

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2000 - 184896

(P2000 - 184896A)

(43)公開日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 N 15/00	ZNA A
A 6 1 P 3/10			A 6 1 P 3/10	
		5/00		5/00
		5/06		5/06
C 0 7 K 14/61			C 0 7 K 14/61	

審査請求 有 請求項の数 19 O L (全 84数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 34866(P2000 - 34866)

(62)分割の表示 特願平2 - 500631の分割

(22)出願日 平成1年10月30日(1989.10.30)

(31)優先権主張番号 428,066

(32)優先日 平成1年10月26日(1989.10.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 596168317

ジェネンテック・インコーポレーテッド

GENENTECH, INC.

アメリカ合衆国カリフォルニア州94080サウ

スサンフランシスコ・ポイントサンブルノ

・ブルバード460

(72)発明者 ウェールズ ジェイムズ エイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9401

0 パーリンガム コロンブス アベニュー

1342

(74)代理人 100059959

弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ホルモン変異体

(57)【要約】

【課題】 本来のホルモンとは異なる望ましい生物学的、生化学的および免疫原的性質を有するホルモン変異体を提供すること。

【解決手段】 天然に存在しないアミノ酸配列を有し、N末端から順番に少なくとも第1、第2および第3部分からなる成長ホルモン変異体で、該第1部分は標的物質と相互作用する天然に生ずる親成長ホルモンのアミノ酸配列の少なくとも1部に対応し、該第3部分は該親成長ホルモンのアミノ酸配列の少なくとも別の部分に対応し、かつ該第2部分は該親成長ホルモンの天然の類似体のアミノ酸配列の類似部分に対応し、上記成長ホルモン変異体は、上記親成長ホルモンと比べて標的物質と異なる相互作用を有する成長ホルモン変異体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然に存在しないアミノ酸配列を有し、N末端から順番に少なくとも第1、第2および第3部分からなる成長ホルモン変異体で、該第1部分は標的物質と相互作用する天然に生ずる親成長ホルモンのアミノ酸配列の少なくとも1部に対応し、該第3部分は該親成長ホルモンのアミノ酸配列の少なくとも別の部分に対応し、かつ該第2部分は該親成長ホルモンの天然の類似体のアミノ酸配列の類似部分に対応し、上記成長ホルモン変異体は、上記親成長ホルモンと比べて標的物質と異なる相互作用を有する成長ホルモン変異体。

【請求項2】 前記親成長ホルモンがhGHであり、かつ前記天然の類似体がヒト胎盤ラクトゲン、ヒトプロラクチンおよびブタ成長ホルモンからなる群から選択されるものである請求項1記載の成長ホルモン変異体。

【請求項3】 前記親成長ホルモンがhGHであり、かつ前記第2部分がhPL(12-25)、pGH(11-33)、hPRL(12-33)、hPRL(12-19)、hPRL(22-33)、hPL(46-52)、pGH(48-52)、hPL(56-64)、pGH(57-73)、hPRL(54-74)、hPRL(88-95)、hPRL(97-104)、hPRL(109-112)、pGH(108-127)、hPRL(111-129)、hPRL(126-136)、pGH(164-190)およびpGH(167-181)からなる類似アミノ酸配列群から選択され、上記類似アミノ酸が図2に示すアミノ酸置換、挿入および欠失を導入する請求項1記載の成長ホルモン変異体。

【請求項4】 前記第2部分がhPRL(97-104)、hPRL(54-74)およびhPL(56-64)からなる群から選択され、上記アミノ酸が表3および図2に示す置換を導入する請求項3記載の成長ホルモン変異体。

【請求項5】 前記第2部分がhPRL(22-33)であり、表3および図2に示すアミノ酸置換を導入する請求項3記載の成長ホルモン変異体。

【請求項6】 天然には存在しないアミノ酸配列を有し、かつヒト成長ホルモンの少なくとも1つのアミノ酸残基の種々のアミノ酸による置換によって誘導されるヒト成長ホルモン変異体で、該置換されるアミノ酸残基がP2、T3、I4、P5、L6、S7、R8、F10、N12、M14、L15、R16、H18、R19、H21、Q22、F25、D26、Q29、E30、E33、S43、F44、Q46、N47、P48、Q49、T50、F54、S55、E56、S57、I58、P59、S62、N63、R64、E65、E66、Q68、Q69、K70、S71、L73、R77、L80、F97、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、G104、R167、K168、D169、D171、K172、V173、E1

74、T175、F176、R178、I179、C182、R183、S184、V185、E186、G187、S188およびF191からなるヒト成長ホルモンのアミノ酸残基から選ばれたものであり、Aが置換される場合、G、E、M、F、R、Q、S、D、N、HまたはKに置換され、Cが置換される場合、G、E、M、F、A、R、QまたはSに置換され、Dが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、H、KまたはNに置換され、Eが置換される場合、G、M、F、A、R、Q、S、D、N、K、L、HまたはVに置換され、Fが置換される場合、G、E、M、A、R、Q、S、Y、W、L、I、VまたはYに置換され、Gが置換される場合、E、M、F、A、R、Q、SまたはPに置換され、Hが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、K、D、NまたはYに置換され、Iが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、V、TまたはLに置換され、Kが置換される場合、E、G、M、F、A、R、Q、S、H、DまたはNに置換され、Lが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、I、V、YまたはDに置換され、Mが置換される場合、G、A、S、N、LまたはIに置換され、Nが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、D、KまたはYに置換され、Pが置換される場合、G、A、S、NまたはLに置換され、Qが置換される場合、G、E、M、F、A、R、S、H、K、DまたはNに置換され、Rが置換される場合、G、E、M、F、A、Q、S、H、K、D、N、TまたはVに置換され、Sが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、H、D、N、KまたはYに置換され、Tが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、VまたはIに置換され、Vが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、I、T、L、YまたはWに置換され、Yが置換される場合、G、E、M、F、A、R、Q、S、W、L、IまたはVに置換され、変異体がHGH-Vでないヒト成長ホルモン変異体。

【請求項7】 前記置換されるアミノ酸残基がF10、F54、E56、I58、R64、Q68、D171、K172、E174、T175、F176、R178、C182およびV185からなるヒト成長ホルモンのアミノ酸残基群から選ばれたものである請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項8】 前記置換がE174Aである請求項7記載の成長ホルモン変異体。

【請求項9】 前記置換がH18A、R64K、E65A、L73A、E174ANQSおよびG、E186A、S188AおよびF191Aからなる群から選ばれる請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項10】 前記置換されるアミノ酸残基がH21、Q46、N47、P48、Q49、T50、S51、K172、V173およびF176からなるヒト成

長ホルモンのアミノ酸残基群から選ばれる請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項11】 前記置換されるアミノ酸残基がF97、A98、N99、S100、L101、V102、Y103およびG104からなる群から選ばれる請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項12】 前記変異体がK168A：E174A、R178N：I179MおよびK172A：F176Aからなる群から選ばれる二重アミノ酸置換を含む請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項13】 前記置換されるアミノ酸残基がF10、F25、D26、I58、R64、R167、K168、K172、E174およびF176からなるヒト成長ホルモンのアミノ酸残基群から選ばれる請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項14】 前記置換されるアミノ酸残基がF97、S100、V102、Y103およびT175からなるヒト成長ホルモンのアミノ酸残基群から選ばれる請求項6記載の成長ホルモン変異体。

【請求項15】 ヒト成長ホルモンのアミノ酸配列中のアミノ酸残基の置換、挿入または欠失からなる1つ以上のアミノ酸変化を含む該配列を有するヒト成長ホルモン変異体で、該成長ホルモンのソマトジェニックレセプターに対する活性ドメインは変化していないヒト成長ホルモン変異体。

【請求項16】 前記成長ホルモンがヒト成長ホルモンであり、かつ前記活性ドメインが残基2-33、54-74および167-191を含む請求項15記載の変異体。

【請求項17】 前記活性ドメインが残基6-14、56-68および171-191を含む請求項16記載の変異体。

【請求項18】 ヒト成長ホルモンのアミノ酸配列中のアミノ酸残基の置換、挿入または欠失からなる1つ以上のアミノ酸変化を含む該配列を有する成長ホルモン変異体で該成長ホルモンのソマトジェニックレセプターに対する活性アミノ酸が変化していない成長ホルモン変異体。

【請求項19】 前記成長ホルモンがヒト成長ホルモンhGHであり、かつ前記活性アミノ酸がF10、F54、E56、I58、K64、Q68、D171、K172、E174、T175、F176、R178、C182およびV185を含む請求項18記載の変異体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本出願は1988年10月28日の米国特許出願番号第07/264,611号の継続出願である。本発明はポリペプチド中の活性ドメインおよびアミノ酸残基の同定法に関する。また本発明はホルモン変異体に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】ポリペプチドすなわちペプチドおよびたん白質には各々特異的アミノ酸配列、構造および機能を有する広範囲の生物学的分子が含まれる。ほとんどのポリペプチドは特異的基質と相互作用しそのポリペプチドの機能を遂行する。したがってズブチリシン、アミラーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子との酵素は特異的基質と相互作用を起こし、その特定の切断部位で加水分解を起こす一方、ヒト成長ホルモン、インシュリンなどのたん白質性ホルモンは特異的レセプターと相互作用を起こし成長や代謝を調節する。別にポリペプチドと免疫原性レセプターなど該ポリペプチドの主要標的ではない物質との相互作用もある。多くのポリペプチドは別個の生物学的効果を産む別々のリガンドまたはレセプターと相互作用する別個の領域を含む点で多機能的である。たとえばヒト成長ホルモン(hGH)は成人において糖代謝および脂質代謝に関係し、子供においては長骨の成長を誘導する。

【0003】アミノ酸配列を修正による天然のポリペプチドの機能の改善について努力がはらわれてきている。1つの方法はポリペプチドのアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸を別のアミノ酸に置換することである。インビトロ突然変異誘発やクローン化遺伝子の発現によるたん白質工芸が種々のたん白質の熱的または酸化的安定性の改善に応用された例が報告されている。ピラフランカ(Villafranca), J. E. 等、(1983) Science 222、782-788;ペリー(Perry), L. J. 等(1984) Science 226、555-557;エステル(Estell), D. A. 等(1985) J. Biol. Chem. 260、6518-6521;ロゼンバーグ(Rosenberg), S. 等(1985) Nature (ロンドン) 312、77-80;コートニー(Courtney), M. 等(1985) Nature (ロンドン)、313、149-157。さらにこのような方法を応用して基質特異性を变化させた酵素を生成させたことも報告されている。エステル(Estell), D. A. 等(1986) Science 223、655-663;クレイク(Craik), C. S. 等(1985年) Science, 228、291-297;ファースト(Farshat), A. R. 等(1985) Nature (ロンドン) 314、235-238;ウィンサー(Winther), J. R. (1985) Carisberg Res. Commun. 50、273-284;ウェルス(Wells), J. A. 等(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84、1219-1223。修正すべきアミノ酸の決定は主にポリペプチドの結晶構造、ポリペプチドの機能に関する化学的修正の効果および、またはポリペプチドの作用モードを確認するための種々の基質とポリペプチドとの相互作用に基づいて行なわれる。ある場合には、たとえば異なる基質特異性を有するズブチリシン類の基質結合領域におけるアミノ酸配列の差異など関連ポリペプチドの特異的アミノ酸残基に基づいてアミノ酸置換を誘導

する場合もある。ウェルス (Wells), J. A. 等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5767。別の場合、分子の既知活性領域のアミノ酸配列を第2の分子の既知活性領域のアミノ酸配列となるよう修正することも報告されている。ワートン (Wharton) R. P. 等 (1985) Nature 316, 601-605、およびワートン (Wharton) R. P. 等 (1984) Cell 38, 361-369 (ファージレセプターの認識ヘリックスの別のレセプター認識ヘリックスによる置換) ; ジョーンズ (Jones), P. T. 等 (1986) Nature 321, 522-525 (ヒトミエローマたん白質の可変領域のマウス抗体の相当領域による置換)。この方法は置換により変化する性質に関しいくらかの予想を提供し得るが特定の性質を決定する全ての領域および残基の評価を保証する方法ではない。せいぜい置換残基の分子接触力に関するエネルギーの実験的見積りが行なわれるぐらいである。特異的な修正残基に対する水素結合 (ファースト (Farsht), A. R. 等 (1985) Nature 314, 235 ; ブランアン (Bryan), P. 等 (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3743 ; ウェルス (Wells), J. A. 等 (1986) Philos. Trans. R. Soc. London A. 317, 415)、静電相互作用 (ウェルス (Wells), J. A. 等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1219 ; クロニン (Cronin), C. N., 等 (1987) J. Am. Chem. Soc. 109, 2222) および疎水のおよび立体的効果 (エステル (Estell), D. A. 等 (1986) Science 233, 659 ; チェン (Chen), J. T. 等 (1987) Biochemistry 26, 4093) の強さが見積られた。これらの報告および別の報告 (ラスコウスキー (Laskowski), M. 等 (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 545 ; ウェルス (Wells), J. A. 等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5167 ; ジョーンズ (Jones), P. T. 等 (1986) Nature 321, 522 ; ワートン (Wharton) R. P. 等 (1985) Nature 316, 601) は既知の接触残基の突然変異誘発は結合に大きな効果を引き起こすが一方非接触残基の突然変異誘発は比較的小さい効果しかないと結論づけた。

【0004】アミノ酸配列と機能との関係を理解するための第2の方法には、関連遺伝子間のインビボ相同的組換を利用したハイブリッドポリペプチドをコードするハイブリッドDNA配列の生成によるものである。このようなハイブリッドポリペプチドは大腸菌およびサルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 由来の *trpB* および *trpA* (シュナイダー (Schneider), W. P. 等 (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2169-2173) ; アルファ1およびアルファ2白血球インターフェロン (ウェバー (Weber), H. およびワンスマン (Weissmann), C. (1983) 50

Nuc. Acids Res. 11, 5661) ; 大腸菌 K-12 の外膜ポアたん白質 ompC および phoE (トマセン (tommassen), J. 等 (1985) EMBO 4, 1583-1587) ; およびバチルスステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) およびバチルスリテニホルミス (*Bacillus lichiniiformis*) 由来の好熱性アルファアミラーゼ (グレー (Gray), G. L. 等 (1986) J. Bacteriol. 166, 635-643) の相同的組換えにより得られると報告されている。このような方法はハイブリッドアルファアミラーゼについて報告されているようにアミノ酸配列や機能の他に有用なハイブリッドポリペプチドに関する有用な情報を提供し得るが所定のポリペプチドを系統的に研究し標的物質の1つに活性を示すポリペプチド中の詳細な領域やアミノ酸残基を測定するのにこれらの方法を利用するのは難しい。このことはそのハイブリッドのDNAおよびアミノ酸配列を規定する交叉組換えの部位が基本的に目的遺伝子のDNA配列および宿主細胞の組換えメカニズムに依存することからくる。これらの方法は遺伝子の5 または3 末端付近で交叉が起こる偶然的環境以外1つのポリペプチドをコードするDNAの比較的小さいセグメントの別の遺伝子由来の相当するセグメントによる所定のかつ方法論的に必然的な置換を提供することはない。

【0005】たん白質性ホルモンとそれらのレセプターとの相互作用をいくつかの方法で研究した報告がなされている。1つの方法ではホルモンペプチドフラグメントを用いホルモン上のレセプター結合部位の位置を決定した。別の方法では中和モノクローナル抗体とペプチドフラグメント間の競争を利用しエピトープマッピングによりレセプター結合部位の位置を決定した。これらの方法の例にはヒト成長ホルモン (hGH) について報告された研究がある。ヒト成長ホルモン (hGH) は正常なヒトの成長および発達における多くの調節に関与している。この22000ダルトンの脳下垂体ホルモンは線型成長 (体発達)、泌乳、マクロファージの活性化、他のインシュリン様および糖尿病誘発効果を含む多くの生物学的効果を示す。チョウラ (Chawla), R. K. (1983) Ann. Rev. Med. 34, 519 ; エドワーズ (Edwards), C. K. 等 (1988) Science 239, 769 ; ソーナー (Thorner), M. O. 等 (1988) J. Clin. Invest. 81, 745 参照。子供の成長ホルモン欠乏症は小人症を引き起こすがこれは十年以上前からhGHの投与によりうまく治療し得るようになってきている。またhGHの遺伝的および翻訳後修正型を区別し臨床的に投与されたときのhGHに対する免疫学的応答を調べたり、またこのホルモンの循環レベルを定量したりするためにhGHの抗原性にも興味を持たれる (ルイス (Lewis), U. J. (1984) Ann. Rcv. Physiol. 46, 33)。

【0006】hGHは胎盤ラクタゲン、プロラクチンおよび他の成長ホルモンの遺伝子および種の変異体を含む

相同的ホルモン群の一員である。ニコル (Nichol), C. S. 等 (1986) *Endocrine Reviews* 7、169。hGH は広い種特異性を示し、かつ単量体的に各クローン化ソマトジェニック (ラング (Leung), D. W., 等 (1987) *Nature* 330、537) またはプロラクチンレセプター (ポーチン (Boutin), J. W. 等 (1988) *Cell* 53、69) に結合する点でこれらの群の中で異常である。hGH のクローン化遺伝子は大腸菌中分泌型として発現され (チャン (Chang, C. N. 等 (1987) *Gene* 55、189)、かつそのDNA およびアミノ酸配列も報告されている (ゴードル (Goeddel) 等 (1979) *Nature* 281、544; グレー (Gray) 等 (1985) *Gene* 39、247)。hGH の三次元的構造はまた分っていない。しかし、ブタの成長ホルモンの三次元折りたたみパターンは中位の分解能と精度で報告されている (アブデル-メグッド (Abdel-Meguid), S. S. 等 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84、6434)。hGH 由来のペプチドフラグメントが hGH のレセプター接合部位の位置決定に使用された。リ (Li), C. H. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46、31; ミルス (Mills), J. B., 等 (1980) *Endocrinology*、107、391。他の報告ではウシ成長ホルモンのたん白質分解後、残基96~133のフラグメントが単離された。ヤマサキン (Yamasakin) 等 (1970) *Biochemistry* 9、1107。しかし残基1-133を含むより大きいフラグメントを組換え法で作ったときは検出可能な結合活性は観測されなかった。クリビ (Krivik), G. G. 等 *International Symposium on Growth Hormone: Basic and Clinical Aspects*、アブストラクト I-18、最終プログラム、セロノシンボジア (Serono Symposia) 提供、USA、1987年6月14-18日。明らかにこれらの結果は矛盾しており、かつ、たん白質性ホルモン、特にその結合部位が2つ以上の不連続なエピトープおよび、または構造依存エピトープからなるものに関するレセプター結合部位の位置決めはペプチドフラグメントを使用するのは信頼性に欠けることを示している。エピトープマッピングによるレセプター結合部位の位置決定に中和モノクローナル抗体を使用することは同様の制限がある。たとえばモノクローナル抗体をレセプター結合検定中 hGH の残基98-128からなるペプチドに対し hGH レセプターと競合するのに使用した報告がある。たとえ hGH ホルモンのペプチド98-128のみが中和モノクローナル抗体と結合しても、この領域がこれらの競争実験に基づくレセプター結合部位を含むことが提唱された。レテジン (Retegin), L. A., 等 (1982) *Endocrinology* 111、668。

【0007】hGH ホルモンの抗原部位を同定する試みに同様な方法が使用されてきた。報告による競合結合による hGH に対する異なる24個のモノクローナル抗体のエピトープマッピングでは該ホルモン上の抗原部位は

わずか4種に分類された。スロウィー (Surowy), T. K. 等 (1984) *Mol. Immunol.* 21、345; アストン (Aston), R. 等 (1985) *Pharmac. Ther.* 27、403。しかしこの戦術は該ホルモンのアミノ酸配列上のエピトープの位置は決められなかった。抗体部位を限定する別の方法には目的たん白質上の短い線状ペプチドに対する抗体の結合テストがある。ゲイセン (Geysen), H. M. 等 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81、3998; ゲイセン (Geysen), H. M. (1985) *Immunol. Today* 6、364。しかしこの方法はレセプター結合部位の位置を決めるには線状ペプチドフラグメントを用いるのと同じ制限を受ける。有用となるためにはこの線状配列はそれを認識するのにこの抗体の抗原中にみられる構造が保持されていなければならない。さらにX線結晶学から明らかになった抗体エピトープの部位に基づき (シェリフ (Scheriff), S. 等 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84、8075; アミット (Amit), A. G., 等 (1986) *Science* 233、747) 事実上全ての抗体結合部位は部分的に不連続であり (パーロー (Barlow), D. J. 等 (1986) *Nature* 322、747) かつ結果として線状フラグメントはこれらの構造をうまく真似ることができないことが推定されてきた。また hGH のペプチドフラグメントはこれらのフラグメントの非共有結合的結合により研究されてきた。数人の研究者はヒト成長ホルモンの天然のアミノ酸配列または化学修飾ペプチドを含む比較的長いフラグメントを結合させた分析を報告している。バースタイン (Burstein), S. 等 (1979) *J. of Endo. Met.* 48、964 (アミノ末端フラグメント hGH - 1 - 134) とカルボキシル末端フラグメント hGH - (141 - 191) の組合せ); リ (Li), C. H. 等 (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46、31、ミルス (Mills), J. B., 等 (1980) *Endocrinology* 107、391 (hGH のズブチリシン切断二本鎖型)。同様に、化学修飾フラグメント hGH - (1 - 134) およびヒト絨毛性ソマトマトロピン (胎盤ラクトゲンとも呼ばれる) 由来の化学修飾カルボキシ末端フラグメント (hCS - (141 - 191)) も化学修飾フラグメント hCS - (1 - 133) および hGH - (141 - 191) 同様非共有的に結合させた。米国特許第4,189,426。これらの研究者は肝臓成長ホルモンレセプターへの結合決定基が成長ホルモンの最初の134個のアミノ末端残基であると誤って報告した (バースタイン (Burstein), 等 (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75、5391 - 5394)。明らかにこれらの方法は間違った結果を導く。さらに2個の大きいフラグメントを使用することによりこの方法では潜在的に特定の相互作用に実際に関与する特異的残基または領域を同定することなしにこれらの組合せで使用される2個のフラグメントのどちらかにその機能を割振ることが可能である。hGH

に関する上述の方法および実験のレビューが報告されている。ニコル(Nichol), C. S.等(1986) *Endocrine Rev.* 7、169-203。

【0008】hGHの“欠失ペプチド”(hGH-32-46)由来の7残基ペプチドフラグメントを他の哺乳類の成長ホルモンの類似セグメント由来のアミノ酸残基を含むよう修正した別の方法が報告されている。しかしそのような置換の効果はあったとしても報告されていない。米国特許第4,699,897 参考。それにもかかわらず短かいペプチドフラグメントを使用する短所は、それらのフラグメントの線型配列が本来の成長ホルモンにみられる構造をインビトロでもインビボでも認識されるよう取り込めなければならないことから明白である。多くの天然のhGH変異体が同定されている。この中には、hGH-V(シーバーク(Seeberg), P. H. (1982) *DNA* 1、239; 米国特許第4,446,235号、4,670,393号および4,665,180号)およびhGHの残基32-46の欠失を含む20K hGH(コスチオ(Kostyo), J. L.等(1987) *Biochimica et Biophysica Acta* 925、314; ルイス(Lewis), U. J.,等(1978) *J. Biol. Chem.* 253、2679)が含まれる。ある研究者は、hGH中部位165のシステインをアラニンに置換した通常Cys-53とCys-165の間で生成するジスルフィド結合の破壊を報告した。トクナガ(Tokunaga), T.,等(1985) *Eur. J. Biochem.* 153、445。この単一置換は明らかにhGHの三次構造を維持し、かつhGHのレセプターにより認識される変異体を生じた。他の研究者は固体樹脂サポート上でのhGHのインビトロ合成を報告した。この研究者の第1の報告はhGHの正しくない188個のアミノ酸配列を公表した。リ(Li), C. H.等(1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88、2050; および米国特許第3,853,832号。第2の報告は190個のアミノ酸配列を公表した。米国特許第3,853,833号、この後者の配列も正しくないものである。特にhGHの配列は部位68の後にグルタミンが入っており、部位73はグルタミンではなくグルタミン酸、部位106はアスパラギンではなくアスパラギン酸、部位108はアスパラギン酸ではなくアスパラギンである。

【0009】先に示したものに加え特定のモノクローナル抗体への結合が変化したハイブリッドインターフェロンも報告されている。キャンブル(Camble), R.等、“ペプチド; 構造と機能”合成遺伝子から生成したインターフェロン-2類似物の性質、*Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium*、(1985)デバー(Deber)等編、ピアスケミカル社、シカゴ、Ill., 375-384。該文献に公表されているように-1インターフェロンのアミノ酸残基101-114または-115-128が-2インターフェロンの残基98-114が-2インターフェ

ロンはNK-2モノクローナル抗体を結合するが-1インターフェロンは結合しない。-2インターフェロン中のこの特定の領域は-1および-2インターフェロン間の27個のアミノ酸の相異中の7個がこの領域中に存在することから選択された。報告されているようにこのようにして得たハイブリッドはNK-2モノクローナル抗体との活性が実質的に減少している。抗ウイルス活性をテストしてみるとこれらのハイブリッドは野生型の-2インターフェロンの活性と同程度の抗ウイルス活性を示した。この領域内のより小さいセクションの置換も報告された。また3~7個のアラニン残基クラスターの連続的置換も報告された。しかし、唯1つの類似体[Ala-30、32、33]IFN-2が公表されている。ニワトリ卵白リゾチームの小ペプチドフラグメント内のアラニン置換および2A11または3A9細胞の刺激に関するこれらの置換の効果も報告されている。アレン(Allen), P. M.等(1987) *Nature* 327、713-715。抗原結合ループを含む二次構造ユニットの全ユニット(ジョーンズ(Jones), P. T.等(1986) *Nature* 321、522-525)またはDNA認識ヘリックス(ワートン(Wharton), R. P.等(1985) *Nature* 316、601-605)の置換による結合性の操作に関する別の報告もある。上述の文献は単に本出願の登録期日前の公表のため提供したものであり先の発明または以前に登録された出願に基づく優先権によりこれらの公開期日が早いことから本発明の権利を失うという告白として解釈されるものはなにもない。

【0010】上述の参考文献により示される状況があるならば構造と機能との関係を明らかにするためポリペプチドの有効な系統的分析法が必要なことは明白である。したがってここでの目的はポリペプチドの機能活性に寄与するポリペプチド内の活性ドメインの同定法を提供することである。さらに本目的は機能活性を決定する活性アミノ酸の測定法を提供することである。さらに本発明の目的はポリペプチド内の生物学的活性ドメインを系統的に同定する方法を提供することである。さらに本目的は本来のホルモンとは異なる望ましい生物学的、生化学的および免疫原的性質を有するホルモン変異体を提供することである。さらに本目的は1つの生物学的機能については減少した活性を有しかつ第2の標的物質については実質的または増加した活性を有するホルモン変異体を提供することである。さらに本目的はhGHに対するソマトジェニックレセプターに関する変化した結合活性および、または生物学的活性を有し、かつ有効性を増したhGH変異体を提供することである。さらに本目的は1つ以上の望ましい生物学的性質は保持しているが糖尿病誘発活性は減少しているhGH変異体を提供することである。さらに本目的はhGHのソマトジェニックレセプターに関する結合活性を増加したhPRLおよびhPL

を提供することである。さらに本目的はhGH変異体を含むポリペプチド変異体のクローニングおよび発現に使用するDNA配列、ベクターおよび該ベクターを含む発現宿主を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】1つの特徴として本発明は第1の標的物質に関するポリペプチドの活性に影響する未知の活性ドメインを同定することによるポリペプチドの構造と機能の系統的分析法を提供する。これらの未知活性ドメインは該ポリペプチドの一次アミノ酸配列中に少なくとも2個の不連続アミノ酸セグメントを含む。活性ドメインは該ポリペプチド(親ポリペプチドと呼ぶ)の選択されたアミノ酸セグメントを該ポリペプチドの類似体由来する類似アミノ酸セグメントと置換することにより決定される。この類似体は標的物質に関し親ペプチドと異なる活性を有している。このようにして生成した各セグメント置換ポリペプチドの標的物質に関する活性を検定する。これらの活性を親ポリペプチドの活性と比較する。この構造的に類似するアミノ酸セグメントは標的物質に関し異なる相互作用を起こす類似体由来することからこのような活性の比較は親ポリペプチド中の活性ドメインの位置の指標を提供する。さらに本方法は親ポリペプチドの活性ドメイン中の活性アミノ酸の同定も含んでいる。本方法は親ポリペプチドの活性ドメイン内のアミノ酸残基1個の各アミノ酸への置換、および該残基置換ポリペプチドの標的物質に関する検定を含んでいる。各残基置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドの活性と比較する。活性アミノ酸残基が同定されるまで活性ドメイン中の種々のアミノ酸についてこれらのステップを繰り返す。本発明の別の特徴として、種々の標的物質に関し種々の活性ドメインおよび活性アミノ酸残基を同定する方法が提供される。これらの方法には第

2の標的に関し上述の方法の反復が含まれる。

【0012】上述の方法に従がい1つ以上の標的物質に関し親ポリペプチドと比較して異なる活性を有するポリペプチド変異体を同定する。これらの変異体は標的物質に関し親ポリペプチドの活性を決定する活性ドメインまたは活性ドメイン中の活性アミノ酸残基の同定に基づき作られる。さらに本発明は少なくとも3つの部分からなる成長ホルモン、プロラクチンおよび胎盤ラクトゲン変異体を含む。第1部分は親ホルモンのアミノ酸の少なくとも1部に対応し、第3部分は同親ホルモンの少なくとも1部に対応し、かつ第2部分は親ホルモンの類似体のアミノ酸配列に対応する。第2部分はポリペプチド変異体の第1および第3部分の間には含まれない親ホルモンのアミノ酸残基の類似体である。また本発明にはhGHのセグメント置換および残基置換変異体を含む特定のヒト成長ホルモン、ヒトプロラクチンおよびヒト胎盤ラクトゲン変異体を含む。

【0013】

【発明の実施の形態】1つの態様において本発明の方法は親ポリペプチドと標的物質との相互作用に関するポリペプチド中の1つ以上の活性ドメインを決定するための、ヒト成長ホルモンまたはヒトプロラクチンなどの親ポリペプチドの系統的分析を提供する。本発明の方法を採用するにあたり目的とする標的物質に異なる活性を示す該ポリペプチドに対する1つ以上の類似体が必要ではない。したがって本明細書で用いられているように“親ポリペプチド：とは親ポリペプチドとは異なる標的物質への活性を示す“類似体”が存在するポリペプチドを意味する。このようなポリペプチド、類似体および標的物質の例を第1表に示す。

【表1】第1表

親ポリペプチド	類似体	標的または標的を含むアッセイ
ヒト成長ホルモン	ヒト胎盤ラクトジェン、ヒトプロラクチンおよびブタ成長ホルモン	ソマトジェニック、ラクトジェニック、ジアベタジェニック、脂質分解、窒素遅延、マクロファージ活性化およびhGHのインシュリン様効果に対するレセプター；ラット体重法；ラット体重増アッセイ、OB/OB マウス又はイヌにおけるインシュリン耐性アッセイ、ヒト肝臓、アジポーズ、リンパ球、胸腺細胞および卵巣組織上のレセプター
hPRL	pGH	ヒトプロラクチンレセプターに対する結合
ウサギGHレセプター	ヒトGHレセプター	ウサギGHへの結合
α -インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン	$\alpha 1$ インターフェロンレセプターへの結合
ヒト組織成長因子 (TGF- β_1)	ヒトTGF- β_2 またはインヒピン	ヒト造血細胞増殖調節
表皮増殖因子 (EGF)	TGF- α	カロチノサイト増殖
マウス組織壊死因子 (nTNF)	(hTNF) ヒト組織壊死因子	マウスTNFレセプター活性
ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	ヒト骨髓幹細胞の増殖および分化
ヒトCD-4レセプター	マウスCD-4レセプター	HIVウイルスのgp-120
ズブチリシン (バチルスアミリルグイフェイシヤンス)	ズブチリシン (バチルスリチエニルホルミス)	サクシニル-ala-ala-pro-glu-P-ニトロアニリド
ヒト γ -インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン (例えばマウス由来)	ヒトインターフェロンレセプターの活性化
インシュリン成長因子 (IGF-1)	インシュリン	IGF-1レセプター成長調節レセプター
組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)	トリプシンウロキナーゼ	プラスミノゲン (切断) フィブリン (結合)

【0014】もちろん第1表の親ポリペプチド、類似体および標的物質は単に例である。また親ポリペプチドにはたとえばスクシニルコエンザイムAシンターゼ、ミトコンドリアATPase、アミノアシルtRNAシンターゼ、グルタミンシンターゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼおよびアスパラテートトランスカルバモラーゼなどの1つ以上のサブユニットを含むたん白質性物質が含まれる (ハング (Huang) 等 (1982) Ann. Rcv. Biochem. 51, 935-971 参照)。このような多重サブユニット親ポリペプチドの場合、活性ドメインは親ポリペプチドの2つ以上のサブユニットにまがっている。したがって後により詳細に述べる方法は特定のポリペプチドの各サブユニットを探り、部分的には1つのサブユニット上に含まれかつ部分的には1つ以上の他のサブユニット上に含まれる特定の標的物質に対する活性ドメインおよび活性アミノ酸を確定するのに用い得る。一般的に親ポリペプチドおよび類似体は機能に関する1つのポリペプチド群に属する。さらに通常このような親ポリペプチドおよび類似体はあるアミノ酸配列、すなわち保存残基を持つ。これらの配列ホモロジーは90%以上のこともあるが約15%~20%と低いこともある。一次配列ホモロジーに加え、親

ポリペプチドの類似体はポリペプチドおよびその類似体の三次元的枠組みでも限定される。したがって類似体はアミノ酸配列において親ポリペプチドからの多様性を示す場合もその分子の三次構造の全て、または一部の比較に基づき親ポリペプチドと構造的にホモロジーをもつこともある。チョシア (Chothia), C. 等 (1986) Emb. J. 5, 823。

