

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年3月30日(30.03.2023)



(10) 国際公開番号
WO 2023/048290 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/67 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C07K 5/103 (2006.01) *C12P 21/04* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) *C40B 40/08* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C40B 40/10* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松井 健(MATSUI, Ken); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 富永 譲(TOMINAGA, Jo); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 木原 史織(KIHARA, Shiori); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 芳坂 貴弘(HOSAKA, Takahiro); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 渡邊 貴嘉(WATANABE, Takayoshi); 〒9231292 石川

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/035787

(22) 国際出願日: 2022年9月26日(26.09.2022)

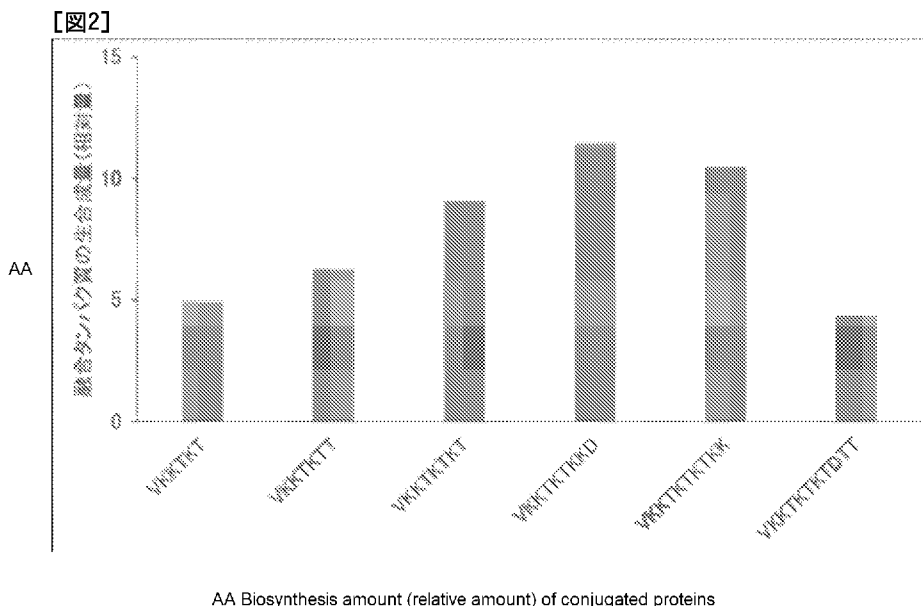
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

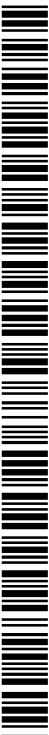
(30) 優先権データ:
特願 2021-157186 2021年9月27日(27.09.2021) JP

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYPEPTIDE, TAG, EXPRESSION VECTOR, METHOD FOR EVALUATING POLYPEPTIDE, METHOD FOR PRODUCING NUCLEIC ACID DISPLAY LIBRARY, AND SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: ポリペプチドの作製方法、タグ、発現ベクター、ポリペプチドの評価方法、核酸ディスプレイライブラリの作製方法及びスクリーニング方法



(57) Abstract: This method for producing a polypeptide comprising expressing a polypeptide as a tag-added polypeptide comprises expressing the tag-added polypeptide from a nucleic acid having: a base sequence which is arranged immediately after a start codon and encodes a tag including the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; and a base sequence which is arranged in a frame downstream from the base sequence encoding the tag and encodes the polypeptide. SEQ ID



WO 2023/048290 A1

県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸
先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人太陽国際特許事務所(TAIYO,
NAKAJIMA & KATO); 〒1600022 東京都新宿
区新宿4丁目3番17号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP,
KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

NO: 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n is a sequence of n of any amino acids, wherein n is an integer of 1-8, and amino acids constituting (Xaa)_n may be at least one kind or at least two kinds.

(57) 要約: ポリペプチドをタグ付加ポリペプチドとして発現させることを含むポリペプチドの作製方法であって、開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグをコードする塩基配列と、前記タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させることを含む、ポリペプチドの作製方法。配列番号1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n。(Xaa)_nは任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1~8の整数であり、(Xaa)_nを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

明 細 書

発明の名称：

ポリペプチドの作製方法、タグ、発現ベクター、ポリペプチドの評価方法、核酸ディスプレイライブラリの作製方法及びスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本開示は、ポリペプチドの作製方法、タグ、発現ベクター、ポリペプチドの評価方法、核酸ディスプレイライブラリの作製方法及びスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子工学により目的タンパク質を発現させる際に、タグと呼ばれる比較的分子量のポリペプチドを目的タンパク質の末端につける技術がある。タグは、目的タンパク質の検出、単離、固定化などに利用される。

[0003] タグを目的タンパク質の発現量増大に利用することが検討されている。

国際公開第2016/204198号には、目的タンパク質の発現量を増大させるタグとして、SKIKのアミノ酸配列からなるタグ（配列番号107）と、目的タンパク質のN末端にタグを付加して発現させる方法とが開示されている。

Protein Expression and Purification 2010; 74: 248-256には、開始コドンの直後にAla又はSerを組み込むことでタンパク質の発現量を高めることが記載されている。

[0004] タンパク質の発現量増大のために、遺伝子の塩基配列の最適化も検討されている。

Science 2013; 342: 475-479は、タンパク質のN末端に希少コドンを使用すると、大腸菌において発現量が増加することが記載されている。

Protein Expression and Purification 2010; 70: 224-230は、ヒトペプチドデホルミラーゼ（hPDF）について、hPDF遺伝子のGC含量の低減及び希少コドンの除去により大腸菌における発現量が増加することが記載さ

れている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本開示に係る実施形態は、生産性の高いポリペプチドの作製方法と、ポリペプチドの発現量を増大させるタグ及び発現ベクターと、効率のよいポリペプチドの評価方法と、発現量が多く且つ発現量の偏りが少ない核酸ディスプレイライブラリの作製方法と、信頼度の高いスクリーニング方法とを提供することに關する。

課題を解決するための手段

[0006] 課題を解決するための具体的手段には、以下の態様が含まれる。

[0007] <1> ポリペプチドをタグ付加ポリペプチドとして発現させることを含むポリペプチドの作製方法であって、

開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグをコードする塩基配列と、

タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、

を有する核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させることを含む、

ポリペプチドの作製方法。

<2> タグが配列番号2のアミノ酸配列からなるタグである、<1>に記載のポリペプチドの作製方法。

<3> タグが配列番号3のアミノ酸配列からなるタグである、<1>に記載のポリペプチドの作製方法。

<4> 無細胞ペプチド合成システム又は大腸菌によって核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させる、<1>~<3>のいずれか1項に記載のポリペプチドの作製方法。

<5> ポリペプチドが非天然アミノ酸を含む、<1>~<4>のいずれか1項に記載のポリペプチドの作製方法。

<6> 配列番号1のアミノ酸配列からなるタグ。

- <7> 配列番号2のアミノ酸配列からなるタグ。
- <8> 配列番号3のアミノ酸配列からなるタグ。
- <9> 無細胞ペプチド合成システム又は大腸菌によってポリペプチドをタグ付加ポリペプチドとして発現させるために用いる、<6>~<8>のいずれか1項に記載のタグ。
- <10> ポリペプチドが非天然アミノ酸を含む、<9>に記載のタグ。
- <11> 開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグをコードする塩基配列と、タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する、発現ベクター。
- <12> タグが配列番号2のアミノ酸配列からなるタグである、<11>に記載の発現ベクター。
- <13> タグが配列番号3のアミノ酸配列からなるタグである、<11>に記載の発現ベクター。
- <14> 無細胞ペプチド合成システム又は大腸菌において発現するように設計された、<11>~<13>のいずれか1項に記載の発現ベクター。
- <15> <1>~<5>のいずれか1項に記載のポリペプチドの作製方法によってポリペプチドを作製することと、標的物質に対するポリペプチドの結合性を評価することと、を含む、ポリペプチドの評価方法。
- <16> 開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグをコードする塩基配列と、タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させ、核酸-ポリペプチド連結体を作製すること、を含む、核酸ディスプレイライブラリの作製方法。
- <17> タグが配列番号2のアミノ酸配列からなるタグである、<16>に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。
- <18> タグが配列番号3のアミノ酸配列からなるタグである、<16>に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<19> 核酸-ポリペプチド連結体を作製することが、mRNA-ポリペプチド連結体を作製すること、及び、mRNA-ポリペプチド連結体のmRNAを逆転写しcDNA-ポリペプチド連結体を作製することを含む、<16>~<18>のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<20> 核酸-ポリペプチド連結体において核酸とポリペプチドとがピュロマイシンリンカーによって連結している、<16>~<19>のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<21> ポリペプチドが非天然アミノ酸を含む、<16>~<20>のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<22> ポリペプチドが、第一の官能基を有するアミノ酸と、第一の官能基と共有結合する第二の官能基を有するアミノ酸とを含み、第一の官能基を有するアミノ酸と第二の官能基を有するアミノ酸との間に2個~28個のアミノ酸が介在するポリペプチドであり、

核酸-ポリペプチド連結体のポリペプチドが第一の官能基と第二の官能基との共有結合

によって環化すること、をさらに含む、<16>~<21>のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<23> <16>~<22>のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法によって核酸ディスプレイライブラリを作製することと、

核酸ディスプレイライブラリから目的の活性を有する核酸-ポリペプチド連結体を選択し、選択した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定することと、を含む、スクリーニング方法。

発明の効果

[0008] 本開示に係る実施形態によれば、生産性の高いポリペプチドの作製方法と、ポリペプチドの発現量を増大させるタグ及び発現ベクターと、効率のよいポリペプチドの評価方法と、発現量が多く且つ発現量の偏りが少ない核酸デ

ディスプレイライブラリの作製方法と、信頼度の高いスクリーニング方法とが提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]配列番号7～26のタグについて融合タンパク質の生合成量を示すグラフであり、タグを融合タンパク質の生合成量の順に並べたグラフである。

[図2]配列番号27、28、31、37、48及び52のタグについて融合タンパク質の生合成量を示すグラフである。

[図3]配列番号27のタグを付加したインテグリン結合ペプチドの結合性能を示したグラフである。

[図4]配列番号133～136に導入した化合物の構造を示した図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に、本開示の実施形態を説明する。これらの説明及び実施例は一実施形態を例示するものであり、本開示の実施形態の範囲を制限するものではない。本開示において述べる作用機序は推定を含んでおり、その正否は本開示の実施形態の範囲を制限するものではない。

[0011] 本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

[0012] 本開示において各成分は該当する物質を複数種含んでもよい。本開示において組成物中の各成分の量について言及する場合、組成物中に各成分に該当する物質が複数種存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する複数種の物質の合計量を意味する。

[0013] 本開示においてポリペプチドは、アミノ酸がペプチド結合により繋がった分子を指す。ポリペプチドのアミノ酸残基数に制限はなく、ポリペプチドは

タンパク質を含む用語である。本開示におけるポリペプチドはアミノ酸残基数が6残基以上であることが望ましい。ポリペプチドには、アミノ酸が翻訳後修飾されたポリペプチドが含まれる。アミノ酸の翻訳後修飾としては、リン酸化、メチル化、アセチル化などが挙げられる。

[0014] 本開示において核酸は、ポリペプチドを合成する情報を担う分子を指す。核酸は、あらゆる核酸（例えば、DNA、RNA、これらの類似体、天然物、人工物）と、あらゆる核酸に低分子化合物、基、核酸以外の分子、構造物などが連結している核酸とを含む用語である。核酸は、一本鎖の核酸でもよく、二本鎖の核酸でもよい。

[0015] 本開示において、アミノ酸の表記に、IUPAC-IUBMB-JCBN (IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) が定める3文字表記及び1文字表記を使用する。

本開示において言及されるアミノ酸は、特に断らない限り、L-アミノ酸である。

[0016] <ポリペプチドの作製方法、タグ、発現ベクター>

本開示は、生産性の高いポリペプチドの作製方法を提供する。本開示に係るポリペプチドの作製方法は、ポリペプチドをタグ付加ポリペプチドとして発現させることを含む。

[0017] 本開示は、生産性の高いポリペプチドの作製方法のために、ポリペプチドの発現量を増大させるタグ及び発現ベクターを提供する。本開示に係る実施形態により提供されるタグをVKKXタグと総称する。

[0018] 本開示に係るポリペプチドの作製方法は、開始コドンの直後に配置されたVKKXタグをコードする塩基配列と、VKKXタグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置されたポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させることを含む。VKKXタグをコードする塩基配列とポリペプチドをコードする塩基配列とは、核酸1分子においてインフレームで配置されている。すなわち、VKKXタグをコードする塩基配列の直前の開始コドンを起点とする読み枠に、VKKXタ

グとポリペプチドとが入る。VKKXタグをコードする塩基配列とポリペプチドをコードする塩基配列とは、直接連結していてもよく、他の塩基配列を介して連結していてもよい。

[0019] 開始コドンの直後に配置されたVKKXタグは、開始コドン以降の塩基配列の翻訳効率を上げるものと推測される。したがって、本開示に係るポリペプチドの作製方法は、生産性の高いポリペプチドの作製方法である。

[0020] VKKXタグは、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグである。VKKXタグは、配列番号2のアミノ酸配列からなるタグが好ましく、配列番号3のアミノ酸配列からなるタグがより好ましく、配列番号4のアミノ酸配列からなるタグが更に好ましい。

