

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02015/030171**

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 **平成27年3月5日 (2015.3.5)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
<b>C O 7 K 14/22 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/22	4 B O 6 5
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)

出願番号 特願2015-534325 (P2015-534325)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2014/072735  
 (22) 国際出願日 平成26年8月29日 (2014.8.29)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-179948 (P2013-179948)  
 (32) 優先日 平成25年8月30日 (2013.8.30)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504139662  
 国立大学法人名古屋大学  
 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番  
 (74) 代理人 100114362  
 弁理士 萩野 幹治  
 (72) 発明者 堀 克敏  
 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大  
 学法人名古屋大学内  
 Fターム(参考) 4B024 AA11 BA07 BA41 BA80 CA07  
 DA05 EA04 GA11 HA11  
 4B064 AG01 AG27 CA19 CB06 CC24  
 DA13  
 4B065 AA04X AA04Y AA90Y AB01 AC14  
 BA01 CA24 CA46

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被毛微生物

## (57) 【要約】

三量体オートトランスポーターアドヘシンに接着又は凝集以外の機能を持たせることを課題とする。三量体オートトランスポーターアドヘシン又はその一部にペプチド又は蛋白質からなる機能分子が結合又は融合してなる機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

三量体オートトランスポーターアドヘシン又はその一部にペプチド又は蛋白質からなる機能分子が挿入、結合又は融合してなる機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物。

## 【請求項 2】

前記三量体オートトランスポーターアドヘシンが、アシネトバクター属微生物の三量体オートトランスポーターアドヘシンである、請求項 1 に記載の微生物。

## 【請求項 3】

前記三量体オートトランスポーターアドヘシンが、アシネトバクター-sp. Tol5株のAtaAである、請求項 1 に記載の微生物。

10

## 【請求項 4】

前記微生物がグラム陰性菌である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 5】

前記微生物がガンマプロテオバクテリアである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 6】

前記微生物がアシネトバクター又は大腸菌である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 7】

前記機能分子が、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の微生物。

20

## 【請求項 8】

前記機能分子が、Hisタグ、FLAGタグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 9】

前記機能分子が、プロテアーゼ認識配列、或いは、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子とプロテアーゼ認識配列の組合せ、からなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の微生物。

30

## 【請求項 10】

前記機能分子が、Hisタグ、FLAGタグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である請求項 9 に記載の微生物。

## 【請求項 11】

三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードするDNAに、ペプチド又は蛋白質からなる機能分子をコードするDNAが挿入又は付加されてなる機能性ファイバーDNAを、標的微生物に導入するステップ、を含む、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物の作製方法。

## 【請求項 12】

三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードする前記DNAが、アシネトバクター属微生物の三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードするDNAである、請求項 11 に記載の作製方法。

40

## 【請求項 13】

三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードする前記DNAが、アシネトバクター-sp. Tol5株のAtaAをコードするDNAである、請求項 11 に記載の作製方法。

## 【請求項 14】

アシネトバクター-sp. Tol5株のAtaAをコードする前記DNAが、以下の(a)~(d)のいずれかのDNAである、請求項 13 に記載の作製方法：

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNA、

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNAと70%以上の相同性を有する塩基配列か

50

らなり、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードするDNA、

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードするDNA、

(d) 配列番号 1 で表される塩基配列のシグナルペプチドに相当する部位 ( 1 ~ 177 位 ) を残し、その後ろからヘッドメインのコード領域直前 ( 323 位 ) の間 ( 即ち、178 位から 323 位の間 )、より好ましくは 310 位までの間 ( 即ち、178 位から 310 位までの間 ) から連続する数百から数千塩基を削った塩基配列からなるDNA。

【請求項 15】

前記機能的ファイバーDNAと一緒に、以下の(A)~(C)のいずれかのDNAも前記標的微生物に導入する、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の作製方法：

(A) 配列番号 3 で表される塩基配列からなるDNA、

(B) 配列番号 3 で表される塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなるDNA、

(C) 配列番号 3 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項 16】

前記機能分子が、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子である、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 17】

前記機能分子が、Hisタグ、FLAGタグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 18】

前記標的微生物がグラム陰性菌である、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 19】

前記標的微生物がガンマプロテオバクテリアである、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 20】

前記標的微生物がアシネトバクター又は大腸菌である請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 21】

請求項 11 ~ 20 のいずれか一項に記載の作製方法で得られた、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物。

【請求項 22】

請求項 9、10 又は 21 に記載の微生物から回収された、機能性ファイバー。

【請求項 23】

以下のステップ(1)及び(2)を含む、機能性ファイバーの回収方法：

(1) 請求項 9、10 又は 21 に記載の微生物に対して、前記プロテアーゼ認識配列を認識するプロテアーゼを作用させるステップ、

(2) 切断された機能性ファイバーを回収するステップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は機能性ファイバーを細胞表面に発現する微生物及びその作製方法等に関する。本出願は、2013年8月30日に出願された日本国特許出願第2013-179948号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 2 】

本発明者が以前にバイオフィルターから単離したAcinetobacter sp. Tol 5 (アシネトバクター属細菌Tol 5株)は、細胞自己凝集性が高く、また、疎水性の各種プラスチック担体から親水性のガラス、金属表面まで、様々な材料表面に対して高い付着性を示す非病原性のグラム陰性細菌である。他の微生物では報告例のないこのような付着特性をもたらす因子として、細菌細胞表層に存在する新規のバクテリオナノファイバーを発見し、さらにナノファイバーを構成する新しい蛋白質を同定した。この蛋白質は三量体オートトランスポーターアドヘシン(TAA)ファミリーに属しており、本発明者がAtaAと名付けた(非特許文献1)。TAAは種々のグラム陰性病原性細菌が宿主の細胞やコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンといった細胞外マトリックスに特異的に接着し、宿主に感染するために有する病原性因子として知られている(非特許文献2)。TAAファミリーに属する蛋白質はホモ三量体を形成し、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、シグナルペプチド-ヘッド-ネック-ストーク-メンブレンアンカーという共通の基本構造をとる。メンブレンアンカードメインはトランスロケータドメインともいい、外膜にベータバレルを形成し、ペリプラズムでシグナルペプチドが切断された後のヘッド-ネック-ストークから成るパッセンジャードメインを細胞外に輸送、ファイバーとして細胞表層に提示させる機能を有する。パッセンジャードメインのヘッド側がファイバーの先端になり、成熟蛋白質のアミノ末端側にあたる。しかしTAAには、シングルペプチド鎖のアミノ酸残基数が300ほどの小さなものから3000を超える大きなものまで存在し、アミノ酸配列、特にパッセンジャードメインを構成するドメインやモチーフの種類と並びは多様である。本発明者が見つけたAtaAのペプチド鎖は3630アミノ酸から成り、TAAの中でも最大級である。長いストークに複数の長い繰返し配列がモザイク状に並ぶユニークな一次構造をしている。この繰返し配列は、何種類ものモチーフが反復、混在して形成されている。ヘッドもファイバーの先端以外にストークの途中、メンブレンアンカー寄りにもう一つ繰り返す。そして、AtaAのみが様々な表面に対し非特異的で高い接着性を示す。また、TAAの研究は病原性細菌に集中しており、Tol 5のような非病原性細菌についてのTAAの研究例は皆無である。以上の研究成果に基づき、本発明者は、AtaAをコードする遺伝子を導入することによって標的微生物に非特異的付着性及び/又は凝集性を付与又は増強する方法を報告した(特許文献1)。尚、特許文献1ではAtaA及びそれをコードする遺伝子(ataA遺伝子)をそれぞれAa dA及びaadA遺伝子と呼称していた。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 3 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 4 2 8 1 号パンフレット

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 4 】

【 非特許文献 1 】 Ishikawa, M.; Nakatani, H.; Hori, K., AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from Acinetobacter sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces. PLoS One 2012, 7, (11), e48830.

【 非特許文献 2 】 Linke, D.; Riess, T.; Autenrieth, I. B.; Lupas, A.; Kempf, V. A., Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. Trends Microbiol. 2006, 14, (6), 264-270.

【 非特許文献 3 】 Bentancor LV et al. Camacho J Bacteriol. 2012 Aug;194(15):3950-60

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 5 】

TAAは一種類のペプチドで細胞表層への自己分泌が可能であり、細胞表層に完全なファイバーを形成する。中でも、アシネトバクター属細菌のTAA(特にAtaA)は標的微生物の固定化や凝集に有用である上に、250nmとTAAの中で最長レベルのファイバーであることが

ら、長さを活かした機能性ナノファイバーとして、更なる用途の拡大が期待できる。本発明は、TAA（特にアシネトバクターのTAA）に接着/凝集以外の機能を持たせること、また新たな機能をもつファイバーで被覆された微生物を得ることを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題に鑑み、鋭意検討の結果、ニッケルやカドミウムなどの2価イオンに高親和性のHisタグをはじめ、様々な機能性ペプチドや蛋白質をTAAファイバーに導入し、標的微生物の表層に提示させることに成功した。即ち、付着や凝集とは異なる機能を備えるTAAファイバー（以下、「機能性ファイバー」とも呼ぶ）を細胞表面に発現した微生物（以下、「被毛微生物」とも呼ぶ）を作製することに成功した。また、ファイバーの長さを変えることによつて、機能分子（機能性ペプチドや蛋白質）の提示位置を変化させることにも成功した。即ち、機能分子の提示距離を調整可能であることを実証した。さらには、ファイバーに導入したプロテアーゼ認識配列を利用することによつて、機能性ファイバーの切断及び回収にも成功した。

以下の発明は、主として上記の成果に基づく。

[1] 三量体オートトランスポーターアドヘシン又はその一部にペプチド又は蛋白質からなる機能分子が挿入、結合又は融合してなる機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物。

[2] 前記三量体オートトランスポーターアドヘシンが、アシネトバクター属微生物の三量体オートトランスポーターアドヘシンである、[1]に記載の微生物。

[3] 前記三量体オートトランスポーターアドヘシンが、アシネトバクターsp. Tol5株のAtaAである、[1]に記載の微生物。

[4] 前記微生物がグラム陰性菌である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の微生物。

[5] 前記微生物がガンマプロテオバクテリアである、[1]～[3]のいずれか一項に記載の微生物。

[6] 前記微生物がアシネトバクター又は大腸菌である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の微生物。

[7] 前記機能分子が、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子である、[1]～[6]のいずれか一項に記載の微生物。

[8] 前記機能分子が、Hisタグ、FLAGタグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、-グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である、[1]～[6]のいずれか一項に記載の微生物。

[9] 前記機能分子が、プロテアーゼ認識配列、或いは、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子とプロテアーゼ認識配列の組合せ、からなる、[1]～[6]のいずれか一項に記載の微生物。

[10] 前記機能分子が、Hisタグ、FLAGタグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、-グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である[9]に記載の微生物。

[11] 三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードするDNAに、ペプチド又は蛋白質からなる機能分子をコードするDNAが挿入又は付加されてなる機能性ファイバーDNAを、標的微生物に導入するステップ、を含む、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物の作製方法。

[12] 三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードする前記DNAが、アシネトバクター属微生物の三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードするDNAである、[11]に記載の作製方法。

[13] 三量体オートトランスポーターアドヘシンをコードする前記DNAが、アシネトバクターsp. Tol5株のAtaAをコードするDNAである、[11]に記載の作製方法。

[14] アシネトバクターsp. Tol5株のAtaAをコードする前記DNAが、以下の(a)～(d)

10

20

30

40

50

のいずれかのDNAである、[ 1 3 ]に記載の作製方法：

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNA、

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNAと70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードするDNA、

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードするDNA、

(d) 配列番号 1 で表される塩基配列のシグナルペプチドに相当する部位(1~177位)を残し、その後ろからヘッドドメインのコード領域直前(322位)の間(即ち、178位から322位の間)、より好ましくは310位までの間(即ち、178位から310位までの間)から連続する数百から数千塩基を削った塩基配列からなるDNA。

10

[ 1 5 ] 前記機能的ファイバーDNAと一緒に、以下の(A)~(C)のいずれかのDNAも前記標的微生物に導入する、[ 1 2 ] ~ [ 1 4 ] のいずれか一項に記載の作製方法：

