

(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
2022年7月28日(28.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/158551 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/55 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) *C12N 15/33* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/002101

(22) 国際出願日: 2022年1月21日(21.01.2022)

(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 2021-009194 2021年1月22日(22.01.2021) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 玉 木 秀 幸 (TAMAKI, Hideyuki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 草田 裕之(KUSADA, Hiroyuki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 鎌形 洋一(KAMAGATA, Yoichi); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 亀山 恵司(KAMEYAMA, Keishi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 高 島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町 四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, 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))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 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))

(54) Title: BACTERIOPHAGE-DERIVED TOXIN-ANTITOXIN SYSTEM AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: バクテリオファージ由来のトキシン-アンチトキシンシステム及びその用途

(57) Abstract: The present invention provides a bacteriophage-derived protein that exhibits a ribonuclease activity and contains any of the following amino acid sequences (a) to (c): (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO: 2; (b) an amino acid sequence in which one or a plurality of amino acid sequences are substituted into, deleted from, inserted into, and/or added to the amino acid sequence given by SEQ ID NO: 2; and (c) an amino acid sequence that exhibits at least 95% identity with the amino acid sequence given by SEQ ID NO: 2.

(57) 要約: 本発明は、バクテリオファージ由来であって、以下の (a) ~ (c): (a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列 (b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列 (c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含み、リボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質、を提供する。



WO 2022/158551 A1

明 細 書

発明の名称：

バクテリオファージ由来のトキシノーアンチトキシンシステム及びその用途

技術分野

[0001] 本発明は、新規なトキシノーアンチトキシンシステム及びその用途に関する。より詳細には、本発明は、バクテリオファージ由来のリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質（トキシン）と、該タンパク質に結合してその活性を阻害するタンパク質（アンチトキシン）、それらをコードする核酸、並びにそれらを用いたRNAの分解制御及び細胞の増殖制御方法等に関する。

背景技術

[0002] トキシノーアンチトキシン（TA）システムは、ほとんどの原核生物ゲノムに存在し、栄養飢餓、プログラム細胞死、バクテリオファージからの防御など、細菌の複数の生命活動に関与している。TAシステムは通常、ジシストロニックに発現する一对の遺伝子から構成され、一方は安定なトキシンタンパク質をコードし、他方は該トキシンの毒性を中和する不安定なアンチトキシンをコードしている。飢餓等のストレスやファージ感染等の特定の要因によりアンチトキシンの分解が促進されると、トキシンが活性化されて細胞増殖の停止や細胞死を引き起こす。

[0003] 既知のTAシステムは、アンチトキシンの分子種（タンパク質、非コードRNA）と毒性中和メカニズムに応じて、I型からVI型まで6種類に分類されている。それらのうち、最も広く研究されているII型のTAシステムは、アンチトキシンがタンパク質であり、トキシンタンパク質に直接結合して複合体を形成することにより、トキシンの活性を阻害するものである。トキシンの種類はファミリーにより異なるが、リボヌクレアーゼ活性を有するものが最も多く知られている（例えば、非特許文献1を参照）。

[0004] しかしながら、既知のTAシステムはいずれも細菌や古細菌といった原核生

物由来のものであり、ウイルス由来のTAシステムに関する報告は皆無に等しい。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Heaton, B.E. et al., J. Biol. Chem., 287 (15): 12098-12110 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、新規のTAシステムを同定し、該TAシステムのバイオテクノロジーにおける種々の応用を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、本発明者らが以前に分離したラクノスピラ科に属する糖尿病誘起細菌*Fusimonas intestini* A J110941株 (Kusada, H. et al., Sci. Rep., 7: 18087 (2017)) に感染するバクテリオファージのゲノム中に、*Brucella abortus*由来のTAシステム (BrnT/BrnA) とアミノ酸レベルで30%前後の相同性を有する一対のORFが存在することを見出し、LinT及びLinAと命名した。LinT及びLinAをそれぞれコードする核酸をクローニングし、大腸菌で組換え発現させ、得られたLinTタンパク質のRNA分解活性を調べたところ、LinTはリボヌクレアーゼ活性を有することが明らかとなった。LinAはLinTのリボヌクレアーゼ活性を濃度依存的に阻害したことから、LinAはLinTのアンチトキシンとして作用することが示された。さらに、LinTを発現する組換え大腸菌は細胞増殖が強力に抑制されたが、LinTとLinAを共発現させると、LinTの細胞毒性が中和され、細胞増殖が回復した。以上のことから、LinT及びLinAは、バクテリオファージ由来の新規TAシステムであることが明らかとなった。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] バクテリオファージ由来であって、以下の (a) ~ (c) :

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 ないし数個のアミノ酸配列が置換及び／又は欠失及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列を含み、リボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質。

[2] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる、[1] に記載のタンパク質。

[3] [1] 又は [2] に記載のタンパク質をコードする核酸。

[4] バクテリオファージ由来であって、以下の (a) ~ (c) :

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 ないし数個のアミノ酸配列が置換及び／又は欠失及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列を含み、[1] 又は [2] に記載のタンパク質と結合してそのリボヌクレアーゼ活性を阻害するタンパク質。

[5] 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる、[4] に記載のタンパク質。

[6] [4] 又は [5] に記載のタンパク質をコードする核酸。

[7] [1] 又は [2] に記載のタンパク質と、[4] 又は [5] に記載のタンパク質とを組み合わせる、トキシノーアンチトキシン (TA) システム。

〔 8 〕 〔 3 〕 に記載の核酸と、 〔 6 〕 に記載の核酸とを組み合わせる、 T Aシステム。

〔 9 〕 基質RNAを 〔 1 〕 又は 〔 2 〕 に記載のタンパク質に接触させることを含む、該RNAの分解方法。

〔 1 0 〕 細胞に 〔 1 〕 又は 〔 2 〕 に記載のタンパク質、あるいは 〔 3 〕 に記載の核酸を接触させることを含む、該細胞の増殖抑制方法。

〔 1 1 〕 細胞に 〔 7 〕 又は 〔 8 〕 に記載のTAシステムを接触させることを含む、該細胞の制御方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、バクテリオファージ由来の新規なTAシステムが提供される。当該TAシステムは、トキシンのリボヌクレアーゼとしての利用、アンチトキシンのその阻害剤としての利用や、両タンパク質又はそれらをコードする核酸による細胞の増殖抑制・増殖制御等に利用することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明のファージ由来TAシステム (LinT/LinA) と *Brucella abortus* 由来のTAシステム (BrnT/BrnA) とのアラインメントを示す図である。BrnTの活性に必須となるアミノ酸残基5つが、LinTにおいても全て保存されていた (矢印)。

