

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4842750号  
(P4842750)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日(2011.10.14)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21	Z N A
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	A
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	21/02	C

請求項の数 12 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2006-257911 (P2006-257911)	(73) 特許権者	000000918
(22) 出願日	平成18年9月22日 (2006. 9. 22)		花王株式会社
(65) 公開番号	特開2007-306912 (P2007-306912A)		東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
(43) 公開日	平成19年11月29日 (2007.11.29)		〇号
審査請求日	平成20年12月12日 (2008.12.12)	(74) 代理人	110000084
(31) 優先権主張番号	特願2006-116560 (P2006-116560)		特許業務法人アルガ特許事務所
(32) 優先日	平成18年4月20日 (2006. 4. 20)	(74) 代理人	100068700
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

枯草菌spoVG遺伝子若しくはaprE遺伝子の上流に位置する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を枯草菌prsA遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子のゲノム上における上流に導入してなるか、或いは枯草菌spoVG遺伝子若しくはaprE遺伝子の上流に位置する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を枯草菌prsA遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流に連結した遺伝子断片をゲノム上に導入し、且つ枯草菌ywhA遺伝子、yjbl遺伝子若しくはyIIB遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子を欠失又は不活性化してなる微生物株に、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

10

【請求項2】

転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位が、枯草菌のspoVG遺伝子の上流に位置するものである請求項1記載の組換え微生物。

【請求項3】

転写開始制御領域が配列番号9の塩基番号38～210の塩基配列からなる領域であり、転写開始制御領域とリボソーム結合部位が配列番号9の塩基番号38～230の塩基配列からなる領域である、請求項2記載の組換え微生物。

【請求項4】

微生物がバチルス属 (*Bacillus*) 細菌である請求項1～3のいずれか1項記載の組換え微生物。

20

## 【請求項 5】

バチルス (*Bacillus*) 属細菌が枯草菌 (*Bacillus subtilis*) である請求項 4 記載の組換え微生物。

## 【請求項 6】

ywhA 遺伝子、yjbI 遺伝子又は yllB 遺伝子に相当する遺伝子が、当該遺伝子と塩基配列において 90% 以上の同一性を有するバチルス属細菌由来の遺伝子である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の組換え微生物。

## 【請求項 7】

prsA 遺伝子に相当する遺伝子が、以下 (1) ~ (4) から選択される遺伝子である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の組換え微生物。

(1) 配列番号 1 で示される塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つ配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子。

(2) 配列番号 1 で示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、且つ配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子。

(3) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子。

(4) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードする DNA からなる遺伝子。

## 【請求項 8】

目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子上流に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌用シグナル領域のいずれか 1 以上の領域を結合した請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の組換え微生物。

## 【請求項 9】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域及び分泌シグナル領域からなる 3 領域を結合した請求項 8 記載の組換え微生物。

## 【請求項 10】

分泌シグナル領域がバチルス (*Bacillus*) 属細菌のセルラーゼ遺伝子由来のものであり、転写開始制御領域及び翻訳開始制御領域が当該セルラーゼ遺伝子上流 0.6 ~ 1 kb 領域由来のものである請求項 8 又は 9 記載の組換え微生物。

## 【請求項 11】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域及び分泌シグナル領域からなる 3 領域が、配列番号 5 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1 ~ 659 の塩基配列、配列番号 7 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1 ~ 696 の塩基配列、又は当該塩基配列のいずれかと 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA 断片である請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項記載の組換え微生物。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の組換え微生物を用いる目的のタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に用いる組換え微生物、及びタンパク質又はポリペプチドの生産方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめ

10

20

30

40

50

めとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

#### 【 0 0 0 3 】

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。特に最近では、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、遺伝子組換え技術等を用いたより効率的な生産菌の育種が行われるようになってきている。さらに、近年のゲノム解析技術の急速な発展を受けて、対象とする微生物のゲノム情報を解読し、これらを積極的に産業に応用しようとする試みもなされている。ゲノム情報の公開されている産業的に有用な宿主微生物としては、枯草菌 *Bacillus subtilis* Marburg No.168 (非特許文献 1)、大腸菌 *Escherichia coli* K-12 MG1655 (非特許文献 2)、コリネバクテリウム *Corynebacterium glutamicum* ATCC132032などが挙げられ、これらのゲノム情報を利用し、改良を加えた菌株が開発されている。しかしながら、上記のような取り組みにも関わらず、生産効率は必ずしも満足できるものではない。

10

#### 【 0 0 0 4 】

prsA遺伝子は、枯草菌においてタンパク質の分泌過程に関与するタンパク質として発見され、これまでの研究から、PrsAは、細胞膜を通過して細胞質外に輸送された後のタンパク質の折りたたみを容易にするシャペロン様の機能を有することが推測されている。そして、自身のプロモーター領域を含む枯草菌のprsA遺伝子を挿入したプラスミドを導入し、微生物中に複数のprsA遺伝子を持たせることにより、目的タンパク質の生産性が向上した微生物が報告されている(非特許文献 3)。しかしながら、かかる微生物では、1菌体当たり導入される複数個のプラスミドの個数を制御するのが困難であり、また生産培養中にプラスミドの脱落がしばしば起こるという問題があり、実用的ではない。更に前記報告において、prsA遺伝子断片を挿入したクローニングベクター-pHP13は枯草菌プラスミドpTA1060の複製機能を含んでおり(非特許文献 4)、pTA1060の枯草菌1ゲノム当たり、つまり1菌体当たりにおけるコピー数は平均5.2であることが報告されている(非特許文献 5)。すなわち、前記報告における目的タンパク質の増加量は野生株の生産量の1~5倍であることから、導入したprsA遺伝子1個あたりの生産増加量は野生株生産量の約0.2~1倍であり、十分な効果が得られているとは言えない。

20

30

#### 【 0 0 0 5 】

ywhA遺伝子がコードするタンパク質YwhAは、そのアミノ酸配列よりMarRファミリーに属する転写因子をコードしていると考えられるが、制御対象となる遺伝子、及びその機能は不明である。またyvbA遺伝子がコードするタンパク質YvbAは、そのアミノ酸配列よりArsRファミリーに属する転写因子をコードしていると考えられるが、制御対象となる遺伝子、及びその機能は不明である。yjbl遺伝子とylib遺伝子は、いずれも機能未同定のタンパク質をコードする遺伝子である。

しかしながら、prsA遺伝子を過剰発現しており、且つ、斯かる遺伝子を改変した微生物はこれまで知られておらず、特にその様な微生物がprsA遺伝子を過剰発現している微生物に比べ、有用なタンパク質又はポリペプチドの優れた生産性を示すことは予想すらされていない。

40

【非特許文献 1】Nature, 390, 249, 1997

【非特許文献 2】Science, 277, 1453, 1997

【非特許文献 3】Mol. Microbiology, 8, :727 (1993)

【非特許文献 4】Mol. Gene. Genet., 209:335 (1987)

【非特許文献 5】Plasmid, 18:8 (1987)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【 0 0 0 6 】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドの生産性がより向上された微生物、及び当該微

50

生物を利用して、目的のタンパク質又はポリペプチドを製造する方法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、微生物ゲノム上にコードされる各種遺伝子において、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に影響を及ぼす遺伝子を探索したところ、枯草菌prsA遺伝子を強化して枯草菌PrsAを過剰に発現させると共に、機能が解明されていない特定の遺伝子を欠失又は不活性化した微生物株に、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した場合に、目的のタンパク質又はポリペプチドの生産性が当該遺伝子の改変前と比較して向上することを見出した。

10

【0008】

すなわち本発明は、微生物において機能を有する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を、枯草菌prsA遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子のゲノム上における上流に導入してなるか、或いは微生物において機能を有する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を枯草菌prsA遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子上流に連結した遺伝子断片を導入し、且つywhA遺伝子、yvbA遺伝子、yjbl遺伝子若しくはylIB遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子を欠失又は不活性化してなる微生物株に、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物に係るものである。

