(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4568723号
(P4568723)
(45)発行日　平成22年10月27日(2010.10.27)　(24)登録日　平成22年8月13日(2010.8.13)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C07K 1/02	(2006.01)	C07K	1/02	
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A

請求項の数 14　(全 36 頁)

(21)出願番号　特願2006-527869 (P2006-527869)
(86)(22)出願日　平成17年7月29日 (2005.7.29)
(86)国際出願番号　PCT/JP2005/013913
(87)国際公開番号　WO2006/011589
(87)国際公開日　平成18年2月2日 (2006.2.2)
審査請求日　平成19年1月22日 (2007.1.22)
(31)優先権主張番号　特願2004-224554 (P2004-224554)
(32)優先日　平成16年7月30日 (2004.7.30)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　503360115
独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(72)発明者　芝　清隆
日本国東京都豊島区上池袋１－２９－１５－３０５
(72)発明者　齊藤　博英
日本国東京都文京区小石川５－３１－４－５０５

審査官　小金井　悟

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多数種モチーフ配列のランダム重合による人工遺伝子及び人工タンパク質集団の作製法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（１）任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡの少なくても３種以上のＤＮＡ配列を構築し、（２）該一本鎖ＤＮＡ配列の３´末端配列の一部が互いに相補的塩基対を形成し、かつ該相補的塩基対の両端に相手の塩基と対にならない塩基が１塩基以上存在するように、相補的塩基配列を導入し、（３）該方法により構築した多種の一本鎖ＤＮＡを調節された濃度で混合した反応液にＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応をランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールして進行させることを特徴とする多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。
【請求項２】
任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡの少なくても４種以上のＤＮＡ配列を構築し、該一本鎖ＤＮＡを調節された濃度で混合した反応液にＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させることを特徴とする請求項１記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。
【請求項３】
相補的塩基対の数が、６塩基以上であることを特徴とする請求項１又は２記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。
【請求項４】

相補的塩基対の両端に、相手の塩基と対にならない塩基を１～３のいずれかの塩基数、存在させたことを特徴とする請求項１～３のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項５】

多種の一本鎖ＤＮＡの相補的塩基対の組合わせを調節して、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールすることを特徴とする請求項１～４のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項６】

ランダム重合反応系に加えられる多種の一本鎖ＤＮＡの濃度が、０．２μＭ～２０μＭの範囲で変動することを特徴とする請求項１～５のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項７】

構築した多種の一本鎖ＤＮＡを反応液に混合し、該導入した一本鎖ＤＮＡの相補的塩基配列を鋳型として、３′末端から５′末端方向に作用するエキソヌクレアーゼ活性を含む耐熱性ＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させることを特徴とする請求項１～６のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項８】

任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡが、機能モチーフ配列、構造モチーフ配列、進化分子工学的に取得された人工ペプチド配列、又はタンパク質工学的な知識に基いてデザインされた配列に基いて構築されたマイクロ遺伝子であることを特徴とする請求項１～７のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項９】

マイクロ遺伝子の構築に際して、合成する一本鎖ＤＮＡ配列内で、予め各翻訳読み枠で、停止コドンを排除しておくことを特徴とする請求項８記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項１０】

任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡが、多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡに制限酵素認識配列を付加することで、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度を制限酵素反応により直接モニターできるように構築されていることを特徴とする請求項１～９のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法。

【請求項１１】

請求項１～１０のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法により作製した遺伝子を組込んだベクターを、宿主細胞に導入し、発現することを特徴とする多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団の作製方法。

【請求項１２】

多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡを塩基変異、欠損を挿入することなくランダムに重合して人工遺伝子集団を作製し、該人工遺伝子集団を翻訳することでフレームシフトに依存せず多様性分子集団をえることを特徴とする請求項１１記載の多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団の作製方法。

【請求項１３】

多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡを塩基変異、欠損を挿入しつつランダムに重合して人工遺伝子集団を作製し、該人工遺伝子集団を翻訳することでフレームシフトに依存して多様性分子集団をえることを特徴とする請求項１１記載の多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団の作製方法。

【請求項１４】

請求項１～１０のいずれか記載の作製方法により作製された、多数種モチーフ配列がラン

ダムに重合した人工遺伝子集団、又は請求項１１～１３のいずれか記載の方法により作製された、多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団について、機能性遺伝子或いは機能性タンパク質をスクリーニングすることを特徴とする機能性人工遺伝子又は機能性人工タンパク質の創出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、機能性人工遺伝子或いは機能性人工タンパク質の創出を目的とする、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団、該人工遺伝子集団がコードする人工タンパク質集団、及びその作製法に関する。

【背景技術】

【０００２】

近年、創薬分野等への利用を中心に、ヒトゲノム遺伝子やタンパク質の機能解明の研究が進む中で、ポストゲノム研究として、新規遺伝子の機能の解析とタンパク質の機能解明が大規模に進行しつつあり、その成果として多くの遺伝子やタンパク質の機能が明らかにされつつある。この遺伝子やタンパク質の機能の解明により、その知識が蓄積するに伴って、合理的に新しい機能を持った人工の遺伝子及びタンパク質をデザイン・創製することへの期待と機運が高まってきた。この「合理的に新しい機能を持った人工の遺伝子及びタンパク質をデザイン・創製する」ことへの研究は、１９８０年代に蛋白工学（プロテイン・エンジニアリング）として誕生した（Science,219,666-671,1983）。しかし、その後、いくつかの人工タンパク質が創製されたものの、いまだに自由に新しいタンパク質をデザインできるといったレベルには達していない。

【０００３】

１９９０年代に入り、進化分子工学（試験管内分子進化法）が、人工分子の創製分野で大きな流れとなった。この進化分子工学においては、合理的に人工分子を設計するのではなく、予め無作為に準備したランダムな配列集団の中から、「選択」により目的とする機能・活性をもつ分子を得る戦略が採用されている（科学、67,938-947,1997）。すなわち、進化分子工学とは、（１）様々な配列多様性を持つコンビナトリアルな分子集団(ＤＮＡやタンパク質)から、目的の活性を持つわずかな分子を選択し、（２）その遺伝子を遺伝子増幅反応（ＰＣＲ）により増幅した後に同様の反応を繰り返し、（３）目的の反応活性を有する人工分子を進化させるという手法である。現在この手法では、リボソームディスプレイやｍＲＮＡディスプレイなどの遺伝子-タンパク質融合技術を利用して機能性人工タンパク質の創製が試みられている。しかしながら従来の技術には以下のような問題点が存在する。（ｉ）配列多様性を持ち、かつ目的の実験に適したＤＮＡ集団の有効な構築手法が確立されていない、(ii)リボソーム(ｍＲＮＡ)ディスプレイで選択できる人工タンパク質は、標的分子に結合する物質に限られ酵素活性や生体内で機能する分子の選択には不適である。

【０００４】

天然には存在しない非凡な機能を持った人工タンパク質を進化分子工学的に創製する場合には、スクリーニングの母集団となる人工遺伝子多様性集団（ライブラリー）を、いかに巧妙に調製するかが成功の鍵を握る。このため、機能性分子を効果的に創出することを目的とした、人工遺伝子及び人工タンパク質集団作成法の開発が不可欠となる。人工遺伝子集団の調製法としては、error prone ＰＣＲ法（PCR Methods Appl, 2:28-33, 1992）、ＤＮＡ シャフリング法（Nature, 370:389-391, 1994）、又は、天然の遺伝子配列の一部若しくは全てをランダマイズ化した化学合成法が現在汎用されている。

【０００５】

error prone ＰＣＲ法は、親遺伝子を鋳型としてマンガンイオン存在下でＰＣＲ増幅をおこなうことにより、親遺伝子にランダムに塩基置換を導入して変異体集団を調製する方法である。しかし、error prone ＰＣＲ法で塩基置換変異導入効率を上げた場合に、アミノ酸置換のみならず、アミノ酸をコードするコドンがストップコドンに置換されてしまう

確率も高くなってしまうといった問題が存在する。また、このerror prone ＰＣＲ法では、変異の割合を上昇させるような条件では意図しない欠失変異が起こりやすく(Trends Biochem. Sci. 26:100-106, 2001)、その結果、他の読み枠にコードされているストップコドンが出現してしまう問題点を有している。そのため、error prone ＰＣＲ法は、通常は低い変異導入率、すなわち、遺伝子あたり２から３塩基の置換、アミノ酸として１残基の変異率が導入されるような条件で行われる。このため、機能や基質親和性を大きく変化させる人工分子を創出することは難しいと考えられる。

【０００６】

ＤＮＡシャッフリング法は、あるタンパク質をコードする遺伝子ＤＮＡ及び配列相同性を持つ１つまたは複数の類似ＤＮＡを用いて、それらを試験管内で相同組み換えさせることにより、変異体集団を調製することができる。しかしながら、ＤＮＡシャッフリング法は相同組み換えを基本としているため、比較的類似した配列間での組み換えに限定される。即ち、配列類似性の低いＤＮＡ間でシャッフリングさせることは困難である。さらに、目的の変異体集団を得るためには、ＤＮＡの切断、連結といった一連の煩雑な操作が要求される。

【０００７】

化学合成により天然の遺伝子配列の一部もしくは全てをランダマイズ化した遺伝子集団を用いる手法は、人工ＲＮＡ酵素(リボザイム)など機能性核酸の作成において有効な効果を示しているが、機能性人工タンパク質の創製には至っていない。その理由としては、（１）ランダムに変異を導入した集団には、タンパク質翻訳を停止するストップコドンが高頻度で出現するため、長いＯＲＦ(Open Reading Frame)をもつ遺伝子の作製は難しい、（２）２０種類のタンパク質が構成する配列空間は、４種類の塩基から構成される核酸の配列空間と比較して広大なために、ランダムな配列集団から機能性タンパク質を選択することが極めて困難である、ことなどが挙げられる。

【０００８】

近年、核酸やタンパク質の機能や構造に重要な役割を果たす短い配列(モチーフ配列)の役割に注目が集まっている。モチーフ配列を利用して人工遺伝子集団を作成する手法として、本発明者の発明した高分子マイクロ遺伝子重合体の作製手法（特許３４１５９９５号公報； Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:3805-3810, 1997）が挙げられる。この手法を用いることにより、全ての翻訳読み枠のストップコドンが排除された人工遺伝子を準備することができる。この方法は、あらかじめ終止コドンが排除された短いＤＮＡ配列（マイクロ遺伝子）をタンデムに重合し大きな翻訳読み枠を調製する方法である。更に、繰り返しの単位となるマイクロ遺伝子を、本発明者の発明した多機能塩基配列設計法（特開２００１－３５２９９０号公報）を用い、三つの読み枠に目的の機能や構造に対応したモチーフ配列をコードするようにデザインすることから、潜在能力の高い人工遺伝子集団を調製することができる。

【０００９】

しかしながら克服すべき課題として、（１）人工遺伝子集団に導入できるモチーフの数が、読み枠の数に対応した三つに限定される、（２）配列多様性をもつ人工遺伝子集団作成のためには、マイクロ遺伝子重合反応の際に生じるランダムなフレームシフトに依存する、（３）目的の実験に応じてモチーフ配列の出現頻度を調節することが困難である、ことが挙げられる。 また、上記のマイクロ遺伝子重合体の作製手法（特許３４１５９９５号公報）は、マイクロ遺伝子の繰り返し重合体の作成を目的とするため、複数種のモチーフ配列をランダムに重合した遺伝子集団を作製するには至っていない。

【００１０】

以上の背景から、天然には存在しない非凡な機能を持った人工タンパク質を進化分子工学的に創製する場合の成功の鍵となる人工遺伝子多様性集団（ライブラリー）を効果的に創出するために、複数種のモチーフ配列を少なくともその一部でコードするＤＮＡのランダムな組み替え技術で、かつ用いるＤＮＡの全体にわたっての配列類似性を必要としない組み替え技術及び長い翻訳読枠(Open Reading Frame;ＯＲＦ)を有し、目的の実験に適応

して自在にモチーフ配列の出現頻度を制御できるコンビナトリアルな人工遺伝子集団及び人工タンパク質集団作成技術の開発が求められている。

【００１１】

【特許文献１】特許３４１５９９５号公報。

【特許文献２】特開２００１－３５２９９０号公報。

【非特許文献１】Science,219,666-671,1983。

【非特許文献２】科学、67,938-947,1997。

【非特許文献３】PCR Methods Appl, 2:28-33, 1992。

【非特許文献４】Nature, 370:389-391, 1994。

【非特許文献５】Trends Biochem. Sci. 26:100-106, 2001。

【非特許文献６】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:3805-3810, 1997。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

本発明の課題は、機能性人工遺伝子或いは機能性人工タンパク質の効果的な創出を目的として、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団、該人工遺伝子集団がコードする人工タンパク質集団、及びその作製法を提供すること、更には、少なくともその一部でモチーフ配列をコードし、全体にわたっての高い配列類似性を条件としないＤＮＡをランダムに重合することができ、かつ、ストップコドンの出現を回避した一本鎖ＤＮＡをランダムに重合することで、長い翻訳読枠（ＯＲＦ）を有するＤＮＡ配列のランダム重合を可能とした、コンビナトリアルな人工遺伝子及び人工タンパク質集団の作製方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討の結果、任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡを少なくても３種以上構築し、その一本鎖ＤＮＡ配列の末端配列の一部に互いに相補的塩基対を形成できるような塩基配列を導入し、該多種の一本鎖ＤＮＡを任意の割合で混合して、ＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、相補的塩基対の組合わせと多種の一本鎖ＤＮＡのそれぞれの濃度等による塩基対の形成の頻度により、多数種のモチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させることが可能であり、かつ、全体にわたっての高い配列類似性を条件としない、少なくともその一部でモチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな組み替え、及び長い翻訳読枠（ＯＲＦ）を有するＤＮＡ配列のランダム重合が可能であることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【００１４】

すなわち、本発明は、任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡの少なくても３種以上のＤＮＡ配列を構築し、該一本鎖ＤＮＡ配列の末端配列の一部が互いに相補的塩基対を形成できるように、相補的塩基配列を導入し、該方法により構築した多種の一本鎖ＤＮＡを任意の割合で混合した反応液にＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させ、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団を作製することからなる。本発明におけるのモチーフ配列としては、少なくても３種以上、望ましくは４種以上のモチーフ配列をそれぞれ存在させた一本鎖ＤＮＡを構築することが望ましい。

