

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6791623号

(P6791623)

(45) 発行日 令和2年11月25日 (2020. 11. 25)

(24) 登録日 令和2年11月9日 (2020. 11. 9)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)

C 1 2 N 15/113 Z

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 11 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2015-211548 (P2015-211548)

(22) 出願日 平成27年10月28日 (2015. 10. 28)

(65) 公開番号 特開2017-79640 (P2017-79640A)

(43) 公開日 平成29年5月18日 (2017. 5. 18)

審査請求日 平成30年9月18日 (2018. 9. 18)

(73) 特許権者 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1

〇号

(73) 特許権者 504143441

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

(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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え微生物及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築された枯草菌に、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入された組換え微生物であって、

前記枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が、下記の (a)、(b)、(c)、(d) ～ (f) からなる群より選択される、組換え微生物。

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ A b r B と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 9 個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなりかつ A b r B と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ A b r B と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2】

枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するような遺伝子構築が、a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子の転写開始制御領域、又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域における抑制性制御因子の結合部位を不活性化することである、請求項 1 項記載の組換え微生物。

【請求項 3】

a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子の転写開始制御領域、又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域における抑制性制御因子の結合部位が、配列番号 9 に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、転写開始制御領域又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域としての機能を有する DNA において、配列番号 9 の 20～49 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域、又は/及び 73～89 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域である請求項 2 項記載の組換え微生物。

10

【請求項 4】

枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するような遺伝子構築が、配列番号 9 に示される塩基配列において 73～89 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域を削除するものである、請求項 3 項記載の組換え微生物。

【請求項 5】

目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の上流に、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 1～4 のいずれか 1 項記載の組換え微生物。

20

【請求項 6】

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、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の上流に結合した請求項 5 に記載の組換え微生物。

【請求項 7】

分泌シグナル領域が、バチルス (B a c i l l u s) 属に属する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 領域由来のものである請求項 5 又は 6 記載の組換え微生物。

30

【請求項 8】

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 10 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 の塩基配列若しくは配列番号 12 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、又はこれらの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、又は当該塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなる DNA 断片である請求項 6 及び 7 記載の組換え微生物。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の組換え微生物を培養し、培養物又は菌体から目的タンパク質又はポリペプチドを回収する工程を含む、目的タンパク質又はポリペプチドの製造方法。

40

【請求項 10】

枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築する工程、及び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発現可能に強化又は導入する工程を含む組換え枯草菌の製造方法であって、

前記枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が、下記の (a)、(b)、(d)～(f) からなる群より選択される、方法。

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ A b r B と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子と

50

しての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなりかつA b r Bと同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつA b r Bと同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項11】

枯草菌のa b r B遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築され、且つ目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入された組換え枯草菌を用いて該タンパク質又はポリペプチドを製造する、目的タンパク質又はポリペプチドの生産性向上方法であって、

前記枯草菌のa b r B遺伝子又はそれに相当する遺伝子が、下記の(a)、(b)、(d)～(f)からなる群より選択される、方法。

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1に示すヌクレオチド配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつA b r Bと同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなりかつA b r Bと同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号2に示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつA b r Bと同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換え微生物及びその利用に関する。

【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、医薬品、洗浄剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

【0003】

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。

【0004】

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* ATCC 13203

10

20

30

40

50

2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かった。

【0005】

一方、枯草菌A b r Bは、対数増殖期から定常期へと移行する間の遷移期、および定常期において、孢子形成やコンピテンス、或いは栄養源獲得などに関与する様々な遺伝子発現の制御に重要な役割を果たす転写因子であり（非特許文献3及び4）、例えば、A b r B制御下の遺伝子として死滅因子（k i l l i n g f a c t o r）をコードするs k f遺伝子を含むs k f Aオペロン（s k f A-H）などが負に制御されることが報告されている（非特許文献5）。また、a b r B遺伝子を欠失させた枯草菌株では、アミラーゼや

10

プロテアーゼの生産性が向上することが報告されている（特許文献1）。

しかしながら、A b r Bを恒常的に発現させた組換え微生物については全く報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2007-74934号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Kunst, F. et al., Nature, 1997, 390:249-256

20

【非特許文献2】Blattner, F.R. et al., Science, 1997, 277:1453-1462

【非特許文献3】M. A. Strauch et al., Mol. Microbiol., 1993, 7:337-342

【非特許文献4】Z. E. V. Phillips et al., Cell Mol. Life Sci., 2002, 59:392-402

【非特許文献5】M. Fujita et al., J. Bacteriol., 2005, 187:1357-1368

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

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、及び当該微生物を利用して、目的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。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明者らは上記課題に鑑み、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を得るため検討を行った結果、遷移期および定常期に特異的に発現する遺伝子群を抑制する転写因子であるA b r Bを恒常的に発現させることにより、目的タンパク質又はポリペプチドの生産性が向上した微生物を取得できることを見出した。

【0010】

すなわち、本発明は、以下に係るものである

1) 枯草菌のa b r B遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築された微生物に、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入された組換え微生物。

