(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3961565号
(P3961565)
(45)発行日　平成19年8月22日(2007.8.22)　(24)登録日　平成19年5月25日(2007.5.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/52	(2006.01)	C07K	14/52	
A61P 15/00	(2006.01)	A61P	15/00	

請求項の数 3　(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平8-515121
(86)(22)出願日	平成7年10月31日(1995.10.31)
(65)公表番号	特表平10-508480
(43)公表日	平成10年8月25日(1998.8.25)
(86)国際出願番号	PCT/GB1995/002547
(87)国際公開番号	WO1996/014410
(87)国際公開日	平成8年5月17日(1996.5.17)
審査請求日	平成14年9月18日(2002.9.18)
(31)優先権主張番号	9422293.2
(32)優先日	平成6年11月4日(1994.11.4)
(33)優先権主張国	英国(GB)
(31)優先権主張番号	9508618.7
(32)優先日	平成7年4月28日(1995.4.28)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者
アプライド　リサーチ　システムズ　エー　アールエス　ホールディング　ナームロゼ　ベノートスハップ
オランダ領アンチル，キュラソー，ピエテルマーイ　１５
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　吉田　維夫
(74)代理人
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトＳＣＦ、そのスプライシング変異体及びその医薬的使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記のアミノ酸配列：
Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val
Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu
Lys Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Glu Ile Cys Ser Leu Leu
Ile Gly Leu Thr Ala Tyr Lys Glu Leu Ser Leu Pro Lys Arg Lys
Glu Thr Cys Arg Ala Ile Gln His Pro Arg Lys Asp
を有する幹細胞因子（SCF）ポリペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載のアミノ酸配列をコードする核酸。
【請求項３】
下記のヌクレオチド配列：

GAA GGG ATC TGC AGG AAT CGT GTG ACT AAT AAT GTA AAA GAC GTC

ACT AAA TTG GTG GCA AAT CTT CCA AAA GAC TAC ATG ATA ACC CTC

AAA TAT GTC CCC GGG ATG GAT GTT TTG GAA ATC TGT TCA TTG TTG

ATA GGG CTG ACG GCC TAT AAG GAA TTA TCA CTC CCT AAA AGG AAA

GAA ACT TGC AGA GCA ATT CAG CAT CCA AGG AAA GAC

を有する、請求項２に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

本発明は、新しいヒト幹細胞因子（SCF）蛋白質、この蛋白質をコードするDNA配列、その治療、特に試験管内受精における使用、及びこのような蛋白質を含む医薬製剤に関する。

成功する胚着床は、受容体の子宮内膜内に着床することができる子供の生まれる胚盤胞を生ずるプレ着床胚の正確な発達を要求する。可溶性の成長因子は、子宮の上皮により分泌されるなら、この過程を制御するために胚に直接作用するという考えを支持するかなりの群のデータが収集されている（Pampfer, S. et al, Bioessays, 13: 535-540（1991）; Tartakousky, B., and Ben Yair, E., Development Biology, 146: 345-352（1991）; Anderson, E. D., J. Cellular Biochem., 53: 280-287（1993）; and Schultz, G. A. and Hevner, S., Mutat. Res., 296: 17-31（1992））。

更に、発達する胚は、その受容性に影響を与えるためにその上皮に自己分泌様式で作用し得る種々のサイトカインを産生することが示されている。ヒト胚により産生されることが示されている成長因子の例は、IL-1, IL-6, CSF-1及びTNF-αを含む（Zolti et al, Fertil. Steril., 56（1991）265-272及びWitkin et al, J. Reprod. Immunol., 19（1991）85-93）。TNF-αは桑実胚段階までヒト胚の培養培地中に存在するが、胚盤胞からのそれには存在しないことが示されている（Lachappelle et al, Human Reproduction, 8: 1032-1038（1993））。それゆえ胚によりサイトカインの産生は、段階特異的な様式で制御され得る。

