

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018651 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/20, 1/21, C12P 21/02

目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010342

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 14 日 (14.08.2003)

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-239554 2002 年 8 月 20 日 (20.08.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三谷 恭雄 (MITANI, Yasuo) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 中島 信孝 (NAKASHIMA, Nobutaka) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 田村 具博 (TAMURA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL MICROORGANISM SENSITIVE TO LYSOZYME

(54) 発明の名称: リゾチーム感受性新規微生物

(57) Abstract: It is intended to provide a bacterium belonging to the genus *Rhodococcus* which is sensitive to lysozyme at a low concentration compared with a wild type strain, can be easily lysed and enables the recovery of an expressed recombinant protein. Namely, a mutant microorganism belonging to the genus *Rhodococcus* which has a higher sensitivity to lysozyme than that of a wild type microorganism belonging to the genus *Rhodococcus*.

(57) 要約: 野生型株と比べて低濃度のリゾチームに対して感受性であり、容易に溶菌が可能で、発現させた組換えタンパク質の回収が容易なロドコッカス属細菌の提供。野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物。



WO 2004/018651 A1

明 細 書

リゾチーム感受性新規微生物

技術分野

本発明は、組換えタンパク質の産生に適したロドコッカス属微生物に関する。具体的には、野生型株と比べて低濃度のリゾチームに対して感受性であり、容易に溶菌が可能な変異株に関する。該変異株を用いることにより発現タンパク質の抽出回収を容易に行うことができる。

背景技術

微生物を宿主とした組換えタンパク質の発現に係る技術として、大腸菌を宿主とした発現系が広く一般に利用されている。その理由として、宿主微生物としての安全性が確認されていること、増殖が早いこと、分子生物学的実験操作が十分に確立されていること等を含め実験室における取り扱いが極めて容易であることが挙げられる。その一方で、組換えタンパク質の発現において、大腸菌に見られない有用性、優位性を持つ宿主微生物の開発が進められている。

ロドコッカス属微生物は一部を除き病原性が無く、通常の実験室内で容易に培養が可能であるといった必須条件に加え、産業上極めて有用な微生物触媒としての機能を有しているため、近年様々な分子生物学的技術が開発されている。例えば、該微生物にさらに有用な機能を付加する目的で、遺伝子組換え技術に係る開発が行われ、大腸菌およびロドコッカス属微生物のいずれにおいても自立複製が可能なシャトルベクターが確立されている (R. De Mot et al., *Microbiology* 143, 3137-3147 (1997))。また、ロドコッカス属微生物においては転移可能なトランスポゾン¹の存在も報告されており (I. Nagy et al., *J. Bacteriol.* 179, 4635-4638 (1997)) 遺伝子破壊や染色体への外来遺伝子の組み込み等による該微生物の機能改良が期待される。

こうした分子生物学的基盤の確立の上に、微生物触媒としての機能をさらに高めることを目的として、組換えタンパク質の発現のためのベクターの開発が行わ

れている（特開平 10-248578）。

ロドコッカス属微生物であるロドコッカス・エリスロポリスは微生物触媒としての有用性に加えて、4℃という低温環境下での増殖が可能であるという際だった特徴を有する。それゆえ、これまでには確立されていなかった、大腸菌等を用いた場合には不可能な温度域での組換えタンパク質等の物質生産を可能にすることが期待され、かかる目的で誘導型発現ベクターの開発がなされている（既出願、田村；平成 14 年 8 月 12 日出願）。

しかしながら、ロドコッカス属の微生物は他のグラム陽性菌と比べて細胞壁の構造が特殊で強固であるため、該微生物からの細胞内容物の抽出は大腸菌等と比べて煩雑かつ困難である。すなわち、ロドコッカス属微生物は、微生物を溶菌するために一般的に用いられるリゾチームなどの細胞壁溶解酵素に対して極めて強い抵抗性を有しているため、その溶菌方法として、高濃度のペニシリン等の抗生剤に一定時間接触させることで細胞壁を弱めた上でリゾチームによる溶菌処理を行うという方法や、長時間に及ぶ超音波処理によって物理的に菌体を破碎する方法がとられている。このような方法では、処理が煩雑になることに加えて、大量の菌体の処理が困難であること、検体間での処理に差が出やすいこと等産業利用を図る上で大きな問題点がある。また、ペニシリン等の抗生剤は細胞壁の新規の合成を阻害することでその効果をもたらすものであり、合成が完了した細胞壁に対しては何ら影響を及ぼさない。従って、低温下等に見られるような急速な増殖が期待されない状況ではその効果は著しく低下するものと考えられる。

なお、ロドコッカス属に見られる細胞壁の構造はコリネ型細菌にも共通のものであることが知られており（C. E. Barry III et al., Prog. Lipid Res. 37, 143-179 (1988)）、形質転換等の分子生物学的操作を容易にする目的において本発明と類似の発明がなされている（特公平 01-003475, T. Hirasawa et al., J. Bacteriol. 182, 2696-2701 (2000)）。

発明の開示

本発明は、リゾチームに対する感受性が高まり、低濃度のリゾチームで容易に溶菌し得るロドコッカス属微生物であって、外来遺伝子を組込んで発現させた後に、リゾチーム処理を行うことにより容易に該タンパク質を回収することのでき

るロドコッカス属微生物の提供を目的とする。また、本発明は、前記リゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を用いて外来タンパク質を産生させる方法を提供する。

本発明者らは細胞内容物の抽出処理が困難であるという点を克服しロドコッカス属微生物を用いた組換えタンパク質の発現系を完成させることを目的とし、野生型株と比べて極めて低濃度のリゾチームに対して感受性を有するロドコッカス属新規微生物を見出した。具体的には野生型株に対して突然変異の誘発を行い、リゾチーム含有培地で生育できない変異株を取得した。突然変異誘発の方法としては一般にニトロソグアニジン等の化学変異剤を用いる方法や放射線を照射する方法等がとられるが、本発明では安全性、簡便性といった点を考慮し紫外線照射による方法をとった。さらに、本発明者らは該微生物を用いることにより、ペニシリン等による前処理なしに、リゾチーム処理のみによる溶菌が可能となり、その結果菌体内に蓄積された組換えタンパク質等細胞内容物の抽出が従来の方法に比べて極めて簡便に行えることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物、

(2) ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである(1)のロドコッカス属微生物、

(3) ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (2002 年 6 月 12 日付(原寄託)で独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)に、受託番号 FERM BP-8443 として寄託されている)またはロドコッカス・エリスロポリス L-88

(2002 年 6 月 12 日付(原寄託)で独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)に、受託番号 FERM BP-8444 として寄託されている)である(2)のロドコッカス属微生物、

(4) 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物を外来タンパク質をコードする遺伝子を用いて形質転換し、該遺伝子を発現させ、前記ロドコッカス属微生物をリゾチームで処理して、前記タンパク質を抽出回収することを含む、タンパク質を産生する方法、

(5) ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである(4)のタンパク質を産生する方法、および

(6) ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (受託番号 FERM BP-8443) またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (受託番号 FERM BP-8444) である(5)のタンパク質を産生する方法、である

