

(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  
2023年10月12日(12.10.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/195515 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/63* (2006.01)      *C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 1/15* (2006.01)      *C40B 40/08* (2006.01)  
*C12N 1/19* (2006.01)      *C40B 40/10* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)
- (21) 国際出願番号:                      PCT/JP2023/014202
- (22) 国際出願日:                      2023年4月6日(06.04.2023)
- (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 2022-063650    2022年4月6日(06.04.2022)    JP
- (71) 出願人: 独立行政法人国立高等専門  
学校機構 (NATIONAL INSTITUTE OF  
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1930834 東京都八  
王子市東浅川町7 0 1 番2 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 本間 俊将 (HOMMA, Toshimasa);  
〒0218511 岩手県一関市萩荘字高梨 独立
- 行政法人国立高等専門学校機構 一関工  
業高等専門学校内 Iwate (JP).
- (74) 代理人: 鎌田 光宜, 外 (KAMADA, Mitsunori et  
al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四  
丁目1 番1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル  
高島国際特許事務所 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, CV, 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, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING MIXED POPULATION CONTAINING NUCLEIC ACIDS HAVING DIFFERENT SEQUENCE REPEATS AND DIFFERENT NUMBERS OF REPETITIONS

(54) 発明の名称: 反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団の構築方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for constructing a mixed population containing nucleic acids having different sequence repeats and different numbers of repetitions, the method comprising the steps of: (A) using as a template a mixed population of circular single-stranded nucleic acids containing respective sequence repeats that differ from each other in at least one base, to prepare a mixed population containing linear single-stranded nucleic acids each corresponding to each of the circular single-stranded nucleic acids, wherein each of the linear single-stranded nucleic acids includes 2-300 consecutive repetitions of a sequence complementary to each of the sequence repeats; and (B) using as a template the mixed population of linear single-stranded nucleic acids to prepare a mixed population containing double-stranded nucleic acid populations each corresponding to each of the circular single-stranded nucleic acids, wherein each of the double-stranded nucleic acid populations contains 2-300 types of double-stranded nucleic acids, each including 1-300 consecutive repetitions of each of the sequence repeats, with the number of repetitions of each of the sequence repeats included being different from each other.

(57) 要約: 本発明は、以下の工程を含む、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団の構築方法を提供する: (A) 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該各線状一本鎖核酸は各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程、および (B) 各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含むかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程。

WO 2023/195515 A1

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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：

反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団の構築方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団または該混合集団によってコードされるペプチドからなる混合集団の構築方法に関する。

### 背景技術

[0002] 特定のアミノ酸の並びが繰り返し現れるペプチドを人工的にデザインすることで環境応答性高分子や特殊ハイドロゲル、繊維素材などが開発されている。例えば、エラスチンの配列をベースにデザインされた[VPGXG]<sub>90</sub>（数字は反復回数、XにはV:G:Aが5:3:2の割合で入る。）は体温に近い転移温度の付近で急激に相転移を起こす環境応答性があり、薬剤放出や組換えタンパク質精製タグなどへの応用が試されている（特許文献1、非特許文献1）。また、クモ糸フィブロインの反復アミノ酸配列情報を改変して発酵生産法で強靱な繊維を作る取り組み（特許文献2）や、イカの歯に存在する反復アミノ酸配列情報を基にデザインした組換えタンパク質で自己修復性樹脂の研究開発（非特許文献2）なども進められている。さらに、高機能な細胞培養基材を目指し、高柔軟性発現部位、インテグリン結合サイト、マトリックスメタロプロテアーゼ認識サイト、ヘパリン結合サイトがタンデムに繋がった非常に長い単位が反復するペプチド（非特許文献3）も開発されている。

[0003] しかしながら、人工的な反復アミノ酸配列を持つペプチドをコードする遺伝子の合成はプライマーや制限酵素の使用が制限されるために非常に手間がかかる。たとえ遺伝子を合成できたとしても宿主での発現が難しい場合も多く、さらにデザインされた反復アミノ酸配列が予想どおりの物性を示すとは限らないため、デザインと遺伝子合成を繰り返し行わなければならない。こ

うした問題の解決法として、反復アミノ酸配列の混合集団を構築して、適した選抜方法でその中から有用な配列を見出す進化分子工学的手法が開発（特許文献3）された。しかしながらこの手法には、1）反復塩基配列の延伸操作に制限酵素を使うため、使用する塩基配列情報が制限される、2）延伸操作が複雑であり、時間がかかる、3）反復単位毎にアミノ酸配列が異なるため、機能に及ぼすアミノ酸の置換の影響の解明が困難であり、配列情報をデザインに反映しにくい、などの課題がある。

[0004] 同一のアミノ酸配列が繰り返し現れる反復アミノ酸配列を合成する手段としては、1種類の環状一本鎖DNAを鋳型にしてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う方法（非特許文献4）が知られている。しかしながら、この方法は、DNAポリメラーゼと鋳型が何度も着脱を繰り返すため、反復回数が異なる1種類の反復塩基配列で構成される混合集団を作ることができるが、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる反復配列で構成される混合集団を作れない技術的欠点がある。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開2016/081884号公報  
特許文献2：国際公開2019/022163号公報  
特許文献3：国際公開2002/020565号公報

### 非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Y. Fan et al., *Polymers*, 10, 468, 2018  
非特許文献2：H. Jung et al., *PNAS*, 113, 6478–6483, 2016  
非特許文献3：C. L. McGann et al., *Macromolecules*, 214, 203–213, 2013  
非特許文献4：M. Amiram et al., *Nat. Mater.*, 10, 141–148, 2011

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、理想的な機能を示すペプチドをデザインするための新規なアプ

ローチを提供することを目的としている。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、アミノ酸残基置換が生じたアミノ酸配列をコードするように核酸の一部を混合塩基を用いて合成した環状一本鎖DNAの混合集団を鋳型に鎖置換型DNAポリメラーゼを用いて等温増幅することで、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を簡便に構築でき、さらに該核酸を含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、発現させることによって、反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドからなる混合集団をも簡便に構築できることを見出し、以て本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下を提供する。

[1] 以下の工程を含む、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団の構築方法：

(A) 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該各線状一本鎖核酸は各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程、および

(B) 各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程。

[2] 前記各二本鎖核酸集団が、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている、[1]に記載の方法。

[3] さらに以下の工程を含む、[1]または[2]に記載の方法：

(C) 前記各二本鎖核酸集団からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込む工程、および

(D) 該発現ベクターを宿主細胞に導入する工程。

- [4] 核酸が、DNAである、[1]～[3]のいずれか1つに記載の方法。
- [5] 工程(A)および工程(B)において、鎖置換型DNAポリメラーゼが用いられる、[4]に記載の方法。
- [6] 工程(A)および工程(B)が同時に行われる、[5]に記載の方法。
- [7] 工程(A)および工程(B)が等温条件下で行われ、該等温条件が50℃～68℃内の一定温度である、[6]に記載の方法。
- [8] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、16種類以上10000種類以下である、[1]～[7]のいずれか1つに記載の方法。
- [9] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列である、[1]～[8]のいずれか1つに記載の方法。
- [10] 反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる二本鎖核酸集団を該反復塩基配列毎に含む、核酸の混合集団であって、該反復塩基配列は少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列である、混合集団。
- [11] 前記二本鎖核酸集団が、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている、[10]に記載の混合集団。
- [12] 核酸が、DNAである、[10]または[11]に記載の混合集団。
- [13] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、16種類以上10000種類以下である、[10]～[12]のいずれか1つに記載の混合集団。
- [14] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列である、[10]～[13]のいずれか1つに記載の混合集団。
- [15] [10]～[14]のいずれか1つに記載の混合集団が発現可能に組み込まれた、発現ベクター。

[16] [15]に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

[17]以下の工程を含む、反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドからなる混合集団の構築方法：

(a) 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該反復塩基配列は少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列であり、該各線状一本鎖核酸は各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程、

(b) 各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含み、かつ互いに該各反復塩基配列の反復回数が異なる2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程、

(c) 前記各二本鎖核酸集団からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込む工程、

(d) 該発現ベクターを宿主細胞に導入する工程、および

(e) 該宿主細胞を培養することによってペプチドを発現させる工程。

[18] 前記各二本鎖核酸集団が、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている、[17]に記載の方法。

[19] 核酸が、DNAである、[17]または[18]に記載の方法。

[20] 工程(a)および工程(b)において、鎖置換型DNAポリメラーゼが用いられる、[19]に記載の方法。

[21] 工程(a)および工程(b)が同時に行われる、[20]に記載の方法。

[22] 工程(a)および工程(b)が等温条件下で行われ、該等温条件が50℃~68℃内の一定温度である、[21]に記載の方法。

[23] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、16種類以

上10000種類以下である、[17]～[22]のいずれか1つに記載の方法。

[24] 反復アミノ酸配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該反復アミノ酸配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下のペプチドからなるペプチド集団を該反復アミノ酸配列毎に含む、ペプチドの混合集団であって、該反復アミノ酸配列は少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列である、混合集団。

[25] 少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列が、2種類以上1000種類以下である、[24]に記載の混合集団。

### 発明の効果

[0010] 本発明によれば、アミノ酸残基置換が生じたアミノ酸配列をコードするように核酸の一部を混合塩基を用いて合成した環状一本鎖DNAの混合集団と鎖置換型DNAポリメラーゼを含んだ反応溶液を一定温度でインキュベートするだけで、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を構築することができる。また、反応の際に5'末端側にクローニング用塩基配列を持った2種類のプライマーを用いることで対応する塩基配列を有する発現ベクターに容易に該核酸を導入でき、ペプチドの発現試験、物性評価を迅速に行うことができる。また、ペプチドのアミノ酸配列情報を単純化（例えば[VPGXG]<sub>90</sub>の形で表記）でき、より優れた機能を持ったペプチドを新たに開発する際にそのアミノ酸配列情報を容易にデザインへ反映できる。さらに、遺伝子合成に制限酵素を使用せずに済むため、反復アミノ酸配列の自由度が高いという利点も有する。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を調製する工程を示す図である。

[図2]等温増幅によって得られたDNA産物を示す図である。

[図3]Brevibacillus内で線状ベクターに相同組み換えで挿入された核酸（反復塩基配列が3回反復されている）の挿入部位の上流から下流の塩基配列を示す図である。囲み文字：分泌シグナルをコードする塩基配列。大文字：反復



塩基配列（例：3回反復）。小文字：線状ベクター末端塩基配列。下線部位：クローニング用塩基配列。太文字：hisタグ配列をコードする塩基配列。

[図4]20個の形質転換体の培養上清が電気泳動されたポリアクリルアミドゲルのHisタグ融合タンパク質染色像を示す図である。

[図5]4個の形質転換体の培養上清が電気泳動されたポリアクリルアミドゲルのHisタグ融合タンパク質染色像を示す図である。無：IPTG無添加、有：0.3 mM IPTG

[図6]1、2、3または4番目の形質転換体によって発現されたペプチドの反復アミノ酸配列を示す図である。下線部は導入された混合塩基によって変化するアミノ酸残基を表す。なお、全てのペプチドで最初の反復アミノ酸配列と最後の反復アミノ酸配列はプライマー由来の混合塩基でアミノ酸が決定されるため省略した。

[図7]10個の形質転換体の可溶性画分と不溶性画分が電気泳動されたポリアクリルアミドゲルのHisタグ融合タンパク質染色像を示す図である。溶：可溶性画分、不：不溶性画分

[図8]His融合タンパク質の発現量を示す図である。

[図9]可溶性画分に含まれるHis融合タンパク質と不溶性画分に含まれるHis融合タンパク質の存在比を示す図である。

[図10]1、4、5、6、8または10番目の形質転換体によって発現されたペプチドの反復アミノ酸配列を示す図である。下線部は導入された混合塩基によって変化するアミノ酸残基を表す。なお、全てのペプチドで最初の反復アミノ酸配列と最後の反復アミノ酸配列はプライマー由来の混合塩基でアミノ酸が決定されるため省略した。

[図11]4、5、6、8または10番目の形質転換体によって発現されたペプチドのハイドロパシーインデックスを示す図である。

[図12]10個の形質転換体の可溶性画分と不溶性画分が電気泳動されたポリアクリルアミドゲルのCBB染色像を示す図である。

[図13]比較対象株ELPが発現する組換えタンパク質の塩基配列を塩基配列 1 7

として示す図である。

[図14]比較対象株ELPが発現する組換えタンパク質のアミノ酸配列をアミノ酸配列4として示す図である。

[図15]細胞抽出液の蛍光強度を示す図である。

[図16]精製GFP溶液の蛍光強度を示す図である。\*: $P<0.05$ ; \*\*\*\*: $P<0.0001$

[図17]精製GFP溶液が電気泳動されたポリアクリルアミドゲルのCBB染色像を示す図である。

[図18]コロニー6の形質転換体によって発現されたペプチドの反復アミノ酸配列を示す図である。下線部は導入された混合塩基によって変化するアミノ酸残基を表す。

### 発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団の構築方法（以下、本発明の核酸集団の構築方法）を提供する。

[0013] 本発明の核酸集団の構築方法において、核酸は、DNA、RNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）であってよいが、好ましくはDNAである。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。

[0014] 本発明の核酸集団の構築方法は、少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該各線状一本鎖核酸は各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程（本発明の工程（A））を含む。

[0015] 本発明の工程（A）では、少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団が鋳型として用いられる（図1のStep 1）。

[0016] 本発明の工程（A）において反復塩基配列（本発明の反復塩基配列）は、本発明の核酸集団の構築方法において構築される混合集団を構成する各環状一

本鎖核酸に反復して含まれる塩基配列をいう。本発明の各反復塩基配列は、少なくとも1か所の塩基が互いに異なるものであればその種類は特に制限されないが、通常、4種類以上、好ましくは、16種類以上、より好ましくは、64種類以上であり、通常、10000種類以下、好ましくは、1000種類以下、より好ましくは、100種類以下である。本発明の反復塩基配列の長さの範囲は、通常、約15bp～約500bp、好ましくは、約30bp～約350bp、より好ましくは、約45bp～約160bpである。また、本発明の反復塩基配列の配列情報は、少なくとも1か所の塩基が互いに異なる塩基配列であれば特に制限されないが、少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列（本発明の反復アミノ酸配列）をコードする塩基配列であることが好ましい。