(A) 配列番号 3 で表される塩基配列からなるDNA、

(B) 配列番号 3 で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNA、

(C) 配列番号 3 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

[ 1 6 ] 前記機能分子が、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子である、[ 1 1 ] ~ [ 1 5 ] のいずれか一項に記載の作製方法。

20

[ 1 7 ] 前記機能分子が、Hisタグ、FLAGタグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である、[ 1 1 ] ~ [ 1 5 ] のいずれか一項に記載の作製方法。

[ 1 8 ] 前記標的微生物がグラム陰性菌である、[ 1 1 ] ~ [ 1 7 ] のいずれか一項に記載の作製方法。

[ 1 9 ] 前記標的微生物がガンマプロテオバクテリアである、[ 1 1 ] ~ [ 1 7 ] のいずれか一項に記載の作製方法。

[ 2 0 ] 前記標的微生物がアシネトバクター又は大腸菌である [ 1 1 ] ~ [ 1 7 ] のいずれか一項に記載の作製方法。

[ 2 1 ] [ 1 1 ] ~ [ 2 0 ] のいずれか一項に記載の作製方法で得られた、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物。

30

[ 2 2 ] [ 9 ]、[ 1 0 ] 又は [ 2 1 ] に記載の微生物から回収された、機能性ファイバー。

[ 2 3 ] 以下のステップ(1)及び(2)を含む、機能性ファイバーの回収方法：

(1) [ 9 ]、[ 1 0 ] 又は [ 2 1 ] に記載の微生物に対して、前記プロテアーゼ認識配列を認識するプロテアーゼを作用させるステップ、

(2) 切断された機能性ファイバーを回収するステップ。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 7 】

【図 1】全長AtaAおよび短縮AtaAへのHisタグの挿入。図示の方法に従って、Hisタグを導入したAtaAファイバー用のコンストラクトを作製した。

40

【図 2】AtaAファイバー中のHisタグ挿入位置。図において強調した5箇所Hisタグを挿入した。

【図 3】FLAGタグつきAtaAの作製。図示の方法に従って、FLAGタグで標識されたAtaAファイバー用のコンストラクトを作製した。

【図 4】ソルターゼ A 認識配列のAtaAへの導入。図示の方法に従って、ソルターゼ A 認識配列を導入したAtaAファイバー用のコンストラクトを作製した。

【図 5】HRV3Cプロテアーゼ認識配列を持つAtaAの作製。図示の方法に従って、HRV3Cプロテアーゼ認識配列を導入したAtaAファイバー用のコンストラクトを作製した。

【図 6】eGFP又はtfu0937ベータグルコシダーゼ(BGL)融合AtaAコンストラクトの作製。

50

図示の方法に従って、eGFP又はtfu0937ベータグルコシダーゼが融合したAtaAファイバー用のコンストラクトを作製した。

【図7】eGFP又はtfu0937ベータグルコシダーゼ（BGL）融合AtaAファイバーの一次構造の模式図。

【図8】機能性ファイバー被毛微生物のフローサイトメトリー解析。（a）Hisタグを導入したAtaAファイバー遺伝子を発現する微生物をフローサイトメトリー（抗Hisタグ抗体を使用）で解析した。（b）FLAGタグで標識したAtaAファイバー遺伝子を発現する微生物をフローサイトメトリー（抗FLAGタグ抗体を使用）で解析した。

【図9】機能性ファイバー被毛微生物のフローサイトメトリー解析。（a）ソルターゼA認識配列を導入したAtaAファイバー遺伝子を発現する微生物をフローサイトメトリー（抗stalk抗体を使用）で解析した。（b）HRV3Cプロテアーゼ認識配列を導入したAtaAファイバー遺伝子を発現する微生物をフローサイトメトリー（抗stalk抗体を使用）で解析した。

【図10】被毛の長さの調整。Hisタグの提示位置を変えてAtaAファイバーを導入した。（a）は電子顕微鏡像、（b）は電子顕微鏡像から算出したファイバーの長さを比較したグラフ。

【図11】（a）Hisタグを導入したAtaAファイバー被毛微生物のNi-セファロースビーズへの結合。（b）同微生物のエステラーゼ活性。（c）HRV3Cプロテアーゼで切断、回収された機能性AtaAファイバー。

【図12】機能性ファイバー被毛微生物（大腸菌）のフローサイトメトリー解析。（a）Hisタグを導入したAtaAファイバー遺伝子を発現する大腸菌をフローサイトメトリー（抗Hisタグ抗体を使用）で解析した。（b）Hisタグを導入したAtaAファイバー被毛大腸菌のNi-セファロースビーズへの結合。（c）Hisタグを導入したAtaAファイバー被毛大腸菌（JCM20137 (Tfu0937-BLC):: His-tagged AtaA)のベータグルコシダーゼ活性。Ni-セファロースビーズ上に結合した状態で活性を測定した。

【図13】tfu0937ベータグルコシダーゼを融合したAtaAファイバー被毛微生物のフローサイトメトリー解析。

【図14】（a）eGFPを融合したAtaAファイバー被毛微生物のフローサイトメトリー解析。（b）同微生物が発する蛍光（緑色）。

【図15】tfu0937ベータグルコシダーゼを融合したAtaAファイバー被毛微生物（4140株）のベータグルコシダーゼ活性。

【図16】（a）Hisタグを導入したAtaAファイバー被毛微生物についてのウエスタンブロット解析。（b）HRV3Cプロテアーゼ認識配列を導入したAtaAファイバー被毛微生物についてのウエスタンブロット解析。（c）tfu0937ベータグルコシダーゼを融合したAtaAファイバー被毛微生物についてのウエスタンブロット解析。

【図17】ソルターゼA（Srt）によるYpet蛍光蛋白質連結反応のスキーム（上）。フローサイトメトリー解析の結果（左下）。レーザー蛍光顕微鏡解析の結果（右下）。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明の第1の局面は機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物に関する。本発明では、TAAの本来の機能とは別の機能が付与されていることを表現するために用語「機能性」を使用する。従って、本発明の機能性ファイバーは、TAAに特徴的な本来の機能とは別の機能を発揮する。例えば、アシネトバクター属微生物TAAを用いた場合には接着性/凝集性以外の機能を発揮する。本発明の機能性ファイバーでは、機能分子としてのペプチド及び/又は蛋白質がTAAファイバーに挿入、結合又は融合しており、当該ペプチド及び/又は蛋白質が所望の機能を発揮する。

【0009】

オートトランスポーターアドヘシンとは、グラム陰性細菌の持つ接着性ナノファイバーとして報告されている蛋白質であり、宿主の組織や細胞表面分子、細胞外マトリックスと特異的に相互作用することが知られている。オートトランスポーターアドヘシンは、付着

10

20

30

40

50

、浸入、細胞毒性、血清耐性、細胞間伝播といった機能を持つと言われている。オートトランスポートアドヘシンは、N末端シグナルペプチド、内部パッセンジャードメイン、C末端トランスロケータードメインという共通の領域編成を持っている。その中でもC末端トランスロケータードメインはこの属を定義するドメインである。オートトランスポートアドヘシンの分泌はシグナルペプチドによって開始され、Secシステムによる内膜の通過から始まる。続いて、トランスロケータードメインが外膜へ挿入され、バレル構造を形成する。最終的にパッセンジャードメインはバレルで形成されたトンネル内を通過し菌体表面へその姿を現す。オートトランスポートアドヘシンは、単量体オートトランスポートアドヘシンと三量体オートトランスポートアドヘシン (TAA) に分類される (Shane E.Cotter, Neeraj K.Surana and Joseph W.St Gemelli 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of Autotransporter proteins. *TRENDS in Microbiology*. 13:199-205)。単量体オートトランスポートアドヘシンのトランスロケータードメインは、12の膜貫通逆平行シートからなるバレル構造を、一つのサブユニットから形成していると考えられている。しかしTAAのトランスロケータードメインは、外膜中で三量体を形成しており、4つのシートを持つサブユニットがオリゴマー化し三つのサブユニットから12ストランドのバレル構造を形成していることが知られている。さらに、事実上全ての単量体オートトランスポートアドヘシンのパッセンジャードメインはトランスロケータードメインと非共有結合でバクテリア表面につながるか、細胞外に放出されるのに対し、全てのTAA蛋白質ではパッセンジャードメインはトランスロケータードメインと共有結合でつながれたままであると考えられている。よってTAAでは、トランスロケータードメインは、パッセンジャードメインを細胞外膜につなぎとめるメンブレンアンカードメインでもある。また、シグナルペプチドを切り取られた後に細胞外に出るパッセンジャードメインは、成熟蛋白質のアミノ末端であるファイバー先端から、ヘッドドメイン、ネックドメイン、ストロウドメインと各種ドメイン構造が連なったファイバーを構成する。さらにストロウドメインは、コイルドコイルを基本に、Trpリング、GIN、DALL、FGG、HANSなどのモチーフ構造を複数含むが、その種類と数、アミノ酸配列はTAAによって実にさまざまであり、この蛋白質ファミリーを多様なものとしている。通常、ネックドメインも複数回繰り返して出現する。また稀ではあるがTAAによっては、ヘッドドメインも複数回出現する。

10

20

30

#### 【0010】

三量体オートトランスポートアドヘシンは、TAA (トリメリックオートトランスポートアドヘシン) と略称され、共通オリゴマー構造のコイルドコイルをつくる新しいクラスとしてOcaファミリー (Oligomeric Coiled-coil Adhesin Family) とも呼ばれている (Andreas Roggenkamp, Nikolaus Ackermann, Christoph A. Jacobi, Konrad Truelzsch, Harald Hoffmann, and Jurgen Heesemann 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol*. 185:3735-3744)。

40

#### 【0011】

本発明では、TAA又はその一部 (即ち短縮物) が用いられる。TAAの由来 (例えばアシネトバクター属、エシェリヒア属、エルシニア属、ヘモフィルス属) は特に限定されない。好ましくは、アシネトバクター属微生物のTAAを用いる。アシネトバクター属微生物TAAとしてはAtaA (アシネトバクター sp. To15株のTAA: 特許文献1を参照) やAta (非特許文献3を参照) 等の報告があるが、好ましくは、AtaAを用いる。AtaAの由来であるアシネトバクター sp. To15株は非病原性菌であり、この特徴は、本発明の産業上利用を図る上で重要である。

#### 【0012】

本発明では、機能分子としてペプチド又は蛋白質が用いられる。機能分子としてのペプチドの例はタグ分子 (例えばHisタグ、FLAGタグ、HAタグ、Mycタグ、Eタグ、T7タグ、Pkタグ、VSV-Gタグ、Strepタグ、ZZ-タグ、Spyタグ、エピトープタグ)、酵素認識配列 (例えばソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、トランスグルタミナーゼ認識配列、TEVプロ

50



テアーゼ認識配列、ビオチンリガーゼ認識配列 (Aviタグ) ) である。同様に、機能分子としての蛋白質の例は酵素 (例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、エステラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルカナナーゼ、グルタミナーゼ、イソメラーゼ、デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、フォスファターゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、脱塩素化酵素、オキシゲナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、リゾチーム、セロビオース、エンドグルカナナーゼ、ヒドロキシラーゼ、セロビオハイドロラーゼ、ラッカーゼ、リアーゼ)、蛍光蛋白質 (緑色蛍光蛋白質 (GFP及びその改変体など)、赤色蛍光蛋白質 (RFP及びその改変体など)、黄色蛍光蛋白質 (YFP及びその改変体など))、抗原 (細胞表面マーカーなど)、電子伝達系蛋白質 (シトクローム、フェレドキシン、フラビン蛋白質など)、受容体蛋白質 (細胞表面受容体など) である。機能分子の具体例を以下に示す。

Hisタグの一例: HHHHHH (配列番号 7)

FLAGタグ: DYKDDDDK (配列番号 8)

ソルターゼ (SrtA) 認識配列: LPETGGGGG (配列番号 9)