【0015】一般に三次構造類似体は、その類似体の三次元構造が親ポリペプチドの構造と一緒であることが知られている場合同一と見なし得る。炭素軸の二乗平均分析 (RMS) を行うことにより (たとえばサクリフ (Sutcliffe), M. J. 等 (1987) Protein Engineering 1, 377-384)、もしあるとすれば三次元類似性をもつ領域の重なりが同定される。テスト類似体配列の好ましくは60%以上に関し、もし炭素軸が親ポリペプチドの炭素軸と重っているかまたは約2~約3.5 RMSの内にある場合、そのテスト類似体は親ポリペプチドと三次元的に類似している。もちろんこのことは2つの配列の間に存在する挿入または欠失を除外する。上述の親ポリペプチドおよび類似体は天然の分子の公開であるにもかかわらず、親ポリペプチドおよび類似体にはインビトロ組換え法で導入される配列中に天

然の変異を含む変異体が含まれると理解すべきである。このように親ポリペプチドまたは類似体として用いる変異体はその親ポリペプチドまたは類似体において1つ以上のアミノ酸残基の置換、挿入および、または欠失を含む変異体を含む。このような変異体は本発明の方法を実行し活性ドメインおよび、または活性アミノ酸の同定または本発明のポリペプチド変異体の調製に使用し得る。したがってhGHの天然の変異体またはCYS-165のAla置換を含む組換え変異体はそれらが標的に対して活性をもつ限り親ポリペプチドまたは類似体として使用し得る。このような天然および組換え変異体には他の親ポリペプチド中の特異的残基と等価の異なるアミノ酸残基が含まれ得る。これらの異なるアミノ酸はそれらの残基が一次配列または三次構造により構造的に類似している、またはそれらが機能的に等価であるならば等価であると云える。さらに、多くの親ポリペプチドおよび類似体はその役割を交換し得ることは明白である。したがって非ヒト成長ホルモンおよびそれらの関連類似体群はそれぞれ親ポリペプチドとして使用できかつ同等にその活性ドメインを探ることができる。さらに、HIVウイルスに対するCD-4レセプターなどの標的物質もCD-4レセプター類似体に関する親ポリペプチドとしてHIV結合に寄与する活性ドメインおよび活性アミノ酸の同定やCD-4変異体の調製に使用される。

【0016】本明細書で使用しているように、“標的”とは親ポリペプチドと相互作用する物質である。標的物質にはたん白質性ホルモン、酵素基質、たん白質性レセプターに対するホルモン、たん白質性結合たん白質に対する一般的リガンドおよびポリペプチドに接触し得る免疫系などが含まれる。ホルモンレセプターの例にはhGHに対するソマトジェニックおよびラクトジェニックレセプターおよびhPRLに対するレセプターが含まれる。他の標的物質には抗体、プロテアーゼのインヒビター、たん白質性レセプターに結合するホルモンおよび組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)に結合するフィブリンが含まれる。一般に標的物質は親ポリペプチド上の“活性ドメイン”と接触することにより親ポリペプチドと相互作用を起こす。一般にこのような活性ドメインは該ポリペプチドの表面上に存在するか、もしくは三次元構造の変化によりそのポリペプチドの表面に導き出される。ポリペプチドの表面とは、生理的条件下、すなわちインビボまたはインビトロで発現した時と同様の条件下に存在する本来の構造について規定される。そのアミノ酸セグメントおよびアミノ酸残基はいくつかの方法で確認される。もしその三次元結晶構造が十分な分解能で分っているなら、そのポリペプチドの表面にあるアミノ酸残基は“表面接近可能”なアミノ酸残基である。これら表面接近可能残基にはその三次元構造の表面上に“転がる”理論上の水分子と接触する残基である。ポリペプチドの表面上の活性ドメインはそのポリペプチドの

一次アミノ酸配列の単一のセグメントに含まれる。しかしながら多くの場合天然型のポリペプチドの活性ドメインは親ポリペプチドの一次アミノ酸配列中の2つ以上のアミノ酸セグメントから構成される。たとえばヒト成長ホルモンのソマトジェニックレセプターへの活性ドメインを図5に示す。示されているように活性ドメインのドメインA、CおよびFは各々hGH分子の不連続なアミノ酸セグメント上に存在する。これらのアミノ酸セグメントは図4中A、C、Fという文字で示されている。活性ドメインを構成する不連続なアミノ酸セグメントは活性ドメインおよび標的物質の間の相互作用に有意に関係しない多くのアミノ酸残基により分離されている。一般に不連続アミノ酸セグメント間の間隔は少なくともアミノ酸5残基分である。

【0017】本発明の方法は親ポリペプチドのアミノ酸配列中の未知活性ドメインの検出を目的としている。標的物質に関するポリペプチドの三次元結晶構造が入手できる場合、たとえばインヒビターまたは転移状態類似体に関する酵素の結晶構造が入手できる場合は除いて多くのポリペプチドのほとんどの活性ドメインは未知のままである。本明細書で使用している“類似ポリペプチドセグメント”または“類似セグメント”とは親ポリペプチド中の対応する配列と置換して“セグメント置換ポリペプチド”とするアミノ酸配列を意味する。一般的に類似セグメントは親ポリペプチドにおいて1つ以上の異なるアミノ酸残基の置換、挿入または欠失を起こすが親ポリペプチド中で置換する選択されたセグメント中の他の残基の相対的アミノ酸配列は維持される配列を有している。一般に類似セグメントは親ポリペプチドと類似体の全アミノ酸配列を両配列間の配列同一性が最大となるよう整列させることにより同定される。この配列整列に基づく類似セグメントは親ポリペプチドの対応する配列への置換用に選択される。同様に三次構造ホモロジーを示す類似体由来の類似セグメントは構造ホモロジーを示すこれらの領域から誘導し得る。このような類似セグメントは親ポリペプチド中の対応する配列と置換される。さらにたとえば構造低類似領域の隣接領域などの三次構造相同体の他の領域も類似セグメントとして用いられる。もし可能ならば類似セグメントを選択してセグメント置換ポリペプチド中への不安定化アミノ酸残基の導入は避けるべきである。このような置換にはかさ高側鎖や疎水コア領域中へ親水性側鎖を導入するものが含まれる。

【0018】一般的に親ポリペプチドおよび類似体のアミノ酸配列は知られており、またある場合にはその三次元結晶構造も入手可能である。1つ以上の類似体と親ポリペプチドのアミノ酸配列の整列化により少なくとも予備分析で変化を受けていない配列中の保存されているアミノ酸残基を容易に見つけることができる。また配列整列化は1つ以上のアミノ酸残基の置換、挿入または欠失を含む配列変化領域も明らかにする。このような変化を

含む領域により親ポリペプチド中のどのセグメントが類似セグメントと置換したかが決定される。それゆえ類似体の類似セグメントの置換はアミノ酸残基の置換だけでなく、アミノ酸残基の挿入および、または欠失も起こし得る。もし3次元構造の情報が入手可能な場合は類似セグメントと置換すべきではない親ポリペプチド中の領域を同定することが可能となる。たとえば親ポリペプチド中の両親媒性ヘリックスの疎水性表面において過密領域が同定された場合は類似セグメントと置換すべきではない。そのように同定された残基はポリペプチド変異体中に保持されるべきでかつ表面残基のみが類似残基と置換されるべきである。一般に類似セグメントは長さがアミノ酸3~30残基、好ましくは約3~15残基、もっとも好ましくは約10~15残基である。ある場合、類似セグメントの好ましい長さは相同または親ポリペプチドと比べて類似セグメントの1つ以上のアミノ酸残基の挿入および、または欠失のため変化もある。もし親ポリペプチドの3次元構造が入手できないときは一般に全部ではないにしろ親ポリペプチドのほとんどをカバーする類似セグメントに関するセグメント置換ポリペプチドを作る必要がある。しかし全アミノ酸配列のセグメント置換は必ずしも必要ではない。たとえば全アミノ酸配列の1部のみをカバーする偶然セグメント置換は特定標的物質に対する活性ドメインを同定するのに十分な情報を提供する。しかしほとんどの場合アミノ酸配列の約15%以上が活性ドメイン同定のためセグメント置換を受けることが必要である。一般に約50%、好ましくは約60%、より好ましくは約75%、もっとも好ましくは100%のアミノ酸配列が構造情報がない場合にセグメント置換される。

【0019】ここで使用している“類似性アミノ酸残基”または“類似残基”とは親ポリペプチドの対応セグメント中の対応アミノ酸残基とは異なる類似セグメント中のアミノ酸残基を意味する。したがってもし類似セグメントの置換が1つのアミノ酸置換を起こすならそのアミノ酸残基は類似残基である。1度親ポリペプチドおよび1つ以上の類似体が同定されたならば1つ以上の類似体由来の類似セグメントを親ポリペプチド中の選択されたセグメントと置換し多くのセグメント置換ポリペプチドを作る。このような置換は組換えDNA技術を用い簡単にこなされる。一般に親ポリペプチドをコードするDNA配列は簡便な宿主で発現されるようにクローン化およびその他の処理が行なわれる。親ポリペプチドコードDNAは親ポリペプチドを発現する細胞のmRNAから誘導されるか、または化学合成的にDNA配列を構築することによるゲノムライブラリーから入手し得る(マニアチス(Meniatis), T. 等(1982) Molecular Cloning、コールドスプリングハーバーラボラトリー N. Y.)。それからこの親DNAを適当なプラスミドまたはベクターに挿入し宿主細胞のトランスホームに使用され

る。DNA配列のクローニングおよび発現により親ポリペプチド、セグメント置換ポリペプチド、残基置換ポリペプチドおよびポリペプチド変異体を作るのには原核生物が好ましい。たとえば、大腸菌k12294株(ATCC No. 31446)、大腸菌B株、大腸菌X1776株(ATCC No. 31537)および大腸菌c600株およびc600hfl株、大腸菌W3110(F⁻, ⁺, 独立栄養型、ATCC No. 27325)、枯草菌などのバチルス類およびサルモネラティムリウム(*Salmonella typhimurium*)またはセラチアマルセサンス(*Serratia marcescens*)などその他の腸内細菌および種々のシュードモナス種が用いられる。好ましい原核生物は大腸菌W3110(ATCC 27325)である。原核生物中で発現したとき一般にポリペプチドはN-末端メチオニンまたはホルミルメチオニンを含みかつグリコシル化されていない。もちろんこれらの例は制限することなく説明を意図したものである。

【0020】原核生物に加え、イースト培養物や多細胞生物由来の細胞などの真核生物も使用される。原則としてこのような細胞の培養物も使用可能である。しかし脊椎細胞が最も興味深く、培養中(組織培養)の脊椎細胞の増殖は、反復が可能である(“組織培養”アカデミックプレス版、クルーズ(Kruse)およびパターンソン(Patterson)編(1973))。これらの有用な宿主細胞系列の例にはVEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系列、W138、BHK、COS-7およびMDCK細胞系列がある。一般に宿主細胞に適合する種由来の複製およびコントロール配列を含むプラスミドベクターがこれらの宿主と合わせて使用される通常このベクターは複製部位およびトランスフォーム細胞に発現型選択を提供し得るたん白質をコードする配列を有している。たとえば大腸菌は大腸菌由来のプラスミドであるpBR322でトランスホームする(マンデル(Mandel), M. 等(1970) J. Mol. Biol. 53, 154)。プラスミドpBR322はアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含んでおり、そのため容易な選択手段を提供している。好ましいベクターはpB0475である実施例1参照。このベクターは宿主間での移動を可能にし、それにより突然変異誘発および発現を容易にするファージおよび大腸菌の複製オリジンを含んでいる。“発現ベクター”とは適当な宿主中のDNAの発現を可能にする適当なコントロール配列に機能的に結合する該DNA配列を含むDNA構築物を意味する。これらのコントロール配列には転写を可能にするプロモーター、そのような転写をコントロールするオペレーター配列、適当なmRNAリボゾーム結合部位をコードする配列および転写および翻訳の停止をコントロールする配列が含まれる。ベクターはプラスミドでもファージ粒子でも、または単に潜在的ゲノム挿入物でもよい。1度適当な宿主にトランスホームすればそのベクター

ーは宿主ゲノムとは独立に複製しかつ機能するかまたはある場合にはゲノムそれ自身の中に組込まれる。本明細書において“プラスミド”および“ベクター”はプラスミドが現在もっとも一般的に用いられているベクターであることからしばしば同義語的に使用される。しかし、本発明は同様に機能しかつ本分野でよく知られている他の形の発現ベクターも包含する。

【0021】2つのDNAまたはポリペプチドの関係を述べる際の“機能的に結合した”という言葉はそれらが互いに機能的に結合することを意味する。たとえばおそらくシグナル配列の切断によりたん白質成熟型を分泌するプロセスにおいてシグナル配列として機能するなら該前配列はペプチドと機能的に結合している。プロモーターはコード配列の転写をコントロールするならその配列と機能的に結合している。リボゾーム結合部位は翻訳を可能とする位置にあるならそれはコード配列と機能的に結合している。1度本ポリペプチドがクローン化されればそのクローン化親DNAについて部位特異的突然変異誘発(カーター(Carter), P. 等(1986) Nucl. Acids Res. 13, 4331;ゾラー(Zoller), M. J. 等(1982) Nucl. Acids Res. 10, 6487)、カセット突然変異誘発(ウェルス(Wells), J. A. 等(1985) Gene 34, 315)、制限選択突然変異誘発(ウェルス(Wells), J. A. 等(1986) Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317, 415)または他の技術をほどこし置換した類似セグメントにより規定されるアミノ酸配列の変化をコードする“セグメント置換DNA配列”が作られる。適当な発現ベクターに機能的に結合しているとき、セグメント置換ポリペプチドが得られる。ある場合、親ポリペプチドまたはセグメント修正ポリペプチドの回収は親ポリペプチドまたはセグメント修正ポリペプチドをコードするDNA配列に機能的に結合する適当なシグナル配列を用いることにより発現宿主からそれらの分子を発現かつ分泌させることで可能となる。これらの技術は当分野でよく知られている。もちろん望ましいポリペプチドのインピトロ化学合成などそれらのポリペプチドおよびセグメント置換ポリペプチドの生成に別の方法も使用し得る(バラニー(Barany), G. 等(1979) “ペプチド”(E. グロス(Gross) および J. メイエンホーファー(Meienhofer) 編) アカデミックプレス版、N. Y. 2巻、3~254頁)。

【0022】1度種々のセグメント置換ポリペプチドが生成されればそれらを標的物質に接触させ、もし、標的物質と各セグメント置換ポリペプチドとの相互作用があればそれを測定する。同じ標的物質に関するこれらの活性を親ポリペプチドの活性と比較する。もしその類似体が親ポリペプチドと比べその標的物質に関し異なる活性を有しているなら、それらのセグメント置換ポリペプチドは親ポリペプチド中の活性ドメインを規定する類似セグメントを含んでいると推定される。もし1つの類似体

が親ポリペプチドより大きい活性を有しているなら、複数のセグメント置換ポリペプチドがその標的物質に関し活性の増加を示す可能性がある。このような場合、類似体の活性ドメインおよびその標的物質に関する活性を増加するように修正し得る親ポリペプチドの適当な領域を効果的に同定できる。その標的との相互作用にかかわる類似体の領域が主に1つの連続するアミノ酸セグメント内に存在するとき、このような事象が起こりやすい。もし類似体の“活性ドメイン”が類似体アミノ酸配列の不連続領域に含まれるなら、活性の増加はセグメント置換ポリペプチドへ、類似体からの全ての活性ドメインを同時に導入しなければならぬからそのセグメント置換ポリペプチドの活性の増加は起こりそうもない。したがって、類似体は標的物質に対し親ポリペプチドよりも小さい活性をもつことが好ましい。このような場合、セグメント置換ポリペプチドには活性のロスがみられる。しかし、1度親ポリペプチド中の活性ドメインが決定されたら、このポリペプチドは連続的にまたは同時にそのような活性ドメインを置換して標的物質に関して第1親ポリペプチドの活性を欠いた第2親ポリペプチドとする類似体として使用できる。

【0023】ポリペプチド中の活性ドメインは標的物質に関するセグメント置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドのそれと比較することにより同定される。多くの分析測定が可能であるが標的物質の非触媒的結合についてはセグメント置換ポリペプチドと標的物質間に形成される複合体の解離定数 K_d を親ポリペプチドに関する K_d と比べる方法が簡便なもの1つである。セグメント置換により類似置換残基あたり、約1.5、好ましくは約2.0の K_d 値の増減は、置換セグメントがその標的物質と親ポリペプチドの相互作用の活性ドメインであることを示している。標的物質との触媒的相互作用の場合親酵素に対する活性を測定する適当なパラメーターは K_{cat}/K_m 比を比較することである。親酵素に対し置換類似残基当たり約1.5、好ましくは2.0の K_{cat}/K_m 値の増減は活性ドメインの置換を示す。本明細書で使用している“スキャンニングアミノ酸”とは親ポリペプチド内の活性アミノ酸を同定するのに用いられるアミノ酸のことである。“残基置換ポリペプチド”はスキャンニングアミノ酸に関する親ポリペプチド中のアミノ酸の少なくとも単一置換を含むポリペプチド変異体である。“残基置換DNA配列”は残基置換ポリペプチドをコードする。このようなDNAおよびポリペプチドはセグメント置換DNAおよびポリペプチドの調製で述べた方法で調製される。アミノ酸スキャンで同定した“活性アミノ酸残基”は一般的に標的物質と直接接触するものである。しかし、活性アミノ酸は他の残基または H_2O のような小分子または Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} または Zn^{+2} などのイオン種で形成される塩橋を介して間接的に標的物質に接触することもある。ある場合には、スキャンニングア

ミノ酸は親ポリペプチドの活性ドメイン中に同定されるアミノ酸と置換される。一般的に多くの残基置換ポリペプチドが調製され、その各々は活性ドメイン内の種々のアミノ酸残基の位置でスキャンニングアミノ酸の単一置換を含んでいる。特定の標的物質に関するそのような残基置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドの活性と比較し、標的物質との相互作用に關係する活性ドメイン中*

*のアミノ酸残基を決定する。このような分析に用いられるスキャンニングアミノ酸は置換したものと異なるアミノ酸、すなわちその他の19種の天然のアミノ酸である。

【0024】

【表2】

第 II 表

ポリペプチドアミノ酸	アイソステリックな スキャンニングアミノ酸
Ala	Ser , Gly
Glu	Gln , Asp
Gln	Asn , Glu
Asp	Asn , Glu
Asn	Aln , Asp
Leu	Met , Ile
Gly	Pro , Ala
Lys	Met , Arg
Ser	Thr , Ala
Val	Ile , Thr
Arg	Lys , Met ,
Asn	
Thr	Ser , Val
Pro	Gly
Ile	Met , Leu ,
Val	
Met	Ile , Leu
Phe	Tyr
Tyr	Phe
Cys	Ser , Ala

【0025】この表は各アミノ酸について以下の記号を

アミノ酸又はその残基

アラニン
グルタミン酸
グルタミン
アスパラギン酸
アスパラギン
ロイシン
グリシン
リジン
セリン
バリン
アルギニン
スレオニン
プロリン
イソロイシン
メチオニン
フェニルアラニン
チロシン
システイン

使用しているPhe

三文字記号 Asn , ~~Asn~~ 一文字記号

Ala	A
Glu	E
Gln	Q
Asp	D
Asn	N
Leu	L
Gly	G
Lys	K
Ser	S
Val	V
Arg	R
Thr	T
Pro	P
Ilu	I
Met	M
Phe	F
Tyr	Y
Cys	C

トリプトファン
ヒスチジン

Trp W
His H 24

【0026】残基置換ポリペプチドの活性の効果がある場合、それを一様のスキャンニングアミノ酸残基への天然のアミノ酸残基の変化に系統的に帰着させることができるのでスキャンニングアミノ酸は各残基置換ポリペプチドと同じであることが最も望ましい。ある場合、1つ以上の残基におけるスキャンニングアミノ酸置換は標的物質に関する活性の分析を行うのに十分な量の単離を可能にするレベルで発現しない残基置換ポリペプチドを生ずる。このような場合種々のアミノ酸、好ましくはアイソステリックなアミノ酸が用いられる。最も好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さい中性のアミノ酸である。このようなアミノ酸残基にはアラニン、グリシン、セリンおよびシステインが含まれる。アラニンはベータ炭素からとび出た側鎖をもたず、かつ残基置換ポリペプチド主鎖構造が変化しにくいことからこのグループの中でも好ましいスキャンニングアミノ酸である。またアラニンはもっとも一般的なアミノ酸であることから好ましい。さらにそれは、埋った形でも露出した形でも存在する(クレイトン(Creighton). T. E., "たん白質"(W. H. フリーマン社版、N. Y.); チオシア(Chothla), C. (1976) J. Mol. Biol. 150、1)。もしアラニン置換が適当な量の残基置換ポリペプチドを生じない場合、アイソステリックアミノ酸が使用される。別に優先性が減る順番に以下のアミノ酸が使用される: Ser, AsnおよびLeu。スキャンニングアミノ酸の使用はセグメント置換ポリペプチドの分析により確認される活性ドメイン中の活性アミノ酸の同定に限定されるわけではない。たとえば親ポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸が分っている場合か、または標的物質との相互作用に関わっていると考えられる場合、その残基およびその周りのアミノ酸残基を探るのにスキャンニングアミノ酸を使用することができる。さらにもし親ポリペプチドが小さいペプチド、すなわち約3~50アミノ酸残基であるなら、全分子にわたってスキャンニングアミノ酸分析を行ないうる。

【0027】1度活性アミノ酸残基が同定されたならアイソステリックアミノ酸に置換される。このアイソステリック置換は全ての場合に行う必要はないしまた活性アミノ酸が同定される前にも行なわれる。このアイソステリックアミノ酸残基はいくつかの置換が起こし得る構造への潜在的破壊効果が最小となるように行なわれる。アイソステリックアミノ酸を第II表に示す。活性アミノ酸残基は標的物質に関する残基置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドと比較することにより同定し得る。一般に、Kd値の2倍の増減は置換残基が標的物質との相互作用に活性があることを示している。同様に標的物質との触媒的相互作用の場合、親酵素に対してKcat/Km値の2倍の増減は活性残基の置換を示している。推定上

の、または既知の活性アミノ酸残基をスキャンニングアミノ酸分析にかけるとき、その残基に隣接するアミノ酸残基をスキャンするべきである。その結果3残基置換ポリペプチドができる。1つは推定上または既知活性アミノ酸である部位Nにスキャンニングアミノ酸、好ましくはアラニンを含んでいる。他の2つは部位N+1およびN-1にスキャンニングアミノ酸を含んでいる。各置換ポリペプチドが標的物質に対しKdまたはKcat/Km値に約2倍以上の効果を起こすならばそのスキャンニングアミノ酸は部位N+2およびN-2で置換されている。このことをKdまたはKcat/Km値への効果が2倍以下となる少なくとも1個、好ましくは4個の残基が両方向について同定されるまでか、または親ポリペプチドの末端に到達するまでくり返す。このようにして、特定の標的物質との相互作用に關係する連続するアミノ酸配列に沿って1つ以上のアミノ酸が同定され得る。

【0028】本発明の方法は特定の親ポリペプチドの1つ以上の標的物質に関する活性ドメインの検出に使用される。さらに種々の活性ドメイン内の活性アミノ酸もこの方法により同定される。1度2つ以上の活性ドメインおよび活性アミノ酸残基が特定のポリペプチドの種々の標的物質に関して同定されたならその親ポリペプチドに対して種々の修正を行って該ポリペプチドと1つ以上の標的物質間の相互作用を修正できる。たとえばhGH表面上の2つの活性ドメインはソマトジェニックレセプターおよびプロラクチンレセプターについても同定された。たの特殊な場合の活性ドメインは重複している。したがってソマトジェニックおよびプロラクチンレセプターと相互作用する多くの共通する活性アミノ酸残基が存在する。hGHに対する種々の修正は以後より詳しく説明する情報に基づいて行なわれる。ある場合に種々の標的物質に関する活性ドメインは重複していない。このような状況で1つのレセプターに関する親ポリペプチド中の活性アミノ酸の修正は種々のアミノ酸による置換で行なわれ、その結果その標的物質との活性ドメインの相互作用は減少または増加し、それらの変異体の生理作用が変化することになる。本明細書で使用している"相互作用変化"とは1つ以上の活性ドメインが修正され標的物質とその変異体との相互作用が親ポリペプチドと比べて変化しているポリペプチド変異体について用いられる。相互作用変化とは親ポリペプチドと特定の標的物質との相互作用に比べポリペプチド変異体の相互作用が少なくとも2倍増減することで定義される。

【0029】標的物質と親ポリペプチド、ポリペプチド変異体、セグメント置換ポリペプチドおよび、または残基置換ポリペプチドとの相互作用はインビトロまたはインビボの簡便なアッセイで測定し得る。インビトロアッセイは標的物質とポリペプチド、たとえば酵素と基質、

ホルモンとホルモンレセプター、抗体と抗原などの検出可能な相互作用を測定するのに用いられる。このような検出には色変化、放射性変化、溶解度変化、ゲル電気泳動法および、またはゲル排除法による分子量変化の測定などが含まれる。インビボアッセイには生理作用、たとえば体重変化、電解質バランスの変化、凝血時間の变化、血餅分解の変化および抗原応答の誘導などを検出するアッセイが含まれるが、以上に示したものに限定されるわけではない。一般に標的物質と目的ポリペプチド間の相互作用変化を測定する可変パラメーターが存在する 10 かぎインビトロアッセイが使用される。本発明の例としてはヒト成長ホルモンのソマトジェニックレセプターに関する該ホルモンの活性を決定する該ホルモンの活性ドメインおよび活性アミノ酸を同定する態様がある。本発明のこの態様を実施する場合、セグメント置換および残基血hGH変異体を含むヒト成長ホルモン変異体で成長ホルモンのソマトジェニックレセプターとの結合相互作用が天然のヒト成長ホルモンとは異なるものが調製または同定される。これらのヒト成長ホルモン変異体の少なくとも1つはソマトジェニックレセプターに関しより高 20 いアフィニティーを有し、かつラットのソマトジェネシスに対しより高い能力を有している。他のものはソマトジェニックレセプターについて低い活性を有している。このようなhGH変異体はhGHアゴニストまたはアンタゴニストとして有用であり、かつそれらの変異体はソマトジェニックレセプターとの実写的相互作用がないことからヒト成長ホルモンの他のレセプターを刺激するより高い能力を有している。さらにこれらの変異体はhGH標準またはトレーサーとしてhGHのイムノアッセイ 30 においても有用である。たとえば抗hGHポリクローナル抗体を含むヒトおよびマウス血清との反応性が有意に低い変異体が同定されている別のものにはhGHと同じソマトジェニックレセプターに対する結合アフィニティーを有するが成長を刺激する能力がより高いものがある。

【0030】肝臓由来のソマトジェニックレセプターと相互作用するヒト成長ホルモンの活性ドメインを測定する方法を図1に示した。この方法では、hGHのセグメントを、クローン化hGH肝臓レセプターおよびhGHに対するモノクローナル抗体に対して非常にアフィニティーの小さいことが知られているhGH類似体由来の類 40 似配列と系統的に置換した。このようなhGH類似体にはヒト胎盤ラクトゲン(pPL)、ブタ成長ホルモン(pGH)およびヒトプロラクチン(hPRL)がある。これらの類似体はソマトジェニックhGHレセプター(hGHR)と比べクローン化hGHレセプターに対しては約100~10000倍も小さい結合アフィニティーを有する(ハリントン(Harrington), A. C.等(1986) J. Clin. Invest. 77, 1817; パウマン(Baumann), G., 等(1986) J. Clin. Endocrinol. Metab. 62, 137)。相同たん白質はそれらが大きな 50

配列多様性を有するときでさえ同様な三次元構造を有することが知られていることからこれらの類似体が使用される(チョシア(Chothia), C.等(1986) F M B O J. 5, 823)。そのように行くと、類似配列置換をその分子の本来の構造を大きく破壊することなしに容易に適用できるという見込みが増す。ヒト成長ホルモンおよびその類似体hPL、pGHおよびhPRLのアミノ酸配列を図2に示す。これらのうち最後の3個の類似体は各々85%、68%および23%のレベルでhGHとの配列同一性を共有する。図1を参照すると、ヒトの成長ホルモンに対するソマトジェニックレセプター(hGHに対する“標準物質”)と相互作用するヒト成長ホルモン中の1つ以上の活性ドメインを同定する全戦術が示されている。示されているように、hGHは標的レセプター、この場合のソマトジェニックレセプターに対し正の結合活性を有している。しかしhPRL、hPLおよびpGH類似体はマイナス記号で示されているにその標的物質に関し著しく活性が低い。文字AからFで示されている6個のセグメント置換成長ホルモンはhGHの 50 選択されたアミノ酸セグメントをhPRL類似体の類似アミノ酸セグメントによる置換で生成する。これらの選択されたセグメント各々は互いに異なり、これらを選択してhGHの全アミノ酸配列または活性ドメインを含むことが期待される領域を探る。セグメント置換ヒト成長ホルモンの調製後各hGHソマトジェニックレセプターに関する検定を行ないその活性を測定する。hGHと比較したこれらの結果は図1のセグメント修正ヒト成長ホルモンの下の+または-の記号で示した。図1から分る 60 ように、この図中のセグメント置換ヒト成長ホルモンCおよびFはソマトジェニックレセプターと結合しない。これらの結果に基づき、成長ホルモン変異体CおよびF中の類似体由来の類似セグメントに対応する成長ホルモン中の領域はhGHのソマトジェニックレセプター結合に関する活性ドメインであると同定される。

【0031】示されているように、もし構造の情報または他のデータがある場合は必ずしもヒト成長ホルモンの全アミノ酸配列または他の親ポリペプチドを試験する必要はない。したがって結晶学からの低分解能または高分解能情報は類似物から選択されるアミノ酸セグメントの不安定化置換を避けるための重要な情報を提供し得る。たとえばヒト成長ホルモンのX線座標は得られていないがpGHの低分解能X線結晶構造に基づくpGH構造モデルからのヘリックス投影図は4本のヘリックスのうちの3本(ヘリックス1, 3および4)は強い疎水性モーメントをもつ両親媒性であることを明らかにした。図3参照。アイゼンバーグ(Eisenberg), D.等(1984) J. Mol. Biol. 179, 125。ポリペプチド中の疎水性コアは非常に密に存在するので(ポンダー(Ponder), J. W. 等(1987) J. Mol. Biol. 193, 775)、それらの埋没したアミノ酸残基の変化は一般に

不安定化を招く(アルバー (Alber), T.等 (1987) Biol. Chem. 26、3754;レイダール-オルソン (Reidhaar - Olson), J. F. (1988) Science 241、53)。さらにポリペプチド群たとえばヒト成長ホルモン群の中のアミノ酸が非常によく保存されている領域は少なくとも最初に調べる必要はない。これはそのような保存配列の破壊はその分子の構造を破壊すると考えられるからである。さらに他のデータは親ポリペプチドのある領域は特定の標的物質との相互作用に関係しないことを示している場合がある。たとえば突然変異誘発によるhGHのN末端13残基アミノ酸の欠失(アシュケナン (Ashkenazi), A.等 (1987) Endocrinology) 121、414)および残基32~46を欠失したhGHの中立変異体(20Kd変異体;ルイス (Lewis), U. J. 等 (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92、5111)はソマトジェニックレセプターに対する結合性に大きく影響しないことが報告されている。さらに残基134と149の間の残基の一部または全てを欠失した制限たん白質分解によるhGHの2本鎖誘導体の*

*生成モソマトジェニックレセプターに対する結合に著しい影響を示さなかった。リ (Li), C. H. (1982) Mol. Cell. Biochem. 46、31;ミルス (Mills), J. B. 等 (1980) Endocrinology 107、391。

【0032】この情報に基づき、hGHのアミノ酸配列の6個のセグメントとが多くのhGH類似体由来の対応する類似アミノ酸セグメントとの置換に選ばれた。これらの選択されたセグメントは図2のウからFに対応する。これらのセグメントをジスルフィド結合、二次構造の境界(図4参照)、成長ホルモン群中に高度に保存される配列の領域、またはそのソマトジェニックレセプターへの結合に関与しないことが以前に同定された領域によって分離した。hGHの191残基中の85残基を集的に置換した17個のセグメント置換hGH変異体を調製した。図2のAからEに割り当てた領域および各領域内のセグメントを置換したhGH変異体を第III表にまとめた。

【0033】

【表3】

第 III 表

探索体)	セグメント置換	導入された	突然変異	Kd	Kd(変異)
領域型)	hGH変異体 hGH	実際の置換 ナシ	誘発法	(nM)	Kd(野生)
.0				0.34	1
A 11-33	hPL(12-25)	N12H, P25L	r.		
s ¹ /	1.4 4.1				
/	pGH(11-33)	D11A, M14V,	カセット ²		
	1.2 3.4	H18Q, R19H, P25A, Q29K, E33R			
3.6	hPRL(12-33) 11	N12R, M14V,	カセット		
		L15V, R16L, R19Y, F25S, D26E, Q29S, E30Q, E33K			
5.8	hPRL(12-19) 17	N12R, M14V,	r. s.		
		L15V, R16L, R19Y			
0.29	hPRL(12-33) 0.85	Q22N, P25S,	r. s.		
		D26E, Q29S, E30Q, E33K,			
B 46-52	hPL (46-52)	E46H, N47D,	r.		
s.	2.5 7.2	P48S, Q49E, L52F			

5.8	pGH(57-73) 17	S57T, T60A, S62T, N63G, R64K, E65D, T67A, K70R, N72D, L73V	カセット
23	hPRL(54-74) 69	F54H, S55T, F56S, 158L, P59A, S62E, N63D, R64K, E66Q, T67A, K70M, S71N, K72Q, L73K, E74D	カセット
D 88-104 . s.	hPRL(88-95) 0.47	E88G, Q91Y, F92H, R94T, S95E	r
.	hPRL(97-104) 0.53	F97R, A98G, M99M, S100Q, L101D, V102A, Y103P, G104E	r. s
E 108-136 カセット	hPL(109-112) 0.61	N109D, V110D, 1.8 D112H	
ット	hPRL(111-129) 0.52	Y111V, L113I, K115E, D116Q, E118K, E119R, G120L, Q122E, T123G, G126L, R127I, E129S	カセ
ット	hPRL(126-136) 0.58	R127D, L128V, E129H, D130P, G131E, S132T, P133K, R134E, T135N	カセ
F 164-190 ハイブリット ² / >34	pGH(164-190) >100	Y164S, R167K, M170L, D171H, V173A, F176Y, I179V, V180M, 415.	
29		R167K, S184R, S184R, G187R, G190A	カセット突然変異誘発 - ウェルズ (Wells), J. A. 等 (1986) Philos. Trans. R. Soc. London 318, 415. 等 (1985) Gene 34, 315.
	pGH(167-181)	R167K, D171H,	r.