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明のロドコッカス属微生物は、野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物である。本発明のロドコッカス属微生物は、特定の種に限られず、ロドコッカス・エリスロポリス (*R. erythropolis*)、ロドコッカス・ファシアンス (*R. fascians*)、ロドコッカス・オパカス (*R. opacus*) 等が挙げられる。野生型ロドコッカス微生物とは、ロドコッカス属に属する遺伝的に変異をしていない微生物をいい、例えばロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 が挙げられる。すなわち、本発明のリゾチームに感受性が高いロドコッカス属微生物は、野生型のロドコッカス属微生物を親株として変異誘導し得た変異体であって、親株に比べリゾチーム感受性が高くなっている変異リゾチーム属微生物である。リゾチームに対する感受性が高いとは、低いリゾチーム濃度で溶菌し得ることをいう。微生物を培養している培地にリゾチームを添加した場合に生育が阻止されるとき、その微生物はリゾチームに対する感受性を有するという。例えば、微生物の生育を阻止できる最小濃度のリゾチーム濃度(最小生育阻止リゾチーム濃度)によりリゾチームに対する感受性を表すことができる。リゾチームの由来も限られず、例えば卵白リゾチームが挙げられる。最小生育阻止リゾチーム濃度は、例えばロドコッカス属微生物を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/ $10 \mu\text{l}$ に培地で調製し、該調製液 $10 \mu\text{l}$ に、リゾチームを数百 $\mu\text{g/ml}$ から数 $\mu\text{g/ml}$ 含むように段階希釈した培地に添加し、数日間培養し、ロドコッカス属微生物の生育を阻止するリゾチーム濃度により表すことができる。また、一定濃度のロドコッカス属微生物にリゾチームを添加し、培養を続け吸光度の変化を測定することによってもリゾチーム感受性の程度を決定することができる。この場合、リゾチーム非感受性株はリゾチームによっても溶菌せず増殖を続けるので経時的に吸光度は上昇していくが、リゾチーム感受性株は、リゾチームにより溶菌していくので吸光度は急激に減少する。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物の最小生育阻止リゾチーム濃度は、 $50\mu\text{g/ml}$ 以下、好ましくは $25\mu\text{g/ml}$ 以下、特に好ましくは $13\mu\text{g/ml}$ 以下である。これは、野生株すなわち親株の最小生育阻止リゾチーム濃度の 8 分の 1 以下、好ましくは 16 分の 1 以下、特に好ましくは 30 分の 1 以下である。

通常ロドコッカス属微生物はリゾチームに対する抵抗性が高くリゾチーム単独では、微生物体を溶菌することができず、高濃度のペニシリン等の抗生剤を用いて、増殖している微生物の細胞壁合成を阻害し、微生物の細胞壁を弱めた上でリゾチームを作用させる必要があるが、本発明のロドコッカス属微生物は、リゾチーム単独の処理により溶菌させることができる。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物は、野生型のロドコッカス属微生物、例えばロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 を化学的変異原または物理的変異原で処理し、寒天培地上で培養し、生育したコロニーをリゾチームを含有する培地とリゾチームで含有しない培地で培養し、リゾチームを含有する培地で生育しない菌を選択することにより得ることができる。リゾチームに対する感受性は上述の感受性試験法により測定することができる。化学的変異原としては、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、マスタードガス等のアルキル化剤、ヒドラジン、亜硝酸等の非アルキル化剤、5-ブロモウラシル、2-アミノプテリン等の DNA 塩基のアナログ、アクリジンオレンジ等の DNA 挿入剤が挙げられ、物理的変異原としては、紫外線、X 線、 γ 線、中性子線等が挙げられる。変異原による微生物の処理方法、用いる化学的変異原の濃度、用いる物理的変異原の強度等は公知の方法に従って、適宜選択すればよい。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物の例として、ロドコッカス・エリスロポリス L-6 5 菌株 (受託番号 FERM BP-8443) およびロドコッカス・エリスロポリス L-8 8 菌株 (受託番号 FERM BP-8444) が挙げられる。

本発明のリゾチームに対する感受性の高いロドコッカス属微生物は、リゾチームに対する感受性が野生株すなわち親株に比較して高くなっているが、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、チオストレプトン等の抗生剤の少なくとも 1 種以上に対する感受性は野生株と比較して同等で有意の差はないか、あるいはあったとしても野生株と比較してリゾチーム感受性は

どの差はない。すなわち、本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を特定の抗生剤耐性遺伝子を選択マーカーとして組込んであり、外来遺伝子を組込んだ発現ベクターを用いて形質転換し、該形質転換体を選択マーカーに基づいて選択しようとした場合、形質転換されていないロドコッカス属微生物は該抗生剤に対する感受性が低下していないので生育できず、形質転換体のみを選択することができる。この点で、本発明のリゾチームに対する感受性の高いロドコッカス属微生物は、選択に用いようとする抗生剤に対する感受性が低下していなければよく、他の抗生剤に対する感受性が低下していてもよい。

本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を用いて、組換えタンパク質を効率的に得ることができる。すなわち、本発明のリゾチームに対する感受性が高いロドコッカス属微生物を他の生物種に由来する外来タンパク質をコードする遺伝子で形質転換し、該形質転換ロドコッカス微生物を該遺伝子を発現しうる条件で培養することにより前記外来タンパク質を発現させ、ついで発現タンパク質を微生物体内に保持している微生物をリゾチームで処理することにより、該タンパク質が抽出され、抽出液から該タンパク質を容易に精製し回収することができる。本発明のロドコッカス属微生物の形質転換は公知の方法により行えばよい。この際、本発明のリゾチームに対する感受性の低下したロドコッカス属微生物の形質転換効率は、野生株すなわち親株と比較して同等かあるいは、大きな差はない。変異誘導の影響で多少形質転換効率が低下することもあるが、外来タンパク質の発現産生の効率を大きく低下させるような低下は認められない。

形質転換は、例えば公知のロドコッカス属微生物用発現ベクターを用いることにより行うことができる。また、本発明者らが構築した、チオストレプトンで誘導発現が可能な発現ベクターpHN170を用いて行うことができる。

形質転換により外来遺伝子を組込んだロドコッカス属微生物を培養し、外来遺伝子を発現させた後に、微生物体を遠心分離等により集め、リゾチームを溶解させたリン酸緩衝液等の緩衝液中に懸濁させ、リゾチームの至適温度付近の温度で数十分から数時間インキュベーションを行う。微生物体はリゾチームの作用により溶菌し、発現したタンパク質が緩衝液中に抽出される。抽出されたタンパク質を公知のタンパク質精製法で精製することにより該タンパク質を得ることができる。溶菌の際に用いるリゾチームの濃度は、0.1mg/ml～10mg/ml、好ましくは約1

mg/ml である。精製は、各種の分離精製方法により行うことができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物が GST、His tag 等との融合タンパク質として発現される場合は、目的タンパク質と融合しているペプチドまたはタンパク質の性質を利用して精製することもできる。例えば、GST はグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-239554 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、段階希釈した培養液を LB 寒天培地に滴下し生育状態を比較した写真である。

図 2 は、ロドコッカス・エリスロポリス L-65 の増殖曲線を示した図である。

図 3 は、ロドコッカス・エリスロポリス L-88 の増殖曲線を示した図である。

図 4 は、ロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 の増殖曲線を示した図である。

図 5 は、PIP タンパク質をロドコッカス・エリスロポリス L-65、L-88 および JCM3201 で発現させた場合の SDS ポリアクリルアミド電気泳動の図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

〔実施例 1〕

リゾチーム感受性菌株の製造

ロドコッカス・エリスロポリス JCM3201 を LB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、1% 塩化ナトリウム) で 30℃ にて振とう培養した。対数増殖期中期に適宜

