCGGCCGCGGCTCAA CCTCGCGTGGCCGATGACCATTACCGCAGGACTGGACACGGTGGTCTCGACG CTGCCATTCTACGGGACGAGAGCGACGTTAATGCTGTAATCCAGGGAATCCAG AACCTGAAGATGCCCTGAACGGGACAGCATTTACCTGGAACCTACCCCTGCTCC GAACACTTCCATTGCCGAGTTTGTCAATACTGTGAGTGCTGATTTCTGGAAGGA TGTTTCGACGTAACTGACACTGATAGATGCCAATCACTGCCGGAACACGCGAGC TAATCACTGGATGGGTGAGTTATGAATCTGCTTTTAAATTTTCGTGCTAATTTG TTATAGGAACCTGCAAAATAGGTACAGATGATGGCCGTACTGGAGGTAGCGCCG TTGTTGATTTGAATACGAAGGTCTATGGAACGGACAACCTGTTCTGCTGGATG CTAGTATCTTCCCGGGTATGATCAGTCCCAATCCTTCGGCTTACATTGTTACGGT CGCGGAGCATGCAGCTGAAAAGATTCTTGGCTGGGCGGTGGAGGCTCTAAGC GCTTCATCCCGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCT CAGGCTCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCGCTAAGAA TGTATCCTCTTCTGGGAGTGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACCTACCCG CATCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAGCTCGGCCAGAAACCCCGCTGGCTA TGGACCAAGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGCAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAG TCCCTGACTCTGCTGCTACTGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAAATT ATAACACCATCGGCCCTTCCCGCGCTGCCCGGTATAACCACTGTAATACCACTT CTGGTAACGAGGTTACTAGCGTCAATGAATCGGGCTAAGAAGGCCCGCAAGTCT GTTGGTGTGCTGACCACTTCGCGCTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTAC GCTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCT CAGACCTACGGCTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATC GACGTGATCCTGGGAGGCGGTGATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGAT
----	--	--

[表30]

		CCGGAGTACCCCTATGACCTGAACCCACACTGGAGTTCCGAAGCACAAGCGCAA TCTTGTGCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCCAGTACGTTTGGAAACC GCACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGAC TGTTCCGAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACC CCACCCCTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTGTCCCGGAATCCAC AGGGCTTCTACTTGTTCGTGAGGGGCGGCCGATCGATCATGGACATCACGAG GGCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAAACGCCATCGCT AAGGCCAATGAACTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGAC CATTTCGCACGTCTTCTCCTTCGGTGCATACACTCTTCCGTGCTACCTCCATCTTCG GATTGGCTCCTTCCAAGGCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATG GCAATGGTCCTGGATACGTCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGAC AGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCT GAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTCGCTCGTGGACCACAGGCTCA TTTGGTGCACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCGTGCGCCACGTGATGGCTTTTG CGGGTTGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT
98	G l a B s s — b I A P I Vを コードする塩基 配列を示す。	ATGCGGAACAACCTTTCTTTTTTCCCTCAATGCCATTGCTGGCGCTGTCGCGTTC ATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGC TCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAAATGTCTAT CCTCTTCCTGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCTCCT CAAGGCCACATGAATGCAAAGCTCGGCCCCAGAAACCCCGCTGGCTATGGACC AGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGCAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTG ACTCTGCTGGTACTGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAAATTATAAGA CCATCCGCCCTTTCCGCCGCTGCCCGCTATAACCACTGTAATACCACTTCTGCTA ACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGGCAAGTCTGTGGT GTCGTGACCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTACGCTCAC ACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCCGATGCTCAGACC TACGGCTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGTG ATCCTGGGAGGCCGTCTATGTATATGTTCCCTCAAGGTACCCCTCATCCCGAC TACCCCTATGACGTGAACCAGACTGGAGTTCCGAAGGACAAGCGCAATCTTGT GCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCCAGTACGTTTGGAAACCGCACCG AGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCAACCTCATGGGACTGTTCG AACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCACCC TTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTGTCCCGGAATCCACAGGGC TTCTACTTGTTCGTGAGGGCGGCCGATCGATCATGCACATCACGAGGGCAA GGCTTATATGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAAACGCCATCGCTAAGGC CAATGAACTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTC GCAGTCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATT GGCTCCTTCCAAGGCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAA TGCTCCTGCATACCTCCTTGGCGCTCGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCAT CTGGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAG CCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTCGCTCGTGGACCACAGGCTCATTTGG TGCACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCGTGCGCCACGTGATGGCTTTTGCGGGT TGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT

[表31]