【0034】1/ 制限選択 - ウェルズ (Wells), J. A. 等 (1986) Philos. Trans. R. Soc. London 318, 415.
突然変異誘発 - ウェルズ (Wells), J. A. 等 (1985) Gene 34, 315.

3/ 組換え突然変異誘発 - グレー (Gray), G. L. 等 (1986) J. Bacteriol. 166, 635.

【0035】一般にセグメント置換 hGH 変異体はヒト成長ホルモン配列へ置換される類似セグメントにより決まる。しかしある場合には置換類似セグメント中の類似残基のすべてがその構築物中に維持されるわけではない。このように第III表の hPL (12-25) はヒト胎盤ラクトゲン (hPL) のアミノ酸 12~25 が親 hGH のアミノ酸残基 12~25 と置換したセグメント置換 hGH 変異体のことである。この類似セグメントを置換した効果は、図2のこの領域中の hGH と hPL のアミノ酸配列を比較することにより決定することができる。hPL (12-25) 変異体では4個のアミノ酸置換が生じているがなんの変化も起こらない。hPL (12-25) の場合のこれらの残基は12、16、20および25である。hPL (12-25) 変異体中の実際のアミノ酸置換および他のセグメント置換変異体を第II表に示した。各置換は数字の前後に文字を付けて表わされる。第1の文字および数字は未修正 hGH の残基番号におけるアミノ酸を示している。最後の文字はその位置で置換したアミノ酸を示している。したがって N21H は hGH の12番のアスパラギンが hPL (12-25) 変異体ではヒスチジンに置換していることを示している。したがって導入された実際の置換のいくつかは図2における対応するセグメントで示される置換とは対応していない。このように hPL (12-25) は全 hPL (12-25) セグメントが置換された場合4個の置換 N12H、R16Q、L20A および F25L を含むことになる。しかし、実際の変異体は R16 および L20 は維持しており、導入される置換は第III表に示されているように4個の置換のうち2個、すなわち N12H および F25L だけである。親 hGH の1つ以上の残基を維持する他のセグメント置換変異体には領域 A および E を含むものおよびセグメント置換変異体 hPL (46-52) および pGH (167-181) が含まれる。

【0036】各々のセグメント置換ヒト成長ホルモン変異体をクローン化可溶性 hGH レセプターの細胞外領域からの¹²³I hGH の置換を用いたインビドロシステムで検定しそのソマトジェニックレセプターに対するセグメント置換変異体の相対的アフィニティーを定量した。レング (Leung), D. W. 等 (1987) Nature 330, 537。この短縮型のソマトジェニックレセプターは同膜型レセプターと比べ若干結合アフィニティーは小さいが (Kd - 0.3 nM) 同程度の活性を示す (スペンサー (Spencer), S. A. 等 (1988) J. Biol. Chem. 263, 7862)。実施例に詳細に述べられているように各々残基 11-19, 54-74 および 164-191 を含む選択セグメント A, C および F はソマトジェニックレセプターと相互作用する hGH 分子の活性ドメイ

ンである。このことはこれらの領域内の hGH 類似体の類似セグメントを含むほとんどのセグメント置換 hGH 変異体に関し10倍以上も低い Kd 値が観測されたことに基づく。図4参照。もちろんこのことはこれらの活性ドメイン内の各アミノ酸残基がそのソマトジェニックレセプターの結合残基であることは意味しない。むしろそれらのドメインはそのような活性残基を見出し得るアミノ酸配列を規定している。さらに活性ドメイン A, C および F の位置が決められた。たとえば変異体 hPRL (12-33) をアミノ酸およびカルボキシ末端変異体 hPRL (12-19) および hPRL (22-33) に分断した。この実験結果は hGH の活性ドメインを残基 12~19 にしぼり込んだ。同様に領域 F (pGH (167-181)) のアミノ末端領域は結合アフィニティーの著しい低下を示した。最も著しい効果にはたった2個の突然変異 E56D および R56M が導入された hPL (56-64) の結合よりも30倍も小さいものがあつた。領域 A, C および F は hGH の一次配列上では非常に離れているが、そのホルモンの三次構造はそれらを非常に接近させている。図5参照。これらの活性ドメインはヘリックス1のアミノ末端 (活性ドメイン A), Cys-53 からヘリックス2の開始までのループ (活性ドメイン C) およびヘリックス4の中央領域 (活性ドメイン F) を含むバッチを形成している。

【0037】さらに hGH に対する8個の M a b をセグメント置換 hGH 変異体に対して検定し hGH のエピトープの地図を作った。さらにその M a b は hGH および hGH 変異体を用いた競争検定に用いた hGH に対する hGH レセプター結合を阻害する各 M a b の能力を評価した。これらの実験結果を合せると hGH への類似セグメントの置換は分子本来の構造を著しく破壊しないという証拠および観測される活性はソマトジェニックレセプターとレセプター置換 hGH 変異体との相互作用に関する直接的効果によるものであるという証拠をいくつか提供している。まずセグメント置換変異体はそのソマトジェニックレセプターまたは M a b に対する結合を破壊することにし非常に選択的である。第2にソマトジェニックレセプターおよび M a b は配列同様構造も認識する。該レセプターおよび少なくとも4個の M a b は該たん白質三次構造感受性の不連続エピトープを認識する。第3に精製変異体全ての円二色スペクトルは実際に野生型 hGH と同じである。第4に pGH (164-190) を除いて全ての変異体は基本的に野生型と同量発現したインビボのたん白質分解耐性が構造完全性のスクリーニングに用いられている。ヘクト (Hecht), M. H., 等 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5685; ショートル (Shortle), D. 等 (1985) Genetics 110, 539

セグメント置換 hGH 変異体の結合活性変化は必ずしもそれら変異体中の置換残基が直接ソマトジェニックレセ

プターと接していることを示しているとは限ぎらない。破壊的突然変異は好ましい相互作用がなくなるだけでなく、不都合なものも誘導する。たとえばhPL(12-19)セグメント置換hGH変異体中のN12R変異体はAsn12の水素結合するアミド基を変化させるばかりでなく、Arg置換は正に荷電したより大きい側鎖を導入する。さらに多くの結合性接触がその類似体間に保存されるのでその結果全ての接触ではないにしろある領域をセグメント置換hGH変異体で探ることができる。

【0038】図2の活性ドメインA、CおよびF内の特定の活性アミノ酸を同定するためこれらの活性ドメインの精密構造分析を行った。この分析ではこれら3個の活性ドメインの残基を順番にアラニンと置換した。63個*

*の単一アラニン変異体を作り、各々の可溶性hGHレセプター(shGHR)に対する結合定数を測定した。Leung, D. W. 等(1988) J. Biol. Chem. 263, 7862。この分析に基づいて第IV表にリストしたアミノ酸残基はソマトジェニックレセプターとの相互作用に関して活性なhGH分子内の残基を構成している。これは、それらの残基のアラニン置換により誘導される相対的解離定数が野生型hGHに比べ4倍以上になることに基づいている。図7参照。hGH変異体を作るのに好ましいこれらの残基のアミノ酸置換を示す。

【0039】

【表4】

第 IV 表	
hGH残基	好ましいアミノ酸置換
F10	GEMARQSYWLIY
F54	GEMARQSYWLIV
F56	GMFARQSDNKLH
158	GEMFARQSVY
R64	GEMFAQSH, KDN
Q68	GEMFARSHKDN
D171	GEMFARQSHKN
K172	GEMFARQSHDN
E174	GMFARQSHDNKL
T175	GEMFARQSVI
F176	GEMARQSYWLIV
R178	GEMFAQSHKDN
F182	GEMFARQS
V185	GEMFARQSITLYW

【0040】ソマトジェニックレセプターに対しあまり30*が2倍以下の増加を示す。

活性でないその他のアミノ酸残基を第V表に示す。一般にこれらの残基はアラニンと置換したとき相対的Kd値*

【0041】

【表5】

第 V 表					
14	N12	S55	E66	Q181	
P5	M14	S57	K70	R183	
L6	L15	P59	S71	G187	
S7	R16	S62	K168		
R8	R19	N63	I179		

【0042】アラニンと置換したとき相対的にKd値が減少する(つまりソマトジェニックレセプターに対してはより大きいアフィニティーを示す)hGH中のアミノ

酸残基を第VI表にリストする。

【0043】

【表6】

第 VI 表		
P2	E65	S184
T3	Q69	E186
L10	L73	S188
H18	R167	F191
R64	E174	

【0044】1残基置換hGH変異体、E174A、は驚くべきことにソマトジェニックレセプターに対する解離定数が有意に(ほぼ5倍)に減少する。ソマトジェニ

ックレセプターに対する結合アフィニティーを示すことに加え、この変異体はラットの体重検定においてhGHと比べソマトジェニック能の増加を示した。この置換およ

35

36

び1.4倍以上のソマトジェニック結合の増加を示す他の特定の残基置換を第VII表に示す。

【0045】

【表7】第 VII 表

ソマトジェニック結合の増加を示すhGH変異体

hGH残基

置換アミノ酸

H18

A

R64

K

E65

A

*L73

E174

E186

S188

F191

A

A, N, Q, S, G

A

A

A

【0046】図7には示されていないアラニン置換を含む他の変異体を第VIII表にリストする。

【0047】

【表8】

第 VIII 表

変異体

Kd (mM)

Kd(var) / Kd(wt)

)

H21A

NE

-

K172A/F176A

201

543

N47A

0.84

2.3

P48A

NE

-

Q49A

0.36

1.0

T50A

0.38

1.0

S51A

Q46A

NE

-

V173A

NE

【0048】注：NE - 振とうフラスコ中容易に単離し得るほど発現されなかったもの（すなわち、野生型発現レベルの約5%以下）

同定後、hGH中のソマトジェニックレセプターに対す

る活性アミノ酸残基を予備分析で行ったスクランニングアミノ酸以外の種々のアミノ酸で置換することにより分析を行う。第IX表にその残基置換変異体を示した。

【0049】

【表9】

第 IX 表

変異体

Kd (nM)

Kd(var) / Kd(wt)

)

R77V

0.44

1.3

L80D

0.78

2.3

F176Y

3.2

8.6

E174G

0.15

0.43

E174D

NE

--

E174H

0.43

1.2

E174K

1.14

3.1

E174L

2.36

6.4

E174N

0.26

0.7

E174Q

0.21

0.6

E174S

0.11

0.3

E174V

0.28

0.8

E174R

NE

--

E64K

0.21

0.6

E65K

NE

--

E65H

NE

--

E172R

NE

--

158L

NE

--

F25S

NE

--

D26E

NE

--

Q29S

NE

--

E30Q

NE

--

R178K

NE

--

R178T	NE	--	
R178Q	NE	--	
I179M	NE	--	
3769N	3.6	10.5	38

【0050】注：NE - 振とうフラスコ中容易に単離し得るレベルまで発現しなかったもの（すなわち、野生型発現レベルの約5%以下）

調製したhGH変異体に加え、第X表にはhGH中の特

*定のアミノ酸残基と、生物学的機能が変化した変異体を生成することが予想される置換アミノ酸を示した。

【0051】

【表10】

第 X 表

野生型hGH アミノ酸残基	置換アミノ酸
S43	GEMFARQHDKN
F44	GEMARQSYWLIV
H18	GEMFARQSKDNY
E65	GEFARQSHDNKL
L73	GEMFARQSIVY
E186	GMFARQSHDNKL
S188	GEMFARQHDKNY
F191	GEMARQSYWLIV
F97	GEMARQSYWLIV
A98	GEMFRQSDNHK
N99	GEMFARQSDKY
S100	GEMFARQHDKNY
L101	GEMFARQSIVY
V102	GEMFARQSITLYW
Y103	GEMFARQSWLIV
G104	EMFARQSP
R19	GEMFAQSHKND
Q22	GEMFARSKKDN
D26	GEMFARQSHKN
Q29	GEMFARSKKDN
E30	GMFARQSHDNKL

【0052】別の態様においてはプロラクチンレセプターに対するhGHの結合エピトープを決定した。hGHは成長ホルモンレセプターにもプロラクチン（PRL）レセプターにも結合し得る。本明細書に示されているようにこれらのレセプターはhGHへの結合に関し互いに競争し、このことはそれらの結合部位が重複していることを示している。スキャンニング突然変異誘発データはhPRLレセプターに対するhGHのエピトープはヘリックス1の中央部（残基Phe25およびAsp26を含む）、ループ領域（Ile58およびArg64を含む）およびヘリックス4の中央領域（残基K168, K172, E174およびF176を含む）にある決定基から成る。これらの残基はhGHの構造モデル地図を作ったときのバッチを形成する。この結合バッチは本明細書で述べられ、かつB. C. カニンガム (Cunningham) およびJ. A. ウェルズ (Wells) (1989) Science 244, 1081-1085) により公表されたhGH

レセプターGEMFARQHDKN決定されたものと重複するが同一のものではない。hGHに関するこれらのレセプター結合部位の非重複領域に突然変異を起こすことにより、hGHの選択性が各レセプターへの結合アフィニティーを損失することなく、hGHレセプター側へ2000倍以上またはPRLレセプター側へ20倍以上シフトした。同様に重複領域に突然変異を起こすことにより、両レセプターに対し同時に500倍以上結合を減少させ得る。このようなhGHのレセプター選択的変異体は、線型成長または泌乳などのhGHの種々の生物学的活性と特異的レセプター結合現象を結びつける有用な分子プローブとなる。

【0053】別の態様ではヒト成長ホルモン（hGH）のレセプター結合決定基を通常非結合類似体、ヒトプロラクチン（hPRL）中に入れた。本明細書およびカニンガム (Cunningham), B. C. およびウェルズ (Wells), J. A. ((1989) Science 244, 1081-1

085)で公表されたアラニンスキャンニング突然変異誘発は、ヒト肝臓からクローン化したhGHレセプターに対する結合を調節するhGH中の重要な残基を同定した。hPRL由来の別の突然変異がhGHに導入され、hGHレセプター結合部位内のhPRL置換は結合能をほとんど破壊することを明らかにした。その後hPRLのcDNAをクローン化し大腸菌で発現させた。それからレセプター結合に非常に重要と思われるhGHからの置換を順次導入し突然変異を起こした。部位指定突然変異誘発を7回くり返した後、その会合定数がhGHレセプターの1000倍以上に強化された8個の突然変異を含むhPRL変異体を同定した。このhPRL変異体は野生型よりもわずかに6倍結合が弱く一方hGHとの配列一致性はわずか26%であった。これらの結果はhGHおよびhPRLとの構造類似性を示し、hGHレセプターエピトープの同一性を確認している。さらに一般にこれらの実験はアゴニストまたはアンタゴニストなどの新しい性質をもつハイブリッドホルモンを設計するのに有効であることが分かっている近縁でかつ機能的に多様なホルモン類からレセプター結合性を容易に借し得ることを示している。以下に示すものは例であって本発明の範囲を制限するものではない。

【0054】

【実施例】実施例1

hGH突然変異誘発および発現ベクター
効率的な突然変異誘発を行うためhGHコード配列を変えることなく均等に分布する18個の単独の制限部位をもつ合成hGH遺伝子を作った。この合成hGH DNA配列を各々およそ60塩基対長で隣接するカセットと10bp重複する7個の合成DNAカセットをライゲーションすることにより組立てNsi IからBgl IIでしめされる405bpのDNAフラグメントを作った。この連続フラグメントをポリアクリルアミドゲルで精製し、これから溶出してアルカリホスファターゼプロモーターおよびStIIシグナル配列(チャン(Chang), C. N. 等(1987)Gene 55、189)、ファージf1の複製オリジンおよび複製オリジンおよびラクターゼ遺伝子を含むbp1205から4361までのpBR322の領域を含む受容ベクターpB0475を同様に切断したものにクローン化した。この配列はダイデオキシ分析により確認した(サンガー(Sanger), F.等(1977)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74、5463)。図9に示したようにpB0475を構築した。長さ475bpのDra I, Rsa Iフラグメント上に含まれる繊維上ファージ由来のf1由来のDNAをpBR322の単独のPvu II部位にクローン化しプラスミドp652を作った。テトラサイクリン耐性遺伝子のほとんどはp652をNhe IおよびNar Iを制限切断し、DNAポリメラーゼとdNTPを用いてその粘着末端を充填し、かつ大きい方の3850bpのフラグメント

それ自体をライゲーションすることにより欠失させてプラスミドp652を構築した。p652をEcoRI, EcoRVで切断し、その3690bpのフラグメントをアルカリホスファターゼプロモーター、STIIシグナル配列および中立hGH遺伝子を含むphGH4R(チャン(Chang), C. N. 等(1987)Gene 55、189)由来の1300bpEcoRI, EcoRVフラグメントはライゲーションした。この構築物をpB0473と命名した。合成DNAを3種の様式でpB0473にクローン化した。ベクターpB0473をNsi I, Ggl IIで切断し、両方とも合成DNA由来の240bpNsi I, Hind IIIフラグメントおよび1170bpHind II, Bgl IIフラグメントにライゲーションした。この構築物pB0475はhGHの中立ポリペプチドをコードするDNAを含むがhGH遺伝子の突然変異誘発やその後の操作を可能にする多くの新しい単独制限部位を有している。hGHアミノ酸配列とともにpB0475の全DNA配列を図10に示す。pB0475中のhGH配列内の単独制限部位は類似体pGH, hPLおよびhPRL由来の類似セグメントをコードするDNA配列を含む変異原カセットの挿入を可能にする(ウェルズ(Wells), J. A. 等(1985)Gene 34、315)。別にhGH配列を一本鎖ベクターpB0475の部位指定突然変異誘発により修正し、つづいて単独制限部位の1つについての制限選択を行った(ウェルズ(Wells), J. A. 等(1986)Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317、415)。

【0055】第III表にあげた17種類のセグメント置換hGH変異体を調製した。各々は野生型hGHと同様のレベルおよび後に述べるhGH-hGHハイブリッドをはるかに越えるレベルで大腸菌の細胞周辺腔に分泌された。hGHおよびhGH変異体は低いリン酸最小倍地で生育した大腸菌W3110, tonA株(ATCC27325)で発現させた(チャン(Chang), C. N. 等(1987)Gene 55、189)。hGHおよびhGH変異体は以下のように精製した。細胞ペレット200gに4倍容(800ml)の10mMトリス(pH 8.0)を加えた。この混合物をペレットが溶解するまで室温でシェーカーにより振とうした。この混合物をホモジナイズして低温室で1時間攪拌した後、7000gで15分間遠心した。その上清をデカンテーションしてから45%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え(277g/リットル)、室温で1時間攪拌した。11000g30分間の遠心後、そのペレットを40mlの10mMトリス(pH 8.0)に懸濁した。この溶液を2リットルの10mMトリス(pH 8.0)に対し一晩透析し、この試料を遠心または0.45ミクロンメンブレンで濾過した。その後試料を100mlのDEAEセルロース(ファーストフロア、ファルマシア製)カラムにかけた。カラム容量の8~10倍の10mMトリス(pH 8.0)中ゼロから300

mM NaCl の勾配を用いてカラムの溶出を行った。PAGEで同定したhGHフラクションを集めて10 mMトリス-HCl(pH 8.0) に対し一晩透析した。この試料をCentri-Prep 10限外濾過によりおよそ1mg/mlになるまで濃縮した。

【0056】実施例2

hGHおよびhGHの相同組換え体

ブタの成長ホルモンのC末端領域に結合したhGHの種々の長さのN末端領域を含むランダムハイブリッドライブラリを直列に結合した遺伝子のランダム組換え法により構築した。グレー(Gray), G. L.等(1986) J. Bacteriol. 166, 635。pB0475のEcoRI部位を該プラスミドのEcoRI制限処理により除去し、DNAポリメラーゼとdNTPを添加することにより粘着末端を充填した後、このプラスミドをライゲーションした。つぎにhGH遺伝子の3'末端の直前に新しいEcoRI部位を導入した。これはEcoRI部位を含むhGH-4Rの345bp BglII, EcoRVフラグメントをEcoRI-pB0475構築由来の同様の制限レクターにサブクローニングすることにより行った。それからpGH遺伝子(シーバーク(Seeburg) P. H.等(1983) DNA 2, 37)をこの構築物のhGH遺伝子の3'末端直後に導入した。これは先に述べた構築物のEcoRI, EcoRV消化物の大きい方のフラグメントにpGHcDNAを含むEcoRI, HindIII(充填)フラグメントを導入することにより行った。このプラスミドpB0509は3'末端に単独のEcoRI部位をもつ本来のhGH遺伝子と、それに同じ方向でつづく本来のpGH遺伝子を含む。hGH遺伝子とpGH遺伝子のホモロジーのためpB0509の一部は大腸菌rec⁺MM294(ATCC31446)にトランスホームしたときインビボ組換えを起こしハイブリッドhGH/pGHを生ずる。これらの組換え体は集めたDNAをEcoRIで制限処理し、EcoRI部位を失うような組換えを行わなかったプラスミドを線状にすることにより濃縮した。2回の制限選択および大腸菌rec⁺MM294へのトランスホームの後、ほとんど全てのクローンがハイブリッドhGH/pGH組換え体となった。22個のクローンの配列分析は、hGH/pGHハイブリッドがアミノ末端hGH配列とそれにつづくアミノ酸残基+19, +29, +48, +94, +105, +123および+164で始まるpGH配列を含んでいることを示した。

【0057】hGH遺伝子に均等に分布する交叉点を有する7個のhGH-pGHハイブリッドが得られた。しかし極端なカルボキシ末端ハイブリッド(hGH(1-103)-pGH(164-191))のみが精製および分析に十分なレベルで大腸菌から分泌された。このhGH-pGHハイブリッドはヘリックス4の疎水面上に存在する3個の置換(M170L, V173AおよびV

180M)を導入する。したがって図2のヘリックス領域A, D, EおよびFにおける配列変化のほとんどはヘリックスの疎水面上の残基の突然変異を避けるよう設計した。たとえば上述のハイブリッドhGH-pGH変異体は、M170, V173, F176およびV180を維持するよう修正した。なぜならこれらの残基はヘリックス4の疎水面上内に存在するからである。

【0058】実施例3

可溶性ヒト成長ホルモンレセプターの大腸菌からの発現および精製

可溶性ヒト成長ホルモンレセプターshGHRをコードするクローン化DNA配列(レング(Leung), D. W.等(1987) Nature 330, 537)をpB0475にサブクローンしpJ1446を作った(図11および図12参照)。ベクターpC1S, 2SHCHR(レング(Leung), D. W.等(1987) Nature 330, 537)をXbaIおよびKpnIで消化し、hGHの分泌シグナルおよび246コドンの細胞外領域をコードする10bpフラグメントを精製した(マニアチス(Maniatis), T.等(1982)モレキュラークローニング、コールドスプリングハーバーラボラトリー, N. Y.)。このフラグメントを同様に切断したM13mp18にライゲーションし組換え体用に一本鎖DNAを精製した(メシング(Messing), J. (1983) Methods in Enzymology. 101巻, 20頁)。部位指定突然変異誘発(カーター(Carter), P. 巻(1986) Nucleic Acids Res. 13, 4331)を18mer, ジゴヌクレオチド5'-AAGT-AGT-GCA-TTT-TCT-GG-3'により行ないコドン+1にNsiIを導入した。変異配列はダイデオキシ配列分析(サンガー(Sanger), F.等Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463)により確認した。変異体の二本鎖DNAを精製しNsiIおよびSmaIで切断した。hGHレセプターの246コドン細胞外領域を含む900bpフラグメントを単離した。pB0475をNsiIおよびEcoRVで切断し4.1kbフラグメント(合成hGH遺伝子を欠く)を精製した。レセプターの900bpフラグメントおよび4.1kbベクターフラグメントをライゲーションし、その組換えクローン(pJ1446)を制限地図により確認した。これを大腸菌KS303(トランスホームし(ストローチ(Strauch), K.等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1576)、ついで、低リン酸培地(チャン(Chang), C. N.等(1987) Gene 55, 189)中30°Cで成育した。レセプターフラグメントたん白質をhGHアフィニティークロマトグラフィーで精製した(スペンサー(Spencer), S. A.等(1988) J. Biol. Chem. 263, 7862; レング(Leung) D. W.等(1987) Nature 330, 537)。pJ1446の配列をクローン化レセプターのアミノ酸配列とともに図12に示す。

【0059】大腸菌W3110, deg P株(ストローチ(strauch), K. L. 等(1988)PNAS USA 85, 1576)をpJ1446でトランスホームし、ファーマンター中低リン酸培地(チャン(Chang), C. N. 等(1987)Gene 55, 189)を用い30°Cで生育させた。246アミノ酸のhGHrを用い予備データをとった。アミノ酸1~238番を含むわずかに短いhGHrを本明細書の実施例1で用いた。このレセプターについて得られた結果は246アミノ酸hGHrで得た値と区別できなかった。カルボキシル末端異質性の問題を避けるためにGln238の後に停止コドンを入れたプラスミドphGHr(1-238)を構築し*

*た。phGHr(1-238)を含むKS330培養物からは結合たん白質がphGHr(1-246)を含む培養物からよりもわずかに高い収率でかつより均一なものが生成した(データ示さず)。湿重量0.2kgの細胞ペレットから始め70~80パーセントの収率で20~40mgの高純度結合たん白質がルーチンに単離された(2リットルの高密度細胞培養物から)。N末端シーケンシングおよび質量スペクトル分析と組合せたペプチドマッピングでその生成物は残基1から238に及んでいることが確認された。

phGHr(1-246)テンプレートの部位指定突然変異誘発をオリゴヌクレオチド

* * * *

5 -ATG-AGC-CAA-TTT- ACG-CGT -TAG-GA _____

を用いて行ない(カウター, 等(1986)Nucleic Acids Res. 13, 4431-4443)phGHr(1-240, C241R)を作った(式中アステリクスはphGHr(1-246)とのミスマッチを示し、下線は新しい単独のMluI部位であり、CGT-T*

*AGはC241R突然変異とそれにつづく停止コドンを示す(第X表A)。

【0060】

【表11】

第 X 表

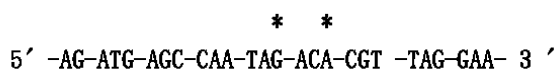
hGH結合たん白質構築物のアミノ末端およびカルボキシル末端配列

プラスミド	末端	たん白質/DNA配列/制限部位
phGHr +3 (1-246) E-SER-GLY	アミノ	- 3 -2 -1 +1 +2 ALA- TYR-ALA-PH _____ GCC- TAMsGCA-TTT-TC _____
phGHr (1-246)	カルボキシル	238 239 240 241 242 243 244 245 GLN-PHE-THR-CYS-GLU-GLU-ASP- PHE-TYR-AM _____
phGHr (1-240, C241R)	カルボキシル	Gln-Phe-Thr-Arg-AM CAA-TTT- ACG-CGT -TAG-GAA-GAT- -TTC-TAC- TAG-CGGCCGC _____
		MluI Not I
phGHr (1-238)	カルボキシル	Gln-AM CAA-TAG-ACA-CGT-TAG-GAA-GAT- TTC-TAC- TAG-CGGCCGC _____

Not I

*は野生型テンプレートとのミスマッチを示す。

【0061】プラスミドp hGHr (1-238)をMluI部位(第X表(A))に対する制限選択(ウェルズ(Wells),等(1986)Phil Trans. R. Soc. Lond. A. 317, 415-423)を用いたp hGHr (1-240, C241R)テンプレートの部位指定突然変異誘発により生成した。簡単に云うとオリゴヌクレオチド



はGln238(CAAトリプレット)の後に翻訳停止コドン誘導しかつMluI制限部位(下線)を修正した。ヘテロ二本鎖による最初のトランスフェクションから二本鎖DNAを回収した後、再トランスフォームしてDNA

238)中にクローン化したhGH結合たん白質がcDNA変異体またはクローニングアーテファクトを生じさせるT51A突然変異を含むことはDNAシーケンシングで確認された。それゆえA51トリバタントは報告されている配列と同じである。(レング(Leung)等(1987)Nature(London) 330, 537-543。部位51にThrまたはAlaを含むたん白質の精製および結合性は区別できない(データ示さず)。Ala51結合たん白質変異体は特性が明らかになっているのでひきつづく全ての分析用に選択された。ヒト血清から単離した天然の産物と大腸菌由来の組換えhGH結合たん白質の特異性を比較するため野生型と種々のhGH変異体のアフィニティーを測定した。

【0062】

【表12】

第 X 表 (B)
hGH結合たん白質のKd^a (nM) ± S . D .

hGH		Kd (変異体)		(変異体) (ヒト血清) ^b	
変異体	ヒト血清	Kd(wt)	大腸菌	Kd(wt)	
wt	0.55 ± 0.07	-	0.40 ± 0.03		
-	1.4				

a. Kd値およびその標準偏差(SD)は、野生型hGH(wt)および多くのhGH変異体を用いた競争結合分析(図24)により測定した。12 ± 1 22 ± 4

b. 各hGH結合たん白質に対するhGH変異体および野生型hGH(wt)の解離定数の比から計算される結合アフィニティーの減少。0.4 ± 0.1 1.7

c. 所定のhGH型の76AのhGH結合たん白質の解離定数の比。±20 1.5

【0063】両たん白質はhGHと特定の化学両論比の複合体を形成した(図24)。これから分るように野生型hGHおよびその変異体のアフィニティーは2つの結合たん白質間でほぼ同じであった(上述、右側欄)。組換えhGH結合たん白質はヒト血清由来の中立たん白質と比べ非常に高いアフィニティーを有している。このことは、その組換えたん白質の純度および均一性を反映している。hGH結合たん白質に対する結合能を破壊するhGHの4つのアラニン変異体に対する結合アフィニテ

14 ± 10の変化により示されるように両たん白質は同じ特異性を有している(上述Kd(変異体)/Kd(wt) ± 1, Tyr 242Bまで及び結合たん白質に対するhGHのアフィニティー(Kd = 0.36 ± 0.08 nM)は実質的にGln238の後で終わっているものと同じであり(0.40 + 0.03 nM)、このことは、その分子の7個のアミノ酸残基を含む最後の8残基はhGHの結合に関し重要ではないことを示している。

【0064】実施例4

レセプターおよびモノクローナル抗体結合検定
精製したhGHまたはhGH変異体(95%以上の純度)について、実施例3の可溶性hGHレセプターへの結合に関する検定を行った。SDS-PAGE後のコマーシャル染色ゲルのレーザーデンシトメータスキャンニングにより精製ホルモンの濃度を定量した。これらの値は280nmの吸光度による濃度(230^{1%} = 0.93)とよく一致した。解離定数(Kd)は25°Cにおける可溶

性hGHレセプターに結合する〔¹²⁵I〕hGHの競合置換に関するスキッチャード分析から計算した。この〔¹²⁵I〕hGHはスペンサー(Spencer), S. A. 等(1988), J. Biochem. 263, 7862)の方法に従って調製した。酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)*

*A)を用い種々のセグメント置換および残基置換hGH変異体に対する8個のモノクローナル抗体の結合を検定した。以下のMabを使用した。

【0065】

Mab	名称	起源 / 方法
1	Mab A	(*)
2	33.2	ハイブリテクス
3	Cat# H-299-01	メディックスバ
イオテクス社		
4	72.3	ハイブリテクス
5	Cat# H-299-02	メディックスバ
イオテクス社		
6	Mab 653	ケミコン
7	Mab D	(*)

【0066】hGHに対するウサギポリクローナル抗体をアフィニティー精製し、0.5M炭酸ナトリウム(pH10)中最終2μg/mlの濃度で24°C、16~20hマイクロプレート(Nuncプレート、インターメド社、デンマーク)をコーティングした。このプレートをバッファB中(50mMトリス[pH7.5]、0.15M NaCl、2mM EDTA、5mg/ml BSA、0.05% トウエン20、0.02%アジ化ナトリウム)0.1μg/mlの各hGHと25°C、2時間反応させた。プレートを洗浄後バッファBで150~0.002nMに段階的に希釈した指示Mabとインキュベートした。2時間後プレートを洗浄し、ホースラディッシュパーオキシダーゼ結合抗マウス抗体で染色して検定した。得られた値は各hGH変異体への最高結合量の半値を与えるに必要な各Mabの濃度を表わしている。抗hGH MabによるhGHからのhGHレセプターの競合置換は以下のように測定した。この検定は先に述べたように抗hGHウサギポリクローナル抗体をコートしたマイクロプレートにおける野生型hGHの固定化により行った。レセプター(10nMで固定)および所定の抗hGH Mab(150~0.002nMの範囲で希釈)をhGHコートマイクロプレートに入れ25°Cで16~20時間インキュベートし、その後未結合成分を洗浄した。結合レセプター量はhGHと該レセプターとの結合を阻害しないホースラディッシュパーオキシダーゼに結合させた抗レセプターMabを加えることにより定量した。標準化置換値はプレート上のhGHを飽和するのに必要なMab濃度の半値に対する該レセプターの50%を置換するのに必要なMab濃度の比から計算した。この値は各Mabの該レセプター置換能の比較に用いた。

*【0067】実施例5

ソマトジェニックレセプター結合の活性ドメイン実施例3の可溶性ソマトジェニックレセプターおよび実施例4で述べたモノクローナル抗体への結合に関し、実施例1および2で述べた17個のセグメント置換hGH変異体を検定した。ソマトジェニックレセプターに対する結合検定の結果を第III表に示す。これから分るように結合能をほとんど破壊するセグメント置換は図4および図5の領域A、CおよびF内のものである。さらにこれらの領域をさらに小さいセグメントにしばり込みソマトジェニックレセプターへの結合に関係するhGH分子の活性ドメインの位置を決定した。第III表からの最も重要な結果を図4に示す。この図は、類似体hPRL、hPLおよびbGH由来の類似配列の置換による可溶性hGHレセプターへの結合における相対的減少を示した棒グラフである。各々アミノ酸残基12-19、54-74および164-190を含む3つの活性ドメイン領域A、CおよびFが同定された。これらの領域は図5のhGH分子の3次元に示されている。これから分るように、3つの活性ドメインA、CおよびFはhGHのアミノ酸配列中では不連続であるけれどもhGHに関するソマトジェニック結合部位を規定する分子構造においては連続領域を形成している。

