

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年12月29日(29.12.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/270588 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/025134

(22) 国際出願日: 2022年6月23日(23.06.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2021-104343 2021年6月23日(23.06.2021) JP

(71) 出願人: パナソニック IP マネジメント株式会社(PANASONIC INTELLECTUAL PROPERTY MANAGEMENT CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5406207 大阪府大阪市中心区城見2丁目1番61号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 初谷 紀幸(HATSUGAI, Noriyuki). 和山 文哉(WAYAMA, Fumiya). 奥村 泰章(OKUMURA, Yasuaki).

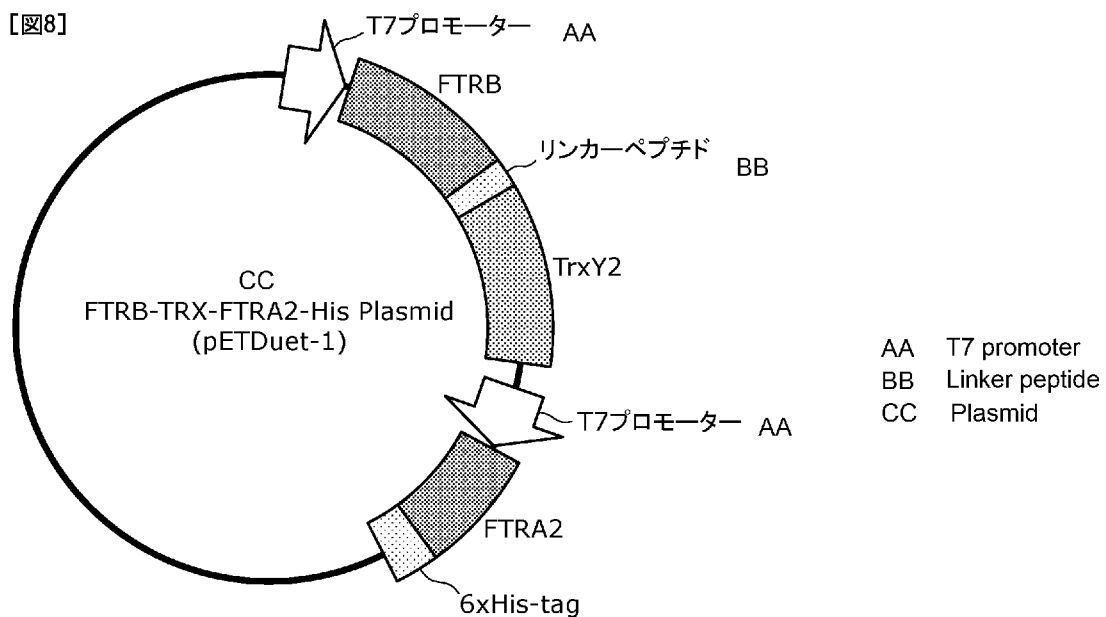
(74) 代理人: 新居 広守, 外 (NII, Hiromori et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目3番10号タナカ・イトピア新大阪ビル6階新居国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: FUSION PROTEIN, FUSION PROTEIN PRODUCTION METHOD, ELECTRODE, REDOX DEVICE, REDOX METHOD, METHOD FOR CUTTING DISULFIDE BONDS, AND METHOD FOR INACTIVATING ALLERGEN

(54) 発明の名称: 融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、電極、酸化還元装置、酸化還元方法、ジスルフィド結合の切断方法、及び、アレルゲンの不活化方法

[図8]



(57) Abstract: In this fusion protein, ferredoxin-thioredoxin reductase and thioredoxin are fused via a linker peptide. The linker peptide includes glycine (G) and serine (S).

(57) 要約: 融合タンパク質は、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとがリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質であって、前記リンカーペプチドは、グリシン(G)及びセリン(S)を含む。

[続葉有]



WO 2022/270588 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

明 細 書

発明の名称：

融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、電極、酸化還元装置、酸化還元方法、ジスルフィド結合の切断方法、及び、アレルゲンの不活化方法

技術分野

[0001] 本開示は、チオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンの融合タンパク質及びその製造方法、融合タンパク質を固定化した電極、当該電極を備える酸化還元装置、当該電極を用いた酸化還元方法、ジスルフィド結合の切断方法、及び、アレルゲンの不活化方法に関する。

背景技術

[0002] チオレドキシン還元酵素の触媒作用によりチオレドキシンが還元されるには、チオレドキシンとチオレドキシン還元酵素とがヘテロタンパク質複合体を形成する必要がある。例えば、特許文献1には、オイルボディ表面回避性リンカーペプチドを介して、チオレドキシンとチオレドキシン還元酵素とが融合されたタンパク質複合体を、植物細胞内のオイルボディと会合した状態で活性を保持したまま調製する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特表2004-527227号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかしながら、特許文献1に記載された方法では、植物細胞内のオイルボディと会合した状態で活性を保持するように、チオレドキシンとチオレドキシン還元酵素との間に位置するオイルボディ表面回避性リンカーペプチドが49アミノ酸残基と長く、さらに、負に荷電するアミノ酸配列で構成されている。したがって、特許文献1に記載された方法で製造されたチオレドキシ

ンとチオレドキシン還元酵素とのタンパク質複合体は、柔軟性に乏しく細胞外での使用には適さない。

[0005] そこで、本開示は、柔軟性及び適度な親水性を有するリンカーペプチドを介した融合されたチオレドキシン及びチオレドキシン還元酵素の融合タンパク質及びその製造方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 本開示の一態様に係る融合タンパク質は、フェレドキシンーチオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとがリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質であって、前記リンカーペプチドは、グリシン（G）及びセリン（S）を含む。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、柔軟性及び適度な親水性を有するリンカーペプチドを介して融合されたチオレドキシン及びチオレドキシン還元酵素の融合タンパク質を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、本実施の形態に係る融合タンパク質の適用例を説明するための図である。

[図2]図2は、本実施の形態に係る電極を備える酸化還元装置の構成の一例を示す図である。

[図3]図3は、図2のⅠ－Ⅰ線における断面図である。

[図4]図4は、電極上に固定された電子伝達体及び融合タンパク質を模式的に示す図である。

[図5]図5は、本実施の形態に係る電極の製造方法の一例を示すフローチャートである。

[図6]図6は、図5の各フローを模式的に示す図である。

[図7]図7は、標的分子の酸化還元方法を説明するための図である。

[図8]図8は、融合タンパク質作製の発現ベクターの概念図である。

[図9]図9は、融合タンパク質の概念図である。

[図10]図10は、融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図である。

[図11]図11は、比較例1、比較例2及び実施例1の還元酵素活性評価のためのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）像である。

[図12]図12は、実施例3、実施例4、比較例3、及び、比較例4のSDS-PAGE後の電気泳動像を示す図である。

[図13]図13は、アレルギー性タンパク質の分解率の算出結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] （本開示の一態様の概要）

本開示の一態様の概要は、以下の通りである。

[0010] 本開示の一態様に係る融合タンパク質は、チオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとがリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質であって、前記リンカーペプチドは、グリシン（G）及びセリン（S）を含む。

[0011] これにより、リンカーペプチドは、低分子量で無極性側鎖を有するグリシンと、低分子量で親水性を有するセリンとを含むため、柔軟性及び適度な親水性を有することができる。

[0012] 例えば、本開示の一態様に係る融合タンパク質では、リンカーペプチドは、5残基より多く50残基以下のアミノ酸配列からなる。

[0013] これにより、リンカーペプチドを介して融合されるタンパク質同士、比較的動きに自由度を持つことができる。

[0014] 例えば、本開示の一態様に係る融合タンパク質では、リンカーペプチドは、少なくとも1つのグリシンと少なくとも1つのセリンとを含み、さらに、
（i） $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ （但し、Rは、水素基、又は、炭素数が1～4のアルキル基のいずれかである）、及び、
（ii） $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ （但し、Rは、炭素数が1又は2のアルキル基中の少なくとも1つの水素基が水酸基に置換されている）の少なくともいずれかを含む。

[0015] これにより、リンカーペプチドは、グリシン及びセリン以外の上記（i）

及び（i i）に該当するアミノ酸を含んでも、柔軟性と適度な親水性とを保つことができる。

[0016] 例えば、本開示の一態様に係る融合タンパク質では、リンカーペプチドは、 $(GGGS)_n$ のアミノ酸配列を含み、 n は、2以上の整数である。

[0017] これにより、融合されるタンパク質同士は、比較的動きに自由度を持つことができ、リンカーペプチドは、柔軟性と適度な親水性とを有することができる。

[0018] また、本開示の一態様に係る融合タンパク質の製造方法は、グリシン（G）及びセリン（S）を含むリンカーペプチドを作成し、作成された前記リンカーペプチドを介してチオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとを融合させる。

[0019] これにより、融合タンパク質の製造方法は、低分子量で無極性側鎖を有するグリシンと、低分子量で親水性を有するセリンとを含むリンカーペプチドを作成するため、柔軟性及び適度な親水性を有するリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質を製造することができる。

[0020] また、本開示の一態様に係る電極は、上記のいずれかの融合タンパク質が固定化されている。

[0021] これにより、電極では、電極に固定化された融合タンパク質に電極から電子が輸送されるため、融合タンパク質から標的分子へ電子を輸送することができる。

[0022] また、本開示の一態様に係る酸化還元装置は、上記の電極と、前記電極に電圧を印加する電源と、を備え、標的分子を酸化又は還元する。

[0023] これにより、酸化還元装置は、電極から標的分子へ電子が輸送されるため、標的分子を効率よく酸化又は還元することができる。

[0024] また、本開示の一態様に係る酸化還元方法は、上記の電極を用い、標的分子を酸化又は還元する。

[0025] これにより、酸化還元方法は、電極から標的分子へ電子が輸送されるため、標的分子を効率よく酸化又は還元することができる。

[0026] また、本開示の一態様に係るジスルフィド結合の切断方法は、上記の電極を用い、標的分子であるタンパク質のジスルフィド結合を切断する。

[0027] これにより、ジスルフィド結合の切断方法は、電極から標的分子へ電子が輸送されるため、標的分子のジスルフィド結合を効率よく還元することができる。

[0028] また、本開示の一態様に係るアレルゲンの不活化方法は、上記の電極を用い、標的分子であるアレルゲンを不活化する。

[0029] これにより、アレルゲンの不活化方法は、電極から標的分子であるアレルゲンへ電子が輸送されてアレルゲンが還元されるため、アレルゲンを効率よく不活化することができる。