【0009】

また本発明は、当該組換え微生物を用いた目的のタンパク質又はポリペプチドの製造方法に係るものである。

20

【発明の効果】

【0010】

本発明の組換え微生物は、目的タンパク質又は目的ポリペプチドの生産性が高いものである。よって、これを用いて目的タンパク質又は目的ポリペプチドの生産を行えば、当該物質の生産に必要な時間やコストを削減することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明においてアミノ酸配列および塩基配列の同一性はLipman-Pearson法 (Science, 27, 1435, (1985))によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。

30

【0012】

本明細書において、転写開始制御領域は、プロモーター及び転写開始点を含む領域であり、リボソーム結合部位は、開始コドンと共に翻訳開始制御領域を形成するShine-Dalgarno (SD) 配列 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1974)) に相当する部位である。

【0013】

本発明の微生物を構築するための親微生物としては、ywhA遺伝子、yvbA遺伝子、yjbl遺伝子若しくはylIB遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子を有するものであればよく、これらは野生型のものでも変異を施したものでもよい。具体的には、バチルス (Bacillus) 属細菌や、クロストリジウム (Clostridium) 属細菌、或いは酵母等が挙げられ、中でもバチルス (Bacillus) 属細菌が好ましい。更に、全ゲノム情報が明らかにされ、遺伝子工学、ゲノム工学技術が確立されている点、またタンパク質を菌体外に分泌生産させる能力を有する点から特に枯草菌 (Bacillus subtilis) が好ましい。

40

【0014】

本発明の枯草菌prsA遺伝子とは、配列番号1で示される塩基配列からなる遺伝子をいう。枯草菌prsA遺伝子に相当する遺伝子とは、枯草菌prsA遺伝子と実質的に同じ機能を有する遺伝子をいい、例えば、バチルス リケニホルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス アントラシス (Bacillus anthracis)、バチルス セレウス (Bacillus cereus)

50

、バチルス チューリンジェンシス (*Bacillus thuringiensis*)、或いはオーシャノバチルス イヘンシス (*Oceanobacillus iheyensis*) 等において、主にゲノム解析により同定された各 *prsA* 遺伝子が挙げられる。また枯草菌 *prsA* 遺伝子に相当する遺伝子としては以下の (1) ~ (4) のいずれかの遺伝子が挙げられる。

【0015】

(1) 配列番号1で示される塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つ配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

【0016】

(2) 配列番号1で示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、且つ配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。なお、ここで、「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press] 記載の方法が挙げられ、例えば、6 × SSC (1 × SSCの組成: 0.15 M 塩化ナトリウム、0.015 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、0.5% SDS、5 × デンハート及び100 mg/mL ニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65 °Cで8 ~ 16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

【0017】

(3) 配列番号2で示されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

【0018】

(4) 配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

なお、ここで、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列には、1若しくは数個、好ましくは1 ~ 10個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列が含まれ、付加には、両末端への1 ~ 数個のアミノ酸の付加が含まれる。

【0019】

なお、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に等価なタンパク質とは、*prsA* 遺伝子によりコードされるタンパク質と実質的に同じ機能を有し、細胞膜を通過して細胞質外に輸送された後のタンパク質の折りたたみを容易にするシャペロン様の機能を有するタンパク質をいう。

【0020】

本発明の微生物において機能する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位としては、宿主となる微生物において機能する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位であれば特に限定されないが、例えば、枯草菌 *spoVG* 遺伝子若しくは *aprE* 遺伝子又はこれらの遺伝子に相当する遺伝子の上流に位置する転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位が好ましい。枯草菌 *spoVG* 遺伝子の転写開始制御領域の一例としては、配列番号9の塩基番号38 ~ 210の塩基配列からなる領域、又はこれらの配列と相同な配列からなり転写開始制御領域としての機能を有する領域が挙げられる。また、枯草菌 *spoVG* 遺伝子の転写開始制御領域とリボソーム結合部位の一例としては、配列番号9の塩基番号38 ~ 230の塩基配列からなる領域、又はこれらの配列と相同な配列からなり転写開始制御領域とリボソーム結合部位としての機能を有する領域が挙げられる。

【0021】

prsA遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子のゲノム上における上流への当該転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位の導入には、枯草菌のprsA遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の本来の転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位の一部又は全部を置換するもの他に、本来の転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を残したまま挿入するものが含まれる。

#### 【 0 0 2 2 】

当該転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位への置換は、例えば相同組換えによる公知の方法を用いて行うことができる。すなわち、まず、かかる転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を含むDNA断片の上流にprsA遺伝子の本来の転写開始制御領域の上流領域を含むDNA断片と薬剤耐性遺伝子断片を、一方、下流にprsA遺伝子の翻訳開始制御領域と構造遺伝子領域の一部又は全部、或いはprsA遺伝子の構造遺伝子領域の一部又は全部を含むDNA断片を、SOE (splicing by overlap extension) - PCR法 (Gene, 77, 61, 1989) などの公知の方法により結合させる。この様にして、prsA遺伝子の本来の転写開始制御領域の上流領域を含むDNA断片、薬剤耐性遺伝子断片、当該転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を含むDNA断片、prsA遺伝子の翻訳開始制御領域と構造遺伝子領域の一部又は全部、或いはprsA遺伝子の構造遺伝子領域の一部又は全部を含むDNA断片、の順に結合したDNA断片を得る。

#### 【 0 0 2 3 】

次に、かかるDNA断片を、公知の方法により親微生物細胞内に取り込ませることにより、親微生物ゲノムのprsA遺伝子の本来の転写開始制御領域の上流領域、及びprsA遺伝子の翻訳開始制御領域と構造遺伝子領域の一部又は全部、或いはprsA遺伝子の構造遺伝子領域の一部又は全部を含む領域の2箇所において、二重交差の相同組換えが起こる。その結果、本来の転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位が当該転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位に置換された形質転換体を、上記薬剤耐性遺伝子を指標として分離することができる。これにより、ゲノム上のprsA遺伝子上流へ導入された転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位は、遺伝的に安定に保持されることとなる。尚、具体的に導入用DNA断片を宿主微生物に導入する公知の方法としては、コンピテントセル形質転換方法(J. Bacteriol. 93, 1925 (1967))、プロトプラスト形質転換法(Mol. Gen. Genet. 168, 111 (1979))、或いはエレクトロポレーション法(FEMS Microbiol. Lett. 55, 135 (1990))等が挙げられ、特にコンピテントセル形質転換方法が好ましい。また、本明細書において、遺伝子の上流・下流とは、複製開始点からの位置ではなく、上流とは対象として捉えている遺伝子又は領域の5'側に続く領域を示し、一方、下流とは対象として捉えている遺伝子又は領域の3'側に続く領域を示す。

特に、本発明微生物の宿主として枯草菌を用いる場合、prsA遺伝子の本来の転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位から、spoVG遺伝子の転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位への相同組換えによる置換は、Mol. Gen. Genet., 223, 268, 1990記載の方法等を利用して行うことが出来る。

#### 【 0 0 2 4 】

また、当該転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位の挿入は、挿入したい転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位の両末端に付加するDNA断片の配列を適切に選択すれば、上述の置換の方法と同様の方法により行うことができる。例えば、かかる転写開始制御領域の上流に、本来の転写開始制御領域の上流領域を含むDNA断片と薬剤耐性遺伝子断片とを結合させ、下流に本来の転写開始制御領域の一部又は全部を含むDNA断片を結合させる。この様にして、本来の転写開始制御領域の上流領域を含むDNA断片、薬剤耐性遺伝子断片、当該転写開始制御領域、本来の転写開始制御領域の一部又は全部を含むDNA断片、の順に結合したDNA断片を得る。次に、かかるDNA断片を宿主微生物に挿入したのち、薬剤耐性遺伝子を指標として形質転換体を分離

することができる。このようにして分離した形質転換体のゲノム上では、本来の転写開始制御領域と当該転写開始制御領域とがそれぞれ間をあげずに隣接した状態で安定に保持されることとなる。

【0025】

本発明において当該転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位が導入されるゲノム上における上流とは、prsA遺伝子の開始コドンの上流側であれば特に限定されないが、隣接する2000塩基対以内の領域が好ましく、500塩基対以内の領域がより好ましく、100塩基対以内の領域が更に好ましく、50塩基対以内の領域が特に好ましい。

