世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

# 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5
C12N 15/19, C12P 21/02
// (C12P 21/02, C12R 1:91)

A1

(11) 国際公開番号 WO 93/14203

(43) 国際公開日 1993年7月22日 (22.07.1993)

(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00043
(22) 国際出願日 1992年1月21日(21. 01. 92)

添付公開書類 国際調査報告書

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
株式会社 ツムラ(TSUMURA & CO.)〔JP/JP〕
〒103 東京都中央区日本橋三丁目4番10号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
森田敏美(MORITA, Toshimi)〔JP/JP〕
矢野久美子(YANO, Kumiko)〔JP/JP〕
山本京子(YAMAMOTO, Kyouko)〔JP/JP〕
高木英樹(TAKAGI, Hideki)〔JP/JP〕
藤橋俊明(FUJIHASHI, Toshiaki)〔JP/JP〕
〒300-11 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586
株式会社ツムラ内 Ibaraki, (JP)
(74) 代理人
弁理士 小野信夫(ONO, Nobuo)
〒101 東京都千代田区神田佐久間町3-15 藤井ビル7階
Tokyo, (JP)

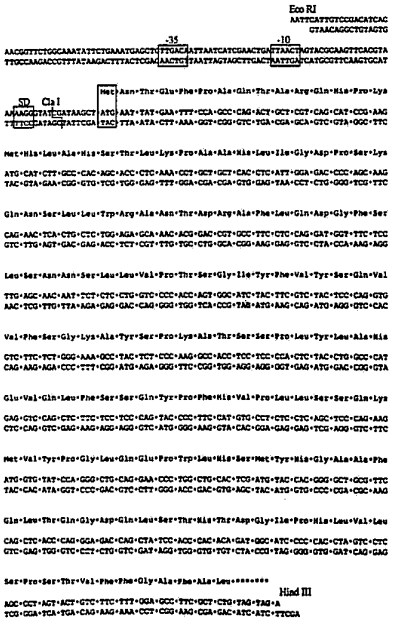
(81) 指定国
AT(欧州特許), BE(欧州特許), CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), US.

(54) Title: LYMPHOTOXINS, EXPRESSION VECTOR THEREFOR, AND PRODUCTION OF LYMPHOTOXINS WITH SAID VECTOR

(54) 発明の名称 リンホトキシン類およびその発現ベクター並びにこれを利用したリンホトキシン類の製造法

(57) Abstract

A vector which can efficiently express lymphotoxins including natural lymphotoxin and lymphotoxin-like peptides having a high homology with lymphotoxin; and a process for producing lymphotoxins by using the vector. The vector has the SD sequence located (13) bases upstream from the initiator codon, a base sequence of TTAACT in the -10 region and a base sequence of TTGACA in the -35 region, and a molecular weight of 2.7 to 3.1 kb except for the gene coding for lymphotoxins. Lymphotoxins are produced mainly be genetic recombination and the use of this vector serves to increase the amount of expression thereof greatly, thus enabling them to be clinically used.



(57) 要約

天然リンホトキシンやこれに高い相同性を有するリンホトキシン様ペプチド等のリンホトキシン類を効率良く発現することができるベクターおよびこのベクターを用いるリンホトキシン類の製造方法である。

本発明のリンホトキシン類発現ベクターは、開始コドンの１３塩基上流にＳＤ領域を有し、－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであり、リンホトキシン類をコードする遺伝子を除いた大きさが ２．７～３．１ｋｂであるものである。

リンホトキシン類は主に遺伝子組替えによって生産されているが、本ベクターを使用することにより、その発現量を飛躍的に増加させることができ、リンホトキシン類を臨床で使用することが可能となる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバードス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
FI フィンランド
ES スペイン
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリー
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンコル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
SU ソヴィエト連邦
TD チャード
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国
VN ヴェトナム

# 明 細 書

## リンホトキシン類およびその発現ベクター並びにこれを利用したリンホトキシン類の製造法

### 技 術 分 野

本発明は、リンホトキシン類を有利に発現させるためのベクターおよびこれを利用したリンホトキシン類の製造法並びにこれらにより製造されるリンホトキシン類に関する。

### 背 景 技 術

従来、抗腫瘍性ペプチドとして、ＴＮＦ、リンホトキシン等が知られており、その臨床での利用が検討されている。

しかし、このうちＴＮＦは、投与時の血圧低下や発熱等の副作用が問題となっており、実際の治療への適用は難しいとされている。

一方、天然リンホトキシンやこれに高い相同性を有するリンホトキシン様ペプチド等のリンホトキシン類はＴＮＦのような副作用の問題はないが、その生産に問題があった。

すなわち、現在、リンホトキシン類は主に遺伝子組替えによって生産されているが、その発現量が少ないために生産効率が悪く、実際の治療に必要な量のリンホトキシン類を確保するのが困難であるというのが現状であった。

### 発 明 の 開 示

本発明者らは、リンホトキシン類を臨床で使用するため、その発現量を飛躍的に増加させるべく鋭意研究を行なった。 そしてその結果、特定のベクターを利用すれば、従来極めてわずかしか発現しなかったリンホトキシン類が効率良く発現することを見出し本発明を完成した。

すなわち本発明の目的は、開始コドンの１３塩基上流にＳＤ領域を有し、－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであり、リンホトキシン類をコードする遺伝子を除いた大きさが ２．７～３．１ｋｂであるリンホトキシン類発現

ベクターを提供することである。

また本発明の他の目的は、宿主微生物を上記ベクターで形質転換し、これを培養することを特徴とするリンホトキシン類の製造法を提供することである。

更に本発明の他の目的は、本発明方法により有利に調製される新規な天然リンホトキシンと高い相同性を有するペプチドを提供することである。

図面の簡単な説明

第１図ないし第３図は、本発明ベクター構築の手順を示す図面である。

第４図は、遺伝子１１及びこれがコードする天然リンホトキシンと高い相同性を有するペプチド（以下、本発明ペプチドということがある）を示す図面である。

発明を実施するための最良の態様

本発明のベクターは、－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであるプロモーターを用い、ＳＤ領域（リボソーム結合部位）と開始コドン（ＡＴＧ）の間を１３塩基とし、これにリンホトキシン類（以下「ＬＴ」と略称する）をコードする遺伝子（以下「ＬＴ構造遺伝子」と略称する）を結合せしめ、かつ、ＬＴ構造遺伝子を除くベクターの塩基長を２．７～３．１ｋｂとすることにより構築することができる。

具体的には、例えば第１図ないし第３図の手順のいずれかに従い構築することができる。　第１図に示された方法によれば、本発明ベクターは、プロモーターの前半部分をコードする塩基配列（遺伝子１）、ＳＤ領域および開始コドンを含むプロモーターの後半部分とＬＴ遺伝子の先頭部分をコードする塩基配列（遺伝子２）および終止コドンを含む塩基配列（遺伝子４）を合成し、これらと公知のＬＴベクターから切り出したＬＴ構造遺伝子の大部分をコードする塩基配列（遺伝子３）ならびに発現ベクター（遺伝子５）とをライ

ゲーションすることにより構築することができる。

この方法によると、化学合成された遺伝子２を用いることによって、ＳＤ領域および開始コドンの距離が１３塩基とすることが可能となる。

また、ライゲーションされる発現ベクターは、構築された本発明のベクターがＬＴ構造遺伝子を除いて塩基長が２．７～３．１ｋｂとなるようなものであることが必要であり、例えば、ｐＵＣ系のベクターであるｐＵＣ、ｐＴＺ、ブルースクリプト（Bluescript）等を利用することにより、その要求を満足させることができる。

更に、本発明のベクターにおいて使用されるＬＴ構造遺伝子は、天然リンホトキシン遺伝子であっても、天然リンホトキシン遺伝子を利用し、その一部を改変したり、有機合成により全く人工的に製造された天然リンホトキシン相同性の高いペプチドをコードする遺伝子であっても良い。

また、第２図の方法によれば、第１図の方法で得られたＬＴ発現ベクターのＬＴ構造遺伝子を他のＬＴ構造遺伝子に交換することができる。すなわち、第１図に示す方法で調製されたＬＴ発現ベクターからプロモーターの大部分をコードする遺伝子（遺伝子６）を切出し、これと他のベクターから切出すか、合成したＬＴの構造遺伝子の大部分をコードする遺伝子（遺伝子８）、ＳＤ領域および開始コドン（ＡＴＧ）を含み、この距離が１３塩基であるように調製した遺伝子（構造遺伝子７または１０）および発現ベクター（遺伝子３）とライゲーションすることにより本発明のベクターが構築される。

また、第３図に示した方法は、第１図の方法で得られたＬＴ発現ベクターのＬＴ構造遺伝子をそのまま他のベクターに組み込むものであり、コピー数等の面での特徴のある本発明のベクターを得ることができる。

上記した方法は、本発明のＬＴ発現ベクターを調製する方法の一

例であり、他の方法によっても調製することができる。例えば、－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡである条件を満たすプロモーターにはＴｒｐプロモーターが含まれるので、公知のＴｒｐプロモーターを有するベクターにＬＴ構造遺伝子を組み込み、得られたベクターから不用な塩基を取り除き本発明ベクターを調製することも可能である。

叙上の如くして得られたＬＴ発現ベクターは、常法に従いこれを用いて宿主微生物を形質転換し、形質転換された微生物を培養することによりＬＴを製造させることができる。

形質転換体の培養も常法にしたがって行なうことができ、Ｌ－培地、Ｍ９培地、Ｍ９－カザミノ酸培地、高りん酸培地、高りん酸－カザミノ酸培地等を利用することができる。

特に、高いＬＴの発現を得るためには、培地中に３β－インドールアクリル酸を添加することが好ましい。３β－インドールアクリル酸の添加量としては、培地１ｍｌ当り２０～１００μｇ程度である。

培養により得られたＬＴを培養物中から分離精製するには、微生物を例えば超音波処理等で破壊した後、遠心分離等によって上清を得、この上清を硫安沈澱、透析、イオンクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の精製手段を組合せる精製方法に付すことにより実施される。

次に実施例、参考例および試験例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例等になんら制約されるものではない。

実施例　１

（１）プロモーターの先頭部分の構築：

－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであるプロモーター部分（以下、これを「ｔｒｐプロモーター」という）を含む遺伝子（遺伝子１）並びにＳＤ領域およ

び開始コドンを１３塩基の距離に有する、後記参考例（４）（特願平１－２３４８００号）に従って調製されたＬＴ構造遺伝子（以下、「ＭＬＴ」と略称する）の先頭部分（遺伝子２）をＤＮＡ合成装置を用いて有機合成した。遺伝子１および遺伝子２の合成は、次の(1)～(6)のオリゴヌクレオチドおよび(7)～(14)のオリゴヌクレオチドを用いて行なった。

（遺伝子１調製のためのオリゴヌクレオチド）

(1) 5'－ＡＡＴＴＣＡＴＴＧＴＣＣＧＡＣＡＴＣＡＣＡＡＣＧ
ＧＴＴ

(2) 3'－ＧＴＡＡＣＡＧＧＣＴＧＴＡＧＴＧＴＴＧＣＣＡＡＧ
ＡＣＣＧＴＴ

(3) 5'－ＣＴＧＧＣＡＡＡＴＡＴＴＣＴＧＡＡＡＴＧＡＧＣＴ
ＧＴＴ

(4) 3'－ＴＡＴＡＡＧＡＣＴＴＴＡＣＴＣＧＡＣＡＡＣＴＧＴ
ＴＡＡ

(5) 5'－ＧＡＣＡＡＴＴＡＡＴＣＡＴＣＧＡＡＣＴＡＧＴＴＡ
ＡＣＴＡＧＴ

(6) 3'－ＴＴＡＧＴＡＧＣＴＴＧＡＴＣＡＡＴＴＧＡＴＣＡ

（遺伝子２調製のためのオリゴヌクレオチド）

(7) 5'－ＡＣＧＣＡＡＧＴＴＣＡＣＧＴＡＡＡＡＡＧ

(8) 3'－ＴＧＣＧＴＴＣＡＡＧＴＧＣＡＴＴＴＴＴＣＣＣＡＴ
ＡＧＣ

(9) 5'－ＧＧＴＡＴＣＧＡＴＡＡＧＣＴＡＴＧ

(10) 3'－ＴＡＴＴＣＧＡＴＡＣＴＴＡＡＴＡＣ

(11) 5'－ＡＡＴＴＡＴＧＡＡＴＴＴＣＣＡＧ

(12) 3'－ＴＴＡＡＡＧＧＴＣＧＧＧＴＣＴＧ

(13) 5'－ＣＣＣＡＧＡＣＴＧＣＴＣＧＴＣＡＧＣＡＴＣＣＧＡ
ＡＧＡＴＧＣＡ

(14) 3'－ＴＣＧＡＧＣＡＧＴＣＧＴＡＧＧＣＴＴＣＴ

各オリゴヌクレオチド 0.1ODを滅菌水15μlに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡社）、400mM ATP、10倍量のカイネーション緩衝液を加えて30μlとし、37℃で2時間反応させた。反応終了後65℃で10分間熱処理し、酵素を失活させた。その後、各オリゴヌクレオチド0.050Dを1本のチューブにまとめ、アニーリング緩衝液を等量入れ、90℃で3分反応し、ゆっくり冷却した。これにT4DNAリガーゼ 2000単位（宝酒造社）と1M DTT 1μl、10mM ATP 10μl、アニーリング緩衝液 7μlを入れ、100μlとした。その後、16℃で16時間反応させ、10%PAGEゲルにて泳動し、エチジウムブロマイド（EtBr）にて染色後、目的の遺伝子1および2を切出し、溶出緩衝液（0.5M アンモニウムアセテート－1mM EDTA）中で溶出した後、脱塩した。得られた遺伝子1および2はそれぞれ次の塩基配列を有していた。

