

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/104201 A1

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/12**, C07K 14/46, C12N 1/21, C12P 21/02, C09K 5/20, 3/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007105
- (22) 国際出願日: 2004 年 5 月 18 日 (18.05.2004)
- (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2003-142850 2003 年 5 月 21 日 (21.05.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政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一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西宮 佳志

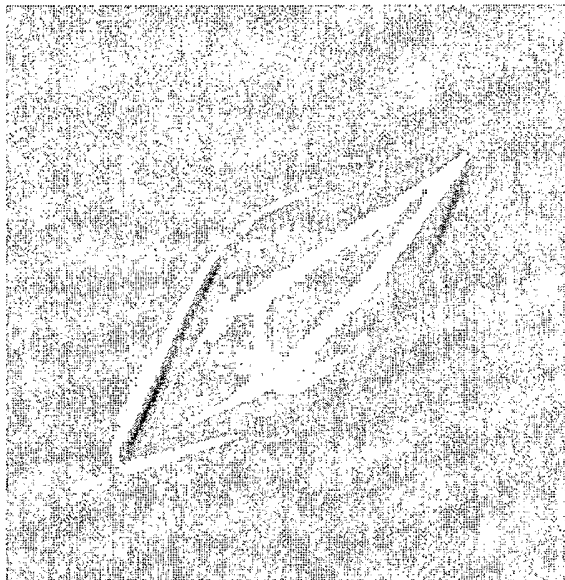
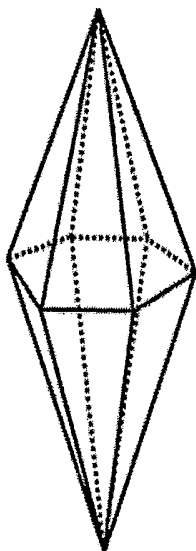
(NISHIMIYA, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 三浦 愛 (MIURA, Ai) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 津田 栄 (TSUDA, Sakae) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: ANTIFREEZING PROTEIN FOUND IN FISH

(54) 発明の名称: 魚類が有する不凍タンパク質



(57) Abstract: Eleven (11) types of antifreezing proteins obtained from junked fish Brachyopsis or Zoarces among fishes inhabited in the water area within Japan or seas close to Japan or in the water area of climate similar thereto; and their amino acid sequences and base sequences. There are further provided a process for mass production of such antifreezing proteins through genetic engineering technique using the thus obtained genes and provided a freeze concentration inhibitor or freezing-point depressant comprising these antifreezing proteins as an active ingredient.

[続葉有]



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

- (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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は、日本国内、日本近海水域、あるいは該水域と同等気候域の水域に生息する魚種のうち廃棄魚であるナガガジあるいはシチロウウオから得た11種の不凍タンパク質、それらのアミノ酸配列及び塩基配列である。さらに本発明は、得られる遺伝子を用いて遺伝子工学的手法により前記不凍タンパク質を多量に生産する方法、並びにこれら不凍タンパク質を有効成分とする凍結濃縮阻害剤或いは凝固点降下剤である。

明 細 書

魚類が有する不凍タンパク質

5 技術分野

本発明は、日本近海で捕獲される魚種であるナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner) またはシチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius)) の体液及びすり身から新たに調製して得られた不凍タンパク質に関するもので、さらに該タンパク質のアミノ酸配列、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを含む形質転換体等に関する。

背景技術

凍結温度域においては、水を含むあらゆる物質（含水物）の内部では、自然の法則に従い、水分子同士だけが結びついて氷塊を形成する。このとき水分子以外のあらゆる物質は氷塊形成に伴う物理的な圧迫を受け移動を強いられ、含水物中の氷塊以外の位置に追いやられてしまう（凍結濃縮と呼ばれる）。従って、凍結濃縮が起こった含水物を解凍すると、凍結前の内部構造、生理的活性、あるいは風味などが損なわれる。不凍機能を有するタンパク質、即ち不凍タンパク質 (Antifreeze protein) (AFP) は、含水物の凍結濃縮を強く抑制する能力を有し、また氷の再結晶阻害や熱ヒステリシスなどの特性を示す。このため、AFPの添加は冷凍食品などの品質を保持し凍結に伴う細胞や臓器の生理的活性の消失を妨げる効果があると考えられている。また、氷スラリーを使用する冷熱供給システムあるいは冷熱蓄熱等において、氷の再結晶による配管系の閉塞を解消し得る有効な添加剤としての利用も期待されている。これらの他にも食肉、野菜、加工食品、血液、細胞、卵子、精子、移植臓器などの冷凍保存耐性の向上にAFPを応用する試みがなされている。

しかし、現在までAFPが探索・同定された動物は、主として南極海や北極海周辺の極緯度地方あるいは寒帯域にのみ生息する魚種であった。温帯域である日本の近海で大量に漁獲される魚種についてAFPを探索、同定し、そのAFPを新たに利用することが望まれていた。特に、魚類由来のAFPの回収と精製に費

やすコストを低減する目的のために、廃棄魚が有する A F P の利用が強く望まれていた。

発明の開示

5 本発明は、このような従来の問題を解決しようとするものであり、日本近海等で大量に漁獲することができ、さらに廃棄の対象となっている魚種について、A F P を探索し、得られる A F P を精製し、或いは遺伝子発現、化学合成などの手法を用いて年間を通じて安定的に供給し、不凍能力を有する蛋白質あるいはペプチドを新たに提供するものである。

10 北海道の野付漁業協同組合においては野付湾内で捕獲される北海シマエビ等を中心にした産業振興に勤めているが、同湾内に生息するナガガジあるいはシチロウウオが北海シマエビを食い荒らしてしまうことが問題になっている。ナガガジあるいはシチロウウオは、底引き網を用いて行う漁の際に、北海シマエビと共に大量に網にかかり、分別されて廃棄魚用のカゴにまとめられ廃棄業者により廃棄
15 される。不凍タンパク質を有するワカサギなど他の魚種が 1 キログラム当たり 3 0 0 円～2, 0 0 0 円以上の原価で取引されるのに対して、ナガガジあるいはシチロウウオは原価が 0 円である。したがって、ナガガジあるいはシチロウウオは不凍タンパク質を回収し精製するための原材料としてこれを低価格に抑えるために最適な魚種であると言える。

20 かかる状況において、本発明者は、日本、あるいは日本周辺で大量に漁獲されかつ廃棄の対象となっている魚種であるナガガジまたはシチロウウオの組織液および筋肉をすりつぶした液中に存在する不凍タンパク質を見出し、そのアミノ酸配列と遺伝子配列を決定して、本発明を完成させるに至ったものである。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

25 (1) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質 Z-1

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

30 (2) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質 Z-2

- (a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 5 (3) 次の(a)または(b)で表される不凍タンパク質Z-3
- (a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 10 (4) 次の(a)または(b)で表される不凍タンパク質Z-4
- (a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 15 (5) 次の(a)または(b)で表される不凍タンパク質Z-5
- (a) 配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 20 (6) 次の(a)または(b)で表される不凍タンパク質Z-6
- (a) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号12で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 25 (7) 次の(a)または(b)で表される不凍タンパク質Z-7
- (a) 配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 30 (8) 次の(a)または(b)で表される不凍タンパク質Z-8

- (a) 配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 5 (9) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-9
- (a) 配列番号18で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号18で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 10 (10) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-10
- (a) 配列番号20で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号20で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 15 (11) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質B-1
- (a) 配列番号22で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号22で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 20 (12) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-1をコードするDNA
- (a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 25 (13) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-2をコードするDNA
- (a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 30 (14) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-3をコードするDNA

- (a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 5 (15) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-4をコードするDNA
- (a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 10 (16) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-5をコードするDNA
- (a) 配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 15 (17) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-6をコードするDNA
- (a) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号12で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 20 (18) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-7をコードするDNA
- (a) 配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 25 (19) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-8をコードするDNA
- (a) 配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 30 (20) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-9をコードするDNA

