

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-14392

(P2020-14392A)

(43) 公開日 令和2年1月30日(2020.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/70 (2006.01)	C 1 2 N 15/70 Z N A Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2018-137930 (P2018-137930)	(71) 出願人	304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田1677-1
(22) 出願日	平成30年7月23日 (2018.7.23)	(72) 発明者	近藤 興 山口県山口市吉田1677-1 国立大学 法人山口大学理学部内
		(72) 発明者	祐村 恵彦 山口県山口市吉田1677-1 国立大学 法人山口大学理学部内
		Fターム(参考)	4B064 AG01 CA02 CA19 DA20 4B065 AA01X AB01 BA02 CA24

(54) 【発明の名称】 原核生物用発現ベクター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 翻訳促進効果のある配列を発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの非翻訳領域に含むように設計された原核生物用発現ベクターの提供。

【解決手段】 (1) 特定の483の塩基を有するミオシン調節軽鎖(myosin regulatory light chain:mlcR)をコードするポリヌクレオチドの全長又は部分配列であって、前記塩基配列の少なくとも474~483番目の塩基配列を含むポリヌクレオチド；(2) 上記(1)記載のポリヌクレオチドと少なくとも90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド；の(1)又は(2)記載のポリヌクレオチドと、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと、発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを順次備えた原核生物用発現ベクター。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の(1)又は(2)記載のポリヌクレオチドと、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと、発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを順次備えた原核生物用発現ベクター。

(1) 配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖 (myosin regulatory light chain: mlcR) をコードするポリヌクレオチドの全長又は部分配列であって、前記配列番号 1 に示す塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 上記(1)記載のポリヌクレオチドと少なくとも 90% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

【請求項 2】

リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと、発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの間に 4 ~ 20 塩基のスペーサー配列を備えることを特徴とする請求項 1 記載の原核生物用発現ベクター。

【請求項 3】

配列番号 1 に示す塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列が、配列番号 2 に示す塩基配列であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の原核生物用発現ベクター。

【請求項 4】

原核生物が大腸菌 (*Escherichia coli*) であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の原核生物用発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の原核生物用発現ベクターを含有する原核生物。

【請求項 6】

請求項 5 記載の原核生物を培養する工程と、培養した前記原核生物から発現対象のタンパク質を回収する工程を含む、タンパク質の生産方法。

【請求項 7】

タンパク質を発現するためのキットであって、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の原核生物用発現ベクターと、タンパク質を発現するための説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は原核生物用発現ベクターや、かかる原核生物用発現ベクターを含有する原核生物や、かかる原核生物を用いた発現対象のタンパク質の生産方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

近年の遺伝子組換え技術の進展とともに、微生物を用いて様々な有用なタンパク質の生産を行うことが行われるようになった。なかでも細菌は、アミノ酸、タンパク質等の有用物質を生産するために広く利用されている。特に近年は、医薬上・産業上有用なタンパク質の遺伝子を細菌に導入して形質転換し、かかる形質転換体を用いて有用タンパク質を効率的に生産する技術が知られるようになっている。

【0003】

タンパク質発現に用いる細菌として、グラム陰性菌の一種である大腸菌が汎用されている。大腸菌をタンパク質発現に利用する技術は工業用タンパク質、食品加工用タンパク質及び医薬品用タンパク質の生産にまで幅広く用いられている。

【0004】

大腸菌を用いたタンパク質生産において様々な発現系ベクターが開発されてきている。最も広く使われる発現系ベクターは pET 発現系ベクター (非特許文献 1 参照) である。pET 発現系ベクターは、T7 プロモーターの下流にクローニングした目的遺伝子を非常

10

20

30

40

50

に強力な T7 RNAポリメラーゼによって発現させるベクターである。しかし、決して万能ではなく、うまく発現させることができないタンパク質も報告されている。また、pCold発現系ベクター（非特許文献2、3参照）も広く使われている。このpCold発現系ベクターでは、cspAプロモーターを用いて低温下で目的遺伝子を発現させる点でT7プロモーター使うpET発現系ベクターとは異なる。さらにこのpCold発現系ベクターではtranslation enhancing element (TEE)を用いて翻訳を促進させ、合成量を増加させている。しかし、このTEEは目的遺伝子の開始コドン下流に位置するため、いわゆる”タグ”となり発現対象タンパク質との融合タンパク質として発現する。そのことにより、生来のタンパク質機能を失わせるという悪影響も想定される。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Dao-shan, C., Lin, S.-W., Dunn, J. J., & Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56(1), 125 - 135.

【非特許文献2】Qing, G., Ma, L. C., Khorchid, A., Swapna, G. V. T., Mal, T. K., Takayama, M. M., et al. (2004). Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 22(7), 877 - 882.

20

【非特許文献3】Etchegaray, J. P., & Inouye, M. (1999). Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 274(15), 10079 - 10085.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記のように、pET発現系ベクターでは発現が十分でない場合があり、pCold発現系ベクターではTEEが目的遺伝子の開始コドン下流に位置するために目的の発現タンパク質とTEEが融合したままになるという問題があった。そこで、本発明の課題は、翻訳促進効果のある配列を発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの非翻訳領域に含むように設計された原核生物用発現ベクターを提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、細胞性粘菌のミオシン調節軽鎖 (myosin regulatory light chain: mlcR) 遺伝子に着目し、mlcR遺伝子をコードするポリヌクレオチドと共にリボソーム結合部位 (Ribosome binding site: RBS) をコードするポリヌクレオチドとmEGFP遺伝子コードするポリヌクレオチドを、汎用されているpUCベクターに組み込んで大腸菌を形質転換したところ、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等の転写促進剤不含培地で培養した形質転換体においてGFPが高発現していることを見だし、本発明を完成した。

40

【0008】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1] 以下の(1)又は(2)記載のポリヌクレオチドと、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと、発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを順次備えた原核生物用発現ベクター。

(1) 配列番号1に示すミオシン調節軽鎖 (myosin regulatory light chain: mlcR) をコードするポリヌクレオチドの全長又は部分配列であって、前記配列番号1に示す塩基配列の少なくとも474~483番目の塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 上記(1)記載のポリヌクレオチドと少なくとも90%以上の配列同一性を有する