遺伝子1

```
 AATTCATTGTCCGACATCACAACGGTTCTGGCAAATATT
     GTAACAGGCTGTAGTGTTGCCAAGACCGTTTATAA
                  -35                  -10
CTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTGATTAA
GACTTTACTCGACAACTGTTAATTAGTAGCTTGACTAATT

CTAGT
GATCA
```

遺伝子2

```
                          SD領域     ClaI        開始コドン
ACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCGATAAGCTATGA
TGCGTTCAAGTGCATTTTTCCCATAGCTATTCGATACT

ATTATGAATTTCCAGCCCAGACTGCTCGTCAGCATCCG
TAATACTTAAAGGTCGGGTCTGACGAGCAGTCGTAGGC
```

AAGATGCA
TTCT

（２）ＭＬＴ遺伝子の回収：

参考例（５）に開示のｐｋｋ２２３－３ ＭＬＴ ＤＮＡを制限酵素 ＥｃｏＲＩ－ＳｃａＩ（東洋紡社）にて切断し、４９５ｂｐのＤＮＡ断片を回収し、更にこれをＮｓｉＩ（ＮＥＢ社）にて切断し、４３１ｂｐのＤＮＡ断片（遺伝子３）を回収した。

（３）終止コドンを含み、更にＨｉｎｄⅢ部位を保有するオリゴヌクレオチドの作製：

ＡＢＩ社ＤＮＡ合成機を用いて、下に示すオリゴヌクレオチドから終止コドンを２つ連続し、更にＨｉｎｄⅢ部位を保有するオリゴヌクレオチド（遺伝子４）を有機合成した。

（遺伝子４調製のためのオリゴヌクレオチド）

(15) 5'－ＡＣＴＧＴＣＴＴＣＴＴＴＧＧＡＧＣＣＴＴＣＧＣＴ
ＣＴＧＴＡＧＴＡＧＡ

(16) 3'－ＴＧＡＣＡＧＡＡＧＡＡＡＣＣＴＣＧＧＡＡＧＣＧＡ
ＧＡＣＡＴＣＡＴＣＴＴＣＧＡ

上記の合成遺伝子０．１ＯＤをアニーリング緩衝液１００μｌに溶解し、９０℃で３分間反応させた後、ゆっくり冷却して次に示す塩基配列を有する遺伝子４を得た。

遺伝子４

ACTGTCTTCTTTGGAGCCTTCGCTCTGTAGTAGA
TGACAGAAGAAACCTCGGAAGCGAGACATCATCTTCGA

（４）ブルースクリプト Ｍ１３ ＳＫⅡ（＋）の切断：

ブルースクリプト（Bluescript）Ｍ１３ ＳＫⅡ（＋）２μｇ（東洋紡社）を制限酵素ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄⅢ（東洋紡社）にて切断後、０．８％低融点アガロースゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色

後、目的の２．９ｋｂからなるプラスミドＤＮＡ（遺伝子５）を得た。

（５）ｔｒｐプロモーターを保有し、ＭＬＴを保有するプラスミドの構築：

遺伝子５と遺伝子１、２、３および４とをＴ４ＤＮＡリガーゼを用いて反応させ、ＭＬＴの遺伝子を有するプラスミド（ｐＢｔｒｐＭＬＴ）を得た。更に－７０℃で冷凍保存しておいた形質転換用ＨＢ１０１株菌体を融解し、この懸濁液１００μｌに、ｐＢｔｒｐＭＬＴを２０ｎｇ添加した。氷冷４５分反応後、４２℃で９０秒間ヒートショックを与え、２分氷冷した。ＳＯＣ培地９００μｌを添加し、３７℃で１時間培養後、懸濁液を０．１ｍｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ寒天培地プレート上にまき、３７℃で一夜培養し、遺伝子１、２、３、４および５からなるベクター（ｐＢｔｒｐＭＬＴ）を有する形質転換体を得た。この形質転換体からＤＮＡを分離し制限酵素ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄⅢで切断した後、１％アガロースゲルで泳動し、ＥｔＢｒ染色にて６２９ｂｐのフラグメントを確認した。

（６）ｐＢｔｒｐ ＭＬＴの発現：

ｐＢｔｒｐ ＭＬＴについて、３０℃および３７℃の条件での蛋白質の発現を確認した。ｐＢｔｒｐ ＭＬＴの単一コロニーを、２．５μｇ／ｍｌトリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地（Ｍ９最小培地、１％ グルコース、１ｍＭ $MgSO_4$、０．１ｍＭ $CaCl_2$、０．５％ カザミノ酸、０．１ｍｇ／ｍｌ チアミン一塩酸、０．１ｍｇ／ｍｌアンピシリン、１００ｍＭＨｅｐｅｓ）にうえつけ、それぞれの温度にて一夜培養した。翌日新しいＭ９ＣＡ培地に１／５０量うえ、$OD_{600}$ ＝ ０．５まで培養後、３β－インドールアクリル酸 ２０μｇ／ｍｌを添加し、更に各々の温度にて１６時間培養した。培養終了後１ｍｌの菌体液を１．５ｍｌの遠心管に移し、遠心にて菌体を得た。この菌体を２００μｌのＳＤＳ ＰＡＧＥ用緩

衝液にて溶解し、９０℃で５分熱処理を加え、１５％ ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動した。 泳動終了後、クマシブルーにて染色し、次いで脱色した。 脱色後、ＬＫＢレーザースキャナー（ファルマシアＬＫＢ社）にて、全蛋白質当りのＭＬＴの発現量を測定したところ、３０℃の培養条件では全蛋白質当り３７％、また、３７℃の培養条件では全蛋白質当り２５％のＭＬＴ蛋白質の発現が確認された。これは、３０℃の培養条件では、リットル当り４０～８０ｍｇの蛋白質量に相当する。

（７）蛋白質の生産および精製：

ｐＢｔｒｐ ＭＬＴを、２.５μｇ／ｍｌトリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地２００ｍｌにて一夜培養し、この培養液を ７ｌのＭ９ＣＡ培地に接種し、$OD_{600}$＝０.５まで３０℃にて培養した。その後、３β－インドールアクリル酸を最終濃度２０μｇ／ｍｌになるように加え、更に１６時間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。

得られた菌体３３.７ｇ／ｗｅｔを ３０ ｍＭ ＮａＣｌ及び０.１ｍＭ ｐ－ＡＰＭＳＦを含む５０ｍＭ トリス塩酸（ｐＨ８.０）５００ｍｌに懸濁し、この菌体懸濁液を高圧ホモジナイザー（ＲＡＮＮＩＥ社）に、６０００ｐ.ｓ.ｉにて３回通し、菌体を破壊した。更に遠心分離により菌体残渣を除き、上清液を得た。

得られた上清５００ｍｌに最終濃度として０.１％になるようにポリエチレンイミンを添加し、４℃にて１０分撹拌後、遠心分離を行い、除核酸を行なった。 上清４８０ｍｌを回収し、硫酸アンモニウムを５０％飽和となるように添加後、４℃にて６時間撹拌後、遠心分離を行い沈澱として粗蛋白を得た。

この粗蛋白を５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ ７.４）４５ｍｌにて溶解後、同緩衝液で透析した。 更に遠心分離後、不溶性蛋白を除去し、上清５２ｍｌを回収した。 更に５０℃にて１０分熱処理を行い、沈澱する蛋白を除去した。 その回収液５０ｍｌをあらかじめ

５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）で平衡化したＤＥＡＥ セファローズ ファスト フロー（ファルマシアＬＫＢ社）のカラムに付し、５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．４）で溶出させた。

この溶出液をアミコン社製限外ろ過機（ＹＭ１０膜）により濃縮し、１３０ｍｌの濃縮液を得た。この濃縮液を５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて透析して１３２ｍｌの蛋白質溶液を得た。得られた蛋白質溶液を、５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて平衡化したＣＭ セファローズ ファスト フロー（ファルマシアＬＫＢ社）のカラムに吸着させ、５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて洗浄後、ＮａＣｌを含む５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて段階的濃度勾配により溶出した。

溶出液からペプチドを含む分画を回収し、リン酸緩衝液に対し透析後、Ｌ９２９試験により活性を求め、各精製過程における比活性および回収率を求めた。なお、蛋白質定量は、バイオラッド社製プロテイン・アッセイ・システムを用いて測定した。この結果を第１表に示す。

# 第 1 表

| | 総液量 (ml) | 蛋白濃度 (mg/ml) | 総蛋白質量 (mg) | LTの生物活性 (u/ml) | 総生物活性 (u) | 収 率 (%) | 比 活 性 (mg) | 精製液 (倍) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 細胞破壊液 | 500 | 7.72 | 3862.5 | $1.26\times10^{8}$ | $6.3\times10^{10}$ | 100 | $1.63\times10^{7}$ | 1 |
| 0.1%ポリエチレンイミン処理 | 480 | 5.75 | 2730.2 | $1.29\times10^{8}$ | $6.2\times10^{10}$ | 98 | $2.24\times10^{7}$ | 1.37 |
| 50%硫安透析液 | 52 | 15.02 | 781.5 | $1.15\times10^{9}$ | $6\times10^{10}$ | 95 | $7.66\times10^{7}$ | 4.7 |
| 50℃熱処理 | 50 | 12.34 | 617.3 | $1.18\times10^{9}$ | $5.9\times10^{10}$ | 94 | $9.56\times10^{7}$ | 5.9 |
| DEAE分画区濃縮後 | 130 | 1.57 | 203.7 | $4\times10^{8}$ | $5.2\times10^{10}$ | 83 | $2.55\times10^{8}$ | 15.6 |
| DEAE分画区濃縮透析後 | 132 | 1.48 | 195.5 | $3.82\times10^{8}$ | $5.04\times10^{10}$ | 80 | $2.58\times10^{8}$ | 15.8 |
| CM分取蛋白 | 70 | 1.96 | 136.85 | $4.43\times10^{8}$ | $3.1\times10^{10}$ | 49 | $2.27\times10^{8}$ | 14 |

（８）精製した蛋白質の純度検定およびその構造の確認：

精製した蛋白質２μｇを１５％ ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動後、クマシブルーにて染色し、脱色したのち、ＬＫＢレーザースキャナーにて純度検定した。その結果、本発明にて精製した蛋白質は、純度９５％以上で回収されていた。

実 施 例 ２

インタクトＬＴの構築発現

（１） ｐｔｒｐ ＭＬＴベクターからｔｒｐプロモーター部分の取得：

実施例１で得たｐｔｒｐＭＬＴ ＤＮＡを制限酵素ＢａｍＨＩ（東洋紡社）－ＣｌａＩ（ファルマシアＬＫＢ社）を用いて切断後、１.５％低融点アガロースゲルで泳動し、１２９ ｂｐからなるプロモーター領域（遺伝子６）を回収した。この遺伝子６は次に示すような塩基配列を有していた。

遺伝子６

```
GATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCATTGTCCGACATCACAA
    GGGGCCCGACGTCCTTAAGTAACAGGCTGTAGTGTT

CGGTTCTGGCAAATAATCTGAAATGAGCTGTTGACAATTA
GCCAAGACCGTTTATTAGACTTTACTCGACAACTGTTAAT

ATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAA
TAGTAGCTTGATCAATTGATCATGCGTTCAAGTGCATTTT

AGGGTAT
TCCCATAGC
```