[図2]LinTの宿主細菌由来RNAの分解活性及びLinAのLinT中和活性を示す図である。

[図3]大腸菌でLinTを発現させると菌体増殖 (A) 及びコロニー形成能 (B) が抑制され、LinAを共発現させるとそれらが回復することを示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 1. 本発明のトキシノーアンチトキシン (TA) システム

本発明は、バクテリオファージ由来の新規TAシステム (以下、「本発明のTAシステム」ともいう) を提供する。本発明のTAシステムはII型のTAシステムに属する。即ち、アンチトキシンはタンパク質であり、トキシンタンパク質に直接結合して複合体を形成することにより、トキシンの毒性を中和する。

[0012] より具体的には、本発明のTAシステムは、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含み、リボヌクレアーゼ活性を有するトキシタンパク質（以下、「本発明のトキシン」ともいう）と、

(2) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含み、上記トキシタンパク質と結合してそのリボヌクレアーゼ活性を阻害するタンパク質（以下、「本発明のアンチトキシン」ともいう）

とからなる。

[0013] 1-1. 本発明のトキシン

本発明のトキシンは、バクテリオファージ由来であって、(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列、もしくは(a)のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、且つリボヌクレアーゼ活性を有する。

ここで「配列番号2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列」とは、

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸配列が置換及び／又は欠失及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列、あるいは

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を意味する。

また、「バクテリオファージ由来」であるとは、実際に、バクテリオファージのゲノムから単離された遺伝子にコードされたアミノ酸配列を有するだけでなく、当該アミノ酸配列から派生し、上記(b)又は(c)の条件を満たすアミノ酸配列を含み、且つリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であれば、天然のバクテリオファージから単離されたものでないものをも包含する意味で用いられる。

[0014] 上記(b)のアミノ酸配列として、例えば、(i) 配列番号2で表されるア

ミノ酸配列中の1～数（2、3、4もしくは5）個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、（ii）配列番号2で表されるアミノ酸配列中の1～数（2、3、4もしくは5）個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（iii）配列番号2で表されるアミノ酸配列に1～数（2、3、4もしくは5）個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、（iv）配列番号2で表されるアミノ酸配列に1～数（2、3、4もしくは5）個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列が挙げられる。他のアミノ酸で置換される場合、物理化学的性質が類似したアミノ酸（「類似アミノ酸」）、例えば、芳香族アミノ酸（Phe、Trp、Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala、Leu、Ile、Val）、極性アミノ酸（Gln、Asn）、塩基性アミノ酸（Lys、Arg、His）、酸性アミノ酸（Glu、Asp）、水酸基を有するアミノ酸（Ser、Thr）、側鎖の小さいアミノ酸（Gly、Ala、Ser、Thr、Met）などの同じグループに分類されるアミノ酸に置換されることが好ましい。このような類似アミノ酸による置換は蛋白質の表現型に変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている（例えば、Bowieら、Science, 247: 1306-1310（1990）を参照）。

また、上記のようにアミノ酸配列が置換、欠失又は挿入されている場合、その置換、欠失又は挿入の位置は、リボヌクレアーゼ活性が保持される限り、特に限定されない。

[0015] 上記（c）において、「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである

）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸残基の割合（％）を意味する。本明細書におけるアミノ酸配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST（National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool）を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

[0016] 上記（c）において、配列番号2で表されるアミノ酸配列との同一性は、好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上である。

[0017] 上記（b）又は（c）のアミノ酸配列を含む本発明のトキシンは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有する。ここで「活性」とは、リボヌクレアーゼ活性をいう。また、「実質的に同質」とは、例えば生理学的に、あるいは薬理学的にみて、その性質が定性的に同じであることを意味する。したがって、リボヌクレアーゼ活性が同等であることが好ましいが、活性の程度（例、0.5～2倍）は異なってもよい。リボヌクレアーゼ活性は、例えば、基質RNAと本発明のトキシンとを接触させ、反応させた後、反応液をゲル電気泳動して、バンドパターンを分析することにより測定することができる。本発明のトキシンの基質となるRNAは特に限定されず、任意のRNAを分解可能である。

[0018] 好ましい一実施態様において、本発明のトキシンは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。

[0019] 1－2. 本発明のアンチトキシン

本発明のアンチトキシンは、バクテリオファージ由来であって、

（a）配列番号4で表されるアミノ酸配列、もしくは（a）のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、且つ本発明のトキシンのリボヌクレアーゼ活性を中和する活性を有する。

ここで「配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列」とは、

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸配列が置換及び／又は欠失及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列、あるいは

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を意味する。

また、「バクテリオファージ由来」であるとは、上記本発明のトキシンの場合と同義である。

[0020] 上記(b)のアミノ酸配列として、例えば、(i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列中の1～数(2、3、4もしくは5)個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(ii) 配列番号4で表されるアミノ酸配列中の1～数(2、3、4もしくは5)個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(iii) 配列番号4で表されるアミノ酸配列に1～数(2、3、4もしくは5)個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号4で表されるアミノ酸配列に1～数(2、3、4もしくは5)個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、さらに好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列が挙げられる。他のアミノ酸で置換される場合、上述のように、類似アミノ酸による置換が好ましい。

また、上記のようにアミノ酸配列が置換、欠失又は挿入されている場合、その置換、欠失又は挿入の位置は、本発明のトキシンのリボヌクレアーゼ活性を中和する活性が保持される限り、特に限定されない。

[0021] 上記(c)において、「同一性」とは、上記本発明のトキシンの場合と同義である。配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は、好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上である。

[0022] 上記（b）又は（c）のアミノ酸配列を含む本発明のアンチトキシンは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有する。ここで「活性」とは、本発明のトキシンのリボヌクレアーゼ活性を中和する活性をいう。また、「実質的に同質」とは、例えば生理学的に、あるいは薬理学的にみて、その性質が定性的に同じであることを意味する。したがって、中和活性は同等であることが好ましいが、活性の程度（例、0.5～2倍）は異なってもよい。当該中和活性は、例えば、基質RNAと本発明のトキシン及び本発明のアンチトキシンとを接触させ、反応させた後、反応液をゲル電気泳動して、バンドパターンを分析することにより測定することができる。

[0023] 好ましい一実施態様において、本発明のアンチトキシンは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。

[0024] 好ましい一実施態様において、本発明のTAシステムは、*Fusimonas intestini* AJ110941株（受託番号FERM BP-11443として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）〔現独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）〕にブダペスト条約に基づき国際寄託されている（受託日：平成23年11月30日））の培養液から分離された、同菌株を宿主とするバクテリオファージLSP1株のゲノムにコードされる、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるトキシンと、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるアンチトキシンとを組み合わせるTAシステムである。