50

ポリヌクレオチド；

[2] リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと、発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの間に 4 ~ 20 塩基のスペーサー配列を備えることを特徴とする上記 [1] 記載の原核生物用発現ベクター。

[3] 配列番号 1 に示す塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列が、配列番号 2 に示す塩基配列であることを特徴とする上記 [1] 又は [2] 記載の原核生物用発現ベクター。

[4] 原核生物が大腸菌 (*Escherichia coli*) であることを特徴とする上記 [1] ~ [3] のいずれか記載の原核生物用発現ベクター。

[5] 上記 [1] ~ [4] のいずれか記載の原核生物用発現ベクターを含有する原核生物

10

[6] 上記 [5] 記載の原核生物を培養する工程と、培養した前記原核生物から発現対象のタンパク質を回収する工程を含む、タンパク質の生産方法。

[7] タンパク質を発現するためのキットであって、上記 [1] ~ [4] のいずれか記載の原核生物用発現ベクターと、タンパク質を発現するための説明書を含むキット。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、発現対象のタンパク質の発現量を、変異を加えることなく高めることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

20

【0010】

【図 1】プラスミドベクター「m1cR - RBS - Spacer - GFP - pUC19」の作製工程において、m1cR 遺伝子とフォワードプライマー、リバースプライマーの位置関係を示した図である。

【図 2】プラスミドベクター「m1cR - RBS - Spacer - GFP - pUC19」のマップを示す図である。

【図 3】実施例 1 において、プラスミドベクター「m1cR - RBS - Spacer - GFP - pUC19」及び「GFP - pUC19」で形質転換した大腸菌を LB 寒天培地に塗布して 37 °C で一晩暗黒環境下にて培養し、青色 LED 照射下で撮影した写真である。

【図 4】実施例 1 において、緑色蛍光を発することが確認されたコロニーを LB 培地で一晩暗黒環境下にて培養後、培養液を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

30

【図 5】実施例 1 において、赤色蛍光を発することが確認されたコロニーを LB 培地で一晩暗黒環境下にて培養後、培養液を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図 6】実施例 2 において、(a) は m1cR の欠損部位を表す図であり、(b) は欠損 m1cR - GFP 形質転換体を培養し、GFP の蛍光強度 (Z score) を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図 7】実施例 3 において、GFP 発現の有無における菌の生育速度及びプラスミドベクター収量を比較した結果を示す図である。(a) における横軸は時間、縦軸は生育開始時の細胞濃度を 1 とした場合の相対細胞濃度を示す。(b) における縦軸はプラスミドベクターの収量を示す。

40

【図 8】実施例 4 において、4 種類のベクターを大腸菌に導入して、グルコースあり又はなしの培地で培養した場合の GFP の蛍光の Z score を調べた結果を示す図である。

【図 9】実施例 5 において、4 種類のベクターを大腸菌に導入して、IPTG あり又はなしの培地で培養した場合の GFP の蛍光の Z score を調べた結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明におけるベクターは、(1) 配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖 (m1cR) をコードするポリヌクレオチドの全長又は部分配列であって、前記配列番号 1 に示す塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチド；の (1) 又は (

50

2) 記載のポリヌクレオチドと、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと、タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを順次備えた原核生物用発現ベクター（以下、「本件ベクター」ともいう）であればよく、かかるベクターを用いれば、翻訳促進効果のある配列がタンパク質をコードするポリヌクレオチドにおける開始コドンの5'側（上流）に位置するため、翻訳促進効果のある配列が翻訳されることなく発現対象のタンパク質を発現させることが可能となる。

【0012】

本件ベクターにおけるミオシン調節軽鎖（*myosin regulatory light chain: mlcR*）は、アクチン上を動くモータータンパク質であるミオシンIIの構成要素である。かかるミオシン調節軽鎖は、細胞分裂、細胞の運動、細胞の形態変化等の機能に關与していることが知られている。

10

【0013】

上記ミオシン調節軽鎖の由来としては、細胞性粘菌（*Dictyostelium discoideum*）、真正粘菌（*Physarum polycephalum*）、襟鞭毛虫、海綿、線虫等の環形動物、ショウジョウバエ等の昆虫、ホヤ等の尾索動物、ギボシムシ等の半索動物、ウニ等の棘皮動物、ナメクジウオ等の頭索動物、ゼブラフィッシュ等の魚類、アフリカツメガエル等の両生類、ニワトリ等の鳥類、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、サル、ヒツジ、ヤギ、ブタ等の哺乳動物を挙げる事ができ、細胞性粘菌を好適に挙げる事ができる。

20

【0014】

ミオシン調節軽鎖（*mlcR*）をコードするポリヌクレオチドは、公知の文献やNCBI（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>）等のデータベースを検索して適宜入手することができる。細胞性粘菌由来のミオシン調節軽鎖（*mlcR*）の全長をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号1に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げる事ができる。

【0015】

ミオシン調節軽鎖（*mlcR*）をコードするポリヌクレオチドの部分配列とは、ミオシン調節軽鎖（*mlcR*）の全長をコードするポリヌクレオチドの一部が欠損した配列を意味する。かかるミオシン調節軽鎖（*mlcR*）をコードするポリヌクレオチドの部分配列としては、

30

配列番号2に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の474～483番目の10塩基）や、

配列番号3に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の464～483番目の20塩基）や、

配列番号4に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の459～483番目の25塩基）や、

配列番号5に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の454～483番目の30塩基）や、

配列番号6に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の444～483番目の40塩基）や、

40

配列番号7に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の439～483番目の45塩基）や、

配列番号8に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の424～483番目の60塩基）や、

配列番号9に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の410～483番目の74塩基）や、

配列番号10に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の374～483番目の110塩基）や、

配列番号11に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列の249～483番目の235塩基）や、

50

配列番号 12 に示す塩基配列（配列番号 1 に示す塩基配列の 219 ~ 483 番目の 265 塩基）や、

配列番号 13 示す塩基配列（配列番号 1 に示す塩基配列の 129 ~ 483 番目の 355 塩基）からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0016】

