

(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
2010 年 9 月 16 日(16.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/104115 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C40B 40/02 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) C40B 40/08 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/054010
- (22) 国際出願日: 2010 年 3 月 10 日(10.03.2010)
- (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 2009-057211 2009 年 3 月 10 日(10.03.2009) 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 1 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): 久保 泰 (KUBO Tai) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 木村 忠史(KIMURA

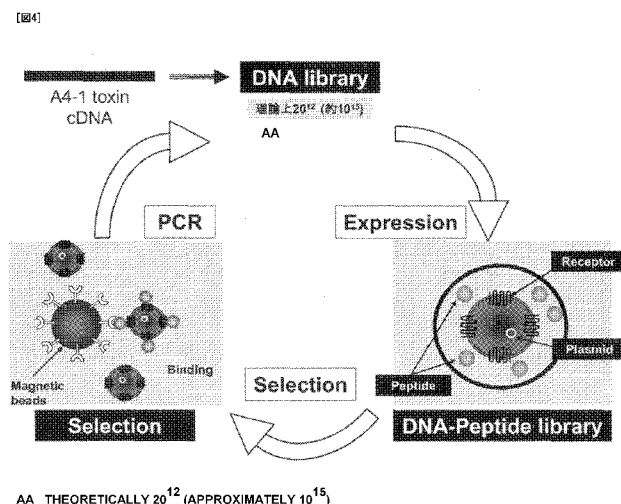
Tadashi) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 小野 世吾(ONO Seigo) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

- (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING POLYPEPTIDE SPECIFICALLY RECOGNIZING MEMBRANE PROTEIN

(54) 発明の名称: 膜タンパク質を特異的に認識するポリペプチドの調製方法



(57) Abstract: A high throughput screening system showing a high efficiency for searching for a ligand of a target protein, in which a display random peptide library is used and which is applicable to a membrane protein, is constructed. The display random peptide library to be used therefor is a library consisting of gram-negative bacteria having been transformed by expression vectors, in which the individual polynucleotides in a random polynucleotide library comprising polynucleotides, encoding a target protein and having a secretion signal sequence located upstream, are connected in tandem; wherein said target protein is expressed on the inner membrane surface of each of the gram-negative bacteria; and each of polypeptides corresponding respectively to the polynucleotides constituting said random polynucleotide library is present in the periplasmic space. A polypeptide having bonded to the target protein is obtained by screening and recovering spheroplasts. The obtained polynucleotide is amplified and subjected, as the starting material in the subsequent cycle, to repeated screening and amplification so that the *in vitro* molecule evolution thereof can be conducted to thereby give a polypeptide sequence having a higher affinity for the target protein.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/104115 A1



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 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))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明は、膜タンパク質にも適用可能な標的タンパク質のリガンド検索のためのディスプレイ型ランダムペプチドライブラリーを用いる効率の良いハイスループットスクリーニング系を構築するものである。そのために用いるディスプレイ型ランダムペプチドライブラリーは、上流に分泌シグナル配列を有する標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドからなるランダムポリヌクレオチドライブラリーの各ポリヌクレオチドがタンデムに連結された発現ベクターにより形質転換されたグラム陰性細菌の群からなるライブラリーであって、各グラム陰性細菌の内膜表面において前記標的タンパク質が発現しており、かつペリプラズム間隙内には、前記ランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチドに対応する各ポリペプチドが存在している。標的タンパク質に結合したポリペプチドを、スフェロプラストの選択・回収により獲得し、得られたポリヌクレオチドを増幅し、次のサイクルの出発原料としてスクリーニング、増幅を繰り返すことで、より標的膜タンパク質との親和性の高いポリペプチド配列に試験管内分子進化させることができる。

明 細 書

発明の名称：

膜タンパク質を特異的に認識するポリペプチドの調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、膜タンパク質を特異的に認識するポリペプチドの調製方法に関する。

背景技術

[0002] 天然のタンパク質は、生命活動に必要な生体反応を始めとして細胞・組織の構造や形態形成など様々な機能を担っている。現在我々は、医療・食品・製造など様々な分野において、タンパク質が本来持つ特性を利用するのみならず、化学的あるいはタンパク質工学的にタンパク質を改変することによって、用途に適した特性（例えば、耐熱性、pH安定性、基質特異性など）を付与したタンパク質を新たに創製して利用している。また、このように天然のタンパク質を基にするのではなく、全くランダムなポリペプチドのライブラリーから目的の特性を示すものを選択することも行われており、その代表的な技術として試験管内分子進化法がある。

試験管内分子進化法では、ランダムな塩基配列を含む遺伝子ライブラリーが出発材料となる。これよりタンパク質を発現してランダムなアミノ酸配列を含むライブラリーを調製し、その中から所望の物理化学的特性や生物化学的機能を持つタンパク質及びそれをコードする遺伝子を選択的に濃縮していく。選択された候補ペプチドは、さらにそれを出発材料として改変を加え、より高機能なものを創り出すプロセスに進むことができる。そのため、近年この技術に関して様々な改良や新技術が導入されており、それは主として次のような技術要素である。

（１）遺伝子型（genotype）と表現型（phenotype）の対応付け

遺伝子が持つ情報とそれがコードするタンパク質が示す特性とを如何に対応付けるかは重要なポイントである。その遺伝子型（genotype）と表現型（p

henotype) を対応付ける技術として、これまでにmRNAディスプレイ、cDNAディスプレイ、リボソームディスプレイ法、STABLE、in vitro compartment法などがある。また、ファージディスプレイ、イーストディスプレイ、バクテリアディスプレイなどのように、ファージや細胞内部に遺伝子型を持ち、細胞表層に表現型を持つ方法などが考案されてきた。

(2) ランダム配列ライブラリーの調製法

試験管内分子進化技術のもうひとつの重要な技術要素は、多様性・独立性に富んだライブラリーを如何に作るかで、ランダムな核酸配列を基本として、その領域のシャッフリングやリコンビネーションなどにより多様性を生み出す方法が考えられた。

(3) ランダム配列の空間提示方法

これらのランダム配列を含むポリペプチド鎖を効率よく空間提示する方法も重要な技術要素である。これには、天然あるいは非天然の分子骨格を用いて空間提示する方法があり、 α -amylase inhibitor、bovine pancreatic trypsin inhibitor、ankyrin repeat proteinなどの分子骨格 (scaffold) を利用した報告がある。

[0003] 最近、本発明者らは、ヘビ毒に含まれる神経毒の一種である α -neurotoxin (α -型神経毒) のファミリーが共通して持つスリーフィンガー (Three-Fingerあるいは 3F) 型スキヤフォールドを利用してタンパク質のコンビナトリアルライブラリーを作製し、試験管内分子進化法により抗体に代わる新規なタンパク質の創製法を開発した (特許文献 1, 2)。この方法においては、タンパク質のスリーフィンガー様のスキヤフォールド形成に重要な領域の配列を維持しながら、相互作用に関与するループ領域のアミノ酸配列がランダムであるように設計したディスプレイ型のポリペプチドライブラリーを作製し、エマルジョンPCR法と組み合わせたハイスループットスクリーニングにより、標的タンパク質との親和性の高いポリペプチドを得ることに成功している。具体的には、このライブラリーを、ビーズ等の担体に固定化した可溶性のインターロイキン6受容体 (IL-6R) と接触させて親和性の高いタンパク

質を選択し、IL-6Rに結合しうる新規なタンパク質を同定した。このタンパク質は、IL-6Rの本来のリガンドであるIL-6と同程度に受容体と親和性があり、さらにIL-6Rに対して阻害効果と促進効果を示すそれぞれのタンパク質を得ることができた。

しかし、標的分子をビーズ等の担体に安定に固定化する際に、標的分子が膜受容体等膜タンパク質である場合には、膜成分とともにビーズ等の担体に安定に固定化する必要があるが、それには技術的な困難性が伴う。

一方、未だにリガンドが決められないオーファンレセプターと呼ばれるGタンパク質共役型受容体（GPCR）をはじめ、イオンチャネル、薬物トランスポーターなど、創薬ターゲットの約6割は膜タンパク質が占めると言われている。

したがって、これらの膜タンパク質を標的とするペプチド創薬および低分子化合物をデザインするためのリード化合物創製のため、膜タンパク質にも適用可能な標的タンパク質のリガンド検索のためのハイスループットスクリーニング系の構築が切望されていた。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2007-306866号公報

特許文献2：特開2008-193922号公報

特許文献3：特開2008-11号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：J. Immunol. Methods., 290: 3-28 (2004)

非特許文献2：Biochemistry 34: 8076-8081 (1995)

非特許文献3：J. Biol. Chem. 276: 40306-40312 (2001)

非特許文献4：J. Gen. Physiol. 123: 455-467 (2004)

非特許文献5：J. Biol. Chem. 279: 37734-37740 (2004)

非特許文献6：Toxicol. 49: 202-212 (2007)

非特許文献7：Toxicol. 39: 43-60 (2001)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、膜タンパク質にも適用可能な標的タンパク質のリガンド検索のための効率の良いハイスループットスクリーニング系の構築を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] そこで本発明者らは、グラム陰性菌である大腸菌のペリプラズム間隙を利用することを着想し、膜タンパク質を大腸菌内膜に発現させると共に、ランダム化したスキャフォールドタンパク質をペリプラズム間隙内に分泌するように発現させ、ペリプラズム間隙を膜タンパク質に対するポリペプチドの反応場とすることによるスクリーニング技術を開発した。そして、当該スクリーニング技術を、PCR技術と組み合わせることにより、より標的膜タンパク質との親和性の高いペプチド配列に分子進化させることができることも実証できた。そこで、この方法を、ペリプラズム内分泌・選択 (intra periplasm secretion & selection, iPS&S) 法と命名した (図4)。
- [0008] 本発明の「iPS&S法」とは、ポリペプチドをコードする遺伝子 (ポリヌクレオチド) が細胞内にあって、当該ポリヌクレオチドが発現してペリプラズム間隙に分泌され、ペリプラズム間隙中で表現型のポリペプチドが提示されているという点で、大腸菌表層ディスプレイの一種といえる。従来技術との大きな違いは、標的膜タンパク質分子のcDNAをペプチドのcDNAを含むプラスミド上にタンデムに並べて搭載し、大腸菌の内膜に標的分子を発現するため、ひとつの大腸菌宿主内でポリペプチドと標的分子を同時に発現・提示するところである (図12)。これにより、標的膜タンパク質と特異的に結合するポリペプチドの遺伝子情報を大腸菌スフェロプラストの選択・回収により獲得することができる。また、得られたポリヌクレオチドを増幅し、次のサイクルの出発原料として標的膜タンパク質と共に大腸菌で発現させ、スクリーニングする工程を繰り返すことで、より標的膜タンパク質との親和性の高いポリペプチド配列に試験管内分子進化させることができる技術でもある。し

たがって、iPS&S法は、大腸菌などグラム陰性細菌の内膜に発現することが可能な膜タンパク質であれば標的とすることが可能で、その膜タンパク質と特異的に結合するポリペプチドを探索・同定する方法であるということが出来る。

[0009] また、本発明者らは、クモ毒由来のカルシウムチャネル遮断タイプの毒ペプチド（特許文献3）がジスルフィド結合を3箇所有するスキヤフォールド構造（ICKスキヤフォールド）を形成していることを見出し、当該ICKスキヤフォールドを利用したペプチドライブラリーを作製した。当該ペプチドライブラリーについては、本発明と同日付で出願したが、本発明者らが以前開発した3フィンガー様（3F）スキヤフォールドを利用したライブラリーよりもサイズが小さく、ジスルフィド結合数も1箇所少ないため、狭いペリプラズム間隙内では正確な発現、分泌が容易であるという利点を生かすことができる。

以上の知見をもとに、従来困難であるとされていた膜タンパクに対するリガンド検索にも有効なハイスループットスクリーニング法である「iPS&S法」についての本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は以下の通りである。

〔1〕 ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドの群からなるランダムポリペプチドライブラリーであって、対応するランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが、グラム陰性細菌中で発現し、ペリプラズム間隙中に分泌された状態で存在しており、かつ当該グラム陰性細菌の内膜表面に、標的タンパク質が発現していることを特徴とする、ランダムポリペプチドライブラリー。

〔2〕 前記ランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチドが、その上流に分泌シグナル配列を有しており、かつ同一の発現ベクター中で標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドとタンデムに連結されている、前記〔1〕に記載のランダムポリペプチドライブラリー。

〔3〕 ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポ

リペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーであって、当該ポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが、その上流に分泌シグナル配列を有し、グラム陰性細菌で発現可能な制御領域下に組み込まれており、かつ標的膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されていることを特徴とする、ランダムポリヌクレオチドライブラリー。

〔４〕 ランダム化された３以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが挿入された、グラム陰性細菌で発現可能な発現ベクターの群からなり、前記各ポリヌクレオチドの上流に分泌シグナル配列があり、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されている発現ベクターの群から構成されていることを特徴とする、ランダムポリヌクレオチドライブラリー。

〔５〕 前記〔３〕又は〔４〕に記載のランダムポリヌクレオチドライブラリーにより形質転換されたグラム陰性細菌の群からなり、各グラム陰性細菌の内膜表面には標的タンパク質が発現しており、かつペリプラズム間隙内には、前記ランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチドに対応する各ポリペプチドが存在していることを特徴とする、ディスプレイ型グラム陰性細菌ライブラリー。

〔６〕 前記〔５〕に記載のディスプレイ型グラム陰性細菌ライブラリーを用いることを特徴とする、標的タンパク質に親和性の高いポリペプチドのスクリーニング方法。

〔７〕 標的膜タンパク質に対して親和性を有するポリペプチドのスクリーニング方法であって、下記（ａ）～（ｅ）の工程を含む方法；

（ａ）ランダム化された３以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが挿入された、グラム陰性細菌で発現可能な発現ベクターであって、前記各ポリヌクレオチドの上流に分泌シグナル配列があり、標的タンパク

質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されている発現ベクターの群を用意する工程；

（b）前記ポリヌクレオチドライブラリーを構成する各発現ベクターを、形質転換グラム陰性細菌において、前記標的膜タンパク質を内膜表面に、また各ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドをペリプラズム間隙内にそれぞれ発現させる工程；

（c）前記各ポリペプチドを、前記ペリプラズム間隙内で前記標的膜タンパク質と接触させる工程；

（d）前記形質転換グラム陰性細菌のスフェロプラストを形成させて、前記標的膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する工程；

（e）前記選択されたポリペプチドを発現した形質転換細胞中のポリヌクレオチドを増幅して、当該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を決定する工程。

〔8〕 標的の膜タンパク質に対して親和性を有するポリペプチドのスクリーニング方法であって、下記（a）～（j）の工程を含む方法；

（a）ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが挿入された、グラム陰性細菌で発現可能な発現ベクターであって、前記各ポリヌクレオチドの上流に分泌シグナル配列があり、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されている発現ベクターの群を用意する工程；

（b）前記ポリヌクレオチドライブラリーを構成する各発現ベクターを、形質転換グラム陰性細菌において、前記標的膜タンパク質を内膜表面に、また各ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドをペリプラズム間隙内にそれぞれ発現させる工程；

（c）前記各ポリペプチドを、前記ペリプラズム間隙内で前記標的膜タンパク質と接触させる工程；

（d）前記形質転換グラム陰性細菌のスフェロプラストを形成させて、前記

標的膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する工程；

（e）前記選択されたポリペプチドを発現した形質転換細胞中のポリヌクレオチドを増幅して発現ベクターに挿入した第2のポリヌクレオチドライブラリーであり、各ポリヌクレオチドは分泌シグナル配列の下流に挿入され、かつ前記標的膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの群で構成された第2のポリヌクレオチドライブラリーを製造する工程、；

（f）前記第2のポリヌクレオチドライブラリーを構成する各発現ベクターを形質転換グラム陰性細菌において、前記標的膜タンパク質を内膜表面に、また各ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドをペリプラズム間隙内にそれぞれ発現させる工程；

（g）前記各ポリペプチドを、前記ペリプラズム間隙内で前記標的膜タンパク質と接触させる工程；

（h）前記形質転換グラム陰性細菌のスフェロプラストを形成させて、前記標的膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する工程；