Thermobifida fusca由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼ: 配列番号 10

eGFP: 配列番号 11

#### 【0013】

機能性ファイバーには1種類又は2種類以上の機能分子が導入される。また、機能性ファイバー1分子あたりの機能分子の数も特に制限はない。即ち、機能性ファイバー1分子あたりに1又は複数の機能分子が導入される。

#### 【0014】

機能性ファイバーにおける機能分子の結合又は融合の位置は目的に応じて設計ないし調整可能である。

#### 【0015】

一態様では、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子とプロテアーゼ認識配列の組合せを機能分子として採用する。この態様の微生物では、プロテアーゼ認識配列に加えて、別の機能分子が導入された機能性ファイバーが細胞表面に発現する。このような微生物からは、プロテアーゼ認識配列を機能分子として採用した場合 (即ち、プロテアーゼ認識配列が導入された機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物) と同様に、使用したプロテアーゼ認識配列を認識するプロテアーゼを作用させることにより、機能性ファイバーを切断ないし回収することが可能となる (詳細は後述する)。

#### 【0016】

本発明の微生物は以下の方法、即ち、TAA又はその一部をコードするDNA (以下、「ファイバーDNA」とも呼ぶ) に、ペプチド又は蛋白質からなる機能分子をコードするDNA (以下、「機能分子DNA」とも呼ぶ) が挿入又は付加されてなる機能性ファイバーDNAを標的微生物に導入するステップ、を含む方法、によって作製することができる。

#### 【0017】

ファイバーDNAとしては、好ましくは、アシネトバクター sp.Tol5株から単離・同定されたataA遺伝子が用いられる。ataA遺伝子は配列番号1で表される塩基配列からなり、配列番号2で表される蛋白質AtaAをコードする。アシネトバクター sp.Tol5株は、排ガス処理リアクターから分離されたトルエン分解能を有する株であり、受託番号FERM P-17188として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (NITE IPOD) (日本国茨城県つくば市東1-1-1つくばセンター中央第6) に寄託されている。

#### 【0018】

好ましい一態様では配列番号1で表される塩基配列からなるDNAがファイバーDNAとして採用されるが、該DNAと機能的に同等のDNAを用いることにしてもよい。配列番号1で表される塩基配列からなるDNAと機能的に同等のDNAとしては、配列番号1で表される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性 (又は同一性) を有する塩基配列からなり、細胞外に

10

20

30

40

50

分泌されてファイバー構造物を形成するDNAが挙げられる。あるいは、配列番号1で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成するDNAが挙げられる。

【0019】

別の好ましい態様では、配列番号1で表される塩基配列のシグナルペプチドに相当する部位(1~177位)を残し、その後ろからヘッドドメインのコード領域直前(322位)の間(即ち、178位から322位の間)、より好ましくは310位までの間(即ち、178位から310位までの間)から連続する数百から数千塩基を削った塩基配列からなるDNAがファイバーDNAとして採用される。このDNAは、AtaAが形成するファイバーの先端(成熟蛋白質のアミノ末端)または先端付近からファイバー長の8割ほど(約3000アミノ酸)の間の任意の長さを削って短くしたファイバーを形成する。該DNAと機能的に同等のDNAを用いることとしてもよい。該DNAと機能的に同等のDNAとしては、該DNAの塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性(又は同一性)を有する塩基配列からなり、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードするDNAが挙げられる。あるいは、該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードするDNAが挙げられる。

10

【0020】

ストリンジентな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、低ストリンジентな条件及び高ストリンジентな条件が挙げられるが、高ストリンジентな条件が好ましい。低ストリンジентな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42、5×SSC、0.1% SDSで洗浄する条件であり、好ましくは50、5×SSC、0.1% SDSで洗浄する条件である。高ストリンジентな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば65、0.1×SSC及び0.1% SDSで洗浄する条件である。

20

【0021】

塩基配列における変異はシグナルペプチド、ヘッドドメイン、及びメンブレンアンカドメインの各ドメイン構造を維持するものであることが好ましい。同時に、ストロクドメインに含まれる各モチーフ構造を維持するものであることが好ましい。配列番号1で表される塩基配列において、シグナルペプチドは1~177位の塩基に相当し、ヘッドドメインは322~888位及び8989~9450位の塩基に相当し、ストロクドメインは946~8988位及び9508~10671位の塩基に相当し、メンブレンアンカドメインは10672~10890位の塩基に相当する。

30

【0022】

TAAの一部をコードするDNAの具体例は後述の実施例に示される。即ち、後述の実施例に示すNHIsBでは、配列番号1の塩基配列における301位~1020位の領域を削除したDNAをファイバーDNAとして使用している。同様に、NHIsCでは301位~4728の領域、NHIsDでは301位~7563位の領域を削除したDNAをファイバーDNAとして使用している。

【0023】

アシネトバクター属微生物TAAをコードするDNAとともに、配列番号3で表される塩基配列からなるDNAを標的微生物に導入することにより、標的微生物における機能性ファイバーの形成能をさらに向上させることができる。配列番号3で表される塩基配列からなるDNAと機能的に同等の遺伝子を導入してもよい。配列番号3で表される塩基配列からなるDNAと機能的に同等のDNAとしては、配列番号3で表される塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAが挙げられる。あるいは、配列番号3で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAが挙げられる。尚、配列番号3で表される塩基配列は、To15株のAtaA遺伝子のすぐ下流に見出された配列であり、グラム陰性細菌が有する外膜蛋白質ompA遺伝子やBamE遺伝子、omIA遺伝子などと相同性を示す蛋白質のORFをコードする。当該ORFであるTo15-OmlT(特許文献1ではTo15-OmpAと称されていた)は795

40

50

bpの遺伝子（配列番号3）でコードされる264アミノ酸（配列番号4）からなる。

【0024】

オートトランスポーターアドヘシンをコードするDNAを含むオペロンを標的微生物に導入してもよい。例えば、配列番号5で表される塩基配列からなるDNAを標的微生物に導入することにより、オートトランスポーターアドヘシンをコードするDNAとともに上記外膜蛋白質をコードするDNAを標的微生物に導入することができる。該オペロンと機能的に同等のオペロンを導入してもよい。機能的に同等のオペロンとしては、配列番号5で表される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなり、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質とその機能を促進する蛋白質をコードするDNAからなるオペロンが挙げられる。配列番号5で表される塩基配列はTo15株から単離・同定されたオペロン（ataA-omITオペロン）であり、プロモーター/リボソーム結合部位（1～106位）、ataA遺伝子（107～10999位）及びTo15-omIT遺伝子（11064～11858位）を含む。尚、当該オペロンを組み込んだベクターで形質転換したE.coli DH5 は、「DH5 -XLTOPO::aadA-ompA」として、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（N P M D）（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に受託番号NITE BP-490（受託日2008年（平成20年）2月19日）として寄託されている。

10

【0025】

標的微生物には様々な微生物を用いることができる。標的微生物は野生株、変異株、遺伝子組換え株のいずれであってもよい。本発明の用途に応じて適切な微生物が選択される。好ましくはグラム陰性菌を、さらに好ましくはガンマプロテオバクテリアを標的微生物とする。標的微生物として利用し得る微生物を例示すると、エシェリヒア（*Escherichia*）属細菌、例えば、エシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）、アシネトバクター（*Acinetobacter*）属細菌、例えばアシネトバクター カルコアセチカス（*Acinetobacter calcoaceticus*）、エンテロバクター（*Enterobacter*）属細菌、例えばエンテロバクター アエロゲネス（*Enterobacter aerogenes*）、ラルストニア（*Ralstonia*）属細菌、例えばラルストニア ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）属細菌、例えばシュードモナス プチダ（*Pseudomonas putida*）、シュードモナス フルオレセンス（*Pseudomonas fluorescens*）、アエロモナス（*Aeromonas*）属細菌、例えばアエロモナス キャピエ（*Aeromonas caviae*）、アルカリゲネス（*Alcaligenes*）属細菌、例えばアルカリゲネス レータス（*Alcaligenes latus*）、ザントモナス（*Xanthomonas*）属細菌、例えばザントモナス カンペストリス（*Xanthomonas campestris*）、デスルフォモナイル（*Desulfomonile*）属細菌、例えばデスルフォモナイル ティージェイ（*Desulfomonile tiedjei*）、デスルフォモナス（*Desulfuromonas*）属細菌、例えばデスルフォモナス クロロエテニカ（*Desulfuromonas chloroethenica*）、クロモバクテリウム（*Chromobacterium*）属細菌、例えばクロモバクテリウム チョコラチウム（*Chromobacterium chocolateum*）、パークホルデリア（*Burkholderia*）属細菌、例えばパークホルデリア アルボリス（*Burkholderia arboris*）、ロドバクター（*Rhodobacter*）属細菌、アシドボラックス（*Acidovorax*）属細菌、例えばアシドボラックス ファシリス（*Acidovorax facilis*）、ザイモモナス（*Zymomonas*）属細菌、例えばザイモモナス・モビリス（*Zymomonas mobilis*）である。中でも、エシェリヒア コリ（大腸菌）とアシネトバクターは好適な標的微生物である。

20

30

40

【0026】

ファイバーDNAに、ペプチド又は蛋白質からなる機能分子をコードするDNA（機能分子DNA）を挿入又は付加することにより、機能性ファイバーDNAが構築される。ファイバーDNA 1分子あたりの機能分子DNAの挿入又は付加数は1又は2以上（これに限定されるものではないが、例えば2分子～10分子）である。挿入位置は、ファイバーDNAの発現産物（アシネトバクター属微生物TAA）の重要な立体構造、即ち、ファイバー構造に影響のない位置が好ましい。この観点から、Trpリングドメイン（配列番号1で表される塩基配列において1528～1656、1885～2013、2431～2559、2788～2916、3334～3462、3691～3819位の

50

塩基に相当する)、ヘッドドメイン(配列番号1で表される塩基配列において322~888位及び8989~9444位の塩基に相当する)、メンブレンアンカードメイン(配列番号1で表される塩基配列において10672~10890位の塩基に相当する)に対応する位置を避けて挿入位置を決定するとよい。一方、機能分子DNAの発現産物の機能が発揮し易くするためには、ファイバーDNAの上流側領域に機能分子DNAを挿入するとよい。このようにすれば、微生物の細胞表面から離れた位置に機能分子を提示させることができる。例外的に、後に機能性ファイバーを回収するために機能分子としてプロテアーゼ認識配列を採用する場合(その他の機能分子と併用する場合を含む)には、中央領域から下流側領域(但し、機能性ファイバーの切り出しを考慮し、メンブレンアンカードメインを除く部分)に機能分子DNAである、プロテアーゼ認識配列をコードするDNAを挿入するとよい。特に好ましい態様の一つでは、シグナルペプチドをコードする配列の直後に機能分子DNAを挿入する。ここでの上流領域とは、ファイバーDNAの5'側末端から全長の約1/3に相当する位置までの領域(配列番号1のDNAにおいては3700位塩基までの領域が相当する)、好ましくは5'側末端から全長の約1/4に相当する位置までの領域、更に好ましくは5'側末端から全長の約1/5に相当する位置までの領域である。同様に、下流側領域とは、ファイバーDNAの3'側末端から全長の約1/3に相当する位置までの領域(配列番号1のDNAにおいては7260位塩基までの領域が相当する)、好ましくは3'側末端から全長の約1/4に相当する位置までの領域、更に好ましくは3'側末端から全長の約1/5に相当する位置までの領域である。また、中央領域とは、上流側領域と下流側領域に挟まれた領域である。

10

20

30

40

50

#### 【0027】

上述の通り、本発明では、機能分子として、タグ分子(例えばHisタグ、FLAGタグ、HAタグ、Mycタグ、Eタグ、T7タグ、Pkタグ、VSV-Gタグ、Strepタグ、ZZ-タグ、Spyタグ、エピトープタグ)、酵素認識配列(例えばソルターゼ認識配列、HRV 3C認識配列、トランスグルタミナーゼ認識配列、TEVプロテアーゼ認識配列、ピオチンリガーゼ認識配列(Aviタグ))などのペプチド、或いは酵素(例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、エステラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルカナーゼ、グルタミナーゼ、イソメラーゼ、デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、フォスファターゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、脱塩素化酵素、オキシゲナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、リゾチーム、セロピオース、エンドグルカナーゼ、ヒドロキシラーゼ、セロピオハイドロラーゼ、ラッカーゼ、リアーゼ)、蛍光蛋白質(緑色蛍光蛋白質(GFP及びその改変体など)、赤色蛍光蛋白質(RFP及びその改変体など)、黄色蛍光蛋白質(YFP及びその改変体など)、抗原(細胞表面マーカーなど)、電子伝達系蛋白質(シトクローム、フェレドキシン、フラビン蛋白質など)、受容体蛋白質(細胞表面受容体など)など)などの蛋白質が用いられる。従って、このようなペプチド又は蛋白質をコードするDNAを機能分子DNAとして用意することになる。機能分子DNAの配列の具体例を以下に示す。

