

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3691055号

(P3691055)

(45) 発行日 平成17年8月31日(2005.8.31)

(24) 登録日 平成17年6月24日(2005.6.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/71

C 0 7 K 14/71

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

請求項の数 12 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-517679
 (86) (22) 出願日 平成6年2月10日(1994.2.10)
 (65) 公表番号 特表平8-506484
 (43) 公表日 平成8年7月16日(1996.7.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1994/000427
 (87) 国際公開番号 W01994/018330
 (87) 国際公開日 平成6年8月18日(1994.8.18)
 審査請求日 平成12年11月30日(2000.11.30)
 (31) 優先権主張番号 93200350.2
 (32) 優先日 平成5年2月10日(1993.2.10)
 (33) 優先権主張国 オランダ(NL)

(73) 特許権者
 ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノート
 シャープ
 オランダ国、3013・エイエル・ロッテ
 ルダム、ヴェーナ 455
 (74) 代理人
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的結合能力をもつ固定化タンパク質並びに各種プロセス・物品におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

特定の化合物に対する結合能力を有する、抗体、抗体フラグメント、及び複数の抗体フラグメントの組み合わせからなる群から選択される結合タンパク質を固定化するための方法にして、上記結合タンパク質又は上記の特異的結合能力を保持したその機能的部分であって *Saccharomyces* 属に属する酵母の外部に連結した上記結合タンパク質又は機能的部分の生産に組換えDNA技術を利用して、*Saccharomyces* 属に属する酵母の細胞壁に固着し得るアンカータンパク質のアンカー部分(当該アンカー部分は上記アンカータンパク質のC末端部分から導かれる)のN末端に上記結合タンパク質又はその機能的部分とそのC末端で結合しているようなキメラタンパク質を *Saccharomyces* 属に属する酵母の細胞が産生及び分泌できるようにすることによって上記タンパク質又はその機能的部分が細胞壁又は細胞壁の外側に局在化するようにさせることを含む方法。

【請求項2】

下記の(i)及び(ii)を含んでなる組換えポリヌクレオチド。

(i) 抗体、抗体フラグメント、及び複数の抗体フラグメントの組み合わせからなる群から選択される結合タンパク質又は特異的結合能力を保持したその機能的部分をコードする構造遺伝子、及び

(ii) *Saccharomyces* 属に属する酵母の細胞壁に固着し得るアンカータンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一部分であって、当該遺伝子部分がアンカータンパ

10

20

ク質のアンカー部分（当該アンカー部分は上記アンカータンパク質のC末端部分から導かれる）をコードしている遺伝子部分。

【請求項3】

請求項2記載のポリヌクレオチドにおいて、上記アンカータンパク質が、*Saccharomyces*由来の - アグルチニン、*a* アグルチニン、FLO1からなる群から選択されることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項4】

請求項2記載のポリヌクレオチドにおいて、当該ポリヌクレオチドが、当該ポリヌクレオチドの発現産物の分泌を確実にするためのシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでいることを特徴とするポリヌクレオチド。

10

【請求項5】

請求項4記載のポリヌクレオチドにおいて、上記シグナルペプチドが、*Saccharomyces*のインベルターゼに由来することを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項6】

請求項2乃至請求項5のいずれか1項記載のポリヌクレオチドにして、誘導型プロモーターとすることができるプロモーターに機能的に連結しているポリヌクレオチド。

【請求項7】

請求項2乃至請求項6のいずれか1項記載のポリヌクレオチドを含んでなる組換えベクター。

【請求項8】

請求項2乃至請求項6のいずれか1項記載のポリヌクレオチドにコードされたキメラタンパク質。

20

【請求項9】

細胞の外部に細胞壁をもつ*Saccharomyces*属に属する酵母の細胞にして、請求項2乃至請求項6のいずれか1項記載のポリヌクレオチドを少なくとも1つ保有する宿主細胞。

【請求項10】

請求項9記載の細胞にして、その染色体に請求項2乃至請求項6のいずれか1項記載のポリヌクレオチドが少なくとも1つ組込まれていることを特徴とする細胞。

【請求項11】

請求項8記載のキメラタンパク質がその細胞壁に固定化されている*Saccharomyces*属に属する酵母の細胞にして、当該キメラタンパク質の結合タンパク質部分がその細胞壁中又は細胞壁の外側に局在化している細胞。

30

【請求項12】

特定化合物に対する結合能力を保持している固定化された、抗体、抗体フラグメント、及び複数の抗体フラグメントの組み合わせからなる群から選択される結合タンパク質又はその機能的部分を用いて単離プロセスを行う方法にして、上記特定化合物を含んだ媒質を請求項9乃至請求項11のいずれか1項記載の*Saccharomyces*属に属する酵母の細胞に、特定化合物と固定化結合タンパク質との複合体が形成されるような条件下で、接触させ、特定化合物を当初含んでいた上記媒質から当該複合体を分離し、所望により、結合タンパク質又はその機能的部分から特定化合物を解離させることを特徴とする方法。

40

【発明の詳細な説明】

発明の背景

医薬品産業、ファインケミカル産業及び食品産業では、動物・植物組織の抽出物や培地のような複雑な混合物から単離する必要のある化合物が数多く必要とされている。このような単離プロセスによって製品の価格が決定されることが多い。従来の単離プロセスは特異性が余り高くなく、単離プロセスの間に単離すべき化合物がなかり稀釈され、その結果、水その他の溶媒を除去するため経費のかさむ諸工程を設ける必要があった。

幾つかの特定の化合物の単離にはアフィニティー技術が利用されている。かかる技術の利点は、それらの化合物がある種のリガンドに極めて特異的に結合することである。しかし

50

、このようなりガンドは非常に高価である場合が極めて多い。このような高価なりガンドが無駄に使われることのないように、かかるリガンドを不溶性担体に連結することも可能である。しかし、こうしたリガンドの連結処理も経費のかさむ場合が多く、しかもかかる処理によってリガンドの機能が悪影響を受けることも多い。したがって、有効性の高い固定化リガンドを調製するための経済的な方法を開発することが望まれている。

発明の概要

本発明は、特定の化合物に対する結合能力を有する「結合タンパク質」を固定化するための方法にして、上記結合タンパク質又は上記の特異的結合能力を保持したその機能的部分であって宿主細胞の外部に連結した結合タンパク質又は機能的部分の生産に組換えDNA技術を利用して、宿主細胞の細胞壁に固着し得るアンカータンパク質のアンカー部分（当該アンカー部分は上記アンカータンパク質のC末端部分から導かれる）のN末端に上記結合タンパク質又はその機能的部分とそのC末端で結合しているようなキメラタンパク質を宿主細胞が産生及び分泌できるようにすることによって上記結合タンパク質又はその機能的部分が細胞壁中又は細胞壁の外側に局在化するようにさせることを含んでなる方法を提供する。

10

宿主は好ましくはグラム陽性細菌及び菌類である。これらはその細胞外部に細胞壁を有しており、細胞外部に膜をもつグラム陰性細菌及び動物・植物細胞などの高等真核生物とは対照的である。好適なグラム陽性細菌には、乳酸菌や*Bacillus*属及び*Streptomyces*属の細菌が含まれる。好適な菌類には、*Candida*属、*Debaryomyces*属、*Hansenula*属、*Kluyveromyces*属、*Pichia*属及び*Saccharomyces*属の酵母並びに*Rhizopus*属、*Aspergillus*属及び*Penicillium*属のカビが含まれる。本明細書中では、菌類は酵母の群とカビの群を含んでなるが、これらは下等真核生物としても知られている。植物及び動物の細胞との対比において、細菌及び下等真核生物の群を本明細書では微生物と記載することもある。

20

本発明は、上記の方法に使用し得る組換えポリヌクレオチドにして、(i)上記結合タンパク質又は特異的結合能力を保持したその機能的部分をコードする構造遺伝子、及び(ii)グラム陽性細菌又は菌類の細胞壁に固着し得るアンカータンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一部分であって、当該遺伝子部分がアンカータンパク質のアンカー部分（当該アンカー部分は上記アンカータンパク質のC末端部分に由来する）をコードしているもの、

30

を含んでなるポリヌクレオチドをも提供する。アンカータンパク質は、 α -アグルチニン、 α -アグルチニン、FLO1、下等真核生物の主要細胞壁タンパク質及び乳酸菌のプロテイナーゼから選択することができる。好ましくは、かかるポリヌクレオチドは当該ポリヌクレオチドの発現産物の分泌を確実にするためのシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでなるが、そのようなシグナルペプチドは酵母の接合因子、酵母の α -アグルチニン、*Saccharomyces*のインベルターゼ、*Kluyveromyces*のイヌリナーゼ、*Bacillus*の α -アミラーゼ及び乳酸菌のプロテイナーゼから選択されるタンパク質から得ることができる。本発明のポリヌクレオチドはプロモーターに機能的に連結させることもできるが、プロモーターは誘導型プロモーターであるのが好ましい。

40

本発明は、さらに、本発明のポリヌクレオチドを含んでなる組換えベクター、本発明のポリヌクレオチドにコードされたキメラタンパク質、並びに細胞の外部に細胞壁をもつ宿主細胞にして本発明のポリヌクレオチドを少なくとも1つ保有する宿主細胞をも提供する。好ましくは、少なくとも1つのポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組込まれている。これに関連した本発明の別の具体的態様は、本発明のキメラタンパク質が細胞壁に固定化されていてそのキメラタンパク質の結合タンパク質部分が細胞壁中又は細胞壁の外側に局在化している宿主細胞である。

本発明の別の具体的態様は、特定化合物に対する結合能力を保持している固定化された結合タンパク質又はその機能的部分を用いて単離プロセスを行う方法であるが、この方法では、上記特定化合物を含んだ媒質を本発明の宿主細胞に、特定化合物と固定化結合タンパ

50

ク質との複合体が形成されるような条件下で、接触させ、特定化合物を当初含んでいた上記媒質から当該複合体を分離し、所望により、結合タンパク質又はその機能的部分から特定化合物を解離させる。

【図面の簡単な説明】

図1には、pEMB L9から誘導されたプラスミドであるpUR4122の組成が示してあるが、その調製法については実施例1に記載されている。

図2には、プラスミドpUR2741の組成が示してあるが、このプラスミドは既報のプラスミドpUR2740から誘導されたものである。実施例1参照。

図3には、pEMB L9から誘導されたプラスミドであるpUR2968の組成が示してある。その調製法については実施例1に記載されている。

10

図4には、プラスミドpUR2741とpUR2968とpUR4122とを出発材料としたプラスミドpUR4174の調製法、並びにプラスミドpSY16とpUR2968とpUR4122とを出発材料としたプラスミドpUR4175の調製法が示してある。これらの調製法は実施例1に記載されている。

図5には、プラスミドpUR2743.4の組成を示した。その調製法は実施例2に記載されている。このプラスミドは配列番号：12に示した714bpのPstI-XhoIフラグメントを含んでいるが、このフラグメントには、抗トラセオリド抗体02/01/01のscFv-TRASフラグメントがコードされている(トラセオリド(traseolide)は登録商標である)。

図6には、プラスミドpUR4178の組成を示した。その調製法は実施例2に記載されている。このプラスミドは配列番号：12に示す上述の714bpのPstI-XhoIフラグメントを含んでいる。このフラグメントは、インベルターゼのシグナル配列(SUC2)で先導されたscFv-TRASとAGGの融合タンパク質の発現に適している。

20

図7には、プラスミドpUR4179の組成を示した。その調製法は実施例2に記載されている。このプラスミドは配列番号：12に示す上述の714bpのPstI-XhoIフラグメントを含んでいる。このフラグメントは、プレプロ-接合因子のシグナル配列で先導されたscFv-TRASとAGGの融合タンパク質の発現に適している。

図8は分子設計図であり、実施例3に記載のムスク系香料分子のトラセオリド(登録商標)と修飾ムスク抗原が示してある。

図9には、プラスミドpUR4177の組成が示してある。その調製法は実施例4に記載されている。プラスミドpUR4177は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンに対するモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖フラグメントの可変領域(scFv-HCGフラグメント)をコードした配列番号：13に示す734bpのEagI-XhoI DNAフラグメントを含んでおり、GAL7プロモーター調節下でのインベルターゼのシグナル配列で先導されたキメラなscFv-HCG-AGG融合タンパク質の生産に適した基本鎖長2µmのベクターである。

30

図10には、プラスミドpUR4180の組成が示してある。その調製法は実施例4に記載されている。プラスミドpUR4177は、配列番号：13に示した上述の734bpのEagI-XhoI DNAフラグメントを含んでおり、GAL7プロモーター調節下でのプレプロ-接合因子のシグナル配列で先導されたキメラなscFv-HCG-AGG融合タンパク質の生産に適した基本鎖長2µmのベクターである。

40

図11には、基本鎖長2µmのベクターであるプラスミドpUR2990の組成が示してあり、このプラスミドは、実施例5では、プラスミドpUR4196を調製する際の出発ベクターとして示した(図12参照)。プラスミドpUR2990はキメラなりパーゼ-FLO1タンパク質をコードするDNAフラグメントを含んでいるが、このタンパク質は下等真核生物の細胞壁につなぎとめられ、脂質の加水分解を触媒し得る。

図12には、プラスミドpUR4196の組成が示してある。その調製法は実施例5に記載されている。このプラスミドは、scFv-HCGとそれに続くFLO1タンパク質のC末端部分からなるキメラタンパク質をコードするDNAフラグメントを含んでおり、宿主生物の細胞壁につなぎとめられていてHCGを結合し得るキメラタンパク質の生産に適

50

したベクターである。

図13には、プラスミドpUR2985が組成が示してある。その調製法は実施例6に記載されている。このプラスミドには、*Brevibacterium sterolicum*の染色体からPCR法で得られたコレステロールオキシダーゼ(EC 1.1.3.6)の成熟部分をコードするchoB遺伝子が含まれている。

図14には、プラスミドpUR2987の組成を示した。プラスミドpUR2985からのその調製法は実施例6に記載されている。このプラスミドには、コレステロールオキシダーゼの成熟部分をコードするchoB遺伝子と、その前と後にそれぞれ位置するプレプロ-接合因子のシグナル配列をコードするDNAと-アグルチニンのC末端部分をコードするDNAとからなるDNA配列が含まれている。

10

図15には、既報のプラスミドpGKV550の組成が示してある。このプラスミドは実施例7に記載されており、*Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2株の細胞壁プロテイナーゼのオペロンを、プロモーター、リボソーム結合部位及びprtP遺伝子を含めて、完全に含んでいる。

図16には、プラスミドpUR2988の組成が示してある。その調製法は実施例7に記載されている。このプラスミドは別のプラスミドpUR2989の調製に使用できると期待されるが、そのpUR2989を乳酸菌に導入すれば、乳酸菌の外表面につなぎとめられていてコレステロールに結合し得るキメラタンパク質が生産されるはずである。

図17には、プラスミドpUR2993の組成が示してある。その調製法は実施例8に記載されている。このプラスミドは酵母細胞の形質転換に使用でき、その形質転換酵母細胞は、EGFレセプターをその一部として有する固定化キメラタンパク質を介してヒト上皮成長因子(EGF)に結合し得る。

