(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-113167
(P2004-113167A)
(43)公開日　平成16年4月15日(2004.4.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/21	C12N 1/21		4B063
C12Q 1/34	C12Q 1/34		4B065
G01N 33/53	G01N 33/53	D	

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 17 頁）

(21)出願番号　特願2002-283121(P2002-283121)
(22)出願日　平成14年9月27日(2002.9.27)

(71)出願人　000005201
富士写真フイルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼２１０番地
(74)代理人　110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者　駒澤　宏幸
埼玉県朝霞市泉水３－１１－４６　富士写真フイルム株式会社内
(72)発明者　須藤　幸夫
神奈川県南足柄市中沼２１０番地　富士写真フイルム株式会社内
(72)発明者　竹下　由美子
埼玉県朝霞市泉水３－１１－４６　富士写真フイルム株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細菌表面へ蛋白質を発現させるためのベクター

(57)【要約】
【課題】細菌を用いたタンパク質の発現時に発現部位を制御することができ、また効率良く発現することができ、かつ高発現時にインクルージョンボディーに取り込まれやすいという欠点を解消した細菌表面発現用ベクター、及び該ベクターを導入した形質転換体を提供すること。
【解決手段】シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を含む、細菌表面へ異種蛋白質を発現させるための細菌用発現ベクター。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を含む、細菌表面へ異種蛋白質を発現させるための細菌用発現ベクター。
【請求項２】
氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＣ末端の下流に異種蛋白質を挿入するためのクローニング部位を有する、請求項１に記載のベクター。
【請求項３】
氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端の核酸配列として該蛋白質のＮ末端の６００～７００ｂｐの核酸配列を使用し、Ｃ末端の核酸配列として該蛋白質のＣ末端の５００～６００ｂｐの核酸配列を使用する、請求項１又は２に記載のベクター。
【請求項４】
異種蛋白質をコードする遺伝子を請求項１から３の何れかに記載のベクターに宿主内で発現できるように組み込んだ、組み換えベクター。
【請求項５】
異種蛋白質がリパーゼである、請求項４に記載の組み換えベクター。
【請求項６】
請求項４又は５に記載の組み換えベクターを導入した形質転換体。
【請求項７】
大腸菌である、請求項６に記載の形質転換体。
【請求項８】
請求項６又は７に記載の形質転換体を異種蛋白質を発現できる条件下で培養することを含む、細菌の表面に異種蛋白質を発現させる方法。
【請求項９】
請求項６又は７に記載の形質転換体を用いて、細菌の表面に発現した異種蛋白質の機能を分析する方法。
【請求項１０】
請求項６又は７に記載の形質転換体を用いて、細菌の表面に発現した異種蛋白質の機能を分析し、所望の機能を有する異種蛋白質をスクリーニングする方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、大腸菌などの細菌表面上に異質蛋白質を表現できる氷核形成蛋白質（ｉｃｅ ｎｕｃｌｅａｔｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎ：ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を含む細菌表面発現用ベクターに関する。さらに、本発明は、上記ベクターを使用した、細菌表面上への異質蛋白質の発現方法及び異種タンパク質の機能の分析方法に関する。
【０００２】
【従来技術】
大腸菌などの細菌で組み換えタンパク質を発現する方法は、多く知られているが、タンパク質を位置特異的に発現することは難しい。シュウドモナス・シリンガエの氷核形成タンパク質を用いて形質転換細胞の表層に異種タンパク質を発現する方法が報告されている（特許文献１；非特許文献１～６）。しかしながら、これらの方法で用いられたものは、表層に発現させる核酸配列が長いため発現が難しく、また発現誘導させるとインクルージョンボディーに取り込まれやすいなどの欠点があった。
【０００３】
一方、細菌ではなくファージまたは酵母などの表面にペプチドやタンパク質を発現させ、その機能をスクリーニングすることが知られている（非特許文献７～１０）。しかしながら、ファージに提示されるペプチドは十分な長さのものが得られず、タンパク質の機能を検索することが難しく、取り扱いも煩雑である。一方、酵母の表面に提示する方法は、タ

ンパク質の機能を十分に発揮できることが知られているが、大腸菌などの細菌に比べ増殖に要する期間が長いという決定的な欠点を有する。従って、大腸菌などの細菌の表面に効率良く機能するタンパク質を提示することができれば、これらの欠点を克服した有用なタンパク質機能検索技術を提供することが可能になる。

【０００４】

【特許文献１】

米国特許第６，０７１，７２５号

【０００５】

【非特許文献１】

Ｈｅｕｎｇ－Ｃｈａｅ Ｊｕｎｇ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌｕｍｅ １６, ５７６－５６０, Ｊｕｎｅ １９９８

【０００６】

【非特許文献２】

Ｅ．Ｊ．Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．, Ｌｅｔｔｅｒｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ １９９９, ２９, ２９２－２９７

【０００７】

【非特許文献３】

Ｙｏｎｇ－Ｓｕｎｇ Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．, Ａｐｐｌｉｅｄ ａｎｄ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ, Ｆｅｂ．２０００, ｐ．７８８－７９３

【０００８】

【非特許文献４】

Ａｍａｒｊｅｅｔ Ｓ．Ｂａｓｓｉ ｅｔ ａｌ．, Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．２０００, １６, ５５７－５６３