[0025] 本発明のトキシン及び本発明のアンチトキシン（以下、包括的に「本発明のタンパク質」ともいう）は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基；例えば、シクロペンチル、

シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基；例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基； α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているものなども含まれる。

[0026] 本発明のタンパク質は、フリー体であっても塩の形態であってもよい。本発明のタンパク質の塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

[0027] 本発明のタンパク質は、それらを産生するバクテリオファージ（例、バクテリオファージLSP1株）から自体公知のタンパク質の精製方法によっても製造することができる。また、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

好ましい一実施態様において、本発明のタンパク質は、それらをコードす

る核酸を含む形質転換体を培養し、得られる培養物から分離精製することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードする核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。本発明のタンパク質をコードするDNAは、例えば、それらを産生するバクテリオファージ（例、バクテリオファージLSP1株）より調製したゲノムDNA画分及び全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法及びReverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) 法によって直接増幅することができる。

[0028] 1-3. 本発明のトキシンをコードする核酸

本発明のトキシンをコードする核酸としては、例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含有するDNA、または配列番号1で表されるヌクレオチド配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含有し、前記したリボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAなどが挙げられる。

配列番号1で表されるヌクレオチド配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号1で表される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、いっそう好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含むDNAなどが用いられる。

本明細書におけるヌクレオチド配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=0N；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。

[0029] ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、スト

リンジエントな条件に従って行なうことができる。

ハイスโตรリンジエントな条件としては、例えば、ナトリウム塩濃度が約19～約40mM、好ましくは約19～約20mMで、温度が約50～約70℃、好ましくは約60～約65℃の条件等が挙げられる。特に、ナトリウム塩濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が好ましい。

[0030] 好ましい一実施態様において、本発明のトキシンをコードする核酸は、配列番号1で表されるヌクレオチド酸配列からなる核酸である。

[0031] 1-4. 本発明のアンチトキシンをコードする核酸

本発明のアンチトキシンをコードする核酸としては、例えば、配列番号3で表されるヌクレオチド配列を含有するDNA、または配列番号3で表されるヌクレオチド配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含有し、本発明のトキシンのリボヌクレアーゼ活性を中和する活性を有するタンパク質をコードするDNAなどが挙げられる。

配列番号3で表されるヌクレオチド配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号3で表される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、いっそう好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含むDNAなどが用いられる。ここで「同一性」とは、上記本発明のトキシンをコードする核酸の場合と同義である。

[0032] 好ましい一実施態様において、本発明のアンチトキシンをコードする核酸は、配列番号3で表されるヌクレオチド酸配列からなる核酸である。

[0033] 好ましい一実施態様において、本発明のTAシステムは、*Fusimonas intestini* AJ110941株の培養液から分離された、同菌株を宿主とするバクテリオファージLSP1株のゲノムDNAに含まれる、配列番号1で表されるヌクレオチド配列からなるトキシンをコードするDNAと、配列番号3で表されるヌクレオチド配列からなるアンチトキシンをコードするDNAとを組み合わせるTAシステムである。

[0034] 本発明のトキシンをコードするDNA及び本発明のアンチトキシンをコードす

るDNA（以下、包括的に「本発明のタンパク質をコードするDNA」ともいう）は、それらのタンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、該タンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）第2版（前述）に記載の方法などに従って行なうことができる。

バクテリオファージLSP1株のゲノムDNAから本発明のタンパク質をコードするDNAをクローニングする場合、トキシンをコードするDNAとアンチトキシンをコードするDNAが一部オーバーラップしているので、各DNAを別個にPCR増幅してクローニングすることもできるし、両DNAがオーバーラップした状態で1つのDNA配列としてクローニングすることもできる。後者のDNAは、原核細胞に導入することにより、ジシストロニックに発現させることができる。

[0035] DNAのヌクレオチド配列は、公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。

[0036] 本発明のタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、該タンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）；枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）；酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）；昆虫細胞発現プラスミド（例：pFast-Bac）；動物細胞発現プラスミド（例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV

、pcDNAI/Neo) ; λ ファージなどのバクテリオファージ ; バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター (例 : BmNPV、AcNPV) ; レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、MoMuLV (モロニーマウス白血病ウイルス) LTR、HSV-TK (単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

[0037] 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点 (以下、SV40 oriと略称する場合がある) などを含むものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfrと略称する場合がある、メソトレキセート (MTX) 耐性)、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、neo^rと略称する場合がある、G418耐性) 等が挙げられる。特に、dhfr

遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によって目的遺伝子を選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、本発明のタンパク質をコードするDNAの5'末端側に付加してもよい。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが；宿主がバチルス属菌である場合、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが；宿主が酵母である場合、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合、インスリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

[0038] 本発明のトキシンをコードするDNAと、本発明のアンチトキシンをコードするDNAとは、別個の発現ベクター中に挿入されてもよいし、あるいは、単一の発現ベクター中に挿入されてもよい。両DNAが同一の発現ベクター中に挿入される場合、各DNAは別個のプロモーター（プロモーターの種類は同一でも異なってもよい）の制御下におかれてもよいし、単一のプロモーターの制御下におかれてもよい。単一のプロモーターの制御下におかれる場合、真核細胞内で本発明のトキシン及び本発明のアンチトキシンを機能的に発現させるために、両DNAをジストロニックな発現を可能にする配列（例、IRES、2A配列）を介して連結することができる。

[0039] 上記した本発明のタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、本発明のタンパク質を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞、植物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. US

A) , 60巻, 160 (1968)) , エシェリヒア・コリJM103 [ヌクレイック・アシ
ッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 9巻, 309 (1981)) , エシェリ
ヒア・コリJA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journ
al of Molecular Biology) , 120巻, 517 (1978)) , エシェリヒア・コリHB10
1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)) ,
エシェリヒア・コリC600 [ジェネティックス (Genetics) , 39巻, 440 (1954
)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtil*
is) MI114 [ジーン (Gene), 24巻, 255 (1983)) , バチルス・サブチルス207
-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)
, 95巻, 87 (1984)) などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces c*
erevisiae) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセ
ス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パ
ストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

[0040] 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株
化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; Sf細胞) 、 *Trichoplusia ni*の中腸由
来のMG1細胞、 *Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five™細胞、 *Mamestra brassi*
*cae*由来の細胞、 *Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがB
mNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞 ; BmN
細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL17
11) 、 Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213
-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチ
ャー (Nature) , 315巻, 592 (1985)] 。

[0041] 動物細胞としては、例えば、サルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズ
ハムスター卵巣細胞 (以下、CHO細胞と略記) 、 dhfr遺伝子欠損CHO細胞 (以
下、CHO(dhfr-)細胞と略記) 、 マウスL細胞、 マウスAtT-20細胞、 マウスミエ

ローマ細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞などが用いられる。

[0042] 植物細胞としては、種々の植物（例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ等の穀物、トマト、キュウリ、ナス等の商品作物、カーネーション、トルコギキョウ等の園芸植物、タバコ、シロイヌナズナ等の実験植物など）から調製した懸濁培養細胞、カルス、プロトプラスト、葉切片、根切片などが用いられる。

[0043] 形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って形質転換することができる。

植物細胞は、プロトプラストに対するエレクトロポレーション法やマイクロインジェクション法、無傷細胞に対するアグロバクテリウム法や植物ウイ

ルスベクター法、パーティグルガン法により形質転換することができる。

[0044] 形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15～約43℃で、約3～約24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30～約40℃で、約6～約24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K.L. ら, プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.

