

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12)特許公報 ( B 2 )

(11)特許番号

特許第3530495号

( P 3 5 3 0 4 9 5 )

(45)発行日 平成16年 5月24日(2004.5.24)

(24)登録日 平成16年 3月 5日(2004.3.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
C12N 15/09	ZNA	A01K 67/033	501
A01K 67/033	501	C12N 9/04	Z
C12N 9/04		C12Q 1/02	
C12Q 1/02		A01H 1/00	A
// A01H 1/00		C12R 1:01	

請求項の数 7 (全11頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 46399( P 2001 - 46399)	(73)特許権者	501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2
(22)出願日	平成13年 2月22日(2001.2.22)	(73)特許権者	501073884 神村 学 茨城県つくば市並木 2 - 205 - 202
(65)公開番号	特開2002 - 238583( P 2002 - 238583 A )	(72)発明者	神村 学 茨城県つくば市並木 2 - 205 - 202
(43)公開日	平成14年 8月27日(2002.8.27)	(72)発明者	木内 信 茨城県つくば市大字新井313 - 9
審査請求日	平成13年 2月22日(2001.2.22)	(72)発明者	齋藤 準 茨城県つくば市千現 2 - 11 - 8 篠内ハイ ツ102
		(74)代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
		審査官	齋藤 真由美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】緑きょう病菌由来エクジステロイド 2 2 位酸化酵素とそれを用いた脱皮ホルモン不活性化システム

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の ( a ) または ( b ) のタンパク質。

( a ) 配列表配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

( b ) 配列表配列番号 2 において、 1 個または数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、エクジステロイド 2 2 位酸化酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 以下の ( a ) または ( b ) の DNA からなる遺伝子。

( a ) 配列表配列番号 1 に示す塩基配列からなる DNA。

( b ) ( a ) の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエクジステロイ

2

ド 2 2 位酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のタンパク質を節足動物に投与することによって、その脱皮ホルモンを不活性化する方法。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のタンパク質を用いて脱皮ホルモンを不活性化することによって、節足動物の成育を制御する方法。

【請求項 5】 請求項 1 に記載のタンパク質を用いて脱皮ホルモンを不活性化することによって、昆虫の成育を制御する方法。

【請求項 6】 請求項 1 に記載のタンパク質をカイコに投与することによって、カイコが吐糸する糸の径を制御してなる蚕糸の製造方法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載のタンパク質を形質転換

体に投与することによって、脱皮ホルモン誘導性遺伝子の発現を抑制する方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、昆虫病原系状菌である緑きょう病菌 (*Nomuraea rileyi*) から単離されたエクジステロイド 2 2 位酸化酵素およびそれをを用いた脱皮ホルモン不活性化システムに関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】昆虫や甲殻類を初めとする節足動物の脱皮は、脱皮ホルモン活性を有する数種のエクジステロイドによって誘導されることが知られている。これらの脱皮ホルモンについては、少なくとも 2 つの利用法が開発されている。

【 0 0 0 3 】その一つは、個体の脱皮または変態時期を早めたり、蛹化を斉一化するなどの発育のコントロールにおける利用である。このことにより、例えばカイコにおいては、蚕糸産生のコントロールが可能になる。

【 0 0 0 4 】他の利用方法は、培養細胞系、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物において、脱皮ホルモン処理により、目的遺伝子を高レベルで、かつ発現時期をコントロールし得る遺伝子発現システムへの利用である。これは脱皮ホルモンが転写因子である脱皮ホルモン受容体に結合し、さらに脱皮ホルモン応答遺伝子上にある脱皮ホルモン応答配列に結合することにより、応答遺伝子の転写活性を制御するという知見に基づくものである。

【 0 0 0 5 】例えば、脱皮ホルモン受容体および転写制御領域に脱皮ホルモン応答配列を組み込んだ目的遺伝子をこれらの系に導入しておき、培養細胞系に添加 (Christopherson, K. S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6314 - 6318)、動物に注射 (No, D et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346 - 3351) もしくは植物の根から吸収させる (Martinez, A. et al. (1999) The Plant Journal 19, 97 - 106) などの方法を用いて、それぞれの細胞内脱皮ホルモン濃度を高めることにより、目的遺伝子産物の発現誘導を行うものである。これらのうち、培養細胞系に用いるものは、キットとして既に実用化されている。

【 0 0 0 6 】一方、脱皮ホルモン自体を用いずに、脱皮ホルモン活性を高める技術も開発されている。例えば、脱皮ホルモン活性の強いエクジステロイド、およびエクジステロイド骨格を持たない、より安定かつ強力な脱皮ホルモンアゴニストの害虫防除における利用がその例である。このように、脱皮ホルモン活性を上げる技術は既に開発がなされている。

【 0 0 0 7 】これに対して、脱皮ホルモン活性を下げる手法、すなわち、体内・細胞内に存在する脱皮ホルモンを不活性化する手法はほとんど開発されていない。現在、パキユロウィルス由来のエクジステロイド UDP -

グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (特開平 1 1 - 1 2 3 0 7 9 ) が脱皮ホルモンの不活性化能をもつ酵素の遺伝子として注目されている。しかし、該酵素が作用するには UDP - グルコースの共存が必須であるなどの欠点があるため、精製酵素標品もしくはリコンビナントタンパク質としては実用化されるには至っていない。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、効率よく脱皮ホルモンを不活性化する物質およびシステムを提供することにある。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、脱皮ホルモンの不活性化が昆虫などの発育コントロールおよび目的遺伝子産物の発現誘導の制御などの応用に極めて重要であるという認識の下、脱皮ホルモン活性を有するエクジステロイドは全て 2 2 位に水酸基を持ち、この部位が修飾を受けると脱皮ホルモン活性が著しく低下することに着目し、さらに具体的に昆虫病原系状菌である緑きょう病菌 (*Nomuraea rileyi*) からエクジステロイド 2 2 位酸化酵素を単離し、該酵素もしくはその修飾タンパク質によってエクジステロイドの 2 2 位の水酸基をケト基に酸化することで上記の課題が解決されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】すなわち本発明は、以下の ( a ) または ( b ) のタンパク質、すなわち、

( a ) 配列表配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

( b ) 配列表配列番号 2 において、1 個または数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、エクジステロイド 2 2 位酸化酵素活性を有するタンパク質に関する。

【 0 0 1 1 】また、本発明は、以下の ( a ) または ( b ) の DNA、すなわち、

( a ) 配列表配列番号 1 に示す塩基配列からなる DNA。

( b ) ( a ) の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエクジステロイド 2 2 位酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子に関する。

【 0 0 1 2 】さらに、本発明は、前記タンパク質を節足動物に投与することによって、その脱皮ホルモンを不活性化する方法に関する。また、本発明は、前記タンパク質を用いて脱皮ホルモンを不活性化することによって、節足動物の成育を制御する方法に関する。さらに、本発明は、前記タンパク質を用いて脱皮ホルモンを不活性化することによって、昆虫の成育を制御する方法に関する。また、本発明は、前記タンパク質をカイコに投与することによって、カイコが吐糸する糸の径を制御してなる蚕糸の製造方法に関する。さらに、本発明は、前記タンパク質を形質転換体に投与することによって、脱皮ホ

ルモン誘導性遺伝子の発現を抑制する方法に関する。

【 0 0 1 3 】本発明によるタンパク質は、脱皮ホルモンの 2 2 位水酸基を酸化し、不活性化する活性を有する酵素である。そのため、該酵素を節足動物体内に投与すれば、脱皮ホルモンを不活性化することによってその生育を制御することができる。本発明による酵素は、カイコを初めとする昆虫類の生育制御に用いることができる。特に、本発明による酵素をカイコに投与することによって、通常の蚕糸より細いため、商品価値が高い蚕糸を産生させることができる。

【 0 0 1 4 】本発明による酵素は昆虫に対してのみならず、昆虫類と同様にエクジステロイドを脱皮ホルモンとして用いている甲殻類の生育制御に用いることも可能である。また、該酵素を得るには、配列表 2 に示した塩基配列からなる、本発明による遺伝子を導入したリコンビナント・バキュロウィルスにカイコを感染させ、その血中に前記タンパク質を大量に発現させて回収するシステムを用いることが可能である。

【 0 0 1 5 】本発明による酵素または遺伝子を用いれば、脱皮ホルモンを添加、注射または根部吸収させて細胞内脱皮ホルモン濃度を高めて目的遺伝子産物の発現誘導を行う系において、該目的遺伝子の発現を任意に停止させることができる。したがって、培養細胞、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物などの形質転換体において、脱皮ホルモンを用いた遺伝子発現系を負の方向に制御することも可能になり、これによって形質転換体を利用した遺伝子発現システムの応用の幅が大きく広がる。以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【 0 0 1 6 】

【発明の実施の形態】配列表 1 に、本発明による、緑きょう病菌 (*Nomurea rileyi*) から単離されたエクジステロイド 2 2 位酸化酵素の c DNA およびそれから予想されるアミノ酸配列を示した。また、配列表 2 に、該エクジステロイド 2 2 位酸化酵素の予想されるアミノ酸配列を示した。c DNA のクローニングについては、まず、緑きょう病菌培養液から脱皮ホルモンの 1 種エクジソンの 2 2 位水酸基のケト化 (酸化) 活性を指標にタンパク質を精製し、N 末端および内部アミノ酸配列を決定した。さらに、それらのアミノ酸配列をもとにして PCR により全長 c DNA をクローニングした。

【 0 0 1 7 】図 1 A に昆虫体内に見られるエクジステロイドと本発明による酵素によるその酸化産物の構造を示した。また、図 1 B に示したように、これらのエクジステロイドは HPLC で簡便に検出することができる。すなわち、逆層カラム (TSKgel ODS-80Ts, 4.6 mm x 150 mm TOSO) を HPLC (LC 10-AT, Shimadzu) に取り付け、通常の紫外線検出器で 245 nm の吸光度を測定することにより行った。なお、この際流速は 0.6 ml/min、カラム保持温度は 40 °C で、アセトニトリル 20-30 % のグラジエント中で 40 分間サンプルを流した。