本明細書において、「配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖（m1cR）をコードするポリヌクレオチドの全長又は部分配列であって、前記配列番号 1 に示す塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列を含む」とは、配列番号 1 に示す塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列、すなわち配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖（m1cR）をコードするポリヌクレオチド中の 3' 末端側の 10 塩基を含んでいればよいことを意味する。具体的には、配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖（m1cR）の全長をコードするポリヌクレオチドでもよく、配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖（m1cR）をコードするポリヌクレオチド中の 3' 末端側の 10 塩基を含んでいる限り、配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖（m1cR）中の 5' 末端側の任意の塩基が欠損した部分配列をコードするポリヌクレオチドでもよい。

10

【0017】

本明細書において、「少なくとも 90% 以上の配列同一性」とは、配列同一性が 90% 以上であることを意味し、好ましくは 93% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 98% 以上、さらにより好ましくは 99% 以上、最も好ましくは 100% の配列同一性を意味する。

20

【0018】

「上記（1）記載のポリヌクレオチドと少なくとも 90% 以上の配列同一性を有する塩基配列」とは、換言すると、「上記（1）記載のポリヌクレオチドにおいて、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、及び / 又は付加されたポリヌクレオチド」であり、かつ、記（1）記載のポリヌクレオチドと同等の機能を有する塩基配列である。ここで、「1 若しくは数個の塩基配列が欠失、置換、挿入、及び / 又は付加されたポリヌクレオチド」とは、ポリヌクレオチドの長さに応じて適宜調整できるが、例えば 1 ~ 30 個の範囲内、好ましくは 1 ~ 20 個の範囲内、より好ましくは 1 ~ 15 個の範囲内、さらに好ましくは 1 ~ 10 個の範囲内、さらに好ましくは 1 ~ 5 個の範囲内、さらに好ましくは 1 ~ 3 個の範囲内、さらに好ましくは 1 ~ 2 個の範囲内の数のポリヌクレオチドが欠失、置換、挿入、及び / 又は付加されたポリヌクレオチドを意味する。これらポリヌクレオチドの変異処理は、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発等の当業者に既知の任意の方法により行うことができる。

30

【0019】

本件ベクターにおけるリボソーム結合サイト（Ribosome binding site: RBS）をコードするポリヌクレオチドとは、原核生物の mRNA において翻訳開始コドン（AUG、GUG、UUG、AUU、CUG）の約 3 ~ 9 塩基上流に位置するプリン塩基（アデニン（A）、グアニン（G））に富むポリヌクレオチドであり、mRNA にリボソームを動員するのを助け、リボソームを開始コドンに配置することによってタンパク質合成を開始させるサイトである。リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドとしては、シャイン・ダガルノ配列（Shine-Dalgarno sequence）に基づいて設計することができる。具体的には、プリン塩基（アデニン（A）、グアニン（G））に富む 4 ~ 9 塩基からなるポリヌクレオチドを挙げることができ、GGAAG、AGGA、GGAGG、AGGAG、GGAGGT、AGGGAG、GAGGAG、AGGAGG、AGGAGGT、AGAGGAGA 等を挙げることができる。

40

【0020】

リボソーム結合サイトとして機能する任意のプリン塩基（アデニン（A）、グアニン（G））に富む配列の活性は、任意の好適な方法を使用して試験することができる。例えば、発現は、国際公開第 2004 / 046321 号パンフレットの実施例 1 に記載のとおり、mRNA によりコードされるレポータータンパク質の活性を計測することにより計測す

50

ることができる。

【0021】

リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの間には、任意の塩基配列からなるスペーサー配列を含むことが好ましい。スペーサー配列としては、4～20塩基、好ましくは5～11塩基、より好ましくは6～10塩基からなるポリヌクレオチドであり、かかる配列により、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドと発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドにおける開始コドンが、翻訳制御機能を発揮できる適切な距離で配置されることとなる。スペーサー配列の塩基としては特に制限されず、アデニン、グアニン、シトシン、チミンのいずれの塩基でもよい。

10

【0022】

本明細書における発現対象のタンパク質としては、原核生物内で発現させる目的タンパク質であればよく、用途に合わせて全長のタンパク質でも、その一部のアミノ酸配列からなるタンパク質でもよい。また、発現対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞において発現が最適化されるように改変されていてもよい。

【0023】

本明細書における原核生物としては、真正細菌又は枯草菌であればよく、真正細菌としては、大腸菌等のグラム陰性細菌や枯草菌等のグラム陽性細菌を挙げることができ、大腸菌を好適に挙げることができる。

【0024】

本明細書における原核生物用発現ベクターに用いるベクターとしては、プラスミドベクター、フォスミド、コスミド、BAC (bacterial artificial chromosome) ベクター等を挙げることができ、プラスミドベクターであることが好ましい。プラスミドベクターとしては、pUC18、pUC19、pBR322、pBR325、pGEM3、pGEM4等の大腸菌で複製可能なプラスミドベクターや、pUB110、pE194、pTP5、pC194等の枯草菌で複製可能なプラスミドベクターを挙げることができる。

20

【0025】

また、上記ベクターには、生来のタンパク質機能を維持できる限り、プロモーター、複製開始点、オペレーター、薬剤耐性遺伝子、マルチクロニング部位、異化活性化タンパク質結合サイト (Catabolite activator protein)、シグナルペプチド、タグペプチド、又はプロテアーゼ認識サイトを有するペプチドをコードするポリペプチドを含んでもよい。

30

【0026】

上記プロモーターとしては、T7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrpx2)、tacプロモーター、let1プロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