胚に対するサイトカインの可能性ある直接的効果に基づくデータは、主にマウスでの実験からのものである。ここでは、多くのサイトカインが、試験管内でプレ着床された胚の発達に影響を与えることが示されている。生体内濃度におけるIFN-γ及びCSF-1は、胚盤胞段階に発達するいくつかの胚を阻害する（Hill et al, J. Immunol., 139（1987）2250-2254）。TNF-αはより敏感な効果を有することも示されている。TNF-αは胚盤胞形成の速度に明らかな影響を与えないが、内部細胞集団（ICM）に関与する細胞の増殖を特異的に阻害するようであり、ICMの削減された胚盤胞を生ずる（Pampfer et al, Endocrinology, 134: 206-212（1994））。

他の成長因子もICM細胞に特異的に影響を及ぼす。例えば、インスリン様成長因子１及び２はICM増殖を刺激し、一方、白血病阻害因子（LIF）はそれらの分化を阻害する（Harvey et al, Mol. Reprod. Dev., 31（1992）195-199）。

試験管内で培養された胚は生体内対照と比べて発達が遅く、胚転移の後により低い妊娠比率を示す（Bowman, P. and Mclaren, A., J. Embryol. Exp. Morphol., 24: 203-207（1970）。これにより、発達における成長因子の役割のより優れた理解は、試験管内培養条件での改良を導き、ヒトIVFプログラムにおける成果を上げ得るだろう。

幹細胞因子（SCF）は構造においてCSF-1に関連する成長因子であり、c-kitチロシンキナーゼレセプターを通して作用する。骨髄において、SCF及びCSF-1は、幹細胞のマクロファージコロニーへの増殖及び分化を促進するように共力的に作用する。

EP-A-0423980は、ヒトSCFの核酸配列を開示し、細胞増殖、特に血液細胞の増殖の刺激を要求する条件におけるSCFの使用の可能性を議論する。

マウスにおいて、c-kitはプレ着床発達全体を通して発現されることが示されている（Arceci et al（1992））。我々は、ヒト胚においてこれが真実であることを示す。特定の段階において、ヒト胚もSCF mRNAを発現することは、この成長因子が自己分泌様式で作用し

得ることを示唆する。これは、SCFの発現がプレ着床胚において検出されないことにおいてマウスと対照的である（Arceci et al（1992））。
全長のSCF転写物は８のエキソンからなる（Martin, F. H. et al, Cell, 63: 203-211（1990）。この論文はSCFの変異形態も開示する。エキソン６の損失によって生ずるSCFのスプライシング変異体も開示される（Flanagen et al, Cell, 63: 1025-1035（1991））。
エキソン３と４との間の155塩基対からなる新しいエキソンを含むことにより生ずる更なる新しいスプライシング変異体が見い出された。これは、フレームシフトも生じ、フレームシフトのためにエキソン４において現れるフレーム停止コドンにおいて終了する前の、エキソン３に続く33の新しいアミノ酸を含むSCFの種をコードする。
これにより本発明は、次のＣ末端配列：

Glu Ile Cys Ser Leu Leu Ile Gly Leu Thr Ala Tyr Lys Glu Leu Ser Leu Pro Lys Arg Lys Glu Thr Cys Arg Ala Ile Gln His Pro Arg Lys Asp

又はそれに実質的に相同である配列を含むSCFを提供する。
好ましくは、本発明の新しいSCFは、先に言及される33の新しいアミノ酸の前に（いずれのシグナル配列も含まない）全長のSCFの最初の39アミノ酸を含む。１つの実施形態において、本発明の新しいSCFは、図２に示される配列と実質的に相同な位置１～39における配列を有する。
アミノ酸レベルにおいて、蛋白質配列は、重要な番号の構成アミノ酸が相同性を示すなら、他の蛋白質配列と実質的に相同であると考えられ得る。アミノ酸の少なくとも40%，50%，60%，70%，80%，90%，95%、又は99%が相同であり得、大きい方が好ましい。
これにより、かわりのスプライシングメカニズムは、ヒト胚において新しいSCFを産生し得る。それゆえ、本発明の新しいSCFは、患者の着床の前の正確な分化及び発達を確実にするためにプレ着床胚の処理に用いられ得る。
更に、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA配列であって、該配列が、