【0026】

また、本発明における転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位をprsA遺伝子上流に連結した遺伝子断片は、枯草菌その他の微生物のゲノムをテンプレートとして、PCR法等の公知のクローニング方法により得た転写開始制御領域若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位断片、及びprsA遺伝子断片をもとに、制限酵素法やSOE (splicing by overlap extension) - PCR法 (Gene, 77, 61, 1989) など公知の方法により連結することにより得ることができる。かかる断片は、プラスミド等のベクターによって細胞質中に導入することができ、また、公知の形質転換法によって細胞内に導入した核酸断片と染色体との間で相同組換えをさせることにより、染色体上に導入することができる。

【0027】

なお、宿主において導入を起こさせる染色体の領域としては、必須でない遺伝子の内部、若しくは必須でない遺伝子上流の非遺伝子領域の内部が好ましく、例えば、aprE遺伝子、sacB遺伝子、nprE遺伝子、amyE遺伝子、ybxG遺伝子の内部、若しくは当該遺伝子上流の非遺伝子領域の内部が挙げられるが、amyE遺伝子の内部、若しくはybxG遺伝子上流の非遺伝子領域の内部が好ましい。ここで必須でない遺伝子とは、破壊されたとしても、少なくともある条件においては、宿主は生存することができる遺伝子の意である。また、導入に際して、必須でない遺伝子、若しくは必須でない遺伝子上流の非遺伝子領域の一部又は全部の欠失を伴ってもなんら問題は生じない。

【0028】

以下、具体、SOE (splicing by overlap extension) - PCR法 (Gene, 77, 61, 1989) によって調製されるDNA断片を用いた当該転写開始制御領域、又は転写開始制御領域とリボソーム結合部位をprsA遺伝子上流に連結した遺伝子断片の二重交差による親微生物ゲノム上への導入方法について説明する。

ここで用いる導入用DNA断片は、親微生物ゲノム上の導入部位の上流に隣接する約0.1~3、好ましくは0.4~3kb断片(以下、断片(1))と、下流に隣接する約0.1~3、好ましくは0.4~3kb断片(以下、断片(2))の間に、当該転写開始制御領域、若しくは転写開始制御領域とリボソーム結合部位を含む断片(以下、断片(3))、prsA遺伝子断片(以下、断片(4))、及び薬剤耐性マーカー遺伝子断片(以下、断片(5))を挿入したDNA断片である。まず、1回目のPCRによって、断片(1)~断片(5)の5断片を調製する。

この際、例えば、断片(1)の下流末端に断片(3)の上流側10~30塩基対配列、断片(4)の上流末端に断片(3)の下流側10~30塩基対配列、断片(4)の下流末端に断片(5)の上流側10~30塩基対配列、更に断片(2)の上流側に断片(5)の下流側10~30塩基対配列が付加される様にデザインしたプライマーを用いる(図1)。

【0029】

次いで、1回目に調製した5種類のPCR断片を鋳型とし、断片(1)の上流側プライマーと断片(2)の下流側プライマーを用いて2回目のPCRを行う。これにより、断片(1)の下流末端に付加した断片(3)の配列に於いて断片(3)とのアニールが生じ、同様に、断片(4)の上流末端に付加した断片(3)の配列に於いて断片(3)とのアニールが生じ、断片(4)の下流末端に付加した断片(5)の配列に於いて断片(5)とのアニールが生じ、断片(2)の上流側に付加した断片(5)の配列において断片(5)とのアニ

10

20

30

40

50

ールが生じる。PCR増幅の結果、断片(1)~断片(5)の5断片が、(1)(3)(4)(5)(2)の順に結合したDNA断片を得ることが出来る(図1)。

【0030】

薬剤マーカー遺伝子としては、エリスロマイシン耐性遺伝子等を用いることが出来る。また、ここで行うPCR反応は、後記表2に示したプライマーセットを用い、Pyrobest DNAポリメラーゼ(宝酒造)などの一般のPCR用酵素キット等を用いて、成書(PCR Protocols. Current Methods and Applications, Edited by B.A.White, Humana Press pp251, 1993、Gene, 77, 61, 1989)等に示される通常の条件に準じて行えばよい。

【0031】

かくして得られた導入用DNA断片を、コンピテント法等によって細胞内に導入すると、同一性のあるゲノム上導入部位の上流及び下流の相同領域において、細胞内での遺伝子組換えが生じ、当該転写開始制御領域、又は転写開始制御領域とリボソーム結合部位をprsA遺伝子の上流に連結した遺伝子断片が導入された細胞を薬剤耐性マーカーによる選択によって分離することができる。薬剤耐性マーカーによる選択は、例えば、エリスロマイシンを含む寒天培地上に生育するコロニーを分離したのち、ゲノムを鋳型としたPCR法などによってゲノム上への導入が確認されるものを選択することにより行えばよい。尚、上記薬剤耐性マーカー遺伝子は、一般的に用いられる抗生物質を用いた選択に利用可能なものであれば特に限定されないが、エリスロマイシン耐性遺伝子の他には、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、スペクチノマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子及びブラストサイジンS耐性遺伝子等の薬剤耐性マーカー遺伝子が挙げられる。

【0032】

本発明の組換え微生物においては、上記のPrsAの過剰発現に加えて、ywhA遺伝子、yvbA遺伝子、yjbl遺伝子若しくはyl1B遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の欠失又は不活性化がなされる。斯かる欠失又は不活性化は、単独でもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。

ywhA遺伝子がコードするタンパク質YwhAは、そのアミノ酸配列よりMarRファミリーに属する転写因子をコードしていると考えられるが、制御対象となる遺伝子、及びその機能は不明である。またyvbA遺伝子がコードするタンパク質YvbAは、そのアミノ酸配列よりArsRファミリーに属する転写因子をコードしていると考えられるが、制御対象となる遺伝子、及びその機能は不明である。yjbl遺伝子とyl1B遺伝子は、いずれも機能未同定のタンパク質をコードする遺伝子である。各遺伝子の遺伝子番号は、表1に示すとおりである。

【0033】

【表1】

AccessionNo.	ORF	機能
ywhA	BG12455	推定の転写因子 (MarR ファミリー)。機能未同定。
yvbA	BG14078	推定の転写因子 (ArsR ファミリー)。機能未同定。
yjbl	BG13138	機能未同定。
yl1B	BG11425	機能未同定。

【0034】

なお、これら各遺伝子の名称、番号及び機能等は、Kunstらによって報告され(Nature, 390, 249-256, 1997)、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for Bacillus subtilis (BSORF DB)でインターネット公開(<http://bacillus.genome.ad.jp/>、2004年3月10日更新)された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載している。

【0035】

ywhA遺伝子、yvbA遺伝子、yjbl遺伝子又はyl1B遺伝子に相当する遺伝子とは、例えば、これらの各遺伝子と塩基配列において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、特に好ましくは98%以上の同一性を有する、他の微



生物由来、好ましくは*Bacillus*属細菌由来の遺伝子が挙げられる。尚、ここで、塩基配列の同一性はLipman-Pearson法 (Science,227,1435,1985)によって計算される。

【0036】

上記遺伝子の欠失又は不活性化の手順としては、当該遺伝子(標的遺伝子)を計画的に欠失又は不活性化する方法のほか、ランダムな遺伝子の欠失又は不活性化変異を与えた後、適当な方法によりタンパク質生産性の評価及び遺伝子解析を行う方法が挙げられる。

【0037】

標的遺伝子を欠失又は不活性化するには、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、標的遺伝子の一部を含むDNA断片を適当なプラスミドベクターにクローニングして得られる環状の組換えプラスミドを親微生物細胞内に取り込ませ、標的遺伝子の一部領域に於ける相同組換えによって親微生物ゲノム上の標的遺伝子を分断して不活性化することが可能である。或いは、塩基置換や塩基挿入等の変異によって不活性化した標的遺伝子、又は図3のように標的遺伝子上流、下流領域を含むが標的遺伝子を含まない直鎖状のDNA断片等をPCR等の方法によって構築し、これを親微生物細胞内に取り込ませて親微生物ゲノムの標的遺伝子内の変異箇所の外側の2ヶ所、又は標的遺伝子上流側、下流側で2回交差の相同組換えを起こさせることにより、ゲノム上の標的遺伝子を欠失或いは不活性化した遺伝子断片と置換することが可能である。

