





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

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

添付公開書類 :

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

---

protein would dissolve in a second aprotic polar solvent to which an inorganic salt has been added.

(57) 要約：目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞から、前記組換えタンパク質を精製する方法であって、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒に宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが前記組換えタンパク質が溶解しない条件で前記組換え細胞を処理し、第1の可溶性画分を除去した後、得られた第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に前記組換えタンパク質が溶解する条件で処理することを特徴とする、組換えタンパク質の精製方法を開示する。

## 明 細 書

### 発明の名称：組換えタンパク質の精製方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、組換えタンパク質を発現する組換え細胞から当該組換えタンパク質を精製する方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 目的とするタンパク質の工業規模での生産は、遺伝子組換え宿主細胞を利用して可能になっている。組換え細胞により生産された組換えタンパク質を単離、精製する方法も多数報告されている。

[0003] 不溶性の目的とするタンパク質を単離する方法としては、組換え細胞の懸濁液から水酸化ナトリウム等の金属水酸化物を利用する方法（特許文献1）、及びギ酸やプロピオン酸等の有機酸を利用する方法（特許文献2）等が報告されている。しかしながら、これらの方によって不溶性の目的とするタンパク質を単離する場合には、目的とするタンパク質とともに存在する不純物を除去することが難しいため、単離された目的とするタンパク質の純度が高くないという問題があった。また、有機酸を使用する方法では、酸に対して耐性がないタンパク質は分解され易いことから、単離可能なタンパク質が限定されるという問題があった。

[0004] 目的とするタンパク質とともに存在する不純物を除去でき、有機酸を使用しない方法として、ジメチルスルホキシド等の非プロトン性極性溶媒に溶解し、水等の溶媒を用いて不純物を除去し、目的とするタンパク質を精製する方法（特許文献3）等が報告されている。この方法によれば、約70%まで目的とするタンパク質を精製することができるが、目的とするタンパク質が、ハイドロパシーインデックス（H I）が0以下の親水性組換えタンパク質に限定されるという問題があった。また、不純物を除去するために添加する水等の水系溶媒の影響でタンパク質によってはゲル化してしまう虞もあった。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：特表2013-523665号公報

特許文献2：特表2004-503204号公報

特許文献3：国際公開第2014/103847号

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0006] 工業規模の生産においては、依然として、目的とする組換えタンパク質を簡便に高い純度で精製する方法が望まれている。そこで本発明は、目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞から、当該組換えタンパク質を簡便に高い純度で精製する方法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] 本発明者らは、鋭意検討した結果、非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが目的とする組換えタンパク質が溶解しない条件で組換え細胞を処理することにより、目的とする組換えタンパク質を溶解させる前に宿主細胞由来のタンパク質を除去することで、水等の水系溶媒を添加することなく、簡便に高い純度で目的とする組換えタンパク質を精製できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、例えば、以下の各発明に関する。

[1]

目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞から、上記組換えタンパク質を精製する方法であって、

無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒に宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で上記組換え細胞を処理し、第1の可溶性画分を除去した後、得られた第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に上記組換えタンパク質

が溶解する条件で処理することを特徴とする、組換えタンパク質の精製方法。

。

[2]

無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理した後、第2の不溶性画分を除去し、組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得ることをさらに含む、[1]に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[3]

第2の不溶性画分を除去して得られた第2の可溶性画分を上記組換えタンパク質の貧溶媒を用いて処理し、上記組換えタンパク質を凝集させ、精製した組換えタンパク質を凝集体として得ることをさらに含む、[2]に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[4]

以下(A)～(D)の工程を含む、組換えタンパク質の精製方法。

(A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

(B) 第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

(C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、

(D) 第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程

[5]

(E) 第2の可溶性画分を上記組換えタンパク質の貧溶媒を用いて処理し、上記組換えタンパク質を凝集させ、精製した組換えタンパク質を凝集体として回収する工程、をさらに含む、[4]に記載の組換えタンパク質の精製

方法。

[6]

上記条件が、温度条件であることを特徴とする、[1]～[5]のいずれかに記載の組換えタンパク質の精製方法。

[7]

上記第1又は第2の非プロトン性極性溶媒が、双極子モーメント3.0D以上である、[1]～[6]のいずれかに記載の組換えタンパク質の精製方法。

[8]

上記無機塩が、アルカリ金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属硝酸塩及びチオシアノ酸塩からなる群から選択される、[1]～[7]のいずれかに記載の組換えタンパク質の精製方法。

[9]

上記組換えタンパク質が構造タンパク質である、[1]～[8]のいずれかに記載の組換えタンパク質の精製方法。

[10]

上記構造タンパク質がコラーゲン、エラスチン、レシリン、カイコシルク及びスパイダーシルクからなる群から選択されるタンパク質に由来する、[9]に記載の精製方法。

[11]

以下(A)～(D)及び(F)の工程を含む、人造ポリペプチド繊維の製造方法。

(A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

(B) 第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

- (C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、
- (D) 第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程、
- (F) 第2の可溶性画分を糸状の液体として凝固液に付与し、上記組換えタンパク質を糸状に凝固させて回収することにより未延伸糸を得る工程

### [12]

以下(A)～(D)及び(G)の工程を含む、ポリペプチドフィルムの製造方法。

- (A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、
- (B) 第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、
- (C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、
- (D) 第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程、
- (G) 第2の非プロトン性極性溶媒に耐性のある平板上に、第2の可溶性画分を用いて所定の厚さの塗膜を形成させ、上記塗膜から第2の非プロトン性極性溶媒を除去することでポリペプチドフィルムを得る工程

### 発明の効果

[0009] 本発明の組換えタンパク質の精製方法は、複雑な工程を含まず、工程数も少ない簡便な方法であるにも関わらず、得られる精製した組換えタンパク質の純度が高く、さらなる精製工程を経ることなく、例えば紡糸やフィルムの形成等の製造にそのまま利用することができる。

また、本発明の組換えタンパク質の精製方法は、酸を添加する工程を要さ

ない。したがって、精製対象の組換えタンパク質が、酸に対して耐性のあるタンパク質に限定されない。

さらに、本発明の組換えタンパク質の精製方法は、組換えタンパク質を含む非プロトン性極性溶媒を水等の水系溶媒と置換する精製工程を要さない。

したがって、精製対象の組換えタンパク質が、ハイドロパシーインデックスが0以下の親水性の組換えタンパク質に限定されない。また、水系溶媒の影響による当該組換えタンパク質のゲル化の心配もない。また、非プロトン性極性溶媒に水等の水系溶媒を添加しないため、当該非プロトン性極性溶媒を回収して再利用することも可能である。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、実施例1で検討した、宿主細胞由来のタンパク質の除去に関する、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S – P A G E）による分析の結果を示す写真である。

[図2]図2は、実施例2で検討した、宿主細胞由来のタンパク質の除去に関する、遠心分離により得られた上清画分のS D S – P A G Eによる分析の結果を示す写真である。

[図3]図3は、実施例2で検討した、宿主細胞由来のタンパク質の除去に関する、遠心分離により得られた沈殿画分のS D S – P A G Eによる分析の結果を示す写真である。

[図4]図4は、実施例3で検討した、宿主細胞由来のタンパク質の除去に関する、遠心分離により得られた上清画分のS D S – P A G Eによる分析の結果を示す写真である。

[図5]図5は、実施例3で検討した、宿主細胞由来のタンパク質の除去に関する、遠心分離により得られた沈殿画分のS D S – P A G Eによる分析の結果を示す写真である。

[図6]図6は、実施例4で検討した、目的とするタンパク質の精製に関する、S D S – P A G Eによる分析の結果を示す写真である。

[図7]図7は、実施例5で検討した、目的とするタンパク質の精製に関する、

S D S – P A G E による分析の結果を示す写真である。

[図8]図8は、実施例6で検討した、目的とするタンパク質の精製に関する、S D S – P A G E による分析の結果を示す写真である。

[図9]図9は、実施例7で検討した、目的とするタンパク質の精製に関する、S D S – P A G E による分析の結果を示す写真である。

[図10]図10は、実施例8で検討した、精製タンパク質溶液を紡糸用のドープとして使用して糸を形成させたときの写真である。

[図11]図11は、実施例9で検討した、目的とするタンパク質のゲル化の状態を示す写真である。

[図12]図12は、実施例9で検討した、従来方法と本実施例の方法による目的とするタンパク質の精製に関する、S D S – P A G E による分析の結果を示す写真である。

### 発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0012] 一実施形態に係る組換えタンパク質の精製方法は、目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞から、上記組換えタンパク質を精製する方法であって、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒に宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で上記組換え細胞を処理し、第1の可溶性画分を除去した後、得られた第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理することを特徴とする。無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理した後、第2の不溶性画分を除去し、組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得ることをさらに含むことが好ましい。第2の不溶性画分を除去して得られた第2の可溶性画分を上記組換えタンパク質の貧溶媒を用いて処理し、上記組換えタンパク質を凝集させ、精製した組換えタンパク質を凝集体として得ることをさらに含むことが好ましい。

[0013] 一実施形態に係る組換えタンパク質の精製方法は、具体的には、以下（A）～（D）の工程を含むことを特徴とする：

- (A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、
- (B) 第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、
- (C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、
- (D) 第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程

[0014] (組換えタンパク質)

本実施形態に係る目的とする組換えタンパク質（以下、「組換えタンパク質」又は「目的とするタンパク質」ということもある。）としては、工業規模での製造が好ましい任意のタンパク質を挙げることができ、例えば、工業用に利用できるタンパク質、医療用に利用できるタンパク質、構造タンパク質等を挙げることができる。工業用又は医療用に利用できるタンパク質の具体例としては、酵素、制御タンパク質、受容体、ペプチドホルモン、サイトカイン、膜又は輸送タンパク質、予防接種に使用する抗原、ワクチン、抗原結合タンパク質、免疫刺激タンパク質、アレルゲン、完全長抗体又は抗体フラグメント若しくは誘導体を挙げができる。構造タンパク質の具体例としては、スパイダーシルク、カイコシルク、コラーゲン、エラスチン及びレシリン、並びにこれら由来のタンパク質等を挙げができる。

[0015] フィブロイン様タンパク質であるスパイダーシルクあるいはカイコシルク由来のタンパク質として、例えば、式1：[(A)nモチーフーR E P]<sub>m</sub>で表されるドメイン配列を含むタンパク質（ここで、式1中、(A)nモチーフは4～20アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A

) n モチーフ中の全アミノ酸残基数に対するアラニン残基数が 80 %以上である。REP は 10 ~ 200 アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。m は 8 ~ 300 の整数を示す。複数存在する (A) n モチーフは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。複数存在する REP は、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。) を挙げることができる。具体的には配列番号 1 (PRT468) ~ 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質等を挙げができる。PRT468 (配列番号 1) のハイドロパシーインデックスは、-0.59、PRT698 (配列番号 4) のハイドロパシーインデックスは 0.43 である。ハイドロパシーインデックスの値は国際公開第 2014/103846 号に記載の方法に従って算出した値である。

[0016] コラーゲン由来のタンパク質として、例えば、式 2 : [REP2] o で表されるドメイン配列を含むタンパク質 (ここで、o は 5 ~ 300 の整数を示す。REP2 は GIy-X-Y から構成されるアミノ酸配列を示し、X 及び Y は GIy 以外の任意のアミノ酸残基を示す。複数存在する REP2 は、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。) を挙げることができる。具体的には、配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質 (Collagen-type 4-Kai) を挙げができる。配列番号 5 で示されるアミノ酸配列は、NCBI データベースから入手したヒトのコラーゲンタイプ 4 の部分的な配列 (NCBI の Genbank のアクセッション番号 : CAA56335.1、GI : 3702452) のリピート部分及びモチーフに該当する 301 残基目から 540 残基目までのアミノ酸配列の N 末端に配列番号 8 で示されるアミノ酸配列 (His タグ配列及びヒンジ配列) が付加されたものである。Collagen-type 4-Kai のハイドロパシーインデックスは、-0.75 である。

[0017] レシリン由来のタンパク質として、例えば、式 3 : [REP3] p で表されるドメイン配列を含むタンパク質 (ここで、p は 4 ~ 300 の整数を示す。REP3 は Ser-J-J-Tyr-Gly-U-Pro から構

成されるアミノ酸配列を示す。Jは任意のアミノ酸残基を示し、特にA s p、S e r及びT h rからなる群から選ばれるアミノ酸残基であることが好ましい。Uは任意のアミノ酸残基を示し、特にP r o、A l a、T h r及びS e rからなる群から選ばれるアミノ酸残基であることが好ましい。複数存在するR E P 3は、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。)を挙げることができる。具体的には配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質を挙げることができる。配列番号6で示されるアミノ酸配列は、レシリン(N C B IのG e n b a n kのアクセッション番号N P \_ 6 1 1 1 5 7 . 1、G I : 2 4 6 5 4 2 4 3)のアミノ酸配列において、87残基目のT h rをS e rに置換し、かつ95残基目のA s nをA s pに置換した置換した配列の19残基目から321残基目までのアミノ酸配列のN末端に配列番号8で示されるアミノ酸配列(H i s タグ配列及びヒンジ配列)が付加されたものである。R e s i l i n - K a i (配列番号6)のハイドロパシーインデックスは、-1. 22である。

[0018] エラスチン由来のタンパク質として、例えば、N C B IのG e n b a n kのアクセッション番号A A C 9 8 3 9 5(ヒト)、I 4 7 0 7 6(ヒツジ)、N P 7 8 6 9 6 6(ウシ)等のアミノ酸配列を有するタンパク質を挙げることができる。具体的には配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質を挙げることができる。配列番号7で示されるアミノ酸配列は、N C B IのG e n b a n kのアクセッション番号A A C 9 8 3 9 5のアミノ酸配列の121残基目から390残基目までのアミノ酸配列のN末端に配列番号8で示されるアミノ酸配列(H i s タグ配列及びヒンジ配列)が付加されたものである。e l a s t i n H o m o s a p i e n s (配列番号7)のハイドロパシーインデックスは、0. 42である。

[0019] (組換え細胞)

本実施形態に係る組換え細胞は、組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞であり、遺伝子工学的手法を用いた一般的な方法を用いて取得できる。

- [0020] 組換え細胞は、例えば、目的とするタンパク質をコードする核酸配列と、当該核酸配列に作動可能に連結された 1 又は複数の調節配列とを有する発現ベクターで宿主（宿主細胞）を形質転換することにより得ることができる。
- [0021] 調節配列は、宿主における組換えタンパク質の発現を制御する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合配列、転写終結配列等）であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。発現ベクターの種類は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、フォスマミドベクター、人工染色体ベクター等、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。
- [0022] 宿主として、原核生物、並びに酵母、糸状真菌、昆虫細胞、動物細胞及び植物細胞等の真核生物のいずれも好適に用いることができる。例えば原核生物の好ましい例として、大腸菌、バチルス・ズブチリス、シュードモナス、コリネバクテリウム、ラクトコッカス等の細菌を挙げることができ、より好ましくは、大腸菌細胞を挙げることができる。
- [0023] 発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製が可能、又は宿主の染色体中への組込みが可能で、目的とするタンパク質をコードする核酸を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが好適に用いられる。
- [0024] 細菌等の原核生物を宿主として用いる場合は、本発明に係る発現ベクターは、原核生物細胞中で自立複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明に係る核酸配列及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子配列が含まれていてもよい。
- [0025] プロモーターとして、宿主細胞中で機能し、目的とするタンパク質を発現誘導可能な誘導性プロモーターを用いてもよい。誘導性プロモーターは、誘導物質（発現誘導剤）の存在、リプレッサー分子の非存在、又は温度、浸透圧若しくは pH 値の上昇若しくは低下等の物理的要因により、転写を制御できるプロモーターである。
- [0026] 細菌等の原核生物の宿主としては、エシェリヒア属、ブレビバチルス属、

セラチア属、バチルス属、ミクロバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属及びシュードモナス属等に属する微生物を挙げることができる。

- [0027] エシェリヒア属に属する微生物として、例えば、エシェリヒア・コリ BL21 (ノバジエン社)、エシェリヒア・コリ BL21 (DE3) (ライフテクノロジーズ社)、エシェリヒア・コリ BLR (DE3) (メルクミリポア社)、エシェリヒア・コリ DH1、エシェリヒア・コリ GI698、エシェリヒア・コリ HB101、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ K5 (ATCC 23506)、エシェリヒア・コリ KY3276、エシェリヒア・コリ MC1000、エシェリヒア・コリ MG1655 (ATCC 47076)、エシェリヒア・コリ No. 49、エシェリヒア・コリ Rosetta (DE3) (ノバジエン社)、エシェリヒア・コリ TB1、エシェリヒア・コリ Tuner (ノバジエン社)、エシェリヒア・コリ Tuner (DE3) (ノバジエン社)、エシェリヒア・コリ W1485、エシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) XL1-Blue、エシェリヒア・コリ XL2-Blue等を挙げることができる。

- [0028] ブレビバチルス属に属する微生物として、例えば、ブレビバチルス・アグリ、ブレビバチルス・ボルステレンシス、ブレビバチルス・セントロポラス、ブレビバチルス・フォルモサス、ブレビバチルス・インボカツス、ブレビバチルス・ラチロスポラス、ブレビバチルス・リムノフィルス、ブレビバチルス・パラブレビス、ブレビバチルス・レウスゼリ、ブレビバチルス・サーモルバー、ブレビバチルス・ブレビス47 (FERM BP-1223)、ブレビバチルス・ブレビス47K (FERM BP-2308)、ブレビバチルス・ブレビス47-5 (FERM BP-1664)、ブレビバチルス・ブレビス47-5Q (JCM8975)、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087)、ブレビバチルス・チョウシネ