99	C e l B s s _ b I A P I Vを コードする塩基 配列を示す。	ATGATCTGGACACTCGCTCCCTTTGTGGCACTCCTGCCACTGGTAACGGCTTTC ATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGC TCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGACGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTCA CCTCTTCCCTGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCCT CAAGGGCCAGATGAATGGAAAGCTCGGCCCCAGAAACCCCGCTGGCTATGGACC AGTTCCCTTACCTGGCCCTGTGCAAGACTTATAACGTTGATCCTCAACTCCCTG ACTCTGCTGGTACTGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAATTTATAAGA CCATCGGCGTTTCCGCGCTGCCCGGTATAACCAGTGTAATACCACCTTCTGGTA ACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGGCAAGTCTGTGTGGT GTGCTGACCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGTCTGGAGCCTACGCTCAC ACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTCAGACC TACGGCTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGCTG ATCCTGGGAGGCGGTCTGTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAG TACCCCTATGAACGTGAACCCAGACTGGAGTTCGGAAGGACAAGCGCAATCTTGT GCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAACCGCACCG AGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCACTCACTCAGGACTGTTCG AACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGAACCCACCC TTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTTGTCCCGAATCCACAGGGC TTCTACTTGTTCGTGAGGGCGGCCGATCGATCATGGACATCAGGAGGGCAA GGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAACGCCATCGCTAAGGC CAATGAACCTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTTGTGCCGACCATTC GCACGTCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATT GGCTCCTTCCAAGGCCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAA TGGTCCCTGGATACGTCCTTGGCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCAT CTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCGCTCCGCTTGTCTCTGAAAG CCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTGCTCGTGGACCACAGGCTCATTTGG TGCACGGCGTTTCAGCAAGACACCTTCCTGCCCCACCTGATGGCTTTTGGCGGT TGCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACTTGCCAGCCCTTCGGGT
100	C e l B _ b I A P I Vをコー ドする塩基配列 を示す。	ATGATCTGGACACTCGCTCCCTTTGTGGCACTCCTGCCACTGGTAACGGCTCAA CAGGTGGGAACCTACAGCGGACGCCATCCAGACTCACCAGTATAAATGTACT TCACAGAACGGCTGCACGAGGCAGAACACCTCAGTCTCTTTGATGCAGCAAC CCATTTTATCCACAAAAAAGGAACACAAACATCCTGCACCAACAGCAACGGCTT GGACACTTCCATTTGTCCGCACAAACACACCTCGCGCGACAACCTGCTCCTTGT ATGGGATCACGGACTACGCTAGCTACGGCGTCCAGACGAAGATGACACATTGA CCCTTCACCAATATCTGCAAACTGGCAATGAAACAAAGTCCGTGTCAACCGGTG TCTACCTCCTCGCTGAAGACGGAGAGAACTATTCATGCTGCAACTCCTGAATC AGGAATTCACCTTCGATGTGACGCGCTTACCCCTCGTCTGCGGCATGAATGGTG CTCTATATCTCTCTGAAATGGAGGCTTCGGGCGGAAAGAGTTCCCTAAATCAAG CGGGAGCCAAATACGGAAACCGGTTACTGTGATGCCAATGTACACCAACGCCCTT GGATCAACGGCGAAGGCAACACCGAGAGTGTGCGGCTCCTGCTGTGAGGAAATG GATATTTGGGAAGCCAACGCCCGAGCAACAGGGCTTACACCGCACCCCTTCCAA CACAACCGGTTTGTACGAGTGCAGCGGCTCGGGATGCGGAGACTCCGGGGTCT GTGACAAGTCCGGCTGTGGATTCAACCCATATGGCCTAGGTGCAAGGACTACT ACGGTTACGGCCTCAAGGTCAACACCAACGAGACATTACGGTTCGTAACCCAG TTCTCACAAGCGATAACACGACATCGGGCCAGCTCAGCGAAATCCGCCGTCTC TACATCCAGAACCGCCAGCTTATTCAAATGCTGCGGTACCTCAGGACGAAAAA ACTGTGACTCAATCACAAGGATTTCTGACGCGGTGAAGGAAGTGCTTCAAC CGACTTGGCGGCTCGAGGAAATGGGCCACGCCCTGGGCCGCGCATGGTTCT TGCGCTCAGTGTCTGGAACGACGAGGCTCATTCATGCAATGGCTTCGATGGGG GCAGCGCAGGACCGTGCAGCGCGACGGAGGGAGACCCGCGTTGATCGAGAA GTTGTATCCGGATACTCATGTGAAGTTTCCAAAGATCCGGTGGGGAGATATTGG ATCTACCTACAGGCATGGCGGTGGAGGCTTAAGCGCTTCATCCAGCTGAGGA AGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACGTTGCCA AGAAGTTGCAGCAATCCAGACCCCGCTAACAATGTCATCCTCTTCTCGGCG ATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCCTCAAGGGCCAGATG AATGGAAAGCTCGGCCAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAGTTCCCTTACGT GGCCCTGTGGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGTCTGGTAC TGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAATTTATAAGACCATCGGCGTTTC CGCCGCTGCCCGGTATAACCAGTGAATACCCTTCTGGTAACGAGGTTACTAG CGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCGGCAAGTCTGTTGGTGTCTGACCACTT CGCGCTCCAGCATGCTTCCCTGTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCGC AATTGGTATAGGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTCAGACCTACCGCTGCGCAG GACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGTGATCCTGGGAGGC GGTGTATGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGAC GTGAACCCAGACTGGAGTTGGAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAATGGCA GGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAACCGCACCGAGCTCCTGCAGG

[表32]

		CTGCCAATCATCCATCGGTCACCTCATGGGACTGTTGGAACCGGCCGACA TGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCACCCCTTGAAGAGATGA CCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCG TCGAGGGCGGCCGCATCGATCATGGACATCAAGAGGGCAAGGCTTATATGGCC CTCACTGATACCGTTATGTTGACAAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAACTCACT TCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGACGCTCTCTCC TTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTCCAAAG GCCTCTGACAACAAGAGCTACAACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCCTGGATAC CTCCTTGGCGCTGCATTGCGTCCCGATGTCGAACGACAGCATCTCGGAGGATCC ATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGA GGATGTGGCTGTTTTGCTCGTGGACCACAGGCTCATTTGGTGCACGGCGTTTC AGGAAGAGACCTTCGTGCGCCACGTGATGGCTTTTTCGGGTTGCGTTGAGCCC TATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCCCTTCGGGT
101	SKIK_CD H s _ b I A PIVをコード する塩基配列を 示す。	ATGTCCAAGATCAAGAAGCTCGTTAACCGTTTTGCTCGCTTCATTCCCTGTACCG AGCACCGGTGAGTGGTGGCCTATCGAGCTAATGTTGCTTCTCTTCGTCTGACTT TTCTTGGCAGTGTTGCAGTCATGCTGGGCTTTCATCCAGCTGAGGAAGAGGAT CCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCAGCTCTTTGACGTTGCCAAGAAGTT GCAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAATGTCATCCTCTTCTCGGCGATGCTAT GGGAGTCCCGACCGTGACTGCTACCCGCATCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAA AGCTCGGCCAGAAACCCCGCTGGCTATGGACCAGTTCCCTTACGTGGCCCTG TCGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGCTGGTACTGCTACC GCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAAATTATAAGACCATCGGCGTTTCCGCGCT GCCCCGTATAACCACTCTAATACCACTTCTGCTAACGAGCTTACTAGCGTCATG AATCGGGCTAAGAAGGCCGGCAAGTCTGTTGGTGTGCTGACCACTTCGCGCGT CCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCGCAATTGGTA TAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTCAGACCTACGGCTGCCAGGACATCG CCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCGACGTGATCCTGGGAGGCGGTGCTA TGTATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGACGTGAACC ACACTGGAGTTCCGAAGCACAAGCCCAATCTTGTGCAGGAATGGCAGCTAAC CATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAA TGATCCATCGGTCACTCACCTCATGGGACTGTTTGAACCGGCCGACATGAAGTA TAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCCACCCCTTGAAGAGATGACCGAGG CTGCCCTTCAGGTTTTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCGTGAGG GCGGCCGCATCGATCATGGACATCACGAGCGCAAGGCTTATATGCCCTCACTG ATACCGTTATGTTTCGACAACGCCATCGCTAAGGCCAATGAACCTCACTTCGGAGC TGGATAACCTTATCTTGGCTACTGCCGACCATTCGCAAGTCTTCTCCTTCGGTG GATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTCCAAGGCCTCTG ACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCCTGGATACGTCCTTG GCGGTGGATTGCGTCCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGGATCCATCTTATC GGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTG GCTGTTTTGCTCGTGGACCACAGGCTCATTTGGTGCACGGCGTTTCAGGAAGA GACCTTCGTGCGCCACGTGATGGCTTTTTCGGGTTGCGTTGAGCCCTATACTGA CTGTAACCTTGCCAGCCCCCTTCGGGT