[0017] 本発明の各反復アミノ酸配列は、少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なるものであればその種類は特に制限されないが、通常、2種類以上、好ましくは、5種類以上、より好ましくは、10種類以上であり、通常、1000種類以下、好ましくは、300種類以下、より好ましくは、100種類以下である。本発明の反復アミノ酸配列の長さの範囲は、通常、約5個～約165個、好ましくは、約10個～約115個、より好ましくは、約15個～約55個である。

[0018] 本発明の反復アミノ酸配列としては、例えば、機能未知のペプチド、または機能の向上もしくは喪失を求められるペプチドなどが挙げられる。ペプチドの機能としては、特に制限されるものではないが、例えば、酵素活性、タンパク質結合活性、核酸結合活性などが挙げられる。

[0019] 本発明の工程（A）において各環状一本鎖核酸（本発明の環状一本鎖核酸）は、上記の各反復塩基配列からなる。本発明の環状一本鎖核酸は、本分野における公知の手段に従って作製することができる。そのような手段の一例としては、例えば、以下のような方法が挙げられる。

[0020] まず、5'末端がリン酸基で修飾された、本発明の反復塩基配列からなる線状一本鎖核酸を調製する。次に、該線状一本鎖核酸を環状構造にした際に生じる5'末端と3'末端の連結部位を中心として形成される約20bp～約40bpの塩基配列に相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸（プライマーA）を合成する

。さらに、該一本鎖核酸に該線状一本鎖核酸をアニーリングさせることによって、該線状一本鎖核酸に環状構造を形成させ、リガーゼを用いて、該線状一本鎖核酸の5'末端と3'末端を連結する。プライマーAが本発明の環状一本鎖核酸（または線状一本鎖核酸）にアニーリングする温度は、プライマーAの塩基配列によって決定されるが、通常、約4℃～約75℃、好ましくは、約4℃～約55℃、より好ましくは、約4℃～約20℃が挙げられる。以上の通りにして、本発明の環状一本鎖核酸は、反復塩基配列ごとに作製され、混合集団（本発明の環状一本鎖核酸からなる混合集団）を構成する（図1のStep 2）。

[0021] 本発明の工程（A）において本発明の環状一本鎖核酸を作製する際に使用されるプライマーAは、5'側末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されていてもよい。付加される塩基配列の長さはクローニングに適した長さであれば特に制限されるものではないが、例えば、約5bp～約50bp、好ましくは、約7bp～約20bp、より好ましくは、約12bp～約17bpが挙げられる。

[0022] 本発明の工程（A）では、以上の通りにして得られる本発明の環状一本鎖核酸からなる混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団（本発明の線状一本鎖核酸からなる混合集団）を調製する。本発明の環状一本鎖核酸に対応する線状一本鎖核酸（本発明の線状一本鎖核酸）とは、各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下、好ましくは、150反復以下、より好ましくは、75反復以下含む線状一本鎖核酸をいう。本発明の環状一本鎖核酸を鋳型として本発明の線状一本鎖核酸を合成する過程において、既に合成された線状一本鎖核酸と環状一本鎖核酸間の水素結合を5'→3'へ解離させつつ、新たな相補的核酸を5'→3'へ合成することができるポリメラーゼを使用することによって、反応温度を変化させることなく本発明の反復塩基配列を連続して2反復以上含むように線状一本鎖核酸を伸長することができる（図1のStep 3の1、2）。そのような方法としては、本発明の環状一本鎖核酸を鋳型とした鎖置換型DNAポリメラーゼを用いた核酸合成方法が挙げられる。

[0023] 本発明の工程 (A) における鎖置換型DNAポリメラーゼを用いた核酸合成方法は、公知のプロトコールに従って実施することができる。例えば、本発明の環状一本鎖核酸からなる混合集団、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPsおよびプライマーAを含む混合液を等温条件下、所望の時間、反応させることによって各線状一本鎖核酸を合成することができる。鎖置換型DNAポリメラーゼは、5' → 3' ポリメラーゼ活性および鎖置換活性を有する限り特に制限されるものではないが、例えば、Bst DNAポリメラーゼ、 $\phi$ 29 DNAポリメラーゼ、Csa DNAポリメラーゼ、96-7 DNAポリメラーゼおよびSD DNAポリメラーゼなどが挙げられる。等温条件としては、プライマーAが本発明の環状一本鎖核酸にアニーリングし、鎖置換型DNAポリメラーゼが5' → 3' ポリメラーゼ活性および鎖置換活性を発揮できる限り制限されるものではないが、例えば、約25°C～約72°C、好ましくは、約50°C～約68°C、より好ましくは、約55°C～約65°Cなどに含まれる一定温度が挙げられる。また、等温遺伝子増幅法の反応時間は、各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む線状一本鎖核酸を合成できるかぎり特に制限されないが、例えば、約0.001時間～約8時間、好ましくは、約0.01時間～約4時間、特に好ましくは、約0.05時間～約2時間などが挙げられる。

[0024] 本発明の核酸集団の構築方法は、各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程（本発明の工程 (B)）を含む。

[0025] 本発明の工程 (B) では、本発明の工程 (A) で調製された、本発明の線状一本鎖核酸からなる混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団（本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団）を調製する。本発明の環状一本鎖核酸に対応する二本鎖核酸集団（本発明の二本鎖核酸集団）とは、各反復塩基配

列を連続して1反復以上、300反復以下、好ましくは、150反復以下、より好ましくは、75反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下、好ましくは、150種類以下、より好ましくは、75種類以下の二本鎖核酸からなる集団をいう。本発明の線状一本鎖核酸を鋳型として本発明の二本鎖核酸集団を合成する過程において、鋳型となる本発明の線状一本鎖核酸と既に合成された相補的核酸間の水素結合を5' →3' へ解離させつつ、新たな相補的核酸を5' →3' へ合成することができるポリメラーゼを使用することによって、反応温度を変化させることなく本発明の反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の相補的線状一本鎖核酸を伸長することができる。2種類以上、300種類以下の該相補的線状一本鎖核酸は環状一本鎖核酸ごとに合成され、2種類以上、300種類以下の相補的線状一本鎖核酸を環状一本鎖核酸ごとに含む混合集団を構成する（図1のStep 3の3、4）。そして、該混合集団をさらなる鋳型として、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団が合成される（図1のStep 3の5）。そのような方法としては、本発明の線状一本鎖核酸を鋳型とした鎖置換型DNAポリメラーゼを用いた核酸合成方法が挙げられる。

[0026] 本発明の工程（B）における鎖置換型DNAポリメラーゼを用いた核酸合成方法は、本発明の工程（A）と同様に公知の手段に従って実施することができるが、例えば、本発明の線状一本鎖核酸からなる混合集団、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPs、プライマーAおよび本発明の線状一本鎖核酸の塩基配列に相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸（プライマーB）を含む混合液を等温条件下、所望の時間、反応させることによって本発明の二本鎖核酸集団を調製することができる。鎖置換型DNAポリメラーゼは、5' →3' ポリメラーゼ活性および鎖置換活性を有する限り特に制限されるものではないが、例えば、Bst DNAポリメラーゼ、φ29 DNAポリメラーゼ、Csa DNAポリメラーゼ、96-7 DNAポリメラーゼおよびSD DNAポリメラーゼなどが挙げられる。等温条件としては、

鎖置換型DNAポリメラーゼが5' →3' ポリメラーゼ活性および鎖置換活性を発揮できる限り制限されるものではないが、例えば、約25℃～約72℃、好ましくは、約50℃～約68℃、より好ましくは、約55℃～約65℃などに含まれる一定温度が挙げられる。また、等温遺伝子増幅法の反応時間は、各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸を合成できるかぎり特に制限されないが、例えば、約0.5時間～約5時間、好ましくは、約1時間～約4時間、特に好ましくは、約2時間～約3時間などが挙げられる。また、後述する工程(C)において、発現ベクターに発現可能に組み込むための二本鎖核酸の十分な分子数を確保することを考慮した場合、等温遺伝子増幅法の反応時間は、約0.5時間～約48時間、好ましくは、約3時間～約24時間、特に好ましくは、約6時間～約12時間などが挙げられる。

[0027] 本発明の工程 (B) において本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を作製する際に使用されるプライマーBは、さらに5' 側末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されていてもよい。付加される塩基配列の長さはクローニングに適した長さであれば特に制限されるものではないが、例えば、約5bp～約50bp、好ましくは、約7bp～約20bp、特に好ましくは、約12bp～約17bpが挙げられる。

[0028] 本発明の核酸集団の構築方法の本発明の工程 (A) および工程 (B) は、工程 (A)、工程 (B) の順に連続的に実施されてもよいし、同時に実施されてもよい。工程 (A)、工程 (B) の順に実施される場合、工程 (A) で調製された、本発明の線状一本鎖核酸からなる混合集団をそのまま工程(B)で用いてもよいし、公知の手段(例: エタノール沈殿法)を用いて予め精製したのち、工程 (B) で用いてもよい。本発明の工程 (A) および工程 (B) において、同一の鎖置換型DNAポリメラーゼが使用される場合、本発明の工程 (A) および工程 (B) は同時に行われてもよい。その場合、本発明の工程 (A) および工程 (B) においては、共通の等温条件、共通の反応時間の下、共通のプライマーAが使用される。共通の等温条件としては、例えば、約25℃～約72℃、好ま

しくは、約50℃～約68℃、より好ましくは、約55℃～約65℃などに含まれる一定温度が挙げられる。共通の反応時間としては、各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸を合成できる時間として、例えば、約0.5時間～約5時間、好ましくは、約1時間～約4時間、特に好ましくは、約2時間～約3時間などが挙げられ、発現ベクターに発現可能に組み込むための二本鎖核酸の十分な分子数を確保することを考慮した場合、約0.5時間～約48時間、好ましくは、約3時間～約24時間、特に好ましくは、約6時間～約12時間などが挙げられる。工程(B)では、工程(A)で調製される本発明の線状一本鎖核酸が鋳型として利用されるため、工程(A)と工程(B)が同時に開始され、同時に終了する場合、工程(B)の反応開始は工程(A)より僅かに遅れる。結果として、工程(B)で調製される二本鎖核酸の反復塩基配列の反復回数は、本発明の線状一本鎖核酸よりも減少し、それに伴い得られる種類も減少する。従って、本発明の工程(A)および工程(B)が同時に行われる場合、本発明の二本鎖核酸集団は、各反復塩基配列を連続して1反復以上、200反復以下、好ましくは、120反復以下、より好ましくは、60反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、200種類以下、好ましくは、120種類以下、より好ましくは、60種類以下の二本鎖核酸からなる集団である。また、本発明の工程(A)および工程(B)において使用される、プライマーAおよびプライマーBが、それぞれの5'側末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている場合、本発明の二本鎖核酸集団は、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている。

[0029] 以上の通りにして、本発明の工程(A)および工程(B)を含む、本発明の核酸集団の構築方法は、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を構築することができる。従って、本発明はまた、反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸か



らなる二本鎖核酸集団を該反復塩基配列毎に含む、核酸の混合集団であって、該反復塩基配列は少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列である、混合集団（本発明の核酸集団）を提供する。本発明の核酸集団において、核酸の種類、反復塩基配列の種類、長さ、二本鎖核酸に含まれる反復塩基配列の反復回数、二本鎖核酸の種類、二本鎖核酸に付加される両末端のクローニング用塩基配列などは、本発明の核酸集団の構築方法における定義と同一であってよい。

[0030] 本発明の核酸集団の構築方法は、前記各二本鎖核酸集団からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込む工程（本発明の工程（C））をさらに含んでもよい。

[0031] 本発明の工程（C）は、例えば、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより実施することができる。例えば、発現ベクターが、プライマーAおよびプライマーBの5'側末端にそれぞれ付加された、ベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列を、発現ベクターの挿入部位の5'側および3'側に有する場合、該塩基配列を介した相同組み換えによって、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込むことができる（図1のStep 4）。

[0032] また、上記の混合集団に含まれる核酸の反復回数を後から所望の範囲に限定し、当該範囲の反復回数を有する核酸からなる混合集団のみを上記の発現ベクターに組み込むことも可能である。核酸の反復回数の範囲を後から限定する方法としては、分子量の違いに基づいて分子を分離する方法が挙げられる。そのような方法としては、アガロースゲル電気泳動法、アクリルアミドゲル電気泳動法およびゲルろ過法などが挙げられる。例えば、アガロースゲル電気泳動法の場合、反復塩基配列の長さおよび反復回数の所望の範囲から単離したい核酸の塩基長の範囲を計算し、当該塩基長の範囲をよく分離することができる濃度のアガロースゲルを作製する。作製したアガロースゲルで上記の混合集団に含まれる核酸全てを電気泳動によって分離し、所望の範囲の反

復回数を有する核酸のみを含むアガロースゲルを切り出し、当該核酸を抽出することができる。

[0033] 発現ベクターとしては、エシェリヒア属菌用発現プラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pET22b）；バチルス属菌用発現プラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）；酵母用発現プラスミド（例、pSH19、pSH15）；昆虫細胞用発現プラスミド（例：pFast-Bac）；動物細胞用発現プラスミド（例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo）； $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ；バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター（例：BmNPV、AcNPV）；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクター；Tiプラスミドなどの植物細胞用プラスミドなどが用いられる。

[0034] プロモーターとしては、核酸の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が動物細胞である場合、サイトメガロウイルス（CMV）由来プロモーター（例：CMV前初期プロモーター）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）由来プロモーター（例：HIV LTR）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）由来プロモーター（例：RSV LTR）、マウス乳癌ウイルス（MMTV）由来プロモーター（例：MMTV LTR）、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）由来プロモーター（例：MMTV LTR）、単純ヘルペスウイルス（HSV）由来プロモーター（例：HSVチミジンキナーゼ（TK）プロモーター）、SV40由来プロモーター（例：SV40初期プロモーター）、エプスタインバーウイルス（EBV）由来プロモーター、アデノ随伴ウイルス（AAV）由来プロモーター（例：AAV p5プロモーター）、アデノウイルス（AdV）由来プロモーター（Ad2またはAd5主要後期プロモーター）などが用いられる。宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda P_L$ プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。宿主がバチルス属菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。宿主が酵母である場合、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好まし