[0021] 配列番号1：Val-Lys-Lys-(Xaa)_n。(Xaa)_nは任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1~8の整数であり、(Xaa)_nを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0022] 配列番号1において、(Xaa)_nを構成するアミノ酸としては、Ile、Lys、Arg、His、Ser、Thr、Asp、Cys、Asn、Tyr、Gln、Trp及びPheからなる群から選ばれるn個のアミノ酸が好ましく、Ile、Lys、Arg、His、Ser、Thr及びAspからなる群から選ばれるn個のアミノ酸がより好ましい。

配列番号1において、nは1~7の整数が好ましく、2~7の整数がより好ましい。

[0023] 配列番号2：Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m。N末端から4番目のXaaはIle、Lys、Arg、His、Ser及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_mは任意のアミノ酸m個の連なりであり、mは0~7の整数であり、(Xaa)_mを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0024] 配列番号2において、N末端から4番目のXaaとしては、Ile、Lys及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸が好ましく、Thrがより好ましい。

配列番号2において、(Xaa)_mを構成するアミノ酸としては、Ile、Lys、Arg、His、Ser、Thr、Asp、Cys、Asn、Tyr、Gln、Trp及びPheからなる群から選ばれるm個のアミノ酸が好ましく、Ile、Lys、Arg、His、Ser、Thr及びAspからなる群から選ばれるm個のアミノ酸がより好ましい。

配列番号2において、mは0～6の整数が好ましく、1～6の整数がより好ましい。

[0025] 配列番号3：Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k。N末端から4番目のXaaはIle、Lys及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_kはLys、Thr及びAspからなる群から選ばれるk個のアミノ酸の連なりであり、kは0～6の整数であり、(Xaa)_kを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0026] 配列番号3において、N末端から4番目のXaaとしては、Thrが好ましい。

配列番号3において、kは1～6の整数が好ましい。

[0027] 配列番号4：Val-Lys-Lys-Thr-Lys-Thr-(Xaa)_j。(Xaa)_jはLys、Thr及びAspからなる群から選ばれるj個のアミノ酸の連なりであり、jは0～4の整数であり、(Xaa)_jを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0028] VKKXタグの具体例として、配列番号7～52のいずれかのアミノ酸配列からなるタグが挙げられる。

[0029] VKKXタグをコードする塩基配列に制限はない。例えば、タグ付加ポリペプチドの発現に使用する生合成システム（例えば、無細胞ペプチド合成システム、大腸菌）のコードン表に従ってVKKXタグの塩基配列を設計することができる。

[0030] 本開示に係るポリペプチドの作製方法の目的物であるポリペプチドは、立体構造、アミノ酸配列、アミノ酸残基数、アミノ酸の種類、及びポリペプチドをコードする塩基配列に制限はない。アミノ酸は、天然アミノ酸、非天然

アミノ酸、修飾化アミノ酸及びそれらの誘導体を含む。

[0031] 本開示において天然アミノ酸とは、一般的なタンパク質を構成するアミノ酸を指し、アラニン (Ala, A)、アルギニン (Arg, R)、アスパラギン (Asn, N)、アスパラギン酸 (Asp, D)、システイン (Cys, C)、グルタミン (Gln, Q)、グルタミン酸 (Glu, E)、グリシン (Gly, G)、ヒスチジン (His, H)、イソロイシン (Ile, I)、ロイシン (Leu, L)、リシン (Lys, K)、メチオニン (Met, M)、フェニルアラニン (Phe, F)、プロリン (Pro, P)、セリン (Ser, S)、トレオニン (Thr, T)、トリプトファン (Trp, W)、チロシン (Tyr, Y) 及びバリン (Val, V) を指す。天然アミノ酸は、天然物でもよく人工物でもよい。

本開示において非天然アミノ酸とは、上記の20種類のアミノ酸以外のアミノ酸を指し、天然物も人工物も含む。

[0032] 非天然アミノ酸の一例として、クロロアセチル基を有するアミノ酸（例えば、クロロアセチル化リシン (chloroacetyl lysine) 等のクロロアセチル化アミノ酸、クロロアセチルジアミノ酪酸）が挙げられる。

非天然アミノ酸の一例として、N-メチルアミノ酸（例えば、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン）が挙げられる。

[0033] 修飾化アミノ酸の一例として、標識化合物と結合したアミノ酸である標識化アミノ酸が挙げられる。標識化合物は、生化学的、化学的、免疫化学的又は電磁的な検出方法で検出可能な物質である。標識化合物としては、色素化合物、蛍光物質、化学発光物質、生物発光物質、酵素基質、補酵素、抗原性物質、特定のタンパク質に結合する物質、磁性物質などが挙げられる。標識化アミノ酸としては、機能で分類すると、例えば、蛍光標識アミノ酸、放射性同位体標識アミノ酸、光応答性アミノ酸、光スイッチアミノ酸、蛍光プローブアミノ酸などが挙げられる。

[0034] 標識化アミノ酸は、アミノ酸と標識化合物とが直接結合していてもよく、アミノ酸と標識化合物とがスペーサーを介して結合していてもよい。スペー

サーとしては、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン；ポリオキシエチレン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等のポリエーテル；ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、ポリカーボネートなどが挙げられる。

[0035] 天然アミノ酸、非天然アミノ酸又は修飾化アミノ酸の誘導体としては、例えば、ヒドロキシ酸、メルカプト酸及びカルボン酸が挙げられる。

[0036] ポリペプチドの実施形態例として、非天然アミノ酸を含むポリペプチドが挙げられる。具体例として、N-メチルアミノ酸（例えば、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン）を含むポリペプチドが挙げられる。非天然アミノ酸を含むポリペプチドのアミノ酸残基数は、例えば3個～20個である。

[0037] ポリペプチドの実施形態例として、非天然アミノ酸を含む環状ポリペプチドが挙げられる。具体例として、チオール基を有するアミノ酸（例えば、システイン）と、クロロアセチル基を有するアミノ酸（例えば、クロロアセチルジアミノ酪酸、クロロアセチル化リシン）と、N-メチルアミノ酸（例えば、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン）とを一分子に含むポリペプチドが挙げられる。このポリペプチドは、チオール基とクロロアセチル基とが反応して環化し、環状ポリペプチドとなる。非天然アミノ酸を含む環状ポリペプチドのアミノ酸残基数は、例えば3個～20個である。

[0038] V K K X タグとポリペプチドとは、直接連結していてもよく、他のアミノ酸配列を介して連結していてもよい。他のアミノ酸配列としては、プロテアーゼ認識配列（例えば、ソルターゼ認識配列、HRV3C認識配列、TEVプロテアーゼ認識配列）、スペーサー配列（例えば、グリシン及びセリンからなる群から選ばれる少なくとも1個のアミノ酸）、V K K X タグ以外の他のタグ（例えば、Hisタグ、HAタグ、FLAGタグ、Mycタグ、HiBiTタグ）が挙げられる。

プロテアーゼ認識配列により、V K K X タグとポリペプチドとの分離が可能になる。スペーサー配列により、タグ付加ポリペプチドの柔軟性が向上す

る。他のタグにより、タグ付加ポリペプチドの精製又は検出が容易になる。他のタグは、VKKXタグとポリペプチドとの間ではなく、ポリペプチドのC末端側にあってもよい。

これらのアミノ酸配列のような機能配列ではなく、特定の機能をもたないアミノ酸配列を、VKKXタグとポリペプチドとの間に介在させてもよく、ポリペプチドのC末端側に付加してもよい。

[0039] 本開示に係る発現ベクターは、開始コドンの直後に配置されたVKKXタグをコードする塩基配列と、VKKXタグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置されたポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する。VKKXタグは、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグである。VKKXタグは、配列番号2のアミノ酸配列からなるタグが好ましく、配列番号3のアミノ酸配列からなるタグがより好ましく、配列番号4のアミノ酸配列からなるタグが更に好ましい。

[0040] 本開示に係る発現ベクターは、生合成システムによってポリペプチドを合成するに必要な塩基配列を有していてもよい。ポリペプチド合成に必要な塩基配列とは、開始コドン、VKKXタグをコードする塩基配列及びポリペプチドをコードする塩基配列はもちろん、それ以外に例えば、プロモーター配列、及び／又はリボソーム結合配列を含んでいてもよい。VKKXタグとポリペプチドとの間又はポリペプチドのC末端側に他のアミノ酸配列を挿入する場合、発現ベクターは他のアミノ酸配列をコードする塩基配列をも有していてもよい。

プロモーター配列、リボソーム結合配列、開始コドン等は、発現ベクターを発現させる生合成システム（例えば、無細胞ペプチド合成システム、大腸菌）の要求に合わせて発現ベクターに配置してもよい。

本開示に係る発現ベクターは、プロモーター配列、リボソーム結合配列、開始コドン、VKKXタグをコードする塩基配列、ポリペプチドをコードする塩基配列等を含むDNA断片を、オーバーラップエクステンションPCR等の方法により連結することで作製してもよい。

- [0041] 本開示に係る発現ベクターの構築に用いられるベクターとしては、プラスミドDNA、コスミドDNA、ファージDNA、動物ウイルスベクター、昆虫ウイルスベクター等が挙げられる。発現ベクターは直鎖状でもよく、環状でもよい。
- [0042] 本開示に係るポリペプチドの作製方法の実施形態の一例は、発現ベクターを含む形質転換体を培養し、培養物からタグ付加ポリペプチド又はポリペプチドを回収することで実現される。形質転換体は、本開示に係る発現ベクターで宿主を形質転換して作製してもよい。形質転換体の作製に用いられる宿主は、大腸菌、酵母、真菌細胞、昆虫細胞、動物細胞及び植物細胞のいずれでもよい。
- [0043] 本開示に係るポリペプチドの作製方法の実施形態の一例は、無細胞ペプチド合成システムによって実現される。無細胞ペプチド合成システムは、ポリペプチド合成のための反応システムであって、細胞そのものを使用することなく、(1) 核酸の翻訳を行うシステム、又は、(2) 核酸の転写及び翻訳を行うシステムである。無細胞ペプチド合成システムは、鋳型核酸、リボソーム、転写及び／又は翻訳のための因子及び酵素、これら以外にシステムの構成に必要な酵素類、各種の基質、エネルギー源、緩衝液及び塩類から構成される。転写及び／又は翻訳のための因子及び酵素としては、大腸菌等の原核細胞に由来する物質；コムギ胚芽、動物細胞、昆虫細胞等の真核細胞に由来する物質；が挙げられる。
- [0044] 無細胞ペプチド合成システムにおいて鋳型核酸は、DNAでもよくRNAでもよい。鋳型核酸は、一本鎖の核酸でもよく、二本鎖の核酸でもよい。鋳型核酸は、線状の核酸でもよく、環状の核酸でもよい。鋳型核酸は、ポリペプチド合成に必要な塩基配列がベクター（プラスミドベクター、コスミドベクター等）に組み込まれた核酸でもよい。
- [0045] 鋳型核酸は、無細胞ペプチド合成システムによってポリペプチドを合成するために必要な塩基配列を有する。ポリペプチド合成に必要な塩基配列とは、コーディング領域はもちろん、それ以外に例えば、プロモーター配列、リボソ

ーム結合配列である。鋳型核酸の塩基配列は、終止コドンを含んでもよく終止コドンを含まなくてもよい。ここで終止コドンとは、対合する tRNA が ないコドン を意味する。鋳型核酸の塩基配列が終止コドンを含まない場合、 mRNA-リボソーム-ポリペプチド連結体が形成されうる。

[0046] (1) 核酸 (例えば RNA) の翻訳を行う無細胞ペプチド合成システムは、リボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、翻訳終結因子、アミノアシル tRNA 合成酵素及びアミノアシル tRNA 合成酵素によってアミノアシル化される tRNA を含み、大腸菌由来のシステムである場合はさらにメチオニル tRNA トランスホルミラーゼを含む。

(2) 核酸 (例えば DNA) の転写及び翻訳を行う無細胞ペプチド合成システムは、(1) の構成物質に加えて、RNA ポリメラーゼ (例えば T7 RNA ポリメラーゼ)、及び RNA ポリメラーゼの基質であるヌクレオシド三リン酸を含む。

(1) 及び (2) のいずれにおいても、構成物質から翻訳終結因子を除くことにより、mRNA-リボソーム-ポリペプチド連結体を形成することができる。

[0047] 転写及び/又は翻訳のための因子及び酵素以外の酵素類としては、例えば、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ (nucleoside diphosphate kinase; NDPK) 等のエネルギーの再生のための酵素; 無機ピロフォスファターゼ等の転写及び/又は翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素; などが挙げられる。

各種の基質としては、天然アミノ酸及び/又は非天然アミノ酸、エネルギー源としてのヌクレオチド三リン酸、クレアチンフォスフェート、ホルミル葉酸等が挙げられる。ヌクレオチド三リン酸としては、ATP、GTP、CTP、UTP が挙げられ、(1) においては ATP 及び GTP が用いられ、(2) においては ATP、GTP、CTP 及び UTP が用いられる。

緩衝液としては、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.3) が通常使用される。塩類としては、グルタミン酸カリウム、塩化アンモニウム、酢酸マグネシ

ウム、塩化カルシウム、プトレシン (putrescine)、スペルミジン (spermidine)、ジチオトレイトール (dithiothreitol ; DTT) 等が通常使用される。

