

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512532

(P2005-512532A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B O 3 O
<b>A O 1 H 5/00</b>	A O 1 H 5/00	A 2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 1/22</b>	C O 7 K 1/22	4 B O 2 9
<b>C O 7 K 16/40</b>	C O 7 K 16/40	4 B O 3 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 184 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-552917 (P2003-552917)	(71) 出願人	503089489 ディヴァーサ コーポレーション アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン ディエゴ ディレクターズ プレイス 4955
(86) (22) 出願日	平成14年8月5日(2002.8.5)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月5日(2004.4.5)	(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/024910	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開番号	W02003/052050	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 国際公開日	平成15年6月26日(2003.6.26)	(74) 代理人	100114007 弁理士 平山 孝二
(31) 優先権主張番号	60/309,497		
(32) 優先日	平成13年8月3日(2001.8.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P450酵素、それらをコードした核酸及びそれらの作製と使用

## (57) 【要約】

本発明は、P450活性を持つポリペプチド、そのポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、それらポリペプチドに結合する抗体、及びそれらポリペプチド及びポリペプチドの作製並びに使用のための方法を教示するものである。そのP450酵素は、エポキシド及びアレンオキシドを対応するジオールへの加水分解を触媒するために使用できる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

単離された、又は組換え核酸：その核酸は、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、

その核酸は、P450活性を有する少なくとも一種のポリペプチドをコードし、その配列同一性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索によって決定される。

**【請求項 2】**

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約200残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約200残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約200残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約200残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約200残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項 1 記載の単離された、又は組換え核酸。

**【請求項 3】**

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約300残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約300残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約300残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約300残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約300残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項 2 記載の単離された、又は組換え核酸。

**【請求項 4】**

該核酸が、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約400残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約400残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約400残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約400残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約400残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項3記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項5】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約500残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約500残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約500残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約500残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約500残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項4記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項6】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約600残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約600残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約600残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約600残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約600残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項5記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項7】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約700残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO

:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約700残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約700残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約700残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約700残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項6記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項8】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約800残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約800残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約800残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約800残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約800残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項7記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項9】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約900残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約900残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約900残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約900残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約900残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項8記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項10】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約1000残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約1000残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約1000残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約1,000残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性

10

20

30

40

50

を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約1,000残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項9記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項11】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも95%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項10記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項12】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも95%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも98%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項11記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項13】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも95%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも98%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも99%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項12記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項14】

該核酸が、

20

30

40

50

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも95%の配列同等性を持つ核酸、

ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも98%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも99%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項13記載の単離された、又は組換え核酸。 10

【請求項15】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも95%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも98%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、 20

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも99%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項14記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項16】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも98%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも99%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項15記載の単離された、又は組換え核酸。 30

【請求項17】

該核酸が、

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基の領域において、少なくとも99%の配列同等性を持つ核酸を含む、請求項16記載の単離された、又は組換え核酸。

40

【請求項18】

該核酸が、

SEQ ID NO:1に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:3に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:5に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:7に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:9に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:11に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:13に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:15に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:17に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:19に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:21に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:23に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:25に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:27に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:29に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:31に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:33に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:35に記載の配列を持つ 50

核酸、SEQ ID NO:37に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:39に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:41に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:43に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:45に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:47に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:49に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:51に記載の配列を持つ核酸、SEQ ID NO:53に記載の配列を持つ核酸、又はSEQ ID NO:55に記載の配列を持つ核酸を含む、請求項1記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項19】

該核酸が、下記から成るポリペプチドをコードする請求項1記載の単離された、又は組換え核酸：

SEQ ID NO:2に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:4に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:6に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:8に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:10に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:12に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:14に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:16に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:18に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:20に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:22に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:24に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:26に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:28に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:30に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:32に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:34に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:36に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:38に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:40に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:42に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:44に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:46に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:48に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:50に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:52に記載の配列を持つポリペプチド、SEQ ID NO:54に記載の配列を持つポリペプチド、又はSEQ ID NO:56に記載の配列を持つポリペプチド。

【請求項20】

該配列比較アルゴリズムがBLASTバージョン2.2.2.アルゴリズム、フィルターセッティングはblastall -p blastp -d "nr pataa" -F F、そしてその他のオプションは初期設定である、請求項1記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項21】

該P450活性が一酸素添加反応から成る、請求項1記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項22】

該P450活性が基質への酸素結合による触媒反応をも含む、請求項1記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項23】

該P450活性が、更に、脂肪族、又は芳香族炭素のヒドロキシル化をも含む、請求項22記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項24】

該P450活性が、更に、エポキシ化をも含む、請求項22記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項25】

該P450活性が、更に、N-、O-、又はS-脱アルキル化をも含む、請求項22記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項26】

該P450活性が、更に、脱ハロゲン化をも含む、請求項22記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項27】

該P450活性が、更に、酸化的脱アミノ酸をも含む、請求項22記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項28】

10

20

30

40

50

該P450活性が、更に、N-酸化をも含む、請求項 2 2 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 2 9】

該P450活性が、更に、N-水酸化をも含む、請求項 2 2 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 0】

該P450活性が、更にスルフォキシドの形成をも含む、請求項 2 2 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 1】

該エポキシターゼ活性が、更に、アルケン基質をも含む、請求項 2 4 記載の単離された、又は組換え核酸。 10

【請求項 3 2】

該エポキシターゼ活性が、更に、キラル生成物の生成をも含む、請求項 2 4 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 3】

該エポキシターゼ活性が、光学選択的である、請求項 2 4 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 4】

該P450活性が熱に安定である、請求項 1 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 5】

該ポリペプチドが、約37~70 の温度範囲を含むコンディションの下でP450活性を保持する、請求項 3 4 記載の単離された、又は組換え核酸。 20

【請求項 3 6】

該P450活性が耐熱性である、請求項 1 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 7】

該ポリペプチドが、37 以上から約90 から成る温度範囲に曝された後、P450活性を保持する、請求項 3 6 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 3 8】

該ポリペプチドが、37 以上から約50 から成る温度範囲に曝された後、P450活性を保持する、請求項 3 6 記載の単離された、又は組換え核酸。 30

【請求項 3 9】

厳格な条件下で下記の核酸にハイブリダイゼーションされる配列から成る単離された、又は組換え核酸：その核酸は、

SEQ ID NO:1に記載の配列、SEQ ID NO:3に記載の配列、SEQ ID NO:5に記載の配列、SEQ ID NO:7に記載の配列、SEQ ID NO:9に記載の配列、SEQ ID NO:11に記載の配列、SEQ ID NO:13に記載の配列、SEQ ID NO:15に記載の配列、

SEQ ID NO:17に記載の配列、SEQ ID NO:19に記載の配列、SEQ ID NO:21に記載の配列、SEQ ID NO:23に記載の配列、SEQ ID NO:25に記載の配列、SEQ ID NO:27に記載の配列、SEQ ID NO:29に記載の配列、SEQ ID NO:31に記載の配列、SEQ ID NO:33に記載の配列、SEQ ID NO:35に記載の配列、SEQ ID NO:37に記載の配列、SEQ ID NO:39に記載の配列、SEQ ID NO:41に記載の配列、SEQ ID NO:43に記載の配列、SEQ ID NO:45に記載の配列、SEQ ID NO:47に記載の配列、SEQ ID NO:49に記載の配列、SEQ ID NO:51に記載の配列、SEQ ID NO:53に記載の配列、又はSEQ ID NO:55に記載の配列を含む、 40

そして、その核酸はP450活性を持つポリペプチドをコードする。

【請求項 4 0】

該核酸の長さが、少なくとも約100残基である、請求項 3 9 記載の単離された、又は組換え核酸。

【請求項 4 1】

該核酸の長さが、少なくとも約200残基である、請求項 4 0 記載の単離された、又は組換え核酸。

## 【請求項 4 2】

該核酸の長さが、少なくとも約300残基である、請求項 4 1 記載の単離された、又は組換え核酸。

## 【請求項 4 3】

該核酸の長さが、少なくとも約400残基である、請求項 4 2 記載の単離された、又は組換え核酸。

## 【請求項 4 4】

該核酸の長さが、少なくとも約500、600、700、800、900、1,000残基、又は全長の遺伝子あるいは転写体である、請求項 4 3 記載の単離された、又は組換え核酸。

## 【請求項 4 5】

該厳格な条件は、約65 において15分間の0.2 X SSCでの洗浄から成る洗浄ステップを含む、請求項 3 9 記載の単離された、又は組換え核酸。

## 【請求項 4 6】

P450活性を持つポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブ：そのプローブは、下記の配列から成る連続した少なくとも10塩基から構成される。

SEQ ID NO:1に記載の配列、SEQ ID NO:3に記載の配列、SEQ ID NO:5に記載の配列、SEQ ID NO:7に記載の配列、SEQ ID NO:9に記載の配列、SEQ ID NO:11に記載の配列、SEQ ID NO:13に記載の配列、SEQ ID NO:15に記載の配列、SEQ ID NO:17に記載の配列、SEQ ID NO:19に記載の配列、SEQ ID NO:21に記載の配列、SEQ ID NO:23に記載の配列、SEQ ID NO:25に記載の配列、SEQ ID NO:27に記載の配列、SEQ ID NO:29に記載の配列、SEQ ID NO:31に記載の配列、SEQ ID NO:33に記載の配列、SEQ ID NO:35に記載の配列、SEQ ID NO:37に記載の配列、SEQ ID NO:39に記載の配列、SEQ ID NO:41に記載の配列、SEQ ID NO:43に記載の配列、SEQ ID NO:45に記載の配列、SEQ ID NO:47に記載の配列、SEQ ID NO:49に記載の配列、SEQ ID NO:51に記載の配列、SEQ ID NO:53に記載の配列、又はSEQ ID NO:55に記載の配列、

そして、上記のプローブが結合、又はハイブリダイゼーションにより核酸を同定する。

## 【請求項 4 7】

該プローブが、下記の配列から成る連続した少なくとも約10~50、約20~60、約30~70、約40~80、約60~100塩基から構成されるオリゴヌクレオチドから成る、請求項 4 6 記載の核酸プローブ。

SEQ ID NO:1に記載の配列、SEQ ID NO:3に記載の配列、SEQ ID NO:5に記載の配列、SEQ ID NO:7に記載の配列、SEQ ID NO:9に記載の配列、SEQ ID NO:11に記載の配列、SEQ ID NO:13に記載の配列、SEQ ID NO:15に記載の配列、SEQ ID NO:17に記載の配列、SEQ ID NO:19に記載の配列、SEQ ID NO:21に記載の配列、SEQ ID NO:23に記載の配列、SEQ ID NO:25に記載の配列、SEQ ID NO:27に記載の配列、SEQ ID NO:29に記載の配列、SEQ ID NO:31に記載の配列、SEQ ID NO:33に記載の配列、SEQ ID NO:35に記載の配列、SEQ ID NO:37に記載の配列、SEQ ID NO:39に記載の配列、SEQ ID NO:41に記載の配列、SEQ ID NO:43に記載の配列、SEQ ID NO:45に記載の配列、SEQ ID NO:47に記載の配列、SEQ ID NO:49に記載の配列、SEQ ID NO:51に記載の配列、SEQ ID NO:53に記載の配列、又はSEQ ID NO:55に記載の配列。

## 【請求項 4 8】

P450活性を持つポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブ：そのプローブは下記の核酸から成る。

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも100残基の領域において、少なくとも50%の配列同一性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも100残基の領域において、少なくとも60%の配列同一性を持つ核酸、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも100残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、

そして、該配列同等性は、配列比較アルゴリズム又は視覚的な検査による分析によって決定される。

【請求項49】

該プローブが、SEQ ID NO:1 に記載の配列において、連続した少なくとも約10~50、約20~60、約30~70、約40~80、約60~100塩基から構成される核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:3 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:5 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:7 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:9 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:11 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:13 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:15 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:17 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:19 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:21 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:23 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:25 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:27 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:29 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:31 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:33 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:35 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:37 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:39 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:41 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:43 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:45 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:47 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:49 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:51 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:53 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:55 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、を含む、請求項48記載の核酸プローブ。

【請求項50】

該プローブが、少なくとも約100残基の領域において、SEQ ID NO:1に記載の配列から成る核酸に対する配列同一性が、少なくとも90%である核酸、又はそのサブ核酸、SEQ ID NO:3 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:5 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:7 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:9 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:11 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:13 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:15 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:17 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:19 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:21 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:23 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:25 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:27 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:29 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:31 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:33 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:35 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:37 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:39 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:41 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:43 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:45 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:47 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:49 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:51 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:53 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:55 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、を含む、請求項49記載の核酸プローブ。

【請求項51】



:27 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:29 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:31 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:33 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:35 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:37 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:39 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:41 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:43 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:45 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:47 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:49 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:51 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:53 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:55 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列。

10

【請求項 5 4】

それぞれの増幅プライマーペアが、少なくとも連続した約10~50塩基から構成されるオリゴヌクレオチドから成る、請求項 5 3 記載の増幅プライマーペア。

【請求項 5 5】

以下の核酸配列の増幅が可能な増幅プライマーペアと核酸鋳型の増幅から成るP450活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法：

SEQ ID NO: 1 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:3 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:5 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:7 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:9 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:11 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:13 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:15 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:17 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:19 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:21 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:23 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:25 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:27 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:29 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:31 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:33 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:35 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:37 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:39 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:41 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:43 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:45 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:47 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:49 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:51 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:53 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:55 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列。

20

30

【請求項 5 6】

以下から成る核酸から構成される発現カセット：

( i ) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも100残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

40

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも100残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも100残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、もしくは、

( ii ) 厳格条件下で下記の配列から成る核酸にハイブリダイズされる核酸：SEQ ID NO:

50

1 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:3 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:5 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:7 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:9 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:11 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:13 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:15 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:17 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:19 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:21 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:23 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:25 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:27 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:29 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:31 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:33 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:35 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:37 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:39 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:41 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:43 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:45 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:47 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:49 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:51 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:53 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:55 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列。

【請求項 57】

下記から成る核酸から構成されたベクター：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、又はSEQ ID NO:53の少なくとも100残基の領域において、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、又はSEQ ID NO:55の少なくとも100残基の領域において、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、又はSEQ ID NO:35の少なくとも100残基の領域において、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、

SEQ ID NO:27の少なくとも100残基の領域において、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも100残基の領域において、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸、もしくは、

(ii) 厳格条件下で下記の配列から成る核酸にハイブリダイズされる核酸：SEQ ID NO:1 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:3 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:5 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:7 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:9 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:11 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:13 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:15 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:17 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:19 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:21 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:23 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:25 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:27 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:29 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:31 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:33 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:35 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:37 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:39 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:41 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:43 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:45 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:47 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:49 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:51 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:53 に記

載の核酸配列、又はそのサブ配列、SEQ ID NO:55 に記載の核酸配列、又はそのサブ配列。

【請求項 5 8】

請求項 5 7 に記載のベクターを含むクローニング媒介物：この中のクローニング媒介物は、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージ、あるいは人工クロモソームを含む。

【請求項 5 9】

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルス 関連ベクターを含む、請求項 5 8 記載のクローニング媒介物。

【請求項 6 0】

バクテリア人工クロモソーム (BAC)、プラスミド、バクテリオファージ P1-由来ベクター (PAC)、酵母人工クロモソーム (YAC)、あるいは高等動物人工クロモソーム (MAC) を含む、請求項 5 9 記載のクローニング媒介物。

【請求項 6 1】

ベクターを含む形質変換細胞：この中のベクターは、以下を含む：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53 の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55 の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは、

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

その配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される。

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸：SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列を含む核酸。

【請求項 6 2】

以下を含む形質変換細胞：

10

20

30

40

50

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

その配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される。

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸： SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列を含む核酸。

#### 【請求項63】

該細胞が、細菌、高等動物細胞、カビ、酵母、昆虫細胞あるいは植物細胞を含む、請求項61あるいは62の形質変換細胞。

#### 【請求項64】

以下を含む形質変換動物：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核

10

20

30

40

50

酸配列、

この配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される。

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸：SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列。

【請求項 6 5】

該動物がマウスである、請求項 6 4 記載の非ヒト形質変換動物。

【請求項 6 6】

以下を含む形質変換植物は：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

この配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される。

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸：SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示

される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列。

【請求項 6 7】

該植物が、トウモロコシ、ポテト、トマト、小麦、油種、アブラナ、大豆、あるいはタバコである、請求項 6 6 記載の形質変換植物。 10

【請求項 6 8】

以下を含む形質変換植物。

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列 20

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

この配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される；あるいは

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸： SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列。 40

【請求項 6 9】

該種子が、トウモロコシ、ポテト、トマト、小麦、油種、アブラナ、大豆、ヤシ、ヒマワリ、胡麻、南京豆、あるいはタバコの種子である、請求項 6 8 記載の形質変換した種子 50

。

## 【請求項 7 0】

以下の核酸配列に相同的な又は厳格な条件下でハイブリダイズできるアンチセンス オリゴヌクレオチド：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

この配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される；、あるいは

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸： SEQ ID NO:1 として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列。

## 【請求項 7 1】

該アンチセンス オリゴヌクレオチドが、約10 - 50、20 - 60、30 - 70、40 - 80、あるいは60 - 100塩基長である、請求項 7 0 記載のアンチセンス オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 7 2】

以下の配列に相同的であるか、厳格な条件下でハイブリダイズするアンチセンス オリゴヌクレオチドの細胞への投与、あるいは細胞中で発現させることを含めた細胞中のP450メッセージの翻訳を阻害する方法：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO

:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

この配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される；あるいは、

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸：SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列。

### 【請求項73】

単離あるいは組換えポリペプチドは、以下を含む：

#### (a) 以下を含むポリペプチド

SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:28の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つアミノ酸配列、あるいは

SEQ ID NO:20の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つアミノ酸配列、あるいは

#### (b) 以下を含む核酸によりコードされたポリペプチド：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO

10

20

30

40

50

:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列、

SEQ ID NO:27の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいは

SEQ ID NO:19の少なくとも約100残基にわたり、少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列、

この配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索により決定される；あるいは、

(ii) 厳格な条件下でハイブリダイズする以下の核酸：SEQ ID NO:1として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:5として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:11として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:17として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:25として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示される配列、あ

るいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:37として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:43として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示される配列、あるいはそのサブ配列、

SEQ ID NO:51として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示される配列、あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそのサブ配列。

【請求項 7 4】

該ポリペプチドが、P450活性を持つ、請求項 7 3 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項 7 5】

該P450活性が、モノオキシゲネーションに関わる、請求項 7 4 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項 7 6】

該P450活性が、基質への酸素の取り込みを触媒することから成る、請求項 7 4 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項 7 7】

該P450活性が、更に、脂肪族あるいは芳香族炭素の水酸化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項 7 8】

該P450活性が、更に、エポキシ化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項 7 9】

該P450活性が、更に、N-、O-、あるいはS-脱アルキル化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項 8 0】

該P450活性が、更に、脱ハロゲン化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8 1】

該P450活性が、更に、酸化的脱アミノ化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 2】

該P450活性が、更に、N-酸化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 3】

該P450活性が、更に、N-水酸化をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 4】

該P450活性が、更に、スルフォキシドの形成をも含む、請求項 7 6 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 5】

該エポキシダーゼ活性が、更に、アルケン基質をも含む、請求項 7 8 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 6】

該エポキシダーゼ活性が、更に、キラル産物をも含む、請求項 7 8 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 7】

該エポキシダーゼ活性が、対掌選択的である、請求項 7 8 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 8】

該P450活性が、熱に安定である、請求項 7 4 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 8 9】

該ポリペプチドが、約37 - 70 の温度範囲を含む条件においてP450活性を保持する、請求項 8 8 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 9 0】

該P450活性が、耐熱性である、請求項 7 4 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 9 1】

該ポリペプチドが、約37以上90 の範囲の温度に曝された後でもP450活性を保持する、請求項 9 0 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 9 2】

該ポリペプチドが、約37以上50 の範囲の温度に曝された後でもP450活性を保持する、請求項 9 0 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 9 3】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも200残基の領域にわたり、少なくとも50%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも60%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:28の少なくとも200残基の領域にわたり、少なくとも80%の同等性を持つアミノ酸配列、あるいは

SEQ ID NO:20の少なくとも200残基の領域にわたり、少なくとも90%の同等性を持つアミノ酸配列を含む、請求項 7 3 記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

## 【請求項 9 4】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ

10

20

30

40

50

ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも300残基の領域にわたり、少なくとも50%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56の少なくとも300残基の領域にわたり、少なくとも60%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:28の少なくとも300残基の領域にわたり、少なくとも80%の同等性を持つアミノ酸配列、あるいは

SEQ ID NO:20の少なくとも200残基の領域にわたり、少なくとも90%の同等性を持つアミノ酸配列を含む、請求項93記載の単離、あるいは組換えポリペプチド。

10

【請求項95】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも400残基の領域にわたり、少なくとも50%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56の少なくとも400残基の領域にわたり、少なくとも60%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:28の少なくとも400残基の領域にわたり、少なくとも80%の同等性を持つアミノ酸配列、あるいは

20

SEQ ID NO:20の少なくとも400残基の領域にわたり、少なくとも90%の同等性を持つアミノ酸配列を含む、請求項94記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項96】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも500残基の領域にわたり、少なくとも50%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56の少なくとも500残基の領域にわたり、少なくとも60%の同等性を持つアミノ酸配列、

30

SEQ ID NO:20の少なくとも500残基の領域にわたり、少なくとも90%の同等性を持つアミノ酸配列を含む、請求項95記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項97】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも60%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも70%の同等性を持つアミノ酸配列、

40

SEQ ID NO:28の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも90%の同等性を持つアミノ酸配列、

SEQ ID NO:20の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも95%の同等性を持つアミノ酸配列を含む、請求項73記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項98】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも70%の同等性を持つアミノ酸配列、

50



Q ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54の少なくとも100残基の領域にわたり、少なくとも98%の同等性を持つアミノ酸配列を含む、請求項102記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

【請求項104】

ポリペプチドは、SEQ ID NO:2として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:4として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:6として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:8として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:10として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:12として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:14として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:16として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:18として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:20として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:22として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:24として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:26として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:28として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:30として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:32として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:34として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:36として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:38として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:40として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:42として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:44として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:46として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:48として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:50として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:52として示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:54として示されるアミノ酸配列、あるいはそのサブ配列を含む、請求項103記載の単離あるいは組換えポリペプチド。

10

20

【請求項105】

請求項73記載のポリペプチドを含むシグナル配列を欠いた単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項106】

該P450活性が、約37 において100 - 1,200ユニット/mgタンパクの範囲の比活性を持つ、請求項74記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項107】

該P450活性が、500 - 1,000ユニット/mgタンパクの範囲の比活性を持つ、請求項106の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項108】

該P450活性は、約37 において500 - 700ユニット/mgタンパクの範囲の比活性を持つ、請求項107記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

30

【請求項109】

該P450活性が、37 において750 - 1,000ユニット/mgタンパクの範囲の比活性を持つ、請求項107記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項110】

該耐熱性が、その上昇された温度で加熱した後、37 における比活性の少なくとも半分を保持することを意味する、請求項90記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項111】

該耐熱性が、その上昇された温度で加熱した後、37 における比活性が500 - 1,200 ユニット/mgタンパクの範囲の比活性を持つことを意味する、請求項90記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

40

【請求項112】

該ポリペプチドが、少なくとも一つのグリコシレーション部位を含む、請求項73記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項113】

該グリコシレーション部位が、N-結合グリコシレーションである、請求項112記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項114】

50

該P450が、*P. pastoris*あるいは*S. pombe*で発現された後にグリコシル化される、請求項112記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項115】

該ポリペプチドが、pH 4.5 - 5を含む条件下でP450活性を保持する、請求項74記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項116】

該ポリペプチドが、pH 9.0、pH 9.5、あるいはpH 10を含む条件下でP450活性を保持する、請求項74記載の単離ポリペプチドあるいは組換えポリペプチド。

【請求項117】

請求項73記載のポリペプチドを含むタンパク画分：そのタンパク画分ポリペプチドは、液体、固体、あるいはゲルを含む。 10

【請求項118】

請求項73記載のポリペプチドを含むヘテロ二量体及び第二のドメイン。

【請求項119】

第二のドメインが、ポリペプチドであり、そのヘテロ二量体は、融合タンパクである、請求項118記載のヘテロ二量体。

【請求項120】

第二のドメインが、エピトープ(決定基)である、請求項118記載のヘテロ二量体。

【請求項121】

第二のドメインが、タグである、請求項118記載のヘテロ二量体。 20

【請求項122】

ポリペプチドが、請求項67あるいは請求項107に記載の配列を含むP450活性を持つ固定化ポリペプチド。

【請求項123】

該ポリペプチドが、細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレー、あるいはキャピラリー管に固定化される、請求項122記載の固定化ポリペプチド。

【請求項124】

請求項73あるいは請求項118記載の固定化ポリペプチドを含むアレー。

【請求項125】

請求項1あるいは請求項39記載の固定化核酸を含むアレー。 30

【請求項126】

請求項73記載のポリペプチド、あるいは請求項1あるいは請求項39記載の核酸によりコードされるポリペプチドと特異的に結合する単離、あるいは組換え抗体。

【請求項127】

抗体が、モノクローナルあるいはポリクローナル抗体である請求項126記載の単離、あるいは組換え抗体。

【請求項128】

請求項73記載のポリペプチド、あるいは請求項1あるいは請求項39記載の核酸によりコードされるポリペプチドと特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマ。 40

【請求項129】

次のステップを含むP450活性を持つポリペプチドを単離、あるいは同定する方法：(a)請求項126記載の抗体を与える；(b)ポリペプチドを含むサンプルを与える。そして；(c)ステップ(b)のサンプルをステップ(a)の抗体と、その抗体がそのポリペプチドと特異的に結合できる条件において、接触させる。それにより、P450活性を持つポリペプチドを単離、あるいは同定する。

【請求項130】

請求項1記載の核酸、あるいは請求項73記載のポリペプチドを、体液性免疫応答を起こすために十分な量で、非ヒト動物に投与し、それにより、抗P450抗体を作製することを含む、抗P450ポリペプチド抗体を作製する方法、。

## 【請求項 1 3 1】

次のステップを含む組換えポリペプチドを産生する方法：(a)動作的にプロモーターに結合させた核酸をあたえる；その核酸は、請求項 1 あるいは請求項 3 9 記載の配列を含む、そして；(b)ポリペプチドが発現できる条件において、ステップ(a)の核酸を発現させ、それにより、組換えポリペプチドを産生する。

## 【請求項 1 3 2】

宿主細胞をステップ(a)の核酸で形質変換させ、ステップ(a)の核酸を発現させ、それにより、形質変換細胞において組換えポリペプチドを産生することを更に含む、請求項 1 3 1 記載の方法。

## 【請求項 1 3 3】

次のステップを含む P450 活性を持つポリペプチドを同定する方法：(a)請求項 7 3 記載のポリペプチド、あるいは請求項 1 あるいは請求項 3 9 記載の核酸によりコードされるポリペプチドを与える；(b)P450 基質を与える。そして；(c)ステップ(a)のポリペプチド、あるいは断片、あるいはそれらの変種とステップ(b)の基質を接触させ、基質量の減少、あるいは反応産物の増加を測定する。その基質量の減少、あるいは反応産物の増加が、P450 活性を持つポリペプチドを検出する。

## 【請求項 1 3 4】

該基質がアルケンである、請求項 1 3 3 記載の方法。

## 【請求項 1 3 5】

次のステップを含む P450 基質の同定法：(a) 請求項 74 記載のポリペプチド、あるいは請求項 1 又は請求項 3 9 記載の配列を持つ核酸によりコードされるポリペプチドを与える；(b)試験基質を与える。そして；(c)ステップ(a)のポリペプチドとステップ(b)の基質を接触させ、基質量の減少、あるいは反応産物の増加を測定する。その基質量の減少、あるいは反応産物の増加が、P450 基質として、試験基質を同定する。

## 【請求項 1 3 6】

次のステップを含む試験化合物が特異的にポリペプチドと結合するかを調べる方法：(a)ある核酸又はその核酸を含むベクターを、その核酸のポリペプチドへの翻訳がなされる条件において、発現させる。その核酸は、請求項 1 又は請求項 3 9 記載の配列を持つ。あるいは請求項 7 3 記載のポリペプチドを与える；(b)試験化合物を与える；(c)そのポリペプチドとその試験化合物を接触させる；そして、(d)ステップ(b)の試験化合物が、そのポリペプチドと特異的に結合するかを調べる。

## 【請求項 1 3 7】

次のステップを含む P450 活性の調節因子を同定する方法：(a)請求項 74 記載のポリペプチド、あるいは請求項 1 又は請求項 3 9 記載の核酸にコードされるポリペプチドを与える；(b)試験化合物を与える；(c)ステップ(a)のポリペプチドとステップ(b)の試験化合物を与え、P450 活性を測定する。試験化合物の非存在下における P450 活性と存在下における活性の変化は、試験化合物による P450 活性調節の測定値を与える。

## 【請求項 1 3 8】

該 P450 活性は、P450 基質を与えることにより測定され、基質量の減少、あるいは反応産物の増加、又は基質量の増加、あるいは反応産物の減少を測定する、請求項 1 3 7 の方法。

## 【請求項 1 3 9】

試験基質の存在下における基質量の減少、あるいは反応産物の増加を、試験基質の非存在下における基質、あるいは反応産物の量と比較してその試験化合物が P450 基質の活性化因子として同定する、請求項 1 3 8 記載の方法。

## 【請求項 1 4 0】

試験基質の存在下における基質量の減少、あるいは反応産物の増加を、試験基質の非存在下における基質、あるいは反応産物の量と比較してその試験化合物が P450 基質の阻害因子として同定する、請求項 1 3 8 記載の方法。

## 【請求項 1 4 1】

10

20

30

40

50

処理装置を含むコンピューターシステム及びこの中でポリペプチドあるいは核酸の配列を保存したデータ保存装置と言われるデータ保存装置：そのポリペプチドは、請求項 7 3 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含み、その核酸は、請求項 1 又は請求項 3 9 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含む。

【請求項 1 4 2】

配列比較アルゴリズム及びその中に少なくとも一つの保存されている対照配列を持つデータ保存装置を更に含む、請求項 1 4 1 記載のコンピューターシステム。

【請求項 1 4 3】

その配列比較アルゴリズムは、ポリモルフィズムを示すコンピュータープログラムを含む、請求項 1 4 1 記載のコンピューターシステム。

【請求項 1 4 4】

該配列に関する一つ、あるいはそれ以上の特徴を同定する同定装置を更に含む、請求項 1 4 2 記載のコンピューターシステム。

【請求項 1 4 5】

ポリペプチド配列あるいは核酸配列を保存しているコンピューター可読性媒体：ポリペプチド配列又は核酸配列は、請求項 7 3 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含む、その核酸配列は、請求項 1 又は請求項 3 9 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含む。

【請求項 1 4 6】

次のステップを含むある配列の持つある特徴を同定するための方法：(a)ある配列における一つ又はそれ以上の特徴を同定するコンピュータープログラムを利用してその配列を読む。その配列は、ポリペプチド配列又は核酸配列を含み、そのポリペプチド配列は、請求項 7 3 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含み、その核酸配列は、請求項 1 又は請求項 3 9 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含む；そして、(b)そのコンピュータープログラムを利用してその配列における一つ又はそれ以上の特徴を同定する。

【請求項 1 4 7】

次のステップを含む最初の配列と二番目の配列を比較する方法：(a)最初と二番目の配列を、配列を比較するコンピュータープログラムを利用して読む。その最初の配列は、ポリペプチド配列、あるいは核酸配列を含み、そのポリペプチド配列は、請求項 7 3 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含み、その核酸配列は、請求項 1 又は請求項 3 9 記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含む；そして、(b)そのコンピュータープログラムを利用して、最初と二番目の配列間の相違を調べる。

【請求項 1 4 8】

最初と二番目の配列間の相違を調べるステップは、ポリモルフィズムを同定するステップを更に含む、請求項 1 4 7 記載の方法。

【請求項 1 4 9】

配列における一つ、あるいはそれ以上の特徴を同定する同定装置を更に含む、請求項 1 4 7 記載の方法。

【請求項 1 5 0】

最初の配列をコンピュータープログラムを利用して読み、その配列における一つ、あるいはそれ以上の特徴を同定することを更に含む、請求項 1 4 7 記載の方法。

【請求項 1 5 1】

次のステップを含む環境サンプルに由来する P450 活性を持つポリペプチドをコードした核酸を単離、あるいは回収する方法：(a)P450 活性を持つポリペプチドをコードした核酸を増幅するための増幅プライマー配列ペアを与える。そのプライマーペアは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、あるいはそれらのサ

10

20

30

40

50

ブ配列を増幅することができる；(b)環境サンプルから核酸を単離するか、あるいは環境サンプル中の核酸が、増幅プライマーペアーにハイブリダイズするために接近できるようにその環境サンプルを処理する；そして、(c)ステップ(b)の核酸とステップ(a)の増幅プライマーペアーを混合し、環境サンプルから核酸を増幅する。それにより、環境サンプルに由来するP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を単離又は回収する。

【請求項152】

各増幅プライマー配列ペアーは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそれらのサブ配列の少なくとも10~50連続塩基配列を含むオリゴヌクレオチドから成る、請求項151記載の方法。

10

【請求項153】

次のステップを含む環境サンプルに由来するP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を単離、あるいは回収する方法：(a)請求項1あるいは請求項39記載の配列、あるいはそれらのサブ配列を含むポリヌクレオチドプローブを与える；(b)環境サンプルから核酸を単離するか、あるいは環境サンプル中の核酸が、ステップ(a)ポリヌクレオチドプローブにハイブリダイズするために接近できるようにその環境サンプルを処理する；(c)単離した核酸、あるいは処理を施したステップ(b)の環境サンプルをステップ(a)のポリヌクレオチドプローブと混合する；そして、(d)ステップ(b)のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離する。それにより、環境サンプルからエポキシドヒドロキシダーゼ活性を持つポリペプチドをコードする核酸を単離する。

20

【請求項154】

環境サンプルは、液体サンプル、土壌サンプル、空気サンプル、あるいは生物学的サンプルを含む、請求項151あるいは請求項153記載の方法。

【請求項155】

生物学的サンプルは、細菌細胞、原生動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、カビ細胞、あるいは高等動物細胞に由来する、請求項154記載の方法。

【請求項156】

次のステップを含むP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸の変種を作製する方法：(a)請求項1あるいは請求項39記載の配列を含む鋳型核酸を与える；そして、(b)鋳型核酸の変種を作製するために、その鋳型核酸における一つ、あるいはそれ以上のヌクレオチドを修飾、削除、又は付加、あるいはそれらの組み合わせにより修飾する。

30

【請求項157】

P450ポリペプチド変種を作製するために、変種核酸を発現させることをも含む、請求項156記載の方法。

【請求項158】

修飾、挿入又は削除は、エラープローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド指向変異法、アセンブリPCR、セクシュアルPCR変異法、インピボ変異法、カセット変異法、再帰的アンサンブル変異法、指数的アンサンブル変異法、部位特異的変異法、遺伝子再集合、遺伝子飽和部位変異法(GSSM)、合成結合再集合(SLR)、及びそれらの方法の組み合わせによって導入される、請求項156記載の方法。

40

【請求項159】

修飾、挿入又は削除は、リコンビネーション、再帰的な配列リコンビネーション、フォスフォチオエイトDNA変異法、ウラシル含有テンプレート変異法、ギャップデュプレックス変異法、ポイントミスマッチリペアー変異法、リペアー欠損宿主変異法、化学変異法、放射線変異法、デリーション変異法、リストラクシオン/セレクション変異法、リストラクシオン/ピューリフィケーション変異法、人工遺伝子合成、アンサンブル変異法、キメラ遺伝子重合体の創製及びそれらの方法の組み合わせによって導入される、請求項156

50

記載の方法。

【請求項160】

修飾、挿入、又は削除は、エラープローンPCRによって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項161】

修飾、挿入、又は削除は、シャッフリングによって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項162】

修飾、挿入、又は削除は、オリゴヌクレオチド指向変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

10

【請求項163】

修飾、挿入、又は削除は、アセンブリPCRによって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項164】

修飾、挿入、又は削除は、セクシュアルPCR 変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項165】

修飾、挿入、又は削除は、インピボ変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項166】

修飾、挿入、又は削除は、カセット変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

20

【請求項167】

修飾、挿入、又は削除は、再帰的アンサンブル変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項168】

修飾、挿入、又は削除は、指数的アンサンブル変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項169】

修飾、挿入、又は削除は、部位特異的変異法によって導入される、請求項156記載の方法。

30

【請求項170】

修飾、挿入、又は削除は、遺伝子再集合によって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項171】

修飾、挿入、又は削除は、合成結合再集合（SLR）によって導入される、請求項156記載の方法。

【請求項172】

修飾、挿入、又は削除は、遺伝子飽和部位変異法（GSSM）によって導入される、請求項156記載の方法。

40

【請求項173】

その方法は、鑄型核酸によりコードされているポリペプチドに比べて、P450が変化した又は異なる活性を持つまで、あるいはその安定性が変化又は異なるまで繰り返される、請求項156記載の方法。

【請求項174】

P450ポリペプチド変種は、耐熱性であり、上昇した温度に曝された後でいくらかの活性を保持している、請求項173記載の方法。

【請求項175】

P450ポリペプチド変種は、鑄型核酸によりコードされたP450に比べて、グリコシル化の度合いが高い、請求項173記載の方法。

50

## 【請求項 176】

P450ポリペプチド変種は、高温においてもP450活性を持つ。鋳型核酸によりコードされているP450は、そのような高温において活性を示さない、請求項 173 記載の方法。

## 【請求項 177】

その方法は、P450をコードしている配列が鋳型核酸に比べて、異なったコドン使用を持つまで繰り返される、請求項 156 記載の方法。

## 【請求項 178】

その方法は、鋳型核酸に比べて、P450遺伝子のメッセージがより高い、又は低い発現、あるいは安定性を示すまで繰り返される、請求項 156 記載の方法。

## 【請求項 179】

P450活性を持つポリペプチドをコードした核酸の宿主における発現を促進させるためのコドン修飾法：その方法は、次のステップを含む：(a)請求項 1 あるいは請求項 39 記載の配列を含むP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を与える；そして、(b)ステップ(a)の核酸における全く好ましくない、あるいはあまり好ましくないコドンを同定し、それらを同じアミノ酸をコードする好ましい、あるいは天然に使用されているコドンを置換コドンとして置き換える。好ましいコドンとは、宿主における遺伝子の配列中に過剰発現されているコドンであり、又、全く、あるいはあまり好ましくないコドンとは、宿主においてコードされている配列中に過小発現されているコドンである。それにより、宿主における発現を促進するための核酸修飾が施される。

10

## 【請求項 180】

P450ポリペプチドをコードした核酸のコドンを修飾する方法：その方法は、次のステップを含む：(a)請求項 1 又は請求項 39 記載の配列を含むP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を与える；そして、(b)ステップ(a)のコドンを同定し、それを同じアミノ酸をコードする異なるコドンを置換コドンとして置き換える。それにより、P450コードした核酸を修飾する。

20

## 【請求項 181】

P450ポリペプチドをコードした核酸の宿主における発現を促進させるためのコドン修飾法：その方法は、次のステップを含む：(a)請求項 1 又は請求項 39 において示すような配列を含むP450ポリペプチドをコードした核酸を与える；そして、(b)ステップ(a)の核酸における全く好ましくない、あるいはあまり好ましくないコドンを同定し、それらを同じアミノ酸をコードする好ましい、あるいは天然に使用されているコドンを置換コドンとして置き換える。好ましいコドンとは、宿主における遺伝子の配列中に過剰発現されているコドンであり、又全く、あるいはあまり好ましくないコドンとは、宿主においてコードされている配列中に過小発現されているコドンである。それにより、宿主における発現を促進するための核酸修飾が施される。

30

## 【請求項 182】

P450活性を持つポリペプチドをコードした核酸の宿主における発現を減少させるためのコドン修飾法：その方法は、次のステップを含む：(a)請求項 1 又は請求項 39 において示すような配列を含むP450ポリペプチドをコードした核酸を与える；そして、(b)ステップ(a)の核酸において、少なくとも一つ、好ましいコドンを同定し、それらを同じアミノ酸をコードする全く好ましくないか、あるいはより好ましくないコドンを置換コドンとして置き換える。好ましいコドンとは、宿主における遺伝子の配列中に過剰発現されているコドンであり、又全く、あるいはあまり好ましくないコドンとは、宿主においてコードされている配列中に過小発現されているコドンである。それにより、宿主における発現を減少させるための核酸修飾が施される。

40

## 【請求項 183】

宿主細胞が、細菌細胞、カビ細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、あるいは高等動物細胞である、請求項 181 あるいは請求項 182 記載の方法。

## 【請求項 184】

多数の修飾P450活性部位又は基質結合部位をコードした核酸ライブラリーの作製法：そ

50

の修飾された活性部位又は基質結合部位とは、初期活性部位、あるいは初期基質結合部位をコードした配列を含む初期核酸に由来する。その方法は、次のステップを含む：(a)初期活性部位又は初期基質結合部位をコードする初期核酸を与える。その初期核酸とは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそれらのサブ配列に、厳格な条件下でハイブリダイズする配列を含み、その核酸は、P450の活性部位又は基質結合部位をコードしている。(b)初期核酸における多数の標的コドンに天然に存在するアミノ酸による変異をコードした変異オリゴヌクレオチドの集団を与える；そして、(c)変異される各アミノ酸コドンにおいて、アミノ酸変種の並びをコードしている活性部位又は基質結合部位をコードした変種核酸を作製するためにその変異オリゴヌクレオチドの集団を利用する。

10

**【請求項 185】**

至適化指向変異システムを含む方法により、ステップ(a)の初期核酸を変異させることを含む、請求項 184 記載の方法。

**【請求項 186】**

遺伝子飽和部位変異法(GSSM)により、ステップ(a)の初期核酸を変異させることを含む、請求項 184 記載の方法。

20

**【請求項 187】**

合成結合再集合(SLR)により、ステップ(a)の初期核酸を変異させることを含む、請求項 184 記載の方法。

**【請求項 188】**

エラーブローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド指向変異法、アセンブリーPCR、セクシュアルPCR 変異法、インピボ変異法、カセット変異法、再帰的アンサンブル変異法、指数的アンサンブル変異法、部位特異的変異法、遺伝子再集合、遺伝子飽和部位変異法(GSSM)、合成結合再集合(SLR)及びそれらの組み合わせによって、ステップ(a)の初期核酸、変種を変異させることを更に含む、請求項 184 記載の方法。

**【請求項 189】**

リコンビネーション、再帰的な配列リコンビネーション、フォスフォチオエイトDNA 変異法、ウラシル含有テンプレート変異法、ギャップデュプレックス変異法、ポイントミスマッチリペアー変異法、リペアー欠損宿主変異法、化学変異法、放射線変異法、デリージョン変異法、リストラクション/セレクション変異法、リストラクション-ピューリフィケーション変異法、人工遺伝子合成、アンサンブル変異法、キメラ遺伝子重合体の創製及びそれらの組み合わせ等の方法によって、ステップ(a)の初期核酸あるいは変種を変異させることを更に含む、請求項 184 記載の方法。

30

**【請求項 190】**

次のステップを含む低分子の作製法：(a)小分子を合成又は修飾できる多数の生合成酵素を与える。それら酵素の一つは、請求項 1 又は請求項 39 記載の配列を含む核酸にコードされたP450を含む；(b)ステップ(a)の酵素の少なくとも一つに対する基質を与える；そして、(c)一連の生体触媒反応により、小分子を産生する多数の生体触媒反応を容易にする条件において、ステップ(b)の基質と酵素を反応させる。

40

**【請求項 191】**

次のステップを含む小分子の修飾法：(a)P450酵素を与える。その酵素は、請求項 73 記載のアミノ酸配列を含むか、あるいは請求項 1 又は請求項 39 記載の配列を含む核酸にコードされている；(b)小分子を与える；そして、(c)P450酵素により触媒される酵素反応が容易に起こる条件において、ステップ(a)の酵素とステップ(b)の小分子を反応させる。

**【請求項 192】**

ステップ(a)の酵素に対する多数の小分子基質を更に含む。それにより、そのP450酵素

50

により触媒される少なくとも酵素反応一つにより産生される修飾小分子のライブラリーを作製する、請求項 191 記載の方法。

【請求項 193】

多数の酵素反応により産生された修飾小分子の修飾小分子を作製するために、その酵素による多数の生体触媒反応が容易に起こる条件において、多数の付加的な酵素を更に含む、請求項 191 記載の方法。

【請求項 194】

好ましい活性を持つある特定の修飾小分子がライブラリーに存在するかを調べるためのライブラリーを試験するステップを更に含む、請求項 191 記載の方法。

【請求項 195】

ライブラリーを試験するそのステップは、好ましい活性を持つ特定の修飾小分子の存否を一部の修飾小分子を調べることにより、そのライブラリーの多数の修飾小分子の一部を産生するために使われる生体触媒反応の一つを除く全てを系統的に削除するステップを更に含み、好ましい活性の特定の修飾小分子を産生する少なくとも一つの特別な生体触媒反応を同定する、請求項 192 記載の方法。

【請求項 196】

次のステップを含む P450 酵素の機能断片を決定する方法：(a) P450 酵素を与える。その酵素は、請求項 73 記載のアミノ酸配列を含むか、あるいは請求項 1 又は請求項 39 記載の配列を含む核酸にコードされている；そして、(b) ステップ(a)の配列から多数のアミノ酸残基を削除し、P450 活性を残るサブ配列について調べる。それにより、P450 酵素の機能断片を決定する。

【請求項 197】

P450 活性は、P450 酵素基質を与えることにより測定し、基質量の減少、あるいは反応生成物の増加を検出する、請求項 196 記載の方法。

【請求項 198】

次のステップを含むリアルタイム代謝フラックス分析による新規、あるいは修飾表現型の全細胞エンジニアリングの方法：(a) 細胞の遺伝的組成を修飾することにより、細胞を修飾する。その遺伝的組成は、請求項 1 又は請求項 39 記載の配列を含む核酸を細胞に添加することにより修飾される；(b) 多数の修飾細胞を得るために、その修飾細胞を培養する；(c) リアルタイムでステップ(b)の細胞培養をモニターすることにより、少なくとも一つの代謝パラメーターを測定する；そして、(d) 同様の条件で、その測定パラメーターが、非修飾細胞の比較できる測定値と異なるかを調べるために、ステップ(c)のデータを分析する。それにより、即時流量実時間分析によるその細胞における修飾表現型の同定がなされる。

【請求項 199】

その細胞の遺伝的組成は、その細胞における配列の削除、あるいは修飾を含む方法によって、あるいは遺伝子の発現をロックアウトすることによって修飾される、請求項 198 記載の方法。

【請求項 200】

新規にエンジニアされた表現型を持つ細胞を選別することを更に含む、請求項 198 記載の方法。

【請求項 201】

その選別された細胞を培養し、それにより、新規にエンジニアされた表現型を持つ細胞を作製することを更に含む、請求項 200 記載の方法。

【請求項 202】

次のステップを含むアルケンを加水分解する方法：(a) P450 活性を持つポリペプチドを与える。そのポリペプチドは、請求項 74 記載のアミノ酸配列を含むか、あるいは請求項 1 又は請求項 39 記載の配列を含む核酸にコードされているポリペプチドを含む；(b) アルケンを含む組成を与える；そして、(c) そのポリペプチドがオキシゲナーゼとしてアルケンに作用する条件下、ステップ(a)のポリペプチドとステップ(b)の組成を反応させる。

10

20

30

40

50

## 【請求項 203】

次のステップを含む好ましいキラル化合物を産生する方法：(a)立体選択的P450活性を持つポリペプチドを与える。そのポリペプチドは、P450酵素を与える。その酵素は、請求項73記載のアミノ酸配列を含むか、あるいは請求項1又は請求項39記載の配列を含む核酸にコードされているポリペプチドを含む；(b)P450基質を含む組成を与える；(c)そのポリペプチドが、P450基質をキラルエポキシドへの変換を触媒する条件において、ステップ(a)のポリペプチドとステップ(b)の組成を反応させる；そして、(d)そのキラルエポキシドをキラル化合物に変換する。

## 【請求項 204】

該キラル化合物が、ジオール、アミノアルコール、あるいは分枝アルキル鎖残基を含む、請求項203記載の方法。

10

## 【請求項 205】

該キラル産物が、抗生物質である、請求項203記載の方法。

## 【請求項 206】

P450活性ポリペプチドの耐熱性、あるいは熱安定性を増加させる方法、P450ポリペプチドをグリコシル化する方法：そのポリペプチドは、請求項73記載の配列の少なくとも30の隣接配列、あるいは請求項1又は請求項39記載の配列を持つ核酸にコードされているポリペプチドを含む。それにより、P450活性ポリペプチドの耐熱性、あるいは熱安定性を増加させる。

## 【請求項 207】

20

P450の比活性は約37~90 の範囲の温度で熱安定あるいは耐熱性である、請求項206記載の方法。

## 【請求項 208】

請求項1あるいは請求項39記載の核酸の少なくとも100残基にわたり、少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列を持つ核酸を含むベクターを発現させることを含んだ、ある細胞において組換えP450ポリペプチドを過剰発現させる方法：その配列同等性は、配列比較アルゴリズムを用いた分析あるいは視覚的検索により決定される。過剰発現は、高い活性を持つプロモーター、ジシストロニックベクターの利用あるいはそのベクターの遺伝子増幅により影響される。

## 【請求項 209】

30

次のステップを含むエポキシダーゼをコードしている核酸を含む細胞を選別する増殖を基にした方法：(a)多数の細胞を与える。その細胞は、増殖に必要な組成を欠いている；(b)前駆体あるいは基質を与える。その前駆体あるいは基質は、P450により、その細胞の増殖に必要な組成に変換されることができ、その必須組成は、その細胞の増殖を誘導するエポキシドを含むはずである；(c)そのエポキシドを欠いている培地中でその細胞を培養し、ステップ(b)の前駆体あるいは基質を加える；そして、(d)細胞の増殖をスクリーンする。刺激されたクローンの増殖における細胞が、その前駆体あるいは基質をエポキシドを含む組成に変換できるP450をコードしている核酸を含んでいるものとして同定される。それにより、P450をコードしている核酸を含む細胞を選別する。

## 【請求項 210】

40

次のステップを含むP450をコードしている核酸を選別する増殖を基にした方法：(a)ポリペプチドをコードしている核酸を与える；(b)前駆体あるいは基質を与える。その前駆体あるいは基質は、P450により、その細胞の増殖に必要な組成に変換されることができ、その必須組成は、その細胞の増殖を誘導するエポキシドを含むはずである；(c)多数の細胞を与える。その細胞は、ステップ(b)の組成を作れない；(d)その核酸を細胞へ導入し、細胞を、その核酸が発現され、コードしているポリペプチドに翻訳される条件において、増殖させる。その細胞を、増殖に必要なエポキシドを含む組成を欠いている培地中で増殖させ、ステップ(b)の前駆体あるいは基質を添加する；そして、(e)増殖をスクリーンする。刺激されたクローンの増殖における細胞が、その前駆体あるいは基質をエポキシドを含む組成に変換できるP450をコードしている核酸を含んでいるものとして同定される。それ

50

により、P450をコードしている核酸を含む細胞を選別する。

【請求項 2 1 1】

次のステップを含むP450をコードしている核酸を同定する方法：(a)核酸ライブラリーを与える；(b)前駆体あるいは基質を与える。その前駆体あるいは基質は、P450により、その細胞の増殖に必要な組成に変換されることができ、その必須組成は、その細胞の増殖を誘導するエポキシドを含むはずである；(c)多数の細胞を与える。その細胞は、ステップ(b)の組成を作れない；(d)その遺伝子ライブラリーのメンバーを細胞に導入し、その細胞を、増殖に必要なエポキシドを含む組成を欠いている培地中で増殖させる；(e)ステップ(b)の前駆体あるいは基質をその培養に添加する；(f)増殖している細胞を選別し、ステップ(d)の挿入されたライブラリーのメンバーを同定する。その細胞は、その前駆体を酵素的に増殖に必要なエポキシドを含む組成に変換することにより、増殖させることができ、その酵素は、その遺伝子ライブラリーのメンバーによりコードされている。それにより、P450をコードしている核酸を同定する。

10

【請求項 2 1 2】

次のステップを含むP450をコードした核酸を含む細胞の選別法：(a)エポキシドヒドロラーゼを含む多数の細胞を与える。その細胞は、増殖に必要な組成を欠いている；(b)前駆体あるいは基質を与える。その前駆体あるいは基質は、P450によりエポキシドに変換されることができ、そのエポキシドは、エポキシドヒドロラーゼによりその細胞の増殖に必要な組成に変換させることができる；(c)増殖に必要なエポキシド及び組成を欠いている培地中でその細胞を増殖させ、ステップ(b)の前駆体あるいは基質をその培養に添加する；そして、(d)細胞の増殖をスクリーンする。刺激されたクローンの増殖における細胞が、その前駆体あるいは基質をエポキシドに変換できるP450をコードしている核酸を含んでいるものとして同定される。それにより、エポキシダーゼ活性を持つP450をコードしている核酸を含む細胞を選別する。

20

【請求項 2 1 3】

次のステップを含むP450をコードした核酸を含む細胞の細胞増殖を基にした選別法：(a)ポリペプチドをコードしている核酸を与える；(b)前駆体あるいは基質を与える。その前駆体あるいは基質は、P450により、その細胞の増殖に必要なエポキシドに変換されることができ、そのエポキシドは、エポキシドヒドロラーゼによりその細胞の増殖に必要な組成に変換させることができる；(c)多数のエポキシドヒドロラーゼを含む細胞を与える。その細胞は、ステップ(b)の組成を作れない；(d)その核酸を細胞へ導入し、細胞を、その核酸が発現され、コードしているポリペプチドに翻訳される条件において、増殖させる。その細胞を、増殖に必要なエポキシドを含む組成を欠いている培地中で増殖させ、ステップ(c)の基質を添加する；そして、(e)増殖をスクリーンする。刺激されたクローンの増殖における細胞が、その前駆体あるいは基質をエポキシドを含む組成に変換できるP450をコードしているものとして同定される。それにより、エポキシダーゼ活性を持つP450をコードしている核酸を選別する。

30

【請求項 2 1 4】

該前駆体あるいは基質が、アルケンを含む、請求項 2 0 9、請求項 2 1 0、請求項 2 1 1、請求項 2 1 2、あるいは請求項 2 1 3 記載の方法。

40

【請求項 2 1 5】

該前駆体あるいは基質が、アリルアルコール、3,3-ジメチルアクリレートあるいはトランス-3-メチル-2-ペンテノエートを含む、請求項 2 0 9、請求項 2 1 0、請求項 2 1 1、請求項 2 1 2、あるいは請求項 2 1 3 記載の方法。

【請求項 2 1 6】

該核酸が、遺伝子ライブラリーのメンバーである請求項 2 0 9、あるいは請求項 2 1 2 記載の方法。

【請求項 2 1 7】

該ライブラリーが、生物体の混合集団から得られた物である、請求項 2 0 9、あるいは請求項 2 1 2 記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の引照

本出願は、2001年8月3日にファイルされた米国臨時出願番号(USSN) 60/309,497の35 U.S. C. § 119(e)の優先的利点を求めるものである。前述の出願は、明確にすべての目的における参照としてここに取り込まれる。

技術領域

【0002】

本出願は、分子ならびに細胞生物学及び生化学に関連している。特に、本出願は、P450の活性、そのポリペプチドをコードしたポリヌクレオチド、及びそれらポリペプチドやポリヌクレオチドの作製ならびに使用について教示するものである。本出願は、概して、エポキシドの産生に使用するP450酵素の選別あるいはスクリーニング及び同定に関連している。本出願は、本発明のP450酵素を用いたエポキシドの産生に関する方法を提供するものである。

背景

【0003】

アルコール、 $\alpha$ -ヒドロキシル酸及びエポキシドを含むキラル分子は、多くの化学試薬ならびに医薬品、農業化成品の合成にとって重要である。現在の合成化学における大きなチャレンジは、立体及び部位選択性の高いそのような化合物を高収量で産生することにある。鏡像化学(光学)的に単一なエポキシドは、多くの医薬品、農業化成品及び他の高品質化成品を合成するための多様な合成源となる。しかしながら、現在のキラルエポキシドへの化学ルートは、プロセススケールでの合成において、それらの広範な応用を妨げる重大な欠点を持っている(以下を参照)。

【0004】

現在可能な技術のうち、最も広く使用されているものはSharplessのエポキシ化反応(Sharpless, K. B. & Michaelson, R. C. J. Am. Chem. Soc. 1973 95, 6136)、Jacobson/Katsuki-型エポキシ化(Zhang, W., Loebach, J. L., Wilson, S. R., & Jacobsen, E. N. J. Am. Chem. Soc. 1990 112, 2801; Katsuki, T. & Sharpless, K. B. J. Am. Chem. Soc. 1980 102, 5974)、及びJuliaのポリロイシン-触媒反応(Julia, S., Masana, J., & Vega, J. C. Angew. Chem. 1980 92, 968)である(図-1)。これら全ての方法には、プロセススケールでのキラル合成に応用する場合、高価な金属触媒の使用、低い基質/触媒比、及び低~中程度の立体選択性での限定的な効率及び産生性を含む問題による制限がある。更に、各方法には、効果的に使われる基質の範囲に制限が存在する。Sharplessのエポキシ化触媒は、強制的にアリルアルコールと反応し、Jacobsen反応は、cis-二置換アルケンにのみ効果的に反応し、Julia法は、カルコン様アルケンに対してのみ応用できる。従って、上記方法によるような高い鏡像体超過率を得ることができるが、プロセススケールにおいて、温和な反応条件下においても機能するような非不斉酸化触媒に対する需要があることは明らかである。酸化酵素は、これらの基準を満たし、また、商業的にその化学触媒に変わる実行可能な変法を提供できる可能性を持っている。

【0005】

上述したように、現在、バイオテクノロジー及び化学工業における生物学的あるいは化学的プロセスを至適に実行できる分子(例えば、酵素)に対する需要が存在する。例えば、化成、医薬、繊維、食品や飼料、及び界面活性剤等の既存あるいは新規両市場において使用される分子や化合物は、厳格な経済的及び環境的な基準を満たすはずである。ポリマー、医薬、天然産物、及び農業化成品の合成は、有害な副産物の産生、不十分な触媒による高価なプロセスによりしばしば妨げられる。例えば、酵素は、触媒におけるこれらの問題点を克服できる多くの注目すべき利点を持っている:それらは、単一の機能的官能基に反応し、それらは、単一分子において類似する官能基を区別し、そして、それらは、鏡像体を区別する。更に、それらは、生物学的に分解可能であり、反応混合物中で低濃度にお

いて機能する。酵素は、それらの化学的、部位的、及び立体的特異性を持つために、好ましい選択的な転換を最適な状態で達成する驚くべき機会を提供する。これらを、特に、ワンステップ反応によって化学的に複製することは非常に困難である。付随する環境的負担の軽減とともに、保護基、選択性、単一反応容器におけるマルチステップ転換を行う能力の必要性を省けることは、化成及び医薬工業における酵素の需要を増大させた。酵素をベースとしたプロセスは、徐々に多くの習慣的な試薬ベースの方法と置き換わりつつある。より広範な工業的使用に対して現存する制限は、商業的に入手可能な酵素の数が相対的に少ないことによる。今までに述べられている3,000以上もの非DNA修飾酵素活性から300にも満たない酵素(DNA修飾酵素を除く)が商業的に入手可能になっているのみである。

#### 【0006】

工学的な応用のための酵素の使用は、また、求められている工業的な条件下での実行を要求され得る。これには、環境中あるいは進化的に選別されなかった現在知られる一群の酵素の基質に対する活性が含まれる。しかしながら、天然の環境には、例えば、異常に高い温度やpHを含む極端な条件が与えられる。多数の微生物は、それらの両極端に耐えられるようになるよりも部分的にはポリペプチドに対する選択によりこれらの条件に順応している。

#### 【0007】

酵素は、温度、pH、及び塩濃度の条件下、生物体の周囲環境内で非常に特異的な生物学的機能を遂行するための選択的切迫により進化した。その大部分である現在までに同定された非DNA修飾酵素活性は、中温性の生物体から単離されており、役に立つ系統発生的多様性の極一部を表しているにすぎない。生体触媒の活発な領域は、極端な環境に生きる微生物から単離された酵素の助けを持つ新しい次元の様相を帯びてきている。例えば、そのような酵素は、100 以上の地上の熱泉や深海の高温孔、0 以下の極地の水中、死海の飽和した塩環境、石炭堆積や高含硫地熱泉中のpH 0付近の環境、あるいは下水泥中のpH 11付近の環境で機能するはずである。例えば、生物体、ポリヌクレオチド、あるいはポリペプチド(例えば、酵素)を含んでいる過酷な条件から得られた環境サンプルは、生体触媒の新しい領域を切り開く。本発明は、興味あるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの迅速なスクリーニングによって、生物剤、治療剤、及び工業応用のための酵素の開発のための材料を提供するのみならず、例えば、特別な活性、特異性、あるいは条件のために修飾された分子、あるいはポリペプチドを開発するための指向的進化及び変異による更なる修飾工程のための新たな物質をも提供する。

#### 【0008】

工業使用のための新規酵素の需要に加え、新規な活性を持つ生物学的に活性な化合物の需要が飛躍的に増大した。この需要は、主に、現在入手可能な抗生物質に抵抗する病原性生物の数が明らかに増加傾向にあることと関連した全世界的な人口統計の変化により生じたものである。例えば、若い世代を持った新しい国々における抗バクテリア薬の需要が急増する一方で、老齢化した世代を抱えるアメリカのような国においては、癌、糖尿病、関節炎、及び他の衰弱状況に対処する医薬品の増大しつつある需要が存在している。感染症による死亡率は、1980から1982の間で58 %の増加を示し、抗生物質抵抗性の微生物の出現により、アメリカ単独で年間300億ドルの健康管理コストの超過を加えたものと概算されている。(Adams et al., Chemical and Engineering News, 1995; Amann 他, Microbiological Reviews, 59, 1995)。この傾向に対する対応として、製薬業界は、特徴的な活性、あるいは特異性を持った化合物を得るために多様な微生物のスクリーニングを著しく増加させてきた。従って、本発明は、ポリヌクレオチド及び関連した配列特異的な情報を、例えば、種々のマクロ生物体の腸内のような環境に存在する感染性微生物から搾取及び同定するために使用することができる。

#### 【0009】

環境サンプルから新規酵素を同定することはこの問題の一つの解決である。興味ある活性を持っているポリペプチド及び興味あるポリペプチドをコードしたポリヌクレオチドを迅速に同定することにより、本発明は、種々の方法、生物剤、診断薬、治療薬のための組

10

20

30

40

50

成及び材料、また工業応用のための混合物等を提供する。

【0010】

専ら、酸化酵素が過去数十年の間に研究されている。アルコールの酸化、水酸化、及びエポキシ化を含む非常に多様な酸化をこれらの酵素は触媒する(図-2)。有機分子への酸素分子の導入(酸素化)に關与するこれらの反応は、従来の化学合成を用いた立体的及び部位選択的な様態において達成することが最も困難な典型である。これらの転換を触媒するための酵素の使用は、それらが反応性のある化学的な機能性を予め活性化していない部位に導入できるため、非常に強力な合成手段となる可能性を持っている。更に、これらの酸化酵素は、温和な反応条件下、高い立体特異性をもってこの機能性を導入できる。しかしながら、広く使用されている加水分解酵素に比べて、生体触媒やバイオトランスフォーメーションにこれら酸化酵素が商業化された応用例は、その潜在的な利点にも関わらず、相対的に非常に少ない。

10

【0011】

P450は、天然に広く存在し、生体異物の解毒、通常には存在しない炭素源の異化、及び二次代謝物の生合成等のプロセスに關わる酸化酵素である。これら酸化酵素は、分子中の鉄/ヘム核により酸素分子を活性化し、エポキシ化反応を支える酸化還元電子シャトルを利用する。しかしながら、現在までのところ、エポキシドの合成に酸化酵素(又は、エポキシダーゼ)を用いた報告は殆どない。これは、おそらく、伝統的な方法によって得ることができる限られたバイオディバーシティー(生物多様性)から安定なエポキシドを見出すことが困難なためである。

20

【0012】

総括

本発明は、SEQ ID(配列認識番号) NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51あるいはSEQ ID NO:53と少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、又は、それ以上の残基にわたり少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、又は、それ以上の配列相同性を持った核酸配列を含んだ単離あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、P450の活性を持つ少なくとも一つのポリペプチドをコードする核酸であり、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

30

【0013】

本発明は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43あるいはSEQ ID NO:55と少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、又は、それ以上の残基にわたり少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は、それ以上の配列相同性を持った核酸配列を含んだ単離あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、P450の活性を持つ少なくとも一つのポリペプチドをコードする核酸であり、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

40

【0014】

本発明は、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31あるいはSEQ ID NO:35と少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、又は、それ以上の残基にわたり少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は、それ以上の配列相同性を持った核酸配列を含んだ単離あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、P450の活性を持つ少なくとも一つのポリペプチドをコードする核酸であり、その配列同等性は、配列比較アルゴリズムあるいは視覚的な検索分析により決定される。

【0015】

本発明は、SEQ ID NO:27と少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900

50

、1000、1100、1200、又は、それ以上の残基にわたり少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%又は、それ以上の配列相同性を持った核酸配列を含んだ単離あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、P450の活性を持つ少なくとも一つのポリペプチドをコードする核酸であり、その配列相同性は、配列比較アルゴリズム、あるいは可視的な検索分析により決定される。

**【0016】**

本発明は、SEQ ID NO:19と少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、又は、それ以上の残基にわたり少なくとも90%、95%、98%、99%又は、それ以上の配列相同性を持った核酸配列を含んだ単離あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、P450の活性を持つ少なくとも一つのポリペプチドをコードする核酸であり、その配列相同性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

10

**【0017】**

一例として、本発明は、単離あるいは組換え核酸を提供する。ここに言う核酸は、SEQ ID NO:1として示す配列、SEQ ID NO:5として示す配列SEQ ID NO:7として示す配列、SEQ ID NO:9として示す配列、SEQ ID NO:11として示す配列SEQ ID NO:13として示す配列、SEQ ID NO:15として示す配列、SEQ ID NO:17として示す配列、SEQ ID NO:19として示す配列、SEQ ID NO:21として示す配列、SEQ ID NO:23として示す配列、SEQ ID NO:25として示す配列、SEQ ID NO:27として示す配列、SEQ ID NO:29として示す配列、SEQ ID NO:31として示す配列、SEQ ID NO:33として示す配列、SEQ ID NO:35として示す配列、SEQ ID NO:37として示す配列、SEQ ID NO:39として示す配列、SEQ ID NO:41として示す配列、SEQ ID NO:43として示す配列、SEQ ID NO:45として示す配列、SEQ ID NO:47として示す配列、SEQ ID NO:49として示す配列、SEQ ID NO:51として示す配列、SEQ ID NO:53として示す配列、あるいはSEQ ID NO:55として示す配列、を含んでいる。

20

**【0018】**

一例として、本発明は、単離あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、SEQ ID NO:2として示す配列、SEQ ID NO:4として示す配列、SEQ ID NO:6として示す配列、SEQ ID NO:8として示す配列、SEQ ID NO:10として示す配列、SEQ ID NO:12として示す配列、SEQ ID NO:14として示す配列、SEQ ID NO:16として示す配列、SEQ ID NO:18として示す配列、SEQ ID NO:20として示す配列、SEQ ID NO:22として示す配列、SEQ ID NO:24として示す配列、SEQ ID NO:26として示す配列、SEQ ID NO:28として示す配列、SEQ ID NO:30として示す配列、SEQ ID NO:32として示す配列、SEQ ID NO:34として示す配列、SEQ ID NO:36として示す配列、SEQ ID NO:38として示す配列、SEQ ID NO:40として示す配列、SEQ ID NO:42として示す配列、SEQ ID NO:44として示す配列、SEQ ID NO:46として示す配列、SEQ ID NO:48として示す配列、SEQ ID NO:50として示す配列、SEQ ID NO:52として示す配列、SEQ ID NO:54として示す配列、あるいはSEQ ID NO:56として示す配列、を含んでいる。

30

**【0019】**

一例として、配列比較アルゴリズムとは、BLAST 版2.2.2アルゴリズムであり、Blastall -p Blastp -d "nr pataa" -F Fがフィルターセッティングとしてセットされ、他の全てのオプションはデフォルトにセットされる。

40

一例として、P450の活性は、モノオキシゲナーゼ反応を含む。一例として、P450の活性は、酸素の基質への取り込みの触媒反応を含む。一例として、P450の活性は、更に、脂肪族、あるいは芳香族炭素の水酸化をも含むことができる。別の例として、P450の活性は、エポキシ化を含み得る。他の例として、P450の活性は、N-、O-、あるいはS-脱アルキル化を含み得る。一例として、P450の活性は、脱ハロゲン化を含める。別の例として、P450の活性は、酸化的脱アミド化を含み得る。一例として、P450の活性は、N-オキシデーシオン、あるいはN-ヒドロキシレーションを含み得る。一例として、P450の活性は、スルホキシドの形成を含み得る。

**【0020】**

一例として、エポキシダーゼ活性は、更に、アルケンを基質にできる。エポキシダーゼ

50

活性は、更に、キラル産物の産生を含み得る。一例として、エポキシダーゼ活性は、光学選択的である。

本発明は、単離、あるいは組換え核酸を提供する。このP450の活性は熱に安定である。一例として、ポリペプチドは、37~70 の範囲の温度からなる条件下、P450活性を保持できる。他の例として、P450の活性は耐熱性である。ポリペプチドは、37 以上おおよそ90 までの範囲の温度に曝された後でもP450活性を保持できる。他の例として、ポリペプチドは、37 以上からおおよそ50 までの範囲の温度に曝された後でもP450活性を保持できる。

#### 【0021】

本発明は、単離、あるいは組換え核酸を提供する。この核酸は、厳格な条件下、SEQ ID NO:1として示す配列、SEQ ID NO:3として示す配列、SEQ ID NO:5として示す配列、SEQ ID NO:7として示す配列、SEQ ID NO:9として示す配列、SEQ ID NO:11として示す配列、SEQ ID NO:13として示す配列、SEQ ID NO:15として示す配列、SEQ ID NO:17として示す配列、SEQ ID NO:19として示す配列、SEQ ID NO:21として示す配列、SEQ ID NO:23として示す配列、SEQ ID NO:25として示す配列、SEQ ID NO:27として示す配列、SEQ ID NO:29として示す配列、SEQ ID NO:31として示す配列、SEQ ID NO:33として示す配列、SEQ ID NO:35として示す配列、SEQ ID NO:37として示す配列、SEQ ID NO:39として示す配列、SEQ ID NO:41として示す配列、SEQ ID NO:43として示す配列、SEQ ID NO:45として示す配列、SEQ ID NO:47として示す配列、SEQ ID NO:49として示す配列、SEQ ID NO:51として示す配列、SEQ ID NO:53として示す配列、あるいはSEQ ID NO:55として示す配列を含む核酸にハイブリダイズする配列を含み、その核酸は、P450活性を持ったポリペプチドをコードする。その核酸は、少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300残基長、あるいはその遺伝子又は転写体の完全長でありえる。一例として、厳格な条件下とは、65 の温度で0.2 X SSCによる約15 分間の洗浄を含む。

#### 【0022】

本発明は、P450の活性を持つポリペプチドを同定するための核酸プローブを提供する。このプローブとは、SEQ ID NO:1として示す配列、SEQ ID NO:3として示す配列、SEQ ID NO:5として示す配列、SEQ ID NO:7として示す配列、SEQ ID NO:9として示す配列、SEQ ID NO:11として示す配列、SEQ ID NO:13として示す配列、SEQ ID NO:15として示す配列、SEQ ID NO:17として示す配列、SEQ ID NO:19として示す配列、SEQ ID NO:21として示す配列、SEQ ID NO:23として示す配列、SEQ ID NO:25として示す配列、SEQ ID NO:27として示す配列、SEQ ID NO:29として示す配列、SEQ ID NO:31として示す配列、SEQ ID NO:33として示す配列、SEQ ID NO:35として示す配列、SEQ ID NO:37として示す配列、SEQ ID NO:39として示す配列、SEQ ID NO:41として示す配列、SEQ ID NO:43として示す配列、SEQ ID NO:45として示す配列、SEQ ID NO:47として示す配列、SEQ ID NO:49として示す配列、SEQ ID NO:51として示す配列、SEQ ID NO:53として示す配列、あるいはSEQ ID NO:55として示す配列を含んだ配列のうち少なくとも1、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000あるいはそれ以上の連続した塩基配列を含み、そのプローブは、結合やハイブリダイゼーションによってその核酸を同定する。そのプローブは、本発明の核酸配列、例えば、SEQ ID NO:1として示す配列、SEQ ID NO:3として示す配列、SEQ ID NO:5として示す配列、SEQ ID NO:7として示す配列、SEQ ID NO:9として示す配列、SEQ ID NO:11として示す配列、SEQ ID NO:13として示す配列、SEQ ID NO:15として示す配列、SEQ ID NO:17として示す配列、SEQ ID NO:19として示す配列、SEQ ID NO:21として示す配列、SEQ ID NO:23として示す配列、SEQ ID NO:25として示す配列、SEQ ID NO:27として示す配列、SEQ ID NO:29として示す配列、SEQ ID NO:31として示す配列、SEQ ID NO:33として示す配列、SEQ ID NO:35として示す配列、SEQ ID NO:37として示す配列、SEQ ID NO:39として示す配列、SEQ ID NO:41として示す配列、SEQ ID NO:43として示す配列、SEQ ID NO:45として示す配列、SEQ ID NO:47として示す配列、SEQ ID NO:49として示す配列、SEQ ID NO:51として示す配列、SEQ ID NO:53として示す配列、あるいはSEQ ID NO:55として示す配列、中の少なくとも

も10～50、0～60、30～70、40～80、あるいは60～100の連続した塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。

【0023】

本発明は、P450の活性を持つポリペプチドを同定するための核酸プローブを提供する。このプローブとは、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53上の少なくとも100残基にわたり50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、あるいはそれ以上の相同性を持つ核酸配列を含んだ核酸を含み、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

10

本発明は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55上の少なくとも100残基にわたり60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、あるいはそれ以上の相同性を持つ核酸配列を含んだ核酸プローブを提供し、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

本発明は、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35上の少なくとも100残基にわたり70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、あるいはそれ以上の相同性を持つ核酸配列を含んだ核酸プローブを提供し、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

【0024】

本発明は、SEQ ID NO:27上の少なくとも100残基にわたり80%、85%、90%、95%、98%、99%、あるいはそれ以上の相同性を持つ核酸配列を含んだ核酸プローブを提供し、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは可視的な検索分析により決定される。

20

本発明は、SEQ ID NO:19上の少なくとも100残基にわたり90%、95%、98%、99%、あるいはそれ以上の相同性を持つ核酸配列を含んだ核酸プローブを提供し、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

【0025】

そのプローブは、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、中の少なくとも10～50、20～60、30～70、40～80、あるいは60～100の連続した塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。

30

40

【0026】

本発明は、P450の活性を持つポリペプチドをコードした核酸を増幅するための増幅プライマー配列ペアを与える。この増幅プライマーとは、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5と

50

して示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列あるいはそのサブ配列、を含む核酸を増幅することができる。一例として、増幅プライマー配列ペアの一つあるいは各メンバーは、その配列中の少なくとも10~50の連続した塩基配列を含むオリゴヌクレオチドから成る。

10

#### 【0027】

本発明は、P450の活性を持つポリペプチドをコードした核酸を増幅する方法を提供し、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列あるいはそのサブ配列、を増幅することのできる増幅プライマー配列ペアを用いた鑄型核酸の増幅から成る。

20

30

#### 【0028】

本発明は、本発明の核酸、あるいは、厳格な条件下において、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID N

40

50

0:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列あるいはそのサブ配列、を含む核酸とハイブリダイズする核酸から成る発現カセットを与える。

【0029】

本発明は、本発明の核酸、あるいは、厳格な条件下において、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列あるいはそのサブ配列、を含む核酸とハイブリダイズする核酸から成るベクターを与える。

【0030】

本発明は、本発明のベクター、あるいは、本発明の核酸を含むクローニング媒介体を提供する。そのクローニング媒介体とは、ウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、バクテリオファージ、あるいは、人工クロモゾームを含み得る。ウイルスベクターは、アデノウイルス、レトロウイルス、あるいは、アデノウイルス関連ベクターを含み得る。クローニング媒介体には、人工バクテリアクロモゾーム(BAC)、プラスミド、バクテリオファージP1-由来ベクター(PAC)、人工酵母クロモゾーム(YAC)、あるいは人工の高等動物クロモゾーム(MAC)をも含み得る。

【0031】

本発明は、本発明のベクター、本発明のクローニング媒介体、あるいは本発明の核酸を含む形質転換細胞を与える。本発明の核酸とは、例えば、

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53上の少なくとも100残基にわたり少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55上の少なくとも100残基にわたり少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35上の少なくとも100残基にわたり少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:27上の少なくとも100残基にわたり少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:19上の少なくとも100残基にわたり少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸であり、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。

(ii) 厳格な条件下、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列

、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列あるいはそのサブ配列、を含む核酸とハイブリダイズする核酸。形質転換細胞には、バクテリア細胞、高等動物細胞、カビ細胞、酵母細胞、昆虫細胞、あるいは植物細胞が使える。

10

#### 【0032】

本発明は、本発明の核酸、あるいは本発明のベクターを含むヒト以外の形質変換動物を与える。一例として、その動物は、マウスである。

20

本発明は、本発明の核酸あるいは本発明のベクターを含む形質変換植物を与える。その形質変換植物とは、トウモロコシ、トマト、コムギ、油種、大豆、あるいはタバコ等の植物である。