【0038】

特に、本発明微生物を構築するための親微生物として枯草菌を用いる場合、相同組換えにより標的遺伝子を欠失又は不活性化する方法については、既にいくつかの報告例があり(Mol.Gen.Genet.,223,268,1990等)、こうした方法を繰り返すことにより、本発明の宿主微生物を得ることができる。

【0039】

また、ランダムな遺伝子の欠失又は不活性化についてもランダムにクローニングしたDNA断片を用いて上述の方法と同様な相同組換えを起こさせる方法や、親微生物に線等を照射すること等によっても実施可能である。

【0040】

以下、より具体的にSOE(splicing by overlap extension)-PCR法(Gene,77,61,1989)によって調製される削除用DNA断片を用いた二重交差法による削除方法について説明するが、本発明に於ける遺伝子削除方法は下記に限定されるものではない。

【0041】

本方法で用いる削除用DNA断片は、削除対象遺伝子上流に隣接する約0.1~3、好ましくは0.4~3kb断片と、同じく下流に隣接する約0.1~3、好ましくは0.4~3kb断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片を挿入した断片である。まず、1回目のPCRによって、削除対象遺伝子上流断片及び下流断片、並びに薬剤耐性マーカー遺伝子断片の3断片を調製するが、この際、例えば、上流断片の下流末端に薬剤耐性マーカー遺伝子上流側10~30塩基対配列、逆に下流断片の上流末端には薬剤耐性マーカー遺伝子下流側10~30塩基対配列が付加される様にデザインしたプライマーを用いる(図3)。

【0042】

次いで、1回目に調製した3種類のPCR断片を鋳型とし、上流断片の上流側プライマーと下流断片の下流側プライマーを用いて2回目のPCRを行う。これにより、上流断片の下流末端及び下流断片の上流末端に付加した薬剤耐性マーカー遺伝子配列に於いて、薬剤耐性マーカー遺伝子断片とのアニールが生じ、PCR増幅の結果、上流側断片と下流側断片との間に、薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入したDNA断片を得ることができる(図3)。

【0043】

薬剤耐性マーカー遺伝子として、クロラムフェニコール耐性遺伝子を用いる場合、例えば表2に示したプライマーセットを用い、Pyrobest DNAポリメラーゼ(宝酒造)などの一般のPCR用酵素キット等を用いて、成書(PCR Protocols. Current Methods and Applications, Edited by B.A.White, Humana Press pp251,1993, Gene,77,61,1989)等に示される通常の条件によりSOE-PCRを行うことにより、各遺伝子の削除用DNA断片が得られ

10

20

30

40

50

る。

【0044】

かくして得られた削除用DNA断片を、コンピテント法等によって細胞内に導入すると、同一性のある削除対象遺伝子の上流及び下流の相同領域において、細胞内での遺伝子組換えが生じ、目的遺伝子が薬剤耐性遺伝子と置換した細胞を薬剤耐性マーカーによる選択によって分離することができる。即ち、表2に示したプライマーセットを用いて調製した削除用DNA断片を導入した場合、クロラムフェニコールを含む寒天培地上に生育するコロニーを分離し、ゲノムを鋳型としたPCR法などによってゲノム上の目的遺伝子がクロラムフェニコール耐性遺伝子と置換していることを確認すれば良い。

【0045】

本発明の微生物は、かくして作製された微生物に、目的タンパク質又は目的ポリペプチドをコードする遺伝子を導入することによって作製することができる。ここで、「目的タンパク質又はポリペプチド」は、製造又は精製が目的の一つであるタンパク質又はポリペプチドをいう。また、「目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を有する微生物」において、遺伝子とは、その微生物が本来有する遺伝子を含むのみならず、その微生物は本来有しない遺伝子、すなわち外来の遺伝子を含む意である。

【0046】

目的タンパク質又は目的ポリペプチドは特に限定されず、例えば洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や生理活性ペプチドなどが含まれるが、産業用酵素が好ましい。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素 (Oxidoreductase)、転移酵素 (Transferase)、加水分解酵素 (Hydrolase)、脱離酵素 (Lyase)、異性化酵素 (Isomerase)、合成酵素 (Ligase/Synthetase) 等が含まれるが、好適にはセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素が挙げられる。 $\alpha$ -アミラーゼとしては、微生物由来、好ましくは *Bacillus* 属細菌由来、より好ましくは *Bacillus* sp. KSM-K38株由来の  $\alpha$ -アミラーゼが挙げられる。*Bacillus* sp. KSM-K38株由来の  $\alpha$ -アミラーゼのより具体的な例としては、配列番号4のアミノ酸番号1~480のアミノ酸配列からなる *Bacillus* 属細菌由来のアルカリ  $\alpha$ -アミラーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる  $\alpha$ -アミラーゼが挙げられる。また、セルラーゼとしては、多糖加水分解酵素の分類 (Biochem. J., 280, 309, 1991) 中でファミリー5に属するセルラーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特に *Bacillus* 属細菌由来のセルラーゼが挙げられる。例えば、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-S237株 (FERM BP-7875)、やバチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-64株 (FERM BP-2886) 由来のアルカリセルラーゼが挙げられ、更に好適な例としては、配列番号6のアミノ酸番号1~795のアミノ酸配列からなる *Bacillus* 属細菌由来のアルカリセルラーゼ、又は配列番号8のアミノ酸番号1~793のアミノ酸配列からなる *Bacillus* 属細菌由来のアルカリセルラーゼ、或いは当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるセルラーゼが挙げられる。また、プロテアーゼとしては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等が挙げられる。

【0047】

本発明の微生物に導入されるべき目的タンパク質又は目的ポリペプチドの遺伝子は、その上流に当該遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる制御領域、即ち、プロモーター及び転写開始点を含む転写開始制御領域、リボソーム結合部位及び開始コドンを含む翻訳開始制御領域及び分泌シグナルペプチド領域から選ばれる1以上の領域が適正な形で結合されていることが望ましい。特に、転写開始制御領域、翻訳開始制御領域及び分泌シグナル領域からなる3領域が結合されていることが好ましく、更に分泌シグナルペプチド領域がバチルス属細菌のセルラーゼ遺伝子由来のものであり、転写開始制御領域及び翻訳開始制御領域が当該セルラーゼ遺伝子の上流0.6~1 kb領域であるものが、目的タンパク質又は目的ポリペプチド遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。例えば、特開2000-210081号

10

20

30

40

50

公報や特開平4-190793号公報等に記載されているBacillus属細菌、すなわちKSM-S237株 (FERM BP-7875)、KSM-64株 (FERM BP-2886) 由来のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子の転写開始制御領域、翻訳開始制御領域及び分泌用シグナルペプチド領域が目的タンパク質又は目的ポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。より具体的には配列番号5で示される塩基配列の塩基番号1~659の塩基配列、又は配列番号7で示される塩基配列の塩基番号1~696の塩基配列、或いは当該塩基配列に対して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、特に好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA断片、あるいは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加した塩基配列からなるDNA断片が、目的タンパク質又は目的ポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。尚、ここで、上記塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加した塩基配列からなるDNA断片とは、上記塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加しているが、遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる機能を保持しているDNA断片を意味する。

10

**【0048】**

このような目的タンパク質又は目的ポリペプチドをコードする遺伝子の導入は、例えば、(1)ベクターによる導入、(2)ゲノムへの挿入により行うことができる。(1)ベクターによって導入する場合、その上流に「当該遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる制御領域、即ち、プロモーター及び転写開始点を含む転写開始制御領域、リボソーム結合部位及び開始コドンを含む翻訳開始制御領域及び分泌シグナルペプチド領域から選ばれる1以上の領域」が適正な形で結合されている目的タンパク質又は目的ポリペプチドをコードする遺伝子を含むベクターを、コンピテントセル形質転換方法、プロトプラスト形質転換法、或いはエレクトロポレーション法等の適当な形質転換法により導入すればよい。ここで、ベクターとしては、目的とする遺伝子を宿主に導入し、増殖、発現させるための適当な運搬体核酸分子であれば特に限定されず、プラスミドのみならず、例えば、YAC、BACなどの人工染色体、トランスポゾンを用いたベクター、コスミドが挙げられ、プラスミドとしては例えば、pUB110、pHY300PLKが挙げられる。