【０００９】

【非特許文献５】

Ｍａｒｋ Ｓｈｉｍａｚｕ ｅｔ ａｌ．, Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．２００１, １７, ７６－８０

【００１０】

【非特許文献６】

Ｈｅｅ－Ｓｕｎ Ｊｅｏｎｇ ｅｔ ａｌ．, Ｅｎｚｙｍｅ ａｎｄ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２８ （２００１） １５５－１６０

【００１１】

【非特許文献７】

植田充美他、現代化学、２００１年９月、４６～５０頁

【００１２】

【非特許文献８】

植田充美他、化学工学、第６５巻、第８号（２００１）、４１５～４１８頁

【００１３】

【非特許文献９】

植田充美他、現代化学、２００１年４月、４８～５４頁

【００１４】

【非特許文献１０】

吉村徹他、現代化学、２００１年１０月、５５～６２頁

【００１５】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）の特性を利用した細菌表面表現用ベクター、及び該ベクターを導入した形質転換体を提供することを解決すべき課題とした。より具体的には、本発明は、細菌を用いたタンパク質の発現時に発現部位を制御することができ、また効率良

く発現することができ、かつ高発現時にインクルージョンボディーに取り込まれやすいという欠点を解消した細菌表面発現用ベクター、及び該ベクターを導入した形質転換体を提供することを解決すべき課題とした。

【００１６】

さらに本発明は、この細菌表面発現用ベクターを使用し、異質蛋白質を細菌表面上に発現させ、さらに細菌表面に発現した異種タンパク質の機能を解析する方法を提供することを解決すべき課題とした。より具体的には、本発明は、例えば、工業的に利用価値の高い組み換えリパーゼの活性を容易に検索することを可能にする異種タンパク質の機能解析方法を提供することを解決すべき課題とした。

【００１７】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を含む発現ベクターに異種タンパク質を組み込むことによって構築した組み換え発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換することにより、大腸菌の表面に該異種タンパク質を効率よく発現できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【００１８】

即ち、本発明によれば、シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を含む、細菌表面へ異種蛋白質を発現させるための細菌用発現ベクターが提供される。

【００１９】

好ましくは、本発明のベクターは、氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＣ末端の下流に異種蛋白質を挿入するためのクローニング部位を有する。

好ましくは、氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端の核酸配列として該蛋白質のＮ末端の６００～７００ｂｐの核酸配列を使用し、Ｃ末端の核酸配列として該蛋白質のＣ末端の５００～６００ｂｐの核酸配列を使用する。

【００２０】

本発明の別の側面によれば、異種蛋白質をコードする遺伝子を上記した本発明のベクターに宿主内で発現できるように組み込んだ、組み換えベクターが提供される。

好ましくは、異種蛋白質はリパーゼである。

【００２１】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の組み換えベクターを導入した形質転換体が提供される。

好ましくは、形質転換体は大腸菌である。

【００２２】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の形質転換体を異種蛋白質を発現できる条件下で培養することを含む、細菌の表面に異種蛋白質を発現させる方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の形質転換体を用いて、細菌の表面に発現した異種蛋白質の機能を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の形質転換体を用いて、細菌の表面に発現した異種蛋白質の機能を分析し、所望の機能を有する異種蛋白質をスクリーニングする方法が提供される。

【００２３】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を説明する。

（１）細菌用発現ベクター

本発明の細菌表面発現用ベクターは、シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を含むことを特徴とするものであり、好ましくは、氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＣ末端の下流に異種蛋白質を挿入する

ためのクローニング部位を有している。

【００２４】

シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株は、特許第３０６００１０号（特開２０００－１０６８６８号）に記載されている氷核活性細菌の１種である。シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株の氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）の遺伝子は本発明者が今回初めてクローニングし、その遺伝子の塩基配列（配列番号５に記載）が決定された（実施例１の（１）を参照）。本発明では、このシュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株の氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）の遺伝子のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を使用するが、好ましくは、氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端の核酸配列として該蛋白質のＮ末端の６００～７００ｂｐの核酸配列を使用し、Ｃ末端の核酸配列として該蛋白質のＣ末端の５００～６００ｂｐの核酸配列を使用することができる。このようなＮ末端の核酸配列及びＣ末端の核酸配列の一例としては、本出願の実施例で使用した配列番号６及び７に記載の塩基配列を挙げることができる。

【００２５】

シュウドモナス・シリンガエ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｙｒｉｎｇａｅ）には、約５０の亜種に相当する病原型がある。病原型は、植物に対する寄生性の差異で分けることができる。例えばクワに病原性のあるものはｐｖ．　ｍｏｒｉ，タバコの病原細菌はｐｖ．　ｔａｂａｃｉ等である。このうち特定の病原型（例えばｐｖ．　ｍｏｒｉ）が氷核活性機能を持つことが知られている。シュウドモナス・シリンガエは、基本的な菌学的性質のほか、５つの主要性質で同定するＬＯＰＡＴ法（Ｌｅｌｌｉｏｔｔら，Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｂａｃｔ．，２９巻，４７０－４８９頁，１９６６年）等により同定が可能である。