[0048] 本開示に係るポリペプチドの作製方法には、公知のあらゆる無細胞ペプチド合成システムが採用できる。無細胞ペプチド合成システムの市販品の例として、PUREfrex (ジーンフロンティア、「PUREfrex」は登録商標)、PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit (New England BioLabs)、Human Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ)、Rapid Translation System (ロシュ)、Expressway Cell-Free Expression System (インビトロジェン) 等が挙げられる。

[0049] 本開示に係るポリペプチドの作製方法は、さらに、タグ付加ポリペプチドを精製すること、タグ付加ポリペプチドを濃縮すること、タグ付加ポリペプチドのVKKXタグを切断すること、目的のポリペプチドを修飾すること等を含んでもよい。

[0050] <ポリペプチドの評価方法>

本開示に係るポリペプチドの評価方法は、本開示に係るポリペプチドの作製方法によってポリペプチドを作製することと、標的物質に対するポリペプチドの結合性を評価することと、を含む。評価の工程においてポリペプチドは、VKKXタグが付いたタグ付加ポリペプチドでもよく、タグ付加ポリペプチドからVKKXタグを除いたポリペプチドでもよい。

[0051] 標的物質に対するポリペプチドの結合能を評価する方法として表面プラズモン共鳴法が知られているが、近年、無細胞ペプチド合成システムを用いてポリペプチドを取得し、ELISAによって結合能を評価する方法が報告されている (Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 2017年、75巻、11号、1171~1178)。しかしながら、無細胞ペプチド合成システムではポリペプチドのアミノ酸配列によって発現量に偏りが生じることがあるため、発現量の少ないポリペプチドの結合評価は困難である。本開示に係るポリペプチドの

評価方法によれば、ポリペプチドの発現量を多く、且つ、複数種類のポリペプチド間で発現量の偏りが少なく取得することが可能であり、したがって、より多種のポリペプチドの結合能等を評価することができる。

[0052] 標的物質は、生理活性を示すあらゆる化学物質を含む用語であり、化合物、基、分子、タンパク質、核酸、脂質、糖質、これらの複合体などを含む用語である。標的物質は、例えば、金属イオン、脂質分子集合体、ペプチド、受容体、転写因子、酵素、補酵素、調節因子、抗体、抗原、DNA、RNA、膜小胞、細胞外小胞、細胞小器官、細胞、これらの断片、これらの複合体、これらの修飾基である。

[0053] 本開示に係るポリペプチドの評価方法の実施形態の一例は、ポリペプチドと標的物質（例えば、標的タンパク質）とを接触させてインキュベートすることを含む。例えば、ポリペプチドと標的物質とを緩衝液中で接触させ、緩衝液のpH及び温度並びに接触時間を調節してインキュベートする。この際、標的物質を固相担体に固定しておき、固定された標的物質にポリペプチドを接触させてもよい。あるいは、ポリペプチドを固相担体に固定しておき、固定されたポリペプチドに標的物質を接触させてもよい。固相担体は、標的物質あるいはポリペプチドを固定できる担体であれば制限はなく、マイクロタイタープレート、基板、ビーズ、磁性ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられる。標的物質あるいはポリペプチドは、これらの固相担体に公知の技術によって固定される。

[0054] 上記の接触の後、標的物質（例えば、標的タンパク質）に結合したポリペプチドを定量する。ポリペプチドの定量には、公知のあらゆるタンパク質定量技術が採用できる。例えば、ゲル電気泳動法、吸光光度法、蛍光法、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)、クロマトグラフィー、表面プラズモン共鳴法等で定量する。

[0055] 本開示に係るポリペプチドの評価方法の実施形態の一例は、評価対象であるポリペプチドにVKKXタグ以外の他のタグ（例えば、Hisタグ、HA

タグ、FLAGタグ、Mycタグ、HiBiTタグ)をも付加して発現させ、他のタグの機能(例えば発光)を利用して、標的物質に結合したポリペプチドを定量する。

[0056] <核酸ディスプレイライブラリの作製方法>

核酸ディスプレイライブラリは、核酸-ポリペプチド連結体を構成単位とし、複数個の核酸-ポリペプチド連結体のひとまとまりを指す。核酸ディスプレイライブラリを構成する核酸-ポリペプチド連結体のクローン数及びコピー数に制限はない。

[0057] 核酸-ポリペプチド連結体の実施形態例として、mRNA-ポリペプチド連結体又はcDNA-ポリペプチド連結体が挙げられる。cDNA-ポリペプチド連結体は、mRNA-ポリペプチド連結体の逆転写産物である。

[0058] 核酸-ポリペプチド連結体において核酸とポリペプチドとは、例えばピュエロマイシンリンカー又はリボソームを介して連結している。

[0059] 核酸-ポリペプチド連結体のポリペプチドは、立体構造、アミノ酸配列、アミノ酸残基数、アミノ酸の種類、及びポリペプチドをコードする塩基配列に制限はない。アミノ酸は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、修飾化アミノ酸及びそれらの誘導体を含む。

[0060] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法によって作製される核酸ディスプレイライブラリにおいて、核酸-ポリペプチド連結体のポリペプチドは、VKKXタグが付加したタグ付加ポリペプチドとして発現している。

[0061] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法は、核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させ、核酸-ポリペプチド連結体を作製することを含む。核酸は、開始コドンの直後に配置されたVKKXタグをコードする塩基配列と、VKKXタグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置されたポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する。VKKXタグは、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグである。VKKXタグは、配列番号2のアミノ酸配列からなるタグが好ましく、配列番号3のアミノ酸配列からな

るタグがより好ましく、配列番号4のアミノ酸配列からなるタグが更に好ましい。

[0062] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法は、鋳型核酸の開始コドンの直後にVKKXタグをコードする塩基配列が配置されていることにより、発現量が多く且つ発現量の偏りが少ない核酸ディスプレイライブラリを作製することができる。

[0063] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法の実施形態の一例は、mRNA-ポリペプチド連結体を作製すること、及び、mRNA-ポリペプチド連結体のmRNAを逆転写しcDNA-ポリペプチド連結体を作製することを含む。本実施形態例によれば、核酸-ポリペプチド連結体の核酸がDNAであるので、化学的により安定した核酸ディスプレイライブラリが得られる。

[0064] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法の実施形態の一例は、無細胞ペプチド合成システムによって実施される。無細胞ペプチド合成システムは、(1)核酸の翻訳を行うシステム、又は、(2)核酸の転写及び翻訳を行うシステムのいずれでもよい。無細胞ペプチド合成システムの詳細は先述のとおりである。本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法には、公知のあらゆる無細胞ペプチド合成システムと、公知のあらゆる核酸ディスプレイライブラリの作製技術とが採用できる。

[0065] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法において、翻訳される核酸(通常はmRNA)と翻訳産物との連結は、ピューロマイシンリンカーを介した連結、リボソームを介した連結などのいずれでもよい。翻訳産物が適切な高次構造を形成しやすい観点及び翻訳産物の機能を評価しやすい観点から、翻訳される核酸と翻訳産物との連結はピューロマイシンリンカーを介した連結であることが好ましい。

したがって、無細胞ペプチド合成システムにおいて翻訳される核酸は、3'末端にピューロマイシンリンカーが付加された核酸であることが好ましい。核酸にピューロマイシンを付加するためのリンカーとしては、核酸とピュ

ーロマイシンの解離を抑制する観点から、2' - O - メチル化した核酸リンカー又は5' 末端に紫外線架橋性化合物を有する核酸リンカーが好ましい。

[0066] 無細胞ペプチド合成システムにおいて鋳型核酸は、DNAでもよくRNAでもよい。鋳型核酸は、例えば、ランダム配列を含むランダムプライマーセットを用いてオーバーラップエクステンションPCRを行うことで作製された、二本鎖DNA断片の集団である。ランダム配列は、例えば、トリプレットの繰り返し配列 [NNK]^m である（ここで、mは正の整数、Nはそれぞれ独立にA、T、G又はC、Kはそれぞれ独立にT又はG）。トリプレット [NNK] の繰り返し数を任意の数に設定して、任意の長さのペプチドを作製することができる。ランダム配列は、終止コドンの出現抑制の観点からは、1種類のアミノ酸に対して1種類のコドン割り当てたトリマーオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

[0067] 鋳型核酸は、VKKXタグ及び目的のポリペプチド以外の他のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでいてもよい。他のアミノ酸配列としては、プロテアーゼ認識配列、スペーサー配列、VKKXタグ以外の他のタグが挙げられる。他のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、VKKXタグをコードする塩基配列と目的のポリペプチドをコードする塩基配列との間に、又は、目的のポリペプチドをコードする塩基配列の下流に、インフレームで配置される。

[0068] 鋳型核酸の3' 末端側には、ポリペプチドの柔軟性を上げる観点から、スペーサーをコードする塩基配列があることが好ましい。スペーサーは例えば、グリシン及びセリンから選ばれる少なくとも1個のアミノ酸である。

[0069] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法の実施形態の一例は、発現させるポリペプチドが非天然アミノ酸を含むポリペプチドである。非天然アミノ酸は、非天然アミノ酸；天然アミノ酸又は非天然アミノ酸の修飾化アミノ酸；天然アミノ酸、非天然アミノ酸又は修飾化アミノ酸の誘導体；を含む。これらアミノ酸の詳細は先述のとおりである。

[0070] 本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法の実施形態の一例は

、発現させるポリペプチドが、第一の官能基を有するアミノ酸と、第一の官能基と共有結合する第二の官能基を有するアミノ酸とを含み、第一の官能基を有するアミノ酸と第二の官能基を有するアミノ酸との間に2個～28個のアミノ酸が介在するポリペプチドである。発現させるポリペプチドは、第一の官能基を有するアミノ酸と第二の官能基を有するアミノ酸との間に6個～16個のアミノ酸が介在するポリペプチドであってもよい。このポリペプチドは、第一の官能基と第二の官能基とが反応して環化し得、環状ポリペプチドとなり得る。この環状ポリペプチド全体のアミノ酸残基数は、例えば4個～32個である。

[0071] 発現させるポリペプチドが上記の形態であるとき、本開示に係る核酸ディスプレイライブラリの作製方法は、核酸-ポリペプチド連結体のポリペプチドが第一の官能基と第二の官能基との共有結合によって環化することを含む。環化は、mRNA-ポリペプチド連結体において形成されてもよく、cDNA-ポリペプチド連結体において形成されてもよい。

[0072] 第一の官能基と第二の官能基とは、共有結合する限り、同じ種類の官能基でもよく、異なる種類の官能基でもよい。第一の官能基と第二の官能基の組み合わせとしては、例えば、チオール基とクロロアセチル基、チオール基とチオール基、側鎖中のカルボキシ基と側鎖中のアミノ基が挙げられる。

チオール基を有するアミノ酸としては、例えば、システインが挙げられる。

クロロアセチル基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチルジアミノ酪酸、クロロアセチル化リシンが挙げられる。

側鎖中にカルボキシ基を有するアミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸が挙げられる。

側鎖中にアミノ基を有するアミノ酸としては、例えば、リシン、アスパラギン、グルタミンが挙げられる。

[0073] <スクリーニング方法>

本開示に係るスクリーニング方法は、本開示に係る核酸ディスプレイライ

ブラリの作製方法によって核酸ディスプレイライブラリを作製することと、核酸ディスプレイライブラリから目的の活性を有する核酸-ポリペプチド連結体を選択し、選択した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定することと、を含む。

[0074] 「目的の活性」とは、例えば、標的物質への結合である。標的物質は、生理活性を示すあらゆる化学物質を含む用語であり、化合物、基、分子、タンパク質、核酸、脂質、糖質、これらの複合体などを含む用語である。標的物質は、例えば、金属イオン、脂質分子集合体、ペプチド、受容体、転写因子、酵素、補酵素、調節因子、抗体、抗原、DNA、RNA、膜小胞、細胞外小胞、細胞小器官、細胞、これらの断片、これらの複合体、これらの修飾基である。

[0075] 本開示に係るスクリーニング方法の実施形態の一例は、核酸ディスプレイライブラリと標的物質とを接触させてインキュベートすることを含む。例えば、核酸ディスプレイライブラリと標的物質とを緩衝液中で接触させ、緩衝液のpH及び温度並びに接触時間を調節してインキュベートする。この際、標的物質を固相担体に固定しておき、固定された標的物質に核酸ディスプレイライブラリを接触させてもよい。固相担体は、標的物質を固定できる担体であれば制限はなく、マイクロタイタープレート、基板、ビーズ、磁性ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられる。標的物質は、これらの固相担体に公知の技術によって固定される。

[0076] 上記の接触の後、標的物質に結合している核酸-ポリペプチド連結体を抽出し、抽出した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定する。塩基配列の同定は、核酸増幅システム及びシーケンサーを用いて実施可能である。

[0077] 核酸増幅システムは、核酸を鋳型にして核酸を増幅するシステムを指す。核酸増幅システムの核酸増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR)、リガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction; LC

R)、TMA (transcription mediated amplification)、NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) 等のいずれでもよい。