Hisタグの一例: CAT CAT CAC CAT CAT CAC (配列番号12)

FLAGタグ: GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG (配列番号13)

ソルターゼ(SrtA)認識配列: TTG CCT GAG ACA GGA GGC GGT GGA GGC (配列番号14)

Thermobifida fusca由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ: 配列番号15

eGFP: 配列番号16

#### 【0028】

1種類又は2種類以上の機能分子DNAがファイバーDNAに挿入されることになる。一態様では、コードする分子が異なる2種類以上の機能分子DNAが併用される。当該態様によれば、2種類以上の機能が付加された機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物を得ることができる。

#### 【0029】

一態様では、後に機能性ファイバーを切断ないし回収することを可能にするために、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質が

らなる群より選択される一又は二以上の機能分子をコードするDNAと、プロテアーゼ認識配列をコードするDNAを併用する。

【0030】

機能分子DNAが挿入されたファイバーDNA（機能性ファイバーDNA）を標的微生物に導入して形質転換することにより、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物が得られる。典型的には、機能性ファイバーDNAを適当なベクターに連結し、該ベクターで標的微生物（宿主微生物）を形質転換することにより、機能性ファイバーを細胞表面に発現する微生物を得ることができる。具体的には、宿主微生物に該DNAを多コピーにて導入したり、構成的に発現するプロモーター支配下に該DNAを連結したり、又は誘導酵素系プロモーター支配下に該DNAを連結したりして、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物を得ることができる。

10

【0031】

まず、目的のDNAをベクター中に連結し、組換えベクターを製造する。上記ベクターには、宿主細胞で自律的に増殖し得るファージ、コスミド、人工染色体又はプラスミドが使用されるほかに、例えば、プラスミドを発現カセットとして染色体に導入するような場合にはその発現カセットの構築に必要な宿主（例えば、大腸菌）での自律複製能は必要だが、その発現カセットを導入する宿主（例えば、アシネトバクター属細菌）での自律複製能は必ずしも必要でない。これらの組換えベクターは例えば、大腸菌とアシネトバクター属細菌の両方で使用可能なように設計したシャトルベクター等も使用可能である。

20

【0032】

プラスミドとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pET21a(+)、pET32a(+)、pET39b(+)、pET40b(+)、pET43.1a(+)、pET44a(+)、pKK223-3、pGEX4T、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、大腸菌-アシネトバクター間シャトルベクタープラスミドpARP3などが挙げられ、ファージDNAとしてはファージ（gt11、ZAP等）が挙げられる。また、クローニング、シーケンス確認用にpCR4-TOPO（登録商標）などの市販のクローニング用ベクターを用いてもよい。

【0033】

ベクターにDNAを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。例えば、目的のDNAは、通常知られている方法により合成することができ、ベクターに組み込むため、適当な制限酵素の切断部位を両末端に含むように、プライマーを用いてPCR法により増幅してもよい。PCR反応の条件は、当業者が適宜決定することができる。

30

【0034】

その他、組換えベクターには、プロモーター及び機能性ファイバーDNAに加えて、必要に応じてエンハンサーなどのシスエレメント、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）などが連結されていてもよい。選択マーカーの例としては、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールなどの薬剤耐性マーカー、ロイシン、ヒスチジン、リジン、メチオニン、アルギニン、トリプトファン、ウラシルなどの栄養要求性マーカーが挙げられるがこれに限定されない。

40

【0035】

プロモーターは、特に制限されず、宿主微生物に応じて当業者が適宜選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、 $\lambda$ -PLプロモーターなどが使用できる。配列番号6で表される塩基配列からなるプロモーター、及びそれと機能的に同等のプロモーター、例えば、配列番号6で表される塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなるプロモーターも好適に用いられる。

【0036】

機能性ファイバーDNAとベクター断片とを連結させるには公知のDNAリガーゼを用いるとよい。そして、機能性ファイバーDNAとベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ

50

、組換えベクターを作製する。好ましくは市販のライゲーションキット、例えば、ライゲーションhigh（東洋紡株式会社製）を用いて、規定の条件にてライゲーション反応を行うことにより組換えベクターを得ることができる。

【0037】

クローニング、連結反応、PCR等を含む組換えDNA技術は、例えば、Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press (1989) 及び Short Protocols In Molecular Biology, Third Edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. に記載されるものを利用することができる。

【0038】

得られたベクターを、必要であればボイル法、アルカリSDS法、磁性ビーズ法及びそれらの原理を使用した市販されているキット等により精製し、さらに例えばエタノール沈殿法、ポリエチレングリコール沈殿法などの濃縮手段により濃縮することができる。

【0039】

標的微生物への組換えベクターの導入方法は、特に限定されないが、例えばカルシウムイオンを用いるヒートショック法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0040】

目的のDNAを含む形質転換微生物は、その組換えベクターが有するマーカー遺伝子により、例えば、アンピシリン、カナマイシンなどの抗生物質を含むLB培地寒天プレート上でコロニーを形成することにより選抜することができるが、クローニングされた宿主微生物が組換えベクターにより形質転換されたものかどうかを確認するため、一部を用いて、PCR法によるインサートの増幅確認、又はシーケンサーを用いたダイデオキシ法による配列解析をしてもよい。自律複製可能なプラスミドを導入する形式の他に、染色体の遺伝子と相同な領域をベクター内に配置し、相同組換えを起こさせて目的遺伝子を導入させる染色体組み込み型の導入方法を使用してもよい。

【0041】

得られた形質転換微生物を培地で培養する方法は、標的微生物の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌等の微生物を宿主として得られた形質転換微生物を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換微生物の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。具体的には、M9培地、M9G培地、BS培地、LB培地、Nutrient Broth培地、肉エキス培地、SOB培地、SOC培地等が挙げられる。

【0042】

炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコースなどの糖類、グリセリンなどのポリオール類、メタノール、エタノールなどのアルコール類、又はピルビン酸、コハク酸、クエン酸若しくは乳酸等の有機酸類の他、脂肪酸類や油脂などを使用することができる。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物、メチルアミンなどのアルキルアミン類、又はアンモニア若しくはその塩などを使用することができる。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミン、消泡剤なども必要に応じて使用してもよい。また、イソプロピル - D - チオガラクトピラノシドなどの蛋白質発現誘導剤を必要に応じて培地に添加してもよい。

【0043】

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、好ましくは0~40℃、より好ましくは10~37℃、特に好ましくは15~37℃で行う。培養期間中、培地のpHは宿主の発育が可能で、オートトランスポートアダプシンの活性が損なわれない範囲で適宜変更することができるが、好ましくはpH4~8程度の範囲である。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイク

10

20

30

40

50

リン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0044】

上記のようにして、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物を得ることができる。

【0045】

以上の方法にて作製した被毛微生物から機能性ファイバーを切り出すことにより、機能性ファイバーを回収することができる。そこで本発明の更なる局面は、機能性ファイバーの回収方法及び回収した機能性ファイバーに関する。この局面では、プロテアーゼ認識配列が結合又は融合した機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物、或いは、プロテアーゼ認識配列に加えて、他の機能分子（タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原など）が結合又は融合した機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物が用いられる。即ち、細胞表面を覆う機能性ファイバーにプロテアーゼ認識配列が組み込まれている微生物を用意する。そして、当該微生物に対して、当該プロテアーゼ認識配列を認識するプロテアーゼを作用させる。例えば、プロテアーゼ認識配列としてHRV 3C認識配列を採用した場合には、HRV 3Cプロテアーゼ又は同様の活性（基質の認識及び切断）を示すプロテアーゼを作用させればよい。各種プロテアーゼが市販されており、適切なプロテアーゼは容易に入手することが可能である。反応条件は、添付の操作マニュアル（市販品を利用する場合）や過去の報告等を参考にすればよい。

10

【0046】

プロテアーゼを作用させた後、切断された機能性ファイバーを回収する。回収には硫酸沈殿、密度勾配遠心分離等を利用することも可能であるが、簡便且つ効率的な回収のためには、タグ分子（例えばHisタグ、FLAGタグ）を利用することが好ましい。タグ分子を利用する場合には、タグ分子が組み込まれるように機能性ファイバーを設計しておけばよい（即ち、プロテアーゼ認識配列（或いはプロテアーゼ認識配列と他の機能分子）に加えてタグ分子も含む機能性ファイバーが発現するようにする）。タグ分子を利用した機能性ファイバーの回収操作の一例（Hisタグを利用した場合）を示すと、プロテアーゼを作用させた後の培養液をNiが固定化された担体を充填したカラム（例えばNi-セファロースカラム）で精製する。この精製に先立って、培養液を前処理（濾過、希釈、濃縮、脱塩、硫酸沈殿、限外濾過等）に供してもよい。また、Ni-セファロースカラムによる精製の後、必要に応じて更なる精製（濾過、限外濾過、濃縮、脱塩、遠心処理、カラムクロマトグラフィー、凍結、乾燥等）を行うことにしてもよい。

20

30

【実施例】

【0047】

アシネトバクター sp. Tol 5由来の三量体オートトランスポーターアドヘシン（TAA）であるAtaAの遺伝子を改変することにより、有用な機能をもつナノファイバー（機能性AtaAファイバー）で覆われた微生物（被毛微生物）を作製することを試みた。また、機能性AtaAファイバーの回収も試みた。

【0048】

1. 方法

(1) 全長AtaAおよび短縮AtaAへのHisタグの挿入（図1）

40

制限酵素サイトSfiIとポリヒスチジンタグを含むプライマーを表1の通り設計した。

【0049】

## 【表 1】

## プライマー

1. T7 promoter primer	GTAATACGACTCACTATAGGGC(配列番号32)	
2. sfi1hisataa as1	GTGATGATGGTGATGATGGGCCTTATTGGCCAGATTATAATTCCCAGCCGCTC(配列番号33)	
3. sif1hisataa s1	CTGGCCAATAAGGCCCATCATCACCATCATCACGCAGGAAATCCAAGTGTG(配列番号34)	
4. aada_2255-R	CCATTGGCATTACTGCATAAATA(配列番号35)	
5. sfi1hisataa as2	GTGATGATGGTGATGATGGGCCTTATTGGCCAGTGCATTATAGGCAGCACCAC(配列番号36)	
6. sif1hisataa s2	CTGGCCAATAAGGCCCATCATCACCATCATCACGCAAACAATACATATACCGCTC(配列番号37)	
7. XcmI S ataa	AACAGCTGAGTAACAGCTGACCAAGTTACG(配列番号38)	
8. sfi1hisataa as3	CTTGTCATCGTCGCTCTTGTAGTCGGCCTTATTGGCCAGAGTACCGTTACCATTGCCTG(配列番号39)	10
9. sif1hisataa s3	CTGGCCAATAAGGCCGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCAGCAACGATCGGAAGTGC(配列番号40)	
10. AadA-PW6-R	CAATCGCAACTTGTCCACCC(配列番号41)	
11. aada_5558-F	CAACATCACCAAAAAGTAGTG(配列番号42)	
12. sfi1hisataa as4	GTGATGATGGTGATGATGGGCCTTATTGGCCAGTAACTGGTCTTCTGTGCGCCG(配列番号43)	
13. sif1hisataa s4	CTGGCCAATAAGGCCCATCATCACCATCATCACAAAACGGTCAGCGATGCGCAAG(配列番号44)	
14. AadA-PW11-R	CTTGACCTTGTTCATACG(配列番号45)	
15. bglII S ataa	GGTTTGAGCAATAAAGATCTAAATTCAAC(配列番号46)	
16. sfi1hisataa as5	GTGATGATGGTGATGATGGGCCTTATTGGCCAGATTCATCTTCTGTACCGTTTG(配列番号47)	
17. sif1hisataa s5	CTGGCCAATAAGGCCCATCATCACCATCATCACACTGATGGTATTAATCTTC(配列番号48)	
18. Xbalataa AS	TGGGTCTAGAGAATTAGTCAATCAC(配列番号49)	20