GAA ATC TGT TCA TTG TTG ATA GGG CTG ACG GCC TAT AAG GAA TTA TCA CTC CCT AAA AGG AAA GAA ACT TGC AGA GCA ATT CAG CAT CCA AGG AAA GAC TGA

に実質的に相同な配列を含み、遺伝コードの縮退のために、供されたアミノ酸配列もコードし又はその配列に実質的に相同である全ての他の核酸配列を含むことを特徴とするDNA配列も提供する。
実質的に相同性を有する配列は、ストリンジエント条件下において（例えば約0.9Mの塩溶液中で35～65℃において）、図２に示される核酸配列とハイブリダイズするであろうものとして考えられ得る。
本発明のDNA配列を含むDNA構成物は本発明の他の態様を形成する。
本明細書で議論されるように、本発明の蛋白質は、着床前の正確な発達を確実にするために胚を処理するのに役立つ。SCFは、トランスメンブランレセプターc-kitへの結合により作用することが示されている。更に、我々は、ヒト胚がプレ着床胚発達のほとんどの段階全体を通してc-kitを発現することが示されている。
これにより、更なる態様において、本発明は：
（ａ）プレ着床胚の正確な発達を確実にするための方法であって、プレ着床胚（そして好ましくはヒト胚）に本発明のSCFを投与するステップを含むことを特徴とする方法；並びに
（ｂ）ヒトプレ着床胚の正確な発達を確実にするための方法であって、ヒトプレ着床胚にSCFを投与するステップを含むことを特徴とする方法を提供する。この方法において、用いられるSCFは先に記載される変異体（Martin et al, 前掲及びFlanagan et al, 前掲）

及び本明細書に記載される新しい変異体を含む自然に発生する形態のいずれかであり得る。

更に、本発明は、ヒトプレ着床胚において正確な発達を確実にするのに用いるための薬剤の製造におけるSCFの使用も提供する。また、適切な薬剤を製造するためにSCFのいずれの形態も用いられ得る。

薬剤は、好ましくは、１以上の医薬として許容される担体及び／又は賦形剤と共に本発明の蛋白質を含む医薬製剤の形態で供される。このような医薬製剤は本発明の更なる態様を形成する。このような医薬製剤は、SCFが先に記載される方法に用いられ得る方法を供する。

本発明は、以下の実施例により記載されよう。その実施例は本発明を限定するいずれの方法としても解釈されるべきでない。本発明は、以下の図面を引用する。

図１：新しいエキソンの配列及びその予測されるアミノ酸配列；

図２：ヒトSCFの配列；

図３：ヒト胚からのRNAに基づくnested RT-PCR増幅の産物を示すアガロースゲル。各々のパネルは、異なるcDNA標的に特異的なプライマーでの増幅の産物を示す。異なる胚からの増幅されたcDNAを各々のレーンに充填した。レーンは（以下の）表１におけるcDNAラベルに従ってラベルされる。更なるサンプルは：レーンｐ、最初のトリメスター栄養膜；レーンｑ，200BeWo細胞からのcDNA；レーンｒ，10ngヒトゲノムDNA；及びレーンｓ、陰性対照としてcDNAを入れないものであった。DNA分子量マーカーは、レーンｉ内に充填された123塩基対はしご（ladder）であった。予測されるPCR産物の大きさはbpで示される。

表　1

ヒト胚cDNA及び対照

名前	発達の段階
a	２細胞
b	３細胞
c	４細胞
d	６細胞
e	８細胞
f	桑実胚
g	胚盤胞
h	ａ～ｇの培養上清
j	３のプールした胚盤胞
k	ｊの培養上清
l	２×６細胞及び１×８細胞
m	ｌの培養上清
n	１×４細胞及び１×６細胞
o	ｎの培養上清