ンシスHPD31-S (FERM BP-6623)、ブレビバチルス・チヨウシネンシスHPD31-OK (FERM BP-4573)、ブレビバチルス・チヨウシネンシスSP3株 (Takara社製) 等を挙げることができる。

[0029] セラチア属に属する微生物として、例えば、セラチア・リクエファシエンス (*Serratia liquefacience*) ATCC14460、セラチア・エントモフィラ (*Serratia entomophila*)、セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*)、セラチア・フォンティコーラ (*Serratia fonticola*)、セラチア・グリメシ (*Serratia grimesii*)、セラチア・プロテアマキュランス (*Serratia proteamaculans*)、セラチア・オドリフェラ (*Serratia odorifera*)、セラチア・プリムシカ (*Serratia plymuthica*)、セラチア・ルビダエ (*Serratia rubidaea*) 等を挙げができる。

[0030] バチルス属に属する微生物として、例えば、バチルス・サチラス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) 等を挙げができる。

[0031] ミクロバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354等を挙げができる。

[0032] ブレビバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020、ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14067) ATCC13826、ATCC14067、ブレビバクテリウム・インマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*) ATCC14068、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13869)

ATCC13665、ATCC13869、ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC14066、ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240、ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111、ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112等を挙げることができる。

[0033] コリネバクテリウム属に属する微生物として、例えば、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*) ATCC6871、ATCC6872、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14067、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511、コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020、ATCC13032、ATCC13060、コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990、コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERMBP-1539)、コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868等を挙げることができる。

[0034] シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物として、例えば、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・ブラシカセラム (*Pseudomonas brassicacearum*)、シュードモナス・フルバ (*Pseudomonas fulva*)、及びシュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) D-0110等を挙げることができる。

- [0035] 上記宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、又はGene, 17, 107 (1982) やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げることができる。
- [0036] ブレビバチルス属に属する微生物の形質転換は、例えば、Takahashiらの方法 (J. Bacteriol., 1983, 156: 1130-1134) や、Takagiらの方法 (Agric. Biol. Chem., 1989, 53: 3099-3100)、又はOkamotoらの方法 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61: 202-203) により実施することができる。
- [0037] 目的とするタンパク質をコードする核酸を導入するベクター(以下、単に「ベクター」という。)としては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK23.3-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)(Stratagene社製)、pTrs30[Escherichia coli JM109/pTrS30(FERM BP-5407)より調製]、pTrs32[Escherichia coli JM109/pTrS32(FERM BP-5408)より調製]、pGHA2[Escherichia coli IGHA2(FERM B-400)より調製、特開

昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製) 等を挙げることができる。

- [0038] 宿主としてEscherichia coliを用いる場合は、pUC18、pBluescriptII、pSupex、pET22b、pCold等を好適なベクターとして挙げることができる。
- [0039] ブレビバチルス属に属する微生物に好適なベクターの具体例として、枯草菌ベクターとして公知であるpUB110、又はpHY500 (特開平2-31682号公報)、pNY700 (特開平4-278091号公報)、pHY4831 (J. Bacteriol., 1987, 1239-1245)、pNU200 (鵜高重三、日本農芸化学会誌1987, 61:669-676)、pNU100 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 30:75-80)、pNU211 (J. Biotech em., 1992, 112:488-491)、pNU211R2L5 (特開平7-170984号公報)、pNH301 (Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58:525-531)、pNH326、pNH400 (J. Bacteriol., 1995, 177:745-749)、pHT210 (特開平6-133782号公報)、pHT110R2L5 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 42:358-363)、又は大腸菌とブレビバチルス属に属する微生物とのシャトルベクターであるpNCO2 (特開2002-238569号公報) 等を挙げることができる。
- [0040] 原核生物を宿主とした場合のプロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであれば制限されない。例えば、trpプロモーター (P<sub>trp</sub>)、

Iacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌又はファージ等に由来するプロモーターを挙げができる。またP<sub>trp</sub>を2つ直列させたプロモーター (P<sub>trp</sub> × 2) 、 tacプロモーター、IacT7プロモーター、Iet-Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。上記発現ベクターにおいて、上記核酸の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

[0041] 真核生物の宿主としては、例えば、酵母、糸状真菌（カビ等）及び昆虫細胞を挙げができる。

[0042] 酵母としては、例えば、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、トリコスporon (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、ヤロウイア属及びハンゼヌラ属等に属する酵母を挙げができる。より具体的には、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリベロマイセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クリベロマイセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、トリコスporon・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シワニオマイセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*)、シワニオマイセス・オシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、キャンディダ・ユーティリス (*Candida utilis*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)

*pastoris*) ピキア・アングスタ (*Pichia angusta*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・ポリモルファ (*Pichia polymorpha*)、ピキア・スチピチス (*Pichia stipitis*)、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等を挙げることができる。

[0043] 酵母を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターは通常、複製起点（宿主における増幅が必要である場合）及び大腸菌中でのベクターの増殖のための選抜マーカー、酵母における組換えタンパク質発現のためのプロモーター及びターミネーター、並びに酵母のための選抜マーカーを含むことが好ましい。

[0044] 発現ベクターが非組込みベクターの場合、さらに自己複製配列 (ARS) を含むことが好ましい。これにより細胞内における発現ベクターの安定性を向上させることができる (Myers, A. M., et al. (1986) *Gene* 45: 299–310)。

[0045] 酵母を宿主として用いる場合のベクターとしては、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、YIp、pHS19、pHS15、pA0804、pHIL301、pHIL-S1、pPIC9K、pPICZ $\alpha$ 、pGAPZ $\alpha$ 、pPICZ-B等を挙げることができる。

[0046] 酵母を宿主とした場合のプロモーターの具体例としては、酵母中で発現できるものであれば制限されない。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター、pGAPプロモーター、pGCW14プロモーター、AOX1プロモーター、MOXプロモーター等を挙げることができる。

- [0047] 酵母への発現ベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法（Methods Enzymol., 194, 182 (1990)）、スフェロプラスト法（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)）、酢酸リチウム法（J. Bacteriol., 153, 163 (1983)）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法等を挙げることができる。
- [0048] 糸状真菌としては、例えば、アクレモニウム（*Acremonium*）属、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、ウスチラーゴ（*Ustilago*）属、トリコデルマ（*Trichoderma*）属、ノイロスボラ（*Neurospora*）属、フザリウム（*Fusarium*）属、フミコーラ（*Humicola*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）属、マイセリオフトラ（*Mycelioiophthora*）属、ボトリティス（*Botrytis*）属、マグナポルサ（*Magnaporthe*）属、ムコア（*Mucor*）属、メタリチウム（*Metarrhizium*）属、モナスカス（*Monascus*）属、リゾpus（*Rhizophorus*）属、及びリゾムコア属に属する菌等を挙げることができる。
- [0049] 糸状真菌の具体例として、アクレモニウム・アラバメンゼ（*Acremonium alabamense*）、アクレモニウム・セルロリティカス（*Acremonium cellulolyticus*）、アスペルギルス・アクレアツス（アキュレータス）（*Aspergillus aculeatus*）、アスペルギルス・アワモリ（*Aspergillus awamori*）、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）、アスペルギルス・サケ（*Aspergillus sake*）、アスペルギルス・ゾジエ（ソーヤ）（*Aspergillus sojae*）、アスペルギルス・テュビゲンシス（*Aspergillus tubigensis*）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus nigerr*）、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nid*

ulans)、アスペルギルス・パラシチクス (*Aspergillus parasiticus*)、アスペルギルス・フィクム (フィキュウム) (*Aspergillus ficuum*)、アスペルギルス・フェニクス (*Aspergillus phoenicus*)、アスペルギルス・フォエチズス (フェチダス) (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・フラーブス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ヤポニクス (ジャポニカス) (*Aspergillus japonicus*)、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*)、トリコデルマ・ハージアヌム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderm a reseei*)、クリソスボリウム・ルクノエンス (*Chrysosporium lucknowense*)、サーモアスクス (*Thermoscus scus*)、スプロトリクム (*Sporotrichum*)、スプロトリクム・セルロフィルム (*Sporotrichum cellulophilum*)、タラロマイセス (*Talaromyces*)、チエラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、チラビア (*Thielavia*)、ノイロスボラ・クラザ (*Neurospora crassa*)、フザリウム・オキシスポーラス (*Fusarium oxysporus*)、フザリウム・グラミネルム (*Fusarium graminearum*)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*)、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ペニシリウム・クリゾゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・カマンベルティ (*Penicillium camemberti*)、ペニシリウム・カネセンス (*Penicillium canescens*)、ペニシリウム・エメリソニ (*Penicillium emersonii*)、ペニシリウム・フニクロスム (*Penicillium funiculosum*)、ペニシリウム・グリゼオロゼ

ウム (*Penicillium griseoroseum*)、ペニシリウム・パープロゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、ペニシリウム・ロケフォルチ (*Penicillium roqueforti*)、マイセリオフトラ・サーモフィルム (*Myceliophthora thermophilum*)、ムコア・アンビグス (*Mucor ambiguus*)、ムコア・シイルシネロイデス (*Mucor circinelloides*)、ムコア・フラギリス (*Mucor fragilis*)、ムコア・ヘマリス (*Mucor hiemalis*)、ムコア・イナエクイスポラス (*Mucor inaequisporus*)、ムコア・オブロンジエリプティカス (*Mucor oblongiellipticus*)、ムコア・ラセモサス (*Mucor racemosus*)、ムコア・レクルバス (*Mucor recurvus*)、ムコア・サトルニナス (*Mucor saturninus*)、ムコア・サブティリススミウス (*Mucor subtilissimus*)、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、ファネロケーテ・クリソスボリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、リゾムコア・ミーヘイ (*Rhizomucor miehei*)、リゾムコア・プシルス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾpus・アルビザス (*Rhizophorus arrhizus*) 等を挙げることができる。

[0050] 糸状真菌を宿主とした場合のプロモーターの具体例としては、解糖系に関する遺伝子、構成的発現に関する遺伝子、加水分解に関する酵素遺伝子等いずれであってもよく、具体的には *amyB*、*glcA*、*agdA*、*glcB*、*TEF1*、*xynF1tannase gene*、*No. 8AN*、*gpdA*、*pgkA*、*enoA*、*melO*、*sodM*、*catA*、*catB* 等を挙げることができる。

[0051] 糸状真菌への発現ベクターの導入は、従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、Cohenらの方法（塩化カルシウム法） [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)]、プロ

トプラス法 [Mol. Gen. Genet., 168: 111 (1979)]、コンピテント法 [J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)]、エレクトロポレーション法等を挙げることができる。

- [0052] 昆虫細胞として、例えば、鱗翅類の昆虫細胞が挙げられ、より具体的には、Sf9、及びSf21等のスピードプロテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 由来の昆虫細胞、並びに、High 5等のイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の昆虫細胞等を挙げることができる。
- [0053] 昆虫細胞を宿主として用いる場合のベクターとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアーリ・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等のバキュロウイルス (*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)) を挙げることができる。
- [0054] 昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、*Bio/Technology*, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。すなわち、組換え遺伝子導入ベクター及びバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルス(発現ベクター)を得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac1 (ともにInvitrogen社製) 等を挙げることができる。

- [0055] 組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターとバキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)）等を挙げることができる。
- [0056] 上記組換えベクターは、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。例えば、大腸菌においては、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。栄養要求性に関する遺伝子変異を相補できる劣性の選択マーカーも使用できる。酵母においては、選択マーカー遺伝子として、ジエネティシンに対する耐性遺伝子を用いることができ、栄養要求性に関する遺伝子変異を相補する遺伝子、LEU2、URA3、TRP1、HIS3等の選択マーカーも使用できる。糸状真菌においては、選択マーカー遺伝子として、niaD (Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 1795-1797 (1995))、argB (Enzyme Microbiol. Technol., 6, 386-389, (1984)), sC (Gene, 84, 329-334, (1989)), ptrA (Biosci Biotechnol. Biochem., 64, 1416-1421, (2000)), pyrG (Biochem Biophys Res Commun, 112, 284-289, (1983)), amdS (Gene, 26, 205-221, (1983))、オーレオバシジン耐性遺伝子 (Mol Gen Genet, 261, 290-296, (1999))、ベノミル耐性遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4869-4873, (1986)) 及びハイグロマイシン耐性遺伝子 (Gene, 57, 21-26, (1987)) からなる群より選ばれるマーカー遺伝子、ロイシン要求性相補遺伝子等を挙げることができる。また、宿主が栄養要求性変異株の場合には、選択マーカー遺伝子として当該栄養要求性を相補する野生型遺伝子を用い

ることもできる。

[0057] 上記発現ベクターで形質転換された宿主の選択は、上記核酸に選択的に結合するプローブを用いたラークハイブリダイゼーション及びコロニーハイブリダイゼーション等で行うことができる。当該プローブとしては、上記核酸の配列情報に基づき、PCR法によって増幅した部分DNA断片をラジオアイソトープ又はジゴキシゲニンで修飾したものを用いることができる。

[0058] (組換えタンパク質の生産)

組換えタンパク質は、上記発現ベクターで形質転換された宿主を培養培地中で培養することにより生産することができる。上記宿主を培養培地中で培養する方法は、宿主の培養に通常用いられる方法に従って行うことができる。

[0059] 上記宿主が、大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物である場合、培養培地として、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源及び無機塩類等を含有し、該宿主の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

[0060] 炭素源としては、該宿主が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、及びこれらを含有する糖蜜、デンプン及びデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸及びプロピオン酸等の有機酸、並びにエタノール及びプロパノール等のアルコール類を用いることができる。

[0061] 窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム及びリン酸アンモニウム等の無機酸又は有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、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、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物を用いることができる。

[0062] 無機塩としては、例えば、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、硫酸銅及び炭酸カルシウムを用いることができる。

[0063] 大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物の培養は、例えば、振盪培養又

は深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行うことができる。培養温度は、例えば、15～40°Cである。培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中の培養培地のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。培養培地のpHの調整は、無機酸、有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム及びアンモニア等を用いて行うことができる。

- [0064] また、培養中必要に応じて、アンピシリン及びテトラサイクリン等の抗生物質を培養培地に添加してもよい。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微生物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等を培地に添加してもよい。
- [0065] 昆虫細胞の培養培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（Pharmingen社製）、SF-900 II SFM培地（Life Technologies社製）、ExCell 1400、ExCell 1405（いずれもJRH Biosciences社製）、Grace's Insect Medium（Nature, 195, 788 (1962)）等を用いることができる。
- [0066] 昆虫細胞の培養は、例えば、培養培地のpH 6～7、培養温度25～30°C等の条件下で、培養時間1～5日間とすることができる。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培養培地に添加してもよい。
- [0067] 宿主が植物細胞の場合、形質転換された植物細胞をそのまま培養してもよく、また植物の器官に分化させて培養することができる。該植物細胞を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーレ（MS）培地、ホワイト（White）培地、又はこれらの培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。
- [0068] 動物細胞の培養は、例えば、培養培地のpH 5～9、培養温度20～40

℃等の条件下で、培養時間3～60日間とすることができる。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0069] 上記方法により目的とするタンパク質を、不溶体として宿主細胞内において発現させることができる。

[0070] [工程（A）]

工程（A）は、目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程である。

[0071] 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞に含まれる宿主細胞由来のタンパク質の一部は、無機塩を添加していない非プロトン性極性溶媒若しくは無機塩を添加した非プロトン性極性溶媒に効果的に溶解させることができる。第1の非プロトン性極性溶媒は、乾燥菌体等の乾燥させた組換え細胞に添加してもよく、組換え細胞の懸濁液等に添加してもよい。さらに宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが組換えタンパク質が溶解しない条件で処理することにより、宿主細胞由来のタンパク質が溶解して可溶性画分（第1の可溶性画分）に含まれ、組換えタンパク質が不溶性画分（第1の不溶性画分）に含まれることになる。後の工程（B）で第1の可溶性画分を除去することで、組換えタンパク質を宿主細胞由来のタンパク質から分離することができる。

[0072] 宿主細胞由来のタンパク質を除去するときの組換え細胞は無傷の細胞であっても、破壊処理等の処理を行った後の細胞であってもよい。また、既に簡単な精製処理を行った細胞を用いて、残存した宿主細胞由来のタンパク質を除去するために本発明の方法を適用することもできる。

[0073] （第1の非プロトン性極性溶媒）

第1の非プロトン性極性溶媒としては、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、1,3-ジメチル-

2-イミダゾリドン(DMI)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、アセトニトリル、アセトン、イソプロパノール、プロピレンカーボネート、ヘキサメチルフォスフォラミド、N-エチルピロリドン、ニトロベンゼン、フルフラール、 $\gamma$ -ブチロラクトン、エチレンスルファイト、スルホラン、スクシノニトリル、エチレンカーボネート等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。これら非プロトン性極性溶媒において、双極子モーメントが3.0D以上のものが好ましく、例えば、DMSO、NMP、DMI、DMF、DMA及びアセトニトリルが好ましく、DMSO、NMP、DMF及びDMAがより好ましい。

[0074] 非プロトン性極性溶媒の純度は、特に限定されず、本工程においては高純度である必要はないが、純度80%以上であることが好ましい。

[0075] 第1の非プロトン性極性溶媒として、1種類の非プロトン性極性溶媒を単独で用いても、2種類以上の非プロトン性極性溶媒を適宜混合して用いてもよい。

[0076] タンパク質等の極性を持った化合物を溶解する場合には極性の大きな溶媒が有効であり、双極子モーメントが3.0D以上の分子は極性が強いとされている。表1に、溶剤ハンドブック(講談社サイエンティフィック社、2007年)に基づく、有機化合物(有機溶剤)の双極子モーメントを記載する。