40

2) 1)に記載の組換え微生物を培養し、培養物又は菌体から目的タンパク質又はポリペプチドを回収する工程を含む、目的タンパク質又はポリペプチドの製造方法。

3) 枯草菌のa b r B遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築する工程、及び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発現可能に強化又は導入する工程を含む組換え微生物の製造方法。

4) 枯草菌のa b r B遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築され、且つ目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入された組換え微生物を用いて該タンパク質又はポリペプチドを製造する、目的タンパク質又はポリペプチドの生産性向上方法。

50

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、目的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組換え微生物を提供することができる。本発明の組換え微生物を用いることで、目的タンパク質又はポリペプチドを高い生産性で効率よく製造することができ、当該物質の生産に必要な時間やコストを低減化することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】SOE-PCR法による導入用DNA断片の調製方法、及び当該DNA断片を用いて親株を形質転換し、標的遺伝子が構成的に発現するよう遺伝子構築する方法を模式的に示したものである。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本明細書に記載の枯草菌の各遺伝子及びゲノム領域の名称は、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for *Bacillus subtilis* (BSORF DB) でインターネット公開 ([bacillus.genome.ad.jp/], 2006年1月18日更新) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載されている。

【0014】

本明細書において、アミノ酸配列及びヌクレオチド配列の同一性はLipman-Pearson法 (Lipman, D.J., Pearson, W.R.: Science, 1985, 227: 1435-1441) 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 Ver. 11 (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。

20

【0015】

本明細書において、別途定義されない限り、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列におけるアミノ酸又はヌクレオチドの欠失、置換、付加又は挿入に関して使用される「1又は数個」とは、例えば、アミノ酸配列では1～18個、好ましくは1～9個、より好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～2個であり、ヌクレオチド配列では1～56個、好ましくは1～28個、より好ましくは1～14個、さらに好ましくは1～7個であり得る。また本明細書において、アミノ酸又はヌクレオチドの「付加」には、配列の一末端及び両末端への1又は数個のアミノ酸又はヌクレオチドの付加が含まれる。

30

【0016】

本明細書において、別途定義されない限り、ハイブリダイゼーションに関する「ストリンジェントな条件」とは、配列同一性が約80%以上、好ましくは約90%以上のヌクレオチド配列を有する遺伝子の確認を可能にする条件である。「ストリンジェントな条件」としては、Molecular Cloning-A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION (Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 記載の条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションの当業者は、プローブのヌクレオチド配列や濃度、長さ等に応じて、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、温度等を調節することにより、ストリンジェントな条件を適切に作り出すことができる。一例を示せば、上記「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーション条件としては、5×SSC、70℃以上が好ましく、5×SSC、85℃以上がより好ましく、又は、6×SSC、60℃以上が好ましく、6×SSC、65℃以上がより好ましく、洗浄条件としては、1×SSC、60℃以上が好ましく、1×SSC、73℃以上がより好ましい。上記SSC及び温度条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素を適宜組み合わせることにより、適切なストリンジェンシーを実現することが可能である。

40

50

【0017】

本明細書において、遺伝子の上流及び下流とは、それぞれ、対象として捉えている遺伝子又は領域を基点とした、5'側及び3'側に続く領域を示す。

【0018】

本明細書において、遺伝子の制御領域とは、該領域の下流の遺伝子の細胞内における発現を制御する機能を有し、好ましくは、下流遺伝子を構成的に発現又は高発現させる機能を有する領域である。具体的には、当該遺伝子におけるコーディング領域の上流に存在し、RNAポリメラーゼが相互作用して当該遺伝子の転写を制御する機能を有する領域と定義され得る。好ましくは、本明細書における遺伝子の制御領域とは、当該遺伝子におけるコーディング領域の上流200～600ヌクレオチド程度の領域をいう。制御領域は、遺伝子の転写開始制御領域及び／又は翻訳開始制御領域、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域を含む。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、翻訳開始制御領域は開始コドンと共にリボソーム結合部位を形成するShine-Dalgarno (SD) 配列に相当する部位である(Shine, J., Dalgarno, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1974, 71:1342-1346)。

10

【0019】

本明細書において、目的遺伝子と制御領域とを「作動可能に連結する」とは、制御領域による遺伝子発現を制御する機能が目的遺伝子に作用するように、DNA上で制御領域と目的遺伝子とを配置することをいう。目的遺伝子と制御領域を作動可能に連結する方法としては、当該制御領域の下流に当該目的遺伝子を連結する方法が挙げられる。

20

【0020】

本明細書において、「転写因子」(「転写制御因子」)とは、DNA上の転写開始制御領域などに結合し、DNAからRNAへの転写過程を促進或いは抑制するタンパク質を意味する。

また、本明細書において、「遷移期」とは細菌の増殖において、対数増殖期又は指数増殖期から定常期又は静止期へと移行する間を意味する。

【0021】

本発明の組換え微生物は、枯草菌のabrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築された微生物に、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入されたものである。

