

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-89197

(P2004-89197A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード (参考) |
|----------------------------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09              | C 1 2 N 15/00 | 2 G O 4 5   |
| C 1 2 Q 1/68               | C 1 2 Q 1/68  | 4 B O 2 4   |
| G O 1 N 33/15              | G O 1 N 33/15 | 4 B O 6 3   |
| G O 1 N 33/50              | G O 1 N 33/50 |             |
| G O 1 N 33/53              | G O 1 N 33/53 |             |

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

|              |                                   |          |                       |
|--------------|-----------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2003-350140 (P2003-350140)      | (71) 出願人 | 595134788             |
| (22) 出願日     | 平成15年10月8日 (2003.10.8)            |          | カウフマン、スチュアート・アラン      |
| (62) 分割の表示   | 特願2002-66165 (P2002-66165)<br>の分割 |          | KAUFFMAN Stuart Alan  |
| 原出願日         | 昭和60年6月17日 (1985.6.17)            |          | アメリカ合衆国 ニュー メキシコ 87   |
| (31) 優先権主張番号 | 01379/85-8                        |          | 501, サンタ フェ, モンテセート 1 |
| (32) 優先日     | 昭和60年3月30日 (1985.3.30)            |          | 5                     |
| (33) 優先権主張国  | スイス(CH)                           |          | 615 OLD GULPH ROAD    |
|              |                                   |          | USA-BRYN MAWR, PENNS  |
|              |                                   |          | YLVANIE 12010         |
|              |                                   | (74) 代理人 | 100078282             |
|              |                                   |          | 弁理士 山本 秀策             |
|              |                                   | (72) 発明者 | バリベ、マール               |
|              |                                   |          | スイス国、1208 ジュネーブ、リュ    |
|              |                                   |          | ・ジョン・レフウ、2            |
|              |                                   |          | 最終頁に続く                |

(54) 【発明の名称】 組換えDNA技術によってDNA、RNA、ペプチド、ポリペプチド、または蛋白質を取得するための方法

## (57) 【要約】

【課題】 予じめ定められた性質を利用して遺伝子産物を得るという全く新規な方法を開発すること。

【解決手段】 生物学的手段によってペプチドまたはポリペプチドを製造するための方法であって、少なくとも部分的にはストキャスティック合成ポリヌクレオチドからなる遺伝子を、1つの共通の培地内で同時に作成し；このようにして得た遺伝子を培養によって蛋白質を生産するクローンを生じさせ；特定された性質を少なくとも1つ有するペプチドまたはポリペプチドを生産するこれらのクローンを確認するよう、形質転換されたこのようなクローンについて、スクリーニング及び/又は選択を行う、ことを含むことを特徴とする方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

予じめ定められた結合性を有するペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を同定する ( i d e n t i f y i n g ) 方法であって :

( a ) 該予じめ定められた結合性 ( p r e d e t e r m i n e d b i n d i n g p r o p e r t y ) を検出するためのリガンドを供給し ;

( b ) ストキャスティックに生成した ( s t o c h a s t i c a l l y g e n e r a t e d ) ポリヌクレオチド配列の多様な集団を合成し、しかして、該ポリヌクレオチド配列は、4以上のアミノ酸位置で2以上のアミノ酸残基の予じめ定められた頻度 ( p r e d e t e r m i n e d f r e q u e n c y o f t w o o r m o r e a m i n o a c i d r e s i d u e s a t f o u r o r m o r e a m i n o a c i d p o s i t i o n s ) をコードするものであり ;

( c ) 該ストキャスティックに生成したポリヌクレオチド配列の多様な集団 ( d i v e r s e p o p u l a t i o n ) をひとつの発現ベクター集団 ( a p o p u l a t i o n o f e x p r e s s i o n v e c t o r s ) に挿入して、ストキャスティックに生成したポリヌクレオチド配列を含む多様な発現ベクター集団を形成せしめ ;

( d ) ストキャスティックに生成したポリヌクレオチド配列を含む多様な発現ベクター集団を発現せしめて、4以上のアミノ酸位置で2つ以上のアミノ酸残基を該予じめ定められた頻度で有する該ペプチド、ポリペプチド、または蛋白質の多様な集団を製造し ; そして

( e ) 該予じめ定められた性質を有する1以上のペプチド、ポリペプチド、または蛋白質と結合しこれを検出できる条件下で、該リガンドを用いることによって ( w i t h s a i d l i g a n d ) 、該多様なペプチド、ポリペプチド、または蛋白質の集団をスクリーニングする ; ことからなることを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、組換えDNA技術に関するものであって、更に詳細には、リガンドとの結合性という性質を利用する方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明は、ストキャスティック遺伝子及び結合性という予じめ定められた性質を有効に利用する技術に関するものであるが、このようなことは従来知られておらず新規である。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0003】

本発明は、予じめ定められた構造、式、配列を有する遺伝子産物を専らその対象としている技術の現状において、予じめ定められた性質を利用するという従来未知の全く新規な方法を開発する目的でなされたものである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、RNA、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を発現することのできる遺伝子を含む形質転換された宿主細胞を用いて、つまり組換えDNA技術を利用して、DNA、RNA、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を同定、分離又は取得するための方法を、その目的対象とするものである。

## 【0005】

この発明は、特に、一応 ( i n a f a s h i o n ) 次のことができるストキャスティック遺伝子 ( s t o c h a s t i c g e n e ) またはストキャスティック遺伝子のフラグメントを製造することを目的とするものである : 該遺伝子またはその断片は、これら

10

20

30

40

50

の遺伝子の転写または翻訳の後に、(およそ少なくとも10,000の)非常に数多くの全く新規な蛋白質を、これらの蛋白質を発現(expressing)しうこれらの遺伝子をそれぞれ含有する(バクテリアまたは真核細胞からなる)宿主細胞の存在下で、同時に得ることができるものであり、しかる後に、該クローンの内どれが希望する性質を有する蛋白質を生産するのかを決定する目的で、選択又はクリーニングを行うものである。該希望する性質としては、例えば、構造的、酵素的、触媒的、抗原的、薬学的性質、またはリガンドとしての性質(properties of liganding)があり、そして更に一般的には、化学的、生化学的、生物学的その他の性質があるのである。

**【0006】**

この発明は、また、利用できる性質、特に化学的、生化学的、または生物学的性質、を有するDNAまたはRNA配列(sequence)を得る方法を、その目的とするものである。

10

**【0007】**

したがって、この発明が、科学、工学、及び医学の非常に数多くの分野において、非常に数多くの応用に受け入れられることは、明白なことである。

**【0008】**

この発明にしたがってペプチドまたはポリペプチドを製造するための方法は、次の特徴を有するものである：少なくとも一部分は合成ストキャスティックポリヌクレオチドからなる遺伝子を、同じ培地中で同時に製造し；このようにして得られた遺伝子を宿主細胞内に導入し；ストキャスティック遺伝子をクローニングし(clone)そしてこれらのストキャスティック遺伝子の各々によって発現される蛋白質の製造が行われるよう、これらの遺伝子を含有する形質転換された宿主細胞の独立クローン(independent clone)を同時に培養し；希望する活性を少なくとも1つは有するペプチドまたはポリペプチドを生産するこれらのクローンを確認する(identify)よう、形質転換された宿主細胞のクローンの選択及び/又はスクリーニングを行い；しかる後に、このようにして確認したクローンを単離し；そして、これらを培養して、該性質を有する少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチドを生産させるのである。

20

**【発明の効果】****【0009】**

多様なストキャスティック遺伝子集団及び結合性という予じめ定められた性質を有効に利用することによって、該性質を有するペプチド類を同定、分離することができ、また該ペプチド類をコードするポリヌクレオチド配列を分離、製造することができる。

30

**【発明を実施するための最良の形態】****【0010】**

この方法を実施する第1の態様においては、ストキャスティック遺伝子は次のようにして製造する。すなわち、はじめに直線状となした発現ベクターの2つの端部からの4種類のデオキシホスホヌクレオチドA、C、G、Tのストキャスティック共重合によって；次いで、それらの3末端が相補的であるところの2つのストキャスティック配列(stochastic sequence)を有する発現ベクター1分子によって構成された、ストキャスティック第1DNA鎖(stochastic first strand of DNA)を形成するよう、コヘッシブ-エンド(cohesive end)を形成せしめ；ひき続いてストキャスティック第2DNA鎖を合成することによって、製造するのである。

40

**【0011】**

この方法を実施するための第2の態様によれば、ストキャスティックDNA断片を形成するよう、コヘッシブ-エンドを有しないオリゴヌクレオチドの共重合によって、続いて、予じめ直線化した発現ベクターに該断片を連結することによって、ストキャスティック遺伝子を製造するのである。

**【0012】**

発現ベクター(expression vector)としては、プラスミド、特に細

50

菌プラスミドが使用できる。発現ベクターとして pUC8 プラスミドを使用すると卓越した結果が得られる。また発現ベクターとしては、ウイルス DNA、または、ウイルス DNA とプラスミドとのハイブリッドも使用することができる。宿主細胞としては、HB101 及び C600 といった原核生物細胞、または真核生物細胞が使用できる。

【0013】

上述した第2の態様による方法を利用する場合には、1群の回帰性オクタマー (palindromic octamer) を形成するオリゴヌクレオチドを利用することができる。

【0014】

次のグループからなる回帰性オクタマーを利用すれば、特に、良い結果が得られる：

10

5' GGAATTCC 3'  
 5' GGTCGACC 3'  
 5' CAAGCTTG 3'  
 5' CCATATGG 3'  
 5' CATCGATG 3'。

【0015】

1群の回帰性ヘプタマー (heptamer) を形成するオリゴヌクレオチドを使用することも可能である。

【0016】

次のグループからなる回帰性ヘプタマーを利用すれば、非常に良い結果が得られる：

20

5' XTCGCGA 3'  
 5' XCTGCAG 3'  
 5' RGGTACC 3'

式中、X = A、G、C 又は T

R = A 又は T。

【0017】

これらの手法を利用する方法の中で特に有利な方法によれば、上述した手法によって得た形質転換された宿主細胞の独立クローンのカルチャーから、プラスミドの形質転換性 DNA (transforming DNA) を分離、精製し；次いで、この精製された DNA は、少なくとも1つの制限酵素 (restriction enzyme) で切断するが、この酵素は、回帰性オクタマーまたはヘプタマー中には存在するけれども使用した発現ベクター中には存在しない特異的酵素切断部位に、対応するものである；この切断処理の後に、制限酵素を失活させ；このようにして得た直線化されたストキャスティック DNA 断片の総体 (ensemble) を、T4 DNA リガーゼを用いて同時に処理して、新しいストキャスティック配列を含む新しい DNA 総体を創製し、その結果、この新しい総体は、当初の総体における遺伝子の数よりもより多い沢山のストキャスティック遺伝子を、含むことができることになるのである。そこで、この新しい形質転換性 DNA の総体を、宿主細胞を形質転換しそしてこれらの遺伝子をクローニング (clone) するために、利用し；そして最後に、スクリーニング及び/又は選択処理を利用して、形質転換された宿主細胞の新しいクローンを分離し、そして、これらを培養して、少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチド、例えば新しい蛋白質を製造するのである。