サンプルａ～ｈは同じドナーからのものである。

図４：RT-PCRに用いられたプライマー、外部プライマーＡ及びＢ内部プライマーＣ及びＤ

実施例１：胚培養及びRNA抽出

IVFプログラムの一部として受精されている凍結保存されたヒト胚を本研究に用いた。これらの胚は両親により研究目的のために示されており、この研究は、Human Embryology及びFertilisation Authority、並びに地方の倫理委員会の要求に従った。この凍結された胚を解凍し、要求される発達段階まで0.4%ヒト血清アルブミンが補給されたEarles平衡塩培地（Armour Pharmaceuticals UK）中で培養し、次に培養流体５μｌ中で液体窒素中で瞬間凍結した（そしてこれにより氷結晶により溶菌した）。同一容量の培養上清を対照として凍結させた。いずれの残った堆積した細胞も慣用的手順の間に除去した。

最初のトリメスター栄養膜からの全RNAを、凍結保存された組織を４Ｍグアニジウムチオシアネート（Gibco BRL Livingston, Scotland）、25mMクエン酸ナトリウムpH7.0, 0.5%サルコシル及び0.1M　２－メルカプトエタノールを含む５mlの緩衝液中でホモジエナイズするChomsczynski and Sacchi, Anal. Biochem., 162: 156-159（1987）の方法により単離した。そのライゼートを２Ｍの酢酸ナトリウムpH４の0.5mlを加えることにより酸性化して、５mlの緩衝飽和フェノール及び１mlのクロロホルム－イソアミルアルコール（49：１ｖ／ｖ）を用いてフェノール－クロロホルム抽出した。その懸濁液を15分間、氷上におき、４℃で20分間、10,000ｇで遠心した。RNAを含む水性相を沈殿させ、70%エタノールで２回、洗浄して、乾燥させ、TE（10mM Tris-HCl pH7.4及び１mM EDTA）中に再懸濁した。RNA濃度を260nmにおいて分光光度で測定した。

先の手順に基づくスケールダウンしたプロトコルを用いて単一のヒト胚からRNAを調製した。RNAの沈殿を補助するために、100μｇの担体イーストtRNA（Gibco BRL, Livingston, Scotland）をホモジエニゼーションステップにおいて加えた。残りの詳細は、全ての容量を50倍小さくし、全体の手順を400μｌエッペンドルフチューブ内で行った他は先の記載に従った。

実施例２：逆転写酵素ポリメラーゼ鎖反応（RT-PCR）

AMV逆転写酵素（Super RT, HT Biotech, Cambridge, UK）を用いて、各々の胚から全RNAの半分からcRNAを合成した。３～５マイクログラムのRNAを、42℃で60分の製造元の説明に従ってオリゴdT（Pharmacia）で開始した。cDNA調製物のPCR増幅を、製造元の推奨される緩衝液中の１UのTaq DNAポリメラーゼ（Cetus, Emeryville, CA）及び10μMの各々の外部プライマーの対（表４を参照）を用いて30μｌの最終容量中でのHybald Omnigene DNA熱サイクラーで先に記載（Sharkey, A. et al, Molecular Endocrinol., 6: 1235-1241（1992））のように行った。次のサイクルプロファイルを用いた：95℃で30ｓ，Ｘ℃で30ｓ，72℃で30ｓを30サイクル、ここでＸは以下に示されるようなサイトカインプライマーの各々の対のためのアニーリング温度である。

	外部プライマー（℃）	内部プライマー（℃）
SCF	54	54
HistRNA	52	59
c-kit	56	56

オリゴヌクレオチドプライマー

SCF, c-kit及びHistidyl-tRNAシンセターゼのためのオリゴヌクレオチドプライマーを、Cruachem PS250 DNAシンセサイザー上で合成した。いずれの汚染するゲノムDNAの増幅もcDNA種から異なるサイズの産物を生ずるであろうように出版されているヌクレオチド配列（図４を参照のこと）からプライマー配列をデザインした。