## 【0050】

PCRの鑄型にはpTa2ベクターにataA遺伝子をクローニングしてあるpTa2::ataAを使用した。1回目のPCRは表1の3,6,9,13,17番のフォワードプライマーとそれらと対になる4,10,14,18番のリバースプライマー、および2,5,8,12,16番のリバースプライマーとそれらと対になる1,7,11,15番のフォワードプライマーの組み合わせで行い、一部の配列が重複する2種類の増幅産物の5つの組合せ(A~E)を得た。2回目のPCRは1回目のPCRで増幅した断片2種類と、それぞれの増幅断片の末端に結合するプライマーのセット(それぞれ1と4、7と10、11と14、15と18番)を用いて目的断片を増幅した。5つの増幅断片HisA~Eはそれぞれ、両端にAtaA遺伝子由来またはAtaA遺伝子をクローニングしたプラスミドベクター由来の制限酵素サイトをもち、配列中にSfiIサイトとHisタグをコードする配列を持つ。これら増幅断片をTAクローニングによってpTa2ベクターにサブクローニングした。pTa2ベクターにサブクローニングした断片を両端の制限酵素サイトを利用して切り出し、同じ制限酵素で処理したpTa2::ataAまたはpDONR::ataAベクターにライゲーションすることで、AtaA遺伝子の一部にHisタグをコードする領域が導入されたコンストラクトpTA2::hisA-ataA, pTA2::hisB-ataA, pTA2::hisE-ataA またはpDONR::hisC-ataA, pDONR::hisD-ataAを作製した。

## 【0051】

アミノ末端を欠失させたAtaAのアミノ末端にHisタグを導入したコンストラクト(Nhis(B-D)-ataA)を作製するために、pDONR::hisA-ataAをataAのコード領域の少し上流に認識サイトがある制限酵素EcoRIと上記増幅断片中に組み込んだSfiIで処理し、AtaAのシグナルペプチドをコードする領域を含む断片を得た。また、pTA2::hisB-ataA, pDONR::hisC-ataA, pDONR::hisD-ataAのそれぞれもEcoRIとSfiIで処理し、SfiI-Hisタグの挿入位置から上流を切り落とし、それぞれにAtaAのシグナルペプチドコード領域を含む断片をつないで、NhisB, NhisC, NhisDを作製した。

## 【0052】

こうして、AtaAファイバー蛋白質のA, B, C, DまたはEの位置にSfiI認識サイトとともにHisタグを挿入した5種類のHis-AtaAファイバー蛋白質と、N末シグナル配列の後ろからB, C, またはDの位置まで削除した3種類の短縮AtaAファイバーのほぼ先端(シグナル配列切断後の蛋白質のN末端付近)にHisタグを付加したHis-NAtaAファイバー蛋白質を得



た。これらタグ導入AtaAの遺伝子は発現ベクターであるpARP3ベクターにサブクローニングしてから使用した。

【 0 0 5 3 】

尚、各コンストラクトが発現する、Hisタグが挿入されたAtaAのアミノ酸配列は以下の通りである。

HisA-ataA : 配列番号 5 0

HisB-ataA : 配列番号 5 1

HisC-ataA : 配列番号 5 2

HisD-ataA : 配列番号 5 3

HisE-ataA : 配列番号 5 4

NHisB-ataA : 配列番号 5 5

NHisC-ataA : 配列番号 5 6

NHisD-ataA : 配列番号 5 7

10

【 0 0 5 4 】

( 2 ) AtaAファイバー中のHisタグ導入位置 ( 図 2 )

AtaAは三量体オートトランスポーターアドヘシン (TAA) ファミリーに属し、他のTAAと同様に、ファイバー先端 (シグナルペプチド切断後のN末端) のヘッドドメイン-ネックドメイン-ストロウドメイン-メンブレンアンカードメイン (C末端) の構造をとる。さらにストロウドメインには複数の繰り返し配列がモザイク状に並ぶ。この繰り返し配列は、TAAを構成する多種類のモチーフを含む。また、AtaAは、ストロウのC末寄りにもう一つのヘッドドメインを有する。Hisタグの挿入位置 (A~D) は、AtaAタンパク質の高次構造予測にもとづき、推定モチーフの境界付近を選択した。具体的な導入位置はシグナルペプチドとアミノ末端側のヘッドドメインの間 (Asn<sub>100</sub>の直後 (A) : HisA)、アミノ末端側のヘッドドメインおよびネックドメインの後 (Ala<sub>340</sub>の直後 (B) : HisB)、パッセンジャードメインの繰り返しモチーフの中央付近と終わり付近 (それぞれThr<sub>1576</sub>の直後 (C) および Leu<sub>2521</sub>の直後 (D) : HisC およびHisD)、カルボキシル末端側のヘッドドメインの前 (Asn<sub>2966</sub>の直後 : HisE) である。

20

【 0 0 5 5 】

( 3 ) FLAGタグつきAtaAの作製 ( 図 3 )

2回の連続したFLAGタグペプチド配列をコードするDNA配列の両末端にSfi I制限酵素サイトを持つ二本鎖オリゴヌクレオチドをSfi Iで処理し、同様にSfi I処理したpTa2::his A-ataAにライゲーションした。導入されたオリゴヌクレオチドの数と配列はDNAシーケンシングによって確認した。これらのFLAGタグ導入AtaAの遺伝子は発現ベクターであるpARP3ベクターにサブクローニングしてから使用した。

30

【 0 0 5 6 】

尚、各コンストラクトが発現する、FLAGタグが挿入されたAtaAのアミノ酸配列は以下の通りである。

2xFLAG-HisA-ataA : 配列番号 5 8

4xFLAG-HisA-ataA : 配列番号 5 9

6xFLAG-HisA-ataA : 配列番号 6 0

40

【 0 0 5 7 】

( 4 ) ソルターゼ A 認識配列のAtaAへの導入 ( 図 4 )

両端にXmnI制限酵素サイトをもち、SfiIサイトとHisタグをコードする配列を持つ二本鎖オリゴヌクレオチドをXmnIで処理し、ataA遺伝子の内部 (シグナルペプチドコード領域とアミノ末端側ヘッドドメインコード領域の間) に存在するXmnIサイトに導入し、pDNOR::XmnI-his-ataAを得た。ソルターゼ A 認識配列をコードする遺伝子配列を制限酵素Sfi Iサイトではさんだ二本鎖オリゴヌクレオチドをSfi Iで処理し、同じくSfi Iで処理したpDNOR::XmnI-his-ataAコンストラクトにライゲーションした。得られたソルターゼ A 認識配列を導入したataAの遺伝子は、発現ベクターであるpARP3ベクターにサブクローニングしてから使用した。尚、構築したコンストラクトが発現する、ソルターゼ A 認識配列が挿入

50

されたAtaAのアミノ酸配列は以下の通りである。

SrtA-ataA：配列番号 6 1

【 0 0 5 8 】

( 5 ) HRV3Cプロテアーゼ認識配列を持つAtaAの作製 ( 図 5 )

オーバーラップPCRによってHRV3Cプロテアーゼ認識配列を含むAtaA遺伝子の断片を作製した。pTA2::ataAを鋳型として1回目のPCRを図中1, 2と3, 4の組み合わせのプライマーセットを用いて行った。増幅した各断片と1, 4のプライマーセットを用いた2回目のPCRによって、AtaA遺伝子中のBgl II制限酵素サイトと終止コドン直後に存在するpTA2::ataA上のXba I制限酵素サイトの間に、HRV3Cプロテアーゼ認識配列をコードするDNA配列を挿入したataA遺伝子断片を増幅した。増幅断片をpTA2ベクターにサブクローニングしてDNA配列を確認後、このコンストラクトをBgl IIとXbaI制限酵素で処理し、得られた断片を同じ酵素で処理したpTA2::ataAにライゲーションしpTA2::3CataAコンストラクトを得た。最終的に3CataA遺伝子は発現ベクターであるpARP3ベクターにサブクローニングし、p3CataAを得た。尚、構築したコンストラクトが発現する、HRV3Cプロテアーゼ認識配列を持つAtaAのアミノ酸配列は以下の通りである。

3CataA：配列番号 6 2

【 0 0 5 9 】

( 6 ) eGFP又はtfu0937ベータグルコシダーゼ ( BGL ) 融合AtaAコンストラクトの作製 ( 図 6、7 )

eGFP遺伝子とtfu0937BGL遺伝子の両端の配列にそれぞれSfi I制限酵素サイトを付加したプライマーを設計した。eGFP遺伝子の両端にはグリシン5つで構成されるlinker部分を付加したプライマーも設計した。また、tfu0937BGL遺伝子の3'末端側にはGGSGG ( 配列番号 6 3 ) のリンカーをコードする塩基を挿入した。設計したプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物をTAクローニングして、DNAシーケンシングにより増幅産物の配列を確認した。配列が正しいことを確認後、クローニングベクターから目的の遺伝子をコードする領域をSfi I処理により切り出し、pDONR:: NhisB-ataA, pDONR:: NhisC-ataA, pDONR:: NhisD-ataA のSfi Iサイトにライゲーションした。最終的には発現用ベクターであるpARP3 vectorに目的の遺伝子をサブクローニングし下記コンストラクトを得た。

pARP3::eGFP- NhisB-ataA, pARP3::eGFP- NhisC-ataA, pARP3::eGFP- NhisD-ataA

pARP3::eGFP-linker- NhisB-ataA, pARP3::eGFP-linker- NhisC-ataA, pARP3::eGFP-linker- NhisD-ataA

pARP3:: tfu0937- N hisC-ataA, pARP3:: tfu0937- N hisD-ataA

pARP3:: tfu0937- N hisD-3CataA

【 0 0 6 0 】

尚、各コンストラクトが発現する、GFPまたはtfu0937BGLを融合したAtaAのアミノ酸配列は以下の通りである。

Gfp- NHisB-linker-ataA ( リンカー有 ) : 配列番号 6 4

Gfp- NHisC-linker -ataA ( リンカー有 ) : 配列番号 6 5

Gfp- NHisD-linker -ataA ( リンカー有 ) : 配列番号 6 6

Gfp- NHisB-ataA ( リンカー無 ) : 配列番号 6 7

Gfp- NHisC-ataA ( リンカー無 ) : 配列番号 6 8

Gfp- NHisD-ataA ( リンカー無 ) : 配列番号 6 9

tfu0937- NHisC-ataA : 配列番号 7 0

tfu0937- NHisD-ataA : 配列番号 7 1

tfu0937- NHisD-3CataA : 配列番号 7 2

【 0 0 6 1 】

( 7 ) 機能性ファイバー遺伝子コンストラクトの導入

上記の方法で構築した各コンストラクトを保有するドナー株E. coli S17-1 ( Simon, R. ; Priefer, U. ; Puhler, A., Bio-Technol 1983, 1, ( 9), 784-791 ) との接合によりTol 5のataA遺伝子欠損変異株である4140株を形質転換した。Hisタグを挿入した遺伝子を含む

コンストラクトについては大腸菌BL21株にも導入し、形質転換体を得た。

【0062】

## 2. 結果

### (1) 機能性AtaAファイバーの発現の確認

フローサイトメトリー又は共焦点レーザー顕微鏡解析により、機能性AtaAファイバーで被覆された微生物(被毛微生物)が得られているか確認した。図8(a)(Hisタグ)、図8(b)(FLAGタグ)、図9(a)(ソルターゼA認識配列)、図9(b)(HRV3Cプロテアーゼ認識配列)、図12(a)(Hisタグ、大腸菌)、図13(tfu0937ベータグルコシダーゼ)、図14(GFP)に示す通り、各機能性AtaAファイバーで被覆された微生物を確認できた。ウエスタンブロット解析によっても、Hisタグを導入した機能性AtaAファイバー(図16(a))、HRV3Cプロテアーゼ認識配列を導入した機能性AtaAファイバー(図16(b))及びtfu0937ベータグルコシダーゼを融合した機能性AtaAファイバー(図16(c))の生産を確認した。Hisタグを導入した機能性AtaAファイバーについては、ファイバーの長さを調整することが可能であった(図10)。即ち、ファイバーの長さを変えることにより、機能分子(この例ではHisタグ)の細胞表層からの提示位置を変えることに成功した。

