(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-505866
(P2022-505866A)
(43)公表日　令和4年1月14日(2022.1.14)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/11 (2006.01)		C12N	15/11	Z	4B065
C07K 14/00 (2006.01)		C07K	14/00	ZNA	4H045
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全155頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-522940(P2021-522940)
(86)(22)出願日　令和1年11月4日(2019.11.4)
(85)翻訳文提出日　令和3年6月7日(2021.6.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/059654
(87)国際公開番号　WO2020/093043
(87)国際公開日　令和2年5月7日(2020.5.7)
(31)優先権主張番号　62/904,800
(32)優先日　令和1年9月24日(2019.9.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/755,264
(32)優先日　平成30年11月2日(2018.11.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　517075883
ユニバーシティ オブ ワシントン
University of Washington
アメリカ合衆国 98105 ワシントン, シアトル, スイート 400, ルーズベルト ウェイ エヌイー 4545
4545 Roosevelt Way NE, Suite 400, Seattle, Washington 98105 US
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　直交タンパク質ヘテロ二量体

(57)【要約】
【課題】直交タンパク質ヘテロ二量体に関する。
【解決手段】　本明細書では、設計されたヘテロ二量体タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質を形成することができる単量体ポリペプチド、そのようなポリペプチドを含むタンパク質足場、および論理ゲートを設計するためのヘテロ二量体タンパク質およびサブユニットポリペプチドを使用する方法が開示される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
設計されたヘテロ二量体タンパク質であって、
（ａ）単量体Ａポリペプチドであって、アミノ酸リンカーによって接続された１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドである、単量体Ａポリペプチドと、
（ｂ）単量体Ｂポリペプチドであって、アミノ酸リンカーによって接続された１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドである、単量体Ｂポリペプチドと、を含み、
単量体Ａおよび単量体Ｂは非共有結合的に相互作用して、前記設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成する、設計されたヘテロ二量体タンパク質。
【請求項２】
単量体Ａおよび単量体Ｂが、単量体Ａおよび単量体Ｂとの間の界面における少なくとも１つの設計された水素結合ネットワークによって決定されるそれらの相互作用特異性を有する、請求項１に記載の設計されたヘテロ二量体タンパク質。
【請求項３】
単量体Ａおよび単量体Ｂのうちの少なくとも１つがヘキサヒスチジンタグを含み、かつ／または
（ｉ）単量体Ａは２つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのアルファヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは３つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのアルファヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは３つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのアルファヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは４つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのアルファヘリックスを含むか、（ｖ）単量体Ａは４つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのアルファヘリックスを含むか、（ｖｉ）単量体Ａは５つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのアルファヘリックスを含むか、（ｖｉｉ）単量体Ａは４つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのアルファヘリックスを含むか、（ｖｉｉｉ）単量体Ａは５つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのアルファヘリックスを含むか、（ｉｘ）単量体Ａは２つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのアルファヘリックスを含むか、または（ｘ）単量体Ａは３つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのアルファヘリックスを含む、請求項１～２のいずれか一項に記載の設計されたヘテロ二量体タンパク質。
【請求項４】
（ｉ）単量体Ａは、配列番号１～２９０の群から選択されるからなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、
（ｉｉ）単量体Ｂは、配列番号１～２９０の群から選択されるからなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、前記偶数の配列番号は、前記工程（ｉ）の奇数の配列番号の結合パートナーである、請求項１～３のいずれか一項に記載の設計されたヘテロ二量体タンパク質。
【請求項５】
参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化が保存的アミノ酸置換である、請求項４に記載の設計されたヘテロ二量体タンパク質。
【請求項６】
定義された界面位置の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％は、前記参照アミノ酸配列と比較して不変である、請求項４または５に記載の設計されたヘテ

ロ二量体タンパク質。
【請求項７】
配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む、天然に存在しないポリペプチド。
【請求項８】
前記参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化が保存的アミノ酸置換である、請求項８に記載の天然に存在しないポリペプチド。
【請求項９】
定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％は、前記参照アミノ酸配列と比較して不変である、請求項７または８に記載の天然に存在しないポリペプチド。
【請求項１０】
配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドを含むタンパク質であって、前記２、３、４個またはそれ以上の天然に存在するポリペプチドが共有結合している、タンパク質。
【請求項１１】
前記２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが異なる、請求項１０に記載のタンパク質。
【請求項１２】
前記２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが融合タンパク質中に存在する、請求項１０または１１に記載のタンパク質。
【請求項１３】
前記２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが、配列番号１～２９０からなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する、請求項１０～１２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１４】
前記２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが、配列番号１～２９０からなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する、請求項１０～１２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１５】
前記２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが、
（ａ）配列番号１～２９０からなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドと、
（ｂ）配列番号１～２９０からなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドと、を含む、請求項１０～１２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１６】

配列番号２９１、２９４、２９６、２９９、および３０２～３０５からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１０～１５のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１７】

定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％は、前記参照アミノ酸配列と比較して不変である、請求項１０～１６のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１８】

タンパク質足場であって、

ａ）アミノ酸リンカーによって単一の構成要素に接続された、それぞれが異なるヘテロ二量体に由来する、任意の数の単量体Ａポリペプチドおよび／または単量体Ｂポリペプチドを含む、第１の設計された構成要素と、

ｂ）前記第１の設計された構成要素の１つにある各単量体Ａおよび／または単量体Ｂに対応する単量体を含む、第２の設計された構成要素と、を含み、

前記第１および第２の設計された構成要素が、相互作用して前記タンパク質足場を形成し、各単量体Ａは、その単量体Ｂメイトと前記足場内でのみ相互作用する、タンパク質足場。

【請求項１９】

前記第１の設計された構成要素は、請求項１０～１７のいずれか一項に記載のタンパク質を含み、前記第２の設計された構成要素は、請求項７～９のいずれか一項に記載の複数の個々のポリペプチドを含む、請求項１８に記載のタンパク質足場。

【請求項２０】

前記第２の設計された構成要素中の前記単量体のいずれかがリンカーを含む、請求項１８または１９に記載のタンパク質足場。

【請求項２１】

前記足場が９５℃まで安定であり、４Ｍのグアニジン変性中点を有する、請求項１８～２０のいずれか一項に記載のタンパク質足場。

【請求項２２】

請求項１～６に記載の設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成する方法であって、

ａ）前記単量体のうちの２つを非連結単量体として提供することと、

ｂ）他の２つの単量体を連結単量体として提供することと、を含み、

これにより、前記非連結単量体は、同じヘテロ二量体のそれぞれの単量体と会合し、他の単量体のいずれとも結合しない、方法。

【請求項２１】

ａ）規則的に繰り返される骨格構造に組み込まれた非対称の埋め込み水素結合ネットワークと、

ｂ）ヘリックスヘアピンヘリックス単量体であって、前記ヘリックスのスーパーコイル位相が、０、９０、１８０、または２７０度に固定され、スーパーコイルねじれ（ω０）およびヘリックスねじれ（ω１）が、２層左巻きスーパーコイルのいずれかに対して一定に保たれているか（ω０＝－２．８５およびω１＝１０２．８５）、または５層の非ねじれ束（ω０＝０およびω１＝１００）を含む、ヘリックスヘアピンヘリックス単量体と、を含む、設計されたヘテロ二量体タンパク質。

【請求項２２】

請求項７～９に記載のポリペプチドまたは請求項１０～１７のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項２３】

プロモーターに作動可能に連結された請求項２２に記載の核酸を含む発現ベクター。
【請求項２４】
請求項２２に記載の核酸、請求項２３に記載の発現ベクター、ならびに／または本明細書の任意の請求項に記載のポリペプチド、タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質、および／もしくはタンパク質足場を含む細胞。
【請求項２５】
タンパク質論理ゲートの設計などの本明細書に開示されるものを含むがこれらに限定されない任意の好適な目的のための、前記請求項のいずれかに記載のポリペプチド、タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質、タンパク質足場、核酸、発現ベクター、および／また細胞の使用。
【請求項２６】
式Ｘ－Ｂ－Ｚのポリペプチドを含む融合タンパク質であって、式中、
（ａ）Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、前記Ｘドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、
（ｂ）Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、前記Ｚドメインは、（ｉ）前記第１の標的とは異なる第２の標的、または（ｉｉ）１、２、または３つのアルファヘリックスを含む異なる天然に存在しないポリペプチドのいずれかに非共有結合することができ、
（ｃ）Ｂドメインは、アミノ酸リンカーであり、
前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、
前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインは、結合界面で相互作用し、前記結合界面は、前記Ｘドメインの各アルファヘリックス水素の少なくとも１つの側鎖が、前記Ｚドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合している水素結合ネットワークを含み、前記結合界面は、複数の疎水性残基を含むものである、融合タンパク質。
【請求項２７】
式Ｘ－Ｂ－Ｚを含む少なくとも２つの融合タンパク質を含むキットまたは組成物であって、式中、
各融合タンパク質の前記Ｂドメインは、独立してポリペプチドリンカーであり、
各融合タンパク質の前記Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第１の天然に存在しないポリペプチドを含み、
各融合タンパク質の前記Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第２の天然に存在しないポリペプチドを含み、それぞれの個々の融合タンパク質の前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、前記Ｘドメインと前記Ｚドメインは結合界面で相互作用し、前記結合界面は、各Ｘドメインのアルファヘリックスの少なくとも１つの側鎖が前記Ｚドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、
第１の融合タンパク質の前記Ｘドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、
第２の融合タンパク質の前記Ｚドメインは、第２の標的に非共有結合することができ、
前記第１の標的または前記第２の標的に非共有結合することができないそれぞれの個々の融合タンパク質の前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインは、複数の融合タンパク質中の異なる融合タンパク質のＸまたはＺドメインに非共有結合することができる、キットまたは組成物。
【請求項２８】
（ｉ）前記第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、前記Ｘ１ドメインが、前記第１の標的に非共有結合することができ、
（ｉｉ）前記第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、前記Ｚ２ドメインが、前記第２の標的に非共有結合することができ、前記Ｚ１ドメインおよびｘ２ドメインが、互いに非共有結合することができる、請求項２７に記載のキットまたは組成物。
【請求項２９】

（ｉ）前記第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、前記Ｘ１ドメインが、前記第１の標的に非共有結合することができ、
（ｉｉ）前記第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、
（ｉｉｉ）前記少なくとも２つの融合タンパク質が、式Ｘ３－Ｂ３－Ｚ３の第３の融合タンパク質を含み、前記Ｚ３ドメインが、前記第２の標的に非共有結合することができ、
（Ａ）前記Ｚ１ドメインおよびＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができ、
（Ｂ）前記Ｚ２ドメインおよびＸ３ドメインが、互いに非共有結合することができる、請求項２７に記載のキットまたは組成物。
【請求項３０】
前記結合界面が、少なくとも２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％以上の疎水性残基を含む、請求項２６に記載の融合タンパク質あるいは請求項２７～２９に記載のキットまたは組成物。
【請求項３１】
各融合タンパク質の前記Ｂドメインが、独立して、６～１２、６～１１、６～１０、７～１２、７～１１、７～１０、８～１２、８～１１、８～１０、９～１２、９～１１、９～１０、１０～１２、１０～１１、１１～１２、６、７、８、９、１０、１１または１２の長さのアミノ酸である、請求項２６～３０のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。
【請求項３２】
個々の融合タンパク質中の前記ＸおよびＺドメインからのアルファヘリックスの前記合計数が４である、請求項２６～３１のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。
【請求項３３】
各融合タンパク質の前記Ｘドメインが２つのアルファヘリックスを有し、各融合タンパク質の前記Ｚドメインが２つのアルファヘリックスを有する、請求項２６～３２のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。
【請求項３４】
各融合タンパク質の前記Ｘドメインまたは前記Ｚドメインのいずれかが１つのアルファヘリックスを有し、他方が３つのアルファヘリックスを有する、請求項２６～３３のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。
【請求項３５】
各Ｘドメインおよび各Ｚドメインが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、前記Ｘドメインと前記Ｚドメインはヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成しないという条件付きである、請求項２６～３４のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。
【請求項３６】
各Ｘドメインおよび各Ｚドメインの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照アミノ酸配列と比較して不変である、請求項３５に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。
【請求項３７】
各融合タンパク質が、配列番号３０２、３０３、３０６～３２６、４３９、４４１、４４

３、４４５、４４７、４４９、４５１、４５３、４５５、および４５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを独立して含む、請求項２６～３６のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。

【請求項３８】

前記第１の標的および前記第２の標的をさらに含む、請求項２７～３７のいずれか一項に記載のキットまたは組成物。

【請求項３９】

前記第１の標的および前記第２の標的がそれぞれ独立して式Ｘ１０－Ｂ１０－Ｚ１０のポリペプチドを含み、式中、

（ａ）前記Ｘ１０ドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、

（ｂ）前記Ｚ１０ドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、

（ｃ）前記Ｂ１０ドメインは、アミノ酸リンカーであり、

前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインは、標的結合界面で相互作用し、前記標的結合界面は、前記Ｘドメインの各アルファヘリックス水素の少なくとも１つの側鎖が前記Ｚドメインの異なるアルファの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、前記標的結合界面が、複数の疎水性残基を含む、請求項３８に記載のキットまたは組成物。

【請求項４０】

前記標的結合界面が、少なくとも２５％の疎水性残基を含む、請求項３９に記載のキットまたは組成物。

【請求項４１】

前記第１の標的および前記第２の標的の前記Ｂ１０ドメインが独立して、６～１２、６～１１、６～１０、７～１２、７～１１、７～１０、８～１２、８～１１、８～１０、９～１２、９～１１、９～１０、１０～１２、１０～１１、１１～１２、６、７、８、９、１０、１１、または１２の長さのアミノ酸である、請求項３９～４０のいずれか一項に記載のキットまたは組成物。

【請求項４２】

前記第１の標的および前記第２の標的のタンパク質中の前記ＸおよびＺドメインからのアルファヘリックスの前記合計数が４である、請求項３８～４１のいずれか一項に記載のキットまたは組成物。

【請求項４３】

（ａ）前記第１の標的および前記第２の標的のそれぞれの前記Ｘ１０ドメインが、２つのアルファヘリックスを有し、前記第１の標的と前記第２の標的のそれぞれの前記Ｚ１０ドメインが、２つのアルファヘリックスを有するか、または

（ｂ）前記第１の標的および前記第２の標的のそれぞれの前記Ｘ１０ドメインもしくは前記Ｚ１０ドメインのいずれかが、１つのアルファヘリックスを有し、他方が、３つのアルファヘリックスを有する、請求項３９～４２のいずれか一項に記載のキットまたは組成物。

【請求項４４】

各Ｘ１０ドメインおよび各Ｚ１０ドメインが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、

７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、前記Ｘ１０ドメインは、前記融合タンパク質の前記Ｘドメインとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、前記Ｚ１０ドメインは、前記融合タンパク質の前記Ｚドメインとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである、請求項３９～４３のいずれか一項に記載のキットまたは組成物。

【請求項４５】

各Ｘドメインおよび各Ｚドメインの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項４４に記載の融合タンパク質、キット、または組成物。

【請求項４６】

前記第１の標的および／または前記第２の標的が、１つ以上の前記Ｘ１０および／または前記Ｚ１０ドメインに連結された１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含み、例えば、前記１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインは、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを任意選択で含み得る、請求項３９～４５のいずれか一項に記載のキットまたは組成物。

【請求項４７】

本明細書に記載の任意の目的のための、請求項２６～４６のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キット、または組成物の使用。

【請求項４８】

（ｉ）試料中に存在する前記第１の標的および前記第２の標的と前記融合タンパク質の非共有結合を促進する条件下で、請求項２６～３７のいずれか一項に記載の融合タンパク質を生物学的試料と接触させることと、

（ｉｉ）前記生物学的試料中の前記第１の標的および／または前記第２の標的への１つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することと、を含む、方法。

【請求項４９】

前記生物学的試料中の前記第１の標的および前記第２の標的への前記１つ以上の融合タンパク質の協調的な非共有結合を検出することを含む、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

前記生物学的試料中の前記第１の標的および前記第２の標的への前記１つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することを含む、請求項４８に記載の方法。

【請求項５１】

標的検出のための方法であって、

（ａ）生物学的試料を少なくとも２つの融合タンパク質と接触させることであって、前記少なくとも２つの融合タンパク質のそれぞれは、式Ｘ－Ｂ－Ｚを含み、式中、

各Ｂは独立して、ポリペプチドリンカーであり、

各Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第１の天然に存在しないポリペプチドを含み、

各Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第２の天然に存在しないポリペプチドを含み、それぞれの個々の融合タンパク質の前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、前記Ｘドメインと前記Ｚドメインは結合界面で相互作用し、前記結合界面は、各Ｘドメインのアルファヘリックスの少なくとも１つの側鎖が前記Ｚドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、

第１の融合タンパク質の前記Ｘドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、

第２の融合タンパク質の前記Ｚドメインは、第２の標的に非共有結合することができ、

前記第１の標的または前記第２の標的に非共有結合することができないそれぞれの個々の

融合タンパク質の前記Ｘドメインおよび前記Ｚドメインは、複数の融合タンパク質中の異なる融合タンパク質のＸまたはＺドメインに非共有結合することができる、接触させることと、
（ｂ）前記生物学的試料中の前記第１の標的および／または前記第２の標的への前記２つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することと、を含む、方法。
【請求項５２】
前記検出が、前記生物学的試料中の前記第１の標的および前記第２の標的への前記２つ以上の融合タンパク質の協調的な非共有結合を検出することを含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
（ｉ）前記第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、前記Ｘ１ドメインが、前記第１の標的に非共有結合することができ、
（ｉｉ）前記第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、前記Ｚ２ドメインが、前記第１の標的に非共有結合することができ、前記Ｚ１ドメインとＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができる、請求項５１または５２に記載の方法。
【請求項５４】
（ｉ）前記第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、前記Ｘ１ドメインが、前記第１の標的に非共有結合することができ、
（ｉｉ）前記第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、
（ｉｉｉ）前記少なくとも２つの融合タンパク質が、式Ｘ３－Ｂ３－Ｚ３の第３の融合タンパク質を含み、前記Ｚ３ドメインが、前記第２の標的に非共有結合することができ、
（Ａ）前記Ｚ１ドメインおよびＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができ、
（Ｂ）前記Ｚ２ドメインおよびＸ３ドメインが、互いに非共有結合することができる、請求項５１または５２に記載の方法。
【請求項５５】
前記Ｘドメイン、Ｙドメイン、Ｂドメイン、およびまたは融合タンパク質が、請求項２６～３７のいずれか一項に記載されている通りである、請求項５１～５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記融合タンパク質の少なくとも１つが、１つ以上の前記Ｘおよび／またはＺドメインに連結された１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインを含み、前記検出工程が、前記第１の標的および／または前記第２の標的の結合により引き起こされる出力シグナルの検出を含む、請求項４８～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記検出工程が、前記第１の標的および前記第２の標的の協調的な非共有結合により引き起こされる前記１つ以上のエフェクターポリペプチドからの出力シグナルを検出することを含む、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインが、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る、請求項５６または５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記出力シグナルが、蛍光活性、機能的活性などを含み得るが、これらに限定されない、請求項５６～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記第１の標的および／または前記第２の標的がポリペプチドまたは核酸を含む、請求項２６～４６のいずれか一項に記載の融合タンパク質、キットまたや組成物、あるいは請求項４８～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】

（ａ）２つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、
（ｂ）２つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、前記第１のポリペプチドは、前記第２のポリペプチドに非共有結合することができ、前記第２のポリペプチドは、前記第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む、組成物であって、
（ｉ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの結合親和性は、前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、
（ｉｉ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの前記結合親和性および前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの前記結合親和性は、互いに、前記第１の標的および前記第２の標的の前記結合親和性よりも大きい、組成物。
【請求項６２】
前記第１の標的および前記第２の標的をさらに含む、請求項６１に記載の組成物。
【請求項６３】
前記第１の標的および／または前記第２の標的が、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含む、請求項６２に記載の組成物。
【請求項６４】
前記１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインが、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る、請求項６３に記載の組成物。
【請求項６５】
前記第１のポリペプチドおよび／または前記第２のポリペプチドが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む、請求項６１～６４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６６】
前記第１のポリペプチドおよび／または前記第２のポリペプチドの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項６５に記載の組成物。
【請求項６７】
（ａ）前記第１のポリペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、
（ｂ）前記第２のポリペプチドが、配列番号５８のアミノ酸配列を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む、請求項６１～６６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６８】
前記第１の標的および／または前記第２の標的がそれぞれが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３

４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、前記第１の標的は、前記第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、前記第２の標的は、前記第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである、請求項６１～６７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６９】

前記第１の標的および／または前記第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項４６に記載の組成物。

【請求項７０】

（ａ）生物学的試料を、請求項６１～６９のいずれか一項に記載の組成物と接触させることと、

（ｂ）前記試料中の前記第１の標的への前記第１のポリペプチドの結合および前記第２の標的への前記第２のポリペプチドの結合を検出すること、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用により引き起こされる出力シグナルを検出することと、を含む方法。

【請求項７１】

（ａ）２つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、前記第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、

（ｂ）２つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、前記第１のポリペプチドは、前記第２のポリペプチドに非共有結合することができ、前記第２のポリペプチドは、前記第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む、組成物であって、

（ｉ）前記第２のポリペプチドに対する前記第１のポリペプチドの結合親和性が、前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの結合親和性よりも大きく、

（ｉｉ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの結合親和性が、前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、

（ｉｉｉ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの前記結合親和性および前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの前記結合親和性は、互いに、前記第１の標的および前記第２の標的の前記結合親和性よりも大きい、組成物。

【請求項７２】

前記第１の標的および前記第２の標的をさらに含む、請求項７１に記載の組成物。

【請求項７３】

前記第１の標的および／または前記第２の標的が、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含む、請求項７２に記載の組成物。

【請求項７４】

前記１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインが、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る、請求項７３に記載の組成物。

【請求項７５】

前記第１のポリペプチドおよび／または前記第２のポリペプチドが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２

、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む、請求項７１～７４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７６】

前記第１のポリペプチドおよび／または前記第２のポリペプチドの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項７５に記載の組成物。

【請求項７７】

（ａ）前記第１のポリペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、

（ｂ）前記第２のポリペプチドが、配列番号４２のアミノ酸配列を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む、請求項７１～７６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７８】

第１の標的および／または第２の標的がそれぞれが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、前記第１の標的は、前記第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、前記第２の標的は、前記第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである、請求項７１～７７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７９】

前記第１の標的および／または前記第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項７８に記載の組成物。

【請求項８０】

（ａ）生物学的試料を、請求項７１～７９のいずれか一項に記載の組成物と接触させることと、

（ｂ）前記試料中の前記第１の標的と前記第１のポリペプチドの、前記第２の標的と前記第２のポリペプチドの、前記第１のポリペプチドと前記第２のポリペプチドの、および前記第１の標的と前記第２の標的との間の結合相互作用を検出すること、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用により引き起こされる出力シグナルを検出することと、を含む方法。

【請求項８１】

（ａ）４つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、前記第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、
（ｂ）４つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、前記第２のポリペプチドは、前記第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む、組成物であって、
（ｉ）前記第２の標的に対する前記第１の標的の結合親和性が、前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの結合親和性よりも大きく、
（ｉｉ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの結合親和性が、前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、
（ｉｉｉ）（Ａ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの前記結合親和性および（Ｂ）前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの前記結合親和性の合計が、前記第１の標的および前記第２の標的の前記結合親和性よりも大きい、組成物。
【請求項８２】
前記第１の標的および前記第２の標的をさらに含む、請求項８１に記載の組成物。
【請求項８３】
前記第１の標的および／または前記第２の標的が、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含む、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８４】
前記１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインが、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る、請求項８３に記載の組成物。
【請求項８５】
前記第１のポリペプチドおよび／または前記第２のポリペプチドが、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む、請求項８１～８４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８６】
前記第１のポリペプチドおよび／または前記第２のポリペプチドの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項８５に記載の組成物。
【請求項８７】
（ａ）前記第１のポリペプチドが、配列番号４２のアミノ酸配列を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、
（ｂ）前記第２のポリペプチドが、配列番号５７のアミノ酸配列を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む、請求項８１～８６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８８】
第１の標的および／または第２の標的がそれぞれが、配列番号１～２９０、３３１、３３

２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、前記第１の標的は、前記第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、前記第２の標的は、前記第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである、請求項８１～８７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項８９】

前記第１の標的および／または前記第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、前記参照ポリペプチドアミノ酸配列と比較して不変である、請求項８８に記載の組成物。

【請求項９０】

（ａ）生物学的試料を、請求項８１～８８のいずれか一項に記載の組成物と接触させることと、

（ｂ）前記試料中の前記第１の標的と前記第１のポリペプチドの、前記第２の標的と前記第２のポリペプチドの、および前記第１の標的と前記第２の標的との間の結合相互作用を検出すること、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用により引き起こされる出力シグナルを検出することと、を含む方法。

【請求項９１】

請求項２６および３０～３７のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項９２】

プロモーターに作動可能に連結された請求項９１に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項９３】

請求項９１に記載の核酸または請求項９２に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項９４】

前記核酸または前記発現ベクターが宿主細胞染色体に組み込まれている、請求項９３に記載の宿主細胞。

【請求項９５】

前記核酸または前記発現ベクターがエピソームである、請求項９３に記載の宿主細胞。

【請求項９６】

（ａ）単量体Ａポリペプチドであって、前記単量体Ａポリペプチドが、１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、隣接するアルファヘリックスが、アミノ酸リンカーによって任意選択に接続され得る、単量体Ａポリペプチドと、

（ｂ）単量体Ｂポリペプチドであって、前記単量体Ｂポリペプチドが、１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、隣接するアルファヘリックスが、アミノ酸リンカーによって任意選択に接続され得る、単量体Ｂポリペプチドと、を含み、

前記単量体Ａポリペプチドおよび前記単量体Ｂポリペプチドが、非共有結合的に相互作用して、前記設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成するものである、ヘテロ二量体。

【請求項９７】

前記単量体Ａポリペプチドおよび前記単量体Ｂポリペプチドが、前記単量体Ａポリペプチドと前記単量体Ｂポリペプチドとの間の界面における少なくとも１つの水素結合ネットワークによって決定されるそれらの相互作用特異性を有する、請求項９６に記載のヘテロ二量体。

【請求項９８】
（ｉ）前記単量体Ａポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含むか、
（ｉｉ）前記単量体Ａポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含むか、
（ｉｉｉ）前記単量体Ａポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含むか、
（ｉｖ）前記単量体Ａポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含むか、
（ｖ）前記単量体Ａポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含むか、
（ｖｉ）前記単量体Ａポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含むか、
（ｖｉｉ）前記単量体Ａポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含むか、
（ｖｉｉｉ）前記単量体Ａポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含むか、
（ｉｘ）前記単量体Ａポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含むか、または
（ｘ）前記単量体Ａポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含み、前記単量体Ｂポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含む、請求項９６または９７に記載のヘテロ二量体。
【請求項９９】
（ｉ）前記単量体Ａポリペプチドは、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の群から選択されるからなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記単量体Ｂポリペプチドは、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８－４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の群から選択されるからなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列、前記偶数の配列番号は、工程（ｉ）の前記奇数の配列番号の結合パートナーである、請求項９６～９８のいずれか一項に記載のヘテロ二量体。
【請求項１００】
参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化が保存的アミノ酸置換である、請求項９９に記載のヘテロ二量体。
【請求項１０１】
定義された界面位置の２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％にあるアミノ酸残基が、前記参照アミノ酸配列と比較して不変である、請求項９９または１００に記載の

ヘテロ二量体。
【請求項１０２】
タンパク質足場であって、
（ａ）２、３、４個、またはそれ以上のポリペプチドを含む融合タンパク質であって、前記融合タンパク質中に存在する各ポリペプチドは、１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、隣接するアルファヘリックスは、アミノ酸リンカーによって任意選択に接続されてもよく、
前記融合タンパク質中の各ポリペプチドは、結合パートナーと非共有的に相互作用することができ、前記融合タンパク質は、前記融合タンパク質中に存在する任意のポリペプチドの結合パートナーを含まない、融合タンパク質と、
（ｂ）前記融合タンパク質中に存在する前記ポリペプチドのうちの少なくとも１つの結合パートナーであって、
前記融合タンパク質および前記結合パートナーは、非共有的に相互作用して、前記タンパク質足場を形成し、前記融合タンパク質中の前記結合パートナーと前記少なくともポリペプチドとの間の相互作用特異性は、前記結合パートナーと前記少なくとも１つのポリペプチドとの間の界面における少なくとも１つの水素結合ネットワークによって決定される、結合パートナーと、を含む、タンパク質足場。
【請求項１０３】
前記融合タンパク質中に存在する前記ポリペプチドのうちの少なくとも１つの前記結合パートナーが、前記融合タンパク質中に存在する各ポリペプチドの結合パートナーを含む、請求項１０２に記載のタンパク質足場。
【請求項１０４】
前記融合タンパク質が、合計で少なくとも３つまたは４つのポリペプチドを含む、請求項１０２または１０３に記載のタンパク質足場。
【請求項１０５】
前記融合タンパク質中の各ポリペプチドが異なるポリペプチドである、請求項１０２～１０４のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１０６】
前記融合タンパク質が、請求項２０～２６のいずれか一項に記載のタンパク質を含み、前記結合パートナーが、請求項１０～１２のいずれか一項に記載の複数の個々のポリペプチドを含む、請求項１０２～１０５のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１０７】
（ｉ）前記融合タンパク質は、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上のポリペプチドを含み、
（ｉｉ）前記結合パートナーは、（ｉ）の各ポリペプチドについて本明細書で定義される結合パートナーを含み、各結合パートナーは、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、請求項１０２～１０６のいずれか一項に記載のタンパク質足場。

【請求項１０８】
前記融合タンパク質および前記結合パートナーにおける前記参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化が、保存的アミノ酸置換である、請求項１０７に記載のタンパク質足場。
【請求項１０９】
前記融合タンパク質および前記結合パートナー中の前記ポリペプチドの定義された界面位置の２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％にあるアミノ酸残基が、前記参照アミノ酸配列と比較して不変である、請求項１０７または１０８に記載のタンパク質足場。
【請求項１１０】
前記少なくとも１つの少なくとも１つの水素結合ネットワークが非対称である、請求項１０２～１０９のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１１１】
前記結合界面が、少なくとも２５％の疎水性残基を含む、請求項１０２～１１１のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１１２】
前記足場が、９５℃まで安定であり、４Ｍのグアニジン変性中点を有する、請求項１０２～１１１のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１１３】
前記アミノ酸リンカーが、（ＧＳＥＧＳ）ｎ（配列番号４２３）を含み、ｎが１～１０である、請求項９６～１０１のいずれか一項に記載のヘテロ二量体タンパク質、または請求項１０２～１１２のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１１４】
前記アミノ酸リンカーが、ＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧ（配列番号４２９）またはＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＧＳ（配列番号４６１）を含む、請求項１１３に記載のヘテロ二量体タンパク質またはタンパク質足場。
【請求項１１５】
前記水素結合ネットワークが、１つ以上の水素結合を含む、請求項１０２～１１４のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【請求項１１６】
前記水素結合ネットワークが、表２による界面残基間で形成される、請求項１０２～１１５のいずれか一項に記載のタンパク質足場。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１８年１１月２日に出願された米国仮特許出願シリアル番号第６２／７５５，２６４号および２０１９年９月２４日に出願された同第６２／９０４，８００号の優先権を主張するものであり、それぞれは、参照によりそのすべてが本明細書に組み込まれる。
【０００２】
連邦資金についての陳述
本発明は、アメリカ国立衛生研究所（ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ）によって授与された助成金番号第ＧＭ１０３５３３号の下で政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
２つのＤＮＡ鎖間、およびタンパク質とＤＮＡ間のヘテロ二量体相互作用の特異性は、多くの場合、タンパク質またはＤＮＡ骨格から外れる側鎖または塩基、例えば、二重らせん

のＷａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ塩基対に参加する塩基、またはＴＡＬＥＮ－ＤＮＡ複合体のＤＮＡに接触するタンパク質の側鎖を変化させることによって達成される。このモジュール性により、本質的に無制限の数の直交ＤＮＡ－ＤＮＡおよびタンパク質－ＤＮＡヘテロ二量体の生成が可能になる。対照的に、タンパク質間相互作用の特異性は、多くの場合、骨格形状の相補性によって達成されるが、これは、モジュール性が低く、したがって一般化するのが困難である。

【発明の概要】

【０００４】

一態様では、本開示は、設計されたヘテロ二量体タンパク質であって、

（ａ）単量体Ａポリペプチドであって、アミノ酸リンカーによって接続された１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドである、単量体Ａポリペプチドと、

（ｂ）単量体Ｂポリペプチドであって、アミノ酸リンカーによって接続された１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドである、単量体Ｂポリペプチドと、を含み、

単量体Ａおよび単量体Ｂが非共有結合的に相互作用して、設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成する、設計されたヘテロ二量体タンパク質を提供する。一実施形態では、

（ｉ）単量体Ａは、配列番号１～２９０の群から選択されるからなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、

（ｉｉ）単量体Ｂは、配列番号１～２９０の群から選択される群から選択されるからなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、偶数の配列番号は、工程（ｉ）の奇数の配列番号の結合パートナーである。

【０００５】

別の態様では、本開示は、配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む、天然に存在しないポリペプチドを提供する。

【０００６】

別の態様では、本開示は、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを提供する。

【０００７】

別の態様では、本開示は、配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドを含むタンパク質であって、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在するポリペプチドが共有結合している、タンパク質を提供する。一実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが異なる。別の実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが融合タンパク質中に存在する。

【０００８】
別の態様では、本開示は、配列番号１～２９０、１～２９０、および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８－４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上のポリペプチドを含むタンパク質であって、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在するポリペプチドが共有結合している、タンパク質を提供する。一実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが異なる。別の実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが融合タンパク質中に存在する。これらの態様のそれぞれにおいて、参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化は、保存的アミノ酸置換であり得る。別の実施形態では、定義された界面位置の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％のアミノ酸残基は、参照アミノ酸配列と比較して不変である。

【０００９】
別の態様では、本開示は、タンパク質足場であって、
ａ）アミノ酸リンカーによって単一の構成要素に接続された、それぞれが異なるヘテロ二量体に由来する、任意の数の単量体Ａポリペプチドおよび／または単量体Ｂポリペプチドから構成される、第１の設計された構成要素と、
ｂ）第１の設計された構成要素の１つにある各単量体Ａおよび／または単量体Ｂに対応する単量体を含む、第２の設計された構成要素と、を含み、
第１および第２の設計された構成要素が、相互作用してタンパク質足場を形成し、各単量体Ａは、足場内でその単量体Ｂメイトとのみ相互作用する、タンパク質足場を提供する。

【００１０】
別の態様では、本開示は、本開示の任意の実施形態の設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成する方法であって、
ａ）単量体のうちの２つを非連結単量体として提供することと、
ｂ）他の２つの単量体を連結単量体として提供することと、を含み、
これにより、連結されていない単量体は、同じヘテロ二量体のそれぞれの単量体と会合し、他の単量体のいずれとも結合しない、設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成する方法を提供する。

【００１１】
別の態様では、本開示は、設計されたヘテロ二量体タンパク質であって、
ａ）規則的に繰り返される骨格構造に組み込まれた非対称の埋め込み水素結合ネットワークと、
ｂ）ヘリックスヘアピンヘリックス単量体であって、前記ヘリックスのスーパーコイル位相が、０、９０、１８０、または２７０度に固定され、スーパーコイルねじれ（ω０）およびヘリックスねじれ（ω１）が、２層左巻きスーパーコイルのいずれかに対して一定に保たれているか（ω０＝－２．８５およびω１＝１０２．８５）、または５層の非ねじれ束（ω０＝０およびω１＝１００）を含む、ヘリックスヘアピンヘリックス単量体と、を含む、設計されたヘテロ二量体タンパク質を提供する。

【００１２】
別の態様では、本開示は、式Ｘ－Ｂ－Ｚのポリペプチドを含む融合タンパク質を提供し、
（ａ）Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、Ｘドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、

（ｂ）Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、Ｚドメインは、（ｉ）第１の標的とは異なる第２の標的、または（ｉｉ）１、２、または３つのアルファヘリックスを含む異なる非天然に存在するポリペプチドのいずれかに非共有結合することができ、
（ｃ）Ｂドメインは、アミノ酸リンカーであり、
ＸドメインおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、
ＸドメインおよびＺドメインは、結合界面で相互作用し、結合界面は、Ｘドメインの各アルファヘリックス水素の少なくとも１つの側鎖が、Ｚドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合している水素結合ネットワークを含み、結合界面は、複数の疎水性残基を含むものである。

【００１３】

別の態様では、本開示は、式Ｘ－Ｂ－Ｚを含む少なくとも２つの融合タンパク質を含むキットまたは組成物を提供し、
各融合タンパク質のＢドメインは、独立してポリペプチドリンカーであり、
各融合タンパク質のＸドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第１の天然に存在しないポリペプチドを含み、
各融合タンパク質のＺドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第２の天然に存在しないポリペプチドを含み、それぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、ＸドメインとＺドメインは結合界面で相互作用し、結合界面は、各Ｘドメインのアルファヘリックスの少なくとも１つの側鎖がＺドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、
第１の融合タンパク質のＸドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、
第２の融合タンパク質のＺドメインは、第２の標的に非共有結合することができ、
第１の標的または第２の標的に非共有結合することができないそれぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインは、複数の融合タンパク質中の異なる融合タンパク質のＸまたはＺドメインに非共有結合することができる。

【００１４】

融合タンパク質、キット、または組成物の一実施形態では、各Ｘドメインおよび各Ｚドメインは、配列番号１～２９０から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるであるポリペプチドを含むが、ただし、ＸドメインおよびＺドメインは、ヘテロ二量体（ａ－ｂ）対を形成しないという条件付きである。別の実施形態では、各Ｘドメインおよび各Ｚドメインの定義された界面位置の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％のアミノ酸残基は、参照アミノ酸配列と比較して不変である。

【００１５】

一態様では、本開示は、
（ｉ）試料中に存在する第１の標的および第２の標的と融合タンパク質の非共有結合を促進する条件下で、本開示の任意の実施形態に記載の融合タンパク質を生物学的試料と接触させることと、
（ｉｉ）生物学的試料中の第１の標的および／または第２の標的への１つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することと、を含む、方法を提供する。

【００１６】

一実施形態では、方法は、生物学的試料中の第１の標的および第２の標的への１つ以上の融合タンパク質の協調的な非共有結合を検出することを含む。別の実施形態では、方法は

、生物学的試料中の第１の標的および第２の標的への１つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することを含む。

【００１７】

別の態様では、本開示は、標的検出のための方法を提供し、この方法は、

（ａ）生物学的試料を少なくとも２つの融合タンパク質と接触させることであって、少なくとも２つの融合タンパク質のそれぞれは、式Ｘ－Ｂ－Ｚを含み、式中、

各Ｂは独立して、ポリペプチドリンカーであり、

各Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第１の天然に存在しないポリペプチドを含み、

各Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第２の天然に存在しないポリペプチドを含み、それぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、ＸドメインとＺドメインは結合界面で相互作用し、結合界面は、各Ｘドメインのアルファヘリックスの少なくとも１つの側鎖がＺドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、

第１の融合タンパク質のＸドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、

第２の融合タンパク質のＺドメインは、第２の標的に非共有結合することができ、

第１の標的または第２の標的に非共有結合することができないそれぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインは、複数の融合タンパク質中の異なる融合タンパク質のＸまたはＺドメインに非共有結合することができる、接触させることと、

（ｂ）生物学的試料中の前記第１の標的および／または第２の標的への２つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することと、を含む。

【００１８】

一態様では、本開示は、

（ａ）２つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、

（ｂ）２つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第２のポリペプチドに非共有結合することができ、第２のポリペプチドは、第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む組成物であって、

（ｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、

（ｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性および第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性は、互いに、第１の標的および第２の標的の結合親和性よりも大きい、組成物を提供する。

【００１９】

一態様では、本開示は、

（ａ）２つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、

（ｂ）２つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第２のポリペプチドに非共有結合することができ、第２のポリペプチドは、第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む組成物であって、

（ｉ）第２のポリペプチドに対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性よりも大きく、

（ｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、

（ｉｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性および第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性は、互いに、第１の標的および第２の標的の結合親和性よりも大きい、組成物を提供する。

【００２０】
別の態様では、本開示は、
（ａ）４つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、
（ｂ）４つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、第２のポリペプチドは、第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む、組成物であって、
（ｉ）第２の標的に対する前記第１の標的の結合親和性が、前記第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性よりも大きく、
（ｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、
（ｉｉｉ）（Ａ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性および（Ｂ）第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性の合計が、第１の標的および第２の標的の結合親和性よりも大きい、組成物を提供する。
【００２１】
本開示の各組成物の様々な実施形態では、組成物は、第１の標的および第２の標的をさらに含んでもよく、第１の標的および／または第２の標的は、さらに１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインを含んでもよい。一実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドは、配列番号１～２９０からなる群、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的はそれぞれ、配列番号１～２９０からなる群、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、第１の標的は、第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、第２の標的は、第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである。別の実施形態では、組成物は生物学的試料と接触されて、結合が検出され、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用によって引き起こされる出力シグナルを検出する。
【００２２】
本開示はまた、本開示のポリペプチド、タンパク質、および融合タンパク質をコードする核酸；プロモーターに作動可能に連結された核酸を含む発現ベクター；ならびに本開示の核酸、発現ベクター、および／またはポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、足場、および設計されたヘテロ二量体対を含む宿主細胞を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１Ａ－１Ｈ】モジュール性ヘテロ二量体設計を示す。図１Ａは、個々のヘリックス生成を示す。らせん位相（Δφ１）、スーパーコイル半径（Ｒ）およびＺ軸に沿うオフセッ

ト（Ｚオフセット）は、徹底的にサンプリングされた。第１のヘリックスにはｚオフセットがないため、合計１１の自由パラメータである。図１Ｂは、平行な、ねじれた骨格の上面図を示す。図１Ｃは、ＨＢＮＥＴ（商標）を使用して識別された代表的な水素結合ネットワークを示す。図１Ｄは、単一の全長骨格に対する７つ組を含む、複数のＨＢＮＥＴ（商標）の一致を示す。図１Ｅは、４つのヘリックスを２つのヘリックスへアピンに接続するためのループの追加を示す。図１Ｆ、１Ｇ、および１Ｈは、設計ＤＨＤ３７＿ＡＢＸＢのＳＥＣトレース、ＣＤスペクトル、および（挿入図）温度融解、ならびにＳＡＸＳ（黒、実験的ＳＡＸＳデータ；赤、設計された骨格から計算されたスペクトル）プロファイルを示す。実験は１回行った。

【図２Ａ－２Ｆ】設計されたヘテロ二量体の構造特性を示す。図２Ａ～２Ｄは、単量体を含む設計モデルに重ね合わされた結晶構造を示す。骨格の断面図（左）は、設計された水素結合ネットワークの位置を示す（中央のパネル）。実線と破線のボックスは、設計モデルと結晶構造のネットワークを比較している。黒のボックスは、全体的な疎水性パッキングを比較している。図２Ａは、１．０ÅＣα　ＲＭＳＤで、ＤＨＤ＿１３１、２．４Åの分解能を示す。図２Ｂは、１．４ÅＲＭＳＤで、ＤＨＤ３７＿１：２３４、３．３Åの分解能を示す。図２Ｃは、１．７ÅＲＭＳＤで、ＤＨＤ＿１２７，１．８　Åの分解能を示す。図２Ｄは、０．９ÅＲＭＳＤで、ＤＨＤ＿１５，３．４Åの分解能を示す。水素結合ネットワークは十分に解像されなかった。図２Ｅ～２Ｆは、ＤＨＤ＿３９およびＤＨＤ＿１２０骨格ならびに設計された水素結合ネットワークを示す。実験的なＳＡＸＳデータ（黒）は、設計された骨格から計算されたスペクトルと同様である。

【図３Ａ－３Ｃ】ＤＨＤの組み合わせによる新機能を示す。図３Ａは、介在する可撓性リンカーを用いてＤＨＤ３７＿ＡＢＸＢの「ｂ」構成要素に融合されたＤＨＤ１３＿ＸＡＡＡの「ｂ」構成要素から形成された誘導二量体を示す。２つのヘテロ二量体の「ａ」構成要素は、ヘテロ二量体によって近接している。図３Ｂは、４つの誘導された二量体化システムに関するＹ２Ｈデータを示す。バーの各ペアについて：左、ヘテロ二量体融合なし。右、ヘテロ二量体融合あり。破線は、ＡＤとＤＢＤが融合していないバックグラウンドの成長を示す。データは、３回の生物学的反復からの平均±ｓ．ｄ．である。図３Ｃは、９＿ａ、１３＿ＸＡＡＡ＿ａおよび３７＿ＡＢＸＢ＿ａが共有結合して足場を形成し、９＿ｂ（ヘキサヒスチジンタグ付き）、１３＿ＸＡＡＡ＿ｂおよび３７＿ＡＢＸＢ＿ｂを動員することを示す。

【図４Ａ－４Ｃ】全対全の直交性評価を示す。図４Ａは、２１個のヘテロ二量体のＹ２Ｈが、ホモ二量体の形成がほとんどないヘテロ二量体の形成を示すことを示す。下部の第１の文字はＡＤに融合した単量体を示し、２番目の文字はＤＢＤに融合したものを示す。図４Ｂは、９対のヘテロ二量体のすべての試験によるＹ２Ｈをすべて示しており、色は成長を示す。ボックスは、設計された同族のヘテロ二量体ペアを示し、黒い破線のボックスは、６つの直交するヘテロ二量体のセットを示す。図４Ｃは、ＤＨＤ１５＿ｂおよびＤＨＤ１３＿ＸＡＡＡ＿ａの不在下（左）または存在下（右）での、ＤＨＤ１５＿ａおよびＤＨＤ１３＿ＸＡＡＡ＿ｂのオフターゲット結合を示す。データは、平均±ｓ．ｄ．である。赤い破線は、ＡＤとＤＢＤが融合していないバックグラウンドの成長を示す。

【図５Ａ－５Ｂ】体系的な検索で得られたＨＢＮｅｔの例を示す。図５Ａは、各ヘリックスに対して異なるクリックパラメータを有する５０個の骨格の重ね合わせを示す。図５Ｂは、体系的探索からの水素結合ネットワークの例を示しており、それぞれが少なくとも４つの残基を含み、４つのヘリックスすべてに接触している。

【図６Ａ－６Ｃ】ＤＨＤの熱的および化学的変性を示す。図６Ａおよび６Ｂは、それぞれ、ＤＨＤ＿１５およびＤＨＤ＿２０の熱変性のＣＤスペクトルを示す。上、２５℃、７５℃、９５℃、最後の２５℃での波長スキャン。設計はアルファヘリックスで、９５℃まで安定していた。下、温度が２５℃～９５℃に上昇したときの２２２ｎｍでの吸収を監視している、ＣＤ温度融解。図６Ｃは、２２２ｎｍでの吸収をＣＤモニタリングすることによるＤＨＤ＿１２７のＧｄｎＨＣｌ変性を示す。すべてのＣＤ実験は１回実行された。

【図７Ａ－７Ｂ】骨格および水素結合ネットワークの順列を示す。図７Ａは、２＋２骨格

（左）で、４つのヘリックスを２つの異なる方法で単一の単量体に接続するように設計された２つのループ（中央）を示す。その後、４つの異なるカットポイントが導入され、１つのヘリックスと３つのヘリックス束（３＋１ヘテロ二量体、右）の４つの可能な骨格置換ヘテロ二量体が生成された。例えば、２：１３４は、元のヘリックス２が単一のヘリックスであり、ヘリックス１、３、および４が３つのヘリックス束に接続されているヘテロ二量体を指す。図７Ｂは、水素結合ネットワークの順列を示す。それぞれの独自のネットワークには一文字（この場合はネットワーク「Ａ」と「Ｂ」）が割り当てられ、疎水性パッキングにはＸが割り当てられている。左側の骨格は「ＡＢＸＢ」と表示され、その第１の７つ組はネットワーク「Ａ」に対応し、その第２と第４の７つ組はネットワーク「Ｂ」に対応し、その第３の７つ組は疎水性パッキングのみに対応する。

【図８Ａ－８Ｈ】ドメイン交換されたＤＨＤ＿１５の結晶構造および高次オリゴマーの生物物理学的特性を示す。図８Ａは、２．２５Åの分解能でのｐＨ６．５でのＤＨＤ＿１５の結晶構造を示す。図８Ｂは、骨格ＲＭＳＤが１．８３Åである、白色で示した結晶構造の両方の半分に対する、カラーで示した設計モデルの重ね合わせを示す。図８Ｃ～８Ｆは、誘導された二量体化ＤＨＤ＿９－１３融合、ＤＨＤ＿１５－３７融合、ＤＨＤ＿１３－３７融合、および図３Ｃの足場複合体のＳＥＣトレースを示す（約１５ｍＬのピークは、完全に組み立てられた複合体に対応する。個々の構成要素の過剰を表すピークが続く）。図８Ｇは、図３Ｃの足場複合体のＣＤ熱溶融曲線を示す。波長スキャンは、２５℃、７５℃、９５℃、および最後の２５℃で実行された。設計はアルファヘリックスで、９５℃まで安定していた。図８Ｈ、図３Ｃの足場複合体のＣＤ化学変性プロファイル。２（図８Ｃ～８Ｆ）または１（図８Ｇ～８Ｈ）の生物学的に独立した繰り返しを行った。

【図９Ａ－９Ｇ】１６個のＤＨＤの全対全のＹ２Ｈアッセイを示す。図９Ａは、トリプトファン、ロイシンおよびヒスチジンを欠く、１００ｍＭの３－ＡＴを含む寒天プレート上での細胞増殖を伴うＹ２Ｈアッセイを示す。プレートは５日目に画像化された。白、寒天プレート上での増殖なし。グレー、非円形のコロニーを形成する弱い成長。黒、強い増殖。図９Ｂは、トリプトファン、ロイシンおよびヒスチジンを欠く１００ｍＭの３－ＡＴを含む液体培地中で酵母培養物を増殖させることによるＹ２Ｈの結果を示す。細胞増殖を評価するために、２日目にＯＤ　６００値を測定した。図９Ｃは、改善された直交性を示すＹ２Ｈによって試験されたＤＨＤの追加のセットを示す。図９Ｄは、図９Ｂにおける非同族相互作用のＯＤ　６００値の分布を示し、細胞の大部分は、０．４未満のＯＤ　６００値に成長し、非同族結合の弱い相互作用を示す。図９Ｅは、より埋もれたかさばる極性残基が設計の成功と強く相関していることを示す。ｆ、成功した設計では、極性界面の表面積が大きくなる傾向がある。図９Ｇは、より良好な疎水性パッキングを備えた設計が（Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＶａｌ残基についてのロゼッタ（商標）フィルター値の平均度により測定されるように）、構成的ヘテロ二量体である可能性が高い傾向があることを示す。２つ（図９Ａ～９Ｃ）の独立した実験を行った。

【図１０】Ｙ２Ｈ実験における６つの直交ペアのセットの水素結合ネットワーク配列モチーフを示す。文字パッチは、骨格上に残基を形成する水素結合ネットワークの位置を示し、残基の同一性を示す。

【図１１Ａ－１１Ｈ】ＣＩＰＨＲ論理ゲートの協調性を示す。図１１Ａは、挿入図に水素結合ネットワークの詳細を伴う、Ａ：Ａ’ヘテロ二量体ビルディングブロックの骨格構造を示す。右下、図全体で使用されている要約表現。図１１Ｂは、誘導された二量体化システムを説明する熱力学的サイクルを示す。図１１Ｃは、熱力学的平衡下での誘導された二量体化システムのシミュレーションを示す。Ａ’－Ｂ二量体化タンパク質の様々な初期量で滴定している間、ＡおよびＢ’単量体は一定に保たれた。結合が協調的でない場合（小文字ｃ）、二量体タンパク質が過剰になると、三量体複合体の最終量が減少する。図１１Ｄは、６アミノ酸および１２アミノ酸（ＡＡ）リンカーを有する設計についてＣＤによってモニターされた平衡変性実験を示す。円は実験データを表し、線は３状態の単分子展開モデルに適合している。設計モデルは側面に示されている。図１１Ｅは、１：１’ヘテロ二量体の計算されたプロファイルに適合した、６残基リンカー（黒）を有する１’－２’の

実験的ＳＡＸＳプロファイルを示す。図１１Ｆは、６残基リンカーを使用する誘導された二量体化システムを示す。図１１Ｇは、２入力ＡＮＤゲートの回路図を示す。図１１Ｈは、３入力ＡＮＤゲートを示す。

【図１２Ａ－１２Ｇ】ＣＩＰＨＲの２つの入力論理ゲートを示す。図１２Ａは、ＣＩＰＨＲゲートが、入力として単量体または共有結合された単量体（左）を備えたＤＨＤ（上）から構築されていることを示す。一部のゲートは、設計された同族相互作用のみを利用するが（中央のパネルの左側）、他のゲートは、観察された分子間および分子内結合親和性階層を利用する（中央のパネルの右側）。図１２Ｂおよび１２Ｃは、直交ＤＨＤ相互作用に基づく２入力ＡＮＤ（１２Ｂ）およびＯＲ（１２Ｃ）ＣＩＰＨＲ論理ゲートを示す。図１２Ｄ～１２Ｇは、多重特異的で競合的なタンパク質結合から作製されたＮＯＴ（１２Ｄ）、ＮＯＲ（１２Ｅ）、ＸＮＯＲ（１２Ｆ）、およびＮＡＮＤ（１２Ｇ）ＣＩＰＨＲ論理ゲートを示す。各ゲートの黒い点は、バックグラウンド成長に対して補正された個々のＹ２Ｈ成長測定値を表し、それらの平均値はバーで示されている。＊バックグラウンドで酵母が増殖しないことを示す。中央のブロックと右側のブロックの０と１は、それぞれ異なる入力状態と期待される出力を表す。＼

【図１３Ａ－１３Ｅ】３入力ＣＩＰＨＲ論理ゲートを示す。図１３Ａは、３入力ＡＮＤゲートの概略図を示す。図１３Ｂは、３入力ＯＲゲートの概略図を示す。図１３Ｃは、Ｙ２Ｈの結果が、いずれかの入力での３入力ＯＲゲートの活性化を確証したことを示す。図１３Ｄは、ＤＮＦゲートの概略図を示す。図１３Ｅは、Ｙ２Ｈの結果が、ゲートの適切な活性化を確証したことを示す。各ゲートの黒い点は、バックグラウンド成長に対して補正された個々の測定値を表し、それらの平均値はバーで示されている。

【図１４Ａ】協調的に誘導される二量体化システムの分子実装を示しており、結合は、３つの構成要素すべてが存在する場合にのみ発生する。

【図１４Ｂ】１’と２を接続する可撓性リンカーに０、２、６、１２、および２４アミノ酸を有する１’－２’変異体のサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを示す。

【図１５Ａ－１５Ｂ】個々のＹ２Ｈ実験からの結合親和性勾配を示す。図１５Ａは、８：８’ヘテロ二量体がその単量体のホモ二量体よりも強く結合することを示す。図１５Ｂは、１：１’、９：９’、および１０：１０’対の単量体間の結合親和性勾配を示す。

【図１６】単量体Ａおよび単量体Ｂの組み合わせを含む例示的なヘテロ二量体タンパク質を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

引用されるすべての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。本出願では、別途記載されない限り、用いられる技術は、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ら、１９８９，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）、Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１８５，Ｄ．Ｇｏｅｄｄｅｌ編，１９９１．Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ），“Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ” ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｍ．Ｐ．Ｄｅｕｔｓｈｃｅｒ，ｅｄ．，（１９９０）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｉｎｎｉｓら、１９９０．Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ），Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，２ｎｄ Ｅｄ．（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ．１９８７．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ），Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｐｐ．１０９－１２８，ｅｄ．Ｅ．Ｊ．Ｍｕｒｒａｙ，Ｔｈｅ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，Ｃｌｉｆｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）、およびｔｈｅ Ａｍｂｉｏｎ １９９８ Ｃａｔａｌｏｇ（Ａｍｂｉｏｎ，Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）などの、いくつかの既知の文献のいずれかに見出す

ことができる。
【００２５】
本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈からそうでないことが明確に示されない限り、複数の指示対象を含む。
【００２６】
本明細書で使用される場合、アミノ酸残基は以下のように省略される：アラニン（Ａｌａ；Ａ）、アスパラギン（Ａｓｎ；Ｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ；Ｄ）、アルギニン（Ａｒｇ；Ｒ）、システイン（Ｃｙｓ；Ｃ）、グルタミン酸酸（Ｇｌｕ；Ｅ）、グルタミン（Ｇｌｎ；Ｑ）、グリシン（Ｇｌｙ；Ｇ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ；Ｈ）、イソロイシン（Ｉｌｅ；Ｉ）、ロイシン（Ｌｅｕ；Ｌ）、リジン（Ｌｙｓ；Ｋ）、メチオニン（Ｍｅｔ；Ｍ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ；Ｆ）、プロリン（Ｐｒｏ；Ｐ）、セリン（Ｓｅｒ；Ｓ）、スレオニン（Ｔｈｒ；Ｔ）、トリプトファン（Ｔｒｐ；Ｗ）、チロシン（Ｔｙｒ；Ｙ）、およびバリン（Ｖａｌ；Ｖ）。
【００２７】
本開示の任意の態様のすべての実施形態は、文脈からそうでないことが明確に示されない限り、組み合わせて使用することができる。
【００２８】
文脈上明らかに別段に必要でない限り、発明を実施するための形態および特許請求の範囲全体を通して、「ｃｏｍｐｒｉｓｅ（備える）」、「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（備えている）」などの語は、排他的意味の対語としての包括的意味、または網羅的意味で、すなわち、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ、ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ（含むがそれらに限定されない）」の意味で解釈されたい。単数または複数を使用する語は、それぞれ、複数、単数も含む。さらに、「本明細書における（ｈｅｒｅｉｎ）」、「上に（ａｂｏｖｅ）」、および「以下に（ｂｅｌｏｗ）」という単語、ならびに類似の意味の単語は、本出願で使用される場合、全体としての本出願を指すものであり、本出願のいかなる特定の部分を指すものではない。
【００２９】
態様が「含む」という言葉で本明細書に記載されている場合は常に、そうでなければ「からなる」および／または「本質的にからなる」に関して記載されている類似の態様も提供されることが理解される。
【００３０】
本明細書で使用される「界面残基」または「界面位置」という用語は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体などの少なくとも２つの単量体間で相互作用しているアミノ酸残基または位置を意味する。相互作用は、第１の単量体のアルファヘリックスからの少なくとも１つの水素が、第２の単量体のアルファヘリックスの側鎖に結合する水素結合ネットワークを含む。いくつかの態様では、相互作用は、少なくとも１つの水素結合、少なくとも２つの水素結合、少なくとも３つの水素結合、少なくとも４つの水素結合、少なくとも５つの水素結合、少なくとも６つの水素結合、少なくとも７つの水素結合を含む、少なくとも８つの水素結合、少なくとも９つの水素結合、および少なくとも１０の水素結合を含む。いくつかの態様では、界面残基は、疎水性残基を含む。
【００３１】
本開示の実施形態の説明は、網羅的であるようにも、本開示を、開示された正確な形態に限定するようにも意図されていない。本開示の特定の実施形態および実施例が例証目的で本明細書に記載されているが、当業者であれば認識するであろうように、様々な同等の修正が本開示の範囲内で可能である。
【００３２】
第１の態様では、本開示は、設計されたヘテロ二量体タンパク質であって、
（ａ）単量体Ａポリペプチドであって、アミノ酸リンカーによって接続された１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドである、単量体Ａポリペプチドと、