【００２６】

セイタカアワダチソウから分離したシュウドモナス・シリンガエＳＥＩ－１株はグラム陰性菌であり、極べん毛をもつ桿菌で運動性のあるのが特徴である。キングＢ培地（栄研化学製、商品名）で黄緑色蛍光色素を産生するのでＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属に所属することが容易に確かめられる。さらに、植物病原細菌の簡易同定ＬＯＰＡＴ法では、レバン産生（－），オキシダーゼ活性（－），ジャガイモ塊茎腐敗（－），アルギニン加水分解（－），タバコ過敏反応（＋）を示し、ＬＯＰＡＴ；Ｉｂ群に属する。ここで、例えばレバン産生（－）とはレバン活性をもたないことを意味する。従って、本菌株は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｙｒｉｎｇａｅと同定される。本菌株は、セイタカアワダチソウに病原性を有する。同植物に病原性を示すＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｙｒｉｎｇａｅはこれまで全く発見されていなかったため、新しい病原型と見なすことができる。菌学的性質のうち、特徴的な性質は、本菌株がＬＯＰＡＴ法に対する極めて特異的反応を示す点である。また、シュウドモナス・シリンガエＳＥＩ－１株は、過冷却点（ＳＣＰ（Ｓｕｐｅｒ　ｃｏｏｌｉｎｇｐｏｉｎｔ），氷核開始温度）は－１．８℃であり、従来の氷核活性細菌の中にあって氷核活性が最も優れていることが判明している。

【００２７】

外側細胞膜蛋白質である氷核形成蛋白質は過冷却した水の中で氷の形成を誘導するという独特の機能を有する。ＩＮＰ遺伝子の中央領域の配列は、氷核形成活性に関与する配列であり、ＩＮＰのＮ－及びＣ－末端のアミノ酸配列は、ＩＮＰが内側の細胞膜を通過するための分泌シグナル及び標的シグナルであると考えられる。特に、ＩＮＰのＮ末端配列は、外側細胞膜上に結合する役割を果たすと考えられる。ＩＮＰは、細胞表面上に多量に発現し、細胞表面上に発現したＩＮＰは、細胞成長の定常期に安定して維持され、ＩＮＰは外側細胞膜に固定化されて外側表面に露出され、さらにＩＮＰは広範なグラム陰性菌で安定的に発現することから、グラム陰性菌の様々な宿主での表面表現用ベクターとして利用することができる。

【００２８】

上記した氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列を所望のベクター中にクローニングすることにより、本発明の細菌用発現ベクターを構築することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されないが、特に好ましくは大腸菌で発現可能な

発現ベクターである。

【００２９】

本発明で好ましく用いることができるベクターとしては、宿主（好ましくは、大腸菌）に適合した複製開始起点、選択可能なマーカーおよび発現制御配列を含むプラスミドベクターが挙げられる。選択可能なマーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子などが挙げられる。

【００３０】

発現制御配列とは、ＤＮＡ配列に適切に連結した場合、このような配列に適合した宿主において、そのＤＮＡ配列を発現させることができる配列を意味する。発現制御配列には、少なくともプロモーターが含まれる。例えば、大腸菌を宿主とする場合には、リボソーム結合部位配列、所望により存在するオペレーター、及び転写開始のためのプロモーターを発現制御配列として含むベクターを使用することができる。プロモーターとしては、ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトース（ｌａｃ）プロモータ系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、ラムダ由来のP_Lプロモーター、およびＮ遺伝子リボソーム結合部位、ならびにｔｒｐ－ｌａｃ（ｔｒｃ）プロモーター系、Ｔ７プロモーターなどの当分野で常用されるプロモーターを使用することができる。

【００３１】

本発明では、市販のベクターを使用することもでき、具体例としては、例えば、大腸菌用としてｐＴｒｃＨｉｓ２Ｂ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐＱＥ７０、ｐＱＥ６０、ｐＱＥ－９（Ｑｉａｇｅｎ）、ｐＢＳ、ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔ、ｐｓｉＸ１７４、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ、ｐＢｓＫＳ、ｐＮＨ８ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８ａ、ｐＮＨ４６ａ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＴＲＣ９９Ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ｐＥＴ（ＮＯＶＡＧＥＮ）、ｐＩＶＥＸ（Ｒｏｃｈｅ）などが挙げられる。

【００３２】

（２）本発明の組み換えベクター

上記した本発明の細菌用発現ベクター中に、異種蛋白質をコードする遺伝子を宿主内で発現できるように組み込むことにより組み換えベクターを構築することができる。宿主内で発現できるように組み込むことは、例えば、宿主内で作動可能なプロモーターの下流にシュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成蛋白質（ＩＮＰ）のＮ末端及びＣ末端の核酸配列および異種蛋白質をコードする遺伝子を配置し、これらの核酸配列及び遺伝子の発現を該プロモーターの制御下に置くことなどを意味する。

【００３３】

本発明で用いる異種タンパク質の種類は特に限定されないが、細菌の表面に発現させることによりその機能を分析することを目的とするタンパク質とすることが好ましい。異種タンパク質の特に好ましい具体例としてはリパーゼが挙げられる。