30

40

【0018】

宿主細胞のクローンを選択するときの基準として利用できる性質としては、与えられたクローンから生産されたペプチドまたはポリペプチドが有するところの、与えられた化学反応を触媒する能力を挙げることができる。

【0019】

例えば、いくつかのペプチド及び/又はポリペプチドの製造にあっては、上記した性質としては、化学的化合物からなる最初のグループから目的とする最終の1つの化合物にいたる一連の反応を触媒する能力 (capacity) を、利用することができる。

【0020】

50

多数のペプチド及びポリペプチドから構成される総体を再帰的自触反応によって ( *reflexively autocatalytic* ) 製造する目的の場合は、該性質としては、適宜な培地中で上記総体をアミノ酸及び / 又はオリゴペプチドから合成する際、それを触媒する能力を挙げることができる。

【0021】

また、該性質としては、与えられた化合物の生物学的又は化学的諸性質を選択的に修飾する ( *modify* ) 能力、例えばポリペプチドの触媒活性を選択的に修飾する能力、を利用することもできる。

【0022】

また、該性質としては、例えばホルモン、神経伝播体、ゆ着因子、成長因子、及び、DNAの複製の特異的レギュレータ及び / 又はRNAの転写及び / 又は翻訳の特異的レギュレータの中から選ばれる少なくとも1つの生物学的活性化合物が有する少なくとも1つの生物学的機能を、刺激し、阻害し、または修飾する能力、を利用することもできる。

10

【0023】

また、該性質としては、ペプチドまたはポリペプチドが与えられたリガンド ( *ligand* ) と結合する能力、を利用することもできる。

【0024】

この発明は、また、上記した方法で得たペプチドまたはポリペプチドを、リガンドの検出及び / 又は滴定のために使用することも、その目的対象とするものである。

【0025】

この発明を実施するための特に有利な態様によれば、形質転換された宿主細胞 ( *host cell* ) のクローンを選ぶ基準 ( *criterion* ) は、これらのペプチドまたはポリペプチドが有するところの、例えば蛋白質といった生物学的活性分子の効果をシミュレートしたり修飾したりする能力であり、そして、この性質を有するペプチドまたはポリペプチドの少なくとも1つを生産する形質転換された宿主細胞のクローンを、次のようにして、スクリーニングし及び / 又は選択する。すなわち、この活性分子に対する抗体を調製し；次に、これらの抗体を精製した後、このペプチドまたはポリペプチドを含有するクローンを確認する ( *identify* ) するのにこれらの抗体を利用し；次いで、このようにして確認したクローンを培養し、これらのクローンによって生成されたペプチドまたはポリペプチドを分離、精製し；そして最後に、ペプチドまたはポリペプチドを *in vitro* アッセイにかけて、それが該分子の効果をシミュレートしたり ( *simulate* ) または修飾したりする能力 ( *capacity* ) を有することを確かめるのである。

20

30

【0026】

この発明に係る方法を実施するための他の態様によれば、選択の基準にして役立つ性質としては、与えられた抗原のエピトープ ( *epitopes* ) の内の1つに類似したエピトープを少なくとも1つ有するか否かという点である。

【0027】

この発明は、上記した方法によって得られそして化学療法的に活性な物質として有用なポリペプチドを製造するのに、利用される。

40

【0028】

特に、該抗原がEGFの場合には、この発明によれば、上皮腫の化学療法的処置に有用なポリペプチドを得ることができる。

【0029】

この方法の変形によれば、DNAハイブリッドの天然の部分によって発現される蛋白質に対応する抗体に対する親和クロマトグラフィによって、希望する性質を有するペプチドまたはポリペプチドを生成する形質転換宿主細胞のクローンを、確認しそして単離する。

【0030】

例えば、ハイブリッドDNAの天然の部分が - ガラクトシダーゼ発現遺伝子を含んで

50

いる場合には、抗 - ガラクトシダーゼ抗体に対する親和クロマトグラフィによって、形質転換された宿主細胞の該クローンを、有利に確認しそしてこれを単離することができるのである。ハイブリッド ペプチドまたはポリペプチドの発現及び精製の後に、それらの新規な部分を分離しそして単離すればよいのである。

**【0031】**

この発明は、また、ワクチンを調製するのに上述した方法を利用するのにも応用される；その応用は次の特徴を有するものである。すなわち、病原剤 ( p a t h o g e n i c a g e n t ) に対する抗体を単離する、例えば、この病原剤に対する抗体産生能を有する動物体内にこの病原剤を注入し、しかる後に生成される抗体を単離し；そして、病原剤のエピトープの1つに類似した少なくとも1つのエピトープを有する蛋白質を少なくとも1つ生成しうるクローンを確認するのに、これら上記した抗体を使用し；これらのクローンに対応する形質転換宿主細胞を培養して、これらの蛋白質を製造し；この蛋白質を細胞のクローンから単離、精製し；そして、この蛋白質を、該病原剤に対するワクチンの製造のために、使用するのである。

10

**【0032】**

例えば、抗 - H V B ワクチンを調製するためには、H V B ウイルスのカプシド蛋白質 ( c a p s i d e p r o t e i n ) を少なくとも1つ抽出、精製し；H V B ウイルスのエピトープの1つに類似したエピトープを少なくとも1つ有するこの蛋白質に対する抗体を産生する能力を有する動物に、この蛋白質を注入し；そして、この蛋白質を製造しよう、これらのクローンに対応する形質転換された宿主細胞のクローンを培養し；これらの細胞のクローンのカルチャー ( c u l t u r e ) から、該蛋白質を単離、精製し；そして、抗 - H V B ワクチン製造のために、この蛋白質を利用すればよいのである。

20

**【0033】**

この発明に係る方法を実施する有利な態様によれば、宿主細胞は、バクテリアからなり、例えば、そのゲノムが - ガラクトシダーゼを発現する天然の遺伝子も含まずまた E B G 遺伝子も含まないようなエシェリヒア・コリ ( E s c h e r i c h i a c o l i ) 、すなわち Z - , E B G - E . c o l i から成る。形質転換細胞は、培地中において、X g a l 及びインディケーター I P T G の存在下で、培養し、そして - ガラクトシダーゼ機能が陽性の細胞を検出する；しかる後に、大規模培養のために、形質転換 DNA を宿主細胞の適宜なクローン内に移入して ( b e t r a n s p l a n t e d ) 、少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチドを製造するのである。

30

**【0034】**

また、形質転換された宿主細胞を選択する基準として利用される性質としては、これらのクローンの培養によって製造されたポリペプチドまたは蛋白質が有するところの、与えられた化合物への結合能を、挙げることもできる。

**【0035】**

この化合物は、特に、ペプチド、ポリペプチド及び蛋白質の中から、とりわけ、DNA の転写活性 ( t r a n s c r i p t i o n a c t i v i t y ) を調節する蛋白質の中から、有利に選ぶことができる。他方、該化合物は、DNA 及び RNA 配列の中からも選ぶことができる。

40

**【0036】**

またこの発明は、次のような蛋白質もその目的とするものである。すなわち、これらの蛋白質とは、形質転換された宿主細胞のクローンを選択する判断基準として利用される性質が、DNA の転写活性をコントロールする調整蛋白質 ( r e g u l a t o r y p r o t e i n ) とこれらの蛋白質とが結合する能力、さもなくば ( o r e l s e ) DNA 及び RNA 配列とこれらの蛋白質が結合する能力、から構成される場合に得られる蛋白質をいうのである。

**【0037】**

更にまた、この発明は、上述した第1番目の特定ケースにおいて得た蛋白質を、隣接 DNA 配列の複製又は転写をコントロールする c i s 調整配列として利用することも、その

50

目的としている。

【0038】

他方、また、この発明の用途としては、既述した第2番目のケースにおいて得た蛋白質の利用も包含されるものであるが、該利用とは、DNAのある配列を、このDNA配列を含有しこの蛋白質を発現する細胞内で、転写し又は複製する性質を修飾するために、該蛋白質を利用することをいうのである。

【0039】

また、この発明は、DNAの製造方法もその目的対象とするものであって、この方法は、少なくとも1部分はストキャスティック合成ポリヌクレオチドから成る遺伝子を、同一培地内で同時に生産することによって特徴づけられるものであり、次の点を特徴とするものである。すなわち、このようにして得られた遺伝子を宿主細胞内に導入して、形質転換された宿主細胞の総体(ensemble)を生成せしめ；この総体にスクリーニング及び/又は選択処理を行って、少なくとも1つの希望する性質を有するストキャスティックDNA配列(stochastic sequence of DNA)をそれらのゲノム中に含有する宿主細胞を、確認し；そして最後に、このようにして確認した宿主細胞のクローンからDNAを単離するのである。

10

【0040】

更にまた、この発明は、RNAを製造するための手法もその目的対象とするものであって、この手法(procedure)は、少なくともその1部分はストキャスティック合成ポリヌクレオチドから成る遺伝子を、同一培地内で同時に生産することによって特徴づけられるものであり、次の点を特徴とするものである。

20

【0041】

すなわち、このようにして得た遺伝子を宿主細胞内に導入して、形質転換された宿主細胞の総体を生成せしめ；このようにして製造した宿主細胞を同時に培養し、そして、希望する性質を少なくとも1つ有するストキャスティックRNA配列を含有する宿主細胞を確認するように、この総体のスクリーニング及び/又は選別を行い；そして、このようにして確認した宿主細胞から、RNAを単離するのである。該性質としては、例えばペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質であってもよいところの、与えられた化合物に対する結合能であってもよいし、また、与えられた化学反応の触媒能であってもよいし、また、転移RNAとなり得る能力であってもよい。

30

【0042】

さて次に、実施例を挙げながら、本発明に係る方法を更に詳細に、そしてまたその応用についても記述するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【実施例】

【0043】

先ず最初に、ストキャスティック遺伝子(stochastic gene)の合成を行い、そして、形質転換されたバクテリアのクローンを製造するために、バクテリア内にこれらの遺伝子を導入するのに特に有用な手法について、記述することにする。

【0044】

I) 発現ベクター上の直接合成

40

次のようにして、発現ベクター上の直接合成を行った。

【0045】

a) ベクターの直線化

pUC8発現ベクター30マイクログラム、すなわち約 $10^{13}$ 分子について、適宜な標準バッファー300L中でPstI制限酵素100ユニットを用いて37℃で2時間これをインキュベートして、該ベクターを直線化する。この直線化されたベクター(linearized vector)は、フェノール-クロロホルムで処理し、次いでエタノール中に沈澱せしめ、30Lの容積中に取り上げ、そして、標準TEBバッファー中0.8%アガロースゲル上に負荷する(load ed)。3V/cmの場で3時間移動せしめた後、直線化されたベクターを電氣的に溶出し(electro-eluted)、エタ

50

ノール中で沈澱させ、そして水30L中にとり上げる。

【0046】

b) 酵素ターミナル トランスフェラーゼ (TdT) を用いるストキャスティック合成 dGTP 1mM、dCTP 1mM、dTTP 0.3mM 及び dATP 1mM の存在下、適宜なバッファー300L中で、直線化されたベクター30 $\mu$ gをTdT30ユニットと37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させる。対応するメッセンジャーRNA中における“終止”コドンの頻度を減少せしめるために、低濃度のdTTPを選択する。他のデオキシヌクレオチド トリホスフェートよりもより低い濃度のdATPを使用すれば、いく分好ましくはないけれども、これと同様の結果を得ることができる。続いて、この反応工程中にアリクオート (aliquotes) を採取してそのゲルについて分析を行いつつ、PstI 10  
部位の3'末端上での重合を進行させる。

