明　細　書

発明の名称 ： ヒト遺伝子由来プロモーター

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト遺伝子由来プロモーターを有する外来遺伝子発現ベクターを用いることにより、外来蛋白質の転写活性が増強された哺乳動物形質転換宿主細胞、及びこれを用いた該外来蛋白質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術の発展によって、治療用蛋白質や抗体医薬といった蛋白質性医薬品が急速にその市場を拡大している。中でも、抗体医薬は人体に投与しても有害な免疫反応を引き起こさず、その特異性の高さから開発が盛んに進められている。

[0003] 抗体医薬に代表される蛋白質性医薬を生産させる宿主としては、微生物や酵母、昆虫、動植物細胞、トランスジェニック動植物等を挙げることができる。蛋白質性医薬の生理活性や抗原性には、フォールディングや糖鎖修飾といった翻訳後修飾が必須であるため、複雑な翻訳後修飾を行うことができない微生物や糖鎖構造の異なる植物は宿主として不適である。ヒトと類似した糖鎖構造を有し、翻訳後修飾が可能、さらには安全性の面を考慮し、ヒトと近縁生物であるＣＨＯ細胞（Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｈａｍｓｔｅｒ　Ｏｖａｒｙ：チャイニーズハムスターの卵巣）等の哺乳動物培養細胞が現在の主流となっている。

[0004] 哺乳動物培養細胞を宿主とする場合、微生物等と比較して、増殖速度の低さ、生産性の低さ、高価なコスト等の問題を抱えている（非特許文献１）。また、蛋白質性医薬品を臨床で利用するためには大量の投与が必要となるため、世界的にもその生産能力の不足が問題となっている。哺乳類培養細胞発現系で蛋白質性医薬品を製造する場合、合成低分子医薬品に比べて製造コストが高いため、各製造工程の改良によって製造コストの低減が図られているが、哺乳類培養細胞発現系における生産量の向上も製造コスト低減の有力な

方法である（非特許文献２、３）。そこで、哺乳動物培養細胞における外来遺伝子の生産性を向上させるため、これまでに、プロモーターやエンハンサー、薬剤選択マーカー、遺伝子増幅、培養工学的手法等多くのアプローチが試行錯誤されてきている。ＣＨＯ細胞を宿主細胞として用いられる場合、外来遺伝子の発現、すなわち蛋白質性医薬品の生産にはウイルス由来のＨｕｍａｎ ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ ｍａｊｏｒ ｉｍｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ ｐｒｏｍｏｔｅｒ（以下ＣＭＶプロモーター）が一般的に用いられている（非特許文献４、５、６）。また、ＣＨＯ細胞において、ヒトリボソーム蛋白質遺伝子であるＲＰＬ３２やＲＰＳ１１の転写開始点の上流域のポリヌクレオチドをＤＮＡエレメントとして使用し、他の異種プロモーターと組み合わせて蛋白質発現に使用できることが知られている（非特許文献７、特許文献１）

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：ＷＯ２００６／１２３０９７

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｆｌｏｒｉａｎ Ｍ．Ｗｕｒｍ．，Ｎａｔ． Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． ２２（１１）：１３９３－１３９８，２００４

非特許文献2：Ｆａｒｉｄ ＳＳ．， Ｊ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ｂ Ａｎａｌｙｔ Ｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｍｅｄ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ． ８４８（１）：８－１８，２００７

非特許文献3：Ｗｅｒｎｅｒ ＲＧ． Ｅｃｏｎｏｍｉｃ ａｓｐｅｃｔｓ ｏｆ ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌ ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｅ ｏｆ ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ． Ｊ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． １１３（１－３）：１７１－１８２，２００４

非特許文献4：Ｄｕｒｏｃｈｅｒ Ｙ ｅｔ ａｌ．， Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． ２０（６）：７００－７０７，２００９

非特許文献5：Ｂｏｓｈａｒｔ Ｍ ｅｔ ａｌ．， Ｃｅｌｌ． ４１（２

）：５２１－５３０，１９８５

非特許文献6：Ｆｏｅｃｋｉｎｇ ＭＫ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ．４５（１）：１０１－１０５，１９８６

非特許文献7：Ｈｏｅｋｓｅｍａ Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｖｏｌｕｍｅ２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４９２８７５，１１ｐａｇｅｓ

発明の概要

発明が解決しようとする課題

［0007］ 本発明の課題は、哺乳動物培養細胞等の宿主細胞において、高い外来遺伝子発現亢進活性を有するプロモーターを用いて、蛋白質性医薬品となる外来蛋白質の産生を亢進させる手段を提供することにある。ＣＨＯ細胞等においてＣＭＶプロモーターと同等以上のプロモーター活性をもつプロモーターを見出すことにより、哺乳動物細胞が安定的に外来遺伝子の高発現を達成する手段を提供し、哺乳類培養細胞発現系における蛋白質生医薬品の生産量の向上、すなわち製造コスト低減に貢献する手段を提供することができる。

課題を解決するための手段

［0008］ 本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒトリボソーム蛋白遺伝子の転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列直前のヌクレオチドまでのポリヌクレオチドが、優れたプロモーター活性を有し、哺乳動物培養細胞において発現対象となる外来蛋白質の生産性を著しく向上させることが可能であることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

（１）配列表の配列番号１に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（２）配列表の配列番号２に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（３）配列表の配列番号３に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（４）前記（１）乃至（３）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９５％以上同一性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

（５）前記（１）乃至（３）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９９％以上同一性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

（６）前記（１）乃至（３）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

（７）前記（１）乃至（６）のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含むことからなる、外来遺伝子発現ユニット。

（８）外来遺伝子が多量体蛋白質をコードする遺伝子である、前記（７）に記載の外来遺伝子発現ユニット。

（９）外来遺伝子がヘテロ多量体蛋白質をコードする遺伝子である、前記（７）に記載の外来遺伝子発現ユニット。

（１０）外来遺伝子が抗体又はその機能性断片をコードする遺伝子である、前記（７）に記載の外来遺伝子発現ユニット。

（１１）前記（７）乃至（１０）のいずれか一つに記載の外来遺伝子発現ユニットを含む外来遺伝子発現ベクター。

（１２）前記（７）乃至（１０）のいずれか一つに記載の外来遺伝子発現ユニット及び下記Ａ群の（ａ）乃至（ｉ）に記載のポリヌクレオチドから選択されるいずれか一つ又は複数のポリヌクレオチドを含む外来遺伝子発現ベクター。

Ａ群

（ａ）配列表の配列番号１０に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（ｂ）配列表の配列番号１１に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレ

オチド。

（ｃ）配列表の配列番号１２に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（ｄ）配列表の配列番号１３に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（ｅ）配列表の配列番号１４に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（ｆ）配列表の配列番号１０乃至１４のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のうち少なくとも３０００の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

（ｇ）配列表の配列番号１０乃至１４のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のうち少なくとも２０００の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

（ｈ）前記（ａ）乃至（ｇ）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９５％以上同一性を有するポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチド。

（ｉ）上記（ａ）乃至（ｇ）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９９％以上同一性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチド。

（１３）前記（１１）又は（１２）に記載の外来遺伝子発現ベクターが導入された形質転換細胞。

（１４）前記（１１）又は（１２）に記載の外来遺伝子発現ベクターとエレメントベクターが導入された形質転換細胞。

（１５）細胞が哺乳動物由来の培養細胞である、前記（１３）又は（１４）に記載の形質転換細胞。

（１６）哺乳動物由来の培養細胞が、ＣＯＳ－１細胞、２９３細胞、又はＣＨＯ細胞である、前記（１５）に記載の形質転換細胞。

（１７）前記（１３）乃至（１６）のいずれか一つに記載の形質転換細胞を

培養し、培養物から外来遺伝子由来の蛋白質を取得することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

（１８）形質転換細胞において外来遺伝子を発現させることを目的とする、前記（１）乃至（６）のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列の使用。

（１９）形質転換細胞において外来遺伝子を発現させることを目的とする、前記（１１）又は（１２）に記載の外来遺伝子発現ベクターの使用。

発明の効果

[0009] 本発明のヒト遺伝子由来のプロモーターを用いた外来遺伝子発現ベクターを哺乳動物宿主細胞へ導入することによって、治療用蛋白質や抗体等の外来遺伝子の発現を著しく亢進することが可能になる。また、本発明のプロモーターは、ＤＮＡエレメントと組み合わせることにより、治療用蛋白質や抗体等の外来遺伝子の発現をさらに亢進することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ＣＨＯ－Ｋ１ポリクローナル形質転換細胞におけるＳＥＡＰ活性を指標としたプロモーター活性の評価。ＣＭＶプロモーターの値を１として各プロモーターのＳＥＡＰ活性を示した。２回の独立した実験結果を示す。（ｎ＝３、平均±ＳＤ）

[図2]ＣＨＯ－Ｋ１ポリクローナル形質転換細胞におけるＳＥＡＰ活性を指標としたトランケート型プロモーター活性の評価　。ＣＭＶプロモーターの値を１として各プロモーターの活性を示した。（ｎ＝３、平均±ＳＤ）

[図3]ＣｈＩＰ　ｏｎ　ｃｈｉｐを行ったサンプルが、抗アセチル化ヒストンＨ３抗体特異的にＣｈＩＰされたことを、ＧＡＰＤＨ領域の増幅により確認した図。

[図4]ＤＮＡエレメントが挿入されたＳＥＡＰ発現ベクターの概略図。

[図5]ＣＨＯ形質転換細胞株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４の発現亢進効果について、ＣＭＶプロモーターにより発現されたＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図6]ＣＨＯ形質転換細胞株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７の発現亢進効果について、ＥＦ－１αまたはＳＶ４０プロモーターにより発現されたＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図7]ＤＮＡエレメントが挿入された抗体発現（抗体遺伝子Ｘ　重鎖、軽鎖共発現）ベクターの概略図。

[図8]ＣＨＯ形質転換細胞株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ７の発現亢進効果について、ＣＭＶ又はＥＦ－１αプロモーターにより発現された抗体生産量を指標にＥＬＩＳＡ法により確認した図。

[図9]ＤＮＡエレメントＡ２及び関連配列の配列長。

[図10]ＣＨＯ形質転換細胞株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ２及び関連配列の発現亢進効果について、ＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図11]ＤＮＡエレメントＡ７及び関連配列の配列長。

[図12]ＣＨＯ形質転換株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ７及び関連配列の発現亢進効果について、ＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図13]ＤＮＡエレメントＡ１８及び関連配列の配列長。

[図14]ＣＨＯ形質転換株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ１８及び関連配列の発現亢進効果について、ＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図15]ＤＮＡエレメントＢ５及び関連配列の配列長。

[図16]ＣＨＯ形質転換株を用いて、ＤＮＡエレメントＢ５及び関連配列の発現亢進効果について、ＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図17]ＤＮＡエレメントＣ１４及び関連配列の配列長。

[図18]ＣＨＯ形質転換株を用いて、ＤＮＡエレメントＣ１４及び関連配列の発現亢進効果について、ＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図19]ＨＥＫ２９３形質転換株を用いて、ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４の発現亢進効果について、ＳＥＡＰ活性を指標に確認した図。

[図20]ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７、又はＡ１８の全長配列を基準として始点と終点となるヌクレオチドを示した図。

[図21]ＤＮＡエレメントＢ５、又はＣ１４の全長配列を基準として始点と終点となるヌクレオチドを示した図。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を具体的に説明する。

[0012] 本明細書において、「遺伝子」とは、ｍＲＮＡに転写され、蛋白質に翻訳される部分を意味し、ＤＮＡのみならずそのｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びそのＲＮＡも含まれるものとする。

[0013] 本明細書において、「ポリヌクレオチド」とは核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。

[0014] 本明細書において、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

[0015] 本明細書において、「遺伝子発現」とは、ある遺伝子がｍＲＮＡに転写される現象、及び／又は該ｍＲＮＡから蛋白質が翻訳される現象を意味している。

[0016] 本明細書において、「外来遺伝子」とは、人工的に宿主細胞に導入される遺伝子を意味している。

[0017] 本明細書において、「外来蛋白質」とは、外来遺伝子にコードされる蛋白質を意味している。

[0018] 本明細書において、「遺伝子発現ユニット」とは、転写の読み枠の方向に、少なくともプロモーター領域、外来遺伝子、転写ターミネーター領域（ポリＡ付加シグナル）を有するポリヌクレオチドを意味している。

[0019] 本明細書において、「外来遺伝子発現亢進活性」とは、外来遺伝子を含む遺伝子発現ユニット周辺ＤＮＡに転写に有利な環境を作り出し、転写効率を大きく向上させることにより、外来蛋白質の宿主細胞における生産を亢進させる活性をいう。

[0020] 本明細書において、「プロモーター」とは、ＤＮＡからＲＮＡへの転写の開始に関与する転写因子が結合する領域を意味する。本明細書においては、

「プロモーター領域」ということもある。プロモーターとして、例えば、転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列直前のヌクレオチドまでのポリヌクレオチドを例示でき、５’ＵＴＲ、及びイントロンを含んでもよい。

[0021] 本明細書において、「プロモーター活性」とは、転写因子がプロモーターに結合し、転写を開始し、遺伝子にコードされる蛋白質の生産を行う活性をいい、分泌型アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）等のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性を指標として検定することが可能である。

[0022] 本明細書において、「プロモーター活性を有する」とは、後記（実施例３）に記載のＳＥＡＰ発現量を指標としたプロモーター活性の評価と同様の条件で、ＣＭＶプロモーターと同等以上のＳＥＡＰ発現活性を有することをいう。

[0023] 本明細書中において、「ＤＮＡエレメント」とは、遺伝子発現ユニットの近傍又は、遺伝子発現ユニットの含まれる外来遺伝子発現ベクター上に配置された場合に、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチドを意味する。

[0024] 本明細書中において、「抗体の機能性断片」とは、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$等を含むが、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。

[0025] 本明細書中において、「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、２つ以上のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の、配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、一列の２つ以上のヌクレオチド配列間または２つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定したときの、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、２つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によってアドレス指定されるギャップアラインメント（存在する場合）との間の同一一致のパーセントを算出することにより評価することが

できる。具体的には、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ－Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＥＭＢＬ－ＥＢＩ）が提供するＣｌｕｓｔａｌＷ２等のソフトを使用することにより評価することができるが、当業者において使用されるものであればこれに限定されない。

[0026] 本明細書中において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ある核酸に対する同一性が８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、最も好ましく９９％以上のヌクレオチド配列からなる核酸の相補鎖がハイブリダイズし、それより同一性が低いヌクレオチド配列からなる核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件を挙げることができる。より具体的には、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社製）中、６８℃でハイブリダイズすること、又は、ＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７乃至１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１乃至２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０ ｍＭ ＮａＣｌ、１５ ｍＭ クエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄する条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることを意味する。

１．外来遺伝子の発現亢進に使用されるプロモーター

本発明のヒト遺伝子由来のプロモーター（以下、「本発明のプロモーター」ということもある）として、ヒトリボソーム蛋白質遺伝子の転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでのポリヌクレオチドが好ましく、転写開始点の上流約１ｋｂｐのヌクレオチド、又は０．５ｋｂｐから開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでのポリヌクレオチドでもよい。

該ヒトリボソーム蛋白質遺伝子としては、好ましくは、ヒトリボソーム蛋白

質Ｓ７遺伝子（以下、「ＲＰＳ７」という）、ヒトリボソーム蛋白質Ｌ３２遺伝子（以下、「ＲＰＬ３２」という）、ヒトリボソーム蛋白質Ｌ３４遺伝子（以下、「ＲＰＬ３４」という）である。

[0027] 本発明のプロモーターとして、好適には、ＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、又はＲＰＬ３４のプロモーターであり、さらに好適には配列表の配列番号１乃至９に記載のポリヌクレオチドであり、特に好適には配列番号１乃至３のポリヌクレオチドである。

[0028] 配列番号１乃至３のヌクレオチド配列は、それぞれＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、ＲＰＬ３４の転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列であり、配列番号４、６及び８は、それぞれ、ＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、ＲＰＬ３４の転写開始点の上流約１ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列であり、配列番号５、７及び９は、それぞれＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、ＲＰＬ３４の転写開始点の上流約０．５ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

[0029] また、本発明のプロモーターは配列番号１乃至９に示すいずれか一つのヌクレオチド配列に対して８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、最も好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ、プロモーター活性を有するポリヌクレオチドであっても良い。