少量の材料のために、２つのプライマーの対を、nested PCR中で各々の標的cDNAのために用いた。cDNA産物の30分の１を製造元の推奨される緩衝液中でAmplitaq（Cetus）を用いて増幅した。外部プライマー対を用いる30サイクルのPCTの後、最初の回の反応の50分の１を内部プライマー対を含む新鮮なチューブに移し、更に30回の増幅にかけた。陰性対照

として、胚を成長させた等量の培養流体を抽出して、同様にRT-PCRにかけた。また、BeWo細胞系統（ECACC No 86082803）の200細胞を陽性対照として抽出した。
この研究に用いられるプライマーを予想される産物のサイズと共に図４に示す。各々の産物の同一性を、先に記載（Sharkey et al, Mol. Endocrinol.（1992））のようにクローニング及び配列決定した。検出される産物が、汚染するゲノムDNAよりむしろcDNAの増幅から生ずるのを確実にするために、イントロン／エキソン境界を横切るようにプライマーを選択した。10ナノグラムのゲノムDNAもゲノムDNAから生ずる予想されるサイズの産物がないことを確認するためにcDNAと同時にPCRにかけた。
結　果
RT-PCRの技術を、試験管内受精により作られたヒト胚から抽出された全RNAに適用した。胚を適切な段階まで培養し、次に液体窒素中で迅速に凍結した。保存された胚を解凍して全RNAを抽出した。単一の胚から抽出された全RNAからの検出可能なRT-PCR産物を作るために、nested PCRプロトコルを用いた。このプロトコルはcDNAを外部プライマー対での２セットのPCR増幅にかけ、次に内部対によるものである。プライマーは出版されているcDNA配列に基づき、汚染するゲノムDNAがcDNA産物から直ちに区別され得るであろうようにイントロン－エキソン境界をつなぐようにデザインした。
最初に、各々の胚からのcDNAを、成功したRNA単離及び逆転写を確認するためにヒスチジルtRNAシンセターゼ（HistRS）のためのプライマーでテストした。用いたプライマーは、ゲノムDNAからの400bp超の弱い産物及びHistRS mRNA由来のcDNAからの110bpの産物を生じた。HistRSのための転写物を、発達の全ての段階における胚からのmRNAにおいて、並びに陽性対照として用いられた脱落膜及び絨毛癌細胞系統BeWoにおいて検出した（図３、各々レーンｐ及びｑ）。抽出され、同様にRT-PCRにかけられた多量の胚培養上清中で産物が検出されなかったことは、外来cDNA又はRNAでの培養の汚染がないことを示す。
SCF及びc-kitのためのプライマーでの同様のRT-PCRの例を図３に示す。cDNAの保存液を２つ別個に各々のRNAサンプルから逆転写し、各々のcDNA保存液に基づきPCRアッセイを２回、繰り返した。その結果を、プレ着床発達の間のc-kit及びSCFの発現のパターンを示す図３に示す。正確なサイズのPCRフラグメントの同定をクローンされたPCR手順の配列決定により確認した。新しいサイズの産物が見られる場合、これらもクローンして、配列決定した。
SCFについて、予測されるフラグメントは966bpである。しかしながら、SCF転写物はサイズにおいて段階特異的差異を示すようであった。クローニング及び配列決定に基づき、エキソン３と４との間の新しいエキソンを挿入するかわりのスプライシングのため、新しい産物を生じたようであった。新しい転写物の予測される配列を図１に示す。新しいスプライシングパターンは、エキソン４におけるフレーム内停止コドンの前の33の新しいアミノ酸を供するフレームシフトも含む。
c-kitに特異的なプライマーを用いる同様の分析において、SCFのためのレセプターは、c-kitがヒトプレ着床胚発達のほとんどの段階において発現されることを示した。これは、胚がこの期間全体を通してSCFに応答する能力を有することを示唆する。
議　論
多くの成長因子は培養されたプレ着床哺乳動物胚の発達に影響を与えることが示されている（Anderson, E. D., J. Cellular Biochem., 53: 280-287（1993）並びにSchultz, G. A.及びHevner, S., Mutat. Res., 296: 17-31（1992）を参照のこと）。
しかしながら、プレ着床発達における成長因子レセプターの発現に種から種への差がある優れた証拠がある。例えば、EGF mRNAはブタ胚中で発現されるが、マウスプレ着床胚におけるいずれの段階でも見い出されていない（Vaughan et al, Development, 116: 663-669（1992）; Repolee et al, Science, 241: 1823-1825（1988）;及びWatson, A. J. et al, Biol. Reprod., 50: 725-733（1994））。それゆえ、ヒトプレ着床発達を制御する因子に関心のある研究者の有用性は限られる。更に、このような研究において研究された特定の成長因子及びレセプターは、ad hocに基づいて選択されている。倫理的及び実用的理由の両方のために、このような試みはヒト胚で用いるには不適切である。それゆえ我々は、