5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G.A. ら, プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約35℃で、約24～約72時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium〔Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195巻, 788 (1962)] に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～約6.4である。培養は、通常約27℃で、約3～約5日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5～約20%の胎児ウシ血清を含む最小必須培地 (MEM)〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199巻, 519 (1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、通常約30℃～約40℃で、約15～約60時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が植物細胞である形質転換体を培養する培地としては、MS培地、LS培地、B5培地などが用いられる。培地のpHは好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約30℃で行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外に本発明のタンパク

質を製造せしめることができる。

[0045] 前記形質転換体を培養して得られる培養物から本発明のタンパク質を自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞の細胞質から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により可溶性蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤を含んでいてもよい。また、本発明のタンパク質が菌体（細胞）外に分泌される場合には、培養物から遠心分離またはろ過等により培養上清を分取するなどの方法が用いられる。

このようにして得られた菌体（細胞）抽出液あるいは培養上清中に含まれる本発明のタンパク質の単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

[0046] かくして得られるタンパク質が遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって、該遊離体を塩に変換することができ、タンパク質が塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

かくして得られる本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

[0047] さらに、本発明のタンパク質は、上記の本発明のタンパク質をコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、本発明のタンパク質をコードするDNAを鋳型としても合成することができる。

[0048] 一方、本発明のトキシンをコードするDNA及び／又は本発明のアンチトキシンをコードするDNAを含む発現ベクターは、目的の宿主細胞に導入することにより、後述する細胞の増殖抑制及び増殖制御、さらには、それらを応用した種々の目的に使用することができる。

[0049] 2. 本発明のTAシステムの利用

2-1. RNAの分解及びその阻害

本発明のトキシンは、リボヌクレアーゼ活性を有するので、基質RNAを本発明のトキシンに接触させることにより、該RNAを分解することができる。従って、本発明のトキシンは、新規なりボヌクレアーゼとして、研究用試薬等の種々の用途に利用することができる。本発明のトキシンの基質となり得るRNAは、特に限定されず、任意のリボヌクレオチドであり得る。本発明のトキシンは、少なくとも37℃付近の温度、中性付近のpHで酵素活性を発揮し得る。

一方、本発明のアンチトキシンは、本発明のトキシンのリボヌクレアーゼ活性を阻害することができるので、該リボヌクレアーゼの特異的な阻害剤として、研究用試薬等の種々の用途に利用することができる。

[0050] 2-2. 細胞の増殖抑制

本発明のトキシンは、そのリボヌクレアーゼ活性による細胞毒性のために、細胞に接触させることにより、該細胞の増殖を抑制することができる。ここで、細胞としては、大腸菌や枯草菌等の原核細胞、酵母、昆虫、植物、動物等の真核細胞など、任意の細胞を挙げることができる。本発明のトキシンをタンパク質の形態で使用する場合、該タンパク質と細胞との接触は、例えば、該細胞の培地に本発明のトキシンを添加することにより実施することが

できる。一方、本発明のトキシンを、それをコードする核酸の形態で使用する場合、自体公知の形質転換法を用いて、目的の細胞に該核酸を導入し、発現させることにより実施することができる。

[0051] 2－3．細胞の増殖制御

本発明のアンチトキシンは、本発明のトキシンのリボヌクレアーゼ活性を阻害することにより、その細胞毒性を中和することができるので、本発明のトキシンと組み合わせて用いることにより、細胞の増殖を制御することができる。例えば、本発明のトキシンと本発明のアンチトキシンとを、細胞の培地に添加して培養することにより、細胞の増殖を部分的に抑制することができる。別の好ましい態様として、本発明のトキシンをコードする核酸と本発明のアンチトキシンをコードする核酸とを細胞に導入し、例えば、両タンパク質を発現させるか、アンチトキシンのみを発現させることで、細胞を増殖させた後、トキシンを発現させ、かつアンチトキシンの発現を抑制することにより、細胞の増殖を停止させることができる。そのような発現調節は、例えば、アンチトキシンをコードするDNAを誘導プロモーター（例、薬剤応答性プロモーター）の制御下においた発現ベクターで形質転換し、誘導物質の添加／除去によりその発現を制御することにより行うことができる。トキシンをコードするDNAは構成プロモーター又は別の誘導プロモーターの制御下におくことができる。好ましい一実施態様においては、トキシンをコードするDNAがTet-onプロモーターの制御下におかれた発現ベクターと、アンチトキシンをコードするDNAがTet-offプロモーターの制御下におかれた発現ベクターとを細胞に導入し、ドキシサイクリンの非存在下で培養して細胞を増殖させた後、ドキシサイクリンを添加して培養することで細胞の増殖を停止させることができる。

あるいは、各タンパク質の発現制御は、それをコードする核酸の発現を抑制する物質を細胞に導入することによって行われてもよい。例えば、各核酸に対するアンチセンス核酸、siRNA/shRNA等を挙げることができる。

あるいは、例えば、本発明のアンチトキシンに結合して、本発明のトキシ

ンとの結合を阻害する物質を用いて、アンチトキシンの中和活性を阻害することで、トキシンの細胞毒性を強力に発現させることもできる。そのような物質としては、アンチトキシンに対する抗体やそのフラグメント、アンチトキシンに対するアプタマー等を挙げることができる。