[0030] 本発明のプロモーターは、配列番号１乃至９に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有するポリヌクレオチドであってもよい。

[0031] 本発明のプロモーターは、配列番号１乃至９に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列において、１又は

複数、好ましくは１乃至３００個、さらに好ましくは１乃至３０個のヌクレオチドが欠失、置換、及び／又は付加されたヌクレオチド配列からなる変異ポリヌクレオチドであって、かつプロモーター活性を有するポリヌクレオチドであってもよい。

[0032] 前記ヌクレオチド配列の変異（欠失、置換、及び／又は付加）の導入は、Ｋｕｎｋｅｌ法若しくはＧａｐｐｅｄ　ｄｕｐｌｅｘ法等の当該技術分野で公知の手法、又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばＭｕｔａｎｔ－Ｋ（タカラバイオ社製）若しくはＭｕｔａｎｔ－Ｇ（タカラバイオ社製）、タカラバイオ社のＬＡ　ＰＣＲ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓシリーズキット等が利用できる。このような変異ポリヌクレオチドも本発明のプロモーターとして使用することができる。

[0033] 本発明のプロモーターの有する外来遺伝子発現亢進活性は、ＳＥＡＰ等のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性を指標として検定することが可能である。ＣＭＶプロモーターを使用した場合と本発明のプロモーターを使用した場合を比較して、レポーター蛋白質の活性が同等以上、好ましくは１．２倍以上、より好ましくは１．５倍以上に上昇した場合、該プロモーターが外来遺伝子発現亢進活性を有すると判断することができる。１．２倍程度以上の亢進によっても、細胞の培養スケールの削減、培養時間、及び精製工程の短縮が期待され、結果として収量の向上と培養コストの削減が可能となる。収量が向上すれば、医薬としての外来蛋白質を安定して供給することが可能となる。又、培養コストが削減されれば、医薬としての外来蛋白質の原価が軽減される。

[0034] また、本発明のプロモーターは、当業者に周知の方法を用いて、宿主細胞に導入することにより、宿主細胞の内在性遺伝子の発現亢進に使用することも可能である。

２．外来遺伝子発現ユニット

本発明の外来遺伝子発現ユニット（以下、「本発明の遺伝子発現ユニット

」ということもある）は、転写の読み枠の方向に、少なくとも前記１．に記載の本発明のプロモーター、外来遺伝子、及び転写ターミネーター領域（ポリＡ付加シグナル）を有するものである。

また、ポリＡ付加配列は、プロモーターからの転写に対して転写終結を起こす活性を有する配列であればよく、プロモーターの遺伝子と同じ又は異なる遺伝子のものであってもよい。

３．外来遺伝子の発現亢進に使用されるＤＮＡエレメント

前記２．に記載の本発明の遺伝子発現ユニットとＤＮＡエレメントを組み合わせて使用することにより、外来遺伝子の発現をさらに亢進することができる。組み合わせて使用するＤＮＡエレメントは、実施例６に示されるように、アセチル化ヒストンＨ３との相互作用を指標として取得することが可能である。一般にヒストン（Ｈ３、Ｈ４）のアセチル化は転写の活性化に関与しているといわれており、主に２つの説が考えられている。ヒストンテールがアセチル化することで電荷的に中和され、ＤＮＡとヒストンとの結合が緩くなるというヌクレオソームの立体構造変化が関係している説（Ｍｅｌｌｏｒ Ｊ．（２００６）Ｄｙｎａｍｉｃ ｎｕｃｌｅｏｓｏｍｅｓ ａｎｄ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．２２（６）：３２０－３２９）と、様々な転写因子のリクルートに関与するという説（Ｎａｋａｔａｎｉ Ｙ．（２００１）Ｈｉｓｔｏｎｅ ａｃｅｔｙｌａｓｅｓ－ｖｅｒｓａｔｉｌｅ ｐｌａｙｅｒｓ．Ｇｅｎｅｓ Ｃｅｌｌｓ．６（２）：７９－８６）である。いずれの説においても、ヒストンのアセチル化が転写活性化に関与している可能性は高く、抗アセチル化ヒストンＨ３抗体を用いたクロマチン免疫沈降（Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ；ＣｈＩＰ）によって、アセチル化ヒストンＨ３と相互作用するＤＮＡエレメントを濃縮することが可能である。

[0035] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用する、外来遺伝子の発現亢進に使用されるＤＮＡエレメントの１つとして、Ａ２を挙げることができる。Ａ

２はヒト１５番染色体８０９６６４２９～８０９７４８７８に位置しており、ＡＴ含量６２．２％、８４５０ｂｐのポリヌクレオチドである。Ａ２のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１０に記載されている。

[0036] 同様のＤＮＡエレメントとして、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４を挙げることができる。Ａ７はヒト１１番染色体８８９９２１２３～８９０００５４２に位置しており、ＡＴ含量６４．５２％、８４２０ｂｐのポリヌクレオチドである。Ａ７のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１１に記載されている。

[0037] Ａ１８は、ヒト４番染色体１１１２７５９７６～１１１２８４４５０に位置しており、ＡＴ含量６２．５４％、８４７５ｂｐのポリヌクレオチドである。Ａ１８のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１２に記載されている。

[0038] Ｂ５は、ヒト１番染色体１４３０３４６８４～１４３０４３０８４に位置しており、ＡＴ含量６６．３７％、８４０１ｂｐのポリヌクレオチドである。Ｂ５のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１３に記載されている。

[0039] 最後に、Ｃ１４は、ヒト１１番染色体４６０８９０５６～４６０９７４８２に位置しており、ＡＴ含量６３．８１％、８４２７ｂｐのポリヌクレオチドである。Ｃ１４のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１４に記載されている。

[0040] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用する、ＤＮＡエレメントの有する外来遺伝子発現亢進活性は、ＳＥＡＰ等のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性を指標として検定することが可能である。

[0041] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用する場合、前記ＤＮＡエレメントのいずれか１種を単独で使用しても良く、ＤＮＡエレメントの１種を２コピー以上使用しても良い。あるいは２種以上ＤＮＡエレメントを組み合わせて使用しても良い。

[0042] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用するＤＮＡエレメントの好ましい例として、Ａ２、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４が挙げることができる。

[0043] 本発明において使用されるＤＮＡエレメントは、配列番号１０乃至１４に示すヌクレオチド配列に対して８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、最も好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ外来遺伝子発現亢進活性を有するヌクレオチド配列であっても良い。ヌクレオチド配列のホモロジー検索は、例えば、日本ＤＮＡデータバンク（ＤＮＡ Ｄａｔａｂａｎｋ ｏｆ ＪＡＰＡＮ）等を対象に、ＦＡＳＴＡやＢＬＡＳＴ等のプログラムを用いて行うことができる。

[0044] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用されるＤＮＡエレメントは、配列番号１０乃至１４に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ外来遺伝子発現亢進活性を有するＤＮＡエレメントであってもよい。

[0045] 当業者であれば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ, Ｊ. ｅｔ ａｌ., Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ：ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２ｎｄ ｅｄ., Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ, １０ Ｓｋｙｌｉｎｅ Ｄｒｉｖｅ Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ, ＮＹ （１９８９））等を参照することにより、こうしたホモログ遺伝子を容易に取得することができる。また、前記のヌクレオチド配列の同一性は、同様に、ＦＡＳＴＡ検索やＢＬＡＳＴ検索により決定することができる。

[0046] 前記ポリヌクレオチドの変異（欠失、置換、及び／又は付加）の導入は、Ｋｕｎｋｅｌ法若しくはＧａｐｐｅｄ ｄｕｐｌｅｘ法等の当該技術分野で公知の手法、又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばＭｕｔａｎｔ－Ｋ（タカラバイオ社製）若しくはＭｕｔａｎｔ－Ｇ（タカラバイオ社製）、タカラバイオ社のＬＡ ＰＣＲ ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ シリーズキット等が利用できる。このような変異ポリヌクレオチドも本発明

のＤＮＡエレメントとして使用することができる。

[0047] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用されるＤＮＡエレメントとしては、配列表の配列番号１０乃至１４のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のうち、少なくとも３０００、あるいは、少なくとも２０００の連続するヌクレオチドからなる部分断片を使用することができる。このような部分断片の例としては、Ａ２の部分断片であるＡ２－１乃至Ａ２－１７、Ａ７の部分断片であるＡ７－１乃至Ａ７－１８、Ａ１８の部分断片であるＡ１８－１乃至Ａ１８－４、Ｂ５の部分断片であるＢ５－１乃至Ｂ５－６、又はＣ１４の部分断片であるＣ１４－１乃至Ｃ１４－１４を挙げることができるが、外来遺伝子発現亢進活性を有している限りこれらの部分断片に限定されない。

[0048] 本発明においては、前記部分断片のいずれか１種を単独で使用しても良く、部分断片の１種を２コピー以上使用しても良い。あるいは２種以上部分断片を組み合わせて使用しても良い。また、各ＤＮＡエレメントの全長配列と部分断片を組み合わせて使用しても良い。該組み合わせにおいて、部分断片は、組合せを構成する全長配列のＤＮＡエレメント由来であっても、異なる全長配列のＤＮＡエレメント由来であっても良い。

[0049] Ａ２の各断片のポリヌクレオチド配列においては、Ａ２－１は配列表の配列番号１０の１乃至３０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－２は配列表の配列番号１０の２８０１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－３は配列表の配列番号１０の５４０１乃至８４５０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－４は配列表の配列番号１０の７０１乃至２７００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－５は配列表の配列番号１０の７０１乃至２２００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－６は配列表の配列番号１０の７０１乃至３７００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－７は配列表の配列番号１０の２００１乃至５０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－８は配列表の配列番

号１０の４００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－９は配列表の配列番号１０の１乃至３７００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１０は配列表の配列番号１０の２００１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１１は配列表の配列番号１０の２８０１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１２は配列表の配列番号１０の７０１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１３は配列表の配列番号１０の２００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１４は配列表の配列番号１０の２８０１乃至８４５０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１５は配列表の配列番号１０の１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１６は配列表の配列番号１０の７０１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＡ２－１７は配列表の配列番号１０の２００１乃至８４５０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0050] Ａ７の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ａ７－１は配列表の配列番号１１の６０１乃至３６００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－２は配列表の配列番号１１の３６０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－３は配列表の配列番号１１の５４０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－４は配列表の配列番号１１の３４０１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－５は配列表の配列番号１１の１５０１乃至４５００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－６は配列表の配列番号１１の４４０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－７は配列表の配列番号１１の２４０１乃至５４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－８は配列表

の配列番号１１の１乃至３６００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－９は配列表の配列番号１１の１５０１乃至５４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１０は配列表の配列番号１１の２４０１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１１は配列表の配列番号１１の３４０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１２は配列表の配列番号１１の４４０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１３は配列表の配列番号１１の１乃至５４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１４は配列表の配列番号１１の１５０１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１５は配列表の配列番号１１の２４０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１６は配列表の配列番号１１の３４０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１７は配列表の配列番号１１の１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＡ７－１８は配列表の配列番号１１の１５０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0051] Ａ１８の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ａ１８－１は配列表の配列番号１２の１乃至５０４０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ１８－２は配列表の配列番号１２の１００１乃至６００２番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ１８－３は配列表の配列番号１２の２００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＡ１８－４は配列表の配列番号１２の３０００乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0052] Ｂ５の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ｂ５－１は配列表の配列番号１３の１乃至４００１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配

列に相当し、Ｂ５－２は配列表の配列番号１３の１乃至３２００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－３は配列表の配列番号１３の２４９１乃至５６０１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－４は配列表の配列番号１３の５３７３乃至８４０１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－５は配列表の配列番号１３の９０１乃至４００１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＢ５－６は配列表の配列番号１３の４００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0053] Ｃ１４の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ｃ１４－１は配列表の配列番号１４の９６０乃至４０１５番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－２は配列表の配列番号１４の１９８７乃至５０１４番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－３は配列表の配列番号１４の４０２０乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－４は配列表の配列番号１４の９６０乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－５は配列表の配列番号１４の９６０乃至６０１１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－６は配列表の配列番号１４の４９３９乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－７は配列表の配列番号１４の９６０乃至５０１４番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－８は配列表の配列番号１４の２９９４乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－９は配列表の配列番号１４の４０２０乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１０は配列表の配列番号１４の１乃至５０１４番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１１は配列表の配列番号１４の１９８７乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１２は配列表の配列番号１４の２９９４

乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１３は配列表の配列番号１４の９６０乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＣ１４－１４は配列表の配列番号１４の１９８７乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

４．ポリヌクレオチドの取得

本発明において、後記の産生亢進の対象となる外来蛋白質をコードする外来遺伝子を含むポリヌクレオチドは、以下に示す一般的な方法により取得することができる。例えば、外来遺伝子が発現している細胞や組織に由来するｃＤＮＡライブラリーを、当該遺伝子断片をもとにして合成したＤＮＡプローブを用いてスクリーニングすることにより単離することができる。ｍＲＮＡの調製は、当該技術分野において通常用いられる手法により行うことができる。例えば、前記細胞又は組織を、グアニジニン試薬、フェノール試薬等で処理して全ＲＮＡを得、その後、オリゴ（ｄＴ）セルロースカラムやセファロース２Ｂを担体とするポリＵ－セファロース等を用いたアフィニティーカラム法により、あるいはバッチ法によりポリ（Ａ）＋ＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を得る。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ（Ａ）＋ＲＮＡをさらに分画してもよい。次いで、得られたｍＲＮＡを鋳型として、オリゴｄＴプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖ｃＤＮＡを合成し、該一本鎖ｃＤＮＡからＤＮＡ合成酵素Ｉ、ＤＮＡリガーゼ及びＲＮａｓｅＨ等を用いて二本鎖ｃＤＮＡを合成する。合成した二本鎖ｃＤＮＡをＴ４ＤＮＡ合成酵素によって平滑化後、アダプター（例えば、ＥｃｏＲＩアダプター）の連結、リン酸化等を経て、λｇｔ１１等のλファージに組み込んでｉｎ　ｖｉｖｏパッケージングすることによってｃＤＮＡライブラリーを作製する。また、λファージ以外にもプラスミドベクターを用いてｃＤＮＡライブラリーを作製することもできる。その後、ｃＤＮＡライブラリーから目的のＤＮＡを有する株（ポジティブクローン）を選択すればよい。

[0054] また、蛋白質の産生に用いる前記プロモーター、ターミネーター領域を含

むポリヌクレオチド、前記ＤＮＡエレメント、又は外来遺伝子を含むポリヌクレオチドをゲノムＤＮＡから単離する場合、は、一般的手法（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８９），Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １９４（１９９１））に従い、採取源となる生物の細胞株よりゲノムＤＮＡを抽出し、ポリヌクレオチドを選別することにより行う。ゲノムＤＮＡの抽出は、例えば、Ｃｒｙｅｒ らの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１２，３９－４４（１９７５））及びＰ．Ｐｈｉｌｉｐｐｓｅｎらの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１９４，１６９－１８２（１９９１））に従って行うことができる。

[0055] 目的とするプロモーター、ＤＮＡエレメント、又は外来遺伝子を含むポリヌクレオチドの取得は、例えばＰＣＲ法（ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．Ｈｅｎｒｙ Ａ．Ｅｒｌｉｃｈ，Ａｔｏｃｋｔｏｎ ｐｒｅｓｓ（１９８９））によって行うこともできる。ＰＣＲ法を用いたポリヌクレオチドの増幅には、プライマーとして２０～３０ｍｅｒの合成１本鎖ＤＮＡを、鋳型としてゲノムＤＮＡを用いる。増幅された遺伝子はポリヌクレオチド配列を確認した後、用いる。ＰＣＲの鋳型としては、バクテリア人工染色体（ＢＡＣ）等のゲノムＤＮＡライブラリーを使用することが可能である。

[0056] 一方、配列未知の外来遺伝子を含むポリヌクレオチドの取得は、（ａ）常法により遺伝子ライブラリーを作製し、（ｂ）作製された遺伝子ライブラリーから所望のポリヌクレオチドを選択し、当該ポリヌクレオチドを増幅する、ことによって行うことができる。遺伝子ライブラリーは、採取源となる生物の細胞株から常法により得た染色体ＤＮＡを適当な制限酵素によって部分消化して断片化し、得られた断片を適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主に導入することによって調製することができる。また、細胞よりｍＲＮＡを抽出し、ここからｃＤＮＡを合成後、適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主に導入することによっても調製することができる。この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベクターとして知られるプラスミドを用いることができ、ファージベクター