本発明は、本発明の核酸、あるいは本発明のベクターを含む形質変換種子を与える。その形質変換種子とは、トウモロコシ、コムギ、油種、ナタネ、大豆、ヤシ、ヒマワリ、ゴマ、ピーナッツ、あるいはタバコ等の種子である。

#### 【0033】

本発明は、厳格な条件下、本発明の核酸と相補的な核酸配列、あるいはハイブリダイズできるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明の核酸とは、例えば、

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53上の少なくとも100残基にわたり少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55上の少なくとも100残基にわたり少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35上の少なくとも100残基にわたり少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:27上の少なくとも100残基にわたり少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸、SEQ ID NO:19上の少なくとも100残基にわたり少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸であり、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。又は、

30

40

(ii) 厳格な条件下、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33とし

50

て示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列、を含む核酸とハイブリダイズする核酸。

一例として、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、10~50、20~60、30~70、40~80、あるいは60~100塩基長であり得る。

【0034】

本発明は、本発明の核酸と相補的であるか、あるいは、厳格な条件下にハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与、あるいは、細胞中で発現させることによりP450メッセージの翻訳を阻害する方法を与える。

本発明は、以下のポリペプチドを含む単離あるいは組換えポリペプチドを提供する。

(a) SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、あるいはSEQ ID NO:54上の少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、またはそれ以上の残基にわたり少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、またはそれ以上の同等性を持つアミノ酸配列を含むポリペプチド；SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、あるいはSEQ ID NO:56上の少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、またはそれ以上の残基にわたり少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、またはそれ以上の同等性を持つアミノ酸配列を含むポリペプチド；SEQ ID NO:28上の少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、またはそれ以上の残基にわたり少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%、またはそれ以上の同等性を持つアミノ酸配列を含むポリペプチド；あるいは、SEQ ID NO:20上の少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、またはそれ以上の残基にわたり少なくとも90%、95%、98%、99%、またはそれ以上の同等性を持つアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は、

(b) 本発明の核酸によりコードされたポリペプチド、例えば、以下のような核酸：

(i) SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、あるいはSEQ ID NO:53上の少なくとも100残基にわたり少なくとも50%の配列同等性を持つ核酸配列；SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、あるいはSEQ ID NO:55上の少なくとも100残基にわたり少なくとも60%の配列同等性を持つ核酸配列；SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、あるいはSEQ ID NO:35上の少なくとも100残基にわたり少なくとも70%の配列同等性を持つ核酸配列；SEQ ID NO:27上の少なくとも100残基にわたり少なくとも80%の配列同等性を持つ核酸配列、あるいはSEQ ID NO:19上の少なくとも100残基にわたり少なくとも90%の配列同等性を持つ核酸配列であり、その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定される。あるいは、

(ii) 厳格な条件下、SEQ ID NO:1として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:11として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:13として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:15として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:17として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:19として示す配列あるいは

はそのサブ配列、SEQ ID NO:21として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:23として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:25として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:27として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:29として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:31として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:33として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:35として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:37として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:39として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:41として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:43として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:45として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:47として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:51として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:53として示す配列あるいはそのサブ配列、SEQ ID NO:55として示す配列あるいはそのサブ配列、を含む核酸とハイブリダイズする核酸。本発明は、P450の活性を持つ単離あるいは組換えポリペプチドを提供する。

**【0035】**

本発明は、SEQ ID NO:2として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:4として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:6として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:8として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:10として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:12として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:14として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:16として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:18として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:20として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:22として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:24として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:26として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:28として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:30として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:32として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:34として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:36として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:38として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:40として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:42として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:44として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:46として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:48として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:50として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:52として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:54として示すアミノ酸配列、SEQ ID NO:56として示すアミノ酸配列、あるいはそれに関するサブ配列、を含む単離あるいは組換えポリペプチドを提供する。

**【0036】**

一例として、P450の活性は、モノオキシゲネーション反応を触媒する。P450の活性は、酸素の基質への取り込みの触媒反応を含み得る。一例として、P450の活性は、脂肪族、あるいは芳香族炭素の水酸化をも含むことができる。別の例として、P450の活性は、エポキシ化を含み得る。更に他の例として、P450の活性は、N-、O-、あるいはS-脱アルキル化を含み得る。一例として、P450の活性は、脱ハロゲン化を含み得る。別の例として、P450の活性は、酸化的脱アミド化を含み得る。別の例として、P450の活性は、N-酸化あるいはN-水酸化を含み得る。一例として、P450の活性は、スルホキシドの形成を含み得る。

**【0037】**

本発明は、単離、あるいは組換えポリペプチドを提供し、その中のエポキシダーゼ活性は、更に、アルケンを基質にできる。一例として、エポキシダーゼ活性は、キラル産物の産生を含み得る。一例として、エポキシダーゼ活性は、光学選択的である。

本発明は、単離、あるいは組換えポリペプチドを提供し、その中のP450活性は熱に安定である。そのポリペプチドは、37~70 の範囲の温度条件下でP450活性を保持できる。他の例として、P450の活性は耐熱性である。そのポリペプチドは、37 以上おおよそ90 までの範囲あるいは37 以上おおよそ50 までの範囲の温度に曝された後でもP450活性を保持できる。

**【0038】**

本発明は、シグナル配列を欠いた本発明のポリペプチドを含んだ単離、あるいは組換えポリペプチドを提供する。

本発明は、単離、あるいは組換えポリペプチドを提供し、その中のP450活性は、37 において100~1200ユニット/mgタンパクの比活性を持つ。一例として、P450活性は、500~1000ユニット/mgタンパクの比活性を持つ。他の例として、P450活性は、37 において

500~700ユニット/mgタンパクの比活性を持つ。一例として、P450活性は、37 で750~1000ユニット/mgタンパクの比活性を持つ。

【0039】

一例として、耐熱性とは、P450の37 における比活性が上昇させた温度において加熱した後、少なくとも半分保持されることを含み得る。他の例として、耐熱性とは、37 における比活性が上昇させた温度において加熱した後でも500~1200ユニット/mgタンパクの範囲で保持できることを含む。

一例として、本発明のポリペプチドとは、少なくとも一つのグリコシレーション部位を含む。一例として、グリコシレーションは、N-グリコシレーションであり得る。一例として、P450は、*P. pastoris*、あるいは*S. pombe*で発現させた後でグリコシレーションを受ける。

10

【0040】

一例として、そのポリペプチドは、pH 4.5、あるいはpH 5を含む条件下においてP450活性を保持できる。別例として、そのポリペプチドは、pH 9、pH 9.5、あるいはpH 10を含む条件下においてP450活性を保持できる。

本発明は、本発明のポリペプチドを含むタンパク画分を提供し、そのタンパク画分は、液体、固体、あるいはゲルを含む。

本発明は、クレーム73に示したポリペプチド及びある第二番目のドメインから成るヘテロダイマーを与える。一例として、その第二番目のドメインとは、ポリペプチドであり、ヘテロダイマーは融合タンパクである。第二番目のドメインは、エピトープ(決定基)、あるいはタグでもあり得る。

20

【0041】

本発明は、P450活性を持つ固定化ポリペプチドを提供し、そのポリペプチドは、本発明のポリペプチド、本発明の核酸によりコードされたポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチド及び第二番目のドメインから成るポリペプチドを含んでいる。そのポリペプチドは、細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、グラファイト粒子、ビーズ、ゲル、プレート、アレー、あるいはキャピラリー管に固定化することができる。

本発明は、本発明の固定化ポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチドを含むポリペプチドと第二番目のドメインから成るポリペプチドを含むアレーを提供する。本発明のアレーは、固定化した本発明の核酸を含むアレーを提供する。本発明のアレーは、本発明の抗体を含むアレーを提供する。

30

【0042】

本発明は、本発明のポリペプチドあるいは本発明の核酸によってコードされたポリペプチドと特異的に結合する単離あるいは組換え抗体を提供する。その抗体は、モノクローナル、あるいはポリクローナルでもよい。

本発明は、本発明の抗体、例えば、本発明のポリペプチド、あるいは本発明の核酸によってコードされたポリペプチドと特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを与える。

【0043】

本発明は、P450活性を持つポリペプチドの単離、あるいは同定法を提供する。その方法は、次のステップから成る：

40

P450活性を持ったポリペプチドの単離、あるいは同定は、

- (a) 本発明の抗体を与える；
- (b) ポリペプチドを含むサンプルを与える；そして、
- (c) 抗体が、そのポリペプチドと特異的に結合する条件下、ステップ(a)の抗体とステップ(b)のサンプルを接触させる。

のステップにより行う。

本発明は、抗P450ポリペプチドの作製法を提供する。ヒト以外の動物に免疫応答が十分な量の本発明の核酸、あるいは本発明のポリペプチドを投与により抗P450ポリペプチド抗体を作製する。

50

## 【0044】

本発明は、次のステップから成る組換えポリペプチドの産生法を提供する：

- (a) 本発明の核酸を与える。動作可能的にプロモーターに結合させる；及び
- (b) ステップ(a)の核酸を、そのポリペプチドが発現されるような条件下において発現させる。

一例として、本法は、更に、ステップ(a)の核酸を含む宿主細胞をステップ(a)の核酸を発現させた後にトランスフォームすることを含む。それにより、トランスフォームした細胞において組換えポリペプチドを産生する。

## 【0045】

本発明は、次のステップから成るP450活性を持つポリペプチドの同定法を提供する：

- (a) 本発明のポリペプチド、あるいは本発明の核酸によりコードされるポリペプチドを与える；
  - (b) P450基質を与える；そして、
  - (c) このステップ(b)の基質とステップ(a)ポリペプチド、あるいはフラグメントあるいは変種を接触させ、基質量の減少、あるいは反応産物量の増加を測定する。
- その基質量の減少、あるいは反応産物量の増加によってP450活性を持つポリペプチドが検出される。一例として、基質はアルケンである。

10

## 【0046】

本発明は、次のステップから成るP450基質の同定法を提供する：

- (a) 本発明のポリペプチド、あるいは本発明の核酸によりコードされるポリペプチドを与える；
- (b) 試験基質を与える；そして、
- (c) ステップ(b)の試験基質とステップ(a)のポリペプチドを接触させ、基質量の減少、あるいは反応産物量の増加を測定する。その基質量の減少、あるいは反応産物量の増加によってP450基質として試験基質が同定される。

20

## 【0047】

本発明は、試験化合物が特異的にポリペプチドと結合するかを測定する次のステップから成る方法を提供する：

- (a) 核酸、あるいはその核酸を含むベクターをその核酸がポリペプチドに変換される条件において発現させる。その中の核酸は、本発明の核酸、あるいは本発明のポリペプチドを提供する核酸を含んでいる；
- (b) 試験化合物を与える；
- (c) 試験化合物とポリペプチドを接触させる；そして、
- (d) ステップ(b)の試験化合物が特異的にポリペプチドと結合するかを測定する。

30

## 【0048】

本発明は、次のステップから成るP450活性の調節因子の同定法を提供する：

- (a) 本発明のポリペプチド、あるいは本発明の核酸によりコードされるポリペプチドを提供する；
- (b) 試験化合物を提供する；
- (c) ステップ(b)の試験化合物とステップ(a)のポリペプチドを接触させてP450活性を測定する。試験化合物存在下及び非存在下で測定したP450活性の差異により、試験化合物がP450活性を調節したかを判別する。

40

一例として、P450活性は、P450基質を用いて、その基質量の減少あるいは反応産物量の増加、あるいは基質量の増加又は反応産物量の減少を見ることにより測定することができる。試験化合物存在下及び非存在下でその基質量の減少、あるいは反応産物量の増加を調べることにより、試験化合物がP450活性の活性化因子であるか同定する。試験化合物存在下及び非存在下でその基質量の増加、あるいは反応産物量の減少を調べることにより、試験化合物がP450活性の阻害因子であるか同定する。

## 【0049】

本発明は、処理機やデータ保存装置より成るコンピューターシステムを提供し、本発明

50

におけるポリペプチド、又はその一部の配列を含むポリペプチドや、本発明における核酸を含む核酸の配列は、これらのデータ保存装置に保存される。一例として、これらのコンピュータシステムは、更に、配列比較アルゴリズムを含み、データ保存装置には、少なくとも一つの対照配列保存されている。一例として、配列比較アルゴリズムは、多型性を解析するコンピュータプログラムを含んでいる。他の一例として、これらのコンピュータシステムは、与えられた配列において、一つ、あるいはそれ以上の特性を同定できる同定機能をも含んでいる。

【0050】

本発明は、コンピュータによる読み込みが可能な媒体を含んでおり、これらの媒体には、本発明におけるポリペプチド、又はその一部の配列を含むポリペプチドや、本発明における核酸を含む核酸の配列の情報が保存されている。

10

【0051】

本発明は、配列上の特徴を同定するための方法を提供しており、それは、以下のステップを含んでいる：

(a) 配列上の特徴を同定するためのコンピュータプログラムを使用した本発明におけるポリペプチド、又はその一部の配列を含むポリペプチドや本発明における核酸を含む核酸の配列を読み込むこと；そして、

(b) そのコンピュータプログラムによって、一つ、あるいはそれ以上の配列上の特性を解析すること。

【0052】

本発明は、第一の配列と、第二の配列との比較法を提供しており、それは、以下のステップを含んでいる：

(a) 第一の配列と第二の配列の配列上の特徴を同定するためのプログラムを有するコンピュータへ読み込む。この第一の配列とは、本発明におけるポリペプチド、又はその一部の配列を含むポリペプチドや本発明における核酸を含む核酸の配列である；

(b) コンピュータプログラムによる、第一の配列と第二の配列との比較解析を行う。一例として、第一の配列と第二の配列との比較解析には、それらの多型性解析のステップも含まれる。一例として、これらの方法には、与えられた配列における、一つ、あるいはそれ以上の配列上の特性の同定も含まれる。他の一例として、これらの方法には、コンピュータプログラムによる、第一の配列の読み込み、及びその配列中の一つ、あるいはそれ以上の配列上の特性の同定も含まれる。

20

30

【0053】

本発明は、環境サンプルからP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸の単離法、あるいは回収法を提供する。それは、次のステップから成る：

(a) P450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を増幅するための増幅プライマー配列ペアを与える。そのプライマーペアは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、あるいはそれらのサブ配列を増幅することができる。

40

(b) その環境サンプルから核酸を単離するか、あるいは、その環境サンプルをそのサンプル中の核酸が増幅プライマーペアにハイブリダイゼーションするよう処理する；そして、

(c) ステップ(b)の核酸とステップ(a)の増幅プライマーペアを混合し、環境サンプルから核酸を増幅する。

これにより、環境サンプルからP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を単離あるいは回収法する。一例として、増幅プライマーペアは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、あるいはそれらのサブ配列を増幅することができる。

50

7、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55として示される配列、あるいはそれらのサブ配列中の少なくとも10~50連続塩基配列を含むオリゴヌクレオチドから成る。

【0054】

本発明は、環境サンプルからP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸の単離法、あるいは回収法を提供する。それは、次のステップから成る：

(a) 本発明のポリペプチド、あるいはそのサブ配列を含むポリヌクレオチドプローブを与える；

(b) その環境サンプルから核酸を単離するか、あるいはその環境サンプルをそのサンプル中の核酸がステップ(a)のポリヌクレオチドプローブにハイブリダイゼーションするよう処理する；

(c) 単離した核酸、あるいはステップ(b)の処理を施した環境サンプルとステップ(a)のポリヌクレオチドプローブを混合する；そして、

(d) ステップ(a)のポリヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイズする核酸を単離する。

これにより、環境サンプルからP450活性を持つポリペプチドをコードした核酸を単離、あるいは回収法する。環境サンプルは、水、液体、土壌、空気、あるいは生物学的なサンプルでもあり得る。生物学的サンプルとは、バクテリア、原生動物、昆虫、酵母、植物、カビ、あるいは高等動物等の細胞に由来することができる。

【0055】

本発明は、P450活性を持つポリペプチドをコードした核酸の変種を作製する方法を提供する。その方法は次のステップから成る：

(a) 本発明の核酸含む鋳型核酸を与える；そして、

(b) 鋳型配列において、一つ、あるいはそれ以上のヌクレオチドを修飾、削除、あるいは挿入するか、あるいはそれらの組み合わせにより鋳型核酸の変種を作製する。

一例として、この方法は、更に、変種P450ポリペプチドを発現することを含める。一例として、その修飾、挿入、あるいは削除は、エラープローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド指向変異法、アセンブリーPCR、セクシュアルPCR変異法、インビトロ変異法、カセット変異法、部位特異的変異法、遺伝子再集合、再帰的アンサンプル変異法、指数的アンサンプル変異法、遺伝子飽和部位変異法(GSSM)、合成結合再集合(SLR)及びそれらの組み合わせなどの方法により導入することができる。他の例として、その修飾、挿入あるいは削除は、再組換え、再帰的な配列再組換え、フォスフォチオエイトDNA変異法、ウラシル含有テンプレート変異法、ギャップデュプレックス変異法、ポイントミスマッチリペア変異法、リペア欠損宿主変異法、化学変異法、放射線変異法、デリーション変異法、リストラクション/セレクション変異法、リストラクション/ピュリフィケーション変異法、人工遺伝子合成、アンサンプル変異法、キメラ遺伝子重合体の創製及び/又はそれらと他の方法の組み合わせ等の方法によって導入される。

【0056】

一例として、本法は、産生される鋳型核酸によりコードされるポリペプチドに比べて、P450が変化、あるいは異なる活性を持つまで、又は、変化、あるいは異なる安定性を持つまで繰り返すことができる。一例として、変種P450ポリペプチドは、耐熱性であり、上昇した温度に曝された後でもいくらかの活性を保持できる。他の例として、変種P450ポリペプチドは、鋳型核酸によりコードされたP450よりもグリコシレーションの度合いが高い。一例として、変種P450ポリペプチドは、ある高温条件においてもP450活性を保持するが、鋳型核酸によりコードされるP450は、その高温以下の条件でも活性を持ってない。一例として、本法は、産生される鋳型核酸に比べて、P450をコードする配列が変化したコドンを持つまで繰り返すことができる。他の例として、本法は、産生される鋳型核酸に比べて、P450遺伝子がより高いか低いメッセージの発現又は安定性を持てるまで繰り返すことができる。

## 【0057】

本発明は、宿主における発現を増加させるためにP450活性を持つポリペプチドをコードする核酸のコドン修飾する方法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

(a) 本発明の核酸含むP450活性を持つポリペプチドをコードする核酸を与える；そして、

(b) ステップ(a)の核酸における好ましくないか、あるいはあまり好ましくないコドンを同定し、それを同じアミノ酸をコードする好ましい、あるいは天然に使われているコドンを置換コドンとして置き換える。その好ましいコドンは、宿主の遺伝子にコードされている配列に過剰表示されるコドンであり、好ましくないか、あるいはあまり好ましくないコドンは、宿主の遺伝子にコードされている配列に過小表示されるコドンである。

これにより、宿主における発現を増加させるための核酸の修飾がなされる。

## 【0058】

本発明は、P450ポリペプチドをコードする核酸におけるコドン修飾する方法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

(a) 本発明の核酸含むP450活性を持つポリペプチドをコードする核酸を与える；そして、

(b) ステップ(a)の核酸におけるあるコドンを同定し、それを同じアミノ酸をコードする異なるコドンを置換コドンとして置き換える。これにより、P450をコードする核酸におけるコドン修飾する。

## 【0059】

本発明は、宿主における発現を増加させるためにP450ポリペプチドをコードする核酸におけるコドン修飾する方法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

(a) 本発明の核酸含むP450ポリペプチドをコードする核酸を与える；そして、

(b) ステップ(a)の核酸における好ましくないか、あるいはあまり好ましくないコドンを同定し、それを同じアミノ酸をコードする好ましい、あるいは天然に使われているコドンを置換コドンとして置き換える。その好ましいコドンは、宿主の遺伝子にコードされている配列に過剰表示されるコドンであり、好ましくないか、あるいはあまり好ましくないコドンは、宿主の遺伝子にコードされている配列に過小表示されるコドンである。

これにより、宿主における発現を増加させるための核酸の修飾がなされる。

## 【0060】

本発明は、宿主における発現を減少させるためにP450活性を持つポリペプチドをコードする核酸におけるコドン修飾する方法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

(a) 本発明の核酸含むP450活性を持つポリペプチドをコードする核酸を与える；そして、

(b) ステップ(a)の核酸における少なくとも一つの好ましいコドンを同定し、それを同じアミノ酸をコードする好ましくないか、あるいはあまり好ましくないコドンを置換コドンとして置き換える。その好ましいコドンは、宿主の遺伝子にコードされている配列に過剰表示されるコドンであり、好ましくないか、あるいはあまり好ましくないコドンは、宿主の遺伝子にコードされている配列に過小表示されるコドンである。これにより、宿主における発現を減少させるための核酸の修飾がなされる。宿主細胞には、バクテリア、カビ、昆虫、酵母、植物、あるいは高等動物等の細胞を使える。

## 【0061】

本発明は、多数の修飾P450の活性部位、あるいは基質結合部位をコードする核酸ライブラリーを作製する方法を提供する。そのP450の活性部位、あるいは基質結合部位は、初期のP450の活性部位、あるいは基質結合部位配列を含む初期核酸に由来する。その方法は、以下のステップから成る：

(a) 初期のP450の活性部位、あるいは基質結合部位をコードする初期核酸を与える。

その初期核酸とは、厳格な条件下で、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ I

D NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、あるいはそのサブ配列として示される配列にハイブリダイズする配列を含み、その核酸は、P450の活性部位、あるいは基質結合部位をコードしている；

(b) 初期核酸における多数の標的コドンに天然に存在するアミノ酸変種の並びをコードした一群の変異オリゴヌクレオチドを与える；そして、

(c) 変異させた各アミノ酸コドンでアミノ酸変種の並びを持つ一群の活性部位、あるいは基質結合部位をコードする変異核酸を作製するためにその一群の変異オリゴヌクレオチドを利用する。それにより、修飾された多数のP450の活性部位、あるいは基質結合部位をコードする核酸ライブラリーが作製される。

一例として、この方法は、ステップ(a)の初期核酸を至適化指向システムによって変異させることを含み得る。他の例として、本法は、ステップ(a)の初期核酸を遺伝子飽和部位変異法(GSSM)、合成結合再集合(SLR)、エラーブローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド指向変異法、アセンブリーPCR、セクシュアルPCR変異法、インビトロ変異法、カセット変異法、部位特異的変異法、遺伝子再集合、再帰的アンサンブル変異法、指数的アンサンブル変異法、及びそれらの組み合わせ等の方法により変異させることを含み得る。一例として、本法は、ステップ(a)の初期核酸、あるいは変種をリコンビネーション、再帰的な配列リコンビネーション、フォスフォチオエイトDNA変異法、ウラシル含有テンプレート変異法、ギャップデュプレックス変異法、ポイントミスマッチリペアー変異法、リペアー欠損宿主変異法、化学変異法、放射線変異法、デリーション変異法、リストラクシオン/セレクション変異法、リストラクシオン/ピューリフィケーション変異法、人工遺伝子合成、アンサンブル変異法、キメラ遺伝子重合体の創製及び/あるいはそれらの組み合わせ等の方法によって変異させることを含み得る。

#### 【0062】

本発明は、次のステップから成る小分子を作る方法を提供する：

(a) 小分子を合成、あるいは修飾することのできる多数の生合成酵素を与える。その一つは、本発明の核酸を含む核酸によりコードされたP450を含む；

(b) ステップ(a)の酵素の少なくとも一つに対する基質を与える；そして、

(c) ステップ(b)の基質とその酵素を、小分子を生成する一連の生体触媒酵素による多数の生体触媒反応が容易に起こる条件下で反応させる。

#### 【0063】

本発明は、次のステップから成る小分子を修飾する方法を提供する：

(a) P450酵素を与える。この酵素は、本発明のポリペプチド含むか、あるいは、本発明の核酸によりコードされている；

(b) ある小分子を与える；そして、

(c) ステップ(a)の酵素とステップ(b)の小分子を、P450酵素により触媒される酵素反応が容易に起こる条件下で反応させ、それによって、P450の酵素反応により小分子が修飾される。

本法には、ステップ(a)の酵素に対する小分子基質が多数含まれ得る。それにより、P450酵素が触媒する少なくとも一つの酵素触媒反応によって修飾された小分子のライブラリーが作製される。他の例として、本法は、更に、多数の生体触媒反応を容易にする条件下、多数の酵素反応により作製される修飾小分子ライブラリーを作るための付加的な酵素をも多数含む。別例として、本法は、更に、ライブラリー中に好ましい活性を持つ特別な修飾小分子が存在するか、そのライブラリーを調べるステップをも含み得る。ライブラリーを調べるステップとは、修飾小分子の一部について、好ましい活性を持つ特別な小分子の存否を調べることにより、ライブラリー中に存在する多数の修飾小分子のうちの一部を作るために使われる生体触媒反応の一つを除く全てを系統的に取り除くステップ及び好ましい活性を持つ特別な修飾小分子を作り出す少なくとも一つの特別な生体触媒反応を同定するステップをも含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0064】

本発明は、P450酵素の機能断片を決定する方法を提供する。それは、以下のステップから成る：

- (a) P450酵素を与える。その酵素は、本発明のポリペプチドを含むか、あるいは本発明の核酸によりコードされている；及び
- (b) ステップ(a)の配列から多数のアミノ酸残基を削除し、残存する配列についてP450活性を調べる。それによりP450酵素の機能断片を決定する。  
一例として、P450活性は、P450基質を与え、基質量の減少、あるいは反応産物量の増加を検出することにより測定することができる。

## 【0065】

本発明は、代謝流量実時間分析を利用した新規、あるいは修飾表現型の全細胞エンジニアリングの方法を提供する。その方法は、次のステップから成る：

- (a) 細胞の遺伝的な組成を修飾することにより修飾細胞を作成する。その遺伝的組成は、本発明の核酸をその細胞に付加することにより修飾される；
- (b) その修飾された細胞を培養し多数の修飾細胞を作成する；
- (c) 即時に、ステップ(b)の細胞培養をモニターすることにより、少なくとも一つの代謝パラメーターを測定する；及び、
- (d) そのパラメーターが、同様の条件で非修飾細胞における比較可能な測定と異なるかを調べるためにステップ(c)のデータを分析する。それにより代謝流量実時間分析を利用してその細胞におけるエンジニアされた表現型を同定する。一例として、その細胞の遺伝的組成は、その細胞における配列の削除、あるいは配列の修飾から成る方法、あるいは遺伝子の発現をロックアウトすることにより修飾することができる。一例として、本方法は、新しくエンジニアされた表現型を含む細胞を選別することも含めることができる。一例として、本方法は選別した細胞を培養することも含んでおり、それにより、新しいエンジニアされた表現型を含む新しい細胞株が作成される。

## 【0066】

本発明は、アルケンのオキシゲナーゼのための方法を提供する。その方法は次のステップから成る：

- (a) P450活性を持つポリペプチドを与える。そのポリペプチドは、本発明のポリペプチド、あるいは本発明の核酸によりコードされたポリペプチドを含む；
- (b) アルケンを含む組成を与える；そして
- (c) そのポリペプチドがオキシゲナーゼとしてアルケンに作用する条件において、ステップ(a)のポリペプチドをステップ(b)の組成と接触させる。

## 【0067】

本発明は、好ましい鏡像性を持つ化合物を産生するための方法を提供する。その方法は次のステップから成る：

- (a) 鏡像選択的なP450活性を持つポリペプチドを与える。このポリペプチドは、本発明のポリペプチド、あるいは本発明の核酸によりコードされたポリペプチドを含む；
- (b) P450基質を含む組成を与える；
- (c) ステップ(a)のポリペプチドをステップ(b)のP450基質とそのポリペプチドがP450酵素基質をキラルなエポキシドに変換触媒する条件において接触させる；そして、
- (d) そのキラルエポキシドをキラル化合物へ変換する。

一例として、キラル化合物は、ジオール、アミノアルコール、ハロヒドリン、あるいは分枝アルキル残基を含む。

## 【0068】

本発明は、P450ポリペプチドの耐熱性、あるいは熱安定性を上昇させる方法、P450ポリペプチドに糖鎖を付加する(グリコシレーション)方法を提供する。そのポリペプチドは、本発明のポリペプチド中の少なくとも30の連続したアミノ酸配列を含むか、本発明のポリペプチドによりコードされるポリペプチドを含む。それにより、P450ポリペプチドの耐熱性、あるいは熱安定性を上昇させる。一例として、P450酵素の比活性は、37~90 の温

10

20

30

40

50

度範囲において耐熱性、あるいは熱安定性である。

本発明は、組換えP450ポリペプチドを細胞中において過剰発現させる方法を提供する。これには、ベクター、核酸、本発明の核酸の少なくとも100残基の範囲にわたり少なくとも50%配列同等性を持つ核酸が含まれる。その配列同等性は、配列比較アルゴリズム、あるいは視覚的な検索分析により決定され、過剰発現は、高活性のプロモーター、ジシストロンベクター、あるいはベクターの遺伝子増幅等を使用することにより影響される。

【0069】

本発明は、P450をコードする核酸を含む細胞を選択する増殖ベースの方法を提供する。その方法は、次のステップから成る：

- (a) ポリペプチドをコードする多数の核酸を与える；
  - (b) 前駆体、あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、P450により細胞の増殖に必要な組成変換されることができ、その必要とされる組成は、細胞の増殖を誘導するエポキシドから成るはずである；
  - (c) エポキシドを欠いている培地において細胞を増殖させ、ステップ(b)の前駆体、あるいは基質を加える；そして、
  - (d) 細胞の増殖をスクリーニングする。増殖中の細胞は、その前駆体、あるいは基質をエポキシドを含む組成に変換することのできるP450をコードした核酸を含む刺激クローンとして同定され、それにより、P450をコードした核酸を含む細胞を選択する。
- 一例として、前駆体、あるいは基質は、アルケンを含む。

10

【0070】

本発明は、P450をコードする核酸を選択する増殖ベースの方法を提供する。その方法は、次のステップから成る：

- (a) ポリペプチドをコードする核酸を与える；
  - (b) 前駆体あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、P450により細胞の増殖に必要な組成に変換されることができ、その必要とされる組成は、細胞の増殖を誘導するエポキシドから成るはずである；
  - (c) 多数の細胞を与える。その細胞は、ステップ(b)の組成を作れない；
  - (d) その核酸を細胞に組み込み、その核酸が発現し、かつ、そのコードするポリペプチドが翻訳される条件下でその細胞を増殖させる。その細胞を、増殖に必要なエポキシドを含む組成を欠いた培地中で培養し、ステップ(b)の前駆体、あるいは基質を加える；そして、
  - (e) 細胞の増殖をスクリーニングする。この中の核酸は、その前駆体、あるいは基質をエポキシドを含む組成に変換することのできるP450をコードした核酸を含む刺激されたクローンとして同定され、それにより、P450をコードした核酸を選択する。
- 一例として、前駆体、あるいは基質は、アルケンを含む。

20

30

【0071】

本発明は、P450をコードする核酸を同定する方法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

- (a) 核酸ライブラリー、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含むライブラリーを与える；
- (b) 前駆体、あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、P450により細胞の増殖に必要な組成に変換されることができ、その必要とされる組成は、細胞の増殖を誘導するエポキシドから成るはずである；
- (c) 多数の細胞を与える。その細胞は、ステップ(b)の組成を作れない；
- (d) 遺伝子ライブラリーを細胞に導入し、その細胞を、増殖に必要なエポキシドを含む組成を欠いた培地中で培養する；
- (e) ステップ(b)の前駆体、あるいは基質をその培養に加える；
- (f) 増殖している細胞を選別し、ステップ(d)のライブラリーのメンバー(クローン)を同定する。その細胞は、その前駆体をエポキシドを含む組成に酵素的に変換することのできる、その酵素は、そのライブラリーメンバーによりコードされている。これにより、P450を

40

50

コードした核酸を同定する。

一例として、前駆体、あるいは基質は、アルケンを含む。

【0072】

本発明は、P450をコードする核酸を含む細胞を選択する増殖ベースの方法を提供する。その方法は、次のステップから成る：

(a) エポキシヒドロラーゼを含む多数の細胞を与える。その細胞は、増殖に必要な組成を欠いている；

(b) 前駆体、あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、P450によりエポキシドに変換されることができ、そのエポキシドは、エポキシヒドロラーゼにより細胞の増殖に必要な組成に変換されることができる；

(c) エポキシド、あるいは増殖に必要な組成を欠いている培地において細胞を増殖させ、ステップ(b)の前駆体、あるいは基質を加える；そして、

(d) 細胞の増殖をスクリーニングする。この中の増殖中の細胞は、その前駆体あるいは基質をエポキシドに変換することのできるP450をコードした核酸を含む刺激クローンとして同定され、それにより、エポキシダーゼ活性を持つP450酵素をコードした核酸を含む細胞を選択する。

一例として、前駆体、あるいは基質は、アルケンを含む。

【0073】

本発明は、P450酵素をコードする核酸を選択する増殖ベースの方法を提供する。その方法は、次のステップから成る：

(a) ポリペプチドをコードする核酸、例えば、本発明のポリヌクレオチド、を与える；

(b) 前駆体、あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、P450によりエポキシドに変換されることができ、そのエポキシドは、エポキシヒドロラーゼにより増殖に必要な組成に変換されることができる；

(c) エポキシヒドロラーゼを含む多数の細胞を与える。その細胞は、ステップ(b)の組成を作れない；

(d) その核酸を細胞に挿入し、その核酸が発現し、かつ、それがコードするポリペプチドに翻訳される条件下でその細胞を増殖させる。その細胞を、増殖に必要なエポキシドを含む組成を欠いた培地中に培養し、ステップ(c)の基質を加える；そして、

(e) 細胞の増殖をスクリーニングする。この中の核酸は、その前駆体、あるいは基質をエポキシドを含む組成に変換することのできるP450をコードした核酸を含む刺激クローンとして同定され、それにより、エポキシダーゼ活性を持つP450をコードした核酸を選択する。

【0074】

一例として、前駆体、あるいは基質はアルケンを含む。一例として、前駆体、あるいは基質は、アリルアルコール、3、3-ジメチルアクリレート、あるいはトランス-3-メチル-2-ペンテノエートを含む。一例として、その核酸は、遺伝子ライブラリーの構成メンバーであり得る。ライブラリーは、混合した複数の生物体から得ることができる。一例として、混合した複数の生物体は、土壌、水、あるいは空気サンプルに由来することができる。一例として、その細胞は、Xynthobacter 株Py2である。

【0075】

本発明は、P450活性を持つポリペプチドのためのスクリーニングに使われる直接定量法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

(a) ポリペプチド、例えば、本発明のポリペプチドを与える；

(b) 前駆体、あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、エポキシダーゼによりエポキシドへ変換されることができる；

(c) ステップ(a)のポリペプチドを、ステップ(b)の前駆体、あるいは基質と、そのポリペプチドが前駆体、あるいは基質をエポキシドに変換される条件の下に混合する；

(d) 前駆体、あるいは基質及びそのエポキシドの分光学的性質を測定する；そして、

(e) エポキシダーゼ活性を指標にポリペプチドをスクリーニングする。そのポリペプチ

10

20

30

40

50

ドは、前駆体、あるいは基質をエポキシドに変換できるものとして同定される。前駆体、あるいは基質がエポキシドへ変換される時の分光学的性質の修飾により検出される。それにより、P450活性を持つポリペプチドが選別される。

一例として、その分光学的性質は蛍光である。一例として、そのポリペプチドは、前駆体、あるいは基質をエポキシドに変換できるエポキシダーゼ活性を持つものとして同定される。その前駆体は黄色、エポキシドは青色の蛍光活性を持ち、変換の程度は、前駆体がエポキシドに変換される時の青色蛍光の黄色蛍光に対する比を測定することによって測定される。

#### 【0076】

本発明は、P450活性を持つポリペプチド、例えば、本発明によるポリペプチドのためのスクリーニングに使われる直接定量法を提供する。その方法は、以下のステップから成る：

- (a) 多数のポリペプチドを与える；
- (b) ウンベリフェロンに共有結合した前駆体、あるいは基質を与える。その前駆体、あるいは基質は、P450によりエポキシドへ変換されることができ；
- (c) ステップ(a)のポリペプチドを、ステップ(b)の前駆体、あるいは基質と、そのポリペプチドが前駆体、あるいは基質をウンベリフェロンに結合したエポキシドに変換できる条件の下に混合する；
- (d) ステップ(c)ウンベリフェロンに結合したエポキシドをウンベリフェロンに変換する；
- (e) 蛍光の収量を測定する；そして、
- (f) P450活性を指標にポリペプチドをスクリーニングする。そのポリペプチドは、前駆体、あるいは基質をエポキシドに変換できるP450活性を持つものとして同定される。ウンベリフェロンの形成による蛍光の収量の増加により検出される。それにより、P450活性を持つポリペプチドが選別される。

一例として、ウンベリフェロンに結合したエポキシドのウンベリフェロンへの変換は、更に、次のステップを含む：

- (a) エポキシヒドロラーゼ活性を持つポリペプチドを与える；
- (b) ウンベリフェロンに結合したエポキシドとステップ(a)のポリペプチドを、ステップ(a)のポリペプチドがウンベリフェロンに結合したエポキシドをウンベリフェロンに結合した隣位のジオールに変換できる条件において混合する；
- (c) ステップ(b)のウンベリフェロンに結合した隣位のジオールについて過ヨウ素酸酸化を行い、ウンベリフェロンに結合したアルデヒドを形成させる；
- (d) ステップ(c)のアルデヒドについて、BSA-触媒-脱離反応を行い、ウンベリフェロンを形成させる。

#### 【0077】

図表の説明

図1は、不斉化学的酸化についての概略を示す。

図2は、酸化酵素による酸化反応の例を描写している。

図3は、エポキシドの合成利用について描写している。

図4は、コンピューターシステムのブロックダイアグラムを示す。

図5は、新規配列とデータベースの配列間の相同性を調べるために、新規核酸あるいはタンパクの配列を配列データベースと比較する過程の一例を描写するフローダイアグラムを示す。

図6は、二配列間に相同性があるかを調べるためのコンピューター処理の過程を描写するフローダイアグラムを示す。

図7は、ある配列に関する特徴の存在を検出するための同定プロセス300の過程を描写するフローダイアグラムを示す。

図8は、有用な小分子エポキシド及びそれらの医薬合成における応用について描写している。

10

20

30

40

50

図 9 は、抗ガン及び抗HIV薬の合成におけるエポキシドの使用について描写している。

図 10 は、エポキシ化を触媒する酵素のついて描写している。

図 11 は、エポキシダーゼの発見のために可能な選別及び選別基質の系統的概略を示す。

図 12 は、エポキシダーゼの発見のために可能なスクリーニングについて描写している。

図 13 は、超ハイスループット単一細胞活性及び配列スクリーニングのための蛍光活性化細胞選別(Fluorescence Activated Cell Sorting:FACS)について描写している。

図 14 は、配列を基にした発見のための環境ライブラリーのバイオパンニングについて描写している。

種々の図における同じ参照符は、同様のエレメントを示す。

#### 【 0 0 7 8 】

詳細な記述

本発明は、P450活性を持つポリペプチド、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びそれらポリヌクレオチドやポリペプチドの作製及び使用に関する方法を提供する。本発明のポリペプチドは、鉄/ヘム核を利用した分子酸素の活性化、酸化反応を支える酸化還元電子シャトルを使うモノオキシゲナーゼとして使用することができる。

#### 【 0 0 7 9 】

一例として、本発明は、環境サンプルに由来する酵素、あるいは遺伝子ライブラリーのような広範なバイオディバーシティ資源からP450酵素を提供する。本発明は、P450酵素を得るために迅速な選別、あるいはスクリーンを行うための方法を提供する。本発明は、組換え遺伝子技術を用いた関心対象の配列や活性のために、未だ知られていないバイオディバーシティにアクセスしたり迅速なスクリーンを行うための方法を提供する。本発明は、生物体の遺伝子サンプルの解析から与えられる融通性及び再現性を以って天然化合物を迅速にスクリーンする能力と関連した利点を合わせ持つ。本発明は、本発明の酵素を用いた有用なキラルエポキシドの合成方法を提供する。本発明は、本発明の方法により開発したP450酵素を用いて産生される有用なキラルエポキシド及びその誘導体を提供する。

#### 【 0 0 8 0 】

P450オキシゲナーゼ、時としてP450エポキシダーゼとも呼ばれる(P450s)、は、天然に広く存在し、生体異物の解毒、非通常炭素源の異化、及び二次代謝産物の生合成等の過程に關与する酸化酵素である。本発明の酵素の持つP450活性は、生体異物の解毒、非通常炭素源の異化、及び二次代謝産物の生合成等を含む既知のP450活性を全て含む。本発明の酵

素の他の具体的な使用、及び本発明の酵素の作製ならびに使用法については以下の例を参照。  
U.S. 特許番号 6,420,131; 6,387,647; 6,380,465; 6,312,917; 6,306,907; 6,306,624; 6,300,544; 6,288,087; 6,284,219; 6,274,360; 6,242,203; 6,217,860; 6,207,648 及び 6,060,253。

#### 【 0 0 8 1 】

細菌において、各反応サイクルの終わりでヘム鉄を還元するために必要とされる電子は、フェレドキシン(FDX)やフェレドキシン還元酵素(FDR)の活性から成る共同する酵素システムによって供給される。P450の例として、エポキシ化を触媒することはよく知られる。特に、エポキシ化は、他に知られる極僅かの酵素クラスでしか触媒されない。P450sを用いてこの変換を行うことは、アキラル(非対象)な分子に立体化学的情報を導入することを可能にする。結果として生ずるキラリティーは、多くの求核試薬を用いてエポキシドを開環することにより他の機能性に変換されることができ(図-3)。そこで、究極的な産物の範囲は、加水分解により生ずるジオールに限定されず、アルコール、ハロヒドリン及び分枝鎖アルキル残基等に拡大できる。更に、本工程は、酵素的なエポキシドの加水分解のようなキネティック解析方法と関連して、物質の損失なくして行える。

#### 【 0 0 8 2 】

定 義

用語「P450s」とは、他の酸素原子の水への還元を伴い酸素-原子を広範な基質に取り込ませる酸素 活性化触媒を包括する。そこで、P450酵素は、以下の活性を持ち得る：脂肪

10

20

30

40

50

族及び芳香族炭素の水酸化、エポキシ化、N、O-及びS-脱アルキル化、脱ハロゲン化、酸化的脱アミノ化、N-酸化及びN-水酸化、あるいはスルホキシド形成。

【0083】

「P450変種」は、「前駆体P450」のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を持つ。前駆体P450は、天然に存在するP450及び組換え体P450を含む。P450変種のアミノ酸配列は、前駆体アミノ酸配列の一つ、あるいはそれ以上のアミノ酸の置換、削除あるいは挿入による前駆体P450のアミノ酸配列に「由来」する。そのような修飾は、前駆体P450酵素自体の細工よりもむしろ前駆体P450のアミノ酸配列をコードする「前駆体DNA配列」についてである。そのような前駆体DNA配列の細工に適した方法は、すでに知られる方法だけでなく、ここに開示する方法を含む。

10

【0084】

用語「抗体」とは、抗原やエピトープに特異的に結合できる免疫グロブリン遺伝子、免疫グロブリン、あるいはそれらの断片によって設計されたものか実体的にコードされたものに由来するペプチド、あるいはポリペプチドを含む；Fundamental Immunology, Third Edition W.E. Paul 編集, Raven出版, N.Y. (1993)；Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175: 267-73；Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25: 85 - 97参照。一つの特殊技術として、抗体をコードした核酸やポリペプチドが化学的、あるいは組み換え遺伝子の方法論により単離、あるいは新規に合成されることは評価される。用語「抗体」とは、抗原結合部分、即ち、抗原に結合する能力を持った抗原結合部位(例えば、断片、サブ配列、相補的決定領域(CDRs))を含むものであり、それらは、

20

- (i) VL、VH、CL及びCH1ドメインを含む一価断片であるFab断片
  - (ii) VH及びCH1ドメインを含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片
  - (iii) VH及びCH1ドメインより成るFd断片
  - (iv) 抗体の一アーム部分のVL及びVHドメインより成るFv断片
  - (v) VHドメインより成るaAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546)
  - (vi) 単離された相補的決定領域(CDR)
- を含む。また、一本鎖抗体も参照により用語「抗体」に含める。

【0085】

ここで用いる用語「アレー」、あるいは「マイクロアレー」、あるいは「バイオチップ」、あるいは「チップ」とは、多数の標的断片であり、以下に更に詳述するように、各標的断片は、一種、あるいはそれ以上の明確な量のポリペプチド(抗体を含む)、あるいは基質表面の明確な部位に固定化された核酸を含んでいる。

30

【0086】

ここで用いる用語「コンピューター」、「コンピュータープログラム」及び「処理機」は、以下に詳細を記述するように、それらの最も広い背景において使われ、そのような全ての装置を含める。

【0087】

ここで用いる用語「発現カセット」は、宿主細胞において両立し得る構造遺伝子(例えば、本発明のP450ポリペプチドのような配列をコードしたタンパク)の発現に影響を及ぼすことのできるヌクレオチド配列を意味する。発現カセットは、少なくとも配列をコードしたポリペプチドと動作可能に、また、他の配列(例えば、転写停止シグナル)と任意的に結合したプロモーターを含む。発現に影響を及ぼすために必要又は補助的な付加ファクター、例えば、エンハンサー、を使用してもよい。ここで用いる「動作可能に結合した」とは、そのDNA配列の転写を媒介できるようなDNA配列から上流のプロモーターの結合を意味する。従って、発現カセットは、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、如何なる形態の組換え「むき出しDNA」ベクター、及びその類をも含んでいる。「ベクター」は、一過性に感染できる核酸、あるいは恒久的に細胞を変換できる核酸から成る。ベクターは、むき出しDNAであり、又はタンパク、あるいはリピドとの複合体でもあり得ることが認識されるであろう。ベクターは、任意にウイルス、あるいは細菌の核酸、及び/又はタンパク、及び/又はメンブラン(例えば、細胞膜、ウイルスのリピドエンベロープ等)を含

40

50

む。レプリコン(例えば、RNAレプリコン、バクテリオファージ)に限らず、添付されて複製されるようになるDNA断片を含む。従って、ベクターは、RNAに限らず、独立した自己複製する環状あるいは直鎖DNA、あるいはRNA(例えば、プラスミド、ウイルス、及びその類、例えば、US特許番号 5,217,879参照)を含み、そして、発現及び非発現プラスミドの両方を含む。組換え微生物、あるいは細胞培養が「発現ベクター」を宿していると記述される場合は、これは、クロモソーム外の環状や直鎖の及び宿主のクロモソームに取り込まれているDNAを含む。ベクターが宿主細胞により維持されている場合、ベクターは、独立構造として有糸分裂の間に安定に複製されるか、あるいは、宿主のゲノム内に取り込まれる。

#### 【0088】

「プラスミド」は、非制限的な基盤の上に商業的、公的な入手が可能であり、既に報告されている操作による入手可能なプラスミドから構築することができる。ここに述べられるものと同等のプラスミドは、既に、公に知られ、また、通常の熟練した研究者には明白なものであろう。

10

#### 【0089】

用語「遺伝子」は、転写産物(例えば、メッセージ)の生産に関与するDNA断片を意味する。それは、引き続き翻訳されてペプチド鎖を産生したり、遺伝子の転写、複製、あるいは安定性を調節したりする。とりわけ、遺伝子は、適用され得る個々の翻訳領域(エクソン)間に存在する非翻訳配列(イントロン)だけでなく、リーダー及びトレイラー領域、プロモーター及びエンハンサーのようなコード領域の前後の領域を含む。

20

#### 【0090】

ここに用いられる「核酸」、あるいは「核酸配列」とは、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、あるいは、それらの如何なる断片、ゲノム又は合成起源のDNA又はRNA(例えば、mRNA、rRNA、tRNA)で、それらは、一本鎖又は二本鎖でもよく、ペプチド核酸(PNA)又はDNA様、あるいはRNA様物質に対するセンス又はアンチセンス鎖、例えば、リボヌクレオプロテイン(irRNA)を含む天然又は合成の起源のものを含めて言及される。その用語は、天然ヌクレオチドの類似体を含む核酸、即ち、オリゴヌクレオチドをも包括する。その用語は、合成バックボーンを持つ核酸様構造体をも包括する。以下の例を参照、Mata(1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup(1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag(1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156

30

#### 【0091】

ここに用いられる「アミノ酸」、あるいは「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、あるいは、如何なるそれらの断片、部分あるいはサブユニットを意味する。

#### 【0092】

ここに用いられる用語「ポリペプチド」及び「タンパク」は、ペプチド結合あるいは修飾ペプチド結合(即ち、ペプチドイソステレス)によりお互いに結合したアミノ酸を意味し、20種の遺伝子にコードされたアミノ酸以外の修飾アミノ酸を含んでもよい。用語「ポリペプチド」は、また、ペプチドやポリペプチドの断片、モチーフ及びその類を含む。その用語は、グリコシル化ペプチドをも含む。本発明のペプチド及びポリペプチドは、以下に更に詳細を述べるように、全ての「疑似体」及び「ペプチド疑似体」をも含んでいる。

40

#### 【0093】

用語「単離された」は、その材料が起源環境(それが天然由来の場合、その自然環境)より採集されたことを意味する。例えば、生物体に存在する天然由来ポリヌクレオチド酵素は、単離されたのではなく、自然界に共在する物質から分離された同一のポリヌクレオチド、あるいはペプチドを「単離された」と言う。このようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部、そして(もしくは)このようなポリヌクレオチドや酵素は、構成成分の一部であり、このようなベクターや構成成分がその自然環境の一部でない場合でも単離される。ここに用いるように、単離された物質又は組成は、「精製された」組成でもあり得る。即ち

50

、それは絶対的な純正純度を要求しない；むしろ、それは相対的な精製度を意味する。ライブラリーから得られた個々の核酸は、電気泳動的に単一なまでに習慣的な手法により精製することができる。別の例として、本発明は、ゲノムDNA、ライブラリー中の他の配列、あるいは他の環境から少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍あるいはそれ以上の割合に精製された核酸を提供する。

【0094】

ここに用いるように用語「組換え」とは、核酸が「バックボーン」核酸に近いが天然の環境に存在するものには近くないことを意味する。一例において、核酸は、核酸「バックボーン」分子の集団において、5%又はそれ以上の核酸挿入数を示す。本発明による「バックボーン分子」核酸には、発現ベクター、自己複製核酸、ウイルス、完成しつつある核酸、及び興味のある挿入核酸の維持、あるいは細工に用いられる他のベクター又は核酸のような核酸を含む。一例として、挿入を豊富にした核酸は、組換えバックボーン分子の集団において15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%あるいはそれ以上の核酸挿入数を示す。「組換え」ポリペプチド、あるいはタンパクは、組換えDNA技術により産生されるポリペプチド、あるいはタンパク、例えば、好ましいポリペプチド又はタンパクをコードした外因性のDNA構築体により形質変換した細胞から得られるものを意味する。「合成の」ポリペプチド又はタンパクは、以下に更に述べるように、化学合成により調製されたものである。

10

【0095】

以下に更に述べるように、プロモーター配列は、プロモーターで転写を開始するRNAポリメラーゼがコードしている配列をmRNAに転写する場合、その配列に「動作可能的に結合」している。

20

【0096】

「オリゴヌクレオチド」は、化学的に合成されるような一本鎖ポリデオキシヌクレオチド、あるいは二本の相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖をいう。そのような合成ポリデオキシヌクレオチドは、5'リン酸基を持たず、ATP及びキナーゼの存在下でもリン酸の添加なくしては他のオリゴヌクレオチドと結合することができない。合成オリゴヌクレオチドは、脱リン酸化していない断片とは結合する。

【0097】

「ハイブリダイゼーション」は、それにより核酸鎖が塩基のペアーリングにより相補的な鎖と結合する過程を意味する。ハイブリダイゼーション反応は、興味のある特別な配列がサンプル中に低濃度で存在している場合でも同定できるように高感度で選択的である。厳格な条件下とは、例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション溶液中の塩、あるいはホルムアミド濃度、ハイブリダイゼーションの温度等により定義され、既にそのことはよく知られている。例えば、その厳格度は、以下に詳述するように、塩濃度を減少させること、ホルムアミド濃度を増加させること、あるいはハイブリダイゼーション温度を上昇させること、ハイブリダイゼーション時間を変えること等により増加させることができる。別の例として、本発明の核酸は、種々の(高、中そして低)厳格な条件下におけるそれらのハイブリダイズする能力により明確にされる。

30

【0098】

用語「変種」とは、一つ又はそれ以上の塩基対、コドン、イントロン、エクソン、あるいはアミノ酸残基(それぞれ)が修飾され、本発明のP450の生物学的な活性をまだ保持している本発明のポリヌクレオチド、あるいはポリペプチドを言及する。変種は、例えば、エラープロードPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド指向変異法、アセンブリーPCR、セクシュアルPCR 変異法、インピボ変異法、カセット変異法、再帰的アンサンプル変異法、指数的アンサンプル変異法、部位特異的変異法、遺伝子再集合、遺伝子飽和部位変異法(GSSM)、及びそれらの組み合わせ等の手段を如何なる組み合わせで用いて作製することができる。野生型P450とは異なるpH、あるいは温度で活性を持つ変種の作製技術はここに含まれる。

40

【0099】

50

用語「飽和変異」、あるいは「GSSM」とは、以下に詳しく述べられるように、ポリヌクレオチドに点変異を導入するためのオリゴヌクレオチドプライマーの変異に用いられる方法を含む。

【0100】

用語「至適化指向的進化システム」、あるいは「至適化指向的進化」とは、関連した核酸配列、例えば、関連した遺伝子の断片を再集合するための方法を含み、以下に詳しく述べられる。

【0101】

用語「合成結合再集合」、あるいは「SLR」とは、オリゴヌクレオチド断片を非確率的に結合させる方法を提供するもので、以下に詳しく述べられる。

【0102】

#### 核酸の作製と細工

本発明は、発現ベクターのような発現カセットを含む本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。また、本発明は、本発明の核酸を用いた新規P450配列の発見のための方法を含む。また、提供される方法は、例えば、合成ライゲーション再集合、至適化指向進化システム及び/又は飽和変異導入により本発明の核酸を修飾するためのものでもある。

【0103】

本発明の核酸は、例えば、cDNAライブラリーのクローニングや発現、メッセージあるいはゲノムDNAのPCRによる増幅、及びその類により、作製、単離及び/又は細工される。本発明の方法を実践することにおいて、相同な遺伝子は、ここに述べられるように、鑄型核酸を細工することにより修飾されることができる。本発明は、如何なる方法又はプロトコール、あるいは既に知られている装置との組み合わせにより実践することができる。

【0104】

#### 一般的な技術

本発明の実践に使われる核酸は、RNA、iRNA、アンチセンス核酸、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルス、あるいは雑種の類に関わらず、種々の資源から単離され、遺伝学的にエンジニアされ、増幅され、及び/又は発現(組換え的に作製)されてもよい。これら核酸より作製された組換えポリペプチドは、望まれる活性のために個々に単離あるいはクローン化し調べることができる。細菌、高等動物、酵母、昆虫、あるいは植物細胞の発現システムを含む如何なる組換え発現システムを使うことができる。

【0105】

別法として、これら核酸は、例えば、以下に述べられるような、よく知られる化学合成技術によりインビトロで合成することができる。

Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; U.S. 特許番号 4,458,066

【0106】

例えば、サブクローニング、プローブの標識(例えば、クローンポリメラーゼを用いたランダムプライマー標識、ニックトランスレーション、増幅)、配列、ハイブリダイゼーション及びその類のような核酸を細工する技術は、科学文献ならびに特許文献によく述べられている。例えば、以下を参照。

Sambrook, 編集, Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2nd ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 編集, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, 編集, Elsevier, N.Y. (1993)

【0107】

本発明の方法を実践するために使われる核酸を得たり細工したりする他の有用な手段は

、ゲノムサンプルからクローンすること、望ましいならば、例えば、ゲノムクローン、あるいはcDNAクローンからスクリーン単離するかあるいは増幅した挿入を再クローンすることである。本発明の方法に使われる核酸の起源は、高等動物の人工クロモゾーム(MACs)に含まれるゲノムあるいはcDNAライブラリーである。例えば、以下を参照。U.S. 特許番号 5,721,118; 6,025,155; ヒト人工クロモゾーム、Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:333-335; yeast artificial chromosomes (YAC); 細菌人工クロモゾーム(BAC); P1 人工クロモゾーム、Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; P1-由来ベクター (PACs)、Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; コスミド、組換えウイルス、ファージ、あるいはプラスミド。

#### 【0108】

一例として、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、翻訳されたポリペプチド、あるいはその断片の類が分泌されるようにするリーダー配列をもって適当な段階で修飾することができる。

#### 【0109】

本発明は、融合タンパク質及びこれらをコードする核酸を提供する。本発明中のポリペプチドは、安定性の増加や精製の簡便化等、目的の特性をそのポリペプチド、例えば、そのN末端側に与えるために、異種性のペプチドやポリペプチドと融合させることができる。本発明中のペプチドやポリペプチドは、また、増加した免疫原性の獲得、精製の簡便化、抗体、及び抗体産生 B 細胞の同定、あるいは単離などを目的とした融合タンパク質として、一つ、あるいはそれ以上の付加的な領域と結合した形で合成又は発現される。検出や精製に有効な領域として、以下のものが含まれる; 固定化金属による精製のためのポリヒスチジン鎖及びヒスチジン-トリプトファン モジュールなどの金属キレートペプチド; 固定化免疫グロブリンによる精製のための、プロテインA領域; FLAGS伸張/親和性精製システム(Immunex Corp, Seattle WA)において利用される領域; 及び精製用領域と、モチーフ含有ペプチドとの間への、Factor Xaやエンテロキナーゼ(Invitrogen, San Diego CA)による切断部位の導入。例えば、発現ベクターは、エピトープをコードする核酸配列と、六つのヒスチジン残基が、チオレドキシンとエンテロキナーゼ切断部位で繋がれた配列を含んでいる(Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:404-414 参照)。ヒスチジン残基は、検出や精製に利用され、エンテロキナーゼ切断部位は、エピトープの他の融合タンパク部位からの分離に利用される。融合タンパク質をコードするベクターや、融合タンパク質の利用に関する技術は、科学論文や特許に記述されている(Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53 参照)。

#### 【0110】

##### 転写、及び翻訳を調節する配列

本発明は、発現(例えば、転写、あるいは翻訳)調節配列、即ち、RNA合成/発現を誘導又は調節するプロモーターやエンハンサーと機能的に結合した本発明における核酸配列(即ち、DNA)を提供する。それらの発現調節配列は、発現ベクター中に含まれる。代表的な細菌のプロモーターには、*lacI*プロモーター、*lacZ*プロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、*gpt*プロモーター、ラムダ PRプロモーター、Pプロモーター、及び*trp*プロモーターが含まれる。代表的な真核生物のプロモーターには、CMV 前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期 SV40プロモーター、レトロウイルス由来LTRプロモーター、及びマウス メタロチオネインIプロモーターが含まれる。

#### 【0111】

細菌におけるポリペプチド発現に適したプロモーターには、大腸菌*lacI*プロモーター、*lacZ*プロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、*gpt*プロモーター、ラムダ PRプロモーター、PLプロモーター、3-フォスフォグリセリン酸キナーゼ(PGK)などの解糖系酵素をコードするオペロン由来のプロモーター、及び酸ホスファターゼプロモーターが含まれる。真核生物のプロモーターには、CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、熱ショックプロモーター、初期及び後期 SV40プロモーター、レトロウイルス由来LTRプロモーター、及びマウス メタロチオネインIプロモーターが含まれる。原核細胞

10

20

30

40

50

、真核細胞、及びそれらのウイルスにおいて、遺伝子発現を調節することが知られているその他のプロモーターもまた使用されるであろう。

【0112】

発現ベクター、及びクローニング用媒体

本発明は、本発明におけるタンパク質をコードする核酸を含む、発現ベクター、及びクローニング用媒体を提供する。本発明における発現ベクター、及びクローニング用媒体には、ウイルス粒子、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリア人工クロモソーム、ウイルスDNA(例えば、ワクチニア、アデノウイルス、ボックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、及びSV40型ウイルス)、P-1由来人工クロモソーム、酵母プラスミド、酵母人工クロモソーム、及び特定の宿主(枯草菌、アスペルギルス、及び酵母)に対して特異的なその他のベクターが含まれる。本発明のベクターは、クロモソーム由来、非クロモソーム由来、及び合成されたDNA配列を含むことができる。多数の有用なベクターが、関連技術内で知られており、これらは商業的な入手が可能である。代表的なベクターには、細菌用：pQEベクター(キアゲン)、pBluescriptプラスミド、pNHベクター、ラムダ-ZAPベクター(ストラテジーン)；ptrc99a, pKK223-3、pDR540、pRIT2T(ファルマシア)；真核細胞用：pXT1、pSG5(ストラテジーン)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40(ファルマシア)。しかし、宿主内での複製が可能であるのなら、その他のプラスミドやベクターも利用されるであろう。低コピー数、あるいは高コピー数のベクターが、本発明において使用されるであろう。

10

【0113】

発現ベクターは、プロモーター、翻訳開始のためのリボゾーム結合部位、及び転写終結配列を含んでいる。これらのベクターは、また、発現を増加させるためのその他の適切な配列も含むであろう。哺乳類発現ベクターは、複製オリジン、必要なりボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナー、及びアクセプター部位、転写終結配列、及び5'非転写配列を含んでいる。ある例では、SV40スプライス由来のDNA配列やポリアデニル化部位が必要な非転写領域として使用されるであろう。

20

【0114】

一例として、発現ベクターは、そのベクターを含んでいる宿主細胞を選別するための一つ又はそれ以上の選別用マーカー遺伝子を含んでいる。このような選別用マーカーには、真核細胞用として、ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子、あるいはネオマイシン耐性遺伝子、大腸菌におけるテトラサイクリン、あるいはアンピシリン耐性遺伝子、及び*S. cerevisiae* TRP1遺伝子が含まれる。プロモーター領域は、選別用マーカー遺伝子を含む、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ(CAT)ベクターやその他のベクターを用いて目的の遺伝子より選別される。

30

【0115】

真核細胞中でのポリペプチド、あるいはその断片の発現ベクターは、その発現レベルを増加させるためのエンハンサーも含まれるであろう。エンハンサーは、その遺伝子のプロモーターに作用し、その遺伝子の転写を増加させるcis-作動性のDNA領域で、通常約10~300塩基対の長さを持つ。その例として、その複製オリジンより約100~270塩基対下流に存在するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製オリジン下流に存在するポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーがある。

40

【0116】

DNA配列は、様々な行程により、ベクターへと挿入される。一般的に、DNA配列及びベクターは、適当な制限エンドヌクレアーゼにより切断され、そのDNA配列は、ベクター中の目的の部位に挿入、連結される。又は、DNA配列とベクターの平滑末端同士が連結されるであろう。Ausubel及びSambrookにより記述されているような、様々なクローニング技術が、関連技術内で知られている。これらの行程等は、関連技術における適用範囲内であるとみなされる。

【0117】

50

ベクターは、プラスミド、ウイルス粒子、あるいはファージの形で存在しているであろう。その他のベクターとして、クロモゾーム由来、非クロモゾーム由来、及び合成されたDNA配列、SV40誘導體、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミド、及びファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルスなどのウイルスDNAが含まれる。原核細胞宿主や真核細胞宿主における様々なクローニングベクター、及び発現ベクターが、Sambrookにより記述されている。

#### 【0118】

利用されるであろう細菌用ベクターには、pBR322 (ATCC 37017)、pKK223-3 (ファルマシア : Uppsala, Sweden)、GEM1 (プロメガ : Madison, WI, USA)、pQE70、pQE60、pQE-9 (キアゲン)、pD10、psiX174 pBluescript II KS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (ストラテジーン)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (ファルマシア)、pKK232-8、及びpCM7等の既知のクローニングベクター中の必要な遺伝的配列を含む商業的に入手可能なプラスミドが含まれる。真核細胞用ベクターとしては、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (ストラテジーン)、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVL (ファルマシア)が含まれる。しかし、宿主内での複製が可能であり、かつ維持されるものであるなら、その他のベクターも利用されるであろう。

#### 【0119】

##### 宿主細胞、及び形質転換細胞

本発明は、また、本発明におけるポリペプチドをコードする核酸、本発明中のベクターを含む形質転換細胞を提供する。宿主細胞としては、細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、あるいは植物細胞を含む、関連技術内で利用されている原核細胞あるいは真核細胞の何れの宿主細胞も使用されるであろう。代表的な細菌細胞には、*E. coli*、*Streptomyces*、*Bacillus subtilis*、*Salmonella typhimurium*、及び*Pseudomonas*、*Streptomyces*、あるいは*Staphylococcus*属に属する様々な種の細菌が含まれる。代表的な昆虫細胞には、*Drosophila S2*、及び*Spodoptera Sf9*が含まれる。また、代表的な動物細胞には、CHO、COS、あるいはBowesメラノーマやその他のマウスやヒト細胞株が含まれる。適切な宿主細胞の選択も、関連技術の範囲内である。

#### 【0120】

ベクターは、形質転換、トランスフェクション、トランスダクション、ウイルス感染、遺伝子ガン、あるいはTi-媒介遺伝子導入を含む様々な技術により宿主細胞に導入される。特有の方法として、カルシウム燐酸によるトランスフェクション、DEAE-デキストランによるトランスフェクション、リポフェクション、あるいは電気穿孔法が含まれる (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986))。

#### 【0121】

設計された宿主細胞は、適切な場所において、通常の栄養培地を基にプロモーターの活性化、形質転換体の選別、あるいは本発明中の遺伝子の増殖を可能にするように修飾された培地中で培養されるであろう。適切な宿主細胞の形質転換、及びその宿主細胞を適切な細胞密度になるまで生育させた後、選択されたプロモーターが、適当な手段(即ち、温度変化、あるいは化学物質の添加)により誘導され、更に、その宿主細胞は、目的のポリペプチド、あるいはその断片が生産されるまで培養されるであろう。

#### 【0122】

その細胞を遠心分離により回収し、物理的、あるいは化学的手段により破碎して得られる粗抽出物を精製に用いる。タンパク質の発現に使用された微生物細胞は、反復凍結融解、超音波破碎、機械的破碎、あるいは細胞溶解試薬を含む適切な方法により破碎されるであろう。このような方法は、関連研究者内でよく知られている。発現されたポリペプチド、あるいはその断片は、硫酸アンモニウム、あるいはエタノールによる沈殿、酸による抽出、陽イオン、あるいは陰イオン交換クロマトグラフィー、セルロース燐酸クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーを含む方法に

より、組換え細胞培養物より回収、及び精製されるであろう。必要であるならば、タンパク質の立体構造を完全なものとするために、折りたたみ化行程が行われるであろう。更に、最終的な精製が必要である場合は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が使用されるであろう。

#### 【0123】

様々な哺乳類細胞培養系が、組換えタンパク質の発現に使用される。哺乳類細胞発現系には、サル腎臓繊維芽細胞のCOS-7細胞株や、C127、3T3、CHO、HeLa、及びBHK細胞のような適当なベクターからタンパク質を発現できる樹立細胞株が含まれる。

#### 【0124】

組換え配列によりコードされる遺伝子産物の生産には、宿主細胞中の構成成分が、通常の様式で利用されるであろう。ベクターを含む宿主細胞により生産されるポリペプチドは、組換え体生産工程に使用される宿主細胞によって、グリコシレーションを受ける場合がある。本発明のポリペプチドの第一のアミノ酸は、メチオニン、あるいはそれとは異なるアミノ酸である。

#### 【0125】

無細胞翻訳系も、また、本発明のポリペプチドの生産に使用される。無細胞翻訳系は、ポリペプチド、あるいはその断片をコードする核酸と機能的に連結されたプロモーターを含むDNA構成物より転写されたmRNAを利用できる。一例として、それらのDNA構成物は、インビトロ転写反応を受ける前に鎖状化されるであろう。転写されたmRNAは、そして、目的のポリペプチド、あるいはその断片を生産するためにウサギ網状赤血球抽出物のような適切な無細胞翻訳系抽出物とともに培養される。

#### 【0126】

発現ベクターは、形質転換された宿主細胞を選別するために、真核細胞用として、ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子、あるいはネオマイシン耐性遺伝子、大腸菌におけるテトラサイクリン、あるいはアンピシリン耐性遺伝子等の特定の表現型特性を示す一つ、あるいはそれ以上の選別用マーカー遺伝子を含むことができる。

#### 【0127】

##### 核酸の増幅

本発明の実践において、本発明のポリペプチドをコードする核酸、あるいは、修飾した核酸は、例えば、増幅により再産生される。本発明は、P450ポリペプチドをコードした核酸を増幅する増幅配列プライマーペアを提供する。その増幅において、プライマーペアは、典型的なSEQ ID NO:1あるいはそのサブ配列；SEQ ID NO:3として示す配列あるいはそのサブ配列；SEQ ID NO:5として示す配列あるいはそのサブ配列；SEQ ID NO:7として示す配列あるいはそのサブ配列；SEQ ID NO:9として示す配列あるいはそのサブ配列、を含む核酸配列を増幅できる。既に応用されている技術でこれら配列の如何なる部分あるいは完全長の配列に対する増幅プライマー配列ペアを修飾できる。例えば、

#### 【0128】

典型的なSEQ ID NO:1は、

```
gtgaccacca ccacgaccaa cgacccccgac accccccagg tccacttctg ggccgtcccc      60
gacctaccg gcctcgactt cgaccgctg ctcgccaaac tgctgcacga ggaccccgtc      120
acccgctcc ggctgccgca cggcgaaggc cacgcctggc tcgtcaccgg ctacgaggac      180
gtcaagtctg tctccgtcga cccgctctc agccgccagg ccgtctgggg ccgttccatc      240
acccgctag cccccactt catcccgatg gagggcgccg tcggcttcgc cgacccgccc      300
gaccacacc ggatgcgccg cgtcgtcgcc cgcgccctca gcgcccgcgc cctgcgctcc      360
ctgctgcgacc acgcccagga cgtcatggac cggctcctcg accgggtcga ggagcacggc      420
gcgcccggcg acctcatgga gctcgtcaac cgccccttc ccctcgccat ggtcagcgaa      480
ctcatgggcg tccccgagg cgaccagccg ctgatggccc actggtccga caccatcatc      540
tcggccggcg ccggccggga ggccagcgag acggccaagg ccgagatggg ccggtacttc      600
accgaactca tcggccgcaa ccacggcacc ggcaaggaga ccctcgccgc cgtcctcgcc      660
gacgccgtcg acgacgacac cctcaccgag cacgaggccg tcggcctcgc cgtcctcatc      720
```

10

20

30

40

50

```

cagatcggcg gcgcccacgc cgtccggaac aacagcgcca acatggtgta cgcgctgctc 780
accacccccg agcacctcgc ccggctgctc gcggagccgg agctcgtccc ccaggccgtc 840
gacgagctcc tccgctacat cccgcaccgc aacgcccgtc gcctctcccg gatcgccctg 900
gaggacgtcg aggtcggcgg ggtcaccatc ccctccggcg accccgtcta cgtctcctac 960
ctgacggcca accgcgaccc cgccgtcttc cccgaccccg agcggctcga cttcgaccgc 1020
gcgtacaacc cccacgtcgc cttcggccac ggccccact actgccccgg ctccgcccctc 1080
gcccgcacgc agtcggagat cctcgtcgc acgctgtgga cccgcttccc gaacctgcgg 1140
ctcgccgtcc ccgaggacca gctgcgctgg cagcgcggcg ccctcatccg cggccccgag 1200
acccttccgg tcacctggtg a 1221

```

である。

10

【 0 1 2 9 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:1の1~21残基及びSEQ ID NO:1の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 3 0 】

典型的なSEQ ID NO:1は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Thr Thr Thr Thr Thr Asn Asp Pro Asp Thr Pro Gln Val His Phe Trp Ala Val Pro
Asp Leu Thr Gly Leu Asp Phe Asp Pro Leu Leu Ala Lys Leu Leu His Glu Asp Pro Val
Thr Arg Val Arg Leu Pro His Gly Glu Gly His Ala Trp Leu Val Thr Arg Tyr Glu Asp
Val Lys Phe Val Ser Val Asp Pro Arg Phe Ser Arg Gln Ala Val Trp Gly Arg Ser Ile
Thr Arg Val Ala Pro His Phe Ile Pro Met Glu Gly Ala Val Gly Phe Ala Asp Pro Pro 20
Asp His Thr Arg Met Arg Arg Val Val Ala Arg Ala Phe Ser Ala Arg Ala Leu Arg Ser
Leu Arg Asp His Ala Gln Asp Val Met Asp Arg Leu Leu Asp Arg Val Glu Glu His Gly
Ala Pro Ala Asp Leu Met Glu Leu Val Asn Arg Pro Phe Pro Leu Ala Met Val Ser Glu
Leu Met Gly Val Pro Glu Gly Asp Gln Pro Leu Met Ala His Trp Ser Asp Thr Ile Ile
Ser Ala Gly Ala Gly Arg Glu Ala Ser Glu Thr Ala Lys Ala Glu Met Gly Arg Tyr Phe
Thr Glu Leu Ile Gly Arg Asn His Gly Thr Gly Lys Glu Thr Leu Ala Ala Val Leu Ala
Asp Ala Val Asp Asp Asp Thr Leu Thr Glu His Glu Ala Val Gly Leu Ala Val Leu Ile
Gln Ile Gly Gly Ala His Ala Val Arg Asn Asn Ser Ala Asn Met Val Tyr Ala Leu Leu
Thr His Pro Glu His Leu Ala Arg Leu Arg Ala Glu Pro Glu Leu Val Pro Gln Ala Val
Asp Glu Leu Leu Arg Tyr Ile Pro His Arg Asn Ala Val Gly Leu Ser Arg Ile Ala Leu 30
Glu Asp Val Glu Val Gly Gly Val Thr Ile Pro Ser Gly Asp Pro Val Tyr Val Ser Tyr
Leu Thr Ala Asn Arg Asp Pro Ala Val Phe Pro Asp Pro Glu Arg Leu Asp Phe Asp Arg
Ala Tyr Asn Pro His Val Ala Phe Gly His Gly Pro His Tyr Cys Pro Gly Ser Ala Leu
Ala Arg Ile Glu Ser Glu Ile Leu Val Asp Thr Leu Trp Thr Arg Phe Pro Asn Leu Arg
Leu Ala Val Pro Glu Asp Gln Leu Arg Trp Gln Arg Gly Ala Leu Ile Arg Gly Pro Glu
Thr Leu Pro Val Thr Trp (SEQ ID NO:2)

```

【 0 1 3 1 】

典型的なSEQ ID NO:3は、

```

atgaccggctc aagaccagac aatcgttcac gatgtcccgg taaacgtcgc tcaacagccc 60
aaccctacc cgctcttga acgcatccgc gagcacggcg tcgtccagcg ggtacggctg 120
aatcccactc ttgaagtctg gatggtcacc ggatacgacg aggcggtggc ggcgctcacc 180
gacccccggc tcagcagcag cccgctcggc gtcaacggac tcgaggagga gatggcccac 240
caggagcgca ccaacgtcct gatggccagc atgctcgtcg ccaacggcga ggaccacacc 300
cggctgcgca acctcgtctc gaaggccttc accgcccgcc ggggtggagca gctcgcgccg 360
cgcgtccagg cgcacaccga cgccttctc gacgcggtcg cggcgcgcgg atccgccgac 420
ctggctctcg agttcgccct gccgctcccc atggccgtac tcagcgacct catcggcac 480
ccggccgagg ggcagcccga cttcggcccgc ctcgcggtcg gcctcatcat gccgccgaac 540
acccccgagc ggctcgccaa gggagcccgc gcccgcgccg aactcaccga gttcttcgag 600
ccgttgatcg cccagcgcaa gaaggagccg aaggacgacc tgctgagcgc gctctgcgcg 660
gcgcaggccg aggagcggat cagcgaccgc gagctgacgg cgatgacgat cctgctcacg 720

```

50