[0077] [表1]

| 有機溶剤 | 双極子モーメント(D) | 有機溶剤     | 双極子モーメント(D) |
|------|-------------|----------|-------------|
| DMSO | 4.30        | NMP(環状)  | 4.09        |
| DMI  | 4.05        | DMF      | 3.86        |
| DMA  | 3.72        | アセトニトリル  | 3.44        |
| アセトン | 2.69        | イソプロパノール | 1.68        |

[0078] 組換え細胞に添加する第1の非プロトン性極性溶媒の添加容量は、宿主細胞を溶解できる量であればよいが、例えば、組換え細胞乾燥重量(wt)に対して、非プロトン性極性溶媒(vol)/組換え細胞乾燥重量(wt)比として、10~100倍であってよく、12~50倍であってよく、20~

35倍であってよい。ここで、組換え細胞乾燥重量とは、例えば、宿主が細菌である場合には、乾燥させた細菌の菌体の重量を意味する。

[0079] (無機塩)

第1の非プロトン性極性溶媒に無機塩を添加することにより、宿主細胞由来のタンパク質がより溶解しやすくなる。

[0080] 第1の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩としては、アルカリ金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属硝酸塩、チオシアノ酸塩、過塩素酸塩等を挙げることができる。

[0081] アルカリ金属ハロゲン化物としては、例えば、臭化カリウム、臭化ナトリウム、臭化リチウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化リチウム、フッ化ナトリウム、フッ化カリウム、フッ化セシウム、ヨウ化カリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化リチウム等を挙げることができる。

[0082] アルカリ土類金属ハロゲン化物としては、例えば塩化カルシウム、塩化マグネシウム、臭化マグネシウム、臭化カルシウム、ヨウ化マグネシウム、ヨウ化カルシウム等を挙げることができる。

[0083] アルカリ土類金属硝酸塩としては、例えば、硝酸カルシウム、硝酸マグネシウム、硝酸ストロンチウム、硝酸バリウム等を挙げることができる。

[0084] チオシアノ酸塩としては、例えばチオシアノ酸ナトリウム、チオシアノ酸アンモニウム、(グアニジニウムチオシアナート)等を挙げることができる。

[0085] 過塩素酸塩としては、例えば過塩素酸アンモニウム、過塩素酸カリウム、過塩素酸カルシウム、過塩素酸銀、過塩素酸ナトリウム、過塩素酸マグネシウム等を挙げることができる。

[0086] これらの無機塩は、1種類を単独で用いてもよく、2種類以上を併用してもよい。

[0087] 好適な無機塩としてはアルカリ金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属ハロゲン化物が挙げられ、好適な無機塩の具体例としては、塩化リチウム、塩化カルシウム等を挙げることができる。

- [0088] 無機塩の添加量としては、使用する第1の非プロトン性極性溶媒に応じて最適量を決めればよいが、例えば第1の非プロトン性極性溶媒に対して0～1.0Mの無機塩を添加できる。例えば、無機塩の添加量の上限値は、0.7M、0.6M又は0.5Mであってよく、無機塩の添加量の下限値は、0.05M、0.1M又は0.2Mであってよい。
- [0089] 第1の非プロトン性極性溶媒としてDMSOを用いた場合には、無機塩の添加量は、0～0.7Mが好ましく、0～0.3Mがより好ましく、0～0.1Mがさらに好ましい。
- [0090] 第1の非プロトン性極性溶媒としてDMF、DMA、DMI、NMPを用いた場合には、無機塩の添加量は、0～0.7Mが好ましく、0～0.6Mがより好ましく、0～0.5Mがさらに好ましい。
- [0091] 第1の非プロトン性極性溶媒は、目的とするタンパク質の溶解を阻害する溶媒をさらに含むことができる。第1の非プロトン性極性溶媒に無機塩を添加することにより、宿主細胞由来のタンパク質がより溶解しやすくなるが、同時に目的とするタンパク質も溶解しやすくなる傾向がある。そこで、目的とするタンパク質の溶解を阻害する溶媒を第1の非プロトン性極性溶媒に添加することにより、目的とするタンパク質の溶解を防ぎつつ、効率的に宿主細胞由来のタンパク質を溶解させることができる。目的とするタンパク質の溶解を阻害する溶媒としては、環状構造を有する非プロトン性極性溶媒が好ましく、具体的には、環状ケトン類、含窒素複素環式化合物類、含酸素複素環式化合物類、含硫黄複素環式化合物類、並びに窒素、酸素及び硫黄のうち2種類以上の原子を持った複素環式化合物類等の溶媒を挙げができる。
- [0092] 環状ケトン類の溶媒としては、例えば、シクロヘキサン、シクロヘキセノン、イソホロン、シクロペニタノン及びシクロペンテノン等を挙げることができ、シクロヘキサン及びイソホロン等が好ましく、シクロヘキサンがより好ましい。
- [0093] 含窒素複素環式化合物類の溶媒としては、例えば、ピリジン、ピペリジン

、ピロリジン、ピコリン、キノリン、NMP、2-ピロリドン、N-エチル-2-ピロリドン及びDMI等を挙げることができ、ピリジン、NMP、2-ピロリドン及びDMIが好ましく、NMPがより好ましい。

[0094] 含酸素複素環式化合物類の溶媒としては、例えば、ジオキサン、テトラヒドロフラン、フルフラール、ジオキソラン、炭酸エチレン、炭酸プロピレン、 $\delta$ -バレロラクトン及び $\gamma$ -ブチロラクトン等を挙げることができ、テトラヒドロフラン、炭酸エチレン、炭酸プロピレン、 $\delta$ -バレロラクトン及び $\gamma$ -ブチロラクトンが好ましく、テトラヒドロフランがより好ましい。

[0095] 含硫黄複素環式化合物類の溶媒としては、例えば、スルホラン及びテトラヒドロチオフェン等が挙げられる。

[0096] 窒素、酸素及び硫黄のうち2種類以上の原子を持った複素環式化合物類の溶媒としては、モルホリン、N-メチルモルホリン、チアゾール、イソチアゾール、オキサゾール及びベンゾオキサゾール等が挙げられる。

[0097] 上記目的とするタンパク質の溶解を阻害する溶媒の第1の非プロトン性極性溶媒への添加量としては、添加する無機塩の量に応じて最適量を決めればよいが、例えば第1の非プロトン性極性溶媒に対して10～75% (v/o / v/o) であってよく、10～50%であってもよい。

[0098] 宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが組換えタンパク質が溶解しない条件は、第1の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩の濃度及び目的とする組換えタンパク質等に応じて適宜設定できるが、温度条件であることが好ましい。宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが、目的とする組換えタンパク質が溶解しない温度まで加温して、所定時間維持することが好ましい。

[0099] 溶解させるための温度は、第1の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩の濃度及び目的とする組換えタンパク質に応じて決めればよいが、例えば10～60°C及び10～40°Cの温度を挙げることができる。例えば、溶解させるための温度の上限値は、70°C、60°C、50°C又は40°Cであってよく、溶解させるための温度の下限値は10°C、20°C、25°C又は30°Cであってよい。

- [0100] 溶解させるための時間は、宿主細胞由来のタンパク質が十分溶解し、且つ目的とする組換えタンパク質の溶解が少ない時間であれば、特に限定する必要はないが、工業的生産を考慮すると、10～100分が好ましく、10～60分がより好ましく、10～30分がさらに好ましい。
- [0101] 目的とする組換えタンパク質がスパイダーシルク、カイコシルク、コラーゲン、エラスチン及びレシリン等の構造タンパク質である場合には、例えば、以下の条件を挙げることができる。
- [0102] 上記構造タンパク質を発現した宿主に添加する第1の非プロトン性極性溶媒の添加量は、組換え細胞乾燥重量（w<sub>t</sub>）当たり、非プロトン性極性溶媒（v<sub>o</sub>l）／組換え細胞乾燥重量（w<sub>t</sub>）比として、10～100倍が好ましく、12～50倍がより好ましく、20～35倍がさらに好ましい。第1の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩としては、塩化リチウム及び塩化カルシウムが好ましく、塩化リチウムがより好ましい。また、無機塩を添加する濃度は第1の非プロトン性極性溶媒に対して0～1.0M以下が好ましく、0～0.6M以下がより好ましく、0～0.5M以下がさらに好ましい。上記の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、例えば10～50℃、好ましくは10～40℃で処理することにより、宿主細胞を構成するタンパク質を溶解することができる。溶解するための時間としては例えば20～60分であってよく、20～40分が好ましく、20～30分がより好ましい。
- [0103] より具体的に、目的とする組換えタンパク質が配列番号1～4のように、式1：〔(A)<sub>n</sub>モチーフ-R E P〕<sub>m</sub>で表されるドメイン配列を含むタンパク質（ここで、式1中、(A)<sub>n</sub>モチーフは4～20アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A)<sub>n</sub>モチーフ中の全アミノ酸残基数に対するアラニン残基数が80%以上である。R E Pは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは8～300の整数を示す。複数存在する(A)<sub>n</sub>モチーフは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。複数存在するR E Pは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。）であった場合には、例えば、以下

の条件を挙げることができる。

[0104] 上記タンパク質を発現した宿主に添加する第1の非プロトン性極性溶媒の添加量は、組換え細胞乾燥重量（wt）当たり、非プロトン性極性溶媒（v○1）／組換え細胞乾燥重量（wt）比として、10～100倍が好ましく、12～50倍がより好ましく、20～35倍がさらに好ましい。第1の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩としては、塩化リチウム及び塩化カルシウムが好ましく、塩化リチウムがより好ましい。また、無機塩を添加する濃度は第1の非プロトン性極性溶媒に対して0～1.0M以下が好ましく、0～0.6M以下がより好ましく、0～0.5M以下がさらに好ましい。上記の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、例えば10～50℃、好ましくは10～40℃で処理することにより、宿主細胞を構成するタンパク質を溶解することができる。溶解するための時間としては例えば20～60分であってよく、20～40分が好ましく、20～30分がより好ましい。

[0105] [工程（B）]

工程（B）は、第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程である。

[0106] 工程（A）で得られた溶液から、宿主細胞由来のタンパク質が溶解した第1の可溶性画分を除去することで、宿主細胞由来のタンパク質を除去することができる。第1の可溶性画分と第1の不溶性画分を分離し、宿主細胞由来のタンパク質が溶解した第1の可溶性画分を除去し、目的とする組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する方法としては、遠心分離、ドラムフィルターやプレスフィルター等のフィルターろ過等、一般的な方法が挙げられる。フィルターろ過による場合、セライト、珪藻土等のろ過助剤及びプリコート剤等を併用することにより、目的とする組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分をより効率的に回収することができる。

[0107] この方法によれば、水等の水系溶媒を添加することなく、簡便な方法により可溶性画分と不溶性画分を分離することで、宿主細胞由来のタンパク質を除去できる。水系溶媒を添加しないため、使用した第1の非プロトン性極性

溶媒は精製して、再度工程（A）に利用することが可能であり、経済的である。

[0108] [工程（C）]

工程（C）は、回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程である。

[0109] 工程（B）において回収した第1の不溶性画分に含まれる目的とする組換えタンパク質は、無機塩を添加した非プロトン性極性溶媒（第2の非プロトン性極性溶媒）を用いて効果的に溶解することができる。第2の非プロトン性極性溶媒を第1の不溶性画分に添加し、当該組換えタンパク質が溶解する条件で処理することにより、当該組換えタンパク質が溶解して可溶性画分（第2の可溶性画分）に含まれ、不溶性の夾雑物が不溶性画分（第2の不溶性画分）に含まれることになる。後の工程（D）で第2の不溶性画分を除去することで夾雑物を除去することができる。

[0110] 第2の非プロトン性極性溶媒としては、上記工程（A）で記載した非プロトン性極性溶媒を用いることができるが、環状構造を有しない非プロトン性極性溶媒であることが好ましく、環状構造を有しない非プロトン性極性溶媒であって双極子モーメントが3. 5 D以上のものがより好ましい。

[0111] 第2の非プロトン性極性溶媒として、工程（A）で用いた第1の非プロトン性極性溶媒と同じ非プロトン性極性溶媒を用いてもよく、第1の非プロトン性極性溶媒と異なる非プロトン性極性溶媒を用いてもよい。

[0112] 第2の非プロトン性極性溶媒の好ましい具体例として、DMSO、DMF、DMA、DM1及びNMPが挙げられ、より好ましい具体例としてDMSO、DMF及びDMAが挙げられる。

[0113] 第2の非プロトン性極性溶媒の純度は、特に限定されないが、夾雑物を低減するという観点から、90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましい。

[0114] 第2の非プロトン性極性溶媒として、1種類の非プロトン性極性溶媒を単

独で用いても、2種類以上の非プロトン性極性溶媒を適宜混合して用いてよい。

- [0115] 目的とする組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分に添加する第2の非プロトン性極性溶媒の添加容量は、非プロトン性極性溶媒（v o l）／組換え細胞乾燥重量（wt）比として、5～50倍が好ましく、6～25倍がより好ましく、8～16倍がさらに好ましい。
- [0116] 第2の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩としては、上記工程（A）で記載した無機塩を用いることができる。工程（A）で無機塩添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いた場合には、その無機塩と同じ種類の無機塩を、第2の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩として用いてもよく、その無機塩とは異なる無機塩を用いてもよい。
- [0117] 第2の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩として、1種類の無機塩を単独で用いても、2種類以上の無機塩を併用してもよい。
- [0118] 第2の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩として、好適にはアルカリ金属ハロゲン化物及びアルカリ土類金属ハロゲン化物が挙げられ、具体的な好適例としては、塩化リチウム及び塩化カルシウム等を挙げることができる。
- [0119] 第2の非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩の添加量としては、使用する第2の非プロトン性極性溶媒により最適量を決めればよく、例えば、第2の非プロトン性極性溶媒に対して0.01～2.0Mの無機塩を添加することができる。
- [0120] 第2の非プロトン性極性溶媒としてDMSOを用いた場合には、無機塩の添加量は、0.01～1.5Mが好ましく、0.5～1.5Mがより好ましく、1～1.5Mがさらに好ましい。
- [0121] 第2の非プロトン性極性溶媒としてDMF、DMA、DMI、NMPを用いた場合には、無機塩の添加量は、0.01～2.0Mが好ましく、0.5～2.0Mがより好ましく、1.0～2.0Mがさらに好ましい。
- [0122] 組換えタンパク質が溶解する条件は、第2の非プロトン性極性溶媒に添加

する無機塩の濃度及び目的とする組換えタンパク質等に応じて適宜設定できるが、温度条件であることが好ましい。組換えタンパク質が溶解する温度まで加温して、所定時間維持することが好ましい。加温することにより目的とする組換えタンパク質を効率よく溶解させることができる。

[0123] 溶解させるための温度は、添加する無機塩の濃度及び目的とする組換えタンパク質に応じて決めればよいが、例えば10～90℃、好ましくは30～85℃、より好ましくは40～80℃を挙げができる。例えば、溶解させるため温度の上限値は、100℃、90℃、85℃又は80℃であってよく、溶解させるため温度の下限値は、50℃、60℃、65℃又は70℃であってよい。

[0124] 溶解させるための時間は、目的とする組換えタンパク質が十分溶解する時間であれば特に限定する必要はないが、工業的生産性及び収率を考慮すると、20～80分が好ましく、20～70分がより好ましく、20～60分がさらに好ましい。

[0125] [工程 (D) ]

工程 (D) は、第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程である。

[0126] 工程 (C) で得られた溶液から、不溶性の夾雑物を含む第2の不溶性画分を除去することで、夾雑物を除去することができる。第2の可溶性画分と第2の不溶性画分を分離し、不溶性の夾雑物を含む第2の不溶性画分を除去し、目的とする組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を回収する方法としては、遠心分離、ドラムフィルターやプレスフィルター等のフィルターろ過等、一般的な方法が挙げられる。フィルターろ過による場合、セライト、珪藻土等のろ過助剤及びプリコート剤等を併用することにより、目的とする組換えタンパク質の溶解した第2の可溶性画分をより効率的に回収することができる。

[0127] [工程 (E) ]

本精製方法は、さらに、第2の可溶性画分を上記組換えタンパク質の貧溶

媒を用いて処理し、上記組換えタンパク質を凝集させ、精製した組換えタンパク質を凝集体として回収する工程（E）を含むことができる。

- [0128] 上記工程（D）で得られた目的とする組換えタンパク質が溶解した第2の可溶性画分に、当該組換えタンパク質が溶解しにくい溶媒（貧溶媒）を添加し、当該組換えタンパク質を凝集（貧溶媒添加凝集）させ、凝集体として回収することにより、さらに精製純度の高い組換えタンパク質を得ることができる。
- [0129] 貧溶媒としては、目的とする組換えタンパク質が第2の非プロトン性極性溶媒に溶解しにくくなるような溶媒が好ましい。例えば、エステル類、ケトン類、アルコール類、ニトリル類、エーテル類及び芳香族炭化水素類の貧溶媒を挙げることができる。
- [0130] エステル類の貧溶媒としては、例えば、酢酸エチル、酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、酢酸オクチル、ギ酸エチル、酪酸エチル、カプロン酸エチル、酢酸2-エトキシエチル、酪酸メチル及びサリチル酸メチル等を挙げることができ、酢酸エチル、ギ酸エチル、酪酸エチル及び酢酸2-エトキシエチルが好ましく、酢酸エチル及び酢酸2-エトキシエチルがより好ましい。
- [0131] ケトン類の貧溶媒としては、例えば、アセトン、メチルエチルケトン、メチルブチルケトン及びメチルイソブチルケトン等を挙げることができ、アセトン及びメチルエチルケトンが好ましく、アセトンがより好ましい。
- [0132] アルコール類の貧溶媒としては、飽和のものが好ましく、炭素数1～5の1価アルコール、炭素数2～5の2価アルコール及び炭素数3の3価アルコールがより好ましい。
- [0133] 具体的には、1価のアルコールとしては、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、1-ペントノール、2-ペントノール及び3-ペントノール等を挙げができる。2価のアルコールとしては、1、2-エタジオール、1、2-プロパンジオール、1、3-プロパンジオール、1、2-ブタンジオール、1、3-ブタンジオール、1、4-ブタンジオール、2-

