



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類5 C12N 15/85 // C12N 15/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 90/13655</p> <p>(43) 国際公開日 1990年11月15日 (15. 11. 1990)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP90/00557 (22) 国際出願日 1990年4月27日 (27. 04. 90)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平1/112519 1989年5月1日 (01. 05. 89) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) [JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 森永伴法 (MORINAGA, Tomonori) [JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町下古山231-3A Tochigi, (JP) 保田尚孝 (YASUDA, Naotaka) [JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町石橋1562-2A Tochigi, (JP) 東尾侃二 (HIGASHIO, Kanji) [JP/JP] 〒350 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP) 玉置大器 (TAMAOKI, Taiki) [JP/CA] T3A OG5 アルバータ州カルガリー市N.W.バービューブレイズ6 Alberta, (CA)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 若林 忠 (WAKABAYASHI, Tadashi) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル8階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), + DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: DNA CODING FOR PROTEIN CAPABLE OF COMBINING WITH ENHANCER OF α-FETOPROTEIN GENE</p> <p>(54) 発明の名称 α-フェトプロテイン遺伝子のエンハンサーに結合する蛋白質をコードするDNA</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A DNA which codes for a protein capable of combining specifically with an enhancer of an α-fetoprotein gene to thereby promote transcription of the gene. This DNA is useful for a system of manifestation of a large quantity of a physiologically active protein in an animal cell when it is applied to a recombinant DNA.</p>		

+ 追って通知があるまで、出願日が1990年10月3日より前の国際出願におけるDEの指定は、先のドイツ民主共和国の領域を除く、ドイツ連邦共和国の領域において有効である。

(57) 要約

α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサーに特異的に結合することにより該遺伝子の転写を促進させる蛋白質をコードするDNAに関する。このDNAは、組換えDNAに適用することで動物細胞における生理活性蛋白質の大量発現系に有用なものである。

情報としての用途のみ

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

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NO ノルウェー
BJ ベナン	HU ハンガリー	RO ルーマニア
BR ブラジル	IT イタリア	SD スーダン
CA カナダ	JP 日本	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SN セネガル
CG コンゴ	KR 大韓民国	SU ソビエト連邦
CH スイス	LI リヒテンシュタイン	TD チャード
CM カメルーン	LK スリランカ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	LU ルクセンブルグ	US 米国
DK デンマーク	MC モナコ	

明 細 書

α -フェトプロテイン遺伝子のエンハンサーに
結合する蛋白質をコードするDNA

技 術 分 野

本発明は、 α -フェトプロテイン遺伝子のエンハンサーに特異的に結合し、該 α -フェトプロテイン遺伝子の転写を促進させる蛋白質をコードするDNAに関する。前記遺伝子のコードする蛋白質は転写制御に関与するものであるが、このDNAは動物細胞における遺伝子の大量発現系に有効に適用できるものである。

背 景 技 術

真核細胞中で行われる遺伝情報の調節は、DNAの遺伝情報の転写、RNAプロセッシング、蛋白質への翻訳及び翻訳後のプロセッシングの各段階で行われているが、このうち転写レベルでの調節は遺伝情報の発現に最も強い影響を及ぼしている。

ところで、RNAポリメラーゼIIによって転写される遺伝子の5'側には転写を制御するプロモーターが存在し、さらにはプロモーター活性を調節するエンハンサーが存在している例がある。そして、最近、これらプロモーターやエンハンサーの特異的な塩基配列を認識して結合する核内因子が発見され、これらの因子の結合によりプロモーターの活性が制御されることが明

らかとなった。

上記因子に関しては、プロモーター領域に存在する T A T A ボックス、C A A T ボックス、G C ボックスに結合し、R N A ポリメラーゼ II による転写を促進させる蛋白質の研究が進められており、C A A T ボックス結合因子と G C ボックス結合因子に関しては c D N A がクローニングされている。

一方、エンハンサー領域に結合する因子についても研究が行われており、例えば、免疫グロブリンの κ 鎖遺伝子エンハンサーに結合する、B細胞由来の特異的な因子 O T F -2 (Octamer transcription factor-2) [Michael et al. 「ネイチャー (Nature)」 336, 544-551, (1988)] やこれと同一のエンハンサー配列を認識するが他の組織にも汎在する O T F -1等 [R. A. Sturm., G. Das and W. Herr 「ジーン アンド ディベロップメント」 (Gene & Development) 2, 1582 (1988)] の c D N A が単離されている。

ヒト α -フェトプロテイン遺伝子では、転写開始点の5'側3.5 Kbの位置にエンハンサー活性を示す領域の存在が確認されており、このエンハンサー領域に結合する因子が発見され、A F P -1と称せられている [Sawadaishi et al. 「モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)」 vol. 8, 5179-5187 (1988)] 。

しかし、AFP-1の構造、物理化学的性質及びそれをコードする遺伝子は未だ明らかにされていない。

発 明 の 開 示

本発明者らは、 α -フェトプロテイン遺伝子のエンハンサー領域に存在するTTAATAATTA構造を中心とする領域に特異的に結合する核内因子の研究を進めた結果、この因子をコードするcDNAを得、該cDNAの塩基配列を決定することにより、該因子のアミノ酸配列を明らかにし、本発明をなすに至った。

即ち、本発明は、 α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサー領域に結合する蛋白質をコードする、新規な塩基配列で表わされたDNAを提供することを課題とする。

本発明に係る α -フェトプロテイン遺伝子のエンハンサー領域に結合する核内因子である蛋白質は、第1図に示したアミノ酸配列を一次配列の中に有する蛋白質であって、細胞核内に存在し、 α -フェトプロテイン生産細胞より抽出されえるものである。

したがって、 α -フェトプロテインを生産する肝臓由来の細胞より抽出したメッセンジャーRNAを用いて、所定の方法により第2図に示す塩基配列を有するDNAを得ることができる。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のDNA(λ 2cDNA)がコード

する、 α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサーに結合する蛋白質のアミノ配列を示し、第2図は、該DNAの塩基配列を示す。

第3図は実施例で行った、ポリ(A)RNAよりcDNAを得て、 λ gt11発現ベクターに組み込むための手順を示し、図中の小さい↓印はcDNAが組み込まれるlacZ遺伝子の挿入位置を示す。

第4図はヒト α -フェトプロテイン遺伝子5'上流に存在するエンハンサー領域の制限酵素地図を表したもので、イニシエーションサイトの上流-3.3 kbから-3.7 kbの領域は拡大して示されている。

HiとHaはそれぞれ制限酵素HindIIIとHaeIIIの認識部位を示す。

第5図は実施例で行った、 λ 2と λ gt11の溶原菌抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果を示したものであり、コントロールは抽出液を加えない場合のパターンである。図にみられるとおり λ 2溶原菌の抽出液を用いた場合にのみ、二本のシフトしたバンド(a, b)が見られる。

第6図は実施例で行った、 λ 2溶原菌抽出液を用いたDNase Iフットプリント結果を示す。G+AはMaxam-Gilbert法の化学的切断によって作製したサイズマーカー、レーン1は蛋白質と結合していないDNAのバンドから抽出されたDNA、2と3はそれ

ぞれ蛋白質と結合してシフトしたバンド a と b の位置から抽出した DNA をそれぞれ表わす。

A は Sma I サイトの 5' 末満が標識された場合、B は Hinc II サイトの 5' 末満が標識された場合のパターン、C は A と B の結果をまとめたものを示す。