[0030] 以下、実施の形態について図面を参照しながら説明する。

[0031] なお、以下で説明する実施の形態は、いずれも包括的または具体的な例を示すものである。以下の実施の形態で示される数値、形状、材料、構成要素、構成要素の配置位置及び接続形態、工程、工程の順序などは、一例であり、請求の範囲を限定する主旨ではない。また、以下の実施の形態における構成要素のうち、最上位概念を示す独立請求項に記載されていない構成要素については、任意の構成要素として説明される。また、各図は、必ずしも厳密に図示したものではない。各図において、実質的に同一の構成については同一の符号を付し、重複する説明は省略又は簡略化される場合がある。

[0032] また、各図において、それぞれ互いに直交するX軸方向、Y軸方向、及びZ軸方向を適宜用いて説明する。特に、Z軸方向のプラス側を上側、マイナス側を下側として説明する場合がある。

[0033] また、本開示において、平行及び垂直などの要素間の関係性を示す用語、及び、矩形などの要素の形状を示す用語、並びに、数値は、厳格な意味のみを表すのではなく、実質的に同等な範囲、例えば数%程度の差異をも含むことを意味する。

[0034] (実施の形態)

以下、実施の形態について図面を参照しながら説明する。

[0035] [1. 融合タンパク質]

まず、本実施の形態に係る融合タンパク質について説明する。本実施の形態に係る融合タンパク質は、チオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとがリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質である。より具体的には、融合タンパク質は、NADPH-チオレドキシン還元酵素又はフェレドキシン-チオレドキシン還元酵素（FTR）とチオレドキシン（Trx）とがリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質であり、言い換えると、ハイブリッド型の酵素である。融合タンパク質は、図1に示されるように、電極から電子メディエータに供与された電子を受容すると、標的分子（ここでは、アレルゲン）へ電子を供与する。図1は、本実施の形態に係る融合タンパク質の適用例を説明するための図である。

[0036] 図1では、融合タンパク質がアレルゲンの不活性化に適用される例を示している。例えば、アレルゲンは、ジスルフィド結合を有するタンパク質であり、いわゆる、アレルゲン性タンパク質ともいわれる。ジスルフィド結合は、非常に強固な結合であり、熱、酸及び酵素（例えば、胃の消化酵素）によっても切断されにくい。そのため、ジスルフィド結合を有するタンパク質は、アレルギーを引き起こす可能性が高い。融合タンパク質がアレルゲンの不活性化に適用される場合、融合タンパク質は、電極から電子メディエータに供与された電子を受容すると、アレルゲンへ電子を供与する。そして、アレルゲンのジスルフィド結合（例えば、図1の（a））は、活性型の融合タンパク質（図1中の活性型FTR-Trx）から電子を供与されることにより、チオール基に還元される（例えば、図1の（b））。これにより、アレルゲン性タンパク質中のジスルフィド結合が切断され、アレルゲンは、不活性化される。

[0037] [2. リンカーペプチド]

実施の形態におけるリンカーペプチドは、チオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとを融合させて融合タンパク質を作製するためのリンカーペプチドである。リンカーペプチドは、チオレドキシンのレドックスアクティブな

ジスルフィド (redox-active disulfide) が、チオレドキシン還元酵素のレドックスアクティブなジスルフィドと相互作用できるように、チオレドキシン還元酵素にチオレドキシンを融合させる。

[0038] リンカーペプチドは、グリシン (G) 及びセリン (S) を含む。リンカーペプチドは、5 残基より多く 50 残基以下のアミノ酸配列からなる。例えば、リンカーペプチドは、少なくとも 1 つのグリシンと少なくとも 1 つのセリンとを含み、さらに、(i) $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ (但し、R は、水素基、又は、炭素数が 1 ~ 4 のアルキル基のいずれかである)、及び、(ii) $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ (但し、R は、炭素数が 1 又は 2 のアルキル基中の少なくとも 1 つの水素基が水酸基に置換されている) の少なくともいずれかを含む。例えば、リンカーペプチドは、 $(\text{GGGGS})_n$ のアミノ酸配列を含み、n は、2 以上の整数である。言い換えると、リンカーペプチドは、グリシン (G) - グリシン (G) - グリシン (G) - グリシン (G) - セリン (S) の 5 残基からなるアミノ酸配列を一単位としたときに、当該一単位のアミノ酸配列 (以下単に「GGGGS」という場合もある。) を 1 以上 3 個以下、好ましくは 2 以上 3 個以下、又はそれ以上含んでもよい。グリシンは、側鎖のない疎水性のアミノ酸であり、他のアミノ酸に比べて柔軟性が高い。セリンは水溶性のアミノ酸である。柔軟性及び適度な親水性を有するリンカーペプチドを作製するために検討した結果、GGGGS を一単位のアミノ酸配列とすることが効果的であることが確認された。

[0039] 一方、特許文献 1 には、チオレドキシン還元酵素、及び、チオレドキシンを融合させるために、負に荷電した 49 アミノ酸残基からなるリンカーペプチドが開示されている。本開示のリンカーペプチドは、側鎖が小さく、荷電を持たない、他のアミノ酸に比べて柔軟性が高いグリシンと、水溶性のアミノ酸であるセリンを含む 5 残基から 15 残基のアミノ酸配列からなる。したがって、本願発明のリンカーペプチドは、特許文献 1 に記載のリンカーペプチドとは、アミノ酸配列の構成も長さも異なり、効果も異なるものである。

[0040] [3. 融合タンパク質の作製方法]

上記のリンカーペプチドを介して融合されるチオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンの融合タンパク質は、それぞれのタンパク質を融合させる慣用の技術によって作製することができる。

[0041] 例えば、チオレドキシン還元酵素、及び、チオレドキシンをコードするDNAは、植物、動物、又は、微生物からポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法により単離することができる。例えば、シロイヌナズナのチオレドキシン還元酵素、及び、チオレドキシンの場合、シロイヌナズナから抽出した全RNAを用いた逆転写反応後のcDNAから、PCR法により単離することができる。単離に必要なプライマーは各生物の遺伝子の配列情報を使って設計することができる。シロイヌナズナのDNA及びアミノ酸配列情報は、例えばTAIR（The Arabidopsis Information Resource）、又は、NCBI（National Center for Biotechnology Information）のゲノムデータベースに登録されているものを活用することができる。

[0042] チオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンの融合タンパク質を作製する場合は、当該タンパク質をコードする遺伝子を公知の方法に従い、発現ベクターに組み込ませることができる。発現ベクターの種類は当該ベクターを組み込ませる予定の宿主の種類に応じて、適宜選択することができる。

[0043] そして、作製した発現ベクターを大腸菌などの微生物、植物体、植物細胞、動物細胞、又は、昆虫細胞などの宿主に形質転換させ、タンパク質を発現させることができる。また、宿主を用いることなく、無細胞タンパク質発現系を用いて作製してもよい。

[0044] [4. 酸化還元装置]

続いて、本実施の形態に係る融合タンパク質の適用例として、融合タンパク質を固定化した電極を備える酸化還元装置について説明する。図2は、実施の形態に係る電極を備える酸化還元装置の構成の一例を示す図である。

[0045] 酸化還元装置100は、融合タンパク質が固定化された電極（例えば、図2中のカソード電極1）と、電極に電圧を印加する電源20とを備え、標的

分子を酸化又は還元する。酸化還元装置 100 は、電極に電圧が印加されることにより、電極と融合タンパク質との間の電子輸送を行う。これにより、融合タンパク質が固定化された電極と試料 9 中の標的分子との間で電子授受が起こるため、標的分子が酸化又は還元される。例えば、酸化還元装置 100 は、標的分子を含む試料 9（例えば、サンプル溶液）を非流動状態で、電極に電圧を印加することで、電極に固定化された融合タンパク質と試料 9 中の標的分子との間で電子授受が行われ、標的分子が酸化又は還元される。図 2 の例では、酸化還元装置 100 は、攪拌子 8 と攪拌子 8 を回転させる攪拌部 40 とを備えているが、攪拌子 8 及び攪拌部 40 を備えていなくてもよい。図 2 の例では、酸化還元装置 100 は、攪拌部 40 が攪拌子 8 を回転させて、サンプル溶液を非流動状態から流動状態に切り替えることにより、酸化又は還元された標的分子をサンプル溶液中に拡散させる。このように、酸化還元装置 100 は、試料 9（サンプル溶液）の流動状態の切り替えを繰り返すことで、溶液全体で、標的分子を効率良く酸化又は還元することができる。

[0046] なお、溶液が非流動状態であるとは、例えば、溶液が攪拌又は振盪されておらず（つまり、剪断力、又は、振動などの外力を受けておらず）、液面にゆらぎなどの動きが見られない状態をいう。

[0047] 続いて、実施の形態に係る酸化還元装置 100 の構成について図 2 から図 4 を参照しながら説明する。

[0048] 図 2 に示されるように、酸化還元装置 100 は、例えば、標的分子を含む試料 9 を攪拌して流動状態にする攪拌部 40 と、標的分子との間で電子授受を行うことにより標的分子を酸化又は還元する融合タンパク質が固定された電極（カソード電極 1）と、電極に電圧を印加する電源 20 と、電源 20 及び攪拌部 40 を制御する制御部 30 と、を備える。なお、電極には、電子伝達体及び融合タンパク質酵素が固定されている。