[0052] また、本発明のTAシステムは、従来公知の細菌等由来のTAシステムと同様に、バイオテクノロジー・分子生物学のためのツールとして、あるいは、がんや感染症に対する遺伝子治療のツールとして等、種々の用途に利用することができる（例えば、Mobile Genetic Elements, 3:5, e26219 (2013); Afr. J. Biotechnol., 13(1), 11-17 (2013); Toxins, 8, 49 (2016)等を参照）。例えば、線状化したベクターへのDNA断片の低頻度の挿入というDNAクローニングにおける課題に対して、本発明のトキシンをコードする核酸を含む発現ベクターを用い、該核酸の内部で切断し得る制限酵素で該発現ベクターを消化し、クローン化しようとするDNA断片とライゲーションした後、適当な宿主細胞にトランスフェクトして培養することにより、該DNA断片が挿入されたベクターを含む宿主細胞のみを増殖させることができる。あるいは、本発明のトキシンをコードする核酸を含む発現ベクターを宿主細胞のゲノムに挿入し、本発明のアンチトキシンをコードする核酸の一部を含む発現ベクターと、該核酸の残りの部分を融合させた目的のDNA断片とをライゲーションし、前記宿主細胞にトランスフェクトすることにより、目的のDNA断片が正しい方向で挿入されたベクターを含む宿主細胞のみを増殖させることができる。この場合、導入したプラスミドが脱落した細胞はゲノムからのトキシンの発現により増殖が抑制されるので、抗生物質等の使用を避けることができる。また、Gateway™システムを利用する場合に、発現ベクター側のattPサイトの間に本発明のトキシンをコードする核酸を挿入し、attBサイト間に挿入されたクローン化しようとするDNA断片との相同組換えにより、該DNA断片が組み込まれたベクターを含む宿主細胞のみを増殖させることができる。

あるいは、宿主細胞で異種タンパク質を大量に組換え生産する手法として、例えば、Tet-offプロモーターの制御下にある本発明のトキシンをコードす

る核酸で宿主細胞をトランスフェクトして、ドキシサイクリンの存在下で正常に増殖し、非存在下で十分に増殖が抑制される形質転換細胞を選択し、目的タンパク質をコードする核酸と本発明のアンチトキシンをコードする核酸とを単一のプロモーターの制御下にジストロニックに発現可能な形態で含む発現ベクターを用いて該形質転換細胞をトランスフェクトし、ドキシサイクリンの存在下で培養して正常に増殖する細胞を選択することにより、目的タンパク質を高発現し得る位置に該発現ベクターが組み込まれた細胞を選択することができる。

[0053] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

[0054] 実施例1 バクテリオファージLSP1由来Toxin-Antitoxinシステムのin silico解析

バクテリオファージLSP1由来のToxin (LinT) タンパク質は、アミノ酸配列（配列番号2）レベルでBrucella abortus由来のリボヌクレアーゼBrnT (Heaton, B.E. et al., Journal of Biological Chemistry, 287(15), 12098-12110 (2012)) に26%の相同性を示した。アミノ酸配列のアライメントの結果、BrnTの活性に必須となるアミノ酸残基5つが、LinTにおいても全て保存されていた（図1）。一方で、バクテリオファージLSP1由来のAntitoxin (LinA) タンパク質は、アミノ酸配列（配列番号4）レベルでBrucella abortus由来のBrnA (BrnTのAntitoxin) に32%の相同性を示した（図1）。

[0055] 配列番号1：

MEYISFEWDENKNKINKAKHGIDFEEAATVFYDDDAIMFDDPEHSMEEERFLILGITKHENLCIVSHCY
RGDDNIIRIISARKATKSEIKTYNRYVGGEINERGV

配列番号2：

MKEEYDIESLNPRKNPYVKRLKKQITINIDNDTVDFFKVQSEESGIPYQTLINLYLSDCAKNKKKLQMS
WK

[0056] 以上の解析結果から、LinA-LinTは新規なToxin-Antitoxinシステムである可能性が示唆されたため、各遺伝子のクローニングおよび大腸菌を宿主とした遺伝子発現系を構築し、組換え酵素の生化学的な特徴づけを実施した。

[0057] 実施例2 バクテリオファージLSP1由来ToxinおよびAntitoxinの高発現プラスミドベクターの構築

LSP1ファージゲノムのlinT、linAおよびlinT-linAの各遺伝子領域をPCR増幅し（プライマー配列は下記参照）、pET28-b（ノバジェン社製）遺伝子発現用プラスミドベクターのマルチクローニングサイトに挿入した組換えプラスミド、pET-LinT28、pET-LinA28およびpET-LinTA28を作製した。ヒートショック法により構築した各プラスミドでEscherichia coli DH5αコンピテントセル（GMBiolab社製）を形質転換した。E. coli形質転換体はコロニーPCRにより選抜し、10mLのLB培地に植菌後37℃にて12時間振盪培養した。各培養液からQIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN社製）を用いて各プラスミドDNAを精製した。精製した各プラスミドDNAの濃度と純度は分光光度計を用いた測定により算出した。

[0058] linT遺伝子増幅プライマー

Forward: 5' -GGAATTCCATATGGAATATATAAGTTTTGAATGGGACG-3' （下線部はNdeI制限酵素サイト）（配列番号5）

Reverse: 5' -CCGGAATTCTACTCCTCTTTCATTGATTTACCTC-3' （下線部はEcoRI制限酵素サイト）（配列番号6）

linA遺伝子増幅プライマー

Forward: 5' -CATGCCATGGAAGAGGAGTATGATATTGAAAGTTTG-3' （下線部はNcoI制限酵素サイト）（配列番号7）

Reverse: 5' -CCGGAATTCCTTCCAAGACATCTGCAACTTCTT-3' （下線部はEcoRI制限酵素サイト）（配列番号8）

linT-linA遺伝子増幅プライマー

Forward: 5' -GGAATTCCATATGGAATATATAAGTTTTGAATGGGACG-3' （下線部はNdeI制限酵素サイト）（配列番号5）

Reverse: 5' -CCGGAATTCCTTCCAAGACATCTGCAACTTCTT-3' (下線部はEcoRI制限酵素サイト) (配列番号8)

[0059] 実施例3 組換えLinTおよびLinAの精製

取得したプラスミドpET-LinT28、pET-LinA28およびpET-LinTA28で*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysSコンピテントセル (BioDynamics Laboratory社製) を形質転換した。得られた形質転換体のシングルコロニーをカナマイシン含有LB培地に植菌し37℃で一晩培養した。各培養液を新たなLB培地に1%植菌し、OD₆₀₀の値が0.5付近になるまで37℃で振盪培養した。各培養液に終濃度100 μMのIPTGを添加し、20℃で18時間振盪培養した。この培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 10分, 4℃) により集菌し、Lysis buffer (50 mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl, 10%グリセロール) に懸濁後、超音波破碎を行った。回収した可溶性画分をHis-select Nickelレジン (Sigma-Aldrich社製) に吸着させWash buffer (50 mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl, 10%グリセロール, 40mM イミダゾール) で洗浄した。洗浄後のレジンをElution buffer (50 mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl, 10%グリセロール, 300mM イミダゾール) で溶出して精製LinAとLinTタンパク質、およびLinT-LinA複合タンパク質を獲得した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、LinTおよびLinAをそれぞれ単独で発現させた場合と比較して、LinT-LinAを共発現させた方がより純度の高いタンパク質のバンドが観察された。これはトキシンとアンチトキシンが通常では複合体を形成することで構造的に安定化しているためであると考えられる。