20

図18には、プラスミドpUR4482及びpUR4483の組成が示してある。それらの調製法は実施例9に記載されている。プラスミドpUR4482は、インベルターゼのシグナル配列、ラクダ抗体のCHv09可変領域とMycテールと「X-P-X-P」ヒンジ領域及び-アグルチニンの細胞壁アンカー領域をもつ融合タンパク質を発現させるための、酵母のエピソーム型発現プラスミドである。プラスミドpUR4483は「X-P-X-P」ヒンジ領域を含んでいない点でpUR4482とは異なる。

図19には、プラスミドpUR4424、pUR4482及びpUR4483上に存在するラクダ抗体遺伝子を発現する対数増殖期($OD_{530} = 0.5$)のSU10細胞の免疫蛍光標識実験(抗Myc抗体)の結果を示す。Ph = 位相差。Fl = 蛍光。

30

図20には、プラスミドpUR4424、pUR4482及びpUR4483上に存在するラクダ抗体遺伝子を発現する対数増殖期($OD_{530} = 0.5$)のSU10細胞の免疫蛍光標識実験(抗ヒトIgG抗体)の結果を示す。Ph = 位相差。Fl = 蛍光。

図面で用いた略号

-gal :	グアーの-ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 ;	
AG-alpha-1/AG 1 :	<i>S. cerevisiae</i> の-アグルチニンを発現する遺伝子 ;	
AG 1 cds / -AGG :	-アグルチニンのコーディング配列 ;	
Amp/amp ^r :	-ラクタマーゼ耐性遺伝子 ;	40
CHv09 :	ラクダ重鎖可変09フラグメント ;	
EmR :	エリスロマイシン耐性遺伝子 ;	
f1 :	f1ファージ複製配列 ;	
FLO1/FLO(C-part) :	フロキュレーションタンパク質のFLO1コーディング配列のC末端側部分 ;	
Hinge :	ラクダ「X-P-X-P」ヒンジ領域, 実施例9参照 ;	
LEU2 :	LEU2遺伝子 ;	
LEU2d/leu2d :	トランケート型LEU2遺伝子 ;	
Leu2d cs :	LEU2d遺伝子のコーディング配列 ;	
MycT :	ラクダMycテール ;	50

O r i M B 1 :	大腸菌プラスミド由来のM B 1複製起点 ;	
P g a l 7 / p G A L 7 :	G A L 7プロモーター ;	
T p g k :	ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子のターミネーター ;	
p p -M F / M F 1 s s :	接合因子のプレプロ部分 (=シグナル配列) ;	
r e p A :	複製に必要なタンパク質 r e p Aをコードする遺伝子 (図15/16) ;	
S c F v (V h - V 1) :	V _H 鎖とV _L 鎖を含む単鎖抗体フラグメント ;	
s s :	シグナル配列 ;	
S U C 2 :	インベルターゼのシグナル配列 ;	10
2 u / 2 m i c r o n :	2 μm配列 .	

発明の詳細な説明

本発明は、固定化リガンドを利用して、複雑な混合物から貴重な化合物を単離することに関する。この固定化リガンドは、遺伝子工学によって得られるタンパク質であって、「アンカータンパク質」又はその機能的部分と「結合タンパク質」又はその機能的部分との2つの部分で構成される。

「アンカータンパク質」は微生物、好ましくは酵母やカビのような下等真核生物の細胞壁に固着する。この種のタンパク質は長いC末端部分を有していることが多く、そのC末端部分が細胞壁につなぎとめられる。そのようなC末端部分は非常に特殊なアミノ酸配列を有している。この典型的な例がプロリンに富んだタンパク質のC末端配列を介した細胞壁への固着である。K o k (1 9 9 0) の報文参照。

これらのアンカータンパク質のC末端部分は、相当数の潜在的セリン及びトレオニン-グリコシル化部位を含んでいる可能性がある。これらの部位がO-グリコシル化されると、タンパク質のC末端部分が桿状のコンホメーションをとるようになる。

細胞壁固着マンノタンパク質の場合、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) を用いてもそれらを細胞壁から抽出することができないのに、グルカナーゼ処理すればそれらを遊離させることができることから、それらは下等真核生物の細胞壁中のグルカンに結合しているらしい。本出願人の係属中の特許出願で1994年1月20日に公開されたW O 9 4 / 0 1 5 6 7号並びにS c h r e u d e r 他 (1 9 9 3) の報文参照。両文献はいずれも本出願の優先日以降に公開されたものである。タンパク質を細胞の外側につなぎとめるもう一つの機構は、グルコシル-ホスファチジルイノシトール (G P I) 基を含んだタンパク質がそのG P Iを介して細胞表面に固着する性質を利用したものである。C o n z e l m a n n 他 (1 9 9 0) の報文参照。

「結合タンパク質」は、単離すべき特定の化合物に連結又は結合するので、そう呼ばれる。アンカータンパク質のN末端部分が特定の化合物に結合する能力を十分に有していれば、そのアンカータンパク質自身をその特定化合物の単離プロセスに使用することができる。結合タンパク質として好適なもの例には、抗体、抗体フラグメント、複数の抗体フラグメントの組合せ、レセプタータンパク質、それぞれの基質に対する結合能力を保持している不活性化酵素及び応用分子進化法 (A p p l i e d M o l e c u l a r E v o l u t i o n) で得られるペプチド (L e w i n (1 9 9 0) の報文参照)、並びにこれらのタンパク質の一部分で単離すべき特定の化合物に対する結合能力を保持しているものが含まれる。これらの結合タンパク質はすべて、単離すべき化合物又は関連化合物群を特異的に認識する能力をもっていることを特徴とする。単離すべき特定の化合物と結合タンパク質の間の結合速度と解離速度は(したがって、当然に、結合定数も)、その化合物の存在する抽出液の組成を変化させるか或いはタンパク質工学によって結合タンパク質を変化させることによって調節することができるが、後者の方法が好ましい。

結合タンパク質とアンカータンパク質(或いはそれらの機能的部分)を含んでなる「キメラタンパク質をコードする遺伝子」は、構成型、誘導型又は抑制解除型プロモーターの調節下に置くことができ、通常はキメラタンパク質の効率的な分泌を図るためにシグナル配列をコードするDNAフラグメントで先導される。分泌によってキメラタンパク質が微生

10

20

30

40

50

物の細胞壁に固着して、微生物の表面がそのキメラタンパク質によって覆われるようになる。これらの微生物は普通の培養法で得ることができ、その菌体の単離も遠心や膜濾過法などの物理的分離手段を用いれば経済的なプロセスとなる。

こうして単離した微生物を、洗浄後、貴重な特定化合物又は化合物群を含んだ抽出液に添加すればよい。ある程度時間が経過すれば、結合状態にある特定化合物(群)と遊離状態にある特定化合物(群)との間で平衡が成立し、特定の化合物又は関連化合物群の結合した微生物を抽出液から簡単な物理的技術で分離することができる。別法として、リガンドで覆われた微生物を担体材料の表面にくっつけて、その被覆担体材料をカラムに詰めて使用することもできる。そのカラムに、特定の化合物又は化合物群を含んだ抽出液を流し込み、その後で、溶出液の組成か温度又はそれらを共に変化させることによってリガンドから上記化合物(群)を解離させることができる。これら2通りの可能性の他にも、数々の変法を用いて、特定化合物とリガンドとの結合、それらの単離及び/又は特定化合物(群)の解離を行い得ることは当業者には明らかであろう。

特に、本発明は下等真核生物の細胞壁に結合したキメラタンパク質に関する。好適な下等真核生物には、*Candida*、*Debaryomyces*、*Hansenula*、*Kluyveromyces*、*Pichia*及び*Saccharomyces*などの酵母、並びに*Aspergillus*、*Penicillium*及び*Phizopus*等のカビが含まれる。用途によっては、特にグラム陽性細菌などの原核生物を用いることもでき、その具体例には、乳酸菌や*Bacillus*属及び*Streptomyces*属に属する細菌が含まれる。

「下等真核生物」に関しては、本発明は、キメラタンパク質をコードする遺伝子にして下記のa及びbからなる遺伝子を提供する。

a. 下等真核生物宿主において機能し得るシグナル配列、例えば -接合因子、インペルターゼ、 -アグルチニン、イヌリナーゼのような酵母タンパク質由来のもの或いはキシラナーゼのようなカビタンパク質由来のものなど、をコードするDNA配列。

b. 細胞壁タンパク質のC末端をコードする構造遺伝子と、その前に位置する構造遺伝子にして特定の化合物又は化合物群に対する結合能力を有するタンパク質をコードする構造遺伝子。後者のタンパク質の例としては、

- ・抗体；
- ・単鎖抗体フラグメント(scFv)(Bird及びWebb Walker(1991)の報文参照)；
- ・抗体の重鎖可変領域(V_H)又は軽鎖可変領域(V_L)或いはこれらの可変領域の一部分であって1~3つの相補性決定領域(CDR)を保持した部分；
- ・レセプタータンパク質のアゴニスト認識部分又はアゴニスト結合能力を保持したその一部分；
- ・触媒活性を喪失した酵素又はかかる酵素の一部分であって酵素の基質結合部位を保持した部分；
- ・特異的脂質結合タンパク質又はかかるタンパク質の一部分であって脂質結合部位を保持した部分(Ossendorf(1992)の報文参照)；並びに
- ・応用分子進化法で得られるペプチド(Lewin(1990)の報文参照)、

が挙げられる。これらの遺伝子の発現産物はすべてシグナル配列と2つのタンパク質部分(すなわち単離すべき1種類以上の化合物に対する結合能力を有する部分と通常は細胞壁結合タンパク質のC末端)で構成されていることを特徴とし、後者(細胞壁結合タンパク質)の具体例としては、 -アグルチニン(Lipke他(1989)の報文参照)；a-アグルチニン(Roy他(1991)の報文参照)；FLO1(実施例5及び配列番号：14参照)；並びに下等真核生物の主要細胞壁タンパク質が挙げられるが、これらのタンパク質のC末端は下等真核生物宿主の細胞壁に発現産物をつなぎとめることができる。

キメラタンパク質をコードするこれらの遺伝子の発現は構成型プロモーターの制御下に置くこともできるが、誘導型プロモーターが好ましく、その好適な具体例としては、Sac

10

20

30

40

50

charomycesのGAL7プロモーター、Kluyveromycesのイヌリナーゼプロモーター、Hansenulaのメタノールオキシダーゼプロモーター及びAspergillusのキシラナーゼプロモーターが挙げられる。かかる構築体は新たな遺伝情報が宿主細胞の染色体に安定に組込まれるような方法で作製するのが好ましい。WO 91/00920号(UNILEVER)参照。

上記の遺伝子で形質転換した下等真核生物は普通の培養法、連続培養又は流加培養法で増殖させることができる。適当な微生物増殖法は、使用する遺伝子とプロモーターの構成並びに物理的分離後の菌体の所望精製度に応じて選択される。

「細菌」に関しては、本発明は、キメラタンパク質をコードする遺伝子にして下記のa及びbからなる遺伝子を提供する。

a. 特定の細菌で機能し得るシグナル配列、例えばBacillusの -アミラーゼ、Bacillus subtilisのズブチリシン又はLactococcus lactis subsp. cremorisのプロテイナーゼ由来のもの、をコードするDNA配列。

b. 細胞壁タンパク質のC末端をコードする構造遺伝子と、その前に位置する構造遺伝子にして特定の化合物又は化合物群に対する結合能力を有するタンパク質をコードする構造遺伝子。後者のタンパク質の例は、下等真核生物に関して既に列挙した。

これらの遺伝子の発現産物はすべてシグナル配列と2つのタンパク質(単離すべき特定の化合物又は化合物群に対する結合能力を有する部分と通常は細胞壁結合タンパク質のC末端)で構成されていることを特徴とし、後者(細胞壁結合タンパク質)の具体例には、Lactococcus lactis subsp. cremoris Wg2株のプロテイナーゼが含まれるが、そのC末端は宿主細菌の細胞壁に発現産物をつなぎとめることができる。

本発明を以下の実施例で例示するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。最初に、実施例で挙げるエンドヌクレアーゼの制限部位を示しておく。

<i>BstEII</i>	G GTNACC CCANTG G	<i>ClaI</i>	AT CGAT TAGC TA	<i>EagI</i>	C GGCCG GCCGG C
<i>EcoRI</i>	G AATTC CTTAA G	<i>HindIII</i>	A AGCTT TTCGA A	<i>NheI</i>	G CTAGC CGATC G
<i>NotI</i>	GC GGCCGC CGCCGG CG	<i>NruI</i>	TCG CGA AGC GCT	<i>PstI</i>	CTGCA G G ACGTC
<i>SacI</i>	GAGCT C C TCGAG	<i>SaI</i>	G TCGAC CAGCT G	<i>XhoI</i>	C TCGAG GAGCT C

実施例 1 下等真核生物の細胞壁に固定化され、複雑な混合物中のリゾチームに対して高い特異性で結合し得るキメラタンパク質をコードする遺伝子の構築

リゾチームは抗菌酵素であって医薬品産業及び食品産業において数多くの用途を有する。卵黄やリゾチーム産生微生物含有培地など、幾つかのリゾチーム源が知られている。リゾチームに対するモノクローナル抗体が得られており(Ward他(1989)の報文参照)、かかる抗体の軽鎖及び重鎖をコードするmRNAもハイブリドーマから単離されていて、逆転写酵素を用いたcDNA合成の鋳型として用いられている。Ward他(1989)の報文に記載されたプラスミドを出発材料として、我々はpUR4122と名付けたpEMBL由来プラスミドを構築した。このpUR4122においては、pEMBLベクターのEcoRIからHindIII部位までの範囲のマルチクローニング部位が231bpのDNAフラグメントで置換されているが、そのDNAフラグメントのヌクレオチド配列は

10

20

30

40

50

配列番号：1に示したもので、ヌクレオチド1～6にE c o R I部位（G A A T T C）、ヌクレオチド105～110にP s t I部位（C T G C A G）、ヌクレオチド122～128にB s t E I I部位（G G T C A C C）、ヌクレオチド207～212にX h o I部位（C T C G A G）及びヌクレオチド226～231にH i n d I I I部位（A A G C T T）を有している。

pUR4122の構築

プラスミドpEMBL9（Dente他（1983）の報文参照）をE c o R I及びH i n d I I Iで消化し、得られた大フラグメントを配列番号：1に示す合成二本鎖DNAと連結した。後段でのDNAフラグメントの連結（それによって、リゾチームに対する単鎖抗体フラグメントのコーディング配列が最終的に得られる）のために、pEMBL9ベクターに挿入した上記231bpのDNAフラグメント（配列番号：1）の中には、以下の要素：GAL7プロモーターの3部分；インペルターゼのシグナル配列（SUC2）；PstI制限部位；BstEII制限部位；V_HフラグメントとV_Lフラグメントとを繋ぐ（GGGGS）×3ペプチドリンカーをコードする配列；SacI制限部位XhoI制限部位；HindIII制限部位が組込まれており、プラスミドpUR4119が得られる。V_HとGGGGSリンカーがインフレーム（in frame）で（すなわち、フレームシフトを起こさずに）融合するように、プラスミドpSW1-VHD1.3-VKD1.3-TAG1（Ward他（1989）の報文参照）をPstI及びBstEIIで消化し、その0.35kbpのDNAフラグメントを同様に消化したpUR4119と連結して、プラスミドpUR4119Aを得た。続いて、プラスミドpSW1-VHD1.3-VKD1.3-TAG1をSacI及びXhoIで消化し、得られたV_Lのコーディング部分を含むフラグメントをpUR4119AのSacI/XhoI部位に連結して、プラスミドpUR4122（図1参照）を得た。

