

明 細 書

発明の名称：

ペプチドタグおよび当該ペプチドタグをコードする核酸

技術分野

[0001] 本開示は、ペプチドタグおよび当該ペプチドタグをコードする核酸に関する。

背景技術

[0002] 細胞内で機能する抗体すなわちイントラボディ（細胞内抗体）は、高等生物の細胞内で抗原（標的分子）を認識して結合することで細胞の機能に影響を及ぼすことができる。これらの抗原は、細胞内抗体に結合することにより不活化され得る重要な細胞内治療標的にもなり得る。また、研究手法として、細胞内抗体の使用は細胞の内部で抗体に結合することにより直接タンパク質の機能を特異的に阻害するための手段として着目されている。

[0003] 細胞内抗体の場合、まず標準的な方法で抗原を認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成した後、そのcDNAから一本鎖抗体（single chain Fv: scFv）をコードするDNAを含む細胞内発現ベクターを構築し、重鎖（VH）と軽鎖（VL）との複合体を細胞内抗体とすることが一般的である。最近では、ヒトB細胞から単離された抗体から、ヒトscFvを提示するファージライブラリーが作製されており、細胞内抗原に結合するscFvの単離に使用されることがある。

[0004] 抗体は通常、血液等の体内の細胞外空間を巡回して細胞外抗原を認識して機能するものであり、細胞外環境での作用が前提である。従って、抗体が細胞質で発現される場合、発現レベルの低下および抗体ドメインの半減期の制限に至るフォールディングおよび安定性の問題が生じ得る。細胞質内における細胞内抗体の安定性の問題は、細胞質内における細胞内抗体の凝集体形成に繋がり得る。凝集体の形成は、細胞内抗体の産生量の低下、および正常機能の発現の阻害などに繋がり得る。細胞内抗体以外のタンパク質においても

同様である。細胞内抗体は、特に凝集し易い特徴を有するが、細胞内抗体以外のタンパク質においても、細胞質で産生させる際に細胞質内において凝集体を形成し得る。

- [0005] これに対して、酸性アミノ酸を45%以上含むアミノ酸配列を有するペプチドタグが、細胞内抗体の安定性を改善することが示されている（特許文献1、非特許文献1）。特許文献1および非特許文献1では、酸性アミノ酸を45%以上含むアミノ酸配列を有するペプチドタグの有効性を提案するに際して、ペプチドタグの設計指針として、細胞質のpH環境よりもエンドソームの細胞質側表面のpH環境を基準として電価値とpI値が十分に低くなるようペプチドタグを設計することの重要性が指摘されている。非特許文献3では、抗体の重鎖可変領域に対してHRASの膜局在化シグナルを付加している。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：WO2019/004213

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Kabayama et al., 2020, Nature Communication, 11, 336
非特許文献2：Shubhada et al., 2012, Biochemical genetics, Vol. 50, No. 7-8, pp. 625-41.
非特許文献3：Tanaka et al., 2007, EMBO Journal, 26:3250-3259

発明の概要

- [0008] 本開示は、ペプチドタグおよび当該ペプチドタグをコードする核酸を提供する。本開示のペプチドタグは、細胞内におけるタンパク質の凝集性を低減することができる。

[0009] 本発明者らは、様々なアミノ酸配列のペプチドタグについて鋭意研究したところ、細胞内におけるタンパク質の凝集性に対して軽減効果を有するペプチドタグを見出した。

[0010] 本開示によれば以下の発明が提供される。

[1] ペプチド、例えば、600アミノ酸長以下、例えば、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）のアミノ酸配列を有するペプチドであって、

（a）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

（b）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上、好ましくは30%以上が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、

好ましくは、前記ペプチドを連結したタンパク質の細胞内における凝集性を低下させることができる、

ペプチド {ここで、好ましくは、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%または15%以上がNまたはPである}。

[2] （c）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは15%以下、さらに好ましくは10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸である、上記[1]に記載のペプチド。

[3] （d）AまたはGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満である、上記[1]または[2]に記載のペプチド。

[4] 上記[1]～[3]のいずれかに記載のペプチドであって、

（a）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、（b）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、

（c）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下が、M、T、W、C、

I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、

(d) AまたはGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満である、
ペプチド。

[5] 配列番号2～11のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド。

[6] 上記[1]～[5]のいずれかに記載のペプチドをコードする核酸。

[7] 制御配列と作動可能に連結された上記[6]に記載の核酸と、当該核酸とインフレームで目的タンパク質をコードする核酸を含む、タンパク質発現ベクター。

[8] 目的タンパク質が、抗体または抗体の抗原結合性断片である、上記[7]に記載のタンパク質発現ベクター。

[9] 抗体の抗原結合性断片が、単鎖Fv (scFv) である、上記[8]に記載のタンパク質発現ベクター。

[10] 上記[1]～[5]のいずれかに記載のペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質。

[11] 目的タンパク質が、抗体または抗体の抗原結合性断片である、上記[10]に記載の融合タンパク質。

[12] 抗体の抗原結合性断片が、単鎖Fv (scFv) である、上記[11]に記載の融合タンパク質。

[13] 制御配列と作動可能に連結された上記[6]に記載の核酸と、当該核酸とインフレームで目的タンパク質をコードする核酸を含む、タンパク質産生細胞。

[14] 600アミノ酸長以下、例えば、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）のアミノ酸配列を選択または同定する方法であって、

アミノ酸配列（群）（10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）のアミノ酸配列（群）を含み得る）から、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸である、
アミノ酸配列(群)を取得することと、

選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドタグと参照タンパク質との融合タンパク質を哺乳動物細胞内(好ましくはヒト細胞内)において発現させたときに、細胞内において融合タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合を低下させる(例えば、所定の値以下とする)ペプチドタグのアミノ酸配列を選択または同定することと、

当該アミノ酸配列を有するペプチドタグまたは当該ペプチドタグをコードする核酸を得ることと、

を含む、

方法。

[15] 取得されるアミノ酸配列群が、上記[1]～[5]のいずれかに記載のペプチドである、請求項14に記載の方法。

[16] 取得されるアミノ酸配列群が、ヒトゲノムのコーディング領域によりコードされるアミノ酸配列の群である、上記[14]または[15]に記載の方法。

[17] 取得されるアミノ酸配列が、ネオアンチゲンを含む、上記[14]～[16]のいずれかに記載の方法。

[0011] [18] 以下(a)～(h)からなる群から選択される1以上を満たし、かつ、前記ペプチドを連結したタンパク質の細胞内における凝集性を低下させることができる、ペプチド。

[19] 以下(A)～(AE)、および(AF)～(AU)からなる群から選択される、前記ペプチドを連結したタンパク質の細胞内における凝集性を低下させることができるペプチド。

[0012] [20] 上記[18]に記載のペプチドをコードする核酸。

〔21〕制御配列と作動可能に連結された上記〔20〕に記載の核酸と、当該核酸とインフレームで目的タンパク質をコードする核酸を含む、タンパク質発現ベクター。

〔22〕上記〔18〕に記載のペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質。

〔23〕目的タンパク質が、抗体または抗体の抗原結合性断片である、上記〔22〕に記載の融合タンパク質。

〔24〕抗体の抗原結合性断片が、単鎖Fv (scFv) である、上記〔23〕に記載の融合タンパク質。

[0013] 〔25〕上記〔19〕に記載のペプチドをコードする核酸。

〔26〕制御配列と作動可能に連結された上記〔25〕に記載の核酸と、当該核酸とインフレームで目的タンパク質をコードする核酸を含む、タンパク質発現ベクター。

〔27〕上記〔25〕に記載のペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質。

〔28〕目的タンパク質が、抗体または抗体の抗原結合性断片である、上記〔26〕に記載の融合タンパク質。

〔29〕抗体の抗原結合性断片が、単鎖Fv (scFv) である、上記〔27〕に記載の融合タンパク質。

[0014] 〔30〕上記〔14〕に記載の方法であって、アミノ酸配列（群）が、上記〔18〕に記載のペプチドを含む、方法。

〔31〕上記〔14〕に記載の方法であって、アミノ酸配列（群）が、上記〔19〕に記載のペプチドを含む、方法。

[0015] 〔32〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がscFvであり、所定の値が30%以下の値である、方法。

〔33〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がscFvであり、所定の値が20以下の値である、方法。

〔34〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がscFvで

あり、所定の値が15%以下の値である、方法。

[35] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、所定の値が10%以下の値である、方法。

[36] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、所定の値が5%以下の値である、方法。

[0016] [37] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[38] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(B)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(B)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[39] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(C)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(C)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[40] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(D)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(D)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[41] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(E)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(E)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[42] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(F)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(F)に記載の条件をさらに満たす、方

法。

[43] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(G)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(G)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[44] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(H)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(H)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[45] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(I)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(I)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[46] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(J)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(J)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[47] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(K)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(K)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[48] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(L)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(K)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[49] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(M)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(M)に記載の条件をさらに満たす、方

法。

[50] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(N)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(N)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[51] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(O)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(O)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[52] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(P)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(P)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[53] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(Q)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(Q)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[54] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(R)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(R)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[55] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(S)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(S)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[56] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(T)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(T)に記載の条件をさらに満たす、方

法。

〔57〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（U）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（U）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔58〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（V）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（V）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔59〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（W）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（W）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔60〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（X）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（X）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔61〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（Y）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（Y）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔62〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（Z）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（Z）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔63〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A A）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A A）に記載の条件をさらに満たす

、方法。

〔64〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A B）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A B）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔65〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A C）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A C）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔66〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A D）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A D）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A E）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A E）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67 A〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A F）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A F）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67 B〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A G）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A G）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67 C〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質が s c F v であり、アミノ酸配列群が、下記（A H）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A H）に記載の条件をさらに満たす、方法。

す、方法。

〔67D〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A I）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A I）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67E〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A J）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A J）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67F〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A K）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A K）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67G〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A L）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A L）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67H〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A M）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A M）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67I〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A N）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A N）に記載の条件をさらに満たす、方法。

〔67J〕上記〔14〕に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記（A O）に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記（A O）に記載の条件をさらに満たす、方法。

す、方法。

[67K] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A P)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A P)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[67L] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A Q)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A Q)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[67M] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A R)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A R)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[67N] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A S)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A S)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[67O] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A T)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A T)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[67P] 上記[14]に記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、アミノ酸配列群が、下記(A U)に記載のペプチドを含み、好ましくは、取得されるアミノ酸配列は、下記(A U)に記載の条件をさらに満たす、方法。

[0017] [68] 上記[37]～[67]および[67A]～[67N]のいずれかに記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、所定の値が15%以下の値である、方法。

[69] 上記[37]～[67]および[67A]～[67N]のいずれかに記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、所定の値が10%以下の値である、方法。

[70] 上記[37]～[67]および[67A]～[67N]のいずれかに記載の方法であって、参照タンパク質がs c F vであり、所定の値が5%以下の値である、方法。

[0018] [71] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、30%を超える値である、方法。

[72] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、30～40%の範囲の値である、方法。

[73] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、40～50%の範囲の値である、方法。

[74] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、50～60%の範囲の値である、方法。

[75] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、60～70%の範囲の値である、方法。

[76] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、70～80%の範囲の値である、方法。

[77] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、80～90%の範囲の値である、方法。

[78] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内

において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、90～95%の範囲の値である、方法。

[79] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、95～99%の範囲の値である、方法。

[80] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、99～99.9%の範囲の値である、方法。

[81] 上記[37]～[70]のいずれかに記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、99.9～100%の範囲の値である、方法。

[0019] [82] 上記[69]に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、30%を超える値である、方法。

[83] 上記[69]に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、30～40%の範囲の値である、方法。

[84] 上記[69]に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、40～50%の範囲の値である、方法。

[85] 上記[69]に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、50～60%の範囲の値である、方法。

[86] 上記[69]に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、60～70%の範囲の値である、方法。

[87] 上記[69]に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、70～80%の範囲の値である、方法。

〔８８〕上記〔６９〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、８０～９０％の範囲の値である、方法。

〔８９〕上記〔６９〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、９０～９５％の範囲の値である、方法。

〔９１〕上記〔６９〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、９９～９９．９％の範囲の値である、方法。

〔９２〕上記〔６９〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、９９．９～１００％の範囲の値である、方法。

〔００２０〕〔９３〕上記〔７０〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、３０％を超える値である、方法。

〔９４〕上記〔７０〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、３０～４０％の範囲の値である、方法。

〔９５〕上記〔７０〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、４０～５０％の範囲の値である、方法。

〔９６〕上記〔７０〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、５０～６０％の範囲の値である、方法。

〔９７〕上記〔７０〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、６０～７０％の範囲の値である、方法。

〔９８〕上記〔７０〕に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、７０～８０％の範囲の値である、方法。

。

[9 9] 上記 [7 0] に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、80～90%の範囲の値である、方法

。

[1 0 0] 上記 [7 0] に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、90～95%の範囲の値である、方法。

[1 0 1] 上記 [7 0] に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、95～99%の範囲の値である、方法。

[1 0 2] 上記 [7 0] に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、99～99.9%の範囲の値である、方法。

[1 0 3] 上記 [7 0] に記載の方法であって、細胞内において参照タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が、99.9～100%の範囲の値である、方法。

[0021] [1 0 4] ペプチドタグが、少なくとも配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するs c F vの凝集性を低下させることができる、上記 [1] ～ [5] のいずれかに記載のペプチド。

[1 0 5] ペプチドタグが、少なくとも配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するs c F vの凝集性を低下させることができる、上記 [6] に記載の核酸。

[1 0 6] ペプチドタグが、少なくとも配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するs c F vの凝集性を低下させることができる、上記 [7] ～ [9] のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター。

[0022] [1 0 7] タンパク質発現ベクターが、ウイルスベクターである、上記 [7] ～ [9] のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター。

[1 0 8] ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルス

ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、および水泡性口炎ウイルスベクターからなる群から選択される、上記〔107〕に記載のタンパク質発現ベクター。

[0023] 〔109〕核酸が、mRNAである、上記〔6〕に記載の核酸。

〔110〕核酸が、5'末端Cap構造と3'UTRにポリA鎖を有する、上記〔109〕に記載の核酸。

〔111〕核酸が、Uとしてシュードウリジンを含む、上記〔109〕または〔110〕に記載の核酸。

〔112〕上記〔109〕～〔111〕のいずれかに記載の核酸を含む、ナノ粒子。

〔113〕脂質ナノ粒子である、上記〔112〕に記載のナノ粒子。

〔114〕参照タンパク質が、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、上記〔14〕～〔17〕および〔30〕～〔103〕のいずれかに記載の方法。

〔115〕細胞が真核細胞である、上記いずれかに記載の方法、ペプチド、融合タンパク質、核酸、またはベクター。

〔116〕細胞がヒト細胞である、上記いずれかに記載の方法、ペプチド、融合タンパク質、核酸、またはベクター。

〔117〕ペプチドタグが、目的タンパク質の自由な局在を妨げない、上記いずれかに記載の方法、ペプチド、融合タンパク質、核酸、またはベクター。

[0024] 本開示のペプチドタグは、タグ化したタンパク質の細胞内における安定化を引き起こし得る。したがって、本開示のペプチドタグは、より生体適合性の高いペプチドタグであり得る。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]図1は、単鎖Fv (scFv) の細胞内での凝集性に対するペプチドタグTag4-1による効果を示す。

[図2A]図2 Aは、アミロイドである α -シヌクレインの細胞内蓄積モデルの作製スキームを示す。

[図2B]図2 Bは、本開示のペプチドタグの1つであるT a g 1 8 - 1を有するs c F v - E 6 - C M Aペプチド融合タンパク質の細胞内発現による細胞内シヌクレインフィブリルへの影響を示す蛍光顕微鏡像である。

[図2C]図2 Cは、本開示のペプチドタグの1つであるT a g 4 - 8またはT a g 1 8 - 1を有するs c F v - E 6 - C M Aペプチド融合タンパク質の細胞内発現による、シヌクレインフィブリルの除去効果を示す。

[図3A]図3 Aは、本開示のペプチドタグの1つであるT a g 1 8 - 1を有するs c F v - C 2自体を細胞内で発現させ、その細胞内局在を示す蛍光顕微鏡像である。

[図3B]図3 Bは、本開示のペプチドタグの1つであるT a g 1 8 - 1を有するs c F v - C 2の安定化作用を示す。

発明の具体的な説明

[0026] 本発明では、「対象」は、脊椎動物であり、例えば、鳥類または哺乳動物、例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、イヌ、およびネコ、並びにサル、チンパンジ、ゴリラ、オランウータン、ボノボ、ヒトなどの霊長類、特に、ヒトが挙げられる。本明細書では、対象は上述のようにヒトを含む意味で用いられ、ヒトを排除する場合には、用語「非ヒト」を用いる。

[0027] 本明細書では、「抗体」とは、免疫グロブリンを意味し、ジスルフィド結合で安定化された2本の重鎖（H鎖）と2本の軽鎖（L鎖）が会合した構造をとるタンパク質をいう。重鎖は、重鎖可変領域V H、重鎖定常領域C H 1、C H 2、C H 3、及びC H 1とC H 2の間に位置するヒンジ領域からなり、軽鎖は、軽鎖可変領域V L（V LはV κ またはV λ であり得る）と軽鎖定常領域C Lとからなる。この中で、V HとV Lからなる可変領域断片（F v）が、抗原結合に直接関与し、抗体に多様性を与える領域である。また、V L、C L、V H、C H 1からなる抗原結合領域をF a b領域と呼び、ヒン

ジ領域、CH2、CH3からなる領域をFc領域と呼ぶ。

可変領域のうち、直接抗原と接触する領域は特に変化が大きく、相補性決定領域 (complementarity-determining region: CDR) と呼ばれる。CDR以外の比較的変異の少ない部分をフレームワーク (framework region: FR) と呼ぶ。重鎖と軽鎖の可変領域には、それぞれ3つのCDRが存在し、それぞれN末端側から順に、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3と呼ばれる。それぞれのCDRは、フレームワーク領域中に組み込まれている。抗体の重鎖可変領域は、N末端側からC末端側に向けて、重鎖フレームワーク領域1、重鎖CDR1、重鎖フレームワーク領域2、重鎖CDR2、重鎖フレームワーク領域3、重鎖CDR3、および重鎖フレームワーク領域4をこの順番で有する。抗体の軽鎖可変領域は、N末端側からC末端側に向けて、軽鎖フレームワーク領域1、軽鎖CDR1、軽鎖フレームワーク領域2、軽鎖CDR2、軽鎖フレームワーク領域3、軽鎖CDR3、および軽鎖フレームワーク領域4をこの順番で有する。抗体は、組換えタンパク質 (組換え抗体) であってもよく、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) などの動物細胞に産生させることができる。抗体の由来は、特に限定されないが例えば、非ヒト動物の抗体、非ヒト哺乳動物の抗体 (例えば、マウス抗体、ラット抗体、ラクダ抗体)、およびヒト抗体が挙げられる。また、抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト化抗体であってもよい。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよく、好ましくはモノクローナル抗体である。「キメラ抗体」とは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域に異なる種の重鎖定常領域および軽鎖定常領域がそれぞれ連結した抗体である。ヒト化抗体は、非ヒト由来の抗体に特徴的なアミノ酸配列で、ヒト抗体の対応する位置を置換した抗体を意味し、例えば、マウス又はラットを免疫して作製した抗体の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3を有し、重鎖及び軽鎖のそれぞれ4つのフレームワーク領域 (FR) を含むその他のすべての領域がヒト抗体に由来するものが挙げられる。かかる抗体は、CDR移植抗体と

呼ばれる場合もある。「ヒト化抗体」は、ヒトキメラ抗体を含む場合もある。「ヒトキメラ抗体」は、非ヒト由来の抗体において、非ヒト由来の抗体の定常領域がヒトの抗体の定常領域に置換されている抗体である。抗体は、単離された抗体、または精製された抗体であり得る。抗体は、例えば、IgGであり得る。

[0028] 免疫グロブリン鎖の可変領域は、3つの超可変領域（より頻繁には、「相補性決定領域」又はCDRと称される。）によって連結された、相対的に保存されたフレームワーク領域（FR）を含む同一の全体構造を一般に呈する。上記各重鎖／軽鎖対の2つの鎖から得られたCDRは、標的タンパク質（例えば、PCSK9）上の特異的エピトープと特異的に結合する構造を形成するために、フレームワーク領域によって典型的に並列される。N末端からC末端へ、天然に存在する軽鎖及び重鎖可変領域は何れも、これらの要素の以下の順序と通例合致する。FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4。これらの各ドメイン中の位置を占めるアミノ酸に番号を割り当てるために、付番システムが考案されている。この付番システムは、「Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD)」又は「Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883」において定義されている。

[0029] 本明細書では、抗体は、抗体の抗原結合性断片を含む。本明細書では、断片化されていない抗体を全長抗体ということがある。全長抗体は、シグナル配列を除く抗体の全長を含み得る。

[0030] 本明細書では、「抗原結合性断片」とは、抗原への結合性が維持された抗体の一部を意味する。抗原結合性断片は、本開示の抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域またはその両方を含みうる。抗原結合性断片は、キメラ化またはヒト化されていてもよい。抗原結合性断片としては、例えば、Fab

、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv が挙げられる。また、抗体結合性断片には、組換えにより生産された結合体または機能的等価物（例えば、 $scFv$ （単鎖 Fv ）、ダイアボディー、 $scDb$ 、タンデム $scFv$ 、ロイシンジッパー型、 $sc(Fv)_2$ （単鎖 $(Fv)_2$ ）等）の形態を有する、その他の抗体の一部）を含んでいてもよい。このような抗体の抗原結合性断片は、特に限定されないが例えば、抗体を酵素で処理して得ることができる。例えば、抗体をパパインで消化すると、 Fab を得ることができる。あるいは、抗体をペプシンで消化すると、 $F(ab')_2$ を得ることができ、これをさらに還元すると Fab' を得ることができる。本明細書ではこのような抗体の抗原結合性断片を用いることができる。 $scFv$ においては、 VL 及び VH が人工のポリペプチドリンカーで連結され、元の抗体と同じ抗原特異性が維持され得る。 VL 及び VH は、 N 末端側から VH 及び VL または VL 及び VH の順番で連結され得る。リンカーは、 $10\sim 25$ アミノ酸程度の長さを有し得る。リンカーは、グリシンを豊富に含んでいてもよく、水溶性を高める目的でセリンやトレオニンなどのアミノ酸を含んでいてもよい。

[0031] 本明細書では、「細胞内抗体」(intrabody)とは、細胞内（例えば、細胞質内、または核内）において発現させた抗体である。抗体が細胞外に分泌されて機能するのに対して、細胞内抗体は、細胞内で発現し、機能するように設計される点で異なり得る。細胞内抗体は、細胞内タンパク質の機能に影響することができ、細胞質、核、または分泌経路において、それらの機能を阻害することができる。がん遺伝子産物は細胞内抗体の標的であり得る (Biocca, S.、Pierandrei-Amaldi, P.、およびCattaneo, A. (1993年)、Biochem Biophys Res Commun、第197巻、422～7ページ; Biocca, S.、Pierandrei-Amaldi, P.、Campioni, N.、およびCattaneo, A. (1994年)、Biotechnology (NY)、第12巻、396～9ページ; Cochet, O.ら (1998年)、Cancer Res、第58巻、1170～6ページ)。

ジ)。細胞内抗体は、タンパク質機能を阻害することを目的としてタンパク質に対して直接的に結合する。結合は、タンパク質の機能を直接阻害することもあるが、タンパク質の他のタンパク質との結合を阻害することもある。

[0032] 細胞内抗体としては、様々な抗体またはその抗原結合性断片が挙げられるが、特に限定されないが好ましくは、s c F v、タンデム s c F v、V H H 抗体（ナノボディ）、ミニボディ、およびダイアボディが用いられ得る。s c F v は、典型的には、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を有する抗体断片であって、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、リンカーを介して連結されている。タンデム s c F v は、典型的には、2つの異なる抗原特異性を有する s c F v を有する抗体断片であって、これらがリンカーを介して連結されている。ダイアボディは、典型的には、s c F v の二量体である。ダイアボディは、2価の単特異性ダイアボディと、二重特異性ダイアボディとに大別される。ミニボディは、典型的には、二量体化ドメインと s c F v との融合タンパク質の2つが、二量体化ドメインを介して二量体化してなる。V H H 抗体は、重鎖抗体の重鎖の可変ドメインからなる抗体断片である。V H H 抗体は、典型的には、ラクダ科の動物（例えば、ラクダ、ラマ、アルパカ等）に由来する重鎖抗体の重鎖可変ドメインである。通常の抗体は細胞外に発現させるため細胞外でしか機能させることができないのに対して、細胞内抗体は、細胞内において抗体機能を発揮させることができる点で優れている。細胞内における標的タンパク質の活性化、および不活性化、並びにタンパク質間相互作用の中和や遮断などの様々な用途に細胞内抗体を用いることができる。s c F v は、細胞内に発現させると凝集性を示す傾向を有する。したがって、このような場合に、本開示のペプチドタグを細胞内抗体に連結させて融合タンパク質を得てその凝集性を低下させることは有用である。タンパク質の凝集性を減じることによって、タンパク質が有すべき機能を細胞内において発揮させ得る。

[0033] 本明細書では、「ペプチドタグ」とは、目的タンパク質に融合させることにより、目的タンパク質を標識する、または目的タンパク質の生化学的性質

を変更するものである。ペプチドタグとしては、例えば、FLAGタグ、3×FLAGタグ、Mycタグ、HAタグ、T7、6×Hisタグ、PAタグ、Sタグ、Eタグ、VSV-G、Glu-Glu、StreptagII、HSVタグ、Chitin Binding Domain (CBD) タグ、Calmodulin Binding Peptide (CBP) タグ、V5タグ、GSTタグ、マルトース結合タンパク質 (MBP) タグ、チオレドキシン (Trx) タグ、およびmini-AIDタグなどの様々なタグが挙げられる。それぞれ、タグに対する親和性を利用して目的タンパク質をアフィニティ精製したり、タグに対する抗体を作製して、目的タンパク質を検出したりすることに用いることができる。タグを認識する抗体は、一般的にタグ抗体と呼ばれ、タグ抗体のエピトープとなるタグ配列をエピトープタグという。タグは、一般的には数アミノ酸から数十アミノ酸長のポリペプチド鎖を有し得る。