【0047】

3'末端当り添加したヌクレオチドの平均値が300に達するか又はそれをこえたときに、反応を終止し、そして、示差沈澱によってまたはBiogel P60といった分子篩を有するカラムを通過させることによって、遊離のヌクレオチドをポリマーから分離する。エタノール中で沈澱させて濃縮した後、ポリマーを更にTdTを用いて重合させるが、その場合、最初はdATPの存在下、次にdTTPの存在下で重合を行う。これら最後の2つの反応は、ゲル上で濾過することによって分離しそして短時間(30秒~3分)行うが、それは、ポリマーの3'末端に順次10-30Aを加え次いで10-30Tを加えるためである。 20

【0048】

c) 第2のストキャスティックDNA鎖の合成

上記した操作終了時には、ベクターの各分子は、それぞれ、2つのストキャスティック配列を持っているが、該配列の3'末端は相補的になっている。このポリマー混合物は、しかる後に、相補的末端がハイブリッド化 (hybridization) するのに都合の良い条件で、インキュベートする(150mM NaCl、10mM Tris-HCl、pH7.6、1mM EDTA、65 $^{\circ}$ Cで10分間、ひき続き1時間当り3~4%の割合で温度を下げながら22 $^{\circ}$ Cにまでもっていく。そこで、ハイブリッド化したポリマーは、4つのヌクレオチド トリホスフェートの存在下(200mM)、40 $^{\circ}$ Cで2時間の間、ポリメラーゼ1の大きなフラグメント (Klenow) 60ユニットと反応させる。この工程で、ハイブリッドポリマーの3'端部からの第2鎖の合成が完了する。しかる後に、線状化されたベクターから出発したこの直接合成の結果得られる分子は、適格細胞 (competent cell) を形質転換するのに用いるのである。 30

【0049】

d) 適格クローンの形質転換

CaCl<sub>2</sub> 6mM、Tris-HCl 6mM、pH8、MgCl<sub>2</sub> 6mMの存在下、濃度10<sup>10</sup> cells/mlのC600の適格HB101 100~200mlを、(上記で得た)ストキャスティックDNA調製物とともに、0 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。この混合物に対して、37 $^{\circ}$ C、3分間の温度ショックを与えた後、抗生物質を含まないNZY培地を400~800ml添加する。形質転換されたカルチャーは、37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした後、アンピシリンを40 $\mu$ g/ml含有するNZY培地を添加して10Lに希釈する。37 $^{\circ}$ Cで3~5時間インキュベートした後、増殖した (amplified) カルチャーを遠心分離し、そして、形質転換細胞のペレットをライオフファイルし、-70 $^{\circ}$ Cで貯蔵する。このようなカルチャーは独立形質転換株 (independent transformant) を3 $\times$ 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>含有しており、またこれらの独立形質転換株は、発現ベクター内に挿入されたユニーク (unique) ストキャスティック遺伝子を、それぞれ1個含有している。 40

【0050】

II) コヘッシブ - エンドを持たないオリゴヌクレオチドを出発原料とするストキャス 50

## ティック遺伝子の合成

この手法は次の事実を基礎をおくものである。その事実とは、慎重に選んだ回帰性オリゴヌクレオチドを重合することにより、ストキャスティック遺伝子の構築ができることであり、該遺伝子は、6個の可能な読取フレーム (reading frame) のいずれにおいても“終止”コドンを含むものではなく、また一方、すべてのアミノ酸を特定化するトリプレットのバランスのとれた表現を確実にするものである。更にまた、結果として得られる蛋白質において、シーケンスモチーフ (sequence motif) の反復を避けるために、オリゴヌクレオチドは、3の倍数ではない数の塩基を含むことができる。以下に述べる実施例は、これらの基準を満たすところの可能性のある結合の内の1つの使用を、記述したものである：

### a) オクタマーグループの選定

該オリゴヌクレオチドのグループは次式で示され：

```

5'   G G A A T T C C   3'
5'   G G T C G A C C   3'
5'   C A A G C T T G   3'
5'   C C A T A T G G   3'
5'   C A T C G A T G   3'

```

5つの回帰体 (palindrome) (このように自己相補性配列) からなるものであって、これは、ストキャスティック重合が、“終止”コドンを全く発生させないこと、そしてまたすべてのアミノ酸を特定すること、を容易に確認させるものである。

### 【0051】

どのような“終始 (stop)”コドンも発生させることがなく且つポリペプチド中に発見されるアミノ酸をすべて特定化するような、回帰性オクタマーのグループであれば上記以外のもも使用できることは明白である。また、2本鎖DNAを形成する相補体 (complement) が同じく使用されるという条件の下であれば、オクタマーの非回帰性グループであってもまたその他のオリゴマーであっても、これらのものも使用できることは明らかである。

### 【0052】

#### b) オクタマーのグループからストキャスティック遺伝子のアセンブリー

ATP 1 mM、ポリエチレングリコール 10%、及び T4 DNAリガーゼ 100 ユニットを含有する適宜なバッファー 100  $\mu$ l 中で、上述したオリゴヌクレオチド (常法にしたがって予じめ 5' の位置でリン酸化しておく) の各々 5  $\mu$ g を含有する混合物を、13 で 6 時間反応させる。この工程は、2本鎖状態でしかもコヘッシブ - エンドを有しないオリゴマーのストキャスティック重合を行うものである。その結果得られたポリマーは、モレキュラーシーブ (BioGel P60) を通して単離し、20 ~ 100 オリゴマーを有するものを回収する。濃縮した後、このフラクションを、上述した条件のもとで、再度 T4 DNAリガーゼによる触媒及び重合処理にかける。しかる後に、上述したようにして、少なくとも 100 オリゴマーがアSEMBルした (assembled) ポリマーを単離する。

### 【0053】

#### c) 宿主プラスミドの調製

上述したようにして、適宜なバッファー中で、Sma I 酵素によって pUC8 発現ベクターを線状化する。この Sma I によって線状化されたベクターは、コヘッシブ - エンドを有してはいない。したがって、この直線化ベクターは、仔牛の腸から得たアルカリホスファターゼ (CIP) を用いて、つまり適宜なバッファー中においてベクター 1 マイクログラム当り該酵素 1 ユニットのレベルで、37 で 30 分間処理する。しかる後に、この CIP 酵素は、フェノール - クロロホルムを用いて連続 2 回の抽出を行って、これを失活させる。直線化され脱リン酸された (dephosphorylated) ベクターは、エタノール中で沈澱させ、次いで 1 mg/ml で水中で再溶解させる。

### 【0054】

10

20

30

40

50

## d) ストキャスティック遺伝子のベクターへの連結

ベクターとポリマーとを等モル量ずつ混合し、これを、T4 DNAリガーゼ1000ユニット、ATP 1mM、ポリエチレングリコール10%の存在下、適宜なバッファー中において13で12時間インキュベートする。この工程によって、ストキャスティックポリマーが発現ベクター内に連結されて、2本鎖の環状分子が形成される。したがって、この分子は形質転換することが可能である。

## 【0055】

適格クローンの形質転換

適格クローンの形質転換は、先述した方法にしたがって実施する。

## 【0056】

III) ヘプタマーのグループを出発原料とするストキャスティック遺伝子のアセンブリ

この手法は、すぐ上で検討したものとは、次の点で相違する。つまりこの手法は、同一のモチーフをより少ない数だけ有するストキャスティック配列の代りに、可変性(variable)コヘッシブ-エンドを有する回帰性ヘプタマー(palindromic heptamer)を利用するものである。

## 【0057】

a) ヘプタマーのグループの選定

例えば、次に示す3つの回帰性ヘプタマーを利用することができる：

5' XTCGCGA 3'

5' XCTGCAG 3'

5' RGGTACC 3'

式中、X = A、G、C又はT

R = A又はT。

## 【0058】

ここにおいて、重合化の際に“終止”コドンが発生することは全くなく、そして、すべてのアミノ酸を特定するトリプレットは生成するものである。これらと同一の条件を満たすものであれば、上記以外のヘプタマーグループを用いることができるのは明白なことである。

## 【0059】

b) ヘプタマーのグループの重合

この重合処理は、オクタマーについて上述したのと全く同じ方法で実施する。

## 【0060】

c) コヘッシブ端部の除去

このようにして得たポリマーは、その2つの5'末端に1つの対になっていない塩基を有している。したがって、対応する3'末端に相補的な塩基を加えてやる必要がでてくる。これは次のようにして行う：2重鎖ポリマー(double

stranded polymer) 10マイクログラムを、4つのデオキシヌクレオチド-ホスフェート(200mM) 100µlの存在下、Klenow酵素10ユニットと、4で60分間反応させる。フェノールクロロホルム抽出によって酵素を失活せしめ、示差沈澱によって、ポリマーから遊離のヌクレオチド残渣を洗い落とす。次いで、上述した手法によって、このポリマーを(予じめ直線化し脱リン酸しておいた)宿主プラスミドに連結するのである。

## 【0061】

次の点に注目すべきである。すなわち、既述したこれら最後の2つの手法は回帰性オクタマーまたはヘプタマーを利用するものであるが、これらはある制限酵素の特異的部位を構成するものである。大抵の場合、pUC8発現ベクターからはこれらの部位は消失している。したがって、次のような処理をすることによって、ストキャスティック遺伝子の最初の調製物の複雑性を相当高くすることができる：上述した最後の2つの手法の内の1つによって得た10<sup>7</sup>の独立形質転換株のカルチャーから誘導したプラスミドDNAを、単

10

20

30

40

50

離する。このDNAを精製した後、これをClaI制限酵素(手法II)又はPstI制限酵素(手法III)を用いて、部分的に消化する。酵素失活後、部分消化されたDNAはT4 DNAリガーゼで処理するが、これは、最初の配列の基本的な性質は保持する一方で、非常に数多くの新規配列を創造する効果を有するものである。そこで、この新規なストキャスティック配列の総体は、コンピテント細胞を形質転換するのに使用できるのである。また、手法II及びIIIによってクローン化された(cloned)ストキャスティック遺伝子は、クローニングベクターに属しそしてストキャスティックDNA配列内には表現されない制限部位を利用することによって、pUC8発現ベクターから無傷のまま切り出すことができるのである。

#### 【0062】

丁度述べたばかりの2つの手法によって発生するストキャスティック遺伝子内での組換えは、反復的分子モチーフ(recurrent molecular motif)による内部相同(internal homology)の結果生じるものであるが、この組換えは、in vivoでコード連鎖(coding sequence)の突然変異生成を達成するためのもう1つの重要な方法である。その結果、新しい遺伝子の数を増加させることとなり、これらの遺伝子は検査することができるものである。