、3-ブタンジオール及び1、5-ペンタンジオール等を挙げることができ  
る。3価のアルコールとしては、グリセリン等を挙げることができる。

- [0134] ニトリル類の貧溶媒としては、飽和のものが好ましく、炭素数2～8、特  
に炭素数2～6がより好ましく、炭素数2～4のものがさらに好ましい。具  
体的には、アセトニトリル、プロピオニトリル、スクシノニトリル、ブチロ  
ニトリル及びイソブチロニトリル等を挙げができる。
- [0135] エーテル類の貧溶媒としては、飽和のものが好ましく用いられる。具体  
には、ジエチルエーテル、メチルテルブチルエーテル、アニソール、  
ジオキサン及びテトラヒドロフラン等を挙げができる。
- [0136] 芳香族炭化水素類の貧溶媒としては、ベンゼン及びトルエン等を挙げるこ  
とができ、トルエンが好ましい。
- [0137] 第2の可溶性画分に添加する貧溶媒の添加量としては、目的とする組換え  
タンパク質に応じて適時決めればよいが、通常、当該タンパク質の溶解して  
いる第2の可溶性画分と同量を添加すればよい。当該タンパク質の凝集の状  
況及び宿主細胞由来のタンパク質の混入の存在等に応じて添加量を適宜調整  
すればよい。
- [0138] 凝集させた目的とする組換えタンパク質を凝集体として回収する方法とし  
ては、遠心分離、ドラムフィルターやプレスフィルター等のフィルターろ過  
等、一般的な方法が挙げられる。フィルターろ過による場合、セライト、珪  
藻土等のろ過助剤及びプリコート剤等を併用することにより、より効率的に  
目的とする組換えタンパク質を凝集体として回収することができる。
- [0139] この方法によれば、水等の水系溶媒を添加することなく、目的とする組換  
えタンパク質を精製できる。したがって、凝集体として当該組換えタンパク  
質を回収した後に、使用した第2の非プロトン性極性溶媒を精製して、再度  
利用することが可能であり、経済的である。
- [0140] [人造ポリペプチド繊維の製造方法]  
目的とする組換えタンパク質が、ポリペプチド繊維の製造を目的として生  
産させた構造タンパク質、例えば、スパイダーシルク、カイコシルク等由來

のタンパク質の場合、工程（D）で得られた組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を、ポリペプチド繊維の製造にそのまま用いることができる。ここで、そのまま用いるとは、さらなる精製工程を必要としないことを意味する。これは、工程（D）で得られた第2の可溶性画分に含まれる精製された組換えタンパク質の純度が紡糸に用いるのに十分高いことを示している。工程（A）～（D）の後、紡糸工程を行うことにより、湿式紡糸により人造ポリペプチド繊維を製造することができる。

[0141] すなわち一実施形態に係る人造ポリペプチド繊維の製造方法は、以下（A）～（D）及び（F）の工程を含むことを特徴とする：

（A）目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

（B）第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

（C）回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、

（D）第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程、

（F）第2の可溶性画分を糸状の液体として凝固液に付与し、上記組換えタンパク質を糸状に凝固させて回収することにより未延伸糸を得る工程

[0142] 工程（A）～（D）については、上述した通りである。工程（F）は、第2の可溶性画分を糸状の液体として凝固液に付与し、上記組換えタンパク質を糸状に凝固させて回収することにより未延伸糸を得る工程である。

[0143] 工程（D）で得られた組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を凝固液に付与すると、組換えタンパク質が凝固する。この際、第2の可溶性画分を糸状の液体として凝固液に付与することで、組換えタンパク質が糸状に凝固し、糸（未延伸糸）が形成できる。未延伸糸の形成は、例えば特許第558

4932号に記載されている方法に準じて行うことができる。

- [0144] (1) ポリペプチドの溶液（ドープ液）の調製 上述したように、工程（D）で得られた組換えタンパク質が溶解した第2の可溶性画分は、さらなる精製工程を必要とせず、いわゆるドープ液として工程（E）の紡糸に用いることができる。紡糸に適した粘度は一般に10～10,000cP（センチポイズ）であり、粘度は、例えば京都電子工業社製の商品名“EMS粘度計”を使用して測定できる。工程（D）で得られた第2の可溶性画分の粘度が、10～10,000cP（センチポイズ）の範囲内にない場合には紡糸できる粘度に第2の可溶性画分の粘度を調整してもよい。粘度の調整には、工程（A）の説明において好適な溶媒として例示した非プロトン性極性溶媒を用いることができる。非プロトン性極性溶媒は工程（A）の説明において例示した好適な無機塩を含んでいてもよい。
- [0145] ドープ液として用いるために、粘度を調整する際に非プロトン性極性溶媒に添加する無機塩の濃度は、精製を目的とした場合より高くしてもよい。例えば、無機塩を、ドープ液に対して0.5～2.0Mとなるように添加してもよい。
- [0146] 第2の可溶性画分が、実際にドープ液として工程（E）における紡糸に、そのまま用いることが可能かについては、例えば以下の簡易法により確認することができる。即ち、内径0.1mmの針を持ったシリンジに当該第2の可溶性画分を適当量入れ、300mLビーカー中のメタノール（凝固液に相当）に、針の先端をつけ、押し出す。組換えタンパク質がメタノール中で糸として凝固し、ピンセットで糸としてメタノールから取り出しができる場合には、当該第2の可溶性画分はドープ液として紡糸に用いることができる。糸が形成されない場合は、粘度及び無機塩濃度等を見直し、微調整することによりドープ液として用いることができる。

- [0147] (2) ポリペプチドの溶液を用いたポリペプチドの重合

上記（1）で調製したポリペプチドの溶液（ドープ液）を100℃以上に加熱する。当該加熱によりポリペプチド同士の脱水縮合が起こり、重合する

。公知の脱水縮合触媒を併用することで、重合効率を飛躍的に高めることもできる。当該重合反応を行なったドープ液は、必要に応じてエチルアルコール、メチルアルコール又は水等を加えて希釈し、湿式紡糸の作製に用いることができる。

[0148] (3) 湿式紡糸－延伸

(a) 湿式紡糸

加熱後の第2の可溶性画分（ドープ液）を、糸状の流体として凝固液に付与する。湿式紡糸に使用する凝固液は、脱溶媒できる溶液であればどのようなものでもよい。溶媒を脱離し、纖維形成させるための凝固液はメタノール、エタノール、2-プロパノールなどの炭素数1～5の低級アルコール又はアセトンを使用するのが好ましい。適宜水を加えてもよい。凝固液の温度は紡糸の安定性の観点から、5～30°Cが好ましい。

[0149] 第2の可溶性画分（ドープ液）を糸状の流体として付与する方法は、特に制限されないが、例えば紡糸用の口金から脱溶媒槽の凝固液に押し出す方法があげられる。組換えタンパク質が凝固することにより未延伸糸が得られる。第2の可溶性画分を凝固液に押し出す場合の押し出し速度は、口金の直径及び第2の可溶性画分の粘度等に応じて適宜設定できるが、例えば、直径0.1～0.6mmのノズルを有するシリンジポンプの場合、紡糸の安定性の観点から、押し出し速度は1ホール当たり、0.2～6.0mL/hが好ましく、1ホール当たり、1.4～4.0mL/hがより好ましい。凝固液を入れる脱溶媒槽（凝固液槽）の長さは特に限定されないが、例えば長さは200～500mmであってよい。組換えタンパク質の凝固により形成された未延伸糸の引き取り速度は例えば1～14m/min、滞留時間は例えば0.01～0.15minであってよい。未延伸糸の引き取り速度は、脱溶媒の効率の観点から、1～3m/minが好ましい。組換えタンパク質の凝固により形成された未延伸糸は、さらに凝固液において延伸（前延伸）をしてもよいが、凝固液に用いる低級アルコールの蒸発を抑える観点から、凝固液を低温に維持し、未延伸糸の状態で凝固液から引き取るのが好ましい。

## [0150] (b) 延伸

本実施形態に係る人造ポリペプチド繊維の製造方法は、工程（E）で得られた未延伸糸を、さらに延伸する工程を含むこともできる。延伸は一段延伸でもよいし、2段以上の多段延伸でもよい。多段で延伸すると、分子を多段で配向させ、トータル延伸倍率も高くすることができるため、タフネスの高い繊維の製造に適している。

## [0151] [ポリペプチドフィルムの製造方法]

目的とする組換えタンパク質が、ポリペプチドフィルムの製造を目的として生産させた構造タンパク質、例えば、スパイダーシルク、カイコシルク等由来のタンパク質の場合、工程（D）で得られた組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を、ポリペプチドフィルムの製造にそのまま用いることができる。ここで、そのまま用いるとは、さらなる精製工程を必要としないことを意味する。これは、工程（D）で得られた第2の可溶性画分に含まれる精製された組換えタンパク質の純度がポリペプチドフィルムの形成に用いるのに十分高いことを示している。工程（A）～（D）の後、フィルム形成工程を行うことにより、ポリペプチドフィルムを製造することができる。

## [0152] すなわち一実施形態に係るポリペプチドフィルムの製造方法は、以下（A）～（D）及び（G）の工程を含むことを特徴とする：

(A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが上記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

(B) 第1の可溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

(C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、上記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、

(D) 第2の不溶性画分を除去し、上記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程、

(G) 第2の非プロトン性極性溶媒に耐性のある平板上に、第2の可溶性画分を用いて所定の厚さの塗膜を形成させ、上記塗膜から第2の非プロトン性極性溶媒を除去することでポリペプチドフィルムを得る工程

[0153] 工程（A）～（D）については、上述した通りである。工程（G）は、第2の非プロトン性極性溶媒に耐性のある平板上に、第2の可溶性画分を用いて所定の厚さの塗膜を形成させ、上記塗膜から第2の非プロトン性極性溶媒を除去することでポリペプチドフィルムを得る工程である。

[0154] 工程（D）で得られた目的とする組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を用いて塗膜を形成し、第2の可溶性画分に含まれる第2の非プロトン性極性溶媒を除去すると、組換えタンパク質のポリペプチドフィルムが形成される。

[0155] 塗膜を形成する平板としては、ガラス板等の、第2の非プロトン性極性溶媒に耐性のある平板が用いられる。塗膜の厚さは、特に限定されないが、例えば1～1000μmであってよい。

[0156] 所定の厚さのポリペプチドフィルムを形成する方法としては、例えばキャスト法が挙げられる。キャスト法によりポリペプチドフィルムを形成する場合には、平板に、目的とする組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分をドクターコート、ナイフコーティングなどの治具を用いて数ミクロン以上の厚さにキャストしてキャスト膜を形成し、その後減圧乾燥又は脱溶媒槽への浸漬により溶媒を脱離することによりポリペプチドフィルムを得ることができる。

## 実施例

[0157] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0158] (1) 目的とするタンパク質発現株（組換え細胞）の作製  
配列番号1（P R T 4 6 8）、配列番号2（P R T 6 4 7）、配列番号3（P R T 6 9 9）及び配列番号4（P R T 6 9 8）で示されるアミノ酸配列を有するクモ糸由来の配列を有するフィブロインをコードする核酸、G E N 5 1 4、G E N 7 4 0、G E N 7 9 7 及び、G E N 7 9 6 をそれぞれ合成し

た。当該核酸には、5'末端にNde Iサイト及び終止コドン下流にEco RIサイトを付加した。各タンパク質のハイドロパシーインデックス及び分子量は表2に示した通りである。

[0159] [表2]

| 配列番号 | タンパク質名 | 核酸名    | ハイドロパシーインデックス | 分子量  |
|------|--------|--------|---------------|------|
| 1    | PRT468 | GEN514 | -0.59         | 50.1 |
| 2    | PRT647 | GEN740 | 0.04          | 54.1 |
| 3    | PRT699 | GEN797 | 0.17          | 48.8 |
| 4    | PRT698 | GEN796 | 0.43          | 48.5 |

[0160] これら4種類の核酸をそれぞれクローニングベクター(pUC118)にクローニングした。その後、同核酸をNde I及びEco RIで制限酵素処理して切り出した後、タンパク質発現ベクターpET-22b(+)に組換えて発現ベクターを得た。当該4種類の核酸をそれぞれ組換えたpET-22b(+)発現ベクターで、大腸菌BLR(DE3)をそれぞれ形質転換して、目的とするタンパク質を発現する形質転換大腸菌(組換え細胞)を得た。

[0161] (2) 目的とするタンパク質の発現

上記形質転換大腸菌を、アンピシリンを含む2mLのLB培地で15時間培養した。当該培養液を、アンピシリンを含む100mLのシード培養用培地(表3)にOD<sub>600</sub>が0.005となるように添加した。培養液温度を30°Cに保ち、OD<sub>600</sub>が5になるまでフラスコ培養を行い(約15時間)、シード培養液を得た。

[0162] [表3]

| シード培養用培地                        |         |
|---------------------------------|---------|
| 試薬                              | 濃度(g/L) |
| グルコース                           | 5.0     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 4.0     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10.0    |
| 酵母エキス                           | 6.0     |
| アンピシリン                          | 0.1     |

[0163] 500mLの生産培地(表4)を添加したジャーファーメンターにOD<sub>600</sub>

が0.05となるように当該シード培養液を添加した。培養液温度を37°Cに保ち、pH 6.9で一定に制御して培養した。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持した。

[0164] [表4]

| 生産培地                                  |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 試薬                                    | 濃度 (g/L)  |
| グルコース                                 | 12.0      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 9.0       |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 2.4       |
| 酵母エキス                                 | 15        |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0.04      |
| MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O | 0.04      |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.04      |
| アデカノール LG-295S (消泡剤)                  | 0.1(mL/L) |

[0165] 生産培地中のグルコースが完全に消費された直後に、フィード液（グルコース455g/1L、酵母エキス 120g/1L）を1mL/分の速度で添加した。培養液温度を37°Cに保ち、pH 6.9で一定に制御して培養した。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持し、20時間培養を行った。その後、1Mのイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を培養液に対して終濃度1mMになるよう添加し、目的のタンパク質を発現誘導させた。IPTG添加後20時間経過した時点で、培養液を遠心分離し、菌体を回収した。IPTG添加前とIPTG添加後の培養液から調製した菌体を用いて SDS-PAGEを行い、IPTG添加に依存した目的とするタンパク質サイズのバンドの出現により、目的とするタンパク質が不溶体として発現されていることを確認した。

[0166] [実施例1 宿主細胞由来タンパク質の溶解工程における無機塩及び温度の影響]

宿主細胞由来のタンパク質を溶解する工程における、第1の非プロトン性極性溶媒への無機塩の添加及び添加濃度並びに温度の影響について調べた。PRT468発現大腸菌の乾燥菌体50mgに0、0.1、0.25及び0

. 5 Mの塩化リチウムを含むDMSOを1 mL加え、40、45、50、55及び60°Cの温度で30分間処理した。室温まで冷やした後、11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行った。遠心分離により得られた上清（第1の可溶性画分）についてSDS-PAGEにより分析した。結果を図1に示す。40～60までの数字は、温度を示し、0～0.5Mの表記はDMSOに含まれる塩化リチウムの濃度を示す。レーンXLは分子量マーカータンパク質を、レーンCは精製済みPRT468をポジティブコントロールとして泳動したものである。

[0167] 図1A及びCは、全てのタンパク質を染色可能なOrifice（商標）蛍光ゲルステイン（Bio-Rad社製）で、図1B及びDはPRT468のHisタグ領域に反応するInVision（商標）Hisタグ付きゲル内染色試薬（Thermo Fisher Scientific社製）でそれぞれ染色したものである。

[0168] いずれの条件においても宿主細胞由来のタンパク質のバンドが確認され、宿主細胞由来のタンパク質が第1の非プロトン性極性溶媒に溶解し、第1の可溶性画分に含まれていることが示された。しかしながら、0.25M～0.5Mと高濃度の塩化リチウムを含むDMSOを用いたサンプルでは、目的とするタンパク質であるPRT468も溶解し、第1の可溶性画分に含まれていた（図1D）。宿主細胞由来のタンパク質が溶解し、且つ最もPRT468の溶解が少ない条件は、0.1Mの塩化リチウムをDMSOに添加し、40°Cで処理した条件であった。

[0169] [実施例2 宿主細胞由来のタンパク質の溶解工程におけるシクロヘキサン添加の効果その1]

実施例1において、高濃度の塩化リチウムを含むDMSOを第1の非プロトン性極性溶媒として用いた場合には、宿主細胞由来のタンパク質のみならず、目的とするタンパク質であるPRT468の溶解も認められた。そこで、高濃度の塩化リチウムを含むDMSOへシクロヘキサンを添加することによる、PRT468の溶解防止効果を検討した。