又はコスミド等も広く用いることができる。形質転換又は形質導入を行う宿主は、前記ベクターの種類に応じたものを用いればよい。外来遺伝子を含むポリヌクレオチドの選択は、前記遺伝子ライブラリーから、外来遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いるコロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法等によって行う。

[0057] また外来遺伝子を含むポリヌクレオチドを化学的に全合成することもできる。例えば相補的な２対のオリゴヌクレオチドを作製しこれらをアニールさせる方法や、数本のアニールされたＤＮＡをＤＮＡリガーゼにより連結する方法、又は一部相補的な数本のオリゴヌクレオチドを作製しＰＣＲによりギャップを埋める方法等により、遺伝子を合成することができる。

[0058] ポリヌクレオチド配列の決定は、通常の方法、例えばジデオキシ法（Ｓａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，７４，５４６３－５４６７（１９７７））等により行うことができる。更に前記ポリヌクレオチド配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いることによっても容易に行い得る。

５．外来遺伝子発現ベクター、エレメントベクター

本発明の外来遺伝子発現ベクターとしては、前記１．に記載の本発明のプロモーターを含む前記２．に記載の外来遺伝子発現ユニットを含むベクターが提供される。本発明の外来遺伝子発現ベクターは、前記３．に記載のＤＮＡエレメントの１種、前記のＤＮＡエレメントの１種を２個以上のコピー数、又は前記のＤＮＡエレメントの２種以上の組み合わせを含んでもよい。前記の外来遺伝子発現ベクターによって外来遺伝子を宿主細胞内で発現させる際には、ＤＮＡエレメントを遺伝子発現ユニットの直前又は直後に配置してもよく、又は遺伝子発現ユニットから離れた位置に配置しても良い。また、複数のＤＮＡエレメントを含む１つの外来遺伝子発現ベクターを用いてもよい。なお、ＤＮＡエレメントの向きは、遺伝子発現ユニットに対して順方向又は逆方向のいずれであっても良い。

[0059] また、本発明で使用されるベクターとしては、前記ＤＮＡエレメントの１

種、前記のＤＮＡエレメントの１種を２個以上のコピー数、又は前記のＤＮＡエレメントの２種以上の組み合わせを含み、かつ遺伝子発現ユニットを含まないベクター（以下、「エレメントベクター」という。）も含まれる。このようなエレメントベクターは、前記のＤＮＡエレメントを含む外来遺伝子発現ベクター、又は外来遺伝子発現ユニットのみを含みＤＮＡエレメントは含まない外来遺伝子発現ベクターと組み合わせて使用することが可能である。エレメントベクターを並存させることによって、外来遺伝子発現ベクターを単独で使用する場合に比べて外来遺伝子の発現が亢進されるため、前記のベクターの組み合わせも本発明の外来遺伝子発現ベクターに含まれる。

[0060] 外来遺伝子としては、特に限定はされないが、分泌型アルカリフォスファターゼ（ＳＥＡＰ）、緑色蛍光蛋白質（ＧＦＰ）、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子、αーアミラーゼ遺伝子、αーガラクトシダーゼ遺伝子等の各種酵素遺伝子、医薬上有用な生理活性蛋白質であるインターフェロンα、インターフェロンγ等の各種インターフェロン遺伝子、ＩＬ１、ＩＬ２等の各種インターロイキン遺伝子、エリスロポエチン（ＥＰＯ）遺伝子、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）遺伝子等の各種サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子、又は多量体蛋白質をコードする遺伝子、例えば抗体又はその機能性断片であるヘテロ多量体をコードする遺伝子等を挙げることができる。これらの遺伝子はいかなる手法によって得られるものでもよい。

[0061] 「抗体の機能性断片」とは、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の機能性断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの機能性断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0062] また、本発明の外来遺伝子発現ベクター及びエレメントベクターには、形質転換体を選抜するための選択マーカーを含めることができる。例えば、セルレニン、オーレオバシジン、ゼオシン、カナバニン、シクロヘキシミド、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストシジン、テトラサイクリン、カナマイシン、アンピシリン、ネオマイシン等の薬剤に対して耐性を付与する薬剤耐性マーカー等を使用することで、形質転換体の選抜を行うことが可能である。また、エタノール等に対する溶剤耐性や、グリセロールや塩等に対する浸透圧耐性、銅等の金属イオン耐性等を付与する遺伝子をマーカーにすることで、形質転換体の選抜を行うことも可能である。

[0063] 本発明の外来遺伝子発現ベクター及びエレメントベクターは、染色体ＤＮＡに組込まれないベクターであってもよい。一般的に、外来遺伝子発現ベクターは宿主細胞に遺伝子導入された後、ランダムに染色体に組込まれるが、ｓｉｍｉａｎ ｖｉｒｕｓ ４０（ＳＶ４０）やｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ（ＢＰＶ、ＨＰＶ）、ＥＢＶ等の哺乳動物ウイルス由来の構成成分を用いることにより、導入された宿主細胞中で自己複製が可能なｅｐｉｓｏｍａｌ ｖｅｃｔｏｒとして使用することができる。例えば、ＳＶ４０由来の複製起点及びｔｒａｎｓ－ａｃｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒであるＳＶ４０ ｌａｒｇｅ Ｔ抗原をコードした配列を有するベクターやＥＢＶ由来のｏｒｉＰ及びＥＢＮＡ－１をコードした配列を有するベクター等が広く用いられている。ＤＮＡエレメントの効果はベクターの種類、あるいは染色体への組込み有無を問わず、外来遺伝子発現亢進活性を示すことが可能である。

[0064] ６．形質転換細胞

本発明の形質転換細胞は、前記５．の外来遺伝子発現ベクターを用いて導入した形質転換細胞である。外来遺伝子発現ベクターとして、（Ａ）ＤＮＡエレメントを含まない外来遺伝子発現ベクターのみを導入しても良く、又は（Ｂ）ＤＮＡエレメントを含まない外来遺伝子発現ベクターとエレメントベクターを組み合わせて導入しても良い。あるいは、（Ｃ）ＤＮＡエレメントを含む外来遺伝子発現ベクターを導入しても良く、又は（Ｄ）ＤＮＡエレメ

ントを含む外来遺伝子発現ベクターとエレメントベクターを組み合わせて導入しても良い。

[0065] 前記（Ｂ）又は（Ｄ）の組み合わせによる外来遺伝子の宿主細胞内での発現は、例えば、Ｇｉｒｏｄ らの方法（Ｂｉｏｔｅｃｈｉｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ， ９１，２－１１（２００５））及びＯｔｔｅらの方法（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． Ｐｒｏｇ．， ２００７，２３，８０１－８０７（２００７））に従って行うことができる。

[0066] 形質転換させる宿主細胞としては、真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞、さらに好ましくはヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル、又はウシ由来の細胞である。哺乳動物細胞としては、ＣＯＳ－１細胞、２９３細胞、ＣＨＯ細胞（ＣＨＯ－Ｋ１、ＤＧ４４、ＣＨＯ ｄｈｆｒ－、ＣＨＯ－Ｓ）等を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0067] 本発明において、宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、導入遺伝子が宿主内にて安定に存在し、かつ適宜発現させることができる方法であればいかなる方法でもよく、一般的に用いられている方法、例えば、リン酸カルシウム法（Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ．， （１９８４） Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，４８，３４１）、エレクトロポレーション法（Ｂｅｃｋｅｒ， Ｄ．Ｍ． ｅｔ ａｌ． （１９９０） Ｍｅｔｈｏｄｓ． Ｅｎｚｙｍｏｌ．， １９４，１８２－１８７）、スフェロプラスト法（Ｃｒｅｇｇｈ ｅｔ ａｌ．， Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，５，３３７６（１９８５））、酢酸リチウム法（Ｉｔｏｈ， Ｈ． （１９８３） Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ． １５３， １６３－１６８）、リポフェクション法等を挙げることができる。

[0068] ７．外来蛋白質の製造方法

本発明における外来蛋白質の製造は、外来蛋白質をコードする遺伝子を、前記６．の項目に記載の形質転換細胞を公知の方法により培養し、その培養物から採取し、精製することにより行うことができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞、又は細胞の破砕物のいずれをも意味するものであ

る。なお、６．の項目に記載の形質転換細胞を用いて産生することのできる外来蛋白質としては、単量体蛋白質のみならず多量体蛋白質を選択することも可能である。異なる複数のサブユニットから構成されるヘテロ多量体蛋白質の生産を行う場合、これらのサブユニットをコードしている複数の遺伝子を、それぞれ６．の項目に記載の宿主細胞に導入する必要がある。

[0069] 形質転換細胞を培養する方法は、その宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0070] 形質転換細胞が哺乳動物細胞の場合は、例えば３７℃、５％又は８％CO_2条件下で培養し、培養時間は２４～１０００時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養や流加培養又は連続培養等により実施することができる。

[0071] 前記の培養物（培養液）から外来蛋白質遺伝子の発現産物の確認は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタン解析、ＥＬＩＳＡ等により行うことができる。生産された蛋白質を単離精製するためには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。培養後、目的蛋白質が細胞内に生産される場合には、細胞を超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により破砕することにより、目的蛋白質を採取する。また、目的蛋白質が細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により細胞を除去する。その後、有機溶媒による抽出等により目的蛋白質を採取し、必要に応じて各種クロマトグラフィー（疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー等）、分子篩を用いたゲルろ過法、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用いて単離精製すればよい。

[0072] 前記の培養法、精製法は一例であって、これらに限定されるものではない。なお、精製された遺伝子産物が有するアミノ酸配列の確認は、公知のアミノ酸分析、例えばエドマン分解法による自動アミノ酸配列決定法等により行うことができる。

[0073] ８．抗体蛋白質の製造方法

前記７．の項目に記載の製造方法を用いて製造されるヘテロ多量体蛋白質としては抗体蛋白質を挙げることができる。抗体蛋白質は、２分子の重鎖ポリペプチド及び２分子の軽鎖ポリペプチドからなる４量体蛋白質である。従って、抗原結合能を維持した形態で抗体蛋白質を取得するためには、前記６．の項目に記載の形質転換細胞において、重鎖及び軽鎖の遺伝子の双方が導入されている必要がある。この場合に、重鎖及び軽鎖の遺伝子発現ユニットは、同じ発現ベクター上に存在しても良く、あるいは異なる発現ベクター上に存在していても良い。

[0074] 本発明において製造される抗体としては、ウサギ、マウス、ラット等実験動物を所望の抗原で免疫して作製された抗体を挙げることができる。また、前記の抗体を原料とするキメラ抗体、及びヒト化抗体も本発明において製造される抗体として挙げることができる。さらに、遺伝子改変動物又はファージディスプレイ法によって取得されるヒト抗体についても、本発明において製造される抗体である。

[0075] 抗体製造に用いる抗体遺伝子としては、該抗体遺伝子より転写・翻訳される重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの組合せが、任意の抗原蛋白質と結合する活性を保持している限り、特定のポリヌクレオチド配列を持つ抗体遺伝子に限定されない。

[0076] また、抗体遺伝子としては、必ずしも抗体の全長分子をコードしている必要はなく、抗体の機能性断片をコードしている遺伝子を用いることができる。これらの機能性断片をコードする遺伝子は、抗体蛋白質の全長分子をコードする遺伝子を遺伝子工学的に改変することによって取得することができる。

[0077] ９．その他の外来蛋白質の製造方法

本発明の製造方法の対象となる外来蛋白質としては、前述の抗体に加え、ヒト又は非ヒト動物由来の各種蛋白質、その機能性断片、その改変体等を挙げることができる。そのような蛋白質等としては、心房性ナトリウム利尿ペ

プチド（ＡＮＰ）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（ＢＮＰ）、Ｃ型ナトリウム利尿ペプチド（ＣＮＰ）、バソプレッシン、ソマトスタチン、成長ホルモン（ＧＨ）、インスリン、オキシトシン、グレリン、レプチン、アディポネクチン、レニン、カルシトニン、オステオプロテジェリン、インスリン様成長因子（ＩＧＦ）等のペプチドホルモン、インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦα／βほかＴＮＦスーパーファミリー等）、神経成長因子（ＮＧＦ）、細胞増殖因子（ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＨＧＦ、ＴＧＦ等）、造血因子（ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、エリスロポエチン等）、アディポカイン等のサイトカイン、ＴＮＦ受容体等の受容体、リゾチーム、プロテアーゼ、プロテイナーゼ、ペプチダーゼ等の酵素、その機能性断片（元の蛋白質の生物活性を一部又は全部保持している断片）、それらの蛋白質を含むことからなる融合蛋白質等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

実施例

[0078] １０．実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲をなんら限定するものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素、ＤＮＡ修飾酵素等は市販のものであり、常法に従って使用することができる。また、ＤＮＡのクローニング、ポリヌクレオチド配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の培養、得られる培養物からの蛋白質の採取、精製等に用いた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

（実施例１）プロモーター活性評価用ベクターＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏの構築

プロモーター活性の評価は、ＳＥＡＰの発現を指標にして行うこととし、評価用ベクターの構築を行った。

１－１）ＳＥＡＰのｃＤＮＡのＰＣＲによる増幅との制限酵素部位の付加

ＳＥＡＰのｃＤＮＡは、開始コドンのＡＴＧの直前にＮｈｅＩ部位、終止

コドンの直後にＢｇｌIIを付加したプライマーとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲにより増幅した。テンプレートとしては、ｐＳＥＡＰ２－ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用した。得られたフラグメントをＮｈｅＩおよびＢｇｌIIで消化し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。

使用したプライマー

ＳＥＡＰＦ：ＡＡＡＧＣＴＡＧＣＡＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＧＧＣＣ

ＳＥＡＰＲ：ＡＡＡＡＧＡＴＣＴＴＣＡＴＧＴＣＴＧＣＴＣＧＡＡＧＣＧＧＣＣＧＧＣＣＧＣ

１－２）ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏの構築

ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、ＮｈｅＩ－ＢａｍＨＩで消化後、１－１）で調製したＳＥＡＰフラグメントをｌｉｇａｔｉｏｎ反応により組み込んだ。得られたプラスミドをＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ命名した。

（実施例２）ＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、及びＲＰＬ３４のプロモーター領域のクローニング

ｍＲＮＡ量を指標とし、転写活性の高いプロモーターを有すると考えられるヒト遺伝子として、ＥＥＦ２、ＹＢＸ１，ＰＰＩＡ，ＰＳＡＰ，ＲＡＮ，ＰＲＬ３２，ＰＲＬ３４，ＲＰＬＰ１，ＲＰＳ７，ＲＰＳ２４，ＴＭＳＢ４Ｘ、ＵＢＣ，ＹＷＨＡＥ，ＡＲＰＣ２，ＳＥＲＢＰ１を選出し、各遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行い、実施例３のプロモーター活性の評価に供した。

２－１）ＲＰＳ７のプロモーター領域のクローニング

ＲＰＳ７のプロモーター領域としては、ＧｅｎＢａｎｋにＮＭ＿００１０１１．３で登録されているｍＲＮＡの配列を参考にして、ＲＰＳ７の転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでの配列を用いた。

[0079] ＲＰＳ７のプロモーター領域は、大腸菌人工染色体のクローンＲＰ１１－６４４Ｐ１９（ＧｅｎｏＴｅｃｈｓ）をテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲで増幅し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ消化して、ＣＭＶプロモーターを取り除いた後に、ＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ部位にＲＰＳ７のプロモーター領域をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて組み込み、ＲＰＳ７／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。クローニングしたＲＰＳ７のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号１に示す。

ＲＰＳ７のプライマーセット

ＲＰＳ７－Ｆ：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＡＴＴＴＡＴＧＴＡＴＡＴＴＡＡＣＡＧＣＡＣＡＴＴＡＡＣＡＧＣ

ＲＰＳ７－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＴＣＣＴＧＧＧＡＧＡＡＣＴＧＡＡＧＧＣＡＣＡＧＣＧＧ

２－２）ＲＰＬ３２のプロモーター領域のクローニング

ＲＰＬ３２のプロモーター領域としては、ＧｅｎＢａｎｋにＮＭ＿０００９９４．３で登録されているｍＲＮＡの配列を参考にして、ＲＰＬ３２の転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでの配列を用いた。

[0080] ＲＰＬ３２のプロモーター領域は、大腸菌人工染色体のクローンＲＰ１１－７６７Ｃ１（ＧｅｎｏＴｅｃｈｓ）をテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲで増幅し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ消化して、ＣＭＶプロモーターを取り除いた後に、ＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ部位にＲＰＬ３２のプロモーター領域をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて組み込み、ＲＰＬ３２