[0078] 本開示において「シーケンサー」は、第一世代シーケンサー（キャピラリーシーケンサー）、第二世代シーケンサー（次世代シーケンサー）、第三世代シーケンサー、第四世代シーケンサー、及び今後開発されるシーケンサーを含む用語である。シーケンサーは、キャピラリーシーケンサーでもよく、次世代シーケンサーでもよく、その他のシーケンサーでもよい。シーケンサーとしては、解析の速さ、1度に処理可能な試料数の多さ等の観点から、次世代シーケンサーが好ましい。次世代シーケンサー（next generation sequencer, NGS）とは、サンガー法を利用したキャピラリーシーケンサー（第一世代シーケンサーと呼ばれる。）に対比して分類されるシーケンサーを指す。現時点で最も普及している次世代シーケンサーは、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成又はDNAリガーゼによる相補鎖結合に連動した蛍光又は発光をとらえ塩基配列を決定する原理のシーケンサーである。具体的には、MiSeq (Illumina社、MiSeqは登録商標)、HiSeq2000 (Illumina社、HiSeqは登録商標)、Roche454 (Roche社) 等が挙げられる。

[0079] 本開示に係るスクリーニング方法は、発現量が多く且つ発現量の偏りが少ない核酸ディスプレイライブラリを母集団とするので、信頼度の高いスクリーニング方法である。

実施例

[0080] 以下に具体例を挙げて、本開示に係るタグ等をより具体的に説明する。以下の具体例に示す材料、処理手順等は、本開示の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。本開示に係るタグ等の範囲は、以下に示す具体例によって限定的に解釈されるべきではない。

[0081] 以下の説明において、合成、処理、製造などは、特に断りのない限り、室温（25℃±3℃）で行った。物質濃度に係る百分率は質量基準である。

[0082] <実施例1：タグのアミノ酸配列の検討>

大腸菌に由来する無細胞ペプチド合成システムにおいて、ポリペプチドの

生合成量に対するVKKXタグの効果を調べた。生合成するポリペプチドとして、システイン及びクロロアセチル化リシンを含むインテグリン結合ペプチドを選択した。このポリペプチドは、システインのチオール基とクロロアセチル化リシンのクロロアセチル基とが自発的にチオエーテル結合を形成し、環状ポリペプチドとなる。

[0083] インテグリン結合ペプチド、Mycタグ及びHiBiTタグをこの順に連結した融合タンパク質を設計した。インテグリン結合ペプチドとMycタグとの間及びMycタグとHiBiTタグの間には、スペーサーとしてGly-Gly-Serをそれぞれ挿入した。この融合タンパク質のアミノ酸配列が配列番号5であり、この融合タンパク質をコードする塩基配列が配列番号6である。配列番号5において、N末端から12番目のアミノ酸（すなわちアラニン）までがインテグリン結合ペプチドであり、N末端から11番目のアミノ酸がクロロアセチル化リシンである。配列番号6の塩基配列の5'末端から31～33番目のトリプレットTAGをクロロアセチル化リシンのコドンに当てる。配列番号6の塩基配列の末尾が終止コドンTAAである。

[0084] 配列番号5 : A C I P R G D S F A X A G G S E Q K L I S E E D L G G S V S G W R L F K K I S (Xはクロロアセチル化リシン)

配列番号6 : G C G T G C A T C C C G C G C G G C G A T T C T T T T G C A T A G G C A G G C G G T T C T G A A C A G A A A C T G A T C A G C G A A G A A G A T C T G G G T G G C T C T G T A A G T G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C T A A

[0085] VKKXタグとして配列番号7～52の配列と、これらをコードする塩基配列として配列番号53～98の配列とを設計した。表1-1及び表1-2にVKKXタグのアミノ酸配列及び塩基配列を示す。配列番号53～98の配列はそれぞれ配列番号7～52をコードする塩基配列の実施形態例であり、配列番号7～52の配列をコードする塩基配列は配列番号53～98の配列に限定されるものではない。

[0086]

[表1-1]

VKKXタグ		VKKXタグをコードする塩基配列	
配列番号	アミノ酸配列	配列番号	塩基配列
7	VKKI	53	GTTAAAAAAATA
8	VKKK	54	GTTAAAAAAA
9	VKKT	55	GTTAAAAAACA
10	VKKR	56	GTTAAAAACGG
11	VKKS	57	GTTAAAAATCA
12	VKKH	58	GTTAAAAACAT
13	VKKM	59	GTTAAAAAATG
14	VKKP	60	GTTAAAAACCT
15	VKKG	61	GTTAAAAAGGC
16	VKKL	62	GTTAAAAACTA
17	VKKV	63	GTTAAAAAGTT
18	VKKE	64	GTTAAAAAGAA
19	VKKA	65	GTTAAAAAGCA
20	VKKD	66	GTTAAAAAGAT
21	VKRC	67	GTTAAAAATGT
22	VKKN	68	GTTAAAAAAT
23	VKKY	69	GTTAAAAATAT
24	VKKQ	70	GTTAAAAACAA
25	VKKW	71	GTTAAAAATGG
26	VKKF	72	GTTAAAAATTT

[0087]

[表1-2]

VKKXタグ		VKKXタグをコードする塩基配列	
配列番号	アミノ酸配列	配列番号	塩基配列
27	VKKTKT	73	GTTAAAAAAAACAAAAAACA
28	VKKTKTT	74	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACA
29	VKKTKTD	75	GTTAAAAAAAACAAAAAACAGAT
30	VKKTKTKK	76	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAAA
31	VKKTKTKT	77	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAACA
32	VKKTKTKD	78	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAGAT
33	VKKTKTTK	79	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACAAAA
34	VKKTKTTT	80	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACAACA
35	VKKTKTDD	81	GTTAAAAAAAACAAAAAACAGATGAT
36	VKKTKTKKT	82	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAAAACA
37	VKKTKTKKD	83	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAAAAGAT
38	VKKTKTKTK	84	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAACAAAA
39	VKKTKTKTT	85	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAACAACA
40	VKKTKTDK	86	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAGATAAA
41	VKKTKTKDT	87	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAGATACA
42	VKKTKTKDD	88	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAGATGAT
43	VKKTKTTKK	89	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACAAAAAA
44	VKKTKTTKT	90	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACAAAAACA
45	VKKTKTTKD	91	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACAAAAGAT
46	VKKTKTKKTK	92	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAAAACAAAA
47	VKKTKTKKDK	93	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAAAAGATAAA
48	VKKTKTKTKK	94	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAACAAAAAA
49	VKKTKTKTTK	95	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAACAACAAAA
50	VKKTKTDKK	96	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAAGATAAAAA
51	VKKTKTTKK	97	GTTAAAAAAAACAAAAAACAACAACAAAAAA
52	VKKTKTDTT	98	GTTAAAAAAAACAAAAAACAAAACAGATACAACA

[0088] メチオニン、VKKXタグ（配列番号7～52のいずれか）及び融合タンパク質（配列番号5）がこの順に連結したタグ付加融合タンパク質をコードする塩基配列を設計した。この塩基配列においては、開始コドンATGの直後にVKKXタグをコードする塩基配列（配列番号53～98のいずれか）が配置され、VKKXタグをコードする塩基配列の直後に融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号6）が配置されている。

VKKXタグの効果を評価するための対照例として、開始コドンATGの直後に融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号6）が配置されてい

る塩基配列を設計した。

[0089] 融合タンパク質を発現させるための鋳型DNAとして、5'末端からT7プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列及びタグ付加融合タンパク質をコードする塩基配列を連結した鋳型DNAを作製した。鋳型DNAの作製は、2段階のPCRによって行った。

[0090] 1段階目のPCRでは、配列番号99のDNA (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA) と、VKKXタグごとの連結用DNAとをそれぞれ1nmol/Lとなるように混合し、KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO、KOD-211) を用いて、94℃/2分、98℃/10秒、43℃/30秒、68℃/15秒の4ステップを行い2つのDNAを連結した。

VKKXタグごとの連結用DNAの実施形態例が、配列番号100の塩基配列を有するDNAである。配列番号100の塩基配列を有するDNAは、配列番号27のVKKXタグ (VKKTKT) のための連結用DNAである。

配列番号100 : CGCGCGGGATGCACGC [TGTTTTTTGT
TTTTTTTAAAC] CATTGGTATATCTCCTT

配列番号100において [] 内の塩基配列が、配列番号73の塩基配列 (GTTAAAAAACAACA、配列番号27をコードする塩基配列) に相補的な配列である。VKKXタグごとの連結用DNAにおいて [] 内の塩基配列が、配列番号53~98のいずれかの配列に相補的な配列である。

[0091] 次いで、連結したDNAに、配列番号101のフォワードプライマー (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACC) 及び配列番号102のリバースプライマー (CCTGCCTATGCAAAAGAA TCGCCGCGCGGGATGCAC) をそれぞれ0.3μmol/L添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98℃/10秒、61℃/3

0秒、68℃/15秒の3ステップを35サイクル行い、T7プロモーター配列からインテグリン結合ペプチドをコードする塩基配列の一部までを有するDNA断片を作製した。このDNA断片を精製し、50ng/μLに希釈し、2段階目のPCRに供した。

[0092] 2段階目のPCRでは、1段階目で作製したDNA断片及び配列番号103のDNA (GGATTAGTTATTTCATTACAGATCTTCTTCGCTGATCAGTTTTCTGTTTCAGAACCGCCTGCCTATGCAAAAGAATC) をそれぞれ20pg/μL、0.2nmol/Lとなるように混合し、KOD-Plus-Ver. 2を用いて、94℃/2分、98℃/10秒、62℃/30秒、68℃/15秒の4ステップを行い2つのDNAを連結した。次いで、配列番号104のフォワードプライマー (GAAATTAATACGACTCACTATAG) 及び配列番号105のリバースプライマー (GGATTAGTTATTTCATTACAGATC) をそれぞれ0.3μmol/L添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98℃/10秒、57℃/30秒、68℃/15秒の3ステップを35サイクル行い、目的の鋳型DNAを得た。作製した鋳型DNAを精製し、50ng/μLに希釈した。

[0093] 鋳型DNAの実施形態例が、配列番号106の塩基配列を有するDNAである。配列番号106の塩基配列を有する鋳型DNAは、配列番号27のタグが付加されたタグ付加融合タンパク質の鋳型DNAである。配列番号106の塩基配列においては、開始コドンATGの直後に配列番号73の塩基配列 (配列番号27をコードする塩基配列) が配置され、配列番号73の直後に配列番号6の塩基配列 (融合タンパク質をコードする塩基配列) が配置されている。

配列番号106 : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GACCACAACGGTTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
TTAACTTTAAGAAGGAGATATACCAATG [GTTAA
AAAAACAACAAAACA] GCGTG CATCCCGCGCGGCGA

TTCTTTTGCATAGGCAGGCGGTTCTGAACAGAAA
CTGATCAGCGAAGAAGATCTGGGTGGCTCTGTAA
GTGGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGCTAATG
AATAACTAATCC

配列番号106において [] 内の塩基配列が、配列番号73の配列である。VKKXタグごとの鋳型DNAにおいて [] 内の塩基配列が、配列番号53～98の配列のいずれかである。

[0094] 非天然アミノ酸であるクロロアセチル化リシンを翻訳するために、アンチコドンがCUAであり、mRNAのUAGコドンに対合するtRNAを用意した。このtRNAをN-クロロアセチル化リシンpdCpA (phospho 2' deoxyribocytidylriboadenosine) エステル体でアミノアシル化した。このアミノアシルtRNAを、アミノアシルtRNA (1) という。

ポリペプチドの無細胞生合成は、鋳型DNA、PUREflex 2.0 (ジーンフロンティア、PF201-0.25-5) 及びアミノアシルtRNA (1) を含む翻訳液中にて実施した。50 ng/μLに調製した鋳型DNA 1.25 μL (62.5 ng)、PUREflex 2.0 Solution I 2.5 μL、Solution II 0.25 μL、Solution III 0.5 μL、アミノアシルtRNA (1) 0.5 μLを混合し、37°Cで1時間反応させた。

[0095] 生合成したポリペプチドの量は、ELISAによって測定した。96ウェルプレートの各ウェルに50 ngのRecombinant Human Integrin $\alpha V\beta 3$ (R&D systems、3050-AV-050) を固定化し、Blocker Casein in PBS (Thermo、37528) にてブロッキングした後、5 mmol/L MgCl₂を含むCan Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I (TOYOBO、NKB-101) にて希釈した無細胞生合成液を添加し、室温で3時間反応させた。5 mmol/L MgCl₂/0.05% Tween 20含有PBS (phosphate buffered saline) を用いて洗浄後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution II (TOYOBO、NKB-

101) にて希釈した抗Myc抗体 (Cell Signaling、14038S) を添加し、室温で2時間反応させた。5 mmol/L MgCl₂ / 0.05% Tween 20 含有PBSを用いて洗浄後、SuperSignal ELISA Femto Substrate (Thermo、37075) を添加し、発光を測定した。濃度既知の融合タンパク質から作成した検量線をもとに、無細胞生合成液中の融合タンパク質量を算出した。発光測定を2回行い、融合タンパク質量の平均値を算出した。対照例の融合タンパク質量を基準値1にした各融合タンパク質の生合成量の相対値を表2-1及び表2-2に示す。

[0096] [表2-1]

VKXXタグ		融合タンパク質の 生合成量
配列番号	アミノ酸配列	
—	—	1
7	VKKI	4.40
8	VKKK	6.15
9	VKKT	5.66
10	VKKR	5.75
11	VKKS	6.05
12	VKXH	5.82
13	VKKM	1.94
14	VKKP	2.23
15	VKKG	2.39
16	VKKL	2.71
17	VKKV	2.90
18	VKKE	2.94
19	VKKA	3.01
20	VKKD	3.05
21	VKKC	3.14
22	VKKN	3.17
23	VKKY	3.30
24	VKKQ	3.52
25	VKKW	3.52
26	VKKF	3.69