【 0 0 1 8 】本発明による c DNA の予想されるコード領域 (配列表 1 中の A<sub>111</sub> - T<sub>1893</sub>) をバキュロウィルスを用いたタンパク質発現系 (BAC-T0-BAC Baculovirus Expression Systems、Gibco BRL) を用いて、SF-9 セルで発現させたところ、培養開始 7 日目の培養液中に強いエクジステロイドの酸化活性が認められた (図 2)。精製した本酵素に対するポリクロナル抗体を使ったウェスタン・ブロット解析でも、培養液中にエクジステロイド 2 2 位酸化酵素が分泌されていることが確認された (図 3)。

【 0 0 1 9 】なお、一般に生理活性を有するタンパク質をコードするアミノ酸配列において、1 個もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されていても、その生理活性が維持される場合があることは当業者にとって自明のことである。本発明においても、このように修飾され、かつエクジステロイド 2 2 位酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA 断片も含まれる。すなわち、配列表配列番号 2 において、1 個もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失、置換もしくは挿入されたアミノ酸配列からなり、かつ、エクジステロイド 2 2 位酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA も本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 2 0 】ここで、「1 個もしくは数個」とは、アミノ酸が付加、欠失もしくは置換されるアミノ酸残基のエクジステロイド 2 2 位酸化酵素タンパク質の立体構造における部位またはアミノ酸残基の脂累によって異なるが、通常 2 ~ 20 個、好ましくは 2 ~ 15 個程度を指す。そのような改変された DNA は、例えば部位特異的変異法によって、特定のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されるように本発明の DNA の塩基配列を改変することによって得られる。

【 0 0 2 1 】また、本発明の DNA またはこれを有する細胞に変異処理を行い、これらの DNA もしくは細胞から、例えば配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントナトリウム条件でハイブリダイズする DNA を選択することによっても改変された DNA を得ることができる。

【 0 0 2 2 】ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、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。この条件を明確に数値化することは困難であるが、例えば、99.5% 以上であるような相同性が高い核酸同士はハイブリダイズするが、それより相同性が低い DNA 同士はハイブリダイズしないような条件が挙げられる。

#### 【 0 0 2 3 】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。  
(実施例 1) 緑きょう病菌からのエクジステロイド 2 2 位酸化酵素の単離

50 緑きょう病菌をカイコの蛹の抽出液を含む液体培地中で

9 日間培養し、その培養液（目的酵素を含む）を0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターを通した後、4 で保存した。十分量の培養液を回収後、以下の4ステップの抽出により酵素を単離した。

- 1 . 5 0 % 硫酸アンモニウム（硫酸）により沈殿させる
- 2 . フェニル疎水クロマトグラフィー（phenyl-Sepharoseを使用）
- 3 . ゲルろ過（Superdex 200pgを使用）
- 4 . 陰イオンクロマトグラフィー（HiTrap Qを使用）

2 ~ 3 はHPLC（Model Bio-HPLC system, Tosoh）を用いて行った。それぞれの過程で、図 1 A に記載のエクジソンを基質とする酵素反応を行い、酸化生成物をHPLCでモニターすることにより、目的酵素の含まれるフラクションを調べた。そして、最終的な精製後、SDS PAGEを行い銀染色により単一タンパク質が精製されていることを確認した。

#### 【 0 0 2 4 】（実施例 2） エクジステロイド 2 2 位酸化酵素遺伝子の配列決定

まず、実施例 1 に記載の方法に従って単離した酵素の N 末端配列をアミノ酸シークエンサーにより解析し、N 末端のアミノ酸配列を決定した。さらに、酵素標品を V8 プロテアーゼにより部分分解した分解産物の N 末端配列をアミノ酸シークエンサーにより解析することにより、この酵素の内部アミノ酸配列を決定した。このようにして決定した酵素の N 末端配列および内部配列を基に、4 種類のディジェネレートプライマー、すなわち正方向のプライマーとして E22o.6 プライマー（配列表配列番号 3 ; アミノ酸配列の L P Q G G C R ( 2 1 ~ 2 7 ) をコード）および E22o.2 プライマー（配列表配列番号 4 ; アミノ酸配列の C R C I P G E ( 2 6 ~ 3 2 ) をコード）を、ならびに逆方向のプライマーとして Int.R1 プライマー（配列表配列番号 5 ; アミノ酸配列の Q N V N N A W ( 7 4 ~ 8 0 ) を逆向きにコード）および Int.R2 プライマー（配列表配列番号 6 ; アミノ酸配列の D Q G Q N V N ( 7 1 ~ 7 7 ) を逆向きにコード）を設計した。培養した緑きょう病菌から抽出した mRNA を鋳型にしてこれらのプライマーを用いた RT-PCR を行うことにより、この酵素の部分 cDNA をクローニングした。

【 0 0 2 5 】 PCR はプライマーセットを変えて 2 回行った。すなわち 1 回目は、E22o.6 プライマーと Int.R1 プライマーを、2 回目は E22o.2 プライマーと Int.R2 プライマーを用いた。そして、最終的に脱皮ホルモン酸化酵素 cDNA（全長 1963 塩基）中の 206 から 320 までの 115 塩基配列を増幅し、塩基配列を決定した。このクローニングできた部分 cDNA 内にプライマーを設計して、さらに RT-PCR の変法の一つである 5' RACE および 3' RACE を、SMART RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH 社）を用いて行うことにより、この酵素の mRNA の全長をカバーする cDNA をクローニングした。なお、3' RACE においては E2