（ｂ）単量体Ｂポリペプチドであって、アミノ酸リンカーによって接続された１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドである、単量体Ｂポリペプチドと、を含み、
単量体Ａおよび単量体Ｂが非共有結合的に相互作用して、設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成するものである、設計されたヘテロ二量体タンパク質を提供する。
【００３３】
本開示は、２つの異なるアルファヘリックス含有ポリペプチド（単量体Ａおよび単量体Ｂ）の非共有相互作用によって形成されるこの態様に従って設計されたヘテロ二量体タンパク質を提供する。
【００３４】
タンパク質コイルドコイルの相互作用表面積を追加のヘリックスで倍増し、モジュール性水素結合ネットワークを組み込むことにより、本明細書に記載されるように、広範囲のヘテロ二量体相互作用特異性を達成することができる。中心軸の周りに様々な程度の超ヘリックスを持つ数百万のヘリックス骨格が生成され、広範な水素結合ネットワークに対応するものを検索し、続いてヘリックスを短いループで接続し、配列の残りを設計した。以下の実施例に開示されているように、Ｅ　ｃｏｌｉで発現された設計はヘテロ二量体のみを専ら形成し、例示的な設計の結晶構造は計算モデルに適合し、設計された水素結合ネットワークを確証した。独立して発現および精製されたヘテロ二量体設計を混合した後、ネイティブ質量分析によって観察された相互作用の大部分は、設計された同族のペア間だった。本明細書に開示される直交ポリペプチドヘテロ二量体の大きなセットは、例えば、合成タンパク質論理ゲート、転写ネットワーク、および他の合成生物学の用途を生成するために使用することができる。
【００３５】
ヘテロ二量体は、２つの異なる実体（多くの場合、融合タンパク質）をまとめる能力があるため、一般に、バイオエンジニアリングにおいてホモ二量体よりも有用である。この分野での長年の課題は、同族のペアを選択的に形成し、一方で、他の非同族の単量体への結合を回避する単量体である、直交して相互作用するタンパク質ヘテロ二量体のセットを考案することだった。本明細書に開示されるのは、プログラム可能にさらに大きなセットに拡張することができるそのような直交ヘテロ二量体のセットを含む。遺伝的に融合したヘテロ二量体を介して２つの異なる融合タンパク質をまとめる能力により、本明細書にも開示されているように、タンパク質に基づく論理ゲートの設計が可能になった。
【００３６】
一実施形態では、単量体Ａおよび単量体Ｂは、単量体Ａおよび単量体Ｂとの間の界面で少なくとも１つの設計された水素結合ネットワークによって決定されるそれらの相互作用特異性を有する。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量

体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含む。

【００３７】

任意の好適なアミノ酸リンカーを使用して、各単量体のアルファヘリックスを分離することができる。長さおよびアミノ酸含有量は、使用目的に基づいて変化する可能性があり、本明細書の教示に基づいて、当業者によって決定することができる。ポリペプチド単量体は、検出可能なタグおよび精製タグを含む、他の任意の有用な配列を含み得る。１つの非限定的な実施形態では、単量体Ａおよび単量体Ｂのうちの少なくとも１つは、ヘキサヒスチジンタグを含む。

【００３８】

別の実施形態では、本開示は、

（ａ）単量体Ａポリペプチドであって、１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、隣接するアルファヘリックスが、アミノ酸リンカーによって任意選択に接続され得る、単量体Ａポリペプチドと、

（ｂ）単量体Ｂポリペプチドであって、１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、隣接するアルファヘリックスが、アミノ酸リンカーによって任意選択に接続され得る、単量体Ｂポリペプチドと、を含み、

単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチドが、非共有結合的に相互作用して、設計されたヘテロ二量体タンパク質を形成するものである、ヘテロ二量体を提供する。

【００３９】

一実施形態では、単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチドは、単量体Ａポリペプチドと単量体Ｂポリペプチドとの間の界面における少なくとも１つの水素結合ネットワークによって決定されるそれらの相互作用特異性を有する。別の実施形態では、

（ｉ）単量体Ａポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含むか、

（ｉｉ）単量体Ａポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含むか、

（ｉｉｉ）単量体Ａポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含むか、

（ｉｖ）単量体Ａポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含むか、

（ｖ）単量体Ａポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含むか、

（ｖｉ）単量体Ａポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含むか、

（ｖｉｉ）単量体Ａポリペプチドは４つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含むか、

（ｖｉｉｉ）単量体Ａポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは５つのアルファヘリックスを含むか、

（ｉｘ）単量体Ａポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチドは２つのアルファヘリックスを含むか、または

（ｘ）単量体Ａポリペプチドは３つのアルファヘリックスを含み、単量体Ｂポリペプチド

は２つのアルファヘリックスを含む。
【００４０】
上記の実施形態のいずれかの１つの実施形態では、
（ｉ）単量体Ａは、配列番号１～２９０の群から選択されるからなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、
（ｉｉ）単量体Ｂは、配列番号１～２９０の群から選択される群から選択されるからなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、偶数の配列番号は、工程（ｉ）の奇数の配列番号の結合パートナーである。
【００４１】
配列番号１～２９０のアミノ酸配列を表１Ａに提供する。「結合パートナー」には、表に示すように順番に番号が付けられる（同様に命名される）。例えば、配列番号１（ＤＨＤ９　Ａ）および配列番号２（ＤＨＤ９　Ｂ）は結合パートナーであり、その結果、単量体Ａが、配列番号１のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含むならば、単量体Ｂは、配列番号２のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む。同様に、配列番号３～４は結合パートナーであり、配列番号５～６は結合パートナーであり……、配列番号２８９～２９０は結合パートナーである。当業者は、本明細書の教示に基づいて結合パートナーが何を意味するかを明確に理解するであろう。

【表１－１】

表１Ａ

設計名称	オリゴマー化状態	鎖	設計配列
DHD9	ヘテロ二量体	a	GSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESK KINKRIKELIKS　配列番号１
DHD9	ヘテロ二量体	b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEI SDRIERLLRS　配列番号２
DHD13_XAAA	ヘテロ二量体	a	GTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLL EESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR　配列番号３
DHD13_XAAA	ヘテロ二量体	b	GTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKIL EEIRELSKRSLELLREILYLSQEQKGSLVPR　配列番号４
DHD13_XAXA	ヘテロ二量体	a	TKEDILERQRKIIERAQEIIRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLE ESLRLLKELLELLEESAQLLYEQR　配列番号５
DHD13_XAXA	ヘテロ二量体	b	GSTEKRLLEEAERAHREAKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKI LEEIRELSKRLLELLREILYLSQEQK　配列番号６
DHD13_XAAX	ヘテロ二量体	a	TKEDILERARKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLE ESLRLLKELLELSEELAQLLYEQR　配列番号７
DHD13_XAAX	ヘテロ二量体	b	GSTEKRLLEEAERAIREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKI LEEIRELSKRSLELLREILYLLQEQK　配列番号８
DHD13_2:341	ヘテロ二量体	a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELEYIIR　配列番号９
DHD13_2:341	ヘテロ二量体	b	MSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQRKANNGSETEKRLLE EAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSK RSLELLREILYLSQEQK　配列番号１０
DHD13_AAAA	ヘテロ二量体	a	MTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILKEQEKIIRKPGSSEEAMKRSLKLI EESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR　配列番号１１
DHD13_AAAA	ヘテロ二量体	b	GTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHKELTKIHQQSGSSEEAKKRALKIS QEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK　配列番号１２
DHD13_BAAA	ヘテロ二量体	a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILKRSEEIIRKPGSSEEALETLRELQE ESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR　配列番号１３
DHD13_BAAA	ヘテロ二量体	b	GSTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRTEEIIRQSGSSEEAKDELRRI QEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK　配列番号１４
DHD13_4:123	ヘテロ二量体	a	TTKRYLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQ　配列番号１５

【表１－２】

DHD13_4:123	ヘテロ二量体	b	GSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQQVNDVDEKALERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEAR 配列番号16
DHD13_1:234	ヘテロ二量体	a	EAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEAR 配列番号17
DHD13_1:234	ヘテロ二量体	b	TTKRYLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQQVNDVDEKALERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGS 配列番号18
DHD15	ヘテロ二量体	a	TREELLRENIELAKEHIEIMREILELLQKMEELLEKARGADEDVAKTIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERS 配列番号19
DHD15	ヘテロ二量体	b	GTERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLKKARGADEKVLDELRKIIERIRELLDRSRKIHERSEEIAYKEE 配列番号20
DHD20	ヘテロ二量体	a	GDRQELIRRNIELLKEHIKILEEISQLIEELSELLDKSSSEEVVKRYKKILERYKQLLRKSQEIHKESSEIAKKES 配列番号21
DHD20	ヘテロ二量体	b	GDEQKLIERSQRMQKESLELLKEIIKILDTIEKLLDKPDSEELLDTIKKLHDTLKKIHDRNKKLLKEHEEILRQRSGSLVPR 配列番号22
DHD21	ヘテロ二量体	a	DKEEEYKRLLDEIKEILKESKEVLKDSKRVLEDIKRKVPDDDLVKLLEKHVRLLEEHVKLLEQLIREAEKSSK 配列番号23
DHD21	ヘテロ二量体	b	QGSSAEELLKKIKESEKKIRDSLRKIKEIIKKSRKEGVDDKQLDLIRKVVESHRDLLRLHRDLLRLLREETS 配列番号24
DHD25	ヘテロ二量体	a	DIDESIKEVEKLLEEVEQSLQKLDDSLKKLLEKVNQDPDVDDSVRKIVKRHVEILKRHEEVLKRLIEVVKEHTKTVK 配列番号25
DHD25	ヘテロ二量体	b	GSDREEVHKEIVKLIREIIKIHKKILKIHEKIKNGEIDPSEILKLSEEIKKLTDTIIKIIEDLEQLTRDLRR 配列番号26
DHD27	ヘテロ二量体	a	DRKEIVKRHQKVVELLKESSKLLRESSKLLQRLLDKTGDENLQKAVDDQDKAIKRQETAIRKSQEASKKLD 配列番号27
DHD27	ヘテロ二量体	b	DNSEEIKKVAKTSREVAEYSERVAKENDKVVKTLEEGKIDESELLRLLEESIKIFDTALKLHEEAYKLHQDLVRKVS 配列番号28
DHD30	ヘテロ二量体	a	DESEAASVAIESVQILVESVKLLEESVRILLDAVKKNGVEDLLRVAQRWEKLVDEWLKVVKRWLDNVRDIQR 配列番号29
DHD30	ヘテロ二量体	b	GSDKAEEVEKSVRKIEESIKKIRKSIKKAEDAVQLLKEGKIDAKDFLRIVREDLEVVKEDVEIVKEDVENVREFSS 配列番号30
DHD33	ヘテロ二量体	a	SDKEVSDKLLKASKKLLKVSEELLEVVRRLLKALKDDELIKKIADLLRKIIDKDKKFIRTSEEIVKESR 配列番号31
DHD33	ヘテロ二量体	b	GSDLKEVLKTVEEAVKEIIKSSEELLQISRKILEISRVGVDEHEYISAIREYLKALEKHIQILKKFIEILKELIRAVS 配列番号32
DHD34_XAAXA	ヘテロ二量体	a	SKEEIDKIVKKHKKKIEEHKKKVDELKKLVEEHDKRVSQDKDDKVKKLSEEVKKIIKRLEEVSKRLEEVSKKLLKVISDKR 配列番号33
DHD34_XAAXA	ヘテロ二量体	b	GSNDEELKKILETLDRILKKLDKILTRLIEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQFIELIKKYEEVVKEYEEVVRQLIRLFS 配列番号34
DHD34_XAXXA	ヘテロ二量体	a	SKEEIDKIVKKHKKKIEELKKLVDELKKLVEEHDKRVSQDKDDKVKKLSEEVKKIIKRVEEVAKRLEEVSKKLLKVISDKR 配列番号35
DHD34_XAXXA	ヘテロ二量体	b	GSNDEELKKILETLDRILKKLEKILTRLIEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQFIELIKKFEEVIKEYEEVVRQLIRLFS 配列番号36
DHD34_XAAAA	ヘテロ二量体	a	SKEEIDKIVKKHKKKIEEHKKKVDEHKKLVEEHDKRVSQDKDDKVKKLSEELKKISKRLEEVSKRLEEVSKKLLKVISDKR 配列番号37
DHD34_XAAAA	ヘテロ二量体	b	GSNDEELKKILETLDRILKKLDKILTRLDEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQYIELVKKYEEVVKEYEEVVRQLIRLFS 配列番号38
DHD36	ヘテロ二量体	a	DHSRKLKEILDRLRKHVKRLKEHLDELRDLVRQVPEDKLLEHVVKLSDKILQISERAVREFTKSVDKDS 配列番号39
DHD36	ヘテロ二量体	b	GSDKKDELERILDEIRRLIERLDEILSRLNKLLELLKHGVPNAKEVVKDYIRLLKEYLELVKEFLKLVKRHADLVS 配列番号40

【表１－３】

DHD37_ABXB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSER SVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 41
DHD37_ABXB	ヘテロ二量体	b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVEL LKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 42
DHD37_BBBB	ヘテロ二量体	a	MDEEDHLKKLKTHLEKLERHLKLLEDHAKKLEDILKERPEDSAVKESIDELR RSIELVRESIEIFRQSVEEEE 配列番号 43
DHD37_BBBB	ヘテロ二量体	b	GDVKELTKILDTLTKILETATKVIKDATKLLEEHRKSDKPDPRLIETHKKLV EEHETLVRQHKELAEEHLKRTR 配列番号 44
DHD37_XBXB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKLLKELRDILSENPEDERVKDVIDELER VIRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 45
DHD37_XBXB	ヘテロ二量体	b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDLNKVLEKLRRSERKDPKVIETVVEL LKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 46
DHD37_AXXB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRLEDLLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSER VVRTVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 47
DHD37_AXXB	ヘテロ二量体	b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKVVDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVEL LKRLEKLIKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 48
DHD37_3:124	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSEN 配列番号 49
DHD37_3:124	ヘテロ二量体	b	EDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKLEKTKPDSKTAKELDKLLDT LEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLE IAKTHAKKVE 配列番号 50
DHD37_1:234	ヘテロ二量体	a	DSDEHLYKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDAIDLSER SVRIVKTVIKIFEDSVRKKEKRPIDKRDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDD ANKLLEYLRR 配列番号 51
DHD37_1:234	ヘテロ二量体	b	GDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 52
DHD37_AXBB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLDRLDKHLKKLKTFLENLRRHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSKT VIKIFEDSVRKKERSVRIVE 配列番号 53
DHD37_AXBB	ヘテロ二量体	b	GSDDKEATKIIDDLDKLLDTLEKILQTANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVKA VKELLEIAKTHAELLKRHEKKVE 配列番号 54
DHD37_XBBA	ヘテロ二量体	a	DSDEHIKQLRDHLDRLDKHLKKLKTFLENLRRILSENPEDERVKTVIKIFED SVRKKERSVRIVKDVIDLSE 配列番号 55
DHD37_XBBA	ヘテロ二量体	b	GSDDKEANKLLEKATKIIDDLDKLLDTLEKILQTLRRSERKDPKAVKELLEI AKTHAELLKRHEKVVETYVKKVE 配列番号 56
DHD39	ヘテロ二量体	a	DHSRKLEEILDRLRKHVKRLLEHLRELLSLVKENPEDKDLVEVLELSLAILR RSLEAVEAFLKSVTKKDPDDEDLRRKADEIRKEVEEIKKSLAEVEKEIYKLK 配列番号 57
DHD39	ヘテロ二量体	b	GSSADDVLEDILKIIRELIEILDQILSLLNQLLKLLRHGVPNAKKVVEKYKE ILELYLQLVSLFLKIVKTHADAVSGKIDKKAEEEIKKEEEKIKEKLRQAKDI LKKLQEEIDKTR 配列番号 58
DHD40	ヘテロ二量体	a	DRDAHLYKLLTFLEQLVRHLDRLVKHITQLRDIVKKDPEDERAVDVIRQSVR SLEIVITVLKIFVDSVSDAARSKEAEKIVRKIRKEIDEIRQKLREIDKEVKK TTS 配列番号 59
DHD40	ヘテロ二量体	b	GSNDKVLDKILDILDRILRLATRVIDLANKLLQVKKKSTHKDPRIVETYKEL LKIHETAVRLLLELADLHRRLKSKDEEANKRVETELDRIRKKVKDIEDKVRK LEDKVRKTAS 配列番号 60
DHD43	ヘテロ二量体	a	NDLSKEVLKKLEKSVEELLRRVQKSVKEAQKRGLLSDELVDRHLKILNQLVK RHLELLQEVIKRSDKK 配列番号 61
DHD43	ヘテロ二量体	b	GSDEAVKRVVEKSLKILDEVIKKSLDILRELIELQIRHAKDDESVIRASKSA LKDAIEALKKSLDEIKKALKRSADEG 配列番号 62
DHD65	ヘテロ二量体	a	SSEEVVKVHEKVVKLHKEILELLKKIIKIHETAARDPDDKDSIKKLSDEIKK IVKRIEDISDQAKRESSDAQRKQS 配列番号 63
DHD65	ヘテロ二量体	b	DKEEESKELLKKLKEILKRSEELLEESKELLKLAKNGEIDESELADADRKLN KKHEKLVQDIQDLLREHERQDR 配列番号 64

【表１－４】

DHD70	ヘテロ二量体	a	DEKKKIDKIVKETEDLLQKSEKLLQQSKEAVKRIRSQVKENEIVDRLLRISEELLKISRRLVEISRRIASTLS 配列番号 65
DHD70	ヘテロ二量体	b	GSSKEEVIRLLKENVRLIKENLELLTRNLKLITDLVRGSNGSEEKIKTLKELLKEYRELLKRYRKLVEDYKRLVDKHD 配列番号 66
DHD88	ヘテロ二量体	a	EIQELIKSSRRIIEESKELIKESEEVLRRIKEILDRIRNGVDNQEDLLREILKLLTKNLKIIQRNLKLLQDNAEILKRLVS 配列番号 67
DHD88	ヘテロ二量体	b	GSYIEDVIKKILDVSRELIKLSRTIIKISEEINKQLQQGRDTKDLVKKYDEIIKKYTRIVQHYTELIKELQKLLS 配列番号 68
DHD89	ヘテロ二量体	a	SPTEEAIQLSQRVIELSKRVIELSKEILKLLKRVLDLLPDLDKNEEKRLDDYDKELKEYDKELKKYEKRLKDLAS 配列番号 69
DHD89	ヘテロ二量体	b	GSEEEEILKIQKELLRIQSEILDKQKKILDTLRSNGAVTEEVRSILEKVERLSEEAKELSKEAKELTKEVSKLIS 配列番号 70
DHD90	ヘテロ二量体	a	SPLKELNNQLLRLLRELVKVSKKIVDLSKTIIEVLKHTDLDPRLLDSLEKSQQELDKSQKELDKVVKELTKVNKKLQ 配列番号 71
DHD90	ヘテロ二量体	b	GSPLEDLVRKYDELVKTYEKLVEEFKKAVDKYDKAVKKAPVSKEATDSLDLIRKVLELLDRNLKLIKENAKLIKELLK 配列番号 72
DHD91	ヘテロ二量体	a	SPTRENEKVIKENEKVISDNERVLEEVVKVVETATDRKEIQDAVDEVRKSVDKLRDSVRKLEESVRTLD 配列番号 73
DHD91	ヘテロ二量体	b	GSPIKDISKRLLEISKRLVEISDRIVELLQRIADSKDPNKDLQKEVKDVLEEYKRLVREYREVVKEYEKVVS 配列番号 74
DHD92	ヘテロ二量体	a	DEDEHVKQLIKNADLLRKHAELLKELVKLFQEIASQIPDDRVAKKVTDVVDRIDKILKQTEKLVRRTKQILDYSR 配列番号 75
DHD92	ヘテロ二量体	b	GSNLEELVKLLKEVLEMHERLLRIHEDLVEAHKSNASDKESERKLKKSDKDIKESLKKIKSIIDQVRYIQS 配列番号 76
DHD93	ヘテロ二量体	a	PVEDIIEESLRLLEESLKLLNRILKLLEDSLRKLPRSEEWRQRLDEFRKKLEDWKEELERWIEDVRYKKT 配列番号 77
DHD93	ヘテロ二量体	b	GSDEDYESREIIDEIRKLLDRSKKIVHRSQRLVERVKSTPLSEDQEDLIRRHEETINRHRELVKELEKVLEDHERHIR 配列番号 78
DHD94	ヘテロ二量体	a	PEEDSRRVLERFVRVSREVLKVLEEFLRVSEELLREADRDRDRRLEEYERQVDELREEIRRYKEEVDKFDKEVKYYKK 配列番号 79
DHD94	ヘテロ二量体	b	GSPEKDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKNGLIDEKALRKQQEVLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVI 配列番号 80
DHD94_3:214	ヘテロ二量体	a	GSPERDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKN 配列番号 81
DHD94_3:214	ヘテロ二量体	b	GSDEKALRKQQEVLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVITRGEDHKAEEDSRRVLERFVRVSREVLKVLEEFLRVSEELLREADRDRDRRLEEYERQVDELREEIRRYKEEVDKFDKEVKYYKK 配列番号 82
DHD94_2:143	ヘテロ二量体	a	GSDRRLEEYERQVDELREEIRRYKEEVDKFDKEVKYYKK 配列番号 83
DHD94_2:143	ヘテロ二量体	b	GSPERDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKNGLIDEKALRKQQEVLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVITRGEDHKAEEDSRRVLERFVRVSREVLKVLEEFLRVSEELLREADR 配列番号 84
DHD95	ヘテロ二量体	a	DLSEESKKFVEKVKKLEKESRELEKQVKKIEEDSRSVENDVQKEFLELLKRLLDIQKKVVEVLREVVKVQQYVDS 配列番号 85
DHD95	ヘテロ二量体	b	GSDSEYESRQVLRELDTVLKDSHTVLEALRQVIRDSQDVVSKSDEESRRVIDDLEKVIQDSKKVLDDIKRLIDKSKSIKS 配列番号 86
DHD96	ヘテロ二量体	a	NEDELLKLLTENLKLLDENLKLLRENLSLLRQANNITDKNRIREIVKQSKEIVKQSREILKQSKEIVERIKYIVS 配列番号 87
DHD96	ヘテロ二量体	b	GSSLYELTQRYEKLVQQYEELVKDYRRLVKKLEKLKRDNKPDKRLLKEIVDVIKKSVEIIDRSLKLLEESIKILEETD 配列番号 88
DHD97	ヘテロ二量体	a	SQERSLEILKRILDVLKESLEILKESLSILRQLASRIKNPNRKIEEILKESDKIIKESDKVLKEIEEVIRYSS 配列番号 89
DHD97	ヘテロ二量体	b	GSDIEYESKEILELIKELLKLSRELLKESRRALELVRKSRDDSIVEEVIQVHKKVLDIHKEVLKIVRKVVEVHRRVKS 配列番号 90

【表１－５】

DHD98	ヘテロ二量体	a	SKKDESTKLERLAEKIDEITKRIEELVKDVKRKSSEGVDKDQQQKIDEVFQK LLDLQREILEILDRILKVQQYILD 配列番号 91
DHD98	ヘテロ二量体	b	GSDLEYLNRRLLQLIKTLIDLNRHLLKLIDKLKKLNSREGDEEKIKEESKQI QEQFKEIVERSKEIIKQIKEIIKRSQ 配列番号 92
DHD99	ヘテロ二量体	a	DFERSSRRLEKVVEDLRRSSDRLREVIDELRKSADEKDEDEDLRRARKEHRD LIEELKRALEKQEEIIKHLQELVYRQL 配列番号 93
DHD99	ヘテロ二量体	b	GSEESEEVRKVVERIKKISRELEEVVKELDRVSKEFDRHGETDEIVREHERI VEKLEEIVKKHTKIVEELAEIVYKQQ 配列番号 94
DHD100	ヘテロ二量体	a	SDDDSVRVLDEIVKILDESVKLLKESLKLLDDFLRTKPDDHLKEVVKESKKV VEQSKKVLDRIKKIIYESK 配列番号 95
DHD100	ヘテロ二量体	b	GSDLLYLSKELLKLVRELLKLSRELVELSRRLVNSTHKSPELVKKYDKLVKK YQDLLKKLADVADEYLRQRS 配列番号 96
DHD101	ヘテロ二量体	a	DEKDYHRRLIEHLEDLVRRHEELIKRQKKVVEELERRGLDERLRRVVDRFRR SSERWEEVIERFRQVVDKLRKSVE 配列番号 97
DHD101	ヘテロ二量体	b	GSDAYDLDRIVKEHRRLVEEQRELVEELEKLVRRQEDHRVDKKESHEILERL ERIIRRSTRILTELEKLTDEFERRTR 配列番号 98
DHD102	ヘテロ二量体	a	DERYRAREHIRRVEEHTKRLRHILKRLREHEEKLRRELKPGDEITESVDRFK KIVDQFEESIKKFETVSEELRKSDS 配列番号 99
DHD102	ヘテロ二量体	b	GSDRQRILDRLDKILEKLDDILKKLKDILETLSKDDVSDRRHKDLVEKFREL VDTHHKLVERYRELVYQNR 配列番号 100
DHD102_1:243	ヘテロ二量体	a	GSDEITESVDRFKKIVDQFEESIKKFETVSEELRKSIS 配列番号 101
DHD102_1:243	ヘテロ二量体	b	GSDPQRAADRLDKILEKLDDILKKLKDILETLSKDDVKDRRAKDLVEKFREL VDTHHKLVERYRELVYTATAGSDLARELIRRVEEHTKRLRHILKRLREHEEK LRR 配列番号 102
DHD103	ヘテロ二量体	a	NADDQLATSIKKLEDSIDQLIKIVRKFEESVKKLQKHGVDQHHVEILRKIVE IFRQHIEKLKKHLEKLRYTSS 配列番号 103
DHD103	ヘテロ二量体	b	GSDKEYLVTEHEKLVREHEKIVSEIEKLVKKHEAGVDESELEEILKKVEKLL RKLDEILEQLTQLLRKTE 配列番号 104
DHD103_1:423	ヘテロ二量体	a	GSDQHVVEILRKIVEIFRQHIEKLKKHLEKLRYTSS 配列番号 105
DHD103_1:423	ヘテロ二量体	b	GSDAEYLVTEHEKLVREHEKIVSEIEKLVKKHEKGVDESELEEILKKVEKLL RKLDEILEQLTQLLRKAEKHIDKHSKAADQLATSIKKLEDSIDQLIKIVRKF EESVKKLQKH 配列番号 106
DHD104	ヘテロ二量体	a	DEDDDIRRVLDESRRVLEHSRRVLKRSEEVLEKASRKKEKDTEEIEKHLKRL REHAKKLEKHRRELDDFLYKEI 配列番号 107
DHD104	ヘテロ二量体	b	GSRDKYLLERLNDILKKLDEIVDKLSDILKRLKDVRHDDRLQELVERYKEIV KEYKRIVEEYEKLVREFEEQQR 配列番号 108
DHD105	ヘテロ二量体	a	DRDYEDKEFKKIIKELEDVQEELKKLQEKIKRFSSELEEPNELLKEQLKVNE EQLEVNKKILKILRDQLKQNE 配列番号 109
DHD105	ヘテロ二量体	b	GSDAEYKVRESVKRSKESVKHSEDVVDKLNKSVKLSESGHSDAEKASRELVK LVREVVELSREVIKLSEKVLRVIS 配列番号 110
DHD106	ヘテロ二量体	a	DLQYKQEKLIRHFDRVVREWDKLVRKFSKVLEKQKHESKDKELEEASRRVDE LIKRLREQLKRSKEILRRLKELSRKSS 配列番号 111
DHD106	ヘテロ二量体	b	GSDWEELLRRLEKVLQEYEEIVKELIDLIERLIKVSEDKSKDASEYKKLVTE LEKLISKLEEISKKLEELVKEYEYKTE 配列番号 112
DHD107	ヘテロ二量体	a	DAKDELEKSLQEIEESLKELKKLLEELDKSLRELTSQGRNKKLEEHIKKVQK FIELVKKYIKAVQDYLKEVRYDNS 配列番号 113
DHD107	ヘテロ二量体	b	GSDKERAARATEEMVKLTKKLLKAVEDLVRDVRRLLKEGLISEKHARIAETI LEVFKKHAKIIKKHVDIVKYDES 配列番号 114
DHD108	ヘテロ二量体	a	GSPLKERLLEIQRDLDRVLEEVVERLLRIQERLDSVVERKPPDVHEEYKYIV DEIREIVERVVREYEEIVKRIDEEVR 配列番号 115
DHD108	ヘテロ二量体	b	GSEEDERIRYDLDRIRKDVRRKLEEIRQRVRELEKKLRDAGHRRDEKELLRE LIETSKDILRLVEELLKKIIDKSEDLLRKTE 配列番号 116

【表１－６】

DHD109	ヘテロ二量体	a	GSDEEDYINENVEKDVRDIEDDVRRINERIRELLEKIRTEEVLQRVLEEHHE LVERVLRKLVEILRKHEEENR 配列番号 117
DHD109	ヘテロ二量体	b	GSDEEEYYKEKLHKLLREIEELLKHYRELVRRLEELVKRGELDKDTAAHILE RLSELLERIIRRVAHTLRRLSEERR 配列番号 118
DHD110	ヘテロ二量体	a	GSDEDEISYDSKRRVEEIVRQAREKSEKSRKDIEDVAEVLRKGDVSEKEVVD ELVKVLEEQVKVLREAVERLREVLKKQVDDVR 配列番号 119
DHD110	ヘテロ二量体	b	GSDIVELVDHLLKRSLKLLEELAELVRRLLEKSTELLKRRTEEHKEEVVEES EYMVRELEERLRRVVDESEKLVRDADKHIR 配列番号 120
DHD111	ヘテロ二量体	a	GSKEKDIVKTLVDLLRENLETLERLIEEVVRLLKENVDVRDEGRDDKDSERI LRDIKRRIDEAAKESREIIERIEKEVEYRSR 配列番号 121
DHD111	ヘテロ二量体	b	GSPEVDVLRRIVREILKASEELLRLLRKLIDEALKLSERKRDSQEYREVVDR VKKELERLLDEYRKLVEELKEKLRYDTR 配列番号 122
DHD112	ヘテロ二量体	a	GSDKRYESEKLKRRLDEAVEKVREVVERVERESDRVLEEVRRRRESKEVVDK VIEDNDKALEDVLRVVDEVAKVVRDVVRENTR 配列番号 123
DHD112	ヘテロ二量体	b	GSPREYHSKDILRKVDEILERIRRHADRVKKKSERLKRENVDVNEHSKDVKR VIRELLELVKELLRLAKKHSDDQQE 配列番号 124
DHD113	ヘテロ二量体	a	GSDEDEILYHSERLLQKLKKELDDLKEKSRELLEELKKEDPDDRLIERIIRL HDEVLKDLDEVLKNILEVHREVLERLR 配列番号 125
DHD113	ヘテロ二量体	b	DKLDRLLKIHEEALRRAEELIKRLLDIHRRALDLARRGELDDYLLKESEREL REIIRRAREELKESRDRLEEISR 配列番号 126
DHD114	ヘテロ二量体	a	GSPKEELIRRVLEEVKRLNEKLLEIIRRAAELVKRANDELPETEKLREIDRE LEKKLKEIEDELRRIDKELDDALYEIED 配列番号 127
DHD114	ヘテロ二量体	b	GSPKLDKLRELLERNLEKLREILEEVLKILRTNLERVREDIRDEDVLQEYER LIRKAEEDLRRVLKEYDDLLKKLVYELR 配列番号 128
DHD115	ヘテロ二量体	a	GSKEDESVKRAEEIVRTLLKLLEDSLREAERSLRDIKNGEDEHNLRRISEKL EELSKRITETIERLLRELQYTSR 配列番号 129
DHD115	ヘテロ二量体	b	GSPNQELLDRVRKILEDLLRLNEELVRLNKELLKRALEMRRKNRDSEEVLER LAEEYRKRLEEYRRELEKLLEELEETIYRYKR 配列番号 130
DHD116	ヘテロ二量体	a	GSDESEEAQHEVEKVLDDIRRLSEHLQKRLEEVLEEVYELRREGSDRTEVVE LLKEVIREIVRVNREALERLLRVVEEAVKRNE 配列番号 131
DHD116	ヘテロ二量体	b	GSDEEELVETVKRIQKEILDRLTELAKLLVEIQREIKKLKDEGEDDKELKRL SDELEEKVRQVVEEIKRLSDELEETVEYVSR 配列番号 132
DHD117	ヘテロ二量体	a	GSDEEEEVVRRAEELVKEHEELIERVIRTHEELVYKLEDQGADKKLVDVLKR VVEESERVAREIVKVSRELIRLLEEASR 配列番号 133
DHD117	ヘテロ二量体	b	GSSKEEILKELEDLQRRLIEELKKLQERVVELLEELIKRLRDRGRDDKHLKR LVKEVRRLSEEVLRSIKEVSDRVRYQLR 配列番号 134
DHD118	ヘテロ二量体	a	GSDKEEESEYLLRDLVRLLEKVKEKIEEVNREVEKLLKKVKDGRLDRREVLR EILRLNRELAEIIKEVVDRIRHVVERSER 配列番号 135
DHD118	ヘテロ二量体	b	GSDLHEVVYETKELLKRIEEVVEELRKKSEDIIRKAERGEISEDELKRLQEE IAREAKKLLDEIKRVLERHLEQTL 配列番号 136
DHD119	ヘテロ二量体	a	GSPVEEIIKEVVKRVIEVQEKVLRIISHAVKRVVEVQKKYDPGSEESNRVVE EVKKTIEDAIRESDEVVDEVVKRIQYTVR 配列番号 137
DHD119	ヘテロ二量体	b	GSPEQEIADRILTEIRESQKELERLARKILKLLDESQEKAKRGRLSEEESDE LLERIKKELDELLERSKELLKKIEYELR 配列番号 138
DHD120	ヘテロ二量体	a	GSDEDKEANRVLDEVLKTVRDLLETANEVLKEVLYRLKRTDDQEKVVRTLTE VLKEHLKLVEEIVRILDKVLKEHLETEK 配列番号 139
DHD120	ヘテロ二量体	b	GSPEDDVLRRLEEVSEKILRVAEDVARQLREVSEKITQGKVDRKEWEEDIKR LKRELEELLREWKEEIERLTYELR 配列番号 140
DHD121	ヘテロ二量体	a	GSRREEVVKRIRELLKRNKELIDRIRELLEENEYLDKDARDKDVLRRSVELL EELVRILEESVELAKEIIKLLREVVE 配列番号 141
DHD121	ヘテロ二量体	b	GSDEKEDNRRLQHKIERILEKNEDLQRKLEEILELLERGEADEEKIDRLRKA VEDYRRVVEEIKEDVKRHKYTVR 配列番号 142

【表１－７】

DHD122	ヘテロ二量体	a	GSDEKEEAKKASEESVRTVERILEELLKASEESVELLRRGEDAKDVVERSKE ALKRVKELLDEVVKRSDEILKYIHN 配列番号 143
DHD122	ヘテロ二量体	b	GSDEKKLINEVVETQKRLIKEAAKRLSEVVRHQTELIRELREKNVDDKDVEK LLKESLDLAEEIVRRIKELLDESKKLVEYVSN 配列番号 144
DHD123	ヘテロ二量体	a	GSPDMDEVKRVLDELIEIQEEILREIKRVLEKLIKIQEDNGSEYESREVVRE IVEIARKLVERSRRVVKKITETLQ 配列番号 145
DHD123	ヘテロ二量体	b	GSDERYATREIVERIERIAREILKRTEEIVREVREVLSRDVDQEEVVRRLAD LLRESVELVQHLVRRVEELLQESVERKK 配列番号 146
DHD124	ヘテロ二量体	a	GSPEREALREVLEDLKRVTDRLRELVERVLEELKKVTDHVDSERILRESRRV LKELKDIIEEILRESEKVLEKLKYTED 配列番号 147
DHD124	ヘテロ二量体	b	GSPAREILEEVVKKHLEVVEDAARILEEIIREHEKAVREDRDKKELEEISRD LLRKAREALKKVKDISDDLSREIEYVAS 配列番号 148
DHD125	ヘテロ二量体	a	GSPVEEAIKKVIDDLRDVQRKIRELVEELIRLLEEVQRDNDKRESEYVVERV EEILRRITETSREVVRKAVEDLS 配列番号 149
DHD125	ヘテロ二量体	b	GSDSDEKAEYLLKEMERVVRESDEVVKKILRDLEEVLERLRRGEISEDDVTE ILKELAERHIRAIEELVRRLRELLERHKR 配列番号 150
DHD126	ヘテロ二量体	a	GSPVEEVLKELSEVNERVRDIAREIIERLSEVNEEVKETDDEDELKKISKKV VDEVEDLLRKILEVSEEVVRRVEYHDR 配列番号 151
DHD126	ヘテロ二量体	b	GSPKEDILREVLRRHKEIVREIVRLVREAVETHLELVKRNSDDRDAQDVIRK LEEDLERLVRHAQEVIEEIFYRLH 配列番号 152
DHD127	ヘテロ二量体	a	GSPRSYLLKELADLSQHLVRLLERLVRESERVVEVLERGEVDEEELKRLEDL HRELEKAVREVRETHREIRERSR 配列番号 153
DHD127	ヘテロ二量体	b	GSDREYIIKDILDSQEHLLRLIEELLETQKELLEILKRRPDSVERVRELVRR SKEIADEIRRQSDRNVRLLEEVSK 配列番号 154
DHD128	ヘテロ二量体	a	GSDEKDEIRHVIESVERLIEDIKRLLKTLRELAHDDSDKKTVKEVLDRVKEM IERHRRELEEHRKELERAEYEVR 配列番号 155
DHD128	ヘテロ二量体	b	GSESEDRIKELLKRHIELVERHEELLHEIKKLIDLEEKDDKDREEAVKRIDD AIKESEEMLEESKEILEEIEYLNR 配列番号 156
DHD129	ヘテロ二量体	a	GSSLEDSVRLNDEVVKVVERVVRLNQEVVRLIKHATDVEDEETVKYVLERVR EVLDESREVLKRVHELLEESERRLE 配列番号 157
DHD129	ヘテロ二量体	b	GSHEKDIVYKVEDLVRKSDRIAERAREIVKRSRDIMREIRKDKDNKKLSDDL LKVTRDLQRVVDELEELSRELLRVAEESRK 配列番号 158
DHD130	ヘテロ二量体	a	GSPELDEVKKLIDELKKSVERLEESIREVKESIKKLRKGDIDAEENIKLLKE NIKIVRENIKIIKEIIDVVQYVLR 配列番号 159
DHD130	ヘテロ二量体	b	GSDEEEIEELLRELEKLLKKSEEALEESKKLIDESEELLRRDRLDKEKHVRA SEEHVKLSEEHLRISREIVKILEKAVYSTR 配列番号 160
DHD131	ヘテロ二量体	a	GSDESDRIRKIVEESDEIVKESRKLAERARELIKESEDKRVSEERNERLLEE LLRILDENAELLKRNLELLKEVLYRTR 配列番号 161
DHD131	ヘテロ二量体	b	GSDEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGEVSEEESDRILRE IKEILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAE 配列番号 162
DHD132	ヘテロ二量体	a	GSDKKDASRRAIRVLHEFVRVSEEVLEVLRKSVESLKRLDVDEKIKRTHDRI EEELRRWKRELEELIERLREWEYHQD 配列番号 163
DHD132	ヘテロ二量体	b	GSDDEEEDKRLLEEVKRSLDTDERILEKLRHSLERQLEDVDKDEDSRRVLRE LDEITKRSREVVKRLRKLAYESK 配列番号 164
DHD133	ヘテロ二量体	a	GSDKEYKLDRILRRLDELIKQLSRILEEIERLVDELEREPLDDKEVQDVIER IVELIDEHLELLKEYIKLLEEYIKTTK 配列番号 165
DHD133	ヘテロ二量体	b	GSPSKEYQEKSAERQKELLHEYEKLVRHLRELVEKLQRRELDKEEVLRRLVE ILERLKDLHKKIEDAHRKNEEAHKENK 配列番号 166
DHD134	ヘテロ二量体	a	GSRDRKISEELIKALEDHIRMLEELIRAIEEHIKLAERGVDEKELRESLEEL KKIVDELEKSLEELRKLAERYKYETR 配列番号 167
DHD134	ヘテロ二量体	b	GSPKEESVEELKRVIDKHEEILRELKRVLEEHERVSHDEDENELRRSLERLK HILDRLHESLKELHELLKKNEYTER 配列番号 168

【表１－８】

DHD135	ヘテロ二量体	a	GSDHEYWVKIVERILRVMEKHAEIVKKHLEIVERVVREGPSEDLRRKLKESL REIEESLRELKELLDELDELSEKTR 配列番号 169
DHD135	ヘテロ二量体	b	GSDEEYVTRSQRRLKRLLEEYIKVVEEHARLVERNERDDKELKRSIDELDKL TKELLELVKRYKELVDKTET 配列番号 170
DHD136	ヘテロ二量体	a	GSDKEEIVKLQDEVIKTLERHLDILRKHIDLLEKLKDHLSEELKERVDRSIK KLEESIKRLERIIEELQELAEYSL 配列番号 171
DHD136	ヘテロ二量体	b	GSREEELKESAEELERSVRELKKEADKYKEEVDRLHYRGKVDKDWVRVVEKL IKLVEEHLELIREHLELLKEERR 配列番号 172
DHD137	ヘテロ二量体	a	GSDMEYELKKSAEELRKSLEELKRILDELHKSLRELRRHGDDEEYVQTVEEL RKELEEHAKKLEEHLKELERVAT 配列番号 173
DHD137	ヘテロ二量体	b	PEYELKKSVDDLKRDVDRLVEEVEEVFELSKERLREDRKHLELVEEMVRLIE KHLELIKEHLKLADDHVR 配列番号 174
DHD138	ヘテロ二量体	a	GSREKDESKELNDEYKKLLEEYERLLRRSEELVKRAKGPRDEKELKRILEEN EDILRRTKEILERTKEISEEQKYRRR 配列番号 175
DHD138	ヘテロ二量体	b	GSDKDERQERLNEESDKSNEESERSNRESEELNRRARGPNDEKELQEILDRH LELLERNQRLLDENKEILRESQYLND 配列番号 176
DHD139	ヘテロ二量体	a	GSENKYILKEILKLLRENLKLLHDILRLLDENLEELEKHGAKDLDDYRRKIE EIRKKVEDYREKIEEIEKKVERDR 配列番号 177
DHD139	ヘテロ二量体	b	GSESEYTQEEILELLKESIKLLREILRLLEESEELWRRENTKSERSEEIKER AKEAIKRSEEILERVKRLSDHSR 配列番号 178
DHD140	ヘテロ二量体	a	GSDEEEANYVSDKAVKIAEDVQELLKELLELSEVVRRGEVDEDEYDRVLRKL QEVMKEYEEVLKEYEEVSRKHE 配列番号 179
DHD140	ヘテロ二量体	b	GSPEKYLIKTQEELLRRHAEILEDLIRKVERQVDLRRKVDERDEDLKRELER SLRELERLVRESSRLVEEIRELSKEIKR 配列番号 180
DHD141	ヘテロ二量体	a	GSDEEYELERISRESKELLERYKRLLREYQELLKELRHVKDLDRAVKIIHEL MRVSKELVEISHRLLELHERLVRRRK 配列番号 181
DHD141	ヘテロ二量体	b	GSEKEYIEKLSRKIEEDIRRSEERAKDSERLVRRLEELAKRKRLDLDDVLRV AEENLEILEDNLRILEEILKEQDKSNR 配列番号 182
DHD142	ヘテロ二量体	a	GSPHEEVVELHERVMEISERAVELIQRIIDIIRRIREDDKDIEKLVKTIRDL VREYEELHRELEEIDEEIYKKSE 配列番号 183
DHD142	ヘテロ二量体	b	GSDHEDVVRLHEDLVRKQEDARRVLEEIVRLAEEIVEVIKKDEKDKDRVTRL VEEIEKLVEEYKKKVDEMRKISDEIKYRSR 配列番号 184
DHD143	ヘテロ二量体	a	GSRAREVVKRAKRIIEEWQKILEEWRRILEEWRRLLEDERVDDRDNERIIRE NERVIRENEKIIRDVIRLLEELLYERR 配列番号 185
DHD143	ヘテロ二量体	b	GSREDEELEEEIDRIRQMVEEYEELVKEYEELTEKYKQGKVDKEESKKIIEK SERLLDLSQDAVRKVKEIIRRILYTNR 配列番号 186
DHD144	ヘテロ二量体	a	GSPKEEIVKLHDESAELHRRSVEVADEILKMHERSKDVDDERESRELSKEIE RLIREVEEVSKRIKRLSEEVEYLVR 配列番号 187
DHD144	ヘテロ二量体	b	GSPLEEILKIQRRINKIQDDINKILHEILRMQEKLNRSSDKDEVEESLRRIR ELIKRIKDLSKEIEDLSREVKYRTT 配列番号 188
DHD145	ヘテロ二量体	a	GSPEDEHVYVVREIYEVLREHAEVLEENREVIERLLEAKKRGDKSEELVKEL KKSIDKLKEISRKLEEIVKELEKVSEKLK 配列番号 189
DHD145	ヘテロ二量体	b	GSDEDETSYRILELLREIVRASRELIRLSEELLEVARRDDKDETVLETLIRE YKELLDRYRRLIEELTRLVEEYEERSR 配列番号 190
DHD146	ヘテロ二量体	a	GSTQEEINRIQHEVLRIQEEIDEILRDIVEKLKAISRGELDHEVVKDVEDKV REALEKSEELLDKSRKVEYKSE 配列番号 191
DHD146	ヘテロ二量体	b	GSDEEELNRELLEKSKRLVDINRDIIRTAQELIEMLKDSKDGRVDEDTKREL RDKLRKLEEKLERVREELRKYEELLRYVQR 配列番号 192
DHD147	ヘテロ二量体	a	GSDEKDRVYEILKEVQRLVKEYRDISKEIEDLVKHYEHITDDEAQEVSKELI DKSLRASEIVRELIRLIKELLDELE 配列番号 193
DHD147	ヘテロ二量体	b	GSDEEDVLYHLRELLEELKRVSDDYERLVREIKETSERKDRDTKENKDMLDE LVKAHREQEKLLERLVRLLEELFERKR 配列番号 194

【表１－９】

DHD1	ヘテロ二量体	a	PREQAIRISEEIIRISKKIIEILERTRSSTAREAMKWAKDSIRLAEESKYLLDK 配列番号 195
DHD1	ヘテロ二量体	b	IEDDVKKIQDSTKKAQKETIEALERSTSSTARKQMEEQKEQIRLQKEAMYLLKK 配列番号 196
DHD2	ヘテロ二量体	a	SREEIAKLQEEVIKLQRRVIELQKEVIELQRRAKELTSSYTKEILEIQRRIEEIQREIEEIQKRIEEIQEEIQRRT 配列番号 197
DHD2	ヘテロ二量体	b	SDEEIKRLSEEVIQLSRRVIKMSREAIKLSREVQKLTPSYQKRIKEIADRSIELARESIEIAKRSEKIAEESQRRT 配列番号 198
DHD3	ヘテロ二量体	a	PAKDEALKMANESLELAKKSARLIQESSSKEILERIEKIQRRIAELQDRIAYLIKK 配列番号 199
DHD3	ヘテロ二量体	b	PAKDEALRMIDESRELIKKSNELIQRSSSKEILERILEIQRKIAELQKRIQYLLKS 配列番号 200
DHD4	ヘテロ二量体	a	TDEARYRSERIVKEAKRLLDEARRRSEKIVREAKQRSNSEDAKRIMEENLRESEEAARRLREIIRRNLEESRETG 配列番号 201
DHD4	ヘテロ二量体	b	TREALEYQRKMAEEIEDLLREALRRQEEMVREAKQRSLSEEFKRIMERILEEQERVMRLAKEALERILEEQKRTG 配列番号 202
DHD5	ヘテロ二量体	a	SERTKREAKRSQEEILREAKEAMRRAKESQDHRQNRDGSNSEDLERLSQEQKRELEEVERRLKELAREQKYKLEDS 配列番号 203
DHD5	ヘテロ二量体	b	SEDLKRILKEITERELKLMQDLMEILKKITEDENNLDSNNSEDLKRSIEKARRILDEALRKLEESARRAKYIQEDN 配列番号 204
DHD6	ヘテロ二量体	a	TEDEIRESLKWLDEVLQELREIARESNEVLERNRQKSRSDKLREDIERYKKRMEEARKKLDDQLNKYKKRMDENRS 配列番号 205
DHD6	ヘテロ二量体	b	TEEELKESKKFAEDLARSARRALKESKRVLEEISQASRSKKLEEIVRRYKEQVKRWQDEWDERAREYRKRMKENRS 配列番号 206
DHD7	ヘテロ二量体	a	TKTEEIERLAREIKKLSEKVERLAQEIEELSRRVKEENSTDRELKEANREIERAIREIEKANKRMEEALRRMKYNG 配列番号 207
DHD7	ヘテロ二量体	b	TKTEEHERLAREISKLADEHRKLAKIIEELARRIKEENLTDDELRFAIRKIEDALRKNKEALKIMKEAAERNRYNT 配列番号 208
DHD8	ヘテロ二量体	a	TKKEESRELARESEELARESEKLARKSLELARRAESSGSEEEKRRIIDENRKIIERNREIIERNKEIIEYNKELIS 配列番号 209
DHD8	ヘテロ二量体	b	TKDEESLELNRESEELNRKSEELNRKSKELNDRAESSNSEEEEKEILREHKEILREHLEILRRHKEILRRHKYLTS 配列番号 210
DHD16	ヘテロ二量体	a	TREELLRENIELAKEHIEIMREILELLQKMEELLERQSSEDILEELRKIIERIRELLDRSRKIHERSEEIAYKEE 配列番号 211
DHD16	ヘテロ二量体	b	SEDIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERKKLDPSNEKERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLD 配列番号 212
DHD18	ヘテロ二量体	a	DRQKLIEENIKLLDKHIKILEEILRLLKKDIDLLKKSSSEEVLEELKKIHRRIDKLLDESKKIHKRSSEIVKKRS 配列番号 213
DHD18	ヘテロ二量体	b	DEQKLIETSQRLQEKSERLLEKFEQILREASDLYRKPDSEELLRRVEKLLRELEKLIRENQDLARKHEKILRDQS 配列番号 214
DHD19	ヘテロ二量体	a	DRQELIRENIELLKKHIKIVKEIQKLIETFIELLKKSSSEEILRRLKKILKRIEKLYRESQEIHKRSEEIAKKRQ 配列番号 215
DHD19	ヘテロ二量体	b	DEERLIDKSRELQKESEELLKELLKIFKRIEELLEKPDSEELIREIKKLLETLSEIHKRNEKLARTHEEILRQQS 配列番号 216
DHD22	ヘテロ二量体	a	STRDVQREIAKAFKKMADVQKKLAEEIKRHVKNVEKKNKDNDEYRKIATELLKKATESQKKLKELLDRIRKSDS 配列番号 217
DHD22	ヘテロ二量体	b	DKDDRSTSLLKRVEKLIDESDRIIDKFTTLIELSRNGKIDDDQYKKELKEILELLKKYDKHVKEVEELLKRLNS 配列番号 218
DHD23	ヘテロ二量体	a	SKRKALEVSERVVRISEKVVRVLDESSDLLKKSYDDSDKFAELIDRHEEKIKKWKKLIKEWLEIIQRHKS 配列番号 219
DHD23	ヘテロ二量体	b	SAEEFVKLSEEAVKRSKEILDIVRKQVKLVKAGVDKHEITDSLRKSEKLIEEHKELIKTHRDLLRREN 配列番号 220

【表１－１０】

DHD24	ヘテロ二量体	a	SSTEILKRFKRALRESEKIVKHSRRVLKIIREVLKQKPTQAVHDLVRIIETQVKALEEQLKVLKRIVEALERQS 配列番号 221
DHD24	ヘテロ二量体	b	DKQKEIKDILEKTRRIAEESRKIAEKFDEIIKRSTEGKIDESLTKELEELVKEVIKLSEDDARTSDDLVRKES 配列番号 222
DHD26	ヘテロ二量体	a	DEDESIKLTRKSIEETRKSLKIIKEVVELIREVLKHIKDLDKEIFERIDKILDKYKKQVDTYDEILKEYEKKQR 配列番号 223
DHD26	ヘテロ二量体	b	SELDEQKELIKKQEKLIEEQQRLLSKIRRMFKERVKDQELLREIQKVLKRSQEIVETSKKILDRSDKTTE 配列番号 224
DHD28	ヘテロ二量体	a	DQKEINTRIVEKLERIFKKSKEIVRQSERVISTIEKKTEDERELDLLRRHVKIVREHLKLLEELLKIIKEVQKESE 配列番号 225
DHD28	ヘテロ二量体	b	DTEELVKRLNELLKELSKLVKEFIKILETYRKDQTKDTSKISERVDRILKTYEDLLQKYKEILEKIEKQLS 配列番号 226
DHD29	ヘテロ二量体	a	DYARLIDQAVEVTRKVVEVNVTVARVNDKFAKHLGDEELRRVSEHLKEVSKDLQEVAKKSKDAARQVK 配列番号 227
DHD29	ヘテロ二量体	b	DVSKVAEEYLQISKTLVDISRTLLEISERLVRLVRTVADDRSEVKKAIEDSIEVLKTSEEVVRQIKRASDKLVKAIS 配列番号 228
DHD31	ヘテロ二量体	a	DAKEIQRRVVEIQTEVVKLQKKAVDIIRKIIEAFNNSNIDQSLLEAAKEIVKEIDKLEKLTESLLEESKKLLKRSS 配列番号 229
DHD31	ヘテロ二量体	b	SAEEVVKLAKIFLELLRESIKLLKRSVDLLRKSSDPSLDKSEAEKVSREIEKVSDTSLKLSKKALDVVKRALKVAS 配列番号 230
DHD32	ヘテロ二量体	a	DEKDAARKARKVSEEAKEASKKIEKALEESKRILNTLKQKKDEQEVKVIKEHEDVLRQIEKIQKQVLEIQKEVAKLLESLD 配列番号 231
DHD32	ヘテロ二量体	b	SADDVARASEKVLRVARESAKAADKSLEVFKEVVKRGDKEAFLQVVKINEEVVKINITVIRILIEVSKTAT 配列番号 232
DHD38	ヘテロ二量体	a	DEYVKETLKQLREALASLREADKRITELVKEARKKPLSEAARKFAEAIVTHVKVVVEHVEVVLRHVEVLVEAKKNGVIDKSILDNALRIIENVIRLLSNVIRVVDEVLQDLD 配列番号 233
DHD38	ヘテロ二量体	b	DASDVIRRIHELFEEVHRLIEAVHRAIEDVAKAAQKKGLDESAVEILAELSKELAKLSRRLAEISREIQKVVTDPDDKEAVERLKEIIKEIKKQLDELRDRLRKLQDLLYKLK 配列番号 234
DHD60	ヘテロ二量体	a	SEDKAHHDIVRVLEELIKIHDELMKISEEILKATSDSTATDETKEELKRRSKEAQKKSDTLVKIVKELEKESRKAQS 配列番号 235
DHD60	ヘテロ二量体	b	DDEEKYRQIIREAQEISKTAKRILRDAQEISKRIRHQGVDRSEHQRLVDLLRELIKEHHKLLRRQQEADTRND 配列番号 236
DHD63	ヘテロ二量体	a	DRKDKARKASEKLEEVIQRWKTVADKWKKMVDLVSNGKLSQEEVARVTEELLKIQTELAKLLEEHAKVLQESAS 配列番号 237
DHD63	ヘテロ二量体	b	SDEESIKTQSELIKTSEELLKDVKRIDEELQKLRDDPTLDESELKKRVKEWSDRVRKAKEISRKIQEIVKESKKRSS 配列番号 238
DHD66	ヘテロ二量体	a	DKDEELRKVIEKYREMVKEYRKVIREYEEVIKSSKTIDKSSLISLSRKMVELSQRVIDVSDEVAKVLSRKQS 配列番号 239
DHD66	ヘテロ二量体	b	TDEERLKKQTKELKEQTKQLEKQKDLLEKISNGEISKDEIQEIIKESKKIAKESQKALDSSRKALEEVS 配列番号 240
DHD67	ヘテロ二量体	a	DEKEVSKEIIKVLKDIAKVQQKVIEVSQRLASVLRADDDNVVKRALEEYEKILEELRELNKEIEKLTDKYRKVTS 配列番号 241
DHD67	ヘテロ二量体	b	DSDEQTKELEKLTELHKRHVEKLKKQTKESREVDSNKLWKSKDVKDKLSESEKELQKLSDQDKKAKDALESSRRKND 配列番号 242
DHD69	ヘテロ二量体	a	DAEEQLKLLTKLLRHQQRLLQLIKESLKLIEKIDQSSQENQDEIRKWREVTKKLRELIKTSEKLVRELEKSYKKSS 配列番号 243
DHD69	ヘテロ二量体	b	SLRDVVRRYQELVRRYDELIKTLTEILKKYQKKGAEDKDASTELVKAVRTSLKLSKELLKLNSELLKEDS 配列番号 244
DHD71	ヘテロ二量体	a	SKEELKRKLDELKKRSDTLKELSKKLKEISERNPDDKSVHRTIIRIHREFVKNHKEIVRVIEEIVSDKS 配列番号 245

【表１－１１】

DHD71	ヘテロ二量体	b	SKQDEHDRLLKIHDKLVKQHDELLKLLTKLSRAGDSVTKKKLEEILRKLQEV SKQLEESLKDADKVSKDIN 配列番号 246
DHD72	ヘテロ二量体	a	TVQSLLEQHVKIVKRSIEILERHTQILQDIARSQGVSKELEDVERQVKEYRK EVKKLEEDLRQLSRNSK 配列番号 247
DHD72	ヘテロ二量体	b	SDSDRIEKLIRESTELLKEQQKLAKRSRELAETVESLPLTEEYLKQQREHQK KIEKLLKDSEKHLEELKRLVKSEK 配列番号 248
DHD73	ヘテロ二量体	a	DSEKRIEDILRTDLELAKRDAELVKEHIKLVKRIDLSEELKKQVEDVEKESK KLEDSSEKLVQKVRKRSS 配列番号 249
DHD73	ヘテロ二量体	b	DEEERAKDLRKYLEEQTQYYRTVTEHLRNLEKVVEELERRGKPSSELQQILE RSQRIYKETTEIYDTSKKLIEELDKHHR 配列番号 250
DHD148	ヘテロ二量体	a	PLEDILKRHLDKVRELVRLSEEVNKLAKEVLDILKDKRVDEKELDKVLKELE KVVEEYERAVKESRDLLRELRETTR 配列番号 251
DHD148	ヘテロ二量体	b	DKERLLEIHERIQKLLDRNLEIIERLLRLLREARDIKDDDKLDKVIKRLKEL SEESKDILDKIKELLKESEKELT 配列番号 252
DHD149	ヘテロ二量体	a	PEDEVIRVIEELLRIAAEVDEVHRRNVEVQEEASRVTDRERLERLNRESEEL IKRSRELIEEQRKLIERLERLAT 配列番号 253
DHD149	ヘテロ二量体	b	DLEELIKEYAEVVRRHHKAVRDLERLVRELANAKHASEEELKRIATEILRIV KELIRVQERLIKLSEDSNEESR 配列番号 254
DHD150	ヘテロ二量体	a	PTDEVIEVLKELLRIHRENLRVNEEIVEVNERASRVTDREELERLLRRSNEL IKRSRELNEESKKLIEKLERLAT 配列番号 255
DHD150	ヘテロ二量体	b	DNEEIIKEARRVVEEYKKAVDRLEELVRRAENAKHASEKELKDIVREILRIS KELNKVSERLIELWERSQERAR 配列番号 256
DHD151	ヘテロ二量体	a	PKEDIDRVSRELVRVHKELLEVLRKSTEIVEAVARNEKDERTIEEVLEEQER AVRKLEEVSKKHKEAVKRLK 配列番号 257
DHD151	ヘテロ二量体	b	ELERLSEEIQKLSDRLIELIRRHSKVLEEIVRLLKHKDNDEREVRRLLKLLR DLTRRYEEVLRKVEEIVKRQEDESR 配列番号 258
DHD152	ヘテロ二量体	a	PEEDILRLLRKLVEVDKELLEVVRESTEVVRLVARNEKDVETVERVLRKQEE VVRKYERVSRELEEAVRRLK 配列番号 259
DHD152	ヘテロ二量体	b	ELKDLVEEIVKLSKENLKLWEDHSRVLEEIVRLLKHKDNDEREVRRLLKLLE DLTRRAEETSRRIEEIVKEAEDRAR 配列番号 260
DHD153	ヘテロ二量体	a	DEERELREVLRKHHRVVREWTKVVEELKRVVELLKRGETSEEDLLRVLKKLL EMDKRILEVNREVLRVLEKRLT 配列番号 261
DHD153	ヘテロ二量体	b	SLEEIIEELVELVRRSVEIAKESDEVARRIVESEDKKKELIDTLRDLHREWQ EVTKRAEELVREAEKEVR 配列番号 262
DHD154	ヘテロ二量体	a	TAEELLEVHKKSDRVTKEHLRVSEEILKVVEVLTRGEVSSEVLKRVLRKLEE LTDKLRRVTEEQRRVVEKLN 配列番号 263
DHD154	ヘテロ二量体	b	DLEDLLRRLRRLVDEQRRLVEELERVSRRLEKAVRDNEDERELARLSREHSD IQDKHDKLAREILEVLKRLLERTE 配列番号 264
DHD155	ヘテロ二量体	a	PEDDVVRIIKEDLESNREVLREQKEIHRILELVTRGEVSEEAIDRVLKRQED LLKKQKESTDKARKVVEERR 配列番号 265
DHD155	ヘテロ二量体	b	DEVRLITEWLKLSEESTRLLKELVELTRLLRNNVPNVEEILREHERISRELE RLSRRLKDLADKLERTRR 配列番号 266
DHD156	ヘテロ二量体	a	DEDEVVKVHEEHVKSHEEIHRSHEEVVRAAEEDKRDSRELRTLMEEHRKLLE ENEKSIEEVKKIHERVKR 配列番号 267
DHD156	ヘテロ二量体	b	KKEELIDISKEVLDLDDEINKISKEILELIKKLLRLKEEGREDKDKAREVKR RIRELHRRIQELNKRLRELHKRVQETKR 配列番号 268
DHD157	ヘテロ二量体	a	PEEDIARRVEDLLRKSEELIKESEKILKESKRLLDRNDSDKRVLETNLRLID KHTKLLERNLELLEELLKLAEDVAK 配列番号 269
DHD157	ヘテロ二量体	b	RFKDLSREYIEVVKRLLELSREALEVLREIKDTDKTDKKRIKELIDRLRKLI EEYKRIIDRLRKLSKDLEEEHR 配列番号 270
DHD158	ヘテロ二量体	a	DEEELVKILKELQRLSEESLEINKRLVEILRLLRRGEVPKEEVEKKLREIKK EQEKLDREHEKIKKRIEEITK 配列番号 271