20

**【0049】**

また、(2)ゲノムへの挿入は、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、目的タンパク質又は目的ポリペプチドをコードする遺伝子に導入を起こさせる染色体領域の一部を結合したDNA断片を、微生物細胞内に取り込ませ、当該染色体領域の一部領域における相同組換えを起こさせることによって、ゲノムに組み込ませることができる。ここで、導入を起こさせる染色体領域としては、特に制限されないが、必須でない遺伝子領域、若しくは必須でない遺伝子領域上流の非遺伝子領域が好ましい。

30

**【0050】**

本発明の組換え微生物を用いた目的のタンパク質又はポリペプチドの生産は、当該菌株を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。そして、後記実施例に示すように、目的のタンパク質又はポリペプチドの生産性は、上記遺伝子の改変をしていない微生物を用いた場合と比較して、その向上が達成されている。

40

**【0051】**

以下に、本発明の組換え微生物の構築方法及び当該組換え微生物を用いたアミラーゼの生産方法について具体的に説明する。

**【実施例】****【0052】**

以下の実施例におけるDNA断片増幅のためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)には、GeneAmp PCR System (アプライドバイオシステムズ)を使用し、Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ)と付属の試薬類を用いてDNA増幅を行った。PCRの反応液組成は、適宜希釈した鋳型DNAを1 $\mu$ L、センス及びアンチセンスプライマーを各々20pmol及びPyrobest DNA Polymeraseを2.5U添加して、反応液総量を50 $\mu$ Lとした。PCRの反応条件は、98 $^{\circ}$ Cで10秒間、

50

55 で30秒間及び72 で1~5分間（目的増幅産物に応じて調整。目安は1kbあたり1分間）の3段階の温度変化を30回繰り返した後、72 で5分間反応させることにより行った。

【0053】

また、以下の実施例において、遺伝子の上流・下流とは、複製開始点からの位置ではなく、上流とは各操作・工程において対象として捉えている遺伝子の開始コドンの5'側に続く領域を示し、一方、下流とは各操作・工程において対象として捉えている遺伝子の終始コドンの3'側に続く領域を示す。

【0054】

さらに、以下の実施例における各遺伝子及び遺伝子領域の名称は、Nature, 390, 249-256, (1997)で報告され、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for Bacillus subtilis (BSORF DB)でインターネット公開 (<http://bacillus.genome.ad.jp/>、2004年3月10日更新)された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載している。

【0055】

枯草菌の形質転換は以下の様に行った。すなわち、枯草菌株をSPI培地（0.20% 硫酸アンモニウム、1.40% リン酸水素二カリウム、0.60% リン酸二水素カリウム、0.10% クエン酸三ナトリウム二水和物、0.50% グルコース、0.02% カザミノ酸 (Difco)、5mM 硫酸マグネシウム、0.25 μM 塩化マンガン、50 μg/ml トリプトファン）において37 で、生育度(OD600)の値が1程度になるまで振盪培養した。振盪培養後、培養液の一部を9倍量のSPII培地（0.20% 硫酸アンモニウム、1.40% リン酸水素二カリウム、0.60% リン酸二水素カリウム、0.10% クエン酸三ナトリウム二水和物、0.50% グルコース、0.01% カザミノ酸 (Difco)、5mM 硫酸マグネシウム、0.40 μM 塩化マンガン、5 μg/ml トリプトファン）に接種し、更に生育度(OD600)の値が0.4程度になるまで振盪培養することで、枯草菌株のコンピテントセルを調製した。次いで調製したコンピテントセル懸濁液（SPII培地における培養液）100 μLに各種DNA断片を含む溶液（SOE-PCRの反応液等）5 μLを添加し、37 で1時間振盪培養後、適切な薬剤を含むLB寒天培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天）に全量を塗抹した。37 における静置培養の後、生育したコロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体のゲノムを抽出し、これを鋳型とするPCRによって目的とするゲノム構造の改変が為されたことを確認した。

【0056】

実施例1 prsA遺伝子発現強化株の構築

以下の様に、prsA遺伝子の発現を強化した変異株の構築を行った（図2参照）。枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型として、表2に示したPVG-FWとPVG-R、及びprsA/PVG-FとprsA/Em2-Rのプライマーセットを用いてspoVG遺伝子の転写開始制御領域とリボソーム結合部位を含む0.2kb断片（A）、及びprsA遺伝子を含む0.9kb断片（B）をPCRにより増幅した。またプラスミドpMUTIN4（Microbiology, 144, 3097 (1998)）を鋳型として、表2に示したemf2とemr2のプライマーセットを用いてエリスロマイシン（Em）耐性遺伝子を含む1.3kb断片（C）をPCRにより増幅した。次いで、得られた（A）（B）（C）3断片を混合して鋳型とし、表2に示したPVG-FW2とemr2のプライマーセットを用いたSOE-PCRを行うことによって、3断片を（A）（B）（C）の順になる様に結合させ、spoVG遺伝子の転写開始制御領域とリボソーム結合部位がprsA遺伝子の5'側領域に連結し（spoVG遺伝子の開始コドンの位置にprsA遺伝子の開始コドンが位置する様に連結）、更にその下流にEm耐性遺伝子が結合した2.4kbのDNA断片（D）を得た。続いて枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型として、表2に示したamyEfw2とamyE/PVG2-R、及びamyE/Em2-FとamyErv2のプライマーセットを用いてamyE遺伝子の5'側領域を含む1.0kb断片（E）、及びamyE遺伝子の3'側領域を含む1.0kb断片（F）をPCRにより増幅した。次いで、得られた（E）（F）（D）3断片を混合して鋳型とし、表2に示したamyEfw1とamyErv1のプライマーセットを用いたSOE-PCRを行うことによって、3断片を（E）（D）（F）の順になる様に結合させ、spoVG遺伝子の転写開始制御領域とリボソーム結合部位の下流にprsA遺伝子が連結し、更にその下流にEm耐性遺伝子が結合した2.4kbのDNA断片がamyE遺伝子の中央に挿入された総

塩基長4.3kbのDNA断片 ( G ) を得た。得られた4.3kbのDNA断片 ( G ) を用いてコンピテントセル法により枯草菌168株を形質転換し、エリスロマイシン ( 1 μg/mL ) とリンコマイシン ( 25 μg/mL ) を含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体から抽出したゲノムDNAを鋳型として、表 2 に示すamyEfw2とprsA/Em2-R、及びprsA/PVG-FとamyErv2のプライマーセットを用いたPCRを行うことによって2.4kb及び3.3kbのDNA断片の増幅を確認し、枯草菌168株ゲノム上のamyE遺伝子部位にspoVG遺伝子の転写開始制御領域とリボソーム結合部位の下流にprsA遺伝子が連結したDNA断片が挿入されたことを確認した。この様にして得られた菌株をprsA-Ka株と命名した。