- (a) 配列番号18で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号18で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 5 (21) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-10をコードするDNA
- (a) 配列番号20で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号20で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 10 (22) 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質B-1をコードするDNA
- (a) 配列番号22で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (b) 配列番号22で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。
- 15 (23) 配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 又は21で表される塩基配列であって、それぞれ不凍タンパク質Z-1、Z-2、Z-3、Z-4、Z-5、Z-6、Z-7、Z-8、Z-9、Z-10 又はB-1をコードするDNA。
- (24) 上記 (12) ~ (23) のいずれか1 に記載のDNAを含む組換えベクター。
- (25) 組換えベクターが発現ベクターである (24) に記載の組換えベクター。
- 20 (26) 宿主生物を (25) に記載の組換えベクターによって形質転換した形質転換体。
- (27) 宿主生物が大腸菌である (26) に記載の形質転換体。
- (28) (27) に記載の形質転換体を培地中で培養して不凍機能を有するタンパク質を産生せしめ、該タンパク質を採取することを特徴とする不凍機能を有するタン
- 25 パク質の製造方法。
- (29) (1) ~ (11) のいずれか1 に記載のタンパク質をペプチド合成機により化学的に合成することを特徴とするタンパク質の製造方法。
- (30) (1) ~ (11) のいずれか1 に記載のタンパク質を有効成分として含むことを特徴とする凍結濃縮阻害剤。
- 30 (31) (1) ~ (11) のいずれか1 に記載のタンパク質を有効成分として含むことを

特徴とする凝固点降下剤。

(32) (1)～(11)に記載のタンパク質を含むことを特徴とする氷スラリー。

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

北極、南極あるいはその近海などの局地や深海に生息する魚類の体液は、温度
5 がマイナス2℃程度まで下がっても凍結しない。これに対して普通の魚の体液は
マイナス0.8℃で凍結する。なお、海水はマイナス1.9℃で凍結する。

北極、南極等に生息する魚類の体液の不凍性は、これら魚類が自ら生産する不
凍タンパク質あるいは不凍糖蛋白質（AFGP）に起因するものであることが明
らかになっている。このうち不凍タンパク質には、4つのタイプのタンパク質が
10 あり、それぞれ分子量約3,000～4,500のAFPI、分子量約20,000
のAFPII、分子量約7,000のAFPIII、および分子量約11,000のA
FP IVに分類されている。AFGPの分子量は2,200から33,000の間
である。不凍タンパク質は各々、タンパク質のアミノ酸組成およびその高次構造
において差異があり、また、同一タイプに分類されているものであっても、魚種
15 によりタンパク質のアミノ酸配列および高次構造はそれぞれ相違する（Garth L
Fletcher, Choy L Hew, and Peter L Davies(2001) "Antifreeze Proteins of
Teleost Fishes" Ann. Rev. Physiol. 63,359-390）。

一方、不凍タンパク質の機能について述べると、通常の場合、氷結晶は、水溶
液中において氷核が表れると、まず扁平な六角の板状に成長する。板状平面に対
20 し垂直方向への成長は、板状平面方向に対する成長に比べ100倍程度遅い。こ
れに対して、不凍蛋白質（AFP）が存在すると円盤平面方向への氷晶の成長は
阻止され、最初に形成された板状体を基底面として、この基底面に対し垂直方向
に、順次、より小さい板状体が積み重ねられていき、最終的にはピラミッドを二
つ重ねたバイピラミッド型の氷晶にゆつくりと成長していく。したがって、注目
25 する検体中にAFPが存在している場合に限り、検体液を0℃以下にした場合、
その検体液中には一般にバイピラミッド型氷結晶、結晶学的には六方偏四角面体
（図1の左図）あるいは六方両錘体（図2の左図）とよばれる氷の単結晶が、顕
微鏡下に観測される。AFPが存在する結果、氷結晶上の12枚の氷層平面に特異
的な結合が起こり、このようなバイピラミッド型氷結晶が生成する。このことが、
30 巨視的には、検体の非凍結現象（不凍活性）として観測される。この現象は、浸

透圧計（オスモメーター）を用いることにより検体液の凝固点降下あるいは温度ヒステリシスとして定量化することもできる。凝固点降下の測定法を用いて不凍活性を評価する為には、高純度のAFPの水溶液を得る必要がある。これに対しバイピラミダル氷結晶観測による不凍活性評価法は、AFPさえ存在していれば観測される（Choy L. Hew and Daniel S. C. Yang(1992) "Protein interaction with ice" Eur. J. Biochem. 203, 33-42）。

（１）本発明によるナガガジ又はシチロウウオの血液又はすり身から本発明の不凍タンパク質Z-1～Z-12の調製法

ナガガジ魚体１匹の頭部と内臓を取り除き、胴体部分をきり身にして０．１Ｍ重炭酸アンモニウム水溶液（pH＝７．９）を加え、ジューサーミキサーに入れて粉砕した。このナガガジすり身に対して０．１Ｍの重炭酸アンモニウム水溶液を加えてすり身の懸濁液を作製した。これを６，０００回転で３０分間遠心して上澄み液を得た。この上澄み液を５０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液（pH＝３．７）に対して透析した後にこれを１２，０００回転で３０分間遠心して沈殿物を取り除いた。得られた上澄み液に対して陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。この操作には５０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液（pH＝３．７）を用い溶出には０～０．５Ｍの塩化ナトリウム勾配を用いた。この操作で得られる２８０nmの吸収が観測される試料液を逆相クロマトグラフィー（HPLC）により精製した。カラムの平衡化と試料液の取り込みには０．１％のトリフルオロ酢酸を用い溶出にはアセトニトリルの直線勾配を用いた。これにより、ナガガジ由来不凍タンパク質を含む複数の溶出液フラクションを得た。得られた不凍タンパク質の活性確認をバイピラミダル氷結晶の観察により行い、純度の確認をSDS電気泳動により行った。得られた試料を凍結乾燥した後に冷凍保存した。

（２）上記（１）で調製した不凍タンパク質のアミノ酸配列の決定法

プロテインシーケンサーでスタンダードを解析し、HPLCによる分離の際の各アミノ酸に相当する溶出時間を決定した。上記（１）で調製した不凍タンパク質の凍結乾燥粉末を酢酸に溶解し、一般的なエドマン分解法を用いて、プロテインシーケンサーによりN末端側から順次解析を行った。具体的には、（i）フェニルイソチオシアナート（PITC）をタンパク質のN末端にカップリングしフェニルチオカルバミルタンパク質（PTC-タンパク質）を生成した。次に、

(ii) P T C - タンパク質からトリフルオロ酢酸で 2 - アニリノ - 5 - チアゾリ
ノン誘導体 (A T Z - アミノ酸) として N 末端アミノ酸を切り出す。この A T Z
- アミノ酸を酸性下でフェニルチオヒダントイン誘導体 (P T H - アミノ酸) に
転換した後に H P L C で分離し、その溶出時間を基にアミノ酸の種類を決定した。

5 N 末端アミノ酸を切り出された残りのタンパク質を原料として (i) と (ii) の
サイクルを繰り返すことで、アミノ酸配列を決定した。

得られたアミノ酸残基からなる蛋白質のアミノ酸配列において、1 もしくは複
数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたものであっても、不凍機能を有
する蛋白質は本発明に含まれる。

10 例えば、各配列番号で示されるアミノ酸配列の 1 ~ 7 個、好ましくは 1 ~ 5 個、さ
らに好ましくは 1 ~ 2 個のアミノ酸が欠失してもよく、又は各配列番号で表される
アミノ酸配列の 1 ~ 7 個、好ましくは 1 ~ 5 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 個のアミノ酸
が付加してもよく、または、各配列番号で表されるアミノ酸配列の 1 ~ 7 個、好ま
しくは 1 ~ 5 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されて
15 いてもよい。