[0034] 本明細書では、「目的タンパク質」とは、細胞内で発現させるタンパク質である。目的タンパク質は、凝集性タンパク質であっても非凝集性タンパク質であってもよい。いずれの場合にも本開示のペプチドタグを付加することにより、より安定性を増し、凝集形成に対してロバストになるためである。但し、本開示のペプチドタグは、凝集性タンパク質に対して付加した場合にも、その細胞内での凝集性を低下させ得るため、目的タンパク質は、好ましくは凝集性タンパク質であり得る。目的タンパク質が分泌性タンパク質である場合であっても、分泌性タンパク質が細胞外に分泌される前に細胞内で凝集を形成する場合がある。本開示のペプチドタグは、分泌性タンパク質、好ましくは、凝集性の分泌性タンパク質に対しても有利に用いられ得る。

[0035] 本明細書では、「凝集性タンパク質」とは、細胞内において凝集（特に不溶性の凝集塊）を形成するタンパク質をいう。本明細書では、「凝集性」とは、凝集を形成する性質を意味し、「非凝集性」とは、凝集を形成しない性質を意味する。凝集性の減弱化は非凝集性の促進であり得、凝集性の促進は非凝集性の減弱化であり得る。本明細書では、「非凝集性」は「安定性」と

相互互換的に用いられる。凝集は、例えば、免疫細胞染色（ＩＣ）により顕微鏡下で輝点として観察され得る。凝集率は、例えば、タンパク質強制発現細胞のうちの凝集を示す細胞の割合により計算され得る。このように計算される凝集率の低下は、凝集による影響を受けないタンパク質強制発現細胞の増加を意味し、生理学的な好ましさの指標であり得る。凝集性の低下（例えば、凝集率の低下）と可溶性の増大とは異なる指標である。可溶性の増大は、水溶液中で利用可能なタンパク質濃度が高まることを意味するが、凝集塊の数や凝集塊を有する細胞の割合に直結するものではない。したがって、可溶性の増大は凝集性の低下（例えば、凝集率の低下）を必ずしも意味しない。

[0036] 本明細書では、アミノ酸配列は、１文字表記により表される。すなわち、Ａはアラニンを表し、Ｒはアルギニンを表し、Ｎはアスパラギンを表し、Ｄはアスパラギン酸を表し、Ｃはシステインを表し、Ｑはグルタミンを表し、Ｅはグルタミン酸を表し、Ｇはグリシンを表し、Ｈはヒスチジンを表し、Ｉはイソロイシンを表し、Ｌはロイシンを表し、Ｋはリジンを表し、Ｍはメチオニンを表し、Ｆはフェニルアラニンを表し、Ｐはプロリンを表し、Ｓはセリンを表し、Ｔはトレオニンを表し、Ｗはトリプトファンを表し、Ｙはチロシンを表し、かつ、Ｖはバリンを表す。アミノ酸は、通常は上記で列挙された２０種類のＬ－アミノ酸である。

[0037] 本明細書では、「制御配列」は、それに作動可能に連結された遺伝子を駆動し、当該遺伝子からＲＮＡを転写する活性を有する配列をいう。制御配列は、例えば、プロモーターである。プロモーターは、例えば、クラスⅠプロモーター（ｒＲＮＡ前駆体の転写に用いられ得る）、クラスⅡプロモーター（コアプロモーターと上流プロモーターエレメントから構成され、ｍＲＮＡの転写に用いられ得る）、およびクラスⅢプロモーター（Ⅰ型、Ⅱ型、およびⅢ型にさらに大別される）が挙げられる。

[0038] 本発明によれば、凝集性タンパク質の凝集傾向を低下させるペプチドタグが提供される。本発明によれば、制御配列に作動可能に連結され、当該ペプ

チドタグをコードする遺伝子を含むタンパク質発現ベクターが提供される。本発明によれば、当該ペプチドタグと融合した目的タンパク質が提供される。本発明によれば、制御配列に作動可能に連結され、当該ペプチドタグと融合した目的タンパク質をコードする遺伝子を含むタンパク質発現ベクターが提供される。目的タンパク質は、ある態様では、細胞内タンパク質であり得る。目的タンパク質は、ある態様では、細胞内抗体であり得る。目的タンパク質は、ある態様では、s c F vであり得る。

[0039] 以下、本開示の凝集性タンパク質の凝集傾向を低下させるペプチドタグについて詳述する。本開示のペプチドタグは、真核細胞内、特にヒト細胞内において目的タンパク質の凝集傾向を低下させることができる。医薬用途等を検討する場合、ヒト細胞内での目的タンパク質の凝集傾向を低下させることは有益であり得る。

[0040] 本開示のペプチドタグの長さは、特に限定されないが、例えば、600アミノ酸以下、500アミノ酸以下、400アミノ酸以下、300アミノ酸以下、200アミノ酸以下、例えば、5アミノ酸から100アミノ酸、例えば、10アミノ酸から90アミノ酸、20アミノ酸から80アミノ酸、30アミノ酸から70アミノ酸、40アミノ酸から60アミノ酸、10アミノ酸から50アミノ酸、10アミノ酸から40アミノ酸、10アミノ酸から30アミノ酸の長さを有し得る。この態様において、本開示のペプチドタグの長さの下限値は、5アミノ酸以上、10アミノ酸以上、15アミノ酸以上、20アミノ酸以上、30アミノ酸以上、40アミノ酸以上、50アミノ酸以上、60アミノ酸以上、70アミノ酸以上、または80アミノ酸以上であり得、および／または、上限値は、100アミノ酸以下、90アミノ酸以下、80アミノ酸以下、70アミノ酸以下、60アミノ酸以下、50アミノ酸以下、40アミノ酸以下、30アミノ酸以下、または20アミノ酸以下であり得る。

[0041] (a) 本開示のペプチドタグは、以下の割合の酸性アミノ酸（要素1のアミノ酸）を含み得る。

本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%以上が酸性アミノ酸であり得る。

本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり得る。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、より好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、さらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、さらにより好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、なおさらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、とりわけ好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得る。酸性アミノ酸は、DまたはEである。また例えば、本開示のペプチドタグにおける酸性アミノ酸含有率を44%以下、43.5%以下、43%以下、42.5%以下、42%以下、41.5%以下、41%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、または20%以下とすることができる。これにより、ある態様では、ペプチドタグの高い酸性アミノ酸の比率に基づいて正電荷を有する細胞内の分子等と予期せぬ相互作用をきたすリスクを低下させ得る。

[0042] (b) 本開示のペプチドタグは、以下の割合の塩基性アミノ酸（要素2のアミノ酸）を含み得る。

本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の25%以下、20%以下、より好ましくは、15%以下の塩基性アミノ酸を有し得、さらに好ましくは10%以下の塩基性アミノ酸を有し得、さらにより好ましくは5%以下の塩基性アミノ酸を有し得、とりわけ好ましくは、3%未満、2%未満もしくは1%未満の塩基性アミノ酸を有し得る。もっとも好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列中に塩基性アミノ酸を含まない。塩基性アミノ酸は、K、R、またはHである。

[0043] (c) 本開示のペプチドタグは、以下の割合の要素3のアミノ酸を含み得る。

要素3のアミノ酸とは、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAであり得る。

本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上、好ましくは、20%以上、より好ましくは、30%以上、40%以上が、要素3のアミノ酸であり得る。本開示のペプチドタグは、また、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の50%以上、60%以上、または70%以上が、要素3のアミノ酸であり得る。本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の80%以下、より好ましくは、70%以下、さらに好ましくは、60%以下が、要素3のアミノ酸であり得る。また、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の50%以下、40%以下、30%以下、または20%以下が、要素3のアミノ酸であり得る。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下、30%以上70%以下、30%以上60%以下、30%以上50%以下、30%以上40%以下、40%以上70%以下、40%以上60%以下、40%以上50%以下、50%以下以上70%以下、50%以上60%以下、60%以上80%以下、または60%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり得る。

[0044] 特に好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上、10%以上、15%以上、または20%以上（好ましくは21%以上、25%以上、または30%以上）が、NおよびPのいずれかである。また、例えば、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上20%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、

そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の55%以上90%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%超20%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%超30%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%超40%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%超50%以下がNおよびPのいずれかであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の50%超60%以下がNおよびPのいずれかであり得る。

[0045] 例えば、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上、10%以上、15%以上、または20%以上（好ましくは21%以上、25%以上、または30%以上）が、Nである。また、例えば、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上20%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の55%以上90%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%超20%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%超30%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%超40%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%超50%以下がNであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の50%超60%以下がNであり得る。

[0046] 例えば、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５％以上、６％以上、７％以上、８％以上、９％以上、１０％以上、１５％以上、または２０％以上（好ましくは２１％以上、２５％以上、または３０％以上）が、Pである。また、例えば、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４５％以下、４０％以下、３５％以下、３０％以下、２５％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５５％以上９０％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の１０％以上２０％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の１０％超２０％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の２０％超３０％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の３０％超４０％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の４０％超５０％以下がPであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５０％超６０％以下がPであり得る。

[0047] また、特に好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５％以下、１０％以下、１５％以下、または２０％以下が、FまたはYである。特に好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５％以下、１０％以下、１５％以下、または２０％以下が、Fおよび／またはYである。特に好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５％以下、１０％以下、１５％以下、または２０％以下が、FおよびYである。特に好ましい態様では、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の５％以上、１０％以上、１５％以上、または２０％以上が、NおよびPのいずれかであり、かつ、５％以下、１０％以下、１５％以下、または２０％以下が、F

および／またはYである。

[0048] (d) 本開示のペプチドタグは、以下の割合の要素4のアミノ酸を含み得る。

要素4のアミノ酸とは、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸および要素3のアミノ酸のいずれでもないアミノ酸であり得る。要素4のアミノ酸は、例えば、M、T、W、C、I、V、およびLであり得る。

本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下が要素4のアミノ酸であり得る。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは要素4のアミノ酸を含まない。

[0049] (e) 本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以下、30%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下がGであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、Gを含まない。

[0050] (f) 本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以下、30%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下がAであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、Aを含まない。

[0051] (g) 本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以下、30%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下がGであり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以下、30%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下がAであり得る。

[0052] (h) 本開示のペプチドタグは、好ましくは、Sを含み得る。本開示のペプチドタグは、好ましくはSを含まない。本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、または50%以上のSを含み得る。本開示のペプチド

タグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下のSを含み得る。

[0053] (A) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり得る。

[0054] (B) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。

[0055] (C) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。

[0056] (D) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。

[0057] (E) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり得る。

[0058] (F) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の

45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。

[0059] (G) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。

[0060] (H) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。

[0061] (I) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり得る。

[0062] (J) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。

[0063] (K) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。

- [0064] (L) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。
- [0065] (M) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり得る。
- [0066] (N) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。
- [0067] (O) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。
- [0068] (P) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり得る。
- [0069] (Q) 上記のペプチドタグにおいて、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、より好ましくは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上45

%未満が酸性アミノ酸であり得、なおさらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、とりわけ好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得る。

[0070] (R) 上記のペプチドタグにおいて、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸である。より好ましくは5%以下の塩基性アミノ酸を有し得、とりわけ好ましくは、3%未満、2%未満もしくは1%未満の塩基性アミノ酸を有し得る。あるいは、上記のペプチドタグは、ある好ましい態様では、塩基性アミノ酸を含まない。

[0071] (S) 上記のペプチドタグにおいて、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上60%以下が要素3のアミノ酸である。

[0072] (T) 上記のペプチドタグにおいて、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下が要素4のアミノ酸であり得る。ある好ましい態様において、上記のペプチドタグは、要素4のアミノ酸を含まない。

[0073] (U) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、より好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、さらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、さらにより好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上45%未満が酸性アミノ酸であり

得、なおさらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得、とりわけ好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得る。

[0074] (V) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の3%未満、2%未満、または1%未満が塩基性アミノ酸であり得、あるいは、塩基性アミノ酸を含まない。

[0075] (W) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上60%以下が要素3のアミノ酸であり得る。

[0076] (X) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4

のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下が要素4のアミノ酸であり得る。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは要素4のアミノ酸を含まない。

[0077] (Y) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、より好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、さらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上45%未満が酸性アミノ酸である。

[0078] (Z) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上60%以下が要素3のアミノ酸である。

[0079] (AA) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸

の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上80%以下（好ましくは30%以上70%以下）が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の15%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が要素4のアミノ酸であり、またはそのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以下が要素4のアミノ酸である。

[0080] (AB) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上60%以下が要素3のアミノ酸である。この態様において、より好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、さらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上60%以下が要素3のアミノ酸であり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、さらに好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上60%以下が要素3のアミノ酸であり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の40%以上45%未満が酸性アミノ酸であり得る。

- [0081] (A C) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。この態様において、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の15%以下、10%以下、または5%以下がGであり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、Gを含まない。
- [0082] (A D) 本開示のペプチドタグは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の35%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が塩基性アミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%以下が要素3のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が要素4のアミノ酸であり、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がGであり、かつ、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がAであり得る。
- [0083] (A E) 本開示のペプチドタグは、例えば、配列番号2～11のいずれかに記載のアミノ酸配列を有し得る。本開示のペプチドタグは、好ましくは、配列番号5のアミノ酸配列を有し得る。
- [0084] (A F) 本開示のペプチドタグは、例えば、表1～11、表12-1、表12-2、表13-1、表13-2、表14-1、および表14-2に記載のアミノ酸配列のいずれかを有し得る。
- [0085] (A G) 本開示のペプチドタグは、上記(A E)および(A F)のいずれかのアミノ酸配列の任意のアミノ酸（例えば、要素1、要素2、要素3、または要素4のアミノ酸、例えば、要素2、要素3、または要素4のアミノ酸）のNおよびPからなる群から選択される1以上のアミノ酸の付加、および挿入、並びに上記アミノ酸への置換（例えば、1個から30%程度のアミノ酸

の置換、例えば、1から20個、10個、または数個のアミノ酸への置換)からなる群から選択される1以上を有していてもよい。本開示のペプチドタグは、上記(A F)および(A G)のいずれかのアミノ酸配列の任意のアミノ酸(例えば、要素1、要素2、要素3、または要素4のアミノ酸、例えば、要素2、要素3、または要素4のアミノ酸)のSの付加、および挿入、並びに上記アミノ酸への置換(例えば、1個から30%程度のアミノ酸の置換、例えば、1から20個、10個、または数個のアミノ酸への置換)を有していてもよい。本開示のペプチドタグは、上記(A F)および(A G)のいずれかのアミノ酸配列の任意のアミノ酸(例えば、要素1、要素2、要素3、または要素4のアミノ酸、例えば、要素2、要素3(特にFおよび/またはY、要素4のアミノ酸、AまたはG)の欠失を有していてもよい。

[0086] (A H) 本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、または20%以上がNもしくはP、またはNおよびPのいずれかであり得る。本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、20%以上、21%以上、25%以上、または30%以上がPであり得る。本開示のペプチドタグは、好ましくは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、20%以上、21%以上、25%以上、または30%以上がNであり得る。

[0087] (A I) 本開示のペプチドタグでは、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%以上が酸性アミノ酸であり、かつ、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、

上、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、20%以上、21%以上、25%以上、または30%以上がNまたはPであり得る。この態様では、そのアミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満（好ましくは5%未満、より好ましくは0%）がGであり、10%未満（好ましくは5%未満、より好ましくは0%）がAであり、および／または10%未満（好ましくは5%未満、より好ましくは0%）がFおよびYであり得る。

[0088] (AJ) 本開示のペプチドタグでは、

- (a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、
- (b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、
- (c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ
- (d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0089] (AK) 本開示のペプチドタグでは、

- (a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、
- (b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上がNまたはPであり、
- (c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ
- (d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未

満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0090] (AL) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がFおよび／またはYであり、

(c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ

(d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0091] (AM) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上がNまたはPであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がFおよび／またはYであり、

(c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ

(d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0092] (AN) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上65%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がFおよび／またはYであり、

(c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ

(d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0093] (AN) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上65%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上がNまたはPであり、

(c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ

(d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0094] (AO) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上65%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり

、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の60%以下がSであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以上がNまたはPであり、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下がFおよび／またはYであり、

(c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、かつ

(d) AおよびGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満であり得る。この態様において、アミノ酸配列は、10～200アミノ酸長（例えば、10～90アミノ酸長）を有し得る。

[0095] (AP) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(b1) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の55%以上90%未満がNおよびPのいずれかであり、かつ

アミノ酸配列を構成するアミノ酸の残りがその他のアミノ酸であり得る。この態様では、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下（好ましくは15%以下、10%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、または0%）が、酸性アミノ酸、NおよびPのいずれでもない。

[0096] (AQ) 本開示のペプチドタグでは、

(a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の45%以上が酸性アミノ酸であり、

(b1) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の21%以上がNであり、および／または7%以上がPであり、

アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下（好ましくは15%以下、10%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、または0%）がその他のアミノ酸であり得る。

[0097] (AR) 上記(AK)～(AQ)において、好ましくは要素4は0%であり得る。

[0098] (AS) 上記(AK)～(AQ)において、AまたはGは0%であり得る

。上記（ＡＫ）～（ＡＯ）において、好ましくは、ＡおよびＧは０％である。

[0099] （ＡＴ）上記（ＡＫ）～（ＡＱ）において、好ましくは、要素４は０％であり、かつ、ＡおよびＧは０％である。

[0100] （ＡＵ）上記（ＡＲ）～（ＡＴ）において、好ましくは、要素２は０％である。

[0101] 上記（ａ）において、好ましくは、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の１０％以上４５％未満が酸性アミノ酸であり、より好ましくは、１５％以上４５％未満が酸性アミノ酸であり、さらに好ましくは、２０％以上４５％未満が酸性アミノ酸であり、さらにより好ましくは、２５％以上４５％未満が酸性アミノ酸であり、とりわけ好ましくは、３０％以上４５％未満が酸性アミノ酸であり、これらの例において、酸性アミノ酸含有率の上限は、例えば、４５％未満、４０％以下、または３５％以下であり得る。

[0102] 本開示のペプチドタグは、タンパク質（例えば、細胞内凝集性タンパク質）に付与することができる。したがって、本開示によれば、本開示のペプチドタグと細胞内凝集性タンパク質との融合タンパク質が提供される。本開示のペプチドタグはまた、細胞内非凝集性タンパク質に付与してもよい。タグ付与により、非凝集性タンパク質の非凝集性に関する強靱性が増加し得る。タンパク質は、例えば、細胞内抗体であり得る。細胞内抗体は、抗体の抗原結合性断片であり得る。本開示のペプチドタグは、細胞内抗体と分解誘導配列との融合タンパク質に付与してもよい。これにより、細胞内抗体が結合する標的の選択的な分解を誘導することができる。細胞内抗体としては、上記のような抗体断片が挙げられる。また、細胞内抗体としては、 α -シヌクレイン、ＬＲＲＫ２、タウ（Ｔａｕ）、 β -アミロイド、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、Ｃ９ｏｒｆ７２、スーパーオキシドジスムターゼ１（ＳＯＤ１）、ＴＡＲ ＤＮＡ結合タンパク質４３（ＴＤＰ４３）、Ｆｕｓｅｄ ｉｎ Ｓａｒｃｏｍａ（ＦＵＳ）及びプリオンタンパク質、並びにその病理学的形態に結合する抗体が挙げられる。細胞内抗体としては、タンパク

質間相互作用（PPI）を阻害する抗体が挙げられる。細胞内抗体としては、標的に結合する分解誘導配列との融合タンパク質の形態のものが挙げられる。細胞内抗体としては、例えば、Molecular Therapy, 29 (2) : 859-872, 2021に記載された細胞内抗体（例えば、CP13 iB、PHF1 iB、およびTau5 iB）およびこれらの細胞内抗体の全てのCDR配列を有する細胞内抗体が挙げられる。iBはイントラボディの略であり、すなわち細胞内抗体を意味する。本開示では、例えば、これらの細胞内抗体と本開示のペプチドタグとの融合タンパク質が提供される。細胞内抗体は、好ましくは、分解誘導配列をさらに有していてもよい。また、細胞内抗体としては、例えば、Molecular Therapy, 30 (4) : 1484-1499, 2022に記載された細胞内抗体（例えば、VHH E4-1およびVHH Z70）およびこれらの細胞内抗体の全てのCDR配列を有する細胞内抗体が挙げられる。細胞内抗体は、好ましくは、分解誘導配列をさらに有していてもよい。細胞内抗体としては、例えば、J. Biol. Chem., 295 (31) : 10662-10676, 2020に記載された細胞内抗体（例えば、M204-scFv）およびこの細胞内抗体の全てのCDR配列を有する細胞内抗体が挙げられる。細胞内抗体は、好ましくは、分解誘導配列をさらに有していてもよい。細胞内抗体としては、例えば、WO2018/231254に記載された細胞内抗体（例えば、BIB092抗体）、WO2016/207245に記載された細胞内抗体、WO2018/011073に記載された細胞内抗体（例えば、C10-2）、WO2015/114538に記載された細胞内抗体（例えば、VHH tau A2、VHH tau A2-SH、VHH tau A2 var-SH）、WO2014/059442に記載された細胞内抗体（例えば、F9T、D11C、D4G、G12C、H2A、およびH7T）、JP2020/515233（例えば、1E4、9B11、3A9、10F10、11F11、AC8、AE8、AA9、DG5、AD2、AD7、DG11、DG8、DA9）およびこの細胞

内抗体の全てのCDR配列を有する細胞内抗体が挙げられる。細胞内抗体は、好ましくは、分解誘導配列をさらに有していてもよい。細胞内抗体としてはまた、WO 2019177138に記載された異常TDP-43を分解除去できる細胞内抗体（例えば、配列番号21～24）およびこの細胞内抗体の全てのCDR配列を有する細胞内抗体が挙げられる。細胞内抗体は、好ましくは、分解誘導配列をさらに有していてもよい。このように、tauに結合する細胞内抗体（例えば、scFvまたはVHH）、 α -シヌクレインに結合する細胞内抗体（例えば、scFvまたはVHH）、およびその他細胞内で細胞毒性を生じるアミロイドに対する細胞内抗体（例えば、scFvまたはVHH）は好ましく、タグと連結され、タグとの融合タンパク質とされる。

[0103] ある態様では、本開示のペプチドタグは、CAAXモチーフ（例えば、配列番号58：KLNPPDESGPGCMSCCKCVLS）を有しない。ある態様では、本開示のペプチドは、膜局在化シグナルを有しない。ある態様では、本開示のペプチドタグは、目的タンパク質を細胞内に発現させる観点で、細胞外への分泌のためのシグナルペプチド配列を有しない。ある態様では、本開示のペプチドタグは、目的タンパク質の細胞外への分泌を促進する観点で、細胞外への分泌のためのシグナル配列を有していてもよい。分泌性タンパク質が凝集性である場合に、シグナル配列をその配列中に含む本開示のペプチドタグ、またはシグナル配列とタンデムに連結した本開示のペプチドタグは有利であり得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、核移行シグナルを含み得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、細胞質へのタンパク質の局在を妨げる配列を有しない。ある態様では、本開示のペプチドタグは、目的タンパク質の細胞内での自由な分布を促進する。ある態様では、本開示のペプチドタグは、目的タンパク質の細胞内における本来の結合相手との結合および結合相手との共局在を促進し得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、目的タンパク質の細胞内での分布にペプチドタグ固有の制約を与える配列（または自由な分布を妨げる配列）を有することができ

るが、好ましくは、そのような配列を有しないことができる。

[0104] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、以下の配列を含まない (Enzymol., 326, 362-367 (2000)) : S-tag: KETAAAKFERQHMD S (配列番号14)。ある態様においては、本開示のペプチドタグは、要素2は10%以下であり、および／またはAは10%以下である配列を有し得る。

[0105] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、KLNPPDESGPGCMSCKCVLS (配列番号15) を有しない (Tanaka et al., 2007, EMBO Journal, 26:3250-3259)。ある態様では、本開示のペプチドタグは、当該配列と90%以上の配列同一性を有する配列を有しない。

[0106] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、EFGGAPEFPKPSTPPGSSGL (配列番号16) および当該配列と90%以上の配列同一性を有する配列を有しない (Paolo et al., 2003, Clinical Cancer Research, 9:2837-2848)。ある態様では、本開示のペプチドタグは、当該配列と90%以上の配列同一性を有する配列を有しない。

[0107] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、以下のいずれの配列も有しない (Arimori et al., 2017, Structures, 25:1611-1622) :

hMst1: DYEFLKSWTVEDLQKRL LALDPMMEQE
IEEIRQKYQSKRQPILDAIEAK (配列番号17) ;

hMST2: DFDFLKNLSLEELQMRLKALDPMMERE
IEELRQRYTAKRQPILDAMDAK (配列番号18) ;

hRaf1: GEVNWDAFSMP ELHNFLRILQREEEEH
LRQILQKYSYSRQKIQEALHAS (配列番号19) ;

hRaf5: GEVEWDAFSIPELQNFLTILEKEEQDK
IQQVQKKYDKFRQKLEELALRES (配列番号20) ;

hSAV1: HILKWELFQLADLDITYQGMLKLLFMKE
LEQIVKMYEAYRQALLTELENR (配列番号21)。ある態
様では、本開示のペプチドタグは、これらの配列のいずれとも90%以上の
配列同一性を有する配列を有しない。

[0108] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、以下のいずれも有し
ない (Zhang et al., 2004, Protein Expression and Purification, 36 (2): 20
7-216) :

T7C: LEDPFQSGVMLGVASTVAASPEEASVTST
EETLTPAQEAARTRAANKARKEAELAAATAEQ (配
列番号22) ;

T7B: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAAN
KARKEAELAAATAEQ (配列番号23) ;