10

20

pUR4174の構築，図4参照

-アグルチニンのC末端部由来の細胞壁アンカーのコードされたDNAを有するS. cerevisiaeエピソード型発現プラスミドを得るため、プラスミドpUR2741（図2参照）を出発ベクターとして選んだ。このプラスミドは基本的にpUR2740の誘導体であり、pUR2740はWO91/19782号及びVerbakel（1991）の報文に記載されている通りプラスミドpUR2730の誘導体である。pUR2730の作製法は欧州特許出願公開EP-A1-0255153（UNILEVER）の例9に明瞭に記載されている。プラスミドpUR2741は、既に不活性化されているテトラサイクリン（tet）耐性遺伝子の残存部分にあるEagI制限部位がNruI/SalI消化によって欠失している点でpUR2740とは異なる。そのSalI部位の一本鎖突出端は再連結前に埋められている。

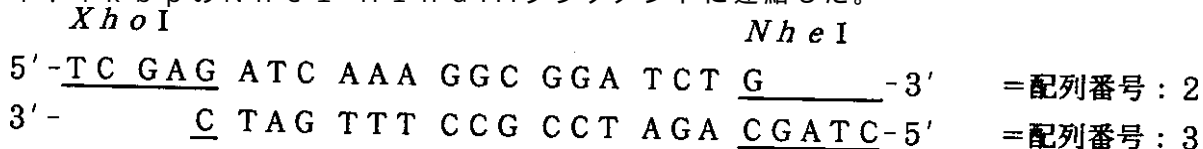
30

pUR4122をSacI及びHindIIIで消化（SacIは部分的消化）しておよそ800bpのフラグメントを単離し、これを、同じ酵素でpUR2741を消化して得たpUR2741ベクターフラグメントにクローニングした。得られたプラスミドはpUR4125と名付けた。

pUR2968と名付けたプラスミド（図3参照）を、（1）Lipke他（1989）の報文に記載されたAgt1含有プラスミドpL21をHindIIIで消化し、（2）約6.1kbpフラグメントを単離し、（3）このフラグメントをHindIII処理pEMBL9と当該6.1kbpフラグメントがpEMBL9ベクターのマルチクローニング部位に存在するHindIII部位に導入されるように連結することによって、作製した。

40

プラスミドpUR4125をXhoI及びHindIIIで消化して、その約8kbpフラグメントを、下記の配列のXhoI/NheIアダプターを用いて、pUR2968の約1.4kbpのNheI-HindIIIフラグメントに連結した。



50

プラスミド pUR 2968 及び pUR 4125 の適当な部分及び Xho I / Nhe I アダプターをこのように連結して得たプラスミドを pUR 4174 と名付けたが、このプラスミド pUR 4174 は、アミノ末端にインペルターゼのシグナル(プレ)ペプチド、続いて scFv-LYS ポリペプチド、最後に -アグルチニンの C 末端からなるキメラ融合タンパク質をコードしている(図 4 参照)。

pUR 4175 の構築, 図 4 参照

pUR 4122 (上記参照) を Pst I 及び Hind III で消化しておよそ 700 bp のフラグメントを単離し、これを、Eag I 及び Hind III で消化した pSY 16 (Harmsen 他(1993)の報文参照)のベクターフラグメントに、下記配列の Eag I - Pst I アダプターを用いて連結した。

E a g I *P s t I*

5' - G GCC GCC CAG GTG CAG CTG CA - 3' = 配列番号 : 4

3' - CGG GTC CAC GTC G - 5' = 配列番号 : 5

こうして得られたプラスミド pUR 4132 を Xho I 及び Hind III で消化して、上記の Xho I / Nhe I アダプターを用いて、pUR 2968 (上記参照) の約 1.4 kb の Nhe I - Hind III フラグメントに連結して、プラスミド 4175 を得た(図 4 参照)。このプラスミドは、-接合因子のプレプロペプチド、続いて scFv-LYS ポリペプチド、最後に -アグルチニンの C 末端からなるキメラ融合タンパク質をコードしている。

実施例 2 下等真核生物の細胞壁に固定化され、複雑な混合物中のトラセオリドに対して高い特異性で結合し得る同族キメラタンパク質群をコードする遺伝子群の構築

ハイブリドーマ細胞系統からの RNA の単離、cDNA の調製並びに抗体可変領域をコードする遺伝子フラグメントの PCR 法による増幅は、文献記載の常法にしたがって行った。例えば Orlandi 他(1989)の報文参照。PCR 増幅では、様々なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。

重鎖フラグメントに対しては、下記のプライマーを使用した。

A : AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G

P s t I

= 配列番号 : 6

(ただし、S は C 又は G、M は A 又は C、R は A 又は G、W は A 又は T である)、及び

B : TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC

B s t E II

= 配列番号 : 7

軽鎖フラグメント(鎖)に対しては、下記のプライマーを使用した。

C : GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA

S a c I

= 配列番号 : 8

D : GTT TGA TCT CGA GCT TGG TCC C

X h o I

= 配列番号 : 9

pUR 4143 の構築

将来の構築作業を簡単にするために、pUR 4122 (上記参照) のインペルターゼシグナル配列と scFv-LYS の連結部に Eag I 制限部位を導入した。これは、配列番号 : 1 に示す合成フラグメント内の約 110 bp の EcoRI - Pst I フラグメントを下記配列の合成アダプターで置換することによって達成した。

EcoRI *PstI*

AATTCGGCCGTTTCAGGTGCAGCTGCA =配列番号：10

GCCGGCAAGTCCACGTCG =配列番号：11

こうして得たプラスミドを pUR4122.1 と名付けたが、この pUR4122.1 は、EagI 部位の後にインフレームで続く単鎖 Fv をプレプロ - 接合因子配列又は SUC2 インペルターゼシグナル配列のいずれかに引き続いて発現させるための構築ベクターである。

重鎖 PCR フラグメントを PstI 及び BstEII で消化して、約 230 bp の PstI フラグメントと約 110 bp の PstI/BstEII フラグメントの 2 種類のフラグメントを得た。後者のフラグメントを、PstI 及び BstEII で消化しておいたベクター pUR4122.1 にクローニングした。こうして新たに得られたプラスミド (pUR4122.2) を SacI 及び XhoI で消化し、次いでこのベクターに軽鎖 PCR フラグメント (同じ制限酵素で消化しておいたもの) をクローニングして pUR4122.3 を得た。このプラスミドを PstI で消化し、しかる後にこのプラスミドベクターに上記の約 230 bp の PstI フラグメントをクローニングして、pUR4143 と呼ばれるプラスミドを得た。2 通りに配向している可能性があるが、通例の制限酵素分析によって選択することができる。pUR4122 に元々存在していた scFv-LYS 遺伝子の代わりに、この新たなプラスミド pUR4143 には抗トラセオリド抗体 02/01/01 の scFv-TRAS フラグメントをコードする遺伝子が含まれている (714 bp の PstI-XhoI フラグメントのヌクレオチド配列に関しては配列番号：12 参照)。

pUR4178 及び pUR4179 の構築

pUR4143 を EagI 及び HindIII で消化すれば、約 715 bp のフラグメントが単離できる。このフラグメントは、同じ制限酵素で消化しておいた pUR2741 及び pUR4175 のベクター主鎖にクローニングすることができる。pUR2741 の場合、そのようにしてプラスミド pUR2743.4 が得られた (図 5 参照)。このプラスミドは XhoI 及び HindIII で消化して pUR4174 の 8 kbp の XhoI-HindIII フラグメントに連結することができ、pUR4178 を与える (図 8)。

pUR4175 を出発ベクターとして用いた場合に得たプラスミドは pUR4179 と名付けた (図 9)。

プラスミド pUR4178 及び pUR4179 を共に *S. cerevisiae* に導入した。

実施例 3 ある種の条件下でトリセオリドの結合又は解離を改良するための、トラセオリドに結合し得るキメラタンパク質の結合部分の修飾

免疫反応の際の抗体の結合特性が、抗原の分子的性質に応じた抗体の結合領域中の相補性決定配列の微調整に起因して変化することは周知の免疫学的現象である。抗体フラグメントの抗原結合領域を抗原接触領域の分子モデルに基づいて適合させることによってこの現象をインビトロ (*in vitro*) で真似ることができる。

その一つの具体例が、抗ムスク抗体 M02/01/01 をもっと強く結合する変異体 M020501i へとタンパク質工学的に改変することである。

まず、抗リゾチーム抗体 HYHEL10 の原子座標 (ブルックヘブン・プロテイン・データバンク (Brookhaven Protein Data Bank) に収録; 3HFM) を鋳型として利用したホモロジーモデリングにより、M02/01/01 可変フラグメント (Fv) の分子モデルを構築した。この分子モデルを、Silicon Graphics 4D240 ワークステーション上で Biosym 製のプログラム DISCOVER に基づいて、モレキュラー・メカニクス (Molecular Mechanics) 法及びモレキュラー・ダイナミクス (Molecular Dynamics) 法を用いて改良した。次に、こうして得た Fv の結合部位のマッピングを CDR 領域にムスク抗原を視覚的にドッキングさせて行った後、再度モレキュラー・ダイナミクス法を用いて改良した。得られたモデルを充填効率 (ファン・デル・ワールスの接触面積) について検討した

ところ、A L A H 9 6をV A Lで置換すればリガンドとF vの間の（疎水性）接触面積が増えて相互作用が強まるものと結論できた（図8）。

この変異を実施例2で得たc D N A由来s c F vのM 0 2 / 0 1 / 0 1に導入したとき、得られるものはF v M 0 2 0 5 0 1 iであり、少なくとも5倍増大した親和性をもつ変異体であると予想できたが、その増大した親和性は上記ムスク香料分子に対するF vの蛍光滴定法を利用して測定することができた。

実施例4 下等真核生物の細胞壁に固定化され、H C Gのようなホルモンに結合し得るキメラタンパク質をコードする遺伝子の構築

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンに対するモノクローナル抗体由来の重鎖及び軽鎖フラグメントの可変領域をコードする遺伝子フラグメントを、実施例2に記載した方法と同様の方法でハイブリドーマから得た。

次に、これらのH C G V_H及びV_L遺伝子フラグメントを対応P s t I - b s t E II及びS a c I - X h o I遺伝子フラグメントの置換によってプラスミドp U R 4 1 4 3にクローニングして、プラスミドp U R 4 1 4 6を得た。

実施例2に記載した方法と同様に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンに対するモノクローナル抗体由来の重鎖及び軽鎖フラグメントの可変領域（s c F v - H C Gフラグメント）をコードする734bpのE a g I - X h o Iフラグメント（配列番号：13に示すヌクレオチド配列）をp U R 4 1 6 6から単離して、同一の制限酵素で消化しておいたp U R 4 1 7 8（実施例2参照）のベクター主鎖に実際に導入したが、同一の制限酵素で消化しておいたp U R 4 1 7 5（実施例1参照）のベクター主鎖にも導入できるはずである。こうしてプラスミドp U R 4 1 7 7（図9参照）及びp U R 4 1 8 0（図10参照）が得られるが、前者については実際にS . c e r e v i s s i a eのS U 1 0株に導入し、後者もS . c e r e v i s s i a eのS U 1 0株に導入できるはずである。

実施例5 下等真核生物の細胞壁に固定化され、H C Gのようなホルモンに結合し得るキメラタンパク質s c F v - F L O 1をコードする遺伝子の構築

S . c e r e v i s s i a eにおけるフロキュレーション表現型に関連した遺伝子の一つがF L O 1遺伝子である。F L O 1遺伝子の主要部分を含んだクローンのD N A配列を今回決定した（2685bpのF L O 1遺伝子を示す配列番号：14参照）。このクローン化フラグメントは、サザンハイブリダイゼーション及びノーザンハイブリダイゼーションの結果ではゲノムコピーよりも約2kb短かったが、F L O 1遺伝子の両端を含んでいた。D N A配列データの解析から、推定タンパク質には、分泌のためのシグナル配列と認められるN末端疎水性領域と、G P Iアンカーの付着のためのシグナルとして機能していると思われる疎水性C末端と、多数のグリコシル化部位とが含まれていたが、グリコシル化部位は特にC末端側に多く含まれており、恣意的に決定したC末端（アミノ酸271～894）には46.6%のセリンとトレオニンが含まれている。したがって、F L O 1遺伝子産物は酵母細胞壁の中に配向して位置している可能性が高く、隣接細胞間の相互作用に直接関与しているらしい。

クローン化したF L O 1配列は、したがって、種類の細胞壁アンカーによる細胞壁へのタンパク質又はペプチドの固定化に適している。s c F v - H C GとF L O 1タンパク質のC末端部分とからなるキメラタンパク質の生産には、出発ベクターとしてプラスミドp U R 2 9 9 0（図11参照）を使用できる。エピソーム型プラスミドp U R 2 9 9 0の調製法は、本出願人の係属中の特許出願で1994年1月20日（本願の優先期間中）に公開されたW O 9 4 / 0 1 5 6 7（U N I L E V E R）に記載されている。プラスミドp U R 2 9 9 0には、H u m i c o l aのリパーゼをコードする遺伝子とF L O 1遺伝子産物の推定C末端細胞壁アンカードメインをコードする遺伝子とからなるキメラ遺伝子が含まれており、そのキメラ遺伝子に先行してインベルターゼのシグナル配列（S U C 2）及びG A L 7プロモーターが存在している。さらに、このプラスミドには、酵母2µm配列、E c k a r d及びH o l l e n b e r g（1983）の報文に記載された不完全L e u 2プロモーター、及びL e u 2遺伝子（R o y他（1991）の報文参照）も含まれている。実施例4記載のプラスミドp U R 4 1 4 6をP s t I及びX h o Iで消化すれば、s c F v -

10

20

30

40

50

G C G コーディング配列を含んだ約 0.7 k b p の P s t I - X h o I フラグメントが得られる。この DNA 配列を F L O 1 の C 末端部分と S U C 2 シグナル配列との間にインフレームで融合させるには、このフラグメントをプラスミド p U R 2 9 9 0 の 9.3 k b p E a g I / N h e I (部分) 主鎖に直接連結すればよく、その結果、プラスミド p U R 4 1 9 6 (図 1 2 参照) が得られる。このプラスミドは、S U C 2 シグナル配列と s c F v - H C G の開始部分との間に A l a をコードする追加トリプレットと、F L O 1 タンパク質の C 末端の最初のアミノ酸 (S e r) の前に E - I - K - G - G アミノ酸配列をコードする追加トリプレットを含んでいる。