【００１５】

本発明において、一本鎖ＤＮＡ配列の末端配列の一部の相補的塩基対は、通常、３′末端に導入することができ、該相補的塩基対の数は６塩基以上であることが好ましい。該相補的塩基対の両端には、相手の塩基と対にならない塩基を１塩基以上、好ましくは１～３の範囲で存在させ、ＤＮＡポリメラーゼによる重合反応の効率を上げることができる。本発明において、任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡは、機能モチーフ配列、構造モチーフ配列、進化分子工学的に取得された人工ペプチド配列、又はタンパ

ク質工学的な知識に基いてデザインされた配列に基いて構築されたマイクロ遺伝子であることができ、該マイクロ遺伝子の構築に際しては、合成する一本鎖ＤＮＡ配列内で、予め各翻訳読み枠で、停止コドンを排除しておくことができる。また、本発明においては、多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡに制限酵素認識配列を付加することで、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度を制限酵素反応により直接モニターできるように人工遺伝子集団の作製を行うことができる。

【００１６】

本発明の、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法により作製された人工遺伝子集団は、更に、この人工遺伝子集団を翻訳し、人工タンパク質に変換することで、多数種モチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団を作製することができる。該人工タンパク質集団の作製に際して、本発明においては、多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡを塩基変異、欠損を挿入することなくランダムに重合して人工遺伝子集団を作製し、該人工遺伝子集団を翻訳することでフレームシフトに依存せずに、多数種モチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団を作製することができる。また、本発明においては、多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡを塩基変異、欠損を挿入しつつランダムに重合して人工遺伝子集団を作製し、該人工遺伝子集団を翻訳することでフレームシフトに依存して、多数種モチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団を作製することができる。このようにして、調製される本発明の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団、或いは、多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団は、それらの集団について、機能性遺伝子或いは機能性タンパク質をスクリーニングすることにより機能性人工遺伝子又は機能性人工タンパク質を創出することができる。

【００１７】

すなわち具体的には本発明は、［１］（１）任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡの少なくても３種以上のＤＮＡ配列を構築し、（２）該一本鎖ＤＮＡ配列の３´末端配列の一部が互いに相補的塩基対を形成し、かつ該相補的塩基対の両端に相手の塩基と対にならない塩基が１塩基以上存在するように、相補的塩基配列を導入し、（３）該方法により構築した多種の一本鎖ＤＮＡを調節された濃度で混合した反応液にＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応をランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールして進行させることを特徴とする多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法や、［２］任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡの少なくても４種以上のＤＮＡ配列を構築し、該一本鎖ＤＮＡを調節された濃度で混合した反応液にＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させることを特徴とする前記［１］記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法や、［３］相補的塩基対の数が、６塩基以上であることを特徴とする前記［１］又は［２］記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法や、［４］相補的塩基対の両端に、相手の塩基と対にならない塩基を１～３のいずれかの塩基数、存在させたことを特徴とする前記［１］～［３］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法、［５］また多種の一本鎖ＤＮＡの相補的塩基対の組合わせを調節して、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールすることを特徴とする前記［１］～［４］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法や、［６］ランダム重合反応系に加えられる多種の一本鎖ＤＮＡの濃度が、０．２μＭ～２０μＭの範囲で変動することを特徴とする前記［１］～［５］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法からなる。

【００１８】

また本発明は、［７］構築した多種の一本鎖ＤＮＡを反応液に混合し、該導入した一本鎖ＤＮＡの相補的塩基配列を鋳型として、３´末端から５´末端方向に作用するエキソヌクレアーゼ活性を含む耐熱性ＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列

をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させることを特徴とする前記［１］～［６］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法や、［８］任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡが、機能モチーフ配列、構造モチーフ配列、進化分子工学的に取得された人工ペプチド配列、又はタンパク質工学的な知識に基いてデザインされた配列に基いて構築されたマイクロ遺伝子であることを特徴とする前記［１］～［７］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法や、［９］マイクロ遺伝子の構築に際して、合成する一本鎖ＤＮＡ配列内で、予め各翻訳読み枠で、停止コドンを排除しておくことを特徴とする前記［８］記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法および［１０］任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡが、多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡに制限酵素認識配列を付加することで、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度を制限酵素反応により直接モニターできるように構築されていることを特徴とする前記［１］～［９］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法からなる。

【００１９】

更に本発明は、［１１］前記［１］～［１０］のいずれか記載の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法により作製した遺伝子を組込んだベクターを、宿主細胞に導入し、発現することを特徴とする多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団の作製方法や、［１２］多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡを塩基変異、欠損を挿入することなくランダムに重合して人工遺伝子集団を作製し、該人工遺伝子集団を翻訳することでフレームシフトに依存せず多様性分子集団をえることを特徴とする前記［１１］記載の多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団の作製方法や、［１３］多数種モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡを塩基変異、欠損を挿入しつつランダムに重合して人工遺伝子集団を作製し、該人工遺伝子集団を翻訳することでフレームシフトに依存して多様性分子集団をえることを特徴とする前記［１１］記載の多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団の作製方法および［１４］前記［１］～［１０］のいずれか記載の作製方法により作製された、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団、又は前記［１１］～［１３］のいずれか記載の多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団について、機能性遺伝子或いは機能性タンパク質をスクリーニングすることを特徴とする機能性人工遺伝子又は機能性人工タンパク質の創出方法からなる。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】本発明のモチーフ配列を利用した人工タンパク質集団作製の概略を示す図である。

【図２】本発明の実施例における、制限酵素認識配列を含む一本鎖DNAのデザイン（上)及びランダム重合反応の電気泳動図を示す図である。ＫＹ－１３５４の３′端が、ＫＹ－１３５５－ＫＹ－１３５７の３′端と相補的塩基対を形成するようにデザインした。電気泳動の結果、ＫＹ－１３５４のみでは、重合反応は進行しないが（レーン１）、種々の組み合わせでＤＮＡを混合することで、重合反応が進行した(レーン２－６)。Ｍは、マーカーＤＮＡを表す。

【図３】本発明の実施例において、制限酵素反応による複数種ＤＮＡランダム重合の確認の結果を示す図である。

【図４】本発明の実施例における、制限酵素認識モチーフをもつDNA重合産物の配列を示す図である。

【図５】本発明の実施例における、アポトーシス制御型タンパク質に存在するＢＨ１－ＢＨ４モチーフをもつ一本鎖ＤＮＡのデザイン(A)とデザイン(B)を示す図である。デザインAでは、ＫＹ－１３７２の３′端が、ＫＹ－１３７４、ＫＹ－１３７５、ＫＹ－１３７７の３′端と相補的塩基対を形成するようにデザインした。デザインBでは、ＫＹ－１３７２及びＫＹ－１３７９の３′端が、ＫＹ－１３７４ 及びＫＹ－１３７５の３′端と相補

的塩基対を形成するようにデザインした。
【図６】本発明の実施例における、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含む一本鎖ＤＮＡ重合反応の電気泳動図を示す図である。。デザインA及びデザインBで合成された４種一本鎖ＤＮＡは、ともに重合反応を進行させることを確認した。
【図７】本発明の実施例における、制限酵素反応によるＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含む一本鎖ＤＮＡランダム重合の確認の結果を示す図である。制限酵素反応後の電気泳動図により、それぞれのモチーフがランダムに重合することを確認した。
【図８】ａ，ｂ，ｃは、本発明の実施例におけるデザインAにより得られた人工遺伝子集団及びその翻訳産物である人工タンパク質集団の配列を示す図である。
【図９】本発明の実施例における、人工タンパク質の哺乳類細胞での発現の確認の結果を示す図である。デザインAにより得られた人工タンパク質Ａ６の遺伝子を乳癌細胞株ＭＣＦ－７に導入し、その発現をAlexa-His抗体による免疫染色で確認した。これら人工タンパク質は、ミトコンドリアに局在して発現することがわかった。
【図１０】本発明の実施例において、デザインＢにより得られた人工遺伝子集団及びその翻訳産物である人工タンパク質集団の配列を示す図である。
【図１１】本発明の実施例において、アポトーシス制御型タンパク質に存在するＢＨ１－ＢＨ４モチーフをもつ一本鎖ＤＮＡのデザイン(Ｃ、Ｄ)及び一本鎖ＤＮＡ重合反応の電気泳動図の結果を示す図である。デザイン(Ｃ)では、４種類一本鎖ＤＮＡ(ＫＹ－１３７２、ＫＹ－１３８９、ＫＹ－１３９１)を等量混合し、重合させたのに対し、デザイン(Ｄ)では、ＫＹ－１３７２：ＫＹ－１３８９：ＫＹ－１３９０：ＫＹ－１３９１＝２：２：０．４：０．３のように、ＢＨ４とＢＨ３モチーフをコードするＫＹ－１３７２とＫＹ－１３８９の割合を多くして重合反応系に加えた。
【図１２】本発明の実施例において、制限酵素反応によるＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含む一本鎖ＤＮＡランダム重合の確認結果を示す図である。デザインＣ及びＤにおいて、三つの制限酵素による部分的切断が確認された。
【図１３】ａ，ｂは、本発明の実施例においてデザインＣにより得られた人工遺伝子集団及びその翻訳産物である人工タンパク質集団の配列を示す図である。
【図１４】ａ，ｂ，ｃは、本発明の実施例においてデザインDにより得られた人工遺伝子集団及びその翻訳産物である人工タンパク質集団の配列を示す図である。
【図１５】本発明の実施例において、人工タンパク質集団（Ｃ）と人工タンパク質集団（Ｄ）におけるＢＨ１－ＢＨ３モチーフの出現頻度を比較した結果を示す図である。ＢＨ３モチーフをコードする一本鎖ＤＮＡ(ＫＹ－１３８９)の濃度を高くして調製したタンパク質集団（Ｄ）では、ＢＨ３モチーフの出現頻度が上昇した。
【図１６】本発明の実施例における、人工タンパク質のヒト癌細胞内部での様々な局在パターンを示す図である。
【図１７】本発明の実施例において、取得した人工タンパク質Ｄ２９をコードする遺伝子の導入により、乳癌細胞株ＭＣＦ－７に誘導されたアポトーシス細胞の数を定量した図である。その効果は天然のアポトーシス誘導型タンパク質Ｂａｘと同等であり、約３０％の細胞がアポトーシス陽性細胞であった。コントロール人工タンパク質Ａ１０の遺伝子を導入した細胞では、そのようなアポトーシス陽性細胞は確認されないことがわかった。
【図１８】本発明の実施例において、Ｄ２９を発現する細胞でアポトーシスが効果的に誘導されていることを示す図である。共焦点顕微鏡による二重染色（緑；発現したタンパク質、赤；アポトーシス陽性細胞）により、Ｄ２９を発現した細胞とアポトーシス陽性細胞の相関が確認できた。コントロール人工タンパク質Ａ１０を発現した細胞では、アポトーシスは誘導されないことがわかった。
【図１９】本発明の実施例において、取得した人工タンパク質Ａ１０またはＤ１６をコードする遺伝子の導入により、子宮頸癌細胞株ＨｅＬａに誘導された増殖阻害の抑制活性を定量した図である。天然型アポトーシス誘導タンパク質ＢＩＭ、または抗癌剤エトポシド（VP-16）、スタウロスポリン（STS）によりＨｅＬａの細胞数は減少するが（ＷＳＴ－１により定量、コントロールｐｃＤＮＡ参照）、Ａ１０またはＤ１６遺伝子の導入により、

増殖活性は部分的に回復した。この増殖阻害抑制効果は、天然のアポトーシス抑制型タンパク質であるＢｃｌ－ｘＬの遺伝子をコードするプラスミドを導入した細胞でも同様に観察できた。

【図２０】本発明の実施例において、取得した人工タンパク質Ａ１０またはＤ１６が、STSにより誘導されたアポトーシスを抑制できることを示した図である。遺伝子導入後２４時間で１２５ｎＭ濃度のSTSを含む培地に交換し、細胞をさらに２３時間培養した。アポトーシス細胞をＴＵＮＥＬ法で染色した結果（赤）、コントロールのｐｃＤＮＡやＤ２９を導入した細胞では、効果的にアポトーシスが誘導されているのに対し、アポトーシス抑制型Ｂｃｌ－ｘＬ遺伝子を導入した細胞ではＴＵＮＥＬ陽性細胞数が減少した。Ａ１０やＤ１６の遺伝子を導入した細胞では、アポトーシスが部分的に抑制された。

【図２１】本発明の実施例において、取得した人工タンパク質Ｄ１６を発現した細胞が、アポトーシス陰性になることを示した図である。図２０と同様にＳＴＳ投与後２３時間経過した細胞を固定した後、人工タンパク質をＭｙｃ一次抗体とＦＩＴＣ二次抗体により緑で染色し、アポトーシス細胞をＴＭＲ－ｒｅｄ標識（赤）で二重染色した。Ｄ１６やＢｃｌ－ｘＬを発現した細胞では、アポトーシスが抑制されることがわかった。Ｄ２９を発現した細胞では、アポトーシス陽性になることが確認できた。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２１】

本発明は、機能性人工遺伝子或いは機能性人工タンパク質の効果的な創出を目的として、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団、該人工遺伝子集団がコードする人工タンパク質集団、及びその作製法を提供することからなる。本発明の多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団の作製方法は、（１）任意のモチーフ配列をコードする配列を含む一本鎖ＤＮＡの少なくても３種以上のＤＮＡ配列を構築し、（２）該一本鎖ＤＮＡ配列の末端配列の一部が互いに相補的塩基対を形成できるように、相補的塩基配列を導入し、（３）該方法により構築した多種の一本鎖ＤＮＡを任意の割合で混合した反応液にＤＮＡポリメラーゼを作用させることにより、モチーフ配列をコードするＤＮＡ間でのランダムな重合反応を進行させることにより、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団を作製することからなる。

【００２２】

本発明の人工遺伝子集団の作製方法を、操作に沿って、例を挙げながら具体的に説明する。図１に示すように、まず目的のモチーフ配列を含む複数種（多数種）の一本鎖ＤＮＡを合成する。本発明では、複数種の一本鎖ＤＮＡの３′側の配列の一部が相補的塩基対を形成できるように合成する。相補的塩基対の数は、６塩基以上が望ましい。但し相補的塩基対の両端には、相手の塩基と対にならない塩基を１塩基以上（好ましくは１－３塩基）存在するように合成する。この操作により、重合反応の効率を上昇することができる。また、加える複数種の一本鎖ＤＮＡの種類、配列、長さ、組み合わせに制限はなく、任意の配列をコードする複数種の一本鎖ＤＮＡを本反応に利用することができる。更に、相補的塩基対を形成する一本鎖ＤＮＡの組み合わせにも制限はない。