T7B1: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRPP
NKARKEAELAAATAEQ (配列番号24) ;

T7B2: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRGG
NKARKEAELAAATAEQ (配列番号25) ;

T7B3: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAA
NKARKEAELTAEQ (配列番号26) ;

T7B4: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAA
NKARKEAELEAETAEQ (配列番号27) ;

T7B5: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAA
AKARKEAELAAATAEQ (配列番号28) ;

T7B6: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRKA
RKEAELAAATAEQ (配列番号29) ;

T7B7: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAA
NKARKEAELAA (配列番号30) ;

T7B8: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAA

NKARKEAELAAA (配列番号31) ;
T7B9: LEDPEEASVTSTEETLTPAQEAAETEAANKARKEAELEAETAEQ (配列番号32) ;
T7B10: LEDPTPAQEAAARTRAANKARKEAELAAATAEQ (配列番号33) ;
T7A: LEDPAANKARKEAELAAATAEQ (配列番号34) ;
T7A1: LEDPERNKERKEAELAAATAEQ (配列番号35) ;
T7A2: LEDPERNKERKEAELEAATAEQ (配列番号36) ;
T7A3: LEDPERNKERKEAELEAETAEQ (配列番号37) ;
T3: LEDPAVWEAGKVVAKGVGTADITATTSNGLIASCKVIVNAATS (配列番号38) ;
T3A: LEDPAVWEAGKVVAKGVGTADITATTSNGLIASSEEDNAATS (配列番号39) 。ある態様では、本開示のペプチドタグは、これらの配列のいずれとも90%以上の配列同一性を有する配列を有しない。

[0109] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、以下のいずれも有しない (特開2015-97519号) :

Zif628: ERPYACPVESCDRRFSRDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRHTGKEPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHLRQKD (配列番号40) ;
HinR: GRPRAITKHEQEQISRLLEKGHPRQQLAIIFGIGVSTLYRYFPASSIKKRMN (配列番号41) ; および

TrpR:MAQQSPYSAAMAEQRHXXQEWLRFVDLLK
NAYQNXDXDLHLPLNLMLTPDERXXEALGTRVRI
VEELLRGEMSQRELKNELGAGIATITRGSNSLKA
APVELRQWLEEVLLKSD (配列番号42)。

[0110] ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、非ヒト生物内で見出される天然の配列であり得る。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、非天然の配列またはその一部であり得る。いずれの態様においても、本開示のペプチドタグは、以下のいずれでもない (WO2010/034183) :

NE-1:TKENPRSNQEESYDDNES (配列番号43) ;
NE-8:TKENPRTNQEESYDDNES (配列番号44) ;
NE-9:TKENPRSNQDESYDDNES (配列番号45) ;
NE-10:TKENPRSNQPPSYDDNES (配列番号46)。

[0111] ある態様では、本開示のペプチドタグは、以下のいずれでもない (WO2011/034605) :

ACID.P1:GGSAQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQGAT (配列番号50)。

[0112] ある態様では、本開示のペプチドタグは、以下のいずれでもない (WO2009/023270) :

rPEG_K288-GFP:(GEGEGGGEG)₃₂ (配列番号51)

。

[0113] ある態様では、本開示のペプチドタグは、以下のいずれでもない (WO2020/059228) :

Hero7:MTRGNQRELARQKNMKKQSDSVKGKRRD
DGLSAAARKQRDSEIMQQKQKK ANEKKEEPK (配列番号1038) ;

Hero9:MSGPNGDLGMPVEAGAEGEEDGFGEAEY
AAINSMLDQINSCLDHLEEKNDHLHARLQELLES

NRQTRLEFQQQLGEAPSDASP (配列番号1039) ;
Hero11:MAQGQRKFQAHKPAKSKTAAASEKNR
GPRKGGRV IAPKKARVVQQQKLKKNLEVGIRKKI
EHDVVMKASSSLPKKLALLKAPAKKKGAAAATSS
KTPS (配列番号1040) 。

[0114] また、ある態様では、本開示のペプチドタグは、以下のいずれでもない (Protein Engineering, Design & Selection, 26 (8) : 490-501, 2013) :

PAS#1:ASPAAPAPASPAAPAPSAPAA (配列番号52) ;

1P2:ASAAAPAAASAAASAPSAAAA (配列番号53) ;

PAS#5:AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPAA (配列番号54) ;

およびこれらの繰り返し配列 (例えば、繰り返し回数は200±20回、400±40回、または600±60回など) 。

[0115] また、ある態様では、本開示のペプチドタグは、以下のいずれでもない (Protein Engineering, Design & Selection, 17 (11) : 779-786, 2004) :

Z (W) :VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNA
FIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAPK (配列番号55) ;

Z (a1) :VDNKFNKEQQNAEYIEHLPNLNEEQEN
AFIQSLEDDPSQSANLLAEAKKLNDAPK (配列番号56) ;

Z (a2) :VDNKFNKEEEEEAEYIEHLPNLNEEQEE
AFIESLEDDPSQSANLLAEAKKLNDAPK (配列番号57)

[0116] ある態様では、本開示のペプチドタグは、配列番号43~46、および4

7～58に記載のいずれのアミノ酸配列からも1以上、好ましくは2以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失、不可および削除からなる群から選択される変異を有していてもよい。ある態様では、本開示のペプチドタグは、配列番号44～47、および47～58に記載のいずれのアミノ酸配列から90%未満、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、または10%以下の配列同一性を有し得る。

[0117] いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、以下の配列を含まない (Protein Science (2019) 28, 823-836) :

PA12-tag: GVAMPGAEDDVV (配列番号47) ;

PA14-tag: EGGVAMPGAEDDVV (配列番号48)。また、いかなる態様においても、本開示のペプチドタグは、以下の配列を含まない :

DYKDDDDVEAEESDNVDSADAEEDDSVWWGGAD
TDYADGSEDKVVEVAEEEEVAEEEEEAADDDEDD
EDGDEVVEEEAEEPVEEATERTTTSTTTTTTTTES
VEEVYPGQVGYPGQVGYPGQV (配列番号49)。

[0118] ある態様では、本開示のペプチドタグは、配列番号14～48、および49～58のいずれとも90%未満、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下または10%以下の配列同一性を有する。

[0119] ある態様においては、本開示のペプチドタグは、以下、(i)～(iii)のいずれか1、2、またはすべてを満たす配列を有し得る：(i)要素2は10%以下である、(ii)Aは10%以下である、および、(iii)Gは10%以下である。

[0120] ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、Aを連続して5以上含む配列を有しない。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、Qを

連続して5以上含む配列を有しない。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、Sを連続して5以上含む配列を有しない。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、Nを連続して5以上含む配列を有しない。ある好ましい態様では、ペプチドタグのアミノ酸配列中の特定の単一のアミノ酸の含有率が、50%を超えない、40%を超えない、35%を超えない、30%を超えない、25%を超えない、または20%を超えない。ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、WO 2022/092132の表1に記載された3～8アミノ酸長を有するアミノ酸配列を含まないか、当該アミノ酸配列の連続した繰り返し（例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、または10以上の連続した繰り返し）を含まない。

[0121] 例えば、本開示のペプチドタグは、細胞内抗体に対しては、凝集形成を抑制して、抗体の細胞内での均一な分布を促進し、および／または、凝集形成を抑制して、細胞内抗体の細胞内における抗原との結合および抗原との共局在を促進し得る。ある態様では、本開示のペプチドタグは、細胞内抗体の細胞内における分布にペプチドタグ固有の制約を与える配列（または自由な分布を妨げる配列）を有しないことができ、および／または、細胞内抗体の細胞内における抗原との結合および抗原との共局在を有しないことができる。

[0122] 本開示のペプチドタグはいずれも、タグ化されたタンパク質の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善する；非凝集性を増加、促進、もしくは改善する；または安定性を増強、促進、または向上させることができる。本開示のペプチドタグは、細胞内抗体の細胞内における分布にペプチドタグ固有の制約を与える配列（または自由な分布を妨げる配列）を有しないことができ、および／または、細胞内抗体の細胞内における抗原との結合および抗原との共局在を有しないことができる。本開示のペプチドタグはまた、目的タンパク質がタンパク質が抗体の抗原結合性断片である場合には、当該タンパク質が抗原に結合することにより細胞質中で抗原と共局在することを促進し得る。

[0123] 本開示のペプチドタグは、例えば、生物が有する遺伝子がコードする遺伝

子産物またはその断片であり得、ここで、非ヒト生物（例えば、微生物、例えば、細菌、藻類、もしくは真菌、動物、例えば、哺乳動物、鳥類、もしくは魚類、または植物）が有する遺伝子がコードする遺伝子産物またはその断片であり得る。あるいは、ある好ましい態様では、本開示のペプチドタグは、ヒトが有する遺伝子がコードする遺伝子産物またはその断片であり得る。

[0124] 本開示のペプチドタグは、凝集性タンパク質に融合させることにより当該凝集性タンパク質の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善し、または凝集性タンパク質の非凝集性を増加、促進、もしくは改善し得る。タンパク質の凝集は、そのタンパク質を発現した細胞に対して悪影響を及ぼし得る上に、凝集によりタンパク質の産生量や機能性に悪影響を及ぼし得る。したがって、凝集傾向を緩和、阻害、または改善することは、凝集による細胞への影響を低減し、タンパク質の産生量や機能性への影響を低減することに繋がり得る。これにより、細胞内で発現させた凝集性タンパク質の発現量の改善および／または機能性の向上の点で有益で有り得、したがって、凝集性タンパク質のインビボでの強制発現において有用であり得る。

[0125] したがって、本開示のペプチドタグは、凝集性タンパク質と融合させてもよい。凝集性タンパク質は、例えば、細胞内に発現させたときに30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上の細胞において凝集を形成するタンパク質であり得る。凝集性タンパク質は、例えば、細胞内に発現させたときに90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または50%以下の細胞において凝集を形成する凝集性タンパク質であってもよい。融合は、例えば、凝集性タンパク質のN末端および／またはC末端（好ましくは、N末端とC末端の両方）に対してなされ得る。融合は、例えば、本開示のペプチドタグをコードする核酸と凝集性タンパク質をコードする核酸とをインフレームで（コドンの読み枠が整合するように）連結することによって達成され得る。本開示のペプチドタグは、非凝集性タンパク質と融合させてもよい。これにより、非凝集性タンパク質の非凝集性をさらに高めることができる。非凝集性タンパク質は、例え

ば、細胞内に発現させたときに20%以下、15%以下、10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下の細胞において凝集を形成するタンパク質または凝集を形成しないタンパク質であってもよい。

[0126] 本開示のペプチドタグは、タンパク質に融合させることにより当該タンパク質の細胞内環境下での安定性を増強、促進、または向上させ得る。細胞内環境下でのタンパク質の安定化は、凝集性タンパク質においても非凝集性タンパク質においても有益である。

[0127] ある態様では、目的タンパク質は、第2のペプチドタグを連結していてもよい。第2のペプチドタグは、例えば、検出目的または精製目的で目的タンパク質に付加され得る。この場合、本開示のペプチドタグは、目的タンパク質と第2のペプチドタグとの融合タンパク質に対して、凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善する；非凝集性を増加、促進、もしくは改善する；または安定性を増強、促進、または向上させることに用いることができる。第2のペプチドタグとしては、通常のペプチドタグ、例えば、HAタグを用い得る。

[0128] 凝集性タンパク質としては、特に限定されないが例えば、抗体の抗原結合性断片であり得る。凝集性タンパク質としては、好ましくは、単鎖Fv (scFv) またはVHH抗体であり得る。scFvは、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とがリンカー（好ましくはフレキシブルリンカー）を介して連結した融合タンパク質である。例えば、細胞内には、undruggableな治療標的が存在する。これは、例えば、治療標的に低分子化合物が結合する部位が見出されない場合に顕著である。抗体は、低分子化合物とは全く異なる原理で標的に対して強い結合親和性で結合することができ、低分子化合物ではundruggableであるとされてきた治療標的に対して有効に作用し得る。しかしながら、抗体は通常は細胞外に分泌され、細胞外で機能するものである。したがって、細胞内に分泌性タンパク質（細胞外に分泌されるタンパク質）を発現させるためには、細胞内に分泌性タンパク質（細胞内抗体）が発現するよう遺伝子を

設計することができる。例えば、分泌性タンパク質（細胞内抗体）を発現させるためには、タンパク質が有するシグナル配列の破壊、好ましくは除去等を実施することができる。特に s c F v は細胞内において凝集性を示し得る。したがって、本開示のタグは、凝集性タンパク質、特に分泌性タンパク質、特に抗体の抗原結合性断片、好ましくは s c F v に対して融合させることができる。また、分泌性タンパク質は、細胞内においては凝集性を示す場合がある。このような分泌性タンパク質の分泌前の細胞内における安定化において本開示のタグは有効であり得る。

[0129] 抗体、または抗体の抗原結合性断片は、その抗原に対して例えば、 10^{-5} M以下、 10^{-6} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、 10^{-11} M以下、または 10^{-12} M以下の結合親和性（K D）を有し得る。結合性の試験および結合親和性の試験は、例えば、緩衝された生理食塩水中において実施することができる。

[0130] 抗原としては、細胞内抗原、例えば、細胞内タンパク質が挙げられる。細胞内タンパク質としては、細胞質内のタンパク質（例えば、細胞内小胞外の細胞質のタンパク質）、核内のタンパク質（この場合、ペプチドタグまたは融合タンパク質には核移行シグナルを含めてもよい）、核内の転写因子、転写因子に結合するタンパク質、ゲノムDNAに結合するタンパク質、ゲノムDNAに結合するタンパク質に結合するタンパク質、クロマチンの構成タンパク質、クロマチンに結合するタンパク質、細胞内の細胞骨格、細胞内の細胞骨格に結合するタンパク質が挙げられる。細胞内タンパク質としてはまた、特に限定されないが例えば、がんドライバー遺伝子の遺伝子産物、活性化したシグナルカスケード中のタンパク質（特に、がん細胞や免疫関連疾患を有する患者における活性化免疫細胞において）、およびがん抑制遺伝子の遺伝子産物（特に、これを負に制御する結合パートナーによる制御下の）が挙げられる。ある態様では、抗原はK r a sであり得る。

[0131] タンパク質の細胞内への導入は、制御配列に作動可能に連結した融合タンパク質（ペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質）をコードする

核酸を含むタンパク質発現ベクターを細胞に導入することにより達成し得る。タンパク質発現ベクターは、タンパク質産生細胞内または哺乳動物細胞内に導入され、当該細胞内において融合タンパク質を発現することができる。

[0132] 制御配列は、mRNAの転写をすることができるプロモーターであり得、例えば、 ρ oI ρ 系プロモーターを各種使用することができる。 ρ oI ρ 系プロモーターとしては、特に制限されないが、例えばCMVプロモーター、EF1プロモーター（EF1 α プロモーター）、SV40プロモーター、MSCVプロモーター、hTERTプロモーター、 β アクチンプロモーター、CAGプロモーター、およびCBhプロモーター等が挙げられる。プロモーターとしてはまた、T7プロモーター、T3プロモーター、およびSP6プロモーターなどのバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼを駆動するプロモーター、並びにU6プロモーターなどの ρ oI ρ 系プロモーターを用いることもでき、環状DNAに対しては好ましくはT7プロモーターであり得、直鎖状DNAに対しては好ましくはSP6プロモーターであり得る。プロモーターは、ウイルスのプロモーターであってもよい。プロモーターはまた、誘導性プロモーターでもよい。誘導性プロモーターは、プロモーターを駆動する誘導因子の存在下でのみ、当該プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導することができるプロモーターである。誘導性プロモーターとしては、ヒートショックプロモーターなどの加熱により遺伝子発現を誘導するプロモーターが挙げられる。また、誘導性プロモーターには、プロモーターを駆動する誘導因子が薬剤であるプロモーターが挙げられる。このような薬剤誘導性プロモーターとしては、例えば、Cumateオペレーター配列、 λ オペレーター配列（例えば、12 $\times$ λ Op）、テトラサイクリン系誘導性プロモーター等が挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリンもしくはその誘導体（例えば、ドキシサイクリン）、またはリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）の存在下で遺伝子発現を駆動するプロモーターが挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとし

ては、例えば、TRE3Gプロモーターが挙げられる。

[0133] タンパク質発現ベクターは、特に限定されないが、ウイルスベクターおよびプラスミドベクターであり得る。ウイルスベクターとしては、特に限定されないが例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、および水泡性口炎ウイルスベクターが挙げられる。これらのベクターは、細胞への感染性を変更する観点で、シュードタイプであってもよい。これらのベクターは、弱毒化株に由来していてもよい。このようなベクターは、周知技術により適宜調製されうる。

[0134] タンパク質発現ベクターの作製の簡便性の観点で、タンパク質発現ベクターは、制御配列と制御配列に作動可能に連結された本開示のペプチドタグをコードする核酸を含み、当該核酸の下流に目的タンパク質をコードする核酸のクローニング部位を有していてもよい。クローニング部位は、当該ベクター内にユニークに存在する制限酵素切断部位を有し、目的タンパク質をコードする遺伝子の断片を導入することに適している。ペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子は、ペプチドタグをコードする遺伝子とインフレームで目的タンパク質をコードする遺伝子を連結させることにより得られる。したがって、本開示では、制御配列と制御配列に作動可能に連結された本開示のペプチドタグをコードする核酸を含むタンパク質発現ベクターが提供される。このベクターは、ある好ましい態様では、当該核酸の下流に目的タンパク質をコードする核酸のクローニング部位を有する。また、本開示では、本開示では、制御配列と制御配列に作動可能に連結された本開示のペプチドタグをコードする核酸と当該核酸とインフレームで連結された目的タンパク質をコードする核酸を含むタンパク質発現ベクターが提供される。このようにして、ペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質を細胞内に発現させることができる。

[0135] 本開示によれば、本開示のペプチドタグをコードする核酸を含むメッセン

ジャーRNA (mRNA) が提供される。mRNAは、目的タンパク質をコードする核酸をさらに含む。目的タンパク質をコードする核酸は、ペプチドタグをコードする核酸にインフレームで連結されている。ある態様では、mRNAでは、少なくとも1以上のウリジンがシュードウリジンに変更されていてもよい。シュードウリジンは、1-メチルシュードウリジンであり得る。mRNAはcDNAから転写されたものであってもよく、すなわち、イントロンを有しなくてもよい。また、mRNAには、5'末端にCap構造を有していてもよい (Furuichi Y & Miura K, Nature, 1975; 253 (5490): 374-5)。Cap構造は、Capアナログを用いたAnti-Reverse Cap Analogues (ARCA) 法によってCap0構造をmRNAに付加することができる (Stepinski J et al, RNA, 2001 Oct; 7 (10): 1486-95)。2'-Oメチルトランスフェラーゼ処理をさらに実施することにより、mRNAのCap0構造をCap1構造に変換することができる。これらは、常法により行うことができ、例えば、市販のキット、例えば、ScriptCap m7G Capping System、およびScriptCap 2'-O-Methyltransferase Kit、またはT7 mScript Standard mRNA Production System (AR Brown CO., LTD) によっても実施することができる。mRNAは、ポリA鎖を有することができる。ポリA鎖の付加は、常法により行うことができ、例えば、A-Plus Poly (A) Polymerase Tailing Kit (AR Brown CO., LTD) により行うことができる。したがって、ある態様では、mRNAは、5'末端にCap構造を有し、3'末端にポリAを有し、好ましくはウリジンの少なくとも1部がシュードウリジン (好ましくは、1-メチルシュードウリジン) であるmRNAであり得る。mRNAは、単離されたmRNAまたは合成されたmRNAであり得る。

- [0136] mRNAは、ナノ粒子、例えば、脂質ナノ粒子（LNP）に内包させることができる。これにより、生体内でのmRNAの分解を防ぐとともに、細胞内にmRNAを送達する効率が向上する。したがって、ある態様では、mRNAは、5'末端にCap構造を有し、3'末端にポリAを有し、好ましくはウリジンの少なくとも1部がシュードウリジン（好ましくは、1-メチルシュードウリジン）であるmRNAであり得る。このようなmRNAを内包する脂質ナノ粒子がまた提供される。脂質ナノ粒子は、特に限定されないが、例えば、US9364435B、US8822668B、US8802644B、およびUS8058069B2に記載された脂質ナノ粒子を用いることができる。あるいは、mRNAは、ポリリオンコンプレックスミセル、またはポリリオンコンプレックス型ポリマーソームに内包してもよい（Miyata et al., Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2562-2574）。ナノ粒子は、1 μ m未満の直径（例えば、流体力学系）を有する粒子である。
- [0137] したがって、本開示によれば、本開示のペプチドタグをコードする核酸を少なくとも含むmRNAを含むナノ小胞（例えば、脂質ナノ小胞およびポリリオンコンプレックス型ポリマーソーム）が提供される。mRNAは、上記ペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸を含み得る。
- [0138] 本開示によれば、タンパク質の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善する方法であって、当該タンパク質に本開示の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善するペプチドタグを融合させることを含む、方法が提供される。この態様では、タンパク質は、凝集性タンパク質であり得る。凝集傾向は、細胞内環境下における凝集傾向であり得る。融合は、通常は、タンパク質のN末端および／またはC末端に対してなされる。方法は、インビトロの方法であり得る。
- [0139] 本開示によればまた、タンパク質の非凝集性を増加、促進、もしくは改善する方法であって、当該タンパク質に本開示の凝集傾向を緩和、阻害もしくは

は改善するペプチドタグを融合させることを含む、方法が提供される。この態様では、タンパク質は、凝集性タンパク質であり得る。非凝集性は、細胞内環境下における非凝集性であり得る。方法は、インビトロの方法であり得る。

[0140] 本開示によればまた、タンパク質の安定性を増強、促進、または向上させる方法であって、当該タンパク質に本開示の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善するペプチドタグを融合させることを含む、方法が提供される。この態様では、タンパク質は、凝集性タンパク質であり得る。この態様では、タンパク質は非凝集性タンパク質であり得る。安定性は、細胞内環境下における安定性であり得る。方法は、インビトロの方法であり得る。

[0141] 本開示によれば、タンパク質の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善のための本開示のペプチドタグの使用が提供される。本開示によればまた、タンパク質の非凝集性を増加、促進、もしくは改善のための本開示のペプチドタグの使用が提供される。本開示によればまた、タンパク質の安定性を増強、促進、または向上のための本開示のペプチドタグの使用が提供される。使用は、インビトロの使用であり得る。

[0142] 本開示のペプチドタグが、どの程度の強さで、タンパク質の凝集傾向を緩和、阻害もしくは改善する；非凝集性を増加、促進、もしくは改善する；または安定性を増強、促進、または向上させることができるかは、インビトロのアッセイによって試験することができる。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するs c F vなどの凝集性タンパク質をコードする遺伝子のN末端またはC末端に本開示のペプチドタグをコードする遺伝子を融合させ、細胞内に導入して、細胞内で、本開示のペプチドタグを融合した凝集性タンパク質を発現させることができる。凝集性タンパク質に対する抗体で凝集性タンパク質により形成される凝集体を観察して、当該凝集性タンパク質を発現する細胞に対する凝集体を有する細胞の割合（％）を算出することができる。この割合によりタンパク質の凝集傾向や非凝集傾向、安定性への本開示のペプチドタグの影響を評価することができる。

- [0143] 本開示によれば、本開示のペプチドタグを含む、組成物が提供され得る。本開示のペプチドタグは、目的タンパク質と反応溶液中で、例えばクリック反応により連結することができる。クリック反応は、フーズゲン反応であり得る。ペプチドタグおよび目的タンパク質は、一方がアルキンにより修飾され、他方がアジド化合物により修飾され、これにより1, 2, 3-トリアゾール環を形成し、これらの連結が達成される。
- [0144] 本開示によれば、本開示のペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質を含む組成物が提供される。目的タンパク質は、ある態様では、凝集性タンパク質であり得る。目的タンパク質は、ある態様では、抗体の抗原結合性断片であり得る。目的タンパク質は、ある態様では、s c F vであり得る。
- [0145] 本開示によれば、本開示のペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸を含むmRNA、および当該mRNAを含む組成物が提供される。本開示によれば、本開示のペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸を含むmRNAを含む小胞および当該小胞を含む組成物が提供される。
- [0146] 本開示によれば、制御配列に作動可能に連結された本開示のペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸を含むタンパク質発現ベクターおよび当該タンパク質発現ベクターを含む組成物が提供される。
- [0147] ある態様では、組成物は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤、および／または、添加剤をさらに有していてもよい。組成物は、ある態様では、医薬組成物であり得る。
- [0148] 本開示のすべての態様において、本開示のペプチドタグを連結した融合タンパク質は、非天然のタンパク質であり得る。
- [0149] 本開示のすべての態様において、ペプチドおよびタンパク質はそれぞれ、組換えペプチドおよびタンパク質であり得る。
- [0150] 本開示のすべての態様において、本開示のペプチドタグは、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列を有するs c F vについて、タンパク質の凝集傾向

を緩和、阻害もしくは改善する；非凝集性を増加、促進、もしくは改善する；または安定性を増強、促進、または向上させることができる。

[0151] ペプチド、タンパク質、および核酸は、単離、濃縮または精製されていることができる。単離とは、系の少なくとも1以上の他の成分をある成分から分離することを意味する。精製とは、系の少なくとも1以上の他の成分の濃度に対して、ある成分の相対的濃度を高めることをいう。濃縮とは、ある成分の濃度を高めることをいう。

[0152] 本開示のある側面では、

アミノ酸配列（または当該アミノ酸配列をコードする核酸）を取得（または選択もしくは同定）する方法であって、

（a）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

（b）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸である、アミノ酸配列を取得することを含む、方法が提供される。

[0153] 本開示のある側面では、

アミノ酸配列（または当該アミノ酸配列をコードする核酸）を取得（または選択もしくは同定）する方法であって、

上記（A）～（AE）および（AF）～（AU）のいずれかの条件または、これらの条件の組み合わせのいずれかを満たすアミノ酸配列を取得することを含む、方法が提供される。