【表１－１２】

DHD158	ヘテロ二量体	b	SLKEKILEIIERNMKLVELSNRSVEIVARILKGEKDDEETLERLLREWDKITRDYEEIIKESRKLVKELEEEAK　配列番号 272
DHD159	ヘテロ二量体	a	SKTEILRKALEIHKEQIDIVRKLIELSEEVLKLVEESKEKNLEKLKRIDEETDRLLERLDELHKRLTELAERLK　配列番号 273
DHD159	ヘテロ二量体	b	SDDEARKQLEEMKRRLREVEKKSKRVEERVRELERLVRENREDEDRVLKTLEDLLRENEKLVRTIERHVREQRELSKEVK　配列番号 274
DHD160	ヘテロ二量体	a	SEEELEKKADELRKLSEEWRKLQEEDKRLSEMVEKGELDLQEVDEHSLRVLERATEVHRTVDKVIEEILRTTN　配列番号 275
DHD160	ヘテロ二量体	b	SEKERHRESQETQEEIRRTHEEIIRKLEEILRRAKAGELPEETLDRLRRIMERLKELSERLDDLVRKLRDDHRREQK　配列番号 276
DHD161	ヘテロ二量体	a	SEKEILEELKRILKRVKDISDRLEELDKRTEEIARREPTKELVDELVKIHRDWLRLHEEILKLVDDALKKVEDATK　配列番号 277
DHD161	ヘテロ二量体	b	DLRELLELQREASRLHRELVKLLTELVKKLELIAKGEDIREEDLKRIKERLEEIKKRSKRIKEESDEIDKKTK 配列番号 278
DHD162	ヘテロ二量体	a	SERELQRELNKIVRRILEIHREVSELHQRAVKLIRENDNSEELEEISRRIEELSKELEKLVREHDEIVKTIE　配列番号 279
DHD162	ヘテロ二量体	b	SEREKLDRNDEELKEINKRVEEIKERSDRITEAIEKNERSEEEIRRLSREQNEALQRLLELHKKLVKLHRELLEDTR　配列番号 280
DHD163	ヘテロ二量体	a	DKEDVIRVHDEQHKLIEEQLELTRRIAELVREIAKNTASEEEIKEMLKEIKRLDDRSREIQDRLQKLLEEIRRKTK　配列番号 281
DHD163	ヘテロ二量体	b	TEEEIVELNKDIQRKSKEHIDLQNELVKKIERAIRENNITEELLEELERLLRESEKIVEEIRRITDKIRKDAK　配列番号 282
DHD164	ヘテロ二量体	a	SEKEILERLLRLSKEQNEISEEIHRLTERLVELKRRKDDDERLKRILDRQKRLVERAREISKEYEDLLRKLE　配列番号 283
DHD164	ヘテロ二量体	b	SMEELLRKNARLSRKQLKIIDEHLELSTKLTRGEAGDETLEEIERRSREMLEEQRRVDEESKRIREKLK　配列番号 284
DHD165	ヘテロ二量体	a	SEEEIRDIVEKLLRTHEEVLKEIKKLLDDSERVRRRELDKKDLDRIQKEQRDIQEENKEKAKRFDELVKELKKAAK　配列番号 285
DHD165	ヘテロ二量体	b	SEEEHRRTMEKVEKEVRDIKRRSEEVKKKVKANTLSEEDLVRLLERLVEDHKRLQDLSQEIIERDEKATK　配列番号 286
DHD166	ヘテロ二量体	a	DEDELAKEIEDVQRRNKESQEEHDKSVKKLEAAERGEIDEDSLLRVLEEDIKVLEKDIEVLERSIEVIEKAE　配列番号 287
DHD166	ヘテロ二量体	b	SEKELIRRLLEQQRQHLRLSERLIELSRRLVEVVRKGKDNRDLLRELKKLSEEHKKHSKDDHEKVREIREREK　配列番号 288
DHS 17	ヘテロ二量体	a	DRKDLLKRNIKLLDRHLKILDTILKLLEKLSELLKKSSSEEVVKEYKKILDEIRKLLEESKEIHKESKEILERES 配列番号 289
DHD17	ヘテロ二量体	b	DEEKLIERSKRLQEESEQLLEKFEQILRELTELLEKPDSEELARKIKKLHDELRKIIKRNQELIREHEEILRKRD　配列番号 290

【００４２】

一態様では、単量体Ａポリペプチドは、配列番号１～２９０の群から選択されるからなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、配列番号１、５５、８１、８３、１０１、１０５、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７１、１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９１、または１９３のアミノ酸１および２のＧｌｙＳｅｒは、任意であり、例えば、配列番号１、５５、８１、８３、１０１、１０５、１１５、１１７、１

１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７１、１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９１、または１９３のアミノ酸１および２のＧｌｙＳｅｒは存在せず、奇数の配列番号（「鎖ａ」）は、表１Ａの配列番号（「鎖ｂ」）の結合パートナーである。

【００４３】

別の態様では、単量体Ｂポリペプチドは、配列番号１～２９０の群から選択されるからなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、配列番号６、８、１４、１６、２６、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４６、４８、５４、５６、５８、６０、６２、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、または１９４のアミノ酸１および２のＧｌｙＳｅｒは、任意であり、例えば、配列番号６、８、１４、１６、２６、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４６、４８、５４、５６、５８、６０、６２、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、または１９４のアミノ酸１および２のＧｌｙＳｅｒは存在せず、偶数の配列番号（「鎖ｂ」）は、表１Ａの配列番号（「鎖ａ」）の結合パートナーである。

【００４４】

上記の実施形態のいずれかの別の実施形態では、

（ｉ）単量体Ａは、配列番号１～２９０、３３１、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８－４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の群から選択されるからなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、

（ｉｉ）単量体Ｂは、配列番号１～２９０、３３１、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の群から選択されるからなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、偶数の配列番号は、工程（ｉ）の奇数の配列番号の結合パートナーである。

【００４５】

配列番号１～２９０、３３１、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３

２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のアミノ酸配列が表１Ｂに提供される。「結合パートナー」は、表１Ｂに示すように同様の設計名称を有する。例えば、配列番号１（ＤＨＤ９　Ａ）および配列番号２（ＤＨＤ９　Ｂ）は結合パートナーであり、例えば、配列番号３３１（ＤＨＤ９　Ａ）および配列番号２（ＤＨＤ９　Ｂ）は結合パートナーであり、結果として、単量体Ａが、配列番号１または配列番号３３１のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む場合、単量体Ｂは、配列番号２のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む。同様に、配列番号３～４は結合パートナーであり、配列番号５～６および５～３３２は結合パートナーであり、以下同様である。当業者は、本明細書の教示に基づいて、結合パートナーが何を意味するかを明確に理解するであろう。

【表２－１】

表１Ｂ

設計名称	オリゴマー化状態	鎖	設計配列
DHD9	ヘテロ二量体	a	GSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS　配列番号１ PKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS　配列番号331
DHD9	ヘテロ二量体	b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRS　配列番号２
DHD13_XAAA	ヘテロ二量体	a	GTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR　配列番号３
DHD13_XAAA	ヘテロ二量体	b	GTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQKGSLVPR　配列番号４
DHD13_XAXA	ヘテロ二量体	a	TKEDILERQRKIIERAQEIIRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELLEESAQLLYEQR　配列番号５

【表２－２】

DHD13_XAXA	ヘテロ二量体	b	GSTEKRLLEEAERAHREAKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRLLELLREILYLSQEQK 配列番号６ TEKRLLEEAERAHREAKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRLLELLREILYLSQEQK 配列番号３３２
DHD13_XAAX	ヘテロ二量体	a	TKEDILERARKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEELAQLLYEQR 配列番号７
DHD13_XAAX	ヘテロ二量体	b	GSTEKRLLEEAERAIREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLLQEQK 配列番号８ TEKRLLEEAERAIREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLLQEQK 配列番号３３４
DHD13_2:341	ヘテロ二量体	a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELEYIIR 配列番号９
DHD13_2:341	ヘテロ二量体	b	MSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQRKANNGSETEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK 配列番号１０
DHD13_AAAA	ヘテロ二量体	a	MTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILKEQEKIIRKPGSSEEAMKRSLKLIEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR 配列番号１１
DHD13_AAAA	ヘテロ二量体	b	GTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHKELTKIHQQSGSSEEAKKRALKISQEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK 配列番号１２
DHD13_BAAA	ヘテロ二量体	a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILKRSEEIIRKPGSSEEALETLRELQEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR 配列番号１３
DHD13_BAAA	ヘテロ二量体	b	GSTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRTEEIIRQSGSSEEAKDELRRIQEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK 配列番号１４ TEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRTEEIIRQSGSSEEAKDELRRIQEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK 配列番号３３６
DHD13_4:123	ヘテロ二量体	a	TTKRYLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQ 配列番号１５
DHD13_4:123	ヘテロ二量体	b	GSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQQVNDVDEKALERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEAR 配列番号１６ SEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQQVNDVDEKALERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEAR 配列番号３３８
DHD13_1:234	ヘテロ二量体	a	EAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEAR 配列番号１７
DHD13_1:234	ヘテロ二量体	b	TTKRYLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQQVNDVDEKALERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGS 配列番号１８
DHD15	ヘテロ二量体	a	TREELLRENIELAKEHIEIMREILELLQKMEELLEKARGADEDVAKTIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERS 配列番号１９
DHD15	ヘテロ二量体	b	GTERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLKKARGADEKVLDELRKIIERIRELLDRSRKIHERSEEIAYKEE 配列番号２０
DHD20	ヘテロ二量体	a	GDRQELIRRNIELLKEHIKILEEISQLIEELSELLDKSSSEEVVKRYKKILERYKQLLRKSQEIHKESSEIAKKES 配列番号２１
DHD20	ヘテロ二量体	b	GDEQKLIERSQRMQKESLELLKEIIKILDTIEKLLDKPDSEELLDTIKKLHDTLKKIHDRNKKLLKEHEEILRQRSGSLVPR 配列番号２２
DHD21	ヘテロ二量体	a	DKEEEYKRLLDEIKEILKESKEVLKDSKRVLEDIKRKVPDDDLVKLLEKHVRLLEEHVKLLEQLIREAEKSSK 配列番号２３
DHD21	ヘテロ二量体	b	QGSSAEELLKKIKESEKKIRDSLRKIKEIIKKSRKEGVDDKQLDLIRKVVESHRDLLRLHRDLLRLLREETS 配列番号２４
DHD25	ヘテロ二量体	a	DIDESIKEVEKLLEEVEQSLQKLDDSLKKLLEKVNQDPDVDDSVRKIVKRHVEILKRHEEVLKRLIEVVKEHTKTVK 配列番号２５

【表２－３】

DHD25	ヘテロ二量体	b	GSDREEVHKEIVKLIREIIKIHKKILKIHEKIKNGEIDPSEILKLSEEIKKLTDTIIKIIEDLEQLTRDLRR　配列番号 26 DREEVHKEIVKLIREIIKIHKKILKIHEKIKNGEIDPSEILKLSEEIKKLTDTIIKIIEDLEQLTRDLRR　配列番号 340
DHD27	ヘテロ二量体	a	DRKEIVKRHQKVVELLKESSKLLRESSKLLQRLLDKTGDENLQKAVDDQDKAIKRQETAIRKSQEASKKLD　配列番号 27
DHD27	ヘテロ二量体	b	DNSEEIKKVAKTSREVAEYSERVAKENDKVVKTLEEGKIDESELLRLLEESIKIFDTALKLHEEAYKLHQDLVRKVS　配列番号 28
DHD30	ヘテロ二量体	a	DESEAASVAIESVQILVESVKLLEESVRILLDAVKKNGVEDLLRVAQRWEKLVDEWLKVVKRWLDNVRDIQR　配列番号 29
DHD30	ヘテロ二量体	b	GSDKAEEVEKSVRKIEESIKKIRKSIKKAEDAVQLLKEGKIDAKDFLRIVREDLEVVKEDVEIVKEDVENVREFSS　配列番号 30 DKAEEVEKSVRKIEESIKKIRKSIKKAEDAVQLLKEGKIDAKDFLRIVREDLEVVKEDVEIVKEDVENVREFSS　配列番号 342
DHD33	ヘテロ二量体	a	SDKEVSDKLLKASKKLLKVSEELLEVVRRLLKALKDDELIKKIADLLRKIIDKDKKFIRTSEEIVKESR　配列番号 31
DHD33	ヘテロ二量体	b	GSDLKEVLKTVEEAVKEIIKSSEELLQISRKILEISRVGVDEHEYISAIREYLKALEKHIQILKKFIEILKELIRAVS　配列番号 32 DLKEVLKTVEEAVKEIIKSSEELLQISRKILEISRVGVDEHEYISAIREYLKALEKHIQILKKFIEILKELIRAVS　配列番号 344
DHD34_XAAXA	ヘテロ二量体	a	SKEEIDKIVKKHKKKIEEHKKKVDELKKLVEEHDKRVSQDKDDKVKKLSEEVKKIIKRLEEVSKRLEEVSKKLLKVISDKR　配列番号 33
DHD34_XAAXA	ヘテロ二量体	b	GSNDEELKKILETLDRILKKLDKILTRLIEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQFIELIKKYEEVVKEYEEVVRQLIRLFS　配列番号 34 NDEELKKILETLDRILKKLDKILTRLIEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQFIELIKKYEEVVKEYEEVVRQLIRLFS　配列番号 346
DHD34_XAXXA	ヘテロ二量体	a	SKEEIDKIVKKHKKKIEELKKLVDELKKLVEEHDKRVSQDKDDKVKKLSEEVKKIIKRVEEVAKRLEEVSKKLLKVISDKR　配列番号 35
DHD34_XAXXA	ヘテロ二量体	b	GSNDEELKKILETLDRILKKLEKILTRLIEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQFIELIKKFEEVIKEYEEVVRQLIRLFS　配列番号 36 NDEELKKILETLDRILKKLEKILTRLIEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQFIELIKKFEEVIKEYEEVVRQLIRLFS　配列番号 348
DHD34_XAAAA	ヘテロ二量体	a	SKEEIDKIVKKHKKKIEEHKKKVDEHKKLVEEHDKRVSQDKDDKVKKLSEELKKISKRLEEVSKRLEEVSKKLLKVISDKR　配列番号 37
DHD34_XAAAA	ヘテロ二量体	b	GSNDEELKKILETLDRILKKLDKILTRLDEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQYIELVKKYEEVVKEYEEVVRQLIRLFS　配列番号 38 NDEELKKILETLDRILKKLDKILTRLDEVLKKSEDPNLDDKDYTELVKQYIELVKKYEEVVKEYEEVVRQLIRLFS　配列番号 418
DHD36	ヘテロ二量体	a	DHSRKLKEILDRLRKHVKRLKEHLDELRDLVRQVPEDKLLEHVVKLSDKILQISERAVREFTKSVDKDS　配列番号 39
DHD36	ヘテロ二量体	b	GSDKKDELERILDEIRRLIERLDEILSRLNKLLELLKHGVPNAKEVVKDYIRLLKEYLELVKEFLKLVKRHADLVS　配列番号 40 DKKDELERILDEIRRLIERLDEILSRLNKLLELLKHGVPNAKEVVKDYIRLLKEYLELVKEFLKLVKRHADLVS　配列番号 350
DHD37_ABXB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE　配列番号 41
DHD37_ABXB	ヘテロ二量体	b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号 42 DDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号 352
DHD37_BBBB	ヘテロ二量体	a	MDEEDHLKKLKTHLEKLERHLKLLEDHAKKLEDILKERPEDSAVKESIDELRRSIELVRESIEIFRQSVEEEE　配列番号 43

【表２－４】

DHD37_BBBB	ヘテロ二量体	b	GDVKELTKILDTLTKILETATKVIKDATKLLEEHRKSDKPDPRLIETHKKLV EEHETLVRQHKELAEEHLKRTR 配列番号 44
DHD37_XBXB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKLLKELRDILSENPEDERVKDVIDELER VIRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 45
DHD37_XBXB	ヘテロ二量体	b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDLNKVLEKLRRSERKDPKVIETVVEL LKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 46 DDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDLNKVLEKLRRSERKDPKVIETVVELLK RHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 354
DHD37_AXXB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRLEDLLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSER VVRTVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 47
DHD37_AXXB	ヘテロ二量体	b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKVVDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVEL LKRLEKLIKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 48 DDKELDKLLDTLEKILQTATKVVDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLK RLEKLIKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 356
DHD37_3:124	ヘテロ二量体	a	DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSEN 配列番号 49
DHD37_3:124	ヘテロ二量体	b	EDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKLEKTKPDSKTAKELDKLLDT LEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLE IAKTHAKKVE 配列番号 50
DHD37_1:234	ヘテロ二量体	a	DSDEHLYKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDAIDLSER SVRIVKTVIKIFEDSVRKKEKRPIDKRDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDD ANKLLEYLRR 配列番号 51
DHD37_1:234	ヘテロ二量体	b	GDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 52
DHD37_AXBB	ヘテロ二量体	a	DSDEHLDRLDKHLKKLKTFLENLRRHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSKT VIKIFEDSVRKKERSVRIVE 配列番号 53
DHD37_AXBB	ヘテロ二量体	b	GSDDKEATKIIDDLDKLLDTLEKILQTANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVKA VKELLEIAKTHAELLKRHEKKVE 配列番号 54 DDKEATKIIDDLDKLLDTLEKILQTANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVKAVK ELLEIAKTHAELLKRHEKKVE 配列番号 358
DHD37_XBBA	ヘテロ二量体	a	DSDEHIKQLRDHLDRLDKHLKKLKTFLENLRRILSENPEDERVKTVIKIFED SVRKKERSVRIVKDVIDLSE 配列番号 55
DHD37_XBBA	ヘテロ二量体	b	GSDDKEANKLLEKATKIIDDLDKLLDTLEKILQTLRRSERKDPKAVKELLEI AKTHAELLKRHEKVVETYVKKVE 配列番号 56 DDKEANKLLEKATKIIDDLDKLLDTLEKILQTLRRSERKDPKAVKELLEIAK THAELLKRHEKVVETYVKKVE 配列番号 360
DHD39	ヘテロ二量体	a	DHSRKLEEILDRLRKHVKRLLEHLRELLSLVKENPEDKDLVEVLELSLAILR RSLEAVEAFLKSVTKKDPDDEDLRRKADEIRKEVEEIKKSLAEVEKEIYKLK 配列番号 57
DHD39	ヘテロ二量体	b	GSSADDVLEDILKIIRELIEILDQILSLLNQLLKLLRHGVPNAKKVVEKYKE ILELYLQLVSLFLKIVKTHADAVSGKIDKKAEEEIKKEEEKIKEKLRQAKDI LKKLQEEIDKTR 配列番号 58 SADDVLEDILKIIRELIEILDQILSLLNQLLKLLRHGVPNAKKVVEKYKEIL ELYLQLVSLFLKIVKTHADAVSGKIDKKAEEEIKKEEEKIKEKLRQAKDILK KLQEEIDKTR 配列番号 362
DHD40	ヘテロ二量体	a	DRDAHLYKLLTFLEQLVRHLDRLVKHITQLRDIVKKDPEDERAVDVIRQSVR SLEIVITVLKIFVDSVSDAARSKEAEKIVRKIRKEIDEIRQKLREIDKEVKK TTS 配列番号 59
DHD40	ヘテロ二量体	b	GSNDKVLDKILDILDRILRLATRVIDLANKLLQVKKKSTHKDPRIVETYKEL LKIHETAVRLLLELADLHRRLKSKDEEANKRVETELDRIRKKVKDIEDKVRK LEDKVRKTAS 配列番号 60 NDKVLDKILDILDRILRLATRVIDLANKLLQVKKKSTHKDPRIVETYKELLK IHETAVRLLLELADLHRRLKSKDEEANKRVETELDRIRKKVKDIEDKVRKLE DKVRKTAS 配列番号 364

【表２－５】

DHD43	ヘテロ二量体	a	NDLSKEVLKKLEKSVEELLRRVQKSVKEAQKRGLLSDELVDRHLKILNQLVK RHLELLQEVIKRSDKK 配列番号 61
DHD43	ヘテロ二量体	b	GSDEAVKRVVEKSLKILDEVIKKSLDILRELIELQIRHAKDDESVIRASKSA LKDAIEALKKSLDEIKKALKRSADEG 配列番号 62 DEAVKRVVEKSLKILDEVIKKSLDILRELIELQIRHAKDDESVIRASKSALK DAIEALKKSLDEIKKALKRSADEG 配列番号 366
DHD65	ヘテロ二量体	a	SSEEVVKVHEKVVKLHKEILELLKKIIKIHETAARDPDDKDSIKKLSDEIKK IVKRIEDISDQAKRESSDAQRKQS 配列番号 63
DHD65	ヘテロ二量体	b	DKEEESKELLKKLKEILKRSEELLEESKELLKLAKNGEIDESELADADRKLN KKHEKLVQDIQDLLREHERQDR 配列番号 64
DHD70	ヘテロ二量体	a	DEKKKIDKIVKETEDLLQKSEKLLQQSKEAVKRIRSQVKENEIVDRLLRISE ELLKISRRLVEISRRIASTLS 配列番号 65
DHD70	ヘテロ二量体	b	GSSKEEVIRLLKENVRLIKENLELLTRNLKLITDLVRGSNGSEEKIKTLKEL LKEYRELLKRYRKLVEDYKRLVDKHD 配列番号 66 SKEEVIRLLKENVRLIKENLELLTRNLKLITDLVRGSNGSEEKIKTLKELLK EYRELLKRYRKLVEDYKRLVDKHD 配列番号 368
DHD88	ヘテロ二量体	a	EIQELIKSSRRIIEESKELIKESEEVLRRIKEILDRIRNGVDNQEDLLREIL KLLTKNLKIIQRNLKLLQDNAEILKRLVS 配列番号 67
DHD88	ヘテロ二量体	b	GSYIEDVIKKILDVSRELIKLSRTIIKISEEINKQLQQGRDTKDLVKKYDEI IKKYTRIVQHYTELIKELQKLLS 配列番号 68 YIEDVIKKILDVSRELIKLSRTIIKISEEINKQLQQGRDTKDLVKKYDEIIK KYTRIVQHYTELIKELQKLLS 配列番号 370
DHD89	ヘテロ二量体	a	SPTEEAIQLSQRVIELSKRVIELSKEILKLLKRVLDLLPDLDKNEEKRLDDY DKELKEYDKELKKYEKRLKDLAS 配列番号 69
DHD89	ヘテロ二量体	b	GSEEEEILKIQKELLRIQSEILDKQKKILDTLRSNGAVTEEVRSILEKVERL SEEAKELSKEAKELTKEVSKLIS 配列番号 70 EEEEILKIQKELLRIQSEILDKQKKILDTLRSNGAVTEEVRSILEKVERLSE EAKELSKEAKELTKEVSKLIS 配列番号 372
DHD90	ヘテロ二量体	a	SPLKELNNQLLRLLRELVKVSKKIVDLSKTIIEVLKHTDLDPRLLDSLEKSQ QELDKSQKELDKVVKELTKVNKKLQ 配列番号 71
DHD90	ヘテロ二量体	b	GSPLEDLVRKYDELVKTYEKLVEEFKKAVDKYDKAVKKAPVSKEATDSLDLI RKVLELLDRNLKLIKENAKLIKELLK 配列番号 72 PLEDLVRKYDELVKTYEKLVEEFKKAVDKYDKAVKKAPVSKEATDSLDLIRK VLELLDRNLKLIKENAKLIKELLK 配列番号 374
DHD91	ヘテロ二量体	a	SPTRENEKVIKENEKVISDNERVLEEVVKVVETATDRKEIQDAVDEVRKSVD KLRDSVRKLEESVRTLD 配列番号 73
DHD91	ヘテロ二量体	b	GSPIKDISKRLLEISKRLVEISDRIVELLQRIADSKDPNKDLQKEVKDVLEE YKRLVREYREVVKEYEKVVS 配列番号 74 PIKDISKRLLEISKRLVEISDRIVELLQRIADSKDPNKDLQKEVKDVLEEYK RLVREYREVVKEYEKVVS 配列番号 376
DHD92	ヘテロ二量体	a	DEDEHVKQLIKNADLLRKHAELLKELVKLFQEIASQIPDDRVAKKVTDVVDR IDKILKQTEKLVRRTKQILDYSR 配列番号 75
DHD92	ヘテロ二量体	b	GSNLEELVKLLKEVLEMHERLLRIHEDLVEAHKSNASDKESERKLKKSDKDI KESLKKIKSIIDQVRYIQS 配列番号 76 NLEELVKLLKEVLEMHERLLRIHEDLVEAHKSNASDKESERKLKKSDKDIKE SLKKIKSIIDQVRYIQS 配列番号 378
DHD93	ヘテロ二量体	a	PVEDIIEESLRLLEESLKLLNRILKLLEDSLRKLPRSEEWRQRLDEFRKKLE DWKEELERWIEDVRYKKT 配列番号 77
DHD93	ヘテロ二量体	b	GSDEDYESREIIDEIRKLLDRSKKIVHRSQRLVERVKSTPLSEDQEDLIRRH EETINRHRELVKELEKVLEDHERHIR 配列番号 78 DEDYESREIIDEIRKLLDRSKKIVHRSQRLVERVKSTPLSEDQEDLIRRHEE TINRHRELVKELEKVLEDHERHIR 配列番号 380

【表２－６】

DHD94	ヘテロ二量体	a	PEEDSRRVLERFVRVSREVLKVLEEFLRVSEELLREADRDRDRRLEEYERQV DELREEIRRYKEEVDKFDKEVKYYKK　配列番号 79
DHD94	ヘテロ二量体	b	GSPEKDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKNGLIDEKALRKQQE VLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVI　配列番号 80 PEKDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKNGLIDEKALRKQQEVL RKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVI　配列番号 382
DHD94_3:214	ヘテロ二量体	a	GSPERDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKN　配列番号 81 PERDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKN　配列番号 337
DHD94_3:214	ヘテロ二量体	b	GSDEKALRKQQEVLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVITRGEDHKAEEDSR RVLERFVRVSREVLKVLEEFLRVSEELLREADRDRDRRLEEYERQVDELREE IRRYKEEVDKFDKEVKYYKK　配列番号 82 DEKALRKQQEVLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVITRGEDHKAEEDSRRV LERFVRVSREVLKVLEEFLRVSEELLREADRDRDRRLEEYERQVDELREEIR RYKEEVDKFDKEVKYYKK　配列番号 384
DHD94_2:143	ヘテロ二量体	a	GSDRRLEEYERQVDELREEIRRYKEEVDKFDKEVKYYKK　配列番号 83 DRRLEEYERQVDELREEIRRYKEEVDKFDKEVKYYKK　配列番号 339
DHD94_2:143	ヘテロ二量体	b	GSPERDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKNGLIDEKALRKQQE VLRKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVITRGEDHKAEEDSRRVLERFVRVSRE VLKVLEEFLRVSEELLREADR　配列番号 84 PERDENRKLLDKVRKLVEKSRRLVEELRKLVDQSTKNGLIDEKALRKQQEVL RKVEEVLEKQERVLRELEEISYRVITRGEDHKAEEDSRRVLERFVRVSREVL KVLEEFLRVSEELLREADR　配列番号 386
DHD95	ヘテロ二量体	a	DLSEESKKFVEKVKKLEKESRELEKQVKKIEEDSRSVENDVQKEFLELLKRL LDIQKKVVEVLREVVKVQQYVDS　配列番号 85
DHD95	ヘテロ二量体	b	GSDSEYESRQVLRELDTVLKDSHTVLEALRQVIRDSQDVVSKSDEESRRVID DLEKVIQDSKKVLDDIKRLIDKSKSIKS　配列番号 86 DSEYESRQVLRELDTVLKDSHTVLEALRQVIRDSQDVVSKSDEESRRVIDDL EKVIQDSKKVLDDIKRLIDKSKSIKS　配列番号 388
DHD96	ヘテロ二量体	a	NEDELLKLLTENLKLLDENLKLLRENLSLLRQANNITDKNRIREIVKQSKEI VKQSREILKQSKEIVERIKYIVS　配列番号 87
DHD96	ヘテロ二量体	b	GSSLYELTQRYEKLVQQYEELVKDYRRLVKKLEKLKRDNKPDKRLLKEIVDV IKKSVEIIDRSLKLLEESIKILEETD　配列番号 88 SLYELTQRYEKLVQQYEELVKDYRRLVKKLEKLKRDNKPDKRLLKEIVDVIK KSVEIIDRSLKLLEESIKILEETD　配列番号 390
DHD97	ヘテロ二量体	a	SQERSLEILKRILDVLKESLEILKESLSILRQLASRIKNPNRKIEEILKESD KIIKESDKVLKEIEEVIRYSS　配列番号 89
DHD97	ヘテロ二量体	b	GSDIEYESKEILELIKELLKLSRELLKESRRALELVRKSRDDSIVEEVIQVH KKVLDIHKEVLKIVRKVVEVHRRVKS　配列番号 90 DIEYESKEILELIKELLKLSRELLKESRRALELVRKSRDDSIVEEVIQVHKK VLDIHKEVLKIVRKVVEVHRRVKS　配列番号 392
DHD98	ヘテロ二量体	a	SKKDESTKLERLAEKIDEITKRIEELVKDVKRKSSEGVDKDQQQKIDEVFQK LLDLQREILEILDRILKVQQYILD　配列番号 91
DHD98	ヘテロ二量体	b	GSDLEYLNRRLLQLIKTLIDLNRHLLKLIDKLKKLNSREGDEEKIKEESKQI QEQFKEIVERSKEIIKQIKEIIKRSQ　配列番号 92 DLEYLNRRLLQLIKTLIDLNRHLLKLIDKLKKLNSREGDEEKIKEESKQIQE QFKEIVERSKEIIKQIKEIIKRSQ　配列番号 394
DHD99	ヘテロ二量体	a	DFERSSRRLEKVVEDLRRSSDRLREVIDELRKSADEKDEDEDLRRARKEHRD LIEELKRALEKQEEIIKHLQELVYRQL　配列番号 93
DHD99	ヘテロ二量体	b	GSEESEEVRKVVERIKKISRELEEVVKELDRVSKEFDRHGETDEIVREHERI VEKLEEIVKKHTKIVEELAEIVYKQQ　配列番号 94 EESEEVRKVVERIKKISRELEEVVKELDRVSKEFDRHGETDEIVREHERIVE KLEEIVKKHTKIVEELAEIVYKQQ　配列番号 396

【表２－７】

DHD100	ヘテロ二量体	a	SDDDSVRVLDEIVKILDESVKLLKESLKLLDDFLRTKPDDHLKEVVKESKKV VEQSKKVLDRIKKIIYESK 配列番号 95
DHD100	ヘテロ二量体	b	GSDLLYLSKELLKLVRELLKLSRELVELSRRLVNSTHKSPELVKKYDKLVKK YQDLLKKLADVADEYLRQRS 配列番号 96 DLLYLSKELLKLVRELLKLSRELVELSRRLVNSTHKSPELVKKYDKLVKKYQ DLLKKLADVADEYLRQRS 配列番号 398
DHD101	ヘテロ二量体	a	DEKDYHRRLIEHLEDLVRRHEELIKRQKKVVEELERRGLDERLRRVVDRFRR SSERWEEVIERFRQVVDKLRKSVE 配列番号 97
DHD101	ヘテロ二量体	b	GSDAYDLDRIVKEHRRLVEEQRELVEELEKLVRRQEDHRVDKKESHEILERL ERIIRRSTRILTELEKLTDEFERRTR 配列番号 98 DAYDLDRIVKEHRRLVEEQRELVEELEKLVRRQEDHRVDKKESHEILERLER IIRRSTRILTELEKLTDEFERRTR 配列番号 400
DHD102	ヘテロ二量体	a	DERYRAREHIRRVEEHTKRLRHILKRLREHEEKLRRELKPGDEITESVDRFK KIVDQFEESIKKFETVSEELRKSDS 配列番号 99
DHD102	ヘテロ二量体	b	GSDRQRILDRLDKILEKLDDILKKLKDILETLSKDDVSDRRHKDLVEKFREL VDTHHKLVERYRELVYQNR 配列番号 100 DRQRILDRLDKILEKLDDILKKLKDILETLSKDDVSDRRHKDLVEKFRELVD THHKLVERYRELVYQNR 配列番号 402
DHD102_1:243	ヘテロ二量体	a	GSDEITESVDRFKKIVDQFEESIKKFETVSEELRKSIS 配列番号 101 DEITESVDRFKKIVDQFEESIKKFETVSEELRKSIS 配列番号 341
DHD102_1:243	ヘテロ二量体	b	GSDPQRAADRLDKILEKLDDILKKLKDILETLSKDDVKDRRAKDLVEKFREL VDTHHKLVERYRELVYTATAGSDLARELIRRVEEHTKRLRHILKRLREHEEK LRR 配列番号 102 DPQRAADRLDKILEKLDDILKKLKDILETLSKDDVKDRRAKDLVEKFRELVD THHKLVERYRELVYTATAGSDLARELIRRVEEHTKRLRHILKRLREHEEKLR R 配列番号 404
DHD103	ヘテロ二量体	a	NADDQLATSIKKLEDSIDQLIKIVRKFEESVKKLQKHGVDQHHVEILRKIVE IFRQHIEKLKKHLEKLRYTSS 配列番号 103
DHD103	ヘテロ二量体	b	GSDKEYLVTEHEKLVREHEKIVSEIEKLVKKHEAGVDESELEEILKKVEKLL RKLDEILEQLTQLLRKTE 配列番号 104 DKEYLVTEHEKLVREHEKIVSEIEKLVKKHEAGVDESELEEILKKVEKLLRK LDEILEQLTQLLRKTE 配列番号 406
DHD103_1:423	ヘテロ二量体	a	GSDQHVVEILRKIVEIFRQHIEKLKKHLEKLRYTSS 配列番号 105 DQHVVEILRKIVEIFRQHIEKLKKHLEKLRYTSS 配列番号 343
DHD103_1:423	ヘテロ二量体	b	GSDAEYLVTEHEKLVREHEKIVSEIEKLVKKHEKGVDESELEEILKKVEKLL RKLDEILEQLTQLLRKAEKHIDKHSKAADQLATSIKKLEDSIDQLIKIVRKF EESVKKLQKH 配列番号 106 DAEYLVTEHEKLVREHEKIVSEIEKLVKKHEKGVDESELEEILKKVEKLLRK LDEILEQLTQLLRKAEKHIDKHSKAADQLATSIKKLEDSIDQLIKIVRKFEE SVKKLQKH 配列番号 408
DHD104	ヘテロ二量体	a	DEDDDIRRVLDESRRVLEHSRRVLKRSEEVLEKASRKKEKDTEEIEKHLKRL REHAKKLEKHRRELDDFLYKEI 配列番号 107
DHD104	ヘテロ二量体	b	GSRDKYLLERLNDILKKLDEIVDKLSDILKRLKDVRHDDRLQELVERYKEIV KEYKRIVEEYEKLVREFEEQQR 配列番号 108 RDKYLLERLNDILKKLDEIVDKLSDILKRLKDVRHDDRLQELVERYKEIVKE YKRIVEEYEKLVREFEEQQR 配列番号 410
DHD105	ヘテロ二量体	a	DRDYEDKEFKKIIKELEDVQEELKKLQEKIKRFSSELEEPNELLKEQLKVNE EQLEVNKKILKILRDQLKQNE 配列番号 109
DHD105	ヘテロ二量体	b	GSDAEYKVRESVKRSKESVKHSEDVVDKLNKSVKLSESGHSDAEKASRELVK LVREVVELSREVIKLSEKVLRVIS 配列番号 110 DAEYKVRESVKRSKESVKHSEDVVDKLNKSVKLSESGHSDAEKASRELVKLV REVVELSREVIKLSEKVLRVIS 配列番号 412

【表２－８】

DHD106	ヘテロ二量体	a	DLQYKQEKLIRHFDRVVREWDKLVRKFSKVLEKQKHESKDKELEEASRRVDE LIKRLREQLKRSKEILRRLKELSRKSS　配列番号 111
DHD106	ヘテロ二量体	b	GSDWEELLRRLEKVLQEYEEIVKELIDLIERLIKVSEDKSKDASEYKKLVTE LEKLISKLEEISKKLEELVKEYEYKTE　配列番号 112 DWEELLRRLEKVLQEYEEIVKELIDLIERLIKVSEDKSKDASEYKKLVTELE KLISKLEEISKKLEELVKEYEYKTE　配列番号 414
DHD107	ヘテロ二量体	a	DAKDELEKSLQEIEESLKELKKLLEELDKSLRELTSQGRNKKLEEHIKKVQK FIELVKKYIKAVQDYLKEVRYDNS　配列番号 113
DHD107	ヘテロ二量体	b	GSDKERAARATEEMVKLTKKLLKAVEDLVRDVRRLLKEGLISEKHARIAETI LEVFKKHAKIIKKHVDIVKYDES　配列番号 114 DKERAARATEEMVKLTKKLLKAVEDLVRDVRRLLKEGLISEKHARIAETILE VFKKHAKIIKKHVDIVKYDES　配列番号 416
DHD108	ヘテロ二量体	a	GSPLKERLLEIQRDLDRVLEEVVERLLRIQERLDSVVERKPPDVHEEYKYIV DEIREIVERVVREYEEIVKRIDEEVR　配列番号 115 PLKERLLEIQRDLDRVLEEVVERLLRIQERLDSVVERKPPDVHEEYKYIVDE IREIVERVVREYEEIVKRIDEEVR　配列番号 459
DHD108	ヘテロ二量体	b	GSEEDERIRYDLDRIRKDVRRKLEEIRQRVRELEKKLRDAGHRRDEKELLRE LIETSKDILRLVEELLKKIIDKSEDLLRKTE　配列番号 116 EEDERIRYDLDRIRKDVRRKLEEIRQRVRELEKKLRDAGHRRDEKELLRELI ETSKDILRLVEELLKKIIDKSEDLLRKTE　配列番号 420
DHD109	ヘテロ二量体	a	GSDEEDYINENVEKDVRDIEDDVRRINERIRELLEKIRTEEVLQRVLEEHHE LVERVLRKLVEILRKHEEENR　配列番号 117 DEEDYINENVEKDVRDIEDDVRRINERIRELLEKIRTEEVLQRVLEEHHELV ERVLRKLVEILRKHEEENR　配列番号 345
DHD109	ヘテロ二量体	b	GSDEEEYYKEKLHKLLREIEELLKHYRELVRRLEELVKRGELDKDTAAHILE RLSELLERIIRRVAHTLRRLSEERR　配列番号 118 DEEEYYKEKLHKLLREIEELLKHYRELVRRLEELVKRGELDKDTAAHILERL SELLERIIRRVAHTLRRLSEERR　配列番号 422
DHD110	ヘテロ二量体	a	GSDEDEISYDSKRRVEEIVRQAREKSEKSRKDIEDVAEVLRKGDVSEKEVVD ELVKVLEEQVKVLREAVERLREVLKKQVDDVR　配列番号 119 DEDEISYDSKRRVEEIVRQAREKSEKSRKDIEDVAEVLRKGDVSEKEVVDEL VKVLEEQVKVLREAVERLREVLKKQVDDVR　配列番号 347
DHD110	ヘテロ二量体	b	GSDIVELVDHLLKRSLKLLEELAELVRRLLEKSTELLKRRTEEHKEEVVEES EYMVRELEERLRRVVDESEKLVRDADKHIR　配列番号 120 DIVELVDHLLKRSLKLLEELAELVRRLLEKSTELLKRRTEEHKEEVVEESEY MVRELEERLRRVVDESEKLVRDADKHIR　配列番号 424
DHD111	ヘテロ二量体	a	GSKEKDIVKTLVDLLRENLETLERLIEEVVRLLKENVDVRDEGRDDKDSERI LRDIKRRIDEAAKESREIIERIEKEVEYRSR　配列番号 121 KEKDIVKTLVDLLRENLETLERLIEEVVRLLKENVDVRDEGRDDKDSERILR DIKRRIDEAAKESREIIERIEKEVEYRSR　配列番号 349
DHD111	ヘテロ二量体	b	GSPEVDVLRRIVREILKASEELLRLLRKLIDEALKLSERKRDSQEYREVVDR VKKELERLLDEYRKLVEELKEKLRYDTR　配列番号 122 PEVDVLRRIVREILKASEELLRLLRKLIDEALKLSERKRDSQEYREVVDRVK KELERLLDEYRKLVEELKEKLRYDTR　配列番号 426
DHD112	ヘテロ二量体	a	GSDKRYESEKLKRRLDEAVEKVREVVERVERESDRVLEEVRRRRESKEVVDK VIEDNDKALEDVLRVVDEVAKVVRDVVRENTR　配列番号 123 DKRYESEKLKRRLDEAVEKVREVVERVERESDRVLEEVRRRRESKEVVDKVI EDNDKALEDVLRVVDEVAKVVRDVVRENTR　配列番号 351
DHD112	ヘテロ二量体	b	GSPREYHSKDILRKVDEILERIRRHADRVKKKSERLKRENVDVNEHSKDVKR VIRELLELVKELLRLAKKHSDDQQE　配列番号 124 PREYHSKDILRKVDEILERIRRHADRVKKKSERLKRENVDVNEHSKDVKRVI RELLELVKELLRLAKKHSDDQQE　配列番号 428

【表２－９】

DHD113	ヘテロ二量体	a	GSDEDEILYHSERLLQKLKKELDDLKEKSRELLEELKKEDPDDRLIERIIRL HDEVLKDLDEVLKNILEVHREVLERLR　配列番号 125 DEDEILYHSERLLQKLKKELDDLKEKSRELLEELKKEDPDDRLIERIIRLHD EVLKDLDEVLKNILEVHREVLERLR　配列番号 353
DHD113	ヘテロ二量体	b	DKLDRLLKIHEEALRRAEELIKRLLDIHRRALDLARRGELDDYLLKESEREL REIIRRAREELKESRDRLEEISR　配列番号 126
DHD114	ヘテロ二量体	a	GSPKEELIRRVLEEVKRLNEKLLEIIRRAAELVKRANDELPETEKLREIDRE LEKKLKEIEDELRRIDKELDDALYEIED　配列番号 127 PKEELIRRVLEEVKRLNEKLLEIIRRAAELVKRANDELPETEKLREIDRELE KKLKEIEDELRRIDKELDDALYEIED　配列番号 355
DHD114	ヘテロ二量体	b	GSPKLDKLRELLERNLEKLREILEEVLKILRTNLERVREDIRDEDVLQEYER LIRKAEEDLRRVLKEYDDLLKKLVYELR　配列番号 128 PKLDKLRELLERNLEKLREILEEVLKILRTNLERVREDIRDEDVLQEYERLI RKAEEDLRRVLKEYDDLLKKLVYELR　配列番号 430
DHD115	ヘテロ二量体	a	GSKEDESVKRAEEIVRTLLKLLEDSLREAERSLRDIKNGEDEHNLRRISEKL EELSKRITETIERLLRELQYTSR　配列番号 129 KEDESVKRAEEIVRTLLKLLEDSLREAERSLRDIKNGEDEHNLRRISEKLEE LSKRITETIERLLRELQYTSR　配列番号 357
DHD115	ヘテロ二量体	b	GSPNQELLDRVRKILEDLLRLNEELVRLNKELLKRALEMRRKNRDSEEVLER LAEEYRKRLEEYRRELEKLLEELEETIYRYKR　配列番号 130 PNQELLDRVRKILEDLLRLNEELVRLNKELLKRALEMRRKNRDSEEVLERLA EEYRKRLEEYRRELEKLLEELEETIYRYKR　配列番号 432
DHD116	ヘテロ二量体	a	GSDESEEAQHEVEKVLDDIRRLSEHLQKRLEEVLEEVYELRREGSDRTEVVE LLKEVIREIVRVNREALERLLRVVEEAVKRNE　配列番号 131 DESEEAQHEVEKVLDDIRRLSEHLQKRLEEVLEEVYELRREGSDRTEVVELL KEVIREIVRVNREALERLLRVVEEAVKRNE　配列番号 359
DHD116	ヘテロ二量体	b	GSDEEELVETVKRIQKEILDRLTELAKLLVEIQREIKKLKDEGEDDKELKRL SDELEEKVRQVVEEIKRLSDELEETVEYVSR　配列番号 132 DEEELVETVKRIQKEILDRLTELAKLLVEIQREIKKLKDEGEDDKELKRLSD ELEEKVRQVVEEIKRLSDELEETVEYVSR　配列番号 434
DHD117	ヘテロ二量体	a	GSDEEEEVVRRAEELVKEHEELIERVIRTHEELVYKLEDQGADKKLVDVLKR VVEESERVAREIVKVSRELIRLLEEASR　配列番号 133 DEEEEVVRRAEELVKEHEELIERVIRTHEELVYKLEDQGADKKLVDVLKRVV EESERVAREIVKVSRELIRLLEEASR　配列番号 361
DHD117	ヘテロ二量体	b	GSSKEEILKELEDLQRRLIEELKKLQERVVELLEELIKRLRDRGRDDKHLKR LVKEVRRLSEEVLRSIKEVSDRVRYQLR　配列番号 134 SKEEILKELEDLQRRLIEELKKLQERVVELLEELIKRLRDRGRDDKHLKRLV KEVRRLSEEVLRSIKEVSDRVRYQLR　配列番号 436
DHD118	ヘテロ二量体	a	GSDKEEESEYLLRDLVRLLEKVKEKIEEVNREVEKLLKKVKDGRLDRREVLR EILRLNRELAEIIKEVVDRIRHVVERSER　配列番号 135 DKEEESEYLLRDLVRLLEKVKEKIEEVNREVEKLLKKVKDGRLDRREVLREI LRLNRELAEIIKEVVDRIRHVVERSER　配列番号 363
DHD118	ヘテロ二量体	b	GSDLHEVVYETKELLKRIEEVVEELRKKSEDIIRKAERGEISEDELKRLQEE IAREAKKLLDEIKRVLERHLEQTL　配列番号 136 DLHEVVYETKELLKRIEEVVEELRKKSEDIIRKAERGEISEDELKRLQEEIA REAKKLLDEIKRVLERHLEQTL　配列番号 438
DHD119	ヘテロ二量体	a	GSPVEEIIKEVVKRVIEVQEKVLRIISHAVKRVVEVQKKYDPGSEESNRVVE EVKKTIEDAIRESDEVVDEVVKRIQYTVR 配列番号 137 PVEEIIKEVVKRVIEVQEKVLRIISHAVKRVVEVQKKYDPGSEESNRVVEEV KKTIEDAIRESDEVVDEVVKRIQYTVR　配列番号 365

【表２－１０】

DHD119	ヘテロ二量体	b	GSPEQEIADRILTEIRESQKELERLARKILKLLDESQEKAKRGRLSEEESDE LLERIKKELDELLERSKELLKKIEYELR 配列番号 138 PEQEIADRILTEIRESQKELERLARKILKLLDESQEKAKRGRLSEEESDELL ERIKKELDELLERSKELLKKIEYELR 配列番号 440
DHD120	ヘテロ二量体	a	GSDEDKEANRVLDEVLKTVRDLLETANEVLKEVLYRLKRTDDQEKVVRTLTE VLKEHLKLVEEIVRILDKVLKEHLETEK 配列番号 139 DEDKEANRVLDEVLKTVRDLLETANEVLKEVLYRLKRTDDQEKVVRTLTEVL KEHLKLVEEIVRILDKVLKEHLETEK 配列番号 367
DHD120	ヘテロ二量体	b	GSPEDDVLRRLEEVSEKILRVAEDVARQLREVSEKITQGKVDRKEWEEDIKR LKRELEELLREWKEEIERLTYELR 配列番号 140 PEDDVLRRLEEVSEKILRVAEDVARQLREVSEKITQGKVDRKEWEEDIKRLK RELEELLREWKEEIERLTYELR 配列番号 442
DHD121	ヘテロ二量体	a	GSRREEVVKRIRELLKRNKELIDRIRELLEENEYLDKDARDKDVLRRSVELL EELVRILEESVELAKEIIKLLREVVE 配列番号 141 RREEVVKRIRELLKRNKELIDRIRELLEENEYLDKDARDKDVLRRSVELLEE LVRILEESVELAKEIIKLLREVVE 配列番号 369
DHD121	ヘテロ二量体	b	GSDEKEDNRRLQHKIERILEKNEDLQRKLEEILELLERGEADEEKIDRLRKA VEDYRRVVEEIKEDVKRHKYTVR 配列番号 142 DEKEDNRRLQHKIERILEKNEDLQRKLEEILELLERGEADEEKIDRLRKAVE DYRRVVEEIKEDVKRHKYTVR 配列番号 444
DHD122	ヘテロ二量体	a	GSDEKEEAKKASEESVRTVERILEELLKASEESVELLRRGEDAKDVVERSKE ALKRVKELLDEVVKRSDEILKYIHN 配列番号 143 DEKEEAKKASEESVRTVERILEELLKASEESVELLRRGEDAKDVVERSKEAL KRVKELLDEVVKRSDEILKYIHN 配列番号 371
DHD122	ヘテロ二量体	b	GSDEKKLINEVVETQKRLIKEAAKRLSEVVRHQTELIRELREKNVDDKDVEK LLKESLDLAEEIVRRIKELLDESKKLVEYVSN 配列番号 144 DEKKLINEVVETQKRLIKEAAKRLSEVVRHQTELIRELREKNVDDKDVEKLL KESLDLAEEIVRRIKELLDESKKLVEYVSN 配列番号 446
DHD123	ヘテロ二量体	a	GSPDMDEVKRVLDELIEIQEEILREIKRVLEKLIKIQEDNGSEYESREVVRE IVEIARKLVERSRRVVKKITETLQ 配列番号 145 PDMDEVKRVLDELIEIQEEILREIKRVLEKLIKIQEDNGSEYESREVVREIV EIARKLVERSRRVVKKITETLQ 配列番号 373
DHD123	ヘテロ二量体	b	GSDERYATREIVERIERIAREILKRTEEIVREVREVLSRDVDQEEVVRRLAD LLRESVELVQHLVRRVEELLQESVERKK 配列番号 146 DERYATREIVERIERIAREILKRTEEIVREVREVLSRDVDQEEVVRRLADLL RESVELVQHLVRRVEELLQESVERKK 配列番号 448
DHD124	ヘテロ二量体	a	GSPEREALREVLEDLKRVTDRLRELVERVLEELKKVTDHVDSERILRESRRV LKELKDIIEEILRESEKVLEKLKYTED 配列番号 147 PEREALREVLEDLKRVTDRLRELVERVLEELKKVTDHVDSERILRESRRVLK ELKDIIEEILRESEKVLEKLKYTED 配列番号 375
DHD124	ヘテロ二量体	b	GSPAREILEEVVKKHLEVVEDAARILEEIIREHEKAVREDRDKKELEEISRD LLRKAREALKKVKDISDDLSREIEYVAS 配列番号 148 PAREILEEVVKKHLEVVEDAARILEEIIREHEKAVREDRDKKELEEISRDLL RKAREALKKVKDISDDLSREIEYVAS 配列番号 450
DHD125	ヘテロ二量体	a	GSPVEEAIKKVIDDLRDVQRKIRELVEELIRLLEEVQRDNDKRESEYVVERV EEILRRITETSREVVRKAVEDLS 配列番号 149 PVEEAIKKVIDDLRDVQRKIRELVEELIRLLEEVQRDNDKRESEYVVERVEE ILRRITETSREVVRKAVEDLS 配列番号 377
DHD125	ヘテロ二量体	b	GSDSDEKAEYLLKEMERVVRESDEVVKKILRDLEEVLERLRRGEISEDDVTE ILKELAERHIRAIEELVRRLRELLERHKR 配列番号 150 DSDEKAEYLLKEMERVVRESDEVVKKILRDLEEVLERLRRGEISEDDVTEIL KELAERHIRAIEELVRRLRELLERHKR 配列番号 452

【表２－１１】

DHD126	ヘテロ二量体	a	GSPVEEVLKELSEVNERVRDIAREIIERLSEVNEEVKETDDEDELKKISKKV VDEVEDLLRKILEVSEEVVRRVEYHDR　配列番号 151 PVEEVLKELSEVNERVRDIAREIIERLSEVNEEVKETDDEDELKKISKKVVD EVEDLLRKILEVSEEVVRRVEYHDR　配列番号 379
DHD126	ヘテロ二量体	b	GSPKEDILREVLRRHKEIVREIVRLVREAVETHLELVKRNSDDRDAQDVIRK LEEDLERLVRHAQEVIEEIFYRLH　配列番号 152 PKEDILREVLRRHKEIVREIVRLVREAVETHLELVKRNSDDRDAQDVIRKLE EDLERLVRHAQEVIEEIFYRLH　配列番号 454
DHD127	ヘテロ二量体	a	GSPRSYLLKELADLSQHLVRLLERLVRESERVVEVLERGEVDEEELKRLEDL HRELEKAVREVRETHREIRERSR　配列番号 153 PRSYLLKELADLSQHLVRLLERLVRESERVVEVLERGEVDEEELKRLEDLHR ELEKAVREVRETHREIRERSR　配列番号 381
DHD127	ヘテロ二量体	b	GSDREYIIKDILDSQEHLLRLIEELLETQKELLEILKRRPDSVERVRELVRR SKEIADEIRRQSDRNVRLLEEVSK　配列番号 154 DREYIIKDILDSQEHLLRLIEELLETQKELLEILKRRPDSVERVRELVRRSK EIADEIRRQSDRNVRLLEEVSK　配列番号 456
DHD128	ヘテロ二量体	a	GSDEKDEIRHVIESVERLIEDIKRLLKTLRELAHDDSDKKTVKEVLDRVKEM IERHRRELEEHRKELERAEYEVR　配列番号 155 DEKDEIRHVIESVERLIEDIKRLLKTLRELAHDDSDKKTVKEVLDRVKEMIE RHRRELEEHRKELERAEYEVR　配列番号 383
DHD128	ヘテロ二量体	b	GSESEDRIKELLKRHIELVERHEELLHEIKKLIDLEEKDDKDREEAVKRIDD AIKESEEMLEESKEILEEIEYLNR　配列番号 156 ESEDRIKELLKRHIELVERHEELLHEIKKLIDLEEKDDKDREEAVKRIDDAI KESEEMLEESKEILEEIEYLNR　配列番号 458
DHD129	ヘテロ二量体	a	GSSLEDSVRLNDEVVKVVERVVRLNQEVVRLIKHATDVEDEETVKYVLERVR EVLDESREVLKRVHELLEESERRLE　配列番号 157 SLEDSVRLNDEVVKVVERVVRLNQEVVRLIKHATDVEDEETVKYVLERVREV LDESREVLKRVHELLEESERRLE　配列番号 385
DHD129	ヘテロ二量体	b	GSHEKDIVYKVEDLVRKSDRIAERAREIVKRSRDIMREIRKDKDNKKLSDDL LKVTRDLQRVVDELEELSRELLRVAEESRK　配列番号 158 HEKDIVYKVEDLVRKSDRIAERAREIVKRSRDIMREIRKDKDNKKLSDDLLK VTRDLQRVVDELEELSRELLRVAEESRK　配列番号 460
DHD130	ヘテロ二量体	a	GSPELDEVKKLIDELKKSVERLEESIREVKESIKKLRKGDIDAEENIKLLKE NIKIVRENIKIIKEIIDVVQYVLR　配列番号 159 PELDEVKKLIDELKKSVERLEESIREVKESIKKLRKGDIDAEENIKLLKENI KIVRENIKIIKEIIDVVQYVLR　配列番号 387
DHD130	ヘテロ二量体	b	GSDEEEIEELLRELEKLLKKSEEALEESKKLIDESEELLRRDRLDKEKHVRA SEEHVKLSEEHLRISREIVKILEKAVYSTR　配列番号 160 DEEEIEELLRELEKLLKKSEEALEESKKLIDESEELLRRDRLDKEKHVRASE EHVKLSEEHLRISREIVKILEKAVYSTR　配列番号 462
DHD131	ヘテロ二量体	a	GSDESDRIRKIVEESDEIVKESRKLAERARELIKESEDKRVSEERNERLLEE LLRILDENAELLKRNLELLKEVLYRTR　配列番号 161 DESDRIRKIVEESDEIVKESRKLAERARELIKESEDKRVSEERNERLLEELL RILDENAELLKRNLELLKEVLYRTR　配列番号 389
DHD131	ヘテロ二量体	b	GSDEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGEVSEEESDRILRE IKEILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAE　配列番号 162 DEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGEVSEEESDRILREIK EILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAE　配列番号 464
DHD132	ヘテロ二量体	a	GSDKKDASRRAIRVLHEFVRVSEEVLEVLRKSVESLKRLDVDEKIKRTHDRI EEELRRWKRELEELIERLREWEYHQD　配列番号 163 DKKDASRRAIRVLHEFVRVSEEVLEVLRKSVESLKRLDVDEKIKRTHDRIEE ELRRWKRELEELIERLREWEYHQD　配列番号 391