第 7 図は実施例で得られた、 $\lambda 2$ にクローンされた cDNA の塩基配列とそれにコードされる蛋白質のアミノ酸配列を示す。

第 8 図は実施例で行った、キャットプラスミド pAF1.0 E25CAT の構築を表わし、pAF1.0 E25CAT は pAF1.0 CAT の ClaI サイトにエンハンサー領域の N1aIV / XhoI フラグメント (31bp) を挿入することによって構築したことを示す。

第 9 図は、ヒト肝癌細胞培養株 HuH-7 株を用いたキャットアッセイを示す。

発明を実施するための最良の形態

次に本発明に係る目的 DNA 断片の回収方法の概略を説明する。回収の手法自体は公知技術に基づき行うことができるものである。

まず、 α -フェトプロテイン生産細胞としては、株化したヒト肝癌細胞 HuH-7 等の細胞を例示し得る。

次に、本発明においては、如上の α -フェトプロテイン生産細胞を培養し、得られた増殖細胞を回収し

た後、破碎してRNAを抽出し、得られた抽出RNA画分より、オリゴ(dT)セルロース等を用いてポリ(A)RNAを常法にしたがって回収する。

なお、上記RNAの抽出はグアニジンチオシアネート塩化セシウム法 [J.M. Chirgwin et al., 「バイオケミストリー」 (Biochemistry) 18, 5294, (1979)] 等の方法を採用して行うとよい。

次いで、上述のようにして回収したポリ(A)RNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、さらに、このcDNAを2本鎖cDNAにした後、 λ ファージにパッケージングして組換えファージを作製する。

ここで用いる λ ファージとしては市販のパッケージングシステム、例えばパッカージーンパッケージングシステム(プロメガ社製)等が使用できる。

次に、上述のようにして作製した組換え体を宿主である大腸菌、例えばE. coli Y 1090(r⁻)に導入し、さらに、この大腸菌をアガロースプレート上で増殖させてcDNAライブラリーを作製する。このようにして作製したcDNAライブラリーより α -フェトプロテイン遺伝子のエンハンサー領域のDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより、目的とする α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサー領域に結合する蛋白質をコードするDNAを得ることができ

る。

以下実施例により本発明を詳しく説明する。

実施例

本例ではヒト肝癌細胞由来の株化細胞 H u H - 7 より α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサー（以下、エンハンサーという。）結合蛋白質をコードする D N A の調製を示す。

① α -フェトプロテイン生産細胞の培養

原料細胞としてヒト肝臓由来の細胞であって、 α -フェトプロテイン遺伝子の生産能を有する株化ヒト肝癌細胞 H u H - 7 を用い、下記条件で培養を行った。

なお、上記細胞株は、岡山大学医学部附属癌源研究施設、病理研究部門 佐藤二郎教授の研究室より分譲可能である。

培養条件：

培地としては、ラクトアルブミンの加水分解物（ギブコ）を 3%（wt）添加した R P M I - 1640 培地あるいは牛胎児血清を 5～10%（V/V）を加えた R P M I - 1640 培地を用いた。この培養液は適宜交換し、培養は 5% 炭酸ガスを含む空気を満たした培養器内（37℃）で行った。

② 上記培養細胞からポリ（A）R N A の調製

培養細胞 2×10^8 個からグアニジンイソチオシアネート塩化セシウム法 [「バイオケミストリー」

(Biochemistry) 18, 5294, (1979)] を用い、下記の手順によりトータルRNAを抽出した。

細胞に6Mグアニジンイソチオシアネート、5mM クエン酸ナトリウム、0.1M2-メルカプトエタノール、0.5 % N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムから成る溶液 20mℓを添加し、ホモジナイズ（室温）したのち、得られたホモジネート 10mℓ当り4gの塩化セシウムを溶解した。5.7M塩化セシウム、0.1MEDTA (pH 7.5)から成る溶液2.5mℓをポリアロマー遠心管に入れ、その上から前記ホモジネート 10mℓを重層したのち、日立超遠心ローターRPS 40T によって34,000rpm で18時間、20℃で遠心を行った。遠心後、沈渣を10mMトリス-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA、1 % SDSから成る溶液1mℓに溶解し、得られた溶液に等量のクロロホルム：n-ブタノール(4:1、v/v)を加え、十分混合したのち、遠心分離（16,000g,10分間）して、水層を得た。この水層に1/10量の3M酢酸ナトリウム (pH 5.5)と2.5 倍量のエタノールを加え混合し、-70℃に2 時間以上放置後遠心（16,000g,20分間）して沈澱を得た。沈澱を70%エタノールで洗った後乾固し、これをトータルRNAとした。

トータルRNAからポリ(A)RNAを調製するには以下に述べる様にオリゴ(dT)セルロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。オリゴ

(dT)セルロース50mgを0.5M NaCl、1mM EDTA、0.1% SDSを含む10mMトリス-HCl(pH 7.5)緩衝液で平衡化し、これに同緩衝液に溶解したトータルRNA 390 μ gを吸着させた。非吸着RNAを同上緩衝液で洗い、次に、吸着したRNAを1mM EDTA、0.05% SDSを含む10mMトリス-HCl(pH 7.5)で溶出させた。この溶出液に1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.5)と2.5倍容量のエタノールを加えて混合したのちに -70°C に2時間以上放置した。遠心分離(12,000g, 15分間)によって沈澱を集め、70%エタノールで洗ったのちに滅菌蒸留水に溶解してポリ(A)RNAとした。

③ cDNAの合成

cDNAの合成はファルマシア社製のcDNA合成キットを用いて行った。

2.5 μ gのポリ(A)RNAと0.4 μ gのランダムプライマー [dp(N)₆、宝酒造]を第一鎖合成反応液に加え、以後はファルマシア社のプロトコールにしたがって反応を行った。二本鎖cDNAの両末端にプロトコールにしたがって、EcoRIアダプターを連結した。2.5 μ gのポリ(A)RNAから二本鎖cDNA 2.3 μ gが得られた。

④ 組換えDNAの作製と組換え体ファージの作製

上記で得られた二本鎖cDNAを用いた組換え

DNAの作製には、プロメガ社製のプロトクローン λ gt11システムを用い、プロトコールにしたがって行った。得られた組換えDNAは、プロメガ社製のパッケージングシステムを用いて組換え体ファージとし宿主大腸菌Y1090(r⁻)に導入した。この組換え体ファージをアガロースプレート上で増殖させ、該大腸菌を溶菌し、 λ gt11cDNAライブラリーを作製した。このライブラリーの complexity は 3×10^6 であった。

cDNAの作製と λ gt11発現ベクター作製の工程は第3図に示した。

⑤スクリーニング用プローブの調製およびスクリーニング方法

上記 λ gt11cDNAライブラリーのスクリーニングはすでに発表されている方法に従って行った [Cell. 52, 415 (1988)]。スクリーニング用のプローブはヒト α -フェトプロテイン遺伝子の5'側上流に位置するエンハンサー領域 [Molecular and Cellular Biology 8, 5179 (1988)] のDNAを材料として作製した (第4図参照)。

ヒト肝癌細胞HuH-7から調製されたDNAからエンハンサーを含む領域をクローニングした後このDNAを、制限酵素HgiAIとBstNIによってエンハンサー活性をもつDNAフラグメントを切り出し、