```

ctcgccgggc acgagacgac ggccagcctg atcgccaacg gcgtgcacgc cctgctgcgg 780
caccgggagc agttcgccac cctgcgcgac gaccctcgc tgctgccggg cgcgatcgag 840
gaactcctgc gctacgaggg cccgggtgagc cggggcgctc cccgcttcac caccgaccgg 900
tacgagatcg gcggggtcac cgtaccggcc ggcgagatga tcatcatcgg gctcgccgcg 960
gccaatcgcg acccggcccc ctacgaccgt cccgacatcc tcgacgttgc acgccgtgag 1020
gtgccgcaac agctcgcttt cggccatggc gtgcacttct gcctgggtgc gccgctggcc 1080
cgcgcgaggg cccggatcgc catcggcacc ctgctgcgcc gcttccccga tctgcggtc 1140
gccgaccggg acgcggacct cagccggcgc gagggcatcc tgcgcggcat ggcgaccctg 1200
cccgtgacct tcacgcccga ggcctga 1227

```

である。

10

【 0 1 3 2 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:3の1~21残基及びSEQ ID NO:3の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 3 3 】

典型的なSEQ ID NO:3は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Thr Gly Gln Asp Gln Thr Ile Val His Asp Val Pro Val Asn Val Ala Gln Gln Pro
Asn Pro Tyr Pro Leu Phe Glu Arg Ile Arg Glu His Gly Val Val Gln Arg Val Arg Leu
Asn Pro Thr Leu Glu Val Trp Met Val Thr Gly Tyr Asp Glu Ala Val Ala Ala Leu Thr
Asp Pro Arg Leu Ser Ser Ser Pro Val Gly Val Asn Gly Leu Glu Glu Glu Met Ala His
Gln Glu Arg Thr Asn Val Leu Met Ala Ser Met Leu Val Ala Asn Gly Glu Asp His Thr 20
Arg Leu Arg Asn Leu Val Ser Lys Ala Phe Thr Ala Arg Arg Val Glu Gln Leu Ala Pro
Arg Val Gln Ala His Thr Asp Ala Phe Leu Asp Ala Val Ala Ala Arg Gly Ser Ala Asp
Leu Val Ser Glu Phe Ala Leu Pro Leu Pro Met Ala Val Leu Ser Asp Leu Ile Gly Ile
Pro Ala Glu Gly Gln Pro Asp Phe Ala Arg Leu Ala Val Gly Leu Ile Met Pro Pro Asn
Thr Pro Glu Arg Leu Ala Lys Gly Ala Arg Ala Arg Ala Glu Leu Thr Glu Phe Phe Glu
Pro Leu Ile Ala Gln Arg Lys Lys Glu Pro Lys Asp Asp Leu Leu Ser Ala Leu Cys Ala
Ala Gln Ala Glu Glu Arg Ile Ser Asp Arg Glu Leu Thr Ala Met Thr Ile Leu Leu Thr
Leu Ala Gly His Glu Thr Thr Ala Ser Leu Ile Ala Asn Gly Val His Ala Leu Leu Arg
His Pro Glu Gln Phe Ala Thr Leu Arg Asp Asp Pro Ser Leu Leu Pro Gly Ala Ile Glu
Glu Leu Leu Arg Tyr Glu Gly Pro Val Ser Arg Gly Val Ala Arg Phe Thr Thr Asp Pro 30
Tyr Glu Ile Gly Gly Val Thr Val Pro Ala Gly Glu Met Ile Ile Ile Gly Leu Ala Ala
Ala Asn Arg Asp Pro Ala Arg Tyr Asp Arg Pro Asp Ile Leu Asp Val Ala Arg Arg Glu
Val Pro Gln Gln Leu Ala Phe Gly His Gly Val His Phe Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala
Arg Ala Glu Ala Arg Ile Ala Ile Gly Thr Leu Leu Arg Arg Phe Pro Asp Leu Arg Leu
Ala Asp Pro Asp Ala Asp Leu Ser Arg Arg Glu Gly Ile Leu Arg Gly Met Ala Thr Leu
Pro Val Thr Phe Thr Pro Glu Ala (SEQ ID NO:4)

```

【 0 1 3 4 】

典型的なSEQ ID NO:5は、

```

atgagcgacg agccgaaccg cgagccgggc cggggcatag cgggcgaccg ggcggcgggc 60
ccgcccgggg acccctggac gcggctgccg tccatggcgc cggcggagcc ggtggccgac 120
ggtaaggggc gccccggtc cgccgcccgc ccgggacggg tgcggaccgt gcccgatccg 180
gccgtcctcg gtggctcccg ggccaggacc gtgcgcacca gtcccctcga ccccggcgcc 240
tcgcgcgacc cgcaccgcat ccaccggacg ctgcgggagg acttcccgct cagctacgac 300
ccgctgctgc gggcctgggt gctcagccgg tacgccgacg tggccaccgc cctcaccgac 360
agccgcttca cccacgggca ccggcccggc gaccgcccgt gcgcgcgggc ccatgtcgac 420
gtcgacgtgg cggccctgcg gtcggtcacg gagcgcaccg cgtacgtgct ggcccgcggg 480
atcgccgagc ggcccagggc cgatctggtg gccgacttct gccactggct gcccgccggg 540
accgtggccg ccgcccgcg cgtcccctac cgcgacatga tgcggctcgt ccgcgccggg 600
gcggccggcg ctctcgcggg ggagtgcggc ggcgacatcg ccgtacggga gaaggcgctt 660
gcgtccttcc tcggcaacgt cctcgccgat cccgatcagg tcgccccct gcgggacgcg 720

```

50

```

ccggccgggc tggaggcccg cgcctggacg gagtcgctgc gccgcgaccc gcccgtagcag      780
atcgccgtgc gcaggacgag cgccgaggtg ccggtgagcg gcggtgtcgt cccggcgggc      840
gtgcccgtgg cgctgctcgt gggctcggcg ggccgggacc cggagcgggt ccgagagccg      900
gaccgtttcg atcccttccg tgccgacccg ggccagttga cgtacggctc cggcttctgc      960
ccggcgggtgc tcctggcccg tcttgaggcg gagtacgcgc tgcgggccct gttcacggcg     1020
atgccccggc tccgcctcgc cgagggcttc cgcccgtgtt gggcgggtct catcacgcgg     1080
gcgcccggga gcctgatcgt ccggccggga ggctga                                  1116

```

である。

【 0 1 3 5 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:5の1~21残基及びSEQ ID N 10  
0:5の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 3 6 】

典型的なSEQ ID NO:5は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Ser Asp Glu Pro Asn Arg Glu Pro Gly Arg Gly Ile Ala Gly Asp Arg Ala Ala Ala
Pro Pro Gly Asp Pro Trp Thr Arg Leu Pro Ser Met Ala Pro Ala Glu Pro Val Ala Asp
Gly Lys Gly Gly Pro Arg Ser Ala Ala Ala Pro Gly Arg Val Arg Thr Val Pro Asp Pro
Ala Val Leu Gly Gly Ser Arg Ala Arg Thr Val Ala Pro Ser Pro Leu Asp Pro Gly Ala
Ser Arg Asp Pro His Arg Ile His Arg Thr Leu Arg Glu Asp Phe Pro Leu Thr Tyr Asp
Pro Leu Leu Arg Ala Trp Val Leu Ser Arg Tyr Ala Asp Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
Ser Arg Phe Thr His Gly His Arg Pro Gly Asp Pro Pro Cys Ala Arg Ala His Val Asp 20
Val Asp Val Ala Ala Leu Arg Ser Val Thr Glu Arg Thr Ala Tyr Val Leu Ala Arg Arg
Ile Ala Glu Arg Pro Gln Ala Asp Leu Val Ala Asp Phe Cys His Trp Leu Pro Ala Gly
Thr Val Ala Ala Ala Val Gly Val Pro Tyr Arg Asp Met Met Arg Leu Val Arg Gly Arg
Ala Ala Gly Ala Leu Ala Gly Glu Cys Gly Gly Gln Ile Ala Val Arg Glu Lys Ala Leu
Ala Ser Phe Leu Gly Asn Val Leu Ala Asp Pro Asp Gln Val Ala Ala Leu Arg Asp Ala
Pro Ala Gly Leu Val Ala Arg Ala Trp Thr Glu Ser Leu Arg Arg Asp Pro Pro Val Gln
Ile Ala Val Arg Arg Thr Ser Ala Glu Val Pro Val Ser Gly Gly Val Val Pro Ala Gly
Val Pro Val Ala Leu Leu Val Gly Ser Ala Gly Arg Asp Pro Glu Arg Phe Arg Glu Pro
Asp Arg Phe Asp Pro Phe Arg Ala Asp Pro Gly Gln Leu Thr Tyr Gly Ser Gly Phe Cys
Pro Ala Val Leu Leu Ala Gly Leu Glu Ala Glu Tyr Ala Leu Arg Ala Leu Phe Thr Ala 30
Met Pro Arg Leu Arg Leu Ala Glu Gly Phe Arg Pro Val Trp Ala Gly Leu Ile Thr Arg
Ala Pro Arg Ser Leu Ile Val Arg Pro Gly Gly (SEQ ID NO:6)

```

【 0 1 3 7 】

典型的なSEQ ID NO:7は、

```

atgccccca acaccgtccc gaccccgggtg ccaggaggcc gaccgctgat cgggcacgcc      60
cgccaactgc tgtggcgcag gctgccgttc ctggagtcgc tgcgggacca cggcgacatc     120
gtggtgatcc gcctcggccc gtggcggatc catgtgtcga acgaccggc gctcgtccgc     180
gacgtcctca ccaaacgctc cccggacttc gggctgagcc cccagttcca ggtgatgaaa     240
cgcgatcatcg gcaacgggct cctcgccacc gacggcccct tccaccgccc gcagcgcaaaa     300
ctgatcctcc ccgccctgca ccacaccagg atccgcgcct acgcccgcac catgaccgccc     360
ctcgccgacg cccgtaccgc ccgctggcag gacgggcaga ccctgcgcgt cgacgcggag     420
ttaccgaac tggccaccga gatcgtgtg cgctgcctgt tctccaccga gatcggcggc     480
gccgacgtgg ccgcccgtgt ggcccacctg cccgacctga tgagctgggc cggcagccgc     540
ggcctcgacc cgaccgggct gctcggcgcc gtccccacc cgctgggccc cgccttccgg     600
cgctccatgg cggtgctgga cgcgctgctc gcccggtca tcggggccc cgggcccggac     660
ggccccggcca ccgaccacc cgacctgctc gccgcgctgc tcgccccc cgacgcggag     720
accggggagc ccatgtccga ccggcagatc cgcgacgagg ccatgtcgtt cctggtggcc     780
ggggccgaat cggcttccc caccctgacc tggagcggcc tgctgctggc cggcgacccc     840
gaggcggccc gccggtcca ccaggaggcc gatcgcgaac tgtccggccc cccggcccac     900
ttcgaggacc tgccgaggct gcgccacacc cgcatggtgc tccaggaggc gctgcgcctg     960

```

```

taccgccccg gctacctgat ctcccgggcg gcgctgcgcg acaccacgct cggcccctac      1020
cgcatcccgg ccggcgccac cgtgatgttc tcctactacg ccctccagcg ggacccccgc      1080
cgcttcccgg acccggcccc gttcgaccgg ttgcgctggt cgcccaagcg cggcggcgcc      1140
gaccgggagg cgttcacgcc gttcggcctc ggcccgcacg gctgcctcgg cgagagcttc      1200
gcgtggaccg agatgtccat cgtgctcgcc accctcgccg cccgctggga gctgcgctcc      1260
gcctcgccgc gcccggtgcg gccgggtgcc accttctccc tgaccatggc cggcgccccg      1320
atgaccgtca ccgcgcggcc ggtgcgcacc ggccccgtcc acaccctgct ggccagccgt      1380
aacggaggat ga                                                                1392

```

である。

【 0 1 3 8 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:7 の1~21残基及びSEQ ID NO:7の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 3 9 】

典型的なSEQ ID NO:7は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Pro Pro Asn Thr Val Pro Thr Pro Val Pro Gly Gly Arg Pro Leu Ile Gly His Ala
Arg Gln Leu Leu Trp Arg Arg Leu Pro Phe Leu Glu Ser Leu Arg Asp His Gly Asp Ile
Val Val Ile Arg Leu Gly Pro Trp Arg Ile His Val Leu Asn Asp Pro Ala Leu Val Arg
Asp Val Leu Thr Lys Arg Ser Pro Asp Phe Gly Leu Ser Pro Gln Phe Gln Val Met Lys
Arg Val Ile Gly Asn Gly Leu Leu Ala Thr Asp Gly Pro Phe His Arg Arg Gln Arg Lys
Leu Ile Leu Pro Ala Leu His His Thr Arg Ile Arg Ala Tyr Ala Arg Thr Met Thr Arg
Leu Ala Asp Ala Arg Thr Ala Arg Trp Gln Asp Gly Gln Thr Leu Arg Val Asp Ala Glu
Phe Thr Glu Leu Ala Thr Glu Ile Val Leu Arg Cys Leu Phe Ser Thr Glu Ile Gly Gly
Ala Asp Val Ala Ala Val Val Ala Ala Leu Pro Asp Leu Met Ser Trp Ala Gly Ser Arg
Gly Leu Asp Pro Thr Gly Leu Leu Gly Ala Val Pro Thr Pro Leu Gly Arg Arg Phe Arg
Arg Ser Met Ala Val Leu Asp Ala Leu Leu Ala Arg Val Ile Gly Ala Arg Arg Ala Asp
Gly Pro Ala Thr Asp His Pro Asp Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Arg Asp Ala Glu
Thr Gly Glu Pro Met Ser Asp Arg Gln Ile Arg Asp Glu Ala Met Ser Phe Leu Val Ala
Gly Ala Glu Ser Val Ser Arg Thr Leu Thr Trp Ser Ala Leu Leu Leu Ala Gly Asp Pro
Glu Ala Ala Arg Arg Leu His Gln Glu Ala Asp Arg Glu Leu Ser Gly Arg Pro Ala His
Phe Glu Asp Leu Pro Arg Leu Arg His Thr Arg Met Val Leu Gln Glu Ala Leu Arg Leu
Tyr Pro Pro Gly Tyr Leu Ile Ser Arg Ala Ala Leu Arg Asp Thr Thr Leu Gly Pro Tyr
Arg Ile Pro Ala Gly Ala Thr Val Met Phe Ser Tyr Tyr Ala Leu Gln Arg Asp Pro Arg
Arg Phe Pro Asp Pro Ala Arg Phe Asp Pro Leu Arg Trp Ser Pro Lys Arg Gly Gly Ala
Asp Arg Glu Ala Phe Thr Pro Phe Gly Leu Gly Pro His Gly Cys Leu Gly Glu Ser Phe
Ala Trp Thr Glu Met Ser Ile Val Leu Ala Thr Leu Ala Ala Arg Trp Glu Leu Arg Ser
Ala Ser Pro Arg Pro Val Arg Pro Val Pro Thr Phe Ser Leu Thr Met Ala Gly Ala Pro
Met Thr Val Thr Ala Arg Pro Val Arg Thr Gly Pro Val His Thr Leu Leu Ala Ser Arg
Asn Gly Gly (SEQ ID NO: 8)

```

である。

【 0 1 4 0 】

典型的なSEQ ID NO:9は、

```

gtggaccgga ttctggatct ggcccgaccg tcgatcctgc ggaacccta cccctcgtag      60
gaccggatgc gcgagaccgg cccggctctc tggcacgaac tgctcggttc gtgggtcctg      120
acccggcacg ccgactgcct cgcggtgctc accgacagca accgtttcgc ctccgactgg      180
cgccgggccg gggaggacat ccccggccg ctgctcagcg tgcagacct cgaccgcccg      240
gagcacaccg ccatccggca cctcctctc gacggtttcc gggcccagga ccggcgggcg      300
ctccatgacg acctggaggg gcagatcgcc gatctgctcg cggagtggc cggccggccc      360
tccttcgacc tggctcgggga gctcgccgaa ccgatcgccc tccgcttcgt gaccgccttc      420
ctcggcgtcc cggccccgc gctcgactgg ttcgtgccc tgtcccgtac cgtcgtcgac      480
ggcatggacg ccgggctgtg gcccgagaag cagagaccgg ccgtcgccgc ccgcgcccag      540

```

```

ctcgcggagt acgcgggcg ctaggctcgcc gacccgccga aggacggcct catcgccctac      600
gtggccgagc acgcggcgga cagcggcgtg gcagaaacgg ttctgcggaa cagtctgcgc      660
gccgttctcc acgcgggcta cgaatccgcc tcccggctgc tcggcaacgc cgcggccgcc      720
ctcctacca cccccggcgc gctcgccgcg ttccgggcca ccccggccac ggccgtggac      780
gaactcatcc ggtacgacgc acccgtccag gcggacgcc gggtctgcgt caccgacacc      840
gaactgggtg gcgtcacgat gaaggcgggt gatccggtca cgctcttctt gggcgcggcc      900
aaccacgacc cgctccgctt cgaccacccc acagagctgc gactcgaccg cgccccgaac      960
ccgcacctcg ggttcggccg cggggcccat gcctgtctgg gcgctccat ggcgatccgg     1020
ctcaccggat cggctctcgg gaccctggcc acggaccacc ccggcgcacg ggcggtcgcg     1080
gaaccggaac accggcgcaa cctgaccctt cgcggtctcg accgcttcca ggtctgcctg     1140
cgtccagaca cgggggagga ggtacgacca tga                                     1173

```

である。

【 0 1 4 1 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:9 の1~21残基及びSEQ ID NO:9の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 4 2 】

典型的なSEQ ID NO:9は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Asp Pro Ile Leu Asp Leu Ala Arg Pro Ser Ile Leu Arg Asn Pro Tyr Pro Ser Tyr
Asp Arg Met Arg Glu Thr Gly Pro Val Phe Trp His Glu Leu Leu Gly Ser Trp Val Leu
Thr Arg His Ala Asp Cys Leu Ala Val Leu Thr Asp Ser Asn Arg Phe Ala Ser Asp Trp
Arg Arg Ala Gly Glu Asp Ile Pro Ala Pro Leu Leu Ser Val Gln Thr Leu Asp Pro Pro
Glu His Thr Ala Ile Arg His Leu Leu Leu Asp Gly Phe Arg Ala Gln Asp Arg Arg Ala
Leu His Asp Asp Leu Glu Gly Gln Ile Ala Asp Leu Leu Ala Glu Leu Ala Gly Arg Pro
Ser Phe Asp Leu Val Gly Glu Leu Glu Pro Ile Ala Leu Arg Phe Val Thr Ala Phe Leu
Gly Val Pro Ala Pro Ala Leu Asp Trp Phe Val Pro Met Ser Arg Thr Val Val Asp Gly
Met Asp Ala Gly Leu Trp Pro Glu Lys His Glu Pro Ala Val Ala Ala Arg Ala Gln Leu
Ala Glu Tyr Ala Gly Gly Trp Leu Ala Asp Pro Pro Lys Asp Gly Leu Ile Ala Tyr Val
Ala Glu His Ala Ala Asp Ser Gly Val Ala Glu Thr Val Leu Arg Asn Ser Leu Arg Ala
Val Leu His Ala Gly Tyr Glu Ser Ala Ser Arg Leu Leu Gly Asn Ala Ala Ala Ala Leu
Leu Thr Thr Pro Gly Ala Leu Ala Ala Phe Arg Ala Thr Pro Ala Thr Ala Val Asp Glu
Leu Ile Arg Tyr Asp Ala Pro Val Gln Ala Asp Ala Arg Val Cys Val Thr Asp Thr Glu
Leu Gly Gly Val Thr Met Lys Ala Gly Asp Pro Val Thr Leu Phe Leu Gly Ala Ala Asn
His Asp Pro Leu Arg Phe Asp His Pro Thr Glu Leu Arg Leu Asp Arg Ala Pro Asn Pro
His Leu Gly Phe Gly Arg Gly Ala His Ala Cys Leu Gly Ala Ser Met Ala Ile Arg Leu
Thr Gly Ser Val Leu Gly Thr Leu Ala Thr Asp His Pro Gly Ala Arg Ala Val Ala Glu
Pro Glu His Arg Arg Asn Leu Thr Leu Arg Gly Leu Asp Arg Phe Glu Val Cys Leu Arg
Pro Asp Thr Gly Glu Glu Val Arg Pro (SEQ ID NO:10)

```

【 0 1 4 3 】

典型的なSEQ ID NO:11は、

```

atgactttga agttcaacc ctactgcgaa gagttttacc agaaccctg gcagaacttc      60
cgggcgcttc gaacgcagga cccggtccac tataatcgagg aattcgatgc ctgggctctg     120
ttcggtttcg aggatgtgtg gcgcgcgggc atggaccggg aaagcttcac cgctacctac     180
ggcagctctc cacaggcgtc gctgatcgac cgggtaaagc agccggagat cttcctgttc     240
atggacatac cgaaccacat gatccaccgc ggcattattg cgaaggatta cggccgcaac     300
gcatgccgc ttctcgagg gaagatccgc gccacggcaa aagaggcgat tacgccctac     360
ctgaagtccg gtgagatgga cgtttacgcc ttcgcccgtc cagtggcgct tttcaccatc     420
gctgacatga tcggtctgcg gccggaagag gtcgtccgta tccggtccct tatcgatatt     480
ttcttcgggc gcacaccagg ccatcgaggc acaaccccg acggcgtggc ggcctttcac     540
gaagtaaccg cctactctt tgatctgatc ggccactacc gggcgaagg cgcaccggag     600
ggcagccaca tcgacaactg gctcaaggca gagccgatg gccggcccct cgacgatcag     660

```

```

gcgctgtgcg ccaatatctt ttcgctgtcg attacgggct cggacaccgt gcccctgtca      720
tcggcggcgg caatctatta tctgtcggag catccggcgc agctggaggc ggtgctcc      780
gaccgcgcgc tgattcccgc cgccttcgct gagaccgtgc gctacgatca gccgaccaat      840
gtactgggccc gactgcttgc cattgacacc gacaaatagc gcaagccgat gaaaaaaggt      900
caagcgggcc tgttcatgta tgcgtcggca aaccgtgacc cgctggaatt cgaacacccc      960
gacacgttca atataaccg cgatccccgg cgcaccctgt ccttcggctc cggcatccat     1020
atctgtctgg gccagcttct ggccaaactg gaaggtcaga tcattctgga aacgctgttt     1080
gagcatatcc cggactttac ggtccagtat aaggaggtgc ggcgcattcc cggcgaattt     1140
ctccaggggt tcggggcat gccgatccgc ttcccgtgc gaacctga                       1188

```

である。

10

【 0 1 4 4 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:11 の1~21残基及びSEQ ID NO:11の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 4 5 】

典型的なSEQ ID NO:11は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Thr Leu Lys Phe Asn Pro Tyr Cys Glu Glu Phe Tyr Gln Asn Pro Trp Gln Asn Phe
Arg Ala Leu Arg Thr Gln Asp Pro Val His Tyr Ile Glu Glu Phe Asp Ala Trp Ala Leu
Phe Gly Phe Glu Asp Val Trp Arg Ala Gly Met Asp Arg Glu Ser Phe Thr Ala Thr Tyr
Gly Ser Ser Pro Gln Ala Leu Leu Ile Asp Arg Val Lys Gln Pro Glu Ile Phe Leu Phe
Met Asp Ile Pro Asn His Met Ile His Arg Gly Ile Ile Ala Lys Asp Tyr Gly Arg Asn   20
Ala Met Pro Leu Leu Glu Gly Lys Ile Arg Ala Thr Ala Lys Glu Ala Ile Thr Pro Tyr
Leu Lys Ser Gly Glu Met Asp Val Tyr Ala Phe Ala Arg Thr Val Ala Leu Phe Thr Ile
Ala Asp Met Ile Gly Leu Arg Pro Glu Glu Val Val Arg Ile Arg Ser Leu Ile Asp Ile
Phe Phe Gly Arg Thr Pro Gly His Arg Gly Thr Thr Pro Asp Gly Val Ala Ala Phe His
Glu Val Thr Ala Tyr Val Leu Asp Leu Ile Gly His Tyr Arg Ala Lys Gly Ala Pro Glu
Gly Ser His Ile Asp Asn Trp Leu Lys Ala Glu Pro Asp Gly Arg Pro Leu Asp Asp Gln
Ala Leu Cys Ala Asn Ile Phe Ser Leu Ser Ile Thr Gly Ser Asp Thr Val Pro Leu Ser
Ser Ala Ala Ala Ile Tyr Tyr Leu Ser Glu His Pro Ala Gln Leu Glu Ala Val Arg Ser
Asp Arg Ala Leu Ile Pro Ala Ala Phe Ala Glu Thr Val Arg Tyr Asp Gln Pro Thr Asn
Val Leu Gly Arg Leu Leu Ala Ile Asp Thr Asp Lys Tyr Gly Lys Pro Met Lys Lys Gly   30
Gln Ala Val Leu Phe Met Tyr Ala Ser Ala Asn Arg Asp Pro Leu Glu Phe Glu His Pro
Asp Thr Phe Asn Ile Tyr Arg Asp Pro Arg Arg Thr Leu Ser Phe Gly Ser Gly Ile His
Ile Cys Leu Gly Gln Leu Leu Ala Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ile Leu Glu Thr Leu Phe
Glu His Ile Pro Asp Phe Thr Val Gln Tyr Lys Glu Val Arg Arg Ile Pro Gly Glu Phe
Leu Gln Gly Phe Gly Val Met Pro Ile Arg Phe Pro Leu Arg Thr (SEQ ID NO:12)

```

【 0 1 4 6 】

典型的なSEQ ID NO:13は、

```

atgagcgagt ccctccacac cgtcaccacg ctgccgaccg agcgtcagac cgggtgcccc      60
ttcgaccgcg cggcggaaact gatcgacgca cgccaacacg gtggcatcag ccggtgcacc      120
catcccggcg gcaagcccgg ctatctgatc accggttacg acctcgtccg atccgtactg      180
gccgatcccc ggttcagctc gcgcaaggac ctctgaacg tcgtcgactt cgagctcccg      240
cccgccctc cgggcgagtt cctcctcatg gacgagcccc agcattcgcg ctaccggaag      300
ccgctcgtcg gcaagttcac cgtgcggcgc atgcgactgc tcaccgaacg catcgagcag      360
atcaccacgg aatgcctgga cgccatggag gaggccgggc cgtcggcgga cctcgtggcc      420
gcgttcgcca agccgatccc caccatcgtc atctgcgagc tgctgggcgt tccgtacgag      480
gaccgtgcct cgttccagga gcagatcgac acgttcatga gcggcgagac gagcgacgag      540
gacctcatcg cggcgtacac cgccaccag acctacctg cggagctggt ggccgccaag      600
cgcgcgaaac ccaccgacga cgtgctgagc gaactgaccg acagcgacct caccgacgag      660
gaactgcagg gcatcagcct gatcctgctc gcggccggct tcgacacgac cgcgaacatg      720
ctctccctcg gtacctcgc ccttctgcag caccggcccc aactggccgc gctgcaggcc      780

```

50

gaccccggcc tcatcgacca ggccgtcgaa gagctgctgc ggtacctcag cgtcgcaag 840  
 acgttcatgc ggaccgctc cgtcgacgtc gaggtcggcg gccacaccgt cgaggcgggc 900  
 acgaccgtcg tcctgtcgta cagcacggcc aaccgcgacc ccgagcgctt cgacgacccc 960  
 cacgtgctcg acgtgcaccg gaagcagggc gggcacctgg ccttcggcca cggcatccac 1020  
 ctgtgcctgg gtcagcaact cgcccgcgtc gagatgcgga tcgcatcgc cgcgctgctc 1080  
 gaccgcttcc ccacgctgcg cctcgccgtc cccgccgagg aggtcgccct gcggcccag 1140  
 accgaggaca tctacggggt gaagagcctt cccgtcacct gggacgtatg a 1191

である。

【 0 1 4 7 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:13 の1~21残基及びSEQ ID NO:13の相補配列の最後21残基である。 10

【 0 1 4 8 】

典型的なSEQ ID NO:13は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Ser Glu Ser Leu His Thr Val Thr Thr Leu Pro Thr Glu Arg Gln Thr Gly Cys Pro  
 Phe Asp Pro Pro Ala Glu Leu Ile Asp Ala Arg Gln His Gly Gly Ile Ser Arg Cys Thr  
 His Pro Gly Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Ile Thr Gly Tyr Asp Leu Val Arg Ser Val Leu  
 Ala Asp Pro Arg Phe Ser Ser Arg Lys Asp Leu Leu Asn Val Val Asp Phe Glu Leu Pro  
 Pro Ala Pro Pro Gly Glu Phe Leu Leu Met Asp Glu Pro Gln His Ser Arg Tyr Arg Lys  
 Pro Leu Val Gly Lys Phe Thr Val Arg Arg Met Arg Leu Leu Thr Glu Arg Ile Glu Gln  
 Ile Thr Thr Glu Cys Leu Asp Ala Met Glu Glu Ala Gly Pro Ser Ala Asp Leu Val Ala 20  
 Ala Phe Ala Lys Pro Ile Pro Thr Ile Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Pro Tyr Glu  
 Asp Arg Ala Ser Phe Gln Glu Gln Ile Asp Thr Phe Met Ser Gly Glu Thr Ser Asp Glu  
 Asp Leu Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Thr Gln Thr Tyr Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Lys  
 Arg Ala Lys Pro Thr Asp Asp Val Leu Ser Glu Leu Thr Asp Ser Asp Leu Thr Asp Glu  
 Glu Leu Gln Gly Ile Ser Leu Ile Leu Leu Ala Ala Gly Phe Asp Thr Thr Ala Asn Met  
 Ser Leu Gly Thr Phe Ala Leu Leu Gln His Pro Ala Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp  
 Pro Gly Leu Ile Asp Gln Ala Val Glu Glu Leu Leu Arg Tyr Leu Ser Val Ala Lys Thr  
 Phe Met Arg Thr Ala Leu Val Asp Val Glu Val Gly Gly His Thr Val Glu Ala Gly Thr  
 Thr Val Val Leu Ser Tyr Ser Thr Ala Asn Arg Asp Pro Glu Arg Phe Asp Asp Pro His  
 Val Leu Asp Val His Arg Lys Gln Gly Gly His Leu Ala Phe Gly His Gly Ile His Leu 30  
 Cys Leu Gly Gln Gln Leu Ala Arg Val Glu Met Arg Ile Ala Ile Ala Ala Leu Leu Asp  
 Arg Phe Pro Thr Leu Arg Leu Ala Val Pro Ala Glu Glu Val Ala Leu Arg Pro Glu Thr  
 Ala Asp Ile Tyr Gly Val Lys Ser Leu Pro Val Thr Trp Asp Val (SEQ ID NO:14)

【 0 1 4 9 】

典型的なSEQ ID NO:15は、

gtggccgctt ccgcccgcg cccgccggcg gcccgacct gggcggtgga cgacctgcc 60  
 gccctcgctt tcgaccgct gctcaccgaa ctcttgaga aggagcccgt cgcccgcattc 120  
 aggctgccgt tcgcccgcg gaacgaggcc tggctggtga cgcggtacga ggacgtgcgc 180  
 gcggtgacct ccgaccccc gttcagccgg acggcgctgc tcgaccagca ggtcaccaag 240  
 atgaccggcc acatggtggc ctggaaggcg gccctcaact acgccgatcc gccgtaccac 300 40  
 acccagctgc gcaaggcggg gaccaaggcg ttcaccgggc agagcaccag gcggctgcgt 360  
 ccgcttgccc aggcgggac cgaccggctc ctggacgcga tggaggcggc gggccgcccc 420  
 gccgacctga tgaagcatct gcacggccc ctgccgatgg cgggtggtgtg cgatctgctc 480  
 ggcatcccgg aggaggaccg ggcggagctg gcctcctggc cggacctgat cctgtcctcg 540  
 ggccccggcc cggagagcag caaggcggcc aaggcccaga tccacggcta cgtcatccgg 600  
 ctgctcgacc ggcggcgcg ggagccccag gacgatctgg cgggcgtgct cgcggagtcc 660  
 ctgcccagg ggccgatcac cgccgaggag gccgtctccc tggcgatggc gatcctgatc 720  
 agcggcgcgc acgcggtacg gaacaacagc gccaacatgg tgtacgtgct gtcacccgg 780  
 ccggagctcg cggaccggct gcgcgcccag cccggactgc tcccgcaggc cgtggacgag 840  
 ctgctgcgct ggatcccga ccgcaacggc gtcgggctgc cccggatcgc gacggaggac 900 50

```

gtcggagtcg gcggggtgct gatccgggcg ggtgaggcgg tctacgcctc ctacctcgcg      960
gccaaccggg acccggcggc cttcgaggac ccggaccgcc tcgacttcga ccgggagggc      1020
atcgggcacg tgtcgttcgg tcacggcccc caccactgca tgggcgcgat gctcaccgcc      1080
atggagtccg aggtgatgct gtcgacgctg ctgaccgct atccgcggct gcggctcgcg      1140
gggagcgccg aggacgtggt gtggcagtcg aaggggctca tccgcggccc gaaggaactc      1200
ctcgtgacct ggtga                                     1215

```

である。

【 0 1 5 0 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:15 の1~21残基及びSEQ ID NO:15の相補配列の最後21残基である。

10

【 0 1 5 1 】

典型的なSEQ ID NO:15は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Ala Ala Ser Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Thr Trp Ala Val Asp Asp Leu Pro
Ala Leu Ala Phe Asp Pro Leu Leu Thr Glu Leu Leu Glu Lys Glu Pro Val Ala Arg Ile
Arg Leu Pro Phe Ala Ala Arg Asn Glu Ala Trp Leu Val Thr Arg Tyr Glu Asp Val Arg
Ala Val Thr Ser Asp Pro Arg Phe Ser Arg Thr Ala Leu Leu Asp Gln Gln Val Thr Lys
Met Thr Gly His Met Val Ala Ser Lys Ala Ala Leu Asn Tyr Ala Asp Pro Pro Tyr His
Thr Gln Leu Arg Lys Ala Val Thr Lys Ala Phe Thr Gly Gln Ser Thr Arg Arg Leu Arg
Pro Leu Ala Gln Ala Gly Thr Asp Arg Leu Leu Asp Ala Met Glu Ala Ala Gly Arg Pro
Ala Asp Leu Met Lys His Leu His Gly Pro Leu Pro Met Ala Val Val Cys Asp Leu Leu
Gly Ile Pro Glu Glu Asp Arg Ala Glu Leu Ala Ser Trp Pro Asp Leu Ile Leu Ser Ser
Gly Pro Gly Pro Glu Ser Ser Lys Ala Ala Lys Ala Gln Ile His Gly Tyr Val Ile Arg
Leu Leu Asp Arg Arg Arg Ala Glu Pro Gln Asp Asp Leu Ala Gly Val Leu Ala Glu Ser
Leu Ala Glu Gly Arg Ile Thr Ala Glu Glu Ala Val Ser Leu Ala Met Ala Ile Leu Ile
Ser Gly Ala His Ala Val Arg Asn Asn Ser Ala Asn Met Val Tyr Val Leu Thr Arg Pro
Glu Leu Ala Asp Arg Leu Arg Ala Glu Pro Gly Leu Leu Pro Gln Ala Val Asp Glu Leu
Leu Arg Trp Ile Pro His Arg Asn Gly Val Gly Leu Pro Arg Ile Ala Thr Glu Asp Val
Glu Val Gly Gly Val Leu Ile Arg Ala Gly Glu Ala Val Tyr Ala Ser Tyr Leu Ala Ala
Asn Arg Asp Pro Ala Ala Phe Glu Asp Pro Asp Arg Leu Asp Phe Asp Arg Glu Gly Ile
Gly His Val Ser Phe Gly His Gly Pro His His Cys Met Gly Ala Met Leu Thr Arg Met
Glu Ser Glu Val Met Leu Ser Thr Leu Leu Asp Arg Tyr Pro Arg Leu Arg Leu Ala Gly
Ser Ala Glu Asp Val Val Trp Gln Ser Lys Gly Leu Ile Arg Gly Pro Lys Glu Leu Leu
Val Thr Trp (SEQ ID NO:16)

```

20

30

【 0 1 5 2 】

典型的なSEQ ID NO:17は、

```

atggccgctt gccccatct cccgaaggg caccttccc aggggttcga cgccaccgac      60
cccgacctgc tgcgcgaac cgtcccctt ccggagtca cccggctgcg gcagaccgca      120
ccggtgtggt ggtgcccga gccgcccgg gtcaccggct tcgcgacgg cgggtactgg      180
gccgtcacgc gccacgccg cgtcaagtac gtctccacc accccgagct gttctcctcg      240
aacgagaaca ccgccgtcat ccgcttcaac gagcacaat cccgggacca gatcgaggtc      300
cagaagctga tcatgctcaa catggaccg cccgagcaca cccgggtccg ccagatcgtc      360
cagcgcggct taccctccc cgcatccgc agcctgaaa ccgccctgcg cgaccgggcc      420
cacgccatcg tcgacgagg ccggcgccg gcggacgcc acggcacctt cgacttcgctc      480
accgggtcgc ccgtcgaact gccctccag gccatcgcc aactcatcgg cgtccccag      540
gaggaccgct cccggatctt cgactggtcg aacaagatg tcgctacga cgaccccgaa      600
tacgcatca ccgagggat cggcgccgag gccgcatgg aactcatcgg ctactcgatg      660
aacatggccg ccgcccga gtagtcccc gccgcccaca tcgtcagca gctcgtcgcc      720
gccgagggcc agggcaacct ctctccgac gaggtcggct tcttcgtgct gctgctcgcc      780
gtcggccgga acgagaccac ccgcaacgcc atcagccac gcatgcacgc ctctctcacc      840
caccgagc agtgggagct cttcaagcgc gagcggccc cgaccgccg cgaggagatc      900

```

40

50

gtccgctggg ccacccccgt cgtctccttc cagcggaccg cgaccagga caccgaactc 960  
 ggcggacaga agatcaccaa gggcgaccgc gtcggcctct tctactcctc cgccaacaac 1020  
 gacccccgagg tcttcaccga ccccgaacgc ttcgacatca cccgcgaccc caacccccac 1080  
 ctcggtctcg gcggcggcgg cccccacttc tgcctcggca agtccctcgc catcaaggag 1140  
 atcgagctga tcttcaacgc gatcgcggac gccctgcccg acctcacctc cgcgggcgaa 1200  
 ccgcgccgac tgcgggcccgc ctggctgaac ggcgtcaagg aactccgggt ccgcgccctc 1260  
 gcgtga 1266

である。

【 0 1 5 3 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:17 の1~21残基及びSEQ ID NO:17の相補配列の最後21残基である。 10

【 0 1 5 4 】

典型的なSEQ ID NO:17は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Ala Ala Cys Pro His Leu Pro Glu Gly His Leu Pro Glu Gly Phe Asp Ala Thr Asp  
 Pro Asp Leu Leu Arg Glu Arg Val Pro Phe Pro Glu Phe Thr Arg Leu Arg Gln Thr Ala  
 Pro Val Trp Trp Cys Pro Gln Pro Pro Gly Val Thr Gly Phe Ala Asp Gly Gly Tyr Trp  
 Ala Val Thr Arg His Ala Asp Val Lys Tyr Val Ser Thr His Pro Glu Leu Phe Ser Ser  
 Asn Glu Asn Thr Ala Val Ile Arg Phe Asn Glu His Ile Thr Arg Asp Gln Ile Glu Val  
 Gln Lys Leu Ile Met Leu Asn Met Asp Pro Pro Glu His Thr Arg Val Arg Gln Ile Val  
 Gln Arg Gly Phe Thr Pro Arg Ala Ile Arg Ser Leu Glu Thr Ala Leu Arg Asp Arg Ala 20  
 His Ala Ile Val Asp Glu Ala Arg Arg Gly Ala Asp Ala Asp Gly Thr Phe Asp Phe Val  
 Thr Arg Val Ala Val Glu Leu Pro Leu Gln Ala Ile Ala Glu Leu Ile Gly Val Pro Gln  
 Glu Asp Arg Ser Arg Ile Phe Asp Trp Ser Asn Lys Met Val Ala Tyr Asp Asp Pro Glu  
 Tyr Ala Ile Thr Glu Glu Ile Gly Ala Glu Ala Ala Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Met  
 Asn Met Ala Ala Ala Arg Lys Glu Cys Pro Ala Ala Asp Ile Val Ser Gln Leu Val Ala  
 Ala Glu Gly Gln Gly Asn Leu Ser Ser Asp Glu Phe Gly Phe Phe Val Leu Leu Leu Ala  
 Val Ala Gly Asn Glu Thr Thr Arg Asn Ala Ile Ser His Gly Met His Ala Phe Leu Thr  
 His Pro Asp Glu Trp Glu Leu Phe Lys Arg Glu Arg Pro Ala Thr Ala Ala Glu Glu Ile  
 Val Arg Trp Ala Thr Pro Val Val Ser Phe Gln Arg Thr Ala Thr Gln Asp Thr Glu Leu  
 Gly Gly Gln Lys Ile Thr Lys Gly Asp Arg Val Gly Leu Phe Tyr Ser Ser Ala Asn Asn 30  
 Asp Pro Glu Val Phe Thr Asp Pro Glu Arg Phe Asp Ile Thr Arg Asp Pro Asn Pro His  
 Leu Gly Phe Gly Gly Gly Gly Pro His Phe Cys Leu Gly Lys Ser Leu Ala Ile Lys Glu  
 Ile Glu Leu Ile Phe Asn Ala Ile Ala Asp Ala Leu Pro Asp Leu Thr Leu Ala Gly Glu  
 Pro Arg Arg Leu Arg Ala Ala Trp Leu Asn Gly Val Lys Glu Leu ArgVal Arg Ala Ser A  
 la (SEQ ID NO:18)

【 0 1 5 5 】

典型的なSEQ ID NO:19は、

gtgagcacca cccccgaacc cgcctcctgc cccgtgtcgt cccccgctcc cgagctcttc 60  
 acctgggagt tcgagagcga tccgtatccc gcgtacgcct ggctgcggga gcacgcgccc 120  
 gtgcaccgga cgacgctgcc cagcggggtc gaggcgtggc tggtagcgcg gtacggggac 180 40  
 gcccggcagg cgctggccga ccagcggctc tccaagaacc cggcgcacca cgacgagtcc 240  
 ccgcacgcca agggcaagac gggcattccg ggcgagcga aggccgagct gatgacgcat 300  
 ctgctcaaca tcgacccgcc ggaccacacc cggctgcggc ggctcgtctc gaaggccttc 360  
 accccgcgcc gggtcgccga gttcacgccg cgggtgcagg agctgaccga ccggtgatc 420  
 gacgccttcg tgacgaaggg gagcgcggac ctcatccacg acttcgcctt cccgctgccc 480  
 atctacgcga tctgacacct gctcggcgtg cccgaggagg accaggacga cttccgggac 540  
 tgggccggga tgatgatccg gcacggcggc gggccgcgcg gcggggtcgc gcggtcgggtg 600  
 aagaagatgc gcggctatct cgccgagctg atccaccgca agcgcgaagc gcccggggac 660  
 gacctcatct cggggtcat caaggcctcc gaccacgggg agcacctcac cgagaacgag 720  
 gcggccgcca tggccttcat cctgctcttc gccggcttcg agaccaccgt caacctcatc 780 50

```

ggcaacggcg tgtaccagct gctgcgccac cccgggcagc gcgagcggct gcagacctcg      840
ctcgcggccg gcgagaccgg gctcctggag accgggatcg aggagctgct gcggtacgac      900
gggccggtgg agatggccac ctggcggtac gcgaccgagc cgctgaccct cggcggggcag      960
gacatcccgg cgggcgaccc ggtgctcgtg gtccctcgcg cgcgaccg gcgaccggag      1020
cggttcgacc ggccggacgt gctcgacctc gcccggcgcg acaaccagca cctgggggtac      1080
gggcacggca tccactactg cctggggcgcg ccgctcgcgc ggctcgaagg gcagaccgcg      1140
ctcgcgaccc tgctgactcg gcttccggac ctgcgacttg ccgccgatcc ggccgaactg      1200
cggtggcgcg gcgggctcat catgcggggt ttgcgcacgc ttccggtgga gttctcccct      1260
tccgtacggg tccactga                                     1278

```

である。

10

【 0 1 5 6 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:19の1~21残基及びSEQ ID NO:19の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 5 7 】

典型的なSEQ ID NO:19は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

```

Met Ser Thr Thr Pro Glu Pro Ala Ser Cys Pro Val Ser Ser Pro Ala Pro Glu Leu Phe
Thr Trp Glu Phe Ala Ser Asp Pro Tyr Pro Ala Tyr Ala Trp Leu Arg Glu His Ala Pro
Val His Arg Thr Thr Leu Pro Ser Gly Val Glu Ala Trp Leu Val Thr Arg Tyr Gly Asp
Ala Arg Gln Ala Leu Ala Asp Gln Arg Leu Ser Lys Asn Pro Ala His His Asp Glu Ser
Pro His Ala Lys Gly Lys Thr Gly Ile Pro Gly Glu Arg Lys Ala Glu Leu Met Thr His   20
Leu Leu Asn Ile Asp Pro Pro Asp His Thr Arg Leu Arg Arg Leu Val Ser Lys Ala Phe
Thr Pro Arg Arg Val Ala Glu Phe Thr Pro Arg Val Gln Glu Leu Thr Asp Arg Leu Ile
Asp Ala Phe Val Thr Lys Gly Ser Ala Asp Leu Ile His Asp Phe Ala Phe Pro Leu Pro
Ile Tyr Ala Ile Cys Asp Leu Leu Gly Val Pro Glu Glu Asp Gln Asp Asp Phe Arg Asp
Trp Ala Gly Met Met Ile Arg His Gly Gly Gly Pro Arg Gly Gly Val Ala Arg Ser Val
Lys Lys Met Arg Gly Tyr Leu Ala Glu Leu Ile His Arg Lys Arg Glu Ala Pro Gly Asp
Asp Leu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Ala Ser Asp His Gly Glu His Leu Thr Glu Asn Glu
Ala Ala Ala Met Ala Phe Ile Leu Leu Phe Ala Gly Phe Glu Thr Thr Val Asn Leu Ile
Gly Asn Gly Val Tyr Gln Leu Leu Arg His Pro Gly Gln Arg Glu Arg Leu Gln Thr Ser
Leu Ala Ala Gly Glu Thr Gly Leu Leu Glu Thr Gly Ile Glu Glu Leu Leu Arg Tyr Asp   30
Gly Pro Val Glu Met Ala Thr Trp Arg Tyr Ala Thr Glu Pro Leu Thr Leu Gly Gly Gln
Asp Ile Pro Ala Gly Asp Pro Val Leu Val Val Leu Ala Ala Ala Asp Arg Asp Pro Glu
Arg Phe Asp Arg Pro Asp Val Leu Asp Leu Ala Arg Arg Asp Asn Gln His Leu Gly Tyr
Gly His Gly Ile His Tyr Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Gly Gln Thr Ala
Leu Ala Thr Leu Leu Thr Arg Leu Pro Asp Leu Arg Leu Ala Ala Asp Pro Ala Glu Leu
Arg Trp Arg Gly Gly Leu Ile Met Arg Gly Leu Arg Thr Leu Pro Val Glu Phe Ser Pro
Ser Val Arg Val His (SEQ ID NO:20)

```

【 0 1 5 8 】

典型的なSEQ ID NO:21は、