[0060] 実施例4 バクテリオファージLSP1由来Toxin-Antitoxinシステムのin vitro 解析

LinTのリボヌクレアーゼ活性の有無を確認するため、LSP1の宿主細菌である*Fusimonas intestini* AJ110941株 (FERM BP-11443) のRNAに対する分解活性を測定した。*F. intestini* AJ110941株のRNAはRNeasy Mini kit (QIAGEN社製) を用いて定法に倣って抽出した。

このRNAに精製したLinTを添加し、37℃で30分インキュベーション後に1%アガ

ロールゲルに注入し、100Vで30分間の電気泳動を実施した。電気泳動後のゲルを核酸染色試薬（富士フイルム和光純薬社製）で染色し観察した結果、LinTの添加によりRNAが強力に分解されていることが判明し、LinTはリボヌクレアーゼ活性を示すことが明らかになった（図2）。

次に、LinAがLinTのAntitoxinとして機能するかを明らかにするため、抽出したRNAに精製LinTおよびLinAを添加し、37℃で30分インキュベーションした後、アガロールゲル電気泳動を実施した。その結果、LinAの濃度依存的にLinTによるRNAの分解が抑制されることが判明し、LinAがLinTのAntitoxinとして機能することが明らかとなった（図2）。

[0061] 実施例5 バクテリオファージLSP1由来Toxin-Antitoxinシステムのin vivo 解析

取得したプラスミドpET-LinT28、pET-LinA28およびpET-LinTA28で*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysSコンピテントセル（BioDynamics Laboratory社製）を形質転換した。得られた形質転換体のシングルコロニーをカナマイシン含有LB培地に植菌し37℃で一晩培養した。各培養液を新たにカナマイシン含有LB培地に1%植菌し、OD₆₀₀の値が0.1付近になるまで37℃で振盪培養した。各培養液に終濃度100 μMのIsopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加後、37℃で振盪培養しながら30分ごとに濁度（OD₆₀₀値）を測定した。その結果、linA遺伝子を高発現する組換え*E. coli*はpET28bベクターのみを保持する対照区と同様の増殖を示すのに対して、linT遺伝子を高発現する組換え*E. coli*はLinTの細胞毒性により増殖が強力に抑制されることが判明した（図3A）。また、linT-linAを共発現させた系では、LinAがLinTのAntitoxinとして機能することで、LinTによる細胞毒性を有意に低下させることが判明した（図3A）。

同様に各培養時間におけるコロニー形成能を調べたところ、linA遺伝子を高発現する組換え*E. coli*はpET28bベクターのみを保持する対照区と同等のコロニー形成性能を有する一方で、linT遺伝子を高発現する組換え*E. coli*のコロニー形成性能は培養5時間後には全く無くなることが判明した（図3B）。これ

はLinTの細胞毒性により宿主E. coliの生育が強力に抑制されたためと考えられる。また、linT-linAを共発現した組換えE. coliでは、LinAがLinTのAntitoxinとして機能することで、LinTの細胞毒性を低下させ、コロニー形性能が一定数維持されることが判明した（図3B）。以上の結果から、バクテリオファージLSP1由来のLinT-LinAは確かにToxin-Antitoxinシステムとして機能することが明らかとなった。

[0062] 本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

産業上の利用可能性

[0063] 本発明のTAシステムにおけるトキシンはリボヌクレアーゼ活性を有するので、RNA分解用の試薬等に、該酵素活性を阻害するアンチトキシンは、その阻害剤として有用である。また、両タンパク質又はそれらをコードする核酸を用いて、細胞の増殖抑制・増殖制御等が可能となる。

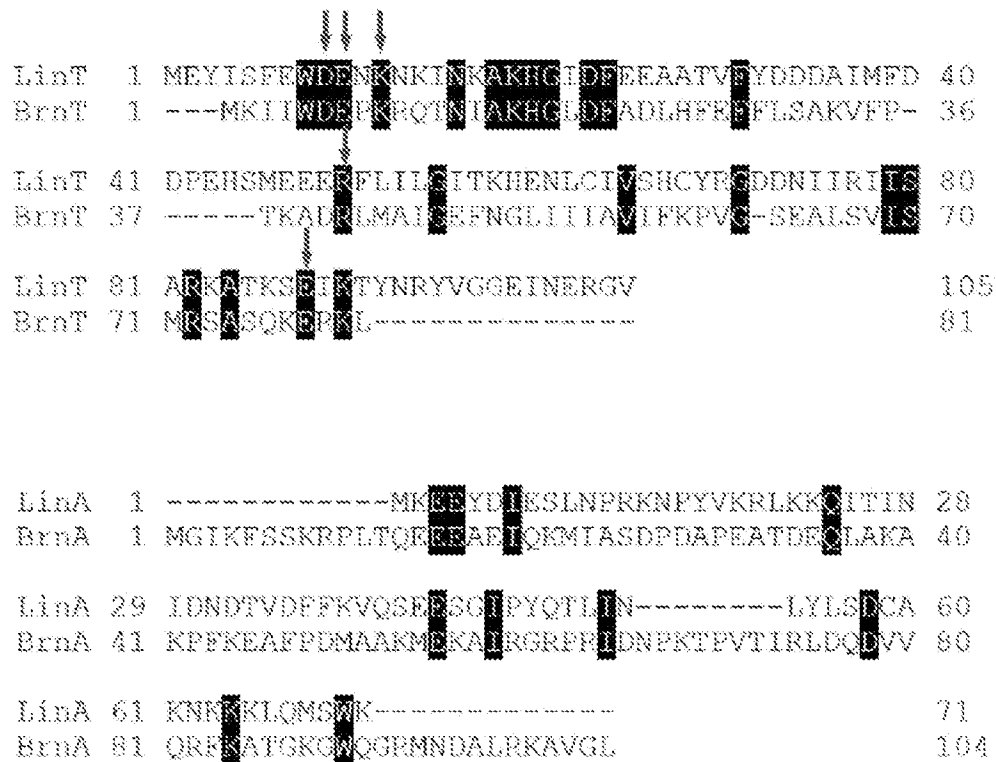
[0064] 本出願は、日本で出願された特願2021-009194（出願日：2021年1月22日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