（２）ＬＴ先頭部分の構築

以下に示す６つのオリゴヌクレオチドからＳＤ領域と開始コドンを１３塩基の距離に保ち、同時にＬＴの先頭部分をコードする遺伝子（遺伝子７）を調製した。

（遺伝子７調製のためのオリゴヌクレオチド）

(1) 5'－CGATAAGCTATGCTTCCAGGAAGT

(2) 3'－TATTCGATACGAAGGTCCTGAACC
AGAA

(3) 5'－AGGTCTTACACCATCAGCTGCCCA
G

(4) 3'－CGTGGTAGTCGACGGGTCTGACGA
G

(5) 5'－ACTGCTCGTCAGCATCCGAAGATG
CA

(6) 3'－CAGTCGTAGGCTTCT

上記ヌクレオチドのうち、(2)～(5)のオリゴヌクレオチドの各々０.１ＯＤを、滅菌水１５μｌに溶解し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ、４００ｍＭ ＡＴＰ、１０倍量のカイネーション緩衝液を加えて３０μｌとし、３７℃で２時間反応させた。反応終了後、６５℃で１０分間熱処理し、酵素を失活させた。その後、オリゴヌクレオチド(1)～(6)の各々 ０.０５ＯＤを１本のチューブにまとめ、アニーリング緩衝液を等量入れ、９０℃で３分反応させ、ゆっくり冷却した。これにＴ４ ＤＮＡリガーゼ２０００単位（宝酒造社）と１ＭＤＴＴ １μｌ、１０ｍＭ ＡＴＰ １０μｌ、アニーリング緩衝液７μｌを入れ、１００μｌとした。 その後、１６℃で１６時間反応させ、１０％ＰＡＧＥゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色後、目的の遺伝子７を切出し、溶出緩衝液中で溶出した後、脱塩した。得られた遺伝子７の塩基配列は次の通りである。

遺伝子７

CGATAAGCTATGCTTCCAGGAGTAGGTCTTACACCAT
TATTCGATACGAAGGTCCTCATCCAGAATGTGGTA

CAGCTGCCCAGACTGCTCGTCAGCATCCGAAGATGCA
GTCGACGGGTCTGACGAGCAGTCGTAGGCTTCT

（３） ＬＴ遺伝子の取得：

ｐｔｒｐ ＭＬＴ ＤＮＡを制限酵素ＮｓｉＩ（ＮＥＢ社）－ＨｉｎｄⅢ（東洋紡社）を用いて切断後、１％低融点アガロースゲルで泳動し、４６５ｂｐからなる遺伝子（遺伝子８）を回収した。

（４）ブルースクリプト Ｍ１３ ＳＫⅡ（＋）の切断：

ブルースクリプト Ｍ１３ ＳＫⅡ（＋）２μｇ（東洋紡社）を制限酵素ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢ（東洋紡社）にて切断後、０．８％低融点アガロースゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色後、目的の２．９ｋｂからなるプラスミドＤＮＡ（遺伝子９）を得た。

（５）ｔｒｐプロモーターを保有しかつＬＴを保有するプラスミドの構築：

遺伝子６、７、８、９にＴ４ＤＮＡリガーゼを作用させ、ＬＴの遺伝子を有するプラスミド（ｐＢｔｒｐ ＬＴ）を得た。 更に、－７０℃で冷凍保存しておいた形質転換用ＨＢ１０１株菌体を融解し、この懸濁液１００μｌに、ｐＢｔｒｐ ＬＴを２０ｎｇ添加した。 氷冷４５分反応後、４２℃で９０秒間ヒートショックを与え、２分氷冷した。 これにＳＯＣ培地９００μｌを添加し、３７℃で１時間培養後、懸濁液を０．１ｍｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ寒天培地プレート上にまき、３７℃で一夜培養し、ｐＢｔｒｐ ＬＴを有する形質転換体を得た。この形質転換体からＤＮＡを分離し、制限酵素ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢで切断した後、１％アガロースゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色にて６６５ｂｐのフラグメントを確認した。

（６）ｐＢｔｒｐ ＬＴの発現：

ｐＢｔｒｐ ＬＴの３７℃の条件での蛋白質の発現を確認した。ｐＢｔｒｐ ＬＴの単一コロニーを、２．５μｇ／ｍｌ トリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地（Ｍ９最小培地、１％ グルコース、１ｍＭ $MgSO_4$、０．１ｍＭ $CaCl_2$、０．５％ カザミノ酸、０．１ｍｇ／ｍｌ チアミン－塩酸、０．１ ｍｇ／ｍｌアンピシリン、

１００ｍＭ Ｈｅｐｅｓ）にうえつけ、３７℃にて一夜培養した。翌日新しいＭ９ＣＡ培地に１／５０量うえ、ＯＤ$_{600}$＝０．５まで培養後、３β－インドールアクリル酸 ２０μｇ／ｍｌを添加し、更に３７℃にて１６時間培養した。 培養終了後、１ｍｌの菌体液を１．５ｍｌの遠心管に移し、遠心にて菌体を得た。 この菌体を２００μｌのＳＤＳ ＰＡＧＥ用緩衝液にて溶解し、９０℃５分熱処理を加え１５％ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動した。 泳動終了後、クマシブルーにて染色した後、脱色した。 脱色後、ＬＫＢレーザースキャナーにて、全蛋白質当りのＬＴの発現量を測定したところ、３７℃の培養条件では全蛋白質当り１０％のＬＴ蛋白質の発現が確認された。これは、３７℃の培養条件では、リットル当り１０～２０ｍｇの蛋白質量に相当する。

（７）蛋白質の生産および精製：

ｐＢｔｒｐ ＬＴを、２．５μｇ／ｍｌトリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地１００ｍｌにて一夜培養し、この培養液を３．５ｌのＭ９ＣＡ培地に接種し、ＯＤ$_{600}$＝０．５まで３７℃にて培養した。その後、３β－インドールアクリル酸を最終濃度２０μｇ／ｍｌになるように加え、更に１６時間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。

得られた菌体１５．９５ｇ／ｗｅｔを３０ｍＭ ＮａＣｌ及び０．１ｍＭ ｐ－ＡＰＭＳＦを含む５０ｍＭ トリス塩酸（ｐＨ８．０）３００ｍｌに懸濁し、この懸濁液を高圧ホモジナイザー（ＲＡＮＮＩＥ社）に６０００ｐ．ｓ．ｉで３回通し、菌体を破壊した。 更に２００ｍｌの同一緩衝液にて高圧ホモジナイザー内を洗浄し、この回収液と破壊液を遠心分離し、粗抽出液を得た。

この粗抽出液５００ｍｌに最終濃度として０．１％になるようにポリエチレンイミンを添加し、４℃にて１０分撹拌後、遠心分離を行い、除核酸を行なった。 上清 ４８０ｍｌを回収し、硫酸アンモニウムを５０％飽和となるように添加後、４℃にて５時間撹拌し、

次いで遠心分離を行い、沈澱として粗蛋白を得た。この粗蛋白を５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．４）４５ｍｌにて溶解後、同緩衝液で透析した。更に遠心分離後、不溶性蛋白を除去し、その上清５２ｍｌを回収した。更に、５０℃にて１０分熱処理を行い、沈澱する蛋白を除去した。その回収液５０ｍｌをあらかじめ５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ ７．４）で平衡化したＤＥＡＥ セファローズ ファスト フロー（ファルマシアＬＫＢ社）のカラムに付し、５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．４）で溶出させた。

この溶出液をアミコン社製限外ろ過機（ＹＭ１０膜）により濃縮し、１３０ｍｌの濃縮液を得た。この濃縮液を５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて透析後、１３２ｍｌの蛋白質溶液を得た。この蛋白質溶液を５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ ７．０）にて平衡化したＣＭ セファローズ ファスト フロー（ファルマシアＬＫＢ社）のカラムに吸着させ、５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて洗浄後、ＮａＣｌを含む５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて段階的濃度勾配により溶出した。このペプチドを含む分画を回収し、リン酸緩衝液に対し透析後、Ｌ９２９試験により活性を求め、各精製過程における比活性および回収率を求めた。なお、蛋白質定量は、バイオラッド社製プロテイン・アッセイ・システムを用いて測定した。この結果を第２表に示す。

# 第 2 表

| | 総液量 (ml) | 蛋白濃度 (mg/ml) | 総蛋白質量 (mg) | LTの生物活性 (u/ml) | 総生物活性 (u) | 収 率 (%) | 比 活 性 (mg) | 精製液 (倍) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 細胞破壊液 | 500 | 4.9 | 2450 | $2.8\times10^{7}$ | $1.4\times10^{10}$ | 100 | $5.7\times10^{6}$ | 1 |
| 0.1%ポリエチレン イミン処理 | 480 | 3.6 | 1728 | $2.7\times10^{7}$ | $1.32\times10^{10}$ | 94 | $7.5\times10^{6}$ | 1.32 |
| 50%硫安透析液 | 52 | 5.8 | 301.6 | $2.9\times10^{8}$ | $1.5\times10^{10}$ | 100 | $5\times10^{7}$ | 8.8 |
| 50℃熱処理 | 50 | 4.8 | 240 | $2.93\times10^{8}$ | $1.46\times10^{10}$ | 100 | $6.1\times10^{7}$ | 10.7 |
| DEAE分画区濃縮後 | 130 | 0.550 | 71.5 | $8.9\times10^{7}$ | $1.16\times10^{10}$ | 83 | $1.62\times10^{8}$ | 28.4 |
| DEAE分画区濃縮透析後 | 132 | 0.520 | 68.64 | $8.5\times10^{7}$ | $1.12\times10^{10}$ | 80 | $1.63\times10^{8}$ | 28.6 |
| CH分取蛋白 | 59 | 0.499 | 29.45 | $9.2\times10^{7}$ | $5.42\times10^{9}$ | 38.7 | $1.84\times10^{8}$ | 32.3 |

（８）精製した蛋白質の純度検定：

精製した蛋白質２μｇを１５％ ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動後、クマシブルーにて染色し、脱色後、ＬＫＢレーザースキャナーにて純度検定した。その結果、本発明にて精製した蛋白質は、純度９５％以上で回収されていた。

実 施 例 ３

組換え型ＬＴ（ＴＬＴ）の構築と発現

（１）ｐｔｒｐ ＭＬＴベクターからｔｒｐプロモーター部分の取得：

実施例２の（１）と同様にして、ｐｔｒｐ ＭＬＴ ＤＮＡから１２９ｂｐのプロモーター領域（遺伝子６）を得た。

（２） ＬＴ先頭部分の構築：

以下に示す４つのオリゴヌクレオチドからＳＤ領域と開始コドンを１３塩基の距離に保ち、同時にＬＴの先頭部分をコードする遺伝子（遺伝子１０）を調製した。

（遺伝子１０調製のためのオリゴヌクレオチド）

(1) 5'－ＣＧＡＴＡＡＧＣＴＡＴＧＣＣＴＧＣＣＣＧＡ

(2) 3'－ＴＡＴＴＣＧＡＴＡＣＧＧＡＣＧＧＧＴＣＴＧＡＣＧＧ

(3) 5'－ＡＣＴＧＣＣＣＧＴＣＡＧＣＡＣＣＣＣＡＡＧＡＴＧＣＡ

(4) 3'－ＧＣＡＧＴＣＧＴＧＧＧＧＴＴＣＴ

上記オリゴヌクレオチドのうち(2)および(3)の各０．１ＯＤを滅菌水 １５μｌに溶解し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ、４００ｍＭ ＡＴＰ、１０倍量のカイネーション緩衝液を加えて３０μｌとし、３７℃で２時間反応させた。反応終了後、６５℃で１０分間熱処理し、酵素を失活させた。その後、(1)～(4)のオリゴヌクレオチド各０．０５ＯＤを１本のチューブにまとめ、アニーリング緩衝

液を等量入れ、９０℃３分反応しゆっくり冷却した。これにＴ４ＤＮＡリガーゼ２０００単位（宝酒造社）と１Ｍ ＤＴＴ １μｌ、１０ｍＭ ＡＴＰ １０μｌ、アニーリング緩衝液 ７μｌを入れ、１００μｌとした。その後、１６℃で１６時間反応させ、１０％ＰＡＧＥゲルにて泳動し、ＥｔＢｒで染色後、目的の遺伝子１０を切出し、溶出緩衝液中で溶出し後、脱塩した。得られた遺伝子１０は、次に示す塩基配列を有していた。

遺伝子１０

CGATAAGCTATGCCTGCCCAGACTGCCCGTCAGCACCCC
TATTCGATACGGACGGGTCTGACGGGCAGTCGTGGGG

AAGATGCA
TTCT

（３） ＬＴ遺伝子の取得：

ｐｔｒｐ ＭＬＴ ＤＮＡを制限酵素Ｎｓｉ１（ＮＥＢ社）－ＨｉｎｄⅢ（東洋紡社）を用いて切断後、１％低融点アガロースゲルで泳動し、４６５ｂｐからなる遺伝子（遺伝子８）を回収した。

（４） ブルースクリプト Ｍ１３ ＳＫⅡ（＋）の切断：

ブルースクリプト Ｍ１３ ＳＫⅡ（＋）２μｇ（東洋紡社）を制限酵素ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢにて切断後、０.８％低融点アガロースゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色後、目的の２.９ｋｂからなるプラスミドＤＮＡ（遺伝子９）を得た。

（５）ｔｒｐプロモーターを保有しかつＴＬＴを保有するプラスミドの構築：

遺伝子６、８、９、１０にＴ４ＤＮＡリガーゼを作用させ、ＴＬＴの遺伝子を有するプラスミド（ｐＢｔｒｐ ＴＬＴ）を得た。更に－７０℃で冷凍保存しておいた形質転換用ＨＢ１０１株菌体を融解し、この懸濁液 １００μｌに、ｐＢｔｒｐ ＴＬＴを２０ｎｇ添加した。４５分氷冷後、４２℃で９０秒間ヒートショックを与え、２分氷冷した。ＳＯＣ培地９００μｌを添加し、３７℃で１時間