【表２－１２】

DHD132	ヘテロ二量体	b	GSDDEEEDKRLLEEVKRSLDTDERILEKLRHSLERQLEDVDKDEDSRRVLRELDEITKRSREVVKRLRKLAYESK 配列番号 164 DDEEEDKRLLEEVKRSLDTDERILEKLRHSLERQLEDVDKDEDSRRVLRELDEITKRSREVVKRLRKLAYESK 配列番号 466
DHD133	ヘテロ二量体	a	GSDKEYKLDRILRRLDELIKQLSRILEEIERLVDELEREPLDDKEVQDVIERIVELIDEHLELLKEYIKLLEEYIKTTK 配列番号 165 DKEYKLDRILRRLDELIKQLSRILEEIERLVDELEREPLDDKEVQDVIERIVELIDEHLELLKEYIKLLEEYIKTTK 配列番号 393
DHD133	ヘテロ二量体	b	GSPSKEYQEKSAERQKELLHEYEKLVRHLRELVEKLQRRELDKEEVLRRLVEILERLKDLHKKIEDAHRKNEEAHKENK 配列番号 166 PSKEYQEKSAERQKELLHEYEKLVRHLRELVEKLQRRELDKEEVLRRLVEILERLKDLHKKIEDAHRKNEEAHKENK 配列番号 468
DHD134	ヘテロ二量体	a	GSRDRKISEELIKALEDHIRMLEELIRAIEEHIKLAERGVDEKELRESLEELKKIVDELEKSLEELRKLAERYKYETR 配列番号 167 RDRKISEELIKALEDHIRMLEELIRAIEEHIKLAERGVDEKELRESLEELKKIVDELEKSLEELRKLAERYKYETR 配列番号 395
DHD134	ヘテロ二量体	b	GSPKEESVEELKRVIDKHEEILRELKRVLEEHERVSHDEDENELRRSLERLKHILDRLHESLKELHELLKKNEYTER 配列番号 168 PKEESVEELKRVIDKHEEILRELKRVLEEHERVSHDEDENELRRSLERLKHILDRLHESLKELHELLKKNEYTER 配列番号 470
DHD135	ヘテロ二量体	a	GSDHEYWVKIVERILRVMEKHAEIVKKHLEIVERVVREGPSEDLRRKLKESLREIEESLRELKELLDELDELSEKTR 配列番号 169 DHEYWVKIVERILRVMEKHAEIVKKHLEIVERVVREGPSEDLRRKLKESLREIEESLRELKELLDELDELSEKTR 配列番号 397
DHD135	ヘテロ二量体	b	GSDEEYVTRSQRRLKRLLEEYIKVVEEHARLVERNERDDKELKRSIDELDKLTKELLELVKRYKELVDKTET 配列番号 170 DEEYVTRSQRRLKRLLEEYIKVVEEHARLVERNERDDKELKRSIDELDKLTKELLELVKRYKELVDKTET 配列番号 472
DHD136	ヘテロ二量体	a	GSDKEEIVKLQDEVIKTLERHLDILRKHIDLLEKLKDHLSEELKERVDRSIKKLEESIKRLERIIEELQELAEYSL 配列番号 171 DKEEIVKLQDEVIKTLERHLDILRKHIDLLEKLKDHLSEELKERVDRSIKKLEESIKRLERIIEELQELAEYSL 配列番号 399
DHD136	ヘテロ二量体	b	GSREEELKESAEELERSVRELKKEADKYKEEVDRLHYRGKVDKDWVRVVEKLIKLVEEHLELIREHLELLKEERR 配列番号 172 REEELKESAEELERSVRELKKEADKYKEEVDRLHYRGKVDKDWVRVVEKLIKLVEEHLELIREHLELLKEERR 配列番号 474
DHD137	ヘテロ二量体	a	GSDMEYELKKSAEELRKSLEELKRILDELHKSLRELRRHGDDEEYVQTVEELRKELEEHAKKLEEHLKELERVAT 配列番号 173 DMEYELKKSAEELRKSLEELKRILDELHKSLRELRRHGDDEEYVQTVEELRKELEEHAKKLEEHLKELERVAT 配列番号 401
DHD137	ヘテロ二量体	b	PEYELKKSVDDLKRDVDRLVEEVEEVFELSKERLREDRKHLELVEEMVRLIEKHLELIKEHLKLADDHVR 配列番号 174
DHD138	ヘテロ二量体	a	GSREKDESKELNDEYKKLLEEYERLLRRSEELVKRAKGPRDEKELKRILEENEDILRRTKEILERTKEISEEQKYRRR 配列番号 175 REKDESKELNDEYKKLLEEYERLLRRSEELVKRAKGPRDEKELKRILEENEDILRRTKEILERTKEISEEQKYRRR 配列番号 403
DHD138	ヘテロ二量体	b	GSDKDERQERLNEESDKSNEESERSNRESEELNRRARGPNDEKELQEILDRHLELLERNQRLLDENKEILRESQYLND 配列番号 176 DKDERQERLNEESDKSNEESERSNRESEELNRRARGPNDEKELQEILDRHLELLERNQRLLDENKEILRESQYLND 配列番号 476

【表２－１３】

DHD139	ヘテロ二量体	a	GSENKYILKEILKLLRENLKLLHDILRLLDENLEELEKHGAKDLDDYRRKIEEIRKKVEDYREKIEEIEKKVERDR 配列番号 177 ENKYILKEILKLLRENLKLLHDILRLLDENLEELEKHGAKDLDDYRRKIEEIRKKVEDYREKIEEIEKKVERDR 配列番号 405
DHD139	ヘテロ二量体	b	GSESEYTQEEILELLKESIKLLREILRLLEESEELWRRENTKSERSEEIKERAKEAIKRSEEILERVKRLSDHSR 配列番号 178 ESEYTQEEILELLKESIKLLREILRLLEESEELWRRENTKSERSEEIKERAKEAIKRSEEILERVKRLSDHSR 配列番号 478
DHD140	ヘテロ二量体	a	GSDEEEANYVSDKAVKIAEDVQELLKELLELSEVVRRGEVDEDEYDRVLRKLQEVMKEYEEVLKEYEEVSRKHE 配列番号 179 DEEEANYVSDKAVKIAEDVQELLKELLELSEVVRRGEVDEDEYDRVLRKLQEVMKEYEEVLKEYEEVSRKHE 配列番号 407
DHD140	ヘテロ二量体	b	GSPEKYLIKTQEELLRRHAEILEDLIRKVERQVDLRRKVDERDEDLKRELERSLRELERLVRESSRLVEEIRELSKEIKR 配列番号 180 PEKYLIKTQEELLRRHAEILEDLIRKVERQVDLRRKVDERDEDLKRELERSLRELERLVRESSRLVEEIRELSKEIKR 配列番号 480
DHD141	ヘテロ二量体	a	GSDEEYELERISRESKELLERYKRLLREYQELLKELRHVKDLDRAVKIIHELMRVSKELVEISHRLLELHERLVRRRK 配列番号 181 DEEYELERISRESKELLERYKRLLREYQELLKELRHVKDLDRAVKIIHELMRVSKELVEISHRLLELHERLVRRRK 配列番号 409
DHD141	ヘテロ二量体	b	GSEKEYIEKLSRKIEEDIRRSEERAKDSERLVRRLEELAKRKRLDLDDVLRVAEENLEILEDNLRILEEILKEQDKSNR 配列番号 182 EKEYIEKLSRKIEEDIRRSEERAKDSERLVRRLEELAKRKRLDLDDVLRVAEENLEILEDNLRILEEILKEQDKSNR 配列番号 482
DHD142	ヘテロ二量体	a	GSPHEEVVELHERVMEISERAVELIQRIIDIIRRIREDDKDIEKLVKTIRDLVREYEELHRELEEIDEEIYKKSE 配列番号 183 PHEEVVELHERVMEISERAVELIQRIIDIIRRIREDDKDIEKLVKTIRDLVREYEELHRELEEIDEEIYKKSE 配列番号 411
DHD142	ヘテロ二量体	b	GSDHEDVVRLHEDLVRKQEDARRVLEEIVRLAEEIVEVIKKDEKDKDRVTRLVEEIEKLVEEYKKKVDEMRKISDEIKYRSR 配列番号 184 DHEDVVRLHEDLVRKQEDARRVLEEIVRLAEEIVEVIKKDEKDKDRVTRLVEEIEKLVEEYKKKVDEMRKISDEIKYRSR 配列番号 484
DHD143	ヘテロ二量体	a	GSRAREVVKRAKRIIEEWQKILEEWRRILEEWRRLLEDERVDDRDNERIIRENERVIRENEKIIRDVIRLLEELLYERR 配列番号 185 RAREVVKRAKRIIEEWQKILEEWRRILEEWRRLLEDERVDDRDNERIIRENERVIRENEKIIRDVIRLLEELLYERR 配列番号 413
DHD143	ヘテロ二量体	b	GSREDEELEEEIDRIRQMVEEYEELVKEYEELTEKYKQGKVDKEESKKIIEKSERLLDLSQDAVRKVKEIIRRILYTNR 配列番号 186 REDEELEEEIDRIRQMVEEYEELVKEYEELTEKYKQGKVDKEESKKIIEKSERLLDLSQDAVRKVKEIIRRILYTNR 配列番号 486
DHD144	ヘテロ二量体	a	GSPKEEIVKLHDESAELHRRSVEVADEILKMHERSKDVDDERESRELSKEIERLIREVEEVSKRIKRLSEEVEYLVR 配列番号 187 PKEEIVKLHDESAELHRRSVEVADEILKMHERSKDVDDERESRELSKEIERLIREVEEVSKRIKRLSEEVEYLVR 配列番号 415
DHD144	ヘテロ二量体	b	GSPLEEILKIQRRINKIQDDINKILHEILRMQEKLNRSSDKDEVEESLRRIRELIKRIKDLSKEIEDLSREVKYRTT 配列番号 188 PLEEILKIQRRINKIQDDINKILHEILRMQEKLNRSSDKDEVEESLRRIRELIKRIKDLSKEIEDLSREVKYRTT 配列番号 488
DHD145	ヘテロ二量体	a	GSPEDEHVYVVREIYEVLREHAEVLEENREVIERLLEAKKRGDKSEELVKELKKSIDKLKEISRKLEEIVKELEKVSEKLK 配列番号 189 PEDEHVYVVREIYEVLREHAEVLEENREVIERLLEAKKRGDKSEELVKELKKSIDKLKEISRKLEEIVKELEKVSEKLK 配列番号 417

【表２－１４】

DHD145	ヘテロ二量体	b	GSDEDETSYRILELLREIVRASRELIRLSEELLEVARRDDKDETVLETLIRE YKELLDRYRRLIEELTRLVEEYEERSR 配列番号 190 DEDETSYRILELLREIVRASRELIRLSEELLEVARRDDKDETVLETLIREYK ELLDRYRRLIEELTRLVEEYEERSR 配列番号 490
DHD146	ヘテロ二量体	a	GSTQEEINRIQHEVLRIQEEIDEILRDIVEKLKAISRGELDHEVVKDVEDKV REALEKSEELLDKSRKVEYKSE 配列番号 191 TQEEINRIQHEVLRIQEEIDEILRDIVEKLKAISRGELDHEVVKDVEDKVRE ALEKSEELLDKSRKVEYKSE 配列番号 419
DHD146	ヘテロ二量体	b	GSDEEELNRELLEKSKRLVDINRDIIRTAQELIEMLKDSKDGRVDEDTKREL RDKLRKLEEKLERVREELRKYEELLRYVQR 配列番号 192 DEEELNRELLEKSKRLVDINRDIIRTAQELIEMLKDSKDGRVDEDTKRELRD KLRKLEEKLERVREELRKYEELLRYVQR 配列番号 492
DHD147	ヘテロ二量体	a	GSDEKDRVYEILKEVQRLVKEYRDISKEIEDLVKHYEHITDDEAQEVSKELI DKSLRASEIVRELIRLIKELLDELE 配列番号 193 DEKDRVYEILKEVQRLVKEYRDISKEIEDLVKHYEHITDDEAQEVSKELIDK SLRASEIVRELIRLIKELLDELE 配列番号 421
DHD147	ヘテロ二量体	b	GSDEEDVLYHLRELLEELKRVSDDYERLVREIKETSERKDRDTKENKDMLDE LVKAHREQEKLLERLVRLLEELFERKR 配列番号 194 DEEDVLYHLRELLEELKRVSDDYERLVREIKETSERKDRDTKENKDMLDELV KAHREQEKLLERLVRLLEELFERKR 配列番号 494
DHD1	ヘテロ二量体	a	PREQAIRISEEIIRISKKIIEILERTRSSTAREAMKWAKDSIRLAEESKYLL DK 配列番号 195
DHD1	ヘテロ二量体	b	IEDDVKKIQDSTKKAQKETIEALERSTSSTARKQMEEQKEQIRLQKEAMYLL KK 配列番号 196
DHD2	ヘテロ二量体	a	SREEIAKLQEEVIKLQRRVIELQKEVIELQRRAKELTSSYTKEILEIQRRIE EIQREIEEIQKRIEEIQEEIQRRT 配列番号 197
DHD2	ヘテロ二量体	b	SDEEIKRLSEEVIQLSRRVIKMSREAIKLSREVQKLTPSYQKRIKEIADRSI ELARESIEIAKRSEKIAEESQRRT 配列番号 198
DHD3	ヘテロ二量体	a	PAKDEALKMANESLELAKKSARLIQESSSKEILERIEKIQRRIAELQDRIAY LIKK 配列番号 199
DHD3	ヘテロ二量体	b	PAKDEALRMIDESRELIKKSNELIQRSSSKEILERILEIQRKIAELQKRIQY LLKS 配列番号 200
DHD4	ヘテロ二量体	a	TDEARYRSERIVKEAKRLLDEARRRSEKIVREAKQRSNSEDAKRIMEENLRE SEEAARRLREIIRRNLEESRETG 配列番号 201
DHD4	ヘテロ二量体	b	TREALEYQRKMAEEIEDLLREALRRQEEMVREAKQRSLSEEFKRIMERILEE QERVMRLAKEALERILEEQKRTG 配列番号 202
DHD5	ヘテロ二量体	a	SERTKREAKRSQEEILREAKEAMRRAKESQDHRQNRDGSNSEDLERLSQEQK RELEEVERRLKELAREQKYKLEDS 配列番号 203
DHD5	ヘテロ二量体	b	SEDLKRILKEITERELKLMQDLMEILKKITEDENNLDSNNSEDLKRSIEKAR RILDEALRKLEESARRAKYIQEDN 配列番号 204
DHD6	ヘテロ二量体	a	TEDEIRESLKWLDEVLQELREIARESNEVLERNRQKSRSDKLREDIERYKKR MEEARKKLDDQLNKYKKRMDENRS 配列番号 205
DHD6	ヘテロ二量体	b	TEEELKESKKFAEDLARSARRALKESKRVLEEISQASRSKKLEEIVRRYKEQ VKRWQDEWDERAREYRKRMKENRS 配列番号 206
DHD7	ヘテロ二量体	a	TKTEEIERLAREIKKLSEKVERLAQEIEELSRRVKEENSTDRELKEANREIE RAIREIEKANKRMEEALRRMKYNG 配列番号 207
DHD7	ヘテロ二量体	b	TKTEEHERLAREISKLADEHRKLAKIIEELARRIKEENLTDDELREAIRKIE DALRKNKEALKIMKEAAERNRYNT 配列番号 208
DHD8	ヘテロ二量体	a	TKKEESRELARESEELARESEKLARKSLELARRAESSGSEEEKRRIIDENRK IIERNREIIERNKEIIEYNKELIS 配列番号 209
DHD8	ヘテロ二量体	b	TKDEESLELNRESEELNRKSEELNRKSKELNDRAESSNSEEEEKEILREHKE ILREHLEILRRHKEILRRHKYLTS 配列番号 210

【表２－１５】

DHD16	ヘテロ二量体	a	TREELLRENIELAKEHIEIMREILELLQKMEELLERQSSEDILEELRKIIER IRELLDRSRKIHERSEEIAYKEE 配列番号 211
DHD16	ヘテロ二量体	b	SEDIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERKKLDPSNEKERKLLER SRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLD 配列番号 212
DHD18	ヘテロ二量体	a	DRQKLIEENIKLLDKHIKILEEILRLLKKDIDLLKKSSSEEVLEELKKIHRR IDKLLDESKKIHKRSSEIVKKRS 配列番号 213
DHD18	ヘテロ二量体	b	DEQKLIETSQRLQEKSERLLEKFEQILREASDLYRKPDSEELLRRVEKLLRE LEKLIRENQDLARKHEKILRDQS 配列番号 214
DHD19	ヘテロ二量体	a	DRQELIRENIELLKKHIKIVKEIQKLIETFIELLKKSSSEEILRRLKKILKR IEKLYRESQEIHKRSEEIAKKRQ 配列番号 215
DHD19	ヘテロ二量体	b	DEERLIDKSRELQKESEELLKELLKIFKRIEELLEKPDSEELIREIKKLLET LSEIHKRNEKLARTHEEILRQQS 配列番号 216
DHD22	ヘテロ二量体	a	STRDVQREIAKAFKKMADVQKKLAEEIKRHVKNVEKKNKDNDEYRKIATELL KKATESQKKLKELLDRIRKSDS 配列番号 217
DHD22	ヘテロ二量体	b	DKDDRSTSLLKRVEKLIDESDRIIDKFTTLIELSRNGKIDDDQYKKELKEIL ELLKKYDKHVKEVEELLKRLNS 配列番号 218
DHD23	ヘテロ二量体	a	SKRKALEVSERVVRISEKVVRVLDESSDLLKKSYDDSDKFAELIDRHEEKIK KWKKLIKEWLEIIQRHKS 配列番号 219
DHD23	ヘテロ二量体	b	SAEEFVKLSEEAVKRSKEILDIVRKQVKLVKAGVDKHEITDSLRKSEKLIEE HKELIKTHRDLLRREN 配列番号 220
DHD24	ヘテロ二量体	a	SSTEILKRFKRALRESEKIVKHSRRVLKIIREVLKQKPTQAVHDLVRIIETQ VKALEEQLKVLKRIVEALERQS 配列番号 221
DHD24	ヘテロ二量体	b	DKQKEIKDILEKTRRIAEESRKIAEKFDEIIKRSTEGKIDESLTKELEELVK EVIKLSEDDARTSDDLVRKES 配列番号 222
DHD26	ヘテロ二量体	a	DEDESIKLTRKSIEETRKSLKIIKEVVELIREVLKHIKDLDKEIFERIDKIL DKYKKQVDTYDEILKEYEKKQR 配列番号 223
DHD26	ヘテロ二量体	b	SELDEQKELIKKQEKLIEEQQRLLSKIRRMFKERVKDQELLREIQKVLKRSQ EIVETSKKILDRSDKTTE 配列番号 224
DHD28	ヘテロ二量体	a	DQKEINTRIVEKLERIFKKSKEIVRQSERVISTIEKKTEDERELDLLRRHVK IVREHLKLLEELLKIIKEVQKESE 配列番号 225
DHD28	ヘテロ二量体	b	DTEELVKRLNELLKELSKLVKEFIKILETYRKDQTKDTSKISERVDRILKTY EDLLQKYKEILEKIEKQLS 配列番号 226
DHD29	ヘテロ二量体	a	DYARLIDQAVEVTRKVVEVNVTVARVNDKFAKHLGDEELRRVSEHLKEVSKD LQEVAKKSKDAARQVK 配列番号 227
DHD29	ヘテロ二量体	b	DVSKVAEEYLQISKTLVDISRTLLEISERLVRLVRTVADDRSEVKKAIEDSI EVLKTSEEVVRQIKRASDKLVKAIS 配列番号 228
DHD31	ヘテロ二量体	a	DAKEIQRRVVEIQTEVVKLQKKAVDIIRKIIEAFNNSNIDQSLLEAAKEIVK EIDKLEKLTESLLEESKKLLKRSS 配列番号 229
DHD31	ヘテロ二量体	b	SAEEVVKLAKIFLELLRESIKLLKRSVDLLRKSSDPSLDKSEAEKVSREIEK VSDTSLKLSKKALDVVKRALKVAS 配列番号 230
DHD32	ヘテロ二量体	a	DEKDAARKARKVSEEAKEASKKIEKALEESKRILNTLKQKKDEQEVKVIKEH EDVLRQIEKIQKQVLEIQKEVAKLLESLD 配列番号 231
DHD32	ヘテロ二量体	b	SADDVARASEKVLRVARESAKAADKSLEVFKEVVKRGDKEAFLQVVKINEEV VKINITVIRILIEVSKTAT 配列番号 232
DHD38	ヘテロ二量体	a	DEYVKETLKQLREALASLREADKRITELVKEARKKPLSEAARKFAEAIVTHV KVVVEHVEVVLRHVEVLVEAKKNGVIDKSILDNALRIIENVIRLLSNVIRVV DEVLQDLD 配列番号 233
DHD38	ヘテロ二量体	b	DASDVIRRIHELFEEVHRLIEAVHRAIEDVAKAAQKKGLDESAVEILAELSK ELAKLSRRLAEISREIQKVVTDPDDKEAVERLKEIIKEIKKQLDELRDRLRK LQDLLYKLK 配列番号 234
DHD60	ヘテロ二量体	a	SEDKAHHDIVRVLEELIKIHDELMKISEEILKATSDSTATDETKEELKRRSK EAQKKSDTLVKIVKELEKESRKAQS 配列番号 235

【表２－１６】

DHD60	ヘテロ二量体	b	DDEEKYRQIIREAQEISKTAKRILRDAQEISKRIRHQGVDRSEHQRLVDLLR ELIKEHHKLLRRQQEADTRND 配列番号 236
DHD63	ヘテロ二量体	a	DRKDKARKASEKLEEVIQRWKTVADKWKKMVDLVSNGKLSQEEVARVTEELL KIQTELAKLLEEHAKVLQESAS 配列番号 237
DHD63	ヘテロ二量体	b	SDEESIKTQSELIKTSEELLKDVKRIDEELQKLRDDPTLDESELKKRVKEWS DRVRKAKEISRKIQEIVKESKKRSS 配列番号 238
DHD66	ヘテロ二量体	a	DKDEELRKVIEKYREMVKEYRKVIREYEEVIKSSKTIDKSSLISLSRKMVEL SQRVIDVSDEVAKVLSRKQS 配列番号 239
DHD66	ヘテロ二量体	b	TDEERLKKQTKELKEQTKQLEKQKDLLEKISNGEISKDEIQEIIKESKKIAK ESQKALDSSRKALEEVS 配列番号 240
DHD67	ヘテロ二量体	a	DEKEVSKEIIKVLKDIAKVQQKVIEVSQRLASVLRADDDNVVKRALEEYEKI LEELRELNKEIEKLTDKYRKVTS 配列番号 241
DHD67	ヘテロ二量体	b	DSDEQTKELEKLTELHKRHVEKLKKQTKESREVDSNKLWKSKDVKDKLSESE KELQKLSDQDKKAKDALESSRRKND 配列番号 242
DHD69	ヘテロ二量体	a	DAEEQLKLLTKLLRHQQRLLQLIKESLKLIEKIDQSSQENQDEIRKWREVTK KLRELIKTSEKLVRELEKSYKKSS 配列番号 243
DHD69	ヘテロ二量体	b	SLRDVVRRYQELVRRYDELIKTLTEILKKYQKKGAEDKDASTELVKAVRTSL KLSKELLKLNSELLKEDS 配列番号 244
DHD71	ヘテロ二量体	a	SKEELKRKLDELKKRSDTLKELSKKLKEISERNPDDKSVHRTIIRIHREFVK NHKEIVRVIEEIVSDKS 配列番号 245
DHD71	ヘテロ二量体	b	SKQDEHDRLLKIHDKLVKQHDELLKLLTKLSRAGDSVTKKKLEEILRKLQEV SKQLEESLKDADKVSKDIN 配列番号 246
DHD72	ヘテロ二量体	a	TVQSLLEQHVKIVKRSIEILERHTQILQDIARSQGVSKELEDVERQVKEYRK EVKKLEEDLRQLSRNSK 配列番号 247
DHD72	ヘテロ二量体	b	SDSDRIEKLIRESTELLKEQQKLAKRSRELAETVESLPLTEEYLKQQREHQK KIEKLLKDSEKHLEELKRLVKSEK 配列番号 248
DHD73	ヘテロ二量体	a	DSEKRIEDILRTDLELAKRDAELVKEHIKLVKRIDLSEELKKQVEDVEKESK KLEDSSEKLVQKVRKRSS 配列番号 249
DHD73	ヘテロ二量体	b	DEEERAKDLRKYLEEQTQYYRTVTEHLRNLEKVVEELERRGKPSSELQQILE RSQRIYKETTEIYDTSKKLIEELDKHHR 配列番号 250
DHD148	ヘテロ二量体	a	PLEDILKRHLDKVRELVRLSEEVNKLAKEVLDILKDKRVDEKELDKVLKELE KVVEEYERAVKESRDLLRELRETTR 配列番号 251
DHD148	ヘテロ二量体	b	DKERLLEIHERIQKLLDRNLEIIERLLRLLREARDIKDDDKLDKVIKRLKEL SEESKDILDKIKELLKESEKELT 配列番号 252
DHD149	ヘテロ二量体	a	PEDEVIRVIEELLRIAAEVDEVHRRNVEVQEEASRVTDRERLERLNRESEEL IKRSRELIEEQRKLIERLERLAT 配列番号 253
DHD149	ヘテロ二量体	b	DLEELIKEYAEVVRRHHKAVRDLERLVRELANAKHASEEELKRIATEILRIV KELIRVQERLIKLSEDSNEESR 配列番号 254
DHD150	ヘテロ二量体	a	PTDEVIEVLKELLRIHRENLRVNEEIVEVNERASRVTDREELERLLRRSNEL IKRSRELNEESKKLIEKLERLAT 配列番号 255
DHD150	ヘテロ二量体	b	DNEEIIKEARRVVEEYKKAVDRLEELVRRAENAKHASEKELKDIVREILRIS KELNKVSERLIELWERSQERAR 配列番号 256
DHD151	ヘテロ二量体	a	PKEDIDRVSRELVRVHKELLEVLRKSTEIVEAVARNEKDERTIEEVLEEQER AVRKLEEVSKKHKEAVKRLK 配列番号 257
DHD151	ヘテロ二量体	b	ELERLSEEIQKLSDRLIELIRRHSKVLEEIVRLLKHKDNDEREVRRLLKLLR DLTRRYEEVLRKVEEIVKRQEDESR 配列番号 258
DHD152	ヘテロ二量体	a	PEEDILRLLRKLVEVDKELLEVVRESTEVVRLVARNEKDVETVERVLRKQEE VVRKYERVSRELEEAVRRLK 配列番号 259
DHD152	ヘテロ二量体	b	ELKDLVEEIVKLSKENLKLWEDHSRVLEEIVRLLKHKDNDEREVRRLLKLLE DLTRRAEETSRRIEEIVKEAEDRAR 配列番号 260
DHD153	ヘテロ二量体	a	DEERELREVLRKHHRVVREWTKVVEELKRVVELLKRGETSEEDLLRVLKKLL EMDKRILEVNREVLRVLEKRLT 配列番号 261

【表２－１７】

DHD153	ヘテロ二量体	b	SLEEIIEELVELVRRSVEIAKESDEVARRIVESEDKKKELIDTLRDLHREWQ EVTKRAEELVREAEKEVR 配列番号 262
DHD154	ヘテロ二量体	a	TAEELLEVHKKSDRVTKEHLRVSEEILKVVEVLTRGEVSSEVLKRVLRKLEE LTDKLRRVTEEQRRVVEKLN 配列番号 263
DHD154	ヘテロ二量体	b	DLEDLLRRLRRLVDEQRRLVEELERVSRRLEKAVRDNEDERELARLSREHSD IQDKHDKLAREILEVLKRLLERTE 配列番号 264
DHD155	ヘテロ二量体	a	PEDDVVRIIKEDLESNREVLREQKEIHRILELVTRGEVSEEAIDRVLKRQED LLKKQKESTDKARKVVEERR 配列番号 265
DHD155	ヘテロ二量体	b	DEVRLITEWLKLSEESTRLLKELVELTRLLRNNVPNVEEILREHERISRELE RLSRRLKDLADKLERTRR 配列番号 266
DHD156	ヘテロ二量体	a	DEDEVVKVHEEHVKSHEEIHRSHEEVVRAAEEDKRDSRELRTLMEEHRKLLE ENEKSIEEVKKIHERVKR 配列番号 267
DHD156	ヘテロ二量体	b	KKEELIDISKEVLDLDDEINKISKEILELIKKLLRLKEEGREDKDKAREVKR RIRELHRRIQELNKRLRELHKRVQETKR 配列番号 268
DHD157	ヘテロ二量体	a	PEEDIARRVEDLLRKSEELIKESEKILKESKRLLDRNDSDKRVLETNLRLID KHTKLLERNLELLEELLKLAEDVAK 配列番号 269
DHD157	ヘテロ二量体	b	RFKDLSREYIEVVKRLLELSREALEVLREIKDTDKTDKKRIKELIDRLRKLI EEYKRIIDRLRKLSKDLEEEHR 配列番号 270
DHD158	ヘテロ二量体	a	DEEELVKILKELQRLSEESLEINKRLVEILRLLRRGEVPKEEVEKKLREIKK EQEKLDREHEKIKKRIEEITK 配列番号 271
DHD158	ヘテロ二量体	b	SLKEKILEIIERNMKLVELSNRSVEIVARILKGEKDDEETLERLLREWDKIT RDYEEIIKESRKLVKELEEEAK 配列番号 272
DHD159	ヘテロ二量体	a	SKTEILRKALEIHKEQIDIVRKLIELSEEVLKLVEESKEKNLEKLKRIDEET DRLLERLDELHKRLTELAERLK 配列番号 273
DHD159	ヘテロ二量体	b	SDDEARKQLEEMKRRLREVEKKSKRVEERVRELERLVRENREDEDRVLKTLE DLLRENEKLVRTIERHVREQRELSKEVK 配列番号 274
DHD160	ヘテロ二量体	a	SEEELEKKADELRKLSEEWRKLQEEDKRLSEMVEKGELDLQEVDEHSLRVLE RATEVHRTVDKVIEEILRTTN 配列番号 275
DHD160	ヘテロ二量体	b	SEKERHRESQETQEEIRRTHEEIIRKLEEILRRAKAGELPEETLDRLRRIME RLKELSERLDDLVRKLRDDHRREQK 配列番号 276
DHD161	ヘテロ二量体	a	SEKEILEELKRILKRVKDISDRLEELDKRTEEIARREPTKELVDELVKIHRD WLRLHEEILKLVDDALKKVEDATK 配列番号 277
DHD161	ヘテロ二量体	b	DLRELLELQREASRLHRELVKLLTELVKKLELIAKGEDIREEDLKRIKERLE EIKKRSKRIKEESDEIDKKTK 配列番号 278
DHD162	ヘテロ二量体	a	SERELQRELNKIVRRILEIHREVSELHQRAVKLIRENDNSEELEEISRRIEE LSKELEKLVREHDEIVKTIE 配列番号 279
DHD162	ヘテロ二量体	b	SEREKLDRNDEELKEINKRVEEIKERSDRITEAIEKNERSEEEIRRLSREQN EALQRLLELHKKLVKLHRELLEDTR 配列番号 280
DHD163	ヘテロ二量体	a	DKEDVIRVHDEQHKLIEEQLELTRRIAELVREIAKNTASEEEIKEMLKEIKR LDDRSREIQDRLQKLLEEIRRKTK 配列番号 281
DHD163	ヘテロ二量体	b	TEEEIVELNKDIQRKSKEHIDLQNELVKKIERAIRENNITEELLEELERLLR ESEKIVEEIRRITDKIRKDAK 配列番号 282
DHD164	ヘテロ二量体	a	SEKEILERLLRLSKEQNEISEEIHRLTERLVELKRRKDDDERLKRILDRQKR LVERAREISKEYEDLLRKLE 配列番号 283
DHD164	ヘテロ二量体	b	SMEELLRKNARLSRKQLKIIDEHLELSTKLTRGEAGDETLEEIERRSREMLE EQRRVDEESKRIREKLK 配列番号 284
DHD165	ヘテロ二量体	a	SEEEIRDIVEKLLRTHEEVLKEIKKLLDDSERVRRRELDKKDLDRIQKEQRD IQEENKEKAKRFDELVKELKKAAK 配列番号 285
DHD165	ヘテロ二量体	b	SEEEHRRTMEKVEKEVRDIKRRSEEVKKKVKANTLSEEDLVRLLERLVEDHK RLQDLSQEIIERDEKATK 配列番号 286
DHD166	ヘテロ二量体	a	DEDELAKEIEDVQRRNKESQEEHDKSVKKLEAAERGEIDEDSLLRVLEEDIK VLEKDIEVLERSIEVIEKAE 配列番号 287

【表２－１８】

DHD166	ヘテロ二量体	b	SEKELIRRLLEQQRQHLRLSERLIELSRRLVEVVRKGKDNRDLLRELKKLSE EHKKHSKDDHEKVREIREREK 配列番号 288
DHS 17	ヘテロ二量体	a	DRKDLLKRNIKLLDRHLKILDTILKLLEKLSELLKKSSSEEVVKEYKKILDE IRKLLEESKEIHKESKEILERES 配列番号 289
DHD17	ヘテロ二量体	b	DEEKLIERSKRLQEESEQLLEKFEQILRELTELLEKPDSEELARKIKKLHDE LRKIIKRNQELIREHEEILRKRD 配列番号 290

【００４６】
いくつかの態様では、単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチド対の非限定的な例が図１６に示されている。
【００４７】
いくつかの態様では、単量体Ａポリペプチドまたは単量体Ｂポリペプチドに有用な配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のアミノ酸配列は、配列のＮ末端でＧｌｙＳｅｒに結合していないか、Ｎ末端でＧｌｙＳｅｒを含んでいない。いくつかの態様では、単量体Ａポリペプチドおよび／または単量体Ｂポリペプチドは、アミノ酸配列のＮ末端またはＣ末端に、少なくとも１つのアミノ酸、少なくとも２つのアミノ酸、少なくとも３つのアミノ酸、少なくとも４つのアミノ酸、少なくとも５つのアミノ酸、少なくとも６つのアミノ酸を、少なくとも７個のアミノ酸、少なくとも８個のアミノ酸、少なくとも９個のアミノ酸、または少なくとも１０個のアミノ酸を含む。いくつかの態様では、追加のアミノ酸は、Ｎ末端のＧｌｙＳｅｒではない。
【００４８】
いくつかの態様では、本開示のタンパク質は、単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチドを含むヘテロ二量体を含み、それぞれ、単量体Ａポリペプチドは、配列番号３３１、５、７、１３、１５、２５、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４５、４７、５３、５５、５７、５９、６１、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、３３７、３３９、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、３４１、１０３、３４３、１０７、１０９、１１１、１１３、４５９、３４５、３４７、３４９、３５１、３５３、３５５、３５７、３５９、３６１、３６３、３６５、３６７、３６９、３７１、３７３、３７５、３７７、３７９、３８１、３８３、３８５、３８７、３８９、３９１、３９３、３９５、３９７、３９９、４０１、４０３、４０５、４０７、４０９、４１１、４１３、４１５、４１７、４１９、または４２１で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含み、単量体Ｂポリペプチドは、配列番号２、３３２、３３４、３３６、３３８、３４０、３４２、３４４、３４６、３４８、４１８、３５０、３５２、３５４、３５６、３５８、３６０、３６２、３６４、３６６、３６８、３７０、３７２、３７４、３７６、３７８、３８０、３８２、３８４、３８６、３８８、３９０、３９２、３９４、３９６、３９８、４００、４０２、４０４、４０６、４０８、４１０、４１２、４１４、４１６、４２０、４２２、４２４、４２６、４２８、１２６、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８、４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、１７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９２、または４９４で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含む。
【００４９】
いくつかの態様では、本開示のタンパク質は、単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチドを含むヘテロ二量体を含み、それぞれ、単量体Ａポリペプチドは、配列番号３３１、５、７、１３、１５、２５、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４５、４７、５３、５５、５７、５９、６１、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、３３７、３３９、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、３４１、１０３、３４３、１０７、１０９、１１１、１１３、４５９、３４５、３４７、３４９、３５１、３５３、３５５、３５７、３５９、３６１、３６３、３６５、３６７、３６９、３７１

、３７３、３７５、３７７、３７９、３８１、３８３、３８５、３８７、３８９、３９１、３９３、３９５、３９７、３９９、４０１、４０３、４０５、４０７、４０９、４１１、４１３、４１５、４１７、４１９、または４２１の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含み、単量体Ａポリペプチドのアミノ酸配列は、Ｎ末端にＧｌｙＳｅｒを含まず、単量体Ｂポリペプチドは、配列番号２、３３２、３３４、３３６、３３８、３４０、３４２、３４４、３４６、３４８、４１８、３５０、３５２、３５４、３５６、３５８、３６０、３６２、３６４、３６６、３６８、３７０、３７２、３７４、３７６、３７８、３８０、３８２、３８４、３８６、３８８、３９０、３９２、３９４、３９６、３９８、４００、４０２、４０４、４０６、４０８、４１０、４１２、４１４、４１６、４２０、４２２、４２４、４２６、４２８、１２６、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８、４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、１７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９２、または４９４の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含む。

【００５０】

いくつかの態様では、本開示のタンパク質は、単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチドを含むヘテロ二量体を含み、それぞれ、単量体Ａポリペプチドは、配列番号３３１、５、７、１３、１５、２５、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４５、４７、５３、５５、５７、５９、６１、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、３３７、３３９、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、３４１、１０３、３４３、１０７、１０９、１１１、１１３、４５９、３４５、３４７、３４９、３５１、３５３、３５５、３５７、３５９、３６１、３６３、３６５、３６７、３６９、３７１、３７３、３７５、３７７、３７９、３８１、３８３、３８５、３８７、３８９、３９１、３９３、３９５、３９７、３９９、４０１、４０３、４０５、４０７、４０９、４１１、４１３、４１５、４１７、４１９、または４２１で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列からなり、単量体Ｂポリペプチドは、配列番号２、３３２、３３４、３３６、３３８、３４０、３４２、３４４、３４６、３４８、４１８、３５０、３５２、３５４、３５６、３５８、３６０、３６２、３６４、３６６、３６８、３７０、３７２、３７４、３７６、３７８、３８０、３８２、３８４、３８６、３８８、３９０、３９２、３９４、３９６、３９８、４００、４０２、４０４、４０６、４０８、４１０、４１２、４１４、４１６、４２０、４２２、４２４、４２６、４２８、１２６、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８、４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、１７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９２、または４９４で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列からなる。

【００５１】

上記の実施形態のいずれかの１つの実施形態では、参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化は、保存的アミノ酸置換である。本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、ポリペプチド機能または他の特性を変更または実質的に変更しないアミノ酸置換を意味する。所定のアミノ酸は、同様の物理化学的特性をもつ残基で置き換えることができ、例えば、１つの脂肪族残基を別のものに置き換える（ＩｌｅとＶａｌとＬｅｕとＡｌａなどを互いに）、または、１つの極性残基を別のものに置き換える（ＬｙｓとＡｒｇ間、ＧｌｕとＡｓｐ間、またはＧｌｎとＡｓｎ間など）ことができる。他のそのような保存

的置換、例えば類似の疎水性特性を有する領域全体の置換はよく知られている。保存的アミノ酸置換を含むポリペプチドは、本明細書に記載のアッセイのいずれか１つで試験して、所望の活性、例えば、抗原結合活性および天然または参照ポリペプチドの特異性、が保持されていることを確認することができる。

【００５２】

アミノ酸は、それらの側鎖の特性における類似性に従って分類することができる（Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄ．，ｐｐ．７３－７５，Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７５））。（１）非極性：Ａｌａ（Ａ）、Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｍｅｔ（Ｍ）、（２）非荷電極性：Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｔｙｒ（Ｙ）、Ａｓｎ（Ｎ）、Ｇｌｎ（Ｑ）、（３）酸性：Ａｓｐ（Ｄ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、（４）塩基性：Ｌｙｓ（Ｋ）、Ａｒｇ（Ｒ）、Ｈｉｓ（Ｈ）。代替的に、天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて分類することができる。（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ、（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、（５）鎖の配向に影響する残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。非保存的置換では、これらのクラスの１つのメンバーを別のクラスに交換する必要がある。特定の保存的置換には、例えば、ＡｌａをＧｌｙにもしくはＳｅｒに、ＡｒｇをＬｙｓに、ＡｓｎをＧｌｎにもしくはＨｉｓに、ＡｓｐをＧｌｕに、ＣｙｓをＳｅｒに、ＧｌｎをＡｓｎに、ＧｌｕをＡｓｐに、ＧｌｙをＡｌａにもしくはＰｒｏに、ＨｉｓをＡｓｎにもしくはＧｌｎに、ＩｌｅをＬｅｕにもしくはＶａｌに、ＬｅｕをＩｌｅにもしくはＶａｌに、ＬｙｓをＡｒｇに、Ｇｌｎに、もしくはＧｌｕに、ＭｅｔをＬｅｕに、Ｔｙｒに、もしくはＩｌｅに、ＰｈｅをＭｅｔに、Ｌｅｕに、もしくはＴｙｒに、ＳｅｒをＴｈｒに、ＴｈｒをＳｅｒに、ＴｒｐをＴｙｒに、ＴｙｒをＴｒｐに、および／またはＰｈｅをＶａｌに、Ｉｌｅに、もしくはＬｅｕに、が含まれる。

【００５３】

上記の実施形態のいずれかの別の実施形態では、定義された界面位置の２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％のアミノ酸残基は、参照アミノ酸配列と比較して不変である。以下の表２は、ヘテロ二量体の界面に存在する各ＡおよびＢ単量体内の残基番号を提供する。界面残基の位置は、Ａ－Ｂ結合パートナーについても同じである。表２は、ヘテロ二量体の設計名称で体系付けられている（表１Ａおよび１Ｂの左側の列を参照）。表１Ａおよび１Ｂの各ポリペプチドの界面残基の位置を定義する目的で、アミノ末端に「ＧＳ」残基が存在する場合、それは含まれないことに留意されたい。

表２．両方の鎖「ａ」および「ｂ」にわたる位置番号による界面残基

ＤＨＤ＿１

［５、６、８、９、１２、１３、１６、１９、２０、２２、２３、３１、３４、３５、３８、４１、４２、４５、４８、５２、５５、５９、６３、６６、７０、７３、７４、７７、８０、８１、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１０６］

ＤＨＤ＿２

［５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３６、３７、３８、４１、４４、４５、４８、５１、５５、５８、６２、６５、６９、７２、７３、７６、８１、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１０６、１０９、１１０、１１２、１１４、１１７、１２０、１２３、１２４、１２７、１２８、１３１、１３４、１３５、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８、１４９、１５２］

ＤＨＤ＿３

［６、７、１０、１１、１３、１４、１７、２０、２１、２４、２５、２８、３３、３６

、４０、４３、４４、４７、５０、５１、５４、６２、６３、６６、６９、７３、７６、７７、８０、８１、８４、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０７、１１０、１１２]
ＤＨＤ＿４
[１、８、１１、１２、１５、１９、２２、２６、２９、３０、３３、３８、３９、４２、４５、４６、４９、５０、５３、５６、５７、６０、６３、６４、６７、６８、７１、７５、７６、８０、８３、８７、９０、９４、９８、１０１、１０５、１０８、１１３、１１４、１１７、１２１、１２４、１２５、１２８、１３２、１３５、１３９、１４２、１４３、１４６、１５０]
ＤＨＤ＿５
[４、８、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、３０、３４、３８、３９、４４、４８、５１、５５、５８、６２、６６、６９、７３、７６、８０、８４、８７、８８、９２、９５、９６、９８、９９、１０２、１０５、１０６、１１０、１１４、１１５、１１７、１２０、１２４、１２７、１３１、１３５、１３８、１４２、１４５、１４９、１５２]
ＤＨＤ＿６
[１、５、８、９、１１、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２７、３０、３３、３５、３７、４２、４６、４９、５３、５６、６０、６４、６７、７１、７４、７７、８１、８４、８７、８８、９１、９２、９５、９９、１０２、１０５、１０６、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１８、１２２、１２５、１２９、１３２、１３３、１３６、１４０、１４３、１４７、１５０]
ＤＨＤ＿７
[３、６、１０、１３、１７、２０、２４、２７、３１、３４、４４、４７、４８、５１、５５、５８、６１、６２、６５、６９、７２、７５、７６、７９、８２、８６、８９、９０、９３、９６、１００、１０３、１０７、１１０、１１５、１２０、１２４、１２７、１３０、１３１、１３４、１３８、１４１、１４５、１４８、１５１、１５２]
ＤＨＤ＿８
[６、１０、１３、１７、２０、２４、２７、２８、３１、３４、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７５、７６、８２、８３、８６、８９、９３、９６、１００、１０３、１０７、１１０、１２３、１２６、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４４、１４７、１５０、１５１、１５２]
ＤＨＤ＿９
[１２、１６、１９、２３、２６、３０、３３、３８、３９、４２、４６、４９、５２、５３、５６、５９、６０、６３、６７、６９、８８、９２、９５、９９、１０２、１０６、１０９、１１５、１２２、１２５、１２９、１３２、１３６、１３９、１４３、１４５]
ＤＨＤ＿１６
[６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、２８、３０、３４、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、７１、７２、５、８、１２、１５、１９、２２、２３、２６、２９、３３、４１、５０、５７、６０、６４、６７、６８、７１、７４、７８]
ＤＨＤ＿１８
[３、６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３１、３４、３８、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、６８、７１、７５、７８、８１、８５、８８、９１、９５、９８、１０２、１０５、１０６、１０９、１１８、１２１、１２５、１２８、１３２、１３５、１３６、１３９、１４２、１４６、１４９、１５０]
ＤＨＤ＿１９
[３、６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３８、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６１、６４、６７、７１、７５、８１、８８、９１、９５、９８、９９、１０２、１０５、１０９、１１８、１２１、１２５、１２

8、129、132、135、139、142、146、149、150]
DHD_22
[1、2、5、6、9、10、12、13、16、19、20、23、27、30、31、33、34、38、41、44、47、48、51、55、58、62、65、69、72、80、81、84、87、91、94、97、98、101、102、105、108、118、122、125、126、129、132、136、139、143、146、147、148]
DHD_23
[1、5、6、8、9、12、15、16、19、22、23、26、29、30、33、34、40、43、47、51、54、57、58、61、64、65、68、72、75、76、79、82、83、86、89、90、93、96、97、100、104、109、110、113、116、120、123、126、127、130、134、138]
DHD_24
[1、5、9、12、16、19、22、26、29、30、33、40、41、42、45、48、49、51、52、55、56、59、62、63、66、69、70、73、77、80、83、84、87、91、94、98、101、105、108、109、113、118、121、125、128、129、132、136、139、142、143、147]
DHD_26
[5、8、9、12、16、19、22、23、26、29、30、33、37、40、44、45、48、51、52、55、58、59、62、65、66、69、73、77、80、84、87、91、94、95、98、101、105、109、112、114、115、118、119、122、125、126、129、132、136、139、143]
DHD_28
[2、5、6、9、13、16、20、23、26、27、30、31、33、34、46、47、50、53、54、57、60、61、64、67、68、71、75、78、82、85、86、89、92、93、96、99、100、103、106、110、114、115、118、121、125、128、132、135、139、142、146、147]
DHD_29
[2、5、6、8、9、10、12、13、16、19、20、22、23、26、27、30、33、34、39、42、45、46、49、53、56、60、63、66、67、70、71、74、77、78、81、84、85、88、91、92、95、98、99、102、106、112、115、116、119、120、122、123、126、129、130、133、137、140、141、144、145]
DHD_31
[2、5、6、9、10、12、13、16、17、19、20、23、24、26、27、30、31、33、34、37、38、39、43、46、50、54、57、60、61、64、65、68、71、75、78、81、82、85、88、89、92、95、96、99、102、103、106、109、110、119、123、126、130、133、134、137、140、141、144、147、148、151、152]
DHD_32
[5、6、9、12、16、19、23、26、27、30、33、34、37、44、48、49、52、55、56、58、59、62、63、65、66、69、70、73、76、77、79、80、82、83、86、87、90、93、94、97、100、101、104、107、108、111、114、115、118、123、124、127、130、133、134、137、138、140、141、144、14

５、１４７、１４８、１５１、１５２]
ＤＨＤ＿３８
[４２、４３、４６、４９、５０、５２、５３、５６、５７、６０、６３、６４、６７、７０、７１、７４、７７、７９、８０、８４、８７、８８、９１、９４、９５、９８、１０１、１０２、１０５、１０９、１１６、１１７、１２０、１２３、１２４、１２７、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４９、１５３、１５８、１６１、１６２、１６５、１６８、１６９、１７２、１７５、１７６、１７９、１８２、１８３、１８５、１８６、１８７、１８９]
ＤＨＤ＿３９
[２、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、２９、３０、３４、４０、４３、４６、４７、５０、５１、５４、５７、５８、６０、６１、６４、１１０、１１４、１１７、１２１、１２４、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４５、１４９、１５２、１５６、１５９、１６０、１６３、１６４、１６６、１６７、１７０、１７３、１７４、１７６、１７７、１７８]
ＤＨＤ＿４０
[５、９、１１、１２、１５、１６、１９、２３、２６、２９、３０、３３、４３、４６、４９、５０、５３、５６、５７、５９、６０、６３、６４、６７、７１、１０８、１１２、１１６、１１９、１２３、１２７、１３０、１３３、１３４、１３７、１３８、１４８、１５１、１５４、１５８、１６１、１６５、１６８、１６９、１７２、１７５]
ＤＨＤ＿４３
[３、４、７、１１、１４、１８、２２、２５、２９、３４、３５、３９、４３、４６、４７、５０、５１、５４、５７、５８、６１、６２、６５、７１、７２、７５、７６、７９、８２、８３、８６、８７、９０、９３、９４、９７、９８、１００、１０１、１０４、１１１、１１４、１１５、１１７、１１８、１２２、１２５、１２６、１２９、１３３、１３６、１３７、１４０、１４４]
ＤＨＤ＿６０
[６、７、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３５、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、７２、７５、７６、７７、８３、８７、９０、９１、９３、９４、９７、１００、１０１、１０４、１０５、１０８、１１１、１１５、１１６、１２１、１２２、１２４、１２５、１２８、１３１、１３２、１３５、１３６、１３８、１３９、１４２、１４３、１４９]
ＤＨＤ＿６３
[６、１０、１３、１７、２０、２４、２７、３０、３１、３４、４１、４４、４５、４８、５１、５２、５５、５６、５８、５９、６２、６５、６６、６８、６９、７０、７２、７３、７４、８０、８３、８４、８７、９０、９３、９４、９７、１０４、１０５、１１８、１２２、１２５、１２６、１２９、１３２、１３６、１３９、１４０、１４３、１４６、１５０]
ＤＨＤ＿６５
[２、５、６、８、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、２９、３０、３３、３４、３７、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２、７５、８２、８５、８６、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０７、１１０、１１８、１２０、１２１、１２３、１２７、１２８、１３１、１３４、１３５、１３８、１３９、１４１、１４２、１４５、１４８]
ＤＨＤ＿６６
[６、１０、１３、１６、１７、２０、２４、２７、３１、３４、４２、４３、４６、４９、５０、５３、５４、５６、５７、６０、６３、６４、６７、６８、７１、７８、８１、８２、８５、８８、８９、９２、９５、９９、１０２、１０３、１０７、１１２、１１３、１１５、１１６、１１９、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３７、１４０、１４１]
ＤＨＤ＿６７

[６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２１、２３、２４、２７、２８、３０、３１、３４、３６、４２、４６、４９、５２、５３、５６、６０、６３、６７、７０、７４、７７、８０、８１、８４、８７、８８、９１、９４、９５、９８、１０１、１０２、１０５、１１０、１１４、１２３、１３０、１３１、１３３、１３４、１４０、１４４、１４７、１５１]

ＤＨＤ＿６９

[２、５、６、９、１０、１２、１３、１６、１７、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３５、４４、４７、５１、５４、５８、６１、６５、６８、７２、７５、７６、７８、８２、８５、８６、８９、９２、９６、９９、１００、１０２、１０３、１０６、１０７、１１１、１１７、１１８、１２０、１２１、１２４、１２７、１２８、１３１、１３４、１３５、１３８、１３９、１４１、１４２、１４６]

ＤＨＤ＿７０

[６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２６、２７、３０、３１、３４、３７、３８、４１、４３、４４、４７、５０、５１、５４、５７、５８、６１、６４、６５、６８、７１、７２、７３、７４、７８、８１、８２、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１０６、１０７、１０９、１１０、１１１、１１９、１２０、１２３、１２４、１２７、１３０、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８]

ＤＨＤ＿７１

[９、１６、１９、２３、３０、３４、４０、４３、４４、４６、４７、５０、５１、５４、５７、５８、６１、６４、６５、６９、７２、７５、７８、７９、８２、８５、８６、８９、９２、９３、９６、９７、９９、１００、１０３、１０６、１１１、１１５、１１８、１１９、１２１、１２２、１２５、１２８、１２９、１３２、１３６、１３９、１４０]

ＤＨＤ＿７２

[１、２、５、６、８、９、１２、１６、１９、２３、２６、２７、３０、３３、３４、４０、４３、４６、４７、５０、５４、５７、６３、６４、６７、６８、７５、７８、７９、８２、８５、８６、８９、９２、９３、９６、９９、１０２、１０３、１０６、１０８、１１２、１１５、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１３０、１３３、１３７、１４０、１４３]

ＤＨＤ＿７３

[２、６、９、１０、１２、１６、１７、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３６、３７、４０、４３、４４、４７、５１、５４、５７、５８、６１、６５、６９、７９、８２、８６、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１０４、１０７、１１７、１２０、１２４、１２７、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１４２、１４５、１４８、１４９]

ＤＨＤ＿８８

[２、３、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、３７、４８、５１、５２、５５、５６、５８、５９、６２、６３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７６、７９、８０、８１、８３、８７、９０、９１、９４、９７、９８、１０１、１０４、１０５、１０８、１１１、１１２、１１５、１１６、１２１、１２５、１２８、１３２、１３５、１３６、１３９、１４０、１４２、１４３、１４６、１４９、１５０、１５３、１５４]

ＤＨＤ＿８９

[１、２、５、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３４、３６、３７、３８、４８、５１、５５、５８、６２、６５、６９、７２、７９、８２、８３、８６、８７、８９、９０、９３、９４、９７、１００、１０１、１０３、１０４、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１４、１１７、１１８、１２１、１２４、１２８、１３１、１３５、１３８、１３９、１４２、１４５、１４６]

ＤＨＤ＿９０

[１、２、５、６、８、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、２９、３０、３３、３４、３７、３９、４３、４６、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７５、７７、７８、８１、８２、８５、８８、８９、９１、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１０６、１０９、１１０、１１３、１１６、１１９、１２２、１２５、１２６、１２９、１３２、１３３、１３６、１３９、１４０、１４３、１４６、１４７、１５０、１５１]

ＤＨＤ＿９１

[２、５、９、１２、１６、１７、１９、２３、２６、２７、３０、３３、３９、４０、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、７０、７４、７７、７８、８１、８４、８５、８８、９１、９２、９５、９６、９８、９９、１０１、１０９、１１２、１１６、１１９、１２３、１２６、１３０、１３３、１３７、１３８]

ＤＨＤ＿９２

[５、６、８、９、１２、１３、１５、１６、１９、２０、２２、２３、２６、２７、２９、３０、３３、３６、３７、３８、４２、４６、４９、５０、５３、５６、５７、５９、６０、６３、６７、７０、７１、７４、７７、８０、８１、８４、８７、８８、９１、９４、９５、９８、１０１、１０２、１０５、１０９、１１０、１１４、１１８、１２１、１２５、１２８、１２９、１３２、１３５、１３６、１３９、１４２、１４３]

ＤＨＤ＿９３

[２、５、６、９、１０、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３４、３５、３７、４０、４４、４７、５１、５４、５８、６１、６５、７６、７９、８３、８６、８７、９０、９３、９４、９７、１００、１０４、１０７、１０９、１１３、１１６、１１７、１２０、１２３、１２４、１２７、１３０、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５]

ＤＨＤ＿９４

[１、５、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４５、４８、５１、５２、５５、５９、６２、６６、６９、７３、７５、７６、８４、８７、８８、９１、９４、９８、１０１、１０２、１０５、１０８、１０９、１１１、１１２、１１５、１１７、１１８、１２２、１２６、１２９、１３０、１３３、１３６、１４０、１４３、１４７、１５０、１５１、１５４]

ＤＨＤ＿９５

[２、６、９、１３、１６、２０、２３、２６、２７、３０、３４、３７、３９、４１、４２、４５、４８、４９、５２、５５、５６、５９、６２、６３、６６、６９、７０、７２、７３、７５、８１、８５、８８、９１、９２、９５、９６、９８、９９、１０２、１０５、１０６、１０９、１１０、１１３、１１４、１２０、１２３、１２４、１２７、１３０、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１４５、１４８、１５１]

ＤＨＤ＿９６

[１、５、６、９、１０、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３４、４２、４５、４６、４９、５２、５３、５６、５９、６０、６３、６６、６７、７０、７４、７５、７７、８１、８４、８８、９１、９５、９８、１０２、１０５、１１４、１１８、１１９、１２２、１２３、１２６、１２９、１３０、１３２、１３３、１３６、１３７、１３９、１４０、１４３、１４４、１４６、１４７、１５０]

ＤＨＤ＿９７

[１、２、５、６、８、９、１２、１５、１６、１９、２０、２２、２３、２６、２７、２９、３０、３２、３３、３７、３９、４１、４４、４７、５１、５４、５８、６１、６５、６８、７１、７２、７９、８２、８３、８６、８９、９０、９３、９６、９７、１００、１０３、１０４、１０７、１１０、１１５、１１６、１１９、１２０、１２１、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３４、１３６、１３７、１４０、１４１、１４４、１４７]

ＤＨＤ＿９８

[６、７、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、３５、３８、４３、４４、

５０、５１、５３、５４、５７、６０、６１、６４、６７、６８、７１、７２、７４、７５、７８、８２、８５、８６、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１０６、１１０、１１９、１２３、１２７、１３０、１３３、１３４、１３７、１４１、１４４、１４８、１５１、１５２]

ＤＨＤ＿９９

[２、５、６、９、１２、１６、１９、２０、２３、２６、３０、３３、３４、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、７０、７１、７４、７８、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１０３、１０６、１１０、１１３、１２３、１２６、１３０、１３３、１３７、１４０、１４１、１４４、１４７、１４８、１５１、１５４、１５５]

ＤＨＤ＿１００

[１、５、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３８、４１、４２、４５、４９、５２、５５、５６、５９、６３、６６、７０、７３、７４、７７、８０、８１、８４、８７、８８、９１、９４、９５、９８、１０１、１０２、１０４、１０５、１０６、１０８、１０９、１１２、１１５、１１９、１２２、１２３、１２６、１２９、１３０、１３３、１３６、１３７]

ＤＨＤ＿１０１

[５、６、９、１２、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、３９、４３、４６、４７、５０、５３、５４、５７、６０、６４、６７、６８、７１、７４、７５、７８、７９、８１、８４、８５、８８、９２、９５、９９、１０２、１０６、１０９、１１９、１２０、１２３、１２６、１３０、１３３、１３４、１３７、１３８、１４０、１４４、１４７、１５１]

ＤＨＤ＿１０２

[６、９、１３、１６、２０、２２、２３、２７、３０、３４、３８、４４、４７、５１、５４、５５、５７、５８、６１、６５、６８、６９、７２、７５、８０、８３、８６、９０、９３、９７、１００、１０４、１０７、１０８、１１２、１１３、１１７、１２１、１２４、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４２、１４５]

ＤＨＤ＿１０３

[１、２、５、６、８、９、１３、１６、１７、１９、２０、２３、２７、３０、３４、３９、４３、４６、４７、５０、５３、５４、５７、６１、６４、６８、７０、７１、７９、８０、８２、８６、８９、９３、９４、９６、１００、１０３、１０６、１１２、１１６、１１９、１２３、１２６、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０]

ＤＨＤ＿１０４

[６、９、１０、１３、１６、１７、１９、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、４５、４８、５２、５５、５９、６２、６６、６９、８０、８３、８４、８７、９０、９４、９７、９８、１０１、１０４、１１３、１１４、１１７、１２０、１２４、１２７、１３１、１３４、１３８、１４１、１４４、１４５]