30

すなわち、親微生物に、枯草菌のabrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するような遺伝子改変が成された改変微生物に、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入されたものである。この組換え微生物は、abrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現され、目的タンパク質又はポリペプチドを導入した親微生物と比較して、当該タンパク質又はポリペプチドの生産性が向上しているという特徴を有する。

【0022】

本発明の微生物を構築するための親微生物としては、枯草菌のabrB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

【0023】

枯草菌において、abrB遺伝子は転写因子AbrBをコードする遺伝子であり、対数増殖期に発現するが、定常期へと移行する間の遷移期およびその後の定常期において発現が抑制される。本転写因子AbrBは対数増殖期において、孢子形成やコンピテンス、或いは栄養源獲得等に関する多数の遺伝子を直接的あるいは間接的に発現抑制する。遷移期

50

および定常期においては、A b r Bによる発現抑制が解除され、上述の多数の遺伝子が発現誘導される。

枯草菌 a b r B 遺伝子は、遺伝子番号：B G 1 0 2 0 4 として特定され、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなり、かつ配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質 A b r B をコードする。

【0024】

枯草菌 a b r B 遺伝子に相当する遺伝子としては、枯草菌以外のバチルス属に属する微生物の a b r B 遺伝子が挙げられる。枯草菌以外の微生物としては、例えば、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus* 等のバチルス属微生物などが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、枯草菌 a b r B に相当する遺伝子は、上記の微生物からゲノム DNA を抽出し、配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドやそのフラグメントをプローブとしたストリンジェントなサザンハイブリダイゼーションを行うことによって同定することができる。また例えば、公知のゲノム配列情報に基づいて上記微生物のゲノムのヌクレオチド配列と、配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列とを比較することによって、上記微生物における枯草菌 a b r B に相当する遺伝子を同定することができる。

【0025】

例えば、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 株の a b r B 遺伝子（配列番号 3、4）、*Bacillus licheniformis* ATCC14580 株の a b r B 遺伝子（配列番号 5、6）、*Bacillus megaterium* DMS319 株の a b r B 遺伝子（配列番号 7、8）は、枯草菌 168 株の a b r B 遺伝子との配列同一性が、ヌクレオチド配列において、それぞれ 91%、88%、80% であり、またそれらのコードするアミノ酸配列において、それぞれ 98%、94%、85% である。これらは、枯草菌 a b r B 遺伝子に相当する遺伝子として例示される。

【0026】

枯草菌 a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子としては、以下が挙げられる：

- (a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ A b r B と同様に遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ A b r B と同様に遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなりかつ A b r B と同様に遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (f) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ A b r B と同様に遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0027】

本発明において、枯草菌 a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築するとは、微生物が生存している間、枯草菌 a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が常に発現するように遺伝子構築すること、すなわち当該遺伝子が通常では発現しない対数増殖期以降の定常期においても発現するように遺伝子構築することを意味する。枯草菌 a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するような遺伝子構築としては、例えば、枯草菌 a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子上流に位置する転写開始制御領域、又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域における抑制性制御因子の結合部位を不活性化することが挙げられる。ここで、「抑制性制御因子」とは、遺伝子上の転写の制御に関わる特定の塩基配列に結合し、転写を抑制的に制御するタンパク質を意味する。枯草菌 a b r B 遺伝子の転写開始制御領域、又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域の一例としては、配列番号 9 に示される塩基配列からなる DNA、又は当該配列と相同な塩基配列からなり転写開始制御領域又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域としての機能を有する DNA が挙げられる。配列番号 9 に示される塩基配列と相同な塩基配列としては、例えば、配列番号 9 に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、又は配列番号 9 に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する DNA からなる塩基配列が挙げられる。

【0028】

上記制御領域において、抑制性制御因子の結合部位としては、例えば、配列番号 9 に示される塩基配列において、20～49 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域、73～89 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域が挙げられる。

ここで、配列番号 9 に示される塩基配列において 20～49 番目の塩基からなる領域又は 73～89 番目の塩基からなる領域に相当する領域としては、上述した配列番号 9 に示される塩基配列からなる DNA と相同な塩基配列からなり転写開始制御領域又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域としての機能を有する DNA において、配列番号 9 に示される塩基配列と比較した場合に当該領域に相当する領域であって、抑制性制御因子の結合部位として機能するものが挙げられる。

【0029】

上記部位を不活性化する手段としては、該部位のヌクレオチド配列上の 1 つ以上のヌクレオチドに対する突然変異導入、又は該ヌクレオチド配列に対する別のヌクレオチド配列の置換若しくは挿入、あるいは該遺伝子の配列の一部若しくは全部の削除などが挙げられる。ここで、一部とは、1～40 個、好ましくは 5～30 個、又は 10～17 個の塩基からなる部分配列が挙げられる。このうち、好ましくは、配列番号 9 に示される塩基配列において、20～49 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域、又は/及び 73～89 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域を全て削除することが挙げられ、より好ましくは 73～89 番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域を全て削除することである。上記突然変異導入や、ヌクレオチド配列の置換若しくは挿入のための具体的な手法としては、紫外線照射、部位特異的変異導入、及び SOE-PCR 法や相同組換え法、などを挙げることができる。