い。宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

[0035] 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子 [メソトレキセート (MTX) 耐性]、アンピシリン耐性 (Amp<sup>r</sup>) 遺伝子、ネオマイシン耐性 (Neor) 遺伝子 (G418耐性) 等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター (CHO-dhfr-) 細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、発現ベクターが導入されたCHO-dhfr-をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

[0036] 発現ベクターは、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列 (シグナルコドン) を、組み込まれる核酸の5'末端側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合、 $\alpha$ -アミラーゼシグナル配列、サブチリシンシグナル配列などが、宿主が酵母である場合、MF $\alpha$ シグナル配列、SUC2シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合、インシュリンシグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

[0037] 以上の通りにして、本発明の工程 (A)、工程 (B) および工程 (C) を含む、本発明の核酸集団の構築方法は、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込まれた態様で構築することができる。従って、本発明はまた、本発明の核酸集団が発現可能に組み込まれた、発現ベクター (本発明の発現ベクター) を提供する。本発明の発現ベクターにおいて、発現ベクターの種類などは、本発明の核酸集団の構築方法における定義と同一であってよい。

[0038] 本発明の核酸集団の構築方法は、発現ベクターを宿主細胞に導入する工程 (本発明の工程 (D)) をさらに含んでもよい。

[0039] 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細

胞、昆虫、動物細胞、植物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1、JM103、JA 221、HB101、C600などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114、207-21、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) HPD31などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22、AH22R、NA 87-11A、DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913、NCYC2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

[0040] 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five™細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞、*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞 ; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217 (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる。

[0041] 動物細胞としては、例えば、サル由来細胞 (例 : COS-1、COS-7、CV-1、Vero)、ハムスター由来細胞 (例 : BHK、CHO、CHO-K1、CHO-dhfr)、マウス由来細胞 (例 : NIH3T3、L、L929、CTLL-2、AtT-20)、ラット由来細胞 (例 : H4IIE、PC-12、3Y1、NBT-II)、ヒト由来細胞 (例 : HEK293、A549、HeLa、HepG2、HL-60、Jurkat、U937)などが用いられる。

[0042] 植物細胞としては、例えば、シロイヌナズナ由来細胞、ポプラ由来細胞などが用いられる。

[0043] 宿主細胞への導入は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。エシェリヒア属菌は、例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972)や*Gene*, 17, 107 (1982)などに記載の方法に従って導入する

ことができる。バチルス属菌は、例えば、Molecular and General Genetics, 168, 111 (1979)などに記載の方法に従って導入することができる。宿主がブレビバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*) HPD31である場合は、*Brevibacillus in vivo Cloning*法 (BIC法)に従って、*Brevibacillus*に導入することができる。酵母は、例えば、Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)などに記載の方法に従って導入することができる。昆虫細胞および昆虫は、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って導入することができる。動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、Virology, 52, 456(1973)に記載の方法に従って導入することができる。植物細胞は、例えば、植物細胞工学, 2, 287 (1990)に記載の方法に従って、導入することができる。

[0044] 以上の通りにして、本発明の工程 (A)、工程 (B)、工程 (C) および工程 (D) を含む、本発明の核酸集団の構築方法は、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を宿主細胞に含まれた態様で構築することができる。従って、本発明はまた、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞 (本発明の宿主細胞) を提供する。本発明の宿主細胞において、宿主細胞の種類などは、本発明の核酸集団の構築方法における定義と同一であってよい。

[0045] 本発明の核酸集団の構築方法はまた、本発明の反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を発現可能な宿主細胞を培養することによって、当該混合集団によってコードされるペプチドの混合集団を容易に構築することができる。従って、本発明はまた、反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドからなる混合集団の構築方法 (以下、本発明のペプチド集団の構築方法) を提供する。

[0046] 本発明のペプチド集団の構築方法は、以下の工程を含む。

(a) 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本

鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該反復塩基配列は少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列であり、該各線状一本鎖核酸は各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程（本発明の工程（a））、

（b）各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含み、かつ互いに該各反復塩基配列の反復回数が異なる2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程（本発明の工程（b））、

（c）前記各二本鎖核酸集団からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込む工程（本発明の工程（c））、および

（d）該発現ベクターを宿主細胞に導入する工程（本発明の工程（d））。

本発明のペプチド集団の構築方法に含まれる本発明の工程（a）～（d）は、本発明の核酸集団の構築方法に含まれる本発明の工程（A）～（D）と同一であってよい。

[0047] 本発明のペプチド集団の構築方法は、該宿主細胞を培養することによってペプチドを発現させる工程（本発明の工程（e））を含む。

[0048] 宿主細胞の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である宿主細胞を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、宿主細胞の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～8である

。宿主がエシェリヒア属菌である宿主細胞を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。培養は、通常約 $15\sim 43^{\circ}\text{C}$ で、約 $3\sim 24$ 時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。宿主がバチルス属菌である宿主細胞の培養は、通常約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で、約 $6\sim 24$ 時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。宿主が酵母である宿主細胞を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地や $0.5\%$  カザミノ酸を含有するSD培地などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約 $5\sim 8$ である。培養は、通常約 $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ で、約 $24\sim 72$ 時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。宿主が昆虫である宿主細胞を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Mediumに非働化した $10\%$  ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約 $6.2\sim 6.4$ である。培養は、通常約 $27^{\circ}\text{C}$ で、約 $3\sim 5$ 日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。宿主が動物である宿主細胞を培養する場合の培地としては、例えば、約 $5\sim 20\%$ の胎児牛血清を含む最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、RPMI1640培地、199培地などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約 $6\sim 8$ である。培養は、通常約 $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ で、約 $15\sim 60$ 時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。宿主が植物である宿主細胞を培養する場合の培地としては、例えば、MS培地などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約 $5\sim 6$ である。培養は、通常約 $10^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ で、約 $5\sim 50$ 日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。以上のようにして、宿主細胞の細胞内または細胞外にペプチドを生成させることができる。

[0049] 前記宿主細胞を培養して得られる培養物から、ペプチドを自体公知の方法に従って分離精製することができる。例えば、ペプチドを宿主細胞から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた宿主細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって宿主細胞を破壊

した後、遠心分離やろ過により可溶性ペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤を含んでいてもよい。一方、ペプチドが細胞外に分泌される場合は、培養物から遠心分離または濾過等により培養上清を回収する。このようにして得られた可溶性画分もしくは培養上清中に含まれるペプチドの単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。かくして得られるペプチドの存在は、特異的な抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロットティングなどにより確認することができる。

[0050] 以上の通りにして、本発明のペプチド集団の構築方法は、反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドからなる混合集団を構築することができる。従って、本発明はまた、反復アミノ酸配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該反復アミノ酸配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下のペプチド（本発明のペプチド）からなるペプチド集団を該反復アミノ酸配列毎に含む、ペプチドの混合集団であって、該反復アミノ酸配列は少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列である、混合集団（本発明のペプチド集団）を提供する。本発明のペプチド集団において、反復アミノ酸配列の種類、長さなどは、本発明の核酸集団の構築方法における定義と同一であってよい。

[0051] 本発明のペプチドとは、各反復アミノ酸配列を連続して1反復以上、300反復以下、好ましくは、150反復以下、より好ましくは、75反復以下含みかつ含



まれる該各反復アミノ酸配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下、好ましくは、150種類以下、より好ましくは、75種類以下のペプチドからなる集団をいう。

**実施例**

[0052] 実施例 1 相同組換えによる形質転換を利用した反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドを発現する *Brevibacillus* ライブラリーの調製  
反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を構築する工程を図 1 に示す。

塩基配列の一部に混合塩基を導入した環状一本鎖DNAの合成

5' 末端がリン酸化され、かつ一部に混合塩基が入った一本鎖DNA 1 (塩基配列 1) をユーロフィンジェノミクス株式会社から購入した。この塩基配列 1 は16番目~18番目 (下線部) の塩基配列を第 1 番目のアミノ酸としたアミノ酸配列 1 をコードする。

塩基配列 1

GGGCGTCCATCCGATACTYWCGGGGCTCCAGGAGGCGGCVRMGGTGGACGCCCTTCTTCCTCCYWCGGC  
GCACCTGGTGGTGGGVRMGGA (90 nt、混合塩基YではC or T、混合塩基WではA or T、混合塩基VではA or C or G、混合塩基RではA or G、混合塩基MではA or Cが入る。) (配列番号 1)

アミノ酸配列 1

T(X<sub>1</sub>)GAPGGG(X<sub>2</sub>)GGRPSSS(X<sub>3</sub>)GAPGGG(X<sub>4</sub>)GGRPSD (30 aa) (配列番号 2)

X<sub>1</sub>からX<sub>4</sub>には混合塩基の種類により表 1 のアミノ酸が入る可能性がある。

[0053] [表1]

	入る可能性があるアミノ酸
X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub>	F, Y, L or H
X <sub>2</sub> , X <sub>4</sub>	H, R, Q, N, S, K, D, G or E

[0054] 一本鎖DNA 1 の環状化は一般的な方法であるテンプレートDNAを使う方法で行った。塩基配列 1 の両末端と相補的な配列を持つプライマー 1 (塩基配列 2) をテンプレートとして用いた。まず、50 μM一本鎖DNA 1 2 μL、50 μM

プライマー 1 4  $\mu\text{L}$ 、滅菌水 29  $\mu\text{L}$ を混合し、95°Cで2分間インキュベートし、その後氷上で静置した。次にT4 Ligase Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、T4 DNA Ligase 1  $\mu\text{L}$ を加え、20°Cで一晩放置することで一本鎖DNA 1を環状化した。生成物はフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出で精製し、TE緩衝液に溶解したのち、濃度を測定した。

塩基配列 2

ATGGTGGTGATGATGATCGGATGGACGCCCTCCKYBCCCACCACC (配列番号 3)

(塩基配列 1 の両末端と相補的な塩基配列を下線で表す。混合塩基KではG or T、混合塩基YではC or T、混合塩基BではT or C or Gが入る。)

[0055] 等温増幅

表 2 の組成で反応溶液を調製し、60°Cで6時間インキュベートすることで等温増幅を行った。プライマー 2 の塩基配列は塩基配列 3 である。

塩基配列 3

GTATCGGCTGCAGATACTYWC~~GGGGCTCCAGGAGG~~ (配列番号 4)

(下線部が環状一本鎖DNAを鋳型に生成した一本鎖DNAと相補的であるため、プライマー 2 の3' 末端からの伸長反応も同時に進行する。)

[0056] [表2]

8,000 U/mL Bst DNA polymerase large-fragment	1.25 $\mu\text{L}$
Thermo reaction buffer (x10)	5 $\mu\text{L}$
100 mM MgSO <sub>4</sub> solution	1 $\mu\text{L}$
dNTP (each 2.5 mM)	30 $\mu\text{L}$
14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 環状一本鎖DNA	1 $\mu\text{L}$
50 $\mu\text{M}$ プライマー 1	0.05 $\mu\text{L}$
50 $\mu\text{M}$ プライマー 2	0.05 $\mu\text{L}$
滅菌水	11.75 $\mu\text{L}$
Total	50 $\mu\text{L}$

[0057] アガロースゲル電気泳動により等温増幅によって得られた産物を確認した(図 2)。レーン全体にスメアが見られ、長短様々なDNA断片が合成されたことがわかった。

[0058] クローニングおよび形質転換

等温増幅産物を日本ジェネティクス株式会社製Fastgene Gel/PCRエクストラクションキットで精製し、Brevibacillus in vivo Cloning法（BIC法）でBrevibacillusに形質転換した。この方法では、導入したい核酸の両端に線状ベクターの両端と相同な15塩基対の配列を付加することで、菌体内で組換え反応が起こり、発現ベクターが形成される。ここでは、開始コドン側にBrevibacillusの分泌シグナルをコードする塩基配列、終止コドン側にHisタグをコードする塩基配列を持った線状ベクターを用意した。そのためあらかじめプライマー1とプライマー2の5'末端にはHisタグ側と分泌シグナル側の末端と相同な塩基配列がそれぞれ付加されており、導入したい核酸の両端に対応する塩基配列が備わっている（図3）。

#### [0059] 発現試験およびアミノ酸配列の確認

形質転換体20コロニーを選択し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のネオマイシンを含む2SY培地3 mLに植菌し、33°C、180 rpmの条件で1日培養した。5,000 rpm、2minの条件で遠心分離を行い、培地上清を回収した。培地上清20  $\mu\text{L}$ とSDS-Buffer 5  $\mu\text{L}$ を混合し、95°C、5分に変性させた後、マーカー（コスモバイオ製SIMASIM A Unstained Broad Range Protein Ladder）5  $\mu\text{L}$ 、サンプル10  $\mu\text{L}$ をポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動法で解析した。Hisタグ融合タンパク質を特異的に染色するIn Visionを使用したところ、2、7、8、9、11および13番のコロニーに染まったバンドが確認できた（図4）。これらのコロニーを形成した形質転換体が発現するペプチドのアミノ酸配列をDNAシーケンス解析を通じて特定した。その結果、反復回数が2回であった8番を除いたその他の形質転換体では、反復アミノ酸配列の相同性が100%（プライマーの塩基配列が影響する末端の反復配列を除く）であるペプチドが観察された。DNAシーケンスの解読限界のため、6回反復以上は解読できなかったが、SDS-PAGEの結果から長短様々なペプチドが得られたと推測される。また、反復アミノ酸配列の $X_1$ から $X_4$ に当たる位置には、形質転換体ごとに違うアミノ酸が入っていた（表3）。 $X_1$ から $X_4$ すべての位置で想定した種類のアミノ酸に置換されており、混合塩基の選択によって入る可能性のあるアミノ酸を選択できることが

わかった。

[0060] [表3]

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Repeat No.
2	L	G	Y	S	6回以上
7	H	R	Y	D	6回以上
8	L	R	Y	E	2
9	H	D	Y	R	5
11	F	G	Y	S	6回以上
13	L	Q	Y	K	3

[0061] 一定の温度でインキュベートするだけの簡単な方法で反復回数と反復アミノ酸配列の両方が無作為に決まったペプチドのライブラリーを構築することができた。このライブラリー構築法は、反復アミノ酸配列の相同性が極めて高いペプチドの混合集団が得られるため、アミノ酸の種類や位置の情報からより優れたペプチドをデザインすることが容易になる。すなわち、反復アミノ酸配列を持った組換えタンパク質素材の研究への進化分子工学的手法の適用を可能にし、開発スピードを劇的に高めることが期待できる。