希釈し1枚当たり約 5×10^3 細胞相当の菌体を1.5%寒天を含むLB培地上に塗布し、紫外線照射装置（アトー社製、出力4W）を用いて波長254nmの紫外線を塗布面に対し15cm離して20秒間照射した。紫外線照射を行った培地を30℃で2日間静置培養すると、1枚当たり約 5×10^2 個のコロニーが形成された。コロニーを楊子でかき取り約150 μ lのLB培地で満たした96穴プレートに接種し、よく懸濁した後、一部を50 μ g/mlの卵白由来リゾチーム（シグマ社製、以下単にリゾチームと表記）を含む約150 μ lのLB培地で満たした96穴プレートに接種した。これら1対のプレートを30℃にて2日間静置培養し、リゾチームを含まないLB培地でのみ生育可能な変異株をリゾチーム感受性株として取得した。本発明に係るリゾチーム感受性新規微生物としてロドコッカス・エリスロポリスL-65菌株およびロドコッカス・エリスロポリスL-88菌株が挙げられる。これらの菌株は2002年6月12日付（原寄託）で独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、受託番号FERM BP-8443およびFERM BP-8444としてそれぞれ寄託されている（2003年7月28日付で、原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求受領）。該菌株をLB培地に接種し、30℃にて振とう培養を行い対数増殖期中期の培養液の一部を新たなLB培地10 μ l中に約 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 細胞が含まれるように希釈し、50、25、12.5および6.3 μ g/mlのリゾチームを含有するLB寒天培地上にそれぞれ滴下した。この培地を30℃にて2日間培養した後、菌体の生育の有無を確認することで最小生育阻止濃度を決定した（表1および図1）。図に示すごとく、リゾチームを含まないLB寒天培地およびリゾチーム12.5 μ g/ml含有LB寒天培地にJCM3201、L-65およびL-88を滴下培養した。滴下した菌株は上段がJCM3201、中段がL-65、下段がL-88であり、培養液中の菌体数は左から、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 である。

表 1

菌株	寄託番号	最小生育阻止リゾチーム濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ロドコッカス・エリスロポリス L-65	F E R M B P-8 4 4 3	1 2 . 5
ロドコッカス・エリスロポリス L-88	F E R M B P-8 4 4 4	1 2 . 5
ロドコッカス・エリスロポリス J C M 3 2 0 1	A T C C 2 5 5 4 4	> 4 0 0

〔実施例 2〕

ロドコッカス・エリスロポリス L-65 培養液へのリゾチーム添加による濁度の変化

100 ml の LB 培地にロドコッカス・エリスロポリス L-65 を植え 30℃ にて振とう培養し、対数増殖期の初期から 1 時間ごとに吸収波長 600 nm での培養液の吸光度 (OD_{600}) を測定した。 OD_{600} が 0.2 前後に達した時点で半量ずつ 2 本に分け、一方はそのまま、もう一方は終濃度 $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを添加しそれぞれさらに培養を続けながら吸光度の測定を行った。この結果を図 2 に示した。ロドコッカス・エリスロポリス L-65 の培養液に $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを添加した場合と添加しない場合の増殖の様子を 600 nm の吸光度で示した。 OD_{600} がおよそ 0.2 になった時点でリゾチームを添加した (矢印で図示)。リゾチームを添加した場合には吸光度が急激に低下することが観察された。これはリゾチームによって溶菌が起きたためと考えられる。

〔実施例 3〕

ロドコッカス・エリスロポリス L-88 培養液へのリゾチーム添加による濁度の変化

実施例 2 と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリス L-88 で行った場合の吸光度の測定結果を図 3 に示した。ロドコッカス・エリスロポリス L-88 の培養液に $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームを添加した場合と添加しない場合の増殖の

様子を600nmの吸光度で示した。OD₆₀₀がおよそ0.2になった時点でリゾチームを添加した(矢印で図示)。リゾチームを添加した場合には吸光度が急激に低下することが観察された。これはリゾチームによって溶菌が起きたためと考えられる。

〔比較例1〕

ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201培養液へのリゾチーム添加による濁度の変化

実施例2と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリスJCM3201で行った場合の吸光度の測定結果を図4に示した。ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201の培養液に12.5μg/mlのリゾチームを添加した場合と添加しない場合の増殖の様子を600nmの吸光度で示した。OD₆₀₀がおよそ0.2になった時点でリゾチームを添加した(矢印で図示)。リゾチームの添加の有無に関わらず増殖の傾向は変わらないことが観察された。

〔実施例4〕

リゾチーム感受性菌株のアンピシリンに対する感受性

ロドコッカス・エリスロポリスL-65およびロドコッカス・エリスロポリスL-88のアンピシリンに対する感受性を実施例1と同様の方法により決定した。即ち、該菌株をLB培地に接種し、30℃にて振とう培養を行い対数増殖期中期の培養液の一部を新たなLB培地10μl中に約 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 細胞が含まれるように希釈し、15、10、1および0.1μg/mlのリゾチームを含有するLB寒天培地上にそれぞれ滴下した。この培地を30℃にて2日間培養した後、菌体の生育の有無を確認することで最小生育阻止濃度を決定した(表2)。同様にカナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンおよびチオストレプトンに対する感受性の比較も行ったが、野生株と変異株の間で有意な差は認められなかった。

表 2

菌株	寄託番号	最小生育阻止アンピシリン濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ロドコッカス・エリスロポリス L-65	F E R M B P-8 4 4 3	1
ロドコッカス・エリスロポリス L-88	F E R M B P-8 4 4 4	1
ロドコッカス・エリスロポリス J C M 3 2 0 1	A T C C 2 5 5 4 4	15

〔実施例 5〕

リゾチーム感受性菌株の形質転換効率

ロドコッカス・エリスロポリスの形質転換はエレクトロポレーション法によった。以下にその詳細を述べる。ロドコッカス・エリスロポリス J C M 3 2 0 1、ロドコッカス・エリスロポリス L-65 およびロドコッカス・エリスロポリス L-88 株をそれぞれ L B 培地 100 ml にて対数増殖期に至るまで 30℃ で振とう培養した。培養液を 30 分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収した。これに 100 ml の氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収した。これに 100 ml の氷冷 10% グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収した。この氷冷 10% グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返し、菌体を 5 ml の氷冷 10% グリセリン溶液に懸濁し、この菌体 400 μl とロドコッカス・エリスロポリスでの自立複製が可能なプラスミド DNA (p H N 1 4 4 : 中島、田村、全長配列を配列番号 1 に示した) の混合液をエレクトロポレーションキュベット (B i o-R a d 社 : 0.2 cm ギャップキュベット) に移し、同社の遺伝子導入装置ジーンパルサー I I を用いて、電場強度 12.5 kV/cm で、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス 25 μF 、外部抵抗 400 Ω にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体と DNA の混合液を 1 ml の L B 培地に混合し、30℃ にて 4 時間培養した後集菌し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チオストレプトン含有 L B 寒天培地に塗布し、30℃ にて 3 日培養し、それ

それぞれの形質転換体を得た。このときのDNA 1 μ gあたりの形質転換効率（コロニー形成数）を表3に示した。

表 3

菌株	寄託番号	形質転換効率
ロドコッカス・エリスロ ポリスL-65	F E R M B P-8 4 4 3	2.6×10^5
ロドコッカス・エリスロ ポリスL-88	F E R M B P-8 4 4 4	2.5×10^5
ロドコッカス・エリスロ ポリスJCM3201	A T C C 2 5 5 4 4	4.0×10^5