以上の実施例 1 ~ 実施例 5 において抗体フラグメントの露出度が低すぎる場合には、抗体フラグメントのフレームワーク領域に変異を導入することによって生産レベルを上げることができ、このような変異導入は、文献に記載された公知技術を用いて、部位特異的変異導入法で行うこともできるし、(標的)ランダム変異誘発法で行うこともできる。

実施例 6 下等真核生物の細胞壁に固定化され、コレステロールに結合し得るキメラタンパク質をコードする遺伝子の構築

文献には、コレステロールオキシダーゼについて 2 種類の DNA 配列：すなわち、B r e v i b a c t e r i u m s t e r o l i c u m 由来の c h o B 遺伝子 (O h t a 他 (1 9 9 1) の報文参照) と S t r e p t o m y c e s s p . S A - C O O 由来の c h o A 遺伝子 (I s h i z a k a 他 (1 9 8 9) の報文参照) が記載されている。コレステロールオキシダーゼ (E C 1.1.3.6) をコードする c h o B 遺伝子と A G - 1 遺伝子の 3 部分との融合 DNA の構築には、染色体 DNA 上での P C R を利用すればよい。染色体 DNA は B r e v i b a c t e r i u m s t e r o l i c u m から常法にしたがって単離することができ、コレステロールオキシダーゼの成熟部分をコードする DNA 部分の増幅は、下記の P C R プライマー c h o 0 1 p c r 及び c h o 0 2 p c r によって行うことができる。

cho01pcr

```

5' -          GCC CCC AGC CGC ACC CTC G-3'          =配列番号：16
3' -          CGG GGG TCG GCG TGG GAG C-5'          =配列番号：17
          ::: ::: ::: ::: ::: ::: :
5' -AGATCTGAATTTCGCGGCC GCC CCC AGC CGC ACC CTC G-3' =配列番号：18
          EcoRI NotI
                   EagI

```

cho02pcr

```

          NheI      HindIII
3' -TAG TAG AGC AGG CTG TAG GTC CGATCGACTTTCGAATCTAGA-5' =配列番号：19
          ::: ::: ::: ::: ::: ::: :
5' -ATC ATC TCG TCC GAC ATC CAG-3'          =配列番号：20
3' -TAG TAG AGC AGG CTG TAG GTC-5'          =配列番号：21

```

これらのプライマーは共に標的配列に特異的にハイブリダイズし得るので、上記遺伝子のコーディング部分が増幅されて、その特異的 P C R 産物は、プロテイナーゼ K 処理及び E c o R I 及び H i n d I I I での消化後、適当なベクター (ここでは、p T Z 1 9 R (M e a d 他 (1 9 8 6) の報文参照) が好ましい) に直接クローニングすることができるようになる。その結果、プラスミド p U R 2 9 8 5 (図 1 3 参照) が得られる。

上記の制限部位の他に、これらの P C R プライマーはいずれも 1.5 k b p の DNA フラグメントの 5' 末端及び 3' 末端に別の制限部位を生じるので、それらの制限部位を利用すれば後段で上記フラグメントをその一端で S U C 2 シグナル配列又はプレプロ- -接合因子シグナル配列と融合させ、かつもう一方の末端で -アグルチニンの C 末端コーディング部分と融合させることができる。プレプロ M F 配列の後での連結を容易にするには、P C R オリゴヌクレオチドプライマー c h o 0 1 p c r の 5' 末端に N o t I 部位を導入

10

20

30

40

50

して、例えばpUR4175中のscFv-Lysコーディング配列を含んだ731bpのEagI/NheIフラグメントでchoBコーディング配列を置換できるようにすればよい。

コレステロールオキシダーゼと -アグルチニンとの酵素活性をもたない融合タンパク質を作るには、上述したpTZ19Rへのサブクローニング法を用いればよい。コレステロールオキシダーゼはFAD依存性酵素であり、Brevibacterium sterolicumの酵素については結晶構造にも既に決定されている(Vrielink他(1991)の報文参照)。この酵素はGly-X-Gly-X-X-Glyという配列のFAD結合ドメインの典型的なパターンに対する相同性をN末端付近(アミノ酸18~23)に示す。プラスミドpUR2985に対する部位特異的インヴィトロ変異導入を製造業者の

10

pr 3'-CGG GAG CAG TAG CGG TCA CGT ATG CCG CCA CGG CAG CGG CGC-5'

```

      ::: ::: ::: ::: : : ::: : : ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: :::
cs 5'-GCC CTC GTC ATC GGC AGT GGA TAC GGC GGT GCC GTC GCC GCG-3'
      Ala           Gly   Gly   Gly Gly Ala   Ala Ala
                ↓     ↓
                Ala   Ala

```

20

pr = プライマー = 配列番号 : 22

cs = コーディング鎖 = 配列番号 : 23

このプライマーを用いて変異導入を行うと、プラスミドpUR2986が得られるはずである。このプラスミドからは、NotI/NheI消化によって、不活性化されていると推定されるコレステロールオキシダーゼをコードしたDNAが1527bpフラグメントとして放出されるはずであり、このDNAフラグメントをpUR4175中のscFv-Lysコーディング配列との置換に直接使用すれば、プラスミドpUR2987(図14参照)が得られる。分泌がSUC2シグナル配列で支配されているような、酵母分泌ベク

30

ターの変異体を得るには、例えばプラスミドpUR2986の1823bp長のSacI/NheIセグメントを用いてpUR4174中のSacI/NheIフラグメントを置換すればよい。こうしたFAD結合部位の不活性化は他の変異体に対しても好ましいと考えられるが、それは、活性中心を変えないでよくとコレステロールオキシダーゼのコレステロールに対する結合特性が変わらないと予想されるからである。上述した成熟コーディング配列の18位及び20位でのGly Alaへの置換以外にも、他のどのような適当なアミノ酸への変更を行うこともできる。

40

実施例7 乳酸菌の細胞壁に固定化され、コレステロールに結合し得るキメラタンパク質をコードする遺伝子の構築

Lactococcus lactis subsp. cremorisのプロテイナーゼが127アミノ酸残基からなる長いC末端を介して細胞壁に固着していることが報告されている。Kok他(1988)並びにKok(1990)の報文参照。実施例6に記載した方法と同様の方法で、Brevibacterium sterolicumのコレステロールオキシダーゼ(choB)をLactococcus lactisの細胞壁に固定化することができる。choB構造遺伝子とN末端シグナル配列とLactococcus lactisのプロテイナーゼのC末端アンカーとの間で融合を行うことができる。

50

プラスミド pGKV550 (図15参照) は、プロモーター、リボソーム結合部位及び上述のシグナル配列とアンカー配列をコードしたDNAフラグメントを含め、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2株の全プロテイナーゼオペロンを含んでいる (Kok (1990) の報文参照)。最初に、以下に示すような pGKV550 上での PCR によって、シグナル配列の主要部とその両側に *Cla*I 部位と *Eag*I 部位の含まれた DNA フラグメントを構築することができる。

プライマー prt1:

5'-AA GAT CTA TCG ATC TTG TTA GCC GGT ACA-3' =配列番号: 24

プロテイナーゼ遺伝子 (非コーディング鎖):

3'-TT CCC GAT AGC TAG AAC AAT CGG CCA TGT CAG-5' =配列番号: 25
*Cla*I

10

プロテイナーゼ遺伝子:

5'-GTC GGC GAA ATC CAA GCA AAG GCG GCT-3' =配列番号: 26
Gln Ala Lys

プライマー prt1:

3'-CAG CCG CTT TAG GTT CGT TGC CGG CCC CCC TTC GAA CCC-5' =配列番号: 27
*Eag*I *Hind*III

実施例6で述べたPCR反応の後で、98bpのPCRフラグメントを単離して *Cla*I 及び *Hind*III で消化すればよい。次に、pGKV550を *Cla*I で部分的に切断し、*Hind*III で完全に切断すれば、かかる消化の後、上記プロテイナーゼ遺伝子のプロモーター、リボソーム結合部位、N末端の8個のアミノ酸と127個のC末端アミノ酸の細胞壁結合フラグメントをコードしたDNAフラグメントを含んだベクターフラグメントをゲル上で単離することができる。

20

prtP アンカードメインとの融合に適したコレステロールオキシダーゼ遺伝子のコピーは、pUR2985 (実施例6) を鋳型として用い、プライマー cho02pcr の代わりに下記のプライマー cho03pcr をプライマー cho01pcr (実施例6) と合わせて利用したPCR反応によって作製することができる。

cho03pcr

3'-TAG TAG AGC AGG CTG TAG GTC CGA GTT CGA ACC TAG GC-5' =配列番号: 40
::: ::: : : : : : : : : : :
*Hind*III

30

5'-ATC ATC TCG TCC GAC ATC CAG =配列番号: 20

この反応によって生じる約1.53kbpフラグメントを *Not*I 及び *Hind*III で消化して得られる分子は、次いで pUR2988 (図16参照) 由来の *Eag*I/*Hind*III 大フラグメントと連結することができる。こうして得られるプラスミド pUR2989 は、プロテイナーゼ遺伝子のシグナル配列とC末端細胞壁アンカードメインとの間に挿入されたコレステロールオキシダーゼのコーディング配列を含んでいるはずである。このプラスミドは、電気穿孔法で *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363株に導入すればプロテイナーゼプロモーターの制御下でコレステロールオキシダーゼを発現するはずである。膜を通しての輸送はプロテイナーゼのシグナル配列によって媒介されるはずであり、コレステロールオキシダーゼの固定化はプロテイナーゼのアンカーによって媒介される。*Lactococcus* がFADを同時に分泌する可能性は低いので、コレステロールオキシダーゼはコレステロールに結合し得るものの、活性ではないはずである。

40

実施例8 下等真核生物の細胞壁に固定化され、上皮成長因子のような成長ホルモンに結合し得るキメラタンパク質をコードする遺伝子の構築

ヒト上皮成長因子 (EGF) を大量に単離するため、結合ドメインが細胞壁アンカーとしての -アグルチニンのC末端部分と融合した形の対応レセプターを利用することができ

50

る。ヒト上皮成長因子の全 cDNA 配列がクローニングされ、配列が決定されている。EGF 結合能力をもつ融合タンパク質の構築には、成熟型レセプターの N 末端部分から中央の 23 個のアミノ酸残基からなる膜貫通領域までを利用することができる。

こうした構築にはプラスミド pUR4175 を利用することができる。EagI 及び NheI (部分) での消化によって、scFv のコードされた配列を含む 731 bp の DNA フラグメントが放出されるが、このフラグメントは、ヒト上皮成長因子レセプターの最初の 621 個のアミノ酸残基をコードする DNA フラグメントで置換することができる。既存のヒト cDNA ライブラリーを出発点とするか、さもなければ例えば A431 ガン腫細胞 (Ulrich 他 (1984) の報文参照) のような優先的に EGF レセプターを過剰産生する細胞から常法によって cDNA ライブラリーを作成しておいて、PCR をさらに行えばヒト上皮成長因子レセプターの細胞外結合ドメイン (アミノ酸 1 ~ 622) と α -アグルチニンの C 末端部分とのインフレイム連結体を作成することができる。

ヒト上皮成長因子レセプターと α -アグルチニンの C 末端とのインフレイム連結のための PCR オリゴヌクレオチド

a: SUC2 シグナル配列と成熟 EGF レセプターの N 末端との間の移行用 PCR オリゴヌクレオチド

>成熟 EGF レセプター

priEGF1: Ala Leu Glu Lys Lys Val =配列番号: 28
 5'-GGG GCG GCC GCG CTG GAG GAA AAG AAA GTT TGC-3'
 NotI ::: ::: ::: ::: ::: ::: :::
 3'-CGC TCA GCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT CAA ACG-5'
 EGF rec (非コーディング鎖): =配列番号: 29

b: EGF レセプターの細胞外結合ドメインの C 末端と α -アグルチニンの C 末端との間のインフレイム移行用 PCR オリゴヌクレオチド

EGF rec (コーディング鎖): =配列番号: 30
 Asn Gly Pro Ile Pro Ser Ala Thr
 5'-AAT GGG CCT AAG ATC CCG TCC ATC GCC ACT-3'
 ::: ::: ::: ::: ::: ::: :::
 3'-TTA CCC GGA TTC TAG GGC AGG CGA TCGGAATTCGAA CCCC-5'
 pr EGF2: NheI HindIII =配列番号: 31

この融合によって、シグナル配列と EGF レセプターの成熟 N 末端の間に 2 つの Ala 残基が追加されることになる。こうして新たに得られる 1.9 kb の PCR フラグメントを NotI 及び NheI で消化すれば、同じ酵素で消化しておいたベクター pUR4175 に直接連結することができ、GAL7 プロモーターと、プレプロ α -アグルチニン配列と、EGF レセプター結合ドメイン遺伝子 / α -アグルチニンの融合遺伝子と、酵母 2 μ m 配列と、不完全 LEU2 プロモーターと、LEU2 遺伝子とを含んだプラスミド pUR2993 (図 17 参照) を得ることができる。このプラスミドは *S. cerevisiae* を形質転換することができ、形質転換細胞は YP 培地中で培養することができ、キメラタンパク質の発現はこの培地にガラクトースを添加することによって誘導し得る。

実施例 9 酵母の細胞壁に固定化され、「ラクダ科」重鎖抗体の結合ドメインを含んでなるキメラタンパク質をコードする遺伝子の構築

最近、ラクダ類並びにその近縁種 (例えば ラマ) が重鎖のダイマーだけで構成された IgG 抗体分子をかなりの量で含んでいることが報告されている (Hammers-Casterman 他 (1993) の報文参照)。このような「重鎖」抗体は軽鎖を欠いているが、そ

10

20

30

40

50

れにもかかわらず広い抗原結合範囲を有していることが実証されている。この種の抗体の可変領域を生産し、酵母の細胞壁の外側に連結できることを示すために、下記の構築体を作製した。

pUR2997, pUR2998及びpUR2999の構築

pUR4177 (実施例4、図9参照)の約2.1 kbpのEagI-HindIIIフラグメントを単離した。PCR法を利用して、EagI部位のすぐ上流にEcoRI部位を導入したが、そうして得られたEcoRI部位の塩基CはEagI部位の最初の塩基Cと同一である。こうして得たEcoRI-HindIIIフラグメントを、EcoRI及びHindIIIで消化しておいたプラスミドpEMBL9に連結して、pUR4177.Aを得た。