この末端をDNAポリメラーゼKlenowフラグメントを用いて補填した。一方pUC18プラスミドをBamHIによって切断し、この末端も同様に補填した。この両者をT4DNAリガーゼ（宝酒造）によって接続し、組換え体プラスミド pAFE (HgiAI / BstNI) 1 を作製した。

pAFE (HgiAI / BstNI) 1 を制限酵素XbaIとPstIによって加水分解し、エクソヌクレアーゼIIIとマングビーンヌクレアーゼ（宝酒造）を用いて削除反応を行ったのち、末端をDNAポリメラーゼKlenowフラグメントを用いて補填し、この末端にXhoIリンカーを挿入して閉環した。

生じたプラスミドを大腸菌DH5に導入して得られたデリション・ミュータントの中からTTAATAATT配列の9塩基下流まで削除反応の進んだクローンを選択し、これを pAFE (HgiAI / XhoI) 1 と名づけた。pAFE (HgiAI / XhoI) 1 を制限酵素NlaIVとXhoIによって加水分解し、エンハンサーを含むフラグメントをアガロース電気泳動によって分離した。このNlaIV / XhoIフラグメントの末端をDNAポリメラーゼKlenowフラグメントによって補填し、T4DNAリガーゼを用いて連結したのち、HincIIで加水分解した pUC18プラスミドとT4リガーゼを用

いて連結した。生じた組換えプラスミドを太腸菌 DH5 α (BRL社) に導入し、組換え体の中から望ましいクローンを N1aIV / XhoI フラグメントの数を基準として選択した。このクローンに含まれる組換えプラスミドには上記 N1aIV / XhoI フラグメントが 6 個連結されて HincII サイトに挿入されていた。このプラスミドを pAFE (N1aIV / XhoI) 6 と名づけた。pAFE (N1aIV / XhoI) 6 を制限酵素 SmaI と HincII (宝酒造) によって切断し、エンハンサーを含む SmaI / HincII フラグメントを分離したのち、T4 ポリヌクレチオドキナーゼと 5' [γ · 32 P] ATP を用いて標識し、これをスクリーニング用プローブ (プローブ DNA) とした。

前記組換え体ファージの増殖により得られているライブラリーの中から 3×10^5 個のプラークをすでに発表されている方法 [Cell 52, 415 (1988)] によりスクリーニングして上記プローブと特異的に結合するクローンを単離した (これを $\lambda 2$ と名づけた。)。即ち、 $\lambda 2$ のプラークを含むアガロースをプレートから切り出し、0.1M NaCl、8.1mM MgSO₄、0.1%ゼラチンを含む 50mM トリス-HCl (pH 7.5) に懸濁してファージを溶出したのち、クロロホルムを一滴加えて 4℃ に保存した。

◎ 溶原菌抽出液の作製

上記保存ファージをすでに発表されている方法 (DNAクローニング、VOL.1、D.M.グローバー編集 IRL Press 出版、1985年、p49)に従って Y1089大腸菌に感染させ溶原菌を作製した。次に溶原菌より Singh らの方法 [Cell. 52, 415 (1988)]に従って抽出液を作製した。コントロールとして cDNA を含まない λ gt11ファージを Y1089に感染させ、この溶原菌からも同様に抽出液を作製した。

⑦ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、上記溶原菌抽出液と⑤で述べた pA F E (HgiA I / BstN I) 1 から Sma I と Hinc II によって切り出したエンハンサー DNA フラグメントの 5'未満を 32 P 標識して作製したプローブ DNA とを用いて既存の方法 [Nature 319, 154, (1988)]に従って行った。

第5図に結果を示すように、 $\lambda 2$ の感染した溶原菌の抽出液を用いた場合にシフトした二本のバンド (a, b)が検出され、このバンドは cDNA を持たない λ gt11の溶原菌抽出物では検出されなかったことから $\lambda 2$ にクローンされた cDNA ($\lambda 2$ cDNA)にコードされる蛋白質がプローブ DNA に結合する性質を持つことが示された。

⑧フットプリント法による DNA 塩基配列上の蛋白質結合部位の同定

10mM トリス-HCl (pH 7.5)、50mM NaCl、1mM DTT、0.5mM EDTA、2.5mM MgCl₂、3μg poly(dI-dC)・poly(dI-dC)、5% グリセロールを含む75μℓの反応液中で総蛋白量として16μgを含むλ2 溶原菌抽出液と⑤で述べた pA F E (HgiA I / BstN I) 1 から作製した Sma I / HincII プローブを混合し、室温に30分放置した。このプローブは片方の5'未満のみが³²P によって標識されている。この反応液に40ng/μℓの DNase I を1μℓ加え、室温で1分間反応させたのち、0.5M EDTA を2.3μℓ加えて反応を止めた。この反応液をゲルシフトアッセイ用の5% ポリアクリルアミドゲルに供与し、11V/cm でプロモフェノールブルーが下端近くへ移動するまで電気泳動を行った。

片方のガラス板を除き、ゲルをサランラップ（旭化成）で包んだのち X線フィルムを密着させオートラジオグラフィーを作製した。

蛋白質を結合した DNA のバンドと結合していない DNA のバンドに相当する位置は泳動度により判るのでそれぞれの位置のゲルを切り出し、0.5mℓの0.5M 酢酸アンモニウム、0.1% SDS、1mM EDTA を含む溶出液で室温において一夜抽出した。遠心(12,000g, 10分間)して上清を取り、ゲル片は同溶出液0.5mℓで2回洗い、洗液と上清を合わせた(1.3mℓ)。これに

5 μ g の酵母トランスファーRNA (シグマ社) を加えたのち等量のフェノール : クロロホルム (1:1) で抽出し、水層をとり出し、これに2倍量のエタノールを加えて -70°C に30分以上保存した。DNAを遠心分離 (12,000g, 10分間) によって集め、70%エタノールで1回洗ったのち、減圧乾固した。このDNAを10 μ l の80%ホルムアミド、10mM NaOH、1mM EDTA、0.1%キシレンシアノール、0.1%ブromoフェノールブルーを含む溶液に溶解し、 90°C で3分加熱したのち3~4 μ lを塩基配列決定用の7M尿素を含む8%ポリアクリルアミドゲルに供与した。サイズマーカーとして前記プローブDNAをマキサム-ギルバート法によってアデニンとグアニンの位置で化学的に切断したもの (Methods in Enzymology vol. 65, 499, 1980) を供に泳動した。

電気泳動終了後オートラジオグラフィーを行った結果を第6図に示す。図のように λ 2 cDNAにコードされた蛋白質と結合していないDNAと比べ、該蛋白質と結合していたDNAではTTAATAATA (エンハンサー領域に存在する構造) を中心とする15塩基対がDNase Iの分解から保護されており、該蛋白質は特異的に前記塩基配列に結合することが示された。

◎ λ 2 にクローンされたcDNA (cDNA) の塩基

配列

$\lambda 2$ の DNA を一般的な方法 (Molecular Cloning、
a laboratory manual、p76、1982) に従って調製し、
EcoRI によって加水分解したのちアガロース電気泳動によってインサート DNA を分離した。

この DNA の塩基配列をジデオキシ法 [Methods in Enzymology 65, 560, (1980)] 及び Maxam-Gilbert 法 [Methods in Enzymology 65, 499, (1980)] を用いて決定した結果及びそれによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を第 7 図に示す。

次に、上述の $\lambda 2$ cDNA にコードされた蛋白質はエンハンサーに対する核内因子であり、これが結合する DNA 領域がエンハンサー活性を持つことを下記に示すキャットアッセイにより確認した。