【００３４】

（３）本発明の形質転換体

上記した異種タンパク質を組み込んだ組み換えベクターを導入した形質転換体も本発明の範囲内である。組み換えベクターを導入する宿主としては任意の細菌宿主を挙げることができるが、グラム陰性菌が好ましい。さらに好ましくは、宿主は、大腸菌，アセトバクター（Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）ｓｐ．，シュード（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ｓｐ．，キサンソモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）ｓｐ．，エルウイニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）ｓｐ．、又はキモモナス（Ｘｙｍｏｍｏｎａｓ）ｓｐ．であり、特に好ましくは大腸菌である。

【００３５】

宿主として用いる大腸菌を用いる場合、大腸菌の種類は、組み換えベクター中に挿入した核酸配列を発現できるものであれば特に限定されず、ＭＣ１０６１、ＤＨ１、ＤＨ５、ＲＲ１、Ｂ、Ｃ６００ｈｆ１、Ｋ８０３、ＨＢ１０１、ＪＡ２２１、ＪＭ１０１、ＪＭ１０９、ＢＬ２１など任意の大腸菌株を用いることができる。

形質転換は、当業者に公知の方法に従い行なうことができ、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン仲介トランスフェクション、又はエレクトロポレーション等によって行なうことができる。

【００３６】

（４）本発明の形質転換体を用いた細菌表面への異種蛋白質の発現方法

上記（３）に記載した形質転換体（好ましくは、大腸菌）を適当な条件下で培養することにより、異種タンパク質を細菌表面に発現させることができる。

【００３７】

形質転換体を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源（例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が）、窒素源（例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等）、無機塩類（リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等）等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【００３８】

培養は、振盪培養または深部通気撹拌培養などの好気的条件下で行うことが好ましい。培養温度は１５～４０℃がよく、培養時間は、通常１６時間～７日間である。培養中ｐＨは、３．０～９．０に保持する。ｐＨの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【００３９】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した細菌を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）等を、ｔｒｐプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸（ＩＡＡ）等を培地に添加してもよい。

【００４０】

（５）細菌表面に発現した異種蛋白質の機能分析方法

本発明では、上記（３）に記載した形質転換体（好ましくは、大腸菌）を適当な条件下で培養することにより異種タンパク質を細菌表面に発現させ、さらに細菌表面に発現した異種蛋白質の機能を分析することができ、さらにこのような分析に基づいて所望の機能を有する異種蛋白質をスクリーニングすることができる。

例えば、異種タンパク質としてリパーゼを使用する場合は、各種のリパーゼを異種タンパク質として細菌に導入して表面に発現させ、培養した形質転換体を用いてリパーゼ活性を酢酸第二銅法などの常法によって測定することができる。所望のリパーゼ活性を有する形質転換体を選択し、該形質転換体から導入したリパーゼをコードする遺伝子を単離・回収することにより、所望の機能を有する異種蛋白質をスクリーニングすることができる。

大腸菌の表層に多様な異種タンパク質を発現し、その機能をスクリーニングすることが出来ると、高活性のタンパク質とその遺伝子配列をスクリーニング中に同時に回収することができる。これは、遺伝型－表現型が一体化されたスクリーニングでありタンパク質の機能改良技術の重要なポイントの一つである。ゲノム解析の進展により遺伝子情報は膨大な量になり多様性も多く知られている。この多様性を有効に利用することは基より、目的とする遺伝子の配列に対して、変異導入、遺伝子・エクソンシャッフリングをする事で、新たなタンパク質を創出することができる。変異導入は、タンパク質の機能の中心となる部

分に重点的に変異を入れる場合と全体に渡り変異を入れる場合が有る。また、シャッフリングは、エクソン単位で入れ替える場合とランダムなシャッフリングを行う場合がある。本提示方法ではいずれの変異方法も利用可能である。機能を有する形質転換体を選抜することで、容易に機能タンパク質と遺伝子を入手できる。この際に、ファージや酵母を利用するより迅速な培養かつ取扱いが容易である大腸菌を提示基体に用いるメリットがある。また、大腸菌に突然変異を加えて、より高機能なタンパク質を微生物レベルで研究する事も可能となる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【００４１】

【実施例】

実施例１：シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成タンパク質のＮ末端及びＣ末端並びに異種タンパク質（ＧＦＰ）をコードする核酸配列を含む大腸菌表面発現用ベクターの作成

（１）シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１　由来の氷核活性タンパク質のクローニングと塩基配列の決定

シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株（特許３０６００１０号）をＬＢ培地中で１６時間培養しゲノムＤＮＡをＱＩＡＧＥＮ　ＤＮｅａｓｙキットを用いて回収した。このゲノムＤＮＡに対して、ゲノムＰＣＲを行い（プライマー１及び２を使用）、サブクローニングベクター（ｐＢｌｕｅＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ－）のＮｏｔ　Ｉ，　Ｘｈｏ　Ｉサイトへ導入した。サイクルシークエンスのダイターミネイター法で塩基配列を決定した。決定した塩基配列（ＩＮＡ－ＳＥ１－１　ＯＲＦ　４０６２ｂｐ）を配列番号５に記載する。