10

#### 【0063】

最後に、新しい合成遺伝子を発生させるためのすべての手法について、in vivo又はin vitroで遺伝子を修飾するための共通の技術を利用することができる。この共通の技術は、数多く存在し、例えば、解読フレームの変更、プロモータに対する配列の逆転、点突然変異、1又はいくつかのサプレッサ転移RNAを発現する宿主細胞の利用が挙げられる。

20

#### 【0064】

上述したことを考慮すると、次のことが明白になる。つまり、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを酵素重合すれば、極めて多数の(例えば10億以上の)各種遺伝子をin vitroで構築することができるのである。この重合化は、確率的に(in a stochastic manner)実施され、それは、反応混合物中に存在するヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのそれぞれの濃度によって決定されるものである。

#### 【0065】

上で指示したように、2つの方法は、このような遺伝子(又はコード化配列)をクローニングするのに利用することができる: 重合は、予じめ直線化したクローニング発現ベクターに対して直接行うか; または、逐次重合をすすめ、次いでポリマーを発現ベクターに連結することもできる。

30

#### 【0066】

これら2つのケースにおいて、次の工程は、適格バクテリア細胞(又はカルチャー内の細胞)の形質転換又はトランスフェクション(transfection)である。この工程は、生細胞内でストキャスティック遺伝子をクローニングすることから成り、生細胞中で遺伝子が不定的に増殖し発現するのである。

#### 【0067】

上述した手法のほかに、ストキャスティック配列の合成に適当な方法であれば他の方法をすべて使用することが、明らかにうまくいくものである。特に、化学合成によって得たDNA又はRNAの1本鎖オリゴマーを、生化学的手段によって重合し、次いで、このような遺伝子をクローニングするために、2本鎖DNA(cDNA)を発生せしめるのに確立された手法によって、これらのDNA又はRNAセグメントを処理することができる。

40

#### 【0068】

形質転換された宿主細胞のクローンのスクリーニングまたは選択

本発明に係る手法における次なる工程は、選択又はスクリーニングによって、形質転換又はトランスフェクションを受けた細胞を調査することから成るものであり、この調査の目的は、細胞が有する形質転換又はトランスフェクションDNAが、希望する性質を有す

50

る転写製品 (RNA) 又は翻訳製品 (蛋白質) の合成につながっていく、そのような細胞を1個又は数个単離すること、である。これらの性質としては、例えば、酵素的、機能的、又は構造的なものを挙げることができる。

【0069】

本発明に係る方法において、最も重要な面の1つは、この方法によって、有用な生産物 (RNA 又は蛋白質) を同時にスクリーニングまたは選択できることであり、そしてまた、該生産物を生産する遺伝子が得られることである。また、既述したようにして合成されクローン化されたDNAは、それ自体が生産物となり有用な生化学的性質を有するところのDNA配列を単離するために、選択又はスクリーニングすることができる。

【0070】

さて次に、工業的又は医学的応用の見地からして、新規な蛋白質が重大な関心事となるような形質転換細胞にあって、目的とするクローンをスクリーニングまたは選択するための好適な手法を以下に述べることにするが、本発明はこの例に限定されるものではない。

【0071】

これらの手法の内の1つは次のような思想によるものである：すなわち、ある蛋白質、又は、生化学的若しくは医学的に興味のある他のタイプの分子であって、ただし、該分子は免疫原性を有しているか (immunogenic) あるいは既に免疫原性化されているものであるが、この蛋白又は分子に対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を、確立された技術によって製造又は取得し；しかる後に、ストキャスティック遺伝子によって形質転換された非常に多数のクローンの中から、その蛋白質が上記した抗体と反応するクローンを確認するため、これらの抗体をプローブ (probe) として使用するものである。この反応は、ストキャスティック遺伝子によって合成されたポリペプチドと最初の分子との間に存する構造的相同 (structural homology)、の結果である。このようにして、最初の分子上で抗原決定基 (antigenic determinant) 又はエピトープとして行動する新規蛋白質を数多く単離することができる。このような新規蛋白質は、最初の分子の効果を容易にシミュレートし、刺激し、変調し、又はブロックしうるものである。この選択又はスクリーニング手段が、それ自体、非常に多くの薬学的及び生化学的用途を有し得ることは、明らかである。

【0072】

具体的な例において、この操作の第1の態様を以下に説明することとするが、この例のみに限定されるものではない：EGF (表皮成長因子) は、血液中に存在する小さな蛋白質であって、その役割は、上皮細胞を刺激することにある。その効果は、上皮細胞の膜内に位置する特異的レセプタとEGFとの間の相互作用によって、得られるものである。EGFの免疫原性を高めるためにKLH (カギアナ カサガイのヘモシアニン) に結合したEGFを動物に注入することによって、EGFに対する抗体を調製する。例えば、EGF又はEGF断片に相当する合成ペプチドをリガンドとしたアフィニティカラムを通すことによって、免疫化した動物の抗-EGF抗体を精製する。そして、この精製された抗-EGF抗体は、クロロホルムで融解せしめた (lysed) 多数の細菌クローンを固体支持体上でスクリーニングするためのプローブとして、使用するのである。抗-EGF抗体はストキャスティックペプチドまたは蛋白質と結合するのであるが、該ペプチドまたは蛋白質が有するエピトープは、最初の抗原のそれに類似のものである。該固体支持体を放射活性を有するプロテインA又は放射活性を有する抗-抗体とインキュベートした後、オートラジオグラフィ処理することによって、上記したようなペプチドまたは蛋白質を含有するクローンが明らかにされる。

【0073】

これらの工程は、このようなクローン、すなわちその各々が、スクリーニング抗体と反応する蛋白質 (及びその遺伝子) を1つ含有しているようなクローンを、確認するものである。非常に数多くのバクテリア細胞のコロニーまたはウィルスのブランク (例えば約1,000,000) 内でのスクリーニングを、うまく実施することができるし、また、例えば約1ナノグラムといった極微量の蛋白製品をうまく検出することができる。しかる後

10

20

30

40

50

に、これら確認したクローンを培養し、そして検出した蛋白質を常法によって精製する。これらの蛋白質は、上皮細胞カルチャー中 *in vitro* でテストを行い、これらの蛋白質が該カルチャー内で EGF の効果を阻害し、シミュレートし、又は変調する (*modulate*) か否かを決定する。このようにして得た蛋白質の内のいくつかのものは、上皮腫の化学療法的処置のために用いることができる。このようにして得た蛋白質の活性は、既述したのと類似の方法にしたがい、蛋白質をコード化する DNA を突然変異することによって、これを改良することができる。この手法の変形の 1 つとしては、ワクチンとして使用することができるこれらのストキャスティック

ペプチド、ポリペプチド、または蛋白質を精製することが挙げられるが、その目的は、一般的には、病原剤に対する免疫性を付与したり、または、免疫システムに対して別の効果を与えたりすること、例えば、与えられた抗原に関して、この抗原に対する抗体とこれらのペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を結合させることによって、この抗原に対する耐性を付与したりあるいは過感作性を軽減したりすること、である。このようなペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質は、*in vivo* のみでなく *in vitro* でも使用できることは明らかである。

10

#### 【0074】

更に正確には、与えられた抗原 X に対する抗体と反応する新規な蛋白質からなる総体 (*ensemble*) において、その各々は、X に共通したエピトープを少なくとも 1 つ有するものであり、したがって、この総体は、X に共通したエピトープの総体を有することになる。このため、総体又は亜-総体 (*sub-ensemble*) を、X に対する抗原性を付与するためのワクチンとして使用することができるのである。例えば、B 型肝炎ウイルスの 1 つ又はいくつかのカプシド蛋白質の精製を容易に行うことができる。そこで、これらの蛋白質は、例えばラビットといった動物内に注入することができるようになり、そして、最初の抗原に対応する抗体を、親和カラム精製によって回収することができる。これらの抗体は、上述したように、最初の抗原のエピトープの少なくとも 1 つに類似したエピトープを 1 つ有する蛋白質を少なくとも 1 つ産生するクローンを、確認する (*identify*) のに使用してもよい。精製した後、B 型肝炎に対する防御の目的で、これらの蛋白質を (単独又は併用して) 抗原として使用する。ワクチンの最終製品は、更に、最初の病原剤にアクセスする必要がないのである。

20

#### 【0075】

上記手法の記述において、選択 (*selection*) 又はスクリーニングを行うための手段を数多く述べてきた点に注目されたい。これらの手法は、すべて、形質転換クローンからの特定蛋白質を精製することを必要としているようである。これら蛋白質の精製は、確立された手法で行うことができ、特に、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換によるもの、及び親和クロマトグラフィーによる技術を利用することができる。また、ストキャスティック遺伝子によって産生された蛋白質は、例えば - ガラクトシダーゼ酵素配列を有するハイブリッド蛋白質の形でクローニングされ得るものである。この酵素は、抗 - ガラクトシダーゼ抗体に対する親和クロマトグラフィーにかけることができ、続いてハイブリッド部分を切断 (*cleavage*) して、(つまり、ハイブリッド蛋白質のバクテリアの部分と新規な部分とを分離するものである。) ペプチドまたはポリペプチドが有する特異的反応に対する触媒能を検出することに基礎をおくところの、第 2 のスクリーニングまたは選択方法にしたがって、ペプチドまたはポリペプチド及び対応する遺伝子を選択するための原理と手法とを、以下に記述することにする。

30

40

#### 【0076】

通常の場合、これは酵素 - ガラクトシダーゼ (*-gal*) によって果される機能であるが、ラクトースの切断を触媒することができるところの、蛋白質という特定のケースにおけるスクリーニングまたは選択について、これを具体的に以下に記述するが、この例に限定されるものではない。

#### 【0077】

上述したように、本法の第 1 工程は発現ベクターの非常に大きな総体を生成せしめるこ

50

とにあり、その各々はそれぞれ異なった新規蛋白質を発現するものである。具体的には、例えば、PstI制限部位にDNAのストキャスティック配列をクローニングしたpUC8発現ベクターを、選んでもよいのである。次に、このようにして得たプラスミドをE. coliのクローン(clone)内に導入するが、ただしそのクローンは、-ガラクトシダーゼ、Zに対する天然の遺伝子及び第1の遺伝子とは関係がないけれども-gal機能に対して突然変異をひき起す可能性がある第2の遺伝子EBGの双方を、既知の遺伝子技術によって、ゲノムから既に除去しておいたものである。このような宿主細胞(Z-, EBG-)は、それ自体では、ラクトースの加水分解を触媒することができず、その結果、生長用炭素源としてラクトースを使用することはできない。このため、-gal機能をスクリーニングまたは選択するのに、このような宿主クローンを利用することができることになるのである。

#### 【0078】

新規な-gal機能発現遺伝子を有する、形質転換されたE. coliクローンを分析するための便利な生物学的アッセイは、先に述べた形質転換バクテリアを、培地中にX-galを含有するペトリ皿の中で培養することから成る。この場合、-gal機能を発現する細菌コロニーは、すべて、青いコロニーとなつて可視化される。このような生物学的アッセイを用いると、弱い触媒活性でさえも検知することができる。この特徴的酵素の特異的活性は、1秒当り10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>生産物分子に亘っている。