【0030】

SOE-PCR 法による欠失用 DNA 断片の調製と当該欠失用 DNA 断片を用いた 2 重交差法による目的領域の欠失の手順の概要を図 1 に示す。初めに、SOE-PCR 法により、欠失させるべき目的領域の上流に隣接する約 0.1～3 kb 領域に対応する断片（上流断片と称する）と、同じく下流に隣接する約 0.1～3 kb 領域に対応する断片（下流断片と称する）とを連結した DNA 断片を調製する。好ましくは、目的領域の欠失を確認するために、当該上流断片と下流断片の間に薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子断片をさらに連結した DNA 断片を調製する。

【0031】

まず、1回目のPCRによって、欠失させるべき領域の上流断片A及び下流断片B、並びに必要に応じてマーカー遺伝子断片（図1中では、クロラムフェニコール耐性遺伝子断片Cm）の3断片を調製する。上流断片及び下流断片のPCR増幅の際には、後に連結される断片の末端10～30ヌクレオチドの配列を付加したプライマーを使用する。例えば、上流断片A、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cm、及び下流断片Bをこの順で連結させる場合、上流断片Aの下流末端に結合するプライマーの5'末端に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの上流側10～30ヌクレオチドに相当する配列を付加し（図1、プライマーDR1）、また下流断片Bの上流末端に結合するプライマーの5'末端に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの下流側10～30ヌクレオチドに相当する配列を付加する（図1、プライマーDF2）。このように設計したプライマーセットを用いて上流断片A及び下流断片BをPCRで増幅した場合、増幅された上流断片A'の下流側には薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの上流側に相当する領域が付加されることとなり、増幅された下流断片B'の上流側には薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cmの下流側に相当する領域が付加されることとなる。

10

【0032】

次に、1回目のPCRで調製した上流断片A'、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cm、及び下流断片B'を混合して鋳型とし、上流断片の上流側に結合するプライマー（図1、プライマーDF1）及び下流断片の下流側に結合するプライマー（図1、プライマーDR2）からなる1対のプライマーを用いて2回目のPCRを行う。この2回目のPCRにより、上流断片A、薬剤耐性マーカー遺伝子断片Cm、及び下流断片Bをこの順で結合した欠失用DNA断片Dを増幅することができる。

20

【0033】

上述の方法などによって得られる欠失用DNA断片を、通常の制限酵素とDNAリガーゼを用いてプラスミドに挿入し、欠失導入用プラスミドを構築する。あるいは、上流断片及び下流断片を直接連結した欠失用DNA断片を調製した後、当該欠失用DNA断片を薬剤耐性マーカー遺伝子を含むプラスミドに挿入することで、上流断片及び下流断片に加えて薬剤耐性マーカー遺伝子断片を有する欠失導入用プラスミドを構築することができる。

【0034】

上記手順で構築された欠失導入用プラスミドを、コンピテントセル形質転換法等の通常の手法により、ゲノム領域を欠失させたい枯草菌に導入する。プラスミドの導入により、当該プラスミド上の上流断片及び下流断片と、枯草菌ゲノムのそれらに相同な領域との間で2重交差の相同組換えが生じ、欠失させるべき領域が薬剤耐性マーカー遺伝子に置き換えられた形質転換体を得られる（図1）。形質転換体の選択は、欠失用DNA断片中に存在する薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子の発現を指標に行えばよい。例えば、クロラムフェニコール耐性遺伝子断片で形質転換処理をした菌を、抗生物質（クロラムフェニコール等）を含む培地で培養し、生育したコロニーを回収することで、目的の領域が欠失しクロラムフェニコール耐性遺伝子に置き換えられた形質転換体を取得することができる。さらに、形質転換体のゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行うことで、目的の領域が欠失されていることを確認することができる。

30

40

【0035】

また、枯草菌abrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するような遺伝子構築の他の手段としては、ゲノム上の枯草菌abrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子に、定常期において該遺伝子の発現を強化できる制御領域（強発現制御領域）を作動可能に連結すること、強発現制御領域と作動可能に連結された枯草菌abrB遺伝子又それに相当する遺伝子を細胞内のゲノム中若しくはプラスミド中に導入することが挙げられる。斯かる強発現制御領域としては、例えば、枯草菌rplK遺伝子、fus遺伝子若しくはatpI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挙げられる。

【0036】

50

本発明の微生物は、このようにして枯草菌の a b r B 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築された微生物に、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発現可能なように強化又は導入することによって作製することができる。

【0037】

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発現可能なように強化又は導入するとは、本発明の微生物において、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が少なくとも発現可能な状態に置かれることを意味している。

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発現可能なように強化又は導入する手段としては、例えば、親株のゲノム上で、野生型に比較し発現を強化できる制御領域（強制御領域）と目的の遺伝子とを作動可能に連結して配置すること；及び、制御領域、好ましくは強制御領域と作動可能に連結された目的の遺伝子を、親株細胞のゲノム中若しくはプラスミド中に導入すること、などが挙げられる。例えば、親株のゲノム上の目的の遺伝子の制御領域配列を強制御領域に置換すること、あるいは、適切な位置に目的の遺伝子が組み込まれた発現ベクターや、強制御領域と作動可能に連結された目的の遺伝子を含むベクターを、一般的な形質転換法を用いて親株に取り込ませることが挙げられる。