（i）必要により工程（e）－（h）を繰り返す工程；そして

（j）選択されたポリペプチドのアミノ酸配列を決定する工程

発明の効果

[0011] 本発明のiPS&S法は、主要な創薬ターゲットであるGタンパク質共役型受容体（GPCR）やイオンチャンネルなどの膜タンパク質を標的とするペプチド創薬および低分子化合物をデザインするためのリード化合物創製に寄与することが期待される。オーファンGPCRに対してペプチド性リガンドを創出し、これを利用した脱オーファンにも利用することができる。また、膜タンパク質に対する特異的なペプチドが同定できると、精製のためのアフィニティー担体や、蛍光や放射性同位元素などによる標識分子を結合して分子イメージング試薬としての利用、抗体の代用として検査・診断材料としての利用などが考えられる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] 図1は、クモ毒由来ICKペプチドのスキヤフォールド；システイン残基

(C1-C6) の位置とランダム化した領域（濃いグレー部分）を示す図である。

[図2] 図 2 は、ICKペプチドファミリーのアラインメントを示す図である。

[図3] 図 3 は、ペプチドPeak A4-1のHainantoxin-4に基づくホモロジーモデリングを示す図である。

[図4] 図 4 は、分子進化技術「iPS&S法」の工程を示す図である。

[図5] 図 5 Aは、プラスミドpGR11-Txの構成概要を示す図であり、図 5 Bは、膜タンパク質とペプチドの発現確認を示す写真である。

[図6] 図 6 は、プラスミドpGR11-Txの構成を示す図である。

[図7] 図 7 は、プラスミドpGR11-USERの構成を示す図である。

[図8] 図 8 は、非特異的吸着ペプチドの除去工程を示す図である。

[図9] 図 9 は、ペプチドA-1とA-2によるムスカリン受容体リガンドNMSとm2受容体との結合阻害アッセイの結果を示す図である。

[図10] 図 10 Aは、ペプチドA-1と非特異的結合ペプチドの構造概要を示す図である。図 10 Bは、ペプチドが吸着する大腸菌のプラスミドの検出を示す図である。図 10 Cは、ペリプラズムに発現するペプチドの検出を示す図である。

[図11] 図 11 は、ペプチド標的特異性評価実験の概要を示す図である。

[図12] 図 12 は、「iPS&S法」におけるプラスミド、膜タンパク質、ポリペプチドの局在様態を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 1. 「iPS&S法」に用いるためのライブラリー

本発明の「iPS&S法」において、ポリペプチドライブラリーを構成する各ポリペプチドは、1個のグラム陰性菌宿主（例えば大腸菌）にそれぞれのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター（プラスミド）が形質転換により導入され、1宿主細菌ごとにライブラリー中の1種類のポリペプチドのみが発現し、ペリプラズム間隙内に分泌された状態でライブラリー化されている。

[0014] 本発明に用いられるポリペプチドライブラリーは、ランダムペプチド領域

を含み、各々のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで構成されたポリヌクレオチドライブラリーと対応付けられた、いわゆるディスプレイ型のランダムポリペプチドライブラリーである。

本発明のランダムポリペプチドライブラリーとしては、典型的には構造的に安定なフレームワーク領域を有し、他の領域の一部配列がランダム化されたものであるが、フレームワーク領域を有さず、かつほとんど又は全てのアミノ酸配列がランダム化されたオリゴペプチドのみで構成された、ランダムオリゴペプチドライブラリーであってもよい。そのときのオリゴペプチドのアミノ酸長は、通常5以上であり、好ましくは5～30、より好ましくは5～10である。アミノ酸長が短い場合には、両端に β 構造やロイシンジッパー等の自己会合性を持つアミノ酸配列を付加するか、又はファージディスプレイ用抗原タンパク質、可溶性酵素タンパク質などと融合タンパク質とすることが好ましい。また、可溶性の酵素や各種生理活性タンパク質自身をテンプレートとし、その活性化領域やレセプター結合領域などの一部をランダム化したライブラリーも、本発明のランダムポリペプチドライブラリーに含まれる。これらの場合のランダム化されるアミノ酸数は、通常3以上であり、好ましくは5～15、より好ましくは5～10である。

[0015] 本発明で用いることができるランダムポリペプチドライブラリーは、対応する各ポリヌクレオチドが大腸菌などのグラム陰性細菌で発現した後、ペリプラズム間隙中に分泌されたポリペプチドができるだけ非特異的な結合をせずに、標的の膜タンパク質との特異的な結合ができるように自由な動きが可能な程度のサイズであると共に、コンパクトに折りたたまれた安定な形態をとることが必要である。したがって、上述のように、例えばオリゴペプチドライブラリーなどの場合は、両端に β 構造やロイシンジッパー等の自己会合性を持つアミノ酸配列を付加して、安定な一定の構造をとらせる工夫が必要となる。

従来知られている各種の安定なスキャフォールド形成性のポリペプチドライブラリー、例えば3Fスキャフォールドライブラリー（特許文献1など）

コンパクトな1Fのスキヤフォールド型ペプチドライブラリー（特許文献2など）の他抗体フラグメントやTCRフラグメントの超可変領域をランダム化した、いわゆる抗体フラグメントライブラリーや、一本鎖TCRライブラリー（例えば臨床免疫 35: 156-164, 2002）など公知のフレームワーク構造を有し、可溶性のポリペプチドをディスプレイ可能なポリペプチドライブラリーは、いずれも好適に用いることができる。

大腸菌宿主の場合は、A4-1などICKスキヤフォールドを利用したペプチドライブラリー（上記同日付出版願）が、典型的な好ましい例であるので、A4-1由来ライブラリーを用いて本iPS&S法の有効性を検証した。なお、サイズが大きなライブラリーを用いる場合には、大腸菌よりも広い間隙空間を有するグラム陰性細菌を宿主とすることが好ましい。

[0016] そして、本発明のランダムポリペプチドライブラリーは、当該ポリペプチドライブラリーを構成する各ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、その上流に分泌シグナル配列を有して発現ベクター（プラスミド）中に存在し、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、同一発現ベクター中にタンデムに挿入された状態で、ランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成している（図5を参照）。

したがって、本発明において、「ランダムポリヌクレオチドライブラリー」というとき、「ランダムポリペプチドライブラリー」を構成する各ポリペプチドのランダム化領域と対応した位置に遺伝子変異が導入されたポリヌクレオチドの群からなるポリヌクレオチドライブラリーを指すが、実際は、各ポリヌクレオチドはその上流に分泌シグナルを有し、かつ標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに結合された状態の発現ベクターの部分配列として存在しているので、このような状態で各ポリヌクレオチドが挿入されている発現ベクターの群も本発明の「ランダムポリヌクレオチドライブラリー」ということができる。また、それぞれの発現ベクターが導入された各形質転換グラム陰性細菌も、各ポリヌクレオチドと対応していることから、当該形質転換グラム陰性細菌の群も本発明の「ランダムポリヌクレオ

チドライブラリー」であるということができる。

そして、各形質転換グラム陰性細菌内の発現ベクターに組み込まれている各ポリヌクレオチドが、それぞれの細菌のペリプラズム間隙中に、対応するポリペプチドを分泌することになるので、本発明の「ランダムポリペプチドライブラリー」というときは、対応するポリヌクレオチドライブラリーにより形質転換された、各グラム陰性細菌のペリプラズム間隙中のポリペプチドの群を指し、これらポリペプチドをペリプラズム間隙中にディスプレイしている形質転換グラム陰性細菌の群も、本発明の「ランダムポリヌクレオチドライブラリー」ということができる。なお、本発明では、このような形質転換グラム陰性細菌群を、「ディスプレイ型グラム陰性細菌ライブラリー」ということもある。

[0017] 本発明の標的タンパク質としては、神経情報伝達、細胞分化、細胞増殖、アポトーシス等にかかわる哺乳類細胞表面の各種シグナル伝達系の膜タンパク質以外にも、炎症や癌やウイルス、病原性細菌などの表面抗原タンパク質等その遺伝子の塩基配列が公知となっている膜タンパク質であればどのようなものでも対象となる。典型的には、ヒトなどの哺乳動物細胞膜表面でシグナル伝達に関わる膜受容体（例えばGPCR、サイトカイン受容体、増殖・分化・成長因子受容体、インテグリン等）、薬物トランスポーター、各種イオンチャネル等、また病原細菌表面抗原タンパク質、癌細胞表面抗原タンパク質、ウイルス表面抗原タンパク質などである。特に、リガンドが未知のGタンパク質共役型受容体であるオーファンレセプターのリガンド検索に好ましく用いられる。

また、本発明の標的タンパク質としては、可溶性タンパク質やペプチドも対象となる。その場合は、グラム陰性細菌内膜に提示できるように、例えば、NlpA (Nature Biotechnology 25: 563-565, 2007) 等と融合することで、適宜適用可能となる。

したがって、本発明の標的タンパク質は、本来の生体膜タンパク質又は膜タンパク質と融合された可溶性タンパク質の場合があり得るが、本発明では

これらをあわせて、単に「標的膜タンパク質」という。

[0018] 本発明のiPS&S法に用いることができる宿主細菌としては、ペリプラズム間隙を有するどのようなグラム陰性細菌、例えばシュードモナス属 (*Pseudomonas*) サルモネラ属 (*Salmonella*) 細菌なども適用可能であるが、好ましくは大腸菌である。また、ポリヌクレオチドライブラリーを導入するために用いる発現ベクターとしては、宿主細菌に適合する適宜の公知発現ベクター、好ましくは発現プラスミドを用いることができる。

[0019] 典型的な発現ベクター（発現用プラスミド）の調製法は以下の通りである。

ランダム化したポリヌクレオチドの5'側に、直接もしくは必要に応じてスペーサーを介し、宿主細菌のペリプラズム間隙に輸送するためのシグナル配列を結合するが、その際に、Omp A外膜タンパク質など外膜タンパク質をコードする配列を付加しておく、ペリプラズム間隙への分泌性が高まる (Protein Expression and Purification 64: 198-204 (2009)による。)。また、宿主細菌のペリプラズム間隙内の可溶性タンパク質（例えばジスルフィド異性化酵素DsbCなどの酵素タンパク質）との融合タンパク質として発現させることも、ペリプラズム間隙への分泌性向上に有効である (文献Protein Peptide Letters 9: 419-426 (2002)による。)。さらに、プロモーター配列を含む制御配列を付加する。好ましくは、3'側には停止コドンが付加するように設計する。その際、Strep-tagII配列などのタグを付加すると、ライブラリーの精製が容易になるのでさらに好ましい。これらのポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチドは、標的膜タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターとは別の発現ベクター中に挿入することも可能であるが、同一の発現ベクター中に挿入することが好ましい。挿入位置は適宜決定できるが、標的膜タンパク質DNAの下流に導入することが好ましい。なお、標的となる膜タンパク質をマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現し得るようにフュージョンしたDNAを用いると、可溶性と発現量が上がる可能性があり好ましい (J. Biol. Chem. 267:

8200-8206 (1992); J. Biochem. 127: 151-161 (2000)による。) 。

[0020] また、本発明のiPS&S法では、本発明のポリヌクレオチドライブラリー中の各ポリヌクレオチドがそれぞれ導入される形質転換グラム陰性菌の内膜には、標的膜タンパク質が発現される必要がある。そのため、形質転換グラム陰性細菌の内膜で発現するように標的膜タンパクをコードするDNAを含む発現ベクターも同時にもしくはあらかじめグラム陰性細菌宿主中に導入する。例えば、あらかじめ標的膜タンパクをコードするDNAで形質転換し、標的膜タンパクが内膜で発現していることが確認された形質転換細菌を用いて、本発明のポリヌクレオチドライブラリーを導入することもできる。しかし、両者を、同一の発現ベクター中に組み込むことが発現量を一定に調節できるので好ましい。すなわち、好ましい場合とは、標的膜タンパクをコードするDNAを含む発現ベクター中のタンデムな位置に、本発明のポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドを組み込む。その際の、両者の割合は1～10：10～1のうちの最適な数値（例えば1：1）に決定し、1回のスクリーニング中には変更しないことが好ましい。なお、発現時期をそろえるために、同一の制御領域下に組み込むこともできる。

[0021] 2. ICKスキヤフォールドを利用したポリペプチドライブラリーについて
ICKスキヤフォールドを利用したポリペプチドライブラリー（以下、ICK型ポリペプチドライブラリーともいう。）は、構造安定性が高い上に、従来の3Fスキヤフォールド型のライブラリーよりもサイズが小さい点で本発明のポリペプチドライブラリーとして特に好ましいので、以下、ICK型ポリペプチドライブラリーを用いた場合について詳細に述べる。

[0022] （1）ICKスキヤフォールドについて

本発明において「ICKスキヤフォールド」とは、クモやサソリ毒に見いだされる30～70アミノ酸残基からなるポリペプチドにおいて、6個のシステイン残基（Cys-1～Cys-6）が、Cys-1とCys-4、Cys-2とCys-5、及びCys-3とCys-6でS-S結合することにより形成する三次構造（図1）をいう。図2に、ICKスキヤフォールドを有する代表的なポリペプチドのアミノ酸配列の

アラインメントを示す。図の右端の数字はアミノ酸の長さである。このアラインメントに示されるポリペプチドの名称とプロテインデータベースのアクセッション番号を以下の表に示す。

[表1]

ICK 骨格ポリペプチド名	データベース・アクセッション番号
Ceratotoxin-1 (CcoTx1)	P84507
Ceratotoxin-2 (CcoTx2)	P84508
Ceratotoxin-3 (CcoTx3)	P84509
Covalitoxin-2 (CvTx-II)	P82601
Hainantoxin-1 (HnTx-I)	P83591
Hainantoxin-3 (HnTx-III)	P83464
Hainantoxin-4 (HnTx-IV)	P83471
Hainantoxin-5 (HnTx-V)	P60975
Hanatoxin-1 (HaTx1)	P56852
Hanatoxin-2 (HaTx2)	P56853
Heteroscodratoxin-1 (HmTx1)	P60992
Heteroscodratoxin-2 (HmTx2)	P60993
Huwentoxin-1 (HwTx-I)	P56676
Huwentoxin-4 (HwTx-IV)	P83303
Omega-granmotoxin SIA (Omega-GsTx SIA)	P60590
Phrixotoxin-3 (PaurTx3)	P84510
Protoxin-1 (ProTx1)	P83480
Protoxin-2 (ProTx2)	P83476
Psalmotoxin-1 (PcTx1)	P60514
Stromatoxin-1 (ScTx1)	P60991
Theraphotoxin-1 (TITx1)	P83745
Toxin GsMTx-4 (GsMTx4)	Q7YT39
Toxin SNX-482 (SX482)	P56854
Toxin SGTx1 (SGTx1)	P56855
Venom protein 5 (TXP5)	P49266
Voltage sensor toxin 1 (VSTX1)	P60980
Voltage sensor toxin 2 (VSTX2)	P0C2P4
Voltage sensor toxin 3 (VSTX3)	P0C2P5

[0023] 図2の1行目に示すポリペプチドは、*Grammostola spatulata*から単離された新規なカルシウムチャネルブロッカー毒「A4-1」(特許文献3、非特許文献8)ポリペプチドである。

A4-1は、34アミノ酸を含むICK型の毒素であり、カルシウムチャンネルに結合してこれらを阻害することが見いだされている。ICKモチーフを含むペプチドは既に数多く知られており、それぞれが Na^+ チャンネル、 Ca^{2+} チャンネル、 K^+ チャンネルのブロッカーや酵素阻害など様々な生物活性を持つことが知られている。このペプチドの遺伝子は加速進化により、標的分子との相互作用に関係する領域に積極的にアミノ酸置換のおこる塩基置換(変異)を導入しているのが特徴で、これが標的分子の多様性を生み出す原因となっている。本発明者らは、この点に着目してICKモチーフを崩さないループ部分やテール領域にランダム配列を導入してICK型ランダムペプチドライブラリーを設計することを着想した。

図2に、A4-1と、既知のチャンネル阻害毒であるパウルトキシン(PaurTx3)やハイナントキシン(HnTx4)等の一次アミノ酸配列のマルチプルアラインメントを示す。相同な配列はブロックで示されている。