⑩ キャットアッセイ

実施例において⑤で述べた pAFE (HgiAI / XhoI) 1 より分離した NlaIV / XhoI フラグメントを、キャットアッセイ用ベクター pAF1.0 CAT の ClaI サイトに平滑未満ライゲーションによって挿入し、pAF1.0 E25CAT を作製した (第 8 図参照)。

pAF1.0 CAT には α -フェトプロテイン遺伝子のプロモーター領域の DNA 1 kb と大腸菌のクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼの構造遺

伝子、そしてSV40のポリ(A)付加シグナルおよびt-抗原遺伝子イントロンが含まれている。このベクターはエンハンサー活性をもつDNAフラグメントの検索に用いられる[J. Biol. Chem. 262, 4812, (1987)]。キヤットプラスミドのHuH-7細胞への導入とキヤットアッセイは既存の方法[Mol. Cell. Biol. 2, 1044, (1982)]を基本として次のように行った。

75cm²の培養フラスコに8×10⁶程度の細胞を培養し、これに20~30μgのキヤットプラスミドDNAをリン酸カルシウム法によって導入した。3%ラクトアルブミン加水分解物を含むRPMI-1640培地で2日間培養したのち細胞をPBSで洗い、ポリスマンを用いて細胞をはがした。細胞を低速遠心(800rpm, 5min)によって集め、1mM EDTA、150mM NaClを含む40mM トリス-HCl(pH 7.5)で一度洗ったのち100μlの250mM トリス-HCl(pH 7.5)に懸濁した。凍結融解を5回繰り返して細胞を破碎し、エッペンドルフ遠心機で12,000rpm、5分間遠心して上清を得た。これを65℃、10分間熱処理し、エッペンドルフ遠心機で12,000rpm、5分間遠心して得た上清を細胞抽出液とした。

細胞抽出液中の蛋白質濃度をバイオラッド社のプロテイン・アッセイ・キットを用いて測定し、50~200μgの蛋白質を次のキヤットアッセイに使用し

た。キヤットアッセイの典型的な反応液 180 μ ℓ中には250mM トリス-HCl (pH 7.5)、0.1 μ Ci [14 C] クロラムフェニコール (アマシヤム)、0.4mM アセチル CoA、50 μ g ~ 200 μ g 細胞抽出蛋白質が含まれていた。この反応液を37°Cで60分~180分間インキュベートし、酢酸エチルを1mℓ加えてクロラムフェニコールとそのアセチル化物を抽出した。酢酸エチル層を回収し、減圧乾固したのち、20 μ ℓの酢酸エチルに再溶解し、その一部または全部をシリカゲルプレート (メルク社) に供与して、クロロホルム:メタノール (96:4) を用いて展開した。展開後シリカゲルプレートを室温で乾燥し、サランラップ (旭化成) に包んでオートラジオグラフィを作った。第9図に示すように、 α -フェトプロテイン遺伝子上流のエンハンサー領域のDNAを含むキヤットプラスミド pAF1.0 E25 CATを用いた場合には pAF1.0 CAT に比較して高い活性が認められ、NlaIV/XhoI フラグメントにエンハンサー活性の存在することがわかった。

産業上の利用可能性

本発明のDNAを発現ベクターに組込むことによって得られる、エンハンサー結合蛋白を培養細胞内で生産しうるプラスミドと、エンハンサーと α -フェトプロテインプロモーターの下流に生理活性蛋白質をコードするDNAを接続した発現ベクターを、同時に培養

細胞に導入することにより、細胞内での生理活性蛋白質の大量発現に利用できる。

請 求 の 範 囲

- (1) α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサー領域に存在する T T A A T A A T T A 構造を中心とする領域に特異的に結合し該遺伝子の転写を促進させる下記アミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA。

MetSerSerValAsnLeuAsnPheAspGlnThrLysLeuAspAsnAspAspCysSerSer
 ValAsnThrAlaIleThrAspThrThrThrGlyAspGluGlyAsnAlaAspAsnAspSer
 AlaThrGlyIleAlaThrGluThrLysSerSerSerAlaProAsnGluGlyLeuThrLys
 AlaAlaMetMetAlaMetSerGluTyrGluAspArgLeuSerSerGlyLeuValSerPro
 AlaProSerPheTyrSerLysGluTyrAspAsnGluGlyThrValAspTyrSerGluThr
 SerSerLeuAlaAspProCysSerProSerProGlyAlaSerGlySerAlaGlyLysSer
 GlyAspSerGlyAspArgProGlyGlnLysArgPheArgThrGlnMetThrAsnLeuGln
 LeuLysValLeuLysSerCysPheAsnAspTyrArgThrProThrMetLeuGluCysGlu
 ValLeuGlyAsnAspIleGlyLeuProLysArgValValGlnValTrpPheGlnAsnAla
 ArgAlaLysGluLysLysSerLysLeuSerMetAlaLysHisPheGlyIleAsnGlnThr
 SerTyrGluGlyProLysThrGluCysThrLeuCysGlyIleLysTyrSerAlaArgLeu
 SerValArgAspHisIlePheSerGlnGlnHisIleSerLysValLysAspThrIleGly
 SerGlnLeuAspLysGluLysGluTyrPheAspProAlaThrValArgGlnLeuMetAla
 GlnGlnGluLeuAspArgIleLysLysAlaAsnGluValLeuGlyLeuAlaAlaGlnGln
 GlnGlyMetPheAspAsnThrProLeuGlnAlaLeuAsnLeuProThrAlaTyrProAla
 LeuGlnGlyIleProProValLeuLeuProGlyLeuAsnSerProSerLeuProGlyPhe
 ThrProSerAsnThrAlaLeuThrSerProLysProAsnLeuMetGlyLeuProSerThr
 ThrValProSerProGlyLeuProThrSerGlyLeuProAsnLysProSerSerAlaSer
 LeuSerSer

- (2) α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサー領域に存在する T T A A T A A T T A 構造を中心とする領域に特異的に結合し該遺伝子の転写を促進させる蛋白質をコードする、請求項(1)記載の下記塩基配列を有する D N A 断片。

1
C

ATG TCC TCA GTT AAT CTA AAC TTT GAC CAA ACT AAG CTG GAC AAC GAT GAC TGT TCC TCT GTC AAC
ACA GCA ATC ACA GAT ACC ACA ACT GGA GAC GAG GGC AAC GCA GAT AAC GAC AGT GCA ACG GGA ATA
GCA ACT GAA ACC AAA TCC TCT TCT GCA CCC AAC GAA GGG TTG ACC AAA GCG GCC ATG ATG GCA ATG
TCT GAG TAT GAA GAT CGG TTG TCA TCT GGT CTG GTC AGC CCG GCC CCG AGC TTT TAT AGC AAG GAA
TAT GAC AAT GAA GGT ACA GTG GAC TAC AGT GAA ACC TCA AGC CTT GCA GAT CCC TGC TCC CCG AGT
CCT GGT GCG AGT GGA TCT GCA GGC AAA TCT GGT GAC AGC GGG GAT CCG CCT GGG CAG AAA CGT TTT
CGC ACT CAA ATG ACC AAT CTG CAG CTG AAG GTC CTC AAG TCA TGC TTT AAT GAC TAC AGG ACA CCC
ACT ATG CTA GAA TGT GAG GTC CTG GGC AAT GAC ATT GGA CTG CCA AAG AGA GTC GTT CAG GTC TGG
TTC CAG AAT GCC CGG GCA AAA GAA AAG AAG TCC AAG TTA AGC ATG GCC AAG CAT TTT GGT ATA AAC
CAA ACG AGT TAT GAG GGA CCC AAA ACA GAG TGC ACT TTG TGT GGC ATC AAG TAC AGC GCT CGG CTG
TCT GTA CGT GAC CAT ATC TTT TCC CAA CAG CAT ATC TCC AAA GTT AAA GAC ACC ATT GGA AGC CAG
CTG GAC AAG GAG AAA GAA TAC TTT GAC CCA GCC ACC GTA CGT CAG TTG ATG GCT CAA CAA GAG TTG
GAC CGG ATT AAA AAG GCC AAC GAG GTC CTT GGA CTG GCA GCT CAG CAG CAA GGG ATG TTT GAC AAC
ACC CCT CTT CAG GCC CTT AAC CTT CCT ACA GCA TAT CCA GCG CTC CAG GGC ATT CCT CCT GTG TTG
CTC CCG GGC CTC AAC AGC CCC TCC TTG CCA GGC TTT ACT CCA TCC AAC ACA GCT TTA ACG TCT CCT
AAG CCG AAC TTG ATG GGT CTG CCC AGC ACA ACT GTT CCT TCC CCT GGC CTC CCC ACT TCT GGA TTA
CCA AAT AAA CCG TCC TCA GCG TCG CTG AGC TCC C