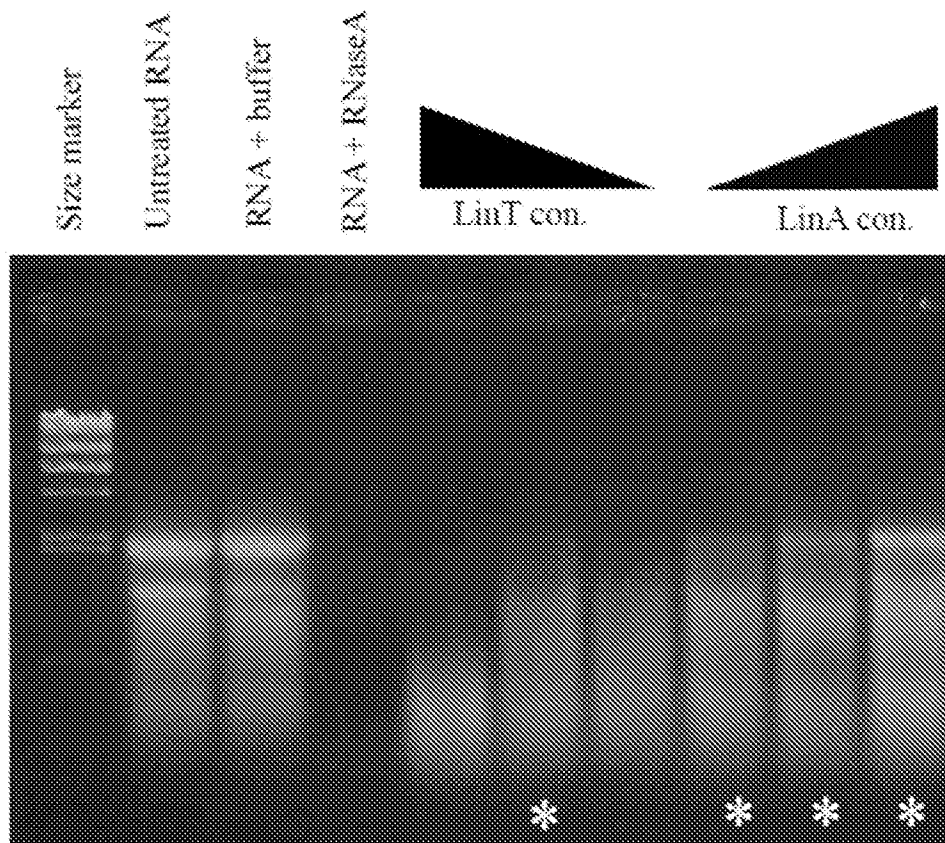
- [請求項1] バクテリオファージ由来であって、以下の（a）～（c）：
- （a）配列番号2で表されるアミノ酸配列
- （b）配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列
- （c）配列番号2で表されるアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列
- のいずれかのアミノ酸配列を含み、リボヌクレアーゼ活性を有するタンパク質。
- [請求項2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載のタンパク質。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載のタンパク質をコードする核酸。
- [請求項4] バクテリオファージ由来であって、以下の（a）～（c）：
- （a）配列番号4で表されるアミノ酸配列
- （b）配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列
- （c）配列番号4で表されるアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列
- のいずれかのアミノ酸配列を含み、請求項1又は2に記載のタンパク質と結合してそのリボヌクレアーゼ活性を阻害するタンパク質。
- [請求項5] 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる、請求項4に記載のタンパク質。
- [請求項6] 請求項4又は5に記載のタンパク質をコードする核酸。
- [請求項7] 請求項1又は2に記載のタンパク質と、請求項4又は5に記載のタンパク質とを組み合わせる、トキシン-アンチトキシン（TA）システム。

- [請求項8] 請求項3に記載の核酸と、請求項6に記載の核酸とを組み合わせる、TAシステム。
- [請求項9] 基質RNAを請求項1又は2に記載のタンパク質に接触させることを含む、該RNAの分解方法。
- [請求項10] 細胞に請求項1又は2に記載のタンパク質、あるいは請求項3に記載の核酸を接触させることを含む、該細胞の増殖抑制方法。
- [請求項11] 細胞に請求項7又は8に記載のTAシステムを接触させることを含む、該細胞の制御方法。