【 0 0 5 7 】

【 表 2 - 1 】

10

プライマー名	配列 ( 5' - 3' )	配列番号
PVG-FW	GTTAGTCGAGATCGAAGTTA	10
PVG-R	AGTAGTTCACCACCTTTTCC	11
prsA/PVG-F	GGAAAAGGTGGTGAACACTATGAAGAAAATCGCAATAGC	12
prsA/Em2-R	TTTGCACTGATTGGTGTATCTTATTTAGAATTGCTTGAAG	13
emf2	GATACACCAATCAGTGCAAA	14
emr2	CAAGAGTTTGTAGAAACGCA	15
PVG-FW2	TAAGAAAAGTGATTCTGGGA	16
amyEfw2	GGAGTGTCAAGAATGTTTGC	17
amyE/PVG2-R	TCCCAGAATCACTTTTCTTAATCATCGCTCATCCATGTCCG	18
amyE/Em2-F	TGCGTTTCTACAAACTCTTGGTTTAGGCTGGGCGGTGATA	19
amyErv2	TCAATGGGGAAGAGAACC	20
amyEfw1	TCAAAACCTCTTTACTGCCG	21
amyErv1	CACGTAATCAAAGCCAGGCT	22
S237ppp-F2 (BamHI)	CCCGGATCCAACAGGCTTATATTTA	23
S237ppp-R2 (ALAA)	TTCAATCCATCTGCTGCAAGAGCTGCCGG	24
K38matu-F2 (ALAA)	GCTCTTGCAAGCAGATGGATTGAACGGTACG	25
SP64K38-R (XbaI)	TTGGTCTAGACCCCAAGCTTCAAAGTCGTA	26
Catf	CAACTAAAGCACCCATTAG	27
Catr	CTTCAACTAACGGGCGAG	28
ywhA FW	GCCTGTATTCTTATCGGGATC	29
ywhA/Cm R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGGTCAATTTCCCATTTTCGAGA	30
ywhA/Cm F	CTGCCCCGTTAGTTGAAGCTCAATAGGGATAATAAAAGCC	31
ywhA RV	AGCGGTTGAAATATCGCTGAA	32
ywhA FW2	GGCGCTTAAACGGAATGCT	33
ywhA RV2	GTAAGATCCTAGCGGTGTCA	34
yvbA FW	AGGTGGATGGCAAGCTGAAG	35
yvbA/Cm R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGAGCGTTTTCTCCTTTACAAAAA	36
yvbA/Cm F	CTGCCCCGTTAGTTGAAGGACTCAATAAATTGGATGCTTAA	37
yvbA RV	AAATATGACCAAAGCAGACCAA	38
yvbA FW2	CTAAGAAAAGAGGTGGATCATA	39
yvbA RV2	TAAAGTACTCCATCTTGTGGG	40
yjbI FW	GGAATGACATCGTGAATGTAAC	41
yjbI/Cm R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGGTGAAGTACTCCTTTAAATATGG	42
yjbI/Cm F	CTGCCCCGTTAGTTGAAGCAAACATCAGCATGAGCTATA	43
yjbI RV	ATATGAAACCGCGTTATCCC	44
yjbI FW2	CACGCAGCAGCTCGGACACT	45
yjbI RV2	AAAAAACAGCCTCAAGCATATG	46
y11B FW	TTCGAGAAAATGATGAACTCCG	47
y11B/Cm R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGGATCTCTTGCCTTCTTCT	48

20

30

40

【 0 0 5 8 】

【表 2 - 2】

プライマー名	配列 (5' - 3')	配列番号
y11B/Cm F	CTGCCCGTTAGTTGAAGTGATTCTTCGTGTATAACACTC	49
y11B RV	TTCTTTTTTCAGCAATCCGAAG	50
y11B FW2	CGATTATCGAGTCCGAAAAG	51
y11B RV2	TAATCGGTTTTTCGTGTATGAG	52
yobS FW	CACTTCCAGAATCGGTCCTA	53
yobS/Cm R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGAGCGTCTACAATCATTTTTGG	54
yobS/Cm F	CTGCCCGTTAGTTGAAGACAAAATAAATGGATGTCTTATATT	55
yobS RV	TAAAAAATGATCCGGATTTAATTC	56
yobS FW2	CGGCATCTGCGCACGTTTAC	57
yobS RV2	AAATTGGCTGTACGCGTGCT	58
ysmB FW	CCGTTTCAAGAATGGAAAACAT	59
ysmB/Cm R	CTAATGGGTGCTTTAGTTGTTGTCCATCCCTCACTCAAG	60
ysmB/Cm F	CTGCCCGTTAGTTGAAGAAAATCTTTGATGAAACTGCAGC	61
ysmB RV	GTCCTTTTTTCAGCATACTTTTC	62
ysmB FW2	TTGGGCATATGAATAATGTAAC	63
ysmB RV2	GACCGAAGAATTCGGCAAA	64

10

## 【 0 0 5 9 】

20

## 実施例 2 アルカリアミラーゼ分泌生産評価 - 1

実施例 1 にて得られたprsA-Ka株の異種タンパク質生産性評価は、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリアミラーゼの生産性を指標として以下の様に行った。

バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-K38株 (FERM BP-6946) より抽出したゲノムDNAを鋳型として、表 2 に示されるK38matu-F2(ALAA)とSP64K38-R(XbaI)のプライマーセットを用いてPCRを行い、アルカリアミラーゼ (特開2000-184882号公報、Eur.J.Biochem., 268, 2974, 2001) をコードする配列番号 3 で示される塩基配列の1.5kbのDNA断片 (H) を増幅した。またバチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-S237株 (FERM BP-7875) より抽出したゲノムDNAを鋳型として、表 2 に示されるS237ppp-F2(BamHI)とS237ppp-R2(ALAA)のプライマーセットを用いてPCRを行い、アルカリセルラーゼ遺伝子 (特開2000-210081号公報) の転写開始制御領域、翻訳開始制御領域、及び分泌シグナル配列をコードする領域を含む0.6kbのDNA断片 (I) を増幅した。次いで、得られた (H) (I) の2断片を混合して鋳型とし、表 2 に示されるS237ppp-F2(BamHI)とSP64K38-R(XbaI)のプライマーセットを用いたSOE-PCRを行うことによって、アルカリセルラーゼ遺伝子の転写開始制御領域、翻訳開始制御領域、及び分泌シグナル配列をコードする領域の下流にアルカリアミラーゼ遺伝子が連結した2.1kbのDNA断片 (J) を得た。得られた2.2kbのDNA断片 (J) をシャトルベクター-pHY300PLK (ヤクルト) のBamHI-XbaI制限酵素切断点に挿入し、アルカリアミラーゼ生産性評価用プラスミドpHYK38(S237ps)を構築した。

30

## 【 0 0 6 0 】

40

実施例 1 にて得られたprsA-Ka株及び対照として枯草菌168株にアルカリアミラーゼ生産性評価用プラスミドpHYK38(S237ps)を、プロトプラスト形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を10mLのLB培地で一夜37℃で振盪培養を行い、更にこの培養液0.05mLを50mLの2xL-マルトース培地 (2%トリプトン、1%酵母エキス、1%NaCl、7.5%マルトース、7.5ppm硫酸マンガン4-5水和物、15ppmテトラサイクリン) に接種し、30℃で5日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリアミラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリアミラーゼの量を求めた。培養上清中のアミラーゼの活性測定にはリキテックAmy EPS(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。すなわち1% NaCl-1/7.5M リン酸緩衝液 (pH7.4 和光純薬工業) で適宜希釈したサンプル溶液50µLに、100µLのR1・R2混合液(R1(カップリング酵

50

素) : R2(アミラーゼ基質)=5 : 1(Vol.))を加えて混和し、30 にて反応を行った際に遊離するp-ニトロフェノール量を405nmにおける吸光度(OD405nm)変化により定量した。1分間に1 $\mu$ molのp-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を1Uとした。この結果、表3に示した様に、宿主としてprsA-Ka株を用いた場合、対照の168株(野生型)の場合と比較して高いアルカリアミラーゼの分泌生産が認められた。これはprsA-Ka株にてprsA遺伝子の発現が野生株より高まり、細胞膜上のPrsAタンパク質量が増加したことにより、タンパク質の分泌効率が向上した結果によるものと推測された。

【0061】

【表3】

菌株名	強化遺伝子	アルカリアミラーゼ分泌生産量 (相対値)
prsA-Ka株	prsA	537
168株	なし	100

10

【0062】

実施例3 ゲノム中ywhA遺伝子の薬剤耐性遺伝子による置換

図3に基づいて、ゲノム中ywhA遺伝子の薬剤耐性遺伝子による置換方法を説明する。尚、ywhA遺伝子はMarRファミリーに属する転写因子をコードする遺伝子である(当該転写因子の制御対象となる遺伝子、及びその機能は不明である)。