[表33]

102	AsAP1ss 54—bIAP IVをコードする塩基配列を示す。	ATGAGGTTCCCTCTCAATTGTAGGTGCGGCGCTCTTCGCTTCCAGCGCTGTTGCC TTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTTCTGGAACCGTCAGGCTGCTCA GGCTCTTGACGTTTGCCAAGAGTTGCGAGCCAATCCAGACCGCCGCTAAGAAATG TCATCCTCTTCTGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGACCGTGAAGTCTACCCGCA TCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAGAGCTCGGCCCGAGAAACCCCGCTGGCTATG GACCAGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGGAAGACTTATAACGTTGATCGTCAAGTC CCTGACTCTGCTGGTACTGCTACCGCCTACCTTTGCGGTGTGAAGGGAAATAT AAGACCATCGGCGTTTCCGCGCTGCCCCTGATAACAGTGTAAATACCACCTTCT GGTAACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGAAGGCCCGGCAAGTCTGT TGGTGTGCTGACCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCCCTGCTGGAGCCTAAG CTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGACCTGCCCGCGATGCTC AGACCTACGGCTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGTCAACAATATGGATATCG ACGTGATCCTGGCAGCGCGTCTGATATATGTTCCCTGAAGGTACCCCTGATC CCGAGTACCCCTATGACGTGAACCCAGACTGGAGTTCCGAAGGACAAGCGCAAT CTTGTGCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCAGTACGTTTGGAAACCG CACCGAGCTCCTGCGAGGCTGCCAATGATCCATCGCTCAGCTACCTCATGGGACT GTTGGAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAGGATCCTACTAAGGACCC CACCTTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTTTGTGCCGGAATCCACA GGGCTTCTACTTGTTCGTCGAGGGCGGCGCGCATCGATCATGGACATCAAGAGG GCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTGACAACGCCATCGCTA AGCCCAATGAACCTCACTTCGGAGCTGGATACCCCTTATCTTGGCTACTGCCGACC ATTGCGACGTCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGTGGTACCTCCATCTTCG GATTGGCTCCTTCCAAGGCCTCTGACAACAAGAGCTACACCTCGATCCTGTATG CCAATGGTCCCTGATACCTCCTTGGCCGTGGATTGCGTCCCGATGTCGAACGAC AGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCCGTCCCGTTGGCTCT GAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTGCGCTCGTGGACCACAGGCTCA TTTTGGTGACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCGTCGCCACAGTGTATGGCTTTTG CGGTTTGCCTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGCCCTTCGGGT
103	AsAP3ss 72—bIAP IVをコードする塩基配列を示す。	ATGCATATCCGCACTGCCATCACCGCGGGCGCGGCCCTTGTCCAGACTGCAGTT GCAGCTTCTGTTGAGGCATTTCATCCCAGCTGAGGAAGAGGATCCTGCTTCTGG AACCGTCAGGCTGCTCAGGCTCTTGACGTTGCCAAGAAGTTGCAGCCAATCCA GACCGCGCTAAGAAATGTCATCCTCTTCTGGGCGATGGTATGGGAGTCCCGAC CGTGAAGTCTACCCGCTCCTCAAGGGCCAGATGAATGGAAAGCTCGGCCCGAG AAACCCCGCTGGCTATGGAACAGTTCCCTTACGTGGCCCTGTGGAAGACTTATA ACGTTGATCGTCAAGTCCCTGACTCTGCTGGTACTGCTACCGCTACCTTTGGG GTGTGAAGGGAAATATAAGACCATCGGCGTTTCCGCGCTGCCCGGTATAACC AGTGTAATACCACTTCTGGTAACGAGGTTACTAGCGTCATGAATCGGGCTAAGA AGGCCGGCAAGTCTGTTGGTGTGCTGACCACTTCGCGCGTCCAGCATGCTTCC CCTGCTGGAGCCTACGCTCACACCGTCAACCGCAATTGGTATAGCGATGCTGAC CTGCCCGCGATGCTCAGACCTACGGCTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCGT CAACAATATCGATATCGACGTATCCTGGGAGCCGGTCTGTATGTATATGTTCCCT GAAGGTACCCCTGATCCCGAGTACCCCTATGACGTGAACCCAGACTGGAGTTCC GAAGGACAAGCGCAATCTTGTGCAGGAATGGCAGGCTAAGCATCAGGGTGCCC AGTACGTTTGGAAACCGCACCGAGCTCCTGCAGGCTGCCAATGATCCATCGGTCA CTCACCTCATGGGACTGTTGGAACCGGCCGACATGAAGTATAACGTGCAGCAG GATCCTACTAAGGACCCCAACCTTGAAGAGATGACCGAGGCTGCCCTTCAGGTT TTGTCCCGGAATCCACAGGGCTTCTACTTGTTCGTCGAGGGCGGCGCATCGAT CATGGACATCAAGAGGGCAAGGCTTATATGGCCCTCACTGATACCGTTATGTTC CACAAAGCCATCGCTAAGGCCAATGAACCTCACTTCGGAGCTGCATACCTTATC TTGGCTACTGCCGACCATTCGCACGTCTTCTCCTTCGGTGGATACACTCTTCGT GGTACCTCCATCTTCGGATTGGCTCCTTCCAAGGCCTCTGACAACAAGAGCTAC ACCTCGATCCTGTATGGCAATGGTCCGTGATACCTCTTGGCGGTGGAITGGCT CCCGATGTGAACGACAGCATCTCGGAGGATCCATCTTATCGGCAGCAGGCTGCC GTCCCGTTGTCTCTGAAAGCCATGGCGGTGAGGATGTGGCTGTTTTGCGCTCGT GGACCACAGGCTCATTTGGTGCACGGCGTTTCAGGAAGAGACCTTCGTCGCCCA CGTGATGGCTTTTGCGGGTTCGTTGAGCCCTATACTGACTGTAACCTTGCCAGC CCCTTCGGGT

[表34]