#### 【0079】

ストキャスティック遺伝子によって合成された蛋白質は、100秒当り約1分子というように特異的活性(Specific activity)が弱いことを考慮に入れると、このような触媒活性の検知を可能にするという課題が依然として残っている。培地中にX-galを含有したペトリ皿内で、そして非代謝性インデューサであるIPTG(イソプロピル-D-チオガラクトシド)の存在下において、青い領域を可視化するに当っては、1平方ミリ当り約10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>分子のX-galを切断する必要がある。弱い酵素を発現しそして表面積1mm<sup>2</sup>を占める細菌コロニーは、その細胞数が10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>である。もしも各細胞が弱い酵素をわずか1コピーしか有しないのであれば、各細胞は、検知すべきX-galの10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>の切断を触媒することが必要となるであろうし、それには2.7~270時間を要することになるであろう。選択された条件の下では、細胞当りの各プラスミドのコピー数を5~20コピー/細胞にまで増幅でき(amplify)更には100又は1000にまでも増幅することができるようになるし、また、細胞の蛋白質の10%までは新規遺伝子によって特定することができるので、活性の弱い酵素が細胞当り100分子の場合には、青いコロニーを検知するのに必要な時間は、約0.27~2.7時間となる。

#### 【0080】

これらの事実の結果として、各コロニーがそれぞれ異なった新規遺伝子を発現しそしてその選択基準として-gal機能発現能を利用するような、非常に数多くの独立細菌コロニーのスクリーニングが、充分にうまく行われることになるのである。直径10cmのペトリ皿1個中に約2000コロニーが存在しても、これらのスクリーニングが可能なのである。このようにして、X-gal寒天シート1平方メートル上で、約2000万コロニーをスクリーニングすることができるのである。

#### 【0081】

X-galペトリ皿上で青色を呈するバクテリアコロニーがあつても、これが偽陽性である場合があるので、その点に留意すべきである。その原因は、バクテリアゲノム中に突然変異が起つてラクトース代謝能が付与されたり、または、該コロニーの細胞によって発現される新規蛋白質の触媒活性の結果として生じる理由以外の理由によるものである。陽性コロニーからの発現ベクターのDNAを精製しそしてZ-, EBG-E. coli宿主細胞を再度形質転換すれば、このような偽陽性を直接除去することができる。もしも-gal活性が発現ベクター内で新規遺伝子によってコード化された新規蛋白質によるものであれば、該ベクターによって形質転換されたこれらの細胞はすべて-gal機能を示

すことになる。これとは逆に、最初の青いコロニーが宿主細胞のゲノム内での突然変異によるものであれば、このような現象はめったに起るものではないし形質転換とは別のものであり、したがって、gal機能発現性を有する形質転換E. coliの新規クローンの細胞数は、ゼロまたは小さいものとなる。

#### 【0082】

ナイーブな(naive)バクテリアを再度形質転換した後の陽性クローン(青色)のすべてからの全発現ベクターであれば、これを大量に同時に精製する力は強調されるはずである。この目的が、触媒機能を有する蛋白質を選択するためのスクリーニングを実施することであることを考慮に入れ、そしてまた、新規なペプチドまたはポリペプチドがこの機能を実行する可能性が、弱くてもせいぜい $10^{-6}$ であり、一方、E. coli細菌宿主の1つのクローンが、これと同じ機能を実行できるような突然変異を受ける可能性が、 $10^{-5}$ であることを考慮に入れると、スクリーニングした2000万の形質転換細菌について次のような計算をすることができる：すなわち、20の陽性クローンが、その各々が担持している発現ベクター内の新規遺伝子に由来するものといえるであろうし、一方、200の陽性クローンがゲノム突然変異の結果得られたものといえるであろう。ナイーブなバクテリアを発現ベクター混合物で再度形質転換(retransformation)した後得た220の陽性の細菌クローン全部について、これから得た発現ベクターを大量精製(mass purification)すれば、多数の陽性クローンと非常に少数の細菌クローンを製造することができることになる：該陽性クローンは、希望する機能を有する新規な蛋白質をコード化する(code)20の発現ベクターを用いて形質転換したこれらすべてのバクテリアから成るものであり、一方、該細菌クローンは、ゲノムの突然変異の結果生じたものであり、関心の的とはならない発現ベクターを200有するものである。このような再度の形質転換の後に、陽性の細菌コロニーからの発現ベクターの精製サイクルを少し行くと、同一機能に対して、宿主細胞内でのバックグラウンド突然変異の率が高いにもかかわらず、希望する触媒活性に対して本当に陽性を示すところの極めてまれな発現ベクターを検知することができる。

#### 【0083】

このタイプのスクリーニング操作にひき続き、確立された技術によって新規蛋白質を精製することができる。このような蛋白質の大量生産は、有用な蛋白質の確認がそれをコード化する遺伝子の同時確認(simultaneous identification)と共に行われることによって、可能となるものである。その結果、その合成と単離とを大規模に行うためには、同一の発現ベクターも使用可能であるし、また、新規遺伝子を更に適当な発現ベクター内に移入(transplant)させることもできるのである。

#### 【0084】

このスクリーニング方法は、適当な生物学的アッセイが存在するのであればすべての酵素機能に対して適用しても、うまくいくものである。このようなスクリーニングにあっては、探し求めている該酵素機能が宿主細胞にとって有用である必要はない。酵素機能についてスクリーニングを行うことができるだけでなく、他のすべての希望する性質についてもスクリーニングを行うことができるが、このような性質に対しては適当な生物学アッセイが確立できることが必要である。したがって、触媒活性又は他のすべての希望する性質について、X-galペトリプレート上で可視化される-gal機能という簡単なケースにおいてすらも、約1億、場合によっては10億もの新しい遺伝子のスクリーニングをうまく行うことができるのである。

#### 【0085】

形質転換された宿主細胞の選択

他方、新しい遺伝子をコードする発現ベクターを含有する宿主細胞の生存に対してその性質の存否が基本的な役割をなしたり、または、その存否が、希望する新しい遺伝子をコーディングしそして発現するこれらのウィルスを選択するのに使用できたりする場合には、触媒的又はその他いかなる性質をも選択する技術が使用可能である。非限定的な具体的実施例として、-ガラクトシダーゼ機能の選択(selection)について記述す

10

20

30

40

50

ることとする。Z - E B G - E . c o l i の適宜のクローンは、ラクトースを唯一の炭素源とした場合には生育することができない。したがって、上述した第1工程を行った後に、他の炭素源を少しずつ無くしていったり又はスタート時からラクトースのみを使用したりするという条件を選び、新しい遺伝子をコード化する発現ベクターによって形質転換された非常に多数の宿主細胞を、このような選定された条件のもとで培養することができるのである。このような選択工程中に、下記によって、i n v i v oでの突然変異の生成が生じ、そのために希望する触媒機能を満たす能力(c a p a c i t y)を適応できるように改良することができるのである。上記突然変異の生成は、組換えによって；または、発現ベクターを回収しそしてそれらの新規遺伝子を各種の突然変異誘発物質により、i n v i t r oで突然変異を生成させるエクспリシティ(e x p l i c i t y)により；

また、その他すべての既知の技術によって；行われるものである。このケースのように、選択技術と便利なバイオアッセイ技術とが同時に存在する場合には、はじめに、次のような選択技術を用いることができる。すなわち、- g a l機能を発現する宿主細菌の表現(re p r e s e n t a t i o n)を富化し、そして、陽性細胞を効率よく確立するためにX - g a l培地を用いるペトリ皿上でスクリーニングを行う、という選択技術を用いることができるのである。使いやすいバイオアッセイが存在しない場合には、それぞれ異なった1個又は少数の宿主細胞であって、その発現ベクターが希望する反応を触媒する蛋白質をコードするような該宿主細胞を精製するためには、順次きびしくしていく選択方法を適用するのが最も容易なルートである。

10

20

## 【0086】

特定の反応を触媒する能力の外に、数多くの種類の構造的特徴と機能的特徴とを有する新しい蛋白質を見出すために、これらの技術を利用することができる。例えば、次のような新しい蛋白質のスクリーニングまたは選択を行うことができる。該新規蛋白質とは、DNAのシス-調節部位(c i s - r e g u l a t o r y s i t e)に結合し、それによって宿主細胞の機能の内の1つの発現をブロックし、または、DNAの転写をブロックしたり、転写その他を刺激したりする蛋白質をいうのである。

## 【0087】

例えば、E . c o l iの場合、ラクトースオペロンのリプレッサ(r e p r e s s o r)に突然変異を起した(i -)クローン ミュータント(c o l o n e m u t a n t i n)は、ラクトース オペレータが抑制されないという事実故に、構造的に - g a l機能を発現する。このタイプの細胞は、すべて、X - g a l培地を含有するペトリプレート上で青いクローンを産生する。このような宿主細胞を、新規蛋白質を合成する発現ベクターを用いて形質転換し、そして、青色でないこれらのクローンを検出するためにX - g a lペトリプレート上で、ふるい分けを行うことができる。これらの中には、該新規蛋白質がラクトース オペレータ(l a c t o s e o p e r a t o r)に結合して - g a lの合成を抑制する(r e p r e s s)場合を示すものがある。そのようなときには、このようなプラスミドを単離して再度形質転換を行い、- g a lを生産しないこれらのクローンを単離し、そしてしかる後に詳細な確認を行えばうまくいくのである。

30

40

## 【0088】

上述したように、有用な蛋白質のみでなく、有用な性質を有する生産物としてのRNAとDNAとをそれ自体の中で創製した後にこれを分離するために、この方法を利用することができる。これは、次の事実の結果である。すなわち、一方では、この手法は、他の細胞又は生化学的構成々分と直接相互反応することができるDNAのストキャスティック配列を創製することに存するものであり、他方、発現ベクター内でクローニングされたこれらの配列は、それ自体多種類の生化学的相互反応を行うことのできるRNAに転写される、という事実の結果なのである。

## 【0089】

それ自体有用なDNAを創製しそして選択するために該手法を使用する実施例この実施例は、有用なDNAの選択、及びそのDNAに結合する調節蛋白質(r e g u l a t o r

50

y protein)の精製と該蛋白質の作用のメカニズムの研究について、説明するものである。標準的技術によって得られる蛋白質であるエストラジオールリセプタ (oestradiol receptor)の調製について検討する。ステロイド系性ホルモンであるエストラジオールの存在下では、該リセプタは、その構造 (conformation)が変化し、ゲノムDNA中のある特定の配列と強固に結合し、その結果、性別に係る遺伝子の転写が影響を受け、そして受精率のコントロールに影響が出てくるのである。エストラジオール、そのリセプタ、及びそれらのベクター中に挿入された数多くの各種DNA配列からなる混合物をインキューベートした後、この混合物をニトロセルロースメンブランで濾過することによって、エストロゲン-リセプタ複合体に結合するストキャスティックDNA配列を直接選択する。ここにおいて、蛋白質に結合したこれらのDNAのみがメンブランに保持されるのである。洗滌しそして溶出した後、メンブランから遊離されてきたDNAを、そのまま、バクテリアを形質転換するのに使用する。形質転換されたバクテリアを培養した後、これらが含んでいるベクターを再度形質転換し、そして、上述したようにして、インキューベーション、濾過及び形質転換を1又は数サイクル実施する。これらの手法を行うことによって、エストラジオール-リセプタコンプレックスに対して高い親和性を有するストキャスティックDNA配列を、単離することができる。このような配列は、数多くの診断的応用及び薬学的応用、特に、受精率のコントロールと不妊症の処理のための応用に、途を拓くものである。