培養後、懸濁液を０．１ｍｌ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ寒天培地プレート上にまき、３７℃で一夜培養し、ｐＢｔｒｐ ＴＬＴを有する形質転換体を得た。この形質転換体からＤＮＡを分離し、制限酵素ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢで切断した後、１％アガロースゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色にて６３７ｂｐのフラグメントを確認した。

（６）ｐＢｔｒｐ ＴＬＴの発現：

ｐＢｔｒｐ ＴＬＴについて、３７℃の条件での蛋白質の発現を確認した。ｐＢｔｒｐＴＬＴの単一コロニーを、２．５μｇ／ｍｌトリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地（Ｍ９最小培地、１％ グルコース、１ｍＭ $MgSO_4$、０．１ｍＭ $CaCl_2$、０．５％カザミノ酸、０．１ｍｇ／ｍｌ チアミン－塩酸、０．１ｍｇ／ｍｌ アンピシリン、１００ｍＭ Ｈｅｐｅｓ）にうえつけ、３７℃にて一夜培養した。翌日新しいＭ９ＣＡ培地に１／５０量うえ、$OD_{600}$＝０．５まで培養後、３β－インドールアクリル酸２０μｇ／ｍｌを添加し、更に３７℃にて１６時間培養した。培養終了後１ｍｌの菌体液を１．５ｍｌの遠心管に移し、遠心にて菌体を得た。この菌体を２００μｌのＳＤＳ ＰＡＧＥ用緩衝液にて溶解し、９０℃で５分熱処理を加え、１５％ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動した。泳動終了後、クマシブルーにて染色し、次いで脱色した。脱色後、ＬＫＢレーザースキャナーにて、全蛋白質当りのＴＬＴの発現量を測定したところ、３７℃の培養条件で、全蛋白質当り１０％のＴＬＴ蛋白質（本発明ペプチド）の発現が確認された。これは、３７℃の培養条件では、リットル当り１０～２０ｍｇの蛋白質量に相当する。

（７）蛋白質の生産および精製：

ｐＢｔｒｐ ＴＬＴを、２．５μｇ／ｍｌ トリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地 ２００ｍｌにて一夜培養し、この培養液を７ｌのＭ９ＣＡ培地に接種し、$OD_{600}$＝０．５まで３７℃にて培養した。その後、３β－インドールアクリル酸を最終濃度２０μｇ／ｍｌ

になるように加え、更に１６時間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。

得られた菌体 １６．９２ｇ／ｗｅｔ（３．５１分）を３０ｍＭ ＮａＣｌ及び０．１ｍＭ ｐ－ＡＰＭＳＦを含む５０ｍＭ トリス塩酸（ｐＨ ８．０）１２０ｍｌに懸濁し、この懸濁液を高圧ホモジナイザー（ＲＡＮＮＩＥ社）に６０００ｐ．ｓ．ｉで３回通し、菌体を破壊した。更に１２０ｍｌの同一緩衝液にて高圧ホモジナイザー内を洗浄し、この回収液と破壊液を遠心分離し、粗抽出液を得た。

この粗抽出液２５０ｍｌに最終濃度として０．１％になるようにポリエチレンイミンを添加し、４℃にて１０分撹拌後、遠心分離を行い、除核酸を行なった。上清２３５ｍｌを回収し、硫酸アンモニウムを５０％飽和となるように添加後、４℃にて４時間撹拌後、遠心分離を行い、沈澱として粗蛋白を得た。この粗蛋白を５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．４）４５ｍｌにて溶解後、同緩衝液で透析した。更に遠心分離後、不溶性蛋白を除去し、その上清６４．５ｍｌを回収した。この上清を５０℃にて１０分熱処理に付し、沈澱する蛋白を除去した。その回収液 ６３．５ｍｌをあらかじめ５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）で平衡化したＤＥＡＥ セファローズ ファスト フロー（ファルマシアＬＫＢ社）のカラムに付し、５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ ７．４）で溶出させた。

この溶出液（素通り分画）２５０ｍｌをｐＨ７．０に調整した。得られた蛋白質溶液を５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて平衡化したＣＭ セファローズ ファスト フロー（ファルマシアＬＫＢ社）のカラムに吸着させ、５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて洗浄後、ＮａＣｌを含む５ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）にて段階的濃度勾配により溶出した。ペプチドを含む分画を回収し、リン酸緩衝液に対し透析後、Ｌ９２９試験により活性を求め、各精製過程における比活性および回収率を求めた。なお、蛋白質定量は、バイオラッド社製プロテイン・アッセイ・システムを用いて測定し

た。 この結果を第３表に示す。

# 第 3 表

| | 総液量 (ml) | 蛋白濃度 (mg/ml) | 総蛋白質量 (mg) | LTの生物活性 (u/ml) | 総生物活性 (u) | 収 率 (%) | 比 活 性 (mg) | 精製度 (倍) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 細胞破壊液 | 250 | 5.5 | 1375 | $4.3\times10^{7}$ | $1\times10^{10}$ | 100 | $7.8\times10^{6}$ | 1 |
| 0.1% ポリエチレンイミン処理 | 235 | 5.65 | 1328 | $4.55\times10^{7}$ | $1\times10^{10}$ | 100 | $8\times10^{6}$ | 1.02 |
| 50%硫安 透析後 | 64.5 | 6.2 | 400 | $1.4\times10^{8}$ | $9\times10^{10}$ | 90 | $2.25\times10^{7}$ | 2.9 |
| 50℃熱処理後 | 63.5 | 5.9 | 375 | $1.4\times10^{8}$ | $8.9\times10^{9}$ | 89 | $2.37\times10^{7}$ | 3 |
| DEAE ファストフロー分取後 | 250 | 0.15 | 37.5 | $3.6\times10^{7}$ | $9\times10^{9}$ | 90 | $2.4\times10^{8}$ | 31 |
| CM分取後 | 94 | 0.29 | 27.25 | $7.79\times10^{7}$ | $7.32\times10^{9}$ | 73 | $2.69\times10^{8}$ | 34 |

（８）精製した蛋白質の純度検定：

精製した蛋白質２μｇを１５％ ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動後、クマシブルーにて染色し、脱色したのち、ＬＫＢレーザースキャナーにて純度検定した。 その結果、本発明ペプチドは、純度９５％以上で回収されていた。

実 施 例 ４

（１） ｔｒｐプロモーター及びＭＬＴ構造遺伝子の単離

ｐＢｔｒｐＭＬＴプラスミドＤＮＡを制限酸素ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄⅢにて切断後、１％低融点アガロース・ゲルで泳動し、ＥｔＢｒ染色後、６２９ｂｐのフラグメント（遺伝子１１）を得た。 この塩基配列及びこれがコードする本発明ペプチドを第４図に示す。

（２） ｐｕｃ９ベクターの切断回収

ｐｕｃ９ ２μｇ（ファルマシアＬＫＢ社）を制限酸素ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄⅢにて切断後、０.８％ 低融点アガロース・ゲルにて泳動し、ＥｔＢｒ染色後、目的の２.７ＫｂからなるプラスミドＤＮＡを得た（遺伝子１２）。

（３）ｔｒｐプロモーターを保有し、かつ、ＭＬＴを保有するプラスミドの構築

遺伝子１１と遺伝子１２にＴ４ＤＮＡリガーゼを作用させ、ＭＬＴの遺伝子を有するプラスミド（p9trpMLT）を得た。更に、－７０℃で凍結保存しておいた形質転換用ＨＢ １０１株菌体を融解し、この懸濁液１００ μｌに、ｐ９ｔｒｐ ＭＬＴを２０ｎｇ添加した。氷冷４５分反応後、４２℃で９０秒間ヒートショックを与え、２分氷冷したＳＯＣ培地９００μｌを添加し、３７℃で１時間培養後、懸濁液を０.１ｍｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ寒天培地プレート上にまき、３７℃で一夜培養し、遺伝子１１、１２を有する形質転換体を得た。 この形質転換体からＤＮＡを分離し、制限酵素ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄⅢ で切断した後、１％アガロースゲルにて泳動させ、ＥｔＢｒ染色にて６２９ｂｐのフラグメントを確認した

（遺伝子１１）。

（４）ｐ９ｔｒｐ ＭＬＴの発現

ｐ９ｔｒｐ ＬＴの、３７℃の条件での蛋白質の発現を確認した。ｐ９ｔｒｐ ＭＬＴの単一コロニーを、２.５μｇ／ｍｌトリプトファンを含有するＭ９ＣＡ培地（Ｍ９最少培地、１％ グルコース、１ｍＭ $MgSO_4$、０.１ｍＭ $CaCl_2$、０.５％ カザミノ酸、０.１ｍｇ／ｍｌ チアミン－ＨＣｌ、０.１ｍｇ／ｍｌ アンピシリン、１００ｍＭ Ｈｅｐｅｓ）にうえつけ、３７℃にて一夜培養した。翌日、新しいＭ９ＣＡ培地に１／５０量うえ、$OD_{600}$＝０.５まで培養後、３β－インドールアクリル酸２０μｇ／ｍｌを添加し、更に ３７℃にて１６時間培養した。培養終了後１ｍｌの菌体液を１.５ｍｌの遠心管に移し、遠心にて菌体を得た。この菌体を２００μｌのＳＤＳ ＰＡＧＥ緩衝液にて溶解し、９０℃で５分間熱処理を加え、１５％ ＳＤＳ ＰＡＧＥにて泳動した。泳動終了後、クマシブルーにて染色し、次いで脱色した。脱色後、ＬＫＢレーザースキャナーにて、全蛋白質当りのＭＬＴ発現量を測定した所、３７℃の培養条件では、全蛋白質当り１０％のＭＬＴ蛋白質の発現が確認された。これは、３７℃の培養条件では、１当り１０～２０mgの蛋白質量に相当する。

（５）活性の測定

（４）にて発現を確認した培養液の残り１ｍｌを遠心にて分離し、菌体を１ｍｌのＰＢＳ（－）緩衝液に懸濁し、１０分間超音波処理おこなったのち、遠心分離により、蛋白質上清を得た。この蛋白質上清を０.２２ミクロンのフィルターを通した後、Ｌ９２９細胞障害性試験を行なった所、菌体液１ｍｌ当り$1\times10^6$ｕｎｉｔ／ｍｌの活性が確認された。

参 考 例

（１）ヒトリンホトキシンＤＮＡを含むファージの単離：

（ａ）フィルター上へのファージの固定

ヒトリンパ細胞ＤＮＡライブラリー（ＥＭＢＬ３ファージ）を大腸菌ＮＭ５３８を用いてＬＢプレート２０枚に各３×１０$^{4}$ＰＦＵまき、３７℃で一夜培養後、ＢＡ８５ニトロセルロースフィルター１３２φ（Ｓ＆Ｓ社）へファージを転写した。この転写したフィルター上のファージを１.５Ｍ 塩化ナトリウム、０.５Ｍ 水酸化ナトリウム溶液で変性し、更にこのフィルターを１.５Ｍ 塩化ナトリウム、０.５Ｍトリス塩酸緩衝液（ｐＨ ８.０）で中和した。中和後、８０℃にて、２時間真空乾燥することによりファージＤＮＡをフィルター上に固定した［Ｍａｎｉａｔｉｓ Ｔ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ，ｐ３２１（１９８２）］。

（ｂ）プローブの作成

既に報告されているリンホトキシン遺伝子の塩基配列［Ｇｒａｙ，Ｎａｔｕｒｅ，ｐ３１２，７２１（１９８４）］の一部である

(1) 5'－ＡＴＧＡＣＡＣＣＡＣＣＴＧＡＡＣＧＴＣＴＣ

(2) 3'－ＣＣＴＣＧＧＡＡＧＣＧＡＧＡＣＡＴＣ

のオリゴデオキシヌクレオチドを、アミダイト法によりＤＮＡ合成装置を用いて合成し、ヒトゲノムリンホトキシンのプローブとした。

プローブの標識は、これらのオリゴデオキシヌクレオチドを最終濃度で１００ｐｍｏｌとなるように１００ｍＭ トリス塩酸緩衝液（ｐＨ ８.０）、１０ｍＭ 塩化マグネシウム、５ｍＭ ＤＴＴ、１.８５ＭＢｑ（$\gamma$－$^{32}$Ｐ）ＡＴＰ、５ｕｎｉｔ Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼからなる溶液３０$\mu$ｌ中に加え、３７℃で、４５分間反応させてリン酸化し、更に、酵素を失活させるため、６５℃、１０分間処理することにより行なった。

（ｃ）目的ファージの検出

上記（ｂ）によりラベルしたプローブを前記（ａ）のＤＮＡを固定したフィルターに別々に会合させた。この会合反応は、２７７.５ＫＢｑラベルプローブを含む６倍濃度のＳＳＣ（０.１５Ｍ 塩化ナトリウム-０.０１５Ｍ クエン酸ナトリウム）、５倍濃度のデン