```

atgtacacca ttcccctac gccacagttc gacaacgaac ttgtcgatcc ggcgacctgg      60
gccgacgagg ccagaatcca tgcctacctg gcctggctgc gggagcacga cccggtgcgc      120
cggctcgagc ctgagggcta cgagcccttc tacgccatca cgaagcatgc cgacctgatg      180
gccatcgaac gcgacaagca ggtgttcata aacgaccgac gccctaccct ggcgcccggaa      240
gcggtcaccg cggcgatcga gcaactcacc gggcgccggc acctggtccg gtcgctggtg      300
cagatggacg agccggacca catgaagtac cggatgctca ccgctcctt cttcaccctg      360
cagaagctcg cggcgatgaa gccggagggt gagcgtctcg cggcgacta tgtggatcgg      420
atggcggagt tcggcggcga atgcgacttc gttcgggacg tggcggctctg gtaccgctg      480
cgggtggtga tgagtgcgct cggcgttccg ccggaggacg agccgctgat gatgaagctg      540
accagagagt tgttcggatc cagcgacccc gaggtccagc ggtccttcga catcatggcg      600
atcggcgacg tggtagggga cttcgaggcg tacttcaccg gcatctcgga agatcgccgg      660

```

50

cgcaatcccc gtgacgacat cgccacgctc attgcccacg ccaaaatcga cggggaaccc 720  
 attggtgacc tggaggcggc aggctattac atcatcatcg ccaccgcccg ccacgacacc 780  
 acctcctcga gtacggccgg cgggctgctc gcgctgatgg agaaccgccga ggagttccag 840  
 aaactgcgcg gcgacacgga tggcatgtg gccggcgcgg tcgacgaaat gattcgctgg 900  
 gtatccccag tgcgtcactt catgcgacc gccaccgagg actacgcaat ccgcggaag 960  
 accatcgcca agggcgaatc ggtgatcctg tggatccgt cggcgaaccg cgatgccgag 1020  
 gtgttcaacg acccgttcgc gttccgcgctc gagcggccgg cggcgcgcaa tttggccttc 1080  
 ggctacggcg ctacgctctg tctcgggtcaa catctggcgc ggatggaaat gcagacgttc 1140  
 taccggaac tgctgtcgcg ggtggggcac gtagagctgg cgggagagcc ccgctacgcc 1200  
 caggctgcct tcgtcggcgg actcaagagc ctgccgattc gctaccgcat gaagtga 1257

10

である。

【 0 1 5 9 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:21 の1~21残基及びSEQ ID NO:21の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 6 0 】

典型的なSEQ ID NO:21は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Tyr Thr Ile Pro Pro Thr Pro Gln Phe Asp Asn Glu Leu Val Asp Pro Ala Thr Trp  
 Ala Asp Glu Ala Arg Ile His Ala Tyr Leu Ala Trp Leu Arg Glu His Asp Pro Val Arg  
 Arg Leu Glu Pro Glu Gly Tyr Glu Pro Phe Tyr Ala Ile Thr Lys His Ala Asp Leu Met  
 Ala Ile Glu Arg Asp Lys Gln Val Phe Ile Asn Asp Pro Arg Pro Thr Leu Ala Pro Glu 20  
 Ala Val Thr Ala Ala Ile Glu Gln Leu Thr Gly Arg Arg His Leu Val Arg Ser Leu Val  
 Gln Met Asp Glu Pro Asp His Met Lys Tyr Arg Met Leu Thr Ala Ser Phe Phe Thr Arg  
 Gln Lys Leu Ala Ala Met Lys Pro Glu Val Glu Arg Leu Ala Ala His Tyr Val Asp Arg  
 Met Ala Glu Phe Gly Gly Glu Cys Asp Phe Val Arg Asp Val Ala Val Trp Tyr Pro Leu  
 Arg Val Val Met Ser Ala Leu Gly Val Pro Pro Glu Asp Glu Pro Leu Met Met Lys Leu  
 Thr Gln Glu Leu Phe Gly Ser Ser Asp Pro Glu Val Gln Arg Ser Phe Asp Ile Met Ala  
 Ile Gly Asp Val Val Arg Asp Phe Glu Ala Tyr Phe Thr Gly Ile Ser Glu Asp Arg Arg  
 Arg Asn Pro Arg Asp Asp Ile Ala Thr Leu Ile Ala His Ala Lys Ile Asp Gly Glu Pro  
 Ile Gly Asp Leu Glu Ala Ala Gly Tyr Tyr Ile Ile Ile Ala Thr Ala Gly His Asp Thr  
 Thr Ser Ser Ser Thr Ala Gly Gly Leu Leu Ala Leu Met Glu Asn Pro Glu Glu Phe Gln 30  
 Lys Leu Arg Gly Asp Thr Asp Arg His Val Ala Gly Ala Val Asp Glu Met Ile Arg Trp  
 Val Ser Pro Val Arg His Phe Met Arg Thr Ala Thr Glu Asp Tyr Ala Ile Arg Gly Lys  
 Thr Ile Ala Lys Gly Glu Ser Val Ile Leu Trp Tyr Pro Ser Ala Asn Arg Asp Ala Glu  
 Val Phe Asn Asp Pro Phe Ala Phe Arg Val Glu Arg Pro Ala Ala Arg Asn Leu Ala Phe  
 Gly Tyr Gly Ala His Val Cys Leu Gly Gln His Leu Ala Arg Met Glu Met Gln Thr Phe  
 Tyr Arg Glu Leu Leu Ser Arg Val Gly His Val Glu Leu Ala Gly Glu Pro Arg Tyr Ala  
 Gln Ala Ala Phe Val Gly Gly Leu Lys Ser Leu Pro Ile Arg Tyr Arg Met Lys (SEQ ID  
 NO:22)

30

【 0 1 6 1 】

典型的なSEQ ID NO:23は、

40

atggcgtcca ccaacagatt gagcccgatc ccgcatccgc cgactaaacc ggtggtcggc 60  
 aacatgctgt cgctggactc gacggcggc gtgcagaacc tggcacggct ggcaaggaa 120  
 ctggggccga tcttctggtt ggacatgatg ggggcgccga tcgtcatcgt ctccggccac 180  
 gatctcgtgg aagagctcag cgacgagaaa cgtttcgaca aggcggtacg cggggcgctg 240  
 cgccgcgtac gtgcggtcgg cggcgacggg ctgttcaccg ccgatacgtc ggagccgaac 300  
 tggagcaagg cgcataacat cctgctgcag ccgttcggca accgcgcat gcagtcctac 360  
 caccgagca tggtcgatat cgccgaacag ctctgaaga aatgggagcg gctgaacgtc 420  
 gacgacgaga tcgacgtcgt tcatgatatg accgcattga cgctcgacac catcggactg 480  
 tgcgggttcg attaccgctt caattcattt taccggcgtg attacatcc gttcgtcgcg 540  
 tcgttgggcc gttcgtcga aaccatcatg atgatccgcg gcctgccgtt ggaaaatctg 600

50

tgatgcaga	agcgtcggcg	cgacctcgcc	gccgacgttg	gcttcatgaa	caaaatggtc	660	
gacgagatca	ttgccgagcg	gcgcaggagc	gctgaagccg	agggaagaa	agacatgctc	720	
ggcgcaatga	tgaccggcgt	cgaccgcacc	accggtgaac	agcttgatga	cgtaacatc	780	
cgctatcaga	tcaacacgtt	tctgatcgcg	gggcatgaaa	ccaccagcgg	cctgttgtcg	840	
tgacgctgt	atgcgttgtt	gaagcatcct	gaaatttca	ggaaggccta	cgaggaagtc	900	
gaccgggtgc	tcgggcccga	tatcaacgcc	aggccgacct	atcagcaggt	gacacagctc	960	
acgtacatca	cgcagattct	gaaggaggcg	ctgcggttgt	ggccgcccgc	gccggcctat	1020	
ggcatctcgc	cgctcaagga	cgagaccatc	ggcggcaagt	acaaattaa	gaagaacacg	1080	
ttcatcaccg	tattggtgct	ggcactgcac	cgcgatcgca	gcgtgtgggg	atccaatccc	1140	
gatgcgttcg	atccggaaaa	tttcagccgc	gaggccgagg	cgcgccggcc	catcaacgcc	1200	10
tggaagccgt	tcggcaacgg	tcagcgcgcc	tgatcggcc	gtggctttgc	gatgcatgaa	1260	
gcggcgcttg	cgatcgggat	gatcctgcaa	cgcttcaagc	tggtcgacgt	caaccgttac	1320	
cagatggtgt	tgaaggagac	gctgacgatc	aagcctgacg	gcttcaagat	caaggtgcgg	1380	
ccgcggggccg	aacgggatcg	cggcgcttac	ggcggcgcgg	catctgtagc	gatggccccg	1440	
aacacgccga	cggcgccccca	cgagcgaacg	cgctctggggc	acaacacgcc	gctgttgggtg	1500	
ctttatggat	cgaacctcgg	caccgcgga	gaactcgcga	cccgcgttgc	cgatctcgcc	1560	
gaagtcaacg	gctttgccac	caaactggcg	ccgctcgatg	atttcgtcgg	caagctgccg	1620	
gagcaaggcg	gcgttctgat	tttctgtcgg	tcctacaatg	gtgtaccgcc	cgacaacgcc	1680	
acgcagttcg	tcaaatggct	tggcggcgat	atcccaaagg	atagttttgc	caaggtgcgt	1740	
tacgcggtgt	tcggctgcgg	caacagcgac	tggcccgca	cctatcagtc	agtgccgcgc	1800	20
ctgatcgacg	agcaattggc	ggcgcacggc	gcgcgcagcg	tttatacgcg	aggcgagggc	1860	
gacgcccgca	gcgatcttga	cgggcaattc	gagagctggt	tgcagccgc	agctccggcg	1920	
gcaaccaggg	agtttggctt	cgagtcaaat	ttcagccgca	gcgctgatga	tgcgccgctc	1980	
tacacgatcg	aaccggtggc	accatcagtg	gtcaatacga	tcgtcaccca	ggcgggcgctc	2040	
ttgccgatga	aggtagtggc	caactccgaa	ctgcaaaaca	agctgggcac	caatccctct	2100	
gatcgttcga	cccggcatgt	cgaggtgcag	ctacctcag	gcatcagcta	tcgtgtcggc	2160	
gatcatctca	gcgtcgtgcc	gcgcaatgat	ccggcgctgg	tcgatgccgt	cgcgccggcg	2220	
ttcggctttc	tgccggcccga	ccagatccgg	ttgcaggtcg	ccgaaggccg	ccgtgcgcaa	2280	
ctgccggtcg	gcgacgccgt	ttcggtcggg	cggctgttga	ccgagttcgt	cgagttgcag	2340	
caggtcgcga	cccgcaagca	aatccagatc	ttgtcggaac	acacgcgttg	tccgatgacc	2400	30
aagcccaaac	tggtagggcct	ggccggagac	gacgcagctt	ccgcggaacg	ctaccgcgcc	2460	
gaggtgctcg	gcaagcgcga	atcgggtgtt	gacctgctgg	aggaacatcc	ggcctgcgaa	2520	
ttgccgttcc	acgcgtttct	ggaaatgctg	tcgctgctgg	cgccgcgcta	ttattcgatc	2580	
tcgtcgtcgc	cgccggggcga	gccccgcgct	tcagcgttta	ccgcggccgt	ggtcgcacgc	2640	
ctgcgagtt	cgggacgcgg	tatctaccgg	ggcgtctgtt	cgaactatct	tgccgggccc	2700	
cgcgcagggtg	acaccatcca	cgccaccgtg	cgcgaaacca	aggccggctt	ccggctgccg	2760	
aatgatccgt	ccgtgccgat	catcatgatc	ggccccggca	cgggtctggc	gccgtttcgt	2820	
ggtttcctgc	aggagcgtgc	cgcgttgacg	gcaaaggcg	ctacgcttgg	tccggcgatg	2880	
ctgtttttcg	gctgccgtca	ccccgaacag	gattatctct	atgccgatga	actaaaggcg	2940	
ttcgccgccg	acgggattac	cgagttgcac	accgcgttct	cgcgccggcga	cggaccgaag	3000	40
acgtatgtgc	agcatctgat	cgtggccgag	aaggatcggg	tctgcagcct	gatcgagcaa	3060	
ggcgcgatca	tctacgtttg	tggcgacggc	ggacggatgg	aaccggacgt	gaaagccacg	3120	
ctgttcggga	tctatcgcga	acgctccggc	gccgatgccg	gcactgcgca	gcgctggatc	3180	
gaagacctcg	gcgcaaaaa	ccgctacgtc	ctcagcgtct	gggcaggtgg	ataa	3234	

である。

【 0 1 6 2 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:23 の1~21残基及びSEQ ID NO:23の相補配列の最後21残基である。

【 0 1 6 3 】

典型的なSEQ ID NO:23は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Ala Ser Thr Asn Arg Leu Ser Pro Ile Pro His Pro Pro Thr Lys Pro Val Val Gly  
 Asn Met Leu Ser Leu Asp Ser Thr Ala Pro Val Gln Asn Leu Ala Arg Leu Ala Lys Glu  
 Leu Gly Pro Ile Phe Trp Leu Asp Met Met Gly Ala Pro Ile Val Ile Val Ser Gly His  
 Asp Leu Val Glu Glu Leu Ser Asp Glu Lys Arg Phe Asp Lys Ala Val Arg Gly Ala Leu  
 Arg Arg Val Arg Ala Val Gly Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ala Asp Thr Ser Glu Pro Asn  
 Trp Ser Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Gln Pro Phe Gly Asn Arg Ala Met Gln Ser Tyr  
 His Pro Ser Met Val Asp Ile Ala Glu Gln Leu Val Lys Lys Trp Glu Arg Leu Asn Val  
 Asp Asp Glu Ile Asp Val Val His Asp Met Thr Ala Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu  
 Cys Gly Phe Asp Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Arg Asp Tyr His Pro Phe Val Ala  
 Ser Leu Val Arg Ser Leu Glu Thr Ile Met Met Ile Arg Gly Leu Pro Leu Glu Asn Leu 10  
 Trp Met Gln Lys Arg Arg Arg Asp Leu Ala Ala Asp Val Gly Phe Met Asn Lys Met Val  
 Asp Glu Ile Ile Ala Glu Arg Arg Arg Ser Ala Glu Ala Glu Gly Lys Lys Asp Met Leu  
 Gly Ala Met Met Thr Gly Val Asp Arg Thr Thr Gly Glu Gln Leu Asp Asp Val Asn Ile  
 Arg Tyr Gln Ile Asn Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu Leu Ser  
 Cys Thr Leu Tyr Ala Leu Leu Lys His Pro Glu Ile Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Glu Val  
 Asp Arg Val Leu Gly Pro Asp Ile Asn Ala Arg Pro Thr Tyr Gln Gln Val Thr Gln Leu  
 Thr Tyr Ile Thr Gln Ile Leu Lys Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Pro Ala Pro Ala Tyr  
 Gly Ile Ser Pro Leu Lys Asp Glu Thr Ile Gly Gly Lys Tyr Lys Leu Lys Lys Asn Thr  
 Phe Ile Thr Val Leu Val Leu Ala Leu His Arg Asp Arg Ser Val Trp Gly Ser Asn Pro  
 Asp Ala Phe Asp Pro Glu Asn Phe Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Arg Pro Ile Asn Ala 20  
 Trp Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys Ile Gly Arg Gly Phe Ala Met His Glu  
 Ala Ala Leu Ala Ile Gly Met Ile Leu Gln Arg Phe Lys Leu Val Asp Val Asn Arg Tyr  
 Gln Met Val Leu Lys Glu Thr Leu Thr Ile Lys Pro Asp Gly Phe Lys Ile Lys Val Arg  
 Pro Arg Ala Glu Arg Asp Arg Gly Ala Tyr Gly Gly Ala Ala Ser Val Ala Met Ala Pro  
 Asn Thr Pro Thr Ala Pro His Glu Arg Thr Arg Leu Gly His Asn Thr Pro Leu Leu Val  
 Leu Tyr Gly Ser Asn Leu Gly Thr Ala Glu Glu Leu Ala Thr Arg Val Ala Asp Leu Ala  
 Glu Val Asn Gly Phe Ala Thr Lys Leu Ala Pro Leu Asp Asp Phe Val Gly Lys Leu Pro  
 Glu Gln Gly Gly Val Leu Ile Phe Cys Ala Ser Tyr Asn Gly Val Pro Pro Asp Asn Ala  
 Thr Gln Phe Val Lys Trp Leu Gly Gly Asp Ile Pro Lys Asp Ser Phe Ala Lys Val Arg  
 Tyr Ala Val Phe Gly Cys Gly Asn Ser Asp Trp Ala Ala Thr Tyr Gln Ser Val Pro Arg 30  
 Leu Ile Asp Glu Gln Leu Ala Ala His Gly Ala Arg Ser Val Tyr Thr Arg Gly Glu Gly  
 Asp Ala Arg Ser Asp Leu Asp Gly Gln Phe Glu Ser Trp Phe Ala Ala Ala Ala Pro Ala  
 Ala Thr Arg Glu Phe Gly Leu Glu Ser Asn Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Ala Pro Leu  
 Tyr Thr Ile Glu Pro Val Ala Pro Ser Val Val Asn Thr Ile Val Thr Gln Gly Gly Val  
 Leu Pro Met Lys Val Val Ala Asn Ser Glu Leu Gln Asn Lys Leu Gly Thr Asn Pro Ser  
 Asp Arg Ser Thr Arg His Val Glu Val Gln Leu Pro Pro Gly Ile Ser Tyr Arg Val Gly  
 Asp His Leu Ser Val Val Pro Arg Asn Asp Pro Ala Leu Val Asp Ala Val Ala Arg Arg  
 Phe Gly Phe Leu Pro Ala Asp Gln Ile Arg Leu Gln Val Ala Glu Gly Arg Arg Ala Gln  
 Leu Pro Val Gly Asp Ala Val Ser Val Gly Arg Leu Leu Thr Glu Phe Val Glu Leu Gln  
 Gln Val Ala Thr Arg Lys Gln Ile Gln Ile Leu Ser Glu His Thr Arg Cys Pro Met Thr 40  
 Lys Pro Lys Leu Val Gly Leu Ala Gly Asp Asp Ala Ala Ser Ala Glu Arg Tyr Arg Ala  
 Glu Val Leu Gly Lys Arg Lys Ser Val Phe Asp Leu Leu Glu Glu His Pro Ala Cys Glu  
 Leu Pro Phe His Ala Phe Leu Glu Met Leu Ser Leu Leu Ala Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile  
 Ser Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro Ala Arg Cys Ser Val Thr Ala Ala Val Val Ala Ser  
 Pro Ala Ser Ser Gly Arg Gly Ile Tyr Arg Gly Val Cys Ser Asn Tyr Leu Ala Gly Arg  
 Arg Ala Gly Asp Thr Ile His Ala Thr Val Arg Glu Thr Lys Ala Gly Phe Arg Leu Pro  
 Asn Asp Pro Ser Val Pro Ile Ile Met Ile Gly Pro Gly Thr Gly Leu Ala Pro Phe Arg  
 Gly Phe Leu Gln Glu Arg Ala Ala Leu Gln Ala Lys Gly Ala Thr Leu Gly Pro Ala Met  
 Leu Phe Phe Gly Cys Arg His Pro Glu Gln Asp Tyr Leu Tyr Ala Asp Glu Leu Lys Ala  
 Phe Ala Ala Asp Gly Ile Thr Glu Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Gly Asp Gly Pro Lys 50

Thr Tyr Val Gln His Leu Ile Val Ala Glu Lys Asp Arg Val Cys Ser Leu Ile Glu Gln  
 Gly Ala Ile Ile Tyr Val Cys Gly Asp Gly Gly Arg Met Glu Pro Asp Val Lys Ala Thr  
 Leu Val Gly Ile Tyr Arg Glu Arg Ser Gly Ala Asp Ala Gly Thr Ala Gln Arg Trp Ile  
 Glu Asp Leu Gly Ala Lys Asn Arg Tyr Val Leu Asp Val Trp Ala Gly Gly (SEQ ID NO:2  
 4)

## 【 0 1 6 4 】

典型的なSEQ ID NO:25は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

gtgaacgcac cgaagagcac cgccccggc cgccgcgcgc cccaccgcct cgaccccacc	60	
ggccccctgcc cgcacgccgt caacgccgc ctcctcgcgg agggcgccgt cacccccgta	120	
ctcctccccg gcgacatcga cggcatggcc gtctcggcc acgacgccct ccgtgacttc	180	10
ctctcccacc ccgacgtcgc caagggcccc cagcacttca ccgccctctc cgagggccga	240	
atacccgacg gctggcccct gcgcacctc gccaccctcc cgggcatgat gaccgccgac	300	
ggcgccgacc accgccgtct gcgcgccctg gtgagcagcg ccttcaccgc ccgccgggtg	360	
gaggaactgc gccccgcgt cgcgacggtc gccgccggac tcctcgacgg actcgccgag	420	
gccgccgaac ggggcgacgg cgtcgcggac ctccgccgcc actacgccct cccgctgccg	480	
ctcggcgtca tctgcgaact cctcggcgtc gaccgggccc accaggaccg gctgcacgag	540	
ctctccgcgc tggctcgtcgc gaccgacatc gggcccgacc gcgccgtcgc cgtcaaccgc	600	
gagctcctcg aactcctcac cgccatcgcc gccccaagg ccgccgatcc gcgcgacgac	660	
ctcaccagcg cgctcatcgc ggccccgcac gaggacggcg accggctcgg cccgcacgag	720	
ctgatcggca ccctgctcct gctgatcgtc gccggccacg agaccaccct gaacctggtg	780	20
accaacgccg tgcgggcgt ctgctccac cgcgaccaac tcgccctggt cctcgacggc	840	
cgggcgagct ggtcggacgt ggtggaggag acgctccgct gggacagccc ggtcagctac	900	
tcccgttcc gctatccac ccgggacctc accgtcgacg gcaccctcat cccccggggc	960	
acccccgtcc tcgccggcta tgcggcggcg ggccgggaca ccaaggcca cggcccggac	1020	
gccgaccgct tcgacctcac gcgtacggcg acggtgaagc acctgtcact cggccacggc	1080	
ccgcaactact gcctgggcgc cccgctcgcc cggatggagg cggccgtcgc cctggagacg	1140	
ctgttcaccc gcttccccgg cctggacctg gccgtcccgg agtccgagtt gccccggcac	1200	
tccgggttcg tcggcaacag cgtccggacg ctcccggctc ggcccggcgg ctga	1254	

である。

## 【 0 1 6 5 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:25 の1~21残基及びSEQ ID NO:25の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 6 6 】

典型的なSEQ ID NO:25は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Asn Ala Pro Lys Ser Thr Ala Pro Gly Arg Arg Ala Pro His Arg Leu Asp Pro Thr		
Gly Pro Cys Pro His Ala Val Asn Ala Arg Leu Leu Ala Glu Gly Ala Val Thr Pro Val		
Leu Leu Pro Gly Asp Ile Asp Gly Met Ala Val Leu Gly His Asp Ala Leu Arg Asp Phe		
Leu Ser His Pro Asp Val Ala Lys Gly Pro Gln His Phe Thr Ala Leu Ser Glu Gly Arg		
Ile Pro Asp Gly Trp Pro Leu Arg Thr Phe Ala Thr Leu Pro Gly Met Met Thr Ala Asp		
Gly Ala Asp His Arg Arg Leu Arg Ala Leu Val Ser Ser Ala Phe Thr Ala Arg Arg Val	40	
Glu Glu Leu Arg Pro Arg Val Ala Thr Val Ala Ala Gly Leu Leu Asp Gly Leu Ala Glu		
Ala Ala Glu Arg Gly Asp Gly Val Ala Asp Leu Arg Arg His Tyr Ala Leu Pro Leu Pro		
Leu Gly Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Asp Arg Ala His Gln Asp Arg Leu His Glu		
Leu Ser Ala Leu Val Val Ala Thr Asp Ile Gly Pro Asp Arg Ala Val Ala Val Asn Arg		
Glu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Ala Ile Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asp Pro Arg Asp Asp		
Leu Thr Ser Ala Leu Ile Ala Ala Arg Asp Glu Asp Gly Asp Arg Leu Gly Pro His Glu		
Leu Ile Gly Thr Leu Leu Leu Leu Ile Val Ala Gly His Glu Thr Thr Leu Asn Leu Val		
Thr Asn Ala Val Arg Ala Leu Cys Ser His Arg Asp Gln Leu Ala Leu Val Leu Asp Gly		
Arg Ala Ser Trp Ser Asp Val Val Glu Glu Thr Leu Arg Trp Asp Ser Pro Val Ser Tyr		
Phe Pro Phe Arg Tyr Pro Thr Arg Asp Leu Thr Val Asp Gly Thr Leu Ile Pro Arg Gly	50	

Thr Pro Val Leu Ala Gly Tyr Ala Ala Ala Gly Arg Asp Thr Lys Ala His Gly Pro Asp  
 Ala Asp Arg Phe Asp Leu Thr Arg Thr Ala Thr Val Lys His Leu Ser Leu Gly His Gly  
 Pro His Tyr Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Met Glu Ala Ala Val Ala Leu Glu Thr  
 Leu Phe Thr Arg Phe Pro Gly Leu Asp Leu Ala Val Pro Glu Ser Glu Leu Pro Arg His  
 Ser Gly Phe Val Gly Asn Ser Val Arg Thr Leu Pro Val Arg Pro Gly Gly (SEQ ID NO:2  
 6)

## 【 0 1 6 7 】

典型的なSEQ ID NO:27は、

atggacgccg ctgctgacct cgtgtacgac ccctggtccc cggagttcgt cgccgatccc	60	
taccccgcct acgcccgggt gcgcgcgcc ggccgcgcgc actggcacgg gccgacgcg	120	10
cagtggctga tcccgcacca cgaggacgtg tcggcactgc tcagggaccg gcggctcggc	180	
cgtacgtaca cccatcgctt cacgcacgag gatttcgggc aggaggcccc ggacgcccgc	240	
tacgagccgt tccacacgct caacgaccac gggctgctcg acctggaggg cgccgaccac	300	
agccgcatcc ggcggtggt gtcgaaggcg ttcacccga ggaccgtgga ggacctggcg	360	
ccgaccgtac ggcggtggt gcgcccactg gtcggcggtc tggtcgcggc cggcgcgcc	420	
gacctcagg cggcggtggc ggaaccctg ccggtcgcgg tgatcgccga gatgctgggc	480	
gtccccgagg gcgacgagga gcgggcgcgg ctgccccct ggtcggcggc gatctgcccc	540	
atgttcgagc tgaatccctc ggaggagacg gcgcgcgccg cgggtggcggc ctctgtggag	600	
ttctccggct atctgcggga gctgatcgcc cggcgcgcca aggagccggg ggacgatctg	660	
atctcgtcgc tgatcgcggt ggaggagctg accgagcagg agatgatctc cacctgtgtg	720	20
ctcctcctga acgcggttca cgaggcgacc gtgaacacca cggtaacgg ctggtggacg	780	
ctgctcagag agggcgtccg gcccgatccc gaaaagtgt ccacagctgt ggaagaactt	840	
ctgcgctacg acaccccgct ccagatgttc gagcgggtgg tcctcgacga catcgagatc	900	
ggcgccaca cccttccgcg cggctccgag gtggccctgc tcctcggtc cgccaaccgc	960	
gacccgccc gcttcggccc gaccgcccac accctcgacc tcacccgcgc cgacaacccc	1020	
cacatcacct tcggcgccg catccactac tgctcggcg ccccgctcgc ccgtctcgaa	1080	
ctgacggcgg tcttcggcga gttgctccgc caggcgccgg gcctccggct cgcggcgagg	1140	
cccgtacgca agccgggata cgtgatccgc ggcttcgagg agctgctcgt cgagctgtga	1200	

である。

## 【 0 1 6 8 】

30

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:27 の1~21残基及びSEQ ID NO:27の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 6 9 】

典型的なSEQ ID NO:27は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Asp Ala Ala Ala Asp Pro Val Tyr Asp Pro Trp Ser Pro Glu Phe Val Ala Asp Pro		
Tyr Pro Ala Tyr Ala Gly Leu Arg Ala Ala Gly Arg Ala His Trp His Gly Pro Thr Arg		
Gln Trp Leu Ile Pro His His Glu Asp Val Ser Ala Leu Leu Arg Asp Arg Arg Leu Gly		
Arg Thr Tyr Thr His Arg Phe Thr His Glu Glu Phe Gly Gln Glu Ala Pro Asp Ala Ala		
Tyr Glu Pro Phe His Thr Leu Asn Asp His Gly Leu Leu Asp Leu Glu Gly Ala Asp His		
Ser Arg Ile Arg Arg Leu Val Ser Lys Ala Phe Thr Pro Arg Thr Val Glu Asp Leu Ala	40	
Pro Thr Val Arg Arg Leu Ala Ala Asp Leu Val Gly Gly Leu Val Ala Ala Gly Gly Gly		
Asp Leu Gln Ala Ala Val Ala Glu Pro Leu Pro Val Ala Val Ile Ala Glu Met Leu Gly		
Val Pro Glu Gly Asp Glu Glu Arg Ala Arg Leu Arg Pro Trp Ser Ala Ala Ile Cys Gly		
Met Phe Glu Leu Asn Pro Ser Glu Glu Thr Ala Arg Arg Ala Val Ala Ala Ser Val Glu		
Phe Ser Gly Tyr Leu Arg Glu Leu Ile Ala Arg Arg Arg Lys Glu Pro Gly Asp Asp Leu		
Ile Ser Ser Leu Ile Ala Val Glu Glu Leu Thr Glu Gln Glu Met Ile Ser Thr Cys Val		
Leu Leu Leu Asn Ala Gly His Glu Ala Thr Val Asn Thr Thr Val Asn Gly Trp Trp Thr		
Leu Leu Arg Glu Gly Val Arg Pro Asp Pro Glu Lys Leu Ser Thr Ala Val Glu Glu Leu		
Leu Arg Tyr Asp Thr Pro Leu Gln Met Phe Glu Arg Trp Val Leu Asp Asp Ile Glu Ile		
Gly Gly His Thr Leu Pro Arg Gly Ser Glu Val Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Asn Arg	50	

Asp Pro Ala Arg Phe Gly Pro Thr Ala Asp Thr Leu Asp Leu Thr Arg Ala Asp Asn Pro  
 His Ile Thr Phe Gly Ala Gly Ile His Tyr Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu  
 Leu Thr Ala Val Phe Gly Glu Leu Leu Arg Gln Ala Pro Gly Leu Arg Leu Ala Ala Glu  
 Pro Val Arg Lys Pro Gly Tyr Val Ile Arg Gly Phe Glu Glu Leu Leu Val Glu Leu (SEQ  
 ID NO:28)

## 【 0 1 7 0 】

典型的なSEQ ID NO:29は、

atgacctcc	caccgcccga	acacaccgcc	gagaaggcag	gggcggtccc	gccccgggc	60	
tgcccgccc	acgcctcaa	gggaccggc	ggagcgacc	ggctctacg	ccccgcccc	120	
gagacggacc	ccatgggct	gtacgaggca	ctgcgcgcc	aacacggccc	ggtcgcccc	180	10
gtgctgctc	acggagacgt	ccgcgcctg	ctcgtgctc	gctacctga	gaaccgagc	240	
gtggccagcc	gcccgacga	gtactcccgc	gaccgcgcg	tctggcacg	ctggcggagc	300	
ggcgagatc	accccgccac	ctgcccctc	gtcccgatg	tggctggcg	tcccgactgc	360	
gtgtgcgcc	acggcgagga	gcaccagcg	ctgcgcggg	cggtcacgg	cgggctcagc	420	
cagttcgacc	accgggggt	ccgccgccac	atcaccgct	tgcgcacca	gctgatcgac	480	
acgttctgc	aggacggcg	ggtggagct	gtcggcagt	taccgagca	cctgccgatg	540	
ctcacgctg	cccatctgt	cggcatgtc	gacgagtcg	ggccccggc	cgtgcacgcc	600	
gcccgtgacc	tcttcaagg	caccgagacc	tcgctcgcca	gcaacgccta	cgtgatcgag	660	
tgctcgaac	agctcgtct	cgccaagcg	tcccggccg	ggcaggacat	cgctccgcg	720	
ctgatggcac	accccgccg	gctcaccgac	gaggaggtg	tgaccacct	gcgctcatc	780	20
ctcctcgcg	ggtacgagac	gaccgccaac	ctcatgtcca	acgtcctgc	catggtggtc	840	
accgacccc	ggttccgagg	atcgctggc	ggcggccaga	tgaccctgc	cgaggccgtc	900	
gagcaggtcc	tctgggacga	gccgcccgt	atggtgtgc	ccggccggtg	ggccaacggc	960	
gacaccacc	tcggcggcc	gcagatcaag	gcgggcgaca	tgtgtgtgt	cggcctggcc	1020	
gccgggaac	tcgacaagg	gatccgccc	gacgcctcg	ccccgtcca	ccacaaccgc	1080	
gcccacctgt	cgttcagcg	cggcaccac	gagtgcccc	gccaggacat	cggccgcatc	1140	
atcgccgac	ccggcatcg	catcctgct	acccggctg	ccgacatcg	cctggccgtc	1200	
cccgaggaga	gcctgtcct	gcgctcctc	acctgggcc	ggcacctgac	ggcgctgccc	1260	
gtgcacttc	ccccccgct	ccccgaggg	cacgacgtc	cgaaccgct	gcccgcccc	1320	
ccggccccga	gcttcgggc	cccgtcggc	ccgctgtgg	cgtcgcccg	ccccggacc	1380	30
gcccggccgt	cggatcagg	gccgcccgc	ggcccgggt	ccggcggcg	ggccacggga	1440	
ggggcgctcc	ggcccgcgt	ggaacacgg	cccggaccc	gcgccacct	gcgtacgagg	1500	
gtcatgcgt	tcctgcggg	gcggtag				1527	

である。

## 【 0 1 7 1 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:29 の1~21残基及びSEQ ID NO:29の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 7 2 】

典型的なSEQ ID NO:29は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Thr Leu Pro Pro Ala Glu His Thr Ala Glu Lys Ala Gly Ala Val Pro Pro Pro Gly	40
Cys Pro Ala His Ala Ser Lys Gly Pro Gly Gly Ala Thr Arg Leu Tyr Gly Pro Ala Ala	
Glu Thr Asp Pro Met Gly Leu Tyr Glu Ala Leu Arg Ala Glu His Gly Pro Val Ala Pro	
Val Leu Leu Asp Gly Asp Val Arg Ala Trp Leu Val Leu Gly Tyr Leu Glu Asn Arg Asp	
Val Ala Ser Arg Pro Thr Gln Tyr Ser Arg Asp Pro Arg Val Trp His Gly Trp Arg Ser	
Gly Glu Ile Asp Pro Ala Thr Ser Pro Leu Val Pro Met Ile Gly Trp Arg Pro Asp Cys	
Val Cys Ala Asp Gly Glu Glu His Gln Arg Leu Arg Gly Ala Val Thr Ala Gly Leu Ser	
Gln Phe Asp His Arg Gly Val Arg Arg His Ile Thr Arg Phe Ala His Gln Leu Ile Asp	
Thr Phe Cys Glu Asp Gly Glu Val Glu Leu Val Gly Gln Phe Thr Glu His Leu Pro Met	
Leu Thr Leu Thr His Leu Leu Gly Met Ser Asp Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val His Ala	
Ala Arg Asp Leu Phe Lys Ala Thr Glu Thr Ser Leu Ala Ser Asn Ala Tyr Val Ile Glu	50

Cys Leu Glu Gln Leu Val Val Ala Lys Arg Ser Arg Pro Gly Gln Asp Ile Ala Ser Ala  
 Leu Met Ala His Pro Ala Gly Leu Thr Asp Glu Glu Val Leu His His Leu Arg Leu Ile  
 Leu Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Thr Ala Asn Leu Met Ser Asn Val Leu Arg Met Val Val  
 Thr Asp Pro Arg Phe Arg Gly Ser Leu Ala Gly Gly Gln Met Thr Leu Pro Glu Ala Val  
 Glu Gln Val Leu Trp Asp Glu Pro Pro Leu Met Val Cys Pro Gly Arg Trp Ala Asn Gly  
 Asp Thr Thr Leu Gly Gly Arg Gln Ile Lys Ala Gly Asp Met Leu Leu Leu Gly Leu Ala  
 Ala Gly Asn Val Asp Lys Ala Ile Arg Pro Asp Ala Ser Thr Pro Val His His Asn Arg  
 Ala His Leu Ser Phe Ser Ala Gly Thr His Glu Cys Pro Gly Gln Asp Ile Gly Arg Ile  
 Ile Ala Asp Ala Gly Ile Asp Ile Leu Leu Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ala Leu Ala Val  
 Pro Glu Glu Ser Leu Ser Trp Arg Ser Ser Thr Trp Ala Arg His Leu Thr Ala Leu Pro 10  
 Val His Phe Ala Pro Arg Val Pro Glu Gly His Asp Val Pro Asn Pro Leu Pro Ala Pro  
 Pro Ala Pro Ser Phe Gly Pro Pro Ser Ala Pro Leu Trp Pro Ser Pro Gly Pro Gly Pro  
 Ala Arg Pro Ser Asp Gln Ala Pro Pro Pro Gly Pro Val Pro Gly Gly Gly Ala Thr Gly  
 Gly Ala Ser Gly Pro Ala Ser Glu His Gly Pro Gly Pro Arg Ala Thr Trp Arg Thr Arg  
 Val Met Arg Phe Leu Arg Arg Arg (SEQ ID NO:30)

## 【 0 1 7 3 】

典型的なSEQ ID NO:31は、

atgtccgtca	tcgaactggg	ggagtacggc	gcgacttca	ccgcgaatcc	gtaccctac	60	
tacgcgaaac	tccgcgaagc	gggacccgtc	cacgaggtcc	ggatgccga	cggcttccag	120	
tcttgctgg	tcgtcggcca	cgaggagggg	cgcgccgcac	tcgccgacc	ccggctcgcc	180	20
aagtccccct	ccgtgatcgg	cgtacggccg	ccggaggagg	acatcatcgg	cgtccacctc	240	
ctcgccgcgg	acgcgcccga	ccacaccggg	ctgcgcccgc	tggtcaccgg	tgagttcacc	300	
ggccgtcggg	tggaggcct	gcgccccgc	atccagcagc	tgaccacgga	gctcgccgac	360	
gccatggaac	cggcaggccg	tgccgacctc	gtcgagcctt	tcgcctacc	gctgccgatc	420	
atcgtcatct	gcgagctcct	cggcgtcccc	gccgaggacc	gcgacacctt	ccgccgtgg	480	
tcgaaccagc	tggtcacgcc	caccggcgac	caggagttcg	gccaggcgat	ggtggacttc	540	
gcggcctatc	tcgacgcgct	catcgaggac	aagcggggccg	ccggaccac	cgacgacctg	600	
ctctccgccc	tgatcaccgc	ccgcgccgag	gacggcgacc	ggctctccgg	ccccgaactc	660	
cgcgccatgg	cctatctgct	gctcatcgcg	ggccacgaga	ccaccgtcaa	cctgatcgcc	720	
aacaccgtcc	gcaacctgct	caccacccc	gagcagctcg	cggccctccg	cgccgaccgg	780	30
gacctcctgg	acgggacgat	cgaggagtcc	ctgcggtacg	acggaccggt	ggagaccggc	840	
acgttccgct	tcaccgggga	ggccgtcacc	atcggcgggc	gggagatcgc	ggcgggcccag	900	
tacgtgctcg	tcggcatcgg	ggcgctcgac	cgcgaccccg	cccgttccc	cgaccccgcac	960	
cgcttcgaca	tccgccggga	caccgcggc	cacctcgctt	tcggccacgg	catccactac	1020	
tgcttggcg	ccccgctggc	ccgcctggag	ggccggatcg	ccctccgtac	cctcctcgac	1080	
cgcttcccgg	acctggaact	cgaccgggag	ggcgagccct	gggaatggct	ccccggcctc	1140	
ctgatgcgcg	gcgtccgaca	cctcccggtc	aggtggtga			1179	

である。

## 【 0 1 7 4 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:31 の1~21残基及びSEQ ID 40  
 NO:31の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 7 5 】

典型的なSEQ ID NO:31は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Ser Val Ile Glu Leu Gly Glu Tyr Gly Ala Asp Phe Thr Ala Asn Pro Tyr Pro Tyr  
 Tyr Ala Lys Leu Arg Glu Ala Gly Pro Val His Glu Val Arg Met Pro Asp Gly Phe Gln  
 Phe Trp Leu Val Val Gly His Glu Glu Gly Arg Ala Ala Leu Ala Asp Pro Arg Leu Ala  
 Lys Ser Pro Ser Val Ile Gly Val Arg Pro Pro Glu Glu Asp Ile Ile Gly Val His Leu  
 Leu Ala Ala Asp Ala Pro Asp His Thr Arg Leu Arg Arg Leu Val Thr Gly Glu Phe Thr  
 Gly Arg Arg Val Glu Gly Leu Arg Pro Arg Ile Gln Gln Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asp  
 Ala Met Glu Pro Ala Gly Arg Ala Asp Leu Val Asp Ala Phe Ala Tyr Pro Leu Pro Ile 50

Ile Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Pro Ala Glu Asp Arg Asp Thr Phe Arg Arg Trp  
 Ser Asn Gln Leu Val Thr Pro Thr Gly Asp Gln Glu Phe Gly Gln Ala Met Val Asp Phe  
 Ala Ala Tyr Leu Asp Ala Leu Ile Glu Asp Lys Arg Ala Ala Gly Pro Thr Asp Asp Leu  
 Leu Ser Ala Leu Ile Thr Ala Arg Ala Glu Asp Gly Asp Arg Leu Ser Gly Pro Glu Leu  
 Arg Ala Met Ala Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Val Asn Leu Ile Ala  
 Asn Thr Val Arg Asn Leu Leu Thr His Pro Glu Gln Leu Ala Ala Leu Arg Ala Asp Pro  
 Asp Leu Leu Asp Gly Thr Ile Glu Glu Ser Leu Arg Tyr Asp Gly Pro Val Glu Thr Gly  
 Thr Phe Arg Phe Thr Arg Glu Ala Val Thr Ile Gly Gly Arg Glu Ile Ala Ala Gly Gln  
 Tyr Val Leu Val Gly Ile Gly Ala Leu Asp Arg Asp Pro Ala Arg Phe Pro Asp Pro Asp  
 Arg Phe Asp Ile Arg Arg Asp Thr Arg Gly His Leu Ala Phe Gly His Gly Ile His Tyr 10  
 Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Gly Arg Ile Ala Leu Arg Thr Leu Leu Asp  
 Arg Phe Pro Asp Leu Glu Leu Asp Pro Glu Gly Glu Pro Trp Glu Trp Leu Pro Gly Leu  
 Leu Met Arg Gly Val Arg His Leu Pro Val Arg Trp (SEQ ID NO:32)

## 【 0 1 7 6 】

典型的なSEQ ID NO:33は、

atgagcgtcg	ccgtcgagac	cctgccggcc	tccccttcg	actgggacgg	gacccggctg	60	
cccgccgagg	tcgaggcgt	ccgcgccgaa	ccgtacgcc	gggtgcggac	gatcgccggg	120	
gccgaggcct	ggctggtctc	ctcgtacgag	ctgtgcaggc	aggtcctgga	ggacccgctg	180	
ttcagcctga	aggacacctc	ggcgccgggc	gcgccgggc	agtacgcgct	gacgatcccg	240	
ccgcacgtgg	tgaacaacat	gggcaacatc	accggggccg	ggctgcgcaa	ggccgtgatg	300	20
aaggcgatca	acccgaaggc	gcccggcctg	gaggagtggc	tcggggcgcg	ggccggggcc	360	
ctgggtggacg	cgctggtcgc	cgagggcgcg	cccgggggagc	tcgggggcgc	ctacgccgac	420	
ccgtactcgt	cggggctgca	ctgccggatg	ctgggcatcc	cggaggagga	cgggccgctg	480	
ctgctgcgca	gcctggacgt	ggccttcgatg	aacgccccgt	ccgagatcga	ggcggccccg	540	
ctccactggg	accgggacat	cgcgtacatg	accgagcgtc	tcgacgatcc	ggcgacgggc	600	
gggctgatgg	cggagctcgc	ggcgctcgc	gaggatcccg	agtacgcgca	tctgacggac	660	
gagatgctgg	cgacggtggg	cgtgacgctg	ttcggggccg	gggtgatctc	caccgccggg	720	
ttcctgacga	tggcgctcgt	gtcgggtctg	accgggccgg	acgtgcgggc	ggcgctgacc	780	
gccggcgggc	ggcacggggt	cgccggggcg	atggacgaac	tgctgcgggt	gaacctgtcc	840	
atcggcgacg	ggctgccccg	gctcgccctg	gaggacgtgc	ggctcggcga	cgctcgaggtg	900	30
cgggccgggtg	aactggtcct	ggtgctggtg	gaggccgca	accacgatcc	gctgcacttc	960	
ccggacccgc	tggccttccg	gccggaccgg	gagaacgccg	ccgaccacct	ctccttcggc	1020	
ggcggtcggc	actactgcc	ggcgacggcg	ctgggcaagc	ggcacgccga	gatcgccctg	1080	
gagacgctcc	tcgaccggct	gccggagctg	cggctcgcgg	tgccggtcga	gcagctggtg	1140	
tggcgcacca	acttcatgaa	gcggctcccg	gagcggctgc	cggtggcctg	gtag	1194	

である。

## 【 0 1 7 7 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:33 の1~21残基及びSEQ ID NO:33の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 7 8 】

典型的なSEQ ID NO:33は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Ser Val Ala Val Glu Thr Leu Pro Ala Phe Pro Phe Asp Trp Asp Gly Thr Arg Leu  
 Pro Ala Glu Val Glu Ala Leu Arg Ala Glu Pro Val Arg Arg Val Arg Thr Ile Ala Gly  
 Ala Glu Ala Trp Leu Val Ser Ser Tyr Glu Leu Cys Arg Gln Val Leu Glu Asp Pro Arg  
 Phe Ser Leu Lys Asp Thr Ser Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gln Tyr Ala Leu Thr Ile Pro  
 Pro His Val Val Asn Asn Met Gly Asn Ile Thr Gly Ala Gly Leu Arg Lys Ala Val Met  
 Lys Ala Ile Asn Pro Lys Ala Pro Gly Leu Glu Glu Trp Leu Arg Ala Arg Ala Gly Ala  
 Leu Val Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Ala Pro Gly Glu Leu Arg Gly Ala Tyr Ala Asp  
 Pro Tyr Ser Ser Gly Leu His Cys Arg Met Leu Gly Ile Pro Glu Glu Asp Gly Pro Arg  
 Leu Leu Arg Ser Leu Asp Val Ala Phe Met Asn Ala Pro Ser Glu Ile Glu Ala Ala Arg 40  
 50

Leu His Trp Asp Arg Asp Ile Ala Tyr Met Thr Glu Arg Leu Asp Asp Pro Ala Thr Gly  
 Gly Leu Met Ala Glu Leu Ala Ala Leu Arg Glu Asp Pro Glu Tyr Ala His Leu Thr Asp  
 Glu Met Leu Ala Thr Val Gly Val Thr Leu Phe Gly Ala Gly Val Ile Ser Thr Ala Gly  
 Phe Leu Thr Met Ala Leu Val Ser Val Leu Thr Arg Pro Asp Val Arg Ala Ala Leu Thr  
 Ala Gly Gly Gly His Gly Val Ala Gly Ala Met Asp Glu Leu Leu Arg Val Asn Leu Ser  
 Ile Gly Asp Gly Leu Pro Arg Leu Ala Leu Glu Asp Val Arg Leu Gly Asp Val Glu Val  
 Arg Ala Gly Glu Leu Val Leu Val Leu Val Glu Ala Ala Asn His Asp Pro Leu His Phe  
 Pro Asp Pro Leu Ala Phe Arg Pro Asp Arg Glu Asn Ala Ala Asp His Leu Ser Phe Gly  
 Gly Gly Arg His Tyr Cys Pro Ala Thr Ala Leu Gly Lys Arg His Ala Glu Ile Ala Leu  
 Glu Thr Leu Leu Asp Arg Leu Pro Glu Leu Arg Leu Ala Val Pro Val Glu Gln Leu Val 10  
 Trp Arg Thr Asn Phe Met Lys Arg Leu Pro Glu Arg Leu Pro Val Ala Trp (SEQ ID NO:3  
 4)

## 【 0 1 7 9 】

典型的なSEQ ID NO:35は、

gtgatcccgg ccacggagga gaacccggcc gcggcgccgc ggggtgccga cctgtccgac	60	
ccgctgctcc accagcgcg cgaggccgga ccggtcctgg cgcgactgcg gcgagaggaa	120	
ccggtctgcc aggtcaccgg ggcggacggc tcgacgttct gggccgtcct gtcgtacgag	180	
ctgatcacc aggtcctcgc cgacgccgcc accttcagct ccaccggcgg gatgcggtc	240	
gacgccgatc cgggtggcgac cgccgccgc accggcaaga tgatggtcat caccgaccgg	300	
ccgctgcacg gcatgatccg ccgggtcgtc agctcggcgt tcacccccg catggtgctc	360	20
cgctcgagg agaccatgcg gaccatctcg gtcgaggtca tcgaggccgc cctcgggcag	420	
gactcgatcg acttcaccga ggtggcggcc cggctgccgc tgtcggtcat ctgagacatg	480	
ctcggcgtgc cgcgcgccga ctgggacttc atgctgtccc gcacgatgac ggccttcggg	540	
gtgaacggcg acgacgggccc cgagcagcag cagcgggtgg cgacggccca caccgacatc	600	
ttcctgtact acgacgagct gatgcggctg cgcaggaagg agccgcagga ggacatcatc	660	
agcgcctcg tgcacggccc gatcgacggc aggccgtga ccgaggagga gatcatcctc	720	
aactgcaacg ggctgatctc cggcggcaac gagaccacc ggcacgccac catcggcgga	780	
ctgctcgcgc tcatcgagca ccccagcag tggcgccggc tcaggagga gccggaggtg	840	
ctgccgaccg cgggtgcagga gatcctgcgg ttcacgacgc ccgcatgca cgtgctgcgc	900	
accgccacc gggaaacgga actggcgggg cgccgatca aggcgggcca catggtcgcg	960	30
ctctggctgg cctcgggcaa ccgggacgag accgtcttcg cggaccggga ccgctttgac	1020	
atcgggcggc gcgaggtgaa ccgcaacctc acctcgcgt acggcagtca cttctgacatc	1080	
ggttcggcgc tcgccaccac ggagctgaac acctcttcg acgtcctcag acagcgggtc	1140	
gcacggcccc aactgaccgg agaggtacgg cgatgcgct ccaacctcat cggcggcatc	1200	
gagcacctgc cggctccgct ggtccccgg gaccgctga	1239	

である。

## 【 0 1 8 0 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:35 の1~21残基及びSEQ ID NO:35の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 8 1 】

典型的なSEQ ID NO:35は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Ile Pro Ala Thr Glu Glu Asn Pro Ala Ala Ala Pro Arg Val Pro Asp Leu Ser Asp  
 Pro Leu Leu His Gln Arg Gly Glu Ala Gly Pro Val Leu Ala Arg Leu Arg Arg Glu Glu  
 Pro Val Cys Gln Val Thr Arg Ala Asp Gly Ser Thr Phe Trp Ala Val Leu Ser Tyr Glu  
 Leu Ile Thr Gln Val Leu Ala Asp Ala Ala Thr Phe Ser Ser Thr Gly Gly Met Arg Leu  
 Asp Ala Asp Pro Val Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Lys Met Met Val Ile Thr Asp Pro  
 Pro Leu His Gly Met Ile Arg Arg Val Val Ser Ser Ala Phe Thr Pro Arg Met Val Leu  
 Arg Leu Glu Glu Thr Met Arg Thr Ile Ser Val Glu Val Ile Glu Ala Ala Leu Gly Gln  
 Asp Ser Ile Asp Phe Thr Glu Val Ala Ala Arg Leu Pro Leu Ser Val Ile Cys Asp Met  
 Leu Gly Val Pro Arg Ala Asp Trp Asp Phe Met Leu Ser Arg Thr Met Thr Ala Phe Gly 40  
 50

Val Asn Gly Asp Asp Gly Pro Glu Gln Gln Gln Arg Val Ala Thr Ala His Thr Asp Ile  
 Phe Leu Tyr Tyr Asp Glu Leu Met Arg Leu Arg Arg Lys Glu Pro Gln Glu Asp Ile Ile  
 Ser Ala Leu Val His Gly Arg Ile Asp Gly Arg Pro Leu Thr Glu Glu Glu Ile Ile Leu  
 Asn Cys Asn Gly Leu Ile Ser Gly Gly Asn Glu Thr Thr Arg His Ala Thr Ile Gly Gly  
 Leu Leu Ala Leu Ile Glu His Pro Glu Gln Trp Arg Arg Leu Gln Glu Glu Pro Glu Val  
 Leu Pro Thr Ala Val Gln Glu Ile Leu Arg Phe Thr Thr Pro Ala Met His Val Leu Arg  
 Thr Ala Thr Arg Glu Thr Glu Leu Ala Gly Arg Arg Ile Lys Ala Gly Asp Met Val Ala  
 Leu Trp Leu Ala Ser Gly Asn Arg Asp Glu Thr Val Phe Ala Asp Pro Asp Arg Phe Asp  
 Ile Gly Arg Arg Glu Val Asn Arg Asn Leu Thr Phe Ala Tyr Gly Ser His Phe Cys Ile  
 Gly Ser Ala Leu Ala Thr Thr Glu Leu Asn Thr Phe Phe Asp Val Leu Arg Gln Arg Val 10  
 Ala Arg Pro Glu Leu Thr Gly Glu Val Arg Arg Met Arg Ser Asn Leu Ile Gly Gly Ile  
 Glu His Leu Pro Val Arg Leu Val Pro Arg Asp Arg (SEQ ID NO:26)

## 【 0 1 8 2 】

典型的なSEQ ID NO:37は、

gtgcagaacg aacagacccc tgccaccgca cccgtcacgc tccccaccgg gcgagccgcc	60
ggctgcccct tgcaccgcc cgccggactc gccgaggtcc gcgccaccgg cccgctggcc	120
cggatgacgt accccgacgg acacatcggc tggctggcca ccggccacgc cgcggtgcgc	180
tccgtcctgg gcgaccccc gttcagctcg cggtacgagc tgatgacta ccccttcccc	240
ggcggccccg agggcccc gccacccgcc cccgtcggcg acatgaccgg gatggacgca	300
cccgagcaca cccgcttccg gcggtgctc accggcaagt tcaccgtccg ccggatgcgg	360
cagctcaccg accgggtcgc ggagctcacc gccgggacc tggacgcgat ggagcgcggc	420
ggcccgggcg tgcacctggt cgaggccttc gcacgaccgc tccccgcgct gatgatctgc	480
gagctgctcg gcgtgccgta cgcgaccgc gagcgttcc aggagcacgc tcagacgatc	540
atgtcgatgg acgtgtcggc cgaggagatg gaggccgct tcaccgcgct cctcgggtac	600
atggcggagc tggtcgcggc caagcgggccc gagccctccg acgacctgct cggcgacctg	660
gcccaggact ccgacctcac cgacgaggaa ctcgtcggcg tcggaggctt cctgctcgcc	720
gccggcctcg acaccaccgc caacatgatc gccacggaa cgttcgcgct cctcaccacc	780
ccggaacagg cggacgcgct gcgcgcggac ccggcccttg ccccgggccc cgtggaggag	840
ctgatgcgct atctgacctg cggccacacc ggagtgcgga ccggcctgga ggacgtcgag	900
gtggaaggcg tgctcatcag ggcgggcgag agcgtcacc tctcccttga ggccgccaac	960
cgggaccggc agcgggtccc cgaccccgac accctcgac tacaccgcaa ggccacgggg	1020
cacctgggct tcgggcacgg catccaccag tgacctggcc agcaactggc ccgctcgag	1080
atgacggtgg ccctgcccgc gctgctgagg cggttcccca cgctgcggct cgacgtgccg	1140
gccgaggagg tgccgctgcg gaccgagatg aacgtgtacg gcgtgcaccg gctgcccgtc	1200
acctgggacg aggtctga	1218

である。

## 【 0 1 8 3 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:37 の1~21残基及びSEQ ID NO:37の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 8 4 】

典型的なSEQ ID NO:37は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Gln Asn Glu Gln Thr Pro Ala Thr Ala Pro Val Thr Leu Pro Thr Gly Arg Ala Ala  
 Gly Cys Pro Phe Asp Pro Pro Ala Gly Leu Ala Glu Val Arg Ala Thr Gly Pro Leu Ala  
 Arg Met Thr Tyr Pro Asp Gly His Ile Gly Trp Leu Ala Thr Gly His Ala Ala Val Arg  
 Ser Val Leu Gly Asp Pro Arg Phe Ser Ser Arg Tyr Glu Leu Met His Tyr Pro Phe Pro  
 Gly Gly Pro Glu Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Val Gly Asp Met Thr Gly Met Asp Ala  
 Pro Glu His Thr Arg Phe Arg Arg Leu Leu Thr Gly Lys Phe Thr Val Arg Arg Met Arg  
 Gln Leu Thr Asp Arg Val Ala Glu Leu Thr Ala Gly His Leu Asp Ala Met Glu Arg Gly  
 Gly Pro Gly Val Asp Leu Val Glu Ala Phe Ala Arg Pro Leu Pro Ala Leu Met Ile Cys  
 Glu Leu Leu Gly Val Pro Tyr Ala Asp Arg Glu Arg Phe Gln Glu His Ala Gln Thr Ile 40 50

Met Ser Met Asp Val Ser Pro Glu Glu Met Glu Ala Ala Phe Thr Ala Phe Leu Gly Tyr  
 Met Ala Glu Leu Val Ala Ala Lys Arg Ala Glu Pro Ser Asp Asp Leu Leu Gly Asp Leu  
 Ala Gln Asp Ser Asp Leu Thr Asp Glu Glu Leu Val Gly Val Gly Gly Phe Leu Leu Ala  
 Ala Gly Leu Asp Thr Thr Ala Asn Met Ile Ala His Gly Thr Phe Ala Leu Leu Thr His  
 Pro Glu Gln Ala Asp Ala Leu Arg Ala Asp Pro Ala Leu Ala Pro Gly Ala Val Glu Glu  
 Leu Met Arg Tyr Leu Thr Val Ala His Thr Gly Val Arg Thr Ala Leu Glu Asp Val Glu  
 Val Glu Gly Val Leu Ile Arg Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Leu Glu Ala Ala Asn  
 Arg Asp Pro Glu Arg Phe Pro Asp Pro Asp Thr Leu Asp Val His Arg Lys Ala Thr Gly  
 His Leu Gly Phe Gly His Gly Ile His Gln Cys Leu Gly Gln Gln Leu Ala Arg Val Glu  
 Met Thr Val Ala Leu Pro Ala Leu Leu Arg Arg Phe Pro Thr Leu Arg Leu Asp Val Pro 10  
 Ala Glu Glu Val Pro Leu Arg Thr Glu Met Asn Val Tyr Gly Val His Arg Leu Pro Val  
 Thr Trp Asp Glu Val (SEQ ID NO:38)

## 【 0 1 8 5 】

典型的なSEQ ID NO:39は、

atgcgcttac	acacagcaga	accggccggg	accgccgacg	ccgaaccctg	tccgtaccgg	60	
ttcaacgagg	cggacggcat	ctccctggcc	gacgcctacg	aggaggcccg	cgagcagccc	120	
gggctgctgc	gggtccggat	ggcctacggt	gagccggcct	ggctcgccac	ccggtacgcc	180	
gacgcccggc	tggtcctggg	cgaccggcgc	ttcagccggg	ccgagggcgc	ccggcacgac	240	
gagccgcgcc	agtccgaggg	gcgccgcgac	agcgggatcc	tcagcatgga	cccgccggac	300	
cacacccggt	tgcgcaccct	ggtggccaag	gcgttcacca	tgaccaggt	ggagaagttg	360	20
cgcccggcgg	tgcgggagct	ggccgacgag	ctgatcgaca	agatggtcgc	caccggcgcc	420	
ccggtcgacc	tggtcgagga	gttcgcgctg	ccggtgccgg	tcggggtgat	ctgccagctg	480	
ctcggcgtgc	cggtcgagga	ccgtccgcgc	ttccgggctg	ggagcgacgc	ggcgctgtcc	540	
accagtccc	tgacggccga	ggagttcgac	gccaaccagg	aggaactgcg	ggcctacatg	600	
cgggggttga	tcgaggatca	ccgggcgctg	ccgcgtgagg	acctgatcac	cgggctgatc	660	
gaggcccggg	accgcgacga	ccggctgacc	gagcaggagt	tggtggacct	gtgcgtcggc	720	
atcctggtgg	ccggccacga	gaccaccgcc	acgcagatcc	ccaacttcgt	ggtgacgctg	780	
ctggaccggc	ccgagcagtg	gaaccggctg	cgggaggacc	cggagctggt	cccgaccgcg	840	
gtcgaggagc	tgatgcgttt	cgtgccgctg	ggcagcggtg	cctcgttccc	gcggtacgcc	900	
accgaggacg	tggaggtcgg	cggcacgctg	gtgcgcgccg	gggagccggt	gctggtggcg	960	30
gtcggggcgg	ccaaccgcga	cccggccagg	ttcgacgcgc	cgcaggagct	ggacctggcc	1020	
cgggagggca	accagcacct	cgggttcggc	catggcgtcc	accactgcct	cggggcgccg	1080	
ctggcccggc	tggagttgca	ggaggcgtg	ggcgcgctgc	tcggcgggct	gccgggtctg	1140	
cggatcgccg	gtgacatcga	gtggaagacg	cagatgctgg	tccgcggggc	gcgcacgctg	1200	
ccggtggggg	ggtga					1215	

である。

## 【 0 1 8 6 】

従って、典型的な増幅プライマー配列ペアは、SEQ ID NO:39 の1~21残基及びSEQ ID NO:39の相補配列の最後21残基である。

## 【 0 1 8 7 】

典型的なSEQ ID NO:39は、以下の配列を持つポリペプチドをコードする。

Met Arg Leu His Thr Ala Glu Pro Ala Gly Thr Ala Asp Ala Glu Pro Val Pro Tyr Pro  
 Phe Asn Glu Ala Asp Gly Ile Ser Leu Ala Asp Ala Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Gln Pro  
 Gly Leu Leu Arg Val Arg Met Ala Tyr Gly Glu Pro Ala Trp Leu Ala Thr Arg Tyr Ala  
 Asp Ala Arg Leu Val Leu Gly Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ala Glu Gly Ala Arg His Asp  
 Glu Pro Arg Gln Ser Glu Gly Arg Arg Asp Ser Gly Ile Leu Ser Met Asp Pro Pro Asp  
 His Thr Arg Leu Arg Thr Leu Val Ala Lys Ala Phe Thr Met His Gln Val Glu Lys Leu  
 Arg Pro Ala Val Arg Glu Leu Ala Asp Glu Leu Ile Asp Lys Met Val Ala Thr Gly Ala  
 Pro Val Asp Leu Val Glu Glu Phe Ala Leu Pro Val Pro Val Gly Val Ile Cys Gln Leu  
 Leu Gly Val Pro Val Glu Asp Arg Pro Arg Phe Arg Ala Trp Ser Asp Ala Ala Leu Ser 40  
 50

Thr Ser Ser Leu Thr Ala Glu Glu Phe Asp Ala Asn Gln Glu Glu Leu Arg Ala Tyr Met  
 Arg Gly Leu Ile Glu Asp His Arg Ala Arg Pro Arg Glu Asp Leu Ile Thr Gly Leu Ile  
 Glu Ala Arg Asp Arg Asp Asp Arg Leu Thr Glu Gln Glu Leu Val Asp Leu Cys Val Gly  
 Ile Leu Val Ala Gly His Glu Thr Thr Ala Thr Gln Ile Pro Asn Phe Val Val Thr Leu  
 Leu Asp Arg Pro Glu Gln Trp Asn Arg Leu Arg Glu Asp Pro Glu Leu Val Pro Thr Ala  
 Val Glu Glu Leu Met Arg Phe Val Pro Leu Gly Ser Gly Ala Ser Phe Pro Arg Tyr Ala  
 Thr Glu Asp Val Glu Val Gly Gly Thr Leu Val Arg Ala Gly Glu Pro Val Leu Val Ala  
 Val Gly Ala Ala Asn Arg Asp Pro Ala Arg Phe Asp Ala Pro Gln Glu Leu Asp Leu Ala  
 Arg Glu Gly Asn Gln His Leu Gly Phe Gly His Gly Val His His Cys Leu Gly Ala Pro  
 Leu Ala Arg Leu Glu Leu Gln Glu Ala Leu Gly Ala Leu Leu Arg Arg Leu Pro Gly Leu  
 Arg Ile Ala Gly Asp Ile Glu Trp Lys Thr Gln Met Leu Val Arg Gly Pro Arg Thr Leu  
 Pro Val Gly Trp (SEQ ID NO:40)

10

## 【0188】

配列同等性の度合い決定

本発明は、以下の配列に少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%、あるいは50%の配列同等性(相同性)を持つ核酸及びポリペプチドを提供する。その配列は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56である。他の例として、配列同等性は、核酸あるいはポリペプチドの5、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000あるいはそれ以上の連続残基あるいは全長にわたり得る。

20

30

## 【0189】

配列同等性(相同性)の度合いは、この中に述べられるように、デフォルトのパラメータを用いてBLAST 2.2.2.、あるいはFASTAバージョン3.0t78のような如何なるコンピュータープログラム及び関連パラメータを用いて決定できる。

## 【0190】

相同的な配列は、その核酸配列中のチミンをウリジンに変えたRNA配列をも含む。相同配列は、ここに述べるどのような操作を用いて作製してもよく、また、シーケンシングのエラーによるものでもよい。この中に示すような核酸配列は、伝統的な単一文字形式(例えば、Stryer、Lubert、Biochemistry、3rd編集、W. H. Freeman & Co., New York参照)あるいは配列中のヌクレオチドの同等性を記録する他の如何なる形式によっても表されることができる。

40

## 【0191】

この中で認められる種々の配列比較プログラムは、本発明の展望において使用される。タンパク及び/又は核酸の配列同等性(相同性)は、多様な配列比較アルゴリズム及び既に知られるプログラムのどれを用いて評価されてもよい。そのようなアルゴリズム及びプログラムは、以下のものには限定されない。

TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、及びCLUSTALW (Pearson and Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul 他, J.Mol.Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson他, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins他, Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul他, J.Mol.Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul他, N

50

ature Genetics 3:266-272, 1993)

【 0 1 9 2 】

相同性又は同等性は、配列分析ソフトウェア(例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705)を利用して調べることができる。そのようなソフトウェアは、種々の削除、置換及び他の修飾に対する相同性の度合いを帰属することにより類似した配列を一致させる。二種以上の核酸又はポリペプチド配列に関して用いる用語「相同性」及び「同等性」とは、比較ウィンドウ上で最大の範囲、あるいは指定した領域で、二種以上の配列あるいはサブ配列を比較又は整列させた時に同等か又はある特定の割合で同じアミノ酸やヌクレオチドを持つ配列又はサブ配列を意味する。配列比較のためには、一つの配列が対照配列として働く。(典型的な配列としては、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56である。) 配列比較アルゴリズムを用いた場合、被験及び対照配列がコンピューターにインプットされ、もし必要ならば、サブ配列が指名され、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターが指定される。デフォルトプログラムのパラメーターが使われるが、異なるパラメーターも指定できる。そして、配列比較アルゴリズムは、対照配列に関連した被験配列の配列同等性パーセンタイルをプログラムパラメーターを基に算出する。

【 0 1 9 3 】

ここで用いられる「比較ウィンドウ」とは、如何なる近接残基数のセグメントに対する対照をも含む。例えば、本発明の異なる例として、以下の典型的な配列、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56についてその中の場所を問わず20~完全長の範囲で、二種の配列を至適に整列させた後に対照配列中の同数の近接配列部位とが比較される。もしその対象配列が、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9に対して必要とされる配列同等性を持つ場合、例えば、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56

Q ID NO:56に対して50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、90 % 又は95 %の配列同等性を持つならば、その配列は、本発明のスコープに範囲に入る。別の具体例として、20~600、50~200、100~150の範囲でサブ配列は、対照配列と至適に整列させた後に対照配列中の同数の近接配列部位と比較される。比較のための配列アラインメントの方法は、既によく知られた技術である。比較のための至適な配列アラインメントの方法が、SmithとWatermanの局所相同性アルゴリズム；Adv.Appl.Math. 2:482, 1981, NeedlemanとWunschの相同性アラインメントアルゴリズム；J.Mol.Biol. 48:443, 1970, Lipmanらの類似性の検索；Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444, 1988, これらアルゴリズムのコンピュータによる実施（GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA: Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）、あるいは手動の10 アラインメント及び視覚的な検索によって行うことができる。BLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)に加え、相同性又は同等性を決定するための他のアルゴリズムには、例えば、ALIGN、AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences)、AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment)、ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool)、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node)、BLIMPS (BLOCKS IMPROVED SEARCHER)、FASTA、Intervals & Points、BMB、CLUSTAL V、CLUSTAL W、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Waterman アルゴリズム、DARWIN、Las Vegas アルゴリズム、FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool)、Framealign、Framesearch、DYNAMIC、FILTER、FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package)、GAP (Global Alignment Program)、20 GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC (Sensitive Sequence Comparison)、LALIGN (Local Sequence Alignment)、LCP (Local Content Program)、MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench)、MAP (Multiple Alignment Program)、MBLKP、MBLKN、PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment)、SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) 及び WHAT-IFが含まれる。そのようなアラインメントプログラムは、実体的に同じ配列を持つポリヌクレオチド配列ゲノムデータベースをスクリーンするために使うことができる。多くのゲノムデータベースが使用可能であり、例えば、かなりの部分のヒトゲノムがヒトゲノムシーケンシングプロジェクト(Gibbs, 1995)として利用可能である。いくつかのゲノム、例えば、*M. genitalium* (Fraser et al., 1995)、*M. jannaschii* (Bult et al., 1996)、*H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995)、*E. coli* (Blattner et al., 1997)、及び酵母 (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997)、及び*D. melanogaster* (Adams et al., 2000)、が既に配列決定されている。モデル生物体、例えば、*C. elegans*及び *Arabidopsis sp*の配列決定について非常に大きな進歩がなされている。いくつかの機能情報を注釈されたゲノム情報を含むデータベースが異なる組織において維持され、インターネットを通じてアクセス可能である。