[0154] 本開示のある側面では、上記取得する方法は、

選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドと参照タンパク質（参照タンパク質）との融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好ましくはヒト細胞内）において発現させたときに、細胞内において融合タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合（凝集率）を低下させる（所定の値以下とする）ペプチドタグのアミノ酸配列を選択または同定すること
をさらに含んでもよい。

- [0155] 本開示のある側面では、上記取得する方法は、
当該アミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチドをコードする核酸
を得ることをさらに含んでもよい。
- [0156] 上記取得する方法では、取得されるアミノ酸配列は、10～200アミノ
酸長（例えば、10～90アミノ酸長）であり得る。
- [0157] 本開示のある側面では、
10～200アミノ酸長（10～90アミノ酸長）のアミノ酸配列（また
は当該アミノ酸配列をコードする核酸）を取得（または選択もしくは同定）
する方法であって、
（a）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ
酸であり、
（b）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上が、F、P、Y、G、
S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸である、
アミノ酸配列を取得することと、
選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドと参照タンパク質（
参照タンパク質）との融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好ましくはヒト細
胞内）において発現させたときに、細胞内において融合タンパク質が凝集体
を形成する細胞の割合（凝集率）を低下させる（所定の値以下とする）ペプ
チドタグのアミノ酸配列を選択または同定することと、
当該アミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチドをコードする核酸
を得ることと、
を含む、
方法
が提供される。この方法では、低下の程度を大きくすること、または所定の
値を小さくすることにより、安定化作用を有するペプチドの中から、とりわ
け優れた安定化作用を示すペプチドを選択することができる。ある態様では
、本方法は、選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドと参照タ
ンパク質（参照タンパク質）との融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好まし

くはヒト細胞内)において発現させることをさらに含んでいてもよい。本方法では、選択または同定されたアミノ酸配列をコードする核酸を得ることをさらに含んでいてもよい。所定の値は、当該凝集性タンパク質を発現する細胞に対する凝集体を有する細胞の割合(%)に基づく数値であり得る。例えば、所定の値は、30%以下の値、20%以下の値、15%以下の値、10%以下の値、5%以下の値、3%以下の値、2%以下の値、もしくは1%以下の値、または0%とすることができる。所定の値はまた、0%~10%の範囲の値、10%~20%の範囲の値、20~30%の範囲の値とすることができる。より効果の高いペプチドを取得したい場合には、所定の値を小さくすると好ましい。この態様によれば、例えば、本開示の上記ペプチドタグ(例えば、上記(A)~(Z)、(AA)~(AE)、および(AF)~(AU)のいずれかのペプチドタグ)の中から、より強力な効果を示すペプチドタグを選択することができる。

[0158] 参照タンパク質は、例えば、細胞内において融合タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合が30%を超える、40%~50%以下、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、90%~95%、95%~99%、99%~99.9%、または99.9%以上であるタンパク質(凝集性タンパク質、例えば、scFv)とすることができる。参照タンパク質は、特別な機能性や抗原への結合性を有する必要がなく、単に凝集率の低減の評価の目的で用いられるものであるため、そのCDR配列は任意の配列であってよい。仮にCDRのアミノ酸配列によりscFvの凝集率が変動してもよい。変動した凝集率を有するscFvに対して、凝集率を所定の値以下にするペプチドタグのアミノ酸配列を探索することができる。ある好ましい態様では、参照タンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質であり得る。

[0159] ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記(B)に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記(D)に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は

[illegible]

定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＢ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＣ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＤ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＥ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＦ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＧ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＨ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＩ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＪ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＫ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＬ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＭ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＮ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＯ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＰ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＱ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＲ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＳ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＴ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（ＡＵ）に規定される条件をさらに満たす。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、上記（Ａ）～（Ｚ）、（ＡＡ）～（ＡＥ）、および（ＡＦ）～（ＡＵ）に記載のいずれか１以上の条件を満たす。

[0160] ある態様は、取得されるアミノ酸配列は、アミノ酸配列群から選択され得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（A）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（B）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（C）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（D）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（E）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（F）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（G）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（H）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（I）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（J）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（K）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（L）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（M）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（N）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（O）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（P）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（Q）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（R）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（S）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（T）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（U）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（V）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（W）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（X）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（Y）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（Z）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（A A）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＢ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＣ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＤ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＥ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＦ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＧ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＨ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＩ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＪ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＫ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＬ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＭ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＮ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＯ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＰ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＱ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＲ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＳ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＴ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

ある態様では、アミノ酸配列群は上記（ＡＵ）に規定されるアミノ酸配列の群であり得るか、当該群を含み得る。

[0161] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が５～１０％であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が低い。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が５～１０％であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が１％以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が５～１０％であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が２％以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が５～１０％であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が３％以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が５～１０％であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が４％以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が６～１０％であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が５％以上低い所定の値以下である。

ある。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が7～10%であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が6%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が8～10%であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が7%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が9～10%であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が8%以上低い所定の値以下である。

[0162] ある好ましい態様では、参照タンパク質の凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が、0.9以下、0.8以下、0.7以下、0.6以下、0.5以下、0.4以下、0.3以下、0.2以下、または0.1以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.9以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.8以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.7以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.6以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.5以下の所定の値

以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.4以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.3以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.2以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5～10%であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.1以下の所定の値以下である。

[0163] ある態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が低い。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.9以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.8以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.7以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.6以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、

当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.5以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.4以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.3以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.2以下の所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が5%未満であり、当該凝集率に対する融合タンパク質の凝集率の比が0.1以下の所定の値以下である。

[0164] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が10%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が20%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が20%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が30%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が30%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

る。

[0165] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が30%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が40%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が40%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が40%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が40%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が40%以上低い所定の値以下である。

[0166] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が50%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が50%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が50%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が50%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が40%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が50%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が50%以上低い所定の値以下である。

[0167] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が60%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が60%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が60%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が60%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が40%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が60%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が50%以上低い所定の値以下である。

[0168] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が60%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が60%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当

該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が40%以上低い所定の値以下である。

[0169] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が50%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が60%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が70%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が70%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

[0170] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が40%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が50%以上低い所定の値以下である。

る。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が60%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が70%以上低い所定の値以下である。

[0171] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が80%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が80%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が10%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が20%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が30%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が40%以上低い所定の値以下である。

[0172] ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が50%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が60%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が70%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が80%以上低い所定の値以下である。

ある好ましい態様では、前記参照タンパク質の凝集率が90%を超え、当該凝集率よりも融合タンパク質の凝集率が90%以上低い所定の値以下である。

[0173] 得られたペプチドタグをコードする核酸は、目的タンパク質をコードする核酸とインフレームで連結して、ペプチドタグと目的タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸を得ることができる。融合タンパク質をコードする核酸からは、融合タンパク質を発現させることができる。制御配列に作動可能に連結した融合タンパク質をコードする核酸を含むタンパク質発現ベクターを調製してもよい。

[0174] 本開示のある側面では、上記方法は、10～200アミノ酸（例えば、10～90アミノ酸）長のアミノ酸配列を有するペプチドタグがタグ化したタンパク質に対して所定の強さ以上の凝集性の改善効果を有するか否かを決定することに用いることができる。すなわち、本開示のある側面では、

10～90アミノ酸長のアミノ酸配列を有するペプチドタグがタグ化したタンパク質に対して所定の強さ以上の凝集性の改善効果を有するか否かを決定する方法であって、

(α) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、

(β) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸である、アミノ酸配列を取得することと、

選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドと参照タンパク質と

の融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好ましくはヒト細胞内）において発現させたときに、細胞内において融合タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合（凝集率）が低下する（または所定の値以下である）ペプチドタグのアミノ酸配列が、凝集性（例えば、所定の強さ以上の凝集性）の改善効果を有すると決定することを含む、

方法

が提供される。ある態様では、本方法は、選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドと参照タンパク質との融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好ましくはヒト細胞内）において発現させることをさらに含んでもよい。ある態様は、取得されるアミノ酸配列は、アミノ酸配列群から選択され得る。アミノ酸群の詳細は上述の通りである。ある態様では、取得されるアミノ酸配列は、更なる１以上の条件を満たす。当該条件は上述の通りである。ある態様では、参照タンパク質の凝集率と所定の値は上述の通りである。

[0175] ある態様では、上記の１０～２００アミノ酸（例えば、１０～９０アミノ酸）長のアミノ酸配列を選択または同定する方法では、１０～２００アミノ酸（例えば、１０～９０アミノ酸）長のアミノ酸配列群が、ヒトゲノムのコーディング領域によりコードされるアミノ酸配列の群であり得る。ある態様では、１０～９０アミノ酸長のアミノ酸配列群が、非ヒト生物のゲノムのコーディング領域によりコードされるアミノ酸配列の群であり得る。

[0176] ある態様では、１０～２００アミノ酸（例えば、１０～９０アミノ酸）長のアミノ酸配列が、ネオアンチゲンであり得る。ネオアンチゲンは、がん細胞の独自の遺伝子変異によって新しく生じた変異抗原として発見された。ネオアンチゲンは、非がん細胞においては発現しない。ネオアンチゲンを含むペプチドを投与することにより、ネオアンチゲンに対する免疫を誘導すると、がん特異的に免疫を誘導することができると期待されている。ネオアンチゲンは、がん細胞毎に異なり得る。ネオアンチゲンは、例えば、当該ネオアンチゲンを有する細胞の細胞内に発現させる目的タンパク質に対してタグ付けすることに用いることができ、元々発現しているペプチドであるので細胞

に対して悪影響がないか、少ししか悪影響を及ぼさないと考えられるため、利用可能である。ネオアンチゲンは、天然に生じる変異体であり得る。ネオアンチゲンは、例えば、その野生型の配列に対して、付加、挿入、欠失、および置換からなる群から選択される1以上の変異を有している。例えば、ヒトのネオアンチゲンは、典型的には、ヒトの野生型の配列に対して、付加、挿入、欠失、および置換からなる群から選択される1以上（例えば、1～10、例えば、1～数個、1～5、1～4、1～3、2、または1）の変異を有している。ヒトのネオアンチゲンは、例えば、ヒトの野生型配列と80%以上の同一性、85%以上の同一性、90%以上の同一性、または95%以上の同一性を有し得る。

[0177] ある態様好ましいでは、参照タンパク質は、s c F vである。ある態様では、s c F vは配列番号1のアミノ酸配列を有する。

[0178] 本発明の更なる側面では、ペプチドタグのアミノ酸配列を改変する方法であって、

融合タンパク質作製のペプチドタグ（本明細書に開示された何れかのペプチドタグであってもよい）を用意することと、

ペプチドタグの要素2、3または4の1以上（好ましくは複数）のアミノ酸（好ましくは、要素2、要素4、A、G、Y、およびFのいずれか）をPおよびNのいずれかに置換することにより、改変されたアミノ酸配列を得ることと、

を含む方法が提供される。本側面の方法は、

選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドと参照タンパク質との融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好ましくはヒト細胞内）において発現させたときに、細胞内において融合タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合（凝集率）が低下する（または所定の値以下である）ペプチドタグのアミノ酸配列が、凝集性（例えば、所定の強さ以上の凝集性）の改善効果を有すると決定することをさらに含んでもよい。このようにすることにより、とりわけ凝集低下作用の強い改変が可能となる。

実施例

[0179] 実施例 1

[方法]

・遺伝子発現ベクターの構築

ペプチドタグと凝集性タンパク質を含む融合タンパク質をコードする遺伝子断片の作製はユーロフィンジェノミクスまたはベクタービルダージャパンにより行われた。合成された遺伝子断片は、pEF-BOSベクター (Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Res. 1990 Sep 11; 18(17): 5322.) へクローニングされた。凝集性タンパク質としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質（具体的にはscFv）を用いた。この凝集性タンパク質は、細胞内に発現させると細胞質内で凝集する。用いられたタグ配列とその配列番号は以下表1の通りであった。

[0180]

[表1]

表1：実験で用いられたタグのリスト

タグ名	アミノ酸配列	配列番号
Tag-1-1	AHSSSAESESTSDSDSSSDSESESSSSDSEGS	2
Tag-1-2	AHSLSAELESTIDSDCSDWESELSSSDSEGS	3
Tag-1-3	AQSSSAESESGSDSDSSSDSESESSSSDSEGS	4
Tag-4-1	NEGYREAFDEDYEQQDEDFAEQDPDGNEAFEGEYDGPNQDEYPDEAQNFE	5
Tag-2-1	DEAGSSGAPADEAGSSGAPADEAGSSGAPADEAGSSGAPADEAGSSGAPAGS	6
Tag-2-2	DEVGISLAPTDEVGISLAPTDEVGISLAPTDEVGISLAPTDEVGISLAPTGS	7
Tag-2-3	DEVMISLWPTDEVMISLWPTDEVMISLWPTDEVMISLWPTDEVMISLWPTGS	8
Tag-3-1	DFAGSSGAPADFAGSSGAPADFAGSSGAPADFAGSSGAPADFAGSSGAPAGS	9
Tag-3-2	DTAVSSIAPLDTAVSSIAPLDTAVSSIAPLDTAVSSIAPLDTAVSSIAPLGS	10
Tag-3-3	DTWVSLIAILDWVSLIAILDWVSLIAILDWVSLIAILDWVSLIAILGS	11
Myc	EQKLISEEDL	12

[0181] 具体的なアミノ酸の含有比率は以下の通りである。

[0182]

[表2]

表2：各ペプチドのアミノ酸含有比率と当該タグ付加によるタンパク質の細胞内凝集形成に対する影響

タグ名	要素 1 (%)	要素 2 (%)	要素 3 (%)	要素 4 (%)	S (%)	G (%)	A (%)	凝集率 (%)
Myc (対照)	40.0	10.0	20.0	30.0	10.0	0	0	40.1
Tag-1-1	28.1	3.1	65.6	3.1	56.3	3.1	6.3	11.4
Tag-1-2	28.1	3.1	46.9	21.9	37.5	3.1	6.3	20.2
Tag-1-3	28.1	0.0	71.9	0.0	56.3	6.3	6.3	15.7
Tag-4-1	42.0	2.0	56.0	0.0	0.0	8.0	8.0	4.0
Tag-2-1	19.2	0.0	80.8	0.0	21.2	21.2	28.8	29.7
Tag-2-2	19.2	0.0	42.3	38.5	11.5	11.5	9.6	22.5
Tag-2-3	19.2	0.0	23.1	57.7	11.5	1.9	0.0	41.2
Tag-3-1	9.6	0.0	90.4	0.0	21.2	21.2	28.8	43.4
Tag-3-2	9.6	0.0	51.9	38.5	21.2	1.9	19.2	26.1
Tag-3-3	9.6	0.0	23.1	67.3	11.5	1.9	9.6	65.0

[0183] 表2において、

要素1は、DおよびEであり、

要素2は、H、KおよびRであり、

要素3は、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAであり、

要素4は、それ以外のアミノ酸である。

[0184] ペプチドタグは、抗体断片のN末端に融合させた。ペプチドタグと融合させた抗体断片には、検出のために、配列番号13のHAタグを抗体断片のC末端に連結させた。

[0185] ・細胞内抗体の細胞内凝集率の測定

(細胞培養)

ヒト子宮頸部類上皮がん由来のHeLa細胞を用意した。HeLa細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所、JCRB細胞バンクから購入し(JCRB9004)、10% FBSを含むDMEM(D-MEM 富士フィルム和光純薬 4548995066251)で培養した。

(トランスフェクション)

ポリ-L-リジン (Sigma-Aldrich P1399 Poly-L-lysine hydrobromide mol. Wt. 150000-300000) をコートした35 mm-ガラス底ディッシュ (IWAKI 3911-035, glass hole, 内径12 mm) にHeLa細胞 4×10^5 個を撒き、24時間後にLipofectamine 3000 (Invitrogen, L3000-008) で製造元の使用方法に基づいてHeLa細胞に前記抗体断片遺伝子を導入し、細胞内にタグ化抗体断片を発現させた。トランスフェクション24時間後に培養液を除き、細胞を4% PFAで固定した。固定20分後にPBS (-) で細胞を洗浄し、その後、免疫染色により、細胞内に発現した抗体 (以下、単に「細胞内抗体」という。) を観察し、その凝集率を測定した。

(免疫染色)

免疫染色は標準的な方法で行った。細胞を2分間、0.3% Triton X-100/PBS (-) で処理をし、ブロッキング溶液 (1% BSA, 0.1% Triton X-100/PBS (-)) で1時間、室温で保温した。ブロッキング溶液で希釈した抗HA抗体 (rabbit anti-HA antibody: Sigma-Aldrich H6908) で細胞を2時間、室温で保温し、細胞をブロッキング溶液で洗浄後に、ブロッキング溶液で希釈したAlexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen A11034) で細胞を2時間、室温で保温した。ブロッキング溶液で細胞を洗浄後、核染色プローブ (NucBlue Fixed cell stain Ready Probes, Invitrogen R37606) で15分、室温で保温し、PBS (-) で洗浄し、蛍光画像を取得するまで4℃で保管した。

(蛍光画像の取得)

蛍光画像はキーエンスBZ-X700またはBZ-X800を用いて40倍の対物レンズを用いて行った。1ディッシュあたり細胞200個以上を含

む画像を取得し、細胞内抗体が凝集している細胞（細胞内抗体凝集細胞）の数をカウントした。細胞内抗体を発現する全細胞数で細胞内抗体凝集細胞の数をノーマライズすることで、細胞内抗体の細胞内凝集率を定量化した。

[0186] [結果]

表1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを抗体の抗原結合性断片（具体的にはs c F v）に融合させて、得られた融合タンパク質をH e L a細胞の細胞質内において発現させた。各ペプチドタグのアミノ酸比率は、表2に示された。また、蛍光画像から求められた細胞内凝集率は、表2に示される通りであった。表2では、M y cタグを付与した分子が対照として用いられ、各ペプチドタグの効果は、M y cタグとの凝集率の差によって評価した。

[0187] 表2に示されるように、

- ・要素3の割合は、40～75%の範囲で、凝集率が低下する傾向が認められ；
- ・要素4の割合は、小さいほど凝集率が低下する傾向が認められ；
- ・アラニン（A）の割合が10%を超えると凝集率が増大する傾向が認められ；
- ・グリシン（G）の割合が10%を超えると凝集率が増大する傾向が認められ；
- ・要素1の割合が大きいほど細胞内凝集率は低下する傾向が認められた。

[0188] セリン（S）は、存在しなくてもよいが（T a g - 4 - 1参照）、大量に存在しても凝集率の低下に悪影響をもたらすことがなかった（T a g - 1 - 1～T a g - 1 - 3参照）。

[0189] いずれの場合にも、酸性アミノ酸含有率が45%未満であるペプチドタグは、細胞内タンパク質等への非特異的吸着（特に、ペプチドタグの負電荷による非特異的吸着）は認められなかった。目的タンパク質の自由な細胞内局在にタグ固有の制限を加えない観点で、本開示のペプチドタグの有用性が示唆された。

[0190] また、Mycタグ（対照）とTag-4-1を比較すると、要素4を減らし、要素3を増やすことは、ペプチドタグの凝集率の低下作用に強く寄与していることが理解できる。同様に、Tag-1-2とTag-1-1との比較からも、要素4を減らし、要素3を増やすことは、ペプチドタグの凝集率の低下作用に寄与していることが理解できる。

[0191] 特に、要素1の割合が20%以上45%未満であり、要素2は10%以下であり、要素3が40～75%であり、要素4の割合が10%以下であり、アラニンの割合が10%以下であり、かつ、グリシンの割合が10%以下である場合に、好ましく凝集率が低下した。

[0192] 凝集性タンパク質とタグ（Tag-4-1）との融合タンパク質を発現するHeLa細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。陰性対照として、Tag-4-1タグ無しの凝集性タンパク質を発現するHeLa細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。結果は、図1に示される通りであった。図1に示されるように、Tag-4-1でタグ化する（Tag-4-1と融合する）と凝集性タンパク質は細胞質内に均一に分布するのに対して、Tag-4-1タグ無しの凝集性タンパク質は、ほとんどの細胞の細胞質内に凝集体を形成した。

[0193] 実施例2：タグへのアミノ酸の付加実験

タグ中のアミノ酸含有率とタグ付与したタンパク質の凝集率についてさらに分析を進めた。Tag-4-1またはTag-11-1に対してセリン（S）をランダムに挿入または付加し、得られた改変タグのタンパク質凝集率に対する効果を調べた。タグが異なる以外は、上記実施例に記載される通りに実験を行った。結果は表3に記載される通りであった。表3では、付加または挿入されたアミノ酸に下線を付与した。

[0194]

[表3]

表3：改変タグの配列、S含有率、D/E含有率、および凝集率

Tag	sequence	凝集率	S (%)	D,E(%)
Tag4-1 (配列番号59)	NEGYREAFDEYEQQDEDFAEQDPDGNEA FEGEYDGNPQDEYPDEAQNFE	4.57	0	42
Tag4-1-S10 (配列番号60)	NEGSYREAFDSEDYEQSQDSEDFSAEQDPD GNSEAFEGSEYSDGPN\$QDEYPDEAQNFE	5.06	16.7	35
Tag4-1-S20 (配列番号61)	NEGSYRESAFDSEDYEQSQDSEDFSAEQDS SPDGN\$SEAFEGSSEYSDGPN\$QDEYPDEA SSQNFSSSE	6.76	28.6	30
Tag11-1 (配列番号62)	YDNPYFEPQYGFPPPEEDEDE	14.48	0	15
Tag11-1-S10 (配列番号63)	SYD\$NP\$YF\$EP\$QYGF\$PP\$E\$ED\$E	11.29	33.3	10
Tag11-1-S20 (配列番号64)	\$SYSD\$NP\$YF\$EP\$SSQ\$SYG\$SF\$PP\$E\$ED\$S ESD\$SSE	18.77	50	7.5

[0195] 表3に示される結果、タグ中におけるSの増加は、タグ付加されたペプチドの凝集率に大きな影響を与えなかった。タグ中の酸性アミノ酸の増加は、タグ付加されたペプチドの凝集率の低下に大きな影響を与えることが知られているが（US2020/0157210A）、これに対して、本実施例によると酸性アミノ酸の割合の低下によっても、凝集率が大きく低下しなかった。

[0196] 同様に、セリン以外のアミノ酸含有率を変更して、タグ付加されたペプチドの凝集率に対する影響を確認した。表4～8では、付加または挿入されたアミノ酸に下線を付与した。

[0197]

[表4]

表4：改変タグの配列、Q含有率、D/E含有率、および凝集率

Tag	sequence	凝集率	Q (%)	D,E(%)
Tag 4-1	NEGYREAFDEYEQQDEDFAEQDPDGNEAF EGEYDGNPNQDEYPDEAQNFE	4.88	10	42
Tag4-1-Q10 (配列番号65)	NEGQYREAFDQEDYEQQQDQEDFQAEQDP DGNQEAFFEGQYDGNPNQDEYQPDQAQNF QE	8.31	25	35
Tag4-1-Q20 (配列番号66)	NEGQYREAFDQEDYEQQQDQEDFQAEQ DQQPDGNQQEAFEGQQEYQDGNPNQDEY PDEAQQQNFQQQE	8.40	35.7	30
Tag 11-1	YDNPYFEPQYGFPPPEEDEDE	16.59	5	15
Tag11-1-Q10 (配列番号67)	QYDQNPQYFQEPQQYGFPPQEQEDQEDQ E	26.70	36.7	10
Tag11-1-Q20 (配列番号68)	QQYQDQNPQYFQEPQQQYGFPPQEQE QEDQQEQDQQQE	17.27	52.5	7.5

[0198] [表5]

表5：改変タグの配列、N含有率、D/E含有率、および凝集率

Tag	sequence	凝集率	N (%)	D,E(%)
Tag 4-1	NEGYREAFDEYEQQDEDFAEQDPDGNEAF EGEYDGNPNQDEYPDEAQNFE	4.88	8.00	42
Tag4-1-N10 (配列番号69)	NEGNYREAFDNEDEYEQQDNEDFNAEQDP DGNNEAFEGNEYNDGNPNQDEYPDEAQNFE	6.12	23.33	35
Tag4-1-N20 (配列番号70)	NEGNYRENAFDNEDEYEQQDNEDFNAEQ DNNPDGNNNEAFEGNNEYNDGNPNQDEYP DEANNQNFNNNE	6.86	34.29	30
Tag 11-1	YDNPYFEPQYGFPPPEEDEDE	16.59	5.00	15
Tag11-1-N10 (配列番号71)	NYDNNPNYFNENPNQYGFPPNENEDNEDNE	18.56	36.67	10
Tag11-1-N20 (配列番号72)	NNYNDNNPNYFNENPNQNNYGNFPPNEN EDNNENDNNNE	17.68	52.50	7.5

[0199]

[表6]

表 6 : 改変タグの配列、P 含有率、D/E 含有率、および凝集率

Tag	sequence	凝集率	P (%)	D,E(%)
Tag 4-1	NEGYREAFDEDEYEQQDEDFAEQDPDGNEAF EGEYDGNQDEYPDEAQNFE	4.49	6.00	42
Tag4-1-P10 (配列番号73)	NEGPYREAFDEDEYEQQDEDFAEQDPDG NPEAFEGPEYEDGNPEQDEYPDEAQNFE	8.84	21.67	35
Tag4-1-P20 (配列番号74)	NEGPYREAFDEDEYEQQDEDFAEQDP PPDGNPEAFEGPEYEDGNPEQDEYPDEAP EQNFPPPE	6.44	32.86	30
Tag 11-1	YDNPYFEPQYGFPPPEDEDE	17.75	20.00	15
Tag11-1-P10 (配列番号75)	PYDNPPEYFPEPEQYGFPPPEDEDEPE	15.57	46.67	10
Tag11-1-P20 (配列番号76)	PPYPDPNPPEYFPEPEQYGFPPPEDEDE PEPDPPPE	18.12	60.00	7.5