10

#### 【0090】

それ自身有用なRNAの創製と選択

20

既述したところにしたがって、多数のストキャスティックDNA配列 (sequence)を製造し発現ベクター内でクローニング (cloned)する。その結果、形質転換細胞においてこれらの配列から転写されたRNAは、それ自体で有用な生産物となり得るものである。以下に述べる手法によって、サプレッサ転移RNA (tRNA)をコード化するストキャスティック遺伝子を選択することができる: argE. 遺伝子内で“ノンセンス (nonsense)”突然変異を有する適格細菌細胞の中に、多数の ( $10^8$ 以上)ストキャスティック配列を形質転換する。これら形質転換されたバクテリアは、最小培地上にプレートする。この最小培地は、アルギニンは含有しないが、該プラスミド用の選択性抗生物質 (ベクターがpUC8の場合にはアンピシリン)を含有するものである。アルギニンを合成できるように形質転換されたバクテリアだけが、生育できるはずである。このフェノタイプ (phenotype)は、宿主ゲノムの復帰突然変異により、または細胞内にサプレッサが存在することによって起り得るものである。このようにして形質転換された各コロニーがarg+表現型か否かを、そのベクター内のストキャスティック遺伝子の存在によって試験することはたやすいことである: それは、そのコロニーからのプラスミドを精製し、そしてそれがそれによって形質転換されてargE細胞のすべてに対してArg+フェノタイプを与えることを、確認すればそれで足りるからである。

30

#### 【0091】

反応連鎖を触媒することができる蛋白質の選択

他の選択手段を以下に記述するが、該手段は、独立した応用に途を拓くものであり、関連する反応連鎖 (sequence of reactions)を触媒できるいくつかの新規蛋白質を同時にそして平行的に選択するという原理をベースとするものである。

40

#### 【0092】

この方法の基本的な考え方は次のとおりである: 最初の化合物を建築用ブロックまたは建設エレメントと考えると、これら当初化合物の総体から1またはいくつかの希望する化合物を触媒化された化学反応の連鎖によって合成したいという希望が出てくるが、その際、非常に数多くの反応ルートが存在し、それらは、他のものに完全に又は一部置換することができ、すべて熱力学的に可能であり、そして、建築ブロックのセットから希望する1又はそれ以上のターゲット化合物へと至るものである。もしも、建築ブロック化合物から標的とする化合物へと至る反応径路の少なくとも1つの各工程が、それぞれ、反応から構成されるものであってしかもその各反応が触媒されるものであれば、標的化合物を能率的

50

に合成する方が都合が良い。他方、多数の独立した又は1部独立した反応径路の内、どれが触媒されるものであるのかを決定することは、比較的重要なことではない。既に述べてきたように、その各々が相異なる新しい蛋白質を発現するところの宿主細胞を非常に数多く取得できるやり方について、説明してきたところである。

【0093】

これら新規な蛋白質のそれぞれが、建築ブロック ( b u i l d i n g b l o c k ) の総体から目的とする化合物へと導く可能性のある反応すべてからなるセット ( s e t ) における、1つの又はその他の可能性のある反応を触媒する候補者、なのである。もしも、可能性のある反応が十分な数だけ触媒されるよう、ストキャスティック蛋白質が、充分の数だけ、建築ブロック化合物を含む反応混合物中に存在しておれば、建築ブロック化合物のセットからターゲット化合物へと導く一連の関連する反応順序が、高い可能性をもって、新規蛋白質からなるサブセット ( s u b s e t ) によって触媒されることになるであろう。この手法を、1つのターゲット化合物の触媒現象だけでなくいくつかのターゲット化合物を同時に触媒する触媒現象へと進展させることができることは、明白なことである。

10

【0094】

この原理によれば、希望する化学反応連鎖を触媒する新規蛋白質のセットを平行して選択するために、次のようにして処理を進めることができる。

【0095】

1. 希望するターゲット化合物へと導く可能性を有する共存する反応の数を増加させる目的で、好ましくは適当な数の異なった化学種 ( c h e m i c a l s p e c i e s ) を利用することによって、建築ブロックを構成する化合物の希望するセットを特定する。

20

【0096】

2. 適当量の反応媒体を用い、非常に数多くの新規なストキャスティック蛋白質を添加する。ただし、これらの蛋白質は、これらの蛋白質を合成する形質転換細胞又はトランスフェクト細胞 ( t r a n s f e c t e d c e l l ) から単離したものである。ターゲット化合物が形成されたか否かを決定するために、アッセイを行う。もしそうであれば、この形成には新規蛋白質の混合物の存在が必要であることを確認する。もしそうであれば、そこで、該混合物は、建築ブロックセットからターゲット化合物へと至る1又はいくつかの反応径路を触媒する蛋白質のサブセットを含んでいなければならない。最初のクローンの総体を精製しそして分割するが、これらのクローンは、新規なストキャスティック蛋白質のセットを合成し、ターゲット化合物に至る反応連鎖を触媒するのに必要なサブセットを合成するものである。

30

【0097】

更に正確に、新規蛋白質の選択について以下に述べることにするが、この実施例のみに限定されるものではない。該新規蛋白質は、特定の小さな蛋白質の合成、とりわけ、より小さなペプチドとアミノ酸から構成される建築ブロックからのペントペプチドの合成を触媒できるものである。すべてこのペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端へと配向されており、20の異なったタイプのアミノ酸からなる直線配列から構成されるものである。2つのより小さなペプチド ( 又は2個のアミノ酸 ) の末端縮合により、またはより大きなペプチドの加水分解によって、1つの工程で、すべてのペプチドを形成することができる。このようにして、M - 1縮合反応によって、M残基を有するペプチドを生成せしめることができる。反応、これによって、長さ1、2、3・・・M残基を有する1セットのペプチドが相互転化され得る ( c a n b e i n t e r c o n v e r t e d ) のであるが、これらの反応数Rは、可能な分子種 ( m o l e c u l a r s p e c i e s ) の数Tよりも大きいものである。これは、下記数1と書き表わすことができる。

40

【0098】

【数 1】

$$R/T \approx M-2$$

このようにして、与えられたペプチド総体を出発物質として、非常に多数の独立した又は一部独立した反応径路が、特定の標的ペプチドの合成へとつながっていくのである。ペントペプチドを選択するが、その存在は、例えば、HPLC（液相高速クロマトグラフィ）、ペーパークロマトグラフィその他といったいくつかの通常の分析技術によって、手軽に決定することができる。稀釈した水性媒体中でペプチド結合を形成するには、エネルギーが必要である。しかし、もしも縮合反応（condensation reaction）にあづかるペプチドが適度に濃縮されていれば、ペプチド結合の形成は、加水分解上熱力的に好都合であるし、例えばペプシンやトリプシンといった適宜な酵素触媒の存在下、ATPや他の高エネルギー化合物の存在を必要とすることなく、ペプチド結合が形成されるのである。小さなペプチドであって、建築ブロックセットを構成するものであり、そしてそのアミノ酸は、トレーサーとして作用するよう、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ で放射活性的にマークしてなる、小さなペプチドのこのような反応混合物は、縮合反応に導くため、十分に高い濃度で使用することができる。

10

【0099】

例えば、次のように処理をすすめていけばうまくいくのである：建築ブロックセットを構成するために選択した、各アミノ酸とアミノ酸を2～4個有する小さなペプチド15mgを、0.1M、pH7.6のホスフェートバッファ0.25ml～1.0ml中に溶解する。上述したところにしたがって発生せしめそして単離した多数の新規な蛋白質を、それらの細菌又は他の宿主細胞から精製する。これらの新規蛋白混合物を、同じバッファ中で最終濃度が0.8～1.0mg/mlとなるまで溶解する。0.25ml～0.5mlの蛋白質混合物を、建築ブロック混合物に添加する。これを25～40で1～40時間インキュベートする。規則正しい間隔で、8μlのアリクオート（aliquots）を取り出し、最初のもは、“ブランク”として使用し、新規蛋白混合物を添加する前に取り上げる。これらのアリクオートは、溶剤としてn-ブタノール-酢酸-ピリジン-水（容積比で30：6：20：24）を用いるクロマトグラフィによって、これらを分析する。クロマトグラムは、これを乾燥させ、そしてニンヒドリンまたは（増感紙を用いて又は用いることなく）オートラジオグラフィによって分析する。建築ブロックセットを構成する化合物が放射活性的にマークされているので、ターゲット化合物は、放射活性を有するであるうし、1～10ngのレベルといった検出可能な十分に高い特異的活性を有することになる。標準的なクロマトグラフィ分析の代りに、HPLC（高速液体クロマトグラフィ）を用いることができ、これはより速くしかも実施するのがより簡単である。更に概説すれば、通常の分析手法であればすべてのものが使用可能である。その結果、最初の建築ブロックとして用いた化合物に比して、ターゲット化合物の収量がその重量の1ppm以下であっても、これを検出できることになるのである。

20

30

40

【0100】

もしもペントペプチドが、上記した条件のもとで生成されたものであれば、ただし、抽出物として、ストキャスティック遺伝子を含まない発現ベクターによって形質転換された宿主細胞から誘導されたもの、を利用しないで生成されたものであれば、このペントペプチドの生成は細菌汚染物（contaminant）の結果ではないということとなり、したがって、反応混合物中に新規な蛋白質のサブセットを存在せしめる必要がでてくるのである。

【0101】

次の工程は、細胞の特定のサブセットを分離することからなるものである。該細胞は、新規な蛋白質を有する発現ベクターを含有するものであり、該蛋白質は、ターゲットとし

50

てのペントペプチドに導く反応の順序を触媒するものである。実施例として、この連鎖を形成する反応の数が5とした場合、必要な反応を触媒する新規な蛋白質は約5つ存在する。新規遺伝子をコード化する発現ベクターを含有するバクテリアのクローンバンク (clone bank) が、約1,000,000という多数の異なる (distinct) 新規遺伝子を有している場合、これらすべての発現ベクターは、一団として (ensemble) 分離し、そして、 $10^8$ の細菌からなる100の異なるセットの中に再度形質転換せしめるが、その際、形質転換される各セット内の細菌数が平均して当初の遺伝子数の約半分、すなわち約500,000となるよう、ベクター対バクテリアの比率を十分に低くしておく。したがって、100セットのバクテリアの内の与えられたどの1つをとっても、それが5つの臨界的 (critical) 新規蛋白質の全体のセットを含む確率は、 $(1/2)^5 = 1/32$ となるのである。バクテリアの最初の100セットの内、約3つのものが5つの臨界的形質転換体を有することになる。これらのセットの各々において、新しい遺伝子の全数は、1,000,000というよりはむしろわずかに500,000となる。連続的にこの処理を、本件においてはトータルで約20回、くり返すことにより、5つの臨界的な新規蛋白質を分離する。これに引き続いて、5つのストキャスティック遺伝子からなるこのセットについて、突然変異を生成させそして選択処理を行うことにより、必要な触媒機能を改良することができる。20の反応からなる1つの連鎖 (sequence) を触媒する必要があり、そしてまた新規蛋白質をコーディングする20の遺伝子を併行して分離する必要がある場合には、 $10^8$ のバクテリアの各セットがそれぞれ $10^6$ のストキャスティック遺伝子の80%を受けとるよう、形質転換数を調節し、そしてこのようなバクテリアのセットを200使用すれば、それで足りるのである。20の新規蛋白質すべてが1つのセット内に発見される確率は、下記数2である。