〔実施例6〕

ロドコッカス・エリスロポリスL-65株を用いた組換えタンパク質の抽出

ロドコッカス・エリスロポリス菌体内で自立複製可能で、かつチオストレプトンによる誘導によりC末側6×ヒスチジントグをもつプロリンイミノペプチダーゼ（以下PIPと表記）タンパク質（T. Tamura et al., FEBS Lett. 398, 101-105 (1996)）を発現すべく構築されたプラスミド（pHN170：中島、田村、全長配列を配列番号2に示した）をロドコッカス・エリスロポリスL-65株にエレクトロポレーション法により導入し、テトラサイクリン（20 μ g/ml）含有LB寒天培地上で形質転換体を選別した。形質転換体をテトラサイクリン（8 μ g/ml）含有LB培地4mlに植え、吸収波長600nmでの培養液の吸光度が0.8に達するまで30℃にて振とう培養した。この全量をチオストレプトン（1 μ g/ml）含有LB培地40mlに加え、羽根付きフラスコで16時間旋回培養しPIPタンパク質の発現を誘導した後、1,500×g、15分間の遠心操作で集菌した。菌体を300mM食塩含有50mMリン酸緩衝液（pH8.0）4mlに懸濁後リゾチームを終濃度1mg/mlとなるように添加した。37℃で1時間インキュベーションした後、氷上にて冷却し10,000×g、15分間の遠心操作を行い上清（s）と沈殿（p）に分離した。得られた上清（s）のうち1mlを別の微量遠心チューブにとりわけ、あらかじめ300mM食塩含

有50mMリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたNi-NTA Superflow (QIAGEN社製) 50 μ lを添加し、上下反転しながら4℃にて1時間インキュベーションした。300mM食塩および10%グリセリン含有50mMリン酸緩衝液(pH6.0) 1mlで、3回洗浄した後500mM EDTA、300mM食塩および10%グリセリン含有50mMリン酸緩衝液(pH6.0) 50 μ lで6×ヒスチジン融合PIPタンパク質を溶出した。このうち10 μ lをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ6×ヒスチジン融合PIPタンパク質のアミノ酸配列から予想される分子量(34.3kDa)付近に明瞭なバンドが検出された(図5)。一方で、得られた沈殿(p)は8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 1mlに再懸濁し30分間放置した後、10,000 $\times$ g、15分間の遠心操作を行い上清を新たな微量遠心チューブに移し、あらかじめ8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたNi-NTA Superflow 50 μ lを添加し、上下反転しながら室温にて1時間インキュベーションした。8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH6.3) 1mlで3回洗浄した後500mM EDTAおよび8M尿素含有100mMリン酸2水素ナトリウム-10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 50 μ lで6×ヒスチジン融合PIPタンパク質を溶出した。このうち10 μ lをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した(図5)。Mは分子量マーカーであり各バンドのおよその分子量を図左に示した。図5中、各レーンは以下のバンドパターンを示した。

レーン1(JCM3201, s); JCM3201株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。未変性条件緩衝液(尿素を含まない)中ではほとんど溶菌しないので目的のバンド(矢印で図示)は検出されない。レーン2(JCM3201, p); JCM3201株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。変性条件緩衝液(尿素を含む)中でわずかに溶菌し、目的のバンドが薄く確認される。

レーン3(JCM3201+amp, s); JCM3201株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。ただし、ここでは集菌直前の2時間に渡ってアンピシリンによる処理を施してある。アンピシリンによってリ

ゾチームに対する感受性が高まり、未変性条件緩衝液中でも溶菌が起こり目的のバンドが十分確認できる。

レーン4 (JCM3201 + amp, p); JCM3201株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。ただし、ここでは集菌直前の2時間に渡ってアンピシリンによる処理を施してある。アンピシリンで前処理をしてもなお未変性条件緩衝液中では溶菌されなかった菌体が、変性条件緩衝液中で溶菌し、目的のバンドが検出されたと考えられる。

レーン5 (L-65, s); L-65株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。リゾチーム処理によって完全に溶菌し、目的のバンドが検出される。

レーン6 (L-65, p); L-65株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。沈殿には溶菌後の細胞残滓のみが含まれると考えられ目的のバンドは検出されない。

レーン7 (L-88, s); L-88株でPIPを発現させた場合の上清から得られた試料を泳動したもの。L-65株の場合と同様のことが考えられる。

レーン8 (L-88, p); L-88株でPIPを発現させた場合の沈殿から得られた試料を泳動したもの。L-65株の場合と同様のことが考えられる。

なお、上記操作で用いた抗生剤は、5mgテトラサイクリンを1mlの50重量%エタノールに溶解したもの、または10mgチオストレプトンを1mlのジメチルスルホオキシドに溶解したものを必要量使用した。

〔実施例7〕

ロドコッカス・エリスロポリスL-88株を用いた組換えタンパク質の抽出

実施例6と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリスL-65株に代えてロドコッカス・エリスロポリスL-88株を用いて行った(図5)。

〔比較例2〕

ロドコッカス・エリスロポリスJCM3201株を用いた組換えタンパク質の抽出

実施例6と同一の操作をロドコッカス・エリスロポリスL-65株に代えてロドコッカス・エリスロポリスJCM3201株を用いて行った(図5)。

〔比較例3〕

ロドコッカス・エリスロポリス JCM 3201 株を用いた組換えタンパク質の抽出

ロドコッカス・エリスロポリス L-65 株に代えてロドコッカス・エリスロポリス JCM 3201 株を用いて実施例 6 のごとく形質転換体を作製し、チオストレプトンによる PIP タンパク質の発現誘導を行った。集菌を行う 2 時間前に 50 mg/ml アンピシリン水溶液 480 μ l を添加し（終濃度 600 μ g/ml）、集菌以下実施例 6 と同様の操作を行い得られた試料を電気泳動に供した（図 5）。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

実施例に示すように、本発明のロドコッカス属微生物はリゾチームに対する感受性が野生株に比べ高くなっている。また、形質転換効率は野生株と比べて大きく変わっていない。従って、本発明のロドコッカス属微生物を外来タンパク質をコードする遺伝子で効率的に形質転換し、該タンパク質を発現させた後に、リゾチームで溶菌させることにより容易に該タンパク質を抽出し、回収することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : プラスミド pHN144

配列番号 2 : プラスミド pHN170

請求の範囲

1. 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物。
2. ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである請求項1記載のロドコッカス属微生物。
3. ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (受託番号 FERM BP-8443) またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (受託番号 FERM BP-8444) である請求項2記載のロドコッカス属微生物。
4. 野生型ロドコッカス属微生物に比べ、リゾチームに対する感受性が高い変異ロドコッカス属微生物を外来タンパク質をコードする遺伝子を用いて形質転換し、該遺伝子を発現させ、前記ロドコッカス属微生物をリゾチームで処理して、前記タンパク質を抽出回収することを含む、タンパク質を産生する方法。
5. ロドコッカス属微生物がロドコッカス・エリスロポリスである請求項4記載のタンパク質を産生する方法。
6. ロドコッカス・エリスロポリスがロドコッカス・エリスロポリス L-65 (受託番号 FERM BP-8443) またはロドコッカス・エリスロポリス L-88 (受託番号 FERM BP-8444) である請求項5記載のタンパク質を産生する方法。