[0170] DMSO：シクロヘキサノン=100：0、50：50、25：75の3種類の混合比率の溶媒を調製し、これらの溶媒に0.1又は0.5Mとなるように塩化リチウムを添加し、計6種類の第1の非プロトン性極性溶媒を調製した（表5参照）。

[0171] [表5]

| レーンNo. | 塩化リチウム (M) | DMSO (%) | シクロヘキサノン (%) |
|--------|------------|----------|--------------|
| 1      | 0.1        | 100      | 0            |
| 2      | 0.1        | 50       | 50           |
| 3      | 0.1        | 25       | 75           |
| 4      | 0.5        | 100      | 0            |
| 5      | 0.5        | 50       | 50           |
| 6      | 0.5        | 25       | 75           |

[0172] PRT468発現大腸菌の乾燥菌体50mgに表5の第1の非プロトン性極性溶媒を1mL加え、60°Cで30分間処理した。室温まで冷やした後、11,000×g、5分間の条件で遠心分離した。遠心分離により得られた沈殿に、用いた処理溶媒0.5mLをそれぞれ添加し、懸濁後、再度遠心分離し、沈殿画分の洗浄を行った。得られた上清画分（第1の可溶性画分）及び沈殿画分（第1の不溶性画分）をSDS-PAGEにより分析した。上清画分の結果を図2に、沈殿画分の結果を図3示す。1～6の数字は、表5のレーンNo.に対応している。レーンXLは分子量マーカータンパク質を、レーンCは精製済みPRT468をポジティブコントロールとして泳動したものである。

[0173] 図2A及び図3Aは、全てのタンパク質を染色可能なOrifice（商標）蛍光ゲルステインで、図2B及び図3BはPRT468のHisタグ領域に反応するInVision（商標）Hisタグ付きゲル内染色試薬でそれぞれ染色したものである。

[0174] シクロヘキサノンを添加していない0.5M塩化リチウム含有DMSOを第1の非プロトン性極性溶媒とした場合には、ポジティブコントロールと同じ位置にバンドが確認され、PRT468の溶解が認められた（図2A及びBのレーン4）。一方、シクロヘキサノンを添加した0.5M塩化リチウム含有DMSOを第1の非プロトン性極性溶媒とした場合には、PRT468

のバンドは確認されなかった。（図2 A及びBのレーン5及び6）。

[0175] 0. 5 M 塩化リチウム含有DMSOを用いた場合には、0. 1 M 塩化リチウム含有DMSOを用いた場合（図3 A及びBのレーン1）と比較して、沈殿画分に含まれるPRT468の減少が認められた（図3 A及びBのレーン4）。しかしながら、シクロヘキサノンを添加した場合には、沈殿画分におけるPRT468の含量の低下は認められなかった（図3 A及びBのレーン5及び6）。ただし、DMSO : シクロヘキサノンが25 : 75の第1の非プロトン性極性溶媒を用いた場合には、上清画分に含まれるPRT468は減少するが、上清画分に含まれる宿主細胞由来のタンパク質も減少してしまうため、宿主細胞由来のタンパク質がPRT468とともに多量に沈殿画分に残存する結果となり（図3 Aのレーン6）、PRT468の精製には適した条件ではなかった。

[0176] これらの結果から、目的とするタンパク質の第1の非プロトン性極性溶媒への溶解性を確認した上で、当該タンパク質に応じてシクロヘキサノンを適切な濃度で添加することにより、高濃度の塩を添加することにより宿主細胞由来のタンパク質を第1の非プロトン性極性溶媒に溶解しやすくしつつ、目的とするタンパク質の第1の非プロトン性極性溶媒への溶解は防止することが可能であることが確認できた。これにより、宿主細胞由来のタンパク質を第1の可溶性画分に、目的とするタンパク質を第1の不溶性画分に効率よく分離することができる。

[0177] [実施例3 宿主細胞由来のタンパク質の溶解工程における非プロトン性極性溶媒の種類の影響]

第1の非プロトン性極性溶媒にDMFを用いた場合にも、宿主細胞由来のタンパク質と目的とするタンパク質を効率よく分離できるかについて検討した。PRT468発現大腸菌の乾燥菌体50mgに0、0.1、0.25及び0.5Mの塩化リチウムを含むDMF（第1の非プロトン性極性溶媒）を1mL加え、60℃の温度で30分間処理した。室温まで冷やした後、11,000×gで5分間遠心分離した。遠心分離により得られた沈殿画分に、

用いた上記第1の非プロトン性極性溶媒0.5mLをそれぞれ添加し、懸濁後、再度遠心分離し、沈殿画分の洗浄を行った。得られた上清画分（第1の可溶性画分）及び沈殿画分（第1の不溶性画分）についてSDS-PAGEにより分析した。上清画分における結果を図4に、沈殿画分における結果を図5に示す。レーン1～4は、DMFに含まれる塩化リチウムの濃度が0（レーン1）、0.1（レーン2）、0.25（レーン3）及び0.5M（レーン4）である結果を示す。レーンXLは分子量マーカータンパク質を、レーンCは精製済みPRT468をポジティブコントロールとして泳動したものである。

[0178] 図4A及び図5Aは、全てのタンパク質を染色可能なOriole（商標）蛍光ゲルステインで、図4B及び図5BはPRT468のHisタグ領域に反応するInVision（商標）Hisタグ付きゲル内染色試薬でそれぞれ染色したものである。

[0179] 塩化リチウムを添加しないDMFよりも塩化リチウムを添加したDMFを第1の非プロトン性極性溶媒として用いた場合の方が、上清画分に宿主細胞由来のタンパク質が多く含まれていた。特に塩化リチウムを0.25M以上含むDMFを用いた場合に効果的に宿主細胞由来のタンパク質を溶解できたことが示された（図4A）。いずれの場合においても上清画分にはほとんどPRT468は含まれていなかった（図4B）。

[0180] 塩化リチウムを0.25M以上含むDMFを第1の非プロトン性極性溶媒として用いた場合には、塩化リチウムを0～0.1含むDMFを用いた場合と比較して、沈殿画分に含まれるPRT468以外のタンパク質が顕著に少なく、効果的に宿主細胞由来のタンパク質を除去できたことが示された（図5A）。また、PRT468の溶解も少なく、ロスすることなく回収できることも示された（図5B）。これにより、DMSOと同様に、塩化リチウムの濃度を最適化することにより、DMFも宿主細胞由来のタンパク質を除去するための第1の非プロトン性極性溶媒として利用できることが確認できた。

[0181] [実施例4 宿主細胞由来のタンパク質の除去及び目的とするタンパク質の精製]

P R T 4 6 8 (配列番号1：分子量50.1、H I : -0.59)、P R T 6 4 7 (配列番号2：分子量54.1、H I : 0.04)、P R T 6 9 9 (配列番号3：分子量48.8、H I : 0.17) 及びP R T 6 9 8 (配列番号4：分子量48.5、H I : 0.43) をそれぞれ発現する形質転換大腸菌から、当該宿主細胞由来のタンパク質を除去し、目的とする組換えタンパク質の精製を行った。

[0182] 上記4種類の目的とするタンパク質をそれぞれ発現した形質転換大腸菌の乾燥菌体50m gに0.1Mの塩化リチウムを含むD M S O (第1の非プロトン性極性溶媒)を1m L加え、40°Cの温度で30分間処理した。室温まで冷やした後、11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、沈殿画分(第1の不溶性画分)と上清画分(上清I：第1の可溶性画分)に分離した。沈殿画分については0.1Mの塩化リチウムを含むD M S O 0.5m Lを再度添加し、懸濁し、遠心分離により沈殿画分の洗浄を行った。当該洗浄後の沈殿画分に0.5Mの塩化リチウムを含むD M S O (第2の非プロトン性極性溶媒)を0.5m L加え、80°Cで30分間処理した。室温まで放冷した後、20,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、目的とするタンパク質を含む上清画分(上清II：第2の可溶性画分)を回収した。上清Iと上清IIについてS D S - P A G Eで分析した。結果を図6に示す。レーン1～4は、それぞれタンパク質濃度が1.5μ gになるように上清I及び上清IIをアプライしたものであり、P R T 4 6 8 (レーン1)、P R T 6 4 7 (レーン2)、P R T 6 9 8 (レーン3) 及びP R T 6 9 9 (レーン4) の結果を示す。レーンX Lは分子量マーカータンパク質を泳動したものである。

[0183] 図6のAは、全てのタンパク質を染色可能なO r i o l e (商標) 蛍光ゲルステインで、図6のBは、目的とするタンパク質のN末端に付加している配列番号8で示されるアミノ酸配列(H i sタグ配列及びヒンジ配列)のH

i s タグ領域に反応する In V i s i o n (商標) H i s タグ付きゲル内染色試薬でそれぞれ染色した。

[0184] 4種類のタンパク質のいずれにおいても効率よく宿主細胞由来のタンパク質が除去されており(図6A)、目的とするタンパク質を精製可能であった(図6B)。

[0185] [実施例5 宿主細胞由来のタンパク質の溶解工程におけるシクロヘキサン添加の効果その2]

宿主細胞由来のタンパク質を溶解するための温度を上昇させた場合にも、DMSOへシクロヘキサンを添加することにより、目的とするタンパク質の溶解防止効果が得られるかについて検討した。宿主細胞由来のタンパク質の溶解工程における温度を40°Cから60°Cとし、第1の非プロトン性極性溶媒として、DMSOと同容量のシクロヘキサン及び0.5Mの塩化リチウムを含む溶媒を使用する以外は、実施例4と同じ方法で宿主細胞由来のタンパク質を溶解し、沈殿画分(第1の不溶性画分)と上清画分(上清I:第1の可溶性画分)に分離した。さらに、実施例4と同じ方法で沈殿画分の洗浄を行い、続けて目的とするタンパク質を溶解し、目的とするタンパク質を含む上清画分(上清II:第2の可溶性画分)を得た。結果を図7に示す。レーン1~4は、それぞれタンパク質濃度が1.5μgになるように上清I又は上清IIをアプライしたものであり、PRT468(レーン1)、PRT647(レーン2)、PRT698(レーン3)及びPRT699(レーン4)の結果を示す。レーンXLは分子量マーカータンパク質を泳動したものである。

[0186] 宿主細胞由来のタンパク質を溶解するための温度を40°Cから60°Cに高めても、シクロヘキサン添加により、目的とする4種類のタンパク質の溶解を抑えることができ、宿主細胞由来のタンパク質を効率よく除去できた(図7A及びBの上清I)。また、実施例4の結果と比較して目的とするタンパク質以外のバンドが少ない又は薄いことから、目的とするタンパク質が実施例4よりも高純度で精製できたことが示された(図7Aの上清II)。

## [0187] [実施例6 貧溶媒を用いた精製の効果その1]

目的とするタンパク質を含む第2の可溶性画分を得た後、さらに貧溶媒を用いて精製した場合におけるその精製の効果を検討した。PRT468を発現する形質転換大腸菌の乾燥菌体10gに0.1Mの塩化リチウムを含むDMSO（第1の非プロトン性極性溶媒）を200mL加え、40℃の温度で1時間処理した。処理した溶液に過助剤ラヂオライト#900を2g加え、攪拌後、Glass Fiber Filter DP-7（ADVANTEC社製）をセットしたブフナーロートを用いて減圧ろ過し、ろ液I（第1の可溶性画分）を得た。0.1M塩化リチウムを含むDMSO 40mLでろ別された残渣（第1の不溶性画分）を洗浄した。当該洗浄残渣に0.5Mの塩化リチウムを含むDMSO（第2の非プロトン性極性溶媒）を200mL加え、80℃の温度で1時間処理し、PRT468を溶解した。室温まで放冷した後、上記と同条件で減圧ろ過し、PRT468を含むろ液II（第2の可溶性画分）を得た。このろ液IIを貧溶媒を用いて以下のようにさらに精製した。

[0188] 113mLのろ液IIに当量の酢酸エチル（貧溶媒）を加え、PRT468を凝集させた。11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、上清分画（遠心分離後の上清）と沈殿画分（凝集体）に分離した。沈殿画分を回収し、RO水200mLで3回洗浄した後、凍結乾燥し、2.5gの粉末（精製粉末）を取得した。それぞれの工程における精製状況をSDS-PAGEで分析した。結果を図8に示す。レーン1は最終的に得られた精製粉末、レーン2はろ液I、レーン3はろ液II、レーン4は遠心分離後の上清を、それぞれタンパク質濃度が1.5μgになるようにアプライしたものである。レーンXLは分子量マーカータンパク質、レーンCは精製済みPRT468をポジティブコントロールを泳動したものである。

[0189] 宿主細胞由来のタンパク質を溶解した後のろ液Iには、宿主細胞由来のタンパク質が多量に溶解しており、効率よく当該タンパク質を含むろ別された残渣から分離できたことが確認された（図8Aのレーン2）。また、酢酸エ

チル添加による精製を行う前のろ液Ⅰと、精製を行った後の精製粉末におけるP R T 4 6 8量に差が見られないことから、酢酸エチル添加による精製によって、目的とするタンパク質P R T 4 6 8を、ほぼロスすることなく効果的に精製できたことが確認された（図8Bのレーン1及び3）。

[0190] [実施例7 貧溶媒を用いた精製の効果その2]

P R T 4 6 8（配列番号1）、P R T 6 4 7（配列番号2）、P R T 6 9 9（配列番号3）及びP R T 6 9 8（配列番号4）をそれぞれ発現する形質転換大腸菌から目的とするタンパク質を精製する方法における、宿主細胞由来タンパク質の溶解条件と貧溶媒を用いた精製の組み合わせの効果について検討した。

[0191] 上記4種類の目的とするタンパク質をそれぞれ発現した形質転換大腸菌を用いて、上記実施例4（40°C）と同様の方法又は実施例5（60°C—シクロヘキサンノン添加）と同様の方法で宿主細胞由来のタンパク質の溶解処理を行った。その後、実施例4と同様に、遠心分離により得られた沈殿画分（第1の不溶性画分）に、0.1Mの塩化リチウムを含むD M S O 0.5mLを添加し、懸濁して、遠心分離することにより沈殿画分の洗浄を行った。洗浄後の沈殿画分に0.5Mの塩化リチウムを含むD M S O（第2の非プロトン性極性溶媒）を0.5mL加え、80°Cで30分間処理し、目的とする4種類のタンパク質を溶解させた。室温まで放冷した後、20,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、目的とするタンパク質を含む上清画分（第2の可溶性画分）を取得した。

[0192] 当該上清画分300μLにイソプロパノール（貧溶媒）600μLを加え、30分間転倒混和し、目的とするタンパク質を凝集させた。11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、上清画分（上清Ⅰ）と沈殿画分（凝集体）に分離した。沈殿画分にR O水1mLを加え、洗浄した。11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、上清画分（上清Ⅱ）を除去した後、沈殿画分を凍結乾燥した。乾燥させた沈殿画分に0.5Mの塩化リチウムを含むD M S Oを500μL加え、80°Cの温度で30分間処理し、目的

とする4種類の精製タンパク質を含む溶液（精製タンパク質溶液）を得た。

[0193] 目的とする4種類の精製タンパク質溶液、上清Ⅰ及び上清ⅡをSDS-PAGEで分析した。図9A及びBは、宿主細胞由来のタンパク質の溶解処理を実施例4（40°C）と同様に行った結果、図9C及びDは、宿主細胞由来のタンパク質の溶解処理を実施例5（60°C—シクロヘキサノン添加）と同様に行った結果を示す。レーン1～4は、それぞれタンパク質濃度が1.5 μgになるように精製タンパク質溶液、上清Ⅰ又は上清Ⅱをアプライしたものであり、PRT468（レーン1）、PRT647（レーン2）、PRT698（レーン3）及びPRT699（レーン4）の結果を示す。

[0194] 図9のA及びCは、全てのタンパク質を染色可能なOriole（商標）蛍光ゲルステインで、図9のB及びDは、目的とするタンパク質のN末端に付加している配列番号8で示されるアミノ酸配列（Hisタグ配列及びヒンジ配列）のHisタグ領域に反応するInVision（商標）Hisタグ付きゲル内染色試薬でそれぞれ染色した。

[0195] 40°Cの温度条件での宿主細胞由来のタンパク質の溶解及び貧溶媒イソプロパノールの添加による凝集化を組み合わせた場合と比較して、60°C—シクロヘキサノン添加条件での宿主細胞由来のタンパク質の溶解及び貧溶媒イソプロパノールの添加による凝集化を組み合わせた場合の方が、いずれの目的とするタンパク質においても、精製後のタンパク質において目的とするタンパク質以外のバンドが減少しており、さらなる純度の向上が認められた（図9A及びC「精製タンパク質」）。一方、精製ロスは40°Cの温度条件での処理と、60°C—シクロヘキサノン添加条件とではほぼ同等であった（図9B及びD）。

[0196] [実施例8 第2可溶性画分のドープ液としての利用]

本精製方法により得られた精製タンパク質溶液を用いて紡糸が可能であるか検討した。

[0197] 実施例2に記載した方法に準じて、以下のように宿主細胞由来タンパク質を除去した。PRT468を発現した大腸菌の乾燥菌体10gに、DMSO

：シクロヘキサン＝1：1の比率で混合した溶媒に0.5Mとなるように塩化リチウムを添加した第1の非プロトン性極性溶媒を200mL加え、60℃の温度で30分間処理した。続けて11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行った。上清画分（第1の可溶性画分）を除去し、沈殿画分（第1の不溶性画分）を上記第1の非プロトン性極性溶媒100mLで洗浄した。