[0062] 実施例2 In Vitroシームレスクロニングを利用した反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドを発現する大腸菌ライブラリーの調製  
pET22b線状ベクターの調製

鋳型としてメルク社から購入したpET22bベクター、塩基配列4のプライマー3、塩基配列5のプライマー4を含むPrime star max (タカラバイオ製)の反応液でインバースPCRを行い、線状ベクターを得た。プライマーのデザインによりペプチドのN末端側にはMK、C末端側にはALTHHHHHH (配列番号5)のアミノ酸配列が付加される。

塩基配列4

TTTCATATGTATATCTCCTTC (配列番号6)

塩基配列5

GCATTA~~ACTCATCATCACCACCACC~~ACTGAGATC (配列番号 7)

[0063] 塩基配列の一部に混合塩基を導入した環状一本鎖DNAの合成

塩基配列 1 の両末端と相補的な塩基配列を持つプライマー 5 (塩基配列 6) と T4 DNA リガーゼを用いて塩基配列 1 の一本鎖 DNA 1 を環状化した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出で精製し、TE 緩衝液に溶解したのち、濃度を測定した。

塩基配列 6

ATGATGAGTTAATGCATCGGATGGACGCCCTCCKYBCCCACCACC (配列番号 8)

(塩基配列 1 の両末端と相補的な塩基配列を下線で表す。)

[0064] 等温増幅

表 4 の組成で反応溶液を調製し、60°C で 12 時間インキュベートすることで等温増幅を行った。プライマー 6 の塩基配列は塩基配列 7 である。

塩基配列 7

GATATACATATGAAAACTYWCGGGGCTCCAGGAGG (配列番号 9)

[0065] [表4]

8,000 U/mL Bst DNA polymerase large-fragment	2 $\mu$ L
Thermo reaction buffer (x10)	5 $\mu$ L
100 mM MgSO <sub>4</sub> solution	1 $\mu$ L
dNTP (each 25 mM)	3 $\mu$ L
14 $\mu$ g/ $\mu$ L 環状一本鎖 DNA	1 $\mu$ L
50 $\mu$ M プライマー 5	0.5 $\mu$ L
50 $\mu$ M プライマー 6	0.5 $\mu$ L
滅菌水	37 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

[0066] クローニングおよび形質転換

アガロースゲル電気泳動により等温増幅を確認後、1kb相当の断片をゲルから切り出した。切り出した DNA 断片を日本ジェネティクス株式会社製 Fastgene Gel/PCR エクストラクションキットで精製した。この DNA 断片と pET22b の線状ベクターを In-fusion 反応 (タカラバイオ製の試薬を使用) で融合し、E. coli BLR (DE3) に形質転換した。

[0067] 発現試験およびアミノ酸配列の確認

発生したコロニーをコロニーPCRで解析し、1kb程度の導入遺伝子を持つ株を選抜し、100  $\mu\text{g/mL}$ アンピシリンを含むLB培地に植菌した。37°C、120 rpmの条件で一晩培養した後、終濃度0.3 mMになるようIPTGを添加し、さらに攪拌速度を160 rpmに変更してさらに6時間培養した。比較としてIPTGを添加せずに培養したサンプルも用意した。培養液500  $\mu\text{L}$ を6,000 rpm、5minの条件で遠心し、菌体を回収した。菌体のペレットを50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 250  $\mu\text{L}$ に懸濁し、超音波処理で菌体を破碎した。15,000 G, 5minの条件で遠心を行い、得た上清20  $\mu\text{L}$ とSDS-Buffer 5  $\mu\text{L}$ を混合し、95°C、5分で変性させた。マーカー (コスモバイオ製SIMASIMA Unstained Broad Range Protein Ladder) 5 $\mu\text{L}$ 、サンプル10  $\mu\text{L}$ をポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動法で解析した。Hisタグ融合タンパク質を特異的に染色するIn Visionを使用したところ、選抜した4つの株すべてで染まったバンドが確認できた (図5)。これらのコロニーを形成した形質転換体が発現するペプチドのアミノ酸配列をDNAシーケンス解析を通じて特定した。その結果、反復アミノ酸配列の相同性が100% (プライマーの塩基配列が影響する末端の反復配列を除く) の株が2つ、ペプチドの途中でランダムにアミノ酸が決まる箇所のアミノ酸の種類が変化した株が2つ観察された (図6)。SDS-PAGEとDNAシーケンスの結果からIn Vitroシームレスクローニングによってもライブラリーを構築できることがわかった。また、アガロースゲル電気泳動後に、任意の長さを持つDNA断片を切り抜くことにより、ペプチドに含まれる反復アミノ酸配列の反復回数を制御できることがわかった。さらに、遺伝子組換えやゲノム編集のためのベクター調製に多用される大腸菌でもライブラリーを構築できることが明らかとなり、多様な生物種の遺伝子組換え、ゲノム編集に利用できることが示された。

[0068] 実施例3 In Vitroシームレスクローニングを利用した互いに異なる反復回数の反復アミノ酸配列RNXGXPXS (配列番号10) を含むペプチドを発現する大腸菌ライブラリーの調製

塩基配列の一部に混合塩基を導入した環状一本鎖DNAの合成

5' 末端がリン酸化され、かつ一部に混合塩基が入った一本鎖DNA 2（塩基配列 8）をユーロフィンジェノミクス株式会社から購入した。この塩基配列 8 はアミノ酸配列 2 をコードする。

塩基配列 8

AGTGCCACACTCCCGTAATGGTGGANTACCGNATAGCCGGAACGNCGGTNTTCCTNACTCGCGCAATGN  
TGGCNTCCCGNATTCTAGGAACGNTGG（配列番号 1 1）

（96 nt、混合塩基NではA, G, C or Tのどれかが入る。）

アミノ酸配列 2

RNGG(X<sub>1</sub>)P(X<sub>2</sub>)SRN(X<sub>3</sub>)G(X<sub>4</sub>)P(X<sub>5</sub>)SRN(X<sub>6</sub>)G(X<sub>7</sub>)P(X<sub>8</sub>)SRN(X<sub>9</sub>)GVPHS（32 aa）（配列番号 1 2）

X<sub>1</sub>からX<sub>9</sub>には混合塩基の種類により表5のアミノ酸が入る可能性がある。

[0069] [表5]

	入る可能性があるアミノ酸
X <sub>1</sub> , X <sub>4</sub> , X <sub>7</sub>	V, F, L or I
X <sub>2</sub> , X <sub>5</sub> , X <sub>8</sub>	H, Y, N or D
X <sub>3</sub> , X <sub>6</sub> , X <sub>9</sub>	G, V, A or D

[0070] 塩基配列 8 の両末端と相補的な塩基配列を持つプライマー7（塩基配列 9）とT4 DNAリガーゼを用いて一本鎖DNA 2 を環状化した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出で精製し、TE緩衝液に溶解したのち、濃度を測定した。

塩基配列 9

ATGATGAGTTAATGCGGAGTGTGGCACTCCANCGTTCCTAG（配列番号 1 3）

（塩基配列 8 の両末端と相補的な塩基配列を下線で表す。）

[0071] 等温増幅

表 6 の組成で反応溶液を調製し、62.8℃で12時間インキュベートすることで等温増幅を行った。プライマー 8 の塩基配列は塩基配列 1 0 である。

塩基配列 1 0

GATATACATATGAAACGTAATGGTGGANTACCG (配列番号 1 4)

(下線部が環状一本鎖DNAを鋳型として合成された一本鎖DNAと相補的であるため、プライマー 8 の3'末端からの伸長反応も同時に進行する。)

[0072] [表6]

8,000 U/mL Bst DNA polymerase large-fragment	2 $\mu$ L
Thmo reaction buffer (x10)	5 $\mu$ L
100 mM MgSO <sub>4</sub> solution	1 $\mu$ L
dNTP (each 2.5 mM)	30 $\mu$ L
13 $\mu$ g/ $\mu$ L 環状一本鎖DNA	1 $\mu$ L
50 $\mu$ M プライマー7	0.5 $\mu$ L
50 $\mu$ M プライマー8	0.5 $\mu$ L
滅菌水	10 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

[0073] クローニングおよび形質転換

アガロースゲル電気泳動により等温増幅を確認後、1~2 kb相当の断片をゲルから切り出した。切り出したDNA断片を日本ジェネティクス株式会社製Fast gene Gel/PCRエクストラクションキットで精製した。このDNA断片とpET22bの線状ベクターをIn-fusion反応(タカラバイオ製の試薬を使用)で融合し、E. coli BLR (DE3) に形質転換した。

[0074] 発現試験およびアミノ酸配列の確認

発生したコロニーをコロニーPCRで解析した結果、21コロニー中19コロニーで1~2 kbの塩基配列を持っていることが示された。10個の形質転換体を選択し、100  $\mu$ g/mLアンピシリンを含むLB培地に植菌した。37°C、120 rpmの条件で一晩培養した後、終濃度0.3 mMになるようIPTGを添加し、さらに攪拌速度を160 rpmに変更してさらに6時間培養した。比較として空ベクターを持つ形質転換体をネガティブコントロールとして培養した。培養液500  $\mu$ Lを6,000 rpm、5minの条件で遠心し、菌体を回収した。菌体のペレットを50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 250  $\mu$ Lに懸濁し、超音波処理で菌体を破碎した。15,000 G、5minの条件で遠心を行い、可溶性画分を得た。また、沈殿を4 M尿素/Tris 緩衝液 (pH 8.0) 250  $\mu$ Lに溶解し、15,000 G、5minの条件で遠心を行い、上



清を不溶性画分とした。サンプル20  $\mu\text{L}$ とSDS-Buffer 5  $\mu\text{L}$ を混合し、95°C、5分で変性させた。マーカー（コスモバイオ製SIMASIMA Unstained Broad Range Protein Ladder）5  $\mu\text{L}$ 、サンプル10  $\mu\text{L}$ をポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動法で解析した。Hisタグ融合タンパク質を特異的に染色するIn Visionを使用したところ、10形質転換体中9個で30~60 kDaのHisタグ融合タンパク質が観察された（図7）。Hisタグ融合タンパク質の発現量（図8）および可溶性画分と不溶性画分の存在比（図9）をデンストメトリーにより算出した。デンストメトリーにはimageJを使用し、マーカーの蛍光強度を定量の指標とした。1番と8番は不溶性Hisタグ融合タンパク質が多量に発現していることがわかった。また、3番、5番、10番は不溶性画分よりも可溶性画分に存在することがわかった。1、4、5、6、8および10番の形質転換体が発現するペプチドのアミノ酸配列をDNAシーケンス解析を通じて特定した結果、反復アミノ酸配列の相同性が100%（プライマーの塩基配列が影響する末端の反復配列を除く）の株が5つ、ペプチドの途中でランダムにアミノ酸が決まる箇所のアミノ酸の種類が変化した株が1つ観察された（図10）。得られた反復アミノ酸配列は $X_1$ から $X_9$ すべての位置で想定した種類のアミノ酸に置換され、発現量と溶解性が変化した。ExPasyのProtScaleにおいて、Kyte & Doolittleの値を用い、ハイドロパシーインデックスを計算した。6回反復した配列を計算対象として、近隣9残基の平均を計算した結果、意外にも不溶性画分に多く存在した4番、6番および8番のペプチドはアミノ酸配列全体で比較的ハイドロパシーインデックスが低かった。これは、従来の指標を使用したタンパク質の機能予測ではペプチドの機能把握が難しいことを示しており、目的の機能を持ったペプチドを得るには、ペプチドライブラリーおよびそれを用いた進化分子工学的手法が有用であることが示唆された（図11）。ペプチドの混合集団の中から目的の性質に近いペプチドを選択し、さらにアミノ酸を置換していくことで目的の性質を持ったペプチドが得られるはずである。例えば、不溶性かつ高発現するペプチドはタンパク質精製タグとして有用である。CBB染色画像（図12）をATTO製ソフトウェアCS Analyzerで解析し

た結果、1番、8番で得られる不溶性画分中の不溶性ペプチドの純度は88%と85%であり、不溶性タグとしてタンパク質の精製に利用できる可能性が示された。

[0075] 実施例4 次世代シーケンサーを利用した反復配列ライブラリーの解析

ライブラリー内の配列を網羅的に解析するためIlluminaアンプリコンシーケンス解析を北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。サンプルは以下のとおり調製した。

塩基配列の一部に混合塩基を導入した環状一本鎖DNAの合成

5'末端がリン酸化され、かつ一部に混合塩基が入った一本鎖DNA 3（塩基配列11）をユーロフィンジェノミクス株式会社から購入した。この塩基配列11はアミノ酸配列3をコードする。

塩基配列11

GGTGTTCTGGTGTAGGTGTCCCAGGTGTCCGGGTGCCGGGTNDTGGTGTACCAGGCNDTGGCGTACCG  
GGCNDTGGGGTACCTGGTGTT（配列番号15）

（90 nt、混合塩基NではA, G, C or Tのどれか、混合塩基DではA, G or Tのどれかが入る。）

アミノ酸配列3

GVPGVGVPGVGVPV(X<sub>1</sub>)GVPV(X<sub>2</sub>)GVPV(X<sub>3</sub>)GVPV (30 aa)（配列番号16）

X<sub>1</sub>からX<sub>3</sub>には混合塩基の種類によりF, Y, C, L, H, R, I, N, S, V, D or Gのどれかのアミノ酸が入る可能性がある。

[0076] 塩基配列11の両末端と相補的な塩基配列を持つプライマー9（塩基配列12）とT4 DNAリガーゼを用いて一本鎖DNA 3を環状化した。Sigma-aldrich製GenElute PCR Clean-up kitで精製し、TE緩衝液に溶解したのち、濃度を測定した。

塩基配列12

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCAGGAACACCAACACCAGGTAC（配列番号17）

（塩基配列11の両末端と相補的な塩基配列を下線で表す。）

**[0077] 等温増幅**

塩基配列 1 1 の環状一本鎖DNAとプライマー 9、プライマー 1 0 を用いて等温増幅を行った。反応溶液の組成はプライマーの種類を変更した以外は表 6 の組成に従った。60°Cで12時間インキュベートした。プライマー 1 0 の塩基配列は塩基配列 1 3 である。