10

【0063】

### (2) 機能性AtaAファイバーの機能評価

Hisタグを導入した機能性AtaAファイバー被毛微生物のNi-セファロースビーズへの結合能を評価した。図11(a)に示す通り、良好な結合を認め、機能性AtaAファイバーを導入したHisタグがその機能を維持した状態で提示されていることが確認された。また、Ni-セファロースビーズに結合させた被毛微生物のエステラーゼ活性を測定した結果(図11(b))からも、Hisタグを介して被毛微生物がNi-セファロースビーズに結合していることが示された。各被毛微生物のエステラーゼ活性の比較から、AtaAファイバー上のHisタグによって菌体をNi-セファロースビーズに結合させるためには、Hisタグを細胞表層から遠い位置に提示することが有利といえる。尚、エステラーゼ活性は以下の方法で測定した。まず、Hisタグ融合AtaAを発現誘導し、OD<sub>600</sub> = 1.5-2.0まで培養した培養液をOD<sub>600</sub> = 0.6になるようにLB培地で希釈した。ここにNi-セファロースビーズ(50%スラリー 純水中にけん濁)を20µl加えて攪拌し、ビーズに結合させた。LB培地と水でビーズを洗浄後、菌が付着したビーズを反応に供した。反応は回収したビーズに対して、200µlの4-NBP反応溶液(1.9mM パラニトロフェニル酪酸、1.1% トリトン-X 100、50mM 3,3-ジメチルグルタル酸、50mM トリス、50mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール)を加え30分間室温でインキューベートした後、生成物であるパラニトロフェノールの吸収波長である405nmの吸光度をそのままマイクロプレートリーダーで測定することによりエステラーゼ活性を求めた。

20

30

【0064】

大腸菌を宿主にした場合も同様に、Hisタグを導入した機能性AtaAファイバー被毛微生物が、Hisタグを介してNi-セファロースビーズに結合することが確認された(図12(b)、(c))。なお、Hisタグを導入した機能性AtaAファイバーで被覆された大腸菌は、表層にベータグルコシダーゼを有している組換え株なので、Ni-セファロースビーズへの微生物細胞の結合はBGL活性で評価した(図12(c))。BGL活性の測定法はtfu0937ベータグルコシダーゼ活性の測定法(下記)と同じである。

40

【0065】

HRV3Cプロテアーゼ認識配列を導入した機能性AtaAファイバー被毛微生物に対してHRV3Cプロテアーゼを作用させ、硫酸沈殿により機能性AtaAファイバーの回収を試みた。図11(c)に示す通り、機能性AtaAファイバーの回収に成功した。

【0066】

eGFPを融合させた機能性AtaAファイバー被毛微生物の蛍光を観察した。発現誘導によって蛍光(緑色)を認め(図14(b))、eGFPがファイバー上で機能していることが確認された。

50

## 【 0 0 6 7 】

tfu0937ベータグルコシダーゼを融合させた機能性AtaAファイバー被毛微生物のベータグルコシダーゼ活性を以下の方法で測定した。tfu0937ベータグルコシダーゼ融合AtaAファイバーを発現誘導し、O.D.600が2.1-2.7になるまで培養した。菌培養液300 $\mu$ lから菌体を回収し、BS-N溶液に溶かした1 mM PNPG 300 $\mu$ lを菌体に加えて37 $^{\circ}$ Cで30分反応させ、反応液から上清を回収し、生成物であるパラニトロフェノールの吸収波長である405nmの吸光度をそのままマイクロプレートリーダーで測定することによりエステラーゼ活性を求めた。測定の結果、tfu0937ベータグルコシダーゼを融合させた機能性AtaAファイバー被毛微生物では発現誘導によって活性の上昇を認め(図15)、当該酵素がファイバー上で機能していることが確認された。

10

## 【 0 0 6 8 】

ソルターゼA (Srt) 認識配列を導入したAtaAファイバーの機能性及び有用性を評価した。Srt認識配列を導入したAtaAまたは導入していないAtaA(コントロール)に、Srt認識配列を連結したYpet蛍光蛋白質をSrt反応により連結させた(図17上)。コントロールとして、Ypet無しの系とSrt無しの系も同様に処理した。フローサイトメトリーで、Srtの連結によるAtaAファイバーの蛍光強度のシフトを解析した。Srt認識配列を導入したAtaAの場合、蛍光強度のシフトが認められ(図17左下)、蛍光蛋白質の連結を確認できた。また、レーザー顕微鏡で、Srtの連結によるAtaAファイバーの細胞周毛蛍光を観察した結果、Srt認識配列を導入したAtaAの場合には細胞周囲に蛍光を認めた(図17右下)。

20

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 6 9 】

本発明によれば、接着機能以外の様々な有用な機能をもつファイバー(機能性ファイバー)を微生物の表面に発現させることができる。機能性ファイバーで被覆された微生物(被毛微生物)は、機能性ファイバーに導入した機能に応じて様々な用途に用いられる。例えば、タグ分子を導入した場合には特異的な結合性を利用して、微生物の固定化、重金属やレアメタルなどの回収(環境中の有害物質の除去、バイオレメディエーション、環境中からの有用物質の取得など)、蛋白質・ペプチド以外の低分子機能化合物のコンジュゲート等を行うことができる。また、酵素を導入した場合には、酵素反応を利用した有用物質の生産、有害物質の分解・除去、高分子バイオマスの低分子化などへの適用が想定される。蛍光蛋白質や抗原、受容体蛋白質を導入した場合には、各種分析(バイオイメージング、バイオセンサー、バイオマーカー、迅速診断等)・検出などへの利用が想定される。電子伝達系蛋白質を導入した場合は、バイオ燃料の生産、微生物発電、環境中の有害物質の分解除去などへの利用が想定される。一方、本発明の回収方法は、機能性ファイバー単独での利用を可能にするものであり、機能性ファイバーの利用分野・応用分野を大幅に拡大する。

30

## 【 0 0 7 0 】

本発明によれば、微生物が細胞表面に発現するファイバー(毛)に本来の機能とは異なる機能を付与することができる。余分な機能性の配列が挿入/追加されれば、毛を構成する蛋白質がその高次構造を形成できなくなることや、細胞表層に発現する(分泌される)ことができなくなる可能性が高い。余分な配列が、蛋白質の高次構造を壊したり、分泌機能を喪失させたりするおそれがあるからである。本発明は当該困難性を克服し、機能が付与されたファイバーを発現する微生物を提供することに成功している。

40

## 【 0 0 7 1 】

本発明では、微生物が細胞表面に発現するファイバーに機能性を付与する。この特徴により、細胞から距離をおいた位置で特定の機能を発揮させることができる。細胞からの距離を保つことは、ファイバー上の機能分子と細胞表層との相互作用や立体障害を回避して機能を発揮させるのに重要である。また、細胞毒性のある機能を発現させる場合、細胞から離れておれば毒性を回避できる。更には、プロテアーゼを利用して、機能性ファイバーを回収すれば、ナノマテリアルとしての利用価値も出てくる。このように、細胞表面に発現するファイバーに機能性を付与することの意義は極めて大きい。

50

## 【 0 0 7 2 】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

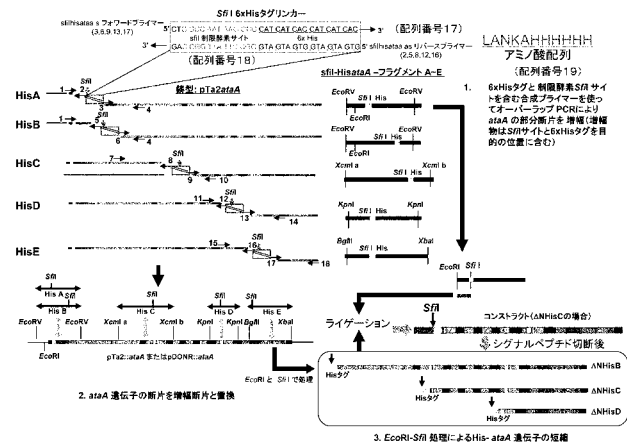
## 【 配列表フリーテキスト 】

## 【 0 0 7 3 】

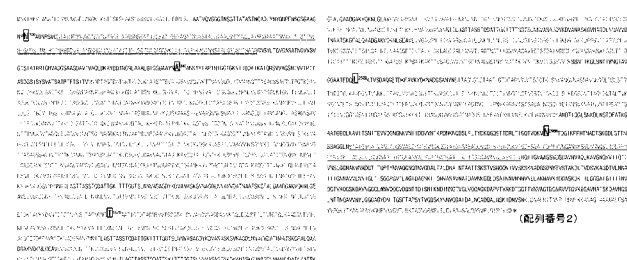
配列番号 7 : 人工配列の説明 : Hisタグ	
配列番号 8 : 人工配列の説明 : FLAGタグ	
配列番号 9 : 人工配列の説明 : ソルターゼA認識配列	10
配列番号 11 : 人工配列の説明 : eGFP	
配列番号 12 : 人工配列の説明 : Hisタグ	
配列番号 13 : 人工配列の説明 : FLAGタグ	
配列番号 14 : 人工配列の説明 : ソルターゼA認識配列	
配列番号 16 : 人工配列の説明 : eGFP	
配列番号 17 ~ 18 : 人工配列の説明 : プライマー	
配列番号 19 : 人工配列の説明 : Hisタグを含む配列	
配列番号 20 : 人工配列の説明 : FLAGタグを含む配列	
配列番号 21 : 人工配列の説明 : FLAGタグを含む配列	
配列番号 22 ~ 24 : 人工配列の説明 : 断片配列	20
配列番号 25 ~ 28 : 人工配列の説明 : プライマー	
配列番号 29、30 : 人工配列の説明 : プライマー	
配列番号 31 : 人工配列の説明 : 断片配列	
配列番号 32 ~ 49 : 人工配列の説明 : プライマー	
配列番号 50 : 人工配列の説明 : HisA-ataA	
配列番号 51 : 人工配列の説明 : HisB-ataA	
配列番号 52 : 人工配列の説明 : HisC-ataA	
配列番号 53 : 人工配列の説明 : HisD-ataA	
配列番号 54 : 人工配列の説明 : HisE-ataA	
配列番号 55 : 人工配列の説明 : NHisB-ataA	30
配列番号 56 : 人工配列の説明 : NHisC-ataA	
配列番号 57 : 人工配列の説明 : NHisD-ataA	
配列番号 58 : 人工配列の説明 : 2xFLAG-HisA-ataA	
配列番号 59 : 人工配列の説明 : 4xFLAG-HisA-ataA	
配列番号 60 : 人工配列の説明 : 6xFLAG-HisA-ataA	
配列番号 61 : 人工配列の説明 : SrtA-ataA	
配列番号 62 : 人工配列の説明 : 3CAtaA	
配列番号 63 : 人工配列の説明 : リンカー	
配列番号 64 : 人工配列の説明 : Gfp- NHisB-linker-ataA	
配列番号 65 : 人工配列の説明 : Gfp- NHisC-linker-ataA	40
配列番号 66 : 人工配列の説明 : Gfp- NHisD-linker-ataA	
配列番号 67 : 人工配列の説明 : Gfp- NHisB-ataA	
配列番号 68 : 人工配列の説明 : Gfp- NHisC-ataA	
配列番号 69 : 人工配列の説明 : Gfp- NHisD-ataA	
配列番号 70 : 人工配列の説明 : tfu0937- NHisC-ataA	
配列番号 71 : 人工配列の説明 : tfu0937- NHisD-ataA	
配列番号 72 : 人工配列の説明 : tfu0937- NHisD-3CataA	
配列番号 73 : 人工配列の説明 : ソルターゼ反応関連配列	
配列番号 74 : 人工配列の説明 : ソルターゼ反応関連配列	
配列番号 75 : 人工配列の説明 : ソルターゼ反応関連配列	50