2o.RF1 プライマー（配列表配列番号 7 ; E22o 全塩基配列の 2 0 9 ~ 2 3 1 に相当）を用いて全塩基配列の 2 0 9 ~ 1 9 6 3 の領域を増幅し、塩基配列を決定した。また、5' RACE においては、E22o.RR1 プライマー（配列表配列番号 8 ; E22o 全塩基配列の 2 6 8 ~ 2 9 0 の逆鎖に相当）を用いて全塩基配列の 1 ~ 2 9 0 の領域を増幅し、塩基配列を決定した。以上のようにして RT-PCR、5' RACE および 3' RACE によりクローニングした領域を重ね合わせて、緑きょう病菌の脱皮ホルモン酸化酵素の cDNA の全長を決定した。

#### 【 0 0 2 6 】（実施例 3） エクジステロイド 2 2 位酸化酵素のカイコ幼虫の成育に対する影響

本発明による酵素を含む酵素液を、カイコの 4 齢または 5 齢幼虫に 1 . 6 u n i t s / 2 0  $\mu\text{l}$  / 頭注射し、その後の生育を調べた。なお、「1 u n i t」は、1 分間に 1 nM のエクジソンを酸化する酵素活性を表す。カイコの 4 齢（終前齢）幼虫は、通常約 5 日間で 5 齢（終齢）幼虫に脱皮し、5 齢幼虫は 7 日ほどで繭を作り始め 1 1 日目に蛹化する。しかし、4 齢期初めに本酵素をカイコ体内に注射すると、注射後約 7 日目に繭を作り始め、1 1 日後に蛹化した（図 4 A）。一方、5 齢 7 日に注射した場合には注射後 1 0 日以上幼虫の状態のまま、最終的には蛹化することなく死亡した（図 4 B）。

【 0 0 2 7 】 また、それぞれにおける酵素液を注射した後の血中エクジステロイドを調べたところ、活性型脱皮ホルモンである 2 0 - ヒドロキシエクジソンとその前駆体であるエクジソンともほとんど検出できず、2 2 位の水酸基が酸化された修飾産物が多量に蓄積していた（図 5）。このように、本発明による酵素をカイコに注射することにより、カイコ体内の脱皮ホルモンが不活性化され、注射する時期に応じて早熟変態や吐糸期間の延長、変態阻害などの成長制御を行うことができた。

#### 【 0 0 2 8 】（実施例 4） 2 2 位が酸化されたエクジステロイドの、脱皮ホルモン誘導性遺伝子に対する転写誘導効果

脱皮ホルモン受容体（E c R）遺伝子はリガンドである脱皮ホルモン自身により転写誘導を受けることが知られている。培養したカイコ前部糸腺に対して異なる濃度の 2 0 - ヒドロキシエクジソンまたは本発明による酵素によって 2 2 位が修飾された 2 0 - ヒドロキシ - 2 2 - デヒドロエクジソンを加え、数時間後の E c R m R N A の発現を調べた。その結果、2 0 - ヒドロキシエクジソンを加えた場合には加えた量に依存して E c R m R N A の発現量が増加したが、2 0 - ヒドロキシ - 2 2 - デヒドロエクジソンを加えた場合には全く発現誘導効果がみられなかった（図 6）。このように、本発明による酵素によって 2 2 位が修飾されたエクジステロイドには脱皮ホルモン誘導性遺伝子に対する転写誘導活性がないことが確かめられた。

【 0 0 2 9 】 以上のように、本発明によるエクジステロ

イド 2 2 位酸化酵素には強い脱皮ホルモン不活性化能があり、該酵素を用いることによって、効果的に昆虫の成長制御や脱皮ホルモン誘導性遺伝子の発現制御を行えることが示された。

【 0 0 3 0 】

【発明の効果】本発明による酵素を用いれば、昆虫脱皮ホルモンの効率的な不活性化によって昆虫の成育を制御することができる。また、該酵素を用いることによって、通常より細い蚕糸の製造することができる。さらに、該酵素をコードする遺伝子を用いることによって、細胞内脱皮ホルモン濃度を高めて目的遺伝子産物の発現誘導を行う系における、該遺伝子の発現の制御も可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】A は昆虫体内に見られるエクジステロイドであり、B は本発明による酵素によるその酸化産物の構造およびエクジステロイドの H P L C によるチャートである。

【図 2】本発明による c D N A が発現した、エクジステロイドの酸化活性を示す図である。

【図 3】精製した本発明による酵素に対するポリクロナル抗体を使ったウェスタン・プロット解析の結果を示す図面代用写真である。

【図 4】A および B は、それぞれ本発明による酵素の、カイコの 4 齢（終前齢）および 5 齢幼虫に対する影響を示す図面代用写真である。

【図 5】酵素液を注射したカイコ 4 齢幼虫（A）及び 5

齢幼虫（B）体内における、2 2 位の水酸基が酸化された修飾産物の蓄積を無処理の 4 齢幼虫（C）及び 5 齢幼虫（D）と比較して示す図である。

【図 6】本発明による酵素により 2 2 位が修飾された 2 0 - ヒドロキシ - 2 2 - デヒドロエクジソンが、E c R m R N A 発現誘導効果を有していないことを示すイメージアナライザー（GS-250, Bio-Rad）により解析した図である。