【0068】実施例6

hGHEピトープマッピング
特定のセグメント置換hGH変異体に対する8種のモノクローナル抗体の結合を第XI表に示す。

【0069】

【表13】

第 XI 表

	Mab					
	1	2	3	4	5	6
	Hybr	Medix	Hybr	Medix		
hGH 変異体	MCA	33.2	1	72.3	2	C
hemicon	MCD	MCB				

wt hGH	0.4	0.4	0.1	0.05	0.
2	0.2	0.08	0.1		
hPL(12-25)	0.4	0.4	>75	>	
; 50	0.2	0.2	0.08	0.1	
pGH(11-33)	0.4	>100	1.5	0.	
05	0.2	0.2	0.08	0.1	
hPRL(12-33)	0.4	>100	>75		
> 50	0.2	0.2	0.08	0.1	
hPRL(12-19)	0.4	> 12	>75		
> 50	0.2	0.2	0.08	0.1	
hPRL(22-33)	0.4	0.4	0.1	0.05	
0.2	0.2	0.08	0.1		
hPL(46-52)	0.4	0.4	0.1	0.05	
0.2	0.2	0.40	0.1		
pGH(48-52)	0.4	0.4	0.1	0.05	
0.2	0.2	0.08	0.1		
hPL(56-64)	0.4	0.4	0.1	0.05	
0.2	0.8	0.08	0.1		
pGH(57-73)	0.4	0.4	0.1	0.05	
>200	>200	0.08	0.1		
hPRL(54-74)	0.4	0.4	0.4	0.05	
0.2	0.6	0.08	0.1		

【0070】pGH(hPRL(68-95)90)の変異体は、各モノクローナル抗体に対する結合能の破壊は著しくかつ非常に選択的である(図7-30)20はhGHの3次元構造内の各Mabに対するエピトープの位置を示している。図6はソマトジェニリン受容体に対する結合部位に対するエピトープを示している。たとえばhPRL(80-895), hPRL(111-129)4), hPL(1409-112)およびhPRL(10121-10229)の変異体はMab Iに結合しないが、これら6の領域以外の他のセグメント置換hGHは野生型hGHと同様の効率で結合した。Mab 2, 3, 4 pGH(および196)への結合は一次配列の不連続であるが、ホルモン253次元構造において近接している領域の突然変異は結合を阻害された(図6および図14~19参照)。これと対照的にMab 4, 7および8は図13、図19および図20に示したように連続的配列で規定される突然変異により阻害された。さらに所定のモノクローナル抗体への結合を阻害する領域を特定のセグメント置換hGH領域のサブドメインへの細分化または特定のMabにすでに結合した共通の置換を有する変異体の分析により解析した。たとえばpGH(11-33)はMab 4への強固な結合を維持しているがhPRL(12-33)は結合能を失っていた。したがって、hPRL(12-33)変異体における破壊的突然変異はpGH(11-33)では変異していない残渣:N12, L15, R16, D26およびE30に限定し得る。さらにhPRL(12-19)変異体は結合能を失ったがhPRL(22-23)は失なわなかったことから(図16参照)、これはN12, L15およびR16

0.1に限定される。N12H突然変異がpGH(11-33)とは共通しない変異であることからこれでMab 4への結合の阻害を説明し得る。このことをAsn-12のアラニン置換でテストした。N12A残基置換hGH変異体75へのMab 3またはMab 4の結合は100倍以上も減少したが他のMabへの結合は影響を受けなかった。【0071】このセットのhGH変異体を用いることにより、8個のMabのほとんどの結合が共通セットの突然変異により阻害されたとしてもこれらのMab全てのエピトープを解明し得る。たとえばhPRL(12-19)はMab 2, 3および4への結合を示さないが、他の変異体はこれらのMabが種々の構造を認識することを示した。特にMab 2および3はpGH(11-33)により阻害されるがMab 4は影響を受けなかった。Mab 3および4の結合はhPL(12-25)により阻害されたが>75Mab 25への結合は影響を受けなかった。このように8個の抗体は重複するが完全に重ならないエピトープを有する。結合を乱す突然変異はヘリックスおよびループの両方に存在し、かつ常にホルモン構造において近接している。合せて考えてみると、8個のMabセットのエピトープはこのホルモンのほとんどをカバーする。しかしなおMabが結合しない領域がある。たとえば20個の変異体のうちの3個はテストしたMab(hPRL(22-33), pGH(48-52)およびhPRL(126-136))のいずれに対する結合も有意に乱さなかった。抗体エピトープとレセプター結合部位には有意な差がある。第1に阻害的突然変異により規定されるパッチはどのMabに関してよりもレセプターに関するものの方が大

P5A	0.71	2.1	
L6A	0.95	2.8	
S7A	0.61	1.8	
R8A	0.48	1.4	
L9A	0.32	0.95	
F10A	2.0	5.9	
D11A	NE	-	
N12A	0.40	1.2	
A13(WT)			
M14A	0.75	2.2	
L15A	0.44	1.3	
R16A	0.51	1.6	
A17(WT)			
H18A	0.24	0.71	
53R19A	0.37	1.1	54

【0077】

* * 【表16】

第 XIV 表

hGH中の部位54-74のアミノ酸スキャンニング

変異体	Kd (nM)	Kd(variant)/
Kd(wt)		
wt	0.31	1.0
F54A	1.5	4.4
S55A	0.41	1.2
E56A	1.4	4.1
S57A	0.48	1.4
I58A	5.6	17.0
P59A	0.65	1.9
T60A	NE	-
T61A	NE	-
S62A	0.95	2.8
N63A	1.12	3.3
R64A	7.11	21.0
E65A	0.20	0.6
E66A	0.71	2.1
T67A	NE	-
Q68A	1.8	5.2
Q69A	0.31	0.9
K70A	0.82	2.4
S71A	0.68	2.0
N72A	NE	-
L73A	0.24	0.70
E74A	NE	-

【0078】

【表17】

第 XV 表

hGH中の部位167-191のアミノ酸スキャンニング

変異体	Kd (nM)	Kd 変異体 / Kd WT
WT	0.34	1
R167A	0.26	0.75
K168A	0.37	1.1
D169A	NE	-
D169A	NE	-

M170A	NE	-	
K171A	2.4	7.1	
K172A	4.6	14	
V173A	NE	-	
E174A	0.075	0.22	
T175A	NE	-	
T175S	5.9	16	
T176A	5.4	16	
L177A	NE	-+	
R178A	NE	-	
R178N	1.4	4.2	
I179A	0.92	2.7	
V180A	0.34	1.0	
Q181A	0.54	1.6	
C182A	1.9	5.7	
R183A	0.71	2.1	
S184A	0.31	0.90	
V185A	1.5	4.5	
E186A	0.27	0.80	
G187A	0.61	1.8	
S188A	0.24	0.7	
C189A	NE	-	
G190A	NE	-	
F191A	0.20	0.60	56

【0079】アミノ末端残基位置の不明確さのためアラニン置換は残基2-19を含むように行った(アブデル-メギド(Abdel-Meguid), S. S.等(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6434)。実際に結合のもっとも著しい減少はF10A(6倍)でつづいてヘリックス1のN末端の残基4-6のアラニン置換で起こった(図21参照)。結合に関して実質的により大きい効果(20倍以上)は残基54~74のループおよびカルボキシ末端配列167-191内の特異的アラニン置換で起った。いくつかのアラニン変異体の結合は4.5倍に増加した。最も劇的な例は多くの破壊的アラニン突然変異の中間に位置するE174Aであった。図4、図7および図21参照。ほとんどの破壊的アラニン置換はF10からR64およびD171からV185に広がる約25°角のバッチをホルモン上に形成する(図21参照)。さらにこれらの側鎖はその分子の同じ方向を向いているようである。たとえばヘリックス4に関する結合に最も影響する全てのアラニン変異体(D171A, K172A, E174A, F176A, I179A, C182AおよびR183A)はこのヘリックスの3回半に限られまたそれらの側鎖はこのヘリックスの同じ面から突き出ている(図21参照)。このモデルに基づいて、T175およびR178は、図21で示されているように中央位置を占めていることから結合に関与していることが予想される。T175A変異体は振とうフラスコ中検定するのに十分な収率で発現されないけれども、

より保存的変異体(T175S)であった。したがってT175S変異体はレセプター結合が16倍減少した。同様に、R178Aはあまり発現されないにもかかわらずR178Nは分析可能な収量で発現した。R178Nは結合アフィニティーが4倍以上減少した。

【0080】カルボキシ末端における次に破壊的変異体はV185Aであった。V185Aはヘリックス4の外にあるけれども、このモデルによりヘリックス4内の破壊的突然変異を同じ方向を向いていることが予想される。これに対し結合バッチ外のアラニン突然変異またはその中にあり上述のものと反対を向いているアラニン突然変異(R167A, K168A, V180A, Q181A, S184A, E186A, S188A)は一般にレセプター結合に関して影響しないか、またはほとんど影響しない。ヘリックス1におけるアラニン変異体は並みの効果しかもたないがこれにも同様の分析を行った。このヘリックス内でもっとも結合を破壊するアラニン置換はこのヘリックスの同じ面に存在する残基6, 10および14のものであった。もっとも小さい破壊的アラニン突然変異(L9A, N12AおよびL15A)ヘリックス1の反対の面に存在する。さらにこのことはhGHに対する結合をレセプターと競合しない抗hGH Mab 3および4の両方がAsn-12に結合するという事実により確認される。第XVI表参照。

【0081】

【表18】

第 XVI 表
8種の抗hGHモノクローナル抗体(Mab)に対する
hGHおよびアラニン変異体の結合

Table with 8 columns: ホルモン, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. Rows include 8hGH, F10A, N12A, 158A, R64A, Q68A, K168A and their corresponding values.

【0082】54-7011A内の側鎖の相対的位置はそれらがヘリックス1および4内の側鎖のように固定しえない。しかし偶数残基の突然変異は奇数残基に比べ結合を大きく阻害するという結合において著しい周期性がある。特にこのことはE170領域の最初の部分により、つまり(54-59)かつ偶数残基はレセプターの方に突き出ておりかつ奇数残基は反対を向いているという構造を反映している。

【0083】実施例9 C182A アラニン置換hGH変異体の構造完全性および結合エネルギー V185A
いくつかの証拠はレセプター結合を乱すアラニン置換は分子の構造をゆがめることによりそれを起こすのではないことを示している。第1に8種のMabはhGHに関して同様レセプターへの結合の破壊を起こすほとんどすべてのアラニン変異体と反応する。先の第XII表参照。例外は各々個hGH Mab6および5への結合を瀬洗濯的に破壊するR64AおよびC182Aである。これら2つのMabは以前にhGHへの結合に関しソマトジェニックレセプターと競合することが示された。さらにレセプター結合に影響しない2つのアラニン変異体を作った。1つは2つのMabの結合に影響し(N12A)、もう1つはMabのいずれにも影響しない(K168A)。このデータはMabもしくはレセプターへの結合が変異体構造の非常に局所的ゆらぎにより破壊されることを示している。さらに全てのhGH変異体の遠紫外円二色スペクトルは野生型hGHと実質的に同じであった。振とうフラスコ中、アラニン変異体の約20%(D11A、T60A、P61A、T67A、N72A、E74A、D16

0.059 A 0.01 1700 A, V173A, T175A, L177A, K178A, C189A, G190A)は単離および分離するのに十分なレベルで分泌されなかった。このような変異体をコードする遺伝子は同じベクターで発現されているので定常的発現レベルの変化は、おそらく分泌レベルの差および、またはhGH変異体のたん白質分解を反映したものである。ヘリックス4における非発現性アラニン変異体のいくつかはヘリックスの疎水性側面を白で示した図21に示されている疎水性面上に存在する(M0.20A0, V173AおよびL177A)。しかしいくつかのアラニン置換がヘリックス1(L6A, L9AおよびI10A)およびヘリックス4(F176AおよびV180A)の疎水性面内で容認されていることからこのことは一般的な効果ではない。

【0084】さらにhGH変異体の発現の減少は荷電または中性アミノ酸がアラニンと置換したときにしばしば観察される(D11A, T60A, T67A, N72A, F74A, D169A, T175A, R178A)。水素結合基をその部位に保存するT175SおよびR178Nのような突然変異はたとえあったとしても野生型よりも低いレベルで発現される。非発現性のC189A変異体はカルボキシ末端スルフィドを破壊し、かつその相対物(C182A)も野生型よりもはるかに低いレベルで発現する。他のいくつかの非発現性アラニン変異体(T60A, T61AおよびT67A)はループ構造内に存在する。したがって低レベル発現または非発現は多くの構造効果に由来するが単一構造的または単一機能的置換によって回避し得る。結合に10倍以上の効

果を示す置換(158A, R64A, K172A, T175S, F176S, F176A)は直接結合に関与しているようである。天然に存在する(ファースト(Fersht), A. R. (1972) J. Mol. Biol. 64, 497; ブラウン(Brown), L. R. 等(1978) Eur. J. Biochem. 88, 87; マリバー(Malivor), R. 等(1973) J. Mol. Biol. 76, 123)または部位指定突然変異誘発で作り上げられた(ファースト(Fersht), A. R. 等(1985) Nature 314, 225; ブライアン(Bryan), P. 等(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3743; ウェルズ(Wells), J. A. 等(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1219; クロニン(Cronin), O. N. 等(1987) J. Am. Chem. Soc. 109, 2222; グラフ(Graf), L. 等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4961)水素結合または塩橋の強さは微環境に依存して1~5 Kcal/molの範囲に広く分布している。hGHに関する結合自由エネルギーの減少はE56, Q68, D171, K172およびR64の各アラニン置換に対し0.8, 1.0, 1.2, 1.6および1.8 Kcal/mol (G結合 = + R_T lnKd (変異体) / Kd (wt)であった。疎水性側鎖のたん白質中への埋没のエネルギーはエダノール中への転移の自由エネルギーに対応する傾向がある(エステル(Estoll), D. A. 等(1986) Science 233, 659; キザキ(Nozaki), Y. 等(1980) "疎水性効果" (ウィリー版, N. Y. 4~21頁)。したがってF175A, F10A, P54A, 158AおよびV185Aの結合自由エネルギーの減少は各々1.6, 1.0, 0.9, 1.7および0.9 Kcal/molであった。これらの値はPhe, Ile またはVal からAlaへの置換における疎水性自由エネルギーの予想*

*値、各々2.0、2.4および1.0 Kcal/molよりもわずかに小さい。この分析により、T175S変異体の効果(G結合=1.6 Kcal/mol)はガンマメチル基の損失に期待される効果(G疎水性=0.7 Kcal/mol)よりも大きい。hGHとそのソマトジェニックレセプターとの分子接触の性質を十分把握するために直接的構造の情報が必要である。しかし、これらアラニン変異体の結合エネルギーはそれらが全く別のシステムにおける接触残基について行った以前の測定の範囲内にあることを示している。事実、レセプター結合に最も破壊的であるC182Aを除いたアラニン置換変異体の結合自由エネルギーの総和は(-13.2 Kcal/mol)、hGHとそのレセプター間の総結合自由エネルギーと一致している(-13 Kcal/mol)。

【0085】実施例10

hGH変異体の抗hGHポリクローナルとの反応性
hGH変異hPRL(22-23)、E174AおよびhPRL(88-95)をラットの体重検定でテストした。この検定の結果を図22に示す。これから分かるようにhPRL(22-33)以外の変異体は生育的14日後減少能を有している。成長のレベルダウンは生物学的効果を中和する種々の成長ホルモンに対する抗体の発現に寄因する。hPRL(22-33)変異体が成長しつづけたという事実はそれが野生型hGHまたは使用した他の変異体と同じ免疫原性をもたないことを示している。hGHに対する種々のhGH変異体の反応性をポリクローナル抗体を含むヒトおよびマウスの血清と比較した結果を第XVII表に示す。

【0086】

【表19】

第 XVII 表
hGH変異体への血清抗hGH抗体の結合
抗プロトロピン結合
減少率の平均値±SD

	ヒト血清 (N=22)		マウス血清 (N=6)	
	減少率(%)	変化率(%)	減少率(%)	変化率(%)
hGH	0	100	0	1
00				
pGH 11-33	86±13	100	65±16	100
100				
hPRL 12-33	79±19	100	52±13	100
100				
hPL 12-25	35±19	81	16±11	
33				
hPRL 12-19	29±20	71	11±12	
33				
hPRL 22-33	69±15	100	38±8	100
100				
hPL 46-52	6±8	10	2±4	

hPRL 126-136 8±12 2±2
61 0

【0087】表から図2のように残基212533の領域内3に置換を含む変異体は野生型hGHに対し各ヒトおよびマウス抗血清との結合活性が実質的に減少しているか、またはある場合には活性をもたない。変異体pGH57-73を除いて、他の領域の置換を含む変異体は有意な反応性の減少を示さない。残基11および33の間のセグメント置換変異体はソマトジェニックレセプターへの結合能を維持しているため、このような変異体はソマトジェネシスの推進能は維持しているが他の性質、この場合抗hGHポリクローナル抗体への反応性を变化させた10変異体の生成を示している。

【0088】実施例11

Kd と能力の関係

特定のhGH変異体のKd (変異体) / Kd (野生型)の比とラット体重検定におけるこれら変異体の能力のセミログプロットを図23に示す。これから分るように線型関係の存在はソマトジェニックレセプターへの結合アフィニティーの減少は能力の減少を示している。図から分るように、hGH変異体E174Aはソマトジェニックレセプターに関し野生型hGHよりも高い結合アフィニティーを有している。また、この能力は野生型hGHよりも約12%大きい。さらに変異体PRL(94-104)は基本的に野生型と同じ結合定数を有しているが能力は約2.7倍大きい。

【0089】実施例12

プロラクチンレセプター結合に関するhGHの活性ドメイン

ヒト成長ホルモン(hGH)は模型成長、泌乳、室素遅延、糖尿病誘発性およびインシュリン様効果およびマクロファージ活性化など多くの生理効果を示す。R. K. チョウラ(Chawla), J. S. パークス(Parks)およびD. ラドマン(Rudman), *Annu. Rev. Med.* 34, 519-547(1983); O. G. P. イサクソン(Isaksson), 等(1985), *Annu. Rev. Physiol.* 47, 483-499; C. K. エドワーズ(Edwards)等(1988) *Science* 239, 769-771。これらの効果は各々hGHと特異的細胞レセプターとの相互作用で始まる。J. P. ハイス(Hughe)等(1985) *Annu. Rev. Physiol.* 47, 469-482。これまでのhGHと結合する生成物を作るクローン化遺伝子の肝臓のhGHレセプター(A. W. レング(Leung), 等(1987) *Nature* (ロンドン) 330, 537-543)および乳線のヒトプロラクチン(hPRL)レセプター(J. M. ブーチン(Boutin)等、(1988) *Cell* 53, 69-77)のみであった。hPRLレセプターへのhGHのレセプター“スピンオーバー”は高レベルのhGHを生産する先端巨大症が、通常レベルのhPRLを有するにもかかわらず過プロラクチン症となる場合の臨床的徴候で

19

62

ある(J. E. フラドキン(Fradkin)等(1989) *New Engl. J. Med.* 320, 640-644)。しかしhGHと結合する他のレセプターが存在し、これらには胎盤ラクトゲン(PL)レセプター(M. フリーマーク(Freemark)等(1987) *Endocrinology* 120, 1865-1872)。これらのレセプターに関するhGH上の結合部位が同一のものであるかどうか、またはどのレセプター(レセプター群)が薬学効果を担っているかは分っていなかった。これらの問題を解くためにhGHおよびhPRLレセプター結合部位の位置決めがなされた。得られた結果はこれらのレセプター結合部位は重複しているが、同一のものではないことを示している。このことはhGHのレセプター特異的変異体の合理的設計を可能にする。

【0090】hGHおよびhPRLレセプターには32%の配列ホモロジーをもつ細胞外ホモロジー結合ドメイン、単一のトランスメンブレンドメインおよび配列の長さも様々である細胞質内ドメインがある。hGHレセプターの細胞外結合ドメインは大腸菌中で発現され、かつ可溶性血清結合たん白質など天然に見られるものと同一の結合性を有する(S. A. スペンサー(Spencer)等(1988) *J. Biol. Chem.* 263, 7862-7867)。同様にhPRLレセプターの細胞外ドメインは大腸菌内で発現されかつ精製された。hPRLレセプターフラグメントは残基Gln1からThr211にわたり、単一のトランスメンブレンドメインの直前で終わっている。それは完全な長さのレセプターと実質的に同じ高い結合アフィニティーおよび特異性を有している。この実験で用いているhPRLレセプターをコードする遺伝子はカナダ モントリオール マクギル大学、ケリー(Kelly), P. A. 博士により提供された。このDNA配列はヒト乳線cDNAライブラリーから入手し、プロラクチンレセプター群の交叉種メンバーのうち既知の保存領域をカバーするプローブで同定された。たとえばダビエス(Davies) J. A. 等(1989) *Mol. Endocrinology* 3, 674-680; エデリー(Edery)等(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2112-2116; ジオリコアー(Jolicoeur)等(1989) *Mol. Endocrinology* 3, 895-900参照。これらの短縮型で高純度のレセプターはhGH変異体の結合アフィニティーの迅速かつ正確な検定に非常に有用な試薬である。

【0091】hPRLおよびhGHレセプター結合部位の関係

hGHおよびhPRLレセプターのエピトープが重複しているかどうかを測定するため我々はhPRLレセプターフラグメントがhGH由来のhGHレセプターフラグメントと置換し得るかどうか分析した(データ示さ

ず)、事実、hPRLレセプターフラグメントはhGHレセプター結合部位に関し見かけ上のK_d値1 nMで競合する。これはhGHに対するhPRLレセプターの直接的結合で測定されたアフィニティーと実質的に同じである(結果示さず)。第III表のセグメント置換hGH変異体のうちの7つを用いhPRLレセプターに関するhGH上のエピトープの位置を決定した。この実験にはhGH 32-46変異体を用いた。方法はhGHsの代わりにhPRLrをレセプターとして用いたこと以外に述べたhGHレセプターに対するhGH上のエピトープの決定に用いた方法、すなわちhGH変異体の結合への影響により行った。上述の12個のセグメント置換hGH変異体の結果を第XVIII表に示す。

【0092】

【表20】第 XVIII 表

hPRLレセプター(hPRLr)の細胞外ドメインに対するホモログスキャンニング突然変異誘発により調製したhGH変異体の結合、変異体は種々のhGH類似体:pGH、hRL、またはhRLから置換したセグメ*

ントに従って命名した。導入された突然変異の正確な記述はコンマで区切られた一連の単一変異体で与えられる。各単一変異体は野生型残基の1文字コードとそれにつづく成熟hGH中のそのコドンの位置および変異体残基で示される。hGHの変異体を先に述べた方法で生産し、精製下。hPRLrへの結合は基本的にhGHrについて述べた方法で測定した(スペンサー(Spencer), S. A.等(1988)J. Biol. Chem. 263, 7862-7867)。もっともこの方法ではhPRLrに対するアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体を用いキャリアたん白質としてギブコ製BSA(粗)を使ってhPRLr複合体を沈殿させた。一般にK_d値の標準偏差は報告されている値の20以下であった。hGHrに対する結合アフィニティーの相対的減少(K_d(変異体)/K_d(hGH))は第III表から得られたものである。レセプター選択性的変化はhGHrに対する結合アフィニティーをhPRLrと比較した相対的減少比で計算した。WT-野生型。

レセプター

選択

性的変化

hGHr		hPRLr		hGHr	
変異体名	導入変異	K _d (aM)	K _d (hGH)	K _d (mut)	K _d (hGH)
MT hGH	なし	2.3	(1)	(1)	(1)
(1)					
pGH					
(11-33)	D11A, M14V,	852	370		
3.4	110				
	H180, R19H,				
	F25A, Q29K,				
	E33R				
pGH					
(48-52)	P48A, T50A,	2.0	0.9		
2.8	0.32				
	S51A, L52F				
pGH					
(57-73)	S57T, T60A,	167	73		
17	4,3				
	S62T, N63G,				
	R64K, E65D,				
	T67A, K70R,				
	N72D, L73V,				
pGH					
(32-46)	残基の欠失	14	6.1		ND
	32~46				
hPL					
(46-52)	Q46H, N47D,	4.4	1.9		
7.2	0.26				
	P48S, Q49E,				

	L15V, R16L, R19Y		
hPRL			
(22-33)	Q22N, P25S, 85	168	73
0.85	D26E, Q29S, た30Q, E33K,		
hPRL			
(54-74)	F54H, S55T, 0.02	2.5	1.1
69	A56S, 158L, P59A, S62E, N63D, R64K, E66Q, T67A, K70M, S71N, N72Q, L73K, E74D		
hPRL			
(88-95)	E88G, Q91Y, 1.1	2.5	1.6
1.4	F92H, R94T, S95E		
hPRL			
(97-104)	F97R, A98G, 3.2	12.1	5.2
1.6	N99M, S100Q, L101D, V102A, Y103P, G104E		
hPRL			
(111-129)	Y111Y, L113I, 0.73	2.6	1.1
1.5	K115E, D116Q, E118K, E119R,		
			66

【0093】表から分るようにpGH(Q122E; 33)およびpGH(57-73)はhPRLレセプター結合アフィニティーに大きな影響を及ぼす。一方、pGH(48-52)は影響をもたない。hPRLレセプターとは異なりhPRLレセプターはhPRLおよびhPLとは結合するがpGHとは結合しない。予想されるように、結合競合ホルモンhPLまたはhPL由来の実質的に全ての置換は結合に影響しなえった。唯一の例外はhPLレセプターへの結合アフィニティーが70倍以上減少するhPRL(22-33)である。このようにhPRLレセプターはhGH中ヘリックス1の中央領域および残基57および73の間のループ付近の突然変異に非常に敏感である。またホモログuesキャンデータによりhPRLおよびhGHレセプターエピトープはいくつかのセグメント置換変異体がレセプター結合選択性に大きな変化を与えることから同一ではないことが示された(第XVIII表)。たとえばpGH(11-33)またはhPRL

(22-33)により引き起こされる結合への影響はhGHレセプターに対してよりもhPRLレセプターに対しての方が約100倍大きい。一方、hPL(56-6343)およびhPRL(54-74)はhPRLレセプターに関してほとんど影響しない一方それらは各々17倍および69倍hGHレセプターへの結合が弱くなった。さらにこれらの選択的結合効果(先に議論したモノクローナル抗体の結合とともに)はレセプター結合アフィニティーの減少はhGHの変異体における局所的であり、全体的構造変化によらないことを実証している。

【0094】hPRLレセプターへの結合を強く調節するhGH中の特定の側鎖をアラニンスキャンニング突然変異誘発および相対的置換により同定した。第XIX表に示したhGH変異体を調製した。hPRL置換、F25SおよびD26Eはヘリックス1における結合アフィニティーの最も大きい減少を引き起こした(各々21および45倍)。これらの残基はヘリックス1の親水性面が

ら突き出ており、かつ結合に緩やかな効果を与えるヘリックス1中の他の突然変異(主にH18AおよびF10A)と同じ側に存在する。hGHレセプターの結合に影響することが知られているループ領域(54~68)中の4個の残基ならびに近接しているがhGHレセプター結合に影響しないこの領域に先行する2つの残基(Q49AおよびT50A)をテストした。最も破壊的な変異体は158AおよびR64Aであり、これらは各々結合アフィニティーが32倍および6倍減少している。他の4個の突然変異の影響は無視できる。ヘリックス1およびループ領域(58-64)がhPRLレセプターに対する強力な結合決定基を含むという事実はヘリックス4と関係する。というのはこのヘリックスはこれら2つの構造の間に押し込まれているためである(図25B)。事実、C165~V185に結合するジスルフィド間のヘリックス4領域のアラニンスキャンニングは強力な結合決定基を明らかにした(第XIX表)。最も破壊的な突然*

*変異はほとんど4個のヘリックスターン、R167~R178に分布しており、かつ同じ親水性面に存在する。

【0095】

【表21】第XIX表

hPRLまたはhGHレセプターフラグメント(hPRLrまたはhGHr)に対するhGHの単一変異体の結合。部位指定突然変異誘発で作ったQ22N, F25S, D26E, Q29SおよびE33K以外のhGHの変異体は先に述べたように調製及び精製した(カニンガム(Cunningham), B. C. およびウェルズ(Wells), J. A. (1989) Science 244, 1330-1335; ゴラー(Zoller), M. J. およびスミス(Smith), M. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 6487-6499)。レセプター結合アッセイおよび変異体の名称を第XVIIIに示す。hGHrに対する結合アフィニティーの減少のデータは第III表からとった。NDは測定しなかったことを示す。

レプター

選択

変化		hPRLr		hGHr		性
		K _o (mut)		K _o (mut)		
hGHr		K _o (nM)		K _o (hGH)		
変異体	hPRLr	K _o (nM)	K _o (hGH)	K _o (hGH)		
WT	hGH	2.3	(1)	(1)		
	(1)					
P2A		1.3	0.6	0.9		
	0.7					
T3A		3.4	1.5	0.9		
	1.7					
P5A		2.5	1.1	2.1		
	0.5					
L6A		4.0	1.8	2.8		
	0.6					
S7A		1.9	0.8	1.8		
	0.4					
F10A		8.1	3.5	5.9		
	0.6					
N12A		1.9	0.8	1.2		
	0.7					
M14A		1.3	0.6	2.2		
	0.3					
L15A		1.2	0.5	1.3		
	0.4					
H18A		3.9	1.7	1.6		
	0.6					
R19A		1.4	0.6	0.7		
	2.4					
Q22N		2.1	0.9	ND		
	-					
F25S		48	21	ND		
	-					

R178N	2.4	1.0	8.5
0.1			
R178K	6.7	2.9	ND
-			69

I179M	1.3	0.6	2.7
-------	-----	-----	-----

【0096】機能地勢図はhGHおよびhPRLレセプターの位置に基づいて導かれた(図283,9 hPRLレセプターに対する最高のエピトープ部分は、(図25B)。結合アフィニティーの2倍以上の減少を示す突然変異が割り振られる。この基準によりhPRLレセプターのエピトープは基本的にF10~Q29のヘリックス1の前面、F54~Q68のループおよびR167からR178のヘリックス4の親水性面に限定される。一方、hGHレセプターエピトープ(図25A)はアミノ末端領域から14~M14のヘリックスの前面、F54からS71のヘリックス1の前面およびD171からV185のヘリックス4の親水性面の残基を含む。さらに変異分析がhPRLエピトープに残存するギャップを満たすのに必要であるがこのエピトープがhGHレセプターのエピトープと重複するが同一のものではないことは明らかである。これらのデータはhGHを認識する結合決定基の全てがhGHおよびhPRLレセプターに関しその細胞外結合ドメインと32%のホモロジーを持つにもかかわらず同一のものでないことを示している。レセプター結合アフィニティーに大きな変化を起こす残基は間接的な構造効果によってそれを行っている。しかしこれら破壊の効果のほとんどがテストした全ての単一変異体が8個のhGHモノクローナル抗体群に対し完全な結合アフィニティーを維持しており、かつしばしばレセプター選択性的変化に導くがレセプターアフィニティーに均一な影響を与えないことから局所的な効果によるものと考えられている(第XIX表および以下参照)。

【0097】hGHのレセプター特異的変異体の設計多くの単一hGH変異体はレセプター結合選択性に多くの変化を起こす(第XIX表)。最も顕著なのはhGHレ*

*セプターに対するアフィニティーの4倍増加を導くがhPRLレセプターへの結合は20倍以上減少するE174Aである。このことはレセプター選択性の120倍の変化を示している。別の突然変異は(主にR178NおよびI179M)はhGHを選択的にhPRLレセプターに結合させる。一般的にレセプター特異性を最も変化させる変異体は2つのレセプターエピトープの非重複領域に存在する。レセプター結合の自由エネルギー変化が加算的であるならわずかな突然変異をもつhGHの非常に特異的な変異体を設計することができると考えられる。事実2つの最もhGHレセプター選択的な単一変異体(K168AおよびE174A)を合せると、その二重変異体はhGHレセプターへの結合に関し2300倍の選択性を示す(第XX表)。先に指摘したようにhPL(56-64)の結合選択性はわずか20の突然変異E56DおよびR64Mを含むhPL(56-64)によりほぼ20倍増加し得る(第XIII表)。これらのhGH変異体(K168A、E174AまたはE56D、R64M)は実質的に好ましいレセプター、各々hGHまたはhPRLに対する選択性を減少していない。また同時に両レセプターの結合を減らすこともできる。

【0098】

【表22】第XX表

hGHおよびhPRLレセプター(hGHrおよびhPRLr)を識別するよう設計されたhGHキ二重変異体の結合、hGH変異体の部位指定突然変異誘発により調製し、精製し、かつ第XIII表に述べた方法でhGHrまたはhPRLrへの結合を検定した。K₀測定値の標準偏差は報告されている値の±100%であった10M以上の値以外報告されている値の20%以下であった。

レセプター

-選択

性的変化	hPRLr		hGHr	
	K ₀ (mut)		K ₀ (mut)	
	hGHr	hPRLr	hGHr	hPRLr
変異体	K ₀ (nM)	K ₀ (hGH)	K ₀ (nM)	K ₀ (hPRLr)
WThGH	2.3	(1)	0.34	(1)
K168A	1950	590	0.09	0.26
	2300			

【0099】たとえば図4にhGHおよびhPRLレセプターへの結合アフィニティーを大きく減少させるK172AおよびF178Nを合せると各々550および1179M

530400倍のアフィニティーの破壊を生む。全ての場合において結合自由エネルギー変化(G結合)は驚くべきほどに加算的である(第XXI表)。突然変異の加算

I179M	ND	-	ND	-
K172A,	~40,000	~20,000	190	-

的効果は酵素 - 基質相互作用にもみられ (P. J. カーター (Carter) 等 (1984) Cell 38、835-840; J.A. ウェルズ (Wells) 等、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84、5167-5171)、プロテアーゼ - プロテアーゼインヒビター相互作用 (M. ラスコウスキー (Laskowski) 等、“プロテアーゼインヒビター: 医学および生化学的特徴”(1983)、N. カツヌマ (Katunuma) 編、ジャパンスイエスサイアティー版、東京、55~68) およびたん白質の安定性 (D. ショートル (Shortlo) 等、(1986) Protein, 1、81-89 (1986): M. M. メクト (Mecht)、J. M. スターテバント (Sturtevant) および R. T. ソーアー (Sawer) Protein 1、43-46) にもみられ、またこれらの参考文献で公表されているように変異残基が独立に機能しかつ互いに接しているときは一般に身うけられる。このことは多くの hGH 変異体中で対を*