塩基配列 1 3

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTAGGTGTCCCAGGTGTCGG (配列番号 1 8 )

**[0078]** アガロースゲル電気泳動により等温増幅を確認後、5回反復に相当する0.5 kbの断片をゲルから切り出した。切り出したDNA断片を日本ジェネティクス株式会社製Fastgene Gel/PCRエクストラクションキットで精製した。このDNA断片を1stPCRサンプルとして、2ndPCRからターゲット解析までを北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。

**[0079] 発現試験およびアミノ酸配列の確認**

切り出した断片の長さをAgilent社 TapeStationで分析した。分析値 (535 bp) が理論的な5回反復断片の長さ518bpに近いことから、ライブラリーには5回反復断片が多く含まれると考えられる。配列番号 1 6 の5回反復配列 (150 aa) についてライブラリー中に含まれる配列の種類と出現数の算出を試みたが、プライマー配列下流から91 bp以降の塩基の読み取りが上手くいかなかった。これは反復配列がクラスターの形成に支障を与えたためと考えられる。そこで5' 末端 (プライマー 9 側) に最も近い反復塩基配列と3' 末端 (プライマー 1 0 側) に最も近い反復塩基配列をアミノ酸に変換し、配列と出現数を算出した。出現数上位1500の配列を確認したところ、配列番号 1 6 の配列のうち混合塩基を加えた箇所 ( $X_1$ から $X_3$ ) のみ異なる反復配列の集団が得られた。(出現数上位100の配列を表 7 に示す。出現数上位1739以内に理論上取りうる全ての組み合わせ1728種類の反復配列が確認された。(反復配列のうち、3ヵ所のX部分にそれぞれ12種類のアミノ酸が入る可能性がある) また、最も多い反復配列でもライブラリーに占める割合は0.9%未満であった。これ

らの結果は構築された遺伝子混合集団は配列の偏りが少ない多様な配列を含むライブラリーであることを示している。

[0080]

[表7-1]

順位	配列	プライマー 9 側の出現 割合 (%)	プライマー 10 側の出 現割合 (%)
1	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 1 9)	0.83	0.87
2	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 2 0)	0.67	0.73
3	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGYGVGVPGVGVP (配列番号 2 1)	0.67	0.70
4	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGCGVPGVGVGVP (配列番号 2 2)	0.60	0.60
5	VGVPGVGVPGVGVPYGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 2 3)	0.56	0.62
6	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGYGVGVPGVGVP (配列番号 2 4)	0.49	0.60
7	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGCGVPGVGVGVP (配列番号 2 5)	0.48	0.53
8	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGIGVPGVGVGVP (配列番号 2 6)	0.47	0.51
9	VGVPGVGVPGVGVPYGVPGYGVGVPGVGVP (配列番号 2 7)	0.47	0.47
10	VGVPGVGVPGVGVPGVGVPFGVPGVGVGVP (配列番号 2 8)	0.46	0.47
11	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGIGVPGVGVGVP (配列番号 2 9)	0.47	0.45
12	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGVGVGVPGVGVP (配列番号 3 0)	0.43	0.42
13	VGVPGVGVPGVGVPYGVPGCGVPGVGVGVP (配列番号 3 1)	0.41	0.42
14	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGDGVPGVGVGVP (配列番号 3 2)	0.41	0.41
15	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGGGVPGVGVGVP (配列番号 3 3)	0.41	0.39
16	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGIGVPGVGVGVP (配列番号 3 4)	0.39	0.42
17	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 3 5)	0.39	0.41
18	VGVPGVGVPGGGVPGCGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 3 6)	0.39	0.40
19	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGHGVPGVGVGVP (配列番号 3 7)	0.38	0.41
20	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 3 8)	0.38	0.40
21	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGIGVPGVGVGVP (配列番号 3 9)	0.36	0.40
22	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGSGVPGVGVGVP (配列番号 4 0)	0.37	0.39
23	VGVPGVGVPGVGVPDGVPGFVGVPGVGVP (配列番号 4 1)	0.36	0.39
24	VGVPGVGVPGVGVPFGVPGNGVPGVGVGVP (配列番号 4 2)	0.35	0.38
25	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGGGVPGVGVGVP (配列番号 4 3)	0.36	0.34
26	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGVPGVGVGVP (配列番号 4 4)	0.34	0.35
27	VGVPGVGVPGGGVPGFVGPGFVGVPGVGVP (配列番号 4 5)	0.34	0.35
28	VGVPGVGVPGVGVPGVGVPYGVPGVGVGVP (配列番号 4 6)	0.33	0.35
29	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGDGVPGVGVGVP (配列番号 4 7)	0.32	0.34
30	VGVPGVGVPGVGVPGVGVPCCGVPGVGVGVP (配列番号 4 8)	0.32	0.34
31	VGVPGVGVPGVGVPYGVPGIGVPGVGVGVP (配列番号 4 9)	0.29	0.33
32	VGVPGVGVPGVGVPCCGVPGHGVPGVGVGVP (配列番号 5 0)	0.29	0.33

[0081] [表7-2]

33	VGVPGVGVPGGGVPGCCVPGCGVPGVGVPG (配列番号 5 1)	0.30	0.31
34	VGVPGVGVPGVGVPGYGVPGVPGVGVPG (配列番号 5 2)	0.31	0.30
35	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGYGVPGVGVPG (配列番号 5 3)	0.30	0.30
36	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGFVPGVGVPG (配列番号 5 4)	0.29	0.31
37	VGVPGVGVPGVGVPGCCVPGSGVPGVGVPG (配列番号 5 5)	0.29	0.31
38	VGVPGVGVPGVGVPGYGVPGLGVPGVGVPG (配列番号 5 6)	0.28	0.30
39	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGYGVPGVGVPG (配列番号 5 7)	0.27	0.31
40	VGVPGVGVPGVGVPGCCVPGNGVPGVGVPG (配列番号 5 8)	0.28	0.30
41	VGVPGVGVPGVGVPGYGVPDGVPGVGVPG (配列番号 5 9)	0.28	0.29
42	VGVPGVGVPGGGVPGCCVPGYGVPGVGVPG (配列番号 6 0)	0.25	0.31
43	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGCGVPGVGVPG (配列番号 6 1)	0.29	0.28
44	VGVPGVGVPGGGVPGFVPGCGVPGVGVPG (配列番号 6 2)	0.28	0.28
45	VGVPGVGVPGVGVPDGVPGYGVPGVGVPG (配列番号 6 3)	0.25	0.30
46	VGVPGVGVPGVGVPGYVPGGGVPGVGVPG (配列番号 6 4)	0.28	0.27
47	VGVPGVGVPGGGVPGFVPGYGVPGVGVPG (配列番号 6 5)	0.25	0.29
48	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGCCVPGVGVPG (配列番号 6 6)	0.28	0.26
49	VGVPGVGVPGVGVPGFVPGRGVPGVGVPG (配列番号 6 7)	0.28	0.24
50	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGYGVPGVGVPG (配列番号 6 8)	0.25	0.27
51	VGVPGVGVPGVGVPDGVPGCGVPGVGVPG (配列番号 6 9)	0.26	0.25
52	VGVPGVGVPGVGVPGHGVPGFVPGVGVPG (配列番号 7 0)	0.26	0.24
53	VGVPGVGVPGGGVPGCCVPGVPGVGVPG (配列番号 7 1)	0.24	0.26
54	VGVPGVGVPGVGVPGRGVPGFVPGVGVPG (配列番号 7 2)	0.24	0.25
55	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGVPGVGVPG (配列番号 7 3)	0.25	0.25
56	VGVPGVGVPGVGVPGYVPGSGVPGVGVPG (配列番号 7 4)	0.24	0.25
57	VGVPGVGVPGFVPGCGVPGFVPGVGVPG (配列番号 7 5)	0.25	0.24
58	VGVPGVGVPGVGVPGYGVPGHVPGVGVPG (配列番号 7 6)	0.23	0.25
59	VGVPGVGVPGVGVPGYGVPNGVPGVGVPG (配列番号 7 7)	0.23	0.25
60	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGIGVPGVGVPG (配列番号 7 8)	0.23	0.24
61	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGVPGVGVPG (配列番号 7 9)	0.23	0.24
62	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGCGVPGVGVPG (配列番号 8 0)	0.24	0.22
63	VGVPGVGVPGVGVPDGVPGVPGVGVPG (配列番号 8 1)	0.22	0.23
64	VGVPGVGVPGVGVPGVPGVPGVGVPG (配列番号 8 2)	0.23	0.22
65	VGVPGVGVPGFVPGFVPGFVPGVGVPG (配列番号 8 3)	0.23	0.21
66	VGVPGVGVPGGGVPGCCVPGVPGVGVPG (配列番号 8 4)	0.22	0.22
67	VGVPGVGVPGVGVPGVPGGGVPGVGVPG (配列番号 8 5)	0.22	0.22

[0082] [表7-3]

68	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPLGVPGVGVPG (配列番号 8 6)	0.22	0.22
69	VGVPGVGVPGGGVPGFVPLGVPGVGVPG (配列番号 8 7)	0.21	0.22
70	VGVPGVGVPGVGVPGVPGIGVPGVGVPG (配列番号 8 8)	0.22	0.21
71	VGVPGVGVPGGGVPGCGVPGIGVPGVGVPG (配列番号 8 9)	0.22	0.21
72	VGVPGVGVPGVGVPGDGVPGIGVPGVGVPG (配列番号 9 0)	0.22	0.21
73	VGVPGVGVPGVGVPGCCVPGRGVPGVGVPG (配列番号 9 1)	0.23	0.20
74	VGVPGVGVPGVGVPGSGVPGFVPGVGVPG (配列番号 9 2)	0.20	0.22
75	VGVPGVGVPGDGVPGCGVPGFVPGVGVPG (配列番号 9 3)	0.21	0.21
76	VGVPGVGVPGFVPGCGVPGCGVPGVGVPG (配列番号 9 4)	0.20	0.22
77	VGVPGVGVPGVGVPGDGVPGVPGVGVPG (配列番号 9 5)	0.21	0.21
78	VGVPGVGVPGFVPGCGVPGYGVPGVGVPG (配列番号 9 6)	0.20	0.21
79	VGVPGVGVPGVGVPGHGVPGYGVPGVGVPG (配列番号 9 7)	0.20	0.21
80	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVPGVGVPG (配列番号 9 8)	0.22	0.19
81	VGVPGVGVPGGGVPGFVPGHGVPGVGVPG (配列番号 9 9)	0.21	0.20
82	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPLGVPGVGVPG (配列番号 1 0 0)	0.20	0.21
83	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGDGVPGVGVPG (配列番号 1 0 1)	0.21	0.19
84	VGVPGVGVPGGGVPGCGVPGIGVPGVGVPG (配列番号 1 0 2)	0.20	0.21
85	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGGGVPGVGVPG (配列番号 1 0 3)	0.21	0.19
86	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGIGVPGVGVPG (配列番号 1 0 4)	0.19	0.20
87	VGVPGVGVPGFVPGFVPGCGVPGVGVPG (配列番号 1 0 5)	0.20	0.20
88	VGVPGVGVPGVGVPGHGVPGVPGVGVPG (配列番号 1 0 6)	0.19	0.20
89	VGVPGVGVPGGGVPGYGVPGFVPGVGVPG (配列番号 1 0 7)	0.18	0.20
90	VGVPGVGVPGVGVPGRVPGCGVPGVGVPG (配列番号 1 0 8)	0.20	0.18
91	VGVPGVGVPGVGVPGHGVPGCGVPGVGVPG (配列番号 1 0 9)	0.20	0.18
92	VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGDGVPGVGVPG (配列番号 1 1 0)	0.18	0.20
93	VGVPGVGVPGGGVPGCGVPGDGVPGVGVPG (配列番号 1 1 1)	0.19	0.18
94	VGVPGVGVPGVGVPGVPGNGVPGVGVPG (配列番号 1 1 2)	0.18	0.19
95	VGVPGVGVPGVGVPGVPGSGVPGVGVPG (配列番号 1 1 3)	0.17	0.19
96	VGVPGVGVPGVGVPNGVPGFVPGVGVPG (配列番号 1 1 4)	0.17	0.20
97	VGVPGVGVPGVGVPGSGVPGCGVPGVGVPG (配列番号 1 1 5)	0.18	0.18
98	VGVPGVGVPGVGVPGLGVPGHGVPGVGVPG (配列番号 1 1 6)	0.20	0.17
99	VGVPGVGVPGCCVPGFVPGFVPGVGVPG (配列番号 1 1 7)	0.18	0.19
100	VGVPGVGVPGVGVPGDGVPGDGVPGVGVPG (配列番号 1 1 8)	0.19	0.17

[0083] 実施例 5 反復配列ライブラリーを利用した組換えタンパク質精製タグの探

## 索

エラスチン様ポリペプチド ([VGVPG]<sub>n</sub>, ELP) は下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution Temperature: LCST) を持ち、この温度以上では不溶性、以下では水溶性を示す。近年、組換えタンパク質の精製コスト削減を目指し、組換えタンパク質の精製用タグとしてELPを活用する研究が盛んに行われている。例えば、ELPと自己切断部位インテインからなるアミノ酸配列を精製タグとして組換えタンパク質の末端に融合発現させることでアフィニティーカラムを使わずに温度変化や塩の添加で組換えタンパク質を精製する。しかしながら、このようなELPタグを融合した場合、組換えタンパク質の生産量が低下してしまう課題がある。そこで、反復配列ライブラリーを用いて生産性に優れたタンパク質精製タグの開発を試みた。

### [0084] sspDnaB-GFPの構築

精製する組換えタンパク質のモデルとして改良型緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein, GFP)、生産宿主としてE.Coli BLR (DE3) を選択した。発現する組換えタンパク質からELP部位を除去するためELPとGFPの間にはCyanobacterium Synechocystis sp. 由来のsspDnaBインテインを配置した。

### [0085] pET22b-sspDnaB-GFP線状ベクターの調製

ユーロフィンジェノミクス株式会社にELP部位を除いたsspDnaB融合GFP部位を発現するpET22b-sspDnaB-GFPの構築を依頼した。pET22b-sspDnaB-GFPを鋳型として、適当なプライマーとPrime star max (タカラバイオ製) を用いたインバースPCRを行い、線状ベクターを得た。