【００２３】

例えば、４種類の一本鎖ＤＮＡを用いて反応させる場合、一種類の一本鎖ＤＮＡの３′配列に対し、残り３種類の一本鎖ＤＮＡの３′配列が相補的配列を形成してもよいし、相同な３′末端配列をもつ二種類の一本鎖ＤＮＡに対し、残りの二種類の一本鎖ＤＮＡの３′配列が均等に相補的配列を形成できるようにデザインしてもよい。また、反応系に加える一本鎖ＤＮＡの濃度は、０．２μＭ～２０μＭで変動することが可能であり、より重合反応に利用したい一本鎖ＤＮＡの濃度を高くして、反応系に加える。即ち、相補的塩基対の組み合わせと一本鎖ＤＮＡ濃度を調節することで、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールすることができる。また、複数種の一本鎖ＤＮＡの設計の際、それぞれの配列の長さ及びＴｍを近い値にすることが望ましい。

【００２４】

これら複数種の一本鎖ＤＮＡの相補した領域が耐熱性ポリメラーゼを利用したＰＣＲ反

応の鋳型として機能する。このような複数種の一本鎖ＤＮＡ存在下で３′末端から５′末端方向に作用する（３′→５′）エキソヌクレアーゼ活性を含む耐熱性ＤＮＡポリメラーゼを作用させてＰＣＲ反応を行うと、モチーフ配列を含む複数種の一本鎖ＤＮＡがランダムに伸長、連結した二本鎖ＤＮＡ重合体集団が合成される。ＰＣＲの条件は、ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、Ventポリメラーゼ）を用いて、例えば９４℃で１０秒、及び５５－７５℃で６０秒を１サイクルとして、これをＤＮＡ重合が確認できるまで(３０～６５サイクル)、最後に６９℃で７分行う。上記反応を行う前に、更に９４℃で１０分、及び６９℃で１０分の反応を行うのが好ましい。さらに、伸長反応温度は、一本鎖ＤＮＡのＴｍ－５℃に近い値を設定することが好ましい。

【００２５】

このようにして、複数種の一本鎖ＤＮＡの相補した領域がランダムな組み合わせで塩基対を形成し、伸長、重合反応を繰り返す結果、モチーフ配列をコードするＤＮＡがランダムにシャフリングされた、二本鎖人工ＤＮＡ集団が作製される。なお、本発明の方法では、本発明者の発明した高分子マイクロ遺伝子重合体の作製手法（特許３４１５９９５号公報； Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:3805-3810, 1997）とは異なり、重合反応の際ＤＮＡ鎖間で生じる塩基の置換、挿入、欠損に依存せずに配列多様性集団を作製することができる。

【００２６】

以上に、本発明の人工遺伝子集団の作製方法について、例を挙げて具体的に説明したが、本発明の人工遺伝子集団の作製方法では、上記のように多種の一本鎖ＤＮＡの相補的塩基対の組合わせ及び／又は多種の一本鎖ＤＮＡのそれぞれの濃度を調節して、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールすることが可能である。また、本発明の人工遺伝子集団の作製方法においては、多数種のモチーフ配列を任意に選定し、ランダムに重合して、人工遺伝子集団、及び、人工タンパク質集団を作製するに際し、任意のモチーフ配列を、機能モチーフ配列、構造モチーフ配列、進化分子工学的に取得された人工ペプチド配列、又はタンパク質工学的な知識に基いてデザインされた配列のような配列に基いて構築し、人工遺伝子集団の作製に際して、ある程度の機能を合理性をもって予測して、人工遺伝子集団の作製を行うことが可能となる。

【００２７】

本発明の人工遺伝子集団の作製方法により作製した、多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団は、該遺伝子を組込んだベクターを、宿主細胞に導入し、発現することにより、多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団を作製することができる。該人工タンパク質集団の作製に用いられるベクター、宿主細胞及びその遺伝子の発現方法は、この分野で公知のベクター、宿主細胞、及び遺伝子の発現方法が用いられる。本発明の方法により作製された多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団、或いは、多種のモチーフ配列をランダムに挿入した人工タンパク質集団は、該人工遺伝子集団或いは人工タンパク質集団について、機能性遺伝子或いは機能性タンパク質をスクリーニングすることにより、機能性人工遺伝子又は機能性人工タンパク質の創出を行うことができる。

【００２８】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

なお、実施例の記載に先立って、本発明のモチーフ配列を利用した人工タンパク質集団作製の戦略を図１に示す。本手法は、（１）モチーフ配列をコードする複数種１本鎖ＤＮＡのデザイン、（２）複数種1本鎖DNA間でのランダム重合反応、（３）制限酵素切断反応によるランダム重合反応効率の検討、（４）ランダム重合体の大腸菌への形質転換及び配列決定、（５）大腸菌または哺乳類細胞での人工タンパク質発現及び機能性人工タンパク質のスクリーニング、の５スキームより構成される。人工遺伝子集団を得たい時(人工タンパク質の発現を必要としない場合)は、（１）－（４）までのステップで反応は完了する。本実施例では、一般的に４種類のモチーフ配列のランダム重合による人工遺伝子及び人

工タンパク質集団作製を試みているが、反応に利用できるモチーフの数は４種類に限定されない（それ以上の数も理論上可能である）。以下具体的実験例を挙げる。

【実施例１】

【００２９】

［制限酵素認識モチーフを含む４種１本鎖ＤＮＡのランダム重合による人工遺伝子集団の作製］

(制限酵素認識配列を含む一本鎖ＤＮＡのデザイン)

機能性配列を含む一本鎖ＤＮＡとして、制限酵素認識配列を含む４種類の一本鎖ＤＮＡを以下のように合成した。ＫＹ－１３５４(配列番号１：５’-GGGGAATTCGGC GGGA-3’)、ＫＹ－１３５５(配列番号２：５’-GGGAAGCTTACCCGCCA-3’)、ＫＹ－１３５６(配列番号３：５’-GGGTCTAGAACCCGCCA-3’)、ＫＹ－１３５７(配列番号４：５’-GGGAGATCTACCCGCCA-3’)。ここで、ＫＹ－１３５４、ＫＹ－１３５５、ＫＹ－１３５６、ＫＹ－１３５７の第４番目～９番目の配列(下線部)は、それぞれ制限酵素認識配列GAATTC (EcoRI)、AAGCTT (HindIII)、TCTAGA (XbaI)、AGATCT (BglII)を含むように設計した。また、ＫＹ－１３５４の第１０番目～１５番目の６塩基(5’-GGCGGG-3’)が、ＫＹ－１３５５、ＫＹ－１３５６、ＫＹ－１３５７の第１１番目～１６番目の６塩基(5’-CCCGCC-3’)と相補的塩基対を形成するように設計した。また、ＫＹ－１３５５、ＫＹ－１３５６、ＫＹ－１３５７の３´末端及び第１０番目には、ＫＹ－１３５４と６塩基以上の相補的塩基対を形成できないようにアデニン（Ａ）を導入した。更に、これら４種類の一本鎖ＤＮＡの長さ(１６－１７塩基)、Ｔｍ(～５８℃)、ＧＣ含量(６５－６９％)がそれぞれ近い値をとるように４種類の一本鎖ＤＮＡを設計した。

【００３０】

（制限酵素認識配列を含む一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応）

まず、上記一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応液５０μＬを調整した。この反応液には、１０ x ThermoPol Reaction Buffer (NEW ENGLAND BioLabs,1x ThermoPol Reaction Buffer：２０ｍＭ　２－アミノ－２－ヒドロキシメチル－１，３、－プロパンジオール塩酸塩（以下トリス塩酸）ｐＨ　８．８、１０ｍＭ　塩化カリウム、１０ｍＭ　硫酸アンモニウム、２ｍＭ　硫酸マグネシウム、０．１％　トライトンＸ－１００)を５μＬ、３５０μＭ ｄＮＴＰ、３´→５´エクソヌクレアーゼ活性をもつVent　ＤＮＡ　polymerases（２　units／μＬ、NEW ENGLAND BioLabs）を２．６μＬ、及び４種類の一本鎖ＤＮＡ(ＫＹ－１３５４－ＫＹ－１３５７)を以下６種類の割合で混合した。（１）ＫＹ－１３５４：２０ pmolのみ（ＤＮＡ１種)、（２）ＫＹ－１３５４：２０　pmol＋ＫＹ－１３５５：２０ pmol（ＤＮＡ２種）、（３）ＫＹ－１３５４：２０　pmol＋ＫＹ－１３５６：２０　pmol（ＤＮＡ２種）、（４）ＫＹ－１３５４：２０　pmol＋ＫＹ－１３５７：２０　pmol（ＤＮＡ２種）、（５）ＫＹ－１３５４：２０　pmol＋ＫＹ－１３５５：１０　pmol ＋ＫＹ－１３５６：１０　pmol（ＤＮＡ３種）、（６）ＫＹ－１３５４：２０　pmol＋ＫＹ－１３５５：６．７　pmol＋ＫＹ－１３５６：６．７　pmol＋ＫＹ－１３５７：６．７ pmol（ＤＮＡ４種）。

【００３１】

これら反応液を２００μＬ　thin wall　ＰＣＲチューブ (東洋紡績,大阪)に入れ、サーマルサイクラーＰＣＲ－２４００(パーキンエルマー, Norwalk)による温度サイクルで上記複数種一本鎖ＤＮＡ間での重合反応をおこなった。重合反応の前処理として、９４℃で１０分、６９℃で１０分の反応を行った。重合反応温度は、ＫＹ－１３５４－１３５７のＴｍ値(５８℃)以下になることを考慮して、５５℃に設定した。重合反応サイクルは、９４℃で１０秒、５５℃で６０秒行い、４０サイクルの反応を進行させた。重合反応終了後６９℃ で7minの伸長停止反応を行った。ＤＮＡ重合産物を１．０％　ＴＡＥ　アガロースゲル(アガロースME 岩井化学 東京),及びMupid 電気泳動装置 (コスモバイオ、東京)を用いて、１００Ｖ、１５分で泳動させ、重合反応を確認した(図２)。本反応により、数キロ塩基対以上にも及ぶＤＮＡがこの方法により重合されたことを確認した。

【００３２】

（制限酵素反応による複数種ＤＮＡランダム重合の確認）
制限酵素認識配列を含む一本鎖ＤＮＡのランダムな重合を確認するため、任意の制限酵素を用いてＤＮＡ重合体の切断反応を行った。異なる制限酵素を含む５種類の反応溶液５０μＬを以下のように調整した。上記ＤＮＡの重合反応液５μＬ、１０x制限酵素buffer Ｂ (HindIII, EcoRI)、又はM(BglII)、又はH(XbaI)を５μＬ、(ロシュダイアグノスティック社, Basel)、制限酵素(ロシュダイアグノスティック社, Basel)は、５類の反応溶液に対しそれぞれ、（１）酵素なし、（２）HindIII(１０units／μＬ)を２μＬ、（３）BglII(１０units／μＬ)を２μＬ、（４）XbaI(４０units／μＬ)を２μＬ、（５）EcoRI(１０units／μＬ)を２μＬ、という条件で加えた。切断反応は、３７℃、９０分で進行させた。ＤＮＡ切断反応を確認するため、５０μＬの反応液から５μＬを抽出し、１．０％ＴＡＥアガロースゲルによる電気泳動(１００Ｖ、１５分)を行った。(図３)。図３により、１－２におけるＤＮＡ重合体は、重合反応に利用した任意の一本鎖ＤＮＡに含まれる制限酵素配列で切断されること、また複数種一本鎖ＤＮＡから構成されたＤＮＡ重合体は、複数種制限酵素で切断されることを確認した。このことから、制限酵素認識モチーフを含む一本鎖ＤＮＡ間でのランダムな重合、伸長反応が生じることがわかった。

【００３３】
(大腸菌への形質転換及びＤＮＡ重合産物の配列決定)
上記のＤＮＡ配列間でのランダムな重合反応液を市販のZero Blunt ＴＯＰＯ ＰＣＲ Cloning Kit (Invitrogen, CA)を利用してクローニング及び配列決定を行った。ライゲーション反応は６μＬの反応スケールで行い、この反応液には、ＤＮＡ重合産物１μＬ、Salt Solution １μＬ、ＴＯＰＯ vector １μＬ、超純水３μＬ が含まれる。以上反応液を室温３０分で反応させた後、２μＬ反応液をTop－１０cell(Invitrogen)に混合し、形質転換した。インサートを含む１８クローンを選択し、そのプラスミドをQIAGEN mini kit(キアゲン)により精製し、ＤＴＣＳ cycle sequence reaction kit(ベックマン)を用いたダイターミネイト法によりキャピラリーシーケンサーCEQ2000XL ＤＮＡ analyzer(ベックマン)で配列を決定した。ＫＹ－１３５４、ＫＹ－１３５５、ＫＹ－１３５７、の３種一本鎖ＤＮＡを混合した重合体から得られたクローン一つ(ＥＨＢ＃７：配列番号５)と、ＫＹ－１３５４、ＫＹ－１３５５、ＫＹ－１３５６、ＫＹ－１３５７の４種一本鎖ＤＮＡを混合した重合体から得られたクローン三つ(ＥＨＢＸ１～ＥＨＢＸ３：配列番号６、７、８)を図４に示す。図４で示されるように、３又は４種類の制限酵素認識配列を含むＤＮＡが任意の割合でランダム重合した、人工遺伝子集団を得ることができた。

【実施例２】
【００３４】
［アポトーシス制御型タンパク質に存在するＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列ランダム重合による人工タンパク質集団（Ａ）の作製］
(アポトーシス制御モチーフＢＨ１－ＢＨ４の選択)
プログラムされた自発的細胞死(アポトーシス)を制御する天然タンパク質として、Bcl-2 familyタンパク質ファミリーが知られている。そのファミリーに属するBcl-xlはアポトーシス抑制に、Noxaは、アポトーシス促進に重要であることがわかっている。ここでは、human Bcl-xlタンパク質に内在するＢＨ１、ＢＨ２、ＢＨ４モチーフの一部配列、及びhuman Noxaタンパク質に内在するＢＨ３モチーフの一部配列を、人工タンパク質集団作成のモチーフ配列として利用することを試みた。以下のペプチド配列をコードする部分をＢＨ１－ＢＨ４モチーフからそれぞれ選択した。ＢＨ１：ELFRDGVN、ＢＨ２：ENGGWDTF、ＢＨ３：LRRFGDKLN、ＢＨ４：RELVVDFL。