他のICK型ポリペプチドについても、図2のアラインメントに示されるICKモチーフをフレームワーク構造として利用することで、A4-1と同様のポリペプチドライブラリーを容易に作製することができる。

[0024] なお、A4-1の三次構造は、BioPackage (MolSoft L.L.C., California, USA)の3Dモデリングソフトウェア部品を用いて予測され、ループおよび β シートの形成に関与する残基は、既知のハイナントキシン(HnTx4)の構造と比較して推定された(図3)。図3において、二次構造情報から得られる β 構造はリボン状矢印として示す。

図1、図2に示されるように、Cys-1とCys-4、Cys-2とCys-5、Cys-3とCys-6とのそれぞれの間のS-S結合によって、3箇所のループ状の領域(Cys-1とCys-2の間の領域、Cys-2とCys-3の間の領域、Cys-5とCys-6の間の領域)が形成され、それぞれループI、ループII、ループIIIとよぶ(Cys-4とCys-5の間には主に β シート構造が存在する。)。これら3つのループ領域、及びCys-6からC末端側のテール領域が、カルシウムチャンネルと結合する領域であると予測される。

[0025] (2) ポリペプチドライブラリーについて

ICKスキヤフォールド型のポリペプチドライブラリーにおいては、ICKスキヤフォールドのループI, IIおよびIIIの領域とテール領域の一部のアミノ酸配列がランダム化されており、標的タンパク質と親和性の高いポリペプチドをスクリーニングするために用いられる。

ICKスキヤフォールドのアミノ酸配列中の下記の領域が同時にランダム化されることで、フレームワークを保ったまま、標的との結合特性の異なる種々のポリペプチドからなるライブラリーが得られる。

(i) Cys-1とCys-2の間のループI領域中のCys-1のC末側4番目からCys-2のN末側1番目までのアミノ酸配列；

(ii) Cys-2とCys-3の間のループII領域中のCys-2のC末側3番目からCys-3のN末側1番目までのアミノ酸配列；

(iii) Cys-5とCys-6の間のループIII領域中のCys-5のC末側2番目からCys-6のN末側3番目までのアミノ酸配列；および

(iv) Cys-6からC末端側のテール領域中のCys-6のC末側3番目からC末端までのアミノ酸配列。

上記(i)～(iv)領域の典型的な例としては、それぞれ図2の第1行に示されるポリペプチドA4-1のアミノ酸配列における(i)6番目のメチオニンから8番目のリジンまでの3アミノ酸残基、(ii)12番目のアスパラギン酸から15番目のリジンまでの4アミノ酸残基、(iii)25番目のアルギニンから27番目のヒスチジンまでの3アミノ酸残基、及び(iv)33番目のバリンから34番目のフェニルアラニンまでの2アミノ酸残基からなるアミノ酸配列があげられる。

本発明では、以下の「A4-1」アミノ酸配列由来の、式〔1〕で示されるアミノ酸配列を含む複数のポリペプチド群からなるライブラリーを典型的なライブラリーとして用いた。

式〔1〕：

DCLGF(X)₃CIP(X)₄CCRPNLVCS(X)₃KWCKY(X)₂ (配列番号2)

(式中、Xは任意のアミノ酸残基である)

このライブラリーでは12アミノ酸残基がランダムとなり、ライブラリーが持つ配列のバリエーションは、理論上 $20^{12} = \text{約}10^{16}$ 通りと極めて多様である。

ICKスキヤフォールドを有するポリペプチド、例えば図2に示されるポリペプチドについても、図2のアラインメントなどを参照することで、A4-1に基づくポリペプチドライブラリーと同様の手法で(i)～(iv)領域をランダム化したポリペプチドライブラリーを製造することができる。

[0026] 3. 「iPS&S法」に用いるライブラリーの調製方法

(1) ポリヌクレオチドライブラリーの調製

ランダムなアミノ酸配列を含むポリペプチドライブラリーの典型例として、クモ毒より同定した Ca^{2+} チャネル阻害ペプチド A4-1遺伝子を鋳型として調製した。A4-1は34残基のアミノ酸からなり、配列相同性のあるペプチドの立体構造から、ICK (Inhibitor Cystine Knot) モチーフとよばれる分子骨格を形成すると考えられる。A4-1のループ領域にランダムなアミノ酸配列を含むランダムペプチドライブラリーに対応するポリヌクレオチドライブラリーを調製した。

ポリヌクレオチドライブラリーを作製する際には、周知の遺伝子への変異導入方法が用いられる。典型的にはランダム配列を入れる所望のアミノ酸残基の位置にトリプレットコドンNNS (NはG、C、T、A。SはGあるいはC) のヌクレオチドを導入したオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせPCRにより作製する(特許文献1, 2などでも同様の手法が用いられている。UNIT 3.17 in “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, New York, N.Y. 1995の方法参照。)。その際、テール部にランダム導入するためのプライマーとしては、終止コドンにコードする塩基配列を用いることが好ましい。他に、酵素的に短いオリゴヌクレオチドを結合する方法(GENE, 164:49-53, 1995)や短いDNAをブロックとしてつなぐ人工遺伝子合成法(Slonomics社)などを用いることができる。

[0027] (2) コンストラクトの調製

典型的な大腸菌発現用プラスミドの調製法について以下に述べる。

ランダム化したポリヌクレオチドの5'側に、大腸菌のペリプラズム間隙に輸送するためのシグナル配列に続いて精製用のタグ配列をアミノ末端側に配し、かつ外膜タンパク質（OmpAなど）及び大腸菌のペリプラズム間隙内酵素（DsbCなど）との融合タンパク質として発現させるように、プロモーター配列を含む制御配列を付加し、3'側には停止コドンが付加するようにプラスミドを設計する。

標的膜タンパク質分子（ムスカリン性アセチルコリンm2受容体）とマルトース結合タンパク質との融合タンパク質をコードするDNAがプロモーター配列と共に、同一の発現プラスミド内に挿入されるように設計することが好ましい。

ここで、ヒトm2受容体のcDNA塩基配列は、DNAデータベースAccession No. BC106742から得られる。

本発明の宿主微生物としては、ペリプラズム間隙を有するグラム陰性細菌であり、その発現ベクターが入手可能であればどのような細菌であってもよいが、典型的には大腸菌を用いる。

形質転換手法及び培養条件などは通常の遺伝子組換え手法が適用できる。

[0028] 4. 「iPS&S法」を用いたハイスループットスクリーニング

iPS&S法においては、ポリヌクレオチドとそれに対応したポリペプチドから構成されるポリペプチドライブラリーは、大腸菌内に導入したベクターとそれにより発現したポリペプチドが標的に結合したときに初めて形成される（図4）。すなわち、標的となる膜タンパク質は大腸菌の内膜に発現させるとともに、ポリペプチドはペリプラズム間隙に発現させる（図12）。標的にポリペプチドが結合したときには、スフェロプラストとポリペプチドが複合体を形成し、ポリヌクレオチドとポリペプチドが間接的に対応づけられる。標的にポリペプチドが結合しないときには、スフェロプラストと複合体を形成することができないのでPCRしてもポリヌクレオチドのライブラリーを

構成することができない。したがって、ポリペプチドライブラリーを構成したポリヌクレオチドライブラリーのみが第2のポリヌクレオチドライブラリーとなり、試験管内分子進化がきわめて簡便に適用でき、より標的親和性の高いポリペプチドを効率的に取得できる。

[0029] 具体的には、大腸菌などの外膜を除いてスフェロプラストの状態にした後、洗浄して非結合性のペプチドを除去する。

次いで、内膜表面に発現している膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する。

その際の選択方法としては、そのN末端側に付加したタグ（Strep-tagなど）を用いてStreptactinビーズで選択してくる方法が典型的であり、タグとしては、他にT7、ヒスチジン、FLAGタグ等があり、磁気ビーズ、セファロースビーズ、アガロースビーズ、多孔性等のビーズ、プレート又はメンブレンを用いて選択してもよい。

選択された、ビーズに固定された状態の「ポリペプチドー膜タンパク質ースフェロプラスト複合体」のスフェロプラスト細胞内部のプラスミドDNAを単離し、当該プラスミドDNA中でポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチド配列をPCRで増幅する。

当該増幅されたポリヌクレオチド配列をもとに同様の発現プラスミドを作製し、形質転換、発現、選択という2ラウンド以降のサイクルを複数回繰り返して、より標的膜タンパク質に対する親和性の高いポリヌクレオチドを濃縮する。

第2ラウンド以降の選択のラウンドにおいては、ポリペプチドー膜タンパク質ースフェロプラスト複合体のインキュベーション時間を減少させたり、洗浄の回数を増加させたり、温度を上げることにより、選択圧を順次高くして、より結合親和性の高いポリペプチドを濃縮することができる。

[0030] また、本発明のポリペプチドーポリヌクレオチドライブラリーのサイズが小さい場合（ランダム化する対象のアミノ酸配列領域が少ない場合）、は下

記の公知の試験管内分子進化技術が適用できる。または、上記した十分に選択、濃縮されてサイズの小さくなった高親和性ポリペプチドーポリヌクレオチドに対して当該分子進化技術を適用することで、より高親和性のポリペプチドーポリヌクレオチドを取得することができる。

具体的には、1ラウンド目のスクリーニング終了後、2ラウンド目の第2のポリペプチドライブラリーを分子進化の手法を適用して作製することができる。すなわち、標的に結合するとして選択されたポリペプチドの配列を決定した後、その配列の一部をさらにランダム化したいわゆる子孫ライブラリーを作製する手法である。配列の一部のランダム化とは、例えば、選択されたポリペプチドのランダム化領域のアミノ酸配列に1個あるいは複数の変異を導入し、残りのアミノ酸配列は固定化したアミノ酸配列を設計する。

その際には、ある領域(例えばループI)のアミノ酸配列は固定して別の領域(例えばループII)のアミノ酸配列に1個あるいは複数の変異を導入したアミノ酸配列を設計する、選択された複数のポリペプチドのランダム化領域に現れたアミノ酸残基をシャッフリングしてこれらを混成させた新たなアミノ酸配列を設計する、などの方法により行うことが好ましい。

このようにして、一部のアミノ酸配列が前ラウンドで選択されたポリペプチドのアミノ酸配列と同じであり残りのアミノ酸が異なる複数のポリペプチドの群からなる第2のポリペプチドライブラリーを製造することができる。次に、この第2のポリペプチドライブラリーを用いて標的と結合するポリペプチドを選択し、以下同様にして、複数のラウンドの選択およびライブラリーのさらなるランダム化を行うことができる。このようにして、標的に結合しうるポリペプチドにさらに変異を導入して人工的な分子進化を促進することが可能となる。

通常、好ましくは2～10ラウンド、より好ましくは3～8ラウンド繰り返すことで、より標的親和性の高いポリペプチドを得ることができる。

[0031] 確認、評価のための手法としては、標的膜タンパク質遺伝子をあらかじめ卵母細胞や培養細胞に導入して発現させた系を用意し、選択されたポリペ

チドと標的膜タンパク質を含む膜画分との親和性を測定する手法が用いられる。他には、膜タンパク質を介して起こる様々なシグナル伝達、例えば細胞内カルシウム、cAMP、アラキドン酸濃度の変化や電位変化をそれぞれの感受性蛍光色素により測定したり、放射性同位元素等による細胞内外のフラックス測定をしたり、標的膜タンパク質を含む人工脂質膜再構成系を基板に固定して、それとポリペプチドとの相互作用を表面プラズモン共鳴（SPR）や水晶発振マイクロバランス（QCM）等の装置で測定する手段がある。あるいは細胞の増殖、生死、分化などの変化を調べる手段がある。

[0032] 5. 本発明の実施態様

以下に、本発明のiPS&S法に適用できる典型的なICKスキファールドを有するA4-1に基づくライブラリーを用いた場合を例として、本発明のiPS&S法における試験管分子進化手法による、標的と親和性の高いポリペプチドのスクリーニング方法を実施態様として説明する。なお、本発明は、当該実施態様には限定されない。

[0033] （１）ポリペプチドライブラリー

A4-1のICKスキファールドに基づいて作製されたポリペプチドライブラリーは、下記のアミノ酸配列からなる式〔１〕のポリペプチドの群から構成される。

式〔１〕

$\text{DCLGF}(X)_3\text{CIP}(X)_4\text{CCRPNLVCS}(X)_3\text{KWCKY}(X)_2$ （配列番号２）

（式中、Xは任意のアミノ酸残基である）

ここで、式〔１〕は、カルシウムチャネルの結合に関与すると推定されているアミノ酸を含む３つのループ領域およびテール領域がランダム化されている構造を有する。図２に示されるように、ループを形成していると予測される領域およびその周辺のアミノ酸残基をランダム化した。さらに、テール領域のアミノ酸残基もランダム化した。ベータシートを形成しているアミノ酸は変更していない。

[0034] （２）ICKインビボライブラリー用のコンストラクトの調製

A4-1遺伝子を含むためには、ループおよびC末端部分のアミノ酸配列をランダム化したA4-1遺伝子の5'側にSD配列およびプロモーター配列、スパーサー、OmpAのシグナル配列、Strep-tagII配列、および大腸菌のDsbCタンパク質を付加し、3'側には停止コドンが付加するように設計した（図6を参照）。さらに、これらの上流には標的となるムスカリン性アセチルコリン受容体がマルトース結合タンパク質とフュージョンする形で付加されている。プロモーター配列およびSD配列は、A4-1遺伝子の大腸菌での転写および翻訳に、DsbCタンパク質は、A4-1遺伝子から発現されるポリペプチドの安定なジスルフィド結合形成の促進に、OmpA配列は、A4-1遺伝子から発現されるポリペプチドがペリプラズム間隙に移行するように、Strep-tagII配列は、ライブラリーの精製に用いるための配列である。得られた全長コンストラクトを直接配列決定して確認している。

[0035] 具体的には、以下の手順で行った。

ムスカリン性アセチルコリン受容体m2サブタイプは、Furukawaらの方法（H. Furukawa and T. Haga: J. Biochem. (2000) 127, 151-161）に従い、マルトース結合タンパク質（MBP）との融合タンパク質として大腸菌内膜に発現させた。一方、ICKモチーフを持つポリペプチドは、大腸菌の外膜タンパク質OmpAのシグナルペプチド配列に続いて精製用のタグ配列Strep-tagIIをアミノ末端側に配して、ジスルフィド異性化酵素DsbCとの融合タンパク質としてペリプラズムに発現させるようにプラスミドの構築を行った（図5A）。このプラスミドDNAを用いて大腸菌のトランスフォーメーションを行った。MBP（43 kDa）と融合したm2（35 kDa）およびDsbC（25 kDa）と融合したICK型ペプチド（4 kDa）の発現は、それぞれ抗MBP抗体および抗Strep-tag抗体によるWesternブロット法により、理論値のサイズ（78 kDaと29 kDa）のバンドが確認できた（図5B）。図5Aに示す受容体とペプチドをタンデムにコードするプラスミドDNAにより大腸菌の形質転換を行うことにより、受容体を内膜に発現し、同時にペプチドをペリプラズム間隙に分泌する発現系を構築することができた。

[0036] (3) スクリーニング及び分子進化工程

A4-1由来ICKライブラリーとm2受容体とともに大腸菌内のペリプラズム間隙で発現させる。その後、大腸菌の外膜を除きスフェロプラストの状態にし、Strep・tactinビーズとともにインキュベートする。数回洗浄した後に、m2受容体に結合したポリペプチドを含むポリペプチド・受容体・大腸菌の複合体を溶出する。溶出した大腸菌に含まれるポリペプチドをコードする遺伝子をPCR増幅し、Subtractionをした後にベクターに導入する。このベクターを大腸菌にトランスフォーメーションし、上述のようにICKとm2受容体を共発現させる。このようにして、複数ラウンドの選択およびポリペプチドライブラリー生成を行うことができる。第2ラウンド以降の選択のラウンドにおいては、ICKと標的とのインキュベーション時間を減少させ、洗浄の回数を増加させることにより、選択圧を順次高くして、より結合親和性の高いポリペプチドを濃縮することができる。