また、制御領域には、発現させる遺伝子産物に応じて、転写及び翻訳に関わる制御領域の他、分泌に関わる制御領域（例えば、分泌シグナルペプチド領域）を包含させることができる。

なお、上記に例示したような、細胞へ遺伝子を発現可能に導入するための種々の手法は、当業者に周知である。すなわち、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。

【0038】

また、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。

【0039】

一態様において、本発明の微生物に導入される目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子は、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領域並びに分泌シグナルペプチド領域から選ばれる1以上の領域と作動可能に連結されていることが挙げられる。好ましくは、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、更に好ましくは、分泌シグナルペプチド領域がバチルス（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の開始コドンから始まる長さ0.6～1kbの上流領域であるものが、目的遺伝子上流に作動可能に連結されているものが挙げられる。

【0040】

例えば、本発明の微生物に導入される目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の一例として挙げられるセルラーゼ遺伝子は、その構造遺伝子が、特開2000-210081号公報や特開平4-190793号公報等に記載されているバチルス（*Bacillus*）属細菌、すなわちKSM-S237株（FERM BP-7875）、又はKSM-64株（FERM BP-2886）由来のセルラーゼ遺伝子の転写開始制御領域、翻訳開始領域及び分泌シグナルペプチド領域が作動可能に連結されていることが望ましい。より具体的には、配列番号10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12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の塩基配列からなるDNA断片、当該塩基配列に対して80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つ遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる機能を有するDNA断片、又は上記いずれかの塩基配列からなるDNAとストリンジェントの条件でハイブリダイズし且つ遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる機能を有するDNA、或いは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなり且つ遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる機能を有するDNA断片が、目的遺伝子の構造遺伝子と作動可能に連結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した塩基配列からなるDNA断片とは、上記塩基配列の一部、好ましくは数個（例えば、1～50個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個）の塩基を欠失しているが、遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる機能を有するDNA断片を意味する。

10

20

【0041】

またここで言うストリンジェントな条件とは、例えば[Molecular cloning—a Laboratory Manual 2nd edition (Sambrookら、1989)]に記載の条件等が挙げられる。例えば、5×SSC、70℃以上が好ましく、5×SSC、85℃以上がより好ましく、又は、6×SSC、60℃以上が好ましく、6×SSC、65℃以上がより好ましく、洗浄条件としては、1×SSC、60℃以上が好ましく、1×SSC、73℃以上がより好ましい。

【0042】

本発明において、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子としては、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コードするものであれば特に限定されず、内在性の遺伝子であっても、外来遺伝子（異種遺伝子）であってもよい。

30

目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子としては、例えば、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断、研究などの各種分野において有用なあらゆるタンパク質又はポリペプチド、例えば、酵素、生理活性ペプチド、マーカー、シグナル伝達物質、構造タンパク質、各種調節因子などをコードする遺伝子が挙げられる。また、上記酵素としては、機能別に列挙すると、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）等が挙げられるが、好適にはセルラーゼ、 α -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。

40

【0043】

ここで、セルラーゼとしては、例えば、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、好ましくは*Bacillus*属細菌由来のセルラーゼが好適に挙げられる。より具体的な例として、配列番号11で示されるアミノ酸配列からなる*Bacillus*属細菌KSM-S237株（FERM BP-7875）由来のアルカリセルラーゼ、又は、配列番号13で示されるアミノ酸配列からなる*Bacillus*属細菌KSM-64株（FERM BP-2886）由来のアルカリセルラーゼ、或いは、当該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアルカリセルラーゼ、又は配

50

列番号11又は配列番号13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置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなるアルカリセルラーゼが挙げられる。

【0044】

α-アミラーゼとしては、微生物由来のα-アミラーゼが挙げられ、好ましくは *Bacillus* 属細菌由来の液化型アミラーゼが好適に挙げられる。より具体的な例として、配列番号14で示されるアミノ酸配列からなる *Bacillus* 属細菌 KSM-K38 株 (FERM BP-6946) 由来のアルカリアミラーゼ、或いは当該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアルカリアミラーゼ、又は配列番号14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置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなるアルカリアミラーゼが挙げられる。

10

【0045】

プロテアーゼとしては、微生物由来、好ましくは *Bacillus* 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好適に挙げられる。より具体的な例として、配列番号15で示されるアミノ酸配列からなるバチルス クラウジ (*Bacillus clausii*) KSM-K-16 株 (FERM BP-3376) 由来のアルカリセリンプロテアーゼ、或いは当該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるプロテアーゼ、又は配列番号15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置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなるアルカリセリンプロテアーゼが挙げられる。