【００３５】
（ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列をコードする一本鎖ＤＮＡのデザイン：Ａ）
ＢＨ１－ＢＨ４モチーフから構成される人工タンパク質集団Ａを作成するために、各翻訳読み枠の停止コドンを排除した一本鎖ＤＮＡを芝らの発明した多機能塩基配列設計法(特開２００１－３５２９９０)によりデザインした。ここでは、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフをコードする遺伝子の別の読み枠には、人工タンパク質の安定化を助けるために、α－ヘリ

ックス性の高いペプチドがコードされるように４種類一本鎖ＤＮＡをデザインした(図５)。ここで、ＫＹ－１３７２(配列番号９)、ＫＹ－１３７７(配列番号１０)、ＫＹ－１３７５(配列番号１１)、ＫＹ－１３７４(配列番号１２)は、それぞれ制限酵素認識配列GTCGAC (SalI)、AAGCTT(HindIII)、AGATCT (BglII)、GAATTC (EcoRI)を含むように設計した（図５、デザインＡ、下線）。

【００３６】

また、ＫＹ－１３７２の３′端７塩基(5’-GGCGGGG-3’)が、ＫＹ－１３７７、ＫＹ－１３７５、ＫＹ－１３７４の３′端７塩基(5’-CCCCGCC-3’)と相補的塩基対を形成するように設計した。また、ＫＹ－１３７２の３′末端及び３′末端から９番目の塩基には、７塩基対以上の相互作用が形成されないようにアデニン(A)及びシトシン(C)をそれぞれ挿入した。さらに、これら４種類の一本鎖DNA設計の際に、その長さ（４０－４５）、ＧＣ塩基の含有度(５５－６５％)、分子内ヘアピン形成能、Ｔｍがそれぞれ近い値をとるように設計した。

【００３７】

(ＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含む一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応)

まず、上記一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応液５０μＬを調整した。この反応液組成は、１０ x ThermoPol Reaction Buffer(実施例１と同様)を５μＬ、３５０μＭ　ｄＮＴＰ、Vent ＤＮＡ polymerases (2 units/μL, NEW ENGLAND BioLabs)を２．６μＬ、及び４種類の一本鎖ＤＮＡ(ＫＹ－１３７２、ＫＹ－１３７７、ＫＹ－１３７５、ＫＹ－１３７４)を種々の割合で混合し、実施例１と同様のＤＮＡランダム重合反応を行った。重合反応の前処理として、９４℃で１０分、６９℃で１０分の反応を行った。重合反応温度は、７２℃に設定した。重合反応サイクルは、９４℃で１０秒、５５℃で６０秒行い、４０サイクルの反応を進行させた。

【００３８】

重合反応終了後６９℃で７ｍｉｎの伸長停止反応を行った。ＤＮＡ重合産物を１．０％ＴＡＥアガロースゲル(アガロースＭＥ　岩井化学 東京)、及びMupid　電気泳動装置 (コスモバイオ、東京)を用いて、１００Ｖ、１５分で泳動させ、重合反応を確認した(図６)。また、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフをコードする一本鎖ＤＮＡがそれぞれ類似の頻度でランダム重合するように、反応の最適化を行った結果、ＫＹ－１３７４：ＫＹ－１３７５：ＫＹ－１３７７：ＫＹ－１３７２＝２：１：１００：１００のように一本鎖ＤＮＡ量比を設定した。本反応により、数キロ塩基対以上にも及ぶＤＮＡがこの方法により重合されたことを確認した。

【００３９】

(制限酵素反応によるＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含むＤＮＡランダム重合の確認)

ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡのランダムな重合を確認するため、任意の制限酵素を用いてＤＮＡ重合体の切断反応を行った。異なる制限酵素を含む５種類の反応溶液５０μＬを以下のように調整した。ＤＮＡ重合反応液５μＬ、１０x制限酵素buffer　H(SalI, or EcoRI)、又はM(HindIII,or BglII)を５μＬ、(ロシュダイアグノスティック社, Basel)、制限酵素(ロシュダイアグノスティック社, Basel)は、５類の反応溶液に対しそれぞれ、（１）酵素なし、（２）SalI（４０units/μL)を２μＬ、（３）HindIII(１０units／μＬ)を２μＬ、（４）EcoRI(１０units／μＬ)を２μＬ、（５）BglII(１０units／μＬ)を２μＬという条件で加えた。切断反応は、３７℃、９０分で進行させた。ＤＮＡ切断反応を確認するため、５０μＬの反応液から５μＬを抽出し、１．０％ＴＡＥアガロースゲルによる電気泳動(１００Ｖ、１５分)を行った(図７)。図７のように、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡから構成されたＤＮＡ重合体が、用いた全ての制限酵素で部分的に切断されることがわかった。このことから、４種類一本鎖ＤＮＡ間でのランダムな重合反応が確認できた。

【００４０】

(大腸菌への形質転換、スクリーニング、及びＤＮＡ重合産物の配列決定)

上記ＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含むＤＮＡ重合反応産物を市販のpcDNA3.1Directional TO

PO Expression Kit (Invitrogen, CA)を利用してクローニング及び配列決定を行った。ここでは、哺乳類細胞系での機能性人工タンパク質スクリーニングのために、哺乳類発現ベクター(pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, Invitrogen)に人工遺伝子をライゲーションした。ライゲーション反応は６μＬのスケールで行い、この反応液には、ＤＮＡ重合反応産物１μＬ、Salt Solution　１μＬ、ＴＯＰＯ　vector　１μＬ、超純水３μＬが含まれる。以上反応液を室温３０分で反応させた後、２μＬの反応液をＴｏｐ－１０cell(Invitrogen)に混合し、氷上に３０ｍｉｎ静地したのち形質転換した。スクリーニングＰＣＲより、インサートを含むクローンから１０種を選択し、そのプラスミドをQIAGEN mini kit(キアゲン)により精製し、DTCS cycle sequence reaction kit(ベックマン)を用いたダイターミネイト法によりキャピラリーシーケンサーCEQ2000XL　ＤＮＡ　analyzer(ベックマン)で配列を決定した(配列番号１３－４２)。

【００４１】

得られた人工タンパク質の遺伝子配列及びアミノ酸配列を図８（配列番号１３－４２）に示す。図８から、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフをコードする人工ＤＮＡがランダムに挿入した人工タンパク質集団を作成できることがわかった。また、「ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡのデザインＡ」においては、より配列多様性の高いライブラリー作製のために、ＤＮＡ重合反応の際に生じるフレームシフトに依存してモチーフが導入されるように遺伝子をデザインした（フレームシフトが起きなければ読み枠がずれる)。図８に示すように、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフをコードする読み枠とは別の読み枠配列が多く出現した。このように本手法では、複数種モチーフ配列を利用してライブラリーを作製できるが、別の翻訳読み枠の配列を利用することで配列多様性を増加させることが可能である。

【００４２】

(人工タンパク質の哺乳類細胞での発現の確認)

上記配列決定した人工タンパク質の哺乳類細胞での発現を確認するため、ＭｘＡ６(図８、ａ，ｂ、ｃ参照)の遺伝子をコードするプラスミドを代表的ヒト乳癌細胞株の一つであるＭＣＦ－７に遺伝子導入した。コントロールとしては、人工タンパク質をコードしないｐｃＤＮＡベクター(Invitrogen)を細胞に導入した。遺伝子導入２４時間後にＭＣＦ－７をメタノール固定し、ヒスチジン-タグのついた人工タンパク質の発現をAlexa-His-抗体(キアゲン社)による免疫染色で確認した(図９)。図９のように、コントロールでは発現が認められないのに対しＭｘＡ６の遺伝子を導入した細胞では、人工タンパク質の発現が認められ、またその局在は、ミトコンドリアに一致することがわかった。このような哺乳類細胞系または大腸菌の発現系を利用して、人工タンパク質集団の発現及び機能性人工タンパク質のスクリーニングを行うことができる。

【実施例３】

【００４３】

［アポトーシス制御型タンパク質に存在するＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列ランダム重合による人工タンパク質集団（Ｂ）の作製］

実施例２の人工タンパク質集団（Ａ）の作製 では、ＢＨ４モチーフをコードするＫＹ－１３７２がＢＨ３、ＢＨ２又はＢＨ１モチーフをコードする一本鎖ＤＮＡ(ＫＹ－１３７７、ＫＹ－１３７５、ＫＹ－１３７４)と相補的塩基対を形成するようにデザインした(１：３対応)。人工タンパク質集団（Ｂ）の作製 では、ＢＨ３又はＢＨ４モチーフをコードする一本鎖ＤＮＡが、ＢＨ２又はＢＨ１モチーフをコードする一本鎖ＤＮＡと相補的塩基対を形成するようにデザインする(２：２対応)(図５)。このように、相補的塩基対を形成する一本鎖ＤＮＡの比は、自在に調節することができる。他の手法は基本的に人工タンパク質集団（Ａ）の作製と同様である。

【００４４】

(ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡのデザイン：Ｂ)

ＢＨ１－ＢＨ４モチーフから構成される人工タンパク質集団Ｂを作成するために、４種類の一本鎖ＤＮＡＫＹ－１３７２、ＫＹ－１３７９(ＢＨ３モチーフ、配列番号４３)、ＫＹ

－１３７５、ＫＹ－１３７４を芝らの発明した多機能塩基配列設計法(特開２００１－３５２９９０)によりデザインした。ここで、ＫＹ－１３７２、ＫＹ－１３７９、ＫＹ－１３７５、ＫＹ－１３７４は、それぞれ制限酵素認識配列GTCGAC (SalI), CTCGAG(XhoI), AGATCT (BglII), GAATTC (EcoRI)を含むように設計した（図５デザインＢ、下線）。また、ＫＹ－１３７２又はＫＹ－１３７９の３′端７塩基(5’-GGCGGGG-3’)が、ＫＹ－１３７５及びＫＹ－１３７４の３′端７塩基(5’-CCCCGCC-3’)と相補的塩基対を形成するように設計した。また、ＫＹ－１３７２及びＫＹ－１３７９の３′末端及び３′末端から９番目の塩基には、７塩基対以上の相互作用が形成されないようにアデニン（Ａ）及びシトシン（Ｃ）をそれぞれ挿入した。

【００４５】

(ＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含む一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応)

まず、上記一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応液５０μＬを調整した。XhoIをコードするＫＹ－１３７９の重合反応検討のためにXhoIを利用したことを除いて、人工タンパク質集団（Ａ）の作製の項と同様に調整した。重合反応は、１％アガロースゲルにより確認した。

【００４６】

(図６)。また、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフがそれぞれ類似の頻度でランダム重合するように、反応の最適化を行った結果ＫＹ－１３７４：ＫＹ－１３７５：ＫＹ－１３７９：ＫＹ－１３７２＝４：１：１０：１のようにＢＨ１－ＢＨ４量比を設定した。

【００４７】

(制限酵素反応によるＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含むＤＮＡランダム重合の確認)

ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡのランダムな重合を確認するため、任意の制限酵素を用いてＤＮＡ重合体の切断反応を行った。制限酵素にXhoIを加えたことを除いて、反応は人工タンパク質集団（Ａ）の作製の項と同様である。５類の反応溶液に対しそれぞれ、（１）酵素なし、（２）SalI(４０units／μＬ)を２μＬ、（３）XhoI(１０units／μＬ)を２μＬ（４）EcoRI(１０units／μＬ)を２μＬ、（５）BglII(１０units／μＬ)を２μＬという条件で加えた。切断反応は、３７℃、９０分で進行させた。ＤＮＡ切断反応を確認するため、５０μＬの反応液から５μＬを抽出し、１．０％ＴＡＥアガロースゲルによる電気泳動(１００Ｖ、１５分)を行った。(図７)。図７のように、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡから構成されたＤＮＡ重合体が、用いた全ての制限酵素で部分的に切断されることがわかった。このことから、４種一本鎖ＤＮＡのランダムな重合反応が確認できた。

【００４８】

(大腸菌への形質転換、スクリーニング、及びＤＮＡ重合産物の配列決定)

人工タンパク質集団（Ａ）の作製の項と同様に形質転換及び配列決定を行った。人工タンパク質の遺伝子配列及びアミノ酸配列を図１０(配列番号４４－５３)に示す。

【実施例４】

【００４９】

［アポトーシス制御型タンパク質に存在するＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列ランダム重合による人工タンパク質集団（Ｃ）の作製］

実施例２及び実施例３における人工タンパク質集団（Ａ、Ｂ）の作製では、ＤＮＡ重合反応の際に生じるランダムな塩基欠損もしくは挿入に起因するフレームシフトに依存して、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフが人工タンパク質集団にランダム挿入された。このため、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフの出現頻度が比較的少なかった（違う翻訳読み枠が多く出現する）。ここではフレームシフトに依存せずに、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフがランダム重合するように一本鎖ＤＮＡのデザインを改変した。他の手法は基本的に人工タンパク質集団（Ａ）の作製と同様である。フレームシフトに依存せず、より多くのＢＨ１－ＢＨ４モチーフが人工タンパク質集団に出現することが実施例４では期待される。

【００５０】

(ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡのデザイン：Ｃ)

ＢＨ１－ＢＨ４モチーフから構成される人工タンパク質集団Ｃを作成するために、４種

類の一本鎖ＤＮＡ　ＫＹ－１３７２、ＫＹ－１３８９(配列番号５４)、ＫＹ－１３９０(配列番号５５)、ＫＹ－１３９１(配列番号５６)をデザインした(図１１、ＫＹ－１３７２：ＢＨ４モチーフ、ＫＹ－１３８９：ＢＨ３モチーフ、ＫＹ－１３９０：ＢＨ１モチーフ、ＫＹ－１３９１：ＢＨ２モチーフ)。ＫＹ－１３８９、ＫＹ－１３９０、ＫＹ－１３９１はそれぞれＫＹ－１３７７、ＫＹ－１３７４、ＫＹ－１３７５の５′末端にCCを付加した配列である。これにより、フレームシフトに依存せずに、ランダム重合したＢＨ１－ＢＨ４モチーフが人工タンパク質集団に出現する。ＫＹ－１３７２、ＫＹ－１３８９、ＫＹ－１３９０、ＫＹ－１３９１は、それぞれ制限酵素認識配列GTCGAC (SalI), AAGCTT (HindIII), GAATTC (EcoRI), AGATCT (BglII)を含むように設計した（図１１デザインＣ、下線）。また、ＫＹ－１３７２の３′端７塩基(5’-GGCGGGG-3’)が、ＫＹ－１３８９－ＫＹ－１３９１の３′端７塩基(5’-CCCCGCC-3’)と相補的塩基対を形成するように設計した。また、ＫＹ－１３７２の３′末端及び３′末端から９番目の塩基には、７塩基対以上の相互作用が形成されないようにアデニン（Ａ）及びシトシン（Ｃ）をそれぞれ挿入した。