ハート液（Ｄｅｎｈａｒｄｔ's）、０.１％ ＳＤＳ、２００μｇ／ｍｌ 変性サケ精子ＤＮＡからなる溶液２００ｍｌ中にフィルターを、４８℃で１６時間浸漬し、反応後フィルターを６×ＳＳＣ－０.１％ ＳＤＳ溶液に４０℃で１５分間ずつ３回浸漬して洗浄し、更に０.２×ＳＳＣ－０.１％ ＳＤＳ溶液に５０℃で３回浸漬して洗浄した。

洗浄したフィルターよりラジオオートグラムをとり、プローブに対して反応するプラークを１組２枚のレプリカフィルターのラジオオートグラムを重ね合わせる事により探した。この方法により、６×１０$^{5}$個のプラークより、プローブに対して反応する２種のＥＭＢＬ３ファージを得た。

（２）ヒトリンホトキシンＤＮＡ断片の単離：

これらのファージより、ファージＤＮＡをグリセロールステップグラジエント法［Ｍａｎｉａｔｉｓ Ｔ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ，ｐ８３（１９８２）］により抽出精製した。

得られたＤＮＡを制限酵素ＥｃｏＲＩ（東洋紡社製）で切断し、０.５％アガロースゲル電気泳動で分離した後、サザンブロット法により、ＤＮＡ断片をアガロースゲル中からＢＡ８５ニトロセルロースフィルター（Ｓ＆Ｓ社）上に転写した。このフィルターに（１）で用いたプローブを会合させ、反応した２.４ｋｂのＤＮＡ断片を得た。このＤＮＡ断片には、ヒトリンホトキシンのシグナルペプチド部分から終止コドンまでが完全に含まれていた。

（３）ヒトリンホトキシン構造遺伝子の作成：

（ａ）遺伝子ａの調製

上記のようにして回収したＤＮＡ断片を、制限酵素ＲｓｒⅡ（ＮＥＢ社）で切断し、リンホトキシン遺伝子のエクソン４の一部を含む５２８ｂｐのＤＮＡ断片（以下、遺伝子ａという）を分離した。

この遺伝子を次に示す。

```
                                    5'-GACCGTGCCTTCCTCCAG
                                    3'-    GCACGGAAGGAGGTC

    GATGGTTTCTCCTTGAGCAACAATTCTCTCCTGGTCCCCACCAG
    CTACCAAAGAGGAACTCGTTGTTAAGAGAGGACCAGGGGTGGTC
5
    TGGCATCTACTTCGTCTACTCCCAGGTGGTCTTCTCTGGGAAAG
    ACCGTAGATGAAGCAGATGAGGGTCCACCAGAAGAGACCCTTTC

    CCTACTCTCCCAAGGCCACCTCCTCCCCACTCTACCTGGCCCAT
    GGATGAGAGGGTTCCGGTGGAGGAGGGGTGAGATGGACCGGGTA
10
    GAGGTCCAGCTCTTCTCCTCCCAGTACCCCTTCCATGTGCCTCT
    CTCCAGGTCGAGAAGAGGAGGGTCATGGGGAAGGTACACGGAGA

    CCTCAGCTCCCAGAAGATGGTGTATCCAGGGCTGCAGGAACCCT
    GGAGTCGAGGGTCTTCTACCACATAGGTCCCGACGTCCTTGGGA
15
    GGCTGCACTCGATGTACCACGGGGCTGCGTTCCAGCTCACCCAG
    CCGACGTGAGCTACATGGTGCCCCGACGCAAGGTCGAGTGGGTC

    GGAGACCAGCTATCCACCCACACAGATGGCATCCCCCACCTAGT
    CCTCTGGTCGATAGGTGGGTGTGTCTACCGTAGGGGGTGGATCA

20  CCTCAGCCCTAGTACTGTCTTCTTTGGAGCCTTCGCTCTGTAGA
    GGAGTCGGGATCATGACAGAAGAAACCTCGGAAGCGAGACATCT

    ACTTGGAAAAATCCAGAAAGAAAAAATAATTGATTTCAAGACCT
    TGAACCTTTTTAGGTCTTTCTTTTTTATTAACTAAAGTTCTGGA

    TCTCCCCATTCTGCCTCCATTCTGACCATTTCAGGGGTCGTCAC
25  AGAGGGGTAAGACGGAGGTAAGACTGGTAAAGTCCCCAGCAGTG

    CACCTCTCCTTTGGCCATTCCAACAGCTCAAGTCTTCCCTGATC
    GTGGAGAGGAAACCGGTAAGGTTGTCGAGTTCAGAAGGGACTAG
```

AAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGG
TTCAGTGGCCTCGAAAGTTTCTTCCTTAA

（ｂ）遺伝子ｂの調製

また、リンホトキシン遺伝子のエクソン３とエクソン４の残りは、ＤＮＡ合成装置を用いて有機合成した下記(1)～(12)の１２本のオリゴデオキシヌクレオチドを用いて合成した。

(1) 5'－ＡＡＴＴＣＡＴＧＣＴＣＣＣＴＧＧＴＧＴＴＧＧ

(2) 3'－ＧＴＡＣＧＡＧＧＧＡＣＣＡＣＡＡＣＣＧＧＡＧＴＧ
ＴＧ

(3) 5'－ＣＣＴＣＡＣＡＣＣＴＴＣＡＧＣＴＧＣＣＣＡＧＡＣ
Ｔ

(4) 3'－ＧＡＡＧＴＣＧＡＣＧＧＧＴＣＴＧＡＣＧＧＧＣＡＧ
Ｔ

(5) 5'－ＧＣＣＣＧＴＣＡＧＣＡＣＣＣＣＡＡＧＡＴＧＣＡＴ
ＣＴＴＧＣＣ

(6) 3'－ＣＧＴＧＧＧＧＴＴＣＴＡＣＧＴＡＧＡＡＣＧＧＧＴ
ＧＴＣＧＴＧ

(7) 5'－ＣＡＣＡＧＣＡＣＣＣＴＣＡＡＡＣＣＴＧＣＴＧＣＴ
Ｃ

(8) 3'－ＧＧＡＧＴＴＴＧＧＡＣＧＡＣＧＡＧＴＧＧＡＧＴＡ
Ａ

(9) 5'－ＡＣＣＴＣＡＴＴＧＧＡＧＡＣＣＣＣＡＧＣＡＡＧＣ
ＡＧ

(10) 3'－ＣＣＴＣＴＧＧＧＧＴＣＧＴＴＣＧＴＣＴＴＧＡＧＴ
ＧＡ

(11) 5'－ＡＡＣＴＣＡＣＴＧＣＴＣＴＧＧＡＧＡＧＣＡＡＡＣ
ＡＣＧ

(12) 3'－ＣＧＡＧＡＣＣＴＣＴＣＧＴＴＴＧＴＧＣＣＴＧ

すなわち、上記のオリゴペプチド各８００ｐｍｏｌを滅菌水１５μｌに溶解し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ、４００ｍＭ ＡＴＰ、１０倍量のカイネーション緩衝液を加えて５０μｌとし、３７℃で２時間反応させた。その後、６５℃で１０分間の処理により、酵素を失活させ、１２本のオリゴデオキシヌクレオチドを１本のチューブにまとめ、濃縮後、セファデックスＧ５０ゲル濾過カラム（ファルマシアＬＫＢ社）を用いて、脱塩、未反応のリン酸を処理した。脱塩回収後、更に濃縮し、アニーリング緩衝液５０μｌに溶解後、９０℃３分間反応させ、ゆっくり冷却した。これに、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ２０００単位（宝酒造社製）と等量のライゲーション緩衝液を入れ、１６℃、一夜反応を行った。

反応終了後、５％アクリルアミドゲル電気泳動に付し、エチジウムブロマイド染色の後、１５８ｂｐのＤＮＡ断片（以下、遺伝子ｂという）をゲルごと切り出し、溶出緩衝液で溶出させ、セファデックスＧ２５ゲル濾過カラム（ファルマシアＬＫＢ社）を用い脱塩し濃縮した。

この遺伝子ｂを次に示す。

```
5'-AATTCATGCTCCCTGGTGTTGGCCTCACACCTTCAGCTGCC
3'-     GTACGAGGGACCACAACCGGAGTGTGGAAGTCGACGG

CAGACTGCCCGTCAGCACCCCAAGATGCATCTTGCCCACAGCAC
GTCTGACGGGCAGTCGTGGGGTTCTACGTAGAACGGGTGTCGTG

CCTCAAACCTGCTGCTCACCTCATTGGAGACCCCAGCAAGCAGA
GGAGTTTGGACGACGAGTGGAGTAACCTCTGGGGTCGTTCGTCT

ACTCACTGCTCTGGAGAGCAAACACG
TGAGTGACGAGACCTCTCGTTTGTGCCTG
```

（ｃ）遺伝子ａおよび遺伝子ｂの結合並びにその増幅

ブルースクリプトＭ１３ＫＳ（＋）ベクター（東洋紡社）を制限

酵素ＥｃｏＲＩで切断し、更に、5'末端のリン酸をアルカリ性ホスファターゼで処理して除去した後、これと前記の様にして調製した遺伝子ａおよび遺伝子ｂの混合物にＴ４ＤＮＡリガーゼを作用させて、ヒトリンホトキシンの構造遺伝子を有するプラスミド１（ブルースクリプトＭ１３ＫＳ（＋）－遺伝子ａ－遺伝子ｂ）を得た。

更に、－７０℃で凍結保存しておいた形質転換用大腸菌ＸＬ１ブルー株菌体を融解し、この懸濁液１００μｌにプラスミド１を２０ｎｇ添加した。氷冷下で４５分間反応させた後、４２℃で９０秒間ヒートショックを与え、更に２分間氷冷した。これにＳＯＣ培地９００μｌを添加し、３７℃で１時間培養後、懸濁液を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ寒天培地プレート上にまき、３７℃で一夜培養し、遺伝子ａおよびｂを有する形質転換体（形質転換体ａ－ｂ）を得た。次に、この形質転換体からブルースクリプトＭ１３ＫＳ（＋）－遺伝子ａ－遺伝子ｂを分離し、制限酵素ＥｃｏＲⅡで切断した後、低融点寒天電気泳動により、遺伝子ａと遺伝子ｂが結合した、６８７ｂｐのヒトリンホトキシン構造遺伝子（以下、遺伝子ａ－ｂという）を分離回収した。

（４）修飾リンホトキシンの構築：

（ａ）構造遺伝子断片の調製

上記（３）で得られた遺伝子ａ－ｂを制限酵素ＰｖｕⅡ（東洋紡社）で切断し、６５３ｂｐのＤＮＡ断片（以下、遺伝子ｃという）を得た。

この遺伝子ｃを次に示す。

5'-CTGCC

3'-GACGG

CAGACTGCCCGTCAGCACCCCAAGATGCATCTTGCCCACAGCAC
GTCTGACGGGCAGTCGTGGGGTTCTACGTAGAACGGGTGTCGTG

CCTCAAACCTGCTGCTCACCTCATTGGAGACCCCAGCAAGCAGA
GGAGTTTGGACGACGAGTGGAGTAACCTCTGGGGTCGTTCGTCT

ACTCACTGCTCTGGAGAGCAAACACGGACCGTGCCTTCCTCCAG
TGAGTGACGAGACCTCTCGTTTGTGCCTGGCACGGAAGGAGGTC

GATGGTTTCTCCTTGAGCAACAATTCTCTCCTGGTCCCCACCAG
CTACCAAAGAGGAACTCGTTGTTAAGAGAGGACCAGGGGTGGTC

TGGCATCTACTTCGTCTACTCCCAGGTGGTCTTCTCTGGGAAAG
ACCGTAGATGAAGCAGATGAGGGTCCACCAGAAGAGACCCTTTC

CCTACTCTCCCAAGGCCACCTCCTCCCCACTCTACCTGGCCCAT
GGATGAGAGGGTTCCGGTGGAGGAGGGGTGAGATGGACCGGGTA

GAGGTCCAGCTCTTCTCCTCCCAGTACCCCTTCCATGTGCCTCT
CTCCAGGTCGAGAAGAGGAGGGTCATGGGGAAGGTACACGGAGA

CCTCAGCTCCCAGAAGATGGTGTATCCAGGGCTGCAGGAACCCT
GGAGTCGAGGGTCTTCTACCACATAGGTCCCGACGTCCTTGGGA

GGCTGCACTCGATGTACCACGGGGCTGCGTTCCAGCTCACCCAG
CCGACGTGAGCTACATGGTGCCCCGACGCAAGGTCGAGTGGGTC

GGAGACCAGCTATCCACCCACACAGATGGCATCCCCCACCTAGT
CCTCTGGTCGATAGGTGGGTGTGTCTACCGTAGGGGGTGGATCA

CCTCAGCCCTAGTACTGTCTTCTTTGGAGCCTTCGCTCTGTAGA
GGAGTCGGGATCATGACAGAAGAAACCTCGGAAGCGAGACATCT

ACTTGGAAAAATCCAGAAAGAAAAAATAATTGATTTCAAGACCT
TGAACCTTTTTAGGTCTTTCTTTTTTATTAACTAAAGTTCTGGA

TCTCCCCATTCTGCCTCCATTCTGACCATTTCAGGGGTCGTCAC
AGAGGGGTAAGACGGAGGTAAGACTGGTAAAGTCCCCAGCAGTG

CACCTCTCCTTTGGCCATTCCAACAGCTCAAGTCTTCCCTGATC
GTGGAGAGGAAACCGGTAAGGTTGTCGAGTTCAGAAGGGACTAG

AAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGG
TTCAGTGGCCTCGAAAGTTTCTTCCTTAA