【配列表フリーテキスト】

10 [配列番号 1] 緑きょう病菌由来エクジステロイド 2 2 位酸化酵素をコードする D N A の塩基配列。

[配列番号 2] 緑きょう病菌由来エクジステロイド 2 2 位酸化酵素のアミノ酸配列

[配列番号 3] 人工物の配列の記載：R T - P C R 用の E22o.6 プライマー。「n」はそれぞれイノシンを表す。

[配列番号 4] 人工物の配列の記載：R T - P C R 用の E22o.2 プライマー。「n」はそれぞれイノシンを表す。

[配列番号 5] 人工物の配列の記載：R T - P C R 用の Int.R1 プライマー。「n」はそれぞれイノシンを表す。

20 [配列番号 6] 人工物の配列の記載：R T - P C R 用の Int.R2 プライマー。「n」はそれぞれイノシンを表す。

[配列番号 7] 人工物の配列の記載：改変 R T - P C R 用の EE22o.RF1 プライマー。

[配列番号 8] 人工物の配列の記載：改変 R T - P C R 用の EE22o.RR1 プライマー。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> National Institute of Sericulture and Entomological Science
      KAMIMURA, Manabu
<120> Ecdysteroid-22-position oxidase obtained from Nomuraea rileyi and
      ecdysone inactivation system using the same
<130> 2007SK
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1963
<212> DNA
<213> Nomuraea rileyi
<400> 1
atgacctcct cactcggctc cggtcatccta tcaagcctac tgcttcacag ctcccaagtt 60
tgcaagcta cttatactac gtggcaacta gaatcgtctt atcgcccacc atgcaagca 120
aacacatcgt ttggcggtta tcgcttctcc ctacgacctg ggcattggct ctaccacagg 180
gcbgctgtcg atgtataccc ggagaggcgt gctggccatc tgacgagact tgggatgcat 240
tcaactctac cgttgatggc aaactcatca aatccgtccc cctcgcaaag ccgtgttaca 300
cgtaactga agggtcaggg gatcaatgcc aaaacgtcaa caatgcatgg tcgactgagc 360
gcttccaaac ggcccaggcc ctcggccgat tctatccttt caacacgacc tgccccccgg 420

```

11

12

ttgccaatgg acagcagcca gggacgtgca gtctgggaca gctcccagtc tatgttgtga 480  
 gagccactga gcattcagac gttgagaaga cgcttgggtt gtttcaagat cacaatatac 540  
 gctgtctat caccaacacg ggacatgac tgaacggccg cggcgacggg ttcggaagtc 600  
 tgggactctg ggttcaaac ctccggaaag gtcttttctt ccacgaaagc tttaaatctg 660  
 ccaccagtg cacagaatcg ggctggaatg gcaagtcgat ccacatcgat ggcgcatatc 720  
 aatggggcga tgtttacgga ttcgccgaga agcataacgt tatcgttgta ggcggtggct 780  
 cttaacgct cggagccact ggagctggt taccaggagg cggccacgga ccggcgtcac 840  
 gaaactacgg actcgggtct gatcaactgc tcgaggccga ggtcatgctt gccaacggca 900  
 ctgtcgtcgt tgccaatcac tgccagcacg ccgatctctt ccgggccctg cgaggcggag 960  
 gccccggata cggagtgtc ctccgtgtca aagtcaaggc atatcccaac gtcgacaagg 1020  