【００５１】

(ＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含む一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応)

上記一本鎖ＤＮＡのランダム重合反応液５０μＬを人工タンパク質集団（Ａ）の作製の項と同様に調整した。加える一本鎖ＤＮＡは、ＫＹ－１３７２：ＫＹ－１３８９：ＫＹ－１３９０：ＫＹ－１３９１＝１：１：１：１のようにそれぞれ等量の一本鎖ＤＮＡを重合反応系に加えた。重合反応は、７２℃、４５サイクルで行い、１％アガロースゲルにより重合を確認した(図１１)。

【００５２】

(制限酵素反応によるＢＨ１－ＢＨ４モチーフを含むＤＮＡランダム重合の確認)

ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡのランダムな重合を確認するため、任意の制限酵素を用いてＤＮＡ重合体の切断反応を行った。反応条件は人工タンパク質集団（Ａ）の作製の項と同様である。５類の反応溶液に対しそれぞれ、（１）酵素なし、（２）HindIII(１０units/μL)を２μＬ、（３）EcoRI(１０units／μＬ)を２μＬ、（４）BglII(１０units／μＬ)を２μＬ、という条件で加えた。図１２のように、ＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列を含む一本鎖ＤＮＡから構成されたＤＮＡ重合体が、用いた全ての制限酵素で部分的に切断されることがわかった。このことから、４種一本鎖ＤＮＡのランダムな重合反応が確認できた。

【００５３】

(大腸菌への形質転換、スクリーニング、及びＤＮＡ重合産物の配列決定)

人工タンパク質集団（Ａ）の作製の項と同様に形質転換及び配列決定を行った。デザインＣにより得られた人工タンパク質の遺伝子及びアミノ酸配列を図１３ａ，ｂに示す（配列番号５７－７４）。図１３のように４つのＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列が高頻度で出現する人工タンパク質集団をえることに成功した。

【実施例５】

【００５４】

［アポトーシス制御型タンパク質に存在するＢＨ１－ＢＨ４モチーフ配列ランダム重合による人工タンパク質集団（Ｄ）の作製］

実施例４の人工タンパク質集団（Ｃ）の作製の結果、得られたタンパク質集団は、比較的ＢＨ３モチーフの出現頻度が低いという結果が得られた。よって実施例５では、ＤＮＡ重合反応に加える一本鎖ＤＮＡの量比は、ＫＹ－１３７２：ＫＹ－１３８９：ＫＹ－１３９０：ＫＹ－１３９１＝２：２：０．４：０．３のように、ＢＨ４とＢＨ３モチーフをコードするＫＹ－１３７２とＫＹ－１３８９の割合を多くして重合反応系に加えた。以外全ての反応条件は、実施例４の人工タンパク質集団（Ｃ）の作製と同様の条件で行った。図１１にランダム重合体の電気泳動図、図１２に制限酵素による切断、図１４ａ，ｂ，ｃに得られた人工タンパク質の遺伝子及びアミノ酸配列をそれぞれ示す（配列番号７５－１００）。図１４に示すように、４つのモチーフが高頻度で出現し、特にＢＨ４－ＢＨ３モチ

ーフの出現頻度が高い人工タンパク質集団の作成に成功した。このように、ＤＮＡ重合反応の際に混合する一本鎖ＤＮＡの量比を変化させることで、人工タンパク質集団に含まれるモチーフの割合を制御することができる。人工タンパク質集団（Ｃ）と人工タンパク質集団（Ｄ）におけるＢＨ１－ＢＨ３モチーフの出現頻度を比較したものを図１５に示す。

【実施例６】

【００５５】

[人工タンパク質のヒト癌細胞での発現及び局在多様性]

実施例２、３、４、及び５で作製した人工タンパク質集団Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの中から無作為に４１クローンを選択し、その遺伝子をヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７に導入した。遺伝子導入２４時間後にＭＣＦ－７をメタノール固定し、Ｍｙｃエピトープタグ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ；配列番号１０１）のついた人工タンパク質の発現をＭｙｃ抗体による免疫染色で確認した。その結果、４１クローン中２８クローン（６８％）で、タンパク質の効果的発現がヒト細胞内で観察できた。また、その細胞内局在を検討した結果、細胞質に存在するもの（１１クローン）、核に存在するもの（５クローン）、ミトコンドリアに存在するもの（５クローン）、それ以外（７クローン）と非常に多様であることがわかった（図１６）。このように、本手法により得られた人工タンパク質は、哺乳類細胞内で効果的に発現し、細胞内で様々なオルガネラに局在できる能力をもつことがわかった。

【実施例７】

【００５６】

［癌細胞に細胞死を誘導する機能性人工タンパク質の創出］

実施例６において、タンパク質発現を確認した２８クローンの遺伝子をヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７に導入し、ＭＣＦ－７の増殖に及ぼす効果を検討した。９６ウエルの細胞培養プレートに、１ウエルあたり1×10^4のＭＣＦ－７を播種し、３７度で２４時間培養した。その後、２８クローンの遺伝子をコードするプラスミド０．２μｇをリポフェクタミン２０００(Invitrogen)を用いてＭＣＦ－７内に導入した。遺伝子導入４８時間後に、増殖活性をミトコンドリアの代謝活性の指標であるテトラゾリウム塩ＷＳＴ－１を用いて定量した（Roche）。コントロールであるタンパク質をコードしない空ベクターを導入した場合の増殖活性と比較した結果、２８種のクローン中一つのクローンＤ２９が、有為にＭＣＦ－７の増殖を阻害することがわかった（コントロールに対し約４０％の増殖阻害効果）。

【００５７】

この増殖阻害活性が、プログラムされた自発的細胞死（アポトーシス）によるものかどうかを検討するため、アポトーシス細胞を検出する指標であるＴＵＮＥＬ染色をおこなった（Roche）。ＴＵＮＥＬ染色では、アポトーシス初期での断片化されたＤＮＡを蛍光標識したヌクレオチドにより検出することができる。この結果、Ｄ２９は天然細胞死誘導タンパク質Ｂａｘと同等の程度ＭＣＦ－７にアポトーシスを誘導できることがわかった（図１７）。これに対し、ＷＳＴ－１により細胞増殖阻害が認められなかったクローンの一つＡ１０は、ＭＣＦ－７にアポトーシスを誘導できないことがわかった。さらに共焦点顕微鏡をもちいて人工タンパク質を発現している細胞の状態を詳しく検討した結果、Ｄ２９を発現している細胞とTUNEL陽性細胞の明確な相関が認められた（図１８）。このように、本手法によりアポトーシス制御型モチーフ配列のランダム重合により作製した人工タンパク質集団は、乳癌細胞にアポトーシスを誘導できる機能性人工タンパク質を含むことがわかった。

【実施例８】

【００５８】

［同一タンパク質集団を利用した細胞死抑制型機能性人工タンパク質の創出］

実施例６において発現を確認したクローンは、細胞死促進型ＢＨ３モチーフと同様に細胞死抑制型ＢＨ４モチーフも含んでいる。よってこれらクローンから、実施例７の細胞死促進型人工タンパク質とは逆の機能をもつ、細胞死抑制型機能性タンパク質を取得できる可能性を検討した。タンパク質発現を確認した２８クローンの遺伝子及び天然の細胞死促

進型タンパク質ＢＩＭの遺伝子をヒト子宮頸癌細胞株ＨｅＬａに導入し、ＢＩＭの増殖阻害活性に及ぼすクローンの効果を検討した。９６ウエルの細胞培養プレートに、１ウエルあたり０．５ｘ１０^{4}のＨｅＬａを播種し、３７度で２４時間培養した。その後、２８クローンの遺伝子をコードするプラスミド１００ｎｇ、及びＢＩＭをコードするプラスミド５０ｎｇをリポフェクタミン２０００(Invitrogen)を用いてＨｅＬａ内に導入した。遺伝子導入４８時間後に、増殖活性をテトラゾリウム塩ＷＳＴ－１により定量した(Roche)。コントロールであるＧＦＰをコードしたベクターを導入した場合の増殖活性と比較した結果、２８種のクローン中二つのクローンＡ１０及びＤ１６が、有為にＢＩＭによる増殖阻害を抑制することがわかった（図１９）。このような増殖阻害抑制効果は、天然のアポトーシス抑制型タンパク質であるＢｃｌ－ｘＬの遺伝子をコードするプラスミドを導入した細胞でも観察できた。さらに、二種類の抗癌剤、エトポサイド(VP-16)とスタウロスポリン(STS)による増殖阻害が、Ａ１０及びＤ１６を導入したＨａＬａ細胞で部分的に抑制されたることもわかった（図１９）。

【００５９】

この細胞死抑制活性が、アポトーシスの抑制によるものかどうかを検討するため、ＴＵＮＥＬ染色をおこなった(Roche)。約１ｘ１０^{5}のＨｅＬａ細胞に人工タンパク質をコードするプラスミド０．４μｇを遺伝子導入し、２４時間後に１２５ｎＭのＳＴＳを含む培地に交換し、さらに２３時間インキュベートした。この結果、Ａ１０またはＤ１６を導入したＨｅＬａ細胞では、STSによるアポトーシスが有為に抑制されることがわかった（図２０）。これに対し、空ベクターpcDNAやＤ２９をコードするプラスミドを導入したほぼ全ての細胞は、TUNEL陽性であった。さらに共焦点顕微鏡をもちいて人工タンパク質を発現している細胞の状態を詳しく検討した結果、Ｄ１６を発現している細胞とTUNEL陰性細胞の明確な相関が認められた（図２１）。このアポトーシス抑制効果は、天然のアポトーシス抑制型タンパク質であるＢｃｌ－ｘＬを発現する細胞でも同様に認められた。このように、本手法により作製した人工タンパク質集団は、アポトーシス誘導型だけではなく、抑制型機能性人工タンパク質も創出できることがわかった。

【産業上の利用可能性】

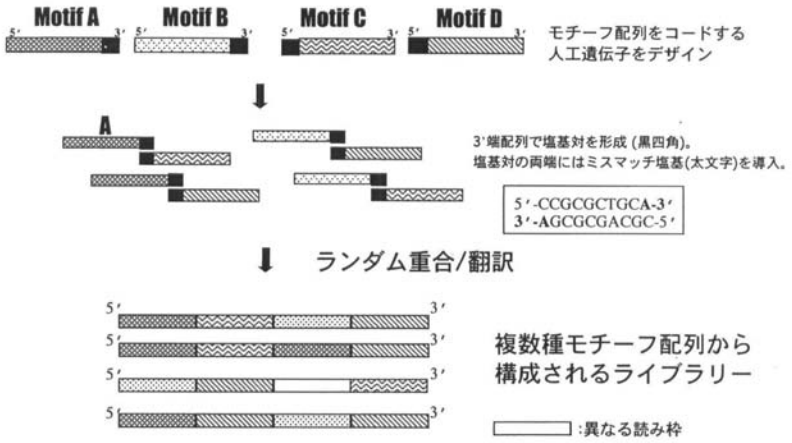
【００６０】

本発明の人工遺伝子集団の作製方法により、従来の人工遺伝子集団の作製方法ではできなかった、多数種モチーフ配列がランダムに重合した人工遺伝子集団を作製することが可能となった。また、該人工遺伝子集団を用いて、該人工遺伝子集団がコードする人工タンパク質集団を作製することが可能となった。本発明の人工遺伝子集団の作製方法により、モチーフ配列を少なくともその一部でコードする全体にわたっての高い配列類似性を条件としない複数種のＤＮＡをランダムに重合することが可能となり、かつ、ストップコドンの出現を回避した一本鎖ＤＮＡをランダムに重合することで、長い翻訳読枠（ＯＲＦ）を有するＤＮＡ配列のランダム重合が可能となった。更に、任意のモチーフ配列を、機能モチーフ配列、構造モチーフ配列、進化分子工学的に取得された人工ペプチド配列、又はタンパク質工学的な知識に基いてデザインされた配列のような配列に基いて構築し、多数種のモチーフ配列を任意に選定し、ランダムに重合して、人工遺伝子集団、及び、人工タンパク質集団を作製することにより、機能性について合理的予測性を加味し、多数種モチーフ配列をランダムに重合した人工遺伝子集団、及び、人工タンパク質集団の作製が可能となった。

【００６１】

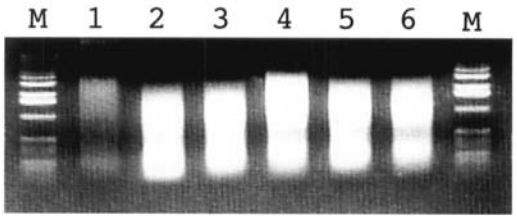
このことから、天然には存在しない非凡な機能を持った人工タンパク質を進化分子工学的に創製する場合の成功の鍵となる有力な人工遺伝子多様性集団（ライブラリー）の創出の可能性を飛躍的に増大した。更に、本発明においては、多数種モチーフ配列の機能の選定と共に、多種の一本鎖ＤＮＡの相補的塩基対の組合わせ及び／又は多種の一本鎖ＤＮＡのそれぞれの濃度を調節して、ランダム重合反応で利用されるモチーフ配列の出現頻度をコントロールすることが可能となり、人工遺伝子集団の作製に際して、ある程度の機能を予測してランダム重合反応調節し、人工遺伝子集団の作製を行うことが可能となった。

【図１】



【図２】

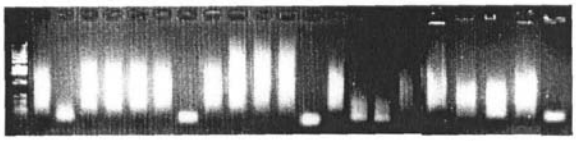
KY-1354 5'-GGGGAATTCGGCGGG**A**-3'
KY-1355 3'-**A**CCGCCCATTCGAAGGG-5'
KY-1356 3'-**A**CCGCCCAAGATCTGGG-5'
KY-1357 3'-**A**CCGCCCATCTAGAGGG-5'