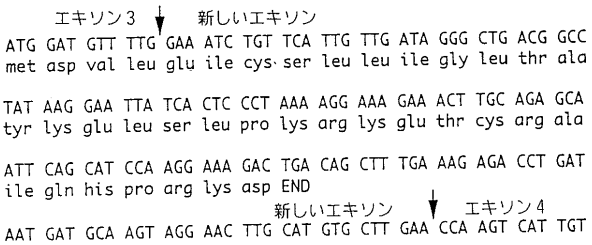
我々が単一のヒトプレ着床胚における成長因子の発現及びレセプターmRNAのためにスクリーニングすることを許容するnested RT-PCR法を用いた。この方法は、その胚材料の使用において信頼でき、センシティブで経済的であるので、他の種において最近数年間にわたって広く用いられている。

Histidyl-tRNAシンセターゼのためのプライマーでのRT-PCRは、cDNAが各々の胚RNAサンプルからうまく調製されていることを確認するためにcDNAサンプルに基づいて用いられた。このハウスキーピング遺伝子に特異的なcDNAが単一の２－細胞胚から作られたcDNAサンプル中でさえ上手く検出されたことは、この方法がこの研究に十分にセンシティブであることを示した。

SCFは２－細胞段階で発現され、次に６－細胞段階で消滅した。これは、母体の発現の後の６－細胞段階における胚のゲノムからの再発現で一貫している（Braude, P et al, Nature, 332: 459-461（1988））。SCFは転写物サイズにおいて段階特異的な差を示した。クローニング及び配列決定に基づき、これらは最初の転写物のかわりのスプライシングのためであることが見い出された。これらの変異体の２つは以前に出版されているものと似ており（Martin et al, 前掲及びSharkey, A. et al, Mol. Endocrinol, 6: 1235-1241（1992））、１つはカルボキシ末端において33の新しいアミノ酸を有するSCFの種を示す新しい形態であった。SCFのいくつかの変異体が現在知られており、そのいくつかはメンブラン結合して生物活性になる。プレ着床胚により発現された種は生物活性であると知られているものを含み、SCFの種々の形態が胚により発現されたc-kitを通して作用し得、この時に胚発達に影響を与え得る。