 tgactgtcga ccatctcacc atcgcccctt cgccaagtcg cctcaacacc agcgcctcgc 1080  
 tcgatgccgt gtccatcatg atgcagtcct tcccggctct caacgagagg ggatacgcag 1140  
 gatacggcac ctggttccgt tacttgctg gccctacat cgccaacagt acatctgcct 1200  
 acaccatag tttctggacc atcggcatga accaggcggga cgcgagtgtc gtattcgaac 1260  
 ctctgcgaag gaagttagcc gaccccggtc tgaatgtgtt catcaacagt gacttccagg 1320  
 agtacaacga ctactggtca ttcttcaca acgagctgga caaggccgat atcccggcgc 1380  
 aactttgct cctcacctcc cgcagctgtg acaagaaggc ttgcatgat ttcgaccgcg 1440  
 tccgccacat ggtcgaggtt gtgagcggca gacctcaaga gtacaccatg aacttggcta 1500  
 tgcttgtgtc gggcggcaag gtcttcgccg atgccgcca cactcttctt ggcctcaacc 1560  
 ctgcctggcg aacctctctt gtggtcctcc tcaccggacg gaagatcccc aagactcaga 1620  
 ccctgtctct gcaagagcgt caggccattg ccgaggatat gacctcgcac aaagggcagg 1680  
 cgaccaagga actggcccc gatacggccc gctacatgag cgagggtgat ggcaacgac 1740  
 ccgattatat caattcttc tacggccgca attatgcagc tcaccttgca gccaaaggaca 1800  
 agtacgatcc taaacacgtg ttctactgtc ggacgtgtgt tgggtccgag cgattcatca 1860  
 gtcggccccg gggggcacta tgcagggctt ttagaaaga cggcccatct agatagtgt 1920  
 gtataagaaa gtagacgttc aattcgaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 1963

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 594

&lt;212&gt; PRT

<213> *Nomuraea rileyi*

&lt;400&gt; 2

Met Arg Ser Lys His Ile Val Trp Ala Leu Ser Leu Leu Pro Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Trp Ala Leu Ala Leu Pro Gln Gly Gly Cys Arg Cys Ile Pro Gly Glu  
 20 25 30  
 Ala Cys Trp Pro Ser Asp Glu Thr Trp Asp Ala Phe Asn Ser Thr Val  
 35 40 45  
 Asp Gly Lys Leu Ile Lys Ser Val Pro Leu Ala Lys Pro Cys Tyr Thr  
 50 55 60  
 Ser Thr Glu Gly Ser Gly Asp Gln Cys Gln Asn Val Asn Asn Ala Trp  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Glu Arg Phe Gln Thr Ala Gln Ala Leu Gly Arg Phe Tyr Pro  
 85 90 95  
 Phe Asn Thr Thr Cys Pro Pro Val Ala Asn Gly Gln Gln Pro Gly Thr  
 100 105 110  
 Cys Ser Leu Gly Gln Leu Pro Val Tyr Val Val Arg Ala Thr Glu His  
 115 120 125  
 Ser Asp Val Glu Lys Thr Leu Gly Phe Val Gln Asp His Asn Ile Arg  
 130 135 140  
 Leu Ser Ile Thr Asn Thr Gly His Asp Leu Asn Gly Arg Gly Asp Gly