次に、先頭にＥｃｏＲＩサイトを有し、かつ開始コドンとしてＡＴＧを有するよう設計した次の２本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端をリン酸化した。

(1)　5'－ＡＡＴＴＣＡＴＧＡＡＴＴＡＣＧＡＧＴＴＣＣ

(2)　3'－ＧＴＡＣＴＴＡＡＴＧＣＴＣＡＡＧＧ

その後、このオリゴヌクレオチドを脱塩濃縮し、アニーリング緩衝液に溶解し、９０℃で３分間処理した後、徐冷、アニールさせて遺伝子ｄを得た。

この遺伝子ｄを次に示す。

5'－AATTCATGAATTACGAGTTCC
3'－　　GTACTTAATGCTCAAGG

（ｂ）構造遺伝子の調製および増幅

ブルースクリプトＭ１３ＫＳ（＋）ベクター（東洋紡社）を制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し、5'末端のリン酸をアルカリ性ホスファターゼで処理して除去した後、これと遺伝子ｃおよび遺伝子ｄを混合し、Ｔ４ＤＮＡリガーゼを作用させて、遺伝子ｃおよび遺伝子ｄを有するプラスミド２（ブルースクリプトＭ１３ＫＳ（＋）－遺伝子ｃ－遺伝子ｄ）を得た。

更に、あらかじめ－７０℃で凍結保存しておいた形質転換用大腸菌ＸＬ１ブルー株菌体を融解し、この懸濁液１００μｌにプラスミド２を２０ｎｇ添加した。氷冷下で４５分間反応させた後、４２℃で９０秒間ヒートショックを与え、更に２分間氷冷した。これにＳＯＣ培地９００μｌを添加し、３７℃で一時間培養後、懸濁液を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ寒天培地プレート上

にまき、３７℃で１夜培養した。その結果、遺伝子ｃおよび遺伝子ｄを有する形質転換体（形質転換体ｃ－ｄ）を得た。次に、この形質転換体ｃ－ｄからブルースクリプトＭ１３ＫＳ（＋）－遺伝子ｃ－遺伝子ｄを分離し、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断した後、低融点寒天電気泳動で、遺伝子ｃと遺伝子ｄが結合した６７３ｂｐの構造遺伝子（修飾リンホトキシン構造遺伝子；遺伝子ｃ－ｄ）を分離回収した。

この遺伝子ｃ－ｄは、第１０図に示されるものであった。

5'－AATTCATGAATTACGAGTTCCCTGCC
3'－　　GTACTTAATGCTCAAGGGACGG

CAGACTGCCCGTCAGCACCCCAAGATGCATCTTGCCCACAGCAC
GTCTGACGGGCAGTCGTGGGGTTCTACGTAGAACGGGTGTCGTG

CCTCAAACCTGCTGCTCACCTCATTGGAGACCCCAGCAAGCAGA
GGAGTTTGGACGACGAGTGGAGTAACCTCTGGGGTCGTTCGTCT

ACTCACTGCTCTGGAGAGCAAACACGGACCGTGCCTTCCTCCAG
TGAGTGACGAGACCTCTCGTTTGTGCCTGGCACGGAAGGAGGTC

GATGGTTTCTCCTTGAGCAACAATTCTCTCCTGGTCCCCACCAG
CTACCAAAGAGGAACTCGTTGTTAAGAGAGGACCAGGGGTGGTC

TGGCATCTACTTCGTCTACTCCCAGGTGGTCTTCTCTGGGAAAG
ACCGTAGATGAAGCAGATGAGGGTCCACCAGAAGAGACCCTTTC

CCTACTCTCCCAAGGCCACCTCCTCCCCACTCTACCTGGCCCAT
GGATGAGAGGGTTCCGGTGGAGGAGGGGTGAGATGGACCGGGTA

GAGGTCCAGCTCTTCTCCTCCCAGTACCCCTTCCATGTGCCTCT
CTCCAGGTCGAGAAGAGGAGGGTCATGGGGAAGGTACACGGAGA

CCTCAGCTCCCAGAAGATGGTGTATCCAGGGCTGCAGGAACCCT
GGAGTCGAGGGTCTTCTACCACATAGGTCCCGACGTCCTTGGGA

GGCTGCACTCGATGTACCACGGGGCTGCGTTCCAGCTCACCCAG
CCGACGTGAGCTACATGGTGCCCCGACGCAAGGTCGAGTGGGTC

GGAGACCAGCTATCCACCCACACAGATGGCATCCCCCACCTAGT
CCTCTGGTCGATAGGTGGGTGTGTCTACCGTAGGGGGTGGATCA

CCTCAGCCCTAGTACTGTCTTCTTTGGAGCCTTCGCTCTGTAGA
GGAGTCGGGATCATGACAGAAGAAACCTCGGAAGCGAGACATCT

ACTTGGAAAAATCCAGAAAGAAAAAATAATTGATTTCAAGACCT
TGAACCTTTTTAGGTCTTTCTTTTTTATTAACTAAAGTTCTGGA

TCTCCCCATTCTGCCTCCATTCTGACCATTTCAGGGGTCGTCAC
AGAGGGGTAAGACGGAGGTAAGACTGGTAAAGTCCCCAGCAGTG

CACCTCTCCTTTGGCCATTCCAACAGCTCAAGTCTTCCCTGATC
GTGGAGAGGAAACCGGTAAGGTTGTCGAGTTCAGAAGGGACTAG

AAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGG
TTCAGTGGCCTCGAAAGTTTCTTCCTTAA

（５） 修飾リンホトキシン発現ベクターの調製：

発現ベクターｐｋｋ２２３－３ベクター（ファルマシアＬＫＢ社製）を制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し、5'末端のリン酸をアルカリ性ホスファターゼで処理して除去した後、これに上記の遺伝子ｃ－ｄとＴ４ＤＮＡリガーゼとを作用させて、修飾リンホトキシンの構造遺伝子を有するプラスミド３（ｐｋｋ２２３－３－ＭＬＴ ＤＮＡ）を得た。

試 験 例 1

１０％ＦＣＳを含むＭＥＭ培地に、Ｌ９２９細胞を$2\times10^5$細胞／ｍｌの濃度になるように懸濁し、これを９６穴プレートに１００μｌずつ分注し、３７℃で５時間培養した。次いで、あらかじめ１０倍段階希釈した本発明のペプチド１０μｌおよびアクチノマイシンＤ（２．５μｇ／ｍｌ）１０μｌを添加し、３７℃で１８時間培養した。更に、ＭＴＴ（５ｍｇ／ｍｌ）２０μｌを添

加し、３７℃で５時間培養した後、１０％ＳＤＳ－０.０１規定塩酸　１００μｌを添加して、更に３７℃で１８時間インキュベートし、細胞を溶解した。溶解後５４０～６９０ｎｍの吸光度をタイターチェックマルチスキャン（フローラボラトリー社）で測定し、Ｌ９２９細胞の生存を確認した。

Ｌ９２９細胞の５０％死滅させるのに必要な生物活性量を１単位と定義し、本発明のペプチドの抗腫瘍活性を求めたところ、そのペプチドの抗腫瘍活性は$9.48\times10^{7}$単位／ｍｇであった。

試　験　例　２

大腸菌体内から精製したリンホトキシン（組換えリンホトキシン）および本発明のペプチドについて、４℃における安定性を以下のように実験を行った。

すなわち、組換えリンホトキシン５５０μｇ／ｍｌおよび本発明のペプチド３１０μｇ／ｍｌの濃度の２種のサンプルを調製した。調製直後および２ヶ月後に、各サンプルについて１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて泳動を行い、染色および脱色をした後、ＬＫＢレーザースキャナーにて純度を計測した。

調製直後の泳動でのリンホトキシンおよび本発明のペプチドの純度は、リンホトキシン９５％以上、本発明のペプチド９５％であったが、４℃の状態で２ヶ月保存したリンホトキシンおよび本発明のペプチドのそれは、リンホトキシン０％、本発明のペプチド６０％の純度であった。

リンホトキシンは、本来、分子量１８,８００の蛋白質であるが、２ヶ月保存後の泳動による分析では、これが分子量１７,０００および１６,０００の蛋白質に分解し、分子量１８,８００のリンホトキシン蛋白質は存在しなかった。これに対し、本発明のペプチドは、分子量１８,０００の蛋白質であり、２ヶ月保存後はリンホトキシンと同様に分子量１７,０００および分子量１６,０００の分解物が確認されたが、本来の分子量１８,０００の本発明のペプチド

蛋白質も６０％存在していた。

このことから、本発明のペプチドは、リンホトキシンに比較して保存安定性に優れていることが確認された。

試 験 例 3

ＳＤ系雌性ラット（体重１９７～２１３ｇ）を２５％ウレタン５ｍｌ／ｋｇ腹腔内投与により麻酔し、背位に固定後、腹上部の皮膚を切開して頸静脈を見えるようにして約１０分おいてから実験した。

各蛋白質の投与および採血は、右頸静脈より行った。各蛋白質の投与量は２５０μｇ／ラットとした。ラットに投与した直後（０分）、５、１０、１５、２０、４０、６０および９０分後に、それぞれ約０.１５ｍｌ採血し、各採血時に血液を速やかにキャピラリー（ＤＲＵＭＭＯＮＤ社製、マイクロヘマトクリット用 長さ７５ｍｍ）２本に吸引し、遠心分離（ＫＵＢＯＴＡ ヘマトクリット ＫＨ－１２００Ｓを使用し、１２,０００ｒｐｍで、３分間遠心した）により血清を得た。この血清を段階希釈し、Ｌ９２９細胞障害性試験により、血中活性を調べた。

その結果、組換えリンホトキシンおよび本発明のペプチドはいずれも１２分であり、本発明ペプチドはリンホトキシンとほぼ同様な血中活性を維持することが確認された。

なお、上記実験中に血圧降下等の副作用は観察されず、また、別途測定した本発明ペプチドのＬＤ$_{50}$値は、１×１０$^{6}$ｕ／ｋｇ以上（マウス、静注）であり、安全性の高いことも確認された。

## 産 業 上 の 利 用 可 能 性

本発明によれば、従来１～２％程度しか発現が得られなかった天然ＬＴが、１０％以上発現させることが可能になった。

特に、天然リンホトキシンと高い相同性を有する、実施例１で得られるペプチド（本発明ペプチド）をコードする遺伝子をＬＴ構造遺伝子として利用すると ３７％の高濃度で発現させることが可能であった。

従って、本発明はＬＴを工業的に有利に製造し、臨床に使用する道を開くものであり、極めて有用なものである。

## 請　求　の　範　囲

１．開始コドンの１３塩基上流にＳＤ領域を有し、－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであり、リンホトキシン類をコードする遺伝子を除いた大きさが２．７～３．１ｋｂであるリンホトキシン類発現ベクター。

２．開始コドンの１３塩基上流にＳＤ領域を有し、－１０領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－３５領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであり、リンホトキシン類をコードする遺伝子を除いた大きさが２．７～３．１ｋｂであるリンホトキシン類発現ベクターで宿主微生物を形質転換し、得られた微生物を培養することを特徴とするリンホトキシン類の製造法。