[0037] 具体的には、以下の手順でm2受容体結合ペプチドをスクリーニングした。

形質転換した大腸菌においては、それぞれのペリプラズムで発現したICK型ペプチドとm2受容体が相互作用する。この中で強い結合活性のあるものを選択した。それには先ず、大腸菌の外膜を除いてスフェロプラストの状態にして、非結合性のペプチドを除去する。受容体と結合したペプチドは、そのN末端側に付加したStrep-tagを用いてStreptactinビーズで選択してくる。即ち、Streptactin - [Strep-tag - ペプチド] - [m2受容体 - 大腸菌（スフェロプラスト）]の複合体が選択されてくる。m2受容体と結合するペプチドの配列情報は、同時に釣られてくる大腸菌が持つプラスミドDNAに含まれるため、この配列をPCRで増幅して、2ラウンド目以降の発現・選択のサイクルを続けて、目的の配列遺伝子を濃縮する（図4）。

選択のサイクルを6ラウンド行った結果、以下の6グループ10種類のペプチドを同定した。

[0038] (4) 本発明のスクリーニングで得られるポリペプチド

以下の実施例に示されるように、本発明においては、6ラウンドの選択お

よびライブラリーの生成により、m2受容体と結合しうる10種類のペプチドを同定した。2～4程度のアミノ酸変異を1グループとすると大きく6グループに分けられる。

以下、それぞれをグループA～Fといい、グループ内のポリペプチドをPepA～Fという。（なお、基のライブラリーでランダム化した領域を下線で示す）

（A）グループA

グループAのポリペプチドは、下記の式〔2〕で表される。

式〔2〕：

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVX₁X₂KWCKYX₃X₄（配列番号3）

（式中、X₁はV, L又はGであり、X₂はA又はGであり、X₃はA, P, Y又はなくてもよく、X₄はN, I, L又はなくてもよい。）

具体的には、以下の4つのポリペプチドである。

PepA-1: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVVAKWCKY（配列番号4）

PepA-2: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVVAKWCKYAN（配列番号5）

PepA-3: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVLGKWCKYPI（配列番号6）

PepA-4: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVGAKWCKYYL（配列番号7）

（B）グループB

PepB: DCLGFRWRCIPGINLCCRPNLVCSNSKKWCKYVM（配列番号8）

（C）グループC

PepC: DCLGFSMGCIPNQVRCRPNLVCSVDLKWCKYSH（配列番号9）

（D）グループD

PepD: DCLGFRWSCIPWEASCRPNLVCSDWKKWCKYIL（配列番号10）

（E）グループE

PepE: DCLGFLGWCIPREELCCRPNLVCSNNWCKYIL（配列番号11）

（F）グループF

グループFのポリペプチドは、下記の式〔3〕で表される。

式〔3〕：

DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCSTVSKWCKYX₅X₆（配列番号12）

(式中、 X_5 はA又はDであり、 X_6 はL又はYである。)

具体的には、以下の2つのポリペプチドである。

PepF-1 : DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVGSTVSKWCKYAL (配列番号 1 3)

PepF-2 : DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVGSTVSKWCKYDY (配列番号 1 4)

[0039] これらのポリペプチドのうち発現量が多かったPepA-1 (配列番号 4)、PepA-2 (配列番号 5) 及びPepC (配列番号 9) の3種類のポリペプチドに対して、以下の手順でm2受容体結合ペプチドの特性解析を行った。

ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) m1, m2, m3, およびm4サブタイプは、それぞれのcDNAから合成したRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に微小注入して細胞膜上に受容体を発現させ、受容体を含む膜画分として調製した。PepA-1、PepA-2及びPepCは大腸菌において遺伝子組換え体として発現し、それを精製した。受容体の結合競合物質として $[^3\text{H}]$ -N-methylscopolamine ($[^3\text{H}]$ -NMS) を用い、ペプチドとの結合競合実験を行った。

その結果、PepA-1は6.0 mMで54.6%、PepA-2は5.4 mMで46.0%、PepCは365 nMで 37.5%、m2とNMSとの結合を阻害した。一方PepCのm2以外のサブタイプm1、m3、m4に対する阻害率は、438 nMにおいてそれぞれ6.0%、10.4%、6.2%であり、PepCは他のmAChRサブタイプと区別してm2受容体の特異的に阻害することが分かった。

これら3種類のポリペプチドを含め、配列番号3～14で示されるポリペプチドは、いずれもm2受容体との結合の阻害剤として、種々の疾患の治療に有用であると考えられる。

このように、本発明のiPS&S法は、標的タンパク質との高親和性ポリペプチドを取得するためのきわめて有効な手法であることが実証できた。

実施例

[0040] 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

なお、本発明の実施例で用いた遺伝子組換え技術、PCR法、その他の手法などの具体的な手順や条件は、特に断らない限り、Sambrook and Russell, Molecular

cular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY (2001); Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995; 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法 II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 III (組換え DNA 技術)」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法またはそれらと実質的に同様な方法により行うことができる。

また、本発明で引用した先行文献又は特許出願明細書の記載内容は、本明細書の記載として組み入れるものとする。

[0041] (実施例 1) クモ毒ポリペプチドの分子骨格をもつポリペプチドライブラリー
の作製

バクテリアディスプレイ法による進化工学を用いて、標的と結合しうるクモ毒様ポリペプチドを取得するために、1CKモチーフのポリペプチド Peak A4-1 の 3 つのループ領域とテール領域をランダム化したポリペプチドライブラリーを作製した。クモ毒様ポリペプチドのシステインのフレームワークは、いくつかの短い神経毒の間で保存されていることが知られている。カルシウムイオンチャネルへの結合に関与すると推定されているアミノ酸を含む部分およびその周辺のアミノ酸残基をランダム化した。

[0042] (1-1) クモ毒様ポリペプチドライブラリー用の全長コンストラクトの

調製

クモ毒様ポリペプチドライブラリー用の全長コンストラクトは、PeakA4-1toxin cDNAを鋳型とし、そのループ部分3ヶ所およびC末端部分のアミノ酸配列をランダムした。即ち、PeakA4-1toxinの塩基配列上、ループIのM6-K8（3アミノ酸）、ループIIのD12-K15（4アミノ酸）、ループIVのR25-H27（3アミノ酸）およびC末端のV33-F34（2アミノ酸）をランダム化した。ポリペプチドコード領域の最後は2つの停止コドン（TGAおよびTAG）を導入し、さらに19塩基対の3' - ノンコーディング領域を付加するよう設計した。

PeakA4-1toxinを鋳型とする上述のヌクレオチド配列を15 bpのオーバーラップを含む2つのオリゴヌクレオチドで合成し、PCRにより全長を合成した。オリゴヌクレオチドは慣用のオペロンバイオテクノロジー株式会社により合成した。2つのフラグメントは共に、ループ配列に対応するランダム化ヌクレオチドを含む。第1のフラグメントは3つのランダム化領域を含む。第2のフラグメントはC末端の1つのランダム化領域、停止コドンおよび3' ノンコーディング領域を含む。これら2つのフラグメントの3' 側にオーバーラップ配列を含む。この実験に用いたオリゴヌクレオチドの一覧を以下に示す。NはA、G、CまたはTを表し、SはCまたはGを表す。

F1: 5' -GACTGTTTAGGATTT (NNS)₃TGCATCCCC (NNS)₄TGCTGTCGTCCAAACCTTGTATGCAGT (NNS)₃AAATGGTGTAATAT-3' （配列番号 15）

F2: 5' -ATCTGCAGAATTCGCCCTTCTATCA (SNN)₂ATATTTACACCATTT-3' （配列番号 16）

下線を付した配列はPCR用のオーバーラップ配列を示す。

PCRは、2.5U/μlのPfuTurboCx Hotstart DNAポリメラーゼ（STRATAGENE）および100 pmolのフラグメントを用いて製造元から供給されたバッファ中で行った。94℃を30秒間、55℃を30秒間および72℃を30秒間で3サイクル行った。

[0043] (1-2) 配列決定による初期ライブラリーの質の評価

次に、上述で得られた全長コンストラクトを用いてライブラリーをプラスミドベクターpCR2.1TOP0 (Invitrogen)にクローニングして、10個の単一コロニーを無作為に取り出し、配列決定した。10個のクローンのすべてにおいて、ランダム化した領域の塩基配列は異なっており、ライブラリーが適切な多様性からなることが確認された。ヌクレオチドの組成についても、SについてはCまたはGのいずれか、Nについては4つのヌクレオチドのいずれかを含むことが確認された。したがって、上述の方法により作製したライブラリーは、多様性および質の点で満足しうるものであった。

[0044] (実施例2) 膜タンパク質とポリペプチドライブラリーを発現するプラスミドベクターの構築

大腸菌内で発現させたm2は内膜に、ポリペプチドはペリプラズム間隙に発現するように設計した。また、それらの発現量および個々の大腸菌で大きな差が出ないようにするため、一つのベクターにタンデムに並べて発現できるようにした。

[0045] (2-1) クモ毒様ポリペプチドライブラリーとムスカリン性アセチルコリン受容体m2をコードするプラスミドの作製

pGR11MBPM2LDHNDATG+ (H. Furukawa and T. Haga: J. Biochem. (2000) 127, 151-161) は、膜タンパク質であるムスカリン性アセチルコリン受容体 (m2) にマルトース結合タンパク質 (MBP) をフュージョンタンパク質として大腸菌の内膜に発現するベクターである。このベクターのm2の下流にある制限酵素サイト (HindIII) を切断した。

pET27b(+) (Invitrogen) は、大腸菌によるタンパク質の発現用のベクターとして用いられている。このベクターのrbsからT7terminatorの配列をPCRした。そのPCR産物をIn-Fusion PCR Cloning System (Clontech) を用いて上記のベクターにクローニングを行った (pGR11-IF)。

PCR forward: 5' -GTCTGCAGGCAAGCTTCTAGAAATAATTTTGTTTAA-3' (配列番号 1

7)

PCR reverse : 5' -GGCCAGTGCCAAGCTTTATGCTAGTTATTGCTCAG-3' (配列番号 1

8)

pET40b(+) (Invitrogen) は、大腸菌内で発現したポリペプチドをペリプラズム間隙に移行させるのに関与するDsbC配列を468 nt (塩基配列番号) から1115 ntに含むベクターである。このDsbC配列を、pET40b(+) をテンプレートとしてPCRにて調製し (PCR forward 1およびreverse 1)、SacIIにて切断した (フラグメント1)。A4-1をテンプレートにPCR forward 2およびreverse 2でPCRを行い、SacIIで切断した (フラグメント2)。その後、PCR 1フラグメントおよびPCR 2フラグメントをライゲーションし、これをテンプレートにPCR forward 3およびPCR reverse 2を用いてPCRを行った (フラグメント3)。このPCRにてStrep・tagII-DsbC-A4-1のフラグメントができ、これをNheIで切断した。pET27b(+) 上にあるXbaIサイト (380 nt) をQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) にてTCTAGAをTGTAGAにし、pelBのシグナル配列とOmpAのシグナル配列を交換したものを作製した。これをテンプレートにして、PCR forward 4およびPCR reverse 3にてPCRを行った。これにより、T7プロモータからOmpAを含んだフラグメントを作製し (フラグメント4)、NheIで切断した。フラグメント3および4をライゲーションし、さらにこれをテンプレートにしてPCR forward 4およびPCR reverse 2でPCRを行った後、pCR2.1にクローニングした。クローニングしたプラスミドからPstIおよびEcoRIで切り出しを行いそのフラグメントをpGR11-IFベクターの同じ制限酵素サイトにクローニングした (pGR11-Tx、図6参照)。

PCR forward 1 5' -CTCAGTTCGAAAAAGGCGCCGATGACGCGGCAATT-3' (配列番号 1

9)

PCR reverse 1 : 5' -TTTTGCCGCGGCTTCTTTACCGCTGGT-3' (配列番号 20)

PCR forward 2 : 5' -GAAGCCGCGGCAAAAGACTGTTTAGGA-3' (配列番号 21)

PCR reverse 2 : 5' -GAATTCTTAAAATACATA-3' (配列番号 2 2)

PCR forward 3 : 5' -CTAGCTAGCTGGAGCCACCCTCAGTTCGAAAAA-3' (配列番号 2 3)

PCR reverse 3 : 5' -CTGAGGGTGGCTCCAGCTAGCGGCCTGCGCAA-3' (配列番号 2 4)

PCR forward-4 : 5' -CTGCAGTCGATCCCGCGAAATTAA-3' (配列番号 2 5)

[0046] USER friendly DNA engineering method (New England Biolabs) のUSER cassette配列をオペロンバイオテクノロジー株式会社にて2つのフラグメントに合成した。PCR forward 1およびPCR reverseでPCRを行い、USER cassetteを作製した。これをテンプレートにしてPCR forward 2およびreverseでPCRを行った。PCR産物をSacIIにて切断した(SacII-USER)。このフラグメントとSacIIで切断したpGR11-Txをライゲーションし、上記のPCR forward 4 (配列番号 2 5) と下記PCR reverse (配列番号 2 7) でPCRを行い、pCR2.1にクローニングした。得られたプラスミドからPstIおよびEcoRIで切り出しを行い、これをpGR11-Txのおなじサイトにクローニングした (pGR11-USER、図7参照)。得られたベクターの配列はDNAシーケンサーにて確認した。

PCR forward 1 : 5' -CTGCAGGCTGAGGAGACATCTAGAGGATCCT-3' (配列番号 2 6)

PCR reverse : 5' -GCTGAGGGAAAGTCTAGAGGATCCTCT-3' (配列番号 2 7)

PCR forward 2 : 5' -TCCCCGCGGCTTTTGCTGAGGAGACATCT-3' (配列番号 2 8)

このベクターをXbaIおよびNt.BbvCI (New England Biolabs) で切断した (m2-USER)。このベクターをUSER friendly DNA engineering methodを用いたクローニング用のベクターとして以下の実験に用いた。

ランダム化したポリペプチドを、調製したベクターにクローニングする際には、ランダム化ポリペプチドをコードするヌクレオチドを用いて、PfuTurb

oGx Hotstart DNAポリメラーゼでPCR（95℃で30秒間、50℃で30秒間、72℃で30秒間）を25サイクルした。PCR産物、m2-USERおよびUSER enzyme（New England Biolabs）を混合し、室温で15分間反応させた。反応液にLigation High（TOYOBO）を添加し、さらに15分間反応させた。最終的に得られた反応液を大腸菌にトランスフォーメーションし、LB-アンピシリン（75 μ g/ml）のプレートにまいて、一晚培養した。PCRに用いたプライマーを以下に示す。ここで、UはUracilを示している。

PCR forward : 5' -GGAGACAUCAGACTGTTTAGGA-3' （配列番号 29）

PCR reverse : 5' -GGGAAAGUATCTGCAGAATT-3' （配列番号 30）

[0047] （2-2） 大腸菌での発現確認

大腸菌にベクターをトランスフォーメーションし、発現誘導をかけた後に膜タンパク質およびポリペプチドの発現の確認を行った。大腸菌を6000 x gで10分間で集菌し、20 mMのTris-HCl（pH 7.5）にて洗浄した。その細胞を用いてペリプラズム画分およびスフェロプラスト画分を調製した。スフェロプラスト画分は、緩衝液（20 mM Tris-HCl（pH 7.4）、1 mM EDTA, 25% Sucrose, 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride）に懸濁し、超音波処理した。150000 x gで1時間の遠心分離により、細胞を回収し、これを緩衝液（20 mM Tris-HCl（pH 7.4）、500 mM NaClおよび1mM EDTA）で懸濁した。150000 x gで1時間の遠心分離で細胞を回収し、20 mM Tris-HCl（pH 7.4）で懸濁することで膜画分を得た。ペリプラズム画分および膜画分を電気泳動（SDS-PAGE）に供し、ウエスタンブロットにて発現の確認をした。ペリプラズム画分はStrep・tagII抗体を用いてポリペプチドの発現を、膜画分はMBP抗体によりm2の検出をした。その結果、ペリプラズム画分には、約29 kDaにポリペプチドに付加したStrep・tagIIのバンドを、また膜内膜画分では、約78 kDaにm2に付加したMBPのバンドを検出した（図5B）。これらの結果により、ポリペプチド発現はペリプラズム間隙に、m2受容体の発現は内膜にそれぞれ確認できた。