- [0198] 湿潤状態の沈殿画分500mgに、1.0Mの塩化リチウムを含むDMSO（第2の非プロトン性極性溶媒）を500μL加え、80℃の温度で30分間処理し、目的とするタンパク質を溶解した。室温まで放冷した後、20,000×g、60分間の条件で遠心分離を行い、沈殿画分（第2の不溶性画分）を除去し、PRT468を含む上清画分（第2の可溶性画分）を精製タンパク質溶液として得た。当該精製タンパク質溶液が紡糸用のドープ液として利用可能か以下の方法で確認した。
- [0199] 上記のPRT468を含む精製タンパク質溶液80μLを内径0.1mmの針を持ったシリンジに入れた。当該シリンジの針の先端を、300mLビーカー中のメタノール（凝固液）につけ、上記精製タンパク質溶液を押し出し、凝固液中に糸状のものが形成されることを確認した（図10A）。形成された糸状のものを凝固液からピンセットで取り出し、自然乾燥した（図10A及びB）。
- [0200] 以上の結果、本精製方法により得られた精製タンパク質溶液は、さらなる精製工程を要することなく、そのまま紡糸用のドープ液として利用できる程、目的とするタンパク質の純度が高いことが確認できた。即ち、従来の組換えタンパク質を用いた紡糸用のドープ液の調製工程（凝集、洗浄、乾燥及び再溶解等）と比較し、極めて少ない工程で紡糸用のドープ液を調製できることがわかった。
- [0201] [実施例9 本精製方法によるゲル化解消効果]

国際公開第2014/103847号に記載の方法（以下、従来方法と呼ぶ）は、DMSO等の非プロトン性極性溶媒に目的とするタンパク質を溶解

し、水等の溶媒を加え不純物を除去し、精製する方法である。この従来方法は、優れた方法であるものの、目的とするタンパク質はハイドロパシーインデックスが0以下の親水性組換えタンパク質に限定され、タンパク質によつてはゲル化する虞があった。

[0202] この従来方法でゲル化の起こるタンパク質（P R T 4 6 8（配列番号1）、H I : -0. 59）について、従来方法と本精製方法により精製を行い、比較した。

[0203] （従来方法）

従来方法に従つて、P R T 4 6 8を発現した大腸菌の乾燥菌体50m gに0. 5Mの塩化リチウムを含むD M S O 5 0 0 μ Lを加え、80°Cの温度で30分間加熱し、P R T 4 6 8を溶解した。室温まで放冷した後、R O水500μ Lを加えて攪拌した。当該溶液の一部をエッペンドルフチューブに分画し、分画直後、1時間後、3時間後及び24時間後に逆さにし、ゲル化の状況を観察した。結果を図11（左「従来」）に示す。従来方法においては、精製P R T 4 6 8は1時間後にはゲル化していた。ゲル化前のP R T 4 6 8含有溶液をS D S-P A G Eで分析した結果を、図12のレーン1に示す。レーンX Lは分子量マーカータンパク質を泳動したものである。

[0204] （本精製方法）

実施例2に記載した方法に準じて、以下のように宿主細胞由来タンパク質を除去した。P R T 4 6 8を発現した形質転換大腸菌の乾燥菌体50m gに、D M S O : シクロヘキサンノン=1:1の比率で混合した溶媒に0. 5Mとなるように塩化リチウムを添加した第1の非プロトン性極性溶媒を1m L加え、60°Cの温度で30分間処理した。11, 000×g、5分間の条件で遠心分離を行つた。上清画分（第1の可溶性画分）を除去し、沈殿画分（第1の不溶性画分）を60°Cの上記第1の非プロトン性極性溶媒で洗浄した。

[0205] 洗浄した沈殿画分に0. 5M塩化リチウムを含むD M S O溶媒（第2の非プロトン性極性溶媒）500μ Lを添加し、80°Cで30分間処理し、P R T 4 6 8を溶解した。当該溶液の一部をエッペンドルフチューブに分画し、

分画直後、1時間後、3時間後及び24時間後に逆さにし、ゲル化の状況を観察した。結果を図11（右「本実施例」）に示す。本精製方法によれば24時間後であってもゲル化は起こらなかった。

[0206] 上記溶液を11,000×g、5分間の条件で遠心分離し、沈殿画分（第2の不溶性画分）を除去した。上清画分（第2の水溶性画分）350μLにイソプロパノール（貧溶媒）700μLを加え、1時間転倒混和し、PRT468を凝集させた。11,000×g、5分間の条件で遠心分離を行い、沈殿画分（凝集体）をRO水で洗浄した。洗浄した凝集体を凍結乾燥し、得られた粉体をSDS-PAGEで分析した。結果を図12のレーン2に示す。

[0207] 本精製方法と従来方法は、ともに非プロトン性極性溶媒を用いるという点で共通する。しかしながら、本精製方法によれば、従来方法ではゲル化が生じてしまう組換えタンパク質であっても、ゲル化を生じることなく、従来方法とほぼ同等の純度で取得することができる事が示された。

## 請求の範囲

[請求項1] 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞から、前記組換えタンパク質を精製する方法であつて、

無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒に宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが前記組換えタンパク質が溶解しない条件で前記組換え細胞を処理し、第1の可溶性画分を除去した後、得られた第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に前記組換えタンパク質が溶解する条件で処理することを特徴とする、組換えタンパク質の精製方法。

[請求項2] 無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒に前記組換えタンパク質が溶解する条件で処理した後、第2の不溶性画分を除去し、組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得ることをさらに含む、請求項1に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項3] 第2の不溶性画分を除去して得られた第2の可溶性画分を前記組換えタンパク質の貧溶媒を用いて処理し、前記組換えタンパク質を凝集させ、精製した組換えタンパク質を凝集体として得ることをさらに含む、請求項2に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項4] 以下(A)～(D)の工程を含む、組換えタンパク質の精製方法。

(A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが前記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

(B) 第1の可溶性画分を除去し、前記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

(C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、前記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、

(D) 第2の不溶性画分を除去し、前記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程

[請求項5] (E) 第2の可溶性画分を前記組換えタンパク質の貧溶媒を用いて処理し、前記組換えタンパク質を凝集させ、精製した組換えタンパク質を凝集体として回収する工程、をさらに含む、請求項4に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項6] 前記条件が、温度条件であることを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項7] 前記第1又は第2の非プロトン性極性溶媒が、双極子モーメント3.0D以上である、請求項1～6のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項8] 前記無機塩が、アルカリ金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属ハロゲン化物、アルカリ土類金属硝酸塩及びチオシアノ酸塩からなる群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項9] 前記組換えタンパク質が構造タンパク質である、請求項1～8のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の精製方法。

[請求項10] 前記構造タンパク質がコラーゲン、エラスチン、レシリン、カイコシルク及びスパイダーシルクからなる群から選択されるタンパク質に由来する、請求項9に記載の精製方法。

[請求項11] 以下(A)～(D)及び(F)の工程を含む、人造ポリペプチド繊維の製造方法。

(A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが前記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

(B) 第1の可溶性画分を除去し、前記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

(C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、前記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、

(D) 第2の不溶性画分を除去し、前記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程、

(F) 第2の可溶性画分を糸状の液体として凝固液に付与し、前記組換えタンパク質を糸状に凝固させて回収することにより未延伸糸を得る工程

[請求項12] 以下(A)～(D)及び(G)の工程を含む、ポリペプチドフィルムの製造方法。

(A) 目的とする組換えタンパク質を不溶体として細胞内において発現している組換え細胞を、無機塩添加若しくは無添加の第1の非プロトン性極性溶媒を用いて、宿主細胞由来のタンパク質が溶解するが前記組換えタンパク質が溶解しない条件で処理する工程、

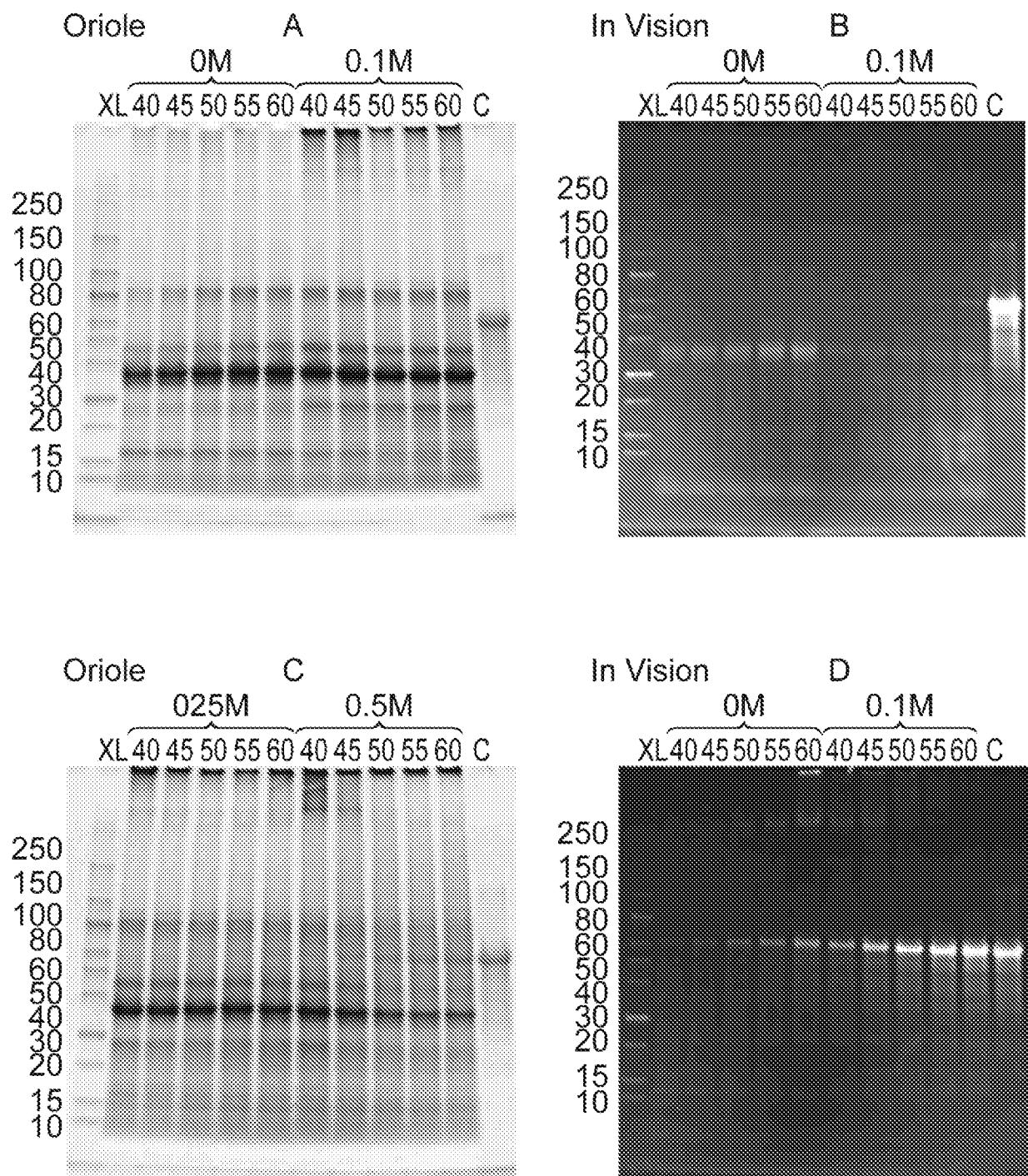
(B) 第1の可溶性画分を除去し、前記組換えタンパク質を含む第1の不溶性画分を回収する工程、

(C) 回収した第1の不溶性画分を、無機塩添加の第2の非プロトン性極性溶媒を用いて、前記組換えタンパク質が溶解する条件で処理する工程、

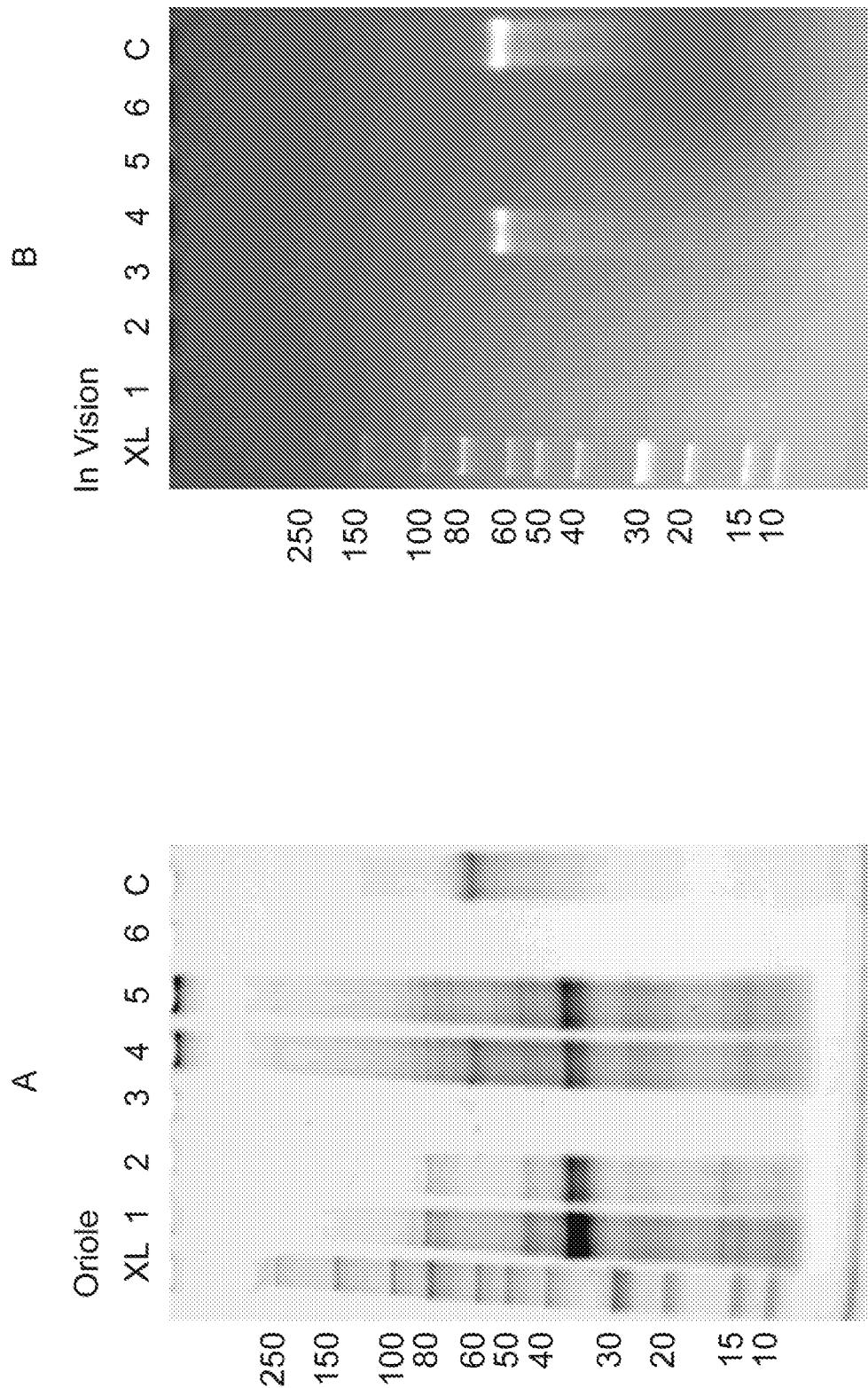
(D) 第2の不溶性画分を除去し、前記組換えタンパク質を含む第2の可溶性画分を得る工程、

(G) 第2の非プロトン性極性溶媒に耐性のある平板上に、第2の可溶性画分を用いて所定の厚さの塗膜を形成させ、前記塗膜から第2の非プロトン性極性溶媒を除去することでポリペプチドフィルムを得る工程