20

【0046】

本発明の組換え微生物は、後述する実施例に示すように、上記遺伝子改変を行っていない微生物と比較して、目的タンパク質又はポリペプチドの生産性が大幅に向上している。本発明の微生物を用いて目的タンパク質又はポリペプチドの製造を行うことで、目的タンパク質又はポリペプチドを高い生産性で効率よく製造することができ、当該物質の生産に必要な時間やコストを低減化することができる。

【0047】

本発明の組換え微生物を用いた目的タンパク質又はポリペプチドの製造は、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、培養物又は菌体からタンパク質又はポリペプチドを回収・精製することにより行えばよい。例えば、後述する実施例に示された培地及び条件下で培養し、分泌生産されたタンパク質を培養上清等から単離・精製することができる。

30

培地の成分・組成などは特に限定されないが、好ましくは、炭素源としてマルトースもしくは、可溶性澱粉やグルコースを含む培地を用いれば、より好ましい。

タンパク質、ポリペプチドの回収・精製は、例えば、遠心分離又はろ過による組換え微生物の分離、上清又はろ液中のタンパク質やポリペプチドの硫酸アンモニウム等の塩を加えることによる沈殿、エタノール等の有機溶媒を加えることによる沈殿、限外ろ過膜等を用いた濃縮や脱塩、イオン交換又はゲルろ過等の各種クロマトグラフィーを用いた精製等の方法を用いて行うことができる。

40

【0048】

本発明の例示的实施形態として、さらに以下を本明細書に開示する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

<1> 枯草菌の *abrB* 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築された微生物に、目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入された組換え微生物。

<2> 枯草菌の *abrB* 遺伝子又はそれに相当する遺伝子を恒常的に発現するような遺伝子構築が、*abrB* 遺伝子又はそれに相当する遺伝子の転写開始制御領域、又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至

50

るまでの領域における抑制性制御因子の結合部位を不活性化することである、＜１＞の組換え微生物。

＜３＞*abrB* 遺伝子又はそれに相当する遺伝子の転写開始制御領域、又は転写開始制御領域及びリボソーム結合部位、或いは転写開始制御領域から翻訳開始制御領域に至るまでの領域における抑制性制御因子の結合部位が、配列番号９に示される塩基配列において２０～４９番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域、又は７３～８９番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域である＜２＞の組換え微生物。

＜４＞枯草菌の *abrB* 遺伝子又はそれに相当する遺伝子を恒常的に発現させる遺伝子構築が、配列番号９に示される塩基配列において７３～８９番目の塩基からなる領域又はこれに相当する領域を削除するものである、＜３＞の組換え微生物。

＜５＞枯草菌の *abrB* 遺伝子又はそれに相当する遺伝子が、下記の（ａ）～（ｆ）からなる群より選択される、＜１＞～＜４＞のいずれかの組換え微生物。

（ａ）配列番号１に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号１に示すヌクレオチド配列と８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、より好ましくは９８％以上、より好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ *abrB* と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号１に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ *abrB* と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｅ）配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなりかつ *abrB* と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｆ）配列番号２に示すアミノ酸配列と８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、より好ましくは９８％以上、より好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ *abrB* と同様の遷移期および定常期に誘導される遺伝子の転写因子としての活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

＜６＞微生物がバチルス (*Bacillus*) 属に属する細菌である＜１＞～＜５＞のいずれかの組換え微生物。

＜７＞微生物が枯草菌 (*Bacillus subtilis*) である＜１＞～＜５＞のいずれかの組換え微生物。

＜８＞目的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＜１＞～＜７＞のいずれかの組換え微生物。

＜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、目的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結合した＜８＞の組換え微生物。

＜１０＞分泌シグナル領域が、バチルス (*Bacillus*) 属に属する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０．６～１ｋｂ領域由来のものである＜８＞又は＜９＞の組換え微生物。

＜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６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８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８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましく

10

20

30

40

50

は97%以上、より好ましくは98%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るDNA断片、又は当該塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなるDNA断片である<9>及び<10>の組換え微生物。

<12><1>～<11>のいずれかの組換え微生物を培養し、培養物又は菌体から目的タンパク質又はポリペプチドを回収する工程を含む、目的タンパク質又はポリペプチドの製造方法。

<13>枯草菌のabrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築する工程、及び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発現可能に強化又は導入する工程を含む組換え微生物の製造方法。

<14>枯草菌のabrB遺伝子又はそれに相当する遺伝子が恒常的に発現するように遺伝子構築され、且つ目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子が発現可能に強化又は導入された組換え微生物を用いて該タンパク質又はポリペプチドを製造する、目的タンパク質又はポリペプチドの生産性向上方法。