104	C末端側の膜結合シグナルペプチドをコードする領域を除いたbIAPIVのアミノ酸配列を示す。	MQWACVLLLLLGLWLQLSLTFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSCVVTTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCQDIATQLVNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTPELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTD'TVMFDNAIAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVLGGGLRPDVND SISEDPSYRQQAAPVLSSESHGCCEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCVEPYTDCNLPAPSG
105	CDHss—bA P I Vのアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLIASFLSASTVLQSCWAFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCQDIATQLVNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTPELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTD'TVMFDNAIAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVLGGGLRPDVND SISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCVEPYTDCNLPAPSG
106	CDHcytbkex—bA P I Vのアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLIASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFD'TWSVPAGTGTGGGLVFGVALPGSALT'TDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNLLFLAYPYEDTILTSIRFGSGYSMPGVYTGNAVNTQISSINATHFTLLFRcENCLTWDQDGGQTGNATTSKGRVLVGLWAQSTESPSNPSCPDNISLAQHIDNQGHISATLDENAASESYEDWVKLANKTVPGDSCSGDGGGGNEPTPVPVPDGGGGGSKRFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCQDIATQLVNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTPELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTD'TVMFDNAIAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVLGGGLRPDVND SISEDPSYRQQAAPVLSSESHGCCEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCVEPYTDCNLPAPSG
107	CDHcytbKexmut1—bA P I Vのアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLIASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFD'TWSVPAGTGTGGGLVFGVALPGSALT'TDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNLLFLAYPYEDTILTSIRFGSGYSMPGVYTGNAVNTQISSINATHFTLLFRcENCLTWDQDGGQTGNATTSKGRVLVGLWAQSTESPSNPSCPDNISLAQHIDNQGHISATLDENAASESYEDWVKLANKTVPGDSCSGDGGGGNEPTPVPVPDGGGGGRHKRFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCQDIATQLVNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTPELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTD'TVMFDNAIAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVLGGGLRPDVND SISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCVEPYTDCNLPAPSG
108	CDHcytbKexmut2—bA P I Vのアミノ酸配列を示す。	MKLVNRLIASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFD'TWSVPAGTGTGGGLVFGVALPGSALT'TDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNNLLFLAYPYEDTILTSIRFGSGYSMPGVYTGNAVNTQISSINATHFTLLFRcENCLTWDQDGGQTGNATTSKGRVLVGLWAQSTESPSNPSCPDNISLAQHIDNQGHISATLDENAASESYEDWVKLANKTVPGDSCSGDGGGGNEPTPVPVPDGGGGPHKRFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCQDIATQLVNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTPELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTD'TVMFDNAIAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVLGGGLRPDVND SISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCVEPYTDCNLPAPSG

[表35]

109	C D H c y t b K e x m u t 3 — b A P I V の アミノ酸配列を 示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDFTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNPNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRCECLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCPDNISLAQHNDQCHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPDGCSDGGGGNEPTVPVPDGGGGQRLVKRFIPAEEDPAFWN RQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRIKKGQMNGKLGPEP PLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLOGVKGNKYKTIGVSAARYNQ NTTSGNEVTSVMNRKAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHVTNRNWYSADL PADAQTYGCCDIATQLVNNMDIDVILCGGRMYMFPECTPDPEYPYDVNQGTGVR KDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNV QQDPTKDPPTLEEMTEAALQVLSRNPQGFFLVEGGGRIDHGHHEGKAYMALTD VMFDNALAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNK SYTSHLYGNGPGYVILGGGLRPDVNDSEDPYSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFA RGPQAHLVHIGVQEETFVAHVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
110	C D H c y t b K e x m u t 4 — b A P I V の アミノ酸配列を 示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDFTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNPNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRCECLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCPDNISLAQIIDNQCHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPDGCSDGGGGNEPTVPVPDGGGGVAVKRFIPAEEDPAFWN RQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRIKKGQMNGKLGPEP PLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLOGVKGNKYKTIGVSAARYNQ NTTSGNEVTSVMNRKAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHVTNRNWYSADL PADAQTYGCCDIATQLVNNMDIDVILCGGRMYMFPECTPDPEYPYDVNQGTGVR KDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNV QQDPTKDPPTLEEMTEAALQVLSRNPQGFFLVEGGGRIDHGHHEGKAYMALTD VMFDNALAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNK SYTSILYGNPGYVILGGGLRPDVNDSEDPYSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFA RGPQAHLVHIGVQEETFVAHVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
111	C D H a l l — b I A P I V の アミノ酸配列を 示す。	MKLVNRLLASFLSASTVLQSCWAQSGTPVAYTDTETGTFDFTWSVPAGTGTGGGLV FGVALPGSALTTTDATEFIGYLQCASQNASSAGWCGISLGGGMNPNLLFLAYPYED TILTSRLRFGSGYSMPGVYTGNNANVTQISSINATHFTLLFRCECLTWDQDGGQTG NATTSKGRVLGWAQSTESPSNPSCPDNISLAQHNDQCHISATLDENAASESYED WVKLANKTVPDGCSDGGGGNEPTVPVPDGGATYDYIVVGGGAGGIPVADRLSE AGHSVILIEKGPPSSGRWGGTMKPSWI.DDTNLTFRDVPGLCNQIWVDSNGIACS DTDQMACCVLGGGTAVNAGLWKPVPDWDYNFPEGWSSDMQAAADRVFS RIPGTITPSTDGKLYYQGGADILLNGLQSAGWSSVTLNDVPAQKTKTFGHAPFM FSGGERGGPMGTLYVSASERDNFARWSNTTVKRVRVREGGRITGVEVEATLDGGY AGTVNVTANTGRVILSAGTFTGTPKVLMSRSGIGPKDQLSIVKSSTDGETMAESEW IELPVGENLVDHVNTDVVVTHPDVVFYDFKAAYKTPIESDATSYLNDRTGIFAQA APNIGPIHFDVETGSDGIKRQIQWTARVEGGHDTDPDGHAMTISQYLGRGSTSRGR MTITAGLDTVVSTLPFLRDESDVNAVIGQIQNLKMALNGTGFTWNYPARNTSIAE FVNTMPITAGTTRRANHWMGTCKIGTDDGRTGGSVAVDLNNTKVYGTDLNFVVD SIFPGMITSNPSAYIVTVAEHAAEKILALGGGGSKRFPAPAEEDPAFWNRQAAQAL DVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRIKKGQMNGKLGPEPPLAMDQF PYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLOGVKGNKYKTIGVSAARYNQCNNTTSGNE VTSVMNRKAKKAGKSVGVVTTTSRVQHASPAGAYAHVTNRNWYSADLADAQTY GCCDIATQLVNNMDIDVILCGGRMYMFPECTPDPEYPYDVNQGTGVRKDKRNLV QEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKD PTLEEMTEAALQVLSRNPQGFFLVEGGGRIDHGHHEGKAYMALTDVMFDNAI AKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILY GNPGYVILGGGLRPDVNDSEDPYSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHL VHIGVQEETFVAHVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
112	G l a B s s — b I A P I V の アミノ酸配列を 示す。	MRNNFLFSLNAIAGAVAFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVIL FLGDGMGVPTVTATRIKKGQMNGKLGPEPPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPD SAGTATAYLOGVKGNKYKTIGVSAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRKAKKAGKSVG VTTTSRVQHASPAGAYAHVTNRNWYSADLADAQTYGCCDIATQLVNNMDIDVIL GGGRMYMFPECTPDPEYPYDVNQGTGVRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNR TELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPTLEEMTEAALQVLSRNP QGFFLVEGGGRIDHGHHEGKAYMALTDVMFDNAIAKANELTSELDTLILATAD HSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVILGGGLRPDVND SEDPYSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHIGVQEETFVAHVMAFAG CPEPYTDCNLPAPSG