ＤＨＤ＿１０５

[９、１２、１６、１９、２３、２６、３０、３３、３７、４１、４３、４４、４７、５０、５１、５４、５７、５８、６１、６４、６５、６８、７１、７２、７９、８２、８３、８６、８９、９０、９３、９７、１００、１０１、１０３、１０４、１０７、１１８、１２１、１２２、１２５、１２８、１２９、１３２、１３５、１３６、１３９、１４２、１４３、１４６、１４７]

ＤＨＤ＿１０６

[２、３、６、９、１０、１２、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３４、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、７１、７４、７８、８１、８５、８８、９２、９３、９５、９９、１０２、１０３、１０６、１０９、１１０、１１３、１２０、１２１、１２３、１２７、１２８、１３０、１３４、１３５、１３７、１４１、１４４、１４８、１５１、１５５]

ＤＨＤ＿１０７

[２、６、９、１０、１３、１６、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、４０、

43、46、50、53、56、57、60、63、64、67、71、73、75、81、84、85、88、91、92、95、98、99、102、106、109、114、115、116、119、122、123、125、126、129、130、133、136、137、140、143、144、146]
DHD_108
[2、6、7、10、17、20、21、24、25、28、35、42、43、46、50、53、57、60、61、64、68、71、75、82、86、89、93、97、100、104、111、115、116、123、124、127、128、130、131、134、135、138、141、142、145、146、149、152、153、156]
DHD_109
[6、7、10、14、17、21、25、28、32、35、41、42、44、45、48、49、52、55、56、59、60、62、63、66、70、77、81、84、85、88、92、95、99、102、106、109、111、116、117、120、123、124、127、130、131、134、135、138、141、142]
DHD_110
[5、6、9、13、17、20、24、27、31、35、38、48、49、52、53、56、59、60、63、66、67、70、74、77、78、81、84、85、88、91、92、95、96、99、102、103、106、109、110、113、114、117、128、129、132、136、139、143、147、150、154、157、161]
DHD_111
[5、6、9、10、13、16、17、20、23、24、27、28、31、34、35、47、51、54、58、62、65、69、72、76、80、84、87、90、91、94、95、98、101、102、105、109、112、113、116、122、125、129、132、136、140、143、147、154、158]
DHD_112
[6、13、16、17、20、24、27、31、35、38、48、51、52、55、58、59、62、63、66、69、70、73、76、77、80、81、88、91、92、95、99、102、106、109、113、120、121、123、124、126、127、130、133、134、137、138、141、144、145、148、151、152、155、156]
DHD_113
[6、9、13、14、16、20、23、27、30、31、34、39、43、44、47、48、51、54、55、58、61、62、65、66、68、69、72、73、76、80、83、84、87、90、91、94、97、98、101、102、105、108、109、112、117、122、125、129、133、136、140、143、147、151]
DHD_114
[5、6、9、10、13、16、17、20、23、24、27、30、31、34、35、38、39、41、44、47、51、55、58、62、65、69、72、76、81、84、87、88、91、95、98、99、102、105、106、108、109、113、117、122、126、129、130、133、137、140、144、147、151、155]
DHD_115
[5、6、9、12、13、16、17、20、23、24、27、30、31、34、37、43、47、50、54、57、58、61、65、68、69、72、74、75、76、78、79、82、85、86、89、90、93、96、97、100、1

０３、１０４、１０７、１０８、１２１、１２５、１２８、１３２、１３５、１３９、１４３、１４６、１５０、１５３]
ＤＨＤ＿１１６
[３、６、７、１０、１４、１７、２１、２４、２５、２８、３２、３５、３６、４８、４９、５２、５６、５９、６０、６３、６６、６７、７０、７１、７４、７７、７８、８１、８７、８８、９１、９５、９８、９９、１０２、１０３、１０５、１０６、１０９、１１０、１１３、１１６、１２９、１３３、１３６、１４０、１４４、１４７、１５１、１５４、１５８、１６１、１６２]
ＤＨＤ＿１１７
[６、１０、１３、１７、２０、２１、２４、２７、２８、３１、３５、３８、４０、４４、４７、４８、５１、５５、５８、５９、６２、６５、６６、６９、７２、７３、７６、７７、７９、８３、８４、８７、９０、９１、９４、９８、１０１、１０２、１０５、１０８、１０９、１１２、１１６、１２５、１２６、１２９、１３３、１３６、１４０、１４１、１４３、１４４、１４７、１５１、１５４、１５５]
ＤＨＤ＿１１８
[６、１０、１３、１４、１７、２０、２４、２８、３１、３５、３８、４９、５２、５３、５６、５９、６０、６３、６６、６７、７０、７４、７７、８１、８２、８５、８８、９２、９５、９９、１０２、１０６、１０９、１１０、１１３、１１６、１１８、１１９、１２３、１２７、１３０、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１４５、１４８、１４９、１５２、１５３]
ＤＨＤ＿１１９
[２、６、１０、１３、１４、１７、２０、２１、２４、２５、２８、３１、３２、３５、４０、４１、４５、４６、４９、５２、５６、６０、６３、６７、７１、７４、７５、７８、８２、８４、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０３、１０６、１０７、１１０、１１３、１１４、１１７、１２０、１２２、１２７、１３１、１３４、１３８、１４１、１４２、１４５、１４８、１４９、１５２、１５６]
ＤＨＤ＿１２０
[７、１０、１３、１４、１７、２１、２５、２８、３１、３２、３５、４１、４４、４５、４８、４９、５１、５２、５５、５６、５９、６２、６３、６６、６９、７０、７３、７４、７９、８３、８４、８７、９１、９４、９５、９８、１０１、１０２、１０５、１０９、１１２、１１３、１２２、１２６、１２９、１３３、１３６、１３７、１４０、１４４、１４７、１４８、１５１]
ＤＨＤ＿１２１
[５、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３７、４３、４６、４７、５０、５３、５４、５７、６０、６１、６４、６７、６８、７１、７４、７５、８２、８５、８６、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０７、１１０、１１３、１１５、１２０、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１４１、１４４、１４８]
ＤＨＤ＿１２２
[６、１０、１３、１４、１７、２１、２４、２５、２８、３１、３２、３５、４１、４４、４５、４８、５１、５２、５５、５９、６２、６３、６６、６９、７０、７３、７４、７５、８１、８２、８５、８８、９２、９５、９６、９９、１００、１０２、１０３、１０６、１０７、１１０、１１３、１２３、１２７、１３１、１３４、１３８、１４１、１４５、１５２、１５６、１５７]
ＤＨＤ＿１２３
[１、３、６、１０、１３、１４、１７、２０、２１、２４、２８、３１、３２、３５、３８、３９、４０、４２、４４、４８、５１、５２、５５、５９、６２、６６、６９、７０、７３、７４、８０、８３、８４、８７、９１、９４、９５、９８、１０２、１０５、１０９、１１０、１１５、１１８、１１９、１２２、１２３、１２６、１２９、１３０、１３３、１３４、１３６、１３７、１４０、１４４、１４５、１４７、１４８]

DHD_124
[6、9、10、13、16、17、20、24、27、28、31、34、35、38、43、44、47、50、51、54、58、61、62、65、68、69、72、79、83、86、87、90、91、94、97、98、101、104、105、108、112、121、125、128、129、132、136、139、143、146、147、150、154、155]
DHD_125
[2、6、9、10、13、16、17、20、24、27、28、31、35、38、43、46、47、50、54、57、58、61、65、68、69、72、73、75、79、82、83、86、90、93、97、100、101、104、107、108、111、121、122、125、129、132、133、136、139、140、143、147、150]
DHD_126
[1、2、5、6、9、10、12、13、16、20、23、24、27、28、30、31、34、43、47、50、51、54、58、61、62、65、68、69、72、83、86、87、90、94、97、98、101、105、108、109、112、115、121、122、125、128、132、136、139、140、143、146、147、150、151]
DHD_127
[3、6、9、10、13、14、16、17、20、23、24、27、31、34、39、44、47、51、54、58、61、65、68、72、79、83、86、90、93、96、97、100、103、104、107、111、114、117、121、124、128、131、135、139、142、145、146]
DHD_128
[6、9、10、13、16、17、20、23、24、27、30、31、32、40、44、47、51、54、58、61、65、68、72、79、83、86、87、90、93、97、100、104、118、121、125、128、132、135、139、142、146]
DHD_129
[2、5、6、9、12、13、16、19、20、23、24、26、27、30、34、42、46、49、53、56、60、63、64、67、70、74、80、81、84、88、91、94、95、98、101、102、105、109、112、122、125、126、129、132、133、135、136、139、143、146、147、150、153]
DHD_130
[3、6、10、13、17、20、24、27、31、34、37、41、44、45、48、51、52、55、58、59、62、65、66、69、70、72、73、79、83、86、90、93、97、100、104、107、111、116、121、122、125、128、129、132、135、136、139、142、143、146、149、150、153]
DHD_131
[3、6、9、10、13、16、17、20、24、27、31、34、44、48、51、52、54、55、58、59、61、62、65、66、69、72、73、76、83、87、90、91、94、97、101、104、108、111、121、124、125、128、131、132、135、138、139、142、145、146、149、150、152、153]
DHD_132
[5、6、9、12、13、16、19、20、23、26、27、30、33、34、37、39、43、46、47、50、54、57、64、68、71、74、75、85、86、89、92、93、95、99、100、103、105、106、107、

１１０、１１４、１２０、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１４１、１４４、１４８]
ＤＨＤ＿１３３
[６、１０、１３、１７、２０、２１、２４、２７、３１、３４、３９、４４、４５、４８、５１、５２、５５、５８、５９、６２、６５、６６、６９、７２、７３、７６、８３、８７、９０、９４、９７、１０１、１０４、１０８、１１１、１１２、１２１、１２２、１２５、１２６、１２９、１３２、１３６、１３９、１４３、１４６、１４９、１５０、１５３]
ＤＨＤ＿１３４
[６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３８、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７５、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１０３、１０６、１１０、１１１、１１８、１２２、１２５、１２９、１３２、１３３、１３６、１３９、１４０、１４３、１４６]
ＤＨＤ＿１３５
[２、５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３４、３７、３８、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、７１、８０、８１、８４、８７、９１、９４、９５、９８、１０１、１０２、１０５、１０８、１１５、１１９、１２２、１２６、１２９、１３０、１３３、１３６、１４０、１４３]
ＤＨＤ＿１３６
[５、６、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３６、３７、４１、４５、４８、５２、５５、５９、６２、６６、６９、７０、７２、７３、７９、８２、８３、８６、８９、９０、９３、９７、１００、１０４、１０７、１１７、１２０、１２１、１２４、１２７、１２８、１３１、１３４、１３５、１３８、１４１、１４２]
ＤＨＤ＿１３７
[２、６、９、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、４３、４６、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２、７４、７８、８１、８５、８９、９２、９６、９９、１０２、１０３、１０７、１１３、１１６、１１７、１２０、１２３、１２４、１２７、１３０、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１]
ＤＨＤ＿１３８
[６、１０、１３、１７、２０、２４、２７、３１、３４、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、８２、８６、８９、９３、９６、１００、１０３、１０７、１１０、１１９、１２０、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４３、１４４、１４７、１４８、１５０、１５１]
ＤＨＤ＿１３９
[２、５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３４、３７、３８、３９、４５、４９、５２、５６、５９、６３、６６、７６、７９、８０、８３、８６、８７、９０、９３、９４、９７、１００、１０１、１０４、１０７、１０８、１１３、１１５、１１８、１２１、１２５、１２８、１３２、１３５、１３９、１４２、１４３、１４５、１４６]
ＤＨＤ＿１４０
[５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３６、３８、４３、４７、５０、５１、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７８、８１、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１２０、１２４、１２７、１３１、１３４、１３５、１３８、１４１、１４５、１４８]
ＤＨＤ＿１４１
[６、１０、１３、１７、２０、２４、２７、２８、３１、３４、３７、４０、４３、４４、４７、４８、５１、５４、５７、５８、６１、６２、６４、６５、６８、７１、７２、８１、８５、８８、９２、９５、９９、１０２、１０６、１０９、１１３、１１８、１２０、１２３、１２４、１２７、１３０、１３１、１３４、１３７、１３８、１４１、１

44、145、148、151、152]
DHD_142
[1、2、5、6、9、12、13、15、16、19、20、23、24、26、27、30、33、40、44、47、51、54、58、61、68、69、72、75、78、79、82、85、86、89、92、95、96、99、100、103、106、107、110、120、121、124、127、131、134、138、141、145、148、152]
DHD_143
[2、6、9、13、16、17、20、23、27、30、34、39、44、48、51、55、58、62、65、66、69、72、73、83、87、90、94、97、101、104、108、111、121、124、125、128、131、132、135、136、138、139、142、145、146、149、150、152、153]
DHD_144
[1、5、6、9、12、13、16、19、20、23、26、27、30、33、42、46、49、53、56、60、63、67、70、73、74、76、77、80、81、83、84、87、88、90、91、94、95、98、99、101、102、105、108、109、117、120、121、124、128、131、135、138、142、145、149、150]
DHD_145
[5、6、9、12、13、16、19、20、23、26、30、33、34、47、50、54、57、61、64、68、71、75、78、85、86、88、89、92、95、96、99、102、103、106、109、110、113、123、127、130、134、137、141、144、145、148、151、155]
DHD_146
[2、5、6、9、10、12、13、16、19、23、26、27、30、33、34、40、43、46、50、53、54、57、60、61、64、67、71、78、81、82、85、88、89、92、95、96、99、100、102、103、106、126、129、133、136、140、143、147、150、151]
DHD_147
[6、7、10、13、14、17、20、24、27、31、34、37、38、42、43、46、49、50、53、54、56、57、60、63、64、67、70、71、74、81、84、88、91、95、98、102、105、109、116、119、123、126、127、130、133、137、140、141、144、147、148]
DHD_149
[1、5、6、9、12、13、16、17、19、23、26、27、30、33、34、42、46、49、53、56、60、63、67、70、74、75、77、81、84、85、88、91、92、95、98、102、105、106、116、120、123、124、127、130、131、134、137、138、141、144、145、148]
DHD_150
[1、2、5、6、9、12、13、16、19、20、23、26、27、30、33、34、42、46、49、50、53、56、60、63、67、70、74、75、77、81、88、91、95、98、102、105、108、116、120、123、124、127、130、131、134、137、138、141、144、145、148]
DHD_151
[5、9、12、13、16、19、20、23、26、27、30、33、34、36、43、46、47、50、54、57、61、64、68、71、74、78、81、

８２、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１０６、１１１、１１６、１２０、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１４１、１４４、１４８]
ＤＨＤ＿１５２
[５、６、９、１２、１３、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３４、３６、４０、４３、４６、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７４、７８、８１、８２、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０３、１０６、１１１、１１６、１２０、１２３、１２７、１３４、１３７、１４１、１４４、１４８]
ＤＨＤ＿１５３
[６、１０、１３、１４、１７、２０、２１、２４、２７、３１、３４、４４、４５、４８、５１、５２、５８、５９、６２、６５、６６、６９、７３、７４、７６、８０、８３、８４、８７、９０、９１、９４、９７、１０１、１０４、１０５、１０７、１１５、１１８、１２２、１２５、１２６、１２９、１３２、１３６、１３９、１４３]
ＤＨＤ＿１５４
[２、５、６、９、１２、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３４、４０、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２、７４、７８、８１、８５、８８、９２、９５、９９、１０２、１０６、１０９、１１５、１１６、１１９、１２２、１２３、１２６、１２９、１３３、１３６、１３７、１４０、１４３、１４４、１４７]
ＤＨＤ＿１５５
[５、６、９、１３、１６、１９、２０、２３、２７、３０、３４、４３、４７、５０、５３、５４、５７、６１、６４、６８、７５、７８、７９、８１、８２、８５、８８、８９、９２、９５、９６、９９、１０２、１０９、１１３、１１６、１２０、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７]
ＤＨＤ＿１５６
[５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３７、４０、４４、４７、５１、５４、５８、６１、６５、６８、７５、７６、７９、８２、８３、８９、９０、９３、９６、９７、１００、１０４、１２４、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４２、１４５、１４６]
ＤＨＤ＿１５７
[５、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３３、３４、３７、３９、４３、４４、４７、４８、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、７６、７９、８３、８６、８７、９０、９３、９４、９７、１００、１０１、１０４、１０７、１１８、１２２、１２５、１２９、１３２、１３６、１３９、１４３、１４６、１５０]
ＤＨＤ１３＿２３４１
[４、５、８、１１、１２、１５、１８、１９、２２、２５、２９、３２、３３、３６、３９、４１、７１、９１、９５、９８、１０２、１０５、１０６、１０９、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２１、１２５、１２６、１２９、１３２、１３３、１３６、１３７、１３９、１４０、１４３、１４４、１４６、１４７、１５０、１５３、１５４]
ＤＨＤ１３＿ＡＡＡＡ
[６、９、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３４、３９、４４、４７、４８、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０７、１０９、１１０、１１１、１１５、１２３、１２４、１２７、１２８、１３０、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８、１４９、１５１]
ＤＨＤ１３＿ＢＡＡＡ
[６、９、１２、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３４、３７、３８、３９、４４、４７、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、８２、８５、８９、９２、９５、９６、９９、１００、１０３、１０６、１１０、

１１５、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８、１４９、１５１]
ＤＨＤ１３＿ＸＡＡＡ
[６、９、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３４、３７、３８、３９、４４、４７、４８、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０９、１１０、１１５、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８、１４９、１５１]
ＤＨＤ１３＿ＸＡＡＸ
[６、９、１２、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３４、３７、３８、３９、４４、４７、４８、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０９、１１０、１１５、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８、１４９、１５１]
ＤＨＤ１３＿ＸＡＸＡ
[６、９、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３４、３７、３８、３９、４４、４７、４８、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１００、１０３、１０６、１０９、１１０、１１５、１２３、１２７、１３０、１３４、１３７、１３８、１４１、１４４、１４５、１４８、１４９、１５１]
ＤＨＤ１５
[５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３４、３７、３９、４０、４４、４７、４８、５１、５２、５５、５８、５９、６２、６５、６９、７２、７８、８２、８３、８６、８９、９０、９３、９６、９７、１００、１０３、１０４、１０７、１１０、１１１、１１４、１１６、１１７、１２１、１２５、１２８、１２９、１３２、１３５、１３６、１３９、１４２、１４３、１４６、１４９]
ＤＨＤ１７
[６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３８、４２、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６４、６７、７１、７５、８１、８４、８８、９１、９５、９８、１０２、１０５、１０６、１０９、１１８、１２１、１２５、１２８、１３２、１３５、１３６、１３９、１４２、１４６]
ＤＨＤ２０
[３、６、９、１０、１３、１６、１７、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３８、４２、４３、４６、５０、５３、５７、６０、６１、６４、６７、６８、７１、７５、７８、８１、８５、８８、９１、９２、９５、９８、９９、１０２、１０５、１０９、１１８、１２１、１２５、１２８、１３２、１３５、１３９、１４２、１４６、１５０]
ＤＨＤ２１
[６、９、１０、１３、１６、２０、２３、２４、２７、３０、３１、３４、３８、４３、４４、４６、４７、５０、５１、５３、５４、５７、５８、６０、６１、６３、６４、６５、６８、７１、７２、７５、７８、７９、８２、８５、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１０７、１０８、１１２、１１３、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３４、１３７、１４１、１４２]
ＤＨＤ２５
[２、５、６、９、１２、１３、１６、１９、２３、２６、２７、３０、４４、４７、４８、５１、５４、５５、５８、６１、６２、６５、６８、６９、７２、７５、７６、８３、８６、８７、９０、９３、９４、９７、１００、１０１、１０４、１０７、１１４、１１５、１１７、１１８、１２１、１２４、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４２、１４５]
ＤＨＤ２７

[５、６、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４１、４２、４５、４９、５２、５６、５９、６３、６６、７０、７３、７４、７７、８１、８４、８８、９１、９５、９８、１０２、１０５、１０８、１１５、１１６、１１９、１２２、１２３、１２６、１２９、１３０、１３３、１３６、１３７、１４０、１４１、１４３、１４４、１４７、１４８]

ＤＨＤ３０

[５、６、８、９、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３４、３７、３９、４２、４５、４９、５２、５６、５９、６３、６６、７０、７５、７８、８２、８５、８９、９２、９６、９９、１０３、１０６、１１３、１１６、１１７、１２０、１２４、１２７、１３１、１３４、１３８、１４１、１４４、１４５]

ＤＨＤ３３

[１、５、６、９、１２、１３、１６、１９、２０、２３、２６、２７、３０、３３、３４、３９、４０、４３、４６、４７、５０、５７、６０、６１、６４、６８、７１、７５、７８、８２、８５、８６、８９、９２、９３、９６、９９、１００、１０３、１１２、１１３、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４１、１４４]

ＤＨＤ３４＿ＸＡＡＡＡ

[１、５、８、９、１２、１６、１９、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４５、４８、４９、５２、５５、５６、５９、６２、６３、６６、６９、７０、７３、７６、７７、８６、９０、９３、９７、１００、１０４、１０５、１０７、１１１、１１４、１２４、１２５、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４２、１４５、１４９、１５２、１５３、１５６、１５７]

ＤＨＤ３４＿ＸＡＡＸＡ

[１、５、８、９、１２、１６、１９、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４５、４８、４９、５２、５５、５６、５９、６２、６３、６６、６９、７０、７３、７６、７７、８６、９０、９３、９７、１００、１０４、１０５、１０７、１０８、１１１、１１４、１２４、１２５、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４２、１４５、１４９、１５２、１５３、１５６、１５７]

ＤＨＤ３４＿ＸＡＸＸＡ

[１、５、８、９、１２、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４５、４８、４９、５２、５５、５６、５９、６２、６３、６６、６９、７０、７３、７６、７７、８６、９０、９３、９７、１００、１０４、１０５、１０７、１０８、１１１、１１４、１１７、１２４、１２５、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１４２、１４５、１４９、１５２、１５３、１５６、１５７]

ＤＨＤ３６

[２、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３３、３４、３９、４０、４２、４３、４６、４７、５０、５１、５３、５４、５７、５８、６１、６４、７５、７９、８２、８６、８９、９３、９６、９７、１００、１０３、１１０、１１４、１１７、１１８、１２１、１２４、１２５、１２８、１３１、１３２、１３５、１３８、１３９、１４２、１４３]

ＤＨＤ３７＿ＡＢＸＢ

[２、５、９、１１、１２、１５、１６、１９、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４３、４６、４９、５０、５３、５６、５７、５９、６０、６３、６４、６７、７７、８１、８４、８８、９１、９２、９５、９８、９９、１０２、１０５、１１３、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４１、１４４]

ＤＨＤ３７＿ＡＸＢＢ

[２、５、９、１２、１６、１８、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４３、４６、４９、５０、５２、５３、５６、５７、６０、６７、７０、７１、７７、７８、８１、８４、８８、９１、９５、９６、９９、１０２、１０５、１１３、１１６、１

１９、１２０、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４４]
ＤＨＤ３７＿ＡＸＸＢ
[２、５、９、１１、１２、１５、１６、１９、２２、２３、２６、２９、３０、３３、３７、４３、４６、４９、５０、５３、５６、５７、５９、６０、６３、６４、６７、７７、８１、８４、８８、８９、９２、９５、９８、９９、１０２、１０５、１１３、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４１、１４４]
ＤＨＤ３７＿ＢＢＢＢ
[５、９、１２、１６、１９、２２、２３、２６、３０、３３、４２、４３、４６、５０、５３、５６、５７、６０、６３、６４、６６、６７、７４、７７、７８、８１、８４、８５、８８、９２、９５、９８、９９、１０２、１０５、１０８、１１１、１１３、１１６、１１９、１２３、１２６、１３０、１３３、１３７、１４０、１４１、１４４]
ＤＨＤ３７＿ＸＢＢＡ
[２、５、８、９、１２、１６、１９、２３、２５、２６、２９、３０、３３、３７、４３、４５、４６、４９、５０、５３、６０、６３、６４、６７、７０、７１、７７、７８、８１、８４、８５、８８、９１、９５、９８、１０２、１０３、１０５、１１３、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１２７、１３０、１３３、１３７、１４０、１４１、１４４]
ＤＨＤ３７＿ＸＢＸＢ
[２、５、９、１１、１２、１５、１６、１９、２３、２６、３０、３３、３７、４３、４６、５０、５３、５６、５７、５９、６０、６３、６４、６７、７７、８１、８４、８８、９２、９５、９８、９９、１０２、１０５、１１３、１１６、１１９、１２０、１２３、１２６、１３０、１３３、１３４、１３７、１４０、１４１、１４４]
ＸＡＡＸ
[３、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２、３、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２]
ＸＡＸＡ
[３、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２、３、６、９、１３、１６、２０、２３、２７、３０、３４、４３、４７、５０、５４、５７、６１、６４、６８、７１、７２]

【００５４】

一実施形態では、単量体Ａポリペプチドおよび単量体Ｂポリペプチドは、単量体Ａおよび単量体Ｂとの間の界面で少なくとも１つの設計された水素結合ネットワークによって決定されるそれらの相互作用特異性を有する。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは１つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含み、単量体Ａおよび単量体Ｂは、水素結合ネットワーク、例えば、表２による界面残基により形成することができる水素結合を含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは２つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含み、単量体Ａおよび単量体Ｂは、水素結合ネットワーク、例えば、表２による界面残基により形成することができる水素結合を含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単

量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは３つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含み、単量体Ａおよび単量体Ｂは、水素結合ネットワーク、例えば、表２による界面残基により形成することができる水素結合を含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは４つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含み、単量体Ａおよび単量体Ｂは、水素結合ネットワーク、例えば、表２による界面残基により形成することができる水素結合を含む。いくつかの態様では、（ｉ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは１つのヘリックスを含むか、（ｉｉ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは２つのヘリックスを含むか、（ｉｉｉ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは３つのヘリックスを含むか、（ｉｖ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは４つのヘリックスを含むか、または（ｖ）単量体Ａは５つのヘリックスを含み、単量体Ｂは５つのヘリックスを含み、単量体Ａおよび単量体Ｂは、水素結合ネットワーク、例えば、表２による界面残基により形成することができる水素結合を含む。

【００５５】

第２の態様では、本開示は、配列番号１～２９０からなる群、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを提供する。配列番号１～２９０のアミノ酸配列は表１Ａで提供され、配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のアミノ酸配列は表１Ｂで提供され、例えば、本開示のヘテロ二量体を生成するために使用することができる。

【００５６】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを提供し、配列番号１、５５、８１、８３、１０１、１０５、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７１、１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９１、または１９３のアミノ酸位置１および２のＧｌｙＳｅｒは任意であり、例えば、存在しない。配列番号１～２９０のアミノ酸配列は、表１Ａに提供されており、例えば、本開示のヘテロ二量体を生成するために使用することができる。

【００５７】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９

２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを提供し、配列番号６、８、１４、１６、２６、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４６、４８、５４、５６、５８、６０、６２、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、または１９４のアミノ酸位置１および２のＧｌｙＳｅｒは任意であり、例えば、存在しない。

【００５８】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを提供する。配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のアミノ酸配列は表１Ｂで提供され、例えば、本開示のヘテロ二量体を生成するために使用することができる。

【００５９】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを提供し、配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４は、直近のＮ末端でＧｌｙＳｅｒに連結されていないか、またはＮ末端でＧｌｙＳｅｒを含まない。

【００６０】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８－４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む天然に存在しないポリペプチドを

提供する。いくつかの態様では、本開示は、配列番号３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の配列からなるポリペプチドを含む非天然に存在するポリペプチドを提供する。

【００６１】

一実施形態では、参照アミノ酸配列からのアミノ酸変化は、保存的アミノ酸置換である。別の実施形態では、定義された界面位置の２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％のアミノ酸残基は、参照アミノ酸配列と比較して不変である。定義された界面残基は表２に示されているとおりである。

【００６２】

第２の態様では、本開示は、配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上の非天然に存在するポリペプチドを含むタンパク質であって、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在するポリペプチドが共有結合している、タンパク質を提供する。いくつかの態様では、本開示は、配列番号１－２９０、および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上のポリペプチドを含むタンパク質であって、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在するポリペプチドが共有結合している、タンパク質を提供する。いくつかの態様では、本明細書に列挙される単量体Ａおよび単量体Ｂの配列は、得られるアミノ酸配列が表１Ａおよび１Ｂに記載されるように元のアミノ酸配列の水素結合ネットワークを維持するように改変（置換）され得る。

【００６３】

この態様では、タンパク質を使用して、本明細書に開示されるものを含むがこれに限定されない任意の好適な目的に使用できる足場を生成することができる。一実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれが異なる。別の実施形態では、２、３、４、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドは、２、３、４、またはそれ以上の同一のポリペプチドを含み得る。すべての実施形態では、２、３、４、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドは、例えば、融合タンパク質の一部として共有結合され得る。２、３、４、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドはそれぞれ、アミノ酸リンカーによって分離され得る。任意の好適なアミノ酸リンカーを使用することができる。

【００６４】

いくつかの態様では、リンカーは可撓性リンカーである。いくつかの態様では、リンカーはＧＳリンカーである。他の態様では、ＧＳリンカーは、（ＧＧＳ）ｎ、（ＧＳＥＧＳ）ｎ（配列番号４２３）または（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号４２５）を含み、式中、ｎは１～１００の整数である。いくつかの態様では、リンカーは、ＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳ（配列番号４２７）またはＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＧＳ（配列番号４６１）で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の

配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、リンカーは、ＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳ（配列番号４２９）で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、リンカーは、（ＧＳＥＧＳ）ｎ、式中、ｎは、１～１０であり、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である（配列番号４２３）で示されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００６５】

一実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれは、配列番号１～２９０からなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する。一実施形態では、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれは、配列番号１～２９０からなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有し、配列番号１、５５、８１、８３、１０１、１０５、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７１、１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９１、または１９３のアミノ酸位置１および２のＧｌｙＳｅｒは任意であり、例えば、存在しない。別の実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれは、配列番号１～２９０からなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する。別の実施形態では、２、３、４個またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドのそれぞれは、配列番号１～２９０からなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有し、配列番号６、８、１４、１６、２６、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４６、４８、５４、５６、５８、６０、６２、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、または１９４のアミノ酸位置１および２のＧｌｙＳｅｒは任意であり、例えば、存在しない。さらなる実施形態では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドは、

（ａ）配列番号１～２９０からなる群から選択されるか、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択される奇数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペ

プチド、ならびに
（ｂ）配列番号１～２９０からなる群から選択されるか、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択される偶数の配列番号のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチド、を含む。

【００６６】
いくつかの態様では、２、３、４個、またはそれ以上の天然に存在しないポリペプチドは、
（ａ）表１Ａおよび／または１Ｂの鎖ａのアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチド、ならびに
（ｂ）表１Ａおよび／または１Ｂの鎖ｂのアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するポリペプチド、を含む。

【００６７】
いくつかの態様では、本開示のタンパク質は、ヘテロ三量体を含む。いくつかの態様では、ヘテロ三量体は、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。いくつかの態様では、本開示のヘテロ三量体は、少なくとも２つの単量体を含み、単量体のそれぞれは、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００６８】
いくつかの態様では、本開示のヘテロ三量体は、少なくとも３つの単量体を含み、単量体のそれぞれは、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００６９】
いくつかの態様では、本開示のヘテロ三量体は、少なくとも１つの単量体を含み、ヘテロ二量体は、表３および４に記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００７０】
いくつかの態様では、本開示のヘテロ三量体は、表３および４に記載のアミノ酸配列の長

さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワークを形成する。

【００７１】

いくつかの態様では、本開示のタンパク質は、ヘテロ四量体を含む。いくつかの態様では、ヘテロ四量体は、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。いくつかの態様では、本開示のヘテロ四量体は、少なくとも２つの単量体を含み、単量体のそれぞれは、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００７２】

いくつかの態様では、本開示のヘテロ四量体は、少なくとも３つの単量体を含み、単量体のそれぞれは、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００７３】

いくつかの態様では、本開示のヘテロ四量体は、少なくとも４つの単量体を含み、単量体のそれぞれは、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００７４】

いくつかの態様では、本開示のヘテロ四量体は、少なくとも１つの単量体を含み、ヘテロ二量体は、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００７５】

いくつかの態様では、本開示のヘテロ四量体は、少なくとも２つのヘテロ二量体を含み、２つのヘテロ二量体のそれぞれは、表１Ａおよび１Ｂに記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を有する単量体を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワーク、例えば、表２の界面残基によって形成される水素結合ネットワークを形成する。

【００７６】

いくつかの態様では、本開示のヘテロ四量体は、少なくとも１つのヘテロ三量体を含み、このヘテロ三量体は、表３および４に記載のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、水素結合ネットワークを形成する。

【００７７】
別の実施形態では、タンパク質は、配列番号２９１、２９４、２９６、２９９、および３０２～３０５からなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。配列番号２９１、２９４、２９６、２９９、および３０２～３０５のアミノ酸配列を表３に提供する。これらは、本開示のこの態様の単なる例示的なそのようなタンパク質であり、当業者は、本開示の単量体の任意の好適な組み合わせをこの態様のタンパク質の生成に使用できることを理解するであろう。
【表３】

表３

設計名称	オリゴマー化状態	鎖	設計配列
DHDSC_9-13-37	ヘテロ三量体(イタリック体で下線が引かれたリンカー)	9a-13a-37a	PKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS*GSEGSGSEGSGS*TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR*GSEGSGSEGSGS*DSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 291
DHD9-13	ヘテロ三量体	9a-13a	PKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKSGSEGSGSEGSGSTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR 配列番号 294
DHD15-37	ヘテロ三量体	15b-37a	TERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLDDPDSEDIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERSGPGSGSEGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 296
DHD13-37	ヘテロ三量体	13b-37b	TEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQKGSEGSGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 299
OPHD_15-9	ヘテロ三量体	15b-9a	TERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLDDPDSEDIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERSGSEGSGSEGSGSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS 配列番号 302
OPHD_37-9	ヘテロ三量体	37a-9a	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRSGSEGSGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 303
OPHD_13-9	ヘテロ三量体	13a-9a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQRGSEGSGSEGSGSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS 配列番号 304
OPHD_9-37	ヘテロ三量体	9b-37a	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRSGSEGSGSEGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 305

【００７８】
第３の態様では、本開示は、タンパク質足場であって、
ａ）アミノ酸リンカーによって単一の構成要素に接続された、それぞれが異なるヘテロ二量体に由来する、任意の数の単量体Ａポリペプチドおよび／または単量体Ｂポリペプチドから構成される、第１の設計された構成要素と、

ｂ）第１の設計された構成要素の１つにある各単量体Ａおよび／または単量体Ｂに対応する単量体を含む、第２の設計された構成要素と、を含み、
第１および第２の設計された構成要素が、相互作用してタンパク質足場を形成し、各単量体Ａは、その単量体Ｂ結合パートナーと足場内でのみ相互作用する、タンパク質足場を提供する。一実施形態では、第１の設計された構成要素は、本明細書に開示される任意の実施形態または実施形態の組み合わせのタンパク質を含んでもよく、および／または第２の設計された構成要素は、本明細書に開示される実施形態または実施形態の組み合わせの複数の個々のポリペプチドを含んでもよい。非限定的な実施形態では、第１の設計された構成要素および第２の設計された構成要素は、表４に示されるように、３つの（ヘテロ三量体）または４つの（ヘテロ四量体）結合パートナーのセットを含み得る。本明細書の教示に基づく当業者によって理解されるように、本開示のヘテロ三量体（表４に示される例示的なヘテロ三量体を含むがこれに限定されない）は、本開示の２つのポリペプチドの第１の構成要素融合タンパク質を含み、第２の構成要素は、融合タンパク質中の２つのポリペプチドの結合パートナーである２つの別個のポリペプチドを含む。例えば、ＤＨＤ９－１３足場は、ＤＨＤ１３　Ａ単量体に共有結合したＤＨＤ９　Ａ単量体を含む第１の設計された構成要素を含み、第２の設計された構成要素は、個々のＤＨＤ９　ＢおよびＤＨＤ１３　Ｂ単量体を含む。表では、様々な足場が、空白の行で区切られている。当業者によって理解されるように、これらは単なる例示である。第１に設計された構成要素の単量体は任意の順序で連結することができ、任意の単量体を設計された構成要素に含めることができる。本明細書の教示に基づいて当業者によってさらに理解されるように、ヘテロ四量体（表４に示される例示的なヘテロ四量体を含むがこれに限定されない）は、本開示の３つのポリペプチドの第１の構成要素融合タンパク質を含み、第２の構成要素は、融合タンパク質の３つのポリペプチドの結合パートナーである３つの別個のポリペプチドを含む。

【表４－１】

表４

DHD9-13	ヘテロ三量体	9a-13a	PKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKSGSEGSGSEGSGSTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR 配列番号 294
DHD9-13	ヘテロ三量体	9b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRS 配列番号 2
DHD9-13	ヘテロ三量体	13b	GSHHHHHHGSGSENLYFQGSTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK 配列番号 295
DHD9-13	ヘテロ三量体	13b	HHHHHHGSGSENLYFQGSTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK 配列番号 431
DHD15-37	ヘテロ三量体	15b-37a	TERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLDDPDSEDIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERSGPGSGSEGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 296
DHD15-37	ヘテロ三量体	15a	TREELLRENIELAKEHIEIMREILELLQKMEELLERQSSEDILEELRKIIERIRELLDRSRKIHERSEEIAYKEE 配列番号 297
DHD15-37	ヘテロ三量体	37b	GSHHHHHHGSGSENLYFQGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 298
DHD15-37	ヘテロ三量体	37b	HHHHHHGSGSENLYFQGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 433
DHD13-37	ヘテロ三量体	13b-37b	TEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQKGSEGSGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE 配列番号 299
DHD13-37	ヘテロ三量体	13a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQR 配列番号 300
DHD13-37	ヘテロ三量体	37a	GSSHHHHHHSSGENLYFQGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 301
DHD13-37	ヘテロ三量体	37a	SHHHHHHSSGENLYFQGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE 配列番号 435
OPHD_15-9	ヘテロ三量体	15b-9a	TERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLDDPDSEDIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERSGSEGSGSEGSGSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS 配列番号 302
OPHD_15-9	ヘテロ三量体	15a	TREELLRENIELAKEHIEIMREILELLQKMEELLEKARGADEDVAKTIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERS 配列番号 19

【表４－２】

OPHD_15-9	ヘテロ三量体	9b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRS　配列番号２
OPHD_37-9	ヘテロ三量体	37a-9a	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRSGSEGSGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号３０３
OPHD_37-9	ヘテロ三量体	37b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号４２
OPHD_37-9	ヘテロ三量体	37b	DDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号３５２
OPHD_37-9	ヘテロ三量体	9b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRS　配列番号２
OPHD_13-9	ヘテロ三量体	13a-9a	TKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQRGSEGSGSEGSGSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS　配列番号３０４
OPHD_13-9	ヘテロ三量体	13b	GTEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQKGSLVPR　配列番号４
OPHD_13-9	ヘテロ三量体	9b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRS　配列番号２
OPHD_9-37	ヘテロ三量体	9b-37a	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRSGSEGSGSEGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE　配列番号３０５
OPHD_9-37	ヘテロ三量体	9a	GSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS　配列番号１
OPHD_9-37	ヘテロ三量体	9a	PKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS　配列番号３３１
OPHD_9-37	ヘテロ三量体	37b	GSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号４２
OPHD_9-37	ヘテロ三量体	37b	DDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号３５２
DHDSC_9-13-37	ヘテロ三量体	9a-13a-37a	PKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSRDAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKSGSEGSGSEGSGSTKEDILERQRKIIERAQEIHRRQQEILEELERIIRKPGSSEEAMKRMLKLLEESLRLLKELLELSEESAQLLYEQRGSEGSGSEGSGSDSDEHLKKLKTFLENLRRHLDRLDKHIKQLRDILSENPEDERVKDVIDLSERSVRIVKTVIKIFEDSVRKKE　配列番号２９１
DHDSC_9-13-37	ヘテロ三量体	9b	PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILEDIERISERIEEISDRIERLLRS　配列番号２
DHDSC_9-13-37	ヘテロ三量体	13b	TEKRLLEEAERAHREQKEIIKKAQELHRRLEEIVRQSGSSEEAKKEAKKILEEIRELSKRSLELLREILYLSQEQK　配列番号２９２
DHDSC_9-13-37	ヘテロ三量体	37b	GSSHHHHHHSSGENLYFQGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号２９３
DHDSC_9-13-37	ヘテロ三量体	37b	SHHHHHHSSGENLYFQGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE　配列番号４３７

【００７９】

これらの実施形態では、以下の実施例に記載されるように、足場は９５℃まで安定であり得、４Ｍのグアニジン変性中点を有する。

【００８０】

いくつかの態様では、本開示のヘテロ三量体またはヘテロ四量体は、Ｈｉｓタグを含まない。

【００８１】

別の態様では、本開示は、タンパク質足場であって、

（ａ）２、３、４個、またはそれ以上のポリペプチドを含む融合タンパク質であって、融

合タンパク質中に存在する各ポリペプチドは、１～５個のアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、隣接するアルファヘリックスは、アミノ酸リンカーによって任意選択に接続されてもよく、
融合タンパク質中の各ポリペプチドは、結合パートナーと非共有的に相互作用することができ、融合タンパク質は、融合タンパク質中に存在する任意のポリペプチドの結合パートナーを含まない、融合タンパク質と、
（ｂ）融合タンパク質中に存在する前記ポリペプチドの少なくとも１つの結合パートナーであって、
融合タンパク質と前記結合パートナーは、非共有的に相互作用して、タンパク質足場を形成し、融合タンパク質中の前記結合パートナーと少なくともポリペプチドとの間の相互作用特異性は、結合パートナーと少なくとも１つのポリペプチドの間の界面における少なくとも１つの水素結合ネットワークによって決定される、結合パートナーと、を含む、タンパク質足場を提供する。

【００８２】

結合パートナーは、融合タンパク質に存在するポリペプチドとヘテロ二量体を形成することができるポリペプチドであり、配列番号１～２９０に関して上に例示されている。融合タンパク質中の少なくとも１つのポリペプチドの結合パートナーは、融合タンパク質中の２、３、４個、またはすべてのポリペプチドの結合パートナーを含み得る。理解されるように、２つ以上の結合パートナーが存在する場合、それらは個々の結合パートナーポリペプチドとして存在し、一緒に連結されていない。

【００８３】

融合タンパク質は、２、３、４個、またはそれ以上のポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、融合タンパク質は、合計で少なくとも３つまたは４つのポリペプチドを含む。そのような融合タンパク質の例示的な実施形態は、例えば、表４にヘテロ三量体およびヘテロ四量体の実施形態を説明する際に、本明細書に提供される。融合タンパク質中のポリペプチドは、すべて同じであっても、すべて異なっていてもよく、または同一および別個のポリペプチドの両方を含み得る。１つの特定の実施形態では、融合タンパク質中の各ポリペプチドは、異なるポリペプチドである。

【００８４】

一実施形態では、
（ｉ）融合タンパク質は、配列番号１～２９０、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、２、３、４個またはそれ以上のポリペプチドを含み、
（ｉｉ）単量体Ａポリペプチドは、配列番号１～２９０から選択されるか、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の群から選択されるからなる群から選択されるアミノ酸配列の長さに沿って、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。本明細書に記載されるように、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、

４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の間の奇数の配列番号は、「Ａ」単量体として示され、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４の間の偶数の配列番号は、「Ｂ」単量体として示されおり、表１ＡおよびＢの隣接するＡおよびＢ単量体は、本明細書に詳細に記載されるようにヘテロ二量体を形成することができる。したがって、例えば、融合タンパク質が配列番号１のポリペプチドを含む場合、結合パートナーは配列番号２を含んでもよく、一方、融合タンパク質が配列番号２のポリペプチドを含む場合、結合パートナーは、配列番号１を含んでもよい。融合タンパク質ポリペプチドおよび結合パートナーの多数の組み合わせは、本明細書の教示に基づいて当業者には明らかであろう。

【００８５】

一実施形態では、参照アミノ酸配列からの融合タンパク質および結合パートナーにおけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸置換である。別の実施形態では、融合タンパク質および結合パートナー中のポリペプチドの定義された界面位置の２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％にあるアミノ酸残基は、参照アミノ酸配列と比較して不変である。さらなる一実施形態では、少なくとも１つの水素結合ネットワークは非対称である。さらなる一実施形態では、結合界面は、少なくとも２５％の疎水性残基を含む。別の実施形態では、足場は９５℃まで安定であり、４Ｍのグアニジン変性中点を有する。

【００８６】

別の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される設計されたヘテロ二量体を形成する方法であって、

ａ）単量体の２つを非連結単量体として提供することと、

ｂ）他の２つの単量体を連結単量体として提供することと、を含み、

これにより、非連結単量体は、同じヘテロ二量体のそれぞれの単量体と会合し、他の単量体のいずれとも結合しない、方法を提供する。この態様の詳細は、以下の実施例に示される。

【００８７】

別の実施形態では、本開示は、以下を含む設計されたヘテロ二量体タンパク質であって、

ａ）規則的に繰り返される骨格構造に組み込まれた非対称の埋め込み水素結合ネットワークと、

ｂ）ヘリックスヘアピンヘリックス単量体であって、前記ヘリックスのスーパーコイル位相が、０、９０、１８０、または２７０度に固定され、スーパーコイルねじれ（ω０）およびヘリックスねじれ（ω１）が、２層左巻きスーパーコイルのいずれかに対して一定に保たれているか（ω０＝－２．８５およびω１＝１０２．８５）、または５層の非ねじれ束（ω０＝０およびω１＝１００）２７を含む、ヘリックスヘアピンヘリックス単量体と、を含む、設計されたヘテロ二量体タンパク質を提供する。この態様の詳細は、以下の実施例に示される。

【００８８】

別の実施形態では、本開示は、タンパク質論理ゲートの設計などの本明細書に開示されるものを含むがこれらに限定されない任意の好適な目的のための、任意の実施形態または実施形態の組み合わせに記載のポリペプチド、タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質、タンパク質足場、核酸、発現ベクター、および／また細胞の使用を提供する。

【００８９】

第４の態様では、本開示は、式Ｘ－Ｂ－Ｚのポリペプチドを含む融合タンパク質を提供し、

（ａ）Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、Ｘドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、
（ｂ）Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、Ｚドメインは、（ｉ）第１の標的とは異なる第２の標的、または（ｉｉ）１、２、または３つのアルファヘリックスを含む異なる非天然に存在するポリペプチドのいずれかに非共有結合することができ、
（ｃ）Ｂドメインは、アミノ酸リンカーであり、
ＸドメインおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、
ＸドメインおよびＺドメインは、結合界面で相互作用し、結合界面は、Ｘドメインの各アルファヘリックス水素の少なくとも１つの側鎖が、Ｚドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合している水素結合ネットワークを含み、結合界面は、複数の疎水性残基を含むものである。Ｘドメインの各ヘリックスはＺドメインの少なくとも１つのヘリックスとＨ結合し、Ｚドメインの各ヘリックスはＸドメインの少なくとも１つのヘリックスとＨ結合する。

【００９０】

第５の態様では、本開示は、式Ｘ－Ｂ－Ｚを含む少なくとも２つの融合タンパク質を含むキットまたは組成物を提供し、
各融合タンパク質のＢドメインは、独立してポリペプチドリンカーであり、
各融合タンパク質のＸドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第１の天然に存在しないポリペプチドを含み、
各融合タンパク質のＺドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第２の天然に存在しないポリペプチドを含み、それぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、ＸドメインとＺドメインは結合界面で相互作用し、結合界面は、各Ｘドメインのアルファヘリックスの少なくとも１つの側鎖がＺドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、
第１の融合タンパク質のＸドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、
第２の融合タンパク質のＺドメインは、第２の標的に非共有結合することができ、
第１の標的または第２の標的に非共有結合することができないそれぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインは、複数の融合タンパク質中の異なる融合タンパク質のＸまたはＺドメインに非共有結合することができる。

【００９１】

融合タンパク質およびキットは、例えば、論理ゲート構築などの本明細書に開示される方法において、および本明細書の教示に基づいて当業者によって理解される他の任意の好適な使用のために使用することができる。具体的には、融合タンパク質は、インビトロおよび生細胞で分割酵素から転写機構に至るまでの任意のタンパク質ユニットの結合を調節するデノボ（ｄｅ　ｎｏｖｏ）設計タンパク質から構築された２入力ＡＮＤおよびＯＲ論理ゲートの設計に使用できる。結合相互作用の協調性により、ゲートは入力の化学量論的不均衡にほとんど影響を受けなくなり、アプローチのモジュール性により、３入力ＯＲ、ＡＮＤ、および分離標準形ゲートへの拡張が容易になる。制御要素のモジュール性と協調性は、本質的に無制限の数のタンパク質構成要素を新たに設計する能力と相まって、幅広い生物学的機能にわたる洗練された翻訳後制御論理の設計を可能にする。

【００９２】

一実施形態では、Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、Ｚドメインは、第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる。この実施形態は、例えば、ＡＮＤ／ＮＯＲゲートで使用する単一構成要素の二量体を生成するために有用である。別の実施形態では、Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む天然に存在しないポリペプチドであり、Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む異なる天然に存在しないポ

リペプチドに非共有結合することができる。この実施形態は、例えば、ＡＮＤ／ＮＯＲゲートで使用するための２構成要素または３構成要素の二量体を生成するために有用である。

【００９３】

第１の標的および第２の標的は、意図された用途に適した任意の標的であり得る。非限定的な実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、ポリペプチドまたは核酸を含み得る。

【００９４】

キットまたは組成物の一実施形態では、

（ｉ）第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、Ｘ１ドメインが、第１の標的に非共有結合することができ、

（ｉｉ）第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、Ｚ２ドメインが、第２の標的に非共有結合することができ、Ｚ１ドメインとＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができる。

【００９５】

キットまたは組成物の別の実施形態では、

（ｉ）第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、Ｘ１ドメインが、第１の標的に非共有結合することができ、

（ｉｉ）第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、

（ｉｉｉ）少なくとも２つの融合タンパク質が、式Ｘ３－Ｂ３－Ｚ３の第３の融合タンパク質を含み、Ｚ３ドメインが、第２の標的に非共有結合することができ、

（Ａ）Ｚ１ドメインとＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができ、

（Ｂ）Ｚ２ドメインとＸ３ドメインが、互いに非共有結合することができる。

【００９６】

融合タンパク質またはキットまたは組成物の一実施形態では、結合界面は、少なくとも２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％以上の疎水性残基を含む。Ｂドメインリンカーは、本明細書に記載されるものを含むがこれらに限定されない、任意の好適なアミノ酸配列であり得る。一実施形態では、各融合タンパク質のＢドメインは、独立して、６～１２、６～１１、６～１０、７～１２、７～１１、７～１０、８～１２、８～１１、８～１０、９～１２、９～１１、９～１０、１０～１２、１０～１１、１１～１２、６、７、８、９、１０、１１、または１２アミノ酸の長さである。

【００９７】

別の実施形態では、個々の融合タンパク質におけるＸおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は４である。さらなる実施形態では、各融合タンパク質のＸドメインは２つのアルファヘリックスを有し、各融合タンパク質のＺドメインは２つのアルファヘリックスを有する。一実施形態では、各融合タンパク質のＸドメインまたはＺドメインのいずれかが１つのアルファヘリックスを有し、他方は３つのアルファヘリックスを有する。

【００９８】

一実施形態では、各Ｘドメインおよび各Ｚドメインは、配列番号１～２９０を含むがこれらに限定されない群から選択されるか、または配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドを含み、ただし、ＸドメインとＺドメインはヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成しないという条件付きである。一実施形態では、各Ｘドメインおよび各Ｚドメインは、配列番号１～２９０、および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４

３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４を含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドを含み、ただし、ＸドメインとＺドメインはヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成しないという条件付きである。１つの非限定的な実施形態では、表２で定義されている定義された界面位置のアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％は、参照ポリペプチドと比較して不変である。

【００９９】

以下の実施例では、異なる命名法が使用される。表５に、実施例と表１Ａおよび１Ｂで使用されている名前の対応を示す。第１の列は実施例で使用されている番号であり、２番目の列は表１Ａおよび１Ｂの対応する名前を示している。例えば、実施例におけるポリペプチド１はＤＨＤ３７＿ＡＢＸＢ （ａ）であり、１’はＤＨＤ３７＿ＡＢＸＢ（ｂ）である。ポリペプチド２は、ＤＨＤ１５（ａ）であり、２’はＤＨＤ１５（ｂ）であり、以下、同様である。

表５

１：ＤＨＤ ３７＿ＡＢＸＢ
２：ＤＨＤ １５
３：ＤＨＤ １３１
４：ＤＨＤ １０１
５：ＤＨＤ ９
６：ＤＨＤ １５０
７：ＤＨＤ １５４
８：ＤＨＤ １７
９：ＤＨＤ １３＿ＸＡＡＡ
１０：ＤＨＤ ３９
１１：ＤＨＤ １５５

【０１００】

一実施形態では、各融合タンパク質は、配列番号３０２、３０３、３０６～３２６、４３９、４４１、４４３、４４５、４４７、４４９、４５１、４５３、４５５、および４５７からなる群から選択される配列のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを独立して含む。

２’－１’＿２－残基＿リンカー
ＧＳＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤＳＥＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＡＡＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号３０６）

２’－１’＿２－残基＿リンカー
ＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤＳＥＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＡＡＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号４３９）

２’－１’＿６－残基＿リンカー
ＧＳＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤ
ＳＥＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＧＳ
ＧＳＰＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥ
ＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番
号３０７）
２’－１’＿６－残基＿リンカー
ＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤＳＥ
ＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＧＳＧＳ
ＰＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫ
ＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号４
４１）
２’－１’＿１２－残基＿リンカー
ＧＳＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤ
ＳＥＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＧＳ
ＧＳＰＧＧＳＧＳＰＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥ
ＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫ
ＶＥ（配列番号３０８）
２’－１’＿１２－残基＿リンカー
ＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤＳＥ
ＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＧＳＧＳ
ＰＧＧＳＧＳＰＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬ
ＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ
（配列番号４４３）
２’－１’＿２４－残基＿リンカー
ＧＳＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤ
ＳＥＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＧＳ
ＧＳＰＧＧＳＧＳＰＧＧＳＧＳＰＧＧＳＧＳＰＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡ
ＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫ
ＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号３０９）
２’－１’＿２４－残基＿リンカー
ＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＤＤＰＤＳＥ
ＤＩＡＲＥＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＧＳＧＳ
ＰＧＧＳＧＳＰＧＧＳＧＳＰＧＧＳＧＳＰＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫ
ＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬ
ＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号４４５）
１１－７’
ＰＥＤＤＶＶＲＩＩＫＥＤＬＥＳＮＲＥＶＬＲＥＱＫＥＩＨＲＩＬＥＬＶＴＲＧＥＶＳＥ
ＥＡＩＤＲＶＬＫＲＱＥＤＬＬＫＫＱＫＥＳＴＤＫＡＲＫＶＶＥＥＲＲＧＳＥＧＳＧＳＥ
ＧＳＤＬＥＤＬＬＲＲＬＲＲＬＶＤＥＱＲＲＬＶＥＥＬＥＲＶＳＲＲＬＥＫＡＶＲＤＮＥ
ＤＥＲＥＬＡＲＬＳＲＥＨＳＤＩＱＤＫＨＤＫＬＡＲＥＩＬＥＶＬＫＲＬＬＥＲＴＥ（配
列番号３１０）
１’－４’
ＧＳＤＡＹＤＬＤＲＩＶＫＥＨＲＲＬＶＥＥＱＲＥＬＶＥＥＬＥＫＬＶＲＲＱＥＤＨＲＶ
ＤＫＫＥＳＨＥＩＬＥＲＬＥＲＩＩＲＲＳＴＲＩＬＴＥＬＥＫＬＴＤＥＦＥＲＲＴＲＧＳ
ＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬ
ＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫ
ＫＶＥ（配列番号３１１）
１’－４’
ＤＡＹＤＬＤＲＩＶＫＥＨＲＲＬＶＥＥＱＲＥＬＶＥＥＬＥＫＬＶＲＲＱＥＤＨＲＶＤＫ

KESHEILERLERIIRRSTRILTELEKLTDEFERRTRGSEG
SGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEK
LRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKV
E（配列番号４４７）
４－３’
GSDEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGE
VSEEESDRILREIKEILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAEG
SEGSGSEGSDEKDYHRRLIEHLEDLVRRHEELIKRQKKVV
EELERRGLDERLRRVVDRFRRSSERWEEVIERFRQVVDKL
RKSVE（配列番号３１２）
４－３’
DEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGEVS
EEESDRILREIKEILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAEGSE
GSGSEGSDEKDYHRRLIEHLEDLVRRHEELIKRQKKVVEE
LERRGLDERLRRVVDRFRRSSERWEEVIERFRQVVDKLRK
SVE（配列番号４４９）
３－２’＊
GSTERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLKKAR
GADEKVLDELRKIIERIRELLDRSRKIHERSEEIAYKEEG
SEGSGSEGSGSDESDRIRKIVEESDEIVKESRKLAERARE
LIKESEDKRVSEERNERLLEELLRILDENAELLKRNLELL
KEVLYRTR（配列番号３１３）
３－２’＊
TERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLKKARGA
DEKVLDELRKIIERIRELLDRSRKIHERSEEIAYKEEGSE
GSGSEGSGSDESDRIRKIVEESDEIVKESRKLAERARELI
KESEDKRVSEERNERLLEELLRILDENAELLKRNLELLKE
VLYRTR（配列番号４５１）
１’－３’
GSDEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGE
VSEEESDRILREIKEILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAEG
SEGSGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKL
LEKLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHA
KKVE（配列番号３１４）
１’－３’
DEDDELERLLREYHRVLREYEKLLEELRRLYEEYKRGEVS
EEESDRILREIKEILDKSERLWDLSEEVWRTLLYQAEGSE
GSGSEGSGSDDKELDKLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLE
KLRRSERKDPKVVETYVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKK
VE（配列番号４５３）
１’－５
PKKEAEELAEESEELHDRSEKLHERAEQSSNSEEARKILE
DIERISERIEEISDRIERLLRSGSEGSGSEGSGSDDKELD
KLLDTLEKILQTATKIIDDANKLLEKLRRSERKDPKVVET
YVELLKRHEKAVKELLEIAKTHAKKVE（配列番号３０３）
５’－２’
TERKLLERSRRLQEESKRLLDEMAEIMRRIKKLLDDPDSE
DIAREIKELLRRLKEIIERNQRIAKEHEYIARERSGSEGS
GSEGSGSPKEEARELIRKQKELIKEQKKLIKEAKQKSDSR
DAERIWKRSREINRESKKINKRIKELIKS（配列番号３０２）