プライマー１：ＡＴＴＡＧＣＧＧＣＣＧＣＡＴＧＧＧＡＡＣＴＣＴＣＧＡＣＡＡＧＧＣ（配列番号１）

プライマー２：ＡＣＣＧＣＴＣＧＡＧＣＴＡＣＴＴＴＡＣＣＴＣＴＡＴＣＣＡＧＴＣＡＴＣＧ（配列番号２）

【００４２】

（２）シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成タンパク質のＮ端及びＣ端のサブクローニング

上記（１）で得られた配列に対してプライマー１及び３を用いてＮ末端部を、さらにプライマー４及び２を用いてＣ末端部をサブクローニングベクター（ｐＢｌｕｅＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ－）のＮｏｔ　Ｉ，　Ｘｈｏ　Ｉサイトへ導入した。

プライマー３：ＡＣＣＧＣＴＣＧＡＧＧＧＣＡＡＴＴＡＧＡＴＣＡＣＴＧＴＧＧＴＴＧＣＣＡ（配列番号３）

プライマー４：ＡＴＴＡＧＣＧＧＣＣＧＣＧＣＡＡＧＴＴＡＣＧＧＣＡＧＣＴＣＧＴＴＧＡＴＴＧ（配列番号４）

Ｎ末端部の核酸配列（ＩＮＡ－ＮＬ－６５１ｂｐ）を配列番号６に記載し、Ｃ末端部の核酸配列（ＩＮＡ－Ｃ－５５５ｂｐ）を配列番号７に記載する。

【００４３】

（３）大腸菌表面発現用ベクターの作成

上記（２）で得られたＮ末端部及びＣ末端部、並びに異種タンパク質（ＧＦＰ）をコードする核酸配列を含む大腸菌表面発現用ベクターを以下の通り作成した。

発現ベクターとしてｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社のｐＴｒｃＨｉｓ２Ｂベクターの　Ｎｃｏ　Ｉ－Ｘｈｏ　Ｉサイト間へ氷核活性Ｎ末端部、Ｐｓｔ　Ｉ　－Ｋｐｎ　Ｉサイト間へ氷核活性Ｃ末端部、ＫｐｎＩ　－ＥｃｏＲ　Ｉサイト間にＧｌｙＳｅｒリンカー、ＥｃｏＲ　Ｉ－Ｈｉｎｄ　ＩＩＩサイト間にＧＦＰをクローニングした。クローニングする際に翻訳のずれが生じないよう、フレームを合わせる核酸配列を付加した。作成した発現ベクターの核酸配列（ＩＮＡ－ＮＬＣ－ＧＦＰ－Ｔａｇ）を配列番号８に記載する。

【００４４】

コントロール発現ベクターとして氷核活性タンパク質のＮ端、Ｃ端部位を含まないベクターを作成した。すなわち、Ｎｃｏ　Ｉ－Ｈｉｎｄ　ＩＩＩサイト間にＧＦＰのみをクローニングした。これは、発現状況の比較に使用した。
構築した発現ベクターの模式図を図１に示す。
【００４５】
実施例２：発現ベクターを導入した形質転換体の作成
実施例１で作成したベクターを用いて大腸菌細胞を形質転換し、大腸菌細胞の表面に異種タンパク質（ＧＦＰ）を発現させた。発現は、ＪＭ１０９コンピテントセルを実施例１の発現ベクターで形質転換し、ＬＢ培地で１６時間培養した。対数増殖期の大腸菌細胞を希釈しＯＤ０．６になるまで培養した。ＩＰＴＧ　濃度が１ｍＭになるよう添加し発現誘導した。誘導後２０時間の発現状況をＦＡＣＳＣＡＮにより観察した。
蛍光観察は、発現したＧＦＰの蛍光、及びＨｉｓタグに対し抗Ｈｉｓ抗体－抗マウスＩｇＧ－ローダミン標識抗体の蛍光に対して行った。結果を図２に示す。
氷核活性タンパク質のＮ末端及びＣ末端を含む発現ベクターで発現されたＧＦＰ連結Ｈｉｓタグ部は大腸菌細胞の表層に提示されていた。
ＦＡＣＳＣＡＮ１：ＧＦＰ蛍光
ＦＡＣＳＣＡＮ２：ローダミン蛍光
【００４６】
【発明の効果】
本発明により、大腸菌を用いたタンパク質の発現時に発現部位を制御することができ、また効率良く発現することができ、かつ高発現時にインクルージョンボディーに取り込まれやすいという欠点を解消した大腸菌表面発現用ベクター、及び該ベクターを導入した形質転換大腸菌細胞を提供することが可能になった。
【００４７】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Fuji Photo Film Co.Ltd.,