*作っている残基は独立に機能していることを示している。このような加算性は望ましいレセプター結合アフィニティーおよび特異性をもつ hGH 変異体を作る上で非常に予想可能な状況を作り出している。

【0100】

【表23】第 XXI 表

hGH または hPRL レセプター (hGHR または hPRLr) への結合に関する hGH 中の変異の加算効果。野生型 hGH に対する変異体の結合自由エネルギー変化 (G 結合) は

$$G_{\text{結合}} = RT \ln \{ C K_D (\text{変異体}) / K_D (\text{hGH}) \}$$

に従い結合アフィニティーの減少から計算した。単一または多重変異ホルモンの $K_D (\text{変異体}) / K_D (\text{hGH})$ 値は第XIII表 - 第XX表から得た。

結合自由エネルギー変化

/mol)	変異	G _{binding} (Kcal)	
		hGH	hPRLr
K168A		+0.04	+1
.9			
E174A		-0.90	+1
.9			
K168A, E174A (expected)		-0.8	
6	+3.8		
	(actual)	-0.80	+
3.8			
K172A		+2.5	+1.
6			
F176A		+2.4	+1.
6			
K172A, F176A (expected)		+4.9	
	+3.2		
	(actual)	+5.7	+
3.8			
Q22N		-0.06	ND

F25S

+1.81

ND

【0101】hGHと同様にアドレナリンレセプター (R. J. レフコウィッツ (Lefkowitz) および M. G. キャロン (Caron) (1988) J. Biol. Chem. 263、4993-4996)、Q22N F-1レセプター (M. A. カサイエリ (Cascieri) 等、(1989) J. Biol. Chem. 264、2199-2202)、IL-2レセプター (R. J. ロブ (Robb) 等、(1984) J. Exp. Med. 160、1126-1146; R. J. ロブ (Robb) 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、5654-5658) および ANPレセプター (D. ロ

ー (Lowe) および D. ゴーデル (Goeddel)、非公開) など2つ以上のレセプターまたはレセプターサブタイプが存在する多くの例がある。これらの場合、特定のレセプター機能を特定の薬学的効果と結びつけるのは難しい。しかしレセプター特異的ホルモン類似体の使用でこの仕事を非常に簡便化できる。NDたとえばカテコールアミン類似体は、アドレナリンレセプターサブタイプの特性を明らかにし、かつレセプター機能を生理的応答に結びつけるのに使われる (R. J. レフコウィッツ (Lefkowitz) 等、(1983) Annu. Rev. Biochem. 52、159-

E56A

ND

+0.8

186) 同様に、hGHのレセプター特異的変異体はhGHの他のレセプターの同定やhGHの複合体薬理学におけるhGHおよびhPRLレセプターの働きを探る上での重要な道具を提供する。この研究はレセプター特異的変異体の合理的設計を可能にするホルモンにおけるレセプター結合部位を同定するための系統的方法を示している。

【0102】実施例13

ヒト成長ホルモンに結合するヒトプロラクチンの作製
 プロラクチン(PRL)は成長ホルモン(GH)、胎盤ラクトゲン(PL)およびプロリフェリンを含む相同ホルモン群の1員である。ニコル(Nicolli), C.S.等(1986) *Endocrinol. Rev.* 7, 169-203。集合的にこのグループのホルモンは成長、分化、電解質バランスなどに関する幅広い生理効果を調節する。チョウラ(Chawla), R. K.等(1983) *Ann. Rev. Med.* 34, 519-547; イサクソン(Isaksson) O. G. P.等(1985) *Ann. Rev. Physiol.* 47, 483-499。これらの薬理学的効果は特定の細胞レセプターへの結合で始まる。たとえばhPRLはラクトジェニックレセプターには結合するがソマトジェニックレセプターには結合せず、また泌乳に活性化するが骨成長は活性化しない。hGHはラクトジェニックレセプターおよびソマトジェニックレセプターの両方と結合し、かつ泌乳および骨成長の両方を活性化する。レセプター結合特異性の差の分子的基础はまだ理解されていない。

hPRLのクローニングと発現

hPRLのcDNAをgt10中のヒトの脳下垂体cDNAライブラリーから(ハイン(Huynh), T. V.等(1985) "DNAクローニング技術-方法" 1巻, D. M. グローバー(Glover) 編(オックスフォードIRL *

5 -CT-AGA-ATT-ATG-TTA-CCA-ATT-TGT-C
 CA-GGT-GGT-GCA-GCA-AGG-TGT-CAA

という配列であり、開始コドンATGはATGで始まる。この配列はATG-AGA-GGT-GGT-GCA-GCA-AGG-TGT-CAAに
 ある。フェージf1の複製の開始はATGから始まる。この配列はATG-AGA-GGT-GGT-GCA-GCA-AGG-TGT-CAAに
 びpBR322-ラクタマーゼ遺伝子はpBO475に由来する(カニングガム(Cunningham), B. C.等(1989) *Science* 243, 1330-1335)。pBO760を含む大腸菌(MM294)を15µg/mlカルベニシリン添加M9ハイケース培地100mlを含む0.5L振とうフラスコ中37°Cで4時間増殖させた(初期対数期; $A_{550} = 0.1 \sim 0.3$) (ミラー(Miller), J. H.(1972) "分子遺伝学実験" (コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY)。インドルアクリル酸を添加し(最終50µg/ml) *tep* プロモーターを誘導した。細胞をさらに6~8h増殖した後遠心で収穫した。細胞分画実験はhPRLはほとんど排他的に包含粒子中に存在し、SDS-PAGEで分析してみると全細胞たん白質中の2~5%

*プレス)、49-78) 公表されたDNA配列の5および3末端に対応するオリゴヌクレオチドを用いた(コーク(Cooke), N. E.等(1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4007-4016) ハイブリダイゼーションにより(マニアチス(Maniatis), T. 等編(1982) "モレキュラークローニング、ラボラトリーマニュアル(コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY)) クローニングした。ほぼ全長のcDNAクローンが同定され、またコドン22から停止コドンの下流55bpまでの720bp Bst II - Hind III フラグメントをpJC118にサブクローン化した。この配列をダイデオキシ法(サンガー(Sanger), F.等(1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467)により決定したところ以前に報告されていたものと全く一致した(コーク(Cooke), K. E.等(1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4007-4016)。

【0103】標準法により細胞内発現ベクターpBO760(図26)を作った(マニアチス(Maniatis), T. 等編(1982) *モレキュラークローニングラボラトリーマニュアル(コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY)*。hPRL遺伝子の転写にpHG207-1由来の大腸菌 *trp* プロモーターを用いた(デボア(deboer), H. A.等(1982) "プロモーターの構造と機能" ロドリゲス(Rodriguez), R. L. およびチャンベリ(Chamberlin), M. J. 編(プラガー版、ニューヨーク)、462-481)。hPRLコード配列は47bp XbaI - BstE II 合成DNAカセットおよびhPRL cDNA由来の720bp BstE II - Hind III フラグメントを含んでいる。合成DNAカセットは

【0104】hPRLの精製および再生。hPRLを含む包含粒子を基本的に報告されている方法で単離した(ウインクラー(Winkler), M. E.等(1986) *Biochemistry* 25, 4041-4045)。簡単に云うと、湿細胞ペレット50gを0.25リットルの10mMトリス(pH 8.0)、1mM EDTA(TEバッファ)に懸濁し、激しい超音波処理で細胞を分解した。不溶性の物質で遠心(10,000×g 15分間)で集め25mlのTEバッファに懸濁した。このサスペンションを50%グリセリン0.2リットルのクッション上に重層し、9000×g 25分間の遠心によりhPRL包含粒子をペレット化した。この包含粒子由来のhPRL(純度約20%)を5mlのTEバッファに懸濁した。TEバッファ中0.3gの還元グルタチオン(シグマ)を含む8N Gn HCl 溶液156mlに包含粒子を溶かすことによりpPRLを再

生した。室温で30分間緩やかに攪拌した後この混合物を0°Cに冷やし、0.6gの酸化グルタチオンを含むTEバッファ8.44mlで希釈した。この溶液を4°Cで一晩ゆっくりと攪拌した後、24時間に3回外液を変える4リットルのTEバッファを用いた透析を行った。不溶性物質を遠心で除去した(10,000×g 20分間)。さらに再生し可溶化したhPRLを45%飽和の(NH₄)₂SO₄の添加および室温2.5時間の攪拌による沈殿化で精製した。この沈殿を遠心(12,000×g 30分間)で集め5mlのTEバッファに溶解した。室温30分後この溶液を清澄化した後(10,000×g 10分間)、ミリポアフィルターで濾過した(0.45μm)。この溶液を4°Cで一晩0.5リットルのTEバッファに対して透析した。最後にこのhPRL(純度85%)を基本的にhGHの精製について述べた方法と同じDEAE高速マトリックスを用いたFPLCにより均一となるまで(>95%)精製した(カニングガム(Cunningham)、B. C.等(1989)Science、243、1330-1335)。

【0105】hGHおよびhPRL変異体の突然変異誘発および結合性部位指定突然変異誘発(ゾラー(Zoller)、M. J.等(1982)Nucleic Acids Res., 10、6487-6500)は大腸菌のメチル化修復欠損株MutLを用いて行った(クレーマー(Kramer)、B.等(1984)Cell 38、879-887)。変異体クローンの濃縮化は、インピボ生成ヘテロ二本鎖のトランスホメーション後に得られた最初のプラスミドDNAプールに制限精製または制限選択を応用し得るように各々単独制限部位を導入または除外する変異原オリゴヌクレオチドを設計することにより行った(ウェルス(Wells)、J. A.等(1986)Phil. Trans. R.Soc. Lond. A 317、415-423)。全てのオリゴヌクレオチドはもっとも上流のミスマッチの5側に正確にマッチする12bpおよびもっとも下流のミスマッチの3側に正*

*確にマッチする10bpを有するよう設計する。hGHの突然変異誘発の場合、先に述べたhGH合成遺伝子は多くの制限部位を含んでおり、これをプラスミドpBO475にクローン化した。hGHの変異体は大腸菌の細胞周辺腔に分泌され(チャン(Chang)、C. N.等(1987)Gene 55、189-196)先に述べたように精製した。各類似体のKd値は本明細書およびスペンサー(Spencer)、S. A.等(1988)、J. Biol. Chem. 263、7862-7867に述べられている精製組換えhGH結合たん白質に結合した(¹²⁵I)hGHの競合的置換により測定した。先に述べたhGH結合たん白質(クローン化ヒト肝臓レセプターの残基1~238を含む)をフー(Fuh)、G.等(1989)、提出)により述べられている方法により大腸菌から分泌させ精製した。置換曲線を3回作成し、またKd値の標準偏差は一般に報告値の20%以下であり、Kd値が10μM以上となる場合を除いて報告値の50%を超えることはなかった。hPRLおよびhPRL変異体の濃度は吸光係数+S(0.1%、280)=0.9(ウェトローファー(Wetlaufer)、D. B. (1962)Adv. in Prot. Chem. 17、303-390)を用いたA₂₃₀で測定した。これは変異体が芳香族残基における突然変異を含む場合はそれに応じて調整した。吸光度により測定した濃度値はSDS-PAGEとhGHのコマーシブルによる染色を用いたレーザーデンストメトリーによって測定した値と10%以内の誤差で一致していた。円二色スペクトルはアピブキャリー60スペクトロポーラリメーターを用いて測定した。hPRL中の残基がhGHレセプターへの結合にもっとも破壊的であるかを探るため(図27)、まず多くのhPRL残基をhGH中に導入した(第XXII表)。

【0106】

【表24】第 XXII 表

hGHに導入したhPRLおよびアラニン置換の比較

hGH変異体	Kd(nM)	Kd(mut)
		Kd(hGH)
WT	0.34	(1)
158L	0.58	1.7
158A	5.6	16
R64K	0.20	0.6
R64A	7.1	21
F176Y	2.9	8.6
F176A	5.4	16
R178K	1.7	5.1
R178N	2.9	8.5

【0107】hGH中部位58、64、176および178の単一アラニン置換はレセプター結合を著しく破壊

するが、これらの部位におけるhPRL残基の置換はほとんど影響しなかった。hPRL置換の最も大きい効果

は部位176および178を含むヘリックス4残基中に存在した。これらのデータはhPRLのヘリックス4領域における残基がhGHレセプターへの結合の欠除を最もよく説明し得ることを示している。組換えhPRLは天然様の構造および機能性を維持していた。まず近および遠紫外線CDスペクトル(図28)は天然のhPRLのスペクトルと同じであった(ビューリー(Bewley)、T. A. (1979)“ホルモン研究の最近の進歩”35巻、155~213頁、アカデミープレス、N. Y.)、遠紫外線スペクトルはhGHと同じであり、このことは208nmおよび224nmにおける平均残基当り率の重要な差が知られているが同様の4-ヘリックス束構造の存在を示している。これらのホルモンの芳香族残基の数や微環境の差を反映する近紫外CDは著しく異なる。別の研究で組換えhPRLはhPRL ELISAにおいて十分な免疫学的交叉反応性を維持しており(データ示さず)、またラットのリンパ種Nb2細胞を繁殖させるこ

*とにおいてhGHと等価であった(タナカ(Tanaka)、T.等(1980)J. Clin. Endo. Metab. 51、1058-1063)。還元すると精製hPRLはSDS-PAGEにおける移動度の著しい減少を起こし(hGHでもみられる)、このことはジスルフィド結合の形成を示している(ポリット(Poliitt)、S.等(1983)J. Bacteriol. 153、27-32)。アミノ末端配列分析は細胞内発現hPRLはアミノ酸末端メチオニンを維持していることを示した。しかし、メチオニルhGHと同様このことは見かけ上その構造や機能に影響しない。hGH結合たん白質へのhPRLの結合はhGHと比較して10⁵倍以上も減少し(第XXIII表)、これは結合アッセイの検出限界以下である。

【0108】

【表25】第 XXIII 表

hGH結合たん白質¹への結合を可能にするhPRL中の作製残基

hPRL 変異体	Kd(nM) ²	Kd(mut)
hGH/hPRL WT	>40,000	
>100,000		
A = H171D/N175TY/176F	4,900	
14,000		
B = A + K178R	220	
660		
B + hGH(184-188)	260	
740		
hGH(54-74)	25,000	
66,000		
B + hGH(54-74)	2,000	
5,800		
B + H54F/S56E:L58I:	36	
110		
E62S:D63N:Q66E		
B + H54F:S56E:L58I:	670	
2,000		
C = B + E174A	68	

【0109】1. 先に述べたようにhPRL変異体を生成、精製および分析した。多くの変異体は66Eで区切られた一連の単一変異体で示される(第XXII表)。コドン番号はhGH配列に基づき54Fにある(図2)。2. 平均標準誤差は、それが5.0%ほどになるKd値が1μMを越える場合を除いて報告値の±5.0%以下であった。この誤差はKd値が10μMを越えるとさらに大きくなる。hGH由来のヘリックス4中の3つの残基を組合せて(H171D、N175TおよびY176F)、hPRLに導入した。アラニン残基の突然変異誘発およびhPRL置換(第XXVII表)はこれらの残基がhGH

のhGHレセプターへの結合に非常に重要であることを示している。hPRLのこの三重変異体はhGHよりは14000倍も弱いghGH結合たん白質に検出可能な結合を起した。さらにテトラ変異体を作るため他の重要なヘリックス4残基(K178R)を導入すると、これは野生型よりわずかに660倍低だけのレベルの結合に強められた(第XIII表の変異体B)。hPRL変異体BへのhGH残基184~188の導入はhGH結合たん白質への結合を強化しなかった。しかしhPRL変異体Cを与えるE174Aの導入(第XXIII表)はE174AがhGHに組込まれたときと同じようにhGH結

D + N71S

3.6

11

D + L179I

2.1

合たん白質への結合アフィニティーをさらに3.5倍増加した。

【0110】ヘリックス4領域への結合力をもつことから残基54～74を含むループ領域を分析した。hPRL中のループ領域をhGH由来の配列(第XIII表のhGH(54-74))で完全に置換することはhGH結合たん白質へのかろうじて検出可能な結合を与える。この変異体を変異体Bと合せたとき結合アフィニティーが実質的に増加する。しかし、この新しい変異体(B+hGH(54-74))の結合アフィニティーは変異体B 10 単独のときよりもほとんど10倍減少する。したがって54-74ループ中のいくつかのhGH残基はヘリックス4中のhGH置換と適合しなかった。我々はhGHの54-74ループからアラニンスキャンニング突然変異誘発によりもっとも結合に影響することが示された7個の残基を選択した。hGHのR64A突然変異は結合アフィニティー420倍以上減少させるが、hGHのR64K変異体(hPRL置換)はhGH結合たん白質への結合がわずかに多い(第XXII表)。それゆえhPRL中のLys64は変化しないままであった。結果としてhGH 20 Hにおいてアラニンへの変化が最も破壊的であった7個の置換のうちの6個をhPRLへ組込んだ。この新しい変異体(B+H65F:S56E:L58I:E56S:D68N:Q66E)はB+hGH(54-74)よりも50倍も強く結合するが野生型hGHの結合アフィニティーよりもわずかに110倍小さいだけである。しかし、これは変異体B単独よりもわずかな改善を示したのみで(6倍)、先にhGHのループ領域において観察された強い相互作用に期待されるほどではなかった。それゆえ、ループ内の6個の突然変異をさらに分断し、 30 H54F:S56E:L58I+変異体Bの組合せが変異体よりも3倍も結合が弱いことが明らかになった。最後に変異体Cへの突然変異E62S:D63N:Q66Eの組込みは(変異体D)はhGHに比べ結合アフィニティーがわずかに6倍低いだけの最も高いアフィニティーをもつ類似体を生ずる。別の単一突然変異(H54F、S56E、L58I、A59P、N71SおよびL179I)はhGH結合たん白質へのhPRL変異体Dの結合アフィニティーを高めることはなかった。変異体Dの構造は事実上CDスペクトル分析(図28)または 40 ELISA活性(データ示さず)によって天然のhPRLと区別できなかった。

【0111】これらの研究は部位指定突然変異誘発実験由来の機能情報のみを用いた遠い関係の類似体の結合性を回復させ得る可能性を示した。hGHのアラニンスキャンニング突然変異誘発はhGHのレセプターへの結合を調節するのに重要な側鎖の系統的分析を提供した(図27)。この情報はhGHレセプター結合し得ないことを説明するhPRL中の多くの残基を浮き立たせた(図29)。しかしさらに分析することでhGH中のアラニ 50

ン置換がhGH中のhPRL置換よりもより破壊的であることが示された(第XXII表)。さらにいくつかのhPRL置換は、特にhPRL中により大きい側鎖が存在するとき結合アフィニティーに関し他のものよりかなり破壊的であった。たとえばhGH中の保存的(しかしより大きい)F176Y置換はhGHレセプターに関する結合アフィニティーに8倍の減少を引き起こすが、一方より小さいR64K置換は結合アフィニティーのわずかな増加を示した。このようにhGH中の破壊的hPRL置換の分析は最初にhPRLへの結合アフィニティーを遂行するヘリックス4中の残基クラスターの導入を示している。このことは野生型hPRLによるhGHレセプターへの結合が観察されないことから非常に重要であり、使用した検定の範囲内の結合アフィニティーをもたすため(Kd 50μM)hPRL中に同時にいくつかのhGH置換を導入することが必要である。ヘリックス4に機能的に重要な残基を導入することによりhPRLに容易に検出可能な結合アフィニティーを導入された。しかし、54-74間のループ領域を作り出すことはより 困難であることが分かった。hGHの全ループをhPRLに組込むことによる結合の増加は期待されたよりも小さく、至適化されたヘリックス4変異体Bと組合せたときは結合に対して破壊的であった。我々のデータはhPRLの54-74ループ構造はこのたん白質中の他の相互作用により支持されることを示している。この問題は段階的に解決された。まず、hGH中のhPRL置換を伴アラニン置換で重要であると同定されたhGH由来の6個のループ残基をhPRLに導入した。これはその状況を改善したにもかかわらずいくつかのhGH突然変異 (H43F、S56EおよびL58Iにしぼった)の組合せはhPRLに対して破壊的であった。これらのデータはループ中のいくつかの残基がその構造に重要でありそのまま残した方がより安定であることを示している。

【0112】突然変異誘発の多くの反復サイクルがhPRLのhGHレセプターへの堅い結合を可能にする残基の組合せを一本化するのに必要であった。この戦術は変異効果が実際に観察されるように加算的であるという仮定に依存している。たとえばE174A突然変異がhPRL変異体CまたはhGHに加えられたとき結合を3～5倍増加した。さらに変異体Dに対するH54F、S56E、およびL58I単一変異体の破壊的效果は(4.4倍)変異体Bに付加された3つの全ての突然変異の組合せによって引き起こされる破壊とほぼ同じであった(3倍)。変異体Dの結合アフィニティーはわずか6倍減少するだけであるにもかかわらず変異体Dに組込んでさらに結合を改善する試みを行いうるV14NおよびH185Vなどいくつかの他の残基がある。すなわちhGH中のアラニン置換がhGHの結合を2～3倍の減少を起こす部位がある(図29)。高分解能の構造が設計過程の助けとなるが、それは明らかに基本的なものではない。

突然変異効果の累積性は天然の変化および淘汰サイクルによるたん白質進化と同じ様式で結合性を取れんさせよう。従来のたん白質工学実験は高分解能構造分析を用いて基質接触残基による天然の変異体酵素の基質特異性の実際の変換が可能であることを示した(ウェルズ(Well s) J. A.等(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84、5167-5171; ウィルクス(Wilks), H. M.等(1988) Science 242、1541-1544)。同様に他のものは結合性は抗原結合ループ(ジョーンズ(Jones), P. T.等(1986) Nature 321、522-525)またはDNAレセプターヘリックス(ワートン(Wharton), R. P.等(1985) Nature 316、601-605)を含む二次構造ユニットの全ユニットの置換により産み出し得ることを示した。しかし、h P R Lにh G Hレセプター結合性を与えるにはh P R Lの構造枠組内の選択的残基置換を必要とする。さらにC Dスペクトルデータはh P R L変異体Dの全構造はそれぞれがh G Hと同様の結合性は維持しているにもかかわらず、h P R Lの構造には非常によく似ているがh G Hには似ていない。

【0113】h G Hレセプターへの結合特異性がh P R Lに組込まれ得るという事実はソマトジェニックレセプター結合に対する特性の残基の機能的な重要性を確認している。またこれらの研究はh G Hとh P R Lがわずか23%の一致しかもたないにもかかわらず両者の構造的関係に対する動かぬ証拠を提供する。これは成長ホルモン、プロラクチン、プロリフェリンまたは胎盤ラクトゲン構造を始めとするこのホルモン群内に含まれる新しいレセプター結合機能に近づく合理的な方法を提供する。このようなハイブリッドはレセプターサブタイプの薬理学的重要性とともにレセプター結合および活性化を区別する上で有用である。これらの類似体はアゴニストまたはアンタゴニストとしてより有用な性質をもつ新しいレセプター特異的ホルモンの設計に導く。

【0114】実施例14

ヒト胎盤ラクトゲンへのヒト成長ホルモンの結合性の付与

ヒト胎盤ラクトゲン(h P L)のh G Hレセプターに対する結合アフィニティーはh G Hに比べ30倍小さい(G.バウマン(Baumann)等(1986) J. Clin. Endocr inol. Metab. 62、134; A. G.ヘリントン(Herinton),等(1986) J. Clin. Invest. 77、1817)。以前の変異実験はh G Hレセプターに対するh G Hの結部位は基本的にアミノ末端(残基4-14)付*

*近のいくつかのマイナーな決定基とともに2つの領域(残基54-74および171-185を含む)内に存在する。h P Lの全配列はh G Hと85%が同じである。h G H上のレセプター結合エピソードを広く構成している3つの領域内でh P Lはわずか7箇所以下以下の置換を含む:P2Q、14V、N12H、R16Q、E56D、R64M、および1179M。(この命名法では野生型h G Hの残基を1文字コードで示し、つづいて成熟h G Hの部位番号およびh P L中の残基を示した)。これら7個の各部位においてh G Hの単一アラニン置換を作った。これらのうち、4つのアラニン置換、14A、E56A、R64A、およびI179Aは結合アフィニティーの2倍以上の減少を引き起こすことが分った。一般にアラニン置換は結合に関しヒトプロラクチン由来の相同的置換よりも大きい効果を有している。それゆえ、h G Hに導入されたh P L由来の置換のいくつかの効果を研究した。I179A置換はアフィニティーの2.7倍の減少を起こした一方、I179Mはわずか1.7倍の効果しか示さなかった。しかし、R64AおよびR64M置換は結合アフィニティーの同一およびより大きい減少(約20倍を引き起こした。さらに、h G Hの二重変異体(E56D:R64M)のアフィニティーはさらに計30倍の減少を示した(第1表)。このようにE56DおよびR64Mは基本的にh G Hとh P Lのレセプター結合アフィニティーの差を決定する。それゆえh P Lの二重変異体D56E、M64Rは実質的にh G Hレセプターへの結合アフィニティーが増加している。M179IおよびV41のような付加的修正もh P Lのh G Hレセプターへの結合を高める。

【0115】実施例15

ヒト成長ホルモンへの結合に関する部位174でのアミノ酸置換の効果

先に示されているように、Glu174のAlaによる置換(E174A)はヒト成長ホルモンのそのレセプターへのアフィニティーを4倍以上増加させる。部位174における至適置換残基を決めるため他の12個の残基で置換したh G H変異体を作りh G H結合たん白質とのアフィニティーを測定した(第XXIV表)。荷電ではなく側鎖の大きさが結合アフィニティーを決定する主要要素である。アラニンが至適置換を起こし、Ser、Gly、Gln、Asn、Glu、His、Lys、Leu、そしてTyrの順でつづいている。

【0116】

【表2.6】第 XXIV 表

変異体	荷電	大きさ(Å) ^b	Kd(nM) ^c	Kd(
野生型	0	0	0.15	0
E174A	0	26	0.075	

E174S	0	33	0.11	0
.30				
E174D	-	59	NE	-
E174N	0	69	0.26	0
.70				
E174V	0	76	0.28	0
.80				
野生型	-	89	0.37	1.0
<hr/>				
E174Q	0	95	0.21	0

.60

【0117】a. 突然変異体pBO4705にクローン化した部位178にKpnI部位を含むhGH遺伝子の変異体に部位指定突然変異誘発を行うことにより生成させた*

6.4

E574KAC-AAG-CTG-NNN-ACA-TTCGTG-CGC- 1.14

で表わされる配列を有してCTGAG-TCでNNNは部位174の新しいコドンを表わし、またアヌテリスクは178で始まるKpnI部位を除外する mismatches を示している。変異コドンは次に示すものである：Gln, 137 AC; Asn, AAC; 6Ser, AGC; Lys, AAA; Arg, AGG; His, CAC; Gly, GGG; Val, GTG; Leu, CTG。ヘテロ日本鎖合成につづいて野生型配列のバックランドを減少させるためおKpnIによる制限処理でプラスミドプールの突然変異を濃縮した。全体的変異体配列はダイオキシ配列分析で確認した(Sanger, F.等(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467)。

* (カ-ター (Carter), P. 等 (1986) Nucleic Acid Res. 13, 4431-4443)。突然変異誘発に用いた236ゴヌクレオチドは、

* * *

* b. 側鎖バックキング値は C. コチア(Chotia)((1984) Nenu. Rev. Biochem. 53, 537) のデータによる。

c. 解離定数は先に述べたようなhGH結合たん白質による(¹²⁵I)hGHの競合適置換により測定した。NFは変異ホルモンが単離および検定するには低すぎるレベルで発現することを示している。

実施例16

第XXV表に示したhGH変異体を構築した。野生型hGHに対するこれらの相対的能力を示す。

【0118】

【表27】

第 XXV 表

hGH変異体	ラット体重検定における相対適能力
F97A	0.87
S100A	2.12
L101A	3.03
V102A	1.39
Y103A	1.73
T175S	1.21

本発明の好ましい態様を述べてきたがこれら公開した態様を種々に変化させること、およびこのような修正は本発明の範囲内にあることは当業者にとって明白である。

【図面の簡単な説明】

【図1】活性ドメインの同定に使用する戦略を示している。

【図2】hGH、hPL、pGHおよびhPRLのアミノ酸配列中の保存性および可変性アミノ酸残基を示している。

【図3】hGHの推定される低分解能構造および各ヘリックスに対しN末端開始残基から見たラセン投影図を示している。疎水性、中性および荷電残基は各々○、およびで示されている。

【図4】可溶性hGHレセプターに対する種々のセグメント置換hGH変異体の結合に関する相対的減少を示す棒グラフである。

【図5】ソマトジェニックhGHレセプターと相互作用する活性ドメインA、CおよびFにおける類似アミノ酸を示す。

【図6】ソマトジェニクレセプターの相対的結合位置およびhGHに対する8個のモノクローナル抗体を示す。

【図7】種々のアラニン置換hGH変異体の可溶性hGHソマトジェニクレセプターに対する結合の相対的増減を示す棒グラフである。T175の斜線棒はアラニンではなくセリンが置換していることを示している。R178の縞棒はアラニンではなくアスパラギンが置換されていることを示している。

【図8】実施例で用いているhGH遺伝子のDNAおよびアミノ酸配列を示している。

【図9】合成hGH遺伝子を含むベクターpBO475の構築を示している。

【図10】hGHのアミノ酸配列を示すpBO475のDNA配列である。

【図11】ベクターpJ1446の構築を示している。

【図12】肝臓由来のソマトジェニクレセプターの可溶性部分のアミノ酸配列を示すpJ1446のDNA配列である。

【図13】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図14】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図15】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図16】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図17】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図18】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図19】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図20】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図21】hGH中のソマトジェニクレセプターに対する結合に関与する活性アミノ酸およびヘリックス1および4に関するラセン投影図を示している。

【図22】hGHおよびhGH変異体を50マイクログラム/kg/日で投与したラットの経時的体重増加を示している。

【図23】野生型hGHと比較したhGH変異体の活性

に対するKd比のセミログプロットである。

【図24】ヒト血清(○)またはプラスミドpGHr(1-238)を発現する大腸菌KS330培養物から単離したhGH結合たん白質に対する(¹²⁵I)hGHおよび未標識hGHの競合結合曲線である。棒は平均値からの標準偏差を示す。挿入図は競合結合曲線から導びいたスキャッチャードプロットを示している。ヒト血清および大腸菌由来の結合たん白質の濃度は各々0.1nMおよび0.08nMであった。

【図25】2.8分解能のX線構造から決定したpGHの構造に基づくhGHの構造モデルである。パネルAはhGHレセプターエピトープの機能性等高線地図を示しパネルBはhPLレセプターエピトープについて測定された同地図を示している。黒丸の大きさは各残基のアラニン置換に関する破壊効果の大きさを示している。小さな丸は2倍以上の破壊を示し、大きい丸は10倍以上の破壊を示す。hGHレセプターエピトープにおける(パネルA)結合親和性が4倍以上増加させるE174AK位置を示している。

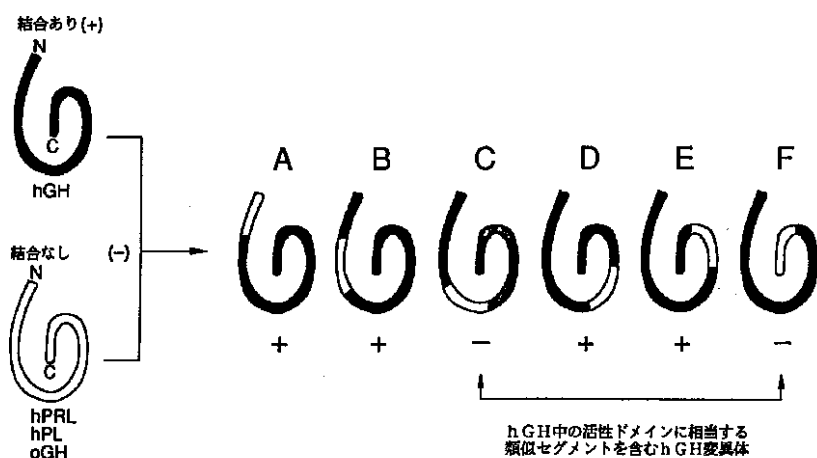
【図26】大腸菌におけるhPRLの細胞内発現に使用したプラスミドpBO760を示している。

【図27】hGH結合たん白質に対する結合に強く影響するhGH中の残基の位置を示している。結合親和性の10倍以上の減少(○)、4~10倍の減少()または4倍以上の増加()を引き起こすアラニン置換(T175またはR178の場合は各々セリンまたはアスパラギン)が示されている。ヘリックス領域のラセン投影図はそれらの両親媒性およびヘリックス4において最も重要な決定因子は親水性面(影部分)に存在するという事実を明らかにしている。

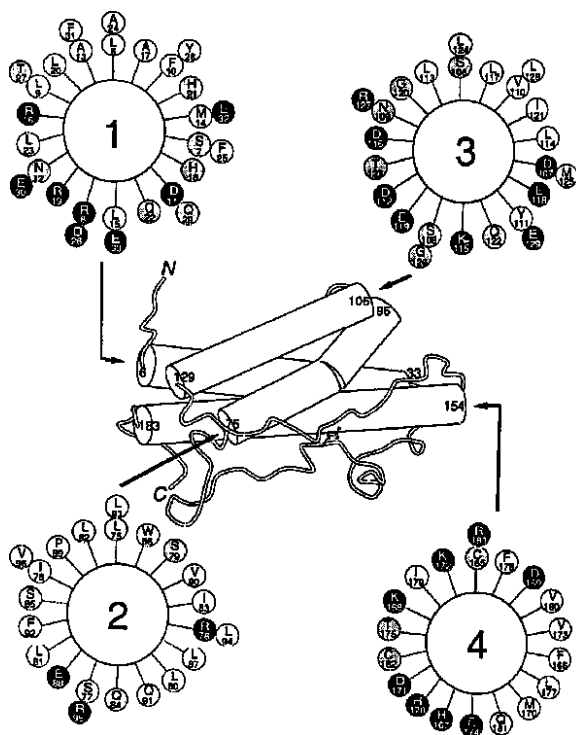
【図28】hGH(-)、野生型hPRL(- -)およびhPRL変異体D(- - -)の遠紫外(パネルA)または近紫外(パネルB)における円二色スペクトルを示している。