10

プラスミドpUR4177.AのEcoRI/NheIフラグメントを、3種類の異なる合成DNAフラグメント(配列番号:32, 配列番号:33及び配列番号:34)のEcoRI/NheIフラグメントで置換して、それぞれ、pUR2997, pUR2998及びpUR2999を得た。pUR2997とpUR2998の約1.5 kbpのBstEII-HindIIIフラグメントを単離した。

pUR4421の構築

プラスミドpEMBL9 (Dente他(1983)の報文参照)のマルチクローニング部位(EcoRI部位からHindIII部位までの範囲)を、下記に示すヌクレオチド配列をもつ合成DNAフラグメント(コーディング鎖を示す配列番号:35並びに非コーディング鎖を示す配列番号:36参照)で置換した。このヌクレオチド配列の5'部分は、EagI部位、ラクダV_H遺伝子フラグメントの最初の4つのコドン(ヌクレオチド16~27)、及び5番目及び6番目のコドン(ヌクレオチド28~33)に一致するXhoI部位(CTCGAG)を含んでいる。その3'部分は、ラクダV_H遺伝子の最後の5つのコドン(ヌクレオチド46~60)(その一部はBstEII部位に一致する)、Mycターールの11個のコドン(ヌクレオチド61~93)(これら11個のコドンを含んだ配列番号:35及びアミノ酸配列を示す配列番号:37を参照)、及びEcoRI部位(GAATTC)を含んでいる。このEcoRI部位はpEMBL9に元々存在していたもので、ヌクレオチド配列の5'末端が下記の(EcoRI)として示す通りGAATTCの代わりにAATTTを含んでいるので、機能しなくなっている。得られたプラスミドはpUR4421と呼ばれる。ラクダV_HフラグメントはQ-V-Kというアミノ酸で始まり、V-S-Sというアミノ酸で終わる。

20

30

```

      EcoRI      EagI
5'-AATTTAGCGG CCGCCCAGGT GAAACTGCTC GAGTAAGTGA CTAAGGTCAC-
3' 1   ATCGCC  GCGGGTCCA CTTTGACGAG CTCATTCACT GATTCCAGTG-
      5           Q  V   K

```

```

-CGTCTCCTCA GAACAAAAAC TCATCTCAGA AGAGGATCTG AATTAATGAG-
-GCAGAGGAGT CTTGTTTTTG AGTAGAGTCT TCTCCTAGAC TTAATTAATC-
  V  S  S    E  Q  K    L  I  S  E  E  D  L  N  *  *
                                     =配列番号:37

```

40

```

      EcoRI           HindIII
-AATTCATCAA ACGGTGATA _____ -3'      119      =配列番号:35
-TTAAGTAGTT TGCCACTATT CGA -5'           123      =配列番号:36

```

pUR4424の構築

プラスミドpB09をXhoI及びBstEIIで消化して、アガロースゲルから約0.34 kbpのDNAフラグメントを単離した。このフラグメントは、ラクダV_Hフラグメントの最初の4つのアミノ酸と最後の5つのアミノ酸の欠けたトランケート型V_Hフラグメントをコードしている。プラスミドpB09は大腸菌JM109 pB09として1993年4月20日にオランダのバールン(Baarn)のCentraal Bureau

50

voor Schimmelcultures (CBS) に寄託番号 CBS 271.93 として寄託された。ラクダ_{V_H}フラグメントのDNA及びアミノ酸配列の後には、欧州特許出願第93201239.6号(未公開)の図6Bに記載された通り、プラスミドpB09中に存在するFla_g配列が続いている。この欧州特許出願の開示内容は文献の援用によって本明細書の内容の一部をなす。得られた約0.34kbpのフラグメントをpUR4421にクローニングした。そのため、プラスミドpUR4421をXhoI及びHindIIIで消化した後、アガロースゲルから約4kbのベクターフラグメントを単離した。得られたベクターを約0.34kbpのXhoI/BstEIIフラグメント及び下記の配列の合成DNAリンカーと連結して、プラスミドpUR4421-09を得た。

*BstEII**HindIII*GTCACCGTCTCCTCATAATGA

=配列番号: 38

GCAGAGGAGTATTACTTCGA

=配列番号: 39

プラスミドpSY16をEagI及びHindIIIで消化して、約6.5kbp長のベクター鎖を単離して、それをpUR4421-09由来の約0.38kbpのEagI/HindIIIフラグメントと連結して、pUR4424を得た。

pUR4482及びpUR4483の構築

pUR4424からインペルターゼのシグナル配列とラクダ重鎖可変09(CH_V09)フラグメントのコードされた約0.44kbpのSacI-BstEIIフラグメントを単離するとともに、約6.3kbpのSacI-HindIIIベクターフラグメントも単離した。約6.3kbpフラグメントとpUR4424の約0.44kbpフラグメントをpUR2997又はpUR2998のBstEII-HindIIIフラグメントと連結してそれぞれpUR4482とpUR4483を得た。

プラスミドpUR4482は、インペルターゼシグナル配列とCH_V09可変領域とMycテールとラクダ「X-P-X-P」ヒンジ領域(Hamers-Casterman他(1993)の報文参照)と -アグルチニン細胞壁アンカー領域との融合タンパク質の発現のための酵母エピソーム型発現プラスミドである。pUR4483はMycテールを含んではいるが「X-P-X-P」ヒンジ領域を含んでいない点でpUR4482とは異なる。同様に、pUR2999のBstEII-HindIIIフラグメントを、上記の約6.3kbpベクターフラグメント及びpUR4424の約0.44kbpフラグメントと連結することもでき、pUR4497が得られるが、このプラスミドは「X-P-X-P」ヒンジ領域を含んではいるがMycテールを含んでいない点でpUR4482とは異なる。

プラスミドpUR4424、pUR4482及びpUR4483を電気穿孔法でSaccharomyces cerevisiae SU10株に導入し、ロイシンを欠く平板上で各形質転換体を選択した。pUR4424、pUR4482及びpUR4483の各々で形質転換したSU10株由来の各形質転換体を、5%ガラクトース添加YP培地上で増殖させ、本出願人の係属中の特許出願で1994年1月20日に公開されたWO94/01567号(UNILEVER)の例1に記載された免疫蛍光顕微鏡法で分析した。細胞表面に存在する、ラクダ抗体とMycテールを共に含んだキメラタンパク質を検出するため、この文献記載の方法に若干の修正を加えた。

一つの方法では、マウスのモノクローナル抗Myc抗体をキメラタンパク質のMycテールに結合させるための第1抗体として使用し、続いて結合マウス抗体を検出するためにフルオレseinイソチオシアネート(FITC)標識ポリクローナル抗マウスIg抗血清(Sigma社製, 製品番号F0527)を使用し、陽性シグナルの有無を蛍光顕微鏡で測定した。

もう一つの方法では、ラクダ抗体と交差反応することが既実証されているウサギのポリクローナル抗ヒトIgG血清をキメラタンパク質のラクダ抗体に結合させるための第1抗体として使用し、続いて結合ウサギ抗体を検出するためにFITC標識ポリクローナル抗ウサギIg抗血清(Sigma社製, 製品番号F0382)を使用し、陽性シグナルの有無を蛍光顕微鏡で測定した。

10

20

30

40

50

図19及び図20に示す結果から、CH_V09フラグメントと α -アグルチニン細胞壁アンカー領域の融合タンパク質を産生する細胞(pUR4482及びpUR4483)で蛍光が観察されることが分かる。しかし、このようなアンカーのないCH_V09フラグメントを産生する細胞(pUR4424)では、同じ状況下で観察しても、蛍光は全く認められなかった。

特許文献

欧州特許出願公開EP-A1-0255153 (UNILEVER) : Production of guar alpha-galactosidase by hosts transformed by recombinant DNA methods. 最初の優先日1986年6月3日; 1988年2月3日公開

10

国際公開WO-91/00920 (UNILEVER) : Process for preparing a protein by a fungus transformed by multicopy integration of an expression vector. 最初の優先日1989年7月7日; 1991年1月24日公開

国際公開WO-91/19782 (UNILEVER) : Xylanase production. 優先日1990年6月19日; 1991年12月26日公開

20

国際公開WO-94/01567 (UNILEVER) : Process for immobilizing enzymes to the cell wall of a microbial cell by producing a fusion protein. 最初の優先日1992年7月8日; 1994年1月20日公開

欧州特許出願EP93201239.6 (未公開) : Production of antibodies or (functionalized) fragments thereof derived from heavy chain immunoglobulins of Camelidae. 出願日1993年4月29日

30

特許以外の文献

R.E. Bird & B. Webb Walker, Single chain antibody variable regions. TIBTECH 9 (April 1991) 132-137

40

A. Conzelmann, C. Fankhauser & C. Desponds, Myoinositol gets incorporated into numerous membrane glycoproteins of Saccharomyces cerevisiae; incorporation is dependent on phosphomannomutase (SEC53). The EMBO Journal 9, No. 3 (1990) 653-661

- L. Dente, G. Cesareni & R. Cortese, pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Research* 11, No. 6 (1983) 1645-1655
- E. Erhart, & C. P. Hollenberg, The Presence of a Defective Leu2 Gene on 2 μ DNA Recombinant Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* Is Responsible for Curing and High Copy Number. *Journal of Bacteriology*. 156, No. 2 (Nov. 1983) 625-635 10
- C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Harmers, E. Bajyana Songa, N. Bendahman & R. Hamers, Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363 (3 June 1993) 446-448
- M.M. Harmsen, A.C. Langedijk, E. van Tuinen, R. H Geerse, H. A. Rauè, & J. Maat, Effect of pmrl disruption and different signal sequences on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragonoloba* α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 125 (1993) 115-123 20
- T. Ishizaki, N. Hirayama, H. Shinkawa, O. Nimi, & Y. Murooka, Nucleotide Sequence of the Gene for Cholesterol Oxidase from a *Streptomyces* sp. *Journal of Bacteriology* 171, No. 1 (Jan. 1989) 596-601 30
- J. Kok, K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, A.M. Ledeboer & G. Venema, Nucleotide Sequence of the Cell Wall Proteinase Gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* 54, No. 1 (Jan. 1988) 231-238
- J. Kok, Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87 (1990) 15-42 (特に第2 2-2 3頁の項目3. 2及び図7) 40

- R. Lewin, The universal constructor set. *New Scientist* (8 December 1990) 30-33
- P.N. Lipke, D. Wojciechowicz & J. Kurjan, AGA1 Is the Structural Gene for the *Saccharomyces cerevisiae* α -Agglutinin, a Cell Surface Glycoprotein Involved in Cell-Cell Interactions during Mating. *Molecular and Cellular Biology*. 9, No. 8 (Aug. 1989) 3155-3165 10
- D.A. Mead, E. Szczesna-Skorupa & B. Kemper, Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engineering* 1, No. 1(1986) 67-74
- R. Orlandi, D.H. Güssow, P.T. Jones, & G. Winter, Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (May 1989) 3833-3837 20
- B.C. Ossendorp, The non-specific lipid-transfer binding protein: a recombinant DNA and immunological approach. Thesis University of Utrecht (30 September 1992)
- T. Ohta, K. Fujishiro, K. Yamaguchi, Y. Tamura, K. Aisaka, T. Uwajima & M. Hasegawa, Sequence of gene choB encoding cholesterol oxidase of *Brevibacterium sterolicum*: comparison with choA of *Streptomyces* sp. SA-C00. *Gene* 103 (1991) 93-96 30
- A. Roy, C.F. Lu, D.L. Marykwas, P.N. Lipke & J. Kurjan, The AGA1 Products Is Involved in Cell Surface Attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Adhesion Glycoprotein α -Agglutinin. *Molecular and Cellular Biology* 11 No. 8 40

(Aug. 1991) 4196-4206

M.P. Schreuder, S. Brekelmans, H. van den Ende, & F.M. Klis, Targeting of a Heterologous Protein to the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9 (1993) 399-409

A. Ullrich, L. Coussens, J.S. Hayflick, T.J. Dull, A. Gray, A.W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T.A. Libermann, J. Schlessinger, J. Downward, E.L.V. Mayes, N. Whittle, M.D. Waterfield & P.H. Seeburg, Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309 (31 May 1984) 418-425

J.M.A. Verbakel, Heterologous gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis University of Utrecht (1 May 1991), esp. pages 76-89

A. Vrielink, L.F. Lloyd, & D.M. Blow, Crystal Structure of Cholesterol Oxidase from *Brevibacterium sterolicum* Refined at 1.8 Å Resolution *J. Mol. Biol.*, 219 (1991) 533-554

E.S. Ward, D. Güssow, A.D. Griffiths, P.T. Jones & G. Winter. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *E. coli*. *Nature* 341 (12 October 1989) 544-546

ブダペスト条約に基づく微生物の寄託に関する情報は本明細書第27頁3～6行に記載されている。欧州特許条約(EPC)規則28(4)又はEPCの締約国以外の国での同様の規定に基づき、請求のあったときはこれらの寄託菌株の試料が専門家のみに分譲されることを要求する。

配 列 表

(1) 一般情報

(i) 出願人

(A) 名称：ユニリーバー・エヌ・ヴィ

(B) 通りの住所：ヴェーナ455

(C) 都市名：ロッテルダム

(E) 国名：オランダ

(F) 郵便番号(ZIP)：NL-3013 AL

(A) 名称：ユニリーバー・ピー・エル・シー

(B) 通りの住所：ブラックフライヤーズ、ユニリーバー・ハウス

(C) 都市名：ロンドン

(E) 国名：英国

(F) 郵便番号(ZIP)：EC4P 4BQ

10

20

30

40

50

- (A) 名称：レオン・ゲラルダス・ジェイ・フランケン
 (B) 通りの住所：ゲルダーストラート 90
 (C) 都市名：ロッテルダム
 (E) 国名：オランダ
 (F) 郵便番号(ZIP)：NL-3011 MP
- (A) 名称：ピーター・ディ・イー・ゲウス
 (B) 通りの住所：ボエイエ 24
 (C) 都市名：バーレンドレヒト
 (E) 国名：オランダ
 (F) 郵便番号(ZIP)：NL-2991 KB 10
- (A) 名称：フランシスカス・マリア・クリス
 (B) 通りの住所：ベネデンラングス 102
 (C) 都市名：アムステルダム
 (E) 国名：オランダ
 (F) 郵便番号(ZIP)：NL-1025 KL
- (A) 名称：ホルガー・ヨーク・トシュカ；c/o ラングネーズ・イグロ，BR3
 (B) 通りの住所：アエケルン 1
 (C) 都市名：レケン
 (E) 国名：ドイツ
 (F) 郵便番号(ZIP)：D-48734 20
- (A) 名称：コルネリス・テオドラス・ヴェルリップス
 (B) 通りの住所：ハーグドルン 18
 (C) 都市名：マースルイス
 (E) 国名：オランダ
 (F) 郵便番号(ZIP)：NL-3142 KB
- (ii) 発明の名称：
 (iii) 配列の数：40
 (iv) コンピューター可読形式：
 (A) 記録媒体：フロッピーディスク
 (B) コンピューター：IBM PCコンパチブル 30
 (C) オペレーションシステム(OS)：PC-DOS/MS-DOS
 (D) ソフトウェア：Patent In Release 1.0，ヴァージョン 1.25 (EPO)
- (2) 配列番号：1に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：231塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：二本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic) 40
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：pUR4119中のフラグメント
 (xi) 配列：配列番号：1：
 GAATTCGAGC TCATCACACA AACAAACAAA ACAAATGAT GCTTTTGCAA GCCTTTCTTT 60
 TCCTTTTGGC TGGTTTTGCA GCCAAAATAT CTGCGCAGGT GCAGCTGCAG TAATGAACCA 120
 CGGTCACCGT CTCCTCAGGT GGAGGCGGTT CAGGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTGGCGGAT 180
 CGGACATCGA GCTCACTCAG ACCAAGCTCG AGATCAAACG GTGATAAGCT T 231
- (2) 配列番号：2に関する情報： 50