／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。クローニングしたＲＰＬ３２のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号２に示す。

ＲＰＬ３２のプライマーセット

ＲＰＬ３２－Ｆ：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＣＴＡＡＡＧＴＧＡＴＴＣＣＴＡＡＡＧＡＡＴＴＣＴＴＣＣＣ

ＲＰＬ３２－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＧＧＧＧＡＡＧＡＡＧＣＧＧＣＣＣＣ

２－３）ＲＰＬ３４のプロモーター領域のクローニング

ＲＰＬ３４のプロモーター領域としては、ＧｅｎＢａｎｋにＮＭ＿０３３６２５．２で登録されているｍＲＮＡの配列を参考にして、ＲＰＬ３４の転写開始点の上流約２ｋｂｐのヌクレオチドから開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでの配列を用いた。

[0081] ＲＰＬ３４のプロモーター領域は、大腸菌人工染色体のクローンＲＰ１１－４６２Ｃ２４（ＧｅｎｏＴｅｃｈｓ）をテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲで増幅し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ消化して、ＣＭＶプロモーターを取り除いた後に、ＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ部位にＲＰＬ３４のプロモーター領域をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて組み込み、ＲＰＬ３４／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。クローニングしたＲＰＬ３４のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号３に示す。

ＲＰＬ３４のプライマーセット

ＲＰＬ３４－Ｆ：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＡＴＧＧＴＧＧＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＴＴＣＡＣＴＧＣＡＧＣＣ

ＲＰＬ３４－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＴＣＴＧＡＧＴＧＣＣＴＡＡＡＴＴＡＡＧＡＡＴＡＧＡＧＴＡＡＣＡＴＣ

２－４）他のヒト遺伝子のプロモーター領域のクローニング

前記２－１）に記載の方法に準じて、ＥＥＦ２、ＹＢＸ１、ＰＰＩＡ、ＰＳＡＰ、ＲＡＮ、ＰＲＬ３２、ＰＲＬ３４、ＲＰＬＰ１、ＲＰＳ７、ＲＰＳ２４、ＴＭＳＢ４Ｘ、ＵＢＣ、ＹＷＨＡ、ＡＲＰＣ２、ＳＥＲＢＰ１のプロモーター領域のクローニングを行い、クローニングされたポリヌクレオチドを含むｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。

（実施例３）ＣＨＯ－Ｋ１ポリクローナル形質転換細胞におけるＳＥＡＰ発現量を指標としたプロモーター活性の評価

３－１）トランスフェクション

ＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ）は１０％ Ｕｌｔｒａ－Ｌｏｗ ＩｇＧ ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）を含むＦ－１２ Ｎｕｔｒｉｅｎｔ Ｍｉｘｔｕｒｅ培地（ＧＩＢＣＯ）を用いて５％CO_2、３７℃で継代培養した。

[0082] ６ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（ＩＷＡＫＩ）に５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌでＣＨＯ－Ｋ１細胞を播種し、翌日に２μｇの実施例１）、及び２）で作製したＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＳ７／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＬ３２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、及びＲＰＬ３４／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ等をそれぞれｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてトランスフェクションした。

３－２）Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎによる薬剤選択

トランスフェクションの２日後に、６ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅから細胞をトリプシン処理により回収し、全量を６ｃｍ ｄｉｓｈ（Ｎｕｎｃ）に播種するとともに培地に終濃度８ μｇ／ｍＬのＰｕｒｏｍｙｃｉｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を添加して薬剤選択を開始した。

３－３）ポリクローナル形質転換細胞株による評価

薬剤選択開始から１１日後にポリクローナル形質転換細胞株をトリプシンで回収し細胞数を測定し、１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ／ｗｅｌｌで２４ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（ＩＷＡＫＩ）に播種し、２４時間後に培養上清を回収し上清のＳＥＡＰ活性をＳｅｎｓｏＬｙｔｅ™ ｐＮＰＰ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ Ａｓ

ｓａｙ（ＡＮＡＳＰＥＣ）を用いて測定した。対照としたＣＭＶプロモーター（ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ）のＳＥＡＰ活性と比べて強かったのは、ＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、ＲＰＬ３４のプロモーター領域であり、それぞれ１．７倍以上、２．０倍以上、２．５倍以上のＳＥＡＰ活性であった（図１）。ＥＥＦ２、ＹＢＸ１、ＰＰＩＡ、ＰＳＡＰ、ＲＡＮ、ＰＲＬ３２、ＰＲＬ３４、ＲＰＬＰ１、ＲＰＳ７、ＲＰＳ２４、ＴＭＳＢ４Ｘ、ＵＢＣ、ＹＷＨＡ、ＡＲＰＣ２、ＳＥＲＢＰ１のプロモーター領域は、ＣＭＶプロモーターのＳＥＡＰ活性と比べて弱かった。

（実施例４）トランケート型プロモーターのクローニング

ＲＰＳ７、ＲＰＬ３２、及びＲＰＬ３４のトランケート型プロモーターとして、各遺伝子の転写開始点の約１ｋｂ上流のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでのヌクレオチド配列（Ｔ１）、及び転写開始点の約０．５ｋｂ上流のヌクレオチドから開始コドンまで対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでのヌクレオチド配列（Ｔ２）を用いて、そのトランケート型プロモーターのクローニングを実施した。

４－１）ＲＰＳ７Ｔ１、及びＲＰＳ７Ｔ２のクローニング

ＲＰＳ７Ｔ１、及びＲＰＳ７Ｔ２は、２－１）で作製したＲＰＳ７／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲで増幅し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ消化して、ＣＭＶプロモーターを取り除いた後に、ＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ部位にＲＰＳ７Ｔ１、及びＲＰＳ７Ｔ２のプロモーター領域をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて組み込み、ＲＰＳ７Ｔ１／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、及びＲＰＳ７Ｔ２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。クローニングしたＲＰＳ７Ｔ１、及びＲＰＳ７Ｔ２のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号４、及び

配列番号５に示す。

ＲＰＳ７Ｔ１のプライマーセット

ＲＰＳ７－Ｔ１：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＣＣＴＡＧＴＧＴＧＧＣＴＴＣＴＧＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＡＧＴＧＣ

ＲＰＳ７－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＴＣＣＴＧＧＧＡＧＡＡＣＴＧＡＡＧＧＣＡＣＡＧＣＧＧ

ＲＰＳ７Ｔ２のプライマーセット

ＲＰＳ７－Ｔ２：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＣＣＴＣＧＧＣＴＣＡＣＧＧＣＡＧＣＣＴＣＧＡＣＣＴＴＴＣＧＧＣ

ＲＰＳ７－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＴＣＣＴＧＧＧＡＧＡＡＣＴＧＡＡＧＧＣＡＣＡＧＣＧＧ

４－２）ＲＰＬ３２Ｔ１、及びＲＰＬ３２Ｔ２のクローニング

ＲＰＬ３２Ｔ１、及びＲＰＬ３２Ｔ２は、２－２）で作製したＲＰＬ３２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲで増幅し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ消化して、ＣＭＶプロモーターを取り除いた後に、ＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ部位にＲＰＬ３２Ｔ１、及びＲＰＬ３２Ｔ２のプロモーター領域をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて組み込み、ＲＰＬ３２Ｔ１／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、及びＲＰＬ３２Ｔ２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。クローニングしたＲＰＬ３２Ｔ１、及びＲＰＬ３２Ｔ２のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号６、及び配列番号７に示す。

ＲＰＬ３２Ｔ１のプライマーセット

ＲＰＬ３２Ｔ１：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＣＣＴＣＴＣＧＡＧＴＡＡＣＴＧＧＧＡＣＴＡＣＡＧＧＣＡＴＧＣ

ＲＰＬ３２－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＧＧＧＧＡＡＧＡＡＧＣＧＧＣＣＣＣ

ＲＰＬ３２Ｔ２のプライマーセット

ＲＰＬ３２Ｔ２：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＧＣＡＧＴＴＴＣＧＣＣＣＡＧＴＧＧＴＴＡＧＡＡＧＣＧＴＧＧ

ＲＰＬ３２－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＧＧＧＧＡＡＧＡＡＧＣＧＧＣＣＣＣ

４－３）ＲＰＬ３４Ｔ１、及びＲＰＬ３４Ｔ２のクローニング

ＲＰＬ３４Ｔ１、及びＲＰＬ３４Ｔ２は、２－３）で作製したＲＰＬ３４／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲで増幅し、ｍｉｎｅｌｕｔｅ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）で精製した。ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ消化して、ＣＭＶプロモーターを取り除いた後に、ＳｐｅＩ－ＮｈｅＩ部位にＲＰＬ３４Ｔ１、及びＲＰＬ３４Ｔ２のプロモーター領域をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて組み込み、ＲＰＬ３４Ｔ１／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、及びＲＰＬ３４Ｔ２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏを構築した。クローニングしたＲＰＬ３４Ｔ１、及びＲＰＬ３４Ｔ２のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号８、及び配列番号９に示す。

ＲＰＬ３４Ｔ１のプライマーセット

ＲＰＬ３４Ｔ１：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＧＣＴＴＣＣＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＴＣＴＡＡＧＡＧＣＧＣＴＣＣＣＣ

ＲＰＬ３４－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＴＣＴＧＡＧＴＧＣＣＴＡＡＡＴＴＡＡＧＡＡＴＡＧＡＧＴＡＡＣＡＴＣ

ＲＰＬ３４Ｔ２のプライマーセット

ＲＰＬ３４Ｔ２：ＴＴＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＧＴＡＡＡＧＣＴＴＧＴＧＣＴＣＴＧＡＡＴＡＡＡＴＧＡＣＡＡＧＧ

ＲＰＬ３４－Ｒ：ＧＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧＣＴＣＴＧＡＧＴＧＣＣＴＡＡＡＴＴＡＡＧＡＡＴＡＧＡＧＴＡＡＣＡＴＣ

（実施例５）ＣＨＯ－Ｋ１ポリクローナル形質転換細胞におけるＳＥＡＰ発現量を指標としたトランケート型プロモーターの活性の評価

５－１）トランスフェクション

ＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ）は１０％ Ｕｌｔｒａ－Ｌｏｗ ＩｇＧ ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）を含むＦ－１２ Ｎｕｔｒｉｅｎｔ Ｍｉｘｔｕｒｅ培地（ＧＩＢＣＯ）を用いて５％ＣＯ２、３７℃で継代培養した。

[0083] ６ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（ＩＷＡＫＩ）に2×10^5ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌでＣＨＯ－Ｋ１細胞を播種し、翌日に２μｇの実施例１）、２）及び４）で作製したＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＳ７／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＳ７Ｔ１／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＳ７Ｔ２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＬ３２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＬ３２Ｔ１／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＬ３２Ｔ２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＬ３４／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、ＲＰＬ３４Ｔ１／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ、及びＲＰＬ３４Ｔ２／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏをそれぞれＦｕｇｅｎｅ６（Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いてトランスフェクションした。

５－２）Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎによる薬剤選択

トランスフェクションの２日後に、６ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅから細胞をトリプシン処理により回収し、全量を６ｃｍ ｄｉｓｈ（Ｎｕｎｃ）に播種するとともに培地に終濃度８ μｇ／ｍＬのＰｕｒｏｍｙｃｉｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を添加して薬剤選択を開始した。

５－３）ポリクローナル形質転換細胞株による評価

薬剤選択開始から１１日後にポリクローナル形質転換細胞株をトリプシンで回収し細胞数を測定し、1×10^5ｃｅｌｌｓ／ｍＬ／ｗｅｌｌで２４ ｗ

ｅｌｌ ｐｌａｔｅ（ＩＷＡＫＩ）に播種し、２４時間後に培養上清を回収し上清のＳＥＡＰ活性をＳｅｎｓｏＬｙｔｅ（登録商標） ｐＮＰＰ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ Ａｓｓａｙ（ＡＮＡＳＰＥＣ）を用いて測定した。測定結果を図２に示す。各トランケート型プロモーターにおいても、対照としたＣＭＶプロモーター（ＣＭＶ／ｐＳｅａｐＩＲＥＳｐｕｒｏ）のＳＥＡＰ活性を上回るＳＥＡＰ活性が得られ、これらのプロモーターがＣＭＶよりも強いプロモーター活性を持つことが示された。

（実施例６）ＤＮＡエレメントの抽出

（６－１） 抗アセチル化ヒストンＨ３抗体を用いたクロマチン免疫沈降

抗アセチル化ヒストン抗体を用いたＣｈＩＰは、下記手順によりＥＺ ＣｈＩＰ（Ｕｐｓｔａｔｅ）を用いて行った。尚、特記がない限り、下記手順の中で使用した抗体、ｂｕｆｆｅｒ等はＵｐｓｔａｔｅ社製品を使用した。

[0084] まず、２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）をＧＩＢＣＯ（登録商標） ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ２９３ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて３７℃、８％CO_2条件下で培養を行い、遠心分離（１０００ｒｐｍ、５分、室温）により増殖期にある細胞を回収した。２×10^7個の細胞を１％ホルムアルデヒド入り培地で１０分間攪拌した後、１０×グリシンを加えて５分間室温で攪拌を行った。遠心分離（３０００ｒｐｍ、５分、４℃）により上清を除き、ＰＢＳを加えて細胞懸濁後に再度、遠心分離によりＰＢＳを除去し、ＳＤＳ ｌｙｓｉｓ ｂｕｆｆｅｒを加えて細胞の懸濁・溶解を行った。溶解したサンプルを氷水で冷却しながら超音波ホモジナイザー（ＢＲＡＮＳＯＮ）を用いてＤＮＡの断片化を行い、ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｃｏｃｋｔａｉｌ入りｄｉｌｕｔｉｏｎ ｂｕｆｆｅｒ及びＰｒｏｔｅｉｎ Ｇ固定化アガロースを加え、４℃で１時間攪拌し、遠心分離後に上清の回収を行った。次に、１０μｇのｎｏｒｍａｌ ｒａｂｂｉｔ ＩｇＧ、又はα－ａｃｅｔｙｌ Ｈｉｓｔｏｎｅ Ｈ３抗体を加え、４℃で一晩攪拌を行った。その溶液にｐｒｏｔｅｉｎ Ｇ固定化アガロースを加

えて、４℃で１時間攪拌後、遠心分離によりペレットの回収を行った。そのペレットをＬｏｗ　Ｓａｌｔ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｏｍｐｌｅｘ　Ｗａｓｈ　Ｂｕｆｆｅｒで2回、Ｈｉｇｈ　Ｓａｌｔ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｏｍｐｌｅｘ　Ｗａｓｈ　Ｂｕｆｆｅｒで2回、ＬｉＣｌ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｏｍｐｌｅｘ　Ｗａｓｈ　Ｂｕｆｆｅｒで2回、最後にＴＥ　Ｂｕｆｆｅｒで４回洗浄し、ｅｌｕｔｉｏｎ　ｂｕｆｆｅｒ（２０μｌの１Ｍ炭酸水素ナトリウム、１０μｌのＳＤＳ、１７０μｌの滅菌水）を加えて３０分後に遠心分離を行い、上清の回収を行った。

次に、その上清に５Ｍ塩化ナトリウムを加えて６５℃で一晩加熱し、更に、ＲＮａｓｅ　Ａを加えて３７℃で３０分間インキュベートした。０．５ＭＥＤＴＡ、１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、Ｐｔｏｔｅｉｎａｓｅ　Ｋを加えて４５℃で２時間静置した。

最後に、Ｐｔｏｔｅｉｎａｓｅ　Ｋで処理した溶液の５倍量のＲｅａｇｅｎｔＡ、Ｂ、Ｃを加え、Ｓｐｉｎ　ｆｉｌｔｅｒによる遠心分離（１００００ｒｐｍ、３０秒、室温）によりクロマチン免疫沈降されたＤＮＡの精製を行った。

（６－２）マイクロアレイ解析

ＧｅｎｏｍｅＰｌｅｘ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｗｈｏｌｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ（ＷＧＡ）　Ｋｉｔ（Ｓｉｇｍａ）を用いて、（６－１）の各ＣｈＩＰサンプルの増幅を行った。手順はＫｉｔ付属のＳｉｇｍａ社のプロトコールに従って行った。