【図29】同類およびアラニンスキャンニング突然変異誘発により限定された結合に重要な領域に関するhGHとhPRLの配列比較を示している。同一残基は影を付け、またその番号はhGH配列に基づいている。変異したとき結合親和性が4倍以上変化する残基には丸を付けた。残基の上のアスタリスクは変異が結合親和性を2~4倍減少させる部位を示している。

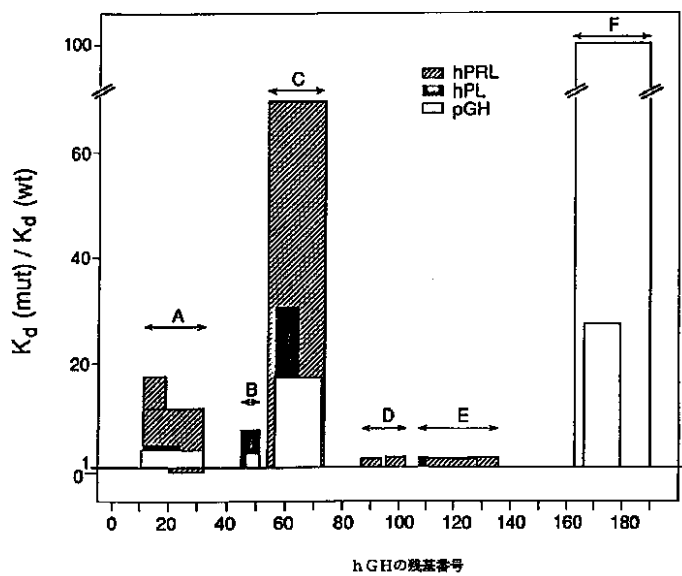
【図1】



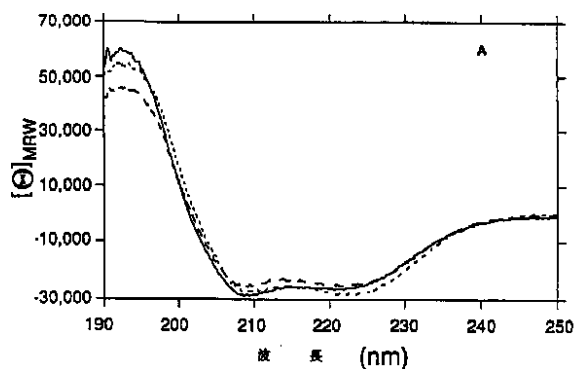
【図3】



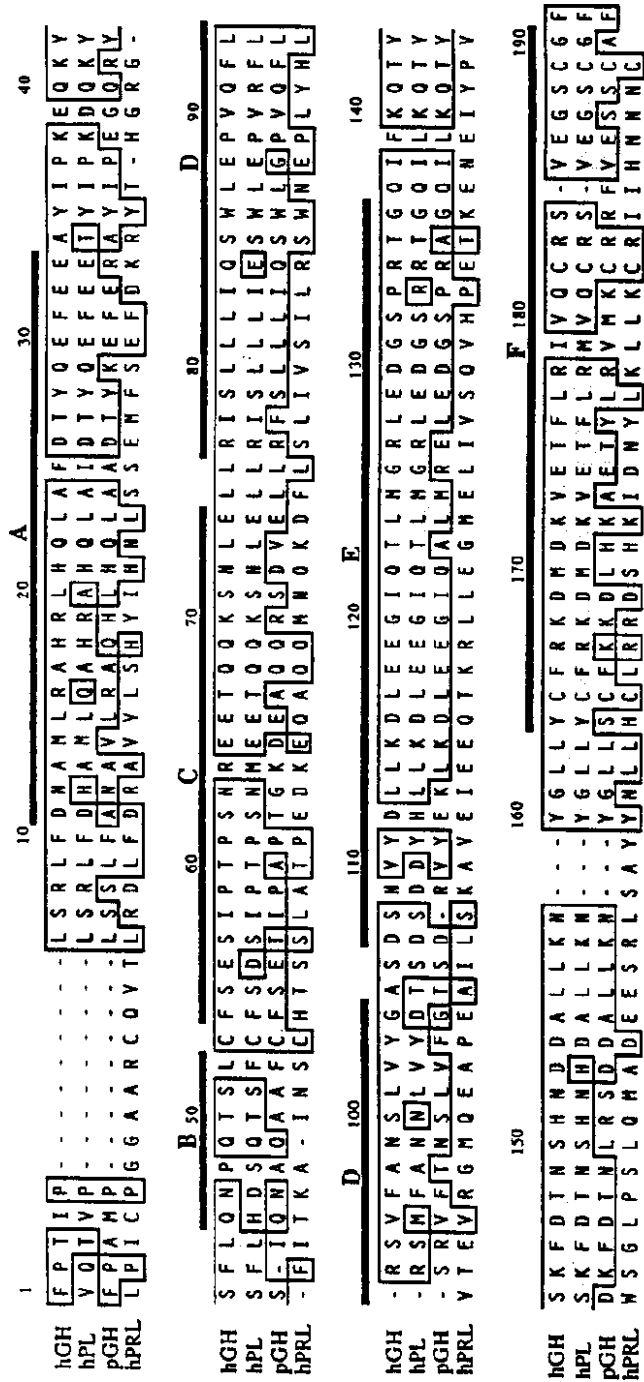
【図4】



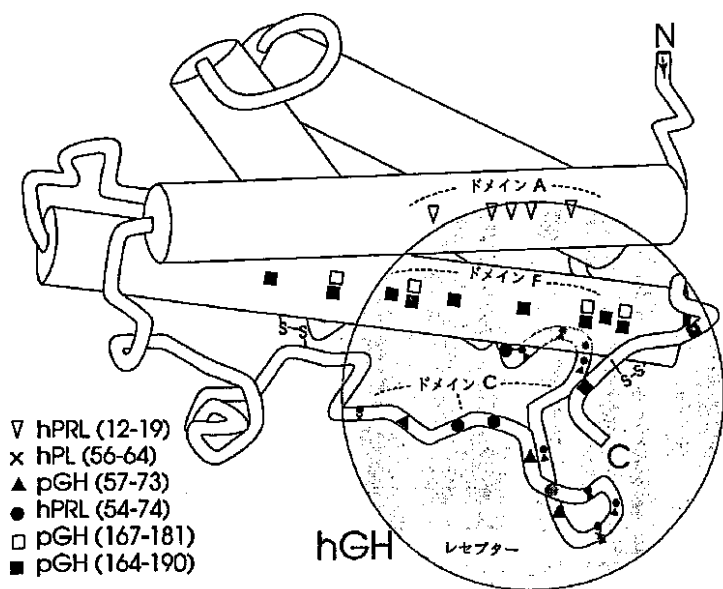
【図28A】



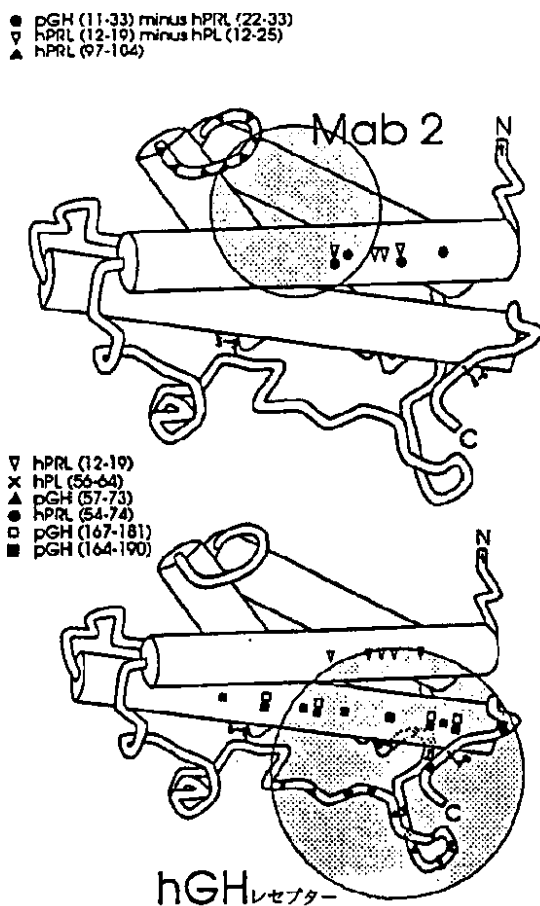
【図2】



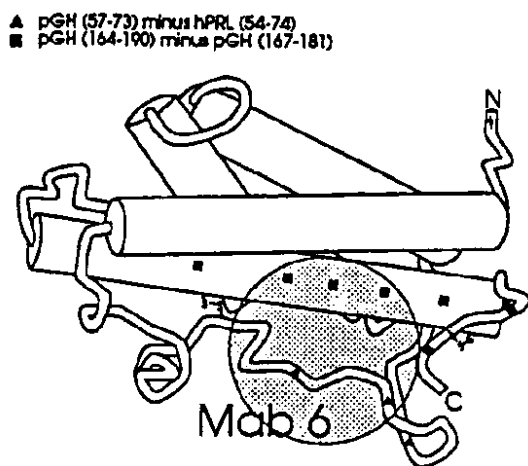
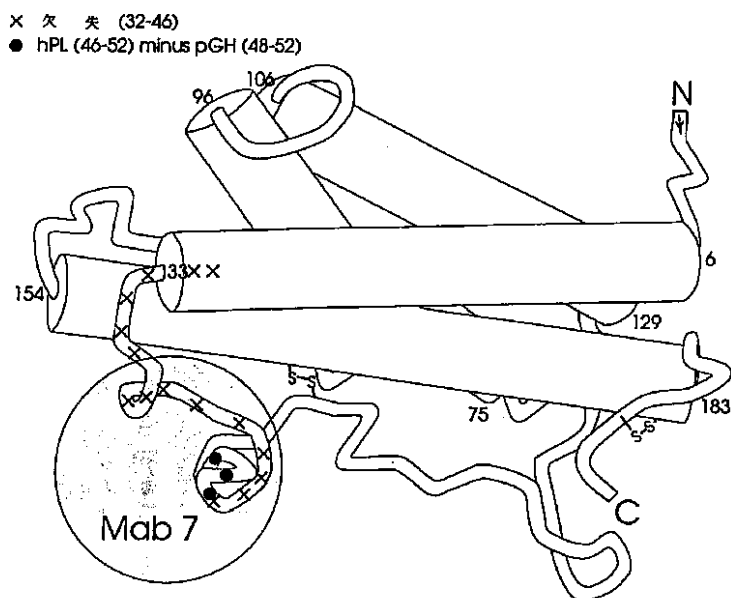
【図5】



【図6B】

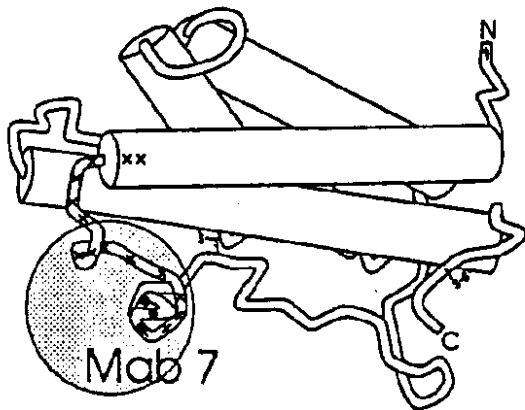
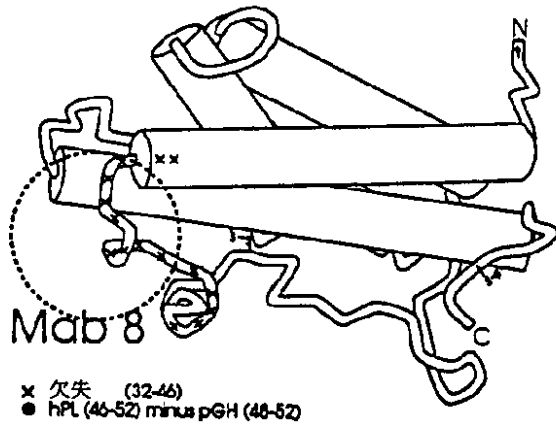
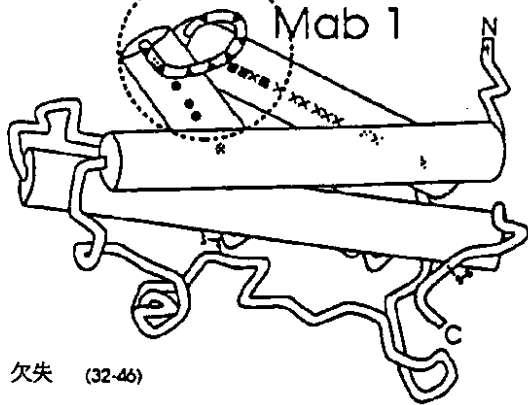


【図19】



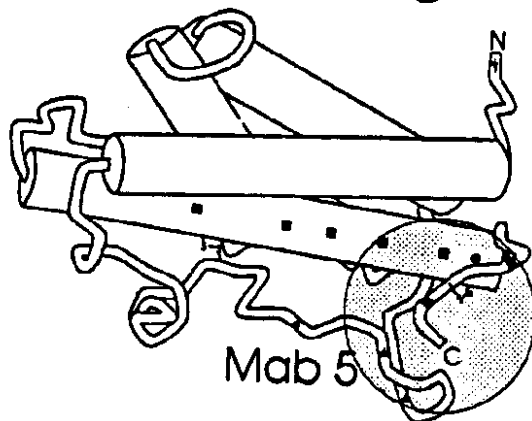
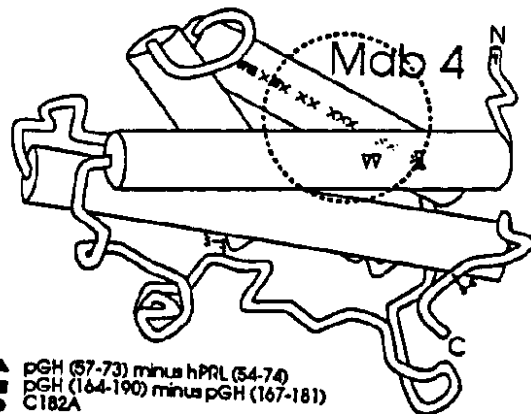
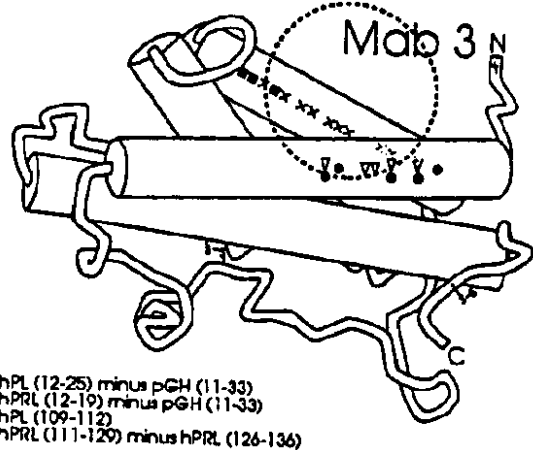
【図6A】

- hPRL (88-95)
- ▲ hPRL (97-104)
- hPL (109-112)
- x hPRL (111-129) minus hPRL (126-136)

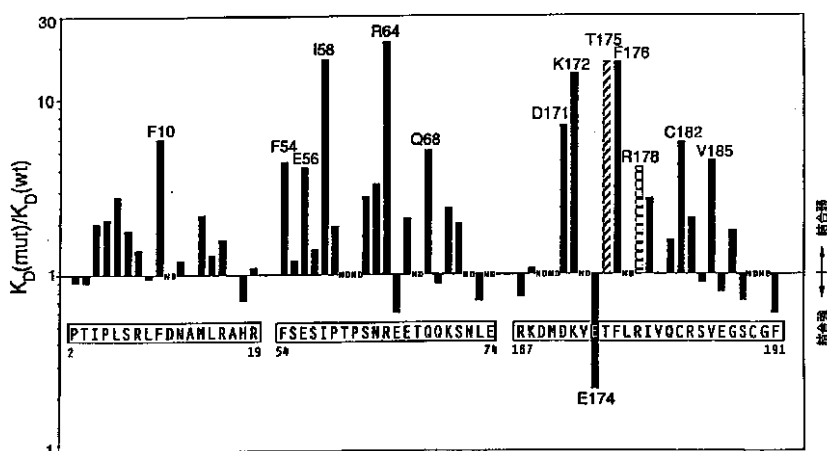


【図6C】

- pGH (11-33) minus hPRL (22-33)
- ▲ hPL (12-25) minus hPRL (22-33)
- ▽ hPRL (12-79)
- hPL (109-112)
- x hPRL (111-129) minus hPRL (126-136)



【図7】



【図8】

合成遺伝子

1 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
 ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA
 NsiI

79 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala
 TTC CCA ACT ATA CCA CTA AGT CGA CTA TTC GAT AAC GCT ATG CTT CGG GCC CAT CGT CTT CAT CAG CTA GCC
 Sall ApaI NheI

142 Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT GAA GAG GCC TAT ATC OCC AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CAG AAC CCC
 StuI PstI

214 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn
 CAG ACC TCC CTC TGT TTC TCA GAA TCG ATT CCG ACA CCC TCC AAT CGC GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC
 ClaI NruI

286 Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
 CTA GAG CTC CTC CGC ATA AGC TTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTC GAG CCC GTG CAG TTC CTG AGG AGT GTC
 SacI HindIII XhoI MstII

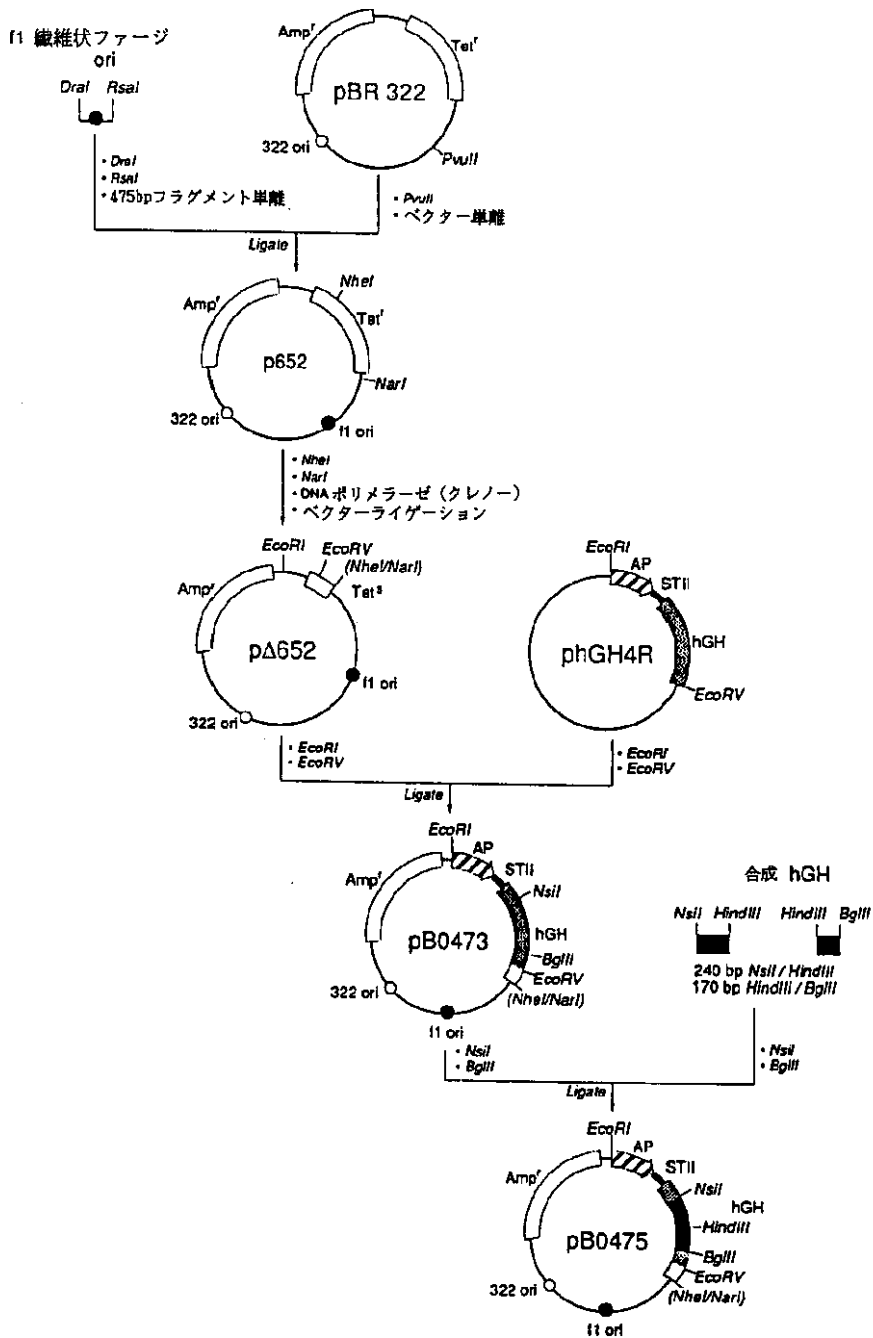
358 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly
 TTC GCC AAC AGC CTG GTC TAC GGC GCC TCT GAT TCG AAC GTG TAC GAC CTG CTG AAG GAC CTA GAG GAA GGG
 NarI AsuII BanHI

430 Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
 ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCG CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC
 SacII BglII

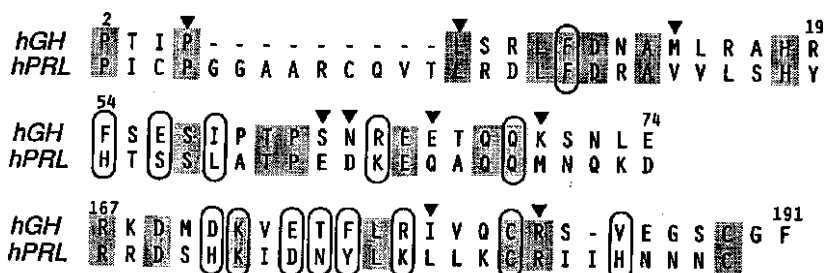
502 Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys
 AAG TTC GAC ACA AAC TCA CAC AAC GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TCG TTC AGG AAG

574 Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe AM*
 GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG TGC CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG
 MstI PvuII

【図9】



【図29】



【 10 A 】

1 5001 5002 5003 5004 5005 5006 5007 5008 5009 5010 5011 5012 5013 5014 5015 5016 5017 5018 5019 5020 5021 5022 5023 5024 5025 5026 5027 5028 5029 5030 5031 5032 5033 5034 5035 5036 5037 5038 5039 5040 5041 5042 5043 5044 5045 5046 5047 5048 5049 5050 5051 5052 5053 5054 5055 5056 5057 5058 5059 5060 5061 5062 5063 5064 5065 5066 5067 5068 5069 5070 5071 5072 5073 5074 5075 5076 5077 5078 5079 5080 5081 5082 5083 5084 5085 5086 5087 5088 5089 5090 5091 5092 5093 5094 5095 5096 5097 5098 5099 5100 5101 5102 5103 5104 5105 5106 5107 5108 5109 5110 5111 5112 5113 5114 5115 5116 5117 5118 5119 5120 5121 5122 5123 5124 5125 5126 5127 5128 5129 5130 5131 5132 5133 5134 5135 5136 5137 5138 5139 5140 5141 5142 5143 5144 5145 5146 5147 5148 5149 5150 5151 5152 5153 5154 5155 5156 5157 5158 5159 5160 5161 5162 5163 5164 5165 5166 5167 5168 5169 5170 5171 5172 5173 5174 5175 5176 5177 5178 5179 5180 5181 5182 5183 5184 5185 5186 5187 5188 5189 5190 5191 5192 5193 5194 5195 5196 5197 5198 5199 5200 5201 5202 5203 5204 5205 5206 5207 5208 5209 5210 5211 5212 5213 5214 5215 5216 5217 5218 5219 5220 5221 5222 5223 5224 5225 5226 5227 5228 5229 5230 5231 5232 5233 5234 5235 5236 5237 5238 5239 5240 5241 5242 5243 5244 5245 5246 5247 5248 5249 5250 5251 5252 5253 5254 5255 5256 5257 5258 5259 5260 5261 5262 5263 5264 5265 5266 5267 5268 5269 5270 5271 5272 5273 5274 5275 5276 5277 5278 5279 5280 5281 5282 5283 5284 5285 5286 5287 5288 5289 5290 5291 5292 5293 5294 5295 5296 5297 5298 5299 5300 5301 5302 5303 5304 5305 5306 5307 5308 5309 5310 5311 5312 5313 5314 5315 5316 5317 5318 5319 5320 5321 5322 5323 5324 5325 5326 5327 5328 5329 5330 5331 5332 5333 5334 5335 5336 5337 5338 5339 5340 5341 5342 5343 5344 5345 5346 5347 5348 5349 5350 5351 5352 5353 5354 5355 5356 5357 5358 5359 5360 5361 5362 5363 5364 5365 5366 5367 5368 5369 5370 5371 5372 5373 5374 5375 5376 5377 5378 5379 5380 5381 5382 5383 5384 5385 5386 5387 5388 5389 5390 5391 5392 5393 5394 5395 5396 5397 5398 5399 5400 5401 5402 5403 5404 5405 5406 5407 5408 5409 5410 5411 5412 5413 5414 5415 5416 5417 5418 5419 5420 5421 5422 5423 5424 5425 5426 5427 5428 5429 5430 5431 5432 5433 5434 5435 5436 5437 5438 5439 5440 5441 5442 5443 5444 5445 5446 5447 5448 5449 5450 5451 5452 5453 5454 5455 5456 5457 5458 5459 5460 5461 5462 5463 5464 5465 5466 5467 5468 5469 5470 5471 5472 5473 5474 5475 5476 5477 5478 5479 5480 5481 5482 5483 5484 5485 5486 5487 5488 5489 5490 5491 5492 5493 5494 5495 5496 5497 5498 5499 5500 5501 5502 5503 5504 5505 5506 5507 5508 5509 5510 5511 5512 5513 5514 5515 5516 5517 5518 5519 5520 5521 5522 5523 5524 5525 5526 5527 5528 5529 5530 5531 5532 5533 5534 5535 5536 5537 5538 5539 5540 5541 5542 5543 5544 5545 5546 5547 5548 5549 5550 5551 5552 5553 5554 5555 5556 5557 5558 5559 5560 5561 5562 5563 5564 5565 5566 5567 5568 5569 5570 5571 5572 5573 5574 5575 5576 5577 5578 5579 5580 5581 5582 5583 5584 5585 5586 5587 5588 5589 5590 5591 5592 5593 5594 5595 5596 5597 5598 5599 5600 5601 5602 5603 5604 5605 5606 5607 5608 5609 5610 5611 5612 5613 5614 5615 5616 5617 5618 5619 5620 5621 5622 5623 5624 5625 5626 5627 5628 5629 5630 5631 5632 5633 5634 5635 5636 5637 5638 5639 5640 5641 5642 5643 5644 5645 5646 5647 5648 5649 5650 5651 5652 5653 5654 5655 5656 5657 5658 5659 5660 5661 5662 5663 5664 5665 5666 5667 5668 5669 5670 5671 5672 5673 5674 5675 5676 5677 5678 5679 5680 5681 5682 5683 5684 5685 5686 5687 5688 5689 5690 5691 5692 5693 5694 5695 5696 5697 5698 5699 5700 5701 5702 5703 5704 5705 5706 5707 5708 5709 5710 5711 5712 5713 5714 5715 5716 5717 5718 5719 5720 5721 5722 5723 5724 5725 5726 5727 5728 5729 5730 5731 5732 5733 5734 5735 5736 5737 5738 5739 5740 5741 5742 5743 5744 5745 5746 5747 5748 5749 5750 5751 5752 5753 5754 5755 5756 5757 5758 5759 5760 5761 5762 5763 5764 5765 5766 5767 5768 5769 5770 5771 5772 5773 5774 5775 5776 5777 5778 5779 5780 5781 5782 5783 5784 5785 5786 5787 5788 5789 5790 5791 5792 5793 5794 5795 5796 5797 5798 5799 5800 5801 5802 5803 5804 5805 5806 5807 5808 5809 5810 5811 5812 5813 5814 5815 5816 5817 5818 5819 5820 5821 5822 5823 5824 5825 5826 5827 5828 5829 5830 5831 5832 5833 5834 5835 5836 5837 5838 5839 5840 5841 5842 5843 5844 5845 5846 5847 5848 5849 5850 5851 5852 5853 5854 5855 5856 5857 5858 5859 5860 5861 5862 5863 5864 5865 5866 5867 5868 5869 5870 5871 5872 5873 5874 5875 5876 5877 5878 5879 5880 5881 5882 5883 5884 5885 5886 5887 5888 5889 5890 5891 5892 5893 5894 5895 5896 5897 5898 5899 5900 5901 5902 5903 5904 5905 5906 5907 5908 5909 5910 5911 5912 5913 5914 5915 5916 5917 5918 5919 5920 5921 5922 5923 5924 5925 5926 5927 5928 5929 5930 5931 5932 5933 5934 5935 5936 5937 5938 5939 5940 5941 5942 5943 5944 5945 5946 5947 5948 5949 5950 5951 5952 5953 5954 5955 5956 5957 5958 5959 5960 5961 5962 5963 5964 5965 5966 5967 5968 5969 5970 5971 5972 5973 5974 5975 5976 5977 5978 5979 5980 5981 5982 5983 5984 5985 5986 5987 5988 5989 5990 5991 5992 5993 5994 5995 5996 5997 5998 5999 6000 6001 6002 6003 6004 6005 6006 6007 6008 6009 6010 6011 6012 6013 6014 6015 6016 6017 6018 6019 6020 6021 6022 6023 6024 6025 6026 6027 6028 6029 6030 6031 6032 6033 6034 6035 6036 6037 6038 6039 6040 6041 6042 6043 6044 6045 6046 6047 6048 6049 6050 6051 6052 6053 6054 6055 6056 6057 6058 6059 6060 6061 6062 6063 6064 6065 6066 6067 6068 6069 6070 6071 6072 6073 6074 6075 6076 6077 6078 6079 6080 6081 6082 6083 6084 6085 6086 6087 6088 6089 6090 6091 6092 6093 6094 6095 6096 6097 6098 6099 6100 6101 6102 6103 6104 6105 6106 6107 6108 6109 6110 6111 6112 6113 6114 6115 6116 6117 6118 6119 6120 6121 6122 6123 6124 6125 6126 6127 6128 6129 6130 6131 6132 6133 6134 6135 6136 6137 6138 6139 6140 6141 6142 6143 6144 6145 6146 6147 6148 6149 6150 6151 6152 6153 6154 6155 6156 6157 6158 6159 6160 6161 6162 6163 6164 6165 6166 6167 6168 6169 6170 6171 6172 6173 6174 6175 6176 6177 6178 6179 6180 6181 6182 6183 6184 6185 6186 6187 6188 6189 6190 6191 6192 6193 6194 6195 6196 6197 6198 6199 6200 6201 6202 6203 6204 6205 6206 6207 6208 6209 6210 6211 6212 6213 6214 6215 6216 6217 6218 6219 6220 6221 6222 6223 6224 6225 6226 6227 6228 6229 6230 6231 6232 6233 6234 6235 6236 6237 6238 6239 6240 6241 6242 6243 6244 6245 6246 6247 6248 6249 6250 6251 6252 6253 6254 6255 6256 6257 6258 6259 6260 6261 6262 6263 6264 6265 6266 6267 6268 6269 6270 6271 6272 6273 6274 6275 6276 6277 6278 6279 6280 6281 6282 6283 6284 6285 6286 6287 6288 6289 6290 6291 6292 6293 6294 6295 6296 6297 6298 6299 6300 6301 6302 6303 6304 6305 6306 6307 6308 6309 6310 6311 6312 6313 6314 6315 6316 6317 6318 6319 6320 6321 6322 6323 6324 6325 6326 6327 6328 6329 6330 6331 6332 6333 6334 6335 6336 6337 6338 6339 6340 6341 6342 6343 6344 6345 6346 6347 6348 6349 6350 6351 6352 6353 6354 6355 6356 6357 6358 6359 6360 6361 6362 6363 6364 6365 6366 6367 6368 6369 6370 6371 6372 6373 6374 6375 6376 6377 6378 6379 6380 6381 6382 6383 6384 6385 6386 6387 6388 6389 6390 6391 6392 6393 6394 6395 6396 6397 6398 6399 6400 6401 6402 6403 6404 6405 6406 6407 6408 6409 6410 6411 6412 6413 6414 6415 6416 6417 6418 6419 6420 6421 6422 6423 6424 6425 6426 6427 6428 6429 6430 6431 6432 6433 6434 6435 6436 6437 6438 6439 6440 6441 6442 6443 6444 6445 6446 6447 6448 6449 6450 6451 6452 6453 6454 6455 6456 6457 6458 6459 6460 6461 6462 6463 6464 6465 6466 6467 6468 6469 6470 6471 6472 6473 6474 6475 6476 6477 6478 6479 6480 6481 6482 6483 6484 6485 6486 6487 6488 6489 6490 6491 6492 6493 6494 6495 6496 6497 6498 6499 6500 6501 6502 6503 6504 6505 6506 6507 6508 6509 6510 6511 6512 6513 6514 6515 6516 6517 6518 6519 6520 6521 6522 6523 6524 6525 6526 6527 6528 6529 6530 6531 6532 6533 6534 6535 6536 6537 6538 6539 6540 6541 6542 6543 6544 6545 6546 6547 6548 6549 6550 6551 6552 6553 6554 6555 6556 6557 6558 6559 6560 6561 6562 6563 6564 6565 6566 6567 6568 6569 6570 6571 6572 6573 6574 6575 6576 6577 6578 6579 6580 6581 6582 6583 6584 6585 6586 6587 6588 6589 6590 6591 6592 6593 6594 6595 6596 6597 6598 6599 6600 6601 6602 6603 6604 6605 6606 6607 6608 6609 6610 6611 6612 6613 6614 6615 6616 6617 6618 6619 6620 6621 6622 6623 6624 6625 6626 6627 6628 6629 6630 6631 6632 6633 6634 6635 6636 6637 6638 6639 6640 6641 6642 6643 6644 6645 6646 6647 6648 6649 6650 6651 6652 6653 6654 6655 6656 6657 6658 6659 6660 6661 6662 6663 6664 6665 6666 6667 6668 6669 6670 6671 6672 6673 6674 6675 6676 6677 6678 6679 6680 6681 6682 6683 6684 6685 6686 6687 6688 6689 6690 6691 6692 6693 6694 6695 6696 6697 6698 6699 6700 6701 6702 6703 6704 6705 6706 6707 6708 6709 6710 6711 6712 6713 6714 6715 6716 6717 6718 6719 6720 6721 6722 6723 6724 6725 6726 6727 6728 6729 6730 6731 6732 6733 6734 6735 6736 6737 6738 6739 6740 6741 6742 6743 6744 6745 6746 6747 6748 6749 6750 6751 6752 6753 6754 6755 6756 6757 6758 6759 6760 6761 6762 6763 6764 6765 6766 6767 6768 6769 6770 6771 6772 6773 6774 6775 6776 6777 6778 6779 6780 6781 6782 6783 6784 6785 6786 6787 6788 6789 6790 6791 6792 6793 6794 6795 6796 6797 6798 6799 6800 6801 6802 6803 6804 6805 6806 6807 6808 6809 6810 6811 6812 6813 6814 6815 6816 6817 6818 6819 6820 6821 6822 6823 6824 6825 6826 6827 6828 6829 6830 6831 6832 6833 6834 6835 6836 6837 6838 6839 6840 6841 6842 6843 6844 6845 6846 6847 6848 6849 6850 6851 6852 6853 6854 6855 6856 6857 6858 6859 6860 6861 6862 6863 6864 6865 6866 6867 6868 6869 6870 6871 6872 6873 6874 6875 6876 6877 6878 6879 6880 6881 6882 6883 6884 6885 6886 6887 6888 6889 6890 6891 6892 6893 6894 6895 6896 6897 6898 6899 6900 6901 6902 6903 6904 6905 6906 6907 6908 6909 6910 6911 6912 6913 6914 6915 6916 6917 6918 6919 6920 6921 6922 6923 6924 6925 6926 6927 6928 6929 6930 6931 6932 6933 6934 6935 6936 6937 6938 6939 6940 6941 6942 6943 6944 6945 6946 6947 6948 6949 6950 6951 6952 6953 6954 6955 6956 6957 6958 6959 6960 6961 6962 6963 6964 6965 6966 6967 6968 6969 6970 6971 6972 6973 6974 6975 6976 6977 6978 6979 6980 6981 6982 6983 6984 6985 6986 6987 6988 6989 6990 6991 6992 6993 6994 6995 6996 6997 6998 6999 7000 7001 7002 7003 7004 7005 7006 7007 7008 7009 7010 7011 7012 7013 7014 7015 7016 7017 7018 7019 7020 7021 7022 7023 7024 7025 7026 7027 7028 7029 7030 7031 7032 7033 7034 7035 7036 7037 7038 7039 7040 7041 7042 7043 7044 7045 7046 7047 7048 7049 7050 7051 7052 7053 7054 7055 7056 7057 7058 7059 7060 7061 7062 7063 7064 7065 7066 7067 7068 7069 7070 7071 7072 7073 7074 7075 7076 7077 7078 7079 7080 7081 7082 7083 7084 7085 7086 7087 7088 7089 7090 7091 7092 7093 7094 7095 7096 7097 7098 7099 7100 7101 7102 7103 7104 7105 7106 7107 7108 7109 7110 7111 7112 7113 7114 7115 7116 7117 7118 7119 7120 7121 7122 7123 7124 7125 7126 7127 7128 7129 7130 7131 7132 7133 7134 7135 7136 7137 7138 7139 7140 7141 7142 7143 7144 7145 7146 7147 7148 7149 7150 7151 7152 7153 7154 7155 7156 7157 7158 7159 7160 7161 7162 7163 7164 7165 7166 7167 7168 7169 7170 7171 7172 7173 7174 7175 7176 7177 7178 7179 7180 7181 7182 7183 7184 7185 7186 7187 7188 7189 7190 7191 7192 7193 7194 7195 7196 7197 7198 7199 7200 7201 7202 7203 7204 7205 7206 7207 7208 7209 7210 7211 7212 7213 7214 7215 7216 7217 7218 7219 7220 7221 7222 7223 7224 7225 7226 7227 7228 7229 7230 7231 7232 7233 7234 7235 7236 7237 7238 7239 7240 7241 7242 7243 7244 7245 7246 7247 7248 7249 7250 7251 7252 7253 7254 7255 7256 7257 7258 7259 7260 7261 7262 7263 7264 7265 7266 7267 7268 7269 7270 7271 7272 7273 7274 7275 7276 7277 7278 7279 7280 7281 7282 7283 7284 7285 7286 7287 7288 7289 7290 7291 7292 7293 7294 7295 7296 7297 7298 7299 7300 7301 7302 7303 7304 7305 7306 7307 7308 7309 7310 7311 7312 7313 7314 7315 7316 7317 7318 7319 7320 7321 7322 7323 7324 7325 7326 7327 7328 7329 7330 7331 7332 7333 7334 7335 7336 7337 7338 7339 7340 7341 7342 7343 7344 7345 7346 7347 7348 7349 7350 7351 7352 7353 7354 7355 7356 7357 7358 7359 7360 7361 7362 7363 7364 7365 7366 7367 7368 7369 7370 7371 7372 7373 7374 7375 7376 7377 7378 7379 7380 7381 7382 7383 7384 7385 7386 7387 7388 7389 7390 7391 7392 7393 7394 7395 7396 7397 7398 7399 7400 7401 7402 7403 7404 7405 7406 7407 7408 7409 7410 7411 7412 7413 7414 7415 7416 7417 7418 7419 7420 7421 7422 7423 7424 7425 7426 7427 7428 7429 7430 7431 7432 7433 7434 7435 7436 7437 7438 7439 7440 7441 7442 7443 7444