図 1

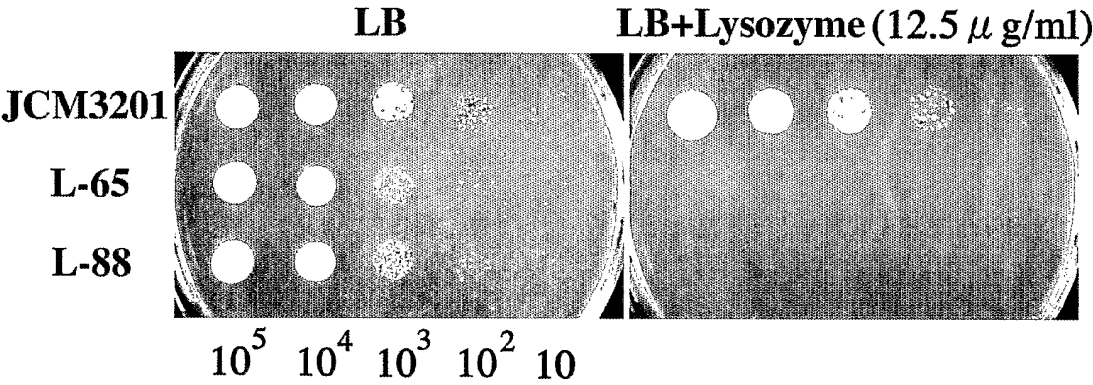


図 2

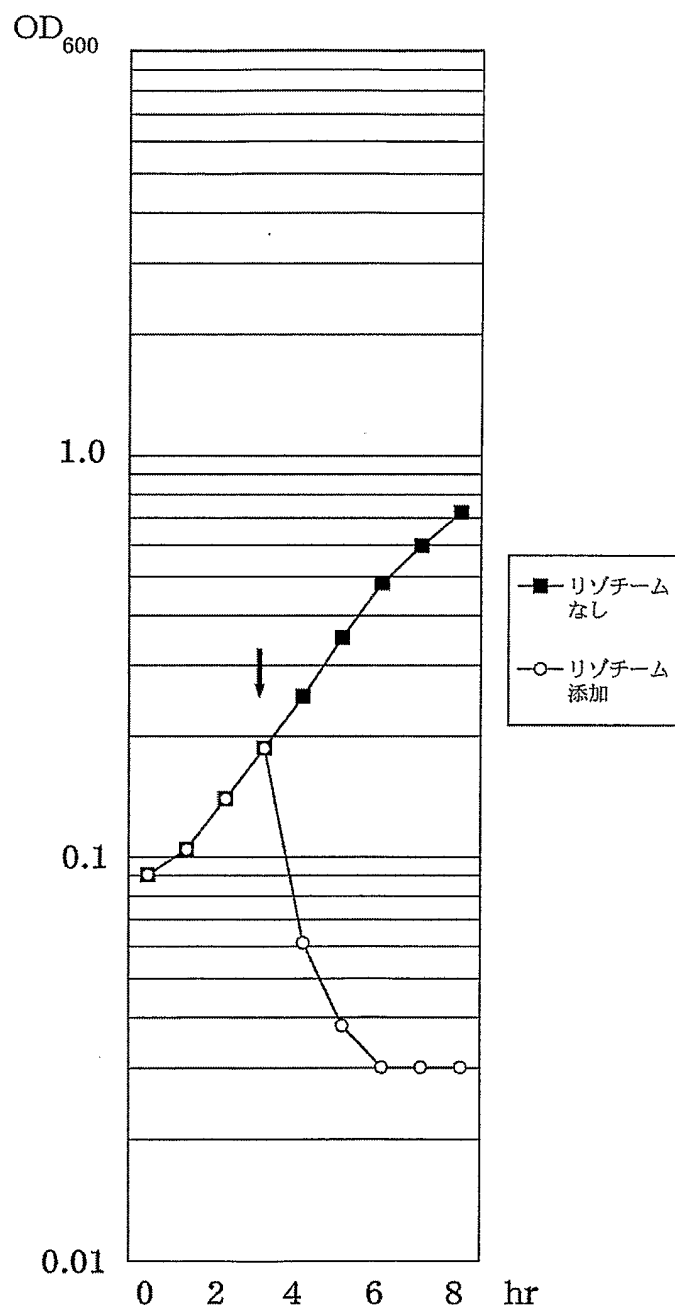
Rhodococcus erythropolis L-65

図 3

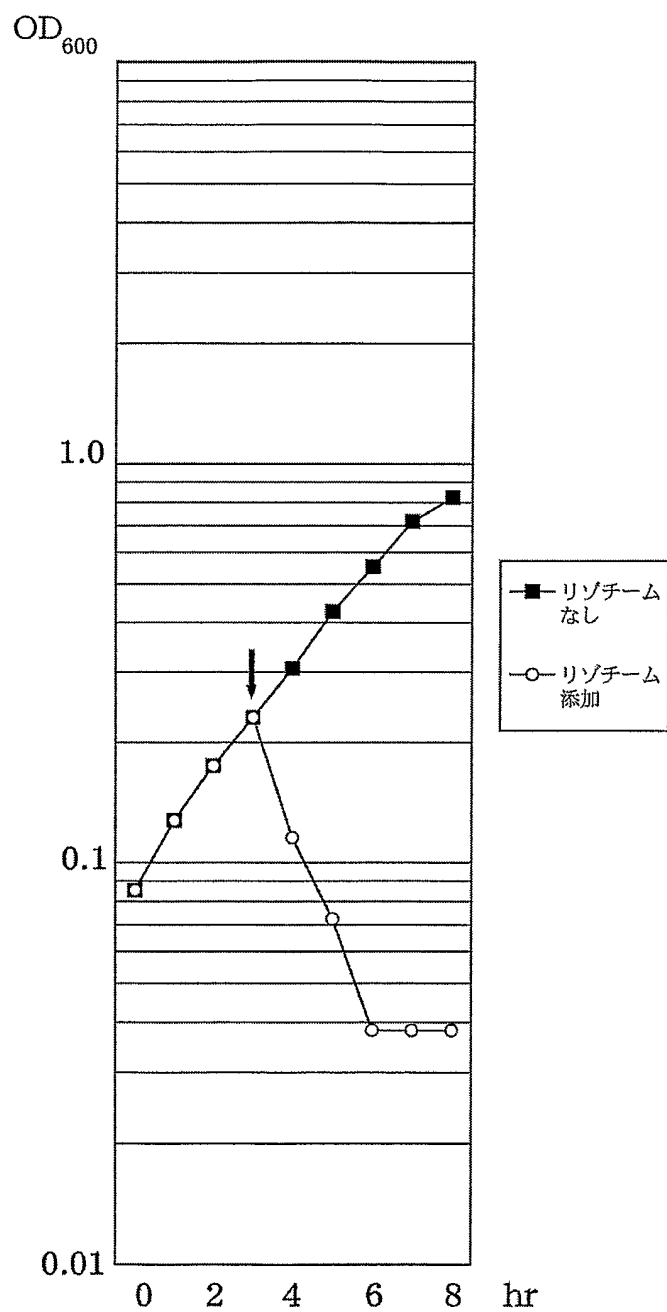
Rhodococcus erythropolis L-88

図 4

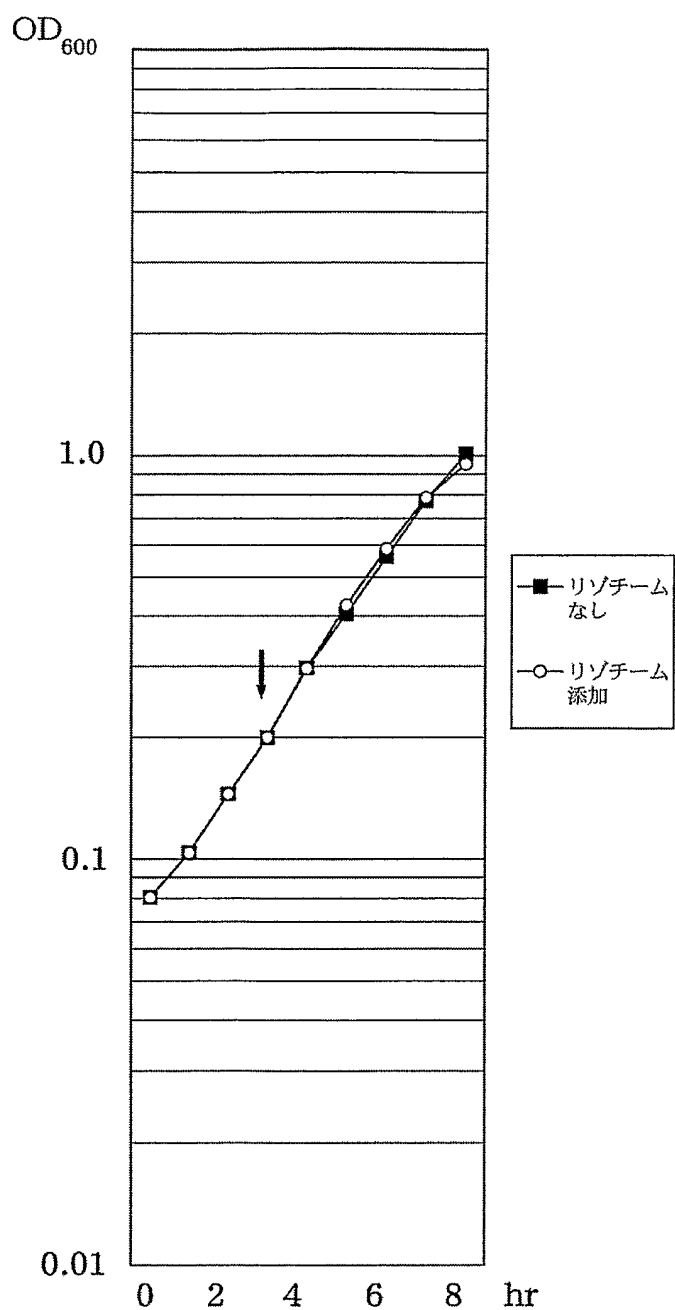
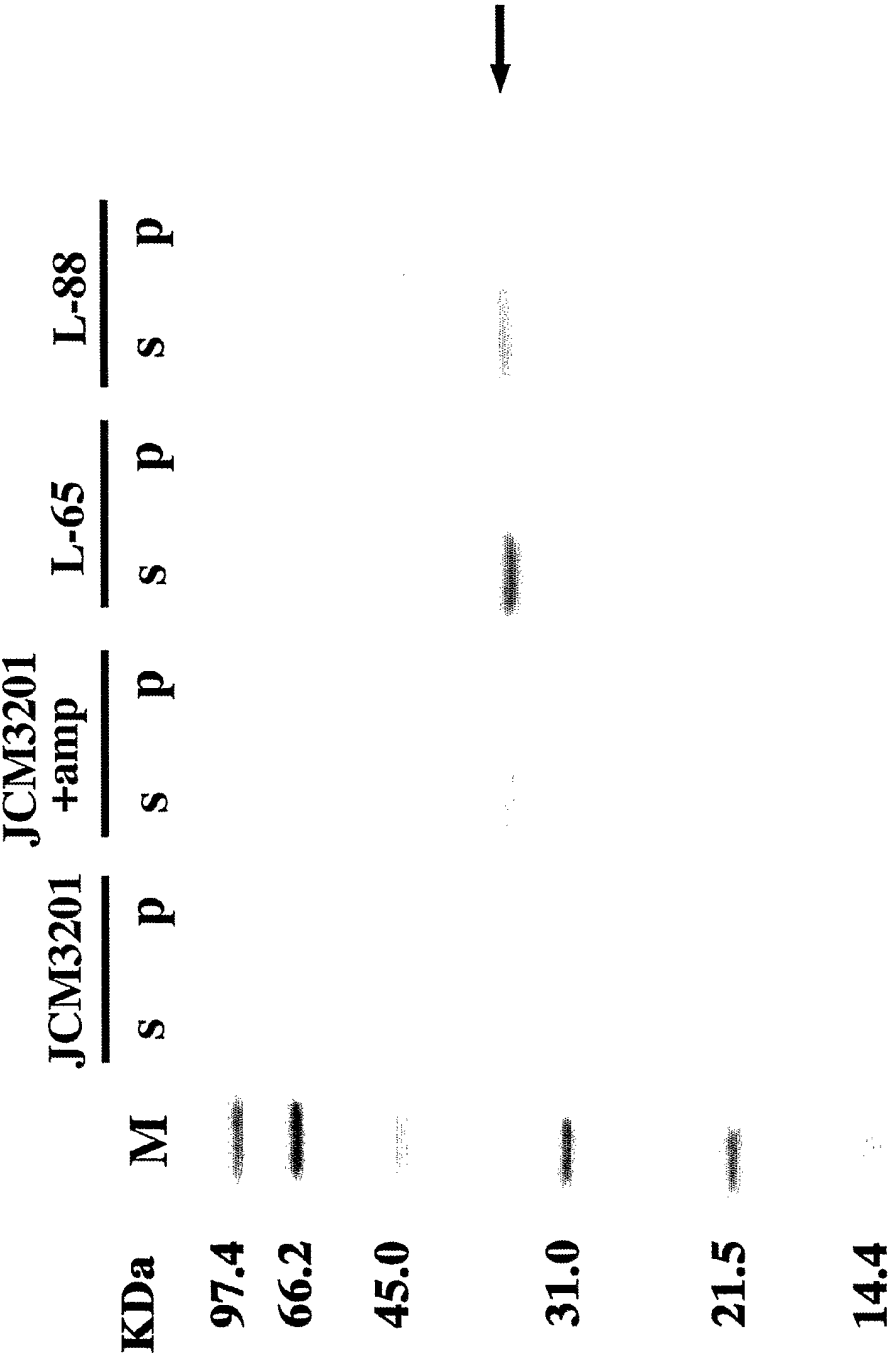
Rhodococcus erythropolis JCM3201

図 5



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A novel lysozyme sensitive microorganism

<130> PH-1850-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002/239554

<151> 2002-08-20

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pHN144

<400> 1

gagctcgacc ggcggggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120

```

tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
cgcgggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggg 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgga cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720
caticgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tticcgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcga aaagggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggaacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cagggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtgggtccggg cgggcacitcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagaggatcc ccgggtaccg agctcgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 1200
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 1260
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 1320
tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc 1380
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 1440
atctcaacag cggtlaagatc cttgagagtt ttgcgccga agaactttt ccaatgatga 1500
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 1560
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag 1620
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga 1680
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 1740
cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga 1800
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 1860