ＣｈＩＰの確認を行うため、ＷＧＡにより増幅した各ＤＮＡ３２０ｎｇを鋳型として、下記プライマー及びＳＹＢＲ（登録商標）　Ｐｒｅｍｉｘ　Ｅｘ　Ｔａｑ™（Ｐｅｒｆｅｃｔ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ）（ＴＡＫＡＲＡ）を用いて、ＰＣＲ法（９５℃　５秒、６０℃　２０秒×４５ｃｙｃｌｅ）によりグリセルアルデヒド３リン酸脱水素酵素（ｇｌｙｃｅｌａｌｄｅｈｙｄｅ－３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ：ＧＡＰＤＨ）遺伝子内部の増幅を行った。なお、ＧＡＰＤＨは、ＣｈＩＰによりＤＮＡエレメ

ントが濃縮されたことを確認するための陽性コントロールとなるハウスキーピング遺伝子であり、ＥＺ　ＣｈＩＰ（Ｕｐｓｔａｔｅ）に付属のプライマーを用いてＰＣＲ法を実施した。

５’－ＴＡＣＴＡＧＣＧＧＴＴＴＴＡＣＧＧＧＣＧ－３’

５’－ＴＣＧＡＡＣＡＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＡＧＡＧＣＧＡ－３’

その結果、抗アセチル化ヒストンＨ３抗体で免疫沈降を行ったサンプル特異的にＧＡＰＤＨの増幅が確認された（図３）。ＷＧＡによって増幅した各ＤＮＡサンプルをマイクロアレイ解析（ＮｉｍｂｌｅＧｅｎ）にかけることにより、Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ　ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ　ｏｎ　Ｃｈｉｐ（ＣｈＩＰ　ｏｎ　ｃｈｉｐ）を行った。ＣｈＩＰ　ｏｎ　ｃｈｉｐは、（６－１）で濃縮されたＤＮＡをマイクロアレイ解析に供することによって、各ＤＮＡエレメントの同定を行う手法である。

（６－３）ＤＮＡエレメントの抽出

（６－２）から得られたＣｈＩＰ　ｏｎ　ｃｈｉｐ解析結果を基に、６２％以上のＡＴ含量を有する５つの配列の抽出を行った。

Ａ２；１５番染色体（８０９６６４２９～８０９７４８７８）

Ａ７；１１番染色体（８８９９２１２３～８９０００５４２）

Ａ１８；４番染色体（１１１２７５９７６～１１１２８４４５０）

Ｂ５；１番染色体（１４３０３４６８４～１４３０４３０８４）

Ｃ１４；１１番染色体（４６０８９０５６～４６０９７４８２）

（実施例７）

分泌型アルカリフォスファターゼ（ＳＥＡＰ）の発現を指標とした、ＤＮＡエレメントの効果

（７－１）ＳＥＡＰ発現ベクターの構築

ｐＳＥＡＰ２－ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を鋳型に、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（９４℃　３０秒、６８℃　２分×４０ｃｙｃｌｅ）により、ＳＥＡＰ遺伝子の増幅を行った。

５’－ＡＡＡＧＣＴＡＧＣＡＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＧＧＣＣ－３’

５’－ＡＡＡＡＧＡＴＣＴＴＣＡＴＧＴＣＴＧＣＴＣＧＡＡＧＣＧＧＣＣＧＧＣＣＧＣ－３’

次に、アガロースゲル電気泳動により増幅されたＳＥＡＰ断片を分離後、ゲルから切り出し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）により精製し、このＤＮＡ断片をインサートとした。インサートを制限酵素ＮｈｅＩ、ＢｇｌＩＩ、ベクターｐＩＲＥＳ　ｈｙｇ３（ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を制限酵素ＮｈｅＩ，ＢａｍＨＩで処理後、アガロース電気泳動によりそれぞれの目的断片を分離後、ゲルから切り出し、精製後に、ｌｉｇａｔｉｏｎ反応、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎを行った。Ｌｉｇａｔｉｏｎ反応は、ＬｉｇａＦａｓｔ　Ｒａｐｉｄ　ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて行った。Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎは、まず、凍結しているコンピテントセルＪＭ１０９（ＴＡＫＡＲＡ）を融解し、その溶液にｌｉｇａｔｉｏｎ反応後の溶液１０μｌを加え、氷上で３０分静置した。その後、ｈｅａｔ　ｓｈｏｃｋ（４２℃、４５秒）を行い、５分氷冷した。この菌体懸濁液に１ｍｌのＬＢ培地を加え、３７℃で１時間振とうし、０．１ｍｇ／ｍｌアンピシリン入りのＬＢプレートに播き、３７℃で１４～１６時間培養した。その後、アルカリ法によりＬＢプレート上で培養したコロニーから目的プラスミドの回収を行った。最後に、アルカリ法にて得られたプラスミド中のＳＥＡＰのポリヌクレオチド配列を決定することで、ｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｈｙｇｒｏを構築した。

（７－２）ＤＮＡエレメントのクローニング

次に、実施例６で抽出したＤＮＡエレメントを、それぞれのポリヌクレオチド配列を有するバクテリア人工染色体（ＢＡＣ）からＢＡＣ　ＳＵＢＣＬＯＮＩＮＧ　Ｋｉｔ（Ｇｅｎｅ　Ｂｒｉｄｇｅｓ）を用いて（７－１）のＳＥＡＰ発現ベクターへクローニングを行った。

[0085] まず、（７－１）のｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ ｉｒｅｓ Ｈｙｇｒｏを制限酵素ＳｐｅＩで数時間処理し、エタノール沈殿を行い、滅菌水で溶解した。ＳｐｅＩ処理した前記ベクターを鋳型に、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ）を用いたＰＣＲ法（９４℃ １５秒、５５℃ ３０秒、６８℃ １０分×３０ｃｙｃｌｅ）を行った。

Ａ２Ｄ；

5’－ＧＧＡＡＡＴＴＧＡＧＡＡＧＴＡＴＣＡＴＴＣＡＣＡＡＣＡＧＴＡＣＣＡＣＡＡＡＣＡＴＧＡＡＡＴＡＡＡＴＧＴＧＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ２Ｒ；

5’－ＣＴＣＡＴＴＣＴＧＴＧＧＧＴＴＧＴＣＡＴＴＴＣＡＣＴＴＣＣＴＴＧＡＴＧＣＴＡＴＣＣＴＴＴＣＡＡＧＣＡＡＡＡＴＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－3’

Ａ７Ｄ；

5’－ＣＴＴＡＴＴＴＴＣＴＡＡＧＴＡＧＴＡＴＡＧＡＣＴＴＡＡＴＴＧＴＧＡＧＡＡＣＡＡＡＡＴＡＡＡＡＡＣＴＴＧＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ７Ｒ；

5’－ＣＴＣＴＴＣＣＣＡＴＴＣＴＣＡＴＴＴＧＡＡＴＣＴＡＣＴＴＣＡＡＡＡＧＧＴＴＴＡＣＣＡＴＡＣＴＡＡＧＡＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－3’

Ａ１８Ｄ；

5’－ＣＧＣＣＴＧＴＡＡＴＣＣＣＡＧＣＡＣＴＴＴＧＧＧＡＧＧＣＴＧＡＧＧＣＧＧＧＴＧＧＡＴＣＡＣＣＴＧＡＧＧＴＣＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ１８Ｒ；

5’－ＣＡＴＡＣＡＧＡＡＧＣＣＡＧＴＴＴＧＡＡＣＴＧＡＧＡＣＣＴＣＡＣＴＣＣＡＴＴＴＣＴＴＡＣＡＡＧＴＴＡＴＧＣＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｂ５Ｄ；

5’－ＡＣＣＧＴＴＴＴＡＴＡＴＴＧＴＴＴＡＡＧＣＡＴＴＴＣＣＴＡＧＡＣＡＴＡＴＴＴＧＧＣＴＡＣＡＡＡＴＣＴＡＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｂ５Ｒ；

5’－ＧＡＴＣＴＴＡＧＧＧＧＧＧＣＴＧＡＴＴＡＴＡＴＡＡＡＡＣＡＡＴＡＧＡＡＡＴＧＴＡＧＴＣＴＴＡＧＡＴＧＡＡＡＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４Ｄ；

5’－ＣＡＣＡＡＡＧＴＴＣＡＣＴＧＴＣＡＡＧＧＣＣＡＧＧＴＧＡＴＧＡＧＧＣＣＣＡＣＡＣＡＴＧＣＣＣＧＧＡＣＣＴＴＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｃ１４Ｒ；

5’－ＣＡＡＡＡＣＣＴＣＡＴＣＴＣＴＡＣＴＧＡＡＡＡＴＡＧＡＡＡＡＴＴＡＧＣＴＧＧＧＣＧＴＧＧＴＧＧＣＡＧＧＴＧＣＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

反応溶液の一部を用いてアガロースゲル電気泳動により増幅の確認を行った後、残りの溶液はエタノール沈殿を行い、滅菌水で溶解し、形質転換用ＤＮＡとした。

[0086] 次に、形質転換用大腸菌の調製を行った。

[0087]

実施例６で抽出された５配列と対応するＢＡＣクローンは以下の通り。

[0088]

[表1]

抽出配列	対応するＢＡＣクローン
Ａ２	ＲＰ１１－１５２Ｆ１３
Ａ７	ＲＰ１１－６４３Ｇ５
Ａ１８	ＲＰ１１－１１５Ａ１４
Ｂ５	ＲＰ１１－６４０Ｍ９
Ｃ１４	ＲＰ１１－７０２Ｆ３

[0089] 融解した前記ＢＡＣ（株式会社ジェノテックス）１０μｌを培地１ｍｌ（最終濃度ｃｈｌｏｒａｍｐｈｅｎｉｃｏｌ １５μｇ／ｍｌ含む）に植菌し、３７℃で一晩培養を行った。その培養液３０μｌを１．４ｍｌの培地（最終濃度ｃｈｌｏｒａｍｐｈｅｎｉｃｏｌ １５μｇ／ｍｌ含む）に移し、３７℃で２時間培養を行い、遠心及び滅菌水による洗浄を２回繰り返し、２０μｌの滅菌水で懸濁した。冷却したキュベット（０．１ｃｍ）にｐＲＥＤ／ＥＴ（Ｇｅｎｅ Ｂｒｉｄｇｅｓ） １μｌ及び大腸菌を添加し、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ（１３５０Ｖ、１０μＦ）を行った後、ＳＯＣ培地１ｍｌを加え、３０℃で７０分間の培養を行い、培養液１００μｌをＬＢプレート（最終濃度ｔｅｔｒａｃｙｃｌｉｎ ３μｇ／ｍｌ、ｃｈｌｏｒａｍｐｈｅｎｉｃｏｌ １５μｇ／ｍｌ含む）に播種し、３０℃で一晩インキュベートした。次の日に得られたコロニーを培地１ｍｌ（最終濃度ｔｅｔｒａｃｙｃｌｉｎ ３μｇ／ｍｌ、ｃｈｌｏｒａｍｐｈｅｎｉｃｏｌ １５μｇ／ｍｌ含む）に植菌し、３０℃で一晩培養を行った。培養液３０μｌを１．４ｍｌ培地（最終濃度ｔｅｔｒａｃｙｃｌｉｎ ３μｇ／ｍｌ、ｃｈｌｏｒａｍｐｈｅｎｉｃｏｌ １５μｇ／ｍｌ含む）に移し、３０℃で２時間培養を行い、５０μｌの１０％Ｌ－ａｒａｂｉｎｏｓｅを添加し、更に３７℃で１時間の培養を行った。その後、滅菌水による洗浄を２回繰り返し、３０μｌの滅菌水で懸濁した大腸菌及び、形質転換用ＤＮＡ １μｌを、冷やしたキュベット（０．１ｃｍ）に添加し、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ（１３５０Ｖ、１０μＦ）を行った。ＳＯＣ培地１ｍｌを加え、３７℃で９０分培養を行い、培養液全量をＬＢプレート（アンピシリン１００μｇ／ｍｌ含

む）への播種、プレート培養、アルカリ法による目的プラスミドの取得を行った。最後に、取得されたプラスミドの配列確認及び制限酵素確認の実施により、目的プラスミドの構築を行った（図４）。

（７－３）ＳＥＡＰ発現を指標とした評価

宿主細胞ＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ）、遺伝子導入試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、（７－２）で構築された各プラスミドの評価を実施した。

[0090] 遺伝子導入２日後からｈｙｇｒｏｍｙｃｉｎ ８００μｇ／ｍｌによる薬剤選択を約２週間行い、ポリクローナル安定発現株の構築を行った。樹立された細胞株は、測定前日に培地交換を行い、一定細胞数を２４穴プレート（ＩＷＡＫＩ）に播種した。播種２４時間後に培養上清の回収を行い、ＳＥＡＰ活性の測定を行った。培養上清中のＳＥＡＰ活性は、ＳｅｎｓｏＬｙｔｅ™ ｐＮＰＰ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ Ａｓｓａｙ（ＡＮＡＳＰＥＣ）を用いて、測定した。

[0091] 測定結果を図５に示す。Ｎｏ ｅｌｅｍｅｎｔであるコントロールのＳＥＡＰ活性を１としたとき、ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４を有するＣＨＯ安定発現株の培養上清中のＳＥＡＰ活性は５倍以上の数値を示した。このことにより、ＤＮＡエレメント５種類全てはＳＥＡＰ発現を劇的に亢進することが確認された。なお、前記の５種類のポリヌクレオチド配列は、配列表の配列番号の１０乃至１４に記載されている。

（実施例８）併用プロモーターの一般性

実施例７においてＤＮＡエレメントの評価に用いたベクターのプロモーターはＣＭＶプロモーターであったが、他の一般的なプロモーターとの併用について検討を行った。

（８－１） ＥＦ－１α及びＳＶ４０プロモーターを用いたＳＥＡＰ発現ベクターの構築

ｐＳＥＡＰ２－ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を鋳型に、（７－１）

に記載のプライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いたＰＣＲ法（９４℃　３０秒、６８℃　２分×４０ｃｙｃｌｅ）により、ＳＥＡＰ遺伝子の増幅を行った。増幅されたＳＥＡＰは、（７－１）と同様の方法によりインサートとして調製した。インサートを制限酵素ＮｈｅＩ、ＢｇｌＩＩ、ベクターｐＩＲＥＳ　ｐｕｒｏ３（ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を制限酵素ＮｈｅＩ、ＢａｍＨＩで処理し、（７－１）と同様の方法でｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏを構築した。

[0092] 次に、ｐＥＦ１／Ｖ５－Ｈｉｓ　Ａ（Ｉｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ）を鋳型として、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　２分×３０ｃｙｃｌｅ）により、ＥＦ－１αプロモーターの増幅を行った。

５’－ＡＡＡＡＣＴＡＧＴＣＡＧＡＧＡＧＧＡＡＴＣＴＴＴＧＣＡＧＣＴＡＡＴＧＧＡＣＣ－３’

５’－ＡＡＡＧＡＴＡＴＣＣＣＴＡＧＣＣＡＧＣＴＴＧＧＧＴＧＧＴＡＣＣＡＡＧＣ－３’

前記で構築したｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏをベクターとして、それぞれを制限酵素ＳｐｅＩ、ＥｃｏＲＶで処理し、（７－１）に記載の方法に準じてｐＥＦ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏの構築を行った。

[0093] 同様に、ｐｃＤＮＡ３．１＋（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を鋳型に、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃　１５秒、６０℃　３０秒、６８℃　１分×３０ｃｙｃｌｅ）により、ＳＶ４０プロモーターの増幅を行った。

５’－ＡＡＡＡＣＴＡＧＴＣＴＧＴＧＧＡＡＴＧＴＧＴＧＴＣＡＧＴＴＡＧＧＧＴＧ－３’

５’－ＡＡＡＧＡＴＡＴＣＡＧＣＴＴＴＴＴＧＣＡＡＡＡＧＣＣＴＡＧＧＣＣＴＣ－３’

前記で構築したｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏをベクターとして、それぞれを制限酵素ＳｐｅＩ、ＥｃｏＲＶで処理し、（７－１）に記載

の方法に準じてｐＳＶ４０／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏの構築を行った。

（８－２）　ＤＮＡエレメントＡ２又はＡ７のクローニング

（８－１）で構築したｐＥＦ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏ及びｐＳＶ４０／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏを基本骨格として、ＤＮＡエレメントＡ２又はＡ７のクローニングを行った。

[0094] まず、ｐＥＦ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏ及びｐＳＶ４０／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｐｕｒｏを制限酵素ＳｐｅＩで数時間処理し、エタノール沈殿を行い、滅菌水で溶解した。ＳｐｅＩ処理したそれぞれのベクターを鋳型に、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃　１５秒、５５℃　３０秒、６８℃　１０分×３０ｃｙｃｌｅ）により、形質転換用ＤＮＡの調製を行った。

Ａ２（ＥＦ／Ｄ）；

5’－ＧＧＡＡＡＴＴＧＡＧＡＡＧＴＡＴＣＡＴＴＣＡＣＡＡＣＡＧＴＡＣＣＡＣＡＡＡＣＡＴＧＡＡＡＴＡＡＡＴＧＴＧＣＴＡＧＴＣＡＧＡＧＡＧＧＡＡＴＣＴＴＴＧＣＡＧＣ－3’

Ａ２（ＳＶ４０／Ｄ）；

5’－ＧＧＡＡＡＴＴＧＡＧＡＡＧＴＡＴＣＡＴＴＣＡＣＡＡＣＡＧＴＡＣＣＡＣＡＡＡＣＡＴＧＡＡＡＴＡＡＡＴＧＴＧＣＴＡＧＴＣＴＧＴＧＧＡＡＴＧＴＧＴＧＴＣＡＧＴＴＡＧ－3’

Ａ２（共通／Ｒ）；

5’－ＣＴＣＡＴＴＣＴＧＴＧＧＧＴＴＧＴＣＡＴＴＴＣＡＣＴＴＣＣＴＴＧＡＴＧＣＴＡＴＣＣＴＴＴＣＡＡＧＣＡＡＡＡＴＴＴＴＡＡＡＡＣＴＴＴＡＴＣＣＡＴＣＴＴＴＧＣＡ－3’

Ａ７（ＥＦ／Ｄ）；

5’－ＣＴＴＡＴＴＴＴＣＴＡＡＧＴＡＧＴＡＴＡＧＡＣＴＴＡＡＴＴＧＴＧＡＧＡＡＣＡＡＡＡＴＡＡＡＡＡＣＴＴＧＣＴＡＧＴＣＡＧＡＧＡＧＧＡ

ＡＴＣＴＴＴＧＣＡＧＣ－３’

Ａ７（ＳＶ４０／Ｄ）；

５’－ＣＴＴＡＴＴＴＴＣＴＡＡＧＴＡＧＴＡＴＡＧＡＣＴＴＡＡＴＴＧＴＧＡＧＡＡＣＡＡＡＡＴＡＡＡＡＡＣＴＴＧＣＴＡＧＴＣＴＧＴＧＧＡＡＴＧＴＧＴＧＴＣＡＧＴＴＡＧ－３’

Ａ７（共通／Ｒ）；

５’－ＣＴＣＴＴＣＣＣＡＴＴＣＴＣＡＴＴＴＧＡＡＴＣＴＡＣＴＴＣＡＡＡＡＧＧＴＴＴＡＣＣＡＴＡＣＴＡＡＧＡＡＣＴＡＧＴＴＴＴＡＡＡＡＣＴＴＴＡＴＣＣＡＴＣＴＴＴＧＣＡ－３’

調製した形質転換用ＤＮＡ及びｐＲｅｄ／ＥＴを形質転換したＢＡＣを用いて、ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７を（８－１）に記載のベクターへクローニングを行った。尚、操作は（７－２）に記載の方法に準じて行った。

（８－３）　ＳＥＡＰ発現を指標とした評価

宿主細胞ＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ）、遺伝子導入試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、（８－２）で構築された各プラスミドの評価を実施した。

[0095] 遺伝子導入２日後からｐｕｒｏｍｙｃｉｎ　８μｇ／ｍｌによる薬剤選択を約２週間行い、ポリクローナル安定発現株の構築を行った。樹立された細胞株は、測定前日に培地交換後に一定細胞数を２４穴プレートに播種した。播種２４時間後に培養上清の回収を行い、ＳＥＡＰ活性の測定を行った。培養上清中のＳＥＡＰ活性は、ＳｅｎｓｏＬｙｔｅ™ ｐＮＰＰ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ Ａｓｓａｙ（ＡＮＡＳＰＥＣ）を用いて、測定した。

[0096] 測定結果を図６に示す。Ｎｏ ｅｌｅｍｅｎｔであるコントロールのＳＥＡＰ活性を１としたとき、ＤＮＡエレメントＡ２又はＡ７は、ＥＦ－１αプロモーターと併用することで２倍以上、ＳＶ４０プロモーターと併用することで４倍以上の発現亢進効果を示した。このことから、これらのＤＮＡエレメントは、一般的なプロモーターとの併用により外来遺伝子の発現亢進効果

を示すことが確認された。

（実施例９）抗体発現を指標とした評価

（９－１）ヒト軽鎖発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬの構築

プラスミドｐＥＦ６／Ｖ５－ＨｉｓＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を鋳型として下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法を行うことにより、ＢＧＨｐＡの直後（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｐｏｓｉｔｉｏｎ　２１７４）から、ＳｍａＩ（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｐｏｓｉｔｉｏｎ　２９５８）までのＤＮＡ断片（ｆ１　ｏｒｉｇｉｎ　ｏｆ　ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ及びＳＶ４０　ｐｒｏｍｏｔｅｒ　ａｎｄ　ｏｒｉｇｉｎを含むＤＮＡフラグメント、以下、「フラグメントＡ」とする。なお、フラクメントＡのポリヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１５に記載されている。）を取得した。

５’－ＣＣＡＣＧＣＧＣＣＣＴＧＴＡＧＣＧＧＣＧＣＡＴＴＡＡＧＣ－３’

５’－ＡＡＡＣＣＣＧＧＧＡＧＣＴＴＴＴＴＧＣＡＡＡＡＧＣＣＴＡＧＧ－３’

得られたフラグメントＡと、ヒトκ鎖分泌シグナル、ヒトκ鎖定常領域及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナルをコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡフラグメント（以下、「フラグメントＢ」とする）をオーバーラップＰＣＲにより結合した。得られたフラグメントＡとフラグメントＢとが結合したＤＮＡ断片を制限酵素ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで消化し、制限酵素ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで消化したプラスミドｐＥＦ６／Ｖ５－ＨｉｓＢ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とライゲーションし、ＥＦ－１αプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトκ鎖定常領域、及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナル配列をもつ、ヒト軽鎖発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬを構築した。

[0097] 前記の方法で得られたｐＥＦ６ＫＣＬから制限酵素ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで切り出されたＤＮＡ断片を、ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで消化したｐＥＦ１／ｍｙｃ－ＨｉｓＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）とｌｉｇａｔｉｏｎし、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ、アルカリ法、配列確認によりプラスミドｐＥＦ

１ＫＣＬを構築した。

（９－２）ヒト重鎖発現ベクターｐＥＦ１ＦＣＣＵの構築

ヒトＩｇＧ１シグナル配列及び定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片（このＤＮＡ断片の有するポリヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１６に記載されている）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで消化し、ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで消化したプラスミドｐＥＦ１ＫＣＬと結合し、ＥＦ－１αプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒト重鎖定常領域、及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナル配列をもつヒト重鎖発現ベクターｐＥＦ１ＦＣＣＵを構築した。

（９－３）ヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃）の構築

（９－１）、（９－２）で構築したＬ鎖又はＨ鎖発現ベクターを結合させることにより、ヒト化抗体発現シングルベクター（ｐＥＦ＿ＬＨＮ（可変領域なし））の構築を行った。

[0098] ｐＥＦ１ＫＣＬのプロモーター上流及びｐｏｌｙＡの下流までの遺伝子発現ユニットの両端にＰＣＲ法により制限酵素ＳａｌＩサイトの付加を行い、アガロースゲル電気泳動、切り出し、ＤＮＡ断片の精製を行い、インサートとした。（９－２）で構築されたｐＥＦ１ＦＣＣＵを制限酵素ＳａｌＩで処理することで、遺伝子発現ユニットより上流に存在するＳａｌＩサイトでベクターをリニアーにし、前記インサートとｌｉｇａｔｉｏｎ反応を行い、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ、アルカリ法、配列確認によりヒト化抗体発現シングルベクター（ｐＥＦ＿ＬＨＮ（可変領域なし）の構築を行った。

[0099] 次に、ｐＥＦ＿ＬＨＮ（可変領域なし）のＡａｔＩＩサイトへ下記オリゴの導入を行った。

５’－ＣＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＴＡＧＴＧＡＣＧＴ－３’

５’－ＣＡＣＴＡＧＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＡＣＧＴ－３’

それぞれのオリゴを５ｐｍｏｌに希釈し、Ｔ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（ＴＡＫＡＲＡ）を用いて、３７℃で１時間反応後、

１０×Ｈ　ｂｕｆｆｅｒ（ＴＡＫＡＲＡ）を添加し、９６℃　１分、室温３０分の反応によりアニーリングを行った。このオリゴと、制限酵素ＡａｔＩＩ処理したベクターｐＥＦ＿ＬＨＮとをＬｉｇａｔｉｏｎし、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ、アルカリ法、配列確認により、ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃（可変領域なし）を構築した。

[0100] 前記で構築した汎用ベクター（ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃（可変領域なし））にヒト化抗体遺伝子Ｘの可変領域の組込みを行うことで、ヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃）の構築を完成させた。

まず、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃　１５秒、５５℃　３０秒、６８℃　１分×３０ｃｙｃｌｅ）により、ヒト化抗体遺伝子ＸのＬ鎖可変領域の増幅を行った。

Ｌ鎖可変領域；

５’－ＡＡＡＣＡＴＡＴＧＧＣＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣ－３’

５’－ＡＡＡＣＧＴＡＣＧＣＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＣＣＴＴＧＧ－３’

増幅したＬ鎖可変領域断片及び汎用ベクター（ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃（可変領域なし））を制限酵素ＮｄｅＩ、ＢｓｉＷＩ処理し、アガロースゲル電気泳動による目的断片の切り出し、精製、ｌｉｇａｔｉｏｎ反応、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ、アルカリ法、配列確認によりＬ鎖可変領域の組込みを行った。同様に、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃　１５秒、５５℃　３０秒、６８℃　１分×３０ｃｙｃｌｅ）により、ヒト化抗体遺伝子ＸのＨ鎖可変領域の増幅を行った。

Ｈ鎖可変領域；

５’－ＡＡＡＧＣＴＧＡＧＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＧＧ－３’

５’－ＡＡＡＧＣＴＧＡＧＣＴＣＡＣＧＧＴＣＡＣＣＡＧＧＧＴＴＣ－３’

増幅したＨ鎖可変領域断片及びＬ鎖可変領域が挿入されたベクターを制限酵素ＢｌｐＩで処理し、アガロースゲル電気泳動による目的断片の切り出し、精製、ｌｉｇａｔｉｏｎ反応、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ、アルカリ

法、配列確認によりＨ鎖可変領域の組込みを行い、ヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃）を構築した。

（９－４）　ヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＣＭＶ＿ＬＨＮ＃）の構築

（９－３）で構築したヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃）をベクター基本骨格として、下記手順によってプロモーターの交換を行い、ヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＣＭＶ＿ＬＨＮ＃）の構築を行った。

[0101] ｐＩＲＥＳ　ｐｕｒｏ３を鋳型として、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃　３０秒、６８℃　３分×４０ｃｙｃｌｅ）によりＣＭＶプロモーター断片の増幅を行った。

Ｈ鎖上流；

５’－ＣＴＴＴＴＧＣＡＡＡＡＡＧＣＴＴＣＧＣＧＴＴＡＣＡＴＡＡＣＴＴＡＣＧＧＴＡＡＡＴＧＧＣＣ－３’

５’－ＴＴＣＡＴＧＧＴＧＧＣＧＣＴＡＧＣＣＣＧＣＡＧＡＴＡＴＣＧＡＴＣＣＧＡＧＣＴＣＧＧＴＡ－３’

Ｌ鎖上流；

５’－ＴＧＡＣＧＴＣＧＡＣＡＡＧＣＴＴＣＧＣＧＴＴＡＣＡＴＡＡＣＴＴＡＣＧＧＴＡＡＡＴＧＧＣＣ－３’

５’－ＣＴＧＧＡＴＧＴＣＧＣＣＡＴＡＴＧＣＧＣＣＧＧＡＧＡＴＣＣＡＣＡＧＣＡＧＣＡＧＧＧＡＧＡＴＧＡＡＣＡＣＣＴＧＧＧＴＣＴＧＣＡＧＣＡＣＣＡＴＧＧＴＧＧＣＧＣＴＡＧＣＣＣＧＣＡＧＡＴＡＴＣＧＡＴＣＣＧＡＧＣＴＣＧＧＴＡ－３’

ＰＣＲ反応溶液に制限酵素ＤｐｎＩを加えて３７℃、１時間反応させ、ｍｉｎｉＥｌｕｔｅ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎｕｐ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）により精製を行い、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ用のサンプルとした。一方、ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃を制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ、ＮｈｅＩ、ＮｄｅＩ、ＦｓｅＩで処理し、アガロースゲル電気泳動を行うことで、

断片の中で大きな断片２本の分離を行った。ゲルからそれぞれを切り出し、ゲルからＤＮＡの抽出を行い、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ用のサンプルとした。全てのＩＮ－Ｆｕｓｉｏｎ用サンプルを集め、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ™ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（ＴＡＫＡＲＡ）、ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ、アルカリ法、配列確認により、ヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＣＭＶ＿ＬＨＮ＃）を構築した。

（９－５） ＤＮＡエレメントＡ７のクローニング

ＳＥＡＰの発現亢進効果が認められた５種類のＤＮＡエレメントの中からＡ７を選択し、抗体発現ベクターへのクローニングを行った。

[0102] （７－２）と同様の方法で、制限酵素ＮｏｔＩ処理したヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクター（ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃、ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＣＭＶ＿ＬＨＮ＃）それぞれを鋳型として、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲ法（９４℃ １５秒、５５℃ ３０秒、６８℃ １１分×３０ｃｙｃｌｅ）により、形質転換用ＤＮＡの調製を行った。

ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃ Ｄ；

５’－ＣＴＣＴＴＣＣＣＡＴＴＣＴＣＡＴＴＴＧＡＡＴＣＴＡＣＴＴＣＡＡＡＡＧＧＴＴＴＡＣＣＡＴＡＣＴＡＡＧＡＣＴＣＧＡＧＧＣＡＣＴＡＧＴＧＡＣＧＴＣＡＧＧＴＧＧＣＡＣＴ－３’

ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃ Ｒ；

５’－ＣＴＣＴＴＣＣＣＡＴＴＣＴＣＡＴＴＴＧＡＡＴＣＴＡＣＴＴＣＡＡＡＡＧＧＴＴＴＡＣＣＡＴＡＣＴＡＡＧＡＧＣＡＣＴＡＧＴＧＡＣＧＴＣＡＧＧＴＧＧＣＡＣＴＴＴＴＣＧＧ－３’

ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＣＭＶ＿ＬＨＮ＃ Ｄ；

ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃ Ｄを使用。

ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＣＭＶ＿ＬＨＮ＃ Ｒ；

ヒト化抗体遺伝子Ｘ／ｐＥＦ＿ＬＨＮ＃　Ｒを使用。

[0103] 調製した形質転換用ＤＮＡ及びｐＲｅｄ／ＥＴを形質転換したＢＡＣを用いて、ＤＮＡエレメントＡ７を（９－３）、（９－４）記載のヒト化抗体遺伝子Ｘ発現シングルベクターへクローニングを行った。図７にベクターの概略図を示す。尚、操作は（７－２）に記載の方法に準じて行った。

（９－６）抗体発現を指標とした評価

宿主細胞ＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ）、遺伝子導入試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、（９－５）で構築された各プラスミドの評価を実施した。

[0104] 遺伝子導入２日後からＧｅｎｅｔｉｃｉｎ（Ｒｏｃｈｅ）　８００μｇ／ｍｌによる薬剤選択を約２週間行い、ポリクローナル安定発現株の構築を行った。樹立された細胞株は、測定前日に培地交換後、一定細胞数を２４穴プレートに播種し、播種２４時間後に培養上清の回収を行い、ＥＬＩＳＡ法により培養上清中の抗体発現量の測定を行った。尚、ＥＬＩＳＡは以下の方法で行った。Ａｎｔｉ－ｋａｐｐａ　Ｌｉｇｈｔ　Ｃｈａｉｎを５０ｎｇ／ｗｅｌｌでコーティングした９６穴プレートに、除細胞した培養上清１００μｌを添加し、３７℃で１時間静置した。次に、サンプル（培養上清）を除き、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．０５％）２００μｌで各ｗｅｌｌを洗った後、ＨＲＰ標識されたａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ（Ｆｃ）１００μｌをｗｅｌｌに添加し、さらに３７℃で１時間静置した。その後、ＨＲＰ標識されたａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ（Ｆｃ）を除き、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．０５％）で各ｗｅｌｌを洗った後、ＰＯＤ基質Ａ．Ｂ．Ｔ．Ｓ．キット（ｎａｃａｌａｉ）を用いて発色させ、測定波長４０５ｎｍの吸光度を測定した。ａｎｔｉ－ｋａｐｐａ　Ｌｉｇｈｔ　Ｃｈａｉｎ、ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ（Ｆｃ）及びサンプルの希釈にはＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．０５％）を用いた。段階希釈（１２ｎｇ、６ｎｇ、３ｎｇ、１．５ｎｇ、０．７５ｎｇ、０．３７５ｎｇ、０．１８７５ｎｇ）したｈｕｍａｎ　ＩｇＧをスタ

ンダードに、サンプル濃度を算出した。

結果を図８に示す。ＥＦ－１αプロモーター又はＣＭＶプロモーターを有する抗体発現ベクターにおいて、ＤＮＡエレメントＡ７を持つサンプルは、ｎｏ　ｅｌｅｍｅｎｔであるコントロールよりも大きな抗体生産亢進効果を示すことが確認された。

（実施例１０）外来遺伝子発現亢進活性を示す配列長

（１０－１）配列長の異なるＤＮＡエレメントのクローニング

実施例７で用いた配列長を基に、各ＤＮＡエレメントの異なる配列長を有するベクターの構築を行った。

[0105] ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４のｆｕｌｌ　ｌｅｎｇｔｈを基に設計した異なる配列長を有するエレメントの詳細を図９、１１、１３、１５、１７に示す。（７－１）のｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｈｙｇｒｏを制限酵素ＳｐｅＩで数時間処理し、エタノール沈殿を行い、滅菌水で溶解した。ＳｐｅＩ処理した前記ベクターを鋳型に、下記プライマー及びＫＯＤ－ｐｌｕｓ－を用いたＰＣＲ法（９４℃　１５秒、５５℃　３０秒、６８℃　１０分×３０ｃｙｃｌｅ）を行い、形質転換用ＤＮＡの調製を行った。調製した形質転換用ＤＮＡ及びｐＲｅｄ／ＥＴを形質転換したそれぞれのＢＡＣを用いて、配列長の異なる各ＤＮＡエレメントを（７－１）のｐＣＭＶ／ＳＥＡＰ　ｉｒｅｓ　Ｈｙｇｒｏへクローニングを行った。尚、操作は（７－２）に記載の方法に準じて行った。

Ａ２－１Ｄ；

5’－ＣＡＴＧＣＡＣＡＧＡＴＴＡＧＣＣＡＴＴＴＡＧＴＡＣＴＴＡＣＴＡＡＡＴＣＡＡＡＣＴＣＡＡＴＴＴＣＴＧＡＡＧＴＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ２－１Ｒ；

5’－ＣＴＣＡＴＴＣＴＧＴＧＧＧＴＴＧＴＣＡＴＴＴＣＡＣＴＴＣＣＴＴＧＡＴＧＣＴＡＴＣＣＴＴＴＣＡＡＧＣＡＡＡＡＴＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－3’

A2−2D;

5’−ACACTGGTCAAAGGGACAGGTCATTGTTATG
CTGGCAATGCAGGCTGCTGAAAACTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACG−3’

A2−2R;

5’−ACTGTAGCTTCTTATTTTTTACCTGCAGTGC
ATTCCTGTAAAAGTAGTGTGGAGTCAATAATCAA
TGTCAACGCGTATAT−3’

A2−3D;

5’−CTGGAAATTGAGAAGTATCATTCACAACAGT
ACCACAAACATGAAATAAATGTGCTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACG−3’

A2−3R;

5’−CCAAGCTTGTCCAACCGCGGCCTGCAGGCTG
CATGCAGCCTGTGAAGGCTTTGATCAATAATCAA
TGTCAACGCGTATAT−3’

A2−4D;

5’−TCAATCATTTATCAATTTTATCTTCAAAGTC
CCTCACTTCAGGGAGATGATATACTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACG−3’

A2−4R;

5’−ATATATAAAAGTTCATGTATATATAAAATCA
TGCAATACACGGCCTTTTGTGACTCAATAATCAA
TGTCAACGCGTATAT−3’

Ａ２－５Ｄ；

5’－ＣＧＣＡＴＡＡＡＡＧＧＡＡＡＡＧＣＡＴＣＣＴＴＡＡＡＡＴＡＡＡ
ＣＡＣＣＡＴＣＡＡＴＧＧＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡ
ＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ２－５Ｒ；

Ａ２－４Ｒを使用。

[0106]

Ａ２－６Ｄ；

5’－ＧＧＧＡＧＧＣＴＡＣＡＧＣＴＴＧＣＣＴＣＴＣＴＡＡＣＣＡＣＴＡ
ＡＡＡＧＧＣＡＴＧＡＣＣＣＴＣＣＴＣＡＡＡＧＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡＴ
ＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ２－６Ｒ；

Ａ２－４Ｒを使用。

[0107]

Ａ２－７Ｄ；

5’－ＴＣＴＧＧＣＴＴＣＣＣＴＧＧＧＣＣＡＣＧＣＴＧＧＡＡＧＡＡＧＡ
ＡＴＴＧＴＣＴＴＧＣＧＣＣＡＣＡＣＡＴＡＡＡＡＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡ
ＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ２－７Ｒ；

5’－ＡＧＣＴＧＡＴＴＴＴＴＡＣＧＴＴＡＡＡＴＧＴＡＡＣＡＴＧＴＡＡ
ＡＧＡＡＡＴＡＴＡＴＧＴＧＴＧＴＴＴＴＴＡＧＡＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡ
ＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－3’

Ａ２－８Ｄ；

5’－ＧＴＧＡＡＧＡＧＧＡＧＧＡＧＡＴＧＴＣＡＡＡＡＴＴＣＡＡＡＧＴ
ＣＴＴＡＡＡＴＧＡＴＧＴＡＧＴＴＴＴＡＡＧＴＡＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡ
ＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－3’

Ａ２－８Ｒ；

5’－ＡＴＧＡＣＡＣＴＴＧＡＴＡＴＴＧＴＴＧＴＴＴＡＴＡＴＴＧＣＴＧ
ＧＴＴＡＧＴＡＴＧＴＧＣＣＴＴＣＡＴＴＴＡＣＣＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡ
ＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－３’

Ａ２－９Ｄ；

Ａ２－６Ｄを使用。

Ａ２－９Ｒ；

Ａ２Ｒを使用。

[0108]

Ａ２－１０Ｄ；

Ａ２－２Ｄを使用。

Ａ２－１０Ｒ；

Ａ２－７Ｒを使用。

[0109]

Ａ２－１１Ｄ；

Ａ２－８Ｄを使用。

Ａ２－１１Ｒ；

Ａ２－２Ｒを使用。

[0110]

Ａ２－１２Ｄ；

Ａ２－２Ｄを使用。

Ａ２－１２Ｒ；

Ａ２－４Ｒを使用。

[0111]

Ａ２－１３Ｄ；

Ａ２－８Ｄを使用。

Ａ２－１３Ｒ；

Ａ２－７Ｒを使用。

[0112]

Ａ２－１４Ｄ；

Ａ２Ｄを使用。

Ａ２－１４Ｒ；

Ａ２－２Ｒを使用。

[0113]

Ａ２－１５Ｄ；

Ａ２－２Ｄを使用。

Ａ２－１５Ｒ；

Ａ２Ｒを使用。

[0114]

Ａ２－１６Ｄ；

Ａ２－８Ｄを使用。

Ａ２－１６Ｒ；

Ａ２－４Ｒを使用。

[0115]

Ａ２－１７Ｄ；

Ａ２Ｄを使用。

Ａ２－１７Ｒ；

Ａ２－７Ｒを使用。

[0116]

Ａ７－１Ｄ；

５’－ＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＣＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＧＡＴＧＡＡＴＴ
ＧＴＴＴＴＡＡＴＡＧＡＧＧＣＡＣＴＧＴＡＴＴＡＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡ
ＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ａ７－１Ｒ；

５’－ＡＴＡＣＡＡＴＧＴＴＣＣＡＴＧＴＡＴＴＣＴＧＴＧＣＣＴＧＡＡＣ

ＣＴＡＴＧＣＡＧＣＴＧＡＴＧＴＡＧＣＴＧＡＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡ
ＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－３’

Ａ７－２Ｄ；
５’－ＧＡＴＣＴＴＡＴＴＴＴＣＴＡＡＧＴＡＧＴＡＴＡＧＡＣＴＴＡＡＴ
ＴＧＴＧＡＧＡＡＣＡＡＡＡＴＡＡＡＡＡＣＴＴＧＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡ
ＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ａ７－２Ｒ；
５’－ＴＧＴＴＧＴＴＴＴＣＡＧＣＣＡＣＴＡＡＧＴＴＴＧＡＧＧＴＧＡＴ
ＴＴＧＴＴＣＴＧＧＣＡＧＴＣＣＴＡＧＧＡＡＡＣＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡ
ＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－３’

Ａ７－３Ｄ；
Ａ７－２Ｄを使用。
Ａ７－３Ｒ；
５’－ＡＧＣＣＴＡＣＡＣＴＡＣＣＣＴＴＴＧＣＡＧＣＣＴＴＴＧＧＴＡＡ
ＣＴＡＴＣＣＴＴＣＴＧＣＴＧＴＣＴＡＣＣＴＣＣＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡ
ＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－３’

Ａ７－４Ｄ；
５’－ＡＧＧＡＧＣＴＣＣＴＧＡＡＴＧＡＡＧＧＡＣＡＴＣＡＣＴＣＡＧＣ
ＴＧＴＧＴＴＡＡＧＴＡＴＣＴＧＧＡＡＣＡＡＴＡＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡ
ＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ａ７－４Ｒ；
５’－ＧＡＣＡＴＡＡＡＡＴＧＴＡＡＧＡＴＡＴＧＡＴＡＴＧＣＴＡＴＧＴ
ＡＡＧＡＴＡＴＧＡＴＡＣＣＴＧＣＣＴＴＡＡＡＡＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡＡ
ＴＧＴＣＡＡＣＧＣＧＴＡＴＡＴ－３’

A7−5D;

5’−CACTGCTTGATACTTACTGTGGACTTTGAAA
ATTATGAATGTGTGTGTGTGTGTCTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACG−3’

A7−5R;

5’−CAATTACATTCCAGTGATCTGCTACTTAGAA
TGCATGACTGAACTCCTGGGTGGTCAATAATCAA
TGTCAACGCGTATAT−3’

A7−6D;

5’−TTATTTTGAAGAGAAACTCCTGGTTCCCACT
TAAAATCCTTTCTTGTTTCCAAGCTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACG−3’

A7−6R;

5’−AAGCAGTGTGTGTTTACCTGCATGTGTATGT
GAATTAACTCTGTTCCTGAGGCATCAATAATCAA
TGTCAACGCGTATAT−3’

A7−7D;

5’−ATTGCATGTTCTCATTTATTTGTGGGATGTA
AAAATCAAAACAATAGAACGTATCTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACG−3’

A7−7R;

5’−TTGGGAGGCCGCAGCTGGTAGATCACTTGAG
GCCACGAATTTGACACCAGCAGGTCAATAATCAA
TGTCAACGCGTATAT−3’

A7−8D;

Ａ７－１Ｄを使用。

Ａ７－８Ｒ；

Ａ７Ｒを使用。

[0117]

Ａ７－９Ｄ；

Ａ７－７Ｄを使用。

Ａ７－９Ｒ；

Ａ７－５Ｒを使用。

[0118]

Ａ７－１０Ｄ；

Ａ７－４Ｄを使用。

Ａ７－１０Ｒ；

Ａ７－７Ｒを使用。

[0119]

Ａ７－１１Ｄ；

Ａ７－６Ｄを使用。

Ａ７－１１Ｒ；

Ａ７－４Ｒを使用。

[0120]

Ａ７－１２Ｄ；

Ａ７－２Ｄを使用。

Ａ７－１２Ｒ；

Ａ７－６Ｒを使用。

[0121]

Ａ７－１３Ｄ；

Ａ７－７Ｄを使用。

Ａ７－１３Ｒ；

Ａ７Ｒを使用。

[0122]

Ａ７－１４Ｄ；

Ａ７－４Ｄを使用。

Ａ７－１４Ｒ；

Ａ７－５Ｒを使用。

[0123]

Ａ７－１５Ｄ；

Ａ７－６Ｄを使用。

Ａ７－１５Ｒ；

Ａ７－７Ｒを使用。

[0124]

Ａ７－１６Ｄ；

Ａ７－２Ｄを使用。

Ａ７－１６Ｒ；

Ａ７－４Ｒを使用。

[0125]

Ａ７－１７Ｄ；

Ａ７－４Ｄを使用。

Ａ７－１７Ｒ；

Ａ７Ｒを使用。

[0126]

Ａ７－１８Ｄ；

Ａ７－６Ｄを使用。

Ａ７－１８Ｒ

Ａ７－５Ｒを使用。

[0127]

Ａ１８－１；

５’－ＡＴＣＣＣＣＴＧＣＴＣＴＧＣＴＡＡＡＡＡＡＧＡＡＴＧＧＡＴＧＴ

ＴＧＡＣＴＣＴＣＡＧＧＣＣＣＴＡＧＴＴＣＴＴＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴ
ＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ａ１８－１Ｒ；
Ａ１８Ｒを使用。

[0128]

Ａ１８－２Ｄ；
５’－ＣＴＡＡＡＧＴＧＣＴＧＧＧＡＴＴＡＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＣＡＣ
ＣＧＴＧＣＣＣＧＧＣＴＧＧＡＧＣＡＴＴＧＧＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡ
ＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ａ１８－２Ｒ；
５’－ＡＣＴＡＣＴＴＡＣＡＣＡＴＴＴＣＧＡＧＴＴＴＴＡＡＡＴＡＡＧＧ
ＣＧＴＴＣＡＡＴＡＴＡＧＡＧＴＧＡＡＣＡＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣ
ＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ａ１８－３Ｄ；
５’－ＣＡＧＧＣＡＴＡＡＧＣＣＡＣＣＧＣＡＣＣＣＧＧＣＣＡＣＣＣＣＴ
ＴＡＣＴＡＡＴＴＴＴＴＡＧＴＡＡＣＧＴＣＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧ
ＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ａ１８－３Ｒ；
５’－ＣＴＧＡＴＴＧＡＣＴＴＴＧＡＣＣＴＣＴＧＣＴＴＴＣＣＡＡＣＴＴ
ＴＧＣＣＣＣＡＡＡＧＡＡＡＧＴＴＡＧＴＣＡＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴ
ＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ａ１８－４Ｄ；
Ａ１８－３Ｄを使用。
Ａ１８－４Ｒ；
５’－ＴＴＣＡＡＴＧＡＡＡＣＡＡＧＣＴＣＴＧＴＧＡＧＧＣＴＣＡＴＴＴ
ＧＴＡＣＣＣＡＴＴＴＴＧＴＴＣＡＧＴＡＣＴＧＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡ

ＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｂ５－１Ｄ；

５’－ＡＣＡＴＡＣＣＣＡＧＡＧＡＣＡＣＴＧＡＧＡＧＡＧＡＣＡＧＡＣＡ

ＧＡＣＡＧＴＡＡＡＣＡＧＡＧＧＡＧＣＡＣＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧ

ＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｂ５－１Ｒ；

Ｂ５Ｒを使用。

[0129]

Ｂ５－２Ｄ；

５’－ＧＣＴＣＡＡＴＴＧＴＡＴＣＴＴＡＴＧＡＡＡＡＣＡＡＴＴＴＴＴＣ

ＡＡＡＡＴＡＡＡＡＣＡＡＧＡＧＡＴＡＴＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴ

ＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｂ５－２Ｒ；

Ｂ５Ｒを使用。

[0130]