[0097]

[表2-2]

VKKXタグ		融合タンパク質の 生合成量
配列番号	アミノ酸配列	
27	VKKTKT	4.94
28	VKKTKTT	5.28
29	VKKTKTD	6.09
30	VKKTKTKK	9.01
31	VKKTKTKT	9.08
32	VKKTKTKD	8.04
33	VKKTKTTK	6.54
34	VKKTKTTT	6.69
35	VKKTKTDD	5.75
36	VKKTKTKKT	10.50
37	VKKTKTKKD	11.45
38	VKKTKTKTK	8.42
39	VKKTKTKTT	7.22
40	VKKTKTKKK	8.49
41	VKKTKTKDT	6.27
42	VKKTKTKDD	5.35
43	VKKTKTTKK	9.45
44	VKKTKTTKT	7.83
45	VKKTKTTKD	7.83
46	VKKTKTKKTK	9.94
47	VKKTKTKKDK	8.90
48	VKKTKTKTKK	10.47
49	VKKTKTKTTK	7.44
50	VKKTKTKKKK	7.78
51	VKKTKTTKK	6.29
52	VKKTKTKTDTT	4.33

[0098] 4アミノ酸からなる配列番号7～26のタグによって、融合タンパク質の生合成量が1.9倍～6.2倍増加していた。図1は、配列番号7～26のタグについて融合タンパク質の生合成量を示すグラフであり、タグを融合タンパク質の生合成量の順に並べたグラフである。VKKI、VKKT、VKKR、VKKH、VKK S及びVKKKの各タグによって、融合タンパク質の生合成量が4.4倍～6.2倍に増加した。すなわち、4アミノ酸からなるタグとしては、VKKの直後にI (Ile)、T (Thr)、R (Arg)、H (His)、S (Ser) 又はK (Lys) を配置したタグが優位で

ある。

[0099] V K K T K T からなるタグ（配列番号 27）によって、融合タンパク質の生合成量が 4.9 倍に増加していた。

[0100] V K K T K T に続けて T、K 及び D を 1 残基以上配置し、タグ全長を 10 アミノ酸まで伸長させることにより（つまり配列番号 28～51）、融合タンパク質の生合成量が 5.4 倍～11.5 倍に増加した。タグ全長を 11 アミノ酸とした例（つまり配列番号 52）は、融合タンパク質の生合成量の増加が 4.3 倍であった。図 2 は、配列番号 27、28、31、37、48 及び 52 のタグについて融合タンパク質の生合成量を示すグラフである。

すなわち、V K K T K T に続けて T (Th r)、K (L y s) 及び D (A s p) を 0～4 残基配置したタグ（つまりタグ全長 10 アミノ酸以下）の優位性が示された。

[0101] <実施例 2：タグをコードする塩基配列の検討>

配列番号 27 のタグ（以下、V K K T K T タグという。）によるポリペプチドの生合成量の増加効果について、タグをコードする塩基配列の GC 含量による影響を調べた。比較対照として、ポリペプチドの生合成量の増加効果が知られている S K I K タグを選択した（配列番号 107。S K I K タグは、国際公開 2016/204198 号に開示されている。）。生合成するポリペプチドは、実施例 1 と同じく、インテグリン結合ペプチドを含む融合タンパク質である。

[0102] V K K T K T タグをコードする塩基配列と S K I K タグをコードする塩基配列をそれぞれ 3 種類設計した。表 3 にタグのアミノ酸配列及び塩基配列を示す。

[0103]

[表3]

タグ		タグをコードする塩基配列		
配列番号	アミノ酸配列	配列番号	塩基配列	GC含量 [%]
107	SKIK	108	AGTAAAATTAAA	8
		109	AGTAAGATTAAG	25
		110	TCCAAGATCAAG	42
27	VKTKT	73	GTTAAAAAAACAAAAACA	17
		111	GTTAAGAAAACCAAGACA	33
		112	GTGAAGAAGACCAAGACC	50

[0104] メチオニン、タグ（配列番号107又は配列番号27）及び融合タンパク質（配列番号5）がこの順に連結したタグ付加融合タンパク質をコードする塩基配列を設計した。この塩基配列においては、開始コドンATGの直後にタグをコードする塩基配列（配列番号108～112及び73のいずれか）が配置され、タグをコードする塩基配列の直後に融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号6）が配置されている。

[0105] 実施例1と同様に2段階のPCRによって鋳型DNAを作製した。1段階目のPCRでは、配列番号99のDNAと、タグごとに設計した連結用DNA（実施形態例が配列番号100）とをそれぞれ1nmol/Lとなるように混合し、KOD-Plus-Ver. 2（TOYOBO、KOD-211）を用いて、94℃/2分、98℃/10秒、43℃/30秒、68℃/15秒の4ステップを行い2つのDNAを連結した。次いで、配列番号101のフォワードプライマー及び配列番号102のリバースプライマーをそれぞれ0.3μmol/L添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98℃/10秒、61℃/30秒、68℃/15秒の3ステップを35サイクル行い、T7プロモーター配列からインテグリン結合ペプチドをコードする配列の一部までを有するDNA断片を作製した。このDNA断片を精製し、50ng/μLに希釈し、2段階目のPCRに供した。2段階目のPCRでは、1段階目で作製したDNA断片及び配列番号103のDNAをそれぞれ20pg/μL、0.2nmol/Lとなるように混合し、KOD-Plus

-Ver. 2を用いて、94℃/2分、98℃/10秒、62℃/30秒、68℃/15秒の4ステップを行い2つのDNAを連結した。次いで、配列番号104のフォワードプライマー及び配列番号105のリバースプライマーをそれぞれ0.3 μmol/L添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98℃/10秒、57℃/30秒、68℃/15秒の3ステップを35サイクル行い、目的の鋳型DNA（実施形態例が配列番号106）を得た。作製した鋳型DNAを精製し、50 ng/μLに希釈した。

[0106] 実施例1と同様に、無細胞ペプチド合成システムによって融合タンパク質を発現させ、ELISAにより定量した。測定を2回行い、融合タンパク質量の平均値を算出した。対照例の融合タンパク質量を基準値1にした各融合タンパク質量の相対値を表4に示す。基準値1の対照例は、実施例1と同じく、開始コドンATGの直後に融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号6）を配置した形態である。

[0107] [表4]

タグ		タグをコードする塩基配列		融合タンパク質の 生合成量
配列番号	アミノ酸配列	配列番号	GC含量 [%]	
---	---	---	---	1
107	SKIK	108	8	3.79
		109	25	4.18
		110	42	1.46
27	VKKTKT	73	17	4.84
		111	33	3.83
		112	50	3.77

[0108] SKIKタグにより融合タンパク質の発現量は増加し、増加率は1.5倍～4.2倍であった。発現量増加の程度には、SKIKタグをコードする塩基配列のGC含量による影響が認められた。

[0109] VKKTKTタグにより融合タンパク質の発現量は増加し、増加率は3.8倍～4.9倍であった。発現量増加の程度には、VKKTKTタグをコードする塩基配列のGC含量による影響がほとんどなかった。すなわち、VKKTKTタグは、コードする塩基配列によらず、融合タンパク質の発現量を

増加させた。

[0110] <実施例3：翻訳条件の検討>

配列番号27～52のVKKXタグによるポリペプチドの生合成量の増加効果について、生合成のインキュベーション時間を短くしてもその効果を発揮できるか調べた。比較対照として、配列番号107のSKIKタグを選択した。生合成するポリペプチドは、実施例1と同じく、インテグリン結合ペプチドを含む融合タンパク質である。

[0111] 実施例1で作製した配列番号27～52のVKKXタグをコードするDNA配列（配列番号73～98）を含む鋳型DNA及び実施例2で作製した配列番号107のSKIKタグをコードするDNA配列（配列番号110）を含む鋳型DNAを用い、反応時間を10分として実施例1と同様に生合成反応を行った。実施例1と同様に無細胞ペプチド合成システムによって融合タンパク質を発現させ、ELISAにより定量した。測定を2回行い、融合タンパク質量の平均値を算出した。対照例の融合タンパク質量を基準値1にした各融合タンパク質量の相対値を表5に示す。基準値1の対照例は、実施例1で用いた対照例と同じく、開始コドンATGの直後に融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号6）を配置した形態である。

[0112]

[表5]

VKKXタグ		融合タンパク質の 生合成量
配列番号	アミノ酸配列	
27	VKKTKT	12.81
28	VKKTKT	16.65
29	VKKTKTD	15.90
30	VKKTKTCK	24.42
31	VKKTKTCT	15.48
32	VKKTKTCD	20.56
33	VKKTKTCK	8.17
34	VKKTKTCT	8.59
35	VKKTKTCD	8.49
36	VKKTKTCKT	13.13
37	VKKTKTCKD	19.84
38	VKKTKTCTK	16.95
39	VKKTKTCTT	7.57
40	VKKTKTCKK	10.77
41	VKKTKTCTT	28.80
42	VKKTKTCKD	14.95
43	VKKTKTCTCK	23.35
44	VKKTKTCTCT	7.18
45	VKKTKTCTCD	10.61
46	VKKTKTCKTK	23.47
47	VKKTKTCKDK	15.53
48	VKKTKTCTCK	36.08
49	VKKTKTCTCK	8.75
50	VKKTKTCKDK	35.42
51	VKKTKTCTCK	15.28
52	VKKTKTCTDT	9.15
107	SKIK	1.27

[0113] 生合成反応のインキュベーション時間を10分とした場合でも、VKKXタグにより融合タンパク質の発現量は増加し、増加率は7.2倍～36倍であった。一方、SKIKタグによっても融合タンパク質の発現量は増加したが、増加率は1.3倍であった。すなわち、VKKXタグは、より短い生合成反応時間でも発現量増加効果を示した。

[0114] <実施例4：ペプチド長の検討>

配列番号27のタグ（VKKTKTタグ）によるポリペプチドの生合成量の増加効果について、合成対象となるポリペプチドの長さによる影響を調べた。生合成するポリペプチドは、dihydrofolate reductase（DHFR）の一部配列及び発光（HiBiT）タグを含む融合タンパク質である。

[0115] DHFRの一部配列、及びHiBiTタグをこの順に連結した融合タンパク質を設計した。DHFRの一部配列とHiBiTタグの間には、スペーサーとしてGly-Gly-Serを挿入した。これらの融合タンパク質のアミノ酸配列が配列番号113、114であり、それぞれ、DHFRのN末端から66アミノ酸番目までのアミノ酸とHiBiTタグの融合タンパク質（80アミノ酸長）、DHFRのN末端から86アミノ酸番目までのアミノ酸とHiBiTタグの融合タンパク質（100アミノ酸長）である。これらの融合タンパク質をコードする塩基配列が配列番号115、116である。

[0116] 配列番号113：VGS LN C I V A V S Q N M G I G K N G D L P W P P
L R N E F R Y F Q R M T T T S S V E G K Q N L V I M G K K T W F S I
P E K N R P G G S V S G W R L F K K I S

配列番号114：VGS LN C I V A V S Q N M G I G K N G D L P W P P
L R N E F R Y F Q R M T T T S S V E G K Q N L V I M G K K T W F S I
P E K N R P L K G R I N L V L S R E L K E P P Q G A G G S V S G W R
L F K K I S

配列番号115：G T T G G A T C C T T G A A C T G C A T C G T A G C
T G T G A G C C A A A C A T G G G A A T T G G G A A G A A C G G C
G A T T T A C C C T G G C C A C C G T T G C G G A A T G A A T T C C
G C T A T T T T C A G C G T A T G A C C A C C A C A A G T T C G G T
G G A A G G G A A A C A G A A T C T G G T G A T C A T G G G C A A G
A A A A C G T G G T T T A G C A T T C C G G A G A A G A A T C G T C
C T G G T G G C T C T G T A A G T G G A T G G C G A T T A T T C A A

GAAGATTAGC

配列番号116 : GTTGGATCCTTGA ACTGCATCGTAGC
TGTGAGCCAAAACATGGGAATTGGGAAGAACGGC
GATTTACCCTGGCCACCGTTGCGGAATGAATTCC
GCTATTTTTCAGCGTATGACCACCACAAGTTCGGT
GGAAGGGAAACAGAATCTGGTGATCGGCAAGAAA
ACGTGGTTTTAGCATTCCGGAGAAGAATCGTCCTC
TGAAAGGCCGTATCAACCTCGTTCTGTACGCGA
ACTGAAAGAGCCTCCACAAGGTGCAGGTGGCTCT
GTAAGTGGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGC

[0117] メチオニン、VKKTKTタグ（配列番号27）又はSKIKタグ（配列番号107）及び融合タンパク質（配列番号113又は114のいずれか）がこの順に連結したタグ付加融合タンパク質をコードする塩基配列を設計した。この塩基配列においては、開始コドンATGの直後にVKKTKTタグ又はSKIKタグをコードする塩基配列（配列番号73又は110）が配置され、VKKTKTタグ又はSKIKタグをコードする塩基配列の直後に各融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号115又は116のいずれか）が配置されている。

[0118] VKKTKTタグ又はSKIKタグの効果を評価するための対照例として、開始コドンATGの直後に各融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号115又は116のいずれか）が配置されている塩基配列を設計した。

[0119] 融合タンパク質を発現させるための鋳型DNAとして、5'末端からT7プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列及びタグ付加融合タンパク質をコードする塩基配列を連結した鋳型DNAを作製した。配列番号115、116の配列を含む鋳型DNAの作製は、3段階のPCRによって行った。