[0200] [表7]

表 7 : 改変タグの配列、F 含有率、D/E 含有率、および凝集率

Tag	sequence	凝集率	F (%)	D,E(%)
Tag 4-1	NEGYREAFDEDEYEQQDEDFAEQDPDGNEAF EGEYDGNQDEYPDEAQNFE	4.90	8.00	42
Tag4-1-F10 (配列番号77)	NEGEYREAFDEDEYEQQDEDFAEQDPDG NEEAFEGPEYEDGNPEQDEYPDEAQNFE	35.13	34.29	35
Tag4-1-F20 (配列番号78)	NEGEYREAFDEDEYEQQDEDFAEQDEE PDGNFEFAFEGPEYEDGNPEQDEYPDEAEE QNFEFE	38.76	23.33	30
Tag 11-1	YDNPYFEPQYGFPPPEDEDE	16.59	10.00	15
Tag11-1-F10 (配列番号79)	EYDENPEYFPEPEQYGFPPPEDEDEE	43.58	55.00	10
Tag11-1-F20 (配列番号80)	FEYEDENPEYFPEPEQYGFPPPEDEDEE EDEFEE	27.43	40.00	7.5

[0201]

[表8]

表8：改変タグの配列、Y含有率、D/E含有率、および凝集率

Tag	sequence	凝集率	Y (%)	D,E(%)
Tag 4-1	NEGYREAFDEYEQQDEDFAEQDPDGNEAF EGEYDGNQDEYPDEAQNFE	4.94	8.00	42
Tag4-1-Y10 (配列番号81)	NEGYREAFDYEDYEQYQDYEDFYAEQDPDG NYEAFEGYDYDGNQDEYPDEAQNFE	29.59	23.33	35
Tag4-1-Y20 (配列番号82)	NEGYREYAFDYEDYEQYQDYEDFYAEQDY PDGNYEAFEGYDYDGNQDEYPDEAY QNFYDY	37.93	34.29	30
Tag 11-1	YDNPYFEPQYGFPEEDEDE	17.75	15.00	15
Tag11-1-Y10 (配列番号83)	YDYDNPYFEPYQYGFPPYEDYEDYE	17.28	43.33	10
Tag11-1-Y20 (配列番号84)	YDYDNPYFEPYQYGYGFPPYEDY EDYDY	30.53	57.50	7.5

[0202] 上記の通り、特定アミノ酸10個または20個のランダムな付加または挿入により得られたタグのタンパク質凝集率への影響を確認すると、FおよびYの付加または挿入は、タグ付与したタンパク質の凝集率を悪化させる傾向を示した。また、その他のアミノ酸の付加または挿入は、DおよびE含有率の減少に関わらず、タグ付与したタンパク質の凝集率への悪影響は限定的であった。

[0203] 実施例3：タグ中アミノ酸の置換によるアミノ酸含有率変動のタンパク質の凝集率への効果

N、P、S、Q、F、およびYをそれぞれ、他のアミノ酸に置換することにより、これらのアミノ酸の中でタンパク質凝集率に効果を奏するアミノ酸を特定することを試みた。表9および10では、置換されたアミノ酸に下線を付与した。

[0204]

[表9]

表 9 : 改変タグの配列、N含有率、D/E含有率、および凝集率

N-terminus	scFv	C-terminus	細胞	sequence	凝集率	N (%)	D, E (%)
Tag 9-1	Y13-259	HA	HeLa	GNNQDSSDSNFEADEASDDNDNDGN (配列番号85)	8.14	20.00	44.00
Tag 4-8	Y13-259	HA	HeLa	NEGNREASDEDSEQQDEDAEQDPDGNEANE GESDGPNQDENPDEAQNSE(配列番号86)	3.67	16.00	42.00
Tag 4-9	Y13-259	HA	HeLa	NEGNREANDEDNEQQDEDAEQDPDGNEANE GENDGPNQDENPDEAQNNE(配列番号87)	4.10	24.00	42.00
Tag 4-10	Y13-259	HA	HeLa	NEGNREANDEDNEQQDEDAEQDPDGNEANE GENDGPNQDENPDEAQNNE(配列番号88)	5.51	32.00	42.00
Tag 4-11	Y13-259	HA	HeLa	NEGNREANDEDNEQQDEDAEQDQDQNEANE GENDGPNQDENPDEAQNNE(配列番号89)	4.44	32.00	42.00
Tag 18-1	Y13-259	HA	HeLa	DNNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN (配列番号90)	4.82	43.75	37.50
Tag 4-8	6E	Tag 4-8, CMA, HA	SHSY5Y	NEGNREASDEDSEQQDEDAEQDPDGNEANE GESDGPNQDENPDEAQNSE	0.96	16.00	42.00
Tag 18-1	6E	Tag 18-1, CMA, HA	SHSY5Y	DNNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN	1.14	43.75	37.50

[0205] [表10]

表 10 : 改変タグの配列、P含有率、N含有率、および凝集率

		凝集率	N (%)	P (%)
Tag 18-1	DNNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN	4.76	43.75	6.25
Tag 18-1-NS7(配列番号91)	DNSESADDNSENPEDNSKNTDDSEENPSNSES	6.37	21.88	6.25
Tag 18-1-NS14(配列番号92)	DSSESADDSSSEPEDSSKSTDDSEESPSSSES	5.72	0.00	6.25
Tag 18-NQ7(配列番号93)	DNQESADDNQENPEDNQKNTDDQEENPQNQE	6.60	21.88	6.25
Tag 18-NQ14(配列番号94)	DQQESADDQEQEPEDQKQTDDQEEQPQQEQ	6.03	0.00	6.25
Tag 18-1-NF7(配列番号95)	DNFESADDNFENPEDNFKNTDDFEENPFNFEF	13.50	21.88	6.25
Tag 18-1-NF14(配列番号96)	DFFESADDFFEPEDFFKFTDDFEFFPFFFEF	13.60	0.00	6.25
Tag 18-1-NP7(配列番号97)	DNPEASDDNPENPEDNPKNTDDPEENPPNPEP	4.48	21.88	28.13
Tag 18-1-NP14(配列番号98)	DPPEASDDPEPPEDPPKPTDDPEPPPPPEP	3.18	0.00	50.00
Tag 18-1-NY7(配列番号99)	DNYESADDNYENPEDNYKNTDDYEENPYNYEY	11.60	21.88	6.25
Tag 18-1-NY14(配列番号100)	DYYESADDYYEYPEDYYKYTDDYEYPYYEY	15.70	0.00	6.25
Tag 11-1	YDNPYFEPQYGFPEEDEDE	17.75	5.00	20.00
Tag 11-1-FYPN(配列番号101)	NDNNNNENQNGNNNEEDEDE	12.46	50.00	0.00
Tag 11-1-FYN(配列番号102)	NDNPNNEPQNGNPPEEDEDE	5.79	30.00	20.00
45Tag1(配列番号1041)	NDEYSDFDSDFDGDYKDSDEYKDDSENFDDGFE	13.91	3.71	0
45Tag1-m1(配列番号1042)	PDEPPDPEDPDPPDPKDPDEDPKDDPEPPDPPE	5.70	0	42.86

[0206] 表 9 および 10 から、タグ中に P または N の含有率が高い場合に、タグを付与されたタンパク質の凝集率の低下作用はもっとも大きく、次いで、S および Q の含有率、さらに、F および Y の含有率の順に凝集率の低下作用を奏した。酸性アミノ酸含有率が約 51% である 45 Tag 1 に関して要素 3 を

全てPに置き換えて作製した45Tag1-m1ペプチドタグはPへのアミノ酸置換によりその凝集抑制作用を大きく向上させた。このように、PおよびNの追加による凝集率の低下作用の増大は酸性アミノ酸含有率にはよらないことが明らかとなった。また、この結果からは、その構成アミノ酸のほとんどが酸性アミノ酸とNまたはPとすることも可能であることも示された。

[0207] 実施例4：配列のシャッフル

Tag4-8のアミノ酸配列をランダムにシャッフルした2つのタグ：Tag4-8(Scr1)およびTag4-8(Scr2)を合成して、上記と同様にscFvに対する凝集率の低下作用を試験した。結果は、表11に示される通りであった。

[0208] [表11]

表11：配列のシャッフリング

	配列	凝集率
Tag4-8	NEGNREASDEDSEQQDEDNAEQDPD GNEANEGESDGPNQDENPDEAQNSE	3.93
Tag4-8(Scr1) (配列番号103)	ENESEDNDEEPPNQNADDGDPNANP AAEQGGDSSDDEEGQENDQSRENEQ	3.25
Tag4-8(Scr2) (配列番号104)	QNEENGGDDQDQEEGSEEQQGESDRS NEESDNEPAADDNAPEGAEEPDDNN	4.52

[0209] 表11に示されるように、Tag4-8、Tag4-8(Scr1)およびTag4-8(Scr2)は、同等の凝集率の低下作用を奏した。各アミノ酸の含有比率や長さを変えずにアミノ酸の並び順のみを変えても凝集率低下作用に影響は認められなかった。

[0210] 実施例5：ヒト由来ペプチドのタグ利用

ヒトプロテオームデータベース(Proteome ID: UP000005640)から特定のアミノ酸含有比率を有するペプチドを全抽出し、ランダムでペプチドを選択してタグとして用い、タグ付与されたタンパク質に対する凝集率の低下作用を検討した。

[0211] 抽出条件1：

長さ 20～70 アミノ酸

グループ [D, E] 含有率 [30] 以上

グループ [D, E] 含有率 [45] 未満

グループ [H, K, R] 含有率 [5] 以下

グループ [C, T, V, L, I, W, M] 含有率 [5] 以下

グループ [G] 含有率 [10] 未満

グループ [A] 含有率 [10] 未満

グループ [F, Y] 含有率 [5] 以下

グループ [N] 含有率 [15] 以上

※ 上記抽出条件において、含有率の単位は%である。アミノ酸は一文字表記により表されている。

[0212]

[表12]

表 1 2 : 抽出条件 1 により抽出したタグを付加した s c F v の凝集率

タグ名称	配列	凝集率%	DE比率	N比率	HKR比率	CTVLWM比率	G比率	A比率	FY比率
Tag 18-1(465-1)	DNNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN	4.68	37.50	43.75	3.13	3.13	0	3.13	0
Tag 465-2	GNNQDSSDSDNEADEASDDDEDNDGN	5.04	44.00	20	0	0	8	8	0
Tag 465-3	SHGNNQDSSDSDNEADEASDDDEDNDGNEGDNE	3.98	43.75	18.75	3.13	0	9.38	6.25	0
Tag 465-4	ESADDNNENPEDNNKNTDDNE	9.99	42.86	33.33	4.76	4.76	0	4.76	0
Tag 465-5	NNENPEDNNKNTDDNEENPNNN	13.94	33.33	47.62	4.76	4.76	0	0	0
Tag 465-6	TDNNESADDNNENPEDNNKKN	8.95	35.00	40	5	5	0	5	0
Tag 465-7	DNNESADDNNENPEDNNKNT	7.77	35.00	40	5	5	0	5	0
Tag 465-8	NNESADDNNENPEDNNKNTD	7.39	35.00	40	5	5	0	5	0
Tag 465-9	FWGSHGNNQDSSDSDNEADEASDDDEDNDGNE	7.36	38.71	16.13	3.23	3.23	9.68	6.45	3.23
Tag 1121-1	KPNNSAPNEDQEEIQQSE	14.73	30	20	5	5	0	5	0
Tag 1121-2	NNSNAPNEDQEEIQQSEQH	13.76	30	20	5	5	0	5	0
Tag 1121-3	SEGEQQLKPNNSNAPNEDQEEE	14.15	31.82	18.18	4.55	4.55	4.55	4.55	0
Tag 2408-1	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSDQ	7.56	33.33	16.67	4.17	4.17	4.17	0	4.17
Tag 2408-2	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSDQ	7.53	32.00	16	4	4	8	0	4
Tag 2408-3	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSDQGS	9.42	30.77	15.38	3.85	3.85	7.69	0	3.85
Tag 6301-1	EEKNENDENSLSSSSDSSD	12.66	40.00	15	5	5	0	0	0
Tag 6301-2	NENDENSLSSSSDSSDSEKDE	8.85	40.00	15	5	5	0	0	0
Tag 6626-1	KETNNNAQNPSEEEGEGQDE	12.50	33.33	19.05	4.76	4.76	9.52	4.76	0
Tag 6626-2	ETNNNAQNPSEEEGEGQDED	8.04	38.10	19.05	0	4.76	9.52	4.76	0
Tag 6626-3	KETNNNAQNPSEEEGEGQDED	13.56	36.36	18.18	4.55	4.55	9.09	4.55	0
Tag 6915-1	ENANDSSDQGEETDESFP	9.52	40.00	15	0	5	5	5	5
Tag 7128-1	DDNESNSESANGWDSGNSFSEE	12.10	34.78	17.39	0	4.35	8.7	4.35	4.35
Tag 7128-2	SDDNESNSESANGWDSGNSFSEE	8.21	33.33	16.67	0	4.17	8.33	4.17	4.17
Tag 7128-3	SSDDNESNSESANGWDSGNSFSEE	8.06	32.00	16	0	4	8	4	4
Tag 7315-1	EENASSGDSEENTNSDHES	10.74	40.00	15	5	5	5	5	0
Tag 7315-2	SEENASSGDSEENTNSDHES	11.72	35.00	15	5	5	5	5	0
Tag 7315-3	ENASSGDSEENTNSDHESQ	10.07	35.00	15	5	5	5	5	0
Tag 8482-1	DDENSENNWRNEYPEEESDGD	8.17	42.86	19.05	4.76	4.76	4.76	0	4.76
Tag 8482-2	ENSENNWRNEYPEEESDGDGE	7.11	42.86	19.05	4.76	4.76	4.76	0	4.76
Tag 8482-3	NSENNWRNEYPEEESDGDGEDS	5.08	40.91	18.18	4.55	4.55	4.55	0	4.55
Tag 8974-1	EQQNEASEENNDDQSQEVPE	7.84	35.00	15	0	5	0	5	0
Tag 8974-2	QQNEASEENNDDQSQEVPEK	6.39	30.00	15	5	5	0	5	0
Tag 9333-1	MQEDEFDQGNQEGEDNSNAE	15.37	40.00	15	0	5	5	5	5
Tag 9333-2	SKMQEDEFDQGNQEGEDNSN	9.82	35.00	15	5	5	5	0	5
Tag 9333-3	QEDEFDQGNQEGEDNSNAEMEENASN	7.13	40.74	18.52	0	3.7	3.7	7.41	3.7
Tag 10381-1	PSNENSQSSEDVSGGNDNSEN	5.59	33.33	19.05	0	4.76	9.52	0	0
Tag 11717-1	EVEESNPSAKEDSNPNSSGE	10.48	30.00	15	5	5	5	5	0
Tag 11717-2	VEESNPSAKEDSNPNSSGED	12.10	30.00	15	5	5	5	5	0
Tag 12237-1	KEENSEPLNENSDESYSSE	9.98	40.00	15	5	5	0	0	5
Tag 12809-1	QPGPNHEEDADSYENMDNPD	28.15	35.00	15	5	5	5	5	5
Tag 12809-2	PNHEEDADSYENMDNPDGPD	20.94	40.00	15	5	5	5	5	5
Tag 12809-3	NHEEDADSYENMDNPDGPD	23.41	40.00	15	5	5	5	5	5
Tag 12885-1	DDPNSSDESNGNDDANSES	14.62	40.00	20	0	0	5	5	0
Tag 12885-2	NSSDESNGNDDANSESNNNS	17.00	30.00	30	0	0	5	5	0
Tag 12885-3	DESNGNDDANSESDNNSSRGD	13.93	31.82	22.73	4.55	0	9.09	4.55	0
Tag 12968-1	DNNENAGEDGDNDFSPSDEEL	13.42	42.86	19.05	0	4.76	9.52	4.76	4.76
Tag 12968-2	AELEEDNNENAGEDGDNDFSPS	10.18	43.48	17.39	0	4.35	8.7	8.7	4.35
Tag 12968-3	DNNENAGEDGDNDFSPSDEELAN	14.63	39.13	21.74	0	4.35	8.7	8.7	4.35
Tag 13648-1	NPADDPNNGQGEFEAEQVREEN	15.03	41.67	16.67	4.17	4.17	4.17	8.33	4.17
Tag 14056-1	NEENTEPGAESSENADDPNKD	13.22	38.10	19.05	4.76	4.76	4.76	9.52	0
Tag 14056-2	SSENADDPNKDTSENADGQSDEN	11.45	34.78	17.39	4.35	4.35	4.35	8.7	0
Tag 14056-3	ESSENADDPNKDTSENADGQSDEN	10.38	37.50	16.67	4.17	4.17	4.17	8.33	0
Tag 14681-1	DRDPEMENEQPSSENDSON	5.63	40.00	15	5	5	0	0	0
Tag 14681-2	PEMENEQPSSENDSONQSG	11.50	30.00	15	0	5	5	0	0
Tag 14681-3	ENEEQPSSENDSONQSGEQI	17.15	30.00	15	0	5	5	0	0
Tag 14844-1	DSEANVSDKEAGSNENDQDN	12.13	33.33	19.05	4.76	4.76	4.76	9.52	0
Tag 15481-1	NYNDGSGEDRDWQDDQSDNQ	9.92	35.00	15	5	5	5	0	5
Tag 16043-1	RENTNEASSEGNSDDSEDE	13.45	40.00	15	5	5	5	5	0
Tag 16043-2	ENTNEASSEGNSDDSEDER	11.56	40.00	15	5	5	5	5	0
Tag 16400-1	QENDNGNETESEQPKESNENQ	15.9	33.33	23.81	4.76	4.76	4.76	0	0
Tag 16400-2	ENDNGNETESEQPKESNENGE	18.1	38.1	23.81	4.76	4.76	4.76	0	0
Tag 16400-3	QENDNGNETESEQPKESNENGE	8.84	36.36	22.73	4.55	4.55	4.55	0	0
Tag 16417-1	QNEENPGDEEAKNQVNSDSDSEE	12.18	40.00	16	4	4	4	4	0
Tag 16417-2	NEENPGDEEAKNQVNSDSDSEES	11.00	40.00	16	4	4	4	4	0
Tag 16417-3	QNEENPGDEEAKNQVNSDSDSEES	12.37	38.46	15.38	3.85	3.85	3.85	3.85	0
Tag 18137-1	YNGGNANPRPANNEEEDEE	7.47	40.91	22.73	4.55	0	9.09	9.09	4.55
Tag 18137-2	NGGNANPRPANNEEEDEEY	8.17	40.91	22.73	4.55	0	9.09	9.09	4.55
Tag 18137-3	NGGNANPRPANNEEEDEEYD	9.86	43.48	21.74	4.35	0	8.7	8.7	4.35
Tag 18347-1	GASENEEEEDDYKNKLPNS	16.06	40.00	15	5	5	5	5	5
Tag 18478-1	LQNQKEAEEPGDSENSQEN	16.82	30.00	15	5	5	5	5	0
Tag 18478-2	QNQKEAEEPGDSENSQENP	14.77	30.00	15	5	0	5	5	0
Tag 18478-3	NQKEAEEPGDSENSQENPP	12.74	30.00	15	5	0	5	5	0
Tag 20166-1	KESVSPENNEEGNDNQDNEN	16.95	33.33	28.57	4.76	4.76	9.52	0	0
Tag 20166-2	ESVSPENNEEGNDNQDNENP	13.67	33.33	28.57	0	4.76	9.52	0	0
Tag 20166-3	KESVSPENNEEGNDNQDNENP	26.56	31.82	27.27	4.55	4.55	9.09	0	0
Tag 41693-1	ASPQPREPSDDSENSDNSEC	7.83	30.00	15	5	5	0	5	0
Tag 55443-1	NNSQDEDGFQELNENGNAKDE	19.76	33.33	23.81	4.76	4.76	9.52	4.76	4.76
Tag 55443-2	NSQDEDGFQELNENGNAKDN	22.25	33.33	23.81	4.76	4.76	9.52	4.76	4.76
Tag 55443-3	NNSQDEDGFQELNENGNAKDN	18.69	31.82	27.27	4.55	4.55	9.09	4.55	4.55

[0213] 表 1 2 では、抽出されたタグのアミノ酸配列の N 含有比率は 1 5 % 以上で

あり、その他のアミノ酸含有比率は、抽出条件 1 に記載された通りである。凝集抑制作用が具体的なアミノ酸配列に依存しないことを確かめるために、抽出条件 1 により抽出されたタグからランダムにタグを選択した。いくつかのタグに関しては、同一タンパク質の別の箇所から同抽出条件を満たすアミノ酸配列を追加的に選択した。選択されたアミノ酸配列を有するタグを付加した s c F v の凝集率を試験したところ、表 1 2 に示される通りの結果を得た。表 1 2 に示されるように、タグを付与した s c F v の凝集率は全体的に低かった。したがって、ペプチドタグの凝集抑制作用は、そのアミノ酸含有比率に大きく依存し、具体的なアミノ酸配列そのものには弱くしか依存しないことが明らかである。

[0214] なお、抽出条件 1 で抽出できるヒト由来アミノ酸配列は以下の通りであった。

[表12-2]

表 12-2 : 抽出条件 1 で抽出できるヒト由来アミノ酸配列の例

配列番号	配列		
105	TDNNEASADDNNENPEDNNKN (Tag465-6)	156	DDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
106	DNNEASADDNNENPEDNNKNT (Tag465-7)	157	DNNEENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
107	NNESADDNNENPEDNNKNTD (Tag465-8)	158	NNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
108	NESADDNNENPEDNNKNTDD	159	SHGNNQDSSSDNEADEASDDEDN
109	ESADDNNENPEDNNKNTDDN	160	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEE
110	SADDNNENPEDNNKNTDDNE	161	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEEN
111	DNNEENPEDNNKNTDDNEENP	162	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEENP
112	NNENPEDNNKNTDDNEENPN	163	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPN
113	NENPEDNNKNTDDNEENPNN	164	SADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN
114	ENPEDNNKNTDDNEENPNNN	165	ADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
115	NPEDNNKNTDDNEENPNNNE	166	DDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
116	PEDNNKNTDDNEENPNNNEN	167	DDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
117	DNNEASADDNNENPEDNNKNTD	168	GSHGNNQDSSSDNEADEASDDEDN
118	NNESADDNNENPEDNNKNTDD	169	SHGNNQDSSSDNEADEASDDEDND
119	NESADDNNENPEDNNKNTDDN	170	HGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDG
120	ESADDNNENPEDNNKNTDDNE (Tag 465-4)	171	GNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGN (Tag 465-2)
121	SADDNNENPEDNNKNTDDNEE	172	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEEN
122	ADDNNENPEDNNKNTDDNEEN	173	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENP
123	DDNNENPEDNNKNTDDNEENP	174	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPN
124	DNNEENPEDNNKNTDDNEENPN	175	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN
125	NNENPEDNNKNTDDNEENPNN (Tag 465-5)	176	SADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
126	NENPEDNNKNTDDNEENPNNN	177	ADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
127	ENPEDNNKNTDDNEENPNNNE	178	DDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
128	NPEDNNKNTDDNEENPNNNEN	179	WGSHGNNQDSSSDNEADEASDDEDN
129	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDD	180	GSHGNNQDSSSDNEADEASDDEDND
130	NNESADDNNENPEDNNKNTDDN	181	SHGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDG
131	NESADDNNENPEDNNKNTDDNE	182	HGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGN
132	SADDNNENPEDNNKNTDDNEEN	183	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEENP
133	ADDNNENPEDNNKNTDDNEENP	184	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPN
134	DDNNENPEDNNKNTDDNEENPN	185	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN
135	DNNEENPEDNNKNTDDNEENPNN	186	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
136	NNENPEDNNKNTDDNEENPNNN	187	SADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
137	NENPEDNNKNTDDNEENPNNNE	188	ADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
138	ENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN	189	SHGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGN
139	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDN	190	HGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGNE
140	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNE	191	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEENPN
141	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEE	192	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN
142	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEEN	193	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
143	SADDNNENPEDNNKNTDDNEENP	194	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
144	ADDNNENPEDNNKNTDDNEENPN	195	SADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
145	DDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN	196	SHGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGNE
146	DNNEENPEDNNKNTDDNEENPNNN	197	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN
147	NNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE	198	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
148	NENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN	199	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
149	HGNNQDSSSDNEADEASDDEDN	200	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
150	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNE	201	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNN
151	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEE	202	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
152	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEEN	203	NESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
153	ESADDNNENPEDNNKNTDDNEENP	204	DNNEASADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNE
154	SADDNNENPEDNNKNTDDNEENPN	205	NNESADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNNNEN
155	ADDNNENPEDNNKNTDDNEENPNN	206	FWGSHGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGNE (Tag465-9)
		207	SHGNNQDSSSDNEADEASDDEDNDGNEGDN