１－６
ＤＳＤＥＨＬＫＫＬＫＴＦＬＥＮＬＲＲＨＬＤＲＬＤＫＨＩＫＱＬＲＤＩＬＳＥＮＰＥＤ
ＥＲＶＫＤＶＩＤＬＳＥＲＳＶＲＩＶＫＴＶＩＫＩＦＥＤＳＶＲＫＫＥＧＳＥＧＳＧＳＥ
ＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＰＴＤＥＶＩＥＶＬＫＥＬＬＲＩＨＲＥ
ＮＬＲＶＮＥＥＩＶＥＶＮＥＲＡＳＲＶＴＤＲＥＥＬＥＲＬＬＲＲＳＮＥＬＩＫＲＳＲＥ
ＬＮＥＥＳＫＫＬＩＥＫＬＥＲＬＡＴ（配列番号３１５）
１’－７
ＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤ
ＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥＧＳＥＧＳＧＳ
ＥＧＳＴＡＥＥＬＬＥＶＨＫＫＳＤＲＶＴＫＥＨＬＲＶＳＥＥＩＬＫＶＶＥＶＬＴＲＧＥ
ＶＳＳＥＶＬＫＲＶＬＲＫＬＥＥＬＴＤＫＬＲＲＶＴＥＥＱＲＲＶＶＥＫＬＮ（配列番号
３１６）
６’－７
ＤＮＥＥＩＩＫＥＡＲＲＶＶＥＥＹＫＫＡＶＤＲＬＥＥＬＶＲＲＡＥＮＡＫＨＡＳＥＫＥ
ＬＫＤＩＶＲＥＩＬＲＩＳＫＥＬＮＫＶＳＥＲＬＩＥＬＷＥＲＳＱＥＲＡＲＧＳＥＧＳＧ
ＳＥＧＳＴＡＥＥＬＬＥＶＨＫＫＳＤＲＶＴＫＥＨＬＲＶＳＥＥＩＬＫＶＶＥＶＬＴＲＧ
ＥＶＳＳＥＶＬＫＲＶＬＲＫＬＥＥＬＴＤＫＬＲＲＶＴＥＥＱＲＲＶＶＥＫＬＮ（配列番
号３１７）
１’－６－７
ＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤ
ＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥＧＳＥＧＳＧＳ
ＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＰＴＤＥＶＩＥＶＬＫＥＬＬＲＩＨＲ
ＥＮＬＲＶＮＥＥＩＶＥＶＮＥＲＡＳＲＶＴＤＲＥＥＬＥＲＬＬＲＲＳＮＥＬＩＫＲＳＲ
ＥＬＮＥＥＳＫＫＬＩＥＫＬＥＲＬＡＴＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳ
ＥＧＳＧＳＥＧＳＴＡＥＥＬＬＥＶＨＫＫＳＤＲＶＴＫＥＨＬＲＶＳＥＥＩＬＫＶＶＥＶ
ＬＴＲＧＥＶＳＳＥＶＬＫＲＶＬＲＫＬＥＥＬＴＤＫＬＲＲＶＴＥＥＱＲＲＶＶＥＫＬＮ
（配列番号３１８）
１１－１
ＤＳＤＥＨＬＫＫＬＫＴＦＬＥＮＬＲＲＨＬＤＲＬＤＫＨＩＫＱＬＲＤＩＬＳＥＮＰＥＤ
ＥＲＶＫＤＶＩＤＬＳＥＲＳＶＲＩＶＫＴＶＩＫＩＦＥＤＳＶＲＫＫＥＧＳＥＧＳＧＳＥ
ＧＳＰＥＤＤＶＶＲＩＩＫＥＤＬＥＳＮＲＥＶＬＲＥＱＫＥＩＨＲＩＬＥＬＶＴＲＧＥＶ
ＳＥＥＡＩＤＲＶＬＫＲＱＥＤＬＬＫＫＱＫＥＳＴＤＫＡＲＫＶＶＥＥＲＲ（配列番号３
１９）
１１－６’
ＤＮＥＥＩＩＫＥＡＲＲＶＶＥＥＹＫＫＡＶＤＲＬＥＥＬＶＲＲＡＥＮＡＫＨＡＳＥＫＥ
ＬＫＤＩＶＲＥＩＬＲＩＳＫＥＬＮＫＶＳＥＲＬＩＥＬＷＥＲＳＱＥＲＡＲＧＳＥＧＳＧ
ＳＥＧＳＰＥＤＤＶＶＲＩＩＫＥＤＬＥＳＮＲＥＶＬＲＥＱＫＥＩＨＲＩＬＥＬＶＴＲＧ
ＥＶＳＥＥＡＩＤＲＶＬＫＲＱＥＤＬＬＫＫＱＫＥＳＴＤＫＡＲＫＶＶＥＥＲＲ（配列番
号３２０）
１１－７’
ＤＬＥＤＬＬＲＲＬＲＲＬＶＤＥＱＲＲＬＶＥＥＬＥＲＶＳＲＲＬＥＫＡＶＲＤＮＥＤＥ
ＲＥＬＡＲＬＳＲＥＨＳＤＩＱＤＫＨＤＫＬＡＲＥＩＬＥＶＬＫＲＬＬＥＲＴＥＧＳＥＧ
ＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＰＥＤＤＶＶＲＩＩＫＥＤＬＥ
ＳＮＲＥＶＬＲＥＱＫＥＩＨＲＩＬＥＬＶＴＲＧＥＶＳＥＥＡＩＤＲＶＬＫＲＱＥＤＬＬ
ＫＫＱＫＥＳＴＤＫＡＲＫＶＶＥＥＲＲ（配列番号３２１）
１’－６
ＧＳＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲ
ＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥＧＳＥＧＳ
ＧＳＥＧＳＰＴＤＥＶＩＥＶＬＫＥＬＬＲＩＨＲＥＮＬＲＶＮＥＥＩＶＥＶＮＥＲＡＳＲ
ＶＴＤＲＥＥＬＥＲＬＬＲＲＳＮＥＬＩＫＲＳＲＥＬＮＥＥＳＫＫＬＩＥＫＬＥＲＬＡＴ

（配列番号３２２）
１’－６
ＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＰＴＤＥＶＩＥＶＬＫＥＬＬＲＩＨＲＥＮＬＲＶＮＥＥＩＶＥＶＮＥＲＡＳＲＶＴＤＲＥＥＬＥＲＬＬＲＲＳＮＥＬＩＫＲＳＲＥＬＮＥＥＳＫＫＬＩＥＫＬＥＲＬＡＴ（配列番号４５５）
７－１
ＤＳＤＥＨＬＫＫＬＫＴＦＬＥＮＬＲＲＨＬＤＲＬＤＫＨＩＫＱＬＲＤＩＬＳＥＮＰＥＤＥＲＶＫＤＶＩＤＬＳＥＲＳＶＲＩＶＫＴＶＩＫＩＦＥＤＳＶＲＫＫＥＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＴＡＥＥＬＬＥＶＨＫＫＳＤＲＶＴＫＥＨＬＲＶＳＥＥＩＬＫＶＶＥＶＬＴＲＧＥＶＳＳＥＶＬＫＲＶＬＲＫＬＥＥＬＴＤＫＬＲＲＶＴＥＥＱＲＲＶＶＥＫＬＮ（配列番号３２３）
４’－２’＊
ＧＴＥＲＫＬＬＥＲＳＲＲＬＱＥＥＳＫＲＬＬＤＥＭＡＥＩＭＲＲＩＫＫＬＬＫＫＡＲＧＡＤＥＫＶＬＤＥＬＲＫＩＩＥＲＩＲＥＬＬＤＲＳＲＫＩＨＥＲＳＥＥＩＡＹＫＥＥＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＤＡＹＤＬＤＲＩＶＫＥＨＲＲＬＶＥＥＱＲＥＬＶＥＥＬＥＫＬＶＲＲＱＥＤＨＲＶＤＫＫＥＳＨＥＩＬＥＲＬＥＲＩＩＲＲＳＴＲＩＬＴＥＬＥＫＬＴＤＥＦＥＲＲＴＲ（配列番号３２４）
２＊－１’
ＴＲＥＥＬＬＲＥＮＩＥＬＡＫＥＨＩＥＩＭＲＥＩＬＥＬＬＱＫＭＥＥＬＬＥＫＡＲＧＡＤＥＤＶＡＫＴＩＫＥＬＬＲＲＬＫＥＩＩＥＲＮＱＲＩＡＫＥＨＥＹＩＡＲＥＲＳＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＳＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号３２５）
１’－９
ＧＳＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＴＫＥＤＩＬＥＲＱＲＫＩＩＥＲＡＱＥＩＨＲＲＱＱＥＩＬＥＥＬＥＲＩＩＲＫＰＧＳＳＥＥＡＭＫＲＭＬＫＬＬＥＥＳＬＲＬＬＫＥＬＬＥＬＳＥＥＳＡＱＬＬＹＥＱＲ（配列番号３２６）
１’－９
ＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥＧＳＥＧＳＧＳＥＧＳＧＴＫＥＤＩＬＥＲＱＲＫＩＩＥＲＡＱＥＩＨＲＲＱＱＥＩＬＥＥＬＥＲＩＩＲＫＰＧＳＳＥＥＡＭＫＲＭＬＫＬＬＥＥＳＬＲＬＬＫＥＬＬＥＬＳＥＥＳＡＱＬＬＹＥＱＲ（配列番号４５７）
【０１０１】
いくつかの態様では、各融合タンパク質は、独立して、配列番号３０２、３０３、３０６～３２６、４３９、４４１、４４３、４４５、４４７、４４９、４５１、４５３、４５５、および４５７のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、３０２、３０３、３０６～３２６、４３９、４４１、４４３、４４５、４４７、４４９、４５１、４５３、４５５および４５７のうちのいずれかのアミノ酸残基１および２のＧｌｙＳｅｒは任意であり、例えば、存在しない。
【０１０２】
別の実施形態では、第１の標的および第２の標的をさらに含むキットまたは組成物。一実施形態では、第１の標的および第２の標的はそれぞれ、独立して、式Ｘ１０－Ｂ１０－Ｚ

１０のポリペプチドを含み、
（ａ）Ｘ１０ドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む非天然に存在するポリペプチドであり、
（ｂ）Ｚ１０ドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む非天然に存在するポリペプチドであり、
（ｃ）Ｂ１０ドメインは、アミノ酸リンカーであり、
ＸドメインおよびＺドメインは、標的結合界面で相互作用し、標的結合界面は、Ｘドメインの各アルファヘリックス水素の少なくとも１つの側鎖がＺドメインの異なるアルファの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、標的結合界面は、複数の疎水性残基を含む。一実施形態では、標的結合界面は、少なくとも２５％の疎水性残基を含む。別の実施形態では、第１の標的および第２の標的のＢ１０ドメインは、独立して、６～１２、６～１１、６～１０、７～１２、７～１１、７～１０、８～１２、８～１１、８～１０、９～１２、９～１１、９～１０、１０～１２、１０～１１、１１～１２、６、７、８、９、１０、１１、または１２の長さのアミノ酸である。別の実施形態では、第１および第２の標的タンパク質におけるＸおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は４である。
さらなる一実施形態では、
（ａ）第１の標的および第２の標的のそれぞれのＸ１０ドメインが、２つのアルファヘリックスを有し、第１の標的および第２の標的のそれぞれのＺ１０ドメインが、２つのアルファヘリックスを有するか、または
（ｂ）第１の標的および第２の標的のそれぞれのＸ１０ドメインもしくはＺ１０ドメインのいずれかが、１つのアルファヘリックスを有し、他方が、３つのアルファヘリックスを有する。一実施形態では、各Ｘ１０ドメインおよび各Ｚ１０ドメインは、配列番号１～２９０、３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、Ｘ１０ドメインは、融合タンパク質のＸドメインとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、Ｚ１０ドメインは、融合タンパク質のＺドメインとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである。一実施形態では、第１の標的および／または第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較して不変である。

【０１０３】

別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的が、１つ以上のＸ１０および／またはＺ１０ドメインに連結された１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含み、例えば、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインは、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る。

【０１０４】

第６の態様では、本開示は、
（ｉ）試料中に存在する第１の標的および第２の標的と融合タンパク質の非共有結合を促進する条件下で、本明細書で開示される第５もしくは第６の実施形態または実施形態の組み合わせの融合タンパク質を生物学的試料と接触させることと、
（ｉｉ）生物学的試料中の第１の標的および／または第２の標的への１つ以上の融合タン

パク質の非共有結合を検出することと、を含む、方法を提供する。
【０１０５】
検出は、質量分析、酵母ツーハイブリッド検出、機能アッセイ、または現在の開示に基づく当業者に明らかである任意の他の好適なアッセイを含むがこれらに限定されない、結合を検出するための任意の好適な手段を含み得る。一実施形態では、方法は、生物学的試料中の第１の標的および第２の標的への１つ以上の融合タンパク質の協調的非共有結合を検出することを含む。この実施形態は、以下の実施例でより詳細に説明されるように、ＡＮＤゲート論理における融合タンパク質の使用を含む。本明細書で使用される場合、「協調的」結合は、融合タンパク質の結合が第２の標的にも結合せずに第１の標的に結合できず、融合タンパク質が第１の標的に結合せずに第２の標的に結合できないことを意味する。
【０１０６】
別の実施形態では、方法は、生物学的試料中の第１の標的および第２の標的への１つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することを含む。この実施形態は、以下の実施例でより詳細に説明されるように、ＯＲゲート論理における融合タンパク質の使用を含む。
【０１０７】
別の実施形態では、本開示は、
（ａ）生物学的試料を少なくとも２つの融合タンパク質と接触させることであって、少なくとも２つの融合タンパク質のそれぞれは、式Ｘ－Ｂ－Ｚを含み、式中、
各Ｂは独立して、ポリペプチドリンカーであり、
各Ｘドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第１の天然に存在しないポリペプチドを含み、
各Ｚドメインは、１、２、または３つのアルファヘリックスを含む第２の天然に存在しないポリペプチドを含み、それぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインからのアルファヘリックスの合計数は、４、５、または６であり、ＸドメインとＺドメインは結合界面で相互作用し、結合界面は、各Ｘドメインのアルファヘリックスの少なくとも１つの側鎖がＺドメインのアルファヘリックスの側鎖と結合する水素結合ネットワークを含み、
第１の融合タンパク質のＸドメインは、第１の標的に非共有結合することができ、
第２の融合タンパク質のＺドメインは、第２の標的に非共有結合することができ、
第１の標的または第２の標的に非共有結合することができないそれぞれの個々の融合タンパク質のＸドメインおよびＺドメインは、複数の融合タンパク質中の異なる融合タンパク質のＸまたはＺドメインに非共有結合することができる、接触させることと、
（ｂ）生物学的試料中の前記第１の標的および／または第２の標的への２つ以上の融合タンパク質の非共有結合を検出することと、を含む、方法を提供する。この実施形態は、以下の実施例でより詳細に説明されるように２つの構成要素ＡＮＤまたはＯＲゲート論理における融合タンパク質の使用を含む。
【０１０８】
ＡＮＤまたはＯＲゲート論理の一実施形態では、検出は、生物学的試料中の第１の標的および第２の標的への２つ以上の融合タンパク質の協調的な非共有結合を検出することを含む。別の実施形態では、
（ｉ）第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、Ｘ１ドメインが、第１の標的に非共有結合することができ、
（ｉｉ）第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、Ｚ２ドメインが、第１の標的に非共有結合することができ、Ｚ１ドメインとＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができる。
【０１０９】
さらなる一実施形態では、
（ｉ）第１の融合タンパク質が、式Ｘ１－Ｂ１－Ｚ１を有し、Ｘ１ドメインが、第１の標的に非共有結合することができ、
（ｉｉ）第２の融合タンパク質が、式Ｘ２－Ｂ２－Ｚ２を有し、

（ｉｉｉ）少なくとも２つの融合タンパク質が、式Ｘ３－Ｂ３－Ｚ３の第３の融合タンパク質を含み、Ｚ３ドメインが、第２の標的に非共有結合することができ、
（Ａ）Ｚ１ドメインとＸ２ドメインが、互いに非共有結合することができ、
（Ｂ）Ｚ２ドメインとＸ３ドメインが、互いに非共有結合することができる。
【０１１０】
別の実施形態では、Ｘドメイン、Ｙドメイン、Ｂドメイン、および／または融合タンパク質は、第４および第５の態様などで、本明細書に開示される任意の実施形態または実施形態の組み合わせに記載されている通りである。一実施形態では、融合タンパク質の少なくとも１つは、１つ以上のＸおよび／またはＺドメインに連結された１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインを含み、検出工程は、第１の標的および／または第２の標的の結合により引き起こされる出力シグナルの検出を含む。別の実施形態では、検出工程は、第１の標的および第２の標的の協調的な非共有結合により引き起こされる１つ以上のエフェクターポリペプチドからの出力シグナルを検出することを含む。そのような検出は、本明細書に開示されるものを含むがこれらに限定されない、検出される出力シグナルに部分的に依存する任意の好適な手段によるものであり得る。検出される出力シグナルは、蛍光活性、機能的活性などを含むがこれらに限定されない任意の好適な出力シグナルであり得る。
【０１１１】
任意の好適なエフェクターポリペプチドドメインを、意図された使用に適したものとして使用することができる。一実施形態では、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインは、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る。
【０１１２】
第７の態様において、本開示は、
（ａ）２つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、
（ｂ）２つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第２のポリペプチドに非共有結合することができ、第２のポリペプチドは、第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む組成物であって、
（ｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、
（ｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性および第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性は、互いに、第１の標的および第２の標的の結合親和性よりも大きい、組成物を提供する。
【０１１３】
この第７の態様の組成物は、例えば、以下の実施例で詳細に説明されるように、ＮＯＲゲートとして使用することができる。
【０１１４】
一実施形態では、組成物はさらに、第１の標的と第２の標的を含む。第１の標的および第２の標的は、意図された用途に適した任意の標的であり得る。非限定的な実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、ポリペプチドまたは核酸を含み得る。別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含む。任意のエフェクターポリペプチドドメインを、意図された用途に適したものとして使用することができる。一実施形態では、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインは、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る。別の実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドは、表１Ａおよび１Ｂに示されるような配列番号１～２９０、および３３１、３３２、３３４、３３

６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドを含む。一実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較して不変である。

【０１１５】

１つの非限定的かつ例示的な実施形態では、

（ａ）第１のポリペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、

９

ＧＴＫＥＤＩＬＥＲＱＲＫＩＩＥＲＡＱＥＩＨＲＲＱＱＥＩＬＥＥＬＥＲＩＩＲＫＰＧＳＳＥＥＡＭＫＲＭＬＫＬＬＥＥＳＬＲＬＬＫＥＬＬＥＬＳＥＥＳＡＱＬＬＹＥＱＲ（配列番号３）；

（ｂ）第２のポリペプチドは、配列番号５８のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。

１０’

ＧＳＳＡＤＤＶＬＥＤＩＬＫＩＩＲＥＬＩＥＩＬＤＱＩＬＳＬＬＮＱＬＬＫＬＬＲＨＧＶＰＮＡＫＫＶＶＥＫＹＫＥＩＬＥＬＹＬＱＬＶＳＬＦＬＫＩＶＫＴＨＡＤＡＶＳＧＫＩＤＫＫＡＥＥＥＩＫＫＥＥＥＫＩＫＥＫＬＲＱＡＫＤＩＬＫＫＬＱＥＥＩＤＫＴＲ（配列番号５８）

【０１１６】

１つの非限定的かつ例示的な実施形態では、

（ａ）第１のポリペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、

９

ＧＴＫＥＤＩＬＥＲＱＲＫＩＩＥＲＡＱＥＩＨＲＲＱＱＥＩＬＥＥＬＥＲＩＩＲＫＰＧＳＳＥＥＡＭＫＲＭＬＫＬＬＥＥＳＬＲＬＬＫＥＬＬＥＬＳＥＥＳＡＱＬＬＹＥＱＲ（配列番号３）；

（ｂ）第２のポリペプチドは、配列番号３６２のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。

１０’
ＳＡＤＤＶＬＥＤＩＬＫＩＩＲＥＬＩＥＩＬＤＱＩＬＳＬＬＮＱＬＬＫＬＬＲＨＧＶＰＮＡＫＫＶＶＥＫＹＫＥＩＬＥＬＹＬＱＬＶＳＬＦＬＫＩＶＫＴＨＡＤＡＶＳＧＫＩＤＫＫＡＥＥＥＩＫＫＥＥＥＫＩＫＥＫＬＲＱＡＫＤＩＬＫＫＬＱＥＥＩＤＫＴＲ（配列番号３６２）

【０１１７】

別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的はそれぞれは、配列番号１～２９０からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含むが、ただし、第１の標的は、第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）対を形成し、第２の標的は、第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）対を形成するという条件付きである。別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的はそれぞれは、配列番号１～２９０および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、ただし、第１の標的は、第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、第２の標的は、第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである。配列番号１～２９０および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のポリペプチド間のヘテロ二量体Ａ－Ｂペアは、上記の長さで記載されている（図１６も参照）。一実施形態では、第１の標的および／または第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較して不変である。

【０１１８】

この第７の態様の組成物は、ＮＯＲ論理ゲートの設計を含む、任意の好適な目的に使用することができる。一実施形態では、本開示は、以下

（ａ）本開示の第７の態様の任意の実施形態または実施形態の組み合わせの組成物と生物学的試料を接触させることと、

（ｂ）試料中の第１の標的への第１のポリペプチドの結合および第２の標的への第２のポリペプチドの結合を検出すること、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用により引き起こされる出力シグナルを検出することと、を含む方法を提供する。ＮＯＲ論理ゲートにおける本開示の第７の態様の構成の使用のさらなる詳細は、以下の実施例で詳細に説明される。

【０１１９】

第８の態様において、本開示は、

（ａ）２つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、

（ｂ）２つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、第１のポリペプチ

ドは、第２のポリペプチドに非共有結合することができ、第２のポリペプチドは、第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む組成物であって、
（ｉ）第２のポリペプチドに対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性よりも大きく、
（ｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、
（ｉｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性および第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性は、互いに、第１の標的および第２の標的の結合親和性よりも大きい、組成物を提供する。

【０１２０】
この第８の態様の組成物は、例えば、以下の実施例で詳細に説明されるように、ＸＮＯＲゲートとして使用することができる。一実施形態では、組成物はさらに、第１の標的と第２の標的を含む。第１の標的および第２の標的は、意図された用途に適した任意の標的であり得る。非限定的な実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、ポリペプチドまたは核酸を含み得る。別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含む。任意のエフェクターポリペプチドドメインを、意図された用途に適したものとして使用することができる。一実施形態では、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインは、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る。別の実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドは、表１Ａおよび１Ｂに示されるような配列番号１～２９０、および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。一実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較される。

【０１２１】
１つの非限定的かつ例示的な実施形態では、
（ａ）第１のポリペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、
９
ＧＴＫＥＤＩＬＥＲＱＲＫＩＩＥＲＡＱＥＩＨＲＲＱＱＥＩＬＥＥＬＥＲＩＩＲＫＰＧＳＳＥＥＡＭＫＲＭＬＫＬＬＥＥＳＬＲＬＬＫＥＬＬＥＬＳＥＥＳＡＱＬＬＹＥＱＲ（配列番号３）；
（ｂ）第２のポリペプチドは、配列番号４２のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％

、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。
１’（ｂ）
ＧＳＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号４２）
【０１２２】
１つの非限定的かつ例示的な実施形態では、
（ａ）第１のポリペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、
９
ＧＴＫＥＤＩＬＥＲＱＲＫＩＩＥＲＡＱＥＩＨＲＲＱＱＥＩＬＥＥＬＥＲＩＩＲＫＰＧＳＳＥＥＡＭＫＲＭＬＫＬＬＥＥＳＬＲＬＬＫＥＬＬＥＬＳＥＥＳＡＱＬＬＹＥＱＲ（配列番号３）；
（ｂ）第２のポリペプチドは、配列番号３５２のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。
１’（ｂ）
ＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号３５２）
【０１２３】
別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的はそれぞれは、配列番号１～２９０および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であるポリペプチドを含み、ただし、第１の標的は、第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、第２の標的は、第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである。配列番号１～２９０および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のポリペプチド間のヘテロ二量体Ａ－Ｂペアは、上記の長さで記載されている（図１６も参照）。一実施形態では、第１の標的および／または第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較して不変である。
【０１２４】

この第８の態様の組成物は、ＸＮＯＲ論理ゲートの設計を含む、任意の好適な目的に使用することができる。一実施形態では、本開示は、以下
（ａ）生物学的試料を、請求項５０～５６のいずれか一項に記載の組成物と接触させることと、
（ｂ）試料中の第１の標的と第１のポリペプチドの、第２の標的と第２のポリペプチドの、第１のポリペプチドと第２のポリペプチドの、および第１の標的と第２の標的の間の結合相互作用を検出すること、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用により引き起こされる出力シグナルを検出することと、を含む方法を提供する。ＸＮＯＲ論理ゲートにおける本開示の第８の態様の構成の使用のさらなる詳細は、以下の実施例で詳細に説明される。

【０１２５】
第９の態様では、本開示は、
（ａ）４つのアルファヘリックスを含む第１のポリペプチドであって、第１のポリペプチドは、第１の標的に非共有結合することができる、第１のポリペプチドと、
（ｂ）４つのアルファヘリックスを含む第２のポリペプチドであって、前記第２のポリペプチドは、前記第１の標的とは異なる第２の標的に非共有結合することができる、第２のポリペプチドと、を含む、組成物であって、
（ｉ）前記第２の標的に対する前記第１の標的の結合親和性が、前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの結合親和性よりも大きく、
（ｉｉ）第１の標的に対する第１のポリペプチドの結合親和性が、第２の標的に対する第２のポリペプチドの結合親和性にほぼ等しく、
（ｉｉｉ）（Ａ）前記第１の標的に対する前記第１のポリペプチドの前記結合親和性および（Ｂ）前記第２の標的に対する前記第２のポリペプチドの前記結合親和性の合計が、前記第１の標的および前記第２の標的の前記結合親和性よりも大きい、組成物を提供する。

【０１２６】
この第９の態様の構成は、例えば、以下の実施例で詳細に説明されるように、ＮＡＮＤゲートとして使用することができる。一実施形態では、組成物はさらに、第１の標的および第２の標的を含む。第１の標的および第２の標的は、意図された用途に適した任意の標的であり得る。非限定的な実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、ポリペプチドまたは核酸を含み得る。別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的は、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインをさらに含む。任意のエフェクターポリペプチドドメインを、意図された用途に適したものとして使用することができる。一実施形態では、１つ以上のエフェクターポリペプチドドメインは、核酸結合タンパク質、転写因子、受容体結合タンパク質、分割酵素、膜受容体のエフェクターなどを含むがこれらに限定されないポリペプチドを含み得る。別の実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドは、表１Ａおよび１Ｂに示されるような配列番号１～２９０、および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。一実施形態では、第１のポリペプチドおよび／または第２のポリペプチドの定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較して不変である。

【０１２７】
１つの非限定的かつ例示的な実施形態では、
（ａ）第１のポリペプチドが、配列番号４２のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、
１’（ｂ）
ＧＳＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号４２）
（ｂ）第２のポリペプチドは、配列番号５７のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。
１０
ＤＨＳＲＫＬＥＥＩＬＤＲＬＲＫＨＶＫＲＬＬＥＨＬＲＥＬＬＳＬＶＫＥＮＰＥＤＫＤＬＶＥＶＬＥＬＳＬＡＩＬＲＲＳＬＥＡＶＥＡＦＬＫＳＶＴＫＫＤＰＤＤＥＤＬＲＲＫＡＤＥＩＲＫＥＶＥＥＩＫＫＳＬＡＥＶＥＫＥＩＹＫＬＫ（配列番号５７）
【０１２８】
１つの非限定的かつ例示的な実施形態では、
（ａ）第１のポリペプチドが、配列番号３５２のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含み、
１’（ｂ）
ＤＤＫＥＬＤＫＬＬＤＴＬＥＫＩＬＱＴＡＴＫＩＩＤＤＡＮＫＬＬＥＫＬＲＲＳＥＲＫＤＰＫＶＶＥＴＹＶＥＬＬＫＲＨＥＫＡＶＫＥＬＬＥＩＡＫＴＨＡＫＫＶＥ（配列番号３５２）
（ｂ）第２のポリペプチドは、配列番号５７のアミノ酸配列を有するものを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチドを含む。
１０
ＤＨＳＲＫＬＥＥＩＬＤＲＬＲＫＨＶＫＲＬＬＥＨＬＲＥＬＬＳＬＶＫＥＮＰＥＤＫＤＬＶＥＶＬＥＬＳＬＡＩＬＲＲＳＬＥＡＶＥＡＦＬＫＳＶＴＫＫＤＰＤＤＥＤＬＲＲＫＡＤＥＩＲＫＥＶＥＥＩＫＫＳＬＡＥＶＥＫＥＩＹＫＬＫ（配列番号５７）
【０１２９】
別の実施形態では、第１の標的および／または第２の標的はそれぞれは、配列番号１～２９０および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むがこれらに限定されない群から選択されるポリペプチドの全長に対して、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポ

リペプチドを含み、ただし、第１の標的は、第１のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成し、第２の標的は、第２のポリペプチドとヘテロ二量体（ａ－ｂ）ペアを形成するという条件付きである。配列番号１～２９０および３３１、３３２、３３４、３３６～４２２、４２４、４２６、４２８、４３０、４３２、４３４、４３６、４３８、４４０、４４２、４４４、４４６、４４８、４５０、４５２、４５４、４５６、４５８～４６０、４６２、４６４、４６６、４６８、４７０、４７２、４７４、４７６、４７８、４８０、４８２、４８４、４８６、４８８、４９０、４９３、および４９４のポリペプチド間のヘテロ二量体Ａ－Ｂペアは、上記の長さで記載されている（図１６も参照）。一実施形態では、第１の標的および／または第２の標的の定義された界面位置にあるアミノ酸残基の少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、参照ポリペプチドアミノ酸配列（表２に示される界面残基）と比較される。

【０１３０】

この第９の態様の構成は、ＮＡＮＤ論理ゲートの設計を含む、任意の好適な目的に使用することができる。一実施形態では、本開示は、

（ａ）生物学的試料を、請求項６０～６６のいずれか一項に記載の組成物と接触させることと、

（ｂ）試料中の第１の標的と第１のポリペプチドの、第２の標的と第２のポリペプチドの、および第１の標的と第２の標的の間の結合相互作用を検出すること、例えば、結合時のエフェクターポリペプチドの作用により引き起こされる出力シグナルを検出することと、

を含む方法を提供する。

【０１３１】

本出願全体を通して使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、その最も広い意味で使用され、サブユニットアミノ酸の配列を指す。本発明のポリペプチドは、Ｌ－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸（インビボでＬ－アミノ酸特異的プロテアーゼに耐性である）、またはＤ－およびＬ－アミノ酸の組み合わせを含み得る。本明細書に記載のポリペプチドは、化学合成または組換え発現させることができる。ポリペプチドは、ペグ化、ＨＥＳ化、ＰＡＳ化、グリコシル化によってなど、他の化合物に結合させてインビボでの半減期の増加を促進し得、あるいはＦｃ融合として、または脱免疫化変異体で生成し得る。そのような結合は、共有結合または非共有結合であることができ、当業者によって理解される。

【０１３２】

当業者によって理解されるように、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドに存在しない、Ｎ末端、Ｃ末端、またはその両方に追加の残基を含み得る。これらの追加の残基は、参照ポリペプチドと比較した本発明のポリペプチドの同一性パーセントの決定に含まれない。

【０１３３】

上記のように、本発明のポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはその両方に追加の残基を含み得る。そのような残基は、検出タグ（すなわち、蛍光タンパク質、抗体エピトープタグなど）、リンカー、治療薬、精製の目的に適したリガンド（Ｈｉｓタグなど）、局在化を促進するリガンド、およびポリペプチドに機能性を追加するペプチドドメインを含むがこれらに限定されない、意図された用途に好適な任意の残基であり得る。

【０１３４】

第１０の態様では、本開示は、本明細書に開示される任意の実施形態または実施形態の組み合わせのポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、足場、または設計構成要素をコードする核酸を提供する。核酸配列は、ゲノムまたはｃＤＮＡ形態で一本鎖または二本鎖のＲＮＡまたはＤＮＡ、あるいはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドを含み得、これらの各々は、化学的または生化学的に修飾された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含み得る。そのような組換え核酸配列は、コードされたタンパク質の発現および／または精製を促進するために有用である追加の配列を含み得、限定されないが、ポリＡ配列

、修飾コザック配列、ならびにエピトープタグ、搬出シグナル、分泌シグナル、核局在化シグナル、および血漿膜局在化シグナルをコードする配列が含まれる。本明細書の教示に基づいて、どの核酸配列が本開示の融合タンパク質をコードするかは、当業者には明らかであろう。

【０１３５】

第１１の態様では、本開示は、対照配列に作動可能に連結された本開示の１つ以上の核酸を含む発現ベクターを提供する。「発現ベクター」は、核酸コード領域または遺伝子を、遺伝子産物の発現をもたらすことができる任意の制御配列に操作可能に連結するベクターを含む。本開示の核酸配列に操作可能に連結された「制御配列」は、核酸分子の発現をもたらすことができる核酸配列である。制御配列はそれらがその発現を指示するように機能する限り、核酸配列と隣接する必要はない。したがって、例えば、介在する非翻訳であるがすでに転写された配列は、プロモーター配列と核酸配列との間に存在し得、プロモーター配列は、依然としてコード配列に「操作可能に連結された」とみなされ得る。他のそのような制御配列には、ポリアデニル化シグナル、終結シグナル、およびリボソーム結合部位が含まれるが、これらに限定されない。そのような発現ベクターは任意のタイプのものであることができ、限定されないが、プラスミドおよびウイルスベースの発現ベクターが含まれる。哺乳動物系において開示される核酸の発現を促進するために使用されるコントロール配列は、構成的（限定されないが、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＲＳＶ、アクチン、ＥＦを含む様々なプロモーターのいずれかによって促進される）または誘導性（限定されないが、テトラサイクリン、エクジソン、ステロイド応答性を含む多数の誘導性プロモーターのいずれかによって促進される）であり得る。発現ベクターは、エピソームとして、または宿主染色体ＤＮＡへの組み込みによって、宿主生物において複製可能でなければならない。様々な実施形態において、発現ベクターは、プラスミド、ウイルスベースのベクター、または他の好適な発現ベクターを含むことができる。

【０１３６】

第１２の態様では、本開示は、本明細書に開示される任意の実施形態または実施形態の組み合わせの１つ以上の核酸、発現ベクター、ポリペプチド、タンパク質、ヘテロ二量体タンパク質、および／またはタンパク質足場を含む細胞を提供する。核酸または発現ベクターは、エピソームまたは染色体に組み込まれている可能性がある。原核細胞または真核細胞など、任意の好適な細胞型を使用することができる。細胞は、細菌の形質転換、リン酸カルシウム共沈降、エレクトロポレーション、またはリポソーム媒介、ＤＥＡＥデキストラン媒介、ポリカチオン媒介、またはウイルス媒介の形質導入を含むがこれらに限定されない技法を使用して、本開示の発現ベクターを組み込むように一時的または安定的に操作することができる。

【０１３７】

さらに、本開示は、本明細書で開示されるポリペプチド、融合タンパク質、タンパク質、ヘテロ二量体など（まとめてポリペプチドと呼ばれる）を生成する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、（ａ）本開示のこの態様による宿主を、ポリペプチドの発現を促す条件下で培養する工程と、（ｂ）任意選択的に、発現されたポリペプチドを回収する工程と、を含む。発現されたポリペプチドは、無細胞抽出物から回収するか、または培養培地から回収することができる。別の実施形態では、本方法は、ポリペプチドを化学的に合成することを含む。

【０１３８】

実施例１　直交タンパク質ヘテロ二量体の設計

要約：ここでは、ヘテロ二量体相互作用の特異性が、大規模でモジュール式の埋め込み水素結合ネットワークを使用して達成できることを示す。本発明者らは、Ｃｒｉｃｋ生成方程式を使用して、中心軸の周りに様々な程度のスーパーコイルを持つ数百万の４つのヘリックス骨格を生成し、広範な水素結合ネットワークに対応するものを同定し、短いループを持つヘリックスの接続ペアを設計し、配列の残りを最適化した。Ｅ．ｃｏｌｉで発現した９７のそのような設計のうち６５は、構成的ヘテロ二量体を形成し、４つの設計の結晶

構造は計算モデルと密接に一致し、設計された水素結合ネットワークを確証した。細胞では、６つのヘテロ二量体のセットが完全に直交していることが分かり、インビトロでは、１６のヘテロ二量体設計からの３２鎖の混合、５Ｍ　ＧｄｎＨＣｌでの変性、および再アニーリングの後、相互作用の大部分は設計された同族ペア間で行われた。直交タンパク質ヘテロ二量体を設計する能力は、合成生物学のための洗練されたタンパク質に基づく制御論理を可能にし、自然がプログラム可能な生体分子相互作用モダリティの可能性を十分に探求していないことを示す。モジュール式水素結合ネットワークを含む水素結合ネットワークは、参照により本明細書に組み込まれる公開された特許出願番号第ＷＯ２０１７／１７３３５６号に記載されている。

【０１３９】

タンパク質－タンパク質相互作用およびタンパク質－ペプチド相互作用の直交セットは、生物学的システムにおいて重要な役割を果たす。配列の再設計による新しい特異性の創出は困難であり、しばしば無差別な結合をもたらした。本発明者らは、非対称の埋め込み水素結合ネットワークを規則的に繰り返される骨格構造に組み込むことにより、設計されたヘテロ二量体の大規模なセットを生成できると仮定した。本発明者らは、各単量体が４ヘリックス骨格から始まるヘリックスターンヘリックスであるヘリックス束ヘテロ二量体を生成した。４つのヘリックスの各々のために、本発明者らは、らせん位相（Δφ１）、スーパーコイルの半径（Ｒ）、およびＺ軸に沿うオフセット（Ｚオフセット）（図１Ａ）を徹底的にサンプリングし、ヘリックスのスーパーコイル位相を０、９０、１８０、および２７０度に制限し、スーパーコイルねじれ（ω０）およびヘリカルねじれ（ω１）を、２層左巻きスーパーコイル（ω０＝－２．８５およびω１＝１０２．８５）、または５層非ねじれ束（ω０＝０およびω１＝１００）のいずれかについての理想的な値に制限した（図５Ａ～Ｂ）。これにより、対向するヘリックスの平行方向と逆平行方向の両方で、２７００万本のねじれのない、および６０００万本の左巻きのスーパーコイル状の骨格が得られた（図１Ｂ）。

【０１４０】

ＤＮＡ塩基対に相当するモジュール式水素結合ネットワークを同定するために、本発明者らは、ロゼッタ（商標）ＨＢＮＥＴ　２１を用いて、各骨格の中央繰り返し単位に埋め込まれた水素結合ネットワークを設計し、水素結合に参加し、かつ４つのヘリックスすべてを接続する、すべての重原子ドナーおよびアクセプターを伴う少なくとも４つの側鎖残基を含む２２５１個の水素結合ネットワークを取得した（図１ｃ；図６、表６）。次に、本発明者らは、各骨格におけるこれらの水素結合ネットワークの幾何学的に互換性のある配置のすべてを同定し（図１ｄ）、少なくとも２つのネットワークに対応する選択された骨格、および短いループで接続されたヘリックスのペアを同定した（図１ｅ）。低エネルギーの配列は、水素結合ネットワークが固定されているロゼッタ設計（商標）２２計算を使用して同定された。完全に満たされた水素結合ネットワークおよび密な疎水性パッキングを備えた設計が、単量体のホモ二量化を嫌うＣ２対称性を備えたネットワークを除いて、実験的特性評価のために選択された。設計されたヘテロ二量体（ＤＨＤ）は、ａまたはｂのラベルが付いた単量体の番号で示される。例えば、ＤＨＤ１５＿ａは、設計ＤＨＤ１５の単量体「ａ」を指す。

【表５－１】

表６：体系的な探索中に各水素結合ネットワークを観察する頻度。

HBNet 組成	頻度	パーセンテージ(%)
(S/T)2Q1Y1	13954	3.87071362
(S/T)3Q1	9959	2.76253669
(S/T)2D1H1	8452	2.34450849
(S/T)1Q2Y1	7603	2.10900356
(S/T)1D1Q1Y1	7359	2.04132016
(S/T)3D1	6332	1.75643963
(S/T)3D1Q1	5525	1.53258512
(S/T)1D1Q3	5071	1.40664962
(S/T)1D1Q2	5062	1.4041531
(S/T)2N1Y1	5046	1.39971484
(S/T)1N1Q1Y1	4921	1.36504097
(S/T)2H2	4683	1.29902192
(S/T)2H1Q1	4572	1.26823152
(S/T)3H1	3955	1.09708129
(S/T)2D1Q2	3946	1.09458477
(S/T)1D1N1Q2	3862	1.07128393
(S/T)3N1	3783	1.04937005
(S/T)2D1Y1	3762	1.04354484
(S/T)2D1Q1	3669	1.01774747
(S/T)1D1H1Q1	3653	1.01330922
(S/T)1D1Q1W1	3409	0.94562582
(S/T)1D1Q2Y1	3342	0.92704063
(S/T)2Q3	3111	0.86296331
(S/T)2D1N1Q1	2999	0.83189552
(S/T)2Q2Y1	2850	0.79056427
(S/T)1D1W1Y1	2849	0.79028688
(S/T)2N1Q2	2741	0.76032865
(S/T)2D1Q1Y1	2723	0.75533562
(S/T)1D1N1Q1Y1	2684	0.74451737
(S/T)2Q1W1	2641	0.73258956
(S/T)2H1N1Q1	2591	0.71872001
(S/T)2Q2	2582	0.71622349
(S/T)2N1Q1	2554	0.70845654
(S/T)2D1W1	2467	0.68432353
(S/T)2H1N1	2377	0.65935834
(S/T)4Q1	2305	0.63938619
(S/T)1N1Q2Y1	2296	0.63688967
(S/T)1D2Q2	2285	0.63383837
(S/T)2D1H1Q1	2276	0.63134185
(S/T)2D1Q1W1	2267	0.62884533
(S/T)1H1Q1Y1	2222	0.61636274
(S/T)1D1N1Q1	2207	0.61220187

【表５－２】

(S/T)2H1Y1	2150	0.59639059
(S/T)1D1N1Y1	2109	0.58501756
(S/T)1Q1Y2	1962	0.54424109
(S/T)1H1Q2	1957	0.54285413
(S/T)1Q1W1Y1	1954	0.54202196
(S/T)2N1Q1Y1	1935	0.53675153
(S/T)3H1Q1	1901	0.52732024
(S/T)1D1H1W1	1879	0.52121764

【０１４１】
選択した９７の設計のうち９４は、Ｎｉアフィニティークロマトグラフィーによって両方の単量体を共精製してＥ．ｃｏｌｉで十分に発現した（１つの単量体のみにヘキサヒスチジンタグが含まれている）。８５／９４の場合、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で観察された優勢な種は、予想されたサイズだった（図１ｆ）。ＣＤ分光法によって特徴づけられる３つの設計は、すべてアルファヘリックスであり、９５℃で安定していることが分かった（図１ｇ、図６）。設計に関する配列およびその他の情報は、表１Ａ～Ｂ（上記）に記載されている。
【０１４２】
本発明者らは、異なるヘリカル繰り返し単位で水素結合ネットワークを並べ替えることによって、および骨格の接続性を並べ替えることによって、ヘテロ二量体セットを拡張できる範囲を調査した。それぞれの固有のネットワークに文字を割り当てると、ＤＨＤ３７＿ＸＢＢＡは、２番目、３番目、および４番目の繰り返し単位が水素結合ネットワークＢ、Ｂ、およびＡを持ち、第１の７つ組が排他的にコアに疎水性残基を持つバリアントを示し、ＤＨＤ１０３＿１：４２３は、１つの単量体がＤＨＤ１０３の第１のヘリックスで構成され、もう一方の単量体がヘリックス２～４で構成される、ヘテロ二量体を示すバリアントを示す（図７）。１４個中１３個の水素結合ネットワーク置換バリアントおよび１０個中９個の「３＋１」骨格置換ヘテロ二量体（５つの開始「２＋２」ヘテロ二量体から生成）は、ＳＥＣで単一のピークとして実行された。
【０１４３】
４４の設計について収集されたＳＡＸＳスペクトルは、設計モデルと一致していた（図１ｈ、図２ｆ－ｈ）。ＤＨＤ１３１、ＤＨＤ３７＿１：２３４、ＤＨＤ１２７、およびＤＨＤ１５のＸ線結晶構造には、０．９５～１．７Åの範囲の設計モデルに対して骨格Ｃα原子ＲＭＳＤを有した。ＤＨＤ１３１の広範な５残基の埋め込み水素結合ネットワーク（２つのセリン、アスパラギン、チロシン、およびトリプトファンを含む）は、結晶構造がほぼ同じであるが、相互作用を橋渡しする追加の水分子を有する（図２ａ）。ＤＨＤ３７＿１：２３４で設計された２つの水素結合ネットワークは、埋め込まれたヒスチジンとチロ

シンの芳香族側鎖が立体的に不利なホモ二量体を含んでおり、結晶構造と密接に一致している（図２ｂ）。ＤＨＤ１２７では、２つの水素結合ネットワークのヒスチジンが設計モデル（図２ｃ）とは異なる回転異性体を採用し、水分子と水素結合を形成する。ｐＨ７．０でのＤＨＤ１５の結晶構造は、設計モデル（図２ｄ）に似ているが、ｐＨ６．５での構造は、ドメインが交換されたヘテロ四量体コンフォメーションである。

【０１４４】

可撓性リンカーを介して２つの異なるヘテロ二量体からそれぞれ１つの単量体を融合し、各ペアの残りの２つの単量体を融合によって結合できるかどうかを試験することにより、３つの誘導二量体化システムを構築した（図３ａ）。いずれの場合も、Ｎｉ－ＮＴＡクロマトグラフィーによって同時精製された３つの構成要素（１つの単量体にはヘキサヒスチジンタグが付いている）。ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）および転写活性化ドメイン（ＡＤ）に融合した２つの異なるヘテロ二量体からの単量体を用いた酵母ツーハイブリッドアッセイ（Ｙ２Ｈ）では、別個のポリペプチド鎖としてのヘテロ二量体化融合の発現により、バックグラウンドよりもシグナルが大幅に増加した（図３ｂ）。

【０１４５】

本発明者らは、可撓性リンカーを介して３つのＤＨＤの単量体鎖「ａ」サブユニットを共有結合させ（図３Ｃ）、この「足場」と３つの別々の鎖「ｂ」単量体（１つはヘキサヒスチジンタグ付き）を大腸菌で共発現させた。足場と単量体の集合体は９５℃で安定しており、グアニジン変性中点は４Ｍである（図９）。

【０１４６】

幾何学的に一致する水素結合相互作用なしに埋め込むのにはエネルギー的にコストがかかる多くの極性基を持つ界面を生成することにより、本発明者らの設計プロトコルは暗黙的に非同族相互作用を嫌うものである（非同族相互作用を嫌う明示的なネガティブ設計は、非常に多くの可能なオフターゲット結合モードを考慮すると計算が困難である）。２４の設計では、ＹＨによってＤＢＤとＡＤに融合された２つのパートナーとの強い相互作用が観察されたが、どちらかのパートナーが両方のドメインに融合された場合は観察されなかった。設計されたヘテロ二量体は細胞内に形成されるが、ホモ二量体は形成されない（図４Ａ）。これらの設計のうち１２個の２４個の単量体は、全対全のＹ２Ｈ実験で交差した。相互作用はすべての同族ペアで観察され、５５２の可能な非同族相互作用のうち２７が観察された（図９）。直交性は８　ＤＨＤサブセットの方が高かった：２４０の可能な非同族相互作用のうち、４つだけが観察された（図４Ｂ；相互作用する極性残基は図１０に概略的に示されている）。融合していない単量体の共発現は、オフターゲット相互作用を排除した（図４Ｃ）。同族の相互作用は、非同族の相互作用よりも明らかに強力である。

【０１４７】

本発明者らの結果は、単一の繰り返し骨格から構築された直交ヘテロ二量体生体分子の非結合セットのドメインが核酸に限定されないことを示す。相互作用の特異性は、図２ａの結晶学的に確認された完全に接続されたＴＹＲ－ＳＥＲ－ＴＲＰ－ＡＳＮ－ＳＥＲ（配列番号３３３）などの広範な埋め込み水素結合ネットワーク、およびワトソン－クリックの塩基対特異性への立体効果の寄与に類似している設計された界面での残基のサイズの不均一性から生じる（図９ｄ－ｉ）。融合された単量体系（図３の誘導二量体化および足場）における特異性の保持、および同族相互作用競合実験（図４ｃ）によって示される相互作用強度階層とともに、直交相互作用の大規模なセットが、非限定的な実施例によって使用され、現在の核酸に基づく回路よりも速い応答時間、ならびに信号入力および出力とのより良好な統合を備えたタンパク質に基づく細胞制御回路を調製する。

【０１４８】

実施例１の方法

計算による設計

１．パラメトリックなヘリックス骨格の系統抽出

本発明者らは、Ｃｒｉｃｋコイルドコイルパラメータの一般化を使用して５、同じ軸の周

りにスーパーコイル状に巻かれたヘテロ二量体の４つのヘリックスすべてを個別にサンプリングした。スーパーコイルねじれ（ω０）ヘリックスねじれ（ω１）を結合し、ヘリックス感で一定に保持されたω０およびω１と共に、理想的な値を用いた２０。左巻スーパーコイルは、ω０＝－２．８５およびω１＝１０２．８５から生じ、スーパーコイルではない直線の束は、ω０＝０およびω１＝１００から生じた。ヘリックスのためのスーパーコイル位相（Δφ０）は、それぞれ、０°、９０°、１８０°および２７０°に固定した。第１のヘリックスのＺ軸に沿ったオフセット（Ｚオフセット）は、基準点として０に固定され、残りのヘリックスは、１．５１Åの工程サイズで－１．５１Å～１．５１Åまで独立してサンプリングされた。すべてのヘリックスで、１０Åの工程サイズで０°～９０°まで独立して、らせん位相（Δφ１）をサンプリングした。１８０°のΔφ０分離を伴うヘリックスのうちの２つは、５Å～８ÅのＺ軸（Ｒ）からの半径をサンプリングし、一方で、他の２つは、７Å～１０Åでサンプリングし、すべて１Åの工程サイズを有した。各ヘリックスは、５つの７つ組リピートに対応するために３５残基を持つように設定されている。半径サンプリングの重複領域から冗長な試料ポイントを削除した後、スーパーコイル状のヘリックス束には６０００万を超える固有の骨格が含まれ、直線のヘリックス束には２，７００万を超える固有の骨格が含まれていた。

【０１４９】

２．ＨＢＮｅｔ探索

パラメトリックに生成された骨格ごとに、ＨＢＮｅｔ（商標）２１　を用いて、４つのヘリックスすべてを接続し、水素結合に寄与する少なくとも４つの側鎖を含み、すべての重原子のドナーとアクセプターを有し、かつ分子間界面にまたがる水素結合ネットワークの中央の７つ組を探索した。ＨＢＮｅｔ（商標）検索の間、対称性は施行されていなかった。埋もれた界面位置については、非荷電極性アミノ酸のみが考慮された。タンパク質のコアと表面の境界にある残基については、すべての極性アミノ酸が考慮された。引き続きロゼッタ（商標）計算を実施して、新たに同定された水素結合ネットワークに置かれているＨＢＮｅｔ（商標）からの原子対の拘束を用いて、疎水性パッキングを最適化した。最後に、最小化工程と側鎖の再パッキング工程を、水素結合残基の原子ペア拘束なしで実行して、拘束がない場合にネットワークがどの程度損なわれていないかを評価した。下流の設計では、中央の７つ組に最大５つのアラニンがあり、満たされていない極性重原子が埋め込まれていない設計が選択された。

【０１５０】

３．７つ組スタッキングでＨＢＮｅｔｓ（商標）の組み合わせを生成する

この工程の目的は、少なくとも２つのＨＢＮｅｔｓ（商標）に対応できる５つの７つ組骨格（フル骨格）を同定することである。１つの７つ組骨格とフル骨格を別々に生成し、１つの７つ組骨格でＨＢＮｅｔｓ（商標）を検索し、それらをすべてのフル骨格にアラインさせる代わりに、本発明者らは、すべてのフル骨格で、中央の７つ組でＨＢＮｅｔｓ（商標）を単純に検索し、中央の７つ組を抽出し、それらをすべてのフル骨格にアラインさせるならば、７つ組スタッキング方法は依然として同じであると考えた。したがって、本発明者らは、ＨＢＮｅｔｓ（商標）を含む中央の７つ組を抽出し、鎖順序のすべてのバリアントを生成し、ＴＭａｌｉｇｎを使用して中央７つ組をフル骨格にペアワイズアラインメントした３０　。０．３未満の平均二乗偏差（ＲＭＳＤ）を伴うすべてのアライメントが同定され、少なくとも２つの中央の７つ組に対応できる完全な骨格が最終設計に選択された。

【０１５１】

４．パラメトリックなヘリックス骨格の接続

ヘリックス状の骨格は、短い２～５残基のループで接続されているため、各ループのＲＭＳＤは、ネイティブタンパク質の９残基のストレッチに対して０．４ＲＭＳＤ未満である。ヘリックス間の距離および方向性により、ループが接続できるものが制限され、そのため、終結点は、ヘリックスを最大３残基まで伸縮する。次に、本発明者らは、ＰＤＢからのすべての短いループを最初と最後の２つのヘリックス残基に重ね合わせた。最も低いｓ

ｔｕｂ－ＲＭＳＤを伴うループは、ロゼッタ（商標）スコア関数を使用して、ヘリックス状のエンドポイントに最小化され、ほぼ完全な終結を確実なものとした。ループの品質は、ＲＭＳＤでＰＤＢの最も近い９つのストレッチまでの距離を測定することによって評価される。最も低いＲＭＳＤを伴うループが解として返される。本発明者らは、この手順を繰り返してすべてのヘリックスを接続し、ＲＭＳＤが最も低い解を報告する。

【０１５２】

５．設計計算

骨格は、ロゼッタ（商標）のデカルト空間最小化を使用して正則化され、７つ組スタッキングによって導入されたねじりひずみを軽減した。水素結合ネットワーク残基を拘束しながら、二つの連続ロゼッタ（商標）パッキングラウンドは、疎水性パッキングを最適化するために、反発エネルギーに対して重量を増加させることにより、実施された。その後、ＦａｓｔＤｅｓｉｇｎ工程を一般的なモンテカルロムーバー内で使用して、タンパク質コアに最大８％のアラニン、３つのメチオニン、および３つのフェニルアラニンを許容しながら、二次構造の形状の相補性を最適化した。原子ペアの拘束なしでＨＢＮｅｔの動きを同定するための最小化と側鎖の再パッキングの最後の工程は、工程２で説明したものと同じである。

【０１５３】

６．設計の評価に使用される選択基準と指標

設計は、次の基準に基づいて選択された：結合時の極性表面積の変化（ｄＳＡＳＡ＿ｐｏｌａｒ）が８００Åを超える；二次構造の形状相補性（ｓｓ＿ｓｃ）スコアが０．６５より大きい；－１．４未満のＨＢＮｅｔの周りの穴のスコア；埋められた満たされていない重原子はない；単量体ごとに少なくとも１つのかさばる極性側鎖が埋め込まれている。次に、選択した設計を、疎水性側鎖の良好なパッキング、特にイソロイシン、ロイシン、およびバリンの交互嵌合について視覚的に検査した。ＯＤ２８０を記録することによりタンパク質濃度測定を支援するために、非干渉位置に表面チロシンを添加した。いくつかの設計の表面電荷残基は、理論上の等電点を緩衝液ｐＨからシフトするように再設計された。

【０１５４】

ＲＭＳＤ計算

結晶構造および対応する設計モデルは、すべての重原子を使用してＴＭａｌｉｇｎと重ね合わされた。このアラインメントから、ＲＭＳＤはすべてのアルファ炭素原子にわたって、また水素結合ネットワーク残基の重原子にわたって計算された。

【０１５５】

ロジスティック回帰

最初に、ロゼッタ（商標）の様々なフィルターを使用して設計にスコアを付け、フィルター値を報告した。実験結果およびロゼッタ（商標）フィルター値は、ロジスティック回帰法３１への入力として使用され、計算メトリックと実験的観測の間の相関関係を見出した。

【０１５６】

視覚化および図

図のすべての構造画像は、ＰｙＭＯＬ３２　を使用して生成された。

【０１５７】

緩衝液と培地の処方

ＴＢＭ－５０５２：１．２％［ｗｔ／ｖｏｌ］トリプトン、２．４％［ｗｔ／ｖｏｌ］酵母抽出物、０．５％［ｗｔ／ｖｏｌ］グリセロール、０．０５％［ｗｔ／ｖｏｌ］Ｄ－グルコース、０．２％［ｗｔ／ｖｏｌ］Ｄ－ラクトース、２５ｍＭ　Ｎａ２ＨＰＯ４、２５ｍＭ　ＫＨ２ＰＯ４、５０ｍＭ　ＮＨ４Ｃｌ、５ｍＭ　Ｎａ２ＳＯ４、２ｍＭ　ＭｇＳＯ４、１０μＭ　ＦｅＣｌ３、４μＭ　ＣａＣｌ２、２μＭ　ＭｎＣｌ２、２μＭ　ＺｎＳＯ４、４００ｎＭ　ＣｏＣｌ２、４００ｎＭ　ＮｉＣｌ２、４００ｎＭ　ＣｕＣｌ２、４００ｎＭ　Ｎａ２ＭｏＯ４、４００ｎＭ　Ｎａ２ＳｅＯ３、４００ｎＭ　Ｈ３ＢＯ３

溶解緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、室温

でｐＨ　８．０
洗浄緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３０ｍＭイミダゾール、室温でｐＨ　８．０
溶出緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール、室温でｐＨ　８．０
緩衝液Ｗ：１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび１ｍＭ　ＥＤＴＡ
緩衝液Ｅ：２．５ｍＭ　Ｄ－デスチオビオチンを含む緩衝液Ｗ
ＴＢＳ緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ　８．０、１００ｍＭ　ＮａＣｌ

【０１５８】

合成遺伝子の構築
ヘテロ二量体の発現のために、両方の単量体は、リボソーム結合配列　（ＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＣＡＴＣ；配列番号３２７）によって分離された同じプラスミドにコードされていた。合成遺伝子はＧｅｎｓｃｒｉｐｔ　Ｉｎｃ．（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，ＵＳＡ）から注文し、ＮｄｅＩ部位とＸｈｏＩ部位の間に挿入されたｐＥＴ２１－ＮＥＳＧ　Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターで提供された。ｐＥＴ２１－ＮＥＳＧ構築物については、ヘキサヒスチジンタグおよびタバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位（ＧＳＳＨＨＨＨＨＨＳＳＧＥＮＬＹＦＱＧＳ；配列番号３２８）を第２の単量体のＮ末端にインフレームで追加した。ベクター中のＣ末端ヘキサヒスチジンタグの発現を停止するために、２番目の単量体の３’末端に終止コドンを導入した。ストレプトタクチン樹脂で精製するために、ストレプトアビジンタグ（ＳＡＷＳＨＰＱＦＥＫＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＳＡＷＳＨＰＱＦＥＫＳＧＥＮＬＹＦＱＧＳ；配列番号３２９）コード配列を第１の単量体配列のフレーム５’にクローン化した。

【０１５９】

同じプラスミドからの３つおよび４つのタンパク質の共発現（誘導二量体化および合成足場設計）のために、合成遺伝子をｐＲＳＦＤｕｅｔ－１発現ベクターにクローン化した。第１の（３つのタンパク質の場合）または第１の２つ（４つのタンパク質の場合）の遺伝子は、ＮｃｏＩ部位とＨｉｎｄＩＩＩ部位の間にクローン化され、後者の場合、リボソーム結合部位が２つのタンパク質を分離した。最後の２つの遺伝子は、リボソーム結合部位によって分離されたＮｄｅＩ部位とＸｈｏＩ部位の間にクローン化された。ヘキサヒスチジンタグおよびＴＥＶプロテアーゼ切断部位コード配列は、最後の遺伝子のフレーム５’にクローン化された。

【０１６０】

酵母ツーハイブリッド（Ｙ２Ｈ）研究用の遺伝子は、ＧＡＬ４転写活性化ドメイン（ｐｏＡＤ）およびＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメイン（ｐｏＤＢＤ）を持つプラスミドにクローン化された。

【０１６１】

タンパク質発現
プラスミドは、タンパク質発現のために、化学的にコンピテントなＥ．ｃｏｌｉ　発現株ＢＬ２１（ＤＥ３）Ｓｔａｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）またはＬｅｍｏ２１（商標）（ＤＥ３）（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）に形質転換された。形質転換および一晩増殖させた後、寒天プレートから単一コロニーを選び、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリン（ｐＥＴ２１－ＮＥＳＧベクター用）またはカナマイシン（ｐＲＳＦＤｕｅｔ－１ベクター用）を含むルリア－ベルターニ（Ｌｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ）（ＬＢ）培地で５ｍｌの開始培養物を、２２５ｒｐｍで１８時間３７℃で振とうしながら、３７℃で増殖させた。開始培養物を、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンまたはカナマイシンを含む５００ｍｌのＴＢＭ－５０５２に希釈し、２２５ｒｐｍで２４時間３７℃で振とうしながらインキュベートした。

【０１６２】

$^{13}C^{15}N$－または^{15}N－標識されたタンパク質の発現のために、プラスミドを、Ｌ

ｅｍｏ２１（商標）（ＤＥ３）Ｅ．ｃｏｌｉ発現株に形質転換し、５０μｇ／ｍｌのカルベニシリンを含有するＭ９／グルコースプレートにプレーティングした。開始培養物のために、単一コロニーを使用して、２５０ｍＬバッフルフラスコ内で５０μｇ／ｍＬカルベニシリンを含む５０ｍＬのＬＢ培地に接種し、２２５ｒｐｍで１８時間３７℃で振とうしながらインキュベートした。次に、１０ｍＬの開始培養物を、２５ｍＭのＮａ２ＨＰＯ４、２５ｍＭのＫＨ２ＰＯ４、５０ｍＭのＮＨ４Ｃｌ、５ｍＭのＮａ２ＳＯ４、および１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを含む５００ｍＬのＴｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ（商標）（Ｄｉｆｃｏ）を含む２Ｌのバッフルフラスコに移した。培養物を３７℃で約１．０のＯＤ６００まで増殖させ、次に、５０００ｒｃｆで１５分間遠心分離して、細胞をペレット化した。Ｔｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ（商標）培地を除去し、細胞を３０ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で簡単に洗浄した。次に、細胞を、５００ｍＬの標識培地（２５ｍＭ　Ｎａ２ＨＰＯ４、２５ｍＭ　ＫＨ２ＰＯ４、５０ｍＭ　１５ＮＨ４Ｃｌ、５ｍＭ　Ｎａ２ＳＯ４、０．２％（ｗ／ｖ）１３　Ｃグルコース）、および１００μｇ／ｍＬカルベニシリンを含む新しい２Ｌバッフルフラスコに移した。ＩＰＴＧ（Ｃａｒｂｏｓｙｎｔｈ）を１ｍＭまで添加し、温度を１８℃に下げる前に、細胞を３７℃で２時間増殖させた。標識されたグルコースとＮＨ４ＣｌはＣａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｉｓｏｔｏｐｅｓから入手した。

【０１６３】

アフィニティー精製

細胞を５０００ｒｃｆ、４℃で１５分間遠心分離して回収し、２０ｍｌの溶解緩衝液に再懸濁した。リゾチーム、ＤＮＡｓｅ、およびＥＤＴＡ不含カクテルプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）を、再懸濁した細胞ペレットに添加し、その後、７０％の電力で５分間超音波処理した。固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）の場合、溶解物を４℃、１８，０００ｒｐｍで少なくとも３０分間遠心分離して清澄化し、溶解緩衝液で事前に平衡化したＮｉ－ＮＴＡ（Ｑｉａｇｅｎ）カラムにアプライした。カラムを５カラム容量（ＣＶ）の洗浄緩衝液で２回洗浄した後、５ＣＶの溶出緩衝液で洗浄した。Ｓｔｒｅｐタグの精製では、ＩＭＡＣからの溶出画分を、緩衝液Ｗで事前に平衡化したＳｔｒｅｐ－Ｔａｃｔｉｎ（登録商標）Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ樹脂（ＩＢＡ）にアプライした。カラムを５ＣＶの緩衝液Ｗで洗浄し、その後、３ＣＶの緩衝液Ｅをアプライして、カラムからタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質の質量と純度は、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＴＳＱ　Ｑｕａｎｔｕｍ　Ａｃｃｅｓｓ質量分析計でエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）を使用して確認した。

【０１６４】

サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）

Ｎ末端ヘキサヒスチジンタグおよびストレプトアビジンタグを、１００ｍｇのタンパク質に対して１ｍｇのＴＥＶの比率で、室温で一晩、ＴＥＶプロテアーゼで切断した。ＴＥＶを添加する前に、緩衝液を溶解緩衝液に交換した。ＴＥＶ切断後、試料を追加のＮｉ－ＮＴＡカラムに通し、１．５ＣＶの溶解緩衝液で洗浄し、フロースルーを収集し、ＴＢＳ緩衝液中のＳｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５　１０／３００増加カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してＳＥＣでさらに精製した。

【０１６５】

円二色性（ＣＤ）測定

ＣＤ波長スキャン（２６０～１９５ｎｍ）および温度溶融（２５～９５℃）は、ＡＶＩＶモデル４２０ＣＤ分光計を使用して実行された。温度溶融は、４℃／分の加熱速度で実行され、２２２ｎｍでの楕円率の変化によって監視された。タンパク質試料は、０．１ｃｍキュベット内のＰＢＳ、ｐＨ７．４で０．２５ｍｇ／ｍＬに希釈された。塩化グアニジニウム（ＧｄｍＣｌ）滴定は、自動滴定装置を備えた同じ分光計で、２５℃のＰＢＳ、ｐＨ７．４で、タンパク質濃度０．０２５ｍｇ／ｍＬを撹拌棒付き１ｃｍキュベットで行った。各滴定は、少なくとも４０の均一に分布したＧｄｍＣｌ濃度ポイントで構成され、各工程の混合時間は１分だった。滴定溶液は、ＰＢＳ＋ＧｄｍＣｌ中の同じ濃度のタンパク質

からなった。

【０１６６】

タンパク質試料の結晶化

精製タンパク質試料は、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０および１５０ｍＭ　ＮａＣｌで約２０ｍｇ／ｍｌに濃縮された。試料は以下の結晶化スクリーニングを利用して、アクティブ湿度チャンバーおよび５ポジションデッキＭｏｓｑｕｉｔｏ（商標）結晶（ｔｔｐｌａｂｔｅｃｈ）でスクリーニングした：ＪＣＳＧ＋（商標）（Ｑｉａｇｅｎ）、Ｃｒｙｓｔａｌ　Ｓｃｒｅｅｎ（商標）（Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）、ＰＥＧ／Ｉｏｎ（商標）（Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）、ＰＥＧＲｘＨＴ（商標）（Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）、Ｉｎｄｅｘ（商標）（Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）、およびＭｏｒｐｈｅｕｓ（商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎｓ）。様々な設計の結晶化に最適な条件は、次のとおりである：ＯＰＨＤ＿３７＿Ｎ３Ｃ１、０．１５Ｍの臭化カリウム、および３０％ｗ／ｖのポリエチレングリコールモノメチルエーテル２０００；ＯＰＨＤ＿１２７、０．１２Ｍのエチレングリコール、０．１Ｍの緩衝液システム３、ｐＨ　８．５、および５０％ｖ／ｖの沈殿物ミックス１（Ｍｏｒｐｈｅｕｓスクリーンから）；ＯＰＨＤ＿１５、０．２Ｍの硫酸アンモニウム、０．１ＭのＢＩＳ－ＴＲＩＳ　ｐＨ６．５、１８％ｖ／ｖのポリエチレングリコール４００；ＯＰＨＤ＿１５、０．１ＭのイミダゾールｐＨ７．０、および２５％ｖ／ｖのポリエチレングリコールモノメチルエーテル５５０；ＯＰＨＤ＿１３１、０．２Ｍの酢酸アンモニウム、０．１ＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、２５％ｗ／ｖのポリエチレングリコール３，３５０。結晶は、タンパク質溶液とリザーバー溶液の１：１、２：１、および１：２混合物からなる液滴を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法によって、１～１４日後に得られた。

【０１６７】

Ｘ線データ収集および構造決定

設計したタンパク質の結晶をループ化し、凍結防止剤が含まれていない場合は２０％（ｖ／ｖ）グリセロールを含有する対応するリザーバー溶液に加え、液体窒素で瞬間冷凍した。Ｘ線データセットは、ローレンスバークレー国立研究所のＡｄｖａｎｃｅｄ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｏｕｒｃｅでビームライン８．２．１および８．２．２によって取得された。データセットは、ＸＤＳ［33］またはＨＫＬ２０００［34］のいずれかを使用してインデックス付けおよびスケーリングされた。初期モデルは、初期検索モデルとして設計モデルを使用する、Ｐｈｅｎｉｘ（商標）ソフトウェアスイート[36]内でプログラムＰＨＡＳＥＲ[35]を使用した分子置換法により、生成された。Ｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅ（商標）[37]を使用したシミュレーション付きアニーリングによる改良により、あるいは、分解能が十分であった場合には、Ｐｈｅｎｉｘ．ａｕｔｏｂｕｉｌｄ（商標）[38]をインプレース再構築をｆａｌｓｅに設定し、シミュレーション付きアニーリングおよびプライムアンドスイッチフェージングを使用して、モデルの偏重を減らすための努力がなされた。ＣＯＯＴでの手動構築の反復ラウンド[39]およびＰｈｅｎｉｘ（商標）の改良を使用して、最終モデルを作成した。コイルドコイル様タンパク質には高度な自己相似性が継承されているため、Ｐｈｅｎｉｘ．Ｘｔｒｉａｇｅ（商標）の報告によると、報告された構造のデータセットは、高度な疑似並進非結晶学的対称性に悩まされ、これは、構造改良を複雑なものとし、報告された予想よりも高いＲ値を説明し得る。理想的な幾何学からの結合距離、角度および二面角のＲＭＳＤは、Ｐｈｅｎｉｘ（商標）[36]を用いて計算した。すべての最終モデルの全体的な品質は、ＭＯＬＰＲＯＢＩＴＹ（商標）[40]用いて評価した。

【０１６８】

小角Ｘ線散乱（ＳＡＸＳ）

試料は、２５ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、１５０ｍＭのＮａＣｌおよび２％のグリセロール中のＳＥＣによって精製された。カラムの空隙容量に先行する画分を、緩衝液減算のブランクとして使用した。散乱測定は、高度な光源でＳＩＢＹＬＳ（商標）１２．３．１ビームラインで行った。Ｘ線波長（λ）は１．２７Åであり、試料から検出器までの距離は１．５ｍであり、０．０１～０．３Å^{-1}の散乱ベクトルｑ（$q = 4\pi \sin\theta / \lambda$

、２θは散乱角）の範囲に対応する。各ウェルについて、１秒未満の等しい時間区分で一連の露光を行った。０．３秒の露光を１０秒間行い、試料あたり３２フレームとなった。各試料について、濃度依存効果を試験するために２つの異なる濃度のデータが収集された。「低」濃度試料は、２～３ｍｇ／ｍＬの範囲であり、「高」濃度試料は、５～７ｍｇ／ｍＬの範囲だった。データはＳＡＸＳ　ＦｒａｍｅＳｌｉｃｅ（商標）オンライン使用して処理し、ＳｃÅｔｔｅｒ（商標）ソフトウェアパッケージ４１，４２を用いて分析した。ＦｏＸＳ（商標）４３，４４を用いて、設計モデルを実験的な散乱プロファイルと比較し、適合品質（χ）値を計算した。

【０１６９】

酵母ツーハイブリッドアッセイ

試験した結合剤の各ペアについて、酵母株ＰＪ６９－４ａ（ＭＡＴａ　ｔｒｐ１－９０１　ｌｅｕ２－３、１１２　ｕｒａ３－５２　ｈｉｓ３－２００　ｇａｌ４（削除）ｇａｌ８０（削除）ＬＹＳ２：：ＧＡＬ１－ＨＩＳ３　ＧＡＬ２－ＡＤＥ２　ｍｅｔ２：：ＧＡＬ７－ｌａｃＺ）の化学的にコンピテントな細胞は、ＬｉＡｃ／ＳＳキャリアＤＮＡ／ＰＥＧ法４５を使用して、ＤＮＡ結合ドメインまたは活性化ドメインを含むプラスミドの適切なペアを用いて、形質転換された。誘導された二量体化の場合、ヘテロ二量体化因子は、ｐ２ａおよび核局在化配列（ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰＧＤＫＡＥＬＩＰＥＰＰＫＫＫＲＫＶＥＬＧＴＡ；配列番号３３０）によって分離された「単量体タンパク質」の１つの下流にクローン化された。ｐ２ａ配列は、翻訳切断を確実にして、ヘテロ二量体を「単量体タンパク質」とは別のタンパク質にする。形質転換された酵母細胞の選択は、トリプトファンおよびロイシンを欠く合成ドロップアウト（ＳＤＯ）培地で、３０℃で１０００ｒｐｍで振とうしながら４８時間行った。得られた培養物を、１：１００に希釈し、トリプトファンおよびロイシンを欠く新鮮なＳＤＯ培地で１６時間増殖させ、その後、９６ウェルプレートに移し、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジンを欠く１００ｍＭの３－アミノ－１，２，４－トリアゾール（３－ＡＴ）（誘導された二量体化の場合は５ｍＭの３－ＡＴ）を含むＳＤＯ培地で１：１００に希釈した。培養物を、１０００ｒｐｍ、３０℃で振とうしながらインキュベートした。ヒスチジンを欠く培地での酵母細胞の増殖には、ＤＮＡ結合ドメインと転写活性化ドメインを近接させる必要があるため、２つのタンパク質の結合は、酵母細胞の増殖によって示された４６，４７。酵母細胞の光学密度を４８時間後に記録した。寒天プレートでのＹ２Ｈアッセイでは、１：１００に希釈した一晩の培養物を、９６　Ｓｏｌｉｄ　Ｐｉｎ　Ｍｕｌｔｉ－Ｂｌｏｔ　Ｒｅｐｌｉｃａｔｏｒ（Ｖ＆Ｐ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、Ｎｕｎｃ（商標）ＯｍｎｉＴｒａｙ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）に移した。寒天は、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジンを欠き、１００ｍＭの３－ＡＴを含む。コロニーの大きさを監視するために、プレートを5日目まで毎日画像化した。画像は、ＩｍａｇｅＪのＣｏｌｏｎｙ　Ａｒｅａ　４８パッケージにより分析された。

【０１７０】

実施例１の参照

１．Ｊｏｎｅｓ，Ｓ．＆Ｔｈｏｒｎｔｏｎ，Ｊ．Ｍ．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ－ｐｒｏｔｅｉｎ　ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９３，１３－２０（１９９６）．

２．Ｈａｒｂｕｒｙ，Ｐ．Ｂ．，Ｚｈａｎｇ，Ｔ．，Ｋｉｍ，Ｐ．Ｓ．＆Ａｌｂｅｒ，Ｔ．Ａ　ｓｗｉｔｃｈ　ｂｅｔｗｅｅｎ　ｔｗｏ－，ｔｈｒｅｅ－，ａｎｄ　ｆｏｕｒ－ｓｔｒａｎｄｅｄ　ｃｏｉｌｅｄ　ｃｏｉｌｓ　ｉｎ　ＧＣＮ４　ｌｅｕｃｉｎｅ　ｚｉｐｐｅｒ　ｍｕｔａｎｔｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６２，１４０１－１４０７　（１９９３）．

３．Ｄｉｓｓ，Ｍ．Ｌ．＆Ｋｅｎｎａｎ，Ａ．Ｊ．Ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ　ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ　ｉｎ　ｄｉｍｅｒｉｃ　ｃｏｉｌｅｄ　ｃｏｉｌｓ　ｖｉａ　ｂｕｒｉｅｄ　ｐｏｌａｒ－ｇｒｏｕｐ　ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．　１３０，１３２１－１３２７　（２００８）．

４．Ｔｈｏｍａｓ，Ｆ．，Ｂｏｙｌｅ，Ａ．Ｌ．，Ｂｕｒｔｏｎ，Ａ．Ｊ．＆Ｗｏｏｌｆ

son, D. N. A set of de novo designed parallel heterodimeric coiled coils with quantified dissociation constants in the micromolar to sub-nanomolar regime. J. Am. Chem. Soc. 135, 5161-5166 (2013).
5. Crick, F. H. C. The Fourier transform of a coiled-coil. Acta Cryst (1953). Q6, 685-689 [doi:10.1107/S0365110X53001952] 6, 1-5 (1953).
6. Zarrinpar, A., Park, S.-H. & Lim, W. A. Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection. Nature 426, 676-680 (2003).
7. Aakre, C. D. et al. Evolving new protein-protein interaction specificity through promiscuous intermediates. Cell 163, 594-606 (2015).
8. Joachimiak, L. A., Kortemme, T., Stoddard, B. L. & Baker, D. Computational design of a new hydrogen bond network and at least a 300-fold specificity switch at a protein-protein interface. J. Mol. Biol. 361, 195-208 (2006).
9. Skerker, J. M. et al. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. Cell 133, 1043-1054 (2008).
10. Crooks, R. O., Baxter, D., Panek, A. S., Lubben, A. T. & Mason, J. M. Deriving Heterospecific Self-Assembling Protein-Protein Interactions Using a Computational Interactome Screen. J. Mol. Biol. 428, 385-398 (2016).
11. Gradisar, H. & Jerala, R. De novo design of orthogonal peptide pairs forming parallel coiled-coil heterodimers. J. Pept. Sci. 17, 100-106 (2011).
12. Thompson, K. E., Bashor, C. J., Lim, W. A. & Keating, A. E. SYNZIP protein interaction toolbox: in vitro and in vivo specifications of heterospecific coiled-coil interaction domains. ACS Synth. Biol. 1, 118-129 (2012).
13. Reinke, A. W., Grant, R. A. & Keating, A. E. A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. J. Am. Chem. Soc. 132, 6025-6031 (2010).
14. Acharya, A., Rishi, V. & Vinson, C. Stability of 100 homo and heterotypic coiled-coil a-a' pairs for ten amino acids (A, L, I, V, N, K, S, T, E, and R). Biochemistry 45, 11324-11332 (2006).

15. Grigoryan, G. & Keating, A. E. Structure-based prediction of bZIP partnering specificity. J. Mol. Biol. 355, 1125-1142 (2006).
16. Gonzalez, L., Jr, Woolfson, D. N. & Alber, T. Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. Nat. Struct. Biol. 3, 1011-1018 (1996).
17. Lumb, K. J. & Kim, P. S. A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil. Biochemistry 34, 8642-8648 (1995).
18. Tatko, C. D., Nanda, V., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. Polar Networks Control Oligomeric Assembly in Membranes. J. Am. Chem. Soc. 128, 4170-4171 (2006).
19. Grigoryan, G. & DeGrado, W. F. Probing Designability via a Generalized Model of Helical Bundle Geometry. J. Mol. Biol. 405, 1079-1100 (2011).
20. Huang, P.-S. et al. High thermodynamic stability of parametrically designed helical bundles. Science 346, 481-485 (2014).
21. Boyken, S. E. et al. De novo design of protein homo-oligomers with modular hydrogen-bond network-mediated specificity. Science 352, 680-687 (2016).
22. Leaver-Fay, A. et al. ROSETTA™3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. Methods Enzymol. 487, 545-574 (2011).
23. Ruotolo, B. T. & Robinson, C. V. Aspects of native proteins are retained in vacuum. Curr. Opin. Chem. Biol. 10, 402-408 (2006).
24. Sahasrabuddhe, A. et al. Confirmation of intersubunit connectivity and topology of designed protein complexes by native MS. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 1268-1273 (2018).
25. Zhou, M., Huang, C. & Wysocki, V. H. Surface-induced dissociation of ion mobility-separated noncovalent complexes in a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. Anal. Chem. 84, 6016-6023 (2012).
26. Zhou, M. & Wysocki, V. H. Surface induced dissociation: dissecting noncovalent protein complexes in the gas phase. Acc. Chem. Res. 47, 1010-1018 (2014).
27. Anderson, G. P., Shriver-Lake, L. C., Liu, J. L. & Goldman, E. R. Orthogonal Synthetic Zippers as Protein Scaffolds. ACS Omega 3, 48

10-4815(2018).
28.Rothemund,P.W.K.Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.Nature 440,297-302(2006).
29.Qian,L.&Winfree,E.Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades.Science 332,1196-1201(2011).
30.Zhang,Y.&Skolnick,J.TM-align:a protein structure alignment algorithm based on the TM-score.Nucleic Acids Res.33,2302-2309(2005).
31.Rocklin,G.J.et al.Global analysis of protein folding using massively parallel design,synthesis,and testing.Science 357,168-175(2017).
32.Schrodinger,LLC.The PyMOL Molecular Graphics System,Version 1.8.(2015).
33.Kabsch,W.XDS.Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66,125-132(2010).
34.Otwinowski,Z.&Minor,W.Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.Methods Enzymol.276,307-326(1997).
35.McCoy,A.J.et al.Phaser crystallographic software.J.Appl.Crystallogr.40,658-674(2007).
36.Adams,P.D.et al.PHENIX:a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66,213-221(2010).
37.Afonine,P.V.et al.Joint X-ray and neutron refinement with phenix.refine.Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66,1153-1163(2010).
38.Terwilliger,T.C.et al.Iterative model building,structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard.Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.64,61-69(2008).
39.Emsley,P.&Cowtan,K.Coot:model-building tools for molecular graphics.Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.60,2126-2132(2004).
40.Davis,I.W.et al.MolProbity:all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids.Nucleic Acids Res.35,W375-83(2007).
41.Dyer,K.N.et al.High-throughput SAXS for the characterization of biomolecules

in solution:a practical approach.Methods Mol.Biol.1091,245-258(2014).
42.Rambo,R.P.&Tainer,J.A.Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law.Biopolymers 95,559-571(2011).
43.Schneidman-Duhovny,D.,Hammel,M.&Sali,A.FoXS:a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles.Nucleic Acids Res.38,W540-4(2010).
44.Schneidman-Duhovny,D.,Hammel,M.,Tainer,J.A.&Sali,A.Accurate SAXS profile computation and its assessment by contrast variation experiments.Biophys.J.105,962-974(2013).
45.Schiestl,R.H.&Gietz,R.D.High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.Curr.Genet.16,339-346(1989).
46.Chien,C.T.,Bartel,P.L.,Sternglanz,R.&Fields,S.The two-hybrid system:a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88,9578-9582(1991).
47.Bartel,P.L.,Roecklein,J.A.,SenGupta,D.&Fields,S.A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7.Nat.Genet.12,72-77(1996).
48.Guzman,C.,Bagga,M.,Kaur,A.,Westermarck,J.&Abankwa,D.ColonyArea:an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays.PLoS One 9,e92444(2014).
49.Dyachenko,A.et al.Tandem Native Mass-Spectrometry on Antibody-Drug Conjugates and Submillion Da Antibody-Antigen Protein Assemblies on an Orbitrap EMR Equipped with a High-Mass Quadrupole Mass Selector.Anal.Chem.87,6095-6102(2015).
50.Waitt,G.M.,Xu,R.,Wisely,G.B.&Williams,J.D.Automated in-line gel filtration for native state mass spectrometry.J.Am.Soc.Mass Spectrom.19,239-245(2008).
51.Marty,M.T.et al.Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra:from binary interactions to polydisperse ensembles.Anal.Chem.87,4370-4376(2015).
52.Bern,M.et al.Parsimonious Charge Deco

ｎｖｏｌｕｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｎａｔｉｖｅ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ．Ｊ．Ｐｒｏｔｅｏｍｅ Ｒｅｓ．１７，１２１６－１２２６（２０１８）．
５３．Ｊｏｎｅｓ，Ｄ．Ｔ．Ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｐｏｓｉｔｉｏｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｓｃｏｒｉｎｇ ｍａｔｒｉｃｅｓ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９２，１９５－２０２（１９９９）．

【０１７１】

実施例２．モジュール式タンパク質論理ゲートを設計するための直交タンパク質ヘテロ二量体

要約：転写後レベルでタンパク質機能を調節するためのモジュール性タンパク質論理のデノボ（ｄｅ ｎｏｖｏ）設計は、計算によるタンパク質設計の課題であり、合成生物学で幅広い用途を持つ可能性がある。ここで、本発明者らは、インビトロおよび生細胞で分割酵素から転写機構に至るまでの任意のタンパク質ユニットの結合を調節するデノボ設計タンパク質から構築された２入力ＡＮＤ、ＯＲ、ＮＡＮＤ、ＮＯＲ、ＸＮＯＲおよびＮＯＴ論理ゲートの設計を説明する。結合相互作用の協調性により、ゲートは入力の化学量論的不均衡にほとんど影響を受けなくなり、アプローチのモジュール性により、３入力ＯＲ、ＡＮＤ、および分離標準形ゲートへの拡張が容易になる。制御要素のモジュール性と協調性は、本質的に無制限の数のタンパク質構成要素を新たに設計する能力と相まって、幅広い生物学的機能にわたる洗練された翻訳後制御論理の設計を可能にするはずだ。

【０１７２】

前書き

任意のタンパク質－タンパク質相互作用のモジュール性制御を備えたタンパク質に基づく論理ゲートを新規に設計する能力は、新しい生体直交機能の調整可能な設計への扉を開く可能性がある。

【０１７３】

原則として、直交するヘテロ二量体分子のセットを使用して、広範囲の論理ゲートを新規に設計することが可能であるはずである。例えば、仮説上のヘテロ二量体ペアＡ：Ａ’、Ｂ：Ｂ’、およびＣ：Ｃ’が与えられた場合、ＡとＣ’の関連付けを変調するＡＮＤゲートは、Ａ’とＢ、およびＢ’とＣを遺伝的に融合することによって構築でき、関連付けは、Ａ’－ＢとＢ’－Ｃの両方が存在する場合にのみ発生する（ここで、および以下の、「：」は、非共有性の相互作用を示し、「－」は、可撓性リンカーを介した遺伝子融合を示す）。このような連想的な論理ゲートを構築するには、いくつかのビルディングブロック特性が望ましい。第１に、ゲートの複雑さが個々の要素の数によって制限されないように、相互に直交するヘテロ二量体のペアが多数存在する必要がある。第２に、ビルディングブロックは、モジュール式で構造が類似している必要があり、これにより、ゲートを構築するときに、ビルディングブロックの形状やその他の特性の違いを考慮する必要がなくなる。第３に、単一のビルディングブロックは、異なる調整可能な親和性を持つ複数のパートナーに結合できる必要があり、これにより、既存の親和性の低い相互作用を中断することで、入力が否定操作を実行できるようになる。第４に、相互作用は協調的である必要があるため、ゲートの活化は入力の化学量論的不均衡に敏感ではない。上記のＡＮＤゲートでは、例えば、相互作用が協調的でない場合、Ａ’－Ｂが大過剰になると、平衡が部分的に組み立てられた複合体（Ａ’－ＢとＡまたはＢ’－Ｃのいずれかであるが両方ではない）の方向へ引っ張られ、これにより、ゲートの活性化が中断される。

【０１７４】

ここで、本発明者らは、水素結合ネットワークを介した特異性を備えたデノボ設計されたタンパク質ヘテロ二量体を使用して、上記の４つの基準すべてを満たす論理ゲートを設計する可能性を検討した。（３４）。６個（インビボ）と１５個（インビトロ）の相互に直交する設計のヘテロ二量体（ＤＨＤ、以下番号で称し、例えば１と１’）のセットは、水素結合ネットワーク（例えば、図１１Ａの挿入図を参照）を介した特異性を備えた１つの同族ペアを形成し、条件１（直交性）を満たす、論理ゲート構築に使用できる。ヘテロ二

量体界面はすべて同じ４つのヘリックス束トポロジー（図１１Ａ）を共有し、条件２（モジュール性）を満たす。共有された相互作用界面は、ペア間の限られた量のクロストークを可能にし、条件３（複数の結合特異性）を満たす、結合アフィニティーの階層につながる。自然界の協調的に活性化可能なシステムから着想を得て（３５、３６）、本発明者らは、（ＡおよびＣ’との）相互作用表面が融合内に埋め込まれるように単量体融合（上記の実施例ではＡ’－ＢおよびＢ’－Ｃ）を構築することにより、条件４（協調性）を達成しようとした。これらの埋もれた界面を露出するために必要な自由エネルギーはゲートの活性化に対抗するので、本発明者らは、両方の相互作用によって提供される結合エネルギーのみがこの障壁を克服するのに十分であり、したがって協調的なゲートの活性化を保証するようにシステムを調整できると考えた（図１１Ｂ）。条件２（モジュール性）が成り立つ場合、協調性を確保するための単一のスキームは、原則として、広範囲のゲート構成で機能する可能性がある。

【０１７５】

協調性の設計

協調ビルディングブロックの設計を開発するために、本発明者らは、単純なシステムＡ＋Ａ’－Ｂ＋Ｂ’に焦点を当てた（以下では、これを誘導二量体化、ＡとＢ’を単量体、Ａ’－Ｂを二量体と称する）。結合が協調的でない場合、Ａ’－ＢがＡおよびＢ’に対して化学量論的に過剰である場合、三量体複合体の量は減少する：いずれかの単量体に結合するリンカータンパク質の中間二量体種の形成は、三量体複合体の形成と競合する。逆に、結合が協調的であり、それ故に、一方の単量体への結合が他方の不在下で起こらない場合、形成される三量体複合体の量は、過剰の二量体に対して非感受性となる。そのような誘導二量体化システムの化学量論的応答に対する結合協同性の効果の単純な熱力学的モデル（図１１Ｂ、補足材料モデリングセクション）は、結合協同性が減少するにつれて、高い二量体濃度で、完全な三量体複合体の最終濃度の対応する減少があることを示す（図１１Ｃ）。

【０１７６】

比較的疎水性の相互作用表面が折り畳まれた構造内に隔離される可能性が高いため、本発明者らは、Ａ’－Ｂ二量体の状態のような折り畳まれた４つのヘリックス束がＡまたはＢ’への結合に拮抗する可能性があると仮定した（図１４Ａ）。本発明者らは、モデルシステムとしてヘテロ二量体１：１’および２：２’を使用して、Ａ’とＢを接続する様々な可撓性リンカーの長さを試験した。すべての設計は、１３ｋｃａｌ／ｍｏｌを超える展開自由エネルギーを伴い、円形二色性（ＣＤ）グアニジン塩酸塩（ＧｄｎＨＣｌ）変性実験で折りたたまれ、安定していることが分かった（図１１Ｄ、表１０）。０および２残基の短いリンカー、または非常に長い２４残基のリンカーを備えた１’－２’二量体構築物は、単量体として精製できたが（図１４Ｂ）、それらは凝集しがちであった。対照的に、６および１２残基のリンカーを使用した設計は、大部分が単量体のままだった（データは示していない）。小角Ｘ線散乱（ＳＡＸＳ）実験（３７）は、それらの流体力学的半径が折り畳まれた４ヘリックス束ＤＨＤの流体力学的半径に近いことを示している（図１１Ｅ）。この長さの範囲のリンカーにより、２つの単量体（１’と２’）が互いに折り返されることが可能となり、その結果、主に疎水性の相互作用表面が互いに埋もれるようになる。このような構造は、自由エネルギーコストΔＧオープンを伴って、１’－２’が１または２と相互作用するために部分的に展開される必要があり、（図１１Ｂ）、その大きさは、ゲートの協調性の程度を決定する。本発明者らは、以下のすべての実験では、６残基または１２残基のリンカー長を選択した。

【０１７７】

本発明者らは、ネイティブ質量分析法を使用して、インビトロで誘導二量体化システムの協同性を研究した（図１１Ｆ）。１、２および１’－２’はＥ．ｃｏｌｉで別々に発現され、精製された。本発明者らは、最初に、１が２から１’－２’への結合を活性化する程度を測定した。２および１’－２’のそれぞれ１０μＭでは、１’－２’と複合体を形成した２の割合は、２０μＭ１を添加すると３％から１００％に増加した（データは示していない）。割合は、天然に存在するアロステリック系に匹敵して増加する（３５）。この結合の活

性化が化学量論的不均衡に対する結合の感度にどのように影響するかを評価するために、１０μＭの１と２を１’－２’の濃度を上げながら滴定し（図１１Ｆ）、形成された種をｎＭＳで測定した。ヘテロ三量体１：１’－２’：２複合体は、広範囲の１’－２’濃度で観察された（データは示していない）。１’－２’が６倍過剰な場合でさえ、形成される１：１’－２’：２の量は減少せず、１：１’－２’または１’－２’：２のいずれの料の減少も観察されなかった（データは示されていない）。本発明者らは、他の単量体の存在下と不在下での親和性の比率として協調性を定義し、これは、我々のモデルでは、二量体の開放の自由エネルギーに直接関係している（Ｃ＝ｅΔＧオープン／ＲＴ補足資料を参照されたい）。熱力学モデルをネイティブＭＳデータ（データは表示されていない）と照合すると、９９１，０００の推定ｃ値が生成され、これは、７ｋｃａｌ／ｍｏｌのΔＧオープンに対応する。これは、測定された１’－２’の展開自由エネルギーの約半分であり、結合が二量体の４つのヘリックス束状態の完全な展開を必要としなくてもよいことを示唆している。

【０１７８】

リンカーユニットが協調的結合を示すことから、本発明者らは、構成要素の１つの化学量論的過剰への依存性の欠如は、より複雑なゲートにまで及ぶはずであると考えた。ｎＭＳを使用して、本発明者らは、２つの入力１’－３’と３－２’、および２つの入力によって結合された単量体１と２から構築された２入力ＡＮＤゲートの協調性を調査した（図１１Ｇ）。２つの入力の濃度が増加すると、ヘテロ四量体複合体の量は２：１の化学量論で頭打ちとになり、その後、６：１のモル比まで一定のままだった。部分的な複合体（ヘテロ三量体およびヘテロ二量体）はほとんど観察されず、高い協同性をさらに示している（データは示していない）。本発明者らは、１’－４’、４－３’、および３－２’から３入力ＡＮＤゲートを構築した。これらは一緒になって、１と２の関連付けを制御するはずである（図１１Ｈ）。２入力ＡＮＤゲートと同様に、完全な５量体複合体の量は、化学量論的濃度を超える入力でわずかに減少しただけで、検出可能な競合する４量体複合体は伴わなかった（データは示していない）。

【０１７９】

モジュール性論理ゲート構築

本発明者らは、ＤＨＤのモジュール式の組み合わせを探索して、様々な２入力の協調的に誘導可能なタンパク質ヘテロ二量体（ＣＩＰＨＲ）論理ゲートを生成した。個々のＤＨＤからの単量体は、遺伝子融合を介して目的のエフェクタータンパク質に連結され、その共局在化または解離は入力に依存している。以前に測定された全対全の特異性マトリックスを利用して（３４）、相互作用の２つのモード：設計されたタンパク質ペア間の同族結合、または多重特異性相互作用を含む競合的結合、が探索された。エフェクタータンパク質の選択は、入力タンパク質から独立しており、多様な機能的出力を可能にする（図１２Ａ）。

【０１８０】

本発明者らは、酵母ツーハイブリッド（Ｙ２Ｈ）アッセイの変形を使用して、前述の酵母フォーハイブリッドシステムと同様のセットアップを使用して、設計された論理ゲートの挙動を特徴付けた。（３８、３９）。ＡＮＤゲートを構築するために、本発明者らは、２をＧａｌ４活性化ドメイン（ＡＤ）に、１をＧａｌ４　ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）に融合した。ＡＤとＤＢＤの共局在、および結果として生じるＨｉｓ３遺伝子の転写の誘導は、両方の入力タンパク質（１’－５、５’－２’）の発現に依存する。ヒスチジンを欠く培地での増殖には、両方の入力の発現が必要だった（図１２Ｂ）。ＯＲゲートは、１－６フ融合をＡＤに連結し、７’をＤＢＤに連結することによって、同様に構築された。入力１’－７または６’－７のいずれかの発現は、ＡＤとＤＢＤの関連を促進することによって増殖をもたらした（図１２Ｃ）。

【０１８１】

本発明者らは、全対全のＹ２Ｈ実験で同定された結合親和性階層を活用して、追加のブール論理ゲートの構築を検討した。（３４）。８は８’と相互作用するだけでなく、ホモ二量体も形成する（図１５Ａ）。したがって、８’は、ヘテロ二量体を形成するために８つ

のホモ二量体を凌駕する必要がある。本発明者らは、ＡＤまたはＤＢＤの両方に８を融合することにより、ＮＯＴゲートを構築した。酵母細胞は、共発現した８’入力タンパク質の存在下で増殖を停止した（図１２Ｄ）。親和性階層

【数１】

$$9:9' \approx 10:10' > 9:10'$$

（図１５Ｂ）に基づいて、本発明者らは、９’と１０を２つの入力として、９がＡＤに、１０’がＤＢＤに、融合されたＮＯＲゲートを構築した。入力のいずれかまたは両方が９：１０’の相互作用を上回り、酵母の増殖を阻害する（図１２Ｅ）。親和性階層

【数２】

$$9':1' > 9:9' \approx 1:1' > 9:1$$

（図１５Ｂ）に基づいて、ＸＮＯＲゲートは、９’と１’を２つの入力として、９をＡＤに、１をＤＢＤに融合することにより、構築され、いずれかの存在は、９：１結合を打ち負かし、増殖を遮断するが、両方が発現すると、両方は代わりに相互作用し、増殖が観察される（図１２Ｆ）。同様に、ＮＡＮＤゲートは、相互作用階層

【数３】

$$1':10' > 1:1' \approx 10:10' > 1:10$$

に基づいて設計された（図１５Ｂ）。１も１０も単独では１’：１０’結合を打ち負かすことはできないため、増殖が生じるが、両方が発現すると、１：１’と１０：１０’の両方の形成の自由エネルギーが１’：１０’の形成の自由エネルギーを上回り、増殖が遮断される（図１２Ｇ）。

【０１８２】

３入力ＣＩＰＨＲ論理ゲート

本発明者らは、単量体１と２が３つの入力１’－４’、４－３’、および３－２’によって近接する３入力ＡＮＤゲート（図１０Ｍ）を構築した。本発明者らは、１と２の両方が存在するｎＭＳを使用してすべての複合体を定量化し、８つの可能な入力の組み合わせすべてを実験的に試験した（図１３Ａ）。３入力ＡＮＤゲートの適切な機能と一致して、１と２は、３つの入力すべてが存在する場合にのみ有意な共集合を示した（データは示していない）。

【０１８３】

ＣＩＰＨＲ論理ゲートのモジュール性を試験するために、本発明者らは、同じ４ペアのＤＨＤを使用して２つの異なる３入力ＣＩＰＨＲ論理ゲートを設計し、Ｙ２Ｈを介してそれらを試験した。３入力ＯＲゲートを作成するために、１’－６－７をＡＤに、１１’をＤＢＤに融合した。３つの入力（１１－１、１１－６’、１１－７’）のいずれか１つが、連結されたタンパク質を介してＡＤをＤＢＤに送ることができる（図１３Ｂ）。Ｙ２Ｈの結果により、細胞内でのこの論理ゲートの正確な挙動が確認された。入力タンパク質のいずれかが細胞増殖を誘導する（図１３Ｃ）。本発明者らは、入力１１－７’、７－１、または１１－６’を用いて、１’－６をＡＤに、１１’をＤＢＤに融合することにより、ＣＩＰＨ

Ｒ離接的標準形（ＤＮＦ、［Ａ ＡＮＤ Ｂ］ＯＲ Ｃ）ゲートを構築した（図．１３Ｄ）。Ｙ２Ｈ実験では、ＤＮＦゲートは設計どおりに機能し、入力がない場合、または１１－７’および７－１入力タンパク質の１つのみが存在する場合は、酵母の増殖レベルが低く、それ以外の場合は酵母の増殖レベルが高くなった（図１３Ｅ）。

【０１８４】

実施例２の参照

１．Ｒ．Ｎｕｓｓｉｎｏｖ，Ｈｏｗ ｄｏ ｄｙｎａｍｉｃ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｓｉｇｎａｌｓ ｔｒａｖｅｌ ｌｏｎｇ ｄｉｓｔａｎｃｅｓ？Ｍｏｌ．Ｂｉｏｓｙｓｔ．８，２２－２６（２０１２）．

２．Ａ．Ｗ．Ｒｅｉｎｋｅ，Ｊ．Ｂａｅｋ，Ｏ．Ａｓｈｅｎｂｅｒｇ，Ａ．Ｅ．Ｋｅａｔｉｎｇ，Ｎｅｔｗｏｒｋｓ ｏｆ ｂＺＩＰ ｐｒｏｔｅｉｎ－ｐｒｏｔｅｉｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｄｉｖｅｒｓｉｆｉｅｄ ｏｖｅｒ ａ ｂｉｌｌｉｏｎ ｙｅａｒｓ ｏｆ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．３４０，７３０－７３４（２０１３）．

３．Ｙ．Ｅ．Ａｎｔｅｂｉ，Ｊ．Ｍ．Ｌｉｎｔｏｎ，Ｈ．Ｋｌｕｍｐｅ，Ｂ．Ｂｉｎｔｕ，Ｍ．Ｇｏｎｇ，Ｃ．Ｓｕ，Ｒ．ＭｃＣａｒｄｅｌｌ，Ｍ．Ｂ．Ｅｌｏｗｉｔｚ，Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｓｉｇｎａｌ Ｐｅｒｃｅｐｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ＢＭＰ Ｐａｔｈｗａｙ．Ｃｅｌｌ．１７０，１１８４－１１９６．ｅ２４（２０１７）．

４．Ｂ．Ｚ．Ｈａｒｒｉｓ，Ｗ．Ａ．Ｌｉｍ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ａｎｄ ｒｏｌｅ ｏｆ ＰＤＺ ｄｏｍａｉｎｓ ｉｎ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ｃｏｍｐｌｅｘ ａｓｓｅｍｂｌｙ．Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｓｃｉ． １１４，３２１９－３２３１（２００１）．

５．Ｇ．Ｓｅｅｌｉｇ，Ｄ．Ｓｏｌｏｖｅｉｃｈｉｋ，Ｄ．Ｙ．Ｚｈａｎｇ，Ｅ．Ｗｉｎｆｒｅｅ，Ｅｎｚｙｍｅ－ｆｒｅｅ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｌｏｇｉｃ ｃｉｒｃｕｉｔｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．３１４，１５８５－１５８８（２００６）．

６．Ｌ．Ｑｉａｎ，Ｅ．Ｗｉｎｆｒｅｅ，Ｓｃａｌｉｎｇ ｕｐ ｄｉｇｉｔａｌ ｃｉｒｃｕｉｔ ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ＤＮＡ ｓｔｒａｎｄ ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ ｃａｓｃａｄｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．３３２，１１９６－１２０１（２０１１）．

７．Ｍ．Ｂ．Ｅｌｏｗｉｔｚ，Ｓ．Ｌｅｉｂｌｅｒ，Ａ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｙ ｎｅｔｗｏｒｋ ｏｆ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ．Ｎａｔｕｒｅ．４０３，３３５－３３８（２０００）．

８．Ｔ．Ｓ．Ｇａｒｄｎｅｒ，Ｃ．Ｒ．Ｃａｎｔｏｒ，Ｊ．Ｊ．Ｃｏｌｌｉｎｓ，Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｇｅｎｅｔｉｃ ｔｏｇｇｌｅ ｓｗｉｔｃｈ ｉｎ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ．Ｎａｔｕｒｅ．４０３，３３９－３４２（２０００）．

９．Ａ．Ｔａｍｓｉｒ，Ｊ．Ｊ．Ｔａｂｏｒ，Ｃ．Ａ．Ｖｏｉｇｔ，Ｒｏｂｕｓｔ ｍｕｌｔｉｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ ｅｎｃｏｄｅｄ ＮＯＲ ｇａｔｅｓ ａｎｄ ｃｈｅｍｉｃａｌ “ｗｉｒｅｓ．” Ｎａｔｕｒｅ．４６９，２１２－２１５（２０１１）．

１０．Ｐ．Ｓｉｕｔｉ，Ｊ．Ｙａｚｂｅｋ，Ｔ．Ｋ．Ｌｕ，Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｃｉｒｃｕｉｔｓ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ ｌｏｇｉｃ ａｎｄ ｍｅｍｏｒｙ ｉｎ ｌｉｖｉｎｇ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． ３１，４４８－４５２（２０１３）．

１１．Ｊ．Ｂｏｎｎｅｔ，Ｐ．Ｙｉｎ，Ｍ．Ｅ．Ｏｒｔｉｚ，Ｐ．Ｓｕｂｓｏｏｎｔｏｒｎ，Ｄ．Ｅｎｄｙ，Ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｇｅｎｅｔｉｃ ｌｏｇｉｃ ｇａｔｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．３４０，５９９－６０３（２０１３）．

１２．Ｂ．Ｈ．Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，Ｎ．Ｔ．Ｈ．Ｐｈａｍ，Ｌ．Ｄ．Ｃａｒａｂａｌｌｏ，Ｔ．Ｌｏｚａｎｏｓｋｉ，Ａ．Ｅｎｇｅｌ，Ｓ．Ｂｈａｔｉａ，Ｗ．Ｗ．Ｗｏｎｇ，Ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｒｏｂｕｓｔ ｇｅｎｅｔｉｃ ｃｉｒｃｕｉｔｓ ｗｉｔｈ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｉｎｐｕｔｓ ａｎｄ ｏｕｔｐｕｔｓ ｆｏｒ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． ３５，４５３－４

62(2017).
13. S. Auslander, D. Auslander, M. Muller, M. Wieland, M. Fussenegger, Programmable single-cell mammalian biocomputers. Nature. 487, 123-127(2012).
14. A. S. Khalil, T. K. Lu, C. J. Bashor, C. L. Ramirez, N. C. Pyenson, J. K. Joung, J. J. Collins, A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions. Cell. 150, 647-658(2012).
15. N. Roquet, A. P. Soleimany, A. C. Ferris, S. Aaronson, T. K. Lu, Synthetic recombinase-based state machines in living cells. Science. 353, aad8559(2016).
16. L. B. Andrews, A. A. K. Nielsen, C. A. Voigt, Cellular checkpoint control using programmable sequential logic. Science. 361, eaap8987(2018).
17. B. Angelici, E. Mailand, B. Haefliger, Y. Benenson, Synthetic Biology Platform for Sensing and Integrating Endogenous Transcriptional Inputs in Mammalian Cells. Cell Rep. 16, 2525-2537(2016).
18. J. J. Lohmueller, T. Z. Armel, P. A. Silver, A tunable zinc finger-based framework for Boolean logic computation in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 40, 5180-5187(2012).
19. A. A. Green, P. A. Silver, J. J. Collins, P. Yin, Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. Cell. 159, 925-939(2014).
20. A. A. Green, J. Kim, D. Ma, P. A. Silver, J. J. Collins, P. Yin, Complex cellular logic computation using ribocomputing devices. Nature. 548, 117-121(2017).
21. K. Rinaudo, L. Bleris, R. Maddamsetti, S. Subramanian, R. Weiss, Y. Benenson, A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 25, 795-801(2007).
22. L. Wroblewska, T. Kitada, K. Endo, V. Siciliano, B. Stillo, H. Saito, R. Weiss, Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery. Nat. Biotechnol. 33, 839-841(2015).
23. S.-H. Park, A. Zarrinpar, W. A. Lim, Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. Science. 299, 1061-1064(2003).

24. P. L. Howard, M. C. Chia, S. Del Rizzo, F.-F. Liu, T. Pawson, Redirecting tyrosine kinase signaling to an apoptotic caspase pathway through chimeric adaptor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 11267-11272 (2003).
25. B. J. Yeh, R. J. Rutigliano, A. Deb, D. Bar-Sagi, W. A. Lim, Rewiring cellular morphology pathways with synthetic guanine nucleotide exchange factors. Nature. 447, 596-600 (2007).
26. L. Morsut, K. T. Roybal, X. Xiong, R. M. Gordley, S. M. Coyle, M. Thomson, W. A. Lim, Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. Cell. 164, 780-791 (2016).
27. K. T. Roybal, L. J. Rupp, L. Morsut, W. J. Walker, K. A. McNally, J. S. Park, W. A. Lim, Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. Cell. 164, 770-779 (2016).
28. J. E. Dueber, B. J. Yeh, K. Chak, W. A. Lim, Reprogramming Control of an Allosteric Signaling Switch Through Modular Recombination. Science. 301, 1904-1908 (2003).
29. R. M. Gordley, R. E. Williams, C. J. Bashor, J. E. Toettcher, S. Yan, W. A. Lim, Engineering dynamical control of cell fate switching using synthetic phospho-regulons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 13528-13533 (2016).
30. J. E. Dueber, E. A. Mirsky, W. A. Lim, Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control. Nat. Biotechnol. 25, 660-662 (2007).
31. X. J. Gao, L. S. Chong, M. S. Kim, M. B. Elowitz, Programmable protein circuits in living cells. Science. 361, 1252-1258 (2018).
32. T. Fink, J. Lonzaric, A. Praznik, T. Plaper, E. Merljak, K. Leben, N. Jerala, T. Lebar, Z. Strmsek, F. Lapenta, M. Bencina, R. Jerala, Design of fast proteolysis-based signaling and logic circuits in mammalian cells. Nat. Chem. Biol. 15, 115-122 (2019).
33. A. J. Smith, F. Thomas, D. Shoemark, D. N. Woolfson, N. J. Savery, Guiding Biomolecular Interactions in Cells Using de Novo Protein-Protein Interfaces. ACS Synth. Biol. 8, 1284-1293 (2019).
34. Z. Chen, S. E. Boyken, M. Jia, F. Busch, D. Flores-Solis, M. J. Bick, P. Lu, Z. L. VanAernum, A.

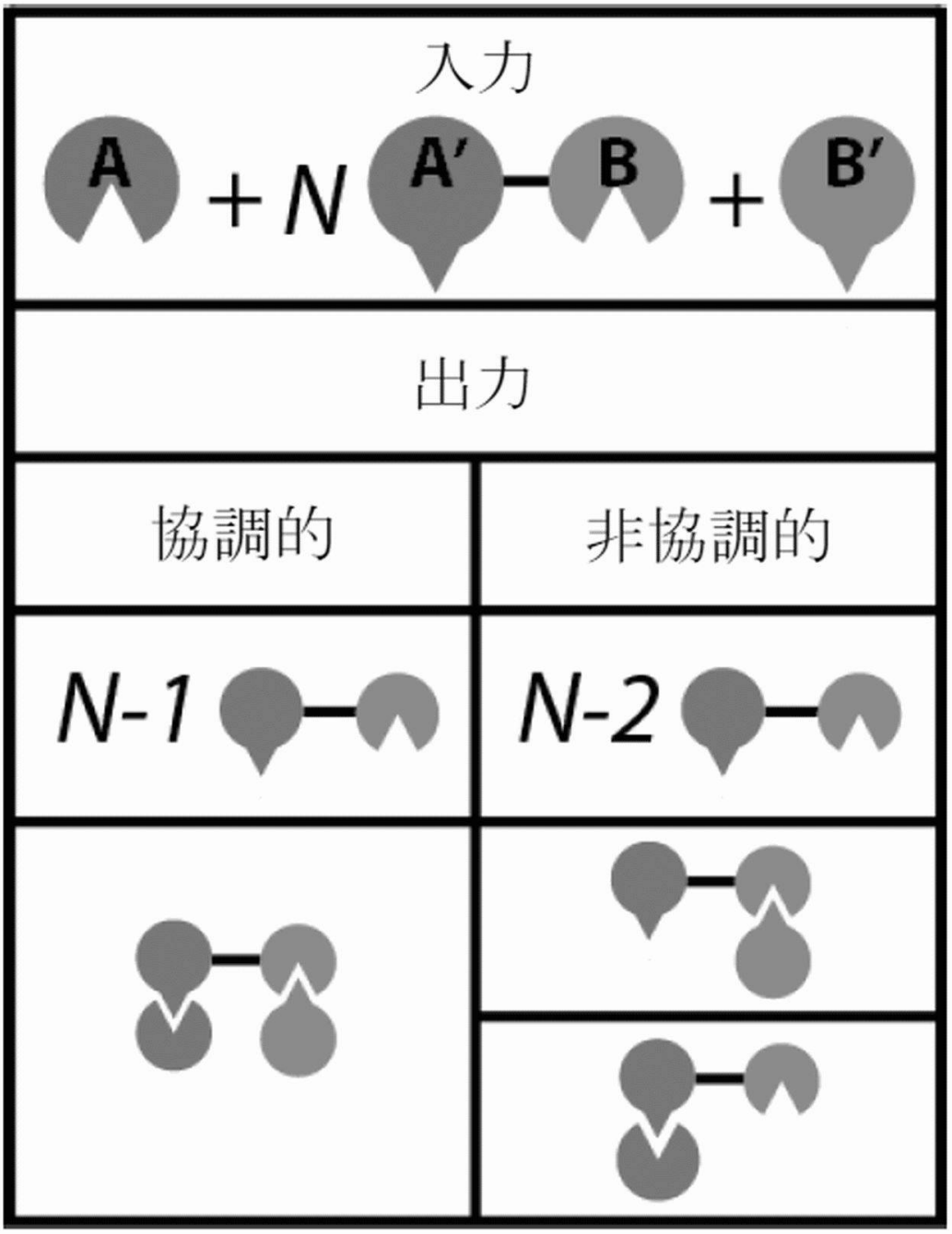
Sahasrabuddhe, R. A. Langan, S. Bermeo, T. J. Brunette, V. K. Mulligan, L. P. Carter, F. DiMaio, N. G. Sgourakis, V. H. Wysocki, D. Baker, Programmable design of orthogonal protein heterodimers. Nature. 565, 106-111 (2019).
35. K. E. Prehoda, J. A. Scott, R. D. Mullins, W. A. Lim, Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. Science. 290, 801-806 (2000).
36. B. Yu, I. R. S. Martins, P. Li, G. K. Amarasinghe, J. Umetani, M. E. Fernandez-Zapico, D. D. Billadeau, M. Machius, D. R. Tomchick, M. K. Rosen, Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. Cell. 140, 246-256 (2010).
37. K. N. Dyer, M. Hammel, R. P. Rambo, S. E. Tsutakawa, I. Rodic, S. Classen, J. A. Tainer, G. L. Hura, High-throughput SAXS for the characterization of biomolecules in solution: a practical approach. Methods Mol. Biol. 1091, 245-258 (2014).
38. A. Pause, B. Peterson, G. Schaffar, R. Stearman, R. D. Klausner, Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9533-9538 (1999).
39. B. Sandrock, J. M. Egly, A yeast four-hybrid system identifies Cdk-activating kinase as a regulator of the XPD helicase, a subunit of transcription factor IIH. J. Biol. Chem. 276, 35328-35333 (2001).
40. A. S. Dixon, M. K. Schwinn, M. P. Hall, K. Zimmerman, P. Otto, T. H. Lubben, B. L. Butler, B. F. Binkowski, T. Machleidt, T. A. Kirkland, M. G. Wood, C. T. Eggers, L. P. Encell, K. V. Wood, NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. ACS Chem. Biol. 11, 400-408 (2016).
41. Y.-C. Kwon, M. C. Jewett, High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. Sci. Rep. 5, 8663 (2015).
42. J. R. Porter, C. I. Stains, B. W. Jester, I. Ghosh, A general and rapid cell-free approach for the interrogation of protein-prot

ein, protein-DNA, and protein-RNA interactions and their antagonists utilizing split-protein reporters. J. Am. Chem. Soc. 130, 6488-6497 (2008).
43. S. L. Maude, T. W. Laetsch, J. Buechner, S. Rives, M. Boyer, H. Bittencourt, P. Bader, M. R. Verneris, H. E. Stefanski, G. D. Myers, M. Qayed, B. De Moerloose, H. Hiramatsu, K. Schlis, K. L. Davis, P. L. Martin, E. R. Nemecek, G. A. Yanik, C. Peters, A. Baruchel, N. Boissel, F. Mechinaud, A. Balduzzi, J. Krueger, C. H. June, B. L. Levine, P. Wood, T. Taran, M. Leung, K. T. Mueller, Y. Zhang, K. Sen, D. Lebwohl, M. A. Pulsipher, S. A. Grupp, Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N. Engl. J. Med. 378, 439-448 (2018).
44. S. S. Neelapu, F. L. Locke, N. L. Bartlett, L. J. Lekakis, D. B. Miklos, C. A. Jacobson, I. Braunschweig, O. O. Oluwole, T. Siddiqi, Y. Lin, J. M. Timmerman, P. J. Stiff, J. W. Friedberg, I. W. Flinn, A. Goy, B. T. Hill, M. R. Smith, A. Deol, U. Farooq, P. McSweeney, J. Munoz, I. Avivi, J. E. Castro, J. R. Westin, J. C. Chavez, A. Ghobadi, K. V. Komanduri, R. Levy, E. D. Jacobsen, T. E. Witzig, P. Reagan, A. Bot, J. Rossi, L. Navale, Y. Jiang, J. Aycock, M. Elias, D. Chang, J. Wiezorek, W. Y. Go, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. N. Engl. J. Med. 377, 2531-2544 (2017).
45. J. A. Fraietta, S. F. Lacey, E. J. Orlando, I. Pruteanu-Malinici, M. Gohil, S. Lundh, A. C. Boesteanu, Y. Wang, R. S. O'Connor, W.-T. Hwang, E. Pequignot, D. E. Ambrose, C. Zhang, N. Wilcox, F. Bedoya, C. Dorfmeier, F. Chen, L. Tian, H. Parakandi, M. Gupta, R. M. Young, F. B. Johnson, I. Kulikovskaya, L. Liu, J. Xu, S. H. Kassim, M. M. Davis, B. L. Levine, N. V. Frey, D. L. Siegel, A. C. Huang, E. J. Wherry, H. Bitter, J. L. Brogdon, D. L. Porter, C. H. June, J. J. Melenhorst, Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. Nat. Med. 24, 563-571 (2018).
46. C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science. 359, 1361-1365 (2018).
47. A. H. Long, W. M. Haso, J. F. Shern, K. M. Wanhainen, M. Murgai, M. Ingaramo, J. P. Smith, A. J. Walker, M. E. Kohler, V. R. Venkateshwara, R. N. K

aplan, G. H. Patterson, T. J. Fry, R. J. Orentas, C. L. Mackall, 4－1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. Nat. Med. 21, 581－590 (2015).
48. E. J. Wherry, M. Kurachi, Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat. Rev. Immunol. 15, 486－499 (2015).
49. E. John Wherry, S. J. Ha, S. M. Kaech, W. Nicholas Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. Blattman, D. L. Barber, R. Ahmed, Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. Immunity. 27 (2007), doi：10.1016／j.immuni.2007.11.006.
50. K. E. Pauken, M. A. Sammons, P. M. Odorizzi, S. Manne, J. Godec, O. Khan, A. M. Drake, Z. Chen, D. R. Sen, M. Kurachi, R. A. Barnitz, C. Bartman, B. Bengsch, A. C. Huang, J. M. Schenkel, G. Vahedi, W. N. Haining, S. L. Berger, E. J. Wherry, Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD－1 blockade. Science. 354, 1160－1165 (2016).
51. K. E. Prehoda, W. A. Lim, How signaling proteins integrate multiple inputs：a comparison of N－WASP and Cdk2. Curr. Opin. Cell Biol. 14, 149－154 (2002).