(3) 上記で調製した不凍タンパク質の遺伝子のクローニング法及び塩基配列の
決定法

ナガガジの肝臓を不凍タンパク質の発現量が増大している厳寒期に生魚から採
取した。採取した肝臓を 5 mm 角に裁断して 1 0 倍量の R N A 安定化剤中に保存
20 した。安定化剤が浸透した肝臓サンプルを素早く低温ですりつぶし R N A を抽出
した。この R N A の溶液からオリゴ d T マトリックスを用いて m R N A を分離・
精製した。精製した m R N A を鋳型にオリゴ d T 配列を含むプライマーと逆転写
酵素で c D N A (1 s t s t r a n d) を合成し、続いて R N a s e H と D
N A p o l y m e r a s e I で c D N A (2 n d s t r a n d) を合成し
25 た。さらに P f u D N A P o l y m e r a s e で c D N A の両末端を平滑化
しアダプター配列を付加した。こうして構築した c D N A ライブラリーを鋳型に、
上記 (2) で決定したアミノ酸配列を元に設計したプライマー、オリゴ d T 配列
を含むプライマーを用いて P o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o
n (P C R) を行い、増幅した遺伝子断片を T A クローニングした。クローニン
30 グした遺伝子断片の配列はオリゴ d T 配列を含むプライマーを用い、D y e T e

r m i n a t o r 法により決定した。その際のサイクルシーケンスの条件は 96℃ 10秒、50℃ 5秒、60℃ 4分、 25サイクルであった。その結果、ナガガジ由来 cDNA ライブラリーの中でも優位な約 500bp 長の遺伝子断片群に不凍タンパク質をコードする塩基配列が含まれていることが示された。

- 5 この結果を基に、500bp の cDNA を鋳型に、付加したアダプター配列にアニールするプライマーとオリゴ dT 配列を含むプライマーを用いて約 500bp の遺伝子断片を増幅し、TA クローニングした。クローニングした遺伝子断片の配列は同様に Dye Terminator 法により決定した。

(4) 組換えベクターの調製法

- 10 増幅した遺伝子断片を 0.8% アガロースで電気泳動し、500bp 長の遺伝子断片を切り出し、精製した。TA クローニング用ベクター 50ng に対し精製した遺伝子断片を 20ng 加え、4℃で一晩 T4 DNA Ligase によりライゲーション反応を行った。

(5) 形質転換体の調製法

- 15 氷上で融解したコンピテントセル (DH5α) に組換えベクター溶液を加え、氷上に 30 分間静置した。これを 42℃で 1 分間熱処理し、すぐに氷上に移して 2 分間静置した。これに SOC 培地を加え、37℃で 30 分間インキュベートした。100μg/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地に広げ、37℃で一晩インキュベートしてコロニーを形成させた。形成された任意のコロニーを 100μg/ml アンピシリン含有 LB 液体培地に植菌し、37℃で一晩大腸菌を振とう培養した。増殖した大腸菌をアルカリ-SDS 法で破壊し、DNA 吸着マトリックス及びスピンカラムを用いて組換えベクターを分離・精製した。

(6) 形質転換体を使用して不凍タンパク質を製造する方法

- 25 プロモーター、ターミネーター配列等を含む組換え体発現用ベクターに不凍タンパク質をコードする塩基配列を組み込み、この組換えベクターによる形質転換体を 100μg/ml アンピシリン含有 LB 液体培地 10ml で前培養した。この培養液 10ml を 100μg/ml アンピシリン含有 LB 液体培地 1000ml に加え、さらに培養を続けた。培養の温度として 28℃を設定した。培養液の濁度 (O.D. = 600) が 0.5 まで増加した時点でタンパク質の発現誘導物質を
30 添加した。発現誘導後一晩で培養液を回収し、(1)内に記述した陽イオン交換ク

ロマトグラフィーによる方法を用いて不凍蛋白質を精製した。

(7) 不凍タンパク質を凍結濃縮阻害剤及び凝固点降下剤として使用する方法

含水物の凍結濃縮阻害剤又は凝固点降下剤としてA F Pを使用する際には、A F Pを、含水物中のA F Pの濃度が、含水物の質量に対して0.02重量%濃度
5 以上となる量を添加する。特に、0.03重量%濃度から0.05重量%濃度の範囲内であるときにA F Pは最大の効果を発揮する。このとき、例えば含水物が液体（水溶液、血液など）である場合には、A F Pの粉末又は水溶液をそのまま混合すれば良い。また、含水物が細胞、組織である場合には、注射器などを用いてA F Pの水溶液を含水物内部に注入しても良い。また、含水物をA F Pの水溶液
10 に浸した後に50～2,000 kg/cm²に加圧する等の手段により、含水物内部にA F Pを浸透させても良い。

本発明の不凍タンパク質は、前述したように、不凍タンパク質には含水物の凍結濃縮を妨げるはたらきや氷の再結晶化を妨げるはたらきがあるため、上記各魚種から得られた不凍タンパク質がA F P I～I Vのどのタイプの不凍タンパク質
15 に分類されるか否かに関わらず、含水物の凍結濃縮阻害剤ないしは氷の再結晶化防止剤として使用でき、例えば冷凍食品あるいは食肉などに混入することによりその品質を持続させるために使用できる。また、この品質維持効果は、細胞（卵子や精子）、組織、臓器、野菜などを長期凍結保存する際にも同様に期待できる。さらに、近年、エネルギー密度が大きい氷スラリーを熱媒体として使用する冷熱
20 供給システムあるいは冷熱蓄熱等が提案されているが、これらにおいては、氷の再結晶による配管系の閉塞の問題があり、本発明の不凍タンパク質は氷の再結晶化を有効に防ぐものであるから、この問題を解決するために有望な手段となりうる。このほか不凍蛋白質をコードする遺伝子を植物体に組み込むことにより、その植物に耐寒性を持たせることも応用技術として期待できる。

25

図面の簡単な説明

図1は、バイピラミッド型氷結晶の形状を示す模式図および写真である。この図において左は六方両錘体の模式図を、右はナガガジの血液に観測された六方両錘体の氷結晶の写真を示す。

30 図2は、バイピラミッド型氷結晶の形状を示す模式図および写真である。この

図において、左は六方偏四角面体の模式図を右はシチロウウオの血液に観測された六方偏四角面体の氷結晶の写真を示す。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2003-142850号の明細書に記載
5 された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれにより限定されるものでは
10 ない。

(実施例1)

(1) 検体試料

不凍タンパク質の採取源として使用した魚種は以下のとおりである。

ナガガジ(*Zoarces elongatus kner*、英名Notched-Fin eelpout)：北海道野付湾
15 で漁獲。

シチロウウオ(*Brachyopsis rostratus*、英名Longsnout poacher)：北海道野付湾
で漁獲。

(2) 不凍活性の観測

採取したナガガジとシチロウウオの血液それぞれ1 μ lをライカ社製DMLB100型
20 顕微鏡(Leica DMLB 100 photomicroscope)の直径16mmのカバーガラス上に滴下し
た。これをそのままもう1枚の直径12.5mmのカバーガラスによりはさみ、これを
DMLB100型顕微鏡のステージ部に設置した冷却箱内にセットした。冷却箱の上下
には直径1mmの光取り入れ穴をあけ、顕微鏡光源からの光は下側の穴から箱内を
通り上側の穴を抜けてレンズに入光させるようにした。この上下の穴により規定
25 される光軸上に検体液をセットすることで、光軸上にある検体液中の物質が顕微
鏡観察される。検体液がセットされた冷却箱の中の温度は、リンカム社製LK600
温度制御装置(LK600 温度コントローラー)により+/-0.1 $^{\circ}$ Cの誤差で制御さ
れる。室温下で検体液をセットした後、温度制御装置により冷却箱内の温度を毎
秒0.2 $^{\circ}$ Cでマイナス22 $^{\circ}$ Cまで下降させた。およそマイナス1.4 $^{\circ}$ Cからマイ
30 ナス40 $^{\circ}$ Cの間の温度のどこかで検体液の全体が凍結する。凍結の後に毎秒0.