#### 【0194】

BLAST、BLAST 2.0 及びBLAST 2.2.2アルゴリズムが本発明の実行に使われることができる。それらは、例えば、Altschul (1977) Nuc.Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J.Mol.Biol. 215:403-410に述べられている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通して公共的に入手が可能である。40 このアルゴリズムは、調べられる配列において、長さWのショートワードを同定することにより高いスコアを持つ配列(HSPs)を初めに同定することに関与しており、それは、あるデータベース配列において同じ長さのワードで整列させた場合に、一致するかあるいは正の値の閾値スコアを満たすものである。Tは、近傍ワードスコア閾値(Altschul (1990) supra)を意味する。これら初期の近傍ワードのヒットは、それらを含むより長いHSPsを見出すための初期検索のシードとして作用する。そのワードは、累積アラインメント スコアが上昇する限り各配列に沿ってその両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM(一致している残基ペアに対する報酬スコア；常に0より大)を用いて計算される。アミノ酸配列については、スコアリング マトリックスを用いて累積スコアが計算される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累50

積アラインメント スコアがその最大到達値から量Xだけ低下する場合；1つ以上の負のスコアリング残基アラインメントの累積のために累積スコアがゼロ、あるいはそれ以下になる場合；又は、いずれかの配列が末端に到達した場合に停止される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T及びXは、アラインメントの感度及び速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルト値としてワード長(word length、W)11、期待値(E)10、カットオフ100、M=5、N=-4、及び両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルト値としてワード長(W)3、期待値(E)10、及びBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff & Henikoff(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 89:10915参照)。BLASTアルゴリズムは、二種の配列間の類似性の統計的分析も実行する(例えば、Karlin及びAltshul(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムから提供される類似性の尺度の一つは、最小合計確率(P(N))であり、これは二種のヌクレオチド配列間又は二種のアミノ酸配列間のマッチングが偶然に発生する確率の指標を提供する。例えば、被験配列と参照配列との比較における最小合計確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合に、その核酸は参照配列と類似であるとみなされる。一例として、タンパク及び核酸の配列相同性は、Basic Local Alignment Search Tool (「BLAST」)により評価される。例えば、5種の特別なBLASTプログラムが以下の用件を実行するために使われることができる：(1) BLASTP及びBLAST3は、被験アミノ酸配列をタンパク配列データベースと比較する；(2) BLASTNは、被験ヌクレオチド配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；(3) BLASTXは、被験ヌクレオチド配列に由来する6種の概念的翻訳産物(両鎖)をタンパク配列データベースと比較する；(4) TBLASTNは、被験タンパク配列を6種全てのリーディングフレーム(両鎖)に翻訳されたポリヌクレオチド配列データベースと比較する；そして、(5) TBLASTXは、被験ヌクレオチド配列の6種の翻訳をヌクレオチド配列データベースの6種の翻訳と比較する。そのBLASTプログラムは、類似した部分を同定することにより相同的な配列を同定し、ここには、被験アミノ酸、あるいはヌクレオチド配列、好ましくは、タンパク又はヌクレオチド配列データベースから得られる試験配列間の「高スコアセグメントペア」として言及される。高スコアセグメント ペアは、好ましくはスコアリングマトリックスにより同定(即ち、アラインメント)され、その大部分は既によく知られている。使用されるスコアリングマトリックスは、好ましくは、BLOSUM62である(Gonnet他、Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993)。より好ましくはないが、PAM、あるいはPAM250を使用することもできる(例えば、Schwartz and Dayhoff, 編集, 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation を参照)。

#### 【0195】

本発明の一例として、ある核酸が本発明のスコープに入るような必要とされている配列同等性を持つものかを調べるために、NCBI BLAST 2.2.2プログラムが、blastpへのデフォルトオプションで、使用される。約38のオプション セットアップがNCBI BLAST 2.2.2プログラムに存在する。本発明のこの典型的な例として、全てのデフォルト値が、デフォルト フィルターリングセッティング(即ち、OFFにセットしてあるフィルターリングを除き、デフォルトへセットされた全てのパラメーター)を除き使用される。デフォルト フィルターリングセッティングでは、「-FF」セッティングが使用され、これはフィルターリングを不能にする。デフォルト フィルターリングの使用は、配列が短いためにKarlin-Altshulバイオレーションを引き起こす。

#### 【0196】

本発明のこの典型的な例において使用されるデフォルト値は以下を含む。

“低複雑度のためのフィルター : ON  
 ワードサイズ : 3  
 マトリックス : BLOSUM62  
 ギャップコスト : Existence: 11

拡張 : 1 “

【0197】

他のデフォルトセッティングは：低複雑度のためのフィルターがOFF、ワードサイズがタンパクのために3、BLOSUM62マトリックス、ギャップExistence Penaltyが11、拡張Penaltyが1である。

【0198】

典型的なNCBI BLAST 2.2.2セッティングは、以下の例 - 1に示す。「-W」オプションを0にデフォルトすることに注意。これは、もしセットしない場合に、ワードサイズをタンパクのためには3、ヌクレオチドのためには11にデフォルトすることを意味する。

【0199】

上記プログラムを用いることにより検出されるかもしれないモチーフに、ロイシンジッパー、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ、グルコシレーションサイト、ユビキチンサイト、アルファ及びベータヘリックス、タンパクが分泌するためのシグナルペプチドをコードしたシグナル配列、ホメオボックス、酸性ストレッチ、酵素活性部位、基質結合部位、及び酵素解裂部位のような転写制御における暗示配列が含まれる。

【0200】

#### コンピューターシステムとコンピュータープログラム産物

配列同等性、構造相同性、モチーフ及びその類を決定及び同定するために、本発明の配列は、コンピューターによって読まれ、そしてアクセスすることのできる如何なる媒体(メディア)上に保存、記録、及び細工することができる。従って、本発明は、コンピューター、コンピューターシステム、コンピューターで可読性の媒体、コンピュータープログラム産物、及び本発明の核酸及びポリペプチド配列を記録保存する類を提供する。ここに用いられるように、用語「記録される」及び「保存される」とは、コンピューターメディア上に情報を保存するための工程を意味する。熟練した研究者は、本発明の一種以上の核酸及び/又はポリペプチドから成る製品をつくるために、コンピューターで可読性のメディア上に配列情報を保存するための既知の如何なる方法にも容易に適應できる。

【0201】

本発明の別の展望は、少なくとも一種の核酸及び/又はポリペプチド配列を記録したコンピューター可読性媒体である。コンピューター可読性媒体は、磁氣的に読める媒体、視覚的に読める媒体、電氣的に読める媒体及び磁気/視覚媒体を含む。例えば、コンピューター可読性媒体には、他のタイプの既によく知られている他の媒体に加えて、ハードディスク、フロッピー、磁気テープ、CD-ROM、デジタル多様ディスク(DVD)、ランダムアクセスメモリー(RAM)、あるいはリードオンリーメモリー(ROM)でもよい。

【0202】

本発明の展望には、システム(例えば、インターネットを基にしたシステム)、特に、コンピューターシステムが含まれ、それは、この中に述べられる配列や配列情報を保存したり細工したりする。コンピューターシステム100の一例を図4におけるブロックダイアグラムで描写する。ここに用いられる「コンピューターシステム」とは、本発明のヌクレオチド、あるいはポリペプチドの配列を分析するためのハードウェア、ソフトウェア、及びデータ保存のための構成成分を意味している。コンピューターシステム100には、配列データについてプロセッシング、アクセッシング及び細工するためのプロセッサを含めることができる。プロセッサ105は、例えば、IntelのPentium(登録商標)III、あるいはSun、Motorola、Compaq、AMD、あるいはInternational Business Machinesの同様なプロセッサのようなくらかはよく知られているタイプのセントラルプロセッシングユニットである。コンピューターシステム100は、プロセッサ105とデータ保存のための一つあるいはそれ以上の内部データ保存コンポーネント110、及びデータ保存コンポーネントに保存したデータの検索のための一種、あるいはそれ以上のデータ検索装置から成る通常の目的に合うシステムである。熟練した研究者は、現在入手可能などのシステムが適しているものが容易に判断できる。

【0203】

10

20

30

40

50

一例において、コンピューターシステム100は、メインメモリー115(好ましくはRAMとして実施)及び一つ又はそれ以上のハードドライブ及び/又はその上に記録したデータを持ったコンピューター可読性媒体のような媒体内部データ保存装置110と接続した母線に連結したプロセッサ105を含む。コンピューターシステム100は、更に、内部データ保存装置110上に保存したデータを読むために一つ又はそれ以上の検索装置118を含めることができる。データ検索装置118は、例えば、フレキシブルディスクドライブ、コンパクトディスクドライブ、磁気テープドライブ、あるいは遠隔データ保存システム(例えば、インターネットを通して)等に接続可能なモデムを意味してもよい。いくらかの具体例として、内部データ保存装置110は、記録したコントロール論理及び/又はデータを含んだフレキシブルディスクドライブ、コンパクトディスクドライブ、磁気テープドライブ等のような除去可能なコンピューター可読性媒体である。コンピューターシステム100は、一旦データ検索装置に挿入されたコントロール論理及び/又はデータをデータ保存コンポーネントから読み出すための適当なソフトウェアを含むか、あるいはそのためにプログラムされてもよい。コンピューターシステム100は、コンピューター使用者にアウトプットを表示するために使われるディスプレイ120を含む。コンピューターシステム100が、コンピューターシステム100への中央集中的アクセスを提供するあるネットワーク、あるいは広域ネットワークにおいて他のコンピューターシステム125a-cに接続できることも注目すべきことである。本発明のヌクレオチド配列やアミノ酸配列にアクセスしたり、それら进行处理するためのソフトウェアは、実行の間、メインメモリー115に存在する。いくつかの例において、コンピューターシステム100は、本発明の核酸配列を比較するための配列比較アルゴリズムを更に含めることができる。そのアルゴリズムと配列は、コンピューター可読性媒体上に保存できる。「配列比較アルゴリズム」とは、あるヌクレオチド配列をデータ保存媒体中の他のヌクレオチド及び/又は化合物と比較するためのコンピューターシステム100上で実行される(地域的あるいは遠隔的に)一種あるいはそれ以上のプログラムを意味する。例えば、配列比較アルゴリズムは、相同性又は構造モチーフを同定するためにコンピューター可読性媒体上に保存した本発明のヌクレオチド配列をコンピューター可読性媒体上の対照配列と比較できる。

10

20

#### 【0204】

上記アルゴリズムで使用されるパラメーターは、配列の長さや相同性の度合いに依存して変更されるであろう。一例として、アルゴリズムで使用されるパラメーターは、使用者が命令を与えない限り、デフォルトのパラメーターである。図-5は、新規配列とデータベース中の配列との間の相同性の度合いを決定するためのプロセス200による新規核酸、あるいはタンパク質配列の配列データベースを用いた比較の一例を示した行程模式図である。配列データベースは、コンピューターシステム100に保存された、私設データベース、あるいはインターネットによる利用が可能な、GENBANK等の公共データベースである。プロセス200は、開始段階201で開始され、その後、段階202へと移行し、そこで、比較されるべき配列が、コンピューターシステム100におけるメモリー上に保存される。上述のように、そのメモリーは、RAM又は内部保存装置を含むどのようなタイプのメモリーでもよい。プロセス200は、その後、段階204へと移行し、そこで、配列データベースが分析及び比較のために開かれる。プロセス200は、その後、段階206へと移行し、ここで、データベース中に保存されている第一の配列がコンピューター上のメモリーに読み込まれる。そして、第一の配列が、第二の配列と同一であるかの比較が段階210で行われる。このステップは、新たな配列とデータベース中の最初の配列との正確な比較を行うことに限定されないことを留意することが重要である。二種類のヌクレオチド、あるいはタンパク質の配列が同一でない場合であっても、それらの配列の比較のための、既知の方法が、関連研究者に知られている。例えば、二種類の精査されるべき配列間の相同性の度合いを高めるため、一つの配列に間隙が導入される。比較過程において、一つの配列に間隙、あるいは他の特性を導入するかを調節するパラメーターは、通常、コンピューターシステムの使用者により入力される。段階210での、二種類の配列比較が行われると、二種類の配列が同一であるかの決定が決定段階210において為される。用語「同一」は、当然、絶対的に同

30

40

50

一である配列に限定されない。使用者により入力された相同性パラメーターの範囲に収まる配列は、プロセス200中で、「同一」と表示されるであろう。二種類の配列が同一であると決定された場合、プロセス200は、段階214となり、データベース中の同一配列名が表示される。この状態は、使用者に表示された名前の配列が、入力された相同性パラメーターを満たすことを示している。保存された配列の名前が使用者に対して表示されると、プロセス200は、決定段階218となり、そこで、データベース中にその他の配列が存在するか決定される。データベース中にその他の配列が存在しない場合、プロセス200は、終了段階220で終了する。データベース中にその他の配列が存在する場合、プロセス200は、段階224へと移行し、そこでポインターは、データベース中の次の配列へと移動し、新しい配列との比較が行われる。このような様式で、新たな配列は、データベース中の全ての配列と、比較、整列される。その配列が相同的でないかの決定が、段階212で決定されているか、そしてプロセス200が、データベース中に、比較のための他の配列が存在するかを決定するため、直ちに決定段階218へと移行するかについて留意しておくことが必要である。従って、本発明の一部として、処理機、本発明の核酸配列を保存するための保存装置、及び比較を行うための配列比較装置を含むコンピューターシステムが含まれる。配列比較装置は、比較されるべき配列間の相同性度合いを示し、また、構造モチーフの同定を行い、あるいはこれらの核酸コード、及びポリペプチドコードと比較された配列中の構造モチーフの同定を行う。図-6は、二種類の配列間相同性を決定する、コンピューターにおけるプロセス250による行程の、行程模式図を示している。プロセス250は、開始段階252で開始され、比較される第一の配列が、メモリー上に保存される段階254へと移行する。比較される第二の配列が、段階256でメモリー上に保存される。プロセス250は、更に、段階260へと移行し、そこで、第一の配列中の第一の文字が読み込まれ、その後、段階262へと移行し、第二の配列中の第一の文字が読み込まれる。その配列がヌクレオチド配列である場合、その文字は、通常、A、T、C、G、あるいはUであることは言うまでも無い。その配列がタンパク質配列である場合、第一の配列と第二の配列との比較を容易にするため、それらは一文字表記アミノ酸コードである。二つの文字が同一であるかが、決定段階264で決定される。それらが同一である場合、プロセス250は段階268へと移行し、そこで、第一の配列と第二の配列の次の文字が読み込まれる。そして、次の文字が同一であるかが決定される。それらが同一である場合、プロセス250は、二つの文字が同一で無くなるまで、上記の過程を繰り返す。次の文字が同一で無いと決定された場合、プロセス250は更に、決定段階274へと移行し、そこで、何れかの配列中に、更に読み込むべき文字があるかを決定する。更に読み込むべき文字が無い場合、プロセス250は、段階276へと移行し、そこで、第一の配列と第二の配列との間の相同性度合いが使用者に提示される。相同性の度合いは、第一の配列中の全配列数に対する第二の配列との間の相同的文字数の比率を計算することにより決定される。よって、第一の配列100残基中の全ての文字が第二の配列中の文字と同一であった場合、それらの相同性の度合いは100%である。

#### 【0205】

また、このコンピュータープログラムは、対照配列と本発明の配列との比較により、これらの配列間に、一種、あるいはそれ以上の配列の違いが存在するかを決定できる。このプログラムは、対照配列、あるいは本発明の配列の長さ、及び挿入、欠失、あるいは置換されたヌクレオチドのデータを保存できる。このコンピュータープログラムは、本発明の配列が、対照配列に対する一塩基変異多型性(SNP)を示すか、あるいは本発明の配列が既知配列に対するSNPを示すかをも決定できるプログラムである。従って、ある例として、このコンピュータープログラムは、SNPを同定するプログラムである。SNPを同定する方法は、コンピュータープログラムに、本発明の配列、及び対照配列を読み込ませ、このコンピュータープログラムによって、これらの配列間の違いを同定させることにより行われる。

#### 【0206】

他の例として、このコンピューターシステムは、本発明の核酸、あるいはポリペプチド中の配列上の特徴を同定する同定機能を有している。「同定機能」は、核酸配列中の特定

の配列的特徴を同定するための一種、あるいはそれ以上のプログラムを意味している。例えば、同定機能は、核酸配列中の読み取り枠 (ORF) を同定するプログラムを含んでいる。図-7は、同定機能プロセス300により、ある配列中の配列的特徴の存在を検出する行程の一例を示した行程模式図である。プロセス300は、開始段階302で開始され、配列的特徴が精査される第一の配列が、コンピューターシステム100中のメモリー115上に保存される段階304へと移行する。プロセス300は、更に、段階306へと移行し、そこで、配列的特徴を含んだデータベースが開かれる。このようなデータベースには、各々の配列的特徴の属性、及びその名称の一覧が含まれている。例えば、ある配列的特徴の名称は「開始コドン」であり、その属性は「ATG」である。他の例として、ある配列的特徴の名称は「TAATAA ボックス」であり、その属性は「TAATAA」である。このようなデータベースの一例は、ウィスコンシン大学遺伝子コンピューターグループにより作成されたものである。また、これらの配列的特徴としては、アルファヘリックスやベータシートのような構造的ポリペプチドモチーフ、酵素活性部位のような機能的ポリペプチドモチーフ、あるいはヘリックス-ターン-ヘリックスや関連研究者に良く知られているその他のモチーフが含まれる。配列的特徴を含んだデータベースが、段階306において開かれると、プロセス300は、段階308へと移行し、そこで、第一の配列的特徴がデータベースより読み込まれる。第一の配列と最初の配列的特徴の属性が段階310において比較される。そして、第一の配列中に最初の配列的特徴の属性が含まれるものか、決定段階316で決定される。第一の配列中に最初の配列的特徴の属性が含まれていた場合、プロセス300は、段階318へと移行し、その属性の名称が使用者に提示される。そしてプロセス300は、決定段階320へと移行し、他の配列的特徴があるものかを決定する。他の配列的特徴が存在しなかった場合、プロセス300は、終了段階324へと移行して終了する。しかし、更に他の配列的特徴が、データベース中に存在した場合、プロセス300は、段階326において、次の配列的特徴を読み込み、そして段階310に戻り、第一の配列中に、次の配列的特徴の属性が含まれているものかを決定する。第一の配列中にその配列的特徴の属性が含まれていない、と決定段階316で決定された場合、プロセス300は、直接、決定段階320へと移行し、データベース中にその他の配列的特徴が存在するかを検索する。よって、一例として、本発明は、読み取り枠 (ORF) を同定するコンピュータープログラムを提供している。

#### 【0207】

本発明の核酸、あるいはポリペプチド配列は、様々な形式の様々なデータ処理プログラムにより、保存、及び処理されるであろう。例えば、その配列は、マイクロソフトワードや、ワードパーフェクトのような文章処理ファイル上に、文字として、あるいは関連研究者にとって精通したDB2、SYBASE、又はORACLEのような、様々なデータベースプログラム中に、ASCIIファイルとして保存される。加えて、多くのコンピュータープログラムやデータベースが、本発明の核酸配列との比較のための、配列比較アルゴリズム、同定機能、あるいは対照核酸配列、又は対照ポリペプチド配列の提供源として利用される。本発明を行う上で利用されるこれらのプログラムやデータベースには、これらに限定されないが、以下のものが含まれる： MacPattern (EMBL)、DiscoveryBase (Molecular Applications Group)、GeneMine (Molecular Applications Group)、Look (Molecular Applications Group)、MacLook (Molecular Applications Group)、BLAST and BLAST2 (NCBI)、BLASTN and BLASTX (Altschul 他, J. Mol. Biol. 215: 403, 1990)、FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988)、FASTDB (Brutlag他. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990)、Catalyst (Molecular Simulations Inc.)、Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.)、Cerius2.DBAccess (Molecular Simulations Inc.)、HypoGen (Molecular Simulations Inc.)、Insight II (Molecular Simulations Inc.)、Discover (Molecular Simulations Inc.)、CHARMm (Molecular Simulations Inc.)、Felix (Molecular Simulations Inc.)、DelPhi (Molecular Simulations Inc.)、QuanteMM (Molecular Simulations Inc.)、Homology (Molecular Simulations Inc.)、Modeler (Molecular Simulations Inc.)、ISIS (Molecular Simulations Inc.)、Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.)、WebLab (Molecular Simulations Inc.)、WebLab Diversity Exp

10

20

30

40

50

lorer (Molecular Simulations Inc.), Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.), SeqFold (Molecular Simulations Inc.), the MDL Available Chemicals Directory data base, the MDL Drug Data Report data base, the Comprエポキシドヒドロラーゼensive Medicinal Chemistry database, Derwent's World Drug Index database, the BioByteMasterFile database, the Genbank database, 及び the Genseqn database。その他、多くのプログラムやデータベースが、関連研究者に対して公開されている。

#### 【0208】

上記のプログラムを使用して検索されるモチーフには、ロイシンジッパー、ヘリックス-ターン-ヘリックス、グリコシレーション部位、ユビキチン化部位、アルファヘリックスや、ベーターシートをコードする配列、タンパク質の分泌を導くシグナルペプチドをコードするシグナル配列、ホメオボックスのような転写調節に関連する配列、酸性領域、酵素活性部位、基質結合部位、及び酵素切断部位等が含まれる。

10

#### 【0209】

##### 核酸のハイブリダイゼーション

本発明は、単離、あるいは組換えにより得られた核酸を提供し、それらの核酸は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56に示されている配列を持つ核酸と厳格な条件下でハイブリダイズする配列を含んでいる。この厳格な条件とは、高度に厳格な条件、中程度に厳格な条件、あるいは低度に厳格な条件から成り、本発明中で示されている、高度に厳格な条件、あるいはその厳格度を低下させた条件が含まれている。他の一例として、厳格な条件下でハイブリダイズできる本発明中の核酸の長さは、本発明中の核酸の約5残基から、その核酸の全長の範囲である。即ち、これらは、残基数として、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400である。また、その全長より短い核酸も含まれる。これらの核酸は、ハイブリダイゼーション用プローブ、標識化用プローブ、PCR用オリゴヌクレオチドプローブ、iRNA、アンチセンス、あるいは抗体結合ペプチド(エピトープ)、モチーフ、及び活性部位などをコードする配列として有用である。

20

30

#### 【0210】

核酸のハイブリダイゼーション反応において、特定レベルの厳格度を得るために使用される条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質により変えられるであろう。例えば、核酸の長さ、相補性の度合い、ヌクレオチド配列の組成(GC対AT含有量)、及びハイブリダイズされる領域の核酸のタイプ(RNA、あるいはDNA)が、ハイブリダイゼーション反応の条件を選択するために考慮される。その他に考慮すべきこととして、例えば、フィルター等に、どの核酸を固定化するかという問題がある。

40

#### 【0211】

ハイブリダイゼーションは、高度に厳格な条件、中程度に厳格な条件、あるいは低度に厳格な条件下で行われる。核酸のハイブリダイゼーションの一例として、固定化された変性した核酸を含むポリマーメンブランが先ず、0.9 M塩化ナトリウム、50 mMリン酸二水素ナトリウム(pH 7.0)、5.0 mM EDTA-2ナトリウム、0.5 % SDS、10 X デンハート、及び0.5 mg/mlポリリボアデニル酸から成る溶液中で、30分間、45℃にてプレハイブリダイズされる。そして、およそ  $2 \times 10^7$  cpm(特異的活性  $4 \sim 9 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g)に、 $^{32}$ Pで末端が標識化されたオリゴヌクレオチドプローブが、その溶液に添加される。12~14時間のインキュベーション後、そのメンブランは、0.5 % SDSを含む 1 X SET(150 mM塩化ナトリウム

50

、20 mM トリス塩酸、pH 7.8、1 mM EDTA (-2ナトリウム)中で、室温にて30分間の洗浄後、新しい1 X SET中で、30分間、(T<sub>m</sub>-10)にて洗浄される。そして、そのメンブレンは、ハイブリダイゼーションによるシグナルを検出するため、オートラジオグラフィ用のフィルムに曝される。

#### 【0212】

検出用プローブとハイブリダイズするcDNAや、ゲノム由来のDNAのような核酸を同定するために使用されるハイブリダイゼーション条件の厳格度を変えることにより、プローブに対して異なる程度の相同性を持つ核酸が、同定、及び単離される。そのプローブの持つ融解温度以下の異なる温度において、ハイブリダイゼーションを行うことにより、厳格度の程度が変えられる。融解温度T<sub>m</sub>は、(一定のイオン強度、及びpHにおいて)50%の標的配列が、その相補的プローブと完全にハイブリダイズする温度である。高度に厳格な条件においては、特定のプローブのT<sub>m</sub>と等しい温度、あるいはそのプローブのT<sub>m</sub>より約5%低い温度が選ばれる。そのプローブの融解温度は、以下の計算式により計算される。

10

#### 【0213】

残基数が14~70のプローブにおける融解温度(T<sub>m</sub>)は、以下の式により求められる： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\text{fraction G+C}) - (600/N)$ 、ここでNは、プローブの残基数である。

#### 【0214】

ハイブリダイゼーションが、ホルムアミドを含む溶液で行われた場合、その融解温度は、以下の式により求められる： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\text{fraction G+C}) - (0.63\% \text{ formamide}) - (600/N)$ 、ここでNは、プローブの残基数である。

20

#### 【0215】

プレハイブリダイゼーションは、6 X SSC、5 X デンハート溶液、0.5 % SDS、100 μgの変性した断片化サケ精子由来DNAより成る溶液中、あるいは6 X SSC、5 X デンハート溶液、0.5 % SDS、100 μgの変性した断片化サケ精子由来 DNA、及び50 %ホルムアミドより成る溶液で行われる。SSC、及びデンハート溶液の組成は、前述の Sambrook に記述されている。

#### 【0216】

ハイブリダイゼーションは、上述のプレハイブリダイゼーション溶液に、検出用プローブを添加することにより行われる。プローブが二本鎖DNAである場合、そのプローブを、ハイブリダイゼーション溶液に添加する前に変性させる。プローブを、プローブと相補的な、あるいはプローブと相同的な配列を含むcDNAやゲノム由来のDNAとハイブリダイズさせるため、そのフィルターを、ハイブリダイゼーション溶液に十分な時間接触させる。残基数が200以上のヌクレオチドプローブの場合、そのハイブリダイゼーションは、そのプローブのT<sub>m</sub>より約15~25%低い温度で行われる。オリゴヌクレオチドのような短いプローブの場合、ハイブリダイゼーションは、そのプローブのT<sub>m</sub>より約5~10%低い温度で行われる。典型的には、6 X SSC 溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、約68%で、ハイブリダイゼーションが行われる。通常、50 %ホルムアミドを含む溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、約42%で、ハイブリダイゼーションが行われる。

30

#### 【0217】

前述の全てのハイブリダイゼーションは、高度に厳格な条件下で行われていると見なされる。

40

#### 【0218】

以下のハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、非特異的に結合した検出用プローブを取り除くために洗浄される。フィルターを洗浄するために使用される厳格度は、ハイブリダイズされる核酸の性質、核酸の長さ、相補性の度合い、ヌクレオチド配列の組成(GC対AT含有量)、及びハイブリダイズされる領域の核酸のタイプ(RNA、あるいはDNA)により変えられるであろう。洗浄における進行的に高度な厳格な条件は、以下の通りである：  
2 X SSC、0.1 % SDS中での、室温における、15分間の洗浄(低度な厳格度)；  
0.1 X SSC、0.5 % SDS中での、室温における、30分から1時間の洗浄(中程度の厳格度)；  
0.1 X S

50

SC、0.5 % SDS中での、ハイブリダイゼーションの温度から、68 までの温度における、15～30分間の洗浄(高度な厳格度); 及び0.15 M塩化ナトリウム中での、72 における15分間の洗浄(非常に高度な厳格度)。最終段階である、低度な厳格度における洗浄は、0.1 X SSC中で、室温において行われる。上述の例は、フィルター洗浄に使用される条件の一連の実施例に過ぎない。関連研究者は、非常に多くの異なる厳格度洗浄法が存在することを知っているであろう。その他、幾つかの例が以下に示されている。

【0219】

プローブとハイブリダイズされた核酸は、オートラジオグラフィーやその他の習慣的な技術により同定される。

【0220】

上記の行程は、プローブに対して、相同性の度合いが低い核酸を同定する場合には、変更されるべきである。例えば、検出用プローブに対して、相同性の度合いが低い核酸を得る場合には、より低度な厳格度の条件が使用される。例えば、約1 Mのナトリウムイオン濃度を持つハイブリダイゼーション溶液中で、ハイブリダイゼーションの温度は、68～42 の範囲で5 ずつ低下させる。それに続くハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、ハイブリダイゼーションの温度で、2 X SSC、0.5 % SDSより成る溶液で洗浄される。これらの条件は、50 以上のときは、「中程度の厳格度条件」であり、50 以下のときは、「低度の厳格度条件」であると見なされる。「中程度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが、55 において行われる場合である。「低度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが、45 において行われる場合である。

【0221】

又、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む6 X SSCなどの溶液中において、42 で行われる。この場合、プローブに対して、相同性度合いの低い核酸を同定するためには、ハイブリダイゼーション用緩衝液中のホルムアミド濃度を、50～0 %の範囲で5 % ずつ低下させてゆく。それに続くハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、50 において、6 X SSC、0.5 % SDSより成る溶液で洗浄される。これらの条件は、ホルムアミド濃度が25%以上のときは、「中程度の厳格度条件」であり、25 %以下のときは、「低度の厳格度条件」であると見なされる。「中程度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが、30 %ホルムアミドを含む溶液中において行われる場合である。「低度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが、10 %ホルムアミドを含む溶液中において行われる場合である。

【0222】

例えば、上記の方法は、本発明の核酸配列、あるいはその核酸の少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、あるいは500の連続した残基を含む断片、及びその核酸と相補的な配列を持つ核酸に対して、少なくとも約97 %、少なくとも約95 %、少なくとも約90 %、少なくとも約85 %、少なくとも約80 %、少なくとも約75 %、少なくとも約70 %、少なくとも約65 %、少なくとも約60 %、少なくとも約55 %、あるいは少なくとも約50 %の相同性を持つ核酸を単離するために使用される。相同性は、整列アルゴリズムを用いて決定される。例えば、相同的ポリヌクレオチドは、ここで記述されているコーディング配列のうちの一つの自然発生的対立遺伝子多型のコーディング配列を含んでいるであろう。このような対立遺伝子多型は、本発明の核酸、あるいはその核酸に対する相補的配列に対して、一つ、あるいはそれ以上の置換、欠失、又は挿入変異を含んでいる。

【0223】

しかし、ハイブリダイゼーション様式の選択は、重要ではない - 重要なのは、その核酸が、本発明の目的範囲内の核酸であるかを定めるための、ここで記載されているような洗浄条件の厳格度である。本発明の目的範囲内の核酸であるかを同定するために使用される洗浄条件は、塩濃度が約0.02 M、pH 7で、少なくとも約50 、あるいは約55～60 ; 0.15 M塩化ナトリウム存在下、72 で15分間; 0.2 X SSC存在下、少なくとも約50 、

10

20

30

40

50

あるいは約55～60℃で約15～20分間；あるいは、ハイブリダイゼーション混合物を室温にて15分間、0.1% SDSを含む2X SSCで2回洗浄後、更に68℃にて15分間、0.1% SDSを含む0.1X SSCで2回洗浄、あるいはこれらに相当する方法を含んでいる。SSC緩衝液や、これらに相当する条件に関しては、Sambrook、Tijssen、及びAusubelを参照のこと。

#### 【0224】

本発明の核酸配列における、3'又は5'付近の配列に由来するプローブは、また、ゲノム由来の配列などの付随した配列を含むクローンを同定するために、クロモゾームウォーキング行程にも使用される。このような方法により、宿主細胞から目的のタンパク質に付随した配列をコードする遺伝子の単離が可能となる。

10

#### 【0225】

一例として、本発明の核酸は、関連核酸の単離、及び同定のためのプローブとして使用される。

#### 【0226】

一例として、これらの方法により同定された関連核酸は、本発明の核酸が、最初に単離された生物とは異なる生物に由来するcDNA、あるいはゲノムDNAである。このような行程において、核酸試料は、プローブが関連核酸と特異的にハイブリダイズするような条件下で、そのプローブと混合される。そして、関連生物より得た核酸とプローブのハイブリダイゼーションは、上述の何れかの方法により検出される。

#### 【0227】

核酸のハイブリダイゼーション反応において、特定レベルの厳格度を得るために使用される条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質により、変えられるであろう。例えば、核酸の長さ、相補性の度合い、ヌクレオチド配列の組成(GC対AT含有量)、及びハイブリダイズされる領域の核酸のタイプ(RNA、あるいはDNA)が、ハイブリダイゼーション反応の条件を選択する上で考慮される。その他、考慮に入れるべきこととしては、例えば、フィルターなどにいずれの核酸を固定化するかという問題がある。ハイブリダイゼーションは、高度に厳格な条件、中程度に厳格な条件、あるいは低度に厳格な条件下で行われる。核酸のハイブリダイゼーションの一例として、固定化された変性した核酸を含むポリマーメンブランが先ず、0.9 M塩化ナトリウム、50 mMリン酸二水素ナトリウム(pH 7.0)、5.0 mM EDTA-2ナトリウム、0.5% SDS、10 X デンハート、及び0.5 mg/mlポリリボアデニル酸より成る溶液中で、30分間、45℃にてプレハイブリダイズされる。そして、およそ $2 \times 10^7$  cpm(特異的活性 $4 \sim 9 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g)に、 $^{32}$ Pで末端が標識化されたオリゴヌクレオチドプローブが、その溶液に添加される。12～14時間のインキュベーション後、そのメンブランは、0.5% SDSを含む1X SET(150 mM塩化ナトリウム、20 mMトリス塩酸、pH 7.8、1 mM EDTA-2ナトリウム)中で、室温にて30分間の洗浄後、新しい1X SET中で、30分間、(T<sub>m</sub>-10)℃にて洗浄される。そしてそのメンブランは、ハイブリダイゼーションによるシグナルを検出するためにオートラジオグラフィ用のフィルムに曝される。

20

30

#### 【0228】

検出用プローブとハイブリダイズするcDNAやゲノム由来のDNAのような核酸を同定するためのハイブリダイゼーション条件の厳格度を変えることにより、プローブに対して異なる程度の相同性を持つ核酸が同定又は単離される。そのプローブの持つ融解温度以下の異なる温度においてハイブリダイゼーションを行うことにより、厳格度の程度が変えられる。融解温度T<sub>m</sub>は、(一定のイオン強度、及びpHにおいて)50%の標的配列が、その相補的プローブと、完全にハイブリダイズする温度である。高度に厳格な条件においては、特定のプローブのT<sub>m</sub>と等しい温度、あるいはそのプローブのT<sub>m</sub>より約5℃低い温度が選ばれる。そのプローブの融解温度は、以下の計算式により計算される。残基数が14～70のプローブにおける融解温度(T<sub>m</sub>)は、以下の式により求められる： $T_m = 81.5 + 16.6(\log [Na^+]) + 0.41(\text{fraction G+C}) - (600/N)$ 、ここでNは、プローブの残基数である。ハイブリダイゼーションがホルムアミドを含む溶液で行われた場合、その融解温度は、以下の式により求められる： $T_m = 81.5 + 16.6(\log [Na^+]) + 0.41(\text{fraction G+C}) - (0.63\% \text{ formamide})$

40

50

)-(600/N)、ここでNは、プローブの残基数である。プレハイブリダイゼーションは、6 X SSC、5 X デンハート溶液、0.5 % SDS、100  $\mu$ gの変性した断片化サケ精子由来DNAより成る溶液中、あるいは6 X SSC、5 X デンハート溶液、0.5 % SDS、100  $\mu$ gの変性した断片化サケ精子由来DNA、及び50 %ホルムアミドより成る溶液中で行われる。SSC及びデンハート溶液の組成は、前述のSambrookに記述されている。

#### 【0229】

ハイブリダイゼーションは、上述のプレハイブリダイゼーション溶液に、検出用プローブを添加することにより行われる。プローブが二本鎖DNAである場合、そのプローブをハイブリダイゼーション溶液に添加する前に、変性させる。プローブを、プローブと相補的な、あるいはプローブと相同的な配列を含むcDNAや、ゲノム由来のDNAとハイブリダイズさせるため、そのフィルターをハイブリダイゼーション溶液に十分な時間接触させる。残基数が200以上のヌクレオチドプローブの場合、そのハイブリダイゼーションは、そのプローブの $T_m$ より約15~25 低い温度で行われる。オリゴヌクレオチドのような短いプローブの場合、ハイブリダイゼーションは、そのプローブの $T_m$ より約5~10 低い温度で行われる。典型的には、6 X SSC溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、約68 でハイブリダイゼーションが行われる。通常、50 %ホルムアミドを含む溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、約42 で、ハイブリダイゼーションが行われる。前述の全てのハイブリダイゼーションは、高度に厳格な条件下で行われていると見なされる。

10

#### 【0230】

次のハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、非特異的に結合した検出用プローブを取り除くために洗浄される。フィルターを洗浄するために使用される厳格度は、ハイブリダイズされる核酸の性質、核酸の長さ、相補性の度合い、ヌクレオチド配列の組成(GC対AT含有量)、及びハイブリダイズされる領域の核酸のタイプ(RNA、あるいはDNA)により変えられるであろう。洗浄における、進行的に高度な厳格な条件は、以下の通りである：2 X SSC、0.1 % SDS中での、室温における、15 分間の洗浄(低度な厳格度)；0.1 X SSC、0.5 % SDS中、室温において、30 分から 1 時間の洗浄(中程度の厳格度)；0.1 X SSC、0.5 % SDS中、ハイブリダイゼーションの温度から68 までの温度範囲において15 分から30 分間の洗浄(高度な厳格度)；及び 0.15 M塩化ナトリウム中、72 において15 分間の洗浄(非常に高度な厳格度)。最終段階である、低度な厳格度における洗浄は、0.1 X SSC中、室温において行われる。上述の例は、フィルター洗浄に使用される条件の一連の実施例に過ぎない。関連研究者は、非常に多くの、異なる厳格度洗浄法が存在することを

20

30

#### 【0231】

プローブとハイブリダイズされた核酸は、オートラジオグラフィーや、その他の習慣的な技術により、同定される。上記の行程は、プローブに対して、相同性の度合いが低い核酸を同定する場合には、変更されるべきである。例えば、検出用プローブに対して、相同性の度合いが低い核酸を得る場合には、より低度な厳格度の条件が使用される。例えば、約1 Mのナトリウムイオン濃度を持つハイブリダイゼーション溶液中でのハイブリダイゼーションの温度は、68~42 の範囲で5 ずつ低下させる。それに続くハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、ハイブリダイゼーションの温度で、2 X SSC、0.5 % SDSより成る溶液で洗浄される。これらの条件は、50 以上の場合、「中程度の厳格度条件」であり、50 以下の場合、「低度の厳格度条件」であると見なされる。「中程度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが55 において行われる場合である。「低度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが45 において行われる場合である。

40

#### 【0232】

又、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む6 X SSC等の溶液中において、42 で行われる。この場合、プローブに対して相同性度合いの低い核酸を同定するためには、ハイブリダイゼーション用緩衝液中のホルムアミド濃度を50~0 %の範囲で5 %ずつ低下させてゆく。それに続くハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、50 にお

50

いて、6 X SSC、0.5 % SDSより成る溶液で洗浄される。これらの条件は、ホルムアミド濃度が25 %以上の時は、「中程度の厳格度条件」であり、25 %以下のときは、「低度の厳格度条件」であると見なされる。「中程度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが30 %ホルムアミドを含む溶液中において行われる場合である。「低度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが10 %ホルムアミドを含む溶液中において行われる場合である。

#### 【0233】

例えば、上記のプロブや方法は、本発明の核酸配列、あるいはその核酸の少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、あるいはそれ以上の連続した残基を含む断片、及びその核酸と相補的な配列を持つ核酸に対して、少なくとも約99 %、98 %、97 %、少なくとも約95 %、少なくとも約90 %、少なくとも約85 %、少なくとも約80 %、少なくとも約75 %、少なくとも約70 %、少なくとも約65 %、少なくとも約60 %、少なくとも約55 %、あるいは少なくとも約50 %の相同性を持つ核酸を単離するために使用される。相同性は、整列アルゴリズムを用いて決定される。例えば、相同的ポリヌクレオチドは、ここで記述されているコーディング配列のうちの一つの自然発生的対立遺伝子多型のコーディング配列を含んでいるであろう。このような対立遺伝子多型は、本発明の核酸、あるいはその核酸に対する相補的配列に対して、一つ、あるいはそれ以上の置換、欠失、又は挿入変異を含んでいる。

10

#### 【0234】

更に、上記のプロブや方法は、本発明の核酸配列又はその核酸の少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、あるいは150の連続したアミノ酸残基を含む本発明のポリペプチドと、少なくとも約99 %、少なくとも約95 %、少なくとも約90 %、少なくとも約85 %、少なくとも約80 %、少なくとも約75 %、少なくとも約70 %、少なくとも約65 %、少なくとも約60 %、少なくとも約55 %、あるいは少なくとも約50 %の相同性を持つポリペプチドをコードする核酸を単離するために使用され、それらの相同性は、配列整列アルゴリズム(即ち、デフォルトパラメーターを用いたFASTAバージョン 3.0 t78、あるいはここで記載されたパラメーターを用いたBLAST 2.2.2 プログラムなどによる解析)を用いて決定される。

20

#### 【0235】

##### オリゴヌクレオチドプロブ、及びそれらの使用法

本発明は、また、エポキシドヒドロラーゼ活性を持つポリペプチドをコードする核酸の同定に使用される核酸プロブを提供する。一例として、これらのプロブは、本発明に記載された配列の連続した少なくとも10残基を含んでいる。又は、本発明のプロブは、本発明の配列の連続した少なくとも5、6、7、8、あるいは9から約40残基、約10~50残基、約20~60残基、あるいは約30~70残基より成る。これらのプロブは、結合やハイブリダイゼーションにより核酸を同定する。これらのプロブは、キャピラリーアレイを含む本発明中の様々な実験に使用される(後述の討論を参照)。本発明のプロブは、また、その他の核酸やポリペプチドの単離にも利用される。

30

#### 【0236】

本発明のプロブは、土壌試料などの生物試料中に、本発明の核酸配列を持つ生物、あるいはその核酸の得られた生物が含まれるかを検定するために利用される。このような行程において、その核酸が単離される生物を含むと思われる生物試料、及びそれらの核酸を試料中より調製する。それらの核酸は、試料中に存在する相補的配列の全てがプロブと特異的に結合できる条件下で、そのプロブと混合される。必要であれば、プロブと相補的配列が特異的に結合する条件を、プロブとその相補的配列を含むことがわかっている試料より得た核酸とを混合することにより決定する。対照として、相補的配列を含まない試料より得た核酸とプロブとの混合も行う。ハイブリダイゼーション緩衝液中の塩濃度、ハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミド濃度、あるいはハイブリダイゼーションの温度等のハイブリダイゼーション条件は、プロブと相補的核酸が特異的に結合す

40

50

る条件を同定するために変更される(特異的ハイブリダイゼーション条件に関する記述を参照)。

#### 【0237】

その試料が、目的の核酸を持つ生物を含んでいる場合、プローブの特異的ハイブリダイゼーションが検出される。ハイブリダイゼーションは、放射性同位元素、蛍光色素、又は検出可能な生産物の生成を触媒する酵素などの検出用物質で標識したプローブを用いることにより検出される。標識されたプローブを用いる相補的核酸の存在を検出するための多くの方法は、関連研究者間でよく知られている。これらの方法には、サザンプロット、ノーザンプロット、コロニーハイブリダイゼーション法、及びドットプロット等が含まれる。各々の実験法は、Ausubel、及びSambrookにより記述されている。

10

#### 【0238】

あるいは、一種以上のプローブ(これらのうちの、少なくとも一種のプローブは、核酸試料中に存在する全ての相補的配列と特異的に結合できる)が、その試料に本発明の核酸配列を持つ生物(即ち、その核酸が単離された生物)が含まれるかを検定するための増幅反応に使用される。一例として、そのプローブは、オリゴヌクレオチドを含んでいる。一例として、その増幅反応は、PCR反応を含んでいる。PCRの手順は、Ausubel、及びSambrookにより記述されている(増幅反応に関する記述を参照)。このような行程において、試料中の核酸は、プローブと混合され、増幅反応が行われ、そして、その増幅反応による生成物が、検定される。増幅反応による生成物は、ゲル電気泳動後に、臭化エチジウムなどのインターカレーターにより染色されて検出される。又、一種、あるいはそれ以上のプローブは、放射性同位元素により標識され、増幅反応により増幅された放射活性を持つ生成物が、ゲル電気泳動後のオートラジオグラフィーにより検出される。

20

#### 【0239】

本発明の核酸配列における、3'又は5'付近の配列に由来するプローブは、また、ゲノム由来の配列などの付随した配列を含むクローンを同定するためのクロモソームウォーキング行程にも使用される。このような方法により、宿主細胞より、目的のタンパク質に付随した配列をコードする遺伝子の単離が可能となる。一例として、本発明の核酸は、関連核酸の単離、及び同定のためのプローブとして使用される。

#### 【0240】

一例として、これらの方法により同定された関連核酸は、本発明の核酸が、最初に単離された生物とは異なる生物に由来するcDNA、あるいはゲノムDNAである。このような行程において、核酸試料は、プローブが関連核酸と特異的にハイブリダイズするような条件下で、そのプローブと混合される。そして、関連生物より得た核酸とプローブのハイブリダイゼーションは、上述の何れかの方法により検出される。

30

#### 【0241】

核酸のハイブリダイゼーション反応において、特定レベルの厳格度を得るために使用される条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質により、変えられるであろう。例えば、核酸の長さ、相補性の度合い、ヌクレオチド配列の組成(GC対AT含有量)、及びハイブリダイズされる領域の核酸のタイプ(RNA、あるいはDNA)が、ハイブリダイゼーション反応の条件を選択する上で考慮される。その他、考慮に入れるべきこととしては、例えば、フィルターにいずれの核酸を固定化するかという問題がある。ハイブリダイゼーションは、高度に厳格な条件、中程度に厳格な条件、あるいは低度に厳格な条件下で行われる。核酸のハイブリダイゼーションの一例として、固定化された変性した核酸を含むポリマーメンブランが先ず、0.9 M塩化ナトリウム、50 mMリン酸二水素ナトリウム(pH 7.0)、5.0 mM EDTA -2ナトリウム、0.5 % SDS、10 X デンハート、及び 0.5 mg/ml ポリリボアデニル酸より成る溶液中、30分間、45 °Cにおいてプレハイブリダイズされる。そして、末端を<sup>32</sup>Pでおよそ2 X 10<sup>7</sup> cpm(特異的活性 4~9 X 10<sup>8</sup> cpm/μg)に標識化されたオリゴヌクレオチドプローブをその溶液に添加する。12~14時間のインキュベーション後、そのメンブランは、0.5 % SDSを含む1 X SET(150 mM塩化ナトリウム、20 mMトリス塩酸、pH 7.8、1 mM EDTA-2ナトリウム)中で、室温にて30分間の洗浄後、新しい1X SET中で、30分間、(Tm-10)

40

50

にて洗浄される。そしてそのメンブランは、ハイブリダイゼーションによるシグナルを検出するためにオートラジオグラフィ用のフィルムに曝される。

#### 【0242】

検出用プローブとハイブリダイズするcDNAやゲノム由来のDNAのような核酸を同定するために使用される、ハイブリダイゼーション条件の厳格度を変えることにより、プローブに対して異なる程度の相同性を持つ核酸が同定又は単離される。そのプローブの持つ融解温度以下の異なる温度において、ハイブリダイゼーションを行うことにより、厳格度の程度が変えられる。融解温度、 $T_m$ 、は、(一定のイオン強度、及びpHにおいて)50%の標的配列が、その相補的プローブと完全にハイブリダイズする温度である。高度に厳格な条件においては、特定のプローブの $T_m$ と等しい温度、あるいはそのプローブの $T_m$ より約5 低い温度が選ばれる。そのプローブの融解温度は、以下の計算式により計算される。残基数が14~70のプローブにおける融解温度( $T_m$ )は、以下の式により求められる： $T_m = 81.5 + 16.6(\log [Na^+]) + 0.41(\text{fraction G+C}) - (600/N)$ 、ここでNは、プローブの残基数である。ハイブリダイゼーションが、ホルムアミドを含む溶液で行われた場合、その融解温度は、以下の式により求められる： $T_m = 81.5 + 16.6(\log [Na^+]) + 0.41(\text{fraction G+C}) - (0.63\% \text{ formamide}) - (600/N)$ 、ここでNは、プローブの残基数である。プレハイブリダイゼーションは、6 X SSC、5 X デンハート溶液、0.5 % SDS、100  $\mu\text{g}$ の変性した断片化サケ精子由来DNAより成る溶液中、あるいは6 X SSC、5 X デンハート溶液、0.5 % SDS、100  $\mu\text{g}$ の変性した断片化サケ精子由来DNA、及び50 %ホルムアミドより成る溶液で行われる。SSC、及びデンハート溶液の組成は、前述のSambrookに記述されている。

10

20

#### 【0243】

ハイブリダイゼーションは、上述のプレハイブリダイゼーション溶液に、検出用プローブを添加することにより行われる。プローブが二本鎖DNAである場合、そのプローブを、ハイブリダイゼーション溶液に添加する前に変性させる。プローブを、プローブと相補的な、あるいはプローブと相同的な配列を含むcDNAやゲノム由来のDNAとハイブリダイズさせるため、そのフィルターを、ハイブリダイゼーション溶液に十分な時間接触させる。残基数が200以上のヌクレオチドプローブの場合、そのハイブリダイゼーションは、そのプローブの $T_m$ より約15~25 低い温度で行われる。オリゴヌクレオチドのような短いプローブの場合、ハイブリダイゼーションは、そのプローブの $T_m$ より約5~10 低い温度で行われる。典型的には、6 X SSC 溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、約68 でハイブリダイゼーションが行われる。通常、50 %ホルムアミドを含む溶液中でのハイブリダイゼーションの場合、約42 でハイブリダイゼーションが行われる。前述の全てのハイブリダイゼーションは、高度に厳格な条件下で行われていると見なされる。

30

#### 【0244】

次のハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、非特異的に結合した検出用プローブを取り除くために洗浄される。フィルターを洗浄するために使用される厳格度は、ハイブリダイズされる核酸の性質、核酸の長さ、相補性の度合い、ヌクレオチド配列の組成(GC対AT含有量)、及びハイブリダイズされる領域の核酸のタイプ(RNA、あるいはDNA)により変えられるであろう。洗浄における進行的に高度な厳格な条件は、以下の通りである：  
2 X SSC、0.1 % SDS 中での、室温における15分間の洗浄 (低度な厳格度)；  
0.1 X SSC、0.5 % SDS 中での、室温における30分から1時間の洗浄 (中程度の厳格度)；  
0.1 X SSC、0.5 % SDS中での、ハイブリダイゼーションの温度から、68 までの温度における15分から 30分間の洗浄 (高度な厳格度)；  
及び 0.15 M塩化ナトリウム中での、72 における、15分間の洗浄 (非常に高度な厳格度)。最終段階である、低度な厳格度における洗浄は、0.1 X SSC中で、室温において行われる。上述の例は、フィルター洗浄に使用される条件の一連の実施例に過ぎない。関連研究者は、非常に多くの異なる厳格度洗浄法が存在することを知っているであろう。

40

#### 【0245】

プローブとハイブリダイズされた核酸は、オートラジオグラフィや、その他の習慣的な技術により、同定される。上記の行程は、プローブに対して、相同性の度合いが低い核

50

酸を同定する場合には、変更されるべきである。例えば、検出用プローブに対して、相同性の度合いが低い核酸を得る場合には、より低度の厳格度の条件が使用される。例えば、約1Mのナトリウムイオン濃度を持つハイブリダイゼーション溶液中で、ハイブリダイゼーションの温度は、68~42 の範囲で5 ずつ低下させる。それに続くハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、ハイブリダイゼーションの温度で、2 X SSC、0.5 % SDSより成る溶液で洗浄される。これらの条件は、50 以上のときは、「中程度の厳格度条件」であり、50 以下のときは、「低度の厳格度条件」と見なされる。「中程度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが、55 において行われる場合である。「低度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが、45 において行われる場合である。

10

#### 【0246】

また、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む6 X SSCなどの溶液中において、42 で行われる。この場合、プローブに対して相同性度合いの低い核酸を同定するためには、ハイブリダイゼーション用緩衝液中のホルムアミド濃度を、50~0 %の範囲で5 %ずつ低下させてゆく。それに続くハイブリダイゼーションにおいて、フィルターは、50 において、6 X SSC、0.5 % SDSより成る溶液で洗浄される。これらの条件は、ホルムアミド濃度が25 %以上の場合は、「中程度の厳格度条件」であり、25 %以下のときは、「低度の厳格度条件」と見なされる。「中程度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが30 %ホルムアミドを含む溶液中において行われる場合である。「低度の厳格度条件」の具体的な例は、上記ハイブリダイゼーションが10 %ホルムアミドを含む溶液中において行われる場合である。

20

#### 【0247】

例えば、上記のプローブや方法は、本発明の核酸配列、あるいはその核酸の少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、あるいはそれ以上の連続した残基を含む断片、及びその核酸と相補的な配列を持つ核酸に対して少なくとも約99 %、98 %、97 %、少なくとも約95 %、少なくとも約90 %、少なくとも約85 %、少なくとも約80 %、少なくとも約75 %、少なくとも約70 %、少なくとも約65 %、少なくとも約60 %、少なくとも約55 %、あるいは少なくとも約50 %の相同性を持つ核酸を単離するために使用される。相同性は、整列アルゴリズムを用いて決定される。例えば、相同的ポリヌクレオチドは、ここで記述されているコーディング配列のうちの一つの自然発生的対立遺伝子多型のコーディング配列を含んでいるであろう。このような対立遺伝子多型は、本発明の核酸、あるいはその核酸に対する相補的配列に対して、一つ、あるいはそれ以上の置換、欠失、又は挿入変異を含んでいる。

30

#### 【0248】

更に、上記のプローブや方法は、本発明の核酸配列、あるいはその核酸の少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、あるいは150の連続したアミノ酸残基を含む本発明のポリペプチドと少なくとも約99 %、少なくとも約95 %、少なくとも約90 %、少なくとも約85 %、少なくとも約80 %、少なくとも約75 %、少なくとも約70 %、少なくとも約65 %、少なくとも約60 %、少なくとも約55 %、あるいは少なくとも約50 %の相同性を持つポリペプチドをコードする核酸を単離するために使用され、それらの相同性は、配列整列アルゴリズム(即ち、デフォルトパラメーターを用いたFASTA パージョン 3.0t78、あるいはここで記載されたパラメーターを用いたBLAST 2.2.2 プログラム等による解析)を用いて決定される。

40

#### 【0249】

##### P450の発現阻害

本発明は、更に、本発明の核酸配列に対して相補的な核酸(即ち、アンチセンス配列)を提供している。アンチセンス配列は、P450をコードする遺伝子の輸送、スプライシング、あるいは転写を阻害する能力を有している。この阻害効果は、ゲノムDNAやメッセンジャーRNAを標的とすることにより生じる。標的核酸の転写又は機能は、例えば、ハイブリダ

50

イゼーション、及び/又は切断により阻害される。本発明により提供される特に有用な一連の阻害剤には、P450遺伝子、あるいはそのメッセンジャーの何れかと結合するオリゴヌクレオチドが含まれており、何れの場合においても、P450の生産又は機能が妨害、あるいは阻害される。これらの結合は、配列特異的なハイブリダイゼーションにより行われる。もう一つの有用なクラスの阻害剤には、P450のメッセージの不活化、あるいは切断を行うオリゴヌクレオチドが含まれる。これらのオリゴヌクレオチドは、このような切断を行うリボザイムのような酵素活性を持つ。これらのオリゴヌクレオチドは、化学的に修飾されるか、相補的核酸を切断するような酵素やその他の構成物と結合している。これらのオリゴヌクレオチドを含む多くの異なるオリゴヌクレオチド集団を用いて、目的の活性を示すオリゴヌクレオチドのスクリーニングが行われる。

10

#### 【0250】

##### アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明は、P450のメッセージと結合するアンチセンス オリゴヌクレオチドを提供し、これらは、mRNAを標的とすることにより、その酵素活性を阻害する。アンチセンス オリゴヌクレオチドの設計法は、科学文献や特許に記述されており、そして、関連研究者は、本発明の新規の試薬を使用することにより、このようなP450オリゴヌクレオチドを設計できるであろう。例えば、有用アンチセンス オリゴヌクレオチドのスクリーニングのための遺伝子ウォーキング/RNAマッピングの手順は、関連研究者によく知られている、即ち、有効なアンチセンス配列選別のための、標準的分子生物学的技術を基にした簡便かつ信頼性の高いRNAマッピング法が、Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183 に記述されている。また、Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198 も参照のこと。

20

#### 【0251】

天然由来の核酸が、アンチセンス オリゴヌクレオチドとして利用される。これらのアンチセンス オリゴヌクレオチドは、どのような長さでも良い；例えば、ある一例として、アンチセンス オリゴヌクレオチドは、約5~100 残基、約10~80残基、約15~60 残基、あるいは約18~40残基である。最適な長さは、日常的なスクリーニングにより決定できる。また、アンチセンス オリゴヌクレオチドは、どのような濃度においても使用できる。最適な濃度は、日常的なスクリーニングにより決定できる。これらの予想される問題に対応するための、様々な合成非天然型ヌクレオチド及び核酸アナログが知られている。例えば、N-(2-アミノエチル)グリシン単位のような、非イオン性骨格を持つペプチド核酸(PNA)が使用される。WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, 編集. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996) に記載されているような、フォスフォロチオエート結合を有するアンチセンス オリゴヌクレオチドも使用されている。本発明により提供される合成的DN 骨格類縁体より成るアンチセンス オリゴヌクレオチドもまた、上述のようなフォスフォロ-ジチオエート、メチルフォスフォネート、フォスフォロアミデート、アルキルフォスフォトリエステル、スルファミン酸、3-チオアセタール、メチレン(メチルイミノ)、3'-N-カルバミン酸、及びモルフォリノカルバミン酸核酸などを含むことができる。

30

#### 【0252】

本発明のP450配列に対するセンス又はアンチセンス オリゴヌクレオチド等、様々な標的に対する適当な結合親和性又は結合特異性を持つ特異的なオリゴヌクレオチドを迅速にスクリーニングするための非常に多くのオリゴヌクレオチドがコンビナトリアル ケミストリーによる技術を用いて作製される(Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584 を参照のこと)。

40

#### 【0253】

##### 阻害的リボザイム

本発明は、P450のメッセージと結合するリボザイムを提供し、これらは、mRNAを標的とすることによりその酵素活性を阻害する。リボザイムの設計法、及び標的とする配列に対するP450特異的アンチセンス配列の選択法は、科学文献や特許に記述されており、そして、関連研究者は、本発明の新規の試薬を使用することにより、このようなリボザイムを設

50

計できるであろう。リボザイムは、標的RNA上の酵素的に切断されるべき部位に近接するRNA結合部位を通して標的RNAと結合し、そして、その標的RNAを切断する。従って、リボザイムは、相補的塩基対形成により、標的RNAを認識し、それと結合する。リボザイムが正確な部位と結合すると、その酵素的作用によって標的RNAを切断不活化する。このような様式による標的RNAの切断がコーディング領域中で起こった場合、コードされるタンパク質の合成を指示するRNAの能力は消失される。通常、リボザイムは、その標的RNAと結合し、それを切断した後、そのRNAより解離し、新たな標的との結合及びその切断を繰り返す。

#### 【0254】

医薬品として効果を示すために必要なリボザイム濃度がアンチセンス オリゴヌクレオチドのそれよりも低い場合等の状況におけるリボザイムの持つこのような性質は、アンチセンス技術(アンチセンス オリゴヌクレオチド分子は、標的核酸と結合するだけでその転写、翻訳、あるいは他の分子との結合を阻害する)等の技術より勝っている。この潜在的な利点は、酵素的に作用するリボザイムの可能性を高めている。従って、一分子のリボザイムは、多数の標的RNA分子を切断することができる。加えて、リボザイムは、通常、塩基対形成機構での結合のみでなく、また、その結合による標的RNAの発現阻害にも依存する高度に特異的な阻害剤である。つまり、その阻害活性は、標的RNAの切断に起因し、その特異性は、非標的RNAの切断量に対する標的RNAの切断量として定義される。この切断機構は、塩基対形成に参与する因子に加え、他の因子にも依存している。従って、リボザイムの作用特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンス オリゴヌクレオチドよりも高い。

#### 【0255】

酵素的リボザイム RNA 分子は、ハンマーヘッド モチーフ中に形成される。しかし、また、ヘアピン、肝炎デルタウイルス、グループ I イントロン、あるいは(RNA ガイド配列と結合した)RNase P-like RNA のモチーフ中にも見られる。このようなハンマーヘッドモチーフの例は、Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; hairpin motifs by Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929、及びHampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; the hepatitis delta virus motif, Perrottaによる(1992) *Biochemistry* 31:16; the RNaseP motif, Guerrier-Takadaによる(1983) *Cell* 35:849; 及び the group I intron by Cech U.S. Pat. No. 4,987,071、に記述されている。これらの具体的なモチーフに関する記述は、これらの中で示されたものに限定されることを意図しているわけではない; 関連研究者は、本発明の酵素的RNA分子が、一ヶ所、あるいはそれ以上の標的RNA領域に対して相補的な特異的基質結合部位を持ち、更に、その分子にRNA切断活性を持たせる配列を基質結合部位の内側、あるいは周辺に有していることを理解するであろう。

#### 【0256】

##### 核酸の修飾

本発明は、本発明の核酸の変種、例えば、P450酵素をコードする核酸、を作製する方法を提供し、鋳型核酸によりコードされたP450とは変化又は異なる活性又は安定性を持ったP450酵素を作製するために、それらを繰り返し、あるいは種々の組み合わせにおいて使用することができる。これらの方法は、種々の組み合わせにおいて、例えば、遺伝子/メッセージの発現、メッセージの翻訳又はメッセージの安定性に関する変種を作製するために繰り返し、あるいは種々の組み合わせにおいて使用することができる。他の例として、細胞の遺伝的組成は、例えば、エックス ビボでの相同遺伝子の修飾等によって変えられる。

#### 【0257】

本発明の核酸は、如何なる手段によっても変えられる。例えば、無作為又は確率的な方法、非確率的方法、あるいは「指向進化」等の方法は、例えば、U.S. 特許番号 6,361,974を参照。遺伝子の無作為的変異の方法は、既によく知られた技術であり、U.S. 特許番号 5,830,696を参照。変異原には、再組換えにより修復され得るDNA解裂を誘導する、例えば、紫外線、ガンマ放射線、あるいはマイトマイシン、亜硝酸、光活性化ソラレン等の化学変異原、単独あるいは組み合わせによる使用が含まれる。他の化学変異原には、例えば

、亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、あるいは蟻酸が含まれる。他の変異原には、ヌクレオチド前駆体類似物、例えば、ニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリン、あるいはアクリジンが含まれる。これらの化薬は、ヌクレオチド前駆体の代わりにPCR反応に加えることができ、それによってその配列を変異させる。プロフラビン、アクリフラビン、キナクリンおよびその類のような介在試薬もまた使用することができる。

【0258】

分子生物学のどのような技術、例えば、無作為PCR 突然変異誘発法 ; Rice (1992) Proc .Natl.Acad.Sci. USA 89:5467-5471参照、多数のカセット突然変異誘発法の組み合わせ ; Cr ameri (1995) Biotechniques 18:194-196参照、等が使用することができる。別の例とし  
10 て、核酸は、例えば、遺伝子、無作為あるいは「確率的」な断片化の後でも再構成できる、例えば、U.S. 特許番号 6,291,242 ; 6,287,862 ; 6,287,861 ; 5,955,358 ; 5,830,721 ; 5,824,514 ; 5,811,238 ; 5,605,793参照。別の例として、修飾、挿入又は削除は、エラーブ  
ローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド指向変異法、アセンブリーPCR、セクシ  
ュアルPCR 変異法、インピボ変異法、カセット変異法、再帰的アンサンブル変異法、指数  
的アンサンブル変異法、部位特異的変異法、遺伝子再集合、遺伝子飽和部位変異法(GSSM)  
、合成結合再集合(SLR)、リコンビネーション、再帰的な配列リコンビネーション、フォ  
スフォチオエイトDNA 変異法、ウラシル含有テンプレート変異法、ギャップデュプレック  
ス変異法、ポイントミスマッチリペアー変異法、リペアー欠損宿主変異法、化学変異法、  
放射線変異法、デリション変異法、リストラクシオン/セレクション変異法、リストラ  
クシオン/ピューリフィケーション変異法、人工遺伝子合成、アンサンブル変異法、キメ  
ラ遺伝子重合体の創製及び/又はそれらと他の方法の組み合わせ等の方法によって導入さ  
れる。

【0259】

次の出版物は、本発明の方法に組み込むことができる方法及び/又は再帰的な配列組換  
えの操作を記述している : Stemmer (1999) " Molecular breeding of viruses for targ  
eting and other clinical properties " Tumor Targeting 4:1-4; Ness (1999) Nature  
Biotechnology 17:893-896; Chang (1999) " Evolution of a cytokine using DNA fami  
ly shuffling " Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull (1999) " Protein evol  
ution by molecular breeding " Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Chris  
30 tians (1999) " Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation us  
ing DNA family shuffling " Nature Biotechnology 17:259-264; Cramer (1998) " DNA  
shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evol  
ution " Nature 391:288-291; Cramer (1997) " Molecular evolution of an arsenate de  
toxification pathway by DNA shuffling, " Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang  
(1997) " Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by D  
NA shuffling and screening " Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:4504-4509; Patten 他 . (19  
97) " Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines " Current Op  
inion in Biotechnology 8:724-733; Cramer 他 . (1996) " Construction and evolutio  
n of antibody-phage libraries by DNA shuffling " Nature Medicine 2:100-103; Gate  
40 s他 , (1996) " Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries thr  
ough display on a lac repressor `headpiece dimer` " Journal of Molecular Biology  
255:373-386; Stemmer (1996) " Sexual PCR and Assembly PCR " : The Encyclopedia  
of Molecular Biology. VCH 出版, New York. pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995)  
" Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of m  
utant and wildtype cassettes " BioTechniques 18:194-195; Stemmer 他 , (1995) " Si  
ngle-step assembly of a gene and entire plasmid form large numbers of oligodeoxy  
ribonucleotides " Gene, 164:49-53; Stemmer (1995) " The Evolution of Molecular C  
omputation " Science 270: 1510; Stemmer (1995) " Searching Sequence Space" Bio/T  
echnology 13:549-553; Stemmer (1994) " Rapid evolution of a protein in vitro by  
50

DNA shuffling” Nature 370:389-391; 及び Stemmer (1994) “DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution.” Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747-10751.

【 0 2 6 0 】

多様性を発生させる変異法は、例えば、部位特異的変異法(Ling他, (1997) “Approaches to DNA mutagenesis: an overview” Anal Biochem. 254(2): 157-178; Dale 他, (1996) “Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method” Methods Mol. Biol. 57:369-374; Smith (1985) “In vitro mutagenesis” Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) “Strategies and applications of in vitro mutagenesis” Science 229:1193-1201; Carter (1986) “Site-directed mutagenesis” Biochem. J. 237:1-7; 及び Kunkel (1987) “The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis” : Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. 編集, Springer Verlag, Berlin)); 鋳型を含むウラシルを用いた変異法 (Kunkel (1985) “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel他, (1987) “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection” Methods in Enzymol. 154, 367-382; 及び Bass他, (1988) “Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities” Science 242:240-245); oligonucleotide-directed mutagenesis (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) “Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment” Nucleic Acids Res. 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) “Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors” Methods in Enzymol. 100:468-500; 及び Zoller & Smith (1987) “Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template” Methods in Enzymol. 154:329-350); フォスフォチオエイト修飾DNA 変異法(Taylor他, (1985) “The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA” Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764; Taylor他, (1985) “The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA” Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) “Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis” Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698; Sayers他, (1988) “Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis” Nucl. Acids Res. 16:791-802; 及び Sayers他, (1988) “Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide” Nucl. Acids Res. 16: 803-814); ギャップデュプレックス DNAを用いた変異法 (Kramer他, (1984) “The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction” Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) Methods in Enzymol. “Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA” 154:350-367; Kramer他, (1988) “Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations” Nucl. Acids Res. 16: 7207; 及び Fritz他, (1988) “Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro” Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999、を含んでいる。

【 0 2 6 1 】

本発明の方法に使われる付加的なプロトコールには、点ミスマッチ修復(Kramer (1984) “Point Mismatch Repair” Cell 38:879-887)、修復不能宿主株を用いた変異法(Carter 他, (1985) “Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vector

s” Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; 及び Carter (1987) “Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors” Methods in Enzymol. 154: 382-403), deletion mutagenesis (Eghtedarzadeh (1986) “Use of oligonucleotides to generate large deletions” Nucl. Acids Res. 14: 5115)、制限-選別及び制限-選別と制限-精製 (Wells他, (1986) “Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin” Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423)、全遺伝子合成による変異法(Nambiar他, (1984) “Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein” Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) “Total synthesis and expression of a gene for the a-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)” Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) “Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites” Gene 34:315-323; 及びGrundstrom他, (1985) “Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale `shot-gun` gene synthesis” Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316)、二本鎖解裂修復 (Mandecki (1986); Arnold (1993) “Protein engineering for unusual environments” Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. “Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181)、等が含まれる。上記方法の多数の付加的な細部は、Methods in Enzymology 154巻に見ることができ、それは、様々な変異誘発方法のトラブルシューティングにとって有用なコントロール手段をも記述している。以下を参照。U.S. 特許番号 5,605,793, Stemmer (1997年2月25日) “Methods for In Vitro Recombination;” U.S. 特許番号 5,811,238, Stemmer 他 (1998年9月22日) “Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;” U.S. 特許番号 5,830,721, Stemmer 他 (1998年11月3日) “DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;” U.S. 特許番号 5,834,252, Stemmer 他 (1998年11月10日) “End-Complementary Polymerase Reaction;” U.S. 特許番号 5,837,458, Minshull, 他 (1998年11月17日) “Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;” WO 95/22625, Stemmer 及び Cramer, “Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;” WO 96/33207, Stemmer 及び Lipschutz “End Complementary Polymerase Chain Reaction;” WO 97/20078, Stemmer 及び Cramer “Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;” WO 97/35966, Minshull 及び Stemmer, “Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;” WO 99/41402, Punnonen 他 “Targeting of Genetic Vaccine Vectors;” WO 99/4138, Punnonen 他 “Antigen Library Immunization;” WO 99/41369, Punnonen 他 “Genetic Vaccine Vector Engineering;” WO 99/41368, Punnonen 他 “Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines;” EP 752008, Stemmer 及び Cramer, “DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;” EP 0932670, Stemmer “Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination;” WO 99/23107, Stemmer 他 “Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling;” WO 99/21979, Apt 他 “Human Papillomavirus Vectors;” WO 98/31837, del Cardayre 他 “Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination;” WO 98/27230, Patten 及び Stemmer, “Methods and Compositions for Polypeptide Engineering;” WO 98/27230, Stemmer 他 “Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection,” WO 00/00632, “Methods for Generating Highly Diverse Libraries,” WO 00/09679, “Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences,” WO 98/42832, Arnold 他 “Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers,” WO 99/29902, Arnold 他 “Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences,” WO 98/41653, Vind, “An in Vitro Method for Construction of

a DNA Library,” WO 98/41622, Borchert 他 “Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling,” 及び WO 98/42727, Pati and Zarlino, “Sequence Alterations using Homologous Recombination.” を参照。

#### 【0262】

ある米国特許出願は、様々な多様性を発生させる方法に関する付加的な詳細を提供している。それらには、以下が含まれる：“遺伝子を変えるコドンのシャフリング”, Patte n 他, 1999年9月28日, (U.S. 通し番号 09/407,800); “繰り返し配列組換えによる全細胞そして生物体の進化”, del Cardayre 他, 1998年7月15日, (U.S. 連載番号 09/166, 188)、及び1999年7月15日, (U.S. 連載番号 09/354,922); “オリゴヌクレオチドに媒介された核酸再組換え”, Cramer 他, 1999年9月28日, (U.S. 連載番号 09/408,392)、及び “オリゴヌクレオチドに媒介された核酸再組換え”, Cramer 他, 2000年1月18日, (PCT/US00/01203); “合成シャフリングのための様々なコドンによるオリゴヌクレオチド合成の使用”, Welch 他, 1999年9月28日, (U.S. 通し番号 09/408,393); “好ましい特徴を持つ特性ストリング、ポリヌクレオチド及びポリペプチドの作製のための方法”, Selifonov 他, 2000年1月18日, (PCT/US00/01202) 及び、例えば、“好ましい特徴を持つ特性ストリング、ポリヌクレオチド及びポリペプチドの作製のための方法”, Selifonov 他, 2000年7月18日, (U.S. 連載番号 09/618,579); “進化擬態に使用するためのデータ構造集団化の方法”, Selifonov 及び Stemmer, 2000年1月18日, (PCT/US00/01138); 及び “一本鎖核酸の鋳型に媒介される再組換えと核酸断片の単離”, Affholter, 2000年9月6日, (U.S. 連載番号 09/656,549)を含んでいる。

10

20

#### 【0263】

例えば、飽和変異法(GSSM)、合成結合再構成(SLR)、あるいはそれらの組み合わせを含む非確率的又は「指向進化」の方法は、新しいか変えられた特性(例えば、非常に酸性かアルカリ条件、高い温度、及びその類の下における活性)を持つP450を作製するために、本発明の核酸の修飾に使用される。修飾された核酸によってコードされるポリペプチドは、蛋白質分解活性、あるいは他の活性を調べる前にある活性のためにスクリーンされることができる。どのような試験形態、あるいはプロトコル、例えば、キャピラリーアレーのプラットフォーム、をも使用できる、例えば、U.S.特許番号 6,361,974; 6,280,926; 5,939,250を参照。

#### 【0264】

飽和変異法、あるいはGSSM

本発明の一例として、非確率的な遺伝子の修飾、「指向進化のプロセス」が、新しいか変えられた特性を持つP450sを作製するために使用される。この方法は、別名として、「遺伝子部位 - 飽和変異法」、「部位 - 飽和変異法」、「飽和変異法」又は簡単に「GSSM」と呼ばれている。他の突然変異法との組み合わせでも使用することができる。例えば、U.S. 特許番号 6,171,820; 6,238,884を参照。一例として、GSSMは、与えられている鋳型ポリヌクレオチドと多数のオリゴヌクレオチドから成り、その中の各オリゴヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドに相同な配列を含んでおり、鋳型ポリヌクレオチドの特異的な配列及び相同遺伝子の変種である配列を標的とする;オリゴヌクレオチドを用いて鋳型ポリヌクレオチドを複製することによって非確率的な配列多様性を持つ祖先ポリヌクレオチドを作製する。それにより、相同性のある遺伝子配列の多様性を持つポリヌクレオチドを作製する。

30

40

#### 【0265】

本発明の一例として、縮重N,N,G/T配列を含むコドンプライマーが、単アミノ酸置換の全範囲が各アミノ酸の位置、例えば、修飾される標的にされる酵素の活性部位あるいはリガンド結合部位のアミノ酸残基に表示されている子孫ポリペプチドの集団を作製できるように、ポリヌクレオチドに点変異を導入するために使用される。これらのオリゴヌクレオチドは、近接する第一の相同配列、縮重N,N,G/T配列、及び第二の相同配列を任意に含める。そのようなオリゴヌクレオチドの使用に由来する下流の子孫翻訳産物は、縮重N,N,G/T配列が20種全てのアミノ酸のためのコドンを含んでいることから、ポリペプチドに沿っ

50