[0049] 電圧印加部 10 は、例えば、カソード電極 1（作用極ともいう）、参照極 2、対極 3、セル 4、蓋部 5、端子 6 a、6 b、6 c、及び、リード 7 a、

7b、7cを備える三電極式セルである。なお、電圧印加部10は、例えば、作用極（カソード電極1）及び対極3を備える二電極式セルであってもよい。

[0050] カソード電極1及び対極3は、導電性物質から構成される。導電性物質としては、例えば、炭素材料、導電性ポリマー材料、半導体、又は、金属などであってもよい。

[0051] まず、カソード電極1について、図3及び図4を参照しながら説明する。図3は、図2の11-11線における断面図である。図4は、電極上に固定された電子伝達体及び酸化還元酵素を模式的に示す図である。

[0052] カソード電極1は、融合タンパク質が固定化された電極である。カソード電極1は、例えば、ガラス基板11と、ガラス基板11上に蒸着されたチタン蒸着層12と、チタン蒸着層12に形成されたカソード基板13と、カソード基板13に固定された電子伝達体及び融合タンパク質を含む反応層14とを有する。

[0053] カソード基板13としては、例えば、金、グラッシーカーボン、又は、ITO（Indium Tin Oxide）などの導電性基板を用いてもよい。カソード基板13の厚みは特に限定されない。

[0054] カソード基板13に固定化される電子伝達体は、電極と電極上固定された融合タンパク質との間の電子授受を可能とする物質であれば特に限定されない。例えば、ピオローゲン、キノン、又は、インドフェノールなどが挙げられる。電子伝達体は、例えば、鎖状の第1のリンカーでカソード基板13上に固定化されている。第1のリンカーは、例えば、炭素数が2以上5以下のアルキル鎖を含む。第1のリンカーは、末端にはチオール基を有する。第1のリンカーと電極（具体的には、カソード基板13）とが化学結合することで、電子伝達体が電極の表面に固定化される。

[0055] 電極へ固定化される電子伝達体、及び、融合タンパク質については、以下の（1）～（4）の特徴を有するとよい。（1）電子伝達体と電極とを繋ぐ第1のリンカーは、導電性を有し、かつ、（2）融合タンパク質と電極とを

繋ぐ第2のリンカーは、第1のリンカーと類似した構造であるが導電性を有しない。また、(3)電子伝達体と電極との間の距離よりも、融合タンパク質と電極との間の距離が大きい。(4)電子伝達体と融合タンパク質との距離は、電子移動が可能な距離(例えば、数 μm 以内)である。これにより、電極から電子伝達体へ移動した電子が、融合タンパク質へ移動しやすくなる。また、電極の最表面に融合タンパク質が配置され、鎖状の第2のリンカーで電極に固定化されているため、融合タンパク質の自由度が高まり、標的分子に作用しやすくなる。

[0056] なお、電子伝達体と融合タンパク質との組み合わせによって、上記の好ましい範囲内で、第1のリンカー及び第2のリンカーの炭素数を変更してもよい。

[0057] なお、第2のリンカーが導電性を有しないとは、わずかに電気を伝導するが、第1のリンカーに比べて十分に導電性が低く、実質的に非導電性と同視できる程度の場合を含む。

[0058] また、電極の表面(いわゆる、カソード基板13)に固定化される融合タンパク質は、酸化還元タンパク質(例えば、チオレドキシン)と酸化還元酵素(例えば、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素)とがリンカーペプチドを介して融合されており、標的分子を酸化又は還元する。融合タンパク質は、第1のリンカーよりも長い鎖状の第2のリンカーでカソード基板13上に固定化されている。第2のリンカーは、例えば、炭素数が3以上20以下のアルキル鎖を含み、中でも、炭素数が6以上14以下のアルキル鎖を含んでもよい。

[0059] 参照極2は、試料9中の成分とは反応せず、一定の電位を維持する電極であり、電源20によりカソード電極1と参照極2との間の電位差を一定に制御するために使用される。参照極2は、例えば、銀/塩化銀電極である。対極3は、例えば、白金電極である。

[0060] 電源20は、制御部30から出力された制御信号に従って、電圧印加部10のカソード電極1と対極3との間に電圧を印加し、カソード電極1と参照

極 2 との間の電位を所定の値に制御する。

[0061] 制御部 30 は、電源 20 の電圧印加及び攪拌部 40 のモータ（不図示）の動きを制御するための情報処理を行う。制御部 30 は、例えば、プロセッサ、マイクロコンピュータ又は専用回路によって実現される。

[0062] 攪拌部 40 は、制御部 30 から出力された制御信号に従って、モータの動作を制御することにより、電圧印加部 10 の中にセットされた攪拌子 8 の回転速度及び回転時間を制御する。

[0063] [5. 電極の製造方法]

続いて、本実施の形態に係る電極の製造方法について図 5 及び図 6 を参照しながら説明する。図 5 は、本実施の形態に係る電極の製造方法の一例を示すフローチャートである。図 6 は、図 5 の各フローを模式的に示す図である。図 6 の（a）は、第 1 固定化工程を示し、図 6 の（b）は、第 2 固定化工程を示す。なお、本実施の形態に係る電極は、カソード電極 1 である。

[0064] 電極の製造方法は、第 1 固定化工程（S 1）と、融合タンパク質を第 2 のリンカーを介して電極上に固定化する第 2 固定化工程（S 2）とを含む。

[0065] 第 1 固定化工程（S 1）では、電子伝達体を鎖状の第 1 のリンカーを介して電極上に固定化する。まず、第 1 のリンカーと結合した電子伝達体（例えば、電子メディエータ）と、第 2 のリンカーとを含む溶液を準備し、自己組織化単分子膜（SAM）の形成と同様にして、電子伝達体と結合した第 1 のリンカーと、第 2 のリンカーとを電極上に固定化する。例えば、電子伝達体と結合した第 1 のリンカー、及び、第 2 のリンカーを、それぞれエタノール：アセトニトリル＝1：1 の溶液に混合し、この混合溶液に電極を 1 時間以上浸漬して静置する。なお、図 6 の（a）に示されるように、電子伝達体は、第 1 のリンカーを有している。第 1 のリンカーは、末端にチオール基を有する。第 1 のリンカーと電極とが化学結合することで、電子伝達体が第 1 のリンカーを介して電極に固定化される。なお、第 1 のリンカーは、電子が電極から電子伝達体まで移動できる長さのアルキル鎖である。第 1 のリンカーは、例えば、炭素数が 2 以上 5 以下のアルキル鎖である。

[0066] また、融合タンパク質を電極に固定化するための第2のリンカーは、炭素数が3以上のアルキル鎖であるが、電子が電極から直接融合タンパク質に移動できないようにするため、炭素数が6以上のアルキル鎖であるとよい。また、第2のリンカーは、炭素数が20以下のアルキル鎖であるが、第1のリンカーに結合した電子伝達体から融合タンパク質への電子の移動をしやすいようにするために、炭素数が14以下のアルキル鎖であるとよい。つまり、第2のリンカーは、炭素数が3以上20以下であるが、より好ましくは、例えば、第2のリンカーは、炭素数が6以上14以下のアルキル鎖であってもよい。また、第2のリンカーは、一方の末端にカルボキシル基又はアミノ基を有し、他方の末端にはチオール基を有する。なお、分子量が500以下の化合物を電子伝達体として用いる場合、第2のリンカーは、炭素数が15未満のアルキル鎖であるとよい。例えば、第2のリンカーのアルキル鎖の長さは、第1のリンカーのアルキル鎖の長さ、及び、第1のリンカーに結合する電子伝達体のサイズ（分子量）によって適宜決定されてもよい。

[0067] 続いて、第2固定化工程（S2）では、融合タンパク質を第2のリンカーを介して電極上に固定化する。より具体的には、図6の（b）に示されるように、電極上に固定化された第2のリンカーと融合タンパク質とを結合させる。このとき、例えば、融合タンパク質中のチオレドキシン還元酵素のアミノ基と第2のリンカーのカルボキシル基とがアミンカップリング反応により結合される。これにより、融合タンパク質が第2のリンカーを介して電極上に固定化される。

[0068] [6. 標的分子の酸化還元方法]

続いて、標的分子の酸化還元方法について図3及び図7を参照しながら説明する。図7は、標的分子の酸化還元方法を説明するための図である。標的分子は、例えば、タンパク質又はアレルゲンであり、ジスルフィド結合を有する。

[0069] 標的分子の酸化還元方法は、例えば、カソード電極1として融合タンパク質を固定化した電極と、対極3としてアノード電極と、参照極2とを備える

三電極方式の電圧印加部 10 を用いて、試料 9 に含まれる標的分子を酸化又は還元する。アノード電極の表面積は、例えば、カソード電極 1 よりも十分大きい。

[0070] 試料 9 は、標的分子を含む水溶液である。試料 9 に印加する電圧は、参照極 2 に対するカソード電極 1 の電位が電子伝達体（電子メディエータ）の酸化電位となるように制御されてもよい。

実施例

[0071] 以下に、実施例により、本開示を具体的に説明するが、本開示は以下の実施例のみに何ら限定されるものではない。

[0072] [チオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンの融合タンパク質の作製]
[実施例 1]

実施例 1 では、融合タンパク質の構成を以下とした。実施例 1 におけるリンカーペプチドは、グリシン（G）－グリシン（G）－グリシン（G）－グリシン（G）－セリン（S）の 5 残基からなるアミノ酸配列（G G G G S）を一単位とした。

[0073] チオレドキシン還元酵素は、フェレドキシン：チオレドキシン還元酵素（以下、FTR）が使用された、また、チオレドキシンは、チオレドキシン Y2（以下、TrxY2）が使用された。FTR は、触媒サブユニット（catalytic subunit）（以下、FTRB）及び可変サブユニット（variable subunit）（以下、FTRA2）から成り、両者はヘテロ二量体を形成する。