### [0086] 等温増幅

塩基配列 1 1 の環状一本鎖DNAとプライマー 1 1、プライマー 1 2 を用いて等温増幅を行った。反応溶液の組成はプライマーの種類を変更した以外は表 6 の組成に従った。60℃で12時間インキュベートした。プライマー 1 1 およびプライマー 1 2 の塩基配列は塩基配列 1 4 および 1 5 である。

塩基配列 1 4



GATATACATATGAAAGTAGGTGTCCCAGGTGTCGG (配列番号 1 1 9)

塩基配列 1 5

GATAGCACCACCAGAACCAGGAACACCAACACCAGGTAC (配列番号 1 2 0)

[0087] クローニングおよび形質転換

アガロースゲル電気泳動により等温増幅を確認後、8回反復に相当する断片をゲルから切り出した。切り出したDNA断片を日本ジェネティクス株式会社製 Fastgene Gel/PCRエクストラクションキットで精製した。このDNA断片とpET22b-sspDnaB-GFP線状ベクターをIn-fusion反応（タカラバイオ製の試薬を使用）で融合し、E. coli BLR (DE3) に形質転換した。

[0088] 比較対象株の作製

比較として、混合塩基を含まない塩基配列 1 6 で調製した環状一本鎖DNAを用いて増幅したDNA断片でも同様の実験を行った。塩基配列 1 6 はVGVPGを6回反復するアミノ酸配列 1 7 をコードする。本研究ではVGVPGが48回反復した配列を使用した。コロニーPCRとDNAシーケンサーを用いてVGVPGが48回反復する塩基配列を持つポジティブコントロール (PC) が得られたことを確認した。PCが発現する組換えタンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を塩基配列 1 7 (図 1 3) とアミノ酸配列 4 (図 1 4) として示す。インテインの働きにより配列中大文字表記したNとGの間が開裂し、下流のGFPが遊離するため、タグ配列の除去が可能である。

また、pET22bの空ベクターを持った形質転換体をネガティブコントロール (NC) として使用した。

塩基配列 1 6

GGTGTTCCTGGTGTAGGTGTCCCAGGTGTCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACCAGGCGTTGGCGTACCG  
GGCGTAGGGGTACCTGGTGTT (配列番号 1 2 1)

[0089] スクリーニング

形質転換後、蛍光を強く発する6つのコロニーを選択し、100  $\mu$ g/mLアンピシリンを含むLB培3 mLに植菌した。37°C、120 rpmの条件で一晩培養した後、OD<sub>590</sub>を測定し、100  $\mu$ g/mLアンピシリンを含むZYP-5052培地1 mLにOD<sub>590</sub>=0.

05になるように一晩培養した液を加えた。25°Cで2日間培養した後、3,000 rpm、25°C、10分の条件で遠心分離を行い、菌体ペレットを回収した。菌体ペレットにBug Buster Protein Extraction Reagent 200  $\mu$ Lを加え、菌体を懸濁し、37°Cで15分間インキュベートした。3,000 rpm、4°C、10分の条件で遠心分離を行い、細胞抽出液を得た。細胞抽出液の蛍光強度をPerkinElmer製EnSightで測定した(図15)。同様の実験を3つのウェルで実施した。PCと同程度もしくはそれ以上の蛍光強度を示した形質転換体(コロニー1、5および6)の細胞抽出液120  $\mu$ Lに5 M NaCl 80  $\mu$ Lを加え、15分間、37°Cでインキュベートした。3,000 rpm、25°C、30分の条件で遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿に20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.4) 50  $\mu$ Lを加え、懸濁し、20°Cで一晩放置した。9,000 G、35°C、10分の条件で遠心分離を行い、不溶性画分を除去し、粗精製GFP溶液を得た。粗精製GFP溶液20  $\mu$ Lに5 M NaCl 30  $\mu$ Lを加え、10分間、42°Cでインキュベートした。9,000 G、35°C、10分の条件で遠心分離を行い、不溶性画分を除去し、精製GFP溶液を得た。精製GFP溶液の蛍光強度をPerkinElmer製EnSightで測定した(図16)。同様の実験を3つのウェルで実施し、得た値をKaleidaGraphを用いたDunnettの多重比較でELPの値に対して有意な差があるか確認した。コロニー6の精製GFP溶液ではPCより有意に高い蛍光強度が得られた。そこでPCと、コロニー6の精製GFP溶液に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで解析した。サンプルとATTO製EzApplyを1:1で混合し、95°Cで5分間加熱した後、10  $\mu$ Lをゲルにアプライした。マーカーにはコスモバイオ製SIMASIMA Unstained Broad Range Protein Ladder 5  $\mu$ Lを用いた。CBB染色の結果(図17)、PCと同様、コロニー6からもGFPの理論分子量: 28.3 kDaに相当するバンドのみ確認され、コロニー6の形質転換体を持つ配列も精製タグとして機能することが明らかとなった。DNAシーケンスでコロニー6の精製タグ中の反復配列を解析したところ、一部のアミノ酸が入れ替わったVGVPGの反復配列を持つことがわかった(図18)。これらの配列が優れた生産性を示すことを予測には既知の情報だけでは困難である。このように、反復配列と反復回数の両方が異なる反復配列ライブラリー

とハイスループットスクリーニングを組み合わせることでより効率的に有益な反復配列を探索することが可能になる。

### 産業上の利用可能性

[0090] 本発明によれば、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団を簡便に構築することができる。また、反復アミノ酸配列同士の相同性が高いため、ペプチドのアミノ酸配列情報を単純化でき、より優れた機能を持ったペプチドを新たに開発する際にそのアミノ酸配列情報を容易にデザインへ反映できる。さらに、遺伝子合成やクローニングに制限酵素を使用せずに済むため、反復アミノ酸配列の自由度が高いという利点も有する。本出願は、日本で出願された特願2022-063650（出願日：令和4年4月6日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、反復塩基配列および反復回数が互いに異なる核酸からなる混合集団の構築方法：
- (A) 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該各線状一本鎖核酸は各反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程、および
- (B) 各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該各反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程。
- [請求項2] 前記各二本鎖核酸集団が、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] さらに以下の工程を含む、請求項1または2に記載の方法：
- (C) 前記各二本鎖核酸集団からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込む工程、および
- (D) 該発現ベクターを宿主細胞に導入する工程。
- [請求項4] 核酸が、DNAである、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項5] 工程(A)および工程(B)において、鎖置換型DNAポリメラーゼが用いられる、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 工程(A)および工程(B)が同時に行われる、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 工程(A)および工程(B)が等温条件下で行われ、該等温条件が50℃～68℃内の一定温度である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、16種類以

上10000種類以下である、請求項1または2に記載の方法。

[請求項9] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列である、請求項1または2に記載の方法。

[請求項10] 反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該反復塩基配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる二本鎖核酸集団を該反復塩基配列毎に含む、核酸の混合集団であって、該反復塩基配列は少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列である、混合集団。

[請求項11] 前記二本鎖核酸集団が、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている、請求項10に記載の混合集団。

[請求項12] 核酸が、DNAである、請求項10または11に記載の混合集団。

[請求項13] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、16種類以上10000種類以下である、請求項10または11に記載の混合集団。

[請求項14] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列である、請求項10または11に記載の混合集団。

[請求項15] 請求項10または11に記載の混合集団が発現可能に組み込まれた、発現ベクター。

[請求項16] 請求項15に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

[請求項17] 以下の工程を含む、反復アミノ酸配列および反復回数が互いに異なるペプチドからなる混合集団の構築方法：

(a) 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列からなる各環状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各線状一本鎖核酸からなる混合集団を調製する工程であって、該反復塩基配列は少なくとも1か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列をコードする塩基配列であり、該各線状一本鎖核酸は各

反復塩基配列に相補的な塩基配列を連続して2反復以上、300反復以下含む、工程、

(b) 各線状一本鎖核酸の混合集団を鋳型として、各環状一本鎖核酸に対応する各二本鎖核酸集団からなる混合集団を調製する工程であって、該各二本鎖核酸集団は各反復塩基配列を連続して1反復以上、300反復以下含み、かつ互いに該各反復塩基配列の反復回数が異なる2種類以上、300種類以下の二本鎖核酸からなる、工程、

(c) 前記各二本鎖核酸集団からなる混合集団を発現ベクターに発現可能に組み込む工程、

(d) 該発現ベクターを宿主細胞に導入する工程、および

(e) 該宿主細胞を培養することによってペプチドを発現させる工程

。

[請求項18] 前記各二本鎖核酸集団が、その両末端にベクターに組み込むためのクローニング用塩基配列がさらに付加されている、請求項17に記載の方法。

[請求項19] 核酸が、DNAである、請求項17または18に記載の方法。

[請求項20] 工程(a)および工程(b)において、鎖置換型DNAポリメラーゼが用いられる、請求項19に記載の方法。

[請求項21] 工程(a)および工程(b)が同時に行われる、請求項20に記載の方法。

[請求項22] 工程(a)および工程(b)が等温条件下で行われ、該等温条件が50℃~68℃内の一定温度である、請求項21に記載の方法。

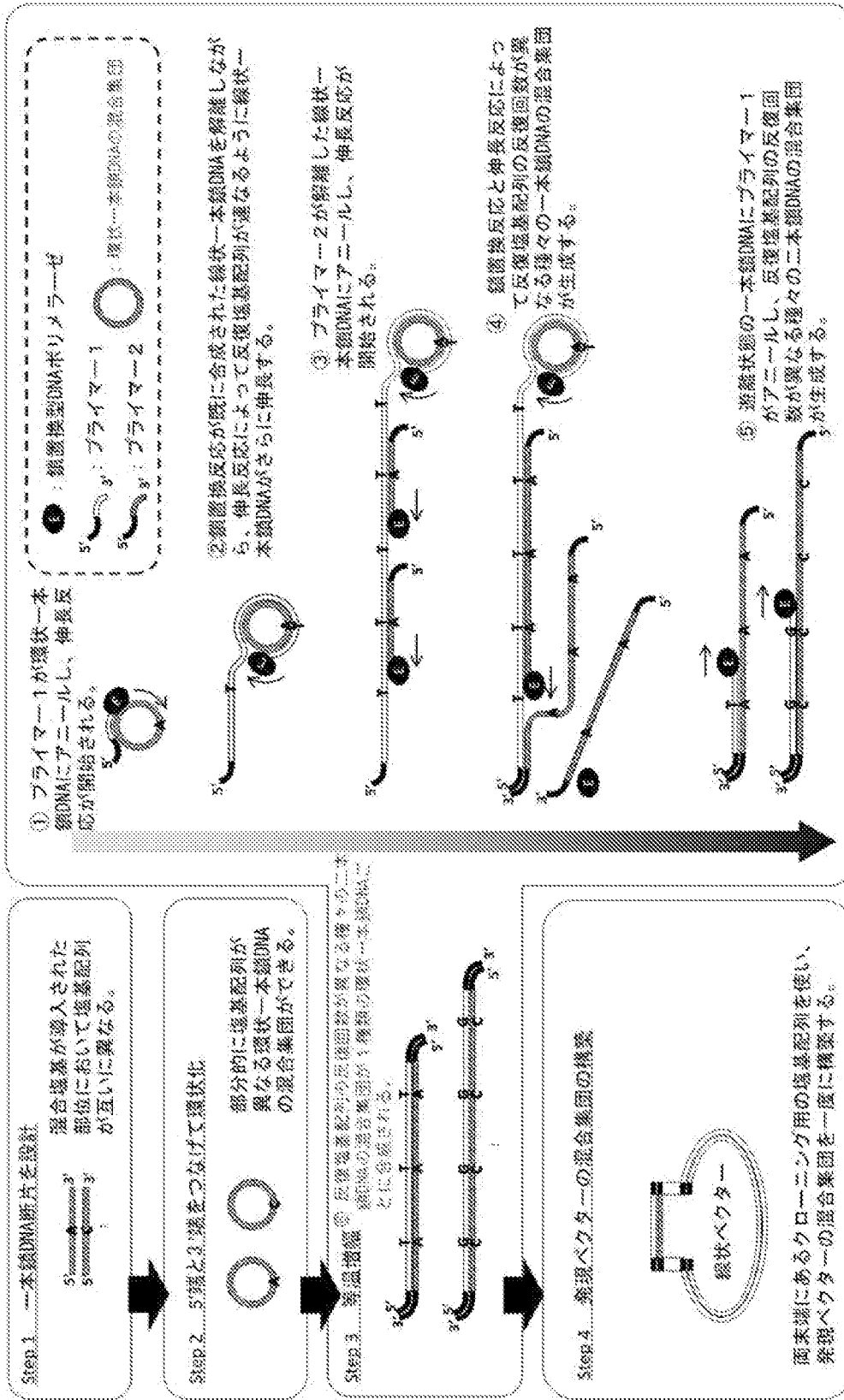
[請求項23] 少なくとも1か所の塩基が互いに異なる反復塩基配列が、16種類以上10000種類以下である、請求項17または18に記載の方法。

[請求項24] 反復アミノ酸配列を連続して1反復以上、300反復以下含みかつ含まれる該反復アミノ酸配列の反復回数が互いに異なる、2種類以上、300種類以下のペプチドからなるペプチド集団を該反復アミノ酸配列毎に含む、ペプチドの混合集団であって、該反復アミノ酸配列は少なくとも

も 1 か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列である、混合集団。

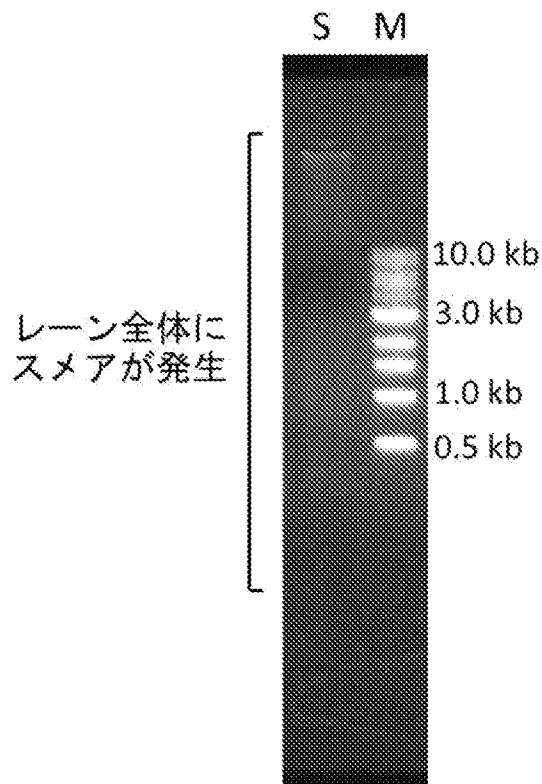
[請求項25] 少なくとも 1 か所のアミノ酸残基が互いに異なる反復アミノ酸配列が、2種類以上1000種類以下である、請求項 2 4 に記載の混合集団。