(3) ヒト肝癌細胞由来の α -フェトプロテイン生産細胞からポリ(A)RNAを抽出し、これを鋳型として逆転写したcDNAにより組換え体ファージを得、これを大腸菌に導入して該ファージを増殖させcDNAライブラリーを作製し、 α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサー領域のDNAをプローブとして該ライブラリーから請求項(1)又は(2)に記載のDNA断片を作製する方法。

(4) 前記DNAプローブが、

- ① α -フェトプロテイン遺伝子エンハンサーを含む領域よりHgiAIとBstNIで切断しフラグメントを得、
- ② 次で①で得たフラグメントを含む組換え体プラスミドを大腸菌に導入して得たクローンにエクソヌクレアーゼとマングビーンヌクレアーゼを働かせ削除反応を行い、
- ③ 削除した部分にXhoIリンカーを挿入したのち閉環し、
- ④ このプラスミドを大腸菌に導入して得たクローンから制限酵素NlaIVとXhoIによってフラグメントを得、
- ⑤ このフラグメントを6個連結したものをプラスミドに挿入して得た組換え体プラスミドからSmaIとHincIIで切断して、エンハンサーを含むフラグ

メントを得て、

- ⑥このフラグメントを5'-[γ ³²P]ATPにより標識したものであるところの、
請求項(3)に記載のDNA断片を作製する方法。

第 | 四

MetSerSerValAsnLeuAsnPheAspGlnThrLysLeuAspAsnAspAspCysSerSer
ValAsnThrAlaIleThrAspThrThrThrGlyAspGluGlyAsnAlaAspAsnAspSer
AlaThrGlyIleAlaThrGluThrLysSerSerSerAlaProAsnGluGlyLeuThrLys
AlaAlaMetMetAlaMetSerGluTyrGluAspArgLeuSerSerGlyLeuValSerPro
AlaProSerPheTyrSerLysGluTyrAspAsnGluGlyThrValAspTyrSerGluThr
SerSerLeuAlaAspProCysSerProSerProGlyAlaSerGlySerAlaGlyLysSer
GlyAspSerGlyAspArgProGlyGlnLysArgPheArgThrGlnMetThrAsnLeuGln
LeuLysValLeuLysSerCysPheAsnAspTyrArgThrProThrMetLeuGluCysGlu
ValLeuGlyAsnAspIleGlyLeuProLysArgValValGlnValTrpPheGlnAsnAla
ArgAlaLysGluLysLysSerLysLeuSerMetAlaLysHisPheGlyIleAsnGlnThr
SerTyrGluGlyProLysThrGluCysThrLeuCysGlyIleLysTyrSerAlaArgLeu
SerValArgAspHisIlePheSerGlnGlnHisIleSerLysValLysAspThrIleGly
SerGlnLeuAspLysGluLysGluTyrPheAspProAlaThrValArgGlnLeuMetAla
GlnGlnGluLeuAspArgIleLysLysAlaAsnGluValLeuGlyLeuAlaAlaGlnGln
GlnGlyMetPheAspAsnThrProLeuGlnAlaLeuAsnLeuProThrAlaTyrProAla
LeuGlnGlyIleProProValLeuLeuProGlyLeuAsnSerProSerLeuProGlyPhe
ThrProSerAsnThrAlaLeuThrSerProLysProAsnLeuMetGlyLeuProSerThr
ThrValProSerProGlyLeuProThrSerGlyLeuProAsnLysProSerSerAlaSer
LeuSerSer