配列番号76：人工配列の説明：ソルターゼ反応関連配列  
配列番号77：人工配列の説明：ソルターゼ反応関連配列

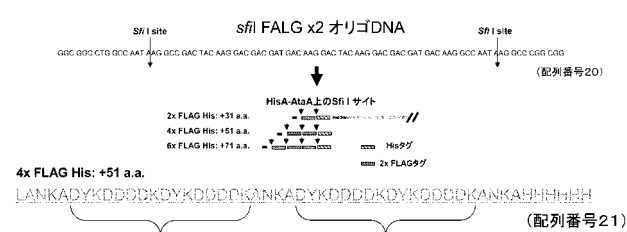
【 図 1 】



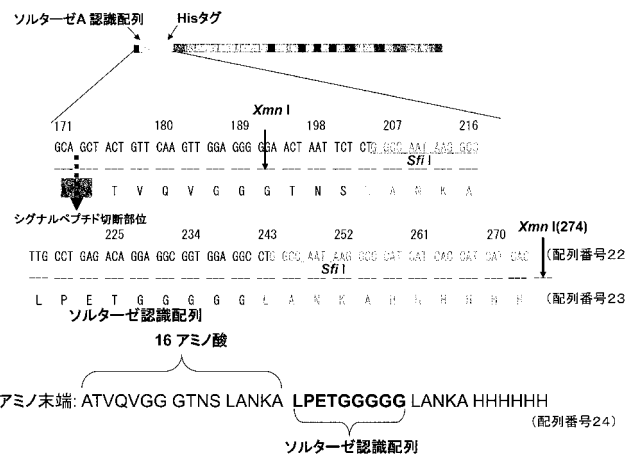
【 図 2 】



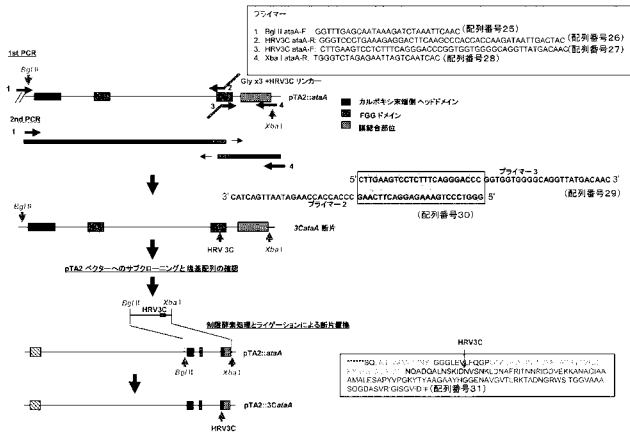
【 図 3 】



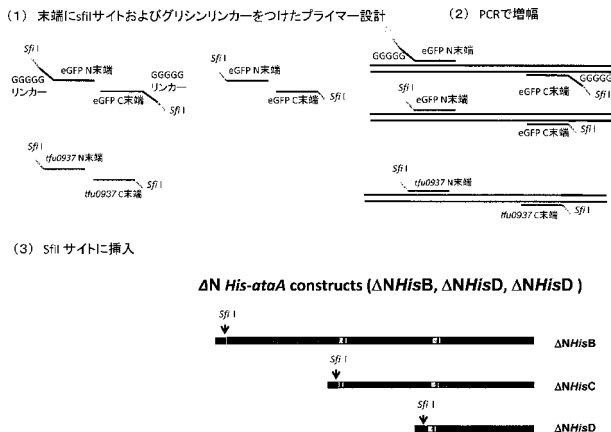
【 図 4 】



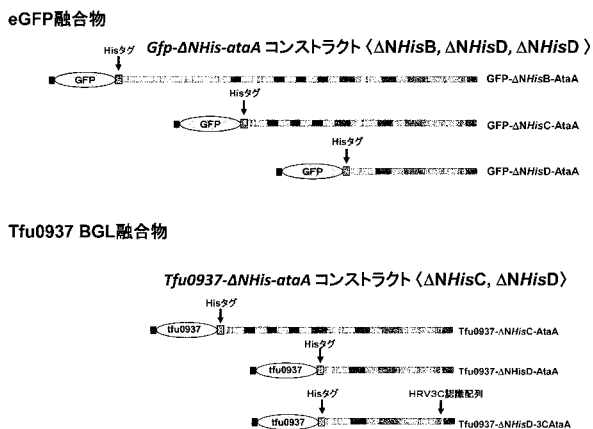
【 図 5 】



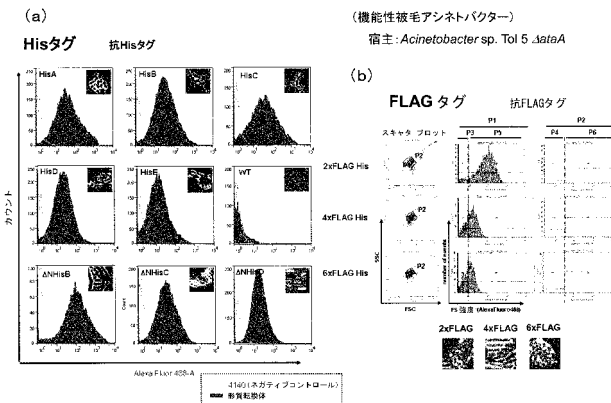
【 図 6 】



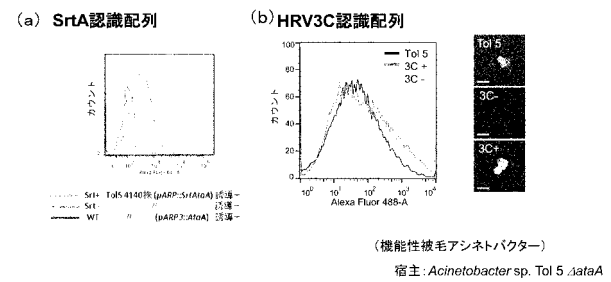
【 図 7 】



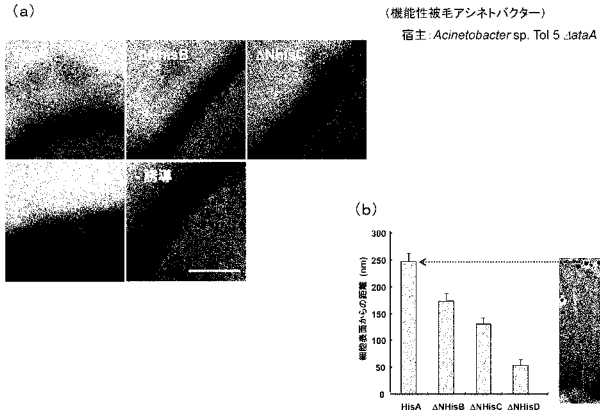
【 図 8 】



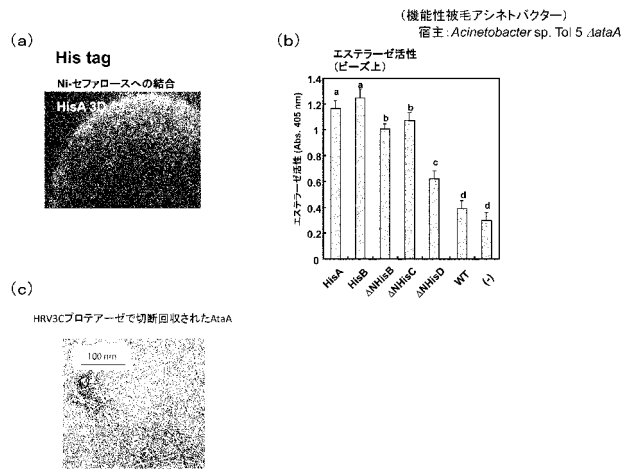
【 図 9 】



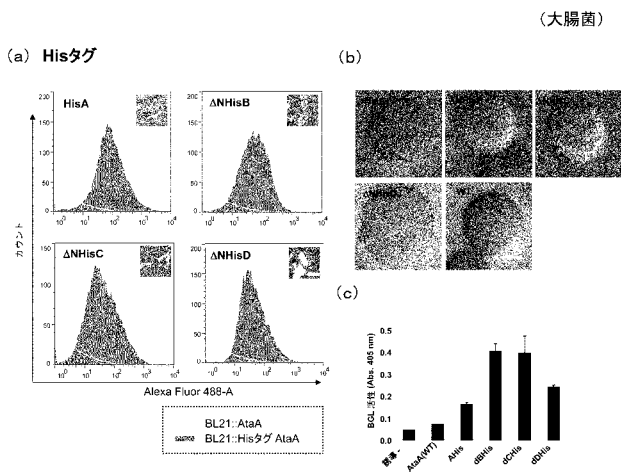
【 図 1 0 】



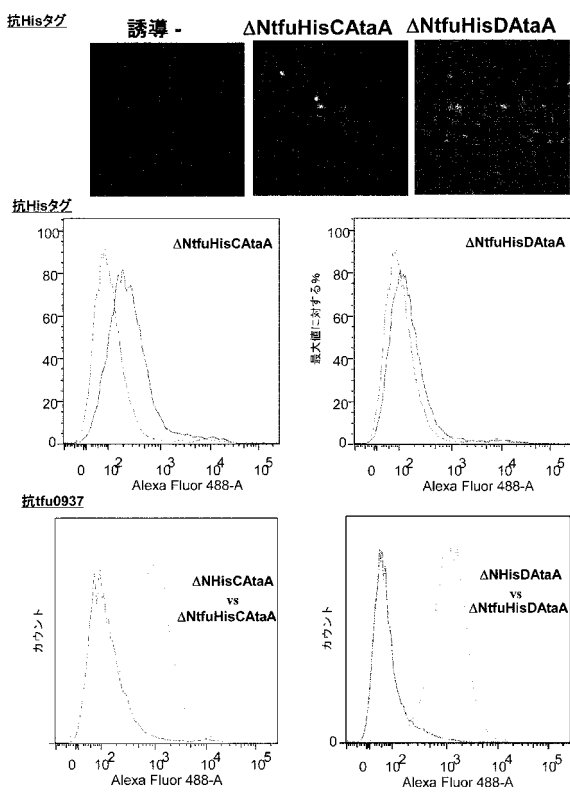
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



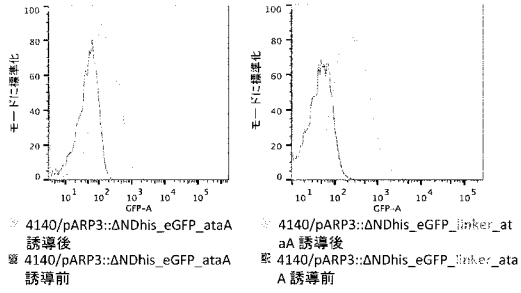
【 図 1 3 】



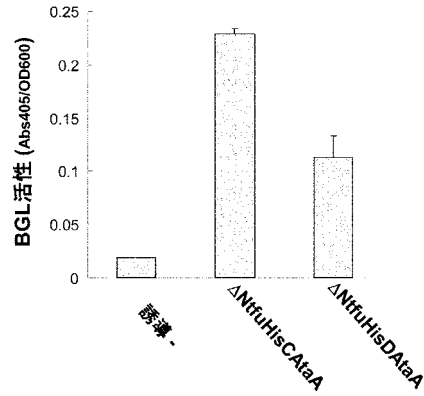


【 図 1 4 】

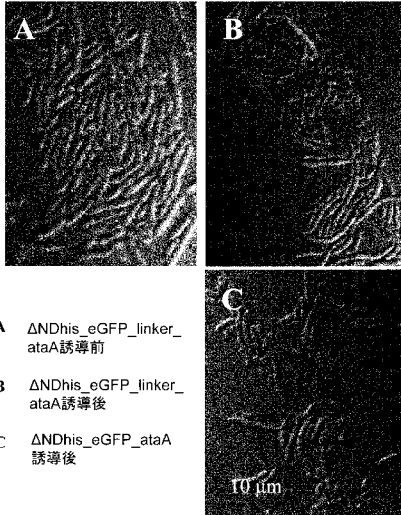
(a)