[0074] 図 8 は、融合タンパク質作製用の発現ベクターの概念図である。図 8 に示されるように、酵素発現ベクター（pETDuet-1：Novagen 社製）のマルチクローニングサイト 1 の 5' 側に FTRB の 32 番目－146 番目のアミノ酸をコードする遺伝子（配列番号 1）を導入し、3' 側に TrxY2 の 59 番目－167 番目のアミノ酸をコードする遺伝子（配列番号 2）を導入した。これらの 2 つの遺伝子の間に、リンカーペプチドをコードする遺伝子（配列番号 3～5）を、必要な単位、及び、適切な順序で発現する

ように導入した。マルチクローニングサイト2に、F T R A 2の73番目ー184番目のアミノ酸をコードする遺伝子（配列番号6）、及び、ヒスチジンタグ（H i s－T a g）をコードする遺伝子（配列番号7）を導入した。

[0075] 発現ベクター作製用挿入遺伝子の各塩基配列

（1）F T R Bの32番ー146番のアミノ酸をコードする遺伝子（配列番号1）

```
ATGGCGAAAACGGAACCGTCGGAGAAATCAGTAG
AGATTATGAGGAAATTCTCCGAGCAATATGCTCG
TCGCTCTGGGACTTACTTCTGTGTTGATAAAGGA
GTTACTTTCAGTCGTTATTAAGGGTTTGGCTGAGC
ATAAAGATTTCATATGGTGCACCGCTTTGCCCTTG
CAGACACTATGATGATAAAGCTGCTGAGGTTGGA
CAAGGCTTTTGGAAATTGTCCGTGTGTTCCAATGA
GAGAGAGGAAGGAGTGCCATTGTATGCTTTTCTT
AACTCCTGATAATGATTTTCGCTGGAAAAGATCAG
ACGATTACATCGGATGAAATAAAAGAAACTACAG
CTAACATG
```

（2）T r x Y 2の59番ー167番のアミノ酸をコードする遺伝子（終始コドン：T A G）（配列番号2）

```
ATGGCAGCAAAGAAGCAAACCTTTCAACTCTTTTG
ATGATTTGTGTGCAGAACTCTGATAAACCTGTACT
TGTAGACTTCTATGCTACTTTGGTGTGGTCCATGT
CAGCTTATGGTACCTATACTCAATGAAGTGAGTG
AAACACTGAAAGATATAATTGCAGTTGTGAAAAT
TGATACTGAGAAGTACCCAAGTCTTGCTAACAAA
TACCAGATTGAGGCTTTGCCACATTTCATCTTAT
TCAAAGACGGCAAACCTCTGGGACCGTTTTCGAGGG
TGCCTTGCCAGCGAACCAACTCGTTGAGCGTATT
```

G A G A A T T C T T T T G C A A G T G A A A C A G T A G

(3) リンカーペプチドをコードする遺伝子 (配列番号3~5)

(G G G G S)₁ : g g c g g c g g c g g c a g c (配列番号3)

(G G G G S)₂ : g g c g g c g g c g g c a g c g g c g g c g g c g g c g g c a g c (配列番号4)

(G G G G S)₃ : g g c g g c g g c g g c a g c g g c g g c g g c g g c g g c a g c g g c g g c g g c a g c (配列番号5)

(4) F T R A 2 の 7 3 番 - 1 8 4 番 の アミノ酸をコードする遺伝子 (配列番号6)

A T G G A T A T T G C T G T G A A A T C G G C G G C T T C T G T A G
A C G C G G A C G C T G A T C T A T C G T C A T C T A C G T C G T T
G G A G A C G G A G G A A G A C G A G A A A G C G A A G G A G A A G
A T T G G A G C T A G G G T T A G G G T T A C G G T T C C G T T G A
A A G T T T A C C A T G T G G T T C G T G T A C C G G A G G T T G A
A T T G A T G G G A A T G G A A G G T T T T A T C A A A G A T T A C
G T C G T T C T T T G G A A A G G A A A G A A A A T C T C A G C T A
A T C T G C C G T T T A A G G T A C A G T T C G T G A A A G A G A T
C G A A G G T C G T G G T C C T G T C A A A T T C T T C A C G C A T
C T T A A G G A A G A C G A G T T C G A G T T A A T T G A T C C G

(5) ヒスチジンタグ (H i s - T a g) をコードする遺伝子 (終始コドン : T G A) (配列番号7)

C A C C A C C A C C A C C A C C A C T G A

[0076] 続いて、作製した発現ベクターを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) (ニッポンジーン社製) に組み込み、その大腸菌を L B 培地にて 3 7 ° C で一晩、前培養した。前培養した大腸菌を、M a g i c M e d i a E . c o l i E x p r e s s i o n M e d i u m (I n v i t r o g e n 社) に適量植菌し、1 6 ° C で一晩培養した。遠心操作で集菌し、菌体内に融合タンパク質を発現させた。図 9 は、融合タンパク質の概念図であり、図 1 0 は、アミノ酸配列

を示す図である。図9の(a)は、FTRB及びTrxY2の融合タンパク質を示す概念図であり、図9の(b)は、FTRA2及びヒスチジンタグの融合タンパク質を示す概念図である。また、図10の(a)は、FTRB及びTrxY2の融合タンパク質のアミノ酸配列を示しており、下線部はリンカーペプチドの配列を示している。また、図10の(b)はFTRA2及びヒスチジンタグの融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図であり、下線部はヒスチジンタグの配列を示している。

[0077] 大腸菌をxTractor Buffer (Clontech) に懸濁し、10分間、4℃にて、ローテーターを用いてインキュベートした。12,000×g、4℃にて20分間、遠心操作をして、細胞片を取り除いた。発現した融合タンパク質を、遠心操作後の上澄みから、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

[0078] [還元酵素活性評価]

[実施例2]

実施例1で精製した融合タンパク質の酵素活性について、以下の公知の方法に従い調べた。還元酵素活性評価法は以下の通りである。

[0079] 酸化型のアレルゲン性タンパク質を含む試料に、1.0mM 還元型ニコチンアミドジヌクレオチドリリン酸(NADPH)、0.2μM フェレドキシン:NADPH還元酵素、1μM フェレドキシン、1μMの本開示の融合タンパク質を混合して、酵素反応液を調製し、37℃で1時間インキュベートさせた。その後、10mM 4-acetamido-4-maleimidy-2,2-disulfonate (AMS)を加えて、37℃で1時間インキュベートさせたのち、SDS-PAGEに供した。AMSはチオール基と特異的に結合する低分子化合物であり、酸化的修飾を受けているタンパク質と、修飾を受けていないタンパク質では、結合するAMSの数が異なり、この数の違いをSDS-PAGEの移動度の違いとして検出することができる。

[0080] 図11は、比較例1、比較例2及び実施例1の還元酵素活性評価のための

S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）像である。アレルギー性タンパク質は、 β ラクトグロブリンが使用された。

[0081] 図11の(b)は、実施例1の配列番号5に示されるアミノ酸残基15個のリンカーペプチド(GGGGS)₃を介して融合された融合タンパク質で β ラクトグロブリンを還元した場合の電気泳動像である。図11の(c)は、実施例1の配列番号4に示されるアミノ酸残基10個のリンカーペプチド(GGGGS)₂を介して融合された融合タンパク質で β ラクトグロブリンを還元した場合の電気泳動像である。図11の(d)は、実施例1の配列番号3に示されるアミノ酸残基5個のリンカーペプチド(GGGGS)₁を介して融合された融合タンパク質で β ラクトグロブリンを還元した場合の電気泳動像である。図11の(b)～(d)のいずれもアレルギー性タンパク質の還元型が検出され、還元酵素活性が確認された。中でも、アミノ酸残基が10個(図11の(c))、又は15個(図11の(b))のリンカーペプチドを融合タンパク質の作製に用いる方が、アレルギー性タンパク質の還元酵素活性は優れることが示唆された。

[0082] [比較例1]

比較例1では、上記の酵素反応液から融合タンパク質を除いた溶液を使用した点以外、実施例2と同様に行った。この場合、図11の(a)に示されるように、アレルギー性タンパク質の還元型は検出されず、還元酵素活性は確認されなかった。

[0083] [比較例2]

比較例2では、融合タンパク質の代わりに、FTRB及びTrxY2を個別に、酵素反応液に添加した点以外は、実施例2と同様に行った。この場合、図11の(e)に示されるように、アレルギー性タンパク質の還元型が検出され、還元酵素活性が確認された。

[0084] [融合タンパク質が固定化された電極を用いたアレルギー性タンパク質の分解能評価]

上記の還元酵素活性では、実施例1で作製された融合タンパク質を酵素反

応溶液に添加した。以下では、実施例1で作製された融合タンパク質を固定化した電極を用いて、酸化型のアレルギー性タンパク質の分解能を評価した。

[0085] (1) 標的分子を含む試料の調製

アレルギー性タンパク質は、 β -ラクトグロブリンを使用した。アレルギー性タンパク質を含む試料（以下、サンプル溶液という）は、 β -ラクトグロブリンをpH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解して3.3ミリグラム／ミリリットルに調製した。

[0086] (2) 電極を用いた標的分子の還元

三電極方式の電圧印加セル（例えば、図2の電圧印加部10）及びポテンシオスタット（例えば、図2の電源20）を用いて、試料に、低温で、8時間、所定の電圧を印加した。三極のうちカソード電極1には実施例1で作製された融合タンパク質を固定化した電極を用い、参照極2にはAg／AgCl電極を用い、対極3に白金（Pt）電極を用いた。アレルギー性タンパク質を含む試料に印加した所定の電圧は、参照極2に対するカソード電極1の電位が電子メディエータの還元電位となるようにポテンシオスタットにより制御した。電極は、第1のリンカーとして炭素数4のアルキル鎖を用いて電子伝達体（例えば、メチルビオローゲン）を電極に固定化し、第2のリンカーとして炭素数10のアルキル鎖を用いて融合タンパク質（より具体的には、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンをリンカーペプチドで結合した融合タンパク質）を電極に固定化した。