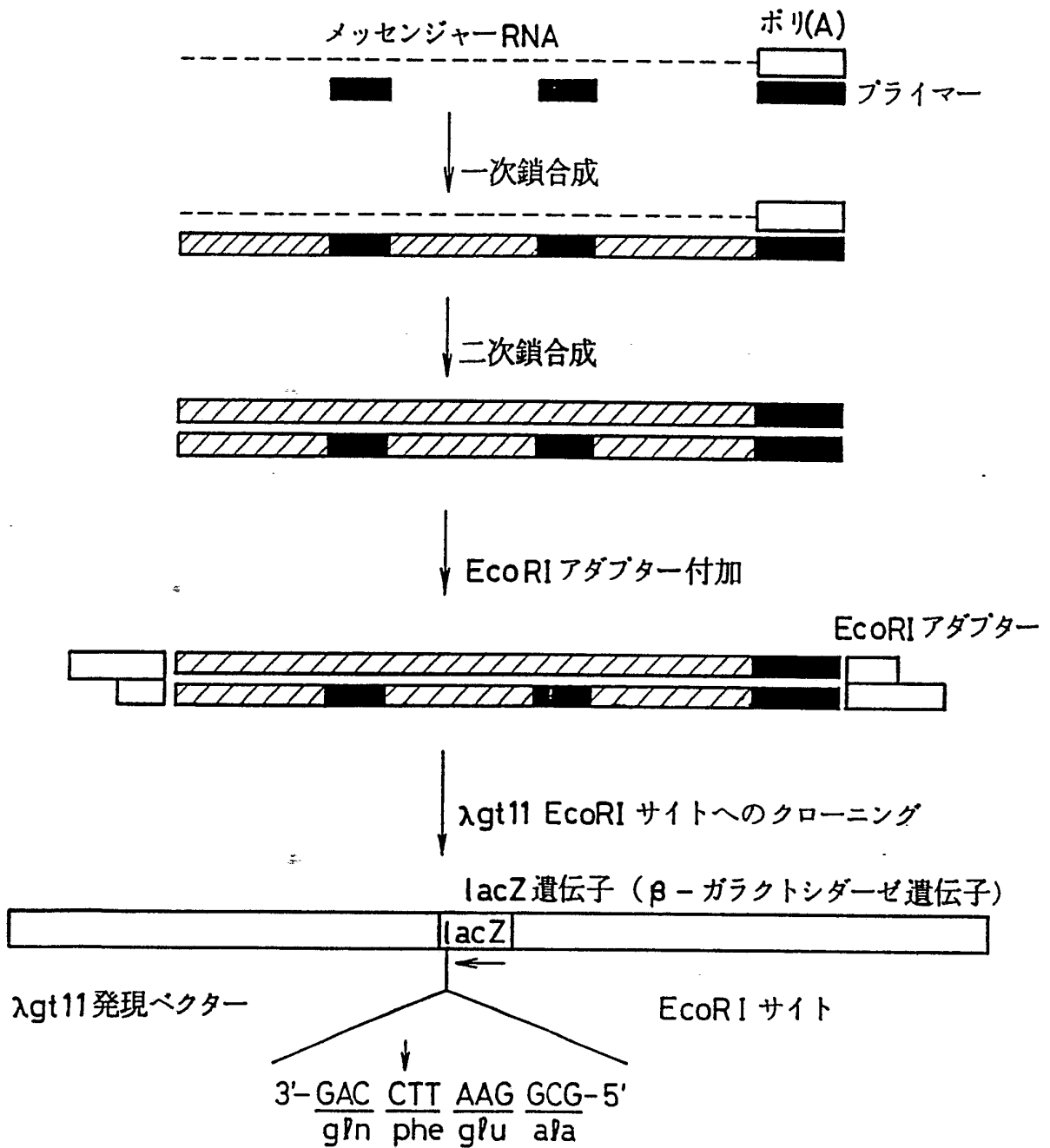
第 2 図

1
C

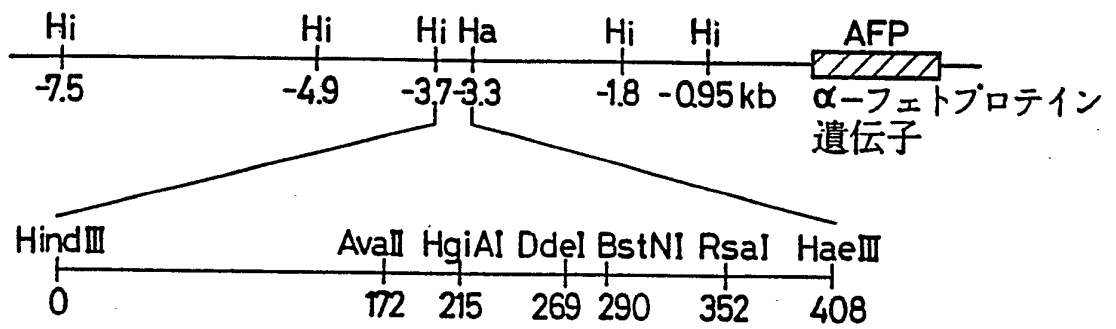
ATG TCC TCA GTT AAT CTA AAC TTT GAC CAA ACT AAG CTG GAC AAC GAT GAC TGT TCC TCT GTC AAC
 ACA GCA ATC ACA GAT ACC ACA ACT GGA GAC GAG GGC AAC GCA GAT AAC GAC AGT GCA ACG GGA ATA
 GCA ACT GAA ACC AAA TCC TCT TCT GCA CCC AAC GAA GGG TTG ACC AAA GCG GCC ATG ATG GCA ATG
 TCT GAG TAT GAA GAT CGG TTG TCA TCT GGT CTG GTC AGC CCG GCC CCG AGC TTT TAT AGC AAG GAA
 TAT GAC AAT GAA GGT ACA GTG GAC TAC AGT GAA ACC TCA AGC CTT GCA GAT CCC TGC TCC CCG AGT
 CCT GGT GCG AGT GGA TCT GCA GGC AAA TCT GGT GAC AGC GGG GAT CGG CCT GGG CAG AAA CGT TTT
 CGC ACT CAA ATG ACC AAT CTG CAG CTG AAG GTC CTC AAG TCA TGC TTT AAT GAC TAC AGG ACA CCC
 ACT ATG CTA GAA TGT GAG GTC CTG GGC AAT GAC ATT GGA CTG CCA AAG AGA GTC GTT CAG GTC TGG
 TTC CAG AAT GCC CGG GCA AAA GAA AAG AAG TCC AAG TTA AGC ATG GCC AAG CAT TTT GGT ATA AAC
 CAA ACG AGT TAT GAG GGA CCC AAA ACA GAG TGC ACT TTG TGT GGC ATC AAG TAC AGC GCT CGG CTG
 TCT GTA CGT GAC CAT ATC TTT TCC CAA CAG CAT ATC TCC AAA GTT AAA GAC ACC ATT GGA AGC CAG
 CTG GAC AAG GAG AAA GAA TAC TTT GAC CCA GCC ACC GTA CGT CAG TTG ATG GCT CAA CAA GAG TTG
 GAC CGG ATT AAA AAG GCC AAC GAG GTC CTT GGA CTG GCA GCT CAG CAG CAA GGG ATG TTT GAC AAC
 ACC CCT CTT CAG GCC CTT AAC CTT CCT ACA GCA TAT CCA GCG CTC CAG GGC ATT CCT CCT GTG TTG
 CTC CCG GGC CTC AAC AGC CCC TCC TTG CCA GGC TTT ACT CCA TCC AAC ACA GCT TTA ACG TCT CCT
 AAG CCG AAC TTG ATG GGT CTG CCC AGC ACA ACT GTT CCT TCC CCT GGC CTC CCC ACT TCT GGA TTA
 CCA AAT AAA CCG TCC TCA GCG TCG CTG AGC TCC C