40

【0027】

上記複製開始点としては、用いる宿主細胞に合わせて適宜選択すればよく、大腸菌を宿主細胞とする場合にはpBR322由来の複製開始点を挙げることができる。

【0028】

上記オペレーターとしては、用いる宿主細胞に合わせて適宜選択すればよく、大腸菌を宿主細胞とする場合にはlacオペレーターを挙げることができる。

【0029】

上記薬剤耐性遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子等を挙げることができる。

50

【0030】

上記シグナルペプチドとしては、ゴルジ体移行シグナルペプチド、細胞膜移行シグナルペプチド、ミトコンドリア移行シグナルペプチド、核移行シグナルペプチド、シナプス移行シグナルペプチド、核小体移行シグナルペプチド、核膜移行シグナルペプチド、ペルオキシソーム移行シグナルペプチド等を挙げることができる。

【0031】

上記タグペプチドとしては、D D D D K (F L A G) タグ、H A タグ、M Y C タグ、P A タグ、H I S タグ、V 5 タグ、C B D タグ、C B P タグ、T A R G E T タグ、G F P タグ、M B P タグ、G S T タグ、T h i o r e d o x i n タグ、S N A P タグ、A C P タグ、M C P タグ、C L I P タグ、T A P タグ等を好適に挙げることができる。

10

【0032】

本件ベクターを含有する原核生物は、本件ベクターを原核生物に導入して作製することができ、本件ベクターを原核生物に導入する方法としては特に制限されず、カルシウムリン酸法、エレクトロポレーション法等の公知の方法を挙げることができる。

【0033】

本明細書におけるタンパク質の生産方法としては、本件ベクターを含有する原核生物を培養する工程と、培養した前記原核生物から発現対象のタンパク質を回収する工程を含む、タンパク質の生産方法であればよく、培養方法としては、通常の前記原核生物の培養に用いられる公知の方法を用いることができる。例えば、原核生物が大腸菌の場合は、37 前後、及び、振とう培養又は通気攪拌培養等の好氣的条件下で培養することができる。培養液からタンパク質を回収する方法としては、公知のタンパク質の回収方法、例えば、遠心分離、次いで、ゲルろ過、イオン交換、アフィニティ等のクロマトグラフィーにより回収する方法を挙げることができる。また、細胞外に分泌されるタンパク質又は細胞外分泌シグナルをもつタンパク質の場合には、細胞を破壊せずにタンパク質を回収することが好ましい。

20

【0034】

上記原核生物を培養する培地としては、原核生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、原核生物を培養し得る培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。上述の培地に用い得る炭素源としては、グルコース、ガラクトース、フラクトース、スクロース、ラフィノース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を挙げることができる。上述の培地に用い得る窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物や、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、各種アミノ酸等の窒素源を含む物質を挙げることができる。上述の培地に用い得る無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を挙げることができる。

30

【0035】

本明細書におけるキットとしては、タンパク質を発現するためのキットであって、本件ベクターと、タンパク質を発現するための説明書を含むキット（以下、「本件キット」ともいう）であればよい。

40

【0036】

本件キットには、本件ベクター及び上記説明書の他に、例えば、滅菌水、生理食塩水、界面活性剤、緩衝剤、保存剤、形質転換用試薬等を必要に応じて含んでもよい。

【実施例】

【0037】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、大腸菌の培養、プラスミドベクターの作製、蛍光顕微鏡観察、大腸菌の増殖測定については以下の手順によって行った。また、発現対象のタンパク質として、蛍光で発現が観察可能な m E G F P 又は m R u b y 3 を選択して用い

50

た。

【0038】

[大腸菌の培養]

大腸菌はK-12由来株のHST08(タカラバイオ社)又はBL21(DE3)(コスモバイオ社)を用いた。LB培地は市販のLB培地(日本ジェネティクス社)を用いた。LB寒天培地は、市販寒天(和光純薬工業社)を上記LB培地に追添加し作製した。培養は、37にて暗黒環境下で行なった。

【0039】

[プラスミドベクターの作製]

(1) GFP発現プラスミドベクター「GFP-pUC19」の作製

mEGFP(monomeric enhanced green fluorescent protein:以下、単に「GFP」ともいう)遺伝子が挿入されていたプラスミドベクターGFP-pUC19kan(ファスマック社)を鋳型に、以下のプライマーを使ってPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行い、mEGFP遺伝子を増幅した。

フォワードプライマー 配列番号14

GFP_FOR:GGTCTAGAGATCTATGGTTAGTAAAGGAG

リバープライマー 配列番号15

GFP_REV:GCCCGGATCCCTACTTATACA

【0040】

得られたPCR増幅産物を制限酵素XbaI(「5'-TCTAGA-3'」)及びBamHI(「5'-GGATCC-3'」)で処理し、pUC19ベクター(タカラバイオ社)に挿入し、プラスミドベクター「GFP-pUC19」を作製した。なお、上記フォワードプライマーGFP_FORには、XbaI、BglIIサイト及びGFPの開始コドン(下線:ATG)が含まれ、上記リバープライマーGFP_REVには、BamHIサイト及び停止コドン(下線:CTA)が含まれる。

【0041】

(2) mlcR、RBS、スペーサー、及びGFP発現プラスミドベクター「mlcR-RBS-Spacer-GFP-pUC19」の作製

(2-1) mlcR遺伝子の増幅

発明者らが公知の手法に基づいて作製した細胞性粘菌cDNAライブラリーを鋳型として、耐熱性DNA複製酵素PrimeSTAR Max DNA Polymerase(タカラバイオ社)を用いて、PCRでmlcR遺伝子を増幅した。このときPCRは増幅効率を高めるために2種類のリバープライマーを用いて2段階で行った。1回目のPCRは、5'末端側に制限酵素XbaI、BglII切断サイトを含むフォワードプライマー(配列番号16:mlcR-FW 5'-GGTCTAGAGATCTATGGCCTCAAC-3'と、3'末端側にRBS及びスペーサーの一部の配列の相補配列を含むリバープライマー(配列番号17:mlcR-RV1 5'-CCACCTCCTTTCCTTACTGAAGAG-3')を設計して用いた。2回目のPCRは、上記フォワードプライマー(配列番号16:mlcR-FW)と、3'末端側にRBS、スペーサーの全配列及びBamHI切断サイトの相補配列を含むリバープライマー(配列番号18:mlcR-RV2 5'-TAGGATCCACCACTCCTTTC-3')を設計して用いた。mlcR遺伝子と上記フォワードプライマー、リバープライマーの位置関係を示した図を図1に示す。