[表36]

113	C e l B s s _ b I A P I V の アミノ酸配列を 示す。	MIWTLAPFVALLPLVTAFIGPAEEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVIL FLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPD SAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSGV VTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCCDIATQLVNNMDIDVI LGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNR TELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNP QGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTDVTVMFDNAIAKANELTSELDTLILATAD HSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVVGGLRPDVNDS ISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAG CPEPYTDCNLPAPSG
114	C e l B _ b I A P I V のアミ ノ酸配列を示 す。	MIWTLAPFVALLPLVTAQQVGTADAHPRLTYYKCTSQNGCTRQNTSVVLDAA TFFIHKKGTQTSCTNSNGLDTSICPDKQTCADNCVVDGITYASYGVQTKNDTLT LHQLYLTGNETKSVSPRVYLLAEDGENYSMLQLLNQEFTFDVDASTLVCGMNG ALYLSEMEASGGKSSLNQAGAKYGTGYCDAQCYTTPWINGEGNTESVSGCCQE MDIWEANARATGLTPHPONTTGLYECSSGSGCGDSGVCDKSGCGFNPNPYGLGAKD YYGYGLKVNTNETFTVTVTQFLTSDNTTSGQLSEIRRLYIQNGQVIQNAAVTSGGK TVDSITKDFCSGEGSAFNRLGGLEEMGHIALGRGMVLALSVWNDAGSFMQWLD CGSAGPCSAATEGDPALIEKLYPDTHVKFSKIRWCDIGSTYRHCGGSGSKRFIPAE EDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQM NGLGPETPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSA ARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSGVVTTSRVQHASPAGAYAHTVNRN WYSDADLPADAQTYGCCDIATQLVNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYD VNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDPSVTHLMGLFEP ADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAY MALTDVTVMFDNAIAKANELTSELDTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAP SKASDNKSYTSILYGNPGYVVGGLRPDVNDSISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGE DVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
115	S K I K _ C D H s s _ b I A P I V のアミノ 酸配列を示す。	MSKIKKLVNRLASFLSASTVLQSCWAFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQ PIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKT YNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRA KKAGKSGVVTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCCDIATQL VNNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQ GAQYVWNRTELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEA ALQVLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTDVTVMFDNAIAKANELTSEL DTLILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVVGGL LRPDVNDSISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVA HVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
116	A s A P 1 s s 5 4 _ b I A P I V のアミノ酸 配列を示す。	MRFLSIVGAALFASSAVAFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVIL FLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPD SAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAGKSGV VTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCCDIATQLVNNMDIDVI LGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQYVWNR TELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQVLSRNP QGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTDVTVMFDNAIAKANELTSELDTLILATAD HSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVVGGLRPDVNDS ISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAG CPEPYTDCNLPAPSG
117	A s A P 3 s s 7 2 _ b I A P I V のアミノ酸 配列を示す。	MHIRTAITAGAALVQTAVAASVQAFIPAEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQT AKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNV DRQVPDSAGTATAYLCGVKGNKYKTIGVSAARYNQCNNTTSGNEVTSVMNRAKKAG KSGVVTTSRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQTYGCCDIATQLVNN MDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPYDVNQTVGRKDKRNLVQEWQAKHQGAQ YVWNRTELLQAANDPSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDPTKDPtleemTEAALQ VLSRNPQGfYLFVEGGRIDHGHHEGKAYMALTDVTVMFDNAIAKANELTSELDTL ILATADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDNKSYTSILYGNPGYVVGGLRP DVNDSISEDPSYRQQAAPVLSSESHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHV MAFAGCPEPYTDCNLPAPSG
118	C D H s s をコ ードするイント ロンを含まない 塩基配列を示 す。	ATGAAACTTGTCACCGTCTGCTGGCTTCGTTCTTGTCGCCATCCACCGTTCTC CAGTCGTGCTGGGCT

[0102] 本出願は、2017年10月3日に出願された日本国特許出願2017-
193624号に基づく優先権を主張するものであり、この内容はここに参

照として組み込まれる。

産業上の利用可能性

[0103] 本発明によれば、糖鎖が過剰かつ不均一に付加しすぎない単一アイソフォームのALPを高い生産性と分泌性を伴って製造できるALPの製造方法が提供され、また新規なALP II、ベクター、並びに形質転換体が提供され、産業上有用である。

請求の範囲

- [請求項1] アルカリホスファターゼ（ALP）を生産する能力を有するアスペルギルス（*Aspergillus*）属形質転換体を培養する工程を含む、ALPの製造方法。
- [請求項2] ALPは、N型糖鎖付加モチーフの一部に糖鎖が付加しない変異を含むALPである、
請求項1に記載のALPの製造方法。
- [請求項3] アスペルギルス属形質転換体は、ALPのN末端側に、CDHss、CDHcytbkex、CDHcytbKexmut1～4、CDHal1、GlaB、GlaBss、CelBss、CelB、SKIK_CDHss、AsAP1ss54、及びAsAP3ss72からなる群より選択されるアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、
請求項1又は2に記載のALPの製造方法。
- [請求項4] アスペルギルス属形質転換体は、ALPをコードする塩基配列に対して、その5'末端側に：
以下の（a）～（c）のいずれかの塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：
（a）配列番号2～15のいずれかの塩基配列；
（b）配列番号2～15のいずれかの塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつALPの分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；
（c）配列番号2～15のいずれかの塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつALPの分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；
あるいは、
以下の（d）～（f）のいずれかの分泌シグナルペプチドをコード

する塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

(d) 配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

(e) 配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；

(f) 配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有し、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；

を有する、

請求項 1 又は 2 に記載の A L P の製造方法。

[請求項5]

A L P は、A L P I I 又は I V である、

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の A L P の製造方法。

[請求項6]

A L P は、以下の (i)～(i i i) のいずれかのタンパク質：

(i) 配列番号 31 又は 32 のアミノ酸配列からなるタンパク質；

(i i) 配列番号 31 又は 32 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A L P 活性を有するタンパク質；

(i i i) 配列番号 31 又は 32 のアミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有し、かつ A L P 活性を有するタンパク質；

あるいは、

以下の (i v)～(v i) のいずれかの塩基配列によりコードされるタンパク質：

(i v) 配列番号 33 又は 34 の塩基配列；

(v) 配列番号 33 又は 34 の塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ A L P 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(v i) 配列番号 33 又は 34 の塩基配列と 90 % 以上の相同性を有

し、かつ、A L P 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；
を有する、

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の A L P の製造方法。

[請求項7] A L P は、3 個の N 型糖鎖付加モチーフのうち 1 個又は 2 個に変異を有し、変異を有する該 N 型糖鎖付加モチーフには糖鎖が付加していない A L P I I である、

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の A L P の製造方法。

[請求項8] A L P I I において、N 型糖鎖付加モチーフが有する変異は、配列番号 3 1 の 1 2 2 位、2 4 9 位、2 5 1 位、及び 4 1 0 位のうちの 1 個又は 2 個である、

請求項 7 に記載の A L P の製造方法。

[請求項9] A L P I I において、N 型糖鎖付加モチーフが有する変異は、配列番号 3 1 の 1 2 2 位における A s n から G l n 又は L y s への変異、2 4 9 位における A s n から G l n、A s p 又は H i s への変異、2 5 1 位における T h r から C y s への変異、4 1 0 位における A s n から G l n 又は L y s への変異のうちの 1 個又は 2 個である、

請求項 7 又は 8 に記載の A L P の製造方法。

[請求項10] アスペルギルス属形質転換体がショウユコウジカビ (*Aspergillus sojae*: アスペルギルス・ソヤ)、ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn: アスペルギルス・オリゼー)、クロコウジカビ (*Aspergillus luchuensis*: アスペルギルス・リュウキュウエンシス)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamarii*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・

ウサミ (*Aspergillus usami*)、又はアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) のいずれかの形質転換体である、

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の A L P の製造方法。

[請求項11] アスペルギルス属形質転換体を培養した培養物から分泌画分を得る工程、及び、

分泌画分から A L P を抽出する工程、
をさらに含む、

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の A L P の製造方法。

[請求項12] ゲルろ過法によって測定される分子量が 8 0 ～ 1 5 0 k D a である、糖鎖付加アルカリホスファターゼ (A L P) Ⅰ Ⅰ。

[請求項13] A L P の N 末端側に対して、C D H s s、C D H c y t b k e x、C D H c y t b K e x m u t 1 ～ 4、C D H a Ⅰ Ⅰ、G l a B s s、C e l B s s、C e l B、S K Ⅰ K _ C D H s s、A s A P 1 s s 5 4、及び A s A P 3 s s 7 2 からなる群より選択されるアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する、アスペルギルス属形質転換用ベクター。

[請求項14] A L P をコードする塩基配列に対して、その 5' 末端側に：

以下の (a) ～ (c) のいずれかの塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

(a) 配列番号 2 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列；

(b) 配列番号 2 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

(c) 配列番号 2 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、かつ A L P の分泌活性を有する分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列；

あるいは、

以下の（d）～（f）のいずれかの分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が結合した塩基配列からなる遺伝子：

（d）配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

（e）配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ ALP の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；

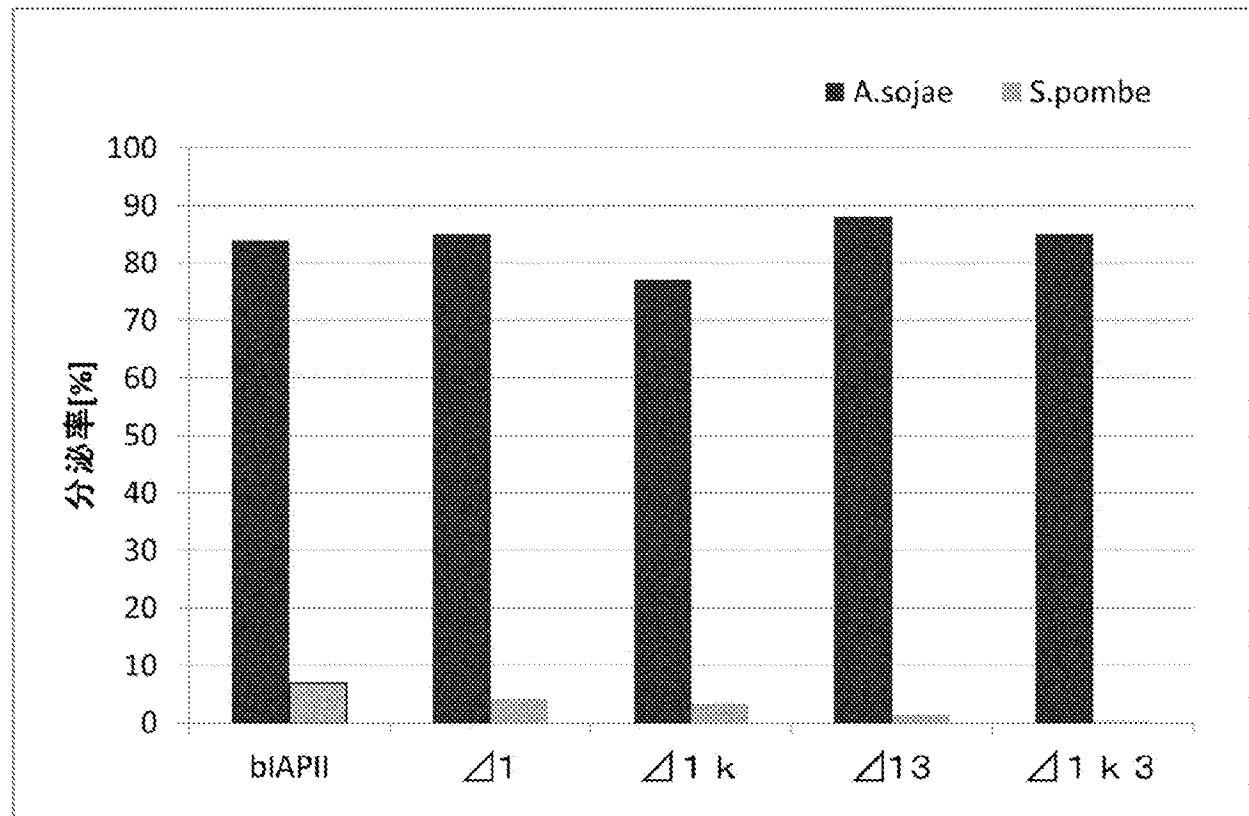
（f）配列番号 17～30 のいずれかのアミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有し、かつ ALP の分泌活性を有する分泌シグナルペプチド；