KY-1354	+	+	+	+	+	+
KY-1355		+			+	+
KY-1356			+		+	+
KY-1357				+		+

【図３】

KY-1354 (EcoRI)	+		+		+		+		+	
KY-1355 (Hind III)	+						+		+	
KY-1356 (Xba I)					+				+	
KY-1357 (Bgl II)			+				+		+	



Hind III	+		+		+		+		+	
Bgl II		+		+		+		+		+
Xba I			+		+		+			
EcoR I										+

【図４】

EcoRI 認識配列: **GAATTC**
Hind III 認識配列: ***AAGCTT***
Bgl II 認識配列: AGATCT
Xba I 認識配列: TCTAGA

EHB #7	EHBX #2	EHBX #3
GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGGGGATTCGGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC
GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GACGGGTAAGATCTCCC
GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC
-GGG**AATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC	GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC	GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC
GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCC-	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC
GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGAATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC
GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC	GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC
GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC
GGG**GAATTC**GGCGGGTAGAG	-GG**GAATTC**GGCCGGGTTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC
	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCCA
EHBX #1	GGGGCATATTCGGCGGGTTCTAGACCC	GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC
GGG**GAATTC**GGCGGGTAAGTCT- - -	A	GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC
GGG**GAATTC**AGGCGGGTAAGCT- - -		GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC
GGG**GAATTC**GGCGGGT***AAGCTT***CCC		GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC
GGG**GAATTC**GGCGGGTAGATCTCCC		
GGG**GAATTC**GGCGGGTTCTAGACCC		
CGGG**GAATTC**GGCGGG		

【図５】

デザインA

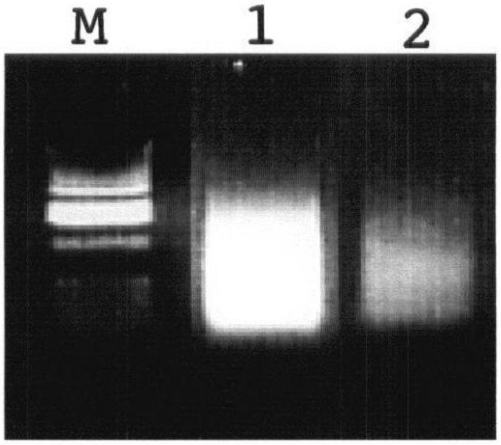
KY-1372: 5'-CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGA-3'
KY-1374: 3'-ACCGCCCCGCTCGAGAAGTCCCTGCCGCAGTTGCTTAAGGGG-5'
KY-1375: 3'-ACCGCCCCGCTCTTGCCGCCTACCCTGTGGAAGTCTAGAGGG-5'
KY-1377: 3'-ACCGCCCCGGACGCCTCTAAGCCGCTGTTCGAGTTGTTCGAAGGG-5'

デザインB

KY-1372: 5'-CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGA-3'
KY-1379: 5'-CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGGCGGGGA-3'
KY-1374: 3'-ACCGCCCCGCTCGAGAAGTCCCTGCCGCAGTTGCTTAAGGGG-5'
KY-1375: 3'-ACCGCCCCGCTCTTGCCGCCTACCCTGTGGAAGTCTAGAGGG-5'

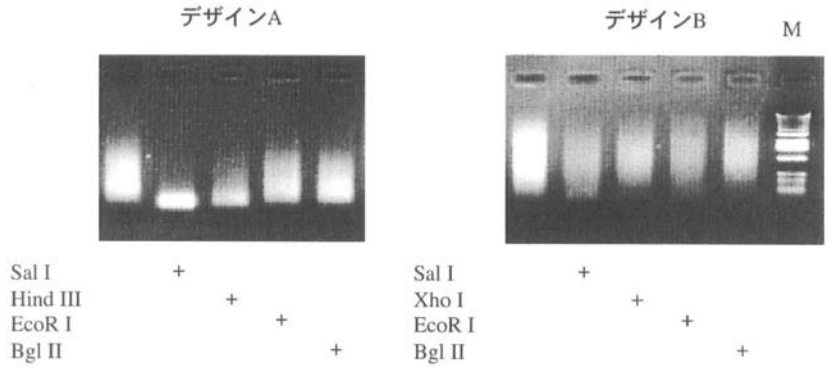
← 塩基対形成部位

【図６】

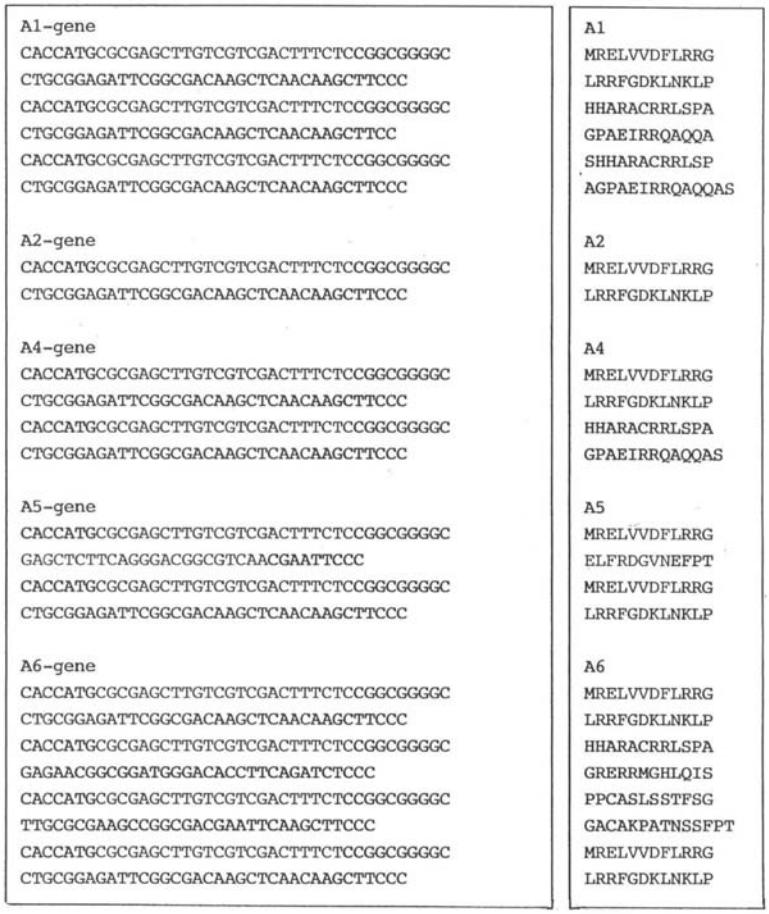


M: マーカー
1:人工遺伝子重合体A
2:人工遺伝子重合体B

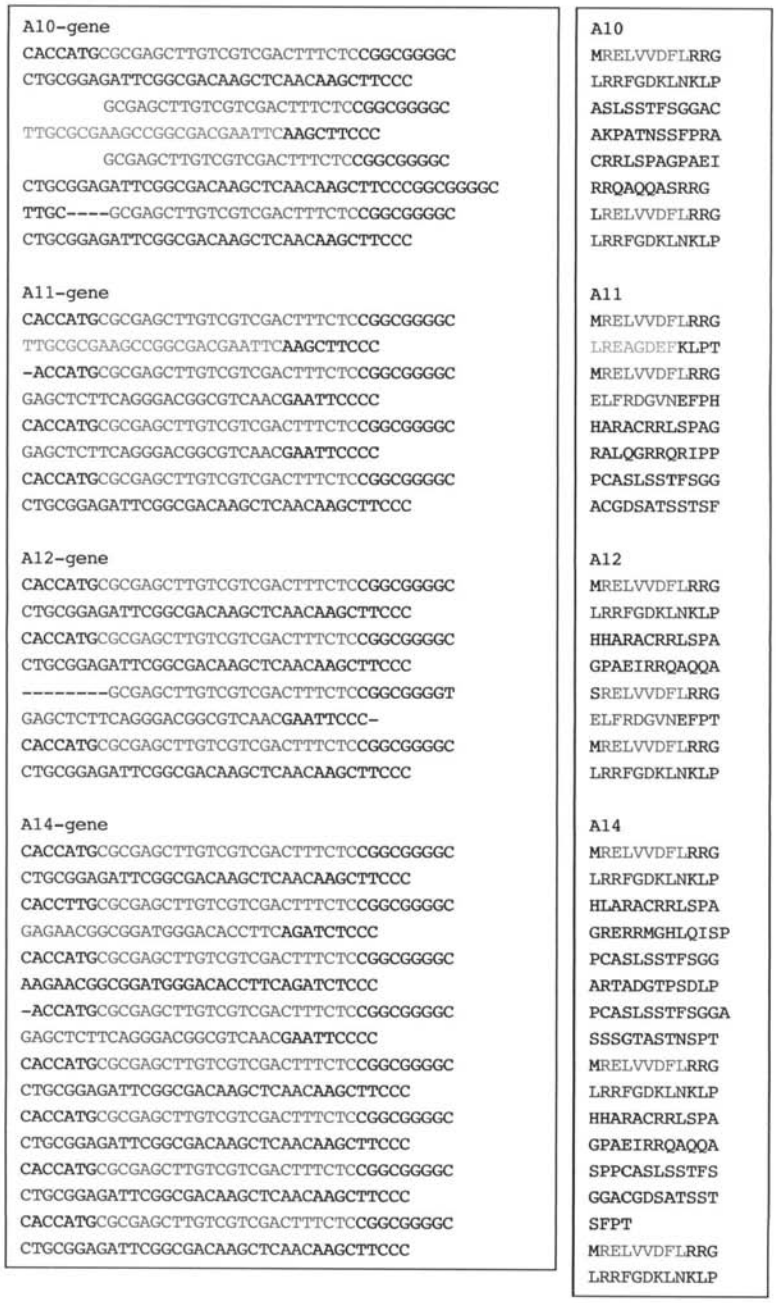
【図７】



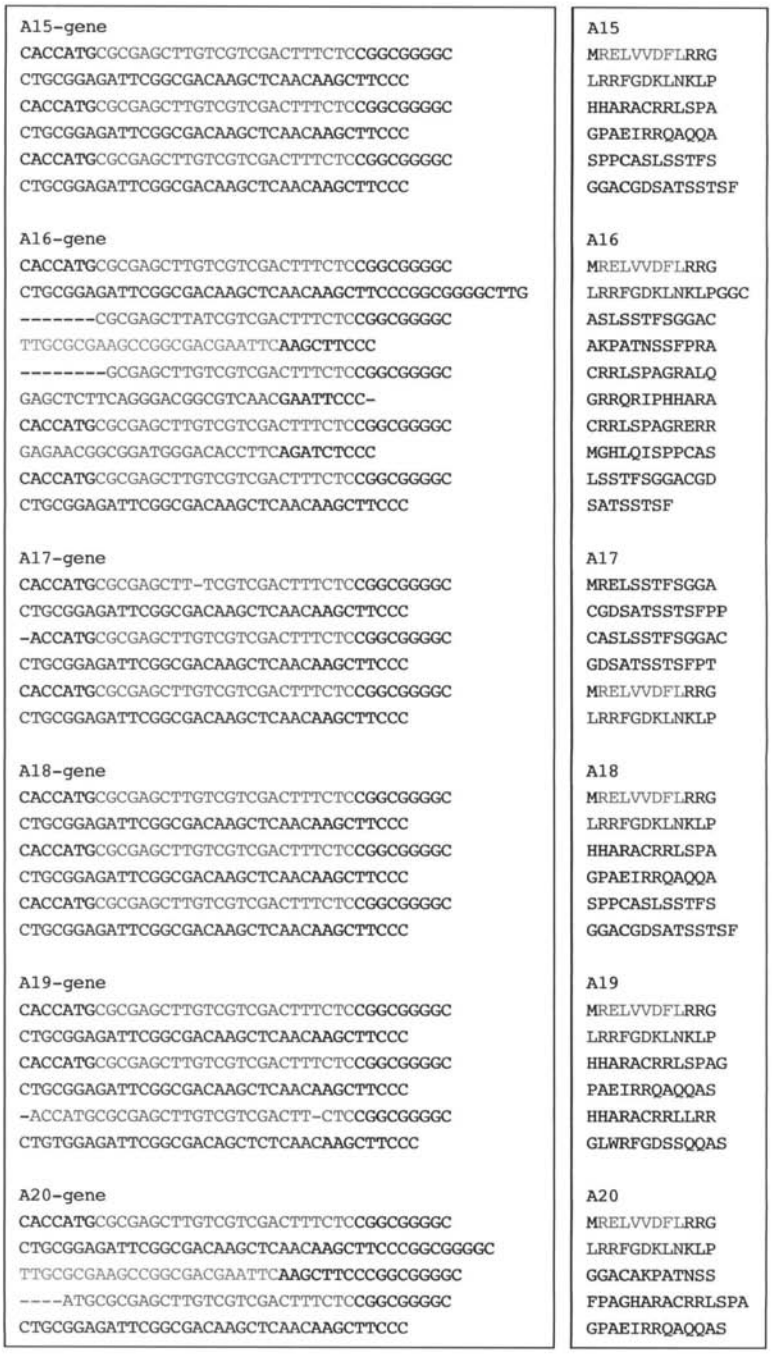
【図８ａ】


A1-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A2-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A4-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A5-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A6-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
TTGCGCGAAGCCGGCGACGAATTCAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A1
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQA
SHHARACRRLSP
AGPAEIRRQAQQAS
A2
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
A4
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQAS
A5
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
A6
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GRERRMGHLQIS
PPCASLSSTFSG
GACAKPATNSSFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP

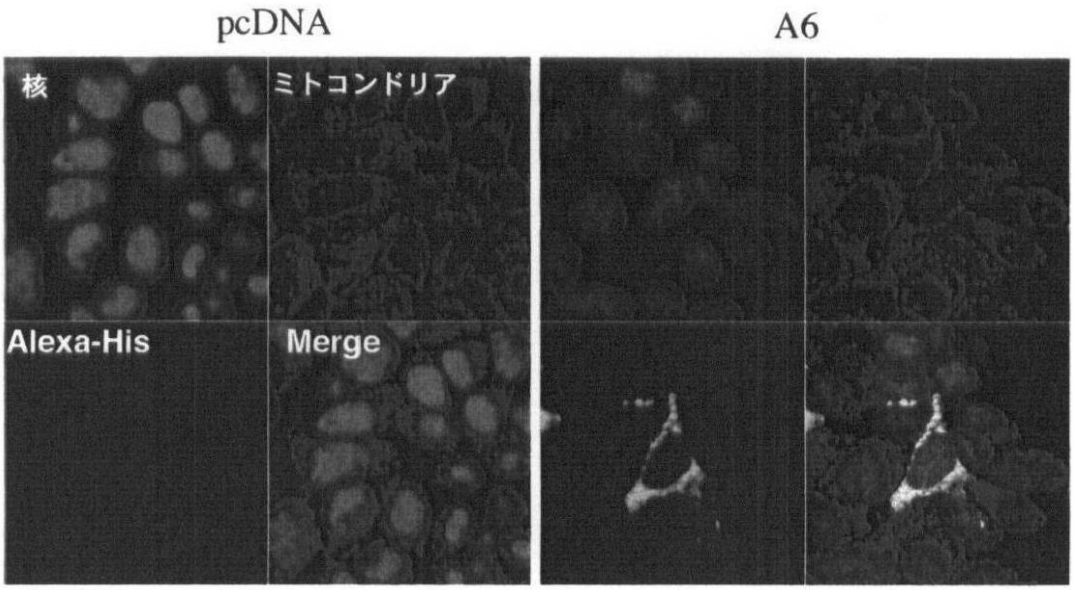
【図８ｂ】


A10-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
GCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
TTGCGCGAAGCCGGCGACGAATTCAAGCTTCCC
GCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGGCGGGGC
TTGC----GCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A11-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
TTGCGCGAAGCCGGCGACGAATTCAAGCTTCCC
-ACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A12-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
--------GCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGT
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC-
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A14-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCTTGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
AAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
-ACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A10
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
ASLSSTFSGGAC
AKPATNSSFPRA
CRRLSPAGPAEI
RRQAQQASRRG
LRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
A11
MRELVVDFLRRG
LREAGDEFKLPT
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPH
HARACRRLSPAG
RALQGRRQRIPP
PCASLSSTFSGG
ACGDSATSSTSF
A12
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQA
SRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
A14
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HLARACRRLSPA
GRERRMGHLQISP
PCASLSSTFSGG
ARTADGTPSDLP
PCASLSSTFSGGA
SSSGTASTNSPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQA
SPPCASLSSTFS
GGACGDSATSST
SFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP

【図８ｃ】


A15-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A16-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGGCGGGGCTTG
-------CGCGAGCTTATCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
TTGCGCGAAGCCGGCGACGAATTCAAGCTTCCC
--------GCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC-
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A17-gene
CACCATGCGCGAGCTT-TCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
-ACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A18-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A19-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
-ACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTT-CTCCGGCGGGGC
CTGTGGAGATTCGGCGACAGCTCTCAACAAGCTTCCC
A20-gene
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGGCGGGGC
TTGCGCGAAGCCGGCGACGAATTCAAGCTTCCCGGCGGGGC
----ATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCC
A15
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQA
SPPCASLSSTFS
GGACGDSATSSTSF
A16
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLPGGC
ASLSSTFSGGAC
AKPATNSSFPRA
CRRLSPAGRALQ
GRRQRIPHHARA
CRRLSPAGRERR
MGHLQISPPCAS
LSSTFSGGACGD
SATSSTSF
A17
MRELSSTFSGGA
CGDSATSSTSFPP
CASLSSTFSGGAC
GDSATSSTSFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
A18
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQA
SPPCASLSSTFS
GGACGDSATSSTSF
A19
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
HHARACRRLSPAG
PAEIRRQAQQAS
HHARACRRLLRR
GLWRFGDSSQQAS
A20
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
GGACAKPATNSS
FPAGHARACRRLSPA
GPAEIRRQAQQAS

【図９】



【図１０】

B3
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCG
CTCGAGGTTGAGCTTGTCGCCGAATCTCCGCAGCATGGTG

B6
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGCCG
CTCGAGGTTGAGCTTGTCGCCGAATCTCCGCAGCATGGTG

B8
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCG
CTCGAGGTTGAGCTTGTCGCCGAATCTCCGCAGCATGGTG

B9
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGC
TCGAGGTCGAGCTCGTCGCCGAATCTCCGCAGCATGGTG

B11
CACCCGACAAGCTCAACCTCGAGCGG
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGG
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGG
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGG
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGG
CACCATGCTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACCTCGAGCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC

B3
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPH
HARACRRLSPAG
RALQGRRQRIPH
HARACRRLSPAL
EVELVAESPQHG

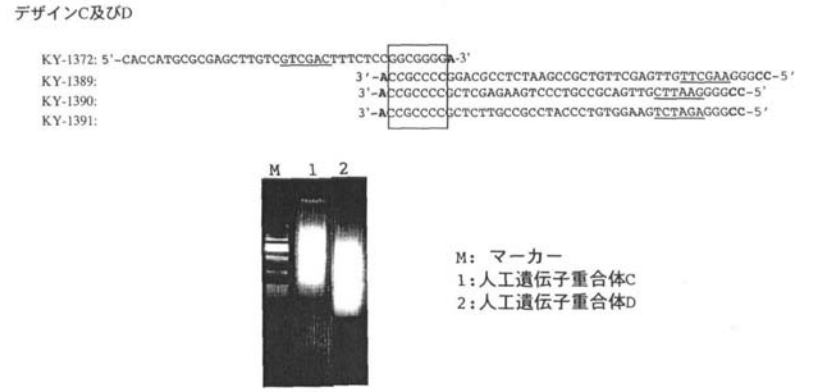
B6
MLRRFGDKLNLERRG
ELFRDGVNEFPT
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPH
HARACRRLSPPLEVE
LVAESPQHG

B8
MRELVVDFLRRS
RLSLSPNLRSMV

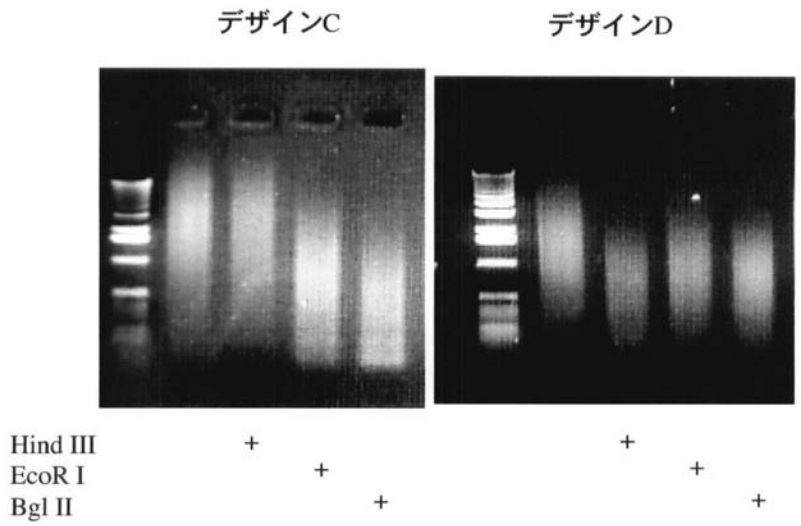
B9
MLRRFGDKLNLERRG
ENGGWDTFRSPHHAR
ACRRLSPAGRALQGR
RQRIPHHARACRRLS
PAGRALQGRRQRIPH
ARACR
RLSPAGRALQGRRQR
IHHARACRRLSPALE
VELVAESPQHG

B11
MLRRFGDKLNLERH
HAAEIRRQAQPRAA
PCCGDSATSSTSSGT
MLRRFGDKLNLER
HHAAEIRRQAQPR
AAGRERRMGHLQIS

【図１１】


デザインC及びD
KY-1372: 5'-CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGGA-3'
KY-1389: 3'-ACCGCCCCCGGACGCCTCTAAGCCGCTGTTCGAGTTGTTCGAAGGGCC-5'
KY-1390: 3'-ACCGCCCCCGCTCGAGAAGTCCCTGCCGCAGTTGCTTAAGGGGCC-5'
KY-1391: 3'-ACCGCCCCCGCTCTTGCCGCCTACCCTGTGGAAGTCTAGAGGGCC-5'
M 1 2
M: マーカー
1:人工遺伝子重合体C
2:人工遺伝子重合体D

【図１２】


デザインC
デザインD
Hind III + +
EcoR I + +
Bgl II + +

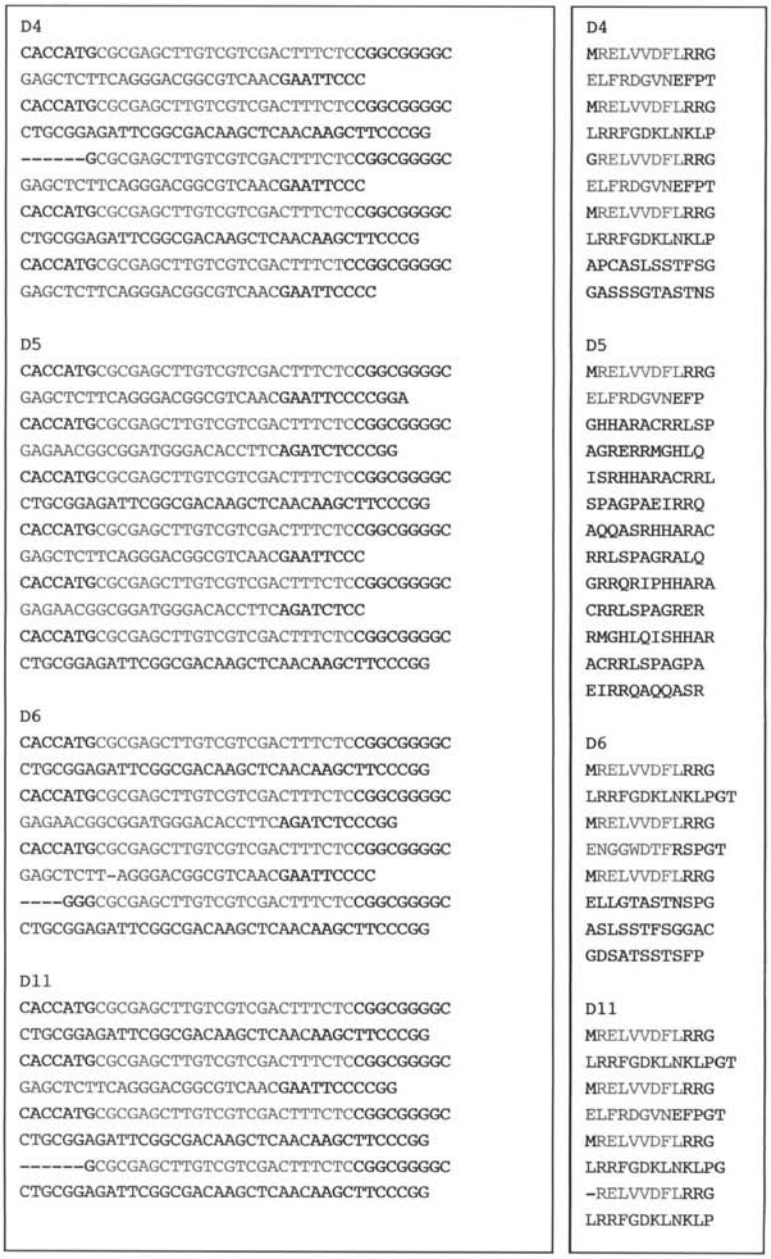
【図１３ａ】

C2
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCTGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCG-
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
C5
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
G-GAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
C6
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
C10
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
C2
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPGT
MRELVVDFLWRG
ENGGWDTFRSPAP
CASLSSTFSGGA
RTADGTPSDLPAP
CASLSSTFSGGA
SSSGTASTNSPAP
CASLSSTFSGGA
RTADGTPSDLPAP
CASLSSTFSGGA
CGDSATSSTSFP
C5
MRELVVDFLRRG
GTADGTPSDLPT
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
C6
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSP
C10
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP

【図１３ｂ】

C15	C15
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCGCCG	ELFRDGVNEFAA
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	PCASLSSTFSGGA
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	RTADGTPSDLPA
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	PCASLSSTFSGGA
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	RTADGTPSDLPA
C-CCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	HARACRRLSPAGP
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	AEIRRQAQQASR
C17	C17
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLP
C21	C21
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCG	ENGGWDTFRSPAP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	CASLSSTFSGGA
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	CGDSATSSTSFP
C19	C19
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ELFRDGVNEFPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ELFRDGVNEFPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGGCGGGG	ELFRDGVNEFPGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	APCASLSSTFSG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCG	GARTADGTPSDLP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	HHARACRRLSPA
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	GRALQGRRQRIPR
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGG	HHARACRRLSPA
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	PCASLSSTFSGGA
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAAC	SSSGTAS
C27	C27
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCGCCG	ELFRDGVNEFAAP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	CASLSSTFSGGA
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	RTADGTPSDLPAP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	CASLSSTFSGGA
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	RTADGTPSDLPAH
C-CCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	ARACRRLSPAGP
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	AEIRRQAQQASR

【図１４ａ】


D4
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
------GCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCC
D5
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGGA
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
D6
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTT-AGGGACGGCGTCAACGAATTCCCC
----GGGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
D11
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
------GCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG
D4
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
GRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP
APCASLSSTFSG
GASSSGTASTNS
D5
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFP
GHHARACRRLSP
AGRERRMGHLQ
ISRHHARACRRL
SPAGPAEIRRQ
AQQASRHHARAC
RRLSPAGRALQ
GRRQRIPHHARA
CRRLSPAGRER
RMGHLQISHHAR
ACRRLSPAGPA
EIRRQAQQASR
D6
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLPGT
MRELVVDFLRRG
ENGGWDTFRSPGT
MRELVVDFLRRG
ELLGTASTNSPG
ASLSSTFSGGAC
GDSATSSTSFP
D11
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLPGT
MRELVVDFLRRG
ELFRDGVNEFPGT
MRELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLPG
-RELVVDFLRRG
LRRFGDKLNKLP