- (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：21塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：XhoI - NheIリンカーのコーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：2：
TCGAGATCAA AGGCGGATCT G 21 10
- (2) 配列番号：3に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：XhoI - NheIリンカーの非コーディング鎖 20
 (xi) 配列：配列番号：3：
CTAGCAGATC CGCCTTTGAT C 21
- (2) 配列番号：4に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：21塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源： 30
 (B) クローン：EagI - PstIリンカーのコーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：4：
GGCCGCCAG GTGCAGCTGC A 21
- (2) 配列番号：5に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：13塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic) 40
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：EagI - PstIリンカーの非コーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：5：
GCTGCACCTG GGC 13
- (2) 配列番号：6に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：22塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状 50

- (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
- (vii) 直接の起源：
- (B) クローン：PCRプライマーA (重鎖)
- (xi) 配列：配列番号：6：
AGGTSMARCT GCAGSAGTCW GG 22
- (2) 配列番号：7に関する情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：32塩基対
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖 10
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
- (vii) 直接の起源：
- (B) クローン：PCRプライマーB (重鎖)
- (xi) 配列：配列番号：7：
TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CC 32
- (2) 配列番号：8に関する情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：24塩基対
- (B) 配列の型：核酸 20
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
- (vii) 直接の起源：
- (B) クローン：PCRプライマーC (軽鎖)
- (xi) 配列：配列番号：8：
GACATTGAGC TCACCCAGTC TCCA 24
- (2) 配列番号：9に関する情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：22塩基対 30
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
- (vii) 直接の起源：
- (B) クローン：PCRプライマーD (軽鎖)
- (xi) 配列：配列番号：9：
GTTTGATCTC GAGCTTGGTC CC 22
- (2) 配列番号：10に関する情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：26塩基対 40
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
- (vii) 直接の起源：
- (B) クローン：EcoRI - PstIリンカーのコーディング鎖
- (xi) 配列：配列番号：10：
AATTCGGCCG TTCAGGTGCA GCTGCA 26

(2) 配列番号：11に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：EcoRI - PstIリンカーの非コーディング鎖

(xi) 配列：配列番号：11：

GCTGCACCTG AACGGCCG

10

18

(2) 配列番号：12に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：714塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：ScFv 抗トラセオリド02/01/01

(xi) 配列：配列番号：12：

CTGCAGGAGT CTGGACCTGG CCTGGTGAAA CTTTCTCAGT CTCTGTCCCT CACCTGCACT 60

GTCACTGGCT ACTCAATCAC CAGTGATTTT GCCTGGAAct GGATCCGGCA GTTCCAGGA 120

AACCAACTGG AGTGGATGGG CTACATAAGC TACAGTGGTA GCACTAGCTA CAACCCATCT 180

CTCAAAAGTC GAATCTCTCT CACTCGAGAC ACATCCAAGA ACCAGTTCTT CCTGCAGTTG 240

AATTCTGTGA CTA CTGAGGA CACAGCCACA TATTACTGTG CAACGTCCCT AACATGGTTA 300

CTACGTCGGA AACGTTCTTA CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGGA 360

GGCGGTTGAG GCGGAGGTGG CTCTGGCGGT GGC GGATCGG ACATCGAGCT CACCCAGTCT 420

CCATCCTCCA TGTCTGTATC TCTGGGAGAC ACAGTCAGCA TCACTTGCCA TGCAAGTCAG 480

GACATTAGCA GTAATATAGG GTGGTTGCAG CAGAAACCAG GGAAATCATT TAAGGGCCTG 540

ATCTATCATG GAACCAACTT GGAAGATGGT ATTCCATCAA GGTCAGTGG CAGTGGATCT 600

GGAGCAGATT ATTCCCTCAC CATCAGCAGC CTGGAATCTG AAGATTTTGC AGACTATTAC 660

TGTGTACAGT ATGCTCAGTT TCCATTCACG TTCGGCTCGG GGACCAAGCT CGAG 714

30

40

(2) 配列番号：13に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：734塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：ScFv 抗HCG

50

(xi) 配列：配列番号：13：

CGGCCGTTCA GGTGCAGCTG CAGGAGTCTG GGGGACACTT AGTGAAGCCT GGAGGGTCCC 60
 TGAAACTCTC CTGTGCAGCC TCTGGATTCTG CTTTCAGTAG CTTTGACATG TCTTGGATTC 120
 GCCAGACTCC GGAGAAGAGG CTGGAGTGGG TCGCAAGCAT TACTAATGTT GGTACTTACA 180
 CCTACTATCC AGGCAGTGTG AAGGGCCGAT TCTCCATCTC CAGAGACAAT GCCAGGAACA 240
 CCCTAAACCT GCAAATGAGC AGTCTGAGGT CTGAGGACAC GGCCTTGTAT TTCTGTGCAA 300
 GACAGGGGAC TGCGGCACAA CCTTACTGGT ACTTCGATGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG 360 10
 TCACCGTCTC CTCAGGTGGA GCGGTTTCAG GCGGAGGTGG CTCTGGCGGT GCGGATCGG 420
 ACATCGAGCT CACCCAGTCT CAAAAATCCA TGTCCATGTC CGTAGGAGAG AGGGTCACCT 480
 TGAGCTGCAA GGCCAGTGAG ACTGTGGATT CTTTTGTGTC CTGGTATCAA CAGAAACCAG 540
 AACAGTCTCC TAAATTGTTG ATATTCGGGG CATCCAACCG GTTCAGTGGG GTCCCCGATC 600
 GCTTCACTGG CAGTGGATCT GCAACAGACT TCACTCTGAC CATCAGCAGT GTGCAGGCTG 660
 AGGACTTTGC GGATTACCAC TGTGGACAGA CTTACAATCA TCCGTATACG TTCGGAGGGG 720
 GGACCAAGCT CGAG 734 20

(2) 配列番号：14に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：2685塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(v) 起源

(A) 生物名：Saccharomyces cerevisiae 30

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：pYY105

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表わす記号：CDS

(B) 存在位置：1...2685

(D) 他の情報：/ 遺伝子産物 = “フロキュレーションタンパク質” / 遺伝子 = “FLO1”

(xi) 配列：配列番号：14：

ATG ACA ATG CCT CAT CGC TAT ATG TTT TTG GCA GTC TTT ACA CTT CTG 48
 Met Thr Met Pro His Arg Tyr Met Phe Leu Ala Val Phe Thr Leu Leu 40
 1 5 10 15

GCA CTA ACT AGT GTG GCC TCA GGA GCC ACA GAG GCG TGC TTA CCA GCA Ala Leu Thr Ser Val Ala Ser Gly Ala Thr Glu Ala Cys Leu Pro Ala	96	
20 25 30		
GGC CAG AGG AAA AGT GGG ATG AAT ATA AAT TTT TAC CAG TAT TCA TTG Gly Gln Arg Lys Ser Gly Met Asn Ile Asn Phe Tyr Gln Tyr Ser Leu	144	
35 40 45		
AAA GAT TCC TCC ACA TAT TCG AAT GCA GCA TAT ATG GCT TAT GGA TAT Lys Asp Ser Ser Thr Tyr Ser Asn Ala Ala Tyr Met Ala Tyr Gly Tyr	192	10
50 55 60		
GCC TCA AAA ACC AAA CTA GGT TCT GTC GGA GGA CAA ACT GAT ATC TCG Ala Ser Lys Thr Lys Leu Gly Ser Val Gly Gly Gln Thr Asp Ile Ser	240	
65 70 75 80		
ATT GAT TAT AAT ATT CCC TGT GTT AGT TCA TCA GGC ACA TTT CCT TGT Ile Asp Tyr Asn Ile Pro Cys Val Ser Ser Ser Gly Thr Phe Pro Cys	288	20
85 90 95		
CCT CAA GAA GAT TCC TAT GGA AAC TGG GGA TGC AAA GGA ATG GGT GCT Pro Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Asn Trp Gly Cys Lys Gly Met Gly Ala	336	
100 105 110		
TGT TCT AAT AGT CAA GGA ATT GCA TAC TGG AGT ACT GAT TTA TTT GGT Cys Ser Asn Ser Gln Gly Ile Ala Tyr Trp Ser Thr Asp Leu Phe Gly	384	30
115 120 125		
TTC TAT ACT ACC CCA ACA AAC GTA ACC CTA GAA ATG ACA GGT TAT TTT Phe Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Val Thr Leu Glu Met Thr Gly Tyr Phe	432	
130 135 140		
TTA CCA CCA CAG ACG GGT TCT TAC ACA TTC AAG TTT GCT ACA GTT GAC Leu Pro Pro Gln Thr Gly Ser Tyr Thr Phe Lys Phe Ala Thr Val Asp	480	40
145 150 155 160		
GAC TCT GCA ATT CTA TCA GTA GGT GGT GCA ACC GCG TTC AAC TGT TGT Asp Ser Ala Ile Leu Ser Val Gly Gly Ala Thr Ala Phe Asn Cys Cys	528	

				165					170					175						
GCT	CAA	CAG	CAA	CCG	CCG	ATC	ACA	TCA	ACG	AAC	TTT	ACC	ATT	GAC	GGT	576				
Ala	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Ile	Thr	Ser	Thr	Asn	Phe	Thr	Ile	Asp	Gly					
				180					185					190						
ATC	AAG	CCA	TGG	GGT	GGA	AGT	TTG	CCA	CCT	AAT	ATC	GAA	GGA	ACC	GTC	624				
Ile	Lys	Pro	Trp	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Ile	Glu	Gly	Thr	Val					
				195					200					205						
TAT	ATG	TAC	GCT	GGC	TAC	TAT	TAT	CCA	ATG	AAG	GTT	GTT	TAC	TCG	AAC	672				
Tyr	Met	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Met	Lys	Val	Val	Tyr	Ser	Asn					
				210					215					220						
GCT	GTT	TCT	TGG	GGT	ACA	CTT	CCA	ATT	AGT	GTG	ACA	CTT	CCA	GAT	GGT	720				
Ala	Val	Ser	Trp	Gly	Thr	Leu	Pro	Ile	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly					
225					230					235					240					
																20				
ACC	ACT	GTA	AGT	GAT	GAC	TTC	GAA	GGG	TAC	GTC	TAT	TCC	TTT	GAC	GAT	768				
Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Asp	Phe	Glu	Gly	Tyr	Val	Tyr	Ser	Phe	Asp	Asp					
				245					250					255						
GAC	CTA	AGT	CAA	TCT	AAC	TGT	ACT	GTC	CCT	GAC	CCT	TCA	AAT	TAT	GCT	816				
Asp	Leu	Ser	Gln	Ser	Asn	Cys	Thr	Val	Pro	Asp	Pro	Ser	Asn	Tyr	Ala					
				260					265					270						
																30				
GTC	AGT	ACC	ACT	ACA	ACT	ACA	ACG	GAA	CCA	TGG	ACC	GGT	ACT	TTC	ACT	864				
Val	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Pro	Trp	Thr	Gly	Thr	Phe	Thr					
				275					280					285						
TCT	ACA	TCT	ACT	GAA	ATG	ACC	ACC	GTC	ACC	GGT	ACC	AAC	GGC	GTT	CCA	912				
Ser	Thr	Ser	Thr	Glu	Met	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Gly	Val	Pro					
				290					295					300						
ACT	GAC	GAA	ACC	GTC	ATT	GTC	ATC	AGA	ACT	CCA	ACC	AGT	GAA	GGT	CTA	960				
Thr	Asp	Glu	Thr	Val	Ile	Val	Ile	Arg	Thr	Pro	Thr	Ser	Glu	Gly	Leu					
305					310					315					320					
																40				

ATC AGC ACC ACC ACT GAA CCA TGG ACT GGC ACT TTC ACT TCG ACT TCC	1008	
Ile Ser Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser		
325 330 335		
ACT GAG GTT ACC ACC ATC ACT GGA ACC AAC GGT CAA CCA ACT GAC GAA	1056	
Thr Glu Val Thr Thr Ile Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu		
340 345 350		
ACT GTG ATT GTT ATC AGA ACT CCA ACC AGT GAA GGT CTA ATC AGC ACC	1104	10
Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Ile Ser Thr		
355 360 365		
ACC ACT GAA CCA TGG ACT GGT ACT TTC ACT TCT ACA TCT ACT GAA ATG	1152	
Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met		
370 375 380		
ACC ACC GTC ACC GGT ACT AAC GGT CAA CCA ACT GAC GAA ACC GTG ATT	1200	20
Thr Thr Val Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu Thr Val Ile		
385 390 395 400		
GTT ATC AGA ACT CCA ACC AGT GAA GGT TTG GTT ACA ACC ACC ACT GAA	1248	
Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Val Thr Thr Thr Thr Glu		
405 410 415		
CCA TGG ACT GGT ACT TTT ACT TCG ACT TCC ACT GAA ATG TCT ACT GTC	1296	
Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met Ser Thr Val		30
420 425 430		
ACT GGA ACC AAT GGC TTG CCA ACT GAT GAA ACT GTC ATT GTT GTC AAA	1344	
Thr Gly Thr Asn Gly Leu Pro Thr Asp Glu Thr Val Ile Val Val Lys		
435 440 445		
ACT CCA ACT ACT GCC ATC TCA TCC AGT TTG TCA TCA TCA TCT TCA GGA	1392	
Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly		
450 455 460		40
CAA ATC ACC AGC TCT ATC ACG TCT TCG CGT CCA ATT ATT ACC CCA TTC	1440	
Gln Ile Thr Ser Ser Ile Thr Ser Ser Arg Pro Ile Ile Thr Pro Phe		

770	775	780		
GCT GCT GAA ACG ACT ACC AAT ACT GTA GCT GCT GAG ACG ATT ACC AAT			2400	
Ala Ala Glu Thr Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Glu Thr Ile Thr Asn				
785	790	795	800	
ACT GGA GCT GCT GAG ACG AAA ACA GTA GTC ACC TCT TCG CTT TCA AGA			2448	
Thr Gly Ala Ala Glu Thr Lys Thr Val Val Thr Ser Ser Leu Ser Arg				
	805	810	815	10
TCT AAT CAC GCT GAA ACA CAG ACG GCT TCC GCG ACC GAT GTG ATT GGT			2496	
Ser Asn His Ala Glu Thr Gln Thr Ala Ser Ala Thr Asp Val Ile Gly				
	820	825	830	
CAC AGC AGT AGT GTT GTT TCT GTA TCC GAA ACT GGC AAC ACC AAG AGT			2544	
His Ser Ser Ser Val Val Ser Val Ser Glu Thr Gly Asn Thr Lys Ser				
	835	840	845	20
CTA ACA AGT TCC GGG TTG AGT ACT ATG TCG CAA CAG CCT CGT AGC ACA			2592	
Leu Thr Ser Ser Gly Leu Ser Thr Met Ser Gln Gln Pro Arg Ser Thr				
	850	855	860	
CCA GCA AGC AGC ATG GTA GGA TAT AGT ACA GCT TCT TTA GAA ATT TCA			2640	
Pro Ala Ser Ser Met Val Gly Tyr Ser Thr Ala Ser Leu Glu Ile Ser				
	865	870	875	880
ACG TAT GCT GGC AGT GCA ACA GCT TAC TGG CCG GTA GTG GTT TAA			2685	30
Thr Tyr Ala Gly Ser Ala Thr Ala Tyr Trp Pro Val Val Val				
	885	890	895	