1℃で冷却箱内温度を上昇させ零℃で上昇を停止し、そのまま1秒～10秒程度の間、零℃を維持していると凍結が溶け、無数のきれつの入った氷結晶状態を経たのちに、数えられる程度の氷の単結晶が水中に浮かんだものが観測された。その瞬間に、冷却箱内の温度をマイナス0.1℃～マイナス1.0℃程度に下降させて止め、氷結晶の形状を観察した。観察結果を図1に示す。試験に使用した魚種のいずれにおいてもバイピラミダル型の氷晶が観察され、これらの魚種は、いずれも不凍タンパク質を有することを確認した。また、魚肉すり身懸濁液1L、および乾物懸濁液1Lを用いて同様の試験を行ったが、これらの試験においても、すべての魚種について、バイピラミダル型の氷晶が観察された。

10 (3) ナガガジAFP-Z-1の調製及びアミノ酸配列決定

ナガガジの身を包丁で切断しミキサーを用いてすり身にした。このすり身20mlに対して20mlの0.1Mの重炭酸アンモニウム水溶液を加えることで、すり身の懸濁液40mlを調製した。これをプラスチック試験管に入れ、6,000回転で30分間遠心して、約20mlの上澄み液を得た。この上澄み液を、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH=3.7)に対して透析し、共雑タンパク質を凝集させた。これを12,000回転で30分間遠心して取り除き、上澄み液を得た。この上澄み液に対して陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、1mlずつの溶出液を280nmの吸収を検出しながらフラクションコレクターにより回収した。陽イオン交換クロマトグラフィーにはAmersham Pharmacia BiotechのFPLCシステムとBIO-RADのHigh-Sカラムを用いた。50mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH=3.7)を用いてカラムの平衡化と上澄み液の取り込みをおこない溶出は流速1ml/分で0～0.5Mの塩化ナトリウムの直線勾配をかけることで行った。ここまでの操作は全て4℃で行った。次に、280nmの吸収の観測された試料液をTOSOのHPLCシステムとODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィーにより精製した。0.1%のトリフルオロ酢酸を用いてカラムの平衡化と試料液の取り込みを行い、溶出にはアセトニトリルの直線勾配を用いた。溶出試料の吸光度は214nmと280nmで検出し、単一のタンパク質を含む溶出液フラクションを得た後にこれを凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を0.1Mの重炭酸アンモニウム水溶液に溶解し、そのバイピラミダル氷結晶の観測をおこなうことで不凍タンパク質であることを確認し、不凍タンパク質Z-1を得た。こうしてナガガジAFP-Z-1のサンプルを精製した後、これ

を凍結乾燥したサンプルを用いたアミノ酸配列の決定を行った。乾燥状態のサンプルを酢酸に溶解し、ポリブレン処理したカートリッジフィルターに添加した。Applied Biosystems 社製491プロテインシークエンサーでエドマン分解し、N末端側から順次アミノ酸配列を決定した。この結果、A F P-Z-1のアミノ酸配列は

5 配列表の配列番号2に示すとおりである。

(4) 全 RNAの単離

全 RNAの単離に関する基本的な操作はプロトコール集 ("Rneasy^R Protect and RNAlaterTM Handbook" 及び "RNeasy^R Mini Handbook" (QIAGEN)) に従った。

また、サンプルとするナガガジの肝臓は不凍タンパク質の発現量が増大している

10 る厳寒期に生魚から採取した。採取した1~2gの肝臓を5mm角に裁断して10倍量のRNAlater (QIAGEN) 中に保存した。この肝臓サンプル60mgを液体窒素中で粉断し30mgずつBuffer RLT 600 μ lに懸濁した後、QIAshredder (QIAGEN) でさらに粉碎した。遠心により回収した上清に等量の70%エタノールを加え、スピンカラムを通すことでRNAをカラムに吸着させた。Buffer RW1、Buffer RPEでカラムを洗浄

15 後、RNaseフリー水30 μ lでそれぞれRNAを溶出した。

(5) mRNAの単離

mRNAの単離は OligotexTM-dT30 <Super> mRNA Purification kit (TaKaRa) を用いて行い、操作は添付されているプロトコールに従った。1.1 μ g/ μ lのtotal RNA 溶液150 μ lに対し2xBinding Buffer 150 μ l、OligotexTM-dT30 <Super> 15

20 μ lを加え70℃で3分間加熱した後、室温で10分間放置した。遠心操作にてOligotexTM-dT30 <Super>を回収後、Wash Bufferに懸濁しスピンカラムでOligotex-dT30 <Super>を洗浄した。OligotexTM-dT30 <Super>に吸着したmRNAを70℃で加熱しておいたRNaseフリー水40 μ lで溶出した。

(6) cDNAライブラリーの構築

25 cDNAライブラリーの構築は ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE^R) で行った。基本的操作は "cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA^R Synthesis Kit, and ZAP-cDNA^R Gigapack^R III Gold Cloning Kit INSTRUCTION MANUAL" (STRATAGENE^R) に従った。上述のように回収したmRNAを鋳型としメチル化されたdCTPを含むdNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 基質として用いStrataScript RTaseを加え、42℃ 1時間反

30 応を行うことで first-strand cDNA を逆転写合成した。次に RNase H、DNA

polymerase、dNTP を加え、16°C 2.5時間反応を行い、second-strand cDNAを合成した。Pfu DNA polymerase で cDNA の末端を平滑化した後、T4 DNA ligase でアダプター配列を結合した。

(7) 塩基配列の決定

5 構築したcDNAライブラリーの一部を0.8% アガロースで電気泳動したところ、500bpの遺伝子断片が主として確認された。そこで、プロテインシークエンサーにより決定されたアミノ酸配列を元に縮重プライマーを設計し、このプライマーとpoly A 配列に相補的なプライマーを用いて500bpのcDNAを鋳型にEx Taq™ (TaKaRa)でPCR(polymerase chain reaction)を行った。PCR産物を pGEM^R-T Easy (Promega)にクローニングし、このプラスミドで大腸菌を形質転換した。形質転換体を100 μg/mlアンピシリン含有LB寒天培地上に広げ、形成された任意のコロニーを100 μg/mlアンピシリン含有LB液体培地に植菌し、37°Cで一晩大腸菌を振とう培養した。増殖した大腸菌からアルカリ-SDS 法でプラスミドを分離精製し、T7 promoter プライマーとBigDye^R Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 10 (Applied Biosystems)を用いてシークエンス反応を行い ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer及び3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した。この解析結果から分離精製した不凍タンパク質Z-1と高い相同性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列群が500bpのcDNAに含まれていることが確認された。そこで、この500bpのcDNAを鋳型にリンカー配列及びpoly A 配列 20 にアニールするプライマーを用いてEx Taq™ (TaKaRa)でPCR(polymerase chain reaction)を行い、不凍タンパク質をコードする塩基配列全長を増幅した。これらPCR産物をpGEM^R-T Easy (Promega)にクローニングし、遺伝子断片の配列を前述の方法で解析した。得られる不凍タンパク質Z-1の塩基配列は配列表の配列番号1に示すとおりである。

25 ナガガジ由来の残り9種類の新規なAFP-Z-2～Z-10のアミノ酸配列を上記と同様な方法により調製し、それらの遺伝子のCDS領域の塩基配列を上記と同様な方法により決定した。新規なAFP-Z-2～Z-10のアミノ酸配列は配列表の配列番号4,6,8,10,12,14,16,18及び20に、塩基配列は配列番号3,5,7,9,11,13,15,17及び19に示す。これらの塩基配列は、既に塩基配列が明らかにされているマクロゾアルケルスアメリカヌス由来のタイプIII型不凍タンパ 30

ク質と約75～90%の相同性を示した。このようにして、ナガガジ由来のタイプIII型の新規新規なAFP-Z-2～Z-10が得られた。

(実施例2)

(1) シチロウオAFP-B-1のアミノ酸配列決定

- 5 実施例1のナガガジAFPの精製と同様の精製法により、シチロウオのすり身40mlからTOSOH HPLC システムと TSK-GEL ODS-80TS (4.6mm(ID) x 15.0cm(L)、TOSOH) を用いてAFPを高純度に精製した後、不凍活性を確認し(図2参照)、その凍結乾燥したサンプルを用いてアミノ酸配列の決定を行った。乾燥状態のサンプルを酢酸に溶解し、ポリブレン処理したカートリッジフィルターに添加した。
- 10 Applied Biosystems 社製491プロテインシークエンサーでエドマン分解し、N末端側から順次アミノ酸配列を決定した。この結果、AFP-B-1のアミノ酸配列は配列表の配列番号22に示すとおりである。

(2) 全RNAの単離

- 全 RNAの単離の基本的な操作はプロトコール集("RNeasy^R Protect and
- 15 RNAlaterTM Handbook" 及び "RNeasy^R Mini Handbook" (QIAGEN)) に従った。また、サンプルとする各種魚類の肝臓は不凍タンパク質の発現量が増大している厳寒期に生魚から採取した。採取した1～2gの肝臓を5mm角に裁断して10倍量のRNAlater (QIAGEN) 中に保存した。この肝臓サンプル60mgを液体窒素中で粉断し30mgずつBuffer RLT 600 μ lにけん濁した後、QIAshredder (QIAGEN) でさらに粉
- 20 砕した。遠心により回収した上清に等量の70%エタノールを加え、スピンカラムを通すことでRNAをカラムに吸着させた。Buffer RW1、Buffer RPEでカラムを洗浄後、RNaseフリー水30 μ lでそれぞれRNAを溶出した。

(3) mRNAの単離

- mRNAの単離は OligotexTM-dT30 <Super> mRNA Purification kit (TaKaRa) を
- 25 用いて行い、操作は添付されているプロトコールに従った。1.1 μ g/ μ lのtotal RNA 溶液150 μ lに対し2xBinding Buffer 150 μ l、OligotexTM-dT30 <Super> 15 μ lを加え70℃で3分間加熱した後、室温で10分間放置した。遠心操作にてOligotexTM-dT30 <Super>を回収後、Wash Bufferにけん濁しスピンカラムでOligotex-dT30 <Super>を洗浄した。OligotexTM-dT30 <Super>に吸着したmRNAを
- 30 70℃で加熱しておいたRNaseフリー水40 μ lで溶出した。

(4) cDNAライブラリーの構築

cDNAライブラリーの構築は ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE[®]) で行った。基本的操作は "cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit, and ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit INSTRUCTION MANUAL" (STRATAGENE[®]) に従った。上述のように回収したmRNAを鋳型としメチル化されたdCTPを含むdNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 基質として用いStrataScript RTaseを加え、42℃ 1時間反応を行うことで first-strand cDNA を逆転写合成した。次に RNase H、DNA polymerase、dNTP を加え、16℃ 2.5時間反応を行い、second-strand cDNAを合成した。Pfu DNA polymerase で cDNA の末端を平滑化した後、T4 DNA ligase でアダプター配列を結合した。

(5) 塩基配列の決定

プロテインシーケンサーにより決定されたアミノ酸配列を元に縮重プライマーを設計し、このプライマーとpoly A 配列に相補的なプライマーを用いて cDNA を鋳型に Ex Taq[™] (TaKaRa) で PCR (polymerase chain reaction) を行った。PCR産物を pGEM[®]-T Easy (Promega) にクローニングし、このプラスミドで大腸菌を形質転換した。形質転換体を100 μ g/ml アンピシリン含有LB寒天培地上に広げ、形成された任意のコロニーを100 μ g/ml アンピシリン含有LB液体培地に植菌し、37℃で一晩大腸菌を振とう培養した。増殖した大腸菌からアルカリ-SDS 法でプラスミドを分離精製し、T7 promoter プライマーと BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer 及び 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した。この解析結果から不凍タンパク質のC末端をコードする塩基配列を決定し、この配列に相補的なプライマーとリンカー配列にアニールするプライマーを用いてcDNA を鋳型に Ex Taq[™] (TaKaRa) で PCR (polymerase chain reaction) を行い、不凍タンパク質をコードする塩基配列全長を増幅した。このPCR産物を pGEM[®]-T Easy (Promega) にクローニングし、遺伝子断片の配列を前述の方法で解析した。この結果、シチロウウオ由来の A F P-B-1の塩基配列は配列番号21に示すとおりである。シチロウウオ由来の A F P-B-1の塩基配列は配列が明らかにされているリプテルス アメリカヌス (sea raven (Hemitripterus americanus)) 由来のタイプII型不凍

タンパク質と約 63% の相同性を示した。このようにして、タイプII型の不凍タンパク質がシチロウウオのすり身から分離、精製された。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中に取り入れるものとする。

5

産業上の利用の可能性

本発明により日本近海で漁獲される魚であって、通常廃棄されているナガガシ
或いはシチロウウオから 11 種類の新規な不凍タンパク質を採取し、これらのア
ミノ酸配列及び塩基配列を決定した。また、得られる遺伝子を用いて遺伝子工学
10 的手法により前記不凍タンパク質を多量に生産することを可能とした。

これら不凍タンパク質は、前述のとおり、例えばアイスクリーム、冷凍食品等
における氷晶の成長による食味劣化、組織破壊を防止し、また、氷スラリーを使
用する冷熱供給システムあるいは冷熱蓄熱等において、氷の再結晶による配管系
の閉塞を解消し得る有効な添加剤として期待されているものである。さらに卵子
15 や精子、移植臓器等の低温長期保存冷凍保存においても有望な物質である。

請 求 の 範 囲

1. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-1

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

5 (b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

2. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-2

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

10 (b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

3. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-3

(a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

15 (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

4. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-4

(a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

20 (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

5. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-5

(a) 配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

25 (b) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

6. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-6

(a) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

30 (b) 配列番号12で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ

酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

7. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-7

(a) 配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

5 (b) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

8. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-8

(a) 配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

10 (b) 配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

9. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-9

(a) 配列番号18で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

15 (b) 配列番号18で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

10. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-10

(a) 配列番号20で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

20 (b) 配列番号20で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

11. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質B-1

(a) 配列番号22で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

25 (b) 配列番号22で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

12. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-1をコードするDNA

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

30 (b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ

酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

1 3. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-2をコードするDNA

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

5 (b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

1 4. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-3をコードするDNA

(a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

10 (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

1 5. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-4をコードするDNA

(a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

15 (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

1 6. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-5をコードするDNA

(a) 配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

20 (b) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

1 7. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-6をコードするDNA

(a) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

25 (b) 配列番号12で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

1 8. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-7をコードするDNA

(a) 配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

30 (b) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ

酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

19. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-8をコードするDNA

(a) 配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

5 (b) 配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

20. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-9をコードするDNA

(a) 配列番号18で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

10 (b) 配列番号18で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

21. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質Z-10をコードするDNA

(a) 配列番号20で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

15 (b) 配列番号20で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

22. 次の (a) または (b) で表される不凍タンパク質B-1をコードするDNA

(a) 配列番号22で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

20 (b) 配列番号22で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不凍機能を有するタンパク質。

23. 配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 又は21で表される塩基配列であって、それぞれ不凍タンパク質Z-1、Z-2、Z-3、Z-4、Z-5、Z-6、Z-7、Z-8、Z-9、Z-10

25 又はB-1をコードするDNA。

24. 請求の範囲第12項～第23項のいずれか1項に記載のDNAを含む組換えベクター。

25. 組換えベクターが発現ベクターである請求の範囲第24項に記載の組換えベクター。

30 26. 宿主生物を請求の範囲第25項に記載の組換えベクターによって形質転換し

た形質転換体。

27. 宿主生物が大腸菌である請求の範囲第26項に記載の形質転換体。

28. 請求の範囲第27項に記載の形質転換体を培地中で培養して不凍タンパク質を産生せしめ、該タンパク質を採取することを特徴とする不凍タンパク質の製造方法。

29. 請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項に記載のタンパク質をペプチド合成機により化学的に合成することを特徴とするタンパク質の製造方法。

30. 請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項に記載のタンパク質を有効成分として含むことを特徴とする凍結濃縮阻害剤。

10 31. 請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項に記載のタンパク質を有効成分として含むことを特徴とする凝固点降下剤。

32. 請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項に記載のタンパク質を含むことを特徴とする氷スラリー。

Fig. 1

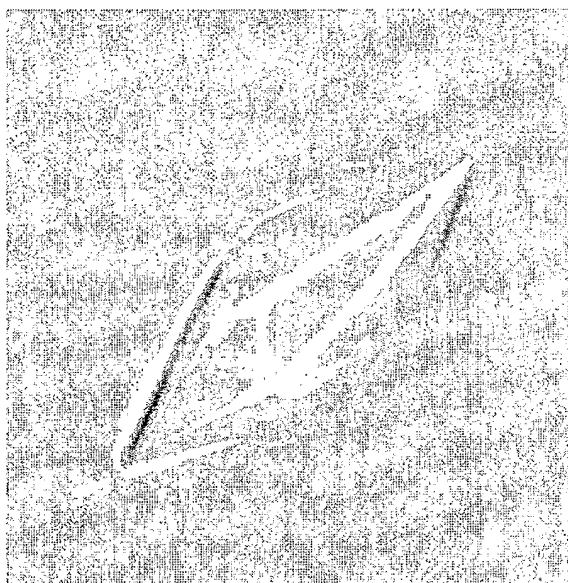
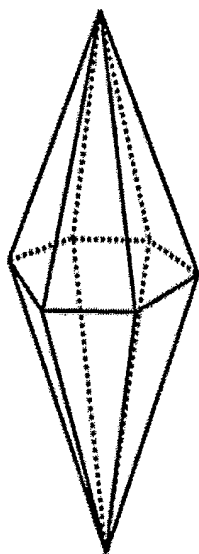
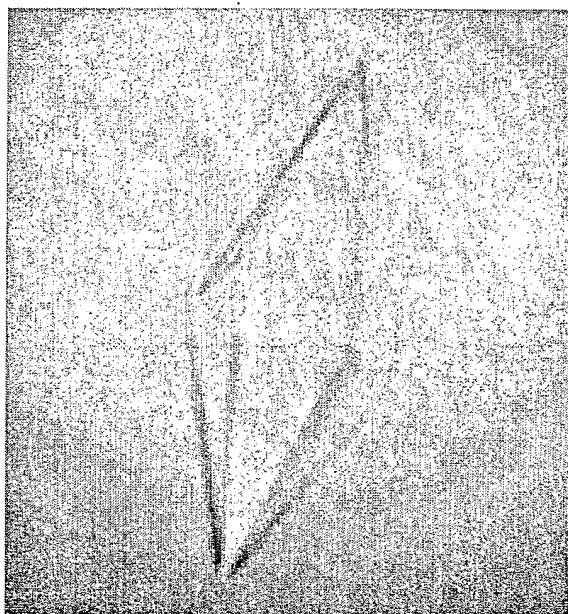
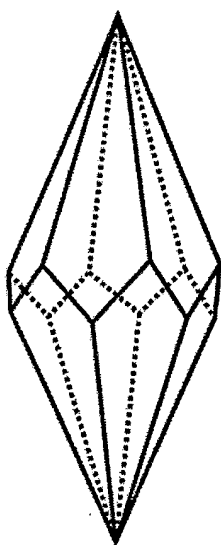


Fig. 2



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

5 <120> Antifreeze protein of fishes

<130> PH-2128-PCT

<150> 2003-05-21

10 <151> JP 2003-142850

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 195

<212> DNA

<213> Zoarces elongatus Kner

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 1

25 ggc gag tcc gtg gtg gcc gcc cag ctg atc ccc atg aat act gcc ctg 48

Gly Glu Ser Val Val Ala Ala Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu

1 5 10 15

act ctg gcg atg atg gag ggg aag gtg acc aac cca agt ggc atc ccg 96

Thr Leu Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20 25 30
 ttc gtg gag gcg tcc caa ata gtg ggg aag caa gtg aac gtg ata gtg 144
 Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val
 35 40 45
 5 gct aag ggc caa acc atc atg cca atc atg gtg aaa acg tac gcg gga 192
 Ala Lys Gly Gln Thr Ile Met Pro Ile Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly
 50 55 60
 aag 195
 Lys
 10 65

<210> 2

<211> 65

<212> PRT

15 <213> Zoarces elongatus Kner

<400> 2

Gly Glu Ser Val Val Ala Ala Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro
 20 20 25 30
 Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val
 35 40 45
 Ala Lys Gly Gln Thr Ile Met Pro Ile Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly
 50 55 60
 25 Lys
 65

<210> 3

<211> 198

<212> DNA

<213> Zoarces elongatus Kner

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(198)

<223>

<400> 3

ggc gag tcc gtg gtg gcc acc cag ctg atc ccc ata aat act gcc ctg 48

Gly Glu Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala Leu

10 1 5 10 15

act ccg gcg atg atg gag ggg aag gtg acc aac cca agc ggc atc ccg 96

Thr Pro Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20 25 30

ttc gcg gag atg tcc caa ata gtg ggg aag caa gtg aac acg cca gtg 144

15 Phe Ala Glu Met Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Thr Pro Val

35 40 45

gct aag ggc caa acc ctc atg cca ggc atg gtg aaa acg tac gtc ccg 192

Ala Lys Gly Gln Thr Leu Met Pro Gly Met Val Lys Thr Tyr Val Pro

50 55 60

20 gca aag 198

Ala Lys

65

<210> 4

25 <211> 66

<212> PRT

<213> Zoarces elongatus Kner

<400> 4

Gly Glu Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala Leu

1 5 10 15
 Thr Pro Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro
 20 25 30
 Phe Ala Glu Met Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Thr Pro Val
 5 35 40 45
 Ala Lys Gly Gln Thr Leu Met Pro Gly Met Val Lys Thr Tyr Val Pro
 50 55 60
 Ala Lys
 65
 10
 <210> 5
 <211> 198
 <212> DNA
 <213> *Zoarces elongatus* Kner
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)
 <223>
 <400> 5
 20 aac cag gcg tcc gtg gtg gcc aac cag ctg atc ccc ata aat act gcc 48
 Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Asn Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala
 1 5 10 15
 ctg act ctg gtg atg atg agg gcg gag gtg gtc acc cca atg ggc atc 96
 Leu Thr Leu Val Met Met Arg Ala Glu Val Val Thr Pro Met Gly Ile
 25 20 25 30
 ccc gcc gtg gac att ccc cga tta gtc tca atg caa gtg aac agg gca 144
 Pro Ala Val Asp Ile Pro Arg Leu Val Ser Met Gln Val Asn Arg Ala
 35 40 45
 gtg ccg ttg ggc aca acc ctc atg cca gac atg gtg aaa ggg tac ccc 192

Val Pro Leu Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Pro

50

55

60

ccg gct

198

Pro Ala

5 65

<210> 6

<211> 66

<212> PRT

10 <213> *Zoarces elongatus* Kner

<400> 6

Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Asn Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1

5

10

15

Leu Thr Leu Val Met Met Arg Ala Glu Val Val Thr Pro Met Gly Ile

15

20

25

30

Pro Ala Val Asp Ile Pro Arg Leu Val Ser Met Gln Val Asn Arg Ala

35

40

45

Val Pro Leu Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Pro

50

55

60

20 Pro Ala

65

<210> 7

<211> 195

25 <212> DNA

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 7

ggc gag tcc gtg gtg gcc acc cag ctg atc ccc ata aat act gcc ctg 48

Gly Glu Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala Leu

5 1 5 10 15

act ccg gcg atg atg gag ggg aag gtg acc aac cca agc gcc atc ccg 96

Thr Pro Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20 25 30

ttc gcg gag atg tcc caa ata gtg ggg aag caa gtg aac gtg ata gtg 144

10 Phe Ala Glu Met Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

35 40 45

gct aag gcc caa acc ctc atg cca gac atg gtg aaa acg tac gcg gga 192

Ala Lys Gly Gln Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50 55 60

15 aag 195

Lys

65

<210> 8

20 <211> 65

<212> PRT

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<400> 8

Gly Glu Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala Leu

25 1 5 10 15

Thr Pro Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20 25 30

Phe Ala Glu Met Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

35 40 45

Ala Lys Gly Gln Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50

55

60

Lys

65

5

<210> 9

<211> 198

<212> DNA

<213> *Zoarces elongatus* Kner

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(198)

<223>

<400> 9

15 aac cag gcg tcc gtg gtg gcc aac cag ctg atc ccc ata aat act gcc 48

Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Asn Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1

5

10

15

ctg act ctg gtg atg atg agg gcg gag gtg gtc acc cca atg ggc atc 96

Leu Thr Leu Val Met Met Arg Ala Glu Val Val Thr Pro Met Gly Ile

20

20

25

30

ccc gcc gtg gac att ccc cga tta gtc tca atg caa gtg aac agg gca 144

Pro Ala Val Asp Ile Pro Arg Leu Val Ser Met Gln Val Asn Arg Ala

35

40

45

gtg ccg ttg ggc aca acc ctc atg cca gag atg gtg aaa ggg tac acc 192

25 Val Pro Leu Gly Thr Thr Leu Met Pro Glu Met Val Lys Gly Tyr Thr

50

55

60

ccg gct

198

Pro Ala

65

<210> 10

<211> 66

<212> PRT

5 <213> Zoarces elongatus Kner

<400> 10

Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Asn Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1 5 10 15

Leu Thr Leu Val Met Met Arg Ala Glu Val Val Thr Pro Met Gly Ile

10 20 25 30

Pro Ala Val Asp Ile Pro Arg Leu Val Ser Met Gln Val Asn Arg Ala

35 40 45

Val Pro Leu Gly Thr Thr Leu Met Pro Glu Met Val Lys Gly Tyr Thr

50 55 60

15 Pro Ala

65

<210> 11

<211> 198

20 <212> DNA

<213> Zoarces elongatus Kner

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(198)

25 <223>

<400> 11

aac cag gag tcc gtg gtg gcc acc gtt ctg atc ccc ata aat act gcc 48

Asn Gln Glu Ser Val Val Ala Thr Val Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1 5 10 15

ctg act gtg ggg atg atg acg aca cgg gtg gtc tcc cca acg ggc atc 96
 Leu Thr Val Gly Met Met Thr Thr Arg Val Val Ser Pro Thr Gly Ile
 20 25 30
 ccc gcc gag gac att ccc cga tta atc tca atg caa gtg aac cag gta 144
 5 Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Leu Ile Ser Met Gln Val Asn Gln Val
 35 40 45
 gtg ccg atg ggc aca acc ctc atg cca gac atg gtg aaa ggg tac gcc 192
 Val Pro Met Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Ala
 50 55 60
 10 ccg gct 198
 Pro Ala
 65

<210> 12

15 <211> 66

<212> PRT

<213> Zoarces elongatus Kner

<400> 12

Asn Gln Glu Ser Val Val Ala Thr Val Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala
 20 1 5 10 15
 Leu Thr Val Gly Met Met Thr Thr Arg Val Val Ser Pro Thr Gly Ile
 20 25 30
 Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Leu Ile Ser Met Gln Val Asn Gln Val
 35 40 45
 25 Val Pro Met Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Ala
 50 55 60
 Pro Ala
 65

<210> 13

<211> 195

<212> DNA

<213> *Zoarces elongatus* Kner

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 13

10 ggc cag tcc gtg gtg gcc acc cag ctg atc ccc atg aat act gcc ctg 48

Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu

1 5 10 15

act ctg gcg atg atg gag ggg aag gtg atc aac cca agt gcc atc ccg 96

Thr Leu Ala Met Met Glu Gly Lys Val Ile Asn Pro Ser Gly Ile Pro

15 20 25 30

ttc gtg gag gcg tcc caa ata gtg ggg aag caa gtg aac gtg ata gtg 144

Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

35 40 45

gct aag gcc caa acc atc atg cca atc atg gtg aaa acg tac gcg gga 192

20 Ala Lys Gly Gln Thr Ile Met Pro Ile Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50 55 60

aag 195

Lys

65

25

<210> 14

<211> 65

<212> PRT

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<400> 14

Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu

1 5 10 15

Thr Leu Ala Met Met Glu Gly Lys Val Ile Asn Pro Ser Gly Ile Pro

5 20 25 30

Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

35 40 45

Ala Lys Gly Gln Thr Ile Met Pro Ile Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50 55 60

10 Lys

65

<210> 15

<211> 198

15 <212> DNA

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(198)

20 <223>

<400> 15

aac cag gcg tcc gtg gtg gcc aac cag ctg atc ccc ata aat act gcc 48

Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Asn Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1 5 10 15

25 ctg act ctg gtg atg atg agg tcg gag gtg gtc acc cca atg ggc atc 96

Leu Thr Leu Val Met Met Arg Ser Glu Val Val Thr Pro Met Gly Ile

20 25 30

ccc gcc gtg gac att ccc cga tta gtc tca atg caa gtg aac agg gca 144

Pro Ala Val Asp Ile Pro Arg Leu Val Ser Met Gln Val Asn Arg Ala

35

40

45

gtg ccg ttg ggc aca acc ctc atg cca gac atg gtg aaa ggg tat acc 192

Val Pro Leu Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Thr

5

50

55

60

ccg gct

198

Pro Ala

65

10 <210> 16

<211> 66

<212> PRT

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<400> 16

15 Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Asn Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1

5

10

15

Leu Thr Leu Val Met Met Arg Ser Glu Val Val Thr Pro Met Gly Ile

20

25

30

Pro Ala Val Asp Ile Pro Arg Leu Val Ser Met Gln Val Asn Arg Ala

20

35

40

45

Val Pro Leu Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Thr

50

55

60

Pro Ala

65

25

<210> 17

<211> 210

<212> DNA

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(210)

<223>

5 <400> 17

aac cag gag tcc gtg gtg gcc gcc gtt ctg atc ccc ata aat aca gcc 48

Asn Gln Glu Ser Val Val Ala Ala Val Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1 5 10 15

ctg aca gtg ggg atg atg acg aca cgg gtg gtc tcc cca acg ggc atc 96

10 Leu Thr Val Gly Met Met Thr Thr Arg Val Val Ser Pro Thr Gly Ile

20 25 30

ccc gcc gag gac att ccc cga tta atc tca atg caa gtg aac cag gca 144

Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Leu Ile Ser Met Gln Val Asn Gln Ala

35 40 45

15 gtg ccg atg ggc aca acc ctc atg cca gac atg gtg aaa ttt tac tgc 192

Val Pro Met Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Phe Tyr Cys

50 55 60

ctc tgc gcg ccg aag aac 210

Leu Cys Ala Pro Lys Asn

20 65 70

<210> 18

<211> 70

<212> PRT

25 <213> Zoarces elongatus Kner

<400> 18

Asn Gln Glu Ser Val Val Ala Ala Val Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1 5 10 15

Leu Thr Val Gly Met Met Thr Thr Arg Val Val Ser Pro Thr Gly Ile

20 25 30
 Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Leu Ile Ser Met Gln Val Asn Gln Ala
 35 40 45
 Val Pro Met Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Phe Tyr Cys
 5 50 55 60
 Leu Cys Ala Pro Lys Asn
 65 70

 <210> 19
 10 <211> 195
 <212> DNA
 <213> Zoarces elongatus Kner
 <220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(195)
 <223>
 <400> 19
 ggc cag tcc gtg gtg gcc acc cag ctg atc ccc atg aat act gcc ctg 48
 Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu
 20 1 5 10 15
 act ctg gcg atg atg gag ggg aag gtg acc aac cca agt ggc atc ccg 96
 Thr Leu Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro
 20 25 30
 ttc gtg gag gcg tcc caa ata gtg ggg aag caa gtg aac gtg ata gtg 144
 25 Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val
 35 40 45
 gct aag ggc caa acc atc atg cca atc atg gtg aaa acg tac gcg gga 192
 Ala Lys Gly Gln Thr Ile Met Pro Ile Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly
 50 55 60

aag

195

Lys

65

5 <210> 20

<211> 65

<212> PRT

<213> *Zoarces elongatus* Kner

<400> 20

10 Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu

1

5

10

15

Thr Leu Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20

25

30

Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

15

35

40

45

Ala Lys Gly Gln Thr Ile Met Pro Ile Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50

55

60

Lys

65

20

<210> 21

<211> 381

<212> DNA

<213> *Brachyopsis rostratus*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1).. (381)

<223>

<400> 21

gct ctg gta tgt ccc gcc ggt tgg aca ctt cat ggt caa cgc tgt ttc 48
 Ala Leu Val Cys Pro Ala Gly Trp Thr Leu His Gly Gln Arg Cys Phe
 1 5 10 15
 tat tct gag gca aca gct atg act tgg gat ctg gct gag gca aac tgt 96
 5 Tyr Ser Glu Ala Thr Ala Met Thr Trp Asp Leu Ala Glu Ala Asn Cys
 20 25 30
 gtg aac aag ggt gga cac ctt gca tcc atc cac agc ctg gag gag caa 144
 Val Asn Lys Gly Gly His Leu Ala Ser Ile His Ser Leu Glu Glu Gln
 35 40 45
 10 ctt tac att aag gac ata gta gct gga ata gta tgg atc gga ggc tcc 192
 Leu Tyr Ile Lys Asp Ile Val Ala Gly Ile Val Trp Ile Gly Gly Ser
 50 55 60
 gct tgc aaa gtg gca ggt gct tgg tcc tgg act gat ggt aca cct gtg 240
 Ala Cys Lys Val Ala Gly Ala Trp Ser Trp Thr Asp Gly Thr Pro Val
 15 65 70 75 80
 gat tat cgt acc tgg tgt cct acc aaa cct aat gat ata ctg agc gat 288
 Asp Tyr Arg Thr Trp Cys Pro Thr Lys Pro Asn Asp Ile Leu Ser Asp
 85 90 95
 tgc tgt atg cag atg act gct gca gtt gac aaa tgc tgg gat gac ttg 336
 20 Cys Cys Met Gln Met Thr Ala Ala Val Asp Lys Cys Trp Asp Asp Leu
 100 105 110
 cct tgt cca gcg tcc cac gca tca atc tgc gcc aag gca gcc ata 381
 Pro Cys Pro Ala Ser His Ala Ser Ile Cys Ala Lys Ala Ala Ile
 115 120 125

25

<210> 22

<211> 127

<212> PRT

<213> *Brachyopsis rostratus*

<400> 22

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/46, C12N1/21, C12P21/02, C09K5/20, C09K3/00

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)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/46, C12N1/21, C12P21/02, C09K5/20, C09K3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED,
EMBL/DDBJ/Genbank/ SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEW C.L. et al., Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, <i>Macrozoarces americanus</i> , J.Biol.Chem. (1988), Vol.263, No.24, pages 12049 to 12055, Fig. 3	1, 12, 23-32
X	JP 11-508451 A (Unilever N.V.), 27 July, 1999 (27.07.99), & WO 97/02343 A1 & AU 9665190 A & ZA 9605735 A & EP 836646 A1 & CZ 9800006 A3 & SK 9701794 A3 & CN 1193999 A & HU 9802321 A2 & BR 9609325 A & MX 9800016 A1 & AU 723039 B & JP 2004/043484 A Fig. 1	1, 12, 23-32

☐ 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
09 August, 2004 (09.08.04)Date of mailing of the international search report
24 August, 2004 (24.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007105

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007105

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 & 12 and 23-32 specifically inventions quoting SEQ ID No. 1 or claim 1

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007105

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

References 1 and 2 describe antifreezing proteins derived from ocean pout (*Zoarces americanus*) species belonging to *Zoarces* genus, which exhibit a homology of 80% or higher with the ten types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 10. Reference 1 also discloses a common structure of antifreezing proteins.

The ten types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 10 among the eleven types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 11 cannot be stated as having a novel chemical structure common thereto from the viewpoint that the claims comprehend specified sequences defined therein having undergone deletion, substitution or addition and from the viewpoint of knowledge regarding the chemical structures of multiple publicly known homologous antifreezing proteins described in References 1 and 2 and common regions thereof clarified therein. Consequently, the ten types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 10 are common to each other only in being derived from *Zoarces* genus *Zoarces* species.

However, only that subjects of invention are derived from the same biomaterial is not sufficient for satisfying the requirement of unity of invention ("uideline for PCT international search and preliminary examination **PCT/GL/ISPE/1**" enforced on March 25, 2004, Chapter 10 unity 10.52 case 32 (contact <http://www.wipo.int/pct/en/texts/pdf/ispe.pdf>)). Consequently, the above matter cannot be special technical matter within the meaning of PCT Rule 13.2.

Moreover, it does not appear that the antifreezing protein claimed in claim 11 among eleven types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 11 and the other ten types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 10 have a common novel chemical structure. Further, the biomaterial from which the antifreezing protein set forth in claim 11 is derived is *Brachyopsis*, which is not taxonomically analogous to the above *Zoarces*. Consequently, the antifreezing protein claimed in claim 11 has no special technical matter common to the other antifreezing proteins of the claims of this application.

Therefore, although the inventions claimed in claims 1 to 32 relate to eleven types of antifreezing proteins defined in claims 1 to 11, they cannot be stated as constituting a group of inventions linked with each other so as to form a single general inventive concept and it appears that the invention group consists of eleven inventions respectively relating to the eleven types of antifreezing proteins set forth in claims 1 to 11.

Reference 1: J.Biol.Chem.(1988), Vol.263, No.24, p.12049-12055

Reference 2: WO 97/02343 A1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/46, C12N1/21, C12P21/02,
C09K5/20, C09K3/00

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))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/46, C12N1/21, C12P21/02,
C09K5/20, C09K3/00

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

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)

JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED
EMBL/DBJ/Genbank/SwissProt/PIR/Geneseq

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 請求の範囲の番号
X	HEW C.L. <i>et al.</i> , Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, <i>Macrozoarces americanus</i> , J. Biol. Chem. (1988), Vol. 263, No. 24, p. 12049-12055 第3図	1, 12, 23-32

☒ 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矛盾するものではなく、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

09.08.2004

国際調査報告の発送日

24.08.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 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 請求の範囲の番号
X	JP 11-508451 A (ユニリーバー・ナームローゼ・ ベンノートシャープ) 1999.07.27 &WO 97/02343 A1 &AU 9665190 A &ZA 9605735 A &EP 836646 A1 &CZ 9800006 A3 &SK 9701794 A3 &CN 1193999 A &HU 9802321 A2 &BR 9609325 A &MX 9800016 A1 &AU 723039 B &JP 2004/043484 A 第1図	1, 12, 23-32

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

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照のこと

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1、12及び請求の範囲23-32に係る発明のうち配列番号1又は請求の範囲1を引用する発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄の続き

文献1及び2にはナガガジ属(*Zoarcetes*)に属するOcean Pout(*Zoarcetes americanus*)種由来の不凍タンパク質であって、請求の範囲1～10に記載された10種の不凍タンパク質と80%以上の相同性を有するものが記載され、文献1には不凍タンパク質が有する共通の構造についても開示されている。

請求の範囲1～11に記載された11種の不凍タンパク質のうち、請求の範囲1～10に記載された10種の不凍タンパク質は、各請求の範囲において定義された特定の配列に対して欠失置換付加させたものも請求の範囲として包含すること、及び文献1及び2に記載された複数の公知の類縁の不凍タンパク質の化学構造及び明らかにされたそれらの共通領域についての知見からみて、請求の範囲1～10に記載された10種の不凍タンパク質が互いに共通する新規な化学構造を有しているとはいえないから、ナガガジ属ナガガジ種由来である点でのみ共通する。

しかしながら、発明の対象が単に同じ生物材料に由来するというだけでは発明の単一性を満たすのに十分ではない（「PCT国際調査及び予備審査のためのガイドライン **PCT/GL/ISPE/1**」2004年3月25日施行,第10章単一性10.52事例32 (<http://www.wipo.int/pct/en/texts/pdf/ispe.pdf>参照)）から、この点をPCT規則13.2における特別な技術的事項であるとすることはできない。

また、請求の範囲1～11に記載された11種の不凍タンパク質のうち、請求の範囲11に記載された不凍タンパク質は、請求の範囲1～10に記載された他の10種の不凍タンパク質と共通する新規な化学構造を有しているとは認められず、また由来となる生物学的材料もシチロウオであって分類学的に類縁のものではない。よって、請求の範囲11に記載された不凍タンパク質は、本願請求の範囲における他の不凍タンパク質と共通する特別な技術的事項を有さない。

よって、請求の範囲1～32に記載された発明は、請求の範囲1～11に記載された11種の不凍タンパク質に係る発明であるが、全て単一の一般的発明概念を形成するように互いに連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲1～11に記載された11種の不凍タンパク質それぞれに関する11個の発明からなる発明群であると認める。

文献1：J. Biol. Chem. (1988), Vol. 263, No. 24, p. 12049-12055

文献2：WO 97/02343 A1