13		14
145	150	155
Phe Gly Ser Leu Gly Leu Trp Val Gln Asn Leu Arg Lys Gly Leu Phe		160
	165	170
Phe His Glu Ser Phe Lys Ser Ala Thr Gln Cys Thr Glu Ser Gly Trp		175
	180	185
Asn Gly Lys Ser Ile His Ile Asp Gly Ala Tyr Gln Trp Gly Asp Val		190
	195	200
Tyr Gly Phe Ala Glu Lys His Asn Val Ile Val Val Gly Gly Gly Ser		205
	210	215
Ser Ser Val Gly Ala Thr Gly Gly Trp Leu Ser Gly Gly Gly His Gly		220
225	230	235
Pro Ala Ser Arg Asn Tyr Gly Leu Gly Ala Asp Gln Leu Leu Glu Ala		240
	245	250
Glu Val Met Leu Ala Asn Gly Thr Val Val Val Ala Asn His Cys Gln		255
	260	265
His Ala Asp Leu Phe Arg Ala Leu Arg Gly Gly Gly Pro Gly Tyr Gly		270
	275	280
Val Val Leu Gly Val Lys Val Lys Ala Tyr Pro Asn Val Asp Lys Val		285
	290	295
Thr Ala His His Leu Thr Ile Ala Pro Ser Pro Ser Arg Leu Asn Thr		300
305	310	315
Ser Ala Leu Val Asp Ala Val Ser Ile Met Met Gln Ser Phe Pro Ala		320
	325	330
Leu Asn Glu Arg Gly Tyr Ala Gly Tyr Ala Thr Trp Phe Arg Tyr Leu		335
	340	345
Pro Gly Pro Tyr Ile Ala Asn Ser Thr Ser Ala Tyr Thr His Ser Phe		350
	355	360
Trp Thr Ile Gly Met Asn Gln Ala Asp Ala Ser Ala Val Phe Glu Pro		365
	370	375
Leu Arg Arg Lys Leu Ala Asp Pro Gly Leu Asn Val Val Ile Asn Ser		380
385	390	395
Asp Phe Gln Glu Tyr Asn Asp Tyr Trp Ser Phe Phe His Asn Glu Leu		400
	405	410
Asp Lys Ala Asp Ile Pro Gly Asp Thr Leu Leu Leu Thr Ser Arg Met		415
	420	425
Leu Asp Lys Lys Ala Leu His Asp Phe Asp Arg Val Arg His Met Val		430
	435	440
Glu Val Val Ser Gly Arg Pro Gln Glu Tyr Thr Met Asn Leu Ala Met		445
	450	455
Leu Val Ser Gly Gly Lys Val Phe Ala Asp Ala Ala Asp Thr Ser Ser		460
465	470	475
Gly Leu Asn Pro Ala Trp Arg Thr Ser Pro Val Val Leu Leu Thr Gly		480
	485	490
Arg Lys Ile Pro Lys Thr Gln Thr Leu Ser Leu Gln Glu Arg Gln Ala		495
	500	505
Ile Ala Glu Asp Met Thr Ser His Lys Gly Gln Ala Thr Lys Glu Leu		510
	515	520
Ala Pro Asp Thr Ala Gly Tyr Met Ser Glu Gly Asp Gly Asn Asp Pro		525
	530	535
		540

15  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:E22o.6 primer  
for RT-PCR. Each "n" represents an inosine.  
<400> 3  
tncncargg nggntgyag 19  