【 10 F 】

```

2441 GCGGACGCG GCGAGARAGG AAGGGAAGAA ACGGAAGGA ACGGCGCGTA GGGCGCTGCC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACAC CACACCCGCC
CCGCTTGCC CGETCTTCC TTCCCTTCT TTCCCTTCT CCGCTTCT CCGCGCGCAT CCGCGCGCAT CCGCGCGCAT CCGCGCGCAT CCGCGCGCAT
sauIAI
mboI[dam-]
dpoI
alwI
xhoII
nlaIV
bstYI
bspIII
hgaI bamHI[M.mspI-]
thai mspI[X.bamHI-] kinPI
fnuDI aluI
bstUI[M.hhaI-]
msei fnu4HI
hinPI hinPI
hhaI hhaI
CGCTTATG CCGCGCTACA GCGCGCTCC GATCCCTGCC ICGCGGTTT CCGTGTGAC hphI mnlI
CGGAAITAC CCGCGGATGT CCGCGGAGG CTAGGACGG AGCGCGGAA GCGCACTAG CCACTTTGG AGACTGTGA CACTTTGG AGACTGTGA CACTTTGG AGACTGTGA
scriFI
ngII
mspi
hpaII
sfanI cauII
fokI cauII
aluI CAGCTTGTCT GTAAGCGAT CCGGAGACA GACAGCCCG TCAGCGCGG TCAGCGCGG TTGGGGGTG TCAGCGCGG GCCATGACC GCCATGACC AGTCAGGTAG
GTGAAACAGA CATTGGCCTA CCGCCCTCGT CIGTTCGGG AGTCCCGG AGTCCCGG AGTCCCGG AGTCCCGG AGTCCCGG AGTCCCGG AGTCCCGG
bsrI
accI
mseI
sfanI
accI
CGATAGCGGA GTGTATAGT GCTTAACAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCCACAGA TCGTAAGGA
GCTATCCGCT CACATATGAC CGAATTGATA CCGCCTAGTC TCCTCTAACA TCAGCTCTAC GTGERTATAG CCACACTTTA TGGCGTGTCT ACCGATCTT
hpaI
hinPI
hhaI
sfanI
mboII
hhaI
pleI bbvI
mnlI
mnlI
mnlI
mnlI
hhaI
hhaI
fnu4HI
fnu4HI
bbvI
bbvI
alul
alul
CCTTTATGG GTAGTCCGG AGAAGCGAA GGAGCGAGTG ACTGAGGAC GCGAGCCAGC AMGCCGAGC CCGTCCGCT AGTCCGCT AGTCCGCT

```


【 図 1 0 H 】

```

mboiI(dam-) sau3AI
sau3AI mboi(dam-)
dpni msei
xhoII alvi msei
khoII draf msei
bstyI khoII draf msei
alvi hphi bstyI ahaiII
TATCAAAAG GATCTCACC TAGATCCCTT
AACTAGAAA GATGCCCGAG ACTGGCGTC
3641 TTG:ICITTT CTACGGGTC TGACGCTCAG TGGACGAAA ACTCAGTTA AGGATTTG
GTCATGAGAT TATCAAAAG GATCTCACC TAGATCCCTT
AACTAGAAA GATGCCCGAG ACTGGCGTC
TCCCTAAAC CAGTACTCTA ATACTTTTC CTAGAAGTGG ATCTAGGAAA
nlaIV nlaIV sau3AI
hgICI hgICI mboi(dam-)
bani bani msei mboi(dam-)
mli mli ddei dpni
msei msei ddei dpni
CTTAATCAGT GAGGCACCCTA TCTCAGCGAT
GAATGATCA CTCGCTGGAT AGATCCGTA
sau96I(M.haeIII-)
nlaIV nlaIV thal
haeIII fnu4HI fnuDI
asuI bsrI bbyI bsrUI
CCACTGGCC CCAGTCTCC AATGATCCG
GGTACGCCG GGTACGCCG ITACTAEGG
3741 TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
GTTACCAATG GAGGCACCCTA TCTCAGCGAT
ACTCAATTA ACTCAATTA ACCAGATGT CAATGCTAC
mli mli
GGAGGCTTA CCATCCGAT CTCCCGAT
haeIII
sau96I(M.haeIII-)
mspi sau96I
hpaiI asuI hnei foki
bgli(M.haeIII-) hhai asuI mli bsrI
CGAAGGCC GAGCGCAGA GTGCTCTGC ACTTATGCC CCTCCATCC
CGATGGCG AGCTTATTT TGTCTGCTG CCTTCCCG CTGCCCTCT CACCAGGAG TTGAATAGG CGGAGGTAGG
3841 CTCTCTATTT CGTTCACCA TACTTCCCTG ACTCCCCCTC GTGTGATTA CTACGATAC GTAGGCTTA
CTACGATAC GTAGGCTTA
GATCTATTT GATCTATTT GATCTATTT GATCTATTT GATCTATTT GATCTATTT
flei fnei
nliII nliII
TACTTCCCTG ACTCCCCCTC GTGTGATTA CTACGATAC GTAGGCTTA
CTACGATAC GTAGGCTTA
AICACGGAC TGAGGGGCG CACTCTATTT GATCTATTT GATCTATTT GATCTATTT
foki
sau96I
mspi
hpaiI
hphi nlaIV
CGACCCCG CCTCAGCGG
cauII cauII
scrFI
ncII
mspi
hpaiI
mspi
hpaiI
alvi alvi alvi
cauII cauII cauII
1011 AGTCTATTA TTGTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTC GCACGTTAT AGTTTGGCA AGCTTGGC
CATGCTGCA GGCTCCTGG IGTCACGCTC
TCAATATTT AACACCGCC CTTCGATCTC ATTGATCAAG CGGTCAATA TCARAAGCT TCARACAG
CGTACGCTC CGTACGCTC
sau3AI
mboi(dam-)
mspi dpni mli
hpaiI alvi sau96I
alvi nlaIV alvi avaiI
alvi nlaIV nlaIV alvi
1141 GTCCTTGGT ATGGTTCAT TCACTCCCG ITCCACAGA TCAAGCCGAG TTACATGAT CCCCACTGG
TCGAAAAG CGGTATGCTC CTCCGGTCT
TACGAAATG AGTCCAGCC AAGGTCTGT AGTTCCGCTC AATGATCAAG CGGTACTAG GGGGTACAC
ACGTTTTTC GCCAATCCAG GAAGCCAGGA

```

【 10 I 】

```

sau3AI          fnu4HI
mboI(dam-)     haeIII
dpmI
pvuI
4241 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTGGCCGCA GTGTATGAC TCATGGTTAT GGACGCACTG CAVANTATC TCACCTGTCAT GCATCCGTA AGATGCTTTT sfANI
GGCTAGCAC AGCTTTCAT CAGCCGGGT CACAATAGT AGTACCAATA CCTCTGTGC GTATTATGCG AATGACAGTA CGGTAGGCAT TCTACGAAA nlaIII
          ahaII[M.hpaII-]
          mspI          hinPI
          hpaII         hhaI
          scrFI        hindII  thai
          nciI hgaI          fnuDII
          cauII hincII       bstUI[M.hhaI-]
          CGGGGACACA
          CGCCAGTGT GCCCTATTAT GCGCGGTGT
          hsrI
          sau3AI
          mboI(dam-)
          dpmI
          xhoII         alwI
          bstYI        xhoII
          alwI         bstYI
          alwI         taqI
          xmnI
          mboII
          fnu4HI
          ddeI
          fnu4HI
          GGTATGCGG CGACCGAGTT GCCTTGGCC GCGTCAACA CGGGATAATA CCGGGCACACA
          CACATAGCC CAGTATGAGT TGGTTCAGT AGACTCTAT CACATAGCC CAGGACCGG CGAGGACCG GCCAGTGT GCCCTATTAT GCGCGGTGT
          hphI rsaI
          bsrI scaI
          CTGTGACTGG TGRGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCCTTGGCC GCGTCAACA CGGGATAATA CCGGGCACACA
          GACACTGACC ACATATGAGT TGGTTCAGT AGACTCTAT CACATAGCC CAGGACCGG CGAGGACCG GCCAGTGT GCCCTATTAT GCGCGGTGT
          mseI
          draII hgiAI
          anaIII bspI286
          T-CCGCAACT TTAAGTGC TCATCATGG AATCGTCT TCGGGCGGA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTGAGT CAGTTCGAT GTACCCACT
          ATCGCTTGA AATTTTCAGC AGTAGTAACC TTTTGAAGA AGCCCGCTT TTGAGAGTTC CTAGAATGCC GACAACCTCA GGTCAAGCTA CATTTGGTGA
          hjiAI
          bspI286
          apaLI dpmI sfANI fnu4HI
          CGTGCACCA ACTGATCTC ACGATCTTT ACTTACCA CCGTTCTGG GTGACRAAA ACAGGAAGGC AATATCCCG AAAAAAGGA ATAAGGGCA
          GACCGTGGT IGACTAGAG TGTAGAAAA TGAATGTTT TGAATGTTT TGCTCTCCG TTTTACGGG TTTTTCCTT TATTCCCGT
          mboII
          bstYI
          hpaII
          bspHI
          bstYI
          bsmAI
          sspI
          4541 CACGGAAATG TTGAAATCTC ATACTCTCC TTTTCAATA TTATGTAACC ATTTATCAGG GTTATGCTCT CARGACCGG TACTATTTG AATGATTTA
          GTGCCCTTAC AACTATAGG TATGAGAGG AATAGTTAT AATACTTCC TAAATGTC CAATAACGCA GTACTGCCCT ACGTAAAC TTCAATAAT

```

【図10J】

```

4741 GAAATATAA GAATAGGGG TTCGGCCAC ATTTCGCCA AAGTGGCCAC CTGACGTCFA AGAACCATT ATTATCATGA CATTACCTA TAAATATAGG
      CTTTATTT GTTTCGCC TAGGGCGTG TAANGGGCT TTTCAGGCTG GACTGCAGAT TCTTGGTAA TAANAGTACT GTATTTGGAT AITTTATGCC

      hlnPI
      hhai
      thai
      fndDII
      nlaIV bsvUI[M.hhai-]
      nlaIII bspMI
      ahaII acyI ddeI
      acyI ddeI
      aaII
      sau9bI[M.haeIII-]
      haeIII
      asuI
      ecoO109I
      mli
      mboII
4841 CGATACCGA GCGCCITTCG ICTTCRA
      GGNAGTCT CCGGGTAGC AGAAGTT

      ^length: 4867
aatI(GAGCTC):
accI(GTATAC):
accIII(TCCGGA):
acyI(GRCGYC):
ahaII(GRCGYC):
ahuI(-GCT):
alaI(GGATC):
aloII(CGGNMCTG):
apaI(GGGCC):
apali(CTGCAC):
aseI(ATAAT):
ashI(GMCC):
ashI(TTCCAA):
asaI(CYCGG):
asaII(GGACC):
avaIII(RTGCAT):
baII(TGCCA):
bamHI(GGATCC):
banI(GGYRCC):
banII(GRCGYC):
bbvI(GCAGC):
bclI(dam-)(TGATCA):

```

【図10K】

bqiI(GCCNNRNGGC):
 867
 bqiI(GGATCT):
 182 455 1390
 bqmI(GAATGC):
 295 977 2631 3942 4707
 f-pai(GTCTC):
 504(M.haeIII-) 677(M.aluI-) 719 1502 2408 2798 3296 4457 4542
 f-p2p9(GGCHC):
 3702 4710 4815
 f-pmI(TCAIGA):
 792
 f-pmI(GCCTGC):
 1701 2108 2568
 baeII(TCCGA):
 706 860 1220 1547 1818 1842 2250 2729 2757 3385 3398 3515 3921 4039 4082 4346
 baeI(CTGG):
 4521
 778
 baeII(TTGGAA):
 541 757 1140 1479 3009 3130 3143
 baeII(CGCG):
 211(M.hhaI-) 647 855 1271 1281 1426 1452 1574 1671 2043 2144 2520(M.hhaI-) 2540(M.hhaI-)
 f-pmI(GCGG):
 2564(M.hhaI-) 2582(M.hhaI-) 2584(M.hhaI-) 2687(M.hhaI-) 3028 3609(M.hhaI-) 3939
 4432(M.hhaI-) 4764(M.hhaI-)
 750
 baeII(CGARRNRNRTGG):
 816 867 1704 2105 2571 3623 3634 3720 3732 4500 4517
 baeII(AGATCY):
 733
 baeII(CCTTAGG):
 1180 1295 1521 1849 2627 2662 3361 4057 4408
 baeII(CGCG):
 290 1481 4263
 baeII(GGCCR):
 625
 baeI(CTCGAT):
 57 473 619 734 1618 1780 2792 3257 3666 3832 4372 4798
 baeI(CTNSG):
 139 817 868 1498 1705 2106 2572 3549 3624 3643 3721 3733 3838 4179 4197
 baeI(GATC):
 4243 4501 4518 4554
 3739 3758 4450
 2332
 baeI(ITPAA):
 290 1481 4263
 baeII(CACNNMGTC):
 290
 baeI(YGGCCR):
 290
 baeI(CGCGG):
 551 2860 4664
 baeI(CTCTTC):
 733
 baeII(CCTNAGG):
 793
 baeII(CCTNRRNAGG):
 801 1475(dcm-) 1517 4850
 baeI(GAATC):
 1
 baeII(CGATC):
 541 757 1140 1479 3009 3130 3143
 1195
 baeII(GATGC):
 204 207 697 849 940 1002 1017 1033 1236 1245 1324 1443 1446 1453 1467 1596 1599
 1722 1803 2516 2538 2552 2621 2718 2771 2887 2905 2908 3026 3181 3324 3389 3392
 3598 3926 4115 4265 4292 4387 4616
 211 647 855 1271 1281 1426 1452 1574 1671 2043 2144 2520 2540 2564 2582 2584
 2687 3028 3609 3939 4432 4764
 238 703 1123 1143 1718 1807 1885 2046 2657 3855 4036 4323
 987 1393 1491 4095
 baeI(TGCGCA):
 555 1481 2995 3006 3458
 baeI(KGCCR):
 153 767 1242 1681 1764 2484 2492 2856 3226
 baeII(RGCGCY):
 291 505 556 1183 1298 1482 1986 2186 2328 2996 3007 3025 3459 3917 3997 4264
 4851

【 1 0 L 】

```

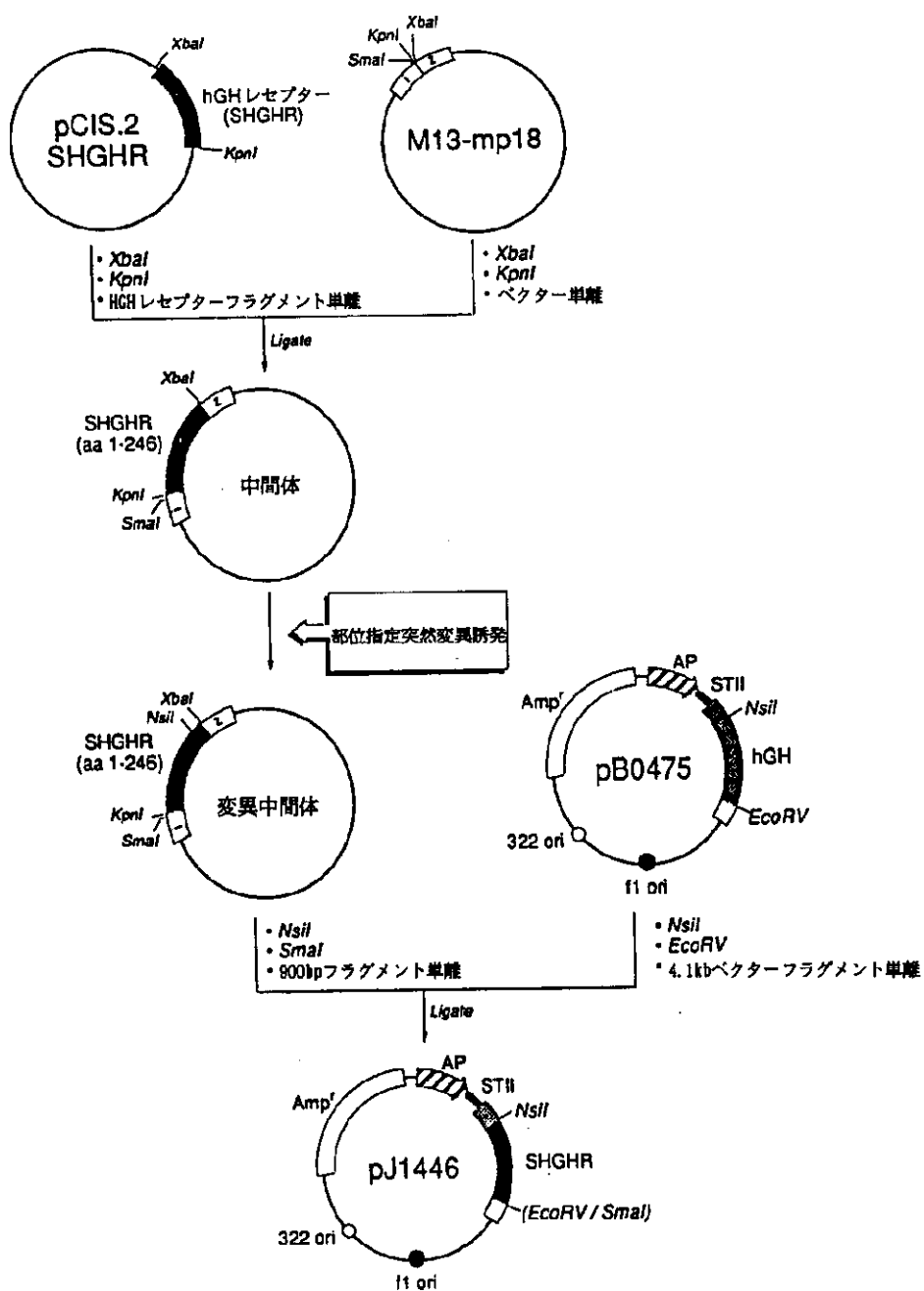
hgat(GACCC):
hgat(GAGCWC):
hgici(GVRC):
hgajii(GRGCCY):
hgai(GCC):
hamp(CCGC):
hancii(GTYRAC):
hancii(GTYRAC):
71 691
623[M.taqi-] 628[M.taqi-] 776[M.taqi-] 1141[M.hphi-] 1562[M.hphi-] 2068 2264
2286 2882 2957 3353 3870
1171 1180 1295 1321 1522 1702 1849 2109 2439 2569 2628 2662 3189 3336 3362 3352
3956 3990 4057 4167 4409
380 1136 1344 1585 2346 2592 2601 3726 3953 4349 4575 4590
409 514 551 744 842 870[dam-] 1638 2465 2861 3632[dam-] 3723[dam-] 4478 4556[dam-]
4665 4861
139 817 868 1498 1705 2106 2572 3549 3624 3635 3643 3721 3733 3838 4179 4197
4243 4501 4518 4554
148 163 241 372 378 554 606 610 639 650 682 736 771 809 835 1013 1125 1185 1265
1303 1330 1516 1830 1888 1944 2372 2579 2609 2871 3097 3154 3421 3821 1902 4032
4238 4849
69 257 324 1044 1066 1757 1979 2011 2125 2136 2148 2159 2176 2274 2545 2763
3688 3740 3745 3759 3812 4047 4086 4451 4823
1171 1180 1295 1321 1522 1702 1849 2109[M.bamHI-] 2439 2569[M.bamHI-] 2628 2662
3189 3336 3362 3552 3956 3990 4057 4167 4409
987 1393 1491 4095
733
1320 2438
767
1180 1295 1521 1849 2627 2662 3361 4057 4408
2804
523[M.aluI-] 1239
40 964 1288 1495 1629 1854 1918 1983 2618 2723 2983 3703 4194 4204 4282 4318
4711 4816
504 767 816 1086 1129 1291 1326 1361 1475 1518 1797 2105 2374 2395 2407 2571
3012 3051 3823 3917 3958 4169 4759
646
nruI(TCCGCA):
nsli(ATGCAT):
451
nspcix(RCATGY):
1853 2617 2982
716
pber7I(CTCGAG):
p1mi(CCRNNNTGG):
14 1352 1401
p1ei(GGTC):
2264 2286 2882 3353 3870
ppuMI(RGGWCCY):
801 1475 1517
psti(CTGCAG):
590 4116[M.HI-]

```

【図10M】

PvuI(CGATCG):
 PvuII(CAGCTG):
 PstI(GTAC):
 SacI(GAGCTC):
 SacII(CCGCGG):
 SalI(GTCGAC):
 SmaII(GATC):
 Sma996I(CGGCC):
 4242
 270 1018[M.HI-]
 159 342 787 1174 2789 4354
 677
 854
 477
 139 817 868 1498 1705 2106 2572 3549 3624 3635 3643 3721 3733 3838 4179 4197
 4243 4501 4518 4554
 504[M.haeIII-] 505[M.haeIII-] 802 1182[M.haeIII-] 1297[M.haeIII-] 1476[dcM-]
 1518 1797 1986[M.haeIII-] 2328[M.haeIII-] 3917[M.haeIII-] 3996[M.haeIII-] 4013
 4235 4851[M.haeIII-]
 4353
 1180 1295 1521 1849 2627 2662 3361 4057 4408
 541 757 1140 1479 3009 3130 3143
 175 237 416 990 1144 1214 1458 1710 1719 1806 1884 1947 2658 2774 2829 2850
 3070 4122 4332 4562
 217
 3081(TACGTA):
 SpeI(ACGATG):
 338
 739I(AATATT):
 677
 555
 567 1406
 478 486 626[M.claI-] 717 779 894 975 1305 2370 3082 4526
 211 647 855 1271 1281 1426 1452 1574 1671 2043 2144 2520 2540 2564 2582 2584
 2687 3028 3609 3939 4432 4764
 968 2726
 368
 716
 816 867 1704 2105 2371 3623 3634 3720 3732 4500 4517
 290
 623 2068 4470
 Not found:
 AtfII(CTTAAAG), Asp718(GGTACC), AvrII(CCTAGG), BssHII(GCGGGC), BstEII(GGTNACC), EspI(GCTNAGC), HpaI(GTTAAC),
 KpnI(GGTACC), MluI(ACGGT), NcoI(CCATGG), NotI(CGGGGCC), PstII(CGGWCCG), SfiI(GCCNNNNGGCC), SmaI(CCCGGG),
 SphI(GCATGC), XmaI(CCCGGG)

【図11】



【 1 2 B 】

dralii
 hphi ddei
 357 AAC TTC ACC AAG TGC CGT TCA CCT GAG CGA GAG ACT TTT TCA TGC CAC TGG ACA GAT GGT GAT CAI
 TTT AAG IGG TTC ACG GCA AGT GGA CTC GCT CTC TGA AAA AGT ACC CTG ACC TGT CTA CTC CAA GTA CCA TGT TTC ITG
 34 Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn

 sau96I
 nlaiV
 avaiI
 asuI
 ppuMI
 ecc0109I
 638 CTA GGA CCC ATA CAG CTG TTC TAT ACC AGA AGG AAC ACT CAA GAA TGG ACT CAA GAA TGG AAA GCA TGC CCT GAT IAT GTT
 GAT CCT GGG TAT GTC GAC AAG ATA TGG TCT TCC TTG TGA GAT GAT CTT ACC TTT CTT ACG GGA CTA ATA CAA
 61 leu Gly Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val

 aluI
 pvuII
 mseI
 719 TCT GCT GGG GAA AAC ACC TGT TAC TTT AAT TCA TCG TTT TCC TTC ATC CCT TAT TGT ATC AAC CTA ACT AGC AAT
 AGA CGA CCC CTT TTG TCG ACA ATG AAA IAA ACT ACC AAA TGG AGC TAG ACC TAT CGA ATA ACA TAG TTC GAT TGA TCG TTA
 88 Ser Ala Gly Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn
 these first 9 bases differ from 262 and 265

 foki
 800 GGT ACA CTC GAT GAA AAG TGT TTC TCT GTT GAT GAA ATA CTG CAA CCA GAT CCA CCC ATT GCC CTC AAC TGG ACT TTA
 CCA CCA TGT CAC CTA CTT TTC ACA AAG AGA CAA CTA CTT TAT CAC GAT GGT CTA GGT GGG TAA CGG GAG TTG ACC IGA AAT
 115 Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu

 bserI
 mseI
 881 CTC AAC GTC AGT TTA ACT GGG ATT CAT GCA GAT ATC CAA GTG AGA TGG GAA GCA CCA CCT ANT GCA GAT ATT CAG AAA GGA
 GAC TTG CAG TCA AAT TGA CCC TAA GTA CCG CTA TAG GAT CAC TCT ACC CTT CCG TTA CGT CTA TAA GTC TTT CCF
 142 Leu Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly

 foki
 962 TGG ATG GTT CTG GAG TAT GAA CTT CAA TAC AAA GAA GTA AAT GAA ACT AAA TGG AAA ATG ATG GAC CCT ATA TTG ACA ACA
 ACC TAC CAA GAC CTC ATA CTT GAA GTT ATG TTT CTT CAT TTA CTT TGA TTT ACC TTT TAC TAC CTG GGA TAT AAC TGT TGT
 169 Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr Thr

【 1 2 C 】

```

sau3AI
mboI[dam-]
dpmI
alwI
xhoII
bstVI
1043 TCG GTT CCA GTG TAC TCA TTG AAA GTG GAT AAG GAA TAT GAA GTG CGT GCG AGA TCC AAA CAA CGA AAC TCI GGT AAT TAT
AGT CAA GGI CAC AIG AGT AAC TTT CAC CTA TTC CTT ATA CTT CAC GCA CAC TCT ACC TTT CTT CCT TTG AGA CCT TTA ATA
196 Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr
bseI rseI
1124 GGC GAG TTC AGT GCG GTC CTC TAT GTA ACA CTT CCT CAG ATG AGC CAA TTT ACA TGT GAA GAA GAT TTC TAC TAG CG
CCG CTC ANG TCA CTC CAC GAG ATA CAT TGT GAA GGA GTC TCG GTT AAA TGT ACA CTT CTT CTA AAG ATG ATC GC
223 Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln Phe Thr Cys Glu Glu Asp Phe Tyr AM*
mseI
hpaI
hindII
hincII
thai
fnuDII
bstUI
fnu4HI
1201 GCCCGCTTAA CTTGTTTATT GCAGCTTATA ATCGTTACAA ATAAACCAAT AGCATCACAA ATTCACAAA TAAAGCATTT TTTTCACTGC ATTCTAGTTG
CGCGCCATTT GAACAAATAA CGTCGAATAT TACCAATGTT TATTTCGTTA TCGTAGTGTG TAAAGTCTTT ATTTCCGTAA AARAGTGAGG TAAGATCAAC
hsaIII
xmaIII
eagI
eaeI
cfrI
notI
fnu4HI
nlaIII mboII
nspCIX mboII
1101 TCGTTTCTCC AACCTCATCA ATGTATCTTA TCATGTGTTG ATGCCATCGT CCATFTCCGAC AGCATGCCA GTCACATATGG CGTGTGCTA GCGCCGCCCT
ACCAACAGG TTGAGTAGI TACATAGAT AGTACAGCC TAGGGTAGCA GGTAAAGGCTG TCGTAGCGGT CAGTCATACC GCACCGCGAT CGCGCGCGGA
sau3AI
mboI[dam-]
dpmI
alwI
xhoII
nlaIY
bstVI
bamHI
nlaIII alwI
sfanI bseI
fnu4HI hhaI
bbeI haeII
fnu4HI
nheI hinPI
fnu4HI hhaI
bbeI haeII
CGTGTGCTA GCGCCGCCCT
GCACCGCGAT CGCGCGCGGA