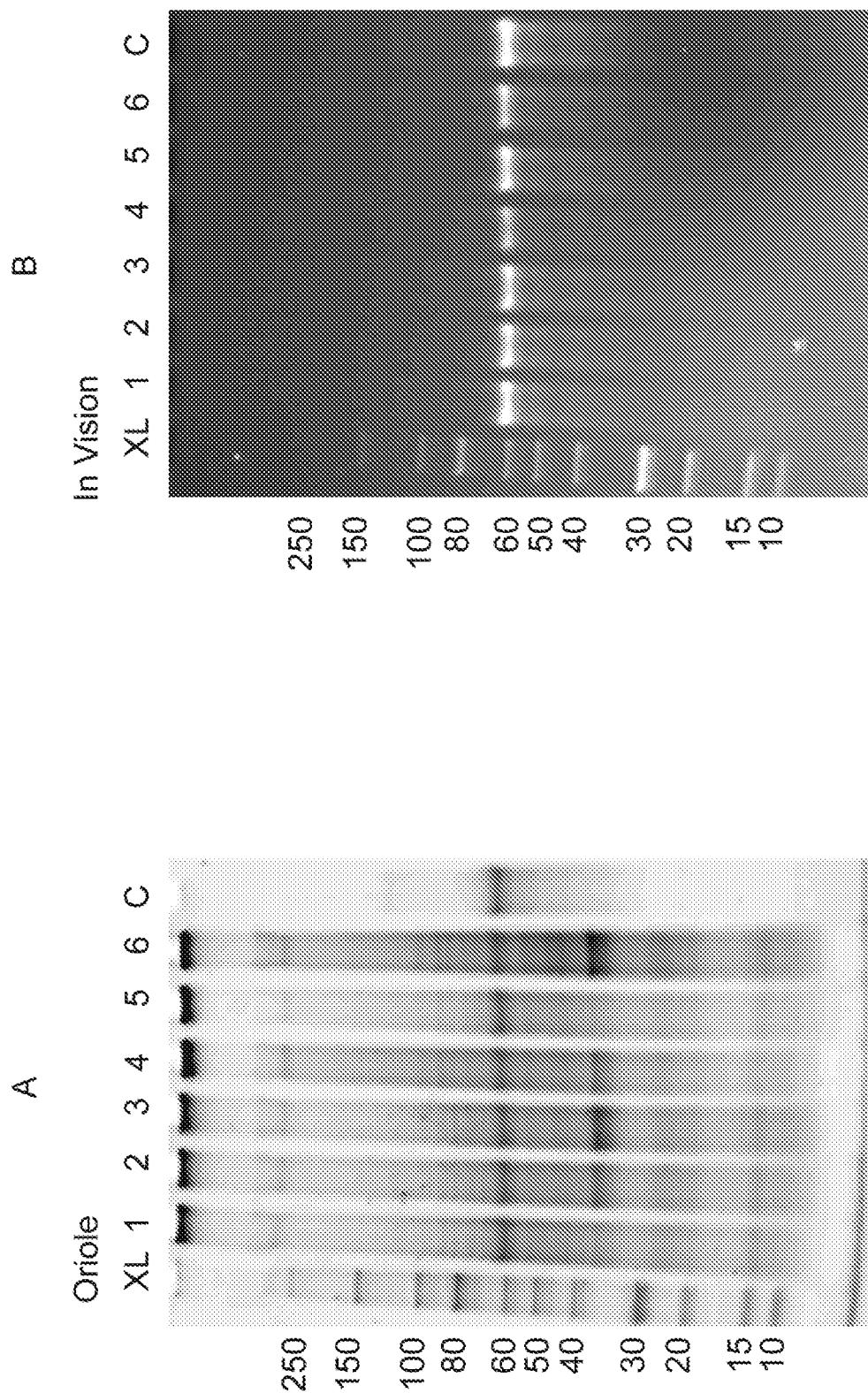
[図1]



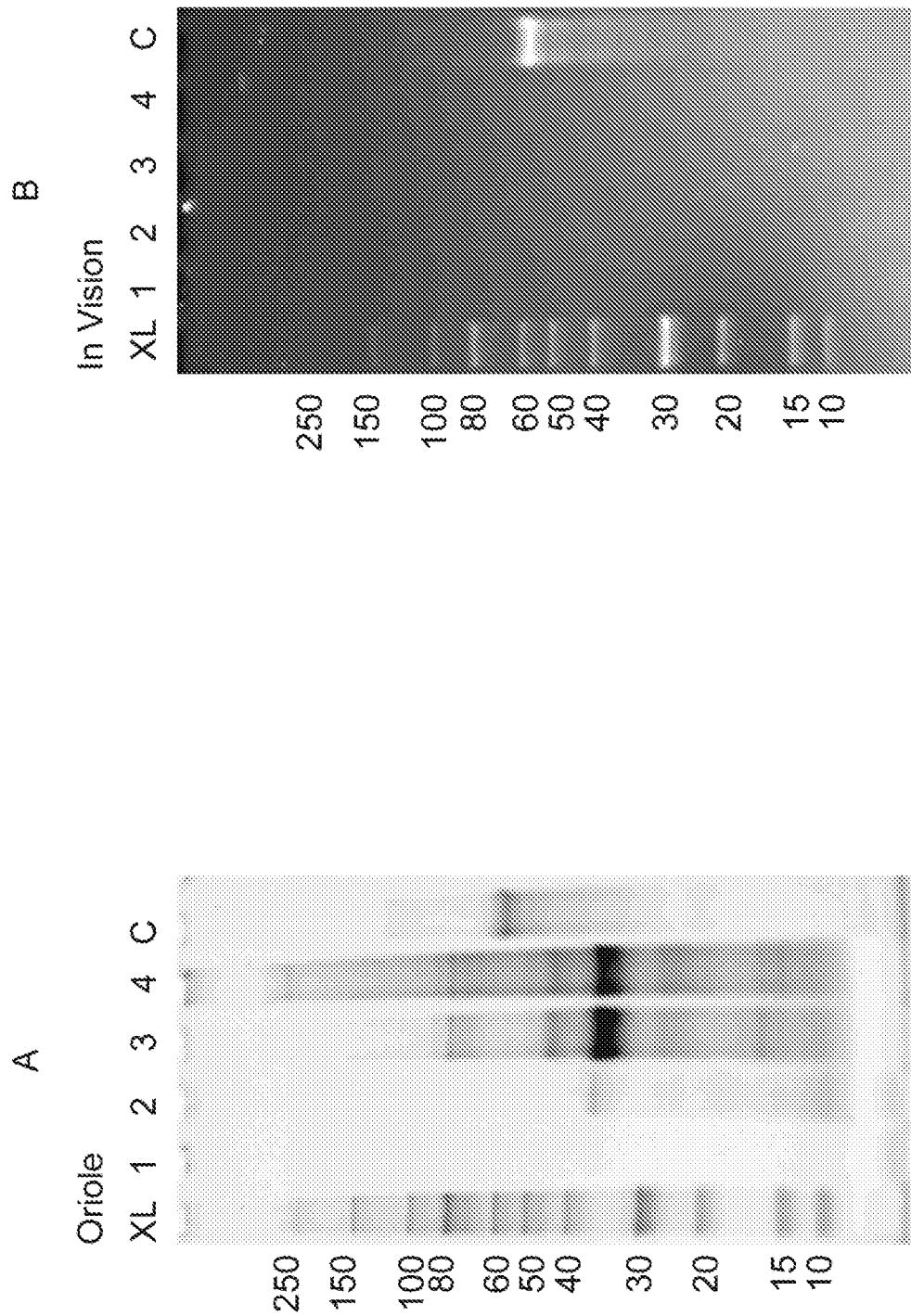
[図2]



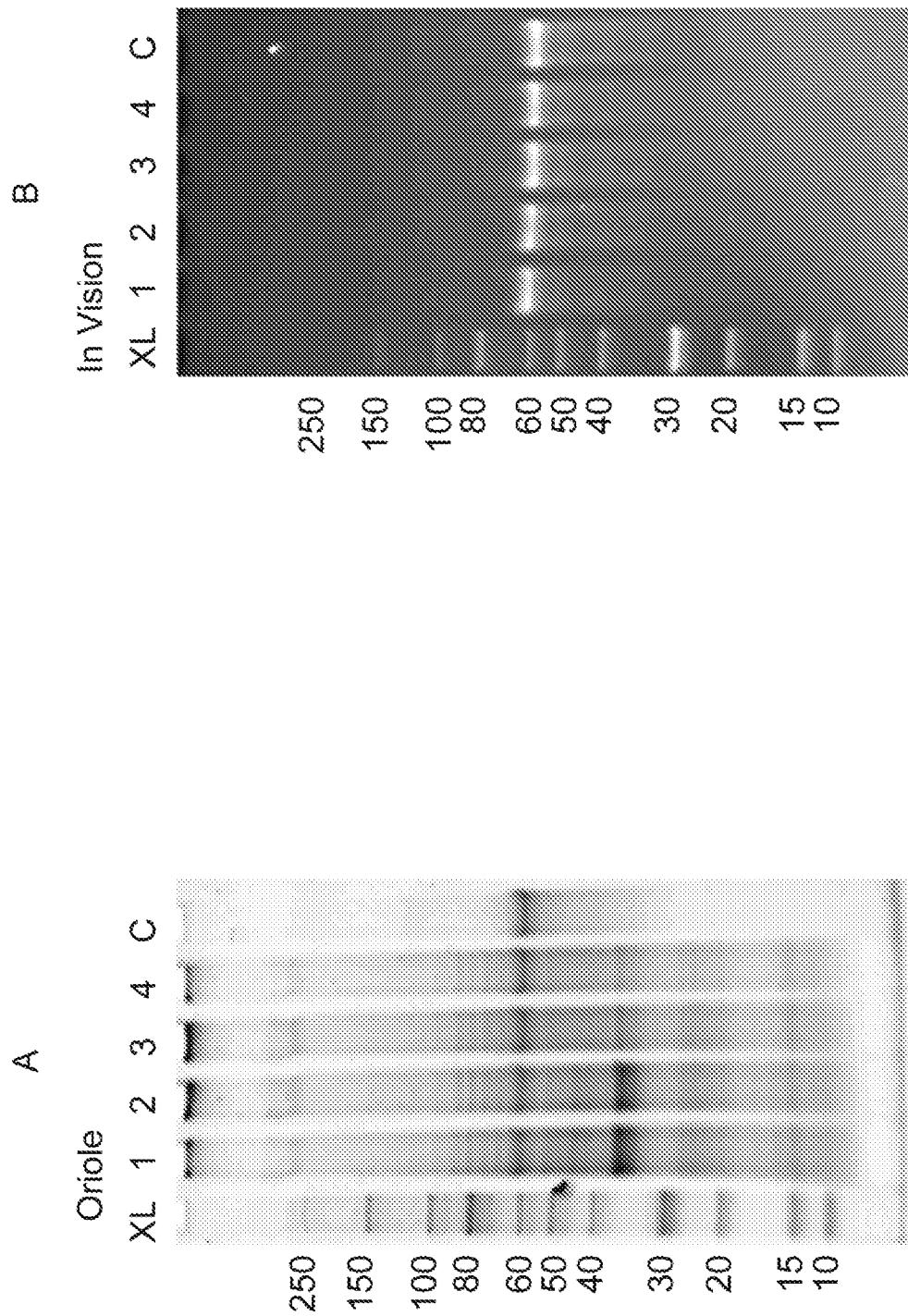
[図3]



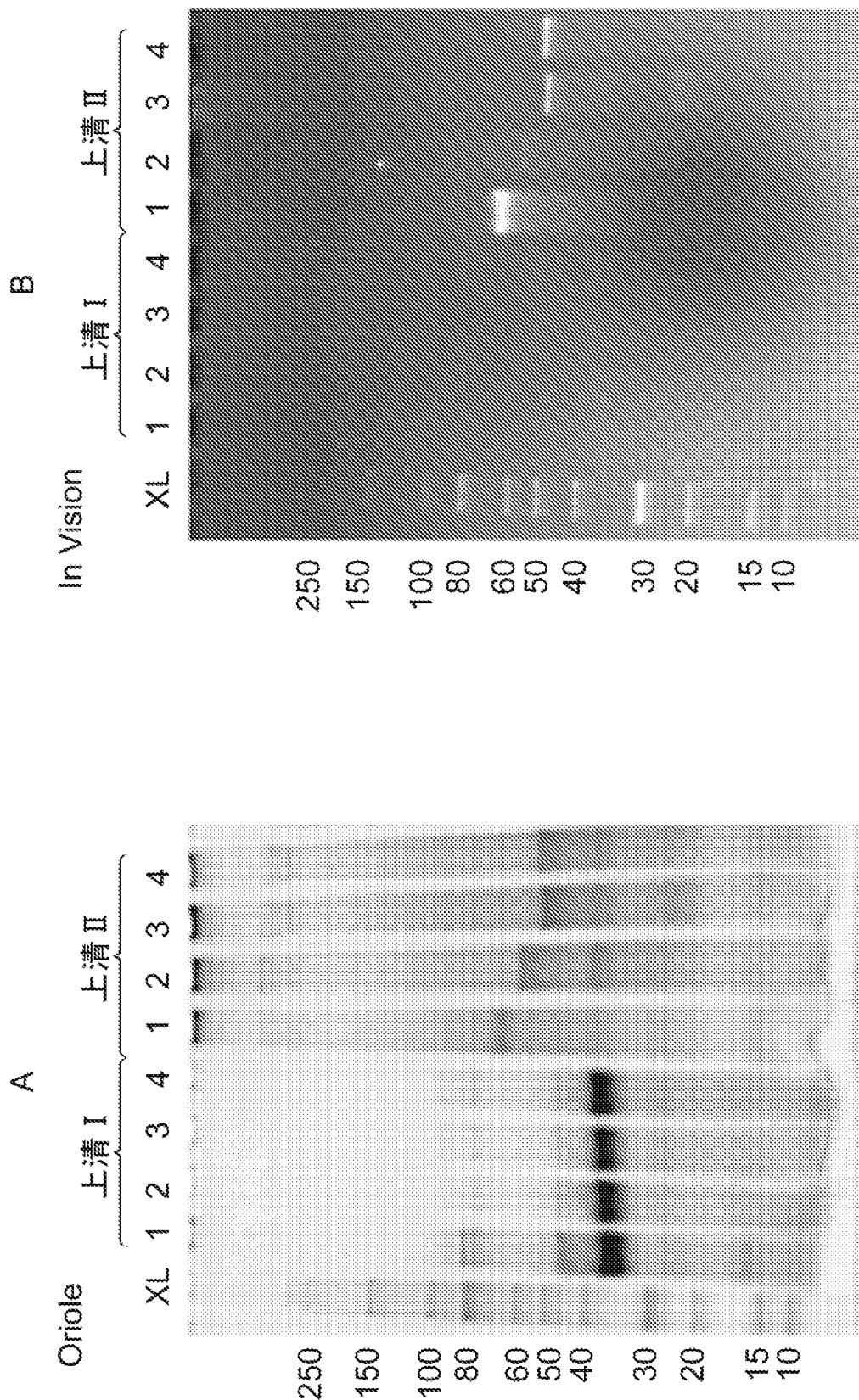
[図4]



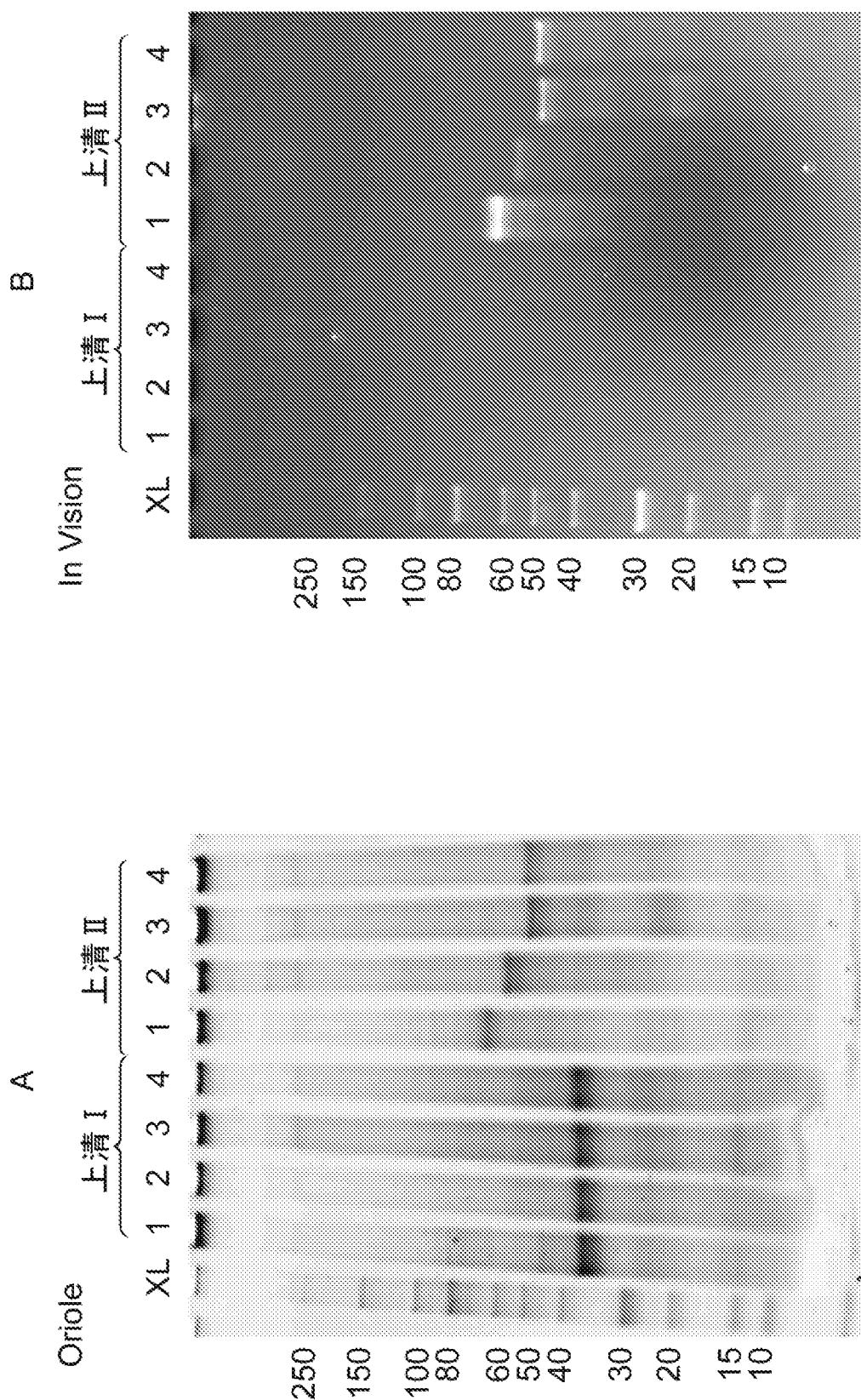
[図5]