【0042】

(2-2) mlcR、RBS、スペーサー、及びGFP発現プラスミドベクターの作製

上記で得られたmlcR遺伝子の増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、分離及び精製後、BglII及びBamHIを用いて制限酵素消化し、同様にBglIIで消化した上記プラスミドベクター「GFP-pUC19」とライゲーションを行い、プラスミドベクター「mlcR480G-RBS-Spacer-GFP-pUC19」を作製した。さらに、大腸菌K-12由来株のHST08(タカラバイオ社)に上記プラスミドベクター

10

20

30

40

50

「m1cR480G-RBS-Spacer-GFP-pUC19」を導入し、アンピシリン含有LB寒天培地で培養して形質転換を行なった。得られた形質転換体をさらにアンピシリン含有LB培地で培養後、市販のプラスミドベクター精製キット：Fast Gene Plasmid Mini（日本ジェネティクス社）によりプラスミドベクター「m1cR480G-RBS-Spacer-GFP-pUC19」を精製した。

【0043】

なお、配列番号17に示すm1cR-RV1の3～8番目の6塩基、及び配列番号18に示すm1cR-RV2の12～17番目の6塩基はRBS（リボソーム結合サイト）の相補配列、配列番号17に示すm1cR-RV1の1～2番目の塩基はスペーサー配列の一部の相補配列、配列番号18に示すm1cR-RV2の3～11番目の塩基はスペーサー配列の相補配列である。

10

【0044】

ここで、上記のm1cR-RV1及びm1cR-RV2プライマーを使うことによって配列番号1に示すm1cRをコードするポリヌクレオチドの480位に塩基置換（本来アデニン（A）がグアニン（G）が生じる。そこで、生じた塩基置換を修正（グアニン（G）をアデニン（A）に修正）するために、フォワードプライマー：m1cR-repair-FW（配列番号19：5'-TTCAGTAAAAAGGAGGTGGTGGAT-3'）及びリバースプライマー：m1cR-repair-RV（配列番号20：5'-TCCTTTTTTACTGAAGAGAGTATTACGAAAAG-3'）を用いたInverse PCRにより増幅した。増幅産物を大腸菌K-12由来株のHST08（タカラバイオ社）に導入してアンピシリン含有LB寒天培地で培養して形質転換を行なった。得られた形質転換体をさらにアンピシリン含有LB培地で培養後、上記と同様の方法でプラスミドベクターを精製し、プラスミドベクター「m1cR-RBS-Spacer-GFP-pUC19」を得た。得られたプラスミドベクターのマップを図2に示す。図2中、CAPはcatabolite activator protein binding site、Placはlac promoter、lacOはlac operatorを示す。

20

【0045】

(3) RBS、スペーサー、及びGFP発現プラスミドベクター「RBS-Spacer-pUC19」の作製

30

m1cRなしのコントロールとして、上記プラスミドベクター「m1cR-RBS-Spacer-GFP-pUC19」をテンプレートとして、m1cRをコードするポリヌクレオチドの3'末端のさらに3'側のグアニン（G）を含むフォワードプライマー：RBS-FW（配列番号21：5'-ATTCTAGAGGAGGTGGTGGATC-3'）と上記リバースプライマー：GFP_REV（配列番号15）を用いてPCRにより増幅後、制限酵素（XbaI、BamHI）処理したpUC19に挿入して、プラスミドベクター「RBS-Spacer-pUC19」を作製した。

【0046】

(4) 欠損m1cR-GFPキメラ遺伝子の作製

上記(2)で作製したプラスミドベクター「m1cR-RBS-Spacer-GFP-pUC19」を鋳型に、m1cR遺伝子の全長483bpにおける3'末端（停止コードは含まず）から10、20、25、30、40、45、60、74、110、235、265、355bpの部分塩基配列をPCRによって増幅し、m1cR遺伝子の5'末端側から所定の領域を欠損させた欠損m1cR-GFPキメラ遺伝子断片（それぞれ順にm1cR_R10、m1cR_R20、m1cR_R25、m1cR_R30、m1cR_R40、m1cR_R45、m1cR_R60、m1cR_R74、m1cR_R110、m1cR_R235、m1cR_R265、m1cR_R355断片）を作製した。PCRに用いたプライマーは、増幅産物の5'末端側にXbaI切断サイト、3'末端側にBamHI切断サイトを含むように設計した。

40

【0047】

50

得られたそれぞれの m l c R の部分塩基配列を X b a I 及び B a m H I で消化し、その後同じ X b a I 及び B a m H I で制限酵素処理した p U C 1 9 とライゲーションすることで、プラスミドベクター「m l c R - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」における配列番号 1 に示す m l c R の全長 (f u l l) を、m l c R の 5 ' 末端から所定の領域を欠損させた部分塩基配列 (配列番号 2 ~ 1 3) に置き換えたプラスミドベクター「m l c R _ 1 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 2 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 2 5 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 3 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 4 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 4 5 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 6 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 7 4 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 1 1 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 2 3 5 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 2 6 5 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」「m l c R _ 3 5 5 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」を作製した。

【 0 0 4 8 】

(5) m l c R 、 R B S 、 及び m R u b y 3 発現プラスミドベクター「m l c R - R B S - S p a c e r - m R u b y - p U C 1 9」の作製

上記 m E G F P 遺伝子の代わりに m R u b y 3 遺伝子 (B a j a r , B . T . e t a l . , 2 0 1 6 . I m p r o v i n g b r i g h t n e s s a n d p h o t o s t a b i l i t y o f g r e e n a n d r e d f l u o r e s c e n t p r o t e i n s f o r l i v e c e l l i m a g i n g a n d F R E T r e p o r t i n g . S c i R e p , 6 , p . 2 0 8 8 9 .) を用いた以外は、上記と同様の用法を行って、「m l c R - R B S - S p a c e r - m R u b y - p U C 1 9」を作製した。