【実施例】

【0049】

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タンパク質の製造方法について具体的に説明する。

【0050】

実施例1 組換え微生物株の構築

(1-1) トリプトファン要求性解除枯草菌変異株168T株の作製

枯草菌野生株168株におけるトリプトファン要求性を解除した。枯草菌168株は、遺伝子型としてtrpC2を所持している。つまり168株はトリプトファン合成に関与するインドール-3-グリセロールリン酸シンターゼをコードするtrpC遺伝子変異のためトリプトファン合成要求性である。また、枯草菌ATCC6051T株はトリプトファン非要求性であることが知られている(Albertini, A. M. & Galizzi, A. Microbiology, 1999, 145 (Pt 12): 3319-3320)。枯草菌168株とATCC6051T株のtrpC遺伝子を比較したところ、328番目から330番目のヌクレオチドATTが枯草菌168株では存在しないことがわかった。そこで、ATCC6051T株ゲノムを鋳型とし、表1に記載のtrpC_F1及びtrpC_R1のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物を構築した。このPCR産物を用いて枯草菌野生株168株をコンピテント法(J. Bacteriol., 1960, 81: 741-746)で形質転換し、トリプトファン非添加のSMA寒天培地(0.2%硫酸アンモニウム、1.4%リン酸水素2カリウム、0.6%リン酸2水素カリウム、0.1%クエン酸3ナトリウム-2水和物、0.5%グルコース、0.035%硫酸マグネシウム7水和物、1.5%寒天)に生育したコロニーを形質転換体として分離した。こうしてトリプトファン非要求性168T株を得た。

【0051】

【表1】

プライマー	配列 (5' →3')	配列番号
trpC_F1	tattcagtgactcgatcagcgtatg	16
trpC_R1	ctattcaaaccactcccgaagggt	17

【0052】

(1-2) abrB遺伝子恒常発現変異が導入された枯草菌変異株(168T__abrB*株)の構築

abrB遺伝子恒常発現変異の導入を行った。枯草菌野生株168株のゲノムDNAを鋳型とし、表2記載のプライマーDsp00Abx-FF及びDsp00Abx-F

10

20

30

40

50

Rを用いて、a b r B遺伝子上流領域断片（A）をPCRにより増幅した。また、表2記載のプライマーD s p o 0 A b o x - P F及びD s p o 0 A b o x - P Rを用いて、a b r B遺伝子上流領域断片（B）をPCRにより増幅した。また、表2記載のプライマーD s p o 0 A b o x - B F及びD s p o 0 A b o x - B Rを用いて、a b r B遺伝子上流領域・中流領域断片（C）をPCRにより増幅した。次いで、クロラムフェニコール耐性遺伝子保有のプラスミドp D L T 3（M o r i m o t o T. e t a l., M i c r o b i o l o g y, 2002, 148:3539-3552）を鋳型とし、表2記載のプライマーr P C R - C m F 2及びr P C R - C m R 2を用いて、PCR増幅を行い、クロラムフェニコール耐性遺伝子の断片（D）をPCR増幅した。

【0053】

次に、得られた断片（A）及び断片（D）を表2記載のプライマーD s p o 0 A b o x - F F及びr P C R - C m R 2を用いてS O E - P C R法によって結合させ、断片（B）及び断片（C）を表2記載のプライマーD s p o 0 A b o x - P F及びD s p o 0 A b o x - B Rを用いてS O E - P C R法によって結合させた。最後に、断片（A+D）及び断片（B+C）を表2記載のプライマーD s p o 0 A b o x - F F及びD s p o 0 A b o x - B Rを用いてS O E - P C R法によって結合させ、最終PCR産物（A+D+B+C）を得た。得られた最終PCR産物を用いて枯草菌変異株168T株で形質転換し、枯草菌変異株168T__a b r B*__Cm株を得た。

【0054】

次に、薬剤耐性遺伝子置換用プラスミドp C m :: E m（L e i Y. e t a l., J. B a c t e r i o l., 2013, 195:1697-1705）を用いて枯草菌変異株168__a b r B*__Cm株で形質転換し、クロラムフェニコール耐性遺伝子がエリスロマイシン耐性遺伝子に置換された枯草菌変異株168T__a b r B*を構築した。

【0055】

得られた枯草菌変異株168T__a b r B*株のゲノムを用いたPCR及びそれに続くサンガー法によるシーケンシングによって、ゲノム上の所定の位置に目的変異が導入されていることを確認した。

【0056】

【表2】

プライマー	配列（5' →3'）	配列番号
Dspo0Abox-FF	tttgaatatctgccgctgcgcgac	18
Dspo0Abox-FR	gctcttctggtggagtctatcctgattatatacgacaaaattcgac	19
rPCR-CmF2	ggatagactccaccagaagagcatcatcggcaatagttaccc	20
rPCR-CmR2	ccaggatgtagtatccttccgcggcgtagaggatctggagc	21
Dspo0Abox-PF	cggaaggatactacatcctggaatgaaataaaaaactttggttcg	22
Dspo0Abox-PR	aaatccttaccttcatagcataacaagg	23
Dspo0Abox-BF	tatgctatgaaggtaaggatttgaaaaatataattttaacaaataag	24
Dspo0Abox-BR	tcgagcattacatttcgaaaggcgc	25

【0057】

（1-3）アルカリセルラーゼ生産用ベクター（p H Y - S 2 3 7）の構築
 バチルス属細菌 K S M - S 2 3 7 株（F E R M B P - 7 8 7 5）由来のS 2 3 7セルラーゼ遺伝子（特開2000-210081号公報参照）（配列番号10）をコードするDNA断片（3.1 kb；配列番号10の塩基番号13～3124）を鋳型として、表3に示されるプライマーE g l - S 2 3 7. F及びプライマーE g l - S 2 3 7. Rのプラ