【表６】

表７．協調性の熱力学的モデリング



【０１８５】

表７を参照すると、タンパク質Ａ、Ａ’－Ｂ、およびＢ’が関与する誘導二量体化システムの場合、Ａ’－Ｂタンパク質の化学量論的過剰（Ｎ）は、結合が非協調的である場合、部分的に組み立てられた二量体複合体をもたらすが、結合が協調的である場合、完全に組み立てられた三量体複合体をもたらす。

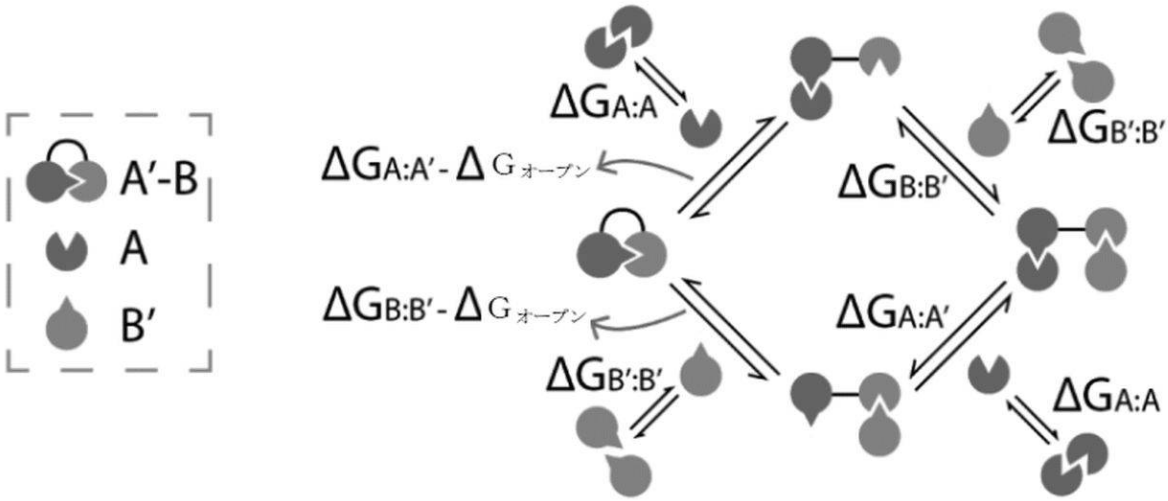
【０１８６】

本発明者らは、熱力学的平衡で協調的に誘導された二量体化システムをモデル化する。以下に示すように（表８）、結合界面が４ヘリックス束内に埋め込まれているＡ’－Ｂの「閉じた」状態を想定すると、Ａ’－ＢのＡまたはＢ’へリックスへアピンへの結合は、「閉

じた」状態から「開いた」状態へ移行するエネルギー障壁（ΔGオープン）に打ち勝つ必要がある。したがって、AまたはBとA’－Bとの間の結合の自由エネルギーは、それぞれ、ΔGA：A’－ΔGオープン、およびΔGB：B’－ΔGオープンと表されることができ、ΔGA：AおよびΔGB：Bは、融合がない場合の同族ペア間の結合の自由エネルギーを表す。A：A’－BまたはA－B’：B複合体が一旦形成されると、その後の結合は、同族のヘテロ二量体間の結合によって簡単に表すことができる：ΔGA：AまたはΔGB：B。本発明者らは、また、（A）2および（B’）2ホモ二量体の存在を観察したため、そのようなプロセスを説明する自由エネルギー項目をモデルに追加した（ΔGA：AまたはΔGB’：B）。

【表７】

表8



【０１８７】

ΔGは、ΔG＝－RTlnKによって平衡定数に関連しており、本発明者らは、さらにKの観点からシステムを検討する。本発明者らは、A’－BのAまたはB’のいずれかへの親和性が同一であるという単純化した仮定を行う（K1＝［A：A’－B］／（［A］［A’－B］）＝［A’－B：B’］／（［B］［A’－B］）。最後に、本発明者らは、システムの協調性cを、他のパートナーの存在下または不在下での平衡定数間の比率として定義する（c＝KB：B’／K1＝KA：A’／K1）。完全に非協調的な工程（C＝１）については、KB：B’＝K1およびKA：A’＝K1であり、すなわち、第１の結合事象は、その後の結合事象の親和性に影響を及ぼさない。

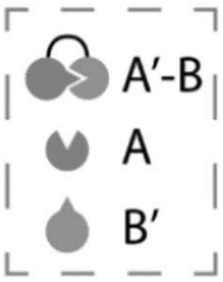
【０１８８】

K1＝exp（－（ΔGA：A’－ΔGオープン）／RT）であるので、自由エネルギーの観点からcについて方程式を書き換えると、c＝exp（ΔGオープン）／RTとなる。したがって、協調性の程度は、二量体A’－Bの埋め込まれた結合界面を部分的に展開／露出するために必要とされる自由エネルギーの大きさによってのみ決定される。

【０１８９】

本発明者らは、ホモ二量体化の平衡定数（KA：AおよびKB’：B）を明示的に組み込むことは、各平衡の絶対位置にのみ影響し、協調性の大きさには影響しないことに留意する（表９を参照）。実際、Aを例にとると、閉じた状態への結合は、K1＊KA：Aになり、開いた状態への結合は、KA：A’＊KA：Aとなる。KA：Aは、分子と分母の両方に存在するので、それらが相殺され、cは、純粋に、K1およびKA：A’の相対的な大きさによって定義される。

【表８】



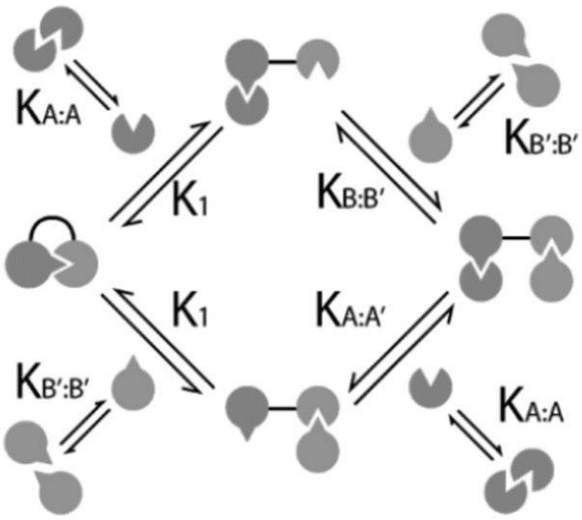


表９

【０１９０】
本発明者らは、Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃａで次の連立方程式を解いて、平衡状態のＡ：Ａ’－Ｂ：Ｂ’の量をＡ’－Ｂの初期濃度の関数としてシミュレートした。
【数４】

$$K_{A:A} = \frac{[A_2]}{[A][A]}$$

$$K_{B':B'} = \frac{[B'_2]}{[B'][B']}$$

$$K_1 = \frac{[A:A'-B]}{[A][A'-B]}$$

$$K_1 = \frac{[B':A'-B]}{[B'][A'-B]}$$

$$K_{A:A'} = \frac{[A:A'-B:B']}{[A][A'-B:B']}$$

$$K_{B:B'} = \frac{[A:A'-B:B']}{[B'][A:A'-B]}$$

$$[A]_{tot} = 2*[A_2]+[A]+[A:A'-B]+[A:A'-B:B']$$

$$[B']_{tot} = 2*[B'_2]+[B']+[A'-B:B']+[A:A'-B:B']$$

$$[A'-B]_{tot} = [A'-B:B']+[A:A'-B']+[A:A'-B:B']$$

【０１９１】
本発明者らは、以前のネイティブＭＳ滴定実験から、同族の設計されたヘテロ二量体（ＤＨＤ）の平衡解離定数が約１０ｎＭの範囲にあり、（１）、したがって、$K_{A:A}$≒$K_{B:B}$≒０．１　ｎＭ$^{-1}$であることが分かっていた。K_1の変化する値（したがって、協調性係数、ｃ＝$K_{A:A'}$／K_1）は、図１２Ｃに示すように、Ａ’－Ｂの初期濃度の関数として、平衡状態でのＡ：Ａ’－Ｂ：Ｂ’の量の異なる応答を示した。
【０１９２】
本発明者らは、ネイティブＭＳ実験を使用して実験的にK_1を推定した。１０μＭの１と１’－２’を混合しても、検出可能な量の１：１’－２’複合体は得られず、これは、結合が非常に弱いことを示唆している。ネイティブＭＳの感度により、検出可能な種の濃度には下限が存在する（０．０３７５μＭ）。この値を使用して、１：１’－２’の親和性の下限を推定できる（１／K_1≧２．６５ｍＭ）。これは、図１３Ｈに報告されている９９１，０００のｃ値に基づいて親和性を計算することによって得られた９．９１ｍＭの値に近い。
【０１９３】
この熱力学的モデリングは、結合界面の閉塞により、誘導された二量体化システムに対して結合協調性を達成できることを示唆している。本発明者らは、可撓性リンカーを介してヘアピンを融合することでこれを達成し、これらの構造の自発的な折り畳みが、トポロジーのような４つのヘリックス束の内側に相互作用界面を埋め込むということを理論的に説明した。これらの構造の形成は、ｉ）ＤＨＤ構造と一致するＳＡＸＳプロファイル、ｉｉ

）ＤＨＤトポロジーの展開に関するΔＳＡＳＡと一致する化学変性実験からのｍ値、およびｉｉｉ）ΔＧオープン＜ΔＧ折り畳み、によって裏付けられ、これは、結合界面の露出が、これらの融合構築物の部分的な展開を必要とするものの、これらのタンパク質の折り畳み自由エネルギーを超えない（物理的に非現実的なシナリオ）ということを示している。

【０１９４】

材料および方法

緩衝液と培地の処方

ＴＢＭ－５０５２：１．２％［ｗｔ／ｖｏｌ］トリプトン、２．４％［ｗｔ／ｖｏｌ］酵母抽出物、０．５％［ｗｔ／ｖｏｌ］グリセロール、０．０５％［ｗｔ／ｖｏｌ］Ｄ－グルコース、０．２％［ｗｔ／ｖｏｌ］Ｄ－ラクトース、２５ｍＭ　Ｎａ２ＨＰＯ４、２５ｍＭ　ＫＨ２ＰＯ４、５０ｍＭ　ＮＨ４Ｃｌ、５ｍＭ　Ｎａ２ＳＯ４、２ｍＭ　ＭｇＳＯ４、１０μＭ　ＦｅＣｌ３、４μＭ　ＣａＣｌ２、２μＭ　ＭｎＣｌ２、２μＭ　ＺｎＳＯ４、４００ｎＭ　ＣｏＣｌ２、４００ｎＭ　ＮｉＣｌ２、４００ｎＭ　ＣｕＣｌ２、４００ｎＭ　Ｎａ２ＭｏＯ４、４００ｎＭ　Ｎａ２ＳｅＯ３、４００ｎＭ　Ｈ３ＢＯ３。

【０１９５】

溶解緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、室温でｐＨ　８．０。

【０１９６】

洗浄緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３０ｍＭイミダゾール、室温でｐＨ　８．０。

【０１９７】

溶出緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール、室温でｐＨ　８．０。

【０１９８】

ＴＢＳ緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ　８．０、１００ｍＭ　ＮａＣｌ。

【０１９９】

ＹＰＡＤ緩衝液：ペプトン２０ｇ／Ｌ、酵母抽出物１０ｇ／Ｌ、ヘミ硫酸アデニン１０μｇ／Ｌ、デキストロース（２０ｇ／Ｌ）。

【０２００】

Ｃ－Ｔｒｐ－Ｕｒａ－Ｌｅｕ－Ｈｉｓ＋アデニン：ヘミサルフェート＋グルコース。

【０２０１】

アミノ酸を含まない酵母窒素塩基（６．７ｇ／Ｌ）、合成ＤＯ培地（－Ｌｅｕ／－Ｈｉｓ／－Ｔｒｐ／－Ｕｒａ）（１．４ｇ／Ｌ）、デキストロース（２０ｇ／Ｌ）、半硫酸アデニン（１０μｇ／Ｌ）。

【０２０２】

合成遺伝子の構築

Ｅ．ｃｏｌｉでのタンパク質発現のために、合成遺伝子はＧｅｎｓｃｒｉｐｔ　Ｉｎｃ．（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，ＵＳＡ）から注文し、ＮｄｅＩ部位とＸｈｏＩ部位の間に挿入されたｐＥＴ２１－ＮＥＳＧ　Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターで提供された。各発現構築物については、ヘキサヒスチジンタグ、次いで、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位（ＧＳＳＨＨＨＨＨＨＳＳＧＥＮＬＹＦＱＧＳ）（配列番号３２８）をタンパク質のＮ末端にインフレームで追加した。ベクター中のＣ末端ヘキサヒスチジンタグの発現を阻害するために、タンパク質コード配列の３’末端に終止コドンを導入した。

【０２０３】

酵母ツーハイブリッド（Ｙ２Ｈ）研究用の遺伝子は、ＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメイン（ｐｏＤＢＤ）およびＧＡＬ４転写活性化ドメイン（ｐｏＡＤ）を有するプラスミドにクローン化された（２）。入力タンパク質は、プラスミドＶ５１０（ウラシル要求性選択マーカー）およびＭＸ１（ブレオマイシン選択マーカー）にクローン化された。遺伝子はＡＤＨ

１プロモーターの制御下で発現した。
【０２０４】
タンパク質発現
プラスミドは、タンパク質発現のために、化学的にコンピテントなＥ．ｃｏｌｉ 発現株Ｌｅｍｏ２１（商標）（ＤＥ３）（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）に形質転換された。形質転換および一晩の増殖に続いて、単一コロニーを寒天プレートから拾い上げ、２２５ｒｐｍで１８時間３７℃で振とうしながら、１００μｇ／ｍＬカルベニシリン（ｐＥＴ２１－ＮＥＳＧベクター用）を含む５ｍｌのＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）培地に移した。自動誘導法を使用して、タンパク質を発現させた（７）：開始培養物を、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを含む５００ｍｌのＴＢＭ－５０５２でさらに希釈し、２２５ｒｐｍで２４時間３７℃で振とうしながらインキュベートした。
【０２０５】
アフィニティー精製
５０００ ｒｃｆ、４℃で１５分間遠心分離してＥ．ｃｏｌｉ細胞を回収し、ペレットを１８ｍｌの溶解緩衝液に再懸濁した。ＥＤＴＡ不含カクテルプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）、リゾチーム、およびＤＮＡｓｅを、再懸濁した細胞ペレットに添加し、その後、７０％の電力で５分間超音波処理することにより細胞溶解した。溶解物を４℃、１８，０００ｒｐｍで４５分間遠心分離して清澄化し、溶解緩衝液であらかじめ平衡化したＮｉ－ＮＴＡ（Ｑｉａｇｅｎ）樹脂を含むカラムにアプライした。カラムを５カラム容量（ＣＶ）の洗浄緩衝液で２回洗浄した後、タンパク質溶出のために、５ＣＶの溶出緩衝液で洗浄した。
【０２０６】
サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）
溶出したタンパク質を溶解緩衝液に緩衝液交換した。Ｎ末端ヘキサヒスチジンタグを、１００ｍｇのタンパク質に対して１ｍｇのＴＥＶの比率で、室温で一晩、ＴＥＶプロテアーゼ切断で除去した。ＴＥＶ切断後、試料を新鮮なＮｉ－ＮＴＡカラムに通し、１．５ＣＶの溶解緩衝液で洗浄し、フロースルーを収集した。得られたタンパク質は、ＴＢＳ緩衝液中のＳｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ １０／３００増加カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してＳＥＣによって精製された。
【０２０７】
円二色性（ＣＤ）測定
円二色性（ＣＤ）波長スキャン（２６０～１９５ｎｍ）および温度溶融（２５～９５℃）を、０．１－ｃｍキュベットにて、ＰＢＳ ｐＨ７．４中に０．２５ｍｇ／ｍｌに希釈したタンパク質試料を用いて、ＡＶＩＶ（商標）４２０ＣＤ分光計を用いて行った。温度溶融は、４℃／分の加熱速度で実行され、２２２ｎｍでの楕円率の変化によって監視された。
ＧｄｍＣｌ滴定は、自動滴定装置を備えたＪＡＳＣＯ（商標）モデルＪ－１５００で、撹拌棒付きの１ｃｍキュベットにて、２５℃のＰＢＳ ｐＨ ７．４中、０．０８ｍｇ／ｍｌ～０．０２５ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度で行った。各滴定は、少なくとも３４の均一に分布したＧｄｍＣｌ濃度ポイントで７．４Ｍまで構成され、各工程の混合時間は３０秒だった。滴定溶液は、ＰＢＳおよびＧｄｍＣｌ中の同じ濃度のタンパク質からなった。
【０２０８】
ＣＤデータ分析およびモデルフィッティング
折り畳み自由エネルギーは、平衡変性データをフィッティングすることによって得られた。融合ヘアピン構築物は、二相性の展開遷移を示し、それぞれのエネルギー地形に中間体が存在することを示す。ネイティブＭＳは、リンカー０、リンカー２、リンカー６、およびリンカー１２が緩衝液中でほぼ独占的に単量体であることを示したため（データは示していない）、これらの中間体は部分的に折りたたまれた単量体種であると結論付けられた。したがって、これらのタンパク質の化学的変性データは、単分子の３状態モデルに適合した。

【数５】

$$N \Leftrightarrow I \Leftrightarrow D$$

式中、Ｎは完全に折りたたまれた状態を表し、Ｉは部分的に折りたたまれた中間体を表し、Ｄは変性状態を表す。各種の画分は、それぞれ第１および第２の遷移のための平衡定数、K_1＝［Ｉ］／［Ｎ］およびK_2＝［Ｄ］／［Ｉ］の関数として記載することができる。

【数６】

$$f_N = (1 + K_1 + K_1 \cdot K_2)^{-1}$$

$$f_I = (1 + K_2 + \frac{1}{K_1})^{-1}$$

$$f_D = (1 + \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_1 \cdot K_2})^{-1}$$

【０２０９】

平衡化学変性実験の文脈では、展開の自由エネルギーは変性剤濃度の線形関数である。

【数７】

$$\Delta G_{[den]} = \Delta\, G_{緩衝液} - m \cdot [den]$$

式中、ΔＧ［ｄｅｎ］は、変性剤の特定の濃度での系の自由エネルギーを表し、$\Delta G_{緩衝液}$は、変性剤がない場合の対応する自由エネルギーの変化であり、ｍは、展開時の溶媒にアクセス可能な表面面積の変化（ΔＳＡＳＡ）に関連する比例定数である。したがって、

各遷移に関連する平衡定数に対する変性剤の効果は、緩衝液中のその自由エネルギー差と特定のｍ値の関数として記述できる。

【数８】

$$K_1 = exp(\frac{m_1 \cdot [den] - \Delta G_1}{R \cdot T})$$

$$K_2 = exp(\frac{m_2 \cdot [den] - \Delta G_2}{R \cdot T})$$

【０２１０】

これらの式をｆ$_N$、ｆ$_I$、ｆ$_D$の定義と組み合わせることにより、各種の分数分布を変性剤濃度の関数として表すことができ、自由エネルギーの変化は各遷移に対応する（緩衝液中）。最後に、ＣＤなどのアンサンブル分光技術の場合、変性剤濃度（独立変数）の関数としての観測信号（従属変数）は、各種に対応する分光信号の線形結合として表すことができ、それらの分数寄与部分がアンサンブルに重み付けされる：

ＭＲＥ２２２ｎｍ＝ｆ$_N$・ＭＲＥ$_N$＋ｆ$_I$・ＭＲＥ$_I$＋ｆ$_D$・ＭＲＥ$_D$

【０２１１】

式中、ＭＲＥ$_N$、ＭＲＥ$_I$、ＭＲＥ$_D$は、それぞれネイティブ、中間、および変性状態の分光学的信号（ベースライン）を表す。この式を使用して、様々なリンカータンパク質の化学変性データを適合させた。適合したパラメータを表１０に示す。緩衝液中のリンカー２４の場合、ネイティブＭＳは有意なの割合の二量体を明らかにした（データは示していない）。したがって、このモデルは展開を説明するのに完全に適切ではなく、この構築物についての適合された値は注意して解釈する必要がある。それにもかかわらず、異なる濃度のタンパク質で行われた変性は、２番目の遷移の位置が濃度に依存せず、したがって単分子であることを明らかにした。この事象については、モデルが保持される。

【０２１２】

これらの連結されたヘアピンの合計ｍ値は、約３ｋｃａｌｍｏｌ$^{-1}$　Ｍ$^{-1}$であることが見出された。ｍ値は展開のΔＳＡＳＡと相関することが示されている（８）。折りたたまれた状態の場合、ＰｙＭＯＬ（商標）を８８００　Å^{2}で使用して、ＳＡＳＡはＤＨＤの構造から推定された（１）。開いた状態については、ＳＡＳＡは、約２０，０００Å^{2}のＰｒｏｔＳＡ（商標）を用いて推定された（９，１０）。したがって、融合ヘアピンの展開単分子についてのΔＳＡＳＡは、３．３の予測されたｍ値を有するであろう、約１１，０００Å^{2}であるはずだ。この数は、本明細書で報告された適合パラメータと密接に一致しており、これらのリンカータンパク質の折り畳まれた状態が４つのヘリックス束トポロジーを持っているという概念と一致している。

【０２１３】

小角Ｘ線散乱（ＳＡＸＳ）

タンパク質試料は、２５ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、１５０ｍＭのＮａＣｌおよび２％のグリセロール中のＳＥＣによって精製された。カラムの空隙容量に先行する溶出画分を、緩衝液減算のブランクとして使用した。散乱測定は、高度な光源でＳＩＢＹＬＳ（商標）１２．３．１ビームラインで行った。試料から検出器までの距離は１．５ｍであり、Ｘ

線波長（λ）は１．２７Åであり、０．０１～０．３Å－１の散乱ベクトルｑ（ｑ＝４πｓｉｎθ／λ、２θは散乱角）の範囲に対応する。各ウェルについて、１秒未満の等しい時間区分で一連の露光を行った。０．３秒の露光を１０秒間行い、試料あたり３２フレームとなった。各試料について、濃度依存効果を試験するために２つの異なる濃度のデータが収集された。「低」濃度試料は、２．５ｍｇ／ｍｌの範囲であり、「高」濃度試料は５ｍｇ／ｍｌだった。データはＳＡＸＳ　ＦｒａｍｅＳｌｉｃｅ（商標）オンライン使用して処理し、ＳｃÅｔｔｅｒ（商標）ソフトウェアパッケージを用いて分析した（１１、１２）。ＦｏＸＳ（商標）オンラインサーバー（１３，１４）　を用いて、実験的な散乱プロファイルを設計モデルと比較し、適合品質（χ）値を計算した。

【０２１４】

論理ゲートについての酵母ツーハイブリッドアッセイ

酵母株ＰＪ６９－４ａ（ＭＡＴａ　ｔｒｐ１－９０１　ｌｅｕ２－３、１１２　ｕｒａ３－５２　ｈｉｓ３－２００　ｇａｌ４（削除）ｇａｌ８０（削除）ＬＹＳ２：：ＧＡＬ１－ＨＩＳ３　ＧＡＬ２－ＡＤＥ２　ｍｅｔ２：：ＧＡＬ７－ｌａｃＺ）の化学的にコンピテントな細胞は、ＬｉＡｃ／ＳＳキャリアＤＮＡ／ＰＥＧ法（１５）を使用して、ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）または活性化ドメイン（ＡＤ）を含むプラスミドの適切なペアを用いて、形質転換された。２つの入力ＣＩＰＨＲ論理ゲートの場合、入力タンパク質をコードする遺伝子（選択マーカーとともに）は、Ｕｒａ３遺伝子座（ウラシル要求性選択マーカー）またはＹＣＲ０４３遺伝子座（ブレオマイシン選択マーカー）のいずれかまたは両方に遺伝的に組み込まれた。３つの入力ＣＩＰＨＲ論理ゲートの場合、２つの入力タンパク質をコードする遺伝子は、ｐ２ａおよび核局在化配列（ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰＧＤＫＡＥＬＩＰＥＰＰＫＫＫＲＫＶＥＬＧＴＡ；配列番号３３０）により分離された、ＡＤまたはＤＢＤプラスミドのいずれかの下流にクローン化されて、記載されるように遺伝的に組み込まれた。ｐ２ａ配列は、翻訳切断を確実にして、さらなる入力タンパク質を別のタンパク質にする。形質転換された酵母細胞の選択は、トリプトファンおよびロイシンを欠く合成ドロップアウト（ＳＤＯ）培地で、３０℃で１０００ｒｐｍで振とうしながら４８時間行った。得られた培養物を１：１００に希釈し、トリプトファンおよびロイシンを欠く新鮮なＳＤＯ培地で１６時間増殖させた後、トリプトファン、ロイシンおよびヒスチジンを欠く新鮮なＳＤＯ培地で１：１００に希釈した。培養物を、１０００ｒｐｍ、３０℃で振とうしながらインキュベートした。ヒスチジンを欠く培地で酵母細胞を増殖させるには、ＤＢＤと転写活性化ドメインを近接させる必要があるため、論理ゲートの活性化の成功は酵母細胞の増殖によって示された。（１６、１７）。酵母細胞の光学密度は、２４時間、４８時間、および７２時間で記録された。

【表９】

表１０．平衡化学変性のための適合パラメータ。エラーはフィットエラーを表す。

	リンカー0	リンカー2	リンカー6	リンカー12	リンカー24
$\Delta G_1^{(N \Leftrightarrow I)}$ (kcal mol^{-1})	3.6(±0.4)	3.5(±0.2)	3.5(±0.2)	2.7(±0.1)	3.7(±0.3)
$\Delta G_2^{(I \Leftrightarrow D)}$ (kcal mol^{-1})	9.8(±0.6)	10.7(±0.4)	12.2(±0.4)	10.6(±0.5)	10.4(±0.8)
$\Delta G_{tot}^{(N \Leftrightarrow D)}$ (kcal mol^{-1})	13.5(±0.7)	14.1(±0.4)	15.7(±0.5)	13.3(±0.5)	14.1(±0.8)
m_1 (kcal mol^{-1} M^{-1})	1.1(±0.2)	1.0(±0.1)	0.9(±0.1)	0.75(±0.05)	1.1(±0.1)
m_2 (kcal mol^{-1} M^{-1})	1.8(±0.1)	1.97(±0.07)	2.22(±0.08)	1.96(±0.08)	2.0(±0.1)
m_{tot} (kcal mol^{-1} M^{-1})	2.9(±0.2)	3.0(±0.1)	3.1(±0.1)	2.71(±0.09)	3.1(±0.2)
MRE_N (deg cm^2 dmol^{-1})	-23,574(±114)	-27,561(±84)	-24,712(±63)	-33,849(±131)	-26,438(±123)
MRE_I (deg cm^2 dmol^{-1})	-16,330(±749)	-18,139(±540)	-14,779(±710)	-17,362(±1,158)	-15,567(±914)
MRE_D (deg cm^2 dmol^{-1})	-525(±107)	-785(±82)	-937(±68)	-1,104(±99)	-1,125(±133)

【０２１５】

参考文献

１．Ｚ．Ｃｈｅｎ，Ｓ．Ｅ．Ｂｏｙｋｅｎ，Ｍ．Ｊｉａ，Ｆ．Ｂｕｓｃｈ，Ｄ．Ｆｌｏｒｅｓ－Ｓｏｌｉｓ，Ｍ．Ｊ．Ｂｉｃｋ，Ｐ．Ｌｕ，Ｚ．Ｌ．ＶａｎＡｅｒｎｕｍ，Ａ．Ｓａｈａｓｒａｂｕｄｄｈｅ，Ｒ．Ａ．Ｌａｎｇａｎ，Ｓ．Ｂｅｒｍｅｏ，Ｔ．Ｊ．Ｂｒｕｎｅｔｔｅ，Ｖ．Ｋ．Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｌ．Ｐ．Ｃａｒｔｅｒ，Ｆ．ＤｉＭａｉｏ，Ｎ．Ｇ．Ｓｇｏｕｒａｋｉｓ，Ｖ．Ｈ．Ｗｙｓｏｃｋｉ，Ｄ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｓ．Ｎａｔｕｒｅ．５６５，１０６－１１１（２０１９）．

２．Ｓ．Ｅ．Ｂｏｙｋｅｎ，Ｚ．Ｃｈｅｎ，Ｂ．Ｇｒｏｖｅｓ，Ｒ．Ａ．Ｌａｎｇａｎ，Ｇ．Ｏｂｅｒｄｏｒｆｅｒ，Ａ．Ｆｏｒｄ，Ｊ．Ｍ．Ｇｉｌｍｏｒｅ，Ｃ．Ｘｕ，Ｆ．ＤｉＭａｉｏ，Ｊ．Ｈ．Ｐｅｒｅｉｒａ，Ｂ．Ｓａｎｋａｒａｎ，Ｇ．Ｓｅｅｌｉｇ，Ｐ．Ｈ．Ｚｗａｒｔ，Ｄ．Ｂａｋｅｒ，Ｄｅ ｎｏｖｏ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｈｏｍｏ－ｏｌｉｇｏｍｅｒｓ ｗｉｔｈ ｍｏｄｕｌａｒ ｈｙｄｒｏｇｅｎ－ｂｏｎｄ ｎｅｔｗｏｒｋ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．３５２，６８０－６８７（２０１６）．

３．Ａ．Ｓ．Ｄｉｘｏｎ，Ｍ．Ｋ．Ｓｃｈｗｉｎｎ，Ｍ．Ｐ．Ｈａｌｌ，Ｋ．Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ，Ｐ．Ｏｔｔｏ，Ｔ．Ｈ．Ｌｕｂｂｅｎ，Ｂ．Ｌ．Ｂｕｔｌｅｒ，Ｂ．Ｆ．Ｂｉｎｋｏｗｓｋｉ，Ｔ．Ｍａｃｈｌｅｉｄｔ，Ｔ．Ａ．Ｋｉｒｋｌａｎｄ，Ｍ．Ｇ．Ｗｏｏｄ，Ｃ．Ｔ．Ｅｇｇｅｒｓ，Ｌ．Ｐ．Ｅｎｃｅｌｌ，Ｋ．Ｖ．Ｗｏｏｄ，ＮａｎｏＬｕｃ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｔｉｏｎ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ｆｏｒ Ａｃｃｕｒａｔｅ Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉ

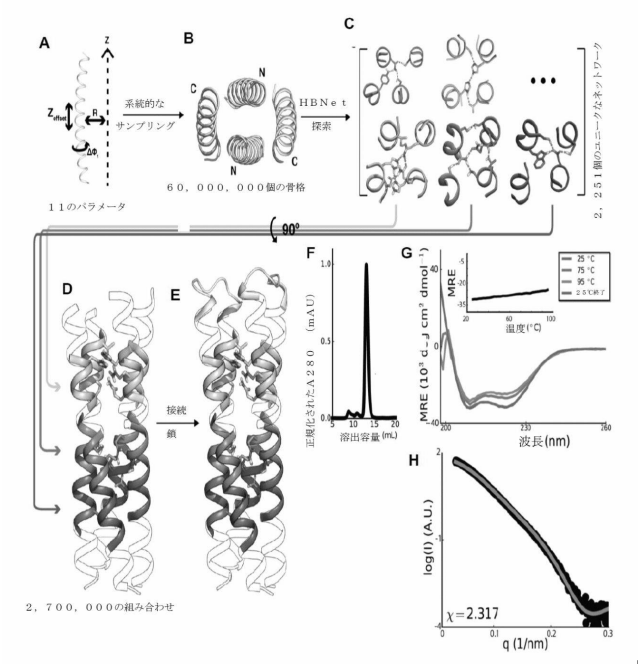
ons in Cells. ACS Chem. Biol. 11, 400－408 (2016).
4. M. E. Lee, W. C. DeLoache, B. Cervantes, J. E. Dueber, A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. ACS Synth. Biol. 4, 975－986 (2015).
5. A. S. Khalil, T. K. Lu, C. J. Bashor, C. L. Ramirez, N. C. Pyenson, J. K. Joung, J. J. Collins, A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions. Cell. 150, 647－658 (2012).
6. A. Aranda－Diaz, K. Mace, I. Zuleta, P. Harrigan, H. El－Samad, Robust Synthetic Circuits for Two－Dimensional Control of Gene Expression in Yeast. ACS Synth. Biol. 6, 545－554 (2017).
7. F. W. Studier, Protein production by auto－induction in high density shaking cultures. Protein Expr. Purif. 41, 207－234 (2005).
8. J. K. Myers, C. N. Pace, J. M. Scholtz, Denaturant m values and heat capacity changes：relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. Protein Sci. 4, 2138－2148 (1995).
9. P. Bernado, M. Blackledge, J. Sancho, Sequence－specific solvent accessibilities of protein residues in unfolded protein ensembles. Biophys. J. 91, 4536－4543 (2006).
10. J. Estrada, P. Bernado, M. Blackledge, J. Sancho, ProtSA：a web application for calculating sequence specific protein solvent accessibilities in the unfolded ensemble. BMC Bioinformatics. 10, 104 (2009).
11. K. N. Dyer, M. Hammel, R. P. Rambo, S. E. Tsutakawa, I. Rodic, S. Classen, J. A. Tainer, G. L. Hura, High－throughput SAXS for the characterization of biomolecules in solution：a practical approach. Methods Mol. Biol. 1091, 245－258 (2014).
12. R. P. Rambo, J. A. Tainer, Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod－Debye law. Biopolymers. 95, 559－571 (2011).
13. D. Schneidman－Duhovny, M. Hammel, A. Sali, FoXS：a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. Nucleic Acids Res. 38, W540－4 (2010).
14. D. Schneidman－Duhovny, M. Hammel, J. A. Tainer, A. Sali, Accurate SAXS profile computa

tion and its assessment by contrast variation experiments. Biophys. J. 105, 962-974 (2013).
15. R. H. Schiestl, R. D. Gietz, High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Curr. Genet. 16, 339-346 (1989).
16. C. T. Chien, P. L. Bartel, R. Sternglanz, S. Fields, The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 9578-9582 (1991).
17. P. L. Bartel, J. A. Roecklein, D. SenGupta, S. Fields, A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. Nat. Genet. 12, 72-77 (1996).
18. Z. L. VanAernum, J. D. Gilbert, M. E. Belov, A. A. Makarov, S. R. Horning, V. H. Wysocki, Surface-Induced Dissociation of Noncovalent Protein Complexes in an Extended Mass Range Orbitrap Mass Spectrometer. Anal. Chem. 91, 3611-3618 (2019).
19. M. T. Marty, A. J. Baldwin, E. G. Marklund, G. K. A. Hochberg, J. L. P. Benesch, C. V. Robinson, Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. Anal. Chem. 87, 4370-4376 (2015).
20. Y.-C. Kwon, M. C. Jewett, High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. Sci. Rep. 5, 8663 (2015).
21. M. C. Jewett, J. R. Swartz, Mimicking the Escherichia coli cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. Biotechnol. Bioeng. 86, 19-26 (2004).
22. A. D. Silverman, N. Kelley-Loughnane, J. B. Lucks, M. C. Jewett, Deconstructing Cell-Free Extract Preparation for in Vitro Activation of Transcriptional Genetic Circuitry. ACS Synth. Biol. 8, 403-414 (2019).
23. J. R. Swartz, M. C. Jewett, K. A. Woodrow, in Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, P. Balbas, A. Lorence, Eds. (Humana Press, Totowa, NJ, 2004), pp. 169-182.
24. V. Munoz, L. Serrano, Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. III. Temperature and

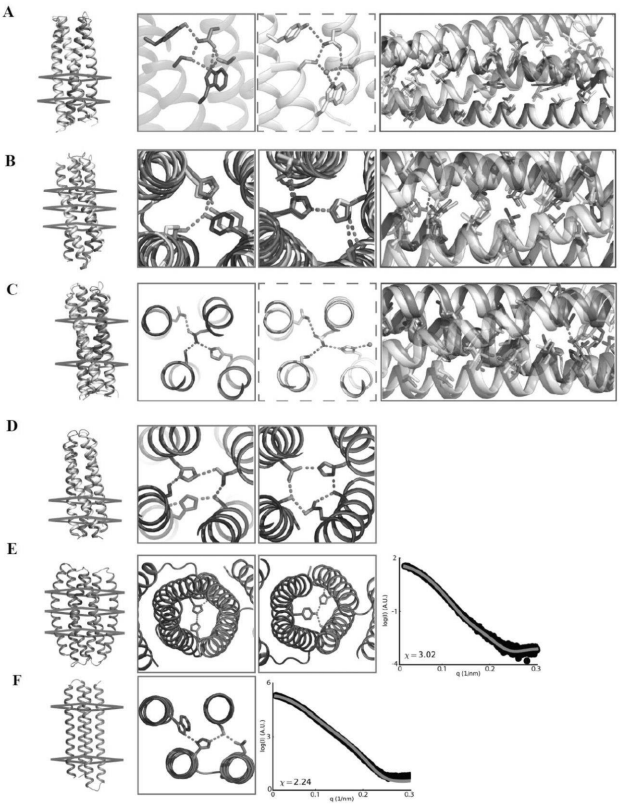
pH dependence. J. Mol. Biol. 245, 297－308（1995）.
23. V. Munoz, L. Serrano, Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. III. Temperature and pH dependence. J. Mol. Biol. 245, 297－308（1995）.

【図面】

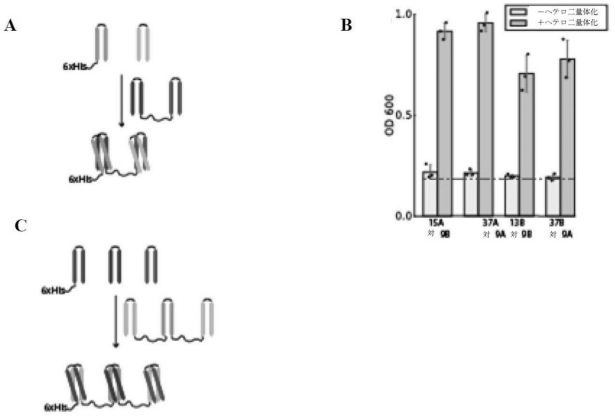
【図１Ａ－１Ｈ】



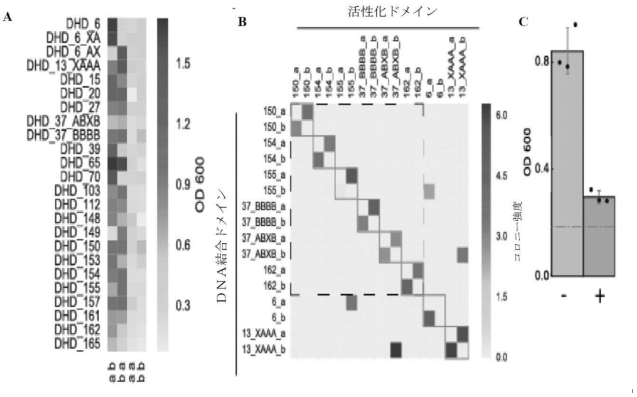
【図２Ａ－２Ｆ】



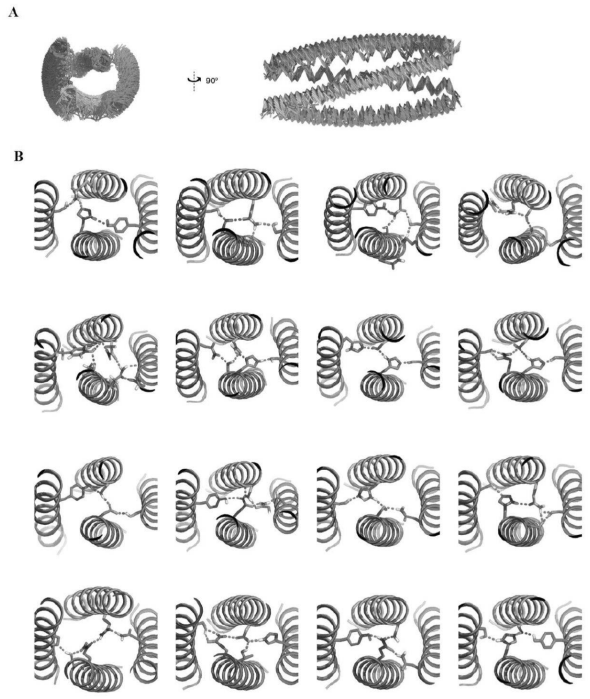
【図３Ａ－３Ｃ】



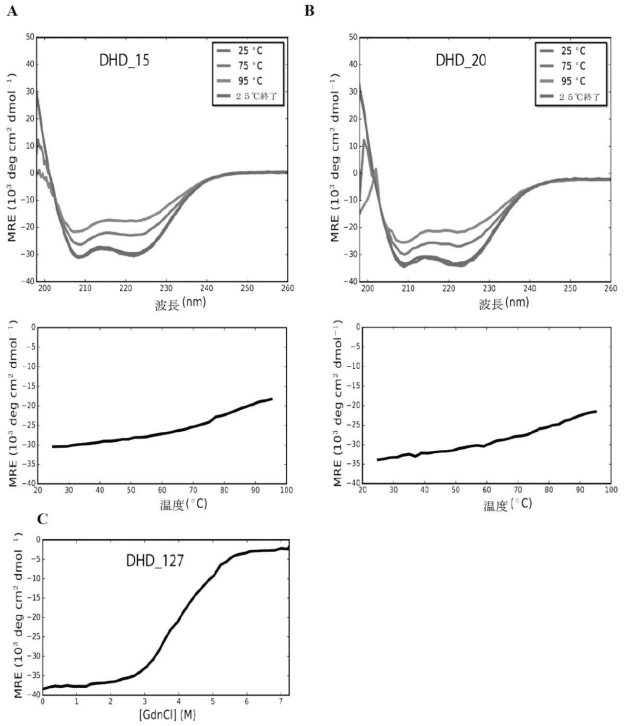
【図４Ａ－４Ｃ】



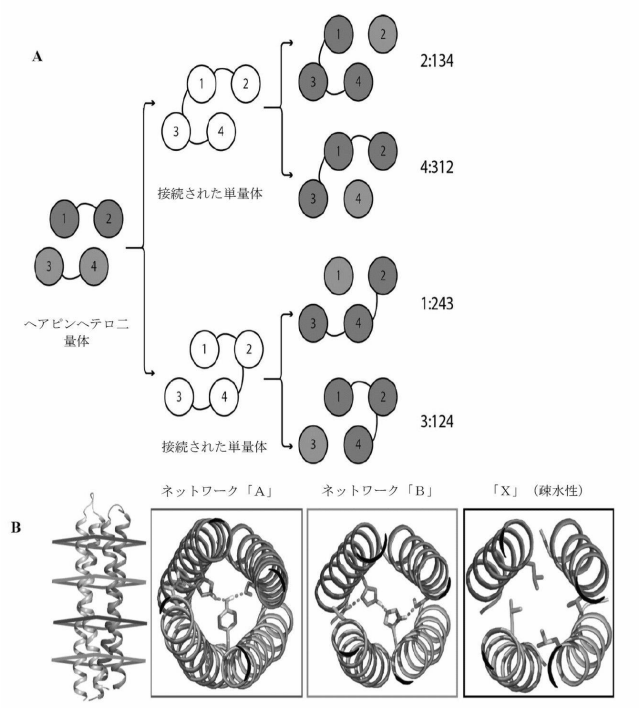
【図５Ａ－５Ｂ】



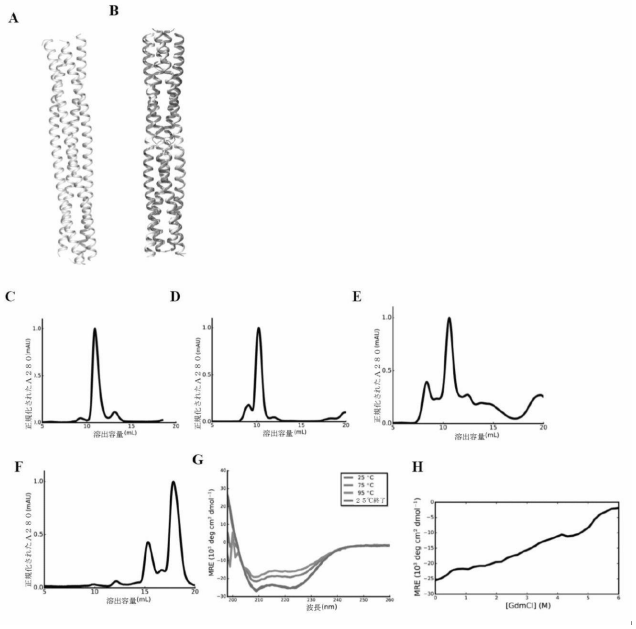
【図６Ａ－６Ｃ】



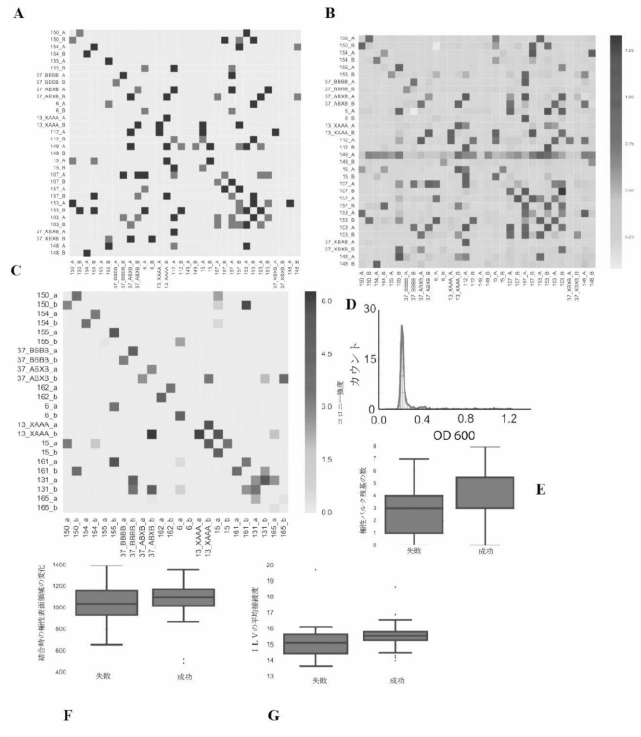
【図７Ａ－７Ｂ】



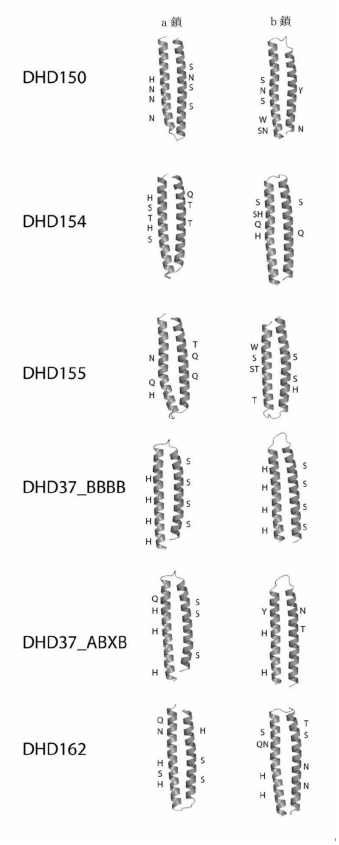
【図８Ａ－８Ｈ】



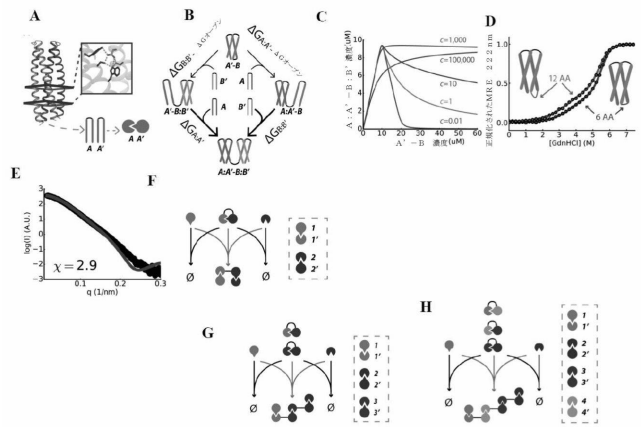
【図９Ａ－９Ｇ】



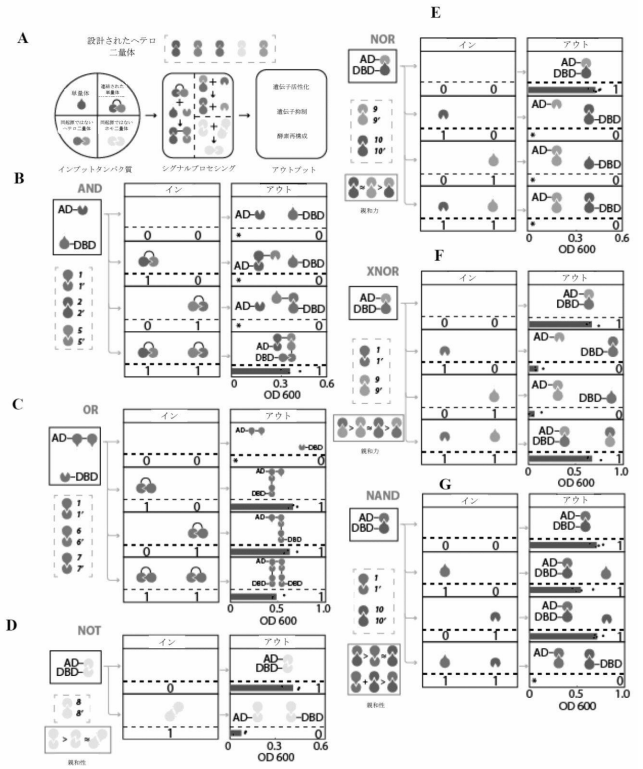
【図１０】



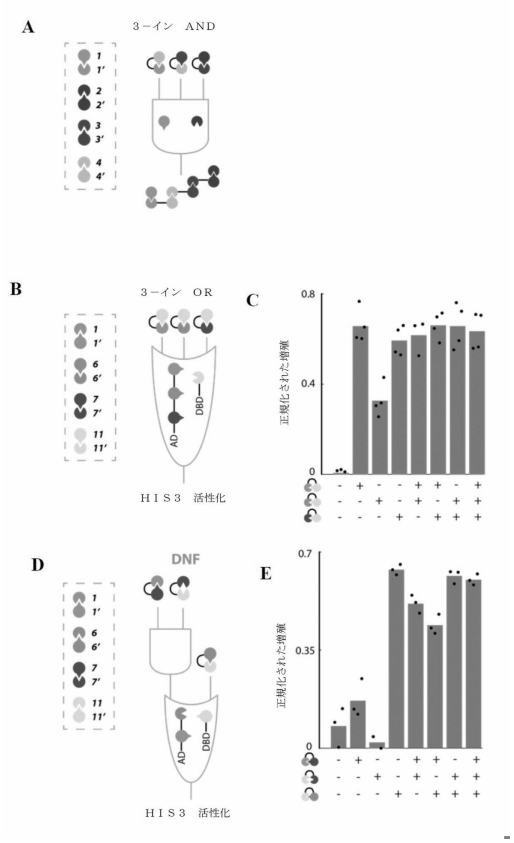
【図１１Ａ－１１Ｈ】



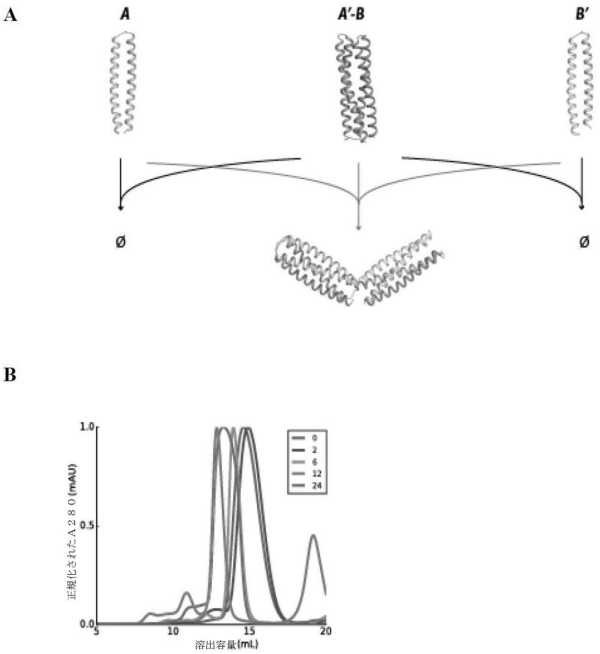
【図１２Ａ－１２Ｇ】



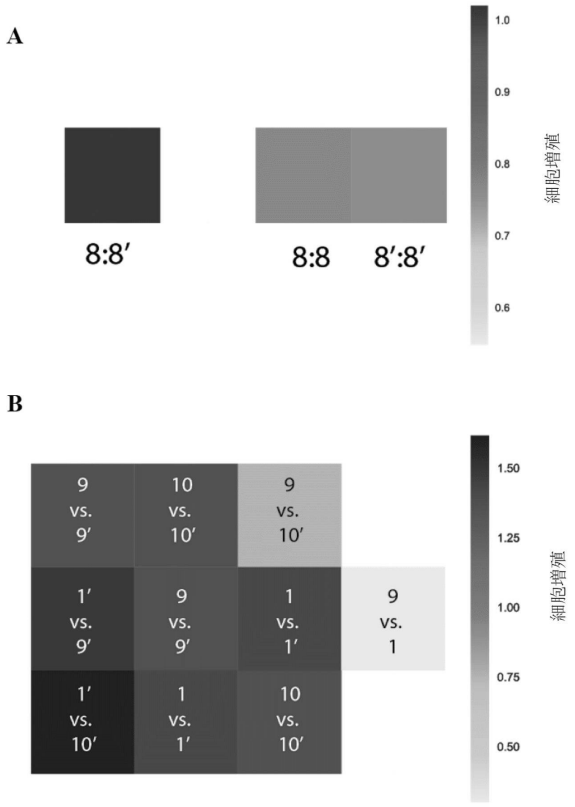
【図１３Ａ－１３Ｅ】



【図１４Ａ－１４Ｂ】



【図１５Ａ－１５Ｂ】



【図１６－１】

単量体A 配列番号	単量体B 配列番号
1	2
331	2
3	4
5	6
5	332
7	8
7	334
9	10
11	12
13	14
13	336
15	16
15	338
17	18
19	20
21	22
23	24
25	26
25	340
27	28
29	30
29	342
31	32
31	344
33	34
33	346
35	36
35	348
37	38
37	418
39	40
39	350
41	42
41	352
43	44
45	46
45	354
47	48
47	356
49	50
51	52
53	54
53	358
55	56
55	360
57	58
57	362
59	60
59	364
61	62
61	366
63	64
65	66
65	368
67	68
67	370
69	70
69	372
71	72
71	374
73	74
73	376
75	76
75	378
77	78
77	380
79	80
79	382
81	82
337	384
83	84
339	386
85	86
85	388
87	88
87	390
89	90
89	392
91	92
91	394
93	94
93	396
95	96
95	398
97	98
97	400
99	100
99	402
101	102
341	404
103	104
103	406
105	106
343	408
107	108
107	410
109	110
109	412
111	112
111	424
113	114
113	416
115	116
459	420
117	118
345	422
119	120
347	424
121	122
349	426
123	124
351	428
125	126
353	126
127	128
355	430
129	130
357	432
131	132
359	434
133	134
361	436
135	136
363	438
137	138
365	440
139	140
367	442
141	142

【図１６－２】

単量体A　配列番号	単量体B　配列番号
369	444
143	144
371	446
145	146
373	448
147	148
375	450
149	150
377	452
151	152
379	454
153	154
381	456
155	156
383	458
157	158
385	460
159	160
387	462
161	162
389	464
163	164
391	466
165	166
393	468
167	168
395	470
169	170
397	472
171	172
399	474
173	174
401	174
175	176
403	476
177	178
405	478
179	180
407	480
181	182
409	482
183	184

単量体A　配列番号	単量体B　配列番号
411	484
185	186
413	486
187	188
415	488
189	190
417	490
191	192
419	492
193	194
421	494
195	196
197	198
199	200
201	202
203	204
205	206
207	208
209	210
211	212
213	214
215	216
217	218
219	220
221	222
223	224
225	226
227	228
229	230
231	232
233	234
235	236
237	238
239	240
241	242
243	244
245	246
247	248
249	250
251	252
253	254
255	256
257	258

単量体A　配列番号	単量体B　配列番号
259	260
261	262
263	264
265	266
267	268
269	270
271	272
273	274
275	276
277	278
279	280
281	282
283	284
285	286
287	288
289	290

【配列表】

20225058660000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/059654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/435
ADD.

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)
C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/030780 A2 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]) 12 March 2009 (2009-03-12) abstract page 15, line 16 - page 16, line 26 page 23 - page 26 page 32 - page 34 claims 1-17 ----- -/--	1-116

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent 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 when the document is taken alone

"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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 December 2019	09/03/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Keller, Yves

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/059654

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/12988 A1 (PENCE INC [CA]; HOUSTON MICHAEL E JR [CA] ET AL.) 10 April 1997 (1997-04-10) abstract page 3 - page 4 figure 3D figure 4A page 14 - page 16 figures 1-25 figures 1A-1F	1-116
X	O'SHEA E K ET AL: "Peptide 'Velcro': Design of a heterodimeric coiled coil", CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE, GB, vol. 3, no. 10, 1 October 1993 (1993-10-01), pages 658-667, XP024248213, ISSN: 0960-9822, DOI: 10.1016/0960-9822(93)90063-T [retrieved on 1993-10-01] the whole document	1-116
X	HELENA GRADISAR ET AL: "De novo design of orthogonal peptide pairs forming parallel coiled-coil heterodimers", JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, vol. 17, no. 2, 28 December 2010 (2010-12-28), pages 100-106, XP055066656, ISSN: 1075-2617, DOI: 10.1002/psc.1331 the whole document	1-116
X	CROOKS RICHARD O ET AL: "Deriving Heterospecific Self-Assembling Protein-Protein Interactions Using a Computational Interactome Screen", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 428, no. 2, 2 December 2015 (2015-12-02), pages 385-398, XP029407028, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2015.11.022 the whole document	1-116
X	AARON W. REINKE ET AL: "A Synthetic Coiled-Coil Interactome Provides Heterospecific Modules for Molecular Engineering", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 132, no. 17, 5 May 2010 (2010-05-05), pages 6025-6031, XP055652786, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja907617a the whole document	1-116

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/059654

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	AMANDA L. EDWARDS ET AL: "Challenges in Targeting a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor with Hydrocarbon-Stapled Peptides", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 11, no. 11, 19 September 2016 (2016-09-19), pages 3146-3153, XP055373864, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/acschembio.6b00465 -----	
T	HELENA GRADISAR ET AL: "Design of a single-chain polypeptide tetrahedron assembled from coiled-coil segments", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 9, no. 6, 28 April 2013 (2013-04-28), pages 362-366, XP055293813, Basingstoke ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1248 the whole document -----	
X,P	CHEN ZIBO ET AL: "Programmable design of orthogonal protein heterodimers", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD., ETC.¦, LONDON, vol. 565, no. 7737, 19 December 2018 (2018-12-19), pages 106-111, XP036664328, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/S41586-018-0802-Y [retrieved on 2018-12-19] the whole document -----	1-116

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/059654

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 additional 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 an 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.:

1-116(partially)

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 Application No. PCT/US2019/059654

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-116(partially)

A heterodimer protein, comprising:(a) a monomer A polypeptide, wherein the monomer A polypeptide comprising 1-5 alpha helices and(b) a monomer B polypeptide, wherein the monomer B polypeptide 1-5 alpha helices,wherein monomer A and monomer B non-covalently interact to form the designed heterodimer protein and wherein the alpha helice of monomer A is SEQ ID. No. 1 (as well as subject matter to the monomer A as defined above (SEQ ID No 1))

2-290. claims: 1-116(partially)

A heterodimer protein, comprising:(a) a monomer A polypeptide, wherein the monomer A polypeptide comprising 1-5 alpha helices and(b) a monomer B polypeptide, wherein the monomer B polypeptide 1-5 alpha helices,wherein monomer A and monomer B non-covalently interact to form the designed heterodimer protein and wherein the alpha helice of monomer A is SEQ ID. No. 2-290 (as well as subject matter to the monomer A as defined above (SEQ ID No 2-290)) each SEQ ID No representing a single invention

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2019/059654

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009030780 A2	12-03-2009	AT 538129 T	15-01-2012
		EP 2188303 A2	26-05-2010
		US 2010305304 A1	02-12-2010
		WO 2009030780 A2	12-03-2009
WO 9712988 A1	10-04-1997	AU 695679 B2	20-08-1998
		EP 0854931 A1	29-07-1998
		JP H11512620 A	02-11-1999
		WO 9712988 A1	10-04-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
G01N 33/53 (2006.01)		G01N	33/53	D

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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

(74)代理人 100117189
弁理士 江口 昭彦
(74)代理人 100134120
弁理士 内藤 和彦
(72)発明者 チェン，ジボ
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，ルーズベルト ウェイ エヌイー ４５４５，スイート ４００，ユニバーシティ オブ ワシントン内
(72)発明者 ボーイケン，スコット
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，ルーズベルト ウェイ エヌイー ４５４５，スイート ４００，ユニバーシティ オブ ワシントン内
(72)発明者 ベルメオ，シェリー
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，ルーズベルト ウェイ エヌイー ４５４５，スイート ４００，ユニバーシティ オブ ワシントン内
(72)発明者 ランガン，ロバート，エー．
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，ルーズベルト ウェイ エヌイー ４５４５，スイート ４００，ユニバーシティ オブ ワシントン内
(72)発明者 ベイカー，デイビッド
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，ルーズベルト ウェイ エヌイー ４５４５，スイート ４００，ユニバーシティ オブ ワシントン内

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA46
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 EA50 FA74