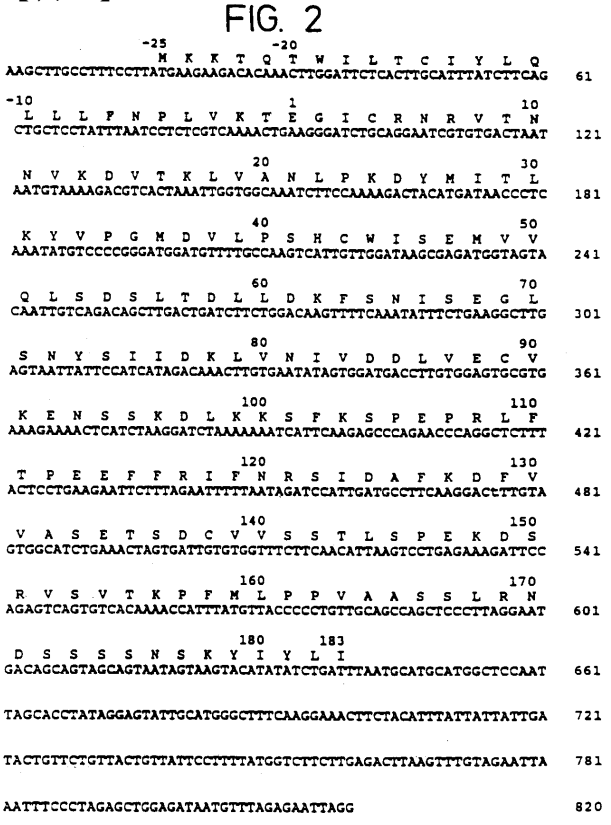
【図１】

FIG. 1



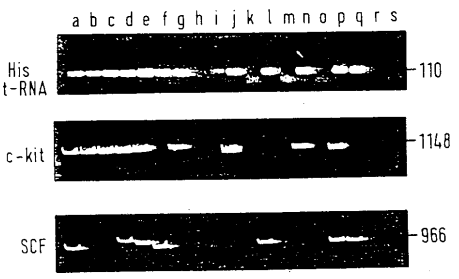
【図２】

FIG. 2



【図３】

FIG. 3



【図４】

特異性	プライマー	配列 5'->3'	フラグメントサイズ (bp)	cDNA上の位置	対照標準 (cDNA配列)
HistRS	A	CCGCAGGTCGAGACAGC		518-534	RABEN et al 1992
	B	CAAACACCTTCTCGCGAA		791-773	NUCLEIC ACIDS RES
	C	CTTCAGGGAGAGCGCTGC		595-613	20:1075-1081
	D	TCATCAGGACCCAGCTGTGC	110	704-685	
SCF	A	CAATGCGTGGACTATCTGCC		9-28	MARTIN et al 1990
	B	GTTCTAAATGAGACCCAAGT		1284-1264	CELL
	C	AACAGCTAAACGGAGTCGCC		61-80	63:203-211
	D	ACAGTGTTGATACAAGCCAC	966	1027-1008	
c-kit	A	GAAGTACAGTGGAAGGTTGTT		1681-1702	YARDEN et al 1987
	B	CATCGGCCACTAAAGTGTGCT		3105-3086	EMBO
	C	GGTTGTTGAGGCAACTGCTTA		1827-1847	6:3341-3351
	D	GGTGACCCAAACACTGATTC	1148	2975-2955	

FIG. 4

フロントページの続き

(72)発明者 シャーキー，アンドリュー マーク
イギリス国，ケンブリッジ シービー１ ４ピーエル，クイーン エディス ウェイ ８９エー
(72)発明者 スミス，スティーブン ケビン
イギリス国，ケンブリッジ シービー４ ３エージー，ハートフォード ストリート １４
(72)発明者 デロー，キンバリー アン
イギリス国，ロンドン エスタブリュ３ ６エルワイ，ドーベハウス ストリート，インペリアル カレッジ オブ サイエンス，テクノロジー アンド メディシン，ナショナル ハート アンド ラング インスティテュート，デパートメント オブ カーディオソラシック サージェリー

審査官 中川 知美

(56)参考文献 Cell，１９９０年，63，p.203-211
Cell，１９９１年，64，p.1025-1035
Mol. Endo.，１９９２年，6 [8]，p.1235-1241
Dev. Biol.，１９９２年，151，p.1-8
Arch. Biochem. Biophys.，１９９４年 ５月，311 [1]，p.55-61

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 14/00 - 14/825
C12N 15/00 - 15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)