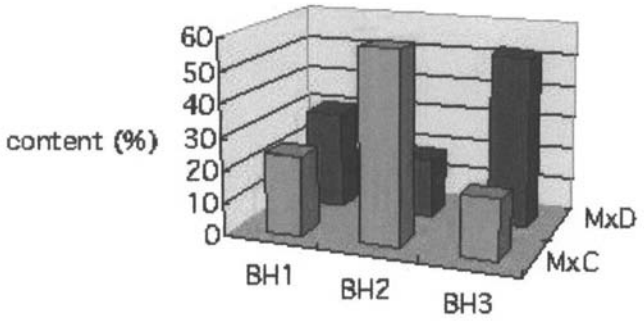
【図１４ｂ】

D12	D12
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLP
----ATGCGCGAGCTTGT-GTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	GCASLCRLSPAG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGGGCGGGGC	PAEIRRQAQQAS
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	RAGPAEIRRQAQQASR
----ATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ELFRDGVNEFP
D15	D15
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCG	LRRFGDKLNKLP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	APCASLSSTFSGGA
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	CGDSATSSTSFP
D16	D16
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC	ELFRDGVNEFPT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCC	ENGGWDTFRSPT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ELFRDGVNEFPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLP
D19	D19
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ELFRDGVNEFPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
TTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLP
D20	D20
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAACTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGGCCGGGGG	ELFRDGVNEFPGRGH
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	HARACRRLSPAG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGGCCGGGGG	RALQGRRQRIPRPGA
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	PCASLSSTFSGG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	ACGDSATSSTSFP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	APCASLSSTFSGG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCG	ACGDSATSSTSFP

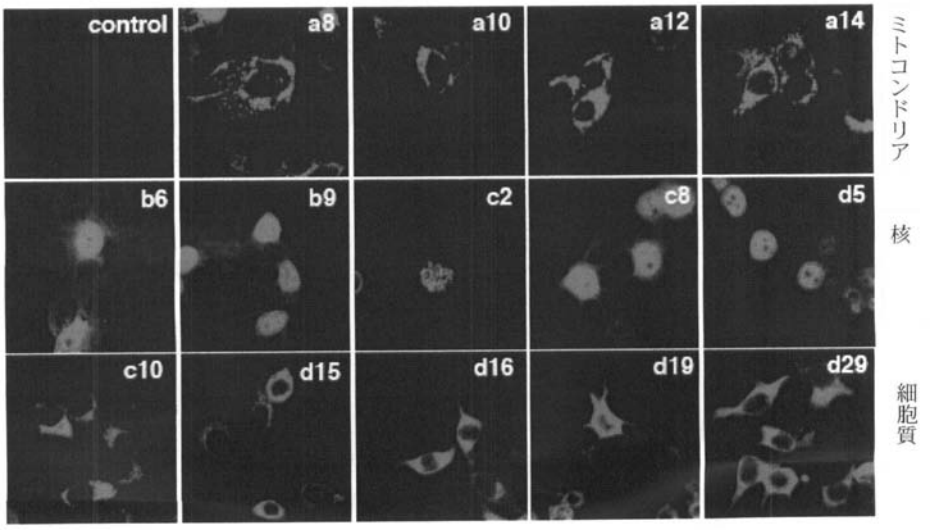
【図１４ｃ】

D21	D21
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACA-----AACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKQASR
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	HHARACRRLSPA
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	GRERRMGHLQISR
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	HHARACRRLSPA
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	GPAEIRRQAQQASR
D23	D23
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCC	ELFRDGVNEFPT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ENGGWDTFRSPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLP
D26	D26
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCC	ENGGWDTFRSPHH
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	ARACRRLSPAGR
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	ERRMGHLQISRHH
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	ARACRRLSPAGR
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ALQGRRQRIPRPC
--CCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	ASLSSTFSGGAS
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	SSGTASTNSPAPC
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	ASLSSTFSGGAR
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCC	TADGTPSDLPPCA
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	SLSSTFSGGACG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	DSATSSTSFP
D29	D29
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	LRRFGDKLNKLPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGG	ELFRDGVNEFPGT
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	MRELVVDFLRRG
GAGCTCTTCAGGGACGGCGTCAACGAATTCCCCGGC	ELFRDGVNEFPGHH
CACCATGCGCGAGCTTGT-GTCG--TCTCTCCGGCGGGCC	ARACVVSPAGPA
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGGCCCC	EIRRQAQQASRPPP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	CASLSSTFSGGA
GAGAACGGCGGATGGGACACCTTCAGATCTCCCGG	RTADGTPSDLPAP
CACCATGCGCGAGCTTGTCGTCGACTTTCTCCGGCGGGGC	CASLSSTFSGGA
CTGCGGAGATTCGGCGACAAGCTCAACAAGCTTCCCGG	CGDSATSSTSFP

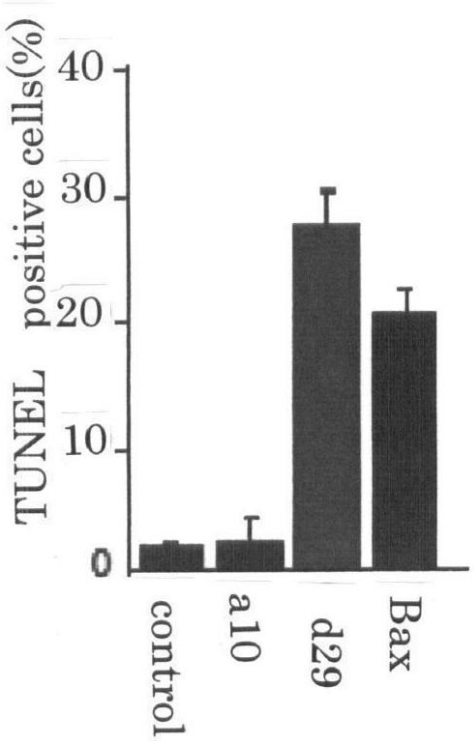
【図１５】



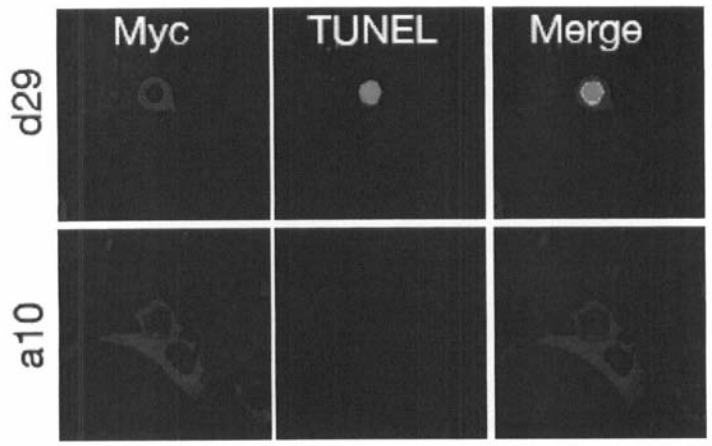
【図１６】


control
a8
a10
a12
a14
b6
b9
c2
c8
d5
c10
d15
d16
d19
d29
ミトコンドリア
核
細胞質

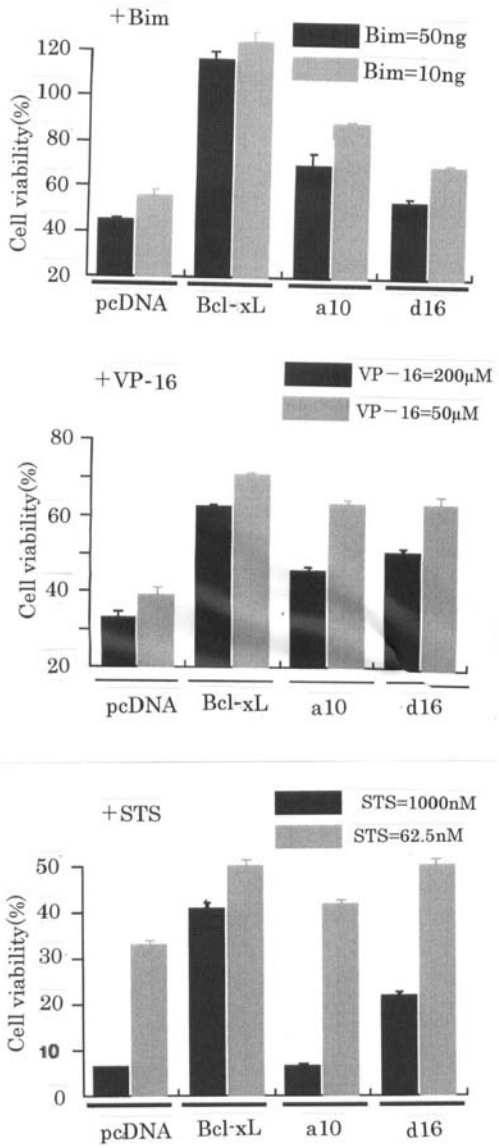
【図１７】


TUNEL positive cells(%)
40
30
20
10
0
control
a10
d29
Bax

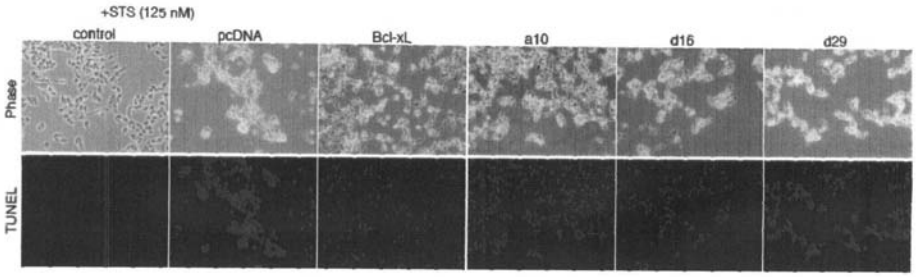
【図１８】


Myc
TUNEL
Merge
d29
a10

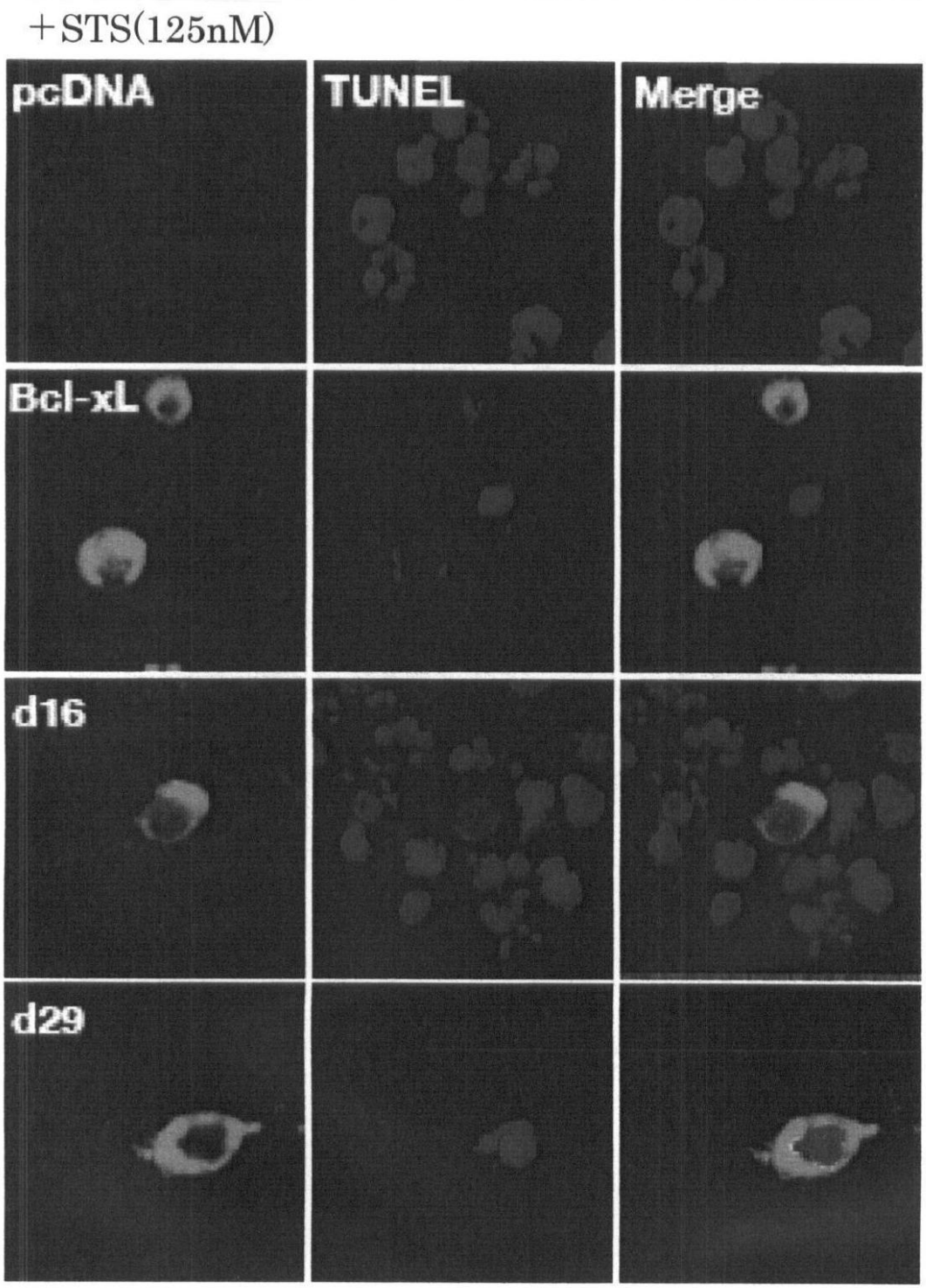
【図１９】


+Bim
Bim=50ng
Bim=10ng
Cell viability(%)
120
100
80
60
40
20
pcDNA
Bcl-xL
a10
d16
+VP-16
VP－16=200μM
VP－16=50μM
Cell viability(%)
80
60
40
20
pcDNA
Bcl-xL
a10
d16
+STS
STS=1000nM
STS=62.5nM
Cell viability(%)
50
40
30
20
10
0
pcDNA
Bcl-xL
a10
d16

【図２０】


+STS (125 nM)
control
pcDNA
Bcl-xL
a10
d16
d29
Phase
TUNEL

【図２１】


+STS(125nM)
pcDNA
TUNEL
Merge
Bcl-xL
d16
d29

【配列表】
0004568723000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０９－３２２７７５（ＪＰ，Ａ）
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, ２００４年 6月 1日, Vol.28, No.4-6, pp.145-153
Chemistry & Biology, ２００４年 6月, Vol.11, No.6, pp.765-773

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
C12P 21/00-21/08
C12Q 1/00- 1/70
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed