

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12	

請求項の数15 (全18頁)

(21)出願番号 特願2000-109033(P2000-109033)
 (22)出願日 平成12年4月11日(2000.4.11)
 (65)公開番号 特開2001-218588(P2001-218588A)
 (43)公開日 平成13年8月14日(2001.8.14)
 審査請求日 平成17年2月23日(2005.2.23)
 審判番号 不服2008-7278(P2008-7278/J1)
 審判請求日 平成20年3月25日(2008.3.25)
 (31)優先権主張番号 特願平11-345508
 (32)優先日 平成11年12月3日(1999.12.3)
 (33)優先権主張国 日本国(JP)

(73)特許権者 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号
 (74)代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (72)発明者 川上 浩一
 千葉県印旛郡白井町桜台 2 - 6 - 9 - 1 0
 3
 合議体
 審判長 鶴飼 健
 審判官 引地 進
 審判官 鈴木 恵理子

特許法第30条第1項適用 Gene, 1999年,
 第240巻, 第1号, 第239 - 244頁(平成11年
 11月15日発行)に発表, 及び, 細胞工学, 2000
 年1月, 第19巻, 第1号, 第137 - 144頁(平成
 11年12月22日発行)に発表

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トランスポゾン転移酵素および遺伝子改変方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるトランポザーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項2】

請求項1に記載の蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素。

【請求項3】

請求項1に記載の蛋白質をコードする核酸。

【請求項4】

核酸が、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有するDNAである請求項3に記載の核酸。

【請求項5】

核酸がRNAである請求項3又は4に記載の核酸。

【請求項6】

請求項1に記載の蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸を存在させて、細胞内のゲノム中に、両端に1対の短い逆転した配列の繰り返し配列を含むDNAを組み込ませて、細胞内のゲノムの構造を改変させる方法。

【請求項7】

請求項1に記載の蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸を存在させて、細胞内のプラスミド中に、両端に1対の短い逆転した配列の繰り返し配列を含むDNAを組み込ませて

、細胞内のプラスミドの構造を改変させる方法。

【請求項 8】

当該蛋白質を産生し得る核酸が、mRNAである請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

細胞が脊椎動物の細胞である請求項 6 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

請求項 6 ~ 9 のいずれかに記載の方法を用いて、細胞の遺伝子に外来遺伝子を導入する方法。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 9 のいずれかに記載の方法を用いて、細胞の遺伝子の発現に基づく機能を改変する方法。 10

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法により機能が改変された細胞。

【請求項 13】

プラスミドが、請求項 1 の記載の蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸の存在下で切り出され得る両端に 1 対の短い逆転した配列の繰り返し配列を含む外来遺伝子(ただし、当該遺伝子が請求項 1 に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含有している場合を除く。)を含有してなるプラスミド。

【請求項 14】

脊椎動物のゲノム DNA 中に、外来遺伝子を挿入する方法において、請求項 1 に記載の蛋白質のトランスポザゼ活性を用いて当該外来遺伝子を挿入する方法。 20

【請求項 15】

脊椎動物が、魚類である請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、トランスポザゼ様活性を有する新規な蛋白質、当該蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素、これを用いた細胞内の遺伝子の遺伝子構造を改変させる方法、この方法による細胞の機能を改変させる方法、この方法による遺伝子の導入方法、このためのプラスミド、及びこの方法により機能が改変された細胞に関する。 30

【0002】

【従来の技術】

メダカ (*Oryzias latipes*) は東アジアに生息する魚であり、脊椎動物の遺伝の研究に使用されてきた。メダカの *i* 遺伝子座の変異は、メラニン欠乏症及び赤目を生じさせる。この *i* 遺伝子座はチロシナーゼの遺伝子をコードしていることが知られている。この *i* 遺伝子座のアレル変異体のひとつである *i*⁴ から約 4.7 kb の DNA がクローニングされ、トランスポゾン様の配列を有しているとされていた。即ち、ショウジョウバエの *hobo*、トウモロコシの実の *Ac* やキンギョソウの *Tam3* などの *hAT* ファミリーのトランスポゾンのトランスポザゼ (transposases) に類似したオープンリーディングフレームや短い逆転した配列の繰り返し (terminal inverted repeats) を有していた。メダカのこのエレメントは、*Tol2* と命名された。実験室で使用されるメダカは、一倍体 (haploid) のゲノム当たり約 10 コピー有している。 40

チロシナーゼの遺伝子座に存在した *Tol2* エレメントは、*i*⁴ 変異体の魚では胚発生の間に標的遺伝子座から切り出されることが PCR により示された (Koga 等、1996)。

【0003】

一方、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) もメダカ (*Oryzias latipes*) と同様に小型の硬骨魚であり、脊椎動物の遺伝現象及び発生の研究のためのモデル動物として開発されてきた (Takeuchi, 1996; Yamamoto, 1967; Streisinger 等、1981)。ゼブラフィッシュにおいては、大量の化学的突然変異誘発スクリーンが行なわれ (Driever 等、1996; Haffter 等、1996)、突然変異した遺伝子のクローニングを容易にするため、シュードタイプ (50

pseudotyped) のレトロウィルスを用いた挿入突然変異誘発法が開発され実行されてきた (Line 等、1994 ; Gaiano等、1996 ; Amsterdam等、1997)。また、エンハンサートラップ及び遺伝子トラップスクリーンが行なわれるようにするトランスポゾン技術の開発の試みの中で、魚類におけるTcl/marinierファミリーのトランスポゾンの転位が調べられ、明らかにされてきた (Ivics等、1997 ; Raz等、1997 ; Fadool等、1998)。これらの結果は励みになるものではあるが、トランスポゾンを用いた非常に効率のよいトランスジェネシス又は挿入突然変異誘発法はまだ開発されていない。

【 0 0 0 4 】

本発明者らは、T o l 2 因子を用いた新規なトランスポゾン技術の開発に興味をもってきた。この目標に向かう最初のステップとして、本発明者らはゼブラフィッシュ胚を用いて、ゼブラフィッシュの受精卵に、T o l 2 因子を含んでいるプラスミドDNAを注入する一過性胚エクシジョンアッセイを開発し、注入されたプラスミドからT o l 2 因子を切り出すことができることを示し、T o l 2 因子が自律的なメンバーでありかつゼブラフィッシュにおいても活性があることを示した (Kawakami等、(1998) Gene 225, 17-22)。T o l 2 因子のDNA配列はh A Tファミリーのトランスポゾンのトランスポザーゼと類似しているが、活性のあるトランスに機能することができる酵素も、切り出し反応に必須なシスエレメントも同定されていない。T o l 2 因子をトランスジェネシス及び挿入突然変異誘発に有用な道具とするためには、シス及びトランスの必要条件を細かく調べ、特性を明らかにしなければならない。T o l 2 因子によってコードされている活性のあるトランスポザーゼはまだ同定されていない。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、第一にゼブラフィッシュ胚に注入されたT o l 2 因子から転写されたmRNAを同定することを目的とする。次いで、この転写物が活性のある酵素をコードしているかどうかを調べるため、ゼブラフィッシュ受精卵に、T o l 2 cDNAを鋳型として用いて試験管内で合成されたRNAと、トランスポザーゼをコードしている領域に欠失をもつ非自律的T o l 2 因子を含んでいるプラスミドDNAとをコインジェクトする新規な分析法を開発する。

また、本発明は、ゼブラフィッシュにおけるT o l 2 因子の切り出しに機能する、活性のあるトランス因子及び必須なシスエレメントを同定する。

【 0 0 0 6 】

したがって、本発明は、T o l 2 因子にコードされている新規な蛋白質、それをコードするポリヌクレオチドを提供するものである。また、本発明は、当該蛋白質を用いて細胞、好ましくは脊椎動物の遺伝子構造を改変する方法、遺伝子構造の改変による細胞機能を改変する方法、これらの方法により機能が改変された細胞を提供するものである。さらに、本発明は遺伝子の転移に必要なシスエレメント構造を解明し、これを提供するものである。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列、又はそのアミノ酸の一部が置換され若しくは欠失し、又は他のアミノ酸が付加していてもよいアミノ酸配列を有するトランスポザーゼ様活性を有する蛋白質に関する。また、前記の蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素に関する。

また、本発明は、前記の蛋白質をコードする核酸、好ましくは配列表の配列番号1に示される塩基配列を有するDNA若しくは当該DNAにハイブリダイズし得るDNA、又は対応するRNAに関する。

【 0 0 0 8 】

本発明は、前記の蛋白質がトランスポゾンを転移させるトランスポザーゼ様活性を有していること明らかにし、当該蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸の存在下で、細胞内、好ましくは脊椎動物の細胞内の遺伝子の一部を切り出し又は切り出して他の箇所に挿入す

10

20

30

40

50

ることからなる遺伝子構造を改変させる方法に関する。当該切り出される遺伝子の一部の塩基配列の上流に、少なくとも1回の逆方向反復配列 (inverted repeats (Angel エlement)) を含む塩基配列を有する遺伝子であることが好ましい。

また、本発明は、前記の方法を用いて、細胞の遺伝子に外来遺伝子を導入する方法、及び細胞の遺伝子の発現に基づく機能を改変する方法に関し、さらに本発明は、これらの方法により機能が改変された細胞に関する。

そして、本発明は、これらの方法に使用されるプラスミド、より詳細には塩基配列の上流に、少なくとも1回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有するDNAを含有してなるプラスミドにも関する。

さらに、本発明は、脊椎動物のゲノムDNA中に、他の遺伝子を挿入する方法において、トランスポザースを用いて自律的に当該挿入を行うことを特徴とする脊椎動物のゲノムDNA中に他の遺伝子を挿入する方法、好ましくは他の遺伝子がT o l 2 エlementであり、脊椎動物が、魚類である前記方法に関する。

【 0 0 0 9 】

先に本発明者らは、チロシナーゼ遺伝子座からクローン化したT o l 2 因子を含んでいるプラスミドであるT o l 2 - t y r プラスミドをゼブラフィッシュ受精卵に注入し、注入したプラスミドDNAからT o l 2 因子を切り出すことができることを示した (Kawakami 等、1998) 。推定上のトランスポザース活性をコード化している転写物を同定するため、T o l 2 - t y r プラスミドを注入した胚から全RNAを調製した。筆者等はまず、T o l 2 配列の別の部分とアニールする、重なりのある4対のプライマーを用いて3 ' R A C E

を行なった。

3 ' R A C E を行なうために用いられたとなり同士の前向きプライマーは：

T o l 2 f 2 ; 5 ' - TTGGTCAGACATGTTTCATTG - 3 ' と

T o l 2 f 3 ; 5 ' - ATGTTTCATTGGTCCTTTGGA - 3 '、

T o l 2 f 4 ; 5 ' - ATAGCTGAAGCTGCTCTGATC - 3 ' と

T o l 2 f 5 ; 5 ' - CTGCTCTGATCATGAAACAG - 3 '、

T o l 2 f 8 ; 5 ' - GCTTAATAAAGAAATATCGGCC - 3 ' と

T o l 2 f 9 ; 5 ' - AATATCGGCCTTCAAAAAGTTTCG - 3 '、並びに

T o l 2 f 1 2 ; 5 ' - CTGTAATCAGAGAGTGTATGTGTA - 3 ' と

T o l 2 f 1 3 ; 5 ' - ATTGTTACATTTATTGCATACAAT - 3 ' である。

【 0 0 1 0 】

ポリアデニル化されたcDNAはT o l 2 f 8 とT o l 2 f 9、及びT o l 2 f 4 とT o l 2 f 5 を用いた3 ' R A C E ではうまく増幅されたが、T o l 2 f 2 とT o l 2 f 3、及びT o l 2 f 1 2 とT o l 2 f 1 3 を用いた3 ' R A C E ではそうではなかった。

次いで、5 ' R A C E を行なうために用いられた重なりのある逆向きの次のプライマー：

T o l 2 r 4 ; 5 ' - CTCAATATGCTTCCTTAGG - 3 ' と

T o l 2 r 5 ; 5 ' - CTTCTTAGGTTTGATGGCG - 3 '

を用いた5 ' R A C E を行ない、2156個のヌクレオチドから成る完全な長さのT o l 2 転写物を同定した (図 1) 。

【 0 0 1 1 】

得られたcDNAの塩基配列を配列表の配列番号1に示す。

図1は、T o l 2 プラスミド及びその転写物の構造を示す。図1の最上段は完全な長さのT o l 2 因子 (T o l 2 - t y r) である。図の破線部分は、イントロンである。一番目のイントロンにある逆向きの反復 (A n g e l 因子) と、前記したプライマーの位置とを矢印で示す。その下の段は、3 ' R A C E の結果を示し、その下の段は5 ' R A C E の結果を示す。いずれの場合も、イントロン部分は破線で示されている。

その下の段にこれらの結果から得られた全長のmRNAの構造を示す。翻訳領域は、配列番号1のcDNAの塩基配列の85番目 (A T G) から2032 (T A G) に相当している。

図1の下から1段目と2段目は、欠失変異株の (T o l 2 - t y r) R V 及び (T o l

2 - t y r) i n 1 R V の構造を示している。

【 0 0 1 2 】

5 ' R A C E 分析では、プラスミド配列からスタートし、T o l 2 因子の一番目のエクソン内の通常では機能しないスプライスアクセプター (cryptic spliceacceptor) 部位へジャンプした異常な転写物も見つかった (データは示さず)。これらの転写物についてはそれ以上は調べなかった。

c D N A の D N A 配列決定により T o l 2 因子のエクソン - イントロン構造 (すなわち、4 つのエクソンと 3 つのイントロン) が明らかにされた (図 1 の最上段参照)。この c D N A は 6 4 9 個のアミノ酸から成るタンパク質をコード化している。この蛋白質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に示す。

10

T o l 2 エlement がトランスポゾン様配列であることは知られていたが、本発明は、T o l 2 エlement が蛋白質をコードし、当該蛋白質の発現による作用であることを初めて確認したものである。即ち、本発明は、T o l 2 エlement においてコードされている新規な蛋白質を提供するものであり、また、当該蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供するものである。

【 0 0 1 3 】

図 2 に本発明の蛋白質のアミノ酸配列及び公知の h A T ファミリーのトランスポゾンのトランスポザーゼ類のアミノ酸配列を比較した図を示す。この比較から、これらの蛋白質は特に中央部のアミノ酸配列が類似していることがわかる (図 2 参照)。しかし、N H₂ - 及び C O O H - 末端のアミノ酸配列にはやや多様性があった。

20

【 0 0 1 4 】

同定された本発明の蛋白質 (T o l 2 転写物) が、活性のある酵素をコード化しているかどうかを決定するため、コインジェクションによる新規な一過性の胚エクシジョンアッセイを開発し、これによる酵素活性の確認を行った。

ゼブラフィッシュの受精卵に、配列番号 1 に示す c D N A を鋳型として用いて試験管内で合成した m R N A と、T o l 2 エlement の E c o R V 切断部位の間の塩基を欠失させた、(T o l 2 - t y r) R V (図 1 参照) を含む (T o l 2 - t y r) R V プラスミドとをコインジェクトした。コインジェクションの約 8 時間後、各々の胚より D N A を抽出し、T o l 2 エlement の外側の配列に基づいて調製されたプライマー t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r

30

t y r - e x 4 f : 5'-GCTACTACATGGTGCCATTCCT-3'

t y r - e x 5 r : 5'-CACTGCCAGATCTGCTGGGCTT-3'

を用いて P C R 法により分析した。図 3 にこの方法の概要を示し、図 4 の A にこれらのプライマーに一を示す。

【 0 0 1 5 】

(T o l 2 - t y r) R V プラスミドから T o l 2 エlement の部分が切り出された場合に生成すると考えられる約 2 5 0 b p の P C R 産物が、調べた全ての胚において増幅されていた (5 6 個中 5 6 個、図 4 B のレーン 1 - 1 0 参照)。この P C R 産物は (T o l 2 - t y r) R V プラスミド D N A のみを注入した胚からは決して検出されなかった (5 0 個より多い中で 0 個、図 4 B のレーン 1 1 - 2 0 参照)。

40

6 個の異なる胚からの P C R 産物をクローン化し、配列決定した。それらのうちの 3 個は、野性型のメダカチロシナーゼ遺伝子の配列 (図 4 C、切り出し産物 a) を有し、正確な切り出しを示しており、他の 3 個は、h A T ファミリーのトランスポゾンの切り出しに特徴的な (Pohlman 等、1984 ; Sutton 等、1984 ; Koga 等、1996 ; Kawakami 等、1998)、少数のヌクレオチドが付加したほぼ野性型の配列 (図 4 C、切り出し産物 b 及び c) を有しており、この実験における切り出しという事象がトランスポザーゼ活性に依存することを示している。

【 0 0 1 6 】

これらの結果、即ち、本発明の配列番号 1 に示す塩基配列を有する m R N A と共にインジェクションした場合には、トランスポゾンの切り出しに特徴的な P C R 産物が得られ、こ

50

れをインジェクションしない場合にはこのようなPCR産物が得られないということは、本発明の蛋白質 (T o l 2 転写物) が、切り出しを触媒する活性のあるトランスポザゼをコードしており、しかも (T o l 2 - t y r) R V プラスミドは切り出しに必須のシスエレメントの配列を含むことを示している。

【 0 0 1 7 】

図 4 は、この実験の結果を示すものであり、図 4 A は、この分析に用いたプライマーの位置及び方向を矢印で示している。図 4 B の上段は、プライマー t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r を用いた PCR 産物を、下段はプライマー T o l 2 f 1 及び T o l 2 r 3 を用いた PCR 産物を示す、図面に代わる写真である。レーン 1 - 1 0 はゼブラフィッシュ胚に (T o l 2 - t y r) R V プラスミドと T o l 2 の mRNA と共にインジェクションした場合を、レーン 1 1 - 2 0 は (T o l 2 - t y r) R V プラスミドのみを単独でインジェクションした場合を、レーン G 及び P は 5 0 n g のゼブラフィッシュゲノム DNA と、1 0 p g の (T o l 2 - t y r) R V プラスミド DNA とからの PCR 産物である。図 4 の C は、上記の実験で得られた切り出し産物の DNA 配列を示している。T o l 2 配列を肉太活字で示し、T o l 2 エレメントの外側の 8 b p の同方向のプライマーの配列部分に下線をつけてある。

10

【 0 0 1 8 】

この実験では、切り出し産物は一回の PCR 増幅の後に検出可能であったが、試験管内で調製した mRNA に代えて全長の T o l 2 エレメントを含有するプラスミド DNA を単独で受精卵に注入した分析法では、二回の PCR が必要であったことが注目された。ここで観察された効率のより高い切り出し反応は、DNA 注入によって供給されるよりも多くのトランスポザゼが RNA 注入によって供給されたためとして説明することができる。

20

【 0 0 1 9 】

T o l 2 エレメントの一番目のイントロンは約 3 0 0 b p の大きな逆方向反復配列 (i n v e r t e d r e p e a t s) を含んでおり、最近 A n g e l エレメントの逆向きの重複として同定された (I z s v a k 等、1999) (図 1 参照) 。このイントロン部分の配列が切り出しに必要であるかどうかを検討するために、一番目のイントロンの配列をも完全に欠いている (T o l 2 - t y r) i n 1 R V (図 1 の下段参照) を含有する (T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドを構築し、その活性を T o l 2 の mRNA とのコインジェクションにより前記の実験と同様に分析した。この結果を図 4 の D に示す。

30

【 0 0 2 0 】

図 4 の D の上段は、プライマー t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r を用いた PCR 産物を、下段はプライマー T o l 2 f 1 及び T o l 2 r 3 を用いた PCR 産物を示す、図面に代わる写真である。レーン 1 - 8 はゼブラフィッシュ胚に、(T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドと T o l 2 の mRNA とをインジェクションした場合を示し、レーン 9 - 1 2 は (T o l 2 - t y r) R V プラスミドと T o l 2 の mRNA とをインジェクションした場合を示し、レーン 1 3 - 1 6 は (T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドのみを単独でインジェクションした場合を示す。レーン P は 1 0 p g の (T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミド DNA の PCR 産物を示す。

【 0 0 2 1 】

レーン 9 - 1 2 は先ほどの実験を対照としておこなったものであり、切り出しを示す PCR 産物を確認することができたが、イントロン部分を欠失させたプラスミドを用いたレーン 1 - 8 のものでは、切り出し産物は検出することができず (1 6 個のうち 0 個、図 4 D 、レーン 1 - 8 参照) 、一番目のイントロンが切り出しに必須のシスエレメントを含んでいることが示された。

40

また、RV 欠失を修復し、(T o l 2 - t y r) R V プラスミドとほぼ同じ大きさの (T o l 2 - t y r) i n 1 、即ち T o l 2 エレメントの 6 4 4 ~ 2 1 6 3 番目の塩基のみを欠失させたものを含有する (T o l 2 - t y r) i n 1 プラスミドもコインジェクションアッセイによって調べたが、切り出しを示す PCR 産物は得られなかった (1 6 個のうち 0 個、データは示さず) 。

50

【 0 0 2 2 】

切り出しに必須のシスエレメントを正確に特定するためには、一番目のイントロン内のより小さい欠失及び点突然変異を用いたさらなる分析が必要であるが、これらの結果からイントロン部分が切り出しに必要であり、かつ当該イントロン部分には *Ang e 1* エレメントが逆方向反復配列として含まれていることから、当該逆方向反復配列が本発明の切り出しに必要な配列と考えることもできる。

【 0 0 2 3 】

このように、*T o 1 2* エレメントによってコードされていた転写物（本発明の蛋白質）及びこの蛋白質のトランスポザーゼ活性と、転移に必須のシスエレメントとを初めて同定することに成功した。これらの発見は、*T o 1 2* トランスポザーゼの生化学的な特徴づけにつながるものであろう。

また、*T c 1 / mariner* ファミリーに属するトランスポゾンのゼブラフィッシュゲノムへの転位が報告されている（Raz等、1997；Fadool等、1998）。この報告の実験では、ゼブラフィッシュの一細胞期の胚に、インビトロで転写したトランスポザーゼRNAと必須のシスエレメントをもつトランスポゾンベクターとがコインジェクトされた。

異なるファミリーに属するトランスポゾンが、ゲノムへの組込みに関して異なる特異性及び効率を有するかもしれないが、*T o 1 2* エレメントを用いた魚類における新規なトランスポゾン技術を開発した本発明の方法によれば、遺伝子の切り出しが前記したラッツ（Raz）らの方法と同様に行われていることから、*T c 1 / mariner* ファミリーのトランスポゾンにおいて行なわれたものと類似の方法で、*T o 1 2* エレメントなどの遺伝子をゲノム内にトランスポートすることができることになるであろう。

【 0 0 2 4 】

そこで本発明者らは、*T o 1 2* エレメントを転位によりゼブラフィッシュのゲノムに導入することができるかどうかを検討した。ゼブラフィッシュのゲノムには*T o 1 2* エレメントは存在しないことが知られている。

T o 1 2 エレメントがトランスポジションを活性化することができるトランスポゼースをコードしているかどうかを試験するために、ゼブラフィッシュの受精卵に、トランスポゼースをコードしていると考えられるテンプレートとしての*T o 1 2 c D N A* を用いてインビトロで転写したRNA、及びトランスポゼースをコードしていると考えられる領域を欠失させている（*T o 1 2 - t y r*）RVエレメントを有するプラスミドDNAを、

これら（*T o 1 2 - t y r*）RVプラスミド及び*T o 1 2 D N A*の構造を図5に示す。3'及び5'は転写の方向を示す。

【 0 0 2 5 】

インジェクトした卵を成魚に生長させて、インジェクトしていない成魚とつがいにした。そして、その子孫に*T o 1 2* 配列が存在するか否かを分析した。

インジェクトした8匹の魚のうちの2匹からの子孫に、*T o 1 2* 配列を見出すことができた。この2匹の魚をff-1（founder fish-1）及びff-7（founder fish-7）と名付けた。

ff-1からの68匹のF₁のうちの2匹が*T o 1 2* 配列を持っていた。これらの2匹の魚は、*T o 1 2* 配列と同様にプラスミド配列も持っていた。また、ff-7からの50匹のF₁のうちの25匹は*T o 1 2* 配列を持っていた。これらの25匹の魚はプラスミド配列をもっておらず、図6のAに示すサザンプロットの結果からA、B及びCの3種類に分類された。このうちAは7匹で、Bは3匹で、Cは15匹であった。

図6のAは、ff-1、ff-7からのF₁の尾ひれから調製したDNAを制限酵素EcoRVで消化し、これを図5に示すプローブを用いてサザンプロット分析した結果を示す、図面に代わる写真である。ff-1からの2匹は同じパターンを示したが、ff-7からのものはA、B及びCの3種類のパターンを示した。

【 0 0 2 6 】

次に、ff-1、ff-7からのF₁のPCR分析を行った。図5にPCR1、PCR2

及びPCR3として示される位置のプライマーを用いた。対照として、ゼブラフィッシュのゲノムDNA(G)、及びゲノムDNAと(Tol2-tyr) RVプラスミドDNA(G+P)を用いた。ff-7からのF₁では、PCR2及びPCR3におけるPCR産物を増幅することはできなかった。即ち、ff-7からの子孫は、ff-1からの子孫とは異なりTol2のフランキング配列となるプラスミド配列を持っていなかった。

【0027】

ff-7の子孫におけるTol2配列を含むDNAフラグメント及びその近傍領域をインバースPCR(inverse PCR)によりクローニングして、その配列を決定した。A、B及びCの3種類のいずれの場合もTol2配列はゼブラフィッシュのゲノム配列の中にあり、その両端には8bpの繰り返し配列がみられた。Tol2配列の両端における8bpの繰り返しは、hATファミリーのトランスポザースによる挿入に特徴的なものであり、トランスポザースによってTol2配列の挿入が行われたことを示すものである。

10

図7にA、B及びCの3種類の決定された塩基配列を示す。図7中のTol2は、Tol2の配列を示している。Aでは、Tol2配列の両端に「CTCAACTG」の繰り返しだが、Bでは、Tol2配列の両端に「TATAGAGA」の繰り返しだが、Cでは、Tol2配列の両端に「GTTTTTCAG」の繰り返しが見られた。

【0028】

脊椎動物の培養細胞や生殖細胞において、Tc1/マリナー(mariner)ファミリーに属する、人工的に再構築され活性化されたスリーピングビューティー(sleeping beauty)(Ivics,Z., et al., Cell, 91, 501-510 (1997))、線虫のTc3(Raz,E., et al., Current Biology, 8, 82-88 (1997))、ショウジョウバエのマリナー因子(mariner)(Fadool,J.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5182-5186 (1998))についてトランスポジション活性が報告されている。しかし、脊椎動物ゲノムに存在する自律的なトランスポゾン活性は未だ報告されていない。

20

本発明は、脊椎動物からの自律的なエレメントを同定した最初の報告であり、脊椎動物における機能的なトランスポザース活性を最初に報告するものである。

即ち、本発明は、脊椎動物において自律的に遺伝子を切り出す方法に関するのみならず、遺伝子を切り出し、きりだされた遺伝子をゲノムなどの他の遺伝子の中に挿入する方法にも関するものである。

【0029】

本発明の蛋白質は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものであるが、必ずしもこの中の全てのアミノ酸を必須とするものではなく、本発明のトランスポザーゼ活性又は当該活性と類似する活性(これらを併せて、トランスポザーゼ様活性という。)を有していればよく、その一部のアミノ酸が置換され若しくは欠失し、又は他のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するものであってもよい。そして、好ましくはTol2エレメントに由来するアミノ酸配列を有するものである。また、本発明の蛋白質は、配列表の配列番号1に示される塩基配列に相当する塩基配列を有するmRNAから産生されることを特徴とするものである。

30

【0030】

本発明の核酸は、前記した本発明の蛋白質からなるアミノ酸配列をコードするものであり、好ましくは配列表の配列番号1で示される配列を有するポリヌクレオチドなどが挙げられる。本発明の核酸は前記の塩基配列を有するもののみならず、これらの塩基配列にハイブリダイズ、好ましくはストリンジントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列も包含される。

40

【0031】

本発明の蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸の存在下で、細胞内の遺伝子の遺伝子構造を改変させる方法としては、細胞に本発明の前記した蛋白質又はそのmRNAなどの当該蛋白質を産生し得る核酸を導入し、同時に転移させたい遺伝子を含む遺伝子、例えばプラスミドなどを導入して、本発明の蛋白質による酵素作用により細胞内の遺伝子構造を改変することができる。本発明の改変は、好ましくは自律的な転移を起こすものである

50

。細胞としては、動物細胞が好ましく、より好ましくは脊椎動物の細胞、さらに好ましくは魚類の細胞、具体的にはゼブラフィッシュなどの魚類の細胞などが挙げられる。

前記の転移させたい遺伝子を含む遺伝子としては、転移させたい外来遺伝子を含むプラスミドのような天然の細胞内に存在しないものであってもよいが、天然の細胞内に存在する遺伝子であってもよい。この場合に転移に必要なシスエレメントを必要に応じて付加することもできる。転移させたい遺伝子としては、トランスポゾンが好ましいが、場合によっては各種の遺伝子異常による疾患を有する細胞に正常な遺伝子を導入するための遺伝子であってもよい。

また、本発明の改変方法は、導入されたプラスミドなどの細胞内の遺伝子の一部を切り出すことのみからなるものであってもよいが、この方法により切り出された遺伝子の全部又は一部が、他の遺伝子に挿入されることを包含するものであってもよい。

本発明の改変方法における切り出される遺伝子は、その塩基配列の上流に、少なくとも1回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有することが好ましい。このような逆方向反復配列は、遺伝子の転移におけるシスエレメント、又はシスエレメントの一部と考えられるからである。

【 0 0 3 2 】

また、本発明は、前記してきた改変方法を用いて、細胞の遺伝子に外来遺伝子を導入する方法、及び細胞の遺伝子の発現に基づく機能を改変する方法に関する。前記してきた方法によれば、例えば、プラスミド中の外来遺伝子を細胞のゲノム中に転移させることができ、細胞に当該細胞が本来有していない新たな遺伝子を導入することができる。また、このようなあらたに導入された遺伝子を発現させることにより、当該細胞の機能を改変することも可能となる。さらに、本発明はこのような方法により細胞の機能が改変された細胞を提供することができる。この方法における細胞としても、前記した細胞が好ましい。

【 0 0 3 3 】

本発明の塩基配列の上流に、少なくとも1回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有するDNAを含有してなるプラスミドとしては、逆方向反復配列の下流にある遺伝子を転移させるためのものであり、少なくとも1回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有する部分とその下流に転移させたい遺伝子を含むし、細胞に容易に導入することができるものであればよい。

【 0 0 3 4 】

【実施例】

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本発明の実験においては、Teubingen、TL及びbrass系統のゼブラフィッシュを用いて注入用の卵を得、以下の実験にはこれを使用した。

【 0 0 3 5 】

実施例1 (cDNAのクローニング)

ゼブラフィッシュの受精卵に、(Tol2 - tyr) プラスミドを注入し、注入の9時間後に50個のゼブラフィッシュ胚より、Tri Zol Reagent (Life Technologies社) を用いて全RNAを抽出し、得られた約3 μgの全RNAを、各々次の3' RACE法及び5' RACE法に用いた。

3' RACEを行なうために用いられたとなり同士の前向きプライマーは：

Tol2f2 ; 5' - TTGGTCAGACATGTTTCATTG - 3'と

Tol2f3 ; 5' - ATGTTTCATTGGTCCTTTGGA - 3'、

Tol2f4 ; 5' - ATAGCTGAAGCTGCTCTGATC - 3'と

Tol2f5 ; 5' - CTGCTCTGATCATGAAACAG - 3'、

Tol2f8 ; 5' - GCTTAATAAAGAAATATCGGCC - 3'と

Tol2f9 ; 5' - AATATCGGCCTTCAAAAGTTTCG - 3'、及び

Tol2f12 ; 5' - CTGTAATCAGAGAGTGATGTGTA - 3'と

Tol2f13 ; 5' - ATTGTTACATTTATTGCATACAAT - 3'である。

5' R A C E を行なうために用いられた重なりのある逆向きのプライマーは：

T o l 2 r 4 ; 5' - CTCAATATGCTTCCTTAGG - 3'と

T o l 2 r 5 ; 5' - CTTCTTAGGTTTGATGGCG - 3'である。

3' R A C E 及び5' R A C E 産物をゲル抽出し、T O P O T A クローニングキット (Invitrogen社) を用いてクローン化し、さらにABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いて配列決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号 1 に示し、その翻訳領域のアミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に示す。

また、その概要を図 1 に示す。括弧内の数字は、T o l 2 エレメントの 5' 末端からの b p である。c D N A 配列の D D B J / E M B L / G e n b a n k 受け入れ番号は A B 0 3 2 2 4 4 である。

【 0 0 3 6 】

実施例 2 ((T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドの構築)

(T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドは、まず (T o l 2 - t y r) プラスミドの N r u I - N s p V を、c D N A の N r u I - N s p V フラグメントで置換し、さらにその結果得られたプラスミドを E c o R V で消化し、自己連結させることによって構築した。

【 0 0 3 7 】

実施例 3 (m R N A 合成、胚への注入、及び P C R 分析)

推定上のトランスポザゼのコード領域全体をコード化している c D N A を、p B l u e s c r i p t S K ⁺ (Stratagene) においてクローン化し、直鎖化し、プロテイナーゼ K を用いて消化し、さらにフェノール/クロロフォルム抽出した。m R N A は、T 7 R N A ポリメラーゼ及び m C A P m R N A C a p p i n g キット (Stratagene) を用いた試験管内の転写により生成した。転写物の濃度及び大きさは、アガロースゲル電気泳動で調べた。

ゼブラフィッシュ受精卵に、前記で得られた D N A 溶液の 1 - 2 n l (~ 2 5 n g / μ l のプラスミド D N A) を m R N A (~ 5 n g / μ l の T o l 2 の m R N A) と共に、又は単独で注入し、2 8 ° C にて ~ 8 時間インキュベートした。各々の胚を、5 0 μ l の 1 0 m M E D T A 、1 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) 、2 0 0 μ g / m l のプロテイナーゼ K に浸し、さらに 5 0 ° C にて 3 時間インキュベートした。

【 0 0 3 8 】

次いで、1 μ l の溶解した胚を、t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r プライマーを用いて P C R (9 4 ° C 3 0 秒、5 5 ° C 3 0 秒、及び 7 2 ° C 3 0 秒を 3 5 サイクル) に使用した (Kawakami 等、1998) 。 P C R 産物を 2 % のアガロースゲル電気泳動にて分析した。結果を図 4 に示す。

D N A 配列分析用には、P C R 産物をゲル抽出し、T O P O T A C l o n i n g (I n v i t r o g e n) を用いてクローン化し、配列決定した。各々のサンプル中の注入されたプラスミド D N A の存在を、T o l 2 f 1 (5' - T C C A C C C A T G C T T C C A G C A G T A - 3') 及び T o l 2 r 3 (5' - C G T T G T G G T T G C A A T C C A T T C A A C - 3') プライマーを用いた P C R (9 4 ° C 3 0 秒、5 5 ° C 3 0 秒、及び 7 2 ° C 3 0 秒を 2 5 サイクル) により確かめた。

【 0 0 3 9 】

【 発明の効果 】

本発明は、遺伝子の転移酵素活性を有する新規な蛋白質及びそれをコードする核酸を提供するものである。

また、本発明は、脊椎細胞において異なるファミリーの遺伝子転移酵素が、遺伝子を転移させ得る活性を発現することができることを開示するものであり、脊椎動物における遺伝子の転移や転移による変異に関する技術の発展に大きく寄与するものである。一方、最近の遺伝子工学が個々の細胞の形質転換から生体の形質転換へと発展していることから、本発明の細胞レベルの遺伝子の転移技術が単に細胞の形質転換のみに制限されるのではなく、生体における形質転換の手段の一つとして、哺乳動物の遺伝子構造や機能を改変する

10

20

30

40

50

ための医学や農学の分野への応用が期待される技術である。とりわけ、遺伝子治療、魚類の品種改良においては有力な手段となることが期待される。

【 0 0 4 0 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation	
<120> Transposon transpher factor and alternation method for a gene	10
<130> PC901482	
<160> 2	
<210> 1	
<211> 2156	
<212> DNA	20
<213> <i>Oryzias latipes</i>	
<400> 1	
acgtcatgtc acatctatta ccacaatgca cagcacctig accigggaaat tagggaaatt	60
ataacagtca atcagtggaa gaaaatggag gaagiatgig attcalcagc agcigcgagc	120
agcacagtcc aaaatcagcc acaggatcaa gagcacccgt ggccgtatct tcgcgaatic	180
ttttctttaa gtggtgtaaa taaagattca ttcaagatga aatgigicct cigtctcccg	240
cttaataaag aaatcggc ctccaagaat tcgccaatcaa acctaggaa gcatattgag	300
agaatgcacc caaattacct caaaaactac tctaaatga cagcacagaa gagaaagatc	360
gggacctcca cccatgcttc cagcagtaag caactgaaag ttgactcagt titcccagtc	420
aaacatgigt ctccagtcac tgtgaacaaa gctatattaa ggtacatcat tcaaggacit	480

catccttca gcactgttga tctgccaatca tttaaagagc tgattagiac actgcagcct	540	
ggcatttctg tcattacaag gcctacttta cgcaccaaga tagctgaagc tgcctctgac	600	
atgaaacaga aagtgactgc tgccaatgagt gaagtigaat ggattgcaac cacaacggat	660	
tgttggactg cacgtagaaa gtcattcatt ggigtiaactg ctacactggat caaccctgga	720	10
agtcttgaaa gacattccgc tgcacttggc tgcaaaaagat taatgggctc tcatactttt	780	
gaggtactgg ccagtgccat gaatgatatc cactcagagt atgaaatcgc tgacaagggt	840	
gtttgcacaa ccacagacag tggttccaac tttatgaagg ctctcagagt ttttgggtg	900	20
gaaaacaatg atatcgagac tgaggcaaga aggtgtgaaa gtgatgacac tgattctgaa	960	
ggctgtgggtg agggaagtga tgggttggaa ttccaagatg cctcaccagt cciggaccaa	1020	
gacgatggct tcgaattcca gctaccacaaa catcaaaaagt gtgcccgtca ctacttaac	1080	
ctagtctcaa gcgttgatgc ccaaaaagct ctctcaaatg aacactacaa gaaactctac	1140	30
agatctgtct ttggcaaatg ccaagcttta tggaaataaaa gcagccgac ggctctagca	1200	
gctgaagctg ttgaatcaga aagccggctt cagcttttaa ggccaaacca aacgcgggtg	1260	
aattcaactt ttaaggctgt tgacagaatt ctcaaatit gcaaagaagc aggagaaggc	1320	40

gcacttcgga atatatgcac ctctcttgag gtccaatgt ttaatccagc agaaatgcig 1380
 ttcttgacag agtgggcca cacaatgcgt ccagttgcaa aagtactcga catcttgcaa 1440
 gcggaaacga atacacagct ggggtggctg ctgcctagtg tccatcagtt aagcttgaaa 1500
 cttcagcgac tccaccattc tctcaggtac tggaccac ttgiggatgc cctacaacaa 1560
 ggaatccaaa cagattcaa gcatagttt gaagatccig agatcatagc agctgccatc 1620
 cttctcccta aattcggac ctcttgaca aaigaigaaa ccatcataaa acgaggcatg 1680
 gactacatca gagtgcattt ggagccttg gaccacaaga aggaatiggc caacagtcca 1740
 tctgatgatg aagattttt cgcttcttg aaaccgacaa cacatgaagc cagcaaagag 1800
 ttggatggat atctggcctg ttttcagac accagggagt ctctgctcac gtttctgct 1860
 attgcagcc tctctatca gactaatca cctcttccg catcggcctg ctgigagagg 1920
 ctttcagca ctgcaggatt gctttcagc cccaaaagag ctaggctiga cactaacaat 1980
 ttgagaatc agcttctact gaagttaa atctgagttt acaacttga gtagcgtgta 2040
 ctggcattag attgtctgtc ttatagttg ataattaa atcaaacagtt cttaaagcagg 2100
 ataaaacctt gtagcattt catttaatgt tttttgagat taaaagccta aacaag 2156

10

20

30

40

<210> 2
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> *Oryzias latipes*
 <400> 2

Met Glu Glu Val Cys Asp Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Thr Val	15	10
Gln Asn Gln Pro Gln Asp Gln Glu His Pro Trp Pro Tyr Leu Arg	30	
Glu Phe Phe Ser Leu Ser Gly Val Asn Lys Asp Ser Phe Lys Met	45	
Lys Cys Val Leu Cys Leu Pro Leu Asn Lys Glu Ile Ser Ala Phe	60	
Lys Ser Ser Pro Ser Asn Leu Arg Lys His Ile Glu Arg Met His	75	
Pro Asn Tyr Leu Lys Asn Tyr Ser Lys Leu Thr Ala Gln Lys Arg	90	
Lys Ile Gly Thr Ser Thr His Ala Ser Ser Ser Lys Gln Leu Lys	105	
Val Asp Ser Val Phe Pro Val Lys His Val Ser Pro Val Thr Val	120	20
Asn Lys Ala Ile Leu Arg Tyr Ile Ile Gln Gly Leu His Pro Phe	135	
Ser Thr Val Asp Leu Pro Ser Phe Lys Glu Leu Ile Ser Thr Leu	150	
Gln Pro Gly Ile Ser Val Ile Thr Arg Pro Thr Leu Arg Ser Lys	165	
Ile Ala Glu Ala Ala Leu Ile Met Lys Gln Lys Val Thr Ala Ala	180	
Met Ser Glu Val Glu Trp Ile Ala Thr Thr Thr Asp Cys Trp Thr	195	
Ala Arg Arg Lys Ser Phe Ile Gly Val Thr Ala His Trp Ile Asn	210	
Pro Gly Ser Leu Glu Arg His Ser Ala Ala Leu Ala Cys Lys Arg	225	30
Leu Met Gly Ser His Thr Phe Glu Val Leu Ala Ser Ala Met Asn	240	
Asp Ile His Ser Glu Tyr Glu Ile Arg Asp Lys Val Val Cys Thr	255	
Thr Thr Asp Ser Gly Ser Asn Phe Met Lys Ala Phe Arg Val Phe	270	
Gly Val Glu Asn Asn Asp Ile Glu Thr Glu Ala Arg Arg Cys Glu	285	
Ser Asp Asp Thr Asp Ser Glu Gly Cys Gly Glu Gly Ser Asp Gly	300	
Val Glu Phe Gln Asp Ala Ser Arg Val Leu Asp Gln Asp Asp Gly	315	
Phe Glu Phe Gln Leu Pro Lys His Gln Lys Cys Ala Cys His Leu	330	40
Leu Asn Leu Val Ser Ser Val Asp Ala Gln Lys Ala Leu Ser Asn	345	

Glu His Tyr Lys Lys Leu Tyr Arg Ser Val Phe Gly Lys Cys Gln	360	
Ala Leu Trp Asn Lys Ser Ser Arg Ser Ala Leu Ala Ala Glu Ala	375	
Val Glu Ser Glu Ser Arg Leu Gln Leu Leu Arg Pro Asn Gln Thr	390	
Arg Trp Asn Ser Thr Phe Met Ala Val Asp Arg Ile Leu Gln Ile	405	
Cys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Ala Leu Arg Asn Ile Cys Thr Ser	420	
Leu Glu Val Pro Met Phe Asn Pro Ala Glu Met Leu Phe Leu Thr	435	
Glu Trp Ala Asn Thr Met Arg Pro Val Ala Lys Val Leu Asp Ile	450	10
Leu Gln Ala Glu Thr Asn Thr Gln Leu Gly Trp Leu Leu Pro Ser	465	
Val His Gln Leu Ser Leu Lys Leu Gln Arg Leu His His Ser Leu	480	
Arg Tyr Cys Asp Pro Leu Val Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ile Gln	495	
Thr Arg Phe Lys His Met Phe Glu Asp Pro Glu Ile Ile Ala Ala	510	
Ala Ile Leu Leu Pro Lys Phe Arg Thr Ser Trp Thr Asn Asp Glu	525	
Thr Ile Ile Lys Arg Gly Met Asp Tyr Ile Arg Val His Leu Glu	540	
Pro Leu Asp His Lys Lys Glu Leu Ala Asn Ser Ser Ser Asp Asp	555	20
Glu Asp Phe Phe Ala Ser Leu Lys Pro Thr Thr His Glu Ala Ser	570	
Lys Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr Arg Glu	585	
Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys Thr	600	
Asn Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser	615	
Thr Ala Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys Arg Ala Arg Leu Asp Thr	630	
Asn Asn Phe Glu Asn Gln Leu Leu Leu Lys Leu Asn Leu Arg Phe	645	
Tyr Asn Phe Glu	649	

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、T o 1 2 プラスミド及びその転写物の構造、及び本発明の c D N A の構造を示すものである。破線部分はイントロンを示す。一番目のイントロンにある逆方向反復配列 (A n g e 1 エレメント) と、本発明で用いたプライマーの位置とを矢印で示す。

【図 2】図 2 は、本発明の T o 1 2 及び A c トランスボザーゼのアミノ酸配列の比較を示す。

【図 3】図 3 は、本発明のコインジェクションによる一過性胚エクシジョンアッセイの概要を示したものである。切り出し産物 (t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r) の検出に用いたプライマーを矢印で示す。 40

【図 4】図 4 は、ゼブラフィッシュ胚における本発明の切り出し反応の P C R 分析の結果を示す図面に代わる写真である。

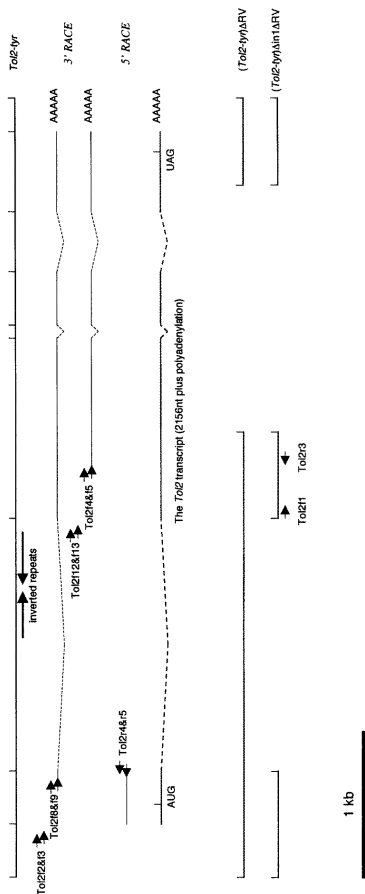
【図 5】図 5 は、T o 1 2 エレメントをゲノムに転移させるための (T o 1 2 - t y r) R V プラスミド、(T o 1 2 - t y r) 及び T o 1 2 c D N A の構造を示す。図 5 上部の黒線はサザンプロット分析に使用するプローブ部分を示す。

【図 6】図 6 は、T o 1 2 エレメントの存在が確認された親 (f f - 1 及び f f - 7) のそれぞれの子孫 F₁ のサザンプロット分析の結果 (図 6 の A) 、及び P C R 分析の結果 (図 6 の B) を示す、図面に代わる写真である。

【図 7】図 7 は、f f - 7 の子孫 F₁ の A 、 B 及び C の 3 種における、ゲノム中に挿入さ 50

れた Tol2 エLEMENT の周囲の塩基配列を示すものである。

【 1 】



【 2 】

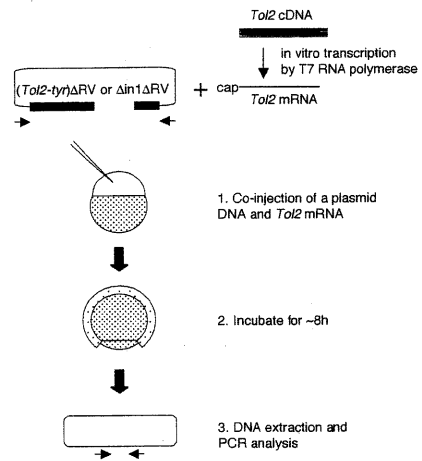
To12 : 106 VDSVFPVKHSPVTYNKALLRYIIQGLHPFSTVDLPSFKELISTLQPGISVITRPTLRSK 166
 ++ P K+ V++ K L II +PF+ V+ F E + +L+P + +R T R
 Ac : 216 INLIEPYKYDEVVSLKHLA-IIMHEYFFNIVEHEYVEFKSLRPHFPDKSRVTARKY 273

To12 : 166 IAEAALIMKQVTAAMSEVE-WIATTTDOWA-RRKSFIVTAHWINPG-SLEHSAALA 222
 I + L K+K+ + +V+ +TT D WT+ + KS++ VT HWI+ L++
 Ac : 274 IMDLYLEEKLYGKLDVQSRFSTTMDMWTSCQNKSYMCVTIHWIDDDWGLQKRIYGVGF 333

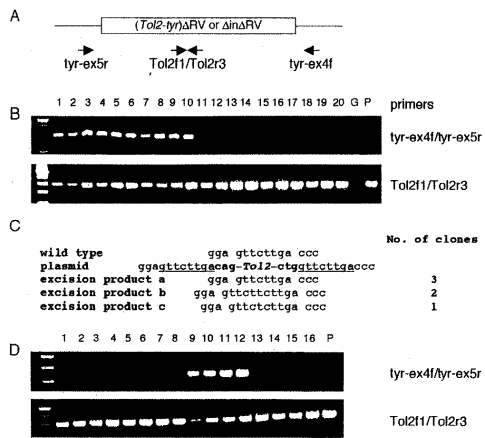
To12 : 223 CKRLMGSHTFEVLASAMNDIHSEYEIRDKVVCITDSSGSMKAFRVFGVENNDIETEAR 282
 + G HT + L+ I ++ I K+ + D+ S N++
 Ac : 334 -HVEGRHTGRLSQTFTAIMVKNIEKLFALSLDNAS-----ANEVAVHDI 379

To12 : 283 RCESDQTDSEGGEGSDGVEFQDASRVLDQDDGFEFQLPKHQKACACHLLNLVS 335
 + DTDS DG F H +CACH+LNLV+
 Ac : 380 IEDLQDTSNLV---CDGAFF-----HVRCAACHILNLVA 410

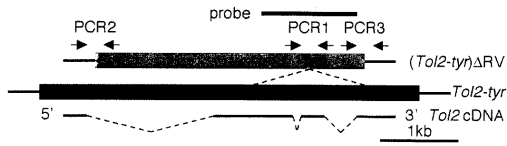
【 3 】



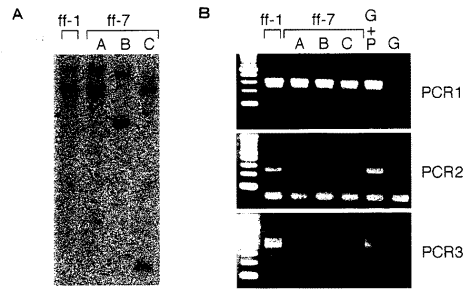
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

A GTTTTTTTTTACATCTCAACTG-Tol2-CTCAACTGATAGTCTAATCACAC
 B CGCTGAGCTCTTTATATAGAGA-Tol2-TATAGAGATGGCTGTTATACGAG
 C AAGTGACGTCAATGTGTTTTTCAG-Tol2-GTTTTCAAGTCATCTGTTCATTA

フロントページの続き

早期審理対象出願

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

JDREAM I

MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/CAPLUS

GENBANK/DDBJ/EMBL/GENESEQ

UNIPROT/PDB/GENESEQ