【 0 0 4 9 】

[蛍光顕微鏡観察]

カバーガラス (2 4 × 6 0 m m : 松浪硝子工業) に大腸菌培養液を 5 μ L 滴下し、その上に 1 . 5 % アガロース片 (8 × 8 × 1 m m) を被せ、さらにカバーガラス (1 8 × 1 8 m m : 松浪硝子工業) を被せ、励起光源として水銀ランプが搭載された倒立型蛍光顕微鏡 (N i k o n) を用いて、観察を行なった。m E G F P 又は m R u b y 3 の蛍光の Z s c o r e は、以下のように計算した。なお、大腸菌の蛍光値は、大腸菌内の任意の 1 箇所を代表値として用いた。背景蛍光は、カバーガラス上で大腸菌が観察されない任意箇所を用いた。

【 0 0 5 0 】

Z s c o r e = (大腸菌の蛍光値 - 1 0 箇所の背景蛍光の平均値) / (1 0 箇所の背景蛍光の標準偏差)

【 0 0 5 1 】

[大腸菌の増殖測定]

分光光度計 (島津製作所) を用いて、6 0 0 n m での吸光度を測定し求めた。

【 0 0 5 2 】

[実施例 1] 形質転換体の観察

上記プラスミドベクター「m l c R - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」で形質転換した大腸菌 (m l c R - G F P / p U C 1 9 株) 、 及びコントロールとして上記プラスミドベクター「G F P - p U C 1 9」で形質転換した大腸菌 (G F P / p U C 1 9 株) を L B 寒天培地に塗布して 3 7 ° C で一晩暗黒環境下にて培養し、青色 L E D 照射下で撮影した写真を図 3 に示す。図 3 中、左上が G F P / p U C 1 9 株、右下が m l c R - G F P / p U C 1 9 株である。

【 0 0 5 3 】

さらに、L B 培地を加えたカルチャーチューブに、上記で緑色蛍光を発することが確認されたコロニーを加えて一晩暗黒環境下にて培養後、大腸菌培養液を上述の蛍光顕微鏡観察方法によって観察した結果を図 4 に示す。

10

20

30

40

50

【0054】

図3、図4より、m1cR - GFP / pUC19株では、LB培地で培養するだけで恒常的に緑色蛍光を発することが確認された。したがって、GFPをコードするポリヌクレオチドの上流にm1cR遺伝子及びRBSをコードするポリヌクレオチドを配置するだけでGFPを発現させることが可能であることが明らかとなった。

【0055】

なお、上記における「m1cR - RBS - Spacer - GFP - pUC19」の代わりに上記「m1cR480G - RBS - Spacer - GFP - pUC19」で大腸菌を形質転換した場合も、同様に恒常的に緑色蛍光を発し、GFPが発現していることが確認された(図示なし)。すなわち、m1cRをコードする塩基配列の一部が変異した配列であっても緑色蛍光を発し、GFPが発現していることに影響はないことが確認された。

10

【0056】

さらに、上記における「m1cR - RBS - Spacer - GFP - pUC19」の代わりに「m1cR - RBS - Spacer - mRuby - pUC19」で大腸菌を形質転換した以外は、上記と同様の方法で蛍光顕微鏡観察を行った。結果を図5に示す。図5に示すように、mRuby3をコードするポリヌクレオチドの上流にm1cR遺伝子及びRBSをコードするポリヌクレオチドを配置するだけで、赤色蛍光を発し、mRuby3が発現していることが可能であることが明らかとなった。

【0057】

また、上記のようにGFP、mRubyのいずれを発現させた場合にも、翻訳促進効果のあるm1cR遺伝子及びRBSをコードするポリヌクレオチドは、GFP又はmRubyをコードするポリヌクレオチドの上流、すなわち非翻訳領域に含むように設計されているため、発現したGFP又はmRubyに変異は生じていない。

20

【0058】

[実施例2] 欠損m1cR - GFP形質転換体の蛍光強度

m1cR全長の塩基配列の代わりに、m1cRの5'末端から所定の領域を欠損させた部分塩基配列に置き換えたそれぞれのプラスミドベクターを用い、実施例1と同様の方法で大腸菌K-12由来株のHST08に形質転換して培養し、GFPの蛍光強度を蛍光顕微鏡で観察した結果を図6に示す。図6中、(a)はm1cRの欠損部位を表す図であり、(b)はそれぞれのプラスミドベクターで形質転換した株のGFP蛍光強度(Z score)を示す図である。また、図6中「m1cR__10」、「m1cR__20」、「m1cR__25」、「m1cR__30」、「m1cR__40」、「m1cR__45」、「m1cR__60」、「m1cR__74」、「m1cR__110」、「m1cR__235」、「m1cR__265」、「m1cR__355」、「m1cR__full」はそれぞれ上記で作製したプラスミドベクター「m1cR__10 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__20 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__25 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__30 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__40 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__45 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__60 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__74 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__110 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__235 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__265 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR__355 - RBS - Spacer - GFP - pUC19」、「m1cR - RBS - Spacer - GFP - pUC19」で形質転換した株を表す。さらに、GFPはプラスミドベクターGFP / pUC19株、RBS + Spacerはプラスミドベクター「RBS - Spacer - pUC19」で形質転換した株を表す。

30

40

【0059】

図6(b)に示すように、m1cR遺伝子の5'末端側の一部を欠損してもGFPの蛍光が観察され、GFPが発現していることが確認できた。特に、蛍光強度に関して、m1

50

c R の 3' 末端から 10 塩基の部分塩基配列を用いた場合、コントロールの R B S + S p a c e r と比較して 2.7 倍もの Z s c o r e を有していた。また、m l c R 遺伝子の 3' 末端から 40 塩基、235 塩基、265 塩基の部分配列を用いた場合、部分塩基配列にも関わらず m l c R 遺伝子全長を用いた場合と同様の Z s c o r e を有し、m l c R 遺伝子の 3' 末端から 25 塩基の部分塩基配列を用いた場合には、m l c R 遺伝子全長を用いた場合の約 2 倍もの Z s c o r e を有していた。また、図 6 (b) に示すように、「R B S + S p a c e r」や「G F P」ではほとんど蛍光が見られなかった。かかる結果より、配列番号 1 に示すミオシン調節軽鎖 (m l c R) をコードする塩基配列の少なくとも 474 ~ 483 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドと、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドにより、リボソーム結合サイトの下流にある遺伝子を高発現させることが可能であることが明らかとなった。