20

枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、表2に示したywhA-FW及びywhA/Cm-Rのプライマーセットを用いて、ゲノム中のywhA遺伝子の上流に隣接する1.0kb断片(A)をPCRにより増幅した。また、上記ゲノムDNAを鋳型とし、ywhA/Cm-F及びywhA-RVのプライマーセットを用いて、ゲノム中のywhA遺伝子の下流に隣接する1.0kb断片(B)をPCRにより増幅した。

さらに、プラスミドpC194 DNAを鋳型とし、表2に示したcatf及びcatrのプライマーセットを用いて、0.85kbのクロラムフェニコール(Cm)耐性遺伝子領域(C)をPCRにより調製した。

30

【0063】

次に、図3に示すように、得られた1.0kb断片(A)、1.0kb断片(B)及びCm耐性遺伝子領域(C)の3断片を混合して鋳型として、表2に示したywhA-FW2及びywhA-RV2のプライマーセットを用いたSOE-PCR法によって、3断片が1.0kb断片(A)、Cm耐性遺伝子領域(C)、1.0kb断片(B)の順に含まれる2.8kbのDNA断片(D)を得た。

さらに、コンピテントセル形質転換法によって、得られたDNA断片(D)を用いて、168株の形質転換を行った。形質転換後、クロラムフェニコール(10 $\mu$ g/mL)を含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。

得られた形質転換体のゲノムDNAを抽出し、PCRによってywhA遺伝子がCm耐性遺伝子に置換していることを確認した。以上のようにして、ywhA遺伝子欠失株(ywhA株)を構築した。また上記形質転換における168株に替えて実施例1にて構築したprsA-Ka株を用いることにより、prsA-Ka株ゲノム中のywhA遺伝子をCm耐性遺伝子にて置換した菌株(prsAK ywhA株)を構築した。

40

【0064】

実施例4 ゲノム中yvbA遺伝子、yjbI遺伝子及びyIIIB遺伝子の薬剤耐性遺伝子による置換

実施例3に示したywhA遺伝子の薬剤耐性遺伝子による置換と同様にして、168株ゲノム中のyvbA遺伝子、yjbI遺伝子及びyIIIB遺伝子のクロラムフェニコール耐性遺伝子による置換を行い、yvbA遺伝子欠失株(yvbA株)、yjbI遺伝子欠失株(yjbI株)及びyIIIB遺伝子欠失株(yIIIB株)を構築した。各菌株の構築には表2に示すプライマーを使用し、それぞれのプライマーとywhA株の構築に用いたプライマーとの対応を表4に示した。尚、

50

yvbA遺伝子はArsRファミリーに属する転写因子をコードする遺伝子であるが、当該転写因子によって制御される遺伝子、及びその機能は不明であり、またyjbI遺伝子とylIB遺伝子はいずれも機能未同定のタンパク質をコードする遺伝子である。各遺伝子の遺伝子番号を表1に示した。

【0065】

【表4】

	ywhA 遺伝子 欠失用	yvbA 遺伝子 欠失用	yjbI 遺伝子 欠失用	ylIB 遺伝子 欠失用
(A) 断片増幅	ywhA-FW	yvbA-FW	yjbI-FW	ylIB-FW
	ywhA/Cm-R	yvbA/Cm-R	yjbI/Cm-R	ylIB/Cm-R
(B) 断片増幅	ywhA/Cm-F	yvbA/Cm-F	yjbI/Cm-F	ylIB/Cm-F
	ywhA-RV	yvbA-RV	yjbI-RV	ylIB-RV
(C) 断片増幅	catf	catf	catf	catf
	catr	catr	catr	catr
(D) 断片増幅	ywhA-FW2	yvbA-FW2	yjbI-FW2	ylIB-FW2
	ywhA-RV2	yvbA-RV2	yjbI-RV2	ylIB-RV2

10

【0066】

また実施例1にて構築したprsA-Ka株のゲノム上の上記各遺伝子を同様にクロラムフェニコール耐性遺伝子にて置換することにより、prsAK yvbA株、prsAK yjbI株及びprsAK ylIB株を構築した。

20

【0067】

実施例5 アルカリアミラーゼ分泌生産評価 - 2

実施例3及び4にて構築した菌株のアルカリアミラーゼ分泌生産性評価を、実施例2と同様に行った。対照として枯草菌168株及び実施例1にて構築したprsA-Ka株についても評価を行った。図4に示した様に、prsAK ywhA株、prsAK yvbA株、prsAK ylIB株においてprsA-Ka株より高いアルカリアミラーゼの分泌生産が認められた。prsAK ywhA株、prsAK yvbA株、prsAK ylIB株のprsA-Ka株に対する生産量の増加(図4の斜線部分に相当)は、ywhA株、yjbI株、ylIB株各々で示された枯草菌168株に対する生産量増加(図4の黒塗りで示す部分に相当)より顕著であった。またyjbI株の生産性は168株より顕著に低いにも関わらず、prsAK yjbI株ではprsA-Ka株を上回るアルカリアミラーゼ分泌生産性が認められた。即ち、prsAK ywhA株、prsAK yvbA株、prsAK yjbI株及びprsAK ylIB株では、prsA遺伝子発現強化と各々の遺伝子欠失との組合せがアルカリアミラーゼ分泌生産量向上に対し、相乗的に作用したものと考えられた。

30

【0068】

比較例1 yobS遺伝子、ysmB遺伝子の薬剤耐性遺伝子による置換

枯草菌168株ゲノム上のyobS遺伝子、或いはysmB遺伝子を、実施例3に示したywhA遺伝子の薬剤耐性遺伝子による置換と同様にして、クロラムフェニコール耐性遺伝子にて置換してyobS株、或いはysmB株を構築した。使用したプライマーを表2に示し、それぞれのプライマーとywhA株の構築に用いたプライマーとの対応を表5に示した。また実施例1にて構築したprsA-Ka株のゲノム上のyobS遺伝子、或いはysmB遺伝子を同様にクロラムフェニコール耐性遺伝子にて置換することにより、prsAK yobS株、或いはprsAK ysmB株を構築した。尚、yobS遺伝子はTetRファミリーに属する転写因子をコードする遺伝子であり、ysmB遺伝子はMarRファミリーに属する転写因子をコードする遺伝子であるが、いずれの転写因子についても、制御される遺伝子、及びその機能は不明である。yobS遺伝子とysmB遺伝子の遺伝子番号及び機能を表6に示した。

40

【0069】



【表5】

	ywhA 遺伝子 欠失用	yobS 遺伝子 欠失用	ysmB 遺伝子 欠失用
(A) 断片増幅	ywhA-FW	yobS-FW	ysmB-FW
	ywhA/Cm-R	yobS/Cm-R	ysmB/Cm-R
(B) 断片増幅	ywhA/Cm-F	yobS/Cm-F	ysmB/Cm-F
	ywhA-RV	yobS-RV	ysmB-RV
(C) 断片増幅	catf	catf	catf
	catr	catr	catr
(D) 断片増幅	ywhA-FW2	yobS-FW2	ysmB-FW2
	ywhA-RV2	yobS-RV2	ysmB-RV2

10

【0070】

【表6】

遺伝子名	遺伝子番号	機能
yobS	BG13510	推定の転写因子 (TetR ファミリー)。機能未同定。
ysmB	BG12332	推定の転写因子 (MarR ファミリー)。機能未同定。

20

【0071】

比較例2 アルカリアミラーゼ分泌生産評価 - 3

比較例1にて構築した菌株のアルカリアミラーゼ分泌生産性評価を、実施例2と同様に行った。対照として枯草菌168株及び実施例1にて構築したprsA-Ka株についても評価を行った。表7に示した様に、yobS株と ysmB株は168株より高い生産性を示したにも関わらず、prsAK yobS株とprsAK ysmB株のアルカリアミラーゼ生産性はprsA-Ka株と同等かそれ以下であり、prsA-Ka株に対してyobS遺伝子欠失、或いはysmB遺伝子欠失を行うことによる効果は認められなかった。

【0072】

【表7】

菌株名	強化遺伝子	削除遺伝子	アルカリアミラーゼ分泌生産量 (相対値)
168株	なし	なし	100
ΔyobS株	なし	yobS	162
ΔysmB株	なし	ysmB	125
prsA-Ka株	prsA	なし	537
prsA/ΔyobS株	prsA	yobS	507
prsA/ΔysmB株	prsA	ysmB	532