を有する、アスペルギルス属形質転換用ベクター。

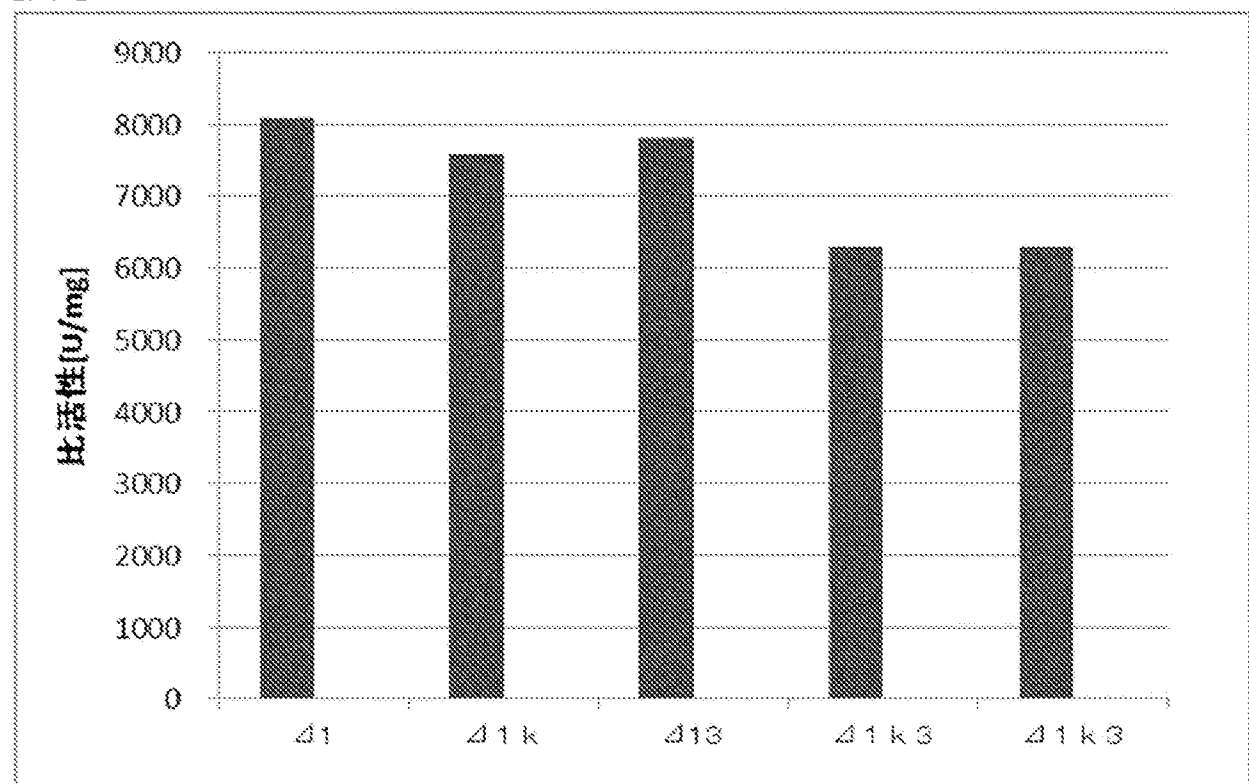
[請求項15]

請求項 13 又は 14 に記載のアスペルギルス属形質転換用ベクターを用いて形質転換された、アスペルギルス属形質転換体。

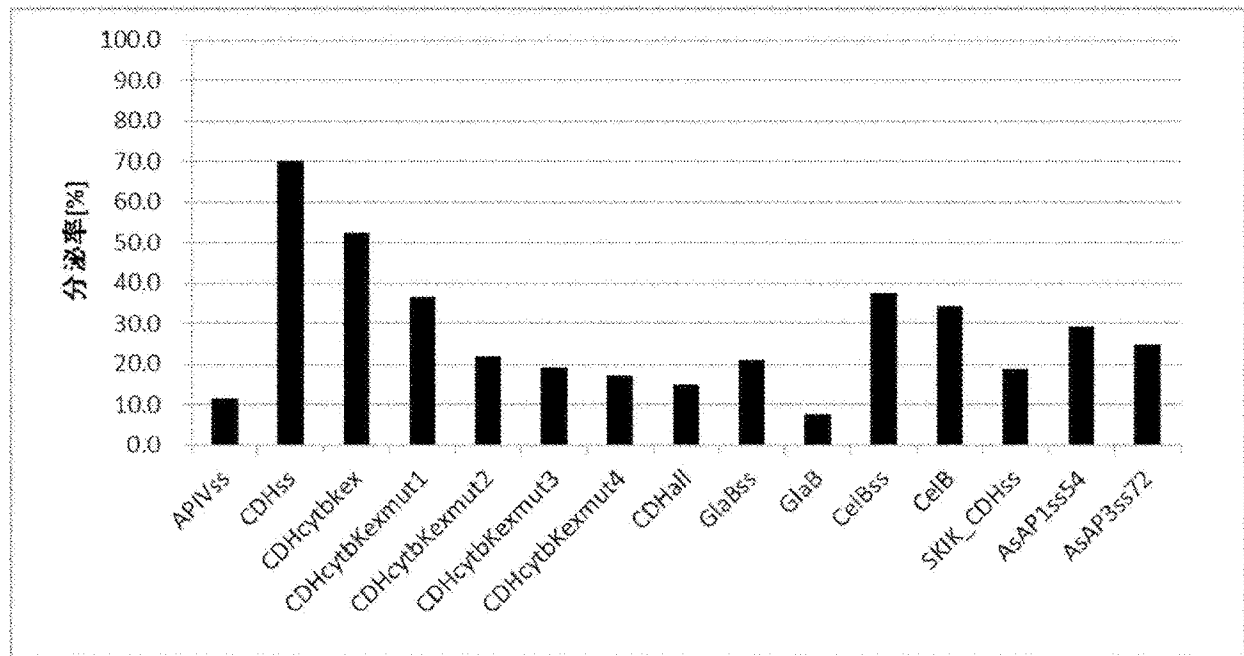
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/037026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/80 (2006.01) i, C12N1/15 (2006.01) i, C12N9/16 (2006.01) i