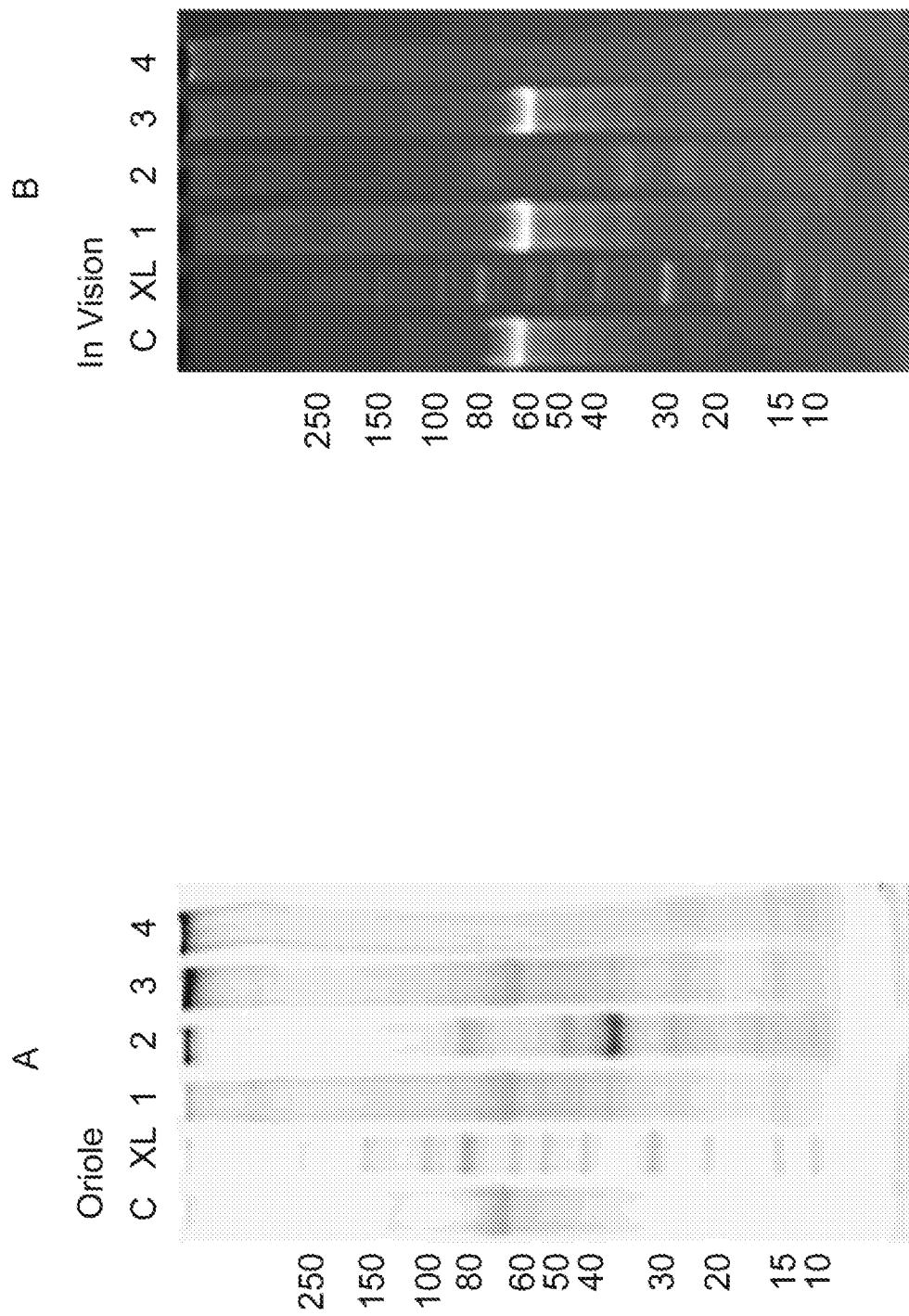
[図6]



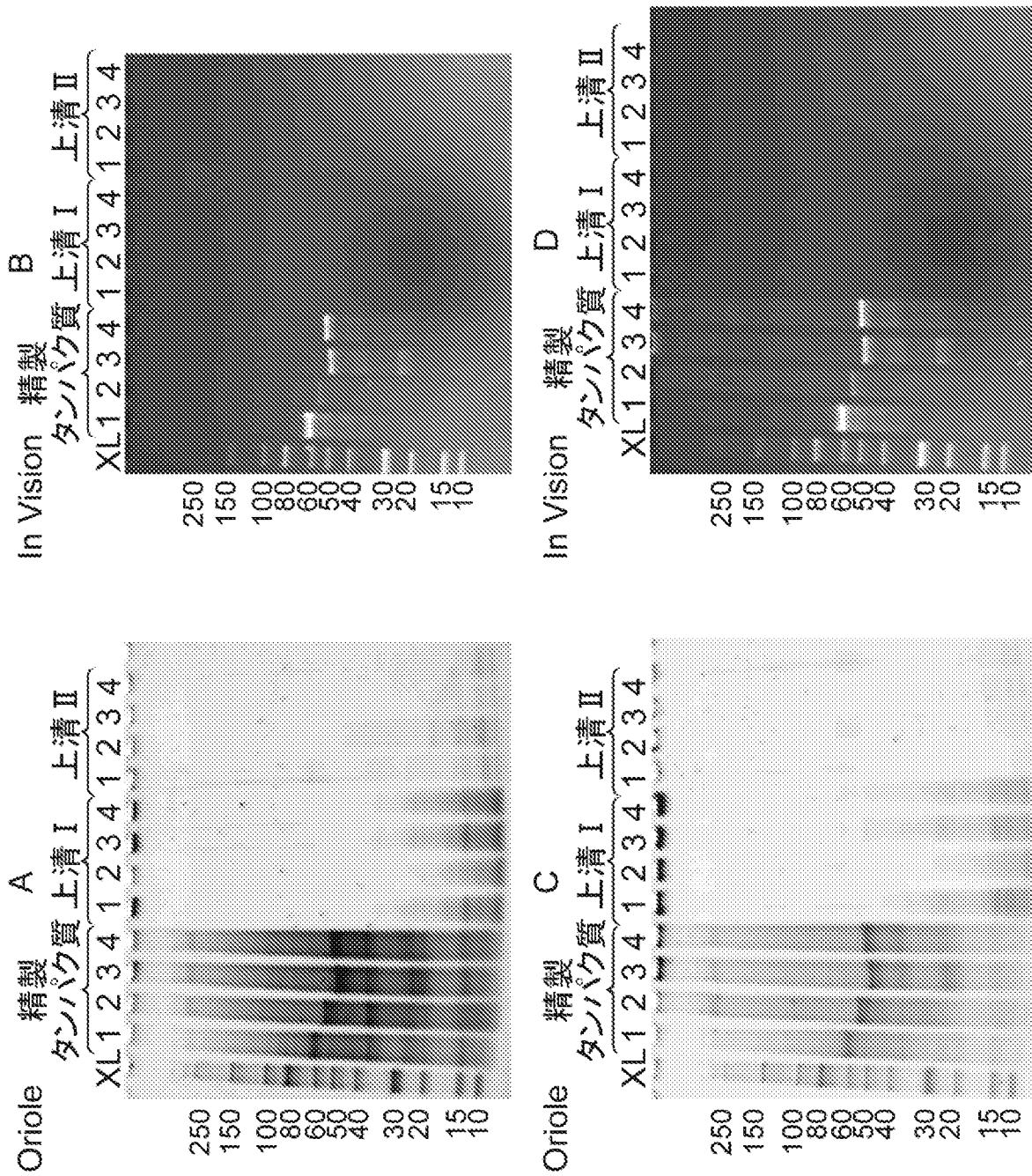
[図7]



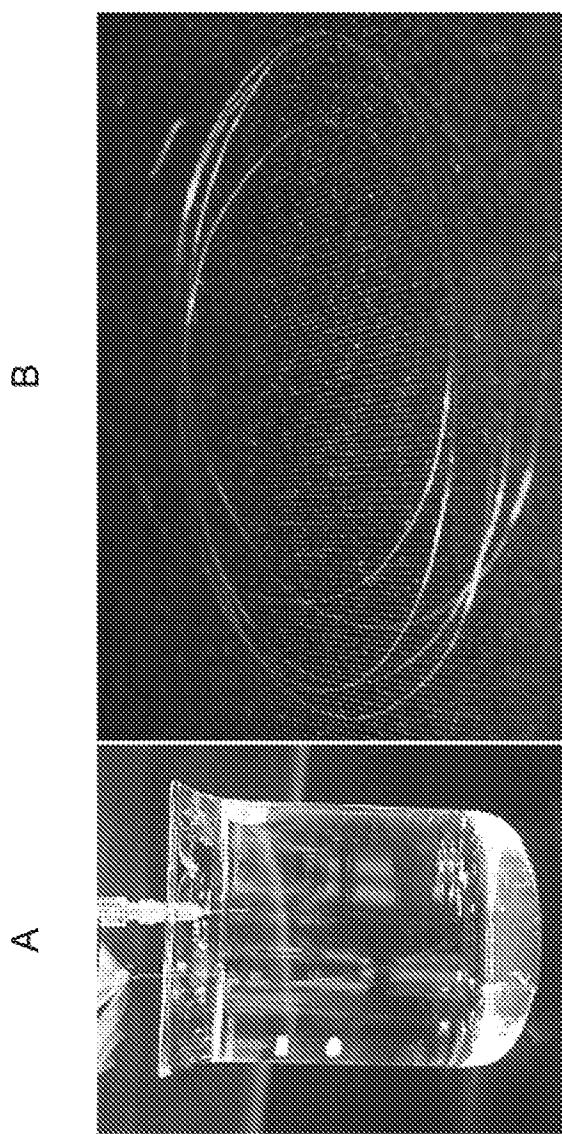
[図8]



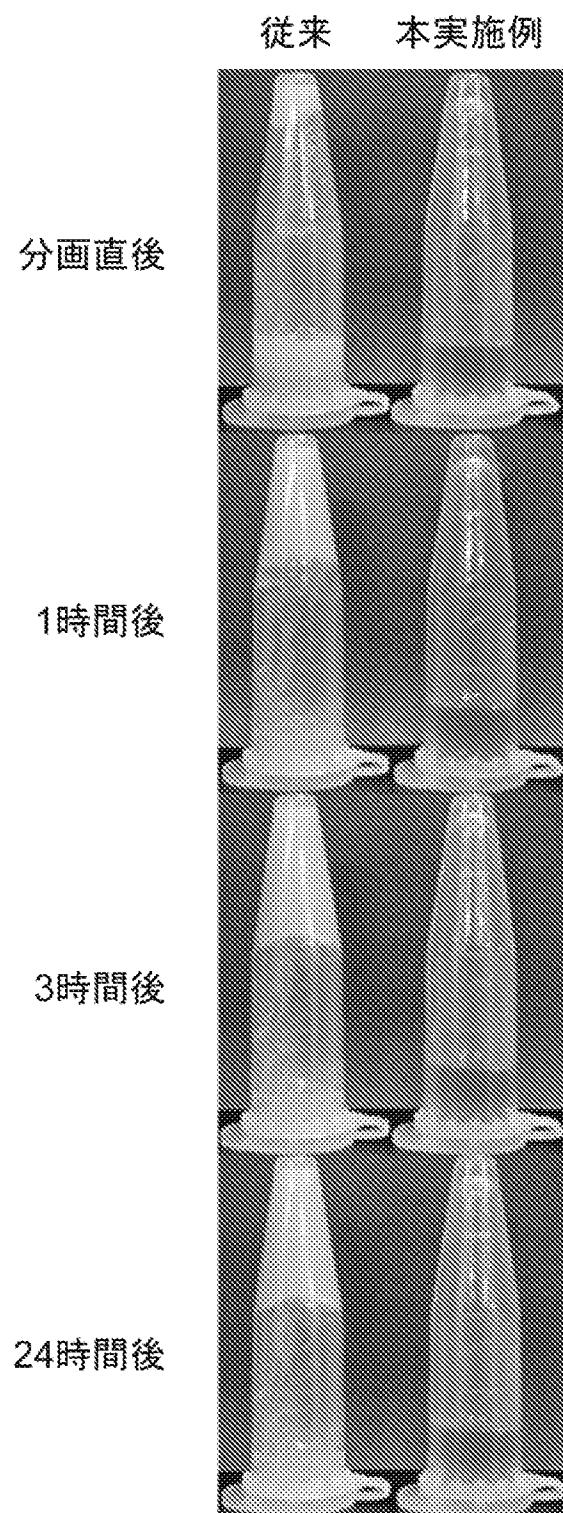
[図9]



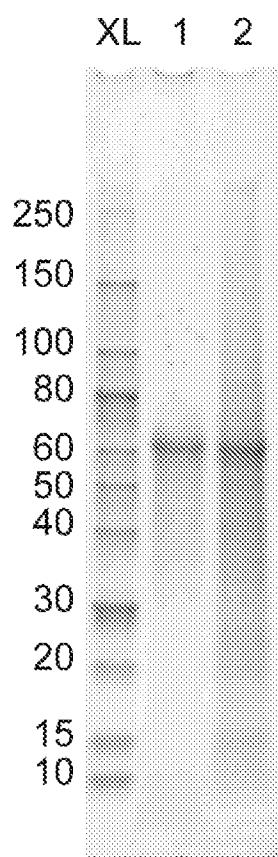
[図10]



[図11]



[図12]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/035983

### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K1/14 (2006.01)i, C07K1/30 (2006.01)i, C07K1/36 (2006.01)i,  
C07K14/435 (2006.01)i, C12P21/02 (2006.01)i, D01F6/68 (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)

Int.Cl. C07K1/14, C07K1/30, C07K1/36, C07K14/435, C12P21/02, D01F6/68

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   | 1971–2017 |
| Registered utility model specifications of Japan           | 1996–2017 |
| Published registered utility model specifications of Japan | 1994–2017 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), DWPI (Thomson Innovation)

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | JP 2013-523665 A (AMSLIK GMBH) 17 June 2013, abstract, claims 1, 18, paragraph [0048], etc. & US 8877903 B2 & WO 2011/120690 A2, abstract, claims 1, 18, page 12, paragraph [0002], etc. & EP 2552935 A1 & CN 102844326 A | 1–12                  |



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  
21 December 2017 (21.12.2017)

Date of mailing of the international search report  
09 January 2018 (09.01.2018)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2017/035983

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | WO 2014/103846 A1 (SPIBER INC.) 03 July 2014, claim 3, paragraphs [0015], [0021], [0059], all examples (in particular, paragraphs [0091], [0110], [0120]) & US 2015/0329587 A1, claim 3, paragraphs [0024], [0029], [0067], all examples (in particular, [0110], [0129], [0139]) & EP 2940032 A1 & CN 104884463 A | 1-12                  |
| Y         | WO 2014/103799 A1 (SPIBER INC.) 03 July 2014, paragraph [0043] & US 2015/0291673 A1, paragraphs [0068]-[0073] & EP 2940066 A1 & CN 104718244 A  | 3, 5                  |
| Y         | JP 2008-506409 A (TECHNISCHE UNIVERSITAET MUENCHEN) 06 March 2008, claim 34 & US 2007/0214520 A1, claim 34 & WO 2006/008163 A2 & EP 1773875 A1 & KR 10-2007-0059065 A & CN 101018806 A  | 3, 5                  |
| A         | WO 2014/103847 A1 (SPIBER INC.) 03 July 2014, entire text & US 2015/0344542 A1, entire text & EP 2940033 A1 & CN 104918950 A  | 1-12                  |

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C07K1/14(2006.01)i, C07K1/30(2006.01)i, C07K1/36(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i,  
C12P21/02(2006.01)i, D01F6/68(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C07K1/14, C07K1/30, C07K1/36, C07K14/435, C12P21/02, D01F6/68

## 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 | 1971-2017年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 |

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), DWPI (Thomson Innovation)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリーエ | 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<br>請求項の番号 |
|-----------------|--|----------------|
| Y               | JP 2013-523665 A (アーエムシルク ゲーエムベーハー)<br>2013.06.17,<br>要約、請求項1、請求項18、[0048]等<br>& US 8877903 B2<br>& WO 2011/120690 A2, Abstract, Claim 1, Claim 18, P. 12 第2<br>段落等<br>& EP 2552935 A1<br>& CN 102844326 A | 1-12           |

□ 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

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

|   |  |
|---|--|
| 国際調査を完了した日<br>21. 12. 2017  | 国際調査報告の発送日<br>09. 01. 2018                                       |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>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）<br>鈴木 崇之<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448<br>4B 4152 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                |
|-----------------------|--|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| Y                     | WO 2014/103846 A1 (スパイバー株式会社) 2014.07.03,<br>請求項3、[0015]、[0021]、[0059]、実施例全体（特に、[0091]、[0110]、[0120]）<br>& US 2015/0329587 A1, Claim 3, [0024], [0029], [0067], EXAMPLES<br>全体（特に、[0110]、[0129]、[0139]）<br>& EP 2940032 A1<br>& CN 104884463 A | 1-12           |
| Y                     | WO 2014/103799 A1 (スパイバー株式会社) 2014.07.03,<br>[0043]<br>& US 2015/0291673 A1, [0068]-[0073]<br>& EP 2940066 A1<br>& CN 104718244 A  | 3, 5           |
| Y                     | JP 2008-506409 A (テヒニシェ ウニヴェルズイテート ミュンヘン) 2008.03.06,<br>請求項34<br>& US 2007/0214520 A1, Claim 34<br>& WO 2006/008163 A2<br>& EP 1773875 A1<br>& KR 10-2007-0059065 A<br>& CN 101018806 A   | 3, 5           |
| A                     | WO 2014/103847 A1 (スパイバー株式会社) 2014.07.03,<br>全文<br>& US 2015/0344542 A1, 全文<br>& EP 2940033 A1<br>& CN 104918950 A   | 1-12           |