1091

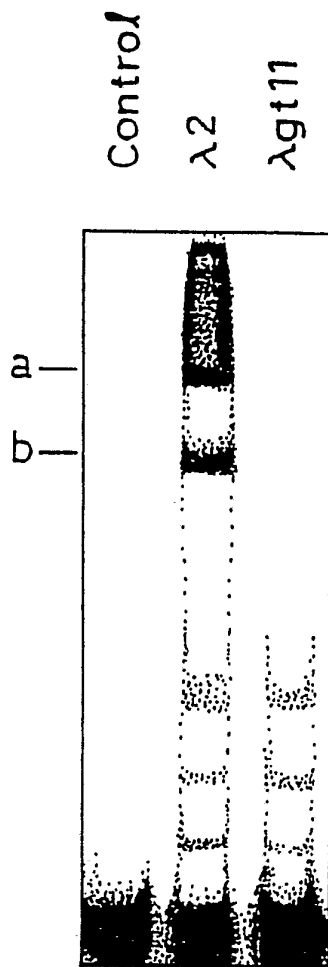
第 3 図



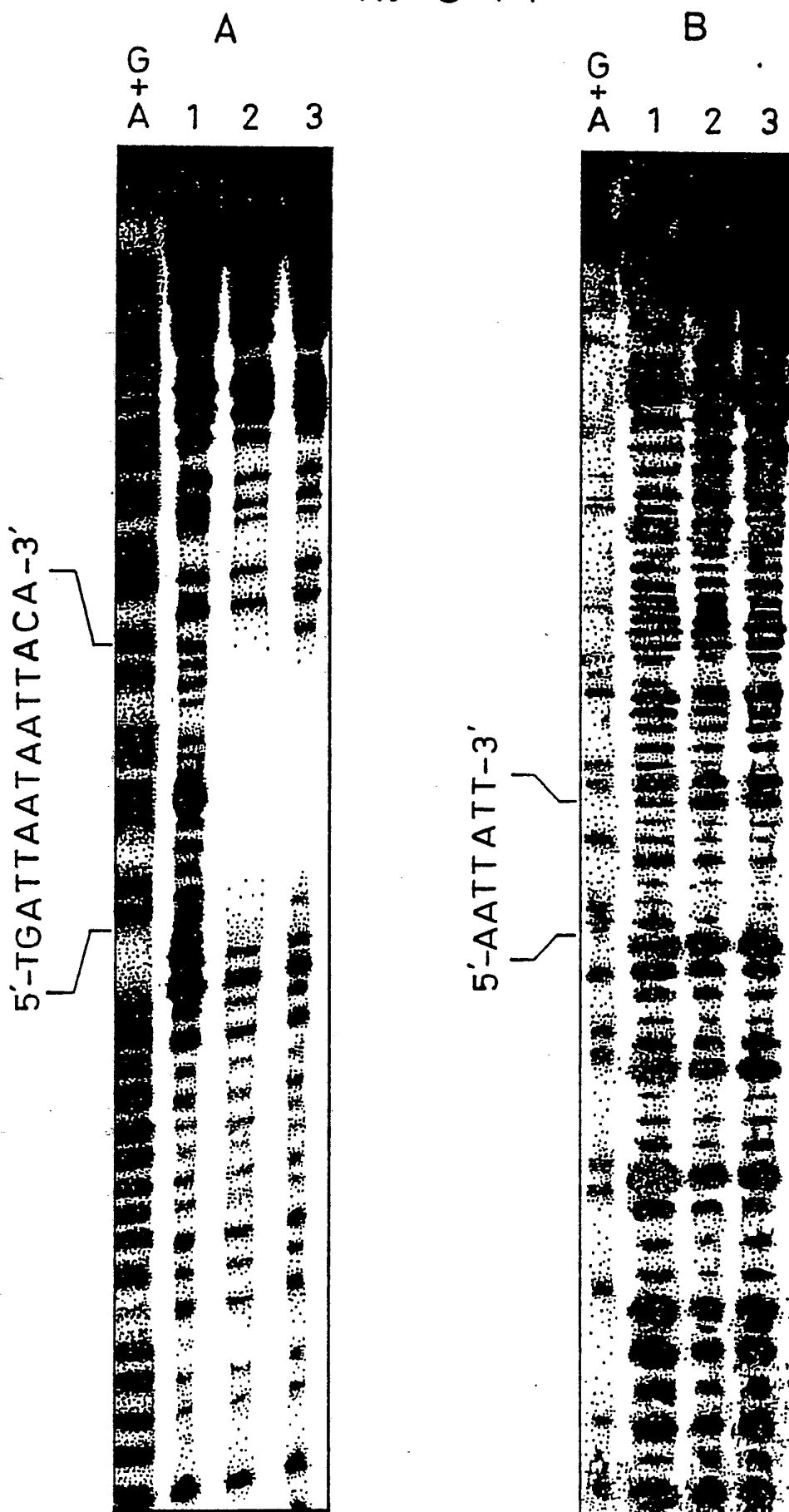
第 4 図



第 5 図

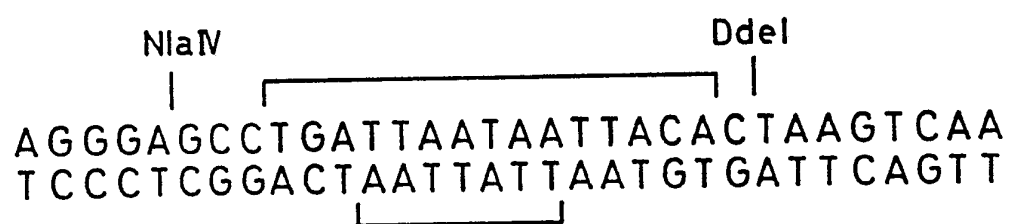


第 6 図



第 6 图

C



第 7 図

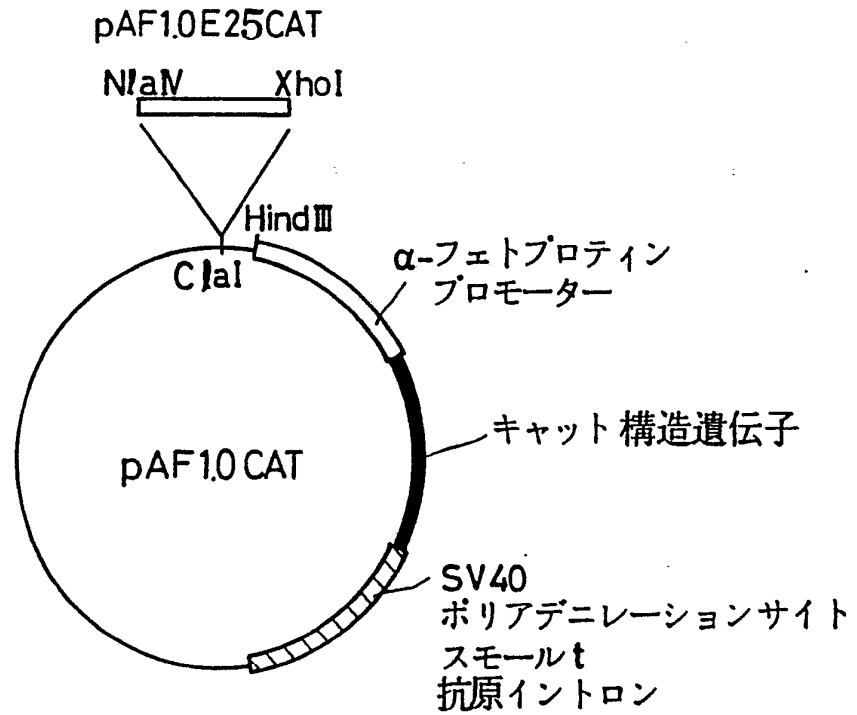
1
C

ATG TCC TCA GTT AAT CTA AAC TTT GAC CAA ACT AAG CTG GAC AAC GAT GAC TGT TCC TCT GTC AAC
 Met Ser Ser Val Asn Leu Asn Phe Asp Gln Thr Lys Leu Asp Asn Asp Asp Cys Ser Ser Val Asn
 ACA GCA ATC ACA GAT ACC ACA ACT GGA GAC GAG GGC AAC GCA GAT AAC GAC AGT GCA ACG GGA ATA
 Thr Ala Ile Thr Asp Thr Thr Thr Gly Asp Glu Gly Asn Ala Asp Asn Asp Ser Ala Thr Gly Ile
 GCA ACT GAA ACC AAA TCC TCT TCT GCA CCC AAC GAA GGG TTG ACC AAA GCG GCC ATG ATG GCA ATG
 Ala Thr Gln Thr Lys Ser Ser Ser Ala Pro Asn Glu Gly Leu Thr Lys Ala Ala Met Met Ala Met
 TCT GAG TAT GAA GAT CGG TTG TCA TCT GGT CTG GTC AGC CCG GCC CCG AGC TTT TAT AGC AAG GAA
 Ser Glu Tyr Glu Asp Arg Leu Ser Ser Gly Leu Val Ser Pro Ala Pro Ser Phe Tyr Ser Lys Glu
 TAT GAC AAT GAA GGT ACA GTG GAC TAC AGT GAA ACC TCA AGC CTT GCA GAT CCC TGC TCC CCG AGT
 Tyr Asp Asn Glu Gly Thr Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Ser Leu Ala Asp Pro Cys Ser Pro Ser
 CCT GGT GCG AGT GGA TCT GCA GGC AAA TCT GGT GAC AGC GGG GAT CCG CCT GGG CAG AAA CGT TTT
 Pro Gly Ala Ser Gly Ser Ala Gly Lys Ser Gly Asp Ser Gly Asp Arg Pro Gly Gln Lys Arg Phe
 CGC ACT CAA ATG ACC AAT CTG CAG CTG AAG GTC CTC AAG TCA TGC TTT AAT GAC TAC AGG ACA CCC
 Arg Thr Gln Met Thr Asn Leu Gln Leu Lys Val Leu Lys Ser Cys Phe Asn Asp Tyr Arg Thr Pro
 ACT ATG CTA GAA TGT GAG GTC CTG GGC AAT GAC ATT GGA CTG CCA AAG AGA GTC GTT CAG GTC TGG
 Thr Met Leu Glu Cys Glu Val Leu Gly Asn Asp Ile Gly Leu Pro Lys Arg Val Val Gln Val Trp
 TTC CAG AAT GCC CCG GCA AAA GAA AAG AAG TCC AAG TTA AGC ATG GCC ANG CAT TTT GGT ATA AAC
 Phe Gln Asn Ala Arg Ala Lys Glu Lys Lys Ser Lys Leu Ser Met Ala Lys His Phe Gly Ile Asn
 CAA ACG AGT TAT GAG GGA CCC AAA ACA GAG TGC ACT TTG TGT GGC ATC AAG TAC AGC GCT CCG CTG
 Gln Thr Ser Tyr Glu Gly Pro Lys Thr Glu Cys Thr Leu Cys Gly Ile Lys Tyr Ser Ala Arg Leu
 TCT GTA CGT GAC CAT ATC TTT TCC CAA CAG CAT ATC TCC AAA GTT AAA GAC ACC ATT GGA AGC CAG
 Ser Val Arg Asp His Ile Phe Ser Gln Gln His Ile Ser Lys Val Lys Asp Thr Ile Gly Ser Gln
 CTG GAC AAG GAG AAA GAA TAC TTT GAC CCA GCC ACC GTA CGT CAG TTG ATG GCT CAA CAA GAG TTG