３．培養を３β－インドールアクリル酸の存在下実施する請求項第２項記載のリンホトキシン類の製造法。

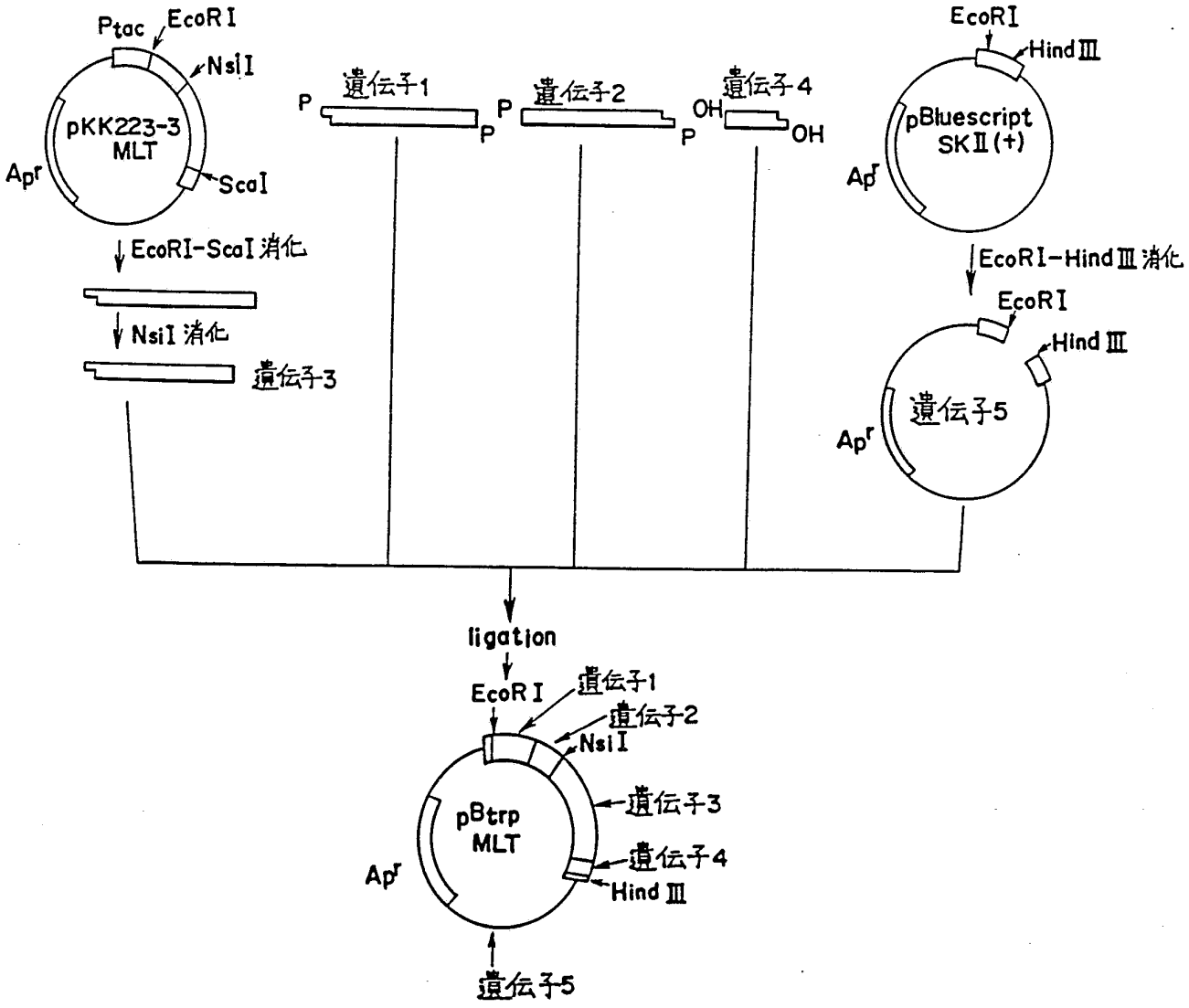
４．下記のアミノ酸配列

Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－Ｇｌｎ－
Ｔｈｒ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－
Ｍｅｔ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｈｉｓ－Ｓｅｒ－Ｔｈｒ－
Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－
Ｉｌｅ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－
Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｔｒｐ－Ａｒｇ－Ａｌａ－
Ａｓｎ－Ｔｈｒ－Ａｓｐ－Ａｒｇ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－
Ｇｌｎ－Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－
Ａｓｎ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－
Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－
Ｔｙｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ－Ｓｅｒ－
Ｇｌｙ－Ｌｙｓ－Ａｌａ－Ｔｙｒ－Ｓｅｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－
Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｈｉｓ－Ｇｌｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－
Ｐｈｅ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－

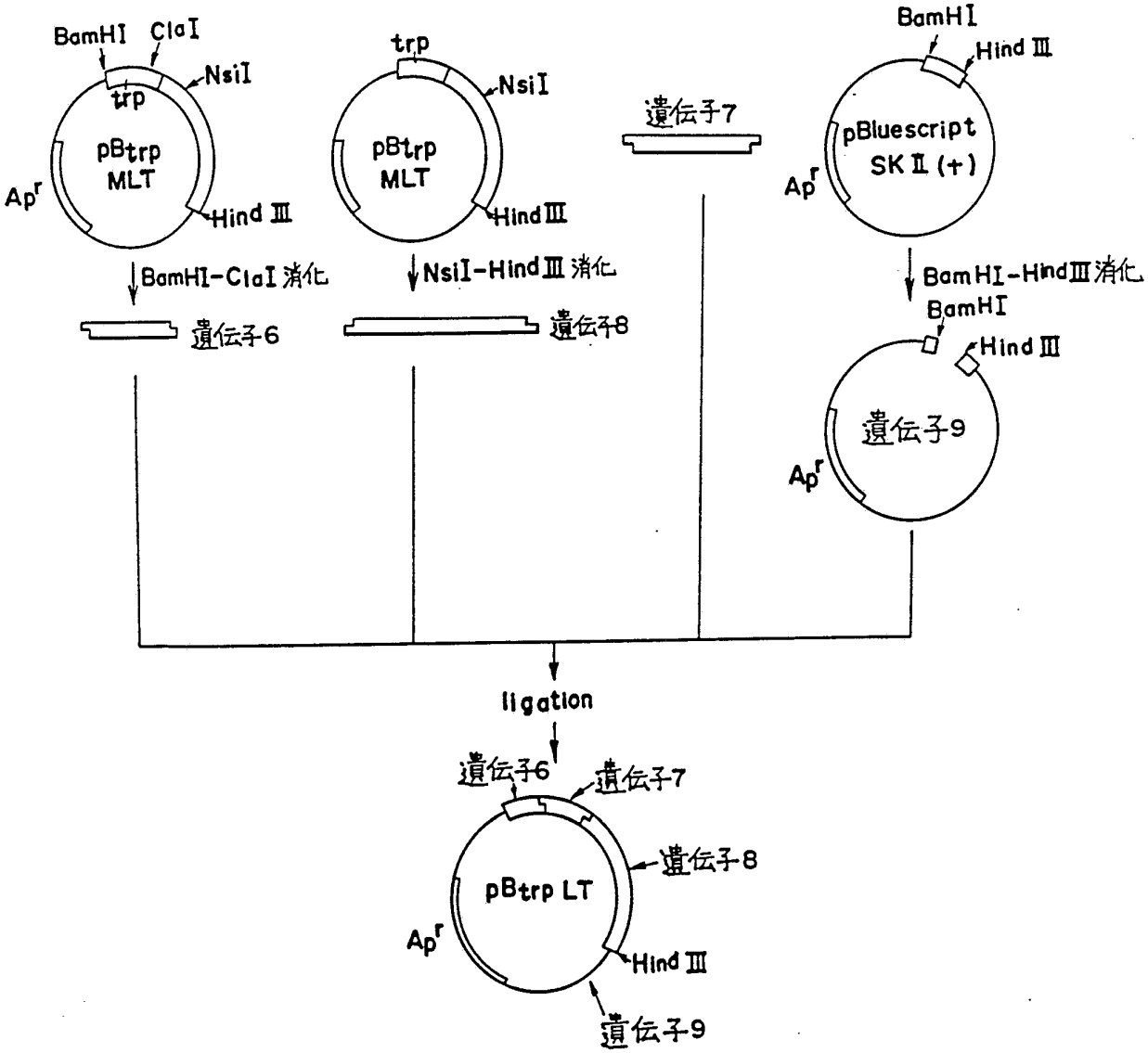
His-Val-Pro-Leu-Leu-Ser-Ser-
Gln-Lys-Met-Val-Tyr-Pro-Gly-
Leu-Gln-Glu-Pro-Trp-Leu-His-
Ser-Met-Tyr-His-Gly-Ala-Ala-
Phe-Gln-Leu-Thr-Gln-Gly-Asp-
Gln-Leu-Ser-Thr-His-Thr-Asp-
Gly-Ile-Pro-His-Leu-Val-Leu-
Ser-Pro-Ser-Thr-Val-Phe-Phe-
Gly-Ala-Phe-Ala-Leu

で表されるペプチド。

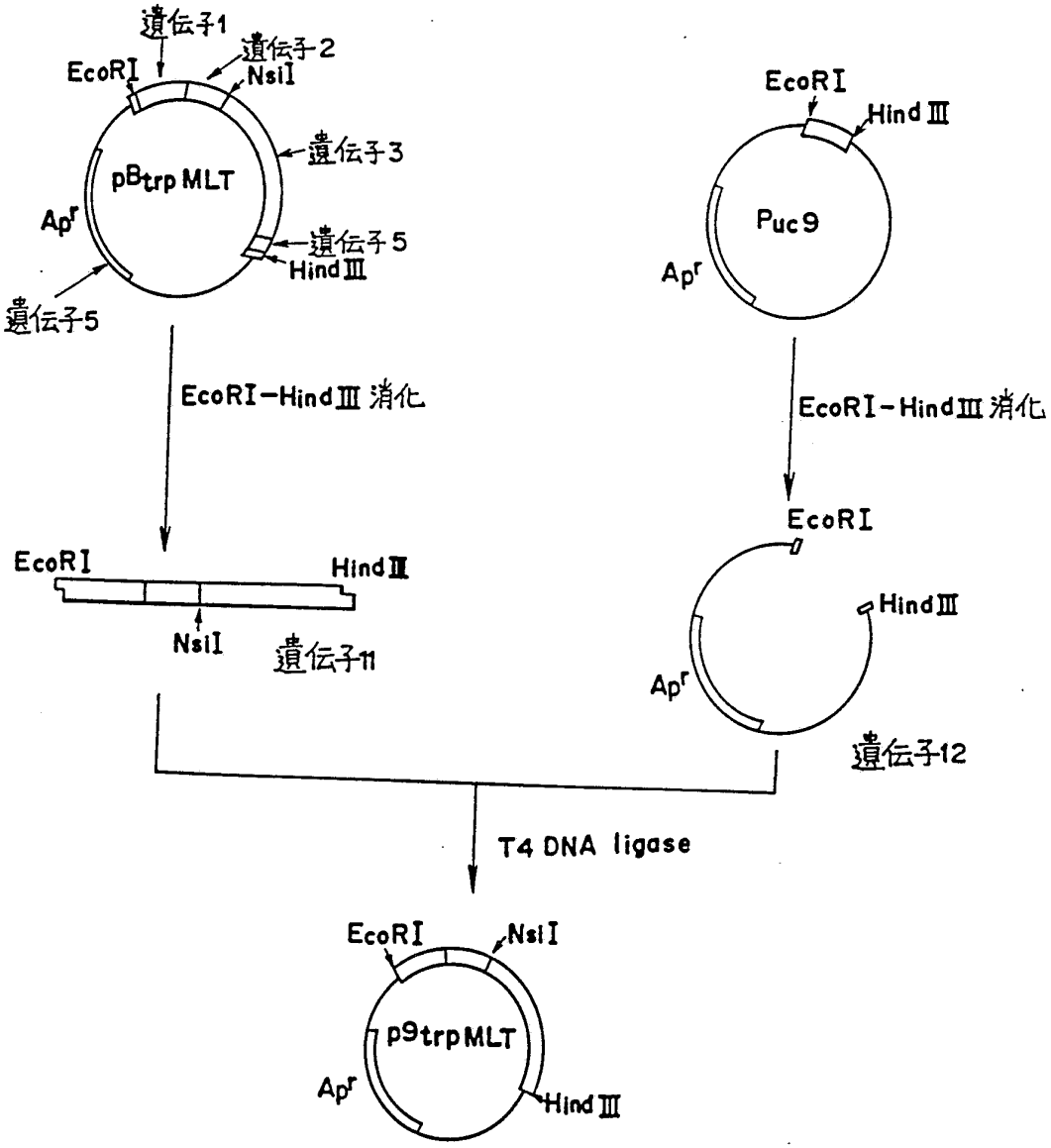
第 1 図


Ptac
EcoRI
NsiI
pKK223-3
MLT
Apr
ScaI
EcoRI-ScaI消化
NsiI消化
遺伝子3
P
遺伝子1
P
P
遺伝子2
P
OH
遺伝子4
OH
EcoRI
HindIII
pBluescript
SKII(+)
Apr
EcoRI-HindIII消化
EcoRI
HindIII
遺伝子5
Apr
ligation
EcoRI
遺伝子1
遺伝子2
NsiI
遺伝子3
遺伝子4
HindIII
pBtrp
MLT
Apr
遺伝子5