た各アミノ酸で全ての可能なアミノ酸変異を含んでいる。一例として、一種のそのような縮重オリゴヌクレオチド(例えば、一種の縮重N,N,G/Tカセットを含む)が、親ポリヌクレオチド鑄型の各コドンを含んで全範囲でコドン置換させるために使用される。他の例として、同じオリゴヌクレオチドあるいは異なる少なくとも二種の縮重カセットが、親ポリヌクレオチド鑄型の少なくとも二つのコドンを含んで全範囲でコドン置換させるために使用される。例えば、一種以上のN,N,G/T配列を、一ヶ所以上の部位でアミノ酸の変異を導入するためのあるオリゴヌクレオチドに含めることができる。この多数のN,N,G/T配列は、直接連続的であるか、又は一つあるいはそれ以上の付加的なヌクレオチドによって分けられることができる。他の例として、挿入及び削除を導入するために使われるオリゴヌクレオチドは、N,N,G/T配列を持ったコドン単独で又は組み合わせで如何なる組換え、あるいはアミノ酸の挿入、削除、及び/又は置換を導入するために使用可能である。

10

## 【0266】

一例として、二ヶ所あるいはそれ以上の連続したアミノ酸部位の同時変異誘発が、連続的なN,N,G/Tトリプレットを含んだオリゴヌクレオチド、即ち、縮重N,N,G/T配列、を用いてなされる。他の例として、そのN,N,G/T配列よりもより少ない縮重を持つ縮重カセットが使われる。例えば、ある例では、一つのNだけを含む縮重トリプレット配列(例えば、オリゴヌクレオチドで)を使用することが望ましいかもしれない。このNとは、トリプレットの第2又は第3番目の位置にある。如何なる組合せ及びここに含まれる変換を含む他のどのような塩基でもトリプレットの残った部位に使用することができる。代わりに、ある例では、縮重N,N,Nトリプレット配列(例えば、オリゴヌクレオチドで)を使用することが好ましいかもしれない。

20

## 【0267】

一例として、縮重トリプレット(例えば、N,N,G/Tトリプレット)の使用は、系統的及び容易にポリペプチドのアミノ酸一残基ごとに天然アミノ酸を全体的に(合計で20アミノ酸)発現生成することを可能にする(別の例として、その方法は、可能な全てよりも少ないアミノ酸残基あるいはコドン部位当たりの置換の作製をも含む)。例えば、100アミノ酸ポリペプチドでは、2000の異なる種(即ち、部位当たり20種の可能なアミノ酸 X 100アミノ酸部位)を作製することができる。オリゴヌクレオチド又は縮重N,N,G/Tトリプレットを含む一式のオリゴヌクレオチドを用いることによって、32の個々の配列を可能な20種全ての自然アミノ酸でコードさせることができる。従って、親ポリヌクレオチド配列が少なくとも一つのそのようなオリゴヌクレオチドを用いた飽和変異法に供与される試験管内では、20種の異なるポリペプチドをコードしている作製された32種の異なる子孫ポリヌクレオチドが存在する。対照的に、部位特異的変異誘発に非縮重オリゴヌクレオチドを使用することは、反応当たり一つの子孫ポリペプチド産物だけが得られる。非縮重オリゴヌクレオチドは、開示した縮重プライマーの組み合わせにより任意に使用することができる; 例えば、非縮重オリゴヌクレオチドは、対象ポリヌクレオチド中に特定の点変異を発生させるために使用することができる。これは、特定のサイレント点変異、対応するアミノ酸の変異を導く点変異、及び停止コドンやポリペプチド断片の発現を引き起こす点変異を作り出す一つの手段を提供する。

30

## 【0268】

一例として、各飽和変異誘発反応容器には、親ポリヌクレオチド中の変異されるコドンに対応する特定アミノ酸部位で20種の自然アミノ酸全てが表示されるように(他の側面では、20種以下の自然アミノ酸の組合せを使用)、少なくとも20種の子孫ポリペプチド(例えば、P450s)分子をコードしたポリヌクレオチドが含まれている。各飽和変異誘発反応から得られる32倍に縮重した子孫ポリペプチドは、クローンの増幅(例えば、発現ベクターを用いて、大腸菌のような適した宿主にクローン化される)したり、発現スクリーニングにかけることができる。特性の好ましい変化(親ポリペプチドと比較して、アルカリあるいは酸性条件の下で増強された蛋白質分解活性のような)を表示する個々の子孫ポリペプチドがスクリーニングによって同定された場合、その中に含まれた相当する好ましいアミノ酸置換を同定するために配列決定される。

40

50

## 【0269】

一例において、この中に開示されるような飽和変異誘発法を使用して親ポリペプチドの各アミノ酸部位を変異させると、好ましいアミノ酸変異が一ヶ所以上のアミノ酸部位で同定されるかもしれない。これらの好ましいアミノ酸置換を全体又は一部の組合せを含む一種あるいはそれ以上の新しい子孫分子を作製することができる。例えば、ポリペプチドのアミノ酸部位三ヶ所それぞれに二つの特別の好ましいアミノ酸変異が同定されれば、変異は各部位において三つの可能性(元のアミノ酸からの変異が無いか、それぞれ二種の好ましい変異)及び三つの部位を含んでいる。従って、 $3 \times 3 \times 3$ 又は27の可能性が存在し、これには、前に調べられた-6つ単一点変異(即ち、三ヶ所のそれぞれで二つ)とどの部位にも変異の無いものも7種を含んでいる。

10

## 【0270】

別の例において、部位飽和変異誘発法は、配列を変化させるための他の確率的あるいは非確率的な手段、例えば、合成ライゲーション再集合(以下参照)、シャフリング、キメラ化、再組換え、及び他の変異プロセスや変異試薬等、とともに使用することができる。この発明は、反復的な飽和変異誘発を含むあらゆる変異プロセスの使用を提供する。

## 【0271】

本発明は、新しいか変化された性質を持つP450sを作製するための「合成ライゲーション再集合」あるいは単に「SLR」、「指向進化プロセス」と呼ばれる非確率的遺伝子修飾システムを提供する。SLRは、オリゴヌクレオチド断片を非確率的に結合させる方法である。この方法は、確率的オリゴヌクレオチドシャフリングとは、核酸のビルディングブロックがシャフルされず、任意に結合あるいはキメラ化され、むしろ非確率的に組み立てられる点において異なる。例えば、U.S.特許番号(USSN) 09/332,835 “Synthetic Ligat ion Reassembly in Directed Evolution” 1999年6月14日ファイル(“USSN 09/332,835”)を参照。一例において、SLRは、次のステップから成り立つ：

20

(a) 鋳型ポリヌクレオチドを提供する。この中で、鋳型ポリヌクレオチドは、相同遺伝子をコードした配列を含む；

(b) 多数のブロックのビルディングブロック ポリヌクレオチドを提供する。この中で、そのビルディングブロック ポリヌクレオチドは、前もって決定された配列部位で鋳型と交叉(クロスオーバー)するように設計され、あるビルディングブロックポリヌクレオチドは、相同遺伝子の変種である及びその変種配列に隣接した鋳型ポリヌクレオチドに相同的な配列を含む；

30

(c) ビルディングブロック ポリヌクレオチドを、ビルディングブロック ポリヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドとクロスオーバー再集合し、相同遺伝子配列の亜型ができるように、鋳型ポリヌクレオチドと混合する。

## 【0272】

SLRは、再集合されるべきポリヌクレオチド間にハイレベルの相同性が存在してもそれに左右されない。従って、この方法は、非確率的に $10^{100}$ 以上のキメラから成る子孫分子のライブラリー(あるいは、セット)を作製するために使用することができる。SLRは、 $10^{100}$ 以上のキメラから成る子孫分子のライブラリーを作製するために使用することができる。従って、本発明の展望は、デザインにより選択された包括的な集合順序を削る最終的なキメラ核酸分子の集団を作製するための非確率的方法を含んでいる。この方法は、デザインされた包括的なアセンブリーオーダーが達成できるように、デザインにより相互に互換性のある結合可能末端を持つ特定の核酸ビルディングブロックを多数作製するステップ及びこれらの核酸ビルディングブロックを組み立てるステップを含んでいる。

40

## 【0273】

組み立てられる核酸ビルディングブロックの相互に互換性のある結合可能末端は、もしそれらが前もって決定された順序でそのビルディングブロックを結合させ得るならば、このタイプの集合のために「利用可能」と考えられる。従って、核酸ビルディングブロックが結合するその包括的な集合順序は、結合可能末端の設計によって特定される。複数の集合ステップが使用される場合、核酸ビルディングブロックが結合するその包括的な

50

集合順序は、集合ステップの連続的な順序によっても特定される。一例として、アニールしたビルディングブロック片は、それらを共有的に結合させるためにリガーゼのような酵素(例えば、T4 DNAリガーゼ)で処理される。

**【0274】**

一例として、オリゴヌクレオチドビルディングブロックの設計は、最終的なキメラポリヌクレオチドの子孫集団を作製するための元として働く一郡の子孫核酸配列の鋳型を分析することにより得られる。これらの親オリゴヌクレオチドの鋳型は、変異、例えば、キメラ化又はシャッフルされる核酸ビルディングブロックのデザインを助ける。この方法の一例として、多数の親核酸の鋳型配列が、一つ以上の境界点を選ぶためにアラインメントされる。境界点は、相同性のある区域に設定され、そして一種以上のヌクレオチドを含む。これらの境界点は、好ましくは少なくとも二種の子孫鋳型に共有される。それにより、境界点は、親ポリヌクレオチドを再配置することを目的に、作製されるオリゴヌクレオチドビルディングブロックの境界を描写するために利用されることができる。祖先分子内で同定及び選択された境界点は、最終的なキメラ子孫分子の集合における潜在的なキメラ化点として働く。境界点は、少なくとも二種の祖先鋳型により共有された(少なくとも一つの相同核酸塩基から成る)相同的領域である。別の意味で、境界点は、少なくとも半分の祖先鋳型により共有された相同的領域、あるいは、少なくとも3分の2の祖先鋳型により共有された相同的領域である。更により好ましくは、利用可能な境界点は、少なくとも4分の3の祖先鋳型により共有された相同的領域、更に一層より好ましくは、殆ど全ての祖先鋳型により共有された相同的領域である。一例として、境界点は、全ての祖先鋳型により共有された相同的領域である。

10

20

**【0275】**

一例として、徹底的な子孫キメラポリヌクレオチドライブラリーを作製するために、結合再集合過程が徹底的に実施される。換言すると、核酸ビルディングブロックの全ての可能な順序の組み合わせが、最終キメラ核酸分子の集団中に表示される。同時に、別の側面において、各組み合わせにおける集合順序(即ち、各最終キメラ核酸の5'から3'配列における各ビルディングブロックの集合順序)は、上述されたように、設計(又は非確率的な)による。本発明の非確率的性質のために、好ましくない副産物が生成する可能性は大きく減少する。

**【0276】**

別の例として、結合再集合法は、体系的に実施される。例えば、本法は、祖先分子の区分されたライブラリーを作製するために、例えば、一つずつ体系的にスクリーニングされうる区分を利用して実施される。換言すると、本発明は、連続段階的集合反応の選択的で適切な使用を組み合わせた特定の核酸ビルディングブロックの選択的で適切な使用により、子孫産物の特定の集団が、各反応容器中で作製されることが達成される状況を提供する。これは、実施される実験及びスクリーニング操作を体系的にする。従って、潜在的に非常に多数の子孫分子がより少ない集団で体系的に調べられることを可能にする。非常に柔軟かつ徹底的及び体系的にキメラ化を行えることから、本発明は、特に、祖先分子間に低いレベルの相同性しかない場合に、多数の子孫分子から成るライブラリー(又は、集団)の作製を提供する。本結合再集合の発明が非確率的な性質を持つために、作製される子孫分子は、好ましくは、設計により選ばれる包括的なアセンブリー順序を持つ最終的なキメラ核酸分子のライブラリーを含む。飽和変異誘発法及び指向進化法は、異なる子孫分子種を作製するためにも使用されることができる。本発明が、境界点の選択、核酸ビルディングブロックの大きさや数、及び結合の大きさや設計に関する選択と制御の自由を与えることは評価される。さらに、分子間相同性の要求性が、本発明の操作性に対して非常に緩和されていることも評価される。実際に、殆ど又は全く分子間相同性のない領域においても、境界点は選択されることさえできる。例えば、コドンのゆらぎ、即ち、コドンの縮重のために対応する祖先鋳型に本来コードされたアミノ酸を変えずに核酸ビルディングブロック中にヌクレオチド置換を導入することができる。異なる例として、本来のアミノ酸に関するコードが変更されるようにコドンを変更することができる。本発明は、分子間の

30

40

50

相同的な境界点の頻度を増加させるため及びビルディングブロック間で達成される結合数を増加させるために、そのような置換を核酸ビルディングブロック中に導入させることを提供し、その結果として、多数の子孫キメラ分子が作製されるようになる。

【0277】

別の例において、ビルディングブロックが作製される段階における合成的性質は、後にインビトロ過程(例えば、変異誘発による)又はインビボ過程(例えば、宿主生物の遺伝子スプライシング能を利用する)において任意に除去されうるヌクレオチド(例えば、一種以上のヌクレオチド、コドンもしくはイントロン又は調節配列であってもよい)の設計及び導入を可能にする。多くの場合、他の多くの理由により、利用可能な境界点を作製するという潜在的な恩典に加えて、これらの核酸の導入もまた望ましくあり得ることが理解される。

10

【0278】

一例として、核酸ビルディングブロックは、イントロンを導入するために使用することができる。従って、機能的イントロンが、この中に述べられる方法により、本発明の人工遺伝子に導入される。人工的に導入したイントロンは、天然に存在するイントロンが遺伝子スプライシングに機能的であるように宿主における遺伝子スプライシングにおいても機能的であり得る。

【0279】

至適化指向進化システム

本発明は、「至適化指向進化システム」と呼ばれる新しいか、又は変化させた性質を持つP450を作製するための非確率的遺伝子修飾システムを提供する。至適化指向進化システムは、組換えを通して核酸の指向的分子進化を行わせる還元再組合せ、組換え、及び選択の反復サイクルを使用を教示する。至適化指向的進化は、進化したキメラ配列の大集団の作製を可能にするもので、この中では、作製された集団は、予め決定された数の交叉(クロスオーバー)イベントを有する配列のために非常に富化されている。

20

【0280】

クロスオーバーイベントは、親変異体からその他の親変異体に配列のシフトが起こるキメラ配列の点である。そのような点は、通常二種の親からのオリゴヌクレオチドが互いに連結して単一の配列を形成する交差点である。この方法は、最終的な配列のキメラ集団が選択された回数のクロスオーバーイベントのために富化されるように、オリゴヌクレオチド配列の正しい濃度計算を可能にする。これは、予め決定された回数のクロスオーバーイベントを有するキメラ変異体選択の高い管理を提供する。

30

【0281】

更に、本方法は、他のシステムに比べ、莫大な量の可能なタンパク変異体スペースを調査する手段を与える。以前は、例えば、反応中に $10^{13}$ のキメラ分子が生成されると、特定の活性をそのような多量のキメラ変異体について調べることは非常に困難であった。また、子孫集団の大部分は、特定の活性レベルを高められていないタンパクを生み出す非常に多くのクロスオーバーイベント数を持っているであろう。これらの方法を使用して、キメラ分子の集団は、特定の数のクロスオーバーイベントを有する変異体のために富化されることができる。従って、反応中に $10^{13}$ のキメラ分子を作製されるが、更なる分析を行うために選択したそれぞれの分子は、例えば、わずか三回のクロスオーバーイベントしか有していない可能性が高い。結果として生ずる子孫集団は、予め決定された数のクロスオーバーイベントを有するように変えられるので、キメラ分子間の機能的多様性の境界限度は減少される。これは、初期親ポリヌクレオチドに由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の特質に影響を与えているのかを判断する時に、取り扱い易い変異数を与える。

40

【0282】

キメラ子孫ポリヌクレオチド配列を作製する一つの方法は、それぞれの親配列の断片または部分に対応するオリゴヌクレオチドの作製することである。好ましくは、それぞれのオリゴヌクレオチドは、それによりオリゴヌクレオチドの混合によって正しい順序でそれぞれのオリゴヌクレオチド断片を有する新しい変異体を得られるように、特異的な重複区

50

域を含む。更なる情報は、例えば、USSN09/332,835に記載されている。それぞれの親変異体の為に作製されたオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作製されるキメラ分子内に生ずるクロスオーバーの総数と関連がある。例えば、三つの親ヌクレオチド配列の変異体が、例えば、高温下で高活性を示すキメラ変種を探すためにライゲーション反応を起こすものとする。一例として、それぞれの親変異体のそれぞれの部分に対応して50種のオリゴヌクレオチド配列が作製される。この場合、結合組換えプロセス中には、それぞれのキメラ配列の中に最高で50回のクロスオーバーイベントがあることになる。作製されたそれぞれのキメラポリヌクレオチドが、交互に親変種からのオリゴヌクレオチドを含有している確率は、極めて低い。それぞれのオリゴヌクレオチド断片が同一の分子数で結合反応中に存在している場合、同じ親ポリヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドがいくつかの部位で互いに結合し、そのためにクロスオーバーイベントが起こらないらしい。それぞれの親からの各オリゴヌクレオチドの濃度は、本例のどのライゲーションステップの間も一定に保たれ、同じ親変異体由来するオリゴヌクレオチドがキメラ配列内で結合し、かつ、クロスオーバーを起こさない確率は(三種の親があると仮定した場合)  $1/3$  である。

#### 【0283】

従って、それぞれの結合反応ステップ中に、決められた数の親変異体、それぞれの変異体に対応するいくつかのオリゴヌクレオチド、及びそれぞれの変異体の濃度において起こるであろうクロスオーバーイベントの起きる集団を予想するために、確率密度関数(PDF)を決定することができる。PDF決定の統計的及び数学的な背景を以下に説明する。これらの方法を利用して、そのような確率密度関数を推定することができ、その結果、特定の結合反応から生じる予め決められた回数のクロスオーバーイベントのためにキメラ子孫集団を富化することができる。更に、クロスオーバーイベントの目標回数を予め決定することができ、その後、システムは、結合反応中のそれぞれのステップにおいて各親オリゴヌクレオチドの開始時の量を計算するようにプログラムされ、それによって、予め決められた回数のクロスオーバーイベントを集中させる確率密度関数が得られる。これらの方法は、組換えを通してポリペプチドをコードする核酸の指向的分子進化を行わせる還元再組合せ、組換え、及び選択の反復サイクルを使用を教示する。このシステムは、進化したキメラ配列の大集団の作製を可能にするもので、この中では、作製された集団は、予め決定された回数のクロスオーバーイベントを有する配列のために非常に富化されている。クロスオーバーイベントは、親変異体からその他の親変異体に配列のシフトが起こるキメラ配列の点である。そのような点は、通常二つの親からのオリゴヌクレオチドが互いに連結して単一の配列を形成する交差点である。この方法は、最終的な配列のキメラ集団が選択された回数のクロスオーバーイベントのために富化されるように、オリゴヌクレオチド配列の正しい濃度計算を可能にする。これは、予め決定された回数のクロスオーバーイベントを有するキメラ変異体選択の高い管理を提供する。

#### 【0284】

更に、本方法は、他のシステムに比べ、莫大な量の可能なタンパク変異体スペースを調査する手段を与える。これらの方法を使用して、キメラ分子の集団は、特定の数のクロスオーバーイベントを有する変異体のために富化されることができる。従って、反応中に $10^{13}$ のキメラ分子が作製されるが、更なる分析を行うために選択されるそれぞれの分子は、例えば、わずか三回のクロスオーバーイベントしか有していない可能性が高い。結果として生ずる子孫集団は、予め決定された数のクロスオーバーイベントを有するように変えられるので、キメラ分子間の機能的多様性の境界限度は減少される。これは、初期親ポリヌクレオチド由来するどのオリゴヌクレオチドが特定の特質に影響を与えているのかを判断する時に、取り扱い易い変異数を与える。

#### 【0285】

一例として、その方法は、キメラ子孫ポリヌクレオチド配列をそれぞれの親配列の断片または部分に対応するオリゴヌクレオチドの作製することによって作製する。好ましくは、各オリゴヌクレオチドは、それによりオリゴヌクレオチドの混合によって正しい順序でそれぞれのオリゴヌクレオチド断片を有する新しい変異体を得られるように、特異的な重

複区域を含む。USSN 09/332,835も参照。

【0286】

各親変異体の為に作製されたオリゴヌクレオチドの数は、最終的に作製されるキメラ分子内に生ずるクロスオーバーの総数と関連がある。例えば、三つの親ヌクレオチド配列の変異体が、例えば、高温下で高活性を示すキメラ変種を探すためにライゲーション反応を起こすものとする。一例として、それぞれの親変異体のそれぞれの部分に対応して50種のオリゴヌクレオチド配列が作製される。この場合、結合組換えプロセス中には、それぞれのキメラ配列の中に最高で50回のクロスオーバーイベントがあることになる。作製されたそれぞれのキメラポリヌクレオチドが、交互に親変種からのオリゴヌクレオチドを含有している確率は、極めて低い。それぞれのオリゴヌクレオチド断片が同一の分子数で結合反 10  
応中に存在している場合、同じ親ポリヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドがいくつかの部位で互いに結合し、そのためにクロスオーバーイベントが起こらないらしい。それぞれの親からの各オリゴヌクレオチドの濃度は、本例のどのライゲーションステップの間も一定に保たれ、同じ親変異体に由来するオリゴヌクレオチドがキメラ配列内で結合し、かつ、クロスオーバーを起こさない確率は(三種の親があると仮定した場合)1/3である。

【0287】

従って、それぞれの結合反応ステップ中に、決められた数の親変異体、それぞれの変異体に対応するいくらかのオリゴヌクレオチド、及びそれぞれの変異体の濃度において起こるであろうクロスオーバーイベントの起きる集団を予想するために、確率密度関数(PDF)を決定することができる。PDF決定の統計的及び数学的な背景を以下に説明する。そのよ 20  
うな確率密度関数は、推定することができ、その結果、特定の結合反応から生じる予め決められた回数 of クロスオーバーイベントのためにキメラ子孫集団を富化することができる。更に、クロスオーバーイベントの目標回数を予め決定することができ、その後、システムは、結合反応中のそれぞれのステップにおいて各親オリゴヌクレオチドの開始時の量を計算するようにプログラムされ、それによって、予め決められた回数 of クロスオーバーイベントを集中させる確率密度関数が得られる。

【0288】

クロスオーバーイベントの決定

本発明の展望には、望まれるクロスオーバー確率密度関数(PDF)、再集合される親遺伝子の数、及びその断片の数をインプットとして受けるシステム及びソフトウェアが含まれ 30  
る。このプログラムのアウトプットは、「断片PDF」であり、再集合遺伝子及びそれらの推定されるクロスオーバーPDFを得るための処方決定するために使用できる。好ましくは、ここで説明されるプロセスは、プログラミング言語であり、また技術的なコンピュータの利用における環境開発をするMATLAB(登録商標)(マサチューセッツ、Natick、Massachusetts)で行われる。

【0289】

反復プロセス

本発明の実施において、これらのプロセスは、反復的に繰り返すことができる。例えば、P450の表現型を変化させるとある核酸(例えば、その核酸)は、同定され、再単離され、再び修飾され、その活性を再び調べられる。このプロセスは、好ましい表現型がエンジ 40  
ニアされるまで反復的に繰り返すことができる。例えば、タンパク分解活性を含む生化学的な異化あるいは同化の全経路を細胞中にエンジニアリングすることが可能である。

【0290】

同様に、ある特定のオリゴヌクレオチドが望ましい特質(例えば、新規P450の表現型)に全く影響を与えないと確認された場合、排除される配列を含むより大きな親オリゴヌクレオチドを合成することにより、変異としてそれを排除することができる。より大きな配列内にその配列を組み入れることは、どのようなクロスオーバーイベントをも妨げることから、子孫ポリヌクレオチド内でこの配列の如何なる変異種ももはや存在しないことになる。どのオリゴヌクレオチドが最も望まれる特質に関連するか、あるいはどれが関連してい 50  
ないか、を決定するこの反復操作は、特定の特質又は活性を提供する可能なタンパク変種

の全てをより効果的に調査すること可能にする。

【0291】

#### インビボ シャッフリング

分子のインビボ シャッフリングは、本発明のポリペプチドの変種、例えば、抗体、P450s、あるいはその類を提供する本発明の方法における用途である。インビボ シャッフリングは、多重体を再組換え細胞の自然特性を利用して行うことができる。インビボにおける組換えは、分子多様性への主要な自然経路を提供するが、遺伝的組換えは、以下の点に関連して、比較的複雑なプロセスである。

- 1) 相同性の認識；
- 2) 遺伝子鎖の切断、遺伝子鎖の侵入、及び組換えキアズマ形成に導く代謝ステップ繋がる；そして、最後に、
- 3) 個別の組換え分子へのキアズマの解離キアズマの形成は、相同配列の認識を必要とする。

【0292】

一例において、本発明は、少なくとも初期ポリヌクレオチド及び第二のポリヌクレオチドからハイブリッド ポリヌクレオチドを作製する方法を提供する。本発明は、部分的配列相同性の少なくとも一領域を共有する少なくとも初期ポリヌクレオチド及び第二のポリヌクレオチドを適当な宿主細胞へ導入してハイブリッド ポリヌクレオチドを作製するために使用することができる。部分的に配列相同のある領域は、ハイブリッド ポリヌクレオチドを作り出す配列の再集合を生じるようなプロセスを促進する。ここに使用される用語「ハイブリッド ポリヌクレオチド」とは、本発明の方法により生じ、かつ少なくとも二種の初期ポリヌクレオチド配列由来の配列を含む如何なるヌクレオチド配列をも意味する。そのようなハイブリッド ポリヌクレオチドは、DNA分子間の配列組込みを促進する分子内再集合の事象により生じ得る。更に、そのようなハイブリッド ポリヌクレオチドは、DNA分子内のヌクレオチド配列を変化させるために反復配列を用いる分子内還元的再集合プロセスにより作製することができる。

【0293】

#### 配列変種の産生

本発明は、本発明の核酸及びP450配列の配列変種の作製あるいは本発明の核酸あるいはポリペプチドを用いてP450を単離する方法も提供する。一例として、本発明は、本発明のP450遺伝子の変種を提供し、それらは、例えば、無作為あるいは確率的な方法、あるいは非確率的な方法、あるいは「指向進化」の方法等、上記した如何なる手段によっても作り出せる。

【0294】

単離した変種は、天然に存在する可能性がある。変種は、インビトロでも作製できる。変種は、部位特異的突然変異、無作為的化学変異、エキソヌクレアーゼIIIデリーション法、及び標準的なクローニング技術のような遺伝的エンジニア技術を用いて作製してもよい。別法として、そのような変種、断片、類似物、あるいは誘導体は、化学的な合成又は修飾によって作製してもよい。変種を作製するための他の方法も熟練した研究者にはよく知られている。これらは、天然から単離されたものに由来する核酸配列を、企業又は研究応用のために価値を増強された特性を持つポリペプチドをコードする核酸へと修飾する方法を含む。そのようなプロセスにおいて、天然から単離されたものから得られた配列に関して、一つあるいはそれ以上のヌクレオチド変異を持つ変種配列が非常に多く作製され、その特徴が調べられる。これらヌクレオチド変異が、天然から単離されたものから得られた核酸の配列にコードされたポリペプチド上にアミノ酸変異を引き起こす。

【0295】

例えば、変種をエラープローンPCRを利用して作製してもよい。エラープローンPCRにおいて、PCRは、点突然変異が高い割合でPCR産物の全長にわたり得られるように、DNAポリメラーゼのコピー忠実度が低い条件で行われる。エラープローンPCRは、例えば、Leung, D.W., 他, Technique, 1:11-15, 1989) 及び Caldwell, R. C. & Joyce G.F., PCR Metho

ds Applic., 2:28-33, 1992に述べられている。簡単に言うと、その操作において、変異される核酸は、点突然変異が高い割合でPCR産物の全長にわたり得られるように、PCRプライマー、反応緩衝液、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、Taqポリメラーゼ及び適当量のdNTPsと混合される。例えば、その反応は、変異される核酸20 fM、30 pMのPCRプライマー、50 mM KCl、10 mM Tris HCl (pH 8.3) 及び0.01 %ゲラチンを含んだ反応緩衝液、7 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM MnCl<sub>2</sub>、5 ユニットの Taq ポリメラーゼ、0.2 mM dGTP、0.2 mM dATP、1 mM dCTP、及び1 mM dTTPを用いて実行される。PCRは、94 1 分間、45 1 分間、72 1 分間の反応を30サイクル行えばよい。しかしながら、これらのパラメーターは、適当に変えられることは認識されるであろう。変異された核酸は、適当なベクターにクローン化され、変異核酸によってコードされたポリペプチドの活性が評価される。

10

## 【0296】

変種は、関心対象のクローン化DNAに部位特異的な変異を発生させるために、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発法を用いて作製してもよい。オリゴヌクレオチドの変異誘発は、例えば、Reidhaar-Olson (1988) Science 241:53-57に記述されている。簡潔に言うと、そのような操作において、クローン化したDNAに導入される一つ以上の変異を持つ多数の二本鎖オリゴヌクレオチドが合成され、変異されるDNAに挿入される。変異DNAを含んでいるクローンは、回収され、それらがコードするポリペプチドの活動が評価される。

## 【0297】

変種を作製する他の方法は、アセンブリーPCRである。アセンブリーPCRは、小さいDNA断片の混合物に由来するPCR産物のアセンブリを含む。多数の異なったPCR反応が、同じバイアル中で平行して起き、別の反応産物をプライムする他の反応産物が得られる。アセンブリーPCRは、例えば、U.S. 特許番号 5,965,408に記述されている。

20

## 【0298】

変種を作製する更に別の方法は、セクシュアルPCRである。セクシュアルPCRでは、強制的な相同組換えが、配列の相同性に基づいたそのDNA分子の無作為な断片化とそれに引き続くPCR反応におけるプライマー伸張によるクロスオーバーの固定の結果として、インビトロにおいて異なるが非常に関連したDNA分子間で起こる。セクシュアルPCRは、例えば、Stemmer (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747-10751に記述されている。簡潔に言うと、そのような操作において、再組換えされる核酸の多数は、平均サイズ50~200のヌクレオチド断片を作製するためにDNaseによって消化される。好ましい平均サイズの断片は、精製され、PCR混合物中に再懸濁させる。PCRを核酸断片間の再組換えを容易にする条件下で行う。例えば、PCRは、精製した核酸断片を10~30ng/mlの濃度で以下の組成の溶液中に再懸濁させることによって行ってもよい：0.2 mM dNTP、2.2 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM KCl、10 mM Tris HCl (pH 9.0) 及び0.1 % Triton X-100。Taqポリメラーゼを100:1の反応溶液中に2.5ユニット加え、PCRは、以下の条件で行われる：94 で60秒間、94 で30秒間、50~55 で30秒間、72 で30秒間(30~45サイクル)そして72 で5分間。しかしながら、これらのパラメーターは、適当に変えられることは認識されるであろう。いくつかの例において、オリゴヌクレオチドがPCR反応中に含まれてもよい。他の例において、最初のPCR反応にはDNAポリメラーゼIのクレノー断片を、引き続くPCR反応にはTaqポリメラーゼを使用してもよい。再組換え配列は、単離され、それらがコードするポリペプチドの活動が評価される。

30

40

## 【0299】

変種は、インビボ変異法によって作製してもよい。いくつかの例において、関心対象の配列における無作為変異は、大腸菌のような細菌株において関心対象の配列を広げることによって作製され、それは、一つ以上のDNA修復経路において変異を伝える。そのような「ミューテーター」株は、野生型の親のそれよりも高い無作為変異率を持っている。これらの株の一つにおいてDNAを増やすことは、結果的に、そのDNA中に無作為な変異を作製するであろう。インビボ変異方の使用に適したミューテーター株は、例えば、PCT出版番号 WO 91/16427に記述されている。

## 【0300】

50

変異体は、また、カセット変異法を使って作製することができる。カセット変異法において、二本鎖DNA分子の小さな領域が元の配列とは異なる合成オリゴヌクレオチド「カセット」と置き換えられる。そのオリゴヌクレオチドは、完全に及び/又は部分的に無作為化された元の配列をしばしば含む。

**【0301】**

再帰的エンゼンブル変異法は、変種を作製するするためにも使用される。再帰的エンゼンブル変異法は、アミノ酸配列は異なるが表現型に関連のある多様な変異株の集団を作製するために開発されたタンパク エンジニアリング(タンパク変異)のアルゴリズムである。再帰的エンゼンブル変異法は、例えば、Arkin (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815に記述されている。

10

**【0302】**

いくつかの例において、変種は、指数的エンゼンブル変異法によって作製される。指数的エンゼンブル変異法は、高い割合で特徴的あるいは機能的な変異株を含む混合ライブラリーを作製するためのプロセスであり、その中では、残基の小さな集団が平行して無作為化され、それぞれ変異された部位で、機能タンパクへ導くアミノ酸が同定される。指数的エンゼンブル変異法は、例えば、Delegrave (1993) Biotechnology Res. 11:1548-1552に、無作為及び部位特異的変異法は、例えば、Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455にそれぞれ記述されている。

**【0303】**

いくつかの例において、変異体は、シャフリング操作を用いて作製され、その中では異なるポリペプチドをコードした多数の核酸の一部がお互いに融合しキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸を作り出す。これは、例えば、U.S. 特許番号 5,965,408; 5,939,250に記述されている。

20

**【0304】**

本発明は、一つ以上のアミノ酸残基(例えば、SEQ ID NO:2のような典型的なポリペプチドの)が保存的あるいは非保存的なアミノ酸残基(例えば、保存的なアミノ酸残基)と置換された配列を含む本発明のポリペプチドの変種を提供し、そのような置換アミノ酸残基は、遺伝コードによりコードされたものであってもなくてもよい。保存的な置換は、類似した性質を持つ他のアミノ酸によりポリペプチド中の与えられたアミノ酸を置換するものである。従って、本発明のポリペプチドは、本発明の配列、例えば、典型的なSEQ ID NO:2、を保存的なアミノ酸で置換したものを含み、以下の置換に限定されないものも含む：アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンのような脂肪族アミノ酸を他の脂肪族アミノ酸の置換；セリンのスレオニンとの置換、又はその逆；アスパラギン酸及びグルタミン酸のような酸性アミノ酸残基の他の酸性アミノ酸残基との置換；アスパラギン及びグルタミンのようなアミド基を持つ残基とアミド基を持つ他の残基との置換；リジン及びアルギニンのような塩基性アミノ酸と他の塩基性残基との交換；及びフェニルアラニン、トリプトファンのような芳香族残基と他の芳香との残基置換。他の変種は、本発明のポリペプチドの一つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むものである。

30

**【0305】**

本発明のスコープに入る他の変種は、そのポリペプチドが他の化合物、例えば、ポリエチレングリコールのようにポリペプチドの半減期を延ばすような化合物と結合したものである。

40

**【0306】**

本発明のスコープに入る更なる変種は、付加的なアミノ酸がポリペプチドに融合したものである。そのようなものには、リーダー配列、分泌配列、プロタンパク配列、あるいはポリペプチドの精製、強化、あるいは安定性を容易にするような配列がある。

**【0307】**

いくつかの例において、本発明のポリペプチドの変種、断片、誘導体、及び類似物は、この中に述べられるような典型的なポリペプチド、例えば、タンパク分解活性のように同じ生物学的機能又は活性を保持している。他の例において、変種、断片、誘導体、及び類

50

似物は、変種、断片、誘導體、及び類似物がプロタンパク部分の解裂により活性化されて活性なポリペプチドを生成するようなプロタンパクを含む。

宿主において高レベルのタンパク発現を達成するためのコドン至適化

#### 【0308】

本発明は、コドンの慣用を修飾するために、P450をコードした核酸を修飾するための方法を提供する。一例として、本発明は、宿主におけるその発現を増加あるいは減少させるために、P450をコードする核酸中のコドンを修飾する方法を提供する。本発明は、宿主における発現を増加させるために修飾したP450をコードしている核酸、そのように修飾されたP450、及び修飾P450sを作製する方法を提供する。その方法は、P450をコードする核酸中の「非優先」あるいは「低優先」コドンを同定し、そして、これら「非優先」、あるいは「低優先」コドンの一つ以上を置換コドンとして同じアミノ酸をコードした「優先」コドンと置き換えることを含み、その核酸中の少なくとも一つの非優先又は低優先コドンを同じアミノ酸をコードする優先コドンで置き換える。優先コドンは、宿主の遺伝子においてコードしている配列中に過剰表示するコドンであり、「非優先」あるいは「低優先」コドンは、宿主の遺伝子においてコードしている配列中に過小表示されるコドンである。

10

#### 【0309】

本発明の核酸、発現カセット及びベクターを発現するための宿主は、細菌、酵母、カビ、植物細胞、昆虫細胞、あるいは高等動物細胞である。従って、本発明は、これら全ての細胞におけるコドン慣用、コドンを変えられた核酸、及びそのコドンを変えられた核酸により作られるポリペプチドを至適化する方法を提供する。典型的な宿主細胞は、*Escherichia coli*や*Pseudomonas fluorescens*のようなグラム陰性細菌を含む；グラム陽性細菌、*Streptomyces diversa*、*Lactobacillus gasserii*、*Lactococcus lactis*、*Lactococcus cremoris*、*Bacillus subtilis*。典型的な宿主細胞は真核細胞も含む：

20

*Saccharomyces sp.*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*を含む種々の酵母、及び*Kluyveromyces lactis*、*Hansenula polymorpha*、*Aspergillus niger*、及び高等動物細胞あるいはその細胞株及び昆虫細胞あるいはその細胞株。従って、本発明はこれら生物体及び種における発現を至適化した核酸やポリペプチドを含む

#### 【0310】

例えば、細菌細胞から単離されたP450をコードしている核酸のコドンは、その核酸が、P450が由来した細菌とは異なる細菌、酵母、カビ、植物細胞、昆虫細胞、あるいは高等動物細胞で至適に発現されるように修飾される。コドンの至適化法は、既によく知られた技術である。例えば、U.S. 特許番号 5,795,737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188; Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253を参照。また、マウスシステムにおけるコドンの至適化について述べたNarum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253; 酵母におけるコドンの至適化について述べたOutchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24; 大腸菌におけるコドンの至適化について述べた; Feng (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409; 大腸菌における分泌に影響を与えるコドンの至適化について述べたHumphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264をも参照。

30

#### 【0311】

#### 形質変換非ヒト動物

本発明は本発明の核酸、ポリペプチド(例えば、P450)、発現カセット又はベクター、あるいは感染又は形質変換した細胞を含む形質変換非ヒト動物を提供する。形質変換非ヒト動物は、本発明の核酸を含む、例えば、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ラット及びマウスであり得る。これらの動物は、例えば、P450の活性を調べるためのインビトロモデルとして、あるいはインビボでP450活性の調節因子をスクリーンするためのモデルとして使用できる。形質変換非ヒト動物において発現されるポリペプチドのためにコードされている配列は、内在的、あるいは、組織特異的コントロールのもとに、成長特異的あるいは、誘導的な転写制御因子であるようにデザインすることができる。形質変換非ヒト動物はすでによく知られた技術を用いてデザインして作製することができる；例えば、U.S.

40

50

特許番号 6,211,428; 6,187,992; 6,156,952; 6,118,044; 6,111,166; 6,107,541; 5,959,171; 5,922,854; 5,892,070; 5,880,327; 5,891,698; 5,639,940; 5,573,933; 5,387,742; 5,087,571等、形質転換細胞やその卵及び、形質変換マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、及びウシの作製及び使用について述べているものを参照。また、例えば、形質変換酪農動物のミルクにおける組換えタンパクの産生について記述してある Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157; 形質変換ヤギの産生について述べている Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461も参照。U.S.特許番号6,211,428は、あるDNA配列を含む核酸構造物を脳内で発現する形質変換非ヒト高等動物の作製及び使用を述べている。U.S.特許番号5,387,742は、クローン化した組換え体、あるいは合成DNA配列を受精したマウスの卵への注入、偽妊娠雌への注入卵への移植、及びアルツハイマー病の病理と関係したタンパクを発現する細胞を持つ形質変換マウスへの成長について述べている。U.S.特許番号6,187,992は、アミロイド前駆体 (APP) をコードしている遺伝子の分解を含むゲノムをもつ形質変換マウスの作製と使用について述べている。

10

#### 【0312】

「ノックアウト動物」を本発明の方法の実践に使用することができる。例えば、一例として、本発明の形質変換あるいは修飾された動物には、「ノックアウト動物」、例えば、P450を発現しないか、又はできないようにエンジニアした「ノックアウトマウス」が含まれる。

#### 【0313】

#### ポリペプチド及びペプチド

本発明は、本発明の典型的な配列に配列同等性を持った単離あるいは組換えポリペプチドを提供する。その典型的な配列は、例えば、SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:56である。先に考察したように、その同等性は、ポリペプチドの全長、あるいは、少なくとも50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700あるいはそれ以上の残基にわたり得る。本発明のポリペプチドは、典型的な配列 (例えば、SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:56) の全長よりの短いものもあり得る。異なる例として、本発明は、サイズで5~全長の範囲のポリペプチド (ペプチド、断片) を提供する。例えば、P450; 典型的には5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、あるいはその残基数を持つ、例えば、本発明のある典型的なP450のそのような隣接残基をもつもの。本発明のペプチドは、例えば、標識プローブ、抗原、耐性原、モチーフ、P450活性部位、として有用である。

20

30

40

#### 【0314】

本発明のポリペプチド及びペプチドは、天然の資源からの単離、合成によるもの、又は組換え的に作製したものであり得る。ペプチド及びポリペプチドは、インビボ、あるいはインビトロで組換え的に発現させることができる。本発明のペプチド及びポリペプチドは、既によく知られているどのような技術によって作製及び単離されることができる。本発明のポリペプチド及びペプチドは、既によく知られている化学的方法により、全合成、あるいは部分合成することができる。例えば、Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232; Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems*

50

(1995) Technomic 出版社, Lancaster, PAを参照。例えば、ペプチド合成は、種々の固層技術を利用して行うことができ(例えば、Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13参照)、また、例えば、ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) を製造業者から提供された手引きに従って用いることにより、自動合成を行ってもよい。

**【0315】**

本発明のペプチド及びポリペプチドは、グリコシレーションをされうる。そのグリコシレーションは、化学的又は細胞の生合成機構によって翻訳後に添加されうる。後者は、既知のグリコシレーションモチーフの利用を含み、それは、その配列に自然(当然)であり得るか、又はあるペプチド、あるいはその核酸がコードしている配列に付加されうる。グリコシレーションは、O-結合、あるいはN-結合である。

**【0316】**

先に明確にしたように、本発明のペプチド及びポリペプチドは、全ての「疑似体」及び「ペプチド疑似体」を含む。用語「疑似体」及び「ペプチド疑似体」は、本発明のポリペプチドと実体的に同じ構造及び/又は機能特性を持つ合成化学化合物を意味する。疑似体は、全てが合成の非天然類似アミノ酸から成るか、部分的に天然のペプチドアミノ酸と非天然類似アミノ酸から成るキメラである。疑似体は、また、天然アミノ酸保存的置換をそのような置換が実体的に疑似体の構造像及び/又は活性を変えない限り如何なる量でも含める。保存的変種である本発明のポリペプチドを用いて行うように、疑似体が本発明のスコープに入るかものか、即ち、その構造及び/又は機能が実体的に変わっていないかをルーチンに調べられる。従って、一例として、疑似体の組成がP450活性を持つ場合には、それは本発明のスコープに入る。

**【0317】**

本発明のポリペプチド疑似体組成は、非天然構造的な組成を如何なる組み合わせでも含まれる。別の例として、本発明の疑似体組成は、次の三種の構造基を一つあるいは全て含む：a)天然のアミド結合(「ペプチド結合」)以外の残基結合グループ；b)天然に存在するアミノ酸残基に代わる非天然残基；あるいは、c)二次的な構造疑似を誘導する残基、即ち、例えば、ベータターン、ガンマターン、ベータシート、アルファヘリックスのコンフォメーション及びその類など、二次的構造を誘導あるいは安定化するもの。例えば、本発明のポリペプチドは、その全てあるいは一部が天然のペプチド結合以外の化学的手段によって結合されている場合、疑似体として調べることができる。個々のペプチド疑似体残基は、ペプチド結合、他の化学結合、あるいはカップリング手段、例えば、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシサクシニミドエステル、二機能性マレイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)等によって結合させることができる。天然のアミド結合(「ペプチド結合」)に代えることのできる結合グループは、例えば、ケトメチレン(例えば、 $-C(=O)-CH_2-$ )、アミノメチレン( $CH_2-NH$ )、エチレン、オレフィン( $CH=CH$ )、エーテル( $CH_2-O$ )、チオエーテル( $CH_2-S$ )、テトラゾール( $CN_4-$ )、チアゾール、レトロアミド、チアミド、あるいはエステル(例えば、Spatola (1983) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, 7巻, pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY参照)である。

**【0318】**

本発明のポリペプチドは、天然に存在するアミノ酸残基に代わり非天然残基を全て又はいくらか含ませることにより、疑似体として調べることができる。非天然残基は、科学文献又は特許によく述べられている；天然アミノ酸残基の疑似体として有用である典型的な非天然組成及び指針は以下に述べられる。芳香族アミノ酸の疑似体は、例えば、次による置換によって作製できる。それらは、D-あるいはL-ナフチルアラニン；D-あるいはL-フェニルグリシン；D-あるいはL-2-チエニルアラニン；D-あるいはL-1-, 2-, 3-, あるいは4-ピレニルアラニン；D-あるいはL-3-チエニルアラニン；D-あるいはL-(2-ピリジル)-アラニン；D-あるいはL-(3-ピリジル)-アラニン；D-あるいはL-(2-ピラジニル)-アラニン；D-あるいはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニル

グリシン；D-(トリフルオロメチル)-フェニルアラニン；D-p-フルオロ-フェニルアラニン；D-あるいはL-p-ビフェニルアラニン；K-あるいはL-p-メトキシ-ビフェニルアラニン；D-あるいはL-2-インドール(アルキル)アラニン；及びD-あるいはL-アルキルアラニン等で、アルキルは、メチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、イソブチル、セクイソチル、イソペンチル、あるいは非アミノ酸で置換してもしなくてもよい。

【0319】

酸性アミノ酸の疑似体は、負に荷電しているが非カルボキシレートアミノ酸、例えば、(フォスホ)アラニン、硫酸化スレオニンによる置換によって作製できる。カルボキシ側鎖(例えば、アスパルチル、あるいはグルタミル)は、1-シクロヘキシル-3(2-モルフォリニル-(4-エチル)カルボジイミド、あるいは1-エチル-3(4-アゾニア-4,4-ジメソルペンチル)カルボジイミドのようなカルボジイミド(R'-N-C-N-R')を用いた反応によっても選択的に修飾することができる。アスパルチル、あるいはグルタミルは、アンモニウムイオンを用いた反応によってアスパラギニル、あるいはグルタミニル残基に転換できる。塩基性アミノ酸の疑似体は、(リジン、アルギニンに加え)アミノ酸オルニチン、シトルリン、あるいは(グアニジノ)アルキル-酢酸で、アルキルは、先に明確にしたものを用いた置換によって作製できる。ニトリル誘導体(例えば、COOHに代わりCN-残基を含んでいる)は、アスパラギンあるいはグルタミンの代わりにすることができる。アスパラギニル、あるいはグルタミニル残基は、対応するアスパラギニル、あるいはグルタミニル残基に脱アミノ化することができる。アルギニン残基疑似体は、アルギニルと一種以上の古典的な試薬、例えば、フェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロ-ヘキサジオン、あるいはニンヒドリン等を、好ましくは、アルカリ条件下で反応させることにより作製することができる。チロシン残基疑似体は、チロシルを、例えば、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンと反応させることにより作製することができる。N-アセチルイミダゾール及びテトラニトロメタンは、それぞれO-アセチルチロシル体及び3-ニトロ誘導体を形成するために使用することができる。システイン残基疑似体は、システイニル残基を、例えば、クロロ酢酸、あるいはクロロアセトアミド及び対応するアミンのようなカルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を与えるアルファ-ハロアセテートと反応させることにより作製することができる。システイン残基疑似体は、システイニル残基を、例えば、プロモ-トリフルオロアセトン、アルファ-プロモ-ベーター-(5-イミドゾイル)プロピオン酸；クロロアセチルフォスフェート、N-アルリルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィッド；メチル 2-ピリジルジスルフィッド；p-クロロマーキュリベンゾエイト；2-クロロマーキュリ-4-ニトロフェノール；又はクロロ-7-ニトロベンゾ-オギザ-1,3-チアゾールと反応させることにより作製することができる。リジン残基疑似体(及びアミノ末端残基は、変えられることができる)は、リジニル残基を、例えば、サクシン、あるいは他の無水カルボン酸と反応させることにより作製することができる。リジン及び他のアルファ-アミノ含有残基疑似体は、メチルピコリンイミデート、ピリドキサルフォスフェート、ピリドキサル、クロロポロヒドリッド、トリニトロ-ベンゼンスルホン酸、0-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオン、及びグリオキシレートとのトランスアミダーゼ-触媒反応等のようなイミドエステルとの反応により作製することもできる。メチオニン疑似体は、例えば、メチオニンスルホキシドを用いた反応により作製できる。プロリン疑似体は、例えば、ピペコリック酸、チアゾリジン、カルボン酸、3-あるいは4-ホドロキシプロリン、デヒドロプロリン、3-あるいは4-メチルプロリン、あるいは3,3-ジメチルプロリン等を含む。ヒスチジン残基疑似体は、ヒスチジルと、例えば、ジエチルプロカーボネイト、あるいはパラ-プロモフェナシルプロミドを反応させることにより作製できる。他の疑似体は、例えば、プロリン及びリジンの水酸化；セリル、あるいはスレオニル残基の水酸基のリン酸化；リジン、アルギニン及びヒスチジンのアルファ-アミノ基のメチル化；N-末端アミンのアスル化；主鎖アミド残基のメチル化、あるいはN-メチルアミノ酸との置換；又はC-末端カルボキシ基のアミド化等が含まれる。

【0320】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドのある残基、例えば、アミノ酸、は、キラリティーが逆のアミノ酸(又はペプチド疑似体)により置き換えることもできる。従って、L-配座(それは、化学的実体の構造に依存してRあるいはSとして言及されることもできる)で天然に存在するどのようなアミノ酸も、同じ構造的タイプ、あるいはペプチド疑似的なアミノ酸で置換することができるが、逆のキラリティーでD-アミノ酸と呼ばれるがR-、あるいはR-型として呼ばれることもできる。

#### 【0321】

本発明は、本発明のポリペプチドを転写後の修飾(例えば、リン酸化、アシル化等)のような天然のプロセス、あるいは化学的修飾技術により修飾する方法も提供し、その結果ポリペプチドを修飾する。修飾は、ポリペプチドのどの部分でも起こり、それには、ペプチドバックボーン、アミノ酸側鎖及びアミノ末端又はカルボキシ末端を含んでいる。同じタイプの修飾が、与えられたポリペプチド中の数ヵ所で同じか異なった度合で存在するかもしれないことが理解されるであろう。修飾は、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有的な付加、ヘム基の共有的付加、ヌクレオチド、あるいはヌクレオチド誘導体の共有的付加、脂質又は脂質誘導体の共有的付加、フォスファチジルイノシトールの共有的付加、クロスリンク環状化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有クロスリンクの形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシディレーション、GPIアンカーの形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ベジル化、タンパク分解的修飾、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、及びアルギニル化のようなトランスファーRNAにより媒介されるアミノ酸のタンパクへの付加等が含まれる。例えば、Creighton, T.E., Proteins - Structure and Molecular Properties 2nd 編集, W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, 編集, Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)を参照。

10

20

#### 【0322】

固相化学的ポリペプチド合成法は、本発明のポリペプチド、あるいは断片の合成に用いることもできる。そのような方法は、1960年代初頭以来よく知られた技術であり(Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, (1963); Stewart, J. M. and Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd編集, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)、また、商業的に入手可能な研究室レベルのペプチドデザイン及びキット(Cambridge Research Biochemicals)にも最近利用されている。そのような商業的に入手可能な研究室キットは、一般的に H. M. Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984)の教えが使われ、一枚のプレートに全てが結合している多数の「竿」、あるいは「ピン」のチップ上でペプチドの合成を提供する。そのようなシステムが使われる場合、竿及びピンのプレートは二番目のプレートの対応するウェルへ転化及び挿入され、それは、ピン又は竿のチップに適当なアミノ酸を付着、あるいは結合させるための溶液を含む。このプロセスを繰り返すことにより、即ち、その竿及びピンのチップを適当な溶液に転化又は挿入すること、アミノ酸は望ましいペプチドに組み込まれる。更に、多数の入手可能なFMOCペプチド合成システムが利用できる。例えば、ポリペプチド、あるいは断片のアセンブリは、Applied Biosystems, Inc. Model 431A<sup>TM</sup>自動ポリペプチド合成機を用いた固層系システムで行うことができる。そのような機器は、直接合成、あるいは既に知られている技術を用いて結合することのできる一連の断片の合成によって本発明のペプチドへの迅速なアクセスを提供する。

30

40

#### 【0323】

P450オキシゲナーゼ、時にはP450エポキシダーゼ(以下P450s)とも言及される、は、天然に広く存在する酸化酵素であり、生体異質の解毒、異常な炭素源の異化、二次代謝物の生合成等に関与するものである。オキシゲナーゼは、鉄/ヘム核を利用して分子状酸素を活性化し、酸化反応を持続させるために酸化還元電子シャトルを利用する。細菌では、各反応サイクルの最終段階でヘム鉄を還元するために要求される電子が、フェレドキシン(FDX)やフェレドキシン還元酵素(FDR)活性から成る相手方の酵素システムによって供給され

50

る。P450の例として、エポキシ化を触媒することが知られている。特に、エポキシ化は、他の酵素クラスによって触媒されることは稀である。この変換を媒介ためのP450sの使用は、立体化学的な情報を非不整分子に導入することを可能にしている。結果として生じるキラリティーは、多様な求核試薬を用いてそのエポキシドを開環させることにより他の機能性を導入することができる(図-3)。従って、究極的な産物の範囲は、加水分解から生じるジオールに限らず、アミノアルコール、ハロヒドリン及び分岐したアルキル残基にまで拡大することができる。更に、この過程は酵素学的なエポキシドの加水分解のような動力学的分解法と関連した物質の損失なくして起こる。

#### 【0324】

キラルエポキシド合成の有用性は、多くの高純度化薬の合成や主要医薬品の重要な中間体の中間体として、大きな商業的な可能性を持っている。従って、P450sは、抗生物質、抗ウイルス剤、抗癌剤、殺虫剤、除草剤を含む多くの価値ある化合物の合成に応用できる可能性を持っている。

10

#### 【0325】

例えば、Glycidol は、現在、抗高血圧剤アテノロール(atenolol) のプロセススケールでの合成に使用している(ICI、図-4B)。キラルエポキシドは、最前線の抗腫瘍剤ドセタキセル(docetaxel; Aventis、図-5A) 及びパクリタキセル(paclitaxel; BMS)の合成にも応用でき、それらは桂皮酸オキシドを経由して進行する。商業的に有益な出発材料に由来するこの重要な中間体の立体特異的な調整には4ステップが関与する。対照的に、酵素学的な合成は入手が容易な桂皮酸のエポキシ化の一段階だけ必要とされ、ドセタキセルへの部分的な生体触媒アプローチはかなりのコスト削減につながるかもしれない。同様に、抗-HIV薬アンプレナビ(anprenavir; MERCK、図-5B)の合成は、また、キラルエポキシド中間体を要求する。この重要なビルディングブロックの簡単な化学的-酵素学的合成は、ある見地から直視されることができ、その薬の調整においてかなりの商業的な便宜を提供するかもしれない。従って、キラルエポキシドへの効果的かつ商業的に実行可能なルートが、十分なインパクトを持つであろうことは明らかである；P450触媒エポキシ化がそのような技術を提供できるであろう。

20

#### 【0326】

従って、キラルエポキシドの合成にP450sの触媒作用や選択性を利用する可能性が存在することは明らかである。しかしながら、今日まで、生体触媒によるエポキシドの合成の報告は殆どない。これは、多分、伝統的な方法によりアクセスできる限りある生物多様性の中から適当な酸化システムを発見する困難さによるものである。

30

#### 【0327】

関心対象となるそのような特別な反応の一つは、酸化酵素を用いたキラルエポキシドを形成するアルケンのエポキシ化反応である。P450sのような酸化酵素(いわゆるエポキシダーゼ)は、高い立体特異性をもって効果的にエポキシドの合成を触媒し、キラルエポキシドの商業ルートを提供する。従って、本発明は、P450酵素の触媒力及び選択性を利用したキラルエポキシドの産生に焦点を置いた技術プラットフォームの構築に関連している。好ましくは、このプラットフォームに必要とされる酵素は、環境遺伝子ライブラリーから得られる。これら酸化酵素は、農業化成及び高純度の化学薬品のみならず抗生物質、抗ウイルス薬、及び抗ガン薬のような医薬品への化学 酵素的ルートの開発を可能にするであろう。

40

#### 【0328】

この中に用いられるように、関心対象の生物活性は、エポキシ化反応のための触媒としての活性であり、より好ましくは、アルケン類のエポキシ化のための触媒としての活性である。この中に用いられるように、生物分子とはP450を意味している。

#### 【0329】

好ましくは、これら酸化酵素の発見のための努力の最初のステップは、エポキシドを形成するP450の発見のための高感度、ハイスループット法の開発の関連する。この努力を容易にするために、インピボにおけるP450によるエポキシドの合成を至適に援助するための

50

多様な宿主が提供される必要がある。これら宿主株は、宿主株ライブラリーから得てもよい。至適化した測定法と宿主のスクリーニングの組み合わせは、エポキシダーゼの生体触媒が環境遺伝子ライブラリーから得られるということを示すために応用することができる。宿主株ライブラリー及び環境遺伝子ライブラリーは、U.S. 特許番号 5,958,672、U.S. 特許番号6,001,574 及び U.S. 特許番号 5,763,239に述べられている技術を利用して作製することができる。

#### 【0330】

##### P450ハイブリッド酵素及びペプチドライブラリー

一例として、本発明は、本発明の配列から成るペプチドライブラリーを含むハイブリッドP450及び融合タンパクを与える。本発明の配列から成るペプチドライブラリーは、標的(例えば、受容体、酵素)のペプチド阻害剤を単離するため及び標的(例えば、サイトカイン、ホルモン、その類などのリガンド)の正式な結合相手を同定するために利用される。

10

#### 【0331】

生物学的又は治療学的に意味のある化合物のための生物分子スクリーニングの領域は著しく成長している。そのようなスクリーニングのフォーカスである意味のある生物分子は、同定された標的分子の生物学的活性を阻害あるいは増加させる分子の検索において、化学ライブラリー、核酸ライブラリー、及びペプチドライブラリーを含む。特別なペプチドライブラリーに関して、標的分子のペプチド阻害剤の単離及び標的の正式な結合相手の同定が一つの重要な焦点となっている。治療学的に適切な標的細胞に関する可能性のある薬の混合ライブラリーをスクリーニングすることが急激に増加し、重要な領域となっている。しかしながら、ペプチドライブラリーに関する一つの重要な問題は、ペプチドが生物学的効果を持つかを調べる前に、特別なペプチドがどの程度のレベルで発現されているかを評価する困難さである。従って、細胞中で機能的なペプチドを発現させ、それに引き続きスクリーンするために、ペプチドは、タンパク分解及び細胞質からエンドソームへの輸送などの異化機構に打ち勝つために十分な量発現されている必要がある。

20

#### 【0332】

一例として、本発明の融合タンパク(例えば、ペプチド残基)は、配置的に安定化され、それらの細胞標的に体する高い結合親和性を与える。本発明は、本発明のP450sの融合体及びP450sの構造がそれほど壊されず、また、ペプチドが、代謝的及び構造的配置的に安定化される様に融合された既知及びランダムペプチドを含む他のペプチドを提供する。これは、その細胞中の存在やその質等を簡単に調べられるペプチドライブラリーの作製を可能にする。

30

#### 【0333】

本発明のアミノ酸配列変種は、変種の性質を予め確定されている性質により調べられる。P450アミノ酸配列の変種は、予め確定している性質、それらを天然に存在する対立形質あるいは種間におけるアミノ酸配列の多様性から分けて置く特徴、により特徴付けることができる。一例として、本発明の変種は、特徴を修飾されたものが選別されるが、天然に存在する類似物として同じ質的な生物学的活性を持つ。例えば、与えられた部位での変異操作を至適するために、無作為な変異をその標的コドン又は領域で行い、発現したP450変種を望まれる活性の至適な組み合わせによりスクリーンしてもよい。既知の配列を持つDNAの予め決められた部位で置換変異を行う技術は、例えば、M13プライマー突然変異誘発法及びPCR突然変異誘発法のようによく知られている。いくつかの場合において、削除はより大きいかもしれないが、削除はおおよそ1~20残基の範囲にある。至適な性質を持つ最終的な誘導体を得るために、置換、削除、挿入、あるいはそれらの如何なる組み合わせを利用してよい。一般的に、これらの変化は、分子の変化を最小にするために少数のアミノ酸について行われる。しかしながら、より大きな変化が、ある環境条件下で容認されてもよい。

40

#### 【0334】

本発明は、ポリペプチドのバックボーン、二次、あるいは三次構造、例えば、アルファヘリックス又はベータシート構造、が修飾されたP450を提供する。一例として、荷電又

50

は疎水性が修飾されている。一例として、側鎖の大部分が修飾されている。機能又は免疫学的同等性に関する実体的な変化は、より保存的でない選択的置換により作られる。例えば、置換は、以下の点に顕著な影響を与えるかもしれない：変化の領域におけるポリペプチドバックボーンの構造、例えば、アルファヘリックス又はベータシート構造；標的部位での分子の荷電あるいは疎水性；又は側鎖の大部分。ポリペプチドの性質に最も大きな変化を作り出されることが一般に期待される置換には次のようなものがある：(a)親水性残基、例えば、セリルあるいはスレオニル、が疎水性残基、例えば、ロイシルイソロイシル、フェニルアラニル、バシル、あるいはアラニル、により置換される；(b)システイン、あるいはプロリンが他の残基と置換される；(c)電氣的に正に荷電した側鎖をもつ残基、例えば、リジル、アルギニル、あるいはヒスチジル、が電氣的に負に荷電した、例えば、グルタミル、あるいはアスパルチルと置換される；あるいは(d)大きな側鎖をもつ残基、例えば、フェニルアラニン、が側鎖を持たない残基、例えば、グリシンと置換される。その変種は、必要とされるP450sの特徴を修飾するために選別されることができ、同じ質的な生物学的な活性(即ち、タンパク分解活性)を持つ。

#### 【0335】

一例として、本発明のP450sは、エピトープ、あるいは精製タグ、シグナル配列又は他の融合配列などを含む。一例として、本発明のP450sは、融合ポリペプチドを作るためにランダムペプチドに融合させることができる。この中の「融合した」、あるいは「動作的に結合した」によるとは、P450構造(即ち、それはタンパク分解活性を持ち得る)の安定性の破壊を最小にするように、又、少なくとも42 の $T_m$ を維持するようにして、ランダムペプチドとP450がお互いに結合していることを意味する。その融合ポリペプチド(あるいはその融合ポリペプチドをコードしている融合ポリヌクレオチド)は、多数のループで多数のポリペプチドを含む更なる他の組成も含み得る。

#### 【0336】

一例として、それらをコードしているペプチド及び核酸は、例えば、核酸/残基頻度あるいは部位当たりで完全にあるいは偏らせる様態において無作為化される。「無作為化」とは、各核酸及びペプチドが本質的にランダムヌクレオチド及びアミノ酸からそれぞれ構成されていることを意味する。一例として、ペプチドを生ずる核酸は、化学的に合成されることができ、従って、そのどの部位に如何なるヌクレオチドをも導入できる。従って、その核酸が発現してペプチドを形成する場合、どのようなアミノ酸残基が如何なる部位に導入されてもよい。その合成プロセスは、無作為化した核酸を作製するために、その核酸の全長に渡ってその全てあるいは可能な組み合わせの形成を可能にするために、修飾することができ、それにより無作為化した核酸が作製される。そのライブラリーは、好ましい応答を持つ一つ以上の細胞を与えるための確率的に十分な範囲の細胞応答に影響を与える無作為化した発現産物の十分に構造的な多様性を持たせた集団を提供することができる。従って、本発明は、少なくとも一つの構成メンバーがいくつかの分子、タンパク、あるいはシグナル伝達を完全にするために必要な活性を持つ他のファクターに対して親和性を持つ構造を持てるように十分な大きさの相互作用ライブラリーを提供する。

#### 【0337】

一例として、本発明のペプチドライブラリーは、配列の選択又は如何なる部位における一定性のないように十分に無作為化されているものである。他の例として、そのライブラリーは偏っている。即ち、配列中のいくつかの部位が、一定に保たれるか、又はある限られた数の可能性から選択される。例えば、一例として、クロスリンクのためのシステイン、SH-3ドメインのためのプロリン、リン酸化部位のセリン、スレオニン、チロシン、あるいはヒスチジン等の創生に、ヌクレオチド又はアミノ酸は、ある特定のクラスのアミノ酸、例えば、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、立体的に偏った(小さいか又は大きい)残基、で無作為化される。例えば、個々の残基は、構造の偏りを作り出すために、その挿入の無作為ペプチド配列中に固定される。別の例として、無作為ライブラリーは、特別な二次構造に好ましい適当な数の残基(グリシンリンカーの他に)を含ませることにより、特別な二次構造に偏らせることができる。

## 【0338】

一例として、その偏りは、既知にクラスの子と相互作用するペプチドに対するものである。例えば、殆どの細胞内シグナリングは、小さなペプチドドメインを介して他のポリペプチドと相互作用しているポリペプチドの短い領域を介して起こる。例えば、HIV-1エンベロープの細胞質ドメインに由来するある短い領域が、細胞性カルモジュリンの作用を抑えることが既に示されている。スズメバチに由来するマストパラン毒素に相同性のあることが示されているFas細胞質ドメインは、細胞死を誘導するアポトーシス又はGタンパク誘導機能を持つ短いペプチド領域に限定することができる。従って、多数の分子、あるいはタンパクドメインが、偏って無作為化したペプチドの作製のための開始点として適している。非常に多くの小分子ドメインが知られており、それらは、共通の機能、構造あるいは親和性を与える。更に、低いアミノ酸相同性の領域は、高い構造相同性を持つかもしれない。本発明で用いられる典型的な分子、ドメイン、及び/又は、対応する共通の配列(例えば、本発明の融合タンパクに取り込まれる)は、SH-2はSH-2ドメイン、SH-3ドメイン、プレックストリン(Pleckstrin)、致死ドメイン、P450解裂/認識部位、酵素疎外剤酵素基質、Traf、等を含む。同様に、本発明における使用に適したドメインを含む既に知られた多くの核酸結合タンパクが存在する、例えば、ロイシンジッパー共通配列。

10

## 【0339】

本発明は、融合タンパクをコードしている核酸を含め、本発明の核酸から成る種々の発現ベクターを提供する。発現ベクターは、自己複製する特別な染色体ベクターや宿主ゲノムと統合するベクターになり得るものでもよい。一般的に、これらの発現ベクターは、融合タンパクにコードされた核酸に動作的に結合した転写あるいは翻訳制御核酸を含む。用語「対照配列」とは、特別な宿主細胞において動作的に結合したコードしている配列を発現するために必要な原核生物に適した対照配列は、例えば、プロモーター、任意にオペレーター配列、及びリボゾーム結合部位を含む。

20

## 【0340】

本発明の発現カセットやベクターに用いられている転写又は翻訳制御配列は、制限はされないが、プロモーター配列、リボゾーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列、及びエンハンサーやアクチベーター配列を含む。一例において、その制御配列は、プロモーターと転写における開始及び停止配列を含む。プロモーター配列は、構成的又は誘導プロモーターのいずれかをコードする。そのプロモーターは、天然に存在するものでもハイブリッドプロモーターのいずれでもよい。一種以上のプロモーターの配列を併せ持つハイブリッドプロモーターは、既によく知られた技術であり、本発明において有用である。一例として、そのプロモーターは、CMVプロモーターのような強力なプロモーターであり、特に、高等動物の細胞内で、特に、Tet制御配列との組み合わせで、高い発現を可能にしている。

30

## 【0341】

更に、発現ベクターは付加的な配列を含んでもよい。一つの具体例として、発現ベクターは、二つの複製システムを持てるかもしれない。従って、例えば、発現のための高等動物、あるいは昆虫細胞及びクローニングや増幅のための原核宿主など二つの生物体中に維持されることを可能にする。更に、発現ベクターを完成するためには、発現ベクターは、宿主細胞のゲノムに相同的な少なくとも一種の配列、好ましくは発現構造体に隣接する二種の相同配列を含んでいる。完成しつつあるベクターは、適当な相同的配列をベクターに含ませるため選別させることにより、宿主細胞の特別な場所に導かれるかもしれない。

40

## 【0342】

一例において、本発明の核酸、あるいはベクターは、スクリーニングを行うために細胞に導入され、その核酸は、それに引き続くその核酸の発現に適した様態において細胞に導入される。その導入の方法は、その標的細胞のタイプにより大きく指定される。典型的な方法は、リボゾーム融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、ウイルスの感染等が含まれる。その核酸の候補は、その宿主細胞のゲノムに安定に取り込まれてもよいし(例えば、レトロウイルスによる導入)、その細胞質に一過性又は安定に存在してもよい(

50

即ち、伝統的なプラスミドの使用により、標準的な調節配列、選別マーカ等を用いて)。多くの製薬的に重要なスクリーンは、ヒト又はモデル高等動物細胞標的を要求するように、そのようなターゲットを感染させることのできるレトロウイルスベクターが好まれる。

#### 【0343】

本発明の発現ベクターは、形質変換された細菌株の選別を可能にする選別可能マーカ遺伝子を含む、例えば、細菌をアンピシクロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシン及びテトラサイクリンのような薬に対して抵抗性を持たせる遺伝子。選別可能マーカは、生合成遺伝子、例えば、ヒスチジン、トリプトファン及びロイシン生合成経路におけるそれらのようなものを含む。

10

#### 【0344】

##### スクリーニング法、及び「オンライン」検出装置

本発明の方法を行う上で、本発明の核酸やポリペプチドに関連した様々な装置や技術が利用される。これらには、ポリペプチドのエポキシドヒドロラーゼ反応性に対するスクリーニング、活性調節物質(例えば、酵素活性の阻害剤、あるいは活性化剤)のスクリーニング、本発明のポリペプチドと結合する抗体のスクリーニング、及び本発明の核酸とハイブリダイズする核酸のスクリーニング等が含まれる。

#### 【0345】

##### 固定化酵素支持体

P450酵素、その断片、酵素をコードする核酸、及びその断片は、固形化支持体に固定化される。これは、しばしば、工業的行程でのP450の利用において、経済的、かつ効率的である。例えば、特別な化学反応に利用されるP450酵素(あるいは、その活性部位)を含む混合物や溶液は、固形化支持体と混合され、行程用タンクに入れられる。その酵素反応が行われた後、P450の固定された固形化支持体は、行程用タンクより回収され、再利用される。本発明の一例として、本発明の単離された核酸が、固形化支持体に固定化される。本発明の他の一例として、固形化支持体として、ゲル、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、及びこれらの組み合わせが利用される。

20

#### 【0346】

例えば、ゲルは、本発明に利用される固形化支持体として有用である。ゲルの例として、以下のものが利用される：セファロース、ゼラチン、グルタルアルデヒド、キトサン処理されたグルタルアルデヒド、アルブミン-グルタルアルデヒド、キトサン-キサンタン、トヨパールゲル(ポリマーゲル)、アルギン酸、アルギン酸ポリリジン、カラギーナン、アガロース、グリオキシルアガロース、磁化グリオキシルアガロース、デキストランアガロース、ポリカルバミルスルホン酸ハイドロゲル、BSA-PEG ハイドロゲル、リン酸化ポリビニルアルコール(PVA)、モノアミノエチル-N-アミノエチルアミン(MANA)、あるいはこれら何れかの組み合わせ。

30

#### 【0347】

他の例として、樹脂やポリマーも、本発明に利用される固形化支持体として有用である。樹脂やポリマーの例として、以下のものが利用される：セルロース、アクリルアミド、ナイロン、レーヨン、ポリエステル、陰イオン交換樹脂、アンバーライト<sup>TM</sup> XAD-7、アンバーライト<sup>TM</sup> XAD-8、アンバーライト<sup>TM</sup> IRA-94、アンバーライト<sup>TM</sup> IRC-50、ポリビニル、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、あるいはこれら何れかの組み合わせ。セラミックも、本発明に利用される固形化支持体として有用である。その例として、無孔性セラミック、有孔性セラミック、及びSiO<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>が含まれる。ガラスも、本発明に利用される固形化支持体として有用である。その例として、無孔性ガラス、有孔性ガラス、アミノプロピルガラス、あるいはこれら何れかの組み合わせが利用される。微小電極も、本発明に利用される固形化支持体として有用であり、その例は、ポリエチレンイミンで覆われたマグネタイトである。黒鉛状粒子もまた、固形化支持体として利用される。又、その他の、固形化支持体として、赤血球のような細胞も利用される。

40

#### 【0348】

50

## 固定化法

多数の酵素、あるいはそれらの断片、又は核酸の固形化支持体への固定化法が、関連研究者に知られている。このような方法の例として、以下のものが利用される：静電液滴法、吸着、共有結合、クロスリンク、化学反応や化学行程、カプセル化、封じ込め、アルギン酸カルシウム、あるいはポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリル酸)による電気化学的方法。同様の方法が、以下に記述されている：Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C. 1987. Academic Press. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Volume 136; 及び Immobilization of Enzymes and Cells. 1997. Humana Press., G. F. Bickerstaffによる編集。Series: Methods in Biotechnology, J. M. Walkerによる編集。

10

【0349】

### キャピラリーアレイ

ギガマトリックス<sup>TM</sup>、Diversa Corporation, CA, USA、のようなキャピラリーアレイが、本発明の方法には利用される。本発明の核酸やポリペプチドは、キャピラリーアレイを含むアレイと固定化されるか、又はそれらに添加される。アレイは、ライブラリー構成物(例えば、低分子化合物、抗体、核酸など)の本発明の核酸やポリペプチドに対する結合性や活性を評価するためのスクリーニング又は検出に利用される。キャピラリーアレイは、試料の保持及びスクリーニングにおけるもう一つの系として利用できる。例えば、スクリーニング装置は、少なくとも一つの壁により光束と保持された試料が隔てられているキャピラリーを多数連ねたアレイを含むことができる。この装置は、更に、アレイ中の隣接したキャピラリーを整列させるための間質材を含んでおり、その間質材の間に一つ、あるいはそれ以上の参照印が押されている。試料をスクリーニングするためのキャピラリーは、キャピラリーアレイで結合するように改良されており、試料を保持するための光束を隔てる第一の壁があり、更に、試料を励起させるために与えられる励起光を透過するためのフィルター材を持つ第二の壁がある。

20

【0350】

ポリペプチド又は核酸、即ち、リガンド、は、キャピラリーアレイ中における少なくとも一部のキャピラリーに第一の試料として導入される。キャピラリーアレイの各々のキャピラリーは、第一の試料を保持するための光束を隔てる少なくとも一つの壁を持つ。キャピラリー中には、第一の成分の後に空気泡が導入される。第二の試料がキャピラリーへ導入され、ここで第二の試料は、空気泡により第一の試料から分離される。対象試料は、検出可能な粒子で標識された第一液としてキャピラリーアレイ中の一つのキャピラリーに導入され、その中で各々のキャピラリーは、第一液と検出用粒子を保持するための光束で仕切られた少なくとも一つの壁を形成しており、そこでは、少なくとも一つの壁が検出用粒子を結合させるための結合基剤で覆われている。本法は、更に、キャピラリーからの第一液の除去についても述べられ、そこでは、結合した検出用粒子がキャピラリー中に保持されており、そして、そのキャピラリーに第二液が導入される。

30

【0351】

キャピラリーアレイは光束を隔てる少なくとも一つの外壁を持つ個々のキャピラリーにより形成されている。キャピラリーの外壁は、互いに結合した一つ、あるいはそれ以上の壁を持つ。同様に、その壁は、それが液体や試料を保持する光束を形成する限り、円筒形、四角、六角形やその他の幾何学的形態の光束を隔たらせる。キャピラリーアレイ中のキャピラリーは、平面構造を形成するように近接して、互いに支えあっている。キャピラリーは融合(この例では、キャピラリーはガラス製)、接着剤、粘結剤、あるいは固定具などにより互いに結着している。キャピラリーアレイは、如何なる数のキャピラリーからでも形成できる(例えば、100~4,000,000のキャピラリー)。キャピラリーアレイは、約100,000又はそれ以上の互いに結着したキャピラリーを持つマイクロタイタープレートを形成できる。

40

【0352】

アレイ、あるいは「バイオチップ」

50

本発明の核酸やポリペプチドは、アレイと固定化されるか、又はそれらに添加される。アレイは、ライブラリー構成物(例えば、低分子化合物、抗体、核酸等)と本発明の核酸やポリペプチドに対する結合性やその調節活性を評価するためのスクリーニングや検出に利用される。例えば、本発明の一例として、測定されるパラメーターは、エポキシドヒドロラーゼ遺伝子転写物の発現である。細胞の転写物、転写物である核酸、又は転写物と相補的な核酸を含む試料のハイブリダイゼーションにより、細胞中の一つ以上又は全ての転写物が、アレイ又は「バイオチップ」上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションにより測定される。マイクロチップ上の核酸の「アレイ」を使用し、細胞中の幾つか、あるいは全ての転写物が同時に分析される。又は、ゲノム由来の核酸を含むアレイもまた、本発明の方法により新たに作製された株の遺伝子型を決定するために使用される。「ポリペプチドアレイ」は、多数のタンパク質を同時に検定するために用いられる。本発明は、既知の、全ての「アレイ」を用いても実行可能であり、これらのアレイには、「マイクロアレイ」、「核酸アレイ」、「ポリペプチドアレイ」、「抗体アレイ」、「バイオチップ」、あるいはこれらを改変したものが含まれる。アレイは、一般的に、多数の「スポット」、あるいは「標的成分」であり、一定量の一つ、あるいはそれ以上の生物分子、即ち、オリゴヌクレオチドを含む各々の標的成分は、試料分子、即ち、mRNA転写物との特異的結合を行わせるために基質表面の一定の領域に固定化されている。

10

### 【0353】

本発明の方法を実行するにあたり、既知のアレイ、あるいは/及びアレイの作製法、及びその使用法は、その全て、あるいは一部、又はその改変されたものが、例えば、以下に記述されている：U.S. Patent Nos. 6,277,628; 6,277,489; 6,261,776; 6,258,606; 6,054,270; 6,048,695; 6,045,996; 6,022,963; 6,013,440; 5,965,452; 5,959,098; 5,856,174; 5,830,645; 5,770,456; 5,632,957; 5,556,752; 5,143,854; 5,807,522; 5,800,992; 5,744,305; 5,700,637; 5,556,752; 5,434,049; 例えば、以下も参照、WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; 例えば、以下も参照、Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407; Bowtell (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32。又、U.S. 特許出願番号20,010,018,642; 20,010,019,827; 20,010,016,322; 20,010,014,449; 20,010,014,448; 20,010,012,537; 20,010,008,765 も参照のこと。

20

30

### 【0354】

#### 抗体及び抗体を基にしたスクリーニング法

本発明は、本発明のP450と特異的に結合する単離された、あるいは組換えにより得られた抗体を提供している。これらの抗体は、本発明の蛍光ポリペプチド又はその関連ポリペプチドの単離、同定、あるいはその定量に利用される。これらの抗体は、又、本発明の領域内のポリペプチド、あるいはその他のP450関連ポリペプチドの単離にも利用される。

### 【0355】

抗体は、免疫沈降、染色、及び免疫親和性カラム等に利用される。必要ならば、特定の抗原に対する抗体をコードする核酸配列は、免疫付与に続くポリペプチド、あるいは核酸の単離、増幅、クローニング、及び本発明のアレイへのポリペプチドの固定化により得られる。又は、本発明における方法は、細胞により生産された抗体の構造の修飾、即ち、抗体の持つ親和性の増加、又は減少にも利用される。更に、本発明の方法により設計された細胞の抗体を生産、あるいは修飾する能力は、表現型として現れるであろう。

40

### 【0356】

免疫付与、抗体(モノクローナル、及びポリクローナル)の生産、及び単離の方法は、関連研究者には良く知られており、科学文献や特許などにも記述されている：Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (編集) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (第7版) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (第2版) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) *Nature* 256:495; Harlow (1988) *ANTIBODIES, A*

50

LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York を参照のこと。動物を使用した通常のインビボにおける方法に加え、抗体は、インビトロにおいても生産される。即ち、それは、組換え抗体結合部位を発現するファージディスプレイライブラリーを使用するものである: Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45。

#### 【0357】

ポリペプチド、あるいはペプチドは、本発明におけるポリペプチドと特異的に結合する抗体を生産するために利用される。これらの抗体は、ポリペプチドを単離、あるいは精製するため、免疫親和性クロマトグラフィーに使用されるか、又は生物試料中にそのポリペプチドが含まれるかを試験するためにも利用される。このような工程において、抽出物などのタンパク質含有物、あるいは生物試料は、本発明のポリペプチドのうちの一つと特異的に結合する抗体と混合される。

10

#### 【0358】

免疫親和性工程において、抗体は、ビーズやその他のカラム基材のような固形支持体と結合される。タンパク質含有物は、本発明のポリペプチドのうちの一つと、抗体が特異的に結合する条件下で、その抗体と混合される。非特異的に結合したタンパク質を取り除くための洗浄を行った後、特異的に結合したタンパク質が溶出される。

#### 【0359】

生物試料中のタンパク質の抗体に対する結合能は、関連研究者が熟知した様々な方法の中の何れによっても決定できる。例えば、その結合は、蛍光試薬、酵素的標識、あるいは放射性同位元素のどの検出可能な試薬による抗体の標識化によっても測定される。又は、試料と結合する抗体は、検出可能な試薬と結合した二次抗体を用いた方法によっても測定される。具体的なアッセイ法としては、ELISA法、サンドウィッチ法、放射能免疫法、及びウェスタンブロット法が含まれる。

20

#### 【0360】

本発明のポリペプチドに対して生成されたポリクロナール抗体は、そのポリペプチドの動物に対する直接注射又は非ヒト動物への投与により得られる。そして、ここで得られた抗体は、そのポリペプチドと結合する。この様式において、たとえ、そのポリペプチドの一部の断片が抗体作成に用いられようとも、生じた抗体は、全体の配列を持つそのポリペプチドとの結合能を有する。このような抗体は、そのポリペプチドを発現する細胞より、ポリペプチドを単離するために利用される。

30

#### 【0361】

モノクロナール抗体の産生には、継続して培養できる細胞株による抗体の産生が可能な系であれば、何れの方法をも適用できる。これらの例としては、ハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術が含まれる (Cole (1985); Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 を参照のこと)。

#### 【0362】

本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を産出するために、U.S. 特許番号 4,946,778 に記述された方法が利用される。又は、これらのポリペプチド、あるいはその断片に対するヒト化された抗体を産生するために形質転換されたマウスが使用される。

40

#### 【0363】

本発明のポリペプチドに対して生成された抗体は、その他の生物や試料より得られた、類似のポリペプチドのスクリーニングにも利用される。このような技術において、生物試料より得られたポリペプチドは、抗体と混合され、その抗体と特異的に結合したポリペプチドが測定される。上記に記された、何れの方法も、抗体との結合を測定するために利用できる。

#### 【0364】

#### キット

本発明は、核酸、発現用カセット、ベクター、細胞、ポリペプチド (即ち、P450)、及

50

び/又は本発明の抗体を含む一連のキットを提供する。このキットは、ここで記されたような本発明の使用方法及び工業的利用法が記述された取り扱い説明書をも含んでいる。

#### 【0365】

##### 代謝パラメーターの測定

本発明の方法は、細胞への核酸の導入により、その遺伝的構成物が修飾された新規の遺伝子型を持つ細胞株の樹立を行うための細胞全体の進化法、あるいは設計法を提示している。新規の遺伝子型を持つ細胞を検出するために、修飾された細胞内における一つ、あるいはそれ以上の代謝パラメーターが、ある時間枠で「実時間」的に又は「オンライン」的に測定される。一例として、多数の代謝パラメーターが、「実時間」的に、あるいは「オンライン」的に測定される。その代謝パラメーターは、本発明の蛍光性ポリペプチドを用いて測定される。

10

#### 【0366】

代謝流量分析 (metabolic flux analysis, MFA) は、既知の生化学的構成に基づいている。経路上、独立した代謝マトリックスは、細胞内代謝物における、質量保存の法則、及び擬似定常状態仮説 (pseudo-steady state hypothesis, PSSH) に基づいている。本法を実行するにあたり、構成される代謝ネットワークは、以下に示した要素を含んでいる：

- ・ その経路における、全ての基質、生産物、及び中間代謝物の同定
- ・ その経路の代謝物が相互変換される、全ての化学反応の同定、及びそれらの反応の化学量論的解析
- ・ その経路に關与する全ての酵素の同定、及びその酵素の行う化学反応の反応速度論的解析
- ・ その経路の構成成分間の調節的相互作用、即ち、アロステリック相互作用、酵素間相互作用など。
- ・ 酵素の細胞内局在、あるいはその酵素の他の分子との複合体形成、及び
- ・ 代謝産物、酵素、あるいはエフェクター分子の濃度勾配、あるいはそれらの細胞内移動における拡散的障壁の存在

20

#### 【0367】

その細胞における代謝ネットワークが構築されると、オンラインメタボロームに関するデータが利用可能な場合は、その細胞内代謝流路を推定するために、マトリクス概念による数学的解析が行われる。代謝的表現型は、細胞内における全体の代謝ネットワークの変化に依存している。代謝的表現型は、環境条件、遺伝子レベルでの調節、発育状態、及びその細胞の遺伝子型などにおけるその経路の利用状態の変化にも依存している。本発明の方法の一例として、オンラインによるMFA解析の後、その経路の利用状態を測定することにより、その細胞の動的挙動、表現型、及びその他の特性が解析される。例えば、酵母の発酵において、グルコースの供給が増加して酸素量が低下した場合、呼吸経路の利用は低下及び/又は停止され、嫌氣的醗酵経路の利用が優位となる。細胞培養における生理学的条件の調整は、その経路の解析の後で可能となる。本発明の方法は、細胞の生理学的条件を目的の状態へと調整するための基質供給、温度、誘導物質等の条件を決定することによる最適な醗酵方法の決定を支援する。本法を実行するにあたり、そのMFA解析データは、又、代謝経路設計、あるいは遺伝子シャッフリング等の実験法やプロトコールを作成するために、トランスクリプトームデータ及びプロテオームデータと比較検討される。

30

40

#### 【0368】

本法を利用することにより、細胞中における、修飾された表現型、あるいは新規の表現型を含む何れの表現型をも比較、及び検出可能である。代謝又は生育における何れの特性をも測定できる。

#### 【0369】

##### mRNA転写物発現の測定

本発明の一例として、細胞中の設計された表現型には、細胞中でのmRNA転写物、又は新規転写物の発現の増加、あるいは減少が含まれる。増加又は減少した転写物の発現は、本発明の蛍光性ポリペプチドを利用して追跡される。mRNA転写物、あるいはそのメッセージ

50

は、又、ノーザンブロット、定量的増幅反応、ハイブリダイゼーションなどを含む何れの既知の方法によっても検出及び定量が可能である。定量的増幅反応は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、定量的実時間 RT-PCR、あるいは「実時間動的 RT-PCR」等の定量的PCRを含んでいる(Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914 を参照のこと)。

#### 【0370】

本発明の一例として、設計される表現型は、相同的遺伝子の発現のノックアウトにより作製される。その遺伝子のコーディング配列、又はその一つ、あるいはそれ以上の転写調節配列、即ち、プロモーターやエンハンサー、がノックアウトされる。それにより、その転写物の発現は、完全に停止又は減少する。

10

#### 【0371】

本発明の一例として、設計される表現型には、相同的遺伝子の発現が増加したものが含まれる。これは、シス、あるいはトランス的に作用する転写調節配列を含む負の調節配列のノックアウト、又は正の調節配列への突然変異の導入により作製される。細胞における一つ、あるいはそれ以上、又は全ての転写産物は、細胞の転写物を含む試料のハイブリダイゼーション、あるいは細胞の転写物である核酸又は転写物と相補的な核酸のアレイ上に固定化された核酸とのハイブリダイゼーションにより測定される。