〈120〉 A vector for expressing a protein on the surface of bacteria

〈130〉 A21644A

〈160〉 8

【0048】

〈210〉 1

〈211〉 32

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈400〉 1

attagcggcc gcatgggaac tctcgacaag gc 32

【0049】

〈210〉 2

〈211〉 35

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈400〉 2

accgctcgag ctactttacc tctatccagt catcg 35

【0050】

〈210〉 3

〈211〉 35

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈400〉 3

accgctcgag ggcaattaga tcactgtggt tgcca 35

【0051】

〈210〉 4

〈211〉 37

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈400〉 4

attagcggcc gcgcaagtta cggcagctcg ttgattg 37

【0052】

〈210〉 5

〈211〉 4062

〈212〉 DNA

〈213〉 Pseudomonas syringae

〈400〉 5

atgggaactc tcgacaaggc gttggtgctg cgtacctgtg caaataacat ggccgatcat 60

tgcggcctta tatggcccgc ttccgggacg gttgaatcca aatactggca gtcaaccagg 120

cgtcacgaga atggtctggt gggtttactg tggggcgctg gaaccagcgc ttttctaagc 180

gtgcatgccg atgcgcgatg gattgtctgt gaagtcgccg ttgcagacat catcagtctg 240

gatgagccgg gaatggtcaa gtttccgcgc gctgaggtgg ttcatgtcgg cgacaggatc 300

agcgcgtcac acttcatttc ggcgcgtcag gccgaccctg catcaacgcc cccgcccacg 360

tcaatgacca cggccacgcc cccgcccacg cccacgcctg cggcagcaca tgtcacatta 420

cctgtggcgg caagtgtcac gttaccggtg gccgaacagg ccagtcatga agtgttcgat 480

gtggcgttgg tcatcgcagc ggccccctca gtaaataccc tgccggtaac gacgccgcag 540

aatttgcaga ccgccactta cggcagcacg ttgagtggcg acaaccacag tcggctcatt 600

gccggttatg gcagtaacga gaccgctggc aaccacagtg atctgattgc cggttatgga 660

agtacaggaa ccgccggttc cgacagctcg ctggtcgcag gctatggaag cacccagact 720

gccggagggg acagcgcgct gacggcgggt tacggcagca cccagaccgc ccgcgaaggc 780

agcaacctga cggcagggta tggcagtacg ggaacagctg gctcggatag ttcgttgatc 840

gccggttacg gcagtactca gacttccgga gaagacagct cgctcacagc gggttacggc 900

agcacgcaga cggcccagga aggcagtaat ctgacggccg ggtacggcag caccggcacg 960

gcgggctccg atagctcgct gatcgccggt tatggcagta cacagacctc tggaggtgac 1020

agctcgctga cggcgggtta cggcagcacg cagacggccc aggaaggcag taatctgacg 1080

gccgggtacg gcagcaccgg cacggcgggc tcggatagtt cgttgatcgc cggttacggc 1140

agtacacaga cttccggaga agacagctcg ctcacggcgg gttacggcag cacgcaaacg 1200
gctcaggaag gcagcaacct taccgctggg tacggcagca ccggcacggc gggctcggat 1260
agctcgttga tcgccggtta cggcagtacc cagacttcgg gcggcgacag ttcgctgacc 1320
gcgggctacg gcagtacgca gacggctcag gaaggcagca acctgacctc cgggtacggc 1380
agcactggta ccgcaggtgc cgacagctcg ctgatcgccg gttatggcag cacgcaaacc 1440
tcgggcagtg acagcgccct gaccgccggc tacggcagca cgcaaacggc tcaggaaggc 1500
agcaatctca ctgctgggta tggcagcacc ggcacggcag gttccgacag ctcgctgatc 1560
gccggttacg gcagcacgca aacctcgggc agcgacagtt cgctcacggc gggttacggc 1620
agtacgcaga cggcccagga gggcagcaat ctgacggcgg ggtacggcag cacgggtaca 1680
gcaggtgtcg acagctctct gatcgcggga tacggcagca cgcagacctc gggaagtgac 1740
agtgcgctga cagcaggtta cggcagtacg cagacggccc aggaaggcag caatctgacg 1800
gcggggtacg gcagcactgg cacggcaggt gccgacagtt cgctgatcgc gggatacggc 1860
agcacgcaga cctcgggaag tgacagtgcg ctgacagcag gttacggcag tacgcagacg 1920
gcccaggaag gcagcaacct gactgcgggt tatggcagca cgggtacggc aggtgccgac 1980
agctcgttga tcgccggata cggcagcacg cagacctcag gcagtgaaag ttcgctcacc 2040
gcgggttacg gcagtaccca gactgcccgt gaaggcagca cgctgacagc cgggtatggc 2100
agtacgggaa cagctggcgc tgacagttcg ctgatcgccg gttacggcag cacgcaaacc 2160
tcgggcagtg aaagctcgct caccgcaggt tatggcagta cccagaccgc acagcagggc 2220
agcgtactta catccggcta tggcagtacg caaacggcgg gggctgccag taacctgacc 2280
accggttatg gaagtaccgg cactgcgggt catgaaagct tcatcatcgc cggttacggg 2340
agtacacaga cagcgggcca caaaagtatc ctgaccgcgg gctatgggag tactcagact 2400
gccagggacg gtagcgacct gattgcgggc tatggcagta cagggacctc aggctcaagc 2460
agttcgctga tcgcaggtta tggcagcacc cagaccgcga gttacaaaag catgctgacc 2520
gccggttatg gcagtactca gacggccaga gaacacagtg accttgtcgc aggctatggc 2580
agcacgtcaa cggcaggttc aaacagttcg ctgatcgccg gatacggcag cacccagacg 2640
gcgggcttca aaagcatact gaccgccggt tatggcagta cccagacggc acaggagcgc 2700
agtgatctgg tcgccggcta tggcagcacg tcgactgcgg gctactccag ttccttgatc 2760
gccggctatg gcagcacgca gacggcaggc tacgggagca cgttgacgac cggttatggc 2820
agtacgcaga ccgcgcagga aaacagctcg ctcaccaccg gttacggaag tacctccact 2880