[0120] 1段階目のPCRでは、配列番号117に示すDHRFをコードするDNAと、配列番号118のVKKTKTタグ付加用のフォワードプライマー又は配列番号119のSKIKタグ付加用のフォワードプライマーと、配列番

号120のリバースプライマーとをそれぞれ0.3 $\mu\text{mol/L}$ 添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98°C/10秒、61°C/30秒、68°C/15秒の3ステップを35サイクル行い、VKKTKTタグ又はSKIKタグを付加したDHFRをコードする塩基配列の全長を有するDNA断片を作製した。このDNA断片を精製し、50 ng/ μL に希釈し、2段階目のPCRに供した。

配列番号117 : GTTGGATCCTTGA ACTGCATCGTAGC
TGTGAGCCAAAACATGGGAATTGGGAAGAACGGC
GATTTACCCTGGCCACCGTTGCGGAATGAATTCC
GCTATTTTCAGCGTATGACCACCACAAGTTCGGT
GGAAGGGAAACAGAATCTGGTGATCATGGGCAAG
AAAACGTGGTTTTAGCATTC CGGAGAAGAATCGTC
CTCTGAAAGGCCGTATCAACCTCGTTCTGTACG
CGAACTGAAAGAGCCTCCACAAGGTGCACACTTC
CTTAGCCGCAGTCTTGATGATGCCCTGAAACTGA
CTGAACAGCCCGAATTAGCGAACAAAGTCGATAT
GGTCTGGATTGTAGGTGGCTCTTCCGTGTACAAA
GAAGCGATGAATCATCCGGGTCATCTGAAACTGT
TTGTTACGCGCATTATGCAGGACTTTGAATCGGA
TACCTTCTTTCCGGAAATTGACCTCGAGAAATAC
AAACTGTTACCGGAATATCCGGGTGTTCTGTCTG
ATGTGCAGGAAGAGAAAGGCATCAAATACAAATT
CGAAGTCTATGAGAAGAACGAC

配列番号118 : AAGGAGATATACCAATGGTTAAAAA
ACAAAAACAGTTGGATCCTTGA ACTGCAT

配列番号119 : AAGGAGATATACCAATGT CGAAGATC
AAGGTTGGATCCTTGA ACTGCAT

配列番号120 : TTAGTCGTTCTTCTCATAGA

[0121] 2段階目のPCRでは、1段階目で作製したDNA断片及び配列番号99のDNAをそれぞれ1nmol/Lとなるように混合し、KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO、KOD-211)を用いて、94℃/2分、98℃/10秒、43℃/30秒、68℃/15秒の4ステップを行い2つのDNAを連結した。

[0122] 次いで、連結したDNAに、配列番号101のフォワードプライマーと、配列番号121又は122のリバースプライマーのいずれかをとをそれぞれ0.3μmol/L添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98℃/10秒、61℃/30秒、68℃/15秒の3ステップを35サイクル行い、T7プロモーター配列からDHFRをコードする塩基配列の一部を有するDNA断片を作製した。このDNA断片を精製し、50ng/μLに希釈し、3段階目のPCRに供した。

配列番号121: AGGACGATTCTTCTCCGGAAT

配列番号122: TGCACCTTGTGGAGGCTCTTT

[0123] 3段階目のPCRでは、2段階目で作製したDNA断片と、配列番号123又は124のDNAとをそれぞれ1nmol/Lとなるように混合し、KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO、KOD-211)を用いて、94℃/2分、98℃/10秒、43℃/30秒、68℃/15秒の4ステップを行い2つのDNAを連結した。

配列番号123: GGATTAGTTATTCAATTAGCTAATCTTCTTGAATAATCGCCATCCACTTACAGAGCCACCA
GGACGATTCTTCTCCGGAAT

配列番号124: GGATTAGTTATTCAATTAGCTAATCTTCTTGAATAATCGCCATCCACTTACAGAGCCACCT
GCACCTTGTGGAGGCTCTTT

[0124] 次いで、連結したDNAに、配列番号101のフォワードプライマー及び配列番号105のリバースプライマーのいずれかをそれぞれ0.3μmol/L添加し、KOD-Plus-Ver. 2存在下、98℃/10秒、61

℃／30秒、68℃／15秒の3ステップを35サイクル行い、T7プロモーター配列から融合タンパク質をコードする塩基配列を有するDNA断片を作製した。このDNA断片を精製し、50ng／μLに希釈した。

[0125] 実施例1で用いた無細胞ペプチド合成システムと同様の無細胞ペプチド合成システムを用い、生合成のインキュベーション時間を10分として融合タンパク質を発現させた。得られた融合タンパク質は、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System（プロメガ、N3040）を用いて定量した。測定を2回行い、融合タンパク質量の平均値を算出した。対照例の融合タンパク質量を基準値1にした各融合タンパク質量の相対値を表6に示す。基準値1の対照例は、開始コドンATGの直後に融合タンパク質をコードする塩基配列（配列番号115又は116）を配置した形態である。

[0126] [表6]

タグ		融合タンパク質		融合タンパク質の 生合成量
配列番号	アミノ酸配列	配列番号	アミノ酸長	
—	—	113	80	1
27	VKKTKT	113	80	1.67
107	SKIK	113	80	1.13
—	—	114	100	1
27	VKKTKT	114	100	1.24
107	SKIK	114	100	0.73

[0127] 通常、アミノ酸の長さが長くなるにつれて翻訳促進効果は小さくなるが、VKKTKTタグは、80～100アミノ酸長の融合タンパク質に対しても翻訳促進効果を示し、促進効果は1.2倍～1.7倍であった。この効果は、SKIKタグよりも優れた効果であった。

[0128] <実施例5：タグ付加ペプチドの結合能評価>

本開示に係るタグ配列の付加によりポリペプチドを高収量で取得可能であることから、高濃度ポリペプチドの結合評価により結合能の重要指標であるEmax値及びEC50値を正確に測定可能となると考えられる。すなわち、本開示に係るタグ配列を活用したポリペプチドの生合成方法及び作製した

ポリペプチドは、結合性能の評価に活用できると考えられる。そこで、配列番号27のVKKTKTタグを付加したポリペプチドを用いて結合評価を実施可能であるかを調べた。

[0129] 大腸菌に由来する無細胞ペプチド合成システムと、配列番号27のタグ配列、インテグリン結合ペプチドからHiBiTタグまでをコードする鋳型DNA配列（配列番号106）を用いて、インテグリン結合ペプチドを高収量に生合成し、得られたペプチドのインテグリン結合能を、各ペプチド濃度におけるインテグリンへのペプチド結合量をELISA評価することで測定した。鋳型DNAの作製方法、ペプチドの無細胞生合成方法、ELISA作業の詳細は実施例1と同一である。ペプチド濃度の測定は5 mmol/L MgCl₂を含むCan Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I (TOYOBO) にて5000倍希釈したペプチドを、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega) と濃度既知の検量線用化学合成ペプチド（配列番号125）を用い、Nano Glo HiBiT Lytic Detection Systemの標準プロトコルに則り測定した。

配列番号125：EQKLISEEDLGGSVSGWRLFKKIS

[0130] また、比較対照として、インテグリン結合ペプチドの結合能（K_d値）をSPR法で測定した。インテグリン結合ペプチド（配列番号126）を化学合成し、CM5チップ（Cytiva、BR100530）にアミンカップリング法で固相化した。Biacore T-100（Cytiva）を用い、固相化したインテグリン結合ペプチドの、Recombinant Human Integrin αVβ3（R&D systems、3050-AV-050）に対する結合能を測定した。測定バッファーには、HBS-Nバッファー（Cytiva、BR100670）に終濃度5 mmol/LになるようMgCl₂を添加して使用し、インテグリンは10、30、100、300 nmol/Lの濃度で10分間添加した。CM5チップは500 mmol/L EDTAの10分間添加を2回繰り返すことで再生、使用した。

配列番号126：CEPRGDNYRXGGSKKK（Xはクロロアセチル

化リシン)

[0131] ELISAの発光測定結果と、Nano Glo HiBiT Lytic Detection Systemを用いて測定したインテグリン結合ペプチド量より、本インテグリン結合ペプチドのEC50値を求めたところ、7.7 nMとなり(図3)、SPR法で計測したKd値(EC50値とほぼ同義)7.6 nMと合致した。本結果は、タグ配列を用いた生合成によりペプチドを高収量で取得可能、高濃度ペプチドの結合評価を行うことができるため、Emax値および結合能の重要指標であるEC50値を正確に測定可能であることを示している。

[0132] <実施例6：VKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリからのインテグリン結合ペプチドスクリーニング>

VKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリから、標的物質に結合するポリペプチドを取得可能であることを調べた。具体的には標的物質としてインテグリンを用い、抽出したポリペプチド群に公知の結合モチーフ(アミノ酸配列RGD)を有するポリペプチドが含まれるかどうかを調べた。

[0133] VKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリとして配列番号127~128の配列を用いた。これらのVKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリは、5'末端から86~88番目の開始コドン(ATG)より翻訳が始まり、89~106番目の塩基(GTTAAGAAAACAACA)がVKKXタグ、107~142番目の塩基(NNNTGT(NNN)₃TAGNNN(NNNはトリマーオリゴヌクレオチド、ここで、Nはそれぞれ独立にA、T、G又はCを表す))がランダム配列、143番目以降の塩基がピユーロマイシンリンカーの結合部および終止コドンである。本ランダム配列中のトリプレットTAGはクロロアセチル化リシンのコドンに当てているため、本ランダム配列がコードするポリペプチドは実施例1と同じく、システインのチオール基とクロロアセチル化リシンのクロロアセチル基とが自発的にチオエーテル結合を形成し、環状ポリペプチドとなる。配列番号127~128の配列を有する核酸において、NNNで表されるトリマーオリゴヌクレオチドは、1種類のアミノ酸に対して1種類のコドンを割り当てた、表7

に示す18種類のコドンに対応するトリマーオリゴヌクレオチドの等量混合物である。

[表7]

アミノ酸(一文字表記)	割り当てコドン	アミノ酸(一文字表記)	割り当てコドン
A	GCT	N	AAC
I	ATC	Q	CAG
L	CTG	R	CGT
V	GTT	H	CAT
F	TTC	K	AAA
W	TGG	D	GAC
Y	TAC	E	GAA
S	TCT	G	GGT
T	ACT	P	CCG

[0134] 配列番号127 : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
 GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TTAAC TT TAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAG
 AAAACAAAACANNNTGT (NNN)₈TAGNNNGGTGG
 CTCTGGCGGTAGCAGGACGGGGGGCGGGCGGGGGG
 TAAATAAATAAGCTTGAGTAT (NNNはトリマーオリゴ
 クレオチド、ここで、Nはそれぞれ独立にA、T、G又はCを表す)

配列番号128 : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
 GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TTAAC TT TAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAG
 AAAACAAAACANNNTGT (NNN)₈TAGNNNGGTGG
 CTCTGGCGGTAGCGGGCGGGGGCGGGAGGCGGGA
 AATAAATAAGCTTGAGTAT (NNNはトリマーオリゴヌクレオ
 チド、ここで、Nはそれぞれ独立にA、T、G又はCを表す)

[0135]

[表8]

条件	ライブラリ配列番号	ライブラリ作製用DNA配列番号	ビューロマイシンリンカー配列番号	UV照射有無	増幅用DNA配列番号	RGDモチーフ含有ペプチドの存在率
1	127	131	133	有	131	93%
2	127	131	134	有	131	96%
3	127	131	135	無	131	93%
4	128	132	136	無	132	87%

[0136] 配列番号127～128のVKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリは、オーバーラップエクステンションPCRを行うことで作製した。具体的には、配列番号127～128のライブラリについて、配列番号129のDNA、配列番号130のDNA、及び表8に記載される配列番号131～132のいずれかのDNA、の3種のDNAを表8の組み合わせで、それぞれ3μmol/L、1μmol/L、1μmol/Lとなるように混合し、Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase (Thermo、12361010) 存在下、98℃/30秒の後、98℃/10秒、60℃/10秒、72℃/10秒の3ステップを7サイクル繰り返し、最後に72℃/5分の処理を行うことで、3つのDNAを連結し、目的のVKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリを作製した。作製したVKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリを精製し、2ng/μLに希釈した。配列番号130のDNAにおいて、NNNで表されるトリマーオリゴヌクレオチドは、1種類のアミノ酸に対して1種類のコドン割り当てた、表7に示す18種類のコドンに対応するトリマーオリゴヌクレオチドの等量混合物である。

[0137] 配列番号129 : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
 GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TTAAC TT TAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAA
 AAAACAAAAC
 配列番号130 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAA
 AAAACAAAACANNNTGT (NNN) 8 TAGNNNGGCGG
 TTCTGGCGGTAGC (NNNはトリマーオリゴヌクレオチド、ここで、Nはそれぞれ独立にA、T、G又はCを表す)

配列番号131 : A T A C T C A A G C T T A T T T A T T T A T T A C C
C C C C G C C G C C C C C C G T C C T G C T A C C G C C A G A A C C
A C C

配列番号132 : A T A C T C A A G C T T A T T T A T T T A T C C C G
C C T C C C G C C C C C C G T C C G C T A C C G C C A G A A C C A C
C