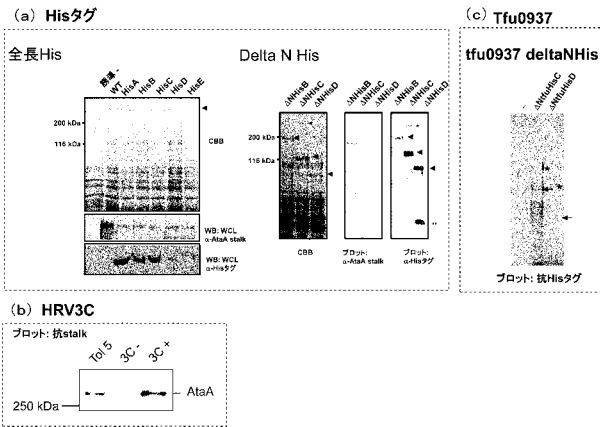
【 図 1 5 】



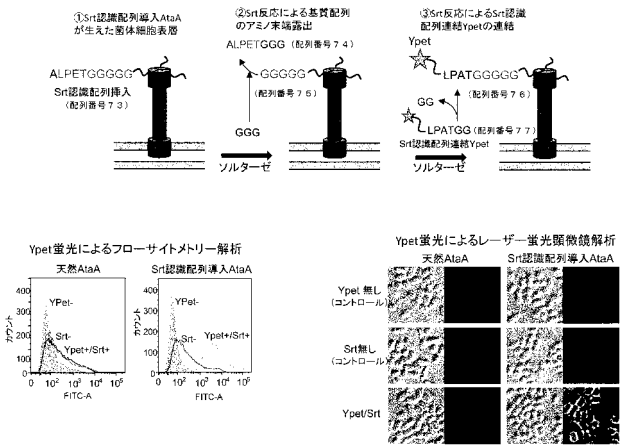
(b)



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



## 【配列表】

2015030171000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年5月25日(2015.5.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アシネトバクター *sp.* T o l 5 株の A t a A 又はその一部にペプチド又は蛋白質からなる機能分子が挿入、結合又は融合してなる機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

前記微生物がグラム陰性菌である、請求項1に記載の微生物。

【請求項5】

前記微生物がガンマプロテオバクテリアである、請求項1に記載の微生物。

【請求項6】

前記微生物がアシネトバクター又は大腸菌である、請求項1に記載の微生物。

【請求項7】

前記機能分子が、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子である、請求項1、4～6のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項8】

前記機能分子が、H i s タグ、F L A G タグ、ソルターゼ認識配列、H R V 3 C 認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である、請求項1、4～6のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項9】

前記機能分子が、プロテアーゼ認識配列、或いは、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子とプロテアーゼ認識配列の組合せ、からなる、請求項1、4～6のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項10】

前記機能分子が、H i s タグ、F L A G タグ、ソルターゼ認識配列、H R V 3 C 認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である請求項9に記載の微生物。

【請求項11】

アシネトバクター *sp.* T o l 5 株の A t a A をコードする D N A に、ペプチド又は蛋白質からなる機能分子をコードする D N A が挿入又は付加されてなる機能性ファイバー D N A を、標的微生物に導入するステップ、を含む、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物の作製方法。

【請求項12】

(削除)

【請求項13】

(削除)

【請求項14】

アシネトバクター *s p . T o l 5* 株の *A t a A* をコードする前記 DNA が、以下の ( a ) ~ ( d ) のいずれかの DNA である、請求項 1 1 に記載の作製方法：

( a ) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA、

( b ) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA と 7 0 % 以上の同一性を有する塩基配列からなり、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードする DNA、

( c ) 配列番号 1 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、細胞外に分泌されてファイバー構造物を形成する蛋白質をコードする DNA、

( d ) 配列番号 1 で表される塩基配列のシグナルペプチドに相当する部位 ( 1 ~ 1 7 7 位 ) を残し、その後ろからヘッドメインのコード領域直前 ( 3 2 3 位 ) の間 ( 即ち、1 7 8 位から 3 2 3 位の間 )、より好ましくは 3 1 0 位までの間 ( 即ち、1 7 8 位から 3 1 0 位までの間 ) から連続する数百から数千塩基を削った塩基配列からなる DNA。

【請求項 1 5】

前記機能的ファイバー DNA と一緒に、以下の ( A ) ~ ( C ) のいずれかの DNA も前記標的微生物に導入する、請求項 1 1 又は 1 4 に記載の作製方法：

( A ) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA、

( B ) 配列番号 3 で表される塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA、

( C ) 配列番号 3 で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 1 6】

前記機能分子が、タグ分子、酵素認識配列、酵素、蛍光蛋白質、抗原、電子伝達系蛋白質及び受容体蛋白質からなる群より選択される一又は二以上の機能分子である、請求項 1 1、1 4、1 5 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 1 7】

前記機能分子が、His タグ、FLAG タグ、ソルターゼ認識配列、HRV 3 C 認識配列、 $\alpha$ -グルコシダーゼ又は緑色蛍光蛋白質である、請求項 1 1、1 4、1 5 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 1 8】

前記標的微生物がグラム陰性菌である、請求項 1 1、1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 1 9】

前記標的微生物がガンマプロテオバクテリアである、請求項 1 1、1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 2 0】

前記標的微生物がアシネトバクター又は大腸菌である請求項 1 1、1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 1、1 4 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の作製方法で得られた、機能性ファイバーを細胞表面に発現した微生物。

【請求項 2 2】

請求項 9、1 0 又は 2 1 に記載の微生物から回収された、機能性ファイバー。

【請求項 2 3】

以下のステップ ( 1 ) 及び ( 2 ) を含む、機能性ファイバーの回収方法：

( 1 ) 請求項 9、1 0 又は 2 1 に記載の微生物に対して、前記プロテアーゼ認識配列を認識するプロテアーゼを作用させるステップ、

( 2 ) 切断された機能性ファイバーを回収するステップ。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/072735
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, C07K14/22(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C07K14/22, C07K19/00, C12N1/21, C12P21/02  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CiNii, Thomson Innovation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	HORI, K., Construction of interfacial microbial processes based on the functions of bacterionanofiber proteins, Kagaku Kogyo, 2012, Vol.76, No.4, pages 212-214, entire text, particularly, page 214.	1-6,11-14, 18-22/1-23
X/Y	HORI, K., Towards green-innovation through interfacial microbial engineering, Kagaku Kogyo, 2012, Vol.63, No.1, pages 70-74, entire text, particularly, page 74.	1-6,11-14, 18-22/1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 November, 2014 (17.11.14)		Date of mailing of the international search report 25 November, 2014 (25.11.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/072735

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Katsutoshi HORI, "Construction of Interfacial Microbial Processes Based on the Functions of Bacterionanofiber Proteins", Japan Society for the Promotion of Science Saisentan · Jisedai Kenkyu Kaihatsu Shien Program Jisshi Jokyo Hokokusho (Heisei 23 Nendo), 2012, entire text, particularly, 'Kenkyu no Jisshi Jokyo'.	1-6,11-15, 18-22/1-23
X/Y	HORI, K., From control and application of microbial adhesion and biofilms into interfacial microbial engineering, Oleoscience, 2012, Vol.12, No.11, pages567-572, entire text, particularly, page 572.	1-6,11-14, 18-22/1-23
X/Y	HORI, K., Analyses of bacterionanofibers and development into interfacial microbial engineering, Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2012, Vol. 64, page23 2Fp11, entire text.	1-14,16-22/ 1-23
X/Y	Katsutoshi HORI, "Kaimen Biseibutsu Process ni yoru Green Innovation", Biotechnology, 2011, vol.89, no.5, pages 245 to 248, entire text, particularly, page 248.	1-6,11-14, 18-22/1-23
X/Y	NAGAI, M. et al., Functional evaluation of the membrane anchor domain chimera of highly adhesive protein, AtaA, Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2013.08.25, Vol.65, page 236 3P-193, entire text.	1-6,11-14, 18-22/1-23
X/Y	BENTANCOR, L. V. et al., Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of Acinetobacter baumannii, J. Bacteriol., 2012, Vol.194, No.15, pages 3950-3960, entire text, particularly, page 3952, right column.	1-7,9,11-14, 16,18-22/ 1-23
Y	HORI, K. et al., Production of peritrichate bacterionanofibers and their proteinaceous components by Acinetobacter sp. Tol 5 cells affected by growth substrates, J. Biosci. Bioeng., 2011, Vol.111, No.1, pages 31-36, page 31, Summary, page 33, right column, fig. 4.	1-23
Y	ISHIKAWA, M. et al., AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from Acinetobacter sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces, PLoS One, 2012, Vol.7, No.11, e48830, pages 1-12, entire text, particularly, page 7, right column.	1-23

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/072735

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/104281 A1 (Nagoya Institute of Technology), 27 August 2009 (27.08.2009), entire text; particularly, claims; sequence no.3 & US 2011/0045529 A1 & EP 2256206 A1 & KR 10-2010-0132506 A & CN 102037126 A	1-23

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 2 7 3 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/22(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C07K14/22, C07K19/00, C12N1/21, C12P21/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)、PubMed、CiNii、Thomson Innovation			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X/Y	HORI, K., Construction of interfacial microbial processes based on the functions of bacterionanofiber proteins, 化学工業, 2012, Vol.76, No.4, pages 212-214, 全文, 特に第214頁.	1-6, 11-14, 18-22/1-23	
X/Y	HORI, K., Towards green-innovation through interfacial microbial engineering, 化学工業, 2012, Vol.63, No.1, pages 70-74, 全文, 特に第74頁.	1-6, 11-14, 18-22/1-23	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 17.11.2014		国際調査報告の発送日 25.11.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 白井 美香保	4N 4502
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 2 7 3 5
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	堀 克敏, バクテリオナノファイバー蛋白質の機能を基盤とする界面微生物プロセスの構築, 日本学術振興会 最先端・次世代研究開発支援プログラム 実施状況報告書 (平成23年度), 2012, 全文, 特に「研究の実施状況」.	1-6, 11-15, 18 -22/1-23
X/Y	HORI, K., From control and application of microbial adhesion and biofilms into interfacial microbial engineering, オレオサイエンス, 2012, Vol.12, No.11, pages567-572, 全文, 特に第572頁.	1-6, 11-14, 18 -22/1-23
X/Y	HORI, K., Analyses of bacterionanofibers and development into interfacial microbial engineering, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2012, Vol.64, page23 2Fp11, 全文.	1-14, 16-22/1 -23
X/Y	堀 克敏, 界面微生物プロセスによるグリーン・イノベーション, 生物工学, 2011, Vol.89, No.5, pages 245-248, 全文, 特に第248頁.	1-6, 11-14, 18 -22/1-23
X/Y	NAGAI, M. et al., Functional evaluation of the membrane anchor domain chimera of highly adhesive protein, AtaA, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2013.08.25, Vol.65, page 236 3P-193, 全文.	1-6, 11-14, 18 -22/1-23
X/Y	BENTANCOR, L. V. et al., Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of Acinetobacter baumannii, J. Bacteriol., 2012, Vol.194, No.15, pages 3950-3960, 全文, 特に第3952頁右欄.	1-7, 9, 11-14, 16, 18-22/1-2 3
Y	HORI, K. et al., Production of peritrichate bacterionanofibers and their proteinaceous components by Acinetobacter sp. Tol 5 cells affected by growth substrates, J. Biosci. Bioeng., 2011, Vol.111, No.1, pages 31-36, 第31頁要旨, 第33頁右欄, 図4.	1-23
Y	ISHIKAWA, M. et al., AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from Acinetobacter sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces, PLoS One, 2012, Vol.7, No.11, e48830, pages 1-12, 全文, 特に第7頁右欄.	1-23
Y	WO 2009/104281 A1 (国立大学法人名古屋工業大学) 2009.08.27, 全文, 特に特許請求の範囲、配列番号3 & US 2011/0045529 A1 & EP 2256206 A1 & KR 10-2010-0132506 A & CN 102037126 A	1-23



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 CA40 DA76 DA89 EA50  
FA16 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。