gcgggctatt ccagctcgct gatcgcgggt tacggcagta cgcagacggc aggctacgag 2940
agcacgttga ccgccggtta cggcagtacg caaaccgcac aggagcgcag tgacctggtg 3000
acaggttatg gaagtacttc cactgccggc tatgcgagtt cgttgattgc aggttatggc 3060
agcacgcaga cggcaggcta cgagagcacc ttgaccgccg gttacggcag cacgcaaacc 3120
gcacaggaaa acagctcgct caccacaggc tatgggagca cttccaccgc cggctttgcc 3180
agctcgctga tcgccggtta cggcagtacg caaacagccg gctacaaaag taccctcacg 3240
gccggctacg gcagtactca gaccgcagag tacggaagtt cactcactgc gggctatggc 3300
agcactgcga cggccgggca ggacagctcg ttgatcgccg gttatggcag ctccctgacc 3360
agcggaatca gaagttttct gacggcaggc tatggcagta cgctgatcgc cggacttcgc 3420
agtgttttga tcgccggtta tggcagtagc cttacatcgg gcattcgcag cacattgact 3480
gcgggttatg gcagtaacca gattgcaagt tacggcagct cgttgattgc aggccatgaa 3540
agcattcagg tcgccggaaa taaaagcatg ctgatcgccg gcaagggcag ctcgcagacc 3600
gcaggttttc gcagcacgct gattgccggt gcgggcagcg tacaactggc gggtgatcgc 3660
agccggttga ttgccggtgc agacagtaat cagaccgcgg gtgaccgcag caaactactg 3720
gccggtaata acagttatct gaccgccggc gatagaagca aactcaccgg cgggcatgac 3780
tgcaccctga tggcgggcga tcaaagcaga ttgaccgctg gaaagaacag tatcttgacg 3840
gccggcgcgc gtagcaaact tattggcagt gaaggctcga cgctctcggc tggagaagac 3900
tccacgctga ttttcaggct ctgggacggg aagaggtaca ggcaactggt tgccaaaacg 3960
ggtgagaacg gtgttgaagc cgatataccg tattacgtga acgaagatga cgatattgtc 4020
gataaacccg acgaggacga tgactggata gaggtaaagt ag 4062

【0053】

〈210〉 6
〈211〉 651
〈212〉 DNA
〈213〉 Pseudomonas syringae
〈400〉 6

atgggaactc tcgacaaggc gttggtgctg cgtacctgtg caaataacat ggccgatcat 60
tgcggcctta tatggcccgc ttccgggacg gttgaatcca aatactggca gtcaaccagg 120
cgtcacgaga atggtctggt gggtttactg tggggcgctg gaaccagcgc ttttctaagc 180

gtgcatgccg atgcgcgatg gattgtctgt gaagtcgccg ttgcagacat catcagtctg 240
gatgagccgg gaatggtcaa gtttccgcgc gctgaggtgg ttcatgtcgg cgacaggatc 300
agcgcgtcac acttcatttc ggcgcgtcag gccgaccctg catcaacgcc cccgcccacg 360
tcaatgacca cggccacgcc cccgcccacg cccacgcctg cggcagcaca tgtcacatta 420
cctgtggcgg caagtgtcac gttaccggtg gccgaacagg ccagtcatga agtgttcgat 480
gtggcgttgg tcatcgcagc ggccccctca gtaaataccc tgccggtaac gacgccgcag 540
aatttgcaga ccgccactta cggcagcacg ttgagtggcg acaaccacag tcggctcatt 600
gccggttatg gcagtaacga gaccgctggc aaccacagtg atctaattgc c 651

【００５４】

〈210〉 7
〈211〉 555
〈212〉 DNA
〈213〉 Pseudomonas syringae
〈400〉 7

gcaagttacg gcagctcgtt gattgcaggc catgaaagca ttcaggtcgc cggaaataaa 60
agcatgctga tcgccggcaa gggcagctcg cagaccgcag gttttcgcag cacgctgatt 120
gccggtgcgg gcagcgtaca actggcgggt gatcgcagcc ggttgattgc cggtgcagac 180
agtaatcaga ccgcgggtga ccgcagcaaa ctactggccg gtaataacag ttatctgacc 240
gccggcgata gaagcaaact caccggcggg catgactgca ccctgatggc gggcgatcaa 300
agcagattga ccgctggaaa gaacagtatc ttgacggccg gcgcgcgtag caaacttatt 360
ggcagtgaag gctcgacgct ctcggctgga gaagactcca cgctgatttt caggctctgg 420
gacgggaaga ggtacaggca actggttgcc aaaacgggtg agaacggtgt tgaagccgat 480
ataccgtatt acgtgaacga agatgacgat attgtcgata aacccgacga ggaagatgac 540
tggatagagg taaag 555