[0138] 標的物質（インテグリン）として R e c o m b i n a n t H u m a n
I n t e g r i n α V β 3 (R & D s y s t e m s、3050-AV-
050) を用い、磁性ビーズ (N H S M a g S e p h a r o s e、C y t i v a、
28951380) にメーカー (C y t i v a) 指定プロトコル
にて固相化（固相化時インテグリン濃度：1 μ g / μ L）した。

[0139] V K K X タグ含有核酸ディスプレイライブラリと標的物質（磁性ビーズ固
相化インテグリン）とを接触させてインキュベートする工程を計4ラウンド
繰り返した後、シーケンサーを用いて核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩
基配列を同定した。

[0140] 各ラウンドの具体的手順は下記の通りである。まず、作製した V K K X タ
グ含有核酸ディスプレイライブラリ（配列番号127~128）を T 7 R
N A P o l y m e r a s e (T a K a R a、2540A) 存在下、37°C
で30分間反応させることでライブラリ転写物を作製した。このDNA断片
を精製し、10 μ M に希釈した。

[0141] 次に T B S バッファー (1. 25 m M T r i s、25 m M N a C l、
p H 7. 5) 中で、ライブラリ転写物（終濃度5 μ M）、表9の配列番号1
33~136の欄に示されたピューロマイシンリンカー（終濃度10 μ M）
を表8の組み合わせにて混合した後、95°Cで5分間反応させ、紫外線架橋
性化合物 (P s o r a l e n C 6) を有するピューロマイシンリンカーを含
む混合液には10 J の UV (365 nm) を氷上にて照射することで、ライ
ブラリ転写物とピューロマイシンリンカーの複合体を作製した。

[0142]

[表9]

配列番号	核酸配列
133	5'-(<u>PsoralenC6</u>)-TACCCCGCGCGCCCGCCGTCCT-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'
134	5'-(<u>PsoralenC6</u>)-UAGCCCGCGCGCCCGCCGUCUU-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'
135	5'-UAGCCCGCGCGCCCGCCGUCUU-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'
136	5'-CCCGCGUCCGCGCCCGCCGUCU-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'

*PsoralenC6、Sp18、Puroの構造は図4参照。

*下線表記のヌクレオチドはRNAの2' OHが2' OMe体となったものであり、下線が付されていないヌクレオチドは未修飾のDNAを表す。

[0143] 配列表においては、配列番号133~136は本体部（すなわち、リンカー及びCCは含まない部分）の配列のみを示す。

[0144] ライブラリ転写物とピューロマイシンリンカーの複合体を、PUREflex 2.0（ジーンフロンティア、PF201-0.25-5）及びアミノアシルtRNA（実施例1と同一）を含む翻訳液中にて翻訳した。複合体10μL、PUREflex 2.0 Solution I 4.5μL、Solution II 0.75μL、Solution III 0.75μL、アミノアシルtRNA（1）3μLを混合し、37℃で30分間反応させることでmRNA-ポリペプチド連結体を作製した。

[0145] 翻訳産物15μLと配列番号137のDNA（終濃度10μM）とをReverTra Ace（TOYOBO、TRT-101）存在下で混合し（反応体積37.5μL）、37℃で30分間反応させることで逆転写を行い、cDNA-mRNA-ポリペプチド連結体を作製する。

[0146] 配列番号137：GCTACCGCCAGAACCACC

[0147] 次いで逆転写産物22.5μLを磁性ビーズ固相化インテグリン10μLと、HBSバッファー（10mM HEPES、150mM NaCl、5mM MgCl₂、pH7.5）中で混合し（反応体積37.5μL）、室温で45分間反応後、磁性ビーズをHBSバッファー100μLで3度洗浄することで、インテグリンに結合するcDNA-mRNA-ポリペプチド連結体を抽出した。抽出したcDNA-mRNA-ポリペプチド連結体を下記2段階のPCRにて増幅した。

[0148] 1段階目のPCRでは、cDNA-mRNA-ポリペプチド連結体25 μ Lを、配列番号138のDNA（終濃度0.5 μ M）、配列番号139のDNA（終濃度0.5 μ M）と混合し（反応体積50 μ L）、Platinum SuperFi II DNA Polymerase（Thermo、12361010）存在下、98 $^{\circ}$ C/30秒の後、98 $^{\circ}$ C/10秒、60 $^{\circ}$ C/10秒、72 $^{\circ}$ C/10秒の3ステップを6~15サイクル繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C/5分の処理を行うことで、増幅産物を得た。増幅産物を精製し、20nMに希釈した。

[0149] 配列番号138：GGAGATATACATATGGTTAAGAAAAC
AAAAAC

配列番号139：CTGCTACCGCCAGAACCACC

[0150] 2段階目のPCRでは、1段階目PCR増幅産物（終濃度10nM）を、配列番号129のDNA（終濃度0.5 μ M）、表8に記載される配列番号131~132のいずれかのDNA（終濃度0.5 μ M）と混合し、Platinum SuperFi II DNA Polymerase（Thermo、12361010）存在下、98 $^{\circ}$ C/30秒の後、98 $^{\circ}$ C/10秒、60 $^{\circ}$ C/10秒、72 $^{\circ}$ C/10秒の3ステップを6サイクル繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C/5分の処理を行うことで、元のVKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリとランダム配列を除き同じ配列のDNAを得た。作製したVKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリを精製し、2ng/ μ Lに希釈して、後続ラウンドに用いた。

[0151] 4ラウンド目の1段階目PCR産物の塩基配列を、MiSeq（Illumina社製）とMiSeq Reagent kit v2（300 cycle）（Illumina、MS-102-2022）を用い、Illumina社標準プロトコルにて同定した。同定したポリペプチド群内における、公知のインテグリン結合モチーフ（アミノ酸配列RGD）を有するポリペプチドの割合を表8に示す。

本結果は、VKKXタグ含有核酸ディスプレイライブラリから、標的物質

に結合するポリペプチドを取得可能であることを示している。

[0152] 2021年9月27日に出願された日本国特許出願2021-157186号の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] ポリペプチドをタグ付加ポリペプチドとして発現させることを含むポリペプチドの作製方法であって、
- 開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグをコードする塩基配列と、
- 前記タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、
- を有する核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させることを含む、ポリペプチドの作製方法。
- 配列番号1 : V a l - L y s - L y s - (X a a) n 。 (X a a) n は任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1～8の整数であり、(X a a) n を構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。
- [請求項2] 前記タグが配列番号2のアミノ酸配列からなるタグである、請求項1に記載のポリペプチドの作製方法。
- 配列番号2 : V a l - L y s - L y s - X a a - (X a a) m 。 N 末端から4番目の X a a は I l e 、 L y s 、 A r g 、 H i s 、 S e r 及び T h r からなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(X a a) m は任意のアミノ酸m個の連なりであり、mは0～7の整数であり、(X a a) m を構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。
- [請求項3] 前記タグが配列番号3のアミノ酸配列からなるタグである、請求項1に記載のポリペプチドの作製方法。
- 配列番号3 : V a l - L y s - L y s - X a a - (X a a) k 。 N 末端から4番目の X a a は I l e 、 L y s 及び T h r からなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(X a a) k は L y s 、 T h r 及び A s p からなる群から選ばれるk個のアミノ酸の連なりであり、kは0～6の整数であり、(X a a) k を構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。
- [請求項4] 無細胞ペプチド合成システム又は大腸菌によって前記核酸から前記

タグ付加ポリペプチドを発現させる、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載のポリペプチドの作製方法。

[請求項5] 前記ポリペプチドが非天然アミノ酸を含む、請求項1に記載のポリペプチドの作製方法。

[請求項6] 配列番号1のアミノ酸配列からなるタグ。

配列番号1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n。(Xaa)_nは任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1～8の整数であり、(Xaa)_nを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項7] 配列番号2のアミノ酸配列からなるタグ。

配列番号2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m。N末端から4番目のXaaはIle、Lys、Arg、His、Ser及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_mは任意のアミノ酸m個の連なりであり、mは0～7の整数であり、(Xaa)_mを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項8] 配列番号3のアミノ酸配列からなるタグ。

配列番号3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k。N末端から4番目のXaaはIle、Lys及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_kはLys、Thr及びAspからなる群から選ばれるk個のアミノ酸の連なりであり、kは0～6の整数であり、(Xaa)_kを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項9] 無細胞ペプチド合成システム又は大腸菌によってポリペプチドをタグ付加ポリペプチドとして発現させるために用いる、請求項6～請求項8のいずれか1項に記載のタグ。

[請求項10] 前記ポリペプチドが非天然アミノ酸を含む、請求項9に記載のタグ。

[請求項11] 開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からな

るタグをコードする塩基配列と、

前記タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する、

発現ベクター。

配列番号1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n。(Xaa)_nは任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1~8の整数であり、(Xaa)_nを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項12] 前記タグが配列番号2のアミノ酸配列からなるタグである、請求項11に記載の発現ベクター。

配列番号2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m。N末端から4番目のXaaはIle、Lys、Arg、His、Ser及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_mは任意のアミノ酸m個の連なりであり、mは0~7の整数であり、(Xaa)_mを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項13] 前記タグが配列番号3のアミノ酸配列からなるタグである、請求項11に記載の発現ベクター。

配列番号3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k。N末端から4番目のXaaはIle、Lys及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_kはLys、Thr及びAspからなる群から選ばれるk個のアミノ酸の連なりであり、kは0~6の整数であり、(Xaa)_kを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項14] 無細胞ペプチド合成システム又は大腸菌において発現するように設計された、請求項11~請求項13のいずれか1項に記載の発現ベクター。

[請求項15] 請求項1に記載のポリペプチドの作製方法によってポリペプチドを作製することと、

標的物質に対する前記ポリペプチドの結合性を評価することと、を

含む、

ポリペプチドの評価方法。

[請求項16]

開始コドンの直後に配置された、配列番号1のアミノ酸配列からなるタグをコードする塩基配列と、前記タグをコードする塩基配列の下流にインフレームで配置された、ポリペプチドをコードする塩基配列と、を有する核酸からタグ付加ポリペプチドを発現させ、核酸-ポリペプチド連結体を作製すること、を含む、

核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

配列番号1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n。(Xaa)_nは任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1~8の整数であり、(Xaa)_nを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項17]

前記タグが配列番号2のアミノ酸配列からなるタグである、請求項16に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

配列番号2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m。N末端から4番目のXaaはIle、Lys、Arg、His、Ser及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_mは任意のアミノ酸m個の連なりであり、mは0~7の整数であり、(Xaa)_mを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項18]

前記タグが配列番号3のアミノ酸配列からなるタグである、請求項16に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

配列番号3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k。N末端から4番目のXaaはIle、Lys及びThrからなる群から選ばれる1種のアミノ酸であり、(Xaa)_kはLys、Thr及びAspからなる群から選ばれるk個のアミノ酸の連なりであり、kは0~6の整数であり、(Xaa)_kを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[請求項19]

前記核酸-ポリペプチド連結体を作製することが、mRNA-ポリペプチド連結体を作製すること、及び、前記mRNA-ポリペプチド

連結体の mRNA を逆転写し cDNA-ポリペプチド連結体を作製することを含む、

請求項 16 に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項20] 前記核酸-ポリペプチド連結体において核酸とポリペプチドとがピユーロマイシンリンカーによって連結している、請求項 16 に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項21] 前記ポリペプチドが非天然アミノ酸を含む、請求項 16 に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項22] 前記ポリペプチドが、第一の官能基を有するアミノ酸と、前記第一の官能基と共有結合する第二の官能基を有するアミノ酸とを含み、前記第一の官能基を有するアミノ酸と前記第二の官能基を有するアミノ酸との間に 2 個～28 個のアミノ酸が介在するポリペプチドであり、

前記核酸-ポリペプチド連結体のポリペプチドが前記第一の官能基と前記第二の官能基との共有結合によって環化すること、をさらに含む、

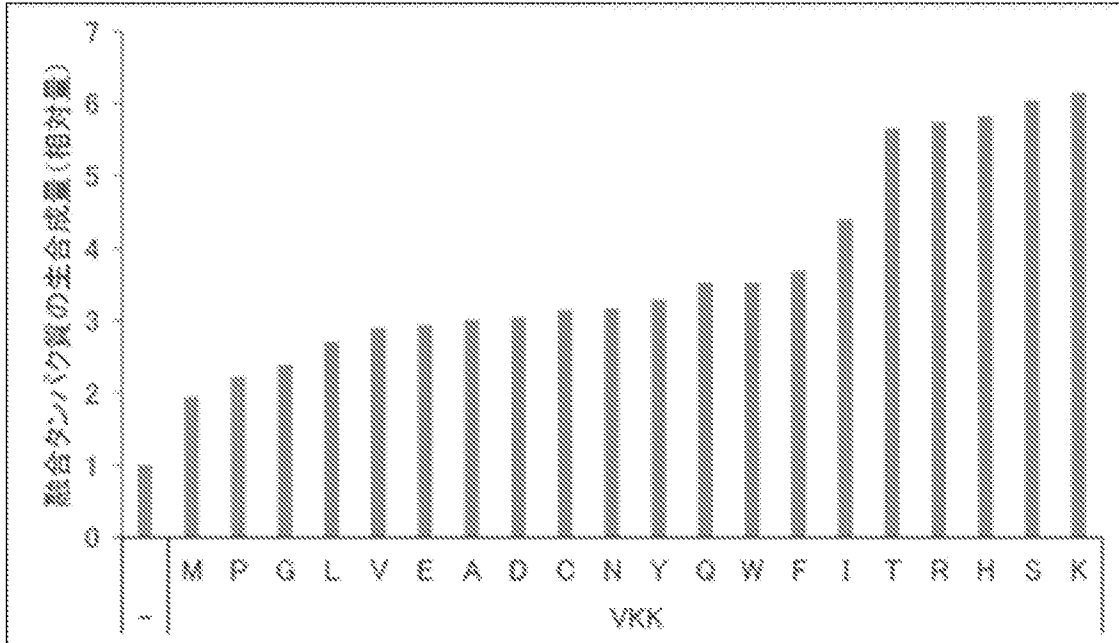
請求項 16 に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項23] 請求項 16 に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法によって核酸ディスプレイライブラリを作製することと、