Ｂ５－３Ｄ；

５’－ＣＣＴＧＴＧＣＴＧＡＡＴＡＣＣＧＴＣＴＧＣＡＴＡＴＧＴＡＴＡＧ

ＧＡＡＡＧＧＧＴＴＡＡＣＴＣＡＧＣＡＧＧＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧ

ＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｂ５－３Ｒ；

５’－ＴＡＴＧＴＧＡＡＴＧＧＡＡＡＴＡＡＡＡＴＡＡＴＣＡＡＧＣＴＴＧ

ＴＴＡＧＡＡＴＴＧＴＧＴＴＣＡＴＡＡＴＧＡＣＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡ

ＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｂ５－４Ｄ；

Ｂ５Ｄを使用。

Ｂ５－４Ｒ；

5’－ＧＡＡＡＧＴＣＴＡＣＡＡＴＴＴＴＴＴＣＡＧＴＴＴＡＡＡＡＴＧＧ
ＴＡＴＴＴＡＴＴＴＧＴＡＡＣＡＴＧＴＡＣＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣ
ＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｂ５－５Ｄ；
Ｂ５－１Ｄを使用。
Ｂ５－５Ｒ；
5’－ＣＡＡＡＧＡＴＧＡＡＧＧＡＴＧＡＧＡＧＴＧＡＣＴＴＣＴＧＣＣＴ
ＴＣＡＴＴＡＴＧＴＴＡＴＧＴＧＴＴＣＡＴＡＴＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡ
ＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｂ５－６Ｄ；
5’－ＣＡＧＴＧＡＡＴＴＡＴＴＣＡＣＴＴＴＧＴＣＴＴＡＧＴＴＡＡＧＴ
ＡＡＡＡＡＴＡＡＡＡＴＣＴＧＡＣＴＧＴＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴ
ＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ｂ５－６Ｒ；
5’－ＧＡＡＣＡＧＡＣＡＧＧＴＧＡＡＴＧＡＧＣＡＣＡＧＡＧＧＴＣＡＴ
ＴＴＧＴＡＡＡＣＣＧＴＴＴＧＴＧＧＴＴＡＧＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴ
ＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４－１Ｄ；
5’－ＣＴＴＴＴＴＧＧＣＴＴＣＴＧＴＧＴＴＴＡＡＧＴＴＡＴＴＴＴＴＴＣ
ＣＣＣＴＡＧＧＣＣＣＡＣＡＡＡＣＡＧＡＧＴＣＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴ
ＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’
Ｃ１４－１Ｒ；
5’－ＡＡＣＣＴＴＧＧＡＡＡＡＡＴＴＣＴＧＴＴＧＴＧＴＴＴＡＧＡＡＧ
ＣＡＴＧＴＡＣＣＡＡＴＣＴＡＴＣＡＣＴＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣＡ
ＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４－２Ｄ；

5’－ＣＴＡＴＴＣＡＣＴＧＴＣＴＧＴＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡＡＧＴＴＡＡ
ＴＡＡＣＡＣＣＣＴＧＡＧＡＧＧＴＴＴＣＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴ
ＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｃ１４－２Ｒ；

5’－ＣＣＴＴＡＧＡＴＴＡＧＴＴＴＡＴＴＧＴＡＴＴＴＴＴＴＡＴＣＡＧ
ＣＴＡＣＴＡＴＡＡＧＧＴＴＴＡＣＡＣＡＣＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣ
ＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４－３Ｄ；

5’－ＣＡＡＧＡＣＣＣＴＣＡＡＡＡＴＴＣＡＡＡＡＡＴＴＴＣＣＴＴＴＡ
ＴＣＴＴＧＣＴＧＴＡＧＣＡＣＣＴＣＣＴＧＣＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡ
ＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｃ１４－３Ｒ；

5’－ＧＧＡＧＧＧＧＡＴＡＧＧＡＡＧＧＧＧＡＴＧＡＧＧＣＣＴＡＡＣＡ
ＧＧＴＴＧＡＴＧＡＴＣＴＡＧＧＣＴＴＴＡＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴＣ
ＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４－４Ｄ；

5’－ＣＴＣＡＡＡＡＡＧＧＡＧＡＴＡＡＴＴＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＧＣＣ
ＴＴＡＡＡＧＡＡＴＣＣＣＴＡＴＣＡＡＧＴＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧ
ＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｃ１４－４Ｒ；

Ｃ１４－１Ｒを使用。

[0131]

Ｃ１４－５Ｄ；

5’－ＣＧＣＴＴＧＡＡＣＣＴＧＧＧＡＧＧＣＡＧＡＧＧＴＴＧＣＡＧＴＧ

ＡＧＣＣＧＡＧＡＴＣＡＣＧＣＣＧＴＴＧＧＡＴＣＣＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴ
ＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧ－３’

Ｃ１４－５Ｒ；

Ｃ１４－１Ｒを使用。

[0132]

Ｃ１４－６Ｄ；

Ｃ１４－４Ｄを使用。

Ｃ１４－６Ｒ；

５’－ＴＴＡＡＣＴＴＴＴＴＣＡＴＣＣＴＡＣＡＧＡＣＡＧＴＧＡＡＴＡＧ
ＴＡＡＡＧＣＴＴＴＣＴＧＴＧＡＡＧＡＣＡＴＡＣＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡ
ＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４－７Ｄ；

Ｃ１４－２Ｄを使用。

Ｃ１４－７Ｒ；

Ｃ１４－１Ｒを使用。

[0133]

Ｃ１４－８Ｄ；

Ｃ１４－３Ｄを使用。

Ｃ１４－８Ｒ；

５’－ＡＡＡＴＴＡＴＴＴＣＣＴＧＧＴＧＧＧＣＡＡＴＡＴＴＡＧＡＡＴＡ
ＴＧＧＧＧＡＡＴＧＴＴＴＧＣＴＴＣＴＧＡＧＣＣＴＡＧＴＣＡＡＴＡＡＴ
ＣＡＡＴＧＴＣＡＡＣＧ－３’

Ｃ１４－９Ｄ；

Ｃ１４－４Ｄを使用。

Ｃ１４－９Ｒ；

Ｃ１４－３Ｒを使用。

[0134]

Ｃ１４－１０Ｄ；

Ｃ１４－２Ｄを使用。

Ｃ１４－１０Ｒ；

Ｃ１４Ｒを使用。

[0135]

Ｃ１４－１１Ｄ；

Ｃ１４－３Ｄを使用。

Ｃ１４－１１Ｒ；

Ｃ１４－２Ｒを使用。

[0136]

Ｃ１４－１２Ｄ；

Ｃ１４－４Ｄを使用。

Ｃ１４－１２Ｒ；

Ｃ１４－８Ｒを使用。

[0137]

Ｃ１４－１３Ｄ；

Ｃ１４－３Ｄを使用。

Ｃ１４－１３Ｒ；

Ｃ１４－１Ｒを使用。

[0138]

Ｃ１４－１４Ｄ；

Ｃ１４－４Ｄを使用。

Ｃ１４－１４Ｒ；

Ｃ１４－２Ｒを使用。

[0139] Ａ２の各断片のポリヌクレオチド配列においては、Ａ２－１は配列表の配列番号１０の１乃至３０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－２は配列表の配列番号１０の２８０１乃至５８００番

目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－３は配列表の配列番号１０の５４０１乃至８４５０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－４は配列表の配列番号１０の７０１乃至２７００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－５は配列表の配列番号１０の７０１乃至２２００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－６は配列表の配列番号１０の７０１乃至３７００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－７は配列表の配列番号１０の２００１乃至５０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－８は配列表の配列番号１０の４００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－９は配列表の配列番号１０の１乃至３７００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１０は配列表の配列番号１０の２００１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１１は配列表の配列番号１０の２８０１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１２は配列表の配列番号１０の７０１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１３は配列表の配列番号１０の２００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１４は配列表の配列番号１０の２８０１乃至８４５０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１５は配列表の配列番号１０の１乃至５８００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ２－１６は配列表の配列番号１０の７０１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＡ２－１７は配列表の配列番号１０の２００１乃至８４５０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0140] Ａ７の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ａ７－１は配列表の配列番号１１の６０１乃至３６００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－２は配列表の配列番号１１の３６０１乃至８４２０

番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－３は配列表の配列番号１１の５４０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－４は配列表の配列番号１１の３４０１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－５は配列表の配列番号１１の１５０１乃至４５００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－６は配列表の配列番号１１の４４０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－７は配列表の配列番号１１の２４０１乃至５４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－８は配列表の配列番号１１の１乃至３６００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－９は配列表の配列番号１１の１５０１乃至５４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１０は配列表の配列番号１１の２４０１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１１は配列表の配列番号１１の３４０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１２は配列表の配列番号１１の４４０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１３は配列表の配列番号１１の１乃至５４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１４は配列表の配列番号１１の１５０１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１５は配列表の配列番号１１の２４０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１６は配列表の配列番号１１の３４０１乃至８４２０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ７－１７は配列表の配列番号１１の１乃至６４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＡ７－１８は配列表の配列番号１１の１５０１乃至７４００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0141] Ａ１８の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ａ１８－１は配列表の

配列番号１２の１乃至５０４０番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ１８－２は配列表の配列番号１２の１００１乃至６００２番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ａ１８－３は配列表の配列番号１２の２００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＡ１８－４は配列表の配列番号１２の３０００乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0142] Ｂ５の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ｂ５－１は配列表の配列番号１３の１乃至４００１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－２は配列表の配列番号１３の１乃至３２００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－３は配列表の配列番号１３の２４９１乃至５６０１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－４は配列表の配列番号１３の５３７３乃至８４０１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｂ５－５は配列表の配列番号１３の９０１乃至４００１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＢ５－６は配列表の配列番号１３の４００１乃至７０００番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0143] Ｃ１４の各断片のポリヌクレオチド配列おいては、Ｃ１４－１は配列表の配列番号１４の９６０乃至４０１５番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－２は配列表の配列番号１４の１９８７乃至５０１４番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－３は配列表の配列番号１４の４０２０乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－４は配列表の配列番号１４の９６０乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－５は配列表の配列番号１４の９６０乃至６０１１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－６は配列表の配列番号１４の４９３９乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌク

レオチド配列に相当し、Ｃ１４－７は配列表の配列番号１４の９６０乃至５０１４番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－８は配列表の配列番号１４の２９９４乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－９は配列表の配列番号１４の４０２０乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１０は配列表の配列番号１４の１乃至５０１４番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１１は配列表の配列番号１４の１９８７乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１２は配列表の配列番号１４の２９９４乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、Ｃ１４－１３は配列表の配列番号１４の９６０乃至７１１９番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当し、そしてＣ１４－１４は配列表の配列番号１４の１９８７乃至８１４１番目のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド配列に相当する。

[0144] 各断片の全長配列上の始点と終点は、図２０及び図２１でも示されている。

（１０－２）配列長の異なるＤＮＡエレメントの評価

宿主細胞ＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ）、遺伝子導入試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を用いて、（１０－１）で構築された各プラスミドの評価を実施した。

[0145] （７－３）の方法と同様に、遺伝子導入後からｈｙｇｒｏｍｙｃｉｎによる薬剤選択を行い、ポリクローナル安定発現株の樹立を行った。樹立された細胞株は、測定前日に培地交換後、一定細胞数を２４穴プレートに播種し、播種２４時間後に培養上清の回収を行い、ＳＥＡＰ活性の測定を行った。

[0146] 測定結果を図、１０、１２、１４、１６、１８に示す。ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈのＤＮＡエレメントだけでなく、ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈより短い配列長を有するクローンにおいても発現亢進効果が確認された。このことより、ＤＮＡエレメントＡ２、Ａ７、Ａ１８、Ｂ５、Ｃ１４はｆｕｌｌ ｌｅｎ

ｇｔｈに比べて短い配列長を持つ場合においても外来遺伝子発現亢進活性を示すが、配列長がｆｕｌｌ　ｌｅｎｇｔｈの場合に最も大きな効果を発揮することが確認された。

（実施例１１）ＣＨＯ細胞以外での効果

実施例７～１０における評価細胞にはＣＨＯ細胞が用いられてきたが、ＣＨＯ細胞以外の細胞株としてＨＥＫ２９３細胞を選択した。ＨＥＫ２９３細胞は１０％ＦＣＳ入りのＤＭＥＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて３７℃、５％CO_2存在下で静置培養を行い、遺伝子導入前日に一定細胞数を６穴プレートに播種した。（８－２）で構築された各ＤＮＡエレメントを有するＳＥＡＰ発現ベクターの評価を行うため、各プラスミド及び遺伝子導入試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて遺伝子導入を行い、遺伝子導入２日後からｈｙｇｒｏｍｙｃｉｎによる薬剤選択を約２週間行い、ポリクローナル安定発現株の樹立を行った。樹立された細胞株は、測定前日に培地交換後に一定細胞数を２４穴ｐｌａｔｅに播種し、播種２４時間後に培養上清の回収を行い、ＳＥＡＰ活性の測定を行った。培養上清中のＳＥＡＰ活性は、ＳｅｎｓｏＬｙｔｅ™ ｐＮＰＰ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ Ａｓｓａｙ（ＡＮＡＳＰＥＣ）を用いて、測定した。

[0147] 測定結果を図１９に示す。実施例３における結果と同様、各ＤＮＡエレメントはＨＥＫ２９３細胞においても外来遺伝子（ＳＥＡＰ）の高い発現亢進効果を有することが確認された。

産業上の利用可能性

[0148] 本発明のプロモーターを用いた外来遺伝子発現ユニット又は本発明の外来遺伝子発現ベクターを哺乳動物宿主細胞へ導入することによって、治療用蛋白質や抗体等の外来遺伝子の生産性を向上させることが可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 配列表の配列番号１に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

[請求項2] 配列表の配列番号２に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

[請求項3] 配列表の配列番号３に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

[請求項4] 請求項１乃至３のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９５％以上同一性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

[請求項5] 請求項１乃至３のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９９％以上同一性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

[請求項6] 請求項１乃至３のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

[請求項7] 請求項１乃至６のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含むことからなる、外来遺伝子発現ユニット。

[請求項8] 外来遺伝子が多量体蛋白質をコードする遺伝子である、請求項７に記載の外来遺伝子発現ユニット。

[請求項9] 外来遺伝子がヘテロ多量体蛋白質をコードする遺伝子である、請求項７に記載の外来遺伝子発現ユニット。

[請求項10] 外来遺伝子が抗体又はその機能性断片をコードする遺伝子である、請求項７に記載の外来遺伝子発現ユニット。

[請求項11] 請求項７乃至１０のいずれか一つに記載の外来遺伝子発現ユニットを含む外来遺伝子発現ベクター。

[請求項12] 請求項７乃至１０のいずれか一つに記載の外来遺伝子発現ユニット及

び下記A群の（１）乃至（９）に記載のポリヌクレオチドから選択されるいずれか一つ又は複数のポリヌクレオチドを含む外来遺伝子発現ベクター。

A群

（１）配列表の配列番号１０に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（２）配列表の配列番号１１に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（３）配列表の配列番号１２に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（４）配列表の配列番号１３に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（５）配列表の配列番号１４に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

（６）配列表の配列番号１０乃至１４のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のうち少なくとも３０００の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

（７）配列表の配列番号10乃至１４のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のうち少なくとも２０００の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

（８）上記（１）乃至（７）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９５％以上同一性を有するポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチド。

（９）上記（１）乃至（７）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列に対して９９％以上同一性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチド。

［請求項13］ 請求項１１又は１２に記載の外来遺伝子発現ベクターが導入された形質転換細胞。

［請求項14］ 請求項１１又は１２に記載の外来遺伝子発現ベクターとエレメントベクターが導入された形質転換細胞。

［請求項15］ 細胞が哺乳動物由来の培養細胞である、請求項１３又は１４に記載の形質転換細胞。

［請求項16］ 哺乳動物由来の培養細胞が、ＣＯＳ－１細胞、２９３細胞、又はＣＨＯ細胞である、請求項１５に記載の形質転換細胞。

［請求項17］ 請求項１３乃至１６のいずれか一つに記載の形質転換細胞を培養し、培養物から外来遺伝子由来の蛋白質を取得することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

［請求項18］ 形質転換細胞において外来遺伝子を発現させることを目的とする、請求項１乃至６のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列の使用。

［請求項19］ 形質転換細胞において外来遺伝子を発現させることを目的とする、請求項１１又は１２に記載の外来遺伝子発現ベクターの使用。