(2) 配列番号：15に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：894アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号：15：

40

Met	Thr	Met	Pro	His	Arg	Tyr	Met	Phe	Leu	Ala	Val	Phe	Thr	Leu	Leu	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala	
			20					25						30		
Gly	Gln	Arg	Lys	Ser	Gly	Met	Asn	Ile	Asn	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Ser	Leu	
		35					40					45				10
Lys	Asp	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asn	Ala	Ala	Tyr	Met	Ala	Tyr	Gly	Tyr	
	50						55					60				
Ala	Ser	Lys	Thr	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	
65					70					75					80	
Ile	Asp	Tyr	Asn	Ile	Pro	Cys	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Phe	Pro	Cys	
				85					90						95	20
Pro	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Asn	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Met	Gly	Ala	
			100					105						110		
Cys	Ser	Asn	Ser	Gln	Gly	Ile	Ala	Tyr	Trp	Ser	Thr	Asp	Leu	Phe	Gly	
		115					120					125				
Phe	Tyr	Thr	Thr	Pro	Thr	Asn	Val	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly	Tyr	Phe	
	130					135					140					30
Leu	Pro	Pro	Gln	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Phe	Lys	Phe	Ala	Thr	Val	Asp	
145					150					155					160	
Asp	Ser	Ala	Ile	Leu	Ser	Val	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala	Phe	Asn	Cys	Cys	
				165					170					175		40
Ala	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Ile	Thr	Ser	Thr	Asn	Phe	Thr	Ile	Asp	Gly	

180 185 190

Ile Lys Pro Trp Gly Gly Ser Leu Pro Pro Asn Ile Glu Gly Thr Val
195 200 205

Tyr Met Tyr Ala Gly Tyr Tyr Tyr Pro Met Lys Val Val Tyr Ser Asn
210 215 220

Ala Val Ser Trp Gly Thr Leu Pro Ile Ser Val Thr Leu Pro Asp Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Ser Asp Asp Phe Glu Gly Tyr Val Tyr Ser Phe Asp Asp
245 250 255

Asp Leu Ser Gln Ser Asn Cys Thr Val Pro Asp Pro Ser Asn Tyr Ala
260 265 270

Val Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr
275 280 285

Ser Thr Ser Thr Glu Met Thr Thr Val Thr Gly Thr Asn Gly Val Pro
290 295 300

Thr Asp Glu Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu
305 310 315 320

Ile Ser Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser
325 330 335

Thr Glu Val Thr Thr Ile Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu
340 345 350

Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Ile Ser Thr
355 360 365

Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met
370 375 380

10

20

30

40

	580		585		590														
Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Glu	Gln	Thr	Thr	Leu	Val	Thr	Val				
	595						600					605							
Thr	Ser	Cys	Glu	Ser	His	Val	Cys	Thr	Glu	Ser	Ile	Ser	Pro	Ala	Ile				
	610					615					620								
Val	Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Glu	Tyr	Thr				
625					630				635						640				
Thr	Trp	Cys	Pro	Ile	Ser	Thr	Thr	Glu	Thr	Thr	Lys	Gln	Thr	Lys	Gly				
				645					650					655					
Thr	Thr	Glu	Gln	Thr	Thr	Glu	Thr	Thr	Lys	Gln	Thr	Thr	Val	Val	Thr				
			660					665					670						
Ile	Ser	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Cys	Ser	Lys	Thr	Ala	Ser	Pro	Ala				
	675						680					685							
Ile	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Asn	Gly	Val	Thr	Thr	Glu	Tyr				
	690					695					700								
Thr	Thr	Trp	Cys	Pro	Ile	Ser	Thr	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Gln	Thr	Thr				
705					710					715					720				
Leu	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Cys	Glu	Ser	Gly	Val	Cys	Ser	Glu	Thr	Ala				
				725					730					735					
Ser	Pro	Ala	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Val	Asn	Asp	Val	Val				
		740						745					750						
Thr	Val	Tyr	Pro	Thr	Trp	Arg	Pro	Gln	Thr	Ala	Asn	Glu	Glu	Ser	Val				
	755						760					765							
Ser	Ser	Lys	Met	Asn	Ser	Ala	Thr	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Asn	Thr	Leu				
	770					775						780							

10

20

30

40

Ala Ala Glu Thr Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Glu Thr Ile Thr Asn
 785 790 795 800

Thr Gly Ala Ala Glu Thr Lys Thr Val Val Thr Ser Ser Leu Ser Arg
 805 810 815

Ser Asn His Ala Glu Thr Gln Thr Ala Ser Ala Thr Asp Val Ile Gly
 820 825 830

10

His Ser Ser Ser Val Val Ser Val Ser Glu Thr Gly Asn Thr Lys Ser
 835 840 845

Leu Thr Ser Ser Gly Leu Ser Thr Met Ser Gln Gln Pro Arg Ser Thr
 850 855 860

Pro Ala Ser Ser Met Val Gly Tyr Ser Thr Ala Ser Leu Glu Ile Ser
 865 870 875 880

20

Thr Tyr Ala Gly Ser Ala Thr Ala Tyr Trp Pro Val Val Val
 885 890

(2) 配列番号：16に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：19塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

30

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：Chob 鋳型コーディング鎖

(xi) 配列：配列番号：16：

GCCCCAGCC GCACCCTCG

19

(2) 配列番号：17に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：19塩基対

(B) 配列の型：核酸

40

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：Chob 鋳型非コーディング鎖

(xi) 配列：配列番号：17：

CGAGGGTGCG GCTGGGGGC

19

(2) 配列番号：18に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：37塩基対

50

- (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：Ch o 0 1 p c r プライマー
 (xi) 配列：配列番号：1 8：
AGATCTGAAT TCGCGGCCGC CCCAGCCGC ACCCTCG 37
- (2) 配列番号：1 9 に関する情報：
 (i) 配列の特徴： 10
 (A) 配列の長さ：4 2 塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：c h o 0 2 p c r プライマー
 (xi) 配列：配列番号：1 9：
AGATCTAAGC TTTCAGCTAG CCTGGATGTC GGACGAGATG AT 42
- (2) 配列番号：2 0 に関する情報： 20
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：2 1 塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：C h o B 鋳型コーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：2 0：
ATCATCTCGT CCGACATCCA G 21 30
- (2) 配列番号：2 1 に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：2 1 塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：C h o B 鋳型コーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：2 1：
CTGGATGTCG GACGAGATGA T 21 40
- (2) 配列番号：2 2 に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：4 2 塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：変異導入プライマー C h o B 50

- (xi) 配列：配列番号：22：
CGCGGCGACG GCACCGCCGT ATGCACTGGC GATGACGAGG GC 42
- (2) 配列番号：23に関する情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：42塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)
(vii) 直接の起源： 10
(B) クローン：Chob 鋳型コーディング鎖
- (xi) 配列：配列番号：23：
GCCCTCGTCA TCGGCAGTGG ATACGGCGGT GCCGTCGCCG CG 42
- (2) 配列番号：24に関する情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：29塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：DNA (genomic) 20
(vii) 直接の起源：
(B) クローン：プライマーprt1
- (xi) 配列：配列番号：24：
AAGATCTATC GATCTTGTTA GCCGGTACA 29
- (2) 配列番号：25に関する情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：32塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状 30
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)
(vii) 直接の起源：
(B) クローン：プロテイナーゼ鋳型非コーディング鎖
- (xi) 配列：配列番号：25：
GACTGTACCG GCTAACAAGA TCGATAGCCC TT 32
- (2) 配列番号：26に関する情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：27塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖 40
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)
(vii) 直接の起源：
(B) クローン：プロテイナーゼ鋳型コーディング鎖
- (xi) 配列：配列番号：26：
GTCGGCGAAA TCCAAGCAAA GGCGGCT 27
- (2) 配列番号：27に関する情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：39塩基対
(B) 配列の型：核酸 50

- (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：prt 2プライマー
 (xi) 配列：配列番号：27：
CCCAAGCTTC CCCC GGCCG TTGCTTGGAT TCGCCGAC 39
- (2) 配列番号：28に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：33塩基対 10
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：EGF1プライマー
 (xi) 配列：配列番号：28：
GGGGCGGCCG CGCTGGAGGA AAAGAAAGTT TGC 33
- (2) 配列番号：29に関する情報：
 (i) 配列の特徴： 20
 (A) 配列の長さ：33塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：EGFレセプター鋳型非コーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：29：
GCAAACCTTC TTTTCCTCCA GAGCCCGACT CGC 33 30
- (2) 配列番号：30に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：30塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：EGFレセプター鋳型コーディング鎖
 (xi) 配列：配列番号：30：
AATGGGCCTA AGATCCCGTC CATCGCCACT 40 30
- (2) 配列番号：31に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：40塩基対
 (B) 配列の型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン：EGF2プライマー 50

(xi) 配列：配列番号：3 1：
CCCCAAGCTT AAGGCTAGCG GACGGGATCT TAGGCCATT 40

(2) 配列番号：3 2に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 7 7 塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：MycT及びヒンジ部とのAG 1リンカー

(xi) 配列：配列番号：3 2：
GAATTCCAGG TCACCGTCTC CTCAGAACAA AAATCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATGAA 60

CCAAAGATTC CACAACCTCA ACCAAAGCCA CAACCTCAAC CACAACCACA ACCAAAACCT 120

CAACCAAAGC CAGAACCAGA ATCTACTTCC CCAAAGTCTC CAGCTAGCCT TAAGCTT 177

(2) 配列番号：3 3に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：6 3 塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：MycTとのAG 1リンカー

(xi) 配列：配列番号：3 3：
GAATTCCAGG TCACCGTCTC CTCAGAACAA AAATCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATGCT 60

AGC 63

(2) 配列番号：3 4に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 4 4 塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：ヒンジ部とのAG 1リンカー

(xi) 配列：配列番号：3 4：
GAATTCCAGG TCACCGTCTC CTCAGAACCA AAGATCCAC AACCTCAACC AAAGCCACAA 60

CCTCAACCAC AACCACAACC AAAACCTCAA CCAAAGCCAG AACCAGAATC TACTTCCCCA 120

AAGTCTCCAG CTAGCCTTAA GCTT 144

(2) 配列番号：3 5に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 1 9 塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

10

20

30

40

50

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：pUR4421コーディング鎖中のフラグメント

(xi) 配列：配列番号：35：

AATTTAGCGG CCGCCAGGT GAACTGCTC GAGTAAGTGA CTAAGGTCAC CGTCTCCTCA 60

GAACAAAAAC TCATCTCAGA AGAGGATCTG AATTAATGAG AATTCATCAA ACGGTGATA 119

(2) 配列番号：36に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：119塩基対

10

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：pUR4421非コーディング鎖中のフラグメント

(xi) 配列：配列番号：36：

AGCTTATCAC CGTTTGATGA ATTCTCATTA ATTCAGATCC TCTTCTGAGA TGAGTTTTTG 60

TTCTGAGGAG ACGGTGACCT TAGTCACTTA CTCGAGCAGT TTCACCTGGG CGGCCGCTA 119

20

(2) 配列番号：37に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：11アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：Mycテール

(xi) 配列：配列番号：37：

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn

1

5

10

30

(2) 配列番号：38に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：21塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

40

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：BstEII-HindIIIリンカーのコーディング鎖

(xi) 配列：配列番号：38：

GTCACCGTCT CCTCATAATG A

21

(2) 配列番号：39に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

50

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：BstEII - HindIIIリンカーの非コーディング鎖

(xi) 配列：配列番号：39：

AGCTTCATTA TGAGGAGACG

20

(2) 配列番号：40に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：28塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

10

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

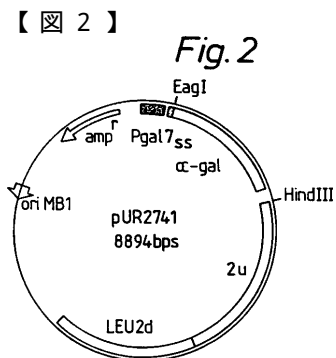
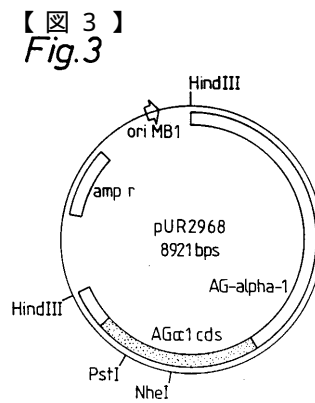
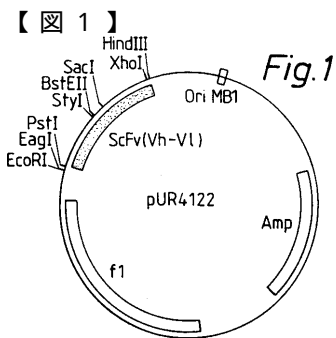
(vii) 直接の起源：