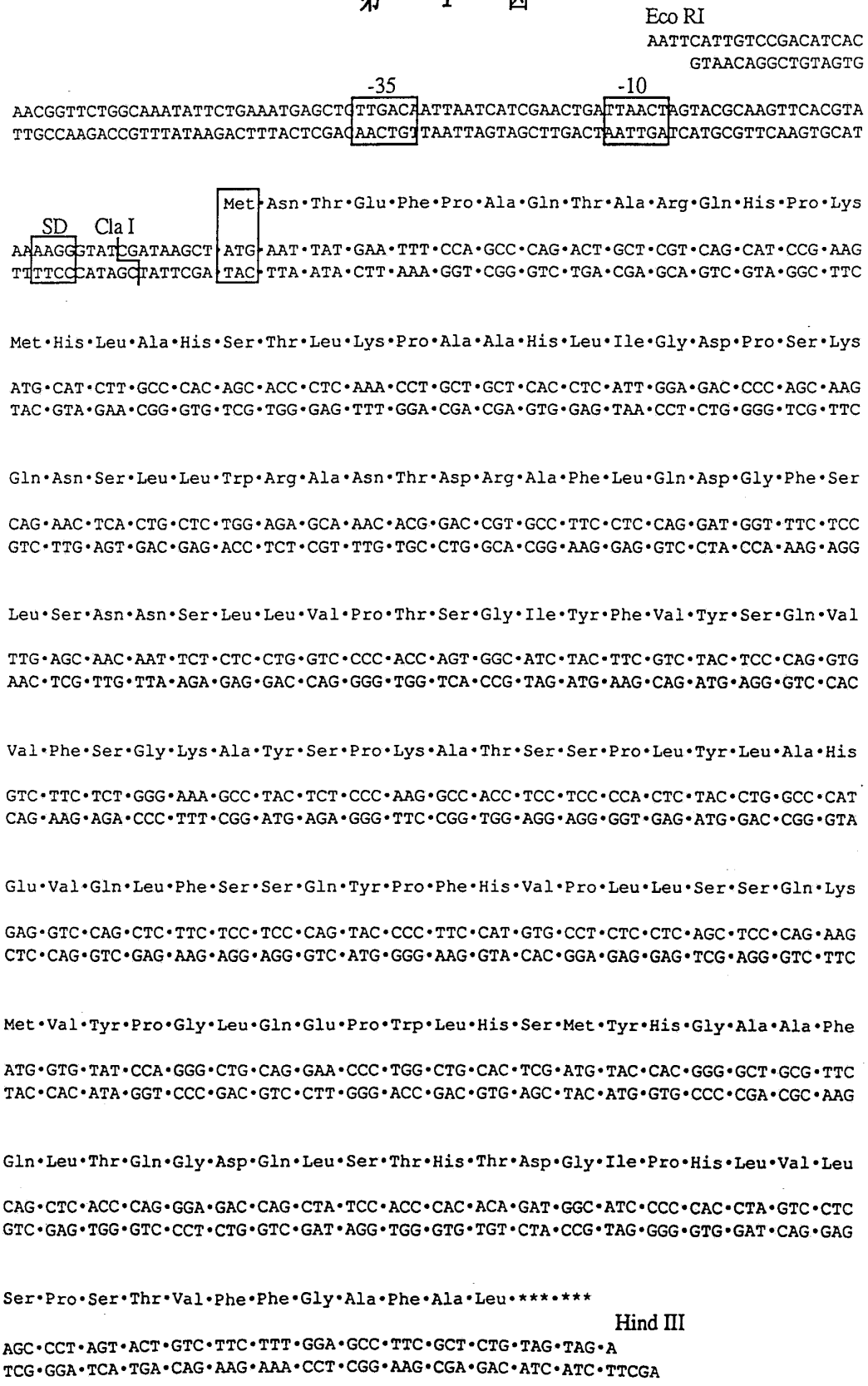
第 2 図


BamHI
ClaI
NsiI
trp
pBtrp MLT
Ap^r
Hind III
BamHI-ClaI 消化
遺伝子6
trp
NsiI
pBtrp MLT
Hind III
NsiI-Hind III 消化
遺伝子8
遺伝子7
BamHI
Hind III
pBluescript SK II (+)
Ap^r
BamHI-Hind III 消化
BamHI
Hind III
遺伝子9
Ap^r
ligation
遺伝子6
遺伝子7
遺伝子8
pBtrp LT
Ap^r
Hind III
遺伝子9

# 第 3 図


遺伝子1
遺伝子2
EcoRI
NsiI
遺伝子3
pBtrp MLT
Apr
遺伝子5
Hind III
遺伝子5
EcoRI
Hind III
Puc 9
Apr
EcoRI-Hind III 消化
EcoRI-Hind III 消化
EcoRI
Hind II
NsiI
遺伝子11
EcoRI
Hind III
Apr
遺伝子12
T4 DNA ligase
EcoRI
NsiI
p9trpMLT
Apr
Hind III

# 第 4 図


Eco RI
AATTCATTGTCCGACATCAC
GTAACAGGCTGTAGTG
-35
-10
AACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTGATTAACTAGTACGCAAGTTCACGTA
TTGCCAAGACCGTTTATAAGACTTTACTCGACAACTGTTAATTAGTAGCTTGACTAATTGATCATGCGTTCAAGTGCAT
Met
Asn·Thr·Glu·Phe·Pro·Ala·Gln·Thr·Ala·Arg·Gln·His·Pro·Lys
SD
Cla I
AAAAGGGTATCGATAAGCTATGAATTATGAAATTTCCAGCCCAGACTGCTCGTCAGCATCCGAAG
TTTTCCCATAGCTATTCGATACTTAATACTTTAAAGGTCGGGTCTGACGAGCAGTCGTAGGCTTC
Met·His·Leu·Ala·His·Ser·Thr·Leu·Lys·Pro·Ala·Ala·His·Leu·Ile·Gly·Asp·Pro·Ser·Lys
ATG·CAT·CTT·GCC·CAC·AGC·ACC·CTC·AAA·CCT·GCT·GCT·CAC·CTC·ATT·GGA·GAC·CCC·AGC·AAG
TAC·GTA·GAA·CGG·GTG·TCG·TGG·GAG·TTT·GGA·CGA·CGA·GTG·GAG·TAA·CCT·CTG·GGG·TCG·TTC
Gln·Asn·Ser·Leu·Leu·Trp·Arg·Ala·Asn·Thr·Asp·Arg·Ala·Phe·Leu·Gln·Asp·Gly·Phe·Ser
CAG·AAC·TCA·CTG·CTC·TGG·AGA·GCA·AAC·ACG·GAC·CGT·GCC·TTC·CTC·CAG·GAT·GGT·TTC·TCC
GTC·TTG·AGT·GAC·GAG·ACC·TCT·CGT·TTG·TGC·CTG·GCA·CGG·AAG·GAG·GTC·CTA·CCA·AAG·AGG
Leu·Ser·Asn·Asn·Ser·Leu·Leu·Val·Pro·Thr·Ser·Gly·Ile·Tyr·Phe·Val·Tyr·Ser·Gln·Val
TTG·AGC·AAC·AAT·TCT·CTC·CTG·GTC·CCC·ACC·AGT·GGC·ATC·TAC·TTC·GTC·TAC·TCC·CAG·GTG
AAC·TCG·TTG·TTA·AGA·GAG·GAC·CAG·GGG·TGG·TCA·CCG·TAG·ATG·AAG·CAG·ATG·AGG·GTC·CAC
Val·Phe·Ser·Gly·Lys·Ala·Tyr·Ser·Pro·Lys·Ala·Thr·Ser·Ser·Pro·Leu·Tyr·Leu·Ala·His
GTC·TTC·TCT·GGG·AAA·GCC·TAC·TCT·CCC·AAG·GCC·ACC·TCC·TCC·CCA·CTC·TAC·CTG·GCC·CAT
CAG·AAG·AGA·CCC·TTT·CGG·ATG·AGA·GGG·TTC·CGG·TGG·AGG·AGG·GGT·GAG·ATG·GAC·CGG·GTA
Glu·Val·Gln·Leu·Phe·Ser·Ser·Gln·Tyr·Pro·Phe·His·Val·Pro·Leu·Leu·Ser·Ser·Gln·Lys
GAG·GTC·CAG·CTC·TTC·TCC·TCC·CAG·TAC·CCC·TTC·CAT·GTG·CCT·CTC·CTC·AGC·TCC·CAG·AAG
CTC·CAG·GTC·GAG·AAG·AGG·AGG·GTC·ATG·GGG·AAG·GTA·CAC·GGA·GAG·GAG·TCG·AGG·GTC·TTC
Met·Val·Tyr·Pro·Gly·Leu·Gln·Glu·Pro·Trp·Leu·His·Ser·Met·Tyr·His·Gly·Ala·Ala·Phe
ATG·GTG·TAT·CCA·GGG·CTG·CAG·GAA·CCC·TGG·CTG·CAC·TCG·ATG·TAC·CAC·GGG·GCT·GCG·TTC
TAC·CAC·ATA·GGT·CCC·GAC·GTC·CTT·GGG·ACC·GAC·GTG·AGC·TAC·ATG·GTG·CCC·CGA·CGC·AAG
Gln·Leu·Thr·Gln·Gly·Asp·Gln·Leu·Ser·Thr·His·Thr·Asp·Gly·Ile·Pro·His·Leu·Val·Leu
CAG·CTC·ACC·CAG·GGA·GAC·CAG·CTA·TCC·ACC·CAC·ACA·GAT·GGC·ATC·CCC·CAC·CTA·GTC·CTC
GTC·GAG·TGG·GTC·CCT·CTG·GTC·GAT·AGG·TGG·GTG·TGT·CTA·CCG·TAG·GGG·GTG·GAT·CAG·GAG
Ser·Pro·Ser·Thr·Val·Phe·Phe·Gly·Ala·Phe·Ala·Leu·*******
Hind III
AGC·CCT·AGT·ACT·GTC·TTC·TTT·GGA·GCC·TTC·GCT·CTG·TAG·TAG·A
TCG·GGA·TCA·TGA·CAG·AAG·AAA·CCT·CGG·AAG·CGA·GAC·ATC·ATC·TTCGA

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00043

**I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER** (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. $Cl^5$ C12N15/19, C12P21/02//(C12P21/02, C12R1:91)

**II. FIELDS SEARCHED**

Minimum Documentation Searched [7]

| Classification System | Classification Symbols |
|---|---|
| IPC | C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/06 |

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [8]

Biosis Database, Chemical Abstract Database (CA, REG)

**III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT** [9]

| Category * | Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12] | Relevant to Claim No. [13] |
|---|---|---|
| X/Y | JP, A, 62-11095 (KANEGAFUCHI CHEM KK), January 20, 1987 (20. 01. 87), & EP, A, 207518 & US, 4988624 & AU, A, £659453 | 1-4 |
| X/Y | JP, A, 2-447 (Sankyo Co., Ltd.), January 5, 1990 (05. 01. 90), (Family: none) | 1-4 |
| X/Y | Bio/technology, Vol. 7, No. 4, 1989, Seow, Heng Fong et al., "Bacterial expression, facile purification and properties of recombinant human lymphotoxin" p. 363-368 | 1-4 |
| X | JP, A, 3-106821 (Denki Kagaku Kogyo K.K.), May 7, 1991 (07. 05. 91), (Family: none) | 4 |
| X | JP, A, 3-52822 (Denki Kagaku Kogyo K.K.), May 7, 1991 (07. 05. 91), (Family: none) | 4 |

* Special categories of cited documents: [10]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"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

"&" document member of the same patent family

**IV. CERTIFICATION**

| Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report |
|---|---|
| April 7, 1992 (07. 04. 92) | April 28, 1992 (28. 04. 92) |
| **International Searching Authority** | **Signature of Authorized Officer** |
| Japanese Patent Office | |

# 国際調査報告

国際出願番号PCT/JP92/00043

## I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類（IPC）

Int. Cl⁵ C12N15/19, C12P21/02 //
(C12P21/02, C12R1:91)

## II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

| 分類体系 | 分類記号 |
|---|---|
| IPC | C12N15/00−15/90, C12P21/00−21/06 |

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

Biosis Database, Chemical Abstract Database (CA, REG)

## III. 関連する技術に関する文献

| 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 | 請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| X/Y | JP, A, 62−11095 (KANEGAFUCHI CHEM KK), 20. 1月. 1987 (20. 01. 87) &EP, A, 207518&US, 4988624 &AU, A, 8659453 | 1 − 4 |
| X/Y | JP, A, 2−447 (Sankyo Co. Ltd), 5. 1月. 1990 (05. 01. 90) (ファミリーなし) | 1 − 4 |
| X/Y | Bio/technology, 第7巻, 第4号, 1989, Seow, Heng Fong et al, 「Bacterial expression, facile purification and properties of recombinant human lymphotoxin」 p. 363−368 | 1 − 4 |
| X | JP, A, 3−106821 (Denki Kagaku kogyo K.K) 7. 5月. 1991 (07. 05. 91) (ファミリーなし) | 4 |

※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」先行文献ではあるが、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の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の文献

## IV. 認証

| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 |
|---|---|
| 07. 04. 92 | 28.04.92 |

| 国際調査機関 | 権限のある職員 |
|---|---|
| 日本国特許庁（ISA/JP） | 特許庁審査官 大久保 元浩 ㊞ 4B9050 |

第2ページから続く情報

（Ⅲ欄の続き）

X JP, A, 3-52822 (Denki kagaku kogyo K.K.) 7. 5月. 1991 (07. 05. 91) (ファミリーなし) 4

V. □ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. □ 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2. □ 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度に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。

3. □ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. □ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. □ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. □ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
   請求の範囲_____
3. □ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
   請求の範囲_____
4. □ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

□ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
□ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。