208	DNNESADDNNEPNEDNNKNTDDNEENPNNNEN (18-1)	260	ENSENNWRNEYPEEESSDGEDS
209	SHGNNQDSSSDNEADEASDDENDGNEGNE (Tag 465-3)	261	EQNEASEENNDDQSQEVPE (Tag8974-1)
210	LEDNNEPRDPQSPDPDPNE (Tag656-1)	262	QONEASEENNDDQSQEVPEK (Tag8974-2)
211	EDNNEPRDPQSPDPDPNEF (Tag656-2)	263	SKMQEDEFDQGNQEQEDNSN (Tag9333-2)
212	DNNEPRDPQSPDPDPNEFG (Tag656-3)	264	KMQEDEFDQGNQEQEDNSNA
213	EGEQQLKPNNSNAPNEDQEE	265	MQEDEFDQGNQEQEDNSNAE (Tag 9333-1)
214	GEQQLKPNNSNAPNEDQEEE	266	QEDEFDQGNQEQEDNSNAEM
215	KPNNSNAPNEDQEEETQQSE (Tag1121-1)	267	FDQGNQEQEDNSNAEMEEEN
216	PNNSNAPNEDQEEETQQSEQ	268	EFDQGNQEQEDNSNAEMEEEN
217	NNSNAPNEDQEEETQQSEQH (Tag1121-2)	269	FDQGNQEQEDNSNAEMEEENA
218	EGEQQLKPNNSNAPNEDQEE	270	DQGNQEQEDNSNAEMEEENAS
219	SEGEQQLKPNNSNAPNEDQEE (Tag1121-3)	271	QGNQEQEDNSNAEMEEENASN
220	EQLNFSDDDEQGSNSPKENN	272	EFDQGNQEQEDNSNAEMEEENA
221	LNFSDDDEQGSNSPKENNSE	273	FDQGNQEQEDNSNAEMEEENAS
222	NFSDDDEQGSNSPKENNSED	274	DQGNQEQEDNSNAEMEEENASN
223	FSDDEQGSNSPKENNSEDQ	275	DEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENA
224	LNFSDDDEQGSNSPKENNSED	276	EFDQGNQEQEDNSNAEMEEENAS
225	NFSDDDEQGSNSPKENNSEDQ	277	FDQGNQEQEDNSNAEMEEENASN
226	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSE	278	DEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENAS
227	QLNFSDDDEQGSNSPKENNSED	279	EFDQGNQEQEDNSNAEMEEENASN
228	LNFSDDDEQGSNSPKENNSEDQ	280	QEDEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENA
229	NFSDDDEQGSNSPKENNSEDQG	281	EDEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENAS
230	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSED	282	DEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENASN
231	QLNFSDDDEQGSNSPKENNSEDQ	283	QEDEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENAS
232	LNFSDDDEQGSNSPKENNSEDQG	284	EDEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENASN
233	NFSDDDEQGSNSPKENNSEDQGS	285	QEDEFDQGNQEQEDNSNAEMEEENASN (Tag9333-3)
234	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSEDQ (Tag2408-1)	286	PSENENSQSEDSVGGDNDSEN (Tag10381-1)
235	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSEDQG (Tag2408-2)	287	EVEESNPSAKEDSNPNSSGE (Tag11717-1)
236	EQLNFSDDDEQGSNSPKENNSEDQGS (Tag2408-3)	288	VEESNPSAKEDSNPNSSGED (Tag11717-2)
237	EKKNENDENSLSSSDSSED (Tag6301-1)	289	KEENSESPLNENSDESYSEE (Tag12237-1)
238	NENDENSLSSSDSSEDKDE (Tag6301-1)	290	QPGPNHEEDADSYENMDNPD (Tag12809-1)
239	KETNNSNAQNPSEEEGEGQDE (Tag6626-1)	291	PNHEEDADSYENMDNPDGPD (Tag12809-2)
240	ETNNSNAQNPSEEEGEGQDED (Tag6626-2)	292	NHEEDADSYENMDNPDGPD (Tag12809-3)
241	KETNNSNAQNPSEEEGEGQDED (Tag6626-3)	293	DDPNSSDESNGNDDANSESD (Tag 12885-1)
242	ENANDSSDDSGEETDESFPN (Tag6915-1)	294	DPNSSDESNGNDDANSESDN
243	DNESNSESANENGWDSGSNFSE	295	PNSSDESNGNDDANSESDNN
244	DNESNSESANENGWDSGSNFSEE	296	NSSDESNGNDDANSESDNNS (Tag 12885-2)
245	SDDNESNSESANENGWDSGSNFSE	297	SSDESNGNDDANSESDNNSS
246	DDNESNSESANENGWDSGSNFSEE (Tag7128-1)	298	SDESNGNDDANSESDNNSSS
247	SDDNESNSESANENGWDSGSNFSEE (Tag7128-2)	299	DESNGNDDANSESDNNSSSR
248	SSDDNESNSESANENGWDSGSNFSEE (Tag7128-3)	300	MQGDDPNSSDESNGNDDANSE
249	SEENASSGDSEENTNSDHES (Tag7135-2)	301	QGDDPNSSDESNGNDDANSES
250	EENASSGDSEENTNSDHESE (Tag 7315-1)	302	GDDPNSSDESNGNDDANSESD
251	ENASSGDSEENTNSDHESEQ (Tag7135-3)	303	DDPNSSDESNGNDDANSESDN
252	DENSENNWRNEYPEEESSDG	304	DPNSSDESNGNDDANSESDNN
253	ENSENNWRNEYPEEESSDGD	305	DKSMQGDDPNSSDESNGNDDAN
254	NSENNWRNEYPEEESSDGD	306	SMQGDDPNSSDESNGNDDANSE
255	DDENSENNWRNEYPEEESSDG (Tag8482-1)	307	MQGDDPNSSDESNGNDDANSES
256	DENSENNWRNEYPEEESSDGD	308	QGDDPNSSDESNGNDDANSESD
257	ENSENNWRNEYPEEESSDGD (Tag8482-2)	309	GDDPNSSDESNGNDDANSESDN
258	NSENNWRNEYPEEESSDGD	310	DDPNSSDESNGNDDANSESDNN
259	NSENNWRNEYPEEESSDGEDS (Tag8482-3)	311	DPNSSDESNGNDDANSESDNNS
		312	DESNGNDDANSESDNNSSSRGD (Tag12885-3)
		313	DDKSMQGDDPNSSDESNGNDDAN
		314	DKSMQGDDPNSSDESNGNDDANS
		315	KSMQGDDPNSSDESNGNDDANSE

316	SMQGGDPNSSDESNGNDDANSES	373	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSS
317	MQGGDPNSSDESNGNDDANSESD	374	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSS
318	QGDDPNSSDESNGNDDANSESDN	375	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSS
319	GDDPNSSDESNGNDDANSESDNN	376	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSS
320	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSS	377	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSS
321	DPNSSDESNGNDDANSESNNSS	378	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE
322	SDESNGNDDANSESNNSSSRGD	379	GDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE
323	DESNGNDDANSESNNSSSRGDA	380	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES
324	DDANSESNNSSSRGDASYNSDE	381	DSYDFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGD
325	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDAN	382	SYDFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDA
326	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANS	383	YDFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDAS
327	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSE	384	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASY
328	SMQGGDPNSSDESNGNDDANSESD	385	QGDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKD
329	MQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN	386	GDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDN
330	QGDDPNSSDESNGNDDANSESDNN	387	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES
331	GDDPNSSDESNGNDDANSESDNNS	388	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE
332	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSS	389	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSD
333	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDAN	390	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE
334	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANS	391	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES
335	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSE	392	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE
336	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSES	393	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES
337	KSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESD	394	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES
338	SMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN	395	DPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTN
339	MQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNN	396	NSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTNNSD
340	QGDDPNSSDESNGNDDANSESNNNS	397	SSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTNNSDS
341	GDDPNSSDESNGNDDANSESNNNS	398	SDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTNNSDSN
342	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSS	399	AEDDDSDSTDTNNSDSNGNGNNGNDDNDKSDSGKGKSDSSSDSSSSNSSDSSSDSSDS
343	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANS	400	EDDDSDSTDTNNSDSNGNGNNGNDDNDKSDSGKGKSDSSSDSSSSNSSDSSSDSSDS
344	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSE	401	DDSDSTDTNNSDSNGNGNNGNDDNDKSDSGKGKSDSSSDSSSSNSSDSSSDSSDS
345	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSES	402	GDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTN
346	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESD	403	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES
347	KSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN	404	QGDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTN
348	SMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNN	405	GDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDESKDNGNGSDSKGAEDDDSDSTDTN
349	MQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		
350	QGDDPNSSDESNGNDDANSESNNSS		
351	GDDPNSSDESNGNDDANSESNNSSS		
352	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSR		
353	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN		
354	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN		
355	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNN		
356	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGD		
357	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN		
358	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNN		
359	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		
360	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDA		
361	DESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE		
362	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDN		
363	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNN		
364	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		
365	DKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		
366	DDPNSSDESNGNDDANSESNNSSSRGDAS		
367	SDESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDE		
368	DESNGNDDANSESNNSSSRGDASYNSDES		
369	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNN		
370	FDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		
371	DDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		
372	DFDDKSMQGGDPNSSDESNGNDDANSESDNNS		

406	DDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDES KDNNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNS	441	ESSENADDPNKTSENADGGSDEN (Tag 14056-3)
407	DPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDESK DNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSD	442	DRDPEMENEQPSSENDSON (Tag 14681-1)
408	MQGDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNS DESKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTN	443	RDPMEENEQPSSENDSONQ
409	QGDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSD ESKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTN	444	DPMEENEQPSSENDSONQS
410	GDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDE SKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNS	445	PEMENEQPSSENDSONQSG (Tag 14681-2)
411	DDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDES KDNNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSD	446	EMENEQPSSENDSONQSGE
412	DPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDESK DNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDS	447	MENEQPSSENDSONQSGEQ
413	GDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDE SKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSD	448	ENEEQPSSENDSONQSGEQI (Tag 14681-3)
414	DDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDES KDNNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDS	449	DSEANVSDKEAGSNENDDON (Tag 14844-1)
415	QGDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSD ESKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSD	450	NYNDGSGEDRDWQDQSDNQ (Tag 15481-1)
416	GDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDE SKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDS	451	RENTNEASSEGNSDDSEDE (Tag 16043-1)
417	DDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDES KDNNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDSN	452	ENTNEASSEGNSDDSEDER (Tag 16043-2)
418	EDDDSDSTSDTNNSDSNGNGNNGNDDNDKSDSGKG SDSSDSDSSSSNSDSSDSSDSDSSDSDSN	453	QENDNGNETESEQPKESNEN
419	MQGDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNS DESKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSD	454	ENDNGNETESEQPKESNENQ
420	QGDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSD ESKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDS	455	NDNGNETESEQPKESNENQE
421	GDDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDE SKDNGNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDSN	456	QENDNGNETESEQPKESNENQ (Tag 16400-1)
422	DDPNSSDESNGNDDANSESDNNSSSRGDASYNSDES KDNNGSGDSKGAEDDDSDSTSDTNNSDSNG	457	ENDNGNETESEQPKESNENQE (Tag 16400-2)
423	AEDDDSDSTSDTNNSDSNGNGNNGNDDNDKSDSGKG KSDSSDSDSSSSNSDSSDSSDSDSSDSDSN	458	QENDNGNETESEQPKESNENQE (Tag 16400-3)
424	EDDDSDSTSDTNNSDSNGNGNNGNDDNDKSDSGKG SDSSDSDSSSSNSDSSDSSDSDSDSSDSDSN	459	QNEENPGDEEAKQVNSESD
425	LEEDDNNENAGEDGDNDFSPS	460	NEENPGDEEAKQVNSESDS
426	DNNENAGEDGDNDFSPSDEEL (Tag 12968-1)	461	EENPGDEEAKQVNSESDSD
427	NNENAGEDGDNDFSPSDEELA	462	ENPGDEEAKQVNSESDSDS
428	NENAGEDGDNDFSPSDEELAN	463	MPGDEEAKQVNSESDSDSE
429	DNNENAGEDGDNDFSPSDEELA	464	QNEENPGDEEAKQVNSESDS
430	NNENAGEDGDNDFSPSDEELAN	465	NEENPGDEEAKQVNSESDSD
431	ALEEDDNNENAGEDGDNDFSPS (Tag 12968-2)	466	QNEENPGDEEAKQVNSESDSD
432	DDNNENAGEDGDNDFSPSDEELA	467	NEENPGDEEAKQVNSESDSDS
433	DNNENAGEDGDNDFSPSDEELAN (Tag 12968-3)	468	QNEENPGDEEAKQVNSESDSDS
434	DDNNENAGEDGDNDFSPSDEELAN	469	NEENPGDEEAKQVNSESDSDSE
435	EDDNNENAGEDGDNDFSPSDEELAN	470	QNEENPGDEEAKQVNSESDSDSE
436	NPADDPNNQGEDEFEEAEQVREEN (Tag 13648-1)	471	NEENPGDEEAKQVNSESDSDSEE
437	NEENTEPGAESSENADDPNKD (Tag 14056-1)	472	QNEENPGDEEAKQVNSESDSDSEE (Tag 16417-1)
438	ENADDPNKDTSENADGGSDEN	473	NEENPGDEEAKQVNSESDSDSEES (Tag 16417-2)
439	SENADDPNKDTSENADGGSDEN	474	QNEENPGDEEAKQVNSESDSDSEES (Tag 16417-3)
440	SSSENADDPNKDTSENADGGSDEN (Tag 14056-2)	475	YNGGNANPRPANNEEEDEED
		476	NGGNANPRPANNEEEDEEDE
		477	GGNANPRPANNEEEDEEDEY
		478	YNGGNANPRPANNEEEDEEDE (Tag 18137-1)
		479	NGGNANPRPANNEEEDEEDEY (Tag 18137-2)
		480	NGGNANPRPANNEEEDEEDEYD (Tag 18137-3)
		481	GASENEEEDDYNKPLDPNS (Tag 18347-1)
		482	LQNKAEAEPPGPDSENSQEN (Tag 18478-1)
		483	QNKAEAEPPGPDSENSQENP (Tag 18478-2)
		484	NQKAEAEPPGPDSENSQENPP (Tag 18478-3)
		485	KESVSPENNEEGGNDQDNEN (Tag 20166-1)
		486	ESVSPENNEEGGNDQDNENP (Tag 20166-2)
		487	KESVSPENNEEGGNDQDNENP (Tag 20166-3)
		488	ASQPREPSPDDENSNDNEC (Tag 41693-1)
		489	NNSQDEDFGQELNENGNAKDE (Tag 55443-1)
		490	NSQDEDFGQELNENGNAKDEN (Tag 55443-2)
		491	NNSQDEDFGQELNENGNAKDEN (Tag 55443-3)

[0215] 抽出条件 2 :

長さ 20~70 アミノ酸

グループ [D, E] 含有率 [30] 以上

グループ [D, E] 含有率 [45] 未満

グループ [P] 含有率 [10] 以上

グループ [H, K, R] 含有率 [5] 以下

グループ [G] 含有率 [10] 未満

グループ [A] 含有率 [10] 未満

グループ [C, T, V, L, I, M, W] 含有率 [0]

グループ [F, Y] 含有率 [0]

※ 上記抽出条件において、含有率の単位は%である。アミノ酸は一文字表記により表されている。

[0216]

[表13]

表 1 3 : 抽出条件 2 により抽出したタグを付加した s c F v の凝集率

タグ名称	配列	凝集率%	DE比率	P比率	H K R 比率	G比率	A比率
tag47-1	SSDSPKQSPPEDSGESEAD	9.48	35	15	5	5	5
tag1784-1	GPEPEPEPEPEPEPEPEPEPE	15.91	42.86	47.62	0	4.76	4.76
tag1784-2	PEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPE	14.03	42.86	52.38	0	0	4.76
tag1784-3	PEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPK	23.67	42.86	47.62	4.76	0	4.76
tag2257-1	PEEDGSPDEPEPEPEPKPS	22.33	35	40	5	5	0
tag2257-2	EDPEEDGSPDEPEPEPEPKP	14.76	42.86	38.1	4.76	4.76	0
tag2257-3	DPEEDGSPDEPEPEPEPKPS	17.21	38.1	38.1	4.76	4.76	0
tag4398-1	PDDGSDSDSSPPSASPAESEP	35.71	33.33	23.81	0	4.76	9.52
tag4398-2	DDGSDSDSSPPSASPAESEPQ	18.64	33.33	19.05	0	4.76	9.52
tag4398-3	PDDGSDSDSSPPSASPAESEPQ	18.58	31.82	22.73	0	4.55	9.09
tag4898-1	PPPEEQGQDAPPQHEDDEPA	9.9	33.33	28.57	4.76	9.52	9.52
tag5533-1	GAPSPAPSPDSDSDSGDFEE	19.43	33.33	19.05	0	9.52	9.52
tag5533-2	APSPAPSPDSDSDSGDFEE	16.43	38.1	19.05	0	4.76	9.52
tag5533-3	PSAPSPDSDSDSGDEEEE	8.76	42.86	19.05	0	4.76	4.76
tag5601-1	PAPPPPPPEEDPEQDSGPE	33.03	30	50	0	5	5
tag5601-2	APPPPPPPPEEDPEQDSGPE	20.10	35	45	0	5	5
tag5601-3	PAPPPPPPEEDPEQDSGPE	24.34	33.33	47.62	0	4.76	4.76
tag6354-1	PPPPQAPPEEENESEPEEPS	7.87	33.33	42.86	0	0	4.76
tag6354-2	PPPPQAPPEEENESEPEEPSG	10.68	33.33	38.1	0	4.76	4.76
tag6354-3	PPPPQAPPEEENESEPEEPSG	7.98	31.82	40.91	0	4.55	4.55
tag6681-1	PQDSSSKSPESADESPDND	8.07	30	20	5	0	5
tag7124-1	QSSDNSEDEEPPDNADSKS	5.56	40	10	5	0	5
tag7702-1	EEEEQPKAPDPQDPQDAESD	13.15	42.86	19.05	4.76	4.76	9.52
tag7702-2	EEEEQPKAPDPQDPQDAESDS	17.29	38.1	19.05	4.76	4.76	9.52
tag7702-3	EEEEQPKAPDPQDPQDAESDS	17.57	40.91	18.18	4.55	4.55	9.09
tag8341-1	PPPSSEEGPEEPKASPESE	23.65	35	35	5	5	5
tag8341-2	PPPSSEEGPEEPKASPESE	23.58	33.33	38.1	4.76	4.76	4.76
tag8341-3	PPPSSEEGPEEPKASPESEA	24.91	33.33	33.33	4.76	4.76	9.52
tag10102-1	DDAEPESEPPPPRSPSEP	19.00	30	45	5	0	5
tag11508-1	SGEASSSEEEPPSPDDKENQA	14.91	33.33	14.29	4.76	4.76	9.52
tag11508-2	GEASSSEEEPPSPDDKENQAP	14.49	33.33	19.05	4.76	4.76	9.52
tag11508-3	SGEASSSEEEPPSPDDKENQAP	13.03	31.82	18.18	4.55	4.55	9.09
tag13088-1	PPPPPPPEESSDSEPEAEFG	14.98	30	45	0	5	5
tag13088-2	PPPPPEESSDSEPEAEFGSP	16.42	30	40	0	5	5
tag13088-3	PPPEESSDSEPEAEFGSPQK	20.58	30	30	5	5	5
tag13619-1	SDPEPPDAGEDSKSENGENAP	11.52	33.33	19.05	4.76	9.52	9.52
tag14205-1	SDSESEDPPRNQASDSENEE	10.73	40	10	5	0	5
tag14666-1	GPGEADPEDEPQSEDSEAPS	10.21	42.86	19.05	0	9.52	9.52
tag14666-2	PGGEADPEDEPQSEDSEAPSS	10.04	42.86	19.05	0	4.76	9.52
tag14666-3	GPGEADPEDEPQSEDSEAPSS	12.08	40.91	18.18	0	9.09	9.09
tag15430-1	ESSESSSDSEANEPSSQASPEPE	14.06	30.43	13.04	0	0	8.7
tag15430-2	SDSESSSDSEANEPSSQASPEPE	10.87	30.77	11.54	0	0	7.69
tag15430-3	DSESESSSDSEANEPSSQASPEPEP	7.54	30.77	15.38	0	0	7.69
tag16604-1	HQEDSEEESEEEAEAGASEPPPP	12.72	43.48	17.39	4.35	4.35	8.7
tag16604-2	GDHQEDSEEESEEEAEAGASEPPPP	12.95	44	16	4	8	8
tag17053-1	PSQPPEEPPEPDEAESSPDQ	15.35	35	35	0	0	5
tag17053-2	PAPSPQPEEPPEPDEAESSPDQ	16.53	33.33	38.1	0	0	9.52
tag17053-3	DPAPSPQPEEPPEPDEAESSPDQ	14.03	36.36	36.36	0	0	9.09
tag17170	PGSQPQASSGPEAEFEEDDE	11.11	42.86	14.29	0	9.52	9.52
tag17514-1	SPDSQEEQKGESSASSPEEP	13.45	30	15	5	5	5
tag17514-2	PADSPDSQEEQKGESSASSPEEP	15.02	30.43	17.39	4.35	4.35	8.7
tag17514-3	ADSPDSQEEQKGESSASSPEEP	16.14	34.78	13.04	4.35	4.35	8.7
tag17603-1	PSPEDESSSSSSSSSEDEE	6.01	35	10	0	0	0
tag17603-2	PRSPSPDESSSSSSSSSEDEE	5.96	30.43	13.04	4.35	0	0
tag17603-3	PRSPSPDESSSSSSSSSEDEEE	7.22	33.33	12.5	4.17	0	0
tag18253-1	SSSDSDSDSSEDEAPSKP	3.59	35	10	5	0	5
tag18453-1	PSGSPRGQPDQDDDEDEE	6.12	42.86	19.05	4.76	9.52	0
tag18467-1	PAGDGEAGPQQAEDHPQNPDPNPDPEDD	9.87	32.26	25.81	3.23	9.68	9.68
tag18467-2	AGDGEAGPQQAEDHPQNPDPNPDPEDDS	5.73	32.26	22.58	3.23	9.68	9.68
tag18467-3	PAGDGEAGPQQAEDHPQNPDPNPDPEDDS	8.73	31.25	25	3.13	9.38	9.38
tag18478-1	QNQKEAEELPGDSENSQENP	14.94	30	15	5	5	5
tag18478-2	NQKEAEELPGDSENSQENPP	11.47	30	20	5	5	5
tag19033-1	DQNESQSPQPEEGPSEDDKA	12.69	38.1	14.29	4.76	4.76	4.76
tag19033-2	QNESQSPQPEEGPSEDDKAE	12.4	38.1	14.29	4.76	4.76	4.76
tag19033-3	NESQSPQPEEGPSEDDKAE	12.28	38.1	14.29	4.76	9.52	4.76
tag29487-1	PASSSSNPEEGPEEDREAESE	12.77	38.1	14.29	4.76	4.76	9.52
tag34831-1	DKPEEDDEAQPPQPSGPEFAE	7.58	43.48	17.39	4.35	4.35	8.7
tag34831-2	KPEEDDEAQPPQPSGPEFAE	8.02	43.48	17.39	4.35	4.35	8.7
tag34831-3	PEEDDEAQPPQPSGPEFAEEG	9.14	43.48	17.39	0	8.7	8.7
tag34858-1	PEEEHAPGEDESSPQSPQS	17.52	30	25	5	5	5

[0217] 表 1 3 では、抽出されたタグのアミノ酸配列の P 含有比率は 1 5 % 以上で

あり、その他のアミノ酸含有比率は、抽出条件2に記載された通りである。凝集抑制作用が具体的なアミノ酸配列に依存しないことを確かめるために、抽出条件2により抽出されたタグからランダムにタグを選択した。いくつかのタグに関しては、同一タンパク質の別の箇所から同抽出条件を満たすアミノ酸配列を追加的に選択した。選択されたアミノ酸配列を有するタグを付加した s c F v の凝集率を試験したところ、表13に示される通りの結果を得た。表13に示されるように、タグを付与した s c F v の凝集率は全体的に低かった。

[0218] なお、抽出条件2で抽出できるヒト由来アミノ酸配列は以下の通りであった。

[表13-2]