```

tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 1920
 ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 1980
 ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg 2040
 gccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 2100
 tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 2160
 tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 2220
 aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 2280
 tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 2340
 tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 2400
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 2460
 agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 2520
 tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 2580
 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatatgt accggataag gcgcagcggg 2640
 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 2700
 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 2760
 acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg 2820
 gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 2880
 ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 2940
 tacggttccct ggcccttttg tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatccccctg 3000
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 3060
 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc 3120
 ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgactagtgt tacaccgag 3180
 aagctcccag cgtcttcttg ggccgcgata ctcgaccacc acgcacgcac accgcactaa 3240
 cgattcggcc ggcgtctgat tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg 3300
 cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc gagcagaaga gtgaacaacc accgaccacg 3360
 cttccgctct gcgcgccgta cccgacctac ctcccgcagc tcgaagcagc tcccgggagt 3420
 accgcgttac tcaccgcct gtgctcacca tccaccgacg caaagcccaa cccgagcaca 3480
 cctcttgcaac caaggtgccg accgtggctt tccgctcgca gggttccaga agaaatcgaa 3540
 cgatccagcg cggcaaggtt caaaaagcag gggttggtgg ggaggaggtt ttggggggtg 3600

```

tcgccgggat  acctgatatg  gctttgtttt  gcgtagtcga  ataattttcc  atatagcctc  3660
ggcgcgtcgg  actcgaatag  ttgatgtggg  cgggcacagt  tgcccatga  aatccgcaac  3720
ggggggcgtg  ctgagcgatc  ggcaatgggc  ggatgcggtg  ttgcttccgc  accggccgtt  3780
cgcgacgaac  aacctccaac  gaggtcagta  ccggatgagc  cgcgacgacg  cattggcaat  3840
gcggtacgtc  gagcattcac  cgcacgcgtt  gctcggatct  atcgtcatcg  actgcgatca  3900
cgttgacgcc  gcgatgcgcg  cattcgagca  accatccgac  catccggcgc  cgaactgggt  3960
tgcacaatcg  ccgtccggcc  gcgcacacat  cggatggtgg  ctcgcccca  accacgtgtg  4020
ccgcaccgac  agcgcccgac  tgacgccact  gcgctacgcc  caccgcatcg  aaaccggcct  4080
caagatcagc  gtcggcggcg  atttcgcgta  tggcgggcaa  ctgacaaaa  acccgattca  4140
ccccgattgg  gagacgatct  acggcccggc  caccgccgtac  acattgcggc  agctggccac  4200
catccacaca  ccccggcaga  tgccgcgtcg  gcccgatcgg  gccgtgggcc  tgggccgcaa  4260
cgtcaccatg  ttcgacgcca  cccggcgatg  ggcataccgc  cagtgggtgg  aacaccgaaa  4320
cggaaccggc  cgcgactggg  accatctcgt  cctgcagcac  tgccacgccg  tcaacaccga  4380
gttcacgaca  ccactgccgt  tcaccgaagt  acgcgccacc  gcgcaatcca  tctccaaatg  4440
gatctggcgc  aatttcaccg  aagaacagta  ccgagcccg  caagcgcatc  tcggtcaaaa  4500
aggcggcaag  gcaacgacac  tcgccaaca  agaagccgtc  cgaaacaatg  caagaaagta  4560
cgacgaacat  acgatgcgag  aggcgattat  ctgatgggcg  gagccaaaa  tccggtgcgc  4620
cgaaagatga  cggcagcagc  agcagccgaa  aaattcgggt  cctccactcg  cacaatccaa  4680
cgcttgittg  ctgagccgcg  tgacgattac  ctcggccgtg  cgaaagctcg  ccgtgacaaa  4740
gctgtcgagc  tgcggaagca  ggggttgaag  taccgggaaa  tcgccgaagc  gatggaactc  4800
tcgaccggga  tcgtcggccg  attactgcac  gacgcccgca  ggcacggcga  gatttcagcg  4860
gaggatctgt  cggcgtaacc  aagtcagcgg  gtgtcgggt  tccggccggc  gctcggcact  4920
cggaccggcc  ggcggatggt  gttctgcctc  tggcgcagcg  tcagctaccg  ccgaaggcct  4980
gtcatcgacc  ggcttcgact  gaagtatgag  caacgtcaca  gcctgtgatt  ggatgatccg  5040
ctcacgctcg  accgctacct  gttcagctgc  cgcccgctgg  gcatgagcaa  cggccaactc  5100
tcgttcaa  5108

```

<210> 2

<211> 8971

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pHN170

<400> 2

```
gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttgcgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt cccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccica tgcacagcat 300
cgcgggccggg gtggagtcca tcgaggctca cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttcccgtaga 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggttggc cttgctgttc ggcagcga aaagggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cagcagagga tcgacaggaa 960
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca caggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc ctgaaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
```

cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380
 aggcataggc ttggttatgc cggtagtgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
 cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgcctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
 cgcacccgtt ctcgagacac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560
 gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620
 ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccca 1680
 tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttccgggtca tgagcgcttg 1740
 tttcggcggtg ggtatggttg caggccccgt ggccggggga ctgltggcg ccattctcctt 1800
 gcatgcacca ttcccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
 cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg ccttgagag ccttcaaccc 1920
 agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgct gccgcactta tgactgtctt 1980
 ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
 ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
 cgccctcgct caagccttcg tctctggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
 cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
 aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgcg 2280
 gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
 gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400
 tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460
 tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520
 agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
 cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640
 tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcaac 2700
 tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa tcatctgctt ttctcgcacg 2760
 caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgigaatc acacccacc ggggggtggg 2820
 attgcagtca ccgatttggg ggtgcccc aggaagatca cgtttacata ggagcttgca 2880
 atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttccgccgag tgacggtgcg cacgctgcac 2940
 cactacgacg acatcgccct gctcgtaccg agcgagcgca gccacgcggg ccaccggcg 3000
 tacagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt tctaccggga gctgggcttc 3060

ccgctcgcacg aggtcgcgcg cctgctcgac gaccgcggccg cggaccgcgc gcgcgcacctg 3120
 cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac tgcagaagat ggccggcgcc 3180
 gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc tcaccccgga ggagaagtgc 3240
 gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg aggtccggga acgctggggg 3300
 aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct cgtacaccaa ggaggactgg 3360
 cagcgcattc aggacgaggc cgacgagctc acccgcgctc tcgtcgccct gatggacgcg 3420
 ggtgagcccc cggactccga gggggcgatg gacgccgcgc aggaccaccg gcagggcatc 3480
 gcccgcgaac actacgactg cgggtacgag atgcacacct gcctgggcga gatgtacgtg 3540
 tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc cgggcctcgc cgcctacatg 3600
 cgcgacgcga tcctcgccaa cggcgctcgc cacacccccct gagcgggtgg cgtggcccgc 3660
 gtctcccgcc cgggtctacc ccacggctca ctcccgggcc acgaccaccg ccgtcccgta 3720
 cgcgacacac tcggtgcccc cgtccgcgcg ctccgtcacg tcgaaacgga agatccccgc 3780
 gtaccgagct cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 3840
 tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 3900
 caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc 3960
 ttttttgcgg catittgcct tcctgttttt gctcaccagc aaacgctggg gaaagtaaaa 4020
 gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg 4080
 aagatccttg agagttttcg ccccggaaga cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 4140
 ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgatc gacgccgggc aagagcaact cggtcgcgcg 4200
 atacactatt ctccagaatga ctgggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcattcttac 4260
 gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg 4320
 gccaaattac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac 4380
 atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 4440
 aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 4500
 actggcgaac tacttactct agcttcccg cacaattaa tagactggat ggaggcggat 4560
 aaagttgcag gaccatttct gcgctcgccg ctcccggtg gctggtttat tgctgataaa 4620
 tctggagccg gtgagcgtgg gtcctcggtt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 4680
 ccttcccgta tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 4740
 agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt 4800

tactcatata tacttttagat tgatttataaa cttcattttt aatttataaag gatctaggtg 4860
aagatccttt ttgataatct catgacccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 4920
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 4980
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa 5040
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 5100
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 5160
tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 5220
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 5280
ggttcgtgca cacagcccag cttaggagcg aagacctaca ccgaactgag atacctacag 5340
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaga aggcggacag gtatccggtg 5400
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 5460
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 5520
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 5580
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 5640
cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 5700
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgct 5760
tgcccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcctg ctgaggcggc gtagcaggtc 5820
agccgcccc a gcggtggtca ccaaccgggg tggaacggcg ccggtatcgg gtgtgtccgt 5880
ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc gtgttgcaat ccttcgcacc 5940
ggcaccgcga gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga ctagtttatt aatgatgatg 6000
atgatgatgc aggtgtttca ggatgaaatc cgaaagcaac ttgttgtatc cttcacgac 6060
ctccacatc gtgagggtcg agcaatccct gaagacgtga agttccgaac cagctatttt 6120
ttcatgtatg actctggcca cgtttgccgt gacctatcg tattcgcca ccgttataag 6180
ggtggggatc ttatttgagc atattttgtc cgtgatatcc cagtccttta tcgtgccgg 6240
tatggtgaac tcattcgggc cgttcattat cctgtatagc ttctgccttt ccgcgtattc 6300
tagtgatttg agtacctcgg gcggccaatc ctctgatctc agcagatgct gatggtaaaa 6360
gtagttcacg gcctcctgat attctggatt ctctgaagat ccagatgaac cgtatttttt 6420
aatggcatct ctgtactttg ccgggagctc gtcaatgagc ctgttcatct ccttcaccgt 6480
cagagggact gaagataagc ctccggatac gatgagccct ttcagatgat cctgggtactt 6540