<210> 4  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:E22o.2 primer  
for RT-PCR. Each "n" represents an inosine.  
<400> 4  
tgyagrtgya tncngnga 20  
<210> 5  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Int.R1 primer  
for RT-PCR. Each "n" represents an inosine.  
<400> 5  
cangcntttt nacrtytg 19  
<210> 6  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Int.R2 primer  
for RT-PCR. Each "n" represents an inosine.  
<400> 6  
ttnacntnt gnccytgrtc 20  
<210> 7  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:E22o.RF 1 primer  
for modified RT-PCR  
<400> 7  
gtgctggcca tctgacgaga ctt 23  
<210> 8  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:E22o.RR 1 primer



for modified RT-PCR

<400> 8

ctttgcgagg gggacggatt tga 23

c

【 図 1 】

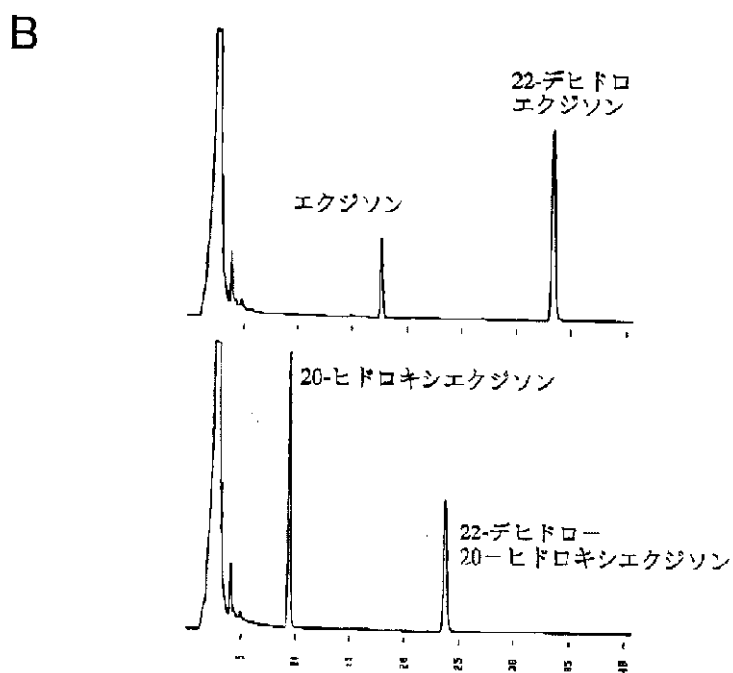
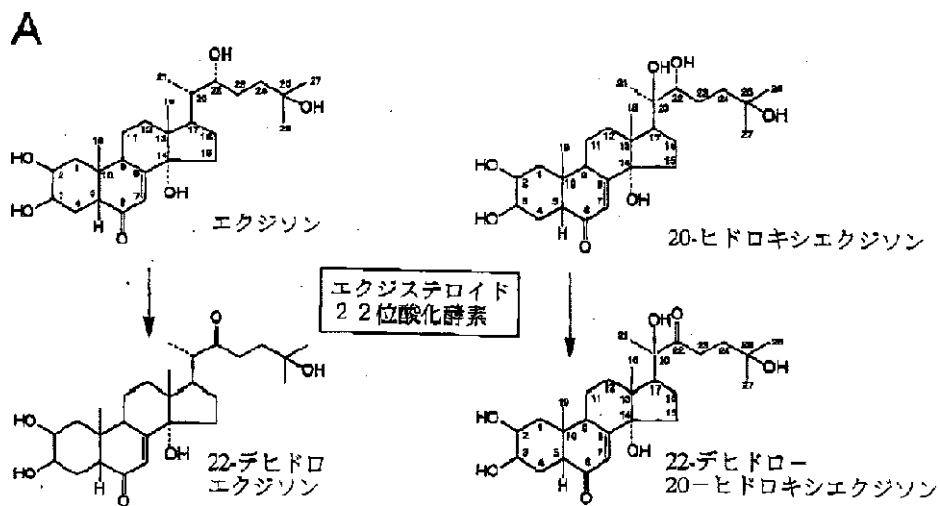


図 1 エクスステロイドの構造と検出

【 図 2 】

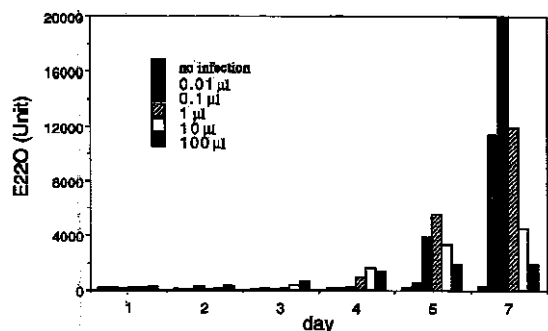


図 2 バキュロウイルス発現系を用いたエクジステロイド 2 2 位酸化酵素の発現

【 図 3 】

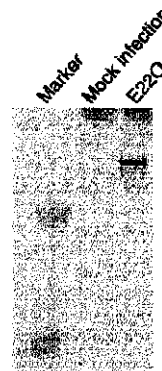


図 3 バキュロウイルス発現系を用いて発現させたエクジステロイド 2 2 位酸化酵素 (E220) のウェスタンブロット解析による検出

【 図 4 】

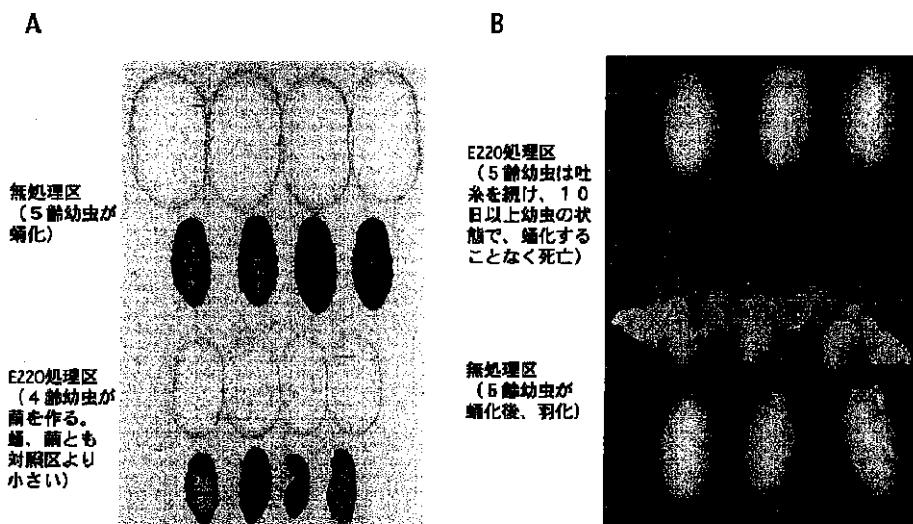


図 4 エクジステロイド 2 2 位酸化酵素 (E220) によるカイコの成長制御

【 図 6 】

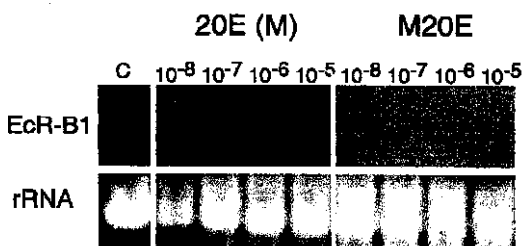


図 6 20-ヒドロキシエクジソン (20E) および 22-デヒドロ-20ヒドロキシエクジソン (M20E) による脱皮ホルモン受容体 (EcR) B1 アイソフォーム mRNA の転写誘導。

【 図 5 】

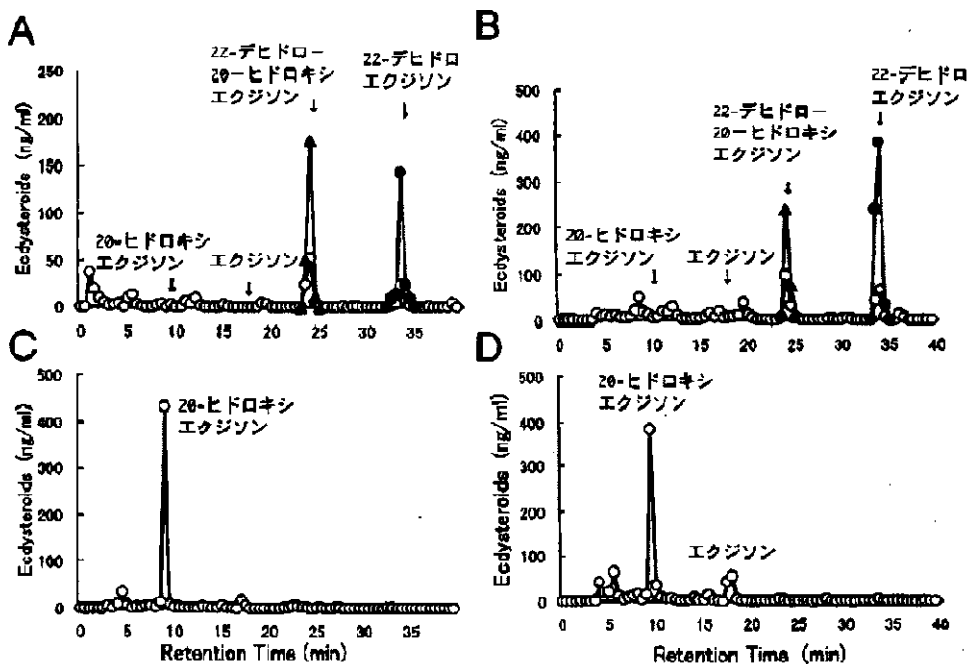


図 5 エクジステロイド 2 2 位酸化酵素 (E220) をカイコに注射した後の血中エクジステロイドの変化。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>                      識別記号                      F I  
 ( C 1 2 N 15/09                      Z N A                      C 1 2 N 15/00                      Z N A A  
 C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者    茗原 眞路子  
 茨城県牛久市牛久町3088 - 3

(58) 調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B 名)

- C12N 15/00 - 15/90
- C12N 1/00 - 9/99
- C12Q 1/68 - 1/70
- C12P 21/00 - 21/08
- C07K 14/00 - 16/46
- A61K 31/00 - 48/00
- A61P 1/00 - 43/00
- G01N 33/00 - 33/98
- A01K 67/033 - 67/04
- Pub Med
- MEDLINE (STN)
- BIOSIS/WPI (DIALOG)
- GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq
- SwissProt/PIR/GenSeq