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)

Int.Cl. C12N15/80, C12N1/15, C12N9/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CiNii,
CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 11-332586 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 07 December 1999, claims 1-16, paragraphs [0004], [0011], [0015], fig. 9 & US 6406899 B1 claims, first column, lines 28-62, third column, lines 56-57, fourth column, lines 42-49, fig. 9 & EP 955369 A2	1, 2, 5-12 1-15
X Y	WO 03/056004 A1 (UNISEARCH LIMITED) 10 July 2003, claims, page 16, line 28 to page 17, line 4 & WO 2003/055999 A1 & WO 2003/056000 A1	1, 10, 11 1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 December 2018 (10.12.2018)

Date of mailing of the international search report
25 December 2018 (25.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/037026

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-5734 A (KIKKOMAN CORPORATION) 17 January	12
Y	2008, claim 1, paragraphs [0009], [0015], [0020] & WO 2008/001700 A1	1-15
Y	JP 2011-87572 A (OZEKI CORPORATION) 06 May 2011, paragraphs [0002]-[0004] (Family: none)	1-15
Y	JP 10-276787 A (NOVO NORDISK A/S) 20 October 1998, paragraph [0003] & US 5766912 A first column, lines 23-31 & EP 238023 A2	1-15
Y	WO 2017/094776 A1 (KIKKOMAN CORPORATION) 08 June 2017, SEQ ID NO: 37, paragraphs [0058], [0149], [0154] (Family: none)	1-15
Y	JP 2012-157315 A (GEKKEIKAN SAKE COMPANY, LTD.) 23 August 2012, test examples 3, 8, SEQ ID NO: 3, 4 (Family: none)	1-15
Y	alkPPc [Aspergillus parasiticus SU-1], Database GenBank, Accession No. KJK66304.1 [online], 18 March 2015, [Retrieved on 07 December 2018], whole document, Retrieved from the Internet, URL: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/770309090 >	1-15
Y	Alkaline phosphatase., Database GenBank, Accession No. Q2UH22 [online], [Retrieved on 07 December 2018], 28 November 2006, whole document, Retrieved from the Internet, URL:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q2UH22 >	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/037026

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/037026

<Continuation of Box III>

The claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) Claims 1-11 and 13-15

Document 1 cited in the ISR discloses an ALP producing method including a step of culturing an aspergillus transformant capable of producing ALP, and indicates that the ALP includes a mutation in a part of N-type glycosylation motif. Claims 1 and 2 lack novelty in light of document 1, and thus do not have a special technical feature. However, claim 3, which is dependent on claim 1, has a special technical feature of "having, on the N-terminal side of ALP, a gene coding an amino acid sequence having a secretory signal peptide derived from aspergillus bacteria selected from the group consisting of CDHss, CDHcytbkex ... and AsAP3ss72". Claims 4 and 13-15 and portions referring to claims 2, in claims 5-11, have the same special technical feature.

Therefore, claims 1-11 and 13-15 are classified as invention 1.

(Invention 2) Claim 12

Claim 12 shares a common technical feature of alkaline phosphatase with claim 1 classified as invention 1. However, this technical feature does not make a contribution over the prior art, and is thus not considered to be a special technical feature. Furthermore, claim 12 shares no other identical or corresponding special technical features with claim 1.

Therefore, claim 12 cannot be classified as invention 1.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/80(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/80, C12N1/15, C12N9/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CiNii, CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 11-332586 A (ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー) 1999.12.07, 請求項1-16, [0004], [0011], [0015], 図9 & US 6406899 B1 claims, first column lines 28-62, third column lines 56-57, fourth column lines 42-49, Fig.9 & EP 955369 A2	1, 2, 5-12 1-15
X Y	WO 03/056004 A1 (UNISEARCH LIMITED) 2003.07.10, 特許請求の範囲、第16 頁第28行-第17頁第4行 & WO 2003/055999 A1 & WO 2003/056000 A1	1, 10, 11 1-15

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.2018

国際調査報告の発送日

25.12.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮岡 真衣

4 B

4044

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2008-5734 A (キッコーマン株式会社) 2008.01.17, 請求項1、[0009]、 [0015]、[0020] & WO 2008/001700 A1	12 1-15
Y	JP 2011-87572 A (大関株式会社) 2011.05.06, [0002] -[0004] (ファミリー なし)	1-15
Y	JP 10-276787 A (ノボ ノルディスク アクティージェルスカブ) 1998.10.20, [0003], & US 5766912 A first column lines 23-31 & EP 238023 A2	1-15
Y	WO 2017/094776 A1 (キッコーマン株式会社) 2017.06.08, 配列番号 37、 [0058]、[0149]、[0154] (ファミリーなし)	1-15
Y	JP 2012-157315 A (月桂冠株式会社) 2012.08.23, 試験例3、試験例8、配列 番号3、4 (ファミリーなし)	1-15
Y	alkPPc [Aspergillus parasiticus SU-1], Database GenBank, Accession No. KJK66304.1 [online], 2015.03.18, [Retrieved on 2018.12.7], Whole Document, Retrieved from the Internet, URL: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/770309090 >	1-15
Y	Alkaline phosphatase., Database GenBank, Accession No. Q2UH22 [online], [Retrieved on 2018.12.7], 2006.11.28, Whole Document, Retrieved from the Internet, URL: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q2UH22 >	1-15

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

< 第 III 欄の続き >

請求の範囲は、以下の 2 つの発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1-11、13-15

国際調査報告で引用された文献 1 には、ALP を生産する能力するアスペルギルス属形質転換体を培養する工程を含む ALP の製造方法、および、当該 ALP が N 型糖鎖付加モチーフの一部に変異を含むことが記載されており、請求項 1、2 は文献 1 より新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項 1 の従属請求項である請求項 3 は、「ALP の N 末端側に、CDHss、CDHcytbkex・・・および AsAP3ss72 からなる群より選択されるアスペルギルス属菌由来の分泌シグナルペプチドを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する」という特別な技術的特徴を有しており、請求項 4、13-15、および、請求項 5-11 のうち、請求項 2 を引用する部分も、これと同一の特別な技術的特徴を有している。

したがって、請求項 1-11、13-15 を発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 12

請求項 12 は、発明 1 に区分された請求項 1 と、アルカリフォスファターゼであるという点で共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項 11 と請求項 1 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

したがって、請求項 11 は、発明 1 に区分できない。