40

【0073】

実施例6 バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) 由来prsA遺伝子発現強化とywhA遺伝子欠失との組み合わせにおけるアルカリアミラーゼ分泌生産評価

バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) 由来のprsA遺伝子 (配列番号65) は、枯草菌prsA遺伝子に相当する遺伝子である。実施例1の方法と同様の方法にて、バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) 由来prsA遺伝子の発現を強化した変異株の構築を行った。すなわち、バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) から抽出したゲノムDNAを鋳型として、表8に示したBce/PVG-FとBce/emf2-Rのプライマーセットを用いてバチルス セレウス (*Bacillus cereus*) 由来prsA遺伝子を含む0.9kb断片 (A) をPCRにより増幅した。また上記

50

比較例にて構築したprsA-Ka株より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、表1に示したamyEfw2とPVG-R、及びemf2とamyErv2のプライマーセットを用いて、amyE遺伝子の5'側領域の下流にspoVG遺伝子転写開始制御領域とリボソーム結合部位を含む領域が連結した1.2kb断片(B)、及びエリスロマイシン耐性遺伝子の下流にamyE遺伝子の3'側領域が連結した2.3kb断片(C)をPCRにより増幅した。次いで、得られた(A)(B)(C)3断片を混合して鋳型とし、表1に示したamyEfw1とamyErv1のプライマーセットを用いたSOE-PCRを行うことによって、3断片を(B)(A)(C)の順になる様に結合させ、spoVG遺伝子の転写開始制御領域とリボソーム結合部位の下流にバチルス セレウス (*Bacillus cereus*) 由来prsA遺伝子が連結し、更にその下流にエリスロマイシン耐性遺伝子が結合した遺伝子断片がamyE遺伝子の中央に挿入された総塩基長4.3kbのDNA断片(D)を得た。得られた4.3kb DNA断片(D)を用いて枯草菌168株を形質転換し、prsAbc-K株を構築した。

10

次いで、実施例3と同様の方法にて、prsAbc-K株のゲノム上よりywhA遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子にて置換したprsAbcK ywhA株を構築した。

構築した上記prsAbc-K株及びprsAbcK ywhA株について、実施例2と同様の方法によりアルカリアミラーゼ分泌生産評価を行った。対照として枯草菌168株と ywhA株についても評価を行った。その結果、図5に示すようにprsAbc-K株にて168株を大きく上回る分泌生産が認められた。更にprsAbc-K株よりywhA遺伝子を欠失した菌株においては一層顕著な生産性向上が認められ、実施例5で見られたのと同様、バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) 由来のprsA遺伝子発現強化とywhA遺伝子欠失との組み合わせがアルカリアミラーゼ分泌生産量向上に対し、相乗的に作用したものと考えられた。すなわち、枯草菌prsA遺伝子に相当する遺伝子を用いれば、枯草菌prsA遺伝子を用いた場合と同様の有効性が得られることが確認された。

20

【0074】

【表8】

プライマー名	配列 (5' - 3')	配列番号
Bce/PVG-F	GGAAAAGGTGGTGAAGCTACTATGAAGAAAGCTATGCTTGCCT	67
Bce/emf2-R	GCACTGATTGGTGTATCTTATTTCTTTCTTTTATCGTCA	68

30

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】SOE-PCR法により調製した結合核酸断片を用いた遺伝子導入を模式的に示したものである。

【図2】SOE-PCRによるprsA発現強化株作成用DNA断片の調製方法を模式的に示したものである。

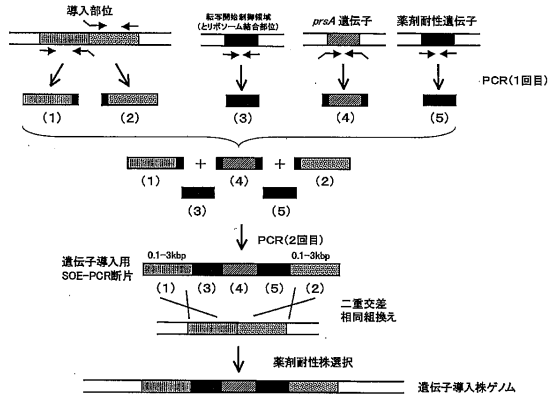
【図3】SOE-PCR断片を用いた2重交差法による標的遺伝子の削除を模式的に示したものである。

【図4】本発明微生物のアルカリアミラーゼ分泌生産量を示したグラフである。

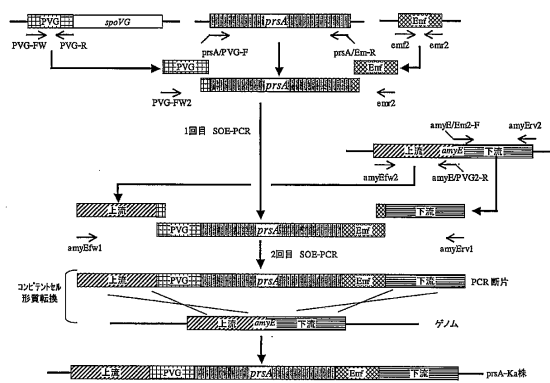
【図5】本発明微生物のアルカリアミラーゼ分泌生産性を示したグラフである。

40

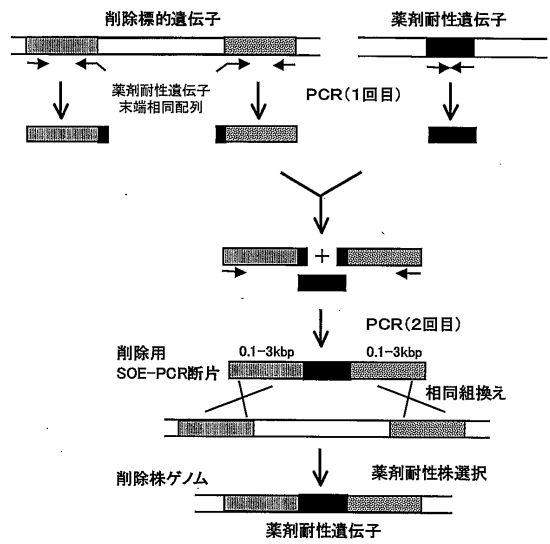
【図1】



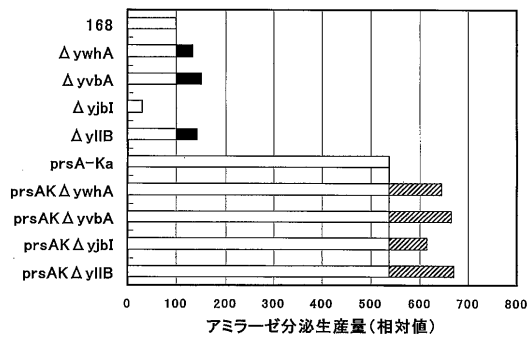
【図2】



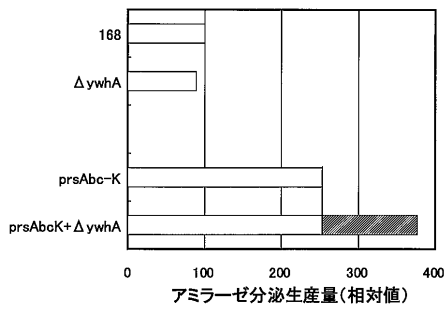
【図3】



【図4】



【図5】



**【配列表】**

0004842750000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100111028  
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100101317  
弁理士 的場 ひろみ
- (72)発明者 遠藤 圭二  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 劉 生浩  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 荒 勝俊  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特開 2 0 0 5 - 1 3 7 3 0 9 ( J P , A )  
米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 2 1 5 8 7 3 ( U S , A 1 )  
J. Bacteriol., 1996, Vol.178, No.8, p.2343-2350  
Protein Expr. Purif., 2005, Vol.41, p.363-372  
Mol. Microbiol., 1993, Vol.8, No.4, p.727-737  
Appl. Environ. Microbiol., 1989, Vol.55, No.9, p.2302-2307

## (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 1 2 P 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 8  
C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
W P I