#### 【0372】

##### ポリペプチド、ペプチド、及びアミノ酸の発現の測定

本発明の一例として、細胞中の設計された表現型には、細胞中でのポリペプチド、あるいは新規ポリペプチドの発現の増加、あるいは減少が含まれる。増加、あるいは減少したポリペプチドの発現は、本発明のP450を利用して追跡される。ポリペプチド、ペプチド、及びアミノ酸は、又、核磁気共鳴法(nuclear magnetic resonance, NMR)、分光測光法、X線撮影法(放射性同位元素による標識化)、電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)、薄相クロマトグラフィー(thin layer chromatography, TLC)、高拡散クロマトグラフィー、免疫沈降法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、放射免疫測定法(radioimmunoassay, RIAs)、酵素免疫吸着法(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISAs)、免疫蛍光法、電気泳動(即ち、SDS-PAGE)後の抗体染色、及び蛍光細胞分析分離法(fluorescent activated cell sorter, FACS)等の各種の免疫学的方法、熱分解質量分析、フーリエ変換赤外分析法、ラマン分光光度法、GC-MS、LC-電気スプレー、及びcap-LC-タンデム電気スプレー質量分析法等を含む何れの既知の方法によっても検出、及び定量が可能である。新規の生物活性も、U.S. 特許番号 6,057,103 に記述された方法又はその変法によってスクリーニングできる。更に、細胞中の一つ、あるいはそれ以上、又は全てのポリペプチドの測定が以下に詳細が記載されているタンパク質アレイを利用することにより可能である。

20

30

#### 【0373】

##### アッセイ系の開発

P450を得るために、幾つかのアッセイ法が利用される。これらの方法には、生育を基にしたアッセイ法、直接的活性測定によるアッセイ法、及び配列を基にしたアッセイ法が含まれる。目的の特性を持つ、広範なP450を得るためには、これら三種類のアッセイの全てを補足的に行うことが望ましい。

40

#### 【0374】

##### 生育を基にしたアッセイ法

エポキシ化を触媒することのできる酵素を同定するための最も直接的かつハイスループットな増殖を基にした選別法は、適当なアルケンについて増殖選別を行うことである(図-10)。この方法は、スクリーニング宿主が、炭素源として使われる標的アルケンを経路誘導体に変える酵素を含む必要がある。数種の細菌(例えば、Xanthobacter strain Py2)が、唯一の炭素源としてアルケンを使用できるものとして、既に同定されており(Ensign, S. A. Biochemistry 2001 40, 5845参照)(図-11A)、その最初のステップは、そのアルケンの対応するエポキシドへの酸化に関与している。従って、そのエポキシドは、他

50

のいくつかの酵素の連続した作用により通常の細胞代謝に導かれることができる。標的アルケン基質に関する直接的な増殖の選別は、従って、実行可能であるが、エポキシド - 形成及び - 修飾に関わる両遺伝子を含むゲノムクローンに依存する。それに代わり、エポキシダーゼの発見努力を減らすために、エポキシド修飾酵素を発現する宿主株を構築することができるかもしれない。

#### 【0375】

二番目の増殖を基にした選別法は、標的エポキシドのジオール加水分解産物を増殖の栄養源として使用する。この方法は、選別のために適当な基質特異性を持つP450を含む宿主株を必要とする。選別基質として使われることができるであろうアルケン類(図-12)は、アリルアルコール、3,3-ジメチル アクリレート及びトランス-3-メチル-2-ペンテノールを含む。ジオールへの加水分解に引き続くこれら化合物のエポキシ化は、グリセロール、及び、例えば、パリンとイソロイシンの生合成の重要な中間体をそれぞれ与える。アリルアルコールのための選別は、従って、増殖のために唯一の炭素源としてグリセロールを使用することに依存することになる。

10

#### 【0376】

##### 直接的な活性を基にしたアッセイ

エポキシダーゼ活性を同定する直接的活性測定法(また、「活性スクリーン」法と呼ばれる)は、超ハイスループットの方法論にはあまり許容がないが、宿主株の修飾をあまり必要としない。活性スクリーンは、酵素の同定、ヒットの二次特徴化及び進化させた酵素の分析に応用可能であり、従って、非常に多様的である。適当な活性スクリーンは、そのエポキシド誘導体の形成に関する特別な分子の分光学的性質の修飾を測定する必要に迫られる。Sames等は、最近、このタイプの適した活性スクリーンの一例について述べている(Moreira, R. Havranek, M. & Sames, D. J. Am. Chem. Soc. 2001,123, 3927) (図-12A)。この場合、黄色蛍光を持つアルケンが青色の蛍光を持つエポキシドへと変換され、青色蛍光の黄色蛍光に対する比を見ることにより反応の度合いが測定可能となる。二番目に可能な蛍光を基にしたスクリーン法は、エポキシドとP450活性のインビボにおけるカップリングと関わっている(図-12B) (Badalassi, F., Wahler, D., Klein, G., Crotti, P., & Reymond, J.-L. Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39, 4067)。結果として生ずるメチルウンベリフェロンに結合している隣接ジオールは、過ヨウ素酸酸化し、更に、メチルウンベリフェロンのBSA-触媒 - 脱離を行う。この方法において、エポキシドの形成は、蛍光の量的収量の増加により検出される。このエポキシド/ジオール検出の方法は、適当なP450を含んだ宿主株のエンジニアリングを必要とする。

20

30

#### 【0377】

活性を基にしたエポキシダーゼ発見に補足的なアプローチは、P450種の配列を基にした発見とそれに引き続く二次アッセイにおけるそれら基質特異性の評価である。この方法は、P450sがハイブリダイゼーション、あるいはPCRスクリーニングのためのオリゴヌクレオチドプローブをデザインするために使用できるいくつかの領域を持つために、確かに実行可能である。そのオリゴヌクレオチドプローブは、マクロライドの生合成経路に関与するP450に特異的とみられる保存領域配列のモチーフを利用してデザインすることができる。これは、実験的データとバイオインフォーマティク分析を、新規に発見されたP450sの基質タイプに関する情報を豊富にするために、合わせることを可能にし、更に、その情報を標的指向酵素のためにより特異的なプローブをデザインするために再利用することを可能にしている。配列採掘による発見プログラムは、環境遺伝子ライブラリー中の総P450s含量に関する情報を同時に提供し、将来の使用のために、環境遺伝子ライブラリー中に利用可能な酵素の内訳を増加させるなどの付加的な利点を持っている。更に、相同配列のハイスループット発見のためのバイオパンニング技術は、この配列を基にした発見法において利用できる。これは、潜在的に有用な生体触媒を大量に発見することを可能にするであろう。

40

#### 【0378】

##### 株の開発

50

環境遺伝子ライブラリー中にP450sを同定する可否は、ライブラリー宿主株への特異的、特徴的エンジニアリングに依存するであろう。第一に、いくつかの場合に、スクリーニング宿主が至適に外因的なP450sの活性を保護できることを確実にすることが必要かもしれない。更に、いくつかの場合において、エポキシド反応産物を修飾あるいは解毒することのできる補助酵素をコードした遺伝子を挿入する必要があるかもしれない。

#### 【0379】

##### P450宿主株

大腸菌における異種P450sの発現は、しばしば、低活性あるいは無活性の結果を与える。多くの場合、これは、宿主に存在する固有の還元酵素と比同族酸化酵素間の比効率的な相互作用によるものかもしれない。この問題を克服するために、P450sとFDXあるいはFDX及びFDRとの同時発現がP450sの活性を著しく改良させるために使われてもよい。従って、適した酵素をよりよく発見するために、上述した全ての方法が、P450エポキシダーゼの発現を至適化した宿主において、好ましくは行われる。例えば、あるactinomyceteのP450の活性が、*P. putida* 由来のプチダレドキシシ/プチダレドキシシ還元酵素ペアを同時発現により保護されている。従って、好ましくは、この還元酵素システムは、P450スクリーニング宿主株の開発に使用される。必要ならば、宿主株は、種々の最近に由来する異なるFDX/FDRペア評価によってさらに至適化されるであろう。新規に同定されたP450sの活性と異なるFDX/FDRペアの存在を相互に参照することは、最も適した還元性補足成分に関する指針を与えるかもしれない、更なる本法の至適化を可能にする。

10

#### 【0380】

##### エポキシドの代謝

エポキシド反応産物は、大腸菌宿主に対して毒性を示すかもしれない、直接に代謝されないらしい。従って、産物エポキシドの増殖源としての同定は、宿主株の更なるエンジニアリングを要求するかもしれない。これに対する一つのアプローチは、*Xanthobacte*のエポキシド修飾遺伝子群をクローン化し、異種的に発現(大腸菌クモゾームにおそらく由来)させることである。この経路は、エポキシアルカン-補酵素M転移酵素、R-及びS-特異的ヒドロキシプロピル-CoM脱水素酵素及びケトプロピル-CoMオキシド還元酵素/カルボキシラーゼから成る。このアプローチをよりよく行うために、大腸菌における補酵素Mの生合成を導入、発見、あるいは開発する必要があり、また、その経路における各酵素の基質特異性の広さを調べる必要がある。更に、このアプローチをその全経路の発現及び活性を得ることにより行うことは助けになるかもしれない。

20

30

#### 【0381】

##### ジオールの代謝

エポキシドを基にした選別へのより好ましいアプローチは、イン シーチュウ(in situ)でエポキシドを加水分解することであり、また、結果として生じるジオールを増殖のための唯一の炭素源として使用することである。この選別法は、適当なエポキシド水解酵素を含む宿主株のエンジニアリングを必要とするかもしれない。エポキシド水解酵素の遺伝子をP450エポキシダーゼの同定のためにその宿主株に導入にはいくつかの利点がある。まず、それは、アルケン基質から生成するエポキシドの毒性に関するあらゆる問題を軽減するであろう。二番目としてアルケンの賢明な選択は代謝されることのできる生成により選別法を介した発見を容易にするであろう。三番目としてそれはエポキシドのスクリーンを基にした発見及び後の標的特異的な至適化のための進化プログラムのための過ヨウ素酸共役蛍光アッセイ(図-9B)の応用を容易にするであろう。

40

#### 【0382】

そのスクリーニング方法は、広い範囲の新規P450sを発見するために利用することができ、それにより合成的に有用な生体触媒の道具箱というべきものが作られる。任意に必要なところで、以下に考察する進化技術をその酵素の性質を至適化するのに使用してもよい。

#### 【0383】

一例として、開発されたそのアッセイは、必要な活性及び基質特異性を持つ最近酵素の

50

存在のために環境遺伝子ライブラリーをスクリーンするために応用されるであろう。これらスクリーンのポジティブヒットは、それから、配列決定され、そしてその遺伝子は発現ベクターにサブクローンされてもよい。それから、発現されて組み換え酵素は、活性及び基質特異性に関して調べられることができる。同定された酵素が一つ以上のそれらの性質の促進を要求される場合には(例えば、pH及び温度至適性、熱安定性、耐熱性、基質特異性等)、それらはGSSM<sup>T</sup><sup>M</sup> (部位飽和変異誘発: Gene Site Saturation Mutagenesis)、Gene Reassembly<sup>T</sup><sup>M</sup> (遺伝子再集合)及び以下に考察するたの技術を利用して至適化することができる。これらP450sは、高純度の化成試薬及び医薬品や農薬化成品の高価な前駆体の化学-酵素的合成に使用されるかもしれない。本発明の方法を利用して開発したその至適化酵素は、一種以上の化合物への商業的に実行可能なルートの開発に応用できるかもしれない。特に、P450sは、高純度試薬及び好ましい純度を持つ医薬品の対象体の合成における重要な中間体として使用することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0384】

一例として、環境遺伝子ライブラリーは、世界中の高範囲にわたる微小環境から単離したDNAを用いて構築される。それから、適当な発見法の応用により機能、酵素のクラス又はその二つの特別な組み合わせに従ってこれらライブラリーからの酵素の抽出が可能になる。伝統的な発見プログラムとは対照的に、この好ましい発見法は、非培養微生物に由来する遺伝子の捕捉を確実にし、よく定義された研究室常用の宿主におけるスクリーニングを容易にする。この発現クローニング法は、酵素活性及び対応する遺伝情報を同時に捕まえる。

#### 【0385】

その好ましい発見法は、以下に関与する:天然又は他の適当な資源から核酸を分離及び分画する;環境遺伝子ライブラリーを構築する;好ましい酵素をコードしている好ましい遺伝子を発見するために以下の方法を利用して環境遺伝子ライブラリーの遺伝子をスクリーニングする;好ましい酵素の活性を至適化するためにこの中に参照として取り込まれている U.S. 特許番号 5,830,696, U.S. Patent No. 5,939,250 及び U.S. 特許番号 5,965,408に述べられている進化技術を利用してその好ましい遺伝子を至適化する;至適化した遺伝子の配列を決定する;適当な宿主株において、配列決定した遺伝子を過剰発現させる発酵により、至適化遺伝子を含むその適当な株を大量に産成し、精製の後、任意に、宿主株に含まれる好ましい酵素を得る。

#### 【0386】

新たにクローン化あるいは発見された酵素は、U.S. 特許番号 5,830,696、U.S. 特許番号 5,939,250 及び U.S. 特許番号 5,965,408 に述べられている進化技術及び以下に述べる組み合わせ進化技術を利用して更にカスタマイズすることができる。

#### 【0387】

一例としてこのスクリーニングステップは、一回以上の発現及び単一細胞活性スクリーニング、マイクロタイタープレートを基にしたスクリーニング活性、配列を基にしたスクリーニング及び増殖選別法を含む配列を基にしたスクリーニング法により行ってもよい。これらの方法は、上述したアッセイを利用したP450sの発見に全て応用してもよい。

#### 【0388】

単一細胞活性スクリーニングは、環境ライブラリーを用いた発現及び配列ハイブリダイゼーションに基づくスクリーニングを行うための蛍光細胞分析分離法(fluorescent activated cell sorter, FACS)を修飾したものである(図13)。発現スクリーニングにおいては、蛍光基質がクローンライブラリーに加えられ、そのクローンが基質を切断することのできる遺伝子産物を発現する場合、蛍光基質より放出される蛍光量子が増加する。又は、FACS-ハイブリダイゼーションクローニング技術により、配列相同性に基づく組換えクローンが検出される。この単一細胞活性スクリーニング法により、一秒当たり50,000クローン及び一日当たり $10^9$ クローンのスクリーニングが可能である。

#### 【0389】

生育に基づく選別法は、酵素探索において、最も有効な方法の一つである。この方法に

において、選択された基質は、宿主細胞が目的の酵素活性を示す時にのみ生育に利用できる栄養素を提供する物質である。細胞株の遺伝子修飾が、この生育に基づく選別法に關与している。この方法で用いられる基質も必要に応じて合成される。

#### 【0390】

他の一例として、配列に基づく探索法は、発現クローニングに対して補足的に行われる有効な方法である。液相系及びFACS系スクリーニングの両者ともに、大量かつ複雑な環境遺伝子ライブラリーのスクリーニングが可能な環境生物パンニング等の超高速大量処理型DNAハイブリダイゼーションに基づく探索技術に利用できる。液相系環境生物パンニング技術において、大規模なライブラリー由来の配列は、一本鎖とされ、溶液中でフック(hook)と呼ばれるビオチン化されたハイブリダイゼーション用プローブのアレイと混合される(図19)。フックと相補的な配列を持つライブラリー中のクローンは、そのフックとハイブリダイズし、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性ビーズ上に結合する。そして、そのビーズより溶出されたDNA配列は、更にもう一度、生物パンニング工程に使用されるか、あるいはラムダファージベクターに戻されてクローニングされる。この方法により、目的のDNA配列は、1,000倍以上に濃縮される。FACS系生物パンニングは、更に、短い配列及び長い配列の両方のクローンを増幅反応を利用しない生物パンニングにより濃縮できるため、酵素の同定過程を容易なものとする。

10

#### 【0391】

酵素の改良、カスタム化、あるいはその特性の改善のために、研究室における酵素進化が利用される。これらの研究室における進化技術には、遺伝子部位飽和突然変異(Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM<sup>TM</sup>)、遺伝子再集合(Gene Reassembly<sup>TM</sup>)が含まれ、進化された組み合わせ遺伝子ライブラリーを作製するために様々な天然由来の遺伝子が混合される。必要であれば、酵素探索法により発見されたP450の熱安定性、特異的活性、あるいは立体選択性をより望ましいものに改良することを目的としてこれらの技術が利用される。

20

#### 【0392】

一例として、本発明は、例えば、環境試料、培養されない微生物群、あるいは培養された微生物群等の一種以上生物より成る生物の混合群を含むライブラリーを迅速にスクリーニングする方法を提供する。

#### 【0393】

一例として、遺伝子ライブラリーは、生物の混合群より得られた核酸や多数の形質転換されたクローンを得るために、それらの核酸を適当なベクターにクローニングしたものにより構築される。よって、遺伝子ライブラリーは、生物の混合群中に存在する遺伝子、あるいはその断片を含んでいる。遺伝子ライブラリーが発現ライブラリーである場合、そのライブラリーは、目的の活性を持つ発現されたポリペプチドのスクリーニングに使用される。又は、遺伝子ライブラリーは、例えば、PCR、あるいはハイブリダイゼーションにより、特定の配列を探索するためにスクリーニングされる。一例として、生物の混合群を含む試料より単離された株に由来する核酸が回収され、その核酸が、遺伝子ライブラリーを作製するために使用される。

30

#### 【0394】

「単離株」とは、一種以上の生物を含む試料、あるいは生物の混合群より得られた特定の生物種、属、群、目、あるいは綱を意味する。そして、これらの単離された生物集団が、遺伝子ライブラリーを作製するために使用される。単離株は、一種以上の生物を含む試料、あるいは生物の混合群を選択的に濾過、あるいは培養することにより得られる。例えば、細菌の単離株は、濾紙を用いた濾過により、その大きさに基づいて他の生物と分離されるか、特定の生物集団を得るための選択培地、あるいは選択的な阻害剤を含む培地中で試料を培養することにより得られる。

40

#### 【0395】

「濃縮された集団」とは、全体の集団に対して、特定の生物種、属、群、目、あるいは綱に属する生物集団の百分率が増加された生物集団を意味している。例えば、選択培地、

50

あるいは選択的な阻害剤を含む培地中で試料を培養することによりこれは為される。一例では、これにより、全集団中における特定の原核生物が濃縮される。同様に、選択的な阻害剤を含む培地、あるいは特定の生物集団の生育を促進させるような培地において混合群を培養することにより、特定の生物種、属、群、目、あるいは綱に属する生物集団が濃縮される。

**【0396】**

他の一例として、生物の混合群より単離された複数の単離株(例えば、二種、あるいはそれ以上の種)より得た核酸が、複数のクローンを含む遺伝子ライブラリーを作製するために使用され、その少なくとも二種の単離株に由来する遺伝子ライブラリーより、「集団単離株ライブラリー」が作製される。

10

**【0397】**

遺伝子ライブラリーが作製されると、それらのクローンの生物活性がスクリーニングされ、この場合は、エポキシドの修飾、あるいは目的の生物分子(例えば、エポキシダーゼ)に対する触媒活性が測定される。このようなスクリーニング技術には、例えば、基質や、目的の生物分子との結合、あるいはその生物活性により検出可能なシグナルを提供するような検出用物質を含む基質を用いたクローンの結合、集団のクローン化、あるいは核酸配列の集団化が含まれる。このような基質は、酵素に対する基質、生物活性を有する分子、及びオリゴヌクレオチドなどである。

**【0398】**

一例として、遺伝子ライブラリーが作製され、それらのクローンは、呈色性、又は蛍光性基質、あるいは目的の基質と混合されるか、又は、それらのクローンは、目的の配列に対応する配列を持った標識化されたプローブ(例えば、検出用物質を含むオリゴヌクレオチド)とハイブリダイズされる。そして、目的の活性を示すクローンが、その検出用シグナル(例えば、蛍光発色など)の検出によって同定される。

20

**【0399】**

一例として、生物の混合群より作製された発現ライブラリーは、目的の活性に対してスクリーニングされる。具体的には、発現ライブラリーが作製され、それらのクローンは、基質、あるいは目的の基質と混合され、目的の活性を示すクローンが同定及び単離される。本発明において、細胞は、長期間生存する必要はない。細胞は、検出されるべき分子を生産する期間のみ生育できれば十分であり、その後は、発現された生物分子(例えば、酵素)がその活性を有してさえいれば、生育していてもいなくてもよい。

30

**【0400】**

特定の例として、本発明は、環境試料中に存在する新規、あるいは目的の生物活性を持つ分子をコードする遺伝子の直接的クローニング法とそれらの分子(例えば、酵素)を迅速、かつ大量に探索するスクリーニング法を組み合わせた方法を提供する。この方法は、非常に多くの天然に存在する微生物より得たゲノムを大腸菌やその他の適当な宿主細胞中で発現可能なベクターにクローニングしたものより成り、環境由来の「発現ライブラリー」の構築に基づいている。クローン化されるDNAは、先ず、環境試料、あるいは環境試料より得られた単離株から直接抽出されるため、そのライブラリーは、純粋培養により生育できるような一部の原核生物に由来するものではない。加えて、これらの試料中に存在する環境DNAの標準化により、試料中に存在する全てのDNAの発現量が均一化される。以下に記述される標準化技術により、試料中に優位的に存在する成分と比べて、数桁低く存在する目的遺伝子の発見効率が劇的に増加する。標準化は、核酸を試料又は単離株より得た後の何れの実施例においても行われる。

40

**【0401】**

他の一例として、本発明は、非常に多くのクローンの同定、及び有用な酵素や、その他の生物分子(例えば、リガンド)をコードする核酸の回収を高速、かつ大量にスクリーニングするためのキャピラリーアレイ系を提供している。具体的には、ここで記述されているキャピラリーアレイに基づく技術は、目的の生物活性を有するタンパク質、あるいは目的の結合親和性を有するリガンドなどのスクリーニング、同定、及びそれらの回収に利用さ

50

れる。例えば、結合アッセイは、目的の結合が起こった際に、検出可能なシグナルを放出するような適当な基質、あるいはその他のマーカーを用いて行われる。

#### 【0402】

加えて、目的の活性、あるいは配列を有するクローンをスクリーニング及び同定するために、蛍光活性化細胞分離法 (fluorescent activated cell sorter, FACS) が利用される。前述の利用法では、FACS装置が、真核細胞系、及び原核細胞系の分析や培養の工程において利用された。FACSは、又、例えば、遺伝子発現の差異を検出する等の目的で、真核細胞系、及び原核細胞系における、外来タンパク質の生産性の測定にも利用される。FACS法の持つ検出能、及び計数能が、これらの例において利用されている。しかし、FACSが、今までに、原核生物中の生物活性物質のスクリーニング、及びそれらの回収工程において利用されたことはない。更に、本発明において、目的の核酸(組換え体のクローン)は、生細胞、及び死細胞の両方から回収できるため、前述の技術と同様に、細胞が生存している必要はない。細胞は、検出されるべき物質を生産する期間のみ生育できれば十分であり、その後は、発現された生物分子がその活性を有してさえいれば生育していてもいなくてもよい。本発明は、又、組換え酵素を発現する大腸菌の検出、及びそれらをコードする核酸の回収に関連した諸問題に対する解決を与えている。加えて、本発明は、一例として、生物物質に関連した蛍光波長を検出できる装置を含み、それらには、ここで示されているような蛍光分析装置(その一例は、FACS装置)が含まれる。

10

#### 【0403】

ある例においては、生物混合群、単離株、あるいは濃縮された生物集団に由来する核酸配列の同定が必要である。この例において、それらの遺伝子産物が発現される必要はない。目的の核酸配列は、クローン、装置(例えば、遺伝子チップ)、濾紙、あるいは核酸試料の検出可能な分子を含むプローブとの混合により、その同定又は「生物パンニング」が行われる。プローブは、通常、目的の核酸配列と実質上同一の配列を有している。又は、プローブは、目的のポリペプチドをコードする核酸の全部又はその一部である。プローブ及び核酸は、そのプローブと実質的に相補的な配列がハイブリダイズできる条件下で混合される。ハイブリダイゼーションの厳格度は、例えば、プローブの長さやそのGC含量によって変えられる。このような要素は、実験的に決定される(Sambrook et al., Molecular Cloning -A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N Y, 1989, 及び Current Protocols in Molecular Biology, M. Ausubel et al., 編集, (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. 及び John Wiley & Sons, Inc., most recent Supplement 等を参照)。ハイブリダイゼーションが行われると、その相補的な配列は、PCRにより増幅され、ハイブリダイゼーション(例えば、プローブと核酸の混合物をX線フィルムなどに露光する)、あるいはチップによる核酸の検出により同定される。

20

30

#### 【0404】

本発明がなされる以前は、遺伝子ライブラリーや発現ライブラリーの評価が最も時間のかかる工程であった。本発明により、例えば、数千の異なる生物、あるいはその一部、及びその単離株のゲノムに由来する配列を含む複合環境ライブラリーの迅速なスクリーニングが可能となった。本発明の利点は、例えば、複合環境試料のスクリーニングに見られる複合試料のスクリーニングには、以前は、ゲノムの多様性を網羅するために、数百万種のクローンのスクリーニングが必要であった。このように、本発明は、非常に多数のクローンを評価するための非常に迅速かつ大量処理によるスクリーニング法を提供している。本発明により、目的の核酸配列、生物活性、あるいは生物分子の探索が一時間当たり約30~200万のクローンに対して行われる。これにより、新規の生物活性、あるいは生物分子探索のための環境ライブラリーの完全なスクリーニングが可能となる。

40

#### 【0405】

目的(例えば、酵素など)の配列、あるいは生物活性が同定されると、目的の生物活性をコードする配列又はポリヌクレオチドは、例えば、その温度安定性、特異性、あるいは活性を改良するためにそのアミノ酸配列が進化又は修飾される。

50

## 【0406】

本発明は、既知、あるいは新規の機能を有するポリヌクレオチドをコードする核酸配列の同定法を提供している。例えば、微生物ゲノムの持つ多様性の殆どが、微生物ゲノム中の遺伝子クラスターの再編成に起因している。これらの遺伝子クラスターは、種を越えた種、あるいは系統発生的に関連した他の生物中に存在している。

## 【0407】

例えば、細菌や多くの真核生物は、遺伝子の調節機構を有しており、この機構で調節される遺伝子の生産物は、関連した経路に参与している。これらの遺伝子は、「遺伝子クラスター」と呼ばれるクラスターを、一つのクロモソーム上で形成しており、これらの遺伝子は、クラスター中の全ての遺伝子の転写を開始する1つのプロモーターを含み、一つの調節配列の制御の下で連動して転写される。遺伝子クラスター、そのプロモーター、及びクラスター中の全ての遺伝子を制御する機能を持つその他の付加的な配列は、「オペロン」と呼ばれ、20、あるいはそれ以上の遺伝子(通常は、2~6の遺伝子)を含むことができる。よって、遺伝子クラスターは、通常、機能的に同一、あるいは関連した隣接遺伝子の集団である。

10

## 【0408】

幾つかの遺伝子ファミリーは、同一の構成成分より成っている。クラスターを形成している遺伝子同士は、同一である必要はないが、クラスター形成は、各遺伝子の独自性を維持するために重要である。遺伝子クラスターは、隣接した関連遺伝子が重複しているような場合や多くの同一遺伝子が一列に並んでいる場合等、多岐に渡っている。特定の遺伝子の反復が、明確な効果を示さない場合もある。この主要な例として、ある種の生物では、重複したインシュリン遺伝子の発現が要求されるが、他の哺乳動物種では、単一のインシュリン遺伝子で十分である。

20

## 【0409】

更に、遺伝子クラスターは、断続的に再編成されるため、例えば、細菌やその他の原核生物に由来する遺伝子クラスターより成る異種性ライブラリーを作製することは、具体的には、多くの様々な有用な活性を有する、ポリケチドの生合成を司るポリケチドシンターゼなどの酵素を含む新規タンパク質資源を探索するために非常に有用である。例えば、ポリケチドは、抗生物質(テトラサイクリンやエリスロマイシン等)、抗がん剤(ダウノマイシン)、免疫抑制剤(FK506 やラパマイシン)、及び獣医用薬品(モネンシン)を含む生物活性を有する化合物における非常に重要な資源分子である。多くのポリケチド(ポリケチドシンターゼにより生合成される)は、医薬用物質として非常に重要である。ポリケチドシンターゼは、長さ、官能基、及び環化状態の異なる非常に多くの炭素鎖の生合成を触媒する多機能な酵素である。ポリケチドシンターゼ遺伝子は、遺伝子クラスターを形成し、その中の少なくとも一つのポリケチドシンターゼ(タイプ I)は、長い遺伝子、かつ大きな酵素分子であり、その遺伝子改変やインビトロでの遺伝子、及びタンパク質レベルでの研究は困難である。遺伝子クラスターにより生産されるその他のタンパク質、例えば、抗生物質、抗ウイルス物質、抗癌物質、インスリン等の調節タンパク質も検討されている。

30

## 【0410】

ポリケチド生合成遺伝子、及びその下流遺伝子のライブラリーを用いた目的成分の選別、及びそれらの組み合わせによる新規ポリケチドの生産が検討されている。本発明の方法により、遺伝子クラスターのクローニングを容易にする長い挿入配列を含むクローン(特に、f因子に基づくベクターの利用)の遺伝子バンクが構築できるため、上述のような新規ポリケチドシンターゼやその他の遺伝子クラスターのクローニングが可能となる。

40

## 【0411】

例えば、遺伝子クラスターは、遺伝子クラスターに由来する目的のタンパク質、及びそのタンパク質に関連した一連の活性の発現を調節する調節配列を含むベクターに挿入される。このような遺伝子クラスター、及びここで記述された例に対して利用されるベクターは、外来性核酸の導入に対して非常に大きな寛容性を有する必要があるが、これには、大腸菌のf因子(fertility factor)が含まれる。この大腸菌のf因子は、接合におけるそれ自身

50

の高頻度の移動に影響を及ぼすプラスミドであり、混合微生物試料由来の遺伝子クラスター等の長い核酸断片の安定した伝播に適している。

【0412】

これらの試料(例えば、微生物の混合集団)、あるいはそこから得られる単離株に由来するか又はそれらから単離された核酸は、そのポリヌクレオチドのスクリーニングに先立ち、ベクター、あるいはプラスミドに導入される。このようなベクター、あるいはプラスミドは、通常、プロモーター、及びエンハンサーなどを含む発現調節配列を有している。

【0413】

従って、本発明は、目的の活性、酵素活性、及び生物活性を有する分子をコードするポリヌクレオチドの微生物の混合集団、濃縮された試料、あるいはそこから得られる単離株からのインビトロでのクローニング法、及びスクリーニング法を提供している。本発明の方法は、新規生物活性分子、特に、培養が不可能あるいは可能な試料中からの新規生物活性物質のインビトロでのクローニング、及びスクリーニングを可能とする。長い遺伝子クラスター、遺伝子、及び遺伝子の断片は、本発明の方法により、クローニングされ、配列が決定され、そしてスクリーニングされる。従来の方法と異なり、本発明の方法により、様々な環境試料に由来するポリヌクレオチド、及びそれらのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドのインビトロでのクローニング、スクリーニング、及び同定が可能である。

10

【0414】

本発明は、混合環境試料、その濃縮試料、あるいはそこから得られる単離株からのポリヌクレオチド配列のスクリーニング、及び同定を可能にしている。遺伝子ライブラリーは、細胞を含まない試料(それらが核酸配列を含んでいる場合)、細胞を含む試料、細胞、ウイルス粒子などの試料より調製される。ライブラリーの調製に利用される生物には、真正細菌や古細菌等の原核微生物、糸状菌、藻類、及び原生動物等の下等真核微生物や、植物、植物芽胞、及び花粉などの混合集団が含まれる。これらの生物は、培養された生物、培養されない生物、環境試料より得られた生物であり、好熱菌、低温菌、好冷菌などの好極限性微生物を含んでいる。

20

【0415】

DNAライブラリーを作製するための核酸資源は、これに限らないが、北極や南極の氷、水、永久凍土地帯より得られる資源、火山地帯より得られる資源、熱帯地方の土壌や植物、哺乳類や無脊椎動物を含む様々な生物の糞、死体や腐乱物などに由来する微生物などの環境試料より得られる。遺伝子ライブラリーを作製するための核酸は、例えば、これらの試料より濃縮された集団、あるいは単離された株より得られる。他の一例として、多数の単離株より得たDNAは、ライブラリーを作製するための核酸資源として集められる。又は、これらの核酸は、多数の単離株より得られ、これら多数の単離株より作製された多数の遺伝子ライブラリーが得られる。集合単離ライブラリーを得るために、二種類、あるいはそれ以上の遺伝子ライブラリーが集合、あるいは組み合わせられる。従って、例えば、これらの核酸は、培養された生物、あるいは培養されない生物より集められ、目的の生物分子(例えば、ポリヌクレオチド配列)の同定、あるいは目的の生物活性(例えば、酵素、あるいは生物学的活性)をスクリーニングするための適当な遺伝子ライブラリー(例えば、組換え発現ライブラリー)を作製するために利用される。

30

40

【0416】

以下に、培養された生物、あるいは培養されない生物、混合生物試料、その濃縮試料、あるいはそこから得られる単離株からのライブラリー作製法の概略が示され、これらのライブラリーは、同定された、あるいは要求される、又は予想される生物活性(例えば、酵素活性)を有する核酸配列を選択するために精査、配列決定又はスクリーニングされ、これらにより選別された核酸は、更に、進化、突然変異又は修飾される。

【0417】

ここで使用されるように、環境試料は、生物、ポリヌクレオチド、あるいはそれらの組み合わせを含む何れの試料でも良い。従って、環境試料は、例えば、昆虫の糞、温泉、及

50

び土壌などを含む多くの資源(上述のように)より得ることができる。核酸資源には、精製、あるいは非精製のものを開始試料として利用できる。従って、核酸は、生物の混合試料、あるいは細胞を含むどのような試料からでも得ることができる。環境試料は、哺乳類生物の血液、尿、脊髄液、組織、口腔内液、大便、あるいは羊水などの生体試料に由来する何れの抽出物をも利用できる。非哺乳類動物(即ち、無脊椎動物)に由来する試料には、組織試料、唾液試料、糞、あるいは消化管内在物等が含まれる。環境試料には、又、例えば、高含硫地熱泉、火口、及び凍土を含む極限環境由来の試料も含まれる。更に、これらの試料は、様々な資源より得られる。例えば、園芸や農業試料としては、植物、肥料、土壌、園芸用水、農業用水、あるいはその他の園芸又は農業産物；食品試料としては、新鮮な食品、あるいは加工食品(例えば、特殊調製粉乳、海鮮食品、生鮮食品、及び包装食品)；及び環境試料としては、液体、土壌、汚水、汚泥、及びその他の生物、あるいはポリヌクレオチドを含むと思われるような何れの環境試料も含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0418】

試料が、例えば、血液、土壌、あるいは汚泥等の混合生物集団を含むものである場合、それらは、効果的に細胞を溶解し、核酸鎖を露出、あるいは分離させるために適当な試薬で処理される。この溶解、及び核酸の変性工程は、必要でない場合でも、核酸のクローニング、増幅、あるいは配列決定をより簡便なものとする。更に、必要であれば、混合生物集団は、分析に先立ち、特定の集団、あるいは目的の単離株(例えば、特定の生物種、属、あるいは族)を単離、あるいは濃縮するために培養され、これにより、純粋な試料が得られる。しかし、これは、必ずしも必要ではない。例えば、試料中の生物の培養には、マイクロドロレット中での生物の培養、及びマイクロドロレットでの培養生物の選別機によるマルチウェル型組織培養用プレート中の各ウェルへの分配が含まれる。又は、試料は、特定の生物集団の生育を抑制、あるいは誘導するように調製された任意の数の選択培地中で培養される。

#### 【0419】

単離株が混合生物集団を含む試料より得られたものである場合、それらの核酸は、以下に記述された方法により、単離株より分離される。単離株より得られた核酸は、遺伝子ライブラリーを作製するために利用されるか、あるいはその試料中の、他の単離株を含む分画と共に集められ、これらの集合された核酸が、遺伝子ライブラリーを作製するために利用される。特定の生物集団の単離法は、混合集団の項に記述されている。

#### 【0420】

従って、試料は、例えば、多様な混合生物集団(例えば、昆虫の腸管に存在する微生物等)より得られる核酸を含んでいる。核酸は、DNAやRNAを単離するための多くの方法を利用して、試料中より単離される。これらの核酸単離法は、関連研究者に一般的に利用されている。核酸がRNAである場合、そのRNAは、既知のプライマーを用いてDNAに逆転写される。DNAがゲノムDNAである場合、そのDNAは、例えば、25-ゲージ針により剪断される。

#### 【0421】

これらの核酸は、適当なベクター中にクローニングされる。そのDNAが、関連技術としてよく知られている多くの方法による発現、配列決定、あるいは修飾等の目的により、使用されるベクターは異なる(例えば、ハイスループット配列決定用ベクターについて公開しているU.S. 特許番号 6,022,716 を参照のこと)。クローニング技術は、関連技術内でよく知られているが、関連研究者は過度の検討をせずにそれらを改良できる。ベクターの選択は、又、本発明の方法において利用されるポリヌクレオチド配列の長さ、及び宿主細胞の種類により決められる。従って、本発明で使用されるベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス(例えば、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、レオウイルス、パラミクソウイルス等)、あるいはこれらのうちの特定の部位(例えば、コートタンパク質、スパイク糖タンパク質、キャプシドタンパク質)等である。例えば、コスミド、及びファージミドは、長いポリヌクレオチドを安定して複製できるため、通常、分析又は修飾されるべき核酸配列が長い場合に利用される。

## 【0422】

そして、クローン化された核酸配列を有するベクターは、ベクターを含む適当な宿主のプレート上での増殖(例えば、クローンによる増幅)、あるいはベクターの適当な宿主細胞へのトランスフェクション(例えば、大腸菌へのファージの導入)により増幅される。クローン化された核酸配列は、適当な宿主の形質転換により、スクリーニング(例えば、発現スクリーニング、PCRスクリーニング、及びハイブリダイゼーションスクリーニング等)のためのライブラリー作製に利用される。関連業者によく知られている宿主は、その形質転換を行うことのできる条件下において、目的の核酸配列を有するベクターの宿主細胞への人工的な導入により形質転換される。これにより、二本鎖の環状又は直鎖状核酸配列による形質転換が可能であり、又、一本鎖の環状又は直鎖状核酸配列による形質転換も可能である。形質転換とは、新規DNA(例えば、その細胞にとっての外来DNA)の細胞への導入により引き起こされたその細胞中での遺伝子の永久的、あるいは一過性的変化を意味している。その細胞が哺乳類動物細胞である場合、遺伝子の永久的な変化は、通常、外来DNAの細胞内ゲノムへの導入により成される。一般的に、形質転換された細胞あるいは宿主細胞とは、宿主には通常存在しないDNAが、組換えDNA技術により、細胞(あるいはその祖先細胞、ここで細胞とは、例えば、原核細胞あるいは真核細胞である)に導入された場合、そのDNAが導入された細胞を意味する。

10

## 【0423】

本発明に使用する特別のタイプのベクターは、f-ファクター複製開始点を含んでいる。大腸菌におけるf-ファクター(あるいは稔性ファクター)は、接合中に起こるそれ自体の高頻度トランスファー及び細菌クロモゾーム自体のより低い頻度のトランスファーに影響するプラスミドである。特別な具体例において、「フォスミド」あるいは細菌人工クロモゾーム(BAC)ベクターとして言及されるクローニングベクターが使用される。これらは、大きなDNAセグメントを安定に組み込ませることのできる大腸菌f-ファクターに由来する。混合した非培養環境サンプルに由来するDNAを取り込ませる場合、これは、安定な環境遺伝子ライブラリーの産生において、大きなゲノム断片を達成することを可能にする。

20

## 【0424】

混合集団あるいはサンプルに由来する核酸は、種々の操作によりベクターに挿入されてもよい。一般に、その核酸配列は、既によく知られる技術により適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。そのような、あるいは他の操作は、熟練した研究者のスコープ範囲以内であるものと考えられる。典型的なクローニングの筋書きは、DNAを適当なヌクレアーゼ(例えば、マング豆ヌクレアーゼ)で「平滑に」し、例えば、EcoRIメチラーゼによりメチル化し、更にEcoRIリンカーGGAATTC(SEQ ID NO:1)に結合させるかもしれない。従って、そのリンカーは、EcoRIによって消化され、そのDNAサイズ分画される(例えば、ショ糖密度勾配)。サイズ分画して得られるDNAは、従って、配列決定、スクリーニング、あるいは発現に適したベクターに結合される(例えば、ラムダベクター及びインピトロラムダパッケージング抽出物を用いてパッケージした物)。

30

## 【0425】

組換えDNAを用いた宿主細胞の形質変換は、熟練した研究者によく知られるような伝統的な手法により行われてもよい。宿主が大腸菌のように原核性の場合、DNAを取り込めるコンピテント細胞は、対数増殖期から集めた細胞を集め、引き続きよく知られる操作によりCaCl<sub>2</sub>法により処理して調整することができる。別法としてMgCl<sub>2</sub>あるいはRbClが使われる。形質変換は、宿主細胞のプロトプラストを作製した後、あるいはエレクトロポレーションによって行うこともできる。

40

## 【0426】

宿主が真核性の場合、DNAを用いたトランスフェクションあるいは形質変換は、カルシウム-フォスフェート共沈法、マイクロインジェクションのような習慣的な機械操作、エレクトロポレーション、リポソームに包埋したプラスミドの挿入、あるいはウイルスベクター等、他によく知られた技術以外の方法を利用してよい。真核細胞は、ヘルペスの単一チミジンキナーゼ遺伝子のような選択マーカーをコードしている二次外来DNAとともに感

50

染させることもできる。他の方法は、シミアンウイルス40(SV40)あるいは牛パピローマウイルスのような真核ウイルスを使用し、一過性に真核細胞を感染あるいは形質変換してそのタンパクを発現させることである(Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman 編集, 1982)。真核細胞は、酵母(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*)、昆虫細胞(例えば、*Drosophila* sp)、あるいはヒトを含む高等動物の細胞でもよい。

**【0427】**

真核システム、及び高等動物発現システムは、発現した高等動物タンパクの翻訳後の修飾を可能にする。初期転写の修飾、グリコシレーション、リン酸化、あるいは遺伝子産物の分泌のための細胞機構を持ち備えた真核細胞を使用すべきである。そのような宿主細胞株は、限定はされないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、Jurkat、HEK-293、及び WI38を含む。

10

**【0428】**

一例として、一旦、クローンのライブラリーが上述したような方法を含む何通りの方法を利用して作製された場合、そのクローンは、例えば、栄養豊富な培地あるいは既に知られている他の成長培地等の液体培地に再懸濁される。ライブラリーの少なくとも一つのクローンを含んだ一つ以上のタイプの培地が、個々にあるいは混合物としてキャピラリーアレーのキャピラリーに導入される。

**【0429】**

他の例として、ライブラリーは、最初、キャピラリー装置に導入あるいは分配される前にバイオパンニングされる。そのようなバイオパンニングの方法は、関心対象の配列あるいは活性のためにライブラリーを富化(強化)する。バイオパンニングあるいは強化の方法例は、以下に述べる。

20

**【0430】**

一例として、ライブラリーは、興味のもたれる配列又は活性を含むクローンのためにライブラリーあるいはクローンに存在する配列を基にスクリーン又は選別強化されることができる。従って、本発明は、望まれる生物活性又は生物学的配列のため及び更に指向進化、分子生物学的、生物学的、バイオテクノロジー及び商業的な応用に利用できる興味を持たれる配列を得ることを助けるために有用な方法及び組成を提供する。

**【0431】**

それ故に、本発明は、サンプル中に存在する核酸配列をスクリーニング及び同定することにより、迅速なスクリーン、強化及び/又はサンプル中の配列を同定する方法を提供する。従って、本発明は、商業応用のための診断、治療、あるいは分子の開発に使用できる配列のレパートリーを増やす。従って、本発明の方法は、望まれる生物活性を持つタンパクあるいはポリペプチドをコードする新規核酸配列を同定できる。

30

**【0432】**

遺伝子ライブラリー(例えば、発現ライブラリー)を作製した後、そのようなライブラリーをスクリーニングする前に「バイオパンニング」のステップを加えることができる。その「バイオパンニング」操作は、特別な生物活性を持つクローンをクローンのライブラリー中に配列の相同性をスクリーニングすることにより同定する操作過程を意味する。

**【0433】**

ライブラリー中の関心対象の標的配列と特異的に相互作用させるために使われるプローブ配列は、領域配列の全長あるいは既知の生物活性のためにコードされている部分領域でもよい。ライブラリーは、既知の生物活性又は望まれる生物活性をコードする配列の少なくとも部分配列から成るプローブの混合物を用いて試験することができる。これらのプローブ又はプローブライブラリーは、好ましくは、一本鎖である。一例として、ライブラリーは、好ましくは、一本鎖へと変換される。特に適したプローブは、特定される生物活性に類似又は同等な生物活性をコードしているDNAに由来するプローブであり、それがスクリーンされる。プローブは、PCR増幅に使用でき、従って、標的配列を選別できる。それ故に、プローブの配列は、実体的あるいは望まれる相同性を持つ配列を同定するためのハイブリダイゼーション プローブとして使用することができる。

40

50

## 【0434】

他の例において、インビボ バイオパンニングは、FACSを基にした装置を用いて行ってもよい。遺伝子ライブラリーあるいは発現ライブラリーは、ベクターを用いて構築され、それは、配列を含み、転写RNAを安定化する。例えば、ヘアピンのような二次構造を生じ、そのRNAの転写領域を隣接させるようにデザインした配列の含有は、それらの安定性を増強するように働く。バイオパンニング プロセスに用いるプローブ分子は、標的配列と相互作用すると同時に検出可能シグナル与える(プローブが標的分子と結合すると同時に、例えば、蛍光だけを)検出可能な分子で標識されたオリゴヌクレオチドから成る。例えば、“Practical Flow Cytometry”, 1995 Wiley-Liss, Inc., Howard M. Shapiro, M. D.に述べられているような既によく知られている種々の色素あるいは染料は、オリゴヌクレオチドを「標識する」ために核酸の間に挿入又は結合するために使用できる。これらのプローブは、ライブラリーの組換え細胞にいくつかの形質転換法を利用して導入される。プローブ分子は、転写された標的RNA又はDNAと相互作用あるいはハイブリダイズし、DNA/RNAヘテロ二量体あるいはDNA/DNA二量体を生じる。プローブの標的への結合は、検出可能なシグナルを与え(例えば、蛍光シグナル)、それは、FACS装置あるいはその類により、スクリーニングのプロセスの間に検出又は選別される。

## 【0435】

DNAプローブは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、であるべきである。一例として、ある経路の一部の領域をコードしている全体をプローブとして使用してもよい。インビトロシステムにおいて、標的DNAにそのプローブがハイブリダイズするところで、標的DNAが少なくとも一つのDNAプローブの使用によって選択的に単離されるハイブリダイゼーション条件が、少なくとも約50%の配列同等性のハイブリダイゼーションの厳格度、より特別には少なくとも約70%の配列同等性を与える厳格度を与えるようにデザインされる。

## 【0436】

潜在的な関心対象の標的DNAを単離するために、微生物DNAライブラリーを検索するハイブリダイゼーション技術は、既によく知られる技術であり、文献において記述されているそれらの如何なるものもこの中の、例えば、チップを基にしたアッセイ、膜を基にしたアッセイ、及びその類を含む使用に適している。

## 【0437】

結果として生じる形質変換クローンのライブラリーは、関心対象の活性を表示するクローンのために更にスクリーンすることができる。クローンは活性化化合物を発現させるための異なった宿主に移すことができ、あるいはこの中に述べられている方法を利用してスクリーンされることができる。

## 【0438】

上述したインビボ バイオパンニングの変法は、例えば、ゲルマイクロドロップレットのような包埋技術であり、それは、FACSにおいてスクリーンされる一部位に複数のクローンを局在させるために使用されるかもしれない。クローンは、それから個々のポジティブクローンを単離するためにFACSにより再度スクリーンされる個々のクローンに分けられる。FACSを利用したこのような方法によるスクリーニングは、特許番号 08/876,276(1997年6月16日ファイル)に全容が述べられている。従って、例えば、もしクローンの混合中に望まれる活性を持つ場合、個々のクローンは、回収され、どのクローンが望まれる活性をもつものかを調べるためにFACSを利用して再スクリーンされてもよい。

## 【0439】

異なったタイプの包埋戦略及び化合物あるいはポリマーを本発明に使用することができる。例えば、高温アガロースが高温で安定なマイクロドロップレットを作製するために使うことができ、熱に安定な生物活性をスクリーンする場合、それは、全てのバックグラウンド活性を除くために使用された熱処理に続く細胞の安定な包埋を可能にする。包埋は、ビーズ、高温アガロース、ゲルマイクロドロップレット、赤血球やマクロファージのような細胞、リボソーム、あるいは分子を包埋及び局在させるどのような方法も利用できる。

## 【0440】

例えば、リポソームを調整法が、例えば、U.S. 特許番号 5,653,996、5393530 及び 5,651,981に、多様な分子の包埋へのリポソームの利用が U.S. 特許番号 5,595,756、5,605,703、5,627,159、5,652,225、5,567,433、4,235,871、5,227,170に述べられている。タンパク、ウイルス、細菌、及びエンドサイトーシス中の赤血球のDNAの捕捉についても *Journal of Applied Biochemistry* 4, 418-435 (1982)にその例が述べられている。膜の低張溶解又は不伝導性分解の間に捕捉される基質のためのインビボあるいはインビトロ担体として使用される赤血球も既に述べられている (Ihler, G. M. (1983) *J. Pharm. Ther.*)。これらの技術は、スクリーニングのために微小環境においてサンプルを包埋する本発明において有用である。

10

## 【0441】

この中で用いるように「微小環境」は分子の構造であり、それは本発明の方法に必要な相互作用を容易にするための適当な環境を提供する。分子の相互作用を容易にするために適した微小環境は、例えば、リポソームを含む。リポソームは、ホスホリピド、グリコリピド、ステロイド、長鎖アルキルエステル；例えば、アルキルフォスフェート、脂肪酸エステル；例えば、レシチン、脂肪酸アミン及びその類、を含む多様なリピドから調整することができる。脂肪物質の混合物は、中性ステロイド、荷電両性体、及びホスホリピドの組み合わせのように使われる。ホスホリピドの描写的な量は、レシチン、スフィンゴミエリン及びジバルミトイルフォスファチジルコリンを含む。代表的なステロイドは、コレステロール、コlestanol及びラノステロールを含む。代表的な荷電両性化合物は、一般

20

## 【0442】

更に、上述の展望のいくつか、あるいは全部を発現ライブラリーを作製する前に標準化ステップが行えるように組み合わせることが可能であり、その発現ライブラリーが作製され、そのように作製された発現ライブラリーは、バイオパンニングされ、バイオパンニングされた発現ライブラリーは、ハイスループット細胞選別及びスクリーニング装置を利用してスクリーンされる。従って、次のようなオプションがある：(i)ライブラリーを作製し、それをスクリーンする；(ii)標的DNAを標準化し、ライブラリーを作製し、それをスク

30

## 【0443】

レルマイクロドロプレット技術は、フローサイトメトリー分析に利用可能なシグナルの増幅や、バイオテクノロジーのための株改良プログラムにおいて微生物株のスクリーニングを可能にするために重要である。Wittrup等は、*Aspergillus awamori* のグルコアミラーゼの分泌を増大させるために、 $10^6$ 個以上の酵母細胞の迅速にかつ定量的なスクリーニングを可能にする微小包埋選別法を開発した (*Biotechnol. Bioeng.* (1993) 42:351-356)。この方法は、高分泌変異株のために、一回の操作で400倍の強化を与える。

40

## 【0444】

レルマイクロドロプレットや他の関連した技術は、組換えライブラリーのハイスループットスクリーニングにおけるシグナルの増強に加え、局在、選別を行うために本発明において使用することができる。核酸がマイクロドロプレットから回復されることから、スクリーニングにおける細胞成育は、問題あるいは懸念にならない。

## 【0445】

関心対象の配列を含むクローンのためのライブラリー集団を強化することのできる何通

50

りものバイオパンニング技術を行った後、強化されたクローンは、栄養培地あるいは他の成長生殖培地などの液体培地に懸濁される。従って、強化されたクローンは、サンプル(例えば、生物体の混合集団、それらの単離物、そしてその類)に由来する核酸配列を取り込ませたベクターを含む構築物で形質変換した多数の宿主細胞を含む。クローンのサブセット及び検出可能な分子を持つ一つ以上の基質(例えば、酵素基質)を含む液体培地は、それから、個々あるいは混合物として一緒に強化したクローンと混ぜられるか接触させられる(例えば、キャピラリーアレーのキャピラリー中に)。基質と好ましい酵素活性を持つ酵素を発現するクローンの相互作用(反応を含む)は、産物又は検出可能なシグナルを生じ、それは、一つ以上のクローン又は少なくとも一つのシグナルを産生しているクローンを同定するために空間的に検出されることができる。シグナルを産生しているクローンあるいはシグナルを産生しているクローンに含まれている核酸は、多様な技術を利用して回収することができる。

10

**【0446】**

ここに用いる「基質」は、例えば、生物活性あるいは生物分子(例えば、酵素及びその特異的酵素活性)の検出のための基質を含む。そのような基質は、既によく知られている。例えば、種々の酵素及びその酵素に対して適当な特異的基質が Molecular Probes, Handbook Of Fluorescent Probes and Research Chemical (Molecular Probes, Inc.; Eugene, OR)に与えられており、その開示は、ここに参照として取り込まれる。基質は、例えば、呈色あるいは蛍光分子と関連した検出分子を持つ。本発明の使用に適した基質は、望まれる活性を持つ与えられている酵素又はそのような酵素をコードしているクローンと相互作用すると同時に可視的に検出可能なシグナルを生じるどのような基質をも含む。

20

**【0447】**

その技術に習熟した研究者は、例えば、望まれる酵素活性を基に、適した基質を選択することができる。望まれる酵素/酵素活性の例は、この中に示したものを含む。望ましい酵素活性は、可視的なシグナル基質が存在する酵素経路の酵素集団を含んでもよい。その一例はカロテノイド合成酵素群である。

**【0448】**

なかんずく、グリコシダーゼ、プロテアーゼ、フォスファターゼ、及びモノオキシゲナーゼのための基質が知られ及び/又は商業的に入手可能である。望まれる活性が他のどの生物分子又は既知の多くの基質を持つ酵素と同じクラスにあるものか、その活性が既知の基質カクテルを用いて調べられる。例えば、おおよそ商業的に入手可能な20種のエステラーゼの基質が知られ、もし至適でないならば、それらの組み合わせにより検出可能なシグナルが得られるようになる。

30

**【0449】**

可視シグナル基質は、呈色基質、蛍光基質、生物あるいは化学蛍光基質、あるいは蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)基質であり得る。検出可能な種は、基質の解裂あるいはその解裂又は検出可能な変化を受けるための他の基質/生物分子の相互作用により影響される二次的な分子によるものである。非常に多数の検出可能なアッセイが免疫アッセイ、呈色アッセイ、及び標識プローブの方法論を利用した診断技術から知られている。

**【0450】**

一例として、可視シグナル基質は、生物あるいは化学蛍光基質であり得る。Tropix(Bedford, MA)からいくつかの酵素のための化学蛍光基質が入手可能である。既知の化学蛍光基質を持つ酵素の中には、アルカリフォスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、及びベーターグルコシダーゼがある。

40

**【0451】**

他の例として、呈色基質は、特に、加水分解酵素のような酵素のために使用してもよい。例えば、可視シグナル基質は、インドール誘導体であり得、それは、酵素的に解裂して色素を産生する。呈色基質を用いる場合は、可視的に検出可能なシグナルは吸光度(吸光度の変化を含む)である。この具体例として、シグナルの検出は、吸光度計やその類を用いた吸光度の測定により得られる。

50

## 【0452】

他の例として、蛍光基質の可視的に検出可能なシグナルは、蛍光である。蛍光基質は、異なる検出モードだけでなく改良された検出のために高い感度を提供する。クマリンの水酸基やアミノ基置換体が蛍光基質を調整するために最も広く使用される蛍光団となっている典型的なクマリン系蛍光基質は、7-ヒドロキシクマリンであり、ウンベリフェロン(Umb)として通常知られている。ウンベリフェロンの誘導体及び類似体も使用される。フルオレスセイン(FDGあるいはC12-FDGのような)及びローダミンの誘導体及び類似体を基にした基質も使用される。レゾルフィンに由来する基質(例えば、レゾルフィン ベーター-D-ガラクトシドあるいはレゾルフィン ベーター-D-グルクロニド)は、特に、本発明において有用である。レゾルフィン系基質は、例えば、グリコシダーゼ、加水分解酵素及び脱アルキル酵素のためのスクリーニングに有用である。前述の基質の脂肪誘導体(例えば、アルキル化誘導体)は、それらが容易に細胞に負荷でき、そして細胞のリピド領域と結合する傾向にあることから、ある具体例において有用かもしれない。フルオレスセイン及びレゾルフィンは、相対的に水に不溶な(即ち、脂溶性)産物を形成するアルキル誘導体として商業的に入手可能である。例えば、フルオレスセイン イメージングは、基質として Molecular Probes(Eugene, OR)により製造されている C12-レゾルフィン ガラクトシドを使用して行うことができる。

10

## 【0453】

特別な蛍光基質は、スクリーンされる酵素活性を基に選ばれてもよい。

## 【0454】

モノオキシゲナーゼ(デアルキラーゼ)：モノオキシゲナーゼの基質として適したいくつかのクマリン誘導体が商業的に入手可能である。典型的には、これらの基質において、その化合物のエチル基の水酸化は、レゾルフィン蛍光団の遊離を起こす。

20

## 【0455】

典型的には、基質は、細胞中に入ることができ、解析が行われる十分な時間の間、細胞中でその存在を維持できる(例えば、一旦、基質が細胞に入ると、それは、スクリーンされる酵素と検出可能な応答を産生するために十分な程度反応する前には「漏出」しない)。細胞中での基質の保持は、多様な技術によって促進できる。一法として、基質化合物は、疎水性テイル(例えば、アルキル)を付加することにより構造的に修飾できる。他の具体例として、DMSOあるいはグリセロールのような溶媒を細胞外壁をコートするために使用することができる。また、基質は、低温下で細胞に投与することができ、それによる細胞からの基質の漏出が遅延することが観察されている。しかしながら、基質の細胞中への侵入は、例えば、酵素あるいはペプチドが分泌される場合、溶解細胞サンプル中に存在する場合又はその類、あるいは基質が外因的に細胞に作用する場合(例えば、細胞外の受容体-リガンド複合体)には必要とされない。

30

## 【0456】

可視シグナル基質は、いくつかの具体的例において、FRET基質であり得る。FRETは、蛍光団の近接及び角配向を計れる吸光法である。基質あるいは産物の濃度を測定するFRETを利用する蛍光指示システムは、一方を「供与体」蛍光残基、他方を「受容体」蛍光残基にさせる励起及び放射スペクトルを持つ二つの蛍光残基を含む。二つの蛍光残基は、受容体蛍光残基の励起スペクトラムがその励起残基の放射スペクトル(供与体蛍光残基)が重なるように選択される。その供与体残基は、供与体残基の励起波長の範囲内で適当な強さの光により励起させ傾向として吸収されたエネルギーを放射する。受容体蛍光タンパク残基が励起状態で供与体残基を消光するように位置する場合、蛍光エネルギーは、受容体残基に移され、二次光子を放射することができる。供与体及び受容体残基の放射スペクトルは、二つの放射が区別できるように最小の重なりを持つ。従って、受容体が、供与体、それからその正味の安定状態の効果は、供与体の放射が消光する長い波長で蛍光を放射すると、その受容体は供与体の最大吸収で放射するようになる。

40

## 【0457】

検出可能あるいは可視的なシグナルは、例えば、蛍光偏光、時間分解蛍光、あるいはFR

50

ETを含む蛍光を測定する蛍光高度計(あるいはその類)を用いて測定することができる。一般に、初期波長を持つ励起源からの励起放射線は、サンプルを励起する励起放射線を生ずる。応答として、サンプル中の蛍光化合物は、励起波長とは異なる波長を持つ放射線を放射する。蛍光物質に関するアッセイを行うための方法は、既によく知られる技術であり、例えば、以下に述べられている：Lakowicz (Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York, Plenum Press, 1983) 及び Herman (“Resonance energy transfer microscopy,” : Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, 編集. Taylor & Wang, San Diego, Academic Press, 1989, pp. 219-243)。蛍光検出技術の例を以下に更に詳しく述べる。

**【0458】**

10

更に、遺伝子の発現の測定にリポーター遺伝子を使用するいくつかの方法が文献に述べられている。Norlan等は、高等動物細胞において、ベクターガラクトシダーゼの発現を分析する技術について述べている。この技術は、ベクターガラクトシダーゼの基質としてフルオレスセイン-ジ-ベクターガラクトシド(FDG)を使用し、それは、加水分解と同時にその蛍光放射により検出することのできる産物であるフルオレスセインを遊離する(Nolan等, 1991)。5-ドデカノイルアミノフルオレスセイン-ジ-ベクターガラクトシド(C12-FDG) (Molecular Probes)のような他の蛍光基質が開発されており、それは、それらが生理的培養条件の下で殆どの細胞膜を容易に通過することのできる脂質性フルオレスセイン誘導体であるという点でFDGとは異なる。

**【0459】**

20

上述したベクターガラクトシダーゼのアッセイは、例えば、*Sulfolobus solfataricus*のような抗耐熱性原生動物から単離したベクターガラクトシダーゼの組換え体を発現している単一大腸菌細胞をスクリーンするために使用されてもよい。他のリポーター遺伝子は、基質として有効であり、ベクターグルクロニダーゼ、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)及びルシフェラーゼとして知られている。

**【0460】**

例えば、そのライブラリーは、特別な酵素活性のためにスクリーンされてもよい。例えば、スクリーンされる酵素活性は、エポキシダーゼあるいはオキシゲナーゼとしてでもよい。組換え体酵素、それから、より特別な酵素活性のために再スクリーニングされてもよい。

30

**【0461】**

別報としてそのライブラリーは、更に特別な酵素活性のためにスクリーニングされてもよい。例えば、エポキシダーゼ活性のための一般的のスクリーニングに代わり、そのライブラリーは、とあるより特別な活性、即ち、そのエポキシダーゼ、が作用する結合のタイプのためにスクリーニングされてもよい。

**【0462】**

上述の展望の一つに関して述べたように、本発明は、微生物に由来した選別されたDNAを含むクローンの活性スクリーニングのための操作法を提供する。それは、以下の方法を含む：関心対象の生物分子あるいは生物活性のためのライブラリーをスクリーンすることで、そのライブラリーは多数のクローン、混合している生物体の集団由来の核酸(例えば、ゲノムDNA)を回収することにより調整されたクローン、それらの強化された又は単離された集団を含む。更に、関心対象の生物分子あるいは生物活性のためにスクリーンされたクローンを産生する核酸で宿主を形質変換すること。

40

**【0463】**

他の例において、強化ステップは、活性を基にしたスクリーニングの前に行ってもよい。例えば、その強化ステップは、バイオパンニング法であり得る。このバイオパンニングの操作は、U.S. 特許番号 6,054,002(2000年4月25日発布)に述べられ、具体化されており、この中に参照として取り込まれる。

**【0464】**

50

他の例において、ポリヌクレオチドは、混合生物体集団の核酸配列から調製されたクローンであるクローンに含まれ、その中の核酸配列は、混合生物体集団の遺伝子ライブラリーを作製するために使用される。その遺伝子ライブラリーは、ライブラリーを含む宿主細胞を望まれる活性を持つ生物活性をコードするDNA配列の全体又は一部に少なくとも一つの検出可能分子を持つ核酸配列で感染させることにより関心対象の配列をスクリーンし、例えば、蛍光を基にした分析により望まれる配列を含むライブラリークローンを分離する。

#### 【0465】

上述したバイオパンニングのアプローチは、与えられているプローブ配列に相同的な配列を持つクローンで強化したライブラリーの作製に使用できる。このアプローチを利用することにより、挿入が40 kbpまでのクローンを含むライブラリーを各ラウンドのパンニングによりおおよそ1,000倍ずつに強化できる。これにより、一回のバイオパンニング強化の後スクリーンされるクローンの数を減らすことができる。この戦略は、例えば、ポリケチド配列のような関心対象の生物活性に関連する関心対象の配列を担っているクローンのために強化したライブラリーの作製に応用できる。

10

#### 【0466】

高密度フィルターあるいはバイオパンニングを利用したハイブリダイゼーションスクリーニングは、保存された遺伝子を含む経路の相同性を検出するための効果的なアプローチを立証した。相手方が未知な新規生物活性分子を発見するためには他のアプローチが必要である。本発明の他のアプローチは、少分子環構造あるいは「バックボーン」の発現のために大腸菌をスクリーンすることである。これらポリ環状構造をコードする遺伝子は、しばしば大腸菌において発現されることができるので、少分子バックボーンは、不活性型ではあるが製造されることができ。生物活性は、活性型に構造を修飾又は「授与する」する必要なグリコシレーションやメチレーションを発現する適当な宿主にその分子あるいは経路を移すと同時に与えられる。従って、大腸菌において組換え体として発現された不活性環状化合物は、クローンを同定するために検出され、それは、引き続き生物活性分子を産生のために *Streptomyces* のような代謝的に豊富な宿主へ移される。自動ハイスループットシステムの使用は、マイクロタイタープレートにおける多様なアレーにより非常に多数のクローンをスクリーンすることを可能にする。

20

#### 【0467】

これらの構造を担うクローンを検出あるいは強化するための一つのアプローチは、キャピラリースクリーニング法又はFACSスクリーニング法を利用することである。それらの操作は、U.S. 連載番号08/876,276(1997年6月16日発布)に述べられ、具体化されている。ポリ環状化合物は、紫外線で励起させた場合、特徴的な蛍光スペクトルを持つ。従って、これらの分子を発現しているクローンは、十分な感度を持った方法により、バックグラウンドと区別されることができ。例えば、ハイスループットFACSスクリーニングは、大腸菌ライブラリー中の少分子バックボーンをスクリーンするために使用されることができ。商業的に入手可能なFACS装置は、UV活性分子について、1秒当たり100,000クローンをスクリーンする能力がある。これらのクローンは、更なるFACSスクリーニングのために選別でき、在住プラスミドは、抽出し、活性スクリーニングのために *Streptomyces* へ移すことができる。

30

40

#### 【0468】

別のスクリーニングアプローチとして、*Streptomyces* に宿主を移した後、クローンの候補を有機溶媒抽出したものについて、*Staphylococcus aureus*、*E. coli*、あるいは *Saccharomyces cerevisiae* のような試験生物体に対する感受性スクリーニングにより生物活性を調べることができる。FACSスクリーニングは、その試験生物体にクローンを包埋することにより、このアプローチに利用することができる。

#### 【0469】

本発明により提供される上述したスクリーニングの変法は、「混合抽出」と呼ばれるアプローチである。「混合抽出」スクリーニングアプローチは、修飾遺伝子がポリ環状バ

50

ックボーンを代謝的に豊富なStreptomycesのような宿主で発現させると同時に活性が授けられるために必要とされるという事実を利用するものであり、その酵素は、抽出され、インビトロで生物活性化合物を産生するために大腸菌クローンから抽出されたバックボーンと混合される。Streptomycesのような代謝的に豊富な宿主から種々の増殖期で得た酵素抽出画分は、大腸菌ライブラリーから得た有機溶媒抽出物のプールと混合して生物活性を評価する。

【0470】

大腸菌クローンにおける活性を検出するための別のアプローチは、生物活性化合物を異なるものに変換することのできる遺伝子をスクリーンすることである。

【0471】

例えば、キャピラリー スクリーニングは、Streptomycesのような代謝的に豊富な宿主におけるUV蛍光分子の発現を検出するためにも使用できる。組換えオキシテトラサイクリンは、*S. lividans* TK24において異種的に産生された場合、特徴的な赤色蛍光を保持する。従って、本発明の方法及びシステムにより同定できる経路クローンをポリ環状分子のためにハイスループット スクリンできる。

【0472】

組換え生物活性化合物は、インビボにおいて「ツーハイブリッド」システムを利用してスクリーンされることができ、それは、エンハンサーやタンパク-タンパク相互作用又は転写因子とそれらの活性化因子、あるいは受容体とそれらが認識する標的間の相互作用、を阻害するような他の相互作用を検出できる。この具体例として、小分子経路及びGFP レポーター構築物の両方がともに発現される。従って、GFPの発現を変化させるクローンは、同定され、そのクローンは、特徴を調べるために単離されることができ。

【0473】

本発明は、クローン化した非培養サンプルに由来する経路を簡略し、上述した多様なスクリーニングアプローチを利用した異種間発現及び興味を持たれる生物活性化合物のダウンストリーム(下流)スクリーニングのために代謝的に豊富な宿主に移すことを可能にもする。

【0474】

遺伝子ライブラリーに由来する異なる発現クローンを個々に含む増殖又は非増殖細胞をスクリーンし、ポジティブなクローンを回収した後、DNAは、既によく知られている技術によりポジティブなクローンから単離することができる。そのDNAは、それから、既によく知られているどのような増幅技術でもインビボあるいはインビトロで増幅されることができる。インビボ増幅は、クローンあるいは基質の増殖宿主への形質変換とそれに続く宿主の増殖を含む。インビトロ増幅は、ポリメラーゼ チェイン リアクションのような技術を利用して行うことができる。一旦、増幅したならば、同定した配列は、「進化」あるいは配列決定されることができる。

【0475】

本発明により供与される利点は、同定された生物分子、あるいは生物活性を配列、活性又は特異性を変えるようにコードした変種を産生及び選別するための細工する能力である。

【0476】

生物分子又は生物活性をスクリーンし、それらを持つことが見いだされたクローンは、熱や有機溶媒に対する安定性のように、天然(例えば、野生型の活性)においては見られないか、あるいは非常に稀な特別に望ましい性質を持つ新しい生物分子又は生物活性を開発するために指向進化を行うことができる。指向変異誘発のためのどのような既知の技術も本発明に利用できる。例えば、本法に従って使用される特別に好ましい変異技術は以下に述べるものを含む。

【0477】

オプションとして、この中に述べられるように、得られ、同定され、あるいはクローン化された生物分子(例えば、ペプチド、あるいはポリペプチド配列)あるいは生物活性(例

10

20

30

40

50

例えば、酵素活性)に変化を与えることが望まれるかもしれない。そのような変化は、例えば、ポリペプチドの活性、特異性、親和性、機能、及びその類を増加、あるいは減少させるために、それら生物分子又は生物活性を修飾することができる。DNAシャッフリングは、特定のサンプルにおける変化を増加させるために使用できる。DNAシャッフリングは、同等ではないが実体的に相同である配列間の組換えを意味し、いくつかの具体例においては、それは、cer/lox 及び/又は flp/frt システム及びその類のように非相同組換えを介したクロスオーバーを含めてもよい(参照、U.S.特許番号5,939,250、1999年8月17日に Jay Short博士に対して発布、及びDiversa Corporationに帰属、その開示は、この中に参照として組み込まれる)。

**【0478】**

10

核酸シャッフリングは、1種又は複数のポリヌクレオチドを作成するためのより短いあるいは小さいポリヌクレオチドのプールのインビトロ又はインビボ相同的組換え法である。関連した核酸配列又はポリヌクレオチドの混合物は、ランダムポリヌクレオチドを作成するためにセクシュアル(sexual)PCRが施され、かつ組換えハイブリッド核酸分子又はポリヌクレオチドのライブラリーあるいは混合集団を得られるように再集合させる。カセット突然変異とは対照的に、シャッフリング及びエラープローンPCRのみが盲検的(プライマー以外の配列情報はない)配列プールの突然変異を可能にするものである。

**【0479】**

反復選択に関するエラープローンPCR単独に勝る本発明の変異原性シャッフリングの利点を以下に説明する。DNAシャッフリングをエラープローンPCR(セクシュアルPCRでない)と比べてみる。選択されプールされた配列の最初のライブラリーは、関連のある多様な起源からなるか、又は単一遺伝子のいずれかの種類の変異に由来することができる(シャッフリングを含む)。選択されプールされた配列の最初の配列が第一ラウンドの活性の選別の後に得られる。例えば、シャッフリングは、関連した全ての配列が自由な組み合わせによって結合することを可能にする。

20

**【0480】**

本方法は、エラープローンPCRとは、逆連鎖反応である点で異なる。エラープローンPCRにおいて、ポリメラーゼ開始部位の数及び分子の数は、指数関数的に増大する。しかし、ポリメラーゼ開始部位の配列及び当該分子の配列は本質的に同じである。対照的に、無作為ポリヌクレオチドの再集合又はシャッフリングする核酸において、開始部位の数及び無作為ポリヌクレオチドの数(サイズではない)は、経時的に減少する。全プラスミドに由来したポリヌクレオチドについて、理論的エンドポイントは、1本の巨大なコンカテマー分子である。

30

**【0481】**

相同領域でクロスオーバーが生じるので、組換えは、同じ配列ファミリーのメンバーの間で初めに生じる。これは、総体的に共存性のないCDRの組合せを邪魔する(例えば、同じ抗原の異なるエピトープに対して)。配列の複数のファミリーを同じ反応においてシャッフリングすることができることが考案されている。更に、シャッフリングは一般に、相対的順番を維持する。

**【0482】**

40

稀なシャッフラント(shufflant)は、非常に多数の最良(例えば、最高親和性)のCDRを含み、かつこれらの稀なシャッフラントは、それらの優れた親和性を基に選択することができる。

**【0483】**

100種の異なる選択された抗体配列のプールからのCDRは、最大 $10^3$ 種の異なる方法で並べ替えることができる。この非常に多数の並べ替えは、DNA配列の単独のライブラリーにおいては表すことができない。従って、DNAシャッフリング及び選択の複数のサイクルが、所望の配列長さ及び配列の多様性に応じて必要であると考えられている。対照的にエラープローンPCRは、同じ相対的配列において全ての選択されたCDRを維持し、非常に小さい変異体クラウド(cloud)を形成している。

50

## 【0484】

本発明の方法で使用することができる鑄型ポリヌクレオチドは、DNA又はRNAであることができる。これは、遺伝子のサイズ又は再結合もしくは再集合される短かく小さいポリヌクレオチドに応じて、様々な長さであることができる。好ましい鑄型ポリヌクレオチドは50bp~50kbである。関心対象のタンパク質をコードしている核酸を含むベクター全体を、本発明の方法において使用することができることが考案されており、かつ実際にうまく使用されている。

## 【0485】

鑄型ポリヌクレオチドは、PCR反応を用いる増幅(U.S.特許番号4,683,202及び4,683,195)、又は他の増幅又はクローニング法により得ることができる。しかし、PCR産物のプール及びセクシュアルPCRを施す前にPCR産物から自在なプライマーを除去することは、より効率的結果をもたらす。セクシュアルPCR前の本来のプールからのこのようなプライマーの適切な除去の失敗は、低頻度のクロスオーバー クローンへつながる。

10

## 【0486】

鑄型ポリヌクレオチドは、しばしば、二本鎖である。二本鎖核酸分子は、得られる一本鎖ポリヌクレオチド領域が互いに相補的であり、その結果ハイブリダイズし、二本鎖分子を形成することができることを確実にすることが推奨されている。

## 【0487】

この段階では、鑄型ポリヌクレオチドと同じ領域及び鑄型ポリヌクレオチドと異なる領域を有する一本鎖又は二本鎖核酸ポリヌクレオチドが、鑄型ポリヌクレオチドに添加されることが考案されている。更に二種の異なるが関連したポリヌクレオチド鑄型をこの段階で混合することができると考えられている。

20

## 【0488】

二本鎖ポリヌクレオチド鑄型及びいずれか添加された二本鎖又は一本鎖ポリヌクレオチドについて遅延又は停止を含むセクシュアルPCRが施され、5bp~5kb又はそれ以上の混合物が提供される。好ましくは、無作為ポリヌクレオチドのサイズは、約10~1000bpであり、より好ましくはこのポリヌクレオチドのサイズは、約20~500bpである。

## 【0489】

あるいは、同じく複数のニックを有する二本鎖核酸を、本発明の方法において使用することが考察されている。ニックは、二本鎖核酸の一本の鎖中の切れ目である。このようなニック間の距離は、好ましくは5bp~5kbであり、より好ましくは10~1000bpである。これは、例えば無作為プライマーから生じるポリヌクレオチドと共に含まれるより短いか又はより小さいポリヌクレオチドを作成するための自己プライミング領域を提供する。

30

## 【0490】

いずれか一種の特異的ポリヌクレオチドの濃度は、総ポリヌクレオチドの1質量%よりも大きくはなく、より好ましくは、いずれか一種の特異的核酸配列は、総核酸の0.1質量%よりも大きいことはない。

## 【0491】

このような混合物中の様々な特異的ポリヌクレオチドの数は、少なくとも約100個であり、好ましくは少なくとも約500個であり、より好ましくは、少なくとも約1,000個である。

40

## 【0492】

この段階で、一本鎖又は二本鎖ポリヌクレオチドは、合成又は天然に関わらず、ポリヌクレオチド混合物の不均一性を増大するために、無作為で二本鎖のより短いか又は小さいポリヌクレオチドに添加することができる。

## 【0493】

更に、二本鎖の無作為に破壊されたポリヌクレオチドの集団を、この段階で、セクシュアルPCR法由来のポリヌクレオチドと混合又は一緒にすることができ、かつ任意に1種以上の追加のセクシュアルPCRサイクルを施すことが考案されている。

## 【0494】

50

鋳型ポリヌクレオチドへの変異の挿入が望ましい場合、鋳型ポリヌクレオチドと同じ領域及び鋳型ポリヌクレオチドと異なる領域を有する一本鎖又は二本鎖ポリヌクレオチドを総核酸に対して質量で20倍過剰に添加することができ、より好ましくは、総核酸に対して質量で10倍過剰に添加することができる。

【0495】

異種であるが関連した鋳型ポリヌクレオチドの混合物が望ましい場合には、各鋳型由来のポリヌクレオチドの集団は、約1:100未満の比で、より好ましくは、約1:40未満の比で一緒にすることができる。例えば、変異されたポリヌクレオチド集団による野生型ポリヌクレオチドの戻し交配は、中立突然変異(例えば、選択される表現型特性における非現実的変更を生じる変異)を排除するために望ましい。このような例において、無作為に提供されたセクシュアルPCRサイクル ハイブリッド ポリヌクレオチドに対する、添加することができるランダムに提供された野生型ポリヌクレオチドの比は、およそ1:1~約100:1であり、より好ましくは、1:1~40:1である。

10

【0496】

無作為ポリヌクレオチドの混合された集団は、一本鎖のポリヌクレオチドを形成するために変性され、次いで再アニーリングされる。他の一本鎖ポリヌクレオチドは、相同性のある領域を持つ一本鎖ポリヌクレオチドだけが再アニーリングされると考えられる。

【0497】

無作為ポリヌクレオチドは、加熱によって変性させることができる。熟練した研究者は、二本鎖の核酸を完全に変性させるために必要な条件を決定することができる。好ましくは、80~100℃、より好ましくは、90~96℃の温度である。ポリヌクレオチドを変性させるために使われうる他の方法には、圧力及びpHが含まれる。

20

【0498】

ポリヌクレオチドは、冷却によって再アニーリングすることができる。好ましくは、20~75℃の間、より好ましくは、40~65℃の間の温度である。平均わずか4連続塩基配列の相同性に基づいて高頻度の交叉(クロスオーバー)が必要とされるならば、プロセスは、より困難になるが、低いアニーリング温度を用いて組換えを強制的に行うことができる。生ずる再生の程度は、一本鎖ポリヌクレオチドの集団間の相同性の程度に依存する。

【0499】

再生は、ポリエチレングリコール(「PEG」)あるいは塩の添加によって加速されうる。塩濃度は、好ましくは、0~200 mMまで、より好ましくは、10~100 mMまでである。塩は、KClあるいはNaClでありうる。PEGの濃度は、好ましくは、0~20%まで、より好ましくは、5~10%までである。

30

【0500】

アニーリングされたポリヌクレオチドは、次に、核酸ポリメラーゼ及びdNTP(即ち、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP)の存在下でインキュベートされる。核酸ポリメラーゼは、クレノー断片、Taqポリメラーゼ、あるいは既知の任意の他のDNAポリメラーゼでもよい。

【0501】

集合のために用いられるアプローチは、クロスオーバーが得られる最小程度の相同性に依存する。もし、同等領域が大きいときは、Taqポリメラーゼを45~65℃の間のアニーリング温度で使うことができる。もし、同等領域が小さいときは、クレノーポリメラーゼを20~30℃の間のアニーリング温度で使うことができる。熟練した研究者は、クロスオーバーが達成させる数を増加させるために温度を変化させることができる。

40

【0502】

アニーリングに先立って、アニーリングと同時に、又はアニーリングの後に、ポリメラーゼをランダムオリゴヌクレオチドに添加することができる。この中でいうポリメラーゼ存在下での変性、再生及びインキュベーションのサイクルとは、核酸のシャッフリング又は集合を意味する。このサイクルは、望ましい回数繰り返される。好ましくは、サイクルは2~50回繰り返され、より好ましくは、シーケンスは10~40回繰り返される。その結果として得られる核酸は、約50bpから約100kbpまでのより大きな二本鎖ポリヌクレオチドであり

50

、好ましくは、500bpから50 kbpまでである。

【0503】

このより大きなポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドと同じ大きさをもつポリヌクレオチドの多数のコピーを直列に含む。この直鎖状結合ポリヌクレオチドは、次に、鋳型ポリヌクレオチドの単一コピーへと変性する。この結果、鋳型ポリヌクレオチドとほぼ同じ大きさを持つポリヌクレオチド集団ができると考えられる。集団は、混合された集団であると考えられ、同一の領域及び異種の領域を持つ一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドが、シャッフリングの前に、鋳型ポリヌクレオチドに加えられ、次にこれらのポリヌクレオチドは、適当なベクターにクローニングされ、そして及びそのライゲーション混合物を細菌の形質転換に用いる。

10

【0504】

その直鎖状結合体の消化よりはむしろPCR(U.S.特許番号4,683,195号及びU.S.特許番号4,683,202号)を含む種々の方法によって、クローニングの前に単一のポリヌクレオチドを増幅することにより、単一のポリヌクレオチドがより大きな鎖状体状のポリペプチドから得られうることが予測される。

【0505】

クローニングのために使用されるベクターは、好ましい大きさのポリヌクレオチドが受容されるならば、それほど重要ではない。もし、特定のポリヌクレオチドの発現が望ましいのであれば、宿主細胞中でポリヌクレオチドを発現させるために、クローニングの媒体は、ポリヌクレオチドの挿入部位の隣に転写シグナル及び翻訳シグナルを更に含むべきである。

20

【0506】

その結果得られた細菌集団は、ランダム変異を有する多くの組換えポリヌクレオチドを含むと考えられる。この混合集団は、所望の組換えポリヌクレオチドを同定するために試験されう。選択の方法は、所望のポリヌクレオチドに依存すると考えられる。

【0507】

例えば、もし、リガンドへの増大された結合効率をもつタンパク質をコードするポリヌクレオチドが望ましいならば、集団又はライブラリーにおいてポリヌクレオチドそれぞれの部分により発現されたタンパク質は、当技術分野で既知の方法(即ち、パニングやアフィニティークロマトグラフィー)によって、リガンドへの結合能について試験されう。もし、増大された薬剤耐性をもつタンパク質をコードするポリヌクレオチドが望ましいならば、集団又はライブラリーにおけるそれぞれのポリヌクレオチドによって発現されたタンパク質は、宿主生物に薬剤耐性を付与する性能について試験されう。所望のタンパク質の知識を持つ研究者は、集団を容易に試験して、望ましいの特性をタンパク質に付与するポリヌクレオチドを同定することができる。

30

【0508】

熟練した研究者は、タンパク質の断片を融合タンパク質としてファージ表面に発現させるファージディスプレイシステム(Pharmacia, Milwaukee WI)を利用できるかもしれない。組換えDNA分子は、ある部位でファージDNAにクローニングされ、その結果、その一部が組換えDNAによってコードされた融合タンパク質の転写が起こる。組換え核酸分子を含むファージは、細胞の中で複製及び転写をうける。融合タンパク質のリーダー配列は、融合タンパク質の輸送をファージ粒子の先端に向ける。従って、組換えDNA分子によって部分的にコードされた融合タンパク質は、上記の方法による検出及び選択のためにファージ粒子の上に提示される。

40

【0509】

核酸シャッフリングの多数のサイクルは、最初の集団の亜集団に由来するポリヌクレオチドを用いて行われることがさらに期待され、その亜集団は、望ましい組換えタンパク質をコードするDNAを含んでいる。このようにして、より高い結合親和性又は酵素的活性を有するタンパク質ができあがる。

【0510】

50

亜集団に由来するサイレント変異を除くために、核酸シャッフリングの多数のサイクルが、野生型ポリヌクレオチド及び最初又はそれに続くラウンドの核酸シャッフリング由来の核酸の亜集団の混合物を用いて行われることが更に予測される。

**【0511】**

精製された形態において、核酸の任意の供給源は、開始核酸として使用されうる。従って、そのプロセスは、DNA又はメッセンジャーRNAを含むRNAを利用することができ、それらDNA又はRNAは、一本鎖でも二本鎖でもよい。更に、それぞれの一本鎖を含むDNA-RNAハイブリッドも使用することができる。核酸の配列は、変異される核酸配列の大きさに依存して、様々な長さでありうる。好ましくは、特異的な核酸の配列は50~50,000塩基対である。関心対象のタンパク質をコードする核酸を含むベクター全体が、本発明の方法において使用されることが予測される。

10

**【0512】**

任意の特異的な核酸配列を、本方法によるハイブリッド集団作製のために用いることができる。特定の核酸配列のハイブリッド配列の小さな集団が存在するか、あるいは本方法に利用可能であることだけが必要とされる。

**【0513】**

変異を持つ特定の核酸配列の最初の小さな集団は、多くの異なった方法で作製される。変異はエラープローンPCRで作製されうる。エラープローンPCRは、低忠実度の重合条件を利用し、長い配列にわたって低いレベルでの点変異をランダムに導入する。別法として、オリゴヌクレオチドによる突然変異誘発によって、鋳型ポリヌクレオチドに変異を導入することができる。オリゴヌクレオチドによる突然変異誘発において、ポリヌクレオチドの短い配列が制限酵素消化によりポリヌクレオチドから除去され、本来の配列が様々な塩基により変化された合成ポリヌクレオチドで置き換えられる。ポリヌクレオチド配列は、また、化学的突然変異誘発によっても変化させることができる。化学的突然変異誘発は、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシアミン、ヒドラジン、又はギ酸を含む。ヌクレオチド前駆体の類似体である他の薬剤は、ニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリン、又はアクリジンを含む。一般的に、これらの薬剤は、ヌクレオチド前駆体の代わりにPCR反応に加えられ、それにより配列が変異される。プロフラビン、アクリフラビン、キナクリンなどのようなインターカレーション試薬を使用してもよい。ポリヌクレオチド配列のランダム突然変異誘発は、また、X線あるいはUV光の照射によって達成されうる。一般的に、このように突然変異誘発されたプラスミドポリヌクレオチドを大腸菌に導入し、ハイブリッドプラスミドのプール又はライブラリーとして増殖させる。

20

30

**【0514】**

別の観点において、同一遺伝子の異なった対立遺伝子又は異なった関連種由来の同一遺伝子(即ち、同族遺伝子)から成るという点で、特定の核酸の小さな混合集団は、天然にも見出だされうる。それとは別に、それらは、一つの種の中に見られる関連した遺伝子、例えば、免疫グロブリン遺伝子であるかもしれない。

**【0515】**

一旦、特定の核酸配列の混合された集団が作製されると、既によく知られた技術を用いて、ポリヌクレオチドは、直接用いるか、あるいは適当なクローニングベクターに挿入することができる。

40

**【0516】**

ベクターの選択は、本発明の方法において使用されるポリヌクレオチド配列の大きさや宿主細胞に依存している。本発明における鋳型は、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス(例えば、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、レオウイルス、パラミクソウイルス等)、又はその中の選ばれた一部分(例えば、コートタンパク質、スパイク糖タンパク質、キャプシドタンパク質)でもよい。例えば、変異される特定の核酸配列がより大きい場合には、大きなポリヌクレオチドを安定に保持することのできるコスミド及びファージミドベクターが好ましい。

50

## 【0517】

もし、特定の核酸配列の混合集団をベクターにクローン化した場合、それは、クローンとして増幅することができる。有用性は、発現されたポリペプチドをスクリーニングすることで容易に調べることができる。

## 【0518】

本発明のDNAシャッフリング法を、未知の配列のプールにおいて盲目的に行うことができる。オリゴヌクレオチドの再集合混合物(再集合される配列に対して相同的な末端を有する)を添加することにより、任意の配列混合物を、任意の特定の部位において、別の配列混合物の中に組み込むことができる。従って、合成オリゴヌクレオチド、PCRポリヌクレオチドあるいは遺伝子全体の混合物でも、特定の部位において別の配列ライブラリー中に混合することができることが予想される。一つの配列(混合物)の挿入は、鋳型の他の部位での配列の挿入に依存しない。従って、組換えの程度、必要な相同性及びライブラリーの多様性は、再集合されたDNAの長さに沿って独立してかつ同時に変化することができる。

10

## 【0519】

シャッフリングには、多様性の領域を分けている相同的な領域の存在が必要である。骨格様タンパク質構造は、シャッフリングには特に適しているかもしれない。保存された骨格は、特異的結合を媒介する比較的制限されないループを示す一方で、自己会合による全体の折り畳み構造を決定する。このような骨格の例としては、既によく知られている免疫グロブリン バレル構造及び4-ヘリックス バンドルが挙げられる。このシャッフリングは、結合のための変異配列の種々の組み合わせを持つ、骨格様タンパク質を作製するために使用できる。

20

## 【0520】

いくつかの標準的遺伝子交配と同等のことがインビトロ シャッフリングによってもまた実施されうる。例えば、「分子戻し交配」を、関心対象の変異に関する選択の際にハイブリッド核酸を野生型核酸と繰り返し混合させることにより実施することができる。伝統的育種と同様に、本アプローチを、異なる供給源由来の表現型を選択したバックグラウンドに組み合わせるために使用することができる。これは、例えば、選択されていない特性(即ち、免疫原性)に影響を与える中立の変異を除去するために有用である。従って、これは、タンパク質の変異が増大された生物学的活性に関与するかどうかを判定するために有用であり、これは、エラープローン変異誘発法又はカセット変異誘発法によっては達成することができない利点である。

30

## 【0521】

大型の機能的遺伝子を、小型ランダム ポリヌクレオチドの混合物から正確に集合させることができる。本反応は、化石における高度に断片化されたDNAから遺伝子を再集合させるために有用でありうる。更に、化石由来のランダムな核酸断片は、関連する種由来の類似遺伝子由来のポリヌクレオチドと組み合わせられうる。

## 【0522】

本発明の方法が、様々な研究及び診断応用のために必要とされるような一つの細胞から全ゲノムをインビトロ増幅するために使用されうることも考えられる。PCRによるDNA増幅は、現実的には約40 kbの長さ限定される。例えば、大腸菌のゲノム(5,000 kb)などの全ゲノムのPCR増幅には、125個の40 kbポリヌクレオチドを生じる約250個のプライマーを必要とすると考えられる。一方、セクシュアルPCRを用いたゲノムのポリヌクレオチドのランダムな作製及びそれに引き続く小さなポリヌクレオチドのゲル精製は、多数の潜在的プライマーを提供すると考えられる。全ゲノムDNAとともに、このランダムな小さいポリヌクレオチド混合物をPCR反応のプライマーとして単独又は鋳型として用いる使用は、ゲノムの多くのコピーを含む単一の直鎖連結構造の理論的終了点を持った逆連鎖反応をもたらすはずである。

40

## 【0523】

コピー数の100倍の増幅及び50 kb超のポリヌクレオチドの平均の大きさは、ランダムポ

50

リヌクレオチドのみが使用された場合に得られうる。多数のより小さなポリヌクレオチドの重複により、より大きな直鎖連結構造が作製されると考えられる。合成プライマーを用いて得られた特異的PCR産物の質は、非増幅DNAから得られた産物と区別できないと考えられる。本アプローチがゲノムマッピングにおいても有用であることが期待される。

【0524】

実施者の判断で、シャッフリングされるべきポリヌクレオチドは、ランダム又は非ランダムなポリヌクレオチドとして作製されうる。更に、本発明は、より大きなポリヌクレオチドの再集合において、ビルディングブロックとして使用されるポリヌクレオチドモノマーを産生する段階を含んだ広範囲のポリヌクレオチドのサイズ及び型に適用可能なシャッフリング法を提供する。例えば、ビルディングブロックは、遺伝子の断片又は遺伝子全体あるいは遺伝子経路又はそれらの任意の組み合わせからなることができる。

10

【0525】

インビボシャッフリングの態様においては、少なくとも二つの異なる核酸配列が各宿主細胞内に存在するような条件下で、特定の核酸配列の混合集団が細菌又は真核細胞内に導入される。ポリヌクレオチドは、様々な異なる方法で宿主細胞に導入することができる。宿主細胞は、既によく知られる方法、例えば、塩化カルシウム処理により小型のポリヌクレオチドで形質転換することが可能である。ポリヌクレオチドがファージゲノムに挿入されているならば、宿主細胞は、特定の核酸配列を有する組換えファージゲノムを用いてトランスフェクトされうる。又は、エレクトロポレーション、トランスフェクション、リポフェクション、微粒子銃(biolistics)、接合などを利用して、核酸配列を宿主細胞に導入することができる。

20

【0526】

一般的に、この観点において、宿主細胞内で安定に配列を複製する能力を有するベクター内に特異的核酸配列が存在すると考えられる。更に、ベクターは、ベクターを有する宿主細胞が選択されうるためのマーカー遺伝子をコードすることが考えられる。これは、変異した特異的核酸配列が宿主細胞への導入後に回収されうることを確実にする。しかしながら、特異的核酸配列の全混合集団がベクター配列上に存在する必要がないことが考えられる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入後に各宿主細胞がその中に少なくとも一つの特異的核酸配列を有する一つのベクターを含むことを確実にするために、むしろ十分な数の配列だけがベクターにクローン化される必要がある。ベクターにクローン化された特異的核酸配列の集団のサブセットを有するよりもむしろ、このサブセットが既に安定に宿主細胞に組み込まれうることも考えられる。