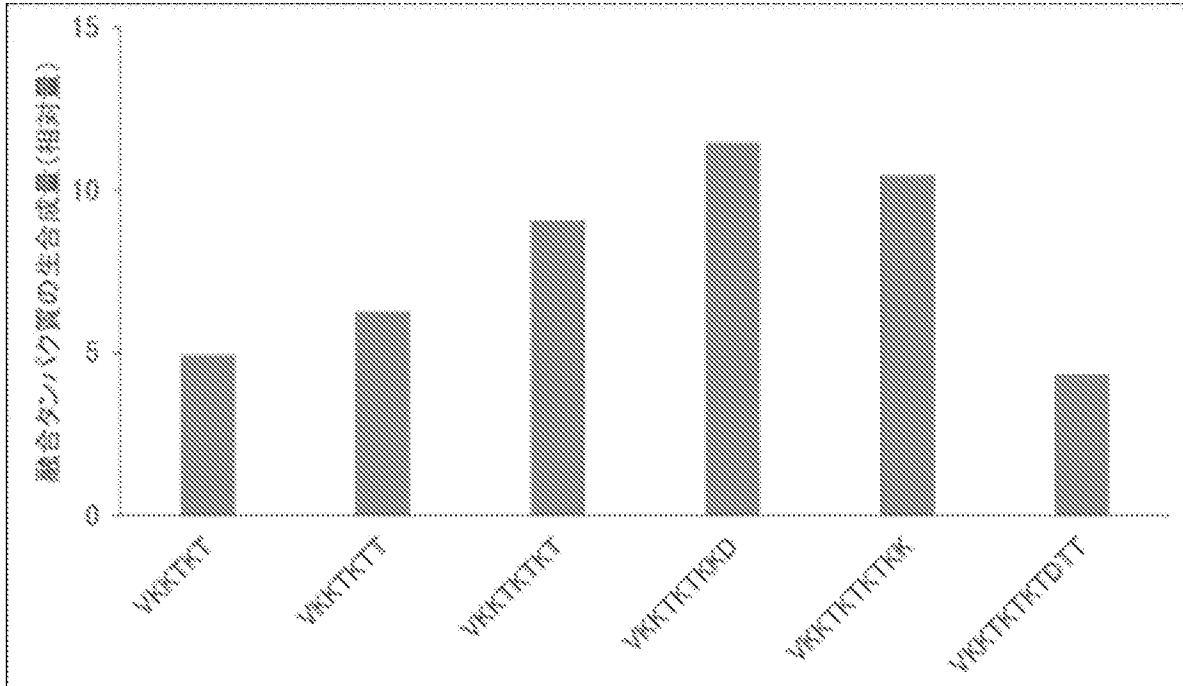
前記核酸ディスプレイライブラリから目的の活性を有する核酸-ポリペプチド連結体を選択し、選択した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定することと、を含む、

スクリーニング方法。

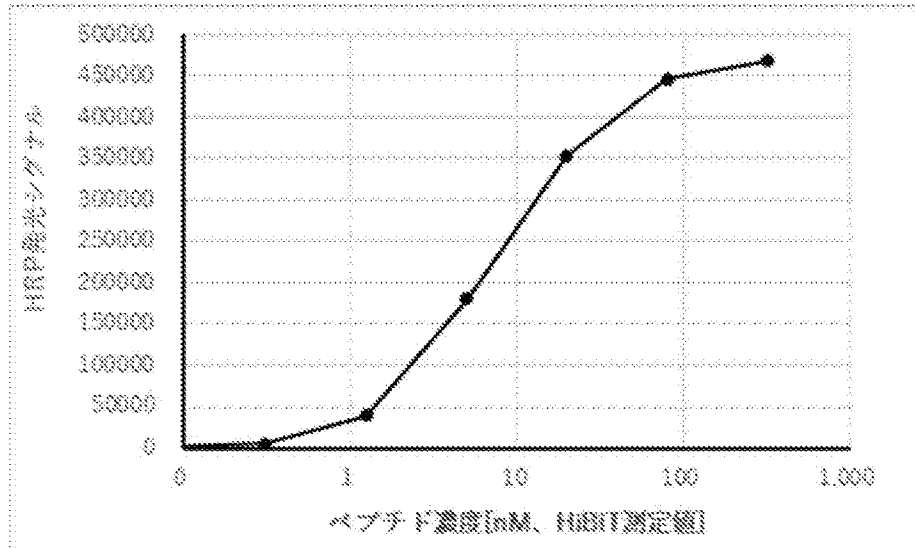
[図1]



[図2]

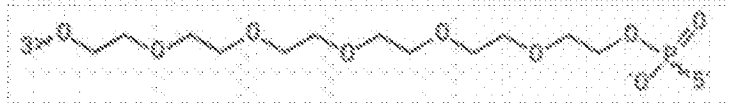


[図3]

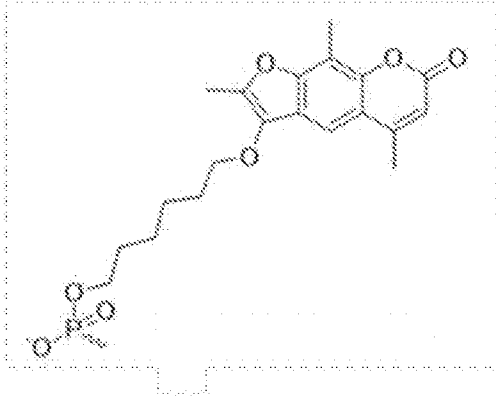


[図4]

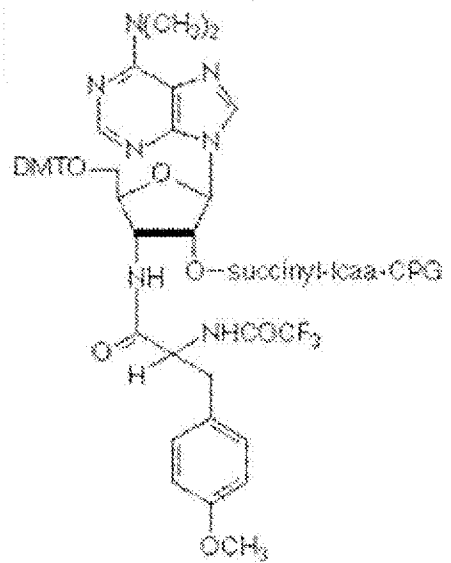
(Sp18): Spacer18



(PsoralenC6): Psoralen C6 Modified Oligo



(Puro): Puromycin-CPG



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/035787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/67</i>(2006.01)i; <i>C07K 5/103</i>(2006.01)i; <i>C07K 7/06</i>(2006.01)i; <i>C07K 19/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/63</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/02</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/04</i>(2006.01)i; <i>C40B 40/08</i>(2006.01)i; <i>C40B 40/10</i>(2006.01)i FI: C12N15/67 Z ZNA; C40B40/10; C40B40/08; C12P21/02 C; C12P21/04; C07K5/103; C07K7/06; C07K19/00; C12N15/63 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/67; C07K5/103; C07K7/06; C07K19/00; C12N15/63; C12P21/02; C12P21/04; C40B40/08; C40B40/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GULYAEVA, N. et al. Relative hydrophobicity of di- to hexapeptides as measured by aqueous two-phase partitioning. Journal of Peptide Research. 2003, vol. 61, no. 3, pp. 129-139 table 1, no. 98	6, 7, 9
X	US 8734812 B1 (NOVARTIS AG) 27 May 2014 (2014-05-27) table 1, seq. ID. no. 36360, 36372	6, 7, 9
X	WO 2016/204198 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. NAGOYA UNIVERSITY) 22 December 2016 (2016-12-22) claims 1-3, 7, 8, paragraphs [0015], [0054], [0083], [0088], [0089], examples, fig. 12, etc.	1-14
Y	claims 1-3, 7, 8, paragraphs [0015], [0054], [0083], [0088], [0089], examples, fig. 12, etc.	15-23
Y	WO 2015/030014 A1 (THE UNIV. OF TOKYO) 05 March 2015 (2015-03-05) claim 13, paragraphs [0056]-[0060], fig. 3, etc.	15-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 30 November 2022		Date of mailing of the international search report 13 December 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

“The form of Annex C/ST.25 text file” above shall read as “the form of ST.26.”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/035787

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	8734812	B1	27 May 2014	JP	2004-508801	A	
				WO	2001/031019	A2	
WO	2016/204198	A1	22 December 2016	US	2020/0032275	A1	
				claim 1-3, 7, 8, paragraphs [0020], [0132], [0168], [0175], examples, fig. 12			
				EP	3312278	A1	
WO	2015/030014	A1	05 March 2015	US	2016/0209421	A1	
				claim 13, paragraphs [0151]-[0157], fig. 3			
				EP	3040417	A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/67(2006.01)i; C07K 5/103(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; C12P 21/04(2006.01)i; C40B 40/08(2006.01)i; C40B 40/10(2006.01)i FI: C12N15/67 Z ZNA; C40B40/10; C40B40/08; C12P21/02 C; C12P21/04; C07K5/103; C07K7/06; C07K19/00; C12N15/63 Z</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/67; C07K5/103; C07K7/06; C07K19/00; C12N15/63; C12P21/02; C12P21/04; C40B40/08; C40B40/10</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>GULYAEVA N. et al., Relative hydrophobicity of di- to hexapeptides as measured by aqueous two-phase partitioning, Journal of Peptide Research, 2003, Vol.61, No.3, pp.129-139 Table 1のNo.98</td> <td>6, 7, 9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 8734812 B1 (NOVARTIS AG) 27.05.2014 (2014-05-27) TABLE 1のSEQ. ID. NO.36360, 36372</td> <td>6, 7, 9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016/204198 A1 (国立大学法人名古屋大学) 22.12.2016 (2016-12-22) 請求項1-3、7、8、段落0015, 0054, 0083, 0088, 0089, 実施例、図12等</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>請求項1-3、7、8、段落0015, 0054, 0083, 0088, 0089, 実施例、図12等</td> <td>15-23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015/030014 A1 (国立大学法人東京大学) 05.03.2015 (2015-03-05) 請求項13、段落0056-0060, 図3等</td> <td>15-23</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	GULYAEVA N. et al., Relative hydrophobicity of di- to hexapeptides as measured by aqueous two-phase partitioning, Journal of Peptide Research, 2003, Vol.61, No.3, pp.129-139 Table 1のNo.98	6, 7, 9	X	US 8734812 B1 (NOVARTIS AG) 27.05.2014 (2014-05-27) TABLE 1のSEQ. ID. NO.36360, 36372	6, 7, 9	X	WO 2016/204198 A1 (国立大学法人名古屋大学) 22.12.2016 (2016-12-22) 請求項1-3、7、8、段落0015, 0054, 0083, 0088, 0089, 実施例、図12等	1-14	Y	請求項1-3、7、8、段落0015, 0054, 0083, 0088, 0089, 実施例、図12等	15-23	Y	WO 2015/030014 A1 (国立大学法人東京大学) 05.03.2015 (2015-03-05) 請求項13、段落0056-0060, 図3等	15-23
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
X	GULYAEVA N. et al., Relative hydrophobicity of di- to hexapeptides as measured by aqueous two-phase partitioning, Journal of Peptide Research, 2003, Vol.61, No.3, pp.129-139 Table 1のNo.98	6, 7, 9																		
X	US 8734812 B1 (NOVARTIS AG) 27.05.2014 (2014-05-27) TABLE 1のSEQ. ID. NO.36360, 36372	6, 7, 9																		
X	WO 2016/204198 A1 (国立大学法人名古屋大学) 22.12.2016 (2016-12-22) 請求項1-3、7、8、段落0015, 0054, 0083, 0088, 0089, 実施例、図12等	1-14																		
Y	請求項1-3、7、8、段落0015, 0054, 0083, 0088, 0089, 実施例、図12等	15-23																		
Y	WO 2015/030014 A1 (国立大学法人東京大学) 05.03.2015 (2015-03-05) 請求項13、段落0056-0060, 図3等	15-23																		
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																				
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																				
<p>国際調査を完了した日</p> <p>30.11.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>13.12.2022</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>北村 悠美子 4B 4501</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																			

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:
- 上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2022/035787

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	8734812	B1	27.05.2014	JP	2004-508801	A	
				WO	2001/031019	A2	
WO	2016/204198	A1	22.12.2016	US	2020/0032275	A1	
					claim 1-3, 7, 8, [0020], [0132], [0168], [0175], Examples, FIG.12		
				EP	3312278	A1	
WO	2015/030014	A1	05.03.2015	US	2016/0209421	A1	
					claim 13, [0151]-[0157], FIG.3		
				EP	3040417	A1	