【００５５】

〈210〉 8
〈211〉 2175
〈212〉 DNA
〈213〉 Pseudomonas syringae

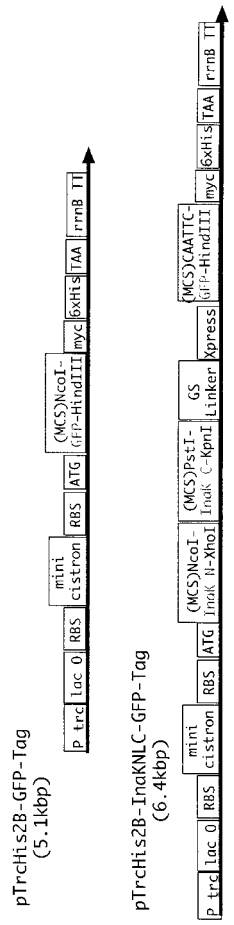
〈400〉 8

atgggaactc tcgacaaggc gttggtgctg cgtacctgtg caaataacat ggccgatcat 60
tgcggcctta tatggcccgc ttccgggacg gttgaatcca aatactggca gtcaaccagg 120
cgtcacgaga atggtctggt gggtttactg tggggcgctg gaaccagcgc ttttctaagc 180
gtgcatgccg atgcgcgatg gattgtctgt gaagtcgccg ttgcagacat catcagtctg 240
gatgagccgg gaatggtcaa gtttccgcgc gctgaggtgg ttcatgtcgg cgacaggatc 300
agcgcgtcac acttcatttc ggcgcgtcag gccgaccctg catcaacgcc cccgcccacg 360
tcaatgacca cggccacgcc cccgcccacg cccacgcctg cggcagcaca tgtcacatta 420
cctgtggcgg caagtgtcac gttaccggtg gccgaacagg ccagtcatga agtgttcgat 480
gtggcgttgg tcatcgcagc ggccccctca gtaaataccc tgccggtaac gacgccgcag 540
aatttgcaga ccgccactta cggcagcacg ttgagtggcg acaaccacag tcggctcatt 600
gccggttatg gcagtaacga gaccgctggc aaccacagtg atctaattgc cctcgagatc 660
tgcagcgcaa gttacggcag ctcgttgatt gcaggccatg aaagcattca ggtcgccgga 720
aataaaagca tgctgatcgc cggcaagggc agctcgcaga ccgcaggttt tcgcagcacg 780
ctgattgccg gtgcgggcag cgtacaactg gcgggtgatc gcagccggtt gattgccggt 840
gcagacagta atcagaccgc gggtgaccgc agcaaactac tggccggtaa taacagttat 900
ctgaccgccg gcgatagaag caaactcacc ggcgggcatg actgcaccct gatggcgggc 960
gatcaaagca gattgaccgc tggaaagaac agtatcttga cggccggcgc gcgtagcaaa 1020
cttattggca gtgaaggctc gacgctctcg gctggagaag actccacgct gattttcagg 1080
ctctgggacg ggaagaggta caggcaactg gttgccaaaa cgggtgagaa cggtgttgaa 1140
gccgatatac cgtattacgt gaacgaagat gacgatattg tcgataaacc cgacgaggaa 1200
gatgactgga tagaggtaaa gggtaccata tgggaattcc ttctggaggc tagtggtggt 1260
ggtggttctg gtggtggtgg ttctggtggt ggtggttctg ctagcatgac tggtggacag 1320
caaatgggtc gggatctgta cgacgatgac gataaggtac caggatccag tgtggtgcaa 1380
ttcgtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 1440
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 1500
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 1560
ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 1620
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 1680

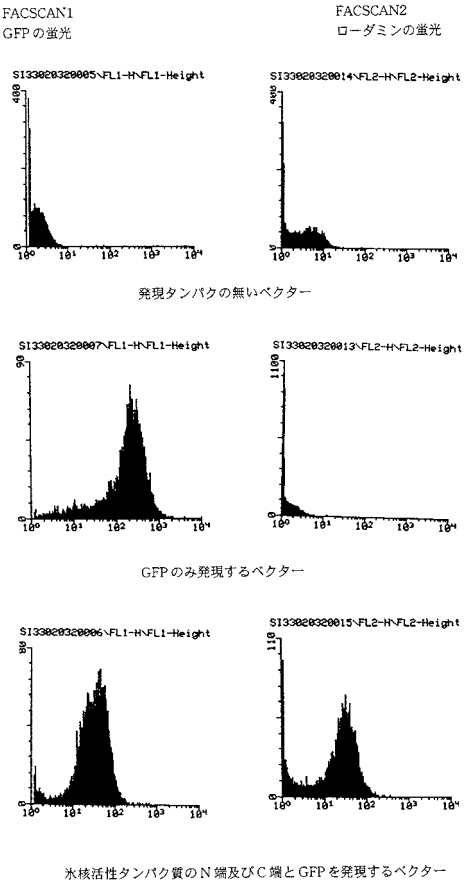
ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 1740
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 1800
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 1860
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 1920
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 1980
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 2040
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaaggga 2100
agctttctag aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccgt cgaccatcat 2160
catcatcatc attga 2175

【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、実施例１で構築した発現ベクターの模式図を示す。
【図２】図２は、シュウドモナス・シリンガエＳＥ１－１株に由来する氷核形成タンパク質のＮ末端及びＣ末端並びに異種タンパク質（ＧＦＰ）をコードする核酸配列を含む大腸菌表面発現用ベクターを導入した大腸菌におけるＧＦＰ及びＨｉｓの発現状況をＦＡＣＳＣＡＮにより観察した結果を示す。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA04 DA06 EA04 FA01 GA11 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ13 QQ32 QR12 QR33 QR59 QR75 QR80
QS05 QS26 QS36 QX02
4B065 AA26X AA41Y AB01 BA01 CA31 CA46