表 13-2 : 抽出条件 2 で抽出できるヒト由来アミノ酸配列の例

参照 番号	配列	544	PGPEPEPEPEPEPEPEPEPKPGA
492	SSDSPKQSPPEDSGESEAD (tag47-1)	545	DPEEDGSPDPEPSPEPEPKP
493	PGPEPEPEPEPEPEPEPE	546	PEEDGSPDPEPSPEPEPKPS (tag2257-1)
494	GPEPEPEPEPEPEPEPEP	547	EDPEEDGSPDPEPSPEPEPKP (tag2257-2)
495	PEPEPEPEPEPEPEPEPK	548	DPEEDGSPDPEPSPEPEPKPS (tag2257-3)
496	EPEPEPEPEPEPEPEPKP	549	EDPEEDGSPDPEPSPEPEPKPS
497	PEPEPEPEPEPEPEPKPG	550	DEDPEDGSPDPEPSPEPEPKPS
498	AGPGPEPEPEPEPEPEPEP	551	PDDGSDSSPPSASPAESEP (tag4398-1)
499	GPPEPEPEPEPEPEPEPE	552	DDGSDSSPPSASPAESEPQ (tag4398-2)
500	PGPEPEPEPEPEPEPEP	553	PDDGSDSSPPSASPAESEPQ (tag4398-3)
501	GPEPEPEPEPEPEPEPEPE (tag1784-1)	554	PPPEEQGGDAPPQHEDEEPA (tag4898-1)
502	PEPEPEPEPEPEPEPEPE (tag1784-2)	555	PSPAPSPDSDSDSDGEEE
503	EPEPEPEPEPEPEPEPEPK (tag1784-3)	556	GAPSPAPSPDSDSDSDGEE (tag5533-1)
504	PEPEPEPEPEPEPEPKP	557	APSPAPSPDSDSDSDGEEE (tag5533-2)
505	EPEPEPEPEPEPEPKPG	558	PSPAPSPDSDSDSDGEEEE (tag5533-3)
506	PEPEPEPEPEPEPEPKGA	559	NGAPSPAPSPDSDSDSDGEEE
507	EPEPEPEPEPEPEPKGAG	560	GAPSPAPSPDSDSDSDGEEE
508	AGPGPEPEPEPEPEPEPE	561	APSPAPSPDSDSDSDGEEEE
509	GPPEPEPEPEPEPEPEPE	562	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEE
510	PGPEPEPEPEPEPEPEPE	563	NGAPSPAPSPDSDSDSDGEEE
511	GPEPEPEPEPEPEPEPEP	564	GAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
512	PEPEPEPEPEPEPEPEPK	565	APSPAPSPDSDSDSDGEEEE
513	EPEPEPEPEPEPEPEPKP	566	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEE
514	PEPEPEPEPEPEPEPKPG	567	NGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
515	EPEPEPEPEPEPEPEPKGA	568	GAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
516	PEPEPEPEPEPEPEPKGAG	569	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
517	AGPGPEPEPEPEPEPEPEP	570	NGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
518	GPPEPEPEPEPEPEPEPE	571	GAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
519	PGPEPEPEPEPEPEPEPEP	572	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
520	GPEPEPEPEPEPEPEPEPK	573	NGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
521	PEPEPEPEPEPEPEPEPKP	574	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
522	EPEPEPEPEPEPEPEPKPG	575	NGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
523	PEPEPEPEPEPEPEPKGA	576	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEE
524	EPEPEPEPEPEPEPEPKGAG	577	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEEGER
525	AGPGPEPEPEPEPEPEPE	578	QNGAPSPAPSPDSDSDSDGEEEEGERD
526	GPPEPEPEPEPEPEPEPEP	579	EPPAPPPPPPEEDPEQDSG
527	PGPEPEPEPEPEPEPEPEPK	580	PAPPPPPPEEDPEQDSGPE (tag5601-1)
528	GPEPEPEPEPEPEPEPEPKP	581	APPPPPPEEDPEQDSGPED (tag5601-2)
529	PEPEPEPEPEPEPEPEPKPG	582	PAPPPPPPEEDPEQDSGPED (tag5601-3)
530	EPEPEPEPEPEPEPEPKGA	583	EPPAPPPPPPEEDPEQDSGPE
531	PEPEPEPEPEPEPEPEPKGAG	584	PPAPPPPPPEEDPEQDSGPED
532	AGPGPEPEPEPEPEPEPEP	585	AEPPAPPPPPPEEDPEQDSGPE
533	GPPEPEPEPEPEPEPEPEPK	586	EPPAPPPPPPEEDPEQDSGPED
534	PGPEPEPEPEPEPEPEPEPKP	587	AEPPAPPPPPPEEDPEQDSGPED
535	GPEPEPEPEPEPEPEPEPKPG	588	PPPPQAPPEEENESEPEEP
536	PEPEPEPEPEPEPEPEPKGA	589	PPPPQAPPEEENESEPEEPS
537	EPEPEPEPEPEPEPEPKGAG	590	PPPPQAPPEEENESEPEPSG
538	AGPGPEPEPEPEPEPEPEPK	591	PPPPQAPPEEENESEPEPS (tag6354-1)
539	GPPEPEPEPEPEPEPEPEPKP	592	PPPPQAPPEEENESEPEPSG (tag6354-2)
540	PGPEPEPEPEPEPEPEPKPG	593	PPPPQAPPEEENESEPEPSG (tag6354-3)
541	GPEPEPEPEPEPEPEPEPKGA	594	PQDSSKSPEPSADESPDND (tag6681-1)
542	PEPEPEPEPEPEPEPEPKGAG	595	QSSDNSEEEPPDNADSKS (tag7124-1)
543	AGPGPEPEPEPEPEPEPEPKP		

596	EEEEQPGKAPDPQDPQDAES
597	EEEEQPGKAPDPQDPQDAESD (tag7702-1)
598	EEEEQPGKAPDPQDPQDAESDS (tag7702-2)
599	EEEEQPGKAPDPQDPQDAESDS (tag7702-3)
600	EEEEQPGKAPDPQDPQDAESDS
601	PPPPSEEEGPEEPPKASPE
602	PPPPSEEEGPEEPPKASPE
603	PPPPSEEEGPEEPPKASPESE (tag8341-1)
604	PPPPSEEEGPEEPPKASPESE (tag8341-2)
605	PPPPSEEEGPEEPPKASPESEA (tag8341-3)
606	PPPPSEEEGPEEPPKASPESE
607	PPPPSEEEGPEEPPKASPESEA
608	PPPPSEEEGPEEPPKASPESEA
609	DDAEPESPPPPPRSPSP (tag10102-1)
610	SGEASSSEEEPPSPDDKENQ
611	SGEASSSEEEPPSPDDKENQA (tag11508-1)
612	GEASSSEEEPPSPDDKENQAP (tag11508-2)
613	SGEASSSEEEPPSPDDKENQAP (tag11508-3)
614	PQPPPPPPPEESSDSEPEAE
615	QPPPPPPPEESSDSEPEAEP
616	PPPPPPPEESSDSEPEAEPG (tag13088-1)
617	PPPPPPPEESSDSEPEAEPGS
618	PPPPPEESSDSEPEAEPGSP (tag13088-2)
619	PPPPPEESSDSEPEAEPGSPQ
620	PPPEESSDSEPEAEPGSPQK (tag13088-3)
621	SDPEPPDAGEDSKSENGENAP (tag13619-1)
622	SDSESDPPRNQASDSENEE (tag14205-1)
623	GPGEDAEPDEDPQSEDSEAPS (tag14666-1)
624	PGEDAEPDEDPQSEDSEAPSS (tag14666-2)
625	GPGEDAEPDEDPQSEDSEAPSS (tag14666-3)
626	ESESSSSDSEANEPSQSASPEPE (tag15430-1)
627	DSESSSSDSEANEPSQSASPEPE
628	SDSESSSSDSEANEPSQSASPEPE (tag15430-2)
629	DSESSSSDSEANEPSQSASPEPEP (tag15430-3)
630	HQEDSEEESEEEAEGASEPPPP (tag16604-1)
631	GDHQEDSEEESEEEAEGASEPPPP (tag16604-2)
632	PSQPPEEPPEDEAESSDPQ (tag17053-1)
633	DPAPSQPPEEPPEDEAESSDP
634	PAPSQPPEEPPEDEAESSDP (tag17053-2)
635	APSQPPEEPPEDEAESSDPQ
636	PSQPPEEPPEDEAESSDPQA

637	DPAPSQPPEEPPEDEAESSDP (tag17053-3)
638	PAPSQPPEEPPEDEAESSDPQ
639	DPAPSQPPEEPPEDEAESSDPQ
640	PGSQPQASSGPEAEEEEDE (tag17170)
641	DSPDSQEEQKGEASSASSPEE
642	SPDSQEEQKGEASSASSPEEP (tag17514-1)
643	PDSQEEQKGEASSASSPEEPE
644	DSQEEQKGEASSASSPEEPEE
645	DSPDSQEEQKGEASSASSPEEP
646	SPDSQEEQKGEASSASSPEEPE
647	PDSQEEQKGEASSASSPEEPEE
648	PADSPDSQEEQKGEASSASSPEE
649	ADSPDSQEEQKGEASSASSPEEP
650	DSPDSQEEQKGEASSASSPEEPE
651	SPDSQEEQKGEASSASSPEEPEE
652	PADSPDSQEEQKGEASSASSPEEP (tag17514-2)
653	ADSPDSQEEQKGEASSASSPEEPE (tag17514-3)
654	DSPDSQEEQKGEASSASSPEEPEE
655	PADSPDSQEEQKGEASSASSPEEPE
656	ADSPDSQEEQKGEASSASSPEEPEE
657	PADSPDSQEEQKGEASSASSPEEPEE
658	SPSPEDESSSSSSSSSEDE
659	PSPDESSSSSSSSSSSEDEE (tag17603-1)
660	PRSPSPDESSSSSSSSSEDEE (tag17603-2)
661	PRSPSPDESSSSSSSSSSSEDEEE (tag17603-3)
662	SSSDSSDSDSSEDEAPSKP (tag18253-1)
663	PSPGSPRGQPQDDDEDEE (tag18453-1)
664	QQAEDHPQNPPDPNQDPPE
665	QAEDHPQNPPDPNQDPPE
666	AEDHPQNPPDPNQDPPEDD
667	EDHPQNPPDPNQDPPEDDS
668	QQAEDHPQNPPDPNQDPPE
669	QAEDHPQNPPDPNQDPPEDD
670	AEDHPQNPPDPNQDPPEDDS
671	PQQAEDHPQNPPDPNQDPPE
672	QQAEDHPQNPPDPNQDPPEDD
673	QAEDHPQNPPDPNQDPPEDDS
674	DGEAGPQQAEDHPQNPPDPNQD
675	GPQQAEDHPQNPPDPNQDPPE
676	PQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDD
677	QQAEDHPQNPPDPNQDPPEDDS
678	GPQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDD
679	PQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDDS
680	EAGPQQAEDHPQNPPDPNQDPPE
681	AGPQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDD
682	GPQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDDS
683	DGEAGPQQAEDHPQNPPDPNQDPPE
684	GEAGPQQAEDHPQNPPDPNQDPPE
685	EAGPQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDD
686	AGPQQAEDHPQNPPDPNQDPPEDDS

687	DGEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPED	718	DKPEEEDDEAQQPQPSGPE
688	GEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDD	719	KPEEEDDEAQQPQPSGPEE
689	EAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDDS	720	AGEGDKPEEEDDEAQQPQPS
690	DGEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDD	721	EGDKPEEEDDEAQQPQPSGP
691	GEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDDS	722	GDKPEEEDDEAQQPQPSGPE
692	DGEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDDS	723	DKPEEEDDEAQQPQPSGPEE
693	PAGDGEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDD (tag18467-1)	724	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEA
694	AGDGEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDDS (tag18467-2)	725	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
695	PAGDGEAGPQQAEDHPQNPPEDPNQDPPEDDS (tag18467-3)	726	EEDDEAQQPQPSGPEEAEEG
696	QNKKEAEEPQPDSENSQENP (tag18478-1)	727	EDDEAQQPQPSGPEEAEEGE
697	NQKEAEEPQPDSENSQENPP (tag18478-2)	728	DDEAQQPQPSGPEEAEFEGE
698	DQNESQSPQEPEEGPSEDDK	729	DEAQQPQPSGPEEAEEGEEE
699	QNESQSPQEPEEGPSEDDKA	730	EAQQPQPSGPEEAEEGEEEE
700	NESQSPQEPEEGPSEDDKAE	731	QQPQPSGPEEAEEGEEEAER
701	DQNESQSPQEPEEGPSEDDKA (tag19033-1)	732	QPPQPSGPEEAEEGEEEAER
702	QNESQSPQEPEEGPSEDDKAE (tag19033-2)	733	EGDKPEEEDDEAQQPQPSGPE
703	NESQSPQEPEEGPSEDDKAE (tag19033-3)	734	GDKPEEEDDEAQQPQPSGPEE
704	ESQSPQEPEEGPSEDDKAE	735	DKPEEEDDEAQQPQPSGPEEA
705	SQSPQEPEEGPSEDDKAE	736	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
706	DQNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	737	QQPQPSGPEEAEEGEEEAER
707	QNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	738	EGDKPEEEDDEAQQPQPSGPEE
708	NESQSPQEPEEGPSEDDKAE	739	GDKPEEEDDEAQQPQPSGPEEA
709	DQNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	740	DKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE (tag34831-1)
710	QNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	741	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE (tag34831-2)
711	NESQSPQEPEEGPSEDDKAE	742	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE (tag34831-3)
712	DQNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	743	EGDKPEEEDDEAQQPQPSGPEEA
713	QNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	744	GDKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
714	DQNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	745	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
715	QNESQSPQEPEEGPSEDDKAE	746	EGDKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
716	XEASSSEEEPPSPDDKENQAP (tag25919-1)	747	GDKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
717	PASSSSNP EEGPEEDREAEE (tag29487-1)	748	DKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
		749	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
		750	PEEEHAPGEDESSPQSPS (tag34858-1)
		751	XPPPESSDSEPEAEPGSPQ (tag)
		752	PPPESSDSEPEAEPGSPQK (tag)

[0219] 抽出条件 3 :

長さ 20~70

グループ [D, E] 含有率 [45] 以上

グループ [G] 含有率 [10] 未満

グループ [A] 含有率 [10] 未満

グループ [F, Y] 含有率 [0]

グループ [C, M, L, I, W, T, V] 含有率 [0]

グループ [P] 含有率 [15] 以上

[0220]

[表14]

表14：抽出条件3により抽出したタグを付加した s c F v の凝集率

タグ名称	配列	凝集率%	DE比率	P比率	G比率	A比率
Tag 167-1	KEPKKEKKDDDEEAPKPSSD	8.02	45	15	0	5
Tag 1034-1	SEEEKPPEEDKEEEEKAP	8.91	55	15	0	5
Tag 1409-1	PAEEEDDDPEQEKEAGEPGRP	5.17	47.62	19.05	9.52	9.52
Tag 1784-1	EPEPEPEPEPEPAPEPEPEP	12.97	45	50	0	5
Tag 2257-1	EDPEEDGSPDPEPSPEPEPK	12.61	45	35	5	0
Tag 2257-2	DEDPEEDGSPDPEPSPEPEPK	11.50	47.62	33.33	4.76	0
Tag 2257-3	DEDPEEDGSPDPEPSPEPEPKP	8.62	45.45	36.36	4.55	0
Tag 2740-1	KPEDKDPDRPEESKEPKKEEK	13.22	45	20	0	0
Tag 2740-2	PEDKDPDRPEESKEPKKEEKQ	11.68	45	20	0	0
Tag 2740-3	EDKDPDRPEESKEPKKEEKQR	8.79	45	15	0	0
Tag 3227-1	KRNDSEEEERERDEEQEP	20.63	50	15	0	0
Tag 4898-1	PEEEPDQDAPDEHEPSPSED	10.71	52.38	23.81	0	4.76
Tag 4898-2	EEEPDQDAPDEHEPSPSEDA	7.01	52.38	19.05	0	9.52
Tag 4898-3	EEPDDQDAPDEHEPSPSEDAP	19.90	47.62	23.81	0	9.52
Tag 5533-1	PSPAPSPDSDSDSDSGEEEEEE	1.89	50	16.67	4.17	4.17
Tag 5533-2	APSPAPSPDSDSDSDSGEEEEEE	1.00	48	16	4	8
Tag 5533-3	PSPAPSPDSDSDSDSGEEEEEEG	0.90	48	16	8	4
Tag 6236-1	EKNDEPQKPEDKGDPEGPE	10.19	47.62	19.05	9.52	0
Tag 6236-2	EKNDEPQKPEDKGDPEGPEA	8.40	45.45	18.18	9.09	4.55
Tag 6755-1	EDEEEEEEEEEDEGPAPP	4.10	75	15	5	5
Tag 6755-2	DEEEEEEEEEDEGPAPPS	2.38	70	15	5	5
Tag 7167-1	GEREPDPPDDRDASDGEDEKP	12.37	47.62	19.05	9.52	4.76
Tag 7167-2	EREPDPPDDRDASDGEDEKPP	8.77	47.62	23.81	4.76	4.76
Tag 7167-3	EGEREPDPPDDRDASDGEDEKP	9.97	50	18.18	9.09	4.55
Tag 7702-1	EEEEEPGKAPDPQDPQDAESD	13.30	45.45	18.18	4.55	9.09
Tag 8243-1	EPEEKQEPEEKQEPEEKQKPE	11.90	47.62	19.05	0	0
Tag 8243-2	QEPEEKQEPEEKQEPEEKQKPE	12.44	45.45	18.18	0	0
Tag 8243-3	EPEEKQEPEEKQEPEEKQKPEA	12.60	45.45	18.18	0	4.55
Tag 8818-1	DDDDDDSPDPESPDDSESD	2.58	65	15	0	0
Tag 8818-2	DDDDDDSPDPESPDDSESDS	2.19	60	15	0	0
Tag 8818-3	DDSPDPESPDDSESDSESEK	8.33	50	15	0	0
Tag 9050-1	DPDQPREDPAAEEKEEKDAPE	15.60	52.38	19.05	0	9.52
Tag 9166-1	PENESEPKHEEPPKEPKPEEE	17.13	50	22.73	0	0
Tag 9166-2	NESEPKHEEPPKEPKPEEEK	7.62	50	18.18	0	0
Tag 9166-3	PENESEPKHEEPPKEPKPEEEE	13.00	52.17	21.74	0	0
Tag 9590-1	PPEEDPEEQAEENPEGEQPE	13.99	50	25	5	5
Tag 9590-2	KPPEEDPEEQAEENPEGEQPE	10.18	47.62	23.81	4.76	4.76
Tag 9590-3	KPPEEDPEEQAEENPEGEQPEE	9.67	50	22.73	4.55	4.55
Tag 9704-1	PDDDESEDHDDPDNAHESP	7.65	55	15	0	5
Tag 9749-1	PEPEPEPEPEPESEPEPEPE	15.74	50	45	0	0
Tag 9749-2	GGEPEPEPEPEPEPESEPEPE	12.24	47.83	39.13	8.7	0
Tag 9749-3	GGEPEPEPEPEPEPESEPEPEPE	14.29	48	40	8	0
Tag 10346-1	PEEEPDQDAPDEHESPPPE	8.16	50	30	0	5
Tag 10346-2	EEEPDQDAPDEHESPPPEDA	6.88	52.38	23.81	0	9.52
Tag 10346-3	PEEEPDQDAPDEHESPPPEDAP	8.97	47.83	30.43	0	8.7
Tag 11099-1	GPSSDDENEESKPEKEDEP	7.21	50	15	5	0
Tag 11099-2	PSSDDENEESKPEKEDEPQ	5.09	50	15	0	0

Tag 12127-1	SDDSDSEKRRPEEQEEEPQ	17.51	45	15	0	0
Tag 12127-2	DDSDSEKRRPEEQEEEPQPR	17.44	45	15	0	0
Tag 13036-1	PEEEDEEPGDPRGEEEEDEPD	3.17	68	20	8	0
Tag 13036-2	PEEEDEEPGDPRGEEEEDEPDPEAP	5.60	64.29	21.43	7.14	3.57
Tag 13036-3	AAPEEEDEEPGDPRGEEEEDEPDPEAPENG	6.19	55.88	17.65	8.82	8.82
Tag 14128-1	PPPSGSDSEEEEEDEEDE	2.43	70	15	5	0
Tag 14128-2	KPPPSGSDSEEEEEDEEDEERKP	10.86	60	16	4	0
Tag 14128-3	KPPPSGSDSEEEEEDEEDEERKPKQ	9.76	57.69	15.38	3.85	0
Tag 16549-1	EEEEEEEEEEEEEEEEAPPP	4.95	75	20	0	5
Tag 16549-2	EEEEEEEEEEEEEEEEAPPPR	3.01	73.91	17.39	0	4.35
Tag 16549-3	PDDDEDEEEEEEEEEEEEEEEEEAPPP	0.89	81.82	15.15	0	3.03
Tag 16604-1	EDSEESQEEEAEGASEPPPP	6.00	47.62	19.05	4.76	9.52
Tag 16604-2	QEDSEESQEEEAEGASEPPPP	7.39	45.45	18.18	4.55	9.09
Tag 16604-3	DHQEDSEESQEEEAEGASEPPPP	10.59	45.83	16.67	4.17	8.33
Tag 16741-1	DQSEEEEEEEKHPPKPAKPE	10.62	45	20	0	5
Tag 16991-1	PAPAHRRPDEGEENEGEED	14.97	47.62	19.05	9.52	9.52
Tag 16991-2	PAPAHRRPDEGEENEGEEDDE	7.12	50	18.18	9.09	9.09
Tag 17199-1	QENGQREEEEEKEPEAEP	9.09	50	15	5	5
Tag 17199-2	PAEQENGQREEEEEKEPEAEP	10.29	45.83	16.67	8.33	8.33
Tag 17936-1	EQEPEPEPEPEPEPEPE	6.37	50	45	0	0
Tag 17936-2	EPEPEPEPEPEPEPEPE	10.94	50	45	0	0
Tag 17936-3	EQEPEPEPEPEPEPEPE	16.61	50	40.91	0	0
Tag 18132-1	PEEEEEEEEEEPASPPERK	3.36	60	20	0	5
Tag 18453-1	PSPGSPRGQPDQDDDEDEED	4.31	45.45	18.18	9.09	0
Tag 18453-2	RSPGSPRGQPDQDDDEDEEDE	13.65	45.83	16.67	8.33	0
Tag 18453-3	PSPGSPRGQPDQDDDEDEDEEA	6.54	45.83	16.67	8.33	4.17
Tag 18866-1	AEDDDEDEEEEEEPDPDP	2.24	80	15	0	5
Tag 18866-2	EDDDEDEEEEEEPDPDE	2.29	85	15	0	0
Tag 19350-1	KQEPDPDEEDKEENKDDAS	14.73	45	15	0	5
Tag 19350-2	QEPDPDEEDKEENKDDASAK	14.12	45	15	0	5
Tag 19511-1	EDEDEDESSEEDSEDEEPP	1.70	70	15	0	0
Tag 19511-2	PDDSRDEDEDEDESSEEDSEDEEPP	4.37	65.38	15.38	0	0
Tag 19511-3	PKKEPDDSRDEDEDEDESSEEDSEDEEPPKRR	3.87	54.55	15.15	0	0
Tag 22900-1	PEEEAEEEEEEEEERPKPSRP	10.93	52.38	19.05	0	9.52
Tag 22900-2	EQPEEEAEEEEEEEEERPKPSRP	6.90	52.17	17.39	0	8.7
Tag 22900-3	EEQPEEEAEEEEEEEEERPKPSRP	9.67	56	16	0	8
Tag 34831-1	PEEEDDEAQGPQSGPEEAEE	10.16	45.45	18.18	4.55	9.09
Tag 34831-2	EGDKPEEEDDEAQGPQSGPEEAEE	10.78	46.15	15.38	7.69	7.69
Tag 34831-3	KPEEEDDEAQGPQSGPEEAEEGEEEAERG	8.33	45.45	15.15	9.09	9.09
Tag 39056-1	NNSEEEEDDDDEEEDPKPP	0.44	65	15	0	0
Tag 39056-2	NSEEEEDDDDEEEDPKPPA	0.99	65	15	0	5
Tag 39056-3	SEEEEDDDDEEEDPKPPAN	1.23	65	15	0	5

[0221] 表 14 では、抽出されたタグのアミノ酸配列の酸性アミノ酸比率は 45% 以上であり、P 含有比率は 15% 以上であり、その他のアミノ酸含有比率は、抽出条件 3 に記載された通りである。凝集抑制作用が具体的なアミノ酸配列に依存しないことを確かめるために、抽出条件 3 により抽出されたタグからランダムにタグを選択した。いくつかのタグに関しては、同一タンパク質の別の箇所から同抽出条件を満たすアミノ酸配列を追加的に選択した。選択されたアミノ酸配列を有するタグを付加した s c F v の凝集率を試験したところ、表 14 に示される通りの結果を得た。表 14 に示されるように、タグを付与した s c F v の凝集率は全体的に低かった。表 14-1 からは、酸性アミノ酸の含有率の高いペプチドタグに対しても、G, A, F, Y, C, M, L, I, W, T, および V の含有率を低くし、P の含有率を高くする戦略

は機能することが理解できた。

[0222] なお、抽出条件 3 で抽出できるヒト由来アミノ酸配列は以下の通りであった。

[表14-2]

表 1 4 - 2 : 抽出条件 3 で抽出できるヒト由来アミノ酸配列の例

配列番号	配列	
753	KEPKEEKDDDEEAPKSSD (Tag 167-1)	
754	SEEEKPPEEDKEEEEKAP (Tag 1034-1)	
755	PAEEDDPPEQEKEAGEGRP (Tag 1409-1)	
756	PEPEPEPEPEPEAPEPEPE	
757	EPEPEPEPEPEAPEPEPEP (Tag 1784-1)	
758	DEDPEEDGSPDPEPSPEPEP	
759	EDPEEDGSPDPEPSPEPEPK (Tag 2257-1)	
760	DEDPEEDGSPDPEPSPEPEPK (Tag 2257-2)	
761	DEDPEEDGSPDPEPSPEPEPKP (Tag 2257-3)	
762	KPEDKDRDPEESKEPEKEEK (Tag 2740-1)	
763	PEDKDRDPEESKEPEKEEKQ (Tag 2740-2)	
764	EDKDRDPEESKEPEKEEKQR (Tag 2740-3)	
765	KRNDSEEEERERDEEQPPP (Tag 3227-1)	
766	PEEEPDQDAPDEHEPSPSE	
767	EEEPDQDAPDEHEPSPSED	
768	PEEEPDQDAPDEHEPSPSED (Tag 4898-1)	
769	EEEPDQDAPDEHEPSPSEDA (Tag 4898-2)	
770	EEPDQDAPDEHEPSPSEDAP (Tag 4898-3)	
771	PEEEPDQDAPDEHEPSPSEDA	
772	EEEPDQDAPDEHEPSPSEDAP	
773	PEEEPDQDAPDEHEPSPSEDAP	
774	SPAPSPDSDSDSDGEEEE	
775	PAPSPDSDSDSDGEEEE	
776	PSPAPSDSDSDSDGEEEE	
777	PSPAPSDSDSDSDGEEEE	
778	APSPAPSDSDSDSDGEEEE	
779	PSPAPSDSDSDSDSDGEEEE (Tag 5533-1)	
780	APSPAPSDSDSDSDSDGEEEE (Tag 5533-2)	
781	PSPAPSDSDSDSDSDGEEEEEG (Tag 5533-3)	
782	GAPSPAPSDSDSDSDGEEEE	
783	APSPAPSDSDSDSDSDGEEEEEG	
784	PSPAPSDSDSDSDSDGEEEEEGE	
785	EKNDEEPQKPEDKGDPEGPE (Tag 6236-1)	
786	EKNDEEPQKPEDKGDPEGPEA (Tag 6236-2)	
787	EDEEEEEEEEEDEGPAPP (Tag 6755-1)	
788	DEEEEEEEEEDEGPAPPS (Tag 6755-2)	
789	EREPDPPDRDASDGEDEKP	
790	REPDPDRDASDGEDEKPP	
791	GEREPDPPDRDASDGEDEKP (Tag 7167-1)	
792	EREPDPPDRDASDGEDEKPP (Tag 7167-2)	
793	EGEREPDPPDRDASDGEDEKP (Tag 7167-3)	
794	GEREPDPPDRDASDGEDEKPP	
795	EGEREPDPPDRDASDGEDEKPP	
796	EEEEQPGKAPDQDPQDAESD (Tag 7702-1)	
797	QEPEEKQEPEEKQEPEEKQK	
798	EPEEKQEPEEKQEPEEKQKP	
799	PEEKQEPEEKQEPEEKQKPE	
800	EEKQEPEEKQEPEEKQKPEA	
801	EPEEKQEPEEKQEPEEKQKPE (Tag 8243-1)	
802	QEPEEKQEPEEKQEPEEKQKPE (Tag 8243-2)	
803	EPEEKQEPEEKQEPEEKQKPEA (Tag 8243-3)	
804	AGDDDDDDSDPSPDDSDS	
805	GDDDDDDSDPSPDDSDSE	
806	DDDDDDSDPSPDDSDSES	
807	DDDDDDSDPSPDDSDSED (Tag 8818-1)	
808	DDDDDDSDPSPDDSDS (Tag 8818-2)	
809	DDDDSDPSPDDSDSEDSE	
810	DDDDSDPSPDDSDSEDSES	
811	DDSDPSPDDSDSEDSESE	
812	DDSDPSPDDSDSEDSESEK (Tag 8818-3)	
813	DSPDPSPDDSDSEDSESEKE	
814	SPDPSPDDSDSEDSESEKEE	
815	PDSPDDSDSEDSESEKEES	
816	DPDQPREDPAAEEKEEKDAPE (Tag 9050-1)	
817	EGKPESEPKHEEPKPEE	
818	PENESEPKHEEPKPEEKPE	
819	ENESEPKHEEPKPEEKPEE	
820	NESEPKHEEPKPEEKPEEE	
821	ESEPKHEEPKPEEKPEEEE	
822	SEPKHEEPKPEEKPEEEEE	
823	PENESEPKHEEPKPEEKPEE	
824	ENESEPKHEEPKPEEKPEEE	