30

【0527】

同等領域を有する二つのポリヌクレオチドが宿主細胞に挿入される場合、相同組換えが二つのポリヌクレオチド間で生じることが見出されている。二つの変異型特異的核酸配列間でのそのような組換えは、ある状況では二重又は三重ハイブリッドの作製をもたらすと考えられる。

【0528】

いくつかの変異型特異的核酸配列が直鎖状核酸分子上に存在するならば、組換え頻度が増加することも見出されている。従って、一つの実例として、いくつかの特異的核酸配列が直鎖上ポリヌクレオチド上に存在する。

40

【0529】

形質転換後、宿主細胞形質転換体は、望ましい性質を有する変異型特異的核酸配列を含む宿主細胞形質転換体を同定するための選択下に置かれる。例えば、ある特定の薬剤への耐性の増加が望ましいならば、形質転換された宿主細胞が特定の薬剤の増加濃度に供され、薬剤耐性の増加を賦与する変異型タンパク質を作製する形質転換体を選択されるであろう。ある特定のタンパク質が受容体に結合する能力の増強が望ましいならば、形質転換体からタンパク質発現を誘導し、結果生じるタンパク質は、リガンドに対するその結合の増強を示す変異型亜集団中に同定するために既知の方法によるリガンド結合アッセイで評価する。又は、タンパク質は、適切なプロセッシングを確実にするために別の系で発現するこ

50

とができる。

【0530】

目的の特性を有する最初の組換え型特異的核酸配列(娘配列)の亜集団が同定されると、それらは続いて別の組換えラウンドに供される。二サイクル目の組換えでは、組換え型特異的核酸配列は、本来の変異型の特異的核酸配列(親配列)とシャッフリングされてもよく、サイクルは上述の通り繰り返される。このようにして、増強された特性を有する又は増強された特性を有するタンパク質をコードする第二の組換え型特異的核酸配列のセットが同定されうる。このサイクルは、望ましいならば、多数回繰り返してもよい。

【0531】

二番目又は引き続き組換えサイクルにおいて戻し交配が実施されうることも考えられる。少なくとも一つの野生型核酸配列及び変異型核酸配列が形質転換後の同一の宿主細胞内に存在するような分子戻し交配は、目的の特異的核酸配列を多数の野生型配列とシャッフリングすることにより実施してもよい。野生型特異的核酸配列との組換えは、免疫原性等の選択されていない特性に影響を与えうるそれらの中立変異を除去するが、選択された特性は除去しない。

10

【0532】

本発明の別の例として、第一ラウンドの間、特異的核酸配列の亜集団を、宿主細胞への導入前にそのPCR増幅を遅く又は停止させることにより、小さなポリヌクレオチドとして作製することができる。他の配列と相同組換えを起こすように、ポリヌクレオチドの大きさは、他のいくつかの配列と同一である領域を含む程度に大きくなくてはならない。ポリヌクレオチドの大きさは0.03~100 kbの範囲であり、より好ましくは0.2~10 kbの範囲であると考えられる。引き続きラウンドにおいて、以前のラウンドから選択された配列以外の全ての特異的核酸配列は、宿主細胞への導入前にそのPCRポリヌクレオチドを作製するために使用されてもよい。

20

【0533】

より短いポリヌクレオチド配列は、一本鎖又は二本鎖であることができる。核酸の鎖を分離するために適した反応条件は既によく知られている。本過程の段階を無限に繰り返すことができ、達成可能なありうるハイブリッドの数によってのみ制限されている。従って、変異型鋳型核酸配列の初期のプール又は集団は、大腸菌等の微生物中で複製可能なベクターにクローン化される。大腸菌で自律的複製が可能である限りは特定のベクターは必要ではない。ある具体例として、ベクターは、ベクターに連結された変異型特異的核酸配列によりコードされるタンパク質の発現及び作製を可能にするように設計されている。ベクターが選択標識をコードする遺伝子を含むこともまた好ましい。

30

【0534】

変異型核酸配列のプールを含むベクター集団が大腸菌宿主細胞に導入される。ベクター核酸配列は、トランスフォーメーション、トランスフェクション、又はファージの場合には感染により導入されてもよい。微生物をトランスフォームするために用いられるベクターの濃度は、多数のベクターが各細胞に導入される程度のものである。細胞の中に存在する場合、相同組換えの効率は、相同組換えが様々なベクター間で起こる程度のものである。これは、本来の親変異型配列と異なる変異の組み合わせを有する(娘)ハイブリッドの作製につながる。その後、宿主細胞は、クローン状態で複製され、ベクターに存在する標識遺伝子により選択される。プラスミドを有するそれらの細胞のみが選択下で増殖すると考えられる。ベクターを含む宿主細胞は、続いて好ましい変異が存在するかを試験される。

40

【0535】

一旦、目的の特性を与えるある特定の娘変異型核酸配列が同定されると、その核酸は、既にベクターに結合された核酸配列又はベクターから分離された核酸配列として単離される。この核酸は、それから最初の集団あるいは親核酸集団とシャッフリングされ、サイクルが繰り返される。

【0536】

変異型特異的核酸の親集団は、ポリヌクレオチド又は同一のベクターにクローニングさ

50

れた形で、既に娘核酸を含んでいる宿主細胞に導入される。細胞内で組換えが生じることは可能であり、次世代の組換え体、即ち、孫娘が上述された方法により選択される。このサイクルは、目的とする特性を有する核酸又はペプチドが得られるまで多数回にわたり繰り返すことが可能である。引き続くサイクルでは、好ましいハイブリッドに添加される変異型配列の集団は、親ハイブリッド又は他のどの様な引き続く世代に由来してもよい。

**【0537】**

別の例として、本発明は、いかなる中立変異も除去するために、得られた組換え特異的核酸の「分子」戻し交配を実施する方法を提供する。中立変異は、核酸又はペプチドに目的とする特性を付与しない変異である。しかしながら、そのような変異は、核酸又はペプチドに望ましくない特性を与えてもよい。従って、そのような中立変異を除去することが望ましい。本発明の方法はそれを実施する方法を提供する。

10

**【0538】**

この観点において、目的とする特性を有するハイブリッド核酸がその具体的な方法で得られた後、核酸、その核酸を有するベクター、又はそのベクターと核酸を含む宿主細胞が単離される。

**【0539】**

核酸又はベクターは、それから大過剰の野生型核酸とともに宿主細胞に導入される。ハイブリッドの核酸及び野生型配列の核酸は、組換えを行うことが可能である。結果として生じる組換え体は、ハイブリッド核酸と同じ選択下に置かれる。目的とする特性を保持した組換え体のみが選択されるであろう。目的とする特性を与えないいかなるサイレント変異も野生型DNAとの組換えを通して失われるであろう。このサイクルは全てのサイレント変異が除去されるまで多数回繰り返すことができる。

20

**【0540】**

他の例において、本発明は、子孫ポリヌクレオチドを作るために(例えば、ポリペプチド又は遺伝子経路を発現できる子孫ポリヌクレオチド キメラ)、シャッフリング、集合、再集合、組換え、及び/又は少なくとも二種のポリヌクレオチドを直鎖状に連結するための方法を提供する。特別な具体例として、二本鎖ポリヌクレオチド(例えば、ハイブリダイゼーションの相手方としてお互いにハイブリダイズする二本の一本鎖配列)がエキソヌクレアーゼにより処理され、その二本の鎖の一方からヌクレオチドを遊離し、望ましいならば、残っている鎖が他の相手とハイブリダイズすることができるように残っている鎖を最初の相手から分ける。

30

**【0541】**

特別な例として、二本鎖ポリヌクレオチド末端(ポリヌクレオチドあるいは非ポリヌクレオチド配列の一部であるか又はそれに結合しているかのしれない)がエキソヌクレアーゼの処理を受ける。3'エキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素、5'エキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素、3'エキソヌクレアーゼ活性と5'エキソヌクレアーゼ活性の両方を持つ酵素、及びそれらの組み合わせが本発明において使用される。エキソヌクレアーゼは、直鎖状の二本鎖ポリヌクレオチドの一方あるいは両方から、及び二つ以上の末端を持つ分枝ポリヌクレオチドの一つあるいは全部の末端からヌクレオチドを遊離させるために使用することができる。

40

**【0542】**

対照的に、ポリヌクレオチドのビルディング ブロックをシャッフリング、集合、再集合、組換え、及び/又は直鎖状に連結させるために、被検サンプルを変性(又は「融解」)させたり、二本鎖ポリヌクレオチドが一本鎖ポリヌクレオチドに融解するような(例えば、温度、pH、及び/又は塩濃度条件を変えることにより)条件から成る非酵素的ステップを使用してもよい。一本鎖ポリヌクレオチドは、異なるハイブリダイゼーションの相手とのアニーリングにある程度関与することが望ましい(即ち、かつ変性ステップ前の相手との独占的再アニーリングに帰するだけでなく)。しかしながら、本来の二本鎖ポリヌクレオチドの再形成のために、反応器の中に存在する以前のハイブリダイゼーション相手の存在は、一本鎖ポリヌクレオチドが以前の相手と再アニーリングすることを妨害せず、時には

50

促進しうる。

【0543】

二本鎖ポリヌクレオチドビルディングブロックの変性、それに引き続くアニーリングから成るこの非酵素的シャッフリングステップとは対照的に、本発明は、変性を必要としないエキソヌクラーゼに基づくアプローチをも提供する - むしろ、アニーリング(即ち、非変性)状態における変性条件の回避及び二本鎖ポリヌクレオチド基質の維持が、エキソヌクラーゼ(例えば、エキソヌクラーゼIII及びレド 遺伝子産物)の作用に必要な条件である。更に対照的に、他の一本鎖ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能な一本鎖ポリヌクレオチド配列の生成は、ハイブリダイゼーション相手の一方における共有結合開裂、及びそれ故の配列破壊の結果である。例えば、エキソヌクラーゼIII酵素は(ポリヌクレオチド鎖の共有結合加水分解を達成するために)一つのハイブリダイゼーション鎖における3'末端ヌクレオチドの酵素的遊離に用いられうる。これは、残りの一本鎖が新しい相手にハイブリダイゼーションするために有利である(その以前の相手は共有結合開裂に供されているため)。

10

【0544】

特に開示された本アプローチについて、より至適な反応速度及び/又はより高い比活性を有し、及び/又は望ましくない活性をより多く欠失させた酵素が同定され、至適化され(例えば、指向進化により操作され)、又は同定及び至適化されることができると理解される。事実、本発明は、このような修飾酵素の発見及び/又は開発を促進しうると期待される。

20

【0545】

更に、二本鎖ポリヌクレオチド末端を保護し、必要に応じて利用可能なエキソヌクラーゼの望まれる酵素作用に対して感受性にできることがわかる。例えば、3'突出を有する二本鎖ポリヌクレオチド末端は、エキソヌクラーゼIIIのエキソヌクラーゼ作用に感受性ではない。しかしながら、以下の様々な方法により、エキソヌクラーゼIIIのエキソヌクラーゼ作用に対して感受性にされうる。例えば、それは、ポリメラーゼ処理による平滑化、平滑末端又は5'突出を作製するための切断、平滑末端又は5'突出を作製するための別の二本鎖ポリヌクレオチドとの連結(ライゲーション又はハイブリダイゼーション)、平滑末端又は5'突出を作製するための一本鎖ポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションを可能にし、任意の種々の方法によっても修飾できる。

30

【0546】

ある例において、エキソヌクラーゼは、直鎖状二本鎖ポリヌクレオチドの一方又は両方の末端に作用し、完了点、ほぼ完了点、又は部分的な完了点まで進行する。エキソヌクラーゼ作用が完了点まで進むことができる場合、「会合点」(ポリヌクレオチドの中間点付近のどこかでありうる)と考えられる方向へポリヌクレオチドの中間領域に沿って各5'突出端が伸長すると考えられる。最終的には、本来の二本鎖ポリヌクレオチドの各々約半分の長さの(解離されうる)一本鎖ポリヌクレオチドの作製が生成される。

【0547】

従って、本エキソヌクラーゼ媒介アプローチは、ポリヌクレオチドビルディングブロックのシャッフリング、集合及び/又は再集合、組換えならびにライゲーションのために利用可能であり、ポリヌクレオチドビルディングブロックは、10塩基又は数十塩基長、又は数百塩基長、又は数千塩基長、又は数万塩基長、又は数十万塩基長、又は数百万塩基長、又はそれ以上であってもよい。

40

【0548】

エキソヌクラーゼの基質は、二本鎖ポリヌクレオチドを断片化させることにより作製できる。断片化は、機械的手段(例えば、剪断、超音波処理等)、(例えば、制限酵素を用いた)酵素的な手段、及びそれらの任意の組み合わせによってすることができる。より大きなポリヌクレオチド断片は、また、ポリメラーゼを媒介とした合成によっても作製されうる。

【0549】

50

エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の別の例は、レッド及び毒液ホスホジエステラーゼを含む。レッド(レッド遺伝子産物(エキソヌクレアーゼとも呼ばれる))は、バクテリオファージのである。レッド遺伝子産物は、5'リン酸化末端に作用し、二本鎖DNAからモノヌクレオチドを遊離させる(Takahashi及びKobayashi, 1990)。毒液ホスホジエステラーゼ(Laskowski, 1980)は、速かにスーパーコイルDNAを開口することができる。

#### 【0550】

従って、一例として、本発明は、デザインにより選択された全集合の並びを有する最終的なキメラ核酸分子の集団を作製する非確率的方法を提供し、それは、デザインにより互いに利用可能な互換的結合末端を有する多数の特定の核酸ビルディングブロックを作製するステップから成り、デザインされた全集合の並びが達成されるようにこれらの核酸ビルディングブロックを集合させる。

10

#### 【0551】

集合される核酸ビルディングブロックの互換的な結合末端は、ビルディングブロックを予め決定された順序で結合させることができるなら、この型の定められた集合のために「利用可能」と考えられる。従って、一例として、核酸ビルディングブロックが結合されうる全集合の並びは、結合可能末端のデザインにより特定され、複数の集合ステップが必要とされるならば、ビルディングブロックが結合されうる全集合の並びは、集合ステップの連続的な順序によっても特定される。本発明の具体例として、アニールしたビルディングブロックは、それらの構築部分の共有結合を達成するために、リガーゼ(例えば、T4DNAリガーゼ)のような酵素で処理される。

20

#### 【0552】

他の例として、核酸ビルディングブロックのデザインは、最終的なキメラ核酸分子の子孫集団を作製する基礎として働く祖先核酸鋳型集団の配列解析において得られる。従って、これらの祖先核酸鋳型は、変異誘発、即ち、キメラ化又はシャッフリングされるビルディングブロックのデザインを助ける配列情報の供給源として働く。

#### 【0553】

一具体例として、本発明は、関連遺伝子ファミリー及びそれらがコードする関連産物ファミリーのキメラ化を提供する。ある特定の例示として、そのコードされた産物とは酵素である。これらの具体例は、本発明のある特定の局面の説明はするが、開示された本発明の限定又はそのスコープの制限を描写するものではない。

30

#### 【0554】

従って、本発明の一例によると、本発明の方法を利用して同定された多数の祖先核酸鋳型配列は、境界点を選択するために整列化され、それにより、境界点は、相同的領域に位置されることができる。その境界点は、作製される核酸ビルディングブロック境界を示すために使用することができる。従って、祖先分子内で同定及び選択された境界点は、子孫分子の集合における潜在的なキメラ化点として働く。

#### 【0555】

典型的には、境界点は、少なくとも二つの祖先鋳型により共有された(少なくとも一つの相同核酸塩基から成る)相同的領域であるが、境界点は、少なくとも半分、少なくとも3分の2、少なくとも4分の3、更に、好ましくは、殆ど全ての祖先鋳型により共有された相同的領域である。なお一層より好ましくは、境界点は、全ての祖先鋳型により共有された相同的領域である。

40

#### 【0556】

他の例として、結合再集合過程は、徹底的なライブラリーを作製するために徹底的に実施される。換言すると、核酸ビルディングブロックの全ての可能な順序の組み合わせが、最終キメラ核酸分子の集団中に示される。同時に、各組み合わせにおける集合順序(即ち、各最終キメラ核酸の5'から3'配列における各ビルディングブロックの集合順序)はデザインによる(又は非確率的)。本発明の非確率的性質のために、望ましくない副産物の可能性は大きく減少する。

50

## 【0557】

更に別の例において、例えば、体系的に区分されたライブラリーを作製するために、本発明は、体系的にスクリーニングされうる区分、例えば、一つずつ、を用いたライゲーション再集合過程の体系的な実施を提供する。換言すると、本発明は、連続的な段階化集合反応の選択的かつ適切な使用を組み合わせた特定の核酸ビルディングブロックの選択的かつ適切な使用を通し、子孫産物の特定の集団が数個の反応容器各々の中で作製される実験デザインを提供する。これは、体系的な実験及びスクリーニング方法の実施を可能にする。従って、潜在的に非常に多数の子孫分子がより少ない群で体系的に試験されることを可能にする。

## 【0558】

非常に柔軟でかつ同時に徹底的及び体系的な方法でキメラ化を実施する能力があるので、特に、祖先分子間の相同性が低い場合、本発明は、多数の子孫分子から成るライブラリー(又は集合)の作製を提供する。特別な具体例において、そのように作製されたライブラリーは、 $10^3 \sim 10^{1000}$ 超の異なる子孫分子種から成る。

10

## 【0559】

一例として、記載されたように作製された最終的なキメラ核酸分子の集団は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから成る。ある具体例として、このポリヌクレオチドは、遺伝子であり、人工遺伝子であってもよい。別の具体例として、このポリヌクレオチドは、遺伝子経路であり、人工遺伝子経路でもよい。本発明は、本発明により作製された一つ以上の人工遺伝子が真核生物(植物を含む)内で動作可能な経路のような人工遺伝子経路に組み込まれうる条件を設定する。

20

## 【0560】

別の具体例において、ビルディングブロックが作製される段階における合成特性は、後にインビトロ プロセス(例えば、変異誘発による)又はインビボ プロセス(例えば、宿主生物の遺伝子スプライシング能を利用することによる)によって任意に除去されうるヌクレオチド(例えば、コドンもしくはイントロン又は調節配列であってもよい、一つ以上のヌクレオチド)のデザイン及び導入を可能にする。境界点を作製するという潜在的な恩典に加えた他の多くの理由により、これらの核酸の導入も多くの場合に望ましくありうるものと理解される。

## 【0561】

従って、別の具体例において、本発明は、核酸ビルディングブロックがイントロンを導入するために使用されうる条件を提供する。従って、本発明は、機能的イントロンが本発明の人工遺伝子に導入されうる条件を提供する。本発明は、機能的イントロンが本発明の人工遺伝子経路に導入されうる条件も提供する。従って、本発明は人工的に導入されたイントロンを含む人工遺伝子であるキメラ ポリヌクレオチドの作製条件を提供する。

30

## 【0562】

従って、本発明は、又、一つ(又はそれ以上)の人工的に導入されたイントロンを含む人工遺伝子経路であるキメラポリヌクレオチドの作製条件も提供する。好ましくは、天然のイントロンが遺伝子スプライシングにおいて機能的に働くのとほぼ同様に、人工的に導入されたイントロンが一つ以上の宿主細胞において遺伝子スプライシングに関して機能的である。本発明は、組換え及び/又はスプライシングのために宿主生物に導入されるべき人工イントロン含有ポリヌクレオチドを作製するプロセスを提供する。

40

## 【0563】

本発明を利用して作製された人工遺伝子は、又、他の核酸との組換えのための基質としても働くことができる。同様に、本発明を利用して作製された人工遺伝子経路もまた他の核酸との組換えのための基質としても働くことができる。好ましい例では、人工イントロン含有遺伝子及び組換え相手として働く核酸との間の相同的領域により組換えが促進され、又は、そこで組換えが起こる。特に好ましい例では、組換え相手は、人工遺伝子又は人工遺伝子経路を含む、本発明により作製された核酸であってもよい。人工遺伝子に人為的に導入された一つ(又はそれ以上)のイントロンに存在する相同的領域により組換えが促進

50

されてもよく、そこで組換えが起こってもよい。

【0564】

本発明の合成ライゲーション再集合法は、多数のビルディングブロックを利用し、その各々は、好ましくは、二つのライゲーション可能末端を持つ。各核酸ビルディングブロック上の二つの結合可能末端は、二つの平滑末端(即ち、各々が0個の核酸の突出を持つ)又は、好ましくは、一つの平滑末端及び一つの突出、より好ましくは、二つの突出であってもよい。

【0565】

この目的のための突出は、3'突出又は5'突出であってもよい。従って、核酸ビルディングブロックは、一つの3'突出もしくは代替的な一つの5'突出、もしくは代替的に二つの3'突出を有するか、あるいは別に二つの5'突出を有してもよい。核酸ビルディングブロックが最終キメラ核酸分子を形成するために集合される全体の順序は、意図的な実験的デザインにより決定されているために無作為ではない。

10

【0566】

一例によると、核酸ビルディングブロックは、二種の一本鎖核酸の化学合成(一本鎖オリゴとも呼ばれる)及びそれらを二本鎖核酸ビルディングブロックが形成するようにそれらをアニールさせることにより作製される。

【0567】

二本鎖核酸ビルディングブロックは、様々な大きさであることができる。これらビルディングブロックの大きさは、実験者の選択により小さくても大きくてもよい。好ましいビルディングブロックの大きさは、1塩基対(突出は全く含まない)から100,000塩基対(突出は全く含まない)の範囲内である。又、他の好ましい大きさの範囲は、1塩基対から10,000塩基対の下限(その間の全整数を含む)及び2塩基対から100,000塩基対の上限(その間の全整数を含む)を有するものである。

20

【0568】

二本鎖核酸ビルディングブロックが作製されうる本発明で利用可能な他の多くの方法が存在する。それらは、既によく知られた技術であり、熟練した研究者によって容易に実施されうる。

【0569】

一例として、二本鎖核酸ビルディングブロックは、最初に二本の一本鎖核酸を作製し、それらをアニリングさせて二本鎖核酸構築ブロックを形成させることにより作製される。二本鎖核酸ビルディングブロックの二本の鎖は、突出を形成する任意のヌクレオチド以外の全てのヌクレオチドにおいて相補的であってもよい;従って、突出以外にはミスマッチを含まない。別の例として、二本鎖核酸ビルディングブロックの二本鎖は、突出を形成する任意のヌクレオチド以外の全ヌクレオチドより少ない数において相補的である。従って、この例において、二本鎖核酸ビルディングブロックは、コドン縮重を導入するために使用することができる。好ましくは、一つ以上のN、N、G/Tカセットあるいは代替的な一つ以上のN、N、Nカセットを用いた。この中で開示された部位飽和性変異誘発法を用いてコドン縮重が導入される。

30

【0570】

本発明のインビボ組換えは、特定のポリヌクレオチドあるいは配列に関する未知のハイブリッド又は対立遺伝子のプールにおいて盲目的に行うことができる。しかしながら、特定のポリヌクレオチドの実際のDNA又はRNA配列を知る必要はない。

40

【0571】

遺伝子の混合集団の中での組換えを利用したアプローチは、どのような有用タンパク質、例えば、インターロイキンI、抗体、tPA及び成長ホルモンの作製にも有用でありうる。このアプローチは、変化した特異性又は活性を持つタンパク質の作製に利用してもよい。アプローチは、ハイブリッド核酸配列、例えば、遺伝子のプロモーター領域、イントロン、エキソン、エンハンサー配列、3'非翻訳領域、又は5'非翻訳領域の作製に有用でもありうる。従って、このアプローチは、発現率が増大した遺伝子の作製に使われうる。このア

50

アプローチは、また、繰り返しDNA配列の研究においても有用でありうる。最後に、このアプローチは、リボザイム又はアプタマーを変異させるためにも有用でありうる。

#### 【0572】

本発明は、ポリヌクレオチドの出発集団からポリヌクレオチドのサブセットを選択する方法を提供し、それは、それぞれの選択可能なポリヌクレオチドとしての選択(陽性選択)及び/又はそれぞれの選択可能なポリヌクレオチドに対する選択(陰性選択)を行うことが可能になるように、被検中のポリヌクレオチドのどこかに存在している一つ以上の選択可能な特徴(又は、選択マーカー)を識別できる能力に基づいている。一例として、末端選択法と呼ばれる方法が提供され、その方法は、選択可能なポリヌクレオチドの末端領域に部分的あるいは全体に存在した選択マーカーを利用することに基づいており、そのような選択マーカーは、「末端選択マーカー」と命名することができる。

10

#### 【0573】

末端選択法は、たとえ同じポリヌクレオチドを持った配列でも、天然に存在する配列中もしくは実験的に導入された配列(この中に述べられているどのような突然変異誘導法及びこの中に記載されていない突然変異誘導法をも含む)あるいはその両方の検出に基づいていてもよい。末端選択マーカーは、構造的な選択マーカー、又は機能的選択マーカー、あるいは構造的及び機能的な両選択マーカーであってもよい。末端選択マーカーは、ポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列、あるいは何らかの化学的構造、また放射活性、酵素活性、蛍光、何らかの光学的特徴、磁氣的性質(例えば、磁気ビーズを用いる)、免疫応答性、及びハイブリダイゼーションの検出に基づく方法を用いて選択されうるマーカー等の何らかの生物学的もしくは生化学的標識が含まれる。

20

#### 【0574】

末端選択法は、突然変異誘発を起こすのに役立つどのような方法と組み合わせても適用することができる。そのような突然変異誘発法には、限定するわけではないが、ここに記載された(上記及び下記)方法が含まれる。そのような方法には、限定的でない例示の様式でここに記載されている方法、又は次の用語のどれかによる技術方法が含まれる。「飽和突然変異誘発」、「シャッフリング」、「組換え」、「再集合法」、「エラープロードPCR」、「アセンブリPCR」、「セクシュアルPCR」、「クロスオーバーPCR」、「オリゴヌクレオチドプライマー誘導性突然変異誘発」、「再帰的(及び/又は指数関数的)エンゼンブル突然変異誘発(Arkin及びYouvan、1992参照)」、「カセット突然変異誘発」、「インピボ突然変異誘発」、及び「インピトロ突然変異誘発」である。更に、末端選択法は、何らかの突然変異誘発及び/又は増幅法によって作製した分子で行うとよい(例えば、Arnold、1993、Caldwell及びJoyce、1992、Stemmer、1994参照、その方法の後で、望ましい子孫分子を選択する(存在についてのスクリーニングを含む)ことが望ましい。

30

#### 【0575】

末端選択法は、更に、突然変異誘発法とは別のポリヌクレオチドに対して適用してもよい。一例として、ここに記載したような末端選択法は、例えば、別のポリヌクレオチドにライゲーションする(ベクターへのライゲーションを含む)ステップのような、クローニングステップを容易化するために使用することができる。従って、本発明は、一般に、望ましいポリヌクレオチド及びライブラリーの構築、選択及び/又は強化を容易にするための手段としての末端選択法を提供する。

40

#### 【0576】

他の例として、末端選択法はポリヌクレオチドのための(ポジティブ)選択に基づき；別法としてポリヌクレオチドのための(ネガティブ)選択に基づき；更なる別法として、ポリヌクレオチドのための(ポジティブ)選択及び(ネガティブ)選択の両方に基づくことができる。末端選択法は、他の選択及び/又はスクリーニング法と平行して、類似あるいは類似していない選択及び/又はスクリーニング法と変異誘発法あるいは指向変異法とのどのような組み合わせにおいても反復的に実行することができ、その全ては、反復方式で、どのような順番でも組み合わせあるいは入れ替えてをもつて行うことができる。末端選択法は、又、少なくとも部分的に環状(例えば、プラスミドもしくは何らかの他の環状ベクタ

50

一、又は部分的に環状である他のポリヌクレオチド)、及び/又は分枝状、及び/又は何らかの化学的置換基もしくは一部分で修飾あるいは置換されているポリヌクレオチドを選択するために利用できる点も高く評価される。

【0577】

ある非限定的な例として、直鎖状ポリヌクレオチドのための末端選択法は、ポリヌクレオチド末端、即ち、末端部(5'末端又は3'末端のいずれであってもよい)又はその近くに存在する少なくとも一つの末端選択マーカに基づいた一般的なアプローチを利用して行われる。ある特別な非限定的な例として、末端選択法は、末端あるいはその近くにある特定の配列、例えば、限定ではないが、ポリヌクレオチド配列を認識する酵素によって認識される配列に対する選択に基づいている。ポリヌクレオチドの化学的修飾を認識かつ触媒する酵素は、この中でポリヌクレオチド作用性酵素といわれている。好ましい具体例として、ポリヌクレオチド作用性酵素は、ポリヌクレオチドを開裂する活性を、ポリヌクレオチドをメチル化する活性、ポリヌクレオチドをライゲーションする活性、及び複数の識別可能な酵素活性を持つ酵素(非例外的に、例えば、ポリヌクレオチドを開裂する活性とポリヌクレオチドをライゲーションする活性の両方を含む)によって非例外的に例示される。

10

【0578】

価値のあるポリヌクレオチド作用性酵素には、熟練した研究者により同定可能(例えば、商業的に入手可能)、あるいは現在は入手できないが将来的に開発されるであろう酵素、即ち、ポリヌクレオチドのライゲーションに互換性のある末端、好ましくは、付着末端を生じる酵素も含まれるものと理解される。末端選択法にかけられるポリヌクレオチドの内部に含まれないか、あるいは含まれることが期待されないか、又は含まれる見込みがないような(例えば、被検作用しているポリヌクレオチドに関する配列情報が不完全である場合)制限酵素部位を使用することが好ましいかもしれない。望ましくない内部制限酵素部位を除去するために手段(例えば、突然変異誘発法)が施せることも認識される。また、ポリヌクレオチドの内部に存在したり、同じ酵素によって認識されたりする感受性の高い制限酵素部位に対して反応せず、部分消化反応(即ち、部分的に起こる消化反応)は、末端領域にある認識部位の消化を達成するために利用できるものと理解される。一例として、認識配列が存在する位置及び環境に応じてある酵素が同じ認識配列の選択的な解裂を示す酵素があることから、部分消化反応は有用である。

20

30

【0579】

酵素は、特定の制限酵素部位の存在に依存して被検ポリペプチドを切断してしまうが、保護方法を用いることで、その酵素による望ましくない消化に対して特定の制限酵素部位(例えば、内部部位)を保護できるものと理解される;そのような保護方法には、望ましくない酵素活性を阻害するメチル化や塩基の置換(例えば、Tに代わってU)といった修飾法が含まれる。

【0580】

本発明の別の例として、末端選択マーカは、特異的なポリヌクレオチド配列を認識するポリヌクレオチド作用性酵素によって認識される末端配列である。本発明の一例として、有用なポリヌクレオチド作用性酵素には、従来よりあるタイプII制限酵素に加えて他の酵素も含まれる。本発明のこの好ましい例として、有用なポリヌクレオチド作用性酵素には、ジャイレース、ヘリカーゼ、リコンビナーゼ、リラキサーゼ、及びそれらに関連するどのような酵素も含まれる。

40

【0581】

末端選択法は、親の鋳型分子(例えば、突然変異誘発を起こさせるため)を子孫の分子(例えば、突然変異誘発によって生じた)と区別し、かつ、分離するために用いることができるものと理解される。例えば、トポイソメラーゼI認識部位を欠いているプライマーの第一セットは、親分子の末端領域を修飾するために用いることができる(例えば、ポリメラーゼに基づく増幅で)。異なる第二のプライマーセット(例えば、トポイソメラーゼI認識部位を持つ)は、その場合、増幅された鋳型分子由来の変異した子孫分子の末端領域

50

を作製するために用いることができる(例えば、中途合成法、鋳型スイッチングポリメラーゼに基づく増幅法、もしくは切断合成法のようなポリヌクレオチドキメラ形成法を用いて;又は飽和突然変異誘発法を用いて;又はトポイソメラーゼIの認識部位を変異子孫分子に導入するためのどのような方法を利用して)。従って、トポイソメラーゼIに基づく末端選択法を用いることは、識別を容易化するだけでなく、望ましい子孫分子の選択的トポイソメラーゼIに基づくライゲーション反応を容易にできる。

#### 【0582】

トポイソメラーゼに基づくニック形成及びライゲーションを利用している末端選択アプローチは、以前に適用可能な選択方法を越えるいくつかの利点を持つことができる。換言すると、このアプローチは、指示クローニング(発現クローニングを含む)を可能にしている。

10

#### 【0583】

本方法は、開示されたどのような方法によるインビトロ及び/又はインビボでの組換え、及びペプチドディスプレイ法によって選択されたポリヌクレオチド配列のような組み合わせによるシャッフリングのために使うことができる。その中の関連ポリヌクレオチドとは、ある表現型のためにスクリーンされた提示されたペプチドをコードしている(例えば、予め決定されている受容体(リガンド)に対する親和性に関して)。

#### 【0584】

生物医薬の開発や分子生物学で増大する重要な展望は、ペプチド、又は生物学的マクロ分子と相互作用するペプチド、あるいはペプチド模倣物の一次アミノ酸配列を含む構造の同定である。予め決定されている生物学的マクロ分子(例えば、受容体)への結合のように、望ましい構造又は機能的特性を持ったペプチドを同定する一つの方法は、ペプチドのアミノ酸配列によって与えられた望ましい構造又は機能的特性を持つ個々のライブラリーのメンバーのために大きなライブラリー又はペプチドをスクリーニングすることを含む。

20

#### 【0585】

ペプチドライブラリーを作製するための直接的な化学合成法に加えて、いくつかの組換えDNA法も報告されている。一つの型はバクテリオファージ粒子又は細胞の表面にペプチド配列、抗体、又は他のタンパク質を提示することを含んでいる。一般的にこれらの方法において、それぞれのバクテリオファージ粒子又は細胞は、天然のバクテリオファージ粒子又は細胞タンパク質の配列に加えて提示されたペプチドの単一の種類を提示する個々のライブラリーのメンバーとして働く。各バクテリオファージ粒子、又は細胞は、特定の提示されたペプチド配列をコードするヌクレオチド配列情報を含んでいる;従って、提示されたペプチド配列は、単離されたライブラリーのメンバーのヌクレオチド配列の決定によって確認することができる。

30

#### 【0586】

既によく知られているペプチドディスプレイ法には、典型的にはバクテリオファージのコートタンパク質との融合体として、糸状バクテリオファージの表面にペプチド配列を表示することが含まれる。バクテリオファージライブラリーは、固定化された予め決定された巨大分子又は小分子(例えば、受容体)とインキュベートされることができ、それによって、固定化された巨大分子と結合するペプチド配列を表示しているバクテリオファージ粒子は、予め決定された巨大分子と結合するペプチド配列を表示していない粒子から分離することができる。固定化された巨大分子に結合したそのバクテリオファージ粒子(即ち、ライブラリーのメンバー)回収及び複製し、それに引き続く親和性の増強及びファージ複製のラウンドのために選択されたバクテリオファージの亜集団を増幅する。数回の親和性の増強及びファージ複製の後、そのバクテリオファージライブラリーのメンバーを単離し、提示されたペプチド配列をコードしているヌクレオチド配列を決定する。それにより、予め決定された巨大分子(例えば、受容体)と結合するペプチドの配列を同定する。このような方法は、PCT特許公報WO 91/17271、WO 91/18980、WO 91/19818及びWO 93/08278に更に詳しく記載されている。

40

#### 【0587】

50

本発明は、又、無作為配列、偽無作為な配列、及び定義された配列のフレームワークペプチドライブラリー及びそれらのライブラリーの作製やスクリーニングの方法等、受容体分子又は関心対象のエピトープ又はペプチド又はRNAを修飾する遺伝子産物に結合する有用な組成物(例えば、一本鎖抗体を含むペプチド)を好ましい形態で同定するための方法を提供する。無作為配列、偽無作為な配列、及び限定配列のフレームワークペプチドは、表示ペプチドあるいは表示されるペプチドを合成するポリヌクレオチド鋳型に接着する表示一本鎖抗体から成るペプチドライブラリーメンバーのライブラリーから作製される。接着の様式は、選択される本発明の特定の具体例に従って変えてもよく、ファージ粒子への封入又は細胞への組み込みを含むことができる。

**【0588】**

10

本発明の重要な利点は、予想されるリガンド構造に関する情報が、関心対象のペプチド性リガンド又はペプチド性抗体を単離するために、予め必要とされないことである。同定されるペプチドは、生物活性を持つことができ、その活性とは、少なくとも選択される受容体分子に対する特異的な結合親和性を含むことを意味し、いくつかの例においては、代謝経路を刺激又は阻害したり、シグナル又はメッセンジャーとして作用したり、細胞活性を刺激又は阻害する他の化合物との結合をブロックする能力をも含む。

**【0589】**

本発明は、予め決定された受容体(例えば、ペプチドホルモン受容体、細胞表層受容体、他のタンパク質と結合してヘテロ二量体及びその類等の細胞内タンパク質複合体を形成する細胞内タンパク質のような高等動物のタンパク質受容体)やエピトープ(例えば、固定化タンパク質、糖タンパク質、オリゴ糖及びその類)に結合するライブラリーメンバーのために、本発明の方法によって同定したポリヌクレオチド及び新生ペプチド(一本鎖抗体を含む)を表示しているポリソームのライブラリーのアフィニティースクリーニングにより選別したポリヌクレオチドの集団をシャッフルする方法を提供する。

20

**【0590】**

これらのどのような方法による最初の選抜ラウンド(典型的には、受容体への結合の親和性選抜による(例えば、リガンド))で選択されるポリヌクレオチド配列が集められ、そのプールは、選抜されたポリヌクレオチド組換え体の集団から成るシャッフリングされたプールを作製するために、インビトロ組換え及び/又はインビボ組換えによってシャッフリングされる。選抜されたポリヌクレオチド組換え体は、その後少なくとも一回選抜される。その後の選抜ラウンドで選抜されたポリヌクレオチド配列は、直接使用でき、配列決定でき、及び/又は一回以上の追加シャッフリング及びその後の選抜ができる。選択された配列は、例えば、天然型様の機能的ペプチドを産成する選択される配列と実質的に同一の野生型又は天然に存在する配列と戻し交配することにより、より免疫原であるかもしれない中間的な配列(例えば、結合に関する非実質的な機能的を持つ)をコードするポリヌクレオチド配列と戻し交配されることができる。一般的には、戻し交配の際に、その後の選抜は、予め決定された受容体(リガンド)に結合する性質を保持するように適用される。

30

**【0591】**

選択された配列のシャッフリング前あるいはシャッフリング時に、配列は、変異誘発されることができる。一具体例として、選択ライブラリーメンバーは、原核生物ベクター(例えば、プラスミド、ファージミド、又はバクテリオファージ)へクローニングされ、その中に分離したライブラリーメンバーを表す個々のコロニー(又はプラーク)のコレクションが作製される。個々の選抜ライブラリーメンバーを、選抜されたライブラリーメンバーの配列に基づいた配列多様性のカーナルを示すライブラリーメンバーのコレクションを作製するためにその後、変異させることができる(例えば、部位特異的変異誘発法、カセット変異誘発法、化学的変異誘発法、PCR変異誘発法及びその類によって)個々の選択されたライブラリーメンバー又は集団の配列は、無作為変異、偽無作為な変異、限定カーナル変異(即ち、可変残基部位と不変残基部位、及び/又はアミノ酸残基の限定された部分集合から選択される残基を含むことができる可変残基部位から成る)、コドンに基づいた変異及びその類を個々の選択されるライブラリーメンバー配列の部分的又は全長にわたって組み

40

50

込むように細工されることができる。変異された選択ライブラリーメンバーは、その後、ここに開示されたインビトロ及び/又はインビボ組換えシャッフリングによってシャッフリングされる。

【実施例】

【0592】

例1 DNAの単離

DNAは、製造業者の指針に従って、IsoQuickを用いて単離する(Orca Research Inc., Bothell, WA)。単離したDNAは、任意に例2(以下)に従って標準化できる。単離と同時に、そのDNAは、25-ゲージの二頭針及び1-ccのシリンジで500回押引することによって剪断する。少量を0.8%のアガロースゲルにかけ、そのDNAの大部分が望ましいサイズの範囲にあることを確認する。

10

【0593】

平滑端DNA: そのDNAを、45  $\mu$ lの10 Xマング豆緩衝液、2.0  $\mu$ lマング豆ヌクレアーゼ(1050 u/ $\mu$ l)及び水で最終量405  $\mu$ lとした混合液中で平滑化する。混合液は、37  $^{\circ}$ Cで15分間反応させる。混合液は、フェノール; クロロホルム抽出、それに次ぐ更なるクロロホルム抽出を行う。1 mlの氷冷エタノールを最終抽出物に加えてDNAを沈殿させる。そのDNAは、30分間の遠心分離により沈殿させる。ペレットは、1 mlの70%エタノールで洗浄の後、再度、遠心分離によって沈殿させる。遠心分離に次ぎ、そのDNAを乾燥し、26  $\mu$ lのTE緩衝液に穏やかに再懸濁させる。

【0594】

DNAのメチル化: DNAは、4  $\mu$ lの10X EcoRIメチラーゼ緩衝液、0.5  $\mu$ lのSAM(32 mM)、5.0  $\mu$ lのEcoRIメチラーゼ(40 u/ $\mu$ l)と混合し、37  $^{\circ}$ Cで1時間反応させてメチル化する。平滑末端を確実にするために、次のものをメチル化反応に加える: 5.0  $\mu$ lの100 mM MgCl<sub>2</sub>、8.0  $\mu$ lのdNTP混合液(2.5 mMの各dGTP、dATP、dTTP、dCTP)、4.0  $\mu$ lのクレノー(5 u/ $\mu$ l)。その混合液を、更に、12  $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。

20

【0595】

30分間の反応後、450  $\mu$ lの1 X STEを加える。混合液は、フェノール; クロロホルム抽出、それに次ぐ更なるクロロホルム抽出を行う。1 mlの氷冷エタノールを最終抽出物に加えてDNAを沈殿させる。そのDNAは、30分間の遠心分離により沈殿させる。ペレットは、1 mlの70%エタノールで洗浄の後、再度、遠心分離によって沈殿させ、DNAを10分間乾燥させる。

30

【0596】

ライゲーション: DNAは、8  $\mu$ l EcoRIアダプター(ストラタジーン社製cDNA合成キット)、1.0  $\mu$ lの10Xライゲーション緩衝液、1.0  $\mu$ lの10 mM rATP、1.0  $\mu$ lのT4 DNAリガーゼ(4 Wu/ $\mu$ l)中に穏やかに懸濁させ、4  $^{\circ}$ Cで2日間ライゲーションさせる。ライゲーション反応は、70  $^{\circ}$ Cで30分間加熱することにより停止させる。

【0597】

アダプターのリン酸化: アダプターの末端は、1.0  $\mu$ lの10 Xライゲーション緩衝液、2.0  $\mu$ lの10 mM rATP、6.0  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O、1.0  $\mu$ lのポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)を混合した37  $^{\circ}$ C、30分間のライゲーション反応によりリン酸化させる。30分間の反応後、31  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O及び5 mlの10 X STEを加え、そのサンプルをSephacryl S-500のスピナラムで分画する。集めた画分(1~3)は、フェノール; クロロホルム抽出を一回、それに次ぎ更なるクロロホルム抽出を行う。そのDNAは、氷冷エタノールを添加し、氷浴中10分間沈殿させる。そのDNAは、30分間の遠心分離により沈殿させる。ペレットは、1 mlの70%エタノールで洗浄の後、再度、遠心分離によって沈殿させ、そのDNAを10分間乾燥させる。そのサンプルは、10.5  $\mu$ l TE緩衝液中に懸濁させる。そのサンプルは、2.5  $\mu$ lのDNA及び水を使用しない以外は、上述したようにラムダアームに直接ライゲーションする。

40

【0598】

ショ糖密度勾配(2.2 ml)サイズ分画: 65  $^{\circ}$ C、10分間の熱処理によりライゲーションを停止させる。そのサンプルを2.2 mlのショ糖密度勾配上に穏やかに乗せ、45k rpm、20

50

で4時間遠心分離する(ブレーキ無し)。フラクションは、勾配チューブの底を20 - ゲージ針を挿入し、シヨ糖液を針を通して溶出させる。最初の20滴をFalcon 2059チューブに採り、一滴ずつ10フラクション(labeled 1~10)を採集する。各一滴は、おおよそ60  $\mu$ lである。各画分の5  $\mu$ lを0.8 %のアガロースゲルにかけ、そのサイズを調べる。画分1-4(約10~1.5 kb)、画分5~7(約5~0.5 kb)を別々のチューブに集める。DNAを沈殿させるために1 mlの氷冷エタノールを加え、水中に10分間置く。沈殿は、30分間の高速遠心分離によりペレットとする。そのペレットは、1 mlの70 % エタノールで洗浄の後、再度、遠心分離によって沈殿させ、乾燥させる。各ペレットは、10  $\mu$ lのTE緩衝液に穏やかに再懸濁させる。

## 【0599】

ラムダアームへの試験的ライゲーション：0.5  $\mu$ lのサンプル及び適当量の標準(既知濃度のDNAサンプル)をエチジウムブロミドを含むアガロースにスポットする。UV照射の下、サンプルを標準と比較観察し、おおよその濃度を得る。表1に示すように、次のライゲーション反応(5  $\mu$ lの反応)を調製し、4 で一夜反応させる。

## 【0600】

## 【表1】

サンプル	H <sub>2</sub> O	10X リガ ーゼ	10 mM rA TP	ラムダア ーム (ZAP)	挿入 DNA	T4DNA リ ガーゼ
画分 1-4	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
画分 5-7	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l

10

20

## 【0601】

試験的パッケージ及びプレート：製造業者の方法に従って、ライゲーション反応をパッケージする。パッケージ反応は、500  $\mu$ lのSM緩衝液を添加して停止させ、同じライゲーション反応に由来するパッケージを集める。集めた反応の各1  $\mu$ lについて適当な宿主( $OD_{600} = 1.0$ ) (XL1-Blue MRF)を用いてタイターを測定する。200  $\mu$ lの宿主(MgSO<sub>4</sub>中)をFalcon 2059チューブに加え、1  $\mu$ lのパッケージファージと37 で15分間反応させる。約3 mlの48 トッパアガー(150  $\mu$ lのIPTG (0.5 M)及び300  $\mu$ lのX-GAL (350 mg/ml)ストック)を加え、100 mmプレートに重層する。プレートは、37 で一夜培養する。

30

## 【0602】

ライブラリーの増幅(各ライブラリーから $5.0 \times 10^5$ の組換え体)：約3.0 mlの宿主細胞( $OD_{600} = 1.0$ )を2本の50 mlコニカルチューブに入れ、 $2.5 \times 10^5$  pfu/チューブのファージを加え、37 で20分間インキュベートする。トッパアガーを各チューブに加え、最終量4.5 mlとする。各チューブを5枚の150 mmプレート上に重層する。プレートは、37 で6~8時間又はブランクが針先程度の大きさになるまで培養する。プレートに8~10 mlのSM緩衝液を加え、4 で一夜置く(可能ならば、穏やかに揺り動かす)。

## 【0603】

ファージの採取：SM緩衝液により各プレートからファージ懸濁液を50 mlコニカルチューブに回収する。約3 mlのクロロホルムを加え、激しく振り混ぜ、室温に15分間置く。チューブは、2K rpmで10分間遠心分離して細胞の残渣を取り除く。上清は、滅菌したチューブに入れ、500  $\mu$ lのクロロホルムを加えて4 で保存する。

40

## 【0604】

増幅したライブラリーの力値(タイター)：回収したファージの連続希釈を作り、(例えば、 $10^{-3}$ 希釈 = 1 mlのSM緩衝液中に1  $\mu$ lの増幅したファージ； $10^{-6}$ 希釈 = 1 mlのSM緩衝液あるいはその類中に1  $\mu$ lの $10^{-3}$ 希釈したファージ)、200  $\mu$ lの宿主(10 mM MgSO<sub>4</sub>中)を2本のチューブに加える。一方のチューブには10  $\mu$ lの $10^{-6}$ 希釈( $10^{-5}$ )を加える。他方のチューブには、1  $\mu$ lの $10^{-6}$ 希釈( $10^{-6}$ )を加え、37 で15分間インキュベートする。

## 【0605】

約3 mlの48 トッパアガー(150  $\mu$ lのIPTG (0.5 M)及び37  $\mu$ lのX-GAL (350 mg/ml)ス

50

トック)を各チューブに加え、100 mmプレートに重層する。プレートは、37 °C で一夜インキュベートする。

【0606】

ZAP IIライブラリーは、製造業者(Stratagene社)の操作法に従って、切り出し、pBLUES CRIPRTライブラリーとする。

【0607】

そのDNAライブラリーは、宿主(例えば、E. coli)にトランスフォームし、クローンの発現ライブラリーを作製する。

【0608】

例2 標準化

ライブラリーの作製に先立ち、精製DNAを標準化できる。DNAは、先ず、次の操作によって分画する。ゲノムDNAから成るサンプルは、塩化セシウム勾配で精製される。塩化セシウム( $R_f = 1.3980$ )溶液を0.2  $\mu$ mフィルターに通し、その15 mlを35 ml OptiSealチューブ(Beckman)に入れる。DNAを加え、激しく混合する。10 mgのビス-ベンジミド(Sigma; Hoechst 33258)を加え、激しく混合する。チューブは、フィルターを通した塩化セシウムで満たし、Beckman L8-70超遠心機においてBti50ローターを用いて33k rpmで72時間遠心する。遠心の後、シリンジポンプ及び分画機(Brandel Model 186)を用いて280 nmの吸収をISCO UA-5UV吸光検出器で測定する。環境サンプル中に存在する生物体由来のDNAを示すピークが得られる。真性細菌の配列は、E. coli のピークの10倍希釈から得られるrRNAをコードしたDNAを以下のプライマーを用いたPCR増幅により検出できる。

フォワードプライマー: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:4)

リバースプライマー: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO:5)

【0609】

回収したDNAは、剪断、あるいは酵素的に消化し、3~6 kbの断片とする。単独リンカープライマーは、結合され、そのDNAは、サイズ-選別される。

【0610】

標準化は、二本鎖DNAサンプルをハイブリダイゼーション緩衝液(0.12 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、pH 6.8/0.82 M NaCl/1 mM EDTA/0.1 % SDS)に再懸濁することにより行われる。鉱油をサンプル上に重層し、沸騰下、10分間変性させる。サンプルは、68 °C で12~36時間インキュベートする。二本鎖DNAは、60 °C でヒドロキシルアパタイトを用いた標準的な操作(Sambrook, 1989)により一本鎖DNAから分離する。その一本鎖DNA画分は、脱塩し、PCRにより増幅する。そのプロセスは、数回以上繰り返される(5回まで)。

【0611】

例3 酵素活性のアッセイ

以下は、エポキシダーゼ活性のために、例1に従って作製した発現ライブラリーをスクリーニングするための代表的な操作例である。

【0612】

例1に述べたようにして調整したライブラリーのプレートを各ウェルに200  $\mu$ lのLB Amp/Methとglycerolを含む一枚のプレートへ多数回接種するためのこのステップは、ベックマン社製の高密度複製装置(HDRT)と1 %ブリーチ、水、イソプロパノール、各接種間の空乾滅菌サイクルを用いて行われる。その一枚のプレートは、37 °C で2時間培養した後、各ウェルに250  $\mu$ lのLB Amp/Methとglycerolを含む二枚の白色96-穴ダイナテックマイクロタイター娘プレートへ接種するために使われる。最初の一枚のプレートは、37 °C で18時間インキュベートした後、-80 °C で保存する。その二枚の濃縮娘プレートは、また、37 °C

で18時間インキュベートされる。その濃縮娘プレートは、更に、70 °C で45分間加熱して宿主の大腸菌を殺し、大腸菌の酵素を失活させる。DMSO中5 mg/mLのモルフォウレアフェニルアラニル-7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(MuPheAFC、「基質」)のストック溶液を600  $\mu$ Mとなるように0.6 mg/mLの界面活性剤ドデシルマルトシドを含有する50 mM pH 7.5 Hepes緩衝液で希釈する。50  $\mu$ lの600  $\mu$ M MuPheAFC溶液を白色濃縮プレートに加え、BIOMEKを用いた一回100  $\mu$ lの混合サイクルにより最終基質濃度を約100  $\mu$ Mにす

10

20

30

40

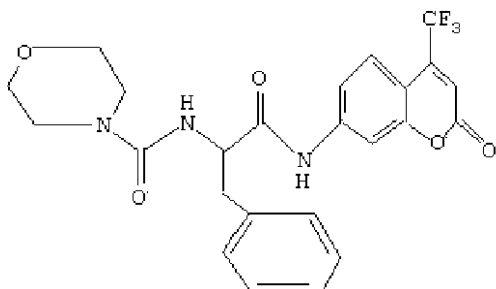
50

る。基質を添加後 (t=0)速やかに、プレートリーダー蛍光測定器により蛍光を測定する (励起波長=400 nm、測定波長=505 nm)。プレートを70 で100分間インキュベートし、暗冷所に更に15分間置いて冷却する。再び、蛍光を測定する (t=100)。活性のあるクローンが存在するかを調べるために、t=100の値からt=0での値を差し引く。

MuPheAFC

【0613】

【化1】



10

【0614】

そのデータは、ある特定のウェル中のクローンが基質を加水分解するかを示す。どのクローンが活性を保持するかを調べるために、元のライブラリープレートを融解し、個々のクローンを一つずつLB Amp/Methとglycerolを含んだ新しいプレートに摂取する。上述のように、プレートを37 で培養し70 の加熱により宿主の酵素を失活させ、Biomekを用いて50 μlの600 μM MuPheAFCを加える。

20

【0615】

基質を添加後、t=0の蛍光を記録する。プレートを70 でインキュベートし、上述のように、t=100の蛍光値を測定する。それらのデータは、どのプレートに活性を持ったクローンが存在するかを示す。

【0616】

基質に対する立体選択性値、E、は、以下の方程式により求める：

【数1】

$$\ln[(1-c(1+ee_p))]$$

$$E = \frac{\ln[(1-c(1+ee_p))]}{\ln[(1-c(1+ee_p))]}$$

$$\ln[(1-c(1+ee_p))]$$

ee<sub>p</sub> = 加水分解生成物の立体超過率 (ee)及びc = 反応の変換率。Wong and Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, 1994, Elsevier, Tarrytown, N.Y., pp. 9-12を参照。

40

【0617】

立体超過率は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)あるいはキラルキャピラリー電気泳動 (CE)によって決定する。定量は、以下のようにして行う：200 μlの適当な緩衝液を白色96-ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、50 μlの部分的あるいは完全精製した酵素溶液を加える；50 μlの基質を加え、50%の基質が消費されるか、あるいは反応が停止するまで (どちらかが最初に起こるまで)蛍光：時間の増加を測定する。

【0618】

例4 酵素活性陽性クローンの指向変異

指向変異を二つの異なる酵素 (アルカリフォスファターゼ及びアルカリ - グリコシダ

50

ーゼ)について、野生型の酵素よりもより高い活性を持つ新しい酵素を作製するために行った。

#### 【0619】

##### アルカリ フォスファターゼ

製造業者による操作に従って、XL1-Red株(ストラタジーン社)を、あるクジラの骨の表面から単離した生物体、0C9a、由来のアルカリフォスファターゼをコードしたゲノミッククローン27a3a(プラスミドpBluescript中)で形質変換する。5 mlの0.1 mg/ml アンピシリン含有LBに200  $\mu$ lの形質変換混合物を接種し、37  $^{\circ}$ Cで30時間培養した。その培養について、ミニプレップを行い、単離した DNA は、その 2  $\mu$ lをXL-1 Blue細胞(ストラタジーン社)に製造業者の操作に従って形質変換させてスクリーニングを行い、以下に概略したようにして定量を行った。スクリーニングアッセイにおいて、変異させた0C9aフォスファターゼは、発色に10分間を要し、野生型の酵素は、30分を要した。

10

#### 【0620】

##### 標準的なアルカリフォスファターゼ スクリーニング アッセイ

形質変換したXL1 Blue細胞をLB/アンピシリンプレートに播いた。生じたコロニーは、D uralon UV(ストラタジーン社)あるいはHATF(ミリポア)メンブラン上に付着させ、クロロホルム蒸気に30秒間置くことによって溶解させた。細胞は、30分間85  $^{\circ}$ Cで加熱することにより完全に殺した。フィルターは、BCIP緩衝液中で発色させ、一番早く発色したコロニー(「ポジティブ」)を選別し、再びBCIPプレート(BCIP緩衝液: 20 mM CAPS pH 9.0、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.01 mM ZnCl<sub>2</sub>、0.1 mg/ml BCIP)に播いた。

20

#### 【0621】

##### ベクター-グリコシダーゼ

この操作は、Thermococcus 9N2 ベクター-グリコシダーゼを変異させるために利用された。

#### 【0622】

PCRは、2  $\mu$ lのdNTP(10 mMストック); 10  $\mu$ lの10X PCR緩衝液; 0.5  $\mu$ lのベクターDNA-31G1A-100 ng; 20  $\mu$ lの3'プライマー(100 pmol); 20  $\mu$ lの5'プライマー(100 pmol); 16  $\mu$ lのMnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O(1.25 mMストック); 24.5  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O; 及び1  $\mu$ lのTaqポリメラーゼ(5.0 ユニット)を含む100  $\mu$ lの反応溶液をインキュベートすることによって行った。PCRサイクルは: 95  $^{\circ}$ C、15秒; 58  $^{\circ}$ C、30秒; 72  $^{\circ}$ C、90秒; 25サイクル(72~4  $^{\circ}$ C、10分の伸張)

30

#### 【0623】

5  $\mu$ lのPCR産物を1%アガロースゲルにより泳動させて反応を調べた。PCR産物をQIAQUICKカラム(Qiagen)で精製し、50  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oに再懸濁させる。

#### 【0624】

25  $\mu$ lの精製PCR産物; 10  $\mu$ lのNEB緩衝液#2; 3  $\mu$ lのKpn I(100 U/ $\mu$ l); 3  $\mu$ lのEcoRI(20 U/ $\mu$ l); 及び59  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oを37  $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートしてPCR産物を消化し、QIAQUICKカラム(Qiagen)で精製する。35  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oで溶出させる。

#### 【0625】

10  $\mu$ lの消化したPCR産物、5  $\mu$ lのベクター(EcoRI/KpnIにより消化し、エピアルカリフォスファターゼで脱リン酸化したもの)、4  $\mu$ lの5Xライゲーション緩衝液、及び1  $\mu$ lのT4 DNAライゲース(BRL)をインキュベートし、PCR産物をベクターに結合させた。

40

#### 【0626】

結果として生じたベクターは、エレクトロポレーションによりM15pREP4細胞に形質変換させた。100又は200  $\mu$ lの細胞をLB amp/meth/kanプレートに播き、37  $^{\circ}$ Cで一夜培養した。

#### 【0627】

ベクター-ガラクトシダーゼを、(1)ミリポアHATFメンブランフィルター上にコロニーを付着させる; (2)150 mmガラス製ペトリ皿中のクロロホルム蒸気により細胞を溶解させる; (3)1 mg/ml XGLUを含有するZ緩衝液で飽和したワットマン3MMフィルターペーパー片を

50

含んだ100 mmガラス製ペトリ皿へそのフィルターリフトを移す (溶解させたコロニーを保持しているフィルターをペトリ皿に移した後、ペトリ皿を室温に維持する); 及び(4) 「ポジティブ」は、フィルター上で青いスポットとして観察される(「ポジティブ」は、早くに出現するスポット)。パストツールピペット(あるいはガラスキャピラリー管)を使用してフィルター上の青いスポットをくり抜く、の手順でアッセイを行った。そのくり抜いた小さなフィルターディスクを20  $\mu$ lの水を含むエッペンドルフチューブに入れる。チューブは、75  $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、プラスミドDNAをフィルターから溶出させるためにボルテックスする。そのDNAを電氣的に調整したコンピテント大腸菌に形質変換し、形質変換細胞を含むプレートについて「ポジティブ」を同定するためにフィルター-リフトアッセイを繰り返す。フィルターリフトを行った後、プレートは、37  $^{\circ}$ Cのインキュベーターに戻してクローンを再生させる。再精製したポジティブを3 mlのLBアンピシリン溶液を接種し、37  $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートする。それらの培養からプラスミドDNAを単離し、プラスミドの挿入を配列決定する。フィルターアッセイには、1 mg/mlの基質5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ベータ-o-グルコピラノシド(XGLU)(ダイアグノステックケミカル又はシグマ)含有Z緩衝液(以下の処方参照)を使用する。Z-緩衝液:(Miller, J. H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, p. 445.に述べられている)1リットルあたり:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	16.1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O	5.5 g
KCl	0.75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.246 g
6-メルカプトエタノール	2.7 ml
pHを7.0に調節	

10

20

30

40

50

#### 【0628】

##### 例5 安定で大きな挿入を持つピコプランクトンゲノミックDNAライブラリーの構築

細胞の採取とDNAの調製。ニューポート、オレゴン、からハワイまでの海洋学的巡航により採取したサンプルから濃縮したピコプランクトンを含むアガロースプラグを調製した。海水(30リットル)をNiskinボトルに採取し、10  $\mu$ mのNitexを通し、分子量30,000カットオフのポリスルホンフィルターを用いたフォローファイバーろ過(Amicon DC10)により濃縮した。濃縮したバクテリオプランクトン細胞を0.22  $\mu$ m、47 mmデュラポアーフィルター上に集め、1 mlの2 X STE緩衝液(1 M NaCl、0.1 M EDTA、10 mM Tris、pH 8.0)中に最終密度が約 $1 \times 10^{10}$ 細胞/mlになるように際懸濁させた。細胞懸濁液を40  $^{\circ}$ Cに冷却した一容量の1 %モルトンSeaplaque LMP アガロース (FMC)と混合し、1 mlのシリンジで吸い取った。シリンジは、パラフィルムで密封し、氷中に10分間置いた。細胞を含んだアガロースプラグに10 mlの溶解緩衝液(10 mM Tris pH 8.0、50 mM NaCl、0.1 M EDTA、1 %サルコシル、0.2 % コール酸ナトリウム、1 mg/mlリゾチーム)を注入させ、更に、37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。アガロースプラグは、40 mlのESP緩衝液(0.5 M EDTA中に1 %サルコシル、1 mg/mlプロテイナーゼ Kを含有)に写し、55  $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートした。その溶液を取り去り、新しいESP緩衝液と交換し、更に1時間55  $^{\circ}$ Cでインキュベートした。そのアガロースプラグを50 mM EDTA中に入れ、巡航の期間中4  $^{\circ}$ Cで保存した。

#### 【0629】

オレゴン沿岸で採取したサンプルから調整したアガロースプラグの一片(72  $\mu$ l)を2 mlのマイクロチューブ中で1 mlの緩衝液A (100 mM NaCl、10 mM Bis Tris Propane-HCl、100  $\mu$ g/ml アセチル化BSA: 25  $^{\circ}$ CでpH 7.0)に対して4  $^{\circ}$ Cで一夜透析した。溶液は、250  $\mu$ lの10 mM MgCl<sub>2</sub>及び1 mM DTTを含有する新しい緩衝液Aと交換し、室温で1時間振とうした。溶液を250  $\mu$ lの同じ緩衝液中に4 UのSau3A1(NEB)を含む溶液と交換し、水浴中、37  $^{\circ}$ Cに平衡化し、更に、37  $^{\circ}$ Cのインキュベーター中で45分間振とうした。プラグを1.5 mlマイクロチューブに移し、68  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートして酵素を失活させ、アガロースを溶解させた。製造業者の指示に従って、アガロースは、ゲラーゼ及びHK-フォスファター

ゼ(エピセントレ社)によりそれぞれ消化し、DNAの脱リン酸化を行った。タンパクは、温和なフェノール/クロロホルム抽出により取り除き、DNAは、エタノール沈殿させ、70 % エタノールで洗浄した。この部分消化DNAは、pFOS1ベクターヘライゲーションさせるために濃度が2.5 ng/ $\mu$ lになるように滅菌水に再懸濁させた。

#### 【0630】

アガロースプラグのいくつかから得られるPCR増幅は、相当量の古生物DNAの存在を示した。オレゴン沿岸沖深さ200 mの海水から採めたサンプルの一つから抽出したrRNAを用いた定量的ハイブリダイゼーションは、この集団中に全ピコプランクトン生物量(Biomass)のおよそ4.7%を含んでいることを示した(このサンプルは、表1の“PAC1”-200 mに一致している: DeLong 他, Nature, 371:695-698, 1994)。アガロースプラグ溶解物について古生物-偏重rDNA PCR増幅を行った結果、そのサンプル中に相当量の古生物DNAの存在を確認した。このピコプランクトン サンプルから調製したアガロースプラグを、フォスミドライブラリーを作製するために選択した。この場所に由来するアガロースプラグ各1 mlには約 $7.5 \times 10^5$ の細胞が含まれるので、部分消化DNAの調製に用いられた72  $\mu$ lのスライスには、約 $5.4 \times 10^5$ の細胞が存在する。

10

#### 【0631】

ベクターアームは、既に述べられたようにして、pFOS1から調製した(Kim 他, Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector, Nucl. Acids Res., 20:10832-10835, 1992)。簡潔に述べると、プラスミドを完全にAstIIで消化し、HKフォスファターゼで脱リン酸化し、BamHIで消化して二つのアームを作製した。そのそれぞれには、35~45 kbpのライゲートされたDNAをクローニング及びパッケージングするために、適当な向きのコス部位が含まれる。部分消化ピコプランクトンDNAを、15  $\mu$ lのライゲーション反応溶液中に各25 ngのベクター、その挿入DNA、及び1UのT4 DNAリガーゼ(ペーリンガーマンハイム)と一夜反応させた。4  $\mu$ lの反応溶液をGigapack XLパッケージングシステム(ストラタジーン社製)を用いてインビトロでパッケージングし、フォスミド粒子を大腸菌DH10B株(BRL)に形質変換し、細胞をLB<sub>c<sub>m</sub>15</sub>プレート上に播いた。結果として生じたフォスミドクローンは、7%のグリセロールを添加したLB<sub>c<sub>m</sub>15</sub>を含む96-穴マイクロタイタープレートに拾い上げた。それぞれ約40 kbピコプランクトンDNAインサートを持つ組換えフォスミドは、3.552フォスミドクローンのライブラリーを与え、それは、おおよそ $1.4 \times 10^8$ 塩基対のクローン化したDNAを含んでいた。調べたクローンの全ては、38~42 kbpの範囲のインサートを含んでいた。このライブラリーは、後の解析まで-80で保存した。

20

30

#### 【0632】

本発明の多くの修飾及び多様化は、上述の教授から可能である;従って、そのクレームのスコープの範囲内で、本発明は、既に述べた特別なもの以外のものに実践してもよい。一方、本発明は、それらの展望を含む文献に詳細が述べられており、その修飾及び多様化が、述べられているスコープの範囲内にあることが理解される。

#### 【0633】

この中に引照される全ての出版物、特許、特許出願、GenBankの配列及びATCCの供託物は、全ての目的のための引照として組み込まれる。

40

#### 【0634】

本発明の多くの展望が記述された。それにも関わらず、種々の修飾は、本発明のスコープ及びスピリットから離れることなくして行われかもしれないものと理解される。従って、他の展望は、以下のクレームのスコープに入る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0635】

【図1】不斉化学的酸化についての概略を示す。

【図2】酸化酵素による酸化反応の例を描写している。

【図3】エポキシドの合成利用について描写している。

【図4】コンピューターシステムのブロックダイアグラムを示す。

50

【図5】新規配列とデータベースの配列間の相同性を調べるために、新規核酸あるいはタンパクの配列を配列データベースと比較する過程の一例を描写するフローダイアグラムを示す。

【図6】二配列間に相同性があるかを調べるためのコンピューター処理の過程を描写するフローダイアグラムを示す。

【図7】ある配列に関する特徴の存在を検出するための同定プロセス300の過程を描写するフローダイアグラムを示す。

【図8】有用な小分子エポキシド及びそれらの医薬合成における応用について描写している。

【図9】抗ガン及び抗HIV薬の合成におけるエポキシドの使用について描写している。

【図10】エポキシ化を触媒する酵素について描写している。

【図11】エポキシダーゼの発見のために可能な選別及び選別基質の系統的概略を示す。

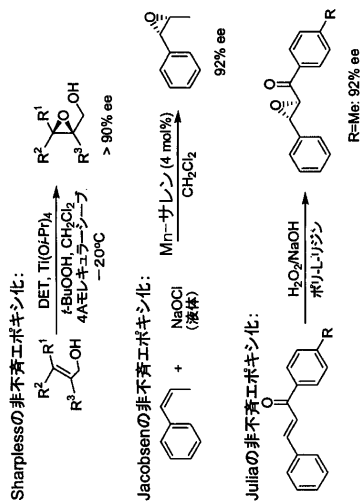
【図12】エポキシダーゼの発見のために可能なスクリーニングについて描写している。

【図13】超ハイスループット単一細胞活性及び配列スクリーニングのための蛍光活性化細胞選別(Fluorescence Activated Cell Sorting:FACS)について描写している。

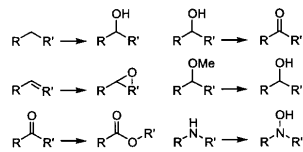
【図14】配列を基にした発見のための環境ライブラリーのバイオパンニングについて描写している。

10

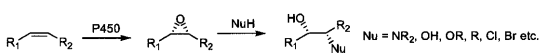
【図1】



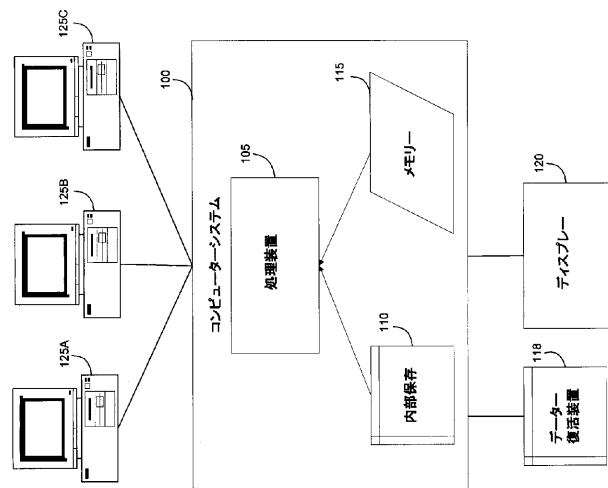
【図2】



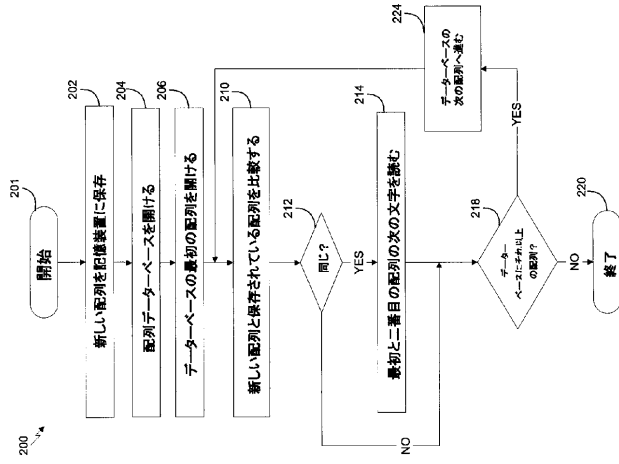
【図3】



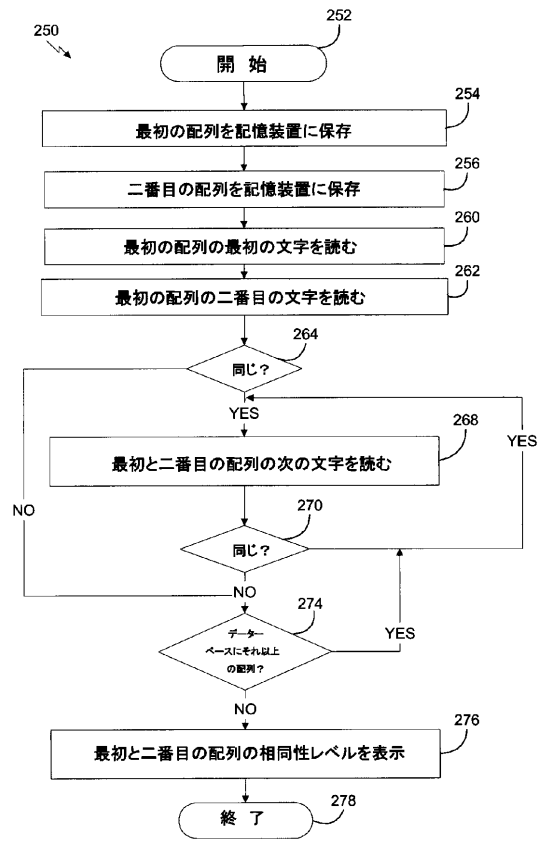
【図4】



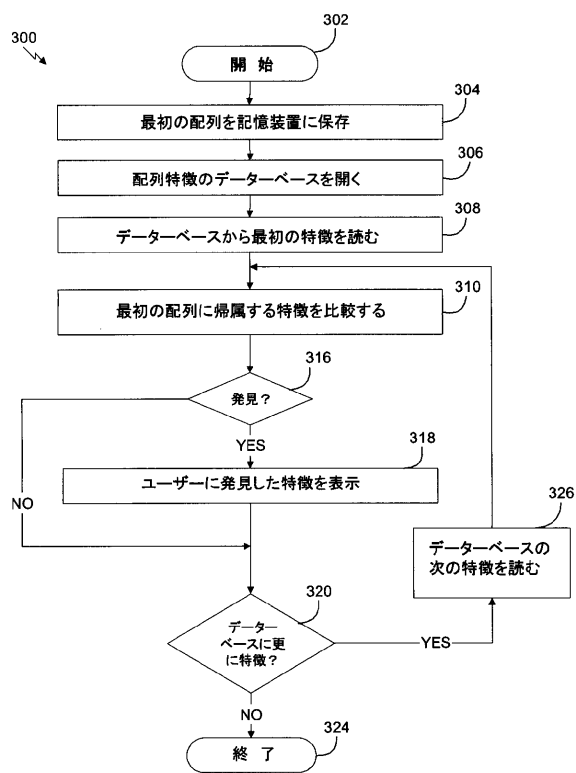
【図5】



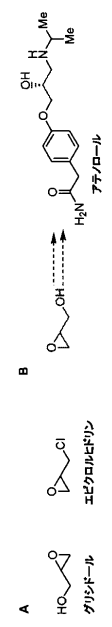
【図6】



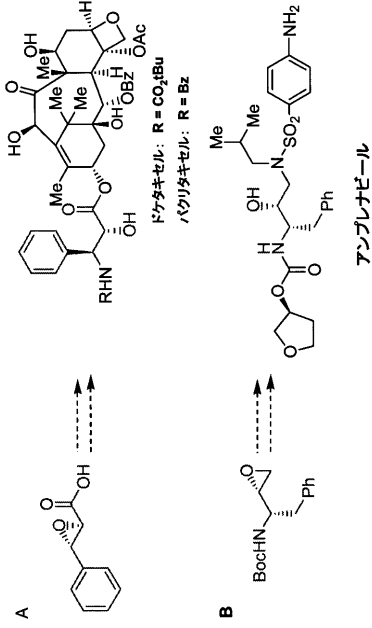
【図7】



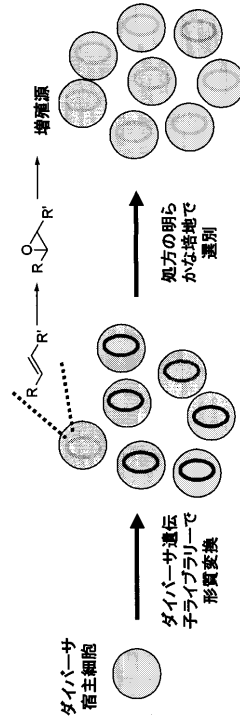
【図8】



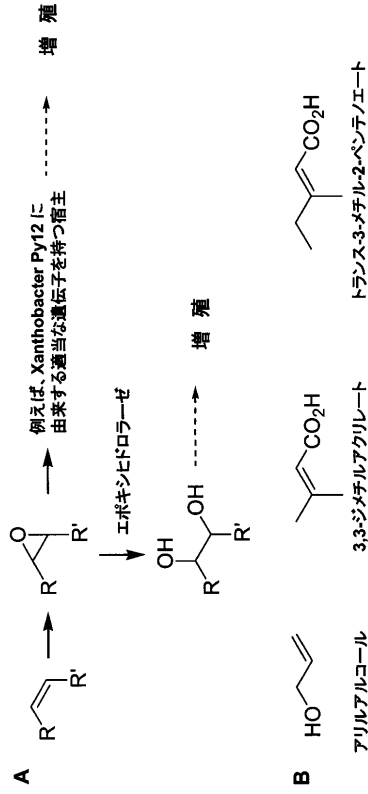
【 図 9 】



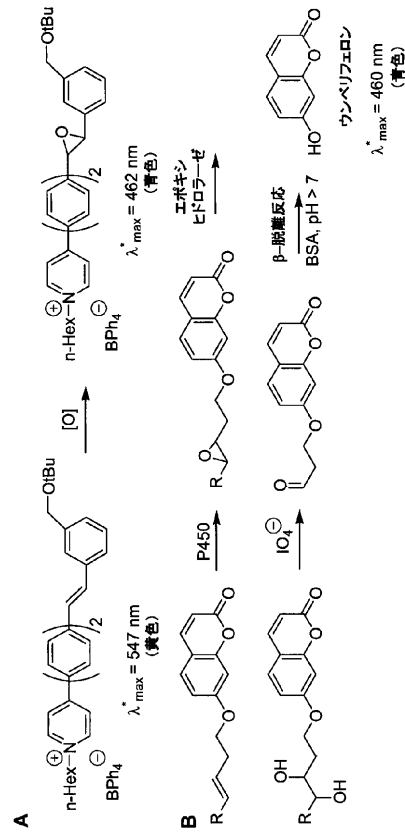
【 図 10 】



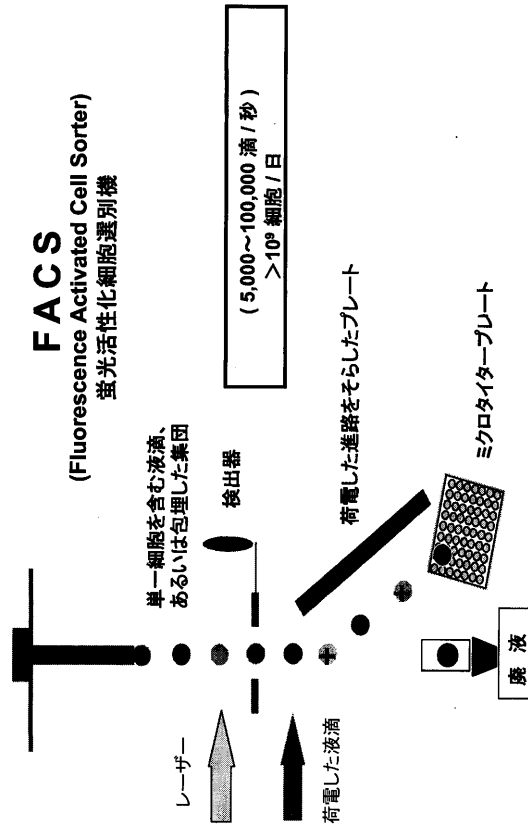
【 図 11 】



【 図 12 】



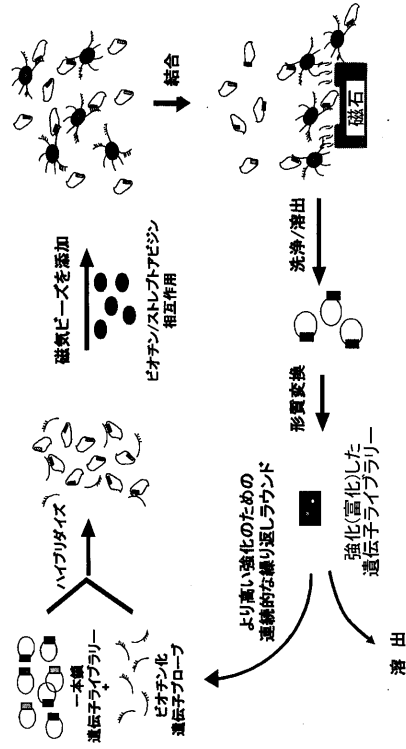
【 図 1 3 】



【 配列表 】

2005512532000001.app

【 図 1 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/24910
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C07H 21/04; C12P 21/06; C12N 9/00, 9/02, 1/20, 15/00		
US CL : 435/4, 6, 69.1, 183, 189, 252.3, 320.1, 325; 536/23.2, 23.4, 23.5		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 6, 69.1, 183, 189, 252.3, 320.1, 325; 536/23.2, 23.4, 23.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. AB018074, UEDA et al., October 1998 (Polynucleotide sequence has more than 60% match to SEQ ID NO:1 over 100 nucleotides), Gene Sequence.	1, 11, 20-49, 53, 54, 56-63, 73-92, 131-132 ----- 55, 105-117, 122-125
---		
Y	UEDA, K. et al., Overexpression of a gene cluster encoding a chalcone synthase-like protein confers Redbrown pigment production in Streptomyces griseus. J. Antibiot., 1995, Vol. 48, No.7, pages 638-646.	1, 11, 20-49, 53, 54, 56-63, 73-92, 131-132 ----- 55, 105-117, 122-125
---		
X	Database GenBank, US National Library of medicine, (Bethesda, MD USA) No. L37200, RODRIGUEZ et al., March 1996. (Polynucleotide sequence has more than 60% match to SEQ ID NO:1 over 100 nucleotides), Gene Sequence.	1, 11, 20-49, 53, 54, 56-63, 73-92, 131-132 ----- 55, 105-117, 122-125
---		
Y	RODRIGUEZ AM et al., A cytochrome P450-IIlike gene possibly involved in oleandomycin biosynthesis by Streptomyces antibioticus., FEMS Lett., 1995, Vol. 127, No. 1-2, pages 117-120.	1, 11, 20-49, 53, 54, 56-63, 73-92, 131-132 ----- 55, 105-117, 122-125
---		
Y		55, 105-117, 122-125
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"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)	"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
"O"	documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 24 February 2004 (24.02.2004)		Date of mailing of the international search report <b>22 MAR 2004</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Manjunath N. Rao, Ph.D. <i>J.N.R. for</i> Telephone No. 703-308-1235

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/24910

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-63, 73-117, 122-125, 131-132, SEQ ID NO:1 and 2
- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24910

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups 1 through 28, claim(s) 1-63, 73-117, 122-125, 131-132, drawn to polynucleotides, polypeptides, vectors, host cells and method of making a polypeptide wherein each group is drawn to a single polynucleotide having any odd number between 1 and 58 and its corresponding encoded single polypeptide having an even number between 1 and 58.

Group 29, claim(s) 64-65, drawn to a non-human transgenic animal comprising the single elected polynucleotide.

Group 30, claim(s) 66-67, drawn to a transgenic plant comprising the single elected polynucleotide.

Group 31, claim(s) 68-69, drawn to a transgenic seed comprising the single elected polynucleotide.

Group 32, claim(s) 70-71, drawn to antisense oligonucleotides.

Group 33, claim(s) 72, drawn to a method of inhibiting translation of a P450 message in a cell.

Group 34, claim(s) 118-121, drawn to a heterodimer comprising a single elected polypeptide.

Group 35, claim(s) 126-127, drawn to an antibody.

Group 36, claim(s) 128, drawn to hybridoma.

Group 37, claim(s) 129, 133-135, drawn to a method for identification of a polypeptide.

Group 38, claim(s) 130, drawn to a method of making antibody.

Group 39, claim(s) 136, drawn to a method of determination of binding to a polypeptide.

Group 40, claim(s) 137-140, drawn to a method for identification of a modulator which modulates the activity of a polypeptide.

Group 41, claim(s) 141-144, drawn to a computer system.

Group 42, claim(s) 145, drawn to a computer readable medium.

Group 43, claim(s) 146, drawn to a method of identifying a feature in the elected sequence.

Group 44, claim(s) 147-150, drawn to a method for comparing a first sequence to a second sequence.

Group 45, claim(s) 151-152, drawn to a method for isolating or recovering a nucleic acid encoding a polypeptide with P450 activity from an environmental sample by amplification technique.

Group 46, claim(s) 153-155, drawn to a method for isolating or recovering a nucleic acid encoding a polypeptide with P450 activity from an environmental sample by hybridization technique.

Group 47, claim(s) 156-178, drawn to a method of generating a variant of a elected polynucleotide sequence.

Group 48, claim(s) 179-183, drawn to a method of modifying the codons of an elected polynucleotide.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24910

Group 49, claim(s) 184-189, drawn to a method for producing a library of nucleic acids encoding a plurality of modified P450 using the elected polynucleotide or polypeptide.

Group 50, claim(s) 190, drawn to a method of making a small molecule.

Group 51, claim(s) 191-195, drawn to a method for modifying a small molecule comprising the use of a elected polynucleotide or polypeptide.

Group 52, claim(s) 196-197, drawn to a method for determining a functional fragment of P450 enzyme.

Group 53, claim(s) 198-201, drawn to a method for whole cell engineering.

Group 54, claim(s) 202, drawn to a method for hydrolyzing an alkene.

Group 55, claim(s) 203-205, drawn to a method for producing a compound of a desired chirality.

Group 56, claim(s) 206-207, drawn to a method of increasing thermotolerance or thermostability of a P450 polypeptide.

Group 57, claim(s) 208, drawn to a method for overexpressing a recombinant P450 polypeptide in a cell.

Group 58, claim(s) 209-210, drawn to a growth-based method for selecting a cell comprising the elected nucleic acid encoding an epoxidase.

Group 59, claim(s) 211, drawn to a method for identifying a nucleic acid encoding a P450.

Group 60, claim(s) 212-217, drawn to a growth-based method for selecting a cell comprising a polynucleotide encoding a P450.

The inventions listed as Groups 1-61 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first-recited product, a polynucleotide, a vector, a host cell, a method for producing a polypeptide and the encoded polypeptide. Further pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, USPTO WEST, BIOTECHNO, BIOTECHABS, CANCERLIT,  
GENBANK.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	4 B 0 5 0
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	Z 4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 N 9/02	C 1 2 N 11/00	
C 1 2 N 11/00	C 1 2 P 7/04	
C 1 2 P 7/04	C 1 2 P 7/18	
C 1 2 P 7/18	C 1 2 P 13/00	
C 1 2 P 13/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/48	M
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	F
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ワイナー デイヴィッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 4 デル マー ストラトフォード コート 4 2  
 5 アpartment 1 8
- (72) 発明者 バーク マーク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ インターメッツォ ウェイ  
 1 2 6 3 4
- (72) 発明者 ヒッチマン ティム  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 9 サン ディエゴ ピスモ コート 7 2 6
- (72) 発明者 プジョル キャサリン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ディレクターズ プレイス  
 4 9 5 5
- (72) 発明者 リチャードソン トビー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 1 サン ディエゴ キャンディー ローズ ウェ  
 イ 1 1 6 4 6
- (72) 発明者 ショート ジェイ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 6 7 ランチョ サンタ フェ パセオ デリシラス  
 6 8 0 1

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB04 AD04 CA17 CD24  
2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB20 CB21 DA12 DA13 DA14  
DA20 DA36 FB01 JA01  
4B024 AA01 AA03 AA08 AA11 AA19 BA08 BA41 CA04 CA05 CA06  
CA07 CA09 CA11 DA01 DA02 DA06 DA12 EA02 EA03 EA04  
EA05 EA06 FA02 FA07 FA10 GA05 GA11 GA17 GA18 GA19  
GA21 GA27 HA03 HA08 HA12 HA14 HA19  
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 FA12  
4B033 NA23 NB22 NB25 NB27 NB32 NB34 NB56 NB62 NB63 NB64  
ND02 ND05 ND12 ND15 ND16  
4B050 CC01 CC02 CC03 CC04 CC05 DD01 GG10 LL01 LL02 LL03  
LL05 LL10  
4B063 QA01 QA18 QA20 QQ05 QQ20 QQ22 QQ42 QQ61 QR02 QR32  
QR33 QR41 QR55 QR57 QR69 QR74 QR82 QS12 QS24 QS25  
QS28 QS34 QS36 QX01 QX07  
4B064 AC02 AC05 AE01 AG27 CA10 CA21 CB01 CB16 CC24 CD21  
DA01 DA02 DA13  
4B065 AA01Y AA26X AA77X AA79X AA88X AA90X AA92X AB01 AB05 AC14  
BA02 BA08 BA24 CA25 CA28 CA44 CA46 CA53  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 AA40 BA10 BA41 CA11 DA75 DA76  
DA86 DA89 EA05 EA20 EA50 EA61 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	P450酶，编码它们的核酸及其制备和用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005512532A</a>	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2003552917	申请日	2002-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	戴弗萨公司		
申请(专利权)人(译)	Divasa公司		
[标]发明人	ワイナーデイヴィッド バークマーク ヒッチマンティム プジョルキャサリーン リチャードソントビー ショートジェイ		
发明人	ワイナー デイヴィッド バーク マーク ヒッチマン ティム プジョル キャサリーン リチャードソントビー ショート ジェイ		
IPC分类号	A01H5/00 A01K67/027 C07K1/22 C07K16/40 C07K19/00 C12M1/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N11/00 C12N15/09 C12P7/04 C12P7/18 C12P13/00 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N9/0071		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01H5/00.A A01K67/027 C07K1/22 C07K16/40 C07K19/00 C12M1/00.A C12M1/34. Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12N11/00 C12P7/04 C12P7/18 C12P13/00 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/48.M G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15 /00.F C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AB04 2B030/AD04 2B030/CA17 2B030/CD24 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045 /BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA03 4B024/AA08 4B024 /AA11 4B024/AA19 4B024/BA08 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024 /EA03 4B024/EA04 4B024/EA05 4B024/EA06 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/GA17 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/GA21 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024 /HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B033/NA23 4B033/NB22 4B033/NB25 4B033/NB27 4B033/NB32 4B033 /NB34 4B033/NB56 4B033/NB62 4B033/NB63 4B033/NB64 4B033/ND02 4B033/ND05 4B033/ND12 4B033/ND15 4B033/ND16 4B050/CC01 4B050/CC02 4B050/CC03 4B050/CC04 4B050/CC05 4B050 /DD01 4B050/GG10 4B050/LL01 4B050/LL02 4B050/LL03 4B050/LL05 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ05 4B063/QQ20 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ61 4B063 /QR02 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR41 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR69 4B063/QR74 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063 /QX01 4B063/QX07 4B064/AC02 4B064/AC05 4B064/AE01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA21 4B064/CB01 4B064/CB16 4B064/CC24 4B064/CD21 4B064/DA01 4B064/DA02 4B064/DA13 4B065 /AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA77X 4B065/AA79X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065 /AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA28		

4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA53 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA05 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA61 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26

代理人(译) 小川伸男

优先权 60/309497 2001-08-03 US

外部链接 [Espacenet](#)

#### 摘要(译)

本发明教导了具有P450活性的多肽，编码该多肽的多核苷酸，与该多肽结合的抗体，以及制备和使用这些多肽和多肽的方法。P450酶可用于催化环氧化物和芳烃氧化物水解成相应的二醇。