10

【0060】

[実施例 3] G F P の発現による生育とプラスミドベクター収量への影響

G F P を発現させることによる宿主細胞の生育への悪影響がないか調べた。まず、G F P 発現の有無における菌の生育速度を比較した。培養は L B 培地で行った。その結果、G F P 蛍光なしの株 (p U C 19 株 : プラスミドベクター「p U C 19」で形質転換した株) の生育と G F P 蛍光ありの株 (m l c R - G F P / p U C 19 株) の生育は同程度であった (図 7 A)。図 7 A 中、横軸は培養時間、縦軸は培養開始時を 1 とした場合の相対細胞密度 (r e l a t i v e c e l l d e n s i t y) を吸光度測定した結果である。また、それぞれの株から公知の手法でプラスミドベクターを精製し、プラスミドベクターの収量を比較した。プラスミドベクターの収量は、分光光度計 (島津製作所社) を用いて、260 nm での吸光度を測定し求めた。その結果、G F P 蛍光ありの株 (m l c R - G F P / p U C 19 株) の方が平均的に G F P 蛍光なしの p U C 19 株に対して収量が約 2 倍であった (図 7 B)。上記結果から、G F P 発現による生育に対する悪影響は観察されず、かつプラスミドベクターの収量が多いことが明らかとなった。

20

【0061】

[実施例 4] グルコースによる発現量の制御

大腸菌を利用して発現を行う際には、発現量を制御、すなわち発現量を高めたり、発現量を抑制する必要がある場合も生じる。上記実施例で用いた p U C 19 ベクターは図 2 に示すように C A P、l a c p r o m o t e r 及び l a c o p e r a t o r を有しているので、グルコースにより発現の制御 (カタボライトリプレッション) ができるか否かを調べた。

30

【0062】

上記実施例で作製した 4 種類のプラスミドベクター「m l c R - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 19」、「m l c R _ 25 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 19」、「m l c R _ 10 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 19」、及び「R B S - S p a c e r - p U C 19」を公知の手法によって作製したケミカルコンピテント大腸菌 B L 21 (D E 3) 株 (コスモバイオ社) に導入し、アンピシリン及び 1% グルコース含有 L B 培地、又はアンピシリン含有、グルコース不含 L B 培地に一晩培養した。培養後の培養液を上記と同様の方法で倒立型蛍光顕微鏡を用いて、G F P の蛍光の Z s c o r e を求めた。結果を図 8 に示す。図 8 中、黒カラムがグルコース含有、白カラムがグルコース不含である。

40

【0063】

図 8 に示すようにグルコースなしの場合、m l c R 遺伝子を含む本件ベクターを用いれば、G F P を高発現していることが明らかとなった。具体的には、Z s c o r e として R B S のみの場合と比較して m l c R _ 10 を有している場合で 3.4 倍、m l c R _ 25 を有している場合で 8.4 倍、m l c R 全長を有している場合で 6.3 倍も高発現していた。一方、グルコースを加えるといずれも発現が抑制されていた。したがって、培地中のグルコース量を調整することで、タンパク質の発現を制御可能であることが確認できた。

50

【 0 0 6 4 】

【 実施例 5 】 I P T G による発現量の制御

上記実施例で用いた p U C 1 9 ベクターは図 2 に示すように l a c p r o m o t e r 及び l a c o p e r a t o r を有しているので、I P T G により発現の制御ができるか否かを調べた。

【 0 0 6 5 】

上記実施例で作製した 4 種類のベクター「m l c R - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」、「m l c R _ 2 5 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」、「m l c R _ 1 0 - R B S - S p a c e r - G F P - p U C 1 9」、及び「R B S - S p a c e r - p U C 1 9」を大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 株 (コスモバイオ社製) に導入し、アンピシリン及び 1 % グルコース含有 L B 培地に於て一晚培養した。その培養液の一部を、アンピシリン及び 1 m M I P T G 含有、グルコース不含 L B 培地、又はアンピシリン含有、グルコース不含 L B 培地 (I P T G なし) に於てさらに培養した。培養後の培養液を上記と同様の方法で倒立型蛍光顕微鏡を用いて、G F P の蛍光の Z s c o r e を求めた。結果を図 9 に示す。図 9 中、I P T G ありを「W /」、I P T G なしを「W / O」と示す。また、横軸がグルコース不含 L B 培地での培養時間、縦軸が Z s c o r e である。

10

【 0 0 6 6 】

図 9 に示すように I P T G なしでも m l c R 遺伝子を含む本発明のベクターを用いれば、G F P を高発現していることが明らかとなった。また、I P T G を加えることによって、m l c R 遺伝子の部分配列、特に m l c R 遺伝子の全長 4 8 3 b p における 3 ' 末端 (停止コドンは含まず) から 2 5 b p の部分塩基配列を含む本件ベクターを用いれば、より発現量が増えることが確認できた。したがって、培地中の I P T G 量を調整することで、発現を制御可能であることが確認できた。

20

【 0 0 6 7 】

なお、上記実施例の結果を踏まえて、1) p U C ベクターを使って、I P T G なしの培地でも G F P 発現が確認できる；2) この時、p U C ベクターでは L a c I - L a c O による転写抑制機能が働いている (この抑制は完全なものではなく、転写されてしまう " モレ " があることが知られている) ；3) この状況下で、m l c R が接続されていることで平時 (m l c R なし) では確認できない G F P 発現が観察される；ということは「上記 (1) 又は (2) 記載のポリヌクレオチドと、リボソーム結合サイトをコードするポリヌクレオチドを備えていれば、発現対象のタンパク質の翻訳が促進されている」と考えられる。