```


【 1 2 J 】

```

sau3AI          sau3AI          bsKI
mboI(dam-)      mboI(dam-)      bspI286
dppI            dppI            apali
xhoII          xhoII          hgiAI
bstYI          bstYI          bspI286
alVI           alVI           apali
alVI           alVI           taqI
CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCCACTCG TGCACCCAAC
TTTTACGGAG TAGTAACCTT TTGCAGAAG CCCCGCTTTT GAGAGTTCCT AGAATGGCGA CACTCTAGG TCAAGCTACA TTGGGTGAGC ACGTGGGTTG
mboII(dam-)
sau3AI
mboII(dam-)
dppI
xhoII
bstYI
alVI
alVI
xnuI          mboII
ATCATTGGAA AACCTTCTC GGGCGAATA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCCACTCG TGCACCCAAC
TTTTACGGAG TAGTAACCTT TTGCAGAAG CCCCGCTTTT GAGAGTTCCT AGAATGGCGA CACTCTAGG TCAAGCTACA TTGGGTGAGC ACGTGGGTTG
mboII(dam-)
sau3AI
mboII(dam-)
dppI          sfaNI          hphI
ACTAGAAGTC GTTGAATATG AAGTGGTGC CAAAGACCCA CTGGTTTITG TCCTTCCGTT TTACGGGCTT TTTCCCTTA TTCCCGCTGT GCCTTTACA
fnu4HI
AGRAAGGCA AATGCCGCA ARAAGGAT  BAGGGGACA CGGAAATGTT
TTCCTCCGTT TTTCCCTTA TTCCCGCTGT GCCTTTACA
hphI
TTTCARATTT AITGAAGCAT TTATCAGGT TATTCTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATPAAACA
CTTATGAGTA TGAGAGGAA AAGTITATA TAACTTCGTA AATAGAGAT ATACAGAGT ACTCGCTAT GTATAAATCT TTTATTTGT
sspI
TTCARATTT AITGAAGCAT TTATCAGGT TATTCTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATPAAACA
CTTATGAGTA TGAGAGGAA AAGTITATA TAACTTCGTA AATAGAGAT ATACAGAGT ACTCGCTAT GTATAAATCT TTTATTTGT
shaII
acyI ddeI          nlaIII
aatII            bspHI            mseI
GACCTTAAG AAACNTAT TATCAGACA TTAACCTATA AAAATAGCGG TATCAGGAGG
ACTGCGTTC AAGGGCTTT TCACGGTGA
nlaIV          bstUI(M.hhaI-)
TTATCCCAA GCCCGTSTA AAGGGCTTT TCACGGTGA
mboII
CCCTTCTCTC TTTCA
GGGAAAGCAG AAGTT
length: 5015
aatII(GACGTC): 4941
accI(GTAKAC): 2901
accIII(TCCGGG): 1849 2256 2716
acyI(GRCGYC): 4559 4941
ahaII(GRCGYC): 4559(M.hpaII-) 4941
chaII(TTAAK): 3887 3906 4598
e'nuI(AACT): 72 203 271 481 651 734 786 1223 2184 2241 2314 2571 2771 2790 3071 3297 3387
3433 3630 4211 4311 4374

```

【図12K】

asmI(GGATC):	851 1095 1339 1340 1852 2253 2254 2719 2720 3697 3771 3783 3868 3881 4345 4648
4666	
4841	
apalI(CGGNXCIG):	3841
3946 3444 4690	
4194	
aseI(ATATAT):	641 1024 1445 1624 1666 1945 2134 2476 4065 4144 4161 4383 4999
aswI(GGKCC):	1610
atwI(CYCGRG):	641 1024 1624[dcw-] 1666 1945 4161 4383
awwI(GGACC):	453
axwI(ATGCAT):	637
aywI(CCTAGG):	1629[dcw-]
balI(TGCCCA):	1339 2253[M.mspI-] 2719[M.mspI-]
bamHI(GGATCC):	1474 2522 3971
banI(GGYRCC):	2556
baulI(GRGCYC):	204 207 479 1221 1384 1591 1615 1744 1747 1870 2664 2769 2866 3035 3053 3472
bbsI(GCAGC):	3537 3540 3746 4074 4263 4440
bclI(dam-)(TGATCA):	138
bglI(GCCNNNNNGGC):	4137[M.haeIII-]
bhmI(CAATCC):	182 701 1289 1538
bmal(GTCTC):	293 587 2779 4090 4855
bspI286(GDGGCHC):	495 1139 1650 2556 2946 3444 4605 4690
bspHI(TCATGA):	3850 4858 4963
bspRII(TCCGGA):	1849 2256 2716
bstI(ACGG):	603 870 896 1049 1368 1695 1966 1990 2398 2877 2905 3533 3546 3663 4069 4187
4230 4494 4669	
bstNI(CCWGG):	501 524 1627 3157 3278 3291
bstUI(CCGG):	211[M.hhaI-] 1203 1419 1429 1574 1600 1722 1819 2191 2292 2668[M.hhaI-] 2688[M.hhaI-]
2712[M.hhaI-] 2730[M.hhaI-] 2732[M.hhaI-] 2835[M.hhaI-] 3176 3757[M.hhaI-] 4087	
4580[M.hhaI-] 4912[M.hhaI-]	
850 1094 1339 1852 2253 2719 3771 3782 3868 3880 4648 4665	
1443 1689 1927 2775 2810 3509 4205 4556	
290 1199 1629 4411	
57 488 546 579 1158 1766 1928 2940 3405 3814 3980 4520 4946	
139 851 1095 1340 1646 1853 2254 2720 3697 3772 3783 3791 3869 3881 3986 4327	
4345 4391 4649 4666 4702	
3887 3906 4598	
562 2480	
dralI(TTTAA):	290 1199 1629 4411
dralI(CACNNNGTG):	290 1199
eaeI(YGGCCR):	3008 4812
eagI(CGGCCG):	640 1623[dcw-] 1665 4998
earI(TCTTTC):	1
eco01091(RGGNCCY):	1
ecori(CAATTC):	501 524 1627 3157 3278 3291
ecoriI(CCWGG):	911
ecorII(CATATC):	

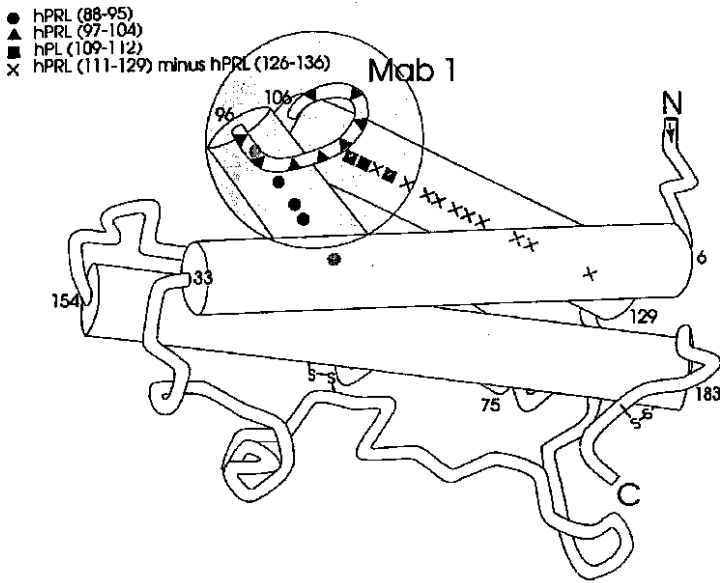
【図12L】

```

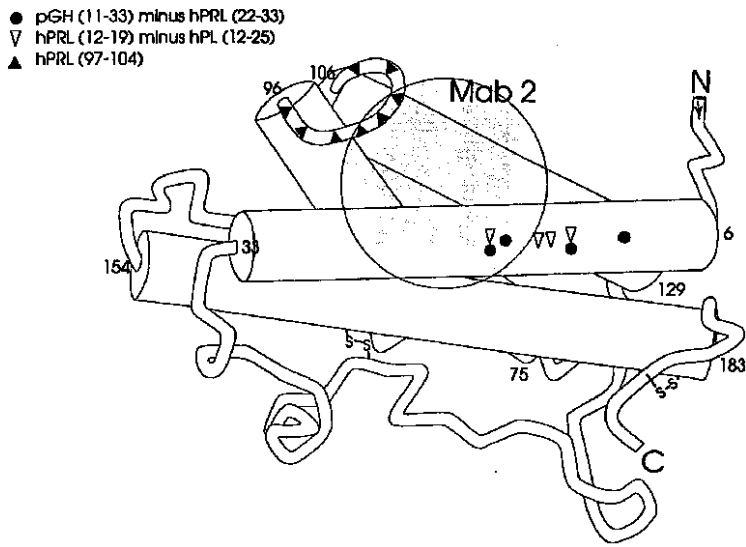
fmr4HI(GC)CC):
1951 2664 2686 2700 2769 2866 2919 3035 3053 3056 3174 3329 3472 3537 3540 3746
4074 4263 4413 4440 4535 4764
fmrPII(CCGG):
111 1203 1419 1429 1574 1600 1722 1819 2191 2292 2668 2688 2712 2730 2732 2835
3176 3757 4087 4580 4912
fokI(GGATG):
238 811 959 963 1866 1955 2033 2194 2805 4003 4184 4471
1541 1639 4243
fspI(TCCGA):
471 526 1629 3143 3154 3606
haeI(AGGCCW):
153 1390 1829 1912 2632 2640 3004 3374
haeII(PGCGY):
291 472 527 1200 1446 1630 2134 2334 2476 3144 3155 3173 3607 4065 4145 4412
4999
hpaI(GCCGC):
1425 1575 2189 2713 2836 3232 3810 4560
495 1139 1650 2946 3444 4605 4690
1474 2522 3971
2556
hpnPI(GCCG):
112 154 210 1391 1542 1604 1640 1830 1913 2633 2641 2667 2689 2711 2731
2834 2864 3003 3038 3308 3375 3475 3649 3758 4151 4244 4581 4913
112 154 210 1391 1542 1604 1640 1830 1913 2633 2641 2667 2689 2711 2731
2834 2864 3003 3038 3375 3475 3649 3758 4151 4244 4581 4913
1206 4562
1206 4562
71
505 685 901 1489[M.hphi-] 1710[M.hphi-] 2216 2412 2434 3030 3105 3501 4018
1206
1443 1469 1670 1850 1997 2257 2587 2717 2776 2810 3337 3484 3510 3700 4104 4138
4205 4315 4557
380 561 575 1492 1713 2494 2740 2749 3874 4101 4497 4723 4738
409 542 1181 1184 1786 2613 3009 3780[dam-] 3871[dam-] 4626 4704[dam-] 4813
5009
mboI(dam-)(GATC):
139 851 1095 1340 1645 1853 2254 2720 3697 3772 3783 3791 3869 3881 3986 4327
4345 4391 4649 4666 4702
148 163 241 372 378 470 614 759 865 1136 1157 1413 1451 1478 1664 1978 2036
2092 2520 2727 2757 3019 3245 3302 3569 3969 4050 4180 4386 4997
69 257 324 519 744 893 1207 1905 2127 2159 2273 2284 2296 2307 2324 2422 2693
2911 3836 3888 3893 3907 3960 4195 4234 4599 4971
1443 1469 1670 1850 1997 2257[M.bamHI-] 2587 2717[M.bamHI-] 2776 2810 3337 3484
3510 3700 4104 4138 4205 4315 4557
1541 1639 4243
1468 2586
1443 1669 1997 2775 2810 3509 4205 4556
2952
nheI(GCTAGC):
1387

```

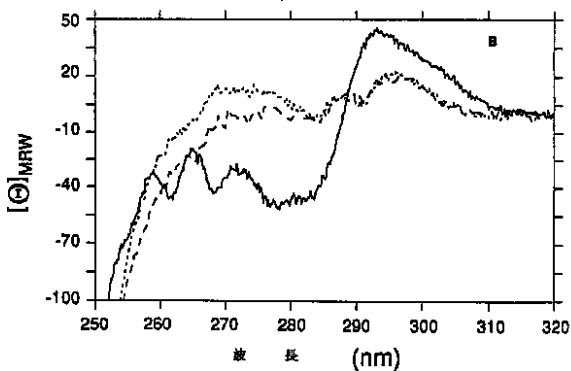

【図13】



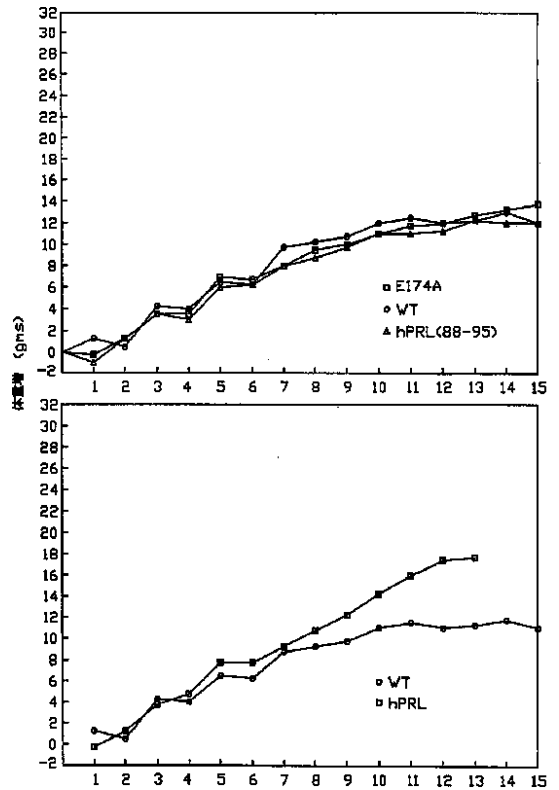
【図14】



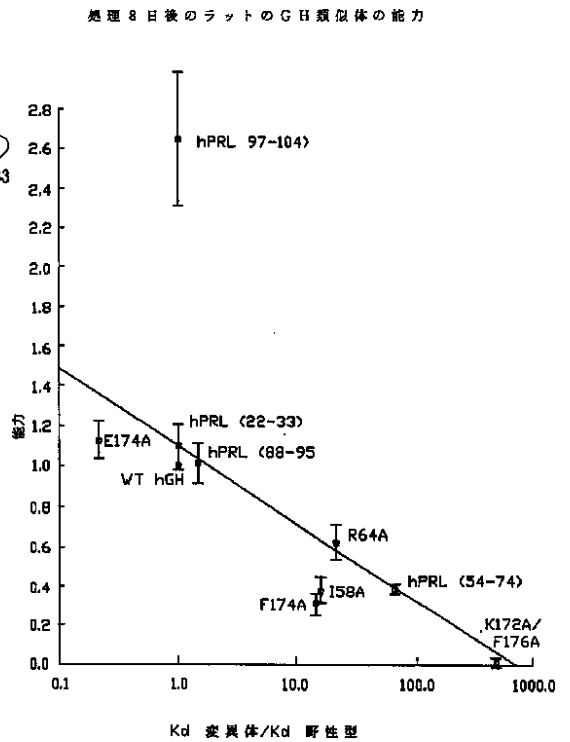
【図28B】



【図22】

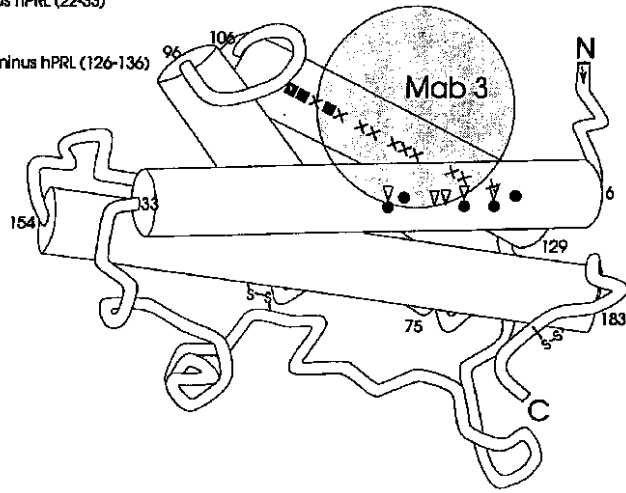


【図23】



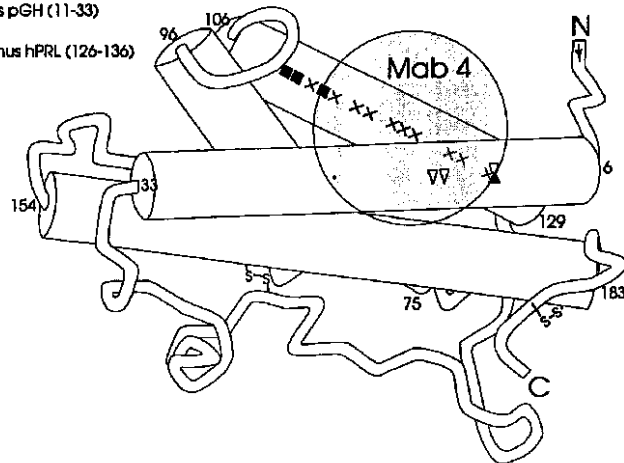
【図15】

- pGH (11-33) minus hPRL (22-33)
- ▲ hPL (12-25) minus hPRL (22-33)
- ▽ hPRL (12-79)
- hPL (109-112)
- × hPRL (111-129) minus hPRL (126-136)



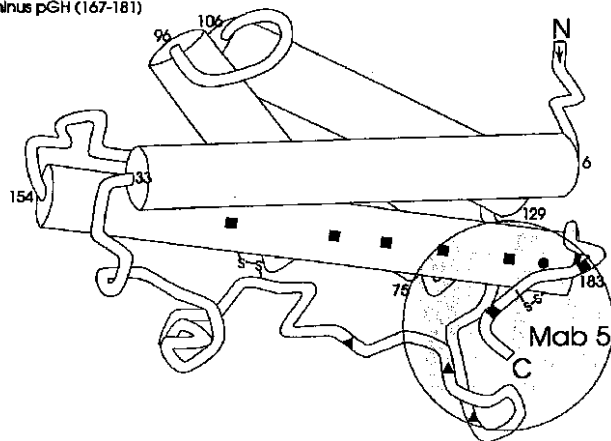
【図16】

- ▲ hPL (12-25) minus pGH (11-33)
- ▽ hPRL (12-19) minus pGH (11-33)
- hPL (109-112)
- × hPRL (111-129) minus hPRL (126-136)



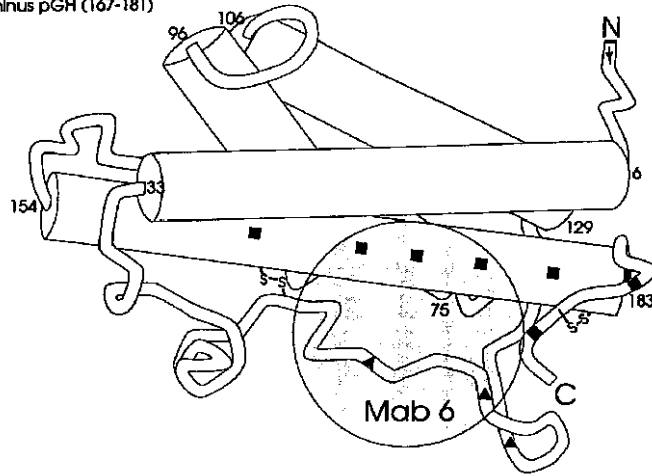
【図17】

- ▲ pGH (57-73) minus hPRL (54-74)
- pGH (164-190) minus pGH (167-181)
- C182A



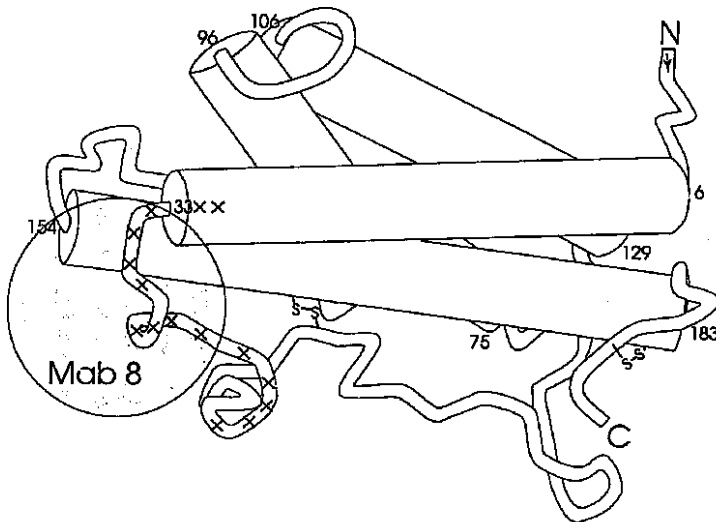
【図18】

- ▲ pGH (57-73) minus hPRL (54-74)
- pGH (164-190) minus pGH (167-181)

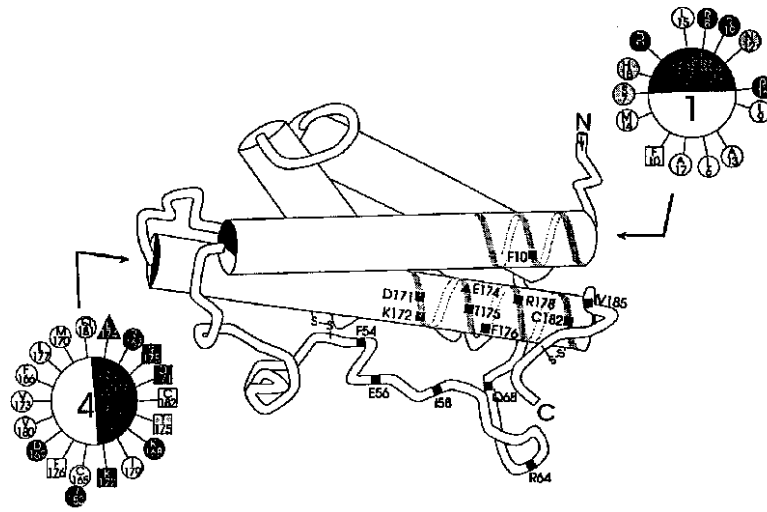


【図20】

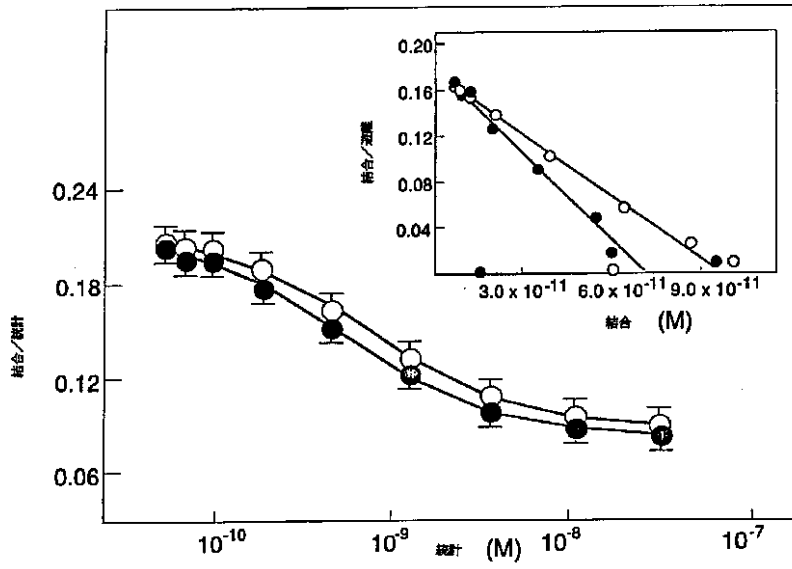
× 欠 失 (32-46)



【図21】

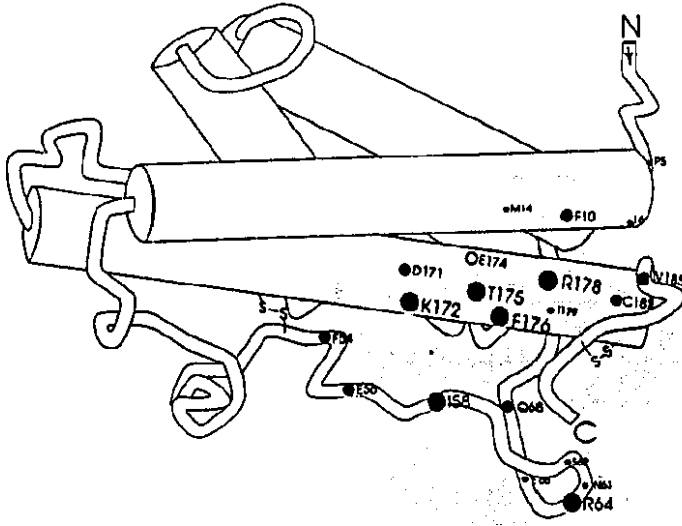


【図24】



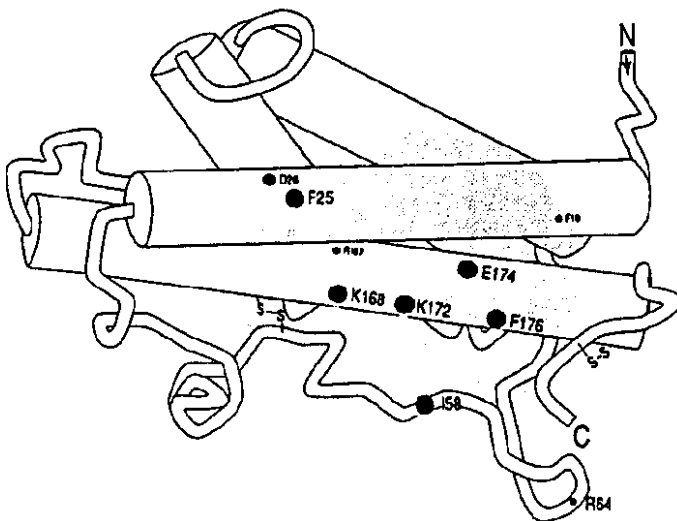
【図25A】

hGHRに対する結合決定基

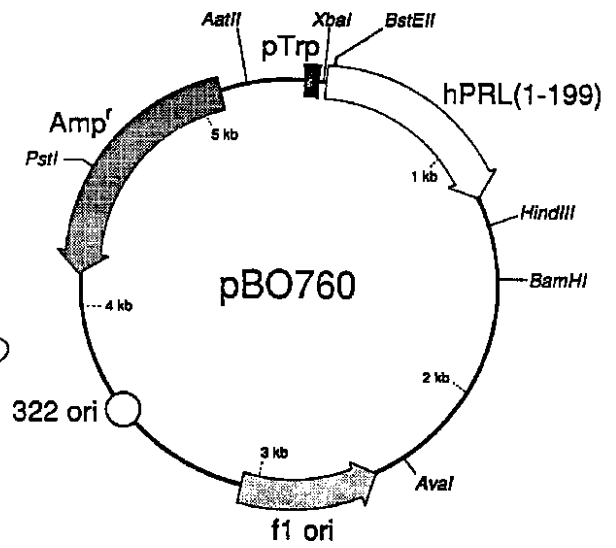


【図25B】

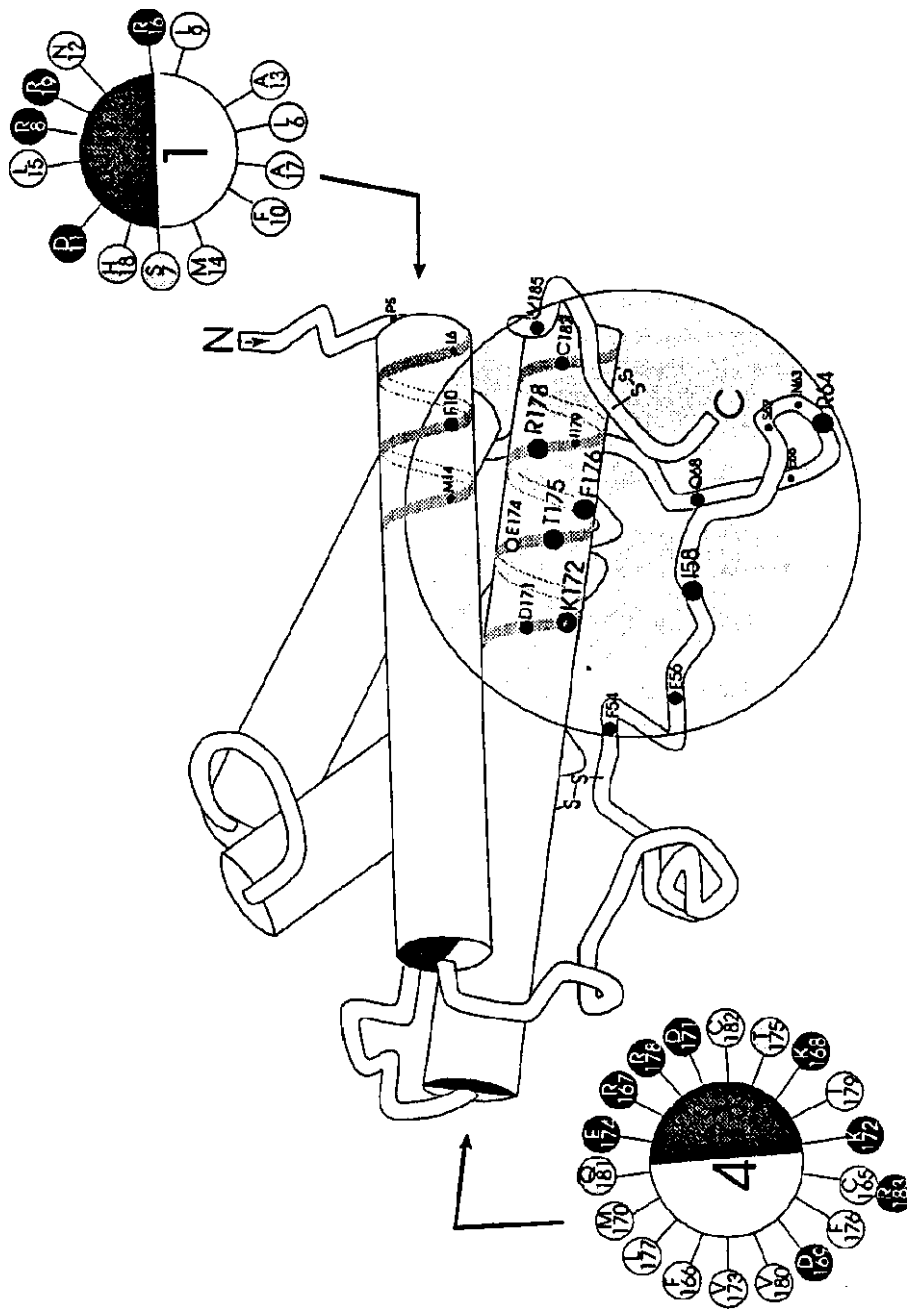
hPRLrに対する結合決定基



【図26】



【図27】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ド (参考)

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

D

// A 6 1 K 38/27

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02

H

C 1 2 P 21/02

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

A 6 1 K 37/36

C 1 2 R 1:19)

(71)出願人 596168317
460 Point San Bruno
Blvd., South San Fra
ncisco, California
94080 USA

(72)発明者 カンニンガム ブライアン シー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94611 ピードモント オリーヴ アベニ
ュー 24

专利名称(译)	荷尔蒙突变体		
公开(公告)号	JP2000184896A	公开(公告)日	2000-07-04
申请号	JP2000034866	申请日	2000-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ウェールズジェイムズエイ カンニングガムブライアンシー		
发明人	ウェールズ ジェイムズ エイ カンニングガム ブライアン シー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/27 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/06 C07K14/00 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/575 C07K14/61 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/12 C12N15/18 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/70 C12P21/02 C12R1/19 C40B40/02 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	C07K14/575 C07K14/61 C07K2319/00 C07K2319/75 C12N15/1037 C12N15/62 C40B40/02 G01N33/6878 G01N33/74 G01N2333/61		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P3/10 A61P5/00 A61P5/06 C07K14/61 G01N33/53.D C12N1/21 C12P21/02.H A61K37/36 A61K38/00 A61K38/27 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/10.P C12N15/10.Z C12N15/62.P C12N15/62.Z C12P21/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA03 4B024/CA05 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG13 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/DB22 4C084/ZC042 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/CA46 4H045/DA31 4H045/EA30 4H045/FA74		
优先权	07/428066 1989-10-26 US		
其他公开文献	JP3765959B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供具有不同于原始激素的所需生物学，生化和免疫原性的激素突变体。种类的生长激素变体，其具有非天然存在的氨基酸序列，并且至少从N端开始依次由第一，第二和第三部分组成，第一部分是与靶标物质相互作用的天然存在的物质。它对应于所得亲本生长激素的氨基酸序列的至少一部分，第三部分对应于亲本生长激素的氨基酸序列的至少另一部分，第二部分是亲本生长激素的天然类似物。一种生长激素变体，对应于人体氨基酸序列的相似部分，其中与亲本生长激素相比，该生长激素变体与靶标物质的相互作用不同。

12		
親本リペプチド	変異体	標的または標的を含むアッセイ
ヒト成長ホルモン	ヒト胎盤ラクタジェン、ヒトプロラクチンおよびブタ成長ホルモン	ラットジエニック、ラクタジェニック、ジアベタジエニック、脂質分解、遊走遅延、マクロファージ活性化およびhCG目のインシュリン様効果に対するレセプター；ラット体重法；ラット体重増アッセイ、OEB/OBマウス又はイスにおけるインシュリン耐性アッセイ、ヒト肝臓、アジボース、リンパ球、胸腺細胞および卵巣組織上のレセプター
hPRL	pGH	ヒトプロラクチンレセプターに対する結合
ウサギGHレセプター	ヒトGHレセプター	ウサギGHへの結合
α-インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン	α1インターフェロンレセプターへの結合
ヒト組織成長因子(TGF-β)	ヒトTGF-β ₁ またはインヒビン	ヒト造血細胞増殖調節
表皮増殖因子(EGF)	TGF-α	カクチノサイト増殖
マウス組織壊死因子(mTNF)	(hTNF)ヒト組織壊死因子	マウスTNFレセプター活性
ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	ヒト骨髓幹細胞の増殖および分化
ヒトCD-4レセプター	マウスCD-4レセプター	HIVウイルスのgp-120
ズブチリン (バザルスアミリルグイフェイシヤンス)	ズブチリン (バザルスリチュールホルミス)	サクシニル-ala-ala-pro-glu-P-ニトロアニリド
ヒトγ-インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン (例えばマウス由来)	ヒトインターフェロンレセプターの活性化
インシュリン成長因子(IGF-1)	インシュリン	IGF-1レセプター成長調節レセプター
組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)	トリプシンウロキナーゼ	プラスミノゲン (切断) フイブリン (結合)