10

20

【0102】

【数2】

$$0.8^{20} \simeq 0.015$$

したがって、200セット内の2つが、ターゲット化合物の生成を触媒するのに必要な20の新規遺伝子を有することになるのである。この20の新規遺伝子を単離するのに必要なサイクル数は、およそ30である。

30

【0103】

上記した原理及び手法は、ペプチドの場合から、化学の多数の領域へと広げられるものである。該化学の領域とは、化学反応が、一般的な酵素機能が可能な、水性媒質、温度、pH、及び濃度の各条件のもとで行われるような、化学領域である。いずれの場合においても、希望する1又はそれ以上のターゲット化合物の生成を検知するために、分析方法を利用することが必要である。また、ターゲット化合物に至る反応連鎖の数を増加させるのに十分な多数の建築ブロック化合物を選択することも、必要なことである。

【0104】

また、標的としてのペントペプチドの合成について行ってきた具体的な実施例は、次のとおり他へも普及せしめることができる：

40

【0105】

記述した手法は、他の生産物の内、ストキャスティックペプチド及び蛋白質を産み出すものである。これらのペプチド又は蛋白質は、他の化合物に対して、触媒的にあるいは他の方法で作用することができる。また、これらは、それらが作用するところの基質を構成することもできる。したがって、このようなストキャスティックペプチドまたは蛋白質が有するところの能力であって、それらの間で相互作用を行いそしてそれによってそれらの間のコンホメーション、構造又は機能を修飾改変する能力を、選択 (又はスクリーニング) することが可能となるのである。同じ様にして、これらのペプチド及び

50

蛋白質が有する能力であって、それらの間で、加水分解、縮合、トランスペプチド作用又はその他ペプチドを修飾する反応を触媒する能力、を選択（又はスクリーニング）することも可能である。例えば、ひき続いて、ストキャスティック ペプチド及び蛋白質のセットの少なくとも1つのメンバーによって、ある与えられたストキャスティック ペプチドの加水分解をひき続き行うことができ、そして、与えられた蛋白質の放射活性標識化を行い、続いてストキャスティック蛋白質混合物と共に、Mg、Ca、Zn、Feといったイオン及びATP又はGTPの存在下でインキュベートして、その測定を行うことができる。そこで、マークした蛋白質の放射活性フラグメントの出現を、既述したようにして測定するのである。この反応を触媒する1又はそれ以上のストキャスティック蛋白質は、上述したように、それらを生成する遺伝子にそって、形質転換クローンのライブラリー (library) の逐次消失 (sequential diminution) を行うことによって、再度単離することができる。

10

## 【0106】

この手法は、ストキャスティック ペプチド及びポリペプチドの総体の選定にまで広げられるが、これらのペプチド類は、最初の建築ブロック（アミノ酸及び小さなペプチド）からセットのペプチドまたはポリペプチドへ至る1セットの反応を触媒しうるものである。したがって、それ自身を合成し得る総体を選択することもできるのである；このような再帰的自己触媒反応のセットは、反応生成物はコンスタントに希釈するが建築ブロックの濃度は一定に維持するケモスタット (chemostat) において、確立することができる。二者択一的に、標準法によりリポソーム内にペプチドの複合セットを封入することによって、上記のようなセットの合成が促進助長される。このようなりポソーム (liposome) の周囲の高張水霧雰囲気では、より大きな蛋白質を形成する縮合反応によれば、リポソーム内の浸透圧が低下して、この縮合反応によって生成した水分子をリポソーム外へと追い出し、そのためにより大きなポリマーの合成がうまくいくのである。このような自己触媒反応の総体の存在は、2次元ゲル電気泳動とHPLCによって、ペプチドとポリペプチドとが安定な分布をもって合成されるのを見て、これを確認することができる。反応量の適量は、使用する分子種の数とペプチド結合が加水分解される以上にペプチド結合をうまく形成するのに必要な濃度と、によってきまってくる。自己触媒反応の総体 (autocatalytic ensemble) の分子種の分布は、異なった自己触媒反応の総体の出現により、自由に変えたり変化させたりする。自己触媒反応のセットを構成するペプチド及びポリペプチドは、（本発明に係る手法によって与えられたようにコード化されたペプチド及びポリペプチドからなる）大きな最初の総体と共通するあるエレメントを有してもよいが、また、最初の総体をコーディングするストキャスティック遺伝子の総体によってコード化されるものではないところの、ペプチド及びポリペプチドを含有することもできる。

20

30

## 【0107】

このような自己触媒反応のセットを確立するのにその生産物が必要とされるところの、ストキャスティック遺伝子のセットは、既述したように、形質転換クローンのライブラリーの逐次消失によって、これを単離することができる。また、ストキャスティック遺伝子によって最初にコード化されそして自己触媒反応のセット内で連続的に合成されたコード化ペプチドを、自己触媒反応のセットは含むこともできる。ペプチド及び蛋白質のコード化されたこのサブセットを単離するために、自己触媒反応のセット (autocatalytic set) を使用して、動物の免疫を通し、自己触媒反応のセットを構成する非常に数多くの構成成分を認識するポリクローナル血清を得ることができる。

40

## 【0108】

これらの血清は、ストキャスティック遺伝子ライブラリーのスクリーニングに利用することができる、血清中に存在する抗体と結合しうる蛋白質を発現するこれらの遺伝子を発見することができる。

## 【0109】

このストキャスティック遺伝子のセットは、ストキャスティック セットの中に存続し

50

ているコード化されたストキャスティック蛋白質を、非常に数多く発現するものである。このような自己触媒反応セットのコード化された構成々分の残りの部分は、ストキャスティック遺伝子ライブラリーの逐次消失によって、これを単離することができるが、該ライブラリーから、免疫法によって検出されたサブセットを、はじめに除去しておく。

【0110】

記述したところによって得た、このようなペプチド及び蛋白質の自己触媒反応セットには、実用的な応用を数多く見出すことが可能である。

【0111】

なお、本発明の他の実施の態様は、以下のとおりである。

【0112】

1. 生物学的手段によってペプチドまたはポリペプチドを製造するための方法であって、少なくとも部分的にはストキャスティック合成ポリヌクレオチドからなる遺伝子を、1つの共通の培地内で同時に作成し；このようにして得た遺伝子を宿主細胞内に導入し；ストキャスティック遺伝子をクローニングしそしてこれらのストキャスティック遺伝子の各々によって発現される蛋白質の製造に至るよう、これらの遺伝子を含有する形質転換宿主細胞の独立クローンを同時に培養し；特定された性質を少なくとも1つ有するペプチドまたはポリペプチドを生産するこれらのクローンを確認するよう、形質転換されたこのようなクローンについて、スクリーニング及び/又は選択を行い；このようにして確認したクローンを単離し、次いで、該性質を有する少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチドを生産するよう、該クローンを生長させること、を特徴とする方法。

10

20

【0113】

2. 実施態様第1項において、該遺伝子は次のようにして製造することを特徴とする方法：予じめ直線化した1つの発現ベクターの2つの末端からはじめて、4つのタイプのデオキシホスホヌクレオチドA、C、G及びTをストキャスティック共重合させることにより；次いで、それらの3'末端が相補的であるところの2つのストキャスティック配列を有する発現ベクター1分子によって構成されるストキャスティック第1DNA鎖を創製するよう、コヘッシブ-エンドを形成することにより；そしてひき続いて第2のストキャスティックDNA鎖を合成せしめることにより；製造する方法。

【0114】

3. 実施態様第1項において、ストキャスティックDNAフラグメントを生成するよう、コヘッシブ-エンドを有しない2本鎖オリゴヌクレオチドをストキャスティック共重合せしめることにより；ひき続いて、予じめ直線状とした1つの発現ベクター内にこれらのフラグメントを連結するとによって；該遺伝子を製造する方法。

30

【0115】

4. 実施態様第2項又は第3項において、発現ベクターがプラスミドであること、を特徴とする同項記載の方法。

【0116】

5. 実施態様第4項において、発現ベクターがpUC8であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0117】

6. 実施態様第2項又は第3項において、発現ベクターがウィルスDNAの断片であること、を特徴とする同項記載の方法。

40

【0118】

7. 実施態様第2項又は第3項において、発現ベクターがプラスミドとウィルスDNAとのハイブリッドであること、を特徴とする同項記載の方法。

【0119】

8. 実施態様第1項～第6項において、宿主細胞が原核細胞であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0120】

9. 実施態様第1項～第7項において、宿主細胞が真正核細胞であること、を特徴とす

50

る同項記載の方法。

【0121】

10．実施態様第8項において、該細胞がHB101及びC600から選ばれること、を特徴とする同項記載の方法。

【0122】

11．実施態様第3項において、オリゴヌクレオチドか1群のパルインドロミックオクタマーを形成すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0123】

12．実施態様第11項において、回帰性オクタマーの該グループが次のグループであること、を特徴とする同項記載の方法：

5' G G A A T T C C 3'  
 5' G G T C G A C C 3'  
 5' C A A G C T T G 3'  
 5' C C A T A T G G 3'  
 5' C A T C G A T G 3'。

【0124】

13．実施態様第3項において、オリゴヌクレオチドが1群の回帰性ヘプタマーを生成すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0125】

14．実施態様第13項において、パルインドロミックヘプタマーの該グループが次のグループであること、を特徴とする同項記載の方法：

5' X T C G C G A 3'  
 5' X C T G C A G 3'  
 5' R G G T A C C 3'

式中、X = A、G、C又はTそしてR = A又はT。

【0126】

15．実施態様第4項、及び実施態様第12項又は第14項のいずれか1項において、実施態様第11項又は第13項に特定した方法にしたがって得た形質転換された宿主細胞のインデペンデントクローンの培養物から誘導したトランスフォーミングDNAを、先ず最初に、分離、精製し；次いで、これら回帰性オクタマーまたはヘプタマー中には存在するけれども使用した発現ベクターには存在しない特定の制限部位に対応する少なくとも1つの制限酵素を用いて、該精製されたDNAを切断し；しかる後に、新規なストキャスティックシーケンスを有するDNAの新規アンサンブルを創製するよう、上記によって得た線状ストキャスティックDNA断片のアンサンブル(ensemble)を、T4 DNAリガーゼによって同時に処理し；この新規なトランスフォーミングDNAのアンサンブルを用いて、宿主細胞の形質転換とこのような遺伝子のクローニングを行い；そして最後に、スクリーニング及び/又は選択を行い、そして形質転換された細胞の新しいクローンを単離し；そして、これらを生長せしめて、希望する性質を有するペプチドまたはポリペプチドを少なくとも1つ製造すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0127】

16．実施態様第1項において、該性質がある与えられた化学反応を触媒し得る能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0128】

17．実施態様第1項において、該性質が、ある与えられた最初の化合物グループから少なくとも1つのターゲット化合物へと至る1つの反応連鎖を触媒し得る能力であること、を特徴とする同項記載のいくつかのペプチド及び/又はポリペプチドを製造するための方法。