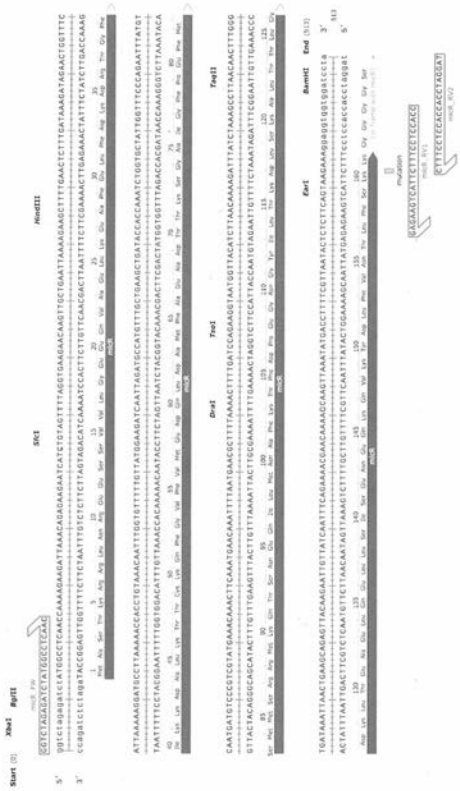
30

【 産業上の利用可能性 】

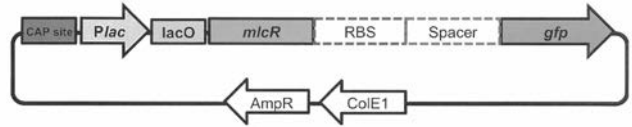
【 0 0 6 8 】

本件ベクターを用いれば、原核生物を用いて有用なタンパク質の生産が可能となる。

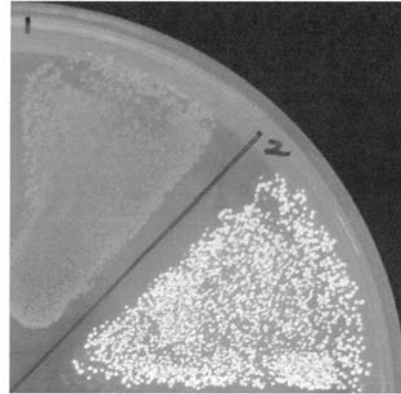
【 図 1 】



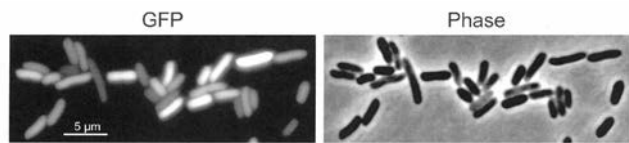
【 図 2 】



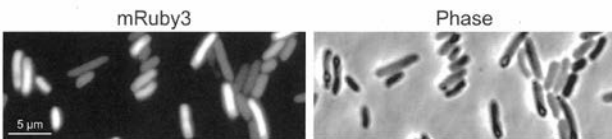
【 図 3 】



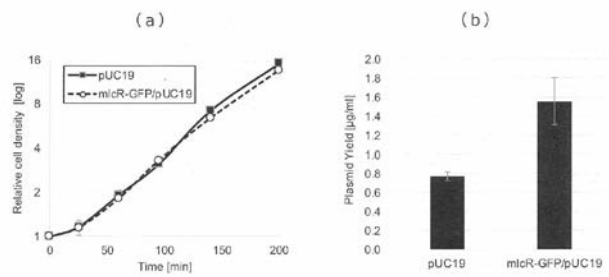
【 図 4 】



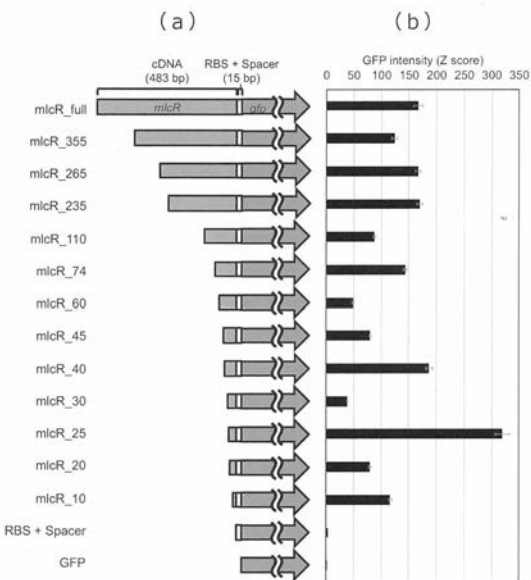
【 図 5 】



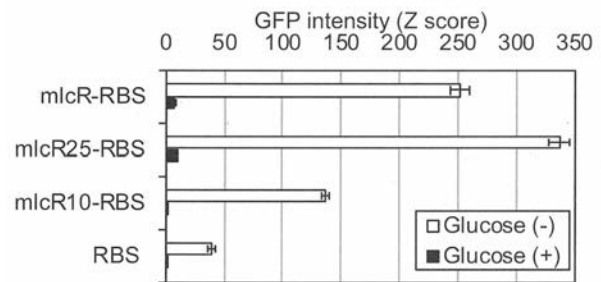
【 図 7 】



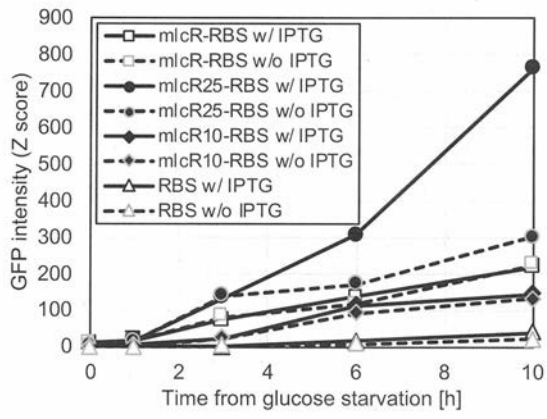
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2020014392000001.app