

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年2月10日(10.02.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/030539 A1

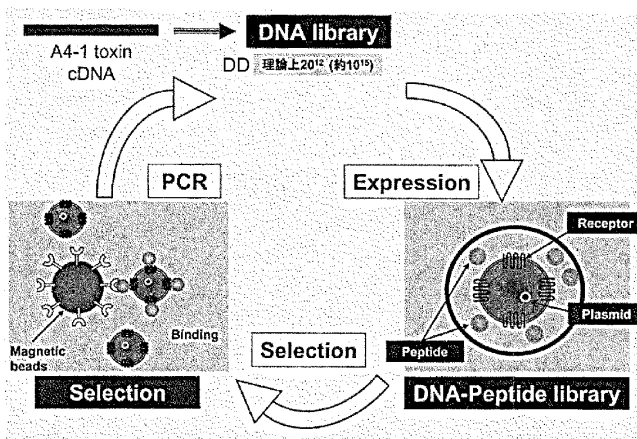
- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C40B 40/10* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/028940
- (22) 国際出願日: 2021年8月4日(04.08.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-132823 2020年8月5日(05.08.2020) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 木村 忠史 (KIMURA Tadashi);
〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.);
〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目 6番5号 丸の内北口ビル 21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR POLYPEPTIDE THAT ACTS ON TARGET PROTEIN

(54) 発明の名称: 標的タンパク質に作用するポリペプチドのスクリーニング方法

[図1]

AA
PERRIS (intra periplasm secretion and selection) 法



AA PERRIS (intra periplasm secretion and selection) method
DD Theoretically 20^{12} (appx. 10^{15})

(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening for a polypeptide that acts on a target protein. Specifically, the present invention relates to a method for screening for a polypeptide that acts on a target protein, the method comprising: (1) a step for providing a polynucleotide library constituted of a plurality of vectors that can be expressed by gram-negative bacteria, the plurality of vectors each including a first polynucleotide encoding mutually different polypeptide, a secretory signal sequence disposed upstream of the first polynucleotide, and a second polynucleotide

[続葉有]

WO 2022/030539 A1

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

encoding the target protein; (2) a step for transforming gram-negative bacteria with the expression vector, expressing the polypeptide inside the periplasm space, and expressing the target protein on the surface of the internal membrane; (3) a step for bringing the polypeptide into contact with the target protein within the periplasm space; (4) a step for allowing the gram-negative bacterial to form spheroplast and measuring the activity of the polypeptide on the target protein in an electrochemical manner; and (5) a step for identifying, on the basis of the measured activity, a polypeptide that acts on the target protein.

(57) 要約: 本発明は、標的タンパク質に作用するポリペプチドをスクリーニングする方法に関する。具体的には、(1) グラム陰性細菌で発現可能な複数の発現ベクターから構成されるポリヌクレオチドライブラリーを提供する工程であって、前記複数の発現ベクターは、それぞれ、互いに異なるポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、第1のポリヌクレオチドの上流に配置された分泌シグナル配列、及び、標的タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含む、工程; (2) 前記発現ベクターでグラム陰性細菌を形質転換し、前記ポリペプチドをペリプラズム間隙内に、前記標的タンパク質を内膜表面に、それぞれ発現させる工程; (3) ペリプラズム間隙内において、前記ポリペプチドを前記標的タンパク質と接触させる工程; (4) グラム陰性細菌にスフェロプラストを形成させ、電気生理学的手法により標的タンパク質に対する前記ポリペプチドの活性を測定する工程; (5) 測定された活性に基づいて、標的タンパク質に作用するポリペプチドを同定する工程; を含む、標的タンパク質に作用するポリペプチドをスクリーニングする方法に関する。