gactgcgtat gccagcgcca gcgctccacc atatgatgac cccatcaaaa ataccttctc 6600
 gttgccgaac agctttgatc ttagggcctc tgcctcttcc acaccatagt caattgtgaa 6660
 tttagactga tccggttccct cggatctacc gcatccaaac tgatcgtaga atagaaccgt 6720
 tatcccttcc ttggtcatat ccctgagaga aagcaggtaa tcgtgggaca tgcccgggcc 6780
 cccgtgcatg gtcattagct ttgctttctc ctcaggggct ttgcacagct tgtaataaat 6840
 ataaattccg ttaccttttg cgtagttttc tatgcattcc tgatccatgg ccgctccctt 6900
 ctctgacgcc gtccacgctg cctcctcacg tgacgtgagg tgcaagcccg gacgttccgc 6960
 gtgccacgcc gtgagccgcc gcgtgccgtc ggctccctca gcccgggcgg ccgtgggagc 7020
 ccgcctcgat atgtacaccc gagaagctcc cagcgtctc ctgggcccgc atactcgacc 7080
 accacgcacg cacaccgcac taacgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt 7140
 cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccgagcaga 7200
 agagtgaaca accaccgacc acgcttccgc tcigcgcgcc gtaccgacc tacctcccgc 7260
 agctcgaagc agtcccggg agtaccgccg tactcaccg cctgtgctca ccatccaccg 7320
 acgcaaagcc caaccgagc acacctcttg caccaaggtg ccgaccgtg ctttccgctc 7380
 gcagggttcc agaagaaatc gaacgatcca gcgcggcaag gttcaaaaag caggggttgg 7440
 tggggaggag gttttggggg gtgtcgccgg gatactgat atggctttgt tttgcgtagt 7500
 cgaataattt tccatatagc ctcggcgcgt cggactcgaa tagttgatgt gggcgggcac 7560
 agttgcccc a tgaatccgc aacggggggc gtgctgagcg atcggaatg ggcggatgcg 7620
 gtgttgcttc cgcaccggcc gttecgacg aacaacctc aacgaggta gtaccggatg 7680
 agccgcgacg acgcattggc aatgcggtac gtcgagcatt caccgcacgc gttgctcgga 7740
 tctatcgta tcgactgca tcacgttgac gccgcgatgc gcgcattcga gcaaccatcc 7800
 gaccatccgg cgccgaactg ggttgcaaa tcgccgtccg gccgcgcaca catcggatgg 7860
 tggctcggcc ccaaccacgt gtccgcacc gacagcgccc gactgacgcc actgcgctac 7920
 gccaccgca tcgaaaccgg cctcaagatc agcgtcggcg gcgatttcgc gtatggcggg 7980
 caactgacca aaaaccgat tcacccgat tgggagacga tctacggccc ggccaccccg 8040
 tacacattgc ggcagctggc caccatccac acacccggc agatgccgcg tggcccgat 8100
 cgggccgtgg gcctgggccc caacgtcacc atgttcgacg ccaccggcg atgggcatac 8160
 ccgcagtggg ggcaacaccg aaacggaacc ggccgcgact gggaccatct cgtcctgcag 8220
 cactgccacg ccgtcaacac cgagttcacg acaccactgc cgttcaccga agtacgcgcc 8280

accgcgcaat ccattctcaa atggatctgg cgcaattica ccgaagaaca gtaccgagcc 8340
cgacaagcgc atctcggta aaaaggcggc aaggcaacga cactcgccaa acaagaagcc 8400
gtccgaaaca atgcaagaaa gtacgacgaa catacgatgc gagaggcgat tatctgatgg 8460
gcggagccaa aaatccggtg cgccgaaaga tgacggcagc agcagcagcc gaaaaattcg 8520
gtgcctccac tcgcacaatc caacgcttgt ttgctgagcc gcgtgacgat tacctcggcc 8580
gtgcgaaagc tcgccgtgac aaagctgtcg agctgcggaa gcaggggttg aagtaccggg 8640
aaatcgccga agcgatggaa ctctcgaccg ggatcgtcgg ccgattactg cacgacgccc 8700
gcaggcacgg cgagatttca gcggaggatc tgcggcgta accaagtcag cgggttgtcg 8760
ggttcgggcc ggcgctcggc actcggaccg gccggcggat ggtgttctgc ctctggcgca 8820
gcgtcagcta ccgccgaagg cctgtcatcg accggcttcg actgaagtat gagcaacgtc 8880
acagcctgtg attggatgat ccgctcacgc tcgaccgcta cctgttcagc tgccgcccgc 8940
tgggcatgag caacggccaa ctctcgttca a 8971

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, JICST-Eplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 64680 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 17 November, 1982 (17.11.82), & JP 57-186489 A & JP 58-56678 A & CA 1185197 A & IL 65650 A & US 4681847 A & EP 64680 B & JP 1-3475 B	1-6
A	JP 61-280273 A (Seitetsu Kagaku Kogyo Co., Ltd.), 10 December, 1986 (10.12.86), (Family: none)	1-6
A	JP 7-255484 A (Japan Energy Corp.), 09 October, 1995 (09.10.95), (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
08 September, 2003 (08.09.03)

Date of mailing of the international search report
24 September, 2003 (24.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10342

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAILEY, S.A. et al., Emulsification of crude oil by <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain ST-2 via a cell-surface, lysozyme-sensitive glycoprotein., <i>System.Appl.Microbiol.</i> , vol.20, pages 545 to 548, (1997)	1-6
A	INOUE, M. et al., Isolation and characterization of lysozyme-sensitive mutants of <i>Staphylococcus aureus</i> ., <i>J.Bacteriol.</i> , Vol.144(3), pages 1186 to 1189 (1980)	1-6
A	HIRASAWA, T. et al., A mutation in the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>ltsA</i> gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production., <i>J.Bacteriol.</i> , Vol.182(10), pages 2696 to 2701, (2000)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/20, C12N 1/21, C12P 21/02

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. ⁷ C12N 1/20, C12N 1/21, C12P 21/02

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

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)

WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, JICST-Eplus

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 請求の範囲の番号
A	EP 64680 A(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)1982.11.17 & JP 57-186489 A & JP 58-56678 A & CA 1185197 A & IL 65650 A & US 4681847 A & EP 64680 B & JP 1-3475 B	1-6
A	JP 61-280273 A(製鉄化学工業株式会社)1986.12.10 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 7-255484 A(株式会社ジャパンエナジー)1995.10.09 (ファミリーなし)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ 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

「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
「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
「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)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「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
「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
「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
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.03

国際調査報告の発送日

24.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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)

長井 啓子



4N 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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 請求の範囲の番号
A	BAILEY, S.A. et al., Emulsification of crude oil by <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain ST-2 via a cell-surface, lysozyme-sensitive glycoprotein. <i>System. Appl. Microbiol.</i> , vol. 20, pp. 545-548 (1997)	1-6
A	INOUE, M. et al., Isolation and characterization of lysozyme-sensitive mutants of <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , vol. 144(3), pp. 1186-1189 (1980)	1-6
A	HIRASAWA, T. et al., A mutation in the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>ltsA</i> gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. <i>J. Bacteriol.</i> , vol. 182(10), pp. 2696-2701 (2000)	1-6