[0087] (3) 標的分子の還元状態の確認

アレルギー性タンパク質（ここでは、 β -ラクトグロブリン）が還元されたことを確認するため、電圧印加後の試料を消化酵素と37℃で1時間反応させた後に、SDS-PAGEを行った。次いで、電気泳動後のゲルを染色し、画像解析によりアレルギー性タンパク質のバンドの濃さを数値化した。電気泳動像を図12に示す。なお、対照サンプルとして、融合タンパク質が固定化されていない普通の電極（カソード電極）を用いて、試料に、低温で

、8時間、所定の電圧を印加した後、試料を消化酵素で処理したものを、SDS-PAGEに供し、この数値をアレルギー性タンパク質の残存率100%とした。

[0088] 図12は、実施例3、実施例4、比較例3、及び、比較例4のSDS-PAGE後の電気泳動像を示す図である。図12には、対照サンプルにおけるアレルギー性タンパク質の残存率に対する比例計算により算出したアレルギー性タンパク質の残存率を表示した。図12の(a)は、分子量マーカーの電気泳動像であり、図12の(b)は、対照サンプルの電気泳動像である。また、図13は、アレルギー性タンパク質の分解率の算出結果を示す図である。図13の(b)は、対照サンプルにおけるアレルギー性タンパク質の分解率を示すグラフである。対照サンプルにおけるアレルギー性タンパク質の分解率は、0%である。

[0089] [実施例3]

実施例3では、実施例1の配列番号5に示されるアミノ酸残基15個のリンカーペプチド(GGGGS)₃を介して融合された融合タンパク質を、上記の[3. 電極の製造方法]に記載の方法で、電極(図2のカソード電極1)表面に固定化した電極を作製し、当該電極を用いた。結果を図12の(c)に示す。図12の(c)は、実施例3の電気泳動像である。また、図13の(c)は、実施例3のアレルギー性タンパク質の分解率を示すグラフである。実施例3では、アレルギー性タンパク質の残存率は44%であり、分解率は56%であることが確認された。

[0090] [実施例4]

実施例1の配列番号4に示されるアミノ酸残基10個のリンカーペプチド(GGGGS)₂を介して融合された融合タンパク質を用いた点以外は、実施例3と同様に行った。結果を図12の(d)に示す。図12の(d)は、実施例4の電気泳動像である。また、図13の(d)は、実施例4のアレルギー性タンパク質の分解率を示すグラフである。実施例4では、アレルギー性タンパク質の残存率は42%であり、分解率は58%であることが確認され

た。

[0091] [比較例 3]

比較例 3 では、実施例 1 の配列番号 3 に示されるアミノ酸残基 5 個のリンカーペプチド (G G G G S)₁ を介して融合された融合タンパク質を用いた点以外は、実施例 3 と同様に行った。結果を図 12 の (e) に示す。図 12 の (e) は、比較例 3 の電気泳動像である。また、図 13 の (e) は、比較例 3 のアレルギー性タンパク質の分解率を示すグラフである。比較例 3 では、アレルギー性タンパク質の残存率は 71 % であり、分解率は 29 % であることが確認された。

[0092] [比較例 4]

比較例 4 では、普通の電極を用いた点、及び、試料にフェレドキシンーチオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンが個別に添加された点以外は、実施例 3 と同様に行った。結果を図 12 の (f) に示す。図 12 の (f) は、比較例 4 の電気泳動像である。また、図 13 の (f) は、比較例 4 のアレルギー性タンパク質の分解率を示すグラフである。比較例 4 では、アレルギー性タンパク質の残存率は 58 % であり、分解率は 42 % であることが確認された。

[0093] (結果)

実施例 2、実施例 3、実施例 4、及び、比較例 3 の結果 (図 11、図 12 参照) から、融合タンパク質中のリンカーペプチドは、アミノ酸残基が 5 個よりも多い方が、アレルギー性タンパク質の分解率が高くなることが確認された。このことは、当該リンカーペプチドで結合されているフェレドキシンーチオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンの自由度が高められるためであると考えられる。

[0094] また、実施例 3、実施例 4、比較例 3 及び比較例 4 の結果 (図 12、図 13 参照) から、アミノ酸残基が 5 個よりも多いリンカーペプチドを含む融合タンパク質を電極に固定化した方が、試料中にフェレドキシンーチオレドキシン還元酵素及びチオレドキシンを個別に添加するよりも、アレルギー性タ

ンパク質の分解率が高くなることが確認された。したがって、本開示に係る電極を用いることで、標的分子であるアレルゲン性タンパク質のジスルフィド結合を効率よく還元することができるため、アレルゲン性タンパク質を効率よく分解できることが確認された。

[0095] (他の実施の形態)

以上、本開示に係る酵素固定電極、酵素固定電極の製造方法、及び、標的分子の酸化還元方法について、実施の形態に基づいて説明したが、本開示は、これらの実施の形態に限定されるものではない。本開示の主旨を逸脱しない限り、当業者が思いつく各種変形を実施の形態に施したものや、実施の形態における一部の構成要素を組み合わせる構築される別の形態も、本開示の範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

[0096] 本開示は、例えば、連続的にアレルゲン性タンパク質を還元して不活性化させることが可能な融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、電極、酸化還元装置、酸化還元方法、ジスルフィド結合の切断方法、及び、アレルゲンの不活化方法として利用できる。

符号の説明

[0097] 1 カソード電極

2 参照極

3 対極

4 セル

5 蓋部

6 a 端子

6 b 端子

6 c 端子

7 a リード

7 b リード

7 c リード

- 8 攪拌子
- 9 試料
- 10 電圧印加部
- 11 ガラス基板
- 12 チタン蒸着層
- 13 カソード基板
- 14 反応層
- 20 電源
- 30 制御部
- 40 攪拌部
- 100 酸化還元装置

請求の範囲

- [請求項1] フェレドキシンーチオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとがリンカーペプチドを介して融合された融合タンパク質であって、
 前記リンカーペプチドは、グリシン（G）及びセリン（S）を含む、
 融合タンパク質。
- [請求項2] 前記リンカーペプチドは、5残基より多く50残基以下のアミノ酸配列からなる、
 請求項1に記載の融合タンパク質。
- [請求項3] 前記リンカーペプチドは、
 少なくとも1つのグリシンと少なくとも1つのセリンとを含み、
 さらに、（i） $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ （但し、Rは、水素基、又は、炭素数が1～4のアルキル基のいずれかである）、及び、（ii） $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ （但し、Rは、炭素数が1又は2のアルキル基中の少なくとも1つの水素基が水酸基に置換されている）の少なくともいずれかを含む、
 請求項1又は2に記載の融合タンパク質。
- [請求項4] 前記リンカーペプチドは、 $(\text{GGGGS})_n$ のアミノ酸配列を含み、
 nは、2以上の整数である、
 請求項1～3のいずれか1項に記載の融合タンパク質。
- [請求項5] グリシン（G）及びセリン（S）を含むリンカーペプチドを作成し、
 作成された前記リンカーペプチドを介してチオレドキシン還元酵素とチオレドキシンとを融合させる、
 融合タンパク質の製造方法。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の融合タンパク質が固定化された、

電極。

[請求項7]

請求項6に記載の電極と、
前記電極に電圧を印加する電源と、
を備え、
標的分子を酸化又は還元する、
酸化還元装置。

[請求項8]

請求項6に記載の電極を用い、標的分子を酸化又は還元する、
酸化還元方法。

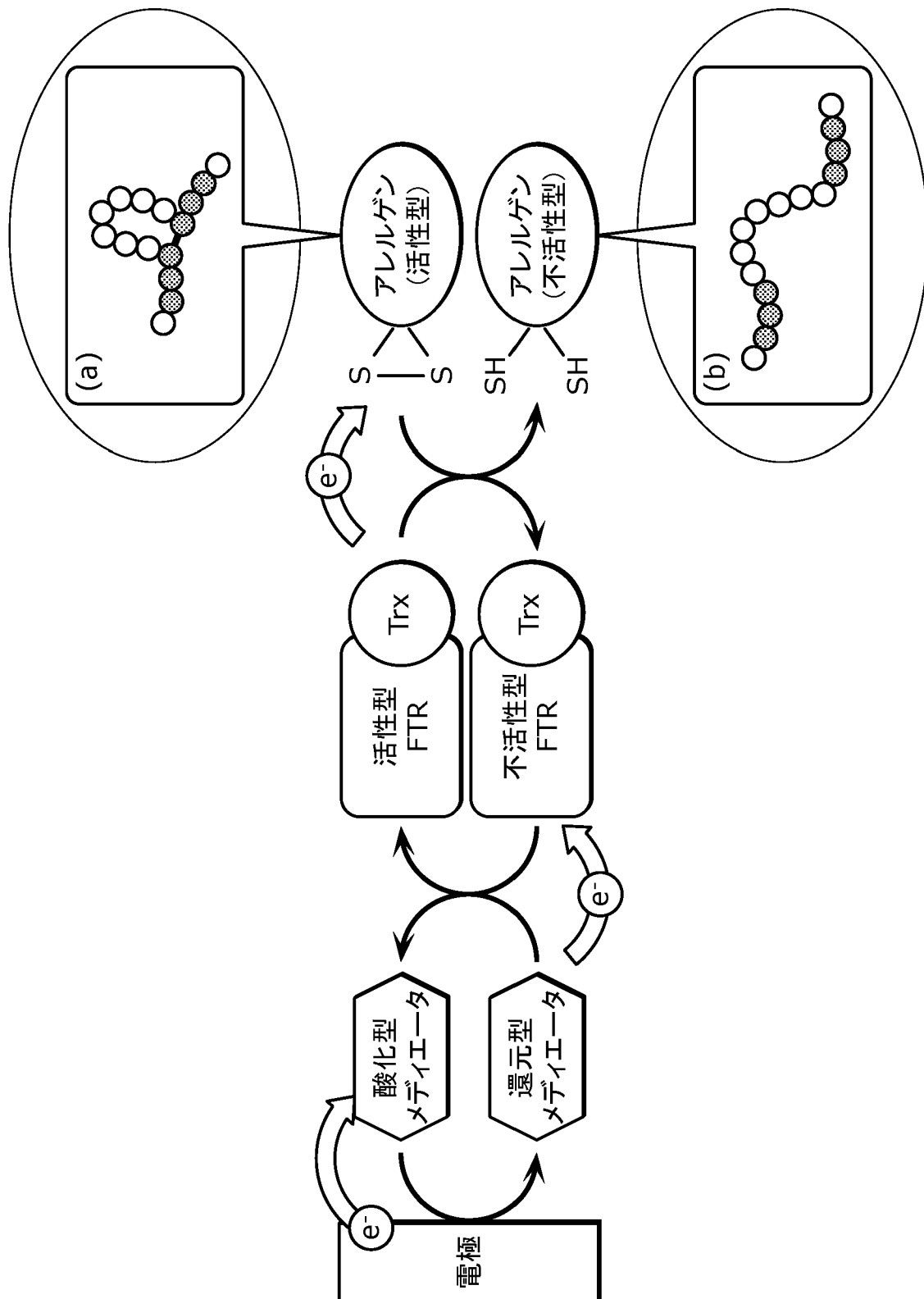
[請求項9]

請求項6に記載の電極を用い、標的分子であるタンパク質のジスル
フィド結合を切断する、
ジスルフィド結合の切断方法。

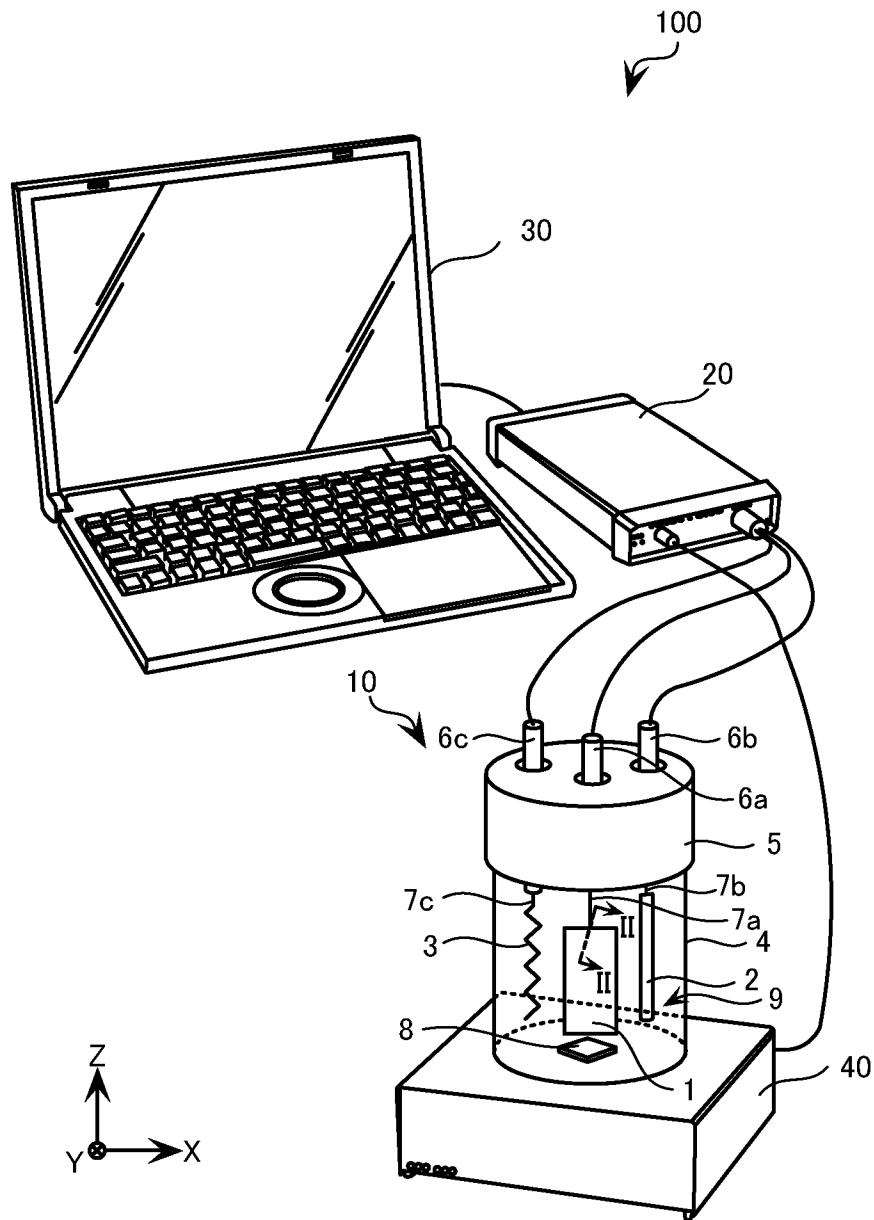
[請求項10]

請求項6に記載の電極を用い、標的分子であるアレルゲンを不活化
する、
アレルゲンの不活化方法。

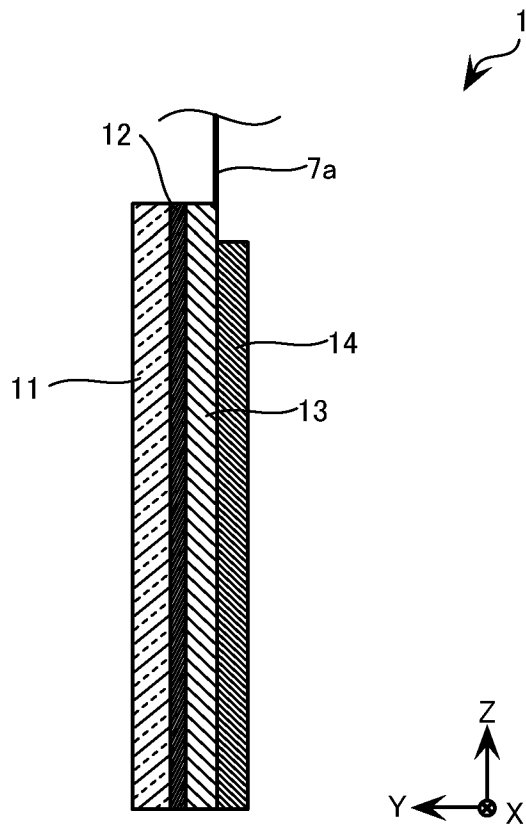
[図1]



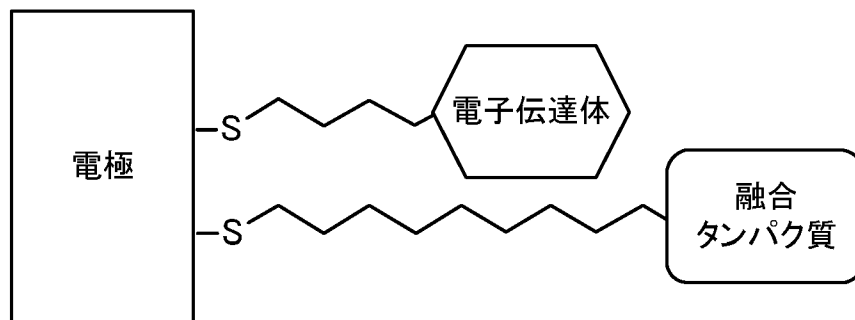
[図2]



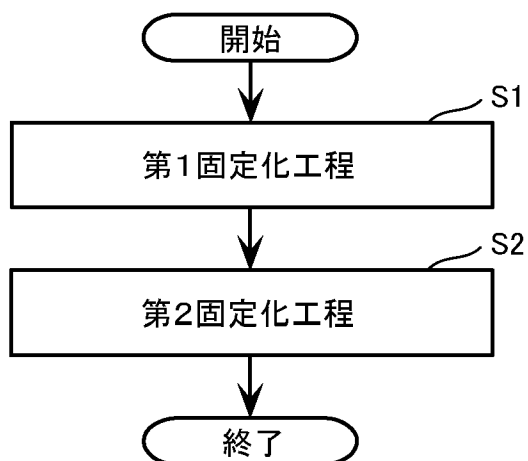
[図3]



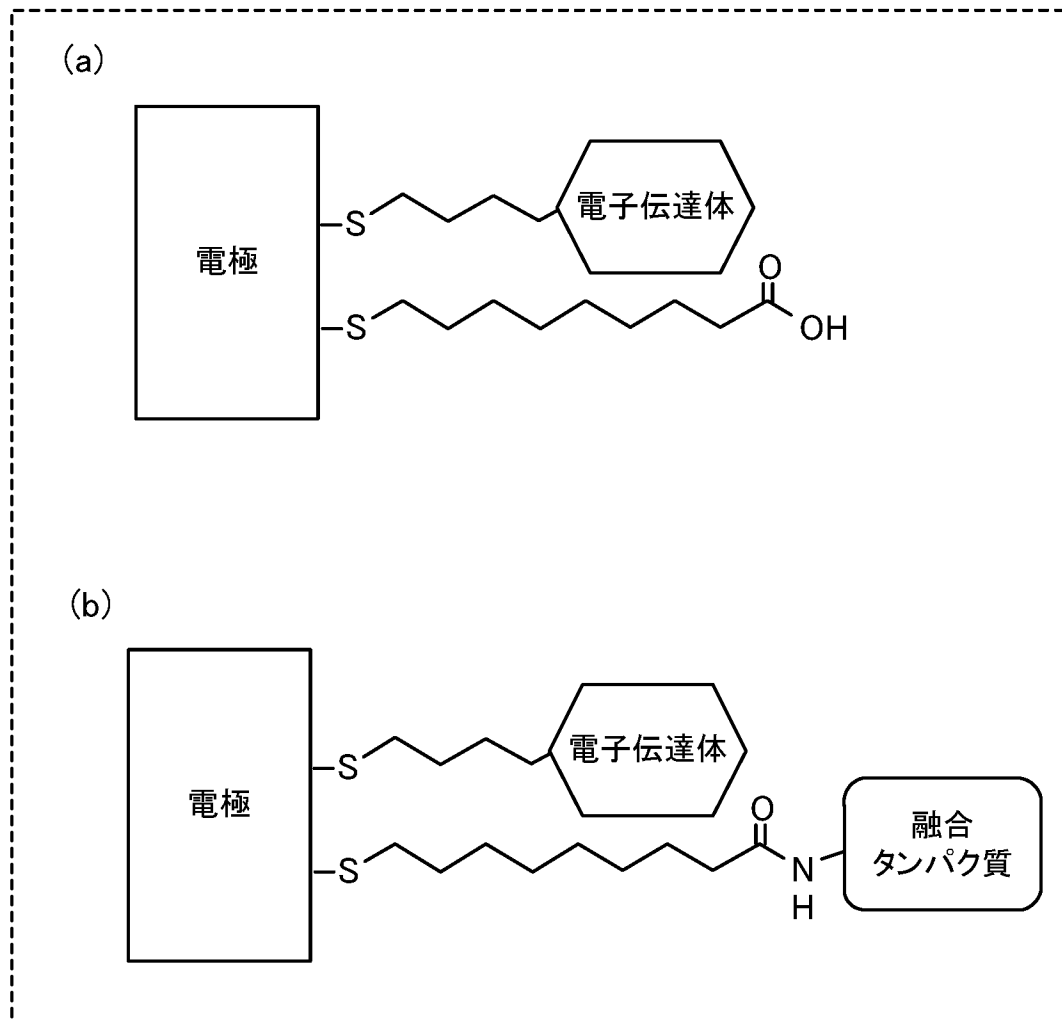
[図4]



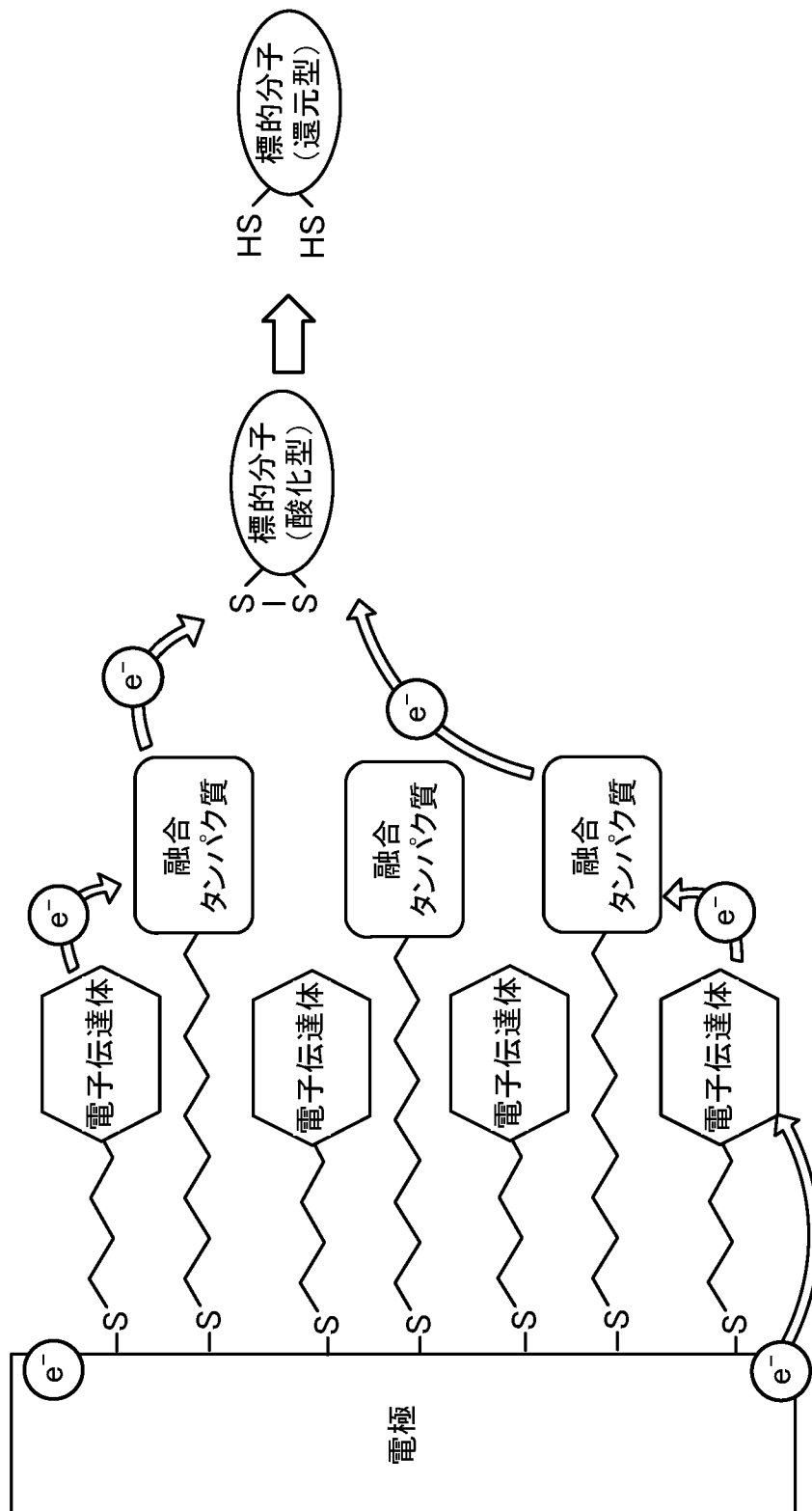
[図5]



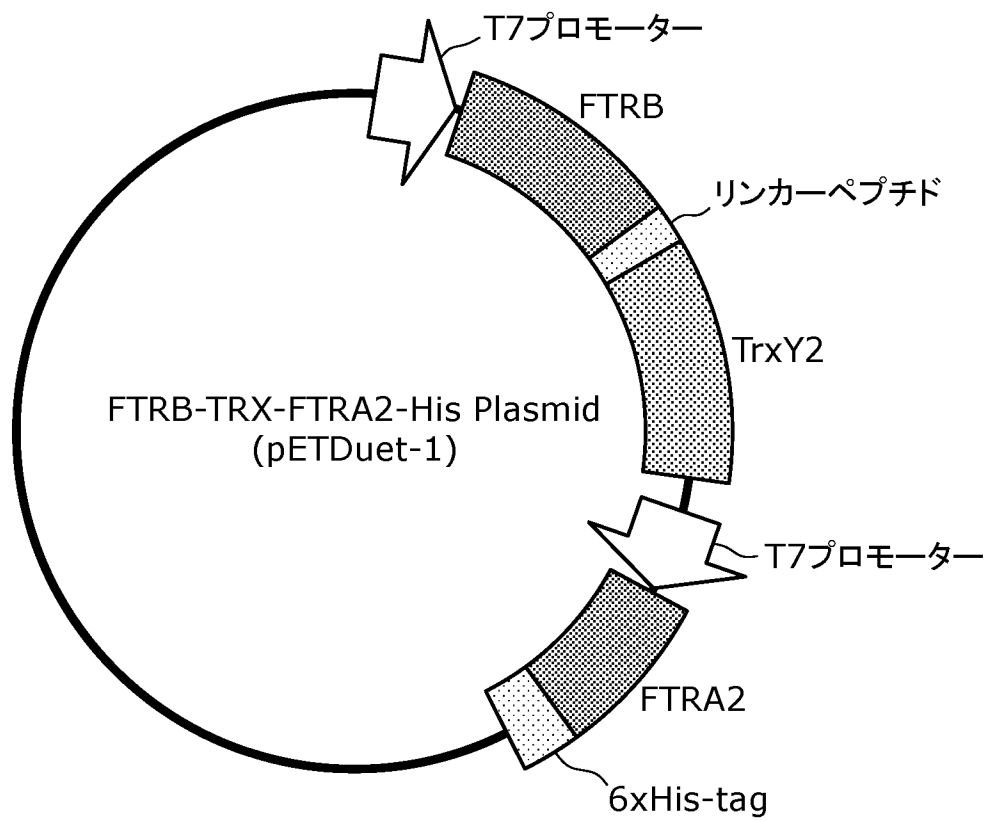
[図6]



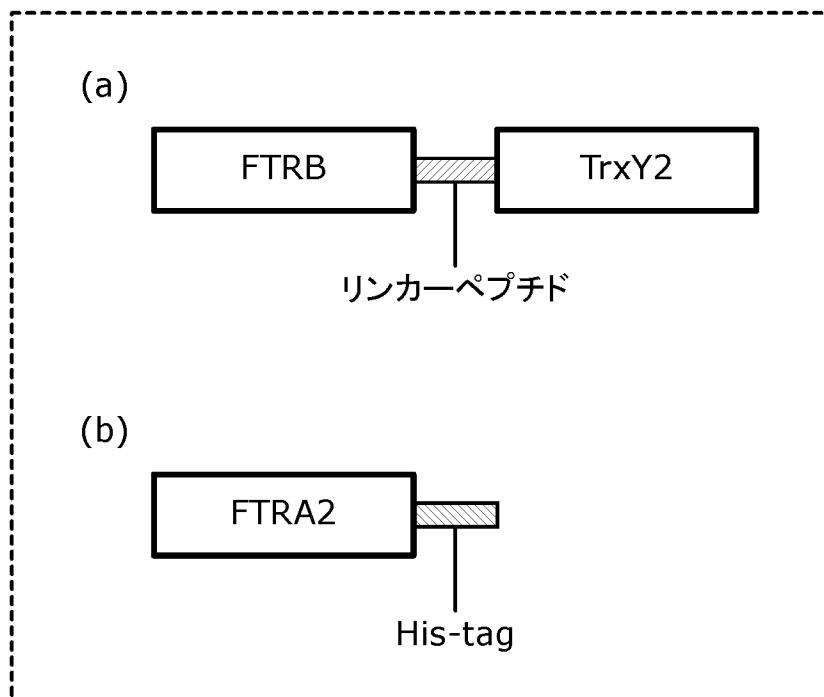
[図7]



[図8]



[図9]



[図10]

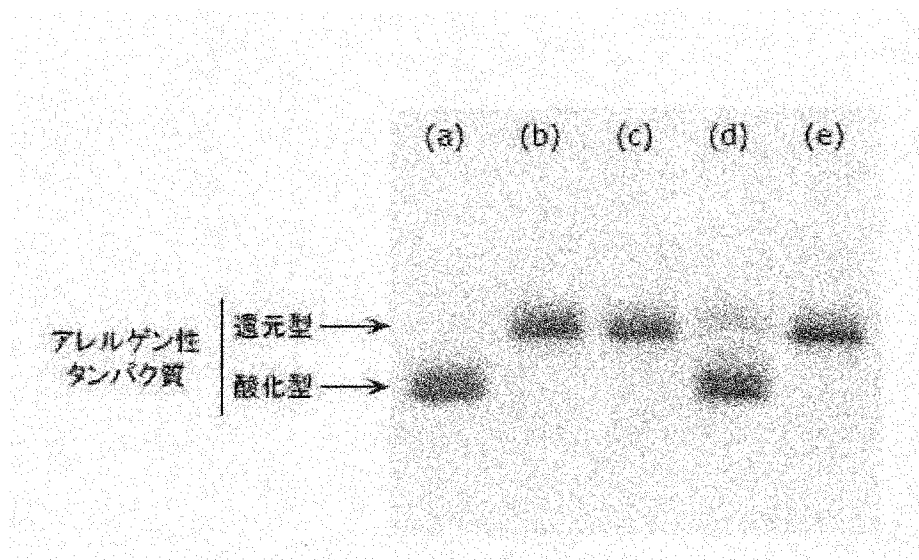
(a) 1 MAKTEPSEKS VEIMRKFSSEQ YARRSGTYFC VDKGVTSVVI KGLAEHKDSY
51 GAPLCPCRHY DDKAAEVGGG FWNCPCVPMR ERKECHCMFL LTPDNDFAGK
101 DQTI TSDEIK ETTANMGGG SGGGSGGGG SMAAKKQTFN SFDDL LQNSD
151 KPVLVDFYAT WCGPCQLMVP ILNEVSETLK DIIAVVKIDT EKYPSLANKY
201 QIEALPTFIL FKDGKLWDRF EGALPANQLV ERIENSLQVK Q

FTRB-TrxY2 融合タンパク質のアミノ酸配列

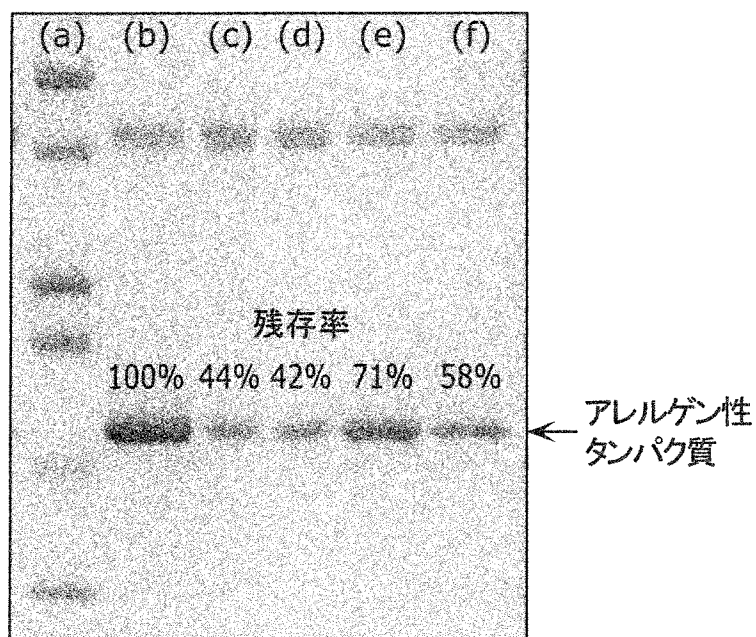
(b) 1 MDIAVKSAAS VDADADLSSS TSLETEEDEK AKEKIGARVR VTVPLKVYHV
51 VRVPEVELMG MEGFIKDYVV LWKGKKISAN LPFKVQFVKE IEGRGPVKFF
101 THLKEDEFEL IDPHHHHHH

FTRA2-His tag 融合タンパク質のアミノ酸配列

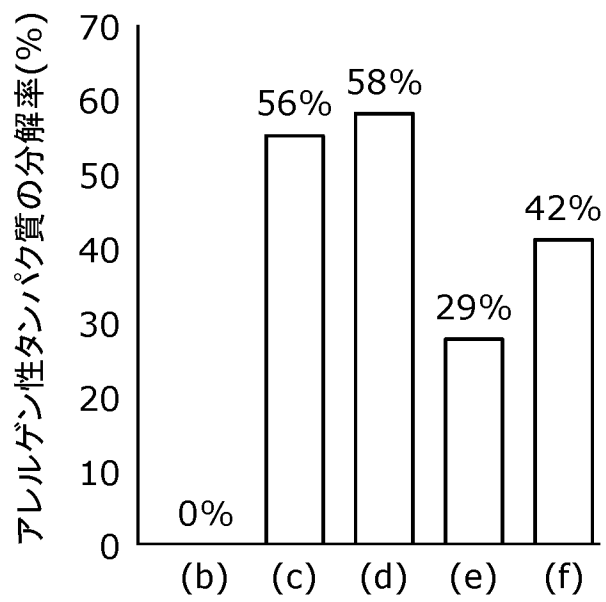
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/025134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; **C12N 15/62**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i; **C07K 14/415**(2006.01)i; **C07K 14/435**(2006.01)i
 FI: C12N9/02 ZNA; C07K19/00; C07K14/415; C07K14/435; C12N15/62 Z

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)

C07K19/00; C12N15/62; C12N9/02; C07K14/415; C07K14/435

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-505250 A (XENCOR, INC) 24 February 2005 (2005-02-24) claims, paragraphs [0024], [0055]-[0060], [0143]-[0149]	1-5
A	The whole document	6-10
A	JP 2009-002689 A (CANON INC) 08 January 2009 (2009-01-08) claim 1	1-10
A	JP 2007-240528 A (CANON INC) 20 September 2007 (2007-09-20) claims 1-7	1-10
A	JP 2004-527227 A (SEMBIOSYS GENETICS INC) 09 September 2004 (2004-09-09) The whole document	1-10
P, A	WO 2021/261511 A1 (PANASONIC IP MAN CO LTD) 30 December 2021 (2021-12-30) claims 1-17, paragraphs [0079]-[0080]	1-10
P, A	WO 2021/261509 A1 (PANASONIC IP MAN CO LTD) 30 December 2021 (2021-12-30) claims 1-18	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 September 2022

Date of mailing of the international search report

13 September 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/025134

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/025134

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2005-505250	A	24 February 2005	US 2003/0100743 A1 claims 24, 55-60, paragraphs [0216]-[0222] WO 2002/090300 A2 claims 24, 55-60, p. 35, line 24 to p. 36, line 34	
JP	2009-002689	A	08 January 2009	(Family: none)	
JP	2007-240528	A	20 September 2007	US 2007/0190590 A1 claims 1-7	
JP	2004-527227	A	09 September 2004	US 2003/0093832 A1 The whole document WO 2002/050289 A1 whole document CN 1486368 A The whole document KR 10-2003-0066732 A The whole document	
WO	2021/261511	A1	30 December 2021	(Family: none)	
WO	2021/261509	A1	30 December 2021	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i FI: C12N9/02 ZNA; C07K19/00; C07K14/415; C07K14/435; C12N15/62 Z		
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）） C07K19/00; C12N15/62; C12N9/02; C07K14/415; C07K14/435 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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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
X	JP 2005-505250 A (ゼンコー) 24.02.2005 (2005 - 02 - 24) Claims 24, 55-60, [0143]-[0149]	1-5
A	The whole document	6-10
A	JP 2009-002689 A (キャノン株式会社) 08.01.2009 (2009 - 01 - 08) Claim 1	1-10
A	JP 2007-240528 A (キャノン株式会社) 20.09.2007 (2007 - 09 - 20) Claims 1-7	1-10
A	JP 2004-527227 A (セムバイオシス ジェネティクス インコーポレイテッド) 09.09.2004 (2004 - 09 - 09) The whole document	1-10
P, A	WO 2021/261511 A1 (パナソニック IPマネジメント株式会社) 30.12.2021 (2021 - 12 - 30) Claims 1-17, [0079]-[0080]	1-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.09.2022		国際調査報告の発送日 13.09.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 幸田 俊希 4N 4671 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	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
P, A	WO 2021/261509 A1 (パナソニック I P マネジメント株式会社) 30, 12, 2021 (2021 - 12 - 30) Claims 1-18	1-10

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/025134

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2005-505250	A	24.02.2005	US 2003/0100743 A1 Claims 24, 55-60, [0216]- [0222] WO 2002/090300 A2 Claims 24, 55-60, p.35 line.24-p.36 line.34	
JP	2009-002689	A	08.01.2009	(ファミリーなし)	
JP	2007-240528	A	20.09.2007	US 2007/0190590 A1 Claims 1-7	
JP	2004-527227	A	09.09.2004	US 2003/0093832 A1 The whole document WO 2002/050289 A1 The whole document CN 1486368 A The whole document KR 10-2003-0066732 A The whole document	
WO	2021/261511	A1	30.12.2021	(ファミリーなし)	
WO	2021/261509	A1	30.12.2021	(ファミリーなし)	