イマーセットを用いてPCRを行い、シャトルベクター pHY300PLK の BamHI 制限酵素切断点に挿入された組換えプラスミド pHY-S237 を構築した。

【0058】

【表3】

プライマー名	配列 (5' → 3')	配列番号
Egl-S237.F	ttgcggatccaacaggcttatatttag	26
Egl-S237.R	aacaactctggatccagttatgcaag	27

10

【0059】

(1-4) アルカリセルラーゼ生産用ベクター (pHY-S237) が導入された組換え枯草菌変異株の作製

上記 (1-1) 及び (1-2) で作製した枯草菌変異株 168T 株及び枯草菌変異株 168T_{abrB}* 株を宿主とした。

上記 (1-3) で作製したアルカリセルラーゼ生産用ベクター (pHY-S237) を用いて、プロトプラスト形質転換法 (Mol. Gen. Genet., 1979, 168: 111-115) により各宿主を形質転換した。テトラサイクリン-塩酸塩 50 ppm を添加した DM3 プロトプラスト再生培地 (0.5 M コハク酸ナトリウム (pH 7.3)、0.5% カザミノ酸 (ディフコ社製)、0.5% 酵母エキス (ディフコ社製)、0.35% K₂HPO₄、0.15% KH₂PO₄、0.5% グルコース、20 mM MgCl₂、0.01% 牛血清アルブミン (シグマ社製)、1% バクト寒天 (ディフコ社製)) 上に生育したコロニーを目的とする枯草菌形質転換体として選抜した。

20

【0060】

実施例2 セルラーゼ生産性の評価

実施例1にて得られた形質転換体を、15 ppm のテトラサイクリンを含む 5 mL の LB 培地 (1.0% トリプトン (ディフコ社製)、0.5% 酵母エキス (ディフコ社製)、1.0% NaCl) で、30℃ で 15 時間振盪培養し、更にこの培養液 0.6 mL を 15 ppm のテトラサイクリンを含む 30 mL の 2×L-マルトース培地 (2% トリプトン、1% 酵母エキス、1% 塩化ナトリウム、7.5% マルトース、7.5 ppm 硫酸マンガ 4-5 水和物) に接種し、30℃ で 3 日間振盪培養した。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を算出した。

30

生産性の比較は、親株の生産性を 100% とする相対値により行った。その結果、親株として 168T 株を用いた場合と比較し、abrB を恒常的に発現させた 168T_{abrB}* 株では、高いアルカリセルラーゼの分泌生産量が確認された。

【0061】

【表4】

菌株名	168T株に対するアルカリセルラーゼ 相対生産性 (%) (培養3日)
168T株	100
168T _{abrB} *株	168

40

【0062】

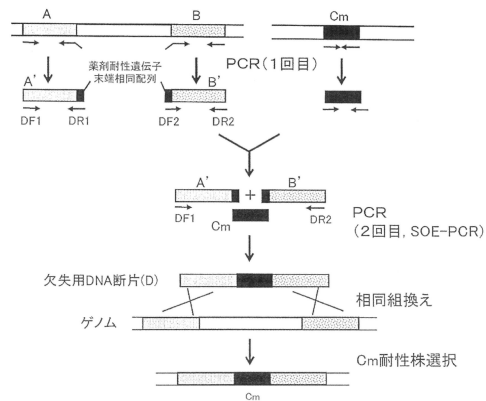
(測定例) アルカリセルラーゼの活性測定

セルラーゼ活性測定は、1/7.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4 和光純薬工業社製) で適宜希釈したサンプル溶液 50 µL に 0.4 mM p-ニトロフェニル-β-D-セロトリオシド (生化学工業社製) を 50 µL 添加して混合し、30℃ にて反応させた際に

50

遊離するp-ニトロフェノールの量を、420nmにおける吸光度(OD420nm)変化により定量することにより行った。セルラーゼ活性は、1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を1Uとして定義した。

【図1】



【配列表】

0006791623000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (72)発明者 増田 健太
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 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2606 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 森本 拓也
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 小笠原 直毅
奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学
- (72)発明者 石川 周
奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学
- (72)発明者 チュムサクル オンウマ
奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 国際公開第2008/102421 (WO, A1)
特開2008-259432 (JP, A)
特開2007-130013 (JP, A)
特開2006-345860 (JP, A)
特開2007-074934 (JP, A)
特開2006-296268 (JP, A)
Molecular Microbiology, 1993年, Vol.7, pp.337-342
Molecular Microbiology, 1988年, Vol.2, pp.689-699
J. Bacteriol., 1995年, Vol.177, pp.6727-6731
J. Bacteriol., 2002年, Vol.184, pp.370-380
Microbiology, 2009年, Vol.155, pp.922-931

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/21
C12N 1/19
C12N 15/09
C12N 15/113
C12P 21/02
WPI
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)
CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
UniProt/GenSeq