 Leu Asp Lys Glu Lys Glu Tyr Phe Asp Pro Ala Thr Val Arg Gln Leu Met Ala Gln Gln Glu Leu
 GAC CGG ATT AAA AAG GCC AAC GAG GTC CTT GGA CTG GCA GCT CAG CAG CAA GGG ATG TTT GAC AAC
 Asp Arg Ile Lys Lys Ala Asn Glu Val Leu Gly Leu Ala Ala Gln Gln Gln Gly Met Phe Asp Asn
 ACC CCT CTT CAG GCC CTT AAC CTT CCT ACA GCA TAT CCA GCG CTC CAG GGC ATT CCT CCT GTG TTG
 Thr Pro Leu Gln Ala Leu Asn Leu Pro Thr Ala Tyr Pro Ala Leu Gln Gly Ile Pro Pro Val Leu
 CTC CCG GGC CTC AAC AGC CCC TCC TTG CCA GGC TTT ACT CCA TCC AAC ACA GCT TTA ACG TCT CCT
 Leu Pro Gly Leu Asn Ser Pro Ser Leu Pro Gly Phe Thr Pro Ser Asn Thr Ala Leu Thr Ser Pro
 AAG CCG AAC TTG ATG GGT CTG CCC AGC ACA ACT GTT CCT TCC CCT GGC CTC CCC ACT TCT GGA TTA
 Lys Pro Asn Leu Met Gly Leu Pro Ser Thr Thr Val Pro Ser Pro Gly Leu Pro Thr Ser Gly Leu

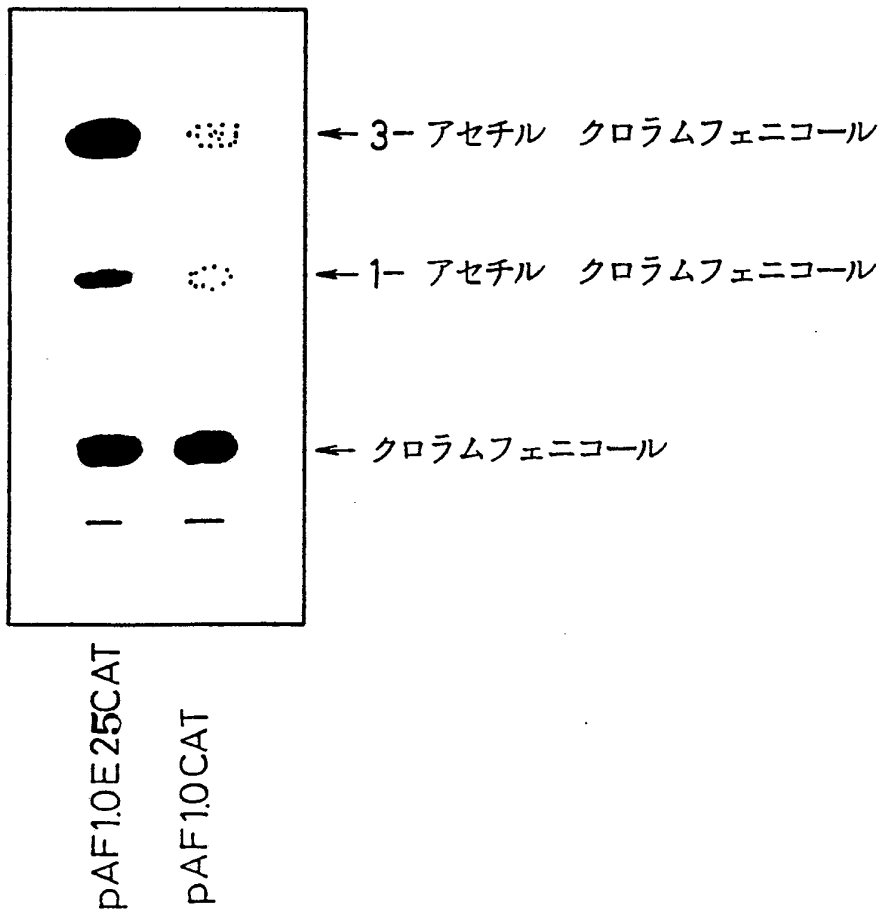
1091

CCA AAT AAA CCG TCC TCA GCG TCG CTG AGC TCC C
 Pro Asn Lys pro Ser Ser Ala Ser Leu Ser Ser

第 8 図



第 9 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/00557

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵	C12N15/85//C12N15/12	
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
BIOSIS DATABASE		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol.262, NO.10 (1987) K.Watanabe et al "Cell-specific Enhancer Activity in a Far L--Fetoprotein Gene" p.4812-4818	1-4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.83 No.21 (1986) S. G. Wideman et al. "Liver-specific expression of the mouse L-fetoprotein gene is mediated by sis- acting DNA elements" p.8196-8200	1-4
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
July 20, 1990 (20.07.90)	August 6, 1990 (06.08.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl.⁸ C12N15/85//C12N15/12		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
BIOSIS DATABASE		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	The Journal of Biological Chemistry, 第262巻, 第10号(1987) K. Watanabe et al. 「Cell-specific Enhancer Activity in a Far Upstream Region of the Human α-Fetoprotein Gene」 p. 4812-4818	1-4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第83巻, 第21号 (1986) S. G. Widen et al. 「Liver-specific expression of the mouse α-fetoprotein gene is mediated by sis-acting DNA elements」 p. 8196-8200	1-4
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 20.07.90	国際調査報告の発送日 06.08.90	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 広田雅紀	4 B 8 7 1 7