(B) クローン：プライマーcho03pcr

(xi) 配列：配列番号：40：

CGGATCCAAG CTTGAGCCTG GATGTCGGAC GAGATGAT

38



【 図 4 】

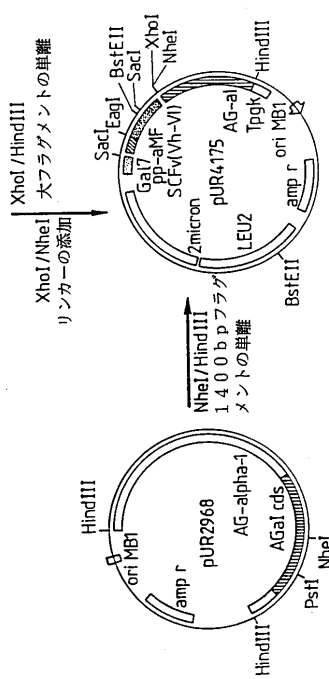
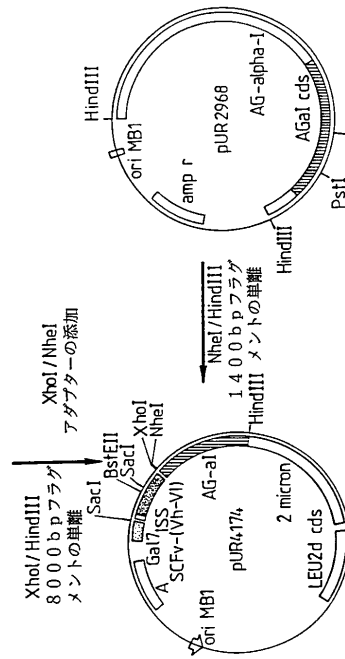
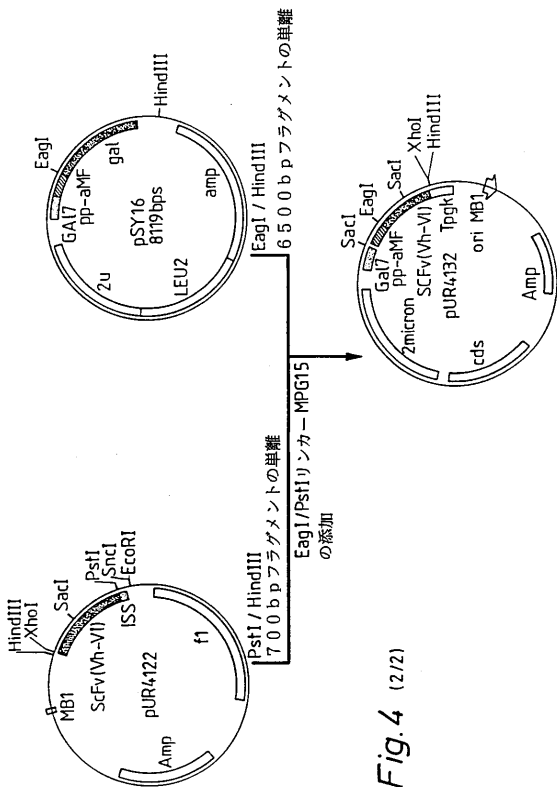
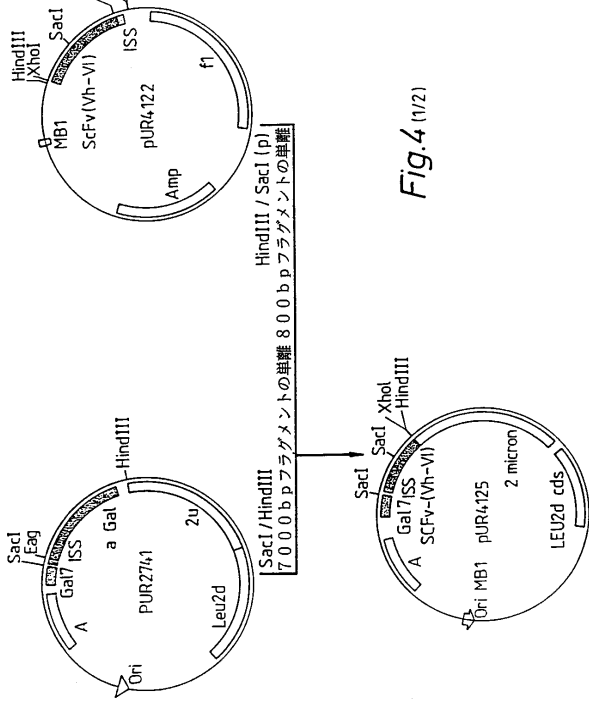
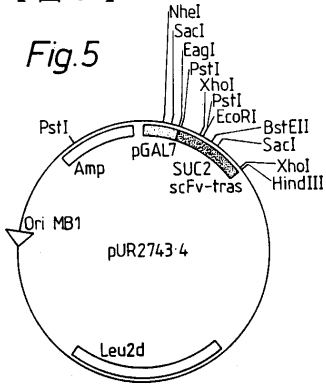


Fig. 4 (1/2) (Cont.)

Fig. 4 (2/2) (Cont.)

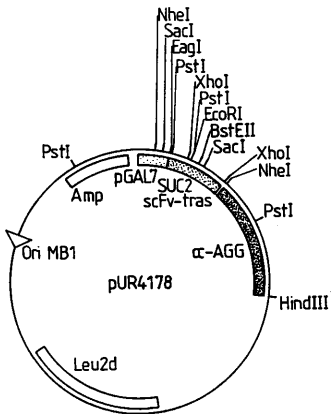
【 5 】

Fig.5



【 6 】

Fig.6



【 8 】

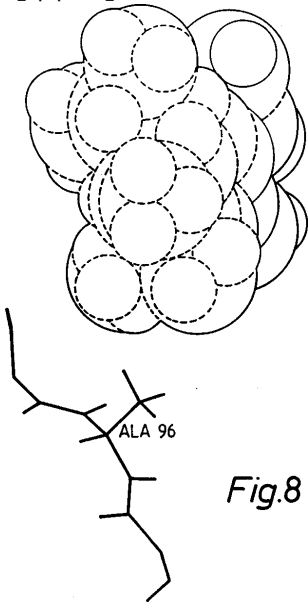
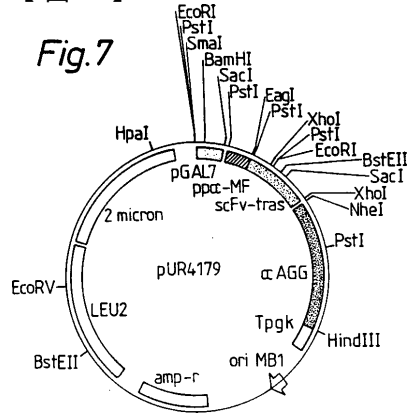


Fig.8

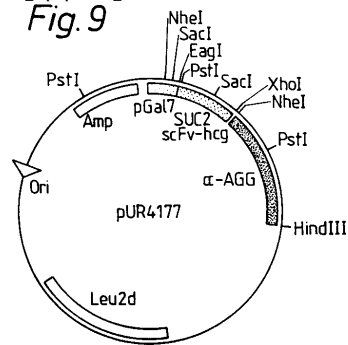
【 7 】

Fig.7



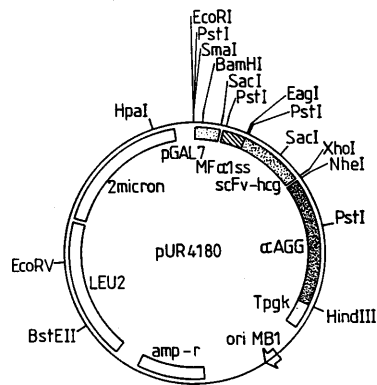
【 9 】

Fig.9

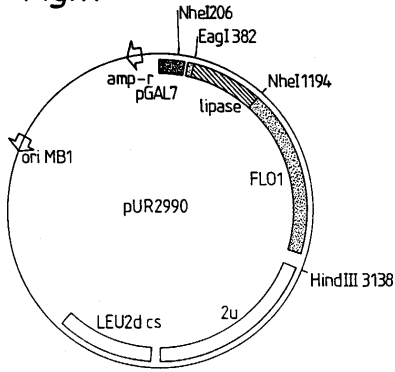


【 10 】

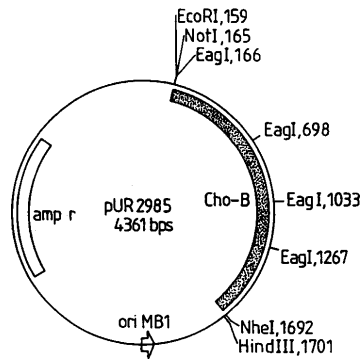
Fig.10



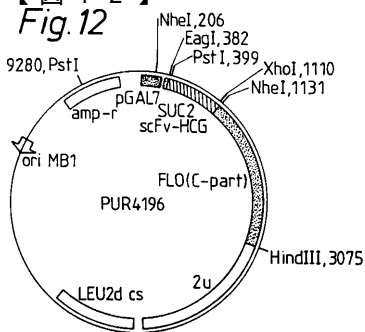
【 1 1 】
Fig.11



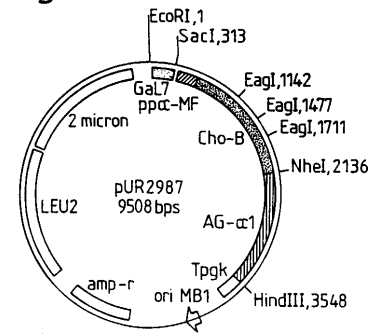
【 1 3 】
Fig.13



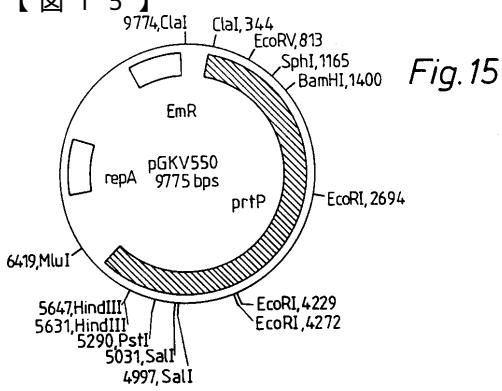
【 1 2 】
Fig.12



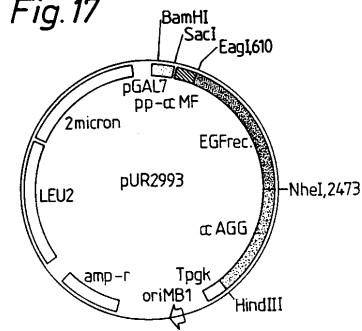
【 1 4 】
Fig.14



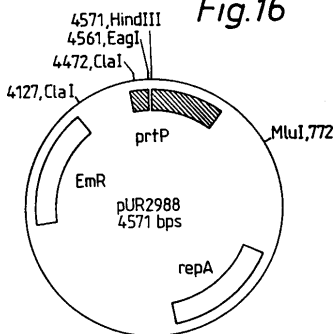
【 1 5 】
Fig.15



【 1 7 】
Fig.17



【 1 6 】
Fig.16



【 図 18 】

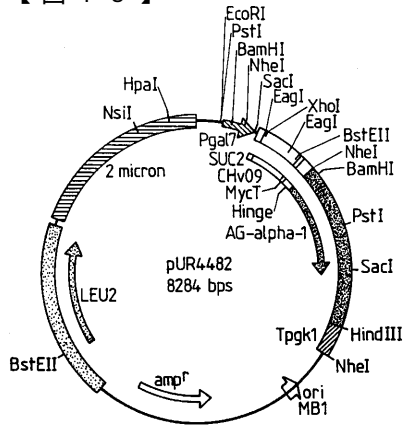
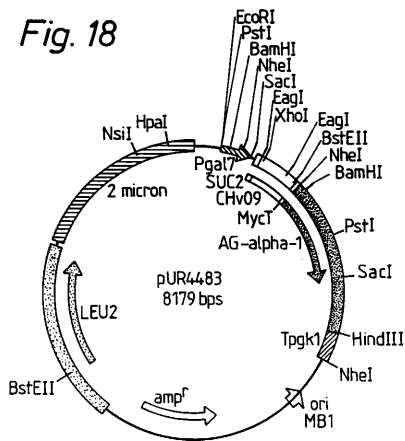
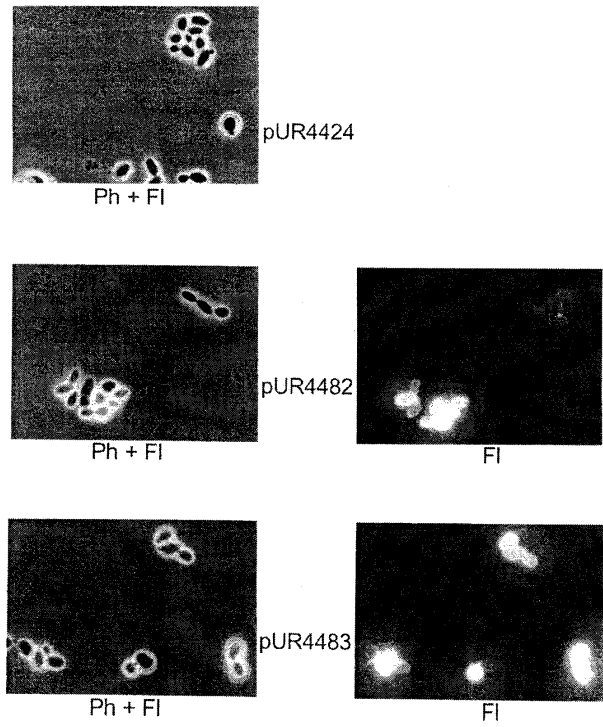


Fig. 18



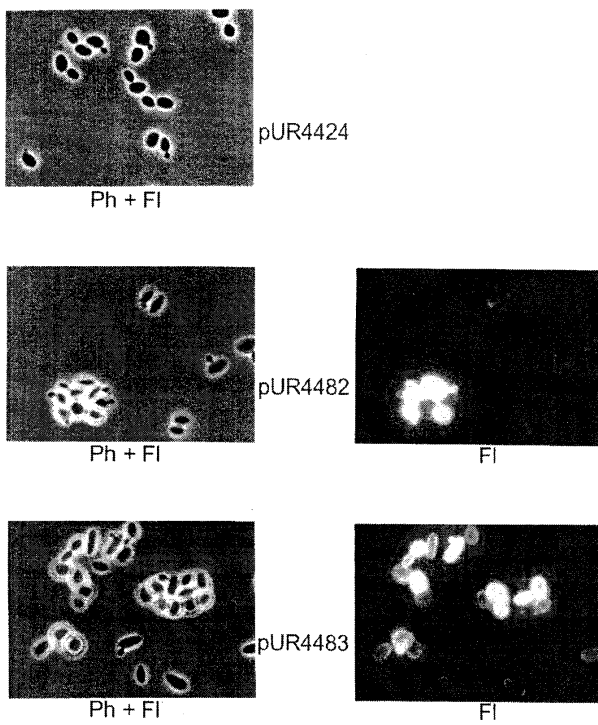
【 図 19 】

Figure 19



【 図 20 】

Figure 20



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
C 1 2 N 11/16	C 1 2 N 11/16
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02 C
//(C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1:865)	C 1 2 R 1:865
(C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:865)	C 1 2 R 1:865

- (72)発明者 フレンケン、レオン・ゲイラーダス・ジェイ
オランダ国、3011・エムピー・ロッテルダム、ゲルダーストラート 90
- (72)発明者 デ・ゲウス、ピーター
オランダ国、エヌエル 2991・ケイビー・バーレンドレック、ボイアー 24
- (72)発明者 クリス、フランシスカス・マリア
オランダ国、エヌエル 1025・ケイエル・アムステルダム、ベネデンラングス 102
- (72)発明者 トシュカ、ホルガー・ヨーク
ドイツ国、ディー 48734、レーケン、エーケルン 1、ラングネーゼ ルグロ気付、ピーアール3
- (72)発明者 ベリプス、コルネリス・セオドラス
オランダ国、エヌエル 3142・ケイビー、マースルイス、ハーグドールン 18

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第89/07140(WO,A1)
国際公開第92/20805(WO,A1)
特表平7-508652(JP,A)
特開昭62-272990(JP,A)
国際公開第92/04363(WO,A1)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.89,No.7(1992.Apr.)p.2713-2717
J.Bacteriol.,Vol.171,No.9(1989)p.4569-4576
J.Cell Biol.,Vol.107,No.3(1988)p.865-876
Mol.Cell Biol.,Vol.8,No.4(1988)p.1709-1714
Mol.Cell Biol.,Vol.9,No.8(1989)p.3155-3165

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷,DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)