[0048] （実験例3）クモ毒様ポリペプチドライブラリーからのm2受容体結合ポリペプチドの選択

(3-1) クモ毒様ポリペプチドの発現とm2受容体への結合

大腸菌中で発現させたm2およびクモ様ポリペプチドは培養中に菌体内のペリプラズム間隙で反応する。ペリプラズム間隙を反応の場とすることでそれぞれの大腸菌でポリペプチドとm2の反応ができる。ランダム化ポリペプチドを配したベクターを大腸菌にトランスフォーメーションし、一晚培養したプレートからLB-アンピシリンの液体培地で菌体を回収し、OD₆₀₀が0.6に達するまで増殖させた。培養物を0.5 mM IPTGで20℃で24時間誘導した。

[0049] (3-2) スフェロプラストの調製

スフェロプラストは大腸菌にある内膜および外膜の2つのうち、外膜だけを除去した状態である。このようにすることで内膜に発現したm2に結合しているポリペプチドをポリペプチドスフェロプラスト複合体として回収することができる(図4)。大腸菌の培養液から細胞を6000 x gの遠心10分間で回収し、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) にて2回洗浄した。回収した細胞を、高張液(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 20% Sucrose, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride)に懸濁し、氷上で10分間インキュベーションした。12000 x gで10分間の遠心分離により、細胞を回収した。これを低張液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5))に懸濁し、氷上で10分間インキュベーションした。12000 x gで10分間の遠心分離により、回収した画分をスフェロプラストとした。

[0050] (3-3) m2受容体結合ポリペプチドの選択

上述のようにスフェロプラストを調製した後、クモ様ポリペプチドに付加したStrep-tagIIをStrep tactin (Magnetic Beads, QIAGEN)で結合させた。これを緩衝液(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.1% TritonX-100)で十分洗浄し、非特異的に結合している物質を除去した(図4)。ビオチン溶液で溶出することで特異的に結合しているポリペプチドスフェロプラスト複合体をStrep tactinより回収した。この回収した溶液を用いてPCR(95℃で30秒間、50℃で30秒間、72℃で30秒間)を30サイクルした。以下にPCRで用いたプライマーの配列を示す。ここで[Bio]はビオチンが付加され

ていることを示す。

PCR forward : 5' - [Bio]-GAGGGACATCAGACTGTTTAGGA-3' (配列番号 3 1)

PCR reverse : 5' -TTCGCCCTTCGACTGAGGGAAAAGT-3' (配列番号 3 2)

[0051] (3-4) m2 受容体結合ポリペプチドの配列の確認

m2に結合するポリペプチドの配列を明らかにするために、ポリペプチドのアミノ酸配列をコードしているプラスミドを回収してそのDNA配列をDNAシーケンサーで確認した。6ラウンド終了後に得られたコロニーを無作為に選び、菌体をLB-アンピシリンの培地中でOD₆₀₀が0.6に達するまで培養した。菌体を回収後、プラスミドをWizard MagneSil Plasmid Purification System (Promega) により得た。得られたプラスミドの濃度をOD₂₆₀により測定し、サンプルあたり200 ngになるようにプレートに分注した。シーケンスは株式会社ベックスに依頼し、プラスミドに含まれるポリペプチドのDNA配列を確認した。ランダム化した配列の類似性に基づいて6つのグループに分けることができた。これらグループのポリペプチド配列上の非ランダム化配列に変異は入っていなかった。

選択のサイクル6ラウンド終了後、10種類のペプチドを同定した。2～4程度のアミノ酸変異を1グループとすると大きく6グループに分けられる。以下、それぞれをグループA～Fといい、グループ内のポリペプチドをPep A～Fという。(なお、基のライブラリーでランダム化した領域を下線で示す)

(A) グループA

グループAのポリペプチドは、下記の式〔2〕で表される。

式〔2〕：

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVX₁X₂KWCKYX₃X₄ (配列番号 3)

(式中、X₁はV, L又はGであり、X₂はA又はGであり、X₃はA, P, Y又はなくともよく、X₄はN, I, L又はなくともよい。)

具体的には、以下の4つのポリペプチドである。

PepA-1: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVVAKWCKY (配列番号 4)

PepA-2: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVVAKWCKYAN (配列番号 5)

PepA-3: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVLGWCKYPI (配列番号 6)

PepA-4: DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVGAKWCKYYL (配列番号 7)

(B) グループ B

PepB: DCLGFRWRCIPGINLCCRPNLVCSNSKKWCKYVM (配列番号 8)

(C) グループ C

PepC: DCLGFSMGCI PNQVRCCRPNLVCSVDLKWCKYSH (配列番号 9)

(D) グループ D

PepD: DCLGFRWSCIPWEASCCRPNLVCSDWKKWCKYLL (配列番号 10)

(E) グループ E

PepE: DCLGFLGWCIPREELCCRPNLVCSNNWKWCKYIL (配列番号 11)

(F) グループ F

グループ F のポリペプチドは、下記の式〔3〕で表される。

式〔3〕:

DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCSIVSKWCKYX₅X₆ (配列番号 12)

(式中、X₅はA又はDであり、X₆はL又はYである。)

具体的には、以下の2つのポリペプチドである。

PepF-1: DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCSIVSKWCKYAL (配列番号 13)

PepF-2: DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCSIVSKWCKYDY (配列番号 14)

[0052] (3-5) ポリペプチドの調製

得られたm2結合ポリペプチドについてさらに詳細に調べるために、全てのクローンからポリペプチドを調製した。ポリペプチドは、pBAD/TOPOThio融合発現キット (Invitrogen) を一部改変して用いチオレドキシン融合タンパク質として調製した。改変した部分は、pBAD/TOPOThioベクターのチオレドキシンのN末端側にStrep・tagIIを挿入した点およびエンテロキナーゼ認識配列のC末端側にPreScission酵素 (GE Healthcare) の認識配列を挿入した点である。m2結合ポリペプチドをコードするプラスミドからDNAを増幅し、pBAD/TOPO

hio改変ベクター中にクローニングし、大腸菌にトランスフォームした。配列決定によりフレームの確認をした。

ポジティブクローンをLB-アンピシリンの培地中でOD₆₀₀が0.5に達するまで培養した。培養物を0.02%アラビノースで25°Cで3時間誘導した。3000 rpmで20分間で細胞を回収し、超音波処理をした。溶解物を遠心分離し、上清（可溶性画分）およびペレット（不溶性画分）に分離し、SDS-PAGEで解析した。可溶性画分は発現したポリペプチドのStrep・tagIIについてStrep tacin（IBA GmbH）アフィニティーカラムで非変性条件化で結合させ、融合タンパク質をPreScission酵素で切断した。融合タンパク質が除かれたポリペプチドを回収し、Lowry法によりタンパク質の定量をした。

ここで、得られた10ポリペプチドのうち、PepA-1、PepA-2及びPepCについては発現量が充分確保できたので、この3ポリペプチドを以下の各結合実験に供し、m2受容体との親和性、特異性を客観的に評価する。

[0053] （3-6） ポリペプチドとm2受容体との結合実験

ポリペプチドの活性および結合様式を評価するために、上記ポリペプチドのうちのPepA-1、PepA-2及びPepCを用いてm2との結合実験を行った。m2は、アフリカツメガエルの卵母細胞にm2タンパク質をコードするcRNAを導入し、細胞膜上に発現した膜画分を用いた。m2の結合競合物質として、トリチウム標識した³H]-N-methylscopolamine（³H]-NMS）を用い、これを緩衝液（20 mM Tris-malate（pH 7.5））に溶解した。精製したポリペプチド、膜画分および³H]-NMSを混合し、30°Cで60分間インキュベートした。反応液をグラスフィルタに通し膜画分をトラップし、20 mM リン酸カリウム緩衝液でよく洗浄して非特異的な結合を除去した。グラスフィルタを乾燥させ、バイアルに移しシンチレーションカクテル中でシンチレーションカウンタを測定した。PepA-1は6.0 μMで54.6%、PepA-2は5.4 μMで46.0%、PepCは365 nMで37.5%の結合阻害が示され、m2に対するアンタゴニスト作用がみられた（図9）。

[0054] （3-7） ポリペプチドとm2以外のムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプとの結合実験

ムスカリン性アセチルコリン受容体には、m2以外にもm1、m3およびm4のサブタイプがある。ポリペプチドの特異性を明らかにするためにサブタイプに対する結合実験を行った。これら受容体のcRNAをそれぞれ調製し、上述と同様の方法でサブタイプに対する結合阻害を測定した。PepCは438 nMの濃度で、m1に対して6.0%、m3に対して10.4%およびm4に対して6.2%の阻害があり、またm2に対しては365 nMで37.5%の結合阻害が見られた。このことは、PepCがムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプの中でm2を選択的に阻害することを示している。

[0055] (実験例4) m2結合ポリペプチドの標的特異性評価

(4-1) 非特異的吸着ポリペプチドの除去

ランダム化したポリペプチドがm2以外の内膜タンパク質等に結合する非特異的吸着が予想されることから、この非特異的結合を除くためにサブトラクションをした。予めm2を除いたベクター (Non-m2-USER) を用意し、これにランダム化ポリペプチドをクローニングした。大腸菌にトランスフォーメーションし、一晚培養したプレートからコロニーを回収した。回収した菌培養液のOD₆₀₀が0.6に達するまで培養し、0.5 mM IPTGで24時間誘導した。遠心分離により菌体を回収し、スフェロプラストを調製した。これをStrep tacinで回収し、F1およびF2でPCR (95°Cで30秒間、50°Cで30秒間、72°Cで30秒間) を30サイクルしたものを非特異的吸着のDNAとした。このPCRでは、リバープライマーの5' 側にビオチンを付したものを使った。非特異的吸着DNAをアビジンコートした磁気ビーズ (MAGNOTEX-SA, TAKARA BIO INC.) に結合させ、アルカリ処理することで結合させたDNAを一本鎖にし、磁気ビーズ結合の非特異的吸着一本鎖DNA (Non-speDI) を準備した (図8)。以下にPCRに使用したF1およびF2の配列を示す。[Bio]はビオチンを付していることを示している。

PCR forward : 5' -GAGGAGACATCAGACTGTTTAGGA-3' (配列番号31)

PCR reverse : 5' - [Bio]-TTCGCCCTTCGACTGAGGGAAAGT-3' (配列番号32)

m2を含むベクターで調製して得られたm2結合ポリペプチドをコードするDNAをPCRにて調製した。このPCR産物を熱処理により一本鎖にして、Non-speDIと

50°Cでアニーリングをした。これにより非特異的なDNAはNon-speDIのDNAと二本鎖を形成する。アニーリング後に二本鎖を形成しなかったDNAを磁気ビーズにより回収し、回収したDNAをテンプレートにPCRしたものを次に進めた（図8）。

[0056] (4-2) 選択されたm2結合ポリペプチドの標的特異性の評価

グループAのPepA-1（配列番号4）を用いてm2を特異的に標的にしているのかを評価した。PepA-1のプラスミドからDNAを増幅し、m2を含まないベクター（Non-m2-USER）にクローニングした。また対照となるペプチドとして、6ラウンドまでセレクションに残ったが、ポリペプチドのランダム化配列の所で停止コドンが入ったもの（truncated peptide）をクローニングして比較した（図10A）。これらをそれぞれ大腸菌にトランスフォーメーションし、一晚培養した。培養したプレートからコロニーを回収し、0.5 mM IPTGで24時間誘導した。遠心分離により、回収した菌体からスフェロプラストを調製し、Streptactinで回収した。回収したスフェロプラストを使ってPCRを行い、電気泳動によりバンドが検出されるかをみた。Truncated peptideではバンドが現れ、一方、PepA-1を発現したサンプルからはバンドは見られなかったことから、PepA-1は大腸菌内膜などに非特異的に吸着していたのではなく、m2と特異的に結合していたことが確認できた（図10B、図11参照）。また、この時に両方のペプチドがペリプラズムに発現していることは、回収したペリプラズム画分を電気泳動とウエスタンブロットで解析することにより確認した（図10C）。

配列表フリーテキスト

[0057] <ICK scaffold polypeptide library>

1. Polypeptide A4-1

DCLGFMKCI PDNDKCCRPNLVCSRTHKWCKYVF

2. A4-1-based polypeptide library

DCLGF (X)₃CIP (X)₄CCRPNLVCS (X)₃KWCKY (X)₂

(X=any amino acid)

3. PepA (Group A)

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVX₁X₂KWCKYX₃X₄(X₁=V, L or G, X₂=A or G, X₃=A, P, Y or not, X₄=N, I, L or not)

4. PepA-1

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVVAKWKY

5. PepA-2

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVVAKWKYAN

6. PepA-3

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVLGKWCKYP I

7. PepA-4

DCLGFRRGCIPVGELCCRPNLVCSVGAKWKYYL

8. PepB (Group B)

DCLGFRWRCIPGINLCCRPNLVCSNSKKWKYVM

9. PepC (Group C)

DCLGFSMGCIPNQVRCCRPNLVCSVDLKWCKYSH

10. PepD (Group D)

DCLGFRWSCIPWEASCCRPNLVCSDWKKWKYIL

11. PepE (Group E)

DCLGFLGWCIPREELCCRPNLVCSNNWKWCKYT I

12. PepF (Group F)

DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCS TVSKWKYX₅X₆(X₅=A or D, X₆=L or Y)

13. PepF-1

DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCS TVSKWKYAL

14. PepF-2

DCLGFEVVCIPGMLDCCRPNLVCS TVSKWKYDY

15. A4-1 random forward primer

GACTGTTTAGGATTT (NNS)₃TGCATCCCC (NNS)₄TGCTGTCGTCCAAACCTTGTATGCAGT (NNS)₃AA

ATGGTGTAATAT

(N=A, G, C or T, S=C or G)

1 6. A4-1 random reverse primer

ATCTGCAGAATTGCGCCTTCTATCA(SNN)₂ATATTTACACCATT

(N=A, G, C or T, S=C or G)

1 7. 27rbs forward primer

GTCTGCAGGCAAGCTTCTAGAAATAATTTGTTTAA

1 8. 27T7term reverse primer

GGCCAGTGCCAAGCTTTATGCTAGTTATTGCTCAG

1 9. Strep40DsbC forward primer

CTCAGTTCGAAAAAGGCGCGATGACGCGGCAATT

2 0. SacII DsbC reverse primer

TTTTGCCGCGGCTTCTTTACCGCTGGT

2 1. SacII A4-1 forward primer

GAAGCCGCGGCAAAAGACTGTTTAGGA

2 2. ERA4-1 reverse primer

GAATTCTTAAAATACATA

2 3. NheStrep forward primer

CTAGCTAGCTGGAGCCACCCTCAGTTCGAAAAA

2 4. NheOmpSS reverse primer

CTGAGGGTGGCTCCAGCTAGCGGCCTGCGCAA

2 5. 27T7prom forward primer

CTGCAGTCGATCCCGCGAAATTAA

2 6. PstNt USER forward primer

CTGCAGGCTGAGGAGACATCTAGAGGATCCT

2 7. Nt USER reverse primer

GCTGAGGGAAAGTCTAGAGGATCCTCT

2 8. SacII Nt USER forward primer

TCCCCGCGGCTTTTGCTGAGGAGACATCT

29. TxUser forward primer

GGAGACAUCAGACTGTTTAGGA

30. TxUser reverse primer

GGGAAAGUATCTGCAGAATT

31. Tx (biotin) forward primer

GAGGGACATCAGACTGTTTAGGA

32. Tx (biotin) reverse primer

TTCGCCCTTCGACTGAGGGAAAGT

請求の範囲

- [請求項1] ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドの群からなるランダムポリペプチドライブラリーであって、対応するランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが、グラム陰性細菌中で発現し、ペリプラズム間隙中に分泌された状態で存在しており、かつ当該グラム陰性細菌の内膜表面に、標的タンパク質が発現していることを特徴とする、ランダムポリペプチドライブラリー。
- [請求項2] 前記ランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチドが、その上流に分泌シグナル配列を有しており、かつ同一の発現ベクター中で標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドとタンデムに連結されている、請求項1に記載のランダムポリペプチドライブラリー。
- [請求項3] ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーであって、当該ポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが、その上流に分泌シグナル配列を有し、グラム陰性細菌で発現可能な制御領域下に組み込まれており、かつ標的膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されていることを特徴とする、ランダムポリヌクレオチドライブラリー。
- [請求項4] ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが挿入された、グラム陰性細菌で発現可能な発現ベクターの群からなり、前記各ポリヌクレオチドの上流に分泌シグナル配列があり、標的膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されている発現ベクターの群から構成されていることを特徴とする、ランダムポリヌクレオチドライブラリー。
- [請求項5] 請求項3又は4に記載のランダムポリヌクレオチドライブラリーに

より形質転換されたグラム陰性細菌の群からなり、各グラム陰性細菌の内膜表面には標的タンパク質が発現しており、かつペリプラズム間隙内には、前記ランダムポリヌクレオチドライブラリーを構成するポリヌクレオチドに対応する各ポリペプチドが存在していることを特徴とする、ディスプレイ型グラム陰性細菌ライブラリー。

[請求項6] 請求項5に記載のディスプレイ型グラム陰性細菌ライブラリーを用いることを特徴とする、標的タンパク質に親和性の高いポリペプチドのスクリーニング方法。

[請求項7] 標的膜タンパク質に対して親和性を有するポリペプチドのスクリーニング方法であって、下記（a）～（e）の工程を含む方法；

（a）ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが挿入された、グラム陰性細菌で発現可能な発現ベクターであって、前記各ポリヌクレオチドの上流に分泌シグナル配列があり、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されている発現ベクターの群を用意する工程；

（b）前記ポリヌクレオチドライブラリーを構成する各発現ベクターを、形質転換グラム陰性細菌において、前記標的膜タンパク質を内膜表面に、また各ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドをペリプラズム間隙内にそれぞれ発現させる工程；

（c）前記各ポリペプチドを、前記ペリプラズム間隙内で前記標的膜タンパク質と接触させる工程；

（d）前記形質転換グラム陰性細菌のスフェロプラストを形成させて、前記標的膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する工程；

（e）前記選択されたポリペプチドを発現した形質転換細胞中のポリヌクレオチドを増幅して、当該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を決定する工程。

[請求項8] 標的の膜タンパク質に対して親和性を有するポリペプチドのスクリ

ーニング方法であって、下記（a）～（j）の工程を含む方法；

（a）ランダム化された3以上のアミノ酸からなるペプチド領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドライブラリーを構成する各ポリヌクレオチドが挿入された、グラム陰性細菌で発現可能な発現ベクターであって、前記各ポリヌクレオチドの上流に分泌シグナル配列があり、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドがタンデムに連結されている発現ベクターの群を用意する工程；

（b）前記ポリヌクレオチドライブラリーを構成する各発現ベクターを、形質転換グラム陰性細菌において、前記標的膜タンパク質を内膜表面に、また各ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドをペリプラズム間隙内にそれぞれ発現させる工程；

（c）前記各ポリペプチドを、前記ペリプラズム間隙内で前記標的膜タンパク質と接触させる工程；

（d）前記形質転換グラム陰性細菌のスフェロプラストを形成させて、前記標的膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する工程；

（e）前記選択されたポリペプチドを発現した形質転換細胞中のポリヌクレオチドを増幅して発現ベクターに挿入した第2のポリヌクレオチドライブラリーであり、各ポリヌクレオチドは分泌シグナル配列の下流に挿入され、かつ前記標的膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの群で構成された第2のポリヌクレオチドライブラリーを製造する工程、；

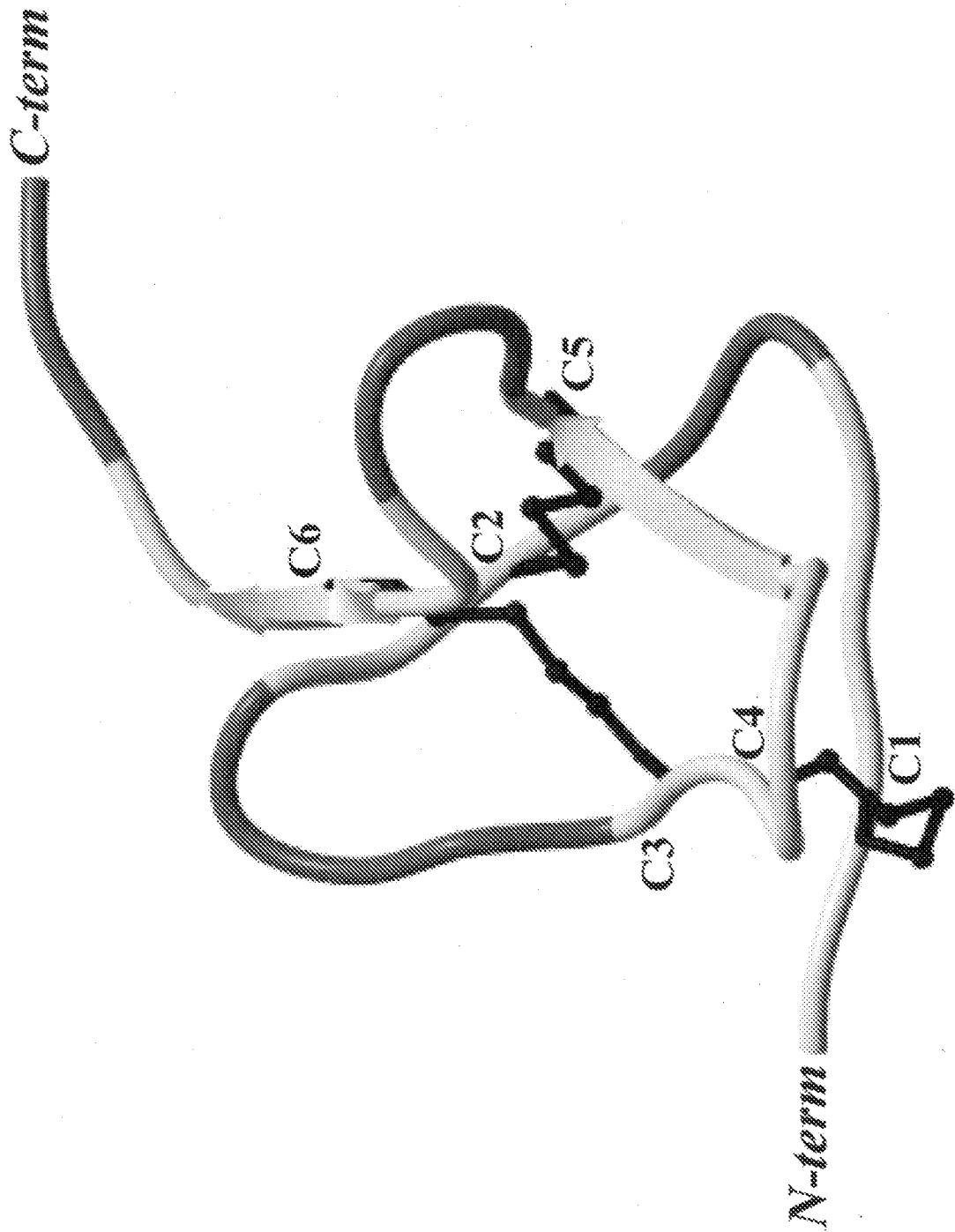
（f）前記第2のポリヌクレオチドライブラリーを構成する各発現ベクターを形質転換グラム陰性細菌において、前記標的膜タンパク質を内膜表面に、また各ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドをペリプラズム間隙内にそれぞれ発現させる工程；

（g）前記各ポリペプチドを、前記ペリプラズム間隙内で前記標的膜タンパク質と接触させる工程；

（h）前記形質転換グラム陰性細菌のスフェロプラストを形成させて

- 、前記標的膜タンパク質と結合したポリペプチドを選択する工程；
- （i）必要により工程（e）－（h）を繰り返す工程；そして
- （j）選択されたポリペプチドのアミノ酸配列を決定する工程。

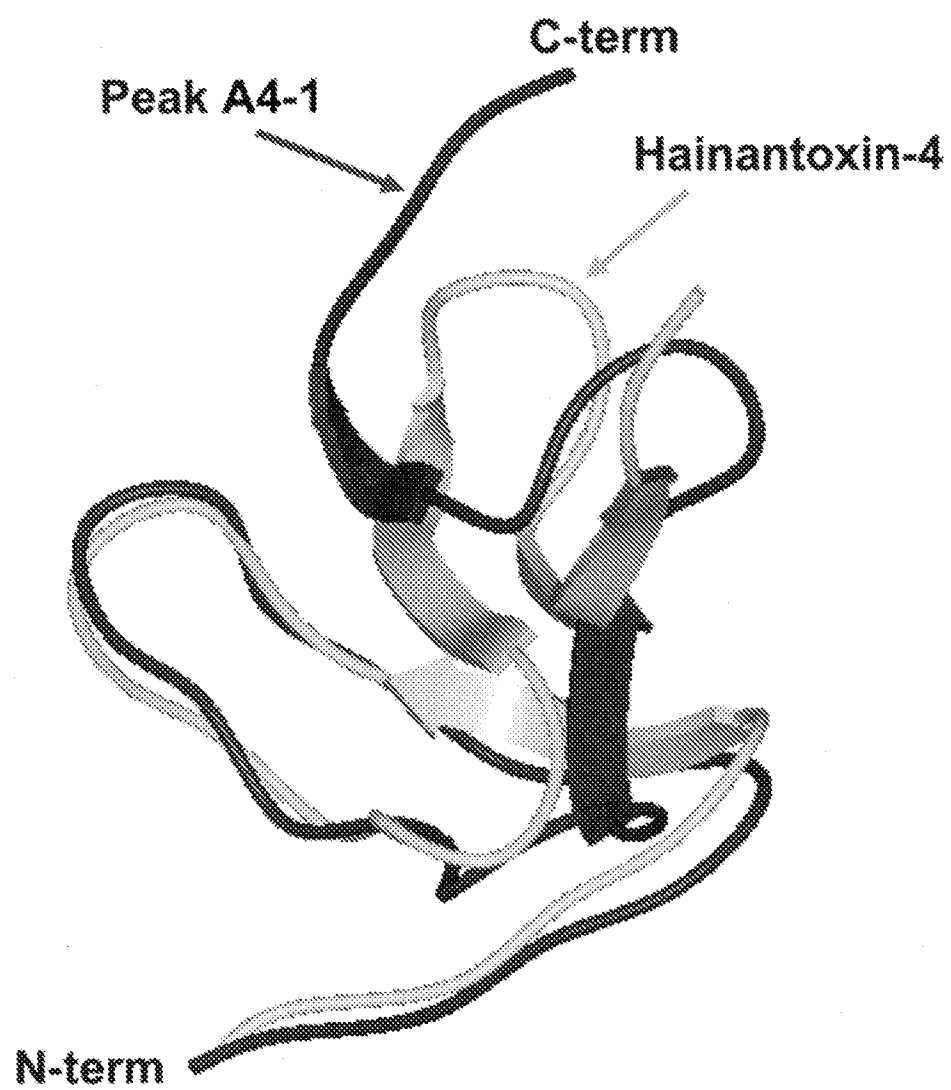
[図1]



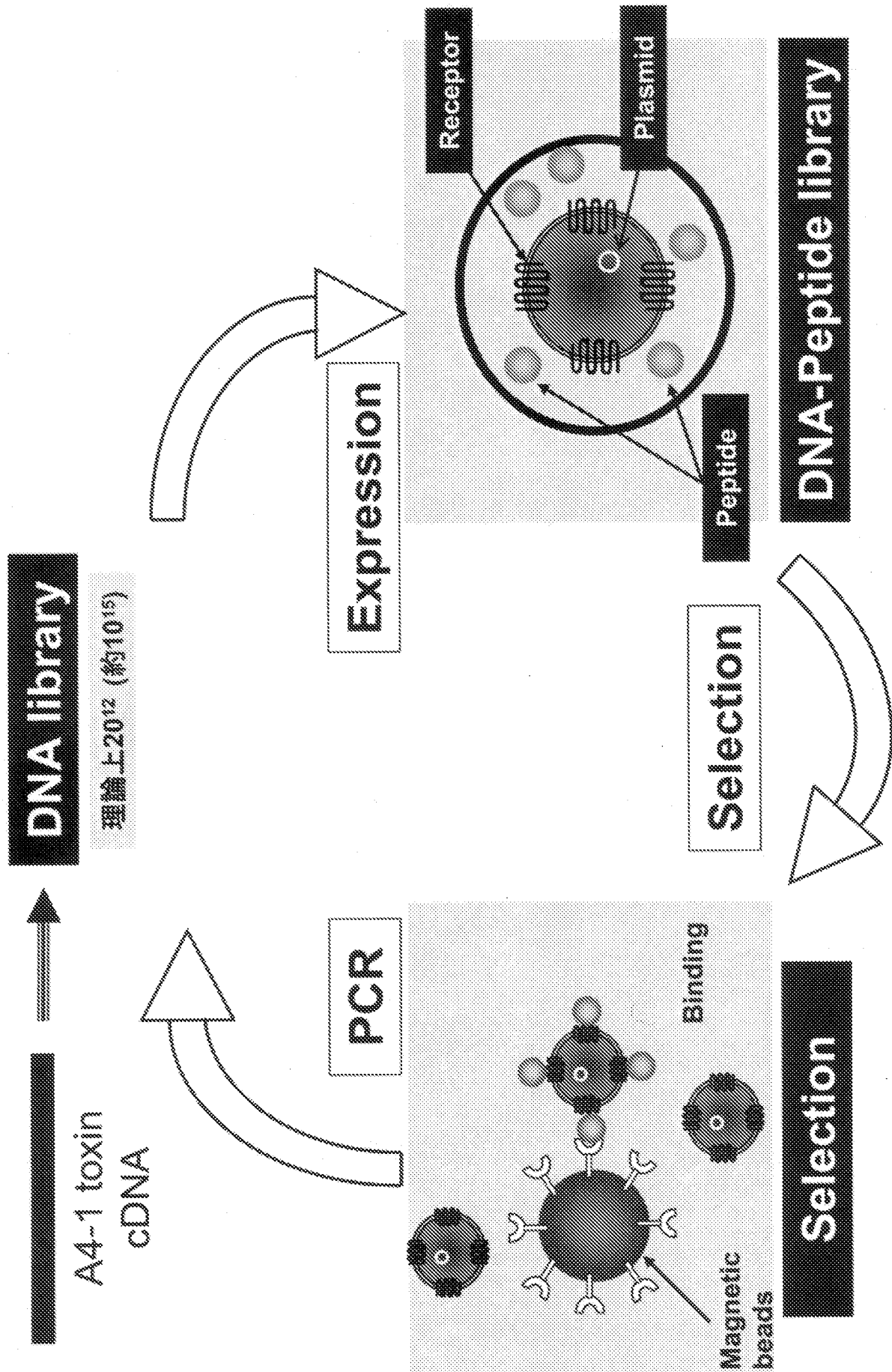
[図2]

[illegible]

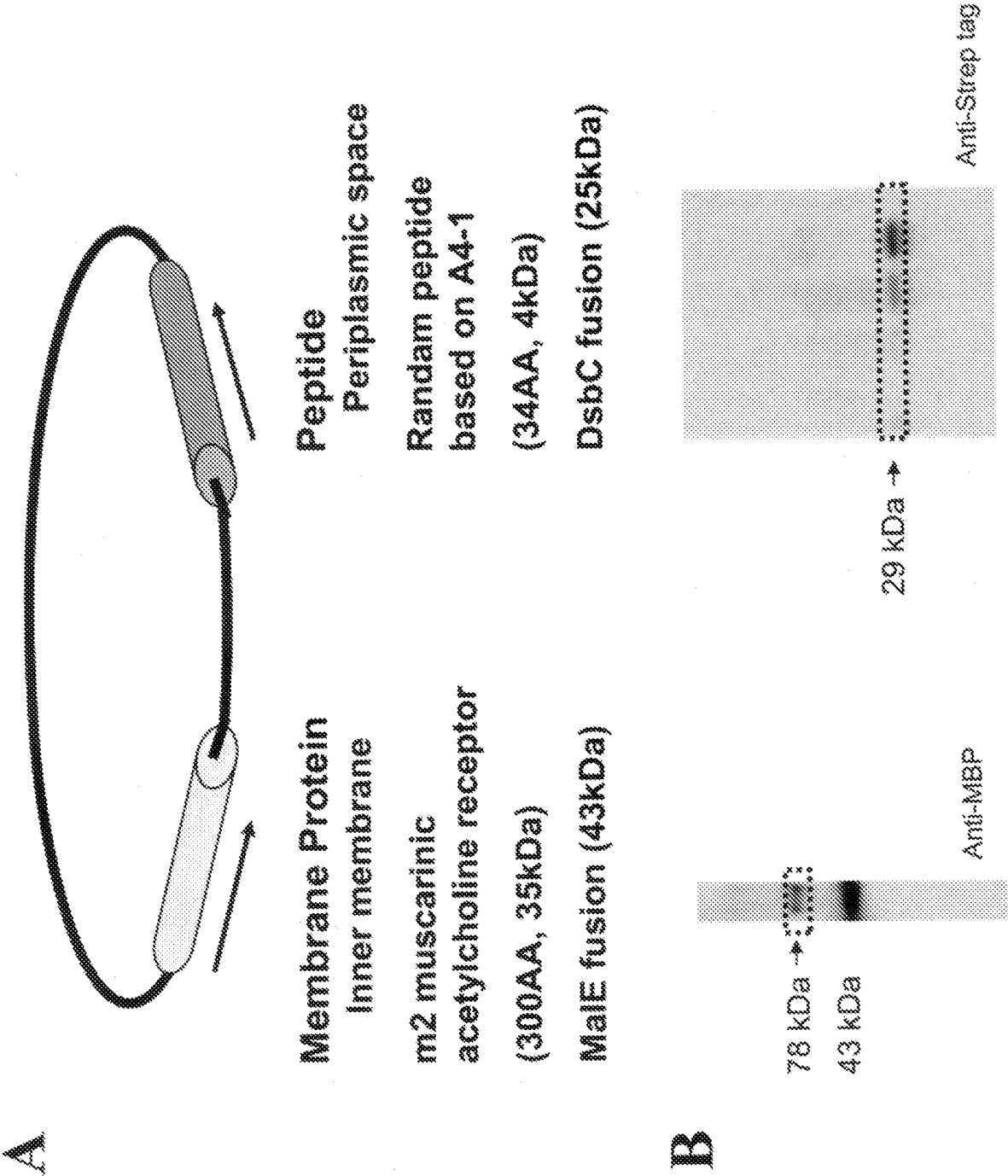
[図3]



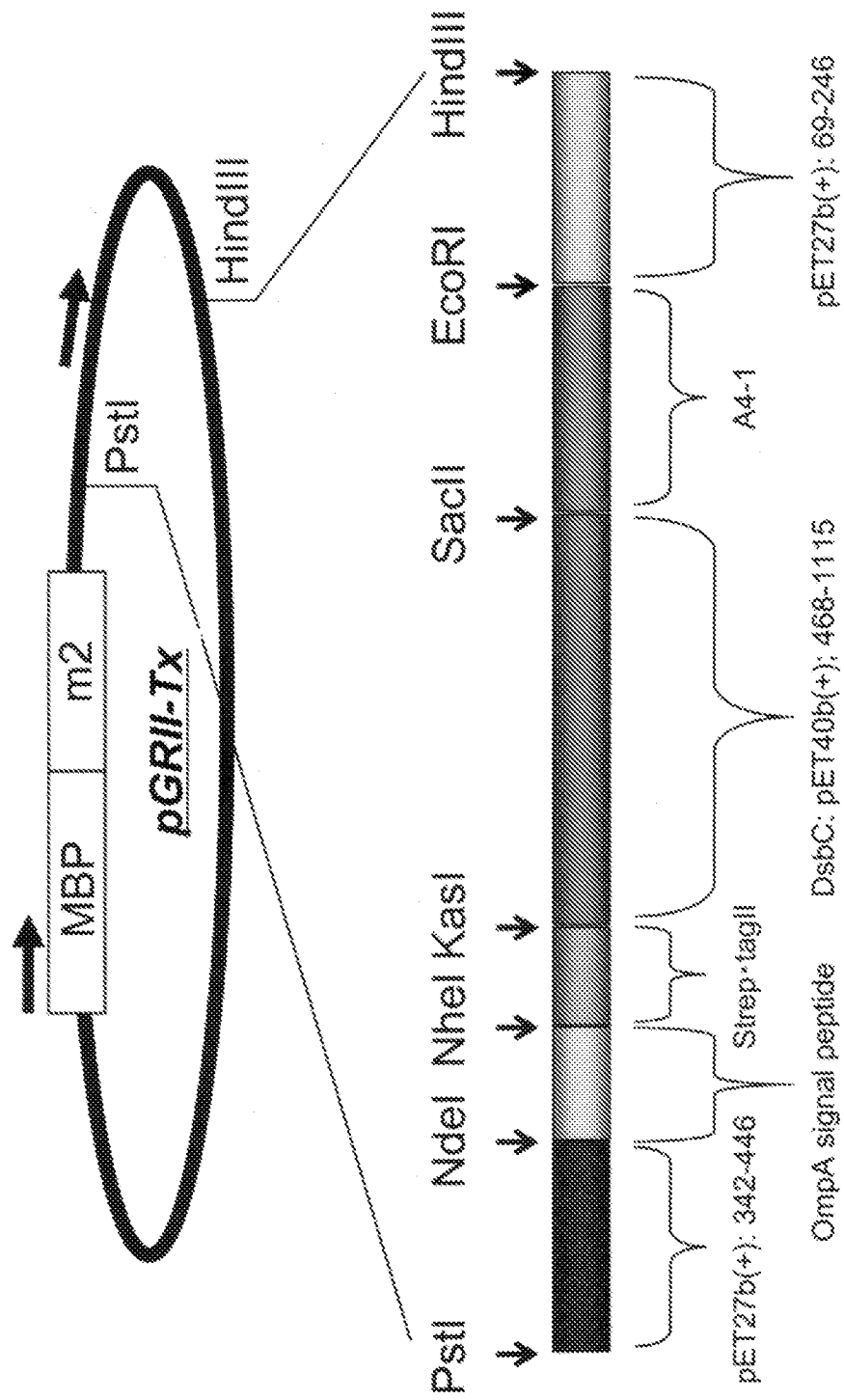
[図4]



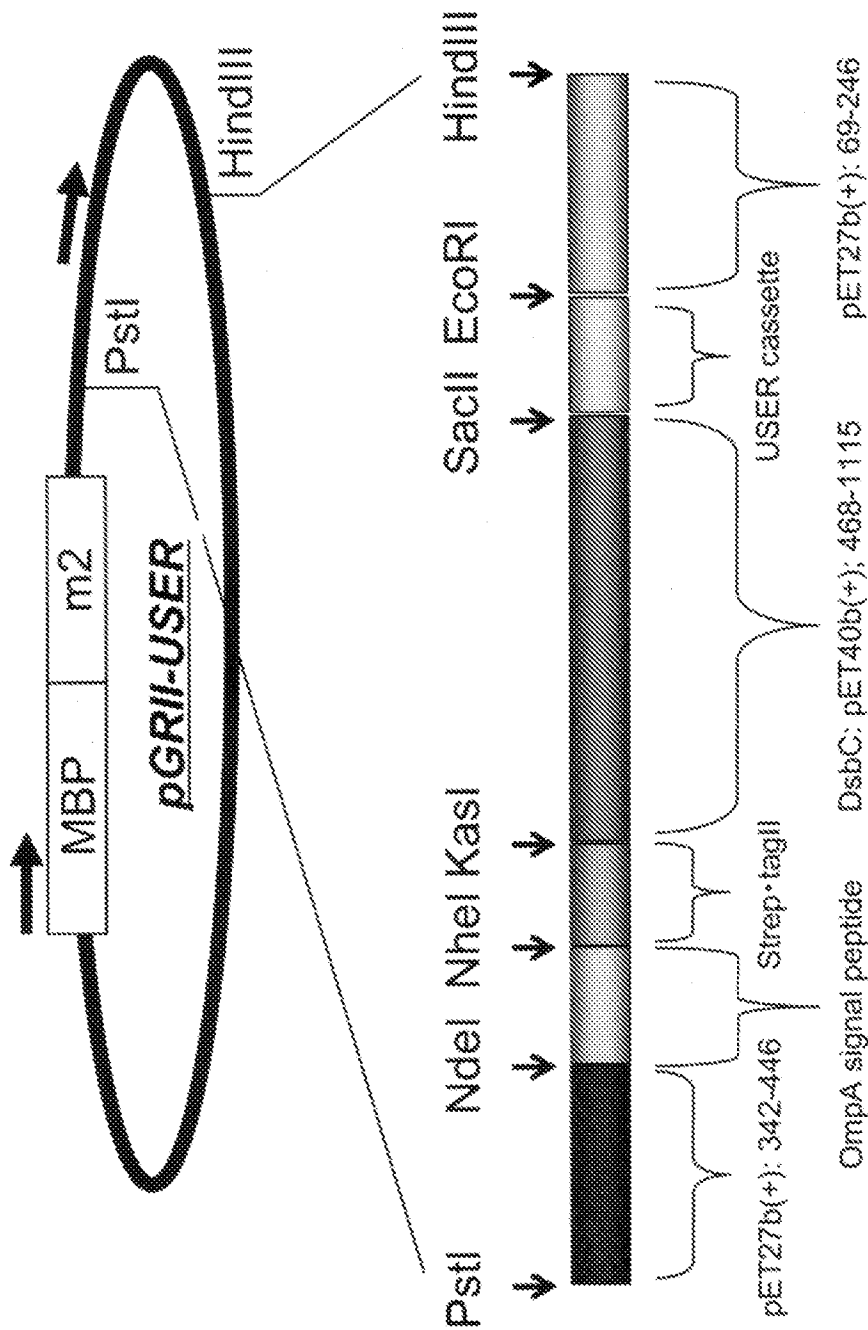
[図5]



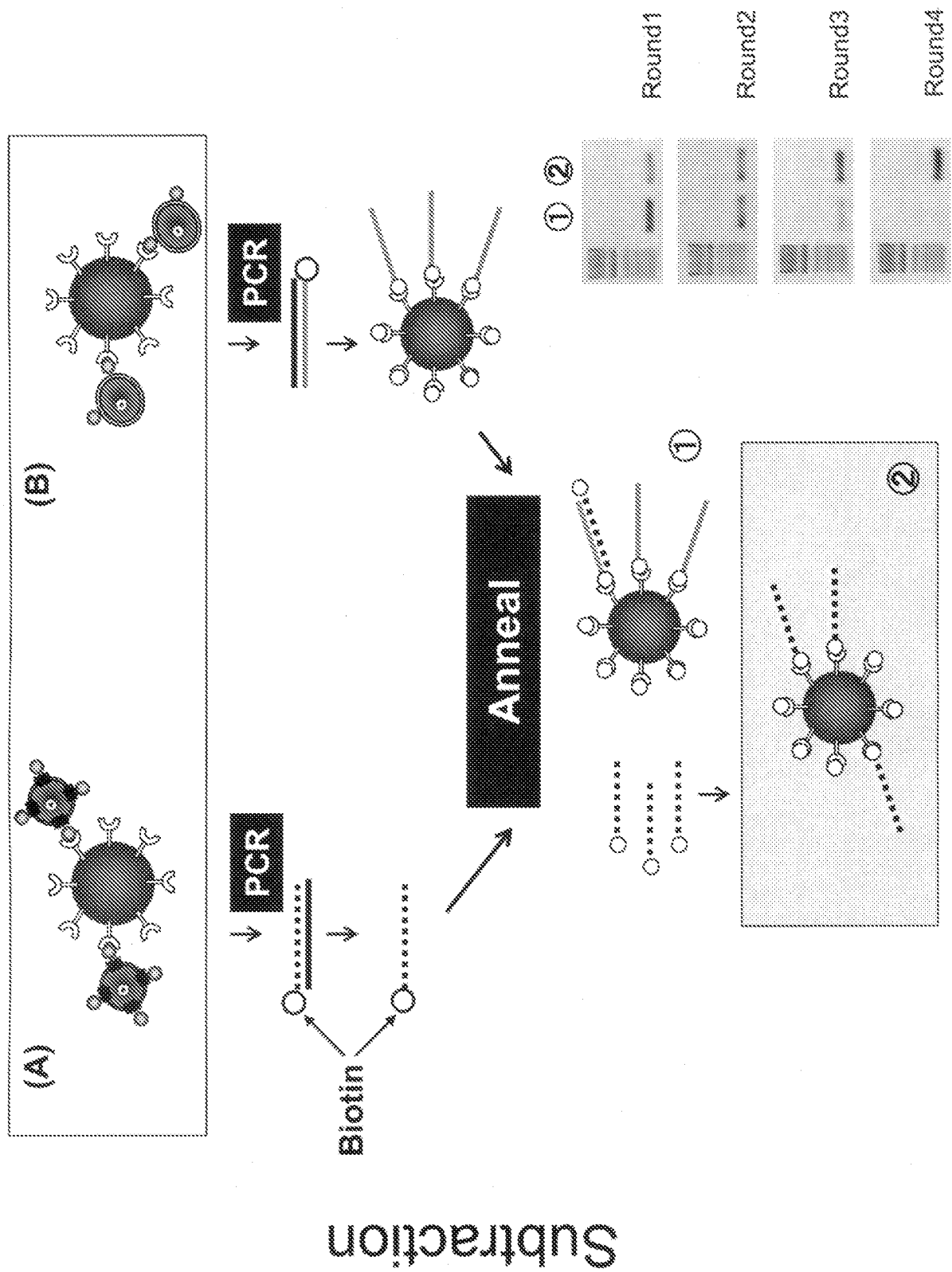
[図6]



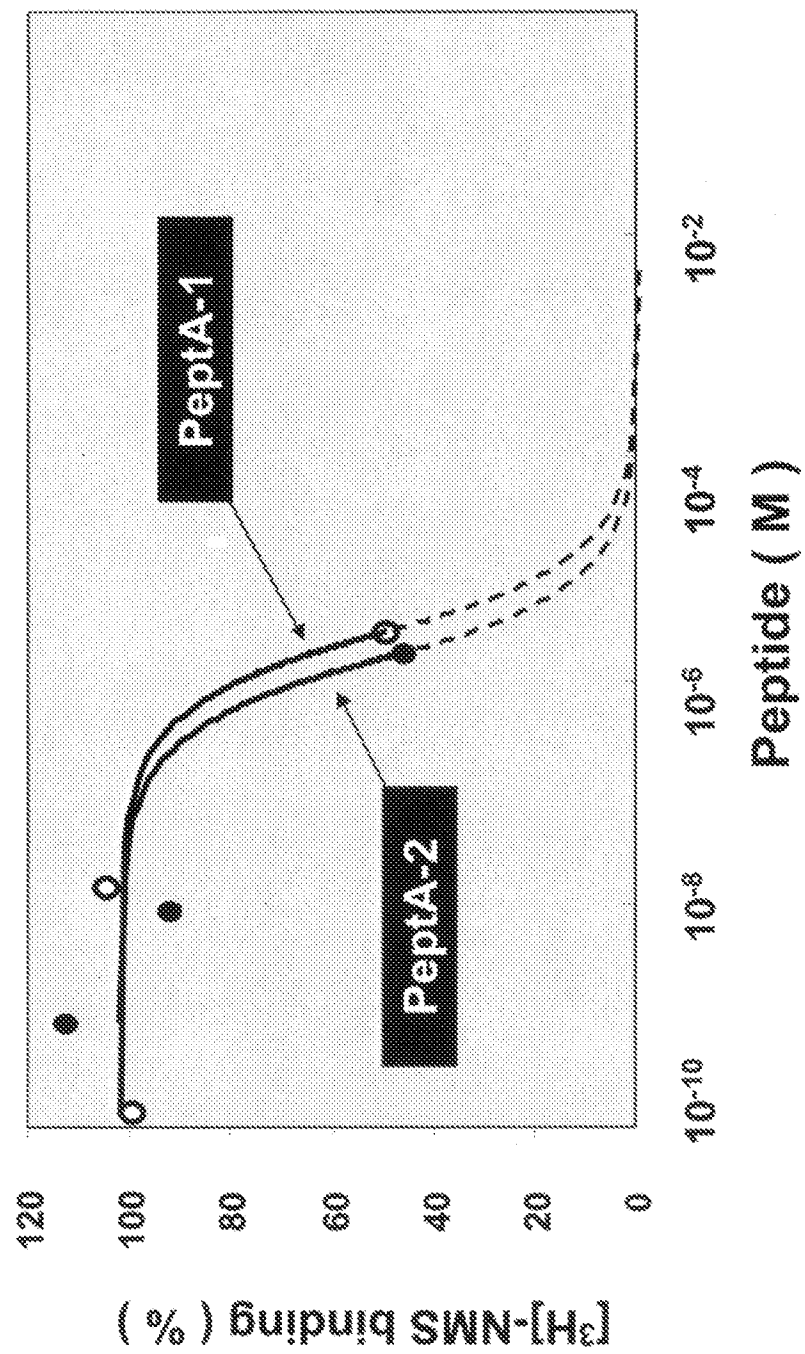
[図7]



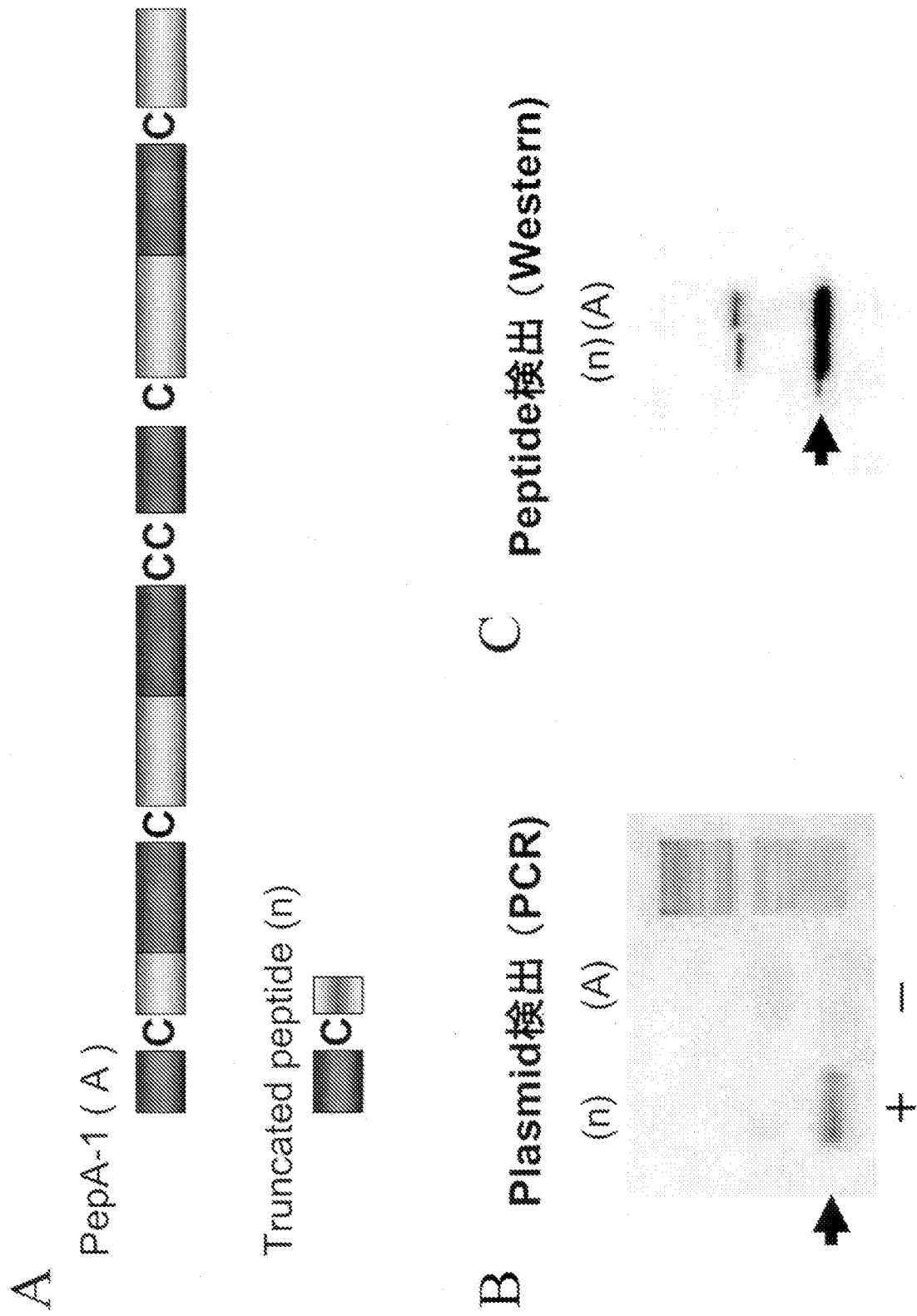
[図8]



[図9]

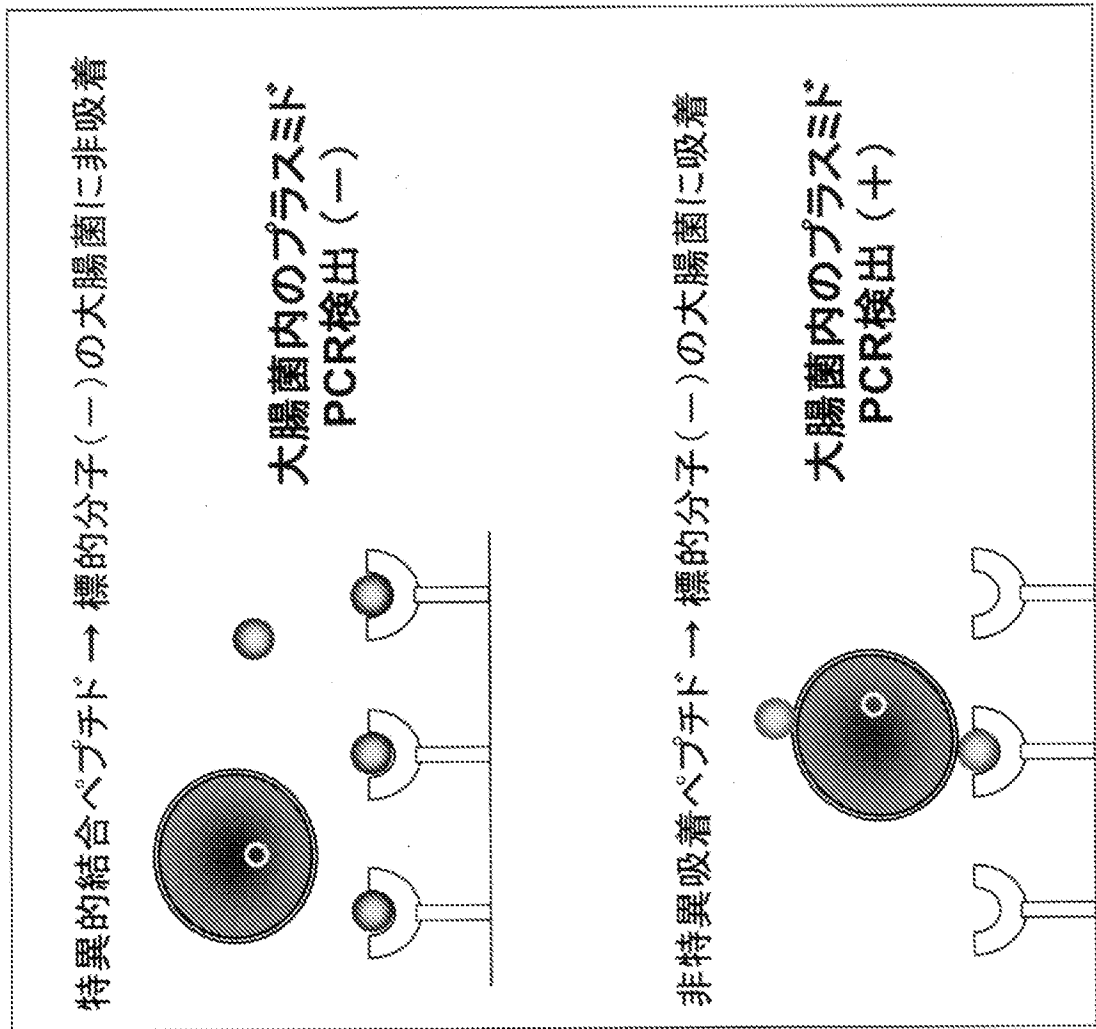


[図10]

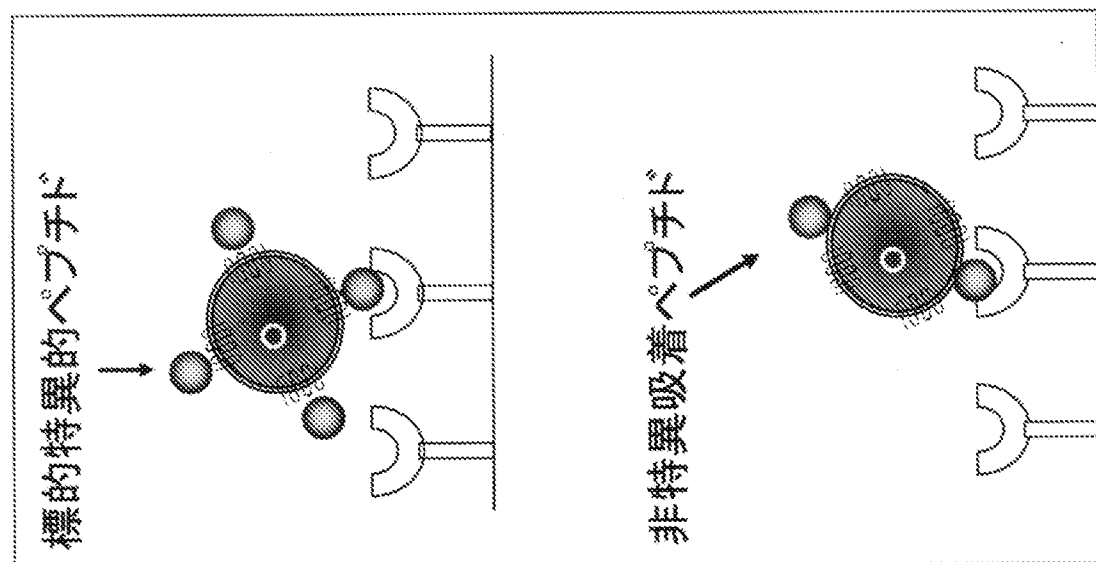


[図11]

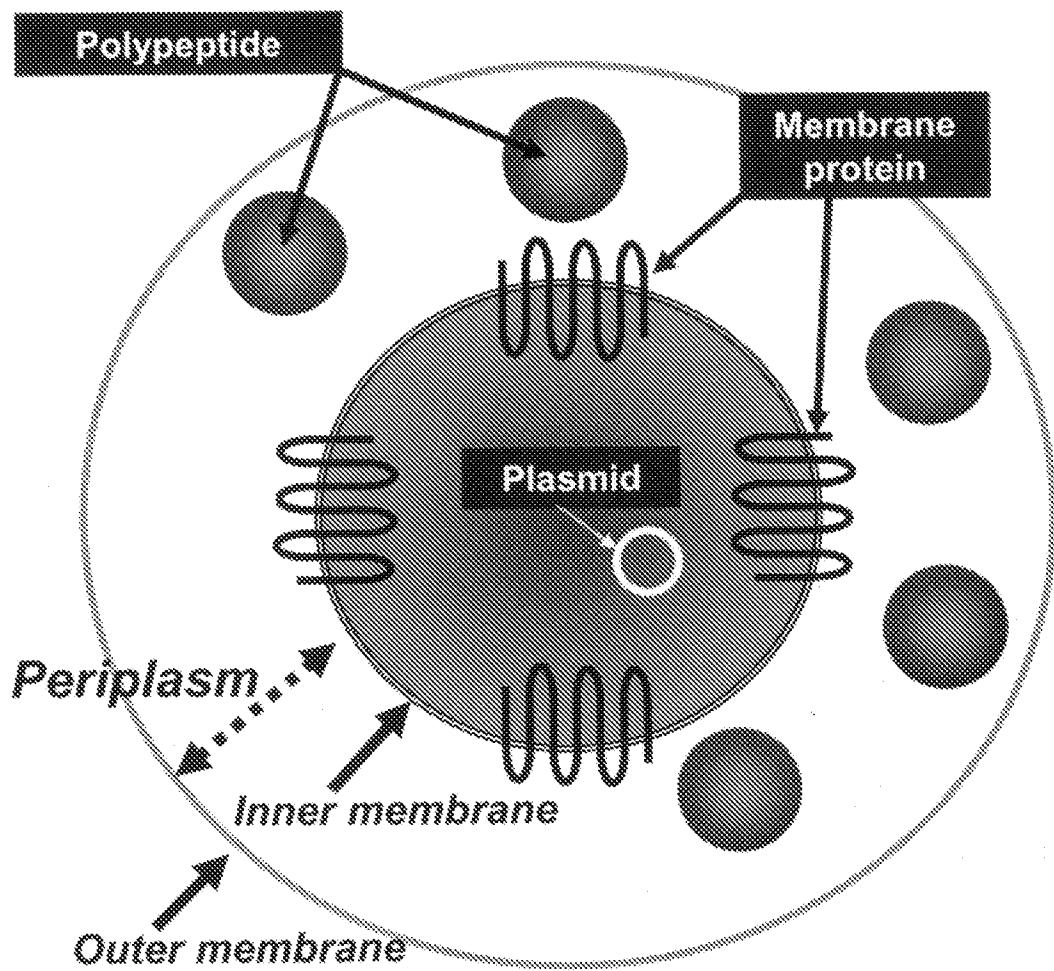
受容体発現(－)



受容体発現(＋)



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C40B40/02
(2006.01)i, C40B40/08(2006.01)i, C40B40/10(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, C12Q1/02, C12Q1/68, C40B40/02, C40B40/08, C40B40/10

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN G., et al., Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS), Nat. Biotechnol., 2001, vol.19, no.6, p.537-542	1-8
A	HARVEY BR., et al., Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004, vol.101, no.25, p.9193-9198	1-8
A	JP 2004-531206 A (Board of Regents, the University of Texas System), 14 October 2004 (14.10.2004), & WO 2002/034886 A2 & EP 1356023 A2 & US 7083945 B1	1-8



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

03 June, 2010 (03.06.10)

Date of mailing of the international search report

15 June, 2010 (15.06.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054010

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-515514 A (Board of Regents, the University of Texas System), 01 June 2006 (01.06.2006), & WO 2005/019409 A2 & EP 1636561 A2 & US 2004/0058403 A1	1-8
A	WO 2006/104254 A1 (BIO-ENERGY CORP.), 05 October 2006 (05.10.2006), (Family: none)	1-8
A	JP 2007-306866 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 29 November 2007 (29.11.2007), (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C40B40/02(2006.01)i, C40B40/08(2006.01)i, C40B40/10(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（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/68, C40B40/02, C40B40/08, C40B40/10		
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		
国際調査で使用了電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)		
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	CHEN G., et al., Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS), Nat. Biotechnol., 2001, vol.19, no.6, p.537-542	1-8
☒ 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 03.06.2010	国際調査報告の発送日 15.06.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / 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） 池上 文緒 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3765

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	HARVEY BR., et al., Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004, vol.101, no.25, p.9193-9198	1-8
A	JP 2004-531206 A (ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ ユニヴァーシティ・オブ・テキサス・システム) 2004.10.14 & WO 2002/034886 A2 & EP 1356023 A2 & US 7083945 B1	1-8
A	JP 2006-515514 A (ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム) 2006.06.01 & WO 2005/019409 A2 & EP 1636561 A2 & US 2004/0058403 A1	1-8
A	WO 2006/104254 A1 (BIO-ENERGY CORPORATION) 2006.10.05 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2007-306866 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2007.11.29 (ファミリーなし)	1-8