[図1]





[図2]

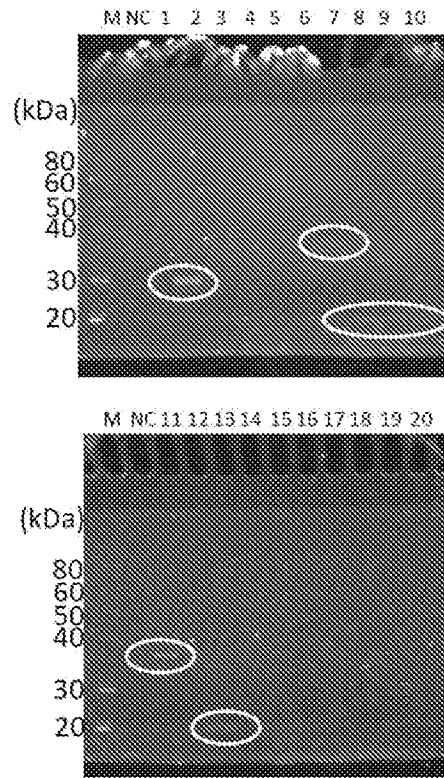


[図3]

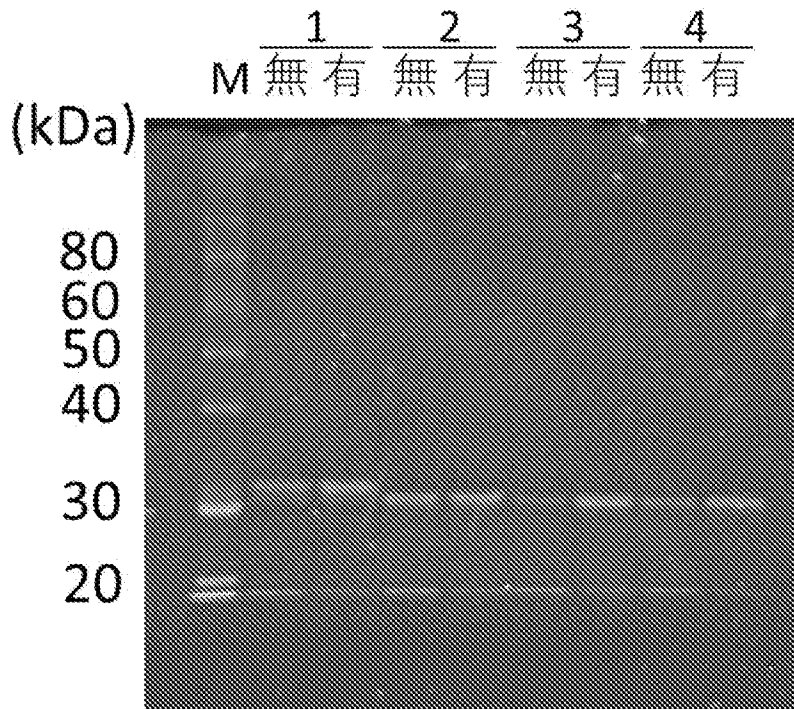
5'

aaggctatgaaaacaatacgaacaggcatgatgactttggcggcactggccgtttgggaaccaacgtggtatcggetGC  
 AGATACTYWCGGGGCTCCAGGAGGCGGCVRMGGTGGACGCCCTTCTTCCTCCYW  
 CGGCGCACCTGGTGGTGGGVRMGGAGGGCGTCCATCCGATACTYWCGGGGCTCC  
 AGGAGGCGGCVRMGGTGGACGCCCTTCTTCCTCCYWCGGCGCACCTGGTGGTGG  
 GVRMGGAGGGCGTCCATCCGATACTYWCGGGGCTCCAGGAGGCGGCVRMGGTGG  
 ACGCCCTTCTTCCTCCYWCGGCGCACCTGGTGGTGGGVRMGGAGGGCGTCCATC  
 CGATcatcatcaccaccatcactaagcttaacaggatgctagggg-3'

[図4]



[図5]



[図6]

1番

THGAPGGGHGGRPSSSLGAPGGGKGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSLGAPGGGKGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSLGAPGGGKGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSLGAPGGGKGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSYGAPGGGDGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSYGAPGGGDGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSYGAPGGGDGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSLGAPGGGKGGRPSD  
THGAPGGGHGGRPSSSLGAPGGGKGGRPSD

2番

[THGAPGGGRGGRPSSSFGAPGGGGGGGRPSD]<sub>n</sub>

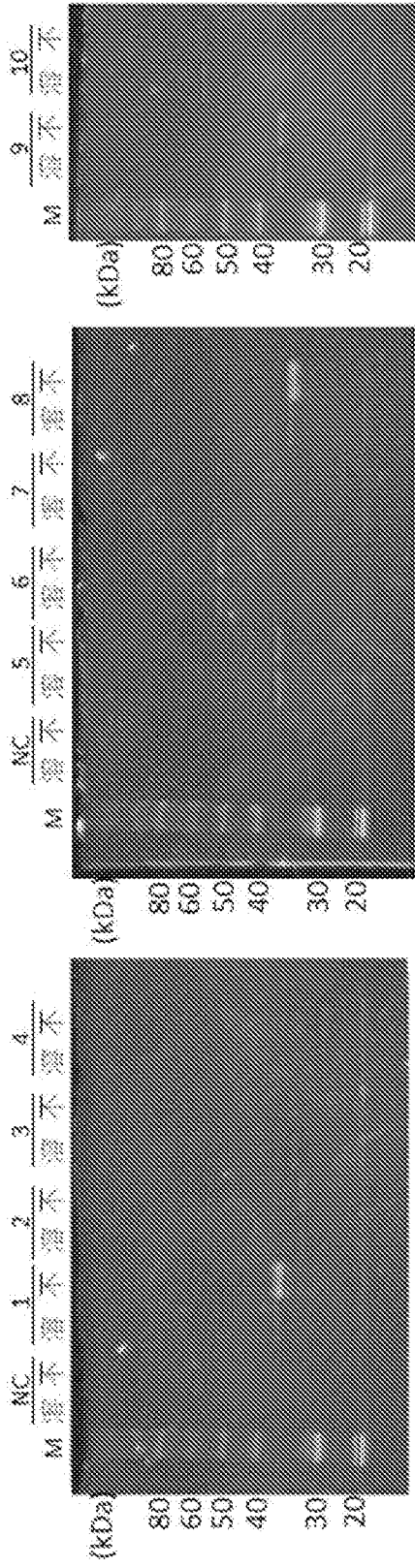
3番

TFGAPGGGRGGRPSSSLGAPGGGNNGRPSD  
TFGAPGGGRGGRPSSSLGAPGGGNNGRPSD  
TFGAPGGGRGGRPSSSLGAPGGGNNGRPSD  
TFGAPGGGRGGRPSSSLGAPGGGNNGRPSD  
TFGAPGGGQGGRPSSSYGAPGGGRGGRPSD  
TLGAPGGGQGGRPSSSYGAPGGGRGGRPSD  
TLGAPGGGQGGRPSSSYGAPGGGRGGRPSD  
TLGAPGGGHGGRPSSSYGAPGGGKGGRPSD  
TLGAPGGGHGGRPSSSYGAPGGGKGGRPSD

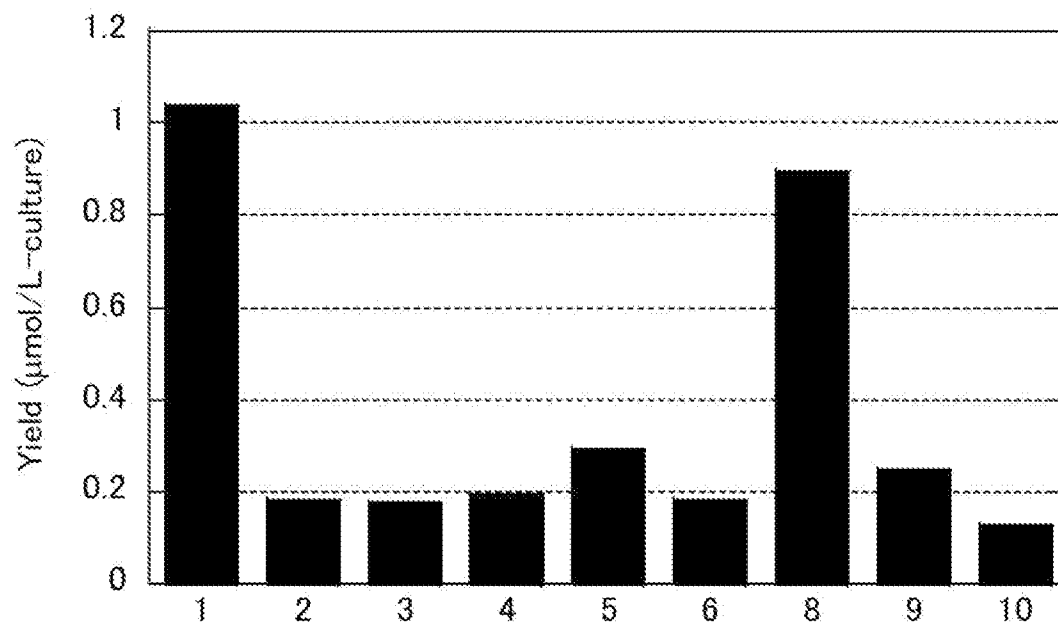
4番

[TFGAPGGGGGGGRPSSSFGAPGGGKGGRPD]<sub>n</sub>

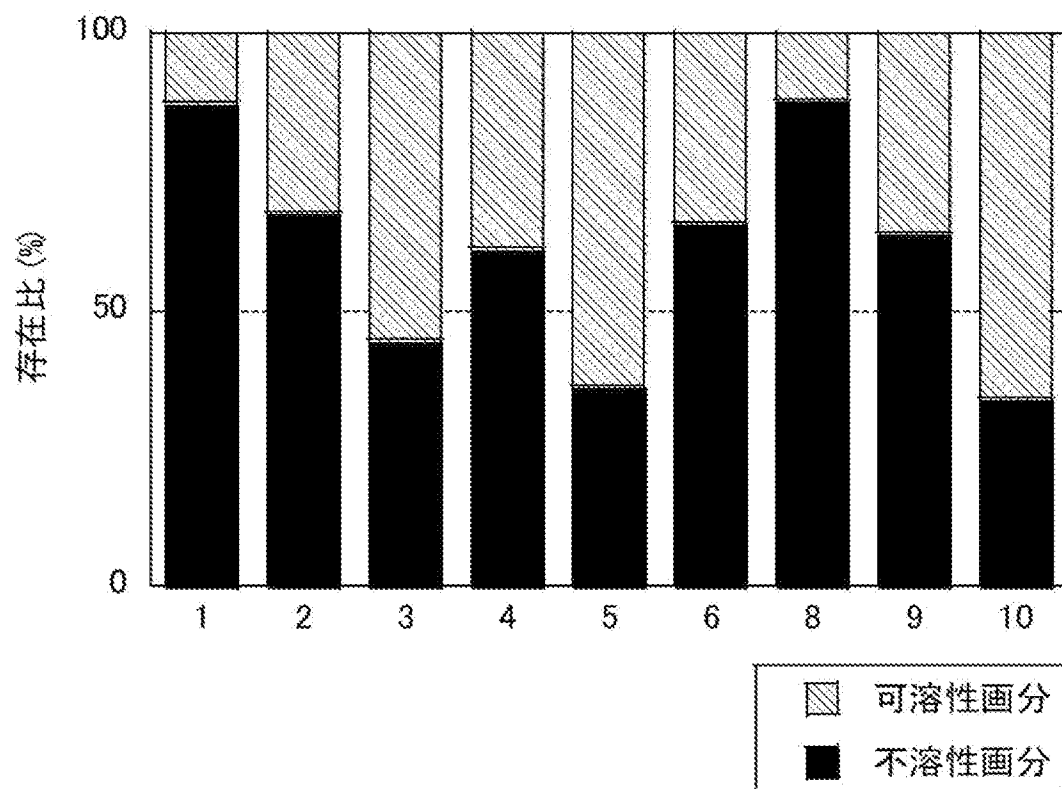
[図7]



[図8]



[図9]



[図10]

1 番

RNGGLPHSRNGGIPDSRNVGFPDSRNDGVPHS  
 RNGGLPHSRNGGIPDSRNVGFPDSRNDGVPHS  
 RNGGLPHSRNGGIPDSRNVGFPDSRNDGVPHS  
 RNGGLPHSRNGGIPDSRNVGFPDSRNDGVPHS  
 RNGGLPHSRNGGIPDSRNVGFPDSRNDGVPHS  
 RNGGLPHSRNGGIPDSRNVGFPDSRNDGVPHS  
 RNGGLPHSRNDGIPDSRNVGFPYSRNDGVPHS  
 RNGGVPHSRNDGIPDSRNVGFPYSRNDGVPHS  
 RNGGVPHSRNDGIPDSRNVGFPYSRNDGVPHS