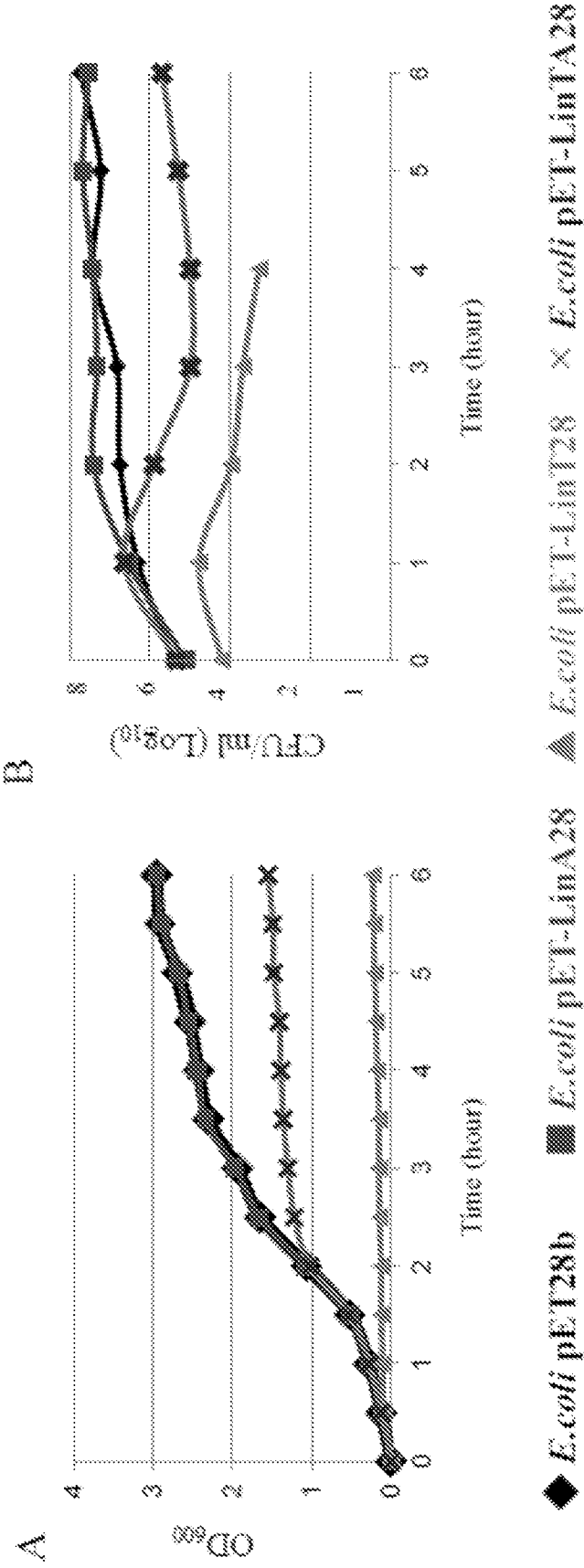
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/55</i> (2006.01)i; <i>C07K 14/005</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/22</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/11</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/33</i> (2006.01)i FI: C12N15/55 ZNA; C12N9/22; C07K14/005; C12N15/33; C12N15/11 Z; C12N1/00 A According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/55; C07K14/005; C12N1/00; C12N9/22; C12N15/11; C12N15/33 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); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>UniProtKB/TrEMBL [online]. Accession No. A0A358PKV4. entry version 6. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PKV4.txt?version=6. [retrieval date 01 April 2022]. 11 December 2019 SQ SEQUENCE</td> <td style="text-align: center;">1, 3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>SQ SEQUENCE</td> <td style="text-align: center;">1, 3, 7-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>SQ SEQUENCE</td> <td style="text-align: center;">2, 4-6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>UniProtKB/TrEMBL [online]. Accession No. A0A358PK07. entry version 6. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PK07.txt?version=6. [retrieval date 01 April 2022]. 11 December 2019 SQ SEQUENCE</td> <td style="text-align: center;">4, 6-8, 11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>SQ SEQUENCE</td> <td style="text-align: center;">1-3, 5, 9, 10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	UniProtKB/TrEMBL [online]. Accession No. A0A358PKV4. entry version 6. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PKV4.txt?version=6 . [retrieval date 01 April 2022]. 11 December 2019 SQ SEQUENCE	1, 3	Y	SQ SEQUENCE	1, 3, 7-11	A	SQ SEQUENCE	2, 4-6	Y	UniProtKB/TrEMBL [online]. Accession No. A0A358PK07. entry version 6. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PK07.txt?version=6 . [retrieval date 01 April 2022]. 11 December 2019 SQ SEQUENCE	4, 6-8, 11	A	SQ SEQUENCE	1-3, 5, 9, 10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	UniProtKB/TrEMBL [online]. Accession No. A0A358PKV4. entry version 6. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PKV4.txt?version=6 . [retrieval date 01 April 2022]. 11 December 2019 SQ SEQUENCE	1, 3																		
Y	SQ SEQUENCE	1, 3, 7-11																		
A	SQ SEQUENCE	2, 4-6																		
Y	UniProtKB/TrEMBL [online]. Accession No. A0A358PK07. entry version 6. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PK07.txt?version=6 . [retrieval date 01 April 2022]. 11 December 2019 SQ SEQUENCE	4, 6-8, 11																		
A	SQ SEQUENCE	1-3, 5, 9, 10																		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “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) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “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 “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 “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 “&” document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 01 April 2022		Date of mailing of the international search report 12 April 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.																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002101

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEATON, E. B. et al. Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of <i>Brucella abortus</i> . J. Biol. Chem. 06 April 2012, vol. 287, no. 15, pp. 12098-12110	1, 3, 4, 6-11
A	abstract, fig. 1, 2, p. 12099, right column, paragraph [0001]	
A	abstract, fig. 1, 2, p. 12099, right column, paragraph [0001]	2, 5
A	KUSADA, H. et al. <i>Fusimonas intestini</i> gen. nov., sp. nov., a novel intestinal bacterium of the family Lachnospiraceae associated with diabetes in mice. Sci. Rep. 22 December 2017, vol. 7, no. 1, 18087, pp. 1-9	1-11
	abstract, etc.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002101

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/55(2006.01)i; C07K 14/005(2006.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/33(2006.01)i FI: C12N15/55 ZNA; C12N9/22; C07K14/005; C12N15/33; C12N15/11 Z; C12N1/00 A																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/55; C07K14/005; C12N1/00; C12N9/22; C12N15/11; C12N15/33 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 <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> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq			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																			
C. 関連すると認められる文献 <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>UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. A0A358PKV4, entry version 6, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PKV4.txt?version=6, [検索日 2022.04.01], 2019.12.11 SQ SEQUENCE</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SQ SEQUENCE</td> <td>1, 3, 7-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SQ SEQUENCE</td> <td>2, 4-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. A0A358PK07, entry version 6, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PK07.txt?version=6, [検索日 2022.04.01], 2019.12.11 SQ SEQUENCE</td> <td>4, 6-8, 11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SQ SEQUENCE</td> <td>1-3, 5, 9, 10</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	UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. A0A358PKV4, entry version 6, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PKV4.txt?version=6 , [検索日 2022.04.01], 2019.12.11 SQ SEQUENCE	1, 3	Y	SQ SEQUENCE	1, 3, 7-11	A	SQ SEQUENCE	2, 4-6	Y	UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. A0A358PK07, entry version 6, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PK07.txt?version=6 , [検索日 2022.04.01], 2019.12.11 SQ SEQUENCE	4, 6-8, 11	A	SQ SEQUENCE	1-3, 5, 9, 10
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	UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. A0A358PKV4, entry version 6, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PKV4.txt?version=6 , [検索日 2022.04.01], 2019.12.11 SQ SEQUENCE	1, 3																		
Y	SQ SEQUENCE	1, 3, 7-11																		
A	SQ SEQUENCE	2, 4-6																		
Y	UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. A0A358PK07, entry version 6, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A358PK07.txt?version=6 , [検索日 2022.04.01], 2019.12.11 SQ SEQUENCE	4, 6-8, 11																		
A	SQ SEQUENCE	1-3, 5, 9, 10																		
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
* 引用文献のカテゴリー “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 “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 “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） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “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 “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 “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 “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 “&” 同一パテントファミリー文献																				
国際調査を完了した日 01.04.2022		国際調査報告の発送日 12.04.2022																		
名称及びあて先 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		権限のある職員（特許庁審査官） 小金井 悟 4B 3961 電話番号 03-3581-1101 内線 3488																		

C. 関連すると認められる文献		
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
Y	HEATON E. B. et al., Molecular structure and function of the novel BrnT/ BrnA toxin-antitoxin system of <i>Brucella abortus</i> , J. Biol. Chem., 2012.04.06, Vol.287, No.15, pp.12098-12110 要約、図1、図2、12099頁右欄1段落	1, 3, 4, 6-11
A	要約、図1、図2、12099頁右欄1段落	2, 5
A	KUSADA H. et al., <i>Fusimonas intestini</i> gen. nov., sp. nov., a novel intestinal bacterium of the family Lachnospiraceae associated with diabetes in mice, Sci. Rep., 2017.12.22, Vol.7, No.1, 18087, pp.1-9 要約等	1-11

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: