(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
2016 年 12 月 22 日(22.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/204198 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/067853

(22) 国際出願日: 2016 年 6 月 15 日(15.06.2016)

(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 2015-121443 2015 年 6 月 16 日(16.06.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 中野　秀雄 (NAKANO Hideo); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 加藤　晃代 (KATO Teruyo); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 萩野　幹治 (HAGINO Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ１丁目１番地 Gifu (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

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

WO 2016/204198 A1

(54) **Title**: PROTEIN EXPRESSION METHOD

(54) 発明の名称 : タンパク質の発現方法

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing a versatile technique whereby the expression amount of a protein can be easily increased in an expression system using *Escherichia coli* or a yeast expression system. In an expression system using *E. coli* or a yeast expression system, a target protein is expressed as a tagged protein carrying a peptide tag attached to the N-terminus, said peptide tag comprising an amino acid sequence represented by SK, SKX, SKXX, AKXX or KKXX (wherein X represents an arbitrary amino acid residue).

(57) 要約: 大腸菌を利用した発現系又は酵母発現系においてタンパク質の発現量を簡便に増大させることができる、汎用性の高い技術を提供することを課題とする。大腸菌を利用した発現系又は酵母発現系によって、SK、SKX、SKXX、AKXX 又は KKXX のアミノ酸配列（但し、X は任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグが N 末端に連結したタグ付加タンパク質として目的タンパク質を発現させる。

明　細　書

発明の名称 ： タンパク質の発現方法

技術分野

[0001] 本発明はタンパク質の発現方法に関する。詳しくは、タンパク質の発現量増加を可能にする、新規な発現方法及びその用途に関する。本出願は、２０１５年６月１６日に出願された日本国特許出願第２０１５－１２１４４３号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

背景技術

[0002] 組換えタンパク質発現において、大腸菌や酵母は最もよく利用されている魅力的な宿主である。目的とする組換えタンパク質を発現させるための様々な発現ベクターやプロモーターが開発されている（非特許文献１）。

[0003] 大腸菌を宿主とする発現系は古くから用いられており、その扱い易さゆえに汎用性が高い。しかしながら、発現させたいタンパク質によっては可溶性として得られる発現量が少ない場合がある。さらに、可溶性の問題だけでなく、発現量そのものが少なく、可溶性・不溶性ともにタンパク質が発現されない場合がある。

[0004] タンパク質による発現量の違いは数多く報告されているが、その原因は明確にはわかっていない。様々な説が提唱されており、mRNAの安定性や開始コドンの次のアミノ酸で違いがあることが報告されている（非特許文献２）。開始コドンより上流の配列が重要だとする説や、コドンが重要だとする説もある（非特許文献３）。

[0005] そのような問題から、組み換えタンパク質の発現量を向上させる試みとして、（１）コドンの変換、（２）可溶性の高い他のタンパク質と融合して発現、（３）培地の変更、（４）シャペロン因子との共発現、（５）発現系（宿主-ベクター）の変更などの、非常に手間のかかる検討をしなければならいのが一般的である。

[0006] 以下、上述の試みに関する代表的な例を挙げる。まず、コドンの変換としては、大腸菌におけるレアコドンを大腸菌用に変換する試みが挙げられる（非特許文献４）。また、レアコドンに対応したtRNA遺伝子を強化した組換え株も盛んに用いられている。

[0007] 可溶性の高い別のタンパク質との融合発現には、すでに大腸菌において可溶性かつ発現量の多いことの知られるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（Glutathione S-transferase；GST）、マルトース結合ドメイン（maltose binding domain）、Trx（thioredoxin）タグ又はSUMO（small ubiquitin-like modifer）タグなどが用いられる。しかしながら、本手法によれば、目的のタンパク質に本来不要なタンパク質が融合された状態で発現するため、目的のタンパク質を切り離す操作などが必要となる。また、宿主に本来余分なものを作らせるという意味では、製造コスト的に好ましくない。

[0008] 培地の変更としては、大腸菌の培養に一般的に用いられるLB培地から、より栄養分が豊富なSuperBroth、Terrific Broth、MMI broth等への変更が検討される場合がある。

[0009] また、宿主ベクター系に関する研究も盛んであり、T7、acUV5、tac、λPL、lac、trp、cspAなどのプロモーターを利用したり、よりタンパク質発現に適した宿主を組み合わせたりすることにより、発現量の向上が図られる。

[0010] 約40塩基からなる塩基配列をN末端もしくは開始コドン上流に挿入し、発現量を上げる試みも知られる（非特許文献５）。また、大腸菌での発現量の多いタンパク質配列のN末端配列の傾向を調査した報告がある（非特許文献６）。

[0011] 大腸菌を宿主とする発現系とともに、酵母を宿主とした発現系も各種タンパク質の発現に利用されている。

先行技術文献

非特許文献

[0012] 非特許文献1：German and Eduardo. Front Microbiol. 2014; 5: 172
非特許文献2：Bivona et al. Protein Expr. Purif. 2010. 74. 248-256.

非特許文献3：Siencexpress 2013.10.1126/science.1241934

非特許文献4：Food Science and Biotechnology, 2013, 22, 269

非特許文献5：2015農芸化学会（岡山）、講演番号3B41p18、安保ら

非特許文献6：Bivona et al. Protein Expr. Purif. 2010. 74. 248-256.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 以上の通り、タンパク質発現量向上を目指した研究の報告が無数に存在する。しかし、上記のごとき検討をしても、必ず発現量が増大するとは限らず、発現量増大のための明確なルールは現状見出されていない。そこで本発明は、大腸菌を利用した発現系又は酵母発現系においてタンパク質の発現量を簡便に増大させることができる、汎用性の高い技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 上記課題に鑑み本発明者らは、宿主やベクター系を変更することなく、且つ、簡便な操作によって発現量を増大させる手法の創出を目指し、研究を進めた。鋭意検討の末、わずか４アミノ酸からなるタグを開始コドン直後に挿入する（換言すれば、４アミノ酸のタグがN末端に連結した状態で目的タンパク質を発現させる）のみで目的タンパク質の大腸菌における発現量を著しく増大可能であることを明らかとした。この手法は、（１）付加するペプチド（タグ）が短いため、目的タンパク質の本来の活性に影響を及ぼす可能性が極めて低いと考えられること、（２）簡便な操作で実現できること（PCR法など、分子生物学的手法により簡単に挿入可能）等の利点を有する。また、タグの下流にプロテアーゼ認識配列を付加しておけば、プロテアーゼ処理によって不要な部分（タグを含むペプチド断片）を目的タンパク質から分離することもできる。この不要な部分は、通常、目的タンパク質に比べて大幅に短い（典型的には数アミノ酸残基で構成される）ことから、目的タンパク質（通常、分子量が数キロDa以上）との分離が容易である。一方、タグを認識する抗体を利用すれば、発現産物（タグが付加された目的産物）をそのまま精

製することもできる。

[0015] 検討を更に進めた結果、タグを利用した上記手法が大腸菌発現系のみならず、無細胞タンパク質合成系においても有効に機能することが示された。また、タグを構成するペプチドの長さと発現量上昇効果との関係に関して重要な知見が得られた。更には、大腸菌発現系とともに頻用される酵母発現系においても上記手法が有効であることが明らかとなった。

[0016] 更なる検討によって、発現量の増大に有効な別のタグも見出すことに成功した。

以上の成果に基づき、以下の発明が提供される。

［１］大腸菌を利用した発現系又は酵母発現系によって、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグがN末端に連結したタグ付加タンパク質として目的タンパク質を発現させること、を特徴とする、タンパク質の発現方法。

［２］前記ペプチドタグが、SKI、SKIK、SKKK、SKII、AKIK、AKII又はKKKKのアミノ酸配列からなる、［１］に記載の発現方法。

［３］前記ペプチドタグと、前記目的タンパク質の配列が直結している、［１］又は［２］に記載の発現方法。

［４］前記ペプチドタグと、前記目的タンパク質の配列の間にプロテアーゼ認識配列が介在する、［１］又は［２］に記載の発現方法。

［５］大腸菌を利用した前記発現系が、T7プロモーターを用いた発現系、又は低温発現プロモーターを用いた発現系である、［１］～［４］のいずれか一項に記載の発現方法。

［６］以下の（１）～（３）のステップを含む、［１］～［５］のいずれか一項に記載の発現方法：

（１）前記ペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を保持する発現ベクターを用意するステップ；

（２）前記発現ベクターを宿主細胞に導入するステップ；及び

（３）前記発現ベクターが導入された形質転換体を培養し、前記目的タン

パク質を発現させるステップ。

［７］前記発現ベクターが以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかの方法で構築される、［６］に記載の発現方法：

（ａ）前記宿主細胞の発現用ベクターに対して、前記ペプチドタグが連結した目的タンパク質をコードする配列を挿入すること、

（ｂ）前記ペプチドタグをコードする配列を開始コドンの直後に有する前記宿主細胞の発現用ベクターに対して、該配列の下流にインフレームで目的タンパク質をコードする配列を挿入すること、

（ｃ）目的タンパク質をコードする配列を保持する前記宿主細胞の発現用ベクターの開始コドンの直後に、前記ペプチドタグをコードする配列を挿入すること。

［８］大腸菌を利用した前記発現系が、大腸菌由来成分を用いた無細胞タンパク質合成系である、［１］～［５］のいずれか一項に記載の発現方法。

［９］以下の（ｉ）及び（ｉｉ）のステップを含む、［８］に記載の発現方法：

（ｉ）前記ペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を含む発現用鋳型を用意するステップ；及び

（ｉｉ）無細胞タンパク質合成反応を行うステップ。

［１０］大腸菌で機能するプロモーター、

リボソーム結合部位、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置されたクローニング部位、

を有する、大腸菌を利用した発現系用の発現ベクター。

［１１］酵母で機能するプロモーター、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置されたクローニング部位、

を有する、酵母発現系用の発現ベクター。

［１２］ペプチドタグをコードする前記配列と前記クローニング部位が隣接している、［１０］又は［１１］に記載の発現ベクター。

［１３］ペプチドタグをコードする前記配列と前記クローニング部位の間に、プロテアーゼ認識配列をコードする配列が配置されている、［１０］又は［１１］に記載の発現ベクター。

［１４］大腸菌で機能するプロモーター、

リボソーム結合部位、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置された、目的タンパク質をコードする配列、

を有する、大腸菌を利用した発現系用の発現ベクター。

［１５］酵母で機能するプロモーター、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置された、目的タンパク質をコードする配列、

を有する、酵母発現系用の発現ベクター。

［１６］［１０］～［１５］のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む、目的タンパク質発現用キット。

［１７］タンパク質のN末端に連結した前記ペプチドタグを認識する抗体を

更に含む、［１６］に記載のキット。

［１８］前記抗体が不溶性支持体又は磁性体に担持されている、［１７］に記載のキット。

［１９］前記ペプチドタグをN末端に有するペプチドを更に含む、［１６］～［１８］のいずれか一項に記載のキット。

［２０］前記ペプチドが、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなる、［１９］に記載のキット。

［２１］SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグがN末端に連結した組換えタンパク質。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]マウス抗体に対するSKIKタグの効果。S:可溶性画分、I:不溶性画分。

[図2]ウサギ抗体に対するSKIKタグの効果。３種類のウサギ抗体（No.1、4、9）を発現させた。

[図3]人工ペプチドに対するSKIKタグの効果。

[図4]T7タグとSKIKタグの比較。発現産物のSDS-PAGEの結果を示す。矢印が目的タンパク質のサイズ。目的タンパク質サイズのバンドの濃さから、◎、○、△、×の４段階で発現量を評価した。１：タグなし、２：T7タグ、３：SKIKタグ

[図5]T7タグとSKIKタグの比較。発現産物から各タグ付scFvを精製し、抗原に対する反応性をELISAで検討した。ELISAシグナルをタンパク質濃度で除算した値で比較・評価した。

[図6]SKIKの効果に関するコドン影響。発現産物のSDS-PAGEの結果（CBB染色）を示す。

[図7]無細胞合成系におけるタグの効果。SDS-PAGE後のゲルの蛍光検出結果を示す。Ｗ：全画分(Whole)、Ｓ：可溶性画分（soluble）、Ｉ：不溶性画分（insoluble)

[図8]制御プロモーターの影響。SDS-PAGEの結果（CBB染色）を示す。M：マー

カー（Thermo ladder）、レーン１：pET22b、レーン２：pET22b-m6FabLZ タグなし、レーン４：pET22b-m6FabLZ SKIK、レーン４：pColdI、レーン５：pCold-m6FabLZ タグなし、レーン６：pCold-m6FabLZ SKIK

[図9]タグ長の検討。SDS-PAGEの結果（CBB染色）を示す。

[図10]酵母発現系での効果。P：大腸菌Shuffle T7 expressにより発現したr4scFv精製物。＋：SKIKタグあり、－：タグなし、NC：pYC2/NT 空ベクター発現物

[図11]SKIKタグが組み込まれたベクターの例。

[図12]他のタグの効果。SDS-PAGEの結果（CBB染色）を示す。

発明を実施するための形態

[0018] １．タンパク質の発現方法

本発明の第１の局面はタンパク質の発現方法に関する。本発明では大腸菌を利用した発現系又は酵母発現系によって目的タンパク質を発現させる。「大腸菌を利用した発現系」は、宿主として大腸菌を用いた発現系（慣例に従い、「大腸菌発現系」と呼ぶ））と大腸菌由来成分を用いた無細胞タンパク質合成系を包括的に表現する。酵母発現系は、酵母細胞を宿主とした発現系である。

[0019] 本発明の最大の特徴は、特定のペプチドタグ（以下、「本発明のペプチドタグ」と呼ぶ）がN末端に連結したタンパク質（タグ付加タンパク質）として目的タンパク質を発現させる点にある。

[0020] 本発明のペプチドタグは、SK、SKX、SKXX（配列番号１）、AKXX（配列番号２９）又はKKXX（配列番号３０）のアミノ酸配列から構成される。Xは任意のアミノ酸残基を表す。SKに続くXとしては、例えばI（Ile）、K(Lys)、S(Ser)、A(Ala)等が用いられる。同様にSKXに続くXとしては、例えばK（Lys）、I(Ile)等が用いられる。また、AKに続くXは好ましくはI（Ile）である。AKXに続くXは好ましくはI（Ile）又はK(Lys)である。KKに続くXは好ましくはK(Lys)である。KKXに続くXは好ましくはK(Lys)である。

[0021] SKはセリン（Ser）及びリシン（Lys）がN末端側からC末端側に向かってこ

の順序で連結したペプチド（Ser-Lys）である。SKXは、SKにアミノ酸残基が１つ付加されたペプチドであり、SKXX（配列番号１）はSKにアミノ酸残基が２つ付加されたペプチドである。SKXで表されるペプチドの具体例はSKI（Ser-Lys-Ile）である。SKXX（配列番号１）はSKIX（配列番号２）であること、即ち、SKIを含むことが好ましい。SKIX（配列番号２）で表されるペプチドの具体例はSKIK（Ser-Lys-Ile-Lys）（配列番号３）及びSKII（Ser-Lys-Ile-Ile）（配列番号３１）である。SKKK（Ser-Lys-Lys -Lys）（配列番号３２）も好ましい具体例の一つである。

[0022] AKXX（配列番号２９）は、アラニン（Ala）及びリシン（Lys）がN末端側からC末端側に向かってこの順序で連結したペプチド（Ala-Lys）にアミノ酸残基が２つ付加されたペプチドである。AKXX（配列番号２９）で表されるペプチドの具体例はAKIK（Ala-Lys-Ile-Lys）（配列番号３３）及びAKII（Ala-Lys-Ile-Ile）（配列番号３４）である。

[0023] KKXX（配列番号３０）は、リシン（Lys）及びリシン（Lys）がN末端側からC末端側に向かってこの順序で連結したペプチド（Lys -Lys）にアミノ酸残基が２つ付加されたペプチドである。KKXX（配列番号３０）で表されるペプチドの具体例はKKKK（Lys-Lys-Lys -Lys）（配列番号３５）である。

[0024] 本発明のペプチドタグは上記の通りSK、SKX、SKXX（配列番号１）、AKXX（配列番号２９）又はKKXX（配列番号３０）のアミノ酸配列から構成され、典型的には２～４アミノ酸残基からなる。但し、その機能（目的タンパク質の発現量を向上させること）に影響のない限り、そのN末端側及び／又はC末端側に他のアミノ酸残基を付加することにしてもよい。この態様の場合、全体の長さを５～１３アミノ酸残基、好ましくは５～１０アミノ酸残基、更に好ましくは５～７アミノ酸残基にする。

[0025] 上記のペプチドタグ（SK、SKX、SKXX（配列番号１）、AKXX（配列番号２９）又はKKXX（配列番号３０））を複数、用いることにしてもよい。一例として、上記のペプチドタグを２～５個、タンデムに連結させる態様を挙げることができる。また、上記のペプチドタグと他のタグ（例えば、Hisタグ、HAタ

グ、FLAGタグ等）を併用（連結）することにしてもよい。

[0026] （１）生細胞を用いた発現系（大腸菌発現系、酵母発現系）

生細胞（大腸菌又は酵母）を用いた発現系では、目的タンパク質をコードする配列を保持する発現ベクターで形質転換した宿主（形質転換体）を培養し、目的タンパク質を発現させる。具体的には、以下のステップ（１）～（３）によって、目的タンパク質を発現させる。

（１）本発明のペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を保持する発現ベクターを用意するステップ

（２）前記発現ベクターを宿主細胞に導入するステップ

（３）前記発現ベクターが導入された形質転換体を培養し、前記目的タンパク質を発現させるステップ

[0027] ステップ（１）は、本願発明に特徴的なステップであり、宿主内でのタグ付加タンパク質の発現を可能にする発現ベクターを用意する。本発明の発現方法には、本発明のペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を保持する発現ベクターが用いられる。

[0028] 大腸菌を宿主とする場合の発現ベクターは、大腸菌での目的タンパク質の発現が可能なように、大腸菌で機能するプロモーター、リボソーム結合部位、開始コドン、開始コドンの直後に配置された、本発明のペプチドタグをコードする配列、及び当該配列の下流に配置された、目的タンパク質をコードする配列を含む。典型的には、発現ベクターはプラスミドの形態である。

[0029] プロモーターは、大腸菌で機能する限りにおいて特に限定されない。例えば、T7プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、trpプロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター、低温発現プロモーター（コールドショック遺伝子cspAのプロモーター）等を用いることができる。この中でもT7プロモーター及び低温発現プロモーターは誘導が容易であり強力な発現制御が可能という利点を有し、特に好ましいプロモーターである。

[0030] リボソーム結合部位は、開始コドンの上流に位置し、リポソームが結合する配列（SD配列）を含む。SD配列はアデニン及びグアニンに富んだ配列であ

り、例えば、AGGAGGの配列からなる。

[0031] 開始コドンの直後には、ペプチドタグをコードする配列が配置される。ペプチドタグをコードする限り、様々な配列を採用することができる。例えば、ペプチドタグがSKの場合であれば、tctaaaやtcg aagの配列など、ペプチドタグがSKIの場合であれば、tct aaa ataやtcg aag atcの配列など、ペプチドタグがSKIKの場合であれば、tct aaa ata aaa（配列番号４）やtcg aag atc aag（配列番号５）の配列など、ペプチドタグがSKKKの場合であれば、tct aaa aaa aaa（配列番号３７）の配列、ペプチドタグがSKIIの場合であれば、tct aaa att att（配列番号３６）の配列、ペプチドタグがAKIKの場合であれば、gca aaa att aaa（配列番号３８）の配列、ペプチドタグがAKIIの場合であれば、gca aaa att att（配列番号３９）の配列、ペプチドタグがKKKKの場合であれば、aaa aaa aaa aaa（配列番号３５）の配列、を用いることができる。

[0032] ペプチドタグをコードする配列の下流には、目的タンパク質をコードする配列が配置される。「目的タンパク質」とは、本発明の発現方法によって生産することが意図されたタンパク質である。目的タンパク質の例は、医薬や食品、或いは研究試薬等の成分として有用なタンパク質、例えば、酵素（アミラーゼ、イソアミラーゼ、ラクターゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、インベルターゼ、ヒアルロニダーゼ、ペプシン、パパイン、トリプシン、キモトリプシン、ブロメライン、サーモライシン、リパーゼ、ウロキナーゼ、ウレアーゼ等）、抗体、抗体断片、サイトカイン（インターフェロン、インターロイキン等）、ホルモン（エリスロポエチン、インスリン、グルカゴン、セクレチン、ガストリン、バソプレッシン、成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン等）、オピオドペプチド（エンドルフィン、エンケファリン、ダイノルフィン等）、線維状タンパク質（ケラチン、

コラーゲン、エラスチン等）である。

[0033] ペプチドタグをコードする配列と、目的タンパク質をコードする配列は直接又は他の配列を介して連結される。ここでの他の配列の例として、プロテアーゼ認識配列をコードする配列を挙げることができる。プロテアーゼ認識配列とは、特定のプロテアーゼにより認識され、当該プロテアーゼによるタンパク質の切断に必要なアミノ酸配列である。例えばソルターゼ認識配列、HRV3C認識配列、TEVプロテアーゼ認識配列を用いることができる。プロテアーゼ認識配列をコードする配列のような機能配列ではなく、特定の機能を持たない配列を、ペプチドタグをコードする配列と目的タンパク質をコードする配列の間に介在させてもよい。

[0034] 発現ベクターは、上記の各要素の他、宿主大腸菌内での増殖に必要な要素、目的タンパク質の発現に必要又は有用な要素、検出や識別などに有用な要素等を含むことができる。発現ベクターに組み込むことが可能な要素を例示すれば、複製起点、ターミネーター（例えばT7ターミネーター）、薬剤耐性遺伝子（アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子等）である。

[0035] 上記構成の発現ベクターは、例えば、以下の（ａ）～（ｃ）の中のいずれかの方法で構築される。

（ａ）大腸菌発現用ベクターに対して、本発明のペプチドタグが連結した目的タンパク質をコードする配列を挿入する方法

（ｂ）本発明のペプチドタグをコードする配列を開始コドンの直後に有する大腸菌発現用ベクターに対して、該配列の下流にインフレームで目的タンパク質をコードする配列を挿入する方法

（ｃ）目的タンパク質をコードする配列を保持する大腸菌発現用ベクターの開始コドンの直後に、本発明のペプチドタグをコードする配列を挿入する方法

[0036] （ａ）の構築方法は、プロモーターやリボソーム結合部位等の発現に必要な要素に加え、クローニング部位を有するベクターを利用した構築方法であ

る。クローニング部位は目的タンパク質をコードする遺伝子の挿入に利用される。クローニング部位としてマルチクローニング部位を備えることにしてもよい。本発明のペプチドタグが連結した目的タンパク質をコードする配列をクローニング部位に挿入することにより、本願発明の発現方法に用いる発現ベクターが完成する。ペプチドタグをコードする配列に隣接するようにクローニング部位を設けておけば、ペプチドタグと目的タンパク質が直結した構造の発現産物を得ることが可能になる。尚、この構築方法の利点の一つは、市販の汎用的なベクターを利用できることである。

[0037] （ｂ）の構築方法では、本発明のペプチドタグをコードする配列が予め組み込まれたベクターが利用される。本発明のペプチドタグをコードする配列の下流には、目的タンパク質をコードする配列をインフレームで挿入するためのクローニング部位が備えられている。目的タンパク質をコードする配列をクローニング部位に挿入することにより、本願発明の発現方法に用いる発現ベクターが完成する。この構築方法の場合、本発明のペプチドタグが連結した目的タンパク質をコードする配列を用意する必要がない（即ち、目的タンパク質をコードする配列をそのまま使用できる）。従って、例えば、多種類の目的タンパク質を発現させる場合に特に有効といえる。尚、（ｂ）の構築方法に利用可能なベクターの例を図１１に示す。

[0038] （ｃ）の構築方法は、上記二つの構築方法とは異なり、予め目的タンパク質をコードする配列を保持するベクターを利用する。この構築方法では、ベクターの開始コドンの直後に、本発明のペプチドタグをコードする配列を挿入することにより、本願発明の発現方法に用いる発現ベクターが完成する。本発明のペプチドタグの挿入は、ペプチドタグをコードする配列と目的タンパク質をコードする配列がインフレームで連結されるようにする。この構築方法は、目的タンパク質をコードする配列を保持するベクターが利用可能な状態にあるとき（例えば、既に所有している場合（構築済み又は入手済み）、或いは容易に入手可能な場合）に特に有効である。

[0039] （ａ）の構築方法においては、本発明のペプチドタグと目的タンパク質を

コードする配列の間にプロテアーゼ認識配列をコードする配列が介在するものを挿入配列とすることにより、（ｂ）の構築方法においては、例えば、本発明のペプチドタグをコードする配列の下流にプロテアーゼ認識配列をコードする配列が配置された大腸菌発現用ベクターを利用することにより、（ｃ）の構築方法においては、例えば、本発明のペプチドタグとともにプロテアーゼ認識配列をコードする配列を挿入することにより、ペプチドタグ配列と目的タンパク質の配列の間にプロテアーゼ認識配列が介在する発現産物を得るための発現ベクターとなる。

[0040] 尚、大腸菌発現系に利用可能な発現ベクターが数多く開発されており、既存の発現ベクターを利用して本発明の発現ベクターを構築することができる。

[0041] ステップ（１）で用意した発現ベクターは宿主大腸菌に導入される（ステップ（２））。導入操作は常法で行えばよい。例えば、コンピテントセル法（例えば塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、ハナハン法、SEM法など）やエレクトロポレーション法によって発現ベクターを導入することができる。宿主大腸菌の例としてJM109株、MC1061株、DH5α株、BL21株を挙げることができる。

[0042] ステップ（２）に続くステップ（３）では、発現ベクターが導入された形質転換大腸菌（形質転換体）を培養し、目的タンパク質を発現させる。培養条件は、形質転換体が生育し、目的タンパク質の発現が可能である限り、特に限定されない。標準的な培養条件を基準として必要に応じて修正を加えればよい。また、予備実験によって適当な培養条件を設定することが可能である。

[0043] 培地の組成は特に限定されない。培地の炭素源として例えば、マルトース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等を用いることができる。また、窒素源として例えば硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、或いはペプトン、酵母エキス、コーンスティープリカー、カゼイン加

水分解物、ふすま、肉エキス等を用いることができる。無機塩としてカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等を用いることができる。組換え菌の生育を促進するためにビタミン、アミノ酸などを添加した培地を使用してもよい。

[0044] プロモーターとして誘導性のものを用いた場合、誘導因子（インデューサー）を培地に添加すること、又は培養条件を変化させることにより、目的タンパク質の発現を誘導することができる。誘導因子は、使用するプロモーターの種類に対応するように選択すればよい。誘導因子の例はイソプロピル－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトシド（IPTG）、インドール酢酸（IAA）である。

[0045] 目的タンパク質は培養液又は菌体から回収される。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理等することによって不溶物を除去した後、限外ろ過膜による濃縮、硫安沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて分離、精製を行うことにより目的タンパク質を得ることができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理、ビーズ破砕処理などによって破砕した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより目的タンパク質を得ることができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破砕、分離、精製）を行ってもよい。

[0046] 以上の方法によれば、本発明のペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質（タグ付加タンパク質）が発現産物として得られる。一態様では、本発明のペプチドタグと目的タンパク質が直結した状態（即ち、本発明のペプチドタグと目的タンパク質の配列の間に他のアミノ酸／アミノ酸配列が介在しない）の発現産物が得られる。プロテアーゼ認識配列をコードする配列が組み込まれた発現ベクターを用いた場合には、本発明のペプチドタグと目的タンパク質の配列の間にプロテアーゼ認識配列が介在した状態の発現産物が得られる。この態様の場合、発現産物をプロテーゼ処理することにより、ペプチドタグが切断（分離）された目的タンパク質を得ることが可能である。

[0047] 一方、酵母発現系を利用する場合（即ち、酵母を宿主として用いる発現方

法）は、以上で説明した大腸菌発現系を利用する場合に準ずる。従って、特に言及しない点については大腸菌発現系における対応する説明が援用される。

[0048] 酵母を宿主とした場合の発現ベクターは、酵母での目的タンパク質の発現が可能なように、酵母で機能するプロモーター、開始コドン、開始コドンの直後に配置された、本発明のペプチドタグをコードする配列、及び当該配列の下流に配置された、目的タンパク質をコードする配列を含む。典型的には、発現ベクターはプラスミドの形態である。大腸菌で複製可能な複製開始点を有するシャトルベクターとしてもよい。

[0049] 酵母を宿主とする場合のプラスミドとしては、プロモーターとして例えばGAL1、GAL10、AOX1、pTEF1、pADH1、pTPI1、pHXT7、pTDH3、pPGK1又はpPYK1を含み、更に、栄養相補遺伝子（例えばURA3遺伝子、HIS3遺伝子、LYS2遺伝子、LEU2遺伝子等）等を含むものが挙げられる。発現誘導因子としては例えばガラクトースが挙げられる。

[0050] 酵母発現系においても、発現ベクターにプロテアーゼ認識配列を組み込むことにしてよい。大腸菌発現系の場合と同様に酵母発現系で使用する発現ベクターも、例えば、以下の（ａ）～（ｃ）の中のいずれかの方法で構築される。尚、酵母発現系に利用可能な発現ベクターが数多く開発されており、既存の発現ベクターを利用して本発明の発現ベクターを構築することができる。

（ａ）酵母発現用ベクターに対して、本発明のペプチドタグが連結した目的タンパク質をコードする配列を挿入する方法

（ｂ）本発明のペプチドタグをコードする配列を開始コドンの直後に有する酵母発現用ベクターに対して、該配列の下流にインフレームで目的タンパク質をコードする配列を挿入する方法

（ｃ）目的タンパク質をコードする配列を保持する酵母発現用ベクターの開始コドンの直後に、本発明のペプチドタグをコードする配列を挿入する方法

[0051] 宿主としての酵母にはサッカロミセス・セレビシアエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、ピキア・パストリス等を用いることができる。宿主の形質転換、形質転換体の培養（目的タンパク質の発現）、及び目的タンパク質の回収は、常法で行うことができる。

[0052] （２）無細胞合成系

本発明の一態様では、大腸菌由来成分を用いた無細胞タンパク質合成系を利用して目的タンパク質を発現させる。無細胞タンパク質合成系とは、生細胞を用いるのではく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸からタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞タンパク質合成系では一般に、細胞破砕液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

[0053] タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（例えばShimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する３種類の開始因子、３種類の伸長因子、終結に関与する４種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる２０種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる３１種類の因子の遺伝子を大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

[0054] 無細胞タンパク質合成系には以下の利点がある。まず第１に、生細胞を維持する必要がないため操作性が良好で系の自由度も高い。したがって、目的のタンパク質の性質に応じて様々な修正や修飾を施した合成系を設計するこ

とが可能となる。次に、細胞系の合成では使用する細胞に毒性のあるタンパク質の合成は基本的にできないが、無細胞系ではそのような毒性のタンパク質であっても生産することができる。さらに、多種類のタンパク質を同時にかつ迅速に合成できることからハイスループット化が容易である。生産されるタンパク質の分離・精製が容易であるという利点も備え、これはハイスループット化に有利に働く。加えて、非天然型のアミノ酸を取り込ませるなどして非天然型タンパク質を合成することも可能であるという利点も併せ持つ。

[0055] 本発明では、大腸菌S30抽出液の系（原核細胞の系）、又は上記の如き大腸菌ゲノムを基に再構成した系を用いる。これらの系はキットとしても市販されており、容易に利用することが可能である。

[0056] 無細胞タンパク質合成系として、コムギ胚芽抽出液の系（真核細胞の系）やウサギ網状赤血球可溶化物の系（真核細胞の系）等も知られているが、歴史的には大腸菌S30抽出液の系が最も古く、この系を利用して様々なタンパク質の合成が試みられてきた。大腸菌S30画分は、大腸菌の集菌、菌体破砕、精製の工程を経て調製される。大腸菌S30画分の調製及び、無細胞転写・翻訳共役反応はPrattらの方法（Pratt, J. M.: Chapter 7, in “Transcription and Translation: A practical approach”, ed. by B. D. Hames & S. J. Higgins, pp. 179-209, IRL Press, New York (1984)）やEllmanらの方法（Ellman, J. et al.: Methods Enzymol., 202, 301-336(1991)）を参考にして行うことができる。

[0057] 無細胞タンパク質合成系を利用して目的タンパク質を発現させる場合においても、上記の大腸菌発現系の場合と同様の構成の発現ベクターを用いることができる。但し、無細胞タンパク質合成系に用いる発現ベクターでは複製開始点は特に必要ない。また、無細胞タンパク質合成系では、プラスミドDNAの形態の発現ベクターに限らず、直鎖状DNA（例えば、当該プラスミドDNAの一部（目的タンパク質の発現に必要な部分）を増幅して得られるもの）、mRNA（例えば、当該直鎖状DNAを転写させて得られるもの）、コンカテマーDNA（

単位配列が直列的に複数個連結されたDNA。例えばローリングサークル増幅法によって調製することができる）を鋳型として目的タンパク質を発現させることができる。

[0058] 無細胞タンパク質合成系を利用する場合には、本発明のペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を含む発現用鋳型（発現ベクター、直鎖状DNA、mRNAなど）を用意し（ステップ（ｉ））、無細胞タンパク質合成反応を行う（ステップ（ｉｉ））。発現産物である目的タンパク質の回収は、大腸菌発現系の場合と同様の操作で行えばよい。

[0059] ２．発現ベクター及び発現キット

本発明の発現方法に用いる発現ベクター（特にクローニング部位を有するもの）は汎用性に優れ、それ自体、有用性及び利用価値が高い。そこで本発明は別の局面として、本発明の発現方法に用いることができる発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターの構成は上記の通りであり、大腸菌発現系、大腸菌由来成分を用いた無細胞タンパク質合成系、又は酵母発現系での目的タンパク質の発現に必要な要素を備える。

[0060] 本発明は更に、本発明の発現ベクターを含む目的タンパク質発現用キットも提供する。当該キットによれば、より簡便に本発明の発現方法を利用した目的タンパク質の生産が可能になる。本発明のキットには、主要構成成分として上記発現ベクター（大腸菌を利用した発現系用又は酵母発現系用）が含まれる。一方、発現産物である、タグ付加タンパク質を特異的に認識する試薬を含めることができる。当該試薬を含むキットは発現産物の検出、精製等を容易にする。当該試薬の一例は、タンパク質のN末端に連結した、本発明のペプチドタグを認識する抗体（抗ペプチドタグ抗体）である。ここでの抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体であってもよい。また、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、dsFv抗体などの抗体断片の形態であってもよい。標識化された抗体とすれば、標識を指標として検出、定量などが可能となる。また、タグ付加タンパク質の検出や精製等を容易にするために、不溶性支持体又は磁性体に担持された抗体としてもよい。抗体を担持させる不溶性支持体

／磁性体の形状は特に限定されない。形状の例として、プレート状、粒子状を挙げることができる。不溶性支持体の材質としては、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂、ガラスを例示することができる。他方、磁性体の材質としては、フェライトやマグネタイトなどの酸化鉄、酸化クロム、コバルトを例示することができる。尚、抗ペプチドタグ抗体は、例えば研究・開発用のツールとして、それ自体が有用であり、利用価値が高い。従って、抗ペプチドタグ抗体については、キットの構成要素としてではなく、単独で、或いは、他の要素（抗ペプチドタグ抗体を使用する際に必要な試薬など）とのセット品として、提供することもできる。

[0061] 更に、本発明のペプチドタグをN末端に有するペプチド（以下、「ペプチド試薬」と呼ぶ）をキットに含めることもできる。当該ペプチド試薬は、タグ付加タンパク質の精製に利用される。例えば、発現させたタグ付加タンパク質を上記試薬（タグ付加タンパク質を特異的に認識するもの）に結合させた後、当該ペプチド試薬を競合的に作用させることによって、捕捉されたタグ付加タンパク質を解離させ、回収する。本発明のペプチドタグを含み、且つこのような用途に適する限り、ペプチド試薬を構成するペプチドの長さ及び全体の配列は特に限定されない。但し、その使用目的及びそれに必要な特性、製造コスト等を考慮すれば、好ましくは、本発明のペプチドタグの配列からなるペプチド（例えば、SK、SKI又はSKIK）をペプチド試薬として用いる。本発明の発現方法を実施する際に必要なその他の試薬（IPTG等の誘導剤など）、容器・器具、培地などを本発明のキットに含めてもよい。尚、通常、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

[0062] ３．組換えタンパク質

本発明の発現方法によれば、特徴的な構造を有する組換えタンパク質、具体的には、本発明のペプチドタグがN末端に連結した組換えタンパク質が得られる。当該組換えタンパク質は、本発明のペプチドタグを利用して検出、精製等が可能であるという利点を有する。従って、それ自体、有用性は高い。

上記の通り、本発明の発現方法が適用可能なタンパク質は特に限定されず、様々な目的タンパク質を「ペプチドタグが連結した組換えタンパク質」として取得することが可能である。また、ペプチドタグと目的タンパク質の配列の間にプロテアーゼ認識配列を組み入れておけば、例えば精製処理後、或いは分画ないし分取後にプロテアーゼを作用させ、ペプチドタグ部分を切断（分離）することが可能である。

実施例

[0063] １．マウス抗体の発現

マウスより取得した抗大腸菌0157の抗体遺伝子を使用し、Fabとして発現させた。なお、Hc、LcのC末端には、それぞれLZA（ロイシンジッパーペプチドA）-HAタグ及びLZB（ロイシンジッパーペプチドB）-Flagタグを連結した形とした。ロイシンジッパーペプチドAとロイシンジッパーペプチドBは高い親和性を持ち、ロイシンジッパーヘテロダイマーを形成する。ロイシンジッパーペプチドAは、ロイシンジッパーを形成できるように7残基毎にロイシンを含む。ロイシンジッパーペプチドBも同様に、7残基毎にロイシンを含む。これらのロイシンは、ロイシンジッパーペプチドAにおけるロイシン（ロイシンジッパーモチーフを構成するもの）に対応するように配置されている。

[0064] まず、ハイブリドーマからクローニングしたマウス抗体の重鎖と軽鎖をそれぞれTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTCC（配列番号６）とGAGCTGGGCGCTCCCACCACCGCCTGGAATGGGCACATGCAGATCTTTG（配列番号７）及びTAATAATCTAGAAGGAGATATCATATGGATGTTTTGATGACCCAAAC（配列番号８）とCTGGGCGCTCCCACCACCGCCACACTCTTTCCTGTTGAAGCTC（配列番号９）のDNAプライマーペアで増幅した。また、LZAとLZBの遺伝子配列をLifetechnologies社による受託サービスにより人工合成し、これらを鋳型として、それぞれGGCGGTGGTGGGAGCGCCCAGCTCGAAAAGGAG（配列番号１０）とTGATATCTCCTTCTAGATTATTAAGCGTAATCTGGAACATC（配列番号１１）及びGGCGGTGGTGGGAGCGCCCAGCTCAAGAAGAAGC（配列番号１２）とTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAACCGCCCTTC（配列番号１３）のプライマーペアで増幅した。次に、CCGACTACAAGGACGACGATGACAAATAATAAGATCCGGCTGCTAACAA

AGC（配列番号１４）とCATATGTATATCTCCTTCTTAA（配列番号１５）で直鎖化した発現ベクターpET22b（Novagen）および上記4断片をGibson assemblyにより連結し、T7プロモーター下流のNdeIサイトに重鎖-LZA-HAタグと軽鎖-LZB-Flagタグが、RBSを含む短いDNA配列を介して連結されたFab発現プラスミドを構築した。DH5alphaを形質転換し、100μg/mLアンピシリン含有LB寒天プレート上に生育した形質転換体からプラスミドを調製した。これをpET22b-m6FabLZとした。

pET22b-m6FabLZを鋳型として、PCRによりHcおよびLcの開始コドン直後にSKIK配列5’-tctaaaataaaa-3’（配列番号４）を挿入した。詳述すると、aggagatatacatatgtctaaaataaaagaggtccagctg（配列番号１６）とGTCATCAAAACATCTTTTATTTTAGACATATGATATCTCCTTCT（配列番号１７）のペア及びtaaaataaaagatgtttgatgacccaaac（配列番号１８）とTAGACATATGTATATCTCCTTCT（配列番号１９）のペアでPCRを行った。DNAポリメラーゼにはKOD plusを使用した。温度プログラムは、94℃で2分保持、94℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で4分の処理を25サイクル、72℃で3分保持、とした。得られたPCR産物を精製し、上記同様にGibson assemblyにより連結し環状化した。DH5alphaを形質転換し、100μg/mLアンピシリン含有LB寒天プレート上に生育した形質転換体からプラスミドを調製した。本プラスミドをpET22b-m6Fab-SKIKとした。

[0065] 発現にはShuffle T7 express株（NEB）を使用し、本菌株を上記プラスミドで形質転換した。以後の操作には100μg/mLアンピシリンを含む培地を使用した。得られた形質転換体のシングルコロニーをLB培地2 mLに植菌し、37℃にて一晩振とう培養した。これを20 mLのTerrific brothに植菌し、37℃にてOD600が0.4～0.5となるまで振とう培養した。その後、16℃に急冷し0.1 mM IPTG存在下でさらに24時間16℃で振とう培養することにより、目的遺伝子の発現を誘導した。遠心分離により回収した細胞ペレットを2 mLのPBSに懸濁し、ビーズ破砕機により破砕した。さらに15000 rpmにて5分間遠心分離し、上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分とし、細胞懸濁液を全細胞画分とした。これらをSDS-PAGEにより解析した。ゲルの染色はCBBにて行った。

[0066] 結果を図１に示す。タグなしとタグありで不溶性画分を比較すると、タグありで著しく発現量が増大していることがわかる。

[0067] ２．ウサギ抗体

ウサギより取得した抗リステリア・モノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）の抗体遺伝子No.1、4及び9をscFvとして発現させた。操作方法、処理条件などは上記の実験に準じた。

[0068] 結果を図２に示す。もともと発現量の多いNo.4、9はタグを付加しても可溶性画分の発現量は依然として多い。一方、No.1はタグ付加により、可溶性及び不溶性画分のタンパク質バンドが著しく濃厚になっており、発現量が増大していることがわかる。

[0069] ３．人工ペプチドの発現

ロイシンジッパーＢをコードする配列を発現させ、タグ付加による発現量の増大効果を調べた。誘導発現条件を37℃で3時間にしたこと以外、上記実験と同様の操作・条件で発現させた。

[0070] 結果を図３に示す。タグを付加した場合のみ、タンパク質バンド（矢印で示す）が確認できる。

[0071] ４．他のタグ（T7タグ）との比較

バクテリオファージカプシド（capsid）タンパク質のリーダー配列由来であるT7タグ配列5’-atggctagcatgactggtggacagcaaatgggt-3’：配列番号２０（アミノ酸配列MASMTGGQQMG：配列番号２１）と、SKIKの効果を比較した。モデルとして、3種類のウサギ由来scFv（No. 1、4及び9）を用いた。発現は大腸菌Shuffle T7 expressにて行った。発現産物を破砕したものをサンプルとしてSDS-PAGEを行い、タンパク質発現状態を比較した。また、精製したscFvの抗原に対する結合活性をELISAにより評価した。ELISAにおいては、タンパク質量あたりの活性を算出した。

[0072] SDS-PAGEの結果から、T7タグの付加及びSKIKの付加は、本来発現量の少ないタンパク質の場合はその発現量を増大させた（図４、No.1）。一方で、No.4やNo.9のようにタグなしで発現量が多いものにT7タグを付加すると若干の減

少が認められた（図４、No.4、9）。これらの結果から、SKIKにはタンパク質の種類を問わず発現量を向上させる働きがあり、T7タグのような負の効果を与えないことがわかる。

[0073] ELISAによる評価では、No.4のT7タグ付加scFvは本来の結合活性を失っていた（図５）。SKIK付加scFvは、タグなしのscFv（本来の抗体）と同程度の結合活性を示した。T7タグに比べSKIKは格段に短いため、抗体本体の機能に与える影響が小さいものと考えられる。

[0074] ５．コドンの影響

SKIKの効果に関するコドン影響を調べた。上述のSKIKをコードする配列（5’-tctaaaataaaa-3’：配列番号４）と、異なるコドンを採用した配列(5’-tcgaagatcaag-3’ ：配列番号５。この配列がコードするペプチドを、便宜上、「SKIK2」と呼ぶ)を比較した。ウサギscFvのNo.1遺伝子をモデルとして、上記実験と同様に発現させ、SDS-PAGEの後にCBB染色し、発現量を比較した（図６）。いずれの塩基配列を用いた場合においても目的タンパク質の発現量が向上していたことから、SKIKをコードする限り、コドンの如何に拘わらず、所望の効果（目的タンパク質の発現量増大）を発揮することを期待できる。

[0075] ６．無細胞合成系におけるタグ効果の検証

大腸菌の無細胞タンパク質合成系によるSKIKタグ配列の効果を調べた。ウサギ抗リステリア菌のscFvをモデルとした。pET22b-r1scFv-HA及びpET22b-SKIK-r1scFv-HAを鋳型としプライマーatctcgatcccgcgaaattaatacg（配列番号２２）とtccggatatagttcctcctttcag（配列番号２３）のペアにて増幅し、T7プロモーターとターミネーターをそれぞれ目的遺伝子の上流・下流に含む発現用DNA断片を得た。同様にポジティブコントロールの蛍光タンパク質GFP発現用断片もPCRにて増幅した。得られた約1 kbのPCR産物をカラム精製し、DNA濃度60～65 ng/μLとした。これを無細胞タンパク質合成系の鋳型とした。ネガティブコントロールは鋳型DNAの代わりにTE緩衝液を添加した。

[0076] 無細胞タンパク質合成の反応組成は表１（無細胞タンパク質合成反応組成

）及び表２（LMの組成）の通りである。30℃にて60分湯浴し反応させた後、1 mg/mL RNase 1μLを添加しRNAを除去した。反応液そのものを全画分(Whole)、13000 rpmにて10分遠心分離した上清及び沈殿をそれぞれ、可溶性画分（soluble）及び不溶性画分（insoluble）とした。2-メルカプトエタノールにより還元処理し、画分ごとの体積を揃えてSDS-PAGE（ゲル濃度12.5%）へ供した。検出にはTyhoonを使用した。

[0077] [表1]

	量（μL）
5 M KOAc	0.6
0.2 M Mg(OAc)2	0.9
0.1 mg/mL リファンピシン	3
LM	7.5
10 mg/mL クレアチンキナーゼ	0.45
100 mM GSSG	0.6
E. coli (BL21 Star (DE3) pSJS1240 の S30 抽出液	8.5
10 mM GSH	1
DNA 鋳型 (60 ng/μL)	1
水	6.15
蛍光ラベルリジン	0.3
計	30

[0078]

[表2]

	濃度
トリス酢酸バッファー(pH7.4)	220 mM
ATP	2.4 mM
GTP CTP UTP ミックス	4 mM
クレアチンリン酸二ナトリウム塩	240 mM
20 アミノ酸	8.4 mM
フォリン酸	512 μg/mL
酢酸アンモニウム	143.2 mM
E.coli tRNA	680 μg/mL

[0079] 結果を図７に示す。タグなしのscFvはいずれの画分においてもタンパク質バンドが確認できなかった、一方で、SKIKタグ付のものは明瞭なバンドが見られ、系内の発現量が著しく増大していることがわかった（図７の矢印）。このことから、SKIKタグは、大腸菌のin vivoのみならずin vitroの発現系においても目的タンパク質の発現量上昇効果を発揮することがわかった。

[0080] ７．制御プロモーターの影響

プロモーターの種類による影響（プロモーター依存性）を調べるために、T7プロモーター制御での発現量と、コールドショックプロモーターcspA制御での発現量を比較した。モデル遺伝子として、SKIKタグなしのときに発現量が低い抗O157マウス抗体（m6FabLZと呼ぶ）を使用した。この遺伝子をpET22b（Novagen；T7プロモーター制御）とpColdI（Takara；cspAプロモーター制御）の開始コドンにあわせてクローニングし、Shuffle T7 express株にて発現させた。誘導培地には100μｇ/mLのアンピシリンを含むTeriffic Brothを使用した。誘導条件は1 mM IPTG存在下において16℃24時間とした。菌体を遠心分離5000×gにて回収しPBSにて洗浄した。洗浄した菌体を、菌体量をそろえて還元剤入りサンプルバッファーに懸濁し5分間ボイルした後、SDS-PAGE（ゲル濃度12.5%）へ供した。CBB染色によりタンパク質バンドを検出した。

[0081] 菌体量をそろえて泳動したSDS-PAGEの結果を図８に示す。矢印で示す抗体断片サイズは、ネガティブコントロール（pET22b）及びタグなしでは検出できなかった。一方で、今回試した両方のプロモーターにおいて、SKIKタグ付のものはメインバンドとして検出された。つまり、SKIKタグによる発現量上昇効果が認められた。このことから、SKIKタグは、大腸菌における任意のプロモーター制御下において効果を発揮することを期待できる。

[0082] ８．タグ長の検討

タグ長を削減したときの影響を調べるために、開始コドンと抗リステリアーウサギ抗体遺伝子（r1scFvと呼ぶ）の間にタグ配列（Sをコードする配列、SKをコードする配列、SKIをコードする配列、又はSKIKをコードする配列）が挿入されたもの（４系列）とタグなしのもの（１系列）の計５系列で比較した。ベクターはpET22bとし、PelBシグナル配列は除去した。発現宿主には上記同様にShuffle T7 expressを使用し、誘導培地には100μｇ/mLのアンピシリンを含むLB培地を使用した。誘導条件は1 mM IPTG存在下において16℃24時間とした。菌体を遠心分離5000×gにて回収しPBSにて洗浄した。洗浄した菌体を、菌体量を揃えて還元剤入りサンプルバッファーに懸濁し5分間ボイルした後SDS-PAGE（ゲル濃度12.5%）へ供した。CBB染色によりタンパク質バンドを検出した。

[0083] 菌体量を揃えて泳動したSDS-PAGE結果を図９に示す。タグなし ＜ S ＜ SK ＜ SKI ＜ SKIKタグの順に目的タンパク質バンド量が増大しており、SKIとSKIKにおいては著しい増大が確認された。このことから、発現量上昇のためのタグ長としては、アミノ酸SKを含む2以上から成る配列が好ましく、SKIを含む3～4アミノ酸がさらに好ましいことがわかった。

[0084] ９．酵母発現系での効果

モデルとしてNo．４ ウサギscFv遺伝子を使用し、発現ベクターを低コピープラスミドのpYC2/NTとした。まず、pYC2/NTをTTTTTTCGGTACCAAGCTTAATATTCCC（配列番号２４）とTAACTGATCCTAGAGGGCCGCATCATG（配列番号２５）のプライマーペアによりPCRを行い直鎖化した。次に、タグなし及びSKIKタグありの

No. 4 scFv遺伝子が挿入された大腸菌発現プラスミドを鋳型とし、それぞれTAAGCTTGGTACCGAAAAAAATGGATGTCGTGATGACCCAGAC（配列番号２６）とGGCCCTCTAGGATCAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG（配列番号２７）（r4scFv-pYC-R）のペア及びTAAGCTTGGTACCGAAAAAAATGtctaaaataaaaGATGTCGTGATGACC（配列番号２８）と上記r4scFv-pYC-Rのペアで増幅した。これらをそれぞれ直鎖化したpYC2/NTとGibson assemblyにより連結し、酵母の発現プラスミドを構築した。

[0085] DH5alphaを形質転換し、100μg/mLのアンピシリンを含むLB培地で生育したコロニーからプラスミドを調製した。酵母S. cerevisiae INVsc1株(Lifetechnologies)のコンピテントセルを同プラスミドで形質転換し、ウラシル欠損合成寒天培地（SD-U培地、炭素源は2% グルコース）に塗布した。得られた形質転換体をSD-U液体培地に植菌し一晩培養した（前培養）。前培養液100μLを新しいSD-U液体培地3 mLに植え継ぎ3時間培養した後、5000 x G、3分の遠心分離により菌体を無菌的に回収し、1 mLのPBSにて2回洗浄した。培地をウラシル欠損合成誘導培地（SG-U、炭素源は2%ガラクトースと1%ラフィノース）3 mLに置換し、24時間発現誘導した。尚、すべての培養は30℃、150 rpmにて好気的に行った。

[0086] 菌体を上記同様に回収し、PBSにて洗浄した後、1 mLのPBSに懸濁した。その内の900μLをビーズ破砕器に供し、細胞を破砕した。15000 rpm、5分の遠心分離により可溶性画分と不溶性画分に分けた。残りの100μLを全細胞画分とした。

[0087] 還元SDS-PAGEによりタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。これをSuperBlock™(PBS) Blocking Bufferにより30分間ブロッキング処理した。次に、ブロッキング処理後の膜を、抗HAタグ抗体（和光純薬、Anti HA、Monoclonal Antibody、Peroxidase Conjugated）を上記ブロッキング剤により500倍希釈した液10 mLに浸し、90分間振とう反応させた。0.05% tween20を含むPBSによる洗浄（10分間）を4回繰り返した後、1 step Ultra TMB blotting solution （Thermo）1 mLを膜に滴下し、HAタグの付いたNo. 4 scFvを可視化した。その結果、タグなしと比較して、タグありの画分においてよ

り濃いバンドが認められた（図１０）。

[0088] １０．他のタグの検討

タグ無では発現量の低いウサギscFvをモデルとして使用し、SKIK以外のペプチドタグの効果を調べた。まず、pET22b-r1scFv-HAを鋳型としてプライマーatatgaaaaaaaaaaaagaccctatgctgacc（配列番号４１）及びAGGGTCTTTTTTTTTTTCATATGTATATCTCC（配列番号４２）によりPCRをおこない、N末端にKKKK（配列番号３５）（コードする塩基配列としてaaaaaaaaaaaa（配列番号４０）を使用）を付加した。同様に、atatggcaaaaattaaagaccctatgctgacc（配列番号４３）とAGGGTCTTTAATTTTTGCCATATGTATATCTCC（配列番号４４）でAKIK（配列番号３３）（コードする塩基配列としてgcaaaaattaaa（配列番号３８）を使用）、atatgtctaaaaaaaaagaccctatgctgacc（配列番号４５）とAGGGTCTTTTTTTTTAGACATATGTATATCTCC（配列番号４６）でSKKK（配列番号３２）（コードする塩基配列としてtctaaaaaaaaa（配列番号３７）を使用）、atatggcaaaaattattgaccctatgctgacc（配列番号４７）とAGGGTCAATAATTTTTGCCATATGTATATCTCC（配列番号４８）でAKII（配列番号３４）（コードする塩基配列としてgcaaaaattatt（配列番号３９）を使用）、atatgtctaaaattattgaccctatgctgacc（配列番号４９）とAGGGTCAATAATTTTAGACATATGTATATCTCC（配列番号５０）でSKII（配列番号３１）（コードする塩基配列としてtctaaaattatt（配列番号３６）を使用）を付加した。これらのタグを使用し、上記１．の実施例（マウス抗体の発現）と同様に大腸菌細胞内で目的タンパク質を発現させた。尚、この実験では発現にLB培地を用いた。得られた全細胞画分をSDS-PAGEにて分離しCBBにて染色した結果を図１２に示す。この結果から、SKXX、AKXX及びKKXXも発現量向上効果があることがわかった。

産業上の利用可能性

[0089] 本発明の発現方法によれば、簡便な操作で目的タンパク質の発現量を増大させることができる。本発明の発現方法ではペプチドタグが連結した目的タンパク質が発現する。使用するペプチドタグは短く、目的タンパク質の活性に影響を及ぼす可能性が極めて低い。従って、酵素や抗体など、生理活性を

示すタンパク質を大量に発現させる手段として本発明は特に有用である。また、本発明は汎用性に優れ、様々なタンパク質の発現への適用が期待される。

[0090] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

配列表フリーテキスト

[0091] 配列番号１～５、２９～４０：人工配列の説明：タグ配列

配列番号６～１９、２２～２８、４１～５０：人工配列の説明：プライマー

配列番号２０、２１：人工配列の説明：T7タグ

請求の範囲

[請求項1] 大腸菌を利用した発現系又は酵母発現系によって、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグがN末端に連結したタグ付加タンパク質として目的タンパク質を発現させること、を特徴とする、タンパク質の発現方法。

[請求項2] 前記ペプチドタグが、SKI、SKIK、SKKK、SKII、AKIK、AKII又はKKKKのアミノ酸配列からなる、請求項１に記載の発現方法。

[請求項3] 前記ペプチドタグと、前記目的タンパク質の配列が直結している、請求項１又は２に記載の発現方法。

[請求項4] 前記ペプチドタグと、前記目的タンパク質の配列の間にプロテアーゼ認識配列が介在する、請求項１又は２に記載の発現方法。

[請求項5] 大腸菌を利用した前記発現系が、T7プロモーターを用いた発現系、又は低温発現プロモーターを用いた発現系である、請求項１～４のいずれか一項に記載の発現方法。

[請求項6] 以下の（１）～（３）のステップを含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現方法：

（１）前記ペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を保持する発現ベクターを用意するステップ；

（２）前記発現ベクターを宿主細胞に導入するステップ；及び

（３）前記発現ベクターが導入された形質転換体を培養し、前記目的タンパク質を発現させるステップ。

[請求項7] 前記発現ベクターが以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかの方法で構築される、請求項６に記載の発現方法：

（ａ）前記宿主細胞の発現用ベクターに対して、前記ペプチドタグが連結した目的タンパク質をコードする配列を挿入すること、

（ｂ）前記ペプチドタグをコードする配列を開始コドンの直後に有する前記宿主細胞の発現用ベクターに対して、該配列の下流にインフ

レームで目的タンパク質をコードする配列を挿入すること、

（ｃ）目的タンパク質をコードする配列を保持する前記宿主細胞の発現用ベクターの開始コドンの直後に、前記ペプチドタグをコードする配列を挿入すること。

[請求項8] 大腸菌を利用した前記発現系が、大腸菌由来成分を用いた無細胞タンパク質合成系である、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現方法。

[請求項9] 以下の（ｉ）及び（ｉｉ）のステップを含む、請求項８に記載の発現方法：

（ｉ）前記ペプチドタグがN末端に連結した目的タンパク質をコードする配列を含む発現用鋳型を用意するステップ；及び

（ｉｉ）無細胞タンパク質合成反応を行うステップ。

[請求項10] 大腸菌で機能するプロモーター、

リボソーム結合部位、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置されたクローニング部位、

を有する、大腸菌を利用した発現系用の発現ベクター。

[請求項11] 酵母で機能するプロモーター、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置されたクローニング部位、

を有する、酵母発現系用の発現ベクター。

[請求項12] ペプチドタグをコードする前記配列と前記クローニング部位が隣接

している、請求項１０又は１１に記載の発現ベクター。

[請求項13] ペプチドタグをコードする前記配列と前記クローニング部位の間に、プロテアーゼ認識配列をコードする配列が配置されている、請求項１０又は１１に記載の発現ベクター。

[請求項14] 大腸菌で機能するプロモーター、

リボソーム結合部位、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置された、目的タンパク質をコードする配列、

を有する、大腸菌を利用した発現系用の発現ベクター。

[請求項15] 酵母で機能するプロモーター、

開始コドン、

該開始コドンの直後に配置された、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグをコードする配列、及び

該配列の下流に配置された、目的タンパク質をコードする配列、

を有する、酵母発現系用の発現ベクター。

[請求項16] 請求項１０～１５のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む、目的タンパク質発現用キット。

[請求項17] タンパク質のN末端に連結した前記ペプチドタグを認識する抗体を更に含む、請求項１６に記載のキット。

[請求項18] 前記抗体が不溶性支持体又は磁性体に担持されている、請求項１７に記載のキット。

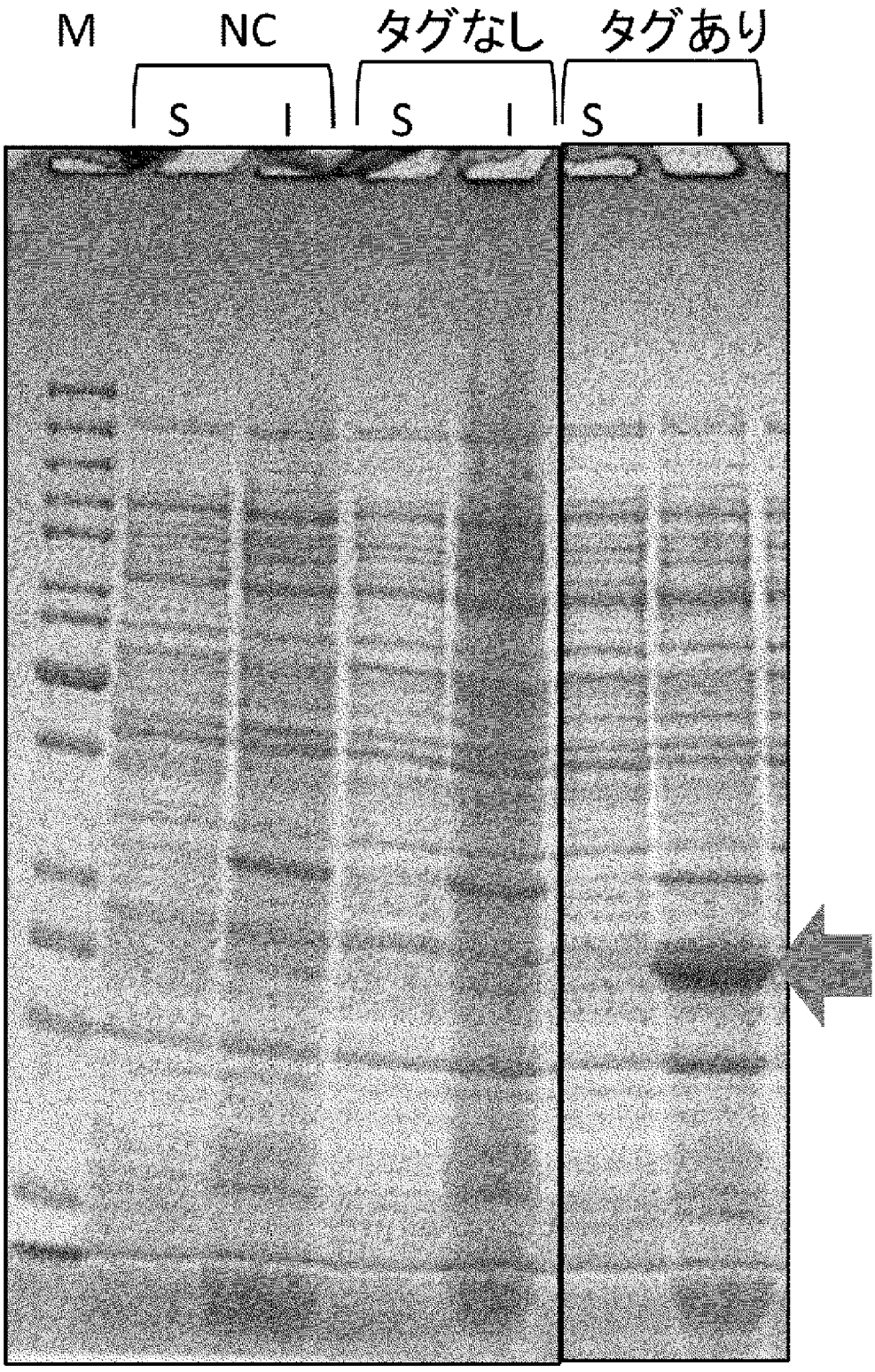
[請求項19] 前記ペプチドタグをN末端に有するペプチドを更に含む、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のキット。

[請求項20] 前記ペプチドが、SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（

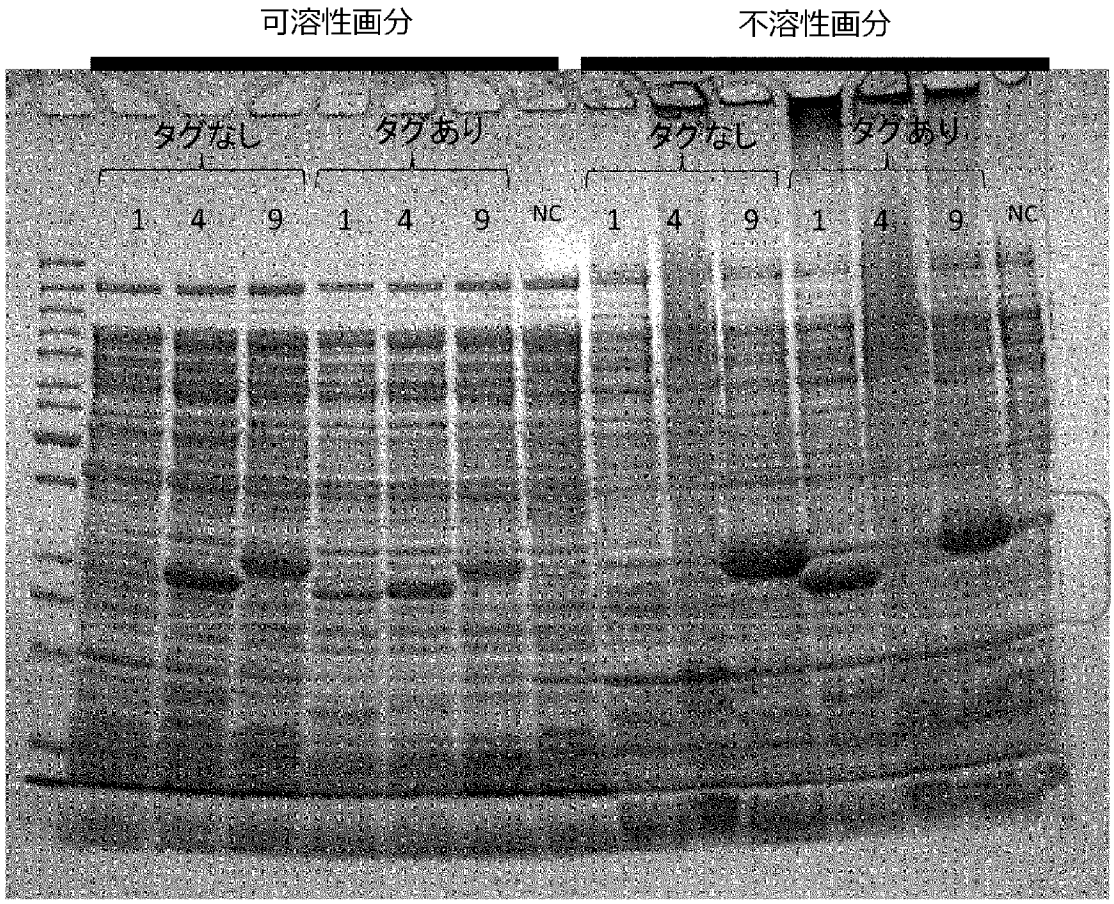
但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなる、請求項１９に記載のキット。

[請求項21] SK、SKX、SKXX、AKXX又はKKXXのアミノ酸配列（但し、Xは任意のアミノ酸残基を表す）からなるペプチドタグがN末端に連結した組換えタンパク質。

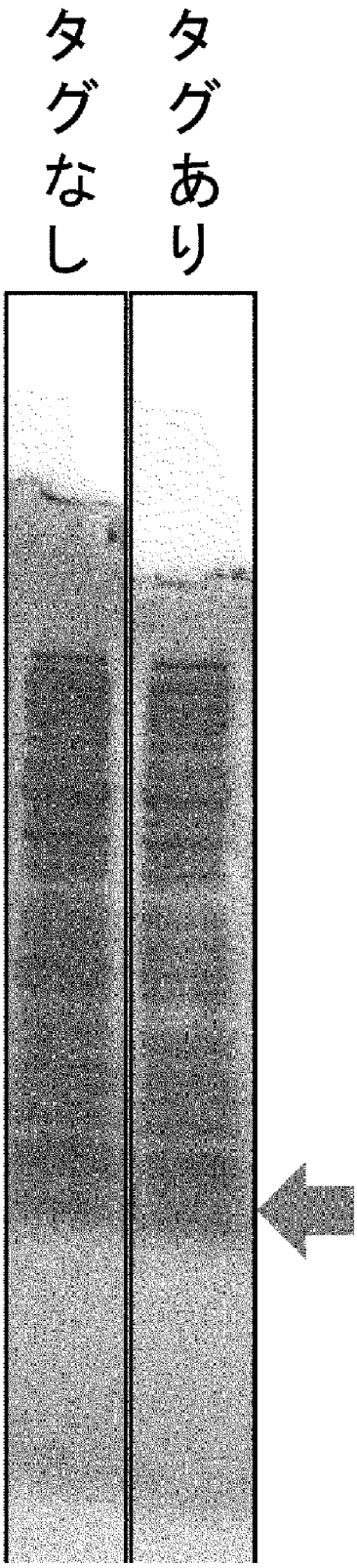
[図1]



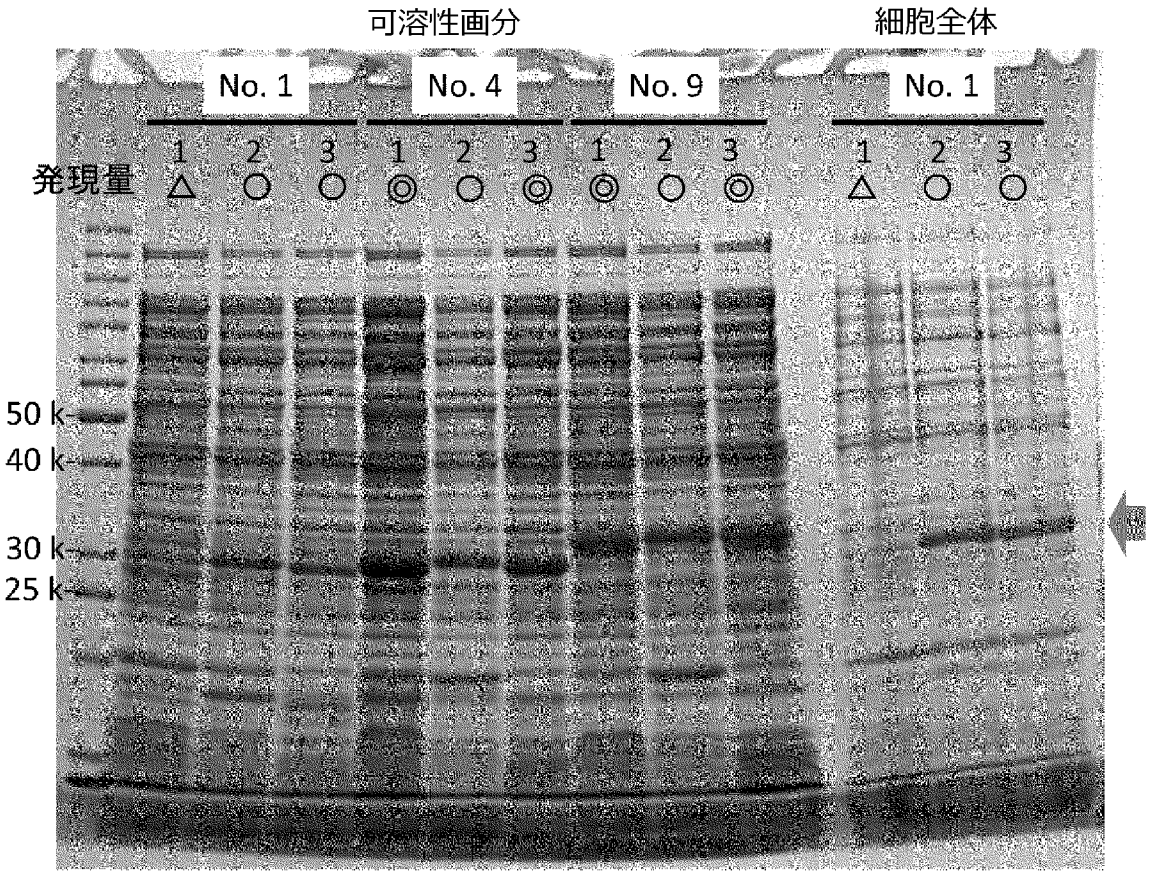
[図2]



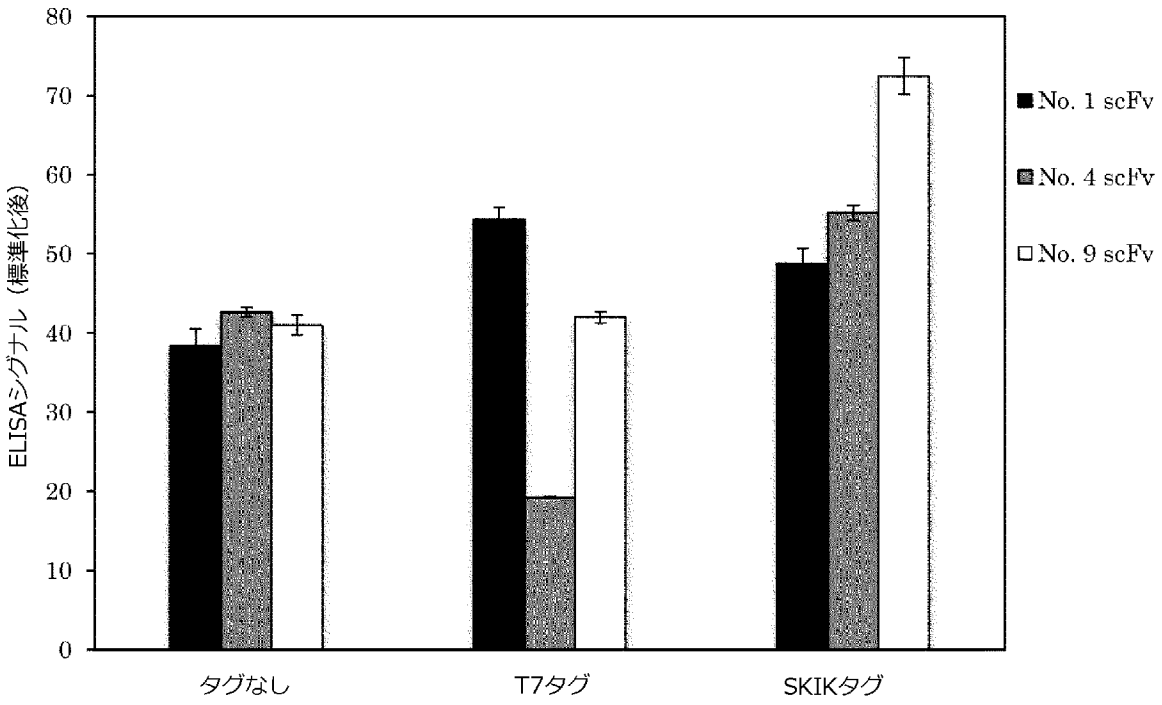
[図3]



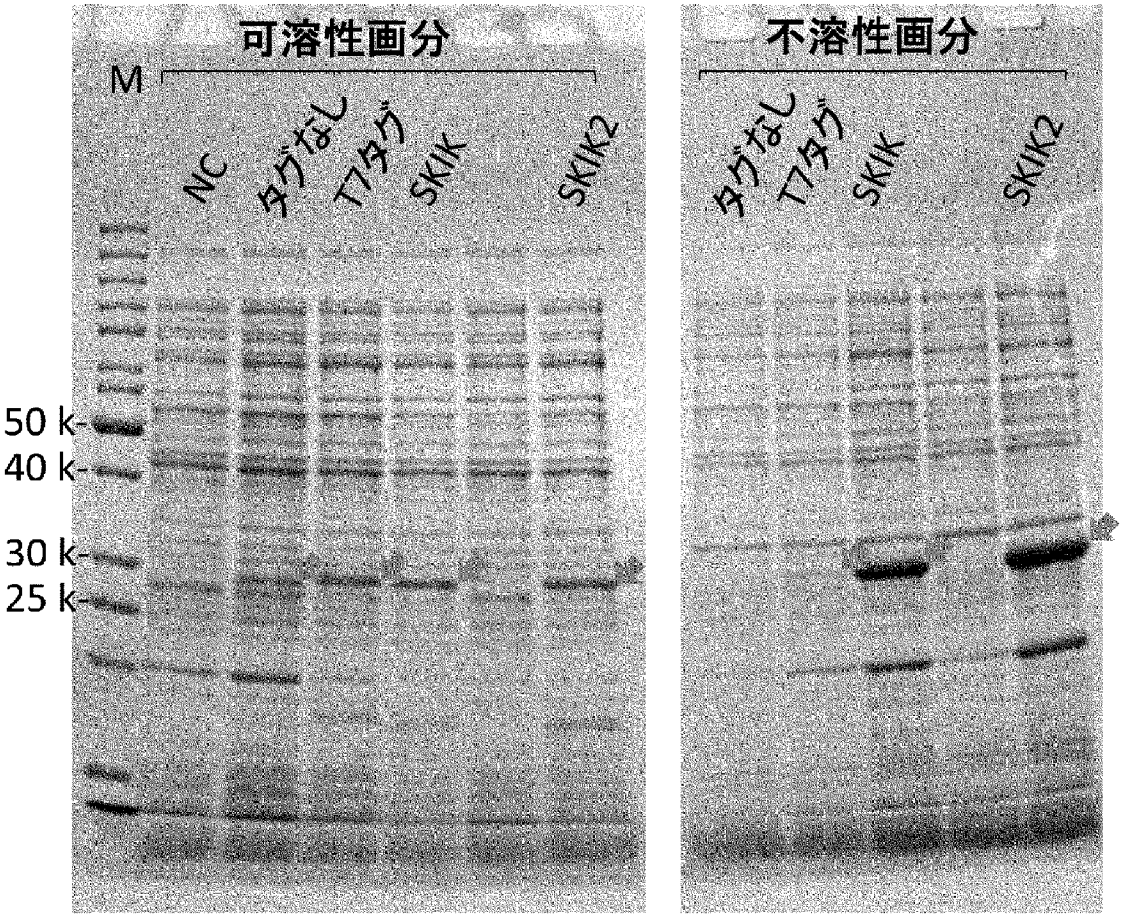
[図4]


可溶性画分
細胞全体
No. 1
No. 4
No. 9
No. 1
1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
発現量
△ ○ ○ ◎ ○ ◎ ◎ ○ ◎ △ ○ ○
50 k
40 k
30 k
25 k

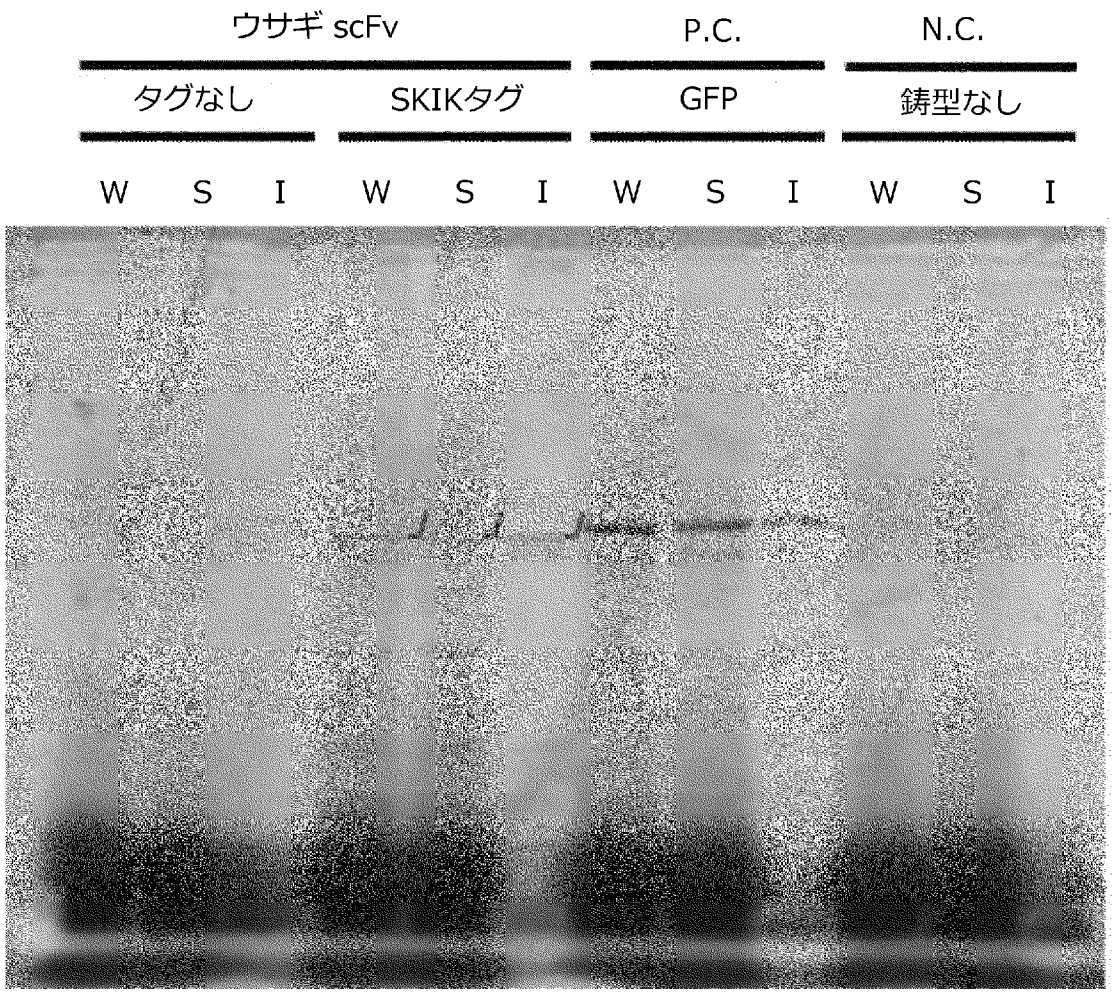
[図5]


80
70
60
50
40
30
20
10
0
ELISAシグナル（標準化後）
No. 1 scFv
No. 4 scFv
No. 9 scFv
タグなし
T7タグ
SKIKタグ

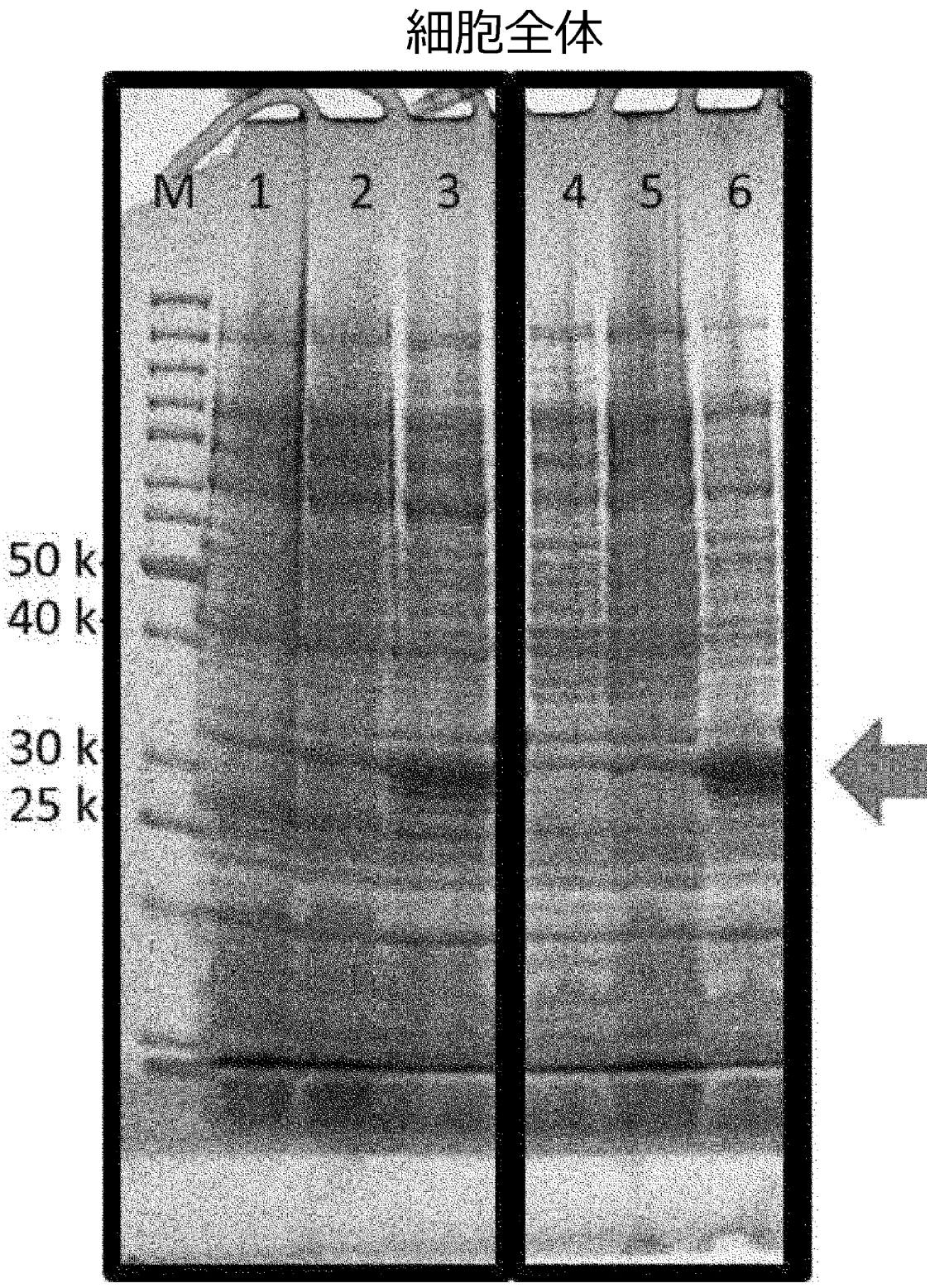
[図6]


可溶性画分
不溶性画分
M
NC
タグなし
Tタグ
SKIK
SKIK2
タグなし
Tタグ
SKIK
SKIK2
50 k-
40 k-
30 k-
25 k-

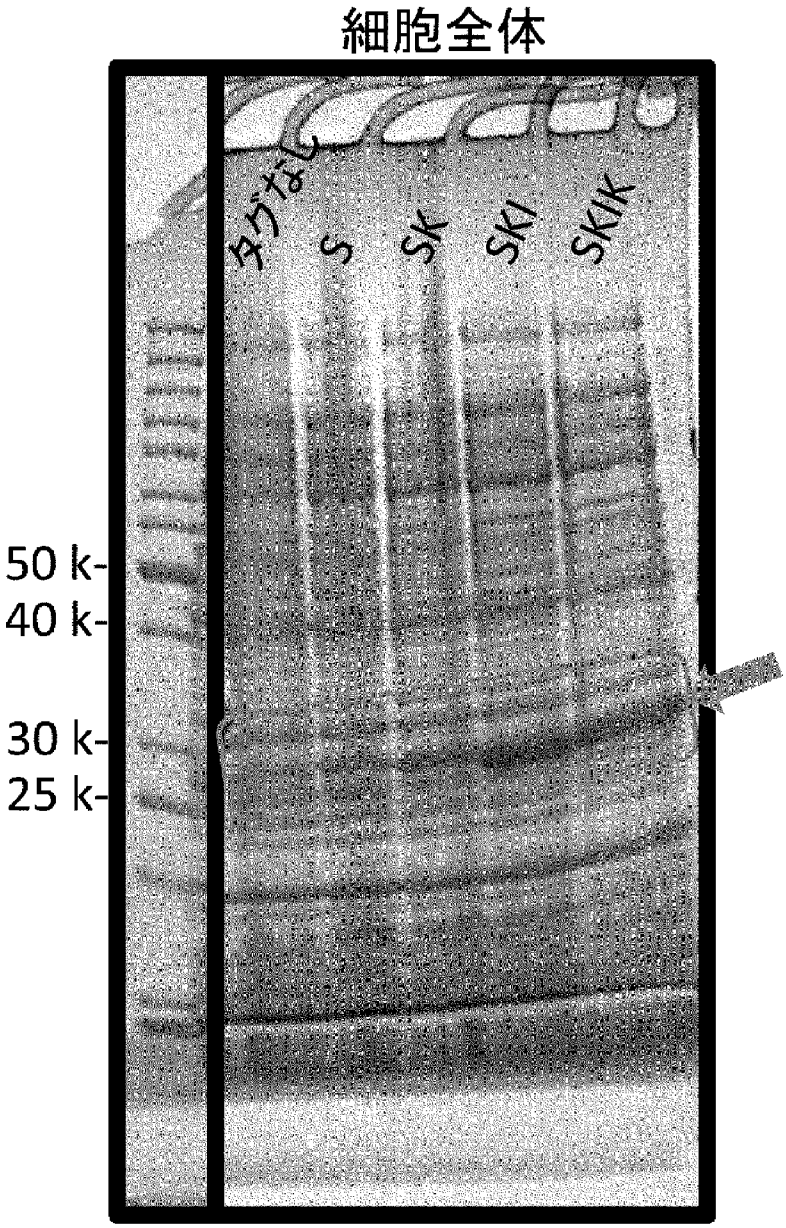
[図7]



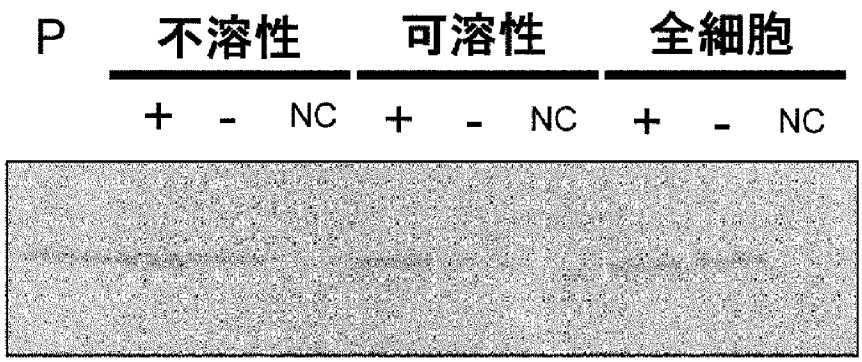
[図8]



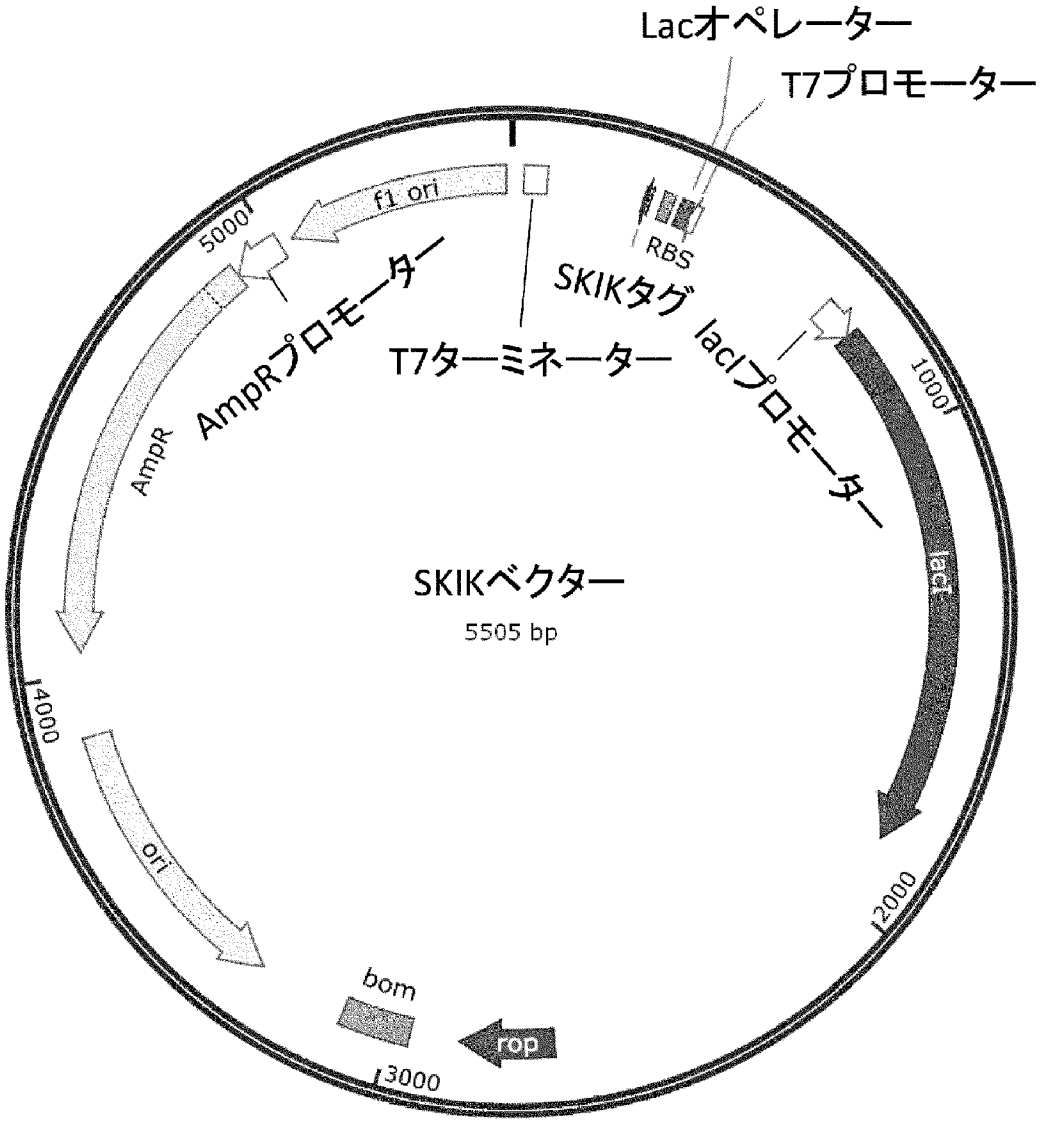
[図9]



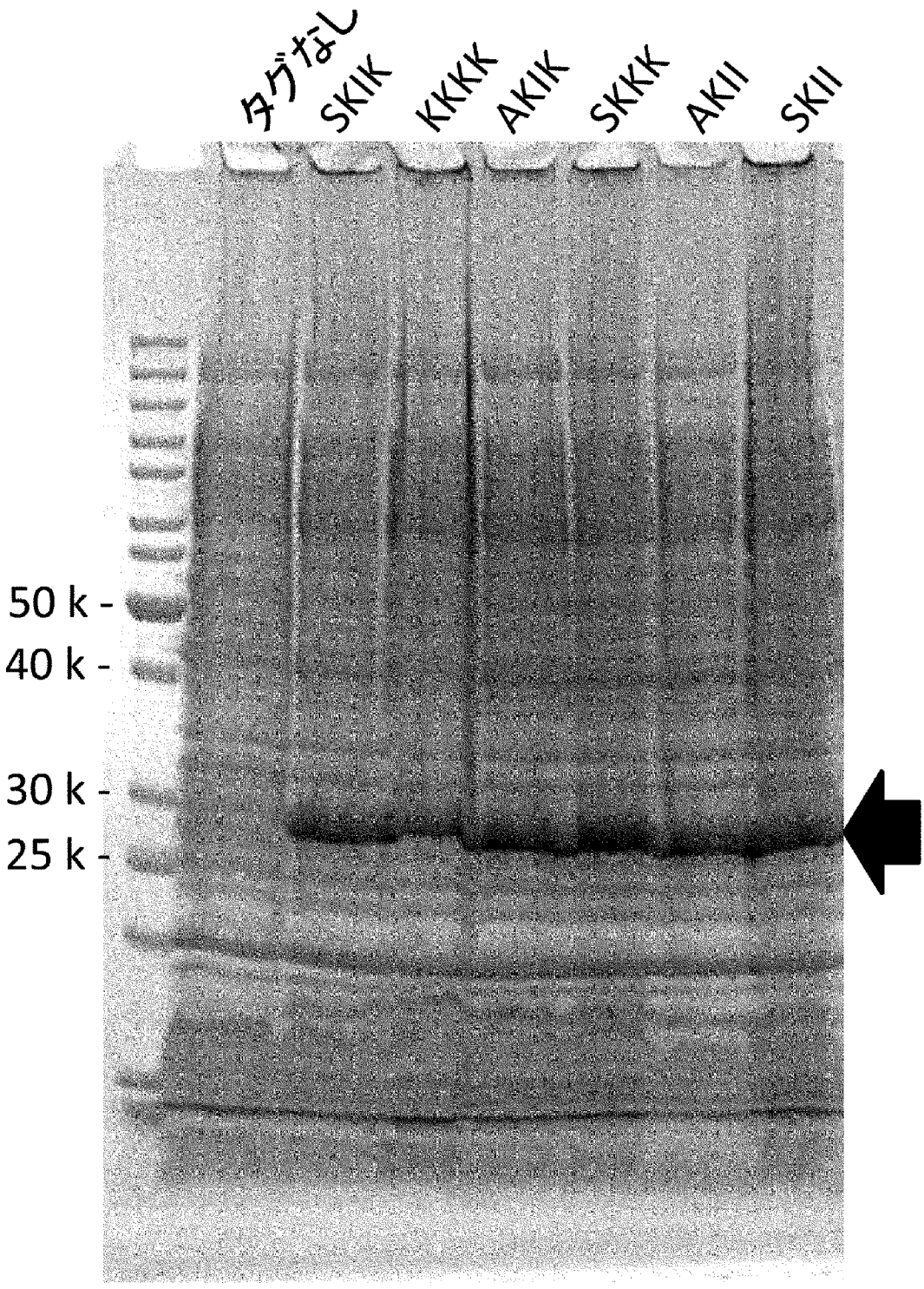
[図10]


P
不溶性
可溶性
全細胞
+ - NC + - NC + - NC

[図11]


Lacオペレーター
T7プロモーター
f1 ori
5000
RBS
SKIKタグ
AmpRプロモーター
T7ターミネーター
laclプロモーター
AmpR
1000
lacI
SKIKベクター
5505 bp
4000
ori
2000
bom
rop
3000

[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/067853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C07K1/22*(2006.01)i, *C07K14/00*(2006.01)i, *C12P21/00*(2006.01)i

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)
C12N15/09, C07K1/22, C07K14/00, C12P21/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-519894 A (Novo Nordisk A/S), 10 June 2010 (10.06.2010), example 1; table 1 & US 2010/0041153 A1 example 1; table 1 & WO 2008/104513 A1 & EP 2118121 A1	1-21
A	US 2009/0035821 A1 (Novo Nordisk A/S), 05 February 2009 (05.02.2009), example 1; table 1 & WO 2007/025987 A1 & EP 1924601 A1	1-21
A	BIVONA, L., et al., Influence of the second amino acid on recombinant protein expression, 2010, Protein Expression and Purification, Vol.74, p.248-256 abstract, fig. 2	1-21

☐ 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	Date of mailing of the international search report
03 August 2016 (03.08.16)	16 August 2016 (16.08.16)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６７８５３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i

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.Cl.　C12N15/09, C07K1/22, C07K14/00, C12P21/00

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

日本国実用新案公報　　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　　１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報　　１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報　　１９９４－２０１６年

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）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

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
A	JP 2010-519894 A（ノボ・ノルデイスク・エー／エス）2010.06.10, 実施例１，表１ & US 2010/0041153 A1, 実施例１，表１ & WO 2008/104513 A1 & EP 2118121 A1	１－２１
A	US 2009/0035821 A1（NOVO NORDISK A/S）2009.02.05, 実施例１，表１ & WO 2007/025987 A1 & EP 1924601 A1	１－２１

☑　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	国際調査報告の発送日
０３．０８．２０１６	１６．０８．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　３９６３
福澤　洋光
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	関連する請求項の番号
A	BIVONA, L., et al., Influence of the second amino acid on recombinant protein expression, 2010, Protein Expression and Purification, Vol.74, p.248-256 要約, 図２	１－２１