825	NESEPKHEEKPPEEKPEEE
826	ESEPKHEEKPPEEKPEEEK
827	KPENESPKHEEKPPEEKPEE
828	PENESPKHEEKPPEEKPEEE (Tag 9166-1)
829	ENESEPKHEEKPPEEKPEEE
830	NESEPKHEEKPPEEKPEEEK (Tag 9166-2)
831	KPENESPKHEEKPPEEKPEEE
832	PENESPKHEEKPPEEKPEEE (Tag 9166-3)
833	ENESEPKHEEKPPEEKPEEEK
834	EGKPENESPKHEEKPPEEKPEE
835	GKPENESPKHEEKPPEEKPEEE
836	KPENESPKHEEKPPEEKPEEE
837	PENESPKHEEKPPEEKPEEEK
838	EGKPENESPKHEEKPPEEKPEEE
839	GKPENESPKHEEKPPEEKPEEE
840	KPENESPKHEEKPPEEKPEEEK
841	EGKPENESPKHEEKPPEEKPEEE
842	GKPENESPKHEEKPPEEKPEEEK
843	EGKPENESPKHEEKPPEEKPEEEK
844	KPPEEDPEEQAEENPEGEQP
845	PPEEDPEEQAEENPEGEQPE (Tag 9590-1)
846	PEEDPEEQAEENPEGEQPEE
847	KPPEEDPEEQAEENPEGEQPE (Tag 9590-2)
848	PPEEDPEEQAEENPEGEQPEE
849	KPPEEDPEEQAEENPEGEQPEE (Tag 9590-3)
850	PDDDESEDHDDPDNAHESP (Tag 9704-1)
851	GEPEPEPEPEPEPESEPE
852	EPEPEPEPEPEPESEPEP
853	PEPEPEPEPEPESEPEPE
854	EPEPEPEPEPEPESEPEPEP
855	PEPEPEPEPEPESEPEPEPE (Tag 9749-1)
856	GGEPEPEPEPEPEPESEPE
857	GEPEPEPEPEPEPESEPEP
858	EPEPEPEPEPEPESEPEPE
859	PEPEPEPEPEPESEPEPEP
860	EPEPEPEPEPEPESEPEPE
861	GGEPEPEPEPEPEPESEPEP
862	GEPEPEPEPEPEPESEPEPE
863	EPEPEPEPEPEPESEPEPEP
864	PEPEPEPEPEPESEPEPEPE
865	GGEPEPEPEPEPEPESEPEPE (Tag 9749-2)
866	GEPEPEPEPEPEPESEPEPEP
867	EPEPEPEPEPEPESEPEPEPE
868	GGEPEPEPEPEPEPESEPEPEP
869	GEPEPEPEPEPEPESEPEPEPE
870	GGEPEPEPEPEPEPESEPEPEPE (Tag 9749-3)

871	PEEPDDQDAPDEHESPPPE (Tag 10346-1)
872	EEEEDDQDAPDEHESPPPED
873	PEEPDDQDAPDEHESPPPED
874	EEEEDDQDAPDEHESPPPEDA (Tag 10346-2)
875	EEPDDQDAPDEHESPPPEDAP
876	PEEPDDQDAPDEHESPPPEDA
877	EEEEDDQDAPDEHESPPPEDAP
878	PEEPDDQDAPDEHESPPPEDAP (Tag 10346-3)
879	GPSSDDENEESKPEKEDEP (Tag 11099-1)
880	PSSDDENEESKPEKEDEPQ (Tag 11099-2)
881	SDDSDSEKRRPEEQEEEPQP (Tag 12127-1)
882	DDSDSEKRRPEEQEEEPQPR (Tag 12127-2)
883	DPREGEEEEDEPDPEAPE
884	PREGEEEEDEPDPEAPEN
885	DEEPGDPREGEEEEDEPDPE
886	EEPGDPREGEEEEDEPDPE
887	EPGDPREGEEEEDEPDPEA
888	PGDPREGEEEEDEPDPEAP
889	GDPREGEEEEDEPDPEAPE
890	DPREGEEEEDEPDPEAPEN
891	PREGEEEEDEPDPEAPENG
892	EDEEPGDPREGEEEEDEPDPE
893	DEEPGDPREGEEEEDEPDPE
894	EEPGDPREGEEEEDEPDPEA
895	EPGDPREGEEEEDEPDPEAP
896	PGDPREGEEEEDEPDPEAPE
897	GDPREGEEEEDEPDPEAPEN
898	DPREGEEEEDEPDPEAPENG
899	PREGEEEEDEPDPEAPENG
900	PEEDEEPGDPREGEEEEDEPD
901	EEDEEPGDPREGEEEEDEPDPE
902	EDEEPGDPREGEEEEDEPDPE
903	DEEPGDPREGEEEEDEPDPEA
904	EEPGDPREGEEEEDEPDPEAP
905	EPGDPREGEEEEDEPDPEAPE
906	PGDPREGEEEEDEPDPEAPEN
907	DPREGEEEEDEPDPEAPENG
908	APEEDEEPGDPREGEEEEDEPD
909	PEEDEEPGDPREGEEEEDEPD
910	EEDEEPGDPREGEEEEDEPDPE
911	EDEEPGDPREGEEEEDEPDPEA
912	DEEPGDPREGEEEEDEPDPEAP
913	EEPGDPREGEEEEDEPDPEAPE
914	EPGDPREGEEEEDEPDPEAPEN
915	AAPEEDEEPGDPREGEEEEDEPD
916	AAPEEDEEPGDPREGEEEEDEPD
917	AAPEEDEEPGDPREGEEEEDEPD
918	PEEDEEPGDPREGEEEEDEPDPE (Tag 13036-1)

919	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPE
920	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA
921	EDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP
922	DEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPE
923	EEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPEN
924	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPD
925	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPD
926	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE
927	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA
928	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP
929	EDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPE
930	DEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPEN
931	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPD
932	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE
933	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA
934	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP
935	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPE
936	EDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPEN
937	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE
938	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA
939	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP (Tag 13036-2)
940	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPE
941	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPEN
942	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA P
943	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP E
944	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPE N
945	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA PE
946	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP EN
947	PRGAAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDE PDP
948	RGAAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEP DPE
949	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE APE
950	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA PEN
951	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP ENG
952	EEDEEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAPE NGS
953	PRGAAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDE PDPE
954	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE APEN
955	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA PENG
956	PEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEAP ENG
957	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE APENG

958	APEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPEA PENG
959	AAPEEEDDEPGDPRGEEEEEEDEPDPE APENG (Tag 13036-3)
960	KPPPSEGSDDEEEDEE
961	PPPSEGSDDEEEDEE (Tag 14128-1)
962	PPPSEGSDDEEEDEEERKP
963	KPPPSEGSDDEEEDEEERKP (Tag 14128-2)
964	PPPSEGSDDEEEDEEERKPKQ
965	KPPPSEGSDDEEEDEEERKPKQ (Tag 14128-3)
966	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
967	EEEEEEEEEEEEEEAAPP (Tag 16549-1)
968	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
969	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
970	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
971	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
972	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
973	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
974	EEEEEEEEEEEEEEAAPP (Tag 16549-2)
975	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
976	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
977	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
978	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
979	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
980	EEEEEEEEEEEEEEAAPP
981	PDDDEEEEEEEEEEEEEEE AAPP (Tag 16549-3)
982	EDSEESQEEAEGASEPPP (Tag 16604-1)
983	QEDSEESQEEAEGASEPPP (Tag 16604-2)
984	DHQEDSEESQEEAEGASEPPP (Tag 16604-3)
985	DQSEEEEEKHPKPAKPE (Tag 16741-1)
986	PAPHRPPEDEGEENEGEED (Tag 16991-1)
987	PAPHRPPEDEGEENEGEED (Tag 16991-2)
988	QENGQREEEEEKEPEAEP (Tag 17199-1)
989	PAEGQENGQREEEEEKEPEAEP (Tag 17199-2)
990	EQEPEPEPEPEPEPEPE (Tag 17936-1)
991	QEPEPEPEPEPEPEPEPE
992	EPEPEPEPEPEPEPEPEQ (Tag 17936-2)
993	EQEPEPEPEPEPEPEPEPE
994	QEPEPEPEPEPEPEPEPEQ
995	EQEPEPEPEPEPEPEPEPEQ (Tag 17936-3)

996	PEEEEEEEEPASPPERK (Tag 18132-1)	1013	PKKEPDDSRDEDEDESEEDSEDEEP PPKRR (Tag 19511-3)
997	PSPGSPRGQPQDDDEDEED (Tag 18453-1)	1014	PEEEAAEEEEEEERPKPSRP (Tag 22900-1)
998	PSPGSPRGQPQDDDEDEEDE	1015	QPEEEAAEEEEEEERPKPSRP
999	RPSGSPRGQPQDDDEDEEDE (Tag 18453-2)	1016	EQPEEEAAEEEEEEERPKPSRP (Tag 22900-2)
1000	PSPGSPRGQPQDDDEDEEDEA (Tag 18453-3)	1017	EEQPEEEAAEEEEEEERPKPSRP
1001	AEDDDEDEEEEEEPDPDP (Tag 18866-1)	1018	EEEQPEEEAAEEEEEEERPKPSRP (Tag 22900-3)
1002	EDDDEDEEEEEEPDPDPE (Tag 18866-2)	1019	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE (Tag 34831-1)
1003	KQEPDPEDKEENKDDSAS (Tag 19350-1)	1020	DKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1004	QEPDPEDKEENKDSASK (Tag 19350-2)	1021	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1005	EDEDESEEDSEDEEPPP (Tag 19511-1)	1022	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1006	DEDESEEDSEDEEPPK	1023	EGDKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE (Ta 34831-2)
1007	EDESEEDSEDEEPPPKR	1024	DKPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1008	DESEEDSEDEEPPPKRR	1025	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1009	PDDSRDEDEDESEEDSEDEEPPP (Tag 19511-2)	1026	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1010	PKKEPDDSRDEDEDESEEDSEDEEP PP	1027	PEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1011	PKKEPDDSRDEDEDESEEDSEDEEP PPK	1028	KPEEEDDEAQQPQPSGPEEAE
1012	PKKEPDDSRDEDEDESEEDSEDEEP PPKR	1029	NNSEEEEDDDDEEEEPDKPP (Tag 39056-1)
		1030	NSEEEEDDDDEEEEPDKPPA (Tag 39056-2)
		1031	SEEEEDDDDEEEEPDKPPAN (Tag 39056-3)

[0223] 以上の実施例により示されるように、ペプチドタグのタンパク質凝集率低下作用は、具体的なアミノ酸配列への依存性は低く、また、由来するタンパク質への依存性も低く、アミノ酸含有率への依存性が高かった。

[0224] 実施例6：様々なタンパク質に対する付加と凝集抑制作用

上記実施例では、s c F vとしてY 1 3 - 2 5 9を用いた。本実施例では、V H H抗体（重鎖抗体の重鎖可変ドメイン）を用いる。V H H抗体としては、R a sに結合するi D a b # 6を用いた。タグとしては、T a g 4 - 8を用いた。その他の条件は、実施例1と同じであった。結果、タグを有しないV H H抗体の凝集率は、5 7 . 8 9 %であったのに対して、T a g 4 - 8をC末端に有するV H H抗体の凝集率は、8 . 7 7 %であり、タグ付与により、強い凝集抑制作用が示された。

[0225] また、細胞として神経芽細胞腫細胞株であるS H S Y 5 Y（ヒトドーパミン様細胞）を用い、s c F vとしてs c F v - 6 E（6 E）を用い、タグと

してT a g 4－8またはT a g 1 8－1をC末端およびN末端に付加すると、T a g 4－8付加s c F vの凝集率は0. 9 6%であり、T a g 1 8－1付加s c F vの凝集率は1. 1 4%であり、タグ付与は、低い凝集率に寄与していることが示された。

[0226] さらに、V H H抗体としてA型ボツリヌス菌毒素に結合するD 4（配列番号1 0 3 2 : Q V Q L Q Q S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T L D Y Y A I G W F R Q A P G K E R E G V L C I S S S G G S T N Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A D D L R C G S N W S S Y F R G S W G Q G T Q V T V S S）を用い、タグとしてT a g 4－8を上記V H H抗体のC末端に付加すると、T a g 4－8付加D 4の凝集率は7. 8%であり、タグを有しないD 4の凝集率は、8 1. 5%である。この結果から、タグ付与は、V H H抗体の凝集率の低下に寄与していることが示された。

[0227] 実施例 7 : 細胞内抗体の安定化による作用強化（アミロイド蓄積に対する抗体作用の増強効果）

神経細胞内にアミロイドが蓄積することにより中枢神経疾患が生じ得ることが知られている。神経細胞に細胞外からヒト α -シヌクレインフィブリルを導入すると、細胞内の正常構造を有するシヌクレインを巻き込んで、シヌクレインフィブリルが形成される。細胞内にG F Pタグ付きシヌクレインを発現させておくと、導入されたヒト α -シヌクレインフィブリルと一緒になってシヌクレインフィブリルを形成し、形成されたシヌクレインフィブリルは、G F Pによる蛍光で観察することができる。本実施例では、S H S Y－5 Y細胞にG F Pタグ付きシヌクレインを発現させ、 α -シヌクレインフィブリル（コスモバイオ、S Y N O 3）を細胞外からS H S Y－5 Y細胞内に導入した。本実施例では、このシヌクレインフィブリルを減少させる抗体の能力を試験した。具体的には、抗体としては、線維化したシヌクレインに結合するs c F v－6 E（配列番号1 0 3 3 : A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W

V S Y I A S G G D T T N Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G A S A F D Y W G Q G T L V T V S
S G G G G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A
S Y L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T
Y Y C Q Q S S N D P Y T F G Q G T K V E I K R) を用いた。s c F v -
6 E は、シヌクレインのモノマーやオリゴマーに対しては有意な結合性を示
さない抗体であり、このようなシヌクレインフィブリル選択的または特異的
な抗体は、シヌクレインフィブリルを選択的に除去するには適している。s
c F v - 6 E に対して、凝集率低下作用を有するタグ (T a g 4 - 8 または
T a g 1 8 - 1) および分解誘導配列 (CMA (配列番号 1 0 3 4) : M A
R V K K D Q A E P L H R K F E R Q P P G) を付加した。上記タンパク質
の発現プラスミドベクターは、X - t r e m G E N E 9 により、シヌクレイ
ンフィブリルは、M u l t i f e c t a m (M e r c k) により細胞内へ導
入した。抗体は、H A タグまたは m y c タグが付与され、抗 H A タグ抗体で
検出された。シヌクレインフィブリルは、抗リン酸化 α シヌクレイン抗体で
検出された。これらの抗体は、A l e x a 5 5 5 標識抗体および A l e x
a 6 3 3 標識抗体で特異的に検出された。蛍光染色された細胞をキーエン
ス B Z - X 8 0 0 で観察した。

[0228] タグは、N 末および C 末に付加した。N 末および C 末に T a g 4 - 8 を付
加したものの凝集率は、S H S Y - 5 Y 細胞において 0. 9 6 % であり、N
末および C 末に T a g 1 8 - 1 を付加したものの凝集率は、S H S Y - 5 Y
細胞において 1. 1 4 % であり、タグ付加しない s c F v - E 6 の凝集率が
H e L a 細胞で 4 1. 6 % であったことを考慮すると良好な凝集抑制を示し
たと考えられる。

[0229] s c F v はシヌクレインフィブリルと結合すると、分解誘導配列のために
シヌクレインフィブリルをリソソームに標的化し、シヌクレインフィブリル
を分解し、結果として、細胞内のシヌクレインフィブリルの量が減少すると

期待される。タグにより s c F v の凝集率を低下させることにより、機能的な s c F v の細胞内量が増加し、これにより、シヌクレインフィブリルの減少が増大するかを評価した。

[0230] シヌクレインフィブリルを形成した細胞内に上記抗体を発現させ、シヌクレインフィブリル陽性細胞数を測定した。抗体が発現した細胞と発現しなかった細胞とで、シヌクレインフィブリルの陽性率を比較した。結果は、抗体陽性細胞中のシヌクレインフィブリル陽性細胞割合／抗体陰性細胞中のシヌクレインフィブリル陽性細胞割合（P／N）により求めた。

[0231] 図2に示されるように、タグ付きの s c F v - E 6 を導入した細胞では、リン酸化シヌクレインが消失した。また、P／Nは、図3に示される通りであった。図3に示されるように、T a g 4 - 8 を付加した s c F v - E 6 も、T a g 1 8 - 1 を付加した s c F v - E 6 も、シヌクレイン陽性細胞率を大きく低下させた。

[0232] 実施例8：細胞内抗体の安定化による作用強化（C F T R を機能回復させる抗体の作用の増強効果）

嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（C F T R ; U n i P r o t K B / S w i s s - P r o t : P 1 3 5 6 9 . 3）は、全身の上皮膜細胞に発現する陰イオンチャンネルであり、その異常は嚢胞性線維症をきたす。C F T R の F 5 0 8 欠損変異（C F T R Δ F 5 0 8）は、C F T R のもっとも一般的な変異であると知られ、3つのヌクレオチドの欠失により508番目のフェニルアラニンが欠失している。その結果、C F T R Δ F 5 0 8 は、正常にフォールディングされず、凝集体を形成する強い傾向を示し、膜上への移行量が野生型よりも少ないとされている。s c F v - C 2（配列番号1035：EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMRLGLFDYWGGGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ

QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQRGDVPPTFGQGTKVE
IKAAA)は、CFTRのNBD1ドメインに結合し、NBD1の凝集体
形成を抑制することができる(Lovato et al., Protein Engineering, Design and Selection, 20(12):607~614, 2007)。CFTR Δ F508
の膜への移行量を増大させる効果を奏する。本実施例では、scFv-C2
に対してタグ(Tag18-1)を付加してHeLa細胞内でのNBD1ド
メインの変異体 Δ F508の凝集を抑制することができるかを評価した。H
eLa細胞にこれらのタンパク質を発現するプラスミドベクターをLipo
3000(商標)により導入した。抗体は、mycタグが付与され、ウサギ
抗mycタグ抗体で検出され、NBD1は、Hisタグが付与され、マウス
抗Hisタグ抗体で検出された。マウス抗Hisタグ抗体は、Alexa
633標識抗マウスIgG抗体により検出され、ウサギ抗mycタグ抗体は
、Alexa 488標識抗ウサギIgG抗体により検出された。蛍光染色
された細胞をキーエンスBZ-X800で観察した。

[0233] まず、HeLa細胞中でscFv-C2の凝集率は82%であった。これ
に対してN末端にTag18-1を有するscFv-C2の凝集率は31%
であり、N末端とC末端にTag18-1を有するscFv-C2の凝集率
は4.6%であった(図3Aおよび図3B参照)。野生型NBD1ドメイン
の凝集率は、scFv-C2発現細胞内で74%であり、NBD1の Δ F5
08変異体の凝集率は、scFv-C2発現細胞内で85%であるのに対し
て、N末端とC末端にそれぞれTag18-1を有するscFv-C2発現
細胞内では、野生型NBD1ドメインの凝集率は32%であり、NBD1の
 Δ F508変異体の凝集率43%であった。このことから、scFv-C2
にタグを付加することにより、scFv-C2自体の凝集形成を抑制し、こ
れにより、NBD1による凝集体形成を抑制することができた。NBD1の
凝集の抑制は、NBD1の細胞膜発現量の向上に寄与すると予想される。

[0234] 実施例 9：既存タグに対するアミノ酸置換の効果

上記実施例から本開示のペプチドタグが有すべき条件に向けたアミノ酸置換、特に、P または N へのアミノ酸置換が、タグの凝集率低下作用を増大させることを明らかにした。本実施例では、P E S T 配列の一部のアミノ酸を N に置換して、置換前後のタグをそれぞれ有する s c F v (Y 1 4 - 2 5 9) の凝集率を調べた。

[0235] [表15]

表 1 5：置換前後の配列の比較

PEST(置換前) 配列番号 1036	YPYDVPDYAGSPQPVEDGEDEFCTPMACEANIQSGDSAAPMSAVHRHRL
PEST(置換後) 配列番号 1037	NNYDVPDNAGSPQPQEDGEDEFNNPQANEANQQSGDSNNPNSAVNRHNN

[0236] それぞれ細胞内に発現させ、実施例 1 と同様に s c F v の凝集率を評価したところ、置換前のタグを有する s c F v の凝集率は 5 0. 3 %であったが、これに対して、置換後のタグを有する s c F v の凝集率は 1 8. 0 %であった。このように、本開示のペプチドタグが有すべき条件に向けたアミノ酸置換、特に、P または N へのアミノ酸置換は、タグのタンパク質凝集抑制効果を高めるものとなることが明らかとなった。

[0237] 以上のように、細胞内では抗体を含む様々なタンパク質は凝集を形成し、これによりその機能を部分的にまたは全体的に損ない得る。凝集体形成を抑制するタンパク質タグは、これらのタンパク質の凝集形成を抑制し、これにより、タンパク質に本来発揮すべき作用を発揮させることができる。酸性アミノ酸比率が相対的に低いタグは、酸性アミノ酸比率が高いタグが用いられ難い場面で有益であり得る。

請求の範囲

- [請求項1] ペプチドであって、
- (a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、
- (b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上、好ましくは30%以上が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、
- 前記ペプチドを連結したタンパク質の細胞内における凝集性を低下させることができる、
- ペプチド。
- [請求項2] (c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは15%以下、さらに好ましくは10%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項1に記載のペプチド。
- [請求項3] (d) AまたはGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満である、請求項1または2に記載のペプチド。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載のペプチドであって、
- (a) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、(b) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の30%以上70%未満が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、
- (c) アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以下が、M、T、W、C、I、V、およびLからなる群から選択されるアミノ酸であり、
- (d) AまたはGがそれぞれ、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の10%未満である、
- ペプチド。
- [請求項5] 配列番号2～11のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド。

- [請求項6] 請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチドをコードする核酸。
- [請求項7] 制御配列と作動可能に連結された請求項6に記載の核酸と、当該核酸とインフレームで目的タンパク質をコードする核酸を含む、タンパク質発現ベクター。
- [請求項8] 目的タンパク質が、抗体または抗体の抗原結合性断片である、請求項7に記載のタンパク質発現ベクター。
- [請求項9] 抗体の抗原結合性断片が、単鎖F_v（s c F_v）である、請求項8に記載のタンパク質発現ベクター。
- [請求項10] 請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質。
- [請求項11] 目的タンパク質が、抗体または抗体の抗原結合性断片である、請求項10に記載の融合タンパク質。
- [請求項12] 抗体の抗原結合性断片が、単鎖F_v（s c F_v）である、請求項11に記載の融合タンパク質。
- [請求項13] 制御配列と作動可能に連結された請求項6に記載の核酸と、当該核酸とインフレームで目的タンパク質をコードする核酸を含む、タンパク質産生細胞。
- [請求項14] アミノ酸配列を選択または同定する方法であって、
（a）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の5%以上45%未満が酸性アミノ酸であり、
（b）アミノ酸配列を構成するアミノ酸の20%以上が、F、P、Y、G、S、Q、N、およびAからなる群から選択されるアミノ酸である、
アミノ酸配列を取得することと、
選択または同定されたアミノ酸配列を有するペプチドタグと参照タンパク質との融合タンパク質を哺乳動物細胞内（好ましくはヒト細胞内）において発現させたときに、細胞内において融合タンパク質が凝集体を形成する細胞の割合を低下させる、または所定の値以下とする

ペプチドタグのアミノ酸配列を選択または同定することと、
当該アミノ酸配列を有するペプチドタグまたは当該ペプチドタグを
コードする核酸を得ることと、
を含む、
方法。

- [請求項15] 取得されるアミノ酸配列が、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のペプチドである、請求項 1 4 に記載の方法。
- [請求項16] 取得されるアミノ酸配列が、ヒトゲノムのコーディング領域によりコードされるアミノ酸配列の群である、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。
- [請求項17] 取得されるアミノ酸配列が、ネオアンチゲンを含む、請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。