【0129】

18．実施態様第16項に記載された、再帰的自己触媒性の(reflexive 1 y a u t o c a t a l y t i c)ペプチド及び/又はポリペプチドの1つ以上からな

10

20

30

40

50

るアンサンブル ( e n s e m b l e ) を製造するための方法であって、該性質が、アミノ酸及び/又はオリゴペプチドを出発原料として該アンサンブルそれ自体を合成する能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0130】

19. 実施態様第1項において、該性質が、ある与えられた化合物の化学的及び/又は生物学的性質を選択的に修正し得る能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0131】

20. 実施態様第19項において、該性質が、あるポリペプチドの触媒活性を選択的に修飾し得る能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0132】

21. 実施態様第19項において、該性質が、少なくとも1つの生物学的活性化化合物の少なくとも1つの生物学的機能をシミュレートしまたはモディファイし得る能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0133】

22. 実施態様第21項において、該生物学活性化化合物は、ホルモン、神経伝播体、ゆ着又は生長因子、及び、DNAの複製及び/又は転写の特異的レギュレータ、及び/又はRNAの翻訳の特異的レギュレータから選択すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0134】

23. 実施態様第1項において、該性質が、与えられたリガンドに結合し得る能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0135】

24. 実施態様第23項に記載した方法によって得たペプチドまたはポリペプチドの、リガンドの検出及び/又はタイトレーションのための利用。

【0136】

25. 実施態様第1項において、該性質が、ある与えられた抗体の抗原のエピトープの1つに類似したエピトープを少なくとも1つ有すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0137】

26. 実施態様第19項及び第25項において、該性質が、生物学的活性分子の効果をシミュレート又は修飾する能力であり、そして、この性質を有するペプチドまたはポリペプチドを少なくとも1つ製造するところの形質転換宿主細胞のクローンのスクリーニング及び/又は選択は、次のようにして行う、すなわち、該分子に対する抗体を調製しそしてこのようにして得たこれらの抗体を利用してこれらのペプチドまたはポリペプチドを含有するクローンを確認し、次に、このようにして確認したクローンを生長せしめ、そしてこれらのクローンによって製造されたペプチドまたはポリペプチドを分離、精製し、そして最後に、この(これらの)ペプチド又はポリペプチドを、*i n v i t r o*でアッセイにかけて、それが該分子の効果をシミュレートまたは修飾する能力を有することを確認することにより、上記スクリーニング及び/又は選択を行うこと、を特徴とする同項記載の方法。

【0138】

27. 実施態様第1項又は第26項に係る方法によって取得され、薬学的及び/又は化学療法的作用を有する活性物質として利用することができる、ペプチドまたはポリペプチド。

【0139】

28. 実施態様第25項に係る方法によって取得されたペプチドまたはポリペプチドであって、該抗原に対して特異的な遊離抗体とこれらのペプチドまたはポリペプチドとの間で結合を形成せしめることによって、これら遊離の抗体の濃度を *i n v i t r o* 又は *i n v i v o* で減少せしめるのに利用することができる、ペプチドまたはポリペプチド。

【0140】

29. 免疫学的過感作性を抑制する剤として利用することができる、実施態様第27項

10

20

30

40

50

又は第 28 項に係るペプチドまたはポリペプチド。

【0141】

30. 実施態様第 25 項に係る方法によって取得され、該抗原に関する耐性を創製する剤として利用することができるペプチドまたはポリペプチド。

【0142】

31. 実施態様第 25 項において、抗原が EGF であることを特徴とする同項記載の方法。

【0143】

32. 実施態様第 31 項に係る方法によって取得され、エピテリオマス (epitheliomas) の化学療法的処置のために利用することができるペプチドまたはポリペプチド。 10

【0144】

33. 実施態様第 1 項において、希望する性質を有するペプチドまたはポリペプチドを生産する形質転換宿主細胞のクローンについて、DNA ハイブリッドの天然のフラグメントによって発現される 1 つの蛋白質に対応する抗体上で親和クロマトグラフィー処理することにより、該クローンを、確認しそして分離すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0145】

34. 実施態様第 33 項において、DNA ハイブリッドの天然フラグメントが  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現遺伝子を含み、そして、抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体を用いるアフィニティ クロマトグラフィーによって、形質転換宿主細胞の該クローンを確認しそして単離すること、を特徴とする同項記載の方法。 20

【0146】

35. 実施態様第 1 項又は第 34 項において、ハイブリッド ペプチドまたはポリペプチドの発現と精製を行った後に、新規フラグメントを分離しそして単離すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0147】

36. 実施態様第 25 項又は第 26 項に係る方法を、ワクチンの調製に応用することであって、病原剤 (pathogenic agent) に対する抗体を取得し、そして、病原剤のエピトープの 1 つに類似したエピトープを少なくとも 1 つ有する少なくとも 1 つの蛋白質を生産するこれらのクローンを確認するために、該抗体を使用し；形質転換宿主細胞の対応するクローンを、この蛋白質を生産するように、生長せしめ；この蛋白質を、細胞クローンの培養物 (culture) から単離、精製し；そして、この蛋白質を、病原剤に対するワクチンの製造のために使用すること、を特徴とする同項記載の方法の応用。 30

【0148】

37. 実施態様第 36 項に係る、抗 HIV ワクチンの調製のための応用であって、HIV ウイルスの少なくとも 1 つのカプシド蛋白質 (capsid protein) を抽出、精製し；この蛋白質を、この蛋白質に対する抗体を形成しうる動物の体内に注入し；これらの抗体を回収、精製し；これらの抗体を用いて、HIV ウイルスのエピトープの 1 つに似た少なくとも 1 つのエピトープを有する少なくとも 1 つの蛋白質を製造するこれらのクローンを確認し；この蛋白質を産生するよう、これらのクローンに対応する形質転換宿主細胞のクローンを生育せしめ；宿主細胞のこれら培養物から、この蛋白質を単離、精製し；そして、抗-HIV ワクチン製造のために、この蛋白質を使用すること、を特徴とする同項記載の応用。 40

【0149】

38. 実施態様第 1 項において、宿主細胞が、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) タイプのバクテリアから成るものであるが、そのゲノムには天然の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子も EBG 遺伝子も含まれていない、つまり、Z<sup>-</sup>, EBG-E. coli から成るものであり；インデューサ (inducer) IPTG をも含有する 50

X - g a l 培地中で、これらの形質転換宿主細胞を培養し； - ガラクトシダーゼ機能に対して陽性であるところのクローンを、培地中で検出し；しかる後に、 - ガラクトシダーゼ機能を備えたペプチド、ポリペプチド又は蛋白質の少なくとも1つを工業的に製造するのに適した宿主細胞クローンに、このDNAを移入 ( t r a n s p l a n t ) すること、を特徴とする同項記載の方法。

【0150】

39. 実施態様第1項において、該性質が、ある与えられた化合物に結合する能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0151】

40. 実施態様第39項において、該化合物が、ペプチド、ポリペプチド及び蛋白質の中から選択されるものであること、を特徴とする同項記載の方法。 10

【0152】

41. 実施態様第40項において、該蛋白質が、DNAの転写活性又は複製を調節する ( r e g u l a t i n g ) 蛋白質であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0153】

42. 実施態様第39項において、該化合物が、DNA及びRNA配列 ( s e q u e n c e s ) から選択されるものであること、を特徴とする同項記載の方法。

【0154】

43. 実施態様第40項又は第42項に記載の方法によって得られた蛋白質。

【0155】

44. DNAを製造するための方法であって、少なくとも一部分はストキャスティック合成 ( s t o c h a s t i c s y n t h e t i c ) ポリヌクレオチドからなる遺伝子を、同一培地中で製造し；形質転換された宿主細胞のある総体 ( e n s e m b l e ) を製造するよう、上記により製造した遺伝子を宿主細胞内に導入し；このようにして製造した宿主細胞の独立クローン ( i n d e p e n d e n t c l o n e ) を製造するよう、これらを生育せしめ；少なくとも1つの希望する性質を有するこれらDNAのストキャスティック配列 ( s t o c h a s t i c s e q u e n c e s ) を含むこれら宿主細胞を確認する ( i d e n t i f y ) よう、この総体について、スクリーニング及び/又は選定を行い；そして、確認された宿主細胞培養物から、このようなDNAを単離すること、を特徴とする方法。 20 30

【0156】

45. 講求の範囲第44項において、該性質が、与えられた化合物に結合する能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0157】

46. 実施態様第45項において、該化合物が、ペプチド、ポリペプチド及び蛋白質の中から選択するものであること、を特徴とする同項記載の方法。

【0158】

47. 実施態様第45項において、該化合物が、DNAの転写活性又は複製 ( r e p l i c a t i o n ) を調節する化合物であること、を特徴とする同項記載の方法。

【0159】

48. 実施態様第47項において、該化合物が、DNAの転写又は複写をコントロールする調節蛋白質であること、を特徴とする同項記載の方法。 40

【0160】

49. 実施態様第46項又は第47項に係る方法によって取得されたDNA配列の利用であって、近隣DNA配列 ( n e i g h b o r i n g s e q u e n c e o f D N A ) の複製又は転写のシス - 調節配列 ( c i s - r e g u l a t o r y s e q u e n c e ) としての、利用。

【0161】

50. 実施態様第42項において、取得された蛋白質が、DNAの転写活性、複製、又は安定性を修飾する能力を有すること、を特徴とする同項記載の方法。 50

## 【0162】

51. 実施態様第48項に係る方法によって取得した蛋白質の利用であって、このDNA配列を含有しそしてこの蛋白質を発現する細胞内でのDNA配列の転写、複製、又は安定性を修飾するための、利用。

## 【0163】

52. RNAを製造するための方法であって、少なくとも一部分はストキャスティック合成ポリヌクレオチドからなる遺伝子を、同一培地中で同時に製造し；このようにして得た遺伝子を宿主細胞内に導入して、形質転換宿主細胞の総体を製造し；このようにして製造した形質転換宿主細胞のインデペンデント クローンを、同時に生育せめ；この総体についてスクリーニング及び/又は選択を行って、希望する性質を少なくとも1つ有するRNAのストキャスティック シーケンスを含有する宿主細胞を確認し；そして、このようにして確認した宿主細胞のカルチャーから、RNAを単離すること、を特徴とする方法。

10

## 【0164】

53. 実施態様第52項において、該性質が、ある与えられた化合物に結合する能力であること、を特徴とする同項記載の方法。

## 【0165】

54. 実施態様第52項において、該性質が、ある与えられた化学反応を触媒する能力 (capacity) であること、を特徴とする同項記載の方法。

## 【0166】

55. 実施態様第52項において、該性質がトランスファRNAであること、を特徴とする同項記載の方法。

20

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/566 G 0 1 N 33/53 M  
G 0 1 N 33/566

(72)発明者 カウフマン、スチュアート・アラン

アメリカ合衆国 ニュー メキシコ 8 7 5 0 1 , サンタ フェ , モンテセート 1 5

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02

4B024 AA11 BA80 CA01 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04 GA11

HA12

4B063 QA18 QQ01 QQ42 QR66 QX02