4 番

[RNGGVPHSRNDGLPYSRNAGIPYSRNGGVPHS]<sub>n</sub>

5 番

[RNGGLPHSRNGGIPNSRNVGVPNSRNVGVPHS]<sub>n</sub>

6 番

[RNGGLPHSRNVGVPNSRNGGLPDSRNDGVPHS]<sub>n</sub>

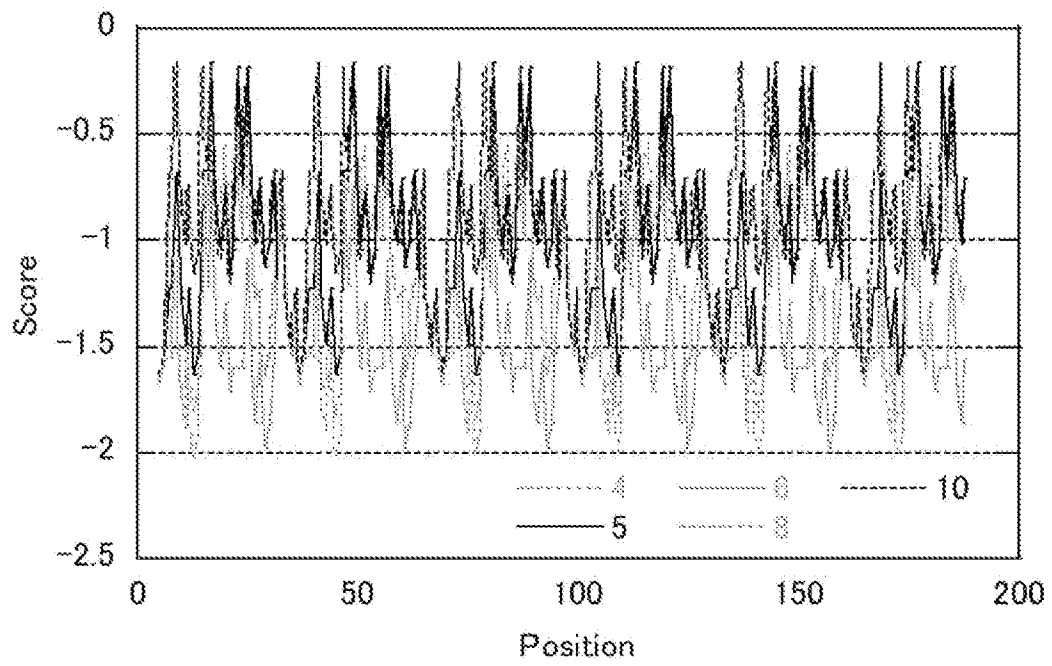
8 番

[RNGGVPDSRNDGVPNSRNVGLPYSRNGGVPHS]<sub>n</sub>

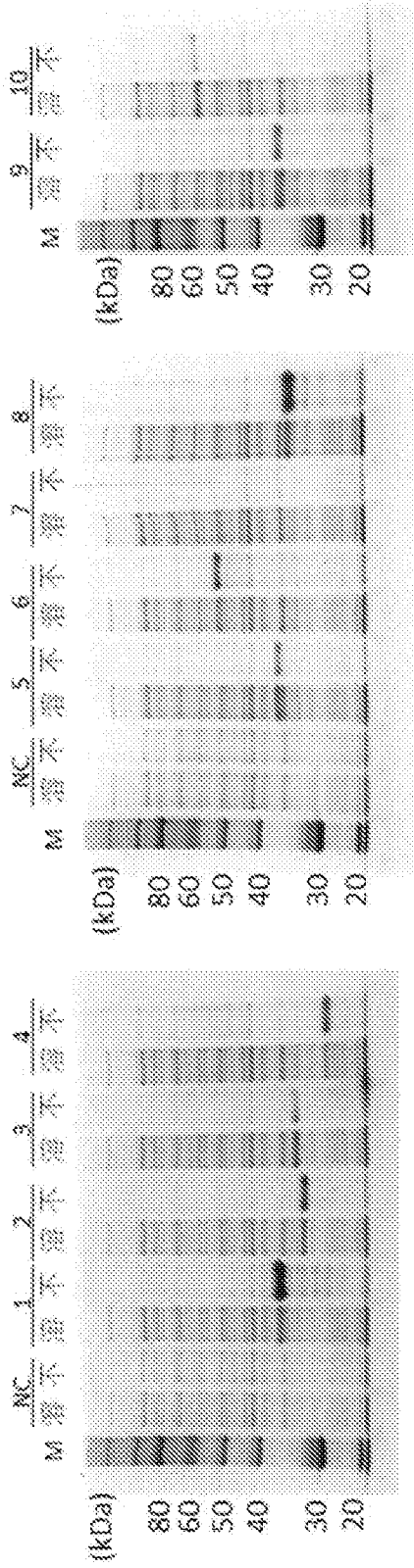
1.0 番

[RNGGVPHSRNVGVPNSRNVGLPDSRNVGVPHS]<sub>n</sub>

[図11]



[図12]





## [図13]

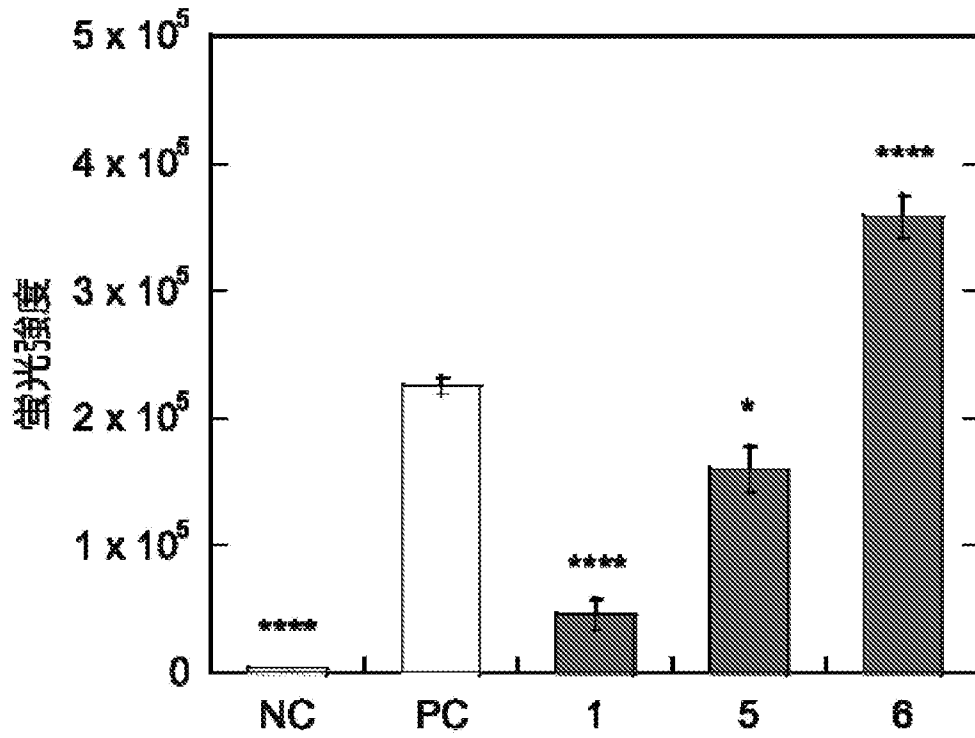
塩基配列 1 7

ATGAAA GTAGGTGTCCCAGGTGTCCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACCAGG  
 CGTTGGCGTACCGGGCGTAGGGGTACCTGGTGTGGTGTTCCTGGTGTAG  
 GTGTCCCAGGTGTCCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACCAGGCGTTGGCGTA  
 CCGGGCGTAGGGGTACCTGGTGTGGTGTTCCTGGTGTAGGTGTCCCAGG  
 TGTCCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACCAGGCGTTGGCGTACCGGGCGTA  
 GGGGTACCTGGTGTGGTGTTCCTGGTGTAGGTGTCCCAGGTGTCCGGCGT  
 GCCGGGTGTGGGTGTACCAGGCGTTGGCGTACCGGGCGTAGGGGTACCT  
 GGTGTGGTGTTCCTGGTGTAGGTGTCCCAGGTGTCCGGCGTGCCGGGTG  
 TGGGTGTACCAGGCGTTGGCGTACCGGGCGTAGGGGTACCTGGTGTGGT  
 GTTCCTGGTGTAGGTGTCCCAGGTGTCCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACC  
 AGGCGTTGGCGTACCGGGCGTAGGGGTACCTGGTGTGGTGTTCCTGGTGT  
 TAGGTGTCCCAGGTGTCCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACCAGGCGTTGGC  
 GTACCGGGCGTAGGGGTACCTGGTGTGGTGTTCCTGGTGTAGGTGTCCC  
 AGGTGTCCGGCGTGCCGGGTGTGGGTGTACCAGGCGTTGGCGTACCGGGC  
 GTAGGGGTACCTGGTGTGGTGTTCCTGGTGTTCGGTGGT GCTATCTCTGG  
CGATAGTCTGATCAGCCTGGCTAGCACAGGAAAAAGATTTCTATTAAAGA  
TTTGTTAGATGAAAAAGATTTTGAATATGGGCAATTAATGAACAGACGAT  
GAAGCTAGAAATCAGCTAAAGTTAGTCGTGATTTTTGTACTGGCAAAAAGCT  
AGTTTATATTCTAAAACTCGACTAGGTAGAACTATCAAGGCAACAGCAAAT  
CATAGATTTTAACTATTGATGGTTGGAAAAGATTAGATGAGCTATCTTTA  
AAAGAGCATATTGCTCTACCCCGTAAACTAGAAAAGCTCCTCTTTACAATTGT  
CACCAGAAATAGAAAAGTTGTCTCAGAGTGATATTTACTGGGACTCCATCG  
TTTCTATTACGGAGACTGGAGTCGAAGAGGTTTTTGATTTGACTGTGCCAG  
GACCACATAACTTTGTCCGAATGACATCATTGTACACAACGGAAGAGCCA  
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTC  
GAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG  
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC  
CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG  
CGTGCAAGTGCCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTT  
CAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAA  
GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACA  
CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC  
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTAT  
ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC  
CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC  
ACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGC  
ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC  
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT  
GTACAAGGCATTAACCTCATCATCACCACCACCAC (配列番号 1 2 2)

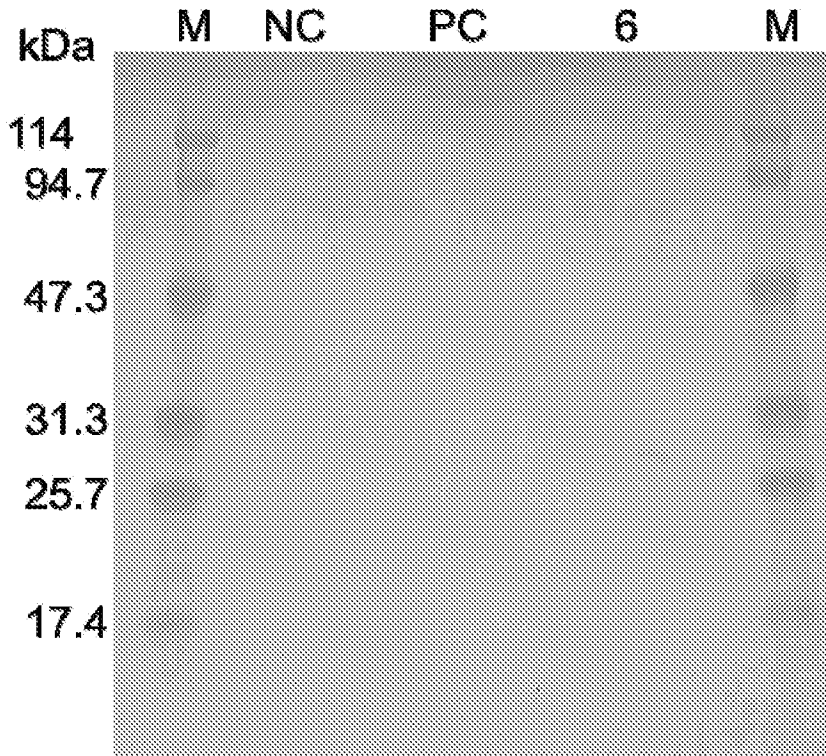
(反復配列部位は斜体、インテイン部位は斜体+下線、GFP部位は下線、Hisタグ部位は大文字で表す。)



[図16]



[図17]



[図18]

VGVPGVGVPGYGVPGRGVPGGGVPGVGVPG  
 VGVPGVGVPGYGVPGVPGYGVPGDGVPGVGVPG  
 VGVPGVGVPGYGVPGRGVPGGGVPGVGVPG  
 VGVPGVGVPGYGVSGLGVPGGGVPGVGVPG

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/014202

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/63</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/15</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C40B 40/08</i> (2006.01)i; <i>C40B 40/10</i> (2006.01)i FI: C12N15/63 ZNA; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C40B40/10; C40B40/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/63; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C40B40/08; C40B40/10		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-179942 A (UNIVERSITY OF ZURICH) 12 September 2013 (2013-09-12) claims, examples	10-16, 24, 25
Y	claims, examples	1-25
Y	AMIRAM, M.et al., Highly parallel method for synthesis of DNA repeats enables discovery of "Smart" protein polymers, Nat Mater., 2011, 10(2), pp. 141-148 entire text, in particular, Materials and Methods	1-25
Y	JP 2018-139603 A (GENERAL ELECTRIC CO.) 13 September 2018 (2018-09-13) claims, paragraph [0004]	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>09 June 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>20 June 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**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 13ter.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 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.  
**PCT/JP2023/014202**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2013-179942	A	12 September 2013	WO	2002/020565	A2	
				claims, examples			
JP	2018-139603	A	13 September 2018	WO	2010/026099	A1	
				claims, paragraph [0004]			

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/63(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C40B 40/08(2006.01)i; C40B 40/10(2006.01)i FI: C12N15/63 Z ZNA; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C40B40/10; C40B40/08		
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）） C12N15/63; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C40B40/08; C40B40/10 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2023年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2023年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2023年 国際調査で使用了電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (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 2013-179942 A (ユニヴェルジテート・チューリッヒ) 12.09.2013 (2013 - 09 - 12)	10-16, 24, 25
Y	特許請求の範囲、実施例	1-25
Y	AMIRAM M, et al., Highly parallel method for synthesis of DNA repeats enables discovery of "Smart" protein polymers, Nat Mater., 2011, 10(2), p.141-148 全文、特にMaterials and Methods	1-25
Y	JP 2018-139603 A (ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ) 13.09.2018 (2018 - 09 - 13) 特許請求の範囲、[0004]	1-25
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	09.06.2023	国際調査報告の発送日 20.06.2023
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）  松原 寛子 4B 4154  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

## 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:
- 上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。



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/JP2023/014202

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2013-179942 A	12.09.2013	WO 2002/020565 A2 claims, examples	
JP 2018-139603 A	13.09